



**Nuevas plataformas quirales de alta
versatilidad:
Síntesis y aplicaciones.**

JIMENA ANDREA OSPINA CHAVEZ

Tesis doctoral

Programa de Doctorado en Química

Bajo la dirección de:

Prof. Rosa María Ortuño Mingarro y Dra. Ona Illa Soler

Departamento de Química
Facultad de Ciencias

2016

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor por

Jimena Andrea Ospina Chavez

Revisada y aprobada,

Prof. Rosa María Ortuño Mingarro

Dra. Ona Illa Soler

Bellaterra, 07 de Enero 2016.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a la Generalitat de Catalunya por la beca predoctoral (FI-DGR) concedida para el desarrollo de esta tesis doctoral.

También quiero expresar mi mas profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido para la realización de esta tesis doctoral. En especial agradezco a la Profesora Rosa María Ortuño por permitirme hacer parte de este grupo de investigación, por sus enseñanzas, por sus valiosas sugerencias y apoyo. De igual manera agradezco profundamente a la Dra. Ona Illa por su orientación, seguimiento y confianza, quien con su amistad me enseñó y me dió fortaleza para continuar y no desfallecer en los momentos mas difíciles. Agradezco su inmensa comprensión y paciencia.

Además quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Alessandro Sorrenti por sus valiosas sugerencias y acertados aportes. También doy gracias al Dr. Ramon Pons del Departamento de Tecnología Química y de Tensioactivos (CSIC-Barcelona) por su contribución en la caracterización del tensioactivo sintetizado. De igual manera quiero agradecer a la Dra. Silvia Lope Piedrafita, del Servicio de Resonancia Magnética Nuclear (SeRMN) de la UAB, por su soporte en los experimentos de RMI. También quiero extender mi sincera gratitud a toda la Unitat de Química Combinatòria del Parc Científic de Barcelona dirigida por la Dra. Miriam Royo, a Imma, Sonia, Daniel, Carol, Marta, Natalia, Patrica y en especial a la Dra. Ximena Pulido quien fue un gran apoyo tanto académico como personal. Asimismo quiero agradecer profundamente a la Dra. Nerea Gaztelumendi del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la UAB, por su acompañamiento en los experimentos biológicos, amistad y sugerencias al final de este largo camino en los momentos de máximo agotamiento.

Quiero extender mi agradecimiento al Dr. Luis Rivas y a la Dra. María Ángeles Abengózar del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC-Madrid), por la contribución con los estudios biológicos en los parasitos de Leshmania.

Por supuesto, quisiera hacer extensiva mi gratitud a todos los compañeros de laboratorio con los que he compartido en algún momento de mi estadia durante todos estos años, a Raquel, Esther, Sergi, Albert, Marta, Álex, Mireia, Juan y Enric, por sus consejos, apoyo incondicional, alegría y ánimo. Tambien a la nueva generación, a Bernat, Oriol, Carmen y Jose mi segunda familia quienes me brindaron su sincera amistad y apoyo incondicional, llenándome de fortaleza y alegría y logrando hacer más fácil la distancia de mi familia.

A mis amigos Mauricio, Albert, Ana, Cecilia, Juan, Luis, Mariluz, Adriana por su amistad, por hacer acompañarme en este largo viaje, por escucharme y compartir maravillosos momentos sin esperar nada a cambio.

A Ferney Chaves, mi dulce compañía quien se ha convertido en mi motor y ejemplo, gracias por creer en mí, por ser complice de mis sueños y compañero de aventuras, gracias por su incansable amor y por ser la luz en los días mas oscuros. Por supuesto también a Sebitas quien ha sido testigo del largo camino que he recorrido para ver culminado este trabajo.

A mi familia, quienes a pesar de la distancia siguen siendo mi mayor motivación. De manera muy especial quiero agradecer a mis padres Maria Isabel y Oscar quienes todos estos años han compartido desde la distancia mis alegrías y angustias, por la confianza y apoyo incondicional, por esperar a pesar de las dificultades e incertidumbres y por haberme enseñado acerca del valor del esfuerzo y la perseverancia. A mi hermana Sandra, por su amor, comprensión y paciencia, quien de forma incondicional entendió mi ausencia y me brindó tranquilidad. A Hernando, Andrés, Wilson y Miguel Angel por animarme a seguir adelante. En todos ellos encontré las fuerzas necesarias para seguir y llegar hasta el final.

A Dios por acompañarme día a día e iluminar continuamente mi camino, por sostener mi vida y cubrir mis miedos en los momentos más difíciles.

A mis padres

Contenido

Lista de abreviaturas	13
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN GENERAL	15
Capítulo 2: IMPORTANCIA DE LOS DERIVADOS CICLOBUTÁNICOS Y PRECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN	21
2.1 Síntesis y aplicaciones de los compuestos ciclobutánicos 1,3-disustituidos	24
2.2 Síntesis y aplicaciones de los compuestos ciclobutánicos 1,2-disustituidos	30
Capítulo 3: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE TENSOACTIVOS PREPARADOS A PARTIR DE (-)- VERBENONA	39
3.1 Introducción	41
3.1.1 Clasificación de los tensioactivos	43
3.1.2 Tensioactivos derivados de aminoácidos	46
3.1.3 Tensioactivos zwitteriónicos (anfotéricos) basados en aminoácidos	50
3.1.4 El grupo amida en la agregación de los tensioactivos.....	52
3.1.5 Transferencia de la quiralidad de los aminoácidos a los agregados supramoleculares	54
3.2 Objetivos	56
3.3 Resultados y discusión	57
3.3.1 Síntesis del γ -aminoácido protegido 36	57
3.3.2 Síntesis de nuevos tensioactivos derivados de amina	59
3.3.3 Síntesis del tensioactivo derivado de amida 45	62
3.3.4 Estudio de la mezcla 45 y 46 como posible tensioactivo	64
3.4 Resumen y conclusiones	72
Capítulo 4: TRIAMINAS CICLOBUTÁNICAS QUIRALES Y SU CONJUGACIÓN CON Gd-DOTA, COMO POSIBLES AGENTES DE CONTRASTE (ACs) EN RESONANCIA MAGNÉTICA DE IMAGEN (RMI)	75
4.1 Introducción	77
4.1.1 Agentes de contraste (ACs)	80
4.1.2 Complejos de Gd(III) como agentes de contraste (ACs).....	82
4.1.3 Agentes de contraste en RMI a altos campos	90
4.2 Objetivos	92
4.3 Resultados y discusión	94
4.3.1 Síntesis de las triaminas ciclobutánicas quirales.....	94
4.3.2 Síntesis de las monoamidas DO3A 71a-d y complejos de gadolinio 53a-d	100
4.3.3 Experimentos de Resonancia Magnética de Imagen (RMI)	102
4.3.4 Estudios teóricos sobre el comportamiento de los complejos 53a-d	105
4.4 Resumen y conclusiones	110

Capítulo 5: PÉPTIDOS HÍBRIDOS CICLOBUTANO-PROLINA Y SU ESTUDIO COMO AGENTES DE INTERNALIZACIÓN CELULAR (CPPs) EN CÉLULAS HeLa Y PARÁSITOS DE <i>Leishmania donovani</i> Y <i>Leishmania pifanoi</i>	113
5.1 Introducción	115
5.1.1 Péptidos de internalización celular (CPPs)	116
5.1.2 CPPs ricos en prolina	118
5.1.3 Mecanismos de internalización celular de los CPPs.....	120
5.1.4 γ -Péptidos que atraviesan la membrana celular de <i>Leishmania donovani</i> y <i>Leishmania pifanoi</i>	122
5.1.5 γ - Péptidos derivados de ciclobutano	127
5.1.6 Síntesis en fase sólida (SFS).....	129
5.2 Objetivos	132
5.3 Resultados y discusión	135
5.3.1 Síntesis de los monómeros 76 (serie 1), 80 y 82 (serie 2).....	135
5.3.2 Síntesis en fase sólida (SFS).....	141
5.3.3 Estudios biológicos de los péptidos γ,γ -ciclobutano-prolina (serie 1)	149
5.3.4 Estudios biológicos de los péptidos β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2).....	153
5.3.5 Estudios biológicos de la serie 1 y serie 2 sobre parásitos del género <i>Leishmania</i>	161
5.4 Resumen y conclusiones	168
Capítulo 6: CONCLUSIONES GENERALES	171
Capítulo 7: METODOLOGÍA	175
7.1 Disolventes y reactivos.....	177
7.2 Técnicas utilizadas.....	179
7.3 Cromatografía	181
7.3.1 Cromatografía en columna.....	181
7.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	181
7.4 Evaluación de las propiedades de la mezcla 45/46 como surfactante:	183
7.4.1 Tensiometría por el método de la gota colgante.....	183
7.4.2 Valoración ácido – base.....	185
7.4.3 Dispersión de rayos X a bajos ángulos	185
7.5 Evaluación de las relajatividades (r_1) de los compuestos 53a , 53b , 53c , 53d por Resonancia Magnética de Imagen (RMI)	186
7.6 Estudios computacionales.....	188
7.7 Descripción experimental y caracterización	189
7.8 Síntesis en fase sólida (SFS).....	259

7.8.1 Síntesis de péptidos híbridos de γ,γ -ciclobutano-prolina (serie 1):	260
7.8.2 Síntesis de péptidos híbridos de β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2):.....	263
7.8.3 Síntesis de Tat ₄₈₋₅₇ y Tat ₄₈₋₅₇ -CF.....	265
7.8.4 Escisión de los péptidos de la resina	269
7.8.5 Ensayos cualitativos utilizados en síntesis en fase sólida	270
7.8.6 Purificación de los péptidos	271
7.8.7 Caracterización de los péptidos	271
7.8.8 Caracterización de los péptidos sintetizados en fase sólida:	271
7.9 Ensayos <i>in vitro</i> de citotoxicidad, internalización y localización de péptidos γ,γ - ciclobutano-prolina (serie 1) y los β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2)	282
7.9.1 Cultivo de células HeLa.....	282
7.9.2 Ensayos de citotoxicidad celular (MTT).....	283
7.9.3 Internalización celular	285
7.9.4 Localización intracelular	287
7.9.5 Ensayos <i>in vitro</i> de internalización, citotoxicidad y localización de péptidos γ,γ - ciclobutano-prolina (serie 1) y los β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2) en parásitos de <i>Leishmania</i>	288
ANEXO	291
BIBLIOGRAFÍA.....	295

Lista de abreviaturas

Abreviaturas	Nombre
ACN	Acetonitrilo
AC	Agente de contraste
AFM	Microscopía de fuerza atómica
Ag. Guani	<i>N,N</i> -di-Boc-1H-pirazol-1-carboxamidina
Alloc	Aliloxicarbonilo
Boc	<i>Terc</i> -butiloxicarbonilo
Cbz	Benciloxicarbonilo
CbzCl	Cloroformiato de bencilo
CF	5-(6)-carboxifluoresceína
CMC	Concentración micelar crítica
COS-1	Línea celular de riñón de simio
CPPs	Péptidos de internalización celular
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno
DC	Dicroísmo circular
DCM	Diclorometano
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-Fmoc-amino-prolina	<i>N</i> -Boc- <i>cis</i> -4- <i>N</i> -Fmoc-amino-L-prolina
(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-Fmoc-amino-prolina	<i>N</i> -Boc- <i>trans</i> -4- <i>N</i> -Fmoc-amino-L-prolina
Fmoc	Fluorenilmetiloxicarbonil
Fmoc-O-Su	Carbonato de 9-Fluorenilmetil <i>N</i> -succinimidilo
GAG	Polisacáridos glicosaminoglicanos
HBSS	Solución salina de Hank's
HeLa	Células de cáncer cérvico-uterino
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas
HPLC-MS semiprep	Cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa acoplada a espectrómetro de masas
IR	Espectroscopía infrarroja
IP	Yoduro de propidio
MAEC	Células endoteliales de aorta de ratón
MBHA	Resina <i>p</i> -metilbenzhidrilamina
MEKC	Cromatografía eletrocínética micelar
MEM	Mezcla de sales enriquecida con aminoácidos, vitaminas y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.

MsCl	Cloruro de metansulfonilo
MTBE	Metil <i>tert</i> -butil éter
MTT	(3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio)
NPY	Neuropéptido Y
OxymaPure®	Etil-2-ciano-2-(hidroximino)acetato
PBS	Tampón fosfato pH 7.2
PDC	Dicromato de piridinio
Pipe	Piperidina
PLE	Esterasa de hígado de cerdo
Pro-péptidos	Péptidos ricos en prolina
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi-tri(pirrolidin)fosfonio
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa
RP-HPLC-MS	Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa acoplada a espectrómetro de masas
RPMI-1640	Medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Solución de Penicilina con estreptomycin
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMI	Resonancia Magnética de Imagen
SAXS	Dispersión de rayos X a bajos ángulos
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SFS	Síntesis en fase sólida
Tat	Secuencia del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TIS	Triisopropilsilano
Tripsina-EDTA	Tripsina- ácido etildiaminotetraacético

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

La unidad estructural de anillo ciclobutánico es una importante plataforma que se encuentran en numerosos compuestos bioactivos y está presente en intermedios clave para la síntesis química de compuestos funcionalizados con interesantes propiedades fisicoquímicas y con posibles aplicaciones en los campos de la biomedicina y de los materiales.

Los compuestos ciclobutánicos 1,2- y 1,3-difuncionalizados, además de presentar una alta versatilidad sintética, exhiben ciertas ventajas estructurales debido a la presencia del anillo de ciclobutano como un elemento de restricción conformacional y de dos centros quirales de configuración conocida. Estas características confieren a los derivados ciclobutánicos interesantes propiedades, las cuales son usadas en la preparación de compuestos con diversas aplicaciones. Nuestro grupo de investigación es pionero en el estudio y síntesis de aminoácidos ciclobutánicos ópticamente activos, con aplicaciones en el campo de la biomedicina, materiales, entre otras.¹⁻⁸

Dada la amplia experiencia de nuestro grupo de investigación en el estudio y síntesis de derivados ciclobutánicos y empleando la versatilidad de éstos compuestos, la presente tesis doctoral se ha enfocado en la preparación de tres grupos de compuestos ópticamente activos (**Esquema 1**), que contienen el anillo ciclobutánico en su estructura como plataforma quiral. Asimismo, se ha realizado el estudio fisicoquímico o de actividad biológica, buscando aplicaciones en el campo de la biomedicina.

¹ Gorrea, E.; Carbajo, D.; Gutiérrez-Abad, R.; Illa, O.; Branchadell, V.; Royo, M.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (20), 4050-4057.

² Fernandez, D.; Torres, E.; Avilés, F. X.; Ortuño, R. M.; Vendrell, J. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (11), 3824-3828.

³ Ortuño, R.M.; Izquierdo, S.; Hölenz, J.; Corbera, J.; Cuberes, R. PCT Int. Appl. **2008** WO 2008015266.

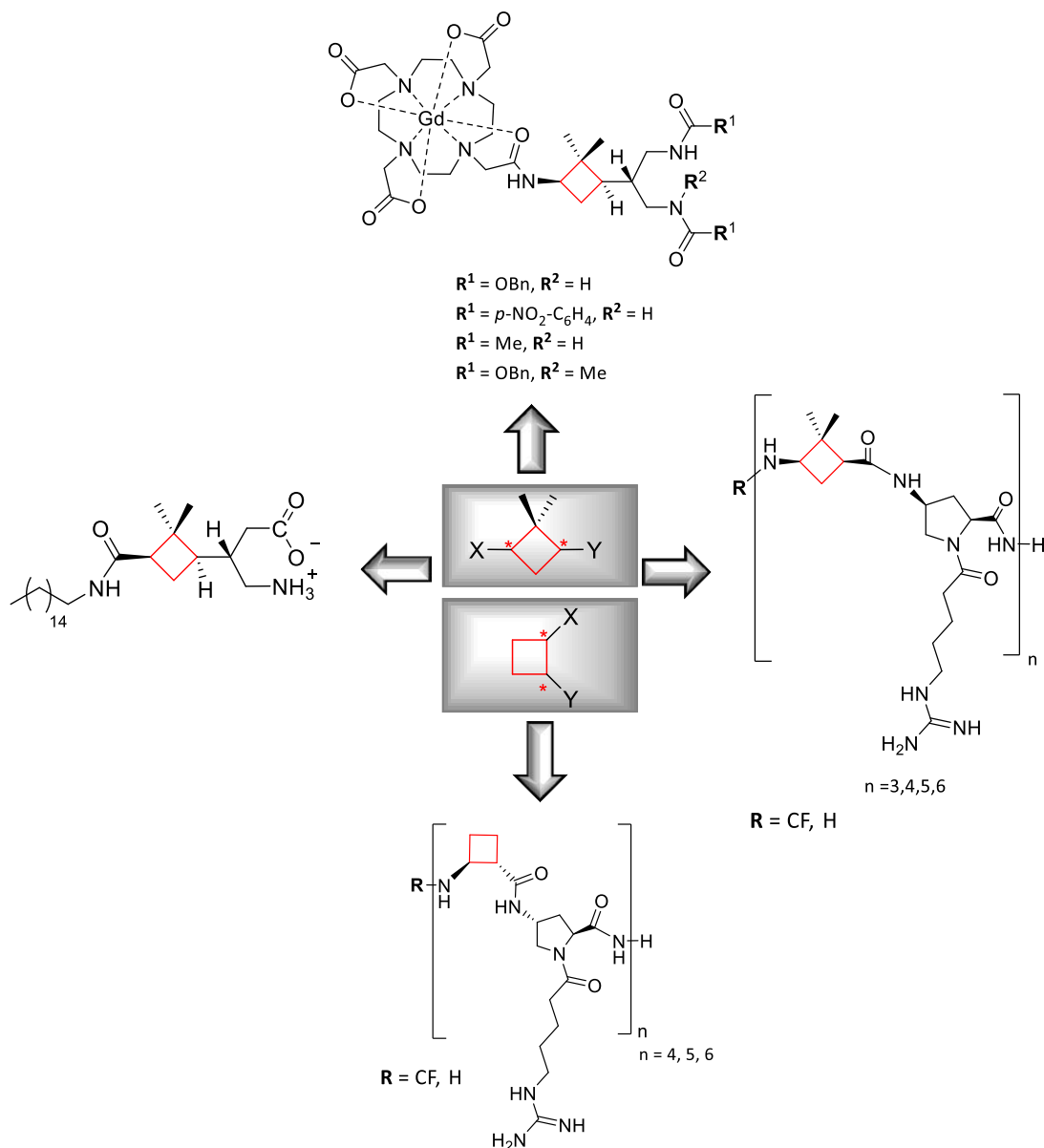
⁴ Rouge, P. D.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14* (2), 193-195.

⁵ Moglioni, A. G.; Brousse, B. N.; Álvarez-Larena, A.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2002**, *13* (5), 451-454.

⁶ Gutiérrez-Abad, R.; Carbajo, D.; Nolis, P.; Acosta-Silva, C.; Cobos, J. A.; Illa, O.; Royo, M.; Ortuño, R. M. *Amino Acids* **2011**, *41* (3), 673-686.

⁷ Celis, S.; Nolis, P.; Illa, O.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2839-2846.

⁸ Torres, E.; Gorrea, E.; Burusco, K. K.; Da Silva, E.; Nolis, P.; Rúa, F.; Boussert, S.; Díez-Pérez, I.; Dannenberg, S.; Izquierdo, S.; Giralt, E.; Jaime, C.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (3), 564-575.



Esquema 1. Diagrama general para la preparación de los productos derivados ciclobutánicos 1,2- y 1,3-disustituídos.

Los resultados de esta tesis se hallan recogidos en 3 capítulos de esta memoria, cada uno de los cuales contendrá una introducción, unos objetivos concretos y las conclusiones correspondientes.

- ❖ En el primer capítulo se expondrá la síntesis de nuevas moléculas ciclobutánicas polifuncionales anfifílicas, que presentan una cadena lipofílica incorporada a una cabeza polar (función γ -aminoácido), así como su estudio como agentes tensioactivos.

CAPÍTULO1: INTRODUCCIÓN GENERAL

- ❖ En el segundo capítulo se presentarán los resultados obtenidos en la síntesis de cuatro triaminas ciclobutánicas conjugadas con Gd(III)-DOTA y su estudio como posibles agentes de contraste en Resonancia Magnética de Imagen.
- ❖ En el tercer capítulo se describirá la síntesis de nuevos péptidos híbridos ciclobutano-prolina de longitud variable y su evaluación como potenciales vectores transportadores de fármacos para diferentes barreras biológicas, como la membrana citoplasmática de células HeLa y la de los parásitos de *Leishmania donovani* y *Leishmania pifanoi*.
- ❖ Finalmente, se presenta un último capítulo, donde se recogerán las conclusiones generales de la presente tesis doctoral.

Parte de los resultados obtenidos han sido plasmados en las siguientes publicaciones científicas.

- ❖ Ospina, J.; Sorrenti, A.; Illa, O.; Pons, R.; Ortuño, R. M. New Chiral polyfunctional cyclobutane derivatives from (-)-verbenone: Possible surfactant behaviour. *Tetrahedron Asymmetry* **2013**, *24* (12), 713–718.
- ❖ Ospina, J.; Gutiérrez-Abad, R.; Lope-Piedrafita, S.; Illa, O.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. Stereoselective synthesis of highly branched chiral cyclobutane-cored triamines and their conjugation to Gd-DOTA. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 8085–8095.
- ❖ Aguilera, J.; Moglioni, A.; Mor, À.; Ospina, J.; Illa, O.; Ortuño, R. M. Divergent synthetic routes to biologically relevant types of compounds: Chiral polyfunctional γ -lactams and amino acids. *Tetrahedron* **2014**, *70* (37), 6546–6553.

Asimismo, agradezco a la Generalitat de Catalunya por la beca predoctoral (FI-DGR) concedida para el desarrollo de esta tesis doctoral.

Capítulo 2

IMPORTANCIA DE LOS DERIVADOS CICLOBUTÁNICOS Y PRECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN

La unidad de ciclobutano se encuentra presente en un número importante de productos de origen natural (**Figura 1**) y compuestos con gran utilidad en la industria farmacéutica, debido a sus interesantes propiedades estructurales que lo convierten en una plataforma de gran importancia sintética.^{9,10}

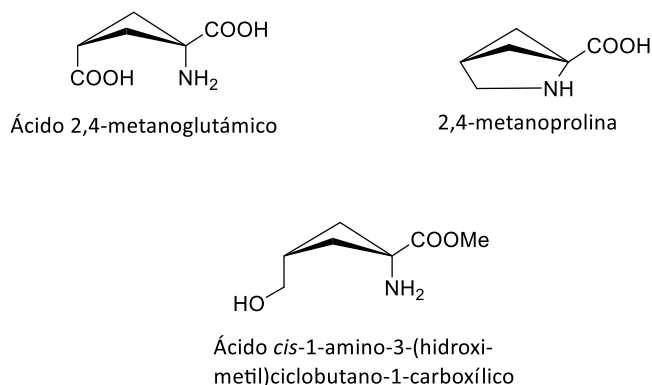


Figura 1. Ejemplos de productos ciclobutánicos de origen natural

Dentro de los compuestos naturales y sintéticos derivados del ciclobutano, los aminoácidos y los nucleósidos son los que presentan un mayor interés debido a la amplia variedad de aplicaciones biológicas, como agentes antibióticos, antivirales o antitumorales.^{4,11} Ejemplo de esto es el antibiótico X-1092 el cual es producido por una variedad *Streptomyces*,¹² los aminoácidos ciclobutánicos análogos de la gabapentina que han sido preparados para el tratamiento de epilepsia, trastornos neurodegenerativos, depresión, ansiedad, pánico, dolor, trastornos neuropatológicos, trastornos gastrointestinales e inflamación,¹³ y los nucleósidos ciclobutánicos A 1 y G 2 los cuales exhiben un amplio espectro de actividades antivirales (**Figura 2**).¹⁴

⁹ Martín-Vilá, M.; Muray, E.; Aguado, G. P.; Alvarez-Larena, A.; Branchadell, V.; Minguillón, C.; Giral, E.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 3569–3584.

¹⁰ Liu, R.; Zhang, M.; Wyche, T. P.; Winston-McPherson, G. N.; Bugni, T. S. Tang, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7503–7506.

¹¹ Ortuño, R. M.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G.Y. *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9* (3), 237-259.

¹² Adlington, R.M.; Baldwin, J. E.; Jones, R. H.; Murphy, J.A.; Parisi, M.F. *J. Chem. Soc.* **1983**, 1479-1481.

¹³ Bryans, J.; Horwell, D.; Thorpe, A.; Wustrow, D. PCT Int. Appl. 1998 WO US19876.

¹⁴ Baló, C.; Caamaño, O.; Fernández, F.; López, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (15), 2593–2597.

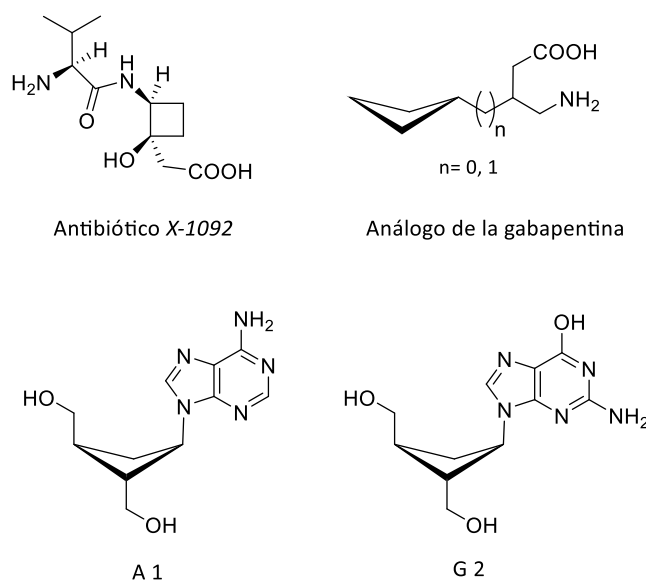


Figura 2. Compuestos activos ciclobutánicos

En muchas ocasiones, la actividad biológica de dos enantiómeros es significativamente distinta y algunas veces el enantiómero inactivo puede interferir o disminuir significativamente la actividad del compuesto activo. De aquí el interés en la síntesis de compuestos quirales enantiopuros. La estereoquímica deseada se puede conseguir principalmente por medio de dos rutas: La primera es el uso de precursores con quiralidad absoluta definida y la segunda mediante la inducción de asimetría con una reacción quimioenzimática a partir de un precursor proquiral.^{9,15,16} El anillo de ciclobutano, puede ser obtenido a partir de un precursor que ya lleve incorporado un anillo ciclobutánico (*chiral pool*) o a través de una reacción de cicloadición [2+2].

2.1 Síntesis y aplicaciones de los compuestos ciclobutánicos 1,3-disustituidos

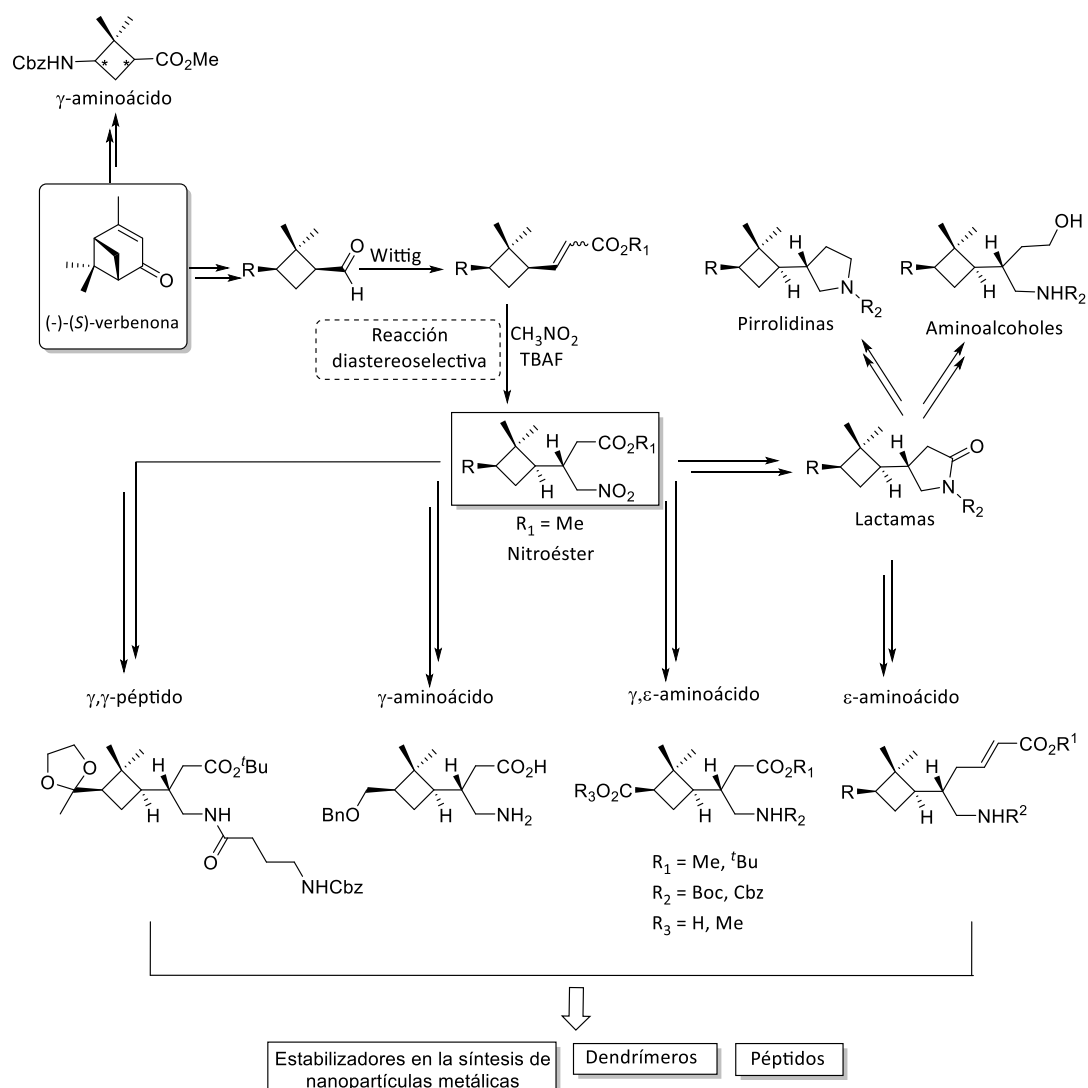
Nuestro grupo de investigación ha empleado eficientemente (-)-verbenona como precursor quiral en la síntesis de una gran variedad de productos polifuncionales, que poseen como principal característica estructural la plataforma ciclobutánica. A partir de (-)-verbenona y por medio de una serie de transformaciones, se han obtenido aldehídos ciclobutánicos funcionalizados que se comportan como intermedios en la obtención de derivados olefínicos, los cuales a su vez dan lugar a un nitrocompuesto

¹⁵ Sabbioni, G.; Jones, J. B. *J. Org. Chem.* **1987**, 52 (20), 4565–4570.

¹⁶ Martín-Vilà, M.; Minguillón, C.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9 (24), 4291–4294.

CAPÍTULO 2: PRECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

ópticamente puro, de gran importancia en la preparación de γ - y ε -derivados (Esquema 2).



Esquema 2. Esquema general de la síntesis algunos compuestos ciclobutánicos 1,3-disustituidos.^{5,17-20}

Utilizando (-)-verbenona como precursor quiral, nuestro grupo de investigación preparó cuatro series de nuevos péptidos (Esquema 3). La primera serie se construyó con el enantiómero (1S, 3R) del γ -aminoácido ciclobutánico **1** en alternancia con el

¹⁷ Aguilera, J.; Moglioni, A.; Mor, À.; Ospina, J.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron* **2014**, *70* (37), 6546–6553.

¹⁸ Gutiérrez-Abad, R.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Org. Lett.* **2010**, *12* (14), 3148–3151.

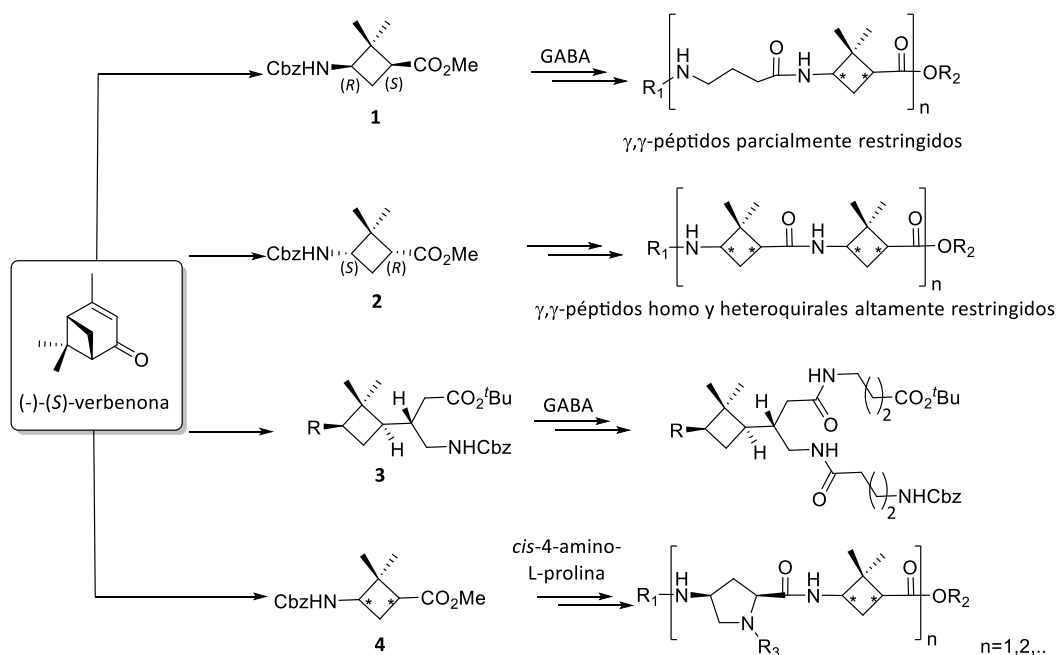
¹⁹ Aguilera, J.; Gutiérrez-Abad, R.; Mor, À.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19* (24), 2864–2869.

²⁰ Aguilera, J.; Favier, I.; Sans, M.; Mor, À.; Álvarez-Larena, Á.; Illa, O.; Gómez, M.; Ortuño, R. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015* (4), 810–819.

CAPÍTULO 2: PRECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

ácido γ -aminobutírico (GABA), mientras que en la segunda serie fueron acoplados alternadamente ambos aminoácidos ciclobutánicos enantioméricos (**2**); las dos series generaron un alto grado de rigidez y fomentaron la inducción de conformaciones extendidas. La tercera serie fue el resultado de la funcionalización del γ -aminoácido ciclobutánico **3** con GABA, donde el ciclobutano no es parte directa del esqueleto peptídico, sino que actúa como una plataforma polifuncional quiral, la cual genera conformaciones plegadas gracias a los enlaces de hidrógeno intramoleculares.²¹

Del mismo modo, nuestro grupo de investigación ha profundizado en la síntesis y estudio como posibles agentes de internalización celular, de una primera generación de di-, tetra- y hexapéptidos ciclobutano-prolina y una segunda generación de hexapéptidos híbridos ciclobutano-prolina N^d -funcionalizados, los cuales han exhibido interesantes propiedades fisicoquímicas y biológicas.^{1,6}



Esquema 3. Esquema general de γ -péptidos ciclobutánicos quirales.

En relación a este campo, la Doctora Raquel Gutiérrez inició el trabajo de investigación con la síntesis y estudio estructural de la primera generación de péptidos, identificando que la configuración absoluta del aminoácido ciclobutánico **4** no tiene

²¹ Aguilera, J.; Cobos, J. A.; Gutiérrez-Abad, R.; Acosta, C.; Nolis, P.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2013 (17), 3494–3503.

CAPÍTULO 2: PRECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

una influencia relevante en el comportamiento biológico de estos compuestos (**Esquema 3**). A continuación, la Doctora Ester Gorrea realizó el estudio de la segunda generación de γ,γ -hexapéptidos la cual poseía una misma cadena peptídica, con variaciones en las cadenas laterales introducidas a través del grupo α -amino (N^α) de los monómeros de prolina. Los resultados de este trabajo evidenciaron la influencia de las cadenas laterales en la hidrofobicidad del péptido y al mismo tiempo en su actividad biológica. Estos resultados motivaron la continuidad de la investigación, la cual será descrita en el capítulo 5 de la presente memoria.

Otra importante aplicación de los compuestos ciclobutánicos 1,3-disustituídos, es la síntesis de dendrímeros peptídicos C_3 -simétricos altamente funcionalizados (**Figura 3**). Estos compuestos fueron sintetizados a partir de un derivado bencílico 1,3,5-trisustituído y el γ,ϵ -amino diácido quiral **5**.¹⁸ Los dendrímeros son macromoléculas que contienen unidades de ramificación simétricas construidas alrededor de una molécula pequeña o un núcleo de polímero lineal.²² El papel emergente de estas macromoléculas dendríticas para ser usadas en terapias contra el cáncer y en el diagnóstico por imagen es muy importante y sus múltiples propiedades lo convierten en un nuevo mecanismo de entrega de fármacos a nanoescala.²³ Son de especial interés, los compuestos que presentan como núcleo o punto focal el benceno y además están ligados a unidades de ramificación periféricas a través de un grupo urea, C-amida o N-amida, poseen diversas aplicaciones en nuevos materiales quirales,²⁴ agentes de nucleación para polímeros,²⁵ organogeladores,²⁶ ligandos para metales, entre otros.

²² Abbasi, E.; Aval, S.; Akbarzadeh, A.; Milani, M.; Nasrabadi, H.; Joo, S.; Hanifehpour, Y.; Nejati-Koshki, K.; Pashaei-Asl, R. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9* (1), 247–257.

²³ Wolinsky, J. B.; Grinstaff, M. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (9), 1037–1055.

²⁴ Kreger, K.; Wolfer, P.; Audorff, H.; Kador, L.; Stingelin-Stutzmann, N.; Smith, P.; Schmidt, H. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (2), 509–516.

²⁵ Blomenhofer, M.; Ganzleben, S.; Hanft, D.; Schmidt, H. W.; Kristiansen, M.; Smith, P.; Stoll, K.; Mäder, D.; Hoffmann, K. *Macromolecules* **2005**, *38* (9), 3688–3695.

²⁶ Zhou, Y.; Xu, M.; Li, T.; Guo, Y.; Yi, T.; Xiao, S.; Li, F.; Huang, C. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *321* (1), 205–211.

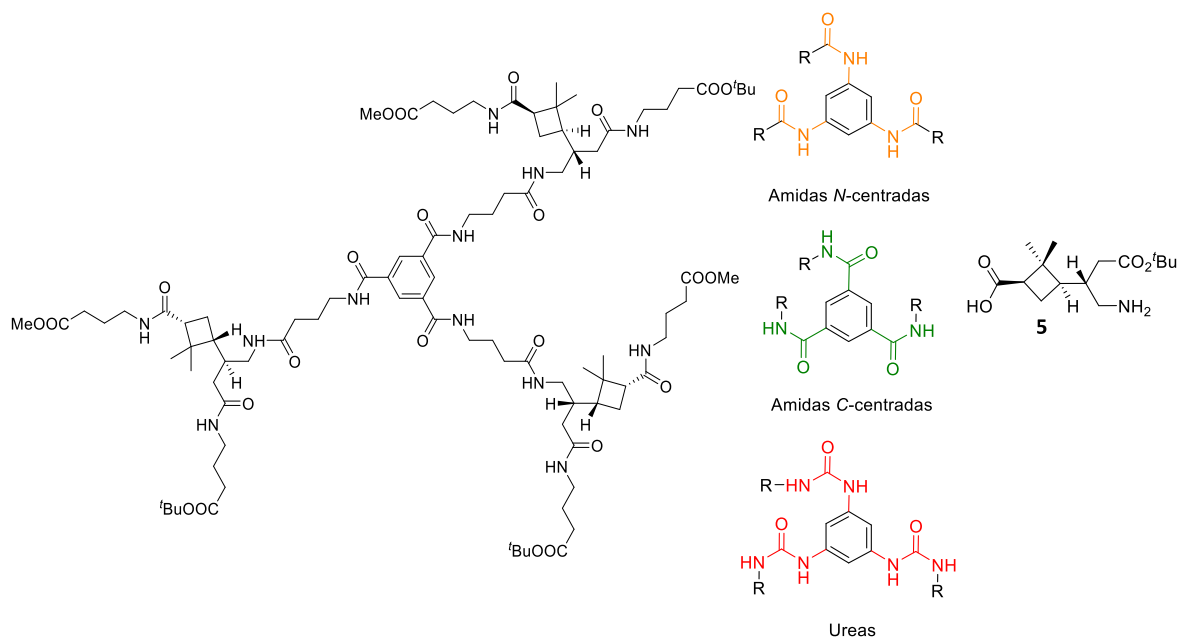
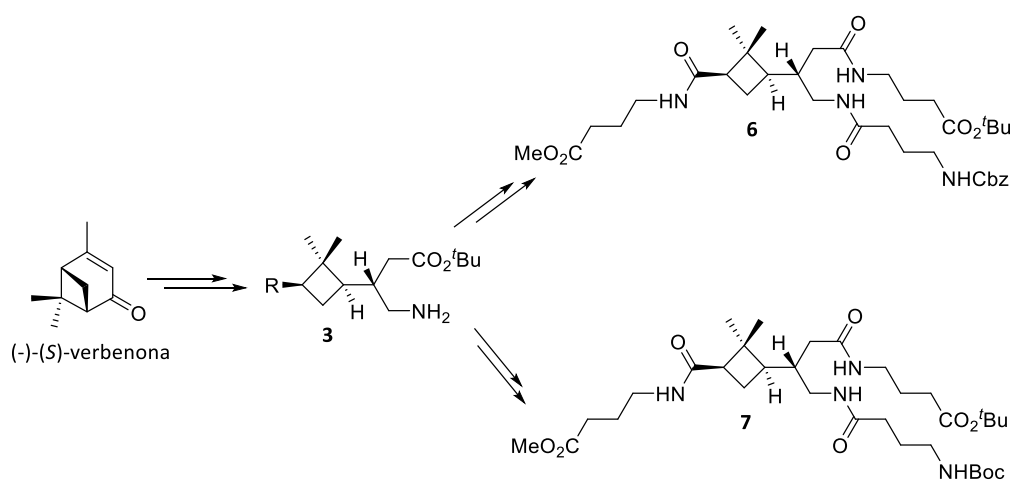


Figura 3. Dendrímeros peptídicos C_3 -simétricos con dendrones ciclobutánicos

Nuestro grupo de investigación, además de sintetizar convergentemente cuatro nuevos dendrímeros peptídicos C_3 -simétricos con un núcleo aromático, sintetizó otro grupo de dendrímeros con núcleo ciclobutánico algunos de los cuales poseen un buen comportamiento como organogelador (compuesto **7**) (**Esquema 4**). Estos estudios demostraron que la naturaleza de los grupos protectores permite la modulación de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos sintetizados.



Esquema 4. Dendrímeros con núcleo ciclobutánico

CAPÍTULO 2: PRECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Trabajos recientes realizados por el Doctor Jordi Aguilera y la Doctora Marta Sans presentan la transformación del nitrocompuesto ciclobutánico en pirrolidinas ciclobutánicas funcionalizadas (**Esquema 2**). Las pirrolidinas **8**, **9** y **10** (**Figura 4**) fueron utilizadas como estabilizadores en la formación de nanopartículas de rutenio, donde el ligando **8** generó nanopartículas con una buena dispersión y de tamaño reducido (2.0 nm) (**Figura 5**).

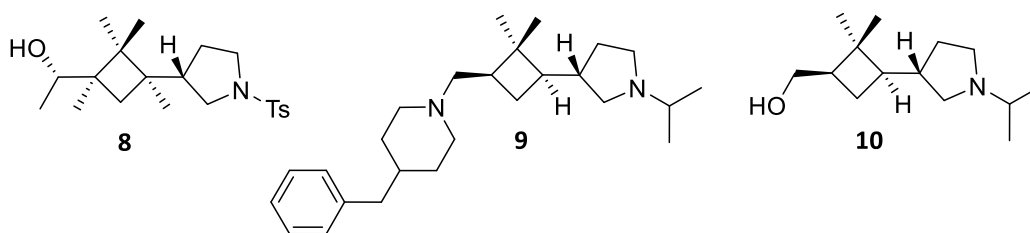


Figura 4. Pirrolidinas ciclobutánicas ópticamente puras

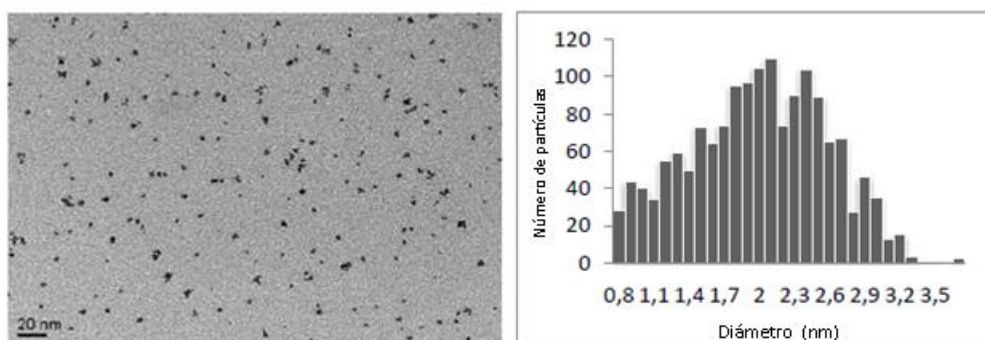


Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) para nanopartículas de Ru estabilizadas por el ligando **8**.

Estos compuestos sintetizados fueron evaluados como catalizadores en la hidrogenación de sustratos derivados de la acetofenona y los resultados evidenciaron una clara dependencia de la reacción con las propiedades electrónicas del sustrato. Específicamente, el sistema basado en RuNP**8** catalizó la reducción de sustratos ricos en electrones tales como la acetofenona y 4-metoxiacetofenona, evidenciando la utilidad de ligandos nitrogenados en catálisis.²⁰

2.2 Síntesis y aplicaciones de los compuestos ciclobutánicos 1,2-disustituídos

Otro campo de investigación ampliamente explorado es la síntesis de nuevos β -aminoácidos no naturales ciclobutánicos. Estos compuestos, al igual que los compuestos ciclobutánicos 1,3-disustituídos, proporcionan una plataforma quiral apropiada para la preparación de diversos productos. La rigidez conferida por el anillo de ciclobutano junto con la estereoquímica relativa *cis/trans* influyen en la inducción de estructuras secundarias definidas y también en el tipo de agregación generada.

El comportamiento de estas estructuras peptídicas ha sido ampliamente estudiado en nuestro laboratorio con el objetivo de mejorar sus características y de esta manera utilizar sus propiedades fisicoquímicas en diversas aplicaciones biológicas y en nuevos materiales.^{1,27,28} Ejemplo de esto es el estudio de los oligómeros constituidos por monómeros ciclobutánicos *cis*, los cuales adoptan estructuras extendidas en solución debido al enlace de hidrógeno intraresidual, mientras que sus análogos *trans*-oligómeros dan lugar a la formación de hélices debido al enlace de hidrogeno inter-residual. En ambos casos, las estructuras secundarias resultan de la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares.¹

También se han estudiado materiales con aplicaciones interesantes como es el caso del dipéptido homoquiral **11** (**Figura 6**), el cual presentó una buena capacidad para conducir la electricidad. El compuesto **11** incorpora un dipéptido ciclobutánico a un residuo tetratriafulvaleno (TTF) por medio de un enlace amida, el cual a su vez esta funcionalizado con cadenas de doce átomos de carbono, lo que facilita el apilamiento en la formación de fibras. Este compuesto se agregó en forma de fibras supramoleculares, las cuales fueron identificadas por medio de microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).²⁸

²⁷ Gorrea, E.; Pohl, G.; Nolis, P.; Celis, S.; Burusco, K. K.; Branchadell, V.; Perczel, A.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (21), 9795–9806.

²⁸ Torres, E.; Puigmartí-Luis, J.; Pérez del Pino, A.; Ortuño, R. M.; Amabilino, D. B. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (7), 1661–1665.

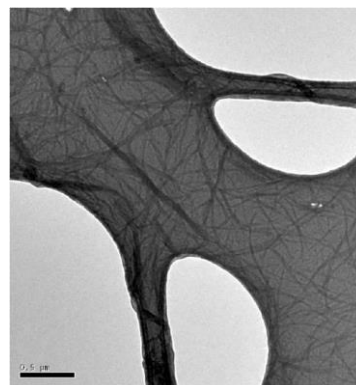
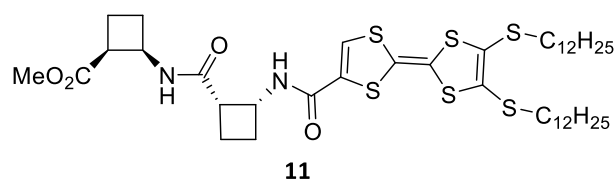


Figura 6. Imagen TEM de la formación de nanofibras del compuesto **11** al ser depositado sobre una rejilla de carbono.

De la misma manera, la utilización del β-aminoácido ciclobutánico (βCbu) permite la construcción de análogos cortos de NPY (neuropéptido Y) con una alta selectividad y propiedades agonistas del receptor Y_4 (**Figura 7**).²⁹ El neuropeptido Y es un neurotransmisor de 36 aminoácidos ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y periférico. Este péptido se encuentra implicado en varios procesos fisiológicos cerebrales, incluyendo la regulación del balance energético, la memoria, el aprendizaje y la epilepsia.

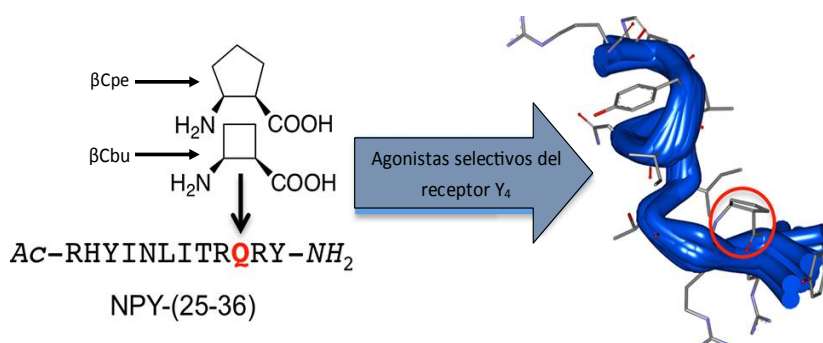


Figura 7. Utilización del β-aminoácido ciclobutánico (βCbu) y β-aminoácido ciclopentánico (βCpe) en la síntesis de un péptido corto con propiedades agonistas del receptor Y_4 .

Por otra parte, el estudio de la influencia de la estereoquímica *cis/trans* en el comportamiento de los derivados ciclobutánicos, permitió explicar la tendencia de los β-dipéptidos ciclobutánicos en agregarse en forma de fibras a nanoescala y actuar como organogeladores. Estas fibras interactúan entre ellas (interacciones no covalentes) para formar redes, como se observó por medio de microscopía electrónica, donde se apreciaron estructuras tridimensionales uniformes (**Figura 8**).³⁰

²⁹ Berlicki, L.; Kaske, M.; Gutiérrez-Abad, R.; Bernhardt, G.; Illa, O.; Bernhardt, G. G.; Ortuño, R. M.; Cabrele, C.; Buschauer, A.; Reiser, O. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (21), 8422–8431.

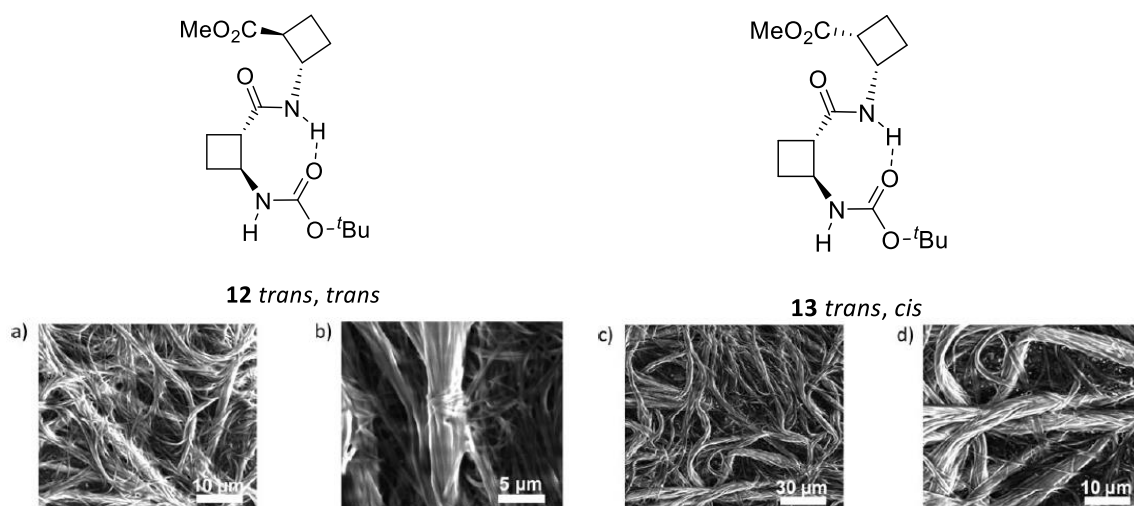


Figura 8. Imágenes SEM de los xerogeles formados en tolueno por los β -dipéptidos *trans, trans*-**12** a) y b); y *trans, cis*-**13** c) y d)

Los experimentos de espectroscopia de RMN proporcionaron información acerca de los cambios conformacionales involucrados en la transición solución-gel y sugirieron un proceso de gelificación diferente para cada dipéptido, como resultado de un ordenamiento molecular distinto en el proceso de formación.³⁰ El modelado de la agregación sugirió una disposición molecular de cabeza-cabeza para el compuesto **12** (Figura 9) y una disposición de cabeza-cola para **13**, formando estructuras helicoidales. Aunque las propiedades y apariencia de los geles de **12** y **13** no son exactamente iguales, la morfología y las estructuras supramoleculares son muy similares.

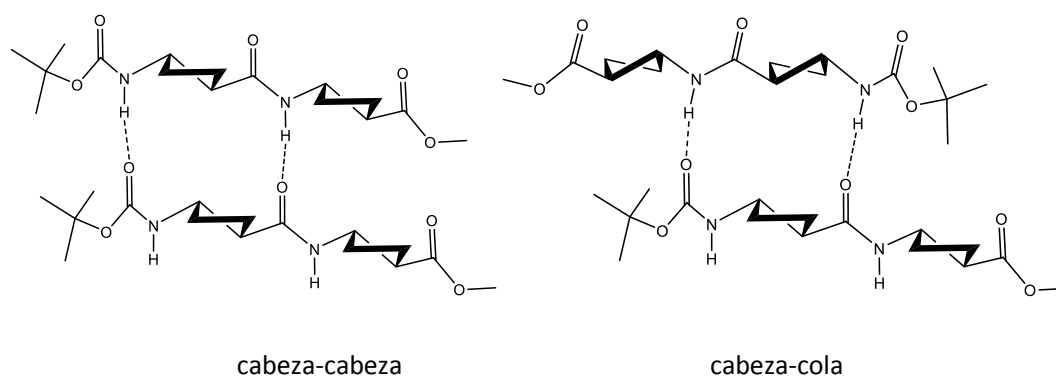
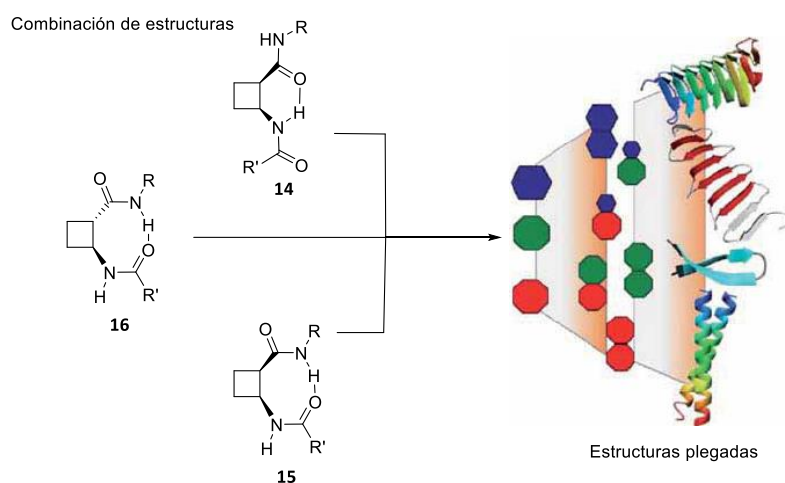


Figura 9. Ejemplo de ordenamiento de dos moléculas de **12** en una disposición cabeza-cabeza y cabeza-cola respectivamente.

³⁰ Gorrea, E.; Nolis, P.; Torres, E.; Da Silva, E.; Amabilino, D. B.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17* (16), 4588–4597.

CAPÍTULO 2: PRECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Buscando ampliar el campo de conocimiento de estas estructuras, la Doctora Esther Gorrea generó un método versátil y eficiente basado en cálculos teóricos, para predecir el plegamiento de los β -péptidos ciclobutánicos diseñados. Las predicciones de plegamiento de los nuevos oligómeros sintetizados y caracterizados en nuestro grupo fueron corroboradas por estudios de Resonancia Magnética Nuclear, observando que la quiralidad de los monómeros da lugar a estructuras secundarias definidas. La forma *cis* del aminoácido ciclobutánico da lugar a dos confórmeros **14** y **15**, mientras que la forma *trans* se manifiesta exclusivamente como una estructura **16** (**Esquema 5**). La combinación de estas subunidades mantiene su tendencia estructural, permitiendo el diseño racional de una nueva serie de oligómeros, simplemente combinando los monómeros adecuadamente.²⁷



Esquema 5. Diseño racional de nuevos β -péptidos con plegamientos definidos por combinación apropiada de monómeros ciclobutánicos con la estereoquímica apropiada.

Recientemente, el Doctor Sergi Celis sintetizó tres tetrapéptidos híbridos, β,α -, β,β - y β,γ -péptidos mediante la combinación alternada de un β -aminoácido ciclobutánico con aminoácidos lineales (glicina, β -alanina y GABA, respectivamente) (**Figura 10**) demostrando la capacidad de estos compuestos para gelificar varios disolventes orgánicos. Los experimentos de RMN indicaron que la gelificación produce una estructura supramolecular quiral, lo cual concuerda con la hélice quiral referenciada en los estudios de dicroísmo circular (DC) y también con cálculos computacionales. Las propiedades físicas tales como la morfología, tamaño y tipo de disposición supramolecular de estos compuestos, se analizaron mediante el uso de varias técnicas,

CAPÍTULO 2: PRECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

incluyendo el DC, SEM y espectroscopia de IR. Estos estudios revelaron que los compuestos **17**, **19** y **20** se agregan en forma de redes fibrilares, mientras que el compuesto **18** exhibe una estructura esferulítica.¹

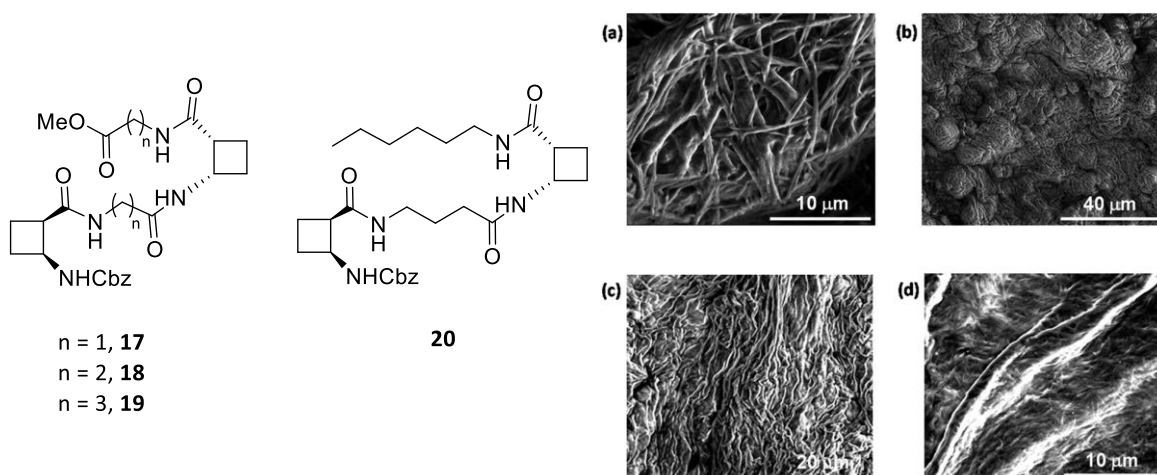


Figura 10. Estructuras de péptidos híbridos ciclobutánicos. Imágenes SEM de los compuestos **17** (a), **18** (b), **19** (c) y **20** (d) como xerogeles (de tolueno)

Los cálculos teóricos realizados para investigar la disposición tridimensional del β, α -tetrapéptido **17** consolidan los resultados previos, sugiriendo un ordenamiento helicoidal para el agregado hexadecamérico (**Figura 11**).

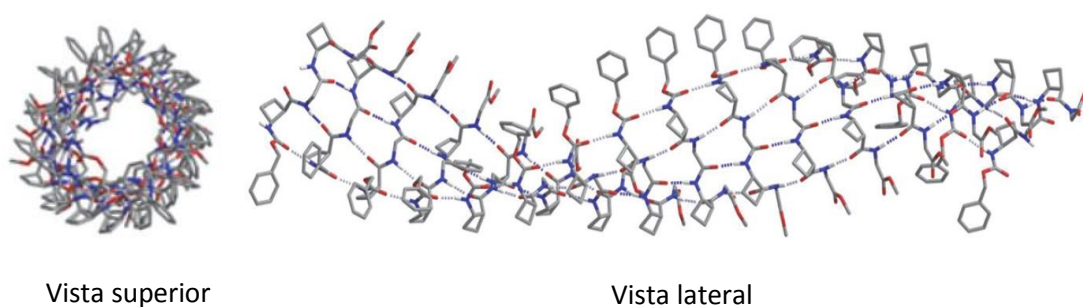


Figura 11. Estructura del agregado hexadecamérico del péptido **17** optimizado a nivel MMFF de cálculo en cloroformo.

De igual manera, el Doctor Alessandro Sorrenti de nuestro grupo, utilizando el ciclobutano 1,2-disustituido como agente de restricción encontró una fuerte influencia de la estereoquímica *cis/trans* (**Figura 12**) en el tipo de agregación molecular de los

CAPÍTULO 2: PRECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

compuestos anfífilos quirales derivados del β -aminoácido ciclobutánico (*cis*- y *trans*-**21**).

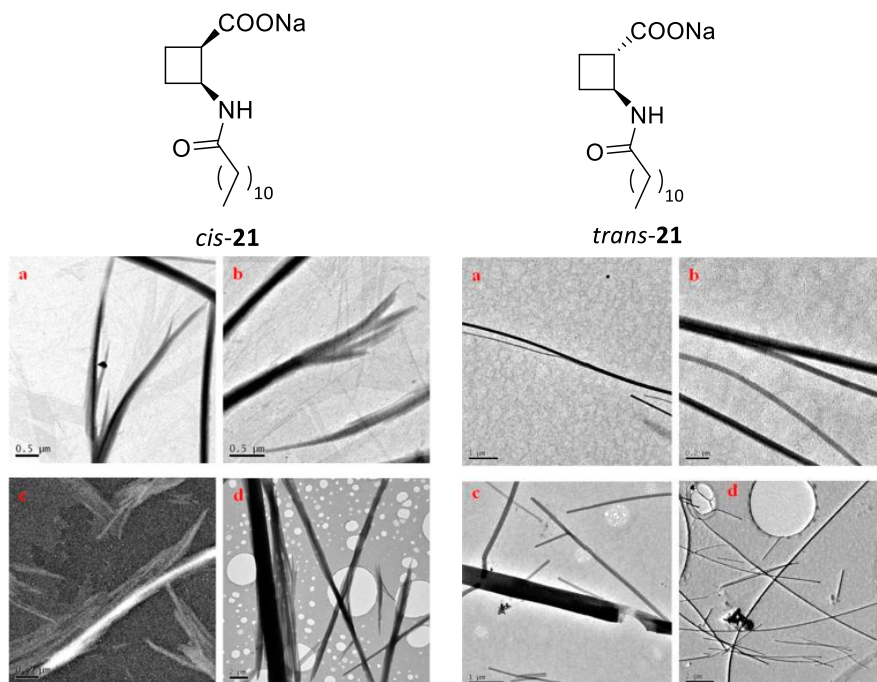


Figura 12. Microscopía electrónica de soluciones acuosas de 1% de *cis*-**21** (lado izquierdo): después de 24 h de incubación (a-c) y después de 3 semanas (d). *Trans*-**21** (lado derecho) después de 3 semanas (a-d). Todas las imágenes corresponden a muestras no teñidas depositadas sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono.

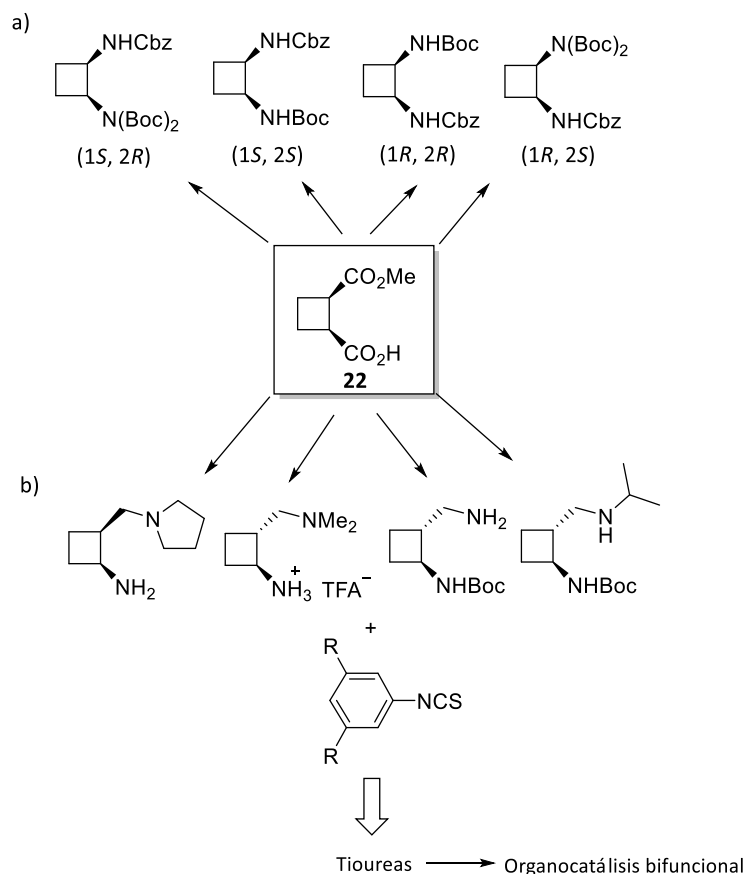
Las propiedades de agregación de estos diastereoisómeros aniónicos anfífilos mostraron estar asociados a la restricción conformacional transmitida por el anillo de ciclobutano y a la estereoquímica relativa de los compuestos. Ello se tradujo en diferencias en el comportamiento fisicoquímico (pKa, CMC, conductividad), así como en los parámetros estructurales de las micelas esféricas formadas. Aunque ambos diastereoisómeros formaron fibras que evolucionaban con el tiempo en micelas esféricas, presentaron diferente morfología y variación en la cinética de formación.³¹

Continuando con el estudio de la influencia de la estereoquímica en la agregación molecular, la Doctora Marta Sans preparó cuatro estereoisómeros derivados de las diaminas ciclobutánicas 1,2-disustituidas ortogonalmente protegidas (**Esquema 6a**) de una manera enantio- y diastereocontrolada a través de rutas sintéticas

³¹ Sorrenti, A.; Illa, O.; Pons, R.; Ortuño, R. M. *Langmuir* **2015**, 31 (35), 9608–9618.

CAPÍTULO 2: PRECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

estereodivergentes utilizando el hemiester **22** como precursor quiral común.³² Así mismo, Enric Mayans de nuestro grupo de investigación preparó otras diaminas ciclobutánicas (**Esquema 6b**) las cuales permitieron la síntesis de tioureas que fueron estudiadas como organocatalizadores bifuncionales.³³



Esquema 6. a) Diaminas ciclobutánicas 1,2-disustituidas y b) 1,3-disustituidas

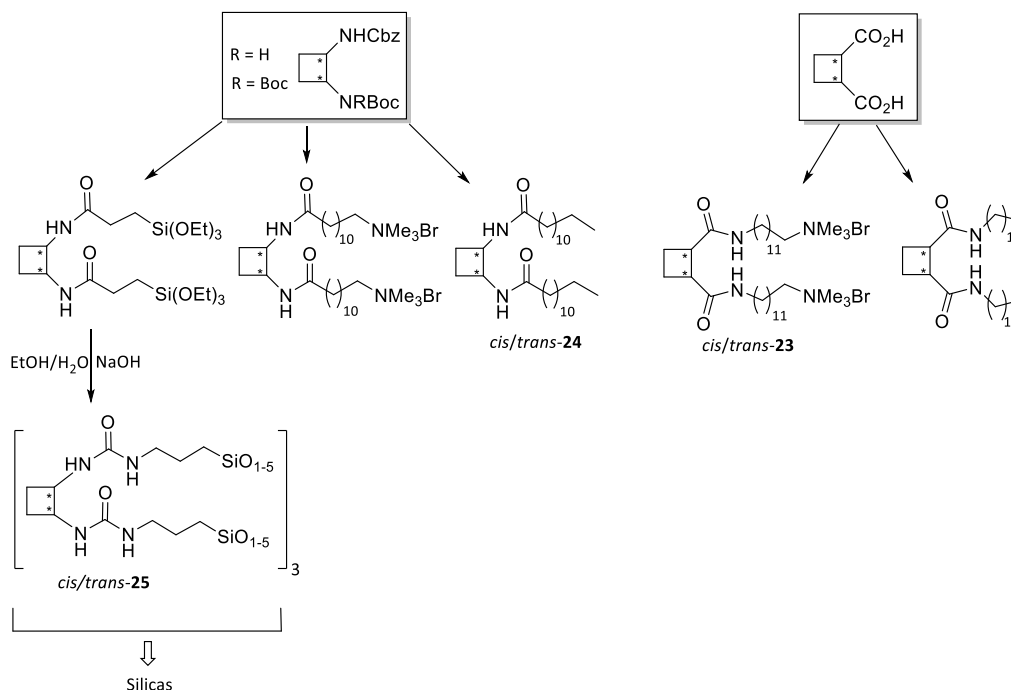
Las diaminas y diácidos ciclobutánicos (**Esquema 7**) se utilizaron eficientemente como plataformas en la preparación de derivados enantiopuros. Algunos de estos derivados fueron funcionalizados como anfífilos y mostraron una gran influencia de la regioquímica y la estereoquímica en sus propiedades de superficie. Por ejemplo las amidas *C*-centradas (*cis*- y *trans*-**23**) actuaron como tensioactivos con claras diferencias en los valores de concentración micelar crítica. Por el contrario las amidas *NH*-centradas se comportaron de manera diferente en agua. Por un lado, el diastereómero *trans* no actuó como un tensioactivo sino como un buen organogelador en *n*-butanol,

³² Sans, M.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Org. Lett.* **2012**, *14* (10), 2431–2433.

³³ Mayans, E.; Gargallo, A.; Álvarez-Larena, Á.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, (8), 1425–1433.

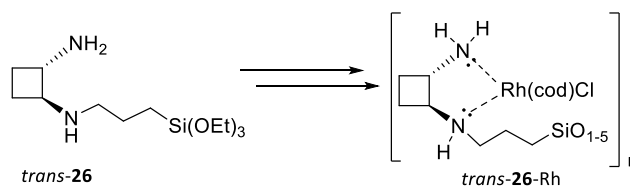
CAPÍTULO 2: PRECEDENTES DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

mientras que el diastereómero *cis* se comportó como un agente tensioactivo. Los compuestos *cis*- y *trans*-**24** (**Esquema 7**), exhibieron una buena capacidad para gelificar varios disolventes y además, los dos compuestos generaron geles estables en tolueno a temperatura ambiente.³⁴



Esquema 7. Derivados enantiopuros preparados a partir de las diaminas y diácidos ciclobutánicos

Actualmente, nuestro grupo de investigación ha incursionado en la síntesis y estudio de nuevos materiales híbridos. Recientemente la Doctora Marta Sans ha realizado la síntesis de nuevos sílices híbridos quirales (*cis*- y *trans*-**25**) (**Esquema 7**) que contiene la unidad ciclobutánica en su estructura. Al mismo tiempo, ha realizado la incorporación de rodio en el material híbrido sintetizado (*trans*-**26**-Rh) (**Esquema 8**), con el objetivo de evaluar en un futuro su posible aplicación en catálisis.



Esquema 8. Síntesis de sílice híbrida ciclobutánica con rodio

³⁴ Sans, M. *The chiral cyclobutane motif in metal ligands for catalysis and advanced materials: organogelators, surfactants and hybrid materials*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 2014.

Capítulo 3

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
TENSIOACTIVOS PREPARADOS A
PARTIR DE (-)-VERBENONA**

3.1 Introducción

La palabra anfífilo proviene de las raíces griegas: *amphis*, que significa "doble" y *philia*, que expresa afinidad. Este término se utiliza para indicar compuestos que muestran una afinidad dual, es decir, que poseen ambas propiedades, hidrófilas (afinidad por el agua) e hidrófobas (afinidad por la grasa).³⁵

El término surfactante es un neologismo adaptado del inglés "Surface active agent". Este término se usa frecuentemente como sinónimo de tensioactivo, es decir, moléculas anfifílicas que tienden a disminuir la tensión superficial o interfásica. Ésta disminución sucede al acumularse el tensioactivo en la superficie o en la interfase de dos líquidos de polaridad diferente, modificando sus propiedades. No todas las moléculas anfifílicas son moléculas tensioactivas, de hecho, sólo los anfífilos con tendencias hidrófilas e hidrófobas equilibradas (balance hidrófilo-lipófilo (HLB)) tienden a migrar a la superficie o a la interfase.³⁵ El término surfactante es equivalente a tensioactivo solo si se supone que la actividad superficial o interfacial se traduce necesariamente por un descenso de la tensión, lo cual es verdad en la mayor parte de los casos que tienen un interés práctico.³⁶

La tensión superficial se puede definir como "la fuerza por unidad de longitud que se debe aplicar paralela a la superficie líquida a fin de contrarrestar la atracción hacia el seno de la misma". Ésta tensión superficial tiene unidades de N/m en el Sistema Internacional de Unidades (SI). La tensión interfacial es la fuerza por unidad de longitud existente en la interfase de dos fases líquidos inmiscibles y al igual que la tensión superficial, las unidades son N/m.³⁷ Los tensioactivos son compuestos que contienen grupos con solubilidad opuesta, por un lado una sección hidrocarbonada soluble en disolventes no polares, normalmente llamado grupo hidrófobo ("cola" o "cadena hidrofóbica") y del lado opuesto un grupo funcional o sección que tiene una atracción fuerte hacia disolventes polares, este grupo es llamado hidrófilo ("cabeza" o

³⁵ Sorrenti, A; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42 (21), 8200–8219.

³⁶ Rosen, M. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 3ª edición. New York: John Wiley & Sons, **2004**. ISBN 0-471-47818-0.

³⁷ Mishra, M.; Muthuprasanna, P.; Prabha, K. S.; Rani, P. S.; Babu, I. a S.; Chandiran, I. S.; Arunachalam, G.; Shalini, S. *Int. J. PharmTech Res.* **2009**, 1 (4), 1354–1365.

CAPÍTULO 3: INTRODUCCIÓN

“grupo hidrofílico”). La cabeza o grupo hidrofílico puede ser polar debido a la inclusión de oxígeno o átomos similares, que le confieren esta propiedad; la cola o cadena hidrofóbica comprende generalmente cadenas de hidrocarburos, pero también se utilizan compuestos fluorocarbonados. Una amplia gama de compuestos químicos puede cumplir estos requerimientos, de ahí que exista un gran número de tensioactivos químicamente posibles.³⁸ Cuando un tensioactivo se absorbe desde una solución acuosa a una superficie hidrofoba, éste normalmente orienta su grupo hidrofóbico hacia la superficie y expone su grupo polar al agua. De este modo la superficie se vuelve hidrofílica y como resultado, la tensión superficial entre la superficie y el agua se reduce.³⁹ Asimismo, en disoluciones acuosas los tensioactivos pueden formar estructuras esféricas llamadas micelas en las que los grupos polares están en la superficie y las partes hidrocarbonadas se orientan hacia el centro de la micela formando un núcleo esférico (**Figura 13**).

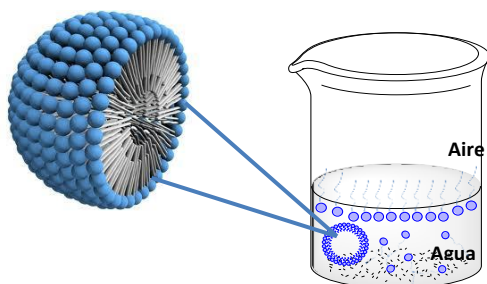


Figura 13. Forma de una micela convencional en agua.

A medida que aumenta la concentración, aumenta el número de moléculas de tensioactivo en la superficie, disminuyendo la tensión superficial hasta alcanzar un valor crítico, llamado concentración micelar crítica (CMC), a partir de la cual, la tensión superficial se mantiene constante y se empiezan a formar micelas o agregados moleculares de tensioactivo (liposomas, vesículas, geles, cristales líquidos, entre otros) en solución,³⁶ los cuales se encuentran en equilibrio con los monómeros (**Figura 14**).

³⁸ Berti, D.; Palazzo, G. *Colloidal Foundations of Nanoscience*. 1ª edición. USA: Newnes, **2014**. ISBN 0444595422.

³⁹ Munday, D. *Surfaces, Interfaces and Colloids—Principles and Applications*. 2ª edición. New York: Wiley-VCH, **1999**. ISBN 0-471-33060-4.

CAPÍTULO 3: INTRODUCCIÓN

La determinación de la CMC, se puede realizar utilizando cualquier propiedad que presente un cambio más o menos brusco frente a la concentración del tensioactivo. Algunas de las propiedades más utilizadas son: la tensión superficial, la conductividad y las propiedades ópticas y espectroscópicas tales como medidas de dispersión de la luz e índice de refracción o absorción.^{36,40}

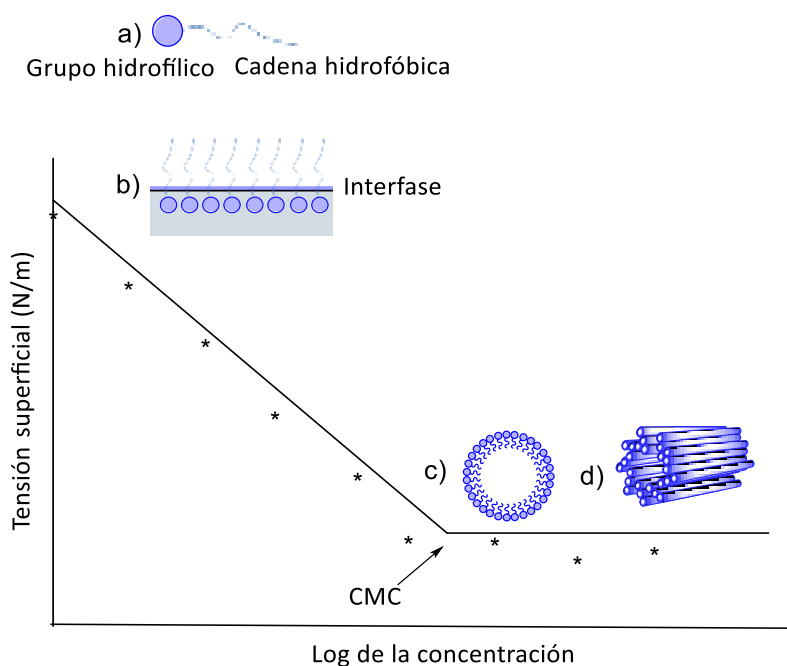


Figura 14. Representación esquemática del ordenamiento de las moléculas del tensioactivo alrededor de la concentración micelar crítica (CMC). a) Molécula de tensioactivo; b) Por debajo de la CMC, monómeros; c) Por encima de la CMC, el tensioactivo se encuentra formando micelas; d) A concentraciones mucho mayores a la CMC se forman superestructuras como organización cilíndricas de micelas.⁴¹

3.1.1 Clasificación de los tensioactivos

Los tensioactivos se encuentran como ingredientes básicos en una amplia gama de productos químicos utilizados a nivel industrial como agentes de limpieza en jabones y detergentes, así como en preparaciones de cosméticos, fármacos, productos alimentarios y en procesos industriales como la petroquímica, cromatografía, análisis

⁴⁰ Tadros, T. F. *Applied Surfactants: Principles and Applications*. 1ª edición. New York: Wiley-VCH, 2005. ISBN 3-527-30629-3.

⁴¹ Jiménez, D.; Medina, S. A.; Gracida, J. N. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 2010, 26 (1), 65–84.

CAPÍTULO 3: INTRODUCCIÓN

de suelos, catálisis, etc.⁴² En la actualidad se estudian distintas clases de tensioactivos para ser utilizados en áreas de alta tecnología como la microelectrónica, biotecnología y biomedicina, entre otras.⁴³

Los tensioactivos suelen clasificarse según diferentes criterios, entre ellos: su uso, la naturaleza química de la cabeza polar y su disociación en agua, así como el número y el tipo de conexión de la cabeza polar(es)/cola hidrofóbica(s). En cuanto a la naturaleza de su grupo hidrófilo o polar (**Figura 15**), los tensioactivos se clasifican como se muestra a continuación.³⁵

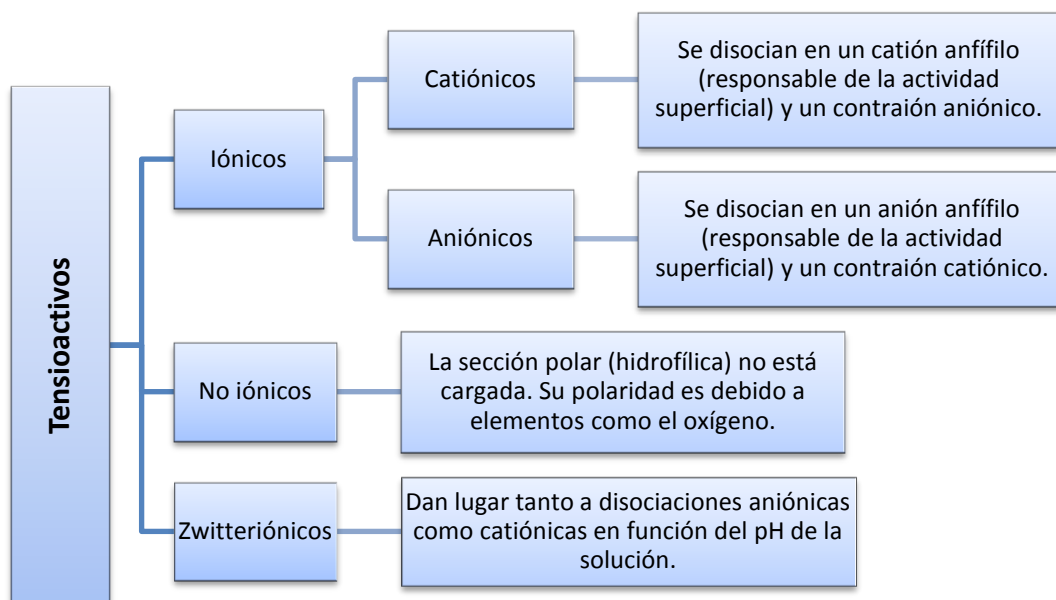


Figura 15. Clasificación de los tensioactivos según la naturaleza de su grupo polar.

Algunos ejemplos de las estructuras químicas de las principales clases de tensioactivos se muestran en la **Figura 16**.

⁴² Schramm, L.L. *Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*. 1ª edición. United Kingdom: University Press, Cambridge, **2000**. ISBN 0-521-64067-9

⁴³ Gautam, K. K.; Tyagi, V. K. *J. Oleo Sci.* **2006**, *55* (4), 155–166.

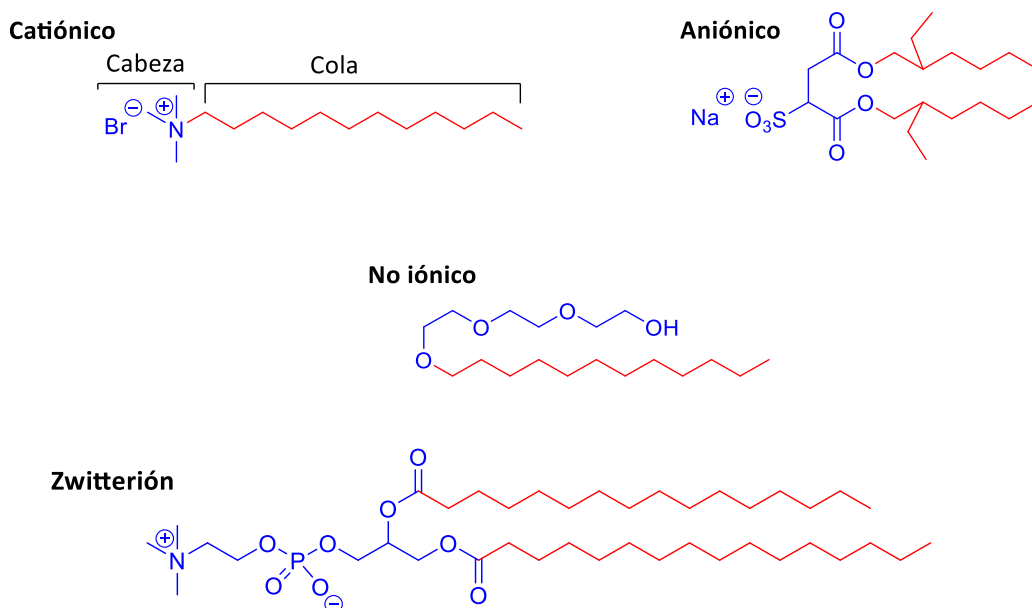


Figura 16. Ejemplo de estructuras químicas de las principales clases de tensioactivos.³⁸

Una clasificación complementaria ha surgido a la luz del desarrollo de nuevos tensioactivos, los cuales poseen más de un grupo polar y más de una cola hidrofóbica. Dependiendo de la cantidad de colas hidrofóbicas y de su disposición geométrica, se clasifican en cuatro grupos de tensioactivos (**Figura 17**).⁴⁴

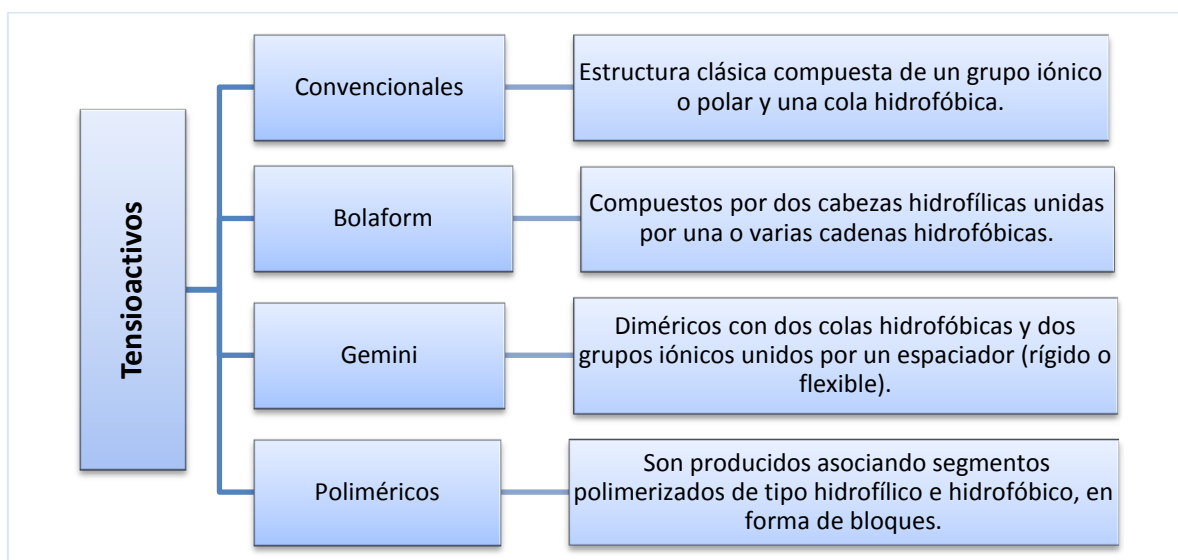


Figura 17. Clasificación de los tensioactivos según el número de cadenas hidrofóbicas y su disposición geométrica.

⁴⁴ Murguía, M.C.; Machuca, L.M.; Lurá, M.C.; Cabrera, M.I.; Grau, R.J. *J Surfact Deterg* **2008**, *11*, 223-230.

Algunos ejemplos se muestran en la **Figura 18**.

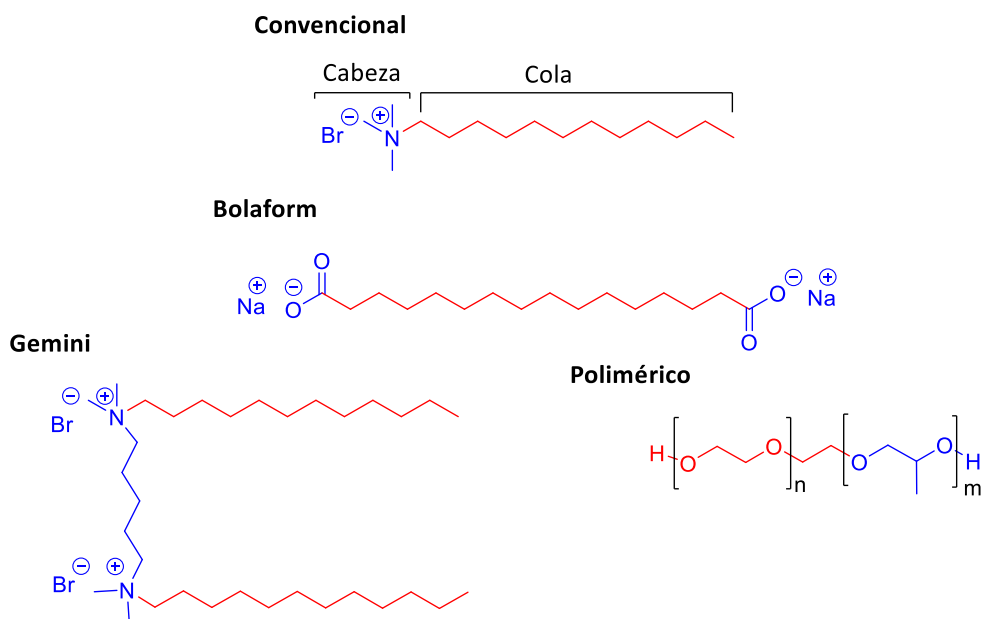


Figura 18. Ejemplo de estructuras químicas de las principales clases de tensioactivos.

La presión que hoy en día ejerce la legislación y los consumidores por generar productos químicos más amables con el medio ambiente, ha impulsado la síntesis de compuestos con elevada biodegradabilidad, alta biocompatibilidad y eficaces.⁴⁵ Los aminoácidos son una buena opción como materias primas para la preparación de este tipo de compuestos, debido a la baja toxicidad y alta biodegradabilidad, características importantes en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria.⁴⁶⁻⁵⁰

3.1.2 Tensioactivos derivados de aminoácidos

El interés en desarrollar tensioactivos derivados de aminoácidos, se remonta a 1909 cuando por primera vez, se incorporó un grupo hidrófobo en los aminoácidos glicina y

⁴⁵ Infante, M. R.; Pérez, L.; Pinazo, A.; Clapés, P.; Morán, M. C.; Angelet, M.; García, M. T.; Vinardell, M. *P. Comptes Rendus Chim.* **2004**, 7 (6-7), 583–592.

⁴⁶ Bordes, R.; Holmberg, K. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, 222, 79–91.

⁴⁷ De, S.; Malik, S.; Ghosh, A.; Saha, R.; Saha, B. *RSC Adv.* **2015**, 5, 65757–65767.

⁴⁸ Mishra, M.; Muthuprasanna, P.; Prabha, K. S.; Rani, P. S.; Babu, L.; Chandiran, I. S.; Arunachalam, G.; Shalini, S. *Int. J. PharmTech Res.* **2009**, 1 (4), 1354–1365.

⁴⁹ Pinazo, A.; Angelet, M.; Pons, R.; Lozano, M.; Infante, M. R.; Pérez, L. *Langmuir* **2009**, 25 (14), 7803–7814.

⁵⁰ Kralova, I.; Sjöblom, J. J. *Dispers. Sci. Technol.* **2009**, 30 (9), 1363–1383.

CAPÍTULO 3: INTRODUCCIÓN

alanina para obtener *N*-acilglicina y *N*-acilalanina.⁵¹ Desde entonces los tensioactivos derivados de aminoácidos han sido sujeto de diversos estudios, debido a su biocompatibilidad y a la diversidad de funcionalidades químicas que se pueden generar. Actualmente, se han sintetizado una gran variedad de nuevos tensioactivos quirales, solubles en agua, no tóxicos en administraciones vía oral, que no presentan irritación en ojos y piel, biodegradables y con un mínimo impacto como contaminante de agua. Todas estas propiedades garantizan su gran potencial para aplicaciones bioquímicas.⁵²⁻⁵⁹

Los tensioactivos derivados de aminoácidos que presentan en su estructura ésteres y amidas, presentan otros beneficios adicionales, como sus excelentes propiedades emulsificantes y antimicrobianas.^{52,60} Estos tensioactivos han sido preparados a partir de aminoácidos de carácter ácido, básico y neutro. Como material de partida en la síntesis de estos compuestos, a nivel experimental e industrial, se han usado aminoácidos como el ácido glutámico, glicina, alanina, arginina, ácido aspártico, prolina y serina.

Los aminoácidos polares (región hidrofílica) y las cadenas alifáticas (región hidrofóbica) de hasta 16 átomos de carbono, pueden ser combinados para generar tres principales estructuras anfifílicas, con elevada capacidad tensoactiva (

Figura 19):^{45,56,60}

⁵¹ Pinazo, A.; Pons, R.; Pérez, L.; Infante, M. R. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50* (9), 4805–4817.

⁵² Infante, M. R.; Pinazo, A.; Seguer, J. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **1997**, *123/124*, 49–70.

⁵³ Vives, M. A.; Macián, M.; Seguer, J.; Infante, M. R.; Vinardell, M. P. *Comp. Biochem. Physiol.-C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1997**, *118* (1), 71–74.

⁵⁴ Vinardell, M. P.; Benavides, T.; Mitjans, M.; Infante, M. R.; Clapés, P.; Clothier, R. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46* (12), 3837–3841.

⁵⁵ Pinazo, A.; Infante, M. R.; Izquierdo, P.; Solans, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, No. 7, 1535–1539.

⁵⁶ Morán, M. C.; Pinazo, A.; Pérez, L.; Clapés, P.; Angelet, M.; García, M.; Vinardell, M.; Infante, M. *Green Chem.* **2004**, *6*, 233–240.

⁵⁷ Benavides, T.; Mitjans, M.; Martínez, V.; Clapés, P.; Infante, M. R.; Clothier, R. H.; Vinardell, M. P. *Toxicology* **2004**, *197* (3), 229–237.

⁵⁸ Sanchez, L.; Mitjans, M.; Infante, M. R.; Vinardell, M. P. *Toxicol. Lett.* **2006**, *161* (1), 53–60.

⁵⁹ Martinez, V.; Corsini, E.; Mitjans, M.; Pinazo, A.; Vinardell, M. P. *Toxicol. Lett.* **2006**, *164* (3), 259–267.

⁶⁰ Pérez, L.; Pinazo, A.; Pons, R.; Infante, M. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *205*, 134–155.

CAPÍTULO 3: INTRODUCCIÓN

- Lineal o de cadena simple: Formados por un aminoácido y una región hidrófoba.
- Diméricos o gemini: Formados por dos cabezas polares (por ejemplo, dos aminoácidos) y dos regiones hidrófobas, separadas por un espaciador de diferente polaridad.
- Estructuras homólogas a los glicerolípidos: Los cuales pueden ser considerados análogos de mono, diglicéridos y fosfolípidos y están formados por una cabeza polar y una o dos regiones hidrófobas unidas a través de un esqueleto de glicerol.

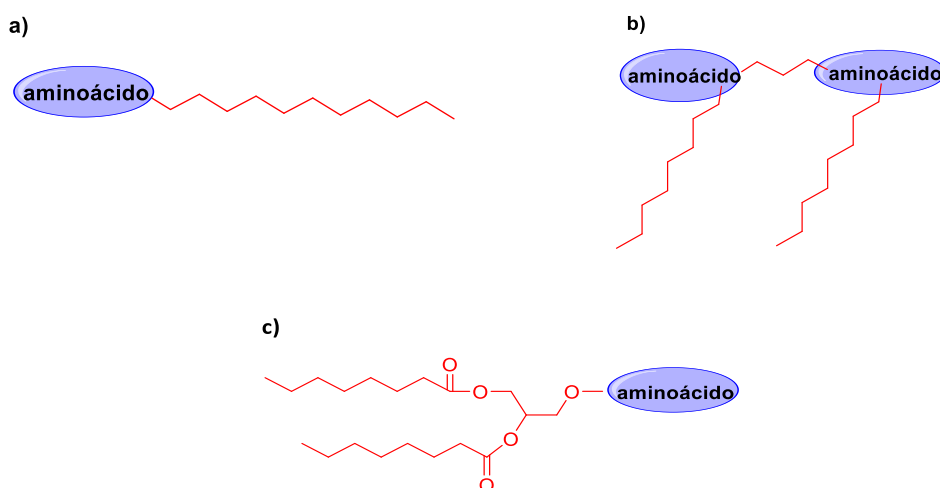


Figura 19. Estructuras de los tensioactivos derivados de aminoácidos: a) Lineales, b) Diméricos (Gemini) c) Glicerolípidos

Los aminoácidos actúan como cabeza polar o grupo hidrófilo y se pueden combinar con cadenas alifáticas de longitud variable, para generar cuatro principales estructuras anfílicas (**Figura 20**), dependiendo del tipo de enlace formado.^{60,61} El grupo carboxilo puede ser derivatizado por reacción del aminoácido con un alcohol de cadena larga obteniendo un aminoéster anfílico (Ruta 1) o con una amina de cadena larga para obtener un tensioactivo aminoamida (Ruta 2). Así mismo, el grupo α -amino se puede derivatizar, al reaccionar con un ácido de cadena larga, obteniendo un compuesto

⁶¹ Foley, P.; Kermanshahi, A.; Beach, E.S.; Zimmerman, J. B. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (4), 1499-1518.

CAPÍTULO 3: INTRODUCCIÓN

anfífilo amidoácido (Ruta 3). El grupo α -amino también puede ser alquilado con un haluro de alquilo de cadena larga, transformándola en una amina secundaria (o terciaria) (Ruta 4), obteniendo un aminoácido *N*-alquilado de cadena larga.⁵¹

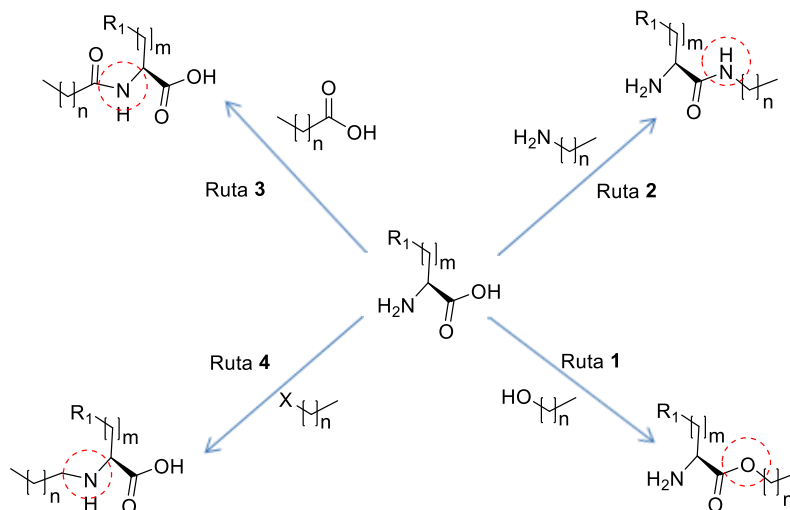


Figura 20. Diferentes combinaciones entre aminoácidos y cadenas alifáticas hidrofóbicas

Las rutas 1 y 2 dan como resultado aminas primarias. Bajo condiciones neutras y ácidas estos compuestos pueden ser protonados y actuar como tensioactivos catiónicos. La ruta 3 da como resultado la formación de tensioactivos aniónicos bajo condiciones neutras y alcalinas. La ruta 4 da lugar a tensioactivos zwitteriónicos.⁶⁰

Los tensioactivos zwitteriónicos no han sido ampliamente estudiados, como sí lo han sido los derivados de aminoácidos. Posiblemente ello es debido a la exigencia sintética de estos compuestos, en comparación con las demás rutas sintéticas. La principal característica de estos tensioactivos es que su estructura química depende del pH de la disolución en la cual está disuelto. En disoluciones con pH ácido, la molécula adquiere carga positiva y se comporta como un tensioactivo catiónico, mientras que a pH alcalino se carga negativamente y se comporta como un tensioactivo aniónico. Esta característica afecta, significativamente, su comportamiento físicoquímico, así como la generación de agregados en solución.^{40,62-64}

⁶² Ghosh, S.; Khatua, D.; Dey, J. *Langmuir* **2011**, 27, 5184-5192

⁶³ Kwaambwa, H.; Nermark, F. *Green Sustainable Chem.* **2013**, 3, 135-140

⁶⁴ Mullally, M. K.; Marangoni, D. G. *Can. J. Chem.* **2004**, 82 (7), 1223-1229.

3.1.3 Tensioactivos zwitteriónicos (anfotéricos) basados en aminoácidos

Los tensioactivos zwitteriónicos presentan grupos catiónicos y aniónicos en la cabeza polar del compuesto, de ahí que sean eléctricamente neutros. La carga catiónica es usualmente atribuida a la presencia del ión amonio cuaternario, mientras que la carga aniónica se asocia a la presencia de carboxilatos, sulfonatos o fosfatos. Los tensioactivos anfotéricos más comunes son las *N*-alquilbetaínas, las cuales derivan de trimetilglicina $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^-$ (Betaína).⁴⁰

En general, estos compuestos presentan una excelente compatibilidad con otros tensioactivos formando micelas mixtas,⁴⁰ además, son solubles en agua, no generan irritación al contacto con ojos o piel, presentan baja toxicidad, el punto isoeléctrico abarca un amplio rango, la espuma presenta alta estabilidad, así como una alta resistencia al agua dura y a la degradación debida a agentes oxidantes.^{62,64,65,66} Experimentalmente, se ha observado una alta biocompatibilidad en sangre de algunos poliuretanos funcionalizados con sulfobetainas, propiedad indispensable en la construcción de materiales biomédicos.⁶⁷

Investigaciones recientes han demostrado las fuertes correlaciones o similitudes entre el comportamiento de los tensioactivos zwitteriónicos y los catiónicos. Ghosh y colaboradores observaron que la cinética micelar para los compuestos anfotéricos y catiónicos es similar.⁶⁸ Así mismo, Mullally y colaboradores, encontraron que los sistemas micelares formados por el tensioactivo zwitteriónico *N*-dodecil-*N,N*-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (ZW3-12) se comportaban más como el bromuro de dodeciltrimetilamonio (DTAB), un tensioactivo catiónico, que como el dodecilsulfato de sodio (SDS), un tensioactivo aniónico.⁶⁴ Por otro lado, se ha observado la existencia de fuertes interacciones entre los tensioactivos aniónicos y zwitteriónicos en sistemas mixtos. Sin embargo, y a pesar de diversos estudios adelantados en este campo, el

⁶⁵ McLachlan, A. a.; Marangoni, D. G. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, 295 (1), 243–248.

⁶⁶ Kuchlyan, J.; Banik, D.; Roy, A.; Kundu, N.; Sarkar, N. *J. Phys. Chem. B* **2015**, 119 (26), 8285–8292.

⁶⁷ Yuan, J.; Lin, S.; Shen, J. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2008**, 66 (1), 90–95.

⁶⁸ Ghosh, K. K.; Pandey, A.; Roy, S. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2000**, 163 (2-3), 293–300.

CAPÍTULO 3: INTRODUCCIÓN

comportamiento de los tensioactivos zwitteriónicos en estos sistemas todavía no se ha comprendido totalmente.⁴⁶

Infante y colaboradores⁴⁵ han trabajado ampliamente en la síntesis química, caracterización y estudio de tensioactivos derivados de aminoácidos naturales, como la arginina (Arg), lisina (Lys), alanina (Ala), serina (Ser), cisteína (Cys), ácido glutámico (Glu) y aspártico (Asp). La lisina tiene gran importancia en la síntesis de tensioactivos biocompatibles y biodegradables. Además, la presencia de dos grupos amino (catiónicos), con diferente basicidad (α -amino y ϵ -amino) y un grupo carboxilo (aniónico), permite una amplia variedad de tensioactivos con diferente carácter aniónico, catiónico, no iónico y derivados zwitteriónicos, dependiendo de las modificaciones estructurales que se realicen.

Dentro de esta gran variedad de compuestos, cabe destacar los tensioactivos zwitteriónicos gemini basados en lisina. Una de las primeras referencias del uso de este aminoácido, se encuentra en la patente realizada por Raths⁶⁹ en la que las colas hidrófobas se conectan directamente a las funciones amina que a su vez están conectadas a un espaciador (**Figura 21a**). Después, se prepararon una serie de agentes tensioactivos zwitteriónicos gemini derivados,⁷⁰ introduciendo la cadena hidrofóbica al *N*(α)-acil lisina (**Figura 21b**) y al *N*(ϵ)-acil lisina (**Figura 21c**). Se han sintetizado más de 15 derivados quirales de la lisina con diferentes cadenas alquilo.

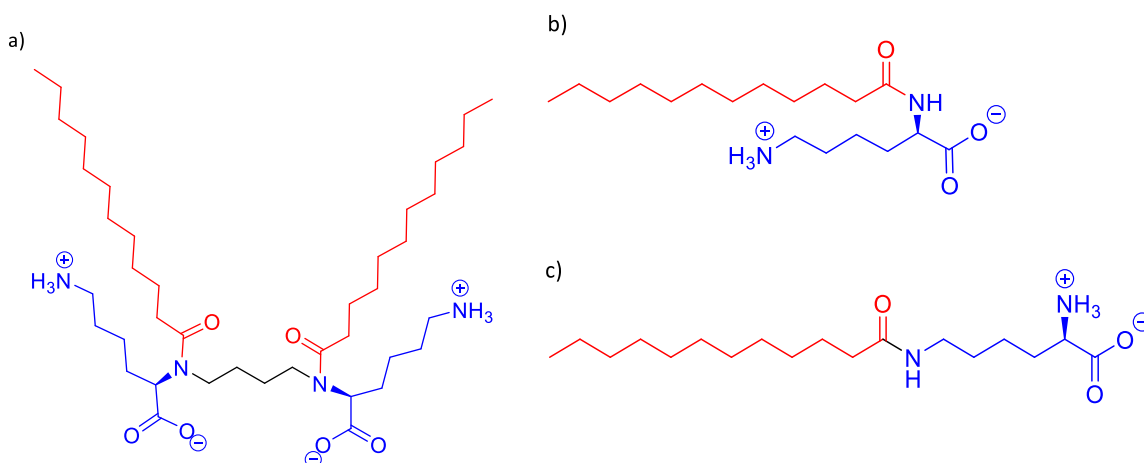


Figura 21. Tensioactivos derivados de lisina

⁶⁹ Raths, H.C. PCT Int. Appl. **1997** WO 1997046513A1.

⁷⁰ Camilleri, P.; Feiters, M.; Kirby A.J.; Ronsin, G.A.; Nolte, R.; Garcia, C. PCT Int. Appl. **2003** WO2003082809A1.

Otra tendencia en la investigación de tensioactivos es la utilización de sistemas mixtos, los cuales exhiben propiedades interfaciales y coloidales significativamente diferentes de las tensioactivos individuales. Cuando un sistema tensioactivo mixto presenta una mayor actividad superficial (CMC inferior) que la obtenida con los componentes individuales de la mezcla a la misma concentración, se considera sinérgica.^{65,71} Ghosh y colaboradores,⁶² mostraron que el sistema mixto C₁₂Gly (zwitteriónico)/SDS (aniónico) presenta un valor de CMC mucho menor que los tensioactivos individuales y además, exhibe una actividad superficial mayor al compararlo con otros tensioactivos o mezclas de tensioactivos (**Figura 22**). El sinergismo lo atribuyen a las fuertes interacciones electrostáticas entre estos dos compuestos ya que pueden formar un tensioactivo aniónico de cadena pseudo-doble.

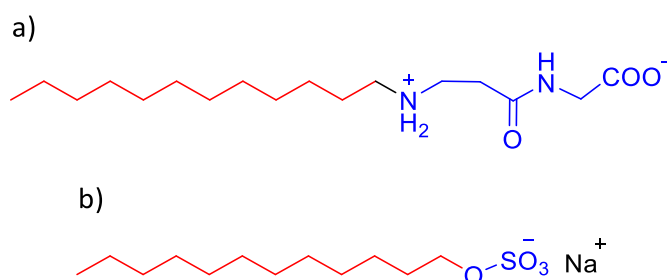


Figura 22. Estructuras química de los tensioactivos a) C₁₂Gly y b) SDS

3.1.4 El grupo amida en la agregación de los tensioactivos

Uno de los factores más influyentes de la CMC es la estructura del agente tensioactivo. Por ejemplo, la presencia de grupos funcionales de diferente polaridad, que pueden actuar como donantes y aceptores de enlaces de hidrógeno, pueden aumentar la atracción intermolecular considerablemente. El enlace amida es probablemente el mejor ejemplo de estos grupos. Éste tipo de enlace es utilizado frecuentemente como espaciador entre la cola hidrófoba y la cabeza polar.⁷²

⁷¹ Ghosh, S.; Moulik, S. J. *Colloid Interface Sci.* **1998**, 208 (2), 357–366.

⁷² Bordes, R.; Tropsch, J.; Holmberg, K. *Langmuir* **2010**, 26 (5), 3077–3083.

CAPÍTULO 3: INTRODUCCIÓN

En investigaciones recientes Hoque y colaboradores,^{73,74} observaron que los tensioactivos que tenían por lo menos un grupo amida, presentaban mejores propiedades de agregación que los tensioactivos que no presentaban grupos amida. Además, encontraron que las propiedades de agregación de los tensioactivos gemini estudiados dependen fuertemente de la posición y el número de enlaces amida y que tanto el tamaño como la forma de las micelas dependen de la longitud de la cadena de hidrocarburos y de la longitud del espaciador. Los valores de CMC de los tensioactivos gemini fue de 23 a 55 veces menor que la del correspondiente análogo monomérico (CMC = 4.4 mM) (Figura 23).

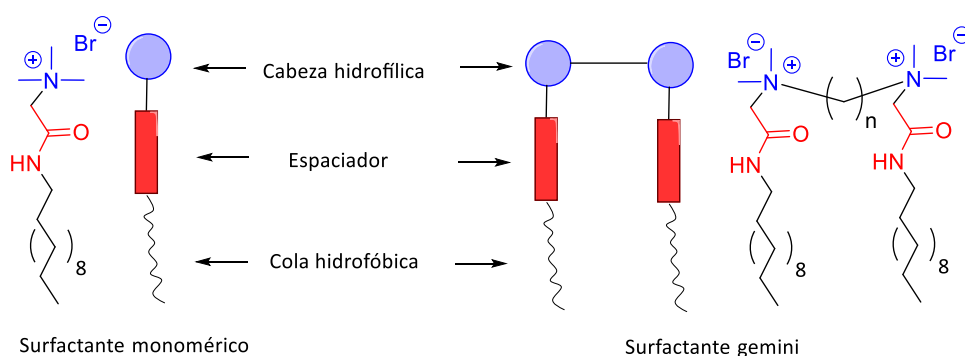


Figura 23. Estructuras químicas de tensioactivos catiónicos estudiados por Hoque y colaboradores.

Los tensioactivos zwitteriónicos gemini son una clase relativamente nueva de tensioactivos, que combinan características estructurales de tensioactivos diméricos y anfóteros.⁷⁵ Hasta el momento no hay muchos ejemplos de estos compuestos. Xie y Feng han descrito la síntesis de tensioactivos zwitteriónicos que contienen grupos carbobetaina en su estructura. Estos compuestos presentan menor CMC que los tensioactivos monoméricos correspondientes.^{76,77} El desarrollo de nuevos compuestos hetero y homogemini zwitteriónicos es una tendencia actual en el campo de los tensioactivos.⁷⁵

⁷³ Hoque, J.; Kumar, P.; Aswal, V. K.; Haldar, J. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (32), 9718–9726.

⁷⁴ Hoque, J.; Gonuguntla, S.; Yarlagadda, V.; Aswal, V. K.; Haldar, J. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (23), 11279–11288.

⁷⁵ Kwaśniewska, D.; Staszak, K.; Wieczorek, D.; Zieliński, R. *J. Surfactants Deterg.* **2015**, *18* (3), 477–486.

⁷⁶ Xie, Z.; Feng, Y. *J. Surfactants Deterg.* **2009**, *13* (1), 51–57.

⁷⁷ Xue, C.; Zhu, H.; Zhang, T.; Cao, D.; Hu, Z. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, *375* (1-3), 141–146.

3.1.5 Transferencia de la quiralidad de los aminoácidos a los agregados supramoleculares

La mayoría de las moléculas biológicamente activas, como los aminoácidos naturales y sintéticos, que contienen uno o más centros quirales, dan lugar a estereoisómeros que pueden comportarse de forma diferente según su entorno quiral. Generalmente sólo uno de los estereoisómeros presenta la actividad biológica deseada, mientras que los otros estereoisómeros pueden ser considerablemente menos activos o incluso mostrar efectos secundarios indeseables.

Varias investigaciones han demostrado que la CMC para los enantiómeros aislados es menor que la obtenida en el racemato.^{78,79,80} Un estudio más reciente propone que la interacción entre dos enantiómeros L, es por lo general más fuerte que la existente entre los componentes del racemato.⁸⁰ Asimismo, los valores de entalpía de micelización sugieren que las micelas racémicas son menos estables que las ópticamente activas, lo que podría sugerir que la formación de agregados es más fácil con un solo enantiómero que con la mezcla racémica.⁷⁸ Estudios de dicroísmo circular (DC) sugieren que los agregados micelares enantioméricamente puros formados a partir del *N*-estearoil- y *N*-palmitoilserina presentan una superficie quiral.⁸¹ Es posible que esta quiralidad supramolecular se deba a la disposición repetitiva de los planos amida en la superficie del agregado con enlaces de hidrógeno intermoleculares que determinan la estructura final.

Los agregados quirales son de gran interés en síntesis asimétrica. Por ejemplo, Roy y colaboradores llevaron a cabo la reducción asimétrica de cetonas proquirales usando NaBH₄ como agente reductor y una superficie quiral de micelas de tensioactivos catiónicos enantioméricamente puros como catalizador,⁸² y obtuvieron los respectivos alcoholes secundarios con un alto exceso enantiomérico. Los tensioactivos

⁷⁸ Miyagishi, S.; Nishida, M. *J. Colloid Interface Sci.* **1978**, *65* (2), 380–386.

⁷⁹ Takehara, M.; Yoshimura, I.; Yoshida, R. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1974**, *51* (9), 419–423.

⁸⁰ Ohta, A.; Nakashima, S.; Matsuyanagi, H.; Asakawa, T.; Miyagishi, S. *Colloid Polym. Sci.* **2003**, *282* (2), 162–169.

⁸¹ Shinitzky, M.; Haimovitz, R. *J. Am. Chem.* **1993**, *115* (9), 12545–12549.

⁸² Roy, S.; Das, D.; Dasgupta, A.; Mitra, R. N.; Das, P. K. *Langmuir* **2005**, *21* (23), 10398–10404.

CAPÍTULO 3: INTRODUCCIÓN

enantioméricamente puros y sus estructuras supramoleculares quirales también han sido utilizados en la síntesis de materiales mesoporosos quirales.^{35,83} En la mayoría de los casos, los tensioactivos se han usado como moldes para las estructuras supramoleculares. Experimentalmente, se ha preparado una amplia variedad de sílices meso-estructuradas, modificando parámetros tales como el tipo de aminoácido del grupo hidrofílico, la longitud de la cadena hidrofóbica del tensioactivo, el grado de ionización, el contraión, etc.^{35,84,85}

Otra aplicación de los tensioactivos quirales es la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), en donde se utilizan tensioactivos naturales y sintéticos. MEKC es una modalidad de cromatografía electrocinética en la que se utiliza un tensioactivo, neutro o iónico, añadido al medio de separación por encima de su CMC, para formar una pseudofase micelar estacionaria en disolución, de manera que la separación de los solutos se produce por un proceso de reparto entre la pseudofase micelar estacionaria y el tampón. En MEKC, una resolución se puede llevar a cabo de dos maneras diferentes: utilizando un tensioactivo quiral o un tensioactivo aquiral más un selector quiral, aunque en algunos casos se utiliza también un selector quiral para poder aumentar el poder de resolución.^{86,87}

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, nuestro interés se ha centrado en el estudio de tensioactivos de tipo γ -aminoácido zwitteriónicos y quirales, que presenten en su estructura el anillo del ciclobutano como plataforma quiral y como elemento de restricción conformacional.

⁸³ Gangardt, D. *Nature* **2004**, 429, 281–285.

⁸⁴ Gao, C.; Che, S. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, 20 (17), 2750–2768.

⁸⁵ Gao, C.; Sakamoto, Y.; Terasaki, O.; Sakamoto, K.; Che, S. *J. Mater. Chem.* **2007**, 17 (34), 3591-3602.

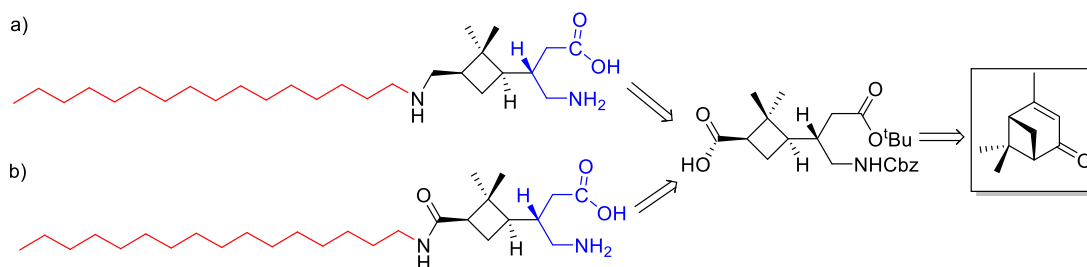
⁸⁶ Morante, S. *Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica*. 1ª edición. España: Dykinson, **2007**. ISBN: 978-84-9772-998-7

⁸⁷ Ali, S.A.; Zheng, J.; Apkarian, R.; Dublin, S.; Shamsi, S.A. *Anal Chem.* **2007**, 79 (3), 879-898.

3.2 Objetivos

Los tensioactivos derivados de aminoácidos son compuestos de elevado interés debido a su multifuncionalidad e inocuidad, como se mencionó previamente. Dada la importancia de estos compuestos en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica y con el propósito de contribuir en el desarrollo y estudio físicoquímico de nuevos tensioactivos biodegradables y de baja toxicidad, el presente objetivo consistió en realizar el diseño, síntesis estereoselectiva y caracterización físico-química de nuevos tensioactivos zwitteriónicos de tipo γ -aminoácido, sintetizados a partir de (-)-verbenona. Para conseguir el objetivo principal, se propusieron los siguientes objetivos específicos.

- ❖ Sintetizar los γ -aminoácidos a) y b), utilizando como precursor quiral (-)-verbenona y realizando la funcionalización primero con una cadena de 6 átomos de carbono y posteriormente con una cadena de 16 átomos de carbono para modular el carácter hidrofóbico del compuesto (**Esquema 9**).



Esquema 9. Retrosíntesis de los tensioactivos zwitteriónicos objetivos

- ❖ Caracterizar físicoquímicamente los tensioactivos sintetizados, utilizando las principales técnicas de identificación: tensiometría, potenciometría y SAXS.

3.3 Resultados y discusión

Los γ -aminoácidos propuestos se prepararon a través de una síntesis divergente, utilizando como intermedio común el γ -aminoácido protegido **36** 1,3-disustituido (**Esquema 11**). Este compuesto quiral clave, ha sido sintetizado previamente en nuestro laboratorio de manera enantioselectiva, utilizando como precursor quiral (-)-verbenona.¹⁹

3.3.1 Síntesis del γ -aminoácido protegido **36**

La síntesis del compuesto **36** se inició con la rotura oxidativa del doble enlace presente en la (-)-verbenona utilizando RuO_4 generado *in situ* a partir de una mezcla de RuCl_3 y NaIO_4 ,⁸⁸ esta oxidación dio como resultado el ácido (-)-*cis*-pinonónico, sin epimerización y con altos rendimientos. Una vez obtenido el derivado ciclobutánico se procedió a esterificar la función ácido carboxílico empleando condiciones suaves como CH_3I como agente metilante y Cs_2CO_3 como base, en presencia de DMF. Una vez se obtuvo el éster metílico **27**, se protegió la cetona en forma de acetal utilizando *p*-toluensulfonato de piridinio (PPTS)⁸⁹ (**Esquema 10**). Después de tener protegida la metilcetona, se redujo el éster **28** hasta el alcohol **29**. La experiencia del grupo de investigación señala que la utilización de métodos directos de reducción a aldehído (tanto del ácido como del éster) no da resultados satisfactorios. Por este motivo, fue necesario realizar la reducción del éster **28** con LiBH_4 en THF anhidro hasta alcohol, para posteriormente oxidarlo controladamente hasta el aldehído **30** utilizando dicromato de piridinio (PDC) como oxidante, que es muy poco ácido y permite detener la reacción en el aldehído.⁹⁰ Dada la inestabilidad del aldehído sintetizado, este compuesto se usa directamente en la siguiente etapa sin purificación. Para la síntesis de las olefinas **31** se utiliza la reacción de Wittig entre el aldehído **30** y el iluro $\text{Ph}_3\text{P}=\text{CHCO}_2^t\text{Bu}$ en tolueno, donde se obtuvo una mezcla de isómeros *Z/E* con un rendimiento del 45% en dos etapas.⁹¹ Para obtener la estructura del γ -aminoácido **36**,

⁸⁸ Yang, D.; Zhang, C. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (14), 4814–4818.

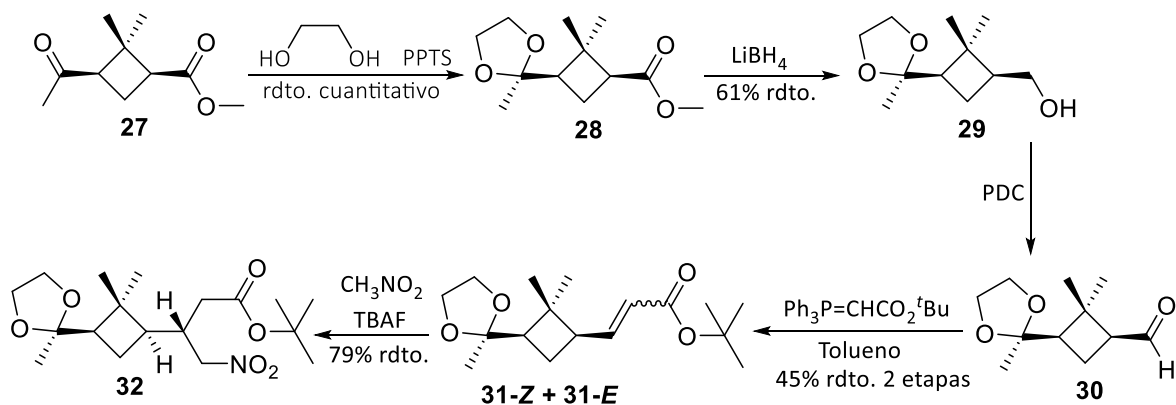
⁸⁹ Sterzycki, R. *Synthesis*, **1979**, *9*, 724–725.

⁹⁰ Moglioni, A. G.; García-Expósito, E.; Aguado, G. P.; Parella, T.; Branchadell, V.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (13), 3934–3940.

⁹¹ Moglioni, A. G.; Muray, E.; Castillo, J. A.; Álvarez-Larena A.; Moltrasio, G. Y.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2402–2410.

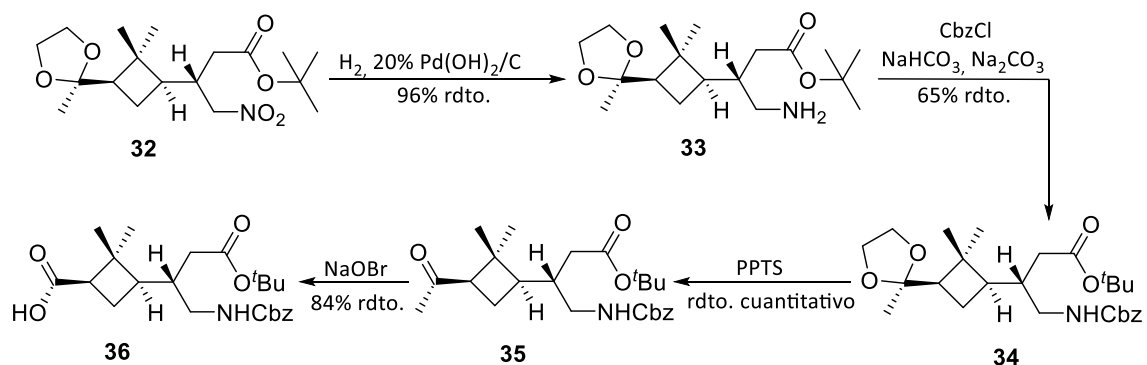
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

primero se adicionó nitrometano al doble enlace C-C, por medio de una adición conjugada de tipo Michael (**Esquema 10**), obteniendo el compuesto nitrado **32** de manera totalmente estereoselectiva.¹⁹



Esquema 10. Ruta sintética para el compuesto clave **32**

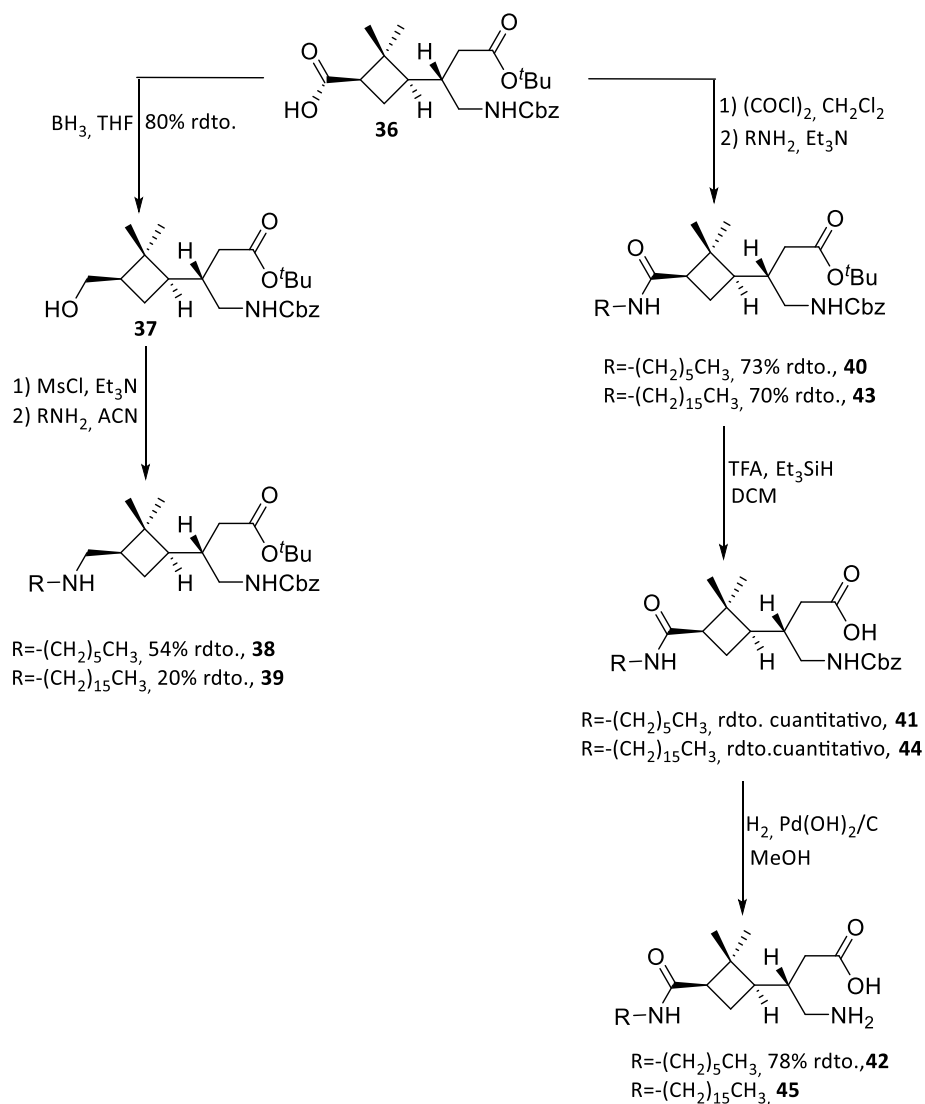
Una vez se preparó el compuesto **32** se redujo el grupo nitro a amina utilizando H_2 , en presencia de $Pd(OH)_2/C$ en MeOH. Para obtener el γ -aminoácido protegido ortogonalmente, la amina **33** se protegió en forma de carbamato de bencilo usando CbzCl y una mezcla $Na_2CO_3/NaHCO_3$. A continuación se hidrolizo el acetal **34** utilizando una mezcla de acetona/ H_2O a reflujo y PPTS como catalizador. Finalmente el compuesto **35** se oxidó en las condiciones de la degradación de Lieben, para obtener el ácido **36** con un rendimiento del 84%. Esta degradación oxidativa se llevó a cabo disolviendo la metilcetona **35** en dioxano/ H_2O y añadiendo una solución de hipobromito de sodio, generada *in situ*, a partir de una solución de NaOH con Br_2 .



Esquema 11. Ruta sintética para el compuesto clave **36**

3.3.2 Síntesis de nuevos tensioactivos derivados de amina

El γ,ϵ -aminoácido **36**, posee una plataforma ciclobutánica, sustituida a su vez por gem-dimetilo, que le proporcionan restricción conformacional a la molécula. Por otra parte, la función γ -aminoácido se encuentra protegida ortogonalmente y además presenta un centro estereogénico adicional con configuración absoluta *S* en la posición β -carbonílica. El grupo carboxilo del compuesto **36** se transformó en la función amida para los compuestos **40** y **43** y en la función amina para los compuestos **38** y **39**. Primero, se introdujo la cadena alquílica de 6 átomos de carbono (con el objetivo de comprobar la viabilidad de las rutas sintéticas propuestas) y posteriormente la de 16 átomos de carbono (para modular la hidrofobicidad de la molécula) (**Esquema 12**).

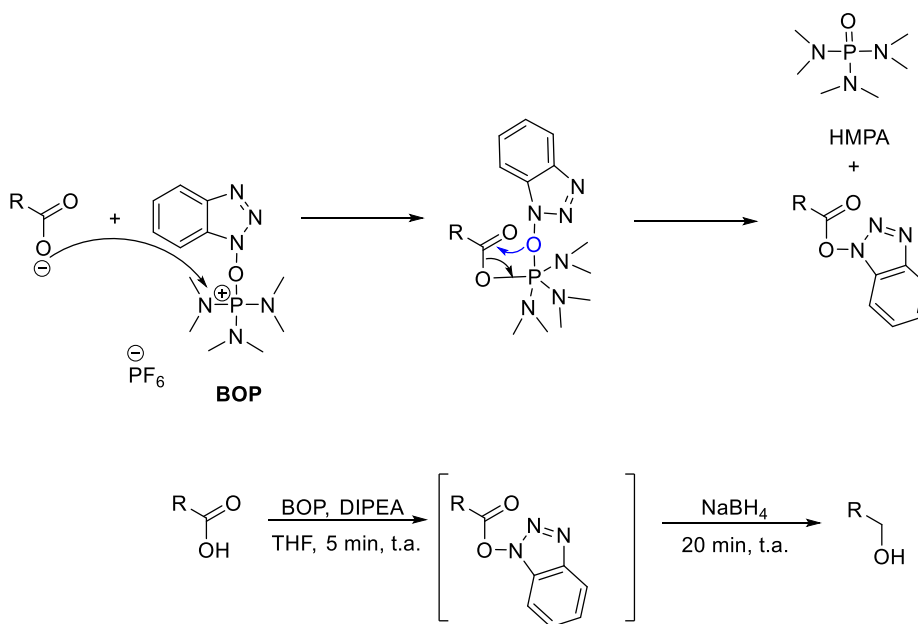


Esquema 12. Ruta sintética de los compuestos anfifílicos sintetizados.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La síntesis de la amina **38**, se inició con la reducción del ácido **36** al alcohol **37**. La presencia del éster *tert*-butílico y del carbamato de bencilo limita la utilización de agentes reductores como el hidruro de aluminio y litio (LiAlH_4). Una alternativa, consiste en transformar el ácido carboxílico en un derivado activado, que luego se pueda reducir usando un agente reductor suave, como el borohidruro de sodio (NaBH_4). Esta estrategia se ha utilizado con éxito mediante la formación de anhídridos mixtos *in situ* con diversos cloroformatos a baja temperatura, seguido por la reducción de estos derivados al alcohol deseado con NaBH_4 .⁹²⁻⁹⁵

Se propuso la utilización de diferentes agentes activadores del ácido carboxílico, como el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-*N*-oxi-tris-(dimetilamino)fosfonio (BOP) (Esquema 13),⁹⁵ el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-*N*-oxi-tri(pirrolidin)fosfonio (PyBOP) y el cloroformiato de etilo, los cuales en presencia de una base pueden convertir el carboxilato en un grupo activado, para posteriormente ser reducido con un agente reductor como el NaBH_4 .



Esquema 13. Activación del ácido carboxílico con BOP y reducción con NaBH_4

⁹² Rodríguez, M.; Heitz, A.; Martínez, J. *Tet. Lett.* **1991**, 923–926.

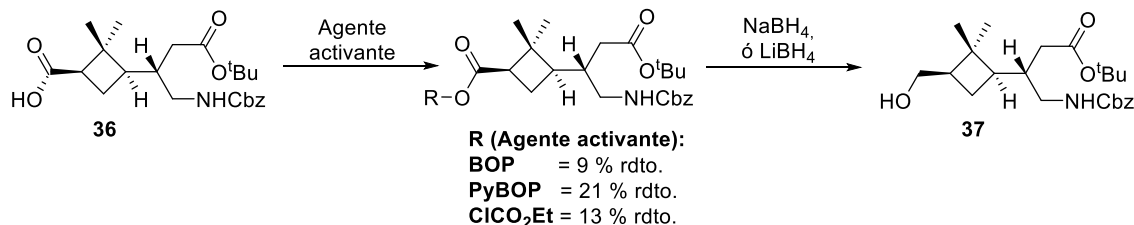
⁹³ Soai, K.; Yokoyama, S.; Mochida, K. *Synthesis* **1987**, 7, 647-648

⁹⁴ Periasamy, M.; Thirumalaikumar, M. *J. Organomet. Chem.* **2000**, 609 (1-2), 137–151.

⁹⁵ McGearry, R. P. *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39 (20), 3319–3322.

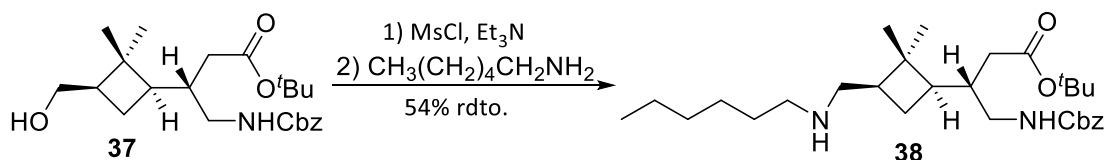
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No obstante, en nuestro caso, al activar el ácido **36**, con BOP, PyBOP y cloroformiato de etilo (ClCO_2Et), obtuvimos rendimientos muy bajos (del 9 al 21% rdto.) (**Esquema 14**).



Esquema 14. Rendimientos obtenidos en la síntesis del compuesto **37**

Por tal motivo decidimos utilizar el diborano B_2H_6 como agente reductor, obteniendo el alcohol **37** con un rendimiento del 80% en una sola etapa desde **36** (**Esquema 12**). Una vez sintetizado el compuesto **37**, se convirtió en mesilato usando cloruro de mesilo (MsCl) en presencia de Et_3N (**Esquema 15**). Este mesilato se usó directamente en la siguiente etapa sin purificación. A continuación, se sometió el mesilato a reflujo con la hexilamina en ACN para dar el γ -aminoácidos diprotectado **38** con un 54% de rendimiento para las dos etapas.

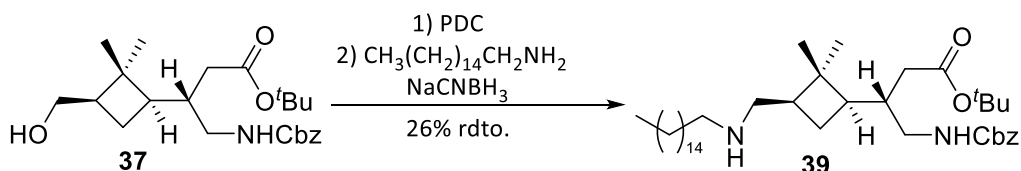


Esquema 15. Ruta sintética para el compuesto clave **38**

Una vez se obtuvo información de la viabilidad de la reacción se realizó la sustitución del mesilato, utilizando una amina de cadena carbonada larga como la hexadecilamina, con el objetivo de modificar la hidrofobicidad de la molécula. El rendimiento obtenido disminuyó considerablemente con respecto a la obtención de compuesto **38**, hasta un 20%. Posiblemente la mayor longitud de la cadena alifática juntamente con el impedimento estérico que proporciona el gem-dimetilo al anillo de ciclobutano son responsables de esta disminución del rendimiento.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por tal motivo se decidió cambiar la ruta sintética propuesta. Primero se realizó la oxidación del alcohol **37** a aldehído y posteriormente se realizó una aminación reductora. Para ello se usó como agente oxidante el dicromato de piridinio (PDC). Una vez el aldehído fue sintetizado, se utilizó sin purificación adicional en la reacción con la hexadecilamina durante 1 hora bajo atmosfera de N₂ y a continuación se redujo la imina intermedia con cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃) dando como resultado el compuesto **38** con un 26% de rendimiento (**Esquema 16**). Debido a la cantidad de producto necesario para realizar la caracterización físicoquímica y el bajo rendimiento obtenido en esta ruta sintética, no se realizó la caracterización físicoquímica del derivado **39** como tensioactivo.



Esquema 16. Ruta sintética para el compuesto objetivo **39**

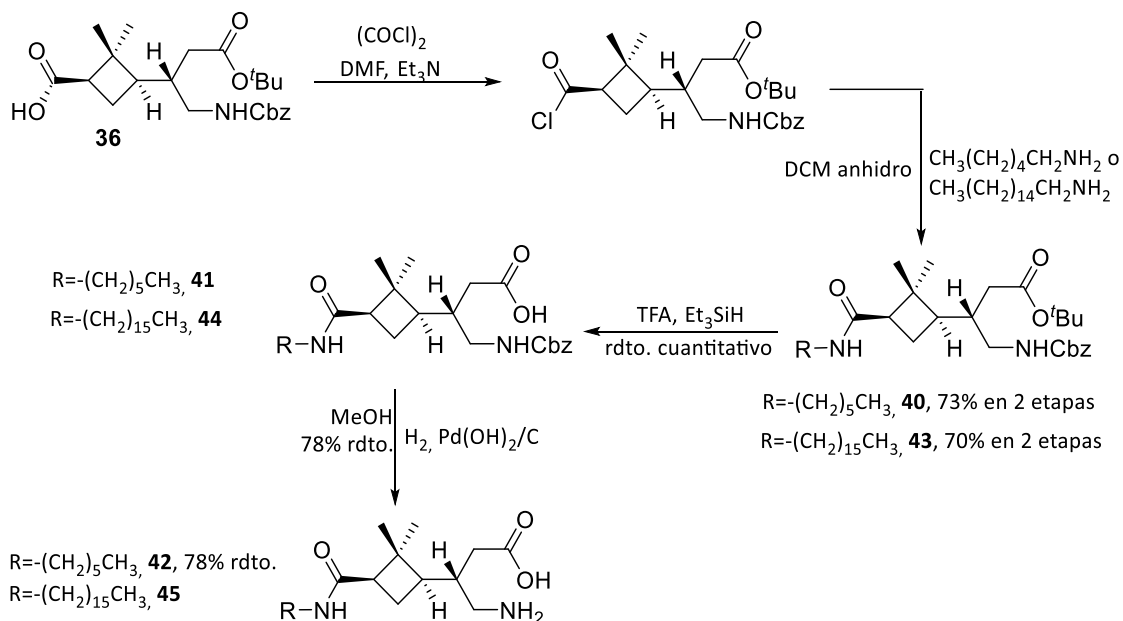
3.3.3 Síntesis del tensioactivo derivado de amida **45**

Para obtener el γ -aminoácido de cadena larga **45** (**Esquema 17**), el compuesto **36** se transformó en el derivado **42** de cadena alifática corta (6 átomos de carbono), para comprobar la viabilidad de la síntesis. Para ello, la síntesis inició con la activación del ácido carboxílico **36**, en forma de cloruro de acilo usando cloruro de oxalilo. Una vez activado el ácido, se continuó con la adición de la hexilamina,⁹⁶ para dar el compuesto **42** con un rendimiento del 73%. Se procedió con la eliminación selectiva del éster *tert*-butílico utilizando ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de trietilsilano en DCM, obteniendo el ácido **41** cuantitativamente. Finalmente, se realizó la hidrogenación catalítica del carbamato de bencilo en presencia de Pd(OH)₂/C en MeOH dando como resultado el γ -aminoácido **42** con un rendimiento del 78%. Se utilizó la misma estrategia sintética para la introducción de la cadena lateral de 16 átomos de carbono utilizando hexadecilamina. En general, los rendimientos de reacción fueron mayores

⁹⁶ Montalbetti, C. a G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, 61 (46), 10827–10852.

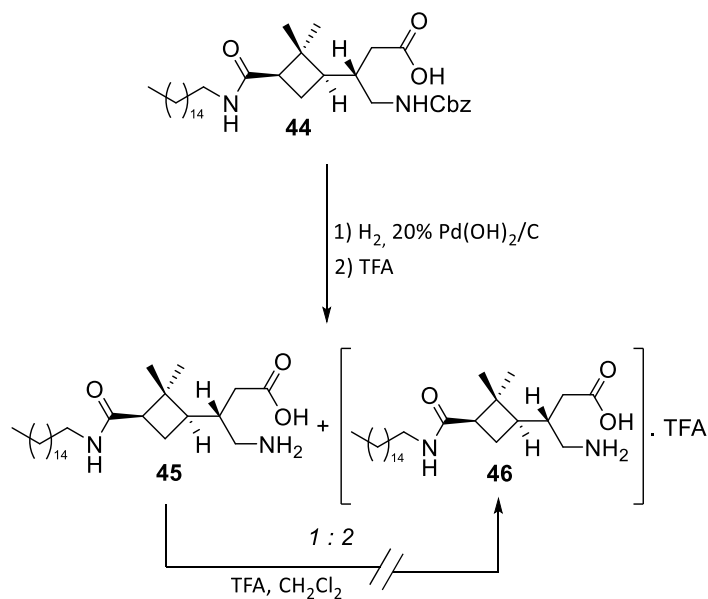
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

que en la ruta sintética hacia el tensioactivo **39**, probablemente debido a que los requerimientos estéricos de la reacción de acoplamiento son menores que los que presenta el proceso de sustitución bimolecular. La desprotección del grupo carboxilo del compuesto **43** se llevó a cabo con TFA para dar el ácido **44** con rendimiento cuantitativo. A continuación, la hidrogenólisis del carbamato de bencilo condujo a la formación del γ -aminoácido libre **45**.



Esquema 17. Ruta sintética para los compuestos **42** y **45**

La espectrometría de masas de alta resolución (positiva y negativa), así como el análisis elemental, reveló la presencia del producto **45** y la sal **46** (Esquema 18), que proviene de la desprotección del ácido **44** con TFA. Estos resultados indican que éste ácido permaneció en siguiente etapa de hidrogenación. La relación de **45/46** se calculó como 0.35:0.65. Se intentó eliminar el ácido residual liofilizando el producto, sin éxito. Cabe destacar que el peso molecular del TFA es mucho más bajo que el de **41** favoreciendo la formación de la sal incluso en presencia de pequeñas cantidades de TFA. Por otro lado, intentamos convertir la mezcla en la sal **45:46** por agitación en diclorometano en presencia de ácido trifluoroacético, pero la cantidad de **46** no incrementó, lo que sugiere que la composición corresponde a un equilibrio ácido-base difícil de desplazar (Esquema 18).



Esquema 18. Ruta sintética para el compuesto 45

3.3.4 Estudio de la mezcla 45 y 46 como posible tensioactivo

Para evaluar la solubilidad de la mezcla 45 y 46 (Figura 24) en agua, se pesó 10 mg en un vial y a continuación se adicionó lentamente y en agitación continua el volumen necesario para obtener las concentraciones molares que se indican en la **Tabla 1**. Asimismo, se evaluó su comportamiento de una manera visual. Los primeros ensayos, determinaron que una solución de 45/46 a 2.5×10^{-4} M en agua forma espuma.



Figura 24. Montaje para la evaluación de la solubilidad

Esta característica evidencia la posible actividad tensioactiva de la mezcla, ya que la formación de espuma está influenciada por la formación de micelas y por su estabilidad.^{97,98}

⁹⁷ Denkov, N. D.; Tcholakova, S.; Golemanov, K.; Ananthpadmanabhan, K. P.; Lips, A. *Soft Matter* **2009**, 5 (18), 3389.

⁹⁸ Kuliszewska, E.; Brecker, L. J. *Surfactants Deterg.* **2014**, 17 (5), 951–957.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 1. Comportamiento de solubilidad de la mezcla **45/46**

Concentración (M)	Observación
0.1	Alta viscosidad de color blanco. ¹
7.5×10^{-2}	Alta viscosidad de color blanco. ¹
5.0×10^{-2}	Solución viscosa de color blanco. ¹
1.0×10^{-2}	Solución viscosa de color blanco lechoso. ^{1,2}
7.5×10^{-3}	Solución viscosa de color blanco. ^{1,2}
5.0×10^{-3}	Disminuye la coloración blanca → Incolora
3.3×10^{-3}	Disminuye la coloración blanca → Incolora.
1.0×10^{-3}	Solución cristalina. ³
7.5×10^{-4}	Solución cristalina. ³ (Figura 25)
5.0×10^{-4}	Solución totalmente cristalina. ³
2.5×10^{-4}	Solución totalmente cristalina. ³ Al agitar se observa la formación de espuma. (Figura 26)
0.7×10^{-5}	Solución cristalina y totalmente soluble

¹ No se observan sólidos en suspensión.

² Se disuelve al calentar.

³ Se observan pocas partículas sólidas dispersas.



Figura 25. Mezcla **45/46** (7.5×10^{-4} M)



Figura 26. Mezcla **45/46** (2.5×10^{-4} M)

A continuación, se realizaron mediciones de pH de la mezcla de **45/46**. En primer lugar, se valoró 1.002 g de una solución al 0.0514 % en peso de la mezcla, con una solución de 0.0039 % en peso de NaOH (≈ 1 mM) bajo una atmósfera de nitrógeno para evitar la carbonatación. El punto de inflexión corresponde a la valoración del protón ácido carboxílico de la sal trifluoroacetato **46** (6.5×10^{-6} moles de NaOH añadido) (**Figura 27**). Teniendo en cuenta los pesos moleculares de **45** y **46**, además de la masa total de la mezcla valorada, los resultados se ajustaron a la relación molar propuesta teniendo en cuenta la información suministrada por el análisis elemental.

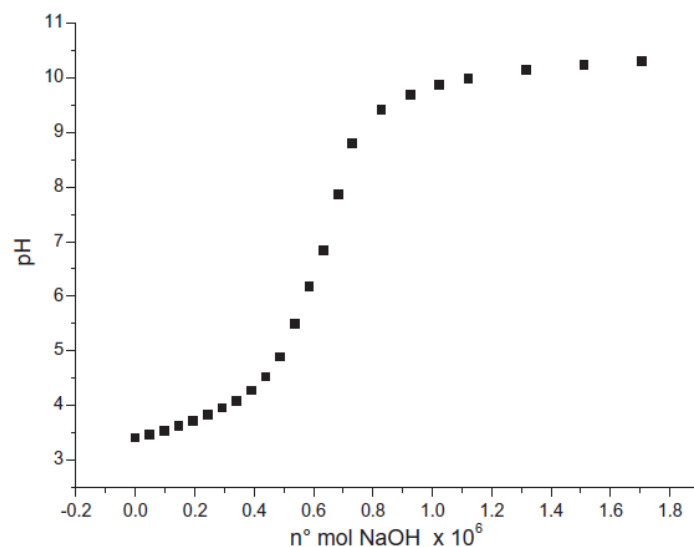


Figura 27. Valoración potenciométrica para la mezcla 45/46

3.3.4.1 Determinación de la CMC de la mezcla 45/46

La tensión superficial (γ) de la mezcla de tensioactivos (45/46) se midió utilizando el método de la gota colgante, como se describe en la sección 7.4.1.^{99,100} Este estudio se realizó en colaboración con el Doctor Ramón Pons, del Departamento de química y tecnología de tensioactivos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y el Doctor Alessandro Sorrenti de nuestro grupo de investigación. En esta técnica, se crea una gota de solución del tensioactivo en el extremo de un tubo de teflón de corte recto con un diámetro interno de 0.8 mm y diámetro externo 1.6 mm. Posteriormente se toma la imagen de la gota utilizando una cámara de video. Una vez obtenida la imagen capturada de la gota, se procede a limpiar la imagen y obtener el contorno de la misma. El contorno de la gota se toma en el punto de máxima intensidad y la tensión superficial se calcula a partir de ese contorno delineado de la gota.¹⁰¹

El método de la gota colgante permite la determinación de la tensión superficial a partir del cálculo de diversos parámetros geométricos. La forma de la gota colgante, se

⁹⁹ Anastasiadis, S.H.; Chen, J.K.; Koberstein, J.T.; Siegel, A.F.; Sohn, J. E.; Emerson, J.A. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *119* (1), 55–66.

¹⁰⁰ Pinazo, A.; Angelet, M.; Pons, R.; Lozano, M.; Infante, M. R.; Pérez, L. *Langmuir* **2009**, *25* (14), 7803–7814.

¹⁰¹ Pucci, C.; Pérez, L.; La Mesa, C.; Pons, R. *Soft Matter* **2014**, *10* (48), 9657–9667.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

especifica en términos de coordenadas cartesianas x y z como se muestra en la **Figura 28**, donde θ es el ángulo entre el eje horizontal y una tangente a la caída de perfil en la posición (x, z) . El parámetro s es la longitud de contorno a lo largo del perfil.⁹⁹

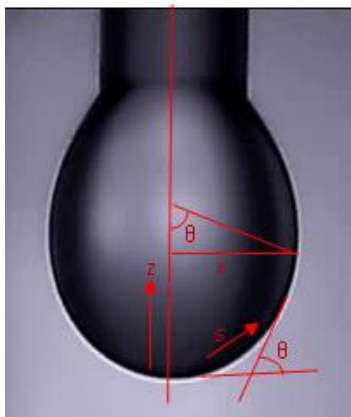


Figura 28. Parámetros de la gota colgante.

La tensión superficial se siguió en función del tiempo en minutos (min) hasta alcanzar el equilibrio (sin variación apreciable de γ). Este punto se alcanzó a las 5-6 horas de la preparación de la muestra. Se controló la temperatura y la humedad para asegurar una atmósfera saturada de humedad y evitar la evaporación. (**Figura 29**).

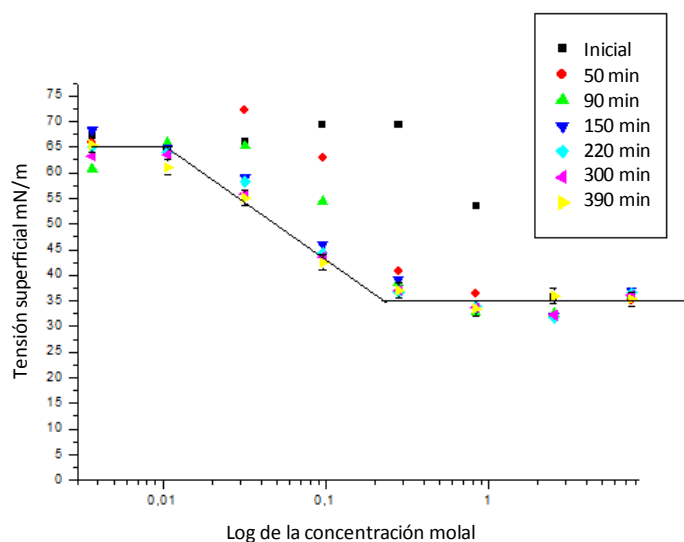


Figura 29. Equilibrio de la tensión superficial vs Log de la concentración mmolal

A medida que aumenta la concentración del soluto, éste se absorbe fuertemente en la interfase, hasta llegar a un punto CMC donde la interfase se satura de tensioactivo e inicia la formación de micelas. La tensión superficial de la mezcla **45/46** se redujo

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

progresivamente al aumentar la concentración (**Figura 30**) hasta un punto de inflexión donde continuó con un valor casi constante de $\approx 35 \text{ mN m}^{-1}$. Para determinar el valor de CMC, se realizó una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados y se identificó el punto de intersección por medio de las ecuaciones de las rectas obtenidas en la regresión lineal. El punto de inflexión se produjo a una concentración de $2.4 \times 10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$, y este valor corresponde a la CMC de la mezcla.

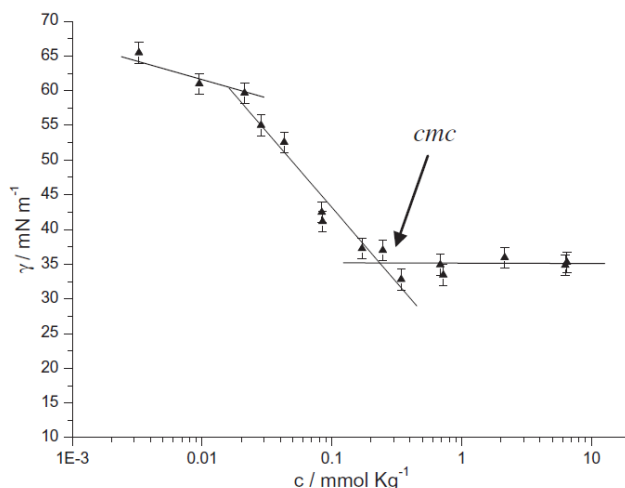


Figura 30. Gráfica de tensión superficial en función de la concentración de la mezcla **45/46** en agua a 25°C .

Las concentraciones se calcularon teniendo en cuenta la masa molar media ponderada de la mezcla 0.35: 0.65 de **45/46** ($526.83 \text{ g mol}^{-1}$). Este valor de CMC, coincide con el valor obtenido en la prueba de solubilidad, donde observamos la formación de espuma. La formación de espuma máxima se observa por lo general justo por encima del valor de CMC. La CMC de la mezcla **45/46** ($2.4 \times 10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$), se encuentra en el rango esperado para un tensioactivo iónico con una cadena de alquilo C_{16} .¹⁰² Pero parece ser alta si se compara con tensioactivos zwitteriónicos de una longitud similar. Por ejemplo, $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}^{+}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{COO}^{-}$ tiene un valor CMC de $2.2 \times 10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$ mientras $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{N}^{+}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{SO}_3^{-}$ tiene una CMC de $3.2 \times 10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$.¹⁰³

Basándose en la hidrofobicidad de la cadena alifática y teniendo en cuenta la presencia del grupo zwitteriónico como cabeza polar, se esperaría que el valor de la CMC fuera

¹⁰² Mukerjee, P.; Mysels, K. J. *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems*. National Bureau of Standards, NSRDS-NBS 36; U.S. Government Printing Office: Washington, DC, **1971**.

¹⁰³ Zajac, J.; Chorro, C.; Lindheimer, M.; Partyka, S. *Langmuir* **1997**, *13* (6), 1486–1495.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

inferior al observado experimentalmente; sin embargo hay muchos factores que podrían estar asociados al incremento del valor de la CMC.^{36,104,105} La presencia de un grupo amida eleva la hidrofilia del tensioactivo, aumentando el valor de la CMC. Así mismo, la presencia de este grupo probablemente facilita las interacciones intermoleculares entre moléculas de tensioactivo a través de enlaces de hidrógeno y la formación de agregados moleculares. Las propiedades de agregación de los tensioactivos con grupos amida dependen fuertemente de la posición y el número de éste tipo de enlaces.⁷⁴

Teniendo en cuenta el valor obtenido de CMC para nuestro tensioactivo, cabe suponer que la formación de enlaces de hidrógeno tiene un efecto menos fuerte sobre la formación de micelas que la hidrofiliencia que proporciona el grupo amida, posiblemente debido a su posición.¹⁰⁶ Debido a que el grupo amida se encuentran cerca de la región polar, las interacciones de enlaces de hidrógeno entre las moléculas de tensioactivo también pueden operar interfacialmente al adherirse a las moléculas de agua.^{73,74} Esto sugiere que el grupo amida en la mezcla **45/46**, desfavorece la rápida formación de agregados micelares. Otra explicación podría estar basada en la geometría o parámetro crítico de empaquetamiento (CPP, *Critical Packing Parameter*) ya que el grupo amida y el ciclobutano presente en el tensioactivo, aumenta la longitud de la cadena hidrófila, lo que lleva a un valor más bajo de CPP y por lo tanto a una estructura menos favorable para el empaquetamiento de monocapas en la interfase.

La geometría o parámetro crítico de empaquetamiento (CPP) de una molécula depende del área transversal de cabeza hidrófila, a_0 , el volumen ocupado por la cola hidrofóbica v (suponiendo que las cadenas hidrofóbicas son fluidas e incompresibles) y la longitud máxima efectiva de las mismas, llamada longitud crítica l_c . El nivel de agregación cuantificado por este parámetro se definiría como $CPP = v/[(a_0)(l_c)]$.⁴⁰

¹⁰⁴ Porte, G.; Poggi, Y.; Appell, J.; Maret, G. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (23), 5713–5720.

¹⁰⁵ Ray, a; Némethy, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (25), 6787–6793.

¹⁰⁶ Folmer, B. M.; Holmberg, K.; Klingskog, E. G.; Bergström, K. *J. Surfactants Deterg.* **2001**, *4* (2), 175–183.

Por otro lado, la cabeza hidrofílica voluminosa, compuesta por la función γ -aminoácido, podría también intervenir en la formación del agregado y a su vez en el aumento de la CMC esperada, debido a la dificultad del ordenamiento micelar. La presencia de una plataforma carbonada (ciclobutano) entre la cabeza polar o anfótera y la cadena hidrófoba, juega un papel importante en sus propiedades físico-químicas, ya que afecta directamente la flexibilidad del tensioactivo. Menger y colaboradores describieron como la posición de un enlace tioéter a lo largo de la cadena hidrófoba, tenía un efecto significativo en su CMC. El aumento de la CMC es más fuerte a medida que se acerca el enlace tioéter a su grupo polar.¹⁰⁷

Asimismo, teniendo en cuenta que la CMC depende del grado de hidratación y de la atracción del contraión con la micela, otro factor que influye en los resultados obtenidos es la presencia del contraión trifluoroacetato. Este ión voluminoso y poco polarizable podría desfavorecer la formación de agregados. El aumento de la repulsión electrostática con el grupo polar del tensioactivo y el aumento de la carga micelar proporcionan un aumento en el grado de ionización micelar y como consecuencia un aumento en la CMC.¹⁰⁸ Por ejemplo, Muto y colaboradores observaron que el valor de CMC aumenta linealmente al incrementar la longitud en la cadena hidrocarbonada de los contraiones de carboxilato.¹⁰⁹

3.3.4.2 Determinación del tipo de agregación para la mezcla 45/46

Para determinar el tipo de agregación que forma la mezcla **45/46** en agua, se utilizó la técnica de dispersión de Rayos X en ángulos pequeños (SAXS). Este estudio se realizó a una concentración de 19 mmol Kg⁻¹, muy por encima de la CMC. El patrón de dispersión experimental obtenido a 25 °C se muestra en la **Figura 31** como una función del módulo del vector de dispersión q . Hay un aparente incremento de la intensidad, a valores de q bajos y un salto significativos a valores intermedios.

¹⁰⁷ Menger, F. M.; Shi, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (29), 9338–9339.

¹⁰⁸ Brito, R. O.; Silva, S. G.; Fernandes, R. M. F.; Marques, E. F.; Enrique-Borges, J.; Do Vale, M. L. C. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, *86* (1), 65–70.

¹⁰⁹ Muto, S.; Shimazaki, Y.; Meguro, K. *J. Colloid Interface Sci.* **1974**, *49* (2), 173–176.

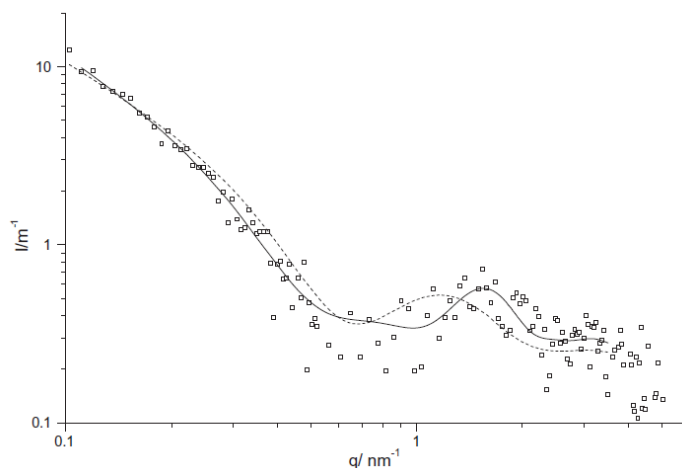
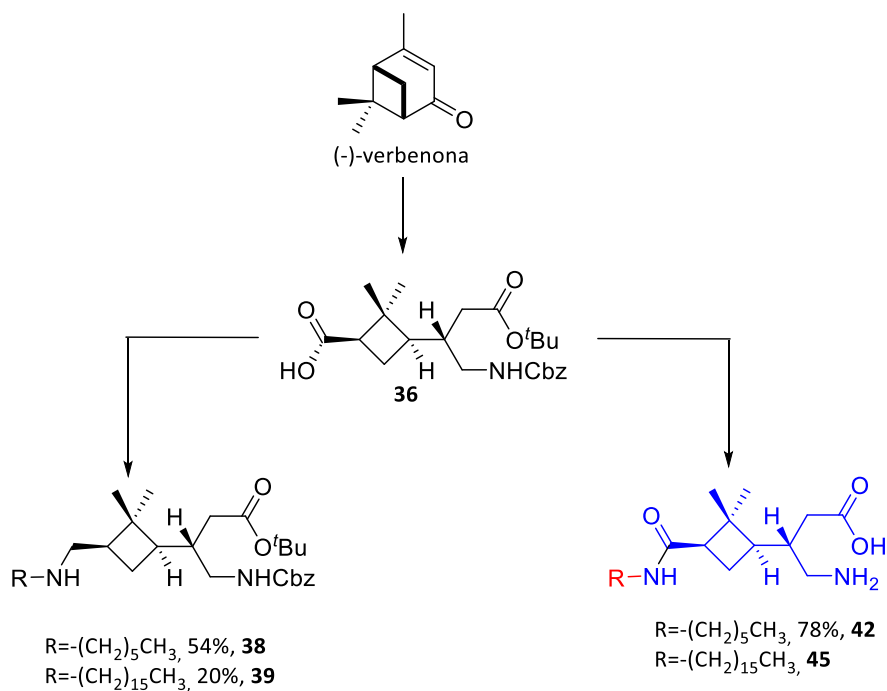


Figura 31. Diagrama de SAXS a 19 mmol kg^{-1} de **45/46** en agua a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. La línea continua corresponde al mejor resultado en forma de estructuras oligolamelares y la línea discontinua corresponde a un modelo de cinta de tipo núcleo-corteza (“core-shell”). A partir de $q=0,5 \text{ nm}^{-1}$, los puntos experimentales han sido promediados para reducir el ruido.

Se obtuvo un buen ajuste utilizando estructuras oligolamelares, con una distancia de repetición de 3.7 nm y también con láminas planas (precursores de cintas) utilizando el modelo de cinta de núcleo-corteza conocidas como “core-shell” con una longitud de repetición de 100 nm de largo y 40 nm de ancho. Ambos modelos ofrecen un ajuste similar. Estos modelos dan lugar a espesores hidrófobos similares que corresponderían a sólo 1.2 nm , lo que implica la fuerte relación de las cadenas hidrófobas y un área por molécula de 1.2 nm^2 . Éste valor de área por molécula es razonable para la cabeza polar formada por el grupo zwitteriónico y por el grupo amida. Los valores observados refuerzan la conclusión previa, sobre la participación del ciclobutano y el grupo amida en la baja hidrofobicidad del tensioactivo sintetizado.

3.4 Resumen y conclusiones

Fueron sintetizados y caracterizados por sus datos espectroscópicos y constantes físicas dos nuevos tensioactivos derivados de amida de 6 y 16 átomos de carbono. Asimismo, se llevó a cabo la síntesis enantiopura y caracterización de dos nuevos tensioactivos derivados de amina de 6 y 16 átomos de carbono protegidos ortogonalmente (**Esquema 19**).



Esquema 19. Síntesis de nuevos compuestos ciclobutánicos

La introducción de sustituyentes alquilo se logró de manera más eficiente a través de la formación de la amida. La alquilación de la amina implica un proceso S_N2, que está limitado por el fuerte impedimento estérico, que genera el grupo gem-dimetilo en el ciclobutano.

La basicidad de la amina primaria en la función γ -aminoácido, condujo a la formación inesperada de una sal de TFA obtenida conjuntamente con la amina libre, en una relación aproximada de 2:1 (**Figura 32**). Basados en los experimentos posteriores, consideramos que esta relación corresponde a un equilibrio ácido-base.

CAPÍTULO 3: RESUMEN Y CONCLUSIONES

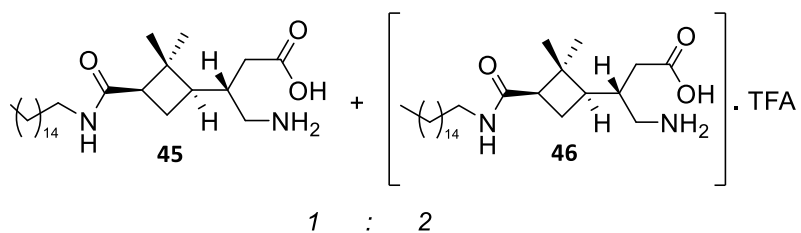


Figura 32. Mezcla de compuestos **45/46** con capacidad tensioactiva.

Los estudios de la mezcla **45/46** sugieren que se comporta como un tensioactivo eficiente, con una concentración micelar crítica (CMC) de $2.4 \times 10^{-1} \text{ mol kg}^{-1}$. A concentraciones moderadas, se ha observado la presencia de estructuras oligolamelares.

Capítulo 4

TRIAMINAS CICLOBUTÁNICAS QUIRALES Y SU CONJUGACIÓN CON Gd-DOTA, COMO POSIBLES AGENTES DE CONTRASTE (ACs) EN RESONANCIA MAGNÉTICA DE IMAGEN (RMI)

4.1 Introducción

Actualmente, el desarrollo de la medicina moderna enfoca sus esfuerzos en realizar un mejor diagnóstico, seguimiento y tratamiento de diversas enfermedades. Muchos de estos diagnósticos se realizan utilizando metodologías como imágenes de rayos X, tomografía computarizada (TC), ecografía, tomografía por emisión de fotón único (SPECT), tomografía por emisión de positrones (PET) y resonancia magnética (RM).¹¹⁰ La RM de imagen (RMI) se basa en la detección de señales de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), emitidas por los protones de los átomos de hidrógeno presentes en el agua de un tejido bajo la acción de un campo magnético.¹¹¹

La RMI presenta grandes ventajas frente a las otras técnicas de diagnóstico, ya que es un método no invasivo, que utiliza radiación electromagnética no ionizante (no presenta peligro asociado a la exposición), proporciona imágenes de alta calidad de la sección transversal del cuerpo en cualquier plano (estructuras anatómicas en 3D) y presenta buen contraste de tejidos blandos.^{112,113}

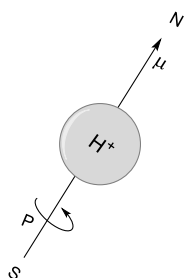


Figura 33. La rotación interna de ^1H

La obtención de imágenes por RMI se basa en los momentos magnéticos que presentan los núcleos atómicos, especialmente del hidrógeno (presentes en el agua y los lípidos). El ^1H se emplea ampliamente porque es abundante en los tejidos biológicos y es el segundo núcleo más sensible. Un protón es una partícula cargada que gira alrededor de un eje interno de rotación con un momento angular (P) y con un momento magnético (μ) y por lo tanto se puede considerar como un imán muy pequeño (**Figura 33**).

En ausencia de un fuerte campo magnético, la orientación de los momentos magnéticos de los protones es al azar (**Figura 34a**). Una vez se someten a un fuerte

¹¹⁰ Boros, E.; Gale, E. M.; Caravan, P. *Dalton Trans.* **2014**, *44*, 4804–4818.

¹¹¹ Yan, G.P.; Robinson, L.; Hogg, P. *Radiography* **2007**, *13*, e5–e19.

¹¹² Katti, G.; Ara, S. A.; Shireen, A. *Int. J. Dent. Clin.* **2011**, *3* (1), 65–70.

¹¹³ Chen, Y.; Yang, H.; Tang, W.; Cui, X.; Wang, W.; Chen, X.; Yuan, Y.; Hu, A. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (40), 5443–5449.

CAPÍTULO 4: INTRODUCCIÓN

campo magnético (B_0), los espines nucleares se alinean respecto al campo magnético externo (B_0) con un ángulo θ en paralelo (α) o en antiparalelo (β) (**Figura 34b**).

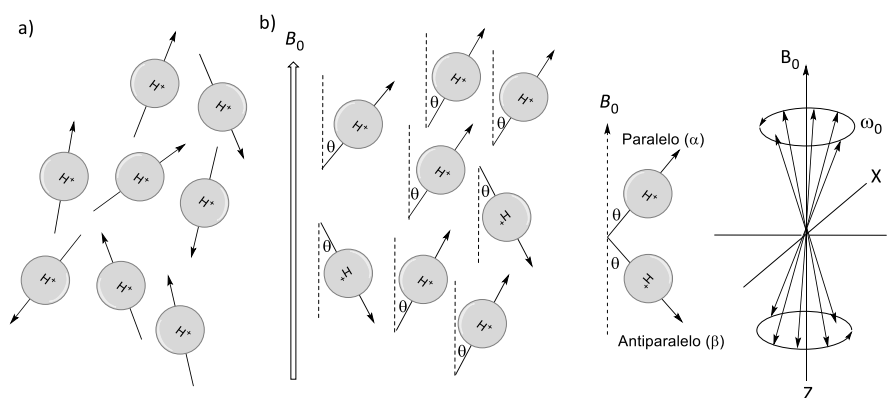


Figura 34. a) Orientación de los protones en ausencia de un campo magnético. b) Alineación de los protones con respecto al campo magnético B_0 .

La resonancia representa un estado de absorción y disipación de energía. La absorción de energía se consigue mediante la aplicación de pulsos de radiofrecuencia (RF) (**Figura 35a**), mientras que la disipación de energía es causada por procesos de relajación (**Figura 35b**). La aplicación de pulsos de radiofrecuencia resonante ($\omega_0 = \gamma\beta_0$, donde ω_0 es la frecuencia de Larmor), altera el alineamiento de los protones en ese campo magnético.¹¹⁴ Los núcleos absorben la energía electromagnética y la población de espín antiparalelo aumenta. Como resultado, la magnetización longitudinal, que es paralela al campo magnético externo, disminuye y se genera la magnetización transversal, que es perpendicular al campo (**Figura 35b**).

Cuando el pulso de RF se retira, los espines nucleares perturbados por este pulso, retornan a su estado inicial. Esta recuperación tanto a nivel longitudinal como transversal se denomina relajación. Hay dos principales procesos de relajación en RMN: La recuperación de magnetización longitudinal y la caída de la magnetización transversal. En estos procesos, T_1 (donde T es tiempo de relajación) es el tiempo requerido para que la magnetización longitudinal se recupere al 63% del valor de

¹¹⁴ Constantin, C.; Doaga, A.; Cojocariu, A.; Dumitru, I.; Caltun, O. *J. Adv. Res. Phys.* **2011**, 2 (1), 106-110.

CAPÍTULO 4: INTRODUCCIÓN

equilibrio, mientras que T_2 es el tiempo requerido para que la magnetización transversal caiga al 37% de su magnitud inicial. **Figura 36.**¹¹⁵

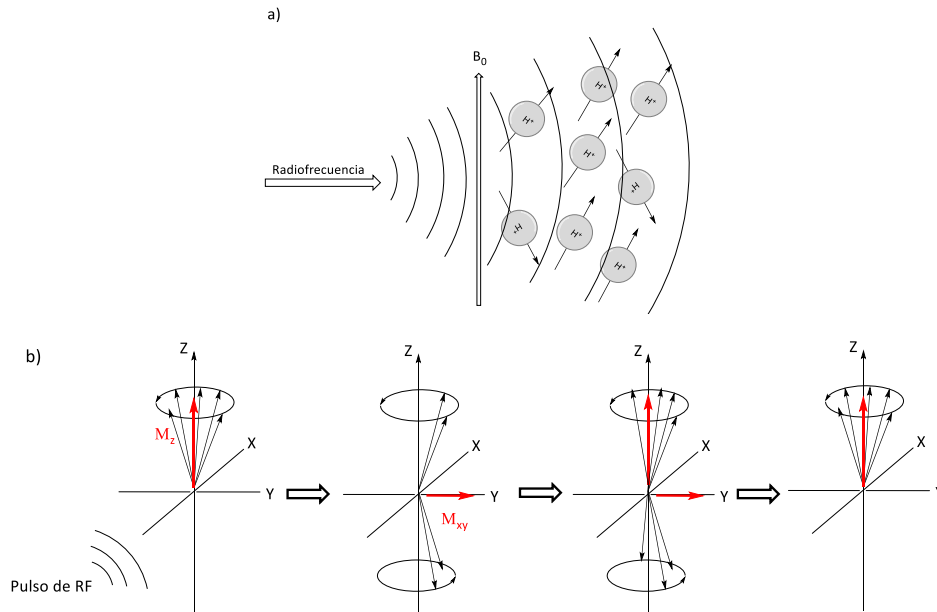


Figura 35. a) El pulso de RF altera el alineamiento de los protones. b) Los resultados de la irradiación a una RF resonante disminuye la magnetización longitudinal (M_z) y genera la magnetización transversal (M_{xy}). Los espines nucleares retornan a su estado inicial (relajación).

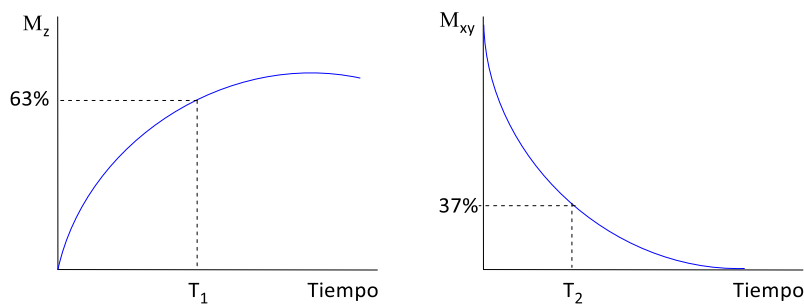


Figura 36. T_1 es el tiempo requerido para recuperar la magnetización longitudinal al 63% de su equilibrio, T_2 es el tiempo requerido para la magnetización transversal a caiga al 37% de su magnitud inicial

La intensidad de señal en RMI está relacionada con el tiempo de relajación de los protones presentes en los tejidos (T_1 y T_2). Cuando hay poco contraste entre tejidos normales y tejidos anómalos, debido a una muy pequeña variación en los tiempos de relajación, es necesario el uso de un agente de contraste.^{113,116}

¹¹⁵ Lee, N.; Hyeon, T. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (7), 2575–2589.

¹¹⁶ Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, 99 (9), 2293–2352.

4.1.1 Agentes de contraste (ACs)

Los agentes de contraste (ACs) son sustancias químicas capaces de alterar notablemente los tiempos de relajación de los protones del agua en los tejidos donde se distribuyen. Estos compuestos actúan reduciendo selectivamente los tiempos de relajación T_1 y T_2 del agua, a través de la interacción de los espines de los electrones del metal que contiene el agente de contraste y los protones del agua en el tejido. Los medios de contraste más utilizados en RMI son los que contienen iones metálicos de transición del grupo de los lantánidos tales como el manganeso, hierro y gadolinio.¹¹³ La gran mayoría de los AC- T_1 se basan en complejos de Gd(III), sin embargo, también se han utilizado otros iones paramagnéticos como el Mn(II) y Fe(III). Estos iones metálicos tienen un momento magnético alto y de ésta manera pueden disminuir los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (T_2). El presente trabajo se centrará en los ACs basados en Gd(III) como metal paramagnético.

Los ACs paramagnéticos reducen el tiempo de relajación longitudinal del agua (T_1) lo que implica un incremento en la velocidad de relajación R_1 ($1/T_1$), generando un realce del contraste de la imagen. La relación entre la concentración del agente de contraste (C) y la velocidad de relajación es la relajatividad (r_1), como más alta la relajatividad más sensible es el AC.^{115, 117, 118}

Ecuación 1.

$$r_1 = \frac{\Delta(1/T_1)}{C} = \frac{\Delta R_1}{C}$$

La relajación electrónica para Gd(III) es un fenómeno muy complejo que depende directamente del campo magnético. A campos bajos (<0.1 tesla), la relajación electrónica es muy rápida y el tiempo de correlación se convierte en la variable dominante (**Ecuación 2**), donde T_{1e} y T_{2e} es la relajación de electrones del ion y τ_R es el movimiento rotacional del complejo. Sin embargo la relajación electrónica disminuye al aumentar la intensidad de campo y en algún momento se vuelve más lento el

¹¹⁷ Aime, S.; Barge, A; Gianolio, E.; Pagliarin, R.; Silengo, L.; Tei, L. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* **2005**, No. 49, 99–121.

¹¹⁸ Caravan, P. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35 (6), 512–523.

CAPÍTULO 4: INTRODUCCIÓN

tiempo de correlación que el movimiento de rotación (**Ecuación 3**). Como resultado, el tiempo de correlación en la relajación nuclear cambia en función del campo magnético.¹¹⁸

$$\frac{1}{T_{1e}}, \frac{1}{T_{2e}} \gg \frac{1}{\tau_R}$$

Ecuación 2.

a campos magnéticos bajos ($B_0 < 0.1T$)

$$\frac{1}{T_{1e}}, \frac{1}{T_{2e}} \ll \frac{1}{\tau_R}$$


Ecuación 3.

a campos magnéticos altos ($B_0 > 1.5T$)

El uso de ACs ha dado lugar a mejoras notables en el diagnóstico médico, en términos de mayor especificidad, mejor caracterización de los tejidos, reducción de artefactos en la imagen y funcionalidad de la información. Los ACs pueden ser clasificados de acuerdo con 1) la propiedad magnética del agente, 2) la biodistribución del agente y 3) el efecto dominante del agente (intensidad de la señal) **Tabla 2**.

La clasificación más ampliamente utilizada corresponde a la realizada según el efecto dominante del agente. De esta manera, los ACs se clasifican como agentes CA-T₁ o CA-T₂. La presencia de un AC-T₁ resulta en un aumento de la señal de RM y un contraste de la imagen positiva. Los AC-T₂ destruyen la señal y el resultado es un contraste de la imagen negativa (**Tabla 2**). Ambos efectos son complementarios como se observa en la **Figura 37**.

Tabla 2. Clasificación de los ACs

Propiedades Magnéticas	Bio-distribución	Contraste de la imagen
Paramagnético	Fluido extracelular Intravascular	 <p>Positivo (AC-T₁): Predomina la reducción del tiempo de relajación longitudinal (complejos de Gd(III))</p> <p>Negativo (AC-T₂): Predomina la reducción del tiempo de relajación transversal (óxidos de hierro)</p>
Superparamagnético	Tejidos específicos	

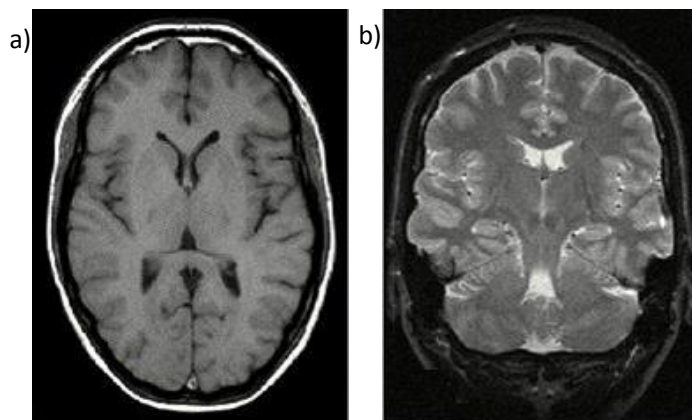


Figura 37. a) Imagen pesada en T_1 b) Imagen pesada en T_2

4.1.2 Complejos de Gd(III) como agentes de contraste (ACs)

La mayoría de los agentes de contraste- T_1 (capaces de disminuir el tiempo de relajación longitudinal de las moléculas de agua) son complejos donde el Gd(III) es coordinado por un ligando y además poseen como co-ligando el agua. Su amplio uso es debido en gran parte a que el ion Gd(III) presenta un alto momento magnético y una lenta velocidad de relajación electrónica, con una rápida cinética de intercambio.

Aunque el gadolinio libre es un metal altamente tóxico *in vivo* debido a que se distribuye en huesos e hígado produciendo rápidamente necrosis hepática, los ACs de Gd(III) se encuentran formando quelatos estables termodinámicamente. Una vez complejo el Gd(III) puede distribuirse en el organismo, garantizando requerimientos claves para su uso clínico como una buena tolerancia, seguridad, toxicidad, estabilidad, osmolalidad, viscosidad, biodistribución, eliminación y metabolismo óptimos. Estos compuestos son utilizados actualmente en clínica (**Figura 38**) forman complejos estables, por lo tanto el riesgo de disociación es bajo y el peligro de efectos tóxicos agudos asociados al suministro de estos compuestos es prácticamente inexistente.¹¹⁹

¹¹⁹ Helm, L. *Future Med. Chem.* **2010**, 2 (3), 385–396.

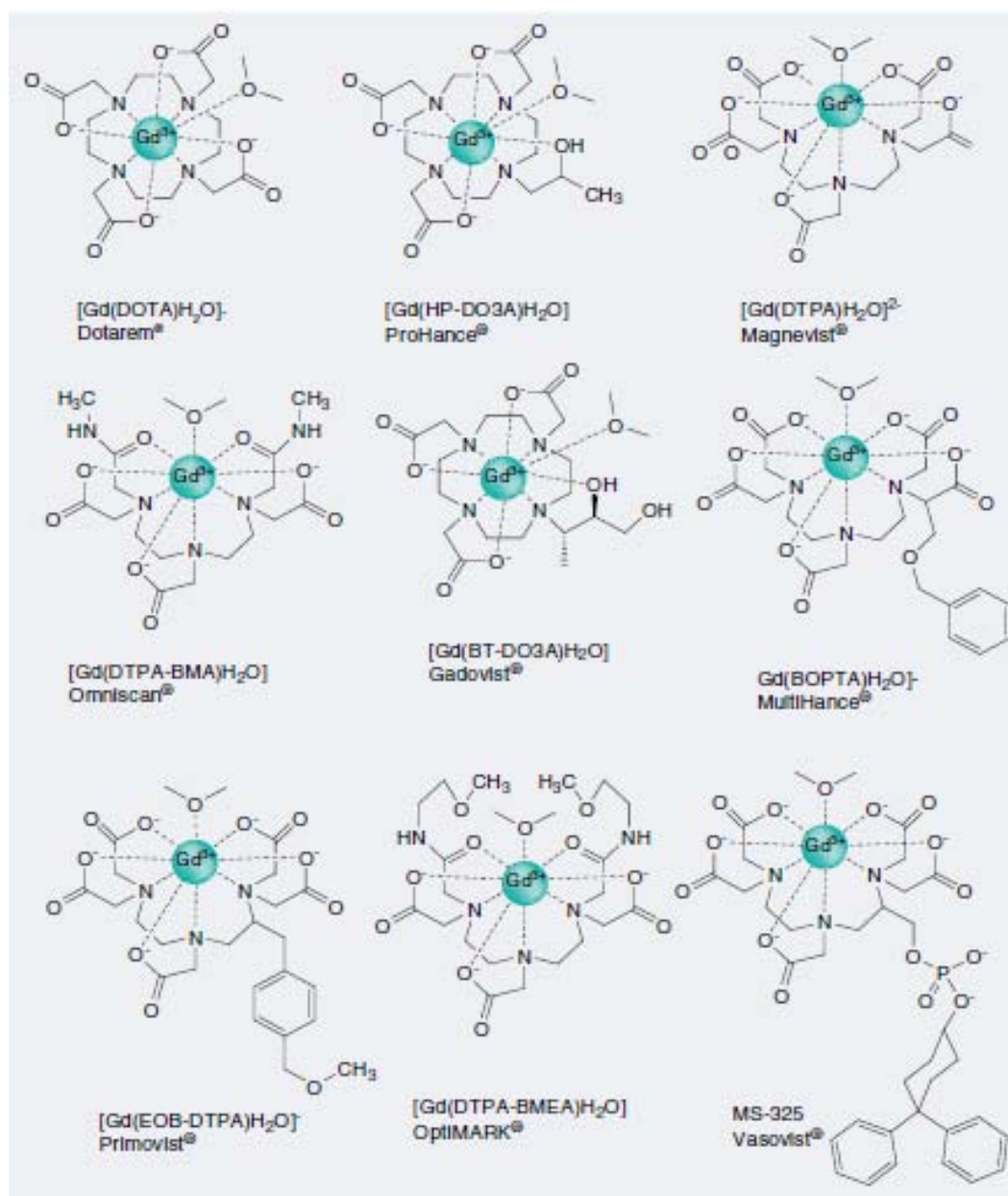


Figura 38. Agentes de contraste basados en Gd(III) para RMI utilizados en clínica. Tomado de Helm y colaboradores, 2010.¹¹⁹

Esta estabilidad se consigue utilizando poliaminocarboxilatos octadentados como quelantes, basados principalmente en dos tipos estructurales: El ácido 1,4,7,10-tetraacético-1,4,7,10-tetraazaciclododecano, macrocíclico (DOTA) y el ácido dietilentriaminopentaacético, acíclico (DTPA).¹²⁸ Estudios de estabilidad, de diversos ACs en RM *in vitro*, modelos animales y en humanos han demostrado que la inercia

CAPÍTULO 4: INTRODUCCIÓN

cinética de quelatos macrocíclicos es superior a la de las estructuras acíclicas.¹²⁰⁻¹²⁷

La eficiencia del agente de contraste (r_1) es el resultado de una compleja interacción de varios parámetros estructurales y dinámicos entre el ligando y el metal. A continuación se describen algunos parámetros que influyen en la relajación de los protones del agua cuando se aplica un campo magnético B_0 (**Figura 39**).¹²⁸⁻¹³⁰

- ❖ La hidratación: El número de moléculas de agua coordinadas directamente con el metal (q) y en la segunda esfera de coordinación (q'), así como la distancia $r_{\text{Gd-H}}$ y $r'_{\text{Gd-H}}$ para estas moléculas de agua. Cuánto más corta es la distancia entre el protón y el ion de metal paramagnético, más eficiente será la relajación.
- ❖ La cinética de intercambio de agua: El rápido movimiento del agua dentro (τ_M) y fuera de la segunda esfera (τ_M') también produce un campo fluctuante para los protones del agua, así como la rápida difusión de agua en la esfera exterior.
- ❖ El tiempo de correlación: Describe el dipolo magnético variable creado por el ion paramagnético. El ion Gd es un dipolo magnético mucho más grande denotado por el espín S. Este dipolo fluctuante puede ser el resultado de un movimiento rotacional del complejo (τ_R), la relajación de electrones del ion (T_{1e} , T_{2e}), o el intercambio rápido de agua.

¹²⁰ Morcos, S. K. *Eur. J. Radiol.* **2008**, *66* (2), 175–179.

¹²¹ Laurent, S.; Elst, L. V.; Muller, R. N. *Contrast Media Mol. Imaging* **2006**, *1* (3), 128–137.

¹²² Laurent, S.; Elst, L. V.; Henoumont, C.; Muller, R. N. *Contrast Media Mol. Imaging* **2010**, *5* (6), 305–308.

¹²³ Tweedle, M. F. *Invest. Radiol.* **1992**, *27*, S2–S6.

¹²⁴ Sieber, M. A.; Lengsfeld, P.; Frenzel, T.; Golfier, S.; Schmitt-Willich, H.; Siegmund, F.; Walter, J.; Weinmann, H.J.; Pietsch, H. *Eur. Radiol.* **2008**, *18* (10), 2164–2173.

¹²⁵ Morcos, S. K.; Thomsen, H. S. *Nephron Clin. Pract.* **2008**, *110* (1), c24–c32.

¹²⁶ Wáng, Y. J.; Schroeder, J.; Siegmund, H.; Idée, J.; Fretellier, N.; Factor, C.; Deng, M.; Kang, W.; Morcos, S. K. **2015**, *5* (4), 534–545.

¹²⁷ White, G. W.; Gibby, W. A.; Tweedle, M. F. *Invest Radiol.* **2006**, *41* (3), 272–278.

¹²⁸ Polasek, M.; Caravan, P. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (7), 4084–4096.

¹²⁹ Boros, E.; Caravan, P. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (5), 2403–2410.

¹³⁰ Terreno, E.; Castelli, D. D.; Viale, A.; Aime, S. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 3019–3042.

CAPÍTULO 4: INTRODUCCIÓN

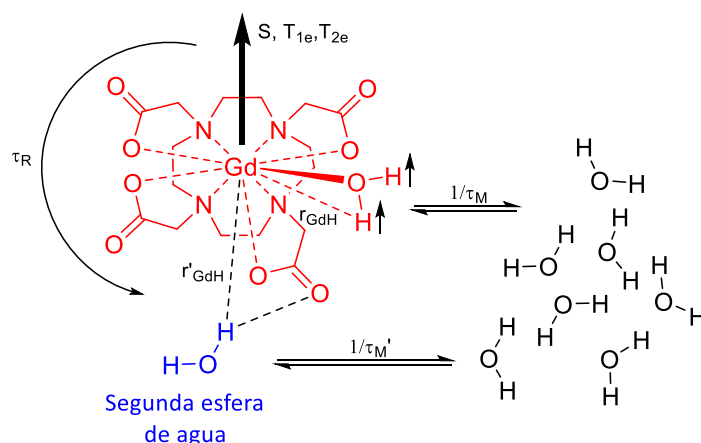


Figura 39. Factores que influyen en la relajación del agua. El complejo tiene una esfera interior rodeada de átomos de nitrógeno y oxígeno del ligando DOTA y una molécula de agua coordinada. Hay una segunda esfera de hidratación con distancia r'_{GdH} y las moléculas de agua de ambas esferas están en intercambio con más moléculas de agua a velocidades de $1/\tau_M$ y $1/\tau_M'$ para la primera y segunda esfera respectivamente.

Los ligandos octadentados derivados del ácido 1,4,7-triacético-1,4,7,10-tetraazaciclododecano (DO3A **Figura 40a**) proporcionan quelatos de Gd con una alta inercia cinética y se recomiendan para aplicaciones *in vivo*.¹²⁸ Sin embargo, los quelatos derivados de DOTA (**Figura 40b**) presentan una mayor estabilidad termodinámica e inercia cinética que estos quelatos, lo cual lo convierten en un buen candidato para direccionar posibles modificaciones que contribuyan a mejorar la eficiencia de los ACs.

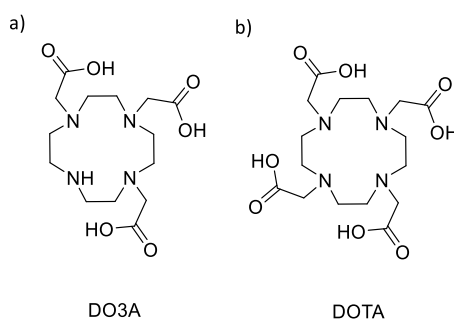


Figura 40. Estructura química de DO3A y DOTA

El primer agente de contraste macrocíclico aprobado para uso comercial en RM (en Europa) fue $[Gd(DOTA)(H_2O)]^-$. La rigidez y el plegamiento proporcionado por el anillo macrocíclico, así como la buena correspondencia entre la cavidad macrocíclica y radio iónico del Gd(III), conducen a la formación de un complejo de Gd(III) altamente

CAPÍTULO 4: INTRODUCCIÓN

estable, que presenta una constante de formación termodinámica (K_f) de $10^{25.3}$. La mayoría de los compuestos derivados de DOTA, se han obtenido mediante la derivatización de uno de los grupos carboxilo y la formación de un enlace amida. Éstos complejos presentan una excelente inercia cinética y, al mismo tiempo, los valores de K_f son similares a los de los complejos de DOTA.¹³¹ No disminuyen como en el caso de los derivados de GdDO3A.¹³²

Las propiedades de los quelatos de gadolinio están regidas por el número, carácter y disposición espacial de los átomos donadores ligados a él. Por lo tanto, es posible mejorar las relajatividades de los ACs que se utilizan actualmente en clínica, transformando el ambiente estérico alrededor del ion Gd(III) y, a su vez, optimizando variables como τ_M y τ_R .

El aumento de τ_R de un rango de 50-90 picosegundos (ps) a cientos de ps, podría contribuir significativamente a mejorar el contraste de la zona estudiada. Esta variable puede ser optimizada mediante la modificación de los grupos donantes en el ligando.^{133,134,135} Por otro lado, la dinámica rotacional, puede ser modulada modificando el tamaño total de la molécula y ajustando la unión del quelato a moléculas de tamaño apropiado. Por ejemplo, la formación de macromoléculas, tales como dendrímeros, polímeros lineales o proteínas, podrían retardar eficazmente el movimiento de rotación del complejo y al mismo tiempo aumentar τ_R .¹³⁶⁻¹³⁸

Caravan y colaboradores,¹³⁹ estudiaron la interacción del intercambio de agua y el

¹³¹ Jurkin, D.; Gildehaus, F. J.; Wierczinski, B. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2009**, *282* (1), 293–298.

¹³² Aime, S.; Anelli, P. L.; Botta, M.; Fedeli, F.; Grandi, M.; Paoli, P.; Uggeri, F. *Inorg. Chem.* **1992**, *31* (1), 2421–2428.

¹³³ Ruloff, R.; Tóth, E.; Scopelliti, R.; Tripier, R.; Handel, H.; Merbach, A. E. *Chem. Commun.* **2002**, 2630–2631.

¹³⁴ Helm, L.; Merbach, A. E. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (6), 1923–1960.

¹³⁵ Dumas, S.; Jacques, V.; Sun, W.-C.; Troughton, J. S.; Welch, J. T.; Chasse, J. M.; Schmitt-Willich, H.; Caravan, P. *Invest. Radiol.* **2010**, *45* (10), 600–612.

¹³⁶ Kobayashi, H.; Kawamoto, S.; Jo, S. K.; Bryant, H. L.; Brechbiel, M. W.; Star, R. A. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14* (2), 388–394.

¹³⁷ Aime, S.; Barge, A.; Gianolio, E.; Pagliarin, R.; Silengo, L.; Tei, L. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* **2005**, No. 49, 99–121.

¹³⁸ Deal, K. A.; Motekaitis, R. J.; Martell, A. E.; Welch, M. J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (16), 3096–3106.

¹³⁹ Caravan, P.; Farrar, C. T.; Frullano, L.; Uppal, R. *Contrast Media Mol. Imaging.* **2009**, *4* (2), 89–100.

CAPÍTULO 4: INTRODUCCIÓN

tiempo de correlación rotacional para ACs- T_1 basados en Gd, para campos magnéticos que van desde 0.47 hasta 9.4 T. Los resultados obtenidos, muestran intervalos óptimos de $5 \text{ ns} < \tau_m < 25 \text{ ns}$ y $0.5 \text{ ns} < \tau_R < 2 \text{ ns}$ para que los ACs exhiban altas capacidades de relajación r_1 .

Uno de los principales retos en el desarrollo de ACs eficientes es el control sobre la dinámica de rotación. Caravan y colaboradores¹²⁸ señalaron que el aumento de la rigidez del complejo contribuye al incremento de la capacidad de relajación (relajatividad). Además, proponen que el movimiento del quelato está dominado por la rotación de la molécula entera, por tanto, la rotación local del quelato se debe restringir. Sin embargo, no todos los requisitos para optimizar los ACs a bajos campos magnéticos pueden ser aplicados para mejorar la relajatividad de los ACs a campos magnéticos altos.¹³⁹

Parker y colaboradores,¹⁴⁰ demostraron que el efecto de rotación se puede modular mediante el control del tamaño de los sustituyentes hidrófilos, como se muestra en la **Figura 41**.

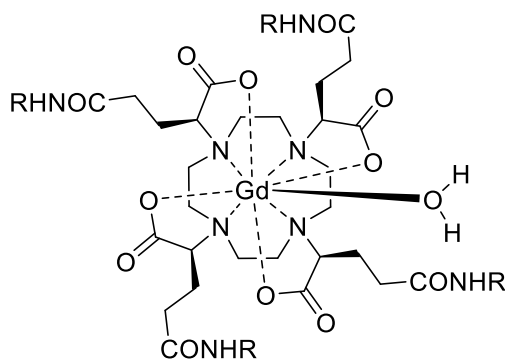


Figura 41. Complejos de Gd-DOTA estudiados por Parker y colaboradores.¹⁴⁰

Otro enfoque para controlar la flexibilidad de rotación, es la descrita por Jacques y Desreux,¹⁴¹ donde proponen unir covalentemente ligandos rígidos bidentados o tridentados a complejos de gadolinio y posteriormente a un metal de transición, con

¹⁴⁰ Fulton, D. A.; O'Halloran, M.; Parker, D.; Senanayake, K.; Botta, M.; Aime, S. *Chem. Commun.* **2005**, 474-476.

¹⁴¹ Jacques, V.; Desreux, J. F. *Top. Curr. Chem.* **2002**, 221, 123-164.

CAPÍTULO 4: INTRODUCCIÓN

el propósito de formar complejos de gadolinio rígidos y compactos.¹⁴² Estos compuestos proporcionaron una relajatividad de $12.2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por ion de Gd(III) a 20 MHz y 37°C , valor mayor que el obtenido para $\text{Gd}(\text{phen})\text{DOTA}^-$ ($3.7 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Figura 42.

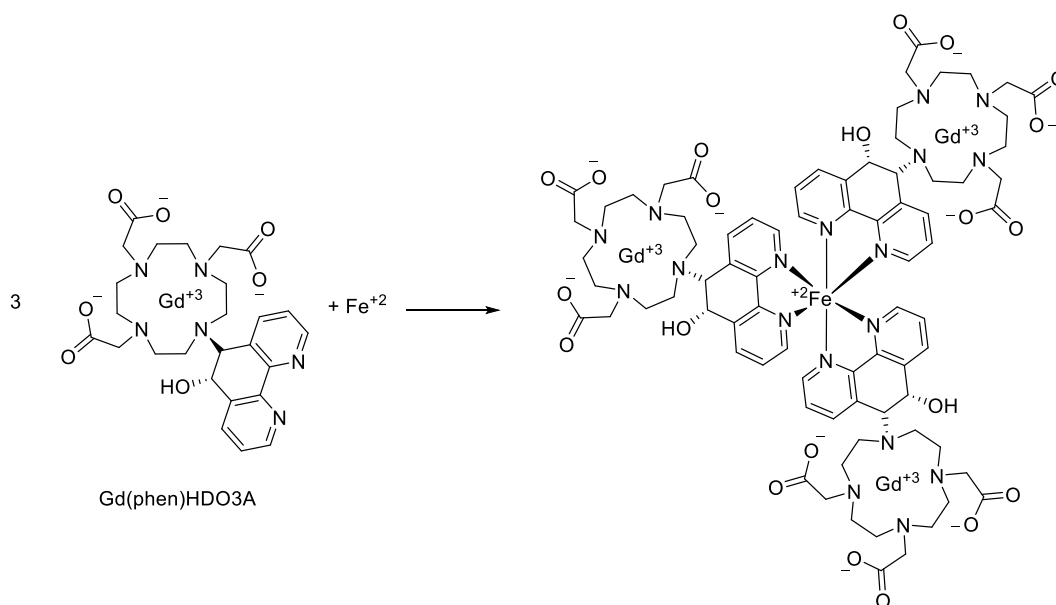


Figura 42. Complejos de Gd(III) rígidos propuestos por Jacques y Desreux

Por otro lado, Caravan y colaboradores,¹²⁸ proponen diversas modificaciones para controlar la dinámica rotacional de estos complejos. Dentro de estas modificaciones, plantean la posibilidad de introducir un grupo funcional o plataforma molecular adicional, en un sitio de conjugación de DOTA o DO3A. Dichas modificaciones pueden realizarse directamente sobre el macrociclo DOTA, o en una ramificación del mismo. Sin embargo, por razones de síntesis, en ocasiones, se utilizan espaciadores largos y esto se traduce en una relativa flexibilidad y por lo tanto una menor relajatividad (**Figura 43a**). Una alternativa para superar la limitación que presenta la flexibilidad del espaciador es utilizar una estrategia de "doble anclaje" (**Figura 43b**) con un ligando especial que permita dos puntos de unión y que evite que el quelato gire independiente de la molécula entera. Otra alternativa consiste en utilizar un espaciador muy corto para minimizar el movimiento interno. Por ejemplo, un grupo ácido carboxílico de DOTA puede ser acoplado directamente a una amina para formar

¹⁴² Comblin, V.; Gilsoul, D.; Hermann, M.; Humblet, V.; Jacques, V.; Mesbahi, M.; Sauvage, C.; Desreux, J. *F. Coord. Chem. Rev.* **1999**, 185-186, 451-470.

4.1.3 Agentes de contraste en RMI a altos campos

La evolución de la técnica de RMI se ha caracterizado por el continuo aumento de la fuerza del campo magnético para su uso en clínica. La intensidad del campo magnético más utilizado en pacientes es de 1.5 Tesla (T), sin embargo, actualmente hay un gran interés en el uso de escáneres con intensidades superiores y este tipo de equipos ya están disponibles en el mercado. Los escáneres para animales pequeños operan casi exclusivamente en las intensidades de 4.7 T e intensidades superiores.

A pesar de no ser utilizados ampliamente en clínica, los campos altos o ultra altos (7 T) en RMI parecen ser bien tolerados tanto en personas sanas, como en pacientes con enfermedades conocidas. Por ejemplo, enfermedades como la esclerosis múltiple, enfermedades cerebrovasculares, tumores cerebrales y enfermedades degenerativas como la demencia, el Alzheimer y el Parkinson han sido estudiadas con éxito utilizando RMI de 7 T.^{144,145} Las principales ventajas de utilizar campos altos son el aumento de la relación señal-ruido, lo que permite una mayor resolución espacial y reducción del tiempo de adquisición,¹⁴⁶ así como la obtención de información fisiopatológica adicional que en campos inferiores no sería observada fácilmente.¹⁴⁷ Como se mencionó al inicio del capítulo, la relajación transversal (T_1) y longitudinal (T_2) es dependiente del campo magnético (B_0) y usualmente la relajación longitudinal disminuye cuando aumenta B_0 .^{118,139} No obstante, existen ACs comerciales como el Gd-DTPA cuya capacidad de relajación es bastante independiente del campo magnético.¹⁴⁸

La mayoría de los agentes de contraste aprobados en clínica presentan relajatividades (r_1) bajas, lo que les hacen eficaces sólo a concentraciones relativamente altas ($\geq 0,1$ mM).¹¹⁸ Por tal razón, actualmente, existe un amplio campo de investigación enfocado

¹⁴⁴ Rommer, P. S.; Wiest, G.; Kronnerwetter, C.; Zach, H.; Loader, B.; Elwischger, K.; Trattnig, S. *Front. Neuroanat.* **2015**, *9* (June), 1–6.

¹⁴⁵ Kerchner, G. A. *J. Alzheimers Dis.* **2011**, *26*, 91-95.

¹⁴⁶ Rooney, W. D.; Johnson, G.; Li, X.; Cohen, E. R.; Kim, S.-G.; Ugurbil, K.; Springer, C. S. *Magn. Reson. Med.* **2007**, *57* (2), 308–318.

¹⁴⁷ Van der Kolk, A. G.; Hendrikse, J.; Zwanenburg, J. J. M.; Visser, F.; Luijten, P. R. *Eur. J. Radiol.* **2013**, *82* (5), 708–718.

¹⁴⁸ Rohrer, M.; Bauer, H.; Mintorovitch, J.; Requardt, M.; Weinmann, H.-J. *Invest. Radiol.* **2005**, *40* (11), 715–724.

CAPÍTULO 4: INTRODUCCIÓN

a aumentar la capacidad de relajación de los ACs.^{129,149-152} Sin embargo el número de parámetros que influyen para obtener una alta relajatividad en clínica crece al aumentar el campo magnético.^{129,139} En el diseño de ACs con altas r_1 en campos magnéticos altos, es necesario controlar y optimizar τ_R . Boros y colaboradores, concluyeron que la fijación rígida del correspondiente complejo de Gd a una plataforma molecular de tamaño apropiado proporcionaría complejos metálicos paramagnéticos con un buen perfil, para ser usados en RMI en campos magnéticos altos.¹²⁹

La resonancia magnética de imagen (RMI) ha revolucionado la medicina, proporcionando una técnica no invasiva con grandes ventajas frente a otras técnicas de diagnóstico. No obstante, el mejoramiento de esta técnica incluye la búsqueda de nuevos compuestos, que contribuyan a optimizar la diferenciación de tejidos anómalos, con el fin de llevar a cabo un mejor diagnóstico, seguimiento y tratamiento de diversas enfermedades. La optimización de la eficiencia, sensibilidad y selectividad de los ACs, está basada en el ajuste de parámetros que influyen directamente en r_1 , como por ejemplo la hidratación (q), la cinética de intercambio de agua (τ_M) y el movimiento de rotación del complejo (τ_R).^{130, 129}

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, nuestro interés se ha centrado en el estudio de complejos derivados de Gd-DOTA acoplados a triaminas quirales funcionalizadas, que presentan en su estructura, el anillo del ciclobutano como plataforma quiral y como elemento de restricción conformacional.

¹⁴⁹ Mastarone, D. J.; Harrison, V. S. R.; Eckermann, A. L.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (14), 5329–5337.

¹⁵⁰ Kielar, F.; Tei, L.; Terreno, E.; Botta, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (23), 7836–7837.

¹⁵¹ Costa, J.; Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A.E. *Inorg. Chem.* **2005**, *44* (13), 4747–4755.

¹⁵² Garimella, P. D.; Datta, A.; Romanini, D. W.; Raymond, K. N.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (37), 14704–14709.

4.2 Objetivos

Considerando la amplia experiencia de nuestro grupo de investigación en el uso de derivados ciclobutánicos con funciones amina para la síntesis de compuestos con potencial interés,^{3,20,32,33} así como la gran importancia de las funciones amina en la química sintética,¹⁵³⁻¹⁵⁷ en el presente capítulo se propone realizar la síntesis estereoselectiva de triaminas ciclobutánicas quirales con dos y tres centros estereogénicos. Estas triaminas se conjugaran a Gd-DOTA y se estudiará la influencia de la sustitución de la triamina y de la quiralidad en su comportamiento en resonancia magnética de imagen.

Para desarrollar el objetivo principal, se propusieron los siguientes objetivos específicos.

- ❖ Sintetizar y caracterizar cuatro triaminas ciclobutánicas enantiopuras (**Esquema 20**), utilizando como precursor quiral (–)-verbenona, introduciendo diversas funcionalizaciones para influir en la densidad electrónica y en la polaridad de cada compuesto.
- ❖ Sintetizar y caracterizar cuatro complejos Gd-DOTA-ciclobutano (**Esquema 21**), a partir de las triaminas ciclobutánicas previamente preparadas.
- ❖ Determinar el tiempo de relajación longitudinal T_1 de los protones del agua para determinar la relajatividad (r_1) a diferentes concentraciones, para los cuatro complejos sintetizados.

¹⁵³ Hems, W. P.; Groarke, M.; Zanotti-Gerosa, A.; Grasa, G. A.; *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1340 – 1347.

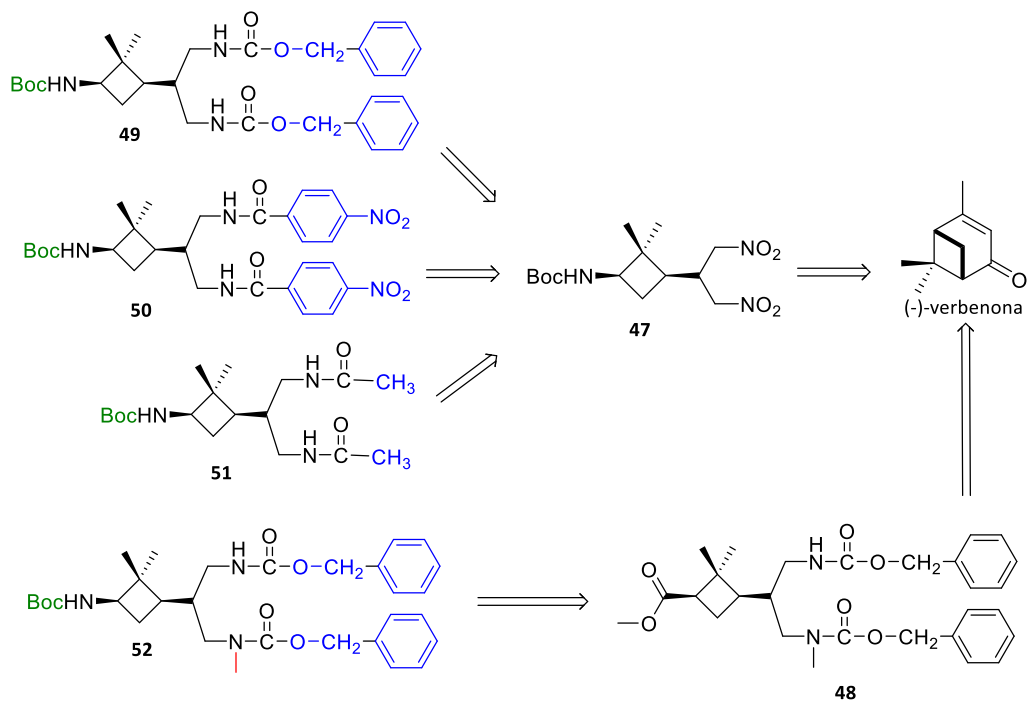
¹⁵⁴ Kizirian, J. C. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 140–205.

¹⁵⁵ Nonn, M.; Kiss, L.; Sillanpää, R.; Fülöp, F. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 100–106.

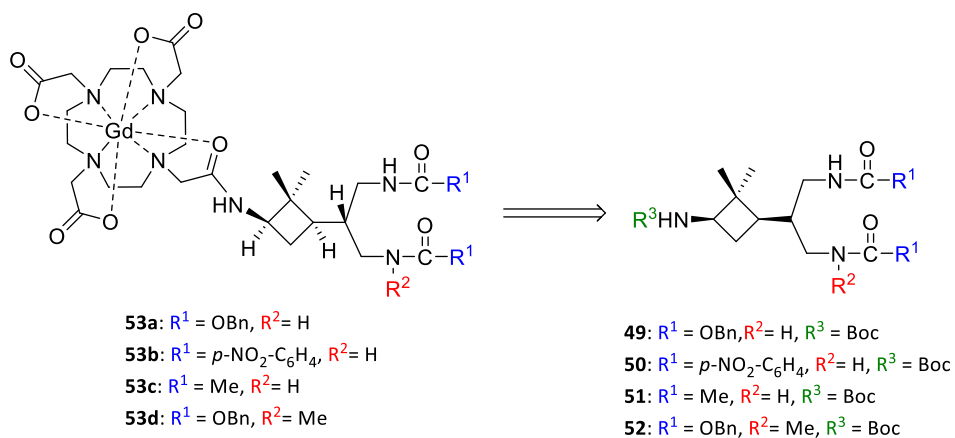
¹⁵⁶ Grasa, G. A.; Zannotti-Gerosa, A.; Hems, W. A. *J. Organomet. Chem.* **2006**, *691*, 2332–2334.

¹⁵⁷ Kodama, K.; Sugawara, K.; Hirose, T. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13584–13592.

CAPÍTULO 4: OBJETIVOS



Esquema 20. Retrosíntesis de las triaminas objetivo **49-52** a partir de la (-)-verbenona



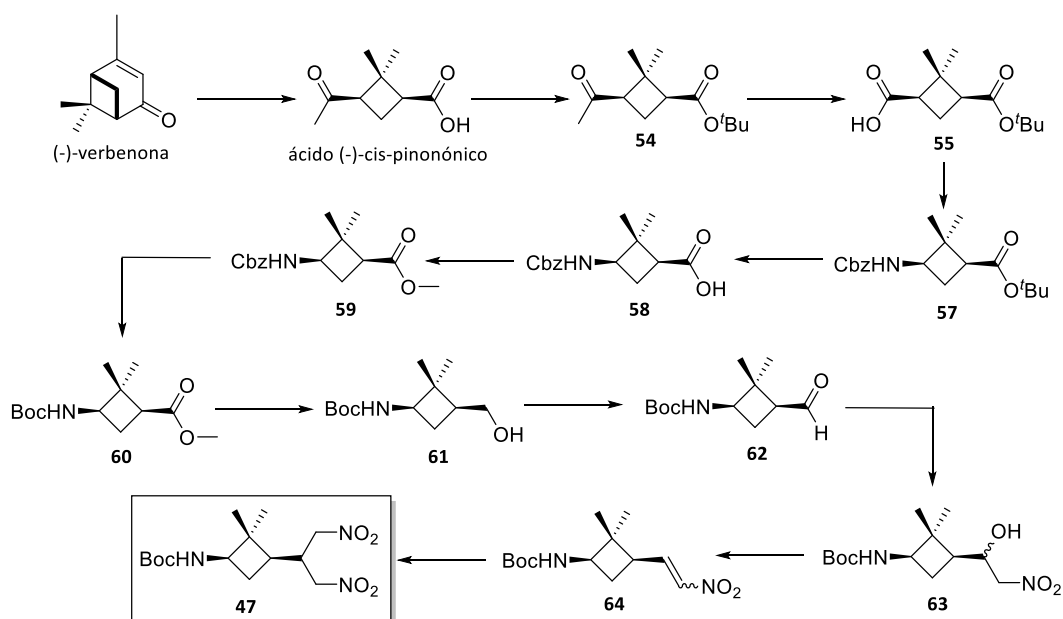
Esquema 21. Retrosíntesis de los complejos objetivo Gd-DOTA a partir de las triaminas **49-52**

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Síntesis de las triaminas ciclobutánicas quirales

4.3.1.1 Síntesis de las triaminas ciclobutánicas con dos centros estereogénicos

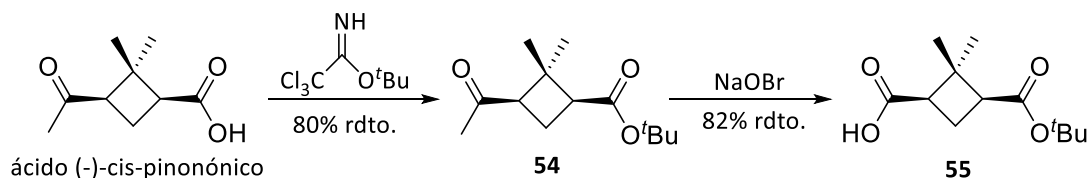
Las triaminas ciclobutánicas con dos centros estereogénicos fueron preparadas a través de rutas sintéticas divergentes, donde el compuesto intermedio común es la plataforma ciclobutánica **47** con dos grupos nitro (**Esquema 22**).



Esquema 22. Ruta sintética para la preparación del compuesto intermedio común **47**

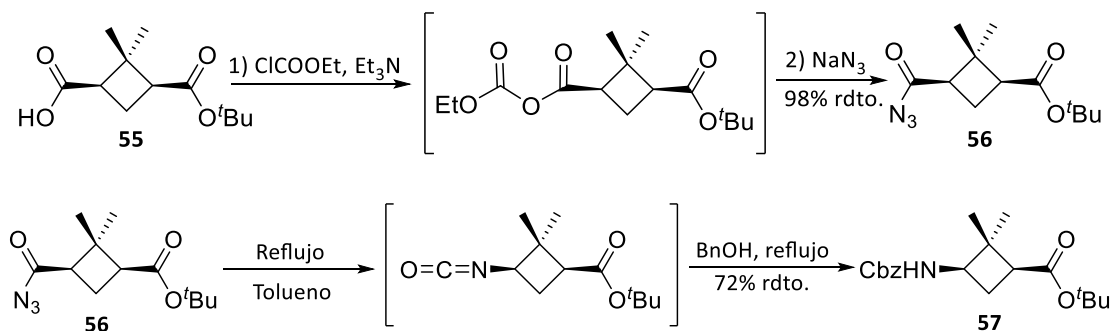
La síntesis de este compuesto intermedio se inicia con la protección en forma de éster *tert*-butílico, de la función ácido carboxílico del ácido (-)-*cis*-pinonónico (**Esquema 23**). La protección se realizó empleando el 2,2,2-tricloroacetimidato de *tert*-butilo y $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ en cantidades catalíticas como ácido de Lewis, disueltos en DCM. Se obtuvo el producto **54** con un 80% de rendimiento. Una vez se obtuvo el éster *tert*-butílico, la función metilcetona del compuesto **54** se oxidó utilizando las condiciones para la degradación de Lieben y de esta manera se obtuvo el ácido **55** con un rendimiento del 82%.⁴

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Esquema 23. Síntesis del ácido carboxílico **55**

Para transformar el ácido carboxílico **55** en el carbamato de bencilo **57** (**Esquema 24**), primero se preparó un anhídrido mixto para activar la función ácido carboxílico, utilizando cloroformiato de etilo en medio básico a 0 °C. Después, por medio de la adición de la azida de sodio como nucleófilo, se formó la respectiva acilazida **56**, la cual fue llevada a reflujo disuelta en tolueno y en presencia de alcohol bencilico. Al calentarse la acilazida, se promueve la transposición del resto alquílico y la eliminación de nitrógeno gaseoso formándose el isocianato. El isocianato preparado *in situ*, en presencia de alcohol bencilico genera el γ -aminoácido **57** protegido ortogonalmente con un rendimiento del 72%. Es importante controlar la calefacción y la evaporación de la acilazida ya que es un producto potencialmente explosivo.



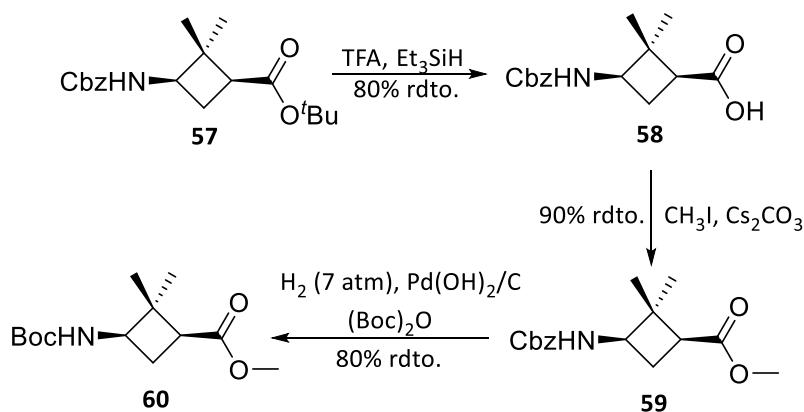
Esquema 24. Síntesis del compuesto **56** y transposición de Curtius.

Teniendo en cuenta que la ruta sintética propuesta requiere la presencia de la función alcohol, es necesario a partir de la función éster *terc*-butílico preparar el éster metílico para posteriormente poder reducirlo hasta alcohol primario. Para esto, la función ácido carboxílico del compuesto **57** se desprotegió, por medio de una acidólisis con TFA en presencia de Et_3SiH (**Esquema 25**). El compuesto **59**, se obtuvo esterificando la función ácido carboxílico en condiciones suaves con CH_3I y Cs_2CO_3 en DMF.¹⁵⁸ Ya que es

¹⁵⁸ Aguilera, J.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19* (3), 302–308.

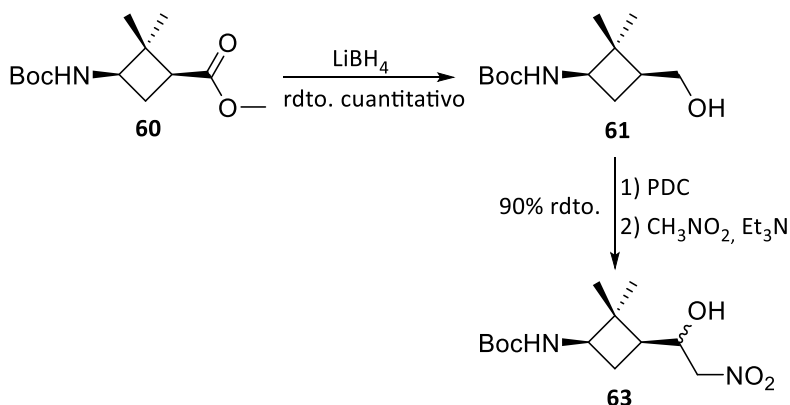
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

necesario mantener diprotegido ortogonalmente el γ -aminoácido, se realizó un cambio de protección de la función amina del compuesto **59**. El carbamato de bencilo fue sustituido por el carbamato de *tert*-butilo utilizando H_2 , en presencia de $Pd(OH)_2/C$ en MeOH en presencia de anhídrido de Boc que reacciona *in situ* con la amina libre formada, dando el compuesto **60**.



Esquema 25. Síntesis del compuesto **60**

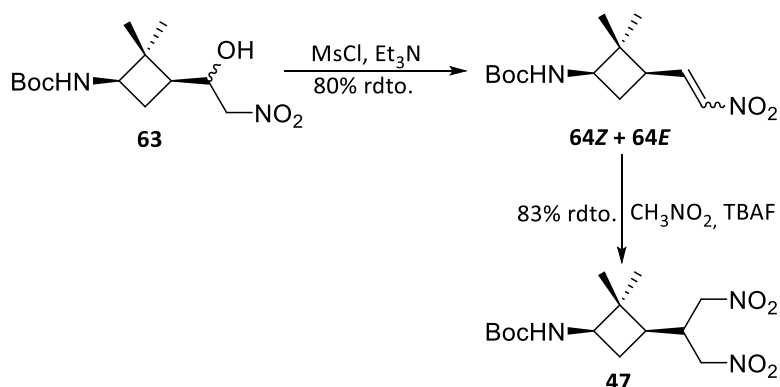
El éster metílico del γ -aminoácido **60** diprotegido ortogonalmente se redujo selectivamente con $LiBH_4$, para obtener cuantitativamente el alcohol primario **61** (Esquema 26). La función alcohol obtenida se oxidó controladamente con PDC. El aldehído resultante se sometió a una reacción de Henry utilizando como nitroalcano el nitrometano y como base trietilamina (Et_3N), proporcionando el nitroalcohol **63** con un rendimiento del 90% en dos etapas.



Esquema 26. Síntesis del nitroalcohol **63**

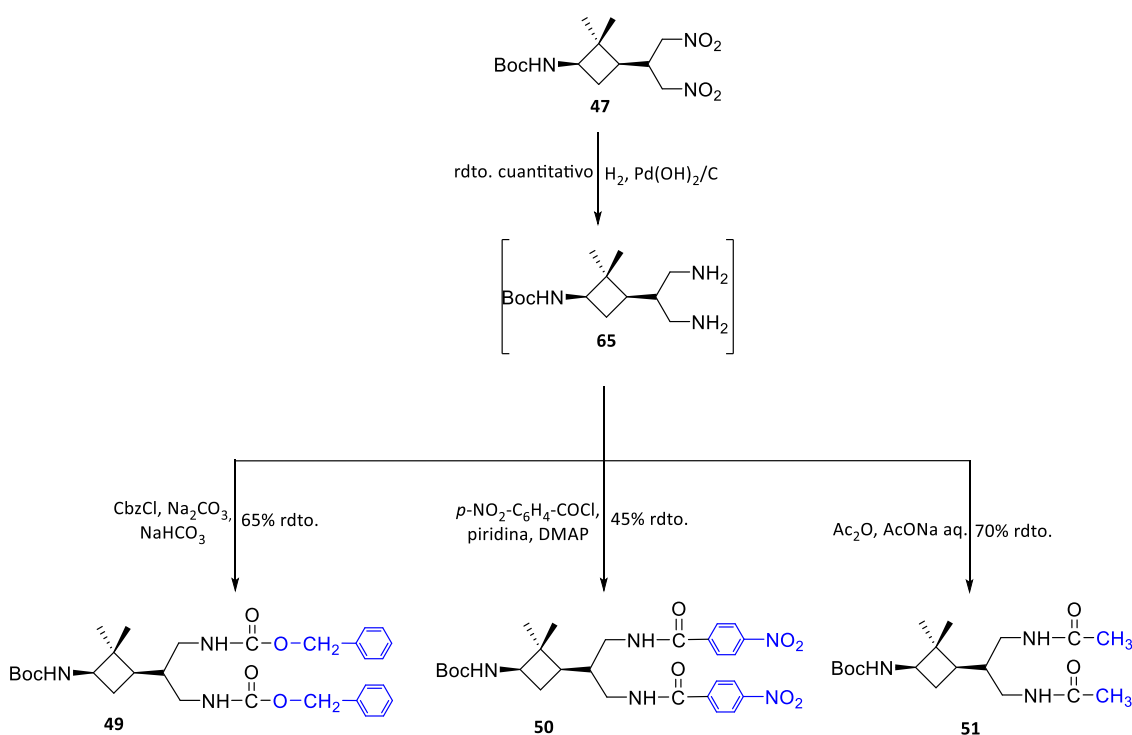
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez se obtuvo el nitroalcohol **63**, éste se deshidrató mediante la formación de un mesilato, utilizando cloruro de mesilo (MsCl) en presencia de trietilamina (Et₃N) proporcionando el nitroalqueno **64** con un rendimiento del 80% (**Esquema 27**). El segundo grupo nitro se introdujo por medio de una adición conjugada de nitrometano en presencia de TBAF (fluoruro de tetrabutilamonio), dando como resultado el compuesto dinitrado **47** con un rendimiento del 83%.



Esquema 27. Síntesis del compuesto **47**

El compuesto **47** es el precursor común de las triaminas **49-51** (**Esquema 28**). Una vez se preparó el compuesto **47**, se redujeron ambos grupos nitro por medio de hidrogenación catalítica, en presencia de Pd(OH)₂/C al 20% en MeOH. Para obtener las triaminas ciclobutánicas objetivo **49-51**, la triamina **65** se hizo reaccionar con CbzCl (cloruro de benciloxycarbonilo) en medio básico, para obtener el bis(carbamato de bencilo) **49** con un rendimiento del 65%. Por otro lado, el compuesto **65** también reaccionó con cloruro de *p*-nitrobenzoilo en presencia de piridina y DMAP, para obtener la bis(*p*-nitrobenzamida) **50** con un rendimiento del 45%. La diacetamida, se obtuvo al hacer reaccionar el intermedio común **65** con anhídrido acético y acetato de sodio, obteniendo el compuesto objetivo **51** con un rendimiento del 70%.



Esquema 28. Síntesis de las aminas ciclobutánicas con dos centros estereogénicos **49-51**

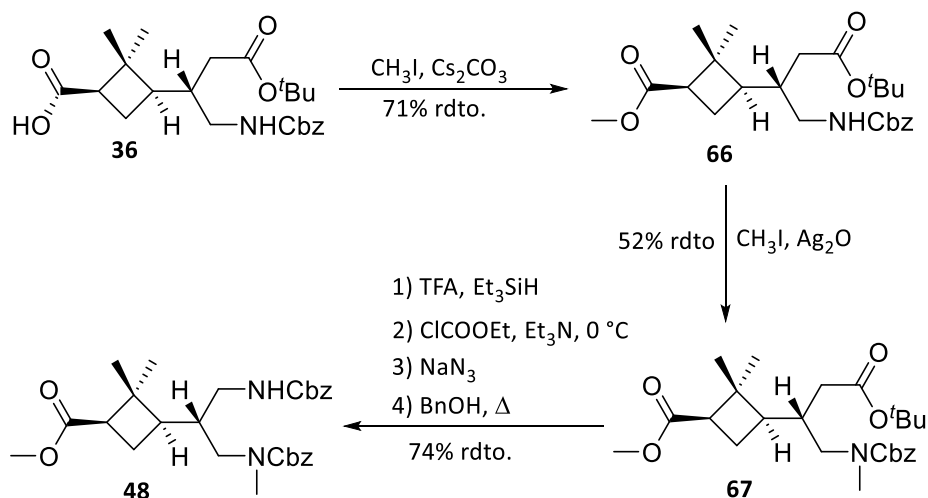
4.3.1.2 Síntesis de la triamina ciclobutánica con tres centros estereogénicos

La triamina **52**, fue preparada con el fin de inducir asimetría en la posición 2 del esqueleto lineal de la diamina, además de la quiralidad intrínseca del anillo de ciclobutano. El derivado **36**, protegido ortogonalmente, fue utilizado como compuesto de partida, para la preparación de la triamina **52**. El orden secuencial de la introducción de los grupos amino aseguró la configuración absoluta del nuevo centro estereogénico.

El ácido carboxílico libre del compuesto **36**, se protegió en forma de éster metílico utilizando CH_3I y Cs_2CO_3 obteniendo el compuesto **66** (**Esquema 29**). La *N*-metilación se realizó mediante la reacción con yoduro de metilo en presencia de óxido de plata y DMF como disolvente proporcionando el compuesto **67** con un 52% de rendimiento. Posteriormente, se desprotegió el éster *tert*-butílico utilizando TFA y Et_3SiH . El ácido resultante se transformó en carbamato de bencilo por medio de una reacción inicial con cloroformiato de etilo. Una vez se obtuvo el anhídrido mixto, se hizo reaccionar con un exceso de azida de sodio para obtener una acilazida, la cual se sometió a una

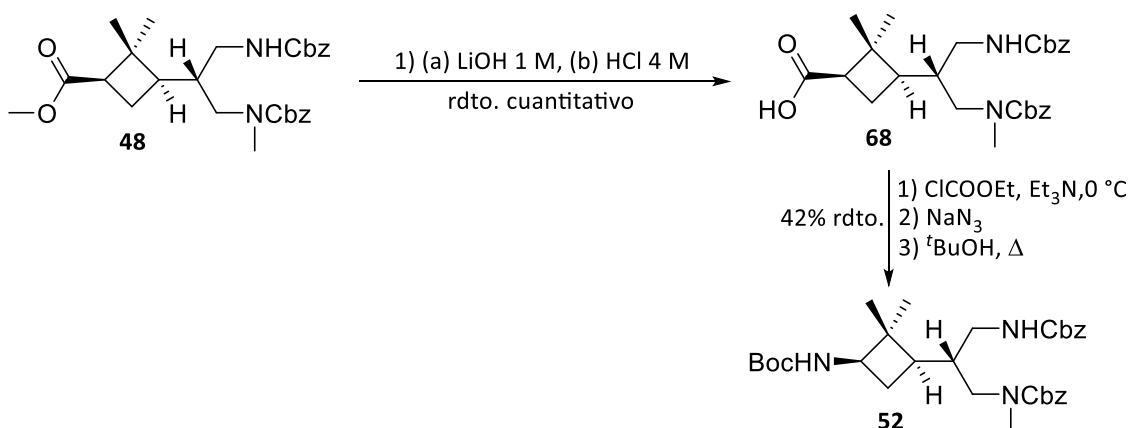
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

transposición de Curtius en presencia de alcohol bencílico, dando como resultado el compuesto **48** con un rendimiento del 74% en los cuatro pasos.



Esquema 29. Síntesis del compuesto **48**

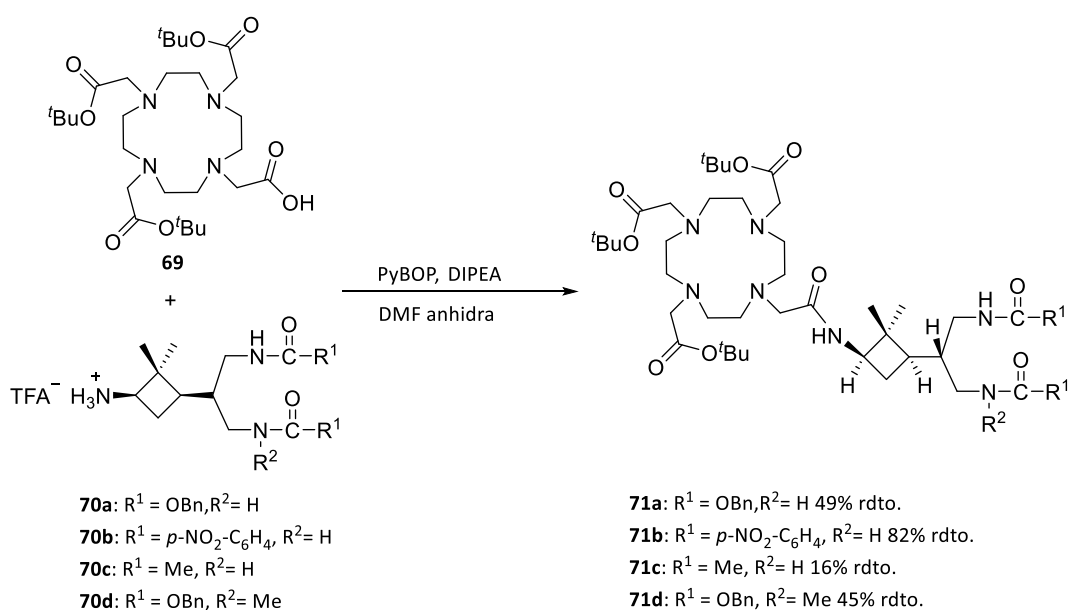
El tercer grupo amino fue generado a partir de la transformación del éster metílico del compuesto **48** (Esquema 30). El compuesto **48** se desprotegió mediante una saponificación con LiOH 1 M. A continuación se preparó la acilazida por medio de la activación del carbonilo con cloroformiato de etilo y el posterior ataque nucleófilo de la azida de sodio. La acilazida obtenida se sometió a una transposición de Curtius en presencia de alcohol *tert*-butílico para dar el compuesto **52** con un rendimiento del 42% en los cuatro pasos.



Esquema 30. Síntesis de la amina ciclobutánica con tres centros estereogénicos **52**

4.3.2 Síntesis de las monoamidas DO3A 71a-d y complejos de gadolinio 53a-d

La etapa siguiente consistió en el acoplamiento del compuesto comercial **69** con las aminas libres **70a-d**. Estas aminas se obtuvieron, a partir de la eliminación selectiva de la protección *N*-Boc de las triaminas **49-52** mediante la acidólisis con TFA y Et₃SiH. La reacción de acoplamiento se realizó utilizando PyBOP como agente activante y DIPEA como base (**Esquema 31**). Finalmente, se obtuvieron las plataformas ciclobutánicas funcionalizadas y conjugadas a DOTA con rendimientos que van desde 16% (**71c**) al 82% (**71b**).



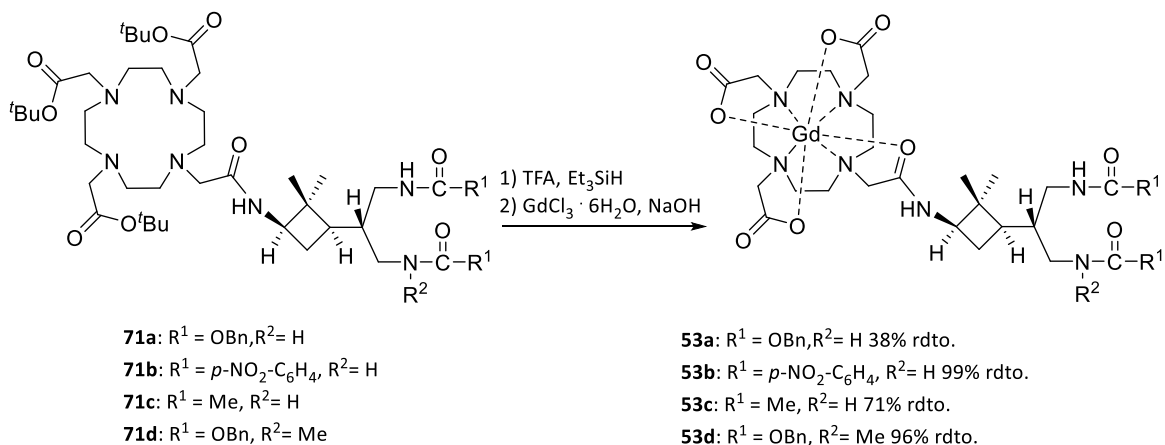
Esquema 31. Síntesis de las monoamidas **71a-d**

Una vez se obtuvo el ligando debidamente funcionalizado, se realizó la acidólisis de los ésteres de *terc*-butilo empleando TFA en exceso y Et₃SiH (**Esquema 32**). Las funciones ácido libres de éste compuesto polidentado cíclico, permitieron la complejación de los iones Gd⁺³ en disolución acuosa, a través de la reacción equimolar de los ligandos **72a-d** con GdCl₃·6H₂O.^{159,160,161} Esta reacción proporcionó los quelatos **53a-d** con rendimientos desde el 38% (**53a**) hasta cuantitativos (**53b**).

¹⁵⁹ Lee, B.-I.; Lee, K. S.; Lee, J. H.; Lee, I. S.; Byeon, S.-H. *Dalt. Trans.* **2009**, No. 14, 2490-2495.

¹⁶⁰ Mastarone, D. J.; Harrison, V. S. R.; Eckermann, A. L.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (14), 5329–5337.

¹⁶¹ Martínez, M. D.; Rustoy, E. M.; Raggio, N.; Burton, G. *Inorg. Chem. Commun.* **2015**, *51*, 110–113.



Esquema 32. Síntesis de los complejos de gadolinio **53a-d**

El progreso de la reacción de complejación se controló utilizando el indicador naranja de xilenol que detecta Gd³⁺ libre. El cambio de color se debe a la coordinación del Gd³⁺ a través de la fracción aminodiacética a un pH ligeramente ácido o neutro lo cual conduce a la deslocalización electrónica extendida y a su vez un desplazamiento de la longitud de onda de absorción a valores más altos, con el consiguiente cambio de color de amarillo (ausencia de Gd³⁺) a violeta (presencia de Gd⁺³)¹⁶² (**Figura 45**).

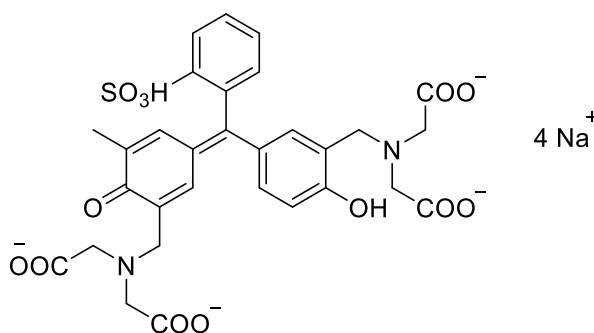


Figura 45. Estructura química del indicador naranja de xilenol

Una vez los complejos **53a-d** fueron sintetizados y purificados, éstos compuestos se caracterizaron por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS /ESI-QTOF) que permitió asegurar la estequiometría de metal-ligando a través de la masa exacta y la distribución isotópica característica del gadolinio como se muestra en la **Figura 46**.

¹⁶² Barge, A.; Cravotto, G.; Gianolio, E.; Fedeli, F. *Contrast Media Mol. Imaging* **2006**, 1, 5, 184-188.

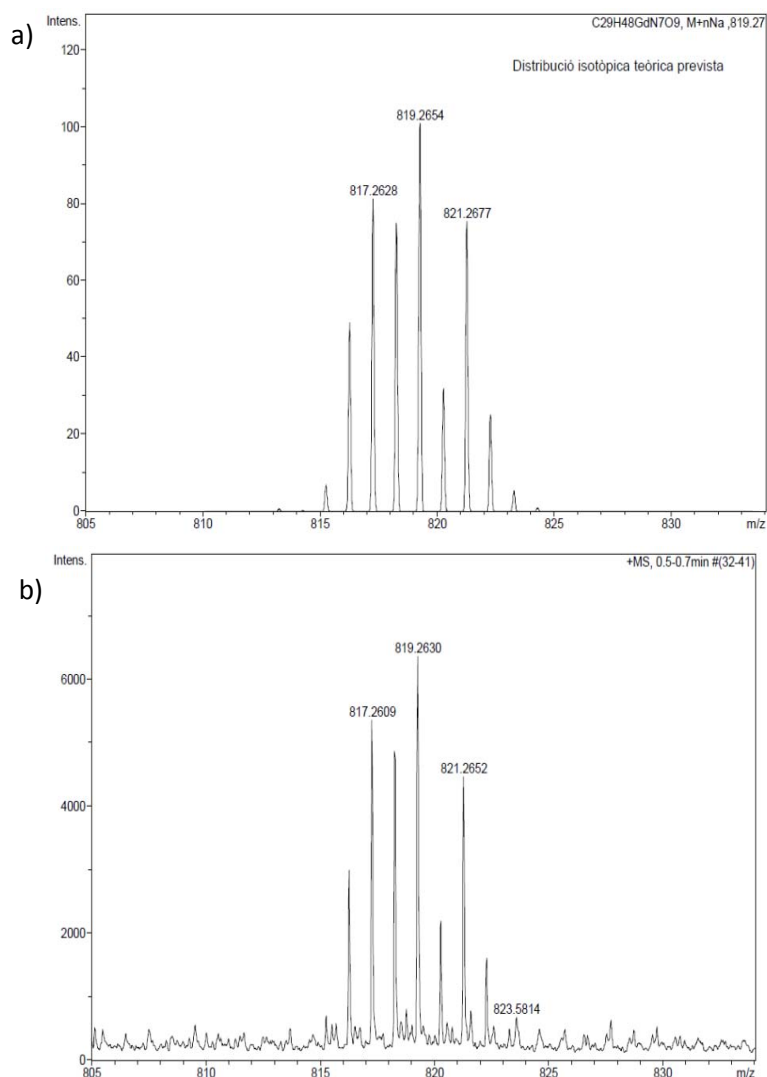


Figura 46. a) Distribución isotópica teórica prevista para el complejo **53c**. b) Distribución isotópica obtenida para el complejo **53c**.

4.3.3 Experimentos de Resonancia Magnética de Imagen (RMI)

Con el objetivo de estudiar el comportamiento de los compuestos **53a-d** como posibles ACs- T_1 en RMI, se realizaron estudios preliminares buscando determinar la relajatividad de estos complejos, así como la influencia de sus sustituyentes en los valores de relajatividad obtenidos. Este estudio se realizó en colaboración con la Doctora Silvia Lope Piedrafita, del Servicio de Resonancia Magnética Nuclear (SeRMN) de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Los tiempos de relajación longitudinal (T_1), fueron estudiados a 7 T y 23 °C. Las imágenes ponderadas en T_1 (T_{1w}), se obtuvieron a partir de disoluciones en agua de los

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

complejos **53a-d** y de DOTAREM® (compuesto de referencia) a diferentes concentraciones (0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.31 y 0.63 mM) (**Figura 47**).

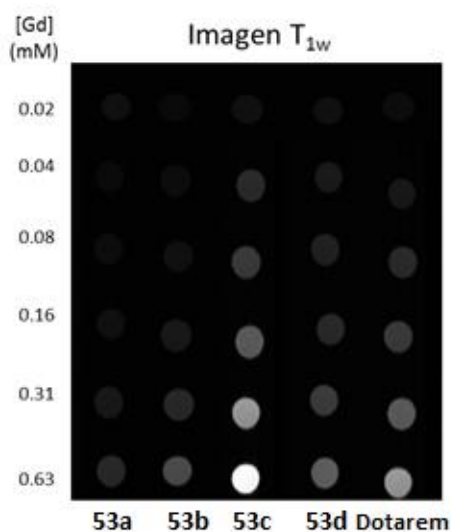


Figura 47. Imágenes ponderadas en T_{1w} para los compuestos **53** y Dotarem®

Los valores de relajatividad longitudinal r_1 (**Tabla 3**), se obtuvieron a partir de las velocidades de relajación experimentales R_1 , usando el método de regresión lineal de mínimos cuadrados versus la concentración de Gd (mM). La pendiente de la línea resultante corresponde a la relajatividad (r_1) (**Figura 48**).

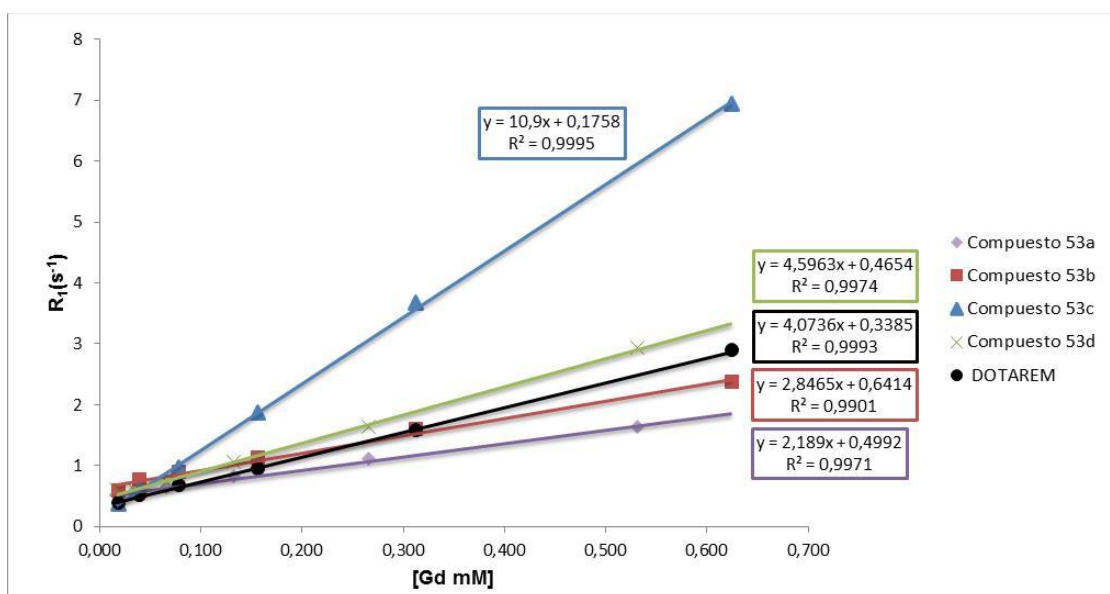


Figura 48. Relajación longitudinal (R_1) vs concentración de Gd para los complejos **53a-d** y DOTAREM® medidos a 7 T y 23 °C.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 3. Relajatividad longitudinal r_1 ($\text{mM}^{-1} \text{s}^{-1}$) de los complejos **53a-d** y DOTAREM®

Compuesto	53a	53b	53c	53d	DOTAREM®
r_1	2.2 ± 0.1	2.8 ± 0.1	10.9 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.7 ± 0.1

Los complejos bis(carbamato de bencilo) **53a** y bis(*p*-nitrobenzamida) **53b**, presentaron valores de relajatividad r_1 inferiores al valor del DOTAREM®, mientras que el valor de relajatividad del compuesto **53d** (el cual presenta un grupo *N*-metilcarbamato) fue similar al obtenido para el compuesto de referencia. Sin embargo, el valor de r_1 para el complejo bis(acetamida) **53c** fue mucho mayor ($10.9 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) que el DOTAREM® ($4.7 \pm 0.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) como se observa en la **Figura 49**.

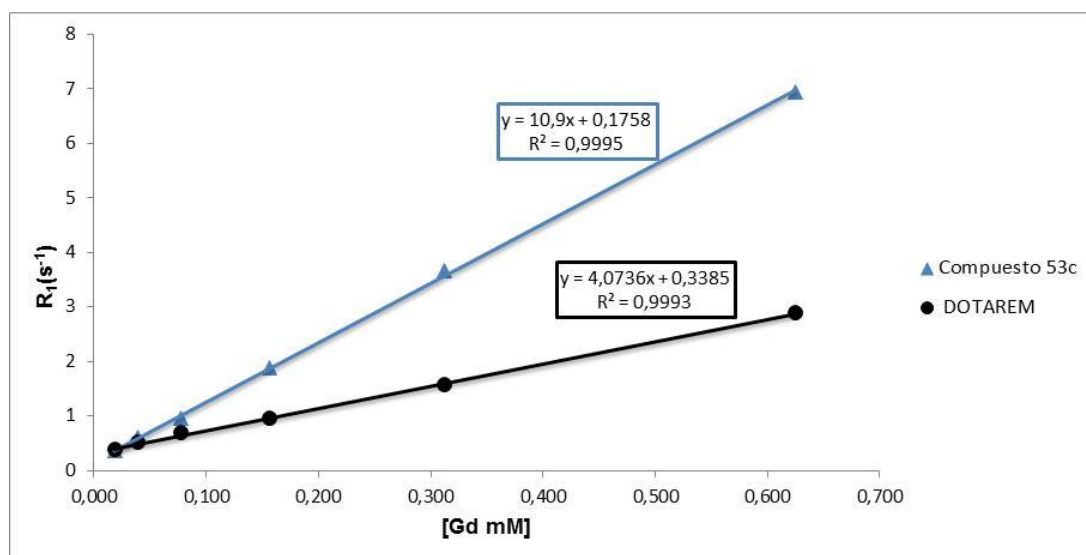


Figura 49. Relajación longitudinal (R_1) vs concentración de Gd del complejo **53c** y DOTAREM®

El complejo bis(acetamida) **53c**, presentó un buen contraste positivo, lo que se traduce en un tiempo de relajación longitudinal (T_1) corto (relajatividad r_1 alta) y a su vez un T_2 corto con un buen contraste negativo (**Figura 50**). Teniendo en cuenta la relajación de los protones del agua en las soluciones del complejo **53c**, a concentraciones desde 0.02 hasta 0.63 mM de Gd(III), el complejo bis(acetamida) podría ser un buen candidato para mejorar el contraste de los tejidos en RM a campos magnéticos altos.

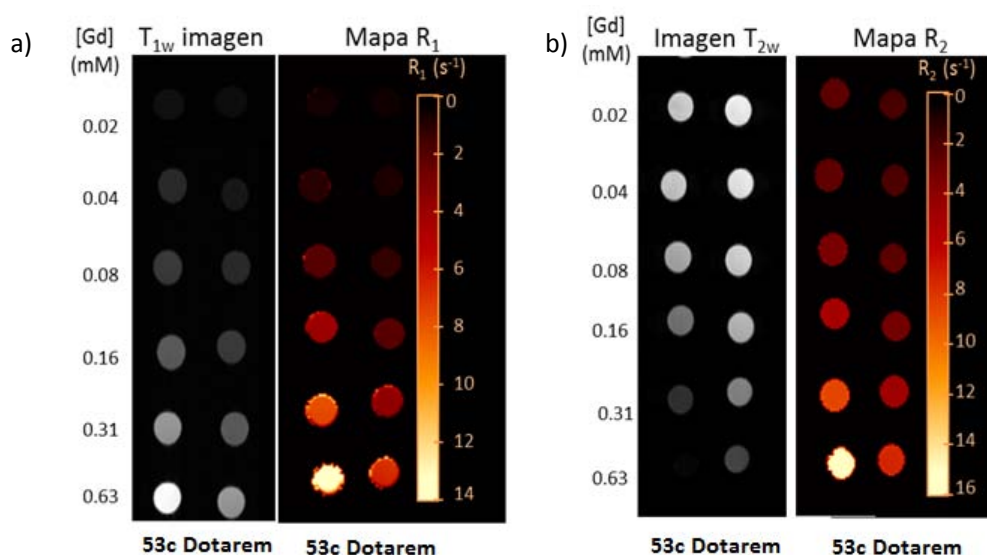


Figura 50. a) Imágenes ponderadas en T_{1w} y Mapa R_1 para el compuesto **53c** y Dotarem. b) Imágenes ponderadas en T_{1w} y Mapa R_1 para el compuesto **53c** y Dotarem

4.3.4 Estudios teóricos sobre el comportamiento de los complejos **53a-d**

Se realizaron estudios computacionales con el objetivo de dilucidar la influencia de los sustituyentes de las funciones amina presentes en la molécula, para los complejos **53a-d** sintetizados. Estos estudios se realizaron en colaboración con el Prof. Vicenç Branchadell, de nuestro grupo de investigación.

Cosentino y colaboradores,¹⁶³ han realizado un extenso estudio de las conformaciones derivadas de los complejos $[\text{Ln}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$. Los complejos derivados de DOTA-Gd se encuentran en solución como una mezcla de estereoisómeros, los cuales se originan de las formas helicoidales de la conformación del anillo y la orientación de los brazos del grupo acetato.¹⁶⁴

Estos compuestos presentan cuatro conformeros diferentes, que surgen a partir de las dos posibles orientaciones de los brazos colgantes (Δ o Λ) y dos conformaciones diferentes del anillo macrocíclico ($\delta\delta\delta\delta$ o $\lambda\lambda\lambda\lambda$) (**Anexo 1**). En los complejos derivados de DOTA estos cuatro isómeros forman dos pares enantioméricos. En nuestro estudio, se consideraron cuatro conformeros diastereoisoméricos diferentes, debido a la

¹⁶³ Cosentino, U.; Villa, A.; Pitea, D.; Moro, G.; Barone, V.; Maiocchi, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4901-4909

¹⁶⁴ Frullano, L.; Rohovec, J.; Peters, J.A.; Geraldes, C.F.G.C. *Top. Curr. Chem.* **2002**; *221*, 25–60.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

presencia de los centros quirales en la plataforma ciclobutánica de los ligandos **53a-d**, los cuales modifican la relación enantiomérica. Para cada una de éstas cuatro estructuras, se realizó un estudio conformacional y se optimizaron las estructuras de mínima energía utilizando el método del funcional de la densidad M06.

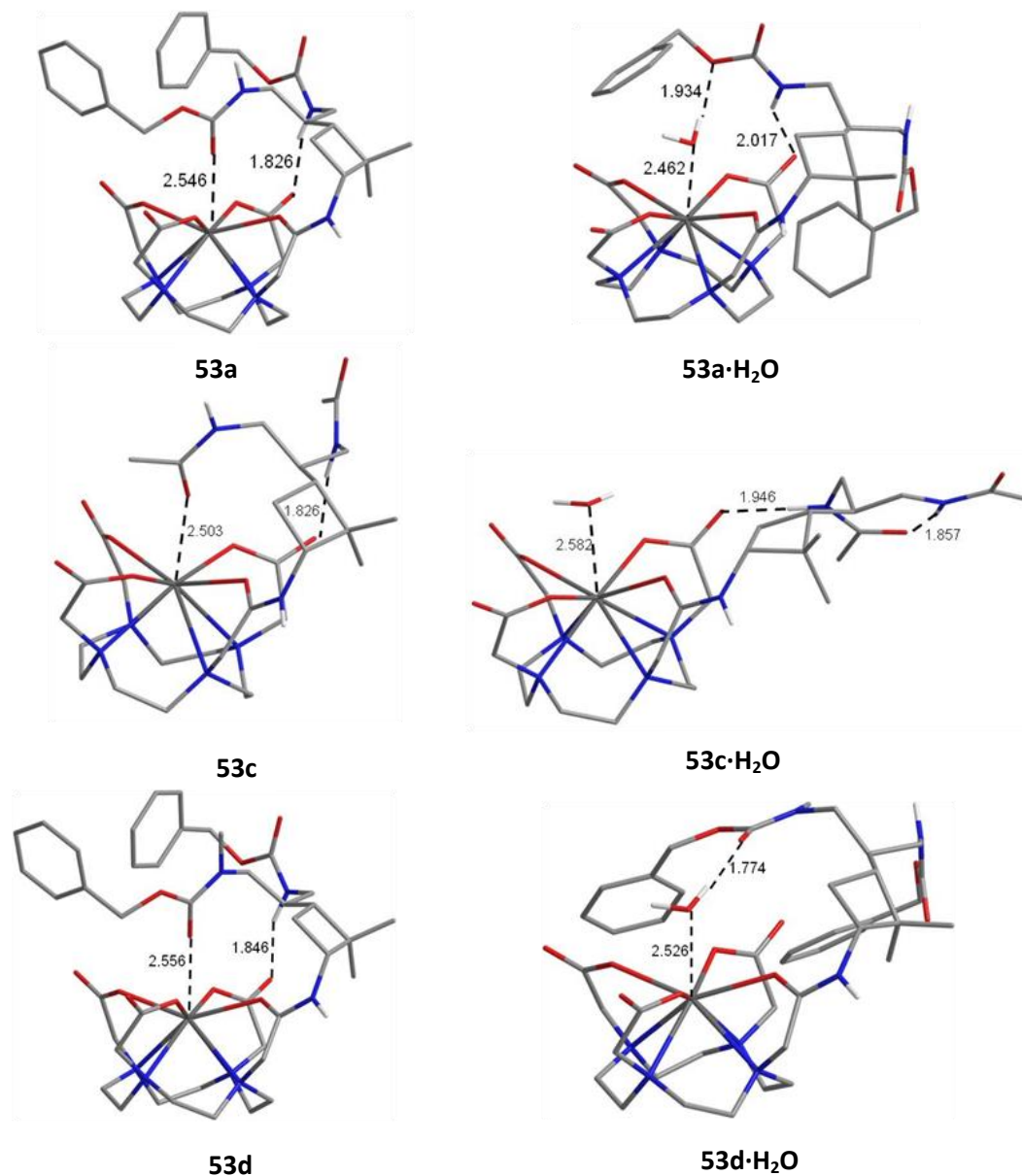


Figura 51. Estructuras optimizadas de los complejos **53a,c,d** y **53a,c,d·H₂O**. Los átomos de hidrógeno no polares se han omitido para mayor claridad. Las distancias interatómicas señaladas están en Å.

Las estructuras más estables en todos los casos corresponden a la configuración del ligando $\Delta(\delta\delta\delta\delta)$. Así mismo, se estudiaron los complejos con una molécula de agua, coordinada directamente al Gd. Las estructuras de **53a,c,d** y **53a,c,d·H₂O** se muestran

en la **Figura 51**. Sin embargo, la estructura más estable de los complejos **53a**, **53c** y **53d**, corresponde a los complejos nona-coordinados debido a que el grupo amidocarbonilo de la cadena lateral *pro-(R)* del ciclobutano está coordinado al gadolinio. De igual manera, hay un enlace de hidrógeno entre el NH de la cadena lateral *pro-(S)* y un grupo acetato próximo al macrociclo. En la estructura más estable del complejo **53b**, el Gd permanece octa-coordinado (**Figura 52**). Los bajos valores de relajatividad, pueden estar relacionados con la presencia del grupo nitro, ya que grupos fuertemente aceptores de electrones unidos al anillo aromático desfavorecen la capacidad de coordinación de los grupos amidocarbonilo de la cadena lateral.¹⁶⁵

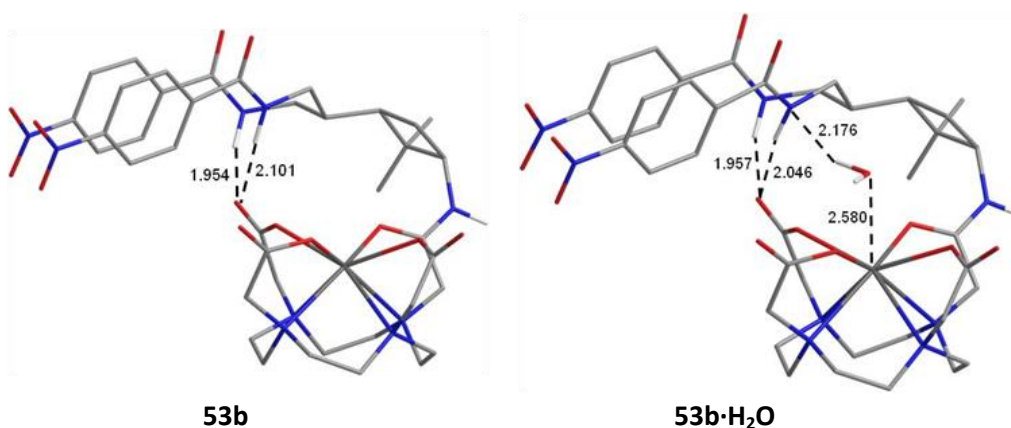


Figura 52. Estructuras optimizadas de los complejos **53b** y **53b·H₂O**. Los átomos de hidrógenos no polares se han omitido para mayor claridad. Las distancias interatómicas señaladas están en Å.

Para los complejos **53·H₂O**, podemos observar dos patrones conformacionales diferentes de la fracción del ciclobutano: *extendida* en **53c·H₂O** (**Figura 51**) y *plegada* en los otros casos (**Figura 52**). En la conformación extendida hay un fuerte enlace de hidrógeno dentro de las cadenas laterales. Por otro lado, en las conformaciones plegadas prevalecen las interacciones de las cadenas laterales con el cuerpo del ligando y la molécula de agua coordinada. Es de notar que, en **53a·H₂O** y **53d·H₂O** uno de los anillos aromáticos se coloca por encima de la molécula de agua coordinada (**Figura 51**). La **Tabla 4** presenta los valores calculados de las energías de disociación Gd-agua, ΔE (Gd-H₂O), y la diferencia de energía entre los complejos de Gd-L nona- y octa-coordinados, $\Delta E'$.

¹⁶⁵ Boros, E.; Polasek, M.; Zhang, Z.; Caravan, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19858–19868.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4. Energías de disociación Gd-H₂O y diferencia de energía entre los complejos octa- y nona-coordinados^a **53** calculados en solución acuosa a un nivel de cálculo de M06/6-311+G(d,p)//M06/6-31G(d)^b

	$\Delta E(\text{Gd-H}_2\text{O})$	$\Delta E'$
53a	5.4	4.1
53b	13.2	-1.9
53c	7.5	1.6
53d	6.1	7.7

^a En kcal mol⁻¹. ^b Para el Gd, efectos relativistas con un Potencial Efectivo del Core (ECP) [Kr]4d¹⁰4f⁷ y el conjunto base de valencia [5s4p3d]

Como se observa en la **Tabla 4**, el complejo **53b** presenta la energía de disociación (ΔE) más elevada. El resto de los complejos presentan energías de disociación que se diferencian entre sí por menos de 2 kcal mol⁻¹. Estos resultados podrían manifestar que existe un rápido intercambio de agua con los complejos **53a**, **53c**, **53d**, donde la nona-coordinación se puede lograr sin una molécula de agua en la primera esfera de coordinación. Sin embargo, no se observa una correlación directa entre las energías de disociación calculadas Gd-H₂O y las relajatividades experimentales.

Por otro lado, si tenemos en cuenta el reordenamiento conformacional de los complejos de Gd, entre las estructuras nona- y octa-coordinadas ($\Delta E'$), los resultados para **53a**, **53c** y **53d** se correlacionan con los valores experimentales de relajatividad. Regueiro-Figueroa y Platas-Iglesias,¹⁶⁶ recientemente han demostrado que existe una correspondencia entre la fuerza de enlace de Gd-OH₂ y las velocidades de intercambio de agua observadas experimentalmente en complejos derivados de Gd-DOTA.

La **Tabla 5** muestra las longitudes de enlace calculadas para Gd-OH₂ y las densidades electrónicas en los puntos críticos de enlace Gd-OH₂ (ρ) para los complejos **53**·H₂O. Si se excluyen los valores correspondientes a **53b**, hay una excelente correlación entre la densidad electrónica y las relajatividades experimentales (**Tabla 3**). Para **53b**·H₂O la distancia Gd-O_w y la densidad electrónica en el punto crítico de enlace son similares a los valores calculados para **53c**·H₂O, sin embargo, los valores de relajatividad observados son notablemente diferentes.

¹⁶⁶ Regueiro-Figueroa, M., Platas-Iglesias, C. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 6436-6445

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5. Longitudes de enlace Gd-O_w (Å) y la densidad electrónica en los puntos críticos de Gd-O_w (ρ en u.a.) calculadas para los complejos **53**·H₂O.

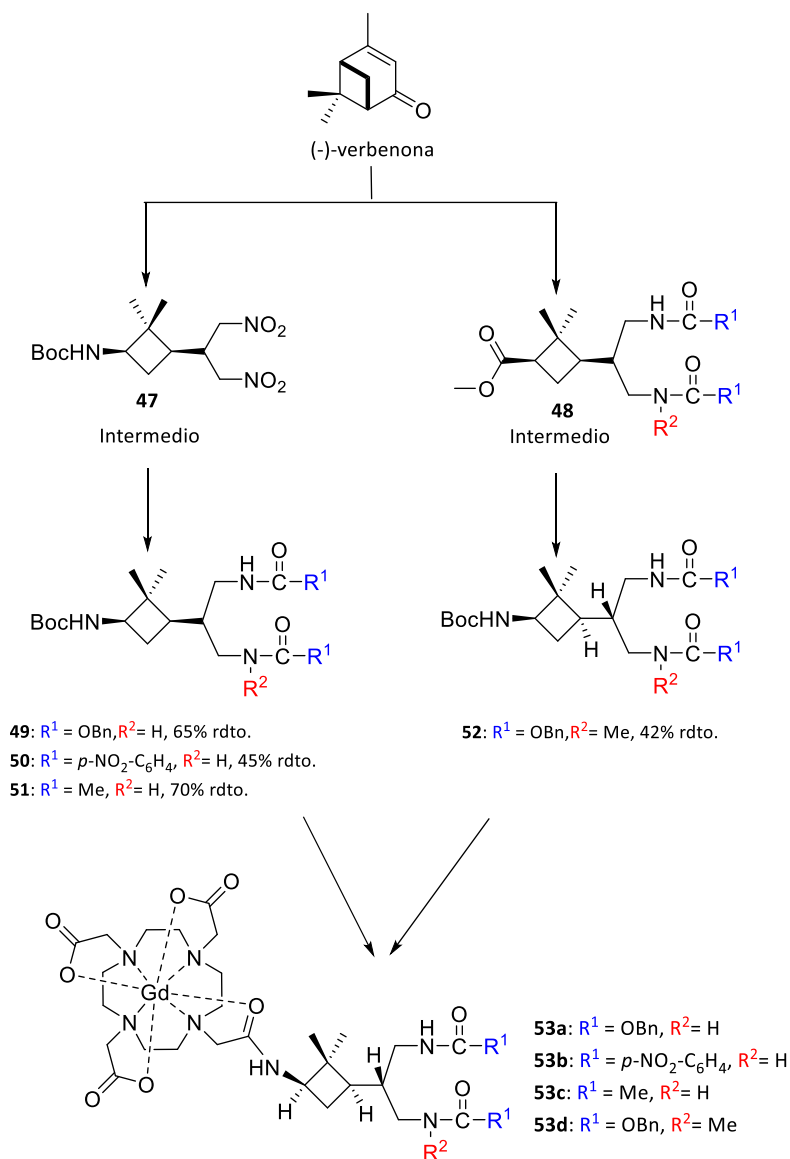
	Gd-O _w	P
53a	2.462	0.0365
53b	2.580	0.0320
53c	2.582	0.0321
53d	2.526	0.0353

No obstante, existe una diferencia significativa en los momentos dipolares eléctricos de los complejos **53**, lo que podría influir en los valores de relajatividad obtenidos experimentalmente. El valor calculado para **53b** es 43.8 D, notablemente mayor que el valor correspondiente a **53c** (28.5 D). Para **53a** y **53d**, los valores calculados son 30.0 y 27.6, respectivamente.

En conclusión, para todos los complejos estudiados excepto **53b**, tanto la energía involucrada en el reordenamiento conformacional entre las estructuras nona- y octa coordinadas ($\Delta E'$), así como la fuerza de enlace Gd-O_w de los complejos **53**·H₂O se correlacionan con las relajatividades observadas. En el caso de **53b**, la naturaleza electroatrayente del grupo nitro se opone a la coordinación de los grupos amido-carbonil de los brazos laterales del ciclobutano con el Gd y por otro lado, la alta polaridad del complejo parece jugar un papel influyente en la relajatividad observada.

4.4 Resumen y conclusiones

Se llevó a cabo la síntesis estereoselectiva de cuatro triaminas sustituidas (**49-52**) con dos o tres centros estereogénicos de configuración absoluta definida. Ésta síntesis se realizó utilizando (-)-verbenona como precursor quiral, la cual proporcionó una plataforma ciclobutánica polifuncional y quiral. La protección ortogonal de estas triaminas ciclobutánicas permitió la desprotección selectiva del grupo amino unido directamente al anillo de ciclobutano y su posterior acoplamiento con DOTA. Por último, la quelación con Gd(III) proporcionó los complejos GdDO3A **53a-d** (Esquema 33).



Esquema 33. Síntesis de nuevos compuestos ciclobutánicos

CAPÍTULO 4: RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se realizó un estudio para evaluar el comportamiento de estos complejos como potenciales ACs en RMI y se observó la influencia de las sustituciones *N*-H vs *N*-Me, así como la de los grupos protectores en las relajatividades obtenidas experimentalmente. La relajatividad (r_1) del complejo bis(acetamida) **53c** ($10.9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) fue mayor que la observada para el DOTAREM® ($4.1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (compuesto de referencia) evidenciando un fuerte aumento del contraste positivo en imágenes ponderadas en T_{1w} . Estos resultados manifiestan el comportamiento de este compuesto como un posible AC- T_1 .

Los cálculos teóricos apoyan la conclusión de que existe una amplia influencia de los grupos protectores de la función amina de las cadenas laterales del ciclobutano. Además, sugieren que la velocidad de intercambio de agua está asociada a la energía implicada en la reorganización conformacional de los complejos de Gd entre las estructuras nona- y octa-coordinadas. Por otro lado, la fuerza del enlace Gd-OH₂ está influenciada por la naturaleza de los grupos protectores de las aminas que condicionan el intercambio de agua. Los complejos altamente polares desfavorecen un contraste eficiente en RMI.

Capítulo 5

PÉPTIDOS HÍBRIDOS CICLOBUTANO- PROLINA Y SU ESTUDIO COMO AGENTES DE INTERNALIZACIÓN CELULAR (CPPs) EN CÉLULAS HeLa Y PARÁSITOS DE *Leishmania donovani* Y *Leishmania pifanoi*

5.1 Introducción

La membrana celular se comporta como una barrera selectiva permeable, con funciones esenciales en la supervivencia celular.¹⁶⁷ El transporte de moléculas en los organismos vivos a través de ésta membrana es un factor clave, ya que incluye la entrada de nutrientes del medio ambiente y la eliminación de compuestos tóxicos.¹⁶⁸ La membrana celular es permeable solamente a pequeños compuestos hidrófobos. Compuestos fuertemente polares, hidrófilos y poco solubles requieren ayuda para ser transportados dentro de la célula.¹⁶⁹

El control del transporte a través de la membrana celular es indispensable ya que muchas dianas terapéuticas se encuentran en el interior de la célula y requieren la entrada de moléculas bioactivas con el fin de ser tratadas eficazmente. Uno de los principales obstáculos para el uso de moléculas terapéuticas de mediano y gran tamaño molecular es su baja permeabilidad a través de las biomembranas, lo que se ha convertido en un gran reto para el campo de la terapia médica.¹⁷⁰ Debido a esta limitación, se han desarrollado varias estrategias para liberar agentes terapéuticos a través de membranas celulares. Estas estrategias incluyen la microinyección, la electroporación y el uso de liposomas. Sin embargo, estos métodos tienen varios inconvenientes como por ejemplo, baja eficiencia, alta toxicidad, baja biodisponibilidad y poca especificidad.¹⁷¹

En las últimas dos décadas, se han desarrollado un gran grupo de péptidos sintéticos de penetración celular (*cell-penetrating peptides* “CPPs”) diseñados a partir de péptidos y proteínas naturales. El gran potencial de los CPPs se basa en el hecho de que pueden transportar, a través de la membrana plasmática, una gran variedad de moléculas cargo, como péptidos, proteínas, ácidos ribonucleicos, oligonucleótidos, liposomas, plásmidos, puntos cuánticos “*quantum dots*” u otras nanopartículas través

¹⁶⁷ Wang, F.; Wang, Y.; Zhang, X.; Zhang, W.; Guo, S.; Jin, F. *J. Control. Release* **2014**, *174*, 126–136.

¹⁶⁸ Löscher, W.; Potschka, H. *Prog Neurobiol* **2005**, *76*, 22–76.

¹⁶⁹ Reissmann, S. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20* (10), 760–784.

¹⁷⁰ Ramsey, J. D.; Flynn, N. H. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *154*, 78–86.

¹⁷¹ Copolovici, D. M.; Langel, K.; Eriste, E.; Langel, Ü. *ACS Nano* **2014**, *8* (3), 1972–1994.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN

de la membrana plasmática, sin ser tóxicos para la célula (**Figura 53**).^{169,172} Debido a su alta capacidad de internalización y a su potencial capacidad de modificación estructural, los CPPs se han convertido en compuestos con un importante interés farmacológico para ser utilizados en diversas aplicaciones médicas.¹⁶⁷

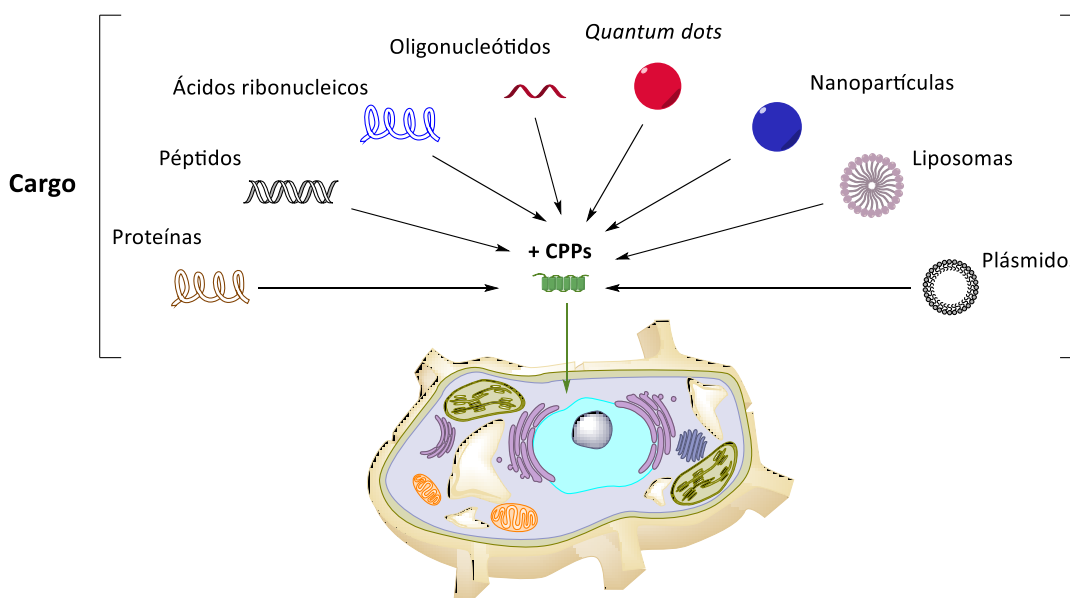


Figura 53. Moléculas cargo que pueden ser transportadas al interior de la célula por los CPPs

5.1.1 Péptidos de internalización celular (CPPs)

En general, los CPPs son péptidos cortos cargados positivamente y compuestos por residuos básicos (lisina o arginina) que constan de menos de 40 aminoácidos. Estos péptidos son capaces de entrar en las células por medio de diversos mecanismos (incluyendo la endocitosis) y realizar la entrega intracelular eficiente de cargos bioactivos conjugados covalentemente o no covalentemente.^{171,173} Los primeros CPPs fueron segmentos de proteínas completas tales como penetratina,¹⁷⁴ y el Tat.^{175,176} Más tarde se encontró que la combinación de varias partes de las proteínas podían

¹⁷² Jobin, M.L.; Blanchet, M.; Henry, S.; Chaignepain, S.; Manigand, C.; Castano, S.; Lecomte, S.; Burlina, F.; Sagan, S.; Alves, I. D. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848* (2), 593–602.

¹⁷³ Antoniou, X.; Borsello, T. *Pharmaceuticals* **2010**, *3* (2), 379–392.

¹⁷⁴ Derossi, D.; Calvet, S.; Trembleau, A.; Brunissen, A.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (30), 18188–18193.

¹⁷⁵ Frankel, A. D.; Pabo, C. O. *Cell* **1988**, *55* (6), 1189–1193.

¹⁷⁶ Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (25), 16010–16017.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN

conducir a nuevas secuencias quiméricas, que también podían tener propiedades para atravesar la membrana celular.¹⁷¹

Existen varios enfoques en cuanto a la clasificación de los CPPs. Por ejemplo, los CPPs se pueden dividir en subgrupos definidos por sus características de origen o de secuencia (**Tabla 6**).¹⁷⁷ Sin embargo, existe una gran variedad en la secuencia de los péptidos. Por tal motivo, la clasificación más utilizada está definida por las propiedades físico-químicas que presentan. Los CPPs se puede clasificar en tres grandes grupos: catiónicos, anfipáticos e hidrófobos.¹⁶⁷

Tabla 6. Ejemplos de CPPs, nombre, secuencia y origen.

Nombre	Secuencia	Origen	Ref.
Tat ^a ₍₄₈₋₆₀₎	GRKKRRQRRRPPQ	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)	175,176,178
Penetratina	RQIKIWFQNRRMKWKK	Homodominio de Antennapedia	174
MAP	KLALKLALKALKALKLA ^b	Péptido Modelo Anfipático	179
VP22	NAKTRRHERRRKLAIER	Virus herpes simplex	180
Poliargininas	R _n , ^a n = 8,9	Secuencia cargada positivamente	181
M918	MVTVLFRRLRIRACGPPRVRV ^a	Proteína supresora de tumores	182
pVEC	LLIILRRRIRKQAHHSK ^a	Cadherina	183

^a Tat₄₈₋₅₇ se describe en la sección 7.8.3

^b C-amida terminal.

Los CPPs catiónicos son una clase de péptidos que presentan pocos residuos ácidos y una carga neta altamente positiva. Los CPPs catiónicos fueron considerados originalmente como “caballos de Troya” ya que entran en las células sin provocar ninguna respuesta celular.¹⁸⁴ Sin embargo, algunos CPPs catiónicos, debido a su estructura o elevada carga neta, pueden inducir una amplia gama de efectos secundarios, incluidos efectos sobre la integridad de membrana y la viabilidad celular.

¹⁷⁷ Koren, E.; Torchilin, V. P. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18* (7), 385–393.

¹⁷⁸ Green, M.; Loewenstein, P. M. *Cell* **1988**, *55* (6), 1179–1188.

¹⁷⁹ Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1998**, *1414* (1-2), 127–139.

¹⁸⁰ Elliott, G.; O’Hare, P. *Cell* **1997**, *88* (2), 223–233.

¹⁸¹ Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (8), 5836–5840.

¹⁸² El-Andaloussi, S.; Johansson, H. J.; Holm, T.; Langel, Ü. **2007**, *15* (10), 1820–1826.

¹⁸³ Säälk, P.; Elmquist, A.; Hansen, M.; Padari, K.; Saar, K.; Viht, K.; Langel, U.; Pooga, M. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (6), 1246–1253.

¹⁸⁴ Verdurmen, W. P. R.; Brock, R. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32* (2), 116–124.

Aunque la carga tiene un papel crucial en la absorción de CPPs catiónicos, la presencia de otros residuos también es relevante. Por ejemplo, la internalización celular de (RQIKIWFQNRRMK**W**KK) es interrumpida por la variación de W₁₄ (triptófano) a F (fenilalanina).¹⁸⁵ Una clase particularmente interesante de CPPs son los péptidos ricos en prolina (Pro-péptidos).¹⁸⁶

5.1.2 CPPs ricos en prolina

Los CPPs ricos en prolina (Pro-péptidos), se caracterizan por contener una plataforma de prolina con una cierta rigidez conferida por su anillo de pirrolidina, el cual le confiere al esqueleto peptídico cierto impedimento estérico, importante para su comportamiento como CPP.¹⁸⁶ Los péptidos derivados de la cis- γ -amino-L-prolina presentan una significativa estabilidad debido a la presencia del esqueleto γ -peptídico, el cual impide problemas asociados a la presencia de proteasas, un importante factor limitante en los CPPs.¹⁸⁷ El carácter anfipático asociado a la presencia de cadenas laterales carbonadas unidas al átomo de nitrógeno del anillo pirrolidínico, es un factor influyente en su potencial capacidad para atravesar la membrana plasmática.^{188,189} La variación estructural de la cadena lateral ofrece una amplia gama de combinaciones, donde se pueden obtener compuestos con diferente carácter hidrófobo/hidrófilo y por consiguiente con diferentes propiedades como CPPs (**Figura 54**).¹⁹⁰

Un grupo importante de Pro-péptidos son los γ -péptidos sintetizados a partir de la cis- γ -amino-L-prolina (**Figura 54d**). Estos compuestos, además de ser capaces de atravesar membranas celulares, pueden ser substituidos en la función -NH- mediante reacciones de acilación, alquilación o guanidilación con el fin de modular sus propiedades hidrofóbicas, hidrofílicas o anfipáticas.^{190,191} Royo, Albericio y colaboradores,

¹⁸⁵ Prochiantz, A. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, 6 (5), 629–634.

¹⁸⁶ Pujals, S.; Giralt, E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 60 (4-5), 473–484.

¹⁸⁷ Lindgren, M. E.; Hällbrink, M. M.; Elmquist, A. M.; Langel, U. *Biochem. J.* **2004**, 377 (Pt 1), 69–76.

¹⁸⁸ Fernández-Carneado, J.; Kogan, M. J.; Pujals, S.; Giralt, E. *Biopolymers* **2004**, 76 (2), 196–203.

¹⁸⁹ Deshayes, S.; Plénat, T.; Aldrian-Herrada, G.; Divita, G.; Le Grimellec, C.; Heitz, F. *Biochemistry* **2004**, 43 (24), 7698–7706.

¹⁹⁰ Farrera-Sinfreu, J.; Giralt, E.; Castel, S.; Albericio, F.; Royo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 9459–9468.

¹⁹¹ Pulido-Villamil, X. *Péptidos miméticos con capacidad de atravesar barreras biológicas*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. **2014**.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN

sintetizaron una familia de γ -hexapéptidos sustituidos basados en la *cis*- γ -amino-L-prolina, los cuales además de poseer una buena habilidad para atravesar la membrana celular en células HeLa (células de cáncer cérvico-uterino) y COS-1 (línea celular de riñón de simio), presentaron baja toxicidad y una buena resistencia a proteasas.¹⁹⁰

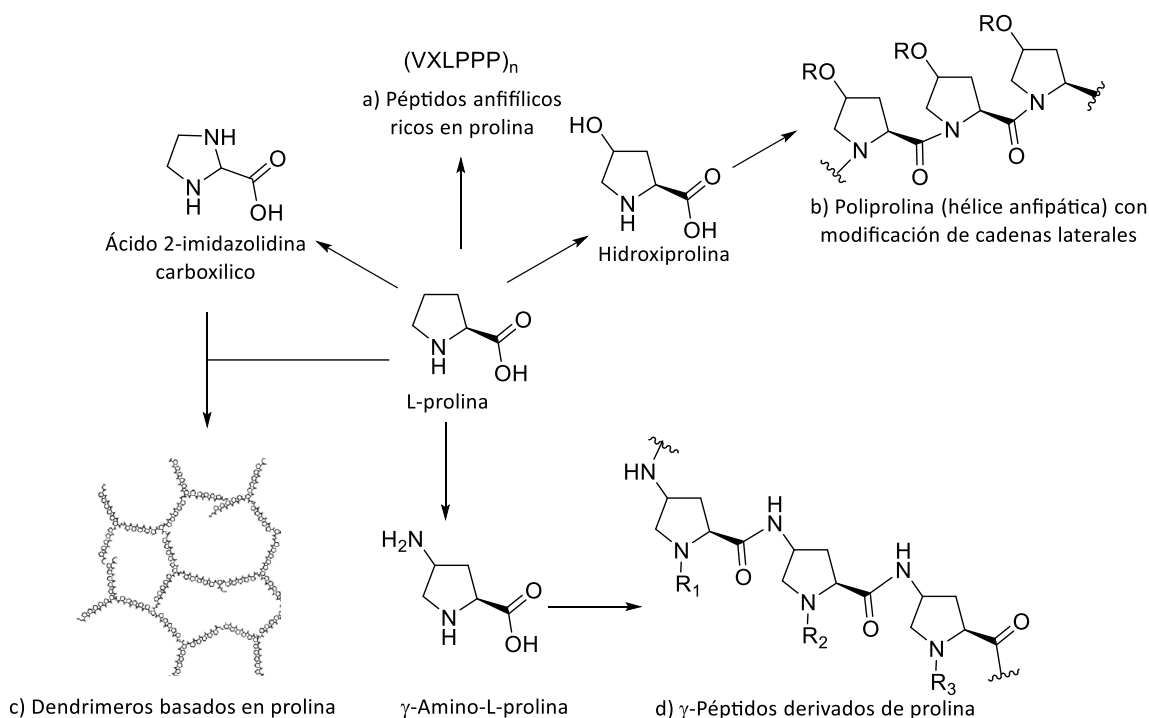


Figura 54. Algunas familias de CPPs basadas en Pro-péptidos: a) Pro-péptidos anfipáticos, donde X=Arg, His, Lys y n=1 a 3; b) Poliprolinas anfipáticas derivadas de L-hidroxiprolina c) Dendrímeros basados en prolina d) γ -péptidos derivados de prolina^{21a}, sintetizados a partir de la *cis*- γ -amino-L-prolina.¹⁸⁶

La continuación de este trabajo de investigación, realizada por los Doctores Carbajo (2012),¹⁹² y Pulido (2014),¹⁹¹ demostró que los péptidos que poseen residuos guanilados en las cadenas laterales, exhiben una mayor eficiencia de internalización celular en células HeLa y en parásitos de *Leshmania donovani*, concluyendo que el carácter catiónico y la hidrofobicidad de los γ,γ -péptidos basados en prolina son factores claves que intervienen en la capacidad de internalización en las diferentes líneas celulares. Asimismo, concluyeron que los residuos guanilados de las cadenas laterales ejercen una mayor influencia que la densidad de carga positiva de la molécula. Ello es debido a que los γ -péptidos CF-Gp-4 y CF-Gp-10, fueron capaces de

¹⁹² Carbajo, D. *γ -Peptides based on proline derivatives: novel applications and secondary structure*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. 2012.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN

internalizar en un cultivo primario de células MAEC, mientras CF-Gp-7 lo hizo aunque en menor medida (CF-Gp-10>CF-Gp-4>>>CF-Gp-7) (Figura 55).

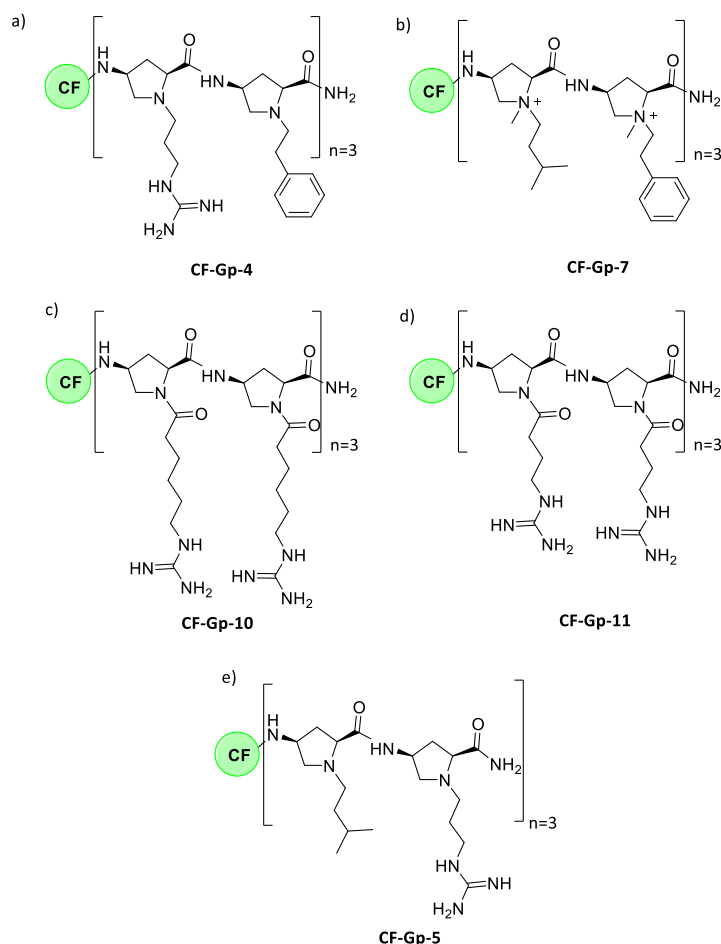


Figura 55. Algunos γ -péptidos guanidilados basados en *cis*- γ -amino-L-prolina

5.1.3 Mecanismos de internalización celular de los CPPs

A pesar del gran número de estudios sobre éste tema, los mecanismos de absorción de los CPPs a través de la membrana plasmática no han sido resueltos totalmente.¹⁹³ Una de las dificultades en la elucidación de estos mecanismos, ha sido las grandes diferencias entre los péptidos, debido a la gran variación de carga y longitud. Además, estos compuestos también pueden interactuar con múltiples moléculas de la superficie celular, incluyendo lípidos de membrana y proteoglicanos asociados a la membrana.^{194,195} Sin embargo, lo que es evidente es que los CPPs pueden ser

¹⁹³ Fonseca, S. B.; Pereira, M. P.; Kelley, S. O. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (11), 953–964.

¹⁹⁴ Nakase, I.; Takeuchi, T.; Tanaka, G.; Futaki, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (4-5), 598–607.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN

absorbidos por las células a través de múltiples vías, tales como la translocación directa a través de la bicapa de la membrana y la endocitosis mediada por absorción (Figura 56).

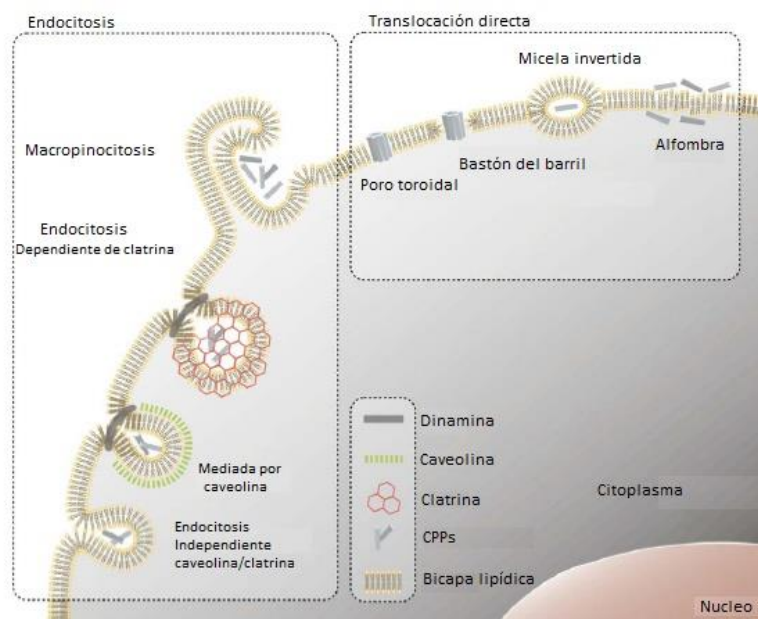


Figura 56. Mecanismos de absorción de los CPPs a través de la membrana celular. Adaptado de Trabulo y colaboradores, 2010.¹⁹⁶

Existe un gran número de publicaciones donde se observa la discrepancia en las conclusiones y donde los CPPs utilizan mecanismos alternativos de internalización celular según el experimento. Sin embargo, es posible que estos diferentes mecanismos actúen al mismo tiempo. Esto depende principalmente de las condiciones experimentales.¹⁹⁷ Algunos estudios sobre el mecanismo de internalización de los CPPs de tipo Pro-péptidos, sugieren que el proceso de internalización celular inicia con la captura del CPP con ayuda de las cargas negativas presentes en la matriz extracelular,^{198,199,200} concretamente los proteoglicanos presentes en la superficie celular. Los proteoglicanos son un grupo heterogéneo de

¹⁹⁵ Nakase, I.; Akita, H.; Kogure, K.; Gräslund, A.; Langel, U.; Harashima, H.; Futaki, S. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 1132–1139.

¹⁹⁶ Trabulo, S.; Cardoso, A. L.; Mano, M.; de Lima, M. C. P. *Pharmaceuticals* **2010**, *3* (4), 961–993.

¹⁹⁷ Vivès, E.; Schmidt, J.; Pèlegri, A. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2008**, *1786* (2), 126–138.

¹⁹⁸ Suzuki, T.; Futaki, S.; Niwa, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (4), 2437–2443.

¹⁹⁹ Console, S.; Marty, C.; García-Echeverría, C.; Schwendener, R.; Ballmer-Hofer, K. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (37), 35109–35114.

²⁰⁰ Fuchs, S. M.; Raines, R. T. *Biochemistry* **2004**, *43* (9), 2438–2444.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN

proteínas con polisacáridos glicosaminoglicanos polisulfatados (GAG). Nakase y colaboradores,^{201,202} concluyeron que al aumentar el contenido de arginina en la secuencia del CPP, aumenta la interacción electrostática entre la membrana plasmática y el péptido, factores que determinan el proceso de internalización celular.

Una vez los Pro-péptidos son capturados en la membrana celular, es posible que se produzcan alguno de los dos mecanismos de internalización antes mencionados, en cantidades discretas o con un patrón difuso dentro de la célula. Sin embargo, la proporción de estos dos mecanismos depende de la concentración y la temperatura a la que se realiza el experimento de internalización.^{203,204}

5.1.4 γ -Péptidos que atraviesan la membrana celular de *Leishmania donovani* y *Leishmania pifanoi*

5.1.4.1 Leishmaniasis

Las enfermedades infecciosas como la malaria, tuberculosis, filariasis, leishmaniasis visceral, lepra y la infección por el VIH constituyen una enorme problemática para la salud mundial. El control de dichas enfermedades, así como la erradicación de nuevos brotes se ha convertido en un tema prioritario para la salud pública. La leishmaniasis ha sido categorizada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre las enfermedades de categoría-1, las cuales están descritas como enfermedades emergentes y no controladas.²⁰⁵ Esta enfermedad sigue siendo una de las afecciones más olvidadas del mundo, afectando en gran medida a los países en vías de desarrollo; en el año 2010, más de 350 millones de personas se encontraban en riesgo de contraer

²⁰¹ Nakase, I.; Niwa, M.; Takeuchi, T.; Sonomura, K.; Kawabata, N.; Koike, Y.; Takehashi, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Simpson, J. *Mol. Ther.* **2004**, *10* (6), 1011–1022.

²⁰² Nakase, I.; Tadokoro, A.; Kawabata, N.; Takeuchi, T.; Katoh, H.; Hiramoto, K.; Negishi, M.; Nomizu, M.; Sugiura, Y.; Futaki, S. *Biochemistry* **2007**, *46* (2), 492–501.

²⁰³ Fretz, M. M.; Penning, N. a; Al-Taei, S.; Futaki, S.; Takeuchi, T.; Nakase, I.; Storm, G.; Jones, A. T. *Biochem. J.* **2007**, *403* (2), 335–342.

²⁰⁴ Futaki, S.; Nakase, I.; Tadokoro, a; Takeuchi, T.; Jones, a T. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35* (Pt 4), 784–787.

²⁰⁵ Jain, K.; Jain, N. K. *J. Immunol. Methods* **2015**, *422*, 1–12.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN

leishmaniasis y aproximadamente 2 millones de casos nuevos se producen anualmente.²⁰⁶

Esta patología es causada por la infección de una de las especies de parásitos protozoarios del género *Leishmania* pertenecientes a la familia Trypanosomatidae (**Tabla 7**), la cual mantienen su ciclo de vida a través de la transmisión entre insecto (mosca de arena) y un huésped mamífero (**Figura 57**).²⁰⁷ Existen tres tipos diferentes de manifestaciones de la enfermedad: cutánea, muco-cutánea y visceral, donde 0.5 millones de casos por año corresponden a la leishmaniasis visceral, causada principalmente por los parásitos *Leishmania infantum* y *Leishmania donovani*.²⁰⁸

Tabla 7. Las principales especies de *Leishmania* que afectan a los seres humanos.²⁰⁶

	Principal manifestación de la enfermedad	Especies
Viejo Mundo, subgénero <i>Leishmania</i>	Leishmaniasis visceral	<i>Leishmania donovani</i> <i>Leishmania infantum</i>
	Leishmaniasis cutánea	<i>Leishmania major</i> <i>Leishmania tropica</i> <i>Leishmania aethiopica</i>
	Leishmaniasis cutánea difusa	<i>Leishmania aethiopica</i>
	Leishmaniasis visceral	<i>Leishmania infantum</i>
Nuevo Mundo, subgénero <i>Leishmania</i>	Leishmaniasis cutánea	<i>Leishmania infantum</i> <i>Leishmania mexicana</i> <i>Leishmania pifanoi</i> <i>Leishmania amazonensis</i>
	Leishmaniasis cutánea difusa	<i>Leishmania mexicana</i> <i>Leishmania amazonensis</i>
	Leishmaniasis cutánea	<i>Leishmania braziliensis</i> <i>Leishmania guyanensis</i> <i>Leishmania panamensis</i> <i>Leishmania peruviana</i>
Nuevo Mundo, subgénero <i>Viannia</i>	Leishmaniasis mucocutánea	<i>Leishmania braziliensis</i> <i>Leishmania panamensis</i>

Los parásitos de *Leishmania* son organismos dimórficos, es decir, con dos formas morfológicas en su ciclo de vida: amastigotes en el sistema fagocítico del huésped mamífero y promastigotes en los órganos digestivos del vector (mosquito). Estos

²⁰⁶ WHO. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **2010**, No. 949, 22–26.

²⁰⁷ Kaye, P.; Scott, P. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, 9 (8), 604–615.

²⁰⁸ Tiuman, T. S.; Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; Nakamura, C. V. *Int. J. Infect. Dis.* **2011**, 15 (8), 525–532.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN

parásitos se internalizan a través de los macrófagos en el hígado, el bazo y la médula ósea.^{209, 210}

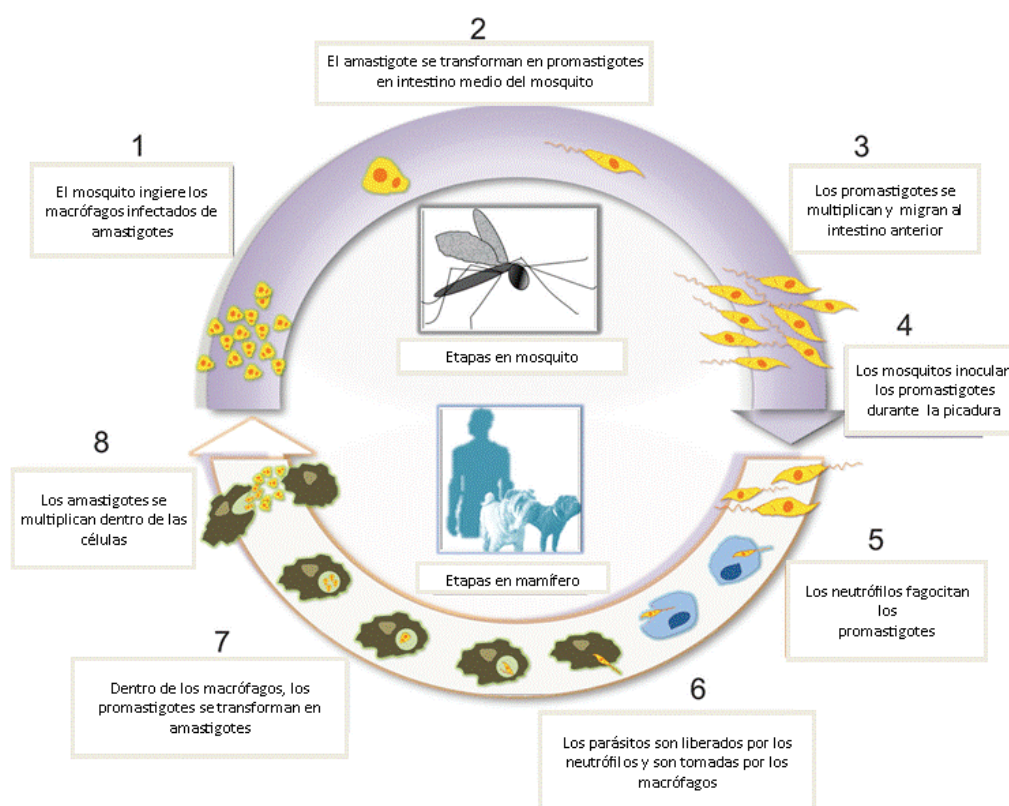


Figura 57. Ciclo de vida del parásito de *Leishmania*. Adaptado de Gutiérrez y colaboradores, 2015.²¹¹

Las vacunas contra esta enfermedad se encuentran todavía en desarrollo y el tratamiento clásico de la leishmaniasis es un procedimiento largo que requiere la administración de fármacos tóxicos con severas reacciones adversas, características que a menudo conllevan al abandono del tratamiento. Por otro lado, los fármacos comúnmente utilizados, no eliminan completamente los parásitos de los individuos infectados, lo que puede contribuir a la resistencia del parásito y reducir en gran medida la eficacia de los medicamentos convencionales.^{208,212,213,214} Durante las

²⁰⁹ Kamhawi, S. *Trends Parasitol.* **2006**, 22 (9), 439–445.

²¹⁰ Burchmore, R. J.; Barrett, M. P. *Int. J. Parasitol.* **2001**, 31 (12), 1311–1320.

²¹¹ Gutiérrez, V.; Seabra, A. B.; Reguera, R. M.; Khandare, J.; Calderón, M. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45, 152–168.

²¹² Bezerra, D.M.J.; Sampaio, C.; Alameida, A.; Mothé, D.; Tavares, P. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–11.

²¹³ De Oliveira Guerra, J. A.; Prestes, S. R.; Silveira, H.; Coelho, L. I. D. A. R. C.; Gama, P.; Moura, A.; Amato, V.; Barbosa, M. D. G. V.; de Lima Ferreira, L. C. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, 5 (3), 1–5.

²¹⁴ Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H. *Society* **2006**, 19 (1), 111–126.

manifestaciones clínicas y que según el tipo de parásito varía la distribución anatómica de los síntomas, la combinación de nuevos fármacos con sistemas de liberación adecuados, vacunas y pruebas de diagnóstico eficaces, puede ser un enfoque prometedor para dar respuesta a los requisitos de la OMS contra la leishmaniasis.²¹¹

5.1.4.2 γ -Péptidos conjugados como vector leishmanicida

Como hemos mencionado a lo largo de este capítulo, la permeabilidad de las membranas biológicas es uno de los factores determinantes en el proceso farmacocinético de un medicamento. Debido a esto, una gran variedad de moléculas bioactivas no pueden atravesar la membrana plasmática, convirtiéndose en un gran obstáculo para un tratamiento eficaz. Los péptidos de internalización celular (CPPs) son candidatos ideales, debido a su capacidad para el transporte de diversas moléculas cargo bioactivas (complejadas o conjugadas covalentemente) a través de las membranas plasmáticas.²¹⁷ La investigación actual relacionada con CPPs se centra principalmente en su acción como sistema de liberación de fármacos en líneas celulares de mamíferos.²¹⁸ Sin embargo, la investigación en protozoos es un campo inexplorado.²¹⁹ La función y la estructura de la membrana plasmática de tripanosomátidos como *Leishmania*, son diferentes a las descritas para las células mamíferas, lo que podría contribuir a la poca información sobre las aplicaciones de los CPPs en estos parásitos. Rivas y colaboradores,²²⁰ evaluaron el uso de conjugados peptídicos (Tat₄₈₋₆₀ como vector transportador y miltefosine como leishmanicida) (**Figura 58f**) sobre parásitos de *L. donovani*. Los resultados mostraron la capacidad de internalización y baja toxicidad de estos conjugados tanto en promastigotes como en amastigotes, logrando evitar la resistencia parasitaria debida a la acumulación del fármaco.

²¹⁷ Sugano, K.; Kansy, M.; Artursson, P.; Avdeef, A.; Bendels, S.; Di, L.; Ecker, G. F.; Faller, B.; Fischer, H.; Gerebtzoff, G.; Lennernaes, H.; Senner, F. *Nat. Rev. Discov.* **2010**, *9* (8), 597–614.

²¹⁸ Waugh, J. M.; Lee, J.; Dake, M. D.; Browne, D. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *683*, 553–572.

²¹⁹ Rivas, L.; Luque-Ortega, J. R.; Andreu, D. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2009**, *1788* (8), 1570–1581.

²²⁰ Luque-Ortega, J. R.; De La Torre, B. G.; Hornillos, V.; Bart, J. M.; Rueda, C.; Navarro, M.; Amat-Guerri, F.; Acuña, a. U.; Andreu, D.; Rivas, L. *J. Control. Release* **2012**, *161* (3), 835–842.

Péptido ricos en prolina como los γ -péptido CF-Gp-11, CF-Gp-14 y CF-Gp-15 (**Figura 59**), evidencian una elevada capacidad de atravesar la membrana del parásito *L. donovani*, al ser comparado con CF-Tat, sin embargo, al aumentar la cantidad de residuos guanidilados, presentan una toxicidad significativamente alta sobre los parásitos.¹⁹¹

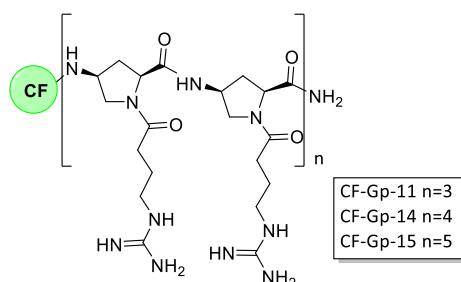


Figura 59. Estructura química de CF-Gp-11, CF-Gp-14 y CF-Gp-15.

5.1.5 γ -Péptidos derivados de ciclobutano

Nuestro grupo de investigación ha realizado la síntesis estereoselectiva de β -^{1,221,222} γ -aminoácidos no naturales,¹⁵⁸ incorporando el ciclobutano como elemento de restricción conformacional de la cadena principal. El estudio de la primera generación de péptidos híbridos de γ,γ -ciclobutano-prolina, fue realizado por la Doctora Raquel Gutierrez-Abad. En éste estudio se prepararon dos series diastereoméricas de γ,γ -péptidos, alternando los aminoácidos ciclobutánicos enantioméricos (1*S*,3*R*)-**73** o (1*R*,3*S*)-**74** y la 4-aminoprolina **75** (**Figura 60**), convenientemente desprotegidos.⁶

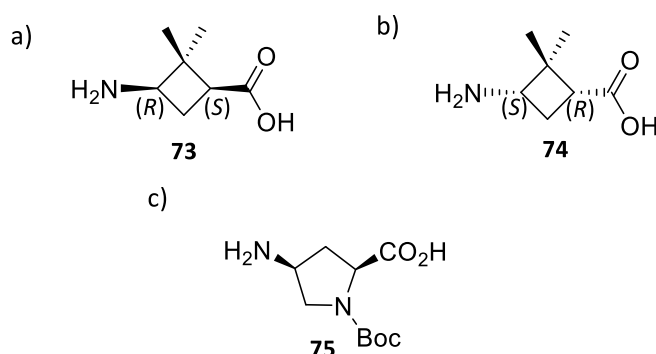


Figura 60. γ -Aminoácidos utilizados en la síntesis de la primera generación de γ,γ -péptidos híbridos

²²¹ Rúa, F.; Boussert, S.; Parella, T.; Díez-Pérez, I.; Branchadell, V.; Giralt, E.; Ortuño, R. M. *Org. Lett.* **2007**, 9 (18), 3643–3645.

²²² Torres, E.; Gorrea, E.; Da Silva, E.; Nolis, P.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Org. Lett.* **2009**, 11 (11), 2301–2304.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN

Los resultados demostraron que la presencia de la plataforma ciclobutánica induce estructuras rígidas con diferentes conformaciones en solución. Los γ,γ -péptidos sintetizados (**Figura 61** y **Figura 62**), exhibieron una baja toxicidad y atravesaron moderadamente la membrana de las células HeLa, evidenciando que la longitud del péptido es un factor importante en la habilidad de internalización y que la configuración absoluta del aminoácido ciclobutánico no tenía una influencia relevante, en la capacidad de internalización celular.

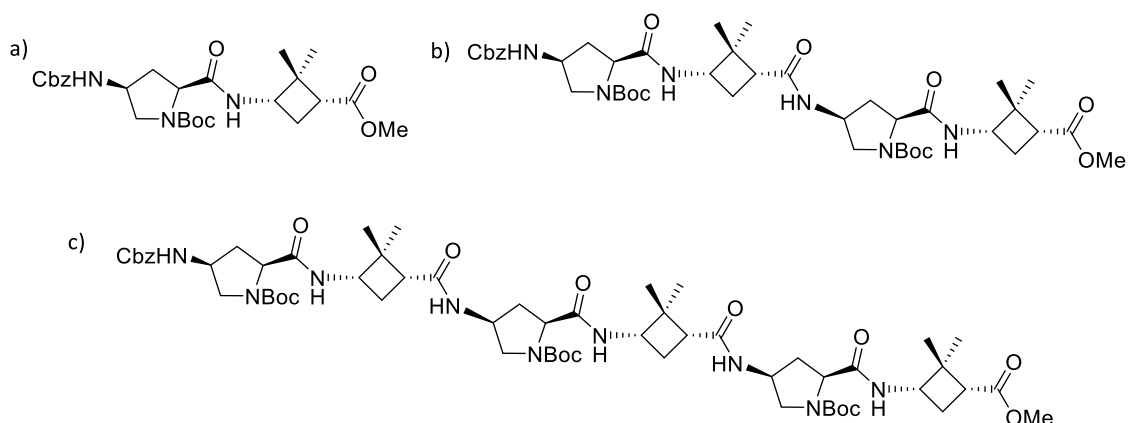


Figura 61. Estructuras sintetizadas para la primera generación de γ,γ -péptidos híbridos (1S,3R)-ciclobutano-prolina

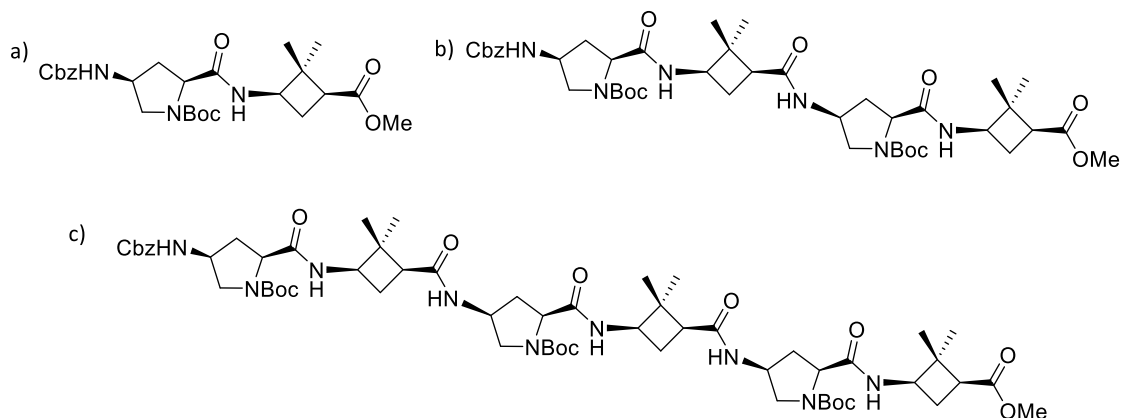


Figura 62. Estructuras sintetizadas para la primera generación de γ,γ -péptidos híbridos (1R,3S)-ciclobutano-prolina.

De igual manera, la Doctora Esther Gorrea de nuestro grupo de investigación, realizó el estudio de la segunda generación de γ,γ -hexapéptidos, realizando modificaciones de las cadenas laterales, introducidas a través del grupo α -amino (N^α) de los monómeros de prolina (**75**). Estos péptidos no presentaron toxicidad en células HeLa.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN

Además, se evidenció que el péptido que exhibía la mejor capacidad de internalización en esta misma línea celular era el γ,γ -hexapéptido ciclobutano-prolina con un espaciador de cinco carbonos entre el átomo N^α y el grupo guanidinio (**h**). El estudio biológico de los péptidos ciclobutano-prolina, permitió demostrar, que la introducción de una plataforma ciclobutánica dentro de la secuencia peptídica, proporciona un buen equilibrio entre la carga y la hidrofobicidad, dando como resultado una menor toxicidad y un moderado grado de internalización.¹

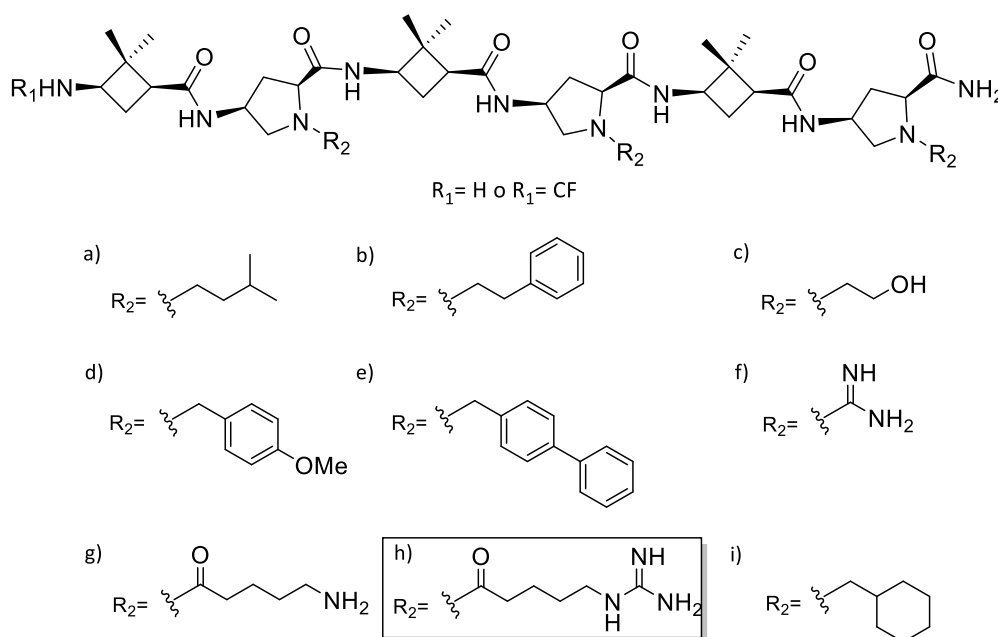
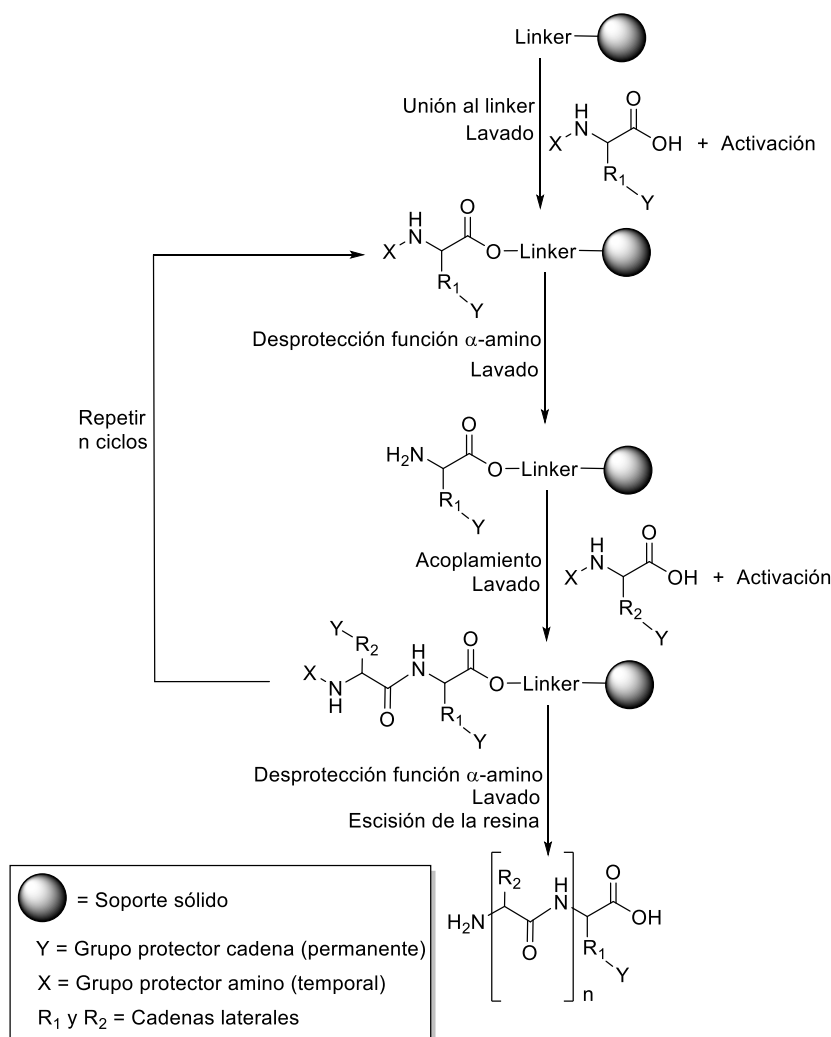


Figura 63. Estructuras sintetizadas para la segunda generación de γ,γ -péptidos híbridos (1*R*,3*S*)-ciclobutano-prolina

5.1.6 Síntesis en fase sólida (SFS).

En fase sólida, un péptido se construye mediante ciclos continuos de desprotección, acoplamiento y lavado (**Esquema 34**). Debido a la necesidad de numerosos pasos repetitivos, el uso de soportes sólidos presenta evidentes ventajas sintéticas, ya que el exceso de reactivos y productos secundarios se pueden separar fácilmente por medio de procesos de lavado y filtración.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN



Esquema 34. Protocolo general de síntesis de péptidos en fase sólida.

En la SFS, el primer aminoácido C-terminal N-prottegido se acopla a través de su grupo carboxilo a una resina que tiene grupos hidroxilo (o cloro) o grupos amino libres en su superficie para producir, respectivamente, un éster- o amido-péptido anclado a la resina. Al finalizar la secuencia peptídica se obtendrá un péptido con una función ácido C-terminal o amida C-terminal, dependiendo de la resina utilizada. Después de fijar el primer aminoácido, se genera la secuencia peptídica deseada de forma lineal desde el extremo C-terminal al N-terminal (estrategia C→N). El crecimiento del esqueleto peptídico se realiza por ciclos repetitivos de reacciones de acoplamiento y desprotección de la función amina. Este proceso (desprotección/acoplamiento) se repite hasta que se obtiene la secuencia deseada.

CAPÍTULO 5: INTRODUCCIÓN

Los grupos funcionales de las cadenas laterales deben ser protegidos con grupos permanentes (Y) que son estables en las condiciones de reacción utilizadas durante la elongación del péptido. El grupo protector temporal (X) se puede eliminar fácilmente en condiciones suaves que preservan la integridad del péptido y previenen la epimerización. Adicionalmente se puede incorporar a la cadena peptídica 5(6)-carboxifluoresceína (CF) como fluorocromo, lo cual permite la detección del péptido que ha atravesado la membrana en experimentos de internalización celular (sección 7.9.3). Finalmente, Los grupos protectores (Y) son retirados de forma análoga a la cadena lateral y el péptido se libera de la resina **Esquema 34**.²²³

Las reacciones de acoplamiento y las desprotecciones de la función -NH- se comprueban por medio del test de ninhidrina. La ninhidrina reacciona con aminas primarias dando un compuesto de color azul que puede ser identificado visualmente. Así mismo las reacciones o desprotecciones de las aminas secundarias pueden ser verificadas por medio de la prueba de cloranilo. Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas secundarias, mientras que una coloración azulada de la resina indica la presencia de aminas secundarias. Una vez sintetizadas las peptidil-resinas, se procede a la escisión del péptido del soporte sólido mediante acidólisis con HF o con TFA, según el tipo de resina utilizada. Los productos escindidos del soporte sólido son purificados y caracterizados.

²²³ Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. *Mol. Biotechnol.* **2006**, 33 (3), 239–254.

5.2 Objetivos

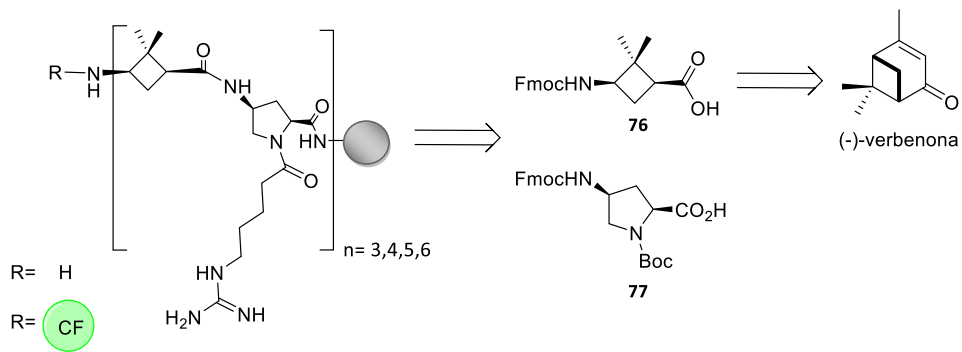
El control de la hidrofobicidad y la presencia de grupos polares o catiónicos son factores de gran importancia en los CPPs, ya que determinan las propiedades de internalización celular de estos compuestos. Trabajos previos realizados en nuestro grupo de investigación han evidenciado la influencia del anillo ciclobutánico en el equilibrio carga-hidrofobicidad de los γ,γ -péptidos ciclobutano-prolina. Teniendo en cuenta estos resultados, se propuso realizar la síntesis estereoselectiva de una serie de péptidos híbridos de γ,γ -ciclobutano-prolina de 6, 8, 10 y 12 unidades (**serie 1**), así como una serie de β,γ -péptidos híbridos ciclobutano-prolina de 8, 10 y 12 unidades (**serie 2**) y su evaluación como potenciales vectores transportadores de fármacos para diferentes barreras biológicas, como la membrana citoplasmática de células HeLa y la de los parásitos de *Leishmania donovani* y *Leishmania pifanoi*.

Para desarrollar el objetivo principal, se propusieron los siguientes objetivos específicos.

- ❖ Sintetizar estereoselectivamente y caracterizar los monómeros convenientemente protegidos **76 (Esquema 35)** para la serie 1, así como **80 y 82** para la serie 2 (**Esquema 36**).
- ❖ Sintetizar en fase sólida los péptidos híbridos de γ,γ -ciclobutano-prolina de 6, 8, 10 y 12 unidades con y sin CF (serie 1) utilizando la estrategia Fmoc/Boc (**Esquema 35**), y los β,γ -péptidos híbridos ciclobutano-prolina de 8, 10 y 12 unidades con y sin CF (serie 2) utilizando la estrategia Fmoc/Alloc (**Esquema 36**), así como el péptido TAT₍₄₈₋₅₇₎ con y sin CF utilizado como referencia.
- ❖ Establecer la capacidad de atravesar la membrana citoplasmática de células HeLa, de los siete péptidos basados en ciclobutano-prolina, utilizando como referencia el péptido Tat₄₈₋₅₇ (**Esquema 37**), por medio de las técnicas de citometría de flujo y microscopía confocal.

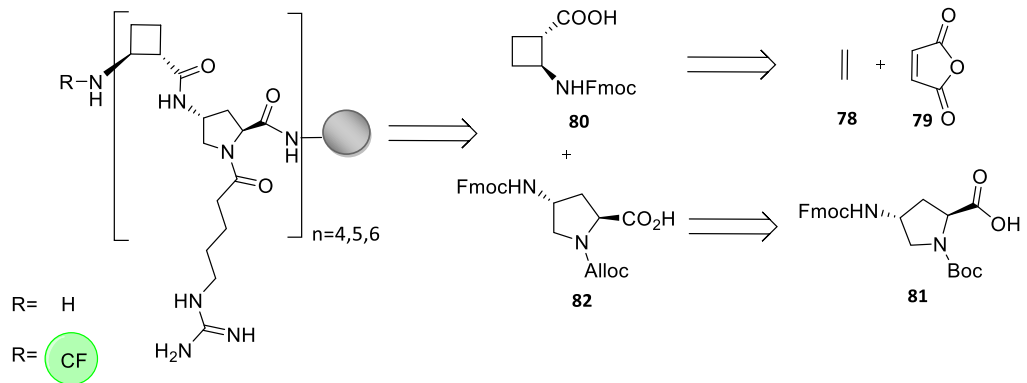
CAPITULO 5: OBJETIVOS

Serie 1

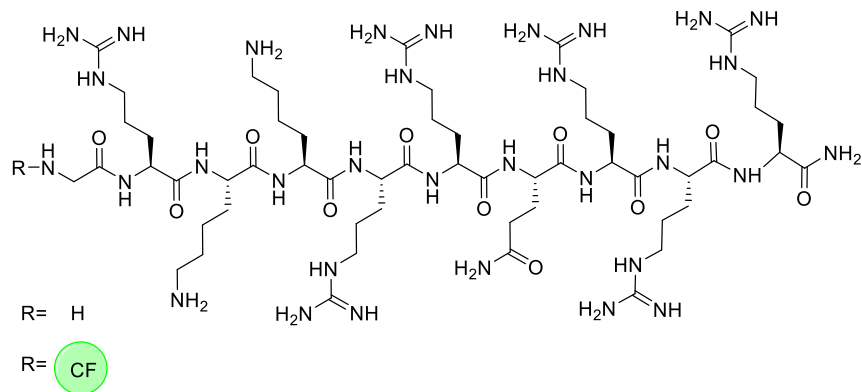


Esquema 35. Retrosíntesis de los péptidos híbridos de γ,γ -ciclobutano-prolina de 6, 8, 10 y 12 unidades (Serie 1)

Serie 2



Esquema 36. Retrosíntesis de los péptidos híbridos de β,γ -ciclobutano-prolina de 8, 10 y 12 unidades (Serie 2)



Esquema 37. Estructura péptido de referencia Tat₄₈₋₅₇ con y sin CF

- ❖ Evaluar la capacidad de estos péptidos ciclobutánicos de atravesar la membrana de promastigotes de *Leishmania donovani* y amastigotes *Leishmania pifanoi* por medio de citometría de flujo.

CAPITULO 5: OBJETIVOS

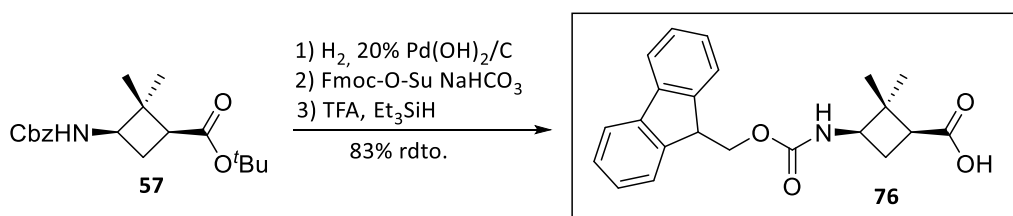
- ❖ Determinar la toxicidad de los péptidos sintetizados sobre células HeLa, promastigotes de *Leishmania donovani* y amastigotes *Leishmania pifanoi* utilizando el método de MTT.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Síntesis de los monómeros 76 (serie 1), 80 y 82 (serie 2).

Considerando que los péptidos híbridos de γ,γ -ciclobutano-prolina (serie 1) se sintetizaron en fase sólida utilizando la estrategia Fmoc/Boc, fue necesario proteger la función amina del γ -aminoácido ciclobutánico **76** con el grupo Fmoc (carbamato de 9-fluorenilmetilo), el cual presenta una alta estabilidad en presencia de agentes ácidos, pero puede eliminarse fácilmente en ciertas condiciones básicas.

El compuesto **76** fue preparado a partir del γ -aminoácido protegido ortogonalmente **57**. Primero se realizó la hidrogenación catalítica del carbamato de bencilo en presencia de $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ en MeOH dando como resultado la amina libre (**Esquema 38**), la cual se protegió en forma de Fmoc utilizando *N*-(9-fluorenilmetoxicarboniloxi) succinimida (Fmoc-OSu) y NaHCO_3 en una mezcla dioxano-agua. Finalmente, se procedió a la eliminación selectiva del éster *tert*-butílico utilizando ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de trietilsilano en DCM, obteniendo el ácido **76** con un 83% de rendimiento en tres etapas.



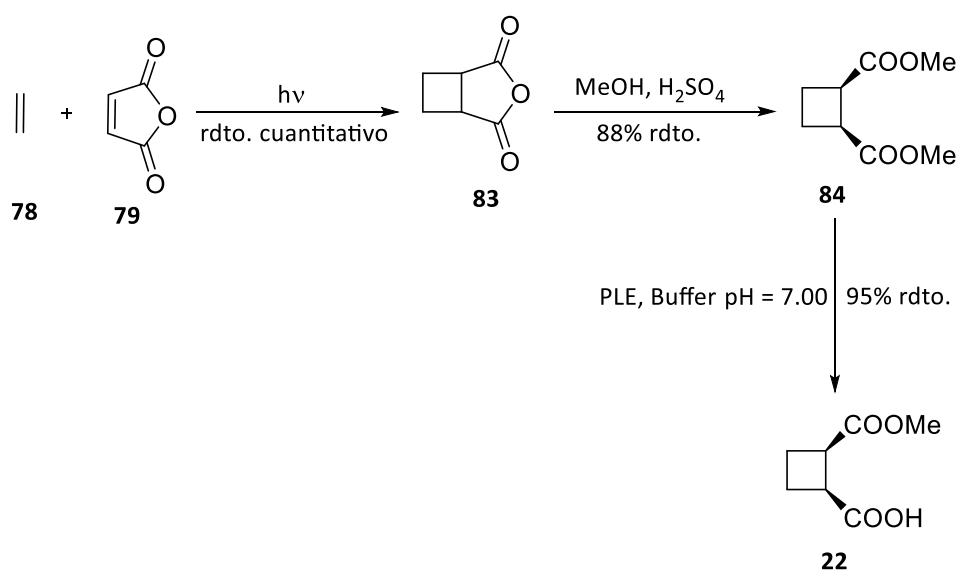
Esquema 38. Síntesis del γ -aminoácido **76**

Al mismo tiempo, los β,γ -péptidos híbridos ciclobutano-prolina (serie 2) se sintetizaron utilizando la estrategia Fmoc/Alloc. Por lo tanto, la función amina del β -aminoácido ciclobutánico **80** fue protegida igualmente con el grupo Fmoc.

La síntesis del monómero **80** se inició con la cicloadición fotoquímica [2+2] entre el etileno **78** y el anhídrido maleico **79**, siguiendo la metodología optimizada por nuestro

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

grupo de investigación.²²⁴ La cicloadición se realizó a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un reactor de Pyrex en presencia de acetona como disolvente y fotosensibilizador (**Esquema 39**). El sistema se saturó con etileno y posteriormente se irradió durante 5 horas usando una lámpara de mercurio de 400 W, obteniendo el anhídrido ciclobutánico **83** con rendimiento cuantitativo. Una vez se obtuvo el fotoaducto, se realizó una esterificación de Fischer obteniendo el diéster **84** con un rendimiento del 88%. La hidrólisis asimétrica del diéster meso **84** por acción de la esterasa de hígado de cerdo (PLE), generó el hemiéster (1*S*,2*R*)-**22** ópticamente activo con un ee >97% y un rendimiento de reacción del 95%.²²⁵



Esquema 39. Síntesis del hemiéster (1*S*,2*R*)-**22**

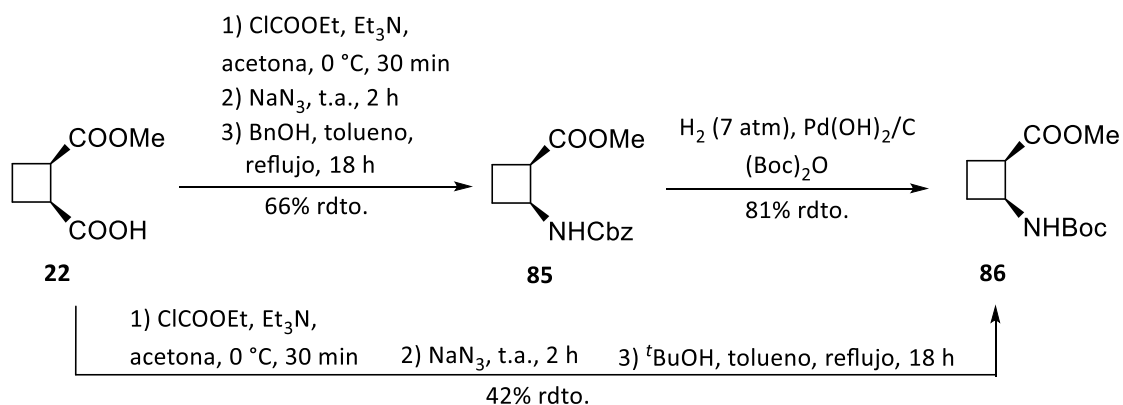
El hemiéster (1*S*,2*R*)-**22** se transformó en el respectivo carbamato de *tert*-butilo **86**, utilizando dos rutas sintéticas (**Esquema 40**). En la primera ruta, se preparó un anhídrido mixto, utilizando cloroformiato de etilo en medio básico a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se formó la acilazida por medio de la adición de la azida de sodio. La acilazida preparada, fue llevada a reflujo en tolueno en presencia de alcohol bencílico para generar el β -aminoácido *N*-Cbz **85** con un rendimiento del 66%. Por último se realizó el cambio de grupo protector de carbamato de bencilo a carbamato de *tert*-butilo, por medio de una hidrogenación catalítica en presencia de dicarbonato de di-

²²⁴ Gorrea, E. *Cyclobutane peptides and ureas: synthesis, folding, self-assembling and some biological properties*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. **2011**.

²²⁵ Sabbioni, G.; Jones, J. B. *J. Org. Chem.* **1987**, 52 (20), 4565–4570.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

tert-butilo, obteniéndose el β -aminoácido (1*R*,2*S*)-**86** con un rendimiento del 81%. Una ruta semejante se utilizó para preparar el mismo compuesto (1*R*,2*S*)-**86**. La acilazida se preparó siguiendo la misma metodología de la primera ruta, pero el isocianato se preparó *in situ* en presencia de alcohol *tert*-butílico, generando el β -aminoácido *N*-Boc **86** con un rendimiento menor que el obtenido en la primera ruta (42%).



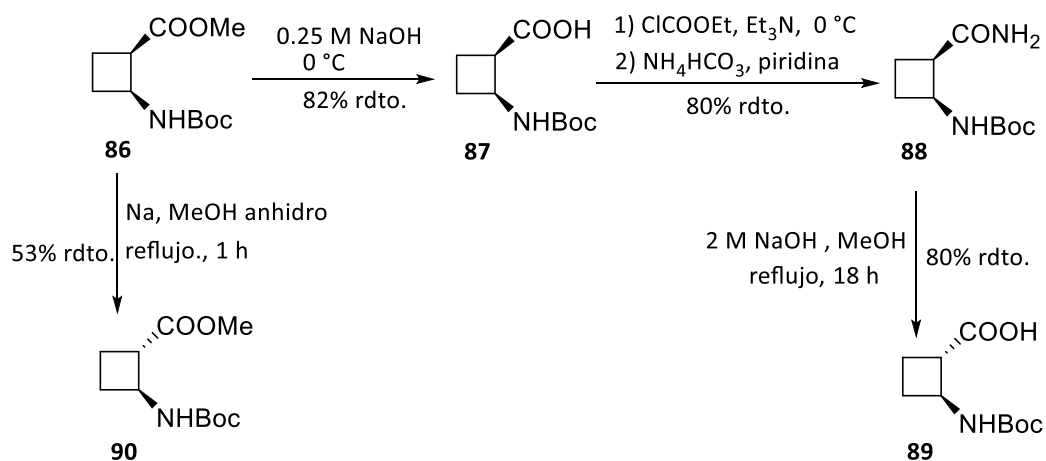
Esquema 40. Síntesis del β -aminoácido protegido **86**

El proceso de epimerización del compuesto **86**, se llevó a cabo siguiendo la metodología optimizada por la Doctora Gorrea de nuestro grupo de investigación (**Esquema 41**).²²⁴ La transformación se inició con la saponificación del éster metílico del compuesto **86** en condiciones básicas suaves (NaOH 0.25 M), para obtener el ácido **87** sin epimerización y con un rendimiento del 82%. A continuación, el ácido libre se activó mediante la preparación del respectivo anhídrido mixto y posteriormente se adicionó bicarbonato de amonio en piridina a temperatura ambiente, para formar la amida **88** con un rendimiento del 80%. Una vez se preparó la amida, se llevó a cabo la epimerización en medio básico, utilizando NaOH 2 M en metanol a reflujo durante 18 horas, para obtener finalmente el ácido *trans*-**89** con un 80% de rendimiento. Este proceso de epimerización también se puede llevar a cabo al generar *in situ* el metóxido de sodio para obtener el éster metílico *trans*-**90** con un 53% de rendimiento (**Esquema 41**).

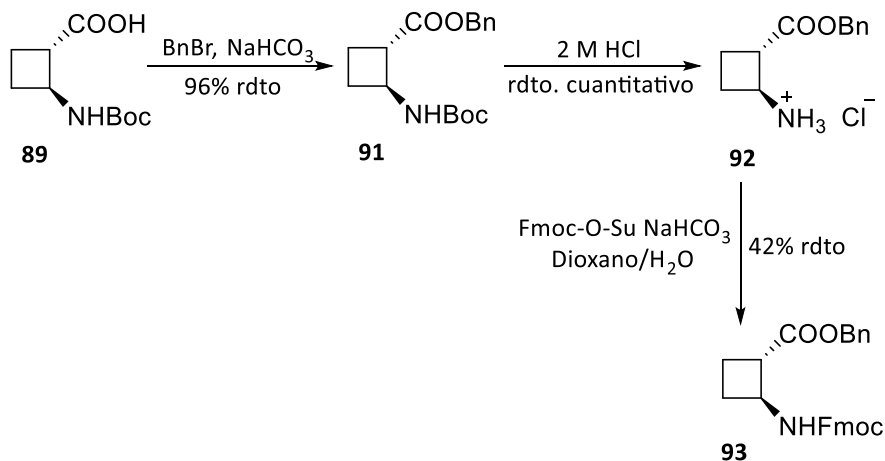
La función ácido carboxílico del compuesto (1*S*,2*S*)-**89**, se protegió en forma de éster bencílico, utilizando bromuro de bencilo y bicarbonato de sodio, obteniendo el éster bencílico **91** con un rendimiento del 96% (**Esquema 42**). A continuación, se procedió al

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cambio del grupo protector *N*-Boc por *N*-Fmoc. Primero se realizó la hidrólisis ácida del compuesto **91**, utilizando HCl 2 M en DCM y una vez se obtuvo la amina libre, se protegió en forma de Fmoc utilizando Fmoc-OSu y NaHCO₃ en una mezcla dioxano-agua, obteniendo el producto **93** con un rendimiento del 42%.



Esquema 41. Síntesis del ácido *trans*-89



Esquema 42. Síntesis del β-aminoácido protegido **93**

Para obtener el compuesto **80**, era necesario desproteger la función ácido carboxílico protegida en forma de éster bencílico. Sin embargo, aquí nos encontramos con dos inconvenientes sintéticos. El primer obstáculo fue la baja solubilidad del compuesto **93**, lo que dificultó algunas estrategias de desprotección y la segunda limitación fue la inestabilidad del grupo Fmoc en presencia de hidrógeno. A pesar de que el grupo Fmoc

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

se conoce como un grupo protector estable bajo condiciones de hidrogenación, se han descrito algunos métodos de desprotección del grupo Fmoc que incluyen hidrogenaciones catalizadas por Pd/C a temperatura ambiente.²²⁶⁻²³⁰

Por lo tanto, fue necesario diseñar otra estrategia sintética que permitiera la obtención del β -aminoácido **80**. En esta nueva propuesta, partimos del compuesto **85** (**Esquema 43**). La función amina fue desprotegida por medio de hidrogenación catalítica, en presencia de Pd(OH)₂/C al 20% en MeOH y TFA, obteniendo la amina protonada **94** de manera cuantitativa. Una vez se obtuvo la amina libre, se protegió en forma de Fmoc utilizando Fmoc-OSu y NaHCO₃. En éstas condiciones básicas (pH entre 8 y 9) y debido a la voluminosidad del grupo Fmoc se obtuvo un equilibrio entre los diastereoisómeros *trans*-**95**:*cis*-**96** en proporción 1.5:1.0, con un rendimiento de reacción del 71% . El compuesto *trans*-**95**, fue purificado mediante cromatografía en columna. Una vez se aisló el β -aminoácido protegido *trans*-**95**, el éster metílico se hidrolizó en medio ácido (HCl 6 M) en dioxano a 60 °C, obteniendo el monómero **80** con un rendimiento del 71%.

Debido a que la resina utilizada en la síntesis de la serie 2 es sensible al medio ácido, el carbamato de *terc*-butilo que protegía la función -NH- del derivado comercial de prolina (2*S*,4*R*)-Fmoc-amino-prolina **81**, fue transformado en carbamato de alilo (Alloc) (**Esquema 44**). Para ello, fue necesario primero realizar la acidólisis del carbamato de *terc*-butilo y a continuación utilizar el cloroformiato de alilo y K₂CO₃, para obtener el monómero **82** con un rendimiento del 95%.

²²⁶ Carpino, L.A.; Han, G.Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, (92), 5748–5749.

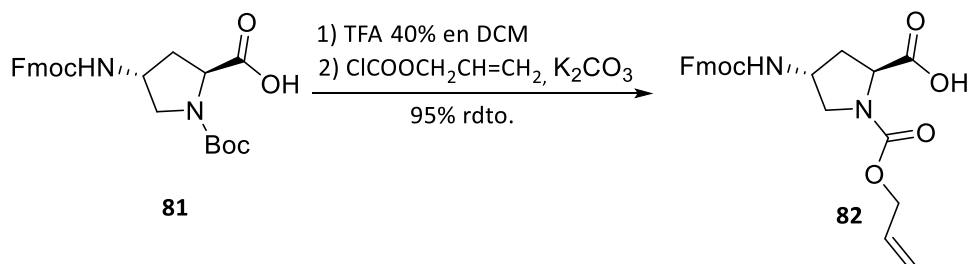
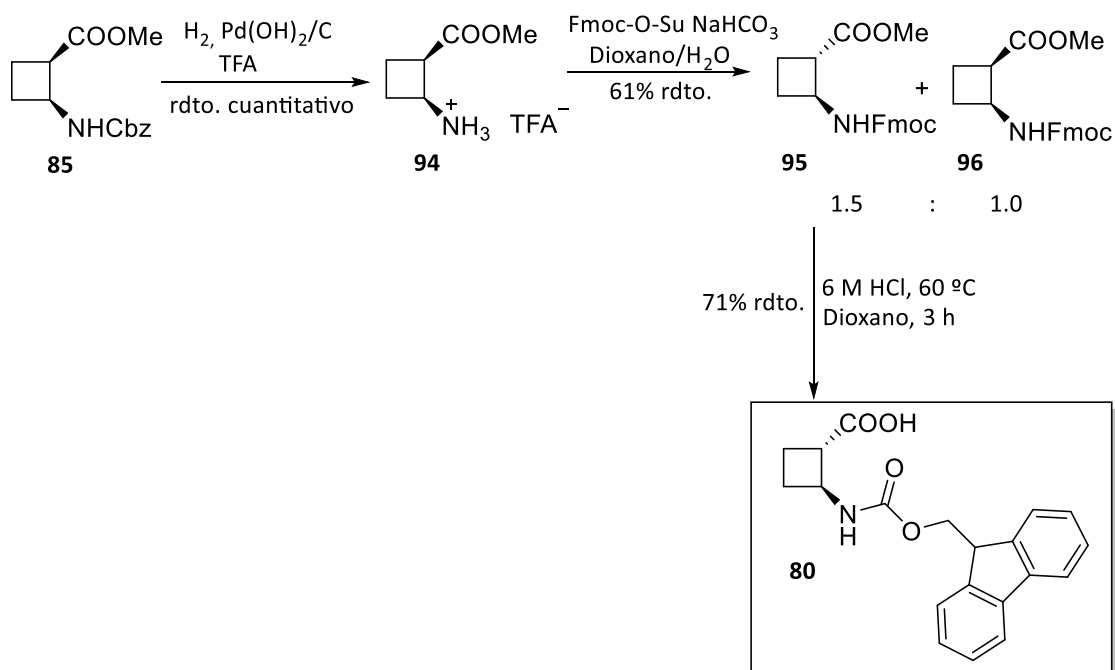
²²⁷ Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Org. Chem.* **1972**, 37 (22), 3404–3409.

²²⁸ Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Sadat-Aalae, S. Y.; Tien, J. H.; Langridge, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, 51 (19), 3732–3734.

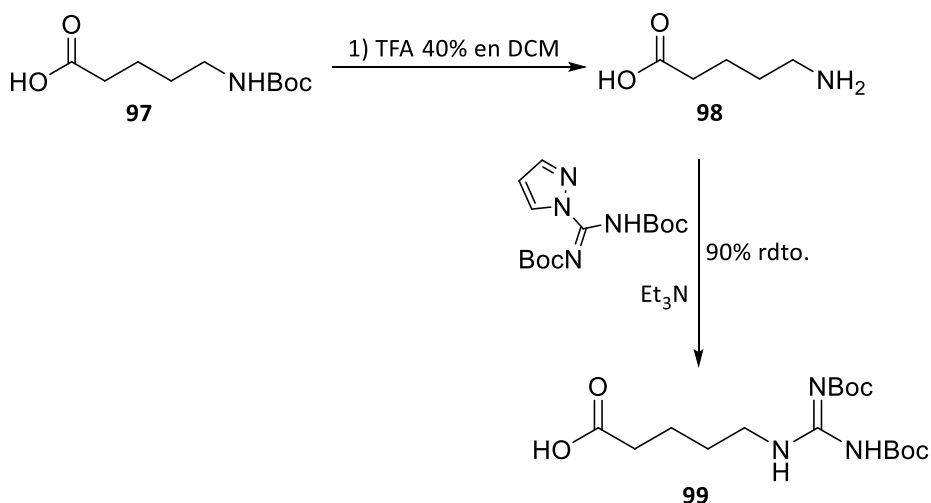
²²⁹ Kelly, R, C.; Gebhard, I.; Wicnienski, N. *J. Org. Chem.* **1986**, 51 (24), 4590–4594.

²³⁰ Maegawa, T.; Fujiwara, Y.; Ikawa, T.; Hisashi, H.; Monguchi, Y.; Sajiki, H. *Amino Acids* **2009**, 36 (3), 493–499.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN



El acoplamiento de la cadena lateral guanidilada, en el caso de los β,γ -péptidos de la serie 2, se realiza en fase sólida. Por tal motivo, es necesario preparar la guanidilación de la cadena lateral en solución. Para ello se utilizó el ácido *N*-Boc-5-aminopentanoico comercial **97**. Primero se realizó la desprotección del éster *tert*-butílico en medio ácido (TFA 40% en DCM), obteniendo el aminoácido **98** de manera cuantitativa (**Esquema 45**). Finalmente se realizó la guanidilación utilizando el *N,N'*-bis(*tert*-butoxicarbonil)-1H-pirazolil-1-carboxamida como agente guanidilante y Et_3N como base, obteniendo la cadena alifática guanidilada **99**, con un 90% de rendimiento.



Esquema 45. Síntesis de la cadena lateral **99**

5.3.2 Síntesis en fase sólida (SFS)

5.3.2.1 SFS de péptidos híbridos de γ,γ -ciclobutano-prolina (serie 1)

Los péptidos híbridos de γ,γ -ciclobutano-prolina (**Figura 64**) se sintetizaron utilizando el protocolo descrito en la sección 7.8.1. Se utilizó el monómero **76** previamente sintetizado en solución y el monómero comercial (2*S*,4*S*)-*N*-Fmoc-amino-prolina **77**. El primer paso de la SFS (**Figura 65**) fue el acoplamiento del aminoácido **77** a la resina *p*-metilbenzhdrilamina (MBHA), utilizando HOBt como agente de acoplamiento y DIC como base.

Serie 1

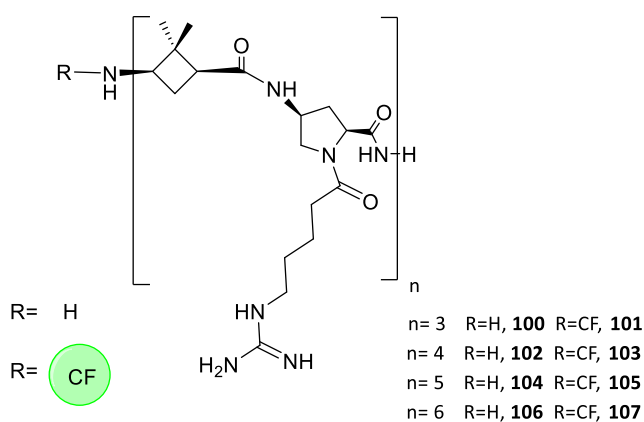


Figura 64. γ,γ -péptidos ciclobutano-prolina de la serie 1

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

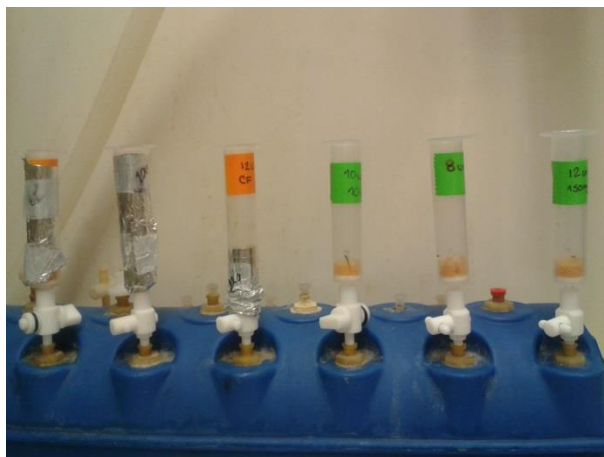
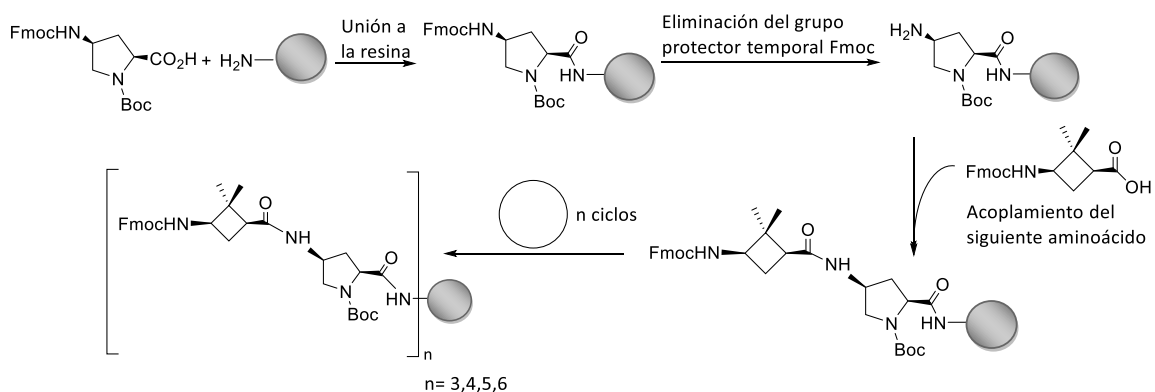


Figura 65. Montaje para la síntesis en fase sólida

Una vez el primer aminoácido estuvo anclado a la resina, se continuó con la elongación de la cadena peptídica hasta llegar a la obtención del hexámero, octámero, decámero y dodecámero, intercalando los residuos peptídicos **76** y **77** (Esquema 46). El grupo protector Fmoc, fue eliminado utilizando piperidina en DMF (2:8) (3 veces x 10 min). Los acoplamiento fueron corroborados por medio de la prueba colorimétrica de Kaiser (ensayo de ninhidrina, el cual se describe en la sección 7.8.5).

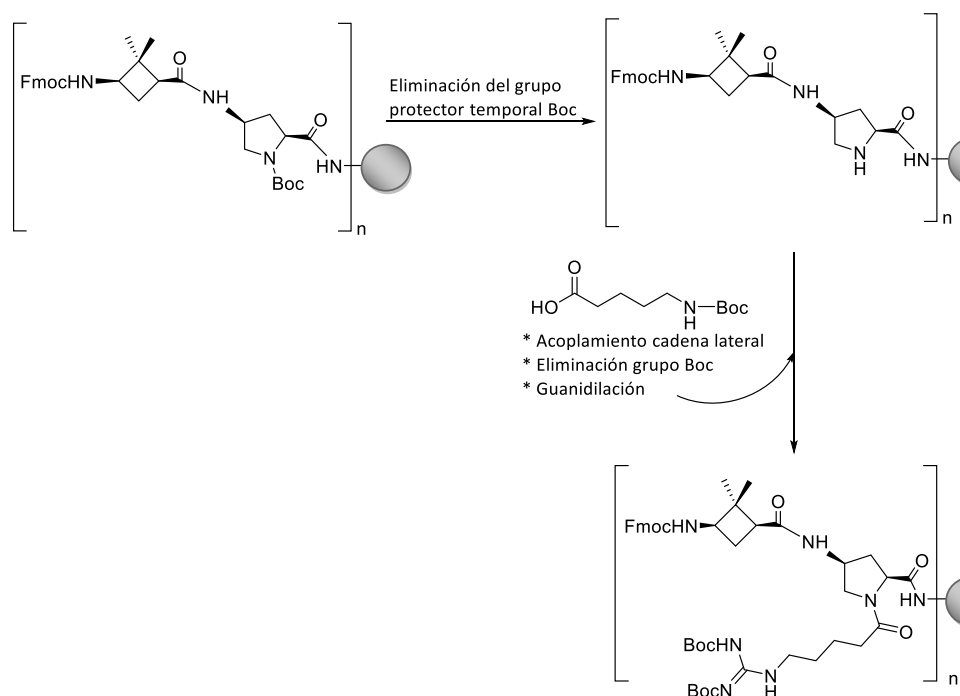


Esquema 46. Elongación de la cadena peptídica, serie 1

Para llevar a cabo la alquilación de la función amina del monómero de prolina, primero se eliminó el grupo protector Boc por medio de la adición de TFA al 40% en DCM y se acopló el ácido *N*-Boc-5-aminopentanoico **97**, utilizando HOBt como agente de acoplamiento y DIC como base (Esquema 47). La eficiencia de esta reacción, se verificó mediante el ensayo colorimétrico de cloranilo (como se describe en la sección

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.8.5). Se eliminó el grupo Boc de la cadena lateral con TFA al 40% y se utilizó el *N,N'*-di-Boc-1H-pirazol-1-carboxamida como agente guanidilante (AG).

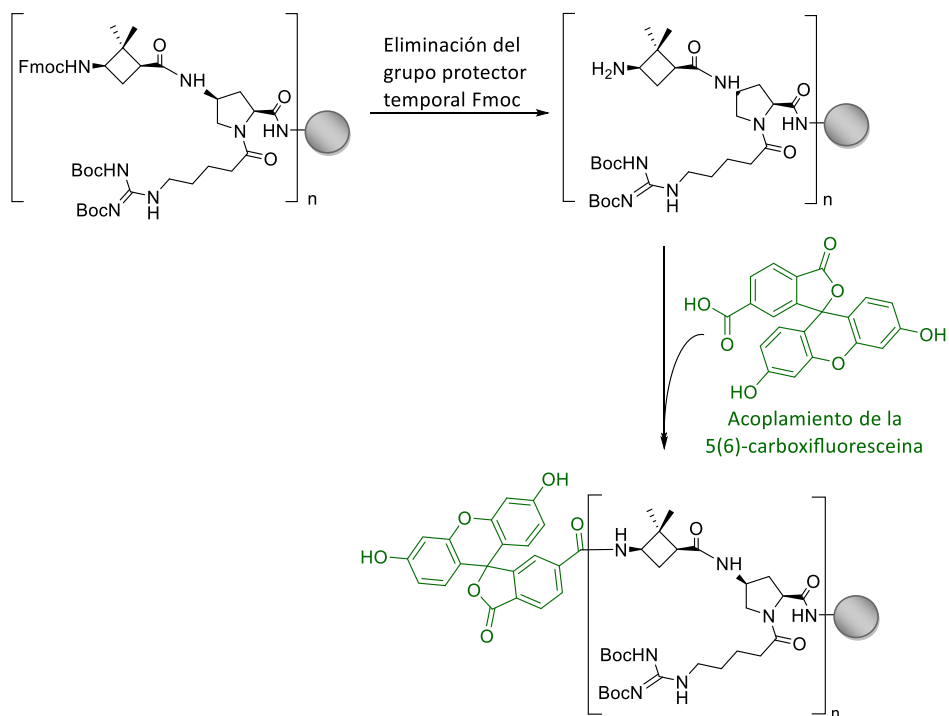


Esquema 47. Alquilación de las cadenas peptídicas. n=3,4,5,6

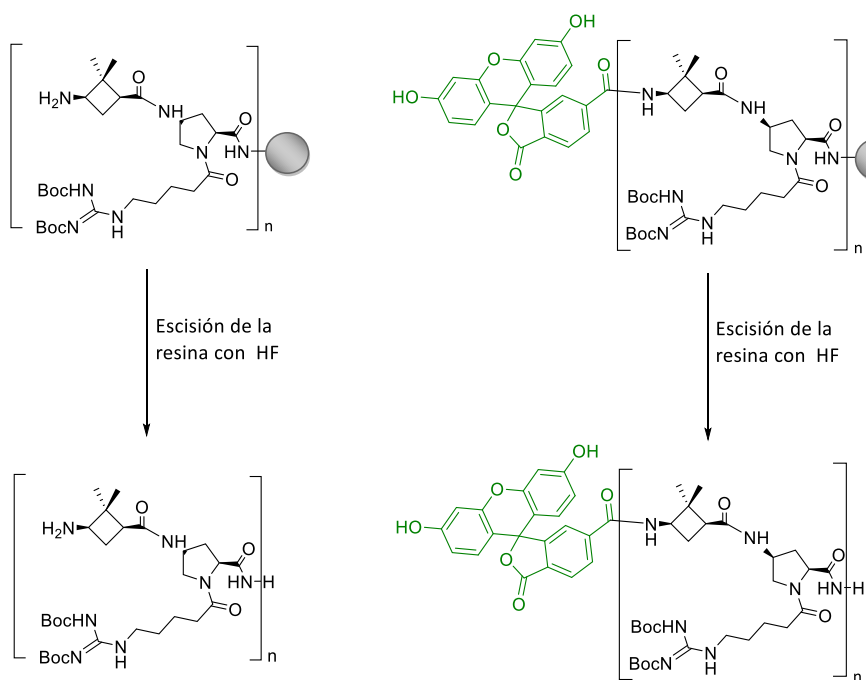
Una vez se obtuvo la cadena peptídica de 6, 8, 10 y 12 residuos, cada secuencia peptídica se trató individualmente. Primero se eliminó el grupo Fmoc y a continuación se dividió la resina en dos partes. Una de ellas fue utilizada para incorporar la 5(6)-carboxifluoresceína (CF) en el grupo amino *N*-terminal y la otra parte permaneció en forma de amina libre. La incorporación de la CF se realizó utilizando HOBt, PyBOP y DIPEA (**Esquema 48**).

A continuación se procedió a la escisión del péptido soportado en la resina MBHA, mediante acidólisis con HF anhidro en presencia de *p*-cresol (5%, v/v) y *p*-tiocresol (5%, v/v) (**Esquema 49**). Los péptidos obtenidos fueron purificados mediante RP-HPLC-MS (como se describe en la sección 7.8.6). Las fracciones correspondientes se recogieron, liofilizaron y se caracterizaron (como se describe en la sección 7.8.7) para obtener los péptidos **100-107** con una pureza de más del 96%.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Esquema 48. Incorporación CF a las cadenas peptídicas. $n=3,4,5,6$



Esquema 49. Escisión de la resina con HF

5.3.2.2 SFS de péptidos híbridos de β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2)

Los péptidos híbridos de β,γ -ciclobutano-prolina de la serie 2 (**Figura 66**) se sintetizaron utilizando el protocolo descrito en la sección 7.8.2.

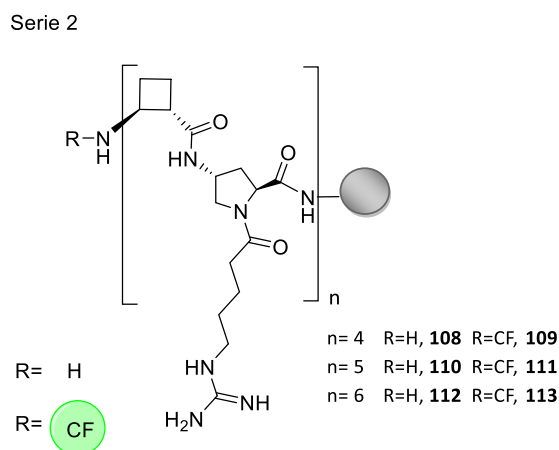
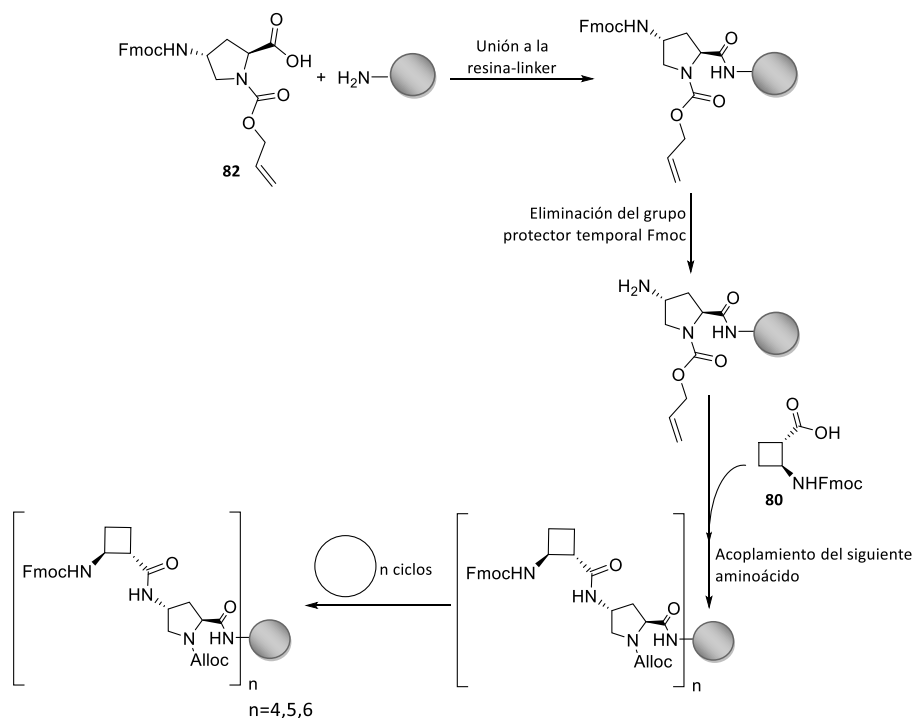


Figura 66. γ,γ -péptidos ciclobutano-prolina de la serie 2

La resina utilizada para la síntesis, fue la aminometil-ChemMatrix®. El soporte sólido fue acondicionado por medio del linker Fmoc-Rink amida (espaciador bifuncional), usando como agente de acoplamiento OxymaPure® ((hidroxiimino)cianoacetato de etilo) y DIC como base. La verificación de la reacción fue realizada utilizando el ensayo de ninhidrina. Una vez acoplado el linker, se eliminó el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF y se comprobó la presencia de aminas libres utilizando de nuevo el ensayo de ninhidrina. Los monómeros utilizados para la síntesis de la cadena peptídica, fueron los compuestos **80** y **82** sintetizados previamente en solución. La síntesis de los péptidos de la serie 2 se realizó mediante la estrategia Fmoc/Alloc.

El primer paso de la SFS para la serie 2 fue el acoplamiento del aminoácido derivado **82** al linker Fmoc-Rink amida-Linker, previa eliminación del grupo Fmoc con piperidina en DMF (2:8) (3 veces x 10 min). En este primer acoplamiento se utilizó HOBt y DIC. Una vez el primer aminoácido estuvo fijado a la resina, se continuó con la elongación de la cadena peptídica hasta llegar a la obtención del octámero, decámero y dodecámero, intercalando los residuos **80** y **82** (**Esquema 50**). El grupo protector Fmoc, fue eliminado utilizando piperidina en DMF (2:8) (3 veces x 10 min). Los acoplamientos fueron corroborados por medio de la prueba colorimétrica de ninhidrina.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN



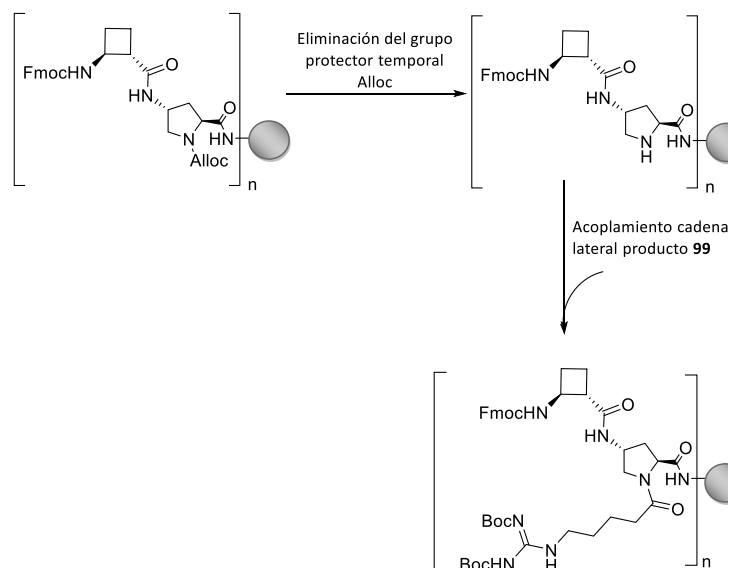
Esquema 50. Elongación de la cadena peptídica, serie 2

Para llevar a cabo la alquilación de la función amina del monómero de prolina, primero se eliminó el grupo protector Alloc (aliloxicarbonilo) por medio de una reducción catalizada por paladio, con una mezcla de $\text{PhSiH}_3/\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (12:0.1) en DCM (**Esquema 51**).²³¹ Una vez se verificó la desprotección por medio del ensayo de cloranilo, se acopló el producto **99** (cadena guanidilada) utilizando OxymaPure® como agente de acoplamiento y DIC como base. La eficiencia de esta reacción se verificó de nuevo mediante el ensayo colorimétrico de cloranilo.

Cada secuencia peptídica de 8, 10 y 12 unidades se trató aisladamente. Primero se eliminó el grupo Fmoc y a continuación se dividió la resina en dos partes. Una parte de la resina fue utilizada para incorporar la CF en el grupo amino N-terminal y la otra parte permaneció en forma de amina libre (**Esquema 52**).

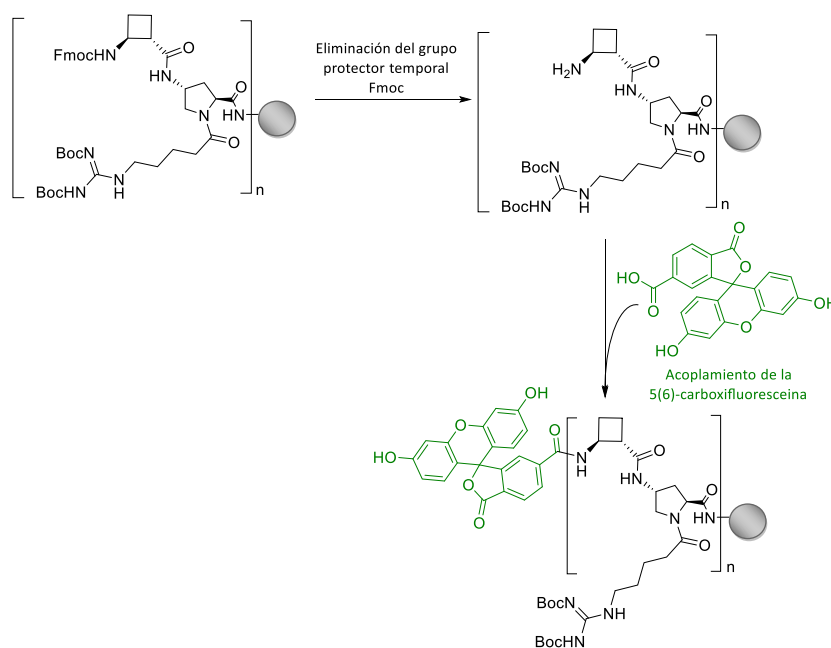
²³¹ Mellah, I. J. *Chem. Pharm. Res.*, **2013**, 5(2),253-257

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

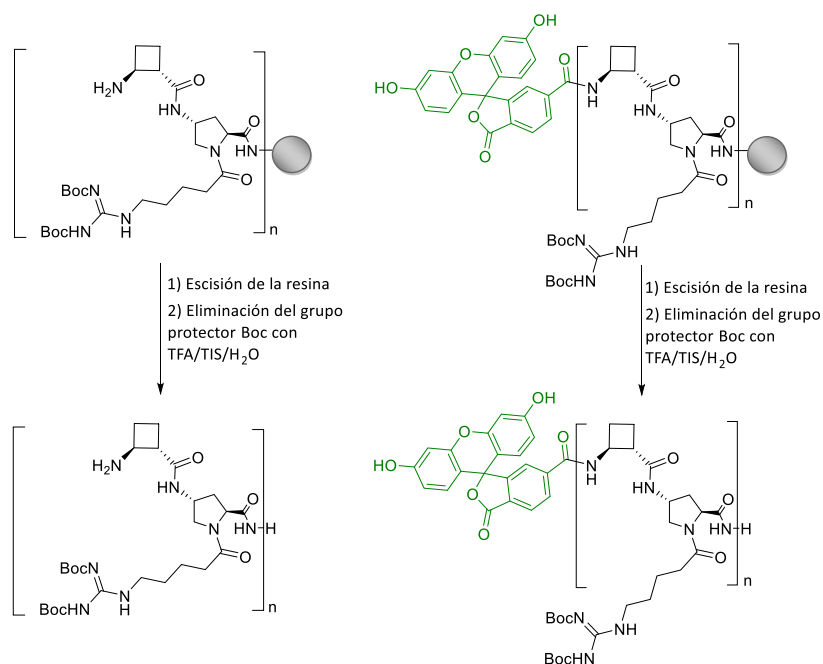


Esquema 51. Alquilación de las cadenas peptídicas previamente sintetizadas. $n=4,5,6$

La liberación del péptido de la resina se realizó mediante hidrólisis ácida (como se indica en la sección 7.8.4) utilizando una mezcla de TFA/TIS/ H_2O (95:2.5:2.5) (**Esquema 53**). Los péptidos liofilizados fueron purificados mediante RP-HPLC-MS (como se describe en la sección 7.8.6) y las fracciones correspondientes se recogieron, liofilizaron y se caracterizaron (como se describe en la sección 7.8.7) para obtener los péptidos **108-113** con una pureza de más del 94%.



Esquema 52. Incorporación CF a las cadenas peptídicas. $n=4,5,6$



Esquema 53. Escisión de la resina con TFA

5.3.2.3 SFS del péptido de referencia Tat₄₈₋₅₇

El péptido Tat₄₈₋₅₇ con y sin CF (**Figura 67**), se sintetizó utilizando la resina H-Rink amide ChemMatrix®. La cadena peptídica fue sintetizada con la incorporación secuencial de cada α -aminoácido (CF-RRRQRRKKRG-NH₂) desde el extremo C-terminal al N-terminal (estrategia C→N), utilizando OxymaPure® y DIC como se indica en la sección 7.8.3. La escisión del péptido de la resina y la eliminación de los grupos protectores se realizó mediante hidrólisis ácida como se indica en la sección 7.8.4. Finalmente, los péptidos obtenidos fueron purificados mediante RP-HPLC-MS (como se describe en la sección 7.8.6) y las fracciones correspondientes se colectaron, liofilizaron y se caracterizaron (como se describe en la sección 7.8.7) para obtener los péptidos **114** y **115**.

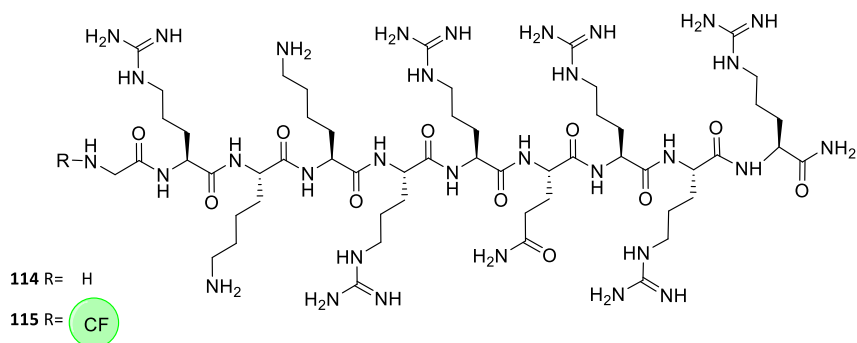


Figura 67. Tat₄₈₋₅₇, péptido utilizado como referencia, en los ensayos biológicos.

5.3.3 Estudios biológicos de los péptidos γ,γ -ciclobutano-prolina (serie 1)

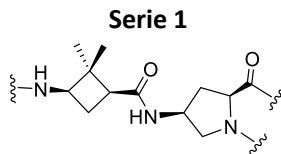
Con el objetivo de estudiar la influencia de la longitud del péptido y del número de grupos guanidinio en el comportamiento de los péptidos híbridos ciclobutano-prolina como potenciales CPPs, se realizaron estudios de viabilidad e internalización celular en células HeLa. Este estudio se realizó en colaboración con la Doctora Ximena Pulido y la Doctora Miriam Royo, de la Unidad de Química Combinatoria del Parque Científico (PCB) de la Universidad de Barcelona.

5.3.3.1 Ensayos *in vitro* de citotoxicidad de los péptidos γ,γ -ciclobutano-prolina (serie 1), en células HeLa

La actividad citotóxica de los γ,γ -péptidos (Serie 1) sobre células HeLa fue evaluada después de 24 horas de incubación, utilizando el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) como se describe en la sección 7.9.2. Los cuatro γ,γ -péptidos y el Tat, fueron estudiados en un rango de concentraciones desde 0.1 hasta 100 μM (Tabla 8).

Tabla 8. Péptidos y concentración estudiadas en los ensayos de citotoxicidad celular.

Serie 1	
Péptidos Estudiados	100, 102, 104, 106 y 114
Concentraciones evaluadas (μM)	0.1, 1, 10, 25, 50, 100



Después del tratamiento, la viabilidad de las células HeLa en todos los casos, fue superior al 80% como se indica en la **Figura 68**. Además, se observa que la viabilidad celular es independiente de la longitud del péptido y por lo tanto del número de residuos de guanidinio (de 3 a 6 unidades) (**Figura 69**).

Estos resultados concuerdan con la toxicidad observada en las oligoargininas, las cuales manifiestan una baja toxicidad para compuestos con menos de 10 residuos guanidilados.²³² El trabajo de Farrera-Sinfreu,¹⁹⁰ corrobora que los oligómeros

²³² Futaki, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, 57, 547–558.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

derivados de γ -aminoprolina a elevadas concentraciones (500 μ M) no provocan toxicidad en células HeLa ni en células COS-1. Así mismo, el γ,γ -hexámero guanidilado ciclobutano-prolina, previamente estudiado por nuestro grupo de investigación, presentó un porcentaje de viabilidad celular superior al 90% (25 μ M, 24 h de incubación), factor que junto con la buena capacidad de internalización celular motivó la continuidad del estudio de este tipo de cadena peptídica.

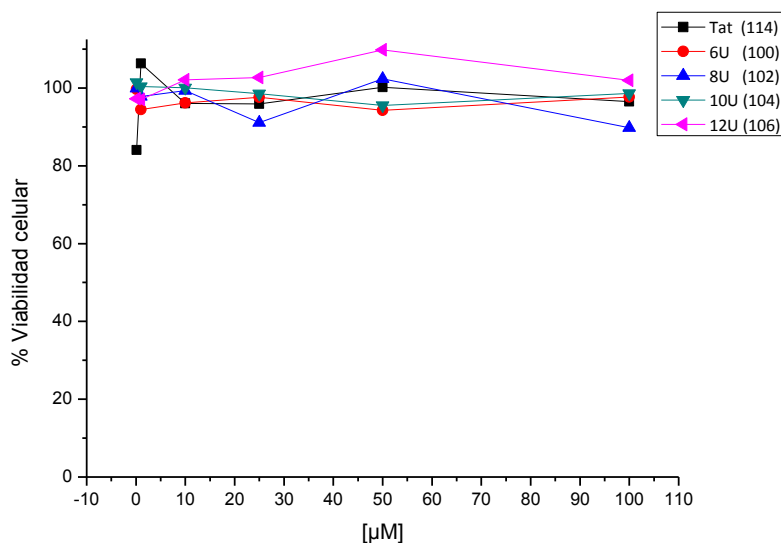


Figura 68. Citotoxicidad de los γ,γ -péptidos híbridos (serie 1) y Tat en células HeLa. La viabilidad celular fue cuantificada utilizando el ensayo de MTT e incubando los péptidos a una concentración final de 0.1, 1, 10, 25, 50, 100 μ M por 24 horas. Las curvas representan el promedio de tres experimentos independientes.

El porcentaje de viabilidad celular en células HeLa a 25 μ M es mayor del 92% (concentración utilizada para los ensayos de internalización celular) (**Figura 69**). Estos resultados sugieren que el aumento de la superficie de interacción de la membrana con los γ,γ -péptidos híbridos ciclobutano-prolina, al aumentar el tamaño y la carga neta (con un máximo de 6 residuos de guanidinio), no provoca alteraciones negativas significativas en la membrana ya que no afecta la actividad metabólica celular y, por lo tanto, la proliferación celular.

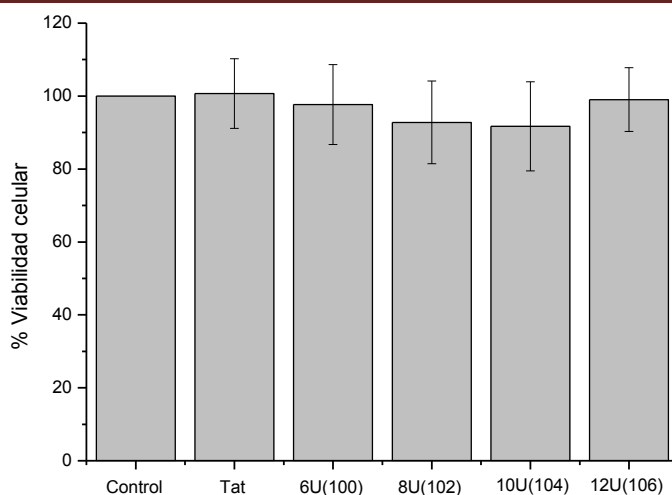


Figura 69. Citotoxicidad de los γ,γ -péptidos híbridos (serie 1) y Tat en células HeLa. La viabilidad celular fue cuantificada utilizando el ensayo de MTT e incubando los péptidos a una concentración final de 25 μM por 24 horas. Las barras de error representan las desviaciones estándar (SD) de las medias de tres experimentos independientes.

5.3.3.2 Ensayos *in vitro* de internalización celular de los péptidos γ,γ -ciclobutano-prolina (serie 1) en células HeLa

La capacidad de atravesar la membrana celular en células HeLa de los péptidos γ,γ -ciclobutano-prolina (serie 1) se determinó por medio de citometría de flujo, utilizando la CF como fluoróforo en el extremo *N*-terminal de los péptidos **101**, **103**, **105**, **107** y **115** (Tat-CF). Los péptidos fueron incubados con las células durante 2 horas, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 7.9.3. Transcurrido este tiempo, se determinó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. La inactivación de la fluorescencia extracelular se realizó ajustando el pH a 6 con HCl 1 N.

Al analizar toda la población celular después de 2 horas de incubación, se observó que el péptido con mayor capacidad de atravesar la membrana celular fue el dodecámero **107**, con un 32% de fluorescencia respecto al Tat. Los demás péptidos evaluados presentan menor capacidad de internalización. Esto sugiere que al incrementar la longitud del péptido y, a su vez, la cantidad de residuos de guanidina, aumenta la capacidad de entrada en las células HeLa (**Figura 70**).

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta relación entre la longitud del γ,γ -péptido y la capacidad de internalización celular, es debida a la interacción entre los grupos guanidinio, con los grupos fosfato, sulfato y carboxilato cargados negativamente que se encuentran presentes en la membrana de la superficie celular y con quienes tiende a formar puentes de hidrógeno bidentados, responsables de la internalización celular.^{177,233}

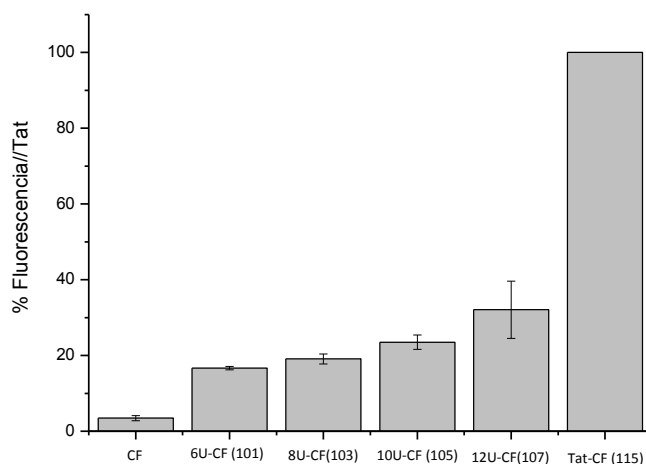


Figura 70. Porcentaje de fluorescencia de los γ,γ -péptidos híbridos (serie 1) y Tat-CF en células HeLa. Los péptidos se incubaron a una concentración final de 25 μ M por 2 h a 37 °C. Las barras de error representan las desviaciones estándar (SD) de las medias de cuatro experimentos independientes. Los cálculos se realizaron utilizando el Tat como péptido de referencia (100%).

La relación de dependencia entre la longitud y la capacidad de internalización celular también se observa claramente al analizar la población de células positivas (células que han internalizado el péptido marcado) (**Figura 71**). El porcentaje de células positivas respecto al control Tat-CF aumenta desde el 64% para el γ,γ -hexámero hasta el 96% para el dodecámero. El dodecámero **107** y el péptido de referencia atraviesan la membrana celular de forma equivalente porcentualmente. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia es superior en el caso del Tat-CF, lo que sugiere que la cantidad de péptido marcado por célula es mayor. Los péptidos de 6, 8, 10 y 12 unidades presentan una intensidad de fluorescencia similar entre ellos, pero el porcentaje de células positivas va aumentando al incrementar la longitud de la cadena peptídica. Ello indica que, al aumentar la longitud del péptido, aumenta levemente la cantidad de péptidos marcados que atraviesan la membrana y se distribuyen en un mayor número de células.

²³³ Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Lewis, R. S.; Murray, B. a.; Wender, P. a. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (31), 9506–9507.

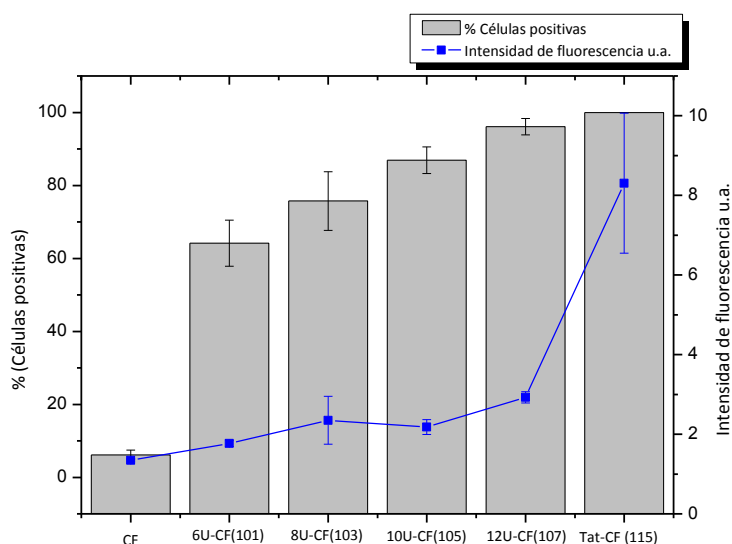


Figura 71. Porcentaje de células positivas e intensidad de fluorescencia de los γ,γ -péptidos híbridos (serie 1) y Tat-CF en células HeLa. Los péptidos se incubaron a una concentración final de 25 μM por 2 h a 37 °C. Las barras de error representan las desviaciones estándar (SD) de las medias de cuatro experimentos independientes. Los cálculos se realizaron utilizando el Tat como péptido de referencia (100%).

5.3.4 Estudios biológicos de los péptidos β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2)

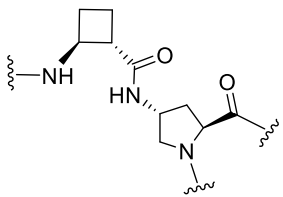
Para estudiar la influencia de la variación estructural del ciclobutano en el comportamiento de los péptidos híbridos ciclobutano-prolina como potenciales CPPs, se realizaron estudios de viabilidad, internalización y localización celular en células HeLa. Este estudio se realizó en colaboración con la Doctora Nerea Gaztelumendi y la Doctora Carme Nogués, del Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona.

5.3.4.1 Ensayos *in vitro* de citotoxicidad de los péptidos β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2), en células HeLa

La actividad citotóxica de los β,γ -péptidos (Serie 2) sobre células HeLa fue evaluada después de 24 horas de incubación utilizando el ensayo de MTT, como se describe en la sección 7.9.2. Los seis β,γ -péptidos, el Tat y Tat-CF, fueron estudiados a 10, 25 y 50 μM (Tabla 9).

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 9. Péptidos y concentración estudiadas en los ensayos de citotoxicidad celular.

Serie 2	
	
Péptidos Estudiados	108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 y 115
Concentraciones evaluadas (μM)	10, 25, 50

Una vez finalizó el tiempo de incubación (24 horas), como se describe en la sección 7.9.2, se realizó la visualización del cultivo celular (**Figura 72**) por medio de microscopía, donde se observó de manera preliminar una adecuada morfología y densidad celular.

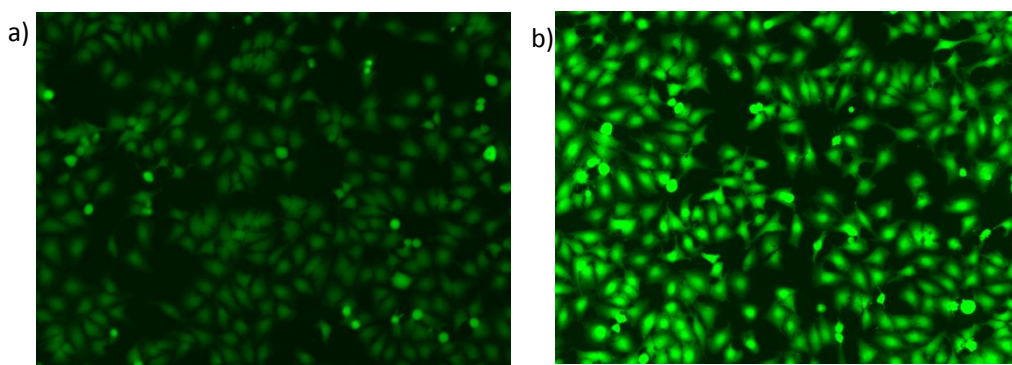


Figura 72. Densidad de células HeLa después de la incubación de a) 8U-CF(**109**) y b) Tat-CF(**115**), a un concentración final de $10 \mu\text{M}$ por 24 horas.

De los resultados de viabilidad celular obtenidos para los β,γ -péptidos sin y con CF (**Figura 73**) podemos concluir que la variación estructural del ciclobutano no influye en la toxicidad sobre células HeLa. A pesar de que la serie 2 presenta una variación estructural respecto a la serie 1, lo que significa que puede tener una interacción distinta entre el grupo guanidinio y la membrana celular, la carga positiva neta de las dos series evaluadas es equivalente, lo que confirma en alguna medida los resultados de toxicidad obtenidos.

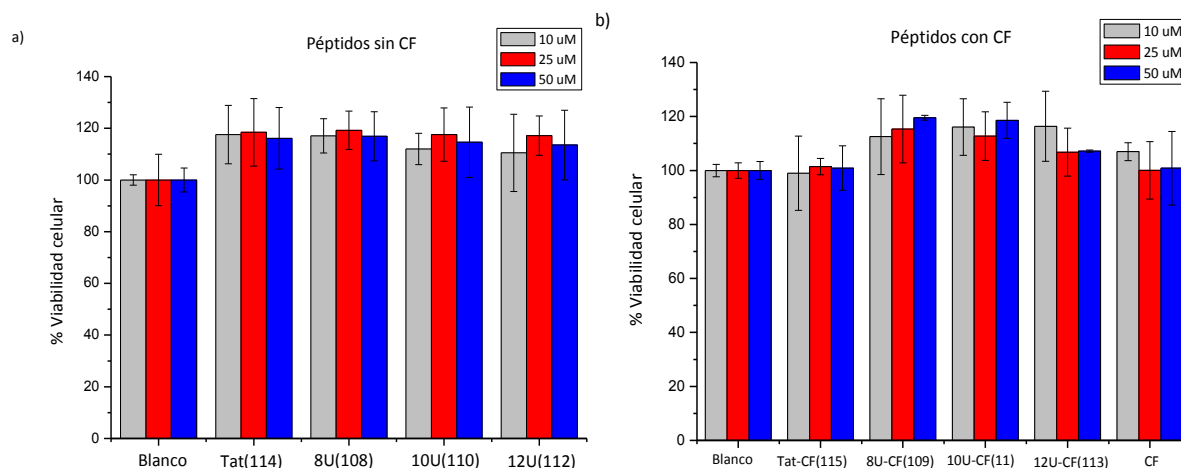


Figura 73. a) Citotoxicidad de los β,γ -péptidos híbridos sin CF y Tat en células HeLa. b) Citotoxicidad de los β,γ -péptidos híbridos con CF y Tat-CF en células HeLa. La viabilidad celular fue cuantificada utilizando el ensayo de MTT e incubando los péptidos a una concentración final de 10, 25 y 50 μM por 24 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Las barras de error representan las desviaciones estándar (SD) de las medias de tres experimentos independientes.

5.3.4.2 Ensayos *in vitro* de internalización celular de los péptidos β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2) en células HeLa

La capacidad de atravesar la membrana celular en células HeLa de los péptidos β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2) se determinó por medio de citometría de flujo, utilizando la CF como fluoróforo en el extremo *N*-terminal de los péptidos **109**, **111**, **113** y **115**. Los péptidos fueron incubados con las células durante 2 horas, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 7.9.3. Transcurrido este tiempo se determinó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo. La previa adición de yoduro de propidio (IP) como agente intercalante del DNA descartó falsos positivos procedentes de péptidos internalizados en células que estaban muertas o dañadas. La inactivación de la fluorescencia extracelular se realizó ajustando el pH a 6 con HCl 1 N. Como se observa en la **Figura 74**, existe una leve disminución de la intensidad de fluorescencia extracelular al disminuir el pH.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

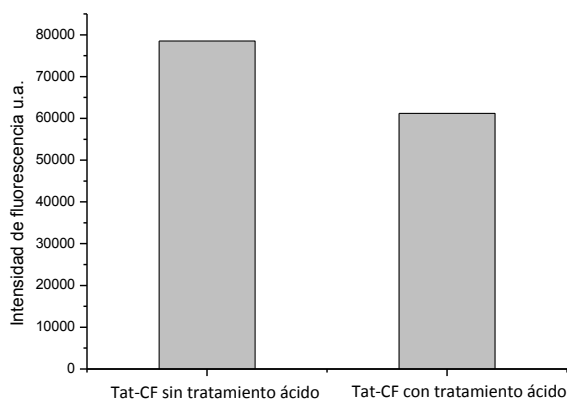


Figura 74. Intensidad de fluorescencia antes y después de ajustar el pH a 6 con HCl 1N. Tat-CF incubado a una concentración final de 25 μM por 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ en células HeLa.

Los resultados obtenidos en citometría de flujo al tener en cuenta la población celular total revelan que la capacidad de internalización para los compuestos estudiados no es mayor al 6% respecto al Tat-CF. Sin embargo, indican que al incrementar la longitud del péptido aumenta levemente la capacidad de entrada en las células HeLa (**Figura 75**).

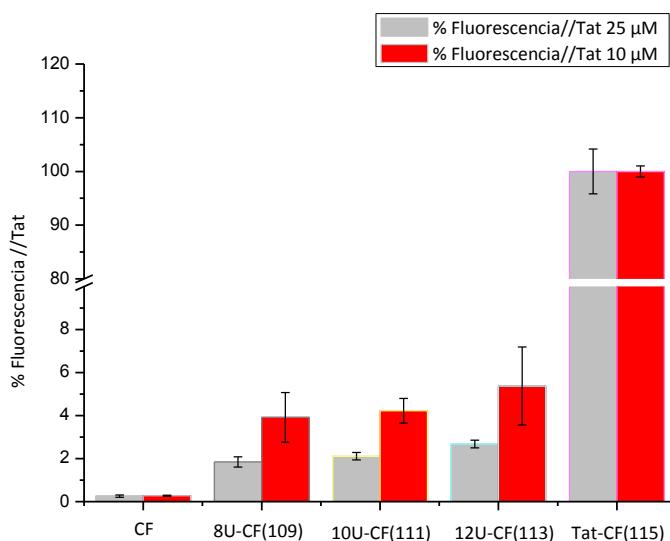


Figura 75. Porcentaje de fluorescencia de los β,γ -péptidos híbridos (serie 2) y Tat-CF en células HeLa. Los péptidos se incubaron a una concentración final de 10 y 25 μM por 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Las barras de error representan las desviaciones estándar (SD) de las medias de tres experimentos independientes. Los cálculos se realizaron utilizando el Tat como péptido de referencia (100%).

Asimismo, al analizar la población positiva (células con péptido internalizado) a 10 μM , se evidencia de nuevo la relación directa entre la longitud del péptido y la capacidad de internalización celular, aumentando desde el 60% hasta el 87% de internalización para el octámero y dodecámero respectivamente (**Figura 76**).

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

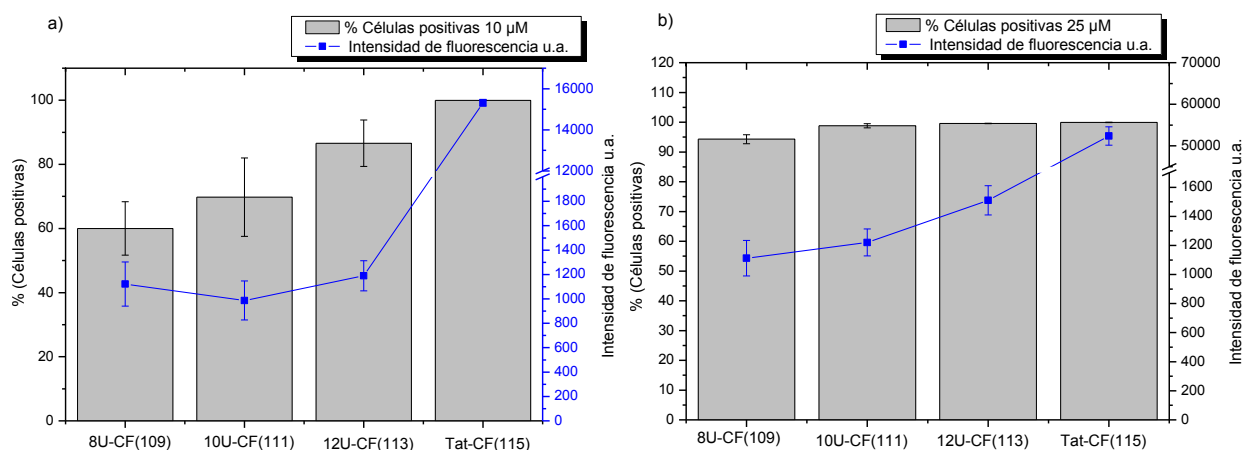


Figura 76. Porcentaje de células positivas e intensidad de fluorescencia de los β,γ -péptidos híbridos (serie 2) y Tat-CF en células HeLa. Los péptidos se incubaron a una concentración final de a) 10 μM y b) 25 μM por 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Las barras de error representan las desviaciones estándar (SD) de las medias de tres experimentos independientes. Los cálculos se realizaron utilizando el Tat como péptido de referencia (100%).

Esta proporcionalidad se hace más evidente al analizar la intensidad de fluorescencia vs el número de eventos. En los histogramas de fluorescencia, se observa el leve desplazamiento hacia la derecha en el eje x (intensidad de fluorescencia) a medida que aumenta la longitud del β,γ -péptido, debido a la presencia de grupos guanidinio en las secuencias peptídicas (**Figura 77**). Cuando los 3 péptidos de 8, 10 y 12 unidades son incubados a 25 μM , se observa más del 90% de células positivas; sin embargo, cuando son incubados a 10 μM el porcentaje de células positivas disminuye.

La diferencia de internalización se debe posiblemente a la diferencia en el mecanismo de atravesar la membrana, el cual depende en gran medida de la concentración de péptido. La internalización directa es la más probable para CPPs hidrofóbicos a altas concentraciones, mientras que la endocitosis es el principal mecanismo de absorción a bajas concentraciones, sin embargo puede existir sinergia entre los dos mecanismos según la concentración. El umbral de concentración para la internalización directa varía según la estructura de los CPPs y las diferentes líneas celulares.²³⁴

²³⁴ Gräslund, A.; Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, Ü.; Futaki, S. *J. Biophys.* **2011**, 1-10.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

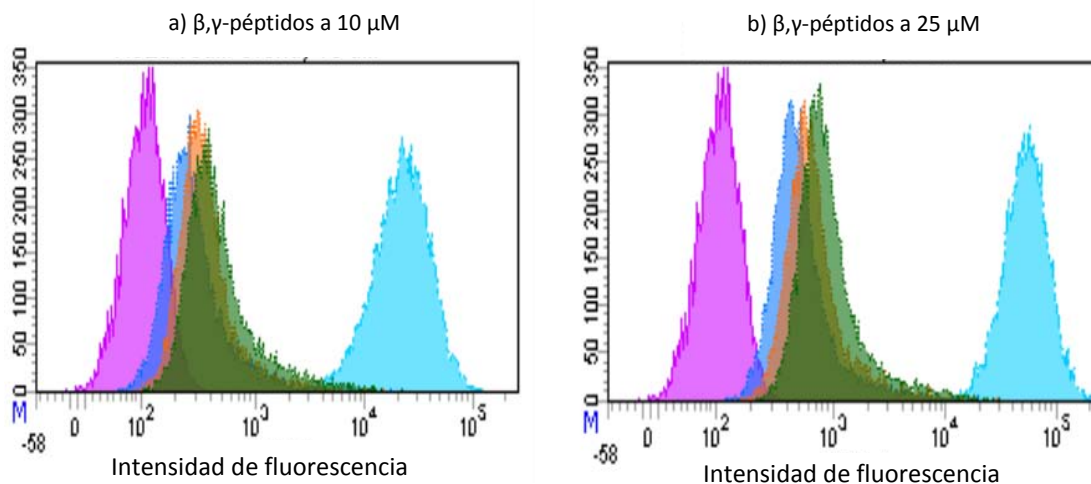


Figura 77. Comparación de péptidos incubados a una concentración final de a) 10 μM y b) 25 μM por 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$, en células HeLa. a) Superposición, 10 μM b) Superposición, 25 μM . Control negativo (color violeta), azul (8U-CF(109)), naranja (10U-CF(111)), verde (12U-CF(113)), azul topacio (Tat-CF(115)).

Los β,γ -péptidos incubados a una concentración de 25 μM internalizaron en las células HeLa en proporciones equivalentes al péptido de referencia Tat-CF. Sin embargo, la intensidad de fluorescencia (cantidad de péptido por célula) es significativamente mayor para el Tat-CF que para los β,γ -péptidos estudiados (**Figura 78**).

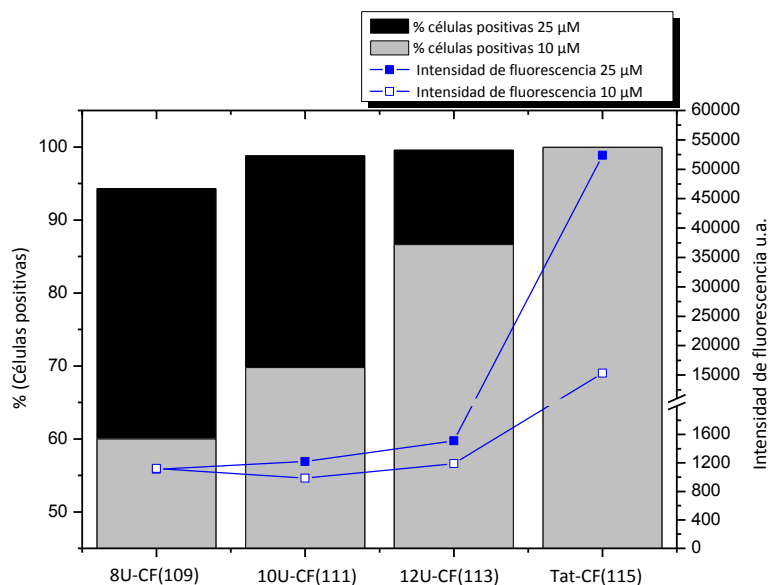


Figura 78. Comparación de péptidos incubados a una concentración final de 10 y 25 μM por 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$, en células HeLa. Los cálculos se realizaron utilizando el Tat como péptido de referencia (100%).

5.3.4.3 Ensayos *in vitro* de localización celular del dodecapéptido β,γ -ciclobutano-prolina en células HeLa

La localización intracelular del β,γ -péptido 12U-CF(**113**) y el de referencia Tat-CF(**115**) se realizó por medio de microscopía láser confocal, utilizando la CF como fluoróforo. La incubación se realizó durante 24 horas a una concentración final de 10 μ M, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 7.9.4. Se utilizó CellMask™ con el fin de marcar de color rojo la membrana plasmática y Hoechst para marcar el DNA de color azul, generando puntos de referencia intracelulares que facilitaron la localización de los péptidos.

La microscopía confocal permitió confirmar los resultados obtenidos mediante citometría de flujo. La leve disminución de la intensidad de fluorescencia, después del tratamiento con HCl 1 N, es corroborada por las imágenes obtenidas antes del tratamiento ácido (**Figura 79**) y después del tratamiento ácido (**Figura 80**), ya que no se observa una cantidad significativa de péptido adherido a la membrana celular.

Es evidente la internalización del péptido 12U-CF(**113**), después de 2 horas de incubación. Las imágenes obtenidas permiten distinguir cantidades puntiformes del β,γ -péptido-CF dentro de la célula viva, lo que sugiere la participación de endocitosis en el mecanismo de internalización (**Figura 79** y **Figura 80**). Como primer paso de internalización de los péptidos catiónicos se propone la interacción entre la carga positiva del CPP con los componentes de membrana cargados negativamente, lo que implica la desestabilización permanente o transitoria de la membrana generando un plegamiento de la membrana lipídica hacia el péptido.^{233,235,236} El siguiente paso del mecanismo de internalización depende en gran medida de varios factores como la concentración de péptido, secuencia peptídica, composición de lípidos de membrana (cultivo celular), temperatura, tiempo de incubación, entre otros.^{234,237}

²³⁵ Thorén, P. E. G.; Persson, D.; Isakson, P.; Goksör, M.; Önfelt, A.; Nordén, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *307* (1), 100–107.

²³⁶ Wadia, J. S.; Stan, R. V.; Dowdy, S. F. *Nat. Med.* **2004**, *10* (3), 310–315.

²³⁷ Gautam, A.; Sharma, M.; Vir, P.; Chaudhary, K.; Kapoor, P.; Kumar, R.; Nath, S. K.; Raghava, G. P. S. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *89*, 93–106.

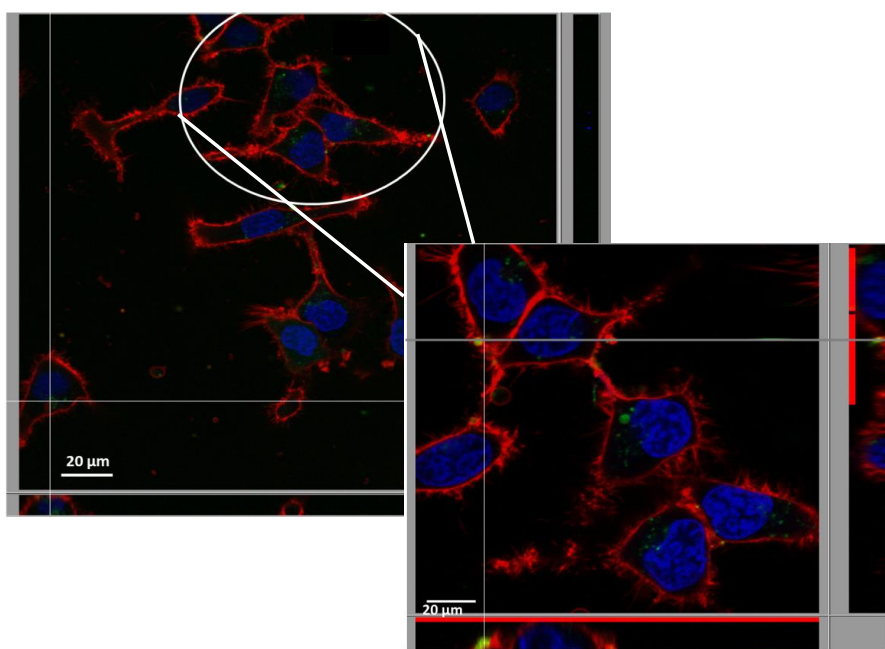


Figura 79. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa incubados con el β,γ -péptido 12U-CF(113) durante 2 horas a una concentración final de 10 μM a 37 °C antes del tratamiento con HCl 1 N.

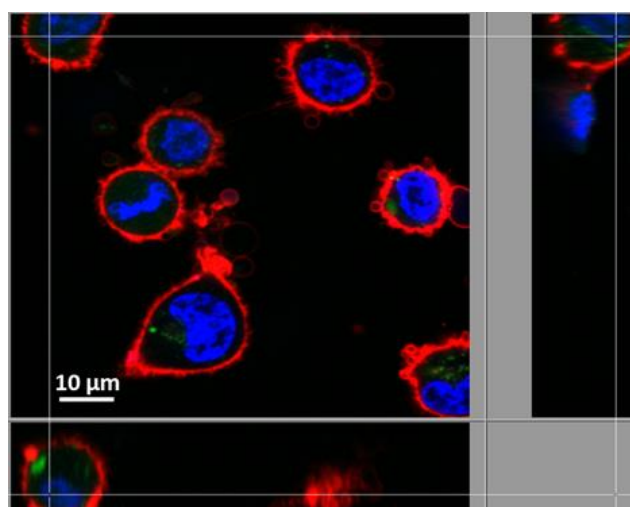


Figura 80. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa incubados con el β,γ -péptido 12U-CF(113) durante 2 horas a una concentración final de 10 μM a 37 °C después del tratamiento con HCl 1 N.

Los resultados de microscopía confocal ratifican la capacidad de internalización observada en citometría de flujo para la serie 2, indicando que los β,γ -péptidos son capaces de atravesar la membrana plasmática en un gran número de células pero en menor proporción que el péptido de referencia. Las células HeLa, al ser incubadas con Tat-CF, exhiben una mayor cantidad de péptido internalizado (**Figura 81**).

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por otro lado, los resultados de microscopía confocal para el Tat marcado con CF, sugieren que ambas vías de absorción endocítica y no endocítica podrían estar involucradas en su internalización celular, ya que se observa una distribución intracelular del péptido difusa y a su vez cantidades puntiformes (**Figura 81**). Sin embargo, es necesario realizar un diseño experimental específico para estudiar los mecanismos moleculares de entrada celular, tanto de nuestros péptidos ciclobutano-prolina como del Tat-CF. A pesar de la amplia controversia acerca del mecanismo de internalización, varios autores proponen que secuencias similares de Tat, presentan ambas vías de absorción.^{234,235}

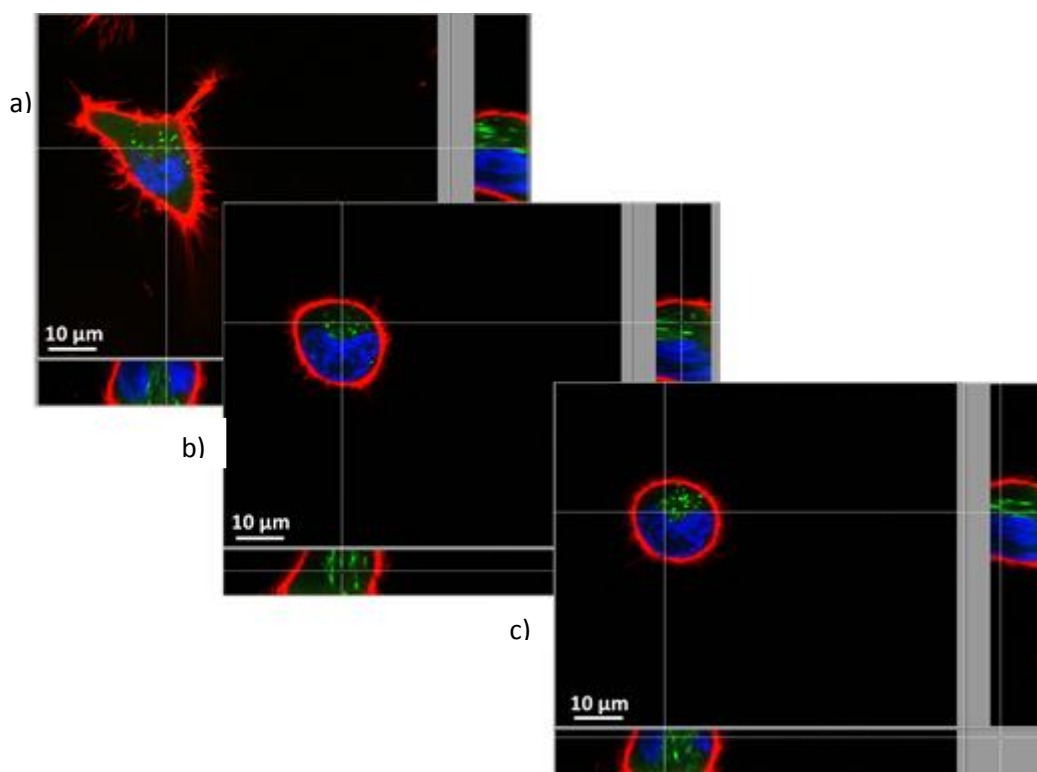


Figura 81. Imágenes de microscopía confocal de células HeLa incubados con Tat.CF(115) durante 2 horas a una concentración final de 10 μM a 37 $^{\circ}\text{C}$. a) Antes del tratamiento con HCl 1 N b) y c) después del tratamiento con HCl.

5.3.5 Estudios biológicos de la serie 1 y serie 2 sobre parásitos del género Leishmania

Para estudiar la capacidad de las series 1 y 2 de atravesar barreras biológicas parasitarias, se realizaron estudios de internalización, localización y viabilidad en

promastigotes de *Leishmania donovani* y *Leishmania pifanoi*. Estos estudios fueron realizados por la Doctora María Ángeles Abengózar y el Doctor Luis Rivas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB)-CSIC de Madrid.

5.3.5.1 Ensayos *in vitro* de internalización, localización y viabilidad celular de los péptidos ciclobutano-prolina (serie 1 y 2) en *Leishmania donovani*

La capacidad de atravesar la membrana del parásito *Leishmania donovani* de los péptidos ciclobutano-prolina (serie 1 y serie 2) se determinó por medio de citometría de flujo, utilizando CF como fluoróforo. Los péptidos fueron incubados con los promastigotes de *Leishmania donovani* durante 4 horas a una concentración final de 10 μ M, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 7.9.5. Se utilizó el Tat-CF como control positivo en todos los ensayos realizados.

La capacidad de entrada de los γ,γ -péptidos de 6, 8 y 10 unidades (serie 1) es menor al 10%. Sin embargo el dodecámero presenta una capacidad de internalización equivalente al péptido de referencia (100%). Los resultados de internalización de los β,γ -péptidos de la serie 2 evidenciaron un ligero incremento del porcentaje de entrada a medida que su secuencia contenía un mayor número de residuos guanidilados. Los valores de porcentaje de fluorescencia aumentaron desde el 5% para el octámero, 26% para el decámero hasta el 33% para el dodécámero. Sin embargo, el péptido más largo de la serie 2 presenta una internalización 3.3 veces menor que el péptido de referencia (**Figura 82**).

Con el fin de comprobar la capacidad de internalización de los decámeros (10U-CF) y dodecámeros (12U-CF) de la serie 1 y serie 2, se realizó la microscopía confocal. Primero, los péptidos fueron incubados con los promastigotes de *Leishmania donovani* a una concentración final de 10 μ M por 4 horas. Las incubaciones se realizaron en presencia de Rodamina-Dextrano (marcador de endocitosis de fase fluida (rojo)) y DAPI (marcador de ácidos nucleicos presentes en el núcleo y el kinetoplasto de los parásitos (azul)), según la necesidad de cada experimento.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

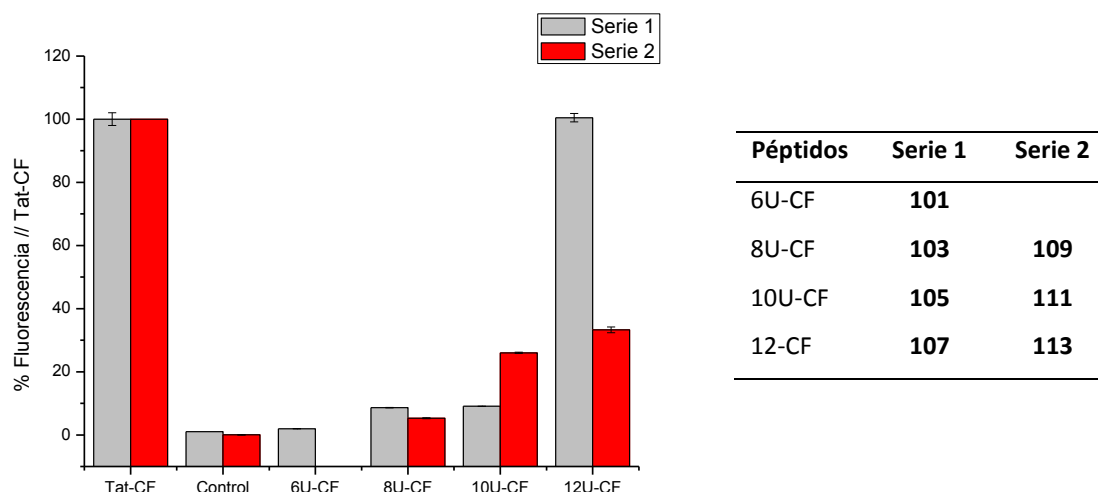


Figura 82. Porcentaje de fluorescencia de los péptidos híbridos (serie 1 y 2) y Tat-CF en promastigotes de *Leishmania donovani*. Los péptidos se incubaron a una concentración final de 10 μ M por 4 h a 26 °C. Las barras de error representan las desviaciones estándar (SD) de las medias de tres experimentos independientes. Los cálculos se realizaron utilizando el Tat-CF como péptido de referencia (100%).

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal mostraron la buena capacidad del γ,γ -péptido 12U-CF(**107**) para atravesar la membrana plasmática de los promastigotes de *Leishmania donovani* (**Figura 83**), confirmando la información obtenida por citometría de flujo, donde el γ,γ -péptido presentaba un 100 % de internalización. Así mismo se confirmó la baja capacidad de internalización (menor al 10%), del γ,γ -péptido 10U-CF(**105**) (**Figura 84a**).

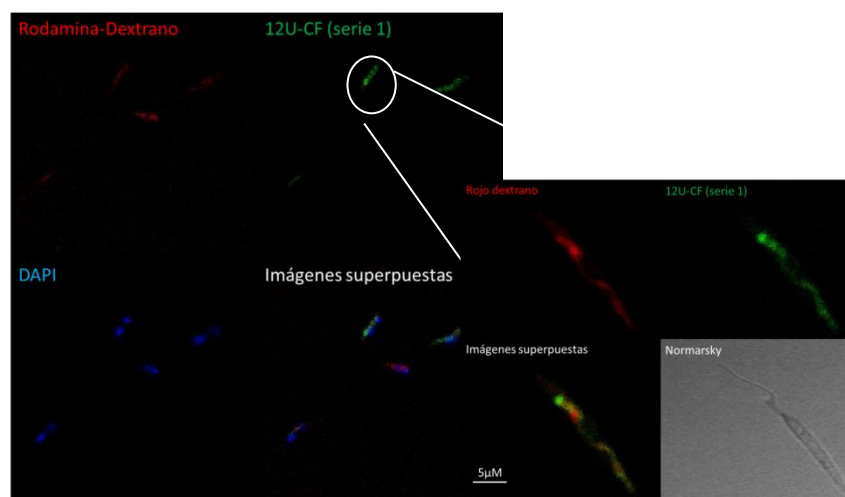


Figura 83. Imagen de microscopía confocal para evaluar la capacidad de internalización del γ,γ -péptido 12U-CF(**107**, serie 1) en *Leishmania donovani*. Los promastigotes fueron incubados con el péptido 12U-CF(**107**, serie 1) (verde) en presencia de Rodamina-Dextrano (rojo) y DAPI (azul) a una concentración final de 10 μ M por 4 h a 26 °C.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

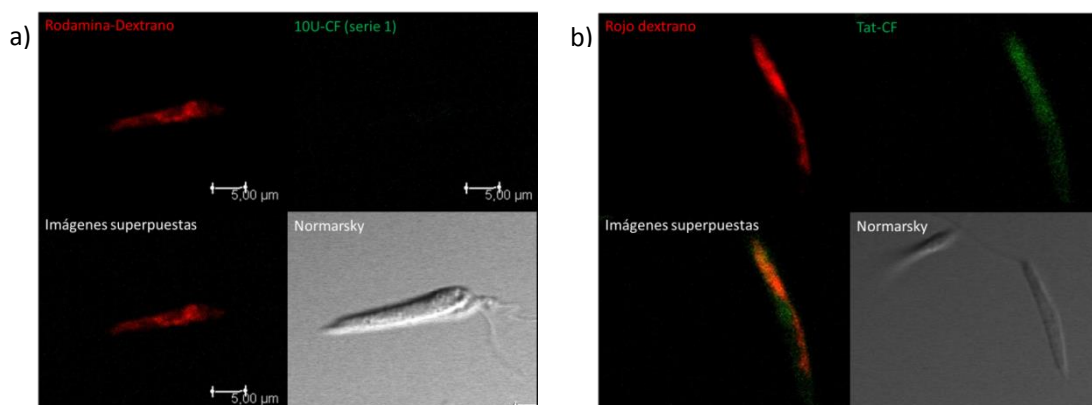


Figura 84. Imagen de microscopía confocal para evaluar la capacidad de internalización del a) γ,γ -péptido 10U-CF(105, **serie 1**) y b) Tat-CF en *Leishmania donovani*. Los promastigotes fueron incubados con el péptido a) 10U-CF(105, **serie 1**) y b) Tat-CF (verde) en presencia de Rodamina-Dextrano (rojo) a una concentración final de 10 μ M por 4 h a 26 °C.

Las imágenes de microscopía confocal obtenidas para los β,γ -péptidos de la serie 2 confirman que son capaces de atravesar la membrana plasmática de los parásitos de *Leishmania donovani*, pero en menor proporción para el β,γ -péptido de 10 unidades, que para el de 12 unidades (**Figura 85**).

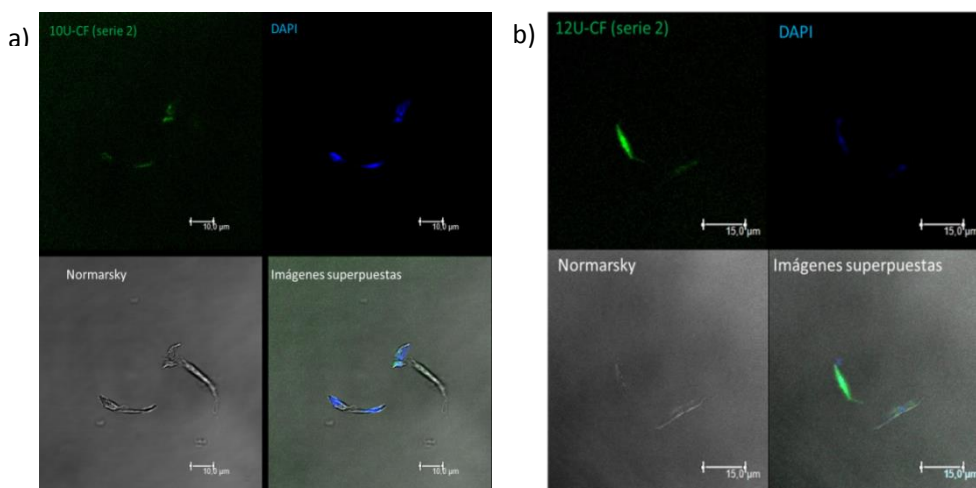


Figura 85. Imagen de microscopía confocal para evaluar la capacidad de internalización del a) β,γ -péptido 10U-CF(111, **serie2**) y b) 12U-CF(113, **serie2**) en *Leishmania donovani*. Los promastigotes fueron incubados con los péptidos (verde) en presencia de DAPI (azul) a una concentración final de 10 μ M por 4 h a 26 °C.

Por otro lado, los ensayos de viabilidad realizados con los parásitos de *Leishmania donovani* en las mismas condiciones (4 horas de incubación) (**Figura 86**) mostraron una disminución de la viabilidad relativa al control para todos los γ,γ -péptidos (serie 1) al

CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aumentar la concentración, alcanzando para el dodecámero un 37% de viabilidad celular a 50 μM . La incubación de los parásitos a concentraciones desde 0.8 μM a 12.5 μM , dieron como resultado porcentajes de viabilidad mayor del 72%, sin embargo, el valor va disminuyendo conforme aumenta el número de residuos de guanidinio.

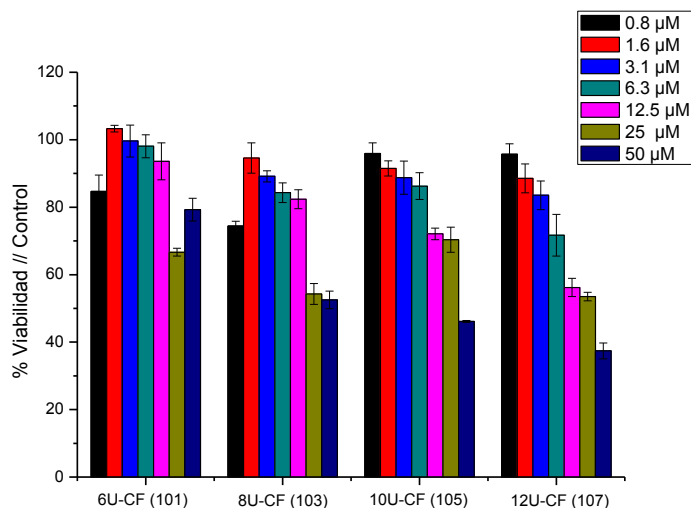


Figura 86. Inhibición de la proliferación de promastigotes de *Leishmania donovani* (ensayo MTT). El tiempo de incubación de los parásitos con los γ,γ -péptidos (serie 1) fue de 4 h a 26 °C. Los datos están expresados como porcentaje relativo al parásito control en ausencia del péptido.

La serie 2 presenta una viabilidad del 53% para los β,γ -péptidos de 10 y 12 unidades y del 77% para el β,γ -péptido de 8 unidades a una concentración de 50 μM . A 10 μM (concentración utilizada para citometría de flujo y microscopía confocal), la viabilidad celular es mayor al 85% para todos los β,γ -péptidos estudiados (**Figura 87**).

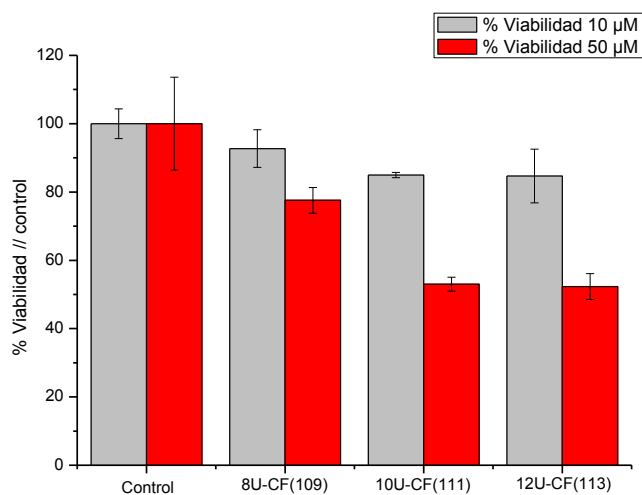


Figura 87. Inhibición de la proliferación de promastigotes de *Leishmania donovani* (ensayo MTT). El tiempo de incubación de los parásitos con los β,γ -péptidos (serie 2) fue de 4 h a una concentración final de 10 y 50 μM a 26 °C. Los datos están expresados como porcentaje relativo al control, que es el parásito en ausencia del péptido.

5.3.5.2 Ensayos *in vitro* de internalización y viabilidad celular de los péptidos ciclobutano-prolina (series 1 y 2) en *Leishmania pifanoi*

La capacidad de atravesar la membrana del parásito *Leishmania pifanoi* de los péptidos β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2) se determinó por medio de citometría de flujo, utilizando CF como fluoróforo. Los péptidos fueron incubados con los amastigotes de *Leishmania pifanoi* durante 4 horas a una concentración final de 12, 25 y 50 μM , siguiendo el procedimiento descrito en la sección 7.9.5.2. Se utilizaron los parásitos sin tratamiento como control negativo en todos los ensayos realizados.

La capacidad de entrada de los β,γ -péptidos de 8, 10 y 12 unidades (en amastigotes de *Leishmania pifanoi*) a las tres concentraciones estudiadas es muy baja. El valor de fluorescencia más alto fue el del β,γ -péptido de 10 unidades con un valor de internalización 1.5 veces mayor que para los parásitos sin tratamiento (**Figura 88**). Estos bajos valores de internalización impiden la realización de ensayos de microscopía confocal. Sin embargo, los ensayos de viabilidad realizados con los parásitos de *Leishmania pifanoi* e incubando los β,γ -péptidos por 4 horas a una concentración final de 50 μM mostraron una viabilidad relativa al control mayor al 80%, en todos los casos (**Figura 89**), indicando que la serie 2 no es tóxica en amastigotes de *Leishmania pifanoi*.

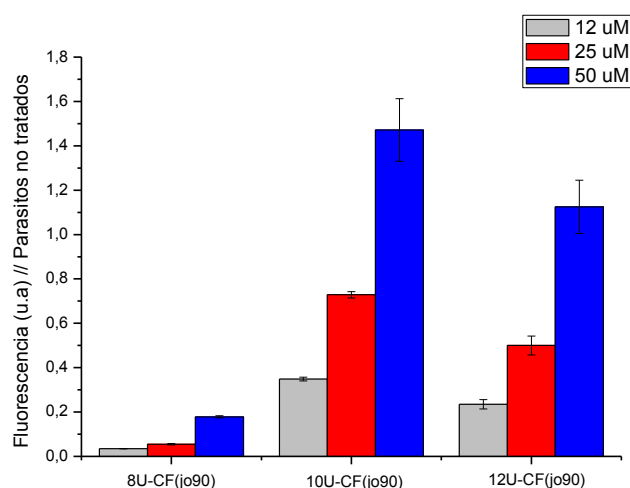


Figura 88. Intensidad de fluorescencia unidades arbitrarias (u.a) de los β,γ -péptidos híbridos (serie 2) en amastigotes de *Leishmania pifanoi*. Los péptidos se incubaron a una concentración final de 12, 25 y 50 μM por 4 h a 26 °C. Las barras de error representan las desviaciones estándar (SD) de las medias de tres experimentos independientes. Como control se utilizaron parásitos sin péptido.

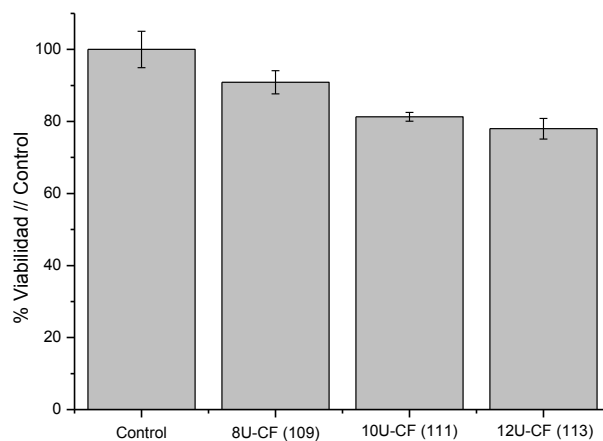


Figura 89. Inhibición de la proliferación de amastigotes de *Leishmania pifanoi* (ensayo MTT). El tiempo de incubación de los parásitos con los β,γ -péptidos (serie 2) fue de 4 h a una concentración final de 50 μM a 26 °C. Los datos están expresados como porcentaje relativo al control, que es el parásito en ausencia del péptido.

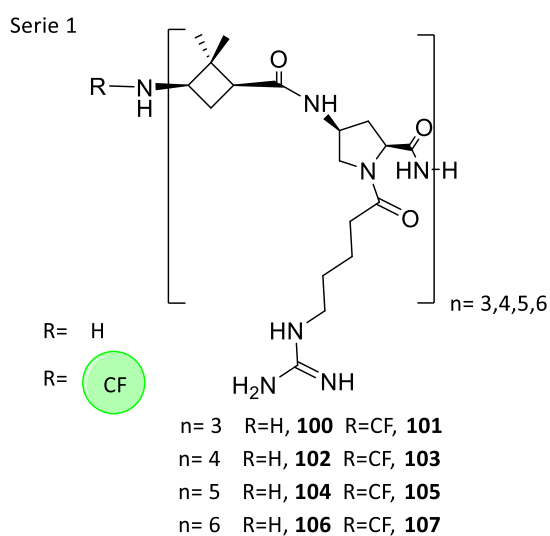
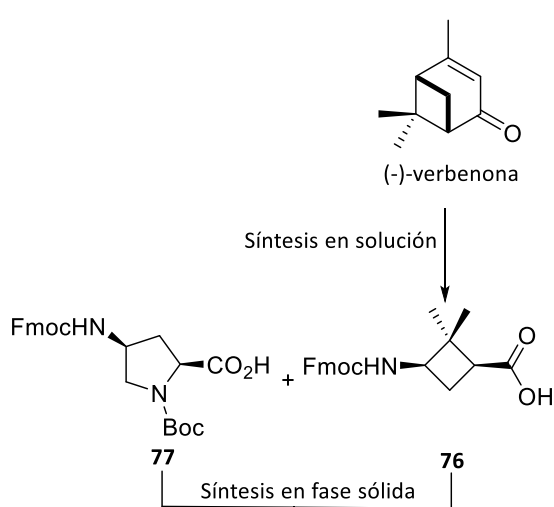
5.4 Resumen y conclusiones

Se llevó a cabo la síntesis estereoselectiva de los monómeros **76** y **80** con configuración absoluta definida, utilizando el ciclobutano como plataforma quiral para la secuencia peptídica. La combinación de los grupos protectores Fmoc/Boc (serie 1, **Esquema 54**) y Fmoc/Alloc (serie 2, **Esquema 55**) en los monómeros sintetizados, permitió la preparación en fase sólida de dos grupos de péptidos híbridos ciclobutano-prolina, así como la preparación del péptido de referencia Tat₄₈₋₅₇, con y sin 5(6)-carboxifluoresceína (CF) (**Figura 90**). Estos péptidos se sintetizaron, purificaron y caracterizaron, alcanzando la pureza necesaria para los estudios de fluorescencia.

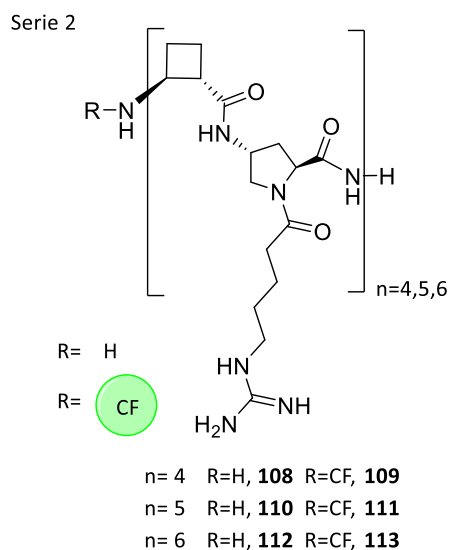
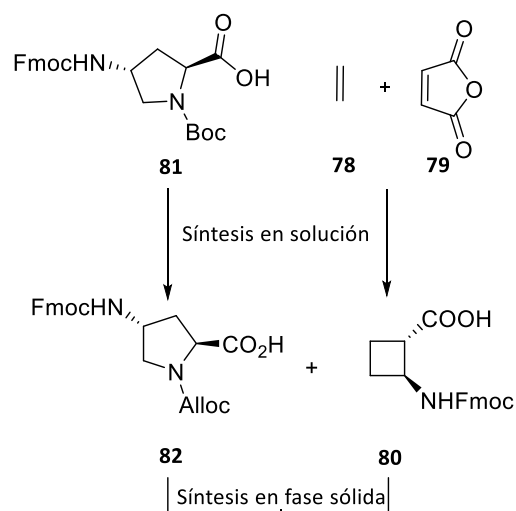
Se estudió la capacidad de atravesar la membrana celular de las dos series de péptidos híbridos ciclobutano-prolina en células HeLa y se observó que al aumentar la longitud de la cadena peptídica y, por lo tanto, la cantidad de residuos guanidilados, aumentó la capacidad de internalización celular. En la serie 1 se observó un aumento en el porcentaje de fluorescencia con respecto al Tat₄₈₋₅₇ desde el 16% para el hexámero, 19% octámero, 23% decámero hasta el 32% para el dodecámero. La serie 2 mostró un menor porcentaje de internalización (6.0% para el dodecámero) al utilizar IP. Sin embargo, el porcentaje de células HeLa positivas para los péptidos 12U-CF (**107, serie 1**) (96%) y 12U-CF (**113, serie 2**) (100%) incubados a 25 μ M, es equivalente al obtenido para el péptido de referencia Tat-CF (100%). No obstante, la intensidad de fluorescencia (cantidad de péptido por célula) es significativamente mayor para el Tat-CF. Los resultados de microscopía confocal corroboraron la internalización positiva observada en citometría de flujo para el compuesto 12U-CF (**113, serie 2**), indicando que el péptido es capaz de atravesar la membrana plasmática de un gran número de células pero en menor proporción que el péptido de referencia. La observación en microscopía confocal de cantidades puntiformes del β,γ -péptido-CF (**113, serie 2**) dentro de la célula viva sugiere la participación de endocitosis en el mecanismo de internalización. Ninguna de las dos series estudiadas presentó toxicidad en células HeLa.

CAPÍTULO 5: RESUMEN Y CONCLUSIONES

El γ,γ -péptido de 12 unidades (**107**, serie 1) internalizó eficientemente (100%) en promastigotes de *Leishmania donovani*. Las imágenes obtenidas por microscopía confocal confirmaron la información de citometría de flujo, evidenciando la eficiente internalización del péptido-CF después de 4 horas de incubación. Sin embargo, experimentos de MTT sugieren que al aumentar la concentración del péptido aumenta la toxicidad en los promastigotes de *Leishmania donovani*. Por otro lado, los β,γ -péptidos de 8, 10 y 12 unidades serie 2 a 50 μM , presentaron una viabilidad mayor al 80% y una baja capacidad de atravesar la membrana de amastigotes de *Leishmania pifanoi*.



Esquema 55. γ,γ -péptidos híbridos sintetizados (serie 1)



Esquema 54. β,γ -Péptidos híbridos sintetizados (serie 1)

CAPÍTULO 5: RESUMEN Y CONCLUSIONES

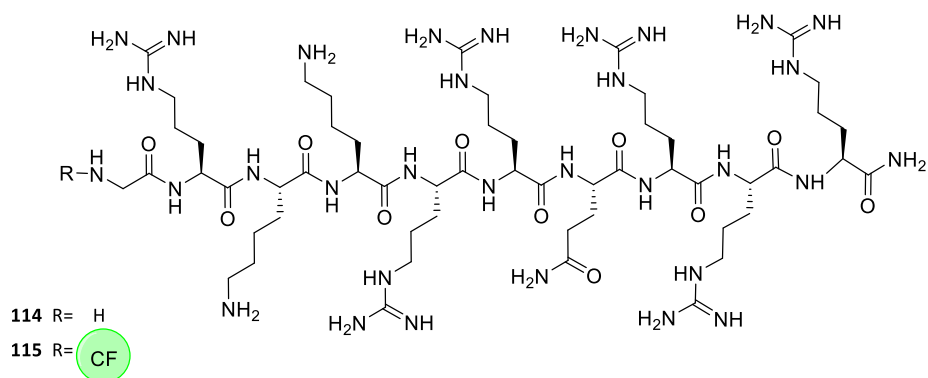


Figura 90. Estructura química Tat₄₈₋₅₇ y Tat₄₈₋₅₇-CF

Capítulo 6

CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GENERALES

Haciendo uso de la versatilidad sintética de los compuestos ciclobutánicos 1,3- y 1,2 difuncionalizados y empleando el anillo de ciclobutano y su quiralidad como elementos de restricción conformacional, se prepararon tres grupos de compuestos ópticamente activos.

- ❖ **Tensioactivos ciclobutánicos polifuncionales:** Se prepararon cuatro nuevos compuestos anfífilos quirales. Al mismo tiempo, se realizó el estudio fisicoquímico y evaluación de las propiedades de superficie del compuesto **45**, determinando que la mezcla **45/46** se comporta como un tensioactivo eficiente y que presenta una agregación de tipo vesícula oligolamelar.
- ❖ **Triaminas ciclobutánicas conjugadas con Gd(III)-DOTA:** Se llevó a cabo la síntesis estereoselectiva de cuatro complejos GdDO3A, **53a-d**, los cuales fueron estudiados como posibles ACs en RMI. Los resultados de RMI y los cálculos teóricos sugieren que existe una amplia influencia de las sustituciones *N*-H y *N*-Me, así como de los grupos protectores de la función amina en la capacidad de contraste. El complejo **53c** presentó una relajatividad mayor que el compuesto de referencia DOTAREM, lo que lo convierte en un posible candidato a ser usado como AC-T₁.
- ❖ **Péptidos híbridos γ,γ - y β,γ -ciclobutano-prolina:** Se prepararon dos nuevas series de péptidos híbridos ciclobutano-prolina de longitud variable (6, 8, 10 y 12 unidades). Ninguna de las dos series sintetizadas presentó toxicidad y exhibieron una buena capacidad de internalización celular en células HeLa. Sin embargo, la cantidad de péptido internalizado es baja al compararlo con Tat (péptido referencia). Por otro lado, los resultados de citometría de flujo y microscopía confocal evidencian una eficiente capacidad de internalización (comparable con Tat) del γ,γ -péptido **107** en promastigotes de *Leishmania donovani*.

Capítulo 7

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA

7.1 Disolventes y reactivos

Tabla 10. Lista de disolventes²³⁸ y reactivos más utilizados.

Abreviatura	Nombre	Casa comercial
ACN	Acetonitrilo	Scharlau
AcOEt	Acetato de etilo	Scharlau
Ag. Guani	<i>N,N</i> -di-Boc-1H-pirazol-1-carboxamida	Sigma-Aldrich
BnBr	Bromuro de bencilo	Sigma-Aldrich
CF	5-(6)-carboxifluoresceína	Sigma-Aldrich
CbzCl	Cloroformiato de bencilo	Sigma-Aldrich
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno	Sigma-Aldrich
DCM	Diclorometano	Scharlau
DIPCDI	<i>N,N</i> -Diisopropilcarbodiimida	Fluka
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina	Sigma-Aldrich
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida	Scharlau
DMSO	Dimetilsulfóxido	Sigma-Aldrich
Et ₂ O	Dietiléter	Scharlau
Et ₃ N	Trietilamina	Sigma-Aldrich
Et ₃ SiH	Trietilsilano	Sigma-Aldrich
(Et) ₂ NCSSNa · 3H ₂ O	Dietilditiocarbamato de sodio trihidratado	Sigma-Aldrich
(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-Fmoc-amino-prolina	<i>N</i> -Boc- <i>cis</i> -4- <i>N</i> -Fmoc-amino-L-prolina	Polypeptide
(2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-Fmoc-amino-prolina	<i>N</i> -Boc- <i>trans</i> -4- <i>N</i> -Fmoc-amino-L-prolina	Polypeptide
Fmoc-O-Su	Carbonato de 9-Fluorenilmetil <i>N</i> -succinimidilo	Sigma-Aldrich
HBSS	Solución salina de Hank's	Biowest
HCOOH	Ácido fórmico	Sigma-Aldrich
Hexano	<i>n</i> -Hexano	Scharlau
HF anh.	Ácido fluorhídrico anhidro	Praxair
HOBT	1-Hidroxibenzotriazol	Albatross Chem
MEM	Mezcla de sales enriquecida con aminoácidos, vitaminas y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.	Gibco
MeOH	Metanol	Scharlau
MsCl	Cloruro de metansulfonilo	Sigma-Aldrich
MTBE	Metil <i>tert</i> -butil éter	Sigma-Aldrich
MTT	(3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio)	Sigma-Aldrich
MgSO ₄	Sulfato de magnesio	Panreac
NaCl	Cloruro de sodio	Panreac
NaCNBH ₃	Cianoborohidruro de sodio	Sigma-Aldrich

²³⁸ Los disolventes fueron destilados cuando fue necesario, bajo atmosfera de nitrógeno usando los procedimientos estándar descritos en "Purification of Laboratory Chemicals". Fourth Edition. Armarego.W.F.; Perrin D.D. 1996. ISBN 0 7506 3761 7.

METODOLOGÍA

OxymaPure®	Etil-2-ciano-2-(hidroximino)acetato	Luxembourg Bio.
PBS	Tampón fosfato pH 7.2	Sigma-Aldrich
PDC	Dicromato de piridinio	Sigma-Aldrich
Pd(PPh₃)₄	Tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0)	Sigma-Aldrich
PhSiH₃	Fenilsilano	Sigma-Aldrich
Pipe	Piperidina	Scharlau
PyBOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxi- tri(pirrolidin)fosfonio	Novabiochem
TFA	Ácido trifluoroacético	Sigma-Aldrich
TIS	Triisopropilsilano	Sigma-Aldrich
Tripsina-EDTA	Tripsina-EDTA	Biowest
RPMI-1640	Medio de cultivo RPMI (Roswell Park Memorial Instute).	Lonza Biological
	Solución de Penicilina con estreptomicina	Industries
Verbenona	(1S)-(-)Verbenona, exceso enantiomérico (ee) 95%	Sigma-Aldrich

METODOLOGÍA

7.2 Técnicas utilizadas

Tabla 11. Instrumentos y/o técnicas utilizadas a lo largo del desarrollo de la investigación

	MODELO	LUGAR
Resonancia magnética nuclear (RMN) ^{239,240,241}	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bruker, modelo AC 250 y Avance 250, para los espectros de ¹H a 250 MHz y de ¹³C a 62.5 MHz. ➤ Bruker, model ARX 360, para los espectros de ¹H a 360 MHz y de ¹³C a 90 MHz. ➤ Bruker, modelo ARX 400, para los espectros de ¹H a 400 MHz y de ¹³C a 100 MHz. 	UAB (SeRMN)
Espectrometría de Masas de alta Resolución (HRMS)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bruker micrOTOFQ, usando ESI – MS (QTOF). 	UAB (SAQ)
Espectroscopia infrarroja (IR) ²⁴²	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Espectrofotómetro Sapphire – ATR. 	
Microanálisis (Análisis elemental)	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Flash EA 2000 CHNS, Thermo Fisher Scientific. ➤ EA 3010, EuroVector. 	
Rotación óptica ²⁴³	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Espectropolarímetro JASCO-715. 	
Micro-destilaciones	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Destilador Buchi, modelo KRV65/30. 	Unidad de Química Orgánica (UAB)
Liofilización	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Liofilizador TELSTAR, modelo LyoQuest-85 	
Hidrogenación	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hidrogenador modelo Chemipress 80 (Trallero & Schlee). 	
Reacciones fotoquímicas	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Reactor fotoquímico pyrex en forma de T de Trallero&SchleeTM. Irradiación emitida por una lámpara de mercurio de 125 W Phillips® y una lámpara de mercurio de 400 W de Electro DHTM. Refrigeración a -40 °C utilizando un refrigerador C40P Thermo ScientificTM, modelo Phoenix II. 	
Puntos de fusión	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Se determinaron por el método de la placa caliente de Kofler, modelo Reichert AustriaTM. 	
Balanzas	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Mettler Toledo AB54, 2 cifras significativas 	

²³⁹ Los desplazamientos químicos se expresan en ppm, utilizando como referencia interna los siguientes valores: CDCl₃: δ =7.26 y 77.2 para ¹H y ¹³C, respectivamente; Metanol – d₄: δ =3.31 y 49.0 para ¹H y ¹³C, respectivamente.

²⁴⁰ Las abreviaturas empleadas en la asignación de las señales son: singlete (**s**), doblete (**d**), triplete (**t**), multiplete (**m**), doble doblete (**dd**), doble triplete (**dt**) singlete ancho (**s.a.**), banda ancha (**b.a.**) absorción compleja (**a.c.**). Se utiliza la notación CH₂ cuando se describe solo un protón, de los protones diastereotópicos de un grupo metileno.

²⁴¹ Las señales de RMN fueron asignadas con la ayuda de DEPT, COSY, HMBC y HMQC

²⁴² Reportado en cm⁻¹

²⁴³ [α]_D : medidas a 22±2 °C

METODOLOGÍA

	➤ Mettler Toledo AB204-S, 4 cifras significativas.	
Tensiometría	➤ Tensiómetro diseñado por el grupo investigación, Química Física de Sistemas Tensioactivos.	Instituto de Química Avanzada de Cataluña.
Conductimetría	➤ Conductímetro Orion Cond. Cell 011010A con electrodos de platino, integrado con un Thermo Orion 550A.	Departamento de química y tecnología de surfactantes (CSIC)
Potenciometría	➤ Thermo Orion, model 8102BN.	
Autoclave	➤ Raypa; AES-12.	
Reactor para HF anh.	➤ Modelo "tipo I" con un cilindro metálico de absorción.	Unidad de Química Combinatoria (UQC)
Citometría de flujo	➤ Citómetro de flujo FC-500.	
Espectrofotometría	➤ Espectrofotómetro con lector múltiple de placas (ELx800 Bio-Tek instruments, Inc).	Parc Científic de Barcelona (UQC)
RP-HPLC analítico	➤ Módulo Waters Alliance 2695 equipado por dos bombas, mezclador de alta presión, autoinyector, detector UV-visible multicanal Photodiode Array Detector 2998.	
HPLC-MS analítico	➤ Módulo Waters Alliance 2695 equipado por dos bombas, mezclador de alta presión, autoinyector, detector UV-visible multicanal Photodiode Array Detector 2996 y espectrómetro de masas Micromass ZQ.	
HPLC-MS semipreparativo	➤ Módulo Waters 2545 Controller equipado por dos bombas, mezclador de alta presión, módulo Waters Alliance 2767 Sample Manager con un inyector y colector de fracciones. Detector UV-visible Dual λ Absorbance Detector 2487 y un espectrómetro de masas Micromass ZQ.	Parc Científic de Barcelona (UQC)
Espectrometría de masas MALDI-TOF²⁴⁴	➤ MALDI Voyager DE RP time-of-flight (TOF) con espectrómetro Applied Biosystems, Framingham.	
Incubadora de células	➤ Blinder; CB150	Unidad de Biología Celular (UAB)

²⁴⁴ Se empleó como matriz una solución de 5 mg/mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (ACH) disuelto en H₂O: ACN (1:1, v/v) con 0.1% de TFA. Preparación de la muestra: 1 μ L del péptido diluido con 1 μ L de la mezcla resultante depositada sobre la placa de análisis.

7.3 Cromatografía

7.3.1 Cromatografía en columna

La técnica de cromatografía en columna a presión se realiza utilizando como fase estacionaria gel de sílice de 0.04-0.06 μm , poro 60 Å, malla 230-400, nitrógeno como gas impulsor y con la fase móvil indicada en cada caso.

La cromatografía en capa fina (CCF), se realiza sobre placas de cromatografía Alugram® SIL G/UV₂₅₄ de 0.25 mm de grosor. Se utilizan dos métodos para revelar las señales:

- Irradiación con lámpara de UV a una longitud de onda de 254 nm.
- Pulverización del cromatofolio con una solución de 3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído (vainillina) y H₂SO₄ en etanol.

La cromatografía en columna a presión en fase reversa se llevo a cabo utilizando como fase estacionaria gel de sílice C₁₈ de 0.04-0.06 μm y poro 60 Å.

7.3.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

- ❖ *Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC).*

El HPLC analítico utilizado para monitorizar las reacciones y determinar la pureza de los compuestos consta de un cromatógrafo *Waters Alliance 2695* (integrado por dos bombas, un mezclador de alta presión y un auto-inyector) con un detector UV-visible multicanal *Photodiode Array Detector 2998*.

Para realizar el análisis cromatográfico se utiliza una columna XBrige BEH 130 C₁₈ (4.6 x 50 mm, 3.5 μm). El flujo utilizado es de 1 mL/min y los eluyentes fueron A: H₂O/HCOOH (99.9:0.1, v/v) y B: ACN/HCOOH (99.93:0.07, v/v). La pureza de los compuestos se determinaron a una $\lambda = 220$ nm.

METODOLOGÍA

- ❖ *Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa acoplada a espectrómetro de masas (RP-HPLC-MS).*

El HPLC analítico utilizado para monitorizar las reacciones y para caracterizar los compuestos sintetizados consta de un cromatógrafo *Waters Alliance 2695* (integrado por dos bombas, un mezclador de alta presión y un auto-inyector) con un detector UV-visible multicanal *Photodiode Array Detector 2996* y un módulo *Waters 2795 Separation Module* unido a un espectrómetro de masas *Micromass ZQ*, con sonda de electrospray (ES).

Para realizar los análisis de HPLC-MS se utilizan las columnas *XBridge® C₁₈* (4.6 x 50 mm, 3.5 µm) o *XBridge® BEH 130 C₁₈* (4.6 x 100 mm, 3.5 µm) según la naturaleza de los compuestos. El flujo utilizado es de 1.6 mL/min y los eluyentes fueron A: H₂O/HCOOH (99.9:0.1, v/v) y B: ACN/HCOOH (99.93:0.07, v/v). Las trazas cromatográficas se recopilaron a una $\lambda = 220$ nm.

- ❖ *Cromatografía líquida de alta resolución semipreparativa acoplada a espectrómetro de masas (HPLC-MS semiprep).*

Este sistema está compuesto por un módulo de gradiente binario *Waters 2545* integrado por dos bombas, un mezclador de alta presión, un módulo *Waters Alliance 2767 sample manager* que es un inyector y el colector de fracciones. Detector UV-visible *Dual λ Absorbance Detector 2487* y un espectrofotómetro de masas *Micromass ZQ*.

El flujo utilizado es de 25 mL/min, utilizando como eluyentes A: H₂O/TFA (99.9:0.1, v/v) y B: ACN/TFA (99.9:0.1, v/v).

Las fracciones purificadas se recogen de manera automática cuando las masas del péptido son detectadas por el equipo. Luego, las fracciones purificadas se colectan y se liofilizan.

7.4 Evaluación de las propiedades de la mezcla 45/46 como surfactante:

7.4.1 Tensiometría por el método de la gota colgante

La Tensión superficial (γ) de la mezcla de surfactante (45/46) se determina por medio del método de la gota colgante, utilizando un equipo diseñado por el Doctor Ramón Pons del Departamento de química y tecnología de surfactantes del Instituto de Química Avanzada de Cataluña (**Figura 91**).

Este equipo consta de una celda de cuerpo metálico con ventanas laterales que permiten visualizar la gota. La sección de la celda donde se forma la gota es hermética permitiendo que el sistema alcance el equilibrio con su fase vapor.

Para introducir las disoluciones a estudiar, se emplea una sonda de plástico y en el extremo se coloca una aguja quirúrgica, la cual se usa para formar la gota colgante desde el fondo de la sonda. Para iluminar la celda desde su parte posterior hay una lámpara de fibra óptica. Entre la lámpara y la celda existe un filtro con el fin de obtener una distribución de luz homogénea. Al otro lado de la celda permanece una cámara de video a la cual se le ajusta un micro-lente. La imagen de la gota se visualiza por medio de un monitor, el cual permite el seguimiento de la formación de la gota. Para grabar las imágenes se utiliza una grabadora con sistema de video.

Una vez obtenida la imagen capturada de la gota, se procede a limpiar la imagen y obtener el contorno de la misma. La tensión superficial (γ) se calcula a partir de ese contorno delineado de la gota.²⁴⁵

²⁴⁵ Anastasiadis, S.; Chen, J.-K.; Koberstein, J.; Siegel, A.; Sohn, J.; Emerson, J. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *119* (1), 55–66.

METODOLOGÍA

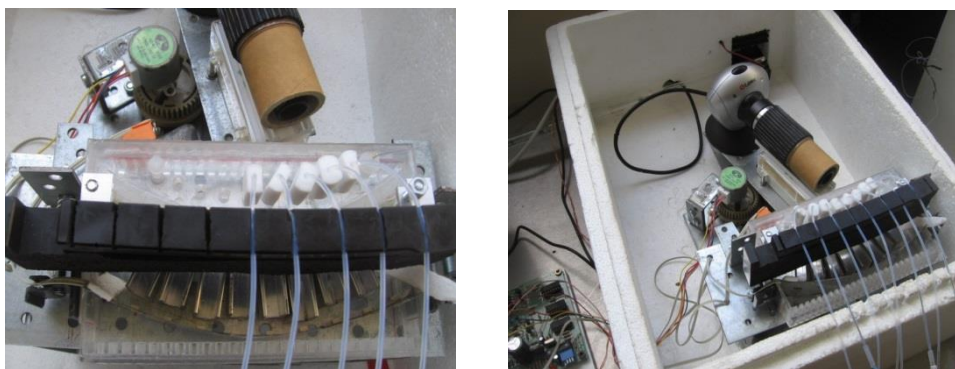


Figura 91. Tensiómetro diseñado por el grupo de investigación del Departamento de química y tecnología de surfactantes (CSIC)

Para realizar la lecturas de γ se prepararan disoluciones desde 0.0037 hasta 7.57 milimolal. Las concentraciones se calculan teniendo en cuenta la masa molar media ponderada de la mezcla 0.35: 0.65 de (45/46) ($526.83 \text{ g mol}^{-1}$). Una vez preparadas las disoluciones, la gota se forma dentro de cada celda por medio de una aguja quirúrgica, la cual se introduce por la parte superior (**Figura 92**).

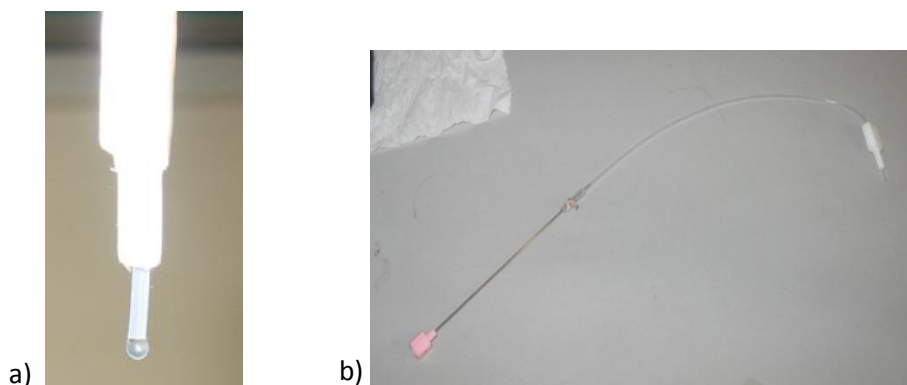


Figura 92. Sistema de formación de la gota. a) Gota formada en la celda. b) Aguja quirúrgica utilizada como capilar

Se realizan lecturas desde el minuto 0 y a los 50, 90, 150, 220, 300 y 390 minutos (**Figura 93**), hasta alcanzar el equilibrio (sin variación apreciable de γ). Se controla la humedad y temperatura ($25.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$) asegurando un ambiente saturado de humedad evitando variaciones debidas a la evaporación. Este experimento se realiza por duplicado.

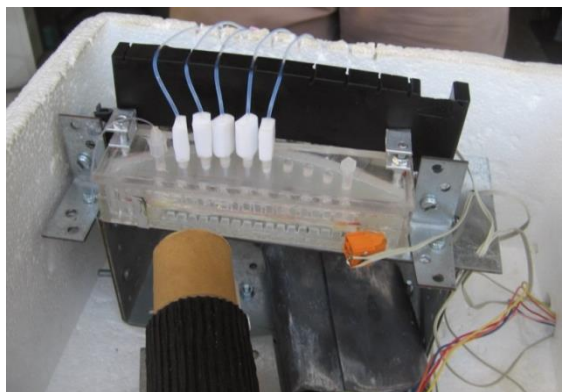


Figura 93. Sistema de lectura de tensión superficial (γ)

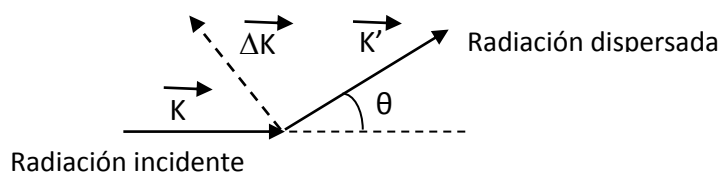
7.4.2 Valoración ácido – base

Se valora 1.002 g de una solución de 0,0514% en peso del agente tensioactivo con una solución de NaOH 0.0039% en peso (≈ 1 mM) bajo una atmósfera de nitrógeno para evitar la carbonatación. El pH se mide a 25 °C con un electrodo (Thermo Orion, modelo 8102BN). El electrodo se calibra con 2 soluciones buffer estándar de pH 4 y 10.

7.4.3 Dispersión de rayos X a bajos ángulos

Para determinar el tipo de agregación formada por el agente tensioactivo, se realiza la técnica de dispersión de Rayos X en ángulos pequeños (SAXS). El equipo utilizado es un espectrofotómetro S3 MICRO (Hecus X-ray Systems, Graz, Austria), el cual está constituido por una fuente GENIX microfocus y un elemento de focalización puntual FOX 3D (ambos de Xenocs, Grenoble) que proporciona un detector de radiación $K\alpha$ de Cu con $\lambda = 0.1542$ nm. La temperatura se controla por medio de un Peltier TCCS-3 Hecus. Para introducir la muestra se utilizan capilares de 1 mm de diámetro con un espesor de 20 μm .

Considerando una radiación X de vector de onda $K = 2\pi/\lambda$ que interacciona con la materia, ésta experimentaría una dispersión elástica en todas las direcciones por parte de los electrones, de tal forma que el vector de onda asociado cambiará en dirección pero no en su magnitud. $\vec{\Delta K} = \vec{K} - \vec{K}'$



De este modo, se define el vector de dispersión como esta variación en el vector de onda, cuyo módulo viene dado por la expresión:

$$q = |\Delta K| = \frac{4\pi}{\lambda} \cdot \sin \frac{\theta}{2}$$

donde, θ es el ángulo de dispersión. En nuestro experimento los valores de q oscilan entre 0.08 nm^{-1} y 6.0 nm^{-1} . Los ángulos de dispersión se calibran mediante la medición de una muestra estándar de behenato de plata ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOAg}$). Las curvas experimentales de SAXS se ajustaron a modelos obtenidos numéricamente teniendo en cuenta los efectos de tamaño y amplitud del haz detectado. Se utiliza una rutina de mínimos cuadrados basado en el algoritmo de Levenberg-Marquardt. También se utiliza el modelo de cintas “core-shell”²⁴⁶ y el modelo de bicapas basado en el esquema Caillé Gauss modificado.²⁴⁷

7.5 Evaluación de las relajatividades (r_1) de los compuestos 53a, 53b, 53c, 53d por Resonancia Magnética de Imagen (RMI)

Se determinaron los tiempos de relajación longitudinal T_1 y transversal T_2 , para los compuestos **53a**, **53b**, **53c**, **53d** y DOTAREM® (compuesto de referencia). Estos tiempos de relajación describen cuánto tarda el mecanismo de señal de resonancia magnética en regresar a su estado original o a su relajación. Un T_1 corto aparece como una señal brillante y un T_2 corto como una señal oscura en las imágenes de Resonancia Magnética (RM). Los valores de relajatividad longitudinal r_1 , se obtuvieron a partir de

²⁴⁶ Pedersen, J. S. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1997**, *70*, 171–210.

²⁴⁷ Pabst, G.; Rappolt, M.; Amenitsch, H.; Laggner, P. *Phys Rev E* **2000**, *52* (3), 4000–4009.

METODOLOGÍA

la regresión lineal de la tasa de relajación R_1 (R_1 es el inverso del tiempo de relajación T_1) versus la concentración de Gd (mM).

$$R_1 = r_1 [\text{Gd}] + (R_1)_0$$

Donde $(R_1)_0$ hace referencia a la tasa de relajación en la ausencia de especies paramagnéticas.

Los experimentos de Resonancia Magnética de Imagen (RMI) se realizaron en un imán horizontal de 7 T (BioSpec 70/30, Bruker BioSpin, Ettlingen, Alemania) (**Figura 94a**)

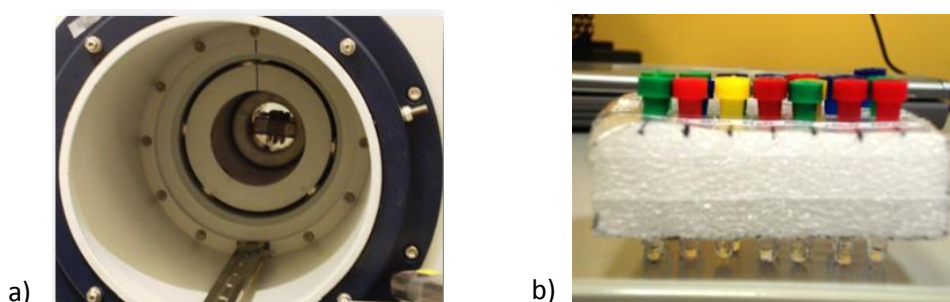


Figura 94. a) Imán horizontal de 7 T. b) Tubos de (4 cm x 4 mm) conteniendo las muestras

Para realizar las lecturas de los tiempos de relajación longitudinal (T_1) se preparan disoluciones en agua de los compuestos (**50a**, **50b**, **50c** y **50d**) y DOTAREM® a las siguientes concentraciones: 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.31 y 0.63 mM. (**Figura 94**).

Estos tiempos se miden usando secuencias espin-eco con tiempo de repetición variables (TR=50, 80, 120, 160, 200, 250, 300, 360, 420, 500, 650, 850, 1100, 1600, 2200, 3000, 5000, y 10000 milisegundos), tiempo de eco = 10 milisegundos, y tamaño de la matriz (MTX) = 256×128.

Las imágenes potenciadas en T_1 , fueron adquiridas usando una secuencia MSME con TE =10 ms, TR = 50 ms, MTX = 512×256, (FOV) = 8×4 cm² y número de promedios (NA)=8.

7.6 Estudios computacionales

La optimización de las geometrías de los complejos fue optimizada usando el método del funcional de densidad (DFT) M06,²⁴⁸ el cual proporciona una buena descripción de las interacciones no covalentes. Con el objetivo de considerar los efectos relativistas más importantes, para el Gd se aplicó el Potencial Efectivo del *Core* (ECP) quasirelativista de Dolg y col.²⁴⁹ y el conjunto base relacionado [5s4p3d]. Este ECP incluye los [Kr]4d¹⁰4f⁷ electrones del lantánido en el *core*, tratando de forma explícita los once electrones más externos. Las geometrías fueron optimizadas en solución acuosa usando el método C-PCM.²⁵⁰ Los principales elementos del grupo se describieron utilizando el conjunto base estándar 6-31G(d).

Las frecuencias vibracionales armónicas se calcularon con el fin de verificar que estas estructuras corresponden a los mínimos de energía (todas las frecuencias son reales). Para evitar problemas numéricos se utilizó una rejilla de integración ultrafinas, en la optimización de la geometría y el cálculo de frecuencias. Las energías de las estructuras más significativas para los principales elementos del grupo, fueron recalculados utilizando el conjunto base estándar 6-311+G(d,p).

Todos estos cálculos se llevaron a cabo utilizando el programa Gaussian-09.²⁵¹ El análisis de la densidad electrónica se llevó a cabo utilizando el programa Multiwfn 3.3.7. Las estructuras de partida para los complejos de Gd se determinaron a partir de una búsqueda conformacional Monte Carlo^{252, 253} usando el campo de fuerza OPLS-AA²⁵⁴ implementado en el programa Macromodel.

²⁴⁸ Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120* (1-3), 215–241.

²⁴⁹ Dolg, M.; Stoll, H.; Savin, a.; Preuss, H. *Theor. Chim. Acta* **1989**, *75* (3), 173–194.

²⁵⁰ Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24* (6), 669–681.

²⁵¹ Frisch, M.J. *et al.*, Gaussian, Inc. Wallingford CT, **2009**.

²⁵² Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379-4386

²⁵³ Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1419-1427.

²⁵⁴ Kaminski, G. A; Friesner, R.A; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (28), 6474–6487.

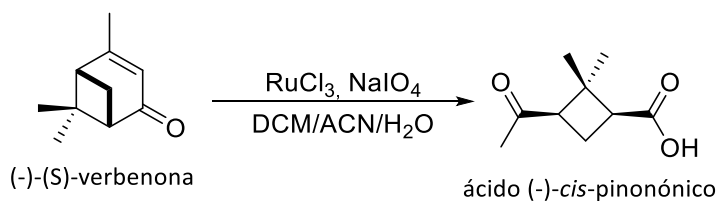
METODOLOGÍA

Se consideraron las cuatro conformaciones diferentes asociadas al *core* del ligando y la geometría de esta parte de la molécula. Para la geometría del metal coordinado, se cogieron las coordenadas determinadas para Gd-DOTA.

Se estudió cada conformación diferente asociada a la plataforma ciclobutánica. En estos cálculos el Gd^{3+} fue reemplazado por Mn^{3+} . Un procedimiento similar se siguió para los complejos hidratados $53 \cdot H_2O$. Las estructuras de los confórmeros más estables se optimizaron en el nivel de M06 de cálculo utilizando la misma metodología descrita anteriormente.

7.7 Descripción experimental y caracterización

Ácido (1*S*,3*R*)-3-acetil-2,2-dimetilciclobutanocarboxílico [ácido (-)-*cis*-pinonónico]:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 4.0 mL de (-)-S-verbenona (25.96 mmol), en 232 mL de una mezcla de DCM/ACN/ H_2O en proporción de 2:2:3 la cual se encuentra previamente a 0 °C. Posteriormente, se añaden 4.2 g de $NaIO_4$ (120.3 mmol, 4.2 eq.) y 162 mg de $RuCl_3$ (0.6 mmol, 0.02 eq.). Pasadas 3 horas se retira el baño de hielo y se deja en agitación toda la noche a temperatura ambiente.

Una vez transcurrido este tiempo, se añaden 200 mL de H_2O y se realizan extracciones con DCM (3 x 40 mL). La fase orgánica, se seca con $MgSO_4$, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 4.28 g (25.18 mmol, rdt. cuantitativo) de ácido pinonónico.

METODOLOGÍA

Datos espectroscópicos para el ácido (-)-cis-pinonónico:

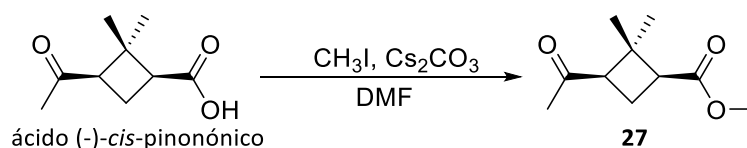
$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 1.00 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.48 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.92 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.8$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 1H, $\text{H}_{4\text{S}}$), 2.09 (s, 3H, CH_3CO), 2.66 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.5$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 10.5$ Hz, 1H, $\text{H}_{4\text{R}}$), 2.89 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.8$ Hz, 1H, H_3), 2.99 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 10.5$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 1H, H_1).

$^{13}\text{C RMN}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ 18.3 (*cis*- CH_3), 19.3 (C_4), 30.2 (*trans*- CH_3), 31.0 (CH_3CO), 44.8 (C_2), 45.4 (C_1), 53.1 (C_3), 178.8 ($\text{CO}_{\text{ácido}}$), 206.1 ($\text{CO}_{\text{cetona}}$).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Burgess, K.; Li, S.; Rebenspies, J. *Tetrahedron Lett* **1997**, 38 (10), 1681–1684.

(1*S*,3*R*)-3-Acetil-2,2-dimetilciclobutanocarboxilato de metilo, **27**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 4.76 g (27.97 mmol) del ácido pinonónico en 65 mL de DMF y se añaden 11 g de Cs_2CO_3 (33.76 mmol, 1.2 eq.), a continuación se adicionan 2.1 mL de CH_3I (33.72 mmol, 1.2 eq.) y se deja en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo se detiene la agitación, se añaden 50 mL de acetato de etilo y se hacen lavados con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 . La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, obteniéndose 4.5 g (24.43 mmol, 87% rdto.) del producto **27** en forma de aceite de color amarillo.

METODOLOGÍA

Datos espectroscópicos para el compuesto 27:

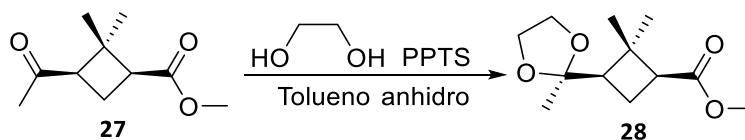
$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 0.90 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.44 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.90 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = ^3J'_{\text{H-H}} = 7.8$ Hz, 1H, $\text{H}_{4\text{S}}$), 2.66 (ddd, $^2J_{\text{H-H}} = 11.3$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 10.8$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 10.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{4\text{R}}$), 2.76 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 1H, H_1), 2.86 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 10.3$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz, 1H, H_3), 3.67 (s, 3H, CO_2CH_3).

$^{13}\text{C RMN}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ 18.3 (*trans*- CH_3), 19.3 (C_4), 30.2 (*cis*- CH_3), 31.0 (CH_3CO), 44.8 (C_2), 45.4 (C_1), 51.3 (CH_3 éster), 53.1 (C_3), 172.8 (CO éster), 206.1 (CO cetona).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Aguado, G. P.; Moglioni, A. G.; Brousse, B. N.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14* (16), 2445–2451.

(1*S*,3*R*)-2,2-Dimetil-3-(2'-metil-[1',3']-dioxolan-2'-il)ciclobutanocarboxilato de metilo, 28:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 4.5 g (24.40 mmol) del producto **27**, en 70 mL de tolueno y se añaden 12 mL (215.17 mmol, 8.8 eq.) de etilenglicol y 1.28 g de PPTS (5 mmol, 12.2 eq.). Se lleva a reflujo, con una trampa de Dean-Stark, durante 5 horas.

Pasado este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida. Se añaden 200 mL de DCM y se hacen lavados con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (3 x 50 mL) y con una solución acuosa saturada de NaCl (1 x 50 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, obteniéndose 5.57 g (24.40 mmol) del producto **28** como un aceite casi incoloro con un rendimiento cuantitativo.

METODOLOGÍA

Datos espectroscópicos para el compuesto **28**:

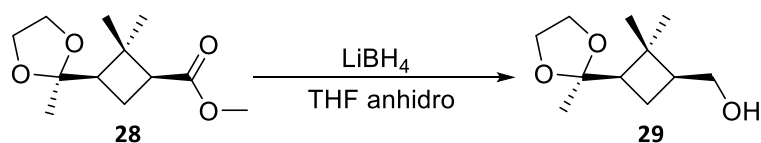
$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 1.05 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.23 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.25 (s, 3H, CH_3), 1.82-1.96 (m, 1H, $\text{H}_{4\text{S}}$), 2.17-2.35 (m, 2H, H_3 , $\text{H}_{4\text{R}}$), 2.58-2.68 (m, 1H, H_1), 3.65 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.78-3.90 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 3.93-4.02 (m, 2H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$).

$^{13}\text{C RMN}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ 20.5 (*trans*- CH_3), 22.9 (C_4), 26 (*cis*- CH_3), 33.6 (CH_3), 45.9 (C_2), 48.4 (C_1), 52.1 ($\text{CH}_{3\text{éster}}$), 53.3 (C_3), 66.4, 68.1 (2C, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 112.1 (C), 175.3 (CO_2CH_3).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Mogliani, A.G.; Muray, E.; Castillo, J. A.; Álvarez-Larena, Á.; Moltrasio, G. Y.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2402-2410.

((**1S,3R**)-2,2-Dimetil-3-(2'-metil-1',3'-dioxolan-2'-il)ciclobutil)metanol, **29**:



En un matraz de fondo redondo de dos bocas provisto de agitación magnética, se disuelven 3.9 g del producto **28** (17.08 mmol) en 50 mL de THF anhidro. A continuación se adiciona, poco a poco, 24 mL de LiBH_4 (solución 2 M en THF, 48 mmol, 2.8 eq.). Se lleva a reflujo durante 6 horas (se observa un burbujeo en el seno de la solución como consecuencia del desprendimiento de hidrógeno).

Pasado este tiempo se enfría la mezcla para añadir cuidadosamente metanol (hasta no observar más burbujeo). Se adicionan 100 mL de agua y se extrae con AcOEt (3 x 50 mL). La fase orgánica, se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, usando como fase móvil una mezcla hexano: AcOEt 1:1. Se obtienen 2.1 g del producto **29** (10.48 mmol, 61% rdto.) en forma de aceite incoloro.

METODOLOGÍA

Datos espectroscópicos para el compuesto 29:

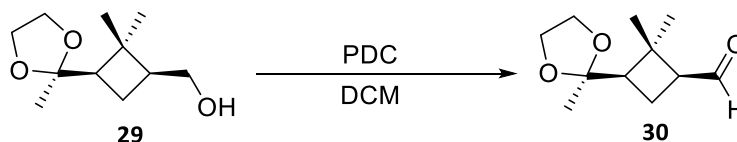
$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 1.10 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.18 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.23 (s, 3H, CH_3 acetal), 1.57 (m, 1H, H_{4a}), 1.78-1.95 (m, 1H, H_{4b}), 1.95-2.07 (m, 1H, H_3), 2.14 (dd, $^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 3.23$ Hz, 1H, H_1), 3.49 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 6.3$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'a}$), 3.71 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 10.7$ Hz, $^3J_{\text{H-H}} = 7.9$ Hz, 1H, $\text{H}_{1'b}$), 3.78-4.03 (a.c., 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$).

$^{13}\text{C RMN}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ 17.1 (*trans*- CH_3), 22.2 (C_4), 23.9 (*cis*- CH_3), 32.3 (CH_3), 40.8 (C_2), 44.9 (C_1), 50.2 (C_3), 63.2, 64.1 (2C, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 65.8 (CH_2OH), 110.2 (C).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Mogliani, A.G.; Muray, E.; Castillo, J. A.; Álvarez-Larena, Á.; Moltrasio, G. Y.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2402-2410.

(1*S*,3*R*)-2,2-Dimetil-3-(2'-metil-1',3'-dioxolan-2'-il)ciclobutanocarbaldehído 30:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 2.1 g del producto **29** (10.5 mmol) en 25 mL de DCM anhidro y se adicionan 8.48 g de PDC (22.6 mmol, 2.14 eq.). Se deja en reacción durante toda la noche. Pasado este tiempo se adicionan 3 espátulas de Florisil[®], con la finalidad de eliminar el exceso de oxidante y se deja agitar por 30 minutos. Se adicionan 30 mL de DCM y la solución se filtra sobre Celite[®]. Se lava la Celite[®] con DCM (3 x 10 mL) y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniendo el compuesto **30** en forma de aceite de color café que se utiliza directamente en la siguiente etapa.

METODOLOGÍA

Datos espectroscópicos para el compuesto **30**:

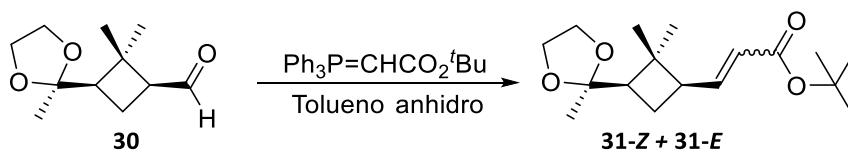
IR (ATR) 2982 (CH), 2957(CH), 2713 (CH_{aldehído}), 1715 (CO_{aldehído}), 1371, 1089, 1048.

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.17 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.23 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.34 (s, 3H, CH₃_{acetal}), 1.71-1.91 (m, 1H, H_{4a}), 2.02-2.14 (m, 1H, H_{4b}), 2.21-2.40 (m, 1H, H₃), 2.54-2.68 (m, 1H, H₁), 3.74-4.06 (a.c., 4H, -OCH₂CH₂O-), 9.73 (d, ³J_{H-H} = 1.4 Hz, H_{aldehído}).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Mogliani, A.G.; Muray, E.; Castillo, J. A.; Álvarez-Larena, Á.; Moltrasio, G. Y.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2402-2410.

3-((1'*R*,3'*R*)-2',2'-Dimetil-3'-(2''-metil-1'',3''-dioxolan-2''-il)ciclobutil)acrilato de *terc*-butilo, **31-Z** y **31-E**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 7.51 g (37.88 mmol) del producto **30** y 8.35 g de Ph₃PCHCO₂^tBu (14.90 mmol, 1.2 eq.) en 20 mL de tolueno anhidro bajo atmosfera de nitrógeno. Se lleva a reflujo durante 18 horas. Pasado este tiempo el solvente se elimina bajo presión reducida. El crudo resultante se disuelve en Et₂O caliente y se filtra en un embudo de vidrio. El solvente se evapora bajo presión reducida y el crudo se purifica por cromatografía en columna utilizando como fase móvil hexano: AcOEt 1:1. Se obtienen 4.79 g (16.16 mmol, 45 % de rdto. en dos etapas) de una mezcla de olefinas **31-Z** y **31-E** en proporción 53:47.

Datos espectroscópicos para el compuesto **31-Z** y **31-E**:

IR (ATR) 2979 (CH), 2935(CH), 2879(CH), 1717 (CO_{éster}), 1713 (CO_{éster}), 1647, 1420, 1368.

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) Para el isómero E δ 1.04 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.17 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.26 (s, 3H, CH₃_{acetal}), 1.50 (s, 9H, ^tBu), 1.72-1.83 (m, 1H, H_{4's}), 2.05-2.10 (m, 1H,

METODOLOGÍA

H_{1'}), 2.20-2.30 (m, 1H, H_{3'}), 2.46-2.55 (m, 1H, H_{4'R}), 3.82-4.05 (a.c., 4H, -OCH₂CH₂O-), 5.64-5.75 (m, 1H, H₂), 6.84 (dd, ³J_{H-H}=15.6 Hz, ⁴J_{H-H}= 7.4 Hz, 1H, H₃).

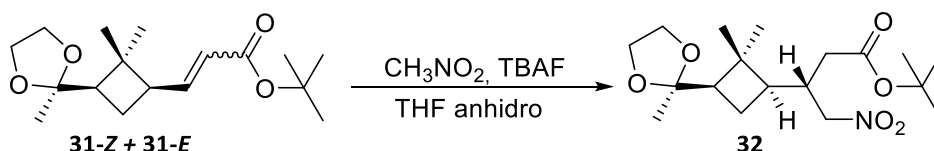
¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) Para el isómero Z δ 1.08 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.17 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.26 (s, 3H, CH₃_{acetal}), 1.50 (s, 9H, ^tBu), 1.93-1.98 (m, 1H, H_{4'S}), 2.05-2.10 (m, 1H, H_{1'}), 2.20-2.30, (m, 1H, H_{3'}), 2.46-2.55 (m, 1H, H_{4'R}), 3.82-4.05 (a.c., 4H, -OCH₂CH₂O-), 5.64-5.75 (m, 1H, H₂), 6.06 (dd, ³J_{H-H}= 11.6 Hz, ⁴J_{H-H}=10.2 Hz, 1H, H₃).

¹³C RMN (62.5 MHz, CDCl₃) δ 18.1 (*trans*-CH₃), 23.1 (C_{4'}), 23.6 (C_{4'}), 25.1 (CH₃_{acetal}), 28.0 (C(CH₃)₃), 28.1 (C(CH₃)₃), 30.9 (*cis*-CH₃), 31.4 (*cis*-CH₃), 39.8 (C_{2'}), 43.6 (C_{2'}), 44.1 (C_{1'}), 44.6 (C_{1'}), 49.7 (C_{3'}), 49.8 (C_{3'}), 63.6 (-OCH₂CH₂O-), 65.4 (-OCH₂CH₂O-), 65.5 (-OCH₂CH₂O-), 79.9 (C(CH₃)₃), 109.5 (C_{acetal}), 109.7 (C_{acetal}), 121.9 (C₂), 123.0 (C₂), 147.6 (C₃), 148.6 (C₃), 165.7 (CO₂^tBu), 165.9 (CO₂^tBu).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Aguilera, J.; Gutiérrez-Abad, R.; Mor, À.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (24), 2864–2869.

(3S)-3-((1'R,3'R)-2',2'-Dimetil-3'-(2"-metil-1",3"-dioxolan-2"-il)ciclobutil)-4 nitrobutanoato de *terc*-butilo, 32:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 3.48 g del producto **31-Z + 31-E** (11.74 mmol) en 125 mL de THF anhidro y se enfría la solución a 0 °C con la ayuda de un baño de hielo. Se añaden 0.76 mL de CH₃NO₂ (14.09 mmol, 1.2 eq.) y 14 mL de una solución 1 M de TBAF en THF (14.09 mmol, 1.2 eq.). Se deja en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente y los subproductos de la reacción a presión reducida.

METODOLOGÍA

El crudo resultante se disuelve en AcOEt y se lava con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (3 x 50 mL). La fase orgánica, se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene un aceite que se purifica mediante cromatografía en columna con una fase móvil de hexano-AcOEt 4:1. Se obtienen 3.33 g (9.31 mmol, 79% rdto.) del producto **32**, en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos para el compuesto **32**:

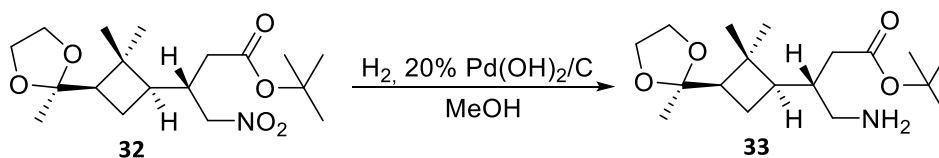
¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.13 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.19 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.24 (s, 3H, CH₃ acetal), 1.47 (s, 9H, ^tBu), 1.55-1.67 (m, 1H, H₃), 1.73-1.84 (m, 1H, H_{4'S}), 1.86-1.98 (m, 1H, H_{4'R}), 2.06–2.20 (m, 1H, H_{2S}), 2.24–2.38 (a.c., 2H, H_{1',H_{2R}}), 2.38–2.58 (m, 1H, H_{3'}), 3.77–3.91 (a.c., 4H, -OCH₂CH₂O-), 4.39–4.54 (a.c., 2H, -CH₂NO₂)

¹³C RMN (62.5 MHz, CDCl₃) δ 16.4 (*trans*-CH₃), 23.2 (C_{4'}), 23.7 (CH₃ acetal), 28.0 (C(CH₃)₃), 31.8 (*cis*-CH₃), 35.5 (C₃), 35.9 (C_{2'}), 41.2 (C₂), 42.9 (C_{1'}), 49.0 (C_{3'}) 63.6 (-OCH₂CH₂O-), 65.4 (-OCH₂CH₂O-), 76.4 (C₄, CH₂NO₂), 81.11 (C(CH₃)₃), 109.4 (C_{acetalico}), 170.5 (CO₂^tBu).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Aguilera, J.; Gutiérrez-Abad, R.; Mor, À.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (24), 2864–2869

(3S)-4-Amino-3-((1'R,3'R)-2',2'-dimetil-3'-(2"-metil-1",3"-dioxolan-2"-il)ciclobutil)butanoato de *terc*-butilo, **33**:



En un recipiente de hidrogenador provisto de agitación magnética se disuelven 200 mg (0.56 mmol) del producto **32** en 8 mL de MeOH. Se adicionan 60 mg de Pd(OH)₂/C. Se deja en agitación a temperatura ambiente durante 12 horas a 5 atmosferas de presión de hidrógeno. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se filtra sobre Celite® y se lava con abundante MeOH (2 x 40 mL). Finalmente se elimina el disolvente a presión

METODOLOGÍA

reducida obteniéndose 176 mg (0.54 mmol, 96% rdto.) del producto **33**, en forma de aceite de color amarillo.

Datos espectroscópicos para el compuesto **33**:

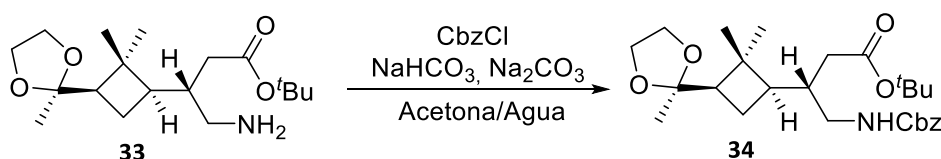
$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 1.10 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.21 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.24 (s, 3H, CH_3 acetal), 1.47 (s, 9H, ^tBu), 1.55–1.80 (a.c., 2H, $\text{H}_{4'S}$, $\text{H}_{1'}$), 1.86–1.99 (a.c., 2H, $\text{H}_{4'R}$, H_3), 2.05–2.19 (a.c., 4H, $\text{H}_{3'}$, H_{2S} , NH_2), 2.28 (dd, $J_{\text{H-H}} = 14.5$ Hz, $J_{\text{H-H}} = 3.6$ Hz, 1H, H_{2R}), 2.55 (dd, $J_{\text{H-H}} = 12.9$ Hz, $J_{\text{H-H}} = 6.7$ Hz, 1H, H_{4S}), 2.71 (dd, $J_{\text{H-H}} = 12.9$ Hz, $J_{\text{H-H}} = 3.9$ Hz, 1H, H_{4R}), 3.77–4.04 (a.c., 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$)

$^{13}\text{C RMN}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ 16.5 (*trans*- CH_3), 23.4 ($\text{C}_{4'}$), 23.8 (CH_3 acetal), 28.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 32.0 (*cis*- CH_3), 36.7 (C_3), 41.0 ($\text{C}_{1'}$), 42.0 (C_2), 43.7 (C_4), 49.2 ($\text{C}_{2'}$), 50.9 ($\text{C}_{3'}$), 63.6 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 65.4 ($-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$), 80.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 109.6 ($\text{C}_{\text{acetalico}}$), 172.5 (CO_2^tBu).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Aguilera, J.; Gutiérrez-Abad, R.; Mor, À.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (24), 2864–2869

(3S)-4-Benciloxicarbonilamino-3-((1'R,3'R)-2',2'-dimetil-3'-(2"-metil-1",3"-dioxolan-2"-il)ciclobutil)butanoato de *terc*-butilo, **34:**



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 100 mg (0.30 mmol) del producto **33** en 6.9 mL de una mezcla agua-acetona (8:1), posteriormente se adiciona Na₂CO₃ (64 mg, 0.60 mmol, 2.0 eq.), NaHCO₃ (25 mg, 0.3 mmol, 1.0 eq.) y CbzCl (0.13 mL, 0.9 mmol, 3.0 eq.). Se deja en reacción durante 18 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se extrae con DCM y la fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El aceite obtenido, se purifica mediante cromatografía en columna con una fase móvil de

METODOLOGÍA

hexano-AcOEt 1:4. Se obtienen 92 mg (0.20 mmol, 65% rdto.) del producto **34**, en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos para el compuesto **34**:

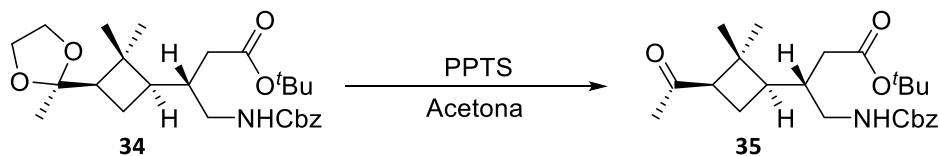
¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.11 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.19 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.25 (s, 3H, CH₃ acetal), 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.53–1.69 (a.c., 2H, H_{4'S}, H_{1'}), 1.82–2.12 (a.c., 4H, H_{4'R}, H₃, H_{3'}, H_{2S}), 2.25 (dd, $J_{H-H} = 18.5$ Hz, $J_{H-H} = 7.2$ Hz, 1H, H_{2R}), 2.95–3.10 (m, 1H, H_{4S}), 3.32 (ddd, $J_{H-H} = 12.7$ Hz, $J'_{H-H} = 5.7$ Hz, $J''_{H-H} = 3.2$ Hz, 1H, H_{4R}), 3.74–3.88 (a.c., 4H, -OCH₂CH₂O-), 5.07 (s, 2H, CH₂Ph), 5.23 (dd, $J_{H-H} = 5.7$ Hz, $J'_{H-H} = 6.0$ Hz, 1H, NH), 7.32–7.43 (a.c., 5H, H_{Ar}).

¹³C RMN (62.5 MHz, CDCl₃) δ 16.5 (*trans*-CH₃), 23.6 (C_{4'}), 23.7 (CH₃ acetal), 27.9 (C(CH₃)₃), 32.0 (*cis*-CH₃), 36.8 (C₃), 37.3 (C₂), 41.0 (C_{2'}), 42.5 (C₄), 44.0 (C_{1'}), 49.3 (C_{3'}), 63.5 (-OCH₂CH₂O-), 65.3 (-OCH₂CH₂O-), 66.4 (CH₂Ph), 80.6 (C(CH₃)₃), 109.6 (C_{acetal}), 127.8, 127.9, 128.3, 136.6 (6C, C_{Ar}), 156.3 (CO_{carbamato}) 172.2 (CO₂^tBu).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Aguilera, J.; Gutiérrez-Abad, R.; Mor, À.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (24), 2864–2869

(3S)-3-((1'R,3'R)-3'-Acetil-2',2'-dimetilciclobutil)-4-benciloxycarbonilamino butanoato de *tert*-butilo, **35**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 750 mg del producto **34** (1.62 mmol) y 347 mg de PPTS (1.38 mmol, 0.85 eq.) en 60 mL de acetona. Se lleva a reflujo durante 2 horas. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se disuelve en AcOEt (30 mL) y se lava con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (3 x 20 mL). La fase orgánica, se seca

METODOLOGÍA

con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose 658 mg del producto **35** (1.57 mmol, rdto. cuantitativo).

Datos espectroscópicos para el compuesto **35**:

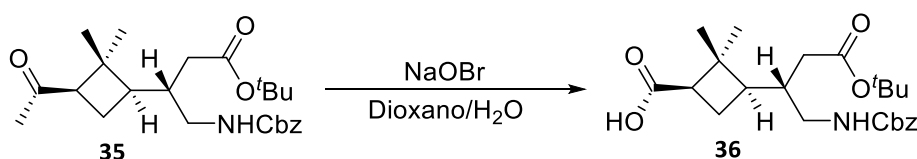
$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 0.92 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.35 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.69–2.25 (a.c., 9H, $\text{H}_{4'a}$, $\text{H}_{1'}$, COCH_3 , $\text{H}_{3'}$, H_3 , $\text{H}_{4'b}$, H_{2a}), 2.64–2.84 (m, 1H, H_{2b}), 2.95–3.12 (m, 1H, H_{4a}), 3.19–3.32 (m, 1H, H_{4b}), 5.03–5.21 (a.c., 3H, CH_2Ph , NH), 7.29–7.42 (a.c., 5H, H_{Ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ 17.2 (*trans*- CH_3), 22.9 ($\text{C}_{4'}$), 28.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.7 (COCH_3), 31.6 (*cis*- CH_3), 37.3 (C_3), 37.6 (C_2), 42.8 ($\text{C}_{2'}$), 43.7 (C_4), 44.3 ($\text{C}_{1'}$), 54.1 ($\text{C}_{3'}$), 67.7 (CH_2Ph), 81.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 124.4, 128.9, 137.1 (6C, C_{Ar}), 156.3 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 172.1 (CO_2^tBu), 207.9 (COCH_3).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Aguilera, J.; Gutiérrez-Abad, R.; Mor, À.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (24), 2864–2869

Ácido (1*R*,3*R*)-3-((2'*S*)-1'-benciloxycarbonilamino-4'-*tert*-butoxi-4'-oxobutan-2'-il)-2,2-dimetilciclobutanocarboxílico, **36**:



Se prepara una solución de hipobromito sódico a partir de 0.40 mL (7.78 mmol, 6.5 eq.) de bromo y 1.2 g de hidróxido de sodio (30 mmol, 25 eq.) en 40 mL de H_2O . Esta solución se enfría a 0°C y posteriormente se adiciona a 500 mg (1.19 mmol) del producto **35** previamente disuelto en una mezcla dioxano: H_2O 3:1 (28 mL), llevada a 0°C . La mezcla se diluye con 15 mL más de dioxano y se agita por 5 h controlando la temperatura a 0°C . Pasado este tiempo, la mezcla se trata con bisulfito de sodio hasta obtener una solución incolora y posteriormente se adiciona una solución de HCl al 5%

METODOLOGÍA

hasta pH de 2. La solución acuosa ácida se extrae con DCM (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, obteniéndose 420 mg del producto **36** (1.00 mmol, 84% rdto.) en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos para el compuesto **36**:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.07 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.28 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.74–1.89 (m, 1H, H_{4'a}), 1.90–2.19 (c.a., 4H, H_{4'b}, H_{1'}, H₃, H_{2a}), 2.19–2.32 (m, 1H, H_{2b}), 2.63–2.81 (m, 1H, H_{3'}), 3.01–3.15 (m, 1H, H_{4a}), 3.19–3.35 (m, 1H, H_{4b}), 5.03–5.24 (c.a., 3H, CH₂Ph, NH), 7.30–7.42 (c.a., 5H, H_{Ar}).

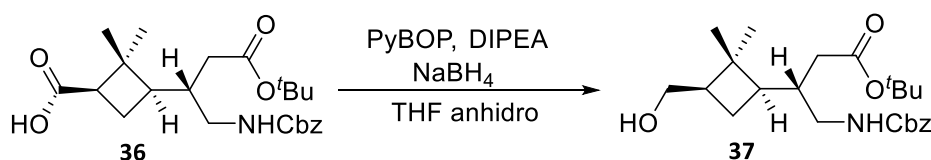
¹³C RMN (62.5 MHz, CDCl₃) δ 17.4 (*trans*-CH₃), 24.0 (C_{4'}), 28.5 (C(CH₃)₃), 30.1 (*cis*-CH₃), 31.3 (C₃), 37.6 (C₂), 42.8 (C_{2'}), 43.4 (C₄), 44.4 (C_{1'}), 45.9 (C_{3'}), 67.1 (CH₂Ph), 81.5 (C(CH₃)₃), 128.5, 128.9, 136.9 (6C, C_{Ar}), 157.0 (CO_{carbamato}), 172.5 (CO₂^tBu), 178.21 (COOH).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Aguilera, J.; Gutiérrez-Abad, R.; Mor, À.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (24), 2864–2869

(3*S*)-4-Benciloxycarbonilamino-3-((1'*R*,3'*R*)-3'-(hidroximetil)-2',2' dimetilciclobutil) butanoato de *terc*-butilo, **37**:

MÉTODO A:

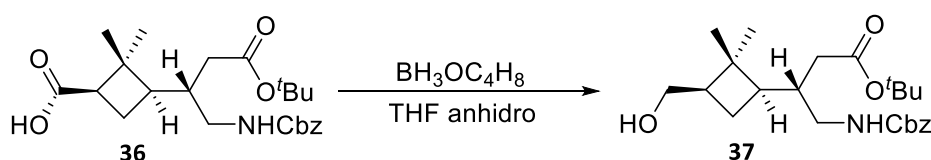


En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 480 mg (1.14 mmol) del producto **36** en 8 mL de THF anhidro, se adicionan 0.774 g (1.49 mmol, 1.3 eq.) de PyBOP y 0,24 mL de DIPEA destilada (1.37 mmol, 1.2 eq.). Se deja en

METODOLOGÍA

agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adicionan muy lentamente 56 mg (1.49 mmol, 1.3 eq.) de NaBH₄ y se deja que la reacción progrese, a temperatura ambiente, durante 18 horas. Pasado este tiempo se elimina el disolvente a presión reducida. Se adicionan 10 mL de DCM y se lava con HCl al 5% (1 x 2 mL), con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (3 x 5 mL) y con una solución acuosa saturada de NaCl (1 x 5 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se purifica mediante cromatografía en columna, usando como fase móvil una mezcla hexano:AcOEt 1:1. Se obtienen 100 mg del producto **37** (0.24 mmol, 21% rdto.), en forma de aceite de color amarillo.

MÉTODO B:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética y bajo atmosfera de nitrógeno, se disuelven 111 mg (0.26 mmol, 1 eq.) del producto **36** en 0.5 mL de THF anhidro. Se adiciona 0.4 mL de una solución de borano 1 M en THF (0.4 mmol, 1.5 eq.) y se lleva a reflujo, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se adiciona lentamente 1 mL de MeOH. Se deja en agitación durante 30 minutos. Se elimina el disolvente a presión reducida y se obtienen 85.4 mg del producto **37** (0.21 mmol, 80% rdto.).

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **37**:

[α]_D: -18.6 (*c* = 1.1, CHCl₃)

IR (ATR) 3339, 2952, 1789, 1520, 1455, 1367 cm⁻¹.

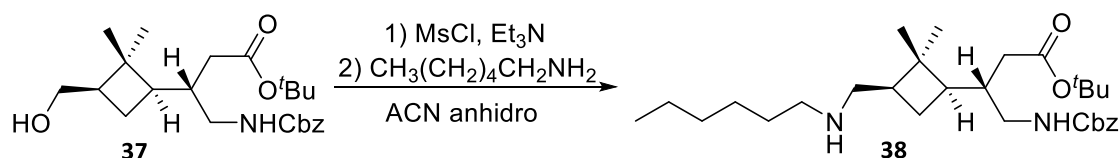
¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.02 (s, 3H, CH₃), 1.16 (s, 3H, CH₃), 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.61–1.76 (m, 1H), 1.78–1.90 (m, 1H), 1.96–2.09 (a.c., 4H), 2.19–2.30 (m, 1H), 2.90–3.05 (m, 1H), 3.18–3.31 (m, 1H), 3.49–3.65 (a.c., 2H), 5.03–5.29 (a.c., 3H, CH₂Ph, NH), 7.30–7.41 (a.c., 5H, H_{Ar}).

METODOLOGÍA

^{13}C RMN (62.5 MHz, CDCl_3) δ 16.0 (CH_3), 24.0, 25.37, 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 31.7, 37.3, 39.8, 42.7, 43.9, 44.0, 63.3(CH_2OH), 66.5 (CH_2Ph), 80.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.1, 128.4, 136.7 (C_{Ar}), 156.5 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 172.4 (CO_2^{tBu}).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NNaO}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$:428.2407
Experimental: 428.2418

(3S)-4-Benciloxycarbonilamino-3-((1'R,3'R)-3'-(hexilamino)metil-2',2'-dimetilciclobutil)butanoato de *terc*-butilo, 38:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética y bajo atmosfera de nitrógeno a $0\text{ }^\circ\text{C}$, se disuelven 88 mg del producto **37** (0.22 mmol, 1 eq.) en 2 mL de DCM anhidro. Se adicionan 0.045 mL de Et_3N (0.32 mmol, 1.5 eq.) y 0.022 mL de MsCl (0.28 mmol, 1.3 eq.). Se deja en agitación durante 1 hora a $0\text{ }^\circ\text{C}$. Pasado este tiempo se adicionan 50 mL de agua y se realizan extracciones con DCM (3x20 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtienen 100 mg del mesilato (0.21 mmol), en forma de un aceite de color amarillo.

Posteriormente, en un balón de 10 mL de capacidad, provisto de agitación magnética, refrigerante de reflujo y bajo atmosfera de nitrógeno, se disuelven 100 mg del mesilato obtenido previamente (0.21 mmol, 1 eq.) en 4 mL de ACN anhidro. Se adicionan 41 μL de hexilamina (0.31 mmol, 1.5 eq.) y 43 μL de Et_3N destilada (0.31 mmol, 1.5 eq.) Se lleva a reflujo durante 24 horas. Pasado este tiempo, se deja enfriar y se elimina el disolvente a presión reducida.

Se adicionan 10 mL de una solución acuosa saturada de NaHCO_3 y se extrae con DCM (3 x 5 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a

METODOLOGÍA

presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, usando como fase móvil una mezcla hexano: AcOEt 2:1 y aumentando la polaridad hasta hexano: AcOEt 1:2. Se obtienen 57.7 mg (0.12 mmol, 54% rdto.) del producto **38**, en forma de aceite de color amarillo.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **38**:

$[\alpha]_D$: -14.4 ($c = 1.2$, CHCl_3)

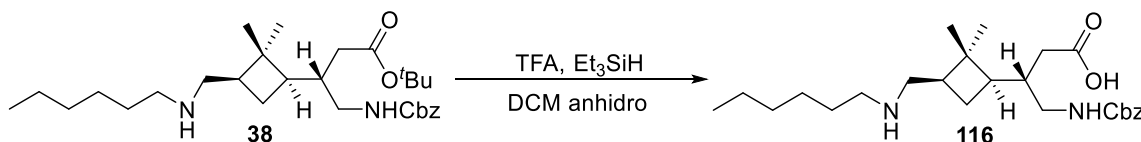
IR (ATR) 2925 y 2856 (NH), 1719, 1514 ($\text{CO}_{\text{carbamato}} + \text{CO}_{\text{éster}}$), 1455, 1366, 1245 cm^{-1} .

^1H RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 0.90 (t, $J_{\text{H-H}}=7.5$ Hz, 3H, CH_3), 0.98 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.19-1.36 (a.c., 10H, $-\text{CH}_2-$), 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.55–1.76 (m, 1H), 1.82-2.17 (a.c., 3H), 2.19-2.33 (m, 1H), 2.38-2.72 (a.c., 4H), 2.90-3.07 (m, 1H), 3.16–3.37 (m, 1H), 5.03–5.26 (a.c., 3H, CH_2Ph , NH), 7.31–7.43 (a.c., 5H, H_{Ar}).

^{13}C RMN (62.5 MHz, CDCl_3) δ 14.2, 16.5, 22.9, 27.4, 28.1, 28.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.1, 31.7, 32.1, 37.5, 40.3, 42.2, 43.1, 44.9, 50.5, 50.7(CH_2) 66.9 (CH_2Ph), 81.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.5, 128.9, 137.1 (6C, C_{Ar}), 156.9 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 172.7 (CO_2^tBu).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{N}_2\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 489.3687; Experimental: 489.3683

Ácido (3S)-4-benciloxycarbonilamino-3-((1'R,3'R)-3'-(hexilamino)metil-2',2'-dimetilciclobutil)butanoico, **116**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 27.6 mg del producto **38** (0.056 mmol), 0.06 mL de TFA (0.73 mmol, 13 eq.) y 0.02 mL de Et_3SiH (0.14 mmol, 2.5 eq.) en DCM anhidro (1 mL). Se deja en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evapora y el exceso de TFA se elimina en el

METODOLOGÍA

liofilizador obteniendo 23 mg (0.053 mmol, rdto. cuantitativo) del producto **116**, en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **116**:

$[\alpha]_D$: -12.2 ($c = 1.0$, CHCl_3)

IR (ATR) 2925 y 2856 (NH), 1668, 1526 ($\text{CO}_{\text{carbamato}} + \text{CO}_{\text{éster}}$), 1455, 1366, 1241, 1117, 1133 cm^{-1} .

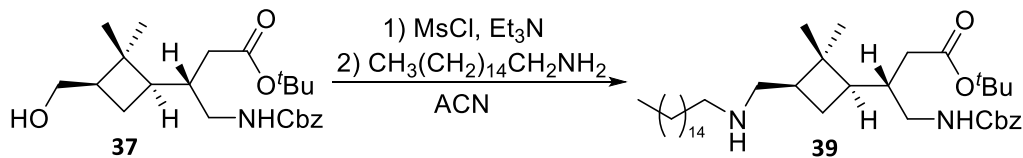
$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 0.80-0.96 (a.c., 6H), 1.12 (s, 3H, CH_3), 1.15-1.38 (a.c., 9H, CH_3 , $-\text{CH}_2-$), 1.43-1.82 (a.c., 3H), 1.92-2.38 (m, 4H), 2.61-3.03 (m, 4H), 3.13-3.30 (m, 1H), 4.98-5.47 (a.c., 3H, CH_2Ph , NH), 7.28-7.42 (a.c., 5H, H_{Ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (62.5 MHz, CDCl_3) 13.8, 16.1, 22.3, 25.7, 26.2, 29.7, 30.1, 31.1, 36.6, 38.5, 40.3, 41.7, 43.9, 48.4, 66.9 (CH_2Ph), 128.05, 128.5, 136.3 (6C , C_{Ar}), 157.1 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 176.1 (COOH).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 433.3061; Experimental: 433.3064

(3S)-4-Benciloxicarbonilamino-3-((1'R,3'R)-3'-(hexadecilamino)metil-2',2'-dimetilciclobutil)butanoato de *terc*-butilo, **39**:

MÉTODO A:

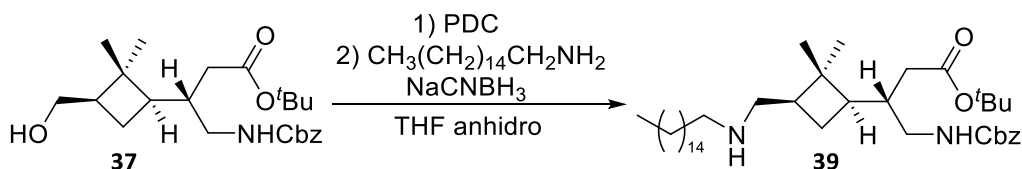


En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética y bajo atmosfera de nitrógeno a 0°C , se disuelven 115 mg del producto **37** (0.28 mmol, 1 eq.) en 2 mL de DCM anhidro. Se adicionan 60 μL de Et_3N (0.42 mmol, 1.5 eq.) y 28 μL de MsCl (0.37 mmol, 1.3 eq.). Se deja en agitación durante 1 hora a 0°C . Pasado este tiempo se adicionan 20 mL de agua y se realizan extracciones con DCM (3 x 10 mL). La fase

METODOLOGÍA

orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtienen 127 mg del mesilato (0.26 mmol), en forma de un aceite de color amarillo. Posteriormente, en un balón de 10 mL de capacidad, provisto de agitación magnética, refrigerante de reflujo y bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelven 65 mg del mesilato obtenido previamente (0.13 mmol, 1 eq.) 2 mL de ACN anhidro. A continuación se adicionan 45 mg de hexadecilamina (0.19 mmol, 1.4 eq.) y 26 μL de Et_3N destilada (0.19 mmol, 1.4 eq.) y se lleva a reflujo durante 24 horas. Pasado este tiempo, se deja enfriar y se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo se disuelve en DCM (15 mL) y se lava con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (2 x 5 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna, usando como fase móvil una mezcla hexano: AcOEt 4:1 y aumentando la polaridad hasta llegar a AcOEt. Se obtienen 35.1 mg (0.05 mmol, 20 % rdt.) del producto **39**, en forma de aceite incoloro.

MÉTODO B:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 121 mg del producto **37** (0.3 mmol) en 1.5 mL de DCM anhidro y se adiciona 0.22 g de PDC (0.6 mmol, 2 eq.). Se deja en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adiciona 1 espátula pequeña de Florisil[®] y se deja agitando por 30 min. Se adiciona 5 mL de DCM y la solución resultante se filtra sobre Celite[®]. Se lava la Celite[®] con DCM (3 x 10 mL) y se elimina el disolvente a presión reducida. Se obtiene 120 mg del aldehído, el cual se usa en el siguiente paso sin purificación adicional.

120 mg del aldehído (0.3 mmol, 1 eq.), se disuelven en 20 mL de THF anhidro y se adicionan 360 mg de hexadecilamina (1.50 mmol, 5 eq.). Se deja en agitación durante 1 hora, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. Pasado este tiempo,

METODOLOGÍA

se adicionan 0.47 mL (0.47 mmol, 1.6 eq.) de NaCNBH₃ 1 M en THF y se deja en agitación durante 18 horas. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente. El crudo se disuelve en 10 mL de DCM y se lava con una solución saturada de bicarbonato sódico (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida obteniéndose un producto sólido, el cual fue purificado por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil una mezcla de hexano–AcOEt 2:1. Se obtienen 48.8 mg (0.07 mmol, 26% rdto.) del producto **39**, en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **39**:

$[\alpha]_D$: +32.8 ($c = 0.6$, CHCl₃)

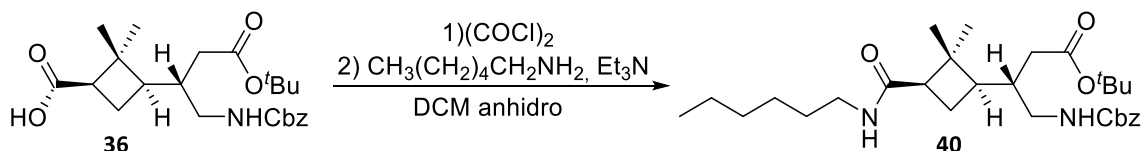
IR (ATR) 2842 (NH), 1658, 1522 (CO_{carbamato} + CO_{éster}), 1355, 1241, 1117 cm⁻¹.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 0.88 (t, $J_{H-H}=7.5$ Hz, 3H, CH₃), 1.06 (s, 3H, CH₃), 1.19-1.36 (a.c., 27H, -CH₂-, 3H, CH₃), 1.36-1.54 (a.c., 11H, ^tBu, -CH₂-), 1.88-2.11 (a.c., 5H), 2.23-2.36 (a.c., 1H), 2.48-2.69 (a.c., 5H), 2.77-3.12 (a.c, 2H), 3.18-3.29 (a.c., 1H), 4.89–5.38 (a.c., 3H, CH₂Ph, NH), 7.31–7.43 (a.c., 5H, H_{Ar}).

¹³C-RMN (62.5 MHz, CDCl₃) 14.13, 19.61, 25.74, 28.06, 29.35, 29.55, 29.90 (C(CH₃)₃), 31.52, 33.65, 36.95, 39.13, 40.78, 41.23, 45.09, 48.33, 48.81, 67.39 (CH₂Ph), 80.55 (C(CH₃)₃), 128.32, 136.60 (6C, C_{Ar}), 157.34(CO_{carbamato}), 172.60 (CO₂^tBu).

Espectro de masas de baja resolución: Calculado para C₃₉H₆₈KN₂O₄ [M+K]⁺:667.5; Experimental: 667.5

(3S)-4-Benciloxycarbonilamino-3-((1'R,3'R)-3'-hexilcarbamoil-2',2'-dimetilciclobutil)butanoato de *terc*-butilo, **40**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 370 mg (0.88 mmol, 1 eq.) del producto **36** en 20 mL de DCM anhidro. Posteriormente se

METODOLOGÍA

adicionan 0.53 mL de cloruro de oxalilo (1.06 mmol, 1.2 eq.) 2 M en DCM, 3 gotas de DMF y 0.15 mL (1.06 mmol, 1.2 eq.) de Et₃N destilada. Se deja en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adicionan 0.13 mL (0.97 mmol, 1.1 eq.) de hexilamina y se deja en agitación durante todo 18 horas a temperatura ambiente.

A continuación se elimina el disolvente a presión reducida. Se adicionan 10 mL de una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y se realizan extracciones con DCM (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, usando como fase móvil una mezcla hexano: AcOEt 2:1 y aumentando la polaridad de la fase móvil hasta hexano: AcOEt 1:2. Se obtienen 323.3 mg (0.64 mmol, 73% rdto.) del producto **40**, en forma de un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **40**:

[α]_D: +5.1 (*c* = 0.9, CHCl₃)

IR (ATR) 3308 (NH), 2928 (CH), 1706, 1647 (CO_{carbamato} + CO_{éster} + CO_{amida}), 1528, 1455, 1366 cm⁻¹.

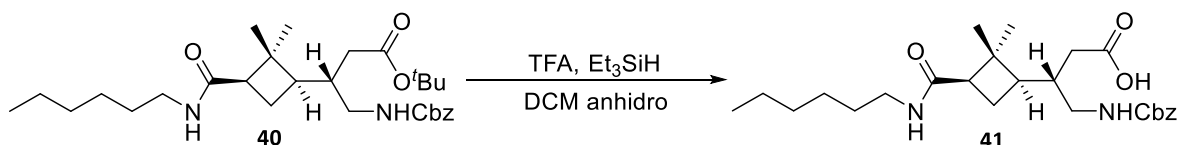
¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 0.91 (t, *J*_{H-H}=7.5 Hz, 3H, CH₃), 1.01 (s, 3H, CH₃), 1.27 (s, 3H, CH₃), 1.31-1.38 (a.c., -CH₂-, 5H), 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.50-1.55 (m, 1H), 1.65-1.84 (m, 2H), 1.88-2.11 (a.c., 4H), 2.16-2.31 (m, 1H), 2.38-2.55 (m, 1H), 2.98-3.14 (m, 1H), 3.18-3.38 (a.c., 3H), 5.04-5.33 (a.c., 3H, CH₂Ph, NH), 7.32-7.42 (a.c., 5H, H_{Ar}).

¹³C-RMN (62.5 MHz, CDCl₃) 14.2 (CH₃), 17.0, 22.9, 24.5, 26.8, 28.5 (C(CH₃)₃), 30.1, 31.7, 31.8, 37.6, 39.7, 42.8, 44.2, 47.6, 53.8, 67.0 (CH₂Ph), 81.2 (C(CH₃)₃), 128.2, 128.9, 137.1 (6C, C_{Ar}), 156.9 (CO_{carbamato}), 171.6(NHCO), 172.5 (CO₂^tBu).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₂₉H₄₆N₂NaO₅ [M+Na]⁺: 525.3299; Experimental: 525.3304.

METODOLOGÍA

Ácido (3S)-4-benciloxycarbonilamino-3-((1'R,3'R)-3'-hexilcarbamoil-2',2'-dimetilciclobutil)butanoico, 41:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 66.2 mg del producto **40** (0.13 mmol, 1 eq.), 0.13 mL de TFA (1.71 mmol, 13 eq.) y 0.05 mL de Et₃SiH (0.32 mmol, 2.5 eq.) en DCM anhidro (2 mL). Se deja en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evapora y el exceso de TFA se elimina en el liofilizador obteniendo 57 mg (0.12 mmol, rdt. cuantitativo) del producto **41**, en forma de aceite de color amarillo.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **41**:

[α]_D: +15.4 (*c* = 1.3, CHCl₃).

IR (ATR) 3322 (NH), 2928 (CH), 1703, 1638 (CO_{carbamato}+CO_{amida}), 1536, 1455, 1371 cm⁻¹.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (t, *J*_{H-H}=5.0 Hz, 3H, CH₃), 0.99 (s, 3H, CH₃), 1.24 (s, 3H, CH₃), 1.29-1.35 (a.c., 6H, -CH₂-), 1.38-1.56 (a.c., 2H), 1.59-1.93 (m, 2H), 1.97-2.13 (a.c., 2H), 2.17-2.36 (m, 1H), 2.37-2.56 (m, 1H), 2.81-3.43 (a.c., 4H), 5.00-5.57 (a.c., 4H, CH₂Ph, NH), 7.28-7.54 (a.c., 5H, H_{Ar}).

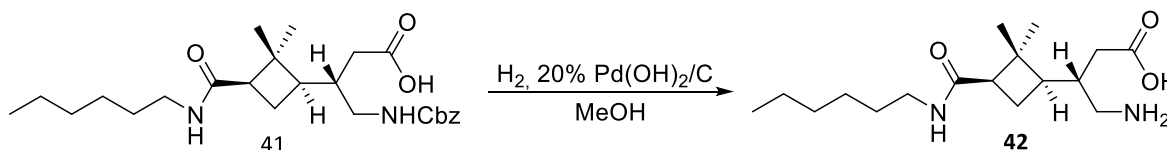
¹³C-RMN (62.5 MHz, CDCl₃) 14.4 (CH₃), 17.1, 22.9, 24.1, 26.9, 30.1, 31.6, 31.8, 35.9, 37.6, 39.8, 42.8, 44.0, 47.6, 67.3 (CH₂Ph), 128.7, 128.9, 136.7 (6C, C_{Ar}), 157.4 (CO_{carbamato}), 172.0 (NHCO), 177.3 (COOH).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₂₉H₃₈N₂NaO₅ [M+Na]⁺: 469.2673; Experimental: 469.2674.

METODOLOGÍA

Ácido (3S)-4-amino-3-((1'R,3'R)-3'-hexilcarbamoil-2',2'-dimetilciclobutil)butanoico,

42:



En un recipiente de hidrogenador provisto de agitación magnética se disuelven 44.8 mg (0.10 mmol) del producto **41** en 5 mL de MeOH. Posteriormente se adicionan 13 mg de Pd(OH)₂/C (30% en peso). Se deja en agitación durante 18 horas a temperatura bajo 5 atmosferas de presión de hidrógeno. Pasado este tiempo, se filtra el crudo de reacción a través de Celite® y se lava con abundante MeOH. Posteriormente se evapora el solvente y se obtienen 24.4 mg (0.078 mmol, 78% rdto.) del producto **42**, en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **42**:

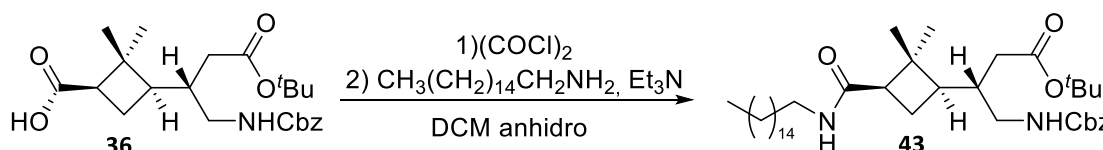
[α]_D: +5.3, (*c* = 1, MeOH).

¹H-RMN (250 MHz, CD₃OD) δ 0.92(t, *J*_{H-H}=5.0 Hz, 3H, CH₃), 1.00 (s, 3H, CH₃), 1.30 (s, 3H, CH₃), 1.33-1.35 (a.c., -CH₂-, 6H), 1.43-1.61 (a.c., 2H), 1.84-2.04 (a.c., 3H), 2.11-2.38 (m, 1H), 2.39-2.65 (m, 1H), 2.66-3.01 (a.c., 2H), 3.03-3.27 (a.c., 2H), 3.29-3.34 (m, 1H).

¹³C-RMN (62.5 MHz, CD₃OD) 13.4, 16.3, 18.4, 22.6, 22.81, 26.7, 29.5, 30.6, 31.7, 35.9, 39.3, 42.5, 44.2, 46.4, 50.5, 172.7(NHCO).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₁₇H₃₂N₂NaO₃ [M+Na]⁺: 335.2305; Experimental: 335.2310.

(3S)-4-Benciloxycarbonilamino-3-((1'R,3'R)-3'-hexadecilcarbamoil-2',2'-dimetilciclobutil)butanoato de *tert*-butilo, **43**:



METODOLOGÍA

En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 310 mg (0.74 mmol, 1 eq.) del producto **36** en 15 mL de DCM anhidro. Posteriormente se adicionan 0.44 mL de cloruro de oxalilo (0.88 mmol, 1.2 eq.) 2 M en DCM, 3 gotas de DMF y 0.12 mL (0.88 mmol, 1.2 eq.) de Et₃N destilada. Se deja en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adicionan 196 mg (0.81 mmol, 1.1 eq.) de hexadecilamina y 0.12 mL de Et₃N destilada. Se deja en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se elimina el disolvente a presión reducida. Después se adicionan 10 mL de una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y se realizan extracciones con DCM (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida.

El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, usando como fase móvil una mezcla hexano: AcOEt 1:1. Se obtienen 330 mg (0.51 mmol, 70% rdto.) del producto **43**, en forma de un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **43**:

[α]_D: +1.2 (*c* = 1.0, CHCl₃).

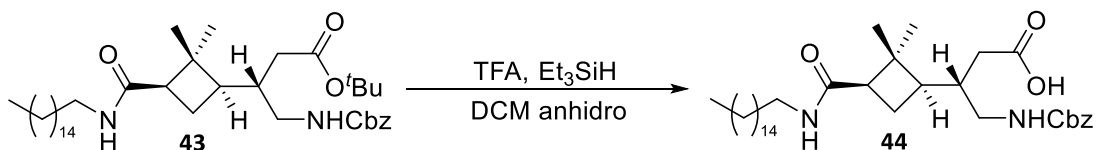
¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (t, *J*_{H-H}=7.5 Hz, 3H, CH₃), 1.00 (s, 3H, CH₃), 1.13-1.37 (a.c., 31H, CH₂, CH₃), 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.68-2.08 (a.c., 5H), 2.13-2.33 (m, 1H), 2.38-2.53 (m, 1H), 2.95-3.13 (m, 1H), 3.16-3.44 (a.c., 3H), 5.00–5.58 (a.c., 4H, CH₂Ph, NH), 7.30–7.41 (a.c., 5H, H_{Ar}).

¹³C-RMN (62.5 MHz, CDCl₃) 14.5, 17.0, 23.1, 27.3, 28.5, 29.7(C(CH₃)₃), 30.1, 30.2, 31.7, 32.3, 37.6, 39.7, 42.8, 44.6, 67.0 (CH₂Ph), 81.3 (C(CH₃)₃), 128.5, 128.9, 137.1 (6C, C_{Ar}), 156.9 (CO_{carbamato}), 171.6 (NHCO), 172.4 (CO₂^tBu).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₃₉H₆₆N₂NaO₅ [M+Na]⁺: 665.4864; Experimental: 665.4851

METODOLOGÍA

Ácido (3S)-4-benciloxycarbonilamino-3-((1'R,3'R)-3'-hexadecilcarbamoil-2',2'-dimetilciclobutil)butanoico, 44:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 220 mg del producto **43** (0.34 mmol), 0.34 mL de TFA (4.44 mmol, 13 eq.) y 0.14 mL de Et₃SiH (0.85 mmol, 2.5 eq.) en DCM anhidro (4 mL). La mezcla se agita durante 18 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evapora y el exceso de TFA se elimina en el liofilizador, obteniendo 200 mg (0.34 mmol, rdto. cuantitativo) del producto **44**, en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **44**:

$[\alpha]_D$: +14.2 ($c = 1.4$, CHCl₃).

IR (ATR) 3320 (NH), 2918, 2850 (CH₂), 1705, 1636 (CO_{carbamato} + CO_{amida}), 1532, 1466, 1160 cm⁻¹.

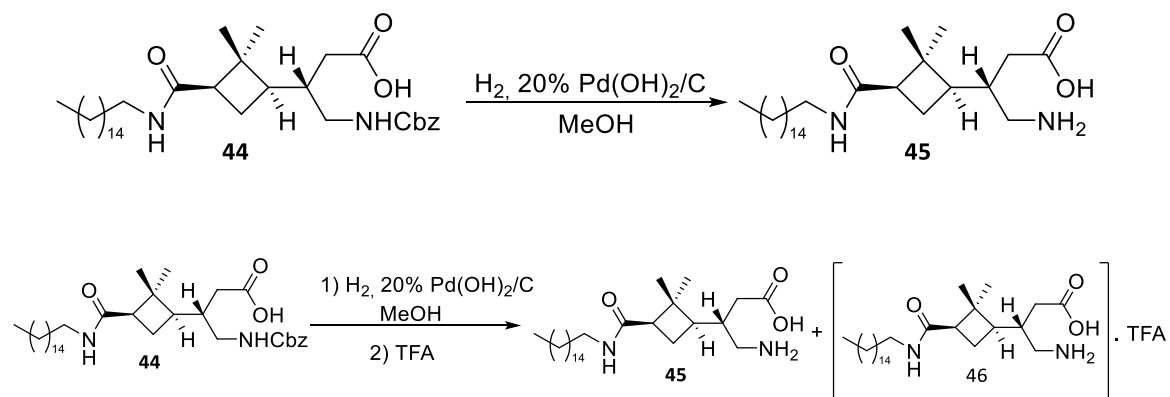
¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (t, $J_{H-H}=7.5$ Hz, 3H, CH₃), 0.95 (s, 3H, CH₃), 1.25-1.40 (a.c., 33H, CH₂, CH₃), 1.42-1.62 (m, 1H), 1.63-1.94 (m, 1H), 1.95-2.40 (a.c., 3H), 2.44-2.67 (m, 1H), 2.84-3.40 (a.c., 4H), 5.00–5.48 (a.c., 3H, CH₂Ph, NH), 5.63-5.83 (b.a., 1H, NH) 7.30–7.47 (a.c., 5H, H_{Ar}).

¹³C-RMN (62.5 MHz, CDCl₃) δ 14.5, 17.1, 23.1, 27.3, 29.8, 30.1, 31.5, 32.3, 35.9, 37.7, 40.1, 42.4, 43.1, 47.5, 67.4 (CH₂Ph), 128.5, 128.9, 136.7 (6C, C_{Ar}), 157.5 (CO_{carbamato}), 172.4 (NHCO), 176.63 (COOH).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₃₅H₅₈N₂NaO₅ [M+Na]⁺: 609.4238; Experimental: 609.4249

METODOLOGÍA

Ácido (3*S*)-4-amino-3-((1'*R*,3'*R*)-3'-hexadecilcarbamoi-2',2' dimetilciclobutil) butanoico, **45** y **46**:



En un recipiente hidrogenador provisto de agitación magnética se disuelven 200 mg del producto **44** (0.34 mmol) en 10 mL de MeOH. Posteriormente se adicionan 60 mg de Pd(OH)₂/C (30% en peso). Se deja la solución agitando a temperatura ambiente durante 12 horas a 5 atmosferas de presión de hidrógeno. Pasado este tiempo, se filtra el crudo de reacción a través de Celite® y se lava con abundante MeOH. Se evapora el solvente y se obtienen 180 mg de una mezcla del producto **45** y **46**, en forma de sólido de color casi blanco.

Datos espectroscópicos de la mezcla de los compuestos **45** y **46**:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (t, *J* = 7.1 Hz 3H, CH₃), 0.97 (s, 3H, CH₃), 1.06-1.41 (a.c., 27H, -CH₂-, 3H, CH₃), 1.59 (a.c., 2H), 1.95-2.07 (a.c., 3H), 2.21-2.66 (a.c., 2H), 2.82-3.03 (a.c., 2H), 3.10–3.32 (a.c., 3H, 4.89-5.21 (b.a. 2H, NH).

¹³C RMN (90 MHz, CD₃OD) 13.3, 16.0, 17.72, 18.07, 22.4, 26.7, 29.1, 29.4, 29.5, 30.1, 31.5, 31.8, 39.1, 42.2, 43.1, 45.9, 50.1, 172.1 (NHCO).

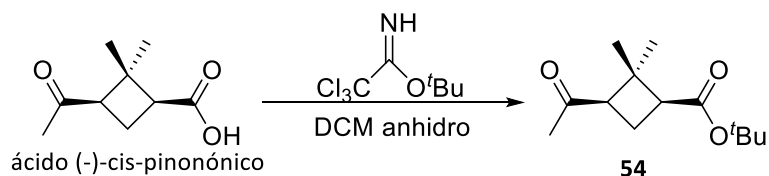
Espectro de masas de alta resolución: Calculado para **45** C₂₇H₅₁N₂O₃ [M-1]⁻: 451.3905; Experimental: 451.3900; C₂₇H₅₃N₂NaO₃ [M+Na]⁺: 453.4051; Experimental: 453.4060.

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para **46** C₂₉H₅₂F₃N₂O₅ [M-1]⁻: 565.3907; Experimental: 565.3839; C₂₇H₅₁N₂O₃ [M-C₂F₃O₂]⁻²: 451.3905; Experimental: 451.3900. C₂₇H₅₃N₂O₃ [M-C₂F₃O₂]⁺: 453.4051; Experimental: 453.4060.

METODOLOGÍA

Análisis elemental: Calculado para la mezcla 0.35:0.65 (**45/46**) C, 64.52%; N, 10.07%; H, 5.32%. Experimental: C, 64.47%; N, 10.58%; H, 5.01%.

(1*S*,3*R*)-3-Acetil-2,2-dimetilciclobutanocarboxilato de *tert*-butilo, **54**:



El ácido (-)-*cis*-pinonónico (3.21 g, 18.86 mmol) se disuelve en 100 mL de DCM anhidro bajo una atmosfera de nitrógeno, a esta solución se le adiciona 6.7 mL (37.72 mmol, 2 eq.) de 2,2,2-tricloroacetimidato de *tert*-butilo previamente sintetizado y 1.16 mL (9.43 mmol, 0.5 eq.) de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Se deja en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se eliminan los disolventes a presión reducida. Se añaden 100 mL de DCM y se hacen lavados con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (3 x 50 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica utilizando como fase móvil AcOEt : hexano, 1:3, obteniendo 3.4 g del éster *tert*-butílico **54** (15.0 mmol, 80% rdt.).

Datos espectroscópicos para el compuesto **54**:

$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 0.90 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.39 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.42 (s, 9H, ^tBu), 1.65-2.01 (m, 1H, H_{4a}), 2.03 (s, 3H, CH_3CO), 2.48-2.69 (a.c., 2H, H_{4b} , H_1), 2.81 (dd, $^2J_{\text{H-H}} = 10.6$ Hz $^3J_{\text{H-H}} = 7.9$ Hz, 1H, H_3).

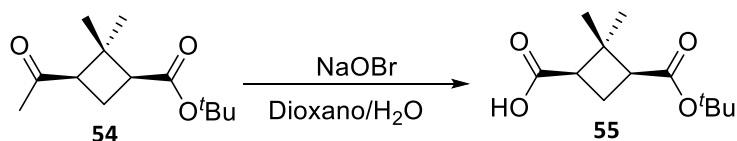
$^{13}\text{C RMN}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ 17.8 (*trans*- CH_3), 19.1 (C_4), 28.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.9 (CH_3CO), 30.2 (*cis*- CH_3), 44.8 (C_2), 45.8 (C_1), 53 (C_3), 80.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 171.4 (CO_2^tBu), 207.2 ($\text{CO}_{\text{cetona}}$).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Rouge, P. D.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 14 (2), 193–195.

METODOLOGÍA

Ácido (1*R*,3*S*)-3-*tert*-butoxicarbonil-2,2-dimetilciclobutanocarboxílico, 55:



Se prepara una solución de hipobromito sódico a partir de 3.2 mL (63.29 mmol, 7.5 eq.) de bromo y 9.5 g de hidróxido de sodio (236.30 mmol, 28 eq.) en 230 mL de H₂O. Esta solución se enfría a 0 °C y posteriormente se adiciona 1.91 g (8.44 mmol) del producto **54** disuelto en una mezcla dioxano: agua 3:1 (117 mL), previamente enfriada a 0 °C. La mezcla se diluye con 81 mL más de dioxano y se agita por 5 h controlando la temperatura a 0 °C. Pasado este tiempo la mezcla se trata con bisulfito de sodio hasta obtener una solución incolora y se adiciona una solución de HCl al 5% hasta pH de 2. La solución ácida se extrae con DCM (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, obteniendo 1.58 g del producto **55** (6.92 mmol, 82% rdt.) en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos para el compuesto 55:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.01 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.30 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.41 (s, 9H, ^tBu), 1.90-2.05 (m, 1H, H_{4a}), 2.39-2.55 (m, 1H, H_{4b}), 2.59-2.86 (a.c., 2H, H₃, H₁), 5.42 (s.a., 1H, COOH).

¹³C RMN (62.5 MHz, CDCl₃) δ 18.2 (*trans*-CH₃), 20.1 (C₄), 28.2 (C(CH₃)₃), 30 (*cis*-CH₃), 44.4 (C₂), 45.2 (C₃), 46.1 (C₁), 80.5 (C(CH₃)₃), 171.5 (CO₂^tBu), 177.9 (COOH)

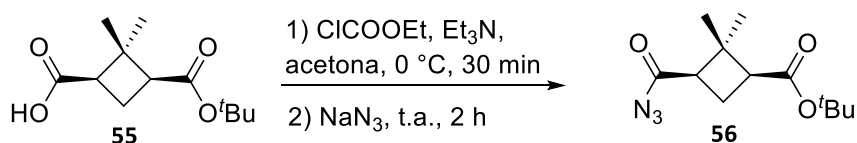
Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Rouge, P. D.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14* (2), 193–195.

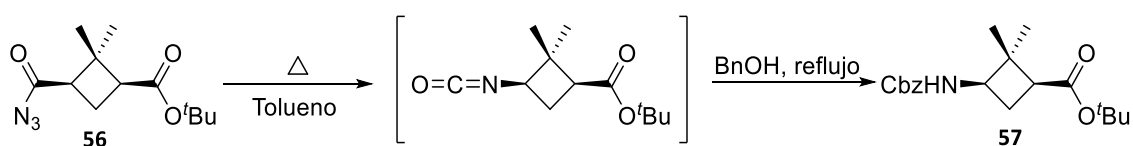
METODOLOGÍA

(1*S*,3*R*)-3-Benciloxycarbonilamino-2,2-dimetilciclobutanocarboxilato de *tert*-butilo,

57:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 1.58 g del ácido **55** (6.92 mmol) en 20 mL de acetona anhidra y se adicionan 1.2 mL de Et₃N destilada (8.30 mmol, 1.2 eq.) y 0.8 mL del cloroformiato de etilo (8.30 mmol, 1.2 eq.). Esta solución se agita por 30 minutos a 0 °C. Pasado este tiempo se adiciona la azida de sodio (0.72 g, 11.1 mmol, 1.6 eq) en 5 mL de agua y se deja en agitación durante 2 h a temperatura ambiente, para ser extraído con DCM (4 x 15 mL), La fase orgánica se seca con MgSO₄ se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, para obtener la azida como un aceite amarillo (1.72 g, 98% rdto.), la cual fue utilizada en la siguiente etapa sin purificación.



Una solución de la acil azida **56** (1.72 g, 6.79 mmol) y alcohol bencílico (1.4 mL, 13.58 mmol, 2 eq.) en tolueno anhidro (30 mL) se lleva a reflujo durante 18 horas. Una vez pasado este tiempo el tolueno se evapora a presión reducida y el exceso de alcohol bencílico se elimina por destilación al vacío. El crudo obtenido se purifica utilizando como fase móvil AcOEt: hexano 1:2 obteniendo el carbamato como un sólido blanco, el cual se cristaliza en éter y bajo una atmosfera de pentano. Se obtienen 1.63 g del amino ácido protegido ortogonalmente **57** (4.89 mmol, 72% rdto.).

Datos espectroscópicos para el compuesto 57:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 0.95 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.30 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.46 (s, 9H, *t*Bu), 2.02 (dd, *J*_{H,H} = 20.8 Hz, *J'*_{H,H} = 10.2, 1H, H_{4a}), 2.29 (m, 1H, H_{4b}), 2.48 (m, 1H, H₁),

METODOLOGÍA

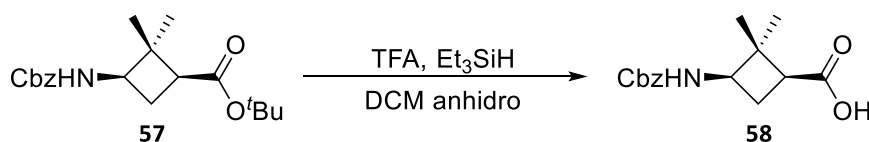
3.90 (dd, $J_{H,H} = 17.2$ Hz, $J'_{H,H} = 8.3$, 1H, H_3), 4.87 (d, $J_{H,H} = 7.5$ Hz, 1H, NH), 5.10 (a.c., 2H, CH_2Ph), 7.37 (a.c., 5H, H_{Ar}).

^{13}C RMN (62.5 MHz, $CDCl_3$) δ 16.9 (*trans*- CH_3), 26.7 (C_4), 28.3 ($C(CH_3)_3$), 29.9 (*cis*- CH_3), 43.9 (C_2), 45.9 (C_3), 51.5 (C_1), 66.8 (CH_2Ph), 80.5 ($C(CH_3)_3$), 128.2, 128.6 (C_{Ar}), 155.8 ($CO_{\text{carbamato}}$), 171.5 (CO_2^tBu).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los previamente descritos en:

Aguilera, J.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (3), 302–308.

Ácido (1*S*,3*R*)-3-benciloxycarbonilamino-2,2-dimetilciclobutanocarboxílico, **58**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 1.78 g del producto **57** (5.34 mmol), 5.3 mL de TFA (69.3 mmol, 13 eq.) y 2.1 mL de Et_3SiH (13.34 mmol, 2.5 eq.) en DCM anhidro (15 mL). Se deja en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evapora y el exceso de TFA se elimina en el liofilizador obteniendo 1.18 g (4.25 mmol, 80% rdt.) del producto **58**, en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos para el compuesto **58**:

1H RMN (250 MHz, $CDCl_3$) δ 0.99 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.35 (s, 3H, *cis*- CH_3), 2.06 (m, 1H, H_{4a}), 2.33 (m, 1H, H_3), 2.58 (m, 1H, H_{4b}), 3.94 (m, 1H, H_1), 5.11 (a.c., 3H, NH , CH_2Ph), 7.37 (a.c., 5H, H_{Ar}), 10.15 (s.a., 1H, $COOH$).

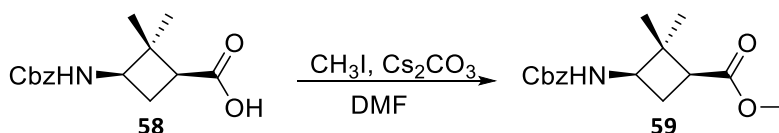
^{13}C RMN (62.5 MHz, $CDCl_3$) δ 16.4 (*trans*- CH_3), 24.8 (C_4), 28.9 (*cis*- CH_3), 30.3 (CH_3CO), 46.49 (C_2), 50.7 (C_3), 51.3 (C_1), 66.8 (CH_2Ph), 128.1, 128.2, 128.5, 136.3 (C_{Ar}), 155.9 ($CO_{\text{carbamato}}$), 206.8 (CH_3CO).

METODOLOGÍA

Los datos espectroscópicos concuerdan con los previamente descritos en:

Aguilera, J.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (3), 302–308.

(1S,3R)-3-Benciloxycarbonilamino-2,2-dimetilciclobutanocarboxilato de metilo, 59:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 1.11 g (4.00 mmol) de **58** en 20 mL de DMF y se añaden 1.56 g de Cs_2CO_3 (4.80 mmol, 1.2 eq.), a continuación se adicionan 0.30 mL de CH_3I (4.80 mmol, 1.2 eq.) y se deja en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo se detiene la agitación, se añaden 30 mL de acetato de etilo y se hacen lavados con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, obteniéndose 1.05 g (3.6 mmol, 90% rdto.) del producto **59** en forma de aceite de color amarillo.

Datos espectroscópicos para el compuesto 59:

$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 0.90 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.29 (s, 3H, *cis*- CH_3), 2.05 (dd, $^2J_{\text{H,H}} = 21.0$ Hz, $^3J'_{\text{H,H}} = 9.8$ Hz, 1H, H_{4a}), 2.36 (m, 1H, H_{4b}), 2.57 (dd, $J_{\text{H,H}} = 9.8$ Hz, $J'_{\text{H,H}} = 7$ Hz, 1H, H_3), 3.67 (s, 3H, COOCH_3), 3.92 (dd, $J_{\text{H,H}} = 17.3$ Hz, $J'_{\text{H,H}} = 8$ Hz, 1H, H_1), 4.91 (d, $J_{\text{H,H}} = 11.8$ Hz, 1H, NH), 5.05 (d, $J_{\text{H,H}} = 19.0$ Hz, 1H, CH_2Ph), 5.12 (d, $J_{\text{H,H}} = 20.3$ Hz, 1H, CH_2Ph), 7.36 (a.c., 5H, H_{Ar}).

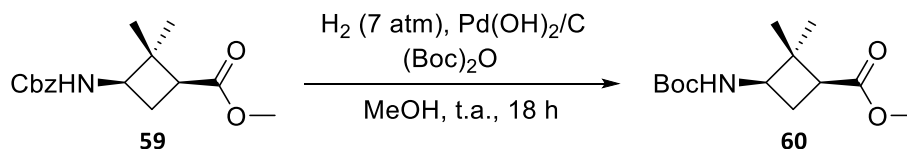
$^{13}\text{C RMN}$ (62.5 MHz, CDCl_3) δ 16.7 (*trans*- CH_3), 26.4 (C_4), 28.5 (*cis*- CH_3), 42.6 (C_3), 45.8 (C_2), 51.3 (COOCH_3) 76.9 (C_1), 66.6 (CH_2Ph), 127.9, 128.6, 136.1 (C_{Ar}), 155.7 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 172.6 (CO_2CH_3).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los previamente descritos en:

Aguilera, J.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19* (3), 302–308.

METODOLOGÍA

(1S,3R)- 3-*tert*-Butoxicarbonilamino-2,2-dimetilciclobutanocarboxilato de metilo, 60:



En un recipiente de hidrogenador provisto de agitación magnética se disuelven 580 mg (1.99 mmol) del producto **59** en 15 mL de MeOH. Posteriormente se adicionan 0.7 mL de Boc₂O (3.18 mmol, 1.6 eq.) y 0.2 g de Pd(OH)₂/C (30% en peso). Esta reacción se deja evolucionar a temperatura ambiente durante 18 horas a 5 atmosferas de presión de hidrógeno. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se filtra sobre Celite® y se lava con abundante metanol (2 x 40 mL). Se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, usando como fase móvil hexano: AcOEt 4:1. Se obtienen 410 mg (1.59 mmol, 80% rdto.) del producto **60**, en forma de un aceite incoloro.

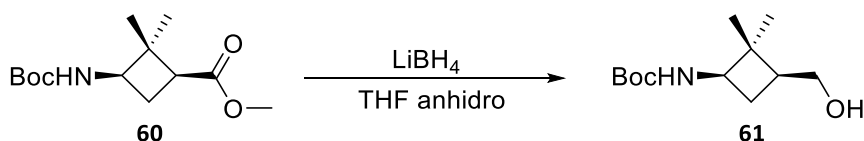
Datos espectroscópicos para el compuesto 60:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 0.84 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.22 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.38 (s, 9H, ^tBu), 1.95-2.11 (m, 1H, H_{4a}), 2.17-2.32 (m, 1H, H_{4b}), 2.44-2.57 (m, 1H, H₃), 3.61 (s, 3H, COOCH₃), 3.70-3.80 (m, 1H, H₁), 4.80 (s.a., 1H, NH).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los previamente descritos en:

Gutiérrez-Abad, Raquel. *The chiral cyclobutane motif in the synthesis of dendrimers and multifunctional platforms. Applications contrast agents, cell-penetrating peptides and NPY analogues*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. **2012**.

((1R,3S)-3-hidroximetil-2,2-dimetilciclobutil)carbamato de *tert*-butilo, 61:



METODOLOGÍA

En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 380 mg del éster metílico **60** (1.5 mmol) en 20 mL de THF anhidro y se adicionan 2.2 mL de una solución 2M de LiBH₄ en THF (4.3 mmol, 3 eq.). Se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente, bajo atmosfera de nitrógeno. El exceso de hidruro se eliminao por la adición lenta de MeOH (5 mL) y H₂O (30 mL). Esta solución se extrae con DCM y la fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna usando como fase móvil AcOEt: hexano 1:4, obteniendo 330 mg (1.44 mmol, rdto. cuantitativo) del compuesto **61** en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **61**:

[α]_D: +5.9 (c 0.3 en DCM)

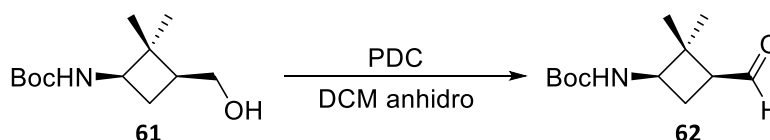
IR (ATR) 3337 (OH, NH), 2961 (CH), 1685 (CO_{carbamato}), 1527, 1365 cm⁻¹.

¹H RMN (360 MHz, CDCl₃) δ 0.92 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.14 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.40 (s, 9H, ^tBu), 1.79-1.94 (m, 1H, H_{4a}), 1.98-2.17 (m, 1H, H_{4b}), 2.19-2.33(m, 1H, H₃), 3.47-3.61 (m, 2H, CH₂OH), 3.61-3.74 (m, 1H, H₁), 4.64 (s.a., 1H, NH).

¹³C RMN (90 MHz, CDCl₃) δ 15.8 (*trans*-CH₃), 28.3 (C(CH₃)₃), 28.5 (C₄), 29.4 (*cis*-CH₃), 40.6 (C₂), 42.9 (C₃), 50.9 (C₁), 63.0 (CH₂OH), 79.1 (C(CH₃)₃), 155.4 (CO_{carbamato}).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₁₂H₂₃NNaO₃ [M+Na]⁺: 252.1570; Experimental: 252.1564.

(1*R*,3*S*)-3-Formil-2,2-dimetilciclobutilcarbamato de *tert*-butilo, **62**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 140 mg del alcohol **61** (0.61 mmol) en 5 mL de DCM anhidro y se adicionan 0.46 g de PDC (1.22 mmol, 2 eq.). Se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente. Pasado

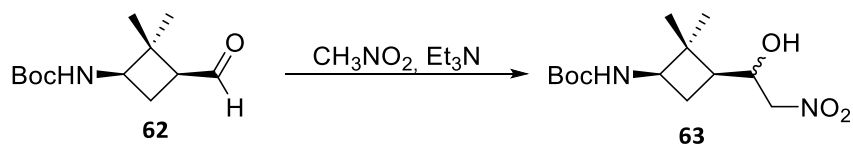
METODOLOGÍA

este tiempo se adicionan 3 espátulas de Florisil® y se deja en agitación durante 30 minutos. Pasado este tiempo se adicionan 10 mL de DCM y la solución se filtra sobre Celite®. Se lava la Celite® 3 x 10 mL de DCM y se elimina el disolvente a presión reducida. Se obtiene 132 mg (0.58 mmol, rdto. cuantitativo) del aldehído **62**. Este producto se utiliza directamente en la siguiente etapa sin purificación.

Datos espectroscópicos para el compuesto **62**:

$^1\text{H RMN}$ (360 MHz, CDCl_3) δ 0.95 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.35 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.41 (s, 9H, $t\text{Bu}$), 1.90-2.09 (m, 1H, H_{4a}), 2.13-2.27 (m, 1H, H_{4b}), 2.49-2.75 (m, 1H, H_3), 3.71-4.01 (m, 1H, H_1), 4.64 (s.a., 1H, NH), 9.70 (d, $^3J_{\text{H-H}} = 1.4$ Hz, $\text{H}_{\text{aldehído}}$)

(1*R*,3*S*)-3-(1-Hidroxi-2-nitroetil)-2,2-dimetilciclobutilcarbamato de *terc*-butilo, **63**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 132 mg del aldehído **62** (0.58 mmol) en 2.0 mL de nitrometano (37.74 mmol, 65 eq.) y se adicionan 40 μL de Et_3N (0.29 mmol, 0.5 eq.). Se deja en agitación durante 2 horas, a temperatura ambiente y bajo atmosfera de nitrógeno. Pasado este tiempo el exceso de nitrometano se elimina bajo presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna usando como fase móvil AcOEt-hexano desde 1:4 hasta 1:1. Se obtiene 136 mg de una mezcla de nitroalcoholes **63** (0.47 mmol, 81% rdto.) en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **63**:

IR (ATR) 3340 (OH, NH), 2961 (CH), 1683 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 1551, 1366 cm^{-1} .

METODOLOGÍA

^1H RMN (360 MHz, CDCl_3) δ 1.04 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.24 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.62-1.81 (m, 1H, H_{4a}), 2.30-2.51 (m, 1H, H_{4b}), 2.72-2.94 (m, 1H, H_3), 3.66-3.86 (m, 1H, H_1), 4.36-4.64 (a.c., 4H, NH, $\text{H}_{1'}$, $\text{H}_{2'}$).

^{13}C RMN (90 MHz, CDCl_3) δ 16.0 (*trans*- CH_3), 28.1 (C_4), 28.3 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 29.7 (*cis*- CH_3), 41.1 (C_2), 43.9 (C_3), 50.7 (C_1), 70.2 ($\text{C}_{2'}$), 79.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 79.8 ($\text{C}_{2'}$), 155.2 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$)

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{NaO}_5$ [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: 311.1577; Experimental: 311.1569.

(1*R*,3*R*)-2,2-Dimetil-3-(2'-nitrovinil)ciclobutilcarbamato de *terc*-butilo, **64Z + 64E**:



La mezcla de nitroalcoholes **63** (240 mg, 0.83 mmol) se disuelve en 5 mL de DCM anhidro y se lleva a 0 °C utilizando un baño de hielo. Una vez fría la solución se adicionan 0.2 mL de Et_3N (1.66 mmol, 2 eq.) y 84 μL de MsCl (1.08 mmol, 1.3 eq.). Se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo el exceso de disolventes y reactivos se elimina bajo presión reducida. El crudo de la reacción se purifica mediante cromatografía en columna usando como fase móvil AcOEt: hexano desde 1:4 hasta 2:1 obteniendo 180 mg de la mezcla de olefinas **64** (0.66 mmol, 80% rdo.).

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **64**:

IR (ATR) 3340 (NH), 3040 (=CH), 2961 (CH), 1693 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 1519, 1365 cm^{-1} .

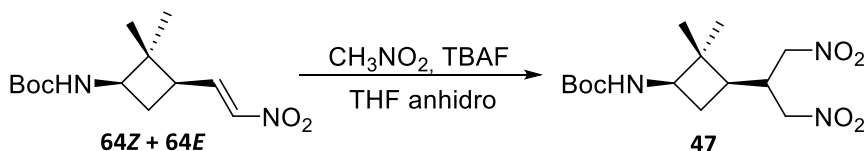
^1H RMN (360 MHz, CDCl_3) δ 0.92 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.17 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.38 (s, 9H, ^tBu), 1.72 (q, 1H, $J_{\text{H-H}} = 10.2$ Hz, H_{4a}), 2.33-2.56 (m, 2H, H_3 , H_{4b}), 3.76-3.95 (m, 1H, H_1), 4.74 (s.a., 1H, NH), 6.88 (d, 1H, $J_{\text{H-H}} = 13.4$ Hz, $\text{H}_{2'}$), 7.16 (dd, 1H, $J_{\text{H-H}} = 13.3$ Hz, $J'_{\text{H-H}} = 8.0$ Hz, $\text{H}_{2'}$).

^{13}C RMN (90 MHz, CDCl_3) δ 17.0 (*trans*- CH_3), 28.0 (C_4), 30.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.9 (*cis*- CH_3), 38.4 (C_2), 47.2 (C_3), 51.3 (C_1), 79.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 139.7 ($\text{C}_{2'}$), 142.1 ($\text{C}_{1'}$), 155.3 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$)

METODOLOGÍA

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $C_{13}H_{22}N_2NaO_4$ $[M+Na]^+$: 293.1465; Experimental: 293.1472.

(1*R*,3*R*)-3-(1',3'-Dinitropropan-2'-il)-2,2-dimetilciclobutilcarbamato de *terc*-butilo, 47:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 110 mg de la mezcla de nitroalquenos **64Z + 64E** (0.40 mmol) en 5 mL de THF anhidro bajo un atmosfera de nitrógeno. Se añaden 29 μ L de CH_3NO_2 (0.53 mmol, 1.3 eq.) y 0.53 mL de una solución 1 M de TBAF en THF (0.53 mmol, 1.3 eq.). Se deja en agitación durante 18 horas a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente y los subproductos de la reacción a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil desde hexano: AcOEt 1:10 hasta 1:1. Se obtienen 112 mg (0.34 mmol, 83% rdto.) del producto **47**.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **47**:

$[\alpha]_D$: +1.2 ($c=0.6$, DCM).

IR (ATR) 3355 (OH, NH), 2970 (CH), 1723 ($CO_{\text{carbamato}}$), 1555, 1366.

1H RMN (360 MHz, $CDCl_3$) δ 1.02 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.22 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.45 (s, 9H, *t*Bu), 1.53-1.80 (a.c., 2H, H_{4a} , $H_{2'}$), 2.33-2.48 (m, 1H, H_{4b}), 2.75-2.91 (m, 1H, H_3), 3.67-3.83 (m, 1H, H_1), 4.37-4.62 (a.c., 4H, $H_{1'}$, $H_{3'}$).

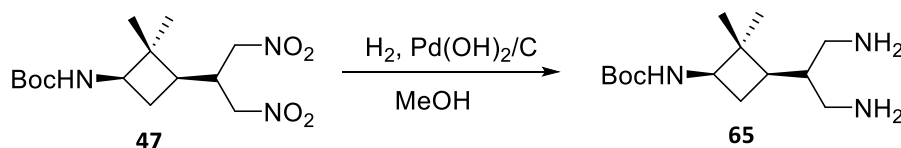
^{13}C RMN (90 MHz, $CDCl_3$) δ 15.7 (*trans*- CH_3), 28.3 ($C(CH_3)_3$), 29.3 (*cis*- CH_3), 29.7 (C_4), 37.5 ($C_{2'}$), 37.8 (C_3), 43.9 (C_2), 50.4 (C_1), 74.4 (2C, $C_{1'}$, $C_{2'}$), 79.6 ($C(CH_3)_3$), 155.1 ($CO_{\text{carbamato}}$).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $C_{14}H_{25}N_3NaO_6$ $[M+Na]^+$: 354.1641; Experimental: 354.1647.

METODOLOGÍA

((1*R*,3*R*)-3-(1',3'-Diaminopropan-2'-il)-2,2-dimetilciclobutil)carbamato de *terc*-butilo,

65:

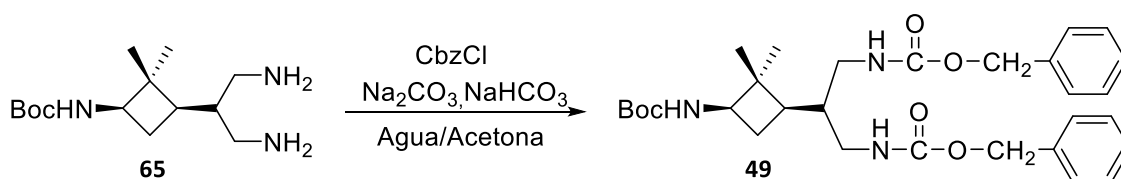


En un recipiente de hidrogenador provisto de agitación magnética se disuelven 123 mg (0.37 mmol) de **47** en 5 mL MeOH. Se adicionan 20% de Pd(OH)₂/C (125 mg, 25% en peso de Pd). Se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente bajo 5 atmósferas de presión de hidrógeno. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se filtra sobre Celite® y se lava con abundante MeOH (2 x 20 mL). Se elimina el disolvente a presión reducida. La diamina **65** obtenida (100 mg, 0,36 mmol, rdto. cuantitativo) se utiliza en la siguiente etapa sin purificación.

Datos espectroscópicos para el compuesto **65**:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.05 (s, 3H, CH₃), 1.20 (s, 3H, CH₃), 1.43 (s, 9H, ^tBu), 1.78-2.10 (m, 1H, CH₂), 2.17-2.46 (m, 2H, CH, CH₂), 2.67-2.96 (m, 3H, CH, 2 CH₂), 3.04-3.35 (m, 2H, 2 CH₂), 3.58-3.81 (m, 1H, CH), 4.65 (s.a., 1H, NH).

1,3-Dicarbamato de dibencil 2-[(1*R*,3'*R*)-3'-*terc*-butoxicarbonilamino-2',2'-dimetilciclobutil]propano, **49:**



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven (100 mg, 0.37 mmol) de la diamina **65** en una mezcla de agua-acetona 10:1 a 0 °C (6.8 mL). Una vez preparada la disolución se adiciona 78 mg de Na₂CO₃ (0.74 mmol, 2 eq.), 31 mg de NaHCO₃ (0.37 mmol, 1 eq.) y 0.15 mL de CbzCl (1.10 mmol, 2.8 eq.). Se deja en agitación durante 1 hora a 0 °C y después se deja evolucionar a temperatura ambiente durante 18 horas. Pasado este tiempo, se realizan extracciones con DCM (3 x 20 mL) y

METODOLOGÍA

la fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil AcOEt: hexano 1:4, obteniendo 130 mg del carbamato **49** (0.24 mmol, 65% rdto.).

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **49**:

$[\alpha]_D$: +7.9 ($c = 0.65$, DCM)

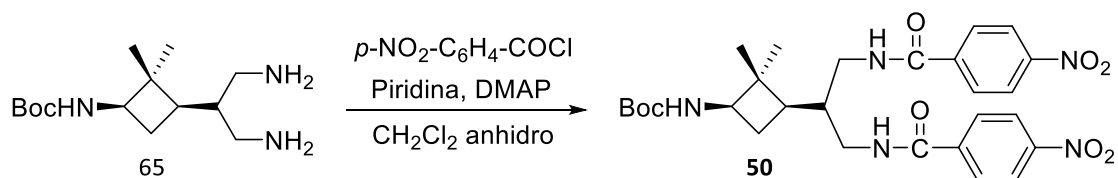
IR (ATR) 3335 (NH), 2952 (CH), 1687 (CO), 1512, 1454, 1366 cm^{-1} .

$^1\text{H RMN}$ (360 MHz, CDCl_3) δ 0.97 (s, 3H, CH_3), 1.16 (s, 3H, CH_3), 1.43 (s, 9H, ^tBu), 1.56-1.71 (m, 1H, CH_2), 2.15-2.36 (m, 1H, CH), 2.57-2.95 (m, 2H, CH_2 , CH), 3.18 3.44 (m, 2H, 2 CH_2), 3.44-3.88 (m, 2H, 2 CH_2), 4.48-4.67 (m, 1H, CH), 4.98-5.18 (m, 5H, 2 CH_2 , NH), 5.52 (s.a., 1H, NH), 5.66 (s.a., 1 H, NH), 7.28-7.43 (m, 10 H, H_{Ar}).

$^{13}\text{C RMN}$ (90 MHz, CDCl_3) δ 15.7 (CH_3), 28.4 (O^tBu), 29.7 (CH_2), 30.0 (CH_3), 38.3 (CH_2), 39.0 (CH_2), 40.2 (CH), 40.9 (CH), 43.4 (C), 50.8 (CH), 66.7 (CH_2), 66.8 (CH_2), 79.2 (C), 128.0, 128.1, 128.5, 136.5, 136.6 (10 C, C_{Ar}), 155.4, 157.1, 157.3 (3 C, $\text{CO}_{\text{carbamato}}$).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{NaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 562.2893; Experimental: 562.2883.

1,3-Dicarbamato de di(*p*-nitrofenil) 2-[(1'*R*,3'*R*)-3'-*terc*-butoxicarbonilamino-2',2'-dimetilciclobutil]propano, **50**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética y bajo una atmósfera de nitrógeno se disuelven 85 mg (0.31 mmol, 1 eq.) de la diamina **65** en 2 mL de piridina con 7.6 mg (0.062 mmol, 0,2 eq.) de DMAP. A esta solución se le adiciona gota a gota (128 mg, 0.69 mmol, 2.2 eq.) del cloruro 4-nitrobenzoico disuelto previamente

METODOLOGÍA

en 2 mL de DCM anhidro y se deja en agitación durante 2 horas, a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo se eliminan los disolventes a presión reducida y el crudo se disuelve en AcOEt. Se realizan lavados con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ (3 x 5 mL) y con una solución acuosa saturada de NaCl (1 x 5 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil AcOEt: hexano 1:2.5, obteniéndose 80 mg del carbamato **50** (0.14 mmol, 45% rdt.).

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **50**:

$[\alpha]_D$: +23.3 ($c = 0.2$, CHCl₃)

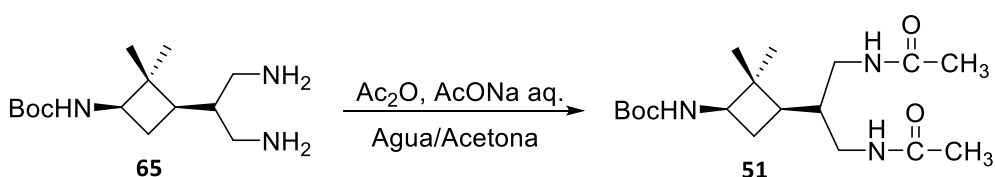
IR (ATR) 3311 (NH), 2956 (NH), 2357, 1650 (CO), 1559, 1521, 1390, 1344, 1295, 1259 cm⁻¹.

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.14 (s, 3H, CH₃), 1.28 (s, 3H, CH₃), 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.52-1.66 (m, 1H, CH), 1.88-2.04 (m, 2H, CH₂), 2.39-2.54 (m, 1H, CH), 2.83-3.20 (m, 1H, CH), 3.62-3.85 (m, 3H, CH₂, CH), 4.55-4.72 (m, 1H, CH), 7.34-7.57 (m, 1H, NH), 7.59-7.92 (m, 2H, NH), 8.04-8.17 (m, 4H, H_{Ar}), 8.29-8.41 (m, 4H, H_{Ar}).

¹³C RMN (90 MHz, CDCl₃) δ 15.1 (CH₃), 28.1 (O^tBu), 29.5 (CH₂), 30.1 (CH₃), 38.1 (CH₂), 38.8 (CH₂), 39.3 (CH), 40.6 (CH), 43.3 (C), 50.6 (CH), 76.9 (C), 123.8 (2 CH), 128.1 (2 CH), 139.1, 149.6, 155.2 (C_{Ar}), 165.8 (NCO), 166.4 (NCO).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₂₈H₃₅N₅NaO₈ [M+Na]⁺ 592.2378; Experimental: 592.2374.

1,3- Diamida de diacetil 2-[(1*R*,3*R*)-3'-*tert*-butoxicarbonilamino-2',2'-dimetilciclobutil]propano, **51**:



METODOLOGÍA

A una solución de la diamina **65** (220 mg, 0.81 mmol) preparada en 4 mL de agua, se adicionan lentamente 0.5 mL de HCl 2 M, hasta llegar a una solución homogénea de pH 2. Esta solución se trata con NaOH 6 M hasta pH 5, cuando se adiciona AcONa (220 mg, 2.67 mmol, 3.3 eq.). Se enfría esta mezcla a 0 °C y se adiciona anhídrido acético (0.2 mL, 2.43 mmol, 3 eq.). Se deja en agitación durante 10 min a temperatura ambiente. Se adicionan una vez más 0.23 mL (2.4 mmol, 3 eq.) de anhídrido acético y el pH se ajusta a 7 mediante el uso de NaOH 6 M, esta reacción se deja en agitación, durante 2 horas a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo, se adicionan 5 mL de AcOEt y se lava con una solución saturada de NaHCO₃ (4 x 3 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil AcOEt: MeOH 10:1. Se obtiene la diacetamida **51** 200 mg (0.56 mmol, 70% rdto.).

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **51**:

$[\alpha]_D$: +23.3 ($c = 0.2$, MeOH)

IR (ATR) 3293 (NH), 2964 (CH), 2348 (CH), 1654 (CO), 1541, 1292, 1171 cm⁻¹.

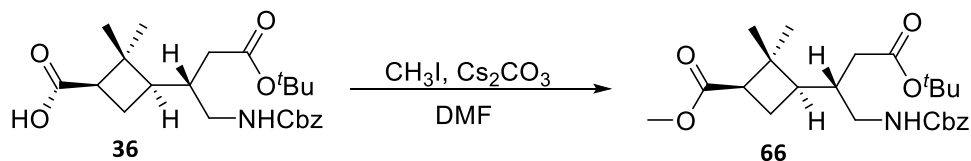
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.97 (s, 3H, CH₃), 1.16 (s, 3H, CH₃), 1.41 (m, 10H, 3 CH₃, CH), 1.56-1.66 (m, 1H, CH), 1.99 (s, 6H, 2 CH₃), 2.22-2.35 (m, 1H, CH), 2.50-2.74 (m, 2H, CH₂), 3.42-3.56 (m, 2H, CH₂), 3.58-3.73 (m, 1H, CH), 4.56-4.67 (m, 1H, CH), 6.55-6.87 (m, 2H, 2 NH).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 15.4 (CH₃), 23.1 (2 CH₃), 28.3 (O^tBu), 29.7 (CH₂), 30.1 (CH₃), 37.5 (CH₂), 38.8 (CH₂), 40.5 (CH), 43.3 (C), 50.7 (CH), 77.2 (C), 79.2 (CH), 155.4 (NCO), 170.9 (COCH₃), 171.3 (COCH₃).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₁₈H₃₃N₃NaO₄ [M+Na]⁺ 378.2363; Experimental: 378.2370.

METODOLOGÍA

3-((2'S)-1'-Benciloxycarbonilamino-4'-*tert*-butoxi-4'-oxobutan-2'-il)-2,2-dimetilciclobutano-(1*R*,3*R*)-carboxilato de metilo, **66**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 150 mg (0.36 mmol) del ácido **36** en 40 mL de DMF y se añaden 116 mg de Cs_2CO_3 (0.36 mmol, 1.0 eq.). A continuación se adicionan 0.1 mL de CH_3I (1.61 mmol, 4.5 eq.) y se deja en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo, se añaden 40 mL de AcOEt y se lava con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (4 x 20 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil hexano: Et_2O , 10:1. Se obtienen 110 mg (0.25 mmol, 71% rdt.) del éster **66**.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **66**:

$[\alpha]_D^{25}$: +64.4 ($c = 0.29$, DCM).

IR (ATR) 3366 (NH), 2951 (CH), 1721, 1720 ($\text{CO}_{\text{carbamato}} + \text{CO}_{\text{éster}}$), 1518, 1455 cm^{-1} .

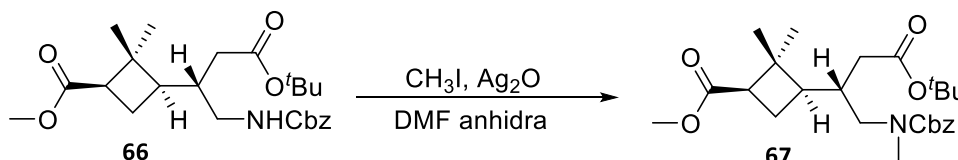
^1H RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 0.98 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.26 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.71–1.85 (m, 1H, $\text{H}_{4'a}$), 1.90–2.11 (a.c., 4H, $\text{H}_{4'b}$, $\text{H}_{1'}$, H_3 , H_{2a}), 2.16–2.34 (m, 1H, H_{2b}), 2.54–2.71 (m, 1H, $\text{H}_{3'}$), 2.98–3.12 (m, 1H, H_{4a}), 3.20–3.35 (m, 1H, H_{4b}), 3.67 (s, 3H, CO_2CH_3), 5.00–5.21 (a.c., 3H, CH_2Ph , NH), 7.29–7.44 (a.c., 5H, H_{Ar}).

^{13}C RMN (62.5 MHz, CDCl_3) δ 17.0 (*trans*- CH_3), 23.7 ($\text{C}_{4'}$), 28.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 30.9 (*cis*- CH_3), 37.1 (C_2), 42.3 ($\text{C}_{2'}$), 42.7 (C_4), 43.9 ($\text{C}_{1'}$), 45.6 ($\text{C}_{3'}$), 51.1 (CO_2CH_3), 66.5 (CH_2Ph), 80.9 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 128.0, 128.4, 136.3 (6C, C_{Ar}), 156.4 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 171.8, 172.8 ($\text{CO}_2^t\text{Bu} + \text{CO}_2\text{CH}_3$).

METODOLOGÍA

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $C_{24}H_{35}NNaO_6$ $[M+Na]^+$ 456.2357;
Experimental: 456.2349.

3-((2'S)-1'-benciloxycarbonil(metil)amino-4'-*tert*-butoxi-4'-oxobutan-2'-il)-2,2-dimetilciclobutano-(1R,3R)-carboxilato de metilo, 67:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 0.56 g (1.29 mmol) del éster **66** en 5 mL de DMF anhidra. Posteriormente se adicionan 2.4 mg de Ag_2O (10.33 mmol, 8 eq.) y 1 mL de CH_3I (16.79 mmol, 13 eq.). Se deja en agitación durante 7 días, protegida de la luz, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el exceso de CH_3I se elimina bajo presión reducida y la solución se filtra a través de Celite®. El filtrado se lava con una solución saturada de $NaHCO_3$ (3 x 5 mL). La fase orgánica se seca con $MgSO_4$, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil desde AcOEt: hexano 1:9 hasta AcOEt: hexano 1:4. Se obtienen 0.30 g (0.67 mmol, 52% rdto.) de **67**, en forma de aceite de color amarillo.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **67**:

$[\alpha]_D$: +2.2 ($c = 0.67$, DCM).

IR (ATR) 3029 (CH), 2970 (CH), 2951 (CH), 1727 (CO), 1586, 1366 cm^{-1} .

1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) 0.97 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.22 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.41 (s, 9H, tBu), 1.66-2.34 (m, 6H, 2 CH_2 , 2 CH), 2.46-2.70 (m, 1H, CH), 2.91 (s, 3H, CH_3), 3.00-3.35 (m, 2H, CH_2), 3.65 (s, 3H, CH_3), 5.01-5.21 (m, 2H, CH_2Ph), 7.29-7.44 (m, 5H, H_{Ar}).

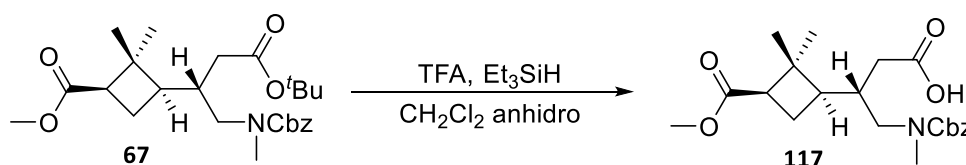
^{13}C RMN (90 MHz, $CDCl_3$) δ 17.1 (CH_3), 24.0 (CH_2), 28.1 (O^tBu), 30.9 (CH_3), 37.0 (CH_2), 41.5 (C), 43.1 (CH_2), 43.9 (CH), 45.9 (CH), 46.9 (CH_3), 51.2 (CH_3), 67.0 (CH_2), 80.5 (C),

METODOLOGÍA

127.8, 127.9, 128.1, 128.5, 136.8 (6C, C_{Ar}), 156.2 (CO_{carbamato}), 171.4 (CO_{éster}), 172.9 (CO_{éster}).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₂₅H₃₇NNaO₆ [M+Na]⁺ 470.2513; Experimental: 470.2526.

Ácido (3S)-4-benciloxycarbonil(metil)amino-3-((1'R,3'R)-3'-metoxicarbonil-2',2'-dimetilciclobutil)butanoico, 117:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 270 mg del producto **67** (0.60 mmol), 0.6 mL de TFA (7.84 mmol, 13 eq.) y 0.2 mL de Et₃SiH (1.33 mmol, 2.2 eq.) en 15 mL de DCM anhidro. Se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente. El disolvente se evapora y el exceso de TFA se elimina en el liofilizador obteniendo 230 mg (0.58 mmol, rdtó. cuantitativo) del producto **117**, en forma de aceite amarillo, el cual se utiliza en la siguiente etapa sin purificación.

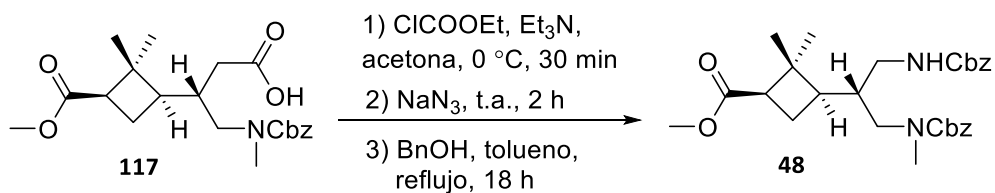
Datos espectroscópicos de **117**:

¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.98 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.24 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.69-2.36 (a.c. 6H), 2.53-2.71 (m, 1H, CH₂), 2.89 (s, 3H, N-CH₃), 3.05-3.19 (m, 1H, CH), 3.20-3.43 (m, 1H, CH₂), 3.67 (s, 3H, CO₂CH₃), 4.98-5.22 (m, 2H, CH₂Ph), 7.29-7.42 (a.c., 5H, H_{Ar}), 9.40 (s. a., 1H, COOH).

¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃) δ 16.9 (*trans*-CH₃), 23.7 (C_{4'}), 30.7 (*cis*-CH₃), 35.6, 41.4, 43.0, 44.1, 45.7, 46.8 (N-CH₃), 51.2 (CO₂CH₃), 67.6 (CH₂Ph), 127.7, 128.1, 128.2, 128.4, 136.1 (6C, C_{Ar}), 157.1 (CO_{carbamato}), 173.2 (CO₂CH₃), 177.0 (CO₂H).

METODOLOGÍA

2,2-Dimetil-3-((*R*)-4-metil-3,9-dioxo-1,11-difenil-2,10-dioxa-4,8-diazaundecan-6-il)ciclobutano (*1R,3R*)- carboxilato de metilo, **117**



A una solución fría del ácido **117** (0.26 g, 0.66 mmol, 1 eq.) en acetona anhidra (15 mL) se le adiciona, 0.14 mL de Et₃N (0.99 mmol, 1.5 eq.) y 95 µL del cloroformiato de etilo (0.99 mmol, 1.5 eq.). Esta solución se agita por 30 minutos a 0 °C. Una vez pasado este tiempo se adiciona la azida de sodio (69 mg, 1.06 mmol, 1.6 eq) en 5 mL de agua y se deja en agitación durante 2 h, a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrae con DCM (4 x 15 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, para obtener la acil azida como compuesto intermedio. Posteriormente, una solución de la acil azida (0.26 g, 0.62 mmol, 1 eq.) y alcohol bencílico (0.12 mL, 1.12 mmol, 1.8 eq.) en tolueno anhidro (30 mL) se lleva a reflujo por 18 horas bajo atmosfera de nitrógeno. Una vez pasado este tiempo el tolueno se evapora a presión reducida y el exceso de alcohol bencílico se elimina por destilación al vacío. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil desde AcOEt: hexano 1:9 hasta AcOEt: hexano 1:1. Se obtienen 0.23 g (0.46 mmol, 74% rdtó.) del carbamato de bencilo **48** en forma de aceite amarillo.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **48**:

[α]_D: +2.8 (c = 0.48, DCM).

IR (ATR) 3343 (NH), 3040 (CH), 2950 (NH), 1686 (CO), 1516, 1361 cm⁻¹.

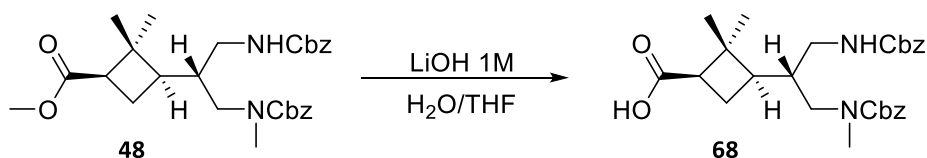
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 1.05 (s, 3H, CH₃), 1.30 (s, 3H, CH₃), 1.74-1.88 (m, 2H, CH, CH₂), 1.89-2.01 (m, 2H, CH, CH₂), 2.56-2.72 (m, 1H, CH), 2.90 (s, 3H, CH₃), 2.96-3.04 (m, 2H, CH₂), 3.04-3.23 (m, 1H, CH₂), 3.25-3.38 (m, 1H, CH₂), 3.67 (s, 3H, CH₃), 5.00-5.26 (m, 4H, 2 CH₂), 6.13 (s.a., 1H, NH), 7.28-7.48 (m, 10H, H_{Ar}).

METODOLOGÍA

^{13}C RMN (90 MHz, CDCl_3) δ 17.2 (CH_3), 23.3 (CH_2), 30.95 (CH_3), 35.1 (CH_3), 39.0 (CH_2), 40.0 (CH), 41.4 (CH), 43.0 (C), 45.7 (CH), 48.3 (CH_2), 51.2 (CH_3), 66.3 (CH_2), 67.4 (CH_2), 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.5, 136.6, 137.0 (12 C, C_{Ar}), 156.7 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 157.4 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 173.2 ($\text{CO}_{\text{éster}}$).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{NaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 519.2466; Experimental: 519.2480.

Ácido (1*R*,3*R*)-2,2-dimetil-3-((*R*)-4*R*-metil-3,9-dioxo-1,11-difenil-2,10-dioxa-4,8-diazaundecan-6-il)ciclobutano carboxílico, 68:



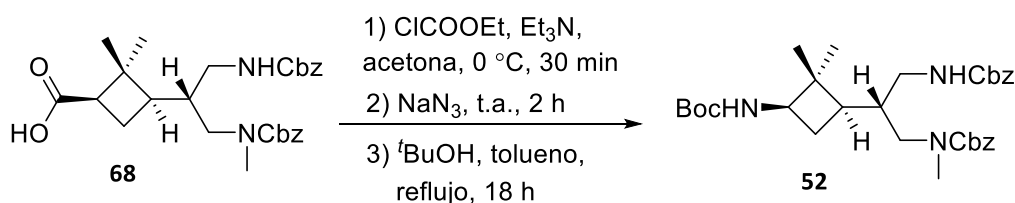
En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 0.18 g (0.36 mmol, 1 eq.) del compuesto **48** en una mezcla H_2O -THF 10:1 (11 mL). Se adicionan 3 mL de una solución de LiOH 1 M (3.0 mmol, 8.3 eq.). Se deja en agitación durante 6 días, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la reacción se lava con DCM y la fase acuosa se lleva a pH 2 con HCl 4 M. La fase acuosa ácida se extrae con DCM. La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtienen 0.17 g (0.35 mmol, rdt. cuantitativo) del ácido **68** en forma de sólido blanco, el cual se utiliza en la siguiente fase sin purificación.

Datos espectroscópicos de 68:

^1H RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 1.15 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.27 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.77-2.04 (a.c., 4H, 2 CH, CH_2), 2.59-2.80 (m, 1H, CH), 2.92 (s, 3H, N- CH_3), 2.97-3.40 (a.c., 4H, 2 CH_2), 5.03-5.24 (a.c., 4H, CH_2Ph), 6.13 (s.b, 1H, NH), 7.29-7.47 (a.c., 10H, H_{Ar}).

METODOLOGÍA

(2*R*)-3-benciloxycarbonilamino-2-((1'*R*,3'*R*)-3'-*tert*-butoxicarbonilamino-2',2'-dimetilciclobutil)propil)(metil)carbamato de bencilo, **52**:



A una solución fría del ácido **68** (0.14 g, 0.29 mmol, 1 eq.) en acetona anhidra (12 mL) se le adicionan 0.12 mL de Et₃N (0.87 mmol, 3 eq.) y 36 µL del cloroformiato de etilo (0.37 mmol, 1.3 eq). Esta solución se agita por 30 minutos a 0 °C. Pasado este tiempo se adiciona la azida de sodio (30 mg, 0.46 mmol, 1.6 eq) en 2 mL de agua y se deja en agitación durante 2 horas, a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrae con DCM (4 x 15 mL), la fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, para obtener 0.14 g de la acil azida como compuesto intermedio.

Posteriormente, una solución de acil azida (0.14 g, 0.27 mmol, 1 eq.) en 20 mL *tert*-butanol (208.24 mmol) se lleva a reflujo durante 18 horas bajo atmósfera de nitrógeno. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se enfría a temperatura ambiente y se adicionan 20 mL de AcOEt. La mezcla de reacción se lava con una solución acuosa de NaHCO₃ (3 x 30 mL). La fase acuosa ácida se extrae con DCM. La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil desde AcOEt: hexano 9:1 hasta MeOH. Se obtienen 65 mg (0.12 mmol, 42% rdt.) de la triamina protegida **52** en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **52**:

[α]_D: +0.5 ($c = 1.59$, DCM).

IR (ATR) 3341 (NH), 3037 (CH), 2954(CH), 1688 (CO), 1518, 1366 cm⁻¹.

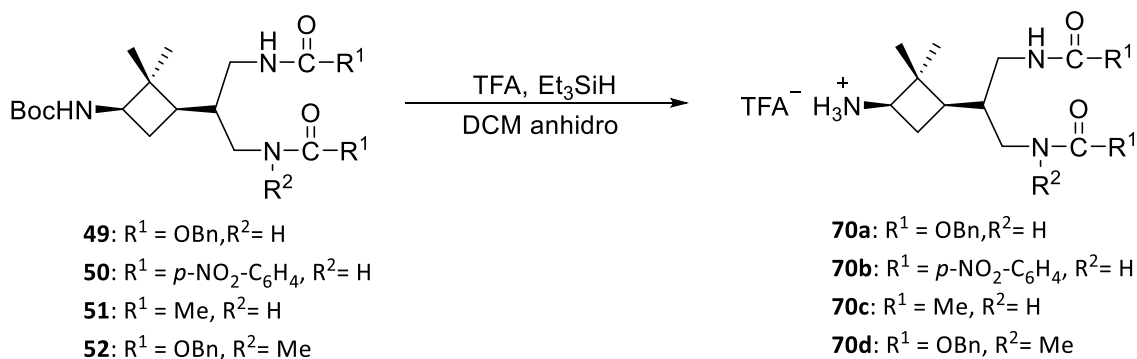
METODOLOGÍA

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.09 (s, 3H, CH₃), 1.26 (s, 3H, CH₃), 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.72-1.97 (m, 4H, CH₂, 2 CH), 2.48-2.62 (m, 1H, CH), 2.92 (s, 3H, CH₃), 3.04-3.45 (m, 4H, 2 CH₂), 4.99-5.28 (m, 5H, 2 CH₂, NH), 6.13 (s.a., 1H, NH), 7.31-7.45 (m, 10H, H_{Ar})

¹³C RMN (90 MHz, CDCl₃) δ 15.6 (CH₃), 28.4 (O^tBu), 29.6 (CH₂), 30.1 (CH₃), 35.6 (CH₃), 38.8 (CH₂), 39.9 (CH), 40.2 (CH), 43.6 (C), 48.8 (CH), 50.9 (CH₂), 66.4 (CH₂), 67.5 (CH₂), 79.2 (C), 127.8, 127.9, 128.0, 128.1, 128.4, 128.5, 136.5, 137.0 (12 C, C_{Ar}), 155.4, 156.7, 157.5 (3 C, CO).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₃₁H₄₃N₃NaO₆ [M+Na]⁺ 576.3044; Experimental: 576.3059.

Método general para la desprotección de los compuestos **49**, **50**, **51** y **52**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven los compuestos **49**, **50**, **51** y **52** en DCM anhidro. A cada mezcla de reacción se le adicionan 16 equivalentes de TFA y 2 equivalentes de Et₃SiH. La reacción se deja en agitación durante 2 horas, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el disolvente se evapora bajo presión reducida y el exceso de TFA se elimina por liofilización. Se obtienen los compuestos **70a** con 98% rdto., **70b** con 97% rdto., **70c** con 97% rdto. y **70d** con 97% rdto. Las aminas se utilizan a continuación sin purificación.

Datos espectroscópicos de **70a**:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 0.91 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.12 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.53-1.78 (m, 3H, CH₂, CH), 2.17-2.36 (m, 1H, CH), 2.72-2.88 (a.c., 2H, CH₂), 3.04-3.27 (m, 3H, CH₂, CH), 4.90-5.12 (m, 4H, CH₂Ph), 5.60 (s.a., 1H, NH), 7.28-7.43 (a.c., 10H, H_{Ar}).

METODOLOGÍA

Datos espectroscópicos de 70b:

$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 0.95 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.12 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.52-1.66 (m, 1H, CH_2), 1.73-2.01 (m, 2H, CH, CH_2), 2.30-2.43 (m, 1H, CH), 2.62-3.00 (m, 1H, CH_2), 3.68-3.75 (m, 3H, CH_2 , CH_2), 4.34-4.55 (m, 1H, CH), 8.04-8.17 (m, 4H, H_{Ar}), 8.29- 8.41 (m, 4H, H_{Ar}).

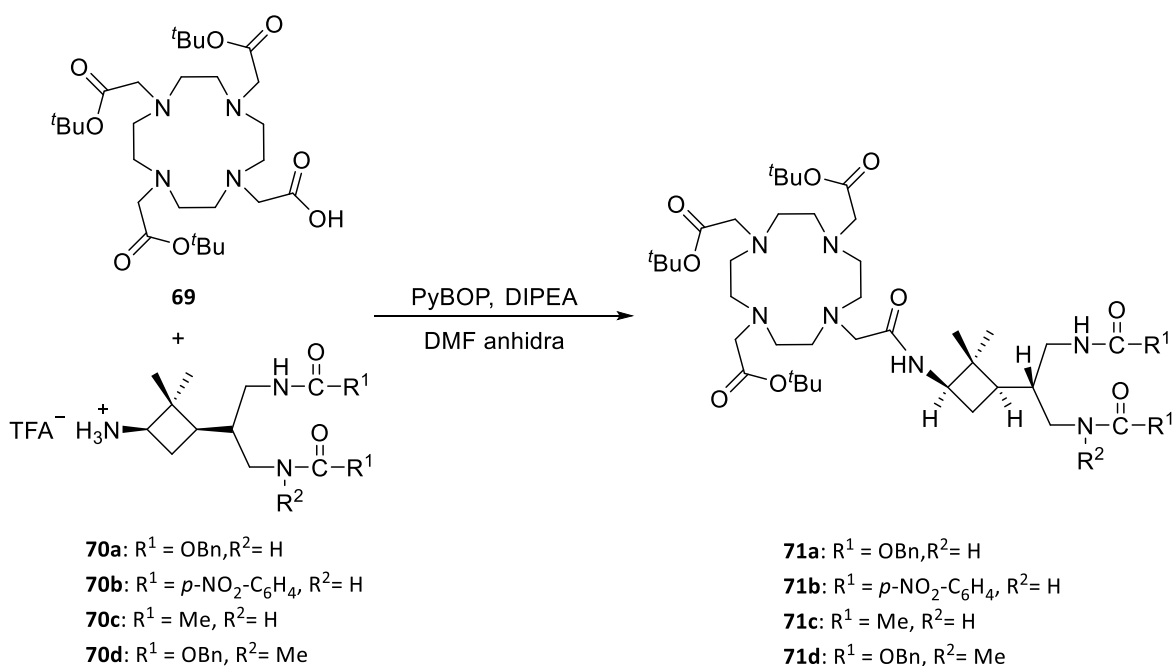
Datos espectroscópicos de 70c:

$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 1.20 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.23 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.66-1.85 (m, 3H, CH_2 y CH), 1.99 (s, 6H, COCH_3 , COCH_3), 2.36-2.46 (m, 1H, CH), 2.80-2.90 (m, 1H, CH), 3.02-3.09 (m, 1H, CH_2), 3.21-3.31 (a.c., 4 CH_2 , CH_2).

Datos espectroscópicos de 70d:

$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 0.88 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.21 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.63-1.92 (m, 4H, CH_2 , 2 CH), 2.13-2.41 (m, 1H, CH), 2.90 (s, 3H, N- CH_3), 3.01-3.42 (a.c., 4H, 2 CH_2), 4.98-5.25 (a.c., 5H, $-\text{CH}_2\text{Ph}$, NH), 6.19 (s. a., 1H, NH), 7.30-7.44 (a.c., 10H, H_{Ar}).

Método general para el acoplamiento de DOTA-tri-*tert*-Bu éster 69 con las plataformas ciclobutánicas 70a, 70b, 70c y 70d:



METODOLOGÍA

En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven las aminas **70a**, **70b**, **70c** y **70d** previamente obtenidas, en suficiente DMF anhidra. Paralelamente se prepara una disolución con 2 eq. de tetraacetato de tri-*tert*-butil-1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-(DOTA-tri-*tert*-Bu éster) **69**, 2 eq. de PyBOP y 4 eq. de DIPEA en DMF anhidra. A esta disolución se adiciona lentamente la solución de la amina preparada. Se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se adicionan 20 mL de una solución saturada de NaHCO₃ y se realizan extracciones con DCM (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄ anhidro, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, posteriormente se evaporan los residuos de DMF en el liofilizador.

Se obtiene el compuesto **71a** con 49% de rdto., el cual fue usado sin purificación en la siguiente etapa. El compuesto **71b** con 82% de rdto., se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil AcOEt: hexano 9:1 hasta MeOH. El compuesto **71c** con 16% de rdto. se purifica inicialmente mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil AcOEt: MeOH 9:1 hasta MeOH, sin embargo debido a su alta polaridad fue necesario realizar una extracción Soxhlet de la silica utilizando MeOH como solvente. El compuesto **71d** con 45% de rdto., fue usado sin purificación en la siguiente etapa.

Datos espectroscópicos de **71a**:

¹H RMN (360 MHz, CDCl₃) δ 0.99 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.11 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.45 (s, 27H, ^tBu), 1.78-1.89 (m, 1H, CH₂), 2.01-3.45 (m, 29H, CH, CH₂), 3.57-3.78 (m, 2H, 2 CH₂), 3.81-3.93 (m, 1H, CH), 5.02-5.15 (m, 4H, 2 CH₂), 5.18 (s.a., 1H, NH), 5.73 (s.a., 1H, NH), 6.11 (s.a., 1H, NH), 7.29-7.41 (m, 10H, H_{Ar}).

¹³C RMN (90 MHz, CDCl₃) δ 16.0 (CH₃), 28.0 (O^tBu), 29.7 (CH₂), 31.7 (CH₃), 38.6, 39.1 (CH₂), 40.2 (CH), 40.9 (CH), 43.8 (C), 48.3, 49.7 (8 CH₂), 51.7, 52.5 (4 CH₂), 55.7 (CH), 66.6 (CH₂), 66.8 (CH₂), 81.9 (C), 128.0, 128.1, 128.5, 132.1, 132.2, 136.5, 136.7 (12 C, C_{Ar}), 157.0, 157.5 (2 C, CO_{carbamato}), 171.5, 172.5 (4 C, CO_{éster}, CO_{amida}).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₅₃H₈₃N₇NaO₁₁ [M+Na]⁺ 1016.605; Experimental: 1016.605.

METODOLOGÍA

Datos espectroscópicos de 71b:

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.08 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.25 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.43 (s, 27H, ^tBu), 1.57- 1.80 (m, 3H), 2.24-2.66 (m, 7H), 2.92-3.08 (m, 1H), 3.59-3.82 (m, 4H), 3.86-4.01 (m, 3H), 4.05-4.39 (m, 12H), 4.45-4.57 (m, 2H), 4.75-4.89 (m, 1H, CH), 7.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H, CH), 7.72 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, CH).

$^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 15.0 (CH_3), 21.6 (CH_2), 26.9 (CH_2), 27.3 (CH_2), 28.2 (9 C, O^tBu), 29.5 (CH), 29.6 (CH), 31.7 (CH_3), 35.44, 38.6 (8C, CH_2), 42.1 (C), 44.6, 48.8 (4 C, CH_2), 60.3 (CH), 77.1 (3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 123.7, 123.7, 129.7, 129.9, 140.6, 141.1, 149.4 (12 C, C_{Ar}), 155.2 (2 C, CO), 171.2, 171.88 (4 C, CO).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $\text{C}_{51}\text{H}_{77}\text{N}_9\text{NaO}_{13}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 1046.564; Experimental: 1046.562.

Datos espectroscópicos de 71c:

$^1\text{H RMN}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 0.86 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.03 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.46 (s, 9H, ^tBu), 1.51 (s, 18H, ^tBu), 1.74-1.87 (m, 4H), 1.98 (s, 6H, 2 CH_3), 2.20-2.28 (m, 4H), 2.47-2.55 (m, 5H), 2.65-2.78 (m, 5H), 2.93-3.02 (m, 5H), 3.62 (s, 6H, 3 CH_2), 3.80-3.91 (m, 2H), 3.94-4.01 (m, 2H).

$^{13}\text{C RMN}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 15.2 (CH_3), 17.0 (CH_3), 19.4 (CH_3), 21.2 (CH_2), 22.5 (CH), 26.9 (CH_2), 28.7 (9 C, O^tBu), 29.3 (CH), 30.1 (CH_3), 39.9 (CH_2), 43.1 (C), 44.2 (CH_2), 45.4 (CH_2), 46.5 (CH_2), 48.9 (CH_2), 50.2 (CH_2), 52.6 (3 CH_2), 55.3 (CH_2), 62.9 (2 CH_2), 63.3 (CH), 65.0 (CH_2), 81.4 (3C, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 125.5 (CO), 128.4 (CO), 171.5 (CO), 171.9 (CO), 172.4 (CO), 173.4 (CO)

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $\text{C}_{41}\text{H}_{75}\text{N}_7\text{NaO}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 832.5518; Experimental: 832.5516.

Datos espectroscópicos de 71d:

$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 1.01 (s, 3H, *trans*- CH_3), 1.16 (s, 3H, *cis*- CH_3), 1.46 (s, 27H, ^tBu), 1.55-1.57 (m, 1H), 2.71-2.82 (m, 11H), 2.88-2.95 (m, 6H), 2.96-3.03 (m, 11H), 3.29-

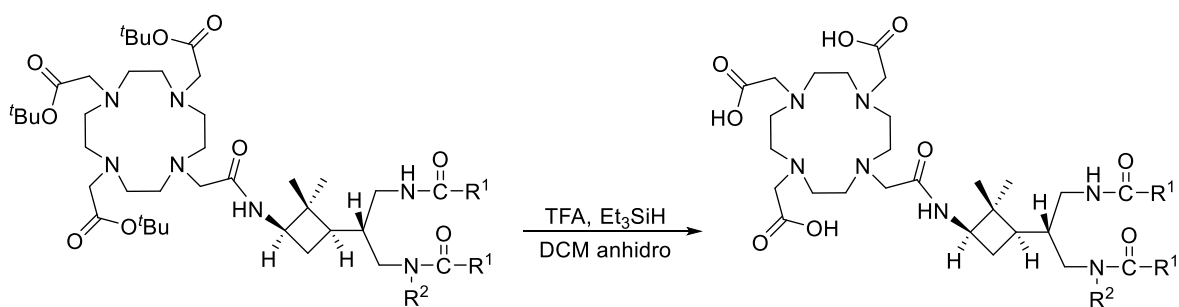
METODOLOGÍA

3.34 (m, 2H), 3.54-3.62 (m, 5H, CH, 2 CH₂) 5.01-5.16 (m, 4H, 2 CH₂), 7.31-7.37 (m, 10H, H_{Ar}).

¹³C RMN (62.5 MHz, CDCl₃) δ 18.8 (CH₃), 26.7, 26.9 (9 C, O^tBu), 29.8 (CH₂), 30.1 (CH₃), 35.3 (CH₃), 37.5 (CH₂), 38.4 (CH₂), 40.7 (CH), 41.0 (CH), 41.8 (C), 46.7 (8 CH₂), 53.0, 53.9 (4 CH₂), 56.0 (CH), 68.0 (CH₂), 68.3 (CH₂), 82.2 (3C), 127.8, 128.4, 128.7, 129.0, 129.1, 136.3, 137.1 (12C, C_{Ar}), 155.6, 156.3 (2C, CO_{carbamato}), 170.4, 171.8 (4C, CO_{éster}, CO_{amida}).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₅₄H₈₅N₇NaO₁₁ [M+Na]⁺ 1030.620; Experimental: 1030.621.

Método general para la desprotección de ^tBu-DOTA-ciclobutano y formación de los complejos de Gd:



71a: R¹ = OBn, R² = H

71b: R¹ = *p*-NO₂-C₆H₄, R² = H

71c: R¹ = Me, R² = H

71d: R¹ = OBn, R² = Me

72a: R¹ = OBn, R² = H

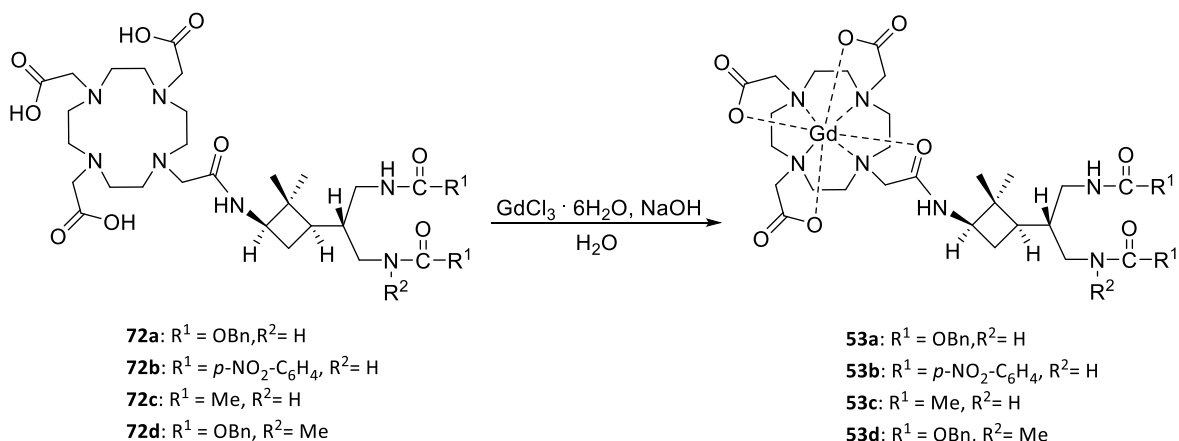
72b: R¹ = *p*-NO₂-C₆H₄, R² = H

72c: R¹ = Me, R² = H

72d: R¹ = OBn, R² = Me

Se disuelven los compuestos **71a-d**, respectivamente, en DCM anhidro. A cada mezcla de reacción se le adicionan 200 equivalentes de TFA y 3 equivalentes de Et₃SiH. La reacción se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el disolvente se evapora bajo presión reducida y el exceso de TFA se elimina por liofilización. El crudo obtenido se disuelve en MeOH. Los productos se aíslan por precipitación con la adición de gotas de Et₂O frío. Los sólidos se filtran y se lavan varias veces con Et₂O. Los respectivos triácidos-DOTA-ciclobutano se secan bajo presión reducida.

METODOLOGÍA



Los ácidos-DOTA-ciclobutano **72a-d** previamente sintetizados, se disuelven en agua y posteriormente se adicionan 0.9 eq. de GdCl₃·6H₂O. Entonces el pH se ajusta a 6.5 con NaOH 0.1 M y la mezcla de la reacción se deja en agitación a temperatura ambiente hasta completar la complejación. El progreso de la reacción se monitorea usando el test naranja de xilenol (por medio del cual se puede detectar Gd⁺³ libre). Una vez finalizada la reacción, el agua residual se elimina en el liofilizador.

El crudo del complejo **53a** se purifica utilizando cromatografía en fase reversa, usando una mezcla 1:1 H₂O:AcCN como eluentes, obteniendo el complejo **53a** en forma de sólido blanco con rdto. del 38%. El complejo **53b** (rdto. cuantitativo) fue lavado con pequeñas porciones de agua desionizada. El crudo del complejo **53c** se purifica utilizando cromatografía en fase reversa, usando una mezcla 1:1 H₂O:AcCN como eluentes, obteniendo el complejo **53c** en forma de sólido blanco con rdto. del 71% y el complejo **53d** (96% rdto.) fue lavado con pequeñas porciones de agua desionizada. Los complejos no pueden ser confirmados por ¹H RMN debido a la naturaleza paramagnética del Gd (III), sin embargo sí que se confirmaron mediante HRMS (ESI-QTOF).

Datos espectroscópicos de **53a**:

HRMS (ESI-QTOF) calculado para C₄₁H₅₆GdN₇NaO₁₁ [M+Na]⁺ 1003.318; Experimental: 1003.318.

Distribución isotópica para **53a**: calculada. 999.314 (6.2%), 1000.316 (44.6%), 1001.315 (78.4%), 1002.317 (77.5%), 1003.318 (100.0%), 1004.321 (41.3%), 1005.320 (72.5%),

METODOLOGÍA

1006.323 (31.7%), 1007.327 (8.6%), 1008.330 (1.7%); Experimental: 999.299 (9.8%), 1000.316 (45.6%), 1001.317 (79.8%), 1002.318 (80.7%), 1003.318 (100.0%), 1004.320 (40.7%), 1005.321 (71.5%), 1006.324 (32.6%), 1007.322 (9.4%), 1008.315 (2.6%).

Datos espectroscópicos de 53b:

HRMS (ESI-QTOF) calculado para $C_{39}H_{50}GdN_9NaO_{13}$ $[M+Na]^+$: 1033.267; Experimental: 1033.267.

Distribución isotópica para **53b**: calculada. 1029.263 (6.3%), 1030.265 (44.9%), 1031.264 (78.4%), 1032.266 (77.2%), 1033.267 (100.0%), 1034.270 (40.5%), 1035.269 (72.8%), 1036.272 (31.1%), 1037.275 (8.5%), 1038.279 (1.8%); Experimental: 1030.267 (50.0%), 1031.265 (79.6%), 1032.266 (79.3%), 1033.267 (100.0%), 1034.270 (42.6%), 1035.269 (70.0%), 1036.268 (32.4%), 1037.269 (11.6%), 1038.263 (3.0%).

Datos espectroscópicos de 53c:

HRMS (ESI-QTOF) calculado para $C_{29}H_{48}GdN_7NaO_9$ $[M+Na]^+$: 819.265; Experimental: 819.263.

Distribución isotópica para **53c**: calculada. 815.261 (6.8%), 816.263 (48.5%), 817.263 (80.5%), 818.264 (74.7%), 819.265 (100.0%), 820.268 (31.6%), 821.268 (74.9%), 822.271 (24.8%), 823.274 (5.4%); Experimental: 815.257 (7.3%), 816.261 (47.2%), 817.261 (84.2%), 818.263 (76.4%), 819.263 (100.0%), 820.266 (31.8%), 821.265 (70.1%), 822.267 (21.6%), 823.581 (7.0%).

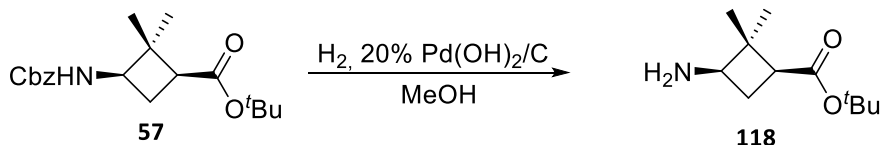
Datos espectroscópicos de 53d:

HRMS (ESI-QTOF) calculado para $C_{42}H_{58}GdN_7NaO_{11}$ $[M+Na]^+$: 1017.334; Experimental: 1017.336.

Distribución isotópica para **53d**: calculada. 1013.330 (6.2%), 1014.331 (44.3%), 1015.331 (78.2%), 1016.333 (77.7%), 1017.334 (100.0%), 1018.336 (42.0%), 1019.336 (72.3%), 1020.339 (32.2%), 1021.342 (8.9%), 1022.346 (1.8%); Encontrada: 1013.321 (5.1%), 1014.332 (44.1%), 1015.334 (74.8%), 1016.336 (77.4%), 1017.336 (100.0%), 1018.338 (48.7%), 1019.338 (63%), 1020.341 (32.2%), 1021.345 (10.9%), 1022.456 (3%).

METODOLOGÍA

(1S,3R)-3-Amino-2,2-dimetilciclobutano-1-carboxilato de *tert*-butilo **118**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelve el compuesto **57** (0.35 g, 1.05 mmol) en 10 mL de MeOH y se deja en agitación constante durante 18 horas, a temperatura ambiente, bajo 5 atmosferas de hidrógeno, en presencia de 35 mg de Pd(OH)₂/C. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se filtra sobre Celite® y se lava con abundante metanol (2 x 40 mL). El solvente se elimina a presión reducida y se obtienen 0.20 g (1 mmol, 96% rdto.) del compuesto **118** en forma de aceite incoloro. El compuesto obtenido se utiliza en la siguiente etapa sin purificación.

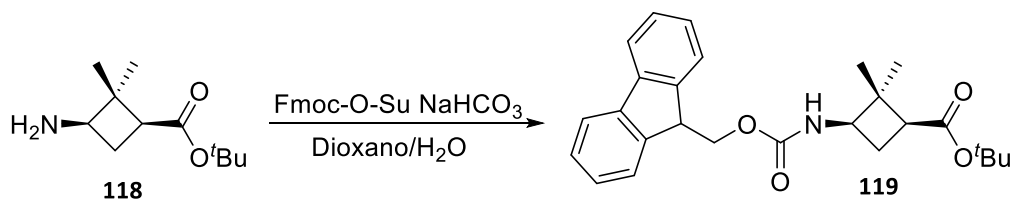
Datos espectroscópicos para el compuesto **118**:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.08 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.24 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.42 (s, 9 H, ^tBu), 1.95-2.34 (a.c., 2H, CH₂), 2.46 (m, 1H, CH), 3.21 (m, 1H, CH), 5.76 (s.a., 2H, NH).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Gorrea, E.; Carbajo, D.; Gutiérrez-Abad, R.; Illa, O.; Branchadell, V.; Royo, M.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (20), 4050.

(1S,3R)-3-((9H-Fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)-2,2-dimetilciclobutano-1-carboxilato de *tert*-butilo, **119**:



METODOLOGÍA

En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 195 mg (0.98 mmol) de la amina **118** en 16 mL de una mezcla agua-dioxano (1:1) a 0°C. Posteriormente se adiciona Fmoc-O-Su (330 mg, 0.98 mmol, 1.0 eq.) y NaHCO₃ (164 mg, 1.95 mmol, 2.0 eq.). Se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente. El crudo de la reacción se diluye con una solución de NH₄Cl saturada y se extrae con DCM. La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene un aceite incoloro el cual se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil hexano-AcOEt 2:1. Se obtienen 297 mg (0.70 mmol, 72% rdto.) de **119**, en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos para el compuesto **119**:

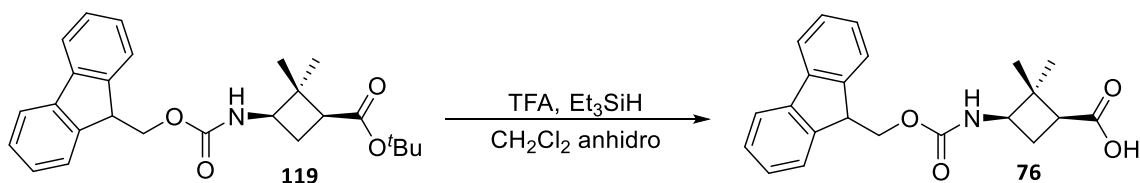
¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 0.96 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.31 (s, 3H, *cis*-CH₃), 1.48 (s, 9H, ^tBu), 2.06-2.25 (m, 1H, H_{4a}), 2.25-2.38 (m, 1H, H₁), 2.45-2.60 (m, 1H, H_{4b}), 3.83-3.97 (m, 1H, H₃), 4.01-4.30 (m, 1H, H₁₀), 4.36-4.61 (a.c., 2H, CH₂), 5.07 (s.a., 1H, NH), 7.28-7.77 (a.c., 8H, H_{Ar}).

¹³C RMN (62.5 MHz, CDCl₃) δ 16.8 (*trans*-CH₃), 26.3 (C₄), 28.3 (C(CH₃)₃), 28.9 (*cis*-CH₃), 43.8 (C₃), 46.0 (C₂), 47.3 (C₁₀), 51.5 (C₁) 66.6 (C₉), 80.5 (C(CH₃)₃), 120.0, 125.09, 127.0, 127.7 (8C_{Ar}), 141.3, 143.9, 144.0 (4C, C₁₁₋₁₄), 156.0 (CO_{carbamato}), 172.0 (CO_{éster}).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Gorrea, E.; Carbajo, D.; Gutiérrez-Abad, R.; Illa, O.; Branchadell, V.; Royo, M.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (20), 4050.

Ácido (1*S*,3*R*)-3-(((9H-fluoren-9-il)metoxi)carbonil)amino)-2,2-dimetilciclobutano -1-carboxílico, **76**:



METODOLOGÍA

En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 299 mg del producto **119** (0.71 mmol), 0.7 mL de TFA (9.22 mmol, 13 eq.) y 0.3 mL de Et₃SiH (1.77 mmol, 2.5 eq.) en DCM anhidro (8 mL). Se deja en agitación durante 8 horas, a temperatura ambiente. El disolvente se evapora a presión reducida y el exceso de TFA se elimina en el liofilizador. Se realizan lavados con hexano (3 x 10 mL) para eliminar el exceso de Et₃SiH obteniendo 207 mg (0.56 mmol, 80% rdto.) del ácido **76**, en forma de sólido blanco.

Datos espectroscópicos para el compuesto **76**:

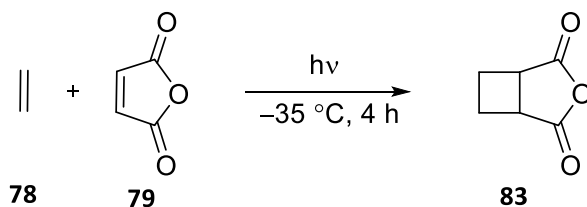
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 0.99 (s, 3H, *trans*-CH₃), 1.34 (s, 3H, *cis*-CH₃), 2.08 (m, 1H, H_{4a}), 2.16-2.30 (m, 1H, H_{4b}), 2.60-2.70 (m, 1H, H₁), 3.88-4.01 (m, 1H, H₃), 4.20-4.26 (m, 1H, H_{2'}), 4.38-4.48 (m, 2H, H_{1'}), 4.82 (d, J_{H,H} = 8.9 Hz, 1H, NH), 7.30-7.81 (a.c., 8H, H_{Ar}).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 16.7 (*trans*-CH₃), 26.2 (*cis*-CH₃), 28.7 (C₄), 42.7 (C₂), 46.3 (C₉), 47.2 (C₃), 51.4 (C₁), 66.6 (C₈), 119.9, (C₁₁), 124.9, 127.0, 127.6 (8C_{Ar}), 141.3, 143.8, (4C, C₁₀₋₁₃), 155.8 (CO_{carbamato}), 172.5 (CO_{ácido}).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Gorrea, E.; Carbajo, D.; Gutiérrez-Abad, R.; Illa, O.; Branchadell, V.; Royo, M.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (20), 4050.

3-oxabicyclo[3.2.0]heptano-2,4-diona, **83**:



En un reactor fotoquímico se disuelve 1.0 g, (10.19 mmol) de anhídrido maleico **79** en 250 mL de acetona. Esta solución se enfría con agitación constante hasta -40 °C utilizando un sistema de refrigeración C40P Thermo Scientific™. Entonces se conecta el reactor a un flujo de etileno **78** hasta que la solución se satura completamente. Una vez el sistema está saturado, la solución se irradia con una lámpara de mercurio de 400

METODOLOGÍA

W durante 1 hora. El sistema se recarga con etileno 4 veces (la reacción se monitorea por ^1H RMN). Terminada la reacción se elimina el disolvente a presión reducida y se obtiene el compuesto **83** (1.25 g, 9.91 mmol, rdto. cuantitativo) puro en forma de sólido blanco.

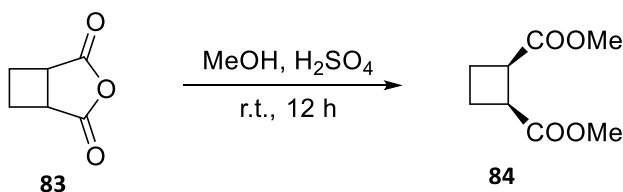
Datos espectroscópicos para el compuesto **83**:

^1H RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 2.35 (a.c., 2H, H_{3a} , H_{4a}), 2.74 (a.c., 2H, H_{3b} , H_{4b}), 3.52 (a.c., 2H, H_1 , H_2).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Tufariello, J. J.; Milowsky, A. S.; Al-Nuri. M.; Goldstein. S. *Tetrahedron: Lett.* **1987**, *28*, 267-270.

(1*R*,2*S*)-Ciclobutan-1,2-dicarboxilato de dimetilo, **84**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelve 1 g (7.93 mmol) del compuesto **83** en 25 mL de MeOH. Se adiciona 0.5 mL de H_2SO_4 concentrado. Se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se elimina el disolvente bajo presión reducida. El crudo de reacción se disuelve en 30 mL de AcOEt y se lava con una solución acuosa saturada de NaHCO_3 (3 x 50 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto obtenido se destila a 150 °C obteniendo 1.20 g del producto **84** (6.97 mmol, 88% rdto.).

Datos espectroscópicos para el compuesto **84**:

^1H RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 2.13-2.26 (a.c., 2H, H_{3a} , H_{4a}), 2.28-2.45 (a.c., 2H, H_{3b} , H_{4b}), 3.35-3.45 (a.c., 2H, H_1 , H_2), 3.68 (s, 6H, CH_3).

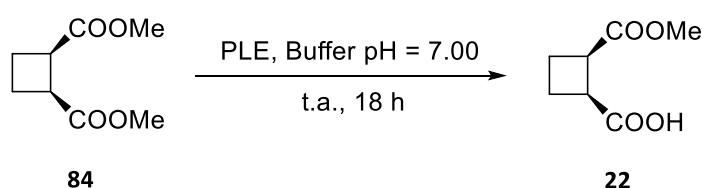
METODOLOGÍA

^{13}C RMN (62.5 MHz, CDCl_3): δ 21.98 (CH_2), 40.43 (CH), 51.64 (CH_3), 173.57 ($\text{C}=\text{O}$).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Torres, E.; Gorrea, E.; Burusco, K. K.; Da Silva, E.; Nolis, P.; Rúa, F.; Boussert, S.; Díez-Pérez, I.; Dannenberg, S.; Izquierdo, S.; Giralt, E.; Jaime, C.; Branchadell, V.; Ortuño, R. *M. Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (3), 564–575.

Ácido (1S,2R)-2-(metoxicarbonil)ciclobutan-1-carboxílico, 22:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética se disuelve 1 g (5.81 mmol) del diéster **84** en 70 mL de una solución buffer (KH_2PO_4 a pH 7). Se adicionan 28 mg de ésterasa de hígado de cerdo (PLE). La reacción se lleva a pH 7.5 por la adición de NaOH 1 M. Se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la mezcla se lleva a pH 2 por adición de HCl 2 M. La fase acuosa ácida se extrae con AcOEt (4 x 150 mL). La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene 0.87 g del hemi-éster **22** (5.50 mmol, 95% rdt.) en forma de aceite.

Datos espectroscópicos para el compuesto 22:

^1H RMN (250 MHz, CDCl_3) δ 2.16-2.32 (a.c. 2H, H_{3a} , H_{4b}), 2.32-2.47 (a.c., 2H, H_{3b} , H_{4a}), 3.38-3.49 (a.c., 2H, H_1 , H_2), 3.70 (s, 3H, CH_3).

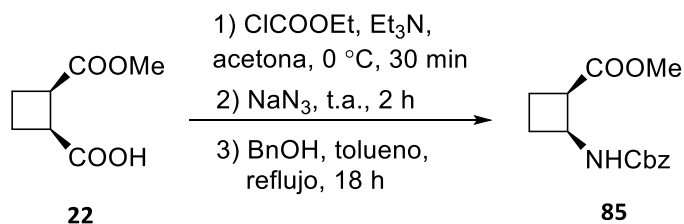
^{13}C NMR (62.5 MHz, CDCl_3) δ 21.9 y 22.1 (C_3 , C_4), 40.5 (C_2 , C_1 , C_2), 51.9 (CH_3), 173.9 ($\text{CO}_{\text{éster}}$), 179.4 ($\text{CO}_{\text{ácido}}$).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Sabbioni, G.; Jones, J. B. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (20), 4565–4570.

METODOLOGÍA

(1*R*,2*S*)-2-(Benciloxycarbonilamino)ciclobutano-1-carboxilato de metilo, **85**:



A una solución fría del ácido **22** (1 g, 6.32 mmol, 1 eq.) en acetona anhidra (20 mL) se le adicionan 1.2 mL de Et₃N (8.22 mmol, 1.3 eq) y 0.78 mL cloroformiato de etilo (8.22 mmol, 1.3 eq). Esta solución se agita durante 30 minutos a 0 °C. Pasado este tiempo se adiciona la azida de sodio (1.0 g, 15.81 mmol, 2.5 eq) en 10 mL de agua y se deja en agitación durante 2 horas, a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrae con DCM (4 x 20 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, para obtener 1.12 g la acil azida como compuesto intermedio.

Nota: Este producto debe ser manipulado con cuidado debido a su naturaleza explosiva. No se debe llevar a sequedad.

Posteriormente, una solución de la acil azida (1.12 g, 6.11 mmol, 1 eq.) y alcohol bencílico (1.33 mL, 12.84 mmol, 2.1 eq.) en tolueno anhidro (50 mL) se lleva a reflujo por 18 horas bajo atmosfera de nitrógeno. Pasado este tiempo el tolueno se evapora a presión reducida y el exceso de alcohol bencílico se elimina por destilación al vacío. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil AcOEt: hexano 1:3. Se obtienen 1.06 g (4.02 mmol, 66% rdto.) del carbamato de bencilo **85** en forma de aceite amarillo.

Datos espectroscópicos para el compuesto **85**:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.90-2.05 (a.c., 2H, H_{3a}, H_{4a}), 2.15-2.46 (a.c., 2H, H_{3b}, H_{4b}), 3.36-3.45 (m, 1H, H₁), 3.66 (s, 3H, CH₃), 4.54 (q, J_{H,H} = 8.5 Hz, 1H, H₂), 5.08 (s, 2H, CH₂ bencil), 5.65 (s.a., 1H, NHCbz), 7.28-7.42 (a.c., 5H, H_{Ar}).

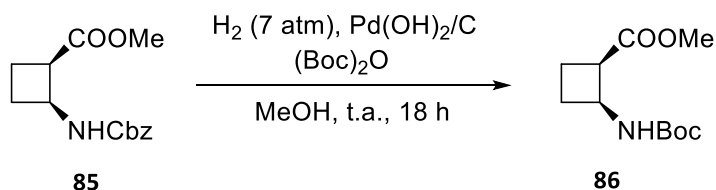
METODOLOGÍA

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Martín-Vilà, M.; Muray, E.; Aguado, G.P.; Alvarez-Larena, A.; Branchadell, V.; Minguillón, C.; Giral, E.; Ortuño, R.M. *Tetrahedron*: **2000**, *11*, 3569–3584.

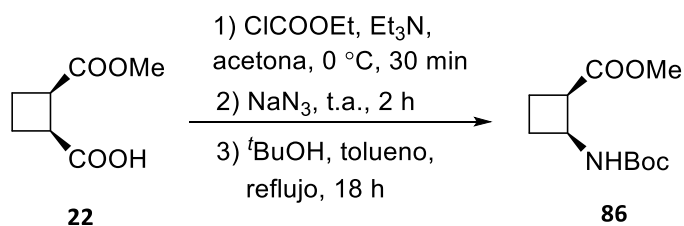
(1*R*,2*S*)-2-(*tert*-Butoxicarbonilamino)ciclobutan-1-carboxilato de metilo, **86:**

Método A:



En un recipiente de hidrogenación provisto de agitación magnética se disuelven 484 mg (1.84 mmol) del producto **85** en 15 mL de MeOH. Se adicionan 0.6 mL de Boc₂O (2.76 mmol, 1.5 eq.) y 50 mg de Pd(OH)₂/C. Se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente, bajo 5 atmosferas de presión de hidrógeno. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se filtra sobre Celite® y se lava con abundante MeOH (2 x 20 mL). Se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil hexano: AcOEt 4:1. Se obtienen 340 mg (1.48 mmol, 81% rdto.) del producto **86**, en forma de un aceite incoloro.

Método B:



METODOLOGÍA

A una solución fría del ácido **22** (1 g, 6.32 mmol, 1 eq.) en acetona anhidra (20 mL) se le adiciona, 1.14 mL de Et₃N (8.22 mmol, 1.3 eq.) y 0.78 mL del cloroformiato de etilo (8.22 mmol, 1.3 eq.). Esta solución se agita durante 30 minutos a 0 °C. Pasado este tiempo se adiciona la azida de sodio (1.03 g, 15.81 mmol, 2.5 eq.) en 10 mL de agua y se deja en agitación durante 2 horas, a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrae con DCM (4 x 15 mL), la fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, para obtener la acil azida como compuesto intermedio (1.10 g, 6.00 mmol, 95% rdto.).

Nota: Este producto debe ser manipulado con cuidado debido a su naturaleza explosiva. No se debe llevar a sequedad.

Posteriormente, una solución de 1.10 g de acil azida en 50 mL *terc*-butanol (526.2 mmol) se lleva a reflujo durante 18 horas bajo atmosfera de nitrógeno. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se lleva a temperatura ambiente. Se adicionan 20 mL de AcOEt y se lava con una solución acuosa de NaHCO₃ (3 x 30 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil AcOEt: hexano 1:4. Se obtienen 0.58 g (2.53 mmol, 42% rdto.) del compuesto **86** en forma de aceite incoloro.

Datos espectroscópicos para el compuesto **86**:

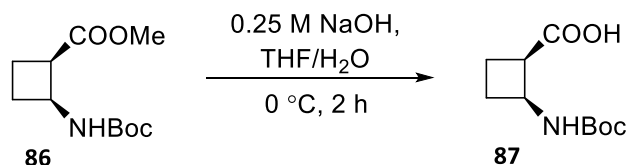
¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.90-2.07 (a.c., 2H, H_{3a}, H_{4a}), 2.14-2.46 (a.c., 2H, H_{3b}, H_{4b}), 3.34-3.48 (m, 1H, H₁), 3.73 (s, 3H, CH₃), 4.38-4.59 (m, 1H, H₂), 5.36 (s.a., 1H, NH).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Izquierdo, S.; Rúa, F.; Sbai, A.; Parella, T.; Álvarez-Larena, Á.; Branchadell, V.; Ortuño, R. *M. J. Org. Chem.* **2005**, *70* (20), 7963–7971.

METODOLOGÍA

Ácido (1*R*,2*S*)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)ciclobutano-1-carboxílico, **87**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 0.65 g del compuesto **86** (2.83 mmol) en 45 mL de una mezcla THF/H₂O (1:10) y se adicionan 28 mL de NaOH 0.25 M (7.09 mmol, 2.5 eq). Esta reacción se deja evolucionar a 0 °C durante 3 horas. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se lava con DCM y la fase acuosa se lleva a pH 2 por adición de HCl 4M. La fase acuosa se extrae con DCM y el solvente se elimina bajo presión reducida obteniéndose 0.50 g de **87** (2.32 mmol, 82% rdto.).

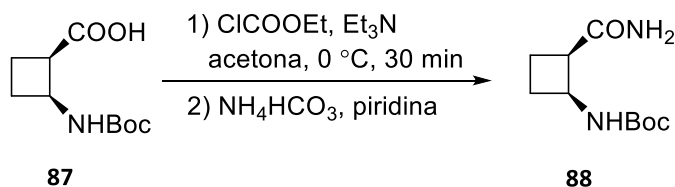
Datos espectroscópicos para el compuesto **87**:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.45 (s, 9H, ^tBu), 1.68-1.76 (m, 1H, H_{4a}), 2.00-2.08 (m, 1H, H_{3a}), 2.16-2.45 (a.c., 2H, H_{3b}, H_{4b}), 3.34-3.48 (m, 1H, H₁), 4.36-4.57 (m, 1H, H₂).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Izquierdo, S.; Rúa, F.; Sbai, A.; Parella, T.; Álvarez-Larena, Á.; Branchadell, V.; Ortuño, R. *M. J. Org. Chem.* **2005**, *70* (20), 7963–7971.

(1*S*,2*R*)-2-Carbamoilciclobutilcarbamato de *tert*-butilo, **88**:



A una solución fría del ácido **87** (0.73 g, 3.39 mmol, 1 eq.) en acetona anhidra (20 mL) se adicionan 0.6 mL de Et₃N (4.07 mmol, 1.2 eq.) y 0.4 mL cloroformiato de etilo (4.07 mmol, 1.2 eq.). Esta solución se agita durante 30 minutos a 0 °C. Pasado este tiempo se adicionan 0.80 g de NH₄HCO₃ (10.17 mmol, 3 eq.) y 0.82 mL de piridina (10.17 mmol, 3

METODOLOGÍA

eq.). Se deja en agitación durante 2 horas, a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se extrae con AcOEt (4 x 20 mL) y la fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil hexano: AcOEt 2:3. Se obtienen 0.58 g (2.71 mmol, 80% rdto.) del producto **88**, en forma de un sólido blanco.

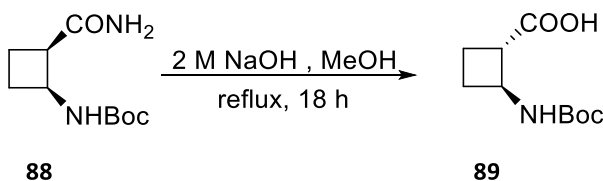
Datos espectroscópicos para el compuesto **88**:

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (s, 9H, ^tBu), 1.83-2.41 (a.c., 4H, H_{3a}, H_{3b}, H_{4a}, H_{4b}), 3.49 (m, 1H, H₁), 4.41 (m, 1H, H₂), 5.33 (s.a., 2H, NH₂), 5.53 (s.a., 1H, NH).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Fernandes, C.; Pereira, E.; Faure, S.; Aitken, D. J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (8), 3217–3220.

Ácido (1*S*,2*S*)-2-(*terc*-butoxicarbonilamino)ciclobutano-1-carboxílico, **89**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 0.47 g del compuesto **88** (2.19 mmol, 1 eq.) en 40 mL de MeOH y se adicionan 11 mL de una solución acuosa de NaOH 2 M (21.93 mmol, 10 eq.). Esta mezcla de reacción se lleva a reflujo durante 18 horas. Pasado este tiempo, se elimina el MeOH bajo presión reducida y la fase acuosa se lleva a pH 2 por la adición de HCl 4 M. La fase acuosa se extrae con AcOEt (3 x 50 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El ácido **89** obtenido (0.38 g, 1.76 mmol, 80% rdto.) se utiliza en la siguiente etapa sin purificación.

Datos espectroscópicos para el compuesto **89**:

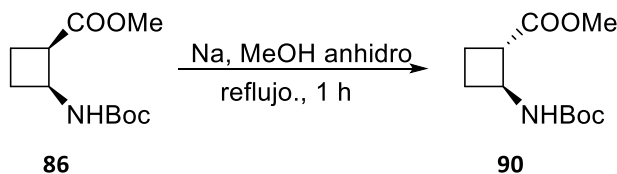
¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.88-2.22 (a.c., 4H, H_{3a}, H_{3b}, H_{4a}, H_{4b}), 3.10 (m, 1H, H₁), 4.14 (m, 1H, H₂), 6.28 (s.a., 1H, NH).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Fernandes, C.; Pereira, E.; Faure, S.; Aitken, D. J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (8), 3217–3220.

METODOLOGÍA

(1*S*,2*S*)-2-(*tert*-Butoxicarbonilamino)ciclobutano-1-carboxilato de metilo, **90**:



En un matraz de fondo redondo de dos bocas provisto de agitación magnética y refrigerante de reflujo se disuelven 0.30 g (1.30 mmols) del producto **86** en 82 mL de MeOH anhidro. El sistema debe estar seco y bajo atmosfera de nitrógeno. A continuación se adiciona 0.18 g (7.85 mmols, 6 eq.) de sodio metálico. Una vez disuelto el sodio, el sistema se lleva a reflujo durante 1 hora.

Pasado este tiempo, la solución se lleva a 0 °C durante 30 min y posteriormente se adicionan 25 mL de HCl 1 M. Se elimina el disolvente bajo presión reducida sin calentar el baño y se realizan extracciones con AcOEt (4 x 40 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil hexano-AcOEt 3:1. Se obtienen 0.16 g (0.70 mmols, 53% rdt.) de **90** en forma de sólido blanco.

Datos espectroscópicos para el compuesto **90**:

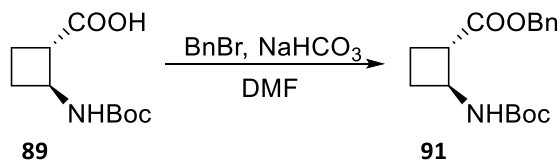
¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.45 (2, 9H, ^tBu), 1.98-2.25 (a.c., 3H, H_{3b}, H_{4a}, H_{4b}), 2.30-2.47 (a.c., 1H, H_{3a}), 2.97-3.24 (m., 1H, H₁), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.20-4.25 (m, 1H, H₂), 5.10 (s.a., 1H, NH).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Torres, E.; Gorrea, E.; Da Silva, E.; Nolis, P.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Org. Lett.* **2009**, *11* (11), 2301–2304.

METODOLOGÍA

(1*S*,2*S*)-2-(*tert*-Butoxicarbonilamino)ciclobutano-1-carboxilato de bencilo, **91**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 200 mg del ácido **89** (0.93 mmol, 1 eq.) en 12 mL de DMF. Se adicionan 0.16 g de NaHCO₃ (1.86 mmol, 2 eq.) y 121 μ L de BnBr (1.02 mmol, 1.1 eq.). Se deja en agitación durante 48 h, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, la solución se diluye con 30 mL de AcOEt y 30 mL de H₂O. La fase orgánica se separa y la fase acuosa se extrae con AcOEt (2 x 30 mL). La fase orgánica se lava con H₂O (2 x 20 mL) y se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil hexano: AcOEt 2:1. Se obtienen 273 mg (0.89 mmol, 96% rdto.) del producto **91**, en forma de un sólido blanco.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **91**:

$[\alpha]_D$: +39.0 ($c = 0.77$, DCM)

Punto de fusión: 50-52 °C (AcOEt)

IR (ATR) 3367 (NH), 2980 (CH), 1720 (CO_{carbamato} + CO_{éster}), 1524 cm⁻¹.

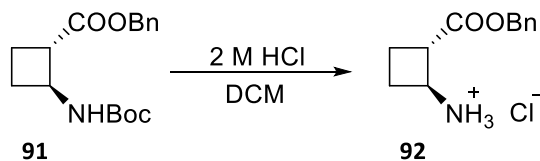
¹H RMN (360 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (s, 9H, ^tBu), 1.81-2.05 (a.c., 2H, H_{3a}, H_{4a}), 2.21-2.37 (a.c., 2H, H_{3b}, H_{4b}), 2.93-3.21 (m, 1H, H₁), 4.44-4.70 (m, 1H, H₂), 4.92-5.15 (m, 2H, CH₂Ph), 7.31-7.43 (a.c., 5H, H_{Ar}).

¹³C RMN (90 MHz, CDCl₃) δ 22.9 (C₄), 28.3 (C(CH₃)₃), 30.6 (C₃), 44.5 (C₁), 57.6 (C₂), 66.7 (CH₂Ph), 79.7 (C(CH₃)₃), 103.2, 128.3, 135.7 (6C, C_{Ar}), 156.7 (CO_{carbamato}), 172.3 (CO₂Bn).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₁₇H₂₃NNaO₄ [M+Na]⁺ 328.1627; Experimental: 328.1631.

METODOLOGÍA

Hidrocloruro de (1*S*,2*S*)-2-(benciloxycarbonil)ciclobutano-1-amina, **92**:

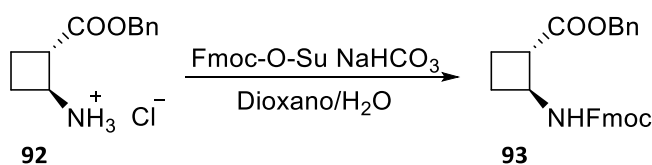


En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 0.7 g del producto **91** (2.29 mmol) en 24 mL de HCl 2 M (48.14 mmol, 21 eq.). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 18 horas. El disolvente y el exceso de HCl se eliminan a presión reducida. La amina **92** (0.54 g, 2.23 mmol, rdt. cuantitativo) se utiliza en la siguiente etapa sin previa purificación.

Datos espectroscópicos para el compuesto **92**:

$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 2.18-2.39 (a.c., 2H, H_{3a} , H_{4a}), 2.42-2.63 (a.c., 2H, H_{3b} , H_{4b}), 3.43-3.60 (a.c., 1H, H_1), 4.13-4.31 (m, 1H, H_2), 5.12-5.33 (m, 2H, CH_2Ph), 7.30-7.43 (a.c., 5H, H_{Ar}), 8.75 (s.a., 3H, NH_3^+).

(1*S*,2*S*)-2-((9*H*-Fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)ciclobutano-1-carboxilato de bencilo, **93**:



0.47 g (1.94 mmol) de la amina **92** se disuelven en 35 mL de una mezcla agua-dioxano (1:1) a 0°C. Posteriormente se adiciona Fmoc-O-Su (0.65 g, 1.94 mmol, 1.0 eq.) y NaHCO_3 (0.33 g, 3.88 mmol, 2.0 eq.). La mezcla resultante se deja en reacción durante 18 horas, a temperatura ambiente. Una vez pasado este tiempo, se evapora el disolvente y el crudo de la reacción se diluye con una solución de NH_4Cl saturada. Se extrae con DCM. La fase orgánica se seca con MgSO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene un aceite incoloro que se purifica mediante

METODOLOGÍA

cromatografía en columna utilizando como fase móvil DCM-MeOH 10:1. Se obtienen 0.35 g (0.81 mmol, 42% rdto.) de **93**.

Datos espectroscópicos y constantes físicas para el compuesto **93**:

$[\alpha]_D$: +28.0 ($c = 0.58$, MeOH)

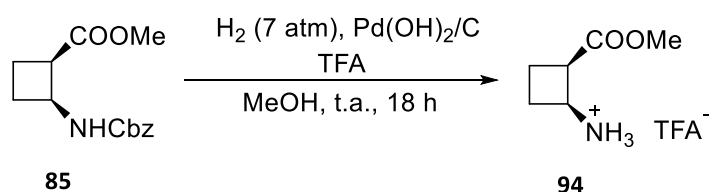
IR (ATR) 3340 (NH), 3062 (CH_{Ar}), 2960 (CH), 1720 ($\text{CO}_{\text{carbamato}} + \text{CO}_{\text{éster}}$), 1524, 1451, 1367, 1340 cm^{-1} .

$^1\text{H RMN}$ (360 MHz, CDCl_3) δ 1.86-2.10 (a.c., 3H, H_{4a} , H_{3a} , H_{3b}), 2.15-2.37 (a.c., 1H, H_{4b}), 3.03-3.22 (m, 1H, H_1), 4.16-4.25 (m, 1H, H_2), 4.27-4.45 (a.c., 2H, $\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$), 4.94-5.23 (m, 3H, NH, CH_2Ph), 7.31-7.37 (a.c., 5H, $\text{H}_{\text{Ar Bn}}$), 7.39-7.83 (a.c., 8H, $\text{H}_{\text{Ar Fmoc}}$).

$^{13}\text{C RMN}$ (90 MHz, CDCl_3) δ 22.9 (C_4), 30.6 (C_3), 44.5 (C_1), 47.37 (C_{Fmoc}), 57.6 (C_2), 66.7 (CH_2Ph), 67.9 ($\text{CH}_2_{\text{Fmoc}}$), 121.1, 125.5, 126.4, 127.1 (8C_{Ar}), 128.0, 128.3, 128.4 (6C , C_{Ar}), 135.8, 141.2, 143.6 (4C , C_{Fmoc}), 160.3 ($\text{CO}_{\text{carbamato}}$), 172.3 (CO_2Ph).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{NNaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 450.1681; Experimental: 450.1685.

2,2,2-Trifluoroacetato de (1S,2R)-2-metoxicarbonilciclobutano-1-amonio, **94**:



En un recipiente de hidrogenación provisto de agitación magnética se disuelven 0.25 g (0.95 mmol) del producto **85** en 15 mL de MeOH. Posteriormente se adicionan 73 μL de TFA (0.95 mmol, 1 eq.) y 25 mg de $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$. Se deja en agitación durante 18 horas, a temperatura ambiente, bajo 5 atmosferas de hidrógeno. Pasado este tiempo, el crudo de reacción se filtra sobre Celite® y se lava con abundante MeOH (2 x 20 mL). El disolvente y el exceso de TFA se eliminan bajo presión reducida. Se obtienen 0.21 g

METODOLOGÍA

(0.92 mmol, rdto. cuantitativo) del producto **94**, en forma de un aceite incoloro, el cual se utiliza en la siguiente etapa sin purificación.

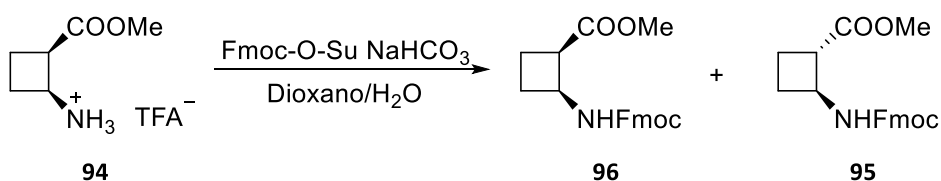
Datos espectroscópicos para el compuesto **94**:

$^1\text{H RMN}$ (250 MHz, CDCl_3) δ 2.18-2.29 (a.c., 1H, H_{3a}), 2.32-2.50 (a.c., 3H, H_{3b} , H_{4a} , H_{4b}), 3.43-3.50 (m., 1H, H_1), 3.78 (s, 3H, CH_3), 4.13-4.28 (m, 1H, H_2), 7.75 (s.a., 3H, NH_3^+).

Los datos espectroscópicos concuerdan con los descritos previamente en:

Martín-Vilà, M.; Muray, E.; Aguado, G.; Alvarez-Larena, A.; Branchadell, V.; Minguillón, C.; Giraltd, E.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11, 3569–3584.

(1R,2S)-2-((9H-Fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)ciclobutan-1-carboxilato de metilo, 96 y (1S,2S)-2-((9H-fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)ciclobutan-1-carboxilato de metilo, 95:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 300 mg (1.31 mmol) de la amina **94** en 20 mL de una mezcla agua-dioxano (1:1) a 0°C. Posteriormente se adicionan 0.33 g de NaHCO₃ (3.94 mmol, 3.0 eq.), controlando el pH entre 8-9 y 0.44 g de Fmoc-O-Su (1.31 mmol, 1.0 eq.). La mezcla resultante se deja en reacción durante 4 horas a 0 °C. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente. El crudo de la reacción se diluye en 50 mL de AcOEt y se realizan lavados con una solución de HCl 0.1 M y una solución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtiene un aceite incoloro el cual se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil hexano-AcOEt 2:1. Se obtienen 115 mg (0.31 mmol, 25% rdto.) de **96** y 165 mg (0.47 mmol, 36% rdto.) de **95**, en forma de sólido blanco.

METODOLOGÍA

Datos espectroscópicos para el compuesto 96:

$[\alpha]_D$: -25.1 ($c = 1.3$, MeOH)

Punto de fusión: 85-87 °C (MeOH)

IR (ATR) 3338 (NH), 2953 (CH_{Ar}), 2960 (CH), 1692 (CO_{carbamato} + CO_{éster}), 1535 cm⁻¹.

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.96-2.11 (a.c., 2H, H_{4a}, H_{3a}), 2.27-2.49 (a.c., 2H, H_{3b}, H_{4b}), 3.36-3.50 (m, 1H, H₁), 3.73 (s, 3H, CH₃), 4.14-4.29 (m, 1H, H₂), 4.32-4.47 (a.c., 2H, CH_{2Fmoc}), 4.52-4.68 (m, 1H, CH_{Fmoc}), 5.66-5.82 (a.c., 1H, NH), 7.31-7.85 (a.c., 8H, H_{Ar} Fmoc).

¹³C RMN (90 MHz, CDCl₃) δ 19.1 (C₄), 30.1 (C₃), 45.5 (C₁), 46.5 (CH_{Fmoc}), 47.6 (CH₃), 52.2 (C₂), 67.3, 67.9 (CH_{2Fmoc}), 120.3, 125.4, 127.4, 128.0 (8C_{Ar}), 141.6, 144.3 (4C, C_{Fmoc}), 155.7 (CO_{carbamato}), 172.2 (CO₂CH₃).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₂₇H₂₅NNaO₄ [M+Na]⁺ 374.1363; Experimental: 374.1357.

Datos espectroscópicos para el compuesto 95:

$[\alpha]_D$: +5.1 ($c = 1.1$, MeOH)

Punto de fusión: 152-154 °C (MeOH)

IR (ATR) 3338 (NH), 2953 (CH_{Ar}), 2960 (CH), 1685 (CO_{carbamato} + CO_{éster}), 1535.

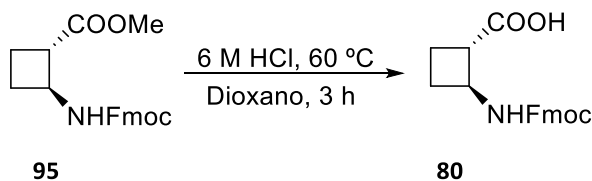
¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.85-2.09 (a.c., 3H, H_{4a}, H_{3a}, H_{3b}), 2.18-2.35 (a.c., 1H, H_{4b}), 3.02-3.19 (m, 1H, H₁), 3.71 (s, 3H, CH₃), 4.14-4.36 (m, 2H, H₂, CH_{Fmoc}), 4.37-4.50 (a.c., 2H, CH_{2Fmoc}), 4.97-5.13 (a.c., 1H, NH), 7.30-7.83 (a.c., 8H, H_{Ar} Fmoc).

¹³C RMN (90 MHz, CDCl₃) δ 17.5 (C₄), 30.6 (C₃), 45.5 (C₁), 46.2 (CH_{Fmoc}), 47.57 (OCH₃), 51.0 (C₂), 51.5 (CH_{2Fmoc}), 128.2, 131.2 (8C_{Ar}), 141.6, 144.3 (4C, C_{Fmoc}), 155.7 (CO_{carbamato}), 177.6 (CO₂CH₃).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₂₇H₂₅NNaO₄ [M+Na]⁺ 374.1363; Experimental: 374.1358.

METODOLOGÍA

Ácido (1S,2S)-2-((9H-fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)ciclobutan-1-carboxílico, **80**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 0.22 g del producto **95** (0.63 mmol) en 13 mL de dioxano y se adicionan 13 mL de HCl 6 M (78 mmol, 124 eq.). La mezcla se calienta a 60 °C y se mantiene en agitación constante durante 3 horas. Pasado este tiempo se elimina el disolvente a presión reducida y el exceso de HCl se elimina en el liofilizador. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil hexano-AcOEt- CH₃COOH 2:1:0.1. Se obtienen 0.15 g (0.44 mmol, 71% rdto.) de **80** en forma de sólido blanco.

Datos espectroscópicos para el compuesto **80**:

$[\alpha]_D$: +11.9 ($c = 0.9$, MeOH)

Punto de fusión: 113-115 °C (MeOH)

IR (ATR) 3329 (NH), 2953 (CH), 1685 (CO_{carbamato} + CO_{ácido}), 1535, 1535, 1261 cm⁻¹.

¹H RMN (250 MHz, CDCl₃) δ 1.74-1.98 (m, 1H, H_{4a}), 2.07-2.39 (a.c., 3H, H_{3a}, H_{4b}, H_{4b}), 2.98-3.22 (m, 1H, H₁), 4.06-4.31 (m, 2H, H₂, H_{2'}), 4.50-4.54 (d, ³J_{H-H} = 5.9 Hz, 2H, H_{1'}), 5.19 (s.a., 1H, NH), 7.40 (dt, ²J_{H-H} = 23.8, ³J'_{H-H} = 7.4 Hz, 4H, H_{5',6'Ar Fmoc}), 7.60 (d, ²J_{H-H} = 7.3 Hz, 2H, H_{4'Ar Fmoc}), 7.80 (d, ²J_{H-H} = 7.4 Hz, 2H, H_{7'Ar Fmoc}).

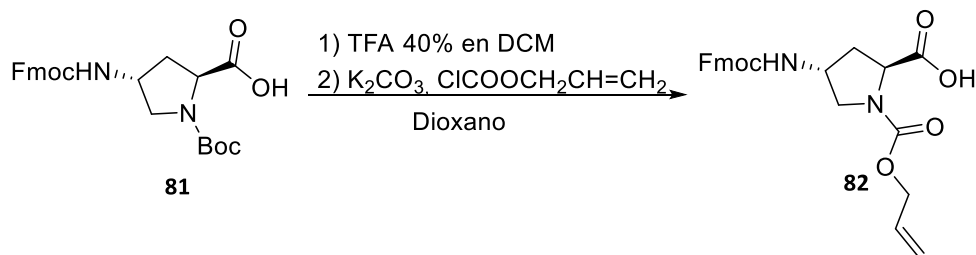
¹³C RMN (90 MHz, CDCl₃) δ 18.6 (C₄), 24.7 (C₃), 46.8 (C₁), 48.9 (C_{2'}), 52.2 (C₂), 67.2 (C_{1'}), 119.8, 120.1 (C_{4'}), 124.7 (2C, C_{5'}), 126.9, 127.1 (C_{7'}), 127.6, 128.2 (C_{6'}), 141.1 (2C, C_{8'}), 143.2 (2C, C_{3'}), 156.7 (CO_{carbamato}), 174.8 (CO_{ácido}).

Espectro de masas de alta resolución: Calculado para C₂₀H₁₉NNaO₄ [M+Na]⁺ 360.1206;

Experimental: 360.1207

METODOLOGÍA

Ácido (2*S*,4*R*)-4-((9*H*-fluoren-9-il)metoxicarbonilamino)-1-(aliloxicarbonil) pirrolidina-2-carboxílico, **82**:

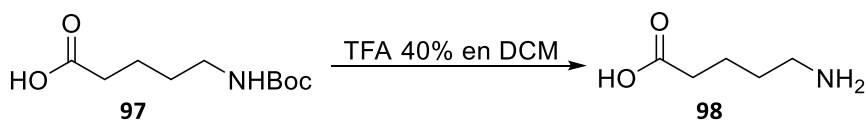


En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 2.11 g (4.68 mmol) del ácido (2*S*,4*R*)-Fmoc-4-amino-1-Boc-pirrolidina-2-carboxílico **81** en 50 mL de TFA 40% en DCM. Se deja en agitación durante 30 minutos, a temperatura ambiente. El exceso de residuos volátiles se evaporan a presión reducida (coevaporaciones con 2 x 10 mL DCM y 1 x 10 mL Et₂O). Se obtiene 1.54 g del producto la amina libre (4.37 mmol, rdto. cuantitativo). El compuesto es caracterizado por **RP-HPLC** (como se indica en la sección 7.8.7.). La pureza se determina a una $\lambda = 260$ nm: 94%. Tiempo de retención = 2.12 min. ***m/z* (ESI)**: MS Calcd para C₂₀H₂₀N₂O₄ [M+H]⁺: 353.14; Experimental: 353.01 MS Calcd para C₂₀H₂₀N₂O₄ [(M*2)+1]⁺: 705.28; Experimental: 705.20.

Posteriormente, en un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 1.9 g (5.39 mmol) de la amina libre previamente sintetizada en 22 mL de dioxano. Una vez disuelto el compuesto se adicionan 56 mL de una solución acuosa de K₂CO₃ al 25% y 0.71 mL de cloroformiato de alilo (6.65 mmol, 1.2 eq.). Se deja en agitación durante 2 horas, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el crudo de la reacción se extrae con AcOEt y la fase acuosa se acidifica con HCl 2 M hasta pH 2 y se extrae nuevamente con AcOEt (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtienen 2.42 g del compuesto **82**, (5.54 mmol, 95% rdto.). El compuesto es caracterizado por **RP-HPLC** (como se indica en la sección 7.8.7.). La pureza se determina a una $\lambda = 260$ nm: 96%. Tiempo de retención = 3.17 min. ***m/z* (ESI)**: MS Calcd para C₂₄H₂₄N₂O₆ [M+H]⁺: 437.16; Experimental: 437.11 MS. Calcd para C₂₄H₂₄N₂O₆ [(M*2)+1]⁺: 873.32; Experimental: 873.21.

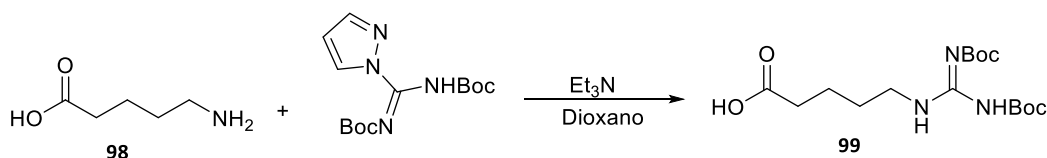
Ácido 5-aminopentanoico, **98**:

METODOLOGÍA



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 2.53 g (11.64 mmol) del ácido Boc-5-aminopentanoico **97** en 60 mL de TFA 40% en DCM. Se deja en agitación durante 30 minutos, a temperatura ambiente. El exceso de residuos volátiles se elimina a presión reducida (coevaporaciones con 2 x 10 mL DCM y 2 x 10 mL Et₂O). Se obtienen 1.26 g del producto **98** (10.75 mmol, rdto. cuantitativo), en forma de sólido blanco. El producto obtenido se utiliza en la siguiente reacción sin purificación previa. El compuesto es caracterizado por **RP-HPLC** (como se indica en la sección 7.8.7.). Tiempo de retención = 2.50 min. *m/z* (ESI): MS Calcd para C₅H₁₁NO₂ [M+H]⁺: 118.08; Experimental: 118.08 MS.

Ácido (*E*)-5-(2,3-bis(*tert*-butoxicarbonil)guanidino)pentanoico, **99**:



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética, se disuelven 1.26 g de ácido 5-aminopentanoico **98** (10.75 mmol, 1 eq.) en 5 mL de dioxano, a esta solución se adicionan 3.34 g (10.75 mmol, 1 eq) de *N,N'*-Bis(*tert*-butoxicarbonil)-1H-pirazol-1-carboxamidina. Se deja en agitación durante 5 minutos, bajo atmosfera de argón. Pasados 5 minutos, se adicionan gota a gota 1.8 mL de Et₃N (12.90 mmol, 1.2 eq.). Se deja en agitación durante 2 horas, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, el exceso de residuos volátiles se evapora a presión reducida. El crudo de reacción se disuelve en 10 mL de DCM y esta fase orgánica se lava con agua destilada (4 x 20 mL). La fase orgánica se seca con MgSO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtienen 3.48 g del compuesto **99** en forma de un sólido blanco (9.68 mmol, 90% rdto.). El compuesto es caracterizado por **RP-HPLC** (como se indica en la sección 8.8.7.). La pureza se determina a una $\lambda = 220$ nm: 77%. Tiempo de retención = 3.28 min. *m/z* (ESI): MS Calcd para C₁₆H₂₉N₃O₆ [M+H]⁺: 360.21; Experimental: 360.27.

7.8 Síntesis en fase sólida (SFS)

Se sintetizó el péptido Tat₄₈₋₅₇ (**Figura 99**) como péptido de referencia, debido a su alta capacidad de atravesar la membrana celular y dos familias peptídicas ciclobutano – prolina, como se muestra a continuación.

1. Péptidos híbridos de γ,γ -ciclobutano-prolina de 6, 8, 10 y 12 unidades con y sin carboxifluoresceina (**serie 1**).
2. Péptidos híbridos de β,γ -ciclobutano-prolina de 8, 10 y 12 unidades con y sin carboxifluoresceina (**serie 2**).

Todos los péptidos se sintetizan manualmente, utilizando síntesis en fase solida (SFS) con jeringas de polipropileno que contienen un filtro de polietileno poroso (**Figura 95**). Las reacciones se llevan a cabo a temperatura ambiente y con agitación constante. Los acoplamientos se controlan con el test de ninhidrina (aminas primarias) y el test de cloranilo (aminas secundarias); en el caso de acoplamientos incompletos, se lleva a cabo un doble acoplamiento. La preparación de éstos test se encuentra descrita en la sección 7.8.5. La eliminación de los excesos de reactivos, disolventes y posibles subproductos se realiza por medio de filtración al vacío. La resina se lava repetidamente con DMF y DCM utilizando 10 mL de solvente por gramo de resina, después de cada reacción.



Figura 95. Montaje para síntesis en fase solida (SFS).

METODOLOGÍA

7.8.1 Síntesis de péptidos híbridos de γ,γ -ciclobutano-prolina (serie 1):

Se utiliza la resina *p*-metilbenzhidrilamina (MBHA) con una funcionalización de 0.63 mmol/g, previamente acondicionada mediante lavados sucesivos con DCM, TFA/DCM (4:5, v/v), DIPEA/DCM (4:5, v/v), DMF y DCM. La síntesis de los péptidos de la **serie 1** (**Esquema 56**), se realiza mediante la estrategia Fmoc/Boc. El protocolo general para la síntesis se muestra en la **Tabla 12** indicando la función del tratamiento, número de ciclos y tiempo en minutos en cada ciclo. Así como el número de equivalentes en el acoplamiento y la concentración utilizada en la desprotección.

Tabla 12. Protocolo general para la síntesis en fase sólida de los péptidos γ,γ -ciclobutano-prolina, mediante la estrategia Fmoc/Boc.

Etapa	Reactivos / Disolventes	Función	Ciclos	t/ciclo (min)
1	DCM	Lavado	5	1
2	DMF	Lavado	5	1
3	(2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-Fmoc-amino-prolina/DIC/HOBt (3:3:3) en DMF	Acoplamiento	1	120
4	DMF	Lavado	5	1
5	DCM	Lavado	5	1
6	DMF	Lavado	5	1
7	Pipe/DMF (2:8, v/v)	Desprotección	3	10
8	DMF	Lavado	5	1
9	DCM	Lavado	5	1
10	DMF	Lavado	5	1
11	(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-Fmoc-amino-cicloBu/HOBt/PyBOP/DIPEA (3:3:3:6) en DMF	Acoplamiento	1	120
12	DMF	Lavado	5	1

Las etapas de la 1 a la 12 se repiten el número de veces (n) correspondientes a la longitud del péptido, n = 3, 4, 5 y 6 para el hexámero, octámero, decámero y dodecámero respectivamente. Cada vez que se obtiene el péptido deseado, se retira 200 mg de resina y se continúa con la elongación de la cadena.

Una vez sintetizado el esqueleto peptídico del hexámero, octámero, decámero y dodecámero, se continúa con la derivatización de la función α -amino. Primero se eliminan los grupos Boc por medio de una acidólisis y se continúa con la incorporación de la cadena lateral utilizando el ácido Boc-5-aminopentanoico y HOBt como agente de acoplamiento, una vez se ha introducido la cadena lateral se eliminan los grupos Boc y

METODOLOGÍA

se someten a una reacción de guanidilación, para finalmente eliminar el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF. (**Tabla 13**)

Tabla 13. Protocolo general para la derivatización de la función α -amino en fase sólida.

Etapa	Reactivos / Disolventes	Función	Ciclos	t/ciclo (min)
1	DCM	Lavado	5	1
2	TFA 40% en DCM	Desprotección	1	5
3	DCM	Lavado	5	1
4	DIPEA/DCM (1:9, v/v)	Neutralización	3	3
5	DCM	Lavado	5	1
6	DMF	Lavado	5	1
7	Ácido Boc-5-aminopentanoico/DIC/HOBt (3:3:3) por cada prolina.	Acoplamiento	1	120
8	DMF	Lavado	5	1
9	DCM	Lavado	5	1
10	TFA 40% en DCM	Desprotección	1	5
11	DCM	Lavado	5	1
12	DIPEA/DCM (1:9, v/v)	Neutralización	3	3
13	DCM	Lavado	5	1
14	DMF	Lavado	5	1
15	Ag. Guani/DIPEA (5:10) en DCM por cada prolina.	Guanidilación	1	60
16	DCM	Lavado	5	1
17	DMF	Lavado	5	1
18	Pipe/DMF (2:8, v/v)	Desprotección	3	10
19	DMF	Lavado	5	1
20	DCM	Lavado	5	1
21	DMF	Lavado	5	1

Una vez sintetizados los péptidos con la longitud deseada, la resina obtenida para cada péptido se divide en dos partes. La mitad (100 mg) quedan en forma de amina libre y con los 100 mg restantes se continúa la incorporación de la carboxifluoresceína (CF) (**Figura 96**) en el grupo amino N-terminal, como se indica en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Protocolo general para la incorporación de carboxifluoresceína (CF).

Etapa	Reactivos / Disolventes	Función	Ciclos	t/ciclo (min)
1	CF/HOBt/PyBOP/DIPEA (4:6:4:6) en DMF	Acoplamiento	1	120
2	TFA 40% en DCM	Desprotección	1	5
3	DCM	Lavado	5	1

METODOLOGÍA

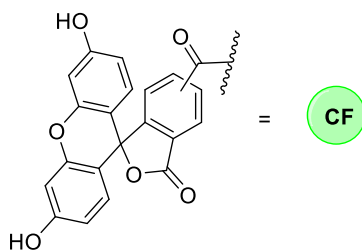
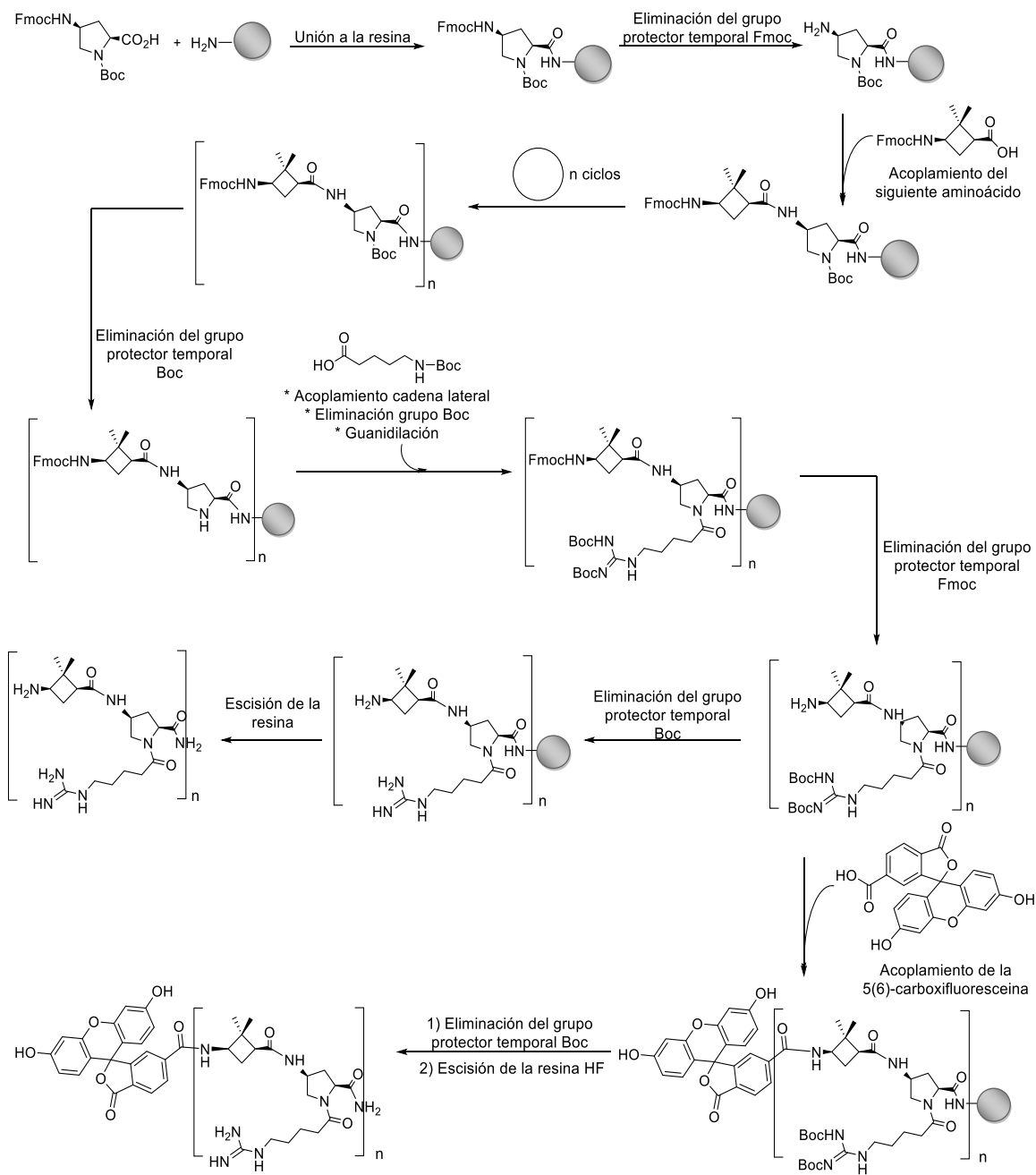


Figura 96. Estructura química 5(6)-carboxifluoresceína



Esquema 56. Diagrama de la SFS para los péptidos híbridos de γ,γ -ciclobutano-prolina

METODOLOGÍA

7.8.2 Síntesis de péptidos híbridos de β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2):

Se utiliza la resina aminometil-ChemMatrix® con una funcionalización de 0.74 mmol/g, previamente acondicionada mediante lavados sucesivos con DCM, TFA/DCM (4:5, v/v), DIPEA/DCM (4:5, v/v), DMF y DCM. Se verifica la presencia de aminas primarias y entonces se acopla el linker utilizando Fmoc-Rink amida-Linker/ OxymaPure®/DIC, 3:3:3 (excesos) en DMF durante 1 hora, este acoplamiento se verifica utilizando el test de ninhidrina. Se elimina el grupo Fmoc con piperidina al 20% en DMF (3 x 10 min) y se comprueba la presencia de aminas libres para continuar el acoplamiento.

La síntesis de los péptidos de la **serie 2 (Esquema 57)**, se realiza mediante la estrategia Fmoc/Alloc. El protocolo general para la síntesis se muestra a continuación indicando la función del tratamiento, número de ciclos y tiempo en minutos de cada ciclo.

Tabla 15. Protocolo general para la síntesis en fase sólida de los péptidos β,γ -ciclobutano-prolina mediante la estrategia Fmoc/Alloc.

Etapa	Reactivos / Disolventes	Función	Ciclos	t/ciclo min
1	DCM	Lavado	5	1
2	DMF	Lavado	5	1
3	(2S,4R)-Fmoc-amino-prolina/DIC/HOBt (3:3:3) en DMF	Acoplamiento	1	120
4	DMF	Lavado	5	1
5	DCM	Lavado	5	1
6	DMF	Lavado	5	1
7	Pipe/DMF (2:8, v/v)	Desprotección	3	10
8	DMF	Lavado	5	1
9	DCM	Lavado	5	1
10	DMF	Lavado	5	1
11	(1S,2S)-Fmoc-amino-cicloBu/HOBt/ PyBOP/DIPEA (3:3:3:6) en DMF	Acoplamiento	1	120
12	DMF	Lavado	5	1

Las etapas de la 1 a la 12 se repiten el número de veces (n) correspondientes a la longitud del péptido, n = 4, 5 y 6 para el octámero, decámero y dodecámero respectivamente. Cada vez que se obtiene el péptido deseado, se retira 200 mg de resina y se continúa con la elongación de la cadena.

METODOLOGÍA

Una vez sintetizado el esqueleto peptídico del octámero, decámero y dodecámero, se continúa con la derivatización de las funciones α -amino. (**Tabla 16**).

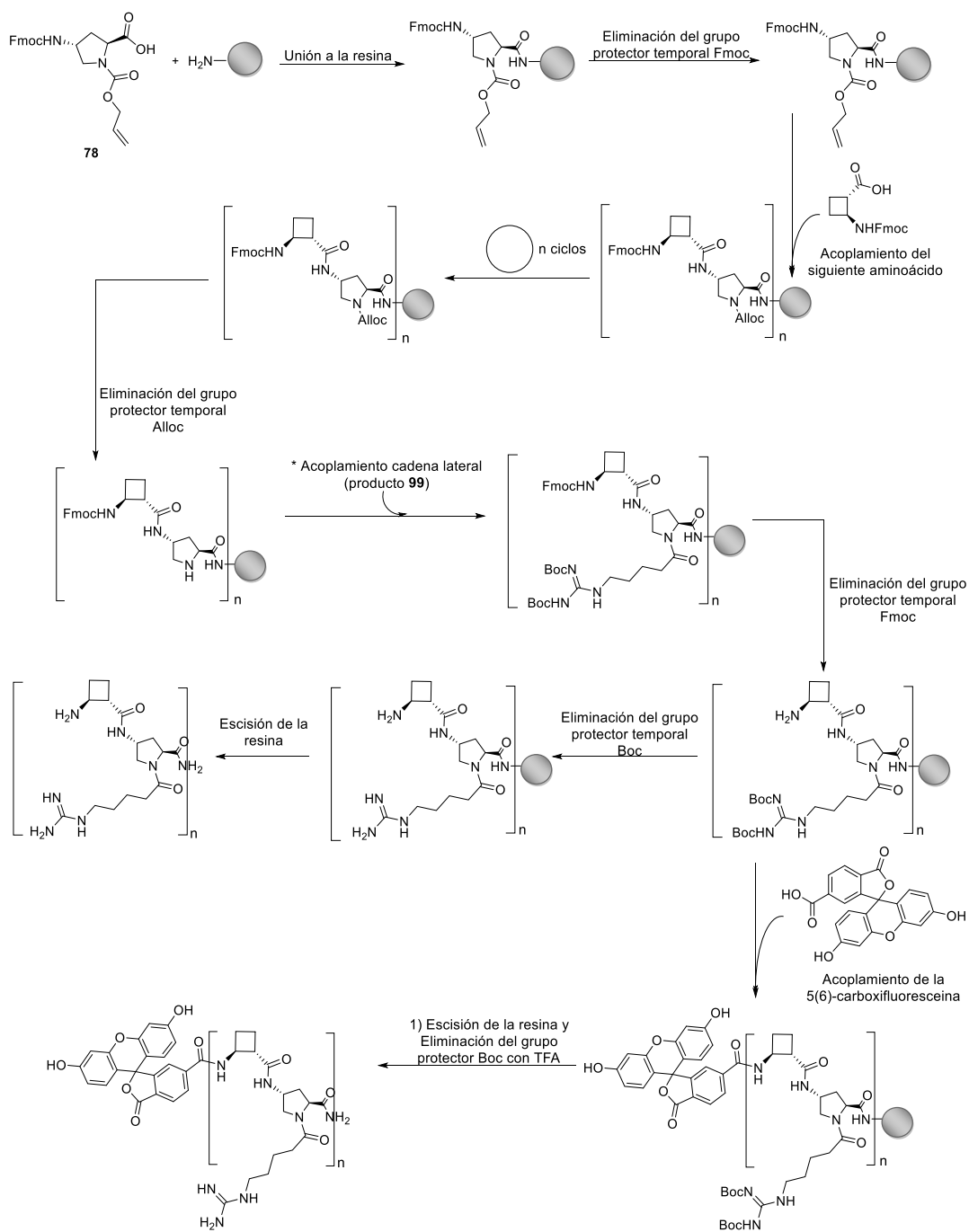
Primero se eliminan los grupos Alloc por medio de una reducción catalizada por paladio y se continúa con la incorporación de la cadena lateral guanidilada, la cual ha sido previamente sintetizada en solución (producto **99**) utilizando OxymaPure® como agente de acoplamiento y se elimina el grupo Fmoc.

Tabla 16. Protocolo general para la derivatización de la función α -amino en fase sólida.

Etapa	Reactivos / Disolventes	Función	Ciclos	t/ciclo (min)
1	DCM	Lavado	5	1
2	PhSiH ₃ /Pd(PPh ₃) ₄ (12:0.1) en DCM	Desprotección	2	15
5	DCM	Lavado	5	1
6	DMF	Lavado	5	1
7	(Et) ₂ NCSSNa · 3H ₂ O (20mM en DMF)	Lavado de Pd	5	1
8	DMF	Lavado	5	1
9	Producto 99 /DIC/OxymaPure® (5:5:5) por cada prolina	Acoplamiento	1	120
10	DMF	Lavado	5	1
11	DCM	Lavado	5	1
12	DMF	Lavado	5	1
13	Pipe/DMF (2:8, v/v)	Desprotección	3	10
14	DMF	Lavado	5	1
15	DCM	Lavado	5	1
16	DMF	Lavado	5	1

Una vez sintetizados los péptidos con la longitud deseada, la resina obtenida para cada péptido se divide en dos partes. La mitad (100 mg) quedan en forma de amina libre y con los 100 mg restantes se procede a la incorporación de carboxifluoresceína (CF) en el grupo amino N-terminal, como se describe en la **Tabla 14**.

METODOLOGÍA



Esquema 5797. Diagrama de la SFS para los péptidos híbridos de β,γ -ciclobutano-prolina

7.8.3 Síntesis de Tat_{48-57} y Tat_{48-57} -CF

El péptido Tat_{48-57} con y sin CF (**Figura 99**), se sintetiza en fase sólida en presencia de los grupos protectores Fmoc/Boc/Pbf/Trt y utilizando la resina H-Rink amida

METODOLOGÍA

ChemMatrix® con una funcionalización de 0.49 mmol/g, previamente acondicionada mediante lavados sucesivos con DMF y DCM.

Se utilizan los aminoácidos protegidos en su función N^{α} amino con el grupo Fmoc y las cadenas laterales protegidas como se describe a continuación: la arginina (Arg, R) con 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf), la glutamina (Gln, Q) con trifenilmetilo (Trt), la lisina (Lys, K) con *terc*-butoxicarbonil (Boc) y la glicina (Gly, G) no necesita protección (**Figura 98**). El protocolo general para la síntesis se muestra a continuación indicando la función del tratamiento, número de ciclos y tiempo en minutos de cada ciclo (**Tabla 17**) y se describe en el **Esquema 58**.

Tabla 17. Protocolo general para la síntesis en fase sólida de Tat₄₈₋₅₇ y Tat₄₈₋₅₇CF

Etapa	Reactivos / Disolventes	Función	Ciclos	t/ciclo (min)
1	DCM	Lavado	5	1
2	DMF	Lavado	5	1
3	Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH(R)/OxymaPure®/DIC (3:3:3) en DMF	Acoplamiento	1	120
4	DMF	Lavado	5	1
5	DCM	Lavado	5	1
6	DMF	Lavado	5	1
7	Pipe/DMF (2:8, v/v)	Desprotección	3	10
8	DMF	Lavado	5	1
9	DCM	Lavado	5	1
10	DMF	Lavado	5	1
11	Fmoc-L-Gln(Trt)-OH(Q)/OxymaPure®/ DIC (3:3:3) en DMF	Acoplamiento	1	120
12	DMF	Lavado	5	1
13	Fmoc-L-Lys(Boc)-OH(K)/OxymaPure®/ DIC (3:3:3) en DMF	Acoplamiento	1	120
14	DMF	Lavado	5	1
15	Fmoc-Gly-OH(G)/OxymaPure®/ DIC (3:3:3) en DMF	Acoplamiento	1	120
16	DMF	Lavado	5	1

Secuencia: Etapas de la 1-8 (2 veces), 1-12 (1 vez), 5-10 (1 vez), 1-8 (1 vez), 1-10 (1 vez), 13-14 (1 vez), 5-10 (1 vez), 13-14 (1 vez), 5-10 (1 vez), 1-10 (1 vez), 15-16 (1 vez).

METODOLOGÍA

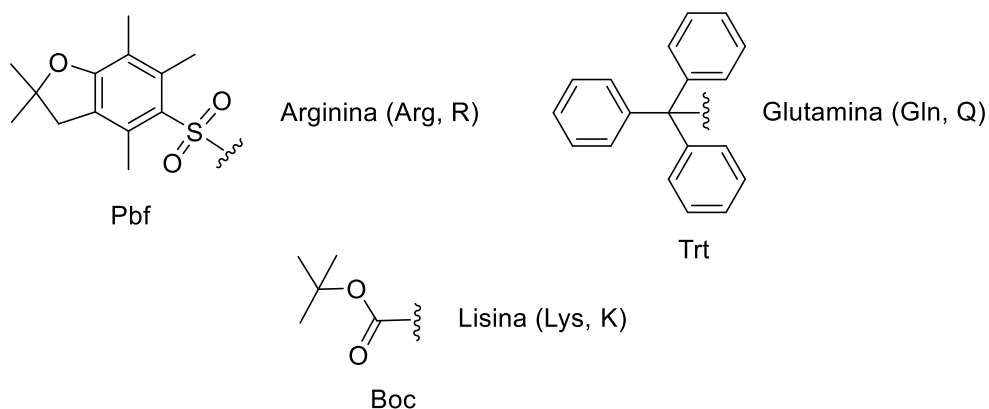


Figura 98. Grupos protectores de amino ácidos utilizados en la síntesis del Tat₄₈₋₅₇

Se divide en dos partes la resina obtenida. La mitad (100 mg) quedan en forma de amina libre y con los 100 mg restantes se procede a la incorporación de carboxifluoresceína (CF) en el grupo amino N-terminal, como se describe en la **Tabla 14**.

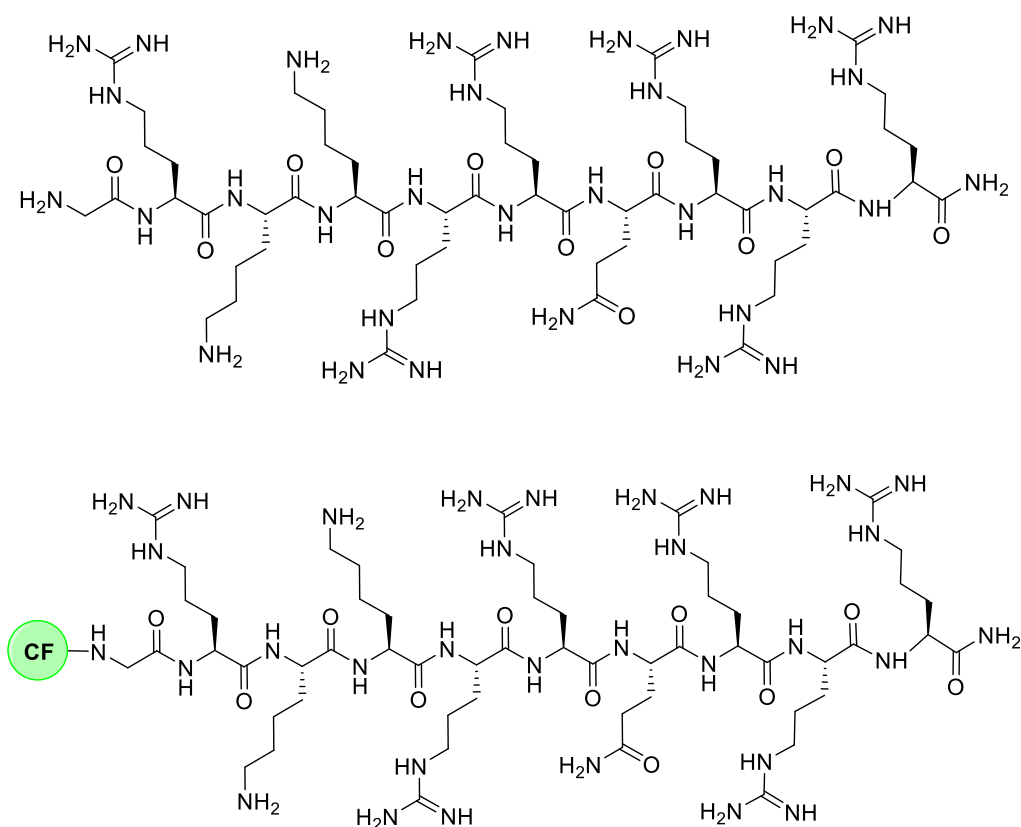
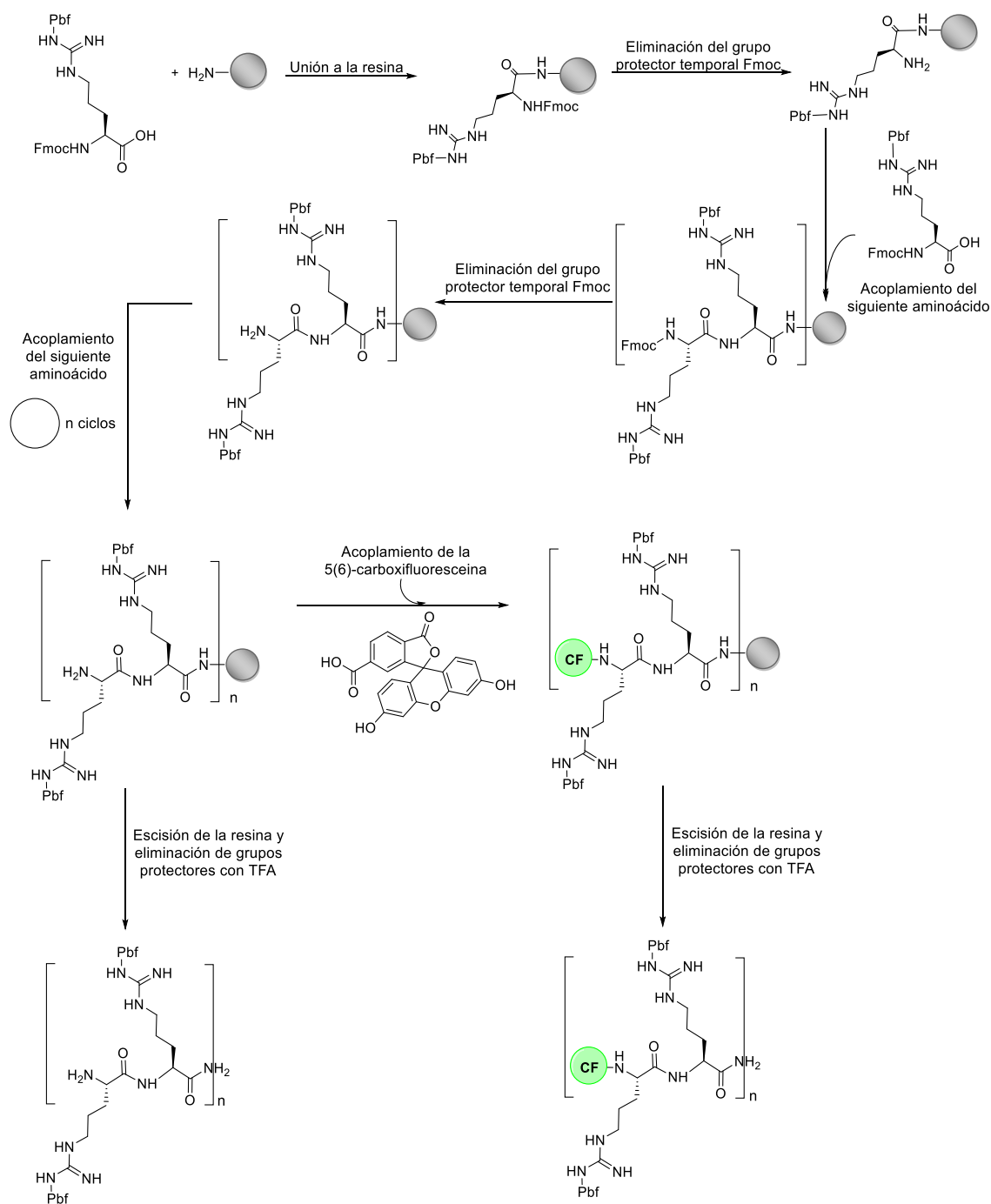


Figura 99. Estructura química de los péptidos Tat₄₈₋₅₇ y Tat₄₈₋₅₇-CF sintetizados en fase sólida.

METODOLOGÍA



Esquema 58. Diagrama de la SFS para el *Tat*₄₈₋₅₇ y *Tat*₄₈₋₅₇-CF

7.8.4 Escisión de los péptidos de la resina

❖ *Escisión de los péptidos de la resina MBHA: acidólisis con HF*

La escisión del péptido se realiza mediante hidrólisis ácida con HF, dentro de un sistema anhidro (Peptide Institute, Inc.).

La mezcla de peptidil-resina con anisol se lleva a 0 °C con N₂ líquido, una vez se obtiene la mezcla fría, se destila HF anhidro dentro del reactor de teflón hasta una proporción HF: anisol, 9:1 (v/v), esta mezcla se mantiene a 0 °C con agitación constante durante 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo el HF se elimina a presión reducida y el péptido liberado de la resina se precipita utilizando MTBE frío.

Para separar el péptido de la resina se realiza un proceso de filtración. El sólido (péptido + resina) se lava con una solución acuosa de ácido acético (9:1, v/v) (4x). Esta solución se recoge y se liofiliza para obtener los péptidos objetivos.

❖ *Escisión de los péptidos de la resina Rink amida aminometil ChemMatrix® y H-Rink amida ChemMatrix®*

La escisión del péptido se realiza mediante hidrólisis ácida utilizando una mezcla de TFA/TIS/H₂O (95:2.5:2.5) durante 3 horas con agitación constante.

Para separar el péptido de la resina se realiza un proceso de filtración. El sólido (péptido + resina) se lava con DCM (4x). La solución se recoge y el disolvente se evapora con cuidado de no llevar a sequedad. En el residuo obtenido se precipita el péptido libre por medio de la adición de Et₂O frío. El precipitado obtenido se lava 3 veces mediante el proceso de centrifugación y se descarta el sobrenadante. El sólido obtenido se disuelve en ACN:H₂O (1:1, v/v) y se liofiliza para obtener el crudo peptídico correspondiente.

7.8.5 Ensayos cualitativos utilizados en síntesis en fase sólida

❖ *Test cualitativo de Kaiser (ensayo de ninhidrina)*

Este ensayo se usa para la detección de aminas primarias. Se realiza tomando una alícuota de peptidil-resina (0.5-2.0 mg) en un tubo de vidrio a la cual se le adicionan 6 gotas del reactivo A y 2 gotas del reactivo B, a continuación se calienta en la estufa a 110 °C durante 3 minutos. Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas primarias en la resina (ensayo negativo), una coloración azul-verdosa indica la presencia de aminas primarias (ensayo positivo).

Reactivo A: Se prepara una disolución en caliente de fenol (40 g) en etanol absoluto (10 mL). Por otro lado, se añade 2 mL de una disolución de cianuro de potasio (55 mg) en agua (100 mL) sobre 100 mL de piridina. A ambas mezclas se les añade 4 g de resina Amberlite® MB-3 y se agita durante 45 minutos. Seguidamente se filtran y se mezclan las dos disoluciones.

Reactivo B: Se prepara una disolución de ninhidrina (2.5 g) en etanol (50 mL). Esta disolución se conserva en un recipiente cerrado protegida del contacto con la luz.

❖ *Test de cloranilo*

Este ensayo permite detectar la presencia de aminas secundarias. Fue usado para evaluar los acoplamiento sobre la función α -amino perteneciente al derivado de prolina. El reactivo que se utiliza es una disolución saturada de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranilo) en tolueno (0.75 mg en 25 mL). Para realizar el test se toma una alícuota de peptidil-resina (0.5-2.0 mg) y se añaden 6 gotas de cloranilo previamente disuelto en tolueno y 20 gotas de acetona. Se agita y se deja reaccionar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una coloración amarilla indica la ausencia de aminas secundarias en la resina (ensayo negativo) mientras que una coloración azulada o verdosa indica la presencia de aminas secundarias (ensayo positivo).

7.8.6 Purificación de los péptidos

Los crudos peptídicos se purifican en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución a escala semipreparativa acoplado a un espectrómetro de masas, utilizando una columna C₁₈ de fase reversa (RP-HPLC-MS semiprep).

La columna utilizada fue X-Bridge™ Prep BEH C₁₈ (19 x 100mm, 5 μM) y los compuestos se eluyen mediante el uso de un sistema de gradiente de los eluyentes A y B. El sistema de elución utilizado fue A: H₂O/TFA (99.9:0.1, v/v) y B: ACN/TFA (99.9:0.1, v/v) durante 15 minutos a un flujo de 25 mL/min. El gradiente utilizado varió en función del péptido a purificar.

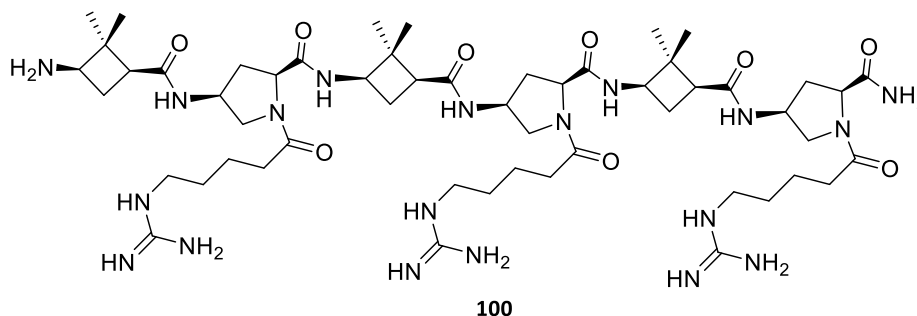
7.8.7 Caracterización de los péptidos

Los péptidos se analizan por RP-HPLC, RP-HPLC-MS y MALDI-TOF para determinar la pureza y sus respectivas masas.

RP-HPLC: Para el análisis y la determinación de los tiempos de retención (t_R) de todos los péptidos, se utiliza un gradiente lineal de 5% a 100% de B en 8 min en la columna XBrige™ BEH 130 C₁₈ (4.6 x 100 mm, 3.5 μm) a un flujo de 1 mL/min. El sistema de elución utilizado fue A: H₂O/TFA (99.95:0,045, v/v) y B: ACN/TFA (99.96:0,036, v/v). La pureza de los compuestos se determina a una $\lambda = 220$ nm.

7.8.8 Caracterización de los péptidos sintetizados en fase sólida:

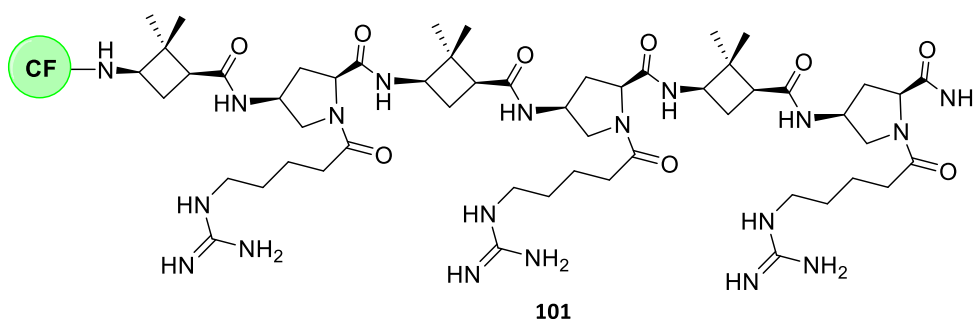
Hexapéptido γ,γ -ciclobutano-prolina, 100:



METODOLOGÍA

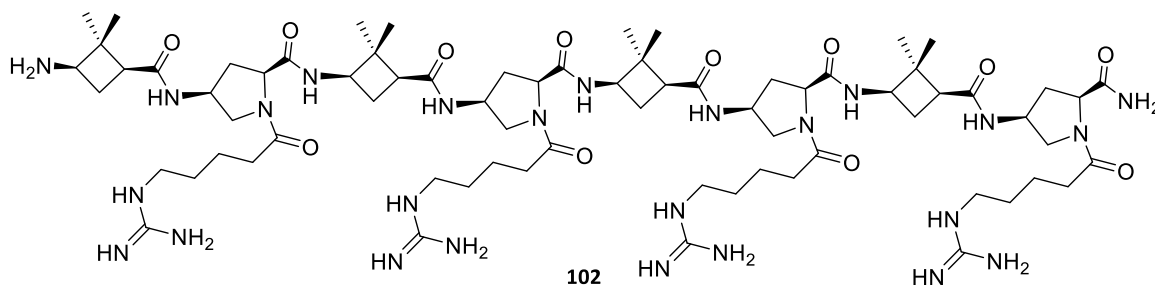
El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 7% de ACN/TFA por 1 min, se incrementa de 7 a 15 % en 2 min, después de 15 a 40% en 6 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 1 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **100** presenta una pureza mayor al 99% y un tiempo de retención de 4.2 min. **m/z (ESI)**: Ms Calcd para $C_{54}H_{93}N_{19}O_9$ $[M+2H/2]^{2+}$: 577.2; Experimental: 577.1. MS Calcd para $C_{54}H_{93}N_{19}O_9$ $[M+3H/3]^{3+}$: 385.1; Experimental: 385.0. **MALDI-TOF**: Ms calcd para $C_{54}H_{93}N_{19}O_9$ $[M+H]^+$: 1152.74; Experimental: 1152.82. Ms calcd para $C_{54}H_{93}N_{19}O_9$ $[M+Na]^+$: 1174.74; Experimental: 1174.72.

Hexapéptido CF- γ,γ -ciclobutano-prolina, **101**:



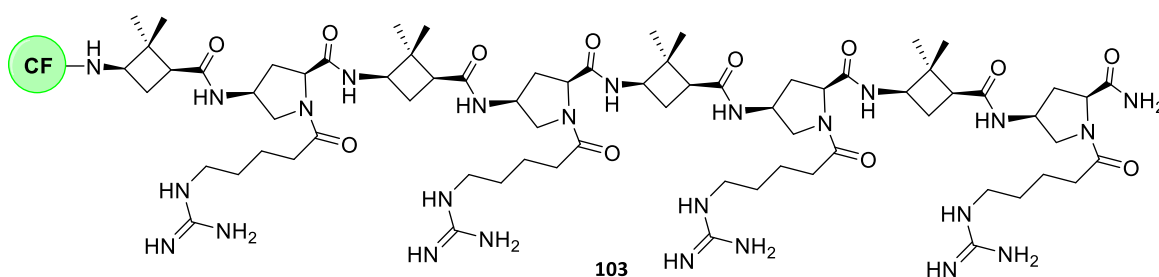
El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 7% de ACN/TFA por 1 min, se incrementa de 7 a 10 % en 2 min, después de 10 a 35% en 6 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido purificado se caracteriza por cromatografía líquida de alta resolución analítica (HPLC-analítico) y espectrometría de masas MALDI-TOF. El péptido **101** presenta una pureza mayor al 98% y un tiempo de retención de 4.8 min. **m/z (ESI)**: Ms Calcd para $C_{75}H_{103}N_{19}O_{15}$ $[M+2H/2]^{2+}$: 756.3; Experimental: 756.3. MS Calcd para $C_{75}H_{103}N_{19}O_{15}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 504.5; Experimental: 504.5. MS Calcd para $C_{75}H_{103}N_{19}O_{15}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 378.6; Experimental: 378.6. **MALDI-TOF**: Ms calcd para $C_{75}H_{103}N_{19}O_{15}$ $[M+H]^+$: 1510,78; Experimental: 1510.38. Ms calcd para $C_{75}H_{103}N_{19}O_{15}$ $[M+Na]^+$: 1533,77; Experimental: 1533.59.

Octapéptido γ,γ -ciclobutano-prolina, **102**:



El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 9 % de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 9 a 16 % en 6 min, después de 16 a 50% en 1 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **102** presenta una pureza mayor al 98% y un tiempo de retención de 4.5 min. ***m/z* (ESI)**: Ms Calcd para $C_{72}H_{123}N_{25}O_{12}$ $[M+2H/2]^{2+}$: 766.4; Experimental: 766.4. MS Calcd para $C_{72}H_{123}N_{25}O_{12}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 511.3; Experimental: 511.2. MS Calcd para $C_{72}H_{123}N_{25}O_{12}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 383.5; Experimental: 383.6. Ms Calcd para $C_{72}H_{123}N_{25}O_{12}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 307.0; Experimental: 307.1. **MALDI-TOF**: Ms calcd para $C_{72}H_{123}N_{25}O_{12}$ $[M+H]^+$: 1530,94; Experimental: 1531.22. Ms calcd para $C_{72}H_{123}N_{25}O_{12}$ $[M+Na]^+$: 1553,92; Experimental: 1553.20.

Octapéptido CF- γ,γ -ciclobutano-prolina, **103**:

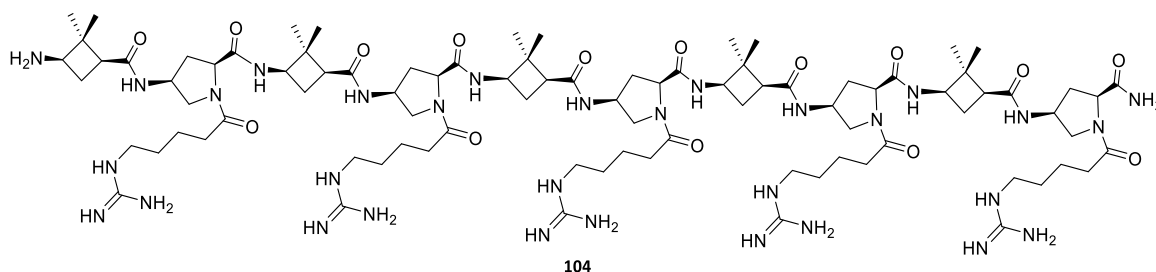


El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 9% de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 9 a 20% en 6 min, después de 20 a 40% en 1 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen

METODOLOGÍA

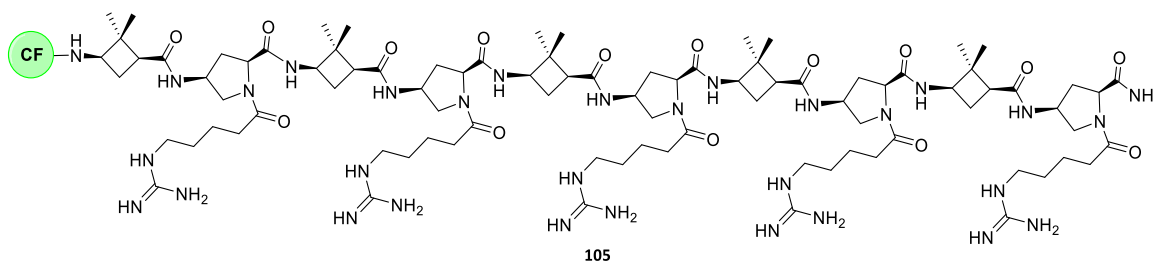
las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **103** presenta una pureza mayor al 97 % y un tiempo de retención de 4.6 min. **m/z (ESI)**: Ms Calcd para $C_{93}H_{133}N_{25}O_{18}$ $[M+2H/2]^{2+}$: 945.0; Experimental: 945.1. MS Calcd para $C_{93}H_{133}N_{25}O_{18}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 630.7; Experimental: 630.6. MS Calcd para $C_{93}H_{133}N_{25}O_{18}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 473.3; Experimental: 473.3. Ms Calcd para $C_{93}H_{133}N_{25}O_{18}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 378.8; Experimental: 378.9. **MALDI-TOF**: Ms calcd para $C_{93}H_{133}N_{25}O_{18}$ $[M+H]^+$: 1888,03; Experimental: 1889.32. Ms calcd para $C_{93}H_{133}N_{25}O_{18}$ $[M+Na]^+$: 1911,02; Experimental: 1911.31.

Decapéptido γ,γ -ciclobutano-prolina, **104**:



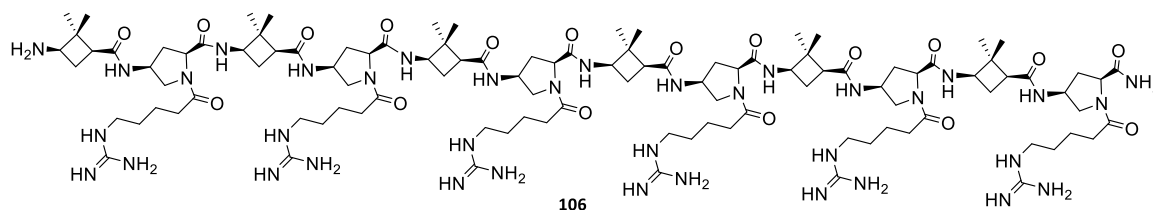
El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 10% de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 10 a 20% en 6 min, después de 20 a 40% en 1 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **104** presenta una pureza mayor al 98% y un tiempo de retención de 4.6 min. **m/z (ESI)**: MS Calcd para $C_{93}H_{133}N_{25}O_{18}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 637.4; Experimental: 637.4. MS Calcd para $C_{93}H_{133}N_{25}O_{18}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 478.3; Experimental: 478.3. Ms Calcd para $C_{93}H_{133}N_{25}O_{18}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 382.8; Experimental: 382.8. **MALDI-TOF**: Ms calcd para $C_{93}H_{133}N_{25}O_{18}$ $[M+H]^+$: 1909,42; Experimental: 1909.46. Ms calcd para $C_{93}H_{133}N_{25}O_{18}$ $[M+Na]^+$: 1931,40; Experimental: 1931.45.

Decapéptido CF- γ,γ -ciclobutano-prolina, 105:



El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 10% de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 10 a 30 % en 6 min, después de 30 a 40% en 1 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **105** presenta una pureza mayor al 99% y un tiempo de retención de 4.6 min. ***m/z* (ESI):** MS Calcd para $C_{111}H_{163}N_{31}O_{21}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 756.9; Experimental: 756.8. MS Calcd para $C_{111}H_{163}N_{31}O_{21}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 567.9; Experimental: 567.9. Ms Calcd para $C_{111}H_{163}N_{31}O_{21}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 454.5; Experimental: 454.5. Ms Calcd para $C_{111}H_{163}N_{31}O_{21}$ $[M+6H/6]^{6+}$: 378.9; Experimental: 378.9. **MALDI-TOF:** Ms calcd para $C_{111}H_{163}N_{31}O_{21}$ $[M+2H]^{2+}$: 2269,72; Experimental: 2269.75. Ms calcd para $C_{111}H_{163}N_{31}O_{21}$ $[M+2H^+Na]^{3+}$: 2292,71; Experimental: 2292.19

Dodecapéptido γ,γ -ciclobutano-prolina, 106:

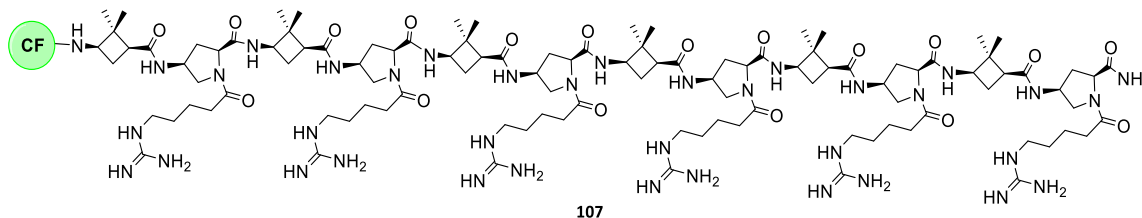


El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 10% de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 10 a 20% en 6 min, después de 20 a 40% en 1 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF.

METODOLOGÍA

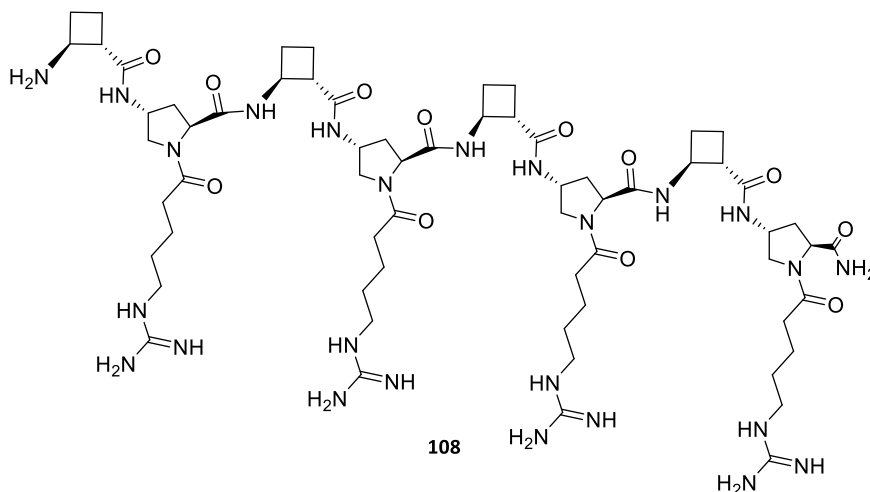
El péptido **106** presenta una pureza mayor al 97% y un tiempo de retención de 4.8 min. **m/z (ESI):** MS Calcd para $C_{108}H_{183}N_{37}O_{18}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 763.6; Experimental: 763.6. MS Calcd para $C_{108}H_{183}N_{37}O_{18}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 572.9; Experimental: 572.9. Ms Calcd para $C_{108}H_{183}N_{37}O_{18}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 458.5; Experimental: 458.6. Ms Calcd para $C_{108}H_{183}N_{37}O_{18}$ $[M+6H/6]^{6+}$: 382.3; Experimental: 382.3. **MALDI-TOF:** Ms calcd para $C_{108}H_{183}N_{37}O_{18}$ $[M+H]^+$: 2287,45; Experimental: 2287.61. Ms calcd para $C_{108}H_{183}N_{37}O_{18}$ $[M+Na]^+$: 2309,44; Experimental: 2309.59.

Dodecapéptido CF- γ , γ -ciclobutano-prolina, **107**:



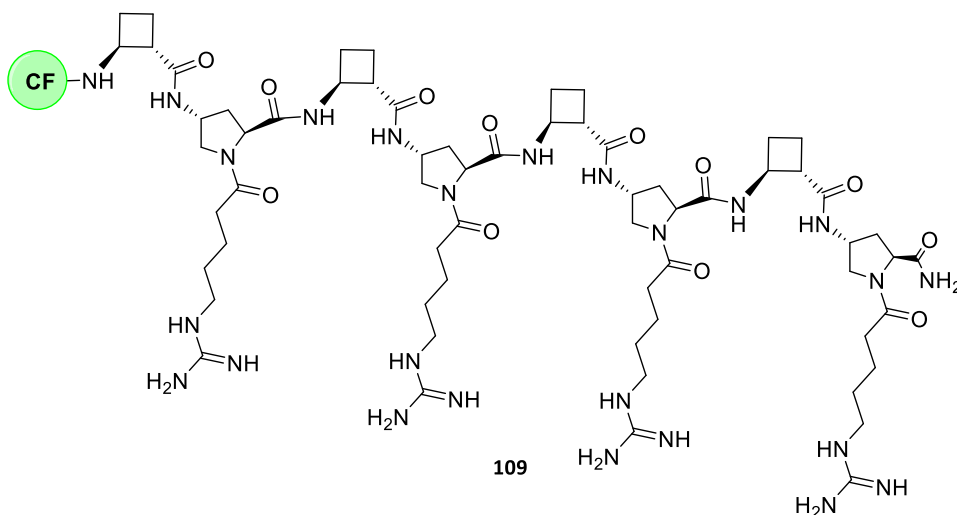
El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 10% de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 10 a 40% en 6 min, después de 40 a 50% en 1 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **107** presenta una pureza mayor al 96% y un tiempo de retención de 4.6 min. **m/z (ESI):** MS Calcd para $C_{129}H_{193}N_{37}O_{24}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 883.0; Experimental: 883.0. MS Calcd para $C_{129}H_{193}N_{37}O_{24}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 662.5; Experimental: 662.5. Ms Calcd para $C_{129}H_{193}N_{37}O_{24}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 530.2; Experimental: 530.2. Ms Calcd para $C_{129}H_{193}N_{37}O_{24}$ $[M+6H/6]^{6+}$: 442.0; Experimental: 442.0. **MALDI-TOF:** Ms calcd para $C_{129}H_{193}N_{37}O_{24}$ $[M+4H]^+$: 2650,20; Experimental: 2650.78. Ms calcd para $C_{129}H_{193}N_{37}O_{24}$ $[M+4H^+Na]^+$: 2673,18; Experimental: 2673.16.

Octapéptido β,γ -ciclobutano-prolina, **108**:



El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 5% de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 5 a 40% en 10 min, después de 40 a 60% en 1 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **108** presenta una pureza mayor al 94% y un tiempo de retención de 3.4 min. **m/z (ESI)**: Ms Calcd para $C_{64}H_{107}N_{25}O_{12}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 474.6; Experimental: 473.2. Ms Calcd para $C_{64}H_{107}N_{25}O_{12}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 355.6; Experimental: 355.7. Ms Calcd para $C_{64}H_{107}N_{25}O_{12}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 284.7; Experimental: 284.7. **MALDI-TOF**: Ms calcd para $C_{64}H_{107}N_{25}O_{12}$ $[M+H]^+$: 1419.72; Experimental: 1419.02. Ms calcd para $C_{64}H_{107}N_{25}O_{12}$ $[M+Na]^+$: 1457.82; Experimental: 1457.00.

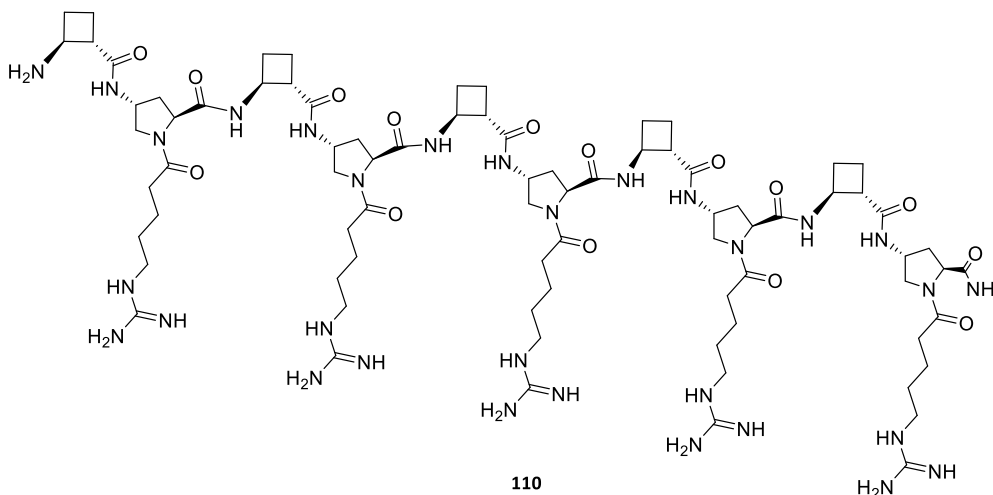
Octapéptido CF- β,γ -ciclobutano-prolina, **109**:



METODOLOGÍA

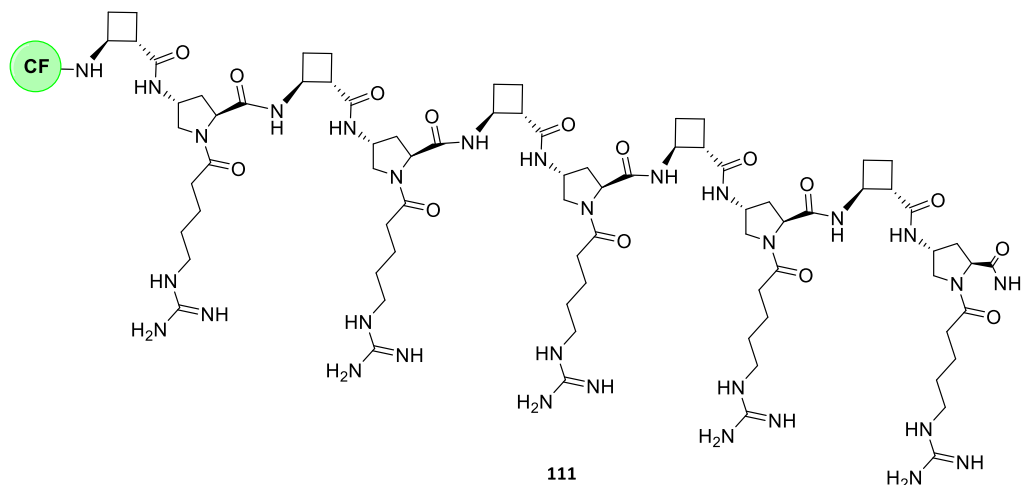
El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 5% de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 5 a 40 % en 10 min, después de 40 a 60% en 1 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **109** presenta una pureza mayor al 99% y un tiempo de retención de 5.9 min. **m/z (ESI):** Ms Calcd para $C_{85}H_{117}N_{25}O_{18}$ $[M+2H/2]^{2+}$: 889.5; Experimental: 889.3. Ms Calcd para $C_{85}H_{117}N_{25}O_{18}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 593.3; Experimental: 593.7. Ms Calcd para $C_{85}H_{117}N_{25}O_{18}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 445.2; Experimental: 445.2. Ms Calcd para $C_{85}H_{117}N_{25}O_{18}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 356.4; Experimental: 356.3. **MALDI-TOF:** Ms calcd para $C_{85}H_{117}N_{25}O_{18}$ $[M+3H]^{3+}$: 1778.03; Experimental: 1778.20. Ms calcd para $C_{85}H_{117}N_{25}O_{18}$ $[M+Na]^+$: 1800.02; Experimental: 1799.22.

Decapéptido β,γ -ciclobutano-prolina, **110**:



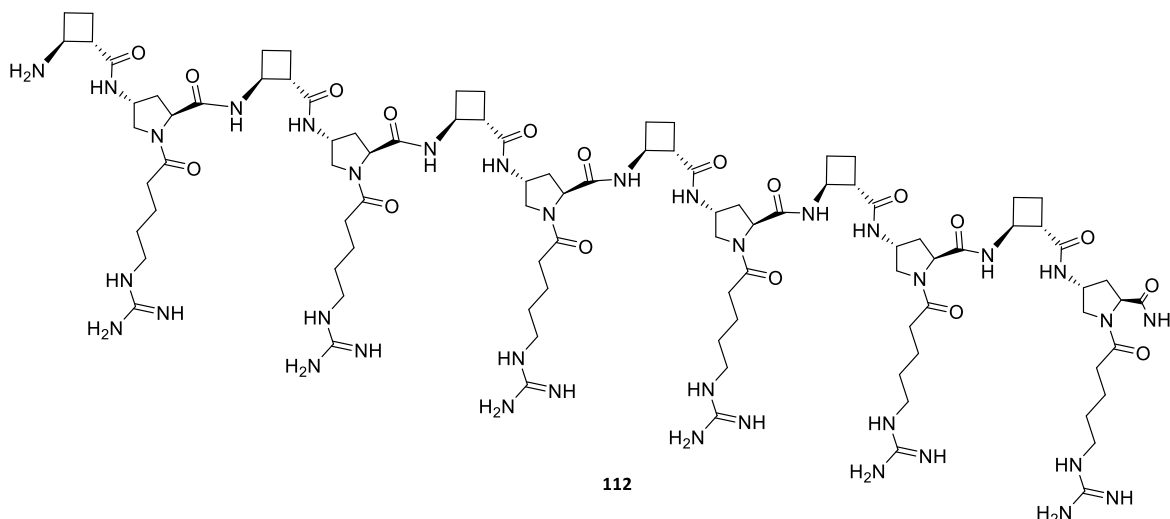
El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 5% de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 5 a 50% en 10 min, después de 50 a 60% en 1 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **110** presenta una pureza mayor al 99% y un tiempo de retención de 3.4 min. **m/z (ESI):** Ms Calcd para $C_{80}H_{133}N_{31}O_{15}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 590.7; Experimental: 590.7. Ms Calcd para $C_{80}H_{133}N_{31}O_{15}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 445.2; Experimental: 445.3. Ms Calcd para $C_{80}H_{133}N_{31}O_{15}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 354.8; Experimental: 354.7. **MALDI-TOF:** Ms calcd para $C_{80}H_{133}N_{31}O_{15}$ $[M+H]^+$: 1769.06; Experimental: 1769.22.

Decapéptido CF-β,γ-ciclobutano-prolina, **111**:



El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 5% de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 5 a 50% en 10 min, después de 50 a 60% en 1 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **111** presenta una pureza mayor al 99% y un tiempo de retención de 5.5 min. **m/z (ESI)**: Ms Calcd para $C_{101}H_{143}N_{31}O_{21}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 710.1; Experimental: 710.4. Ms Calcd para $C_{101}H_{143}N_{31}O_{21}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 532.8; Experimental: 532.8. Ms Calcd para $C_{101}H_{143}N_{31}O_{21}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 426.4; Experimental: 426.4. **MALDI-TOF**: Ms calcd para $C_{101}H_{143}N_{31}O_{21}$ $[M+H]^+$: 2127.11; Experimental: 2127.32.

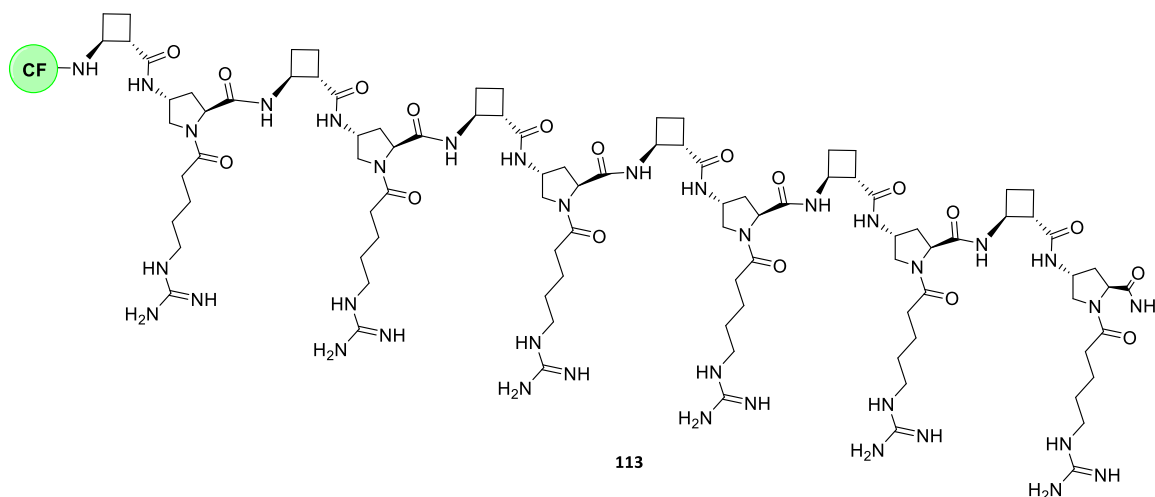
Dodecapéptido β,γ-ciclobutano-prolina, **112**:



METODOLOGÍA

El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 10% de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 10 a 60% en 11 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **112** presenta una pureza mayor al 94% y un tiempo de retención de 3.6 min. **m/z (ESI)**: Ms Calcd para $C_{96}H_{159}N_{37}O_{18}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 530.8; Experimental: 530.9. Ms Calcd para $C_{96}H_{159}N_{37}O_{18}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 424.9; Experimental: 424.8. **MALDI-TOF**: Ms calcd para $C_{96}H_{159}N_{37}O_{18}$ $[M+H]^+$: 2119.27; Experimental: 2119.47. Ms calcd para $C_{96}H_{159}N_{37}O_{18}$ $[M+Na]^+$: 2141.26; Experimental: 2141.40.

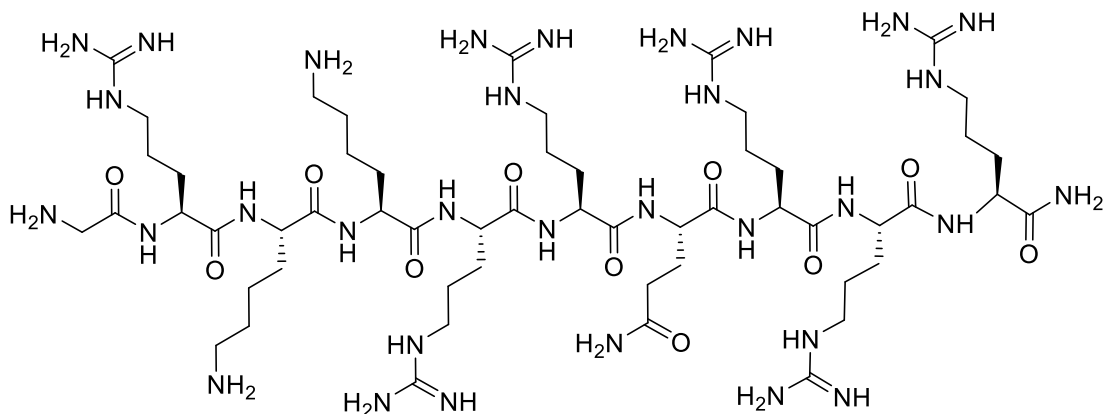
Dodecapéptido CF-β,γ-ciclobutano-prolina, **113**:



El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Gradiente: 10% de ACN/TFA por 2 min, se incrementa de 10 a 60 % en 11 min y finalmente se incrementa hasta 100% de ACN/TFA en 2 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado se caracteriza por RP-HPLC y MALDI-TOF. El péptido **113** presenta una pureza mayor al 99% y un tiempo de retención de 4.8 min. **m/z (ESI)**: Ms Calcd para $C_{117}H_{169}N_{37}O_{24}$ $[M+3H/3]^{3+}$: 826.9; Experimental: 826.5. Ms Calcd para $C_{117}H_{169}N_{37}O_{24}$ $[M+4H/4]^{4+}$: 620.4; Experimental: 620.3. Ms Calcd para $C_{117}H_{169}N_{37}O_{24}$ $[M+5H/5]^{5+}$: 496.5; Experimental: 496.5. **MALDI-TOF**: Ms calcd para $C_{117}H_{169}N_{37}O_{24}$ $[M+H]^+$: 2477.31; Experimental: 2477.46.

METODOLOGÍA

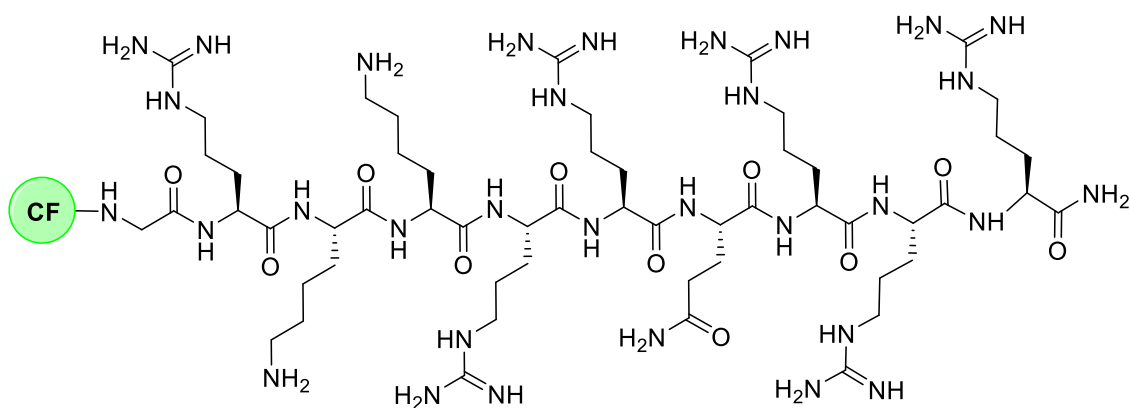
Tat₄₈₋₅₇. 114:



114

El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Fase móvil A: H₂O + 0.1% HCOOH. B: ACN + 0.07% HCOOH. Gradiente: 0-10% de B por 7 min. Se incrementa de 0 a 10% en 7 min y se lleva hasta 100% en 0.5 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales en 2.5 min. El péptido purificado **114** se caracteriza por RP-HPLC-MS. **m/z (ESI)**: Ms Calcd para C₅₅H₁₁₀N₃₂O₁₁ [M+3H/3]³⁺: 465.9; Experimental: 466.0. Ms Calcd para C₅₅H₁₁₀N₃₂O₁₁ [M+4H/4]⁴⁺: 349.7; Experimental: 349.7. Ms Calcd para C₅₅H₁₁₀N₃₂O₁₁ [M+5H/5]⁵⁺: 279.9; Experimental: 279.9. Ms Calcd para C₅₅H₁₁₀N₃₂O₁₁ [M+6H/6]⁶⁺: 233.4; Experimental: 233.3.

Tat₄₈₋₅₇. 115:



115

METODOLOGÍA

El crudo peptídico se purifica por RP-HPLC-MS semiprep. Fase móvil A: H₂O + 0.1% HCOOH. B: ACN + 0.07% HCOOH. Gradiente: 0-10% de B por 7 min. Se incrementa de 0 a 10% en 7 min y se lleva hasta el 100% en 0.5 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales en 2.5 min. Por último se restablecen las condiciones iniciales. El péptido purificado **115** se caracteriza por RP-HPLC-MS. **m/z (ESI)**: Ms Calcd para C₇₆H₁₂₀N₃₂O₁₇ [M+3H/3]³⁺: 585.3; Experimental: 585.5. Ms Calcd para C₇₆H₁₂₀N₃₂O₁₇ [M+4H/4]⁴⁺: 439.2; Experimental: 439.3. Ms Calcd para C₇₆H₁₂₀N₃₂O₁₇ [M+5H/5]⁵⁺: 351.6; Experimental: 351.6. Ms Calcd para C₇₆H₁₂₀N₃₂O₁₇ [M+6H/6]⁶⁺: 293.2; Experimental: 293.2.

7.9 Ensayos in vitro de citotoxicidad, internalización y localización de péptidos γ,γ -ciclobutano-prolina (serie 1) y los β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2)

Para evaluar *in vitro* el potencial de las series 1 y 2 como posibles péptidos penetrantes (CPPs) se utilizó la línea celular HeLa, de morfología epitelial y derivada de un carcinoma cervical humano. Concretamente, se analizó la citotoxicidad de los péptidos (mediante el ensayo del MTT), su capacidad de internalización en el interior de las células (citometría de flujo) y la localización intracelular de los mismos (microscopía confocal).

7.9.1 Cultivo de células HeLa

El mantenimiento y expansión *in vitro* de la línea celular HeLa se realizó en tubos tipo falcón de 25 cm² de superficie con subcultivos en proporción 1:10 dos veces por semana y utilizando el medio de cultivo MEM suplementado con un 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) y un 1 % de L-Glutamina 200 mM (Biowest). Tanto para el mantenimiento y expansión celular como para realizar los distintos experimentos, las células se mantuvieron en incubadores con una atmósfera humidificada, un 5% de CO₂ y una temperatura constante de 37 °C.

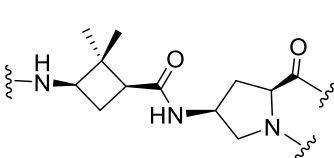
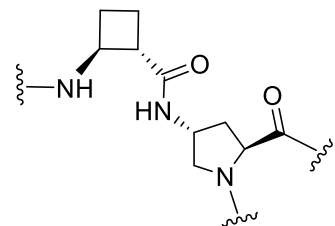
METODOLOGÍA

7.9.2 Ensayos de citotoxicidad celular (MTT)

El ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) descrito por Mosmann en 1983,²⁵⁵ se utilizó para analizar la viabilidad celular y por consiguiente, la toxicidad de los péptidos. Este ensayo colorimétrico permite valorar la proliferación celular mediante la actividad metabólica de las células vivas. El MTT (amarillo) es reducido por enzimas celulares a formazán, un cristal insoluble de color púrpura cuya absorbancia se mide en un espectrofotómetro tras su solubilización en un solvente orgánico. A mayor absorbancia, mayor actividad enzimática y por tanto, mayor número de células vivas (**Figura 100**).

Para llevar a cabo este test, las células HeLa se sembraron en placas de 24 pocillos a una concentración de 6×10^4 células/mL. Tras 24 h de incubación, el medio de cultivo fue aspirado y las células se incubaron durante otras 24 h en presencia de distintas concentraciones de péptidos diluídos en MEM sin suplementar (**Tabla 18**).

Tabla 18. Péptidos estudiados en los ensayos de citotoxicidad celular.

	Serie 1	Serie 2
		
Péptidos Estudiados	100, 102, 104, 106 y 114	108, 109, 110, 111, 112, 113, 114 y 115
Concentraciones evaluadas (μM)	0.1, 1, 10, 25, 50, 100	10, 25, 50

Transcurrido ese tiempo, se aspiró el medio de cultivo, se lavó cada pocillo con 500 μl de HBSS y se añadieron 500 μl de MTT a una concentración final de 0.1 mg/mL. Finalmente y tras al menos 3 h de incubación a 37°C y oscuridad, se eliminó el MTT y las placas se guardaron toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad hasta el momento de la cuantificación en el espectrofotómetro. Para ello, los cristales de formazán se diluyeron en 500 μl de DMSO (**Figura 101**) y la absorbancia a 570 nm se

²⁵⁵ Mosmann, T. J. *Immunol. Methods* **1983**, 65 (1-2), 55–63.

METODOLOGÍA

midió en un espectrofotómetro VICTOR™ X3 Multilabel Plate Reader acoplado a un software de control PerkinElmer 2030 Manager.

Los resultados del test de MTT se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes, en los que se usó TAT como CPP de referencia y células no tratadas como control. Además, cada uno de los experimentos incluyó 4 réplicas de cada producto y concentración. La normalización de los resultados se realizó considerando la media del valor de absorbancia de la población control como el 100% de proliferación celular.

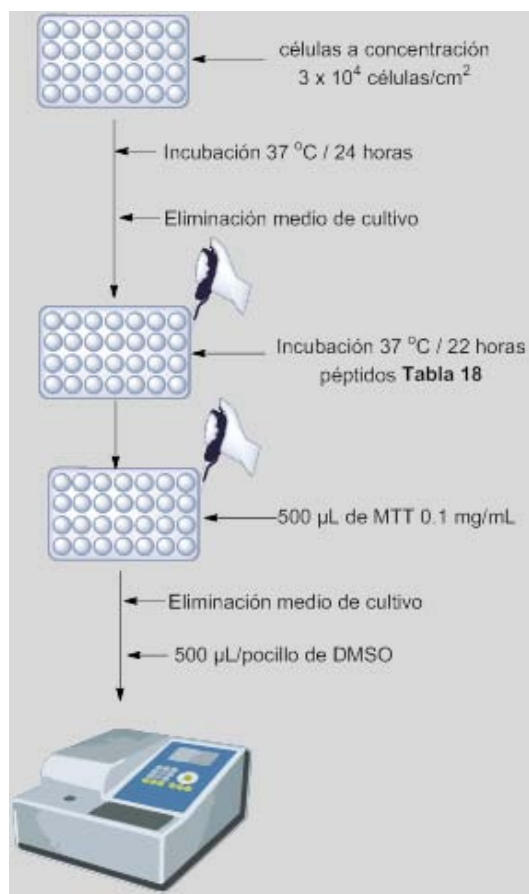


Figura 100. Ensayo de MTT

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{Media Absorbancia de las células tratadas}}{\text{Media Absorbancia de las células no tratadas}} \times 100$$



Figura 101. Ensayo MTT serie 2-CF a 25 µM.

METODOLOGÍA

7.9.3 Internalización celular

La capacidad de internalización de los péptidos en células HeLa se analizó mediante la técnica de citometría de flujo. Este método permite detectar y cuantificar la fluorescencia de una suspensión celular mediante el análisis individualizado de la señal emitida por cada célula. Dado que la citometría implica la presencia de fluorocromos, en esta batería de experimentos solo se utilizaron los péptidos conjugados con CF (fluorocromo derivado de la fluoresceína) y que una vez excitado por un láser, emite luz en la longitud de onda del verde. Si el péptido es capaz de penetrar en el interior de la célula y va conjugado con CF, el fluorocromo es excitado al pasar por el citómetro y emite una luz que es detectada por unos sensores del aparato (se detecta si hay señal y cuánta). Si los péptidos no entran en la célula, no hay fluorocromo y por tanto tampoco señal detectable.

Para el análisis por citometría de flujo, las células HeLa se sembraron en placas de 35 mm (Nunc) a una densidad de 2×10^5 células/placa. Transcurridas 24 h, se descartó el medio de cultivo y las células fueron nuevamente incubadas en presencia de los péptidos-CF a concentraciones de $10 \mu\text{M}$ (serie 2) y $25 \mu\text{M}$ (series 1 y 2) (Tabla 19)

Tras 2 horas de incubación, se aspiró el medio de cultivo, se lavaron los cultivos 2 veces con HBSS (para eliminar restos de medio y péptidos) y se tripsinizaron las células con 0.5 mL de 0.25% tripsina-EDTA durante 5 min a 37°C . Posteriormente, se añadieron 2 mL de medio de cultivo nuevo para neutralizar el efecto de la tripsina, se

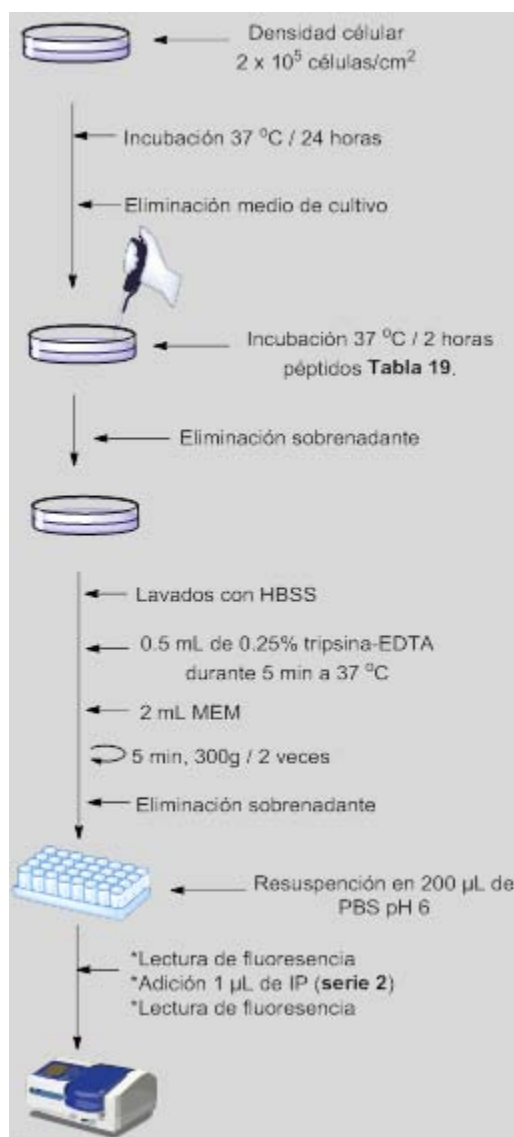


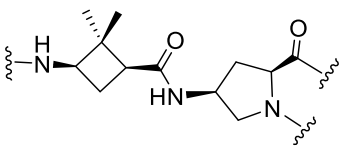
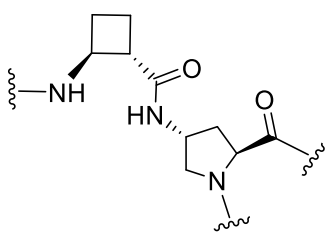
Figura 102. Ensayo de internalización celular

METODOLOGÍA

transfirió la suspensión celular a un tubo cónico y se centrifugó durante 5 min a 300 g. Se descartó el sobrenadante, las células se resuspendieron en 2 mL de HBSS (para eliminar restos del MEM usado para la neutralización de la tripsina) y se volvió a centrifugar 5 min a 300 g. Finalmente y tras eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 200 μ l de PBS a pH 6 (solución previamente preparada) y se realizó la lectura de la fluorescencia en un citómetro BD FACSCanto acoplado al software FACSDiva v 7.0 (**Figura 102**).

Nota: El pH 6 permite desprender los péptidos que hayan quedado adheridos a la superficie celular evitando falsos positivos (en caso de que un péptido quedara adherido a la superficie se obtendría una señal positiva a pesar de que, realmente, no está dentro de la célula).

Tabla 19. Péptidos evaluados como agentes de internalización celular.

	Serie 1	Serie 2
		
Péptidos Estudiados	101, 103, 105, 107 y 115	109, 111, 113 y 115
Concentraciones evaluadas (μ M)	25	10 y 25

Adicionalmente, para los péptidos β,γ -ciclobutano-prolina se realizó una segunda lectura de la fluorescencia emitida exclusivamente por las células vivas (tanto en muestras incubadas con péptidos a 10 como a 25 μ M). Para ello, a la suspensión celular en PBS pH 6 se le añadió 1 μ L de yoduro de propidio (IP) y tras esperar unos 5 min, se volvió a medir la fluorescencia de las muestras.

Nota: El IP es un agente intercalante del DNA que emite luz en el rango del rojo y es impermeable a la membrana plasmática, es decir, que únicamente puede entrar en las células y unirse al DNA si éstas han perdido su integridad de membrana, proceso que conduce a la muerte celular. Por tanto, con la adición de IP se descartan los falsos

METODOLOGÍA

positivos procedentes de células que han internalizado el péptido pero que están muertas o dañadas (el citómetro las identifica como aquellas células con doble señal; verde y roja).

En este caso se realizaron tres experimentos independientes en los que se analizaron, en paralelo, todos los péptidos y concentraciones junto con tres muestras control:

Figura 103.

- ❖ Control negativo: células no tratadas (para descartar autofluorescencia de las células).
- ❖ Control CF: células incubadas con CF pero sin péptidos.
- ❖ Control positivo: células incubadas con TAT-CF (CPP con gran capacidad de internalización).

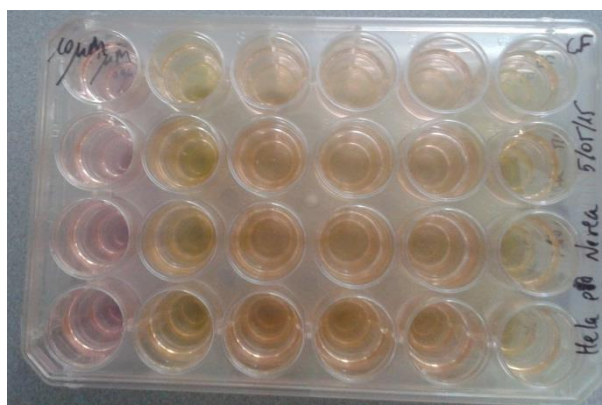


Figura 103. Ensayo internalización celular serie 2-CF a 10 μ M.

Los resultados obtenidos fueron normalizados respecto al TAT, considerando la intensidad de fluorescencia de esta molécula como el 100%.

7.9.4 Localización intracelular

Se utilizaron técnicas de microscopía láser confocal para visualizar la localización intracelular de los péptidos en células HeLa. El microscopio láser confocal permite visualizar la señal emitida por un fluorocromo procedente de un único plano focal evitando la superposición de señales procedentes planos superiores o inferiores al escogido. Además, los diferentes planos observados pueden superponerse a posteriori

METODOLOGÍA

generando una imagen tridimensional de la muestra. Esta metodología es ampliamente utilizada para determinar la localización de una molécula (en este caso un péptido) en el interior de una célula o de un orgánulo.

Para los estudios de localización, 2×10^5 células HeLa se sembraron en placas para microscopía confocal de 35 mm. Tras 24 h de incubación, se descartó el medio de cultivo y las células se incubaron con los péptidos 12U-CF y TAT-CF (ambos a $10 \mu\text{M}$) durante 2 h. Posteriormente, se eliminó el medio, se realizaron 3 lavados consecutivos con HBSS y se añadió a cada cultivo $1 \mu\text{L/mL}$ de CellMask™ Deep Red Plasma Membrane Stain (Molecular Probes) y de Hoechst vital, 33342, Trihydrochloride, Trihydrate (Molecular Probes).

Nota: El cell mask marca de color rojo la membrana plasmática mientras que el Hoechst marca el DNA de color azul. De esta manera se generan puntos de referencia intracelulares que facilitan la localización de los péptidos.

Tras 10 min de incubación a 37°C , se realizaron 2 lavados con HBSS para eliminar el exceso de los productos de contratinción y se observó la localización de los péptidos antes, y tras 20 min de incubación de las células en PBS pH= 6. Los resultados corresponden a experimentos únicos. La observación y adquisición de imágenes se realizó con un microscopio láser de rastreo confocal Olympus Fluoview FV1000 usando un objetivo de aceite de inmersión upsapo 60x / 1.35 y el software de control Olympus Fluoview. Las proyecciones ortogonales se generaron con el programa Imaris.

7.9.5 Ensayos in vitro de internalización, citotoxicidad y localización de péptidos γ,γ -ciclobutano-prolina (serie 1) y los β,γ -ciclobutano-prolina (serie 2) en parásitos de Leishmania.

Los experimentos fueron realizados por la Doctora María Ángeles Abengózar y el Doctor Luis Rivas del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB)-CSIC de Madrid, en promastigotes de *Leishmania donovani* (MHOM/SD/00/1S-2D) y amastigotes de *Leishmania pifanoi*. Estos parásitos fueron incuados a 26°C en medio RPMI suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado, L-glutamina a 2 mM, Unicilina a 20 U/mL y Gentamicina a 48 mg/mL.

7.9.5.1 Viabilidad celular de *Leishmania* frente a los péptidos híbridos ciclobutano-prolina.

Para determinar la toxicidad de los péptidos híbridos ciclobutano-prolina frente a los parásitos de *Leishmania* se realizó el ensayo de MTT. Los parásitos se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración final de 2×10^6 células/mL en medio Hank's-glucosa al 1%. Los péptidos fueron incubados durante 4 h a las concentraciones descritas en la **Tabla 20**. Transcurrido ese tiempo, se transfirió una alícuota de 20 μ L a otra placa y se adicionaron 180 μ L/pocillo de medio RPMI 1640 para determinar la proliferación de los parásitos. La proliferación de los parásitos se expresa como el porcentaje de la reducción MTT respecto al control de los parásitos. El precipitado formazan resultante de la reducción del MTT se solubilizó en SDS (concentración final 1%) y se realizó la lectura en un lector de microplacas Bio-Rad 640 con un filtro de 595 nm.

7.9.5.2 Ensayos de internalización de los péptidos híbridos frente a los parásitos de *Leishmania*

Los parásitos se sembraron a una concentración final de 2×10^6 células/mL en medio Hank's-glucosa al 1% en una placa de 96 pocillos y se incubaron con los péptidos híbridos ciclobutano-prolina en las condiciones descritas en la **Tabla 20**. Después de 4 h de incubación, se tomaron alícuotas de 200 μ L, se centrifugaron a 1200 rpm por 5 min a 4 °C, se lavaron (2 x) con HBBS-Glc y se resuspendieron en el mismo tampón a una concentración final de 1×10^6 células/mL. A esta suspensión celular se le adicionó yoduro de propidio (concentración final: 5 μ g/mL). Finalmente, las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FC500 utilizando los siguientes parámetros para detectar los péptidos fluorescentes ($\lambda_{exc}=488$ nm y $\lambda_{exc}=520$ nm) y el yoduro de propidio ($\lambda_{exc}=488$ nm y $\lambda_{exc}=620$ nm).

METODOLOGÍA

7.9.5.3 Visualización de los péptidos híbridos internalizados en *Leishmania donovani*.

Los parásitos se sembraron a una concentración final de 2×10^6 células/mL en medio Hank's-glucosa al 1% y se incubaron con los péptidos como se describe en la **Tabla 20**. Las incubaciones se realizaron en presencia de Rodamina-Dextrano como marcador de endocitosis de fase fluida (rojo) y DAPI como marcador de ácidos nucleicos presentes en el núcleo y el kinetoplasto de los parásitos (azul), según cada experimento. Los siguientes parámetros fueron utilizados para la detección en el microscopio confocal de los péptidos fluorescentes ($\lambda_{exc}=488$ nm y $\lambda_{exc}=520$ nm), del DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) ($\lambda_{exc}=358$ nm y $\lambda_{exc}=461$ nm) que marca núcleo y kinetoplasto.

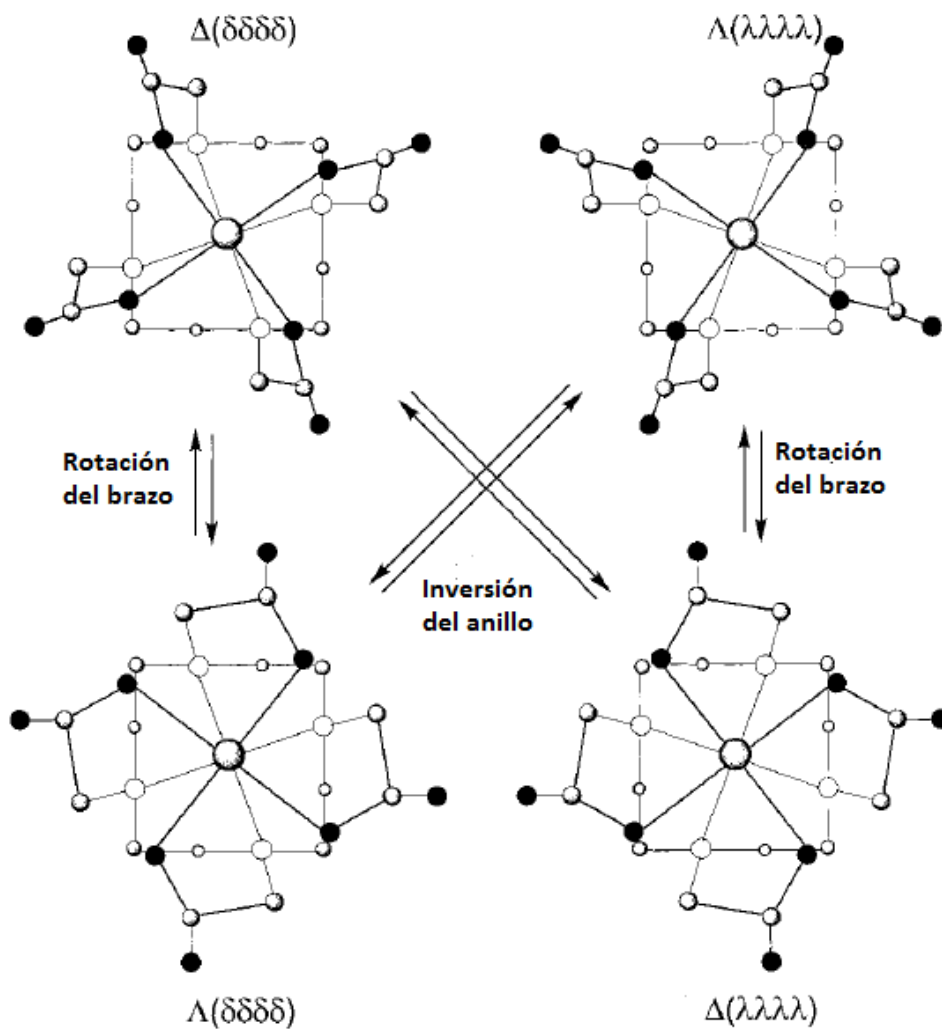
Tabla 20. Condiciones de incubación de los péptidos de la serie 1 y 2 en promastigotes de *L. donovani* y amastigotes de *L. pifanoi*.^a

Péptidos híbridos	Promastigotes <i>L. donovani</i>			Amastigotes <i>L. Pifanoi</i>	
	Internalización	Toxicidad (MTT)	Microscopía confocal	Internalización	Toxicidad (MTT)
Serie 1	Concentración final → 10 µM	Concentración final → 0.8, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25 y 50 µM	Concentración final → 10 µM		
Serie 2		Concentración final → 10 y 50 µM		Concentración final → 12, 25 y 50 µM	Concentración final → 50 µM

^a Los péptidos fueron incubados a 26 °C durante 4 horas.

ANEXO

Anexo 1. Las dos conformaciones diastereoméricas para los complejos de lantánidos-DOTA. Para cada conformación existe el respectivo enantiómero para el isómero mayoritario (Δ -($\lambda\lambda\lambda\lambda$) y Λ -($\delta\delta\delta\delta$)) y para el isómero minoritario (Δ -($\delta\delta\delta\delta$) y Λ -($\lambda\lambda\lambda\lambda$)) de $[\text{Ln}(\text{DOTA})]^-$



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Gorrea, E.; Carbajo, D.; Gutiérrez-Abad, R.; Illa, O.; Branchadell, V.; Royo, M.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (20), 4050-4057.
2. Fernandez, D.; Torres, E.; Avilés, F. X.; Ortuño, R. M.; Vendrell, J. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (11), 3824-3828.
3. Ortuño, R.M.; Izquierdo, S.; Hölenz, J.; Corbera, J.; Cuberes, R. PCT Int. Appl. **2008** WO 2008015266.
4. Rouge, P. D.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2003**, *14* (2), 193-195.
5. Moglioni, A. G.; Brousse, B. N.; Álvarez-Larena, A.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2002**, *13* (5), 451-454.
6. Gutiérrez-Abad, R.; Carbajo, D.; Nolis, P.; Acosta-Silva, C.; Cobos, J. A.; Illa, O.; Royo, M.; Ortuño, R. M. *Amino Acids* **2011**, *41* (3), 673-686.
7. Celis, S.; Nolis, P.; Illa, O.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 2839-2846.
8. Torres, E.; Gorrea, E.; Burusco, K. K.; Da Silva, E.; Nolis, P.; Rúa, F.; Boussert, S.; Díez-Pérez, I.; Dannenberg, S.; Izquierdo, S.; Giralt, E.; Jaime, C.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (3), 564-575.
9. Martín-Vilá, M.; Muray, E.; Aguado, G. P.; Alvarez-Larena, A.; Branchadell, V.; Minguillón, C.; Giralt, E.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 3569-3584.
10. Liu, R.; Zhang, M.; Wyche, T. P.; Winston-McPherson, G. N.; Bugni, T. S. Tang, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7503-7506.
11. Ortuño, R. M.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G.Y. *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9* (3), 237-259.
12. Adlington, R.M.; Baldwin, J. E.; Jones, R. H.; Murphy, J.A.; Parisi, M.F. *J. Chem. Soc.* **1983**, 1479-1481.
13. Bryans, J.; Horwell, D.; Thorpe, A.; Wustrow, D. PCT Int. Appl. 1998 WO US19876.
14. Balo, C.; Caamaño, O.; Fernández, F.; López, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (15), 2593-2597.
15. Sabbioni, G.; Jones, J. B. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (20), 4565-4570.
16. Martín-Vilà, M.; Minguillón, C.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9* (24), 4291-4294.
17. Aguilera, J.; Moglioni, A.; Mor, À.; Ospina, J.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron* **2014**, *70* (37), 6546-6553.
18. Gutiérrez-Abad, R.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Org. Lett.* **2010**, *12* (14), 3148-3151.

BIBLIOGRAFÍA

19. Aguilera, J.; Gutiérrez-Abad, R.; Mor, À.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19* (24), 2864–2869.
20. Aguilera, J.; Favier, I.; Sans, M.; Mor, À.; Álvarez-Larena, Á.; Illa, O.; Gómez, M.; Ortuño, R. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *2015* (4), 810–819.
21. Aguilera, J.; Cobos, J. A.; Gutiérrez-Abad, R.; Acosta, C.; Nolis, P.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *2013* (17), 3494–3503.
22. Abbasi, E.; Aval, S.; Akbarzadeh, A.; Milani, M.; Nasrabadi, H.; Joo, S.; Hanifehpour, Y.; Nejati-Koshki, K.; Pashaei-Asl, R. *Nanoscale Res. Lett.* **2014**, *9* (1), 247–257.
23. Wolinsky, J. B.; Grinstaff, M. W. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (9), 1037–1055.
24. Kreger, K.; Wolfer, P.; Audorff, H.; Kador, L.; Stingelin-Stutzmann, N.; Smith, P.; Schmidt, H. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (2), 509–516.
25. Blomenhofer, M.; Ganzleben, S.; Hanft, D.; Schmidt, H. W.; Kristiansen, M.; Smith, P.; Stoll, K.; Mäder, D.; Hoffmann, K. *Macromolecules* **2005**, *38* (9), 3688–3695.
26. Zhou, Y.; Xu, M.; Li, T.; Guo, Y.; Yi, T.; Xiao, S.; Li, F.; Huang, C. *J. Colloid Interface Sci.* **2008**, *321* (1), 205–211.
27. Gorrea, E.; Pohl, G.; Nolis, P.; Celis, S.; Burusco, K. K.; Branchadell, V.; Perczel, A.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2012**, *77* (21), 9795–9806.
28. Torres, E.; Puigmartí-Luis, J.; Pérez del Pino, A.; Ortuño, R. M.; Amabilino, D. B. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (7), 1661–1665.
29. Berlicki, L.; Kaske, M.; Gutiérrez-Abad, R.; Bernhardt, G.; Illa, O.; Bernhardt, G. G.; Ortuño, R. M.; Cabrele, C.; Buschauer, A.; Reiser, O. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (21), 8422–8431.
30. Gorrea, E.; Nolis, P.; Torres, E.; Da Silva, E.; Amabilino, D. B.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17* (16), 4588–4597.
31. Sorrenti, A.; Illa, O.; Pons, R.; Ortuño, R. M. *Langmuir* **2015**, *31* (35), 9608–9618.
32. Sans, M.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Org. Lett.* **2012**, *14* (10), 2431–2433.
33. Mayans, E.; Gargallo, A.; Álvarez-Larena, Á.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, (8), 1425–1433.
34. Sans, M. *The chiral cyclobutane motif in metal ligands for catalysis and advanced materials: organogelators, surfactants and hybrid materials*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. **2014**.
35. Sorrenti, A.; Illa, O.; Ortuño, R. M. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (21), 8200–8219.
36. Rosen, M. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. 3ª edición. New York: John Wiley & Sons, **2004**. ISBN 0-471-47818-0.

BIBLIOGRAFÍA

37. Mishra, M.; Muthuprasanna, P.; Prabha, K. S.; Rani, P. S.; Babu, I. a S.; Chandiran, I. S.; Arunachalam, G.; Shalini, S. *Int. J. PharmTech Res.* **2009**, *1* (4), 1354–1365.
38. Berti, D.; Palazzo, G. *Colloidal Foundations of Nanoscience*. 1ª edición. USA: Newnes, **2014**. ISBN 0444595422.
39. Munday, D. *Surfaces, Interfaces and Colloids—Principles and Applications*. 2ª edición. New York: Wiley-VCH, **1999**. ISBN 0-471-33060-4.
40. Tadros, T. F. *Applied Surfactants: Principles and Applications*. 1ª edición. New York: Wiley-VCH, **2005**. ISBN 3-527-30629-3.
41. Jiménez, D.; Medina, S. A.; Gracida, J. N. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2010**, *26* (1), 65–84.
42. Schramm, L.L. *Surfactants: Fundamentals and Applications in the Petroleum Industry*. 1ª edición. United Kingdom: University Press, Cambridge, **2000**. ISBN 0-521-64067-9.
43. Gautam, K. K.; Tyagi, V. K. *J. Oleo Sci.* **2006**, *55* (4), 155–166.
44. Murguía, M.C.; Machuca, L.M.; Lurá, M.C.; Cabrera, M.I.; Grau, R.J. *J Surfact Deterg* **2008**, *11*, 223-230.
45. Infante, M. R.; Pérez, L.; Pinazo, A.; Clapés, P.; Morán, M. C.; Angelet, M.; García, M. T.; Vinardell, M. P. *Comptes Rendus Chim.* **2004**, *7* (6-7), 583–592.
46. Bordes, R.; Holmberg, K. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *222*, 79–91.
47. De, S.; Malik, S.; Ghosh, A.; Saha, R.; Saha, B. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 65757–65767.
48. Mishra, M.; Muthuprasanna, P.; Prabha, K. S.; Rani, P. S.; Babu, L.; Chandiran, I. S.; Arunachalam, G.; Shalini, S. *Int. J. PharmTech Res.* **2009**, *1* (4), 1354–1365.
49. Pinazo, A.; Angelet, M.; Pons, R.; Lozano, M.; Infante, M. R.; Pérez, L. *Langmuir* **2009**, *25* (14), 7803–7814.
50. Kralova, I.; Sjöblom, J. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2009**, *30* (9), 1363–1383.
51. Pinazo, A.; Pons, R.; Pérez, L.; Infante, M. R. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50* (9), 4805–4817.
52. Infante, M. R.; Pinazo, A.; Seguer, J. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **1997**, *123/124*, 49–70.
53. Vives, M. A.; Macián, M.; Seguer, J.; Infante, M. R.; Vinardell, M. P. *Comp. Biochem. Physiol.-C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1997**, *118* (1), 71–74.
54. Vinardell, M. P.; Benavides, T.; Mitjans, M.; Infante, M. R.; Clapés, P.; Clothier, R. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46* (12), 3837–3841.
55. Pinazo, A.; Infante, M. R.; Izquierdo, P.; Solans, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2000**, No. 7, 1535–1539.

BIBLIOGRAFÍA

56. Morán, M. C.; Pinazo, A.; Pérez, L.; Clapés, P.; Angelet, M.; García, M.; Vinardell, M.; Infante, M. *Green Chem.* **2004**, *6*, 233–240.
57. Benavides, T.; Mitjans, M.; Martínez, V.; Clapés, P.; Infante, M. R.; Clothier, R. H.; Vinardell, M. P. *Toxicology* **2004**, *197* (3), 229–237.
58. Sanchez, L.; Mitjans, M.; Infante, M. R.; Vinardell, M. P. *Toxicol. Lett.* **2006**, *161* (1), 53–60.
59. Martinez, V.; Corsini, E.; Mitjans, M.; Pinazo, A.; Vinardell, M. P. *Toxicol. Lett.* **2006**, *164* (3), 259–267.
60. Pérez, L.; Pinazo, A.; Pons, R.; Infante, M. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *205*, 134–155.
61. Foley, P.; Kermanshahi, A.; Beach, E.S.; Zimmerman, J. B. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (4), 1499–1518.
62. Ghosh, S.; Khatua, D.; Dey, J. *Langmuir* **2011**, *27*, 5184–5192
63. Kwaambwa, H.; Nermark, F. *Green Sustainable Chem.* **2013**, *3*, 135–140
64. Mullally, M. K.; Marangoni, D. G. *Can. J. Chem.* **2004**, *82* (7), 1223–1229.
65. McLachlan, A. a.; Marangoni, D. G. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *295* (1), 243–248.
66. Kuchlyan, J.; Banik, D.; Roy, A.; Kundu, N.; Sarkar, N. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119* (26), 8285–8292.
67. Yuan, J.; Lin, S.; Shen, J. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2008**, *66* (1), 90–95.
68. Ghosh, K. K.; Pandey, A.; Roy, S. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2000**, *163* (2-3), 293–300.
69. Raths, H.C. PCT Int. Appl. **1997** WO 1997046513A1.
70. Camilleri, P.; Feiters, M.; Kirby A.J.; Ronsin, G.A.; Nolte, R.; Garcia, C. PCT Int. Appl. **2003** WO2003082809A1.
71. Ghosh, S.; Moulik, S. J. *Colloid Interface Sci.* **1998**, *208* (2), 357–366.
72. Bordes, R.; Tropsch, J.; Holmberg, K. *Langmuir* **2010**, *26* (5), 3077–3083.
73. Hoque, J.; Kumar, P.; Aswal, V. K.; Haldar, J. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (32), 9718–9726.
74. Hoque, J.; Gonuguntla, S.; Yarlagadda, V.; Aswal, V. K.; Haldar, J. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16* (23), 11279–11288.
75. Kwaśniewska, D.; Staszak, K.; Wieczorek, D.; Zieliński, R. *J. Surfactants Deterg.* **2015**, *18* (3), 477–486.
76. Xie, Z.; Feng, Y. *J. Surfactants Deterg.* **2009**, *13* (1), 51–57.

BIBLIOGRAFÍA

77. Xue, C.; Zhu, H.; Zhang, T.; Cao, D.; Hu, Z. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **2011**, *375* (1-3), 141–146.
78. Miyagishi, S.; Nishida, M. *J. Colloid Interface Sci.* **1978**, *65* (2), 380–386.
79. Takehara, M.; Yoshimura, I.; Yoshida, R. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1974**, *51* (9), 419–423.
80. Ohta, A.; Nakashima, S.; Matsuyanagi, H.; Asakawa, T.; Miyagishi, S. *Colloid Polym. Sci.* **2003**, *282* (2), 162–169.
81. Shinitzky, M.; Haimovitz, R. *J. Am. Chem.* **1993**, *115* (9), 12545–12549.
82. Roy, S.; Das, D.; Dasgupta, A.; Mitra, R. N.; Das, P. K. *Langmuir* **2005**, *21* (23), 10398–10404.
83. Gangardt, D. *Nature* **2004**, *429*, 281–285.
84. Gao, C.; Che, S. *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20* (17), 2750–2768.
85. Gao, C.; Sakamoto, Y.; Terasaki, O.; Sakamoto, K.; Che, S. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17* (34), 3591-3602.
86. Morante, S. *Desarrollo de métodos analíticos para la separación quiral y su aplicación al estudio de procesos de síntesis asimétrica*. 1ª edición. España: Dykinson, **2007**. ISBN: 978-84-9772-998-7
87. Ali, S.A.; Zheng, J.; Apkarian, R.; Dublin, S.; Shamsi, S.A. *Anal Chem.* **2007**, *79* (3), 879-898.
88. Yang, D.; Zhang, C. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (14), 4814–4818.
89. Sterzycki, R. *Synthesis*, **1979**, *9*, 724-725.
90. Moglioni, A. G.; García-Expósito, E.; Aguado, G. P.; Parella, T.; Branchadell, V.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (13), 3934–3940.
91. Moglioni, A. G.; Muray, E.; Castillo, J. A.; Álvarez-Larena A.; Moltrasio, G. Y.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 2402–2410.
92. Rodriguez, M.; Heitz, A.; Martinez, J. *Tet. Lett.* **1991**, 923–926.
93. Soai, K.; Yokoyama, S.; Mochida, K. *Synthesis* **1987**, *7*, 647-648
94. Periasamy, M.; Thirumalaikumar, M. *J. Organomet. Chem.* **2000**, *609* (1-2), 137–151.
95. McGeary, R. P. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39* (20), 3319–3322.
96. Montalbetti, C. a G. N.; Falque, V. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827–10852.
97. Denkov, N. D.; Tcholakova, S.; Golemanov, K.; Ananthpadmanabhan, K. P.; Lips, A. *Soft Matter* **2009**, *5* (18), 3389.
98. Kuliszewska, E.; Brecker, L. *J. Surfactants Deterg.* **2014**, *17* (5), 951–957.

BIBLIOGRAFÍA

99. Anastasiadis, S.H.; Chen, J.K.; Koberstein, J.T.; Siegel, A.F.; Sohn, J. E.; Emerson, J.A. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *119* (1), 55–66.
100. Pinazo, A.; Angelet, M.; Pons, R.; Lozano, M.; Infante, M. R.; Pérez, L. *Langmuir* **2009**, *25* (14), 7803–7814.
101. Pucci, C.; Pérez, L.; La Mesa, C.; Pons, R. *Soft Matter* **2014**, *10* (48), 9657–9667.
102. Mukerjee, P.; Mysels, K. J. *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems*. National Bureau of Standards, NSRDS-NBS 36; U.S. Government Printing Office: Washington, DC, **1971**.
103. Zajac, J.; Chorro, C.; Lindheimer, M.; Partyka, S. *Langmuir* **1997**, *13* (6), 1486–1495.
104. Porte, G.; Poggi, Y.; Appell, J.; Maret, G. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (23), 5713–5720.
105. Ray, a; Némethy, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93* (25), 6787–6793.
106. Folmer, B. M.; Holmberg, K.; Klingskog, E. G.; Bergström, K. *J. Surfactants Deterg.* **2001**, *4* (2), 175–183.
107. Menger, F. M.; Shi, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (29), 9338–9339.
108. Brito, R. O.; Silva, S. G.; Fernandes, R. M. F.; Marques, E. F.; Enrique-Borges, J.; Do Vale, M. L. C. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2011**, *86* (1), 65–70.
109. Muto, S.; Shimazaki, Y.; Meguro, K. *J. Colloid Interface Sci.* **1974**, *49* (2), 173–176.
110. Boros, E.; Gale, E. M.; Caravan, P. *Dalton Trans.* **2014**, *44*, 4804–4818.
111. Yan, G.P.; Robinson, L.; Hogg, P. *Radiography* **2007**, *13*, e5–e19.
112. Katti, G.; Ara, S. A.; Shireen, A. *Int. J. Dent. Clin.* **2011**, *3* (1), 65–70.
113. Chen, Y.; Yang, H.; Tang, W.; Cui, X.; Wang, W.; Chen, X.; Yuan, Y.; Hu, A. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1* (40), 5443–5449.
114. Constantin, C.; Doaga, A.; Cojocariu, A.; Dumitru, I.; Caltun, O. *J. Adv. Res. Phys.* **2011**, *2* (1), 106–110.
115. Lee, N.; Hyeon, T. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (7), 2575–2589.
116. Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B. *Chem. Rev.* **1999**, *99* (9), 2293–2352.
117. Aime, S.; Barge, A; Gianolio, E.; Pagliarin, R.; Silengo, L.; Tei, L. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* **2005**, No. 49, 99–121.
118. Caravan, P. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35* (6), 512–523.
119. Helm, L. *Future Med. Chem.* **2010**, *2* (3), 385–396.

BIBLIOGRAFÍA

120. Morcos, S. K. *Eur. J. Radiol.* **2008**, *66* (2), 175–179.
121. Laurent, S.; Elst, L. V.; Muller, R. N. *Contrast Media Mol. Imaging* **2006**, *1* (3), 128–137.
122. Laurent, S.; Elst, L. V.; Henoumont, C.; Muller, R. N. *Contrast Media Mol. Imaging* **2010**, *5* (6), 305–308.
123. Tweedle, M. F. *Invest. Radiol.* **1992**, *27*, S2–S6.
124. Sieber, M. A.; Lengsfeld, P.; Frenzel, T.; Golfier, S.; Schmitt-Willich, H.; Siegmund, F.; Walter, J.; Weinmann, H.J.; Pietsch, H. *Eur. Radiol.* **2008**, *18* (10), 2164–2173.
125. Morcos, S. K.; Thomsen, H. S. *Nephron Clin. Pract.* **2008**, *110* (1), c24–c32.
126. Wáng, Y. J.; Schroeder, J.; Siegmund, H.; Idée, J.; Fretellier, N.; Factor, C.; Deng, M.; Kang, W.; Morcos, S. K. **2015**, *5* (4), 534–545.
127. White, G. W.; Gibby, W. A.; Tweedle, M. F. *Invest Radiol.* **2006**, *41* (3), 272–278.
128. Polasek, M.; Caravan, P. *Inorg. Chem.* **2013**, *52* (7), 4084–4096.
129. Boros, E.; Caravan, P. *Inorg. Chem.* **2015**, *54* (5), 2403–2410.
130. Terreno, E.; Castelli, D. D.; Viale, A.; Aime, S. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 3019–3042.
131. Jurkin, D.; Gildehaus, F. J.; Wierczinski, B. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2009**, *282* (1), 293–298.
132. Aime, S.; Anelli, P. L.; Botta, M.; Fedeli, F.; Grandi, M.; Paoli, P.; Uggeri, F. *Inorg. Chem.* **1992**, *31* (1), 2421–2428.
133. Ruloff, R.; Tóth, E.; Scopelliti, R.; Tripier, R.; Handel, H.; Merbach, A. E. *Chem. Commun.* **2002**, 2630–2631.
134. Helm, L.; Merbach, A. E. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (6), 1923–1960.
135. Dumas, S.; Jacques, V.; Sun, W.-C.; Troughton, J. S.; Welch, J. T.; Chasse, J. M.; Schmitt-Willich, H.; Caravan, P. *Invest. Radiol.* **2010**, *45* (10), 600–612.
136. Kobayashi, H.; Kawamoto, S.; Jo, S. K.; Bryant, H. L.; Brechbiel, M. W.; Star, R. A. *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14* (2), 388–394.
137. Aime, S.; Barge, A.; Gianolio, E.; Pagliarin, R.; Silengo, L.; Tei, L. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* **2005**, No. 49, 99–121.
138. Deal, K. A.; Motekaitis, R. J.; Martell, A. E.; Welch, M. J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (16), 3096–3106.
139. Caravan, P.; Farrar, C. T.; Frullano, L.; Uppal, R. *Contrast Media Mol. Imaging.* **2009**, *4* (2), 89–100.

BIBLIOGRAFÍA

140. Fulton, D. A.; O'Halloran, M.; Parker, D.; Senanayake, K.; Botta, M.; Aime, S. *Chem. Commun.* **2005**, 474-476.
141. Jacques, V.; Desreux, J. F. *Top. Curr. Chem.* **2002**, *221*, 123-164.
142. Comblin, V.; Gilsoul, D.; Hermann, M.; Humblet, V.; Jacques, V.; Mesbahi, M.; Sauvage, C.; Desreux, J. F. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *185-186*, 451-470.
143. Geninatti -Crich, S.; Cabella, C.; Barge, A.; Belfiore, S.; Ghirelli, C.; Lattuada, L.; Lanzardo, S.; Mortillaro, A.; Tei, L.; Visigalli, M.; Forni, G.; Aime, S. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (16), 4926-4936.
144. Rommer, P. S.; Wiest, G.; Kronnerwetter, C.; Zach, H.; Loader, B.; Elwischger, K.; Trattnig, S. *Front. Neuroanat.* **2015**, *9* (June), 1-6.
145. Kerchner, G. A. *J. Alzheimers Dis.* **2011**, *26*, 91-95.
146. Rooney, W. D.; Johnson, G.; Li, X.; Cohen, E. R.; Kim, S.-G.; Ugurbil, K.; Springer, C. S. *Magn. Reson. Med.* **2007**, *57* (2), 308-318.
147. Van der Kolk, A. G.; Hendrikse, J.; Zwanenburg, J. J. M.; Visser, F.; Luijten, P. R. *Eur. J. Radiol.* **2013**, *82* (5), 708-718.
148. Rohrer, M.; Bauer, H.; Mintorovitch, J.; Requardt, M.; Weinmann, H.-J. *Invest. Radiol.* **2005**, *40* (11), 715-724.
149. Mastarone, D. J.; Harrison, V. S. R.; Eckermann, A. L.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (14), 5329-5337.
150. Kielar, F.; Tei, L.; Terreno, E.; Botta, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (23), 7836-7837.
151. Costa, J.; Toth, E.; Helm, L.; Merbach, A.E. *Inorg. Chem.* **2005**, *44* (13), 4747-4755.
152. Garimella, P. D.; Datta, A.; Romanini, D. W.; Raymond, K. N.; Francis, M. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (37), 14704-14709.
153. Hems, W. P.; Groarke, M.; Zannotti-Gerosa, A.; Grasa, G. A.; *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1340 - 1347.
154. Kizirian, J. C. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 140-205.
155. Nonn, M.; Kiss, L.; Sillanpää, R.; Fülöp, F. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 100-106.
156. Grasa, G. A.; Zannotti-Gerosa, A.; Hems, W. A. *J. Organomet. Chem.* **2006**, *691*, 2332-2334.
157. Kodama, K.; Sugawara, K.; Hirose, T. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13584-13592.
158. Aguilera, J.; Moglioni, A. G.; Moltrasio, G. Y.; Ortuño, R. M. *Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19* (3), 302-308.

BIBLIOGRAFÍA

159. Lee, B.-I.; Lee, K. S.; Lee, J. H.; Lee, I. S.; Byeon, S.-H. *Dalt. Trans.* **2009**, No. 14, 2490-2495.
160. Mastarone, D. J.; Harrison, V. S. R.; Eckermann, A. L.; Parigi, G.; Luchinat, C.; Meade, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (14), 5329–5337.
161. Martínez, M. D.; Rustoy, E. M.; Raggio, N.; Burton, G. *Inorg. Chem. Commun.* **2015**, *51*, 110–113.
162. Barge, A.; Cravotto, G.; Gianolio, E.; Fedeli, F. *Contrast Media Mol. Imaging* **2006**, *1*, 5, 184-188.
163. Cosentino, U.; Villa, A.; Pitea, D.; Moro, G.; Barone, V.; Maiocchi, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4901-4909
164. Frullano, L.; Rohovec, J.; Peters, J.A.; Geraldès, C.F.G.C. *Top. Curr. Chem.* **2002**; *221*, 25–60.
165. Boros, E.; Polasek, M.; Zhang, Z.; Caravan, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 19858–19868.
166. Regueiro-Figueroa, M., Platas-Iglesias, C. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 6436-6445.
167. Wang, F.; Wang, Y.; Zhang, X.; Zhang, W.; Guo, S.; Jin, F. *J. Control. Release* **2014**, *174*, 126–136.
168. Löscher, W.; Potschka, H. *Prog Neurobiol* **2005**, *76*, 22–76.
169. Reissmann, S. *J. Pept. Sci.* **2014**, *20* (10), 760–784.
170. Ramsey, J. D.; Flynn, N. H. *Pharmacol. Ther.* **2015**, *154*, 78–86.
171. Copolovici, D. M.; Langel, K.; Eriste, E.; Langel, Ü. *ACS Nano* **2014**, *8* (3), 1972–1994.
172. Jobin, M.L.; Blanchet, M.; Henry, S.; Chaignepain, S.; Manigand, C.; Castano, S.; Lecomte, S.; Burlina, F.; Sagan, S.; Alves, I. D. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848* (2), 593–602.
173. Antoniou, X.; Borsello, T. *Pharmaceuticals* **2010**, *3* (2), 379–392.
174. Derossi, D.; Calvet, S.; Trembleau, A.; Brunissen, A.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271* (30), 18188–18193.
175. Frankel, A. D.; Pabo, C. O. *Cell* **1988**, *55* (6), 1189–1193.
176. Vivès, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272* (25), 16010–16017.
177. Koren, E.; Torchilin, V. P. *Trends Mol. Med.* **2012**, *18* (7), 385–393.
178. Green, M.; Loewenstein, P. M. *Cell* **1988**, *55* (6), 1179–1188.
179. Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1998**, *1414* (1-2), 127–139.

BIBLIOGRAFÍA

180. Elliott, G.; O'Hare, P. *Cell* **1997**, *88* (2), 223–233.
181. Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (8), 5836–5840.
182. El-Andalousi, S.; Johansson, H. J.; Holm, T.; Langel, Ü. **2007**, *15* (10), 1820–1826.
183. Säälilik, P.; Elmquist, A.; Hansen, M.; Padari, K.; Saar, K.; Viht, K.; Langel, U.; Pooga, M. *Bioconjug. Chem.* **2004**, *15* (6), 1246–1253.
184. Verdurmen, W. P. R.; Brock, R. *Trends Pharmacol. Sci.* **2011**, *32* (2), 116–124.
185. Prochiantz, A. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1996**, *6* (5), 629–634.
186. Pujals, S.; Giralt, E. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (4-5), 473–484.
187. Lindgren, M. E.; Hällbrink, M. M.; Elmquist, A. M.; Langel, U. *Biochem. J.* **2004**, *377* (Pt 1), 69–76.
188. Fernández-Carneado, J.; Kogan, M. J.; Pujals, S.; Giralt, E. *Biopolymers* **2004**, *76* (2), 196–203.
189. Deshayes, S.; Plénat, T.; Aldrian-Herrada, G.; Divita, G.; Le Grimellec, C.; Heitz, F. *Biochemistry* **2004**, *43* (24), 7698–7706.
190. Farrera-Sinfreu, J.; Giralt, E.; Castel, S.; Albericio, F.; Royo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9459–9468.
191. Pulido-Villamil, X. *Péptidos miméticos con capacidad de atravesar barreras biológicas*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. **2014**.
192. Carbajo, D. *γ-Peptides based on proline derivatives: novel applications and secondary structure*. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. **2012**.
193. Fonseca, S. B.; Pereira, M. P.; Kelley, S. O. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61* (11), 953–964.
194. Nakase, I.; Takeuchi, T.; Tanaka, G.; Futaki, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60* (4-5), 598–607.
195. Nakase, I.; Akita, H.; Kogure, K.; Gräslund, A.; Langel, U.; Harashima, H.; Futaki, S. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (7), 1132–1139.
196. Trabulo, S.; Cardoso, A. L.; Mano, M.; de Lima, M. C. P. *Pharmaceuticals* **2010**, *3* (4), 961–993.
197. Vivès, E.; Schmidt, J.; Pèlegri, A. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **2008**, *1786* (2), 126–138.
198. Suzuki, T.; Futaki, S.; Niwa, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (4), 2437–2443.

BIBLIOGRAFÍA

199. Console, S.; Marty, C.; García-Echeverría, C.; Schwendener, R.; Ballmer-Hofer, K. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (37), 35109–35114.
200. Fuchs, S. M.; Raines, R. T. *Biochemistry* **2004**, *43* (9), 2438–2444.
201. Nakase, I.; Niwa, M.; Takeuchi, T.; Sonomura, K.; Kawabata, N.; Koike, Y.; Takehashi, M.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Simpson, J. *Mol. Ther.* **2004**, *10* (6), 1011–1022.
202. Nakase, I.; Tadokoro, A.; Kawabata, N.; Takeuchi, T.; Katoh, H.; Hiramoto, K.; Negishi, M.; Nomizu, M.; Sugiura, Y.; Futaki, S. *Biochemistry* **2007**, *46* (2), 492–501.
203. Fretz, M. M.; Penning, N. a; Al-Taei, S.; Futaki, S.; Takeuchi, T.; Nakase, I.; Storm, G.; Jones, A. T. *Biochem. J.* **2007**, *403* (2), 335–342.
204. Futaki, S.; Nakase, I.; Tadokoro, a; Takeuchi, T.; Jones, a T. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35* (Pt 4), 784–787.
205. Jain, K.; Jain, N. K. *J. Immunol. Methods* **2015**, *422*, 1–12.
206. WHO. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **2010**, No. 949, 22–26.
207. Kaye, P.; Scott, P. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9* (8), 604–615.
208. Tiunan, T. S.; Santos, A. O.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P. D.; Nakamura, C. V. *Int. J. Infect. Dis.* **2011**, *15* (8), 525–532.
209. Kamhawi, S. *Trends Parasitol.* **2006**, *22* (9), 439–445.
210. Burchmore, R. J.; Barrett, M. P. *Int. J. Parasitol.* **2001**, *31* (12), 1311–1320.
211. Gutiérrez, V.; Seabra, A. B.; Reguera, R. M.; Khandare, J.; Calderón, M. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45*, 152-168.
212. Bezerra, D.M.J.; Sampaio, C.; Alameida, A.; Mothé, D.; Tavares, P. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1-11.
213. De Oliveira Guerra, J. A.; Prestes, S. R.; Silveira, H.; Coelho, L. I. D. A. R. C.; Gama, P.; Moura, A.; Amato, V.; Barbosa, M. D. G. V.; de Lima Ferreira, L. C. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5* (3), 1–5.
214. Croft, S. L.; Sundar, S.; Fairlamb, A. H. *Society* **2006**, *19* (1), 111–126.
215. Croft, S. L.; Coombs, G. H. **2003**, *19* (11), 502–508.
216. Yardley, V.; Croft, S. L. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2000**, *13*, 243–248.
217. Sugano, K.; Kansy, M.; Artursson, P.; Avdeef, A.; Bendels, S.; Di, L.; Ecker, G. F.; Faller, B.; Fischer, H.; Gerebtzoff, G.; Lennernaes, H.; Senner, F. *Nat. Rev. Discov.* **2010**, *9* (8), 597–614.
218. Waugh, J. M.; Lee, J.; Dake, M. D.; Browne, D. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *683*, 553–572.

BIBLIOGRAFÍA

219. Rivas, L.; Luque-Ortega, J. R.; Andreu, D. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2009**, *1788* (8), 1570–1581.
220. Luque-Ortega, J. R.; De La Torre, B. G.; Hornillos, V.; Bart, J. M.; Rueda, C.; Navarro, M.; Amat-Guerri, F.; Acuña, a. U.; Andreu, D.; Rivas, L. *J. Control. Release* **2012**, *161* (3), 835–842.
221. Rúa, F.; Boussert, S.; Parella, T.; Díez-Pérez, I.; Branchadell, V.; Giralt, E.; Ortuño, R. M. *Org. Lett.* **2007**, *9* (18), 3643–3645.
222. Torres, E.; Gorrea, E.; Da Silva, E.; Nolis, P.; Branchadell, V.; Ortuño, R. M. *Org. Lett.* **2009**, *11* (11), 2301–2304.
223. Amblard, M.; Fehrentz, J.-A.; Martinez, J.; Subra, G. *Mol. Biotechnol.* **2006**, *33* (3), 239–254.
224. Gorrea, E. *Cyclobutane peptides and ureas: synthesis, folding, self-assembling and some biological properties*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. **2011**.
225. Sabbioni, G.; Jones, J. B. *J. Org. Chem.* **1987**, *52* (20), 4565–4570.
226. Carpino, L.A.; Han, G.Y. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, (92), 5748–5749.
227. Carpino, L. A.; Han, G. Y. *J. Org. Chem.* **1972**, *37* (22), 3404–3409.
228. Carpino, L. A.; Cohen, B. J.; Stephens, K. E.; Sadat-Aalae, S. Y.; Tien, J. H.; Langridge, D. C. *J. Org. Chem.* **1986**, *51* (19), 3732–3734.
229. Kelly, R. C.; Gebhard, I.; Wicnienski, N. *J. Org. Chem.* **1986**, *51* (24), 4590–4594.
230. Maegawa, T.; Fujiwara, Y.; Ikawa, T.; Hisashi, H.; Monguchi, Y.; Sajiki, H. *Amino Acids* **2009**, *36* (3), 493–499.
231. Mellah, I. *J. Chem. Pharm. Res.*, **2013**, *5*(2),253-257.
232. Futaki, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 547–558.
233. Rothbard, J. B.; Jessop, T. C.; Lewis, R. S.; Murray, B. a.; Wender, P. a. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (31), 9506–9507.
234. Gräslund, A.; Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, Ü.; Futaki, S. *J. Biophys.* **2011**, 1-10.
235. Thorén, P. E. G.; Persson, D.; Isakson, P.; Goksör, M.; Önfelt, A.; Nordén, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *307* (1), 100–107.
236. Wadia, J. S.; Stan, R. V; Dowdy, S. F. *Nat. Med.* **2004**, *10* (3), 310–315.
237. Gautam, A.; Sharma, M.; Vir, P.; Chaudhary, K.; Kapoor, P.; Kumar, R.; Nath, S. K.; Raghava, G. P. S. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *89*, 93–106.

BIBLIOGRAFÍA

245. Anastasiadis, S.; Chen, J.-K.; Koberstein, J.; Siegel, A.; Sohn, J.; Emerson, J. *J. Colloid Interface Sci.* **1987**, *119* (1), 55–66.
246. Pedersen, J. S. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1997**, *70*, 171–210.
247. Pabst, G.; Rappolt, M.; Amenitsch, H.; Laggner, P. *Phys Rev E* **2000**, *52* (3), 4000–4009.
248. Zhao, Y.; Truhlar, D. G. *Theor. Chem. Acc.* **2008**, *120* (1-3), 215–241.
249. Dolg, M.; Stoll, H.; Savin, a.; Preuss, H. *Theor. Chim. Acta* **1989**, *75* (3), 173–194.
250. Cossi, M.; Rega, N.; Scalmani, G.; Barone, V. *J. Comput. Chem.* **2003**, *24* (6), 669–681.
251. Frisch, M.J. *et al.*, Gaussian, Inc. Wallingford CT, **2009**.
252. Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379–4386.
253. Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1419–1427.
254. Kaminski, G. A; Friesner, R.A; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105* (28), 6474–6487.
255. Mosmann, T. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65* (1-2), 55–63.