

COMPUESTOS HÍBRIDOS DE POLIOXOMETALATO- PÉPTIDO Y SUS APLICACIONES EN BIOMEDICINA



Laura Fuertes Monge

Trabajo de Fin de Grado

Departamento de Química Inorgánica

Facultad de Ciencias



Universidad
Zaragoza

Directora: Dra. Elena Atrián Blasco
Ponente: Dra. Elena Cerrada Lamuela

Curso 2019/2020

ABREVIATURAS

Azo: azobenceno	MEB: microscopía electrónica de barrido
AMP: péptido antimicrobiano	MET: microscopía electrónica de transmisión
CD: dicroísmo circular	MIC: concentración mínima inhibitoria
CDP: dipéptido catiónico	NHS: <i>N</i> -hidroxisuccinimida
DCC: dicitclohexilcarbodiimida	NLS: señales de localización nuclear
DIPEA: <i>N,N</i> -diisopropiletilamina	PEC: clúster encapsulado en péptido
DMAP: 4-(dimetilamino)piridina	POM: polioxometalato
DMF: <i>N,N</i> -dimetilformamida	PTA: ácido fosfotúngstico
EA: enfermedad de Alzheimer	RD: línea celular de rabdomioma
E. coli: <i>Escherichia coli</i>	RMN: resonancia magnética nuclear
EDX: fluorescencia de rayos X por energía dispersiva	TBA: tetrabutilamonio
EEDQ: <i>N</i> -etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina	TBABr: bromuro de tetrabutilamonio
Et₂O: dietiléter	TGA: análisis termogravimétrico
EtOH: etanol	Tris-NH₂: tris(hidroximetil)aminometano
5-FU: 5-fluorouracilo	VLP: partícula similar a virus
GAG: glucosaminglucano	VPH: virus del papiloma humano
HB: <i>Hypocrellin B</i>	XRD: difracción de rayos X
Hep-2: línea celular de carcinoma epitelial de laringe humano	°C: grado Celsius
HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol	g: gramo
HR-TEM: microscopía de transmisión electrónica de alta resolución	M: concentración molar
HR-ESI-MS: espectrometría masas con ionización por electrospray de alta resolución	min: minuto
IR: espectroscopía infrarrojo	mmol: milimol
ITC: calorimetría de titulación isotérmica	mL: mililitro
MCF-7: línea celular de adenocarcinoma de mama	Rdto.: rendimiento

En RMN

s: singlete
D₂O: agua deuterada
ppm: partes por millón
MHz: megahercios

En IR

w: débil; **m:** media; **s:** fuerte; **vs:** muy fuerte; **br:** ancha; **sh:** hombro (de sus abreviaturas en inglés)

O_t: oxígeno terminal

O_v: oxígeno puente entre octaedros que comparten vértices

O_a: oxígeno puente entre octaedros que comparten aristas

Abreviaturas y código de letras de aminoácidos

Ala (A): alanina

Arg (R): arginina

Asp (D): ácido aspártico

Cys (C): cisteína

Gln (Q): glutamina

Glu (E): ácido glutámico

Gly (G): glicina

His (H): histidina

Leu (L): leucina

Lys (K): lisina

Met (M): metionina

Phe (F): fenilalanina

Pro (P): prolina

Ser (S): serina

Thr (T): treonina

Tyr (Y): tirosina

Val (V): valina

RESUMEN

Compuestos híbridos de polioxometalato-péptido y sus aplicaciones en biomedicina

Los polioxometalatos son clústers inorgánicos de metales de transición y oxígeno con alta carga negativa y dimensiones nanométricas, utilizados ampliamente en el campo de la catálisis y de la biomedicina. La funcionalización de polioxometalatos con péptidos da lugar a nuevos materiales híbridos con potente actividad biológica para su uso en nanomedicina, especialmente como agentes antibacterianos, antitumorales o antiamiloides. El ensamblaje con péptidos puede producirse a través de interacciones electrostáticas entre ambos componentes (híbridos iónicos) o mediante unión covalente (híbridos covalentes). Durante la última década, se han realizado numerosas investigaciones sobre la síntesis y evaluación de la actividad biológica de diferentes híbridos POM-péptido. Una parte importante de estos estudios consiste en la caracterización de los híbridos, ya que su estructura puede determinar sus propiedades y, por tanto, sus aplicaciones. El creciente interés y los avances en el campo de los nanomateriales híbridos POM-péptido muestran nuevos posibles tratamientos para enfermedades como el cáncer o el Alzheimer. Por todo ello, este trabajo engloba una revisión bibliográfica de diversos híbridos POM-péptido, así como el diseño de una ruta sintética para la obtención de un híbrido de tipo covalente y la síntesis y caracterización de tres precursores POM como trabajo experimental.

ABSTRACT

Polyoxometalate-peptide hybrid compounds and their biomedical applications

Polyoxometalates are a type inorganic clusters of transition metals and oxygen with high negative charge and nanometric dimensions, widely used in the field of catalysis and biomedicine. The functionalization of polyoxometalates with peptides gives rise to new hybrid materials with potent biological activity for use in nanomedicine, especially as antibacterial, antitumor or antiamyloid agents. The assembly with peptides can take place through electrostatic interactions between both components (ionic hybrids) or by covalent bonding (covalent hybrids). During the last decade, much research has been carried out on the synthesis and evaluation of the biological activity of different POM-peptide hybrids. An important part of these studies is the characterization of hybrids, since their structure can determine their properties and, therefore, their applications. Advances in the field of POM-peptide hybrid nanomaterials show new possible treatments for diseases such as cancer or Alzheimer's disease. Therefore, this work includes a bibliographic review of various POM-peptide hybrids, as well as the design of a synthetic route to obtain a covalent-type hybrid and the synthesis and characterization of three POM precursors as experimental work.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Objetivo y planteamiento del trabajo	2
3. Revisión de compuestos híbridos POM-péptido y sus aplicaciones en biomedicina	3
3.1 <i>Introducción</i>	3
3.2 <i>Híbridos POM-péptido iónicos</i>	4
3.3 <i>Híbridos POM-péptido covalentes</i>	8
3.4 <i>Aplicaciones biomédicas</i>	11
4. Síntesis y caracterización de precursores POM	13
4.1 <i>Introducción</i>	13
4.2 <i>Parte experimental.....</i>	14
4.2.1 <i>Instrumentación</i>	14
4.2.2 <i>Síntesis y caracterización.....</i>	14
4.3 <i>Discusión de resultados.....</i>	17
5. Estudio sobre otros posibles métodos de síntesis de híbridos covalentes Dawson-péptido	20
5.1 <i>Unión por reacción con el extremo amino del péptido: activación del grupo ácido de la tricina</i>	20
5.2 <i>Unión por el grupo tiol de la cisteína: reacción con maleimida.....</i>	22
6. Conclusiones	23
7. Referencias.....	23
ANEXOS.....	26
A1. $K_6[\alpha-P_2W_{18}O_{62}] \cdot 13 H_2O$ (1)	26
A2. $Na_{12}[\alpha-P_2W_{15}O_{56}] \cdot 19 H_2O$ (2)	27
A3. $K_8H[P_2W_{15}V_3O_{62}] \cdot 31 H_2O$ (3)	28

1. Introducción

Los polioxometalatos (POMs), también llamados polioxoaniones o clústers metálicos, comprenden una amplia familia de clústers inorgánicos formados por la condensación de oxoaniones de metales de transición (especialmente, wolframio, molibdeno y vanadio) dando lugar a estequiometrías y estructuras muy variadas. Atendiendo a su composición podemos clasificarlos en isopolioxometalatos y heteropolioxometalatos.

Los isopolioxometalatos presentan una fórmula general $[M_mO_n]^{p-}$, siendo M un metal de transición tal como Nb, V, Mo o W unido a átomos de oxígeno, formados por condensación de oxoaniones MO_4^{n-} en medio ácido.

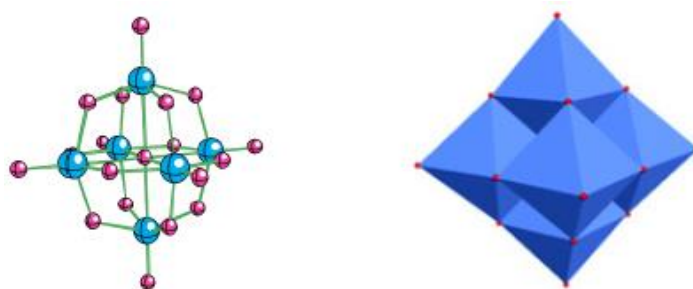


Figura 1. Una estructura característica de isopolioxometalatos es la estructura de Lindqvist $[Nb_6O_{19}]^{8-}$. Representación atómica y poliédrica.

Los heteropolioxometalatos presentan en su estructura, además de átomos de metales de transición y de oxígeno, átomos de boro, silicio, fósforo o germanio que se denominan heteroátomos. El heteroátomo queda alojado en el interior de la estructura, rodeado por los octaedros de oxoaniones condensados y unido a los átomos de oxígeno que le rodean.

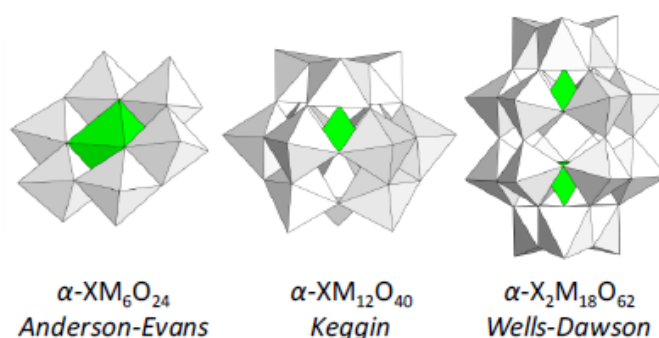


Figura 2. Estructuras características de heteropolioxometalatos.

Los polioxometalatos son sintetizados mediante reacciones simples dando lugar a estructuras generalmente estables térmicamente. Además, presentan buena estabilidad en disolución acuosa, especialmente en medio ácido, ya que en medio básico pueden descomponer por reacción con hidróxidos. Los heteropolioxometalatos son altamente solubles en agua y disolventes polares, como alcoholes, siendo insolubles en

disolventes orgánicos como benceno. Las sales inorgánicas de estos heteropoliácidos tienen mayor solubilidad en agua cuanto más pequeño es el catión (mejor con Li^+ o Na^+ que con K^+ o NH_4^+), mientras que las sales con cationes orgánicos, como el tetrabutilamonio (TBA), son solubles en disolventes orgánicos pero no en agua. Normalmente, los polioxometalatos se encuentran muy hidratados, pudiendo cuantificar las moléculas de agua mediante un análisis termogravimétrico (TGA).

Muchos de los polioxometalatos son potentes agentes oxidantes, ya que presentan átomos metálicos en su mayor estado de oxidación. En algunos casos, estos POMs pueden sufrir reducciones reversibles con ganancia de uno o dos electrones, dando lugar a especies intensamente coloreadas con metales de valencias mixtas, denominadas heteropoliazules.¹

Todas estas propiedades, añadidas a su fácil síntesis, convierten a los polioxometalatos en especies interesantes para su funcionalización con moléculas orgánicas o biomoléculas dando lugar a compuestos híbridos con diversas aplicaciones en el campo de la catálisis y en el diseño de nuevos (nano)materiales. Además, cabe destacar el avance en el diseño y síntesis de híbridos POM-péptido con capacidad antimicrobiana, antitumoral y antiamiloides que abre puertas a la mejora biomédica, por ejemplo en el tratamiento del Alzheimer.^{2,3}

2. Objetivo y planteamiento del trabajo

El trabajo a desarrollar se divide principalmente en dos partes:

- **Revisión bibliográfica** de compuestos híbridos polioxometalato-péptido incluyendo los procedimientos y resultados obtenidos en la síntesis y caracterización de híbridos covalentes e iónicos. Además, se expondrán algunas de las aplicaciones más relevantes de estas especies en el campo de la biomedicina (uso como antibacterianos, antitumorales y antiamiloides).
- **Parte experimental** basada en la síntesis y caracterización de un híbrido covalente polioxometalato-péptido, partiendo de los precursores. Las técnicas para su caracterización serán espectroscopía FT-IR y RMN y análisis termogravimétrico (TGA).

Además, se propondrán otros métodos de síntesis de híbridos covalentes POM-péptido, estudiando distintas estrategias de activación del grupo ácido de la tricina, como ligando orgánico de unión previa al POM, para su posterior unión al extremo amino del péptido. También se valorará la posible unión a través del grupo tiol de un aminoácido cisteína presente en un *spacer* del péptido, para lo que se necesitará como ligando orgánico previamente unido al POM la maleimida.

3. Revisión de compuestos híbridos POM-péptido y sus aplicaciones en biomedicina

3.1 Introducción

Los polioxometalatos son sistemas inorgánicos con propiedades adecuadas para su aplicación en biomedicina como agentes antibacterianos, antivirales y antitumorales. Además, su funcionalización con moléculas orgánicas o biomoléculas permite optimizar sus propiedades fisicoquímicas y generar características estructurales y morfológicas únicas, mejorando y ampliando su rango de aplicaciones en este campo.⁴ La formación de híbridos inorgánicos-(bio)orgánicos puede darse por interacción electrostática entre ambos componentes (unión iónica) o mediante unión covalente, clasificando los híbridos de POMs en Clase I y Clase II, respectivamente.⁵

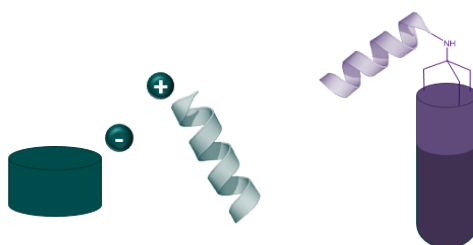


Figura 3. Híbridos POM-péptido: clase I, "Ionic assembly" (izda.) y clase II, "Covalent approach" (dcha.).

Los materiales híbridos de Clase I son capaces de autoensamblarse con un alto rendimiento a través de bloques de construcción relativamente sencillos, abriendo puertas al diseño y creación de nuevos (nano)materiales avanzados. Por otra parte, los de Clase II permiten una modificación más precisa de las propiedades electrónicas y espectroscópicas, además de facilitar un medio controlado en una postfuncionalización en otra superficie, debido a que establecen una unión más fuerte (covalente) entre el POM y el componente (bio)orgánico.

Una de las estrategias para funcionalizar polioxometalatos es la unión a péptidos, tanto de forma iónica como covalente, dando lugar a un **híbrido POM-péptido**. La investigación en la química de los materiales híbridos POM-péptido ha tenido grandes avances en la última década, en especial del año 2015 a 2020, debido a sus destacadas propiedades fisicoquímicas y sus múltiples aplicaciones. La mayoría de estos híbridos han sido sintetizados, según la literatura, por reacción directa del POM con el péptido, destacando como estructuras predominantes para el polioxometalato la Lindqvist [M_6O_{19}]^{q-}, Anderson-Evans [XM_6O_{24}]^{q-}, Keggin [$XM_{12}O_{40}$]^{q-} y Wells-Dawson [$X_2M_{18}O_{62}$]^{q-}.

Es posible funcionalizar POMs con péptidos que presentan propiedades antifúngicas, citotóxicas, anticancerígenas, antiinflamatorias, antiamiloides y antioxidantes, entre otras.^{6,7} Una nueva propuesta de investigación, en la que se engloba este trabajo, es la de utilizar péptidos antimicrobianos (AMPs, por sus siglas en inglés). Estos péptidos

tienen estructura secundaria de α -hélice y contienen residuos protonados, confiriendo carácter catiónico al péptido y permitiendo la síntesis de híbridos de Clase I. En este trabajo se revisarán especialmente los estudios basados en nuevos materiales híbridos POM-péptido con aplicaciones biológicas.

3.2 *Híbridos POM-péptido iónicos*

Los polioxometalatos son polianiones de medidas nanométricas y de alta carga negativa, siendo así capaces de interactuar con moléculas cargadas positivamente. Por ello, para originar el autoensamblaje de híbridos POM-péptido de Clase I, se eligen péptidos catiónicos o aminoácidos cargados positivamente.

La mayoría de los trabajos revisados utilizan como polioxometalatos estructuras simples y pequeñas, destacando la tipo Keggin y algunas de sus variedades tales como los heteropoliácidos Keggin ($H_3PW_{12}O_{40}$ o $H_4SiW_{12}O_{40}$)^{8,9} o el Keggin lacunario.¹⁰ Entre los aminoácidos preferidos para los péptidos de unión al POM, se encuentran los cargados positivamente, como se ha mencionado anteriormente, y los aromáticos, ya que proporcionan hidrofobicidad al sistema y buenas características de autoensamblaje y empaquetamiento. También cabe destacar el uso de péptidos bio-inspirados ya que mejoran la biocompatibilidad del híbrido para su aplicación biomédica.

Tabla 1. Vista previa de los diferentes POMs y péptidos para la obtención de híbridos iónicos

Ref.	Año	Tipo de POM	Fórmula POM	Péptido	Aplicaciones
8	2010	HPA Keggin	$H_3PW_{12}O_{40}$	CDP (FF-NH ₂)	Encapsulación
3	2013	Wells-Dawson	$[P_2CoW_{17}O_{61}]^{8-}$	A β_{15-20} (Ac-QKLVFF-NH ₂)	Antiamiloide
11	2015	Lindqvist	$Na_9[EuW_{10}O_{36}]$	Cápside HPV18 (SSKPAKRVRVRARK) Cápside HPV16 (SSTSTAKRKRKL)	Detección del VPH
9 12	2016	HPA Keggin	$H_4SiW_{12}O_{40}$	KAzoKAzoKAzoKAzo K-NH ₂	Antibacteriano Ensamblaje 1D
13	2016	HPA Keggin	$H_4SiW_{12}O_{40}$	Péptidos cortos ricos en lisina: KLKLLK	Hidrogeles
14	2017	HPA Keggin	$H_4SiW_{12}O_{40}$	Ac-EEMQRRAD-NH ₂ Ac-EEMQRR-NH ₂	Adhesivos
15	2019	Keggin mono-lacunario	$K_8[\alpha-SiW_{11}O_{39}]$	GHK	Adhesivos

La primera síntesis, según se conoce, de híbridos POM-péptido de Clase I fue llevada a cabo por X. Yan *et al.*⁸ en el año 2010. En este caso se seleccionó para la síntesis un polioxoanión Keggin, concretamente el ácido fosfotúngstico (PTA, en inglés), $H_3PW_{12}O_{40}$, el cual se combinó con un dipéptido catiónico (CDP, en inglés), H-Phe-Phe-NH₂ · HCl. El CDP deriva del péptido difenilalanina (FF) que está presente en el péptido β -amiloide. Los autores iniciaron la síntesis del híbrido adicionando una disolución acuosa de PTA a

una disolución HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) del péptido, en una ratio 1:5 y a temperatura ambiente. Instantáneamente, se generó una suspensión turbia opalescente, indicando que se había producido ensamblaje entre los dos componentes. Los polioxoaniones de PTA habían interactuado electrostáticamente con el extremo N-terminal positivo del CDP, quedando encapsulados y generando estructuras PEC (*peptide-encapsulated clusters*, en inglés), las cuales podían autoensamblarse en mayor medida originando esferas coloidales supramoleculares (ver **Figura 4**). El análisis por microscopía electrónica de barrido (MEB) junto con la microscopía electrónica de transmisión (MET) indicaron la formación de estructuras supramoleculares esféricas de tamaño aproximado de 150 nm. Por otra parte, la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-TEM, en inglés) mostraba que dichas esferas supramoleculares contenían unidades estructurales básicas de alrededor de 1 nm (correspondientes a unidades de PTA) rodeadas de una capa de péptido, originando estructuras híbridas iónicas PEC de aproximadamente 1.4 nm. Además, se realizó un estudio por fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDX, en inglés), que indicó la presencia de wolframio y carbono en la estructura supramolecular. Por lo tanto, ésta se componía tanto de PTA como de CDP, siendo una esfera coloidal híbrida.

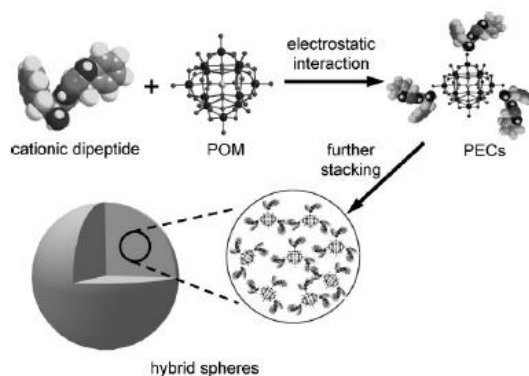


Figura 4. Ilustración esquemática de la unión PTA-CDP con la generación de una estructura esférica supramolecular. Reproducida con permiso de la referencia⁸.

La síntesis se repitió modificando la ratio PTA/CDP, y variando el pH y la temperatura con el objetivo de analizar la influencia de estos tres factores en el ensamblaje iónico. Los cambios en la relación PTA/CDP no modificaron la morfología ni el tamaño de las nanopartículas, pero se vio que había un límite de estabilidad del sistema por encima del cual precipitaba una red de partículas originada por el exceso de péptido. El aumento del pH producía la pérdida de la carga positiva del grupo amino del péptido, impidiendo la unión iónica entre éste y el Keggin. Por lo tanto, las nanoesferas solo eran estables en condiciones ácidas, deshaciéndose a pH básicos. Por otro lado, el calentamiento por encima de 50 °C producía una fuerte disminución en la turbidez de la disolución, sugiriendo que la interacción iónica disminuía e incluso desaparecía a temperaturas por encima de 70 °C. Así, los autores demostraron que estas esferas híbridas presentaban propiedades de respuesta a estímulos, en concreto al pH y a la temperatura. Esta característica, añadida a la capacidad de albergar moléculas en su interior, permite

utilizar estas nanoesferas híbridas en la liberación controlada de fármacos, en especial de los que son hidrofóbicos como *Hypocrellin B* (HB) usado en terapia fotodinámica.

Este artículo dio paso al resto de investigaciones en la química de los híbridos iónicos POM-péptido, donde los procedimientos para su síntesis siguen una forma similar a la descrita, con la particularidad de que cada investigación se centra en un tipo de POM y de péptido diferente, dando lugar a híbridos morfológicamente distintos y con aplicaciones muy variadas.

En el año 2013, Xiaogang Qu *et al.*³ realizaron un estudio similar al descrito anteriormente en el que también se obtuvieron nanoesferas híbridas, en este caso con propiedades antiamiloides. Para la síntesis se adicionó una disolución acuosa de $K_8[P_2CoW_{17}O_{61}]$, POM con estructura Wells-Dawson, a una disolución HFIP del fragmento del péptido β -amiloide, $A\beta_{15-20}$ (Ac-QKLVEFF-NH₂), a temperatura ambiente. Los estudios microscópicos (MEB, MET, HR-TEM) indicaron que las esferas coloidales tenían un tamaño de aproximadamente 80 nm. El espectro FT-IR del híbrido POM-péptido mostraba una fuerte interacción entre ambos componentes, observando señales correspondientes a los enlaces N-H y C=O del péptido (2834 y 1634 cm^{-1} , respectivamente) y bandas en la región del POM, por debajo de 1000 cm^{-1} , asociadas a los enlaces $W=O_t$, $W-O_v-W$ y $W-O_a-W$.

Dos años después, Lixin Wu *et al.*¹¹ innovaron mediante el ensamblaje de un péptido rico en arginina y lisina derivado de la proteína de la cápside del VPH (virus del papiloma humano) con un POM Lindqvist con europio, $Na_9[EuW_{10}O_{36}]$, el cual aportaba propiedades de luminiscencia al híbrido. La caracterización de éste se realizó mediante MET, MEB, difracción de rayos X (XRD, en inglés) y FT-IR. El análisis por calorimetría de titulación isotérmica (ITC, en inglés) confirmó que el ensamblaje estaba gobernado por la termodinámica, y el estudio del potencial ζ demostró que la unión entre ambos componentes se daba por interacción electrostática.

Por último, cabe destacar la funcionalización de POMs con péptidos de tipo facial, utilizados ampliamente por el investigador Wen Li y sus colaboradores, en el año 2016.⁹ Estos péptidos presentan propiedades anfipáticas, de modo que cuando el péptido se pliega las cadenas laterales hidrofóbicas e hidrofílicas se disponen en caras opuestas del péptido, lo que les da el nombre de péptidos faciales. Li *et al.*^{9,12} llevaron a cabo la síntesis de un híbrido basado en el ensamblaje de un péptido facial, combinando una parte hidrófila (aminoácidos lisina) con una parte hidrófoba (azobenceno), y el heteropoliácido Keggin $H_4SiW_{12}O_{40}$. La formación del híbrido se produjo en disolución acuosa a pH ligeramente ácido, al interaccionar ambos componentes en un ratio mínimo POM/péptido 1:2. El péptido facial adoptó la conformación de lámina- β , analizada mediante dicroísmo circular (CD, en inglés), con las cadenas laterales de residuos hidrófobos a lados opuestos del esqueleto del péptido. La microscopía electrónica demostró la formación de largas fibras híbridas de un diámetro de aproximadamente

13 nm. Además, las imágenes por HR-TEM mostraron que los nanoclústers de POM se disponían en el interior de estas nanofibras como una doble capa separada por una distancia próxima a los 5 nm (ver **Figura 6A**). Los investigadores sugirieron, de acuerdo con los resultados experimentales, que las fibras presentaban una estructura interna de capas POM-péptido-péptido-POM (ver **Figura 5**). Los aminoácidos lisina cargados positivamente mantenían unidos los péptidos al POM mediante interacciones electrostáticas, mientras que los péptidos se asociaban debido a puentes de hidrógeno entre los esqueletos peptídicos de las láminas- β , y a interacciones hidrofóbicas y de tipo π - π entre los anillos planos de grupos azobenceno. De este modo, se generaban nanoestructuras 1D.

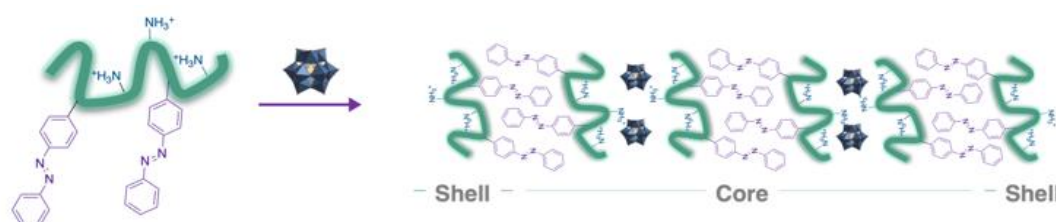


Figura 5. Estructura interna de las nanofibras originadas por interacción electrostática entre un péptido facial y un heteropoliácido Keggin.

Los autores repitieron la síntesis con seis variantes de péptidos faciales combinándolos con siete POMs de diferentes tamaños y estudiando el autoensamblaje entre ambos componentes.⁹ Se vio que la estabilidad de las nanofibras aumentaba con la disminución del número de residuos lisina o con el aumento de las interacciones hidrofóbicas. Además, al aumentar el tamaño de los clústers aniónicos, el impedimento estérico evitaba el plegamiento de los péptidos originando nanoesferas en lugar de nanofibras.

En estudios posteriores durante los años 2016¹³, 2017¹⁴ y 2019¹⁵, Wen Li y sus colaboradores demostraron que al modificar las condiciones experimentales (pH, co-disolventes, etc.), el tamaño del POM y las características del péptido podían dirigir la formación de híbridos con nanoestructuras 1D o 3D, con diferentes posibilidades de aplicación (ver **Figura 6**).

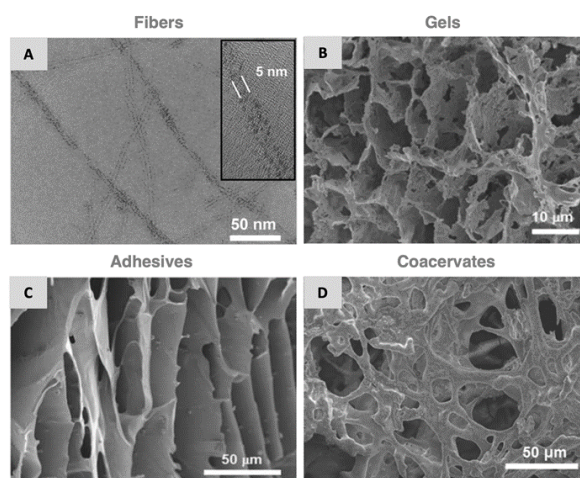


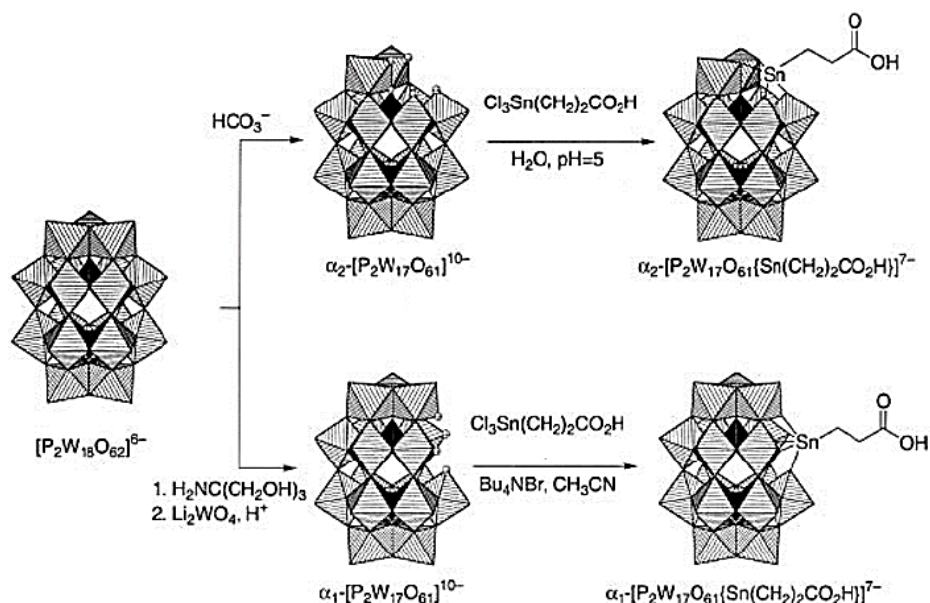
Figura 6. Micrografías MET de diferentes ensamblajes iónicos POM-péptido. Reproducidas con permiso de las referencias.^{12,13,14,15}

3.3 Híbridos POM-péptido covalentes

A diferencia de los híbridos de Clase I, el autoensamblaje de híbridos POM-péptido covalentes (Clase II) representa un desafío sintético, conociéndose un menor número de ejemplos y con aplicaciones hasta ahora limitadas. Sin embargo, la unión entre los componentes es más fuerte, lo que da lugar a híbridos con mayor estabilidad.

Hasta el momento destacan dos líneas diferentes para la síntesis de híbridos POM-péptido covalentes. La primera implica la funcionalización previa del POM con una molécula orgánica, tris(hidroximetil)aminometano (a partir de ahora nombrada como TRIS-NH₂) o un derivado de ésta, mientras que la segunda utiliza como ligando puente entre el polioxometalato y el péptido un compuesto organometálico de estaño.

Los compuestos organometálicos de estaño fueron ampliamente utilizados por Max Malacria y sus colaboradores durante los años 2003 y 2005.^{16,17} La funcionalización se llevó a cabo, tal como indica el **Esquema 1**, con Cl₃Sn(CH₂)₂COOH en dos POMs Wells-Dawson lacunarios con la misma fórmula química pero diferente ubicación del hueco lacunario α_1 -/ α_2 -[P₂W₁₇O₆₁]¹⁰⁻. Esto dio lugar a dos isómeros cuya diferencia se encontraba en la disposición del átomo de estaño en la estructura, afectando así a la simetría de los compuestos obtenidos: el isómero α_2 presenta simetría C_s, mientras que el isómero α_1 es un compuesto quiral.



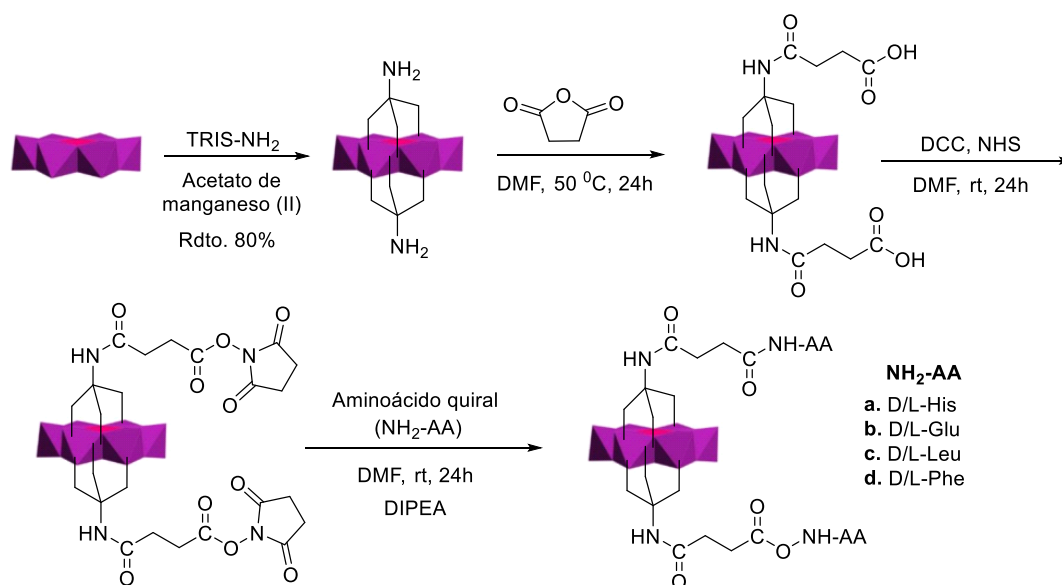
Esquema 1. Ruta para la funcionalización del POM lacunario con el derivado organometálico de estaño. Reproducida con permiso de la referencia.¹⁶

Siguiendo el procedimiento de Pope *et al.*^{18,19} el isómero α_2 se obtuvo adicionando el compuesto organometálico de estaño a una disolución acuosa de α_2 -[P₂W₁₇O₆₁]¹⁰⁻ a pH 5, precipitando como sólido blanco al añadir bromuro de tetrabutilamonio (TBABr). Su caracterización por IR mostró las bandas características asociadas a los enlaces P-O sin el típico desdoblamiento de los compuestos lacunarios, lo que sugería que el hueco

había sido completado con el compuesto organometálico de estaño. El isómero α_1 se sintetizó tras adicionar el POM lacunario $K_9[\alpha_1\text{-LiP}_2\text{W}_{17}\text{O}_{61}]$ a una disolución de TBABr en acetonitrilo a la que se le había añadido previamente el derivado organometálico de estaño. Esta estrategia diferente de síntesis fue necesaria dado que el isómero lacunario α_1 isomerizaba térmicamente al isómero α_2 en las condiciones de síntesis anteriores.

Una vez ensamblado el organometálico, se llevó a cabo la activación del extremo ácido del derivado de estaño y su posterior unión a los aminoácidos fenilalanina (Phe) o al derivado de tirosina Tyr- O^tBu por reacción con su extremo amino, dando lugar a un enlace amida. La activación se realizó utilizando como *coupling reagents* EEDQ (*N*-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina), para la unión con Tyr- O^tBu , o cloroformiato para el ensamblaje con fenilalanina. Los híbridos obtenidos se caracterizaron mediante ^{31}P -RMN y ^1H -RMN.

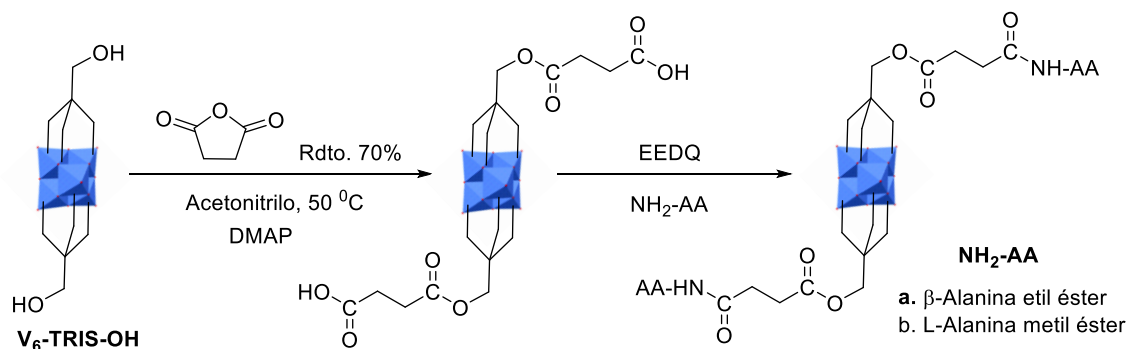
El primer ejemplo de funcionalización de un POM con un derivado del TRIS fue reportado en el año 1990 por J. Zubieta y Q. Chen, los cuales lograron la unión de un polioxovanadato con estructura Wells-Dawson con tris(hidroximetil)nitrometano.²⁰ Recientemente, se han revisado diversas estrategias para la unión de moléculas orgánicas derivadas del TRIS como nexo entre POMs con diversas estructuras y péptidos.^{21,22,23} Un avance importante fue el del investigador Xiaogang Qu y sus colaboradores, en el año 2019. Éstos funcionalizaron un POM Mn-Anderson con la molécula orgánica TRIS- NH_2 para su posterior unión con aminoácidos quirales, generando híbridos con fuerte actividad inhibitoria en la agregación del péptido β -amiloide ($\text{A}\beta$), responsable de enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson.²⁴ La funcionalización del Anderson-Evans con TRIS- NH_2 se realizó según el estudio de Marcoux *et al.*²⁵, mientras que la posterior unión peptídica se obtuvo mediante el procedimiento descrito en el artículo de Yvon *et al.*²¹, ambos procesos representados en el **Esquema 2**.



Esquema 2. Ruta sintética de diferentes híbridos Mn-Anderson-aminoácido quiral.

El tratamiento de $(\text{TBA})_4[\alpha\text{-Mo}_8\text{O}_{26}]$ con acetato de manganeso (II) en presencia del TRIS- NH_2 dio lugar al POM Mn-Anderson difuncionalizado, que fue aislado como cristales naranjas con un 80% de rendimiento y caracterizado mediante difracción de rayos X. Su reacción con anhídrido succínico originó un ácido carboxílico que se activó en la siguiente etapa por reacción con *N*-hidroxisuccinimida (NHS) en presencia de DCC (diciclohexilcarbodiimida). La activación del ácido permitió la fácil reacción con el extremo amino del aminoácido quiral en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA), generando un enlace amida y obteniendo como producto final el híbrido covalente quiral. Los híbridos sintetizados incluían aminoácidos cargados positivamente (D/L-His), cargados negativamente (D/L-Glu) o aminoácidos hidrofóbicos (D/L-Leu y D/L-Phe). Todos los productos se aislaron por precipitación con dietiléter (Et_2O) sin posterior purificación y fueron caracterizados mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF), confirmando que la unión del POM y el aminoácido se producía por amidación.

También en el año 2019, Hu *et al.*²⁶ desarrollaron un nuevo método de síntesis de híbridos con capacidad antitumoral a partir de un hexavanadato Lindqvist enlazado covalentemente a ésteres de aminoácidos. Tal como muestra el **Esquema 3**, se hizo reaccionar el hexavanadato, previamente difuncionalizado con un derivado alcohol del TRIS ($\text{V}_6\text{-TRIS-OH}$), con anhídrido succínico en acetonitrilo y en presencia de DMAP (4-(dimetilamino)piridina) como catalizador para la esterificación. El producto obtenido se trataba de un éster que presentaba un extremo ácido. Este extremo se activó con EEDQ y, seguidamente, se hizo reaccionar con el extremo amino de los diferentes ésteres de aminoácidos, β -Alanina etil éster y L-Alanina metil éster, originando los híbridos covalentes por enlace amida.



Esquema 3. Ruta sintética de híbridos covalentes hexavanadato Lindqvist-aminoácido.

La estructura de ambos híbridos se determinó mediante el análisis por difracción de rayos X. Los espectros FT-IR de ambos compuestos mostraron bandas muy fuertes cerca de los 950 cm^{-1} correspondientes al enlace $\text{V}=\text{O}$. Además, presentaban bandas a 1735 y 1737 cm^{-1} asociadas al enlace éster y bandas a 1667 y 1671 cm^{-1} correspondientes al enlace amida. La caracterización se completó mediante espectroscopía $^1\text{H-RMN}$ y espectrometría de masas con ionización por electrospray de alta resolución (HR-ESI-MS, en inglés). Los resultados confirmaron el éxito en la síntesis de los híbridos de Clase II.

3.4 Aplicaciones biomédicas

La actividad biológica de los híbridos POM-péptido es muy variada, pudiendo utilizarse en el campo de la biomedicina como antiamiloides, agentes antibacterianos o incluso como antitumorales. Además, destacan importantes publicaciones relacionadas con el uso de péptidos del virus del papiloma humano (VPH).

- **Relacionados con el VPH**

El grupo de Lixin Wu, describió la síntesis de híbridos iónicos basados en POMs de europio ensamblados a péptidos derivados de proteínas de la cápside de dos cepas patógenas del VPH, explicada en el apartado 3.2.¹¹ Estos péptidos, llamados señales de localización nuclear (NLS, en inglés), son fragmentos de proteínas de la cápside de VPH-16 y VPH-18, ricos en arginina y lisina y cargados positivamente. La interacción electrostática entre el oxoanión de europio y los péptidos originaron nanoesferas fluorescentes. Posteriormente, en el año 2018, los autores estudiaron la fluorescencia de estos híbridos iónicos en presencia de diferentes glucosaminglucanos (GAGs), como heparina, sulfato de condroitina o ácido hialurónico, los cuales son receptores celulares que permiten la entrada del virus a las células.²⁷ Si el péptido que conformaba el híbrido presentaba afinidad específica por el GAG, dejaría de ensamblarse con el POM para unirse con el GAG, de modo que disminuiría la fluorescencia. El método fue probado con un híbrido que contenía la proteína recombinante HPV-16L1, siendo efectivo para identificar los receptores celulares heparina y sulfato de condroitina. Este avance fue un ejemplo del uso de híbridos POM-péptido para la detección del virus.

- **Antiamiloides**

Diversos híbridos polioxometalato-péptido presentan actividad inhibitoria en la agregación del péptido β -amiloide ($A\beta$), proceso implicado en la formación de placas amiloides en el cerebro que son abundantes en pacientes afectados por la enfermedad del Alzheimer (EA). Entre ellos destaca el híbrido basado en la interacción electrostática entre un polioxowolframato Wells-Dawson y el fragmento peptídico $A\beta_{15-20}$, cuya síntesis se ha descrito en el apartado 3.2.³ El péptido $A\beta_{15-20}$ contiene la secuencia KLVFF que puede unirse al péptido $A\beta$ completo y prevenir su agregación. Además, la incorporación de un tinte fluorescente (congo red) en las nanoesferas híbridas permitió la monitorización del proceso de inhibición mediante el cambio de fluorescencia.

Debido a la estructura compuesta hélice- α y lámina- β , el péptido β -amiloide es sensible a entornos quirales, de modo que la quiralidad y la orientación de la hebra $A\beta$ afectan fuertemente al proceso de agregación. Esto se ve reflejado en la síntesis de híbridos covalentes originados mediante la unión entre un Mn-Anderson y un aminoácido quiral, estudiados por el grupo de investigación de Xiaogang Qu en el año 2019 (**Esquema 2**).²⁴

Los investigadores demostraron que la funcionalización del POM con aminoácidos quirales, en especial con el aminoácido hidrofóbico fenilalanina (Phe), originaba híbridos con actividad antiamiloides. Además, los estudios realizados *in vivo* mostraron que los

híbridos quirales atravesaban la barrera hematoencefálica y alargaban la vida útil de la cepa *Caenorhabditis elegans* transgénica con EA.

- **Antitumorales**

Tal como se expone en el apartado 3.3 (**Esquema 3**), la unión por amidación entre un hexavanadato Lindqvist con β -Alanina etil éster o L-Alanina metil éster dio lugar a híbridos de Clase II con fuerte capacidad antitumoral, incluso mayor que la del fármaco comercial 5-fluorouracilo (5-FU). Los ensayos *in vitro*, realizados por Hu *et al.*²⁶, demostraron que ambos híbridos covalentes, presentaban capacidad inhibitoria contra la proliferación celular para el carcinoma epitelial de laringe humano (Hep-2), para líneas celulares de rhabdomioma (RD) y para adenocarcinoma de mama (MCF-7). En especial, en células MCF-7, la actividad inhibitoria de ambos compuestos duplicaba la del 5-FU (24.87%). Con el objetivo de cuantificar la potencia de ambos compuestos como agentes antitumorales, se calcularon los IC₅₀, que representan la concentración de compuesto necesaria para inhibir la proliferación celular en el 50% de las células. Los resultados corroboraron que ambos híbridos eran agentes anticancerígenos más potentes que el 5-FU, bajo las mismas condiciones. Además, el híbrido con β -Alanina etil éster mostró la actividad inhibitoria más potente contra células Hep-2 y MCF-7 con valores de IC₅₀ de 11.40 y 53.01 μ M, respectivamente.

- **Antibacterianos**

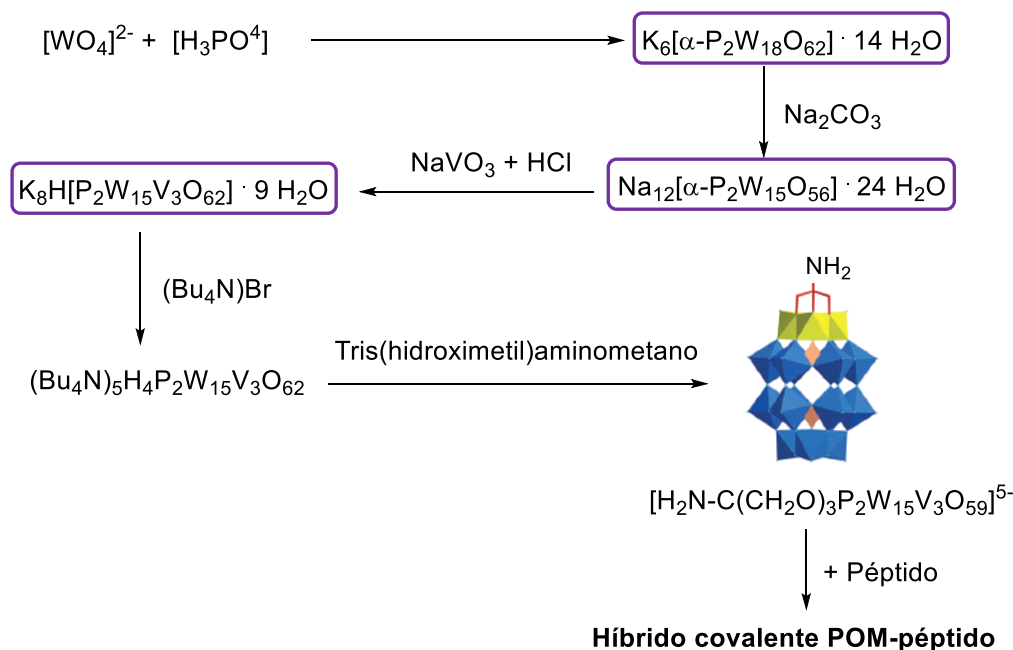
La actividad antibacteriana predomina especialmente en los híbridos POM-péptido de Clase I. El primer ejemplo de estos híbridos iónicos fue sintetizado por Li *et al.*¹², mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.2. El ensamblaje entre el Keggin H₄SiW₁₂O₄₀ y el péptido facial (KAzoKAzoKAzoK) dio lugar a nanofibras híbridas con actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* (E. coli), siendo su concentración mínima inhibitoria (MIC, en inglés) de 60 μ M. Los estudios de microscopía confocal sugirieron que la superficie cargada positivamente de las nanofibras permitía su unión y acumulación en la membrana celular de la bacteria, provocando lisis y muerte celular. Además, las nanofibras presentaron resistencia frente a la degradación enzimática en sueros humanos, lo que podría alargar su tiempo de vida en la circulación y facilitar su distribución a los tejidos afectados en un futuro uso como fármaco antibacteriano.

Las investigaciones de Lixin Wu *et al.*²⁸ sobre la mejora de la estabilidad de VLPs (*virus-like particles*) y la actividad biológica de POMs, llevaron al ensamblaje iónico de Eu-POMs con VLPs del VPH. La encapsulación de Eu-POMs en dichos VLPs daba lugar a híbridos con actividad antibacteriana frente a E. coli, mientras que la adhesión de los POMs a la superficie de los VLPs no originaba híbridos antibacterianos. La morfología del híbrido y, por tanto, su actividad antibacteriana dependía de las condiciones experimentales.

4. Síntesis y caracterización de precursores POM

4.1 Introducción

Uno de los objetivos del proyecto es la síntesis covalente de un híbrido POM-péptido que presente actividad biológica para su uso en biomedicina. Para ello, se diseña la ruta de síntesis a llevar a cabo en el laboratorio representada en el **Esquema 4**.



Esquema 4. Ruta sintética del híbrido covalente POM-péptido.

La parte experimental engloba la síntesis de los tres primeros polioxometalatos, según la ruta sintética, y su caracterización mediante espectroscopía IR, ^{31}P -RMN y análisis termogravimétrico (TGA).

El primer paso de la ruta da lugar a un polioxometalato con heteroátomos de P y cuya estructura es de tipo Wells-Dawson (compuesto **1**). La reacción de éste con carbonato sódico origina el POM Dawson trilacunario (compuesto **2**), el cual ha perdido 3 átomos de W procedentes de los 3 octaedros de la cúspide de la estructura. La tercera etapa permite completar el hueco trilacunario con tres octaedros de vanadio (cap V_3), generando de nuevo la estructura Wells-Dawson completa (compuesto **3**).

La funcionalización con tris(hidroximetil)aminometano puede realizarse a partir del compuesto **3**. Sin embargo, para mejorar la estabilidad del polioxometalato y su solubilidad en disolventes orgánicos, los contraiones K^+ del POM pueden ser sustituidos por cationes TBA, previo a la funcionalización con el tris.

La unión covalente entre el POM funcionalizado y el péptido se produce por reacción entre el grupo amino del tris y el extremo ácido del péptido, dando lugar a un enlace amida.

4.2 *Parte experimental*

4.2.1 Instrumentación

Espectroscopía infrarrojo

Los espectros de infrarrojo (IR) se han realizado a muestras en estado sólido mediante un espectrofotómetro FT/IR-4100 Jasco.

Espectroscopía RMN

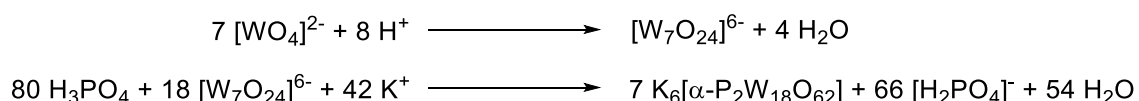
La caracterización de los compuestos mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ se realizó con un espectrofotómetro Bruker AV-400. Como disolvente para la preparación de las muestras se empleó agua deuterada (D_2O) y como referencia H_3PO_4 (^{31}P). Los desplazamientos químicos δ se expresan en partes por millón (ppm).

Análisis termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico se lleva a cabo mediante el instrumento Universal V4.5A de TA Instruments, el cual dispone de una balanza analítica altamente sensible que detecta pequeñas variaciones en el peso de la muestra al ir aumentando la temperatura. Las medidas se realizan en atmósfera de aire, con incrementos de temperatura de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar los $800\text{ }^\circ\text{C}$. La pérdida de masa entorno a los $100\text{ }^\circ\text{C}$ indicará el número de moléculas de agua presentes en la muestra inicial.

4.2.2 Síntesis y caracterización

Síntesis de $\text{K}_6[\alpha\text{-P}_2\text{W}_{18}\text{O}_{62}] \cdot n \text{H}_2\text{O}$ (1)



Esquema 5. Síntesis del compuesto 1.

Este producto se sintetiza siguiendo la síntesis Nadjo con recristalización descrita en la literatura.²⁹

Se toman 200 g de $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.607 mmol) y se disuelven en 233 mL de H_2O . La disolución se mantiene en agitación mientras se añade HCl 4M (167 mL, 0.66 mol) mediante un embudo de adición controlada. El pH varía desde 8.7 a los 10 minutos de adicionar HCl, hasta 7.4. Se añaden 3 mL extra de HCl para que el pH final sea de 7.2. La disolución torna de color, pasando de ser blanquecina a amarillenta. Una vez disuelto todo el sólido, se añade de manera controlada H_3PO_4 4M (167 mL, 0.66 mol) con agitación constante. La disolución presenta un color amarillo pálido, sin precipitado, y con pH 1.7. Esta disolución se deja a reflujo durante aproximadamente 26 horas. Tras el

reflujo, se deja enfriar la disolución y, posteriormente, se añaden 100 g de KCl (1.34 mol) obteniendo un precipitado amarillo pálido que se filtra en un Büchner y se mantiene en el desecador durante la noche. Dado que la pérdida de agua en el desecador es pequeña (0.1 g), el sólido se liofiliza durante 24 horas aproximadamente. El producto seco se recoge, obteniendo 121.34 g de un fino polvo amarillo pálido. A continuación, se redisuelve en 430 mL de H₂O y se filtra para eliminar las impurezas insolubles. El filtrado se deja a reflujo a 80 °C durante 72 horas, posteriormente se enfría a temperatura ambiente y se conserva a 4 °C hasta apreciar cristales. Estos cristales amarillos verdosos se filtran con un embudo Büchner y se secan a vacío durante la noche (23.83 g, primera fracción del compuesto **1**). Al filtrado se le adicionan 50 g de KCl (0.67 mmol) mientras se agita y, seguidamente, el sólido generado se filtra y se seca a vacío durante la noche. El producto seco se trata de un fino polvo amarillo verdoso (44.32 g, segunda fracción del compuesto **1**). Rdto: **2.32%**; 14.1 mmol, 68.15 g.

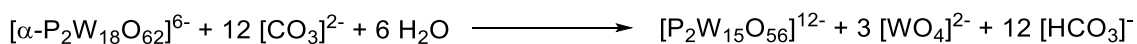
IR (cm⁻¹): 1088 (s), 956 (m), 909 (m), 740 (vs, br)

³¹P-RMN (400 MHz, D₂O, ppm): -12.9 (s)

TGA: pérdida de 4.94% de masa a 100 °C, correspondiente a 13 moléculas de H₂O.

Fórmula final: **K₆[α-P₂W₁₈O₆₂] · 13 H₂O**

Síntesis de Na₁₂[α-P₂W₁₅O₅₆] · n H₂O (**2**)



Esquema 6. Síntesis del compuesto **2**.

El procedimiento para esta síntesis se encuentra en la literatura.³⁰ Se lleva a cabo ajustando las cantidades a 3 mmol del reactivo limitante de partida, K₆[α-P₂W₁₈O₆₂] (**1**).

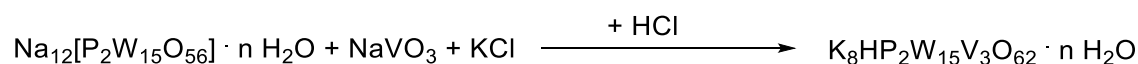
En un matraz de fondo redondo se prepara una disolución con 14.4 g de K₆[α-P₂W₁₈O₆₂] (**1**) (3 mmol) y 50 mL de H₂O, a la que se le añaden 13.125 g de NaClO₄ · H₂O (0.093 mol), con agitación constante. La suspensión se deja en agitación durante 20 minutos y después se coloca en un baño de hielo durante 2 horas. A continuación, el NaClO₄ que no ha reaccionado se elimina mediante filtración con papel de filtro. Al filtrado, con tono amarillo verdoso pálido, se le añade una disolución de Na₂CO₃, previamente preparada añadiendo 40 mL de H₂O a 3.975 g (0.0375 mol) de carbonato de sodio. Rápidamente, se genera una gran cantidad de precipitado blanco. La suspensión se transfiere a 4 tubos Falcon de 50 mL y se centrifuga durante 5 minutos a 3000 rpm. Se decanta el producto, juntando las fracciones sólidas. A continuación, el precipitado se lava con una disolución de NaCl (4 g en 25 mL) y, después, se lava con aproximadamente 25 mL de EtOH, dejando secar a vacío durante algunas horas. Finalmente, el sólido de color blanco se liofiliza (compuesto **2**). Rdto: **52.77%**; 1.58 mmol, 6.86 g.

IR (cm⁻¹): 1128 (w), 1085 (s), 1006 (m), 977 (w), 916(w), 866(s), 808 (s), 722 (br, vs)

TGA: pérdida de 7.83% de masa a 100 °C, correspondiente a 19 moléculas de H₂O.

Fórmula final: **Na₁₂[α-P₂W₁₅O₅₆] · 19 H₂O**

Síntesis de **K₈H[P₂W₁₅V₃O₆₂] · n H₂O (3)**



Esquema 7. Síntesis del compuesto 3.

El procedimiento para la síntesis de este compuesto se describe en la literatura.³¹ Se lleva a cabo ajustando las cantidades de 10.7 mmol a 1.4 mmol del reactivo limitante de partida, Na₁₂[P₂W₁₅O₅₆] (**2**).

Se toman 0.52 g de NaVO₃ (4.29 mmol), se disuelven en 90 mL de H₂O caliente y se dejan enfriar a temperatura ambiente. Seguidamente se adicionan 2 mL de HCl 6M (12 mmol), coloreando la disolución de un rojo anaranjado intenso. A continuación, se añaden lentamente 6 g de Na₁₂[α-P₂W₁₅O₅₆] (**2**) (1.4 mmol), intensificándose el color de la disolución. Ésta se agita durante 10 minutos. Después, se adicionan 13 g de KCl sólido (174.4 mmol), apareciendo un precipitado de color naranja. La suspensión se transfiere a 2 tubos Falcon de 50 mL y se centrifugan durante 10 minutos a 3500 rpm. Se recoge el sólido mediante decantación y éste se redisuelve en 10 mL de H₂O caliente a pH 1.5, generándose una suspensión. Esta suspensión se centrifuga en 2 tubos Falcon de 50 mL durante 10 minutos a 3500 rpm. A continuación, se decanta para recoger el pellet y éste se liofiliza durante la noche. Posteriormente se recoge el sólido seco obtenido (5.38 g). A continuación, se añaden unos 70 mL de H₂O al sólido para su disolución y seguidamente se somete a una acidificación mediante una columna de intercambio iónico (columna con resina Dowex 50WX8 acidificada previamente con 40 mL de una disolución de H₂SO₄ 0.125 M) obteniendo una disolución transparente de color naranja oscuro. Finalmente, esta disolución se trasvasa a un cristizador y se deja a 4 °C hasta obtener cristales, que se pesarán y recogerán en un vial. Rdto: **61.13%**; 0.86 mmol, 4.14 g.

IR (cm⁻¹): 1081 (s), 1063 (sh), 991 (m), 952 (s), 905 (s), 794 (sh, s), 722 (vs, br)

³¹P-RMN (400 MHz, D₂O, ppm): -7.1 (s), -13.8 (s); -9.5, -13.7 (4% del total)

TGA: pérdida de 11.53% de masa a 100 °C, correspondiente a 31 moléculas de H₂O.

Fórmula final: **K₈H[P₂W₁₅V₃O₆₂] · 31 H₂O**

4.3 *Discusión de resultados*

Siguiendo la ruta sintética planteada inicialmente, se han podido llevar a cabo las síntesis de los tres primeros polioxometalatos, precursores del híbrido covalente POM-péptido. El análisis de éstos por espectroscopía de IR y RMN y por análisis termogravimétrico (TGA) permiten su caracterización y muestran las diferencias estructurales entre cada uno de ellos.

✓ Espectroscopía RMN

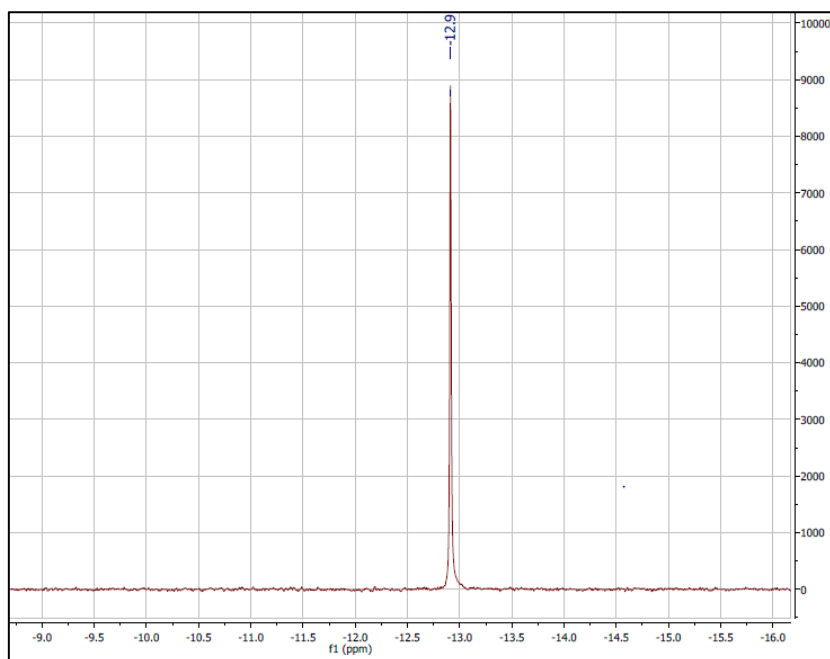


Figura 7. Espectro de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN del compuesto **1**.

La **Figura 7**, correspondiente al espectro de RMN de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ del compuesto **1**, muestra una única señal a -12.9 ppm. Dado que este compuesto presenta en su estructura dos átomos de fósforo, una única señal indica que ambos fósforos son equivalentes ya que presentan el mismo entorno químico. No se observan señales correspondientes a posibles impurezas. Además, el valor del desplazamiento químico indica que el isómero que predomina en la estructura del polioxometalato sintetizado es el isómero α .²⁹

A diferencia del espectro anterior, la **Figura 8** muestra dos señales correspondientes a dos átomos de fósforo no equivalentes. Esto se debe a que el polioxometalato $\text{K}_8\text{H}[\text{P}_2\text{W}_{15}\text{V}_3\text{O}_{62}]$ (**3**) presenta en su estructura un cap $\{\text{V}_3\}$ que hace que el entorno químico de los átomos de fósforo sea diferente, originando dos señales distintas en el espectro de ^{31}P -RMN que son -7.1 ppm (s) (P en entorno del cap $\{\text{V}_3\}$) y -13.8 ppm (s) (P en entorno del cap $\{\text{W}_3\}$). Además, aparecen otras dos señales a -9.5 y -13.7 ppm, que representan un 4% del total, lo que indica la presencia de impurezas en el producto obtenido.

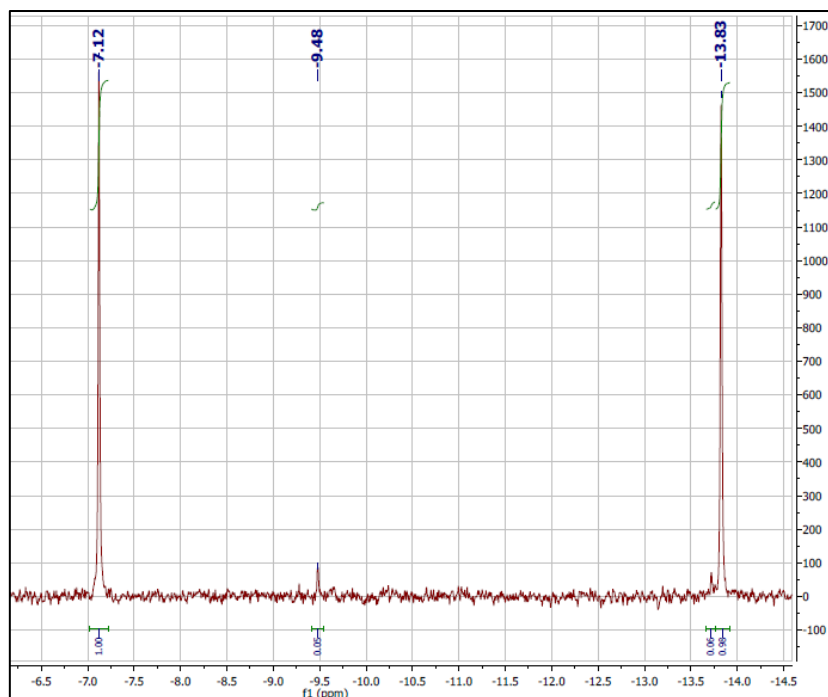


Figura 8. Espectro de $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -RMN del compuesto 3.

✓ Espectroscopía IR

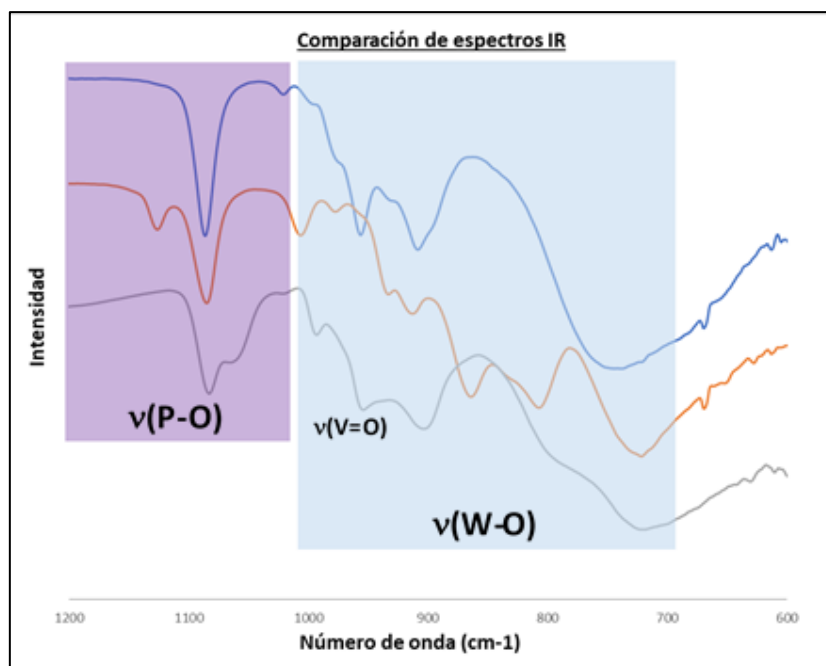


Figura 9. Comparación de espectros IR de los compuestos 1 (azul), 2 (naranja) y 3 (gris).

La máxima diferencia se encuentra en las bandas asociadas a los enlaces W-O del espectro IR del compuesto 2, las cuales se encuentran desdobladas, puesto que es un POM lacunario, y ligeramente desplazadas a números de onda menores. La única banda correspondiente al enlace P-O también se desdobra para los compuestos 2 y 3.

Además, el compuesto **3** es el único que presenta bandas correspondientes a enlaces V-O, de acuerdo con su fórmula química.

Tabla 2. Asignación de bandas y números de onda (cm^{-1}) para los IR de los compuestos **1**, **2** y **3**.

Asignación	(1)	(2)	(3)
P-O	1088 (s)	1128 (m), 1085 (s)	1081 (s), 1063 (sh)
W=O _t	956 (s)	1006 (m), 977 (w)	991 (m)
W-O _v -W	909 (s)	866 (s), 808 (s)	905 (m, br)
W-O _a -W	740 (vs, br)	722 (vs, br)	722 (vs, br)
V=O	-	-	952 (m, br)

Intensidades y formas de las bandas

w: débil; m: media; s: fuerte; vs: muy fuerte; br: ancha; sh: hombro

✓ Análisis termogravimétrico (TGA)

Los polioxometalatos sintetizados se encuentran de manera hidratada, con un número de moléculas de agua diferente según las condiciones de reacción y los procedimientos de síntesis llevados a cabo. Por ello, es necesaria la cuantificación de estas moléculas de agua mediante el análisis termogravimétrico (TGA). La muestra de análisis se somete a un aumento continuado de la temperatura, lo que lleva a la evaporación de las moléculas de agua presentes y, por tanto, a una pérdida de masa que es detectada por una balanza analítica altamente sensible que dispone el instrumento. En la **Figura 10**, correspondiente al análisis termogravimétrico del compuesto **3**, se muestra claramente la pérdida, a 100 °C de temperatura, del 11.53% de masa, correspondientes a 31 moléculas de agua. Para los compuestos **1** y **2** la pérdida de masa fue del 4.94% y 7.83%, respectivamente, correspondiéndose con 13 y 19 moléculas de agua.

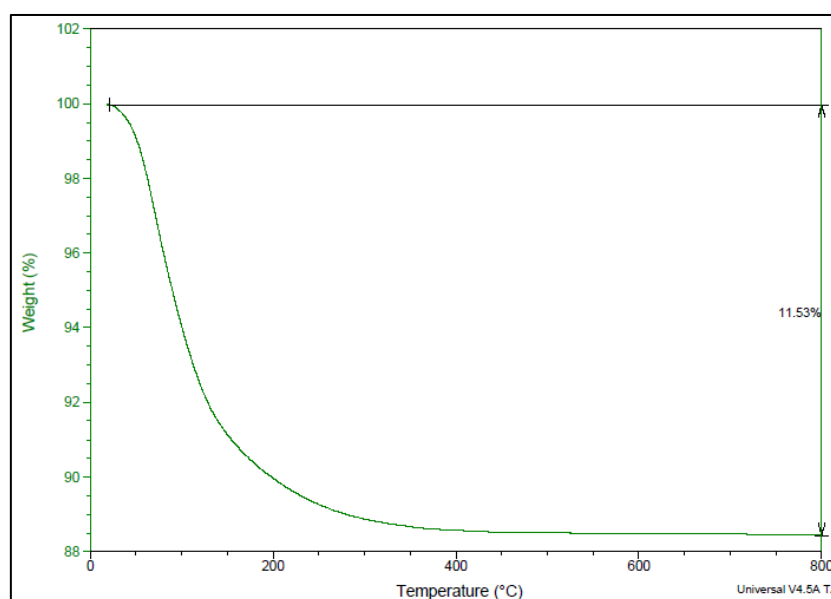


Figura 10. Análisis termogravimétrico del compuesto **3**.

5. Estudio sobre otros posibles métodos de síntesis de híbridos covalentes Dawson-péptido

El método pensado para llevar a cabo experimentalmente la unión covalente del POM al péptido implica la unión previa del POM con tris(hidroximetil)aminometano, que presenta un extremo amino que puede reaccionar con el extremo ácido del péptido, generando un enlace amida. Sin embargo, otra posibilidad sería la funcionalización del POM con la molécula orgánica tricina, la cual presenta un grupo ácido que podría reaccionar con el extremo amino del péptido, obteniendo también un enlace amida.

Otra opción consistiría en la unión del POM al péptido a través del grupo tiol del aminoácido cisteína. Para ello, se utilizará como ligando orgánico de unión previa al POM la maleimida. La reacción entre maleimida y un grupo tiol puede ocurrir a través de diferentes mecanismos, tales como adición nucleófila o mediante radicales. Debido al tamaño de la maleimida, el aminoácido cisteína con el que se producirá la reacción debe pertenecer a un *spacer* (GGGC) colocado en el extremo C-terminal del péptido, de modo que su estructura secundaria de α -hélice no se vea afectada.

5.1 Unión por reacción con el extremo amino del péptido: activación del grupo ácido de la tricina

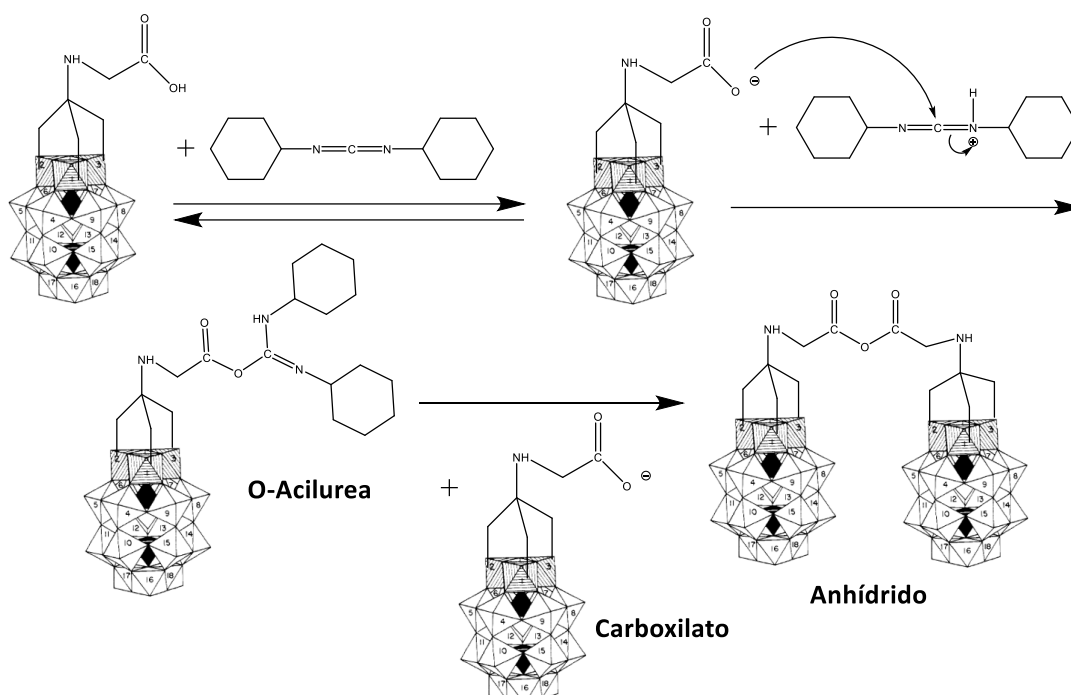
La reacción entre un ácido carboxílico y una amina para dar lugar a un enlace amida, con la correspondiente eliminación de una molécula de agua, no ocurre espontáneamente a temperatura ambiente, se necesitan altas temperaturas. Esta condición puede llevar a la pérdida de la integridad de los sustratos y, dado que en este caso uno de ellos es un péptido, una alta temperatura podría suponer desnaturalización y pérdida de su funcionalidad.

Por este motivo, previo al tratamiento con el extremo amino del péptido, es necesaria la activación del grupo ácido de la tricina, convirtiendo su grupo -OH en un mejor grupo saliente. Esta activación puede realizarse mediante el uso de *coupling reagents*, tales como carbodiimidas.³²

El mecanismo de activación de ácidos carboxílicos a través de carbodiimidas puede explicarse utilizando diclohexilcarbodiimida (DCC) como ejemplo (ver **Esquema 8**). La primera etapa consiste en la transferencia del protón del ácido carboxílico a uno de los nitrógenos de la DCC. Seguidamente, se produce el ataque del carboxilato al carbono electrófilo de la carbodiimida, dando lugar al intermedio *O*-acilurea que presenta un grupo carbonilo muy electrófilo. Por último, otra molécula de carboxilato ataca nucleofílicamente a la *O*-acilurea dando lugar a un anhídrido que reacciona más fácilmente que el ácido con el extremo amino del péptido.

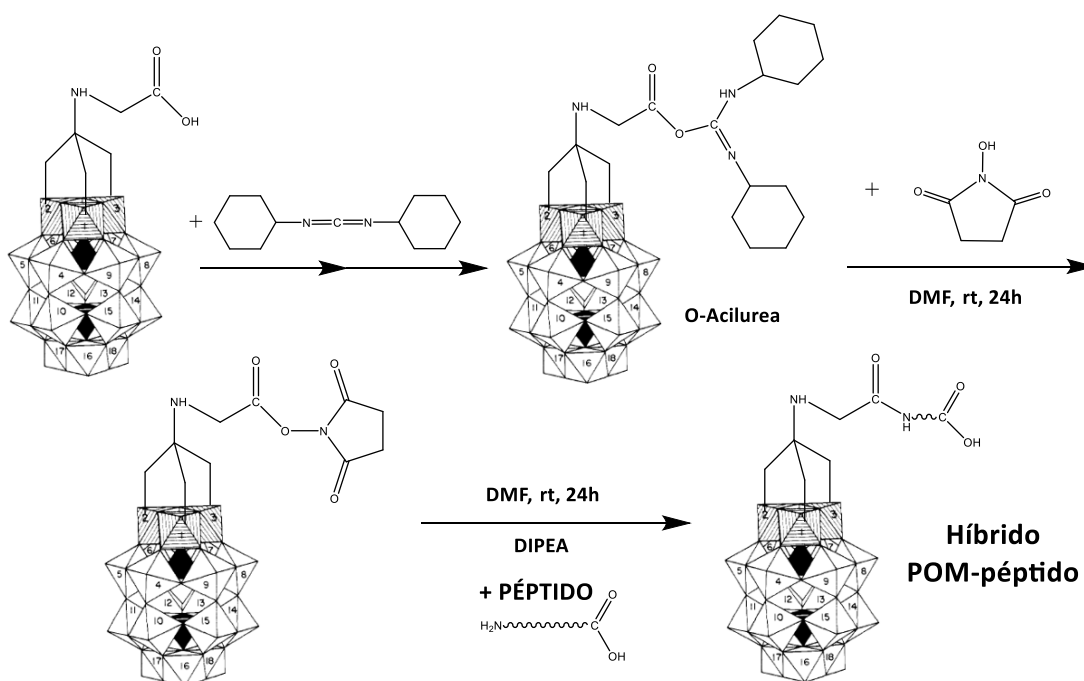
La reacción con carbodiimidas puede llevarse a cabo en DMF y a temperatura ambiente, pero la formación de *N*-acilurea al utilizar DCC (reacción secundaria no deseada) está

desfavorecida por la utilización de disolventes apróticos con baja constante dieléctrica como el diclorometano.



Esquema 8. Activación del grupo ácido de la tricina con DCC.

Uno de los métodos más descritos en la literatura para la unión covalente POM-péptido incluye el uso de *N*-hidroxisuccinimida (NHS) en presencia de carbodiimida para la activación del grupo ácido (**Esquema 9**).^{4,21} El papel de la NHS es mejorar el grupo saliente del ácido que previamente ha activado la carbodiimida al formar la *O*-acilurea.

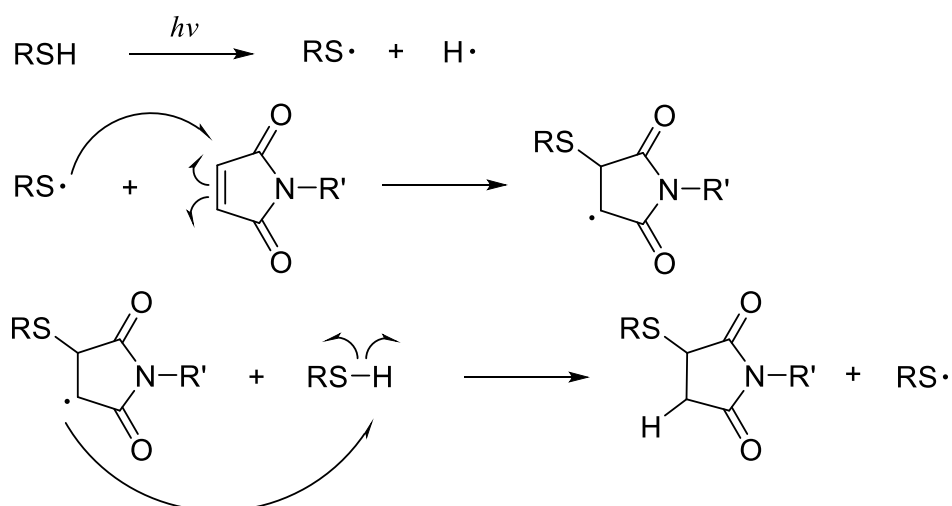


Esquema 9. Activación del grupo ácido de la tricina con NHS en presencia de DCC.

5.2 Unión por el grupo tiol de la cisteína: reacción con maleimida

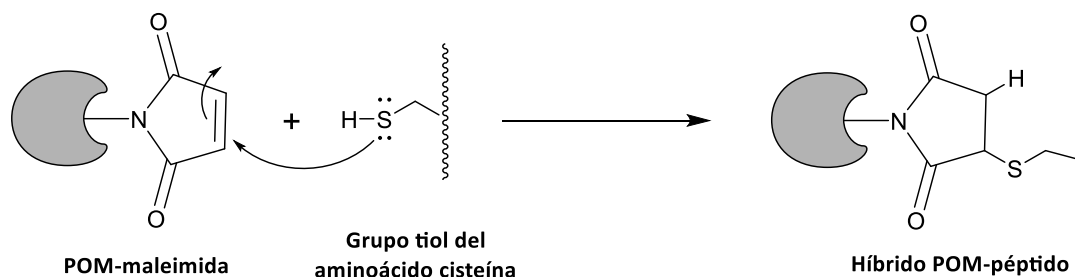
Imidas cíclicas tales como la maleimida junto con sus derivados han mostrado actividad biológica como agentes antibacterianos, antifúngicos o antitumorales.³³ Dado que la maleimida puede reaccionar con un grupo tiol (presente en el aminoácido cisteína), una posibilidad de formar un híbrido covalente POM-péptido mejorando su actividad biológica es el uso de maleimida como nexo entre el POM y el péptido.

La reacción de maleimida con el grupo tiol puede llevarse a cabo a través de radicales como indica el **Esquema 10**.³⁴ La primera etapa consiste en la iniciación radicalaria para obtener el radical tiol. La segunda etapa coincide con la propagación, donde el radical tiol ataca al doble enlace de la maleimida produciéndose una rotura heterolítica del doble enlace y generándose un radical maleimida. Este radical ataca en una tercera etapa de propagación a otra molécula de tiol, aceptando un átomo de hidrógeno y obteniendo un nuevo radical tiol que podría atacar a otra molécula de maleimida.



Esquema 10. Mecanismo de reacción de la maleimida con un grupo tiol a través de radicales. Primera etapa de iniciación y dos etapas de propagación.

Como alternativa al mecanismo radicalario, la reacción entre maleimida y el grupo tiol de la cisteína puede darse mediante una adición de Michael (**Esquema 11**).³⁴ El mecanismo consiste en el ataque nucleofílico del tiol al doble enlace de la maleimida, dando lugar al enlace tioéter. Esta reacción ocurre en condiciones ligeramente ácidas (pH 6-7), ya que en condiciones básicas la maleimida puede hidrolizarse a ácido maleico.



Esquema 11. Reacción entre la maleimida y el grupo tiol vía adición de Michael.

6. Conclusiones

La revisión bibliográfica realizada a lo largo del trabajo ha mostrado los múltiples procedimientos llevados a cabo, en especial durante la última década, para la obtención de híbridos POM-péptido iónicos y covalentes con importante actividad biológica. La caracterización de híbridos iónicos se realiza en gran medida mediante estudios de microscopía electrónica (MEB, MET, HR-TEM) y difracción de rayos X, a diferencia de las técnicas espectroscópicas FT-IR y RMN y la espectrometría de masas con las que se caracterizan, mayormente, los híbridos covalentes. Los polioxometalatos preferidos para la síntesis de nanomateriales híbridos se basan en estructuras básicas como Lindqvist, Wells-Dawson, Anderson-Evans o Keggin, mientras que la variedad de péptidos utilizados es mucho más amplia, destacando aquellos que se asemejan a sistemas biológicos naturales, puesto que mejoran la biocompatibilidad del híbrido para su futuro uso en nanomedicina. Las aplicaciones biomédicas de estos híbridos POM-péptido se resumen en agentes antibacterianos, antitumorales e inhibidores de la agregación del péptido β -amiloide. Además, el ensamblaje de determinados Eu-POMs con péptidos derivados del virus del papiloma humano ha permitido el desarrollo de un nuevo sistema de detección del virus y de sus receptores celulares.

Por otro lado, el trabajo experimental se inició diseñando una posible ruta de síntesis de un híbrido covalente, basado en el ensamblaje entre un polioxometalato Wells-Dawson y un péptido. Se pudo llevar a cabo la síntesis de los tres primeros precursores POM con su correspondiente caracterización estructural. El análisis mediante espectroscopía FT-IR mostró las bandas más características asociadas a los enlaces P-O y M-O, los espectros de ^{31}P -RMN sugirieron el número de átomos de fósforo equivalentes y la presencia o ausencia de impurezas en los productos obtenidos. Por último, el análisis termogravimétrico permitió la cuantificación de las moléculas de agua presentes en la estructura de los polioxometalatos, necesarias para conocer sus fórmulas químicas completas.

7. Referencias

- [1] Kee, H. L.; Tang, H. Domestic Value Added in Chinese Exports : Firm-Level Evidence. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, *30* (202), 1–59.
- [2] Geng, J.; Li, M.; Ren, J.; Wang, E.; Qu, X. Polyoxometalates as Inhibitors of the Aggregation of Amyloid β Peptides Associated with Alzheimer's Disease. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2011**, *50* (18), 4184–4188.
- [3] Li, M.; Xu, C.; Wu, L.; Ren, J.; Wang, E.; Qu, X. Self-Assembled Peptide-Polyoxometalate Hybrid Nanospheres: Two in One Enhances Targeted Inhibition of Amyloid β -Peptide Aggregation Associated with Alzheimer's Disease. *Small* **2013**, *9* (20), 3455–3461.
- [4] Ventura, D.; Calderan, A.; Honisch, C.; Krol, S.; Serrati, S.; Bonchio, M.; Carraro, M.; Ruzza, P. Synthesis and Biological Activity of an Anderson Polyoxometalate Bis-Functionalized with a Bombesin-Analog Peptide. *Pept. Sci.* **2018**, *110* (5).

- [5] Dolbecq, A.; Dumas, E.; Mayer, C. R.; Mialane, P. Hybrid Organic-Inorganic Polyoxometalate Compounds: From Structural Diversity to Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (10), 6009–6048.
- [6] Hamley, I. W. Small Bioactive Peptides for Biomaterials Design and Therapeutics. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (24), 14015–14041.
- [7] Goyal, D.; Shuaib, S.; Mann, S.; Goyal, B. Rationally Designed Peptides and Peptidomimetics as Inhibitors of Amyloid- β (A β) Aggregation: Potential Therapeutics of Alzheimer's Disease. *ACS Comb. Sci.* **2017**, *19* (2), 55–80.
- [8] Yan, X.; Zhu, P.; Fei, J.; Li, J. Self-Assembly of Peptide-Inorganic Hybrid Spheres for Adaptive Encapsulation of Guests. *Adv. Mater.* **2010**, *22* (11), 1283–1287.
- [9] Li, J.; Li, X.; Xu, J.; Wang, Y.; Wu, L.; Wang, Y.; Wang, L.; Lee, M.; Li, W. Engineering the Ionic Self-Assembly of Polyoxometalates and Facial-Like Peptides. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (44), 15751–15759.
- [10] Liu, X.; Xie, X.; Du, Z.; Li, B.; Wu, L.; Li, W. Aqueous Self-Assembly of Arginine and K8SiW11O39: Fine-Tuning the Formation of a Coacervate Intended for Sprayable Anticorrosive Coatings. *Soft Matter* **2019**, *15* (45), 9178–9186.
- [11] Zhang, T.; Li, H. W.; Wu, Y.; Wang, Y.; Wu, L. Self-Assembly of an Europium-Containing Polyoxometalate and the Arginine/Lysine-Rich Peptides from Human Papillomavirus Capsid Protein L1 in Forming Luminescence-Enhanced Hybrid Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119* (15), 8321–8328.
- [12] Li, J.; Chen, Z.; Zhou, M.; Jing, J.; Li, W.; Wang, Y.; Wu, L.; Wang, L.; Wang, Y.; Lee, M. Polyoxometalate-Driven Self-Assembly of Short Peptides into Multivalent Nanofibers with Enhanced Antibacterial Activity. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2016**, *55* (7), 2592–2595.
- [13] Li, J.; Xu, J.; Li, X.; Gao, W.; Wang, L.; Wu, L.; Lee, M.; Li, W. Heteropoly Acids Triggered Self-Assembly of Cationic Peptides into Photo- and Electro-Chromic Gels. *Soft Matter* **2016**, *12* (25), 5572–5580.
- [14] Xu, J.; Li, X.; Li, X.; Li, B.; Wu, L.; Li, W.; Xie, X.; Xue, R. Supramolecular Copolymerization of Short Peptides and Polyoxometalates: Toward the Fabrication of Underwater Adhesives. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (11), 3524–3530.
- [15] Li, X.; Zheng, T.; Liu, X.; Du, Z.; Xie, X.; Li, B.; Wu, L.; Li, W. Coassembly of Short Peptide and Polyoxometalate into Complex Coacervate Adapted for PH and Metal Ion-Triggered Underwater Adhesion. *Langmuir* **2019**, *35* (14), 4995–5003.
- [16] Bareyt, S.; Piligkos, S.; Hasenknopf, B.; Gouzerh, P.; Lacôte, E.; Thorimbert, S.; Malacria, M. Highly Efficient Peptide Bond Formation to Functionalized Wells-Dawson-Type Polyoxotungstates. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, *42* (29), 3404–3406.
- [17] Bareyt, S.; Piligkos, S.; Hasenknopf, B.; Gouzerh, P.; Lacôte, E.; Thorimbert, S.; Malacria, M. Efficient Preparation of Functionalized Hybrid Organic/Inorganic Wells-Dawson-Type Polyoxotungstates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (18), 6788–6794.
- [18] Zonnevillje, F.; T. Pope, M. Attachment of Organic Groups to Heteropoly Oxometalate Anions. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *101* (10), 2731–2732.
- [19] Chorghade, G. S.; Pope, M. T. Characterization, and Reactions of Keggin- and Dawson-Type Tungstostannates (11)'. *Polyhedron* **1987**, *109* (10), 5134–5138.

- [20] Chen, Q.; Zubieta, J. Synthesis and Structural Characterization of a Polyoxovanadate Coordination Complex with a Hexametalate Core: [(N-C₄H₉)₄N]₂[V₆O₁₃{O₂NC(CH₂O)₃]₂. *Inorg. Chem.* **1990**, *29* (8), 1456–1458.
- [21] Yvon, C.; Surman, A. J.; Hutin, M.; Alex, J.; Smith, B. O.; Long, D.-L.; Cronin, L. Polyoxometalate Clusters Integrated into Peptide Chains and as Inorganic Amino Acids: Solution- and Solid-Phase Approaches. *Angew. Chemie* **2014**, *126* (13), 3404–3409.
- [22] Blazevic, A.; Rempel, A. The Anderson-Evans Polyoxometalate: From Inorganic Building Blocks via Hybrid Organic-Inorganic Structures to Tomorrows “Bio-POM.” *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *307*, 42–64.
- [23] Anyushin, A. V.; Kondinski, A.; Parac-Vogt, T. N. Hybrid Polyoxometalates as Post-Functionalization Platforms: From Fundamentals to Emerging Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49* (2), 382–432.
- [24] Gao, N.; Du, Z.; Guan, Y.; Dong, K.; Ren, J.; Qu, X. Chirality-Selected Chemical Modulation of Amyloid Aggregation. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141* (17), 6915–6921.
- [25] Marcoux, P. R.; Hasenknopf, B.; Vaissermann, J.; Gouzerh, P. Developing Remote Metal Binding Sites in Heteropolymolybdates. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, No. 13, 2406–2412.
- [26] Hu, X.; Wang, H.; Huang, B.; Li, N.; Hu, K.; Wu, B.; Xiao, Z.; Wei, Y.; Wu, P. A New Scheme for Rational Design and Synthesis of Polyoxovanadate Hybrids with High Antitumor Activities. *J. Inorg. Biochem.* **2019**, *193* (September 2018), 130–132.
- [27] Gao, P. F.; Liu, Y. X.; Zhang, L.; Zhang, S.; Li, H. W.; Wu, Y.; Wu, L. Cell Receptor Screening for Human Papillomavirus Invasion by Using a Polyoxometalate-Peptide Assembly as a Probe. *J. Colloid Interface Sci.* **2018**, *514*, 407–414.
- [28] Fu, D. Y.; Zhang, S.; Qu, Z.; Yu, X.; Wu, Y.; Wu, L. Hybrid Assembly toward Enhanced Thermal Stability of Virus-like Particles and Antibacterial Activity of Polyoxometalates. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10* (7), 6137–6145.
- [29] Graham, C. R.; Finke, R. G. The Classic Wells-Dawson Polyoxometalate, K₆[α-P₂W₁₈O₆₂]-14H₂O. Answering an 88 Year-Old Question: What Is Its Preferred, Optimum Synthesis? *Inorg. Chem.* **2008**, *47* (9), 3679–3686.
- [30] Schmid, G. *Inorganic Syntheses*; Ginsberg, A. P., Ed.; Inorganic Syntheses; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1990; Vol. 27.
- [31] Finke, R. G.; Rapko, B.; Saxton, R. J.; Domaille, P. J. Trisubstituted Heteropolytungstates as Soluble Metal Oxide Analogues. 3.1 Synthesis, Characterization, ³¹P, ²⁹Si, ⁵¹V, and 1- and 2-D ¹⁸³W NMR, Deprotonation, and H⁺ Mobility Studies of Organic Solvent Soluble Forms of H_xSi_w9V₃O_{40x-7} and H_xP₂W₁₅V₃O_{62x-9}. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (11), 2947–2960.
- [32] Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (2), 606–631.
- [33] Ye, Q.; Cao, J.; Zhou, X.; Lv, D.; He, Q.; Yang, B.; Hu, Y. Synthesis and Evaluation of Novel 7-Azaindazolyl-Indolyl-Maleimide Derivatives as Antitumor Agents and Protein Kinase C Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **2009**, *17* (13), 4763–4772.
- [34] Canalle, L. A.; Löwik, D. W. P. M.; Van Hest, J. C. M. Polypeptide-Polymer Bioconjugates. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (1), 329–353.

ANEXOS

A1. $K_6[\alpha-P_2W_{18}O_{62}] \cdot 13 H_2O$ (1)

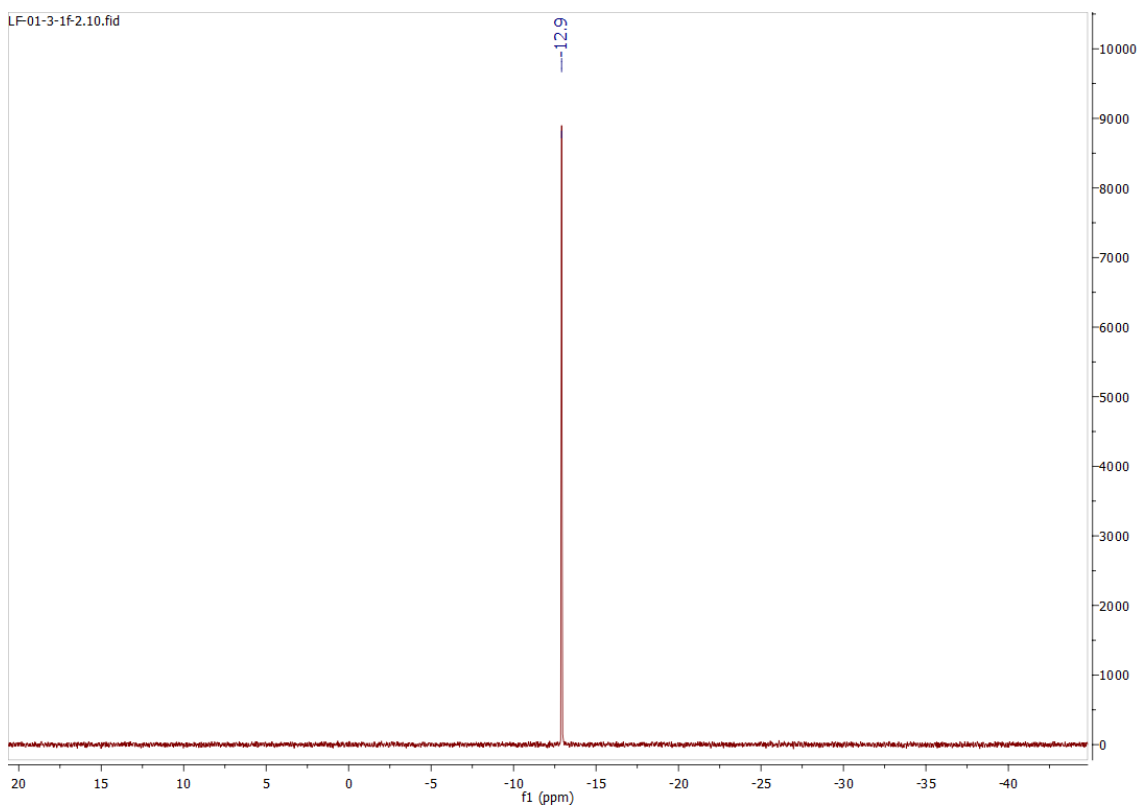
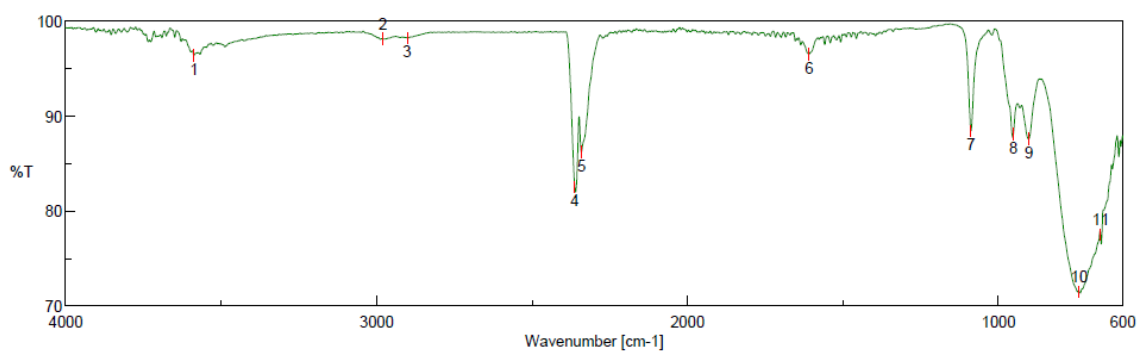


Figura 11. Espectro de $^{31}P\{^1H\}$ -RMN del compuesto 1.



[Result of Peak Picking]

No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity	No.	Position	Intensity
1	3586.95	96.3859	2	2980.45	98.1218	3	2901.38	98.2104	4	2362.85	82.5463
5	2341.16	86.2054	6	1608.82	96.5018	7	1088.14	88.4381	8	951.698	88.0966
9	901.558	87.6173	10	740.049	71.4977	11	671.589	77.5329			

Figura 12. Espectro IR del compuesto 1.

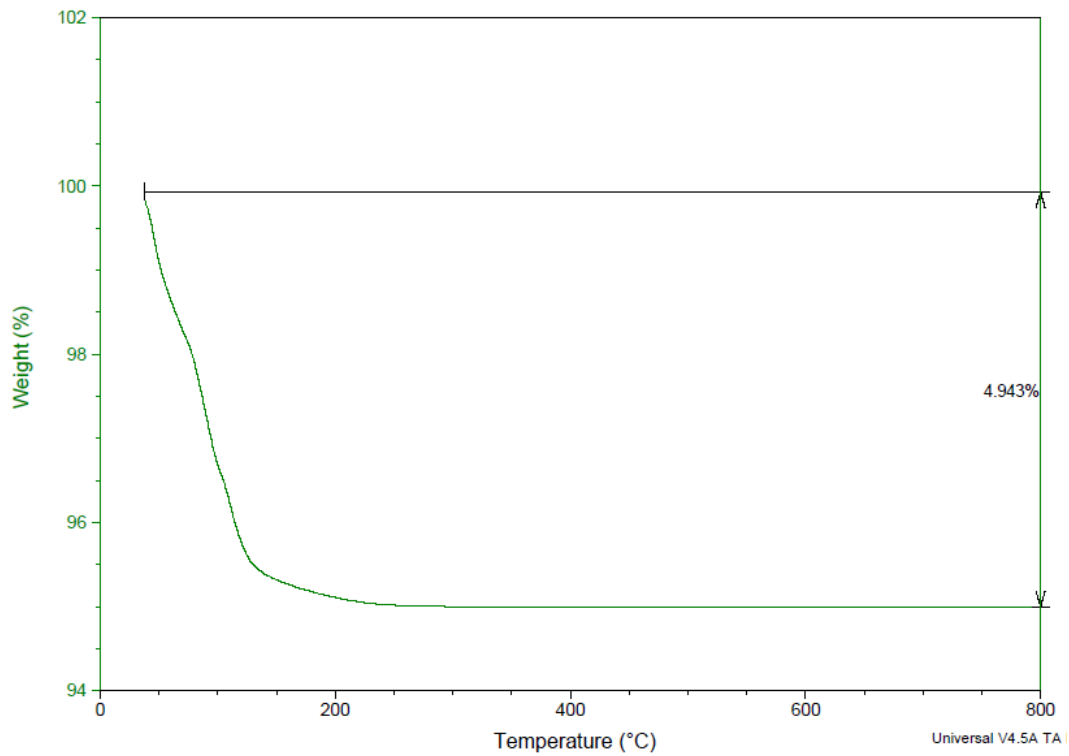


Figura 13. Análisis termogravimétrico del compuesto 1.

A2. $\text{Na}_{12}[\alpha\text{-P}_2\text{W}_{15}\text{O}_{56}] \cdot 19 \text{H}_2\text{O}$ (2)

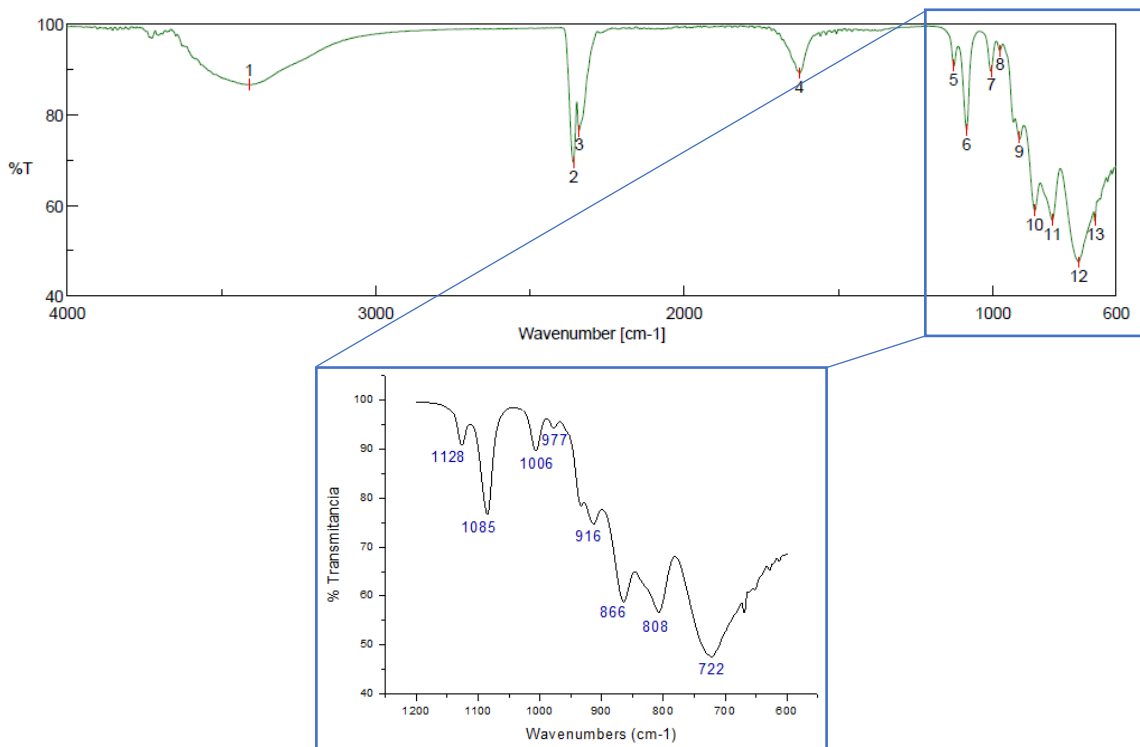


Figura 14. Espectro IR del compuesto 2.

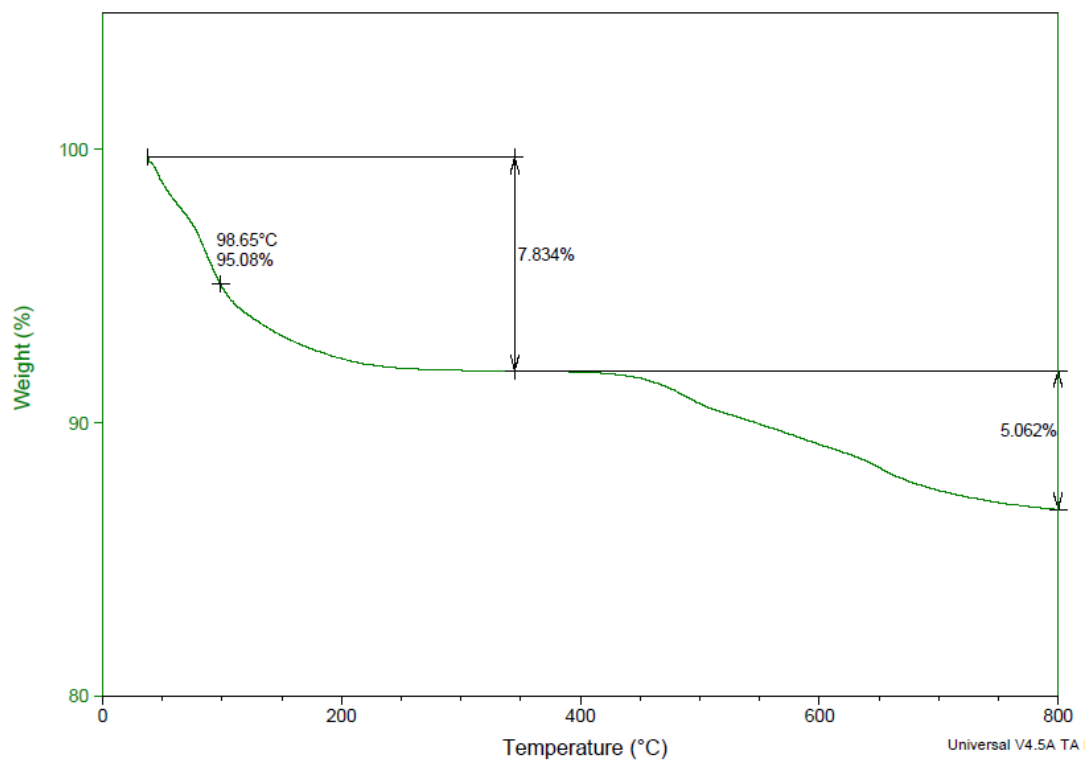


Figura 15. Análisis termogravimétrico del compuesto 2.

A3. $K_8H[P_2W_{15}V_3O_{62}] \cdot 31 H_2O$ (3)

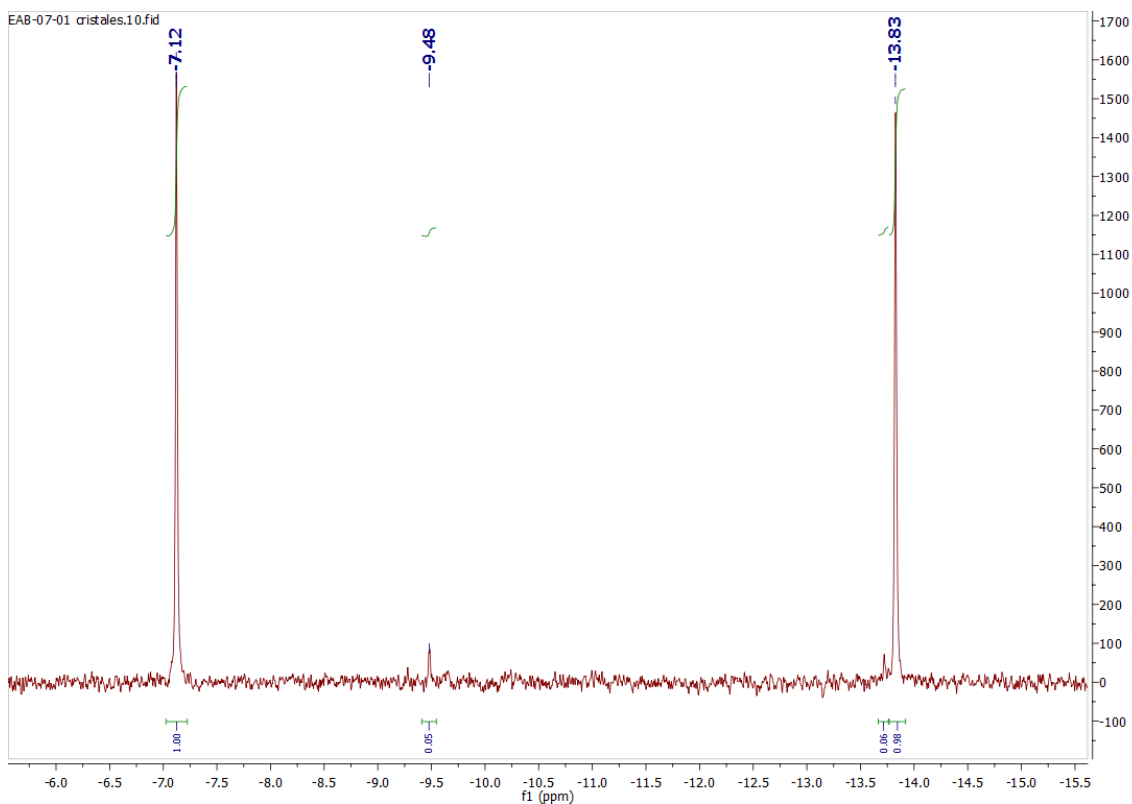


Figura 16. Espectro de $^{31}P\{^1H\}$ -RMN del compuesto 3.

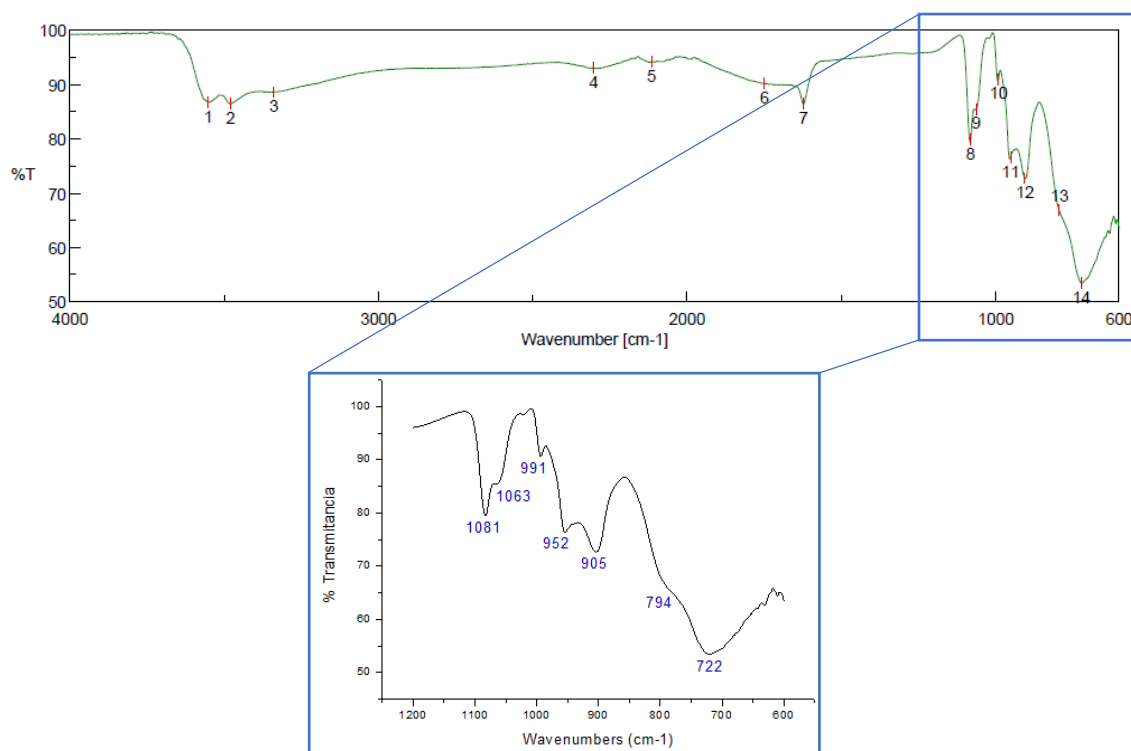


Figura 17. Espectro IR del compuesto 3.

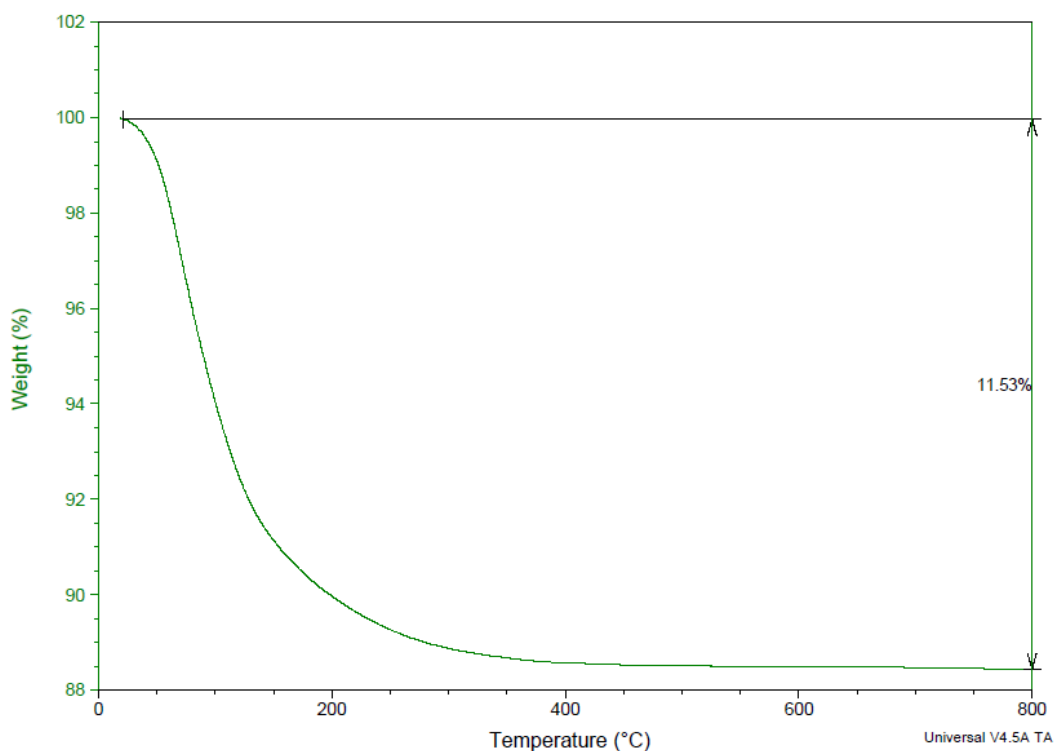


Figura 18. Análisis termogravimétrico del compuesto 3.