



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Determinación de la capacidad de agregación de compuestos escuaramídicos

Ariadna Pérez Pérez

Grau de Química

Any acadèmic 2016-17

Treball tutelat per Maria del Carmen Rotger Pons

Departament de Química

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Paraules clau del treball:

Escuaramides, Interaccions intramoleculares, agregació.

Agradecimientos

El trabajo ha sido realizado bajo la supervisión de M. Carmen Rotger a quién me gustaría expresar más profundo agradecimiento por hacer posible este trabajo. Quiero darle las gracias por toda la paciencia, tiempo y dedicación que ha tenido para que este pequeño proyecto haya salido adelante.

También quiero agradecerle a Marta, Manel, Xisca , Carlos y Helena que siempre que han podido me han ayudado en el laboratorio . Ellos siempre han sido muy amables y han hecho más llevadera la parte experimental del trabajo.

A mis padres por animarme todos los días sin importar las circunstancias y el tiempo. A mis amigos por apoyarme, por no dejarme caer y siempre estar ahí. Anita, Cris, Amy, Dani, Edu, patri , Xavi , Roser , Javi y Ana.

ÍNDICE

1. Introducción	2
1.1 Escuaramidas como agentes de transfección: antecedentes.	6
2. Objetivo	9
3. Resultados y discusión	9
3.1 Síntesis	9
3.2 Estudios de agregación	14
3.2.1 Evaluación DLS de la agregación de los compuestos escuaramídicos	15
3.2.2 Evaluación de la agregación de la escuaramida SQ1 por espectroscopia UV-Visible	17
3.2.3 Evaluación de la agregación de la escuaramida SQ1 por espectroscopia IR.	20
3.3 Estudio sobre la resistencia a la hidrolisis de la SQ1	21
3.4 Determinación del pKa del C2 por potenciometría.	22
4. Conclusiones	24
5. Métodos experimentales	24

1. INTRODUCCIÓN

Las escuaramidas son los amino derivados del 3,4-dihidroxiciclobut-3-en-1,2-diona también conocido como ácido escuarico. Estas poseen una estructura rígida y plana. En el anillo se sitúan dos grupos carbonilo y dos nitrógenos que prácticamente están situados en el mismo plano, por lo que se caracterizan por poseer propiedades donadoras yceptoras de enlaces de hidrógeno simultáneamente (Figura 1). El hecho de que estos grupos estén situados en el mismo plano permite la conjugación del orbital pz del nitrógeno al sistema π situado perpendicular al plano y otorga al enlace N-C carácter de doble enlace. La rotación de dicho enlace está restringida. Al igual que las amidas secundarias. Sin embargo, la energía de rotación del enlace escuaramida es de 68kJ/mol, mientras que las amidas secundarias que es aproximadamente de 80kJ/mol.^{1,2,3}

Aun siendo la barrera rotacional menor que la de una amida es lo suficientemente elevada como para distinguir la presencia de distintos conforméromos en equilibrio en disolución. Los posibles conforméromos son E,E ; Z,E y Z,Z (Figura 1).

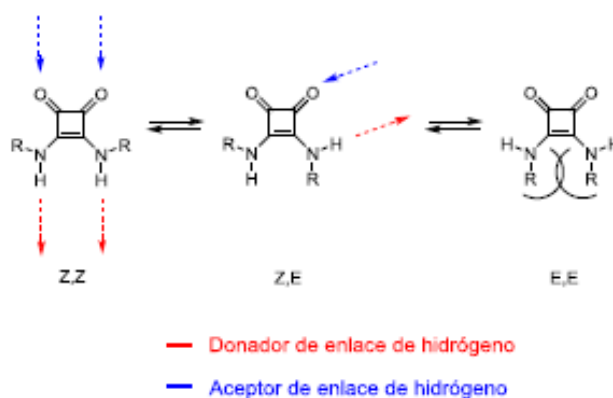


Figura 1. Estructuras de los distintos conforméromos posibles en disolución

El conforméromo E,E es el menos favorable de los tres ya que los sustituyentes están muy próximos en el espacio dando lugar a cierto impedimento estérico y no se han detectado en disolución. Por otra parte los conforméromos Z,E son capaces de establecer puentes de hidrogeno intramoleculares cuando se sitúa a una distancia adecuada en uno de los sustituyentes escuaramidicos un grupo aceptor de enlace de hidrógeno. Este tipo de conforméromo es un buen candidato para obtener estructuras plegadas como miméticos de giros- β (Figura 2).

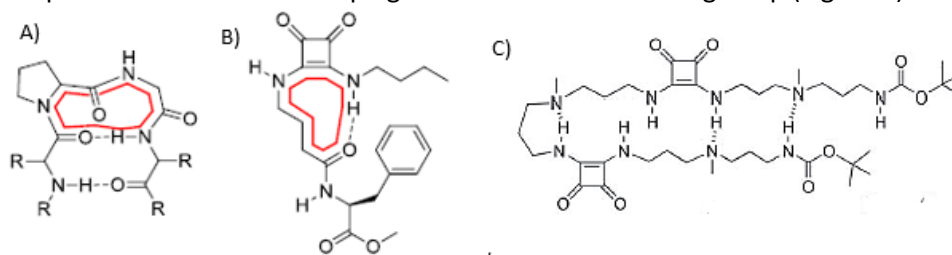


Figura 2. a) Estructura de un giro- β natural ; b) estructura de un mimético de giro β c) estructura plegada tipo horquilla de un compuesto oligoescuaramídico.

¹ M. C. Rotger, M. N. Piña, A. Frontera, G. Martorell, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 2303 – 2308.

² R. I. Storer, C. Aciro, L. H. Jones, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 2330–2346

³ C. Rotger, M. N. Piña, M. Vega, P. Ballester, P. M. Deyà, A. Costa, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, 45, 6844 – 6848.

El mimético de giro- β basado en la unidad escuaramida que se muestra en la figura 2b forma un puente de hidrogeno intramolecular entre el oxígeno del carbonilo amídico y el NH escuaramídico formándose un ciclo de 10 miembros. En la estructura tipo horquilla el giro se forma inducido por el enlace de hidrógeno intramolecular entre el NH escuaramídico y el N terciario. En este caso se forma un ciclo de 9 miembros (Figura 2c).

Dependiendo de cada confórmero el patrón de interacciones mediante enlace de hidrógeno será distinto. Por ejemplo, en una disolución de cloroformo del escuaramido ester que se muestra en la figura 3a, se observa la presencia del confórmero E y Z en equilibrio. El confórmero E puede dimerizar formando dos enlaces de hidrógeno. Sin embargo, la dimerización del confórmero Z de tipo cabeza-cola, no está favorecida al formarse solo un enlace de hidrógeno y la repulsión de los electrones del grupo éster. Por otra parte, para la bis-escuaramida secundaria de la figura 3b, existen diversas posibilidades de dimerización. Los confórmeros E, Z podrían dimerizar de forma análoga al ejemplo anterior y el isómero Z, Z podría dar agregados de tipo cabeza cola. Los estudios realizados determinaron que los confórmeros E, Z forman estructuras plegadas mediante enlaces de hidrógeno intramoleculares. Estas especies monoméricas es tan en equilibrio con un dímero. Al aumentar la concentración se propicia formación de agregados de tipo cabeza-cola.¹

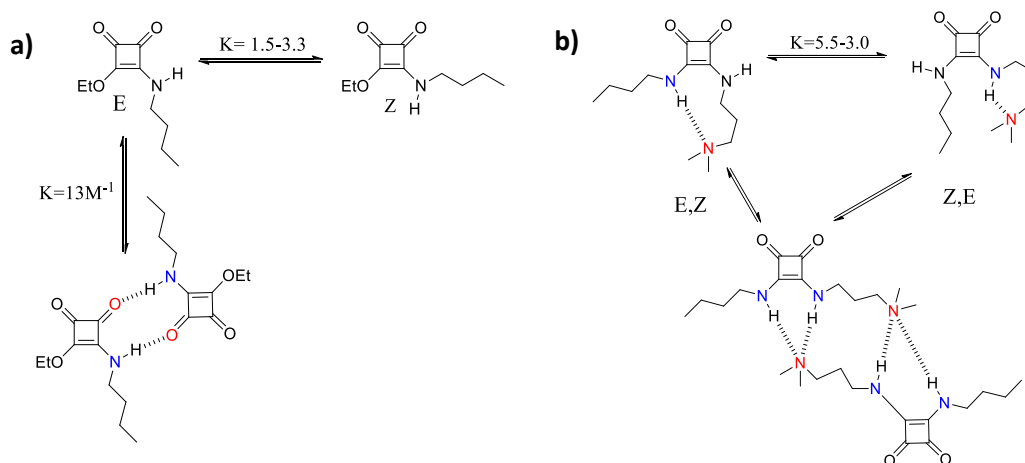


Figura 3. Equilibrios conformacionales y de dimerización

Los módulos de giro escuaramídicos se han utilizado para preorganizar precursores lineales oligoescuaramídicos en la síntesis de macrociclos escuaramídicos. La oligoescuaramidas lineales se preorganizan en forma de horquilla incluso en medios polares próticos como el etanol, para posteriormente y tras reaccionar con escuarato de dietilo obtener los correspondientes macrociclos.^{1,3}

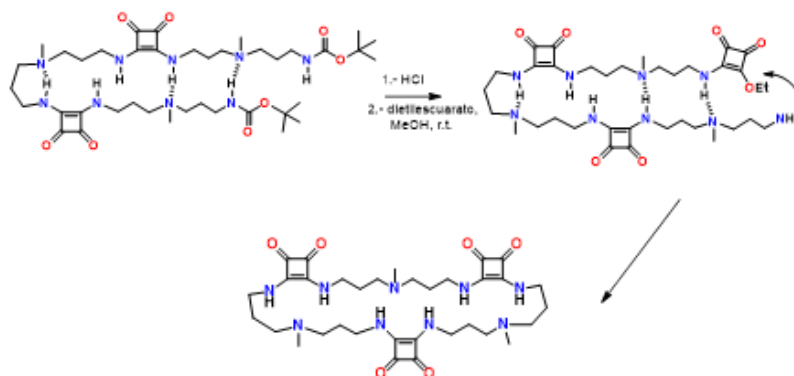


Figura 4. Esquema de la reacción de macrociclación

Los conformeros Z,Z son los que presentan el menor impedimento estérico además estos pueden establecer puentes de hidrogeno cooperativos con una variedad de compuestos o entre ellos mismos dando agregados del tipo cabeza-cola como se puede ver en el ejemplo de la figura 4 donde los enlaces de hidrogeno se forman entre los grupos $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$.⁴ La notable capacidad aceptor/donador de enlaces hidrógeno de la unidad escuaramida se puede explicar en términos de la ganancia en aromaticidad del anillo de cuatro miembros sobre la formación simultánea de enlaces de hidrógeno con los grupos carbonilo y N-H.⁴

Este tipo de agregados resultan muy insolubles en disolventes orgánicos. Existen algunos ejemplos donde se han obtenido estructuras cristalinas de este tipo de agregados. El carácter aromático de las escuaramidas se pone de manifiesto en las estructuras cristalinas obtenidas de diescuaramidas secundarias, donde se observa un empaquetamiento en el que se favorece las interacciones π - π aromático entre los anillos de escuaramida.⁷

Otro modelo de autoensamblamiento es debido a la agrupación de agregados de tipo cabeza-cola de forma helicoidal donde predominan las interacciones $\text{NH}\cdots\text{O}=\text{C}$, estos se posicionan de manera antiparalela compensando el fuerte momento dipolar del anillo escuaramida en los cristales resultantes.⁴

Por lo tanto las escuaramidas no solo pueden formar agregados mediante la formación de un cierto número de puentes de hidrogeno sino también por la acumulación de interacciones de carácter aromático. Aunque estas sean las interacciones no covalentes más habituales encontradas en las escuaramidas, estas pueden auto-asociarse para dar lugar a un gran número de estructuras incluyendo interacciones electroestáticas, e interacciones catión- π y anión- π , etc.^{4,5}

Un ejemplo es la bis-(2-piridi)etilaminoescuaramida además de la formación de los agregados por enlace de hidrógeno entre los grupos el NH escuaramidico con los carbonilos vecinos, se observa la formación de dos interacciones C-H \cdots N entre las piridinas de los extremos de la molécula y los correspondientes anillos de las moléculas vecinas. Este empaquetamiento se ve alterado cuando se forman los complejos con el ion nitrato (Figura 5).⁴

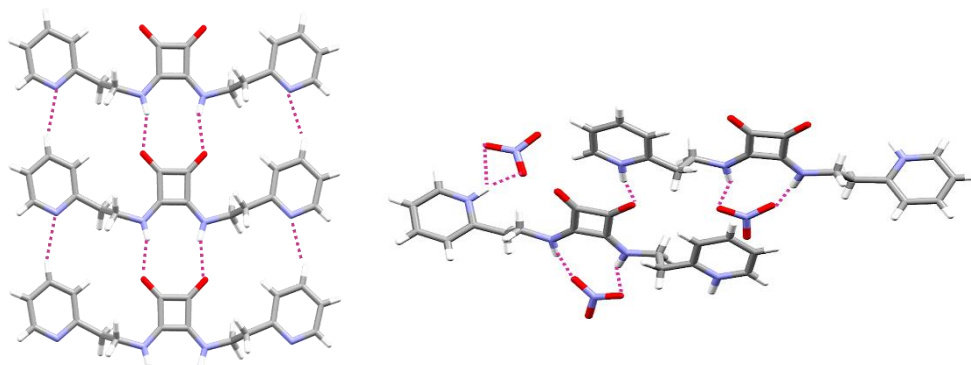


Figura 5.a) Vista en perspectiva de cómo se forman agregados del tipo cabeza-cola. b) Complejo formado en presencia de nitrato.

⁴ C. Rotger, B. Soberats, D. Quiñonero, A. Frontera, P. Ballester, J. Benet-Buchholz, P. M. Deyà, A. Costa, *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, *11*, 1864–1868.

⁵ C. López, M. Ximenis, F. Orvay, C. Rotger, A. Costa, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 1–6.

⁶ A. P. and R. Prohens, *Cryst. Growth Des.*, **2014**, *14*, 397–400.

⁷ D. Quiñonero, A. Frontera, D. Escudero, P. Ballester, A. Costa, P. M. Deyà, *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, *8*, 1182–1187.

También encontramos un ejemplo donde la molécula que carece de agregación en ausencia de aniones fosfato mientras que cuando estos están presentes es capaz de la formación de los polímeros escuaramídicos (Figura 6). Los agregados encontrados varían en forma y tamaño en función de la concentración de aniones fosfato. Por lo tanto, parece que la reorganización de los agregados da lugar a una respuesta cooperativa, los aniones H_2PO_4^- dan lugar a múltiples secuencias de puentes de hidrogeno.⁸ Este polímero podría ser utilizado en la detección selectiva de iones fosfato inorgánicos en medio acuoso. Es de interés tanto desde la perspectiva de su relevancia en sistemas biológicos como de la salud humana, y su papel como contaminante que causa la eutrofización del agua dulce.

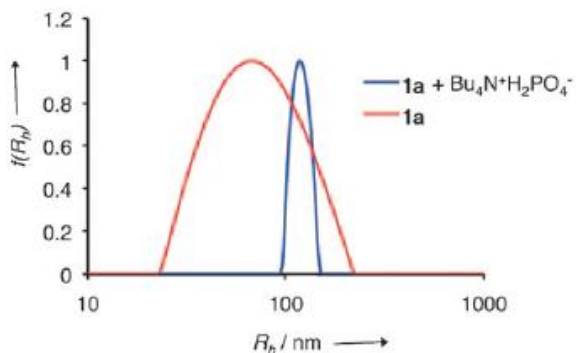


Figura 6. Medidas DLS a 90°C de un polímero escuaramídico ($2,4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) en ausencia (rojo) y presencia (azul) de $\text{BuNH}_4^+\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ($2,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$)

Para la construcción de polímeros constituidos por unidades de compuesto escuaramídicos la estrategia a seguir es exaltar el carácter apolar de estas intentando maximizar las interacciones de tipo aromático como pueden ser $\pi\text{-}\pi$ o $\text{CH}\cdots\pi$. Un ejemplo es la combinación de estructuras arilesquaramidas con los arilesquaramato que da lugar a estructuras fibrilares de hidrogel esto se debe que ambas estructuras son planares y pueden formar dímeros mediante interacciones aromáticas de staking (Figura 7).⁵

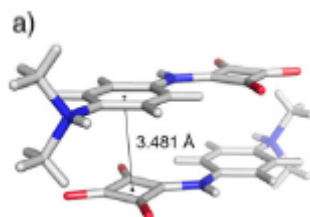


Figura 7. a) Disposición planar de apilamiento de estructuras de arilesquaramida y arilesquaramato.

En base a los echos expuestos podemos hacer una subdivisión de estos compuestos en dos grandes grupos, el primero esta constituido por escuaramidas que presentan propiedades de autoensamblamiento en presencia de cationes . El segundo grupo lo forman las escuaramidas que son capaces de agregarse por si mismas.

⁸ A. Rostami , C. J. Wei , G. Guérin , M. S. Taylor , *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011** , 50, 2059 – 2062 .

Aunque las escuaramidas a lo largo del tiempo han demostrado que tienen un gran número de aplicaciones interesantes, las más destacadas son su uso en organocatálisis y como receptores y transportadores de aniones. Más recientemente se ha demostrado que algunos compuestos escuaramídicos poseen una destacada actividad biológica como agentes antitumorales, antiparasitarios, transportadores moleculares etc.^{2,10,11}

En los compuestos escuaramídicos la combinación de la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas de los restos tetraalquilamonio con oxoaniones resulta una estrategia muy eficaz a la hora de sistemas de reconocimiento específico de aniones como son el sulfato, el fosfato, ambos de relevancia biológica.

Así el reconocimiento específico de grupos fosfato presentes en las membranas biológicas facilita la entrada de oligoescuaramidadas cíclicas en el interior celular. Se ha comprobado la facilidad de internalización de estos compuestos mediante oligoescuaramidas cíclicas al unirlos a un grupo fluorescente, y se observó que estas son capaces de entrar en las células por vía endocitótica y acumularse en los endosomas tardíos.^{9,11}

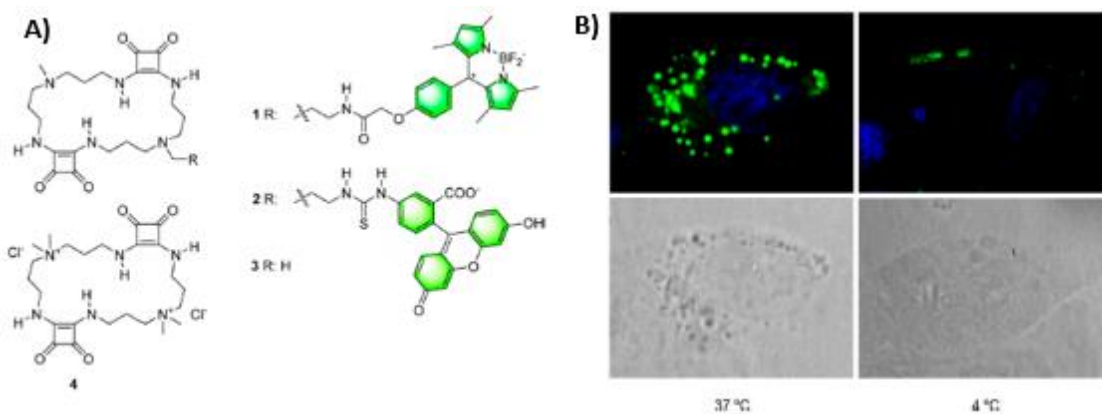


Figura 8.A) Estructura de las cicloescuaramidas utilizadas para los estudios de fluorescencia . B) Imágenes de la microscopia confocal de las células U87MG tratadas con la escuaramida 1 (10 μ M) a 37 °C y 4 °C.

En la bibliografía se han descrito cicloescuaramidas que tienen capacidad de actuar como inhibidores de kinasa con actividad antitumoral. Además, es relativamente reciente su posible aplicabilidad como moléculas antiparasitarias para combatir la malaria o contra la enfermedad de Chagas.^{10,11}

1.1 Escuaramidas como agentes de transfección: antecedentes.

Debido a la gran afinidad de la estructura macrocíclica utilizada como marcador celular por los oxoaniones, el grupo de química supramolecular ha iniciado un estudio sobre la interacción de estructuras macrocíclicas análogas con ácidos nucleicos dado que son compuestos polifosfatados. El objetivo de dicho estudio era la evaluación de estos compuestos como agentes de transfección.

¹⁰ F. Olmo , C. Rotger , I. Ramírez-Macías , L. Martínez , C. Marín , L. Carreras , K. Urbanová , M. Vega, G. Chaves-Lemaur, A. Sampedro, M. J. Rosales , M. Sánchez-Moreno, A. Costa, *J. Med. Chem.* , **2014** , 57, 987– 999 .

¹¹ P. Villalonga , S. Fernandez de Mattos , G. Ramis , A. Obrador-Hevia , A. Sampedro , C. Rotger , A. Costa, *Chem. Med. Chem.* , **2012** , 7, 1472-1480 .

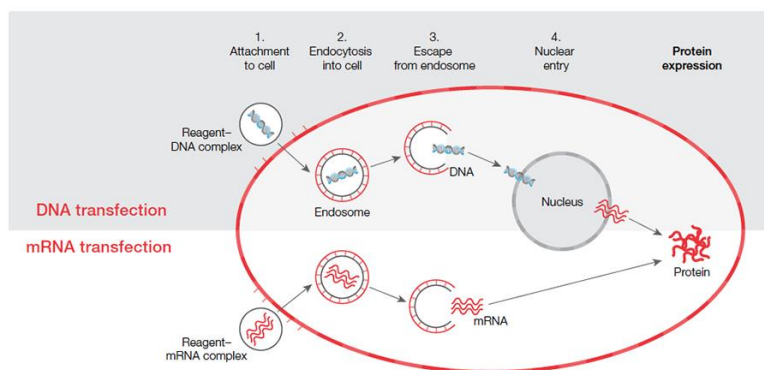


Figura 9. Representación gráfica del proceso de transfección

La transfección celular es el proceso mediante el que se introduce material genético externo a las células eucariotas haciendo que un porcentaje de este se localice en el núcleo para su transcripción y expresión. Pero debido al tamaño y la carga superficial negativa del ADN, la entrada al interior celular precisa de la intervención de un agente de transfección, que facilite su transporte de membrana, y lo proteja de nucleasas. El agente de transfección debe liberar el ácido nucleico en lugar adecuado para su transcripción pueda ejercer su función. Debido a esto se trabaja en el desarrollo de metodologías de transfección que puedan utilizarse en terapia génica.

En la actualidad los virus y retrovirus son los agentes más utilizados, aunque poseen una toxicidad inherente y un alto riesgo de carcinogénesis. Debido a esto se han desarrollado alternativas para utilizar vectores no virales como son algunos polímeros y lípidos catiónicos. Estos compuestos poseen una alta complejidad estructural que dificulta su síntesis.^{13,14}

Como alternativa a los agentes de transfección actuales se ha evaluado una serie de compuestos oligoesquaramídicos cíclicos como agentes de transfección. Las oligoesquaramidas cíclicas de pequeño tamaño estudiadas están formadas por dos grupos escuaramida unidos entre sí mediante dos diaminas alifáticas que contienen nitrógenos terciarios. Estos ciclos se diferencian entre sí por los grupos funcionales situados en las cadenas alquílicas cuya función es actuar de espaciadores (Figura 10). El hecho de poseer nitrógenos terciarios que son protonables a pH fisiológico supone tener grupos cargados positivamente que pueden ser de gran utilidad. Basado en esto las oligoesquaramidas podrían formar estructuras bien definidas con ligandos debido a su flexibilidad que le aporta su adaptabilidad y su cierto grado de preorganización conformacional.^{11,12} En algunos casos se utilizaron espaciadores decorados con grupos funcionales que pudieran modificar la afinidad del macrociclo por los grupos fosfato, ya que es tan importante su asociación con el ácido nucleico como la liberación del mismo en el interior molecular para que el ácido nucleico sea funcional.

¹² M. Sainlos, M. auchencorne, N. Oudrhiri, S. Zertal-Zidani, A. Aissaoui, J.-P. Vigneron, J.-M. Lehn, P. Lehn, *Chem. Bio. Chem.*, **2005**, *6*, 1023-1033.

¹³ Universitat de les Illes Balears, *Oligoesquaramidas cíclicas como agentes de transfección*, A. Costa, C. Rotger, R. Villalonga-Planells, P. Villalonga, P201530636. 17 Nov **2016**

¹⁴ A. I. Rocha, *Características y localización de la región de fusión del rabdovirus de la septicemia hemorrágica de la trucha*, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, **2004**.

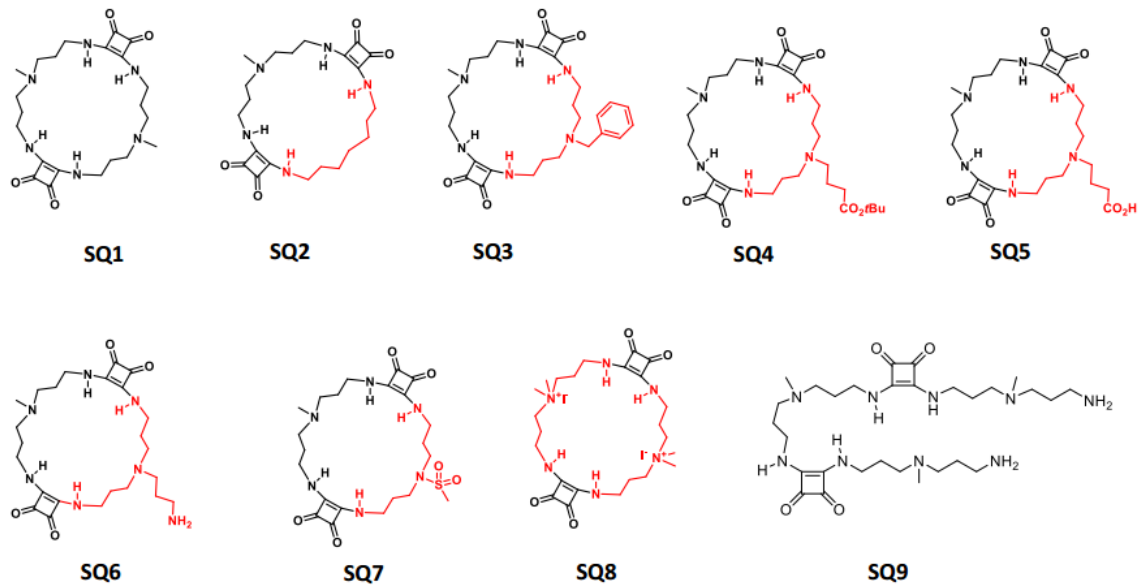


Figura 10. Estructuras de oligoesquaramidas cíclicas como agentes de transfección

Se ha evaluado la capacidad de los compuestos de la figura 10 de condensar o empaquetar ADN en forma de plásmido mediante Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM) . No todos los compuestos son capaces de empaquetar el plásmido de manera eficiente o completa. Las moléculas SQ1, SQ8 y SQ9 son las que mejor empaquetan el plásmido. Por otra parte, las SQ2 y SQ7 son las que no son capaces de conseguir un empaquetamiento del material genético (Figura 11).

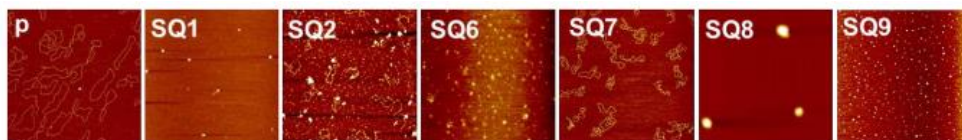


Figura 11. Imágenes de AFM de las estructuras de los complejos formados a partir de las oligoesquaramidas SQ1-SQ9 y el plásmido pmax-GFP (1 μ g plásmido/10 μ M SQ) .

Para evaluar su capacidad de transfección en cultivos celulares se utilizó un plásmido que codifica una proteína fluorescente , el pmax-GFP . Para determinar el grado de síntesis de proteína fluorescente se hicieron estudios de fluorescencia confocal. Para ello se formaron complejos de cada uno de los macrociclos-el pmax GFP. Los resultados se muestran en la figura 12. Los compuestos SQ 1,SQ6 y SQ8 son las que mayor capacidad de transfección muestran.Sin embargo, el más eficaz en esta tarea es el compuesto SQ1.

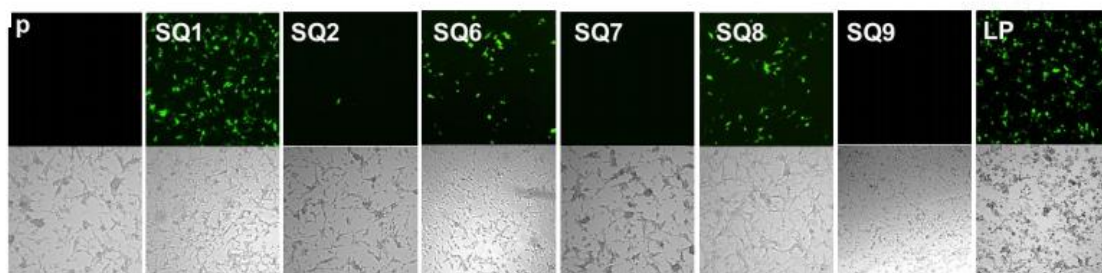


Figura 12. Imágenes de fluorescencia confocal a concentración 10 μ M en células U87-MG. LP: Lipofectamine 2000

Los resultados anteriores indican que el macrociclo SQ1 resulta tener una actividad biológica muy interesante y puede dar a aplicaciones potenciales, por todo ello es conveniente profundizar en el conocimiento de las propiedades supramoleculares de dicho compuesto y conocer su tendencia a auto asociarse en un medio análogo al fisiológico. Por otra parte, conocer la estabilidad química de estos compuestos resulta esencial para conocer mejor su resistencia a la degradación.

2. OBJETIVO

En base a todo lo que se ha expuesto en la introducción resulta evidente la necesidad de conocer el estado de agregación y la resistencia a la hidrólisis de los compuestos que ha demostrado tener una interesante actividad biológica como son las oligoescuaramidas cíclicas formadas por dos unidades escuaramida. Dicha información es fundamental para completar el estudio de su actividad biológica.

En este trabajo nos centraremos en la síntesis y el estudio de dos oligoescuaramidas cíclicas, la SQ4 y la SQ5. Ambos compuestos ya se han sintetizado en el grupo de Química Supramolecular. La oligoescuaramida cíclica SQ1 es un compuesto cuya síntesis se conoce desde 2001 y puede obtenerse en un rendimiento del 80%. Por el contrario, recientemente se ha obtenido la SQ5 en un rendimiento del 32%, poniendo en evidencia la necesidad de optimizar su ruta sintética para poder obtener la cantidad necesaria para proceder al estudio de sus propiedades supramoleculares y su actividad.

Por lo tanto los objetivos definidos para este trabajo son:

- Optimización de la síntesis de SQ5
- Estudio de las interacciones intermoleculares de la SQ1 por técnicas espectroscópicas de Ultravioleta-visible e IR y Dispersión dinámica de luz (DLS).
- Cálculo del pKa de la SQ1 . Para conocer la distribución de especies cargadas en el medio en función del pH. Esta información resulta muy relevante a la hora de estudiar e interpretar las interacciones intra e intermoleculares.

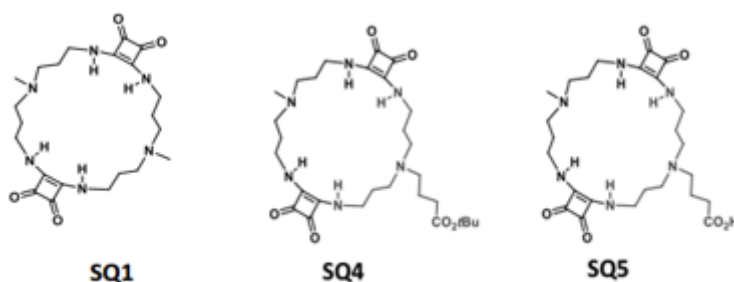


Figura 13. Estructuras de las moléculas estudiadas en este trabajo

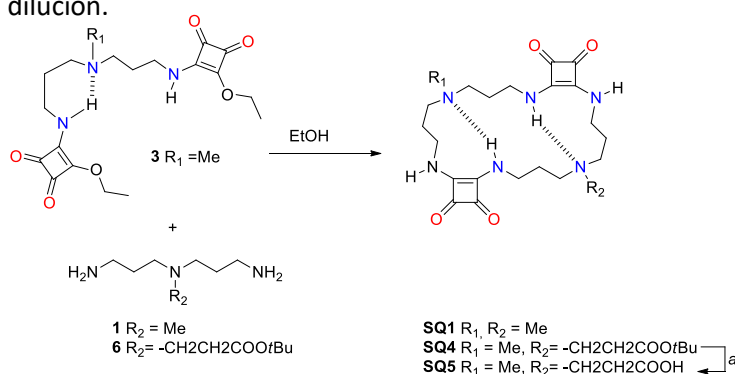
3. RESULTADOS Y DISCURSIÓN

3.1 Síntesis

¹⁵ R. Prohens, G. Martorell , P. Ballestera , A. Costa , *Chem. Commun.* , **2001**, 16 ,1456 – 1457 .

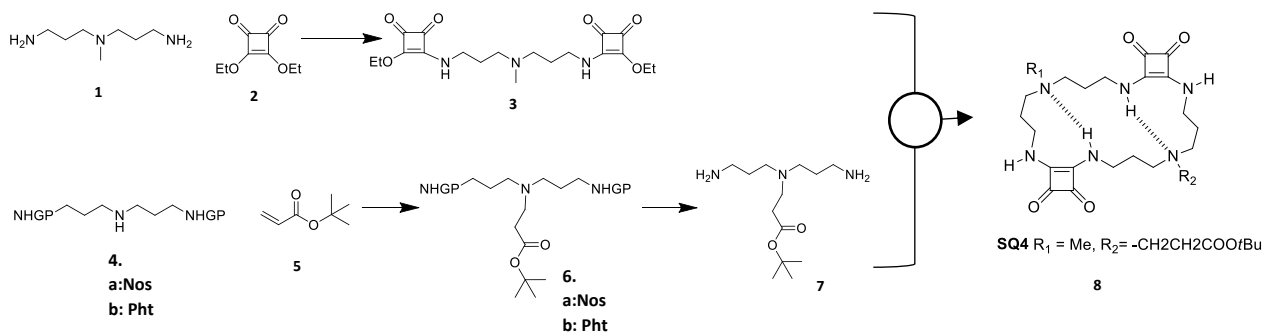
La síntesis de oligoescuaramidas cíclicas se lleva a cabo a partir de la condensación de diversos módulos estructurales y de forma secuencial. Concretamente, para las que están formadas por dos unidades escuaramida, se lleva a cabo mediante la unión de dos unidades estructurales, un bis-escuaramidoéster y una diamina. En la estructura de estos módulos se pueden introducir otros grupos funcionales por lo que al preparar cada una de las unidades por separado y luego condensar ambas estructuras en proporción equivalente para dar lugar al macrociclo correspondiente, se puede obtener una diversidad estructural, siguiendo una metodología de trabajo común. La etapa crucial de toda ruta sintética para obtener un compuesto macrocíclico es la etapa de macrociclación, que generalmente suele tener un bajo rendimiento.

Sin embargo, en la síntesis de las oligoescuaramidas cíclicas estudiadas en este trabajo se ha recurrido a una estrategia de preorganización de los reactivos para favorecer la ciclación en frente de la polimerización de los reactivos. Esto se ha conseguido mediante la introducción de una amina terciaria en los espaciadores alquílicos que actúa como grupo aceptor de enlace de hidrógeno, preorganizando los reactivos como se muestra en el esquema 1. Debido a esto se obtienen generalmente rendimientos en esta etapa entre el 60-80% sin necesidad de recurrir a condiciones de alta dilución.



Esquema 1. Reacción de macrociclación mediante la condensación de un bis-escuaramido ester con una amina. Las aminas terciarias actúan como aceptores de enlace de hidrógeno plegando el precursor lineal del macrociclo. (a) HCl, 37°, 12h.

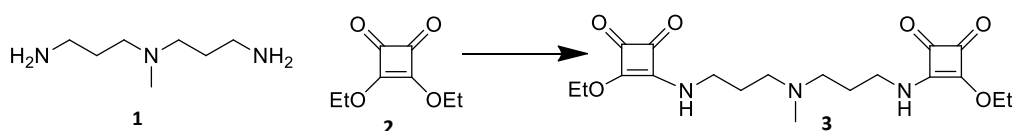
En el caso del compuesto SQ5 la presencia del grupo ácido carboxílico en el medio de reacción interfiere en la preorganización ya que compite con la amina terciaria para formar enlaces de hidrógeno con los grupos NH escuaramídicos. Para evitarlo se decidió trabajar con el correspondiente tertbutil éster y tras la desprotección del grupo ácido en un paso posterior a la macrociclación obtener SQ5. La síntesis de SQ5 se planteó siguiendo la ruta indicada en el esquema 1. Para ello es necesario disponer del bis-escuaramido ester **3** y de la amina **7**.



Esquema 2. Ruta sintética diseñada para SQ4.

3.1.1 Síntesis de los módulos estructurales

Síntesis del bis-esquaramido éster **3**



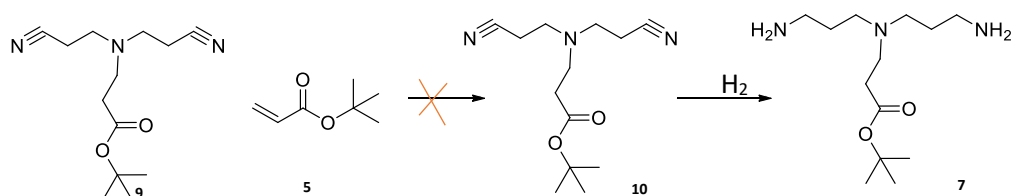
El bis-esquaramido éster **3** se obtiene a partir de la condensación de la amina **1** y dos equivalentes de esuarato de dietilo en éter anhidro. Ambos compuestos son comerciales. Una molécula de esuarato de etilo puede reaccionar con uno o dos grupos amina para dar un esquaramido éster o una bis-esquaramida. La polaridad del disolvente permite controlar la obtención de uno u otro tipo de compuestos. En general disolventes menos polares como el éter etílico y el acetonitrilo facilitan la monoentrada y los más polares como el etanol, metanol o agua facilitan la segunda. El rendimiento de la reacción es del 55%.¹⁶

Síntesis de la amina **7**

La amina **7** no es un producto comercial. Su síntesis resulta laboriosa ya que requiere la ejecución de una serie de pasos sintéticos, lo que dificulta su obtención con un buen rendimiento. Para su preparación se diseñaron varias estrategias.

En primer lugar se planteó una ruta directa que consiste en la reacción de tertbutil acrilato con la amina **9** que es un producto comercial, para dar el dinitrilo **10**, el cual tras su reducción conduciría a la obtención de la amina **7**.

La mezcla de ambos reactivos se mantuvo a reflujo durante 3 días en MeOH pero no se detectó la formación del dinitrilo **10**. Para intentar forzar la reacción se utilizó el propio tertbutil acrilato como disolvente obteniendo el mismo resultado negativo. Finalmente, intentó realizar dicha reacción asistida por microondas, mezclando ambos reactivos en relación 1:1,5 equivalentes de amina **9** y tertbutil acrilato respectivamente durante 3h a 130°C, pero este método tampoco resultó efectivo.^{17,18}



Esquema 3. Ruta para la síntesis de la amina **7**

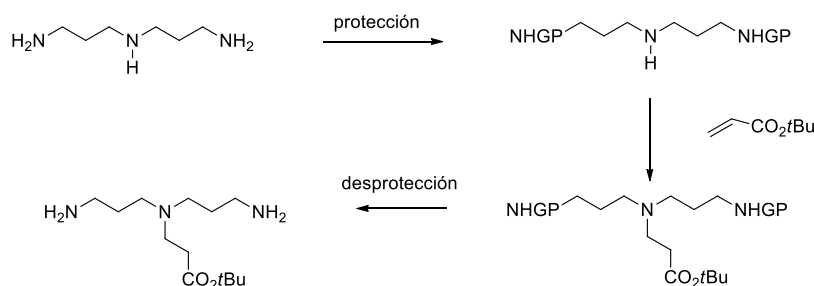
Como alternativa se diseñó la ruta sintética que se muestra en el esquema 4 que implica el uso de N¹-(3-aminopropil)propanoato-1,3-diamina y grupos protectores de aminas primarias para que solo la amina secundaria pueda reaccionar con el tertbutil acrilato (Esquema 4). Estos grupos deben ser ortogonales al grupo tertbutil éster, utilizado como grupo protector del ácido carboxílico que debe permanecer en la molécula hasta haber completado la reacción de macrociclación. El grupo tertbutil éster es lábil en condiciones ácidas (pH<4) o altamente alcalinas (pH>12) a 100°C durante 12 horas.

¹⁶ C. M. Szabo, Y. Matsumura, S. Fukura, M.B. Martin, J. M. Sanders, S. Sengupta, J. A. Cieslak, T. C. Loftus, C.R. Lea, H.J.Lee, A. Koohang, R. M.Coates, H.Sagami, E. Oldfield, *J. Med. Chem.*, **2002**, *45*, 2185-2196.

¹⁷ C. Guisado, J. E. Waterhouse, W. S. Price, M. R. Jorgensen, A. D. Miller, *Org.Biomol.Chem.*, **2005**, *3*, 1049-1057.

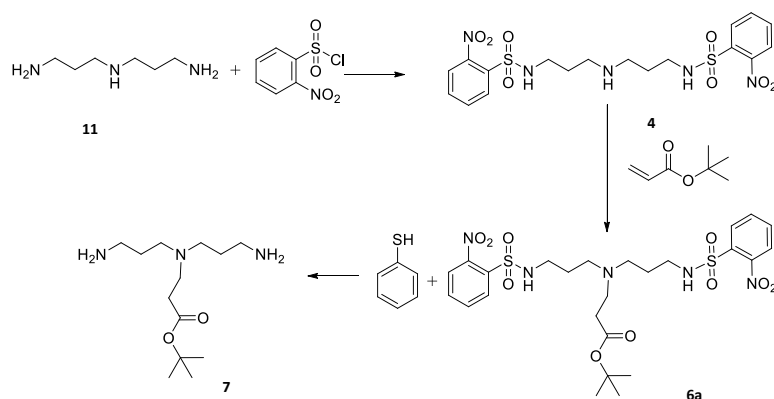
¹⁸ U. Jahn, F. Kafka, R. Pohl, P. G. Jones, *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 10917-10929

Mientras que es estable en el rango de pH 1-12 a temperatura ambiente frente a nucleófilos, electrófilos y condiciones oxidantes y reductoras.¹⁹



Esquema 4. Representación de las reacciones de protección y desprotección del grupo tertbutil éster.

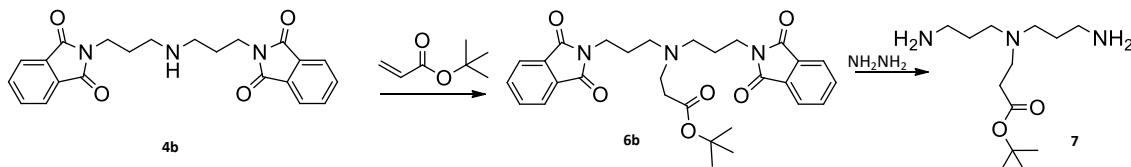
En primer lugar se eligió como grupo protector el grupo 4-nitrobenzenosulfonilo conocido comúnmente como Nosilo. Es un grupo, específico para proteger aminas primarias y se elimina en presencia de 2,5 equivalentes de tiofenol (PhS) en medio básico, 50°C durante 24 horas. Estas condiciones, que resultan ortogonales con el grupo tertbutil éster.¹⁹



Esquema 5. Esquema sintético para obtener el compuesto 7

La reacción de protección se llevó a cabo con cloruro de 2-nitrobenzenosulfonilo en THF, durante 5h a temperatura ambiente para obtener el compuesto 4. Sin embargo en el crudo de la reacción se detectó una mezcla de productos correspondientes a la trientrada y dientrada del grupo protector nosilo. Para aislar el compuesto 4 se procedió a realizar una purificación con una columna cromatográfica (fase estacionaria: sílica gel; fase móvil CH₂Cl₂:MeOH 90:10). El rendimiento de este paso fue del 19,93%.

Para obtener el compuesto 6a se condensa el producto 4 con 1,5 equivalentes de tertbutil acrilato a reflujo esta reacción tiene un rendimiento del 70%.



Esquema 6. Ruta sintética alternativa para obtener el compuesto 4.

¹⁹ TW Green, PGM Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley-Interscience, Nueva York, 1999, 65-67, 708-711.

Alternativamente y debido a que la etapa de protección con el grupo nosilo no resultó tener muy buen rendimiento, se utilizó como grupo protector de amina primaria la ftalimida. Esta estrategia se había utilizado con éxito en el grupo de Química supramolecular para obtener otras aminas funcionalizadas. Por ello se decidió partir de la amina diprottegida **4b** proporcionada por el grupo. Esta se condensó con 1,5 equivalentes de tertbutil acrilato a reflujo durante 24 horas. Esta reacción tiene un rendimiento del 71% tras la purificación con una columna cromatográfica (fase estacionaria: sílica gel; fase móvil: Et₂O: Hex (9:1)). Posteriormente se desprotege el compuesto **6b** con hidracina monohidrato a reflujo durante 3h para obtener el producto **7** con un rendimiento 42%.

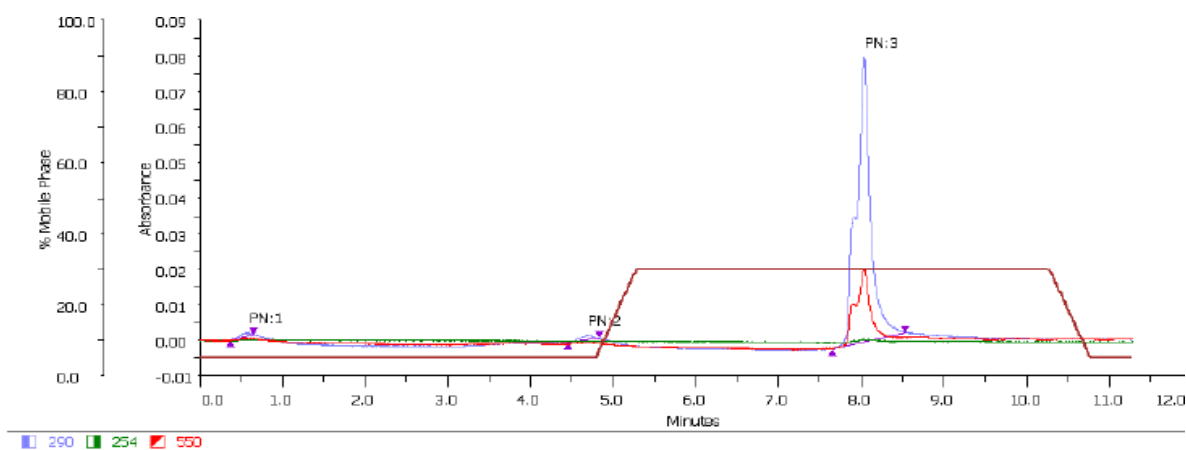
El hecho de realizar diferentes rutas sintéticas para obtener el compuesto **7** se debe a que los rendimientos de la ruta sintética mediante el intermediario **6a** tienen rendimientos bajos además de procesos de elaboración laboriosos. Por lo tanto para conseguir una metodología más sencilla y más eficaz se realizaron las metodologías descritas. El resultado fue que la reacción para obtener el compuesto **7** es mucho más simple y con rendimientos mayores utilizando la reacción mediante el intermedio **6b**. El rendimiento global de la reacción utilizando el intermedio **6b** es 56,1%, en cambio siguiendo la ruta del intermedio **6a** el rendimiento global es 34,2%.

Síntesis de las oligoescuaramidas cíclicas SQ4 y SQ5

A partir de los dos diferentes bloques de construcción o módulos obtenidos se procedió a realizar la reacción de condensación de ambas partes para obtener SQ4. Para ello se mezclaron el bis-escuaramido éster **3** y la amina **7** en proporciones equivalentes en EtOH durante 24h para dar el correspondiente macrociclo SQ4.

Normalmente las oligoescuaramidas cíclicas se purifican, disolviendo el crudo de reacción a pH = 3, filtrando cualquier resto insoluble que pueda haber. Posteriormente la disolución se lleva a pH = 9 con NaOH 1M. A este pH se forma un precipitado que corresponde al macrociclo. Sin embargo, esta metodología no es apta para la purificación de la SQ4 debido a la labilidad del grupo tertbutil acrilato a partir de pH < 4. En este punto el grupo tertbutilo ya ha cumplido su función de enmascarar el grupo carboxilo para que no interfiera en la ciclación, no obstante dificulta el proceso de purificación del producto. El hecho de que la molécula tenga tres centros ionizables en función del pH de la disolución resulta muy soluble en agua en un amplio rango de pH, por lo que no se puede aislar en forma de precipitado. La SQ5 es insoluble en disolventes orgánicos mientras que en medio acuoso mediante soluble prácticamente a cualquier pH. Por lo tanto la purificación de SQ4 se ha de realizar mediante una columna de HPLC preparativa. En este caso este último paso no se pudo completar por falta de tiempo, aunque si se realizó un cromatograma de una muestra analítica para conocer la extensión de la reacción. La columna utilizada es el modelo XBridge™ analítica C18 OBD™ 5µm, 19x150mm, de Waters. La fase móvil está compuesta por dos eluyentes A(H₂O, 10mM AcONH₄, pH 4,5) y B(Acetonitrilo). Siendo el perfil de eludición 0'(10%B); 0-20' (10-50%B); 20'-22' (50-10%); 24'-27' (10%B).

En la figura 14 se muestra el cromatograma de la muestra analítica. El producto SQ4 en estas condiciones tiene un tiempo de retención de 8 minutos. Cabe destacar que el cromatograma presenta un único pico significativo correspondiente al producto siendo así las impurezas presentes mínimas lo que indica que la reacción ha transcurrido eficientemente.



Injection Number	Peak Name	Retention Time (min)	Area (mAUmin x100)	Height (Absorbance)	Sample Name	Sample Location	Fraction Site(s)
1	1	0.53	12.7224	0.001	C2-tbu	Sample Zone->4	
1	2	4.69	24.8163	0.001	C2-tbu	Sample Zone->4	
1	3	8.046	1569.9611	0.08	C2-tbu	Sample Zone->4	

Figura 14 .Cromatograma del compuesto 8 sin purificar.

Para poder completar la síntesis del SQ5 se procedió a realizar la reacción de desprotección a partir de una muestra del compuesto SQ4 sintetizada con anterioridad. Este último paso de SQ4 a SQ5 se realizó en medio ácido (pH=2) con HCl a 37°C durante 12 horas. El producto SQ5 se aísla secándolo durante 24h en un desecador con P₂O₅. El rendimiento de la reacción fue de un 80%.

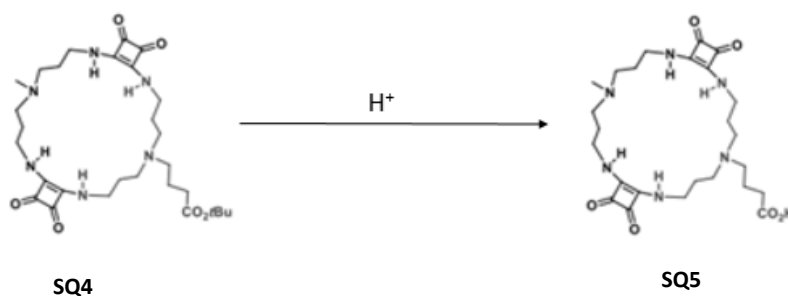


Figura 15. Reacción de desprotección de SQ4 para obtener SQ5

En el apartado de metodología experimental se detallan todos los procedimientos y metodologías experimentales seguidas para las síntesis de los compuestos que se han realizado en este trabajo.

3.2 Estudios de agregación

Es importante realizar estudios de agregación para conocer en qué estado se encuentra la molécula en función de la concentración de la misma y el pH. Saber que grupos están implicados en la formación de agregados y visibilizar los grupos que están disponibles para otras funciones. Además es interesante evaluar si existen cambios en algunas propiedades de la molécula debido a la formación de agregados.

Los agregados son heterogéneos en tamaño y en propiedades fisicoquímicas. En consecuencia, no hay un método único que cubra el análisis de todos los aspectos de los agregados. Cada método

cubre diferentes características del agregado en cuestión. Por este motivo se han utilizado diferentes técnicas espectroscópicas.

La SQ1 tiene una importante actividad biológica como hemos visto anteriormente y por lo tanto en muchas ocasiones se estudia su comportamiento en medios acuosos. La posible formación de agregados por efecto solvofóbico puede disminuir o modificar su disponibilidad para interactuar con otras moléculas, por lo que es necesario conocer dicho comportamiento. Los estudios se han realizado a diferentes pH entorno al pH fisiológico , ya que la SQ1 presenta propiedades interesantes a nivel biológico.

3.2.1 Evaluación DLS de la agregación de los compuestos escuaramídicos

Para evaluar la formación de agregados en disolución acuosa se han realizado estudios de tamaño de partícula y observar las interacciones a través del incremento de tamaño mediante Dinamic Light Scattering (DLS).

La técnica de Light Scattering se basa en incidir sobre la muestra en disolución un rayo láser y medir la intensidad de luz dispersada con un detector en un ángulo Θ . La intensidad es muy sensible a las variaciones de tamaño de los solutos por lo que es ventajoso investigar la agregación en disolución. Además es una técnica no invasiva basada en el movimiento aleatorio de las moléculas en suspensión que se conoce como movimiento browniano. El DLS mide las fluctuaciones de intensidad en función del tiempo para determinar el coeficiente traslacional (D) y el diámetro hidrodinámico(D_H) siguiendo la ecuación de Stokes-Einstein. Mientras Static Light Scattering (SLS) mide la intensidad absoluta.

$$D = \frac{kT}{3\pi D_H \mu}$$

Donde k es la constante de Boltzmann , T la temperatura y μ la viscosidad. Como consecuencia del movimiento browniano las posiciones relativas de las partículas están cambiando constantemente , este hecho provoca cambios en la intensidad de dispersión. Las partículas pequeñas se mueven rápidamente se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas grandes que se mueven más lentamente conllevan a variaciones más lentas.

Para conocer el comportamiento esperado de un compuesto que se agrega al utilizar esta técnica, se utilizó el compuesto 11 que fue proporcionado por el grupo. Este compuesto escuaramídico, aunque no está directamente relacionado con los que se estudian en este trabajo, se ha descrito que forma hidrogeles y por lo tanto, experimenta un proceso de autoagregación a partir de una determinada concentración que se denomina concentración micelar crítica (CMC) o en este caso donde no se forman micelas hablaremos de concentración de agregación crítica (CAC). En ese caso se tomaron medidas a pH =7 y en el intervalo de concentraciones 0,005-0,5 mM.

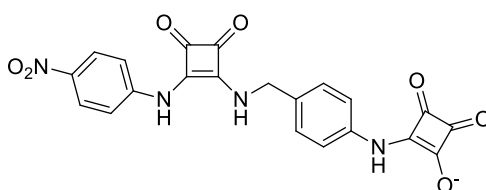


Figura 16. Estructura del compuesto 11

La representación de la intensidad de la luz dispersada en kilocuentas por segundo frente al log de la concentración muestra que existe un comportamiento bien diferenciado entre la zona de las concentraciones más bajas y la de las más altas. En estos casos donde el comportamiento es lineal en ambos tramos se pueden trazar dos rectas y calcular el punto de intersección. La concentración que coincide con este punto es concentración de agregación crítica (CAC) e indica el punto donde se empieza a formar agregados de estructura definida⁵. La CAC obtenida para este compuesto fue $8,0 \cdot 10^{-5}M$.

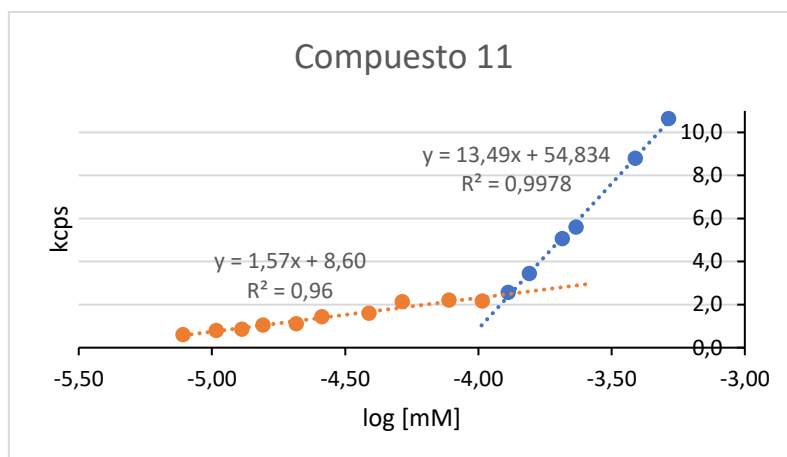


Gráfico 1 Determinación de la CMC del compuesto 11 mediante DLS.

Para realizar este mismo estudio con la escuaramida SQ1 se prepararon 21 muestras de SQ1 en un rango de concentraciones (0,1-20 mM) a pH 5,53 , 6,3 y 7 para evaluar la influencia del pH en el tamaño de partícula y las interacciones. Como se puede observar en la gráfica 2, donde se representan la intensidad de la luz dispersada en kilo cuentas por segundo frente al log de la concentración de la muestras el comportamiento observado es muy parecido para los tres pH . Las variaciones de pH observadas pueden deberse simplemente a pequeños errores experimentales cometidos al realizar las medidas de intensidad. Cabe destacar que existe una clara relación entre la concentración y el tamaño de partícula.

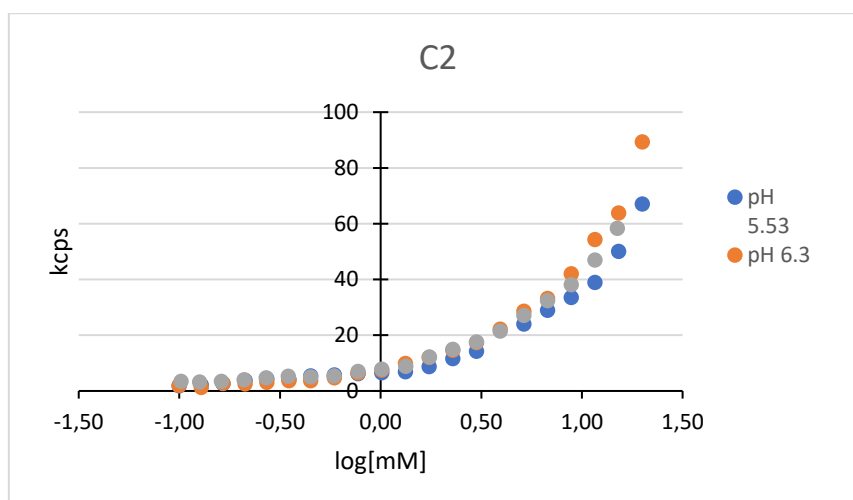


Gráfico 2. Resultados DLS del compuesto SQ1 a diferentes pH

Para las concentraciones más bajas la luz dispersada prácticamente no varía hasta llegar a un punto crítico donde se observa un cambio en dicha tendencia y aumenta la luz dispersada en función de la concentración. En la última zona de la gráfica y a concentraciones más altas el

comportamiento no resulta lineal lo que parece indicar que el tipo de agregados que se forman no responden a una estructura ordenada. Aun así se pueden trazar dos rectas que se cruzan a una concentración igual a 4,46 mM

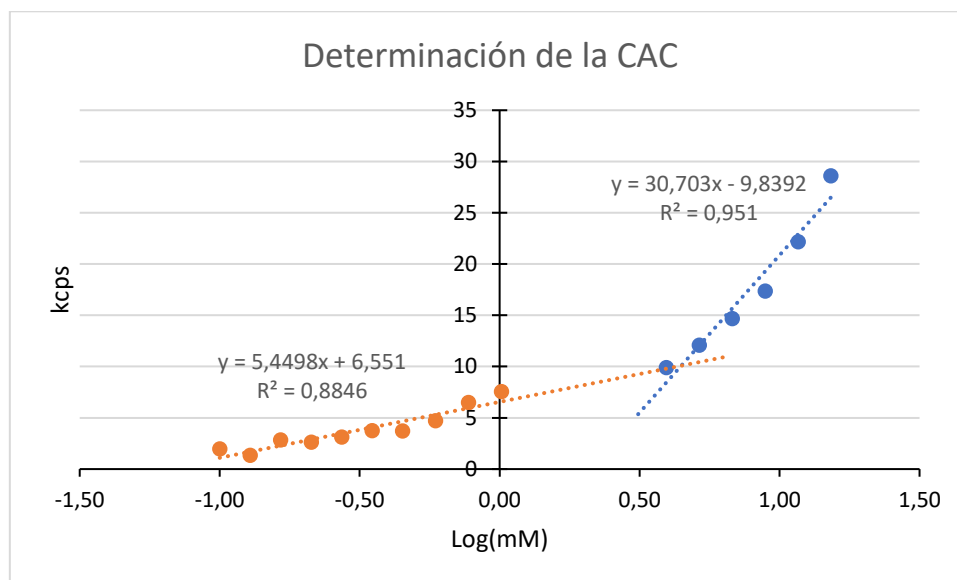


Gráfico 3. Determinación de la CMC de SQ1 a pH=6.3

3.2.2 Evaluación de la agregación de la escuaramida SQ1 por espectroscopia UV-Visible

Para corroborar lo observado mediante DSL y con el objetivo de determinar qué tipo de agregados se formaban se procedió a estudiar la agregación de la escuaramida SQ1 por espectroscopia UV-Visible. La espectrofotometría UV-visible es una técnica analítica que permite determinar la concentración de un compuesto en solución. Se basa en que las moléculas absorben la radiación electromagnética y a su vez que la cantidad de luz absorbida depende de forma lineal de la concentración siguiendo la ley de Lambert Beer. La radiación que absorbe una molécula y la cantidad de radiación absorbida dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica), por lo que dicha técnica constituye un valioso instrumento para la determinación y caracterización de biomoléculas.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Con esta técnica se busca saber si existen agregados en la disolución. Por otra parte determinar si el cromóforo se ve afectado por la formación de estructuras agregadas. Si este se ve implicado crea variaciones en la absorbancia medida, saliendo del así del rango lineal. Para ello se utilizó un Nanodrop 2000® con diferentes pasos ópticos 0,1 , 0,2 y 0,5mm. La preparación de las muestras y la metodología utilizada se detalla en el apartado de Métodos Experimentales.

En primer lugar, se calculó el coeficiente de extinción molar de la SQ1. Para ello, se prepararon 10 muestras de concentraciones entre 0,1-1 mM en tampón cacodilato sódico 0.1M (pH= 7) sin fuerza iónica. El pH seleccionado para realizar las medidas se eligió debido a su similitud con el pH fisiológico. El tampón seleccionado se trata de una sal de arsénico debido a la capacidad de las escuaramidas de unirse de manera efectiva a aniones fosfato y sulfato con constantes de

afinidad que oscilan entre 10^3 - 10^4 M^{-1} . Esta unión podría crear interferencias a la hora de realizar los estudios de agregación de la SQ1.

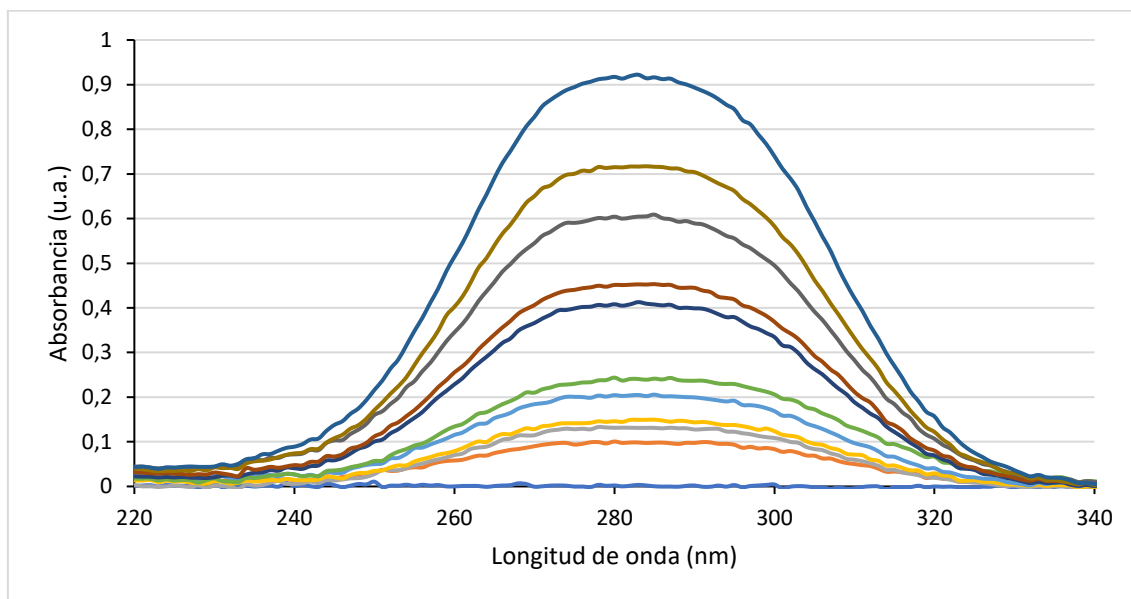


Gráfico 4. Espectro de absorbanza del compuesto SQ1 concentración 0.1-1mM

La banda observada corresponde a la absorbanza del anillo escuaramida con un máximo a 283 nm. Se miran las absorbanzas a la longitud de onda de máxima absorbanza y se representan siguiendo la ley de Lambert-Beer. De este experimento se hicieron 2 repeticiones con las mismas condiciones y se realizó una media. Una vez se comprobó que los datos cumplían la ley de Lambert-Beer se ajustaron para obtener un valor para el coeficiente de extinción molar de $\xi = 47517,5$ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$.

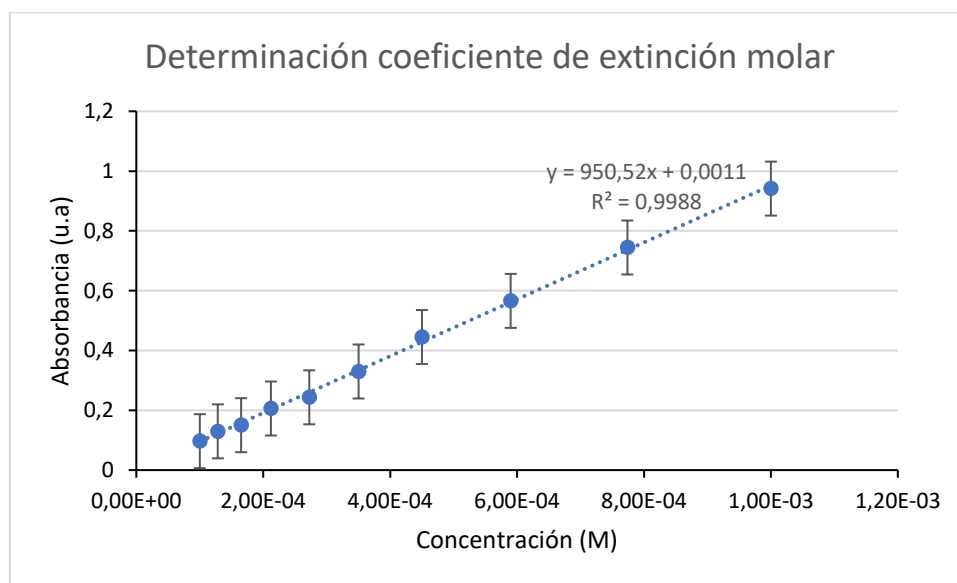


Gráfico 5. Representación para el cálculo para el coeficiente de extinción molar de la SQ1

Para determinar la formación de agregados, supusimos que las interacciones intermoleculares que se establecerían en los agregados modificarían de cierta forma la absorbanza del anillo escuaramida al formar enlaces de hidrógeno o interacciones π - π . Estas podrían afectar la intensidad y posición del máximo de absorbanza de la banda en función de la concentración del

compuesto. Para comprobar la existencia de agregados de SQ1 en concentraciones mayores de 1 mM se prepararon 12 muestras de concentraciones entre 0,1-5 mM en tampón cacodilato sódico 0.1M (pH= 6,3). No se pudieron medir concentraciones superiores ya que la banda a 283nm tiene un coeficiente de extinción molar elevado y la señal resulta demasiado intensa para concentraciones superiores.

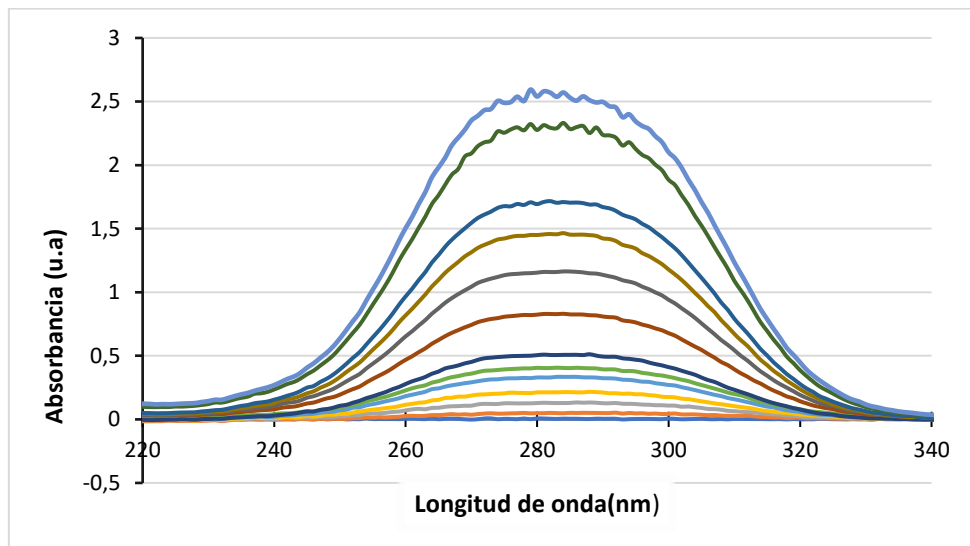


Gráfico 6. Espectro de absorbancia del compuesto SQ1 , concentración entre 1-5mM

Dado que las concentraciones más altas daban una intensidad del máximo de absorbancia superior a 2 se selecciona 256 nm para poder representar todos los puntos. Así poder coger valores en donde el detector no se satura para así tener datos experimentales fiables.

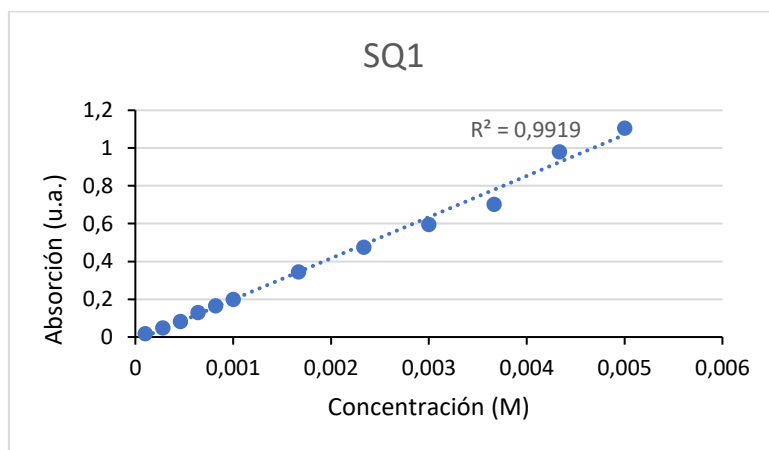


Gráfico 7. Representación de los valores de absorbancia de concentración 1-5mM

Se decidió aumentar la concentración de SQ1 hasta 15 mM , a partir de 12 muestras de concentraciones entre 0,1-15 mM en tampón cacodilato sódico 0,1 M (pH= 6,3). A partir de concentraciones superiores a 10 mM no se puede registrar la absorbancia en el máximo ya que el lector se satura dando una señal fluctuante. Debido a este pequeño contratiempo se evaluó si existían evidencias de la formación de agregados a estas concentraciones a una longitud de onda donde todos los puntos tuvieran absorbancias contempladas en valores inferiores a 1,5 u. a. de absorbancia. Se seleccionó 247 nm para realizar la representación gráfica 8.

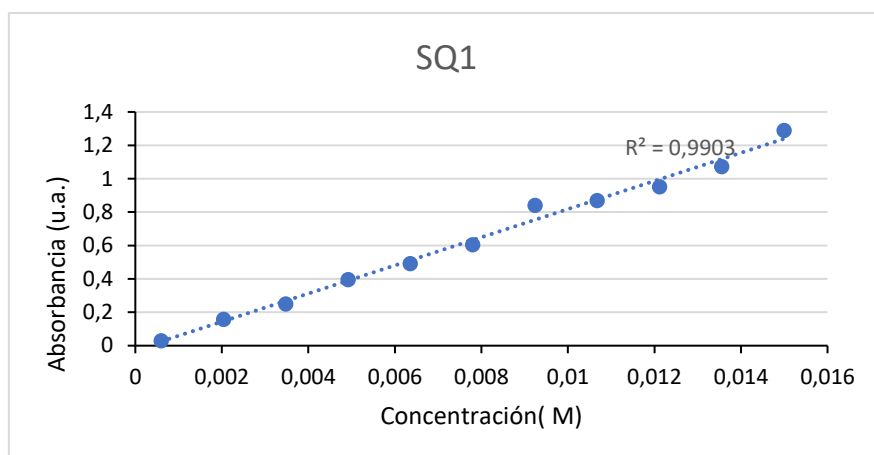


Gráfico 8. Datos de absorbancia a 247.08 nm en un intervalo de concentraciones 0.1-15mM

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que no existen variaciones significativas en la absorbancia en todo el rango de concentraciones evaluadas a pH 6,3 . Por lo tanto no se encuentran evidencias de que existan agregados mediante medidas de absorbancia. Esto da pie a pensar que el compuesto SQ1 si se agrega, como muestran los datos obtenidos por DLS, son agregados donde no se ven afectadas las propiedades del cromóforo.

3.2.3 Evaluación de la agregación de la escuaramida SQ1 por espectroscopia IR.

En el caso de las oligoescuaramidas cíclicas se ha estudiado los espectros de infrarrojo en la zona que comprende desde 1300 cm^{-1} y 1900 cm^{-1} y donde se observan las vibraciones correspondientes a los grupos C=O. En general las escuaramidas presentan bandas de tensión simétrica (ν_s) y asimétrica (ν_a) sobre 1675 cm^{-1} y 1786 cm^{-1} , respectivamente.^{20,21,22,23}

Para realizar este estudio se prepararon dos muestras de concentración 1 mM y 10 mM de SQ1 disueltas en una mezcla D₂O-DCl al 10% de DCl en base a los resultados obtenidos con DLS (Gráfico 9).

En la zona del espectro estudiada se observa una banda ancha e intensa a 1466 cm^{-1} , que disminuye de intensidad al concentrar la muestra y coincide con la vibración de torsión de HOD.

Las bandas correspondientes a la vibración de los grupos C=O a 1803 cm^{-1} y 1660 cm^{-1} no experimentan ningún desplazamiento en la frecuencia con respecto al incremento de la concentración. Al no observarse ningún cambio en la frecuencia no hay evidencias de que haya una interacción entre los grupos escuaramida, como sería la que ocasionaría la formación de enlaces de hidrógeno entre los C=O y los N-H escuaramídicos. Estos resultados junto con los obtenidos por UV llevan a pensar de que para formar los agregados detectados por DSL no se establecen ningún tipo de interacción que implique a los grupos donadores y aceptores de enlace de hidrógeno de la escuaramida.

²⁰ E. Castellanos, 2016-2017, Química Supramolecular: Caracterización de escuaramidas y estudios de complejación mediante espectroscopía IR , Universitat de les Illes Balears.

²¹ E. Pauthe, J. Pelta, S. Patel, D. Lairez, F. Goubard, *Biochim. Biophys. Acta* , **2002**, 1597, 12-21.

²² C. Hetényi, Z. Szabó, É. Klement, Zolt Datki, T. Körtvélyesi, M. Zarándi , B. Penke, *Bioch. Biophys. Res. Commun.* , **2002**, 292, 931-936.

²³ C. Nicolescu, C. Arama and C. M. Monciu, *Farmacía* , **2010**, 58, 78-88.

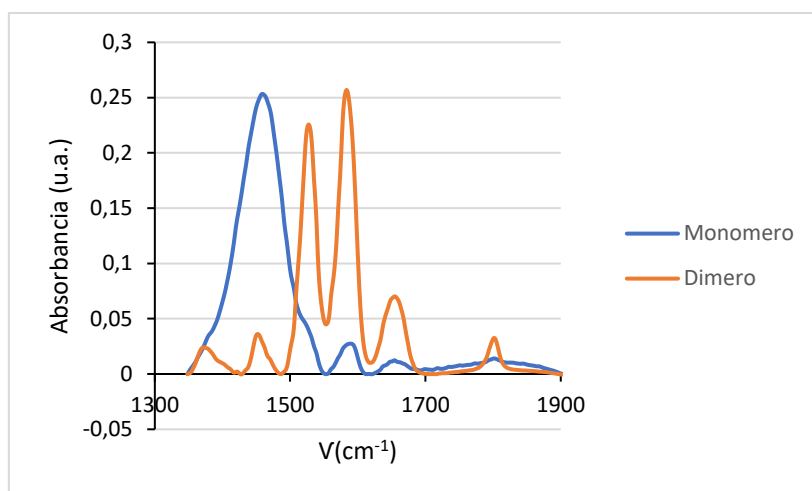


Gráfico 9. Representación del espectro IR de las disoluciones 1 y 10mM de escuaramida SQ1

3.3 Estudio sobre la resistencia a la hidrólisis de la SQ1

Los datos cinéticos de la hidrólisis de este compuesto nos proporcionan información valiosa sobre su estabilidad en medios fisiológicos. En general las bis-escuaramidas secundarias resultan inertes frente a la hidrólisis a 37°C a pH inferior a 10.²⁴ Para realizar el estudio cinético de hidrólisis se preparó una disolución de SQ1 $8 \cdot 10^{-2} \text{M}$, a pH=2 con una fuerza iónica 0.15M (NaCl) a 37°C. Las muestras se dejaron a 37°C durante 31 días y se fueron registrando los espectros de UV en intervalos de tiempo de 7 días aproximadamente. Los resultados obtenidos se exponen gráfica 10. Como se puede observar todos los barridos realizados a lo largo del tiempo se superponen. El hecho de que estén uno sobre el otro indica que la escuaramida SQ1 no se hidroliza en estas condiciones. Por lo tanto, podemos concluir que la SQ1 es estable a pH fuertemente ácido. Normalmente la hidrólisis completa de una escuaramida da lugar a el ácido escuarico y dos aminas. En las condiciones en las que se han trabajado el ácido escuarico presenta una banda de absorbancia a 269 nm.

Se intentó realizar el mismo estudio en medio fuertemente básico pH> 10 pero debido a la insolubilidad de la SQ1 a pH ligeramente y fuertemente alcalinos no se consiguió obtener una disolución de SQ1 a una concentración adecuada para su estudio por UV.

²⁴ M. Ximenis , E. Bustelo , A. G. Algarra , M. Vega , C. Rotger , M. G. Basallote, A. Costa , *J. Org. Chem.* , **2017**, 82, 2160–2170

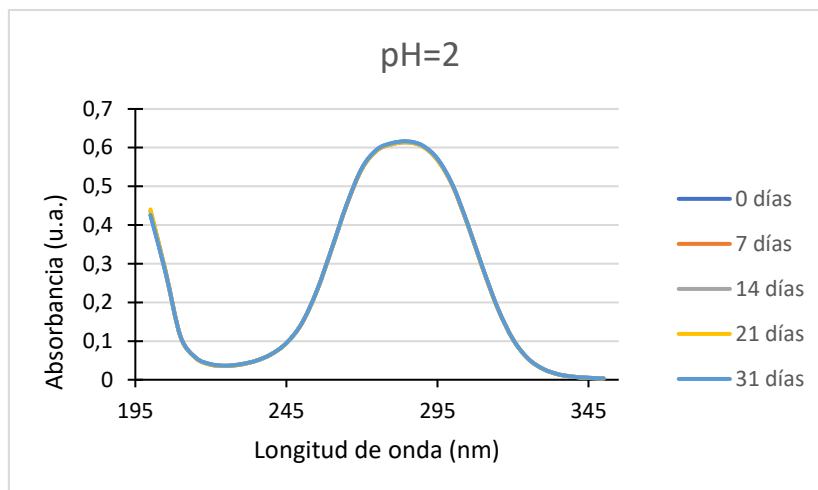


Gráfico 10. Representación de los valores de absorbancia SQ1 pH=2, F.I.= 0.15M(NaCl) a 37°C.

3.4 Determinación del pKa del C2 por valoración potenciométrica.

Uno de los objetivos de este trabajo es la determinación experimental de los valores de pKa del SQ1 para poder conocer su estado de ionización en el medio fisiológico. Este dato resulta muy importante a la hora de estudiar los procesos de asociación con especies aniónicas.

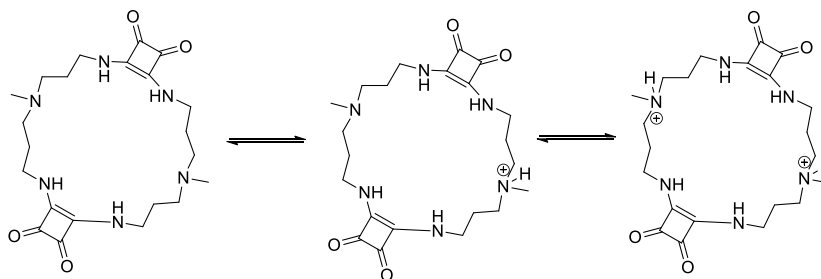


Figura 17. Equilibrios de protonación de la escuaramida SQ1

Se intentó calcular de manera experimental el pKa de la SQ1 por potenciometría. Para ello se realizaron diferentes valoraciones ácido-base con NaOH 1, 0,1 , 0,001 M sobre una disolución 2,57 mg de SQ1 disueltos en agua, fuerza iónica 0,09M y $pH_0=4$. Como se expone en apartados anteriores la solubilidad a medida que el pH se vuelve próximo a 7,8 la SQ1 precipita. Este hecho impide continuar la valoración hasta alcanzar pH superiores puesto que SQ1 ya no se encuentra en disolución. Aun así los datos recogidos se intentaron ajustar mediante el programa HyperQuad sin conseguir un ajuste adecuado para calcular las dos constantes de acidez. Entonces se optó por la posibilidad de realizar este cálculo de manera teórica a partir del análogo acíclico de la SQ1 que se conoce como Zyp1 , este que resulta soluble en un amplio intervalo de pH. Se realizó una valoración ácido-base de una disolución 2,5 mg de Zyp1 disueltos en agua, fuerza iónica 0,09M y $pH_0=5$ valorados con NaOH 0,1M. Los datos fueron se ajustaban perfectamente a un modelo de ácido diprótico con el programa HyperQuad.

²⁵ D.D. Perrin, W. L. F. Armarego, D. R. Perrin, *Purification of Laboratory Chemicals, 2nd Ed.* PergamonPress, 1980

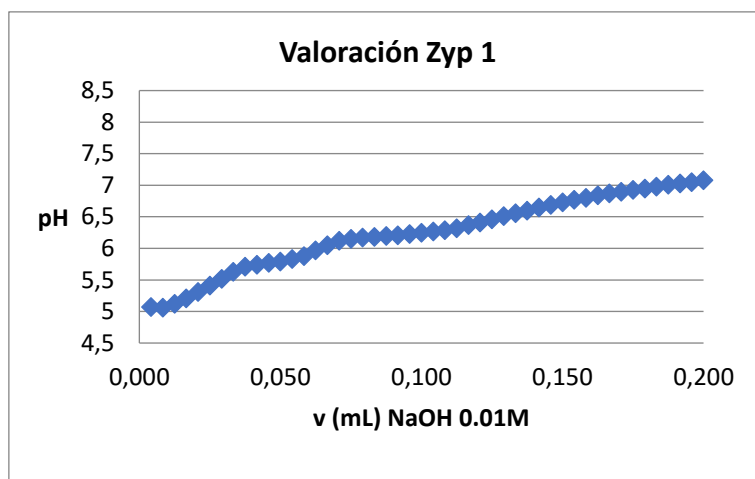


Gráfico 11. Datos obtenidos de la valoración del Zyp1.

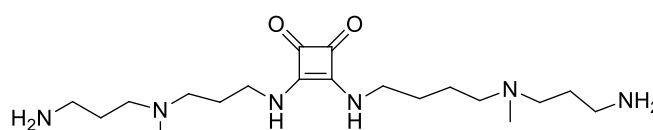
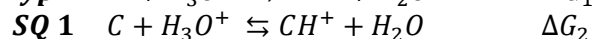
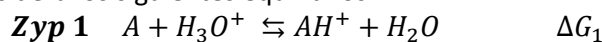


Figura 18. Estructura del compuesto Zyp1.

Los valores obtenidos mediante el ajuste de estos datos con el programa HyperQuad fueron 5,97 y 6,6. Estos valores se utilizaron para calcular teóricamente los valores de pKa de la SQ1 utilizando la metodología de Namazian et al.²⁶. El Dr Antonio Frontera realizó los cálculos teóricos. El nivel de teoría utilizado para este cálculo fue BP86-D3 / def2-TZVP, que es un buen compromiso entre el tamaño del sistema y la exactitud de los resultados. Los cálculos se realizaron utilizando un modelo continuo de disolvente (H₂O) para simular el medio acuoso donde transcurren las reacciones ácido-base. Estimaron que los valores de son 9,4 y 8,3.

El cálculo teórico considera los siguientes equilibrios:

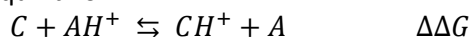


Cada equilibrio posee una ΔG y esta sigue la ecuación:

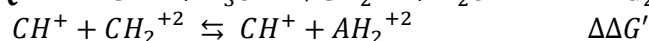
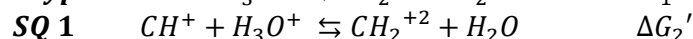
$$\Delta G_1 = -RT \ln k_1$$

$$\Delta G_2 = -RT \ln k_2$$

Entonces a partir de $\Delta \Delta G$ es posible calcular la constante de equilibrio, puesto que conocemos de manera experimental los valores de pKa de Zyp1. Consecuentemente el pKa₁ de la SQ1, considerando el siguiente equilibrio:



Siguiendo el mismo razonamiento es posible calcular el pKa₂, teniendo en cuenta los siguientes equilibrios:



²⁶ M. Namazian, M. Zakery, M. R. Noorbala, M. L. Coote, *Chemical Physics Letters*, **2008**, 451, 163–168.

4. CONCLUSIONES

Mediante el uso de diferentes rutas sintéticas para obtener el compuesto SQ4 se ha conseguido optimizar la síntesis de este. Se ha conseguido una metodología sintética más sencilla y con rendimientos superiores a los obtenidos anteriormente.

Por otro lado, se ha evaluado la capacidad de formar agregados de la SQ1. Observando los resultados por DLS la SQ1 tiene capacidad de formar agregados con una CAC del orden 10^{-3} M en un entorno a pH fisiológico. La formación de agregados no es cooperativa. La formación de agregados no se detecta por técnicas espectroscópicas como el UV-vis y IR debido a que no afectan de manera significativa a la absorbancia del anillo escuaramida por la posible formación enlaces de hidrógeno. Los resultados obtenidos indican que el tipo de agregados que se forman a altas concentraciones de SQ1 no responden a una estructura ordenada y se forman por efectos solvofóbicos en los que pudieran intervenir también interacciones π - π .

Se ha demostrado que la escuaramida SQ1 es resistente a la hidrólisis para pH ácidos (pH =2) a 37 °C durante 30 días.

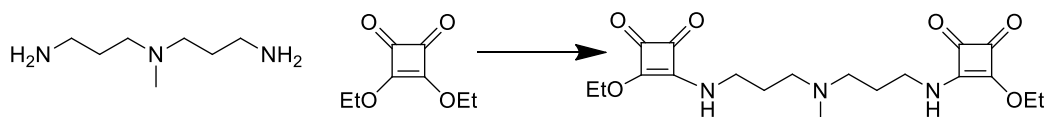
Se ha determinado de manera teórica los valores de pKa para las dos aminas terciarias del compuesto SQ1 lo que permite establecer la distribución de especies cargadas positivamente en el medio en función del pH.

5. MÉTODOS EXPERIMENTALES

Los reactivos y sales empleadas se emplearon sin purificación previa y se adquirieron en las casas comerciales Panreac o Sigma-Aldrich. Los disolventes utilizados se adquirieron a través de la casa comercial Scharlau. Estos disolventes fueron secados y destilados cuando fue necesario empleando los procedimientos adecuados²⁶. Respecto a los disolventes deuterados utilizados, CDCl₃ y DMSO, se adquirieron con calidad espectroscópica RMN 1H con una riqueza del 99.98%, usándolos sin tratamiento previo.

Los espectros de H¹ RMN se registraron con un instrumento Bruker AVANCE-300. Los espectros de masas se registraron con un espectrofotómetro de masas de alta resolución (HRMS) MICROMASS Autospec3000, provisto de una entrada para la muestra por electrospray (ESI). Las medidas de size se llevaron a cabo empleando un Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). Por último Las medidas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000. El sistema RF-HPLC utilizado para la purificación de los productos ha sido un sistema Gilson, equipado con bombas modelo 321 y un modulo detector UV-vis-152.

5.1 Síntesis de la 4,4'-(((metilazanediiil)bis(propano-3,1-diil))bis(azanediil))bis(3- etoxiciclobut-3-eno-1,2-diona)

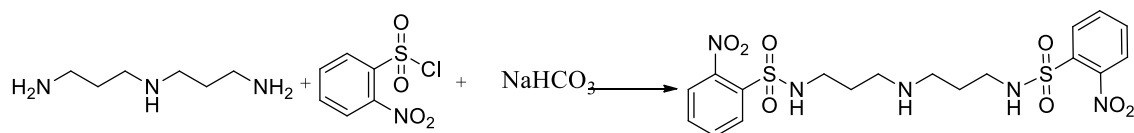


En un balón de fondo redondo se disuelven 696 mg (4,09 mmol) de (3,3')-diamino-N-metil dipropilamina en 50 mL de éter anhidro y se purga el sistema con Ar. A continuación se adicionan gota a gota 0,212 mL de escuarato de dietilo (1,32 mmol) disuelto en 5ml de éter anhidro mientras se agita el sistema con un imán. A medida que se añade el escuarato se va formando un precipitado de color amarillo. Se deja en agitación durante toda la noche

manteniendo la atmosfera inerte. Se filtra en placa filtrante , se lava con éter frío. Al estar el producto adherido a las paredes se hace una digestión con hexano. Se lava otra vez con éter frío . Se obtuvo un rendimiento del 55%.

^1H RMN(300MHz, CDCl_3): δ = 8,15 (br s, 0,6H, NH); 7,85 (br, s, 0,8H, NH); 7,11 (br s, 0,6H, NH); 4,71 (m, 4H, CH_2); 3,71 (br s, 1H CH_2); 2,52 (s, 3H, CH_2); 2,52 (s, 4H, CH_2); 2,22 (s, 3H, CH_3); 1,80(s, 4H, CH_2); 1,44 (m,6H, CH_3)ppm.

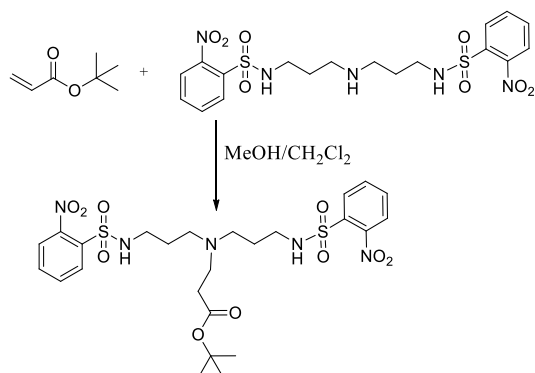
5.2 Síntesis de la N,N'-((metilazanediiil)bis(propano-3,1-diil))bis(2-nitrobenzenosulfonamida)



Se pesan 400 mg (3,05 mmol) de N'-((3-aminopropil)propano-1,3-diamina en un balón de 3 bocas de 100 ml, 1,5 g de NaHCO_3 (62,48 mmol) anhidro y se mantiene en agitación constante. Se lleva a atmosfera inerte con Argón y se añaden 25 mL de THF anhidro. En otro balón de fondo redondo de 50 mL se añaden 710 mg (3,2 mmol) de cloruro de 2-nitrobenzenosulfonil , se hace una purga con Argón y se disuelve en 10 mL THF anhidro. La disolución del grupo protector se trasvasa a un embudo de adición de un sistema con atmosfera de Argón. Se realiza la adición poco a poco durante un periodo de 5 horas. Durante este tiempo se forma una suspensión de un sólido amarillento, corresponde al exceso de NaHCO_3 . El cual se filtra y se lava con THF. Se rotan las aguas madres y se obtiene un aceite de color amarillo, el producto. El producto se purifica con una columna cromatográfica (fase estacionaria: sílica gel; fase móvil CH_2Cl_2 :MeOH 90:10). Se obtuvieron la amina trisustituida y la disustituida. El rendimiento de la reacción fue del 19,93%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ =1,72 [m, 4 H, CH_2]; 2,71 [t, 4 H, CH_2]; 3,20 [t, 4 H, CH_2]; 7,69-7,76 (m, 4 H, CH_{Ar}); 7,82-7,84 (m, 2 H, CH_{Ar}); 8,12-8,14 (m, 2 H, CH_{Ar}) ppm.

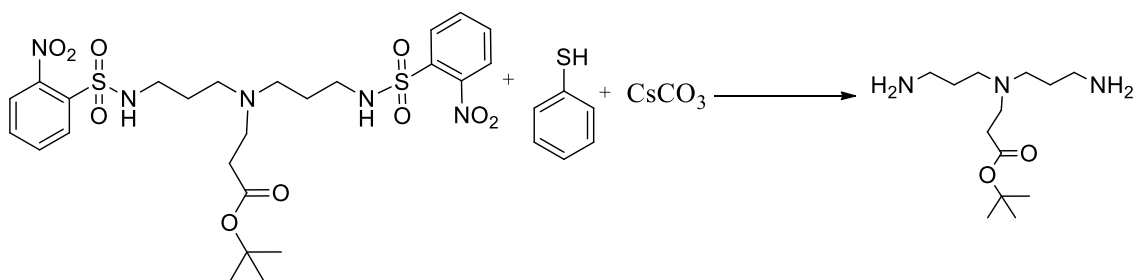
5.3 Síntesis de el tert-butil-1,3-(bis(3-(2-nitrofenilsulfonamido)propil)amino)propanoato



Se disuelven 328 mg (0,56mmol) de N,N'-((metilazanediiil)bis(propano-3,1-diil))bis(2-nitrobenzenosulfonamida) en 7 mL de una mezcla $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (2:1) en un balón de 50mL. Se añaden 2,85 mL (19,63 mmol) de tertbutil acrilato y 4 mL de una mezcla $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1:1). Se pone a reflujo en agitación constante durante 24 h. El producto se purifica con una columna cromatográfica (fase estacionaria: sílica gel; fase móvil AcOEt). El rendimiento fue del 72.85%.

^1H RMN(300MHz, CDCl_3): δ =1,42 (s, 9H, CH_3); 1,71(m, 4H, CH_2); 2,31 (s, 2H, CH_2); 2,47(m, 4H, CH_2); 2,73 (m, 2H, CH_2); 3,15 (s, 4H, CH_2); 7,73(m,4H, CH_{Ar}); 7,83(m,2H, CH_{Ar}); 8,13(m, 2H, CH_{Ar})ppm.

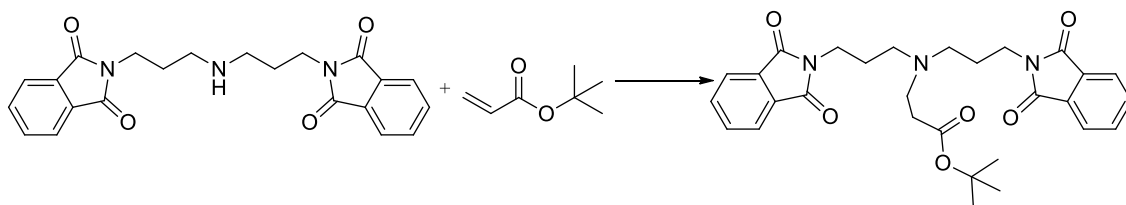
5.4 Síntesis de tert-butil 3-(bis(3-aminopropil)amino)propanoato.



En un balón de 3 bocas de 50 mL se añaden 1,367 g de CsCO₃ (4,2 mmol) y 300 mg (0,48 mmol) de tert-butil-1.3-(bis(3-(2-nitrofenilsulfonamido)propil)amino)propanoato. Se purga el balón con una atmosfera inerte de Argón y se adicionan 4 mL de DMF anhidro. Se pone en agitación el sistema y con ayuda de una jeringa se añaden 0,16 mL de benzotiol y se deja agitando durante 24h. Se filtra por gravedad con un filtro de pliegues y se lava el sólido con CH₂Cl₂. El producto se purifica con una columna cromatográfica (fase estacionaria: Alumina neutra; fase móvil CH₂Cl₂ la primera fracción y después se hizo pasar MeOH). La primera fracción era un sólido amarillo que resultó ser un subproducto de la reacción mientras que la segunda fracción es el producto, en forma de sólido amarillo pálido. El producto se purificó por medio de una digestión con hexano. De la disolución de hexano precipita un sólido blanco que se decanta. La eliminación del hexano permite obtener el producto aunque en muy bajo rendimiento

¹H RMN(300MHz, CDCl₃): δ =1,44 (s, 9 H, CH₃) ; 1,50 (s, 4 H, CH₂) ; 1,58 (m, 4 H, CH₂); 2,34(m,2H,CH₂); 2,44 (m, 4H ,CH₂); 2,71(m,4H,NH₂) ppm.

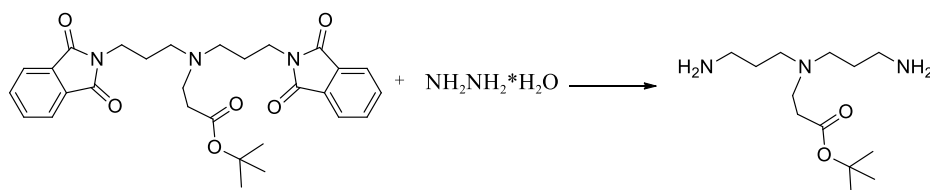
5.5 Síntesis de tert-butil 3-(bis(3-(1.3-dioxoisoindolin-2-il)propil)amino)propanoato



754mg (1,88 mmol) de 2,2'-(azanediilbis(propano-3,1-diil))bis(isoindol-1,3-diona) y se añaden 8 mL de tertbutil acrilato en un balón de 25mL de fondo redondo . Se pone a reflujo en agitación constante durante 24h. Transcurrido ese tiempo y después de evaporar el disolvente, el producto era una pasta muy viscosa de color marrón. . El producto se purifica con una columna cromatográfica (fase estacionaria: sílica gel; fase móvil: Et₂O: Hex (9:1).El rendimiento de la reacción es del 71%.

¹H RMN(300MHz, CDCl₃): δ 1,43[s, 9H CH₃]; 1,85 [m, 4H ,CH₂]; 2,32 [m ,2H ,CH₂] ; 2,49 [m, 2 H,CH₂] ; 2,74 [m, 2H, CH₂] ; 3,72 [m , 4H ,CH₂];7.81[m, 8H ,CH_{arom.}] ppm.

5.6 Síntesis de tertbutil 3-(bis(3-aminopropil)amino)propanoato

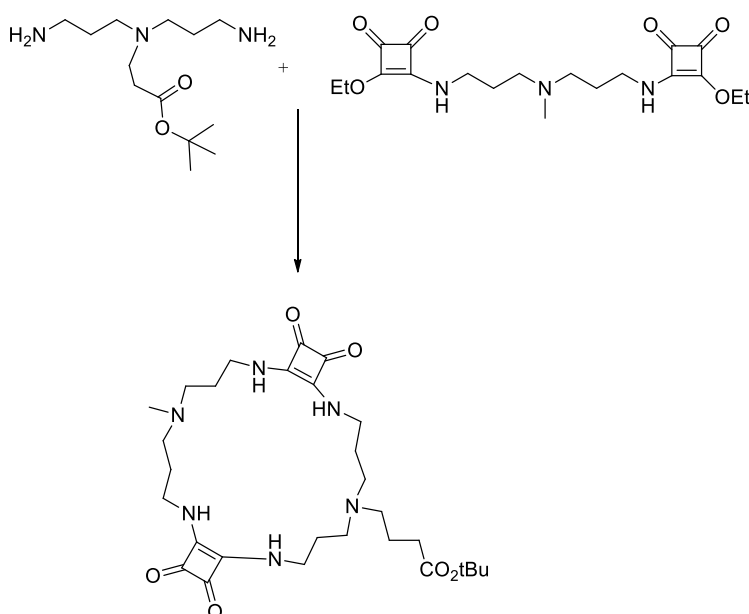


534 mg de tert-butil 3-(bis(3-(1.3-dioxoisindolin-2-il)propil)amino)propanoato se disuelven en 17 mL de EtOH absoluto en un balón de fondo redondo de 25mL . Se añaden 135µL de $\text{NH}_2\text{NH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ (2,5eq) . Se pone a reflujo durante 3 horas.

El crudo de reacción se disuelve en 40 mL de H_2O destilada y se lleva a pH=5 añadiendo HCl 1M. Se realizan 3 extracciones con 20 mL de éter. La fase acuosa extraída se basicifica con NaOH(sólido) hasta pH= 9 -10 . Una vez basicificado se realizan 3 extracciones con 15 mL de CH_2Cl_2 ,se seca con Na_2SO_4 anhidro y se concentra el producto. Se obtiene un aceite de color amarillo. El rendimiento de la reacción del 42%.

^1H RMN(300MHz, CDCl_3): δ =1,44(s, 9H, CH_3) ; 1,58 (m, 4H , CH_2); 2,34 (m,2H, CH_2); 2,44 (m, 4H , CH_2) ; 2,71 (m , 4H , NH_2) ppm.

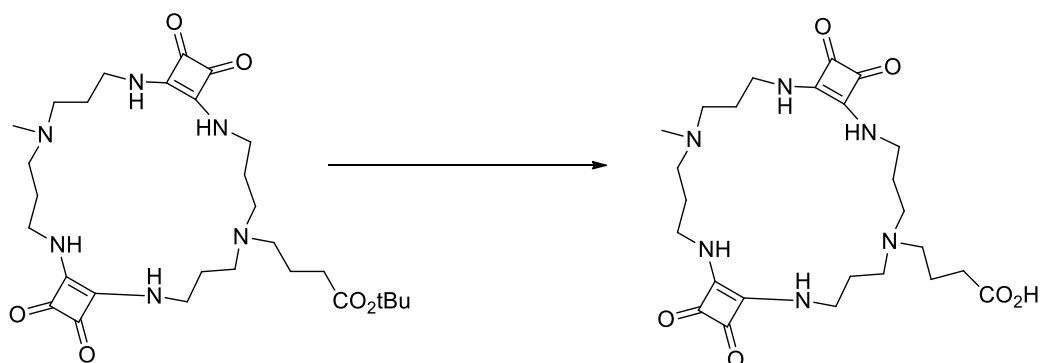
5.7 Síntesis de tert-Butil 4-(20-metil-13,14,27,28- tetraoxo-2,6,11,16,20,25-hexaazatriciclo[24.2.0.0^{12,15}]octacosa-1(26),12(15)-dien-6-il)butanoato



En un balón de fondo redondo de 50mL se añaden 0,11 g (0,42 mmol) de tertbutil 3-(bis(3-aminopropil)amino)propanoato y 0,15 g (0,39 mmol) de 4,4'-(((metilazanediiil)bis(propano-3,1-diil))bis(azanediiil))bis(3- etoxiciclobut-3-eno-1,2-diona).Se disuelve en 30 mL de etanol absoluto y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 24h. Se formó un sólido de color amarillo intenso. Se filtró y se lavó con etanol absoluto frío.

^1H RMN(300MHz, DMSO-d_6): δ =7,42 (br, 4H) ; 3,50 (br, 8H) ; 2,62 (br ,2H); 2,40-2,36 (br , 8H) ; 2,30-2,28(br , 2H); 2,13 (s, 3H) ; 1,65(br,8H) ; 1,37 (s ,9H) ppm.

5.8 Síntesis del ácido 10-(20-metil-13,14,27,28-tetraoxo-2,6,11,16,20,25-hexaazatriciclo[20.2.0.0^{12,15}]octacosa-1(26),12(15)-dien-6-il)butanoico



En un balón de 50mL de fondo redondo se pesan 42 mg de tert-Butil 4-(20-metil-13,14,27,28-tetraoxo-2,6,11,16,20,25-hexaazatriciclo[24.2.0.0^{12,15}]octacos-1(26),12(15)-dien-6-il)butanoato en 25 mL de agua miliQ, se ajusta el pH a 2 aproximadamente con HCl 1M. Durante toda la noche se mantiene con agitación a 50°C . Una vez transcurrido el tiempo se evapora el disolvente y se seca en el desecador con pentóxido de fósforo. Rendimiento de la reacción del 95%.

¹H RMN(300MHz, D₂O): δ= 3,68 (br,8H); 3,51(t, 2H) ; 3,28 (br, 8H); 2,91 (s,3H) ; 2,84(br, 2H) ; 2,09 (br,8H) ppm.

5.9 Preparación de las muestras para DLS

Se preparó 25 ml de una disolución 20 mM de SQ1 en un tampón de cacodilato sódico 0,15 M, a pH 6,3. La disolución se filtró un filtro de celulosa de 0,25μ A partir de esta disolución se tomaron alícuotas de la cantidad necesaria para preparar 3 ml de disoluciones de concentraciones comprendidas en el intervalo 0,1-20mM, diluyendo con el mismo tampón.

5.10 Preparación de las muestras UV-vis

Se preparó 25 ml de una disolución 20 mM de SQ1 en un tampón de cacodilato sódico 0,15 M, a pH 6,3. A partir de esta disolución se tomaron alícuotas de la cantidad necesaria para preparar muestras de 1mL de las disoluciones de concentraciones comprendidas en el intervalo 0,1-15 mM, diluyendo con el mismo tampón.