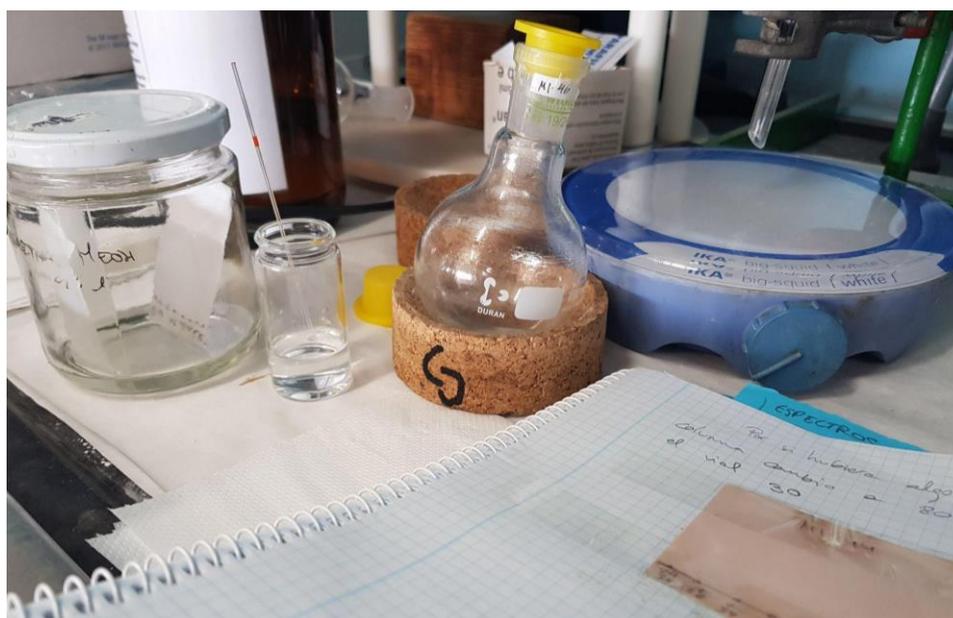


**TRABAJO DE FIN DE GRADO**  
**Facultad de Farmacia, Universidad de La**  
**Laguna**  
**Curso 2021-2022**

---

**Preparación de derivados de**  
**péptidos de defensa del**  
**hospedador y evaluación de su**  
**actividad antimicrobiana**



Mireya Rullo Rodríguez  
Tutora: Susana Abdala Kuri  
Co-tutora: Dácil Hernández Mesa

# ÍNDICE

1. RESUMEN .....	3
2. ABREVIATURAS .....	4
3. INTRODUCCIÓN.....	5
4. OBJETIVOS.....	7
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
7. CONCLUSIONES .....	36
8. BIBLIOGRAFÍA .....	37
9. ANEXO .....	39

## RESUMEN

Los péptidos de defensa del hospedador han sido clave durante millones de años para luchar contra virus, hongos y bacterias patógenas. En la actualidad, ante la aparición de microorganismos resistentes a los tratamientos tradicionales, dichos péptidos han despertado interés por su potencia, selectividad y mecanismo múltiple de acción, que disminuye mucho el riesgo de aparición de resistencias.

En este trabajo se describe el proceso de preparación de una biblioteca de péptidos de pequeño tamaño, entre 2 y 6 aminoácidos, que he llevado a cabo en las instalaciones del IPNA-CSIC. Para ello se empleó un proceso de síntesis combinatoria, purificación y caracterización. Además, se evaluó su actividad antimicrobiana frente a patógenos humanos, animales y vegetales.

**Palabras clave:** Péptidos de Defensa del Hospedador, antimicrobianos, resistencias, síntesis combinatoria.

## ABSTRACT

Host defense peptides have been of utmost importance for millions of years in order to fight pathogenic viruses, fungi and bacteria. Currently, given the appearance of resistance to traditional treatments, these peptides are very interesting due to their potency, selectivity and multiple action mechanism, which greatly reduces the risk of resistance.

This project describes the preparation of a library of small peptides, between 2 and 6 amino acids, which was carried out at IPNA-CSIC. A process of combinatorial synthesis, purification and characterization was used. In addition to this, the antimicrobial activity of these peptides against human, animal and phytopathogens was evaluated.

**Keywords:** Host Defense Peptides, antimicrobials, resistance, combinatorial synthesis.

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado	Abreviatura	Significado
PDH	Péptidos de Defensa del Hospedador	m	Multiplete
DCM	Diclorometano	<i>J</i>	Constante de acoplamiento
AcOEt	Acetato de etilo	THF	Tetrahidrofurano
RMN	Resonancia Magnética Nuclear	Cbz = Z	Carboxibencilo
<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón	br	Ancho, del inglés <i>broad</i>
<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono	UFC	Unidades Formadoras de Colonias
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear (de sus siglas en inglés <i>Homonuclear Correlation Spectroscopy</i> )	MS (ESI-tof)	Espectroscopía de Masas ( <i>Mass Spectrum</i> en inglés) por Técnica de Ionización por ElectroSpray (de sus siglas en inglés <i>ElectroSpray Ionization</i> )
HSQC	Coherencia cuántica única heteronuclear (de sus siglas en inglés <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> )	TFA	Ácido trifluoroacético
OMe	Metoxilo	HBTU	Hexafluorofosfato Benzotriazol Tetrametil Uronio
Ph	Fenilo	DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
Boc	Grupo protector <i>tert</i> -butiloxicarbonilo	δ	Desplazamiento químico
s	Singlete	dt	Doble triplete
d	Doblete	CC	Cromatografía en Columna
dd	Doble doblete	ddd	Doblete de doblete de doblete
MH	Medio de cultivo Mueller Hinton	LB	Medio de cultivo LB Agar
quin = q	Quintuplete	t	Triplete
Tos = PhSO <sub>2</sub>	Tosilo	Me	Metilo

## INTRODUCCIÓN

En la era de los microorganismos multirresistentes, los péptidos de defensa del hospedador (PDH) se presentan como candidatos antimicrobianos muy prometedores [1,2,3,4].

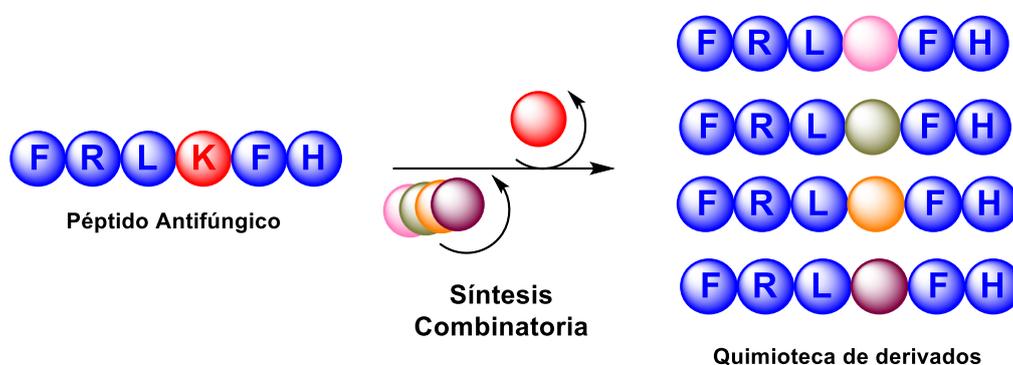
Los PDH son proteínas naturales que ayudan a los seres vivos a defenderse frente a organismos patógenos y potenciar la respuesta inmune innata [5]. Estos efectos beneficiosos se deben a que son péptidos de pequeño tamaño (menos de 50 aminoácidos), catiónicos, y que poseen gran porcentaje de residuos hidrofóbicos [6]. Una relación adecuada entre residuos hidrofóbicos y catiónicos es vital para generar las estructuras anfifílicas, como hélices alfa, que permiten a los PDH atacar con mayor selectividad las membranas bacterianas, con carga neta negativa. Esto se debe a que las membranas de las bacterias poseen lípidos aniónicos (como la cardiolipina), mientras que las células humanas tienen mayor carga de lípidos zwitteriónicos (como fosfatidilcolina) y colesterol [2,6,7].

Una vez se unen a las membranas de los microorganismos patógenos, estos péptidos son capaces de penetrar en ellas y desorganizarlas, bien por formación de poros, o por un efecto “detergente”. Los PDH también pueden penetrar en la célula, alterar el citoplasma y los procesos metabólicos, interactuar con el material genético, e incluso reclutar al sistema inmunológico [3,4,8]. Este mecanismo múltiple de acción hace que a los microorganismos les resulte difícil desarrollar resistencias, y de hecho, muchos péptidos antimicrobianos han mostrado ser tan eficaces que su estructura se ha conservado a lo largo de millones de años [2,9]. Por todo ello, han despertado gran interés en la industria farmacéutica, cosmética, veterinaria y agroquímica. Sin embargo, pese a sus ventajas, también presentan inconvenientes, desde elevados costes de producción a problemas de estabilidad o selectividad *in vivo*. Para superar estos problemas, se han introducido modificaciones en los mismos, bien cambiando aminoácidos naturales por otros modificados o no proteinogénicos, sustituyendo aminoácidos-L por residuos-D [3], o truncando los péptidos bioactivos para obtener péptidos más pequeños que todavía conserven una potente actividad [4,8].

Este trabajo se ha realizado con el departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de la Laguna, en colaboración con el grupo de Síntesis de Fármacos y Compuestos Bioactivos (SFCB) del IPNA-CSIC, que está interesado en

el desarrollo de metodologías sintéticas útiles para la obtención de colecciones de derivados sintéticos de PDH con potencial actividad antimicrobiana [2]. Concretamente, en la preparación de colecciones de péptidos de cadena corta y su utilización para establecer relaciones estructura-actividad, *structure-activity relationships* (SAR) en inglés, fundamentales en la búsqueda de fármacos innovadores [2,10].

A lo largo de esta memoria, se describe el desarrollo de una de esas colecciones de péptidos de cadena corta, entre dos y seis aminoácidos. Concretamente, se sintetizaron derivados de un compuesto peptídico de referencia, FRLKFH, con actividad antifúngica conocida [9,11] y cuyas propiedades antibacterianas no han sido descritas. Para la preparación de la *quimioteca* de posibles antimicrobianos, decidimos preparar tanto fragmentos del péptido original, como otros en los que se ha sustituido el aminoácido lisina por diferentes residuos (**figura 1**). De esta forma se creó un grupo de péptidos para llevar a cabo *screenings* biológicos y determinar sus relaciones estructura-actividad.



**Figura 1.** Esquema de la síntesis combinatoria, se continúa trabajando en la obtención de hexapéptidos.

## OBJETIVOS

Los objetivos propuestos para esta memoria de *Trabajo de Fin de Grado* son los siguientes:

- ❖ Síntesis química de péptidos de pequeño tamaño.
- ❖ Purificación de los productos obtenidos haciendo uso de técnicas cromatográficas.
- ❖ Identificación de la estructura de dichos compuestos peptídicos mediante RMN, COSY, HSQC y espectrometría de masas.
- ❖ Realización de ensayos antimicrobianos frente a patógenos animales, humanos y vegetales.
- ❖ Comentario de los resultados del *screening* de péptidos para establecer relaciones estructura-actividad.

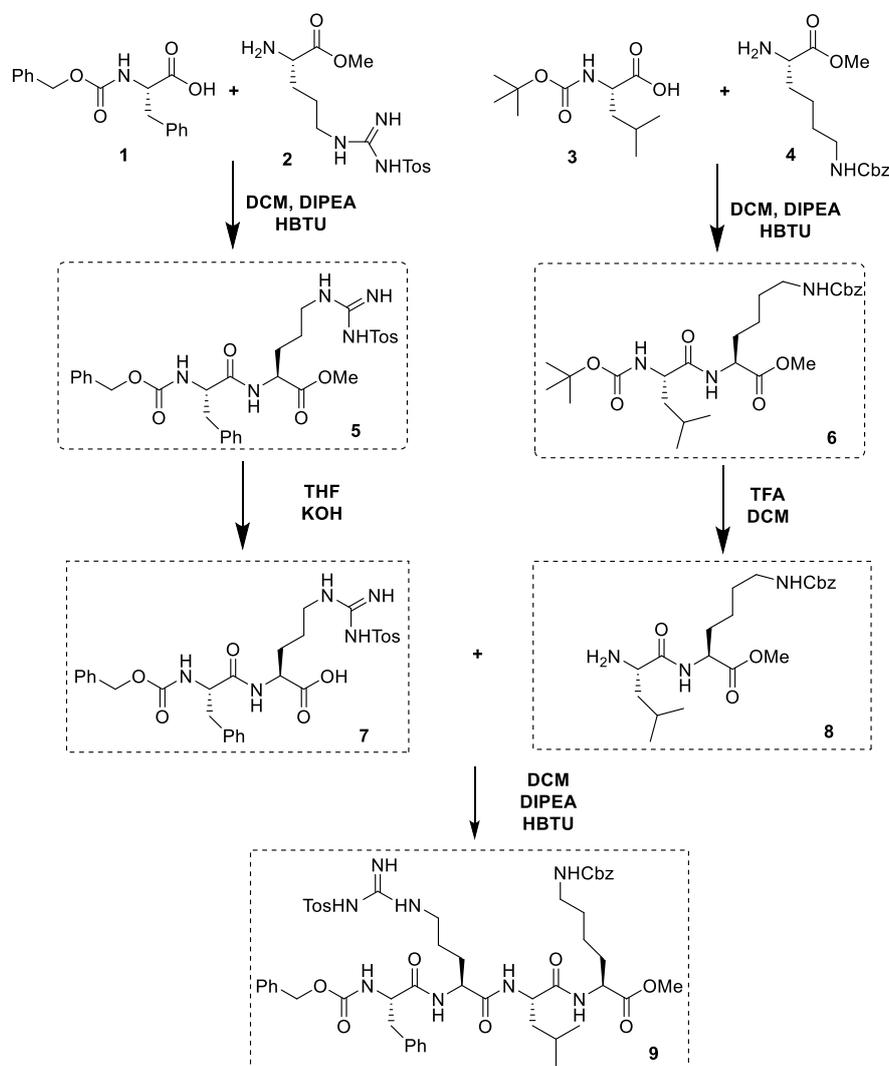


**Imagen 1.** *Quimioteca* de péptidos sintetizados.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

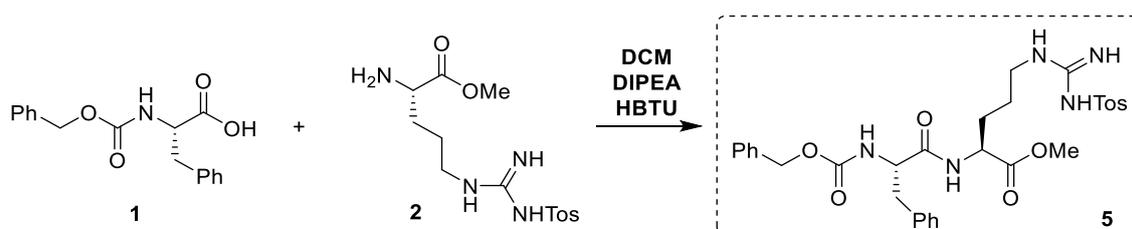
En este trabajo se ha construido una *quimioteca* formada por 20 péptidos que han sido caracterizados, y aquellos de mayor relevancia han sido utilizados en varios ensayos microbiológicos. Se trata de péptidos de entre dos y seis aminoácidos que contienen unidades de fenilalanina, arginina, leucina, hidroxiprolina, histidina, lisina y ornitina. La colección incluye cadenas peptídicas con los extremos C y N-terminales protegidos y sus derivados desprotegidos, pudiéndose comparar el efecto de los grupos protectores sobre la actividad antimicrobiana.

La síntesis química de estos compuestos se llevó a cabo utilizando un proceso combinatorial que se explica detenidamente a continuación para la preparación del péptido Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe (**9**) (**Esquema 1**).



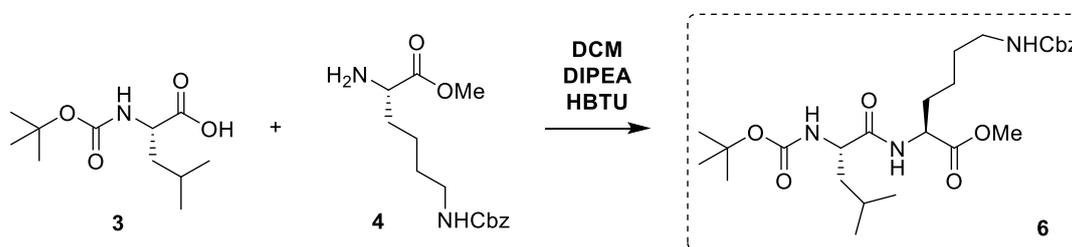
**Esquema 1.** Síntesis del péptido **9**, a partir de los aminoácidos comerciales Z-Phe-OH (**1**), H-L-Arg(Tos)-OMe (**2**), Boc-Leu-OH (**3**) y H-L-Lys(Cbz)-OMe (**4**).

La síntesis comenzó con el acoplamiento de la Z-Phe-OH (**1**) y el H-L-Arg(Tos)-OMe (**2**), ambos comerciales (**Esquema 2**). El proceso se llevó a cabo utilizando como reactivo de acoplamiento HBTU y como base DIPEA. Siguiendo el protocolo estándar puesto a punto en el laboratorio, la mezcla se dejó reaccionar durante dos horas. Tras el proceso usual de extracción y lavados, necesario en todo proceso sintético, se procedió a la purificación del péptido por cromatografía en columna de gel de sílice, obteniendo el dipéptido **5** con un rendimiento de 50%.



**Esquema 2.** Acoplamiento de Z-Phe-OH (**1**) y el H-L-Arg(Tos)-OMe (**2**) para obtener el dipéptido Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OMe (**5**).

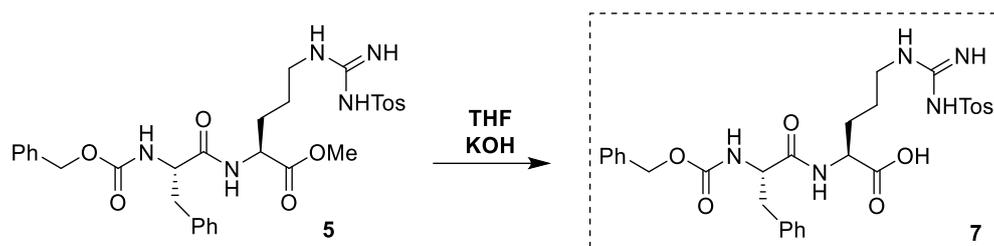
A continuación, se acoplaron Boc-Leu-OH (**3**) y H-L-Lys(Cbz)-OMe (**4**), ambos comerciales, siguiendo el mismo protocolo que en el caso anterior (**esquema 3**), para obtener esta vez el dipéptido Boc-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe (**6**), con un rendimiento de 84%.



**Esquema 3.** Acoplamiento de Boc-Leu-OH (**3**) con H-L-Lys(Cbz)-OMe (**4**) para obtener el dipéptido Boc-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe (**6**).

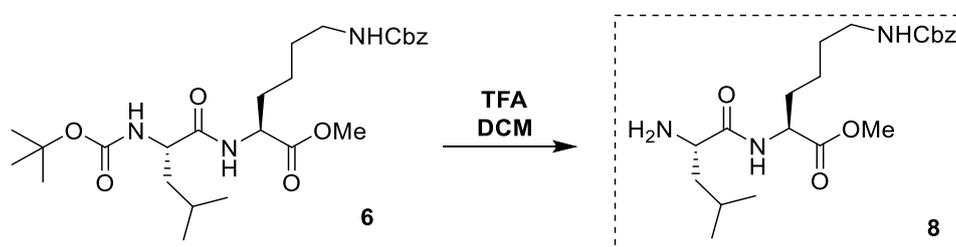
Para acoplar los dipéptidos Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OMe (**5**) y Boc-Leu-L-Lys-OMe (**6**), fue necesario desproteger los extremos C y N-terminales, respectivamente. Así, el producto **5** se saponificó con KOH en THF (**esquema 4**), siguiendo el protocolo estándar para esta reacción. La mezcla se agitó a temperatura ambiente aproximadamente dos

horas. Tras la extracción, lavados y purificación por cromatografía en columna de gel de sílice, se obtuvo el dipéptido **7**, Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OH, con un rendimiento de 68%.



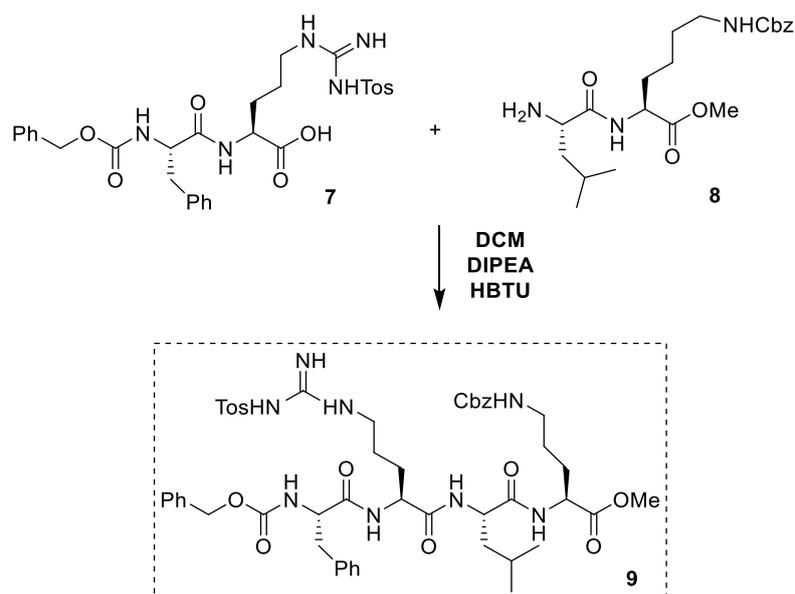
**Esquema 4.** Saponificación de Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OMe (**5**) obteniéndose Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OH (**7**).

Simultáneamente, se desprotegió la funcionalidad amina terminal en el dipéptido **6**, Boc-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe, eliminando el grupo Boc, por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) (**esquema 5**). Tras evaporar al vacío y lavar el residuo varias veces con DCM se obtuvo **8**, H-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe, con rendimiento cuantitativo.



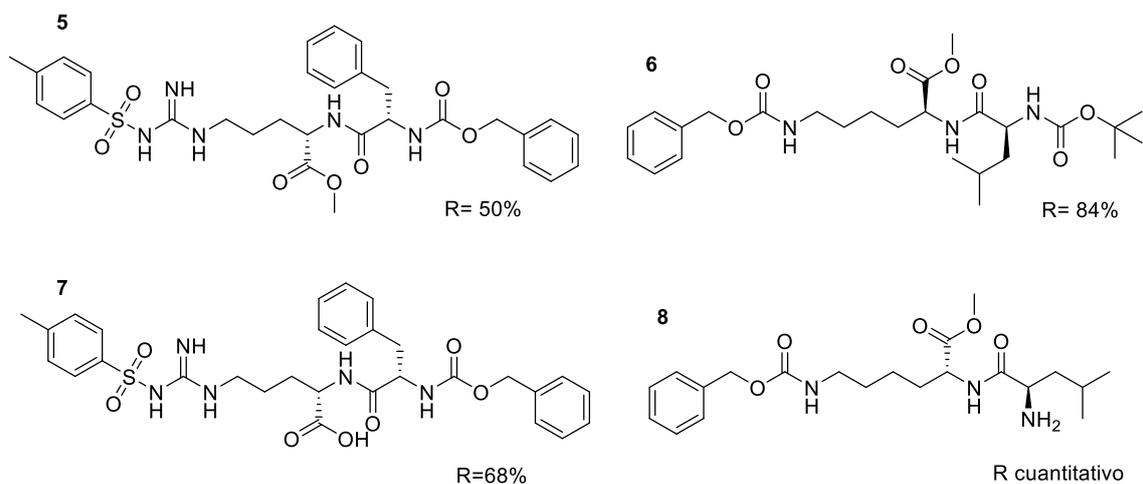
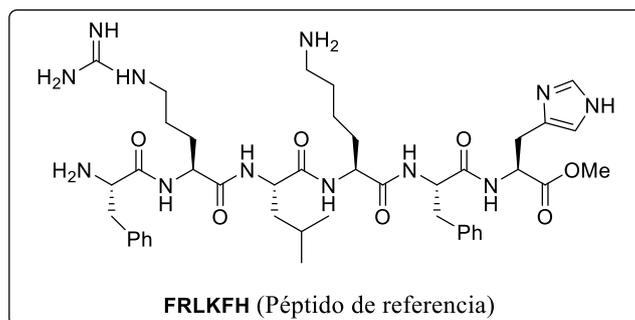
**Esquema 5.** Desprotección de Boc-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe (**6**) para la obtención de H-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe (**8**).

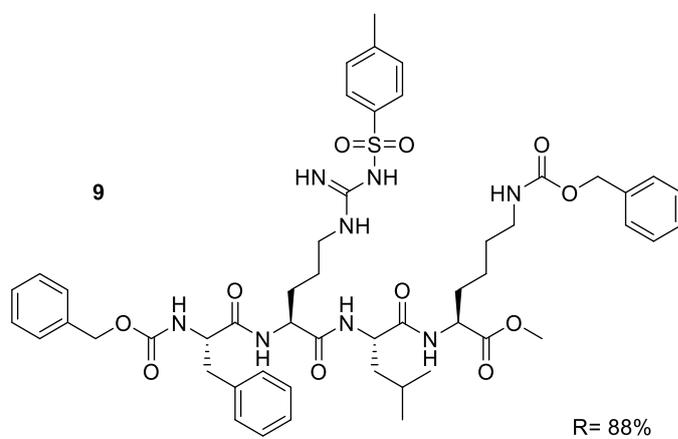
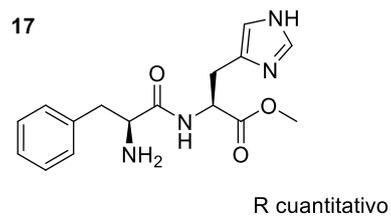
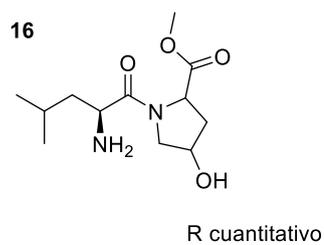
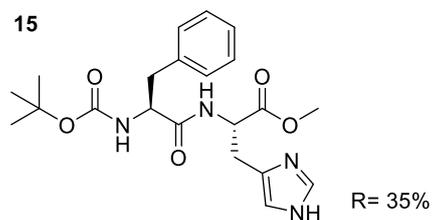
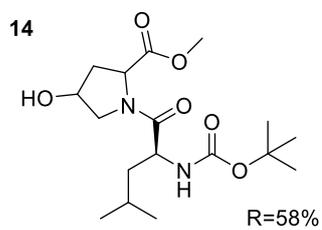
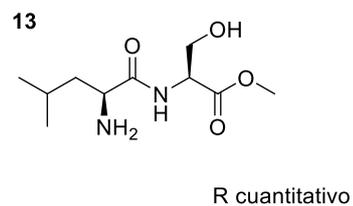
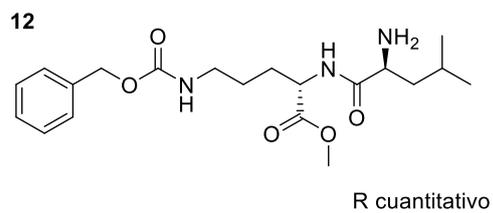
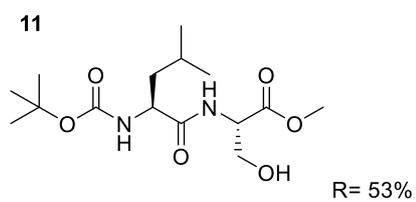
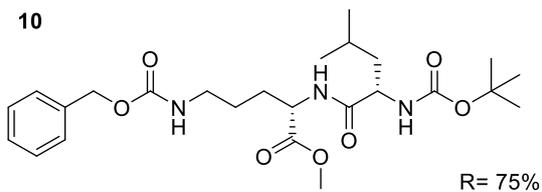
Finalmente, se realizó el acoplamiento de los dos dipéptidos, **7** (Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OH) y **8** (H-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe), para obtener el tetrapéptido Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe (**9**) (**Esquema 6**). El proceso se llevó a cabo utilizando como reactivo de acoplamiento HBTU. Tras dos horas de reacción, se llevó a cabo el proceso usual de extracción y lavados, y se purificó el péptido por CC, obteniendo así el tetrapéptido **9** con un rendimiento de 88%.

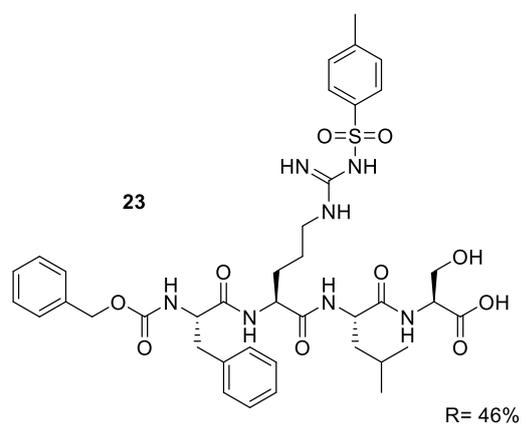
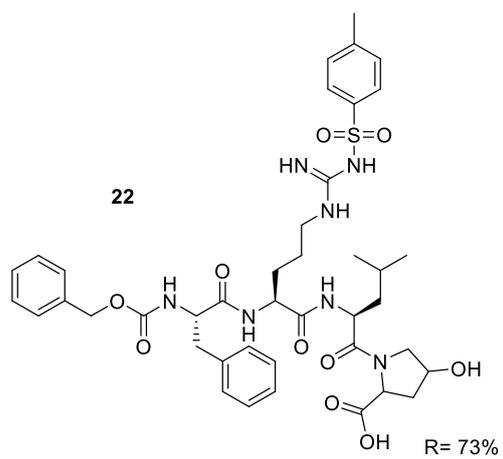
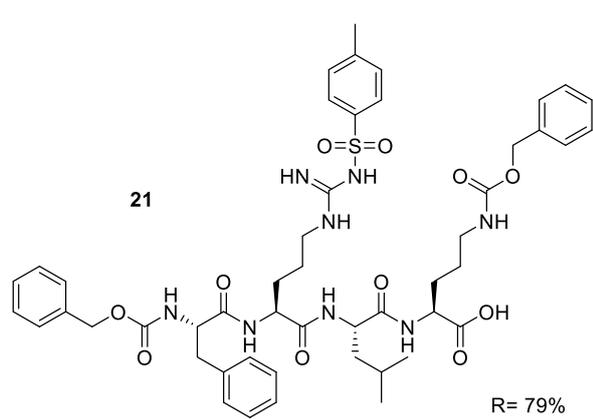
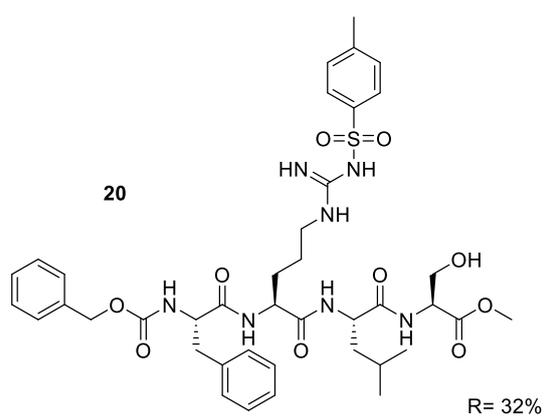
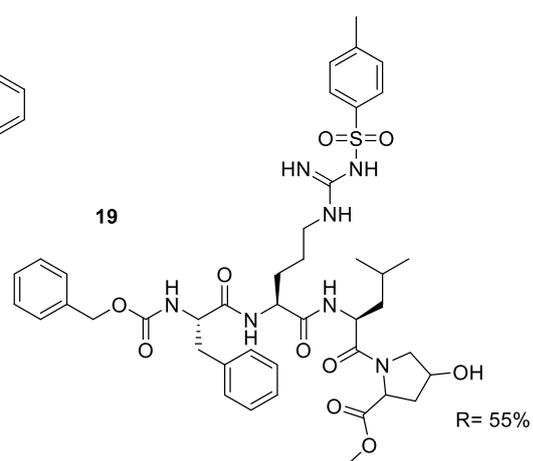
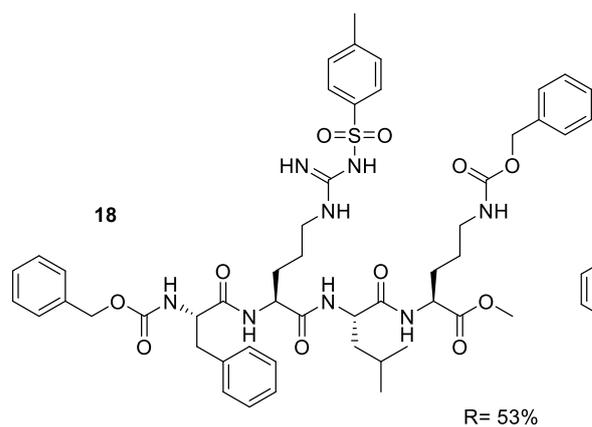


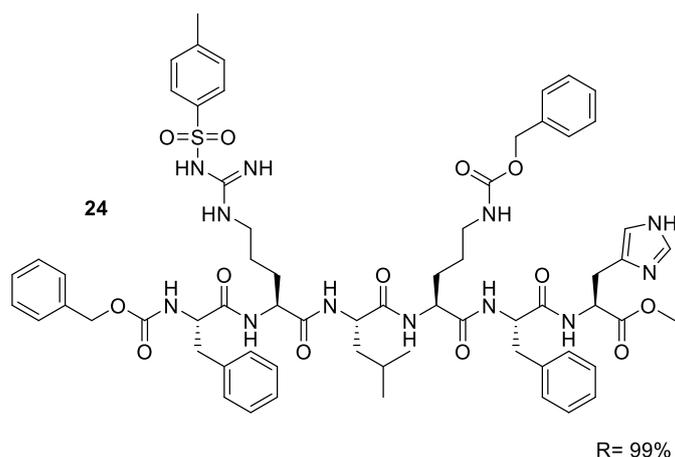
**Esquema 6.** Acoplamiento de Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OH (**7**) y la H-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe (**8**) para la obtención de Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe (**9**).

Siguiendo un proceso de síntesis, extracción y purificación similar a los comentados para el péptido **9**, se consiguió aislar los nuevos péptidos que se listan a continuación (**Figura 2**):





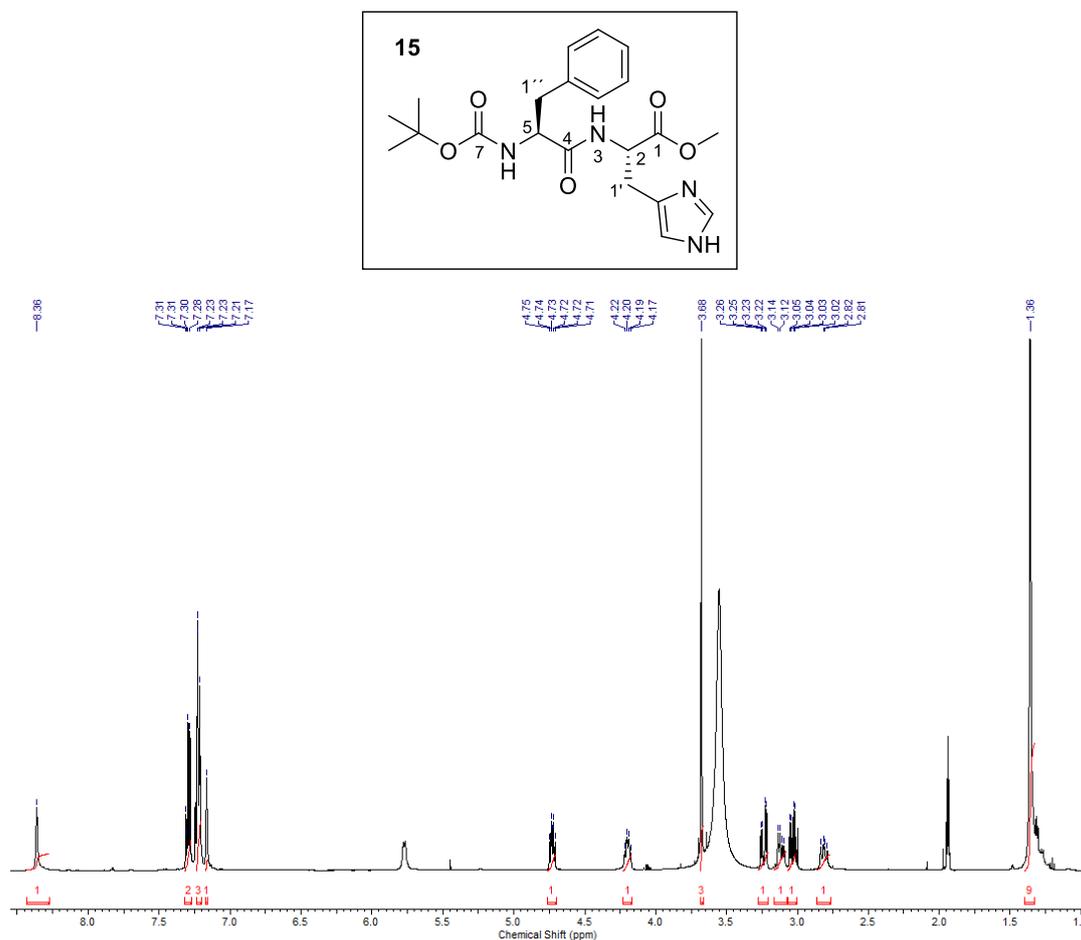


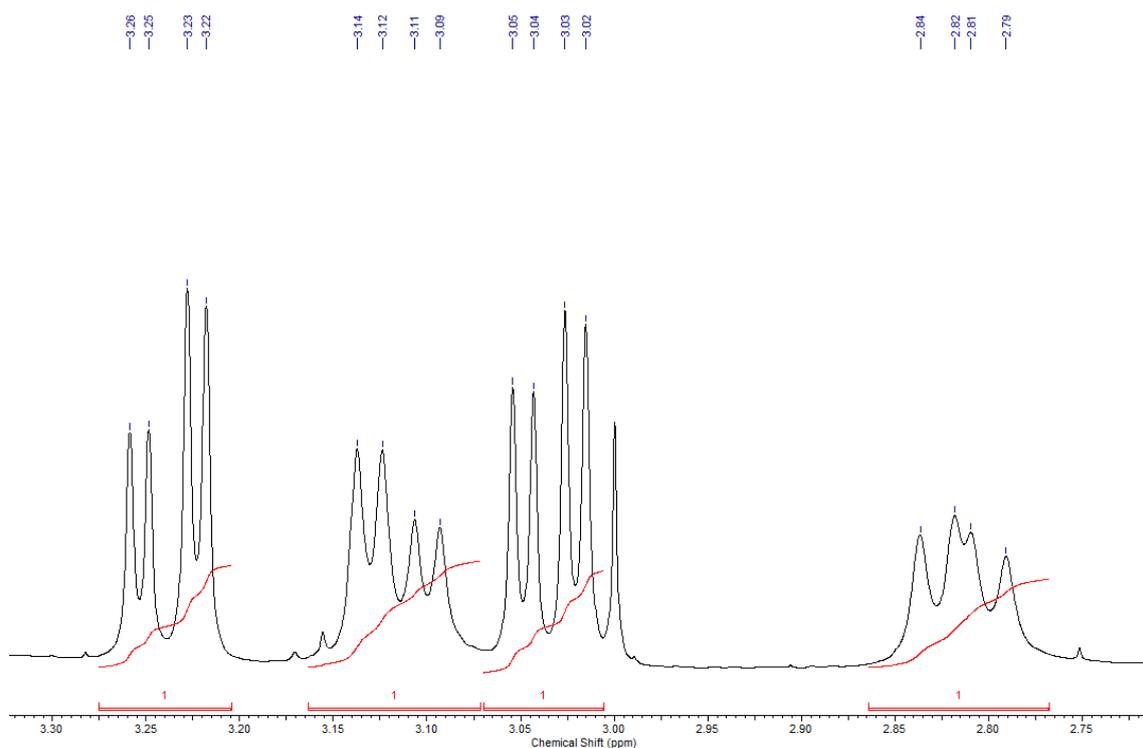


**Figura 2.** *Quimioteca* de péptidos sintetizada.

Las estructuras de los compuestos se comprobaron utilizando técnicas de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, así como experimentos de doble dimensión COSY y HSQC. En la caracterización estructural se utilizaron también técnicas de espectrometría de masas.

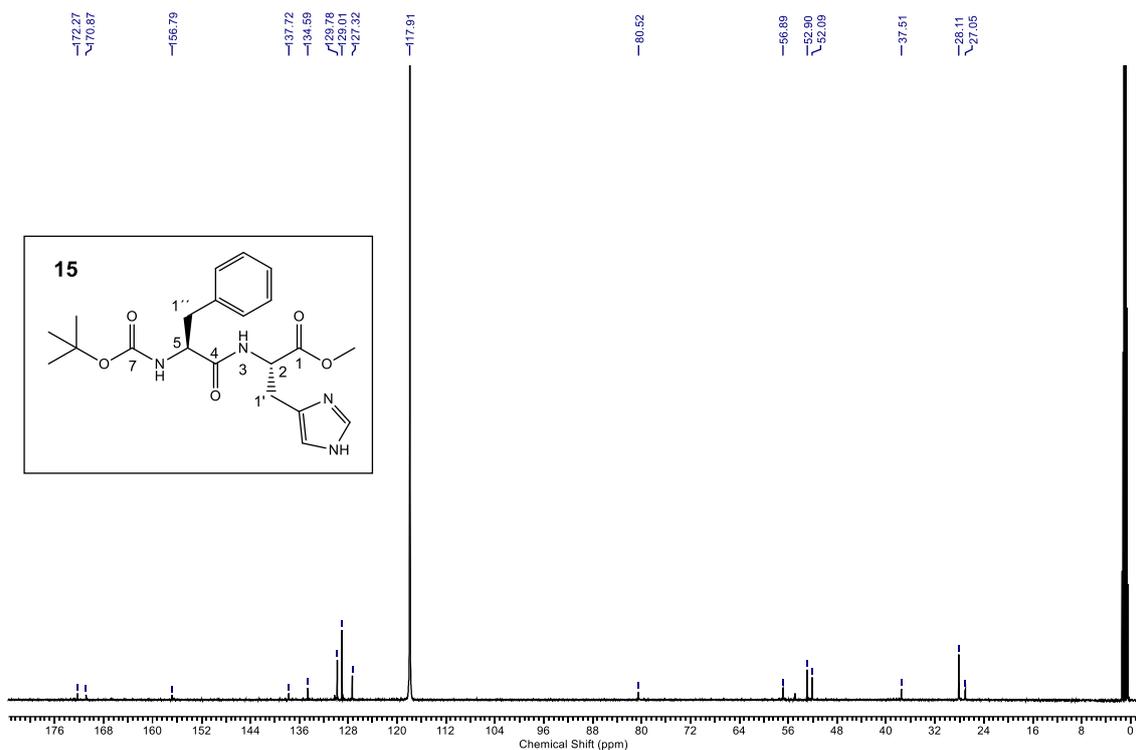
De forma ilustrativa se procede a comentar detenidamente la caracterización del compuesto **15**, el metil éster de *N-tert*-butoxicarbonil-L-fenilalanil-L-histidina:





<b><sup>1</sup>H-RMN del compuesto 15</b>	
Disolvente: Acetonitrilo deuterado. Temperatura: 25°C	
<b>Señal <sup>1</sup>H-RMN (δ ppm)</b>	<b>Comentario</b>
1.36 (9H, s)	Singlete que integra por 9H; su desplazamiento químico sugiere que son los protones correspondientes al <i>terc</i> -butilo del grupo Boc.
2.81 (1H , dd, $J=13.7, 9.4$ Hz)	Doblete de doblete que integra por 1H. Su multiplicidad (dd) y desplazamiento químico sugieren que es uno de los H del 1''-C, en posición contigua al fenilo, que tiene acoplamiento con el protón geminal y también con el protón del 5-C a 4.17 ppm. El experimento COSY confirma estas asignaciones.
3.03 (dd, $J=13.9, 5.6$ Hz, 1H)	Doblete de doblete que integra por 1H. Su multiplicidad (dd) y desplazamiento

	químico sugieren que es el otro H en posición 1''-C que tiene acoplamiento con el protón geminal y también con el protón del 5-C a 4.17 ppm.
3.12 (1H, dd, $J=15.3, 6.7$ Hz)	Doblete de doblete que integra por 1H. Su multiplicidad (dd) y desplazamiento químico sugieren que es uno de los H del 1'-C, en posición contigua al anillo imidazólico, que tiene acoplamiento con el protón geminal y también con el protón del 2-C a 4.73 ppm. El experimento COSY confirma estas asignaciones.
3.24 (1H, dd, $J=15.3, 5.0$ Hz)	Doblete de doblete que integra por 1H. Su multiplicidad (dd) y desplazamiento químico sugieren que es el otro H en posición 1'-C, que tiene acoplamiento con el protón geminal y también con el protón del 2-C a 4.73 ppm.
3.68 (3H, s)	Se trata de los 3H del OMe.
4.17-4.23 (m, 1H)	Protón del carbono 5-C contiguo al NH del carbamato y al C=O de la amida. Confirmado con el experimento bidimensional COSY.
4.73 (td, $J=7.4, 5.2$ Hz, 1H)	Protón del carbono 2-C contiguo al NH de la amida y al C=O del éster. Confirmado con el experimento bidimensional COSY.
5.77 (d, $J=6.6, 1$ H)	Se trata del H del NH en posición 3.
7.17 (s, 1H)	Protón del C12 del anillo imidazólico.
7.20-7.24 (m, 4H)	3H del anillo aromático y 1H del 6-NH
7.27-7.32 (m, 2H)	Se trata de los otros 2H del fenilo.
8.36 (1H, br. s.)	Es el H del carbono que está formando doble enlace con el N en el anillo imidazólico.

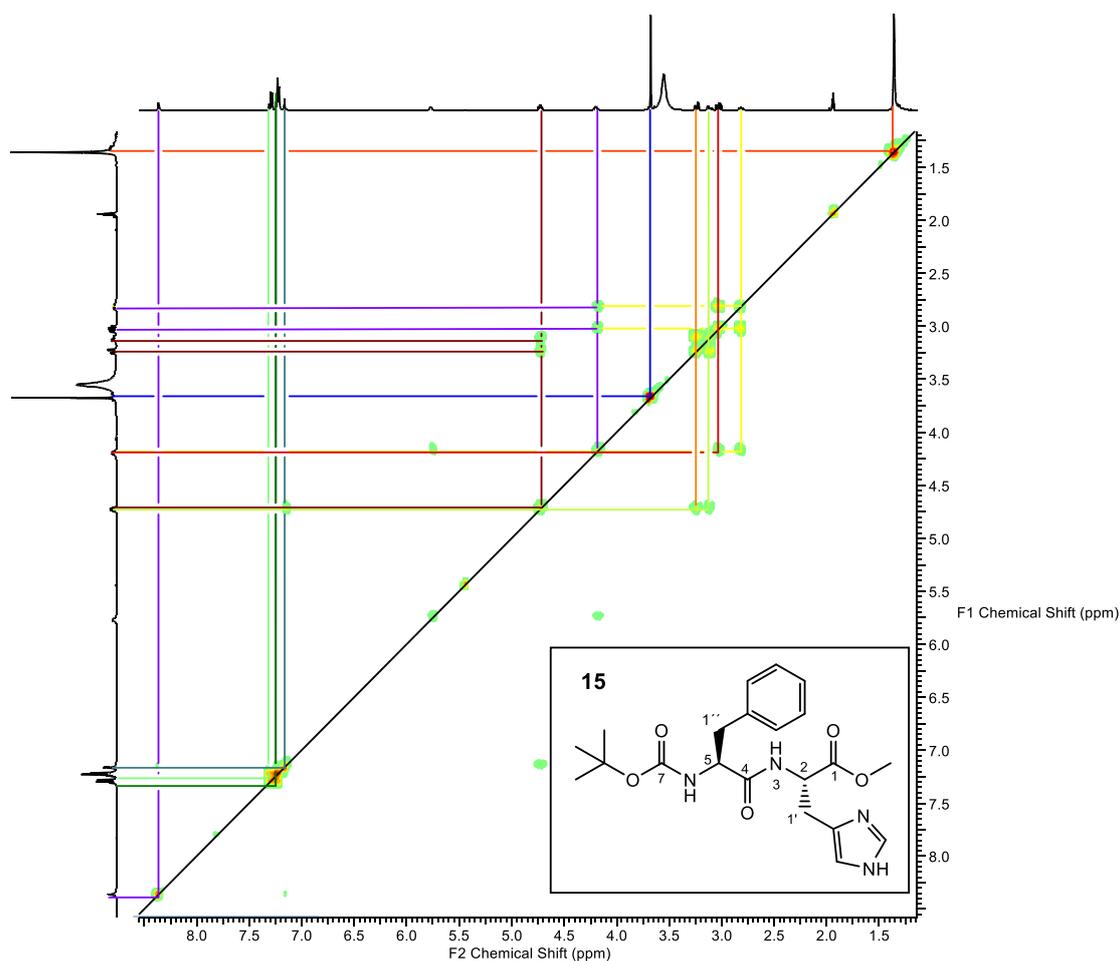


### <sup>13</sup>C-RMN del compuesto 15

Disolvente: Acetonitrilo deuterado. Temperatura: 25°C

Señal <sup>13</sup> C-RMN ( $\delta$ ppm)	Comentario
27.0 (CH <sub>2</sub> , 1'-C)	Según su $\delta$ se deduce que es el carbono 1'-C contiguo al anillo imidazólico. El experimento de HSQC confirma esta asignación.
28.1 (3 x CH <sub>3</sub> , <i>terc</i> -butilo)	Se trata de los tres metilos del <i>terc</i> -butilo, del grupo protector Boc.
37.5 (CH <sub>2</sub> , 1''-C)	Su $\delta$ sugiere que se trata del 1''-C, el carbono contiguo al fenilo.
52.1 (CH <sub>3</sub> , OMe)	Su $\delta$ indica que se trata el CH <sub>3</sub> del metil éster.
52.9 (CH, 2-C)	Su $\delta$ sugiere que se trata del CH en posición 2, contiguo al nitrógeno de la amida y el 1'-C.

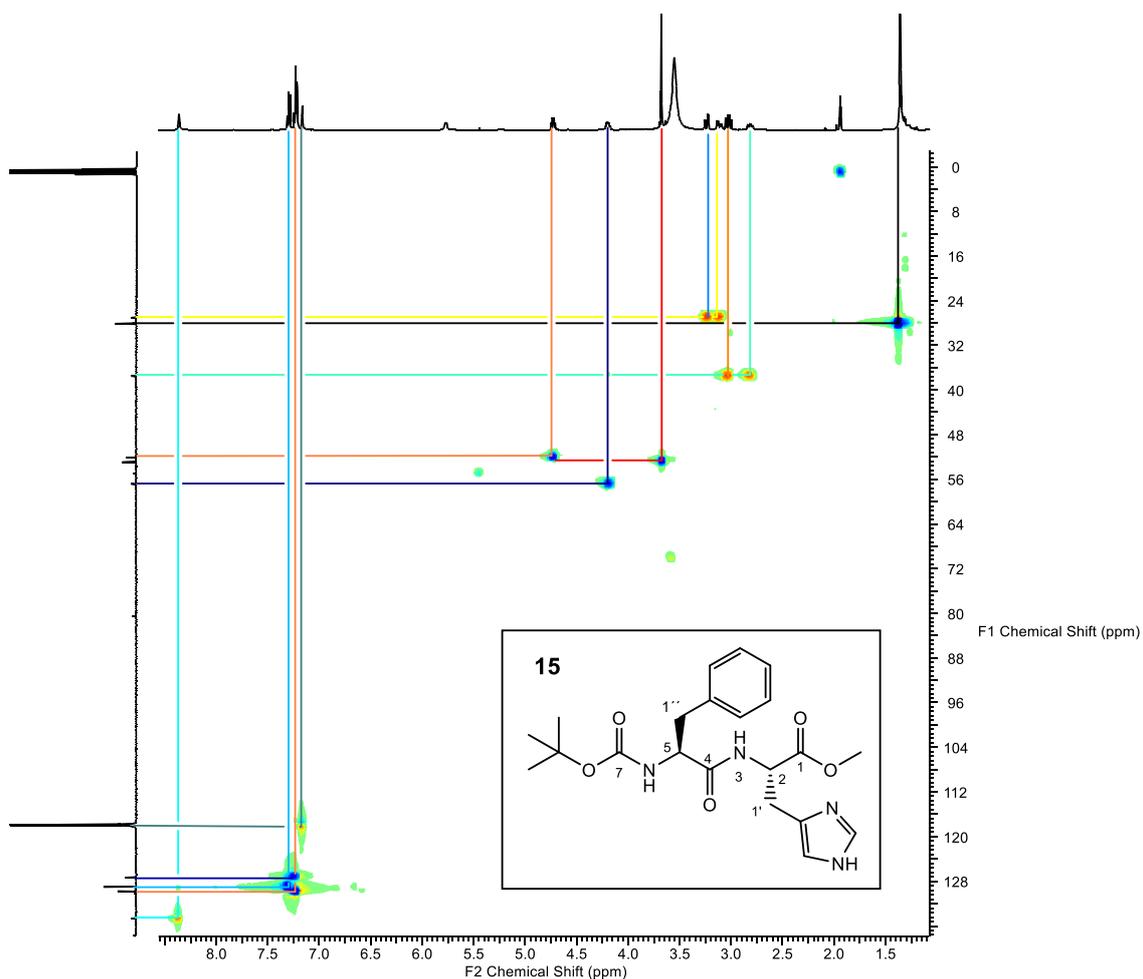
56.9 (CH, 5-C)	Se deduce que se trata del 5-C, CH contiguo al carbamato.
80.5 (C, <i>terc</i> -butilo)	Su $\delta$ sugiere que se trata del C cuaternario del grupo protector Boc.
117.9 (CH, C=C)	Según su $\delta$ se deduce que es el carbono que forma el doble enlace con el carbono cuaternario del anillo imidazólico.
127.3 (C, 2'-C)	Según su $\delta$ se deduce que es el carbono cuaternario del anillo imidazólico.
129.0 (CH, Ph <i>para</i> )	Se deduce que se trata del CH en posición <i>para</i> del fenilo.
129.8 (2 x CH, Ph <i>orto</i> )	Se deduce que se trata de los CH en posición <i>orto</i> del fenilo.
134.6 (2 x CH, Ph <i>meta</i> )	Se deduce que se trata de los CH en posición <i>meta</i> del fenilo.
137.7 (CH, CH=N)	Según su $\delta$ se deduce que se trata del CH=N en el anillo imidazólico. El experimento de HSQC confirma esta asignación.
156.8 (C, Ph)	Se deduce que se trata del C cuaternario del fenilo.
170.8 (C, 7-C)	Su $\delta$ indica que se trata del carbonilo del carbamato.
172.3 (C, 4-C y 1-C)	Según su $\delta$ se deduce que se trata de los C de los grupos carboxilo de la amida y el éster.



### COSY del compuesto 15

Disolvente: Acetonitrilo deuterado. Temperatura: 25°C

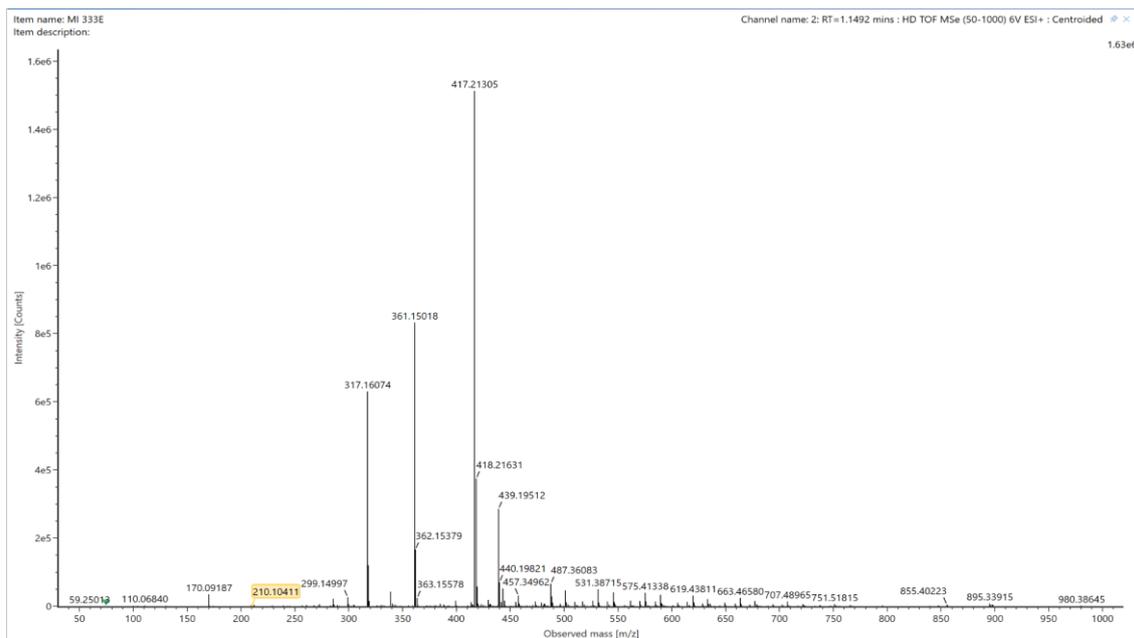
En este experimento de doble dimensión se correlacionan los protones de la molécula con sus protones geminales y contiguos con los que se acoplan. Así, el H del 5-C, tiene correlación con los protones H<sub>a</sub> y H<sub>b</sub> del 1''-C, mientras que los H del *terc*-butilo tienen señal únicamente con sus protones geminales (diagonal del espectro). De esta forma se puede continuar estableciendo la secuencia CH<sub>n</sub> de la molécula.



### HSQC del compuesto 15

Disolvente: Acetonitrilo deuterado. Temperatura: 25°C

Este experimento de doble dimensión se emplea para determinar las relaciones entre los protones de la molécula y sus respectivos carbonos, donde el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN se encuentra en el eje abscisas, y el  $^{13}\text{C}$ -RMN en el eje de ordenadas. Por ejemplo, los 9H del grupo *terc*-butilo se correlacionan con el C a 28.1 ppm.



Composition	i-FIT Confidence (%)	m/z RMS (PPM)	Intensity RMS (%)	Predicted m/z	m/z error (PPM)	m/z error (mDa)	DBE
C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	26.984177	0.432652	1.287947	417.213246	-0.472089	-0.196486	10

### ESI del compuesto 15

La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un dispositivo adecuado.

Así se obtiene el espectro correspondiente a cada compuesto. Dicho espectro proporciona información relacionada con su estructura, lo que permite la dilucidación y/o confirmación de la misma.

En este caso, el pico principal del espectro coincide con la fórmula molecular del compuesto más un átomo de hidrógeno ganado en el proceso de ionización (C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>). La masa molecular obtenida fue 417.2131, frente a la teórica de 417.2132.

La colección de péptidos sintetizados se utilizó tanto en ensayos antifúngicos como antibacterianos. Concretamente se estudió su actividad frente a los hongos *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*, y frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (#CECT749) y *Escherichia coli* (#CECT434).

Los resultados obtenidos en el ensayo antifúngico han sido los siguientes (**Tabla 1**):

**Tabla 1.** Organismos diana / % de inhibición (STD)

Compuesto	Estructura química	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. oxysporum</i>
<b>5</b>	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OMe	4,77/8,05	25,37/15,14	5,71/18,38
<b>6</b>	BOC-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe	-27,11/17,69	25,41/12,94	21,54/8,33
<b>10</b>	BOC-L-Leu-L-Orn(Cbz)-OMe	-6,75/14,36	30,65/16,20	11,01/17,15
<b>11</b>	BOC-L-Leu-L-Ser-OMe	6,88/6,57	5,38/16,15	47,70/4,78
<b>14</b>	BOC-L-Leu-L-Hyp-OMe	14,34/12,02	-1,03/12,17	-11,37/7,89
<b>15</b>	BOC-L-Phe-L-Hys-OMe	-18,62/10,60	78,11/11,92	-17,93/9,17

La tabla muestra los resultados obtenidos y la desviación estándar frente a los fitopatógenos *A. alternata*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*. En verde se somborean los resultados positivos.

Por lo tanto, concluimos que el péptido **15** muestra una actividad antifúngica significativa frente a *Botrytis*, y **11** frente a los tres fitopatógenos seleccionados. Se profundizará en estos prometedores resultados en un futuro.

Respecto a las actividades antibacterianas del estudio realizado con *E.coli* y *S. aureus*, se obtuvieron los resultados mostrados en las **tablas 2** y **3**, respectivamente:

**Tabla 2.** *E. coli* / % de supervivencia

Compuesto	Estructura química	% Supervivencia
5	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OMe	73.7
6	Boc-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe	72.1
7	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OH	76.6
9	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe	73.9
10	Boc-L-Leu-L-Orn(Cbz)-OMe	71.5
11	Boc-L-Leu-L-Ser-OMe	76.4
12	Z-L-Leu-L-Orn(Cbz)-OMe	74.0
13	H-L-Leu-L-Ser-OMe	77.1
14	Boc-L-Leu-L-Hyp-OMe	<b>66.6</b>
15	Boc-L-Phe-L-Hys-OMe	73.8
16	H-L-Leu-L-Hyp-OMe	73.9
17	H-L-Phe-L-Hys-OMe	76.1
18	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Orn(Cbz)-OMe	77.3
20	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Ser-OMe	78.6
22	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Hyp-OMe	75.5
23	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Ser-OMe	76.2
24	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Orn(Cbz)-L-Phe-L-Hys-OMe	<b>69.5</b>

Resultados de la acción de cada compuesto sintetizado a una concentración 100  $\mu$ M frente a un inóculo de  $5,4 \cdot 10^5$  UFC/ml de *E.coli*. La supervivencia con DMSO es del 94.2%, por lo que no tiene efecto significativo en los resultados su uso como disolvente. Se sombrea en amarillo aquellos porcentajes de supervivencia inferiores al 70%.

**Tabla 3.** *S. aureus* / % de supervivencia

Compuesto	Estructura química	% Supervivencia
5	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OMe	74,0
6	Boc-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe	<b>43,5</b>
7	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-OH	<b>65,5</b>
9	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Lys(Cbz)-OMe	<b>54,6</b>
10	Boc-L-Leu-L-Orn(Cbz)-OMe	<b>51,7</b>
11	Boc-L-Leu-L-Ser-OMe	<b>49,3</b>
12	Z-L-Leu-L-Orn(Cbz)-OMe	<b>40,0</b>
13	H-L-Leu-L-Ser-OMe	96,9
14	Boc-L-Leu-L-Hyp-OMe	<b>66,5</b>
15	Boc-L-Phe-L-Hys-OMe	<b>61,2</b>
16	H-L-Leu-L-Hyp-OMe	71,9
17	H-L-Phe-L-Hys-OMe	72,3
18	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Orn(Cbz)-OMe	<b>60,0</b>
20	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Ser-OMe	<b>47,6</b>
22	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Hyp-OMe	<b>54,2</b>
23	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Ser-OMe	<b>59,3</b>
24	Z-L-Phe-L-Arg(Tos)-L-Leu-L-Orn(Cbz)-L-Phe-L-Hys-OMe	<b>57,2</b>

Resultados de la acción de cada compuesto sintetizado a una concentración 100  $\mu$ M frente a un inóculo de  $1,5 \cdot 10^4$  UFC/ml de *S.aureus*. La supervivencia con DMSO es del 100%, por lo que no tiene efecto significativo en los resultados su uso como disolvente. Se sombrea en amarillo aquellos porcentajes de supervivencia inferiores al 70%.

Con los resultados de este *screening* se concluye que los péptidos estudiados no mostraron actividad frente a *E. coli* o *S. aureus* a una concentración de 100  $\mu$ M.

Pese a ello, este ensayo nos ha permitido detectar una serie de compuestos capaces de disminuir el porcentaje de supervivencia de estas bacterias en relación al control de crecimiento. Así por ejemplo el compuesto **14** reduce a un 60% este porcentaje, en ambas bacterias. Además, destacan otros productos como **6**, **12** o **20**, que reducen en torno al 40% el porcentaje de supervivencia de la cepa de *S. aureus* ensayada.

Observando las estructuras de los péptidos capaces de reducir el porcentaje de supervivencia, se detecta la presencia del aminoácido leucina en su secuencia peptídica, combinado con lisina, ornitina y serina, tres aminoácidos acíclicos y con heteroátomos en sus cadenas laterales. La mayor longitud de la cadena lateral de lisina parece favorecer la actividad antibacteriana. Este efecto es observado también en el producto **12**, que presenta la funcionalidad ácida libre. Sin embargo, la presencia de aminoácidos cíclicos como hidroxiprolina (**14**) o histidina (**15**) disminuye el efecto.

Los datos obtenidos del presente estudio microbiológico serán de utilidad para la elaboración de una segunda generación de péptidos mejorados.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Procedimiento sintético experimental

### ❖ *Reacción de saponificación*

El péptido a saponificar se disolvió en THF y se trató a 0°C con 2 equivalentes de una disolución 1M de KOH. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta comprobar la finalización de la reacción por cromatografía en capa fina (aproximadamente 2 horas). Entonces, se vertió en agua y se extrajo con AcOEt. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se concentró a vacío. El residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice.

### ❖ *Reacción de desprotección del grupo Boc*

El péptido se disolvió en DCM y se enfrió a 0 °C para añadir gota a gota el TFA (1/1 DCM/TFA). La mezcla se agitó durante 1.5 horas mientras se alcanzaba temperatura ambiente. Entonces se evaporó a vacío y el residuo obtenido se lavó varias veces con DCM.

### ❖ *Procedimiento general de acoplamiento peptídico*

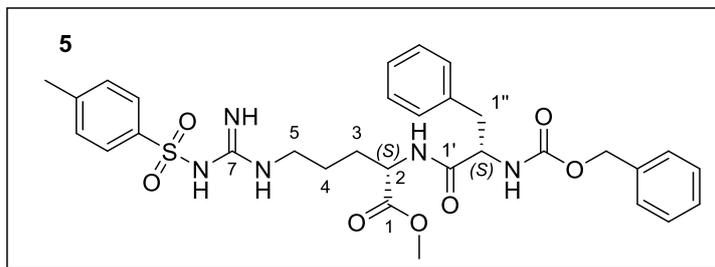
A una solución del ácido y la amina a acoplar en DCM se añadió, a 0°C, 1.1 equivalentes de HBTU y 3 equivalentes de DIPEA. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras comprobar que la reacción había finalizado por cromatografía en capa fina, la mezcla se lavó varias veces con disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y posteriormente con HCl acuoso al 10%. Tras secar con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, filtrar y concentrar a vacío, el residuo obtenido se purificó por cromatografía en columna. **(Imagen 2)**



**Imagen 2.** Imagen de uno de los péptidos sintetizados.

❖ **Caracterización de algunas de las estructuras más significativas**

El dipéptido **5** se preparó partiendo de los aminoácidos comerciales Z-Phe-OH (**1**) y H-L-Arg(Tos)-OMe (**2**), con rendimiento del 50%.



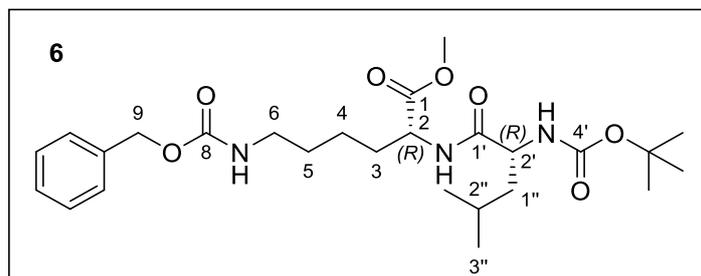
**Metil éster de N-benciloxycarbonil-L-fenilanyl-N<sup>8</sup>-tosil-L-arginina (5):**

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Acetonitrilo-*d*<sub>3</sub>, 70°C)** δ<sub>H</sub> 1.50 (quin, *J*=7.2 Hz, 2H, 4-Ha y 4-Hb), 1.58-1.70 (m, 1H, 3-Ha), 1.73-1.86 (m, 1H, 3-Hb), 2.13-2.28 (br s, 2H, NH), 2.38 (s, 3H, Me-PhSO<sub>2</sub>), 2.91 (dd, *J*=8.8, 14.1 Hz, 1H, 1''-Ha), 3.12-3.19 (m, 3H, 1''-Hb, 5-Ha y 5-Hb), 3.67 (s, 3H, OMe), 4.34-4.48 (m, 2H, 2-H y 2'-H), 5.03 (d, *J*=6.3 Hz, 2H, 6'-Ha y 6'-Hb), 5.80-5.90 (br s, 1H, NH), 6.17 (s, 1H, NH), 6.95 (d, *J*=7.5 Hz, 1H, NH), 7.15-7.43 (m, 12H, Ph), 7.72 (d, *J*=8.2 Hz, 2H, Ph).

**<sup>13</sup>C-RMN (100.6 MHz, Acetonitrilo-*d*<sub>3</sub>, 25°C)** δ<sub>C</sub> 21.0 (CH<sub>3</sub>, Tos), 25.7 (CH<sub>2</sub>, 4-C), 28.9 (CH<sub>2</sub>, 3-C), 38.1 (CH<sub>2</sub>, 1''-C), 40.7 (CH<sub>2</sub>, 5-C), 52.5 (CH + CH<sub>3</sub>, 2-C y OMe), 56.8 (CH, 2'-C), 66.7 (CH<sub>2</sub>, 6'-C), 126.3 (2 x CH, Ph), 127.2 (CH, Ph), 128.1 (2 x CH, Ph), 128.4 (CH, Ph), 128.9 (2 x CH, Ph), 129.0 (2 x CH, Ph), 129.8 (2 x CH, Ph), 129.9 (2 x CH, Ph), 137.6 (C, Ph), 137.9 (C, Ph), 141.9 (C, Tos), 142.7 (C, C-SO<sub>2</sub>), 156.7 (C, CO<sub>2</sub>Bn), 157.6 (C, 7-C), 172.3 (C, 1'-C), 172.7 (C, 1-C).

**MS (ESI-Tof)** calculado para C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>7</sub>S [M + Na]<sup>+</sup> 646.2306, encontrado 646.2333.

El dipéptido **6** se preparó partiendo de los aminoácidos comerciales Boc-Leu-OH (**3**) y H-L-Lys(Cbz)-OMe (**4**), con rendimiento del 84%.



**Metil éster de *N*-(*terc*-butoxicarbonil)-*L*-leucil-*N*<sup>7</sup>-(benciloxycarbonil)-*L*-lisina**

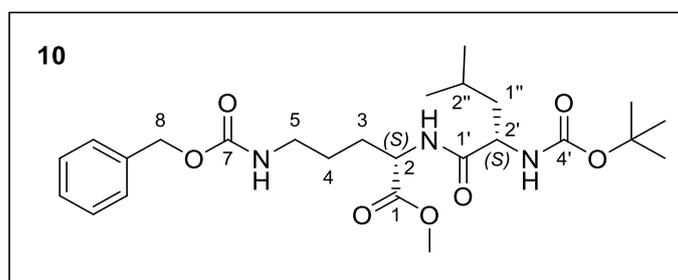
**(6):**

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Acetonitrilo-*d*<sub>3</sub>, 70°C)** δ<sub>H</sub> 0.94 (t, *J*=6.7 Hz, 6H, 2 x 3''-Me), 1.35-1.40 (m, 2H, 4-Ha y 4-Hb), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.46-1.52 (m, 2H, 5-Ha y 5-Hb), 1.54-1.62 (m, 2H, 1''-Ha y 1''-Hb), 1.65-1.75 (m, 2H, 3-Ha y 2''-H), 1.78-1.86 (m, 1H, 3-Hb), 3.11 (q, *J*=6.6 Hz, 2H, 6-Ha y 6-Hb), 3.67 (s, 3H, OMe), 4.06 (td, *J*=5.3, 8.8 Hz, 1H, 2-H), 4.39 (td, *J*=5.3, 8.1 Hz, 1H, 2'-H), 5.08 (s, 2H, 9-Ha y 9-Hb), 5.35 (br s, 1H, NH), 5.46 (br s, 1H, NH), 6.78 (d, *J*=6.6 Hz, 1H, NH), 7.25-7.43 (m, 5H, Ph).

**<sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, Acetonitrilo-*d*<sub>3</sub>, 70°C)** δ<sub>C</sub> 21.1 (CH<sub>3</sub>, 3''-Me), 22.2 (CH<sub>3</sub>, 3''-Me), 22.4 (CH<sub>2</sub>, 4-C), 24.6 (CH, 2''-C), 27.6 (3 x CH<sub>3</sub>, Boc), 29.1 (CH<sub>2</sub>, 5-C), 31.2 (CH<sub>2</sub>, 3-C), 40.4 (CH<sub>2</sub>, 1''-C), 41.1 (CH<sub>2</sub>, 6-C), 51.5 (CH<sub>3</sub>, OMe), 52.2 (CH, 2'-C), 53.5 (CH, 2-C), 65.8 (CH<sub>2</sub>, 9-C), 79.1 (C, Boc), 127.6 (2 x CH, Ph), 127.7 (CH, Ph), 128.4 (2 x CH, Ph), 137.6 (C, Ph), 155.6 (C, CO), 156.5 (C, CO), 172.4 (C, CO), 172.6 (C, CO).

**MS (ESI-Tof)** calculado para **C<sub>26</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>7</sub>** [M + Na]<sup>+</sup> 530.2837, encontrado 530.2836.

El dipéptido **10** se preparó partiendo de los aminoácidos comerciales Boc-*L*-Leu-OH y H-*L*-Orn(Cbz)-OMe, con rendimiento del 75%.



**Metil éster de *N*-(*terc*-butoxicarbonil)-*L*-leucil-*N*<sup>6</sup>-benciloxycarbonil-*L*-ornitina**

**(10):**

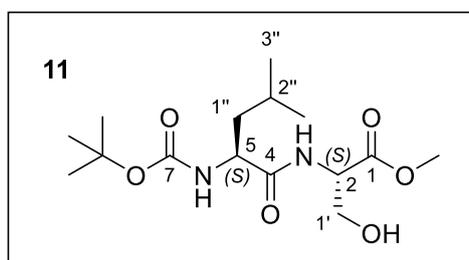
**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Acetonitrilo-*d*<sub>3</sub>, 70°C)** δ<sub>H</sub> 0.94 (t, *J*=6.7 Hz, 6H), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.47-1.58 (m, 4H, 4-Ha, 4-Hb, 1''-Ha y 1''Hb), 1.67-1.71 (m, 2H, 3-Ha y 2''-H), 1.80-1.86 (m, 1H, 3-Hb), 3.13 (q, *J*=6.6 Hz, 2H, 5-Ha y 5-Hb), 3.68 (s, 3H, OMe), 4.05 (td, *J*=5.3, 8.8, 8.8 Hz, 1H, 2-H), 4.41 (td, *J*=5.4, 8.1, 8.1 Hz, 1H, 2'-H), 5.08 (s, 2H,

8-Ha y 8-Hb), 5.35 (br s, 1H, NH), 5.50 (br s, 1H, NH), 6.84 (d,  $J=6.0$  Hz, 1H, NH), 7.32-7.39 (m, 5H, Ph).

**$^{13}\text{C}$ -RMN (100.6 MHz, Acetonitrilo- $d_3$ , 70°C)**  $\delta_{\text{C}}$  21.1 (CH<sub>3</sub>, 3''-Me), 22.2 (CH<sub>3</sub>, 3''-Me), 24.6 (CH, 2''-C), 25.8 (CH<sub>2</sub>, 4-C), 27.6 (3 x CH<sub>3</sub>, Boc), 28.8 (CH<sub>2</sub>, 3-C), 40.2 (CH<sub>2</sub>, 5-C), 41.1 (CH<sub>2</sub>, 1''-C), 51.6 (CH, 2'-C), 52.0 (CH<sub>3</sub>, OMe), 53.5 (CH, 2-C), 65.8 (CH, 8-C), 79.1 (C, Boc), 127.6 (2 x CH, Ph *orto*), 127.7 (CH, Ph *para*), 128.3 (2 x CH, Ph *meta*), 137.6 (C, Ph), 155.6 (C, 7-C), 156.5 (C, 4'-C), 172.3 (C, 1'-C), 172.6 (C, 1-C).

**MS (ESI-Tof)** calculado para  $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{NaO}_7$  [M + Na]<sup>+</sup> 516.2680, encontrado 516.2678.

El dipéptido **11** se preparó partiendo de los aminoácidos comerciales Boc-Leu-OH y H-L-Ser-OMe, con rendimiento del 53%.



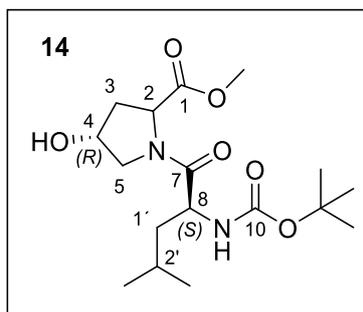
**Metil éster de *N*-*tert*-butoxicarbonil-L-leucil -L-serina (11):**

**$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, Cloroformo- $d$ , 25°C)**  $\delta_{\text{H}}$  0.95 (t,  $J=6.6$  Hz, 6H, 2 x 3''-Me), 1.43 (s, 9H, Boc), 1.48-1.56 (m, 1H, 1''-Ha), 1.59-1.74 (m, 2H, 1''-Hb y 2''-H), 3.56 (br s, 1H, OH), 3.78 (s, 3H, OMe), 3.93 (br. s., 2H, 1'-Ha y 1'-Hb), 4.13 (d,  $J=5.7$  Hz, 1H, 5-H), 4.61-4.68 (m, 1H, 2-H), 5.16 (d,  $J=7.2$  Hz, 1H, NH), 7.10 (d,  $J=7.8$  Hz, 1H, NH).

**$^{13}\text{C}$ -RMN (100.6 MHz, Cloroformo- $d$ , 25°C)**  $\delta_{\text{C}}$  22.0 (CH<sub>3</sub>, 3''-Me), 22.9 (CH<sub>3</sub>, 3''-Me), 24.7 (CH, 2''-C), 28.4 (3 x CH<sub>3</sub>, Boc), 41.0 (CH<sub>2</sub>, 1''-C), 52.7 (CH<sub>3</sub>, OMe), 53.5 (CH, 2-C), 54.8 (CH, 5-C), 62.7 (CH<sub>2</sub>, 1'-C), 80.4 (C, Boc), 156.1 (C, 7-C), 170.8 (C, 4-C), 173.0 (C, 1-C).

**MS (ESI-Tof)** calculado para  $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{NaO}_6$  [M + Na]<sup>+</sup> 355.1839, encontrado 355.1838.

El dipéptido **14** se preparó acoplado los aminoácidos comerciales Boc-Leu-OH y H-L-Hyp-OMe, con rendimiento del 58%.



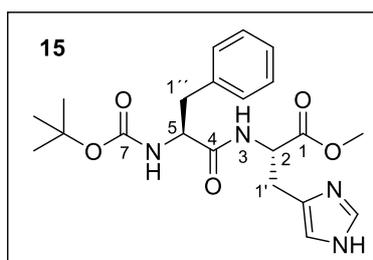
**Metil éster de *N*-*tert*-butoxicarbonil-L-leucil-(4*R*)-hidroxi-L-prolina (**14**):**

**<sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, Acetonitrilo-*d*<sub>3</sub>, 70°C)** δ<sub>H</sub> 0.97 (t, *J*=6.4 Hz, 6H), 1.42 (s, 9H), 1.46-1.53 (m, 2H, 1'-Ha y 1'-Hb), 1.71-1.80 (m, 1H, 2'-H), 1.97-1.99 (m, 1H, 3-Ha), 2.18-2.24 (m, 1H, 3-Hb), 3.20 (br s, 1H, OH), 3.66 (3H, s, OMe), 3.66-3.75 (m, 2H, 5-Ha, 5-Hb), 4.36-4.42 (m, 1H, 4-H), 4.45-4.55 (m, 2H, 2-H, 8-H), 5.04-5.06 (br b, 1H, NH).

**<sup>13</sup>C-RMN (100.6 MHz, Acetonitrilo-*d*<sub>3</sub>, 70°C)** δ<sub>C</sub> 22.5 (CH<sub>3</sub>, 3'-C), 23.7 (CH<sub>3</sub>, 4'-C), 25.8 (CH, 2'-C), 29.0 (3 x CH<sub>3</sub>, Boc), 38.6 (CH<sub>2</sub>, 3-C), 42.5 (CH<sub>2</sub>, 1'-C), 52.3 (CH, 4-C), 52.8 (CH<sub>3</sub>, OMe), 56.3 (CH<sub>2</sub>, 5-C), 59.2 (CH, 2-C), 71.3 (CH, 8-C), 80.4 (C, Boc), 156.6 (C, 10-C), 173.2 (C, CO), 173.8 (C, CO).

**MS (ESI-Tof)** calculado para C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>6</sub> [M + Na]<sup>+</sup> 381.1996, encontrado 381.1988.

El dipéptido **15** se preparó partiendo de los aminoácidos comerciales Boc-Phe-OH y H-L-Hys-OMe, con rendimiento del 35%.



**Metil éster de *N*-*tert*-butoxicarbonil-L-fenilalanil-L-histidina (**15**):**

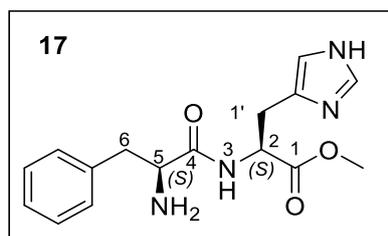
**<sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, Acetonitrilo-*d*<sub>3</sub>, 25°C)** δ<sub>H</sub> 1.36 (s, 9H, Boc), 2.81 (dd, *J*=13.7, 9.4 Hz, 1H, 1''-Ha), 3.03 (dd, *J*=13.9, 5.6 Hz, 1H, 1''-Hb), 3.12 (dd, *J*=15.3, 6.7 Hz,

$^1\text{H}$ , 1'-Ha), 3.24 (dd,  $J=15.3, 5.0$  Hz, 1H, 1'-Hb), 3.68 (s, 3H, OMe), 4.17-4.23 (m, 1H, 5-H), 4.73 (td,  $J=7.4, 5.2$  Hz, 1H, 2-H), 5.77 (d,  $J=6.6$ , 1H, 3-NH) 7.17 (s, 1H, C=C), 7.20-7.25 (m, 4H, 3 x Ph y 6-NH), 7.27-7.32 (m, 2H, Ph), 8.36 (br. s., 1H, CH=N).

$^{13}\text{C}$ -RMN (100.6 MHz, Acetonitrilo- $d_3$ , 25°C)  $\delta_{\text{C}}$  27.0 (CH<sub>2</sub>, 1'-C), 28.1 (3 x CH<sub>3</sub>, *terc*-butilo), 37.5 (CH<sub>2</sub>, 1''-C), 52.1 (CH<sub>3</sub>, OMe), 52.9 (CH, 2-C), 56.9 (CH, 5-C), 80.5 (C, *terc*-butilo), 117.9 (CH, C=C), 127.3 (C, 2'-C), 129.0 (CH, Ph *para*), 129.8 (2 x CH, Ph *orto*), 134.6 (2 x CH, Ph *meta*), 137.7 (CH, CH=N), 156.8 (C, Ph), 170.9 (C, 7-C), 172.3 (C, 4-C y 1-C).

**MS (ESI-Tof)** calculado para C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub> [M + H]<sup>+</sup> 417.2132, encontrado 417.2131.

El dipéptido **17** se preparó al desproteger la amina del dipéptido **15**, con rendimiento cuantitativo.



**Metil éster de L-fenilalanil-L-histidina (17):**

$^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, Acetonitrilo- $d_3$ , 25°C)  $\delta_{\text{H}}$  3.04-3.16 (m, 2H, 6-Ha y 6-Hb), 3.20 (d,  $J=5.1$  Hz, 2H, 1'-Ha y 1'-Hb), 3.71 (s, 3H, OMe), 4.22 (t,  $J=6.7$  Hz, 1H, 2-H), 4.83 (dt,  $J=7.9, 5.1$  Hz, 1H, 5-H), 7.15 (s, 1H, C=C), 7.21-7.35 (m, 5H, Ph), 7.75 (d,  $J=7.9$  Hz, 1H, NH), 8.43 (s, 1H, CH=N).

$^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, Acetonitrilo- $d_3$ , 25°C)  $\delta_{\text{C}}$  ppm 27.2 (CH<sub>2</sub>, 1'-C), 37.72 (CH<sub>2</sub>, 6-C), 53.23 (CH<sub>3</sub>, OMe), 53.31 (CH, 5-C), 55.56 (CH, 2-C), 118.20 (CH, C=C), 128.60 (C, 2'-C), 129.72 (CH, Ph *para*), 129.82 (2 x CH, Ph *orto*), 130.45 (2 x CH, Ph *meta*), 134.48 (CH, C=N), 134.77 (C, Ph), 168.56 (C, 4-C), 170.51 (C, 1-C).

**MS (ESI-Tof)** calculado para C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub> [M + H]<sup>+</sup> 317.1614, encontrado 317.1610.

## 2. Purificación de compuestos

### ❖ *Cromatografía en capa fina*

Se utilizó este método cromatográfico para comprobar el avance de las reacciones, para seguir las columnas cromatográficas y para verificar la pureza de los compuestos sintetizados. Se emplearon placas de gel de sílice Merck (60 F254 de 0,25 mm de espesor) y eluyentes de diferentes polaridades acordes a cada compuesto. Posteriormente se visualizaron irradiándolas con luz ultravioleta y se revelaron con disolución de  $\text{KMnO}_4$ .



**Imagen 3.** Cromatografía en capa fina de dos reacciones.

### ❖ *Cromatografía en columna de gel de sílice*

Esta técnica se empleó para purificar los compuestos, utilizando gel de sílice Merck 60 (0,0630-2.0 mm), con fase móvil de diferente polaridad acorde al producto purificado.



**Imagen 4.** Cromatografía en columna de gel de sílice.

### 3. Técnicas Generales

#### ❖ *Resonancia Magnética Nuclear (RMN)*

Tanto los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN como  $^{13}\text{C}$ -RMN, COSY y HSQC se realizaron en un espectrofotómetro Bruker, modelo *Avance II 500*, a 400 y 500 MHz para el  $^1\text{H}$ -RMN, y 100.6 y 125.7 MHz para el  $^{13}\text{C}$ -RMN. Los disolventes y temperaturas empleados en cada experimento se indican al describir cada péptido. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm), con relación al disolvente empleado como referencia interna, y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hertzios.

#### ❖ *Espectroscopía de Masas*

Los espectros de masas se realizaron utilizando la técnica de Ionización por Electro spray (ESI) con un espectrómetro Vion IMS Qtof.

### 4. Actividades microbiológicas

#### ❖ *Actividades antifúngicas*

Los ensayos antifúngicos fueron realizados por la graduada en biología Zuleima González, técnica contratada por el proyecto MAC-INTERREG APOGEO. Concretamente se estudió la actividad de algunos péptidos frente a *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium oxysporum*.

#### ❖ *Actividades antibacterianas*

Los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron en una campana de seguridad biológica clase II Telstar, modelo *Bio II Advance*.

Las cepas bacterianas empleadas para el *screening* han sido *Staphylococcus aureus* (#CECT749) y *Escherichia coli* (#CECT434).

Los medios de cultivo empleados han sido el caldo Mueller Hinton (MH) y LB Agar (LB), plasmados en la **tabla 4**.

**Tabla 4.** *Medios de cultivo empleados*

<b>Mueller-Hinton Broth:</b> #CM0405; Oxoid Ltd, Wade Road, Basingstoke, Hants, Reino Unido
<b>LB Agar (MILLER):</b> #1.10283.0500; Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania

Los medios LB Agar y Mueller-Hinton empleados en la realización de las actividades biológicas.

➤ **Preparación del inóculo de bacterias**

Con el fin de realizar un *screening* de actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y negativas, se tomaron como representantes de cada grupo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente.

Para la preparación del inóculo se sembraron dichas cepas, procedentes de stock criogénico, utilizando la técnica de siembra en estrías, en medio LB. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37 °C. Transcurrido este tiempo, se seleccionaron tres colonias aisladas y se sembraron en caldo MH. El nuevo cultivo se incubó 18 horas a 37 °C. Finalmente, vía diluciones seriadas, se obtuvo un inóculo a una concentración aproximada de 10<sup>5</sup> UFC/mL en caldo MH.

➤ **Cuantificación del inóculo preparado**

Para cuantificar la concentración bacteriana en el inóculo real utilizado en el ensayo, se realizaron diluciones seriadas a 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, y 10<sup>-4</sup> del mismo, y se sembraron utilizando la técnica de siembra masiva o césped en placas de Petri con medio enriquecido LB. Las placas se incubaron durante 18 horas a 37 °C, y a continuación se llevó a cabo la cuantificación (**Tabla 5**).

**Tabla 5.** *Recuento de las placas de Petri y cálculo del valor real del inóculo empleado*

Bacteria	Dilución	UFC	Valor real del inóculo
<i>E. coli</i>	10 <sup>-2</sup>	143	<b>5,4*10<sup>5</sup> UFC/ml</b>
	10 <sup>-3</sup>	16	
	10 <sup>-4</sup>	3	
<i>S. aureus</i>	10 <sup>-2</sup>	38	<b>1,5*10<sup>4</sup> UFC/ml</b>
	10 <sup>-3</sup>	6	
	10 <sup>-4</sup>	0	

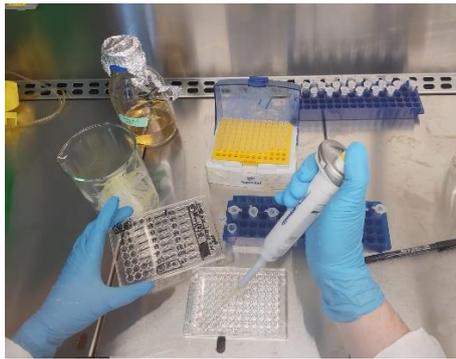
La tabla muestra el valor real del inóculo de bacterias empleado en cada ensayo.

➤ ***Preparación de las muestras a ensayar***

Se prepararon disoluciones de los péptidos sintetizados en DMSO a una concentración de 10 mM, que posteriormente se diluyeron hasta 200  $\mu$ M con medio MH.

➤ ***Evaluación de la actividad antimicrobiana***

El ensayo se realizó utilizando el método de micro-dilución en una placa de 96 pocillos (**imagen 5**). Los péptidos se probaron a una concentración final de 100  $\mu$ M, por triplicado, sobre un inóculo de aproximadamente  $10^5$  UFC/mL de la bacteria a ensayar. Se utilizó DMSO en el control de crecimiento y 100  $\mu$ L de medio en el control de esterilidad.



**Imagen 5.** Preparación de la placa de 96 pocillos de fondo plano.

➤ ***Lectura de resultados***

Para el análisis de los resultados se usó un espectrofotómetro lector de placas BMG LABTECH 96, Modelo *FLUOstar Omega*, con longitud de onda 595 nm. Este procedimiento se observa en la **imagen 6**.



**Imagen 6.** Colocación de la placa de 96 pocillos en el espectrofotómetro *FLUOstar Omega*.

## CONCLUSIONES

- ❖ Se sintetizaron 20 péptidos derivados de PDH del péptido de referencia FRLKFH, 12 de ellos dipéptidos, siete tetrapéptidos y un hexapéptido. Esta síntesis se llevó a cabo mediante un procedimiento de síntesis combinatoria.
- ❖ El procedimiento sintético experimental conllevó manejar técnicas usuales de síntesis orgánica como son el montaje de las reacciones, su seguimiento por cromatografía de capa fina, purificación en columna de gel de sílice, extracciones de compuestos orgánicos, eliminación de disolventes vía evaporación con rotavapor, entre otras.
- ❖ Se caracterizaron los compuestos sintetizados mediante  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, COSY y HSQC. Además, se comprobó su estructura con espectrometría de masas.
- ❖ Algunos de los compuestos sintetizados, una vez purificados y comprobada su estructura, se utilizaron en estudios antifúngicos (contra los hongos *A. alternata*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*) y también antimicrobianos (contra las cepas *Staphylococcus aureus* (#CECT749) y *Escherichia coli* (#CECT434)).
- ❖ Los resultados obtenidos frente a los tres fitopatógenos seleccionados, *A. alternata*, *B. cinerea* y *F. oxysporum*, mostraron una actividad antifúngica interesante, que se estudiará con mayor profundidad en un futuro.
- ❖ Los resultados obtenidos frente a las dos cepas de bacterias seleccionadas indican que, si bien no poseen actividad antibacteriana directa, algunos péptidos consiguen reducir la supervivencia de las dos cepas estudiadas. Los resultados obtenidos serán útiles para la elaboración de una futura generación de péptidos mejorados.

## BIBLIOGRAFÍA

[1] Drayton M, Deisinger JP, Ludwig KC, Raheem N, Müller A, Schneider T, et al. *Host defense peptides: Dual antimicrobial and immunomodulatory action*. Int J Mol Sci [Internet]. 2021; [consultado 28 de abril de 2022] 22(20):11172. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222011172>

[2] Boto A, Pérez de la Lastra JM, González CC. *The road from host-defense peptides to a new generation of antimicrobial drugs*. Molecules [Internet]. 2018; [consultado 28 de abril de 2022] 23(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23020311>

[3] Ting DSJ, Beurman RW, Dua HS, Lakshminarayanan R, Mohammed I. *Strategies in translating the therapeutic potentials of host defense peptides*. Front Immunol [Internet]. 2020; [consultado 6 de mayo de 2022] 11:983. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2020.00983>

[4] Vila J, Moreno-Morales J, Ballesté-Delpierre C. *Current landscape in the discovery of novel antibacterial agents*. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2020; [consultado 6 de mayo de 2022] 26(5):596-603. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2019.09.015>

[5] Wang Z, Wang G. *APD: The antimicrobial peptide database*. Nucleic Acids Res [Internet]. 2004; [consultado 7 de mayo de 2022] 32(1):D590-592. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh025>

[6] Mishra B, Reiling S, Zarena D, Wang G. *Host defense antimicrobial peptides as antibiotics: design and application strategies*. Curr Opin Chem Biol [Internet]. 2017; [consultado 6 de mayo de 2022] 38:87-96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.014>

[7] Epanand RM, Vogel HJ. *Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action*. Biochim Biophys Acta Biomembr [Internet]. 1999; [consultado 6 de mayo de 2022] 146:1-14.

2022] 1462(1-2):11-28. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0005-2736\(99\)00198-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0005-2736(99)00198-4)

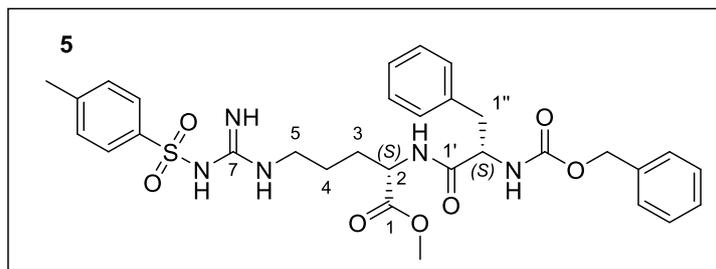
[8] Rodríguez AA, Otero-González A, Ghattas M, Ständker L. *Discovery, optimization, and clinical application of natural antimicrobial peptides*. Biomedicines [Internet]. 2021; [consultado 7 de mayo de 2022] 9(10):1381. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines9101381>

[9] Montesinos E, Bardají E. *Synthetic antimicrobial peptides as agricultural pesticides for plant-disease control*. Chem Biodivers [Internet]. 2008; [consultado 30 de abril] 5(7):1225-37. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.200890111>

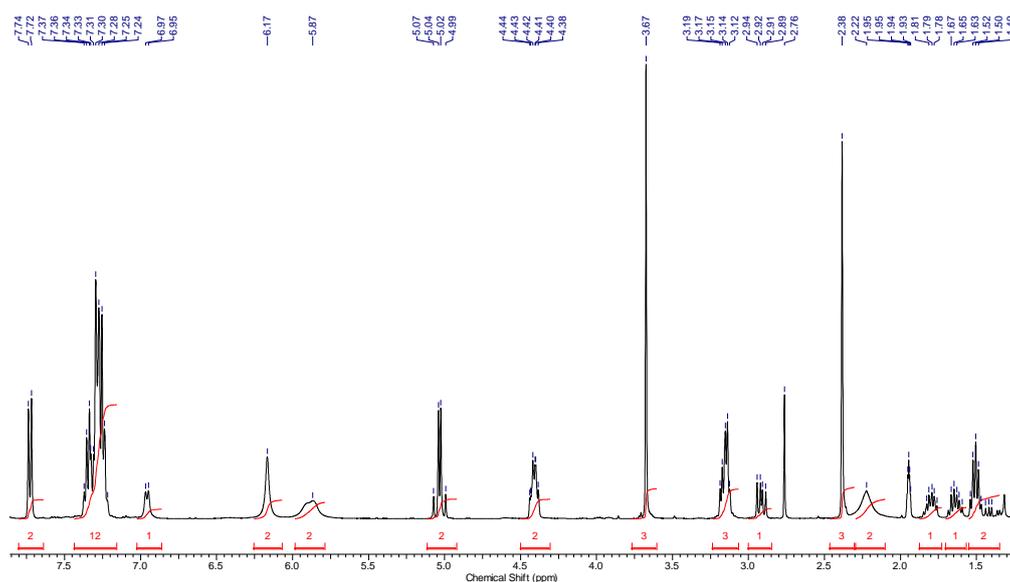
[10] Wang G, editor. *Antimicrobial peptides: Discovery, design and novel therapeutic strategies*. 2.a ed. Wallingford, Inglaterra: CABI Publishing; 2017.

[11] Reed JD, Edwards DL, Gonzalez CF. *Synthetic peptide combinatorial libraries: a method for the identification of bioactive peptides against phytopathogenic fungi*. Mol Plant Microbe Interact [Internet]. 1997; [consultado 7 de mayo de 2022] 10(5):537-49. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.5.537>

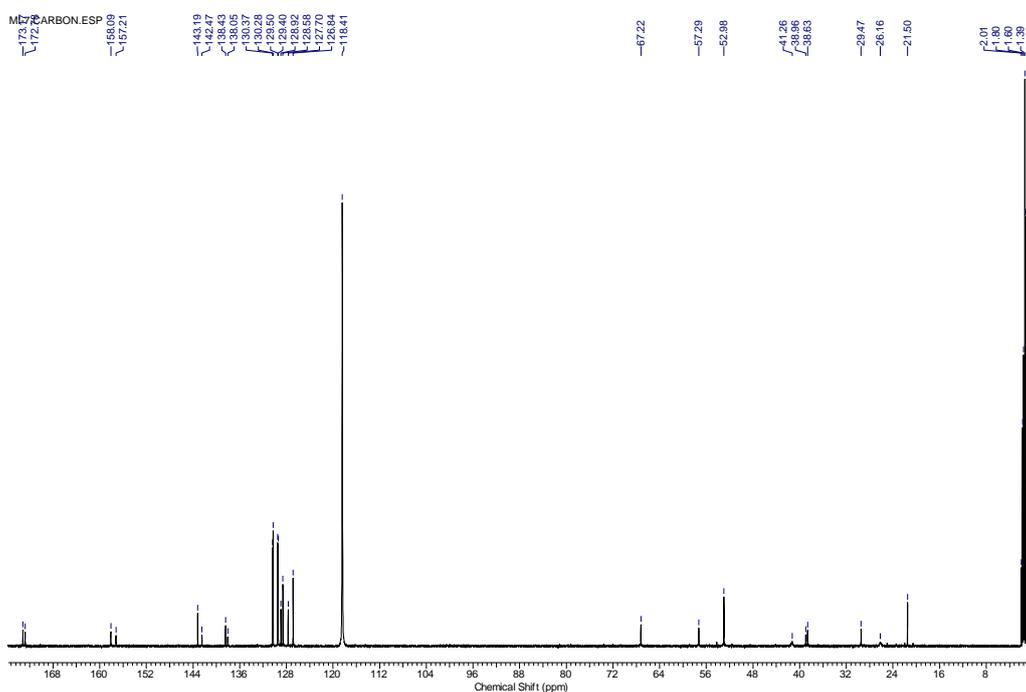
# ANEXO: SELECCIÓN DE ESPECTROS DE ALGUNAS ESTRUCTURAS SIGNIFICATIVAS



## 5 <sup>1</sup>H-RMN:

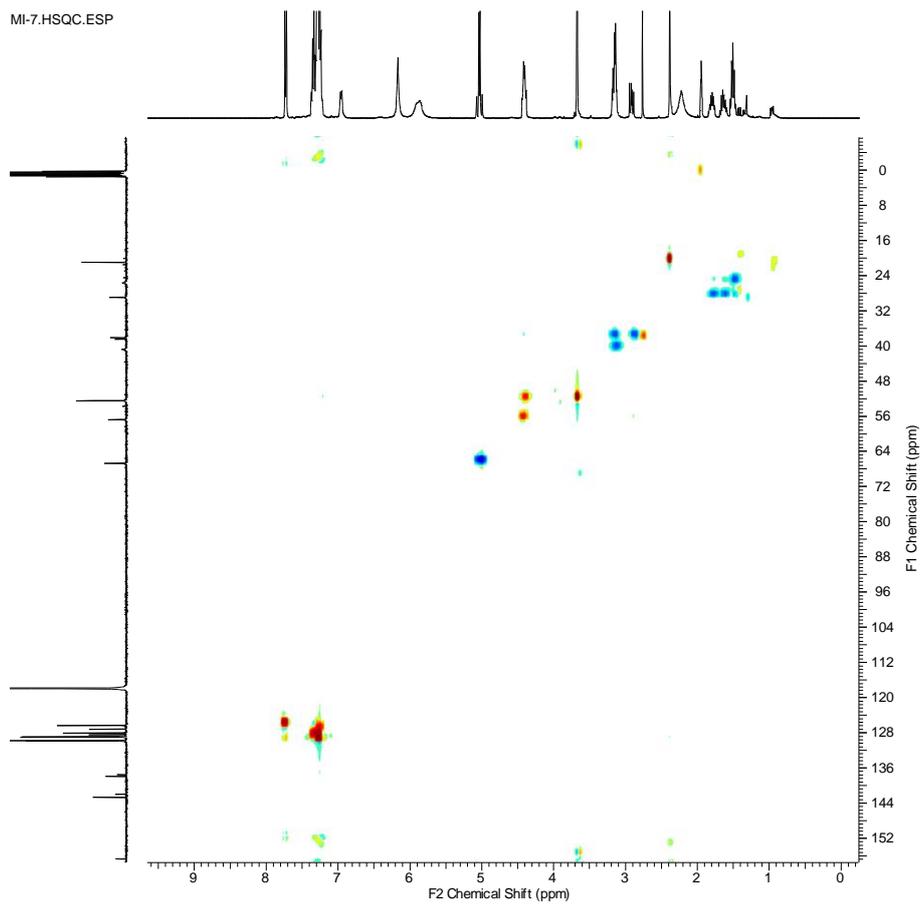


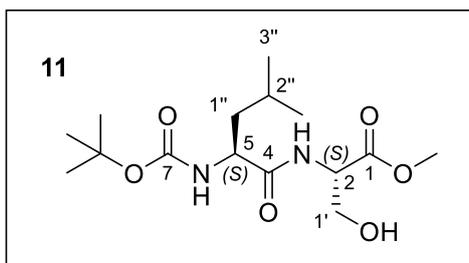
## 5 <sup>13</sup>C-RMN:



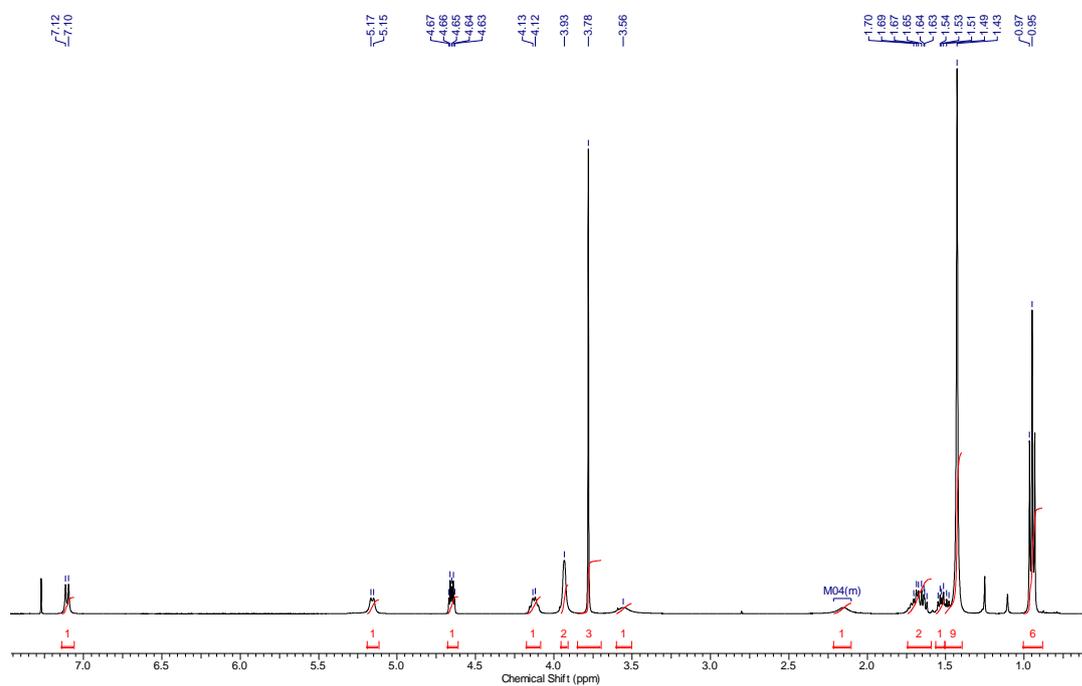
# 5 HSQC:

MI-7.HSQC.ESP

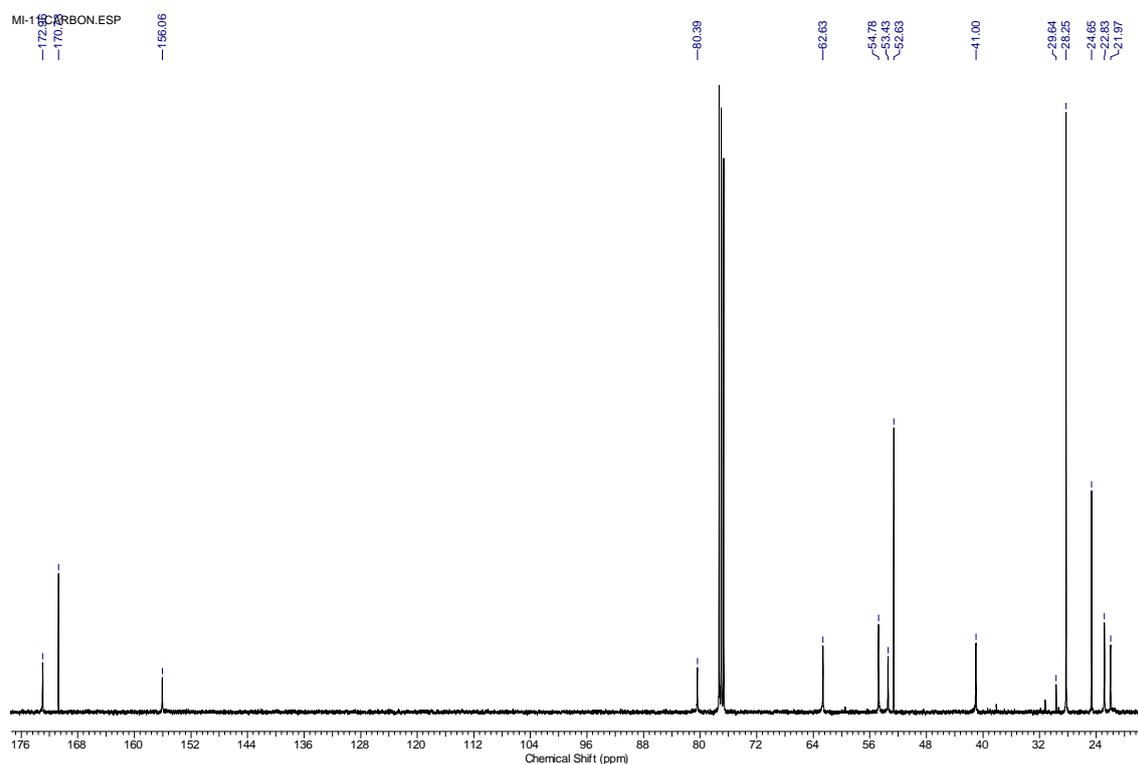




**11 <sup>1</sup>H-RMN:**

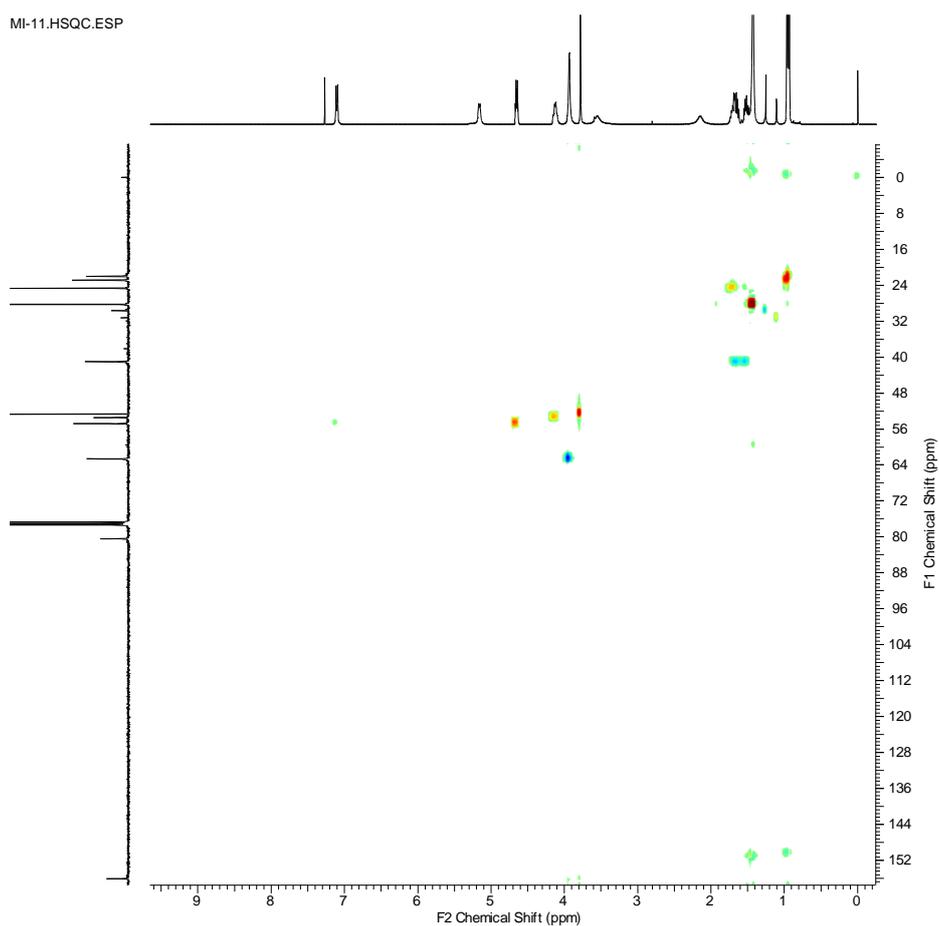


**11 <sup>13</sup>C-RMN:**

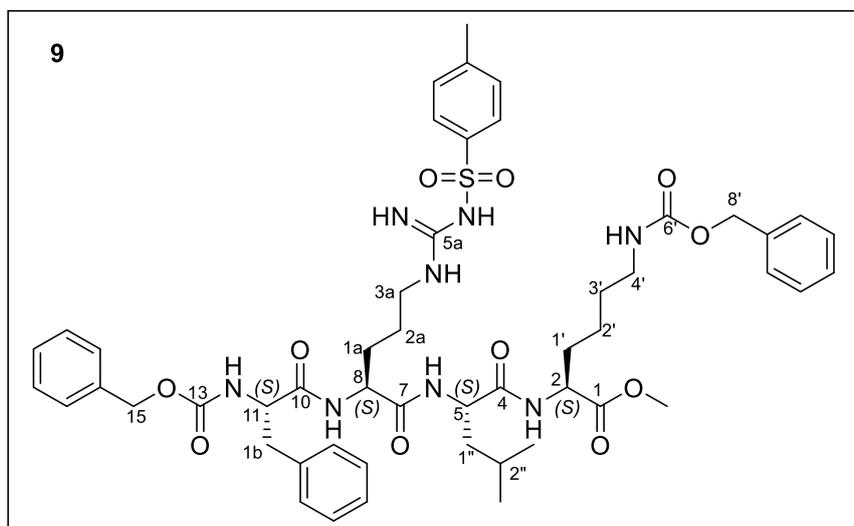


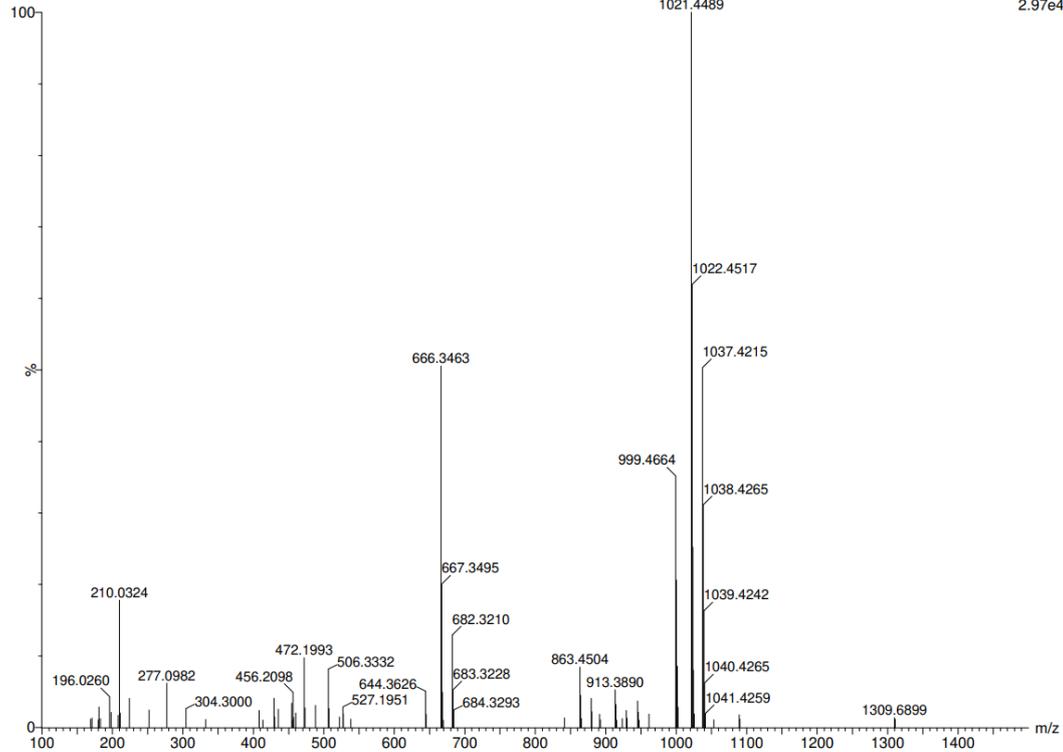
## 11 HSQC:

MI-11.HSQC.ESP



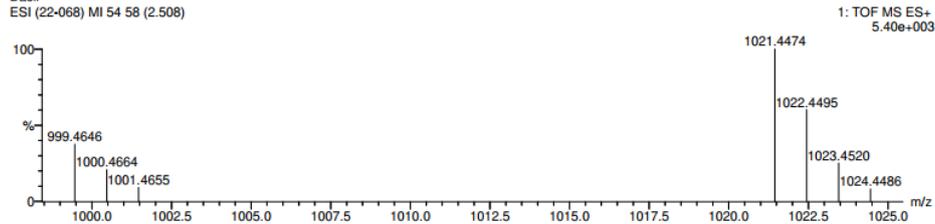
## 9 MS (ESI-Tof):





**Multiple Mass Analysis: 3 mass(es) processed**  
 Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0  
 Element prediction: Off  
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions  
 1342 formula(e) evaluated with 13 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)  
 Elements Used:  
 C: 0-58 H: 0-70 N: 0-8 O: 0-11 Na: 0-1 S: 0-1  
 Dacl  
 ESI (22-068) MI 54 58 (2.508)



Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
999.4646	37.36	999.4626	2.0	2.0	19.5	10.3	0.4	C49 H68 N8 O11 Na S
		999.4650	-0.4	-0.4	22.5	11.4	1.5	C51 H67 N8 O11 S
		999.4666	-2.0	-2.0	23.5	13.5	3.5	C54 H68 N6 O9 Na S
		999.4616	3.0	3.0	27.5	14.0	4.0	C54 H63 N8 O11
		999.4632	1.4	1.4	28.5	14.2	4.2	C57 H64 N6 O9 Na
		999.4690	-4.4	-4.4	26.5	16.0	6.0	C56 H67 N6 O9 S
1021.4474	100.00	1021.4469	0.5	0.5	22.5	9.3	0.1	C51 H66 N8 O11 Na S
		1021.4494	-2.0	-2.0	25.5	12.1	2.9	C53 H65 N8 O11 S
		1021.4460	1.4	1.4	30.5	13.5	4.3	C56 H61 N8 O11
		1021.4436	3.8	3.7	27.5	14.6	5.5	C54 H62 N8 O11
		1021.4510	-3.6	-3.5	26.5	15.2	6.1	Na C56 H66 N6 O9 Na S
1022.4495	60.25	1022.4486	0.9	0.9	29.5	19.6	0.5	C57 H64 N7 O9 S
		1022.4462	3.3	3.2	26.5	20.0	0.9	C55 H65 N7 O9 Na S