



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Implementación y optimización del proceso sintético de i) complejos aminoácido - estaño IV y ii) péptidos conjugados con Ferroceno, como contribución al desarrollo de fármacos basados en moléculas Organometálicas.**

**Julieth Tatiana Román Bothia**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá D. C, Colombia

2020



**Implementación y optimización del proceso sintético de i)  
complejos aminoácido - estaño IV y ii) péptidos  
conjugados con Ferroceno, como contribución al  
desarrollo de fármacos basados en moléculas  
organometálicas.**

**Julieth Tatiana Román Bothia**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias Farmacéuticas**

Director:

Ph.D. Javier Eduardo García Castañeda

Codirector:

PhD. Norberto Farfán García

Línea de Investigación:

Péptidos como agentes terapéuticos

Grupo de Investigación:

Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP)

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia  
Bogotá D.C., Colombia  
2020



*La imaginación es más importante que el conocimiento. El conocimiento es limitado y la imaginación circunda el mundo.*

*Albert Einstein*



## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, Departamento de farmacia y al programa de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. Por la financiación de mi plan de estudios por medio de la Beca Auxiliar docente.

A Colciencias por la financiación del Proyecto “Obtención de un prototipo peptídico promisorio para el desarrollo de un medicamento de amplio espectro para el tratamiento del cáncer de colon, cuello uterino y próstata” - Contrato 845-2019.

A mis compañeros del grupo de Investigación de síntesis y aplicación de moléculas peptídicas por su ayuda incondicional en la elaboración de este trabajo, agradezco por sus consejos, buena actitud, disposición y amistad.

Le estoy muy agradecida al Profesor Javier García, por su guía, enseñanzas, paciencia y apoyo permanente e incondicional. Pero más allá de eso le agradezco por inculcarme este amor a la ciencia y a la enseñanza, mi más sincera y profunda admiración y eterna gratitud.

A la profesora Zuly Rivera, por sus consejos, paciencia y guía. Gracias por depositar su confianza en mí y por ser un ejemplo que seguir de mujer en la ciencia

Al Doctor Norberto farfán y la Dra. Rosa Santillán, por permitirme hacer mi pasantía de investigación, en la universidad Nacional Autónoma de México. Gracias por abrir las puertas de su laboratorio, por las enseñanzas y por acogerme de la manera más fraternal.

De igual forma agradezco a Luis, Diego, Cristian y Ailín, del laboratorio 202 del departamento de química orgánica de la UNAM, por hacer más amable mi permanencia en México.

Finalmente quiero agradecer de manera especial a mi madre, ya que, con su amor, resiliencia ejemplo y devoción, ha permitido formarme como persona y profesional. A mi hermana por acompañarme en este proceso y a Gabriel por sus palabras de aliento, motivación y comprensión.



## Resumen

El cáncer es una problemática de salud pública mundial y que está afectando de manera significativa la población colombiana. A pesar de los avances logrados en el desarrollo y/o mejora de tratamientos, los índices de morbilidad/mortalidad aumentan continuamente. A la fecha, se hacen grandes esfuerzos para identificar nuevos abordajes terapéuticos, siendo una alternativa promisoriosa los fármacos basados en péptidos organometálicos (POM). Estos POMs están formados por un péptido anticancerígeno al cual se le incorpora un metaloceno. Estas moléculas han presentado gran potencial biológico para el desarrollo de agentes anticancerígenos, ya que combinan la actividad citotóxica del motivo organometálico (OM) y del péptido, además el metaloceno le confieren estabilidad al fármaco en ambientes biológicos. En este trabajo, I) se diseñaron, purificaron y caracterizaron compuestos de organoestaño IV a partir de aminoácidos polares (Asp, Lys y Glu), algunos de los cuales no han sido reportados en la literatura consultada, adicionalmente se sintetizó un bloque organometálico el cual puede ser utilizado para la síntesis de POM conjugados con organoestaño IV. (ii) se optimizó la ruta sintética para obtención de péptidos y POMs que contienen Ferroceno, derivados de la secuencia palindrómica RWQWRWQWR. En este trabajo se diseñaron rutas sintéticas y se implementaron los procedimientos para la obtención de POMs conjugados con Ferroceno o Organoestaño IV. Nuestros resultados sugieren que la obtención de péptidos y/o aminoácidos conjugados con compuestos organometálicos es viable, por lo tanto, pueden ser considerados para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer.

**Palabras clave:** Organoestaño IV, Ferroceno, Aminoácidos Conjugados, Péptidos Organometálicos, Síntesis de Fármacos.

## Abstract

Cancer is a global public health problem that is significantly affecting the Colombian population. Despite the advances made in the development and / or improvement of treatments, the morbidity / mortality rates are continuously increasing. To date, great efforts have been made to identify new therapeutic approaches, with organometallic peptides (POM) -based drugs being a promising alternative. These POMs are an anticancer peptide into which a metallocene is incorporated. These molecules have presented great biological potential for the development of anticancer agents, since they combine the cytotoxic activity of the organometallic motif (OM) and the peptide, in addition to the metallocene, they give stability to the drug in biological environments. In this work, I) organotin IV compounds were designed, purified and characterized from polar amino acids (Asp, Lys and Glu), some of which have not been reported in the consulted literature, in addition an organometallic block was synthesized which It can be used for the synthesis of organotin IV conjugated POMs. (ii) the synthetic route was optimized to obtain peptides and POMs containing Ferrocene, derived from the palindromic sequence RWQWRWQWR. In this work, synthetic routes were designed and the procedures for obtaining POMs conjugated with Ferrocene or Organotin IV were implemented. Our results suggest that obtaining peptides and / or amino acids conjugated with organometallic compounds is viable, therefore, they can be considered for the development of new therapeutic agents against cancer.

**Keywords:** Organotin IV, ferrocene, conjugated amino acids, organometallic peptides, synthesis of drugs.

# Contenido

Resumen.....	IX
Lista de figuras.....	XII
Lista de tablas.....	XV
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XVI
	<b>Pág.</b>
1. Introducción.....	20
2. Marco teórico.....	23
3. Capítulo I. Síntesis de Complejos de organoestaño (IV) base de Schiff.....	43
4. Capítulo II. Péptidos Organometálicos con Ferroceno.....	64
5. Capítulo III. Síntesis de bloque Organometálico y Péptidos Organometálicos con Organoestaño (IV).....	90
6. Conclusiones.....	105
7. Bibliografía.....	106

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Peptido LXT-315. Tomado de DrugBank.ca.....	24
<b>Figura 2.</b> Estructura química del péptido palindrómico LfcinB (21-25) <sub>pal</sub> : RWQWRWQWR ..	27
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de reacción usando DIC/HOBt .....	29
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de reacción usando sales de Uronio(TBTU). .....	30
<b>Figura 5.</b> Estructura química de Cis-platino .....	31
<b>Figura 6.</b> Estructura genérica de un organoestaño IV con coordinación de nitrógeno.....	32
<b>Figura 7.</b> Estructura del ferroceno .....	34
<b>Figura 8.</b> Derivados de Ferroceno usados en la funcionalización de aminoácidos y péptidos	35
<b>Figura 9.</b> Viabilidad Celular del péptido LfcinB(21-25) <sub>pal</sub> y su dimero contra las líneas HTB132 y PC 201-012 .....	39
<b>Figura 10.</b> Péptido Sn-Ahx-RRWQWR antes y después del clivaje A) POM anclado a la resina B) péptido después del proceso de clivaje. ....	40
<b>Figura 11.</b> Esquema de la obtención de los compuestos de organoestaño (IV).....	44
<b>Figura 12.</b> Reacción entre la L-lys-OH con salicilaldehído y dibutilestaño (IV) .....	45
<b>Figura 13.</b> Reacción entre la L-lys-OH con salicilaldehído y dibutilestaño (IV) por la estrategia II. Se observa la formación del complejo de organoestaño (IV) monosustituido ( <b>1</b> ) y disustituido ( <b>1b</b> )......	46
<b>Figura 14.</b> Espectro <sup>1</sup> H-RMN del compuesto organoestaño (IV) ( <b>1b</b> ). Se observan las señales de los protones de ( <b>1b</b> ) observándose los desplazamientos químicos y la integración de cada señal.....	49
<b>Figura 15.</b> Ampliación del espectro <sup>1</sup> H-RMN del compuesto organoestaño (IV) ( <b>1b</b> ) entre 2.5-0.5 ppm. ....	50
<b>Figura 16.</b> Ampliación del espectro <sup>1</sup> H-RMN del compuesto organoestaño (IV) ( <b>1b</b> ) entre 3-4.5 ppm. ....	50
<b>Figura 17.</b> Ampliación del espectro <sup>1</sup> H-RMN del compuesto organoestaño (IV) ( <b>1b</b> ) región entre 6-9 ppm. ....	51
<b>Figura 18.</b> Espectro <sup>13</sup> C-RMN del compuesto organoestaño (IV) ( <b>1b</b> ).....	52
<b>Figura 19.</b> Ampliación del espectro <sup>13</sup> C-RMN del compuesto organoestaño (IV) ( <b>1b</b> ).....	52
<b>Figura 20.</b> Ampliación del espectro <sup>13</sup> C-RMN del compuesto organoestaño (IV) ( <b>1b</b> ).....	53
<b>Figura 21.</b> Ampliación del espectro <sup>13</sup> C-RMN del compuesto organoestaño (IV) ( <b>1b</b> ).....	53
<b>Figura 22.</b> Ampliación del espectro <sup>13</sup> C-RMN del compuesto organoestaño (IV) ( <b>1b</b> ).....	54
<b>Figura 23.</b> Espectro <sup>119</sup> Sn-RMN del compuesto organoestaño (IV) ( <b>1b</b> ).....	54

<b>Figura 24.</b> Espectro de masas ES-API del compuesto ( <b>1b</b> ) .....	55
<b>Figura 25.</b> Estructura compuesto 1b .....	56
<b>Figura 26.</b> Monitoreo de la reacción para el complejo de organoestaño IV .....	60
<b>Figura 27.</b> Perfil cromatográfico de la fracción acuosa después de la extracción líquido-líquido del compuesto ( <b>3</b> ) .....	61
<b>Figura 28.</b> Muestra del sólido obtenido para el compuesto ( <b>5</b> ) .....	62
<b>Figura 29.</b> Diagrama de la síntesis del péptido RWQWRWQWR utilizando SPPS y la estrategia Fmoc/tBu. ....	65
<b>Figura 30.</b> Diseño experimental para la síntesis de péptidos monomérico y diméricos .....	69
<b>Figura 31.</b> Ciclos de acople para péptidos monoméricos y dimericos .....	72
<b>figura 32.</b> Carbocationes neutralizados en el proceso de clivaje del péptido LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub> . .....	76
<b>Figura 33 A.</b> Perfil cromatográfico del péptido Ahx-LfcinB(21-25) <sub>Pal</sub> crudo A ) analizado inmediatamente después de terminado los lavados con éter etílico y B) analizado luego de almacenar la solución por 4 días a 4°C.....	78
<b>Figura 34.</b> Perfiles cromatográficos del péptido Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub> disuelto en el solvente y almacenado a 4 ° C durante 0.5, 12, 24 y 72 h.....	78
<b>Figura 35.</b> Reacción de remoción del grupo protector Boc del triptófano. ....	79
<b>Figura 36.</b> Programa de purificación del péptido LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub> . Perfil cromatográfico del péptido crudo y fracción de péptido con mayor pureza. ....	82
<b>Figura 37.</b> Programa de purificación del péptido Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub> . Perfil cromatográfico del péptido crudo y fracción de péptido con mayor pureza.....	82
<b>Figura 38.</b> Programa de purificación del péptido Fc-Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub> . Perfil cromatográfico del péptido crudo y fracción de péptido con mayor pureza.....	83
<b>Figura 39.</b> Programa de purificación del péptido LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub> . Perfil cromatográfico del péptido crudo y fracción de péptido con mayor pureza. ....	84
<b>Figura 40.</b> Programa de purificación del péptido Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub> . Perfil cromatográfico del péptido crudo y fracción de péptido con mayor pureza.....	84
<b>Figura 41.</b> Programa de purificación del péptido Fc- Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub> . Perfil cromatográfico del péptido crudo y fracción de péptido con mayor pureza. ....	85
<b>Figura 42.</b> Espectro de masas MALDI-TOF del péptido Fc-Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub> , purificado (Figura 11). Se observa una especie (3207 u) que corresponde al péptido LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub> . 86	
<b>Figura 43.</b> Espectro de masas MALDI TOF del péptido Fc-Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub> .....	87
<b>Figura 44.</b> Esquema de obtención del bloque organometálico OrgSn(IV)-ED-AMhx por síntesis en solución .....	91
<b>Figura 45.</b> Esquema de la reacción de formación del linker monosustituido ED-AMhx y disustituido ED-(AMhx) <sub>2</sub> . ....	92
<b>Figura 46.</b> Perfil cromatográfico de la mezcla de reacción para la síntesis del Linker ED-(MAhx) <sub>2</sub> por síntesis solución. ....	92
<b>Figura 47.</b> Estructura química de los linkers sintetizados. L: AMhx-ED; L1: AMhx-Ala-ED; L2: AMhx-Ala-Ala-ED; L3: AMhx-Ala-Ala-Ala-ED.....	93
<b>Figura 48.</b> Esquema de la obtención del linker (L3-4): OrgSn(IV)-ED-Ala-Ala-Ala-AMhx, que será utilizado para la funcionalización de péptidos. ....	94

---

<b>Figura 49.</b> Espectros FT-IR de A). Etilendiamina, B). MAhx. y C). Linker (L) .....	97
<b>Figura 50.</b> Perfil cromatográfico de A. AMhx y B. Linker (L) .....	98
<b>Figura 51.</b> Espectros de masas MALDI-TOF del bloque organometálico AMhx-Ala-Ala-Ala-ED- OrgSn(IV) (L3-4) PM teórico= 944.630 u; [M+H] <sup>+</sup> teórico= 945.630 u.....	99
<b>Figura 52.</b> Monitoreo de la reacción por química click entre el péptido LfcinB (20-25) <sub>2</sub> y el bloque (L3-4). (A) péptido LfcinB(20-25) <sub>2</sub> ; (B) péptido LfcinB(20-25) <sub>4</sub> y (C) Mezcla de reacción: péptido LfcinB(20-25) <sub>2</sub> tR=5.2 min; LfcinB(20-25) <sub>4</sub> tR=5.6 min; OrgSn(IV)-ED-Ala- Ala-Ala-AMhx-[LfcinB (20-25) <sub>2</sub> ]: <b>4-L3-[LfcinB (20-25)<sub>2</sub>]</b> tR=6.5 min.....	100
<b>Figura 53.</b> Esquema de la reacción de Michael entre el boque( <b>4-L3</b> ): OrgSn(IV)-ED-Ala-Ala- Ala-AMhx y el péptido LfcinB (20-25) <sub>2</sub> . También se observa la estructura del péptido tetramérico LfcinB (20-25) <sub>4</sub> subproducto formado por la oxidación del péptido dimérico.	101

## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Fármacos pépticos utilizados en el tratamiento del cáncer .....	25
Tabla 2. Estrategias sintéticas y condiciones utilizadas para la obtención de (1) .....	47
Tabla 3. Resumen de la caracterización de (1b) por RMN. ....	55
Tabla 4. Datos difracción de rayos X del compuesto 1b .....	56
Tabla 5. longitudes de los átomos selectos y Ángulos de enlace del compuesto 1b.....	57
Tabla 6. Caracterización IR de los compuestos 3-7 .....	58
Tabla 7. Compuestos de organotin (IV) sintetizados Estrategia II. ....	59
Tabla 8. ciclos de acople necesarios para incorporar el motivo organometálico a los péptidos Ahx-LfcinB(21-25) <sub>Pal</sub> y Ahx-LfcinB(21-25) <sub>Pal2</sub> .....	74
Tabla 9. Condiciones de reacción estandarizadas .....	
Tabla 10. Caracterización de los péptidos obtenidos por cromatografía RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF .....	81
Tabla 11. Linker sintetizados .....	96



## Lista de Símbolos y abreviaturas

Término	Abreviatura	Sigla
Absorbancia	Abs	
Acetato de Etilo	AcEt	
Acetonitrilo	ACN	
Acetonitrilo + TFA 0,05%	Solvente B	
Ácido desoxirribonucleico		ADN
Ácido 6 maleimidohexanoico	AMhx	
Ácido aminohexanoico	Ahx	
Ácido Trifluoroacético		TFA
Agitación constante		AC
Agua + TFA 0,05%	Solvente A	
Arilo	Ar	
American Type Culture Collection		ATCC
Arginina	Arg	R
Azufre		S
Benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino) fosfonio hexafluorofosfato		BOP
<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>	
<i>Candida auris</i>	<i>C.auris</i>	
<i>Candida glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	
<i>Candida krusei</i>	<i>C. krusei</i>	
<i>Candida tropicalis</i>	<i>C. tropicalis</i>	
Carbodiimida	CDD	
Carbono		C
Células escamosas de carcinoma oral		OSCC
Cianuro de potasio	KCN	
Ciprofloxacina		CIP
Cisteína	Cys	C
Concentración mínima bactericida		MBC
Concentración mínima inhibitoria		MIC
Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa		RP-HPLC
Dalton	Da	
Diciclohexilcarbodiimida		DCC

Diclorometano		DCM
Diisopropilcarbodiimida		DIC
Diisopropiletilamina		DIPEA
Dimetilsulfoxido		DMSO
Escherichia coli	E. coli	
Especies reactivas de oxígeno		ROS
Espectroscopia de Transmisión de Infrarrojo con Transformada de Fourier		FTIR
Estaño	Sn	
Etanoditiol	EDT	
Etanol	EtOH	
Extracción en fase sólida		SPE
Fenilalanina	Phe	F
Ferroceno	Fc	
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Hexafluorofosfato azabenzotriazol tetrametiluronio		HATU
Hexafluorofosfato bezotriazol tetrametiluronio		HBTU
Histidina	His	
Hidroxibenzotriazol	HOBt	H
Hidróxido de Potasio	KOH	
Hora	h	
Hormona Liberadora de Gonadotropinas	GnRh	
Lactoferricina	Lfcin	
Lactoferricina Bovina	LfcinB	
Lactoferrina	LF	
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization / Time-Of-Flight		MALDI-TOF
Metanol		MeOH
Metionina	Met	M
Miliequivalente	mEq	
Miligramo	mg	
Mililitro	mL	
Minuto	min	
Molar	M	
N, N-Dimetilformamida	DMF	
N-hidroxisuccinimida	HOSu	
Nitrógeno		N

O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio tetrafluoroborato		TBTU
Organometálico		OM
Organización Mundial de la salud		OMS
Organización Panamericana de la Salud		OPS
Organoestaño	Org	
Oro	Au	
Oxígeno		O
palíndromo	Pal	
Parte Por Millón		Ppm
Péptidos Antimicrobianos		PAMs
Péptidos organometálicos	POMs	
Potencial de Hidrógenos		pH
Porcentaje Volumen/volumen	v/v	
Pseudomonas aeruginosa	P. aeruginosa	
Resina Bis(4-methylphenyl)methanamine	MBHA resin	
Resonancia Magnética Nuclear		RMN
Revoluciones por minuto		Rpm
Salmonella enteritidis	S. enteritidis	
Salmonella maltophilia	S. maltophilia	
Serina	Ser	S
Síntesis de Péptidos en Fase Sólida		SPPS
Síntesis y aplicación de moléculas Peptídicas		SAMP
Staphylococcus aureus	S. aureus	
Suero fetal bovino		SFB
Tampón fosfato de sodio		PBS
Temperatura ambiente		TA
Time-of-flight		TOF
Ter-butilo	tBu	
Tetrahidrofurano		THF
Treonina	Thr	
Trietanolamina	Et3N	
trifosfato de adenosina	ATP	
Triisopropilsilano		TIS
Triptófano	Trp	W
Voltaje		V
Virus del Papiloma Humano		VPH
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	EDC	
1-Hidroxi-6-clorobenzotriazol	6-Cl-HOBt	
2,2,4,6,7- pentametildihidrobenzofurano- 5-sulfonilo	Pbf	
9-Fluorenilmetiloxicarbonilo	Fmoc	

## Introducción

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento anormal de células, las cuales pueden colonizar otros tejidos, mecanismo conocido como metástasis.(1) Según la organización panamericana de la salud (OPS), el cáncer es la segunda causa de muerte en las Américas, en el 2018 causó 1,3 millones de muertes y 3,7 millones de nuevos casos fueron diagnosticados (2). El cáncer, es una de las problemáticas más importantes de salud pública a nivel mundial, debido a su alta morbilidad y mortalidad, particularmente en países emergentes (3). En Colombia, el Ministerio de Salud y Protección Social, empresas sociales del estado y organizaciones sin ánimo de lucro, han desarrollado políticas que buscan mitigar el impacto de esta enfermedad, dentro de las cuales se contempla fortalecer el diagnóstico y la búsqueda de nuevos tratamientos más selectivos y eficaces(4). Los tratamientos disponibles en la actualidad consisten en quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia, inmunoterapia y cirugía(5,6). Estos tratamientos tienen como objetivo la disminución o la erradicación de las células cancerosas y han logrado aumentar la expectativa de vida. Sin embargo, estos tratamientos causan efectos secundarios severos que afectan la calidad de vida de los pacientes. Además, algunos pacientes presentan recurrencia, limitando las opciones terapéuticas. Teniendo en cuenta: el alto costo de los tratamientos lo que limita su cobertura a toda la población, los efectos adversos que reducen la calidad de vida del paciente y la baja eficacia de estos, es necesario desarrollar nuevas alternativas terapéuticas, costo efectivas, más específicas, selectivas y con un perfil de efectos adversos más favorable (7-9).

Como alternativas terapéuticas se han estudiado diferentes moléculas para el desarrollo de fármacos, dentro de las que destacan los péptidos sintéticos, estos presentan ventajas como: (i) favorabilidad en la obtención, debido a que existen gran variedad de metodologías en solución y/o en fase sólida, (ii) son moléculas seguras, debido a que se tiene certeza de la secuencia y sus procesos de purificación que garantizan altas purezas, (iii) versatilidad en la vía de administración, haciendo posible en algunos casos utilizar métodos no invasivos.

Actualmente en el mercado se encuentran aprobados alrededor de 60 péptidos, con diversas indicaciones terapéuticas y cerca de 320 péptidos se encuentran en fases de estudios clínicos(10). El creciente interés en los péptidos, como agentes anticancerígenos se ve reflejado en el aumento de publicaciones que incluyen los términos “péptido” y “cáncer”, en un 400% en los últimos 20 años. En la última década se reportan cerca de 20.000 publicaciones científicas, que relacionan estos dos términos (11). Para el año 2018 el NHI (Instituto Nacional de salud de los estados unidos) reportó 918 estudios clínicos registrados que relacionan cáncer y péptidos. (11,12).

Los péptidos son candidatos promisorios para el desarrollo de fármacos que pueden ser incluidos en el tratamiento del cáncer, ya que son moléculas con baja toxicidad, alta especificidad y costos de producción bajos(13). Sin embargo, también presentan ciertas limitaciones desde el punto de vista farmacológico ya que presentan alta susceptibilidad a degradación enzimática, pueden ser eliminados rápidamente del cuerpo, y en algunos casos no tienen la capacidad de atravesar membranas, lo que conlleva a disminución en la biodisponibilidad del fármaco y una mayor velocidad de eliminación, además de estar sujetos a la generación de respuestas inmunológicas; Por ello, se han explorado nuevas estrategias que permitan aumentar su estabilidad y potenciar su actividad. Una de las alternativas exploradas en las últimas décadas es la conjugación de los péptidos con moléculas de naturaleza no proteica, como compuestos organometálicos. Se ha descrito que la conjugación de secuencias peptídicas con actividad antiviral, antibacteriana o anticancerígena, con compuestos organometálicos ha mostrado resultados prometedores en el campo de la terapéutica.

Por otra parte, los aminoácidos han sido utilizado como precursores para el diseño y síntesis de moléculas promisorias para el tratamiento de múltiples patologías. En los últimos años se ha reportado gran variedad de trabajos en los cuales se modificaron los aminoácidos con el fin de obtener fármacos para el tratamiento del cáncer. Algunos involucran la inclusión de moléculas no naturales como bromotiazoles(14), derivados azufrados, haluros de plata y oro(15), conjugados con ferroceno y cobalto (16,17) entre otros. También incluyen su transformación química por la inclusión de grupos funcionales de naturaleza orgánica y/o inorgánica con el fin de potenciar su actividad y su acción sobre las células cancerosas(18).

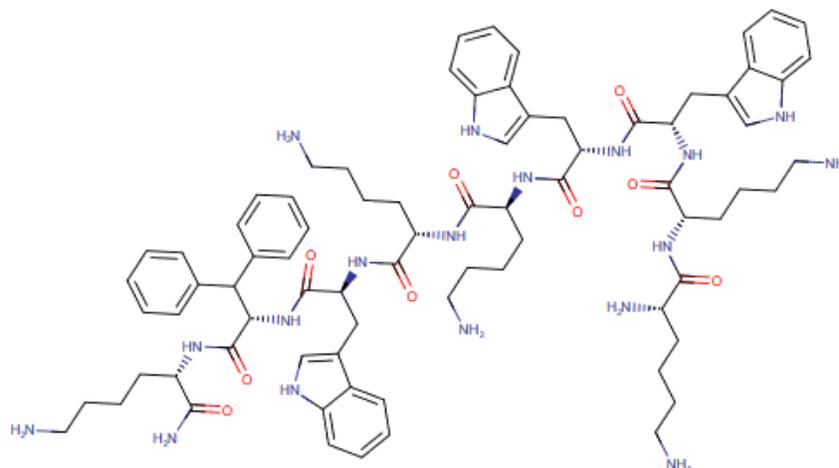
En este proyecto como eje fundamental (i) Se exploraron metodologías para la obtención de complejos de organoestaño (IV) a partir de L o D- aminoácidos, utilizando la formación in situ de bases de Schiff, los cuales eventualmente puedan ser usados como precursores para obtener péptidos organometálicos más complejos, (ii) se identificaron los puntos críticos en la SPPS-Fmoc/tBu para la obtención de péptidos organometálicos conjugados con ferroceno, buscando así oportunidades de mejora en el costo de producción, en el uso racional reactivos/solventes que hicieran más amigable el proceso con el medio ambiente y que fueran menos perjudiciales para la salud humana; (iii) Se pudieron obtener los POMs con ferroceno con alta pureza y (iv) se exploró la factibilidad de obtener péptidos diméricos conjugados con ferroceno.

# 1. Marco teórico

## 1.1 Péptidos como agentes terapéuticos

Entre los principales mecanismos de defensa del cuerpo contra los patógenos, se encuentran los mecanismos innatos, entre los que se resaltan los asociados a péptidos endógenos. Estos péptidos protegen el organismo, ya que poseen actividad antimicrobiana, anticancerígena, inmunomoduladora, vaso dilatadora y antioxidante(19,20). Por su naturaleza proteica poseen alta especificidad y tienen menos efectos secundarios y/o tóxicos. Al ser péptidos conocidos por el organismo estos no generan respuestas inmunes adversas y son menos susceptibles a la acción de las proteasas. Los Péptidos Antimicrobianos (PAMs), son la principal fuente de plantillas para el diseño, identificación y obtención de péptidos para uso terapéutico. Los PAMs han sido identificados en diferentes especies del reino vegetal y animal, y han presentado actividad contra virus, parásitos, bacterias, hongos y contra células tumorales(21).

Los mecanismos de acción asociados a los PAMs son múltiples e incluyen interacciones con la membrana celular, inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos. Además se ha descrito que pueden cumplir funciones inmunomoduladoras, quimiotácticas, intervenir en los procesos de cicatrización y regeneración, entre otros (20,22). Se ha reportado que la actividad de los PAMs está asociada a la estructura primaria de la cual se derivan la carga neta, anfipaticidad, hidrofobicidad y longitud, que a su vez se relaciona con la estructura secundaria. En algunos estudios se han logrado identificar péptidos con actividad antimicrobiana los cuales también presentaron actividad antineoplásica(23). Entre estos encontramos péptidos derivados de PAMs como cecropinas, magaininas, defensinas y Lactoferricina. Esos péptidos han exhibido actividad antibacteriana, antiviral, antiparasitaria y/o antifúngica, además han presentado actividad citotóxica contra líneas celulares de diferentes tipos de cáncer y actividad antitumoral en modelos animales. (19,24,25)



**Figura 1.** Péptido LXT-315. Tomado de DrugBank.ca

En la actualidad existen péptidos antineoplásicos que son empleados para tratamientos de cáncer dependientes de hormonas como el de mama, próstata, cuello uterino, etc. Actualmente los péptidos utilizados para tratar estos cánceres son la Buserelina, Leuprolida, Gonadorelina, Histrelina, Goserelina, Abarelix, Degarelix, Nafarelina y Triptorelin. Algunos de estos péptidos sintéticos son análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas GnRH empleados para tratar endometriosis en la mujer y cáncer de próstata en el hombre (26–28). Biopharma desarrollo el péptido LXT-315(KKWKKWDipK), este nonapéptido es derivado de la LfcinB, y ha presentado actividad anticancerígena frente a líneas celulares de melanoma.(29)

Tabla 1. Fármacos pépticos utilizados en el tratamiento del cáncer

Péptido	Secuencia	Observaciones
Buserelina	<b>XHWSYXLRP</b> (X= L-pyroglutamyl)	Péptido análogo a la hormona luteinizante (LHRH), se utiliza para tratamientos de cánceres responsables de hormonas tales como cáncer de próstata o cáncer de pecho, condiciones dependientes de estrógeno.
Leuprolida	<b>XHWSYLLRP</b> (X= L-pyroglutamyl)	Se emplea para el tratamiento paliativo del cáncer de próstata avanzada.
Gonadorelina	<b>XHWSYGLRPG</b> (X= L-pyroglutamyl)	Es otro nombre que recibe la (GnRH), Se emplea para el tratamiento de la amenorrea hipotalámica y evaluación de la función hipotálamo/pituitaria
Histrelina	<b>XHWSYX'LRP</b> (X= L-pyroglutamyl) (X'=1-Benzyl)	Está indicada para el tratamiento con la pubertad precoz central, también está indicada para el tratamiento paliativo del cáncer de próstata avanzado
Goserelina	<b>XHWSYX'LRP</b> (X=L-pyroglutamyl) (X'= O-tert-butyl)	Está indicado para el tratamiento paliativo del carcinoma avanzado de próstata. Uso en el tratamiento paliativo del cáncer de mama en mujeres pre y perimenopausias
Abarelix	<b>XXXSYNLX'PA</b> (XXX=N-acetyl-3-(2-naphthyl)-D-alanyl-4-chloro) (X'=N6-isopropyl)	Está indicado para el tratamiento paliativo del cáncer avanzado de cáncer
Degarelix	<b>XXXSXX' LX''PA</b> (XXX=N-acetyl-3-(2-naphthyl)-D-alanyl-4-chloro) (XX'= 4-((S)-dihydroorotamido)) (X''= N6-isononvl)	Es usado para el tratamiento del cáncer de próstata avanzado.
Nafarelina	<b>XHWSYX'LRPG</b> (X=L-pyroglutamyl) (X'=3-(2-naphthyl))	Es agonista sintético de la hormona liberadora de gonadotropina, usado para el tratamiento de la pubertad precoz
Triptorelin	<b>XHWSYWLRPG</b> (X=L-pyroglutamyl)	Esta indicado en el tratamiento paliativo de cáncer de próstata avanzado

## Lactoferricina Bovina (LfcinB)

La Lactoferricina Bovina (LfcinB) es un fragmento peptídico de 25 aminoácidos, proveniente de la región N terminal de la glicoproteína Lactoferrina (LF). Esta proteína está presente en secreciones de algunos mamíferos y es hidrolizada por la pepsina gástrica. La hidrólisis de la LF produce la LfcinB, la cual ha presentado mayor actividad antimicrobiana y anticancerígena que la proteína, sugiriendo que la actividad de la proteína se debe a este fragmento(19,30). La LfcinB ha mostrado amplia actividad antimicrobiana contra bacterias

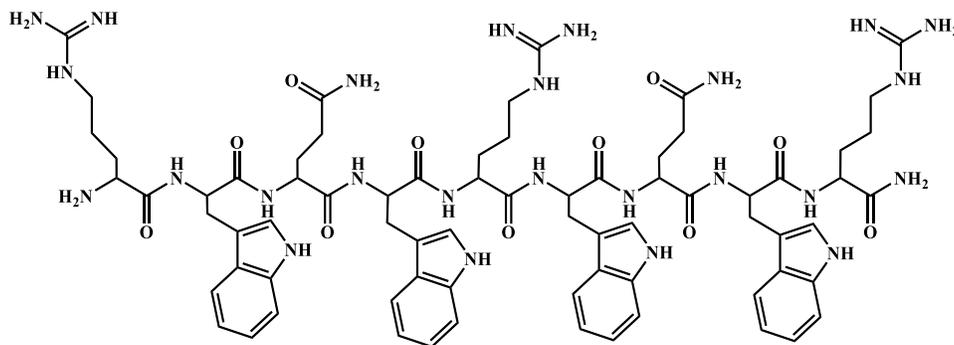
Gram positivas, Gram negativas, hongos, parásitos, virus y células tumorales(31). Estudios sugieren que la actividad antibacteriana se debe a la naturaleza anfipática del péptido y a la presencia de los aminoácidos con cargas positivas (Arg y Lys), que interactúan con las cargas negativas en la superficie de la membrana bacteriana para que los aminoácidos hidrofóbicos (Trp y Phe) interactúen con la capa lipídica causando disrupción de la membrana plasmática y lisis celular(32). En forma similar, el efecto anticancerígeno de la LfcinB parece estar mediado por la interacción del péptido con moléculas cargadas negativamente que son sobre expresadas en la superficie celular de células cancerosas. Se ha descrito que el efecto anticancerígeno de la LfcinB puede estar mediado por diferentes mecanismos, en función de la célula blanco y la concentración del péptido.

La LfcinB en las líneas celulares de cáncer de mama como MDA-MB-231, MCF-7, T-47D, MDA-MB-435, HS578T, induce apoptosis, mientras que en líneas celulares de carcinoma de células escamosas orales (CAL27) y fibrosarcoma (Meth A) indujo necrosis. (33–35). Se ha sugerido que la LfcinB puede presentar el mecanismo dual apoptosis/necrosis dependiente de la concentración. La LfcinB induce apoptosis en líneas celulares de carcinoma derivadas de tumores malignos de mama, colon y ovario (31,36). Además la LfcinB no ha presentado efecto citotóxico *in vitro* en cultivos primarios de linfocitos, fibroblastos y células endoteliales humanas, lo que ha evidenciado su selectividad por células cancerosas(35,37). Estudios previos mostraron que el péptido sintético FKRRWQWRMKKLGAPSITCVR derivado de LfcinB induce apoptosis en la línea celular humana derivada de cáncer de mama MDA-MB-321 y péptidos cortos que contienen el motivo mínimo de actividad RRWQWR presentaron mayor actividad anticancerígena que la LfcinB(38,39).

### **Péptido Palindrómico LfcinB (21-25)<sub>pal</sub>: RWQWRWQWR**

Péptidos que contienen el motivo mínimo de actividad han presentaron actividad antibacteriana y efecto citotóxico contra las líneas celulares derivadas de cáncer oral escamoso (OSCC) Cal-27 y SCC15 y contra las líneas celulares derivadas de cáncer de mama MDA-MB-468, MDA-MB-231 y MCF-7(38,40,41). El péptido palindrómico LfcinB (21-25)<sub>pal</sub>, es una modificación del motivo mínimo de la LfcinB RRWQWR, donde se unieron dos repeticiones de la secuencia RWQWR, esta molécula alterna los residuos cargados de Arg

con los hidrofóbicos de Trp los cuales están separados por un residuo de Gln. De acuerdo con su estructura primaria es un péptido cargado positivamente y tiene características anfipáticas.



**Figura 2.** Estructura química del péptido palindrómico LfcinB (21-25)<sub>pal</sub>: RWQWRWQWR

El péptido palindrómico LfcinB (21-25)<sub>pal</sub>: RWQWRWQWR, ha presentado actividad antibacteriana significativa frente a cepas de *E. coli*, *S. enteritidis* y *S. maltophilia*, la cual ha sido asociado a efectos bactericida y/o bacteriostático dependiente de la concentración (42–44). Este péptido también ha presentado sinergia en el efecto antibacteriano cuando ha sido combinado con antibióticos, siendo promisorio para su aplicación en terapias combinadas (45). El péptido LfcinB (21-25)<sub>pal</sub> también ha presentado actividad antifúngica contra *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. auris* and *C. tropicalis* (46). Adicionalmente, este péptido ha presentado citotoxicidad contra líneas de carcinoma de células escamosas de la cavidad oral (OSCC), líneas celulares humanas derivadas de cáncer de mama MDA-MB-468, MDA-MB231 y MFC-7. El efecto citotóxico del péptido fue rápido, dependiente de la concentración, se mantuvo en el tiempo hasta 48h, selectivo por células cancerosas y está mediado principalmente por eventos apoptóticos (34,37,38). Estos resultados indican que el péptido LfcinB (21-25)<sub>pal</sub> puede ser considerado promisorio como punto de partida para desarrollar un medicamento de amplio espectro para el tratamiento de cáncer.

## 1.2 Síntesis de péptidos en fase sólida.

La síntesis de péptidos en fase solida (SPPS) fue introducida por Robert Merrifield en 1963, obteniendo un tetrapéptido (Leu-Ala-Gly-Val) anclado a una resina de poliestireno, este y otros resultados le llevaron a ser galardonado con el premio Nobel de química en 1984.

Posteriormente esta metodología llegó a convertirse en la forma más común para obtener péptidos en un laboratorio(47).

El principio de esta metodología consiste en la unión del aminoácido a un soporte inerte e insoluble en los medios de reacción; la cadena peptídica puede ser elongada secuencialmente sobre este soporte y finalmente esta puede ser removida. La SPPS se ha destacado por sus numerosas ventajas en comparación con la síntesis de péptidos en solución.

Para el desarrollo de esta metodología es necesaria la protección de los grupos funcionales de los aminoácidos, con el propósito de realizar una síntesis ortogonal, dando paso a la generación de un único producto. Los grupos que protegen el grupo  $\alpha$ -amino y  $\alpha$ -carboxilo de los aminoácidos son fácilmente removidos en condiciones en las que el enlace peptídico no se ve comprometido. Las dos estrategias de protección más usuales son Fmoc/tBu y Boc/Bzl. (48)

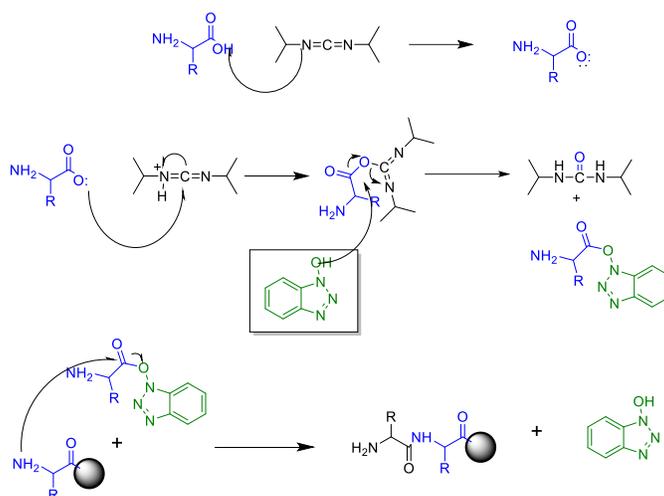
La estrategia Fmoc/tBu, consiste en la protección del grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido con el grupo Fmoc (9-Fluorenilmetiloxicarbonilo), este grupo es lábil a condiciones básicas y resistente a condiciones ácidas. Adicionalmente para garantizar un producto mayoritario, las cadenas laterales de los aminoácidos están protegidas por grupos que son lábiles a condiciones ácidas, las cuales son removidas con ácido tricloroacético (TFA), proceso que ocurre simultáneamente con la separación del péptido de la resina. (48–50)

### **Métodos de acoplamiento**

En SPPS existen diferentes métodos de acople, estas técnicas son eficientes, rápidas y mantienen la integridad del centro quiral (carbono alfa del aminoácido). Las técnicas más usuales involucran la formación del éster activo del aminoácido, la cual ocurre por la activación in situ del grupo carboxilo.(47)

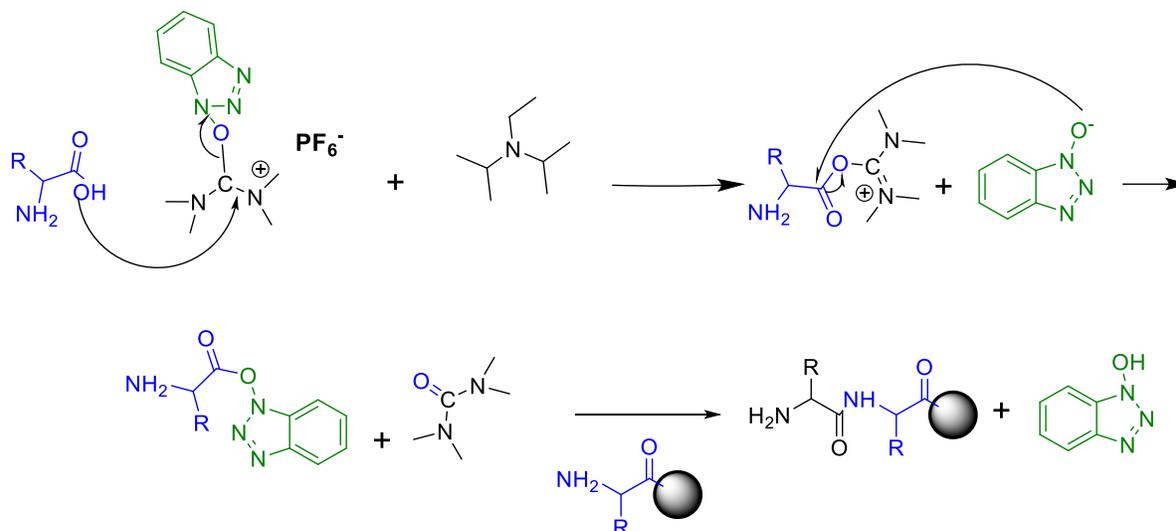
- *Carbodiimidias*: El mecanismo de activación de las carbodiimidias comienza con la transferencia del protón del grupo carboxilo del aminoácido a un nitrógeno de la carbodiimida, luego ocurre un re-arreglo que conduce a la formación del

carbocación, el cual sufre un ataque nucleofílico por el grupo carboxilato del aminoácido formando la O-acilurea. Este intermediario reactivo sufre el ataque nucleofílico del grupo amino del linker unido a la resina o péptido-resina para formar el enlace peptídico, el cual sigue una cinética  $S_N2$  conocida como una sustitución nucleofílica de segundo orden acilica (Figura 3). Las carbodiimidas más empleadas en síntesis de péptidos son N, N-diciclohexilcarbodiimida (DCC), N, N-diisopropilcarbodiimida (DIC) y 1-etil-3-(3'- dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). Sin embargo, se producen reacciones colaterales como la racemización de los aminoácidos, las cuales pueden ser minimizadas por el uso de aditivos como (HOBT y HOAt), que forman un éster menos reactivo, impidiendo la generación de menos productos indeseados. (48,49)



**Figura 3.** Mecanismo de reacción usando DIC/HOBT

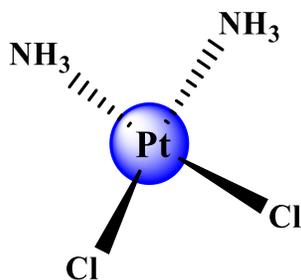
- *Sales de fosfonio y uronio:* estas sales son derivadas del HOBT y las más usadas son HBTU, TBTU y HATU., estas producen el éster activo disminuyendo significativamente la racemización de los aminoácidos. (48,49)



**Figura 4.** Mecanismo de reacción usando sales de Uronio (TBTU).

### 1.3 Compuestos organometálicos

Los compuestos organometálicos son moléculas de interés, debido a su versatilidad sintética y sus múltiples aplicaciones biológicas e industriales. Su interacción con biomoléculas, en particular con proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos, ha sido descrita y atribuida a la naturaleza catiónica del núcleo de coordinación del organometálico y a la capacidad de las biomoléculas de actuar como ligandos. La funcionalización de péptidos o aminoácidos con motivos organometálicos es una estrategia novedosa para el diseño y desarrollo de moléculas con mayor actividad biológica, mayor estabilidad en entornos biológicos y selectividad para objetivos específicos (50). El mejor exponente de compuestos de coordinación utilizando un metal es el cisplatino, este compuesto de coordinación ha sido usado en clínica desde 1978, debido a su actividad anti proliferativa (51-53). Este principio activo en Colombia se encuentra aprobado, para su uso solo o en combinación con otros antineoplásicos o radioterapia, en el tratamiento de cáncer de ovario, cuello uterino, en carcinomas de vejiga, pulmón y otras indicaciones; en la mayoría de las guías de tratamiento se sigue considerando como terapia de primera línea junto con taxanos y antraciclinas.(54)



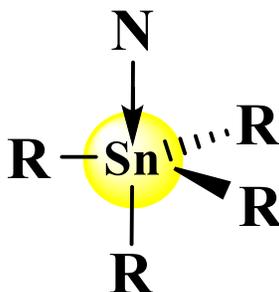
**Figura 5.** Estructura química del Cis-platino

Debido a su efectividad, su uso es extenso y frecuente, sin embargo, este fármaco induce efectos secundarios graves, como nefrotoxicidad, neurotoxicidad, ototoxicidad, náuseas y vómito. Esta baja selectividad, baja biodisponibilidad y alta genotoxicidad, también se ve directamente repercutida en la disminución de la calidad de vida de los pacientes.(50,51) En las últimas tres décadas se han venido desarrollando medicamentos basados en moléculas que contienen metales, de estas las más exploradas, son moléculas derivadas de cisplatino, (carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, polyplatillen) algunas de ellas pueden ser más efectivas en terapias específicas, sin embargo, siguen presentando efectos secundarios graves. Metalocenos como  $Cp_2MX_2$  ( $M=Ti, V, Nb, Mo$ ;  $X$  haluros),  $Cp_2Fe^{2+}(C_5R_5)_2M$  ( $M=Sn, Ge$ ;  $R= H, CH_3$ ) presentaron actividad contra células tumorales de melanoma, carcinoma de colon, carcinoma de pulmón, con menos efectos tóxicos que los derivados de Pt. A la fecha se continua en la búsqueda de compuestos que contengan metales como los complejos de coordinación y/o compuestos organometálicos más potentes y con mejor perfil de efectos secundarios(55).

#### ***Organoestaño IV***

Organotin IV (Organoestaño de su traducción al español) hace referencia a átomos de estaño que se encuentran tetrasustituídos por hidrocarburos (Figura 6), y es perteneciente a una gran familia de compuestos incluidos en la química de los organometálicos. (56)El átomo de estaño presenta dos estados de oxidación  $Sn^{2+}$  y  $Sn^{4+}$ , sin embargo, los compuestos de organoestaño (II) no son estables, debido a su tendencia a polimerizarse y oxidarse fácilmente a organoestaño IV, que es más estable y donde la unión del estaño a sus ligandos generalmente es de naturaleza covalente(57). Los organoestaño (IV) son compuestos que se caracterizan por la presencia de al menos un enlace C-Sn covalente, siendo los más comunes aquellos que contienen centros

tetravalentes. Estos compuestos se pueden clasificar dependiendo del número de ligandos alquilo (R) o arilo (Ar), en mono, di, tri y tetraorganoestaño sustituido. (58)



**Figura 6.** Estructura genérica de un compuesto de organoestaño IV con coordinación de nitrógeno.

Diversos derivados de estaño han sido utilizados en reacciones con diferentes biomoléculas, incluyendo carbohidratos, derivados de ácidos nucleicos, aminoácidos y péptidos. Se han obtenido moléculas con actividad biológica que consisten en complejos de estaño con acrilatos, feniletanoatos, ácidos carboxílicos, ácido acético, benzoato, entre otras moléculas(56,59–64). A su vez se ha encontrado que la actividad citotóxica de los complejos se ve afectada principalmente por la disponibilidad de sitios de coordinación del átomo de estaño y la presencia de enlaces entre el ligando y el metal.(65)

La síntesis de compuestos de estaño conjugados con aminoácidos se basa principalmente en el uso de los aminoácidos como ligandos polidentados. La preparación de derivados de estaño utilizando aminoácidos a partir de bases de Schiff es una de las estrategias más comunes, los complejos se forman mediante la preparación previa de la base de Schiff o mediante reacciones multicomponentes. Por lo general, para la formación de estos compuestos se requiere un ligando adicional al aminoácido, generalmente se usan aldehídos. Los aldehídos son esenciales en la formación de la base de Schiff, por lo que los residuos de aldehído que contienen la función carbonilo experimentan la adición nucleofílica del grupo amino para formar una imina(66–68)

La síntesis de péptidos conjugados con organoestaño IV (POM-Sn IV) es compleja, ya que la incorporación del derivado de organoestaño IV mediante la SPPS está limitada por su baja solubilidad en los medios de reacción y/o por su labilidad en medio ácido. Estas dificultades pueden reflejarse en alguna medida por el escaso reporte de POM-Sn (IV), ya que se reporta la síntesis de dipéptidos y tripéptidos, mono y poli conjugados con estaño (IV)(69,70). Los conjugados organometálicos son usualmente preparados en solución, los dipéptidos son

obtenidos usando DCC/HOBt, posteriormente la sal de sodio del dipéptido es tratada con solución de óxidos de dimetilestano (IV), difenil estano (IV) o di-n-octilestano (IV) y la reacción se mantiene en reflujo con agitación durante 14-16h a temperatura ambiente (TA)(64,66,71). A la fecha se ha avanzado poco en la formación de complejos de estano IV con cadenas peptídicas de mayor longitud, limitando la posibilidad de conjugar secuencias promisorias con organoestano IV. Por lo tanto, se hace necesario diseñar y desarrollar nuevas estrategias sintéticas y/u optimizar las existentes para lograr rutas sintéticas más simples que permitan obtener complejos de organoestano (IV) con cadenas peptídicas de diversa longitud.

### ***Actividad biológica de los complejos de Organoestano IV***

Los derivados del Organoestano (IV) han mostrado actividad antibacteriana, antiparasitaria, antitumoral, antiinflamatoria, antituberculosa, antioxidante, antifúngica y citotóxica frente a varias líneas celulares. Como agente antineoplásico ha sido ampliamente estudiado debido a que los compuestos de estano en quimioterapia han mostrado que pueden sustituir a sus homólogos de platino(60,66,72-85). Moléculas organometálicas, que han sustituido el platino por otro metal presentan, menor toxicidad, mayor excreción del cuerpo, menores efectos adversos, no desarrollan resistencia y entre sus características principales esta la inducción de apoptosis(86,87).

Las bases de Schiff derivadas de organoestano (IV) han mostrado actividad citotóxica en líneas celulares humanas derivadas de cáncer como HeLa (cáncer de cuello uterino), HT29 (cáncer de colon), A549 (cáncer de pulmón), MCF7 (cáncer de mama), C6 (Glioma de rata), Hep3B (cáncer de hígado), y Vero (epitelio de riñón) (56,59-64). Entre los principales mecanismos asociados al efecto citotóxico de los complejos de estano (IV), se resalta su capacidad para inhibir la síntesis de proteínas, debido a la formación de enlaces coordinados con las cadenas laterales de los aminoácidos causando alteraciones en la estructura, secuencia y conformación de la proteína(88). De forma similar se han reportado mecanismos celulares que incluyen la modificación en la estructura de la membrana, interferencia con el flujo de iones cloruro asociada a inflamación y la inhibición en la conservación de energía al interferir en la acción de la ATP sintasa (88).

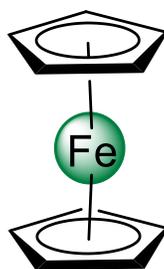
Compuestos de Organoestano (IV) han presentado mayor actividad antitumoral cuando tienen como sustituyentes grupos butilo y han sido menos activos cuando los sustituyentes son fenilo (66). La actividad antitumoral también se ve afectada sí en las posiciones de coordinación se

encuentran oxígenos, estos átomos son capaces de formar grupos hidroxilo u óxidos que al someterse a una hidrólisis resultan en moléculas con mejor potencial antitumoral(86,87). La lipofilidad es un factor a consideración, ya que, dependiendo de la longitud de la cadena hidrocarbonada de los ligandos, la actividad antitumoral y citotóxica puede variar. La presencia de heteroátomos como N, O o S en el ligando desempeñan un papel importante en la geometría y por lo tanto, afectan la actividad biológica de estos complejos (67,85).

### Ferroceno

El Ferroceno (ciclopenta-1,3-dieno; hierro (II);  $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ ) fue descubierto a mediados del siglo XX por Kealy y Pauson, es un metalloceno que consta de dos anillos de ciclopentadienilo unidos a lados opuestos del átomo central de hierro(89,90). Esta molécula es estable en medios acuosos y aeróbicos, tiene propiedades redox y electroquímicas favorables para ser usadas como sondas en reacciones de óxido reducción, adicionalmente puede adoptar conformación escalonada o eclipsada (91,92). El átomo de hierro tiene la estructura electrónica de  $[\text{Ar}] 3d^6 4s^2$ , posee reactividad como un electrófilo super-aromático y tiene una oxidación reversible alrededor de +0.4 V contra SCE<sup>30</sup>

El Ferroceno no sustituido, es inactivo e insoluble en agua, mientras que los Ferrocenos sustituidos en el interior de la célula tumoral pueden modificar su estado de oxidación 2+ (Ferroceno) al estado de oxidación 3+ (iones ferrocenio). (93–96)



**Figura 7.** Estructura del ferroceno

### ***Actividad biológica de los compuestos de ferroceno***

Aunque el mecanismo de acción citotóxica no se conoce, el ferroceno presenta una estructura que podría explicar su actividad farmacológica: (i) tiene capacidad de intercalarse entre los pares bases del ADN. (ii) Su oxidación a ferrocenio ocurre con facilidad, dando así una interacción mayor con los grupos fosfatos del ADN, (iii) su potencial eléctrico induce la

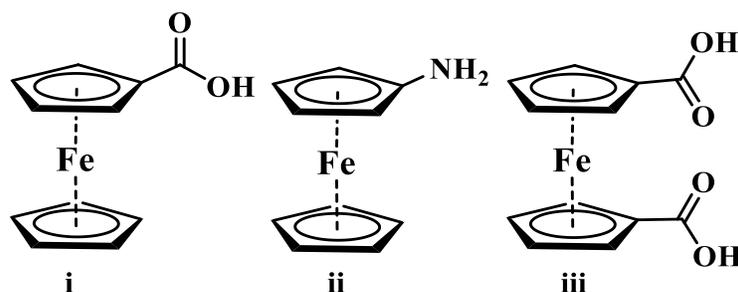
formación de especies reactivas (ROS) como radicales  $\text{OH}\cdot$  que pueden reaccionar con el ADN. (95,97,98)

El ferroceno es una molécula no tóxica que puede derivatizarse, funcionalizarse u oxidarse fácilmente a sales de ferrocenio. La actividad citotóxica de las sales de ferrocenio ha sido el punto de partida para el desarrollo de nuevos derivados anticancerígenos. Compuestos que contienen Fc han exhibido actividad citotóxica, antitumoral, antipalúdica, antifúngica y algunos tienen capacidad de cortar el ADN(99). Se ha descrito que la incorporación del ferroceno a fármacos como antibióticos, analgésicos, antimaláricos y anticancerígenos modificaron su actividad biológica, como en el caso del tamoxifeno, penicilina, cefalosporina biotina, pirazoles, o péptidos.(93–96). Ferroceno conjugado con tamoxifeno, cloroquina, esteroides o antiandrógenos no esteroideos, han presentado mayor actividad citotóxica y antibacteriana que el fármaco libre.

Estudios de biocompatibilidad muestran que el ferroceno es parcialmente selectivo, ya que presenta baja actividad citotóxica en células normales. Estudios in vivo en modelo murino han demostrado efecto en el tratamiento de infecciones ocasionadas por *S. aureus* o *P. aeruginosa*. (97,100)

### ***Ferroceno conjugado con aminoácidos***

La actividad biológica de los derivados de ferroceno se ha visto influenciada por la sustitución del anillo. El ferroceno ha sido modificado en uno o en ambos anillos, con el objetivo de mejorar su reactividad, modificar sus propiedades fisicoquímicas para usarse como agente reactivo y/o catalizador, entre las modificaciones más comunes son las mostradas en la figura 8, estos derivados han sido utilizados como moléculas precursoras para obtener compuestos organometálicos más complejos como los POMs que contiene ferroceno (POM-Fc) (16,101–103).



**Figura 8.** Derivados de Ferroceno usados en la funcionalización de aminoácidos y péptidos

El ácido ferroceno carboxílico monosustituido (i) y disustituido (iii) al igual que el aminoferroceno (ii) son los derivados de ferroceno más frecuentemente empleados para funcionalizar péptidos y aminoácidos, la estrategia más empleada es la formación de enlaces amida entre el grupo carboxilo del ferroceno previamente activado y el grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido, esta reacción se da en condiciones suaves a TA. Existen múltiples estrategias, para activar el grupo carboxílico de (i) y (iii): (a) transformación en cloruro de acilo con cloruro de oxalilo o cloruro de tionilo, (b) transformación del ácido carboxílico en el éster de succinimida o benzotriazol usando carbodiimidas (DIC, DCC o EDC ) junto con N-hidroxisuccinimida (HOSu) o HOBt, (c) activación del ácido carboxílico in situ por sales de uranio (HBTU, HATU o TBTU) o fosfonio (BOP) en presencia de una base terciaria como  $\text{Et}_3\text{N}$ . Se recomienda el último método de activación, ya que es un procedimiento rápido, de un solo paso y los productos secundarios se pueden eliminar fácilmente(16,101–103).

A la fecha se han sintetizado gran variedad de conjugados de ferrocenil-aminoácido utilizando gran diversidad de estrategias sintéticas, entre las más comunes las descritas anteriormente. Conjugados con Ser, Tyr o Thr, se han preparado por síntesis en solución usando EDC/HOBt(104). Además, Compuestos monosustituidos fueron preparados a partir de clorocarbonil-ferroceno con diferentes aminoácidos (His-OMe, Met-OMe, Trp-OMe o Pro-OMe), posteriormente estos compuestos fueron conjugados con Oro (Au). Estos ligandos de ferrocenilo unidos a Au (I) exhibieron efecto citotóxico contra las líneas celulares de cáncer humano HeLa, MCF-7 y N1E-115(105). La química click (1,3 ciclo adición catalizada por cobre) permite la unión entre un grupo alquino y un grupo azida para formar un anillo de triazol, también ha sido utilizada para obtener conjugados de ferroceno. Para esto es necesario utilizar derivados de ferroceno que contengan grupos azida o alquino y aminoácidos modificados que contengan un grupo alquino o azida. (106,107)

### ***Ferroceno conjugado con péptidos***

El primer conjugado de ferroceno-péptido sintetizado fue el dipéptido DL-ferrocenilfenilalanina (Fc-Phe-Ala). La conjugación de ferroceno con péptidos es de gran interés, porque estos POMs adoptan estructuras secundarias que podrían estar relacionadas con diferentes propiedades biológicas. La capacidad de formar estructuras secundarias tipo hoja beta y el autoensamblaje de estos conjugados pueden formar complejos supramoleculares con actividad citotóxica y antibacteriana(96,101,108–112).

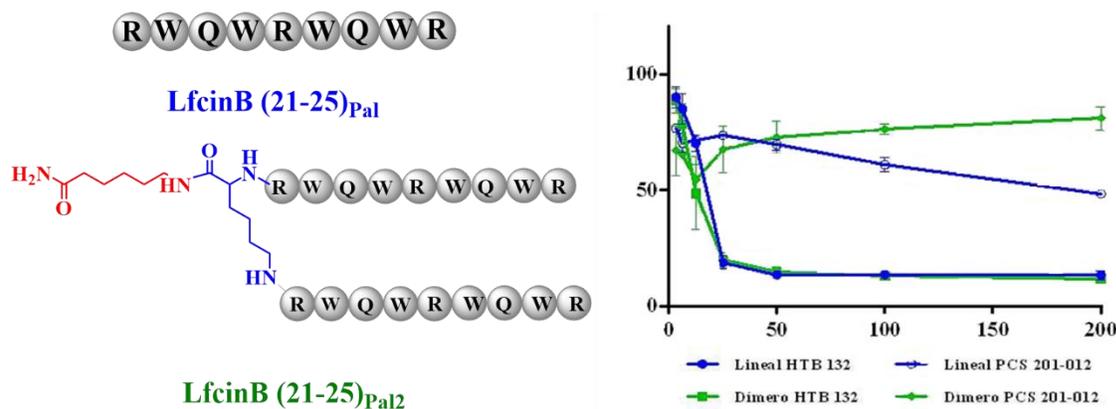
Los POMs se han sintetizado mediante la metodología de síntesis de solución convencional utilizando el método estándar de carbodiimidas con EDC/HOBt (113–115)(116). Mediante SPPS, se han obtenido péptidos de diferente longitud utilizando las estrategias Boc/Bzl o Fmoc/tBu. Los péptidos funcionalizados con ferroceno Fc–Ahx–SPINNTKPHEAR, Ac-C-Ahx-Fc-KSPINNTKPHEAR y Ac-C-Ahx-KSPINNTKPHEAR-Fc-K que contienen secuencias inmunogénicas de la proteína L1 del VPH fueron sintetizados por SPPS-Fmoc/tBu utilizando DCC/HOBt(117). Péptidos con oligoargininas fueron conjugados con ferroceno mediante las estrategias (i) SPPS-Fmoc/tBu, resina Rink amide y la mezcla DIC/HOBt y (ii) SPPS-Boc/Bzl, resina MBHA y BOP/HOBt/DIPEA. Estos POMs presentaron actividad citotóxica contra la línea celular de leucemia humana (ATCC CC-L240) con IC<sub>50</sub> entre 10-100 mM, además se estableció que la incorporación del ferroceno-CH=CH-CO en la secuencia mejoró la actividad citotóxica. Con resultados similares, Ardila 2019 evaluó la actividad antibacteriana de los péptidos Fc-WRWRW, Fc-RWRWR, Fc-RWQWRWQWR, Fc-LLLR y Fc-LLRRLR en cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, encontrando que la incorporación del ferroceno en el extremo N-terminal de la secuencia mejoró significativamente la actividad antibacteriana(118).

## Planteamiento del problema

Estudios han demostrado que los péptidos sintéticos pueden ser candidatos para el desarrollo de alternativas terapéuticas para diferentes enfermedades, incluyendo el cáncer. Los péptidos empleados como fármacos destacan por su baja toxicidad, alta especificidad y bajo costo. También tienen ciertas limitaciones desde el punto de vista farmacológico, que presentan susceptibilidad a degradación enzimática, que conlleva a disminución en la biodisponibilidad del fármaco y una mayor velocidad de eliminación, además de estar sujetos a la generación de respuestas inmunológicas.

Por ello se han buscado diferentes estrategias sintéticas que permitan obtener péptidos con mejor perfil biológico, se destacan la polivalencia y la incorporación de motivos no naturales, estas modificaciones tienen como propósito incrementar la estabilidad fisicoquímica y potenciar la actividad. El grupo de investigación de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas (SAMP) en los últimos años ha trabajado en el diseño, síntesis y evaluación de la actividad antibacteriana y anticancerígena de péptidos modificados derivados de la LfcinB.

El péptido LfcinB (21-25)<sub>pal</sub>, con secuencia RWQWRWQWR, ha presentado actividad antibacteriana, antifúngica y citotóxica en diferentes líneas celulares de cáncer. Rodríguez en 2018 estableció que este péptido presentó actividad anticancerígena selectiva in vitro, ya que en líneas celulares de cáncer de mama presentó actividad, mientras que, en líneas celulares derivadas de fibroblastos normales, no presentó actividad citotóxica significativa. Adicionalmente se observó que cuando este péptido fue presentado como dímero, su actividad citotóxica se potenció (Ver Figura 9). Barragán en 2020 determinó que la actividad anticancerígena del péptido LfcinB (21-25)<sub>pal</sub> y de sus péptidos análogos (scan de alaninas) contra diferentes líneas celulares derivadas de cáncer de mama fue significativa, selectiva y rápida. Estableció que el efecto citotóxico del péptido palíndromo depende de todos los aminoácidos de la secuencia por lo que está directamente relacionada con la estructura primaria, ya que el cambio de cualquier aminoácido disminuía la actividad. También se evidenció que el efecto citotóxico del péptido está mediado por apoptosis principalmente.

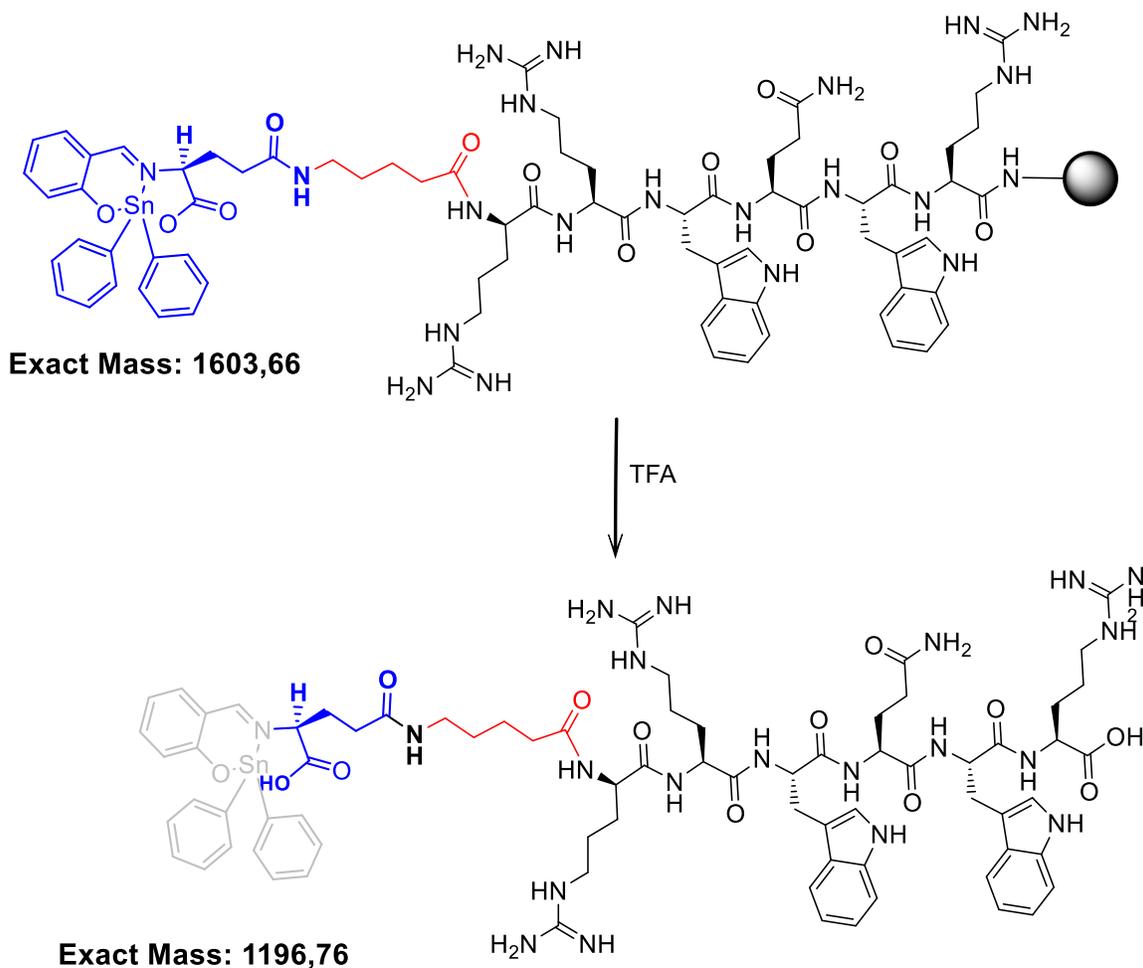


**Figura 9.** Efecto citotóxico del péptido LfcinB(21-25)<sub>pal</sub> (azul) y su dímero LfcinB(21-25)<sub>pal2</sub> (verde) contra las líneas HTB132 y PC 201-012. En la gráfica de la derecha se observa el eje Y que corresponde al porcentaje de viabilidad celular de cada línea celular en presencia de diferentes concentraciones de péptido (0-200 μg/mL). La línea celular derivada de cáncer de mama HTB132 y la línea celular derivada de fibroblastos normales PC 201-012

Por su perfil biológico este péptido es de interés terapéutico, en busca de potenciar su actividad se ha explorado su conjugación con ácido 6-aminohexanoico y la incorporación de motivos organometálicos. Péptidos conjugados y POMs obtenidos previamente en el grupo han presentaron algunas dificultades sintéticas, reflejadas en rendimientos de síntesis, estrategias de purificación y caracterización. Lara en 2018, determinó que las secuencias derivadas de la proteína L1 de la cápside del virus del papiloma humano funcionalizadas con ferroceno Ac-C-Ahx-(Fc)KSPINNTKPHEAR) y (Ac-C-Ahx-SPINNTKPHEAR(Fc)K), presentaban inestabilidades después del proceso de liofilización. El autor sugiere la degradación de los POMs, con base en los resultados de los perfiles cromatográficos (la aparición de múltiples especies). En trabajos posteriores también se observó alta variabilidad en los procesos de síntesis, obteniendo POMs con bajas purezas y/o rendimientos, en algunas ocasiones no fue posible obtener el producto esperado. Lo anterior incrementó el consumo de solventes y reactivos, haciendo los procesos sintéticos y de purificación dispendiosos. Por ello es importante establecer diferentes estrategias que lleven a obtener POMs mediante síntesis más rápidas, robustas y eficientes. En el caso de los péptidos anclados a ferroceno es importante estandarizar la SPPS-Fmoc/tBu la cual implica: El proceso de acondicionamiento de la resina, la estrategia de acople de aminoácidos y de (i), reacciones de desprotección del grupo alfa amino de los Fmoc-aminoácidos, la desprotección de las cadenas laterales y la separación del POM del soporte sólido, la purificación y la caracterización del producto final.

En el caso de los péptidos conjugados con organoestaño IV, Ardila en 2019 determinó que para la síntesis del POM ([Sn]-Ahx-RRWQWR) mediante SPPS Fmoc/tBu, la síntesis ocurrió en forma normal lográndose incorporar cada uno de los aminoácidos y el complejo de organoestaño IV. Sin embargo, durante el proceso de desanclaje se pudo establecer que se el compuesto de Estaño IV se hidrolizó, no pudiéndose obtener el POM lo cual se determinó por espectrometría de masas MALDI-TOF (Ver Figura 10).

## Sn IV- Ahx- RRWQWR



**Figura 10.** (Arriba), Péptido Sn-Ahx-RRWQWR anclado a la resina, la incorporación del compuesto de organoestaño IV fue monitoreada por el test de kaiser. Luego de la reacción de desanclaje del POM de la resina se obtuvo una especie con masa de 1196,76 que corresponde al POM menos 407 unidades de masa (Abajo) indicando que el compuesto de organoestaño IV se hidrolizó.

Para la funcionalización de péptidos con organoestaño (IV), se propone como estrategia obtener de manera eficiente las moléculas precursoras, complejos de aminoácido- organoestaño (IV), que luego puedan ser incorporadas mediante la química click al péptido previamente sintetizado, sin tener que utilizar medios de reacción ácidos y así evitar la hidrólisis del compuesto organoestaño (IV).

## **Pregunta de investigación**

¿Es viable sintéticamente en cuanto a facilidad de síntesis, rendimientos y pureza:

i) obtener complejos Estaño IV- aminoácido polar y ii) obtener péptidos conjugados con ferroceno?

## Objetivos

### Objetivo General:

Optimizar e implementar la ruta sintética para la obtención de conjugados organometálicos de: (i) estaño IV-aminoácido y (ii) péptidos derivados de la secuencia RWQWRWQWR funcionalizados con ferroceno.

### Objetivos Específicos

Sintetizar y caracterizar bloques tipo organoestaño IV utilizando L o D aminoácidos.

Obtener los péptidos monoméricos RWQWRWQWR, Ahx-RWQWRWQWR y Fc-Ahx-RWQWRWQWR.

Obtener los péptidos diméricos (RWQWRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx, (Ahx-RWQWRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx y (Fc- Ahx-RWQWRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx

## **2. Capítulo I. Síntesis de Complejos de organoestaño (IV) base de Schiff**

### **2.1 Metodología**

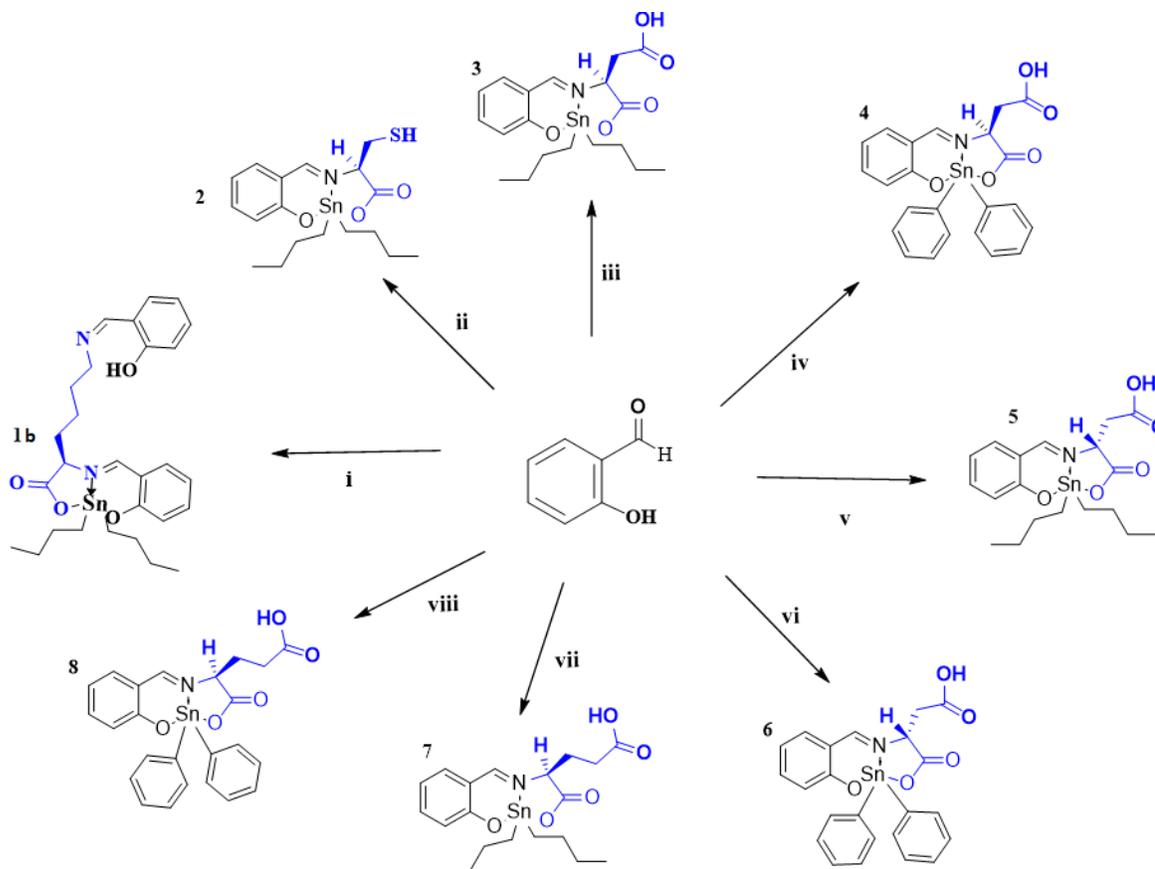
En esta parte del trabajo se exploró la obtención de compuestos de estaño que pueden ser evaluados como moléculas anticancerígenas y/o utilizados como precursores para obtener sistemas funcionalizados de organoestaño IV que puedan ser incorporados a cadenas peptídicas.

#### **Metodología general para la obtención de las bases de Schiff Organoestaño IV.**

En trabajos previos se ha reportado la síntesis de compuestos de organoestaño (IV) de similar naturaleza, donde las estrategias más usadas son: (I) Obtener la base de Schiff y luego esta base se hace reaccionar con el óxido de estaño para formar el complejo organometálico, y (II) Obtener el complejo de organoestaño IV mediante la reacción de un solo paso (one pot), mezclando simultáneamente todos los reactivos, en esta estrategia a medida que se forma la base de Schiff esta reacciona con el óxido de estaño para formar el complejo (66). La síntesis de los compuestos organoestaño (IV)(**1**) al (**8**) se realizó a través la reacción en único paso, estrategia (II) (Figura 11, Tabla 2 y 3). Los aminoácidos en forma de clorhidrato fueron tratados con carbonato de sodio (1:1 equiv) con fin de neutralizar y obtener el aminoácido con el grupo amino.

Para establecer las condiciones óptimas para la obtención de los compuestos de organoestaño (IV) se utilizó como modelo la formación de (**1**) a partir de L-Lys-OH, utilizando óxido de dibutilestaño (IV). A continuación, se presenta el proceso que se siguió

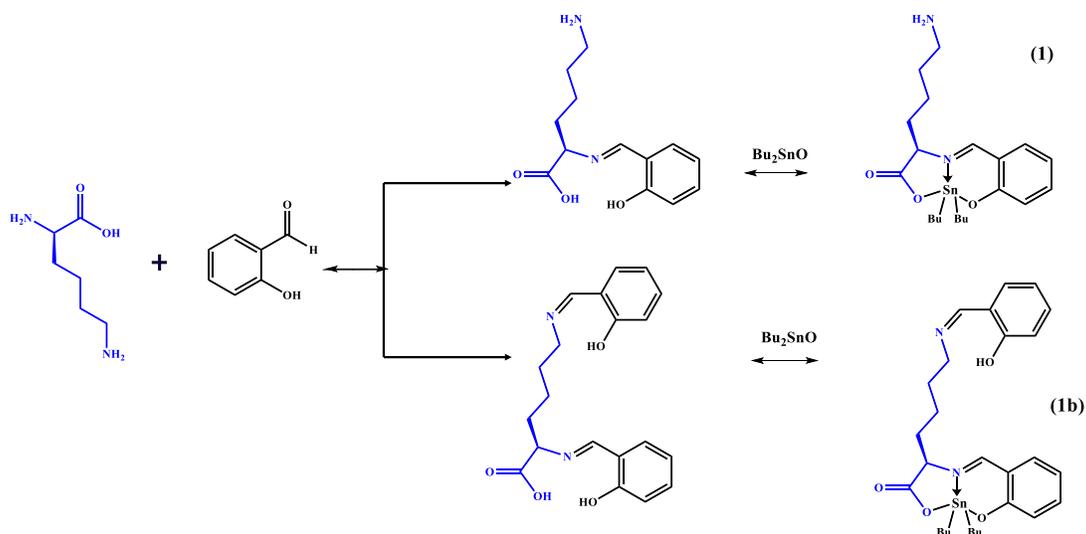
y las estrategias utilizadas para la obtención del compuesto de organoestaño (IV) y el proceso de purificación.



**Figura 11.** Esquema de la obtención de los compuestos de organoestaño (IV). Las reacciones se realizaron con salicilaldehído y i) L-lisina y óxido de dibutilestaño, ii) L-cisteína y dibutilestaño iii) L-ácido aspártico y dibutil estaño, iv) L-ácido aspártico y difenilestaño, V) D-ácido aspártico y dibutilestaño, vi) D-ácido aspártico y difenil estaño, vii) L-ácido glutámico y dibutilestaño, viii) L-ácido glutámico y difenil estaño.

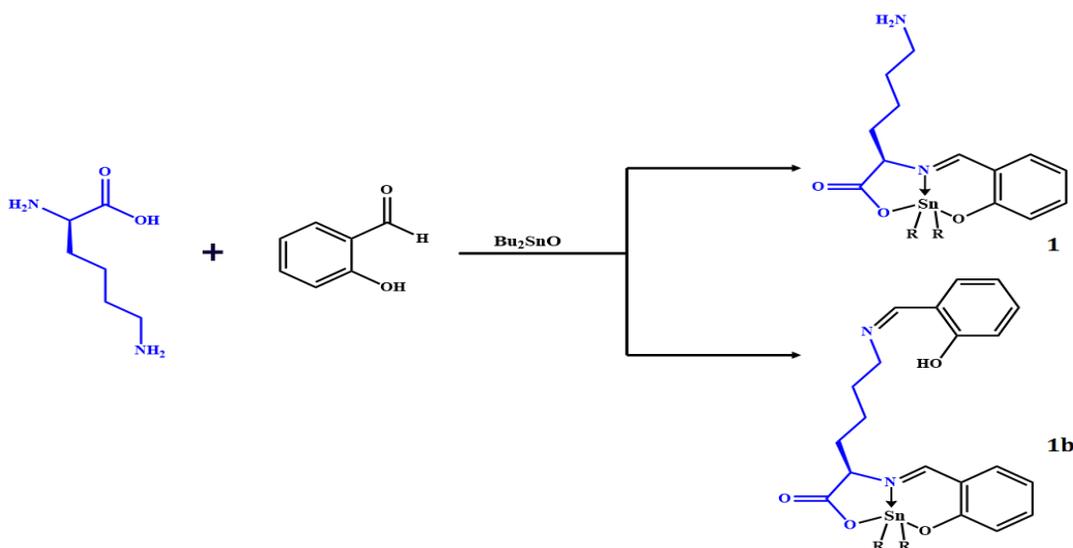
*Estrategia I.* El aminoácido neutralizado disuelto en MeOH fue mezclado con salicilaldehído (1:1 equiv) y dejado en reflujo por 2h a una temperatura mayor de 90°C, luego que la base de Schiff se formó, se adicionó el óxido de dibutilestaño (IV) o óxido de difenilestaño (IV) (1 equiv) y la mezcla se dejó en reflujo usando una trampa Dean-Stark a temperatura mayor de 90°C por 6h o 18h respectivamente. En esta estrategia se utilizaron dos formas de adición del aminoácido para la formación de la base de Schiff, (I-A) en la primera se mezcló

toda la solución del aminoácido con el salicilaldehído y (I-B) la segunda consistió en el goteo de la solución del aminoácido sobre el salicilaldehído.



**Figura 12.** Reacción entre la L-lys-OH con salicilaldehído para formar la base de Schiff, luego se adicionó el dibutilestaño (IV), estrategia I. Se observa la formación del complejo de organoestaño (IV) monosustituido (1) (producto deseado) y el complejo de organoestaño (IV) disustituido (1b).

*Estrategia II.* La solución del aminoácido neutralizado fue mezclada con salicilaldehído y el óxido de estaño (IV) (1:1:1 equiv) y la mezcla se dejó en reflujo usando una trampa Dean-Stark a temperatura mayor de 90°C hasta 6h (óxido de dibutilestaño (IV)) o 18h (óxido de difenilestaño (IV)). Luego la mezcla de la reacción se dejó en agitación constante (AC) hasta que la mezcla de reacción alcanzó TA, luego la mezcla de reacción se rotaevaporó para eliminar el disolvente (Ver figura 13).



**Figura 13.** Reacción entre la L-lys-OH con salicilaldehído y dibutilestaño (IV) por la estrategia II (reacción en un solo paso). Se observa la formación de los complejos de organoestaño (IV) monosustituido (**1**) y disustituido (**1b**).

### Purificación de los compuestos de Organoestaño (IV).

Debido a que algunos de los compuestos de organoestaño (IV) obtenidos presentaban particularidades como labilidad a medios ácidos y baja solubilidad en solventes acuosos se exploraron diferentes estrategias de purificación:

Método (A). Luego de que la mezcla de reacción fue sometida a reflujo esta fue enfriada con AC hasta TA, luego la mezcla fue filtrada para eliminar el óxido de estaño remanente y el filtrado fue rotaevaporado hasta reducir el volumen hasta 1-3 mL. Luego la mezcla fue diluida con DCM y lavada varias veces con solución acuosa de KOH, hasta disminuir significativamente la intensidad del color de la fase orgánica. La fase acuosa que contenía el compuesto de organoestaño (IV), fue almacenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta congelación, luego sometida al proceso de liofilización obteniéndose un sólido de color rojo.

Método (B). La mezcla de reacción luego del proceso de reflujo fue enfriada hasta TA y fue filtrada para retirar el óxido de estaño remanente, y el sobrenadante soportado sobre celita. El sólido obtenido fue lavado 5 veces con n-hexano y el compuesto de organoestaño (IV)

fue extraído de la celita agregando solventes de mayor polaridad como MeOH o acetona. Finalmente, la solución fue rotaevaporada para eliminar el solvente y el sólido fue almacenado en un desecador hasta su uso.

## 2.2 Resultados y Discusión

La obtención de complejos de organoestaño (IV) fue inicialmente estandarizada utilizando L-Lys-OH.HCl, L-Lys-OH, butilestaño (IV) y difenilestaño (IV) con el fin de obtener (**1**). Se evaluaron diferentes condiciones experimentales como solventes, temperatura, tiempo de reacción y la estrategia sintética (Tabla 2). Se pretendía obtener (**1**) basados en la mayor reactividad del grupo alfa-amino del aminoácido respecto al grupo amino épsilon de la cadena lateral, lo que conllevaría a obtener (**1**) como el producto principal.

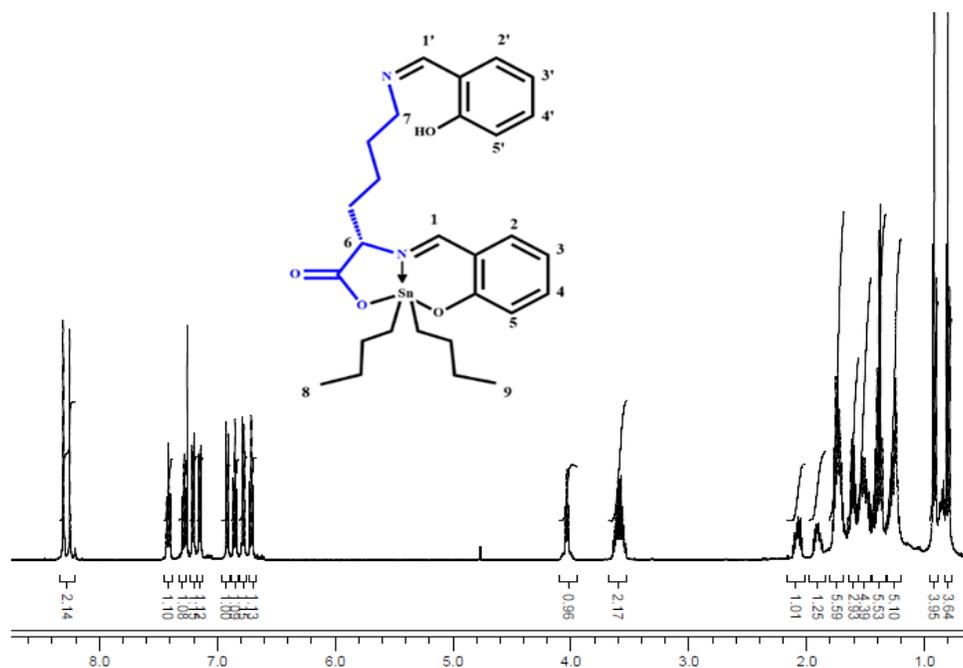
**Tabla 2.** Estrategias sintéticas y condiciones utilizadas para la obtención de (**1**)

Experimento	Solvente	Condiciones	Cantidad (g) /Rendimiento (%)	Resultado/observaciones
1	Benceno/EtOH (4:1 v7v)	Estrategia II. (i)L-Lys-OH, Salicilaldehído, dibutilestaño (IV), Reflujo por 5h a >90°C	1,06/65	Se obtuvo el compuesto ( <b>1b</b> )
2	EtOH	Estrategia I-A. (i) L-Lys-OH/Salicilaldehído, Reflujo por 2h a >90°C; (ii) dibutilestaño (IV), Reflujo por 3h a >90°C	-	No se obtuvo el producto debido a la Insolubilidad de reactivos
3	Benceno/EtOH (4:1 v/v)	Estrategia I-A. (i) L-Lys-OH/Salicilaldehído, Reflujo por 2h a >90°C. (ii) dibutilestaño (IV), Reflujo por 3h a >90°C	0,6	El producto final se obtuvo como una mezcla de iminas, compuestos ( <b>1 + 1b</b> )
4	Benceno/EtOH (4:1 v/v)	Estrategia I-B. (i) L-Lys-OH.HCl/Salicilaldehído, Reflujo por 2h a >90°C. (ii) dibutilestaño (IV), Reflujo por 3h a >90°C.	0,60	El producto final se obtuvo como una mezcla de iminas, compuestos ( <b>1+1b</b> )

Se evaluaron cuatro metodologías para la obtención de (**1**), tres de ellas corresponden a la estrategia I (experimentos 2, 3 y 4) y una a la estrategia II (experimento 1), en las cuales se utilizaron dos medios de reacción EtOH, Benceno/EtOH (4:1 v/v). Como se puede observar

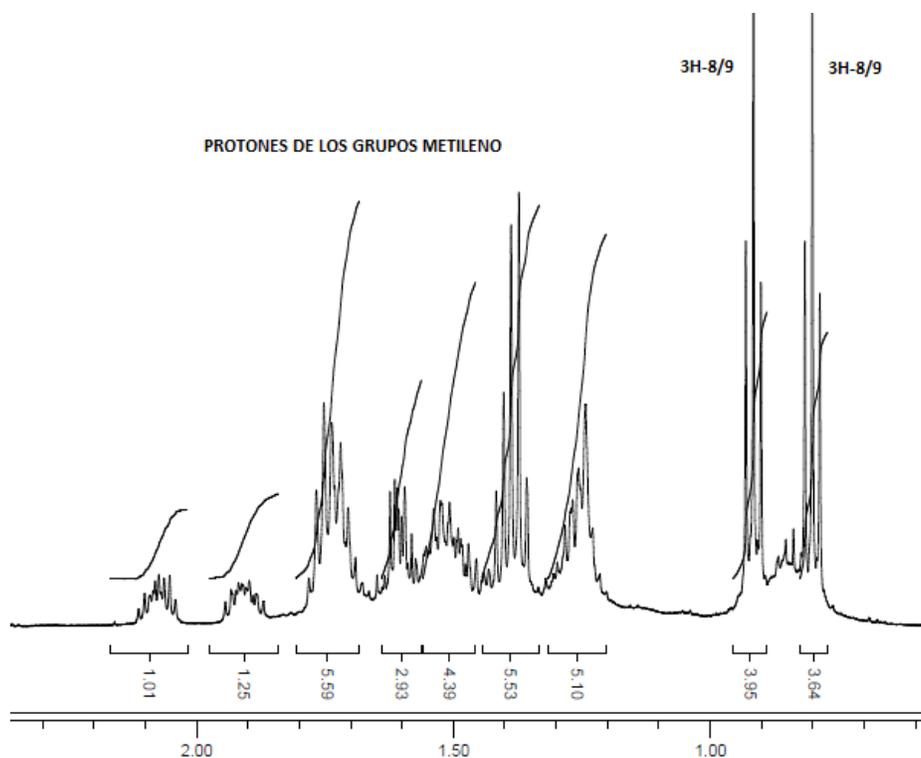
cuando se utilizó EtOH como solvente (experimento 2) el aminoácido y el salicilaldehído fueron solubles y se permitió la reacción para formar la base de Schiff, luego se adicionó el óxido de dibutilestano (IV) el cual fue insoluble lo que impidió la formación del complejo de organoestano (IV) (**1**). Cuando se utilizó Benceno/EtOH (4:1 v/v) como solvente y se adicionó el aminoácido y el salicilaldehído fueron solubles al igual que el óxido de estano, obteniéndose de la mezcla de (**1**) y (**1b**) (experimento 3). Basados en la reactividad diferencial de los grupos alfa y épsilon amino del aminoácido, se adicionó el aminoácido por goteo buscando favorecer la formación de (**1**), sin embargo, el producto mayoritario obtenido fue (**1b**). De los experimentos realizados solo el experimento 1, permitió obtener el compuesto de organoestano (IV) (**1b**), el cual es un compuesto de organoestano (IV) disustituido en los dos grupos amino, lo cual no permite la incorporación de un linker, impidiendo ser usado como precursor para la conjugación de péptidos.

El complejo de organoestano (IV) (**1b**) fue analizado por  $^1\text{H}$ -Resonancia magnética Nuclear (RMN), donde se identificaron las señales correspondientes a los protones de los grupos funcionales iminas (H-1' y H-1) en 8.3 y 8.5 ppm, los protones aromáticos (H-2, H-3, H-4, H-5, H-2', H-3', H-4' y H-5') entre 6.6-7.5 ppm. Mientras que los protones H-6 y 2H-7 se encuentran en 4.0 y 3.6 ppm respectivamente. Entre 2.0 y 1.2 ppm se encuentran las señales correspondientes a los 18 protones de los grupos metileno y en 1.0-0.6 se encuentran las señales de los 6 protones de los grupos metilo.

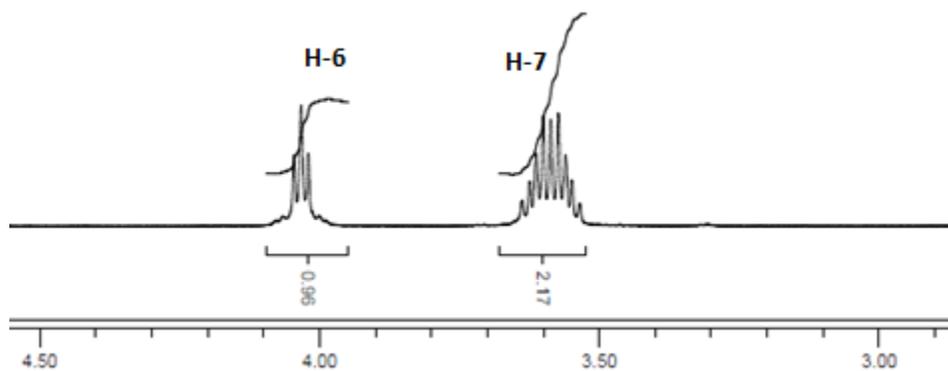


**Figura 14.** Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto organoestaño (IV) (**1b**). Se observan las señales de los protones de (**1b**) observándose los desplazamientos químicos y la integración de cada señal.

En la Figura 15, se observan entre 0.6-2.2 ppm las señales de los protones de naturaleza alifática que corresponden a los grupos metilos y metilenos. Entre 1.2-2.1 ppm se encuentran las señales correspondientes a los grupos metileno, para estas señales se observan un mayor número de protones a lo esperado para (**1b**), esto debido posiblemente a presencia de trazas de solventes, principalmente n-hexano. Entre 0.8 y 0.92 ppm se observan dos señales triples las cuales cada una integra para tres protones que corresponde a los grupos metilos (8/9).

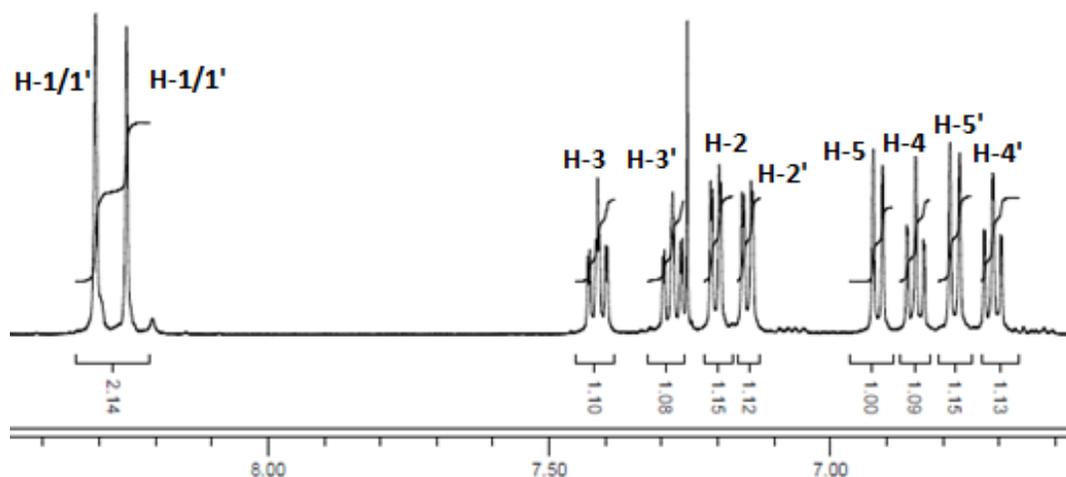


**Figura 15.** Ampliación del espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto organoestaño (IV) (**1b**) entre 2.5-0.5 ppm.



**Figura 16.** Ampliación del espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto organoestaño (IV) (**1b**) entre 3-4.5 ppm.

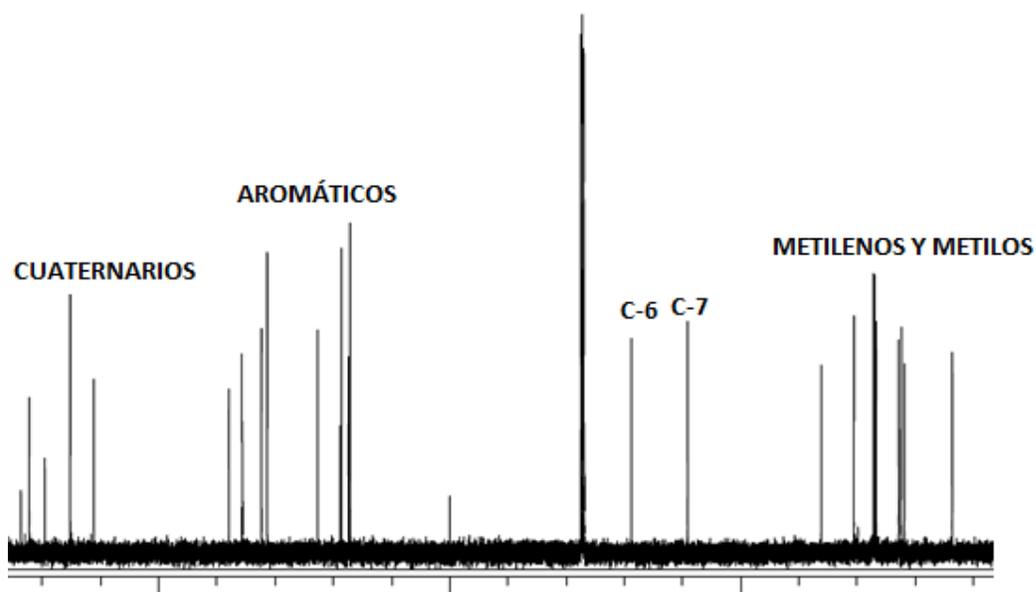
En la Figura 16 se observa la señal para el protón H-6 en 4,03 ppm que integra para un protón y con multiplicidad de señal triple. La señal en 3.58-ppm es una señal múltiple que integra para dos protones, que corresponden a dos hidrógenos en la posición-7 del grupo metileno.



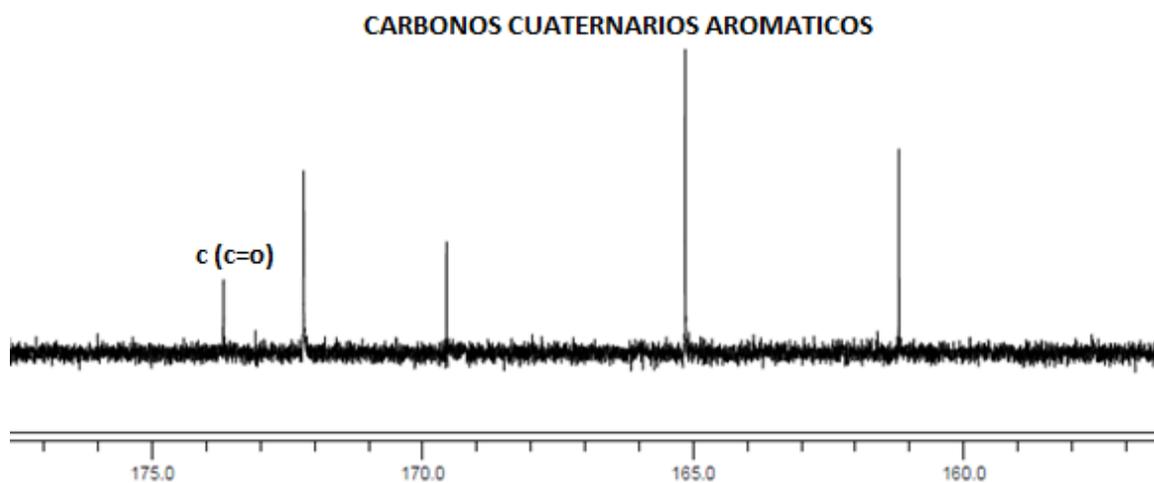
**Figura 17.**Ampliación del espectro  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto organoestaño (IV) (**1b**) región entre 6-9 ppm.

En la Figura 17, se observa entre 8.30 y 8.25 ppm dos señales simples que integran para un protón cada una que corresponden a los protones H-1 y H-1' de los grupos imino. Entre 6,7-7,5 ppm se observan las señales de los protones correspondientes a los grupos CH de los dos anillos aromáticos. La multiplicidad y la integración corresponden con la estructura química de (**1b**)

En la figura 18 se observa el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN para (**1b**), entre 161-174 ppm se observan las señales que corresponden a los 5 carbonos cuaternarios. La señal del carbono carbonílico se localiza en 173.67 ppm, entre 117-138 ppm se observan las señales de los 8 carbonos de los grupos CH de los anillos aromáticos. Mientras que en 68.76 y 59.14 ppm se observan las señales de los carbonos C-6 y C-7 respectivamente. Entre 21-36 ppm se encuentran las señales correspondientes de los carbonos de los grupos metileno mientras que entre 13.5-13.6 ppm se encuentra los dos carbonos de los grupos metilo.

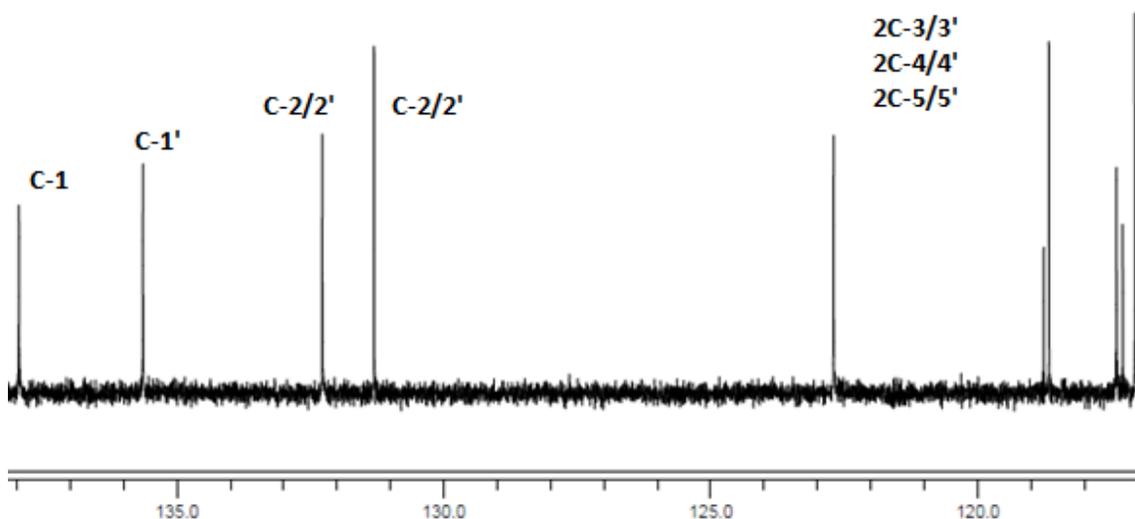


**Figura 18.** Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto organoestaño (IV) (**1b**).



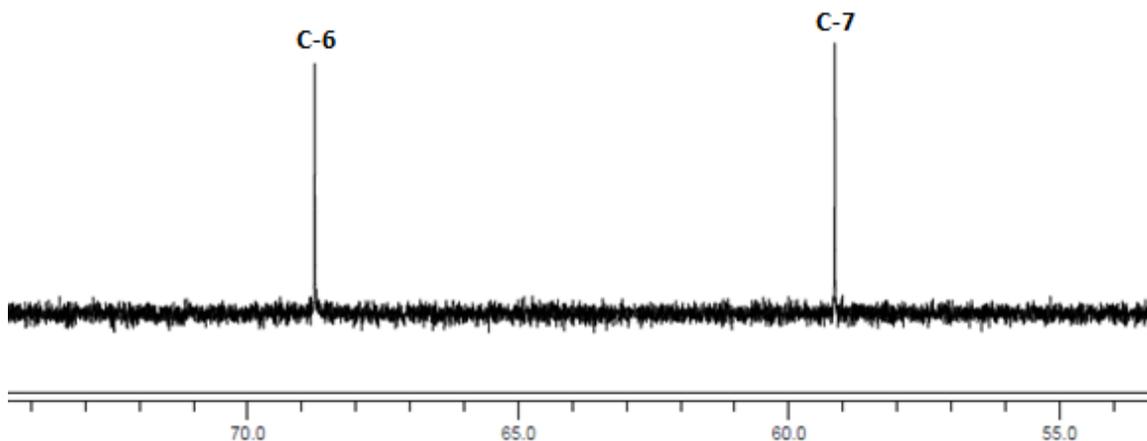
**Figura 19.** Ampliación del espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto organoestaño (IV) (**1b**).

En la figura 19 se observan las 5 señales entre 161-173 ppm, corresponden a los carbonos cuaternarios, lográndose identificar el carbono carbonílico que estará más desplazado hacia campo bajo. Estas señales están de acuerdo con la estructura de (**1b**).



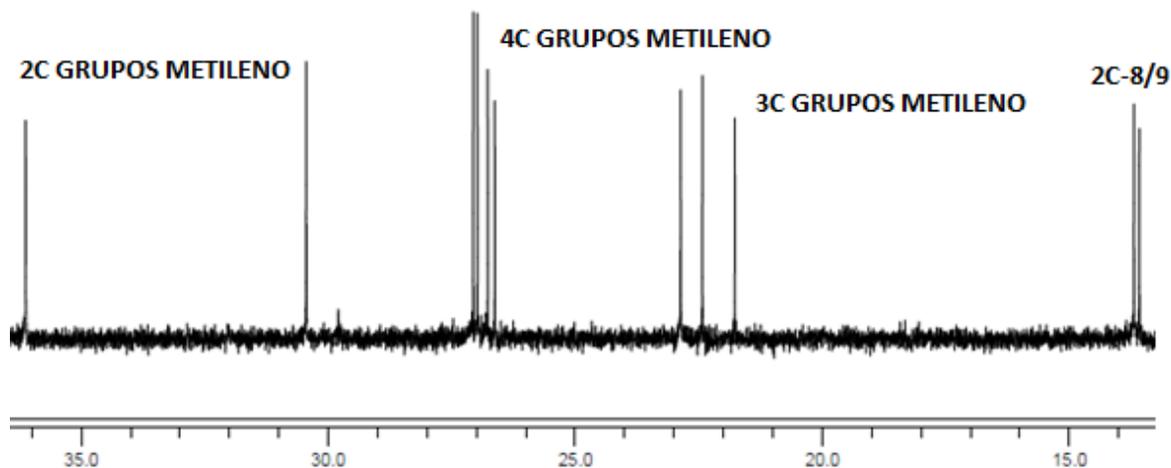
**Figura 20.** Ampliación del espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto organoestaño (IV) (1b).

Entre 137-117 ppm se observan las 8 señales de los carbonos de los grupos CH de los anillos aromáticos de (1b) (Figura 20).



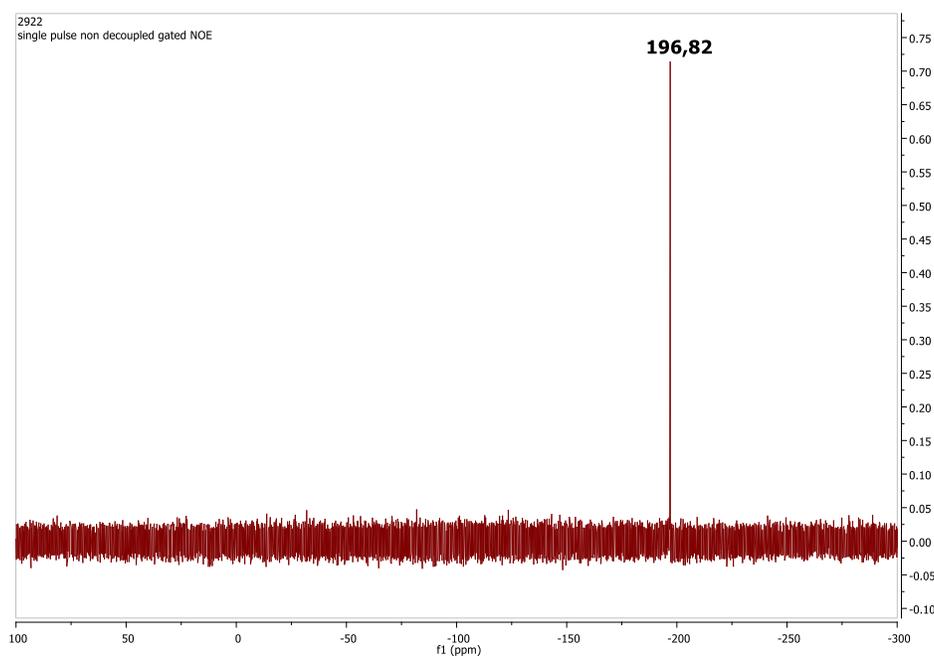
**Figura 21.** Ampliación del espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto organoestaño (IV) (1b).

En la Figura 21 se observan dos señales en 68.76 y 59.14-ppm que corresponden a los carbonos de los dos grupos imino C-6 y C-7 respectivamente, lo que concuerda con la estructura química de (1b).



**Figura 22.** Ampliación del espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto organoestaño (IV) (**1b**).

En la figura 22 se observan las señales correspondientes a los carbonos de los dos grupos metilo de (**1b**).



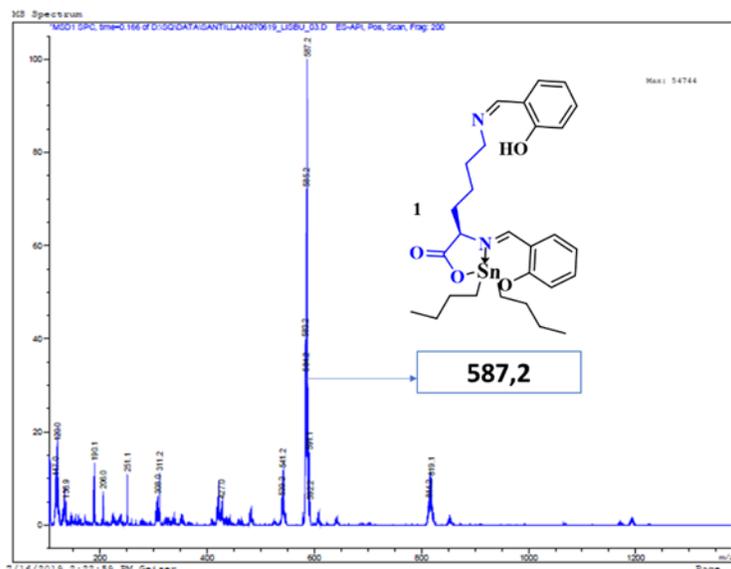
**Figura 23.** Espectro  $^{119}\text{Sn}$ -RMN del compuesto organoestaño (IV) (**1b**).

En la figura 23 se observa la señal en -196.82 ppm característico del átomo de estaño pentacoordinado con los ligandos butilo y el aminoácido, lo que concuerda con la estructura química de (**1b**).

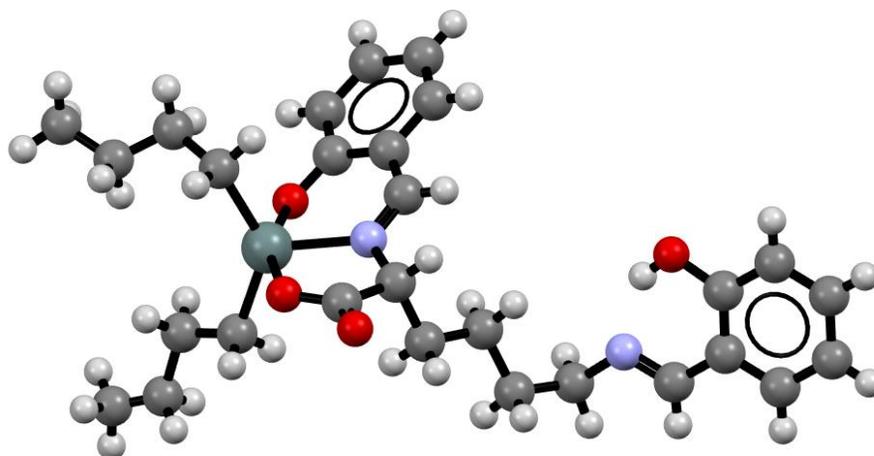
**Tabla 3.** Resumen de la caracterización de (1b) por RMN.

Señal	Grupo	Desplazamiento químico ppm (Multiplicidad)
6H-8/9	CH <sub>3</sub>	0.786 (s), 0.801 (s), 0.816 (s), 0.901 (s), 0.916 (s), 0.930 (s)
18H	CH <sub>2</sub>	1.242 (m), 1.387 (m), 1.525 (m), 1.610 (m), 1.752 (m), 1.912 (m), 2.070 (m)
2H-7	CH <sub>2</sub>	3.587 (m)
H-6	CH	4.033 (t)
2H-2/2'	CH (ar)	7.213-7.194 (d), 7.157-7.133 (d)
2H-3/3'	CH (ar)	7.414 (t), 7.280 (t)
2H-4/4'	CH (ar)	6.849 (t), 6.711 (t)
2H-5/5'	CH (ar)	6.924-6.907 (d), 6.787-6.770 (d)
2H-1/1'	CH Imina	8.306 (s), 8.251 (s)
5C	Cuaternario	173.679 (C=O), 172.198, 169.555, 166.147, 161.198
8C	CH (ar)	137.958, 135.635, 132.274, 1313.305, 122.697, 118.761, 117.396, 117.050
C-6	CH	68.760
C-7	CH <sub>2</sub>	59.149
9C	CH <sub>2</sub>	36.120, 30.443, 27.066, 26.978, 26.768, 26.626, 22.865, 22.423, 21.769
2C	CH <sub>3</sub>	13.690, 13.584
Sn	Sn (IV)	196.82

El análisis de (**1b**) por espectrometría de masas ES- API muestra una señal en 587.2 m/z, que corresponden al ión [M+H]<sup>+</sup>, el cual corresponde a la masa esperada para (**1b**), confirmando los resultados obtenidos en los experimentos de RMN. A partir de (**1b**) se intentó obtener (**1**) mediante hidrólisis acida, sin embargo, no fue posible debido a que el complejo de estaño también fue lábil, hidrolizando el complejo pentacoordinado.

**Figura 24.** Espectro de masas ES-API del compuesto (**1b**)

El compuesto (**1b**) fue cristalizado en solución de EtOH/benceno y se caracterizó por difracción de rayos X, los datos se encuentran en la tabla 4.



**Figura 25.** Estructura compuesto (**1b**)

**Tabla 4.** Datos difracción de rayos X del compuesto **1b**

Propiedad	<b>1b</b>
Formula química	C <sub>28</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Sn
Peso molecular	547.16
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	C 2/c
a (Å)	26.097(3)
b (Å)	10.7720(11)
c (Å)	21.360(2)
a (°)	90.0
b (°)	106.015(3)
c (°)	90.0
Temperatura (K)	296(2)
Volumen (Å) <sup>3</sup>	5771.6(10)
Z	8
Tamaño del cristal	0.15 x 0.11 x 0.09
Intervalo $\theta$ (°)	2.35 a 27.21
Índices	-35 $\leq h \leq$ 35 -14 $\leq k \leq$ 14 -29 $\leq l \leq$ 27
Reflexiones	7926
Reflexiones únicas (R <sub>int</sub> )	3191
Datos/Restricciones/Parámetros	7825 / 0 / 460
Índices R todos los datos	R <sub>1</sub> = 0.1724 wR <sub>2</sub> = 0.0603

Los análisis por difracción de Rayos X muestran que el átomo de estaño está pentacoordinado, el nitrógeno coordina al átomo de estaño con longitud de 2.145(4) Å, la unión de N-C de la base de Schiff se compone por dobles enlaces, los resultados también arrojan que los ángulos de enlace O-Sn-O son de 157.31 grados y para los Bu-Sn-Bu son de 134.5 grados (tabla 5). La disposición de los átomos, su coordinación y geometría están

conforme a los reportados en la literatura para complejos de organoestaño IV derivados de aminoácidos y salicilaldehído. (64,66,67)

Tabla 5. Longitudes de los enlaces de los átomos selectos y Ángulos de enlace del compuesto 1b

Longitud de enlace		Ángulos de enlace	
Átomos	Å	Átomos	Ángulo
Sn1 N5	2.145(4)	N5 Sn1 O3	74.80(15)
Sn1 O3	2.169(4)	O5 Sn1 N5	82.61(14)
Sn1 O5	2.097(4)	O5 Sn1 O3	157.31(14)
Sn1 C17	2.128(8)	O5 Sn1 C17	96.9(3)
Sn1 C19	2.113(7)	O5 Sn1 C19	94.9(2)
N5 C22	1.270(6)	C17 Sn1 N5	109.6(3)
N5 C1	1.488(6)	C17 Sn1 O3	92.7(3)
O2 C24	1.336(7)	C19 Sn1 N5	115.4(3)
O3 C23	1.295(7)	C19 Sn1 O3	92.9(2)
O4 C23	1.200(7)	C19 Sn1 C17	134.5(3)
O5 C16	1.312(6)	C22 N5 Sn1	125.2(3)
C3 N6	1.482(9)	C1 N5 Sn1	115.9(3)
N6 C5	1.258(8)		

### Obtención de los complejos de organoestaño (IV) (2) a (7).

Los complejos de organoestaño (IV) fueron obtenidos de acuerdo con las condiciones relacionadas en la tabla 5. Los compuestos de organoestaño (IV) funcionalizados con los aminoácidos D o L-Aspártico y L-Glutámico fueron obtenidos utilizando el óxido de dibutilestaño (IV) o el óxido de difenilestaño (IV) como ligandos. Estos compuestos fueron caracterizados por FTIR (tabla 6), ya que fueron analizados sin purificar, se buscó correlacionar las señales en IR características al compuesto formado. Siendo las señales más relevantes aquellas que involucraban la formación de la imina proveniente de la formación de la base de Schiff (señal comprendida entre 1670-1615  $\text{cm}^{-1}$ ), adicionalmente se observaron las señales aromáticas en los compuestos coordinados con difenilestaño (3100-3000 $\text{cm}^{-1}$ ) y de manera análoga las señales de los alcanos procedentes de la coordinación con óxido de dibutilestaño (2900-2980  $\text{cm}^{-1}$ ), posteriormente se realizó espectrometría de masas, encontrando señales corresponden al ión  $[M+H]^+$  esperado de cada molécula (anexo 2).

**Tabla 6.** Caracterización IR de los compuestos 3-7

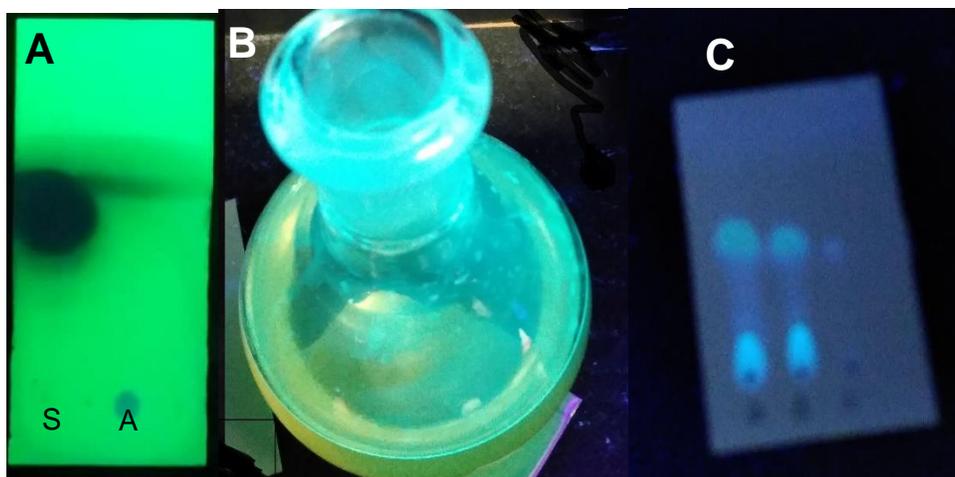
Grupo funcional	FT-IR, Señal cm <sup>-1</sup> / compuesto				
	3	4	5	6	7
Imina	1654	1616	1616	1654	1627
C=O	---	---	---	1800	---
CH <sub>2</sub>	1462	1446	1427	1427	1420
Aromáticos	---	--	3040	3020	---
Cetonas	1735	1735	--	----	---
CH <sub>3</sub>	2958	2958	---	---	2927
O-H	3425	3421	3406	3421	3421

Los compuestos (**3**), (**4**) y (**7**), fueron obtenidos bajo condiciones las experimentales utilizadas para el compuesto **1b**: Los compuestos fueron caracterizados por RMN <sup>1</sup>H, (ver el anexo 1) IR y ES-API. Estos compuestos fueron almacenados a TA en un desecador hasta realizar la purificación.

Para la síntesis de los compuestos **5**, **6** y **8** fue necesario modificar la metodología debido a la baja solubilidad del óxido de difenilestaño, se cambió el sistema de solventes para lograr la disolución completa de todos los reactivos y fue necesario utilizar mayores temperaturas para hacer el reflujo (tabla 7). Estas reacciones fueron monitoreadas mediante TLC y observadas a una longitud de onda de 365 nm, se observó que las reacciones requirieron mayor tiempo. En la figura 25 muestra la mezcla de reacción para la obtención de (**3**), la coloración azul indica la formación del complejo, la figura 25a muestra la placa TLC a tiempo de reacción 0h en la que se observan los reactivos de partida, punto S correspondiente a salicilaldehído y A al aminoácido ácido aspártico, la figura C corresponde es una placa TLC a tiempo final 18h donde se observa la formación de los productos.

**Tabla 7.** Compuestos de organoestaño (IV) sintetizados por la estrategia II.

Compuesto	Condiciones	Rendimiento (%)	EM, m/z [M+H] <sup>+</sup>		Aspecto
(1b)	(i)L-Lys-OH, Salicilaldehído, dibutilestaño (IV), Benceno/EtOH (4:1 v/v), Reflujo por 5h a >90°C	72	587,2	585,3	Sólido amarillo oscuro
(2)	(i)L-Cys-OH/Salicilaldehído, dibutilestaño (IV), Benceno/EtOH (4:1 v/v), Reflujo por 8h a >90°C	--	--	457,1	Sólido Marrón
(3)	(i)L-Asp-OH/Salicilaldehído, dibutilestaño (IV), Benceno/EtOH (4:1 v/v), Reflujo por 8h a >90°C	71	470,0	468,1	Sólido Naranja
(4)	(i)D-Asp-OH/Salicilaldehído, dibutilestaño (IV), Benceno/EtOH (4:1 v/v), Reflujo por 8h a >90°C	52	469,8		Sólido Naranja
(5)	(i)L-Asp-OH/Salicilaldehído, difenilestaño (IV), Tolueno/MeOH (5:1 v/v), Reflujo por 18h a >90°C 4:1	84	510,0	508,0	Sólido Blanco hueso
(6)	(i)D-Asp-OH/Salicilaldehído, difenilestaño (IV), Tolueno/MeOH (5:1 v/v), Reflujo por 18h a >90°C 4:1	43	509,6		Sólido Blanco hueso
(7)	i)L-Glu-OH/Salicilaldehído, dibutilestaño (IV), Benceno/MeOH (4:1 v/v), Reflujo por 8h a >90°C 4:1	82	484,1	482,2	Sólido blanco
(8)	i)L-Glu-OH/Salicilaldehído, difenilestaño (IV), Tolueno/MeOH (5:1 v/v), Reflujo por 18h a >90°C 4:1	76	522,0	522,1	Sólido amarillo



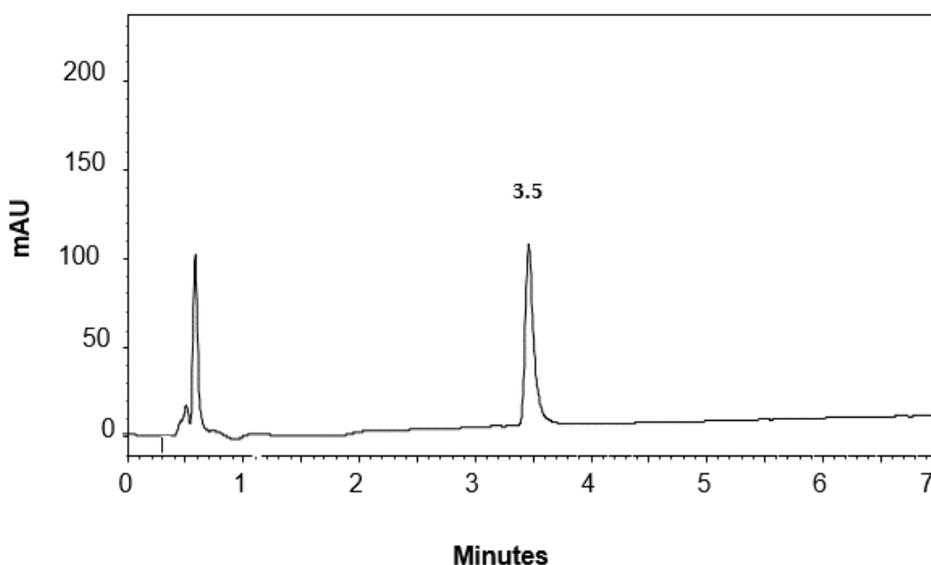
**Figura 26.** Monitoreo de la reacción para el complejo de organoestaño IV (**3**) A) TLC reactivos de partida Tiempo cero B) Mezcla de reacción fluorescente después de 18h de reacción indicando la formación del compuesto C). Mezcla de reacción dos productos y un producto con baja migración y TLC tiempo 8h C.

Para el compuesto (**2**), se obtuvo un sólido marrón que corresponde a compuesto pentacoordinado según el espectro RMN  $^{119}\text{Sn}$ , sin embargo, no se pudo asignar las señales del espectro de  $^1\text{H}$  RMN, y el análisis por espectrometría de masas no se observó el ión  $[\text{M}+\text{H}]^+$  esperado. Sugiriendo que no fue posible obtener el compuesto (**2**)

### Purificación de los compuestos de Organoestaño IV

La purificación de estos complejos de organoestaño (IV), fue realizada en forma similar a la descrita para (**1b**), sin embargo, se observó que la mayoría de los complejos de organoestaño (IV) se adsorbieron irreversiblemente a la celita, luego se utilizó sílice observándose el mismo fenómeno y por último se intentó con alúmina en la cual los complejos de organoestaño (IV) también se adsorbieron irreversiblemente. Lo anterior se puede explicar, teniendo en cuenta que (**1b**) es un compuesto de organoestaño disustituido por lo que no tiene grupos polares reactivos libres que interactúen electrostáticamente con los sitios polares de la celita, sílice o alúmina. Mientras que los compuestos de organoestaño (IV) monosustituidos (**3**) al (**8**) poseen grupos polares reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos empleados (Asp y Glu) que interactúan fuerte e irreversiblemente con los grupos polares de la celita (grupos aluminato), sílice (grupos silanol) o alúmina (grupos hidroxilo). Debido a esta situación se diseñó una metodología

alterna basada en la solubilidad y afinidad del salicilaldehído y el compuesto de organoestaño (IV) en medios acuosos y solventes orgánicos. Para esto el compuesto de organoestaño IV fue disuelto en DCM, se realizó una extracción líquido-líquido con una solución acuosa de KOH pH=10. La extracción líquido-líquido, permitió extraer el compuesto organometálico, asegurando la desprotonación del grupo carboxilo de la cadena lateral de los aminoácidos, haciendo el complejo más polar e incrementando su solubilidad en el medio acuoso. El salicilaldehído es el mayor contaminante en la mezcla de reacción, el cual tiene afinidad por el medio orgánico. Se requirieron de 5 a 7 extracciones con la solución acuosa para retirar completamente el organoestaño IV de la fase orgánica. La purificación fue monitoreada por TLC, visualización en cámara UV a 254 y 365 nm y se realizaron análisis por cromatografía RP-HPLC.



**Figura 27.** Perfil cromatográfico de la fracción acuosa después de la extracción líquido-líquido del compuesto (**3**) con  $T_r = 3.5$  min.

Luego la solución acuosa conteniendo el complejo de organoestaño (IV) fue congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  y liofilizada obteniéndose el sólido. El compuesto liofilizado es obtenido en forma de sal, sin embargo, para las posteriores reacciones no fue necesario neutralizarlo. El análisis cromatográfico se realizó disolviendo el compuesto en la fase móvil (TFA al 0,05% en agua).

En el caso de las reacciones en las que se utilizó tolueno en el medio de reacción, se observó que en el proceso de rotaevaporación, el tolueno arrastró el salicilaldehído, facilitando el proceso de purificación. Luego del proceso de purificación los compuestos de organoestaño (IV) obtenidos fueron almacenados en la oscuridad y en desecador.



Figura 28. Muestra del sólido obtenido para el compuesto (5)

### Resumen capítulo I

- Se evaluaron diferentes rutas sintéticas para la obtención de conjugados organometálicos de estaño IV conjugados con L- Lisina, L-cisteína, L y D- Ácido Aspártico y L Ácido glutámico.
- Se evidencio que la reacción en un solo paso fue la estrategia óptima para obtener los complejos de organoestaño IV
- Se establecieron dos estrategias para la purificación para los compuestos de organoestaño IV, obteniéndolos con altas purezas.
- Se obtuvieron y caracterizaron 7 complejos organoestaño IV. Siendo 4 de estos no reportados en la literatura consultada al momento de redactar este documento

- Los resultados obtenidos muestran que fue posible diseñar e implementar las metodologías de síntesis y purificación de complejos Estaño IV- aminoácido polar, lo que nos permitió contestar la primera parte de la pregunta de investigación: ¿Es viable sintéticamente en cuanto a facilidad de síntesis, rendimientos y pureza: i) obtener complejos Estaño IV- aminoácido polar?
- Los resultados obtenidos en este capítulo dan cumplimiento al primer objetivo específico: Sintetizar y caracterizar bloques tipo organoestaño IV utilizando L o D aminoácidos.

**Conclusión:**

Es viable sintéticamente en cuanto a facilidad de síntesis, rendimientos y pureza obtener conjugados organometálicos de estaño IV utilizando los aminoácidos L- Lisina, L-cisteína, L y D- Ácido Aspártico y L Ácido glutámico y los óxidos de dibutilestaño o difenilestaño, mediante la reacción en un solo paso vía la formación de la base de Schiff.

## 3. Capítulo II. Péptidos Organometálicos con Ferroceno.

### 3.1 Metodología

#### 3.2 Obtención de péptidos y péptidos organometálicos

**Síntesis de los péptidos.** A través de la SPPS usando la estrategia Fmoc/tBu se obtuvieron los péptidos y POMs derivados de la LfcinB, siguiendo la metodología implementada en el laboratorio del grupo de investigación SAMP. El proceso general se dividió en las etapas que se describen a continuación (Figura 29):

**Adecuación de la resina y remoción del grupo Fmoc para la desprotección del grupo alfa amino.** La resina Rink Amide (100 mg; 0,46 meq/g) fue hinchada por tratamiento con DMF por 8 h, con AC a TA. La eliminación del grupo Fmoc se realizó tratando la resina o resina-péptido con 4-metilpiperidina al 2,5% en DMF por 15 min a TA (3 x 1 min). Luego la solución fue eliminada por filtración y la resina o resina-péptido fue lavada con DMF (6x1 min) y DCM (3x1 min). Luego se realizó el monitoreo de la reacción mediante el test de Kaiser.

**Reacción de activación de los Fmoc-aminoácidos y acople del aminoácido a la resina.** La preactivación se realizó mezclando Fmoc-aminoácido/DCC/6-Cl-HOBt (1:1:1 equiv; 5 excesos respecto a los mEq de resina) en DMF con AC a TA. Luego la mezcla de reacción fue adicionada a la resina o resina-péptido y se dejó en reacción por 4 +/- 1 h con AC a TA. La solución de acople se retiró mediante filtración y la resina-péptido fue lavada con DMF (3x1 min) y DCM (3x1 min). Luego se realizó el monitoreo de la reacción mediante el test de Kaiser. Si la prueba fue positiva (coloración azul) se repite el procedimiento descrito anteriormente para el acople de los aminoácidos hasta prueba negativa del test de Kaiser (coloración amarilla).

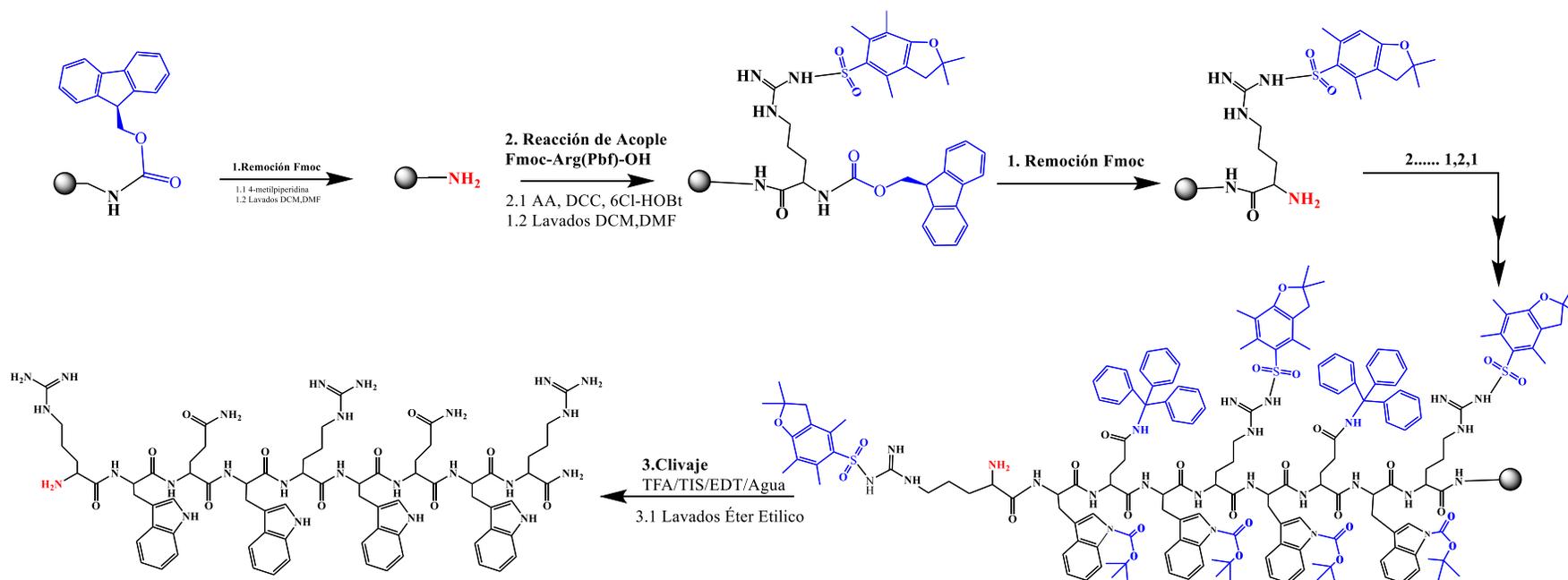


Figura 29. Diagrama de la síntesis del péptido RWQWRWQWR utilizando SPPS y la estrategia Fmoc/tBu.

**Reacción de monitoreo o test de Káiser.** Para realizar el test de Kaiser se prepararon las siguientes soluciones: (S1): 40 g de Fenol disueltos en 10 mL de etanol absoluto (EtOH). (S2): 65 mg de KCN disueltos en 100 mL de agua. (S3): 1 mL de S2 fue diluido con piridina hasta 50 mL. (S4): Se mezcló S1 y S3 (1:10 v/v) (S5): 1,25 g de ninhidrina disueltos en 25 mL de EtOH. Para realizar la prueba, se tomó una fracción de la resina-péptido seca (aproximadamente 1-3 mg) y se adicionó las soluciones S4 y S5 (2:1; v/v), se mezcló y se calentó a 96°C por 5 min, y se observó la coloración.

**Reacción de remoción de las cadenas laterales y desanclaje del péptido del soporte sólido.** La reacción de desprotección de las cadenas laterales y separación del péptido de la resina se realizó tratando la resina-péptido seca con el cóctel de clivaje que contenía TFA/agua/TIS/EDT (93/2/2.5/2.5 v/v) por 8-18 h con AC a TA. El péptido crudo se obtuvo por precipitación con éter etílico frío, luego el péptido crudo fue lavado con éter etílico y centrifugado por 5 min a 3000 rpm y el sobrenadante descartado (5x). Finalmente, el sólido obtenido se dejó a TA hasta sequedad.

**Incorporación del ácido ferroceno Carboxílico.** La síntesis de los péptidos funcionalizados con ferroceno se llevó a cabo por SPPS usando la estrategia Fmoc/tBu, como fue descrito anteriormente. Para la funcionalización de los péptidos con ferroceno, el ácido ferroceno carboxílico (Fc-COOH) fue incorporado en el extremo N-terminal de la cadena peptídica. Para determinar las condiciones óptimas de la incorporación del Fc-COOH a la cadena peptídica se evaluaron las siguientes estrategias de acople:

i. Método de las carbodiimidas. La incorporación del Fc-COOH a la cadena peptídica se realizó en concordancia con (119) con algunas modificaciones. (a) El Fc-COOH y DCC, (1:1; 3 excesos respecto a los mEq de resina) fueron disueltos en DMF, y la mezcla de reacción se dejó en AC a TA por 15 min. Después, la mezcla de reacción se adicionó a la resina-péptido y se dejó en reacción por 4 h con AC a TA. Luego se eliminó la mezcla de reacción por filtración y se realizaron varios lavados con DMF (3x 1 min) y DCM (3x 1 min). Luego la reacción se monitoreó mediante el test de Kaiser, en el caso donde la prueba fuese positiva, se procedía a repetir el procedimiento descrito. (b) El Fc-COOH y DIC, (1:1; 3 excesos respecto a los mEq de resina) fueron disueltos en DMF, y la mezcla de reacción se

dejó en AC a TA por 15 min. Después, la mezcla de reacción se adicionó a la resina-péptido y se dejó en reacción por 4 h con AC a TA. Luego se eliminó la mezcla de reacción por filtración y se realizaron lavados con DMF (3x 1 min) y DCM (3x 1 min). Luego la reacción se monitoreó mediante el test de Kaiser, si la prueba fue positiva entonces se repitió el procedimiento descrito.

ii. Método de las sales de Uronio. La incorporación del Fc-COOH a la cadena peptídica se realizó de acuerdo con la referencia (118) con algunas modificaciones. El Fc-COOH y TBTU (3 excesos respecto a los mEq de resina) fueron disueltos en DMF y la mezcla de reacción fue puesta en AC y TA por 5 min. Luego se adicionó DIPEA (9 excesos respecto a los mEq de resina) y se dejó en AC a TA por 10 min. Luego la mezcla de reacción fue adicionada a la resina-péptido y se dejó por 4h en AC a TA. Después, se eliminó la mezcla de reacción por filtración y se hicieron varios lavados con DMF (3x 1 min) y DCM (3x 1 min). Una vez finalizado, la reacción se monitoreó mediante el test de Kaiser, si la prueba fuese positiva entonces se repitió el procedimiento descrito.

### **Caracterización de los péptidos:**

La caracterización de los péptidos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida en fase reversa RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF.

**Caracterización por Cromatografía RP-HPLC.** La caracterización de los péptidos fue realizada de la siguiente manera. El péptido crudo o purificado (10  $\mu$ L; 1 mg/mL) fue inyectado en un cromatógrafo Agilent serie 1200 utilizando el siguiente sistema cromatográfico: columna monolítica Chromolith® C18 (50x4,6 mm), lectura a 210 nm, elución por gradiente del 5/50% de solvente B (0,05% de TFA en ACN) en 17 min, temperatura ambiente y flujo de 2 mL/min, solvente A (0,05% de TFA en H<sub>2</sub>O).

**Purificación por extracción en fase sólida (SPE).** La purificación de los péptidos se llevó a cabo mediante el método de extracción en fase sólida (SPE) de acuerdo con lo descrito en la referencia (120) presentando algunas modificaciones. Columnas SPE (LC-18, 1 g y tamaño de partícula 40-60  $\mu$ m) fueron activadas y equilibradas de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. El péptido fue disuelto en el solvente A (100 mg/mL) y

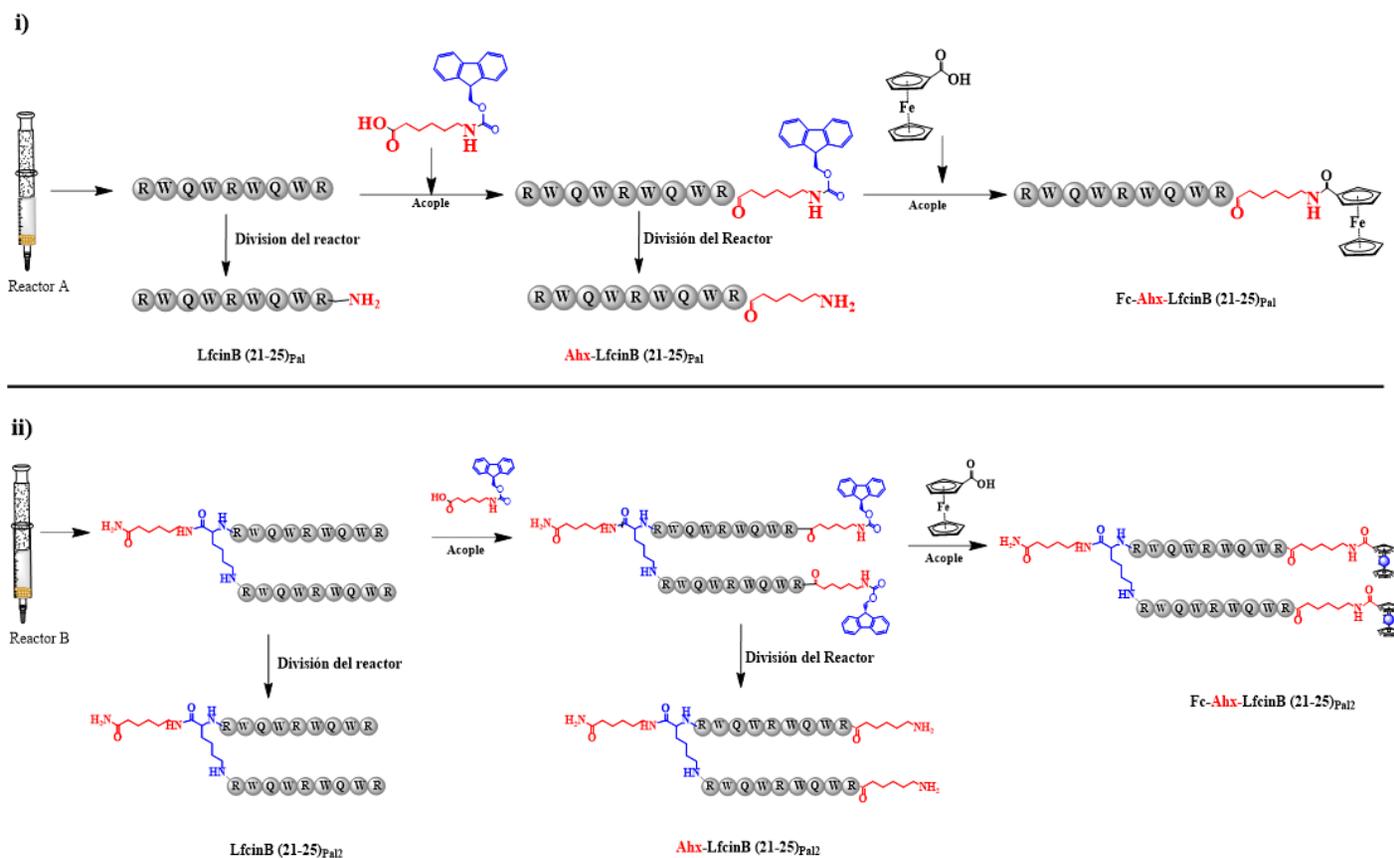
cargado en la columna, luego se realizó elución del péptido utilizando un gradiente creciente de solvente B (0-50%). Las fracciones obtenidas fueron analizadas por cromatografía RP-HPLC y las fracciones que contenían el péptido puro fueron colectadas y liofilizadas.

**Espectrometría de masas.** Los péptidos fueron analizados por espectrometría de masas MALDI-TOF MS en un espectrómetro de masas Ultra Flex III TOF-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) en modo reflectrón, utilizando un objetivo de acero pulido MTP384 (Bruker Daltonics). El péptido (1 mg/mL) fue mezclado con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (1 mg/mL) en una relación 18:2,5 v/v. La mezcla se aplicó sobre la placa porta muestra y se dejó secar para su lectura. La potencia del láser se estableció entre 2700 y 3000 V.

### **3.3 Resultados y Discusión**

#### **3.3.1 Síntesis de péptidos y péptidos Organometálicos**

En este trabajo se sintetizaron, purificaron y caracterizaron 6 péptidos derivados de la secuencia palindrómica RWQWRWQWR empleando la estrategia SPPS- Fmoc/tBu. Estas secuencias, fueron diseñadas con el propósito de establecer la mejor metodología de obtención de péptidos monoméricos y diméricos derivados de esta secuencia funcionalizados con ferroceno. La síntesis se realizó utilizando dos reactores (Figura 40); reactor 1 (péptidos monoméricos) y reactor 2 (péptidos diméricos), esto con el objetivo de: i) facilitar la síntesis, ii) garantizar la homogeneidad en los productos finales, (iii) evaluar el efecto de la incorporación de dos moléculas no naturales a la cadena peptídica (Ahx y Ferroceno) y (iv) reducir costos y mitigar el impacto ambiental.



**Figura 30.** Diseño experimental para la síntesis de péptidos monomérico y diméricos. i) Arriba se observa un solo reactor que contiene 450 mg de resina, en el cual se anclaron los Fmoc-aminoácidos hasta completar la secuencia obteniendo RWQWRWQWR-Resina, luego se retiró del reactor la tercera parte de la resina-péptido para obtener el péptido LfcinB (21-25)<sub>Pal1</sub>. Luego se prosiguió la síntesis en el reactor uniendo el Ahx para obtener Ahx-RWQWRWQWR-Resina y se retiró del reactor la mitad de la resina péptido para obtener el péptido Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal1</sub>. Luego con el péptido-resina remanente en el reactor se unió el Fc-COOH para obtener Fc-Ahx-RWQWRWQWR-Resina que luego permitió obtener el péptido Fc-Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal1</sub>. ii) Abajo se observa un solo reactor que contiene 450 mg de resina, en el cual se anclaron los Fmoc-aminoácidos hasta completar la secuencia obteniendo (RWQWRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx-Resina, luego se retiró del reactor la tercera parte de la resina-péptido para obtener el péptido dimérico LfcinB (21-25)<sub>Pal2</sub>. Luego se prosiguió la síntesis en el reactor uniendo el Ahx para obtener (Ahx-RWQWRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx-Resina y se retiró del reactor la mita de la resina-péptido para obtener el péptido Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal1</sub>. Luego con el péptido-resina remanente en el reactor se unió el Fc-COOH para obtener el péptido (Fc-Ahx-RWQWRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx-Resina que permite obtener Fc-Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal1</sub>.

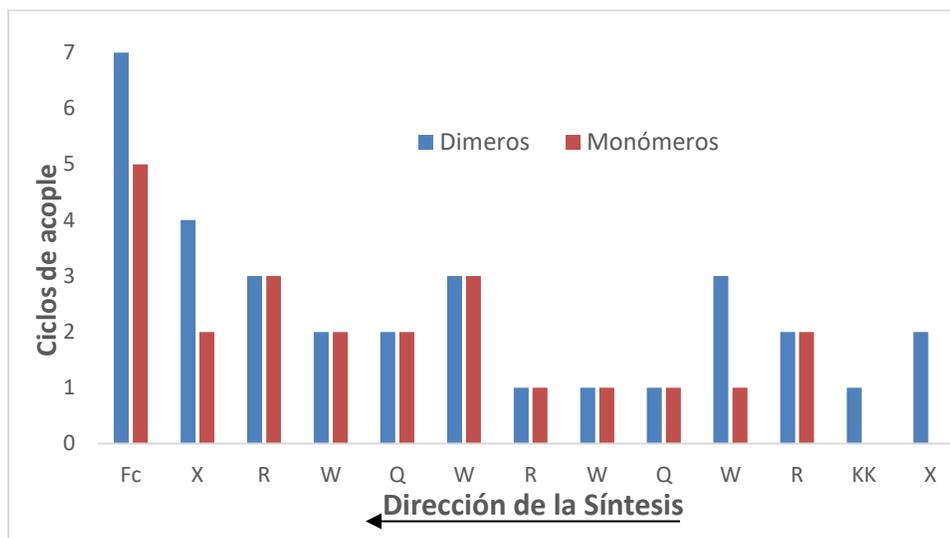


- **Síntesis de péptidos**

En la síntesis de péptidos por SPPS, algunos autores sugieren que la dificultad en los acoplos de los aminoácidos a la cadena peptídica está principalmente mediada por el impedimento estérico y a su vez este efecto puede verse más notorio al incrementar la longitud de la cadena(48,49,121). En la Figura 31 se muestra el número de ciclos de reacción necesarios para la incorporación completa de cada aminoácido, Ahx o Fc en la secuencia, donde el péptido fue sintetizado desde el extremo C terminal al N terminal. El número de ciclos de reacción de acople está directamente relacionado con la dificultad de acople del aminoácido activado a la cadena peptídica, siendo esta dificultad mayor en los últimos acoplos.

Durante la SPPS- Fmoc/tBu se requiere incorporar los Fmoc-aminoácidos a la cadena peptídica anclada al soporte sólido, lo que requiere que la incorporación del Fmoc-aminoácido sea completa, si no se obtendrán péptidos deleccionados lo que puede causar bajos rendimientos, gran cantidad de especies no deseadas, lo que conlleva a obtener productos de menor pureza y gran dificultad en el proceso de purificación.

Por lo anterior la SPPS requiere que se utilicen excesos de reactivos para que las reacciones se completen en el menor tiempo posible. Luego de hacer la reacción de acople se espera que todos los grupos aminos libres de la cadena peptídica creciente anclado al soporte sólido reaccionen con el grupo carboxilo del Fmoc-aminoácido que se desea incorporar, por lo que el test de Kaiser será negativo (coloración amarilla). Cuando el test de Kaiser es positivo (coloración azul) indica la existencia de grupos aminos libres sobre la cadena peptídica anclada al soporte sólido, indicando que se requiere hacer nuevamente la reacción. Para realizar esta segunda reacción se pesa nuevamente los reactivos y se pre-activa el Fmoc-aminoácido (formación del éster reactivo) como está descrito en la metodología. El aminoácido pre-activado se adiciona a la resina-péptido y se deja en reacción, luego se filtra la solución y la resina-péptido es lavada. Nuevamente se realiza el test de kaiser, si la prueba es negativa indica que la reacción fue completa, pero si el test es positivo indica la presencia de grupos aminos libres, teniendo que llevar a cabo el procedimiento nuevamente hasta que la incorporación del Fmoc-aminoácido sea completa.



**Figura 31.** Ciclos de la reacción de acople de los Fmoc-aminoácidos requeridos para la síntesis de los péptidos monoméricos y dimericos

Por lo tanto, el número de ciclos de reacción de acople indica el número de veces que se repitió la reacción de acoplamiento, en este documento se define como ciclo de reacción de acople. Se puede observar que para los aminoácidos resaltados en negro y subrayados (**<sup>1</sup>RWQWRWQWR<sup>9</sup>**) se requirieron el mismo número de ciclos de reacción de acople tanto para la síntesis del monómero y del dímero, sugiriendo que el proceso sintético del dímero que involucra la incorporación de estos aminoácidos no se ve afectado. Los resultados muestran que la síntesis de péptidos monoméricos, la reacción de acoplamiento del Fmoc-Trp (OtBu)-OH (<sup>2</sup>W) y Fmoc-Ahx-OH (<sup>10</sup>Ahx) requirió menor número de ciclos de reacción que para la síntesis de péptidos diméricos, lo que sugiere que la incorporación de estos aminoácidos podría verse afectada por la creciente cadena doble y el hecho de que el último aminoácido anclado a la cadena péptido-resina fue Fmoc-Arg(pbf)-OH el cual posee un grupo protector voluminoso en la cadena lateral.

En la síntesis de los dímeros, los aminoácidos que presentaron la mayor dificultad para ser incorporados en la cadena peptídica fueron los residuos <sup>9</sup>R, <sup>2</sup>W y <sup>6</sup>W, ya que requirieron tres ciclos de reacción de acople. Los aminoácidos <sup>8</sup>W, <sup>7</sup>Q y <sup>1</sup>R necesitaron dos ciclos de reacción de acople mientras los demás solo requirieron un ciclo de reacción de acople.

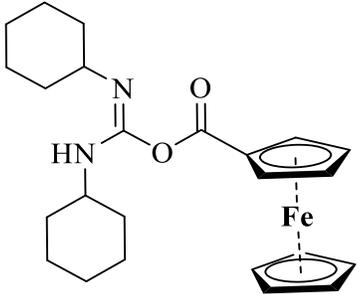
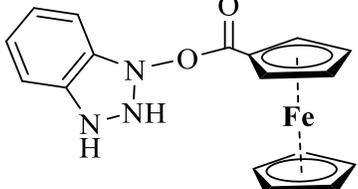
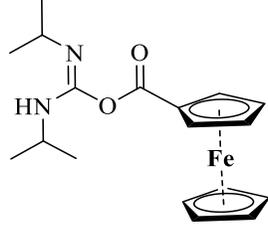
Si se observa el comportamiento del número de ciclos de reacción de acople en los monómeros y dímeros, se evidencia que se requirieron el mismo número de ciclos para la

incorporación de Fmoc-Arg (Pbf)-OH en las posiciones <sup>1</sup>R, <sup>5</sup>R y <sup>9</sup>R, Fmoc-Gln (OtBu)-OH en las posiciones <sup>3</sup>Q y <sup>7</sup>Q, y Fmoc-Trp (OtBu)-OH en las posiciones <sup>4</sup>W, <sup>6</sup>W y <sup>8</sup>W, lo que sugiere que la doble cadena involucrada en la síntesis de dímeros no afectó la incorporación de estos aminoácidos.

La dificultad de incorporación de los aminoácidos a la cadena peptídica durante la SPPS radica principalmente en el impedimento estérico, que ocurre cuando el aminoácido que se desea unir y el aminoácido unido en el extremo de la cadena en crecimiento poseen grupos voluminosos en su cadena lateral. La Fmoc-Arg(Pbf)-OH es una molécula voluminosa ya que el grupo protector del grupo guanidino es el Pbf (2,2,4,6,7-penta-metil-dihidrobenzofurano-5-sulfonilo), mientras que el Fmoc-trp(OtBu)-OH tiene en su cadena lateral un grupo indol el cual es voluminoso y de naturaleza aromática (122)(123) (49). En términos generales se puede evidenciar que la síntesis del péptido monomérico y dimérico no presentaron dificultad y la síntesis no presentó grandes dificultades.

La mayor dificultad en la síntesis de los péptidos monoméricos y diméricos se observó en el acople de las moléculas de naturaleza no proteica como el Fmoc-Ahx y Fc-COOH. Para la incorporación del Fc-COOH durante la síntesis por SPPS del péptido monomérico y dimérico se requirieron 5 y 7 ciclos de reacción de acople respectivamente. Lo anterior incrementó significativamente tanto el costo como el tiempo de la síntesis, ya que cada ciclo de reacción consume Fc-COOH, reactivos de acople y solventes. En busca de optimizar el acople del Fc-COOH a la cadena peptídica palindrómica durante la SPPS se evaluaron tres diferentes estrategias de acople: éster simple (DCC/Fc-COOH, 3:3 equivalentes respecto a la sustitución de la resina, 4h), éster modificado (TBTU/Fc-COOH/DIPEA, 3:3:15 equivalentes respecto a la sustitución de la resina, 4h) y éster simple con DIC (DIC/Fc-COOH, 3:3 equivalentes respecto a la sustitución de la resina, 4h) (tabla 8).

**Tabla 8.** ciclos de acople necesarios para incorporar el motivo organometálico a los péptidos Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub> y Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal2</sub>.

Ester activo del Fc-COO-X	Condiciones experimentales
<p style="text-align: center;"><i>DCC</i></p> 	<p><b>Primer ciclo de reacción</b> Fc-COOH/DCC (1:1 equiv; 3 excesos respecto a la sustitución de la resina), DMF, 4h, AC, TA</p> <p><b>Segundo ciclo de reacción</b> Fc-COOH/DCC (1:1 equiv; 3 excesos respecto a la sustitución de la resina), DMF/DCM (1:1 v/v), 4h, AC, TA</p>
<p style="text-align: center;"><i>TBTU</i></p> 	<p><b>Tercer ciclo de reacción</b> Fc-COOH/TBTU/DIPEA (1:1:5 equiv, 3 excesos respecto a la sustitución de la resina), DMF/4h, AC, TA</p> <p><b>Cuarto ciclo de reacción</b> Fc-COOH/TBTU/DIPEA (1:1:5 equiv, 3 excesos respecto a la sustitución de la resina), 1:1 v/v DMF/DCM 4h, AC, TA</p>
<p style="text-align: center;"><i>DIC</i></p> 	<p><b>Quinto ciclo de reacción</b> Fc-COOH/DIC (1:1 equiv, 3 excesos respecto a la sustitución de la resina), DMF/4h, CA, TA</p> <p><b>Sexto ciclo de reacción</b> Fc-COOH/DIC (1:1equiv, 3 excesos respecto a la sustitución de la resina), DMF/DCM (1:1 v/v), 4h, AC, TA</p> <p><b>Séptimo ciclo de reacción</b> Fc-COOH/DIC (1:1 equiv, 3 excesos respecto a la sustitución de la resina), DMF/DCM/Tritón X-100 (1:1:0,2 v/v), 4h, AC, TA</p>

Para la incorporación del Fc-COOH se requirió realizar 7 ciclos de reacción de acople; el primer ciclo de reacción se utilizó como solvente DMF para disolver los reactivos, sin embargo, cuando la reacción no fue completa se utilizó la mezcla DCM/DMF con el objetivo de hinchar de permitir que la resina se hinche por la menor polaridad que confiere el DCM y así facilitar el acceso a los sitios reactivos en la péptido-resina. Debido a que no se observó un cambio apreciable del test de Kaiser (azul) se realizó el tercer ciclo de reacción con sales de uronio (TBTU), esta metodología permite la formación del éster activo de una manera

más rápida facilitando la reacción de acoplamiento, sin embargo los resultados del test de Kaiser indicaban que no se había completado la reacción por lo que fue necesario hacer uso de la carbodiimida (DIC) que es menos voluminosa y que puede facilitar el acceso a los sitios reactivos. El último recurso requerido para que la reacción de acople del Fc-COOH fuera completa se utilizó TritónX-100 que es un tenso activo que promueve la desagregación de las cadenas facilitando el acceso a los sitios reactivos.

En cuanto a las reacciones de desprotección, en reportes previos referentes a la síntesis de este péptido y otros péptidos lineales derivados de LfcinB, se trató la resina o el péptido-resina con una solución de desprotección de 4-metil piperidina al 2.5% en DMF durante 15 minutos a TA (3x), esta estrategia demostró ser eficaz para eliminar el grupo Fmoc de manera similar a otras metodologías que utilizan concentraciones entre el 20 y el 100% de piperidina o 4-metil piperidina en DMF. Con base a estos informes, se seleccionó 2,5% de 4-metil piperidina en DMF durante 15 minutos a T.A (3x) como punto de partida para la reacción de eliminación de Fmoc. Los resultados mostraron un comportamiento similar para todos los aminoácidos de la secuencia, mientras que para la desprotección del Fmoc-Ahx-péptido-resina la coloración de la solución del test de Kaiser fue más tenue comparada con los otros aminoácidos. Para los péptidos funcionalizados con ferroceno no fue necesario realizar la reacción de desprotección ya que esta molécula no posee el grupo Fmoc.

- ***Desanclaje del soporte sólido y desprotección de las cadenas laterales***

Una vez se acoplaron todos los Fmoc-aminoácidos y el Fc-COOH a la cadena creciente, se obtuvieron los siguientes productos (i) Ahx-R(Pbf)-W(OtBu)-Q(OtBu)-W(OtBu)-R(Pbf)-W(OtBu)-Q(OtBu)-W(OtBu)-R(Pbf)-resina, (ii) R(Pbf)-W(OtBu)-Q(OtBu)-W(OtBu)-R(Pbf)-W(OtBu)-Q(OtBu)-W(OtBu)-R(Pbf)-resina, (iii) Fc-Ahx-R(Pbf)W(OtBu)Q(OtBu)W(OtBu)R(Pbf)W(OtBu)Q(OtBu)W(OtBu)R(Pbf)-resina, (iv) [R(Pbf)W(OtBu)Q(OtBu)W(OtBu)R(Pbf)W(OtBu)Q(OtBu)W(OtBu)R(Pbf)]<sub>2</sub>-K(Trt)-Ahx-resina, (v) [Ahx-R(Pbf)W(OtBu)Q(OtBu)W(OtBu)R(Pbf)W(OtBu)Q(OtBu)W(OtBu)R(Pbf)]<sub>2</sub>-K(Trt)-Ahx-resina y (vi) [Fc-Ahx-

R(Pbf)W(OtBu)Q(OtBu)W(OtBu)R(Pbf)W(OtBu)Q(OtBu)W(OtBu)R(Pbf)]<sub>2</sub>-K(Trt)-Ahx-resina.

El siguiente paso fue desanclar el péptido de la resina y eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales. Estos procesos se realizan simultáneamente debido a que el enlace entre el péptido-resina como también el enlace de los grupos protectores de las cadenas laterales son lábiles a condiciones ácidas. Por lo anterior los productos péptido-resina fueron tratados con una solución ácida que contienen TFA al 92,5% (v/v), y moléculas nucleofílicas (“scavenger”) que son agua 2,5%, TIS 2,5% y EDT 2,5% (v/v) los cuales reaccionan con los carbocationes generados por la desprotección de los grupos protectores (Pbf, OtBu y Trt) y evitar que estos carbocationes reaccionen de manera irreversible con algunas cadenas laterales desprotegidas del péptido (123) Figura 32.

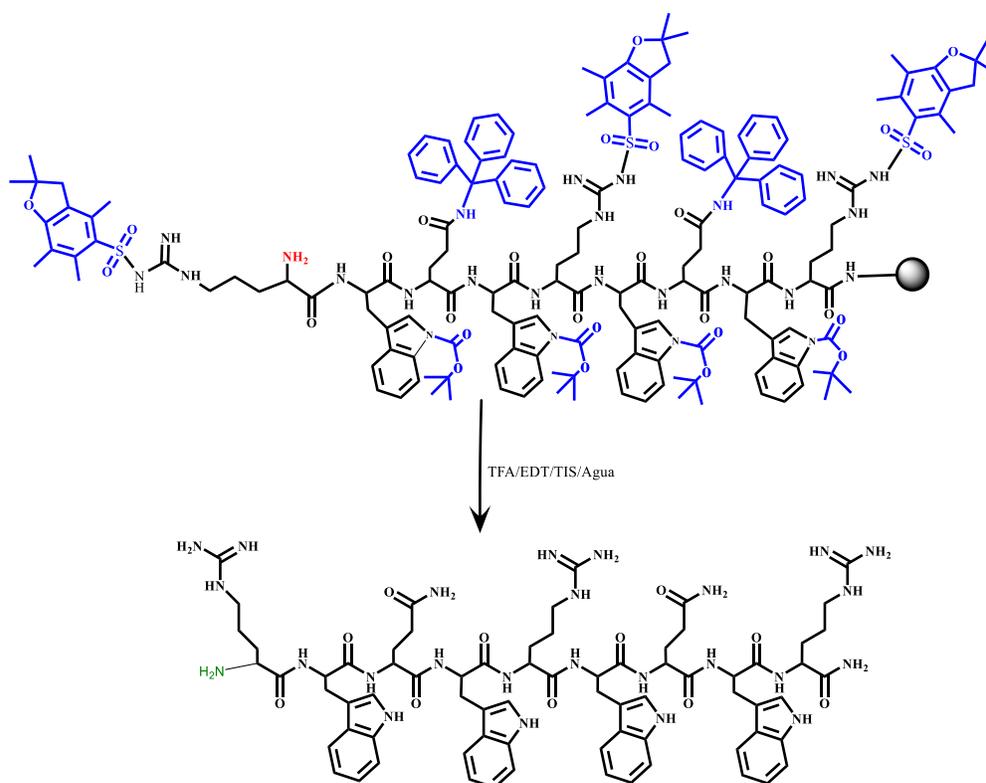
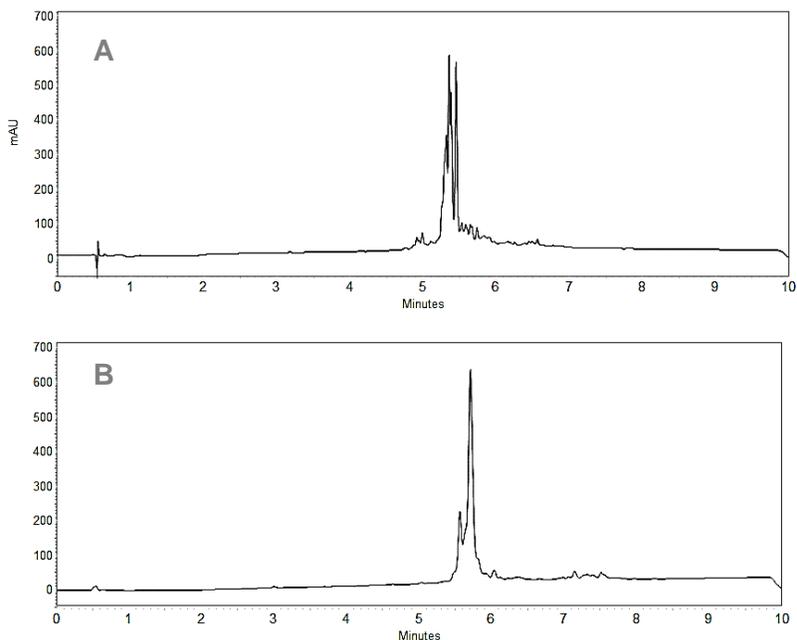


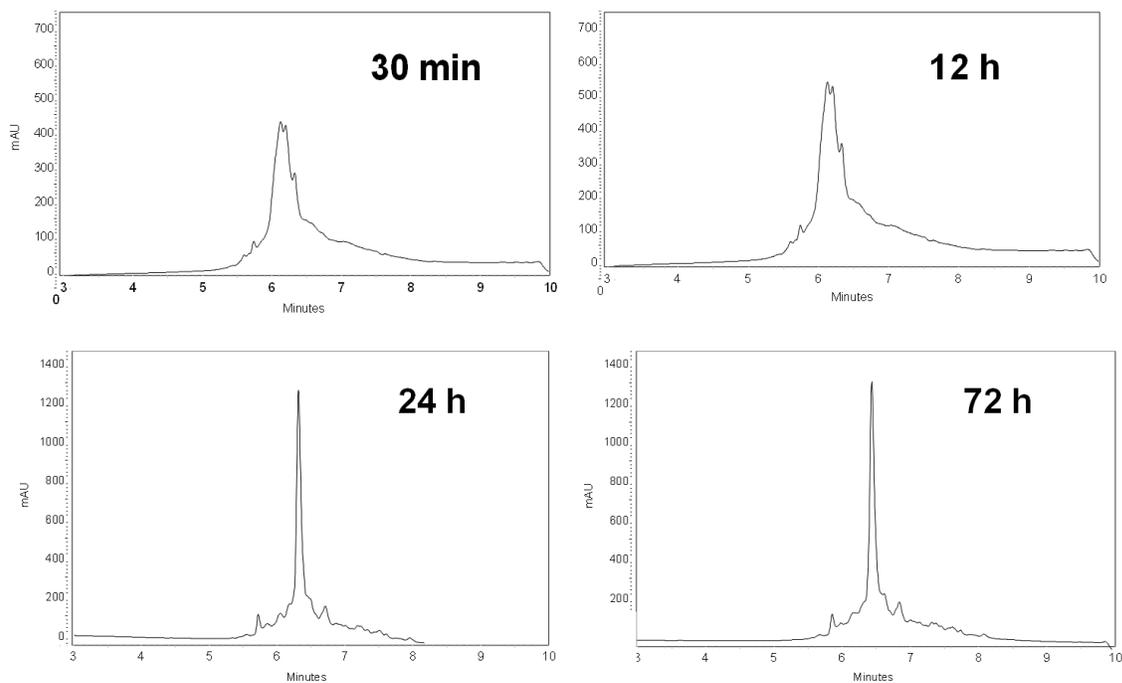
figura 32. Proceso de desanclaje del péptido LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub>.

La concentración de TFA garantiza que todos los grupos protectores sean removidos y se logre la separación del péptido del soporte sólido. Se ha establecido que el grupo protector

Pbf de la cadena lateral de la Arg, requiere como mínimo 4h de reacción para que sea completamente removido. Debido a que estas secuencias contienen varios residuos de Arg, se debe establecer un tiempo óptimo de reacción para asegurar que las cadenas laterales de todos los residuos de Arg sean desprotegidos, en este contexto se evaluaron diferentes tiempos de reacción (4, 8, 12, 16, 24 y 48 h) y se estableció que el tiempo óptimo para esta reacción del péptido LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub> fue de 8 h de reacción. Para la reacción de clivaje del péptido monomérico se utilizó una relación entre el peso de péptido-resina y el volumen de solución de TFA, 1:10 (p/v) este parámetro fue establecido en trabajos anteriores en el grupo de investigación. Para el clivaje de los péptidos diméricos se evaluaron: (i) relación peso resina/volumen de coctel de clivaje y (ii) tiempos de reacción de clivaje. Para el primer factor se evaluaron dos relaciones 1:10, 1:20 (p/v), donde la relación óptima para el desanclaje de los péptidos diméricos fue de 1:20 (p/v). Para establecer el tiempo óptimo de desanclaje se monitoreo la reacción a 8, 12 y 18h. Observando que a las 18 horas se completó la reacción. Una vez terminada la reacción, los péptidos fueron precipitados y lavados con éter etílico, esto con el fin de eliminar los subproductos de la reacción, tales como el agua, TIS, EDT y el TFA. Luego, el precipitado del péptido Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub>, fue disuelto en solución acuosa que contenía TFA al 0,05% (v/v) y analizados por cromatografía RP-HPLC, el perfil cromatográfico se observó gran cantidad de especies (ver figura 33A). Se atribuyó este fenómeno al proceso de síntesis, asumiendo que las reacciones de acople y desprotección fueron incompletas generando especies deleccionadas. Esta solución fue almacenada en la nevera a 4°C y fue analizada nuevamente pasados 3 días, sorprendentemente el perfil cromatográfico mostró una especie principal (ver figura 33B), con mayor pureza que la muestra analizada inmediatamente después de ser disuelta (figura 33A).



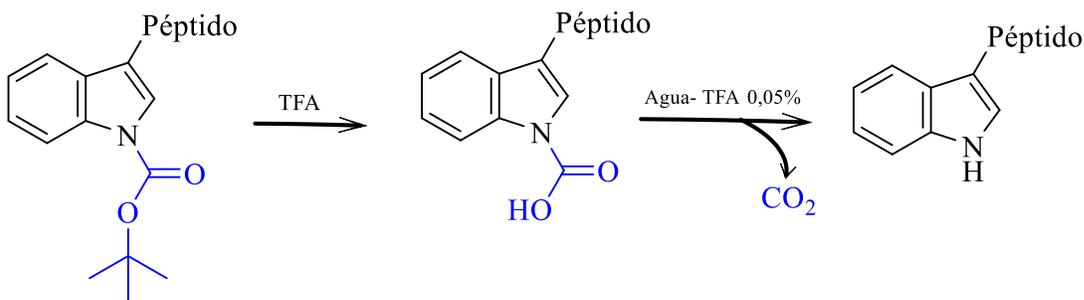
**Figura 33** A. Perfil cromatográfico del péptido Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub> crudo. El péptido luego de ser separado de la resina fue precipitado por tratamiento con éter etílico y el precipitado analizado por RP-HPLC. A) solución del péptido recién preparada (tiempo 0 min) y B) solución del péptido después de almacenamiento por 4 días a 4°C.



**Figura 34.** Perfiles cromatográficos del péptido Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal2</sub>. Luego de la separación del péptido dimérico de la resina y fue precipitado por tratamiento con éter etílico. El sólido fue disuelto en

solución acuosa que contiene TFA al 0,05% y almacenado a 4°C. Alícuotas de la solución fueron tomadas a diferentes tiempos (0,5, 12, 24 y 72 h) y analizadas por RP-HPLC.

Con el propósito de definir el tiempo óptimo de almacenamiento a 4°C de los productos crudos en solución acuosa con TFA 0,05% (v/v), se tomaron alícuotas de la solución acuosa a diferentes tiempos y estas fueron analizadas por cromatografía RP-HPLC. Para el péptido Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal2</sub> se tomaron alícuotas a tiempos de almacenamiento a 4°C de 0, 0,5, 24, y 72 h. Los resultados muestran que el tiempo mínimo de almacenamiento a 4°C requerido para este péptido debe ser de 24 h. (ver figura 34). Este fenómeno ha sido relacionado con el proceso de remoción del grupo protector de la cadena lateral del Trp el cual involucra reacciones secundarias; en un primer paso se libera únicamente el grupo *ter*butilo (figura 35), dejando el grupo indol protegido con un grupo *N*-carbámico. Luego el proceso de descarboxilación del ácido carbámico ocurre lentamente en solución acuosa (124). Los resultados obtenidos están en concordancia con lo descrito por Binner en 2019 que evidenció la eliminación incompleta del grupo protector Boc del Trp en un péptido de 21 aminoácidos. El identificó por espectrometría de masas una especie que corresponde a la masa del péptido más +44Da ((C=O)OH), indicando la presencia de este intermediario (125,126). Luego de almacenar el péptido en solución acuosa a bajas temperaturas se observó la remoción completa del grupo protector. Como alternativa para revertir este proceso se recomienda liofilizar el péptido en solución acuosa con ácido acético al 0,1M repetidamente, ya que este intermediario el ácido carbámico se descarboxila fácilmente en medios acuosos ácidos. Otros autores han sugerido que el proceso de remoción total del grupo Boc puede verse favorecido con el aumento del porcentaje de TFA en el coctel de clivaje. (127).



**Figura 35.** Reacción de remoción del grupo protector Boc del triptófano. Se describe los dos pasos propuestos para la remoción del grupo protector.

- **Análisis cromatográfico**

El perfil cromatográfico de la mayoría de los péptidos crudos presentó una especie principal, sin embargo, el perfil cromatográfico de los péptidos diméricos conjugados con Ahx y/o ferroceno presentaron más de una especie sugiriendo que la incorporación del Ahx y/o el ferroceno afectó significativamente el proceso de síntesis. Lo anterior puede deberse a varias razones como: (i) incorporación incompleta del Ahx y/o ferroceno a la cadena peptídica, (ii) remoción parcial del ferroceno durante la reacción de clivaje, (iii) hidrólisis parcial del metaloceno durante el proceso de desanclaje del soporte sólido, etc.

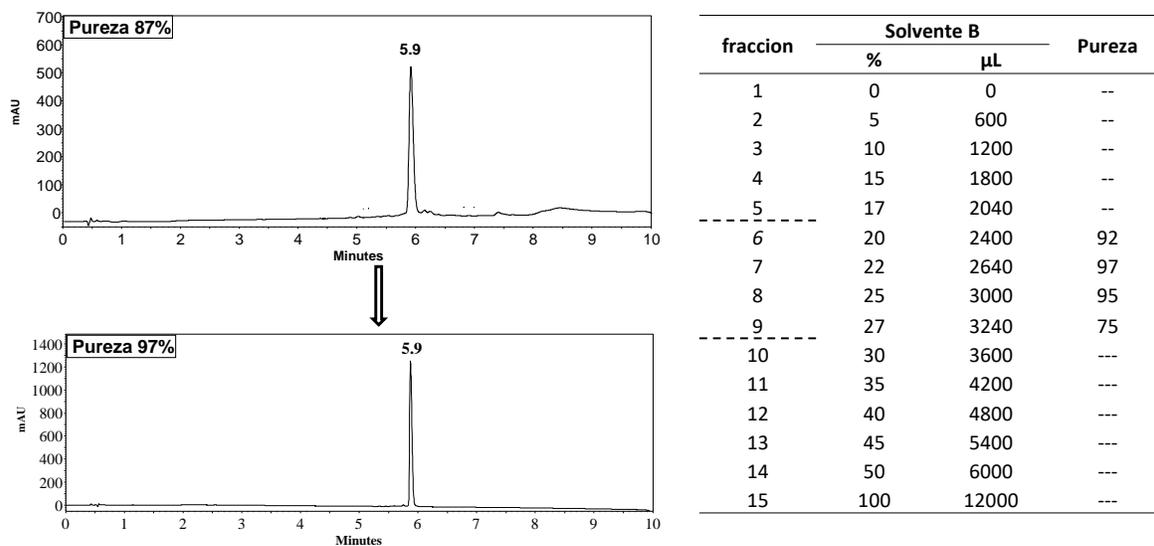
- **Purificación de los péptidos**

Los péptidos son moléculas complejas y cada secuencia posee propiedades físicas y químicas únicas, lo que hace que algunos parámetros de síntesis sean particulares, esto resulta en que péptidos que con secuencias similares pueden presentar diferencias en la solubilidad, tiempos de retención, hidrofobicidad, polaridad, etc. Como se puede observar en la Tabla 9, el porcentaje de pureza cromatográfica de los péptidos disminuye a medida que se incrementa la complejidad de la estructura, obteniendo mayor pureza para los péptidos monoméricos respecto a los diméricos. Al comparar la pureza de los tres péptidos monoméricos, se evidencia que a medida que aumenta la longitud de la secuencia la pureza del producto final decrece. Este mismo comportamiento se observa para los péptidos diméricos, siendo más evidente cuando los péptidos fueron funcionalizados con el Ahx y el ferroceno. Los resultados muestran que la incorporación del ferroceno en la síntesis del péptido dimérico afecta significativamente la pureza del producto final, sugiriendo que la incorporación del Fc-COOH a secuencias diméricas presentó la mayor dificultad, ya que requirieron numerosos ciclos de reacción de acople y los productos crudos presentaron baja pureza respecto a los péptidos monoméricos.

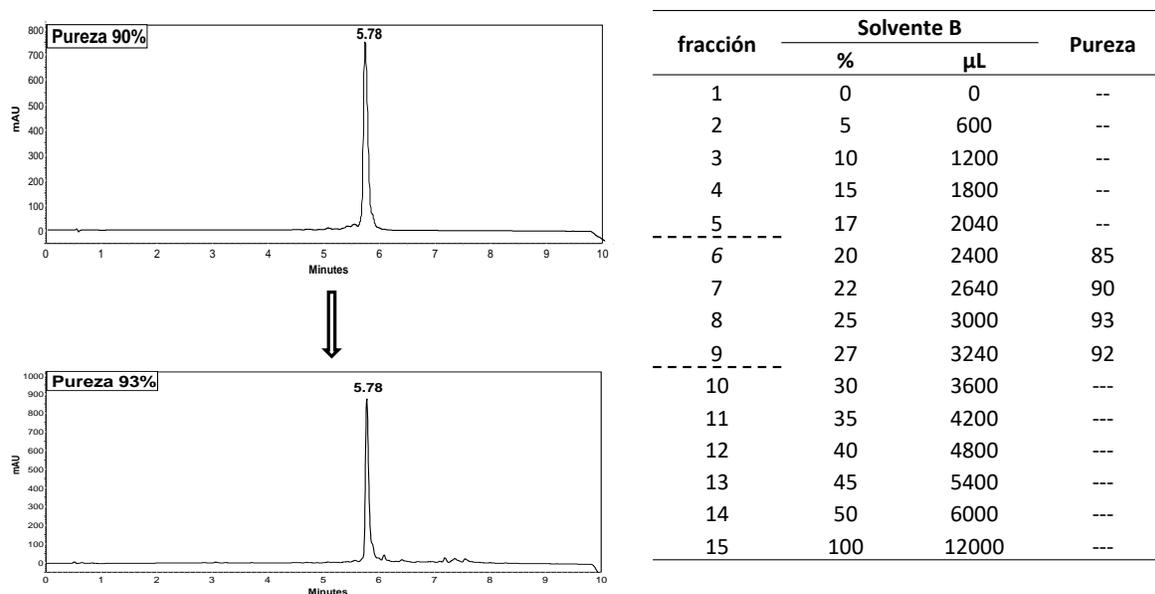
Tabla 9. Caracterización de los péptidos obtenidos por cromatografía RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF

Código	Secuencia	RP-HPLC		EM MALDITOF (m/z)	
		t <sub>R</sub> (min)	Área (%)	Teórica	Exp
LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	RWQWRWQWR	5,9	97	1485,77	1486,75
Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	Ahx RWQWRWQWR	5,8	95	1598,85	1600,32
Fc-Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	Fc Ahx RWQWRWQWR	7,1	90	1810,86	1811,98
LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub>	(RWQWRWQWR) <sub>2</sub> K Ahx	6,7	95	3195,69	3196,41
Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub>	(Ahx-RWQWRWQWR) <sub>2</sub> K Ahx	6,4	80	3421,86	3434,94
Fc-Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub>	(Fc-Ahx-RWQWRWQWR) <sub>2</sub> K Ahx	7,7	50	3846,85	3848,74

El proceso de purificación fue realizado por cromatografía RP-SPE, esta metodología consiste en eluir los péptidos utilizando gradientes crecientes de solvente B (ACN con 0,05% de TFA) comenzando en 0% B (100% A) hasta 50% B (50% A) para incrementar escalonadamente la fuerza de la fase móvil. Este gradiente es calculado a partir del tiempo de retención de los péptidos que fue determinado por RP-HPLC (metodología descrita por Insuasty et al 2019). Para el caso de los péptidos monoméricos LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub> y Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub>, el proceso de purificación fue sencillo ya que consistió principalmente en la remoción de los atrapadores y los aniones trifloracetato. Los rendimientos en estos péptidos fueron altos, obteniendo pocas fracciones enriquecidas con el péptido. (figura 36 y 37)



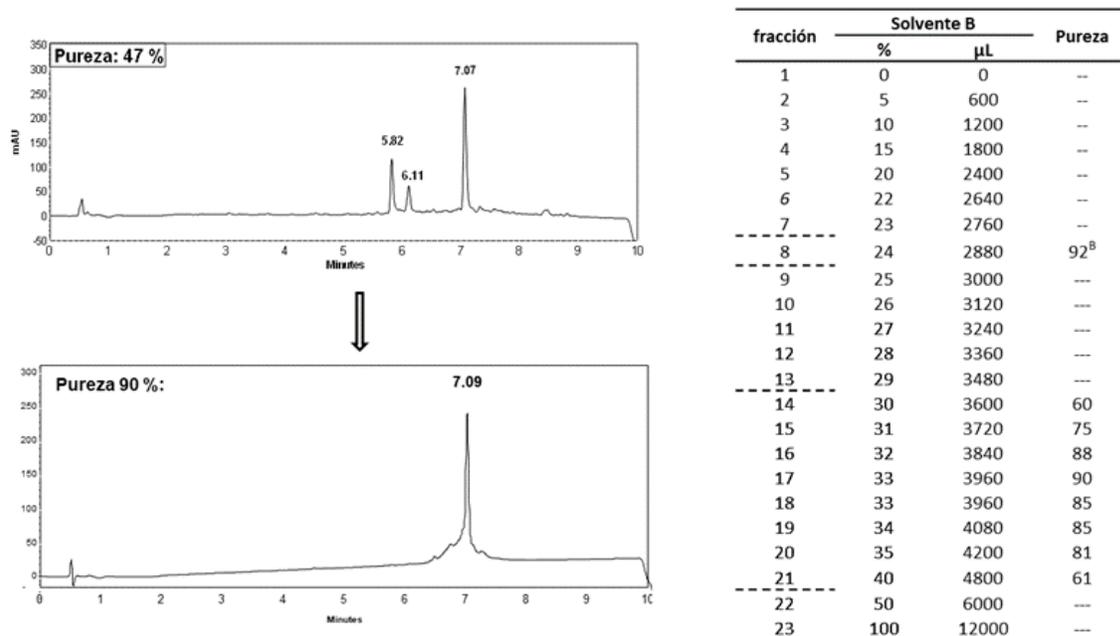
**Figura 36.** Programa de purificación del péptido LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub>. Perfil cromatográfico del péptido crudo (arriba) y fracción de péptido con mayor pureza (abajo). A la derecha se observa el programa de purificación utilizado.



**Figura 37.** Programa de purificación del péptido Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub>. Perfil cromatográfico del péptido crudo (arriba) y fracción de péptido con mayor pureza (abajo). A la derecha se observa el programa de purificación utilizado.

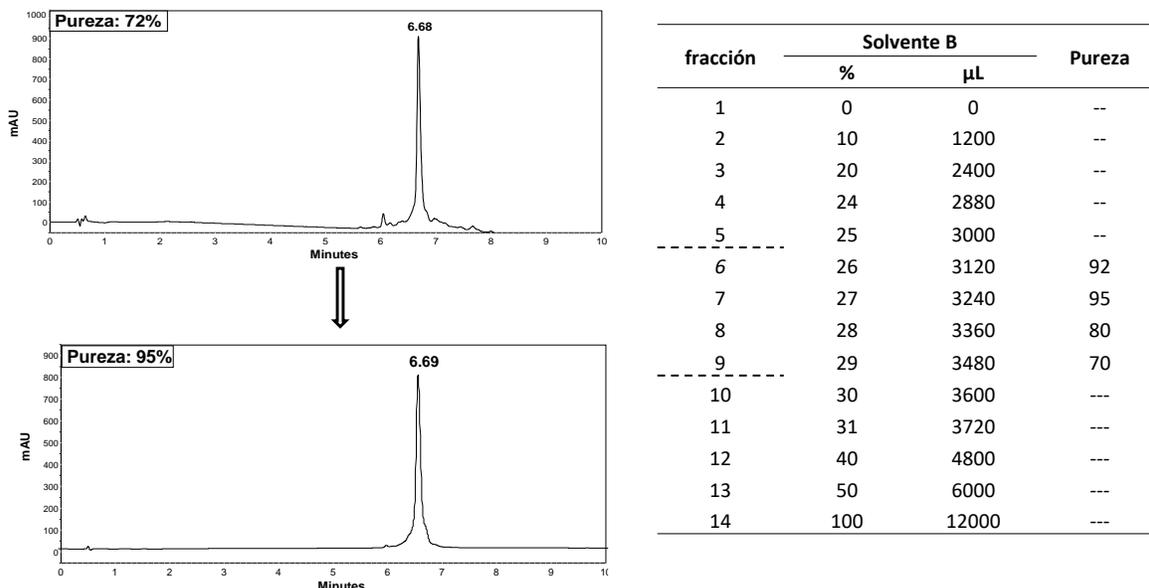
La incorporación del ferroceno confirió menor solubilidad en agua y mayor hidrofobicidad a los péptidos (tabla 10), donde los tiempos de retención aumentaron considerablemente en más de 1 min, por ejemplo, el péptido Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub> presentó  $t_R = 5,8$  min mientras que el péptido Fc-Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub> presentó un  $t_R = 7.1$  min. Para la

purificación de este péptido se requirió hacer un programa de purificación más extenso que permitiera separar las dos especies mayoritarias, la de tiempo 5.8min correspondiente al péptido (Ahx LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub>, que presentó una pureza cromatográfica del 92% y la segunda especie de 7.0min que corresponde al POM . El proceso de purificación muestra que el péptido quedo distribuido en 8 fracciones, siendo la fracción 17 la que presentó mayor pureza (figura 38)

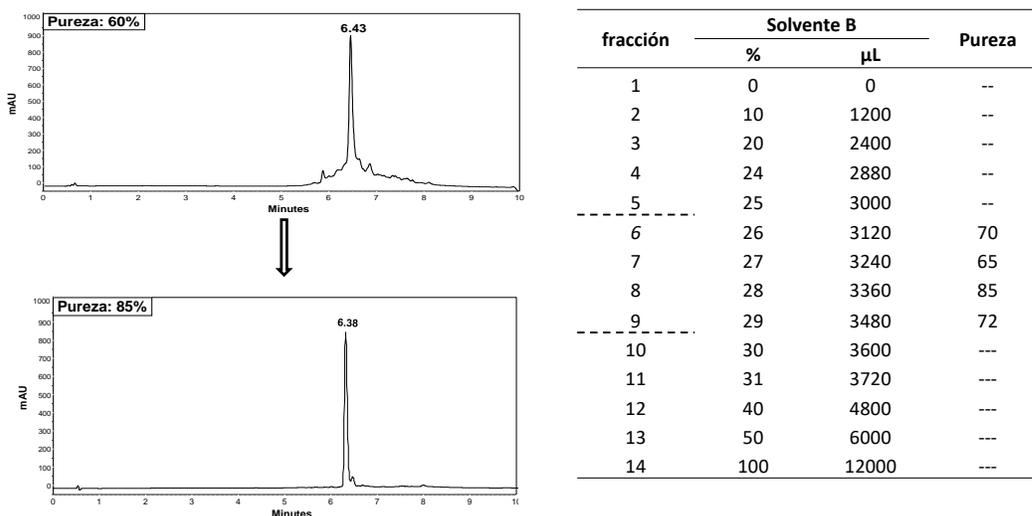


**Figura 38.** . Programa de purificación del péptido Fc-Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub>. Perfil cromatográfico del péptido crudo (arriba) y fracción de péptido con mayor pureza (abajo). A la derecha se observa el programa de purificación utilizado.

El método de purificación utilizado fue adecuado, ya que permitió obtener la mayoría de los péptidos con alta pureza, los programas de purificación cortos como los empleados con los péptidos monoméricos son útiles para purificar eficientemente péptidos diméricos, la única variación consiste en iniciar con una pendiente mayor del gradiente. Estos péptidos diméricos se obtienen crudos con puridades inferiores a las de los monómeros, esto debido a su complejidad sintética y estructural. Sin embargo, después de realizar los procesos de purificación se obtuvieron con puridades similares a los péptidos monoméricos



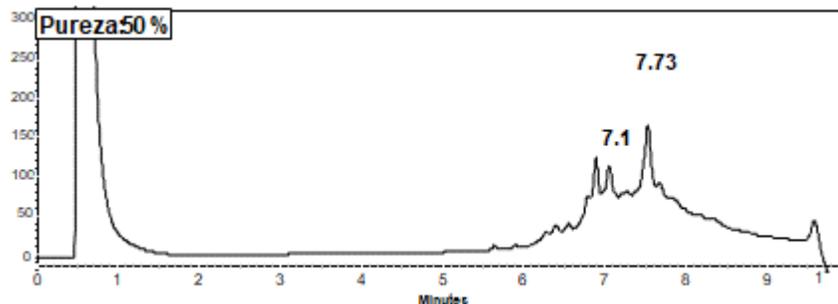
**Figura 39.** Programa de purificación del péptido dimérico LfcinB (21-25)<sub>Pal2</sub>. Perfil cromatográfico del péptido crudo (arriba) y fracción de péptido con mayor pureza (abajo). A la derecha se observa el programa de purificación utilizado.



**Figura 40.** Programa de purificación del péptido dimérico Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal2</sub>. Perfil cromatográfico del péptido crudo (arriba) y fracción de péptido con mayor pureza (abajo). A la derecha se observa el programa de purificación utilizado.

El POM dimérico presentó un porcentaje de pureza cromatográfica del 50%, debido a la presencia de múltiples especies con tiempos de retención cercanos, lo que dificultó obtener fracciones enriquecidas con el péptido puro. Se realizaron proceso de repurificación con las

fracciones enriquecidas, sin embargo, no se logró la separación, sugiriendo que las impurezas coeluyen con el péptido (figura 41)

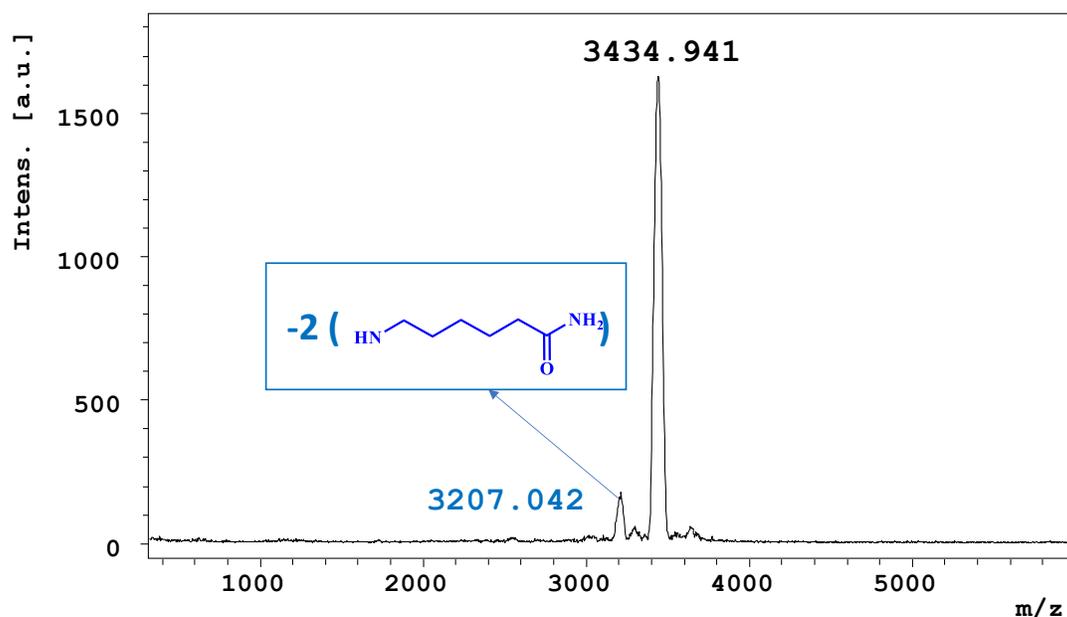


fracción	Solvente B		Pureza
	%	μL	
1	0	0	--
2	5	600	--
3	10	1200	--
4	20	2400	---
5	25	3000	---
6	27	3240	---
7	28	3360	---
8	29	3480	---
9	30	3600	---
10	31	3720	---
11	32	3840	43
12	33	3960	50
13	34	4080	50
14	35	4200	50
15	36	4320	50
16	37	4440	50
17	38	4560	---
18	39	4680	---
19	50	6000	---
20	100	12000	---

**Figura 41.** Programa de purificación del péptido Fc-Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub>. Perfil cromatográfico del péptido crudo (arriba) y el programa de purificación utilizado.

- **Caracterización por espectrometría de masas**

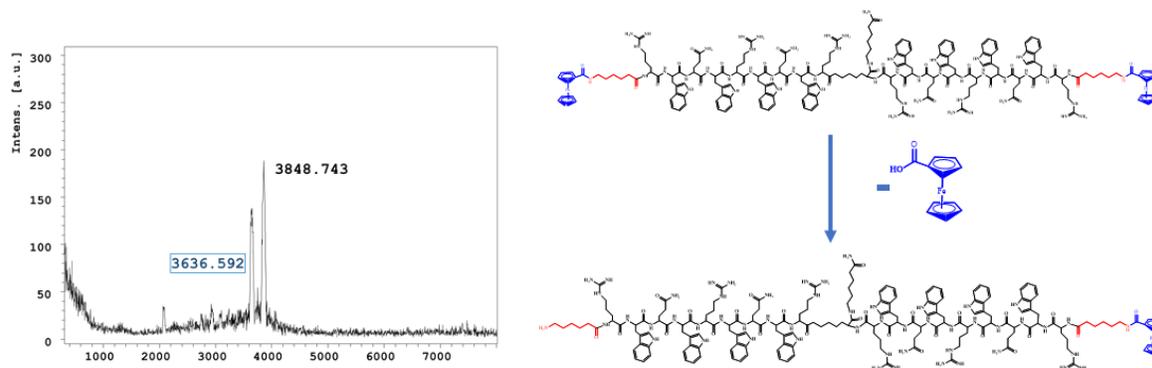
Los péptidos crudos fueron analizados por espectrometría masas MALDI-TOF con el objetivo de determinar la señal correspondiente al ion  $[M+H]^+$  esperado. Para todos los péptidos lineales y el péptido dimérico LfcinB  $(21-25)_{2\text{Pal}}$ , se observó una sola señal que correspondía a la masa esperada. Para el péptido diméricos Ahx-LfcinB  $(21-25)_{2\text{Pal}}$  se observó la presencia de 2 señales, una de las cuales corresponde al péptido de interés (3434,941) y la otra que corresponde a la masa del péptido precursor LfcinB  $(21-25)_{\text{Pal}2}$  (3207,042). Esta última señal indica que la incorporación del Ahx a la secuencia no fue completa sugiriendo que la síntesis de péptido dimérico funcionalizado con Ahx es compleja. (figura 42)



**Figura 42.** Espectro de masas MALDI-TOF del péptido Fc-Ahx-LfcinB  $(21-25)_{\text{Pal}2}$ , purificado (Figura 11). Se observa una especie (3207 u) que corresponde al péptido LfcinB  $(21-25)_{\text{Pal}2}$ .

En el caso del péptido dimérico funcionalizado con ferroceno se observan dos señales mayoritarias que corresponde al péptido funcionalizado en las dos cadenas con ferroceno (3848.743 u) y la otra especie corresponde al péptido funcionalizado con ferroceno en una sola cadena (3636.592 u). (Figura 42), estos resultados sugieren que la incorporación del ferroceno a la secuencia fue incompleta a pesar del número significativo de ciclos de

reacción de acople realizados. Varios autores recomiendan usar fenol en el coctel de clivaje para prevenir que la pérdida del motivo organometálico, sin embargo, en la síntesis del péptido lineal no se observó este fenómeno a pensar que el coctel de clivaje no contenía fenol. Estos resultados indican que en la síntesis de los péptidos diméricos Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal2</sub> y Fc-Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal2</sub> la incorporación de Fmoc-Ahx y al Fc-COOH son los puntos críticos en la síntesis (figura 43)



**Figura 43.** Espectro de masas MALDI TOF del péptido Fc-Ahx-LfcinB (21-25)<sub>Pal2</sub>

Con base en los resultados anteriormente discutidos, se presentan las condiciones óptimas de síntesis de los péptidos sintetizados en este trabajo.

**Tabla 10.** Condiciones de reacción estandarizadas

Parámetros	Reacción de acople	Reacción de desprotección del grupo alfa-amino	Reacción de Desanclaje y desprotección de grupos protectores	Tiempo de Almacenamiento del péptido crudo a 4oC
LfcinB(21-25) <sub>Pal</sub>	DCC/HOBT 4h AC DMF	Piperidina al 2,5% en DMF, 15 min, TA, AC (3x).	TFA/TIPS/EDT/agua (92,5/2,5/2,5/2,5. %v/v), relación resina-péptido: solución 1:10 (p/v), 8h, TA, AC.	Mínimo 24h Agua - TFA 0,05%
Ahx-LfcinB(21-25) <sub>Pal</sub>	DCC/HOBT 4h AC DMF			
Fc-Ahx-LfcinB(21-25) <sub>Pal</sub>	AA/DCC/HOBT 4h AC Fc/DIC DMF/DCM (1:1)			
LfcinB(21-25) <sub>Pal2</sub>	DCC/HOBT 4h AC		TFA/TIPS/EDT/agua (92,5/2,5/2,5/2,5. %v/v), relación resina-péptido: solución 1:20 (p/v), 18h, TA, AC.	Mínimo 24h Agua - TFA 0,05%
Ahx-LfcinB(21-25) <sub>Pal2</sub>	DCC/HOBT 4h AC			
Fc-Ahx-LfcinB(21-25) <sub>Pal2</sub>	AA/DCC/HOBT 4h AC Fc/DIC DMF/DCM (1:1)			

## Resumen capítulo II

- Se obtuvieron 6 péptidos purificados y caracterizados por cromatografía RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF. Donde dos de estos fueron péptidos organometálicos que contienen ferroceno.
- Se estableció que la síntesis de péptidos diméricos se ve afectada por la longitud de la secuencia y la incorporación de Ahx y Fc
- La incorporación incompleta del Fc fue el factor que incidió en mayor medida en la pureza del péptido final
- Se identificaron los puntos de mejora y las condiciones óptimas para la síntesis de los péptidos LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub>, Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub>, Fc-Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub>, LfcinB(21-25)<sub>Pal2</sub>, Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal2</sub> y Fc-Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal2</sub>
  - Los resultados obtenidos permitieron establecer que la síntesis de los péptidos monoméricos funcionalizados con Ahx y ferroceno es viable, mientras que la para los diméricos funcionalizados fue posible identificar los puntos críticos de la síntesis y posibles puntos de mejora, dando a la segunda parte de la pregunta de investigación: ¿Es viable sintéticamente en cuanto a facilidad de síntesis, rendimientos y pureza: obtener péptidos conjugados con ferroceno
  - Se dio cumplimiento a los objetivos 2 y 3 planteados en este trabajo (Obtener los péptidos monoméricos RWQWRWQWR, Ahx-RWQWRWQWR y Fc-Ahx-RWQWRWQWR.y obtener los péptidos diméricos (RWQWRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx, (Ahx-RWQWRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx y (Fc- Ahx-RWQWRWQWR)<sub>2</sub>-K-Ahx)

## Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron establecer las condiciones para la síntesis de péptidos monoméricos y diméricos que contienen la secuencia plaindrómica RWQWRWQWR. La conjugación de secuencias monoméricas con Ahx y/o ferroceno procedió en buena manera lográndose obtener productos con alta pureza. La pureza de los péptidos es afectada por la polivalencia, la longitud de la secuencia y la incorporación de moléculas no peptídicas como el Ahx y el ferroceno.

## 4. Capítulo III. Síntesis de bloque Organometálico (Linker) y Péptidos Organometálicos con Organoestaño (IV)

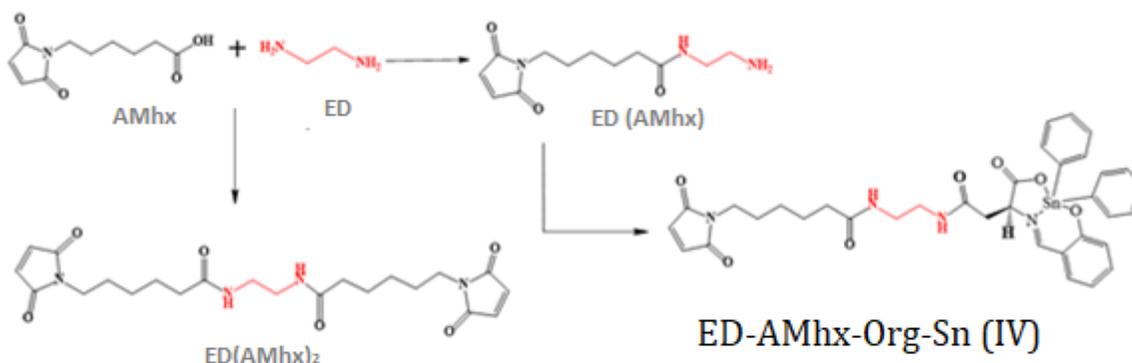
Teniendo en cuenta el complejo pentacoordinado es hidrolizado cuando es sometido al tratamiento ácido durante el proceso de desprotección de las cadenas laterales y separación del POM el soporte sólido, es necesario diseñar una estrategia alternativa para funcionalizar los péptidos con los compuestos de organoestaño. Para esto se propone funcionalizar los complejos de estaño mediante la incorporación de un linker que contengan grupos amino o tiol, los cuales posibilitaran unir el compuesto de organoestaño al péptido en solución. Para la síntesis e incorporación del linker al compuesto de organoestaño (IV) se utilizaron dos aproximaciones (i) síntesis en solución y (ii) síntesis en fase sólida.

### Síntesis en solución-Metodología

En esta aproximación para la obtención del linker se diseñó la siguiente ruta sintética:

- (i) Unión de etilendiamina (ED) y el ácido 6-maleimido hexanoico (AMhx) para generar el linker ED-AMhx, mediante la formación de un enlace amida entre el ácido carboxílico del AMhx y un grupo amino de la ED.
- (ii) Luego el linker ED-AMhx se une al compuesto organoestaño (IV) mediante la formación del enlace amida entre el grupo amino libre de la ED-AMhx y el grupo carboxilo del compuesto de organoestaño (IV) (Org-Sn (IV)) para obtener El bloque ED-AMhx-Org-Sn (IV).

- (iii) El bloque ED-AMhx-Org-Sn (IV) se une al péptido mediante la química click, a través de la reacción selectiva entre el grupo maleimido y el grupo tiol de la cadena lateral de la cisteína del péptido. De acuerdo con la literatura esta reacción es rápida, específica y llevada a cabo en solventes polares como agua y etanol.



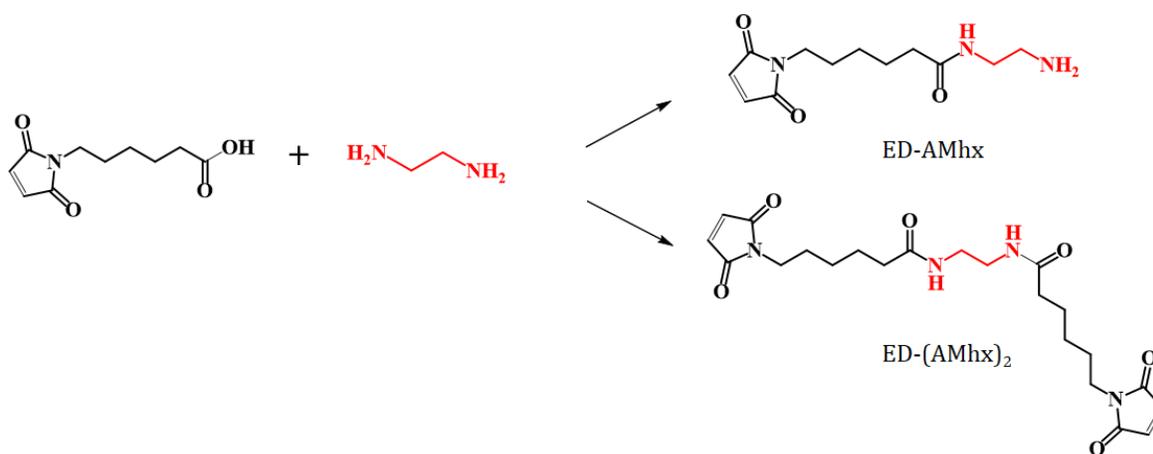
**Figura 44.** Esquema de obtención del bloque organometálico OrgSn(IV)-ED-AMhx por síntesis en solución.

Para la síntesis del linker ED-AMhx, una solución de ED en DCM (20  $\mu$ L/mL) fue adicionada lentamente mediante goteo a una solución que contiene AMhx/DCC (1:1 equiv) en DCM. Luego la mezcla de reacción fue dejada en AC y TA durante 6 h, posteriormente el solvente fue eliminado por rotaevaporación y el sólido almacenado. La reacción fue monitoreada por TLC.

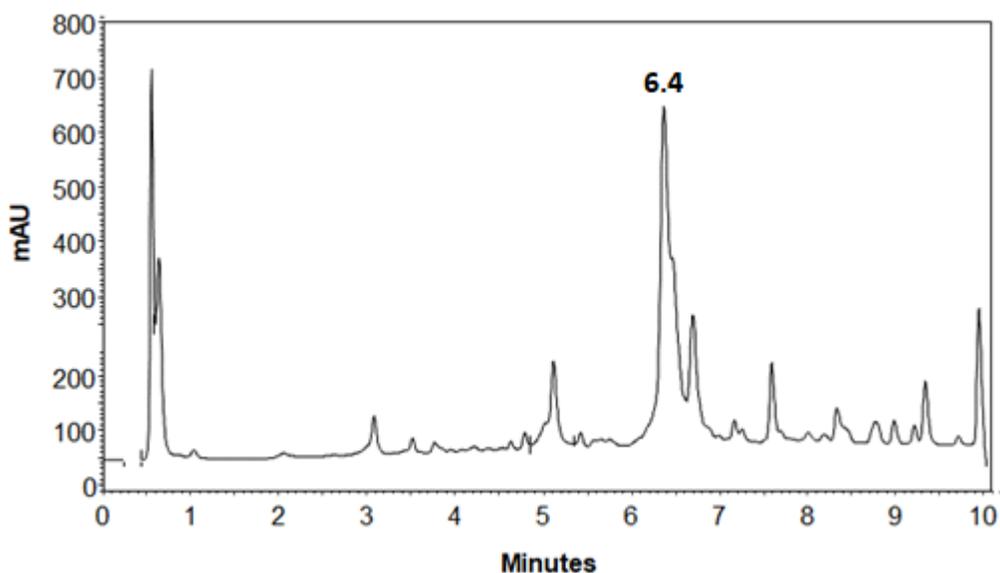
## Resultados y discusión

Para la obtención del linker ED-AMhx, el AMhx fue tratado con DCC para formar el éster activo para posteriormente adicionar por goteo la ED con el fin de favorecer la formación de la ED mono sustituida ED-AMhx. Sin embargo, aunque la reacción se realizó a 4°C y la adición de la ED con goteo lento el producto mayoritario de la reacción fue la ED-disustituida ED-(AMhx)<sub>2</sub> la cual no permite la unión del complejo órgano estaño, debido a que no tiene un grupo reactivo por el bloqueo de los dos grupos amino, adicionalmente en el perfil cromatográfico de la reacción se observa la aparición de múltiples especies.

(Figuras 44 y 45). Teniendo en cuenta lo anterior no se continuo con esta ruta sintética, para la obtención del bloque organometálico



**Figura 45.** Esquema de la reacción de formación del linker monosustituido ED-AMhx y disustituido ED-(AMhx)<sub>2</sub> especie principal.



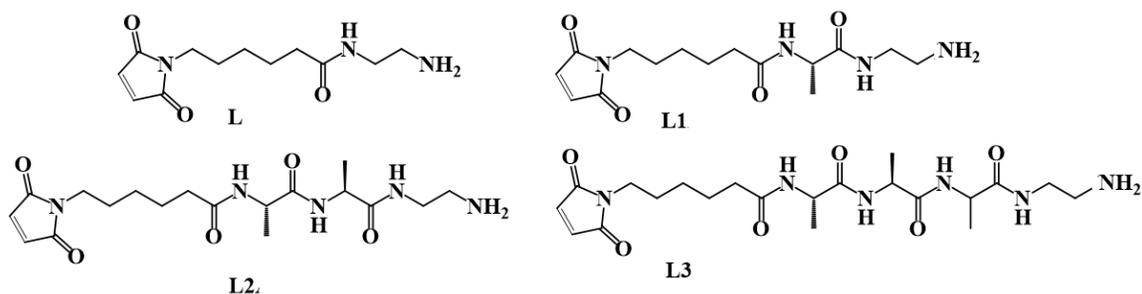
**Figura 46.** Perfil cromatográfico de la mezcla de reacción para la síntesis del Linker ED-(AMhx)<sub>2</sub> por síntesis solución.

## Síntesis en fase sólida- Metodología

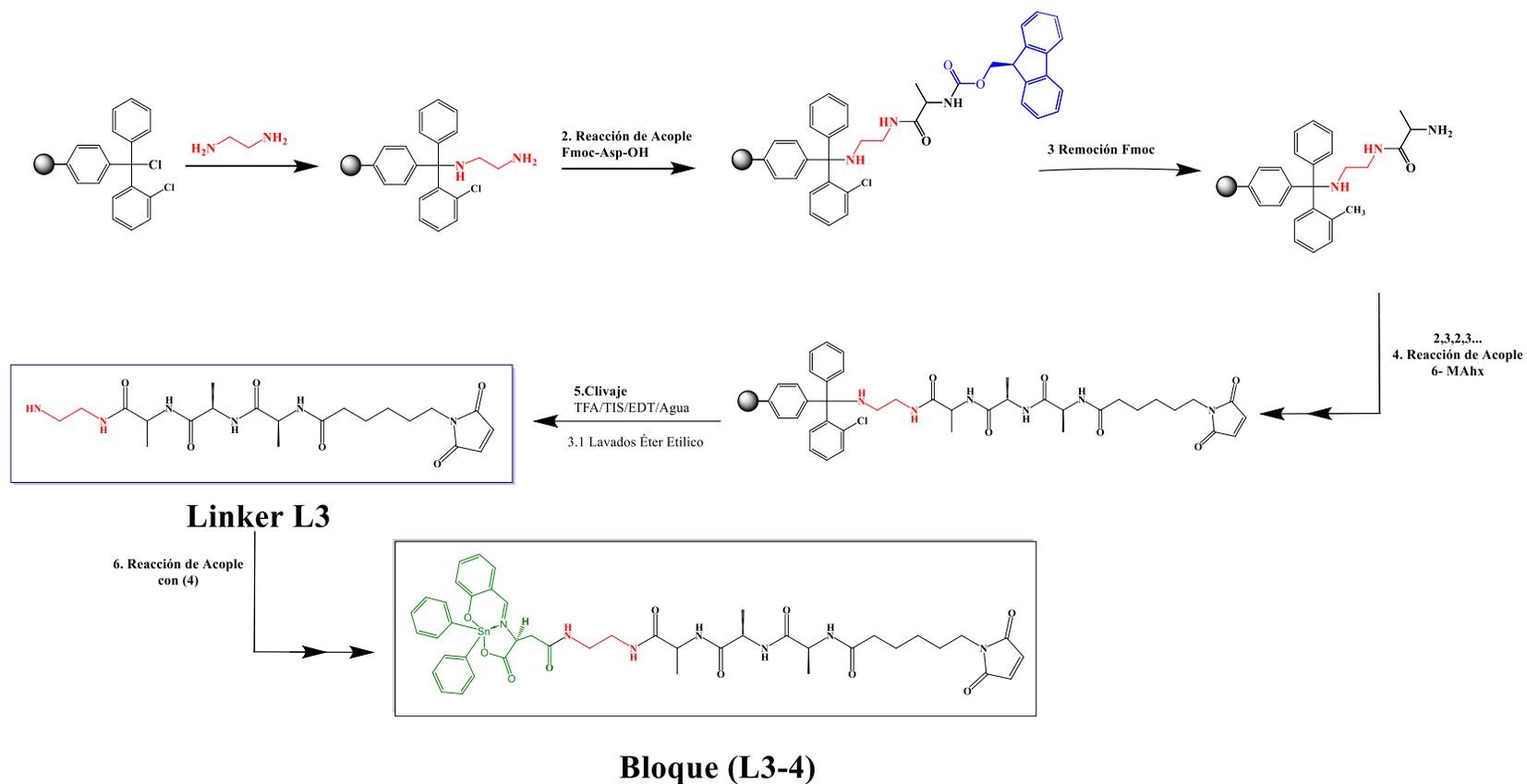
La incorporación del compuesto de organoestaño (IV) a una secuencia peptídica por medio de la química click, requiere que el péptido tenga un grupo tiol y el compuesto de organoestaño (IV) este unido a un linker que contenga el grupo maleimido. Para esto se

diseñó la ruta sintética que se muestra en la Figura 48 y 53. El soporte sólido seleccionado fue la resina cloruro de 2-clorotritilo debido a que esta resina tiene alta sustitución lo que permite obtener cantidades apreciables del linker y segundo la separación de la cadena peptídica del soporte sólido se puede realizar con condiciones acidas suaves (TFA 5% en DCM). La ruta se basa en unir la ED a la resina de tal forma que queda un grupo amino disponible para unir posteriormente los residuos de Fmoc-Ala mediante SPPS-Fmoc/tBu convencional y el ultimo residuo acoplado a la cadena fue el AMhx mediante un enlace amida entre el grupo amino libre de la cadena y el grupo carboxilo del AMhx utilizando la estrategia de las carbodiimidas con DCC. Luego el linker es separado de la resina y mediante síntesis en solución y química click, el grupo maleimido del linker es unido al grupo tiol de la cisteína del péptido (figura 48).

Para la síntesis del linker en fase solida se diseñaron y sintetizaron cuatro péptidos en los cuales se utilizó la Alanina como espaciador: L: AMhx-ED, L1: AMhx-Ala-ED, L2: AMhx-Ala-Ala-ED, y L3: AMhx-Ala-Ala-Ala-ED. Los residuos de Ala se utilizaron como espaciadores por dos razones (i) facilitar la unión del AMhx y (ii) establecer número mínimo de residuos de Ala requeridos para que el linker se precipite en éter etílico y así obtener de manera rápida y eficiente el linker (Figura 47). Una vez obtenido el linker AMhx-Ala(n)-ED, este se utilizó para unir el compuesto de organoestaño (IV) (compuesto (4) obtenido en el primer capítulo) en solución mediante la formación del enlace amida entre el grupo amino libre del linker y el grupo carboxilo del compuesto de organoestaño (IV) (bloque L3-4) (figura 48).



**Figura 47.** Estructura química de los linkers sintetizados. L: AMhx-ED; L1: AMhx-Ala-ED; L2: AMhx-Ala-Ala-ED; L3: AMhx-Ala-Ala-Ala-ED.



**Figura 48.** Esquema de la obtención del linker (L3-4): OrgSn(IV)-ED-Ala-Ala-Ala-AMhx, que será utilizado para la funcionalización de los péptidos.

El procedimiento realizado fue: La resina cloruro de 2-clorotritilo (50 mg; 1,7 meq/g) seca fue tratada con ED (1:1 equiv; 3 excesos respecto a los mEq de resina) y luego se adicionó 5 mL de DCM seco y la mezcla de reacción se dejó en AC a TA por 5h. Luego la mezcla de reacción fue filtrada y se adicionó 5mL de metanol al filtrado y se dejó en reacción a TA y AC por 3 h, obteniendo  $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-Resina}$ . Los Fmoc-aminoácidos fueron incorporados mediante la preactivación: el Fmoc-aminoácido/DCC/6-Cl-HOBt (1:1:1 equiv; 5 excesos respecto a los mEq de resina) fueron disueltos en DMF/DCM (1:1 v/v) con AC a TA por 15 min. Luego la mezcla de reacción se adicionó a la resina y se dejó en reacción por 5h con AC a TA. Luego la solución se retiró mediante filtración y la resina-aminoácido fue lavada con DMF (3x1 min) y DCM (3x1 min). Luego se realizó el monitoreo de la reacción mediante el test de Kaiser, en el caso que la prueba fuese positiva (coloración azul) se repite el procedimiento descrito hasta prueba negativa (coloración amarilla). Luego de unido el Fmoc-aminoácido a la resina, esta se trató con 4-metilpiperidina al 2.5% en DMF con AC y TA por 10 min (2x), luego la resina-péptido fue lavada con DMF (5x) y DCM (3x) y la reacción fue monitoreada mediante el test de Kaiser. Las reacciones de acople y desprotección se realizaron consecutivamente hasta que todos los residuos de Ala fueron incorporados, luego se procedió a unir el AMhx en manera similar a la descrita anteriormente. Luego la separación del péptido de la resina se realizó tratando la resina-péptido seca con el cóctel de clivaje que contenía TFA/DCM (50/50 v/v) por 6 h con AC a TA. El péptido crudo se obtuvo por precipitación y lavado con éter etílico frío (5x), luego fue centrifugado por 5 min a 3000 rpm y el sobrenadante descartado. Finalmente, el sólido obtenido se dejó a TA hasta sequedad.

## Resultados y discusión

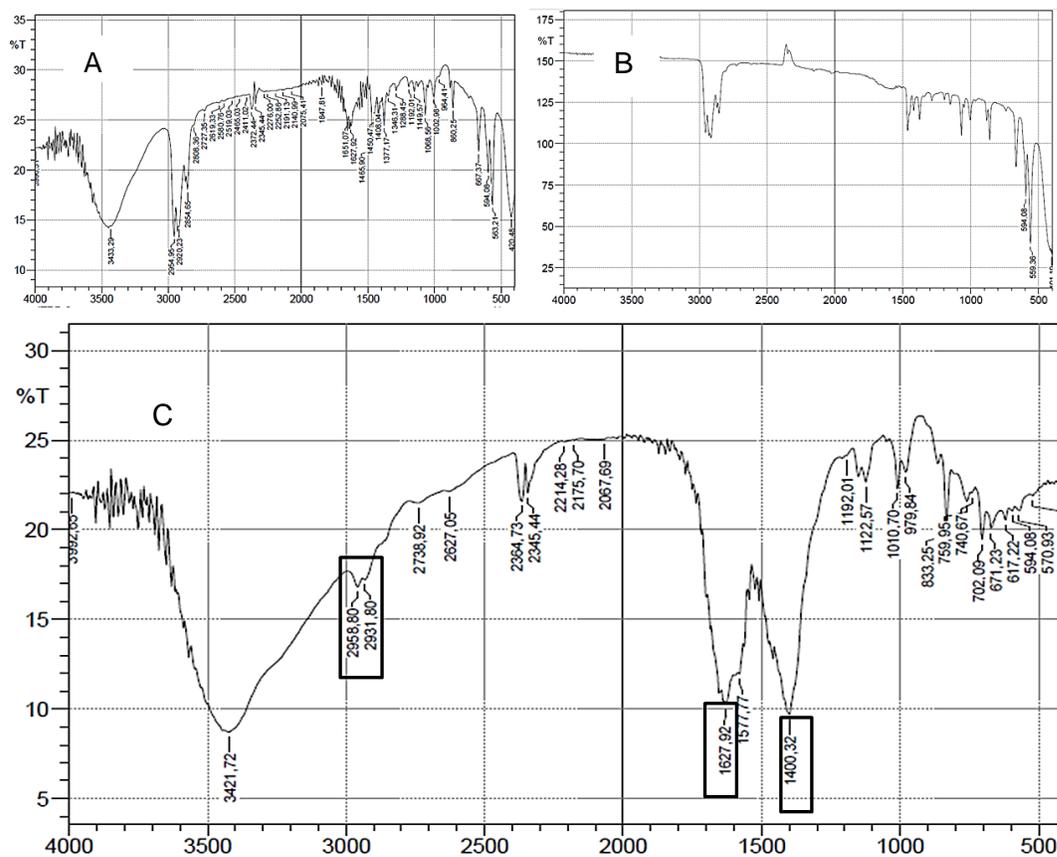
La síntesis de los linkers por SPPS-Fmoc/tBu procedió de forma normal, sin dificultad para acoplar la ED, los aminoácidos y el AMhx. Luego de completada la secuencia la resina-péptido fue tratada con solución de desanclaje y desprotección de las cadenas laterales y cada linker fue tratado con éter etílico con el fin de precipitarlo y obtenerlo como un producto sólido, sin embargo para los linkers L, L1 y L2 no fue posible obtenerlos como un sólido, por lo que se requirió eliminar el exceso de TFA por rotaevaporación, lo que conllevó

a obtenerlos como líquidos viscosos de color amarillo, la eliminación del TFA se hizo por arrastre con EtOH y fue un proceso dispendioso. Mientras que el linker L3 cuando fue tratado con éter etílico este precipitó como un sólido blanco obteniéndolo de manera rápida y fácil

**Tabla 11.** Linker sintetizados

<b>Linker</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Apariencia física del precipitado</b>
L	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -AMhx	Aceite de color amarillo
L1	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Ala-AMhx	Aceite de color amarillo
L2	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Ala-Ala-AMhx	Aceite de color amarillo
L3	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Ala-Ala-Ala-AMhx	Sólido de color blanco

El linker ED-AMhx (**L**) fue caracterizado por espectroscopia IR, (Figura 34C) y se comparó con el espectro IR de la ED (Figura 49A). En el espectro IR de la ED se observa la señal del grupo amino 3433 cm<sup>-1</sup>, los estiramientos C-C en 2964 cm<sup>-1</sup> y las señales características de CH<sub>2</sub> en 1465-cm<sup>-1</sup>. Mientras que en el espectro del linker (**L**) se observa la aparición de una señal en 1627cm<sup>-1</sup> que corresponde vibración del C=O de amidas, como también el estiramiento N-H del nitrógeno de la amida en 1577cm<sup>-1</sup> (grupo maleimido).



**Figura 49.** Espectros FT-IR de A). Etilendiamina, B). AMhx. y C). Linker (L)

El linker (L) también fue caracterizado por RP-HPLC, el perfil cromatográfico muestra una especie mayoritaria con  $t_R = 2.1$  min, mientras que la señal en 0.63 min corresponde al frente del solvente producido por el cambio de la fase móvil. Se observa que el producto final no contiene el AMhx como contaminante, mientras que se observan especies menores en  $t_R = 6.5$  min y  $t_R = 8.9$  min (figura 50). Estos resultados muestran que es posible obtener los linkers por esta metodología. Por lo anterior se utilizó la misma metodología para obtener los linkers (L1), (L2) y (L3).

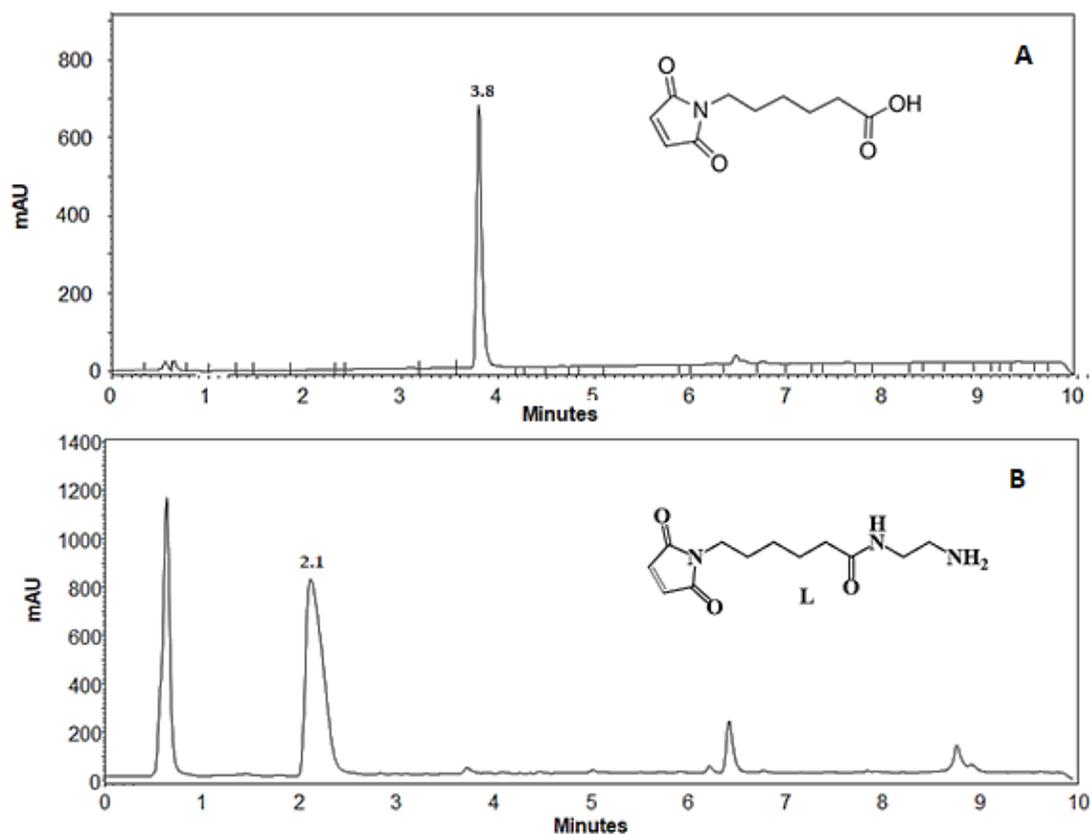
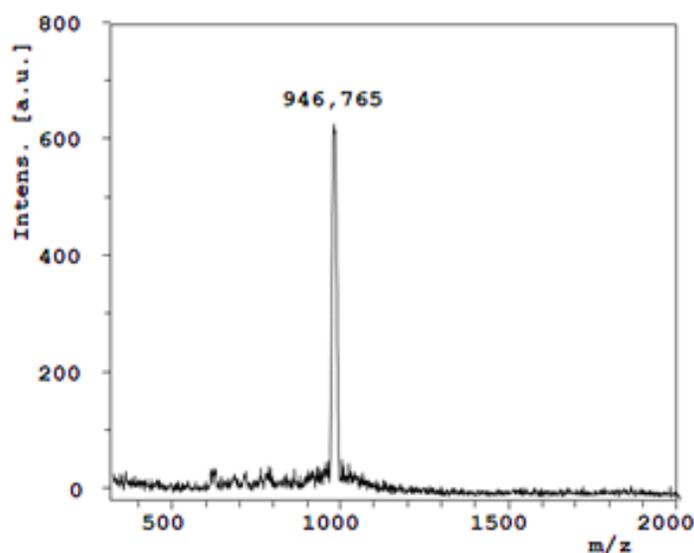


Figura 50. Perfil cromatográfico de A. AMhx y B. Linker (L)

El linker (**L3**): AMhx-Ala-Ala-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, fue el péptido de menor longitud que se precipitó con éter etílico frío, esto permitió hacer varios lavados al sólido con éter etílico para remover el TFA, lo cual incremento significativamente los rendimientos. Debido a la alta pureza del producto crudo, no se requirió hacer pasos de purificación, adicionales.

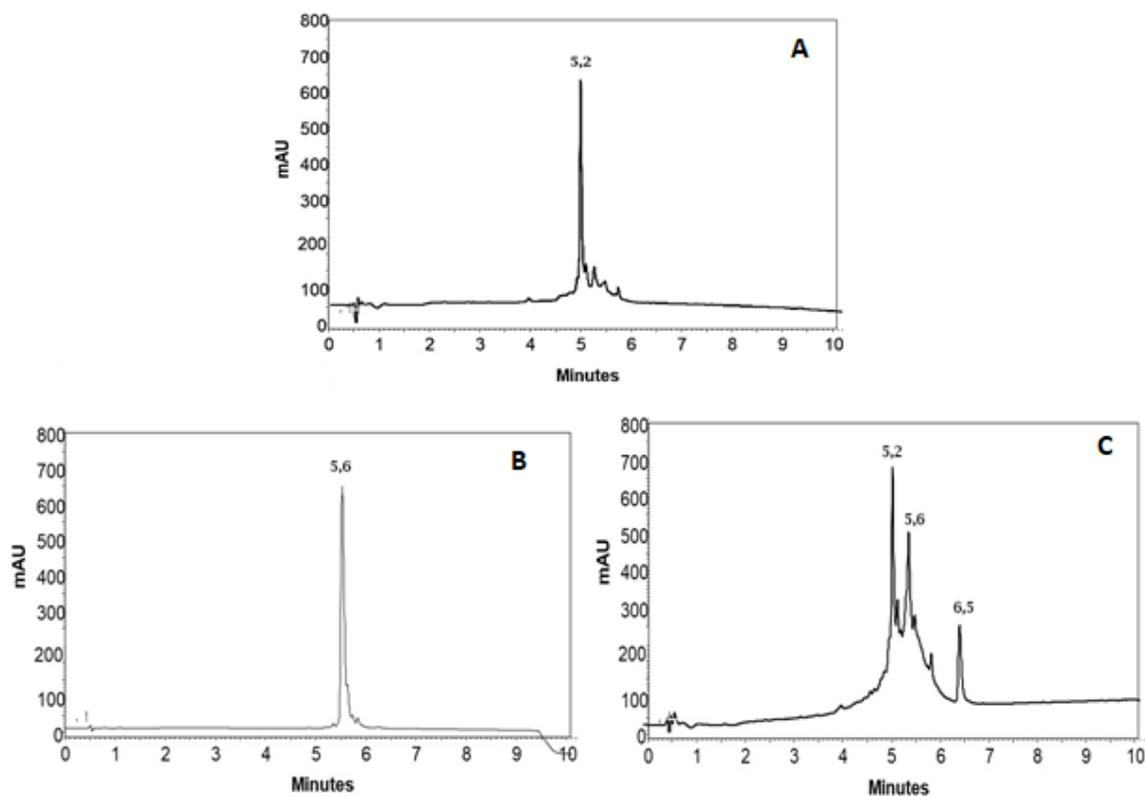
**Formación de Bloque organometálico: AMhx-Ala-Ala-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-OrgSn(IV) (L3-4).** La unión del linker (**L3**) y el compuesto de organoestaño (IV) (**4**) (1:1 equiv) se realizó mediante la formación del enlace amida utilizando DCC, la reacción procedió rápidamente para obtener el bloque (**L3-4**), la reacción fue monitoreada por TLC. Luego la mezcla de reacción fue rotaevaporada para remover el solvente, y el producto crudo fue utilizado para la reacción de química click. El bloque (**L3-4**) fue caracterizado por espectrometría de masas MALDI-TOF obteniéndose la masa correspondiente al producto esperado (Figura 51).



**Figura 51.** Espectros de masas MALDI-TOF del bloque organometálico AMhx-Ala-Ala-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-OrgSn(IV) (**L3-4**) PM teórico= 944.630 u; [M+H]<sup>+</sup> teórico= 945.630 u.

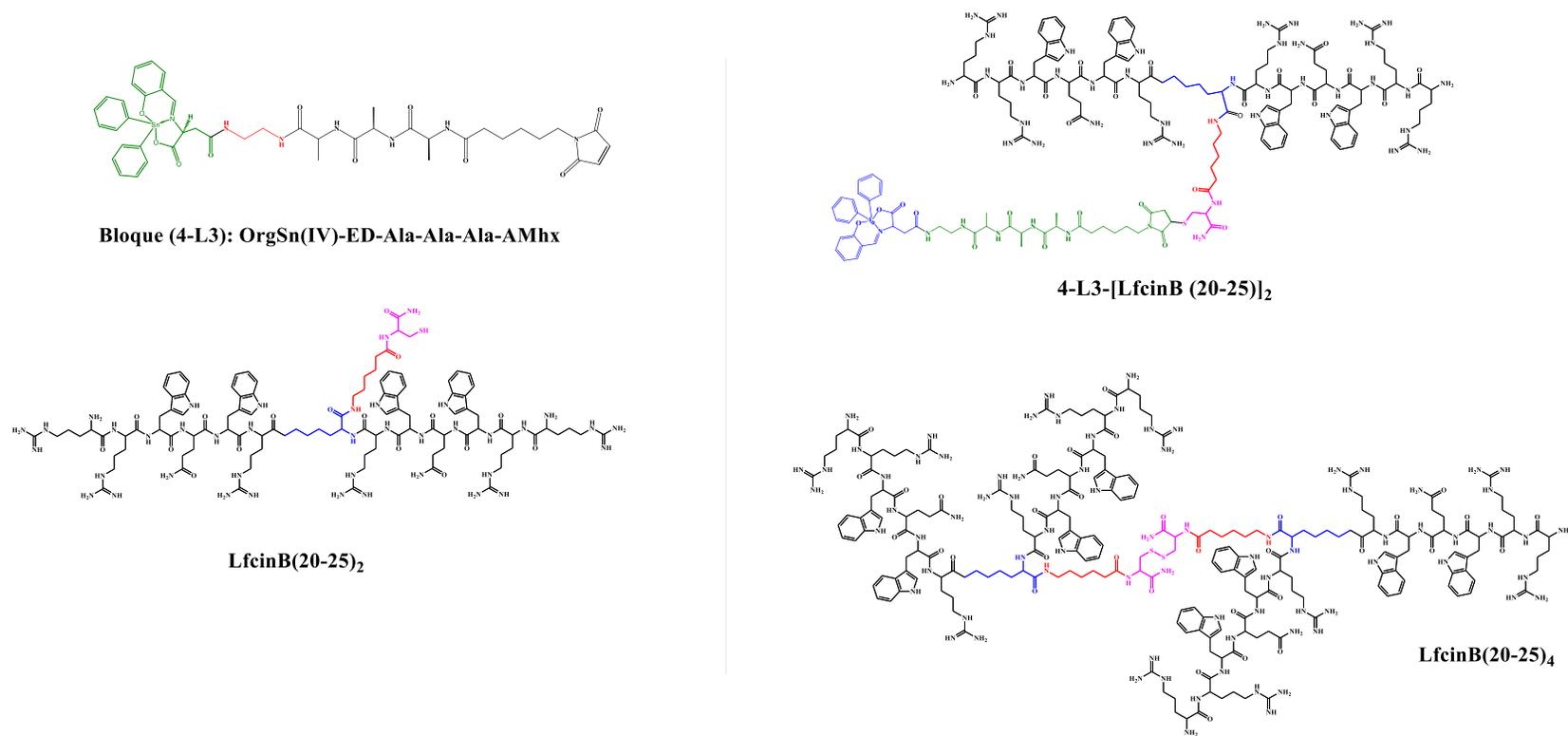
**Funcionalización del péptido LfcinB(20-25)<sub>2</sub> por la reacción de Michael (Química Click): OrgSn(IV)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Ala-Ala-Ala-AMhx-[LfcinB (20-25)<sub>2</sub>]: 4-L3-[LfcinB (20-25)<sub>2</sub>].** De manera preliminar se exploró la funcionalización de un péptido derivado de la LfcinB con el bloque (**L3-4**), para esto se utilizó el péptido LfcinB (20-25)<sub>2</sub>: (RRWQWR)<sub>2</sub>K-Ahx-C, el cual fue sintetizado y suministrado por el grupo de investigación SAMP. Este péptido tiene un residuo de cisteína en el extremo carboxi terminal el cual fue utilizado para que reaccionara selectivamente con el grupo maleimido del bloque (**L3-4**) (reacción de Michael),

Como antecedentes es importante mencionar que Rodríguez en 2018 describió la metodología y la cinética de oxidación para la obtención del tetrámero LfcinB(20-25)<sub>4</sub> a partir del dímero precursor LfcinB (20-25)<sub>2</sub>. El proceso de oxidación se realizó en condiciones básicas usando carbonato de amonio (pH= 8), en medio acuoso, AC a TA por 6h. Insuasty en 2018, realizó el monitoreo de la cinética de la reacción por química click entre el AMhx y L-Cys-OH, obteniendo L-Cys(AMhx)-OH de manera rápida y la reacción se completó en menos de 2 h cuando se realizó en H<sub>2</sub>O.



**Figura 52.** Monitoreo de la reacción por química click entre el péptido LfcinB (20-25)<sub>2</sub> y el bloque (L3-4). (A) péptido LfcinB(20-25)<sub>2</sub>; (B) péptido LfcinB(20-25)<sub>4</sub> y (C) Mezcla de reacción: péptido LfcinB(20-25)<sub>2</sub> tR=5.2 min; LfcinB(20-25)<sub>4</sub> tR=5.6 min; OrgSn(IV)-ED-Ala-Ala-Ala-AMhx-[LfcinB (20-25)<sub>2</sub>]: **4-L3-[LfcinB (20-25)<sub>2</sub>]** tR=6.5 min.

Teniendo en cuenta los reportes anteriores y para evitar la formación de tetrámero, la reacción se llevó a cabo disolviendo (1 equiv) del péptido LfcinB(20-25)<sub>2</sub> en agua destilada y 1 equiv del bloque (L3-4) en metanol/DMSO (2:1v/v) y mezclando las soluciones; se dejó en reacción con AC a TA. , la reacción fue monitoreada por cromatografía RP-HPLC. En la figura 52C se observa el perfil cromatográfico después de 24h de reacción, donde se evidencia la presencia de 3 especies mayoritarias que corresponden al péptido precursor LfcinB(20-25)<sub>2</sub>, tR=5.2 min, el producto de oxidación el péptido que conduce a la formación del péptido tetramérico LfcinB(20-25)<sub>4</sub> y la tercera especie posiblemente el POM que contiene el compuesto de organoestaño (IV): **4-L3-[LfcinB (20-25)<sub>2</sub>]**. Se estableció que la cinética de la reacción fue diferente a la observada entre la L-Cys-OH y el AMhx ya que la reacción después de 24h no fue completa. Debido a la labilidad del complejo pentacoordinado de estaño en medio ácido, el pH del medio de reacción fue neutro.



**Figura 53.** Estructura del bloque(4-L3): OrgSn(IV)-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-Ala-Ala-Ala-AMhx y el péptido LfcinB (20-25)<sub>2</sub>. También se observa la estructura del péptido tetramérico LfcinB (20-25)<sub>4</sub> subproducto formado por la oxidación del péptido dimérico el péptido funcionalizado con el compuesto de organoestaño (IV) 4-L3-[LfcinB (20-25)]<sub>2</sub>.



Se observa que la reacción de oxidación del grupo tiol para formar el puente disulfuro compitió con la reacción de Michael (química click), sugiriendo que las condiciones de reacción deben ser evaluadas para que la reacción de Michael sea la predominante. Además, se debe tener en cuenta que la reacción de Michael esta favorecida por solventes polares próticos, a medida que la polaridad del medio disminuye, el rendimiento decrece hasta un punto en el que no procede, sugiriendo que la reacción de formación del péptido se ve más favorecida que la formación del POM

### **Resumen capítulo III**

- Se establecieron las condiciones óptimas de reacción y se implementó la síntesis en fase sólida del linker L3(AMhx-Ala-Ala-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>)
- Se establecieron las condiciones óptimas de reacción y se implementó la síntesis del bloque organometálico AMhx-Ala-Ala-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-OrgSn(IV) (L3-4), el cual puede ser utilizado como precursor para la obtención de POM.
- El linker y el bloque organometálico fueron obtenidos con alta pureza, por lo cual no se requirió de purificación
- De manera preliminar se estableció que la funcionalización de péptidos mediante la reacción de Michael se ve afectada significativamente por la formación del puente disulfuro de los grupos tiol del péptido

### **Conclusión**

A partir de los compuestos organoestaño obtenidos en el capítulo I fue posible obtener linker, el bloque organometálico por síntesis en fase sólida y de manera preliminar se evaluó la reacción de Michael para la incorporación del bloque al péptido mediante química click.



## 5. Conclusiones

Se implementó una estrategia sintética para la obtención de compuestos organoestaño IV pentacoordinados, derivados de aminoácidos polares L-Lisina, L-ácido glutámico, L-ácido aspártico y D-ácido aspártico.

Se diseñó una ruta sintética para la obtención de a) el linker (AMhx-Ala-Ala-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) por síntesis en fase sólida y b) el bloque organometálico AMhx-Ala-Ala-Ala-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-OrgSn (IV) por síntesis en solución. Estos compuestos fueron obtenidos en buenos rendimientos y sin necesidad de purificarlos, haciendo la síntesis más rápida, económica y más amigable con el medio ambiente

La funcionalización con bloques organometálicos con péptidos por la vía de adición de Michael (química clic), en solución, se ve afectada por la formación de puentes disulfuro entre los grupos tiol, lo que incide significativamente en la obtención del péptido organometálico conteniendo compuestos de organoestaño (IV).

Se identificaron los parámetros óptimos para la síntesis de péptidos y péptidos organometálicos de ferroceno derivados de la secuencia palindrómica RWQWRWQWR

Se determinó que la incorporación de ferroceno a péptidos diméricos afecta significativamente los rendimientos y la pureza de los productos

Las metodologías aquí diseñadas y optimizadas permiten obtener péptidos organometálicos conjugados con ferroceno u organoestaño IV como contribución al diseño de posibles fármacos para el tratamiento del cáncer .

## 6. Bibliografía

1. International Agency for Research on Cancer- WHO. The global cancer observatory. Organización mundial de la salud. 2019.
2. Organización Panamericana de la Salud. OPS. Cancer de mama en las Américas [Internet]. OPS. 2018 [cited 2020 Jun 20]. p. 1–2. Available from: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=hojas-informativas-3677&alias=46713-hoja-informativa-cancer-de-mama-en-las-americas-2018-1&Itemid=270&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=hojas-informativas-3677&alias=46713-hoja-informativa-cancer-de-mama-en-las-americas-2018-1&Itemid=270&lang=es)
3. Solidoro Santisteban Andrés. Pobreza, inequidad y cáncer. Acta Médica Peru [Internet]. 2010;27(3):204–6. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=96618997009>
4. Ministerio de Salud y Protección Social de Colombia. Plan Nacional contra el Cancer 2012-2020 [Internet]. Ministerio de salud y protección social de colombia. 2018 [cited 2019 May 15]. p. 1–124. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-fact-sheets.pdf>
5. Centro para el control y la prevención de enfermedades. Cómo se trata el cancer de mama. CDC. 2019.
6. Instituto Nacional del cancer. Tratamiento del cáncer [Internet]. Instituto Nacional de cancer. 2018 [cited 2020 Jun 24]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento>
7. Piñeros M, Sánchez R, Perry F, García OA, Ocampo R, Cendales R. Demoras en el diagnóstico y tratamiento de mujeres con cáncer de mama en Bogotá, Colombia. Salud Publica Mex. 2011;53(6):478–85.
8. Velásquez-De Charry LC, Carrasquilla G, Roca-Garavito S. Equidad en el acceso al tratamiento para el cáncer de mama en colombia. Salud Publica Mex. 2009;51(SUPPL.2).
9. Goss PE, Lee BL, Badovinac-crnjevic T, Strasser-weippl K, Chavarri-guerra Y, Louis JS, et al. The Lancet Oncology Commission JJ / AC Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. 2013;2045(13).
10. National library of medicine. Home- ClinicalTrials.gov. National library of medicine. 2019.
11. The National Center for Biotechnology Information. Search “Peptide” [Internet]. NCBI.

2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
12. Lau JL, Dunn MK. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2018;26(10):2700–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.06.052>
  13. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discov Today* [Internet]. 2015;20(1):122–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.003>
  14. Vale N, Correia-Branco A, Patrício B, Duarte D, Martel F. In vitro studies on the inhibition of colon cancer by amino acid derivatives of bromothiazole. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2017;27(15):3507–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.073>
  15. Lemke J, Pinto A, Niehoff P, Vasylyeva V, Metzler-Nolte N. Synthesis, structural characterisation and anti-proliferative activity of NHC gold amino acid and peptide conjugates. *Dalt Trans.* 2009;(35):7063–70.
  16. Van Staveren DR, Weyhermüller T, Metzler-Nolte N. Organometallic  $\beta$ -turn mimetics. A structural and spectroscopic study of inter-strand hydrogen bonding in ferrocene and cobaltocenium conjugates of amino acids and dipeptides. *Dalt Trans.* 2003;(2):210–20.
  17. Kraatz HB. Ferrocene-conjugates of amino acids, peptides and nucleic acids. *J Inorg Organomet Polym.* 2005;15(1):83–106.
  18. A Juaristi E, Soloshonok VA, editors. *Enantioselective Synthesis of Beta-Amino Acids* [Internet]. Second edi. Wiley; 2005. 600 p. Available from: <https://books.google.com.co/books?id=WpgRvHGa0zIC>
  19. Gifford JL, Hunter HN, Vogel HJ. Lactoferricin: A lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(22):2588–98.
  20. Corrêa JAF, Evangelista AG, Nazareth T de M, Luciano FB. Fundamentals on the molecular mechanism of action of antimicrobial peptides. *Materialia.* 2019;8(September).
  21. Ageitos JM, Sánchez-Pérez A, Calo-Mata P, Villa TG. Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2017;133:117–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.018>
  22. Marquette A, Bechinger B. Biophysical investigations elucidating the mechanisms of action of antimicrobial peptides and their synergism. *Biomolecules.* 2018;8(2).
  23. Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6(DEC):1–12.
  24. Ptaszyńska N, Olkiewicz K, Okońska J, Gucwa K, Łęgowska A, Gitlin-Domagalska A, et al. Peptide conjugates of lactoferricin analogues and antimicrobials—Design, chemical synthesis, and evaluation of antimicrobial activity and mammalian cytotoxicity. *Peptides.* 2019;117(May).

25. Khan MU, Pirzadeh M, Förster CY, Shityakov S, Shariati MA. Role of milk-derived antibacterial peptides in modern food biotechnology: Their synthesis, applications and future perspectives. *Biomolecules*. 2018;8(4).
26. Thundimadathil J. Cancer Treatment Using Peptides: Current Therapies and Future Prospects. *J Amino Acids*. 2012;2012:1–13.
27. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today*. 2010;15(1–2):40–56.
28. Albericio F, Kruger HG. Therapeutic peptides. *Future Med Chem*. 2012;4(12):1527–31.
29. Camilio KA, Rekdal Ø, Sveinbjörnsson B. LTX-315 (Oncopore™): A short synthetic anticancer peptide and novel immunotherapeutic agent. *Oncoimmunology*. 2014;3(6):7–9.
30. Bellamy W, Takase M, Wakabayashi H, Kawase K, Tomita M. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J Appl Bacteriol*. 1992;73(6):472–9.
31. Mader JS, Salsman J, Conrad DM, Hoskin DW. Bovine lactoferricin selectively induces apoptosis in human leukemia and carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2005;4(4):612–24.
32. Arias M, Piga KB, Hyndman ME, Vogel HJ. Improving the activity of trp-rich antimicrobial peptides by Arg/Lys substitutions and changing the length of cationic residues. *Biomolecules*. 2018;8(2).
33. Eliassen LT, Haug BE, Berge G, Rekdal Ø. Enhanced antitumour activity of 15-residue bovine lactoferricin derivatives containing bulky aromatic amino acids and lipophilic N-terminal modifications. *J Pept Sci*. 2003;9(8):510–7.
34. Solarte VA. Péptidos derivados de lactoferricina bovina como agentes anticancerígenos contra el carcinoma de células escamosas de la cavidad oral. 2016;127.
35. Vargas Casanova Y, Rodríguez Guerra JA, Umaña Pérez YA, Leal Castro AL, Almanzar Reina G, García Castañeda JE, et al. Antibacterial Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Cytotoxic Effect against MDA-MB-468 and MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Lines. *Molecules*. 2017;22(10):1–11.
36. Cutone A, Rosa L, Ianiro G, Lepanto MS, Di Patti MCB, Valenti P, et al. Lactoferrin's anti-cancer properties: Safety, selectivity, and wide range of action. *Biomolecules*. 2020;10(3):1–26.
37. Barragán-Cárdenas A, Urrea-Pelayo M, Niño-Ramírez VA, Umaña-Pérez A, Vernot JP, Parra-Giraldo CM, et al. Selective cytotoxic effect against the MDA-MB-468 breast cancer cell line of the antibacterial palindromic peptide derived from bovine lactoferricin. *RSC Adv*. 2020;10(30):17593–601.
38. Rodríguez J. Evaluación de la actividad anticancerígena in vitro de péptidos sintéticos derivados de lactoferricina bovina en líneas celulares de cáncer de mama. Universidad Nacional de Colombia; 2018.

39. Huertas N de J, Monroy ZJR, Medina RF, Castañeda JEG. Antimicrobial Activity of Truncated and Polyvalent Peptides Derived from the FKRRQWQWRMKKGLA Sequence against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Molecules*. 2017;22(6).
40. Solarte VA, Conget P, Vernot JP, Rosas JE, Rivera ZJ, García JE, et al. A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin as a potential therapeutic tool for oral squamous cell carcinoma: A preclinical model. *PLoS One*. 2017;12(3):1–17.
41. Solarte VA, Rosas JE, Rivera ZJ, Arango-Rodríguez ML, García JE, Vernot JP. A tetrameric peptide derived from bovine lactoferricin exhibits specific cytotoxic effects against oral squamous-cell carcinoma cell lines. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
42. Román JT, Fuenmayor CA, Dominguez CMZ, Clavijo-Grimaldo Di, Acosta M, García-Castañeda JE, et al. Pullulan nanofibers containing the antimicrobial palindromic peptide LfcinB (21-25)Pal obtained: Via electrospinning. *RSC Adv*. 2019;9(35):20432–8.
43. Huertas Méndez NDJ, Vargas Casanova Y, Gómez Chimbi AK, Hernández E, Leal Castro AL, Melo Diaz JM, et al. Synthetic Peptides Derived from Bovine Lactoferricin Exhibit Antimicrobial Activity against *E. coli* ATCC 11775, *S. maltophilia* ATCC 13636 and *S. enteritidis* ATCC 13076. *Molecules*. 2017;22(3):1–10.
44. León-Calvijo MA, Leal-Castro AL, Almanzar-Reina GA, Rosas-Pérez JE, García-Castañeda JE, Rivera-Monroy ZJ. Antibacterial activity of synthetic peptides derived from lactoferricin against *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
45. Vargas Casanova Y. Evaluación De La Actividad Antibacteriana De Péptidos Diméricos Y Tetraméricos Derivados De Lactoferricina Bovina Contra Bacterias Gram Positivas Y Gram Negativas. 2018;100.
46. Vargas-Casanova Y, Poveda JCV, Rivera-Monroy ZJ, Andrés CeballosGarzón, Ricardo Fierro-Medina, Patrice Le Pape JE-C, Giraldo and CMP. Palindromic Peptide LfcinB (21-25)Pal Exhibited Antifungal Activity against Multidrug-Resistant *Candida*. *ChemistrySelect*. 2020;5:7236–42.
47. Navarrete EL. Síntesis de péptidos. In: Universidad nacional autonoma de méxico, Instituto de Biotecnología. 2007. p. 1–53.
48. Torres García C. Desarrollo de nuevas estrategias en fase sólida para la obtención de péptidos modificados : Aplicación a la síntesis de análogos de peptinas. 2015.
49. Soria Gila ML. Síntesis Y Evaluación De Péptidos Y Derivados Desarrollo De Fármacos , Biotecnología Y [Internet]. universidad de Granada; 2016. Available from: <http://hdl.handle.net/10481/48166>
50. Gómez-Ruiz S, Maksimović-Ivanić D, Mijatović S, Kaluderović GN. On the discovery, biological effects, and use of cisplatin and metallocenes in anticancer chemotherapy. *Bioinorg Chem Appl*. 2012;2012:15–7.
51. EMORY. WHISHIP CANCER INSTITUTE. CancerQuest. Tratamiento de cáncer [Internet].

- Cancer Quest. 2020. Available from: <https://www.cancerquest.org/es/para-los-pacientes/tratamientos/tablas-de-tratamientos-de-cancer>
52. Instituto Nacional del cancer. Terapia de primera linea [Internet]. Cancer Org. 2020 [cited 2020 Jun 20]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/terapia-de-primera-linea>
  53. American cancer society. Quimioterapia paara cancer de pulmón no microcítico. [Internet]. Cancer org. 2020 [cited 2020 Jun 16]. Available from: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-pulmon/tratamiento-no-microcitico/quimioterapia.html>
  54. instituto nacional de vigilancia de medicamentos y Alimentos. Consulte su registro sanitario Cisplatino [Internet]. INVIMA. 2020 [cited 2020 May 20]. Available from: [http://consultaregistro.invima.gov.co:8082/Consultas/consultas/consreg\\_encabcum.jsp](http://consultaregistro.invima.gov.co:8082/Consultas/consultas/consreg_encabcum.jsp)
  55. Vasconcellos VF, Marta GN, da Silva EMK, Gois AFT, de Castria TB RR. Cisplatin versus carboplatin in combination with third-generation drugs for advanced non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020;(1):009256.
  56. Amir MK, Khan S, Zia-Ur-Rehman, Shah A, Butler IS. Anticancer activity of organotin(IV) carboxylates. *Inorganica Chim Acta* [Internet]. 2014;423(PB):14–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2014.07.053>
  57. Shaheen F, Sirajuddin M, Ali S, Zia-ur-Rehman, Dyson PJ, Shah NA, et al. Organotin(IV) 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)piperazine-1-carbodithioates: Synthesis, characterization and biological activities. *J Organomet Chem* [Internet]. 2018;856(Iv):13–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2017.12.010>
  58. Pellerito L, Prinzivalli C, Casella G, Fiore T, Pellerito O, Giuliano M, et al. Diorganotin(IV) N-acetyl-l-cysteinate complexes: Synthesis, solid state, solution phase, DFT and biological investigations. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2010;104(7):750–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.03.008>
  59. Ali S, Shahzadi S, Imtiaz-ud-Din. Anticarcinogenicity and Toxicity of Organotin(IV) Complexes: A Review. *Iran J Sci Technol Trans A Sci.* 2018;42(2):505–24.
  60. Banti CN, Hadjikakou SK, Sismanoglu T, Hadjiliadis N. Anti-proliferative and antitumor activity of organotin(IV) compounds. An overview of the last decade and future perspectives. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2019;194(November 2018):114–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.02.003>
  61. Basu Baul TS, Basu S, De Vos D, Linden A. Amino acetate functionalized Schiff base organotin(IV) complexes as anticancer drugs: Synthesis, structural characterization, and in vitro cytotoxicity studies. *Invest New Drugs.* 2009;27(5):419–31.
  62. Devi J, Yadav J. Recent Advancements in Organotin(IV) Complexes as Potential Anticancer Agents. *Anticancer Agents Med Chem.* 2018;18(3):335–53.
  63. Kaluderović GN, Kommera H, Hey-Hawkins E, Paschke R, Gómez-Ruiz S. Synthesis and

- biological applications of ionic triphenyltin(IV) chloride carboxylate complexes with exceptionally high cytotoxicity. *Metallomics*. 2010;2(6):419–28.
64. Ordóñez-Hernández J, Arcos-Ramos R, García-Ortega H, Munguía-Viveros E, Romero-Ávila M, Flores-Alamo M, et al. Synthesis and structural analysis of bioactive Schiff-base pentacoordinated diorganotin(IV) complexes. *J Mol Struct*. 2019;1180:462–71.
  65. Davies A. *Organotin Chemistry*. Second Edi. Wiley-VCH Weinheim, editor. 2004.
  66. Kobakhidze N, Farfán N, Romero M, Méndez-Stivalet JM, Gabriela Ballinas-López M, García-Ortega H, et al. New pentacoordinated Schiff-base diorganotin(IV) complexes derived from nonpolar side chain  $\alpha$ -amino acids. *J Organomet Chem [Internet]*. 2010;695(8):1189–99. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jorganchem.2010.01.024>
  67. Beltrán HI, Zamudio-Rivera LS, Mancilla T, Santillan R, Farfán N. One-step preparation, structural assignment, and x-ray study of 2,2-di-n-butyl- and 2,2-diphenyl-6-aza-1,3-dioxo-2-stannabenzocyclononen-4-ones derived from amino acids. *Chem - A Eur J*. 2003;9(10):2291–306.
  68. Cordes EH, Jencks WP. On the Mechanism of Schiff Base Formation and Hydrolysis. *J Am Chem Soc*. 1962;84(5):832–7.
  69. Katsoulakou E, Tiliakos M, Papaefstathiou G, Terzis A, Raptopoulou C, Geromichalos G, et al. Diorganotin(IV) complexes of dipeptides containing the  $\alpha$ -aminoisobutyryl residue (Aib): Preparation, structural characterization, antibacterial and antiproliferative activities of [(n-Bu)<sub>2</sub>Sn(H-1 L)] (LH = H-Aib-L-Leu-OH, H-Aib-L-Ala-OH). *J Inorg Biochem*. 2008;102(7):1397–405.
  70. Nath M, Pokharia S, Yadav R. Organotin(IV) complexes of amino acids and peptides. Vol. 215, *Coordination Chemistry Reviews*. 2001. 99–149 p.
  71. Ordóñez-Hernández J, Jiménez-Sánchez A, García-Ortega H, Sánchez-Puig N, Flores-Álamo M, Santillan R, et al. A series of dual-responsive Coumarin-Bodipy probes for local microviscosity monitoring. *Dye Pigment [Internet]*. 2018;157(May):305–13. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2018.05.009>
  72. Nath M. Toxicity and the cardiovascular activity of organotin compounds: A review. *Appl Organomet Chem*. 2008;22(10):598–612.
  73. Nath M, Saini PK, Kumar A. Synthesis, structural characterization, biological activity and thermal study of triand diorganotin(IV) complexes of Schiff base derived from 2-aminomethylbenzimidazole. *Appl Organomet Chem*. 2009;23(11):434–45.
  74. Antonenko TA, Shpakovsky DB, Berseneva D, Gracheva YA, Dubova LG, Shevtsov PN, et al. Cytotoxic activity of organotin carboxylates based on synthetic phenolic antioxidants and polycyclic bile acids. *J Organomet Chem [Internet]*. 2020;909:121089. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2019.121089>
  75. Pellerito C, Emanuele S, Ferrante F, Celesia A, Giuliano M, Fiore T. Tributyltin(IV) ferulate, a novel synthetic ferulic acid-derivative, induces autophagic cell death in colon cancer cells: From chemical synthesis to biochemical effects. *J Inorg Biochem*

[Internet]. 2020;(Iv):110999. Available from:  
[https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013419307147?dgcid=rss\\_sd\\_all&utm\\_source=researcher\\_app&utm\\_medium=referral&utm\\_campaign=RESR\\_MRKT\\_Researcher\\_inbound](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013419307147?dgcid=rss_sd_all&utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=RESR_MRKT_Researcher_inbound)

76. Nath M, Yadav R, Eng G, Musingarimi P. Characteristic Spectral Studies and in vitro Antimicrobial and in vivo Multi-Infection Antifungal Activities in Mice of New Organotin(IV) Derivatives of Heterocyclic Amino Acids. *Appl Organomet Chem* [Internet]. 1999;13:29–37. Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0739\(199901\)13:1%3C29::AID-AOC809%3E3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0739(199901)13:1%3C29::AID-AOC809%3E3.0.CO;2-D)
77. Dylg M, Pruchnik H, Pruchnik F, Majkowska-Skrobek G, Ułaszewski S. Antifungal activity of organotin compounds with functionalized carboxylates evaluated by the microdilution bioassay in vitro. *Med Mycol*. 2010;48(2):373–83.
78. Albada B, Metzler-Nolte N. Highly Potent Antibacterial Organometallic Peptide Conjugates. *Acc Chem Res*. 2017;50(10):2510–8.
79. Kumari A, Tandon JP, Singh R V. Antimicrobial effects of newly synthesized organotin(IV) and organolead(IV) derivatives. *Appl Organomet Chem*. 1993;7(8):655–60.
80. Bhanuka S, Singh HL. Spectral, DFT and antibacterial studies of TIN(II) complexes of schiff bases derived from aromatic aldehyde and amino acids. *Rasayan J Chem*. 2017;10(2):673–81.
81. Basu Baul TS, Kehie P, Höpfl H, Duthie A, Eng G, Linden A. Organotin(IV) complexes derived from proteinogenic amino acid: synthesis, structure and evaluation of larvicidal efficacy on *Anopheles stephensi* mosquito larvae. *Appl Organomet Chem*. 2017;31(1):e3547.
82. Shujha S, Shah A, Zia-Ur-Rehman, Muhammad N, Ali S, Qureshi R, et al. Diorganotin(IV) derivatives of ONO tridentate Schiff base: Synthesis, crystal structure, in vitro antimicrobial, anti-leishmanial and DNA binding studies. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2010;45(7):2902–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.03.015>
83. Attanzio A, Ippolito M, Girasolo MA, Saiano F, Rotondo A, Rubino S, et al. Anti-cancer activity of di- and tri-organotin(IV) compounds with D-(+)-Galacturonic acid on human tumor cells. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2018;188(December 2017):102–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2018.04.006>
84. Nath M, Yadav R, Gielen M, Dalil H, De Vos D, Eng G. Synthesis, Characteristic Spectral Studies and in vitro Antimicrobial and Antitumour Activities of Organotin(IV) Complexes of Schiff Bases Derived from Amino-acids. *Appl Organomet Chem*. 1997;11(9):727–36.
85. Nath M, Jairath R, Eng G, Song X, Kumar A. Synthesis, spectral characterization and biological studies of some organotin(IV) complexes of l-proline, trans-hydroxy-l-proline and l-glutamine. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc*. 2005;62(4–5):1179–87.
86. Nath M, Saini PK. Chemistry and applications of organotin(iv) complexes of Schiff

- bases. *Dalt Trans.* 2011;40(27):7077–121.
87. Nath M, Goyal S, Goyal S. Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry Synthesis, Spectral and Biological Studies of Organosilicon ( IV ) Complexes of Schiff Bases Derived from Amino Acids. 2000;(March 2013):37–41.
  88. Yan C, Zhang J, Liang T, Li Q. Diorganotin (IV) complexes with 4-nitro-N-phthaloyl-glycine: Synthesis, characterization, antitumor activity and DNA-binding studies. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2015;71:119–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2015.02.027>
  89. Wilkinson G, Rosenblum M, Whiting MC, Woodward RB. The structure of iron bis-cyclopentadienyl. *J Am Chem Soc.* 1952;74(8):2125–6.
  90. Fischer EO, Pfab W. Cyclopentadien-Metallkomplexe ein neuer Typ metallorganischer Verbindungen. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect B J Chem Sci.* 1952;7(7):377–9.
  91. Mojžišová G, Mojžiš J, Vašková J. Organometallic iron complexes as potential cancer therapeutics. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(4):651–4.
  92. Abd-El-Aziz AS, Manners I. Neutral and cationic macromolecules based on iron sandwich complexes. *J Inorg Organomet Polym.* 2005;15(1):157–95.
  93. Fouda, M.F.R., Abd-Elzaher, M.M., Abdelsamaia, R.A. and Labib AA. On the medicinal chemistry of ferrocene. *Appl Organometal Chem.* 2007;21:613–25.
  94. Allardyce CS, Dorcier A, Scolaro C, Dyson PJ. Development of organometallic (organo-transition metal) pharmaceuticals. *Appl Organomet Chem.* 2005;19(1):1–10.
  95. Neuse EW. Macromolecular ferrocene compounds as cancer drug models. *J Inorg Organomet Polym.* 2005;15(1):3–32.
  96. van Staveren DR, and Metzler-Nolte N. Bioorganometallic Chemistry of Ferrocene. *Chem Rev.* 2004;104(12):5931–86.
  97. Chantson JT, Falzacappa MVV, Crovella S, Metzler-Nolte N. Solid-phase synthesis, characterization, and antibacterial activities of metallocene-peptide bioconjugates. *ChemMedChem.* 2006;1(11):1268–74.
  98. Astruc D. Why is Ferrocene so Exceptional? *Eur J Inorg Chem.* 2017;2017(1):6–29.
  99. Barik T, Ghosh A, Mishra A, Dhiman R, Sasamori T, Chatterjee S. Bioactive 1,1'-unsymmetrical bi-functional ferrocenyl compounds using a novel solvent free one pot multicomponent reaction method. *J Organomet Chem* [Internet]. 2020;908:121095. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2019.121095>
  100. Chowdhury S, Sanders DAR, Schatte G, Kraatz HB. Discovery of a pseudo  $\beta$  barrel: Synthesis and formation by tiling of ferrocene cyclopeptides. *Angew Chemie - Int Ed.* 2006;45(5):751–4.
  101. Schlögl K. Über Ferrocen-Aminosäuren und verwandte Verbindungen. *Monatshefte für Chemie.* 1957;88(4):601–21.

102. Herrick RS, Jarret RM, Curran TP, Dragoli DR, Flaherty MB, Lindyberg SE, et al. Ordered conformations in bis(amino acid) derivatives of 1,1'-ferrocenedicarboxylic acid. *Tetrahedron Lett.* 1996;37(30):5289–92.
103. Kraatz HB, Lusztyk J, Enright GD. Ferrocenoyl Amino Acids: A Synthetic and Structural Study 1. *Inorg Chem.* 1997;36(11):2400–5.
104. Lataifeh A. Ferrocenoyl conjugates of hydroxyl group containing side chain amino acids: Synthesis, electrochemical study and reactivity toward electrophiles. *J Organomet Chem* [Internet]. 2019;121056. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022328X19304991>
105. Gimeno MC, Goitia H, Laguna A, Luque ME, Villacampa MD, Sepúlveda C, et al. Conjugates of ferrocene with biological compounds. Coordination to gold complexes and antitumoral properties. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2011;105(11):1373–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.07.015>
106. Sudhir VS, Phani Kumar NY, Chandrasekaran S. Click chemistry inspired synthesis of ferrocene amino acids and other derivatives. *Tetrahedron* [Internet]. 2010;66(6):1327–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tet.2009.12.011>
107. Mari C, Mosberger S, Llorente N, Spreckelmeyer S, Gasser G. Insertion of organometallic moieties into peptides and peptide nucleic acids using alternative “click” strategies. *Inorg Chem Front.* 2016;3(3):397–405.
108. Appoh FE, Sutherland TC, Kraatz HB. Changes in the hydrogen bonding pattern in ferrocene peptides. *J Organomet Chem.* 2004;689(25 SPEC. ISS.):4669–77.
109. Hirao T. Control of chirality-organized structures of ferrocene-dipeptide bioconjugates. *J Organomet Chem* [Internet]. 2009;694(6):806–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jorganchem.2008.09.074>
110. Moriuchi T, Nagai T, Hirao T. Chirality organization of ferrocenes bearing dipeptide chains of heterochiral sequence. *Org Lett.* 2005;7(23):5265–8.
111. Ong, C.; Jeng, J.; Juang, S.; Chen C. A ferrocene-Intercalator conjugate with a potent cytotoxicity. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 1992;2(9):929–32. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)80590-9](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)80590-9)
112. Jaouen, Gérard, Metzler-Nolte N (Eds., editor. *Medicinal Organometallic Chemistry.* 32nd ed. Springer International Publishing; 2010.
113. Adhikari B, Singh C, Shah A, Lough AJ, Raatz HB. Amino Acid Chirality and Ferrocene Conformation Guided Self-Assembly and Gelation of Ferrocene-Peptide Conjugates. *Chem - A Eur J.* 2015;21(32):11560–72.
114. Adhikari B, Lough AJ, Barker B, Shah A, Xiang C, Kraatz HB. Bis-amino acid derivatives of 1,1'-ferrocenedicarboxylic acid: Structural, electrochemical, and metal ion binding studies. *Organometallics.* 2014;33(18):4873–87.
115. Adhikari B, Kraatz H-B. Redox-triggered changes in the self-assembly of a ferrocene-peptide conjugate. *chem commun* [Internet]. 2014;50(42):5551–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C3CC49268K>

116. Kovač V, Čakić Semencic M, Kodrin I, Roca S, Rapić V. Ferrocene-dipeptide conjugates derived from aminoferrocene and 1-acetyl-1'-aminoferrocene: Synthesis and conformational studies. *Tetrahedron*. 2013;69(48):10497–506.
117. Lara Carrillo JA, Fierro Medina R, Manríquez Rocha J, Bustos Bustos E, Insuasty Cepeda DS, García Castañeda JE, et al. Design, Synthesis, and Use of Peptides Derived from Human Papillomavirus L1 Protein for the Modification of Gold Electrode Surfaces by Self-Assembled Monolayers. *Molecules*. 2017;22(11).
118. Ardila N. Síntesis y evaluación de la actividad antibacteriana de potenciales fármacos basados en péptidos derivados de Buforina y Lactoferricina Bovina funcionalizados con moléculas antimicrobianas. Universidad Nacional de Colombia; 2019.
119. Valencia DP, Dantas LMF, Lara A, García J, Rivera Z, Rosas J, et al. Development of a bio-electrochemical immunosensor based on the immobilization of SPINNTKPHEAR peptide derived from HPV-L1 protein on a gold electrode surface. *J Electroanal Chem* [Internet]. 2016;770:50–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.03.040>
120. Insuasty Cepeda DS, Pineda Castañeda HM, Rodríguez Mayor AV, García Castañeda JE, Maldonado Villamil M, Fierro Medina R, et al. Synthetic Peptide Purification via Solid-Phase Extraction with Gradient Elution: A Simple, Economical, Fast, and Efficient Methodology. *Molecules*. 2019;24(7).
121. Escoda TP. Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV). 2007.
122. Isidro-Llobet A, Álvarez M, Albericio F. Amino Acid-Protecting Groups. *Chem. Rev*. 2009, 109, 6, 2455–2504
123. Garay H. Síntesis de péptidos modificados químicamente con posibles aplicaciones farmacéuticas. 2012. Tesis. Universidad Distrital Francisco Jose de Caldas.
124. Binner M. Can you explain a +44 mass difference in peptide synthesis? [Internet]. Researchgate net. 2019 [cited 2020 May 7]. Available from: <https://www.researchgate.net/>.
125. M. Goodman, Felix A, Moroder L, Toniolo C. Synthesis of peptides and peptidomimetics. In: Buchel K, H F, H H, editors. Houben-Weyl, *Methods of Organic Chemistry*. Vol E22a. 2003.
126. Chan W, White P. Fmoc solid Phase peptide synthesis: A practical Approach. ilustrada. OUP oxford, editor. 2000. 346 p.
127. Ladner CL, Turner RJ, Edwards RA. Development of indole chemistry to label tryptophan residues in protein for determination of tryptophan surface accessibility. *Protein Sci*. 2007;16(6):1204–13.

## A Anexo: Caracterización compuestos Organoestaño IV

A continuación, se muestran los espectros de masas de los compuestos de organoestaño IV, sintetizados en el capítulo 1

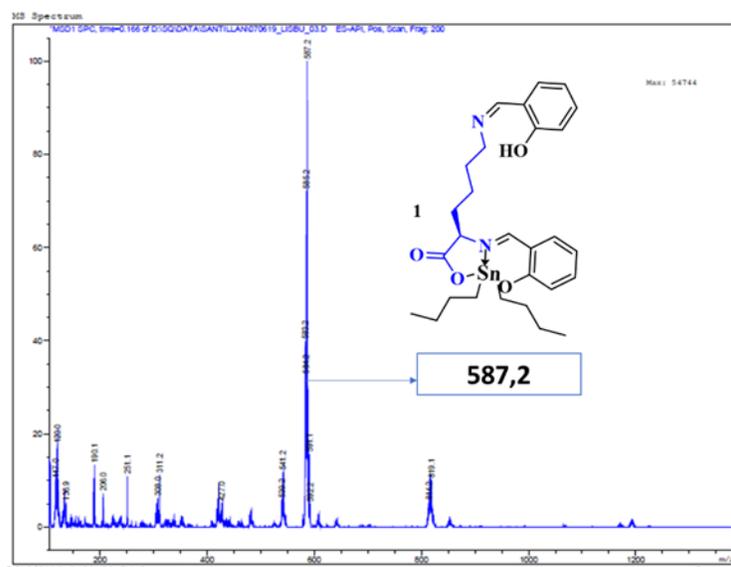


Figura A1. Espectro de masas ES-API del compuesto (1b)

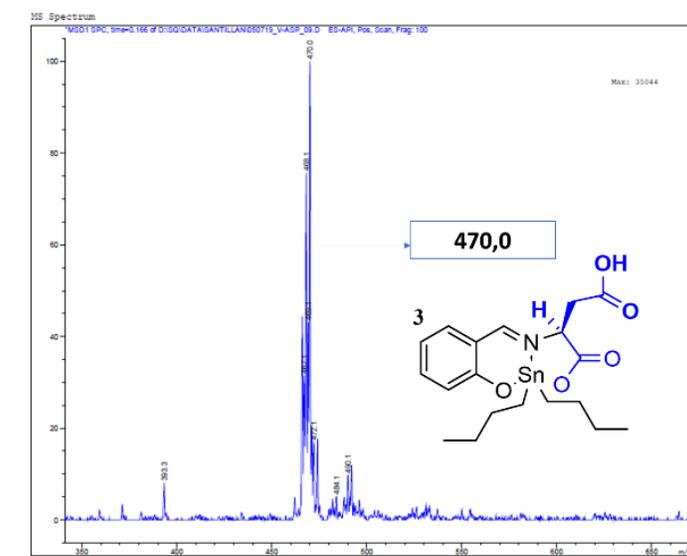


Figura A254. Espectro de masas ES-API del compuesto (3)

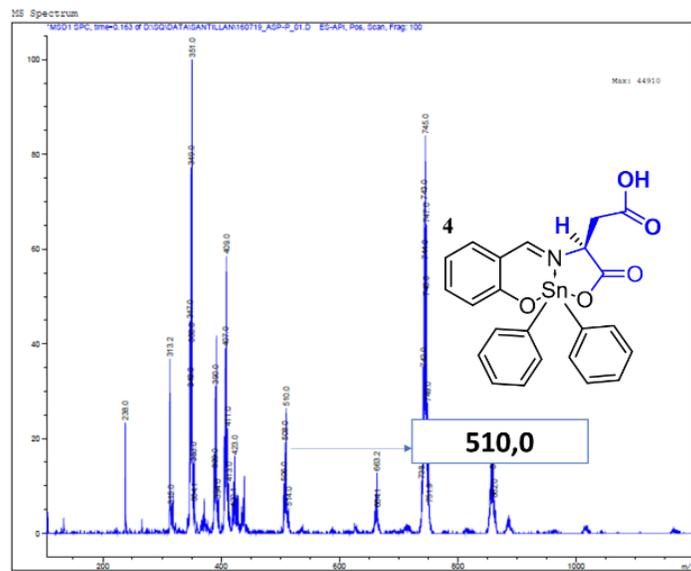


Figura A3. Espectro de masas ES-API del compuesto (4)

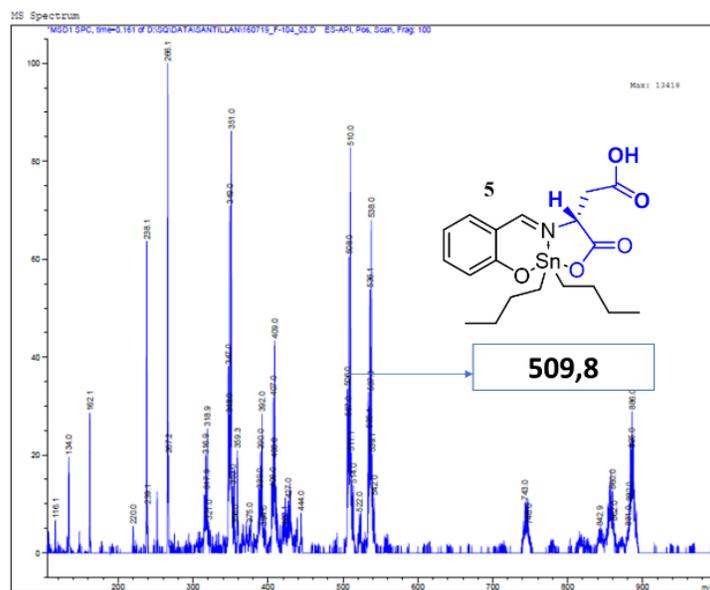


Figura A4 Espectro de masas ES-API del compuesto (5)

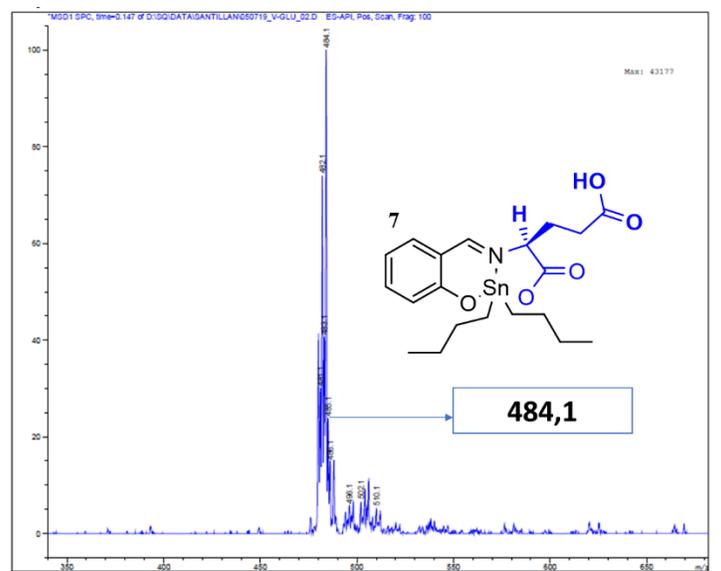


Figura A5. Espectro de masas ES-API del compuesto (7)

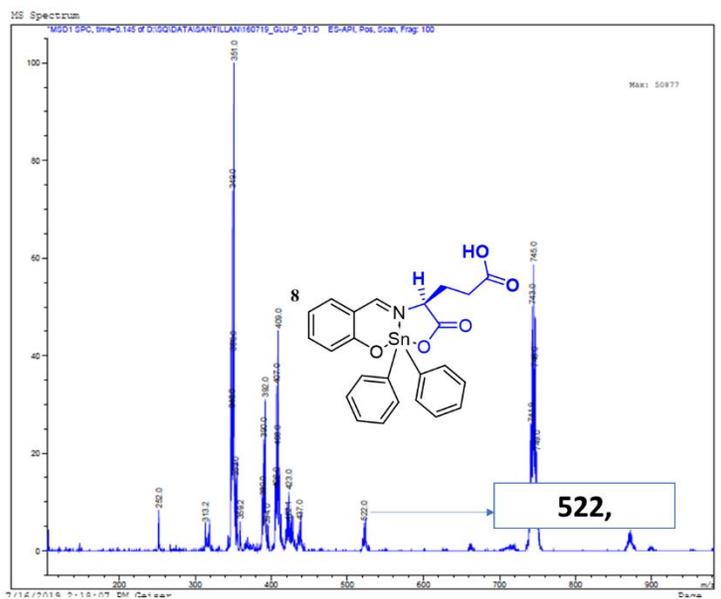


Figura A655. Espectro de masas ES-API del compuesto (8)

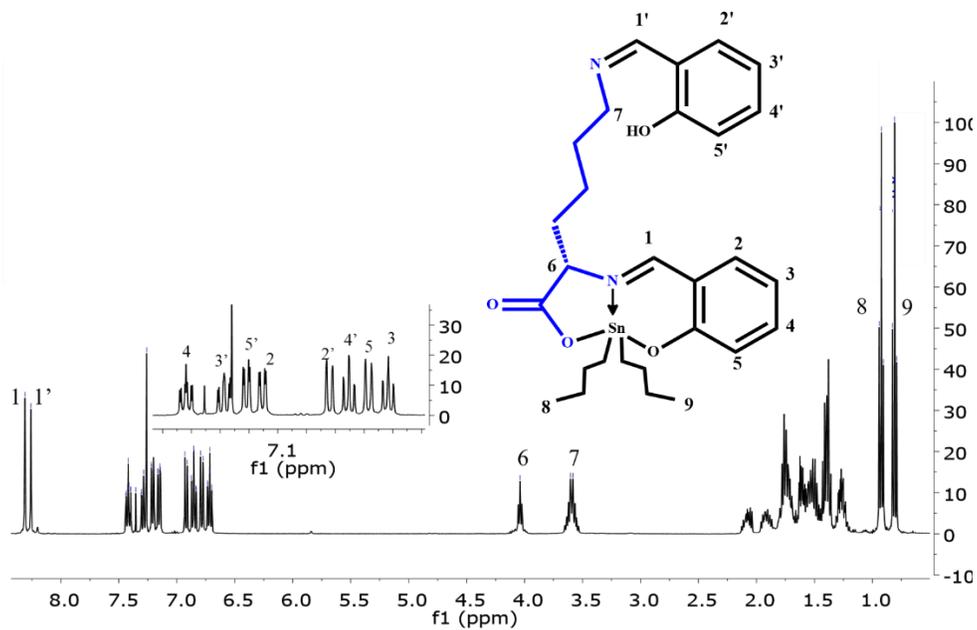


Figura A9. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  del compuesto organoestaño (IV) (1b).

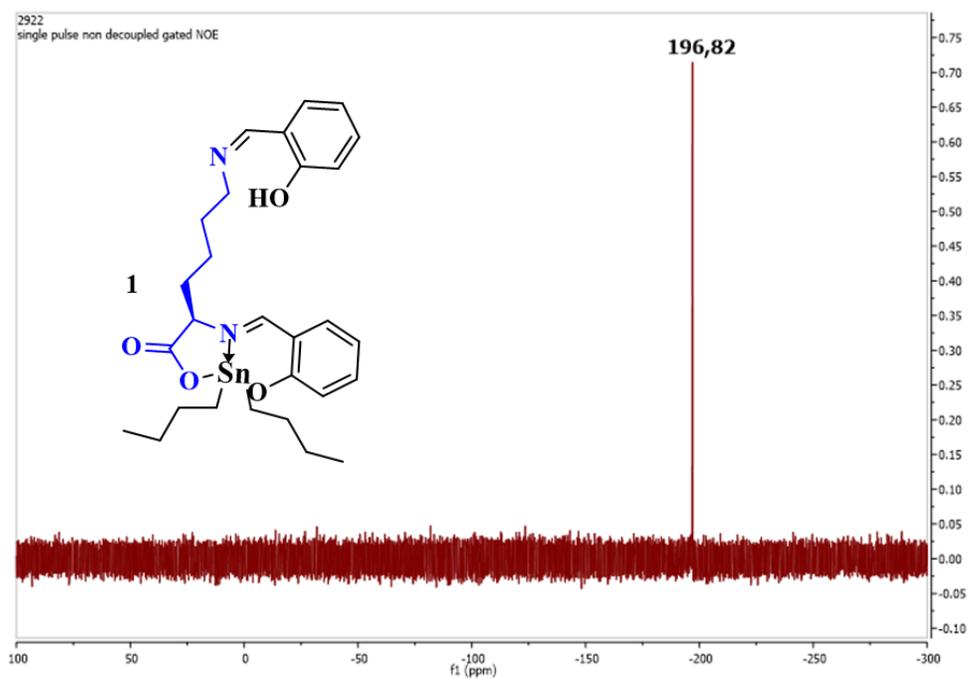


Figura A10. Espectro  $^{119}\text{Sn-NMR}$  del compuesto organoestaño (IV) (1b).

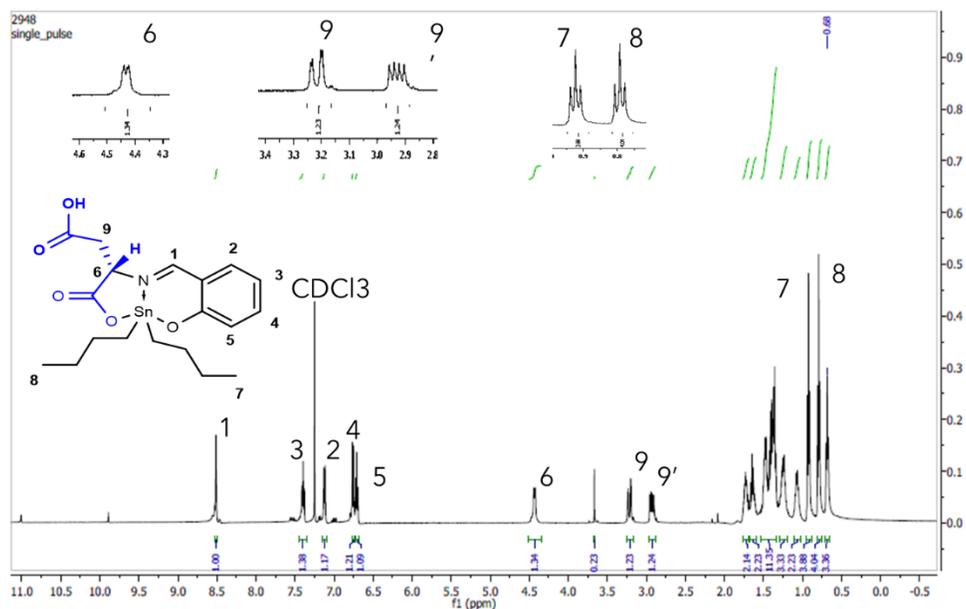


Figura A11. Espectro  $^1\text{H-RMN}$  del compuesto organoestaño (IV) (5).

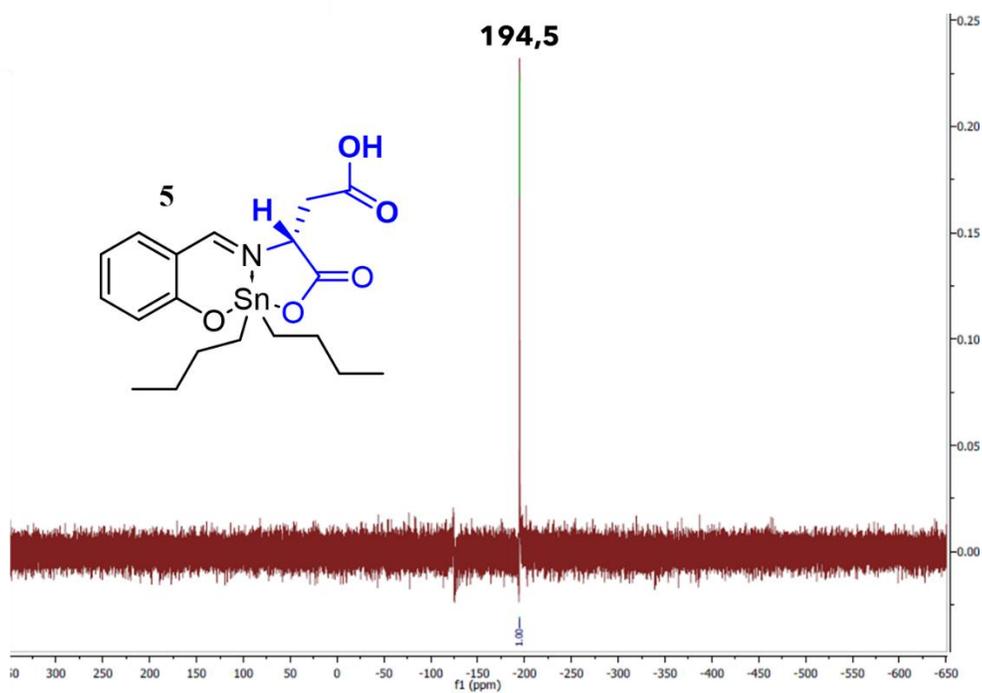


Figura A13. Espectro  $^{119}\text{Sn-RMN}$  del compuesto organoestaño (IV) (5).

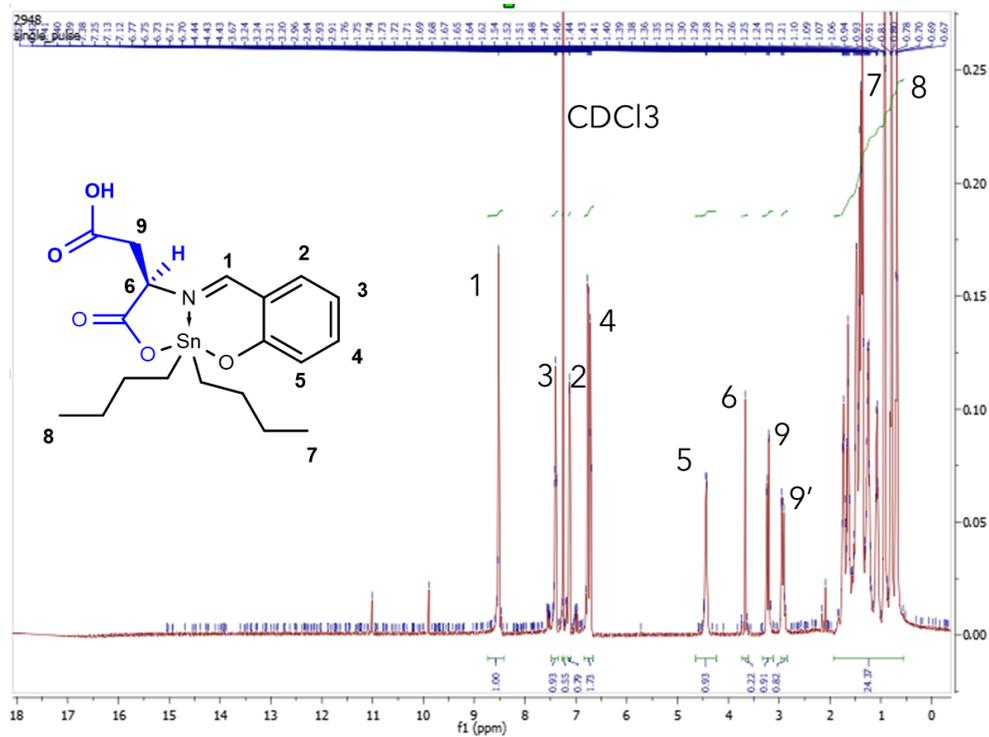


Figura A14. Espectro <sup>1</sup>H-RMN del compuesto organoestaño (IV) (3).

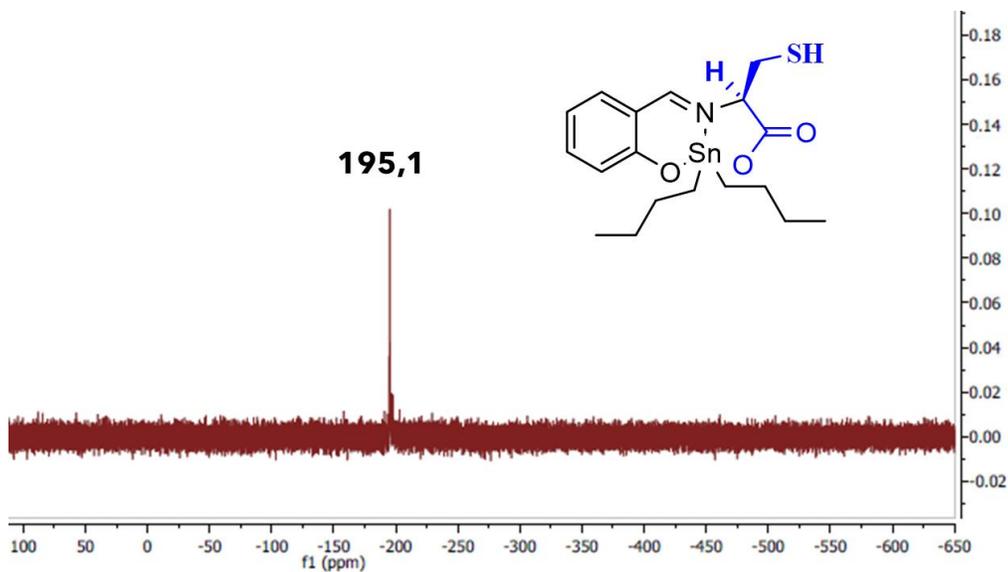


Figura A15. Espectro <sup>119</sup>Sn-RMN del compuesto organoestaño (IV) (2).

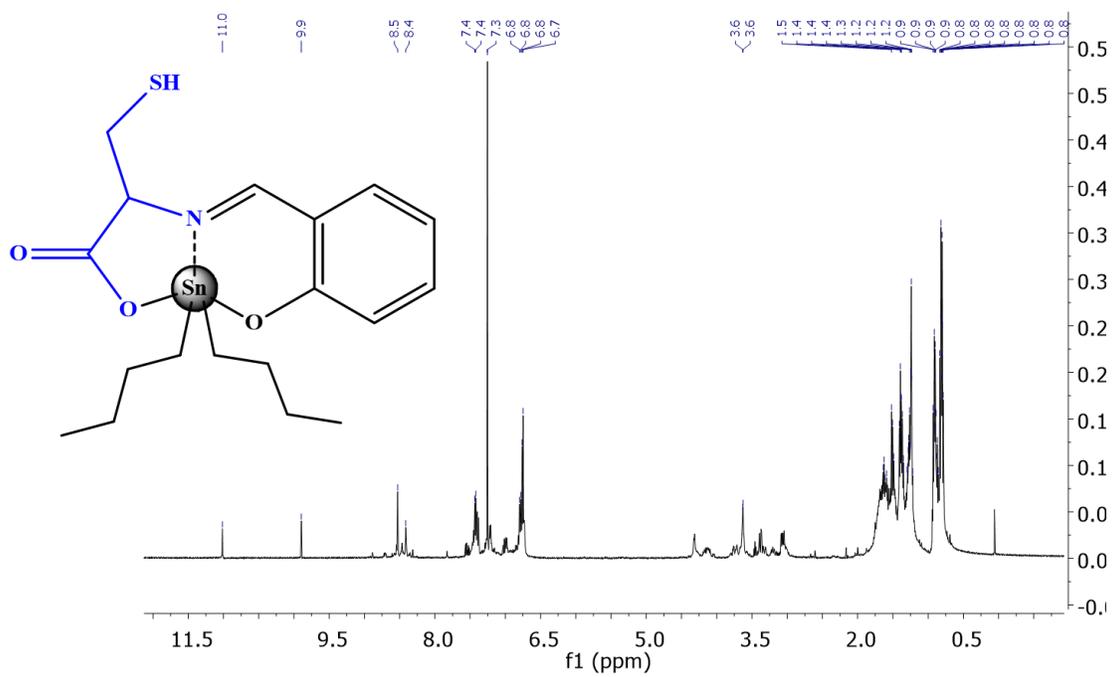


Figura A16. Espectro  $^1\text{H-NMR}$  del compuesto organoestaño (IV) (2).

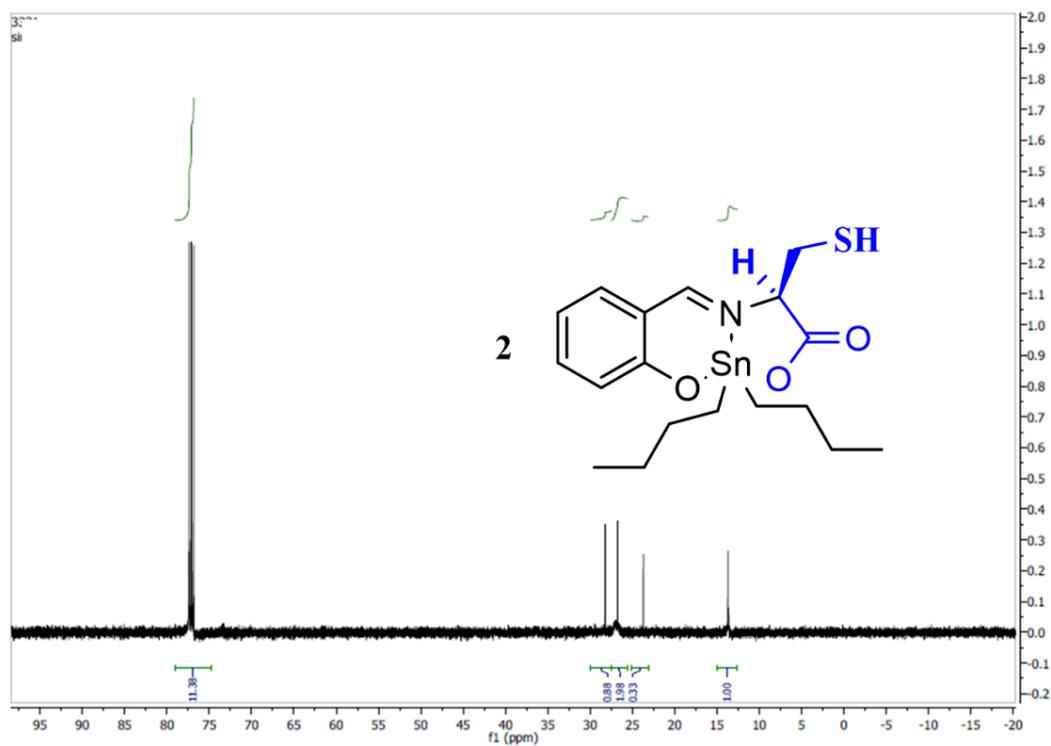


Figura A17. Espectro  $^{13}\text{C-NMR}$  del compuesto organoestaño (IV) (1b).

## B. Anexo: Caracterización de péptidos y péptidos Organometálicos

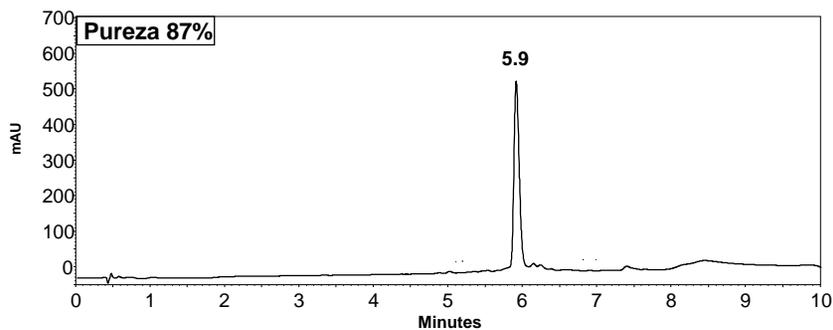
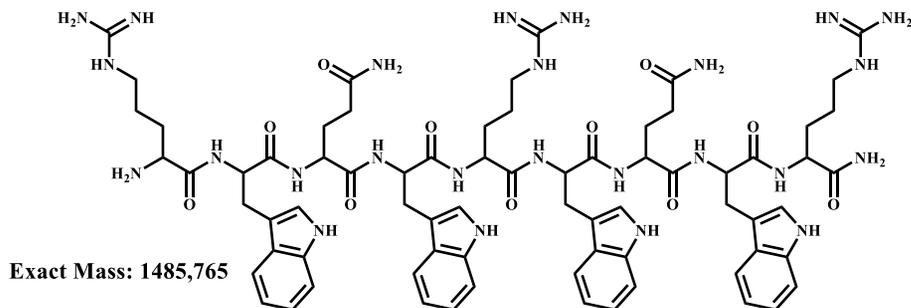
En el presente anexo se muestra para cada péptido obtenido y descrito en la Tabla 11, su estructura, secuencia de aminoácidos, comportamiento de la síntesis caracterización del péptido por RP-HPLC (péptido crudo y péptido puro) y espectro de masas MALDI-TOF.

Tabla 12. Caracterización de los péptidos obtenidos por cromatografía RP-HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF

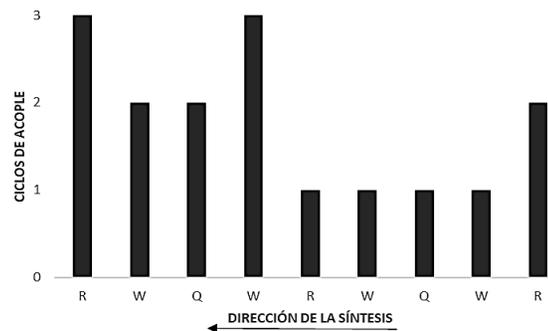
Código	Secuencia	RP-HPLC		EM MALDITOF (m/z)	
		t <sub>R</sub> (min)	Área (%)	Teórica	Exp
LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	RWQWRWQWR	5,9	97	1485,77	1486,75
Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	Ahx RWQWRWQWR	5,8	95	1598,85	1600,32
Fc-Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	Fc Ahx RWQWRWQWR	7,1	90	1810,86	1811,98
LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub>	(RWQWRWQWR) <sub>2</sub> K Ahx	6,7	95	3195,69	3196,41
<b>Ahx</b> -LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub>	(Ahx-RWQWRWQWR) <sub>2</sub> K Ahx	6,4	80	3421,86	3434,94
Fc-Ahx-LfcinB (21-25) <sub>Pal2</sub>	(Fc-Ahx-RWQWRWQWR) <sub>2</sub> K Ahx	7,7	50	3846,85	3848,74



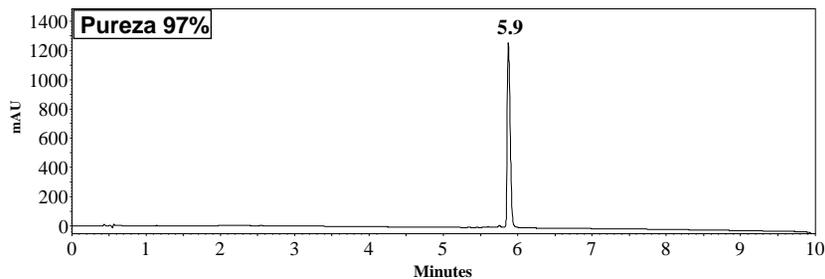
# LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub>



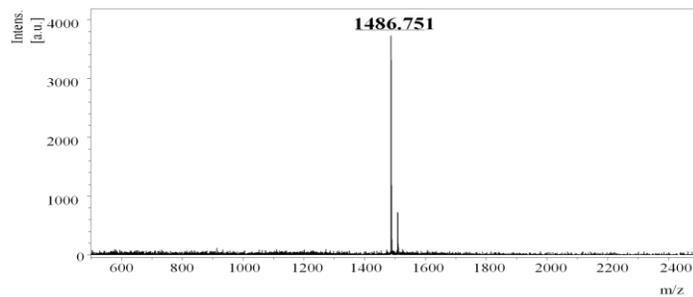
Perfil cromatográfico péptido Crudo



Resumen de síntesis

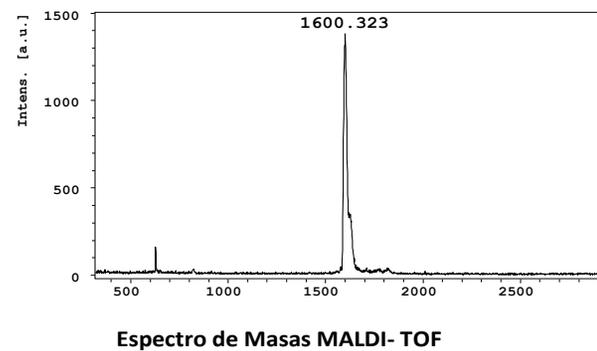
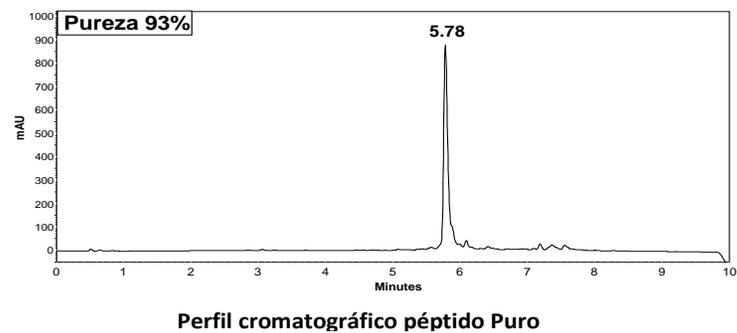
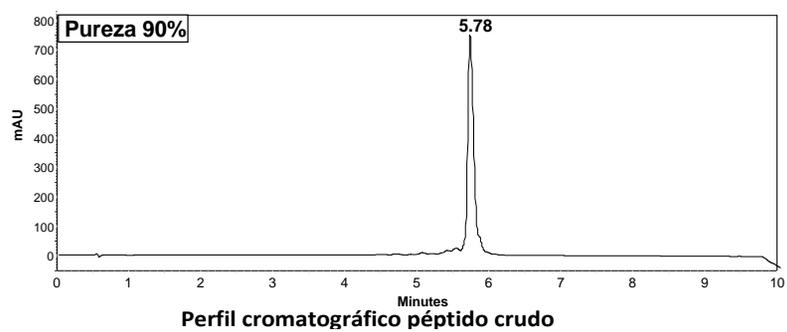
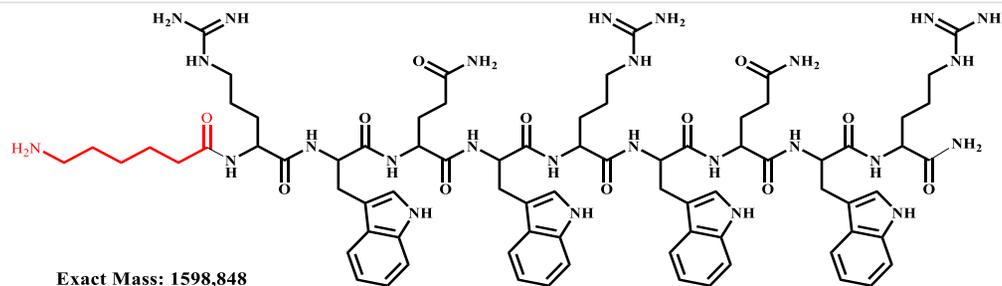


Perfil cromatográfico péptido Puro

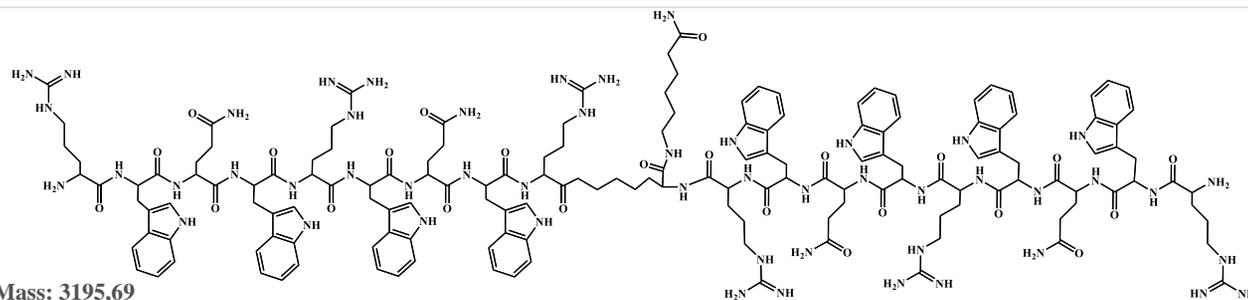


Espectro de Masas MALDI-TOF

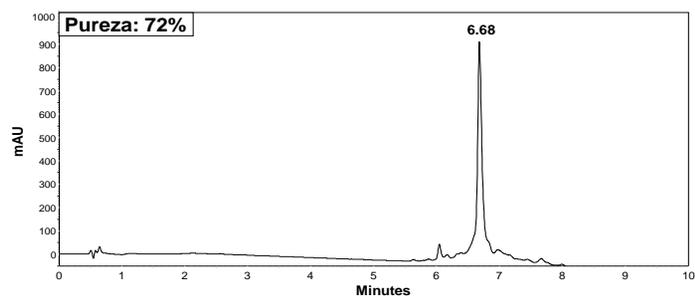
## Ahx-LfcinB(21-25)Pal



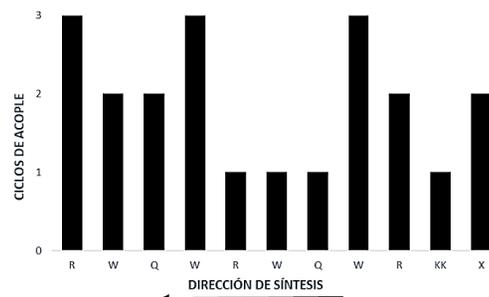
## LfcinB(21-25)Pal2



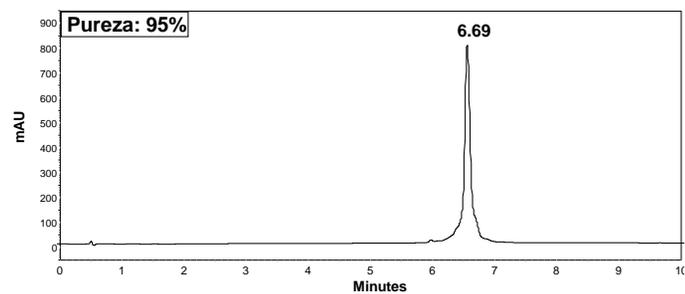
Exact Mass: 3195,69



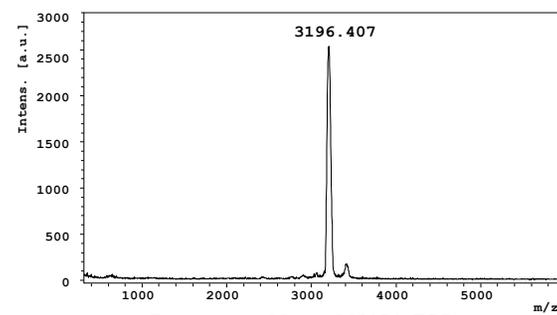
Perfil cromatográfico péptido crudo



Resumen de Síntesis

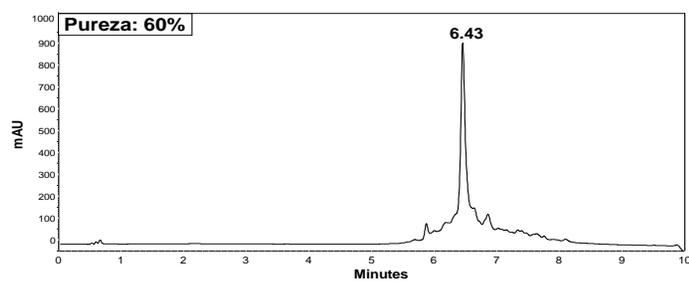
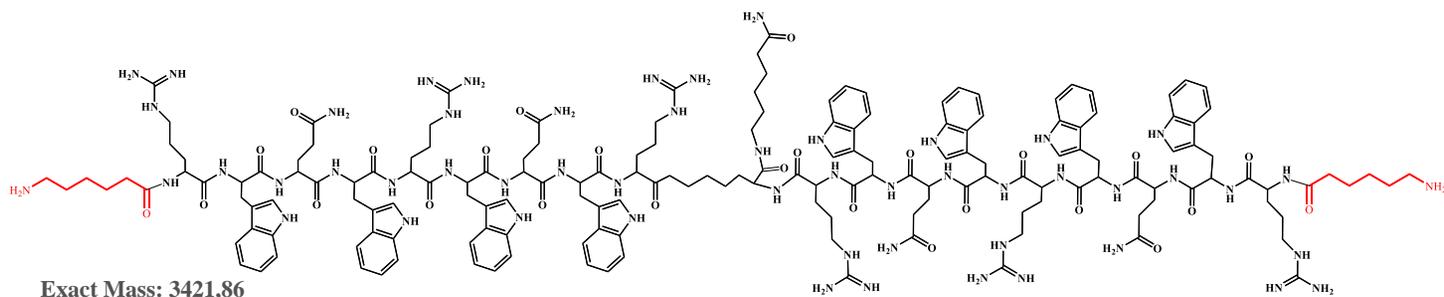


Perfil cromatográfico péptido puro



Espectro de Masas MALDI- TOF

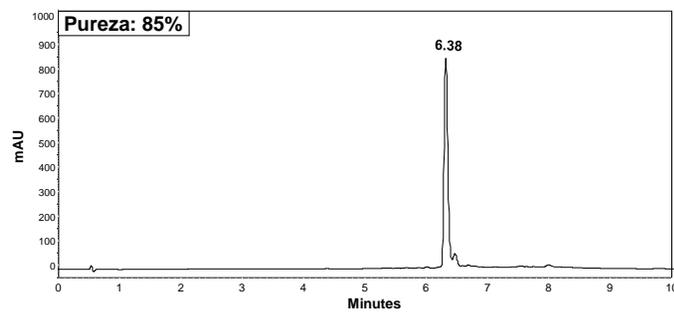
## Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal2</sub>



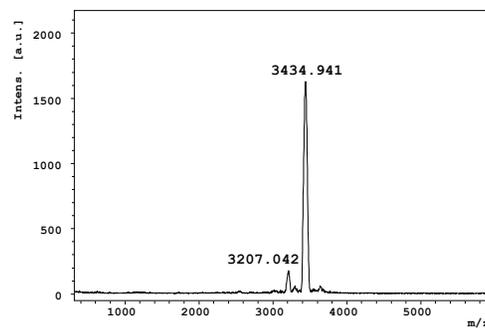
Perfil cromatográfico péptido crudo



Resumen de Síntesis

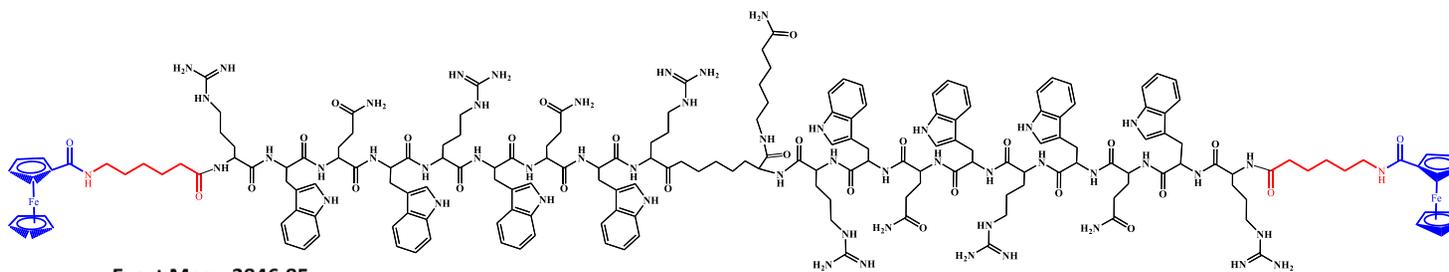


Perfil cromatográfico péptido puro

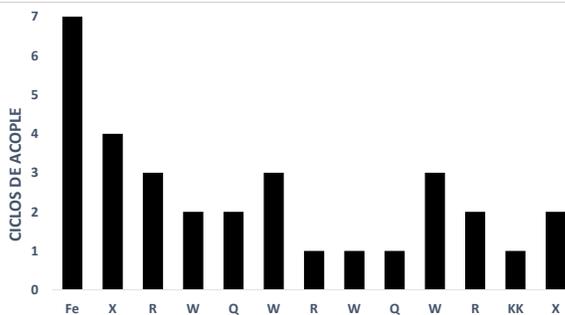


Espectro de Masas MALDI- TOF

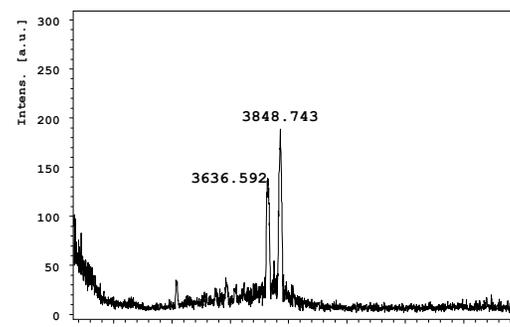
# Fc-Ahx-LfcinB(21-25)<sub>Pal2</sub>



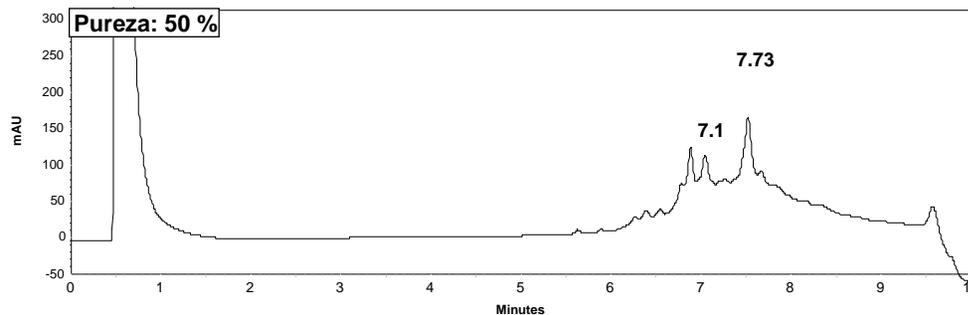
Exact Mass: 3846,85



DIRECCIÓN DE SÍNTESIS  
Resumen de síntesis



Espectro de Masas MALDI -TOF



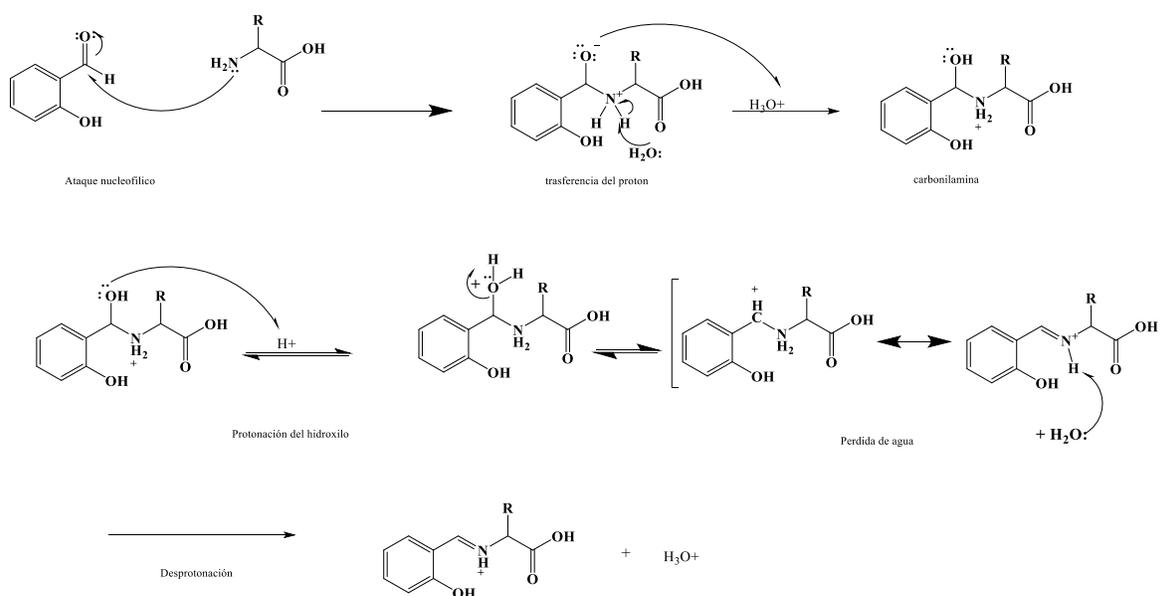
Perfil cromatográfico péptido Crudo



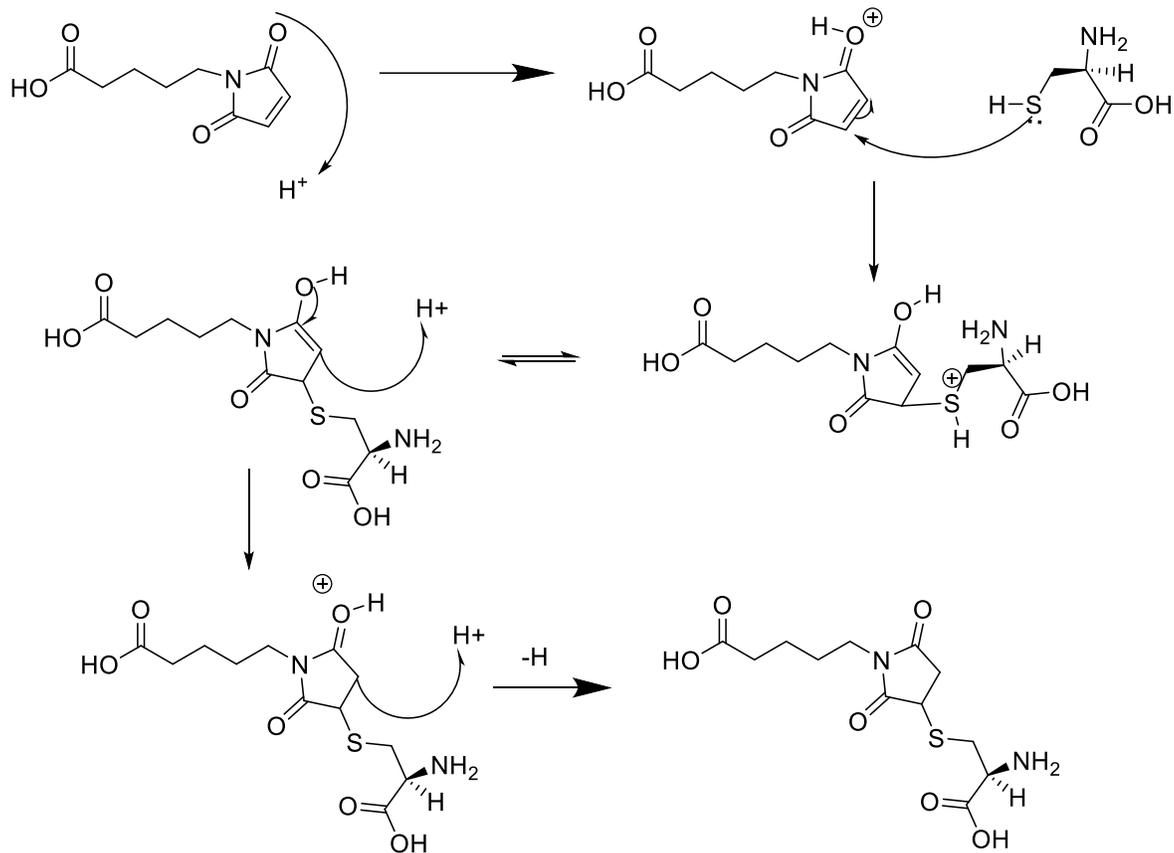
## C. Anexo: Mecanismos de reacción.

Los mecanismos de reacción asociados a la obtención de los compuestos de organoestaño IV, bloque organometálico y la síntesis de péptidos en fase solida empleando la estrategia Fmoc/tBu

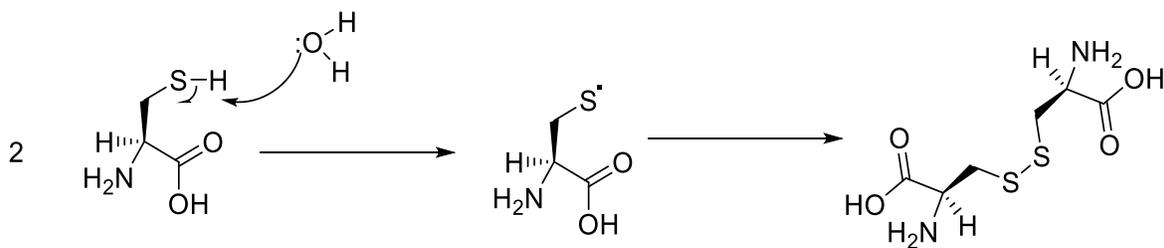
### I. Formación Base de schiff



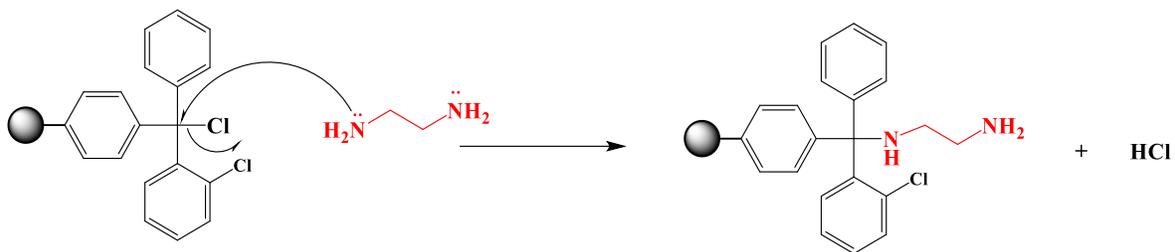
## II. Adición de Michael- química clic



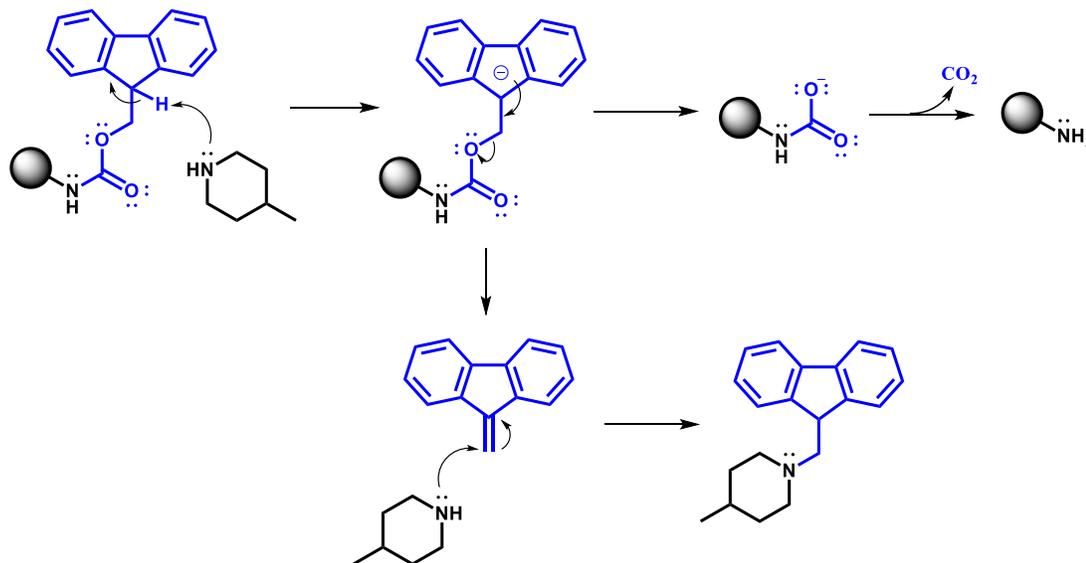
## III. Formación puentes disulfuro



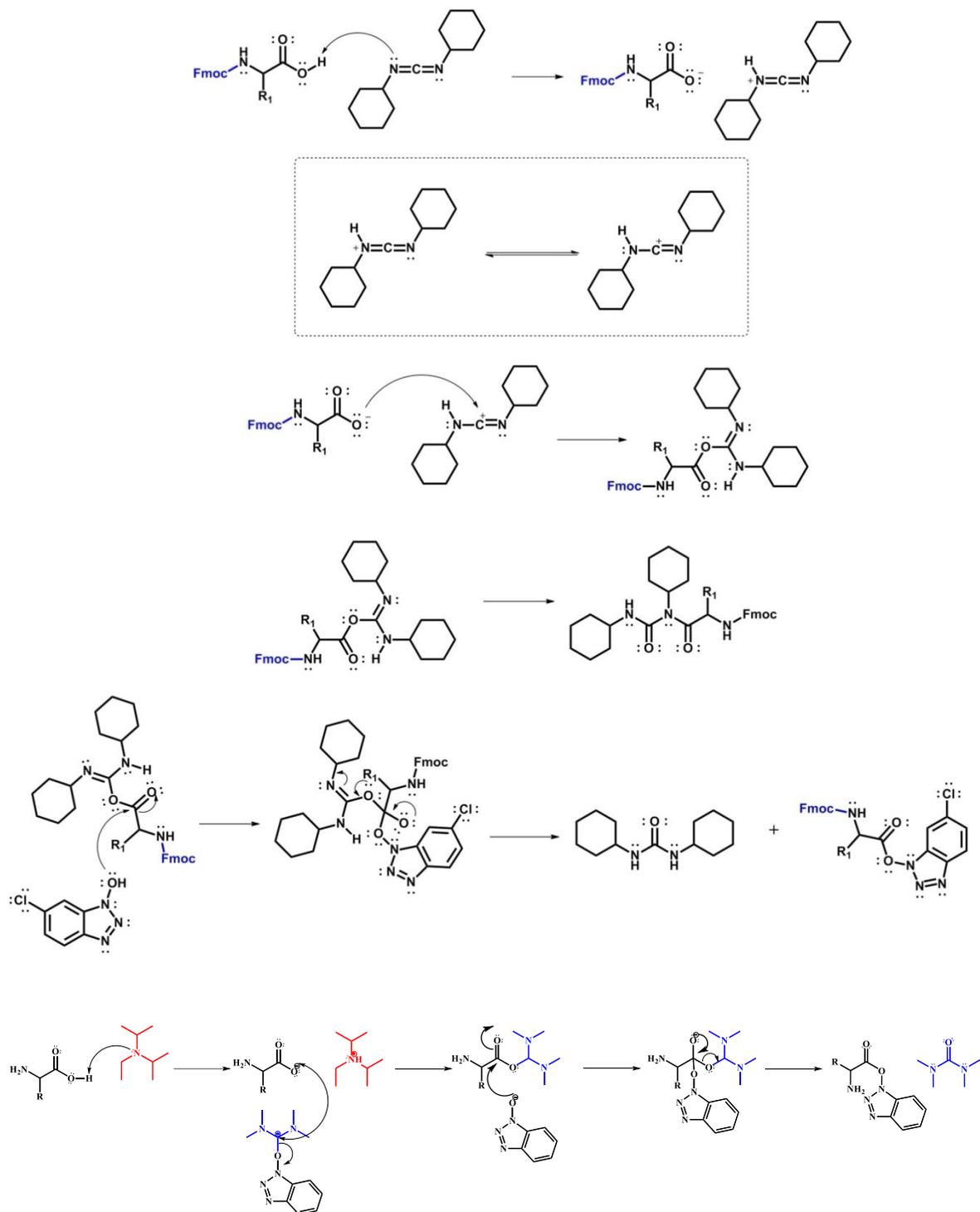
#### IV. Unión resina 2 cloro tritol a etilendiamina: sustitución nucleofílica



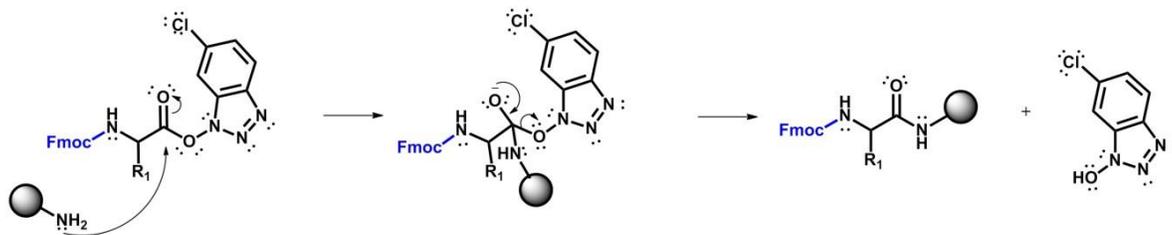
#### V. Remoción del grupo Fmoc



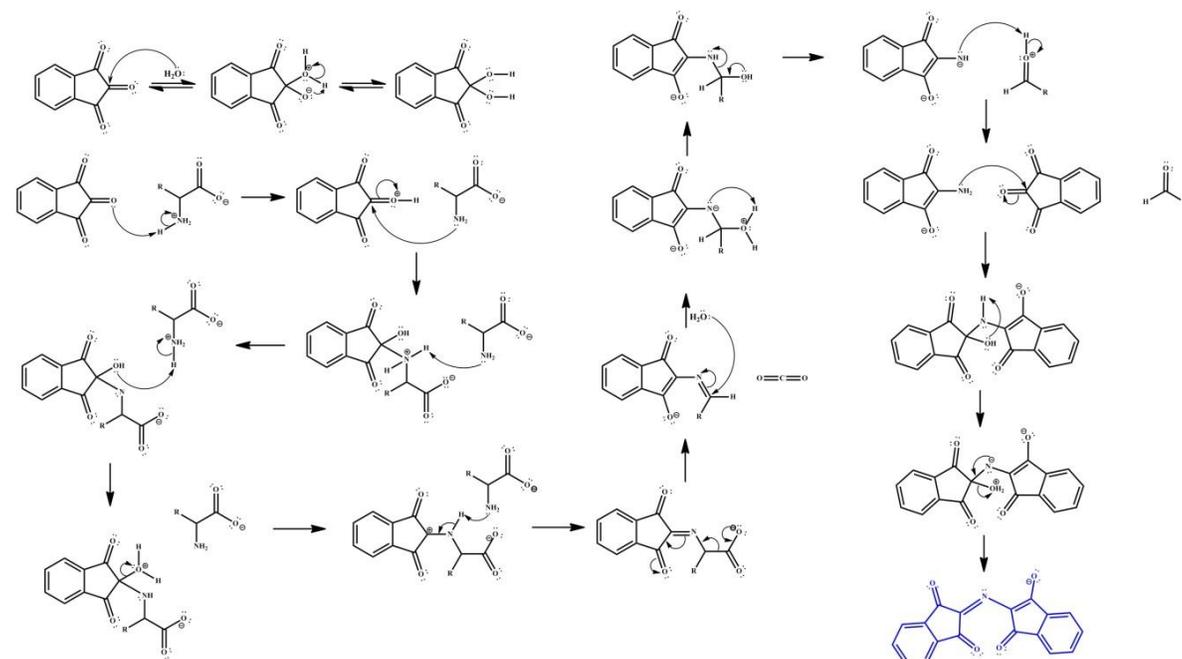
## VI. Activación del aminoácido



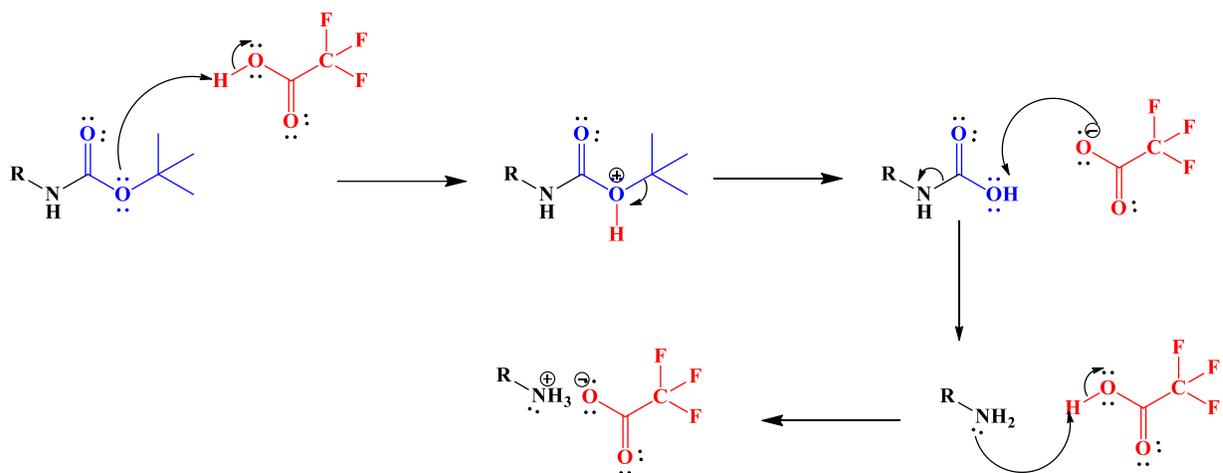
## VII. Acople del aminoácido



## VIII. Test de Kaiser



## IX. Des anclaje soporte solido



## X. Racemización

