



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Síntesis de N-Glucopéptidos Derivados de la LfcinB y Evaluación de su Actividad Antibacteriana y Antifúngica**

**Andrea Verónica Rodríguez Mayor**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Bogotá, Colombia  
2019



# **Síntesis de N-Glucopéptidos Derivados de la LfcinB y Evaluación de su Actividad Antibacteriana y Antifúngica**

**Andrea Verónica Rodríguez Mayor**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias - Química**

Director:

Prof. Javier Eduardo García Castañeda

Línea de Investigación:

Química Orgánica

Grupo de Investigación:

Síntesis y Aplicaciones de Moléculas Peptídicas – SAMP

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2019





*“No duermas para descansar, duerme para soñar.  
Porque los sueños están para cumplirse”*

Walt Disney



## Agradecimientos

A mi madre, que con su ejemplo y esfuerzo ha guiado cada uno de mis pasos. A mi hermano, por ser el motivo que me lleva a superarme cada día. A mi abuela por ser una segunda madre y enseñarme que los obstáculos no existen. A mi novio por ser un apoyo incondicional, un soporte de vida y un compañero de viaje. A toda mi familia por ser el pilar de mis sueños, creer en mí y enseñarme que en familia todo es mejor.

A los profesores **Javier Eduardo García** y **Zuly Jenny Rivera** por su apoyo constante y sus acertados consejos, su guía fue la brújula que me mostró el camino para crecer como persona y profesional. Mis más sinceros agradecimientos a los dos por la confianza depositada en mí. Sus consejos y apoyo enmarcan este proceso académico y se quedan en mis recuerdos con un enorme afecto.

A la **Dra. Claudia Parra**, quien me brindó el espacio en el Laboratorio de Micología Clínica y Experimental de la Pontificia Universidad Javeriana para realizar los ensayos antifúngicos.

A la **Dra. Rosa Santillán** y al **Dr. Norberto Farfán** por invitarme a hacer una estancia de investigación en sus laboratorios de síntesis orgánica en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN y la Universidad Nacional Autónoma de México. Gracias por abrir sus puertas para afianzar vínculos de cooperación Colombia-México

Al grupo de Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas de la Universidad Nacional de Colombia por permitirme llevar a cabo esta investigación, en donde conocí excelentes personas quienes siempre están dispuestas a ayudar.

## **VII Síntesis de N-glucopeptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica**

---

A mis amigos y colegas, que en la cotidianidad del día a día se convirtieron en la familia que se elige, mil gracias por cada risa y momento inolvidable.

Finalmente, a los profesores de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia y al programa de Maestría en Ciencias-Química por la formación académica que me brindó.

## Resumen

La terapia anti adhesiva es una aproximación ecológica para combatir las infecciones, que busca inhibir la adhesión del patógeno a los tejidos del hospedero, requisito primario para la infección. El mecanismo de acción de esta aproximación no implica la destrucción del patógeno, por lo que el patógeno no induce resistencia contra las moléculas que inhiben la adhesión. Se ha demostrado que monosacáridos derivados de glucosa, manosa y galactosa han inhibido la adhesión de bacterias a tejidos en ensayos in vivo e in vitro. Esta inhibición esta mediada por el bloqueo de la interacción receptor ligando entre las moléculas de la superficie de las células bacterianas y las células del hospedero. Desafortunadamente, los monosacáridos como fármacos tienen limitaciones ya que son eliminados rápidamente del cuerpo, por lo que se requieren grandes cantidades, lo que puede inducir efectos secundarios adversos. Para superar estas limitaciones se requiere diseñar glicoconjugados que mantengan o potencien la inhibición de la adhesión sin que afecten la viabilidad de las bacterias. Sin embargo, la obtención de N-glicoconjugados presenta dificultades sintéticas ya que se requieren varios pasos de reacción y es necesario en cada paso realizar procesos de purificación los cuales son dispendiosos, reducen significativamente los rendimientos, incrementan los costos y el tiempo de obtención, además son perjudiciales para el medio ambiente. En este trabajo se diseñaron y sintetizaron N-glicoconjugados que contienen glucosa y secuencias derivadas de la Lactoferricina Bovina (LfcinB). La metodología utilizada fue la Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS-Fmoc/tBu) y el método de construcción por bloques aminoácido-monosacárido. Los resultados evidencian que se optimizó la ruta sintética

## X Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

para la obtención del bloque aminoácido-monosacárido Fmoc-Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-OH, lográndose obtener con alta pureza y buenos rendimientos, sin necesidad de purificar los productos intermediarios. A partir de esto fue posible escalar la reacción para la obtención de 5g de producto Fmoc-Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-OH puro y caracterizado. Nuestros resultados permiten evidenciar que no se requiere purificar los productos intermediarios, haciendo la síntesis más rápida, eficiente, de menor costo y más amigable con el medio ambiente. El Fmoc-Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-OH fue incorporado a la secuencia peptídica por medio de la síntesis en química en fase sólida utilizando la estrategia Fmoc/tBu y el método por construcción de bloques. Los N-glicopéptidos obtenidos se caracterizaron por RP-HPLC y MS MALDI-TOF y se evaluó su actividad antibacteriana y antifúngica. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los N-glicopéptidos derivados de la LfcinB pueden ser considerados como candidatos para el diseño y desarrollo de agentes terapéuticos contra infecciones bacterianas desde una mirada ecológica.

**Palabras clave:** Conjugación química, N-glicopéptidos, SPPS/Fmoc-tBu, LfcinB, método de construcción por bloques.

## Abstract

The inhibition of the adhesion of the pathogen to the target cell is the basis of the ecological approach to fight infections. The mechanism of action does not involve the destruction of the pathogen, instead it seeks to inhibit the adhesion of the pathogen to host tissues, a primary requirement for infection. This approach does not induce resistance of the pathogen against molecules that inhibit adhesion to the target cell. It has been shown that monosaccharides derived from glucose, mannose and galactose have inhibited the adhesion of bacteria to tissues in in vivo and in vitro assays. This inhibition is mediated by blocking the receptor-ligand interaction between the surface molecules of the bacterial cells and the host cells. Monosaccharides as drugs have limitations because they are rapidly eliminated from the body, so large amounts are required, which can induce adverse side effects. To overcome these limitations, it is necessary to design glycoconjugates that maintain or potentiate the inhibition of adhesion without affecting the viability of the bacteria. However, obtaining N-glycoconjugates presents difficulties such as several reaction steps are required, and it is necessary in each step to carry out purification processes which are wasteful, significantly reduce yields, increase costs and time obtained, they are also harmful to the environment. In this work, N-glycoconjugates containing glucose and sequences derived from Bovine Lactoferricin (LfcinB) were designed and synthesized. The results show that the synthetic route was optimized to obtain the N-glycoconjugate Fmoc-Asn (Glc(Ac)<sub>4</sub>)-OH since it does not require to purify the intermediate products, making the

## XII Síntesis de N-glucopeptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

synthesis faster, more efficient, lower cost and more environmental friendly. Fmoc-Asn (Glc(Ac)<sub>4</sub>)-OH was incorporated into the peptide sequence by synthesis in solid phase using the Fmoc/tBu strategy and the block construction method. The obtained N-glycopeptides were characterized by RP-HPLC and MS MALDI-TOF and their antibacterial and antifungal activity was evaluated. The results obtained in this work suggest that N-glycopeptides derived from LfcinB can be considered as candidates for the design and development of therapeutic agents against bacterial infections from an ecological perspective.

**Keywords:** Chemical conjugation, N-glycopeptides, SPPS/Fmoc-tBu, LfcinB, block construction method

## Productos académicos

Durante el desarrollo de este trabajo de maestría se publicaron los siguientes artículos:

- (1) **Rodríguez, V.**; Román, J. T.; Fierro, R.; Rivera, Z. J.; García, J. E. “Hydrazine Hydrate: A New Reagent for Fmoc Group Removal in Solid Phase Peptide Synthesis” *Tetrahedron Lett.* **2019**, 60 (1).
- (2) **Rodríguez, V.**; Pineda, H.; Ardila, N.; Insuasty, D.; Cárdenas, K.; Román, J.; Urrea, M.; Ramírez, D.; Fierro, R.; Rivera, Z.; et al. “Efficient Fmoc Group Removal Using Diluted "4-Methylpiperidine: An Alternative for a Less-Polluting SPPS-Fmoc/TBu Protocol” *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2019**, 4-6.
- (3) Insuasty, D.; Pineda, H.; **Rodríguez, A. V.**; García, J.; Mauricio, M.; Fierro, R.; Rivera, Z. J. “Synthetic Peptide Purification via Solid-Phase Economical, Fast, and Efficient Methodology” *Molecules.* **2019**, 24, 1215.

Parte de los resultados derivados de este trabajo han sido presentados en los siguientes congresos:

- (1) Síntesis de N-glucopéptidos derivados de la LfcinB: Contribución al diseño y desarrollo de moléculas para combatir infecciones bacterianas. **Póster.** V Simposio de Tendencias actuales en la búsqueda y desarrollo de fármacos. CDMX, México. Junio, 2019.
- (2) Optimización de la ruta sintética para la síntesis de N-glicopéptidos: Contribución al diseño y desarrollo de moléculas para combatir infecciones

## **XIV Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica**

---

bacterianas por la aproximación ecológica. **Presentación oral.** II Congreso de Química del Caribe. Barranquilla, Colombia. Febrero, 2019.

- (3) Síntesis de N-Glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana. **Poster.** Congreso Colombiano Bioquímica y Biología Molecular C2B2. Bogotá, Colombia. Noviembre, 2018

# Contenido

	PÁG.
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XI</b>
<b>PRODUCTOS ACADÉMICOS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>XV</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>XX</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XXI</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>5</b>
SÍNTESIS QUÍMICA DE N-GLICOPÉPTIDOS POR EL MÉTODO DE CONSTRUCCIÓN DE BLOQUES .....	5
FORMACIÓN DEL ENLACE GLICOSÍDICO .....	5
<i>Efecto Anomérico</i> .....	7
FORMACIÓN DEL ENLACE AMIDA .....	8
SÍNTESIS QUÍMICA DE GLICOCONJUGADOS: BLOQUE AMINOÁCIDO-CARBOHIDRATO .....	9
1.1 <i>Acetilación de la Glucosa</i> .....	10
1.2 <i>Obtención de la glicosilamina</i> .....	11
1.3 <i>Formación del bloque protegido aminoácido-carbohidrato</i> .....	13
1.4 <i>Formación del bloque desprotegido aminoácido-carbohidrato (5)</i> .....	15
SÍNTESIS QUÍMICA DE N-GLUCOPÉPTIDOS SPPS- FMOC/OTBU .....	16
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>17</b>
<b>DISEÑO DE LAS MOLÉCULAS</b> .....	<b>19</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>21</b>

## XV. Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
<b>CAPÍTULO 1. OPTIMIZACIÓN DE LA RUTA SINTÉTICA DE N-GLUCOSILAMINOÁCIDO</b>	
<b>FMOC-ASN(GLC(AC)<sub>4</sub>)-(OH) (5).....</b>	<b>23</b>
1. METODOLOGÍA.....	23
1.1 Síntesis de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranososa (1).....	24
1.2 Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilazida (2).....	25
1.3 Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosilamina (3).....	25
1.4 Síntesis de Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu (4).....	26
1.5 Síntesis de Fmoc-Asn- $\beta$ (D-glucopiranosil)-OH (5).....	27
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	28
<b>CAPÍTULO 2. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS Y N-GLUCOPÉPTIDOS.....</b>	<b>33</b>
1. METODOLOGÍA.....	33
1.1 Obtención de péptidos y N-glicopéptidos .....	33
1.1.1 Síntesis en Fase Sólida (SPPS) por la estrategia Fmoc/tBu .....	33
1.1.1.1 Reacción de desprotección.....	35
1.1.1.2 Reacciones de Activación y acople.....	36
1.1.1.3 Monitoreo de las reacciones de acople y desprotección utilizando el test de Kaiser 36	
1.1.1.4 Desprotección de las cadenas laterales y desanclaje del péptido/N-glicopéptido de la resina.....	37
1.1.1.5 Desacetilación de los N-glicopéptidos .....	37
1.1.2 Purificación de Péptidos/N-glicopéptidos por extracción en fase sólida.....	38
1.1.3 Caracterización de Péptidos/N-glicopéptidos por cromatografía RP-HPLC.....	38
1.1.4 Análisis de Péptidos/N-glicopéptidos por espectrometría de masas.....	39
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	39
2.1 Síntesis química de péptidos .....	39
2.2 Síntesis química de N-glicopéptidos.....	43

---

<b>CAPÍTULO 3. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS PÉPTIDOS/N-GLUCOPÉPTIDOS.....</b>	<b>47</b>
1. METODOLOGÍA.....	47
1.1 Activación y mantenimiento de la cepa bacteriana ATCC .....	47
1.2 Curvas de calibración de las cepas bacterianas (UFC/mL vs ABS).....	47
1.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	49
1.4 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	50
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	51
2.1 Curvas de calibración.....	51
2.2 Actividad antibacteriana de los péptidos .....	51
<b>CAPÍTULO 4. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS PÉPTIDOS/N-GLUCOPÉPTIDOS .....</b>	<b>54</b>
1. METODOLOGÍA.....	54
1.1 Curvas de letalidad en <i>C. albicans</i> .....	54
1.2 Determinación de la Concentración Mínima inhibitoria (CMI).....	54
2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	55
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO A: MECANISMOS DE REACCIÓN INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SOLIDA EMPLEANDO LA ESTRATEGIA FMOC/TBU .....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXO B: MONITOREO DE REACCIONES PARA LA OBTENCIÓN DE FMOC-ASN-B(2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-D-GLUCOPIRANOSIL)-OTBU .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO C: CARACTERIZACIÓN RMN DE (4) Y (5) FMOC-ASN-B(2,3,4,6-TETRA-O-ACETIL-D-GLUCOPIRANOSIL)-OTBU/OH .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO D: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS .....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO E: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS N-GLUCOPÉPTIDOS DISEÑADOS .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO F: CURVAS DE CALIBRACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS.....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO G: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA DE PÉPTIDOS Y N-GLUCOPÉPTIDOS EVALUADOS.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO H: CURVAS DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA PARA <i>C. albicans</i> .....</b>	<b>113</b>

## XV. Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

### Lista de figuras

	PÁG.
FIGURA 1. MECANISMO DE FORMACIÓN DEL ENLACE GLICOSÍDICO. ....	6
FIGURA 2. MODELO ELECTROSTÁTICO Y ESTÉREO ELECTRÓNICO DEL EFECTO ANOMÉRICO.....	8
FIGURA 3. MÉTODOS PARA LA ACETILACIÓN DE LA D-GLUCOSA.....	10
FIGURA 4. MECANISMO DE ACETILACIÓN DE LA GLUCOSA <b>A</b> . EN MEDIO ÁCIDO <b>B</b> . EN MEDIO BÁSICO <sup>24</sup> . ....	11
FIGURA 5. OBTENCIÓN DE LA GLUCOSILAMINA (3) A PARTIR DEL DERIVADO DE AZIDA. ....	12
FIGURA 6. MECANISMO DE FORMACIÓN DE GLICOSILAZIDA <sup>25,26</sup> . ....	13
FIGURA 7. MECANISMO DE REDUCCIÓN CATALÍTICA CON H <sub>2</sub> EN Pd/C <sup>27</sup> . ....	13
FIGURA 8. ESTRATEGIA DE FORMACIÓN DEL BLOQUE AMINOÁCIDO-CARBOHIDRATO <sup>28</sup> . ....	14
FIGURA 9. DESPROTECCIÓN DEL GRUPO A CARBOXILO DE FMOC-ASN(GLC(Ac) <sub>4</sub> )-OTBU ( <b>4</b> ) PARA PRODUCIR FMOC-ASN(GLC(Ac) <sub>4</sub> )-OH ( <b>5</b> ).....	15
FIGURA 10. OBTENCIÓN DE FMOC-ASN(GLC(Ac) <sub>4</sub> )-OH ( <b>5</b> ) PARA SU USO EN SPPS EN LA SÍNTESIS DE N-GLUCOPÉPTIDOS. I (CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O, HClO <sub>4</sub> , 2 H, BAÑO DE HIELO. II AR, TMSN <sub>3</sub> , SnCl <sub>4</sub> , 18 H, TA. III Pd 5%, MeOH, H <sub>2</sub> , 2 H, TA. IV FMOC-Asp(OH)-OTBU, DCC, HOBT, 16 H, TA. V 95% TFA, 1 H, TA. 24	
FIGURA 11. ESQUEMA DE SÍNTESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL N-GLUCOPÉPTIDO N(GLC)-AHX-RRWQWR ( <b>9</b> ). ....	34
FIGURA 12. REPORTE DE SÍNTESIS N-AHX-RRWQWR ( <b>6</b> ) <b>A</b> . ESTRUCTURA Y MASA TEÓRICA <b>B</b> . COMPORTAMIENTO DE SÍNTESIS <b>C</b> . PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL PÉPTIDO PURO <b>D</b> . ESPECTRO DE MASAS MALDI-TOF.....	41
FIGURA 13. MONITOREO POR RP-HPLC DE LA PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO N-AHX-RRWQWR ( <b>6</b> ). ....	42

---

FIGURA 14. REPORTE DE SÍNTESIS N(Glc(Ac) <sub>4</sub> )-AHX-RRWQWR <b>A.</b> ESTRUCTURA Y MASA TEÓRICA, <b>B.</b> COMPORTAMIENTO DE SÍNTESIS, <b>C.</b> CROMATOGRAMA PRODUCTO PURO, <b>D.</b> ESPECTRO DE MASAS MALDI-TOF.....	45
FIGURA 15. REPORTE DE SÍNTESIS N(Glc)-AHX-RRWQWR (9) <b>A.</b> ESTRUCTURA Y MASA TEÓRICA <b>B.</b> CROMATOGRAMA PRODUCTO PURO <b>C.</b> ESPECTRO DE MASAS MALDI-TOF.....	46
FIGURA 16. DILUCIONES SERIADAS EN BASE 2: (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) DE CADA UNA DE LAS CEPAS DE ESTUDIO. ....	48
FIGURA 17. <b>DISTRIBUCIÓN DEL PLATO MULTIPOZOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CMI.</b> SE OBSERVAN LAS CONCENTRACIONES FINALES DEL PÉPTIDO/N-GLUCOPÉPTIDO (MG/ML). CONTROL NEGATIVO (C-), CONTROL POSITIVO (C+) CONTROL DE CRECIMIENTO (T), CONTROL TÉCNICA (CT).....	49
FIGURA 18. ESQUEMA ROTULACIÓN DE LA CAJA DE PETRI PARA ENSAYOS DE DETERMINACIÓN DE LA CMB. LOS VALORES INDICAN LAS CONCENTRACIONES EN µG/ML DEL PÉPTIDO UTILIZADO PARA EL SUB-CULTIVO. ....	50

## XX Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

### Lista de tablas

	PÁG.
TABLA 1. PÉPTIDOS Y N-GLUCOPÉPTIDOS OBTENIDOS .....	19
TABLA 2. PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA LFCINB SINTETIZADOS EN ESTE TRABAJO .....	40
TABLA 3. N-GLICOPÉPTIDOS ACETILADOS SINTETIZADOS.....	43
TABLA 4. N-GLICOPÉPTIDOS DESACETILADOS SINTETIZADOS.....	44
TABLA 5. COMPROBACIÓN DE LAS ECUACIONES OBTENIDAS EN LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	51
TABLA 6. VALORES DE MIC Y MBC (UG/ML) PARA LOS PÉPTIDOS DE LA FAMILIA LFCINB (20-25).....	52
TABLA 7. VALORES DE MIC Y MBC ( $\mu$ G/ML) PARA LOS PÉPTIDOS DE LA FAMILIA LFCINB(21-25) <sub>PAL</sub> .....	52
TABLA 8. VALORES DE EFECTO FUNGICIDA Y FUNGISTÁTICO (UG/ML) PARA LOS PÉPTIDOS DE LA FAMILIA LFCINB (20-25) .....	55
TABLA 9. VALORES DE EFECTO FUNGICIDA Y FUNGISTÁTICO ( $\mu$ G/ML) PARA LOS PÉPTIDOS DE LA FAMILIA LFCINB(21-25) <sub>PAL</sub> .....	56

---

## Lista de abreviaturas

---

Abreviatura	Término
Abs	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
Ahx	Ácido aminohexanóico
AMPs	Péptidos antimicrobianos
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
BHI	Agar Braun Heart Infusion
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMH	Caldo Muelle Hinton
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DCC	N,N'-Diciclohexilcarbodiimida
DCM	Diclorometano

## XX Síntesis de N-glucopeptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMF	N,N dimetil formaamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDT	Etanoditiol
Fmoc	9-Fluorenilmetiloxicarbonilo
Fmoc-AA	Fmoc-aminoácido
Glc	Glucosil
Glc(Ac) <sub>4</sub>	2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil
h	hora/s
HOBt	Hidroxibenzotriazol
IPA	2-Isopropanol
LF	Lactoferrina
Lfcin	Lactoferricina

LfcinB	Lactoferricina Bovina
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time-Of-Flight
min	minutos
mL	Mililitro
MS	Espectrometría de masas
OtBu	O-terc-butilo
PBS	Solución salina de buffers de fosfatos
RP-HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia- Fase Reversa
rpm	Revoluciones por minuto
SAMP	Síntesis y Aplicación de Moléculas Peptídicas
Ser	Serina
SPE	Extracción en fase sólida
SPPS	Síntesis de Péptidos en Fase Sólida
T3P	Anhídrido cíclico de ácido propilfosfónico
TA	Temperatura ambiente

## XX Síntesis de N-gluco péptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

TBTU	Tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il) uranio
TFA	Ácido Trifluoroacético
Thr	Treonina
TIPS	Trisisopropilsilano
TLC	Cromatografía en capa fina
TMSN <sub>3</sub>	Trimetilsililazida
UFC	Unidades formadoras de colonias
$\alpha$ -NH <sub>2</sub>	alfa-amino

---

# Introducción

El resurgimiento de las infecciones causadas por patógenos que han desarrollado resistencia contra los medicamentos ha creado una problemática a nivel nacional y mundial, generada por la dificultad de tratar estas infecciones. La búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento de las enfermedades ha llevado al diseño y desarrollo de medicamentos de nueva generación, en este contexto, el diseño, síntesis e identificación de moléculas antimicrobianas es indispensable para el desarrollo de nuevos medicamentos<sup>1</sup>.

El diseño de un medicamento requiere en una situación ideal, de elementos estructurales tanto del fármaco como de la célula objetivo. A partir de esto la glicobiología, en particular, ha reunido esfuerzos para emplear la química de los carbohidratos aplicada al diseño y desarrollo de fármacos<sup>2</sup>. La glicosilación de cadenas peptídicas influye en la absorción de los péptidos en el intestino delgado, disminuye la excreción y provee protección contra la degradación enzimática<sup>1</sup>. Los glicopéptidos antibióticos son una clase de agentes antimicrobianos con estructura macromolecular y mecanismos de acción que involucran la unión a los péptidoglicanos de la pared celular, interfiriendo con la formación de la misma<sup>3,4</sup>.

De esta manera se han diseñado fármacos antibacteriales y antifúngicos basados en N-glicopéptidos que han sido utilizados en quimioterapia y vacunas (Doxorrubicina, Daunorubicina, Epirubicina, Idarubicina, anfotericina B, Lincomicina, Vancomicina)<sup>2</sup>. Los sacáridos son moléculas ideales para ser usadas como agentes terapéuticos ya que no son tóxicos o inmunogénicos, debido a que son constituyentes de las superficies celulares y los fluidos corporales; especialmente en la leche materna. Además, son menos propensos a inducir resistencia en los patógenos. La importancia de los carbohidratos radica en que

## 2 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

estos proporcionan un mecanismo de orientación para las células blanco, lo que permite que los medicamentos lleguen al sitio de acción con precisión y actúen correctamente.

Se han desarrollado diferentes estrategias para combatir las infecciones causadas por bacterias, las cuales en su mayoría se basan en destruir la bacteria afectando su viabilidad celular, lo que conlleva a que los patógenos generen mecanismos de supervivencia. La aproximación ecológica consiste en inhibir la adhesión de los patógenos al tejido del hospedero, requisito indispensable para que suceda la infección. Esta aproximación busca el desarrollo de fármacos que no destruyan el patógeno pero que evite la adhesión del patógeno a la célula blanco y que éste pueda ser eliminado por los mecanismos de limpieza del hospedero. Los procesos de reconocimiento y adhesión (requisito para la infección) de microorganismos como *E. coli*, *H. pylori*, *S. typhimurium*, *N. gonorrhoeae*, virus de inmunodeficiencia humana, virus del ébola, virus de la hepatitis C, virus de la influenza, parvovirus, rotavirus, *C. albicans*, *P. falciparum*, *T. cruzi*, *E. histolytica*, *C. parvum*, entre otros, están mediados por carbohidratos presentes en las glicoproteínas de la superficie celular<sup>4-7</sup>. La adhesión del patógeno al tejido es una etapa relevante en el proceso de infección ya que le permite tener acceso a los nutrientes, liberar agentes tóxicos y penetrar el organismo, infectando el hospedero<sup>6</sup>. Ciertos carbohidratos en las superficies celulares son considerados como alternativas para el desarrollo de métodos preventivos y/o para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Se ha reportado que sacáridos de manosa y glucosa como metil  $\alpha$ -manosido y N-acetilglucosamina pueden inhibir la adhesión de *E. coli* a líneas celulares de vejiga de humano<sup>8</sup>. Por otro lado, ha sido demostrado que la adhesión de bacterias Gram-negativas como *Pasteurella multocida* puede ser inhibida por monosacáridos como N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, D-glucosa, D-manosa y D-galactosa<sup>9</sup>. Sin embargo, el uso de monosacáridos para inhibir la adhesión bacteriana tiene limitaciones, ya que son eliminadas rápidamente del cuerpo y se requieren altas concentraciones para alcanzar la actividad deseada lo que implica

efectos secundarios adversos. Una opción para superar estas limitaciones es diseñar glicoconjugados de bajo peso molecular que inhiban la adhesión del patógeno, que no sean susceptibles a las proteasas, que no induzcan una respuesta inmune del hospedero y que no sean eliminados fácilmente por el cuerpo. El primer requisito para que una molécula sea considerada candidata para el desarrollo de fármacos en la terapia ecológica, es que esta no afecte directamente la viabilidad del patógeno, su membrana o algún blanco intracelular.

La gran limitación de los glicoconjugados en el desarrollo de fármacos es su viabilidad sintética en cuanto a pureza y rendimientos. Se requieren diseñar y/u optimizar las rutas sintéticas para que los glicoconjugados puedan ser considerados viables económicamente en el desarrollo de un medicamento. En este trabajo se diseñaron y obtuvieron péptidos y N-gluco péptidos formados por D-glucosa unida a los extremos N y C-terminal de dos secuencias derivadas de la LfcinB: RRWQWR y RWQWRWQWR. Los N-gluco péptidos fueron obtenidos por síntesis en fase sólida utilizando la estrategia Fmoc/tBu y el método de construcción por bloques. La síntesis de los N-gluco péptidos requirió la obtención del N-glucoconjugado Fmoc-Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-(OH) (**5**) para luego incorporarlo a la cadena peptídica. Para esto se requirió obtener grandes cantidades de (**5**), lo que implicó optimizar la ruta sintética y escalar el proceso de síntesis. Además, se implementaron mejoras en las reacciones de desprotección utilizadas en la SPPS y en los procesos de purificación por cromatografía RP-SPE de los N-gluco péptidos.

Por otra parte, la aproximación ecológica requiere que los N-gluco péptidos: (a) no presenten efecto citotóxico sobre el patógeno, (b) sean de bajo peso molecular para que no induzcan una respuesta inmune del hospedero, (c) tengan un tiempo mayor de residencia y (d) no generen efectos secundarios adversos en el hospedero. En este contexto se seleccionaron dos secuencias cortas derivadas de la LfcinB: LfcinB (20-25) RRWQWR y LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub> RWQWRWQWR. El péptido LfcinB (20-25) ha presentado

## 4 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

baja actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas y Gram negativas mientras que el péptido palindrómico LfcinB (21-25)<sub>Pal</sub> ha presentado alta actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estas secuencias son consideradas menos susceptibles a las proteasas ya que derivan de la LfcinB la cual se produce durante la hidrólisis gástrica de la glicoproteína Lactoferrina Bovina. Además, es posible que estas moléculas sean menos propensas a inducir respuesta inmune del hospedero y generar reacciones secundarias adversas, ya que la Lactoferrina se encuentra en la leche de vaca que consumimos a diario. Por otra parte, la D-glucosa no es tóxica para los patógenos, no tiende a inducir una respuesta inmune del hospedero y tampoco genera reacciones secundarias adversas. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que Los N-glicopéptidos obtenidos no presentan actividad antibacteriana contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas evaluadas, lo que permite considerarlos promisorios para su uso en la terapia ecológica.

## Marco Teórico

### ***Síntesis química de N-glicopéptidos por el método de construcción por bloques***

La síntesis de glicopéptidos se puede realizar mediante SPPS por dos métodos principalmente: (a) el método convergente, en donde se sintetiza el péptido con la cadena lateral de un aminoácido protegida selectivamente que luego permite incorporar el azúcar y (b) el método de construcción por bloques en el cual se obtiene un bloque, formado por un azúcar y un aminoácido, que luego se incorpora a la cadena peptídica unida a la resina durante la SPPS. El método de construcción por bloques permite obtener glicopéptidos homogéneos, complejos, bien definidos y que pueden ser predeterminados<sup>10-12</sup>. El punto crítico de dicha estrategia es la obtención del bloque aminoácido-carbohidrato, ya que implica la formación de un enlace glicosídico entre el carbohidrato y el grupo carboxilo del aminoácido.

### ***Formación del enlace glicosídico***

La síntesis de oligosacáridos involucra la formación de enlaces glicosídicos que requieren la unión de un *glicosilo donor* y un *glicosilo aceptor*. El *glicosilo aceptor* es un azúcar con un grupo saliente en el centro anomérico, el cual es activado por un promotor para dar un glicosilo catión (ion oxocarbenio) que es susceptible al ataque de un *glicosilo donor*. La formación del *glicosilo aceptor* está dirigida a obtener reacciones estereo-selectivas y con altos rendimientos<sup>13</sup>. La estereoquímica del carbono anomérico conduce a la formación de dos tipos de glicósidos: el anómero  $\alpha$  (1,2-cis) y/o el anómero  $\beta$  (1,2-trans). La síntesis

## 6 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

química de glicósidos ha llevado al desarrollo de diferentes estrategias de síntesis, dentro de las cuales mencionamos las más utilizadas: (i) estrategias basadas en la formación de haluros de glicosilo y su posterior activación *in situ*; (ii) sales de metales pesados como activadores; (iii) el método de tioglicósidos, el cual es uno de los más utilizados por ser confiable y versátil<sup>13</sup>.

En forma general, el mecanismo de la formación del enlace glicosídico comúnmente aceptado se puede observar en la Figura 1. La reacción de glicosilación implica el desplazamiento nucleofílico del sustituyente en el centro anomérico que a menudo sigue el mecanismo unimolecular SN1. El grupo sustituyente se convierte en un buen grupo saliente y da como resultado la formación del catión glicosilo. El catión se estabiliza intramolecularmente por resonancia y el carbono anomérico es hibridizado a sp<sup>2</sup>, por lo tanto, el ataque nucleofílico se podría dar con igual probabilidad desde la cara superior (trans, β-) o desde la cara inferior (cis, α-) del anillo. Factores como temperatura, grupos protectores, conformación y efecto anomérico van a determinar el anómero mayoritario en el producto de reacción<sup>14</sup>.

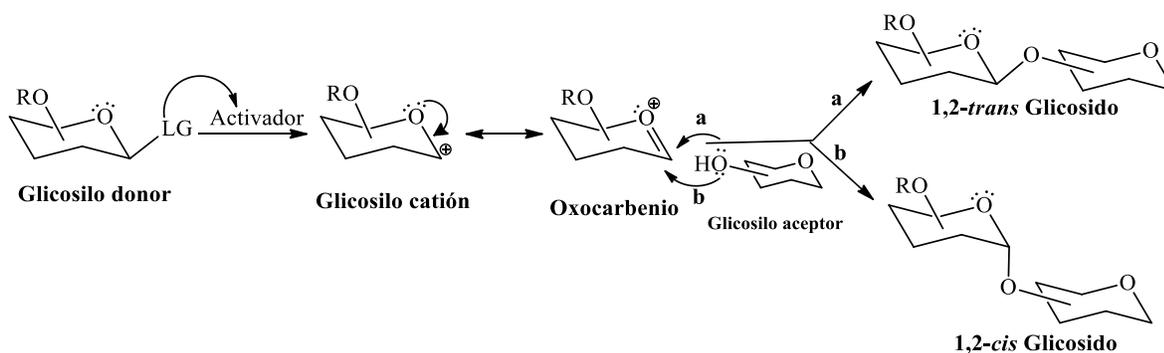


Figura 1. Mecanismo de formación del enlace glicosídico.

## **Efecto Anomérico**

El efecto anomérico se refiere a la tendencia de un sustituyente electronegativo en el C-1 de un anillo de piranosa a asumir predominantemente la orientación axial. La orientación axial del sustituyente anomérico aumenta a medida que aumenta el carácter electronegativo del sustituyente ( $F > BzO > AcO_2 > CH_3O > H$ ). Los sustituyentes en las otras posiciones del anillo también inciden en el efecto anomérico; la configuración del sustituyente en C-2 afecta el equilibrio entre los anómeros y la electronegatividad del sustituyente en la posición 6 favorece la formación del anómero  $\alpha$ <sup>11,13,15</sup>.

Diferentes modelos han sido propuestos para explicar el efecto anomérico, el análisis de las interacciones dipolo-dipolo indican que la configuración más estable es aquella que tenga un menor momento dipolar. El modelo electrostático sugiere que la estabilidad de la configuración axial del sustituyente en el C-1 del anillo de piranosa, se debe a la disposición de los dipolos generados por el par de electrones libres del oxígeno endocíclico y el enlace del sustituyente en el C-1. La configuración axial de un sustituyente electronegativo en la posición anomérica (**A**) se ve favorecida porque presenta menor repulsión dipolo-dipolo que la configuración ecuatorial (**B**), en donde la repulsión dipolo-dipolo es mayor (*Figura 2. Modelo electrostático y estereo electrónico del efecto anomérico.*)<sup>13</sup>.

El modelo estereo-electrónico sugiere que la estabilidad de la configuración axial es atribuida a la interacción entre el orbital del par de electrones libres del oxígeno y el orbital no enlazante del enlace entre el C-1 y el sustituyente. La forma axial es energéticamente favorecida por la interacción de los dos electrones ( $n \rightarrow \sigma^*$ ) del orbital de alta energía ocupado y el orbital de baja energía desocupado. En otras palabras, la configuración axial (**C**) es favorecida de la ecuatorial (**D**), por la interacción entre el par de electrones libres del oxígeno con el orbital anti-enlazante del enlace anomérico en

## 8 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

configuración axial (Figura 2. Modelo electrostático y estereo electrónico del efecto anomérico.)<sup>11,13,16</sup>.

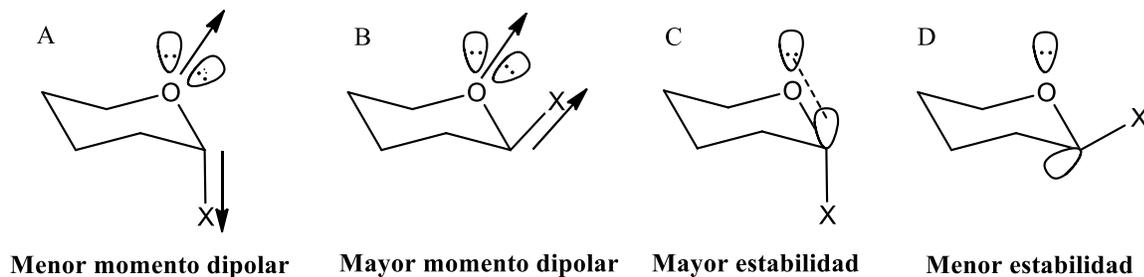


Figura 2. Modelo electrostático y estereo electrónico del efecto anomérico.

### **Formación del enlace amida**

Los enlaces amida juegan un rol importante en la elaboración y composición de sistemas biológicos; ejemplos son el enlace peptídico que permite la unión de aminoácidos para formar la estructura primaria de las proteínas. En glicoproteínas, la N-glicosilación es una modificación postraduccional que involucra un enlace amida. Dichos enlaces también están presentes en una gran variedad de moléculas, incluyendo medicamentos<sup>17</sup>. La formación del enlace amida en la N-glicosilación de las proteínas esta mediado por enzimas y se ha establecido que el carbohidrato se une a las cadenas laterales de la Asparagina (Asn) cuando se encuentra incluida en el motivo Asn-X-Ser/Thr donde X puede ser cualquier aminoácido excepto Pro<sup>18,19</sup>.

El enlace amida se forma a partir de la unión de un ácido carboxílico y una amina, con la formación de una molécula de agua. En la naturaleza, la formación de los enlaces amida está mediada por enzimas, mientras que en las reacciones químicas en condiciones no naturales la unión de estos dos grupos funcionales no se produce espontáneamente a

temperatura ambiente, por esta razón se requiere la formación de un electrófilo más reactivo transformando el grupo hidroxilo del ácido carboxílico en otro grupo que sea un buen grupo saliente. Las estrategias comúnmente utilizadas involucran la formación de cloruros de ácido, anhídridos o ésteres, los cuales son más reactivos y promueven la formación del enlace amida. El mecanismo que se propone para estas reacciones es la sustitución nucleofílica acílica (**Anexo A**). El punto predominante en la formación del enlace amida, es la elección del compuesto acílico, ya que se debe tener en cuenta los subproductos de reacción al momento de la formación de la amida<sup>17</sup>.

### ***Síntesis química de glicoconjugados: bloque aminoácido-carbohidrato***

Los glicoconjugados son moléculas conformadas por carbohidratos unidos covalentemente a lípidos o proteínas, por esta razón son consideradas las más diversas en la naturaleza, tanto en estructura como en funcionalidad y han sido considerados como candidatos para el desarrollo de agentes terapéuticos<sup>4</sup>. A nivel sintético los N-glicosilaminoácidos son la base de la síntesis química de N-glicopéptidos en fase sólida (SPPS) utilizando el método de construcción por bloques. Para eso se requiere modificar la cadena lateral del Fmoc-Asp(OH)-OtBu con una glicosil amina (**3**) para formar un enlace amida, luego la desprotección del grupo carboxilo del aminoácido conduce a la obtención del bloque Fmoc-Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-OH (**5**), el cual puede ser incorporado a la cadena peptídica utilizando la SPPS convencional.

La síntesis química de estos bloques es compleja ya que se requieren: (i) esquemas de protección ortogonales para el aminoácido y para el carbohidrato, (ii) reacciones bajo condiciones anhidras y atmósferas inertes, (iii) procesos de purificación dispendiosos que conllevan a bajos rendimientos y (iv) métodos de caracterización complejos debido a las propiedades intrínsecas de los carbohidratos. Los N-glicosilaminoácidos (conformados por un monosacárido y un aminoácido) se pueden obtener por diferentes

## 10 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

métodos, sin embargo, la mayoría involucran el uso de reactivos perjudiciales para la salud y el medio ambiente. La manipulación de estos reactivos es difícil y requiere condiciones de trabajo rigurosas (ejemplo: Metales pesados, HF/piridina, derivados de fosfano<sup>20</sup>). Por eso, es importante implementar métodos de obtención de glicoconjugados más amigables y que estén en concordancia con los principios de la química verde.

### 1.1 Acetilación de la Glucosa

El pentaacetato de glucosa puede prepararse por acetilación de glucosa con anhídrido acético ((CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O) por varias rutas sintéticas. **A.** En presencia de un catalizador ácido como ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) en baño de hielo, el producto mayoritario es el anómero alfa. **B.** En presencia de un catalizador básico como piridina o acetato de sodio, en donde predomina el anómero beta. Las condiciones de reacción se muestran en la Figura 3<sup>21-23</sup>.

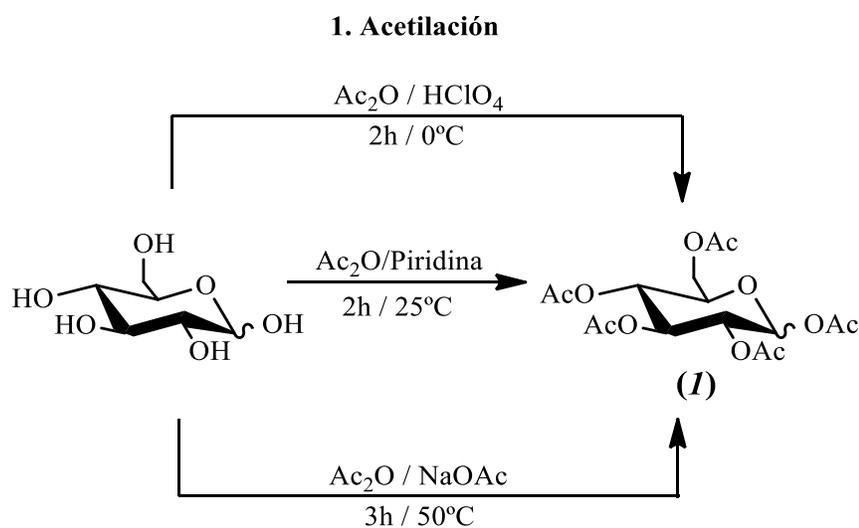
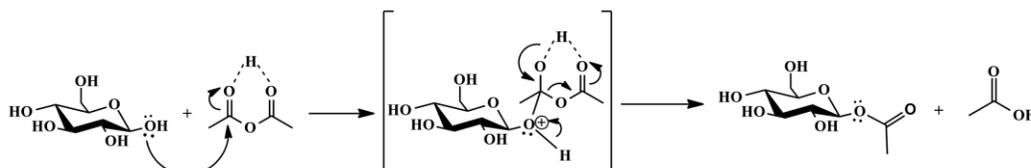


Figura 3. Métodos para la acetilación de la D-glucosa.

La acetilación de la glucosa es una reacción de sustitución nucleofílica sobre un grupo carbonilo del anhídrido acético, siendo los grupos hidroxilo de la glucosa los nucleófilos. El mecanismo de acetilación en medio ácido (Figura 4 A) consiste en la protonación del anhídrido acético activando el electrófilo, seguido del ataque del grupo hidroxilo del monosacárido al carbono carbonílico del anhídrido acético, lo que implica la formación de un intermediario tetraédrico. Posteriormente se reestablece el doble enlace carbono-oxígeno, se elimina ácido acético como grupo saliente y se obtiene el éster, producto de la reacción. La reacción también puede llevarse a cabo en medio básico (Figura 4 B), en este caso la base activa el nucleófilo por sustracción del protón del grupo hidroxilo, quien ataca al carbono carbonílico del anhídrido acético para formar un intermediario tetraédrico. Posteriormente se reestablece el doble enlace carbono-oxígeno y se elimina el anión acetato que es un buen grupo saliente, generando el éster como producto de reacción.

#### A. Medio ácido



#### B. Medio básico

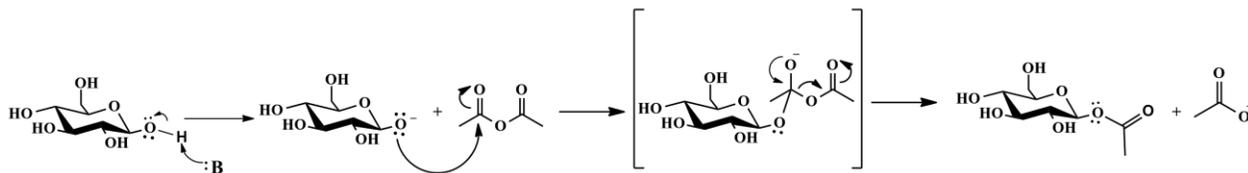


Figura 4. Mecanismo de acetilación de la glucosa **A.** En medio ácido **B.** En medio básico<sup>24</sup>.

## 1.2 Obtención de la glicosilamina

Las glicosilaminas N-sustituidas juegan un rol importante como intermediarios en la síntesis de N-glicosilaminoácidos (bloque aminoácido-monosacárido) y así mismo se encuentra en la literatura múltiples métodos de obtención. Se ha reportado que los

## 12 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

monosacáridos con sustituyentes lábiles pueden ser metilados usando diazometano en presencia de trifloruro de boro<sup>20</sup>. A partir de eso, en 2006 se reportó modificaciones a esta síntesis para obtener glicosilaminas<sup>11</sup>. Los grupos hidroxilo del monosacárido deben ser protegidos ortogonalmente para que la reacción sea regioespecífica y se dé en el carbono anomérico del monosacárido. A pesar de que hay una gran variedad de esquemas de protección, la acetilación permite selectivamente realizar cambios de sustituyente en el carbono anomérico. A partir del monosacárido acetilado, la glicosilamina se puede obtener por dos métodos: **A**. Por tratamiento con bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) en medio acuoso y en DMSO<sup>11</sup>. Esta reacción no requiere condiciones de reacción extremas por lo que es más sencilla de realizar; presenta como desventaja que los rendimientos son bajos y la obtención del producto puro es más dispendiosa. **B**. El monosacárido acetilado es tratado con Trimetilsililazida ( $\text{TMSN}_3$ ) y tetracloruro de estaño ( $\text{SnCl}_4$ ) obteniendo el 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D glucopiranosilazida (2) de manera cuantitativa<sup>11,25</sup>. La glicosilamina (3) se obtiene de forma cuantitativa a partir del derivado de azida (2), por tratamiento catalítico con Pd 5% en carbón activado y atmosfera de  $\text{H}_2$  (Figura 5

Figura 5. Obtención de la glicosilamina (3) a partir del derivado de azida.

)<sup>12</sup>.

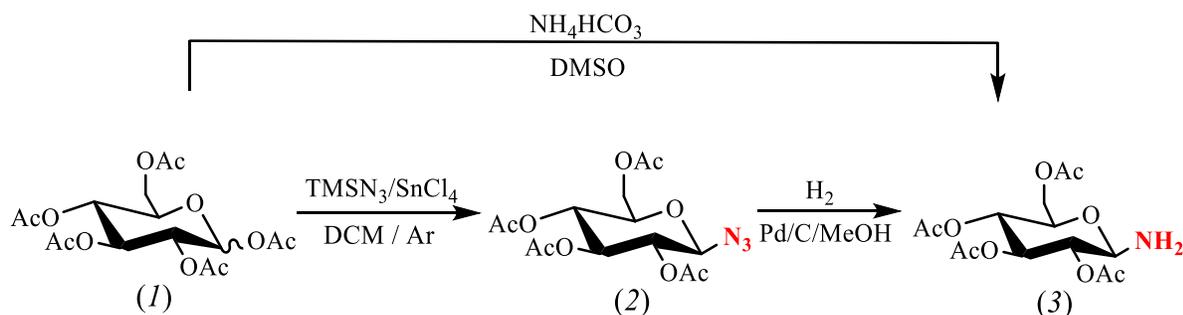


Figura 5. Obtención de la glicosilamina (3) a partir del derivado de azida.

La formación de la glucosilazida (2) involucra un ácido de Lewis ( $\text{SnCl}_4$ ) que reacciona con el oxígeno unido al carbono anomérico formando el ion oxonio, el cual es estabilizado por el grupo aceto del carbono 2 dando lugar al ion 1,2-acetoxonio. Esta conformación restringe el ataque nucleofílico de la  $\text{TMSN}_3$  dando lugar únicamente al producto  $\beta$  de la glucosilazida (2) y como subproducto el clorotrimetilsilano. El mecanismo se muestra en la Figura 6.

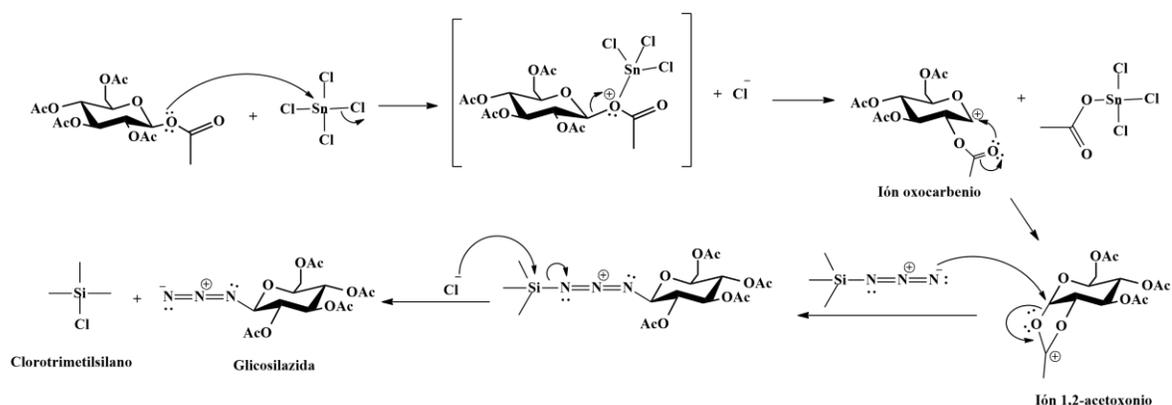


Figura 6. Mecanismo de formación de glicosilazida<sup>25,26</sup>.

Para obtener la glucosilamina (3) se realiza la reducción catalítica de (2) con  $\text{H}_2$  en  $\text{Pd/C}$ . El mecanismo propuesto para esta reacción se puede ver en la Figura 7.

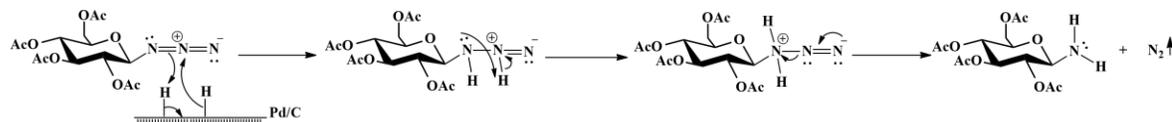


Figura 7. Mecanismo de reducción catalítica con  $\text{H}_2$  en  $\text{Pd/C}$ <sup>27</sup>.

### 1.3 Formación del bloque protegido aminoácido-carbohidrato.

El aminoácido Fmoc-Asp(OH)-OtBu, es acoplado a la glucosilamina (3) mediante la formación de un enlace amida entre el grupo amino de (3) y el grupo carboxilo del Fmoc-aminoácido. La formación del enlace amida puede realizarse por diferentes metodologías

## 14 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

las cuales involucran diisopropilcarbodiimida (DIC), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il) uronio (TBTU) y anhídrido cíclico de ácido propilfosfónico (T3P) (Figura 8)<sup>28,29</sup>.

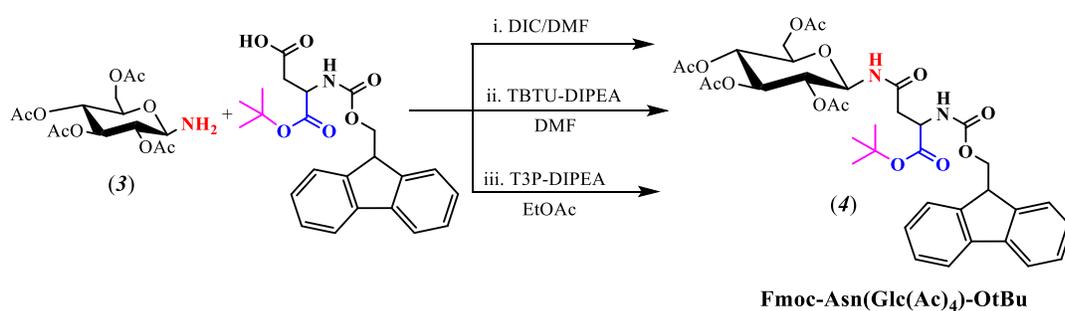


Figura 8. Estrategia de formación del bloque aminoácido-carbohidrato<sup>28</sup>.

Las reacciones con carbodiimidas presentan bajos rendimientos debido a que las reacciones colaterales consumen la mitad del aminoácido (formación de N-acilurea), además la formación del éster puede inducir la racemización del aminoácido<sup>30,31</sup>. Las sales de uronio tienen la ventaja de que no producen racemización del aminoácido, sin embargo, se obtienen subproductos que hacen más dispendiosa la purificación lo que implica bajos rendimientos<sup>10</sup>.

El T3P es un agente acoplante que no requiere de aditivos peligrosos y es considerado como un reactivo no tóxico, ni alergénico. Sus sales son solubles en agua y no son peligrosas, por lo que estas reacciones son consideradas parte de la química verde<sup>32</sup>. El subproducto formado es el ácido propanofosfónico que es fácilmente removido con lavados acuosos<sup>33</sup>, por lo cual, la purificación de (4) es más fácil y los rendimientos son significativamente más altos.



## 16 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

### ***Síntesis química de N-glicopéptidos SPPS- Fmoc/OtBu***

La estrategia SPPS-Fmoc/tBu consiste en la síntesis en fase sólida donde el grupo Fmoc actúa como grupo protector temporal del alfa-amino y los grupos que protegen las cadenas laterales son estables a las condiciones de remoción del grupo Fmoc. Los aminoácidos empleados en la SPPS/Fmoc-tBu presentan una protección ortogonal; el grupo funcional alfa-amino ( $\alpha\text{-NH}_2$ ) está protegido con el grupo Fmoc y las cadenas laterales de los AA presentan grupos protectores lábiles al tratamiento con ácido trifluoroacético, por ejemplo, los grupos tritil o terbutil. La remoción del grupo Fmoc se realiza por tratamiento con una base débil, mediado por una reacción de  $\beta$ -eliminación (Mecanismo en **Anexo A**). Los Fmoc-aminoácidos incluyendo (5) son acoplados a la resina o resina-péptido mediante reacciones de acople utilizando diferentes estrategias como carbodiimidas o sales de uronio. Luego que se han incorporado todos los Fmoc aminoácidos se procede a la desprotección de las cadenas laterales y el desanclaje del péptido de la resina. Los N-glicopéptidos serán obtenidos por SPPS-Fmoc/OtBu y la estrategia de construcción por bloques.

## Planteamiento del problema

Durante las últimas décadas se han venido realizando esfuerzos para el diseño, desarrollo y obtención de agentes terapéuticos de última generación contra infecciones causadas por patógenos resistentes. La síntesis química de péptidos es considerada como una alternativa viable y novedosa para el diseño y obtención de agentes terapéuticos contra infecciones bacterianas<sup>36</sup>. Los péptidos sintéticos presentan ventajas como, inocuidad, certeza de la composición de aminoácidos y versatilidad en la administración, posibilitando mayor cobertura. La obtención de péptidos por medio de la síntesis química en fase sólida (SPPS) es rápida, presenta altos rendimientos, se obtienen moléculas de alta pureza y es económicamente viable<sup>37</sup>. Una de las principales fuentes naturales para el diseño y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos son los péptidos antimicrobianos (AMPs). Los AMPs hacen parte del sistema inmune innato de los organismos y presentan mecanismos de acción que generan menos resistencia que los fármacos convencionales, no producen reacciones adversas y son más resistentes a las proteasas del hospedero<sup>36-38</sup>.

Por otra parte, los carbohidratos forman un grupo complejo de biomoléculas con diversas funciones biológicas, siendo las fuentes primarias de energía de los sistemas biológicos y los principales componentes estructurales de las plantas<sup>39</sup>. La posibilidad de formar gran variedad de estructuras con tan sólo un pequeño número de unidades hace posible generar moléculas con conformaciones particulares que se relacionan con actividades biológicas<sup>39</sup>.

## 18 Síntesis de N-glucopeptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

Los carbohidratos están relacionados con procesos biológicos críticos, como la adhesión a células epiteliales-leucocitarias, infecciones bacterianas y virales y el reconocimiento inmunológico de células tumorales y tejidos extraños. Lo anterior ha motivado el aislamiento, estudio estructural, diseño y síntesis de glicoconjugados como herramientas para el estudio fundamental de la glicobiología y han sido considerados como candidatos para el desarrollo de las futuras generaciones de agentes terapéuticos<sup>4</sup>.

A partir de esto se plantea la siguiente pregunta de investigación

¿Cómo influye en la actividad antibacteriana y antifúngica la incorporación a la cadena peptídica del glicoconjugado Asn(Glc)-OH?

## Diseño de las moléculas

Se diseñaron 6 N-glicopéptidos derivados de la LfcinB escogiendo las secuencias LfcinB (20-25) y (LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub>)<sup>40-42</sup>. Los N-glicopéptidos diseñados contienen el motivo derivado de LfcinB y un residuo de ácido aminohexanóico (Ahx) utilizado como espaciador para facilitar la incorporación de (5) en la cadena peptídica. En el diseño se incluyó la incorporación de (5) en el extremo N-terminal, en el C-terminal y en ambos extremos para determinar la influencia de la posición sacárida en la secuencia en la actividad antimicrobiana. También se obtuvieron 6 péptidos plantilla que no contienen el monosacárido para evaluarlos como control. Las moléculas de este trabajo se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Péptidos y N-glicopéptidos obtenidos

Familia	No	Nombre	Péptido
		<b>LfcinB(20-25)</b>	<b>RRWQWR</b>
	6	[Asn-Ahx] <sup>7</sup> -LfcinB (20-25)	N-Ahx-RRWQWR
	7	[Ahx-Asn] <sup>1</sup> -LfcinB (20-25)	RRWQWR-Ahx-N
LfcinB(20-25)	8	[Asn-Ahx] <sup>7</sup> , [Ahx-Asn] <sup>1</sup> -LfcinB (20-25)	N-Ahx-RRWQWR-Ahx-N
	9	[Asn(Glc)-Ahx] <sup>7</sup> -LfcinB (20-25)	N(Glc)-Ahx-RRWQWR
	10	[Ahx-Asn(Glc)] <sup>1</sup> -LfcinB (20-25)	RRWQWR-Ahx-N(Glc)
	11	[Asn(Glc)-Ahx] <sup>7</sup> , [Ahx-Asn(Glc)] <sup>1</sup> -LfcinB (20-25)	N(Glc)-Ahx-RRWQWR-Ahx-N(Glc)
		<b>LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub></b>	<b>RWQWRWQWR</b>
	12	[Asn-Ahx] <sup>7</sup> -LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	N-Ahx-RWQWRWQWR
	13	[Ahx-Asn] <sup>1</sup> -LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	RWQWRWQWR-Ahx-N
LfcinB(21-25) <sub>Pal</sub>	14	[Asn-Ahx] <sup>7</sup> , [Ahx-Asn] <sup>1</sup> -LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	N-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N
	15	[Asn(Glc)-Ahx] <sup>7</sup> -LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR
	16	[Ahx-Asn(Glc)] <sup>1</sup> -LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc)
	17	[Asn(Glc)-Ahx] <sup>7</sup> , [Ahx-Asn(Glc)] <sup>1</sup> -LfcinB (21-25) <sub>Pal</sub>	N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc)



## **Hipótesis**

La incorporación del residuo Asn(Glc)-OH a péptidos derivados de LfcinB permite obtener N-glicopéptidos inocuos para bacterias Gram positivas y Gram negativas.

## 22 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

### Objetivos

#### 1.1 Objetivo General

Obtener N-glicopéptidos derivados de LfcinB y evaluar su actividad antibacteriana y antifúngica.

#### 1.2 Objetivos específicos

1. Obtener los péptidos: N-Ahx-RRWQWR, RRWQWR-Ahx-N, N-Ahx-RRWQWR-Ahx-N, N-Ahx-RWQWRWQWR, RWQWRWQWR-Ahx-N, N-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N, RRWQWR, RWQWRWQWR.
2. Obtener los N-glicopéptidos: N(Glc)-Ahx-RRWQWR, RRWQWR-Ahx-N(Glc), N(Glc)-Ahx-RRWQWR-Ahx-N(Glc), N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR, RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc), N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc).
3. Evaluar la actividad antibacteriana de los péptidos y N-glicopéptidos obtenidos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.
4. Evaluar la actividad antifúngica de los péptidos y N-glicopéptidos obtenidos frente a *Candida albicans* ATCC SC 5314.

# Capítulo 1. Optimización de la ruta sintética de N-glucosilaminoácido Fmoc-Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-(OH) (5)

## 1. Metodología

La metodología para la obtención de (5) fue implementada en nuestro laboratorio en un anterior trabajo basado en reportes previos, sin embargo, esta metodología no permitía obtener las cantidades requeridas de (5) para realizar ensayos de actividad antibacteriana y antifúngica ni sintetizar N-glicopéptidos. Lo anterior debido a que se requiere que cada intermediario sea purificado por cromatografía en columna, proceso dispendioso que afecta significativamente los rendimientos. Estos procesos de purificación requieren significativas cantidades de solventes, incrementando los costos y causando perjuicio al medio ambiente y la salud. En este trabajo se escaló la ruta sintética para la obtención de N-glicosilaminoácidos de alta pureza y en cantidades apreciables (5 g) asegurando que las reacciones procedieran con buenos rendimientos, generando reacciones más limpias y sin necesidad de purificar por columna los compuestos intermediarios.

A continuación se presentan los pasos que involucran la ruta sintética para la obtención del bloque Fmoc-Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-OH (5) (Figura 10): (i) Síntesis y caracterización de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranososa (1) (ii) Síntesis y caracterización de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilazida (2) (iii) Síntesis y caracterización de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilamina (3) (iv) Síntesis y caracterización de Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-acetil-D-glucopiranosil)-OtBu (4) (v) Síntesis y caracterización del Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OH (5).

## 24 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

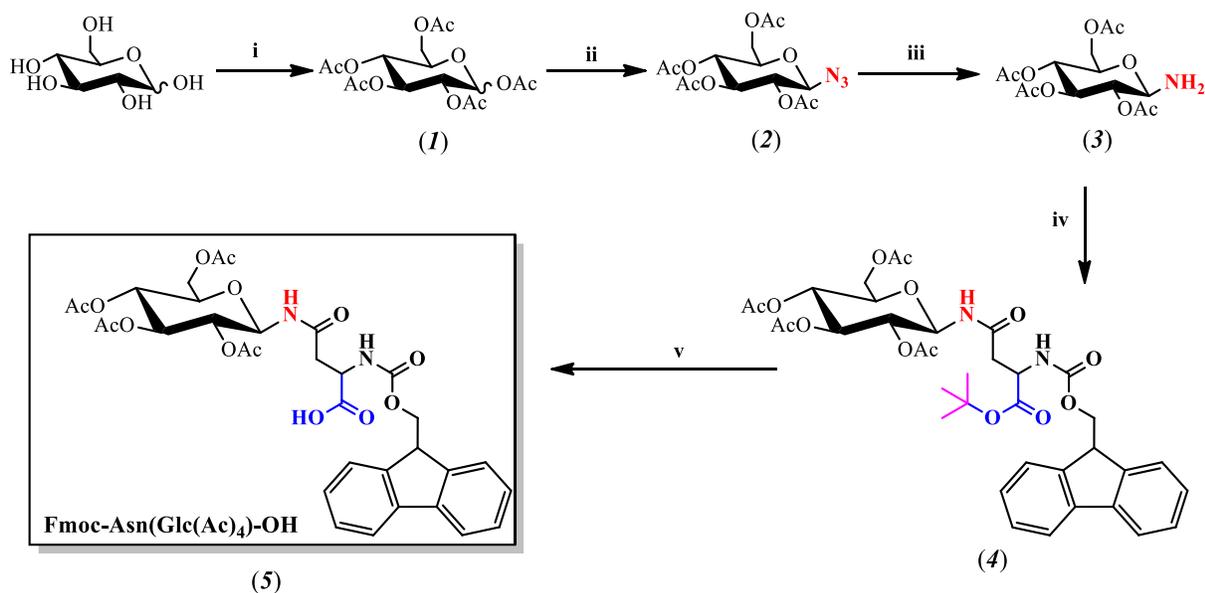


Figura 10. Obtención de Fmoc-Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-OH (5) para su uso en SPPS en la síntesis de N-glicopéptidos. i (CH<sub>3</sub>CO)<sub>2</sub>O, HClO<sub>4</sub>, 2 h, baño de hielo. ii Ar, TMSN<sub>3</sub>, SnCl<sub>4</sub>, 18 h, TA. iii Pd 5%, MeOH, H<sub>2</sub>, 2 h, TA. iv Fmoc-Asp(OH)-OtBu, DCC, HOBT, 16 h, TA. v 95% TFA, 1 h, TA.

### 1.1 Síntesis de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranososa (1)

15 mL (0.2 moles) de anhídrido acético se colocaron en baño de hielo y se adicionaron 20 mg de glucosa y 5 gotas de HClO<sub>4</sub> hasta coloración amarilla. Luego se adicionó lentamente D-glucosa (hasta completar 2,0 g, 0.01 mol), evitando que la temperatura fuera superior a 20°C. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante (AC) por 2 h a temperatura ambiente (TA). La reacción se monitoreó por TLC utilizando como fase móvil acetato de etilo: ciclohexano (1:1 v/v), la reacción se consideró finalizada cuando el reactivo de partida desapareció. Luego la mezcla fue tratada con 25 mL de DCM y se realizaron lavados con agua (3 x 25 mL), solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) (3 x 25 mL) y nuevamente con agua (3 x 25 mL). El extracto orgánico se secó con sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>) y se rotaevaporó a presión reducida hasta

sequedad. El compuesto se obtuvo como un sólido blanco, 4,3 g (rendimiento cuantitativo). **FT-IR** (Pastilla de KBr, cm<sup>-1</sup>): Estiramiento asimétrico -CH<sub>3</sub> 2999; Estiramiento simétrico y asimétrico de -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>; 2966 y 2925; Estiramiento del grupo carbonilo (C=O) 1742; banda característica de acetatos (CH<sub>3</sub>(C=O)-O) 1238. (Ver espectro IR en **Anexo B**).

### **1.2 Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosilazida (2)**

El compuesto (1) (4.3 g - 0,01 mol) se disolvió en 5 mL de DCM anhidro en atmosfera de Argón (Ar). Se adicionaron 1.3 mL (0.01 mol) de SnCl<sub>4</sub> disueltos en 5 mL de DCM anhidro y después de 5 min se adicionaron 1.5 mL (0.01 mol) de TMSN<sub>3</sub>. La mezcla de reacción se dejó a TA y AC durante toda la noche, la reacción se monitoreó por TLC utilizando como fase móvil acetato de etilo: ciclohexano 1:1 (v/v) y se consideró terminada cuando el reactivo de partida desapareció. Posteriormente se adicionaron 25 mL de DCM y la fase orgánica se lavó con agua (3x25 mL), solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (3x25 mL) y agua (2x25 mL), se secó con MgSO<sub>4</sub> anhidro y el solvente fue removido al vacío. El compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (rendimiento 78%). **FT-IR** (Pastilla de KBr, cm<sup>-1</sup>): Estiramiento asimétrico -CH<sub>3</sub> 2999; estiramiento simétrico y asimétrico de -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub> 2966 y 2925; estiramiento simétrico de -N<sub>3</sub> 2119; estiramiento del grupo carbonilo (C=O) 1742; banda característica de acetatos (CH<sub>3</sub>(C=O)-O) 1237. (Ver espectro IR **Anexo B**).

### **1.3 Síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosilamina (3)**

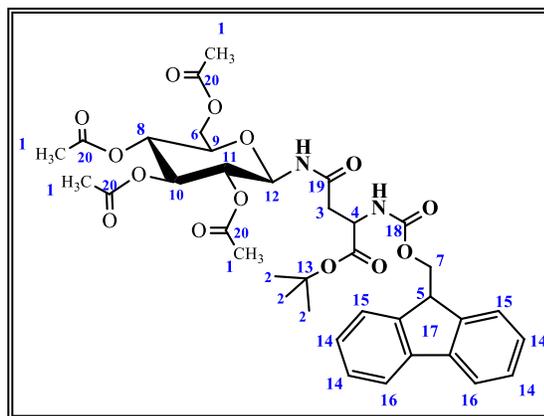
El compuesto (2) se mezcló con Pd 5% en carbón activado (0.05 g), en un balón de reacción seco y atmósfera de Argón. Se adicionaron 30 mL de MeOH absoluto y se burbujeó hidrógeno, la mezcla de reacción se dejó en AC a TA por 2 h y se monitoreó por

## 26 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

TLC (Acetato de etilo:Ciclohexano 1:1) revelado con ninhidrina, se consideró terminada cuando el reactivo de partida desapareció, la solución se filtró sobre papel y se removió el solvente al vacío. El compuesto se obtuvo como un sólido amarillo (rendimiento 97%). **FT-IR** (Pastilla de KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): Estiramiento  $\text{-NH}_2$  de aminas primarias 3465; estiramiento asimétrico  $\text{-CH}_3$  2999; estiramiento simétrico y asimétrico de  $\text{-CH}_3$  y  $\text{-CH}_2$  2966 y 2925; estiramiento del grupo carbonilo ( $\text{C=O}$ ) 1743; banda característica de acetatos ( $\text{CH}_3(\text{C=O})\text{-O}$ ) 1237. (Ver espectro IR en **Anexo B**).

### 1.4 Síntesis de Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu (4)

Para realizar el acople entre (3) y Fmoc-Asp(OH)-O-tBu para formar (4) se realizó la siguiente metodología: 6.9 g (0.02 mol) de Fmoc-Asp(OH)-tBu se mezcló con 3.5 g (0.02 mol) de DCC (diciclohexilcarbodiimida) y 2.9 g (0.02 mol) HOBT (Hidroxibenzotriazol) disuelto en gotas de DMF. La mezcla se dejó en reacción por 15 min. Luego se adicionó (3)



2.1 g (0.01 mol) disuelto en DCM seco. Después de 16 h y se monitoreó la reacción mediante TLC (Acetato de etilo:Ciclohexano 1:1) revelado con ninhidrina. El producto de reacción se precipitó y se lavó 5 veces con éter etílico y se evaporó hasta sequedad. Se obtuvo un sólido blanco (rendimiento 98%). **FT-IR** (Pastilla de KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): Estiramiento  $\text{-NH}$  3308; estiramiento asimétrico  $\text{-C-H}$  3062, estiramiento asimétrico  $\text{-CH}_3$  2999; estiramiento simétrico y asimétrico de  $\text{-CH}_3$  y  $\text{-CH}_2$  2966 y 2925; estiramiento del grupo

## Capítulo 1. Optimización de la ruta sintética de N-glucosilaminoácido Fmoc-27

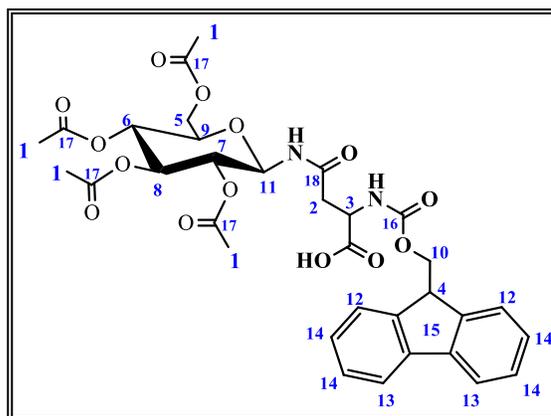
### Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-(OH) (5)

---

carbonilo (C=O) 1752 y 1675; banda característica de acetatos (CH<sub>3</sub>(C=O)-O) 1237. (Ver espectro IR en **Anexo B**). **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δppm 7.74 (t, J = 11.4 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.30 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 6.44 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 5.93 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 5.31 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 5.24 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 5.06 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 4.92 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 4.54 - 4.46 (m, 1H), 4.42 (dd, J = 10.3, 7.3 Hz, 1H), 4.35 - 4.26 (m, 2H), 4.22 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.03 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 3.79 (dd, J = 10.1, 4.1, 2.0 Hz, 1H), 3.47 (dd, J = 14.0, 7.0 Hz, 1H), 2.90 - 2.81 (m, 1H), 2.70 (dd, J = 16.4, 4.2 Hz, 1H), 2.10 - 1.97 (m, 12H), 1.45 (s, 9H). **RMN <sup>13</sup>C** (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 171.13(C-20), 170.53(C-20), 169.86(C-20), 169.50(C-20), 156.13(C-19), 143.89(C-18), 141.29(C-17), 127.71(C-16), 127.07(C-16), 125.16(C-15), 119.99(C-14), 82.46(C-13), 78.14(C-12), 77.34(C-11), 72.61(C-10), 70.62(C-9), 68.07(C-8), 67.20(C-7), 61.57(C-6), 51.00(C-5), 47.15(C-4), 38.04(C-3), 27.88(C-2), 20.60(C-1), 20.55(C-1). (Ver todos los espectros RMN en **Anexo C**).

### 1.5 Síntesis de Fmoc-Asn-β(D-glucopiranosil)-OH (5)

La reacción de desprotección del grupo alfa-amino se realizó por tratamiento de (4) con TFA al 95% en agua durante 1 h, la reacción se monitoreó por RP-HPLC. Luego se adicionó éter etílico y el precipitado blanco fue lavado 5 veces con éter etílico (rendimiento cuantitativo). **FT-IR** (Pastilla de KBr, cm<sup>-1</sup>): Estiramiento -OH 3479;



estiramiento del grupo carbonilo (C=O) 1662; banda característica de acetatos (CH<sub>3</sub>(C=O)-O) 1289. (Ver espectro IR en **Anexo B**). **RMN <sup>1</sup>H** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δppm 7.75 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.58 (d, J = 7.4 Hz, 2H), 7.39 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.30 (t, J = 7.4 Hz,

## 28 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

2H), 6.84 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.17 (t,  $J = 6.7$  Hz, 1H), 5.38 – 5.25 (m, 2H), 5.08 (t,  $J = 9.8$  Hz, 1H), 4.94 (dd,  $J = 12.8, 6.2$  Hz, 1H), 4.60 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 4.37 (dd,  $J = 10.9, 7.5$  Hz, 2H), 4.33 – 4.30 (m, 1H), 4.28 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 4.21 (t,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 4.06 (d,  $J = 12.2$  Hz, 1H), 3.84 (dd,  $J = 9.9, 2.0$  Hz, 1H), 2.97 – 2.86 (m, 1H), 2.77 (dd,  $J = 15.9, 4.4$  Hz, 1H), 2.12 – 1.94 (m, 12H). **RMN  $^{13}\text{C}$**  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169.40(C-18), 156.19(C-16), 143.55(C-15), 141.13(C-15), 132.14(C-14), 131.11(C-14), 126.95(C-13), 124.96(C-13), 119.86(C-12), 117.39(C-12), 77.90(C-11), 77.16( $\text{CDCl}_3$ ), 73.63(C-10), 72.47(C-9), 70.50(C-8), 67.89(C-7), 67.34(C-6), 61.46(C-5), 50.14(C-4), 46.89(C-3), 37.45(C-2), 20.50(C-1), 20.39(C-1). (Ver todos los espectros RMN en **Anexo C**).

## 2. Resultados y discusión

La obtención de (5) involucra una ruta sintética que involucra la síntesis secuencial de (1), (2), (3) y (4).

(i) La síntesis de (1) fue monitoreada por IR encontrando que la glucosa fue completamente acetilada; se observa una banda intensa en  $1742\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente al estiramiento de los grupos carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) de los grupos acetilo presentes en el producto de reacción. Adicionalmente aparecen bandas alrededor de  $2997\text{ cm}^{-1}$  y  $1383\text{ cm}^{-1}$  características de grupos metilo ( $-\text{CH}_3$ ), y en  $1226\text{ cm}^{-1}$  característica del grupo acetato ( $\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})-\text{O}$ ) presente en el producto de reacción y se observó desaparición de la banda ancha en  $3300\text{ cm}^{-1}$  característica de los OH presentes en la glucosa (reactivo de partida). Espectro IR en el **Anexo B**.

(ii) La síntesis de (2) a partir de (1) implicó la sustitución del grupo acetilo unido al C-1 por el grupo azida, la reacción fue monitoreada por espectroscopia IR y se observó la

aparición de una banda intensa en 2119 cm<sup>-1</sup> correspondiente al grupo azida (-N<sub>3</sub>). Espectro IR en el **Anexo B**.

(iii) En la reacción de formación de (3) se evidencia que la banda de 2119 cm<sup>-1</sup>, correspondiente al grupo de azida, desaparece y se ensancha la banda en 3300 cm<sup>-1</sup> debido a los puentes de hidrógenos intermoleculares del grupo amino. (iv) En el monitoreo de la formación de (4) se evidenció corrimiento en la banda de -NH a 3308 cm<sup>-1</sup> y la aparición de las bandas correspondientes al carbono sp<sup>2</sup> en 3062 cm<sup>-1</sup>, lo que concuerda con la formación del enlace amida entre la glucosamina y el Fmoc-aminoácido.

Es importante resaltar que en esta etapa se disminuyó el uso de solventes, ya que se omitieron los procesos de purificación por columna de (1) y (2). La formación de (2) y (3) se realizó a partir de materias primas obtenidas después de extracciones Líquido-Líquido, lo cual evitó procesos dispendiosos de purificación por cromatografía flash en columna y el uso de entre 1-2 L de eluyente (acetato de etilo:ciclohexano (1:1 v/v)).

Por otro lado, la literatura reporta que la formación del enlace entre la glucosilamina y el Fmoc-aminoácido es un punto crítico<sup>28</sup>, ya que la mezcla de reacción puede contener además del producto, materia prima que dificultará la obtención de (4) puro. Por eso, se requiere la purificación mediante cromatografía en columna en fase normal lo que implica la elución de un número significativo de fracciones y consumo de la mezcla de eluyente. Esto pone en riesgo la estabilidad del compuesto en la columna, disminuye considerablemente los rendimientos e incrementa los costos de producción. Por tal motivo, se exploraron alternativas de purificación por Extracción en Fase Solida- Fase Reversa (RP-SPE) que permitió purificaciones más rápidas. Aunque se logró purificar (4), seguíamos obteniendo bajos rendimientos y las cantidades en cada proceso de purificación no excedían los 100 mg. Es por esto que se exploró la cristalización de (4),

## 30 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

llegando a establecer que ese obtenía puro mediante precipitación con éter etílico. Este resultado fue importante durante la experimentación ya que en nuestra experiencia no era posible precipitar péptidos que contenían menos de 3 aminoácidos, bajo estas condiciones. La precipitación de (4) con éter etílico permitió separarlo de la mezcla de reacción y obtenerlo con alta pureza y buenos rendimientos.

El análisis por RMN de (4) permitió confirmar la estructura de la molécula. Se asignaron señales de los cuatro carbonos cuaternarios en 171.10 ppm de los grupos carbonilo (C=O) presentes en el carbohidrato acetilado, en 141.76 y 144.20 ppm de carbonilo (C=O) de amidas y en 156.66 ppm de carbono cuaternario presente en el grupo tert-butilo. Las señales en 28.33 ppm corresponden a los metilos del grupo terbutilo y en 21.08 ppm a los cuatro grupos metilos de los grupos acetilo. El experimento de APT permitió identificar la naturaleza de los carbonos (primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios). En la asignación de protón se identificaron los hidrógenos aromáticos presentes en el grupo Fmoc 7.75 (d, 2H), 7.58 (d, 2H), 7.39 (t, 2H), 7.30 (t, 2H), los hidrógenos unidos a nitrógenos de los grupos amida en 6.45(d, 1H) y 5.95 (d, 1H), los hidrógenos de los grupos acetilos en 2.23-1.86 (m, 12H) y los hidrógenos del grupo terbutilo en 1.73-1.25 (s, 9H). La asignación completa se encuentra en el **Anexo C**.

Basados en la experiencia anterior, (5) también fue precipitado con éter etílico obteniendo grandes cantidades con alta pureza de manera fácil, rápida y económica. (5) fue caracterizado por RMN asignando señales de los cuatro carbonos cuaternarios en 171.31-170.51 ppm de los grupos carbonilo (C=O) presentes en el carbohidrato acetilado, en 169.40 y 156.19 ppm de carbonilo (C=O) de amidas. Las señales en 20.50 y 20.39.ppm corresponden a los grupos metilos de los grupos acetilo y se evidenció la desaparición de las señales en 28.33 ppm correspondientes a los metilos del grupo terbutilo. El

## Capítulo 1. Optimización de la ruta sintética de N-glucosilaminoácido Fmoc-31

Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-(OH) (5)

---

experimento de APT permitió identificar la naturaleza de los carbonos (primarios, secundarios, terciarios y cuaternarios).

En la asignación de protón se identificaron los hidrógenos aromáticos presentes en el grupo Fmoc en 7.75 (d, 2H), 7.58 (d, 2H), 7.39 (t, 2H), 7.30 (t, 2H), los hidrógenos unidos a nitrógenos de los grupos amida en 6.84 (d, 1H), 6.17 (d, 1H), los hidrógenos de los grupos acetilos en 2.12 - 1.94 (m, 12H) y la señal de los hidrógenos del grupo terbutilo no se evidencia en el espectro, confirmando que la remoción del grupo terbutilo se completó. La asignación completa se encuentra en el **Anexo C**.

En resumen, se obtuvo (5) omitiendo la purificación cromatográfica de los intermediarios, lo que nos permitió obtener hasta 5 g de (5) posibilitando la síntesis de N-gluco péptidos en las cantidades requeridas para realizar los ensayos in vitro de actividad antibacteriana y antifúngica.



# Capítulo 2. Síntesis química de péptidos y N-glucopeptidos

## 1. Metodología

### 1.1 Obtención de péptidos y N-glucopeptidos

#### 1.1.1 Síntesis en Fase Sólida (SPPS) por la estrategia Fmoc/tBu

Los péptidos y N-glucopeptidos fueron obtenidos mediante síntesis en fase sólida manual, empleando una resina rink amida (0,46meq/g) bajo la estrategia Fmoc/tBu (Figura 11). Esta es una síntesis ortogonal, que involucra pasos sucesivos de desprotección del grupo  $\alpha$ -amino (Figura 11, paso 1) y acople de los aminoácidos (Figura 11, paso 2) hasta obtener la secuencia peptídica deseada. Luego se procede a hacer la separación del péptido/N-glucopeptido de la resina (clivaje) y la desprotección de las cadenas laterales de los aminoácidos, mediante un tratamiento ácido (Figura 11, paso 3). Para el caso de los N-glucopeptidos se requiere un paso adicional de desprotección de los grupos hidroxilos del monosacárido (Figura 11, paso 4).

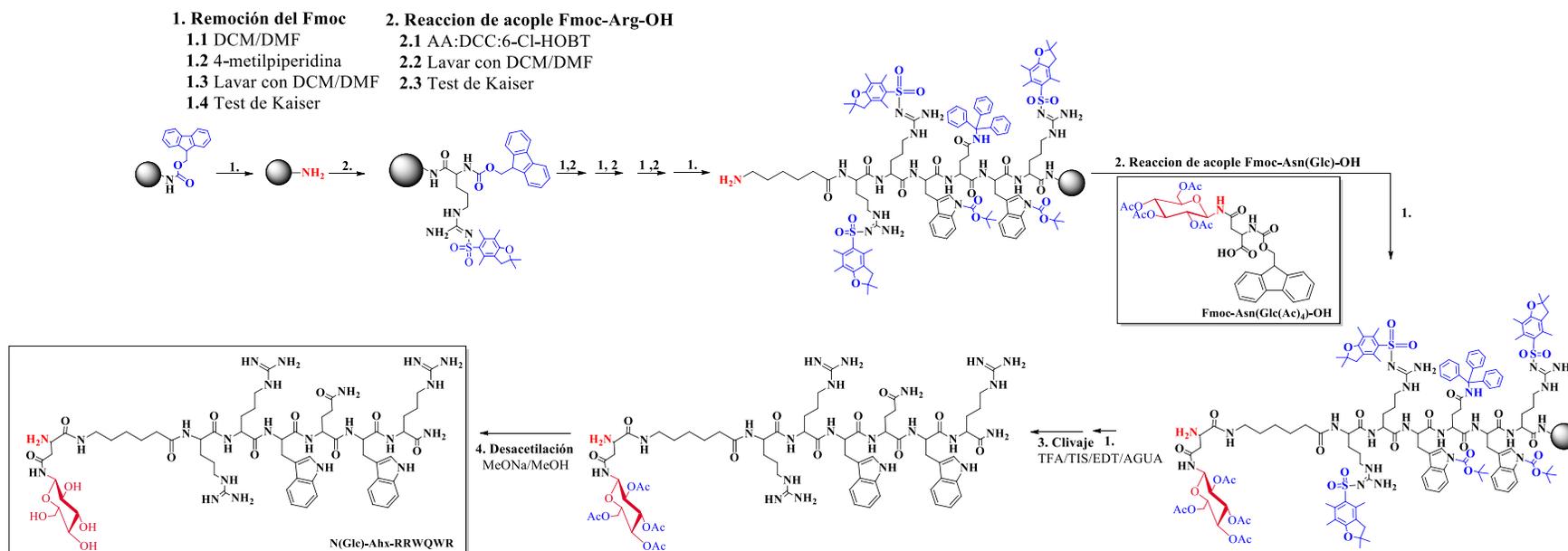


Figura 11. Esquema de síntesis para la obtención del N-glicopéptido N(Glc)-Ahx-RRWQWR (9).

### 1.1.1.1 Reacción de desprotección

Este trabajo contribuyó a la implementación de dos metodologías de desprotección del grupo alfa amino de los Fmoc-aminoácidos en la SPPS. (i) Se estandarizó la remoción del grupo Fmoc en la SPPS utilizando hidrato de hidracina como agente desprotector. Para esto se realizaron reacciones de desprotección de Fmoc-aminoácidos en solución y se establecieron las condiciones óptimas de reacción. A partir de esto se logró establecer tres metodologías de desprotección en SPPS (a) solución de hidrato de hidracina al 16% en DMF y reacción durante 60 min con AC, (b) solución de hidrato de hidracina en DMF y reacción por 10 minutos con AC (x2), (c) solución de hidrato de hidracina al 16% en DMF y reacción por 30 segundos utilizando microondas (x2). Este trabajo fue publicado en la revista *Tetrahedron Letters* en 2019<sup>43</sup>.

(ii) En la segunda metodología el grupo Fmoc fue removido tratando la resina con solución de 4-metilpiperidina diluida (4-metilpiperidina al 2,5% (v/v) en DMF) por 15 min con AC (x2). Esta metodología nos permitió reducir drásticamente el consumo de 4-metilpiperidina la cual, además de ser nociva para la salud y el medio ambiente está restringida comercialmente. Esta metodología puede ser implementada para la SPPS manual rutinaria en la obtención de péptidos cortos. Este trabajo fue publicado en *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* en 2019<sup>44</sup>.

Luego del tratamiento con solución de desprotección, la resina se lavó con DMF (6×10 seg) y DCM (3×10 seg) quedando disponibles los grupos amino para permitir la incorporación del aminoácido. La reacción de desprotección se monitoreó mediante el test de Kaiser.

## 36 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

### 1.1.1.2 Reacciones de Activación y acople

La reacción de acople del Fmoc-aminoácido se realizó por la estrategia de éster modificado utilizando carbodimidas. El aminoácido fue pre-activado con DCC y HOBT (1:1:1; 5 excesos respecto a los mEq de resina) en DMF durante 5 min a TA con AC. Luego, la mezcla de reacción fue adicionada a la resina y se dejó en reacción 2 h a TA. La solución fue retirada mediante filtración y la resina lavada con DMF (3×10 seg), 2-Isopropanol (IPA) (2×10 seg) y DCM (3×10 seg). La reacción fue monitoreada mediante el test de Kaiser.

La reacción de acople de (5) se realizó por la estrategia de sales de uronio. Se disolvió en DMF una mezcla que contiene 5 excesos de Fmoc-aminoácido o (5), HOBT, TBTU (1:1) y 3 excesos molares de DIPEA respecto al TBTU. La mezcla se agitó por 5 min a TA y se adicionó a la resina. Una vez transcurridas 2 h de reacción, la solución se retiró mediante filtración y se realizaron lavados con DMF (3×10 seg), IPA (2× 0 seg) y DCM (3×10 seg). La reacción fue monitoreada mediante el test de Kaiser.

### 1.1.1.3 Monitoreo de las reacciones de acople y desprotección utilizando el test de Kaiser

El monitoreo de las reacciones de desprotección y de acople se realizó con el reactivo de Ninhidrina que permite determinar la presencia de grupos amino libres. Para realizar la prueba de Kaiser<sup>45</sup>, se prepararon tres soluciones: (i) 40 g de Fenol disuelto en 10 mL de Etanol absoluto; (ii) 0.65 mg de KCN, 1.0 mL de agua y 49.0 mL de Piridina; (iii) 1.25 g de Ninhidrina en 25 mL de etanol absoluto. Las soluciones (i) y (ii) fueron mezcladas y

almacenadas (Solución A) mientras que la solución (iii) corresponde a la Solución B que se almacenó en la oscuridad. Para realizar la prueba se tomó una fracción de la resina-péptido seca (~0.1 mg) y se adicionó Solución A y B en proporción 2:1 (v/v). Una vez la mezcla fue homogenizada se sometió a calentamiento a 105°C durante 5 min y se observó el color generado por la reacción. Una coloración azul indicó prueba positiva para la presencia de grupos aminos libres (desprotegió) y coloración amarilla, prueba negativa (la reacción de acople fue completa).

#### **1.1.1.4 Desprotección de las cadenas laterales y desanclaje del péptido/N-glicopéptido de la resina**

Las reacciones de desprotección de las cadenas laterales y el desanclaje del péptido del soporte sólido, se realizaron secando la resina-péptido desprotegida y se adicionó la solución de desprotección y desanclaje (Clivaje) en relación 1 g resina-péptido/10 mL de solución que contiene TFA/H<sub>2</sub>O/Etanoditiol (EDT)/Trisisopropilsilano (TIPS) (92.5/2.5/2.5/2.5 %v/v). Luego de 8 h en AC a TA la solución fue filtrada y el péptido precipitado por tratamiento con éter etílico frío. El precipitado se centrifugó a 2500 rpm por 5 min y el sobrenadante se desechó, luego se realizaron 5 lavados con éter etílico frío bajo las mismas condiciones descritas.

#### **1.1.1.5 Desacetilación de los N-glicopéptidos**

La reacción de desacetilación del monosacárido presente en el N-glicopéptido se realizó con Metóxido de sodio en agua (1 mL solución: 1 µmol de N-glicopéptido), AC por 2 h a TA. Luego los N-glicopéptidos fueron purificados por RP-SPE y caracterizados por RP-HPLC y MS-MALDI-TOF.

## 38 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

### 1.1.2 Purificación de Péptidos/N-glicopéptidos por extracción en fase sólida

Con base en los resultados obtenidos de la cromatografía RP-HPLC analítica, se diseñó un programa de purificación basado en la elución por gradiente en una columna Supelclean LC-18 SPE (5 g). La columna fue activada con 12 mL de Metanol (MeOH grado HPLC) (x3), luego se lavó con 12 mL de A, 12 mL de B (x3) y finalmente con 12 mL de A (x3). El péptido fue disuelto en A (100 mg/3 mL) y eluído con soluciones que contienen cantidades crecientes de B<sup>46</sup>. Las fracciones fueron recolectadas y evaluadas por cromatografía analítica RP-HPLC, las fracciones que contenían la especie pura fueron reunidas y liofilizadas.

### 1.1.3 Caracterización de Péptidos/N-glicopéptidos por cromatografía

#### RP-HPLC

El péptido disuelto en fase móvil A (1 mg/mL) es analizado por HPLC en una columna C18 Chromolith High Resolution RP-18 (50-4.6 mm) empleando un gradiente de elución del 5/50% de B (0.05% v/v de TFA en ACN) en 8 min, a un flujo de 2 mL/min, en A (0.05% v/v de TFA en H<sub>2</sub>O). La lectura se realizó a 210 nm.

### **1.1.4 Análisis de Péptidos/N-glicopéptidos por espectrometría de masas**

El producto puro fue caracterizado por espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization -Time of Flight) utilizando un equipo Bruker Daltonics Microflex. El péptido (1mg/mL) fue mezclado con ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (1 mg/ml) en una relación 18:2.5. La mezcla se sembró sobre la placa porta muestra para su lectura usando un láser con potencia entre 2700 y 3000V.

## **2. Resultados y discusión**

### **2.1 Síntesis química de péptidos**

Se sintetizaron 6 péptidos plantilla que corresponden a las secuencias diseñadas sin el motivo glicósido como control para establecer si la incorporación del monosacárido afecta la actividad antibacteriana. La síntesis de los péptidos fue favorable, indicando viabilidad en la posterior obtención de los N-glicopéptidos. La caracterización de las moléculas obtenidas se presenta en la Tabla 2 en donde se observa que la pureza cromatográfica de las moléculas en su mayoría estuvo entre 82 y 99%. La caracterización de los péptidos purificados por espectrometría de masas MALDI-TOF muestra que los péptidos presentaron relaciones masa/carga correspondiente a la masa monoisotópica teórica.

## 40 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

Tabla 2. Péptidos derivados de la LfcinB sintetizados en este trabajo

	Péptido	RP-HPLC		MS MALDI-TOF m/z [M + H] <sup>+</sup>	
		t <sub>R</sub> (min)	% Área	Calculado	Experimental
LfcinB(20-25)	RRWQWR	4.1	97	986.5	988.200
6	N-Ahx-RRWQWR	4.2	99	1213.7	1213.677
7	RRWQWR-Ahx-N	4.2	94	1213.7	1212.923
8	N-Ahx-RRWQWR-Ahx-N	4.3	92	1440.8	1440.261
LfcinB (21-25) <sub>pal</sub>	RWQWRWQWR	5.9	81	1485.8	1486.751
12	N-Ahx-RWQWRWQWR	5.8	81	1713.9	1714.353
13	RWQWRWQWR-Ahx-N	5.8	88	1713.9	1714.598
14	N-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N	5.7	76	1941.0	1941.869

A manera de ejemplo, en la Figura 12 se muestra la caracterización del péptido (6) en donde se evidencia que la síntesis solo requirió de un ciclo de reacción de acople para cada aminoácido (**Panel B**), el perfil cromatográfico del péptido muestra un único pico con pureza del 99 % y t<sub>R</sub>= 4.2 min. La caracterización por espectrometría de masas MALDI-TOF (Panel D) presentó una señal con m/z=1213.677 el cual corresponde a la especie [M+H]<sup>+</sup> de la molécula. Los reportes para cada péptido se presentan en el **Anexo D**.

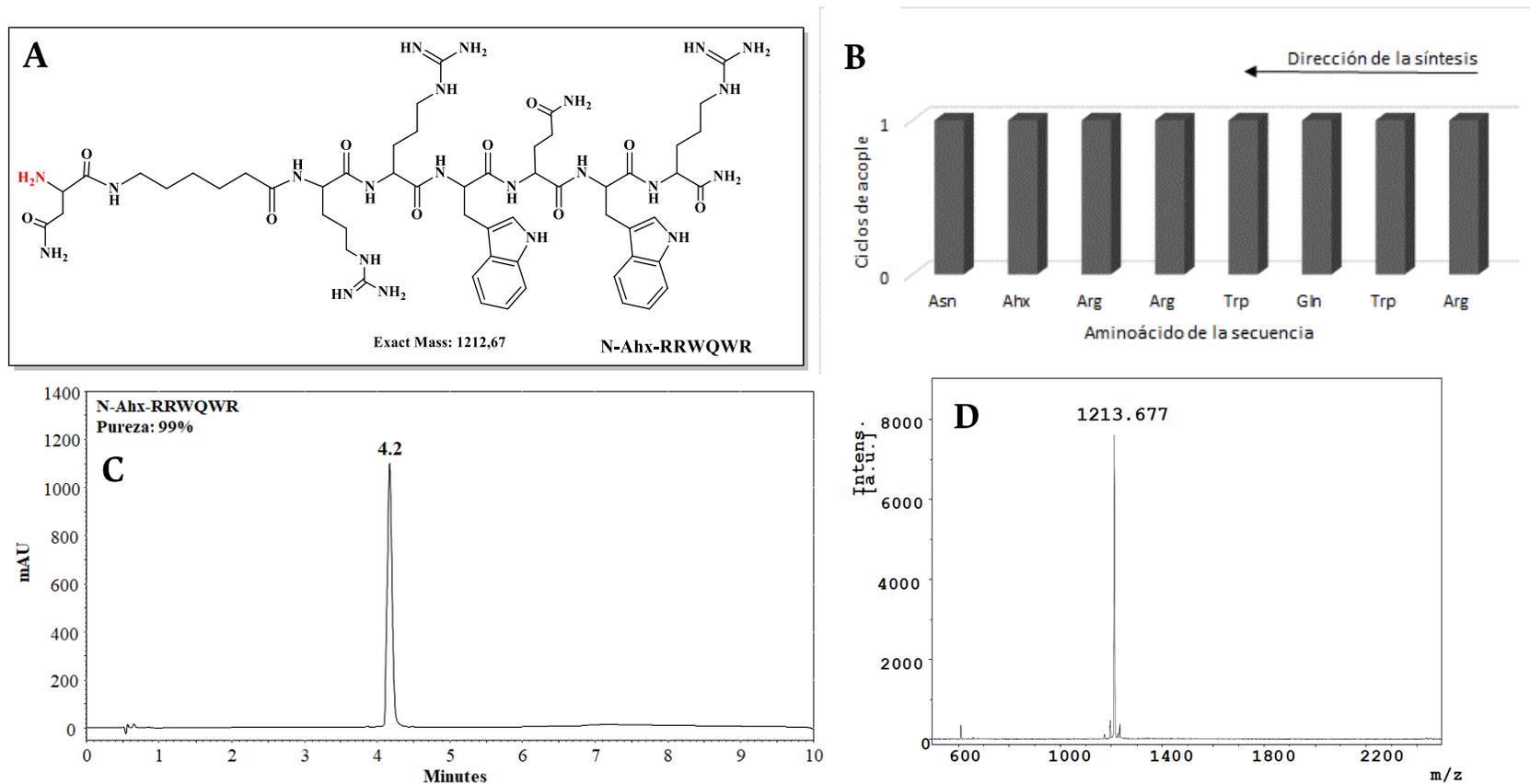


Figura 12. Reporte de síntesis N-Ahx-RRWQWR (6) **A**. Estructura y masa teórica **B**. Comportamiento de síntesis **C**. Perfil cromatográfico del péptido puro **D**. Espectro de masas MALDI-TOF.

La metodología de purificación para las moléculas peptídicas fue implementada en el laboratorio. Consiste en hacer una elución por gradiente en columna SPE y recolectar cada una de las fracciones. Como ejemplo la Figura 13 en donde se presenta el monitoreo por RP-HPLC de la purificación del péptido (6).

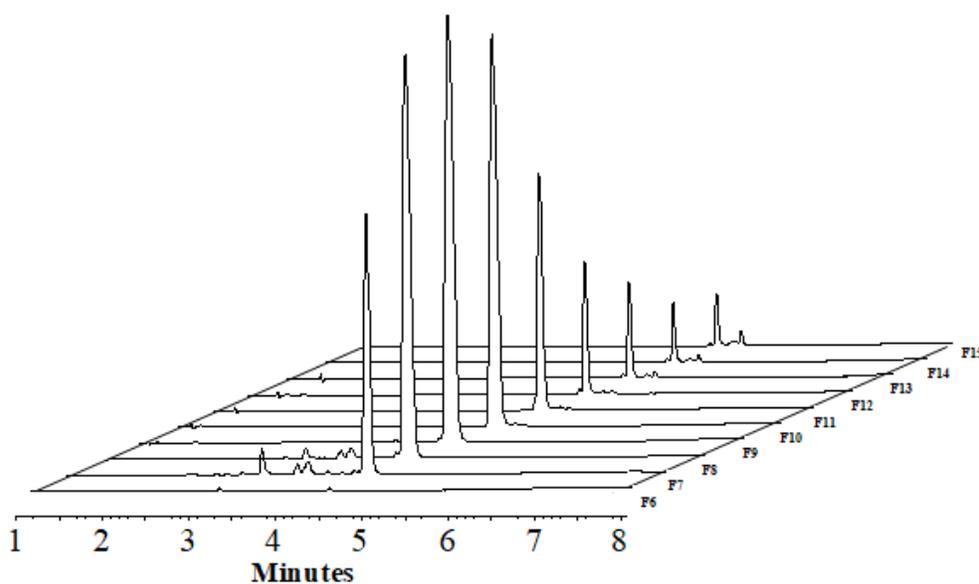


Figura 13. Monitoreo por RP-HPLC de la purificación del péptido N-Ahx-RRWQWR (6).

Todos los péptidos y N-glicopéptidos fueron purificados utilizando esta metodología, demostrando la versatilidad del método. Esta fase del trabajo hace parte de un artículo publicado en la revista *Molecules* en 2019<sup>46</sup>.

## 2.2 Síntesis química de N-glicopéptidos

Se sintetizaron 6 N-glicopéptidos los cuales tienen los grupos hidroxilos del monosacárido protegidos con grupos acetilo. La caracterización de las moléculas crudas se muestra en la Tabla 3, evidenciando tiempos de retención superiores a 5.2 min y purzas cromatográficas entre 63-81%. Las moléculas presentaron una señal m/z correspondiente a su especie  $[M+H]^+$  indicando que todos los N-glicopéptidos fueron obtenidos, excepto para el N-glicopéptido (17') cuya masa presentó diferencia de 415.3 uma, masa que posiblemente corresponde a la deleción de la glucosa por un enlace glicosídico. Por esta razón la molécula (17) se retiró del estudio.

Tabla 3. N-glicopéptidos acetilados sintetizados

	N-glicopéptido	RP-HPLC		MS MALDO-TOF m/z $[M + H]^+$	
		t <sub>R</sub> (min)	% Área	Calculado	Experimental
9'	N(Glc(Ac) <sub>4</sub> )-Ahx-RRWQWR	5.2	70	1542.7	1542.801
10'	RRWQWR-Ahx-N(Glc(Ac) <sub>4</sub> )	5.4	72	1542.7	1543.887
11'	N(Glc(Ac) <sub>4</sub> )-Ahx-RRWQWR-Ahx-N(Glc(Ac) <sub>4</sub> )	6.1	78	2099.9	2098.669
15'	N(Glc(Ac) <sub>4</sub> )-Ahx-RWQWRWQWR	6.0	81	2042.9	2044.199
16'	RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc(Ac) <sub>4</sub> )	6.5	63	2042.9	2042.766
17'	N(Glc(Ac) <sub>4</sub> )-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc(Ac) <sub>4</sub> )	6.6	64	2600.2	2184.984

Los productos crudos fueron desacetilados por tratamiento con metóxido de sodio y caracterizados. Los datos se presentan en la Tabla 4, en donde se observa que los t<sub>R</sub> de cada molécula disminuyeron respecto a sus análogos acetilados, sugiriendo que la reacción de desacetilación fue llevada a cabo, ya que esto implica disminución en la hidrofobicidad de la molécula. El análisis por espectrometría de masas de los cinco N-glicopéptidos obtenidos, muestra que la señal m/z corresponde a la especie  $[M+H]^+$  esperada.

## 44 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

Tabla 4. N-glicopéptidos desacetilados sintetizados

N-glicopéptido	RP-HPLC		MS MALDO-TOF m/z [M + H] <sup>+</sup>		
	t <sub>R</sub> (min)	% Área	Calculado	Experimental	
9	N(Glc)-Ahx-RRWQWR	4.3	84	1374.7	1374.046
10	RRWQWR-Ahx-N(Glc)	4.2	43	1374.7	1374.804
11	N(Glc)-Ahx-RRWQWR-Ahx-N(Glc)	4.2	58	1763.9	1766.054
15	N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR	5.7	82	1874.9	1877.596
16	RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc)	5.7	74	1874.9	1877.435

A manera de ejemplo en la Figura 14, se muestran los resultados de la síntesis del N-glicopéptido (9'), en donde se evidencia que el acople de la Arg<sup>6</sup> y de (5) requirió dos ciclos de reacción para completar la reacción de acople (**Panel B**). Los perfiles cromatográficos de los N-glicopéptidos (9') (Figura 14) y (9) (Figura 15) muestran una especie mayoritaria con pureza cromatográfica superior al 70% y se observa la diferencia de t<sub>R</sub> (5.2 min y 4.3 min respectivamente) correspondiente al cambio de polaridad de la molécula al desacetilarla. La caracterización por espectrometría de masas MALDI-TOF (**Panel D**) presentó una señal con m/z correspondiente a la especie [M+H]<sup>+</sup> de cada molécula. Los reportes para cada N-glicopéptido se presentan en el **Anexo E**.

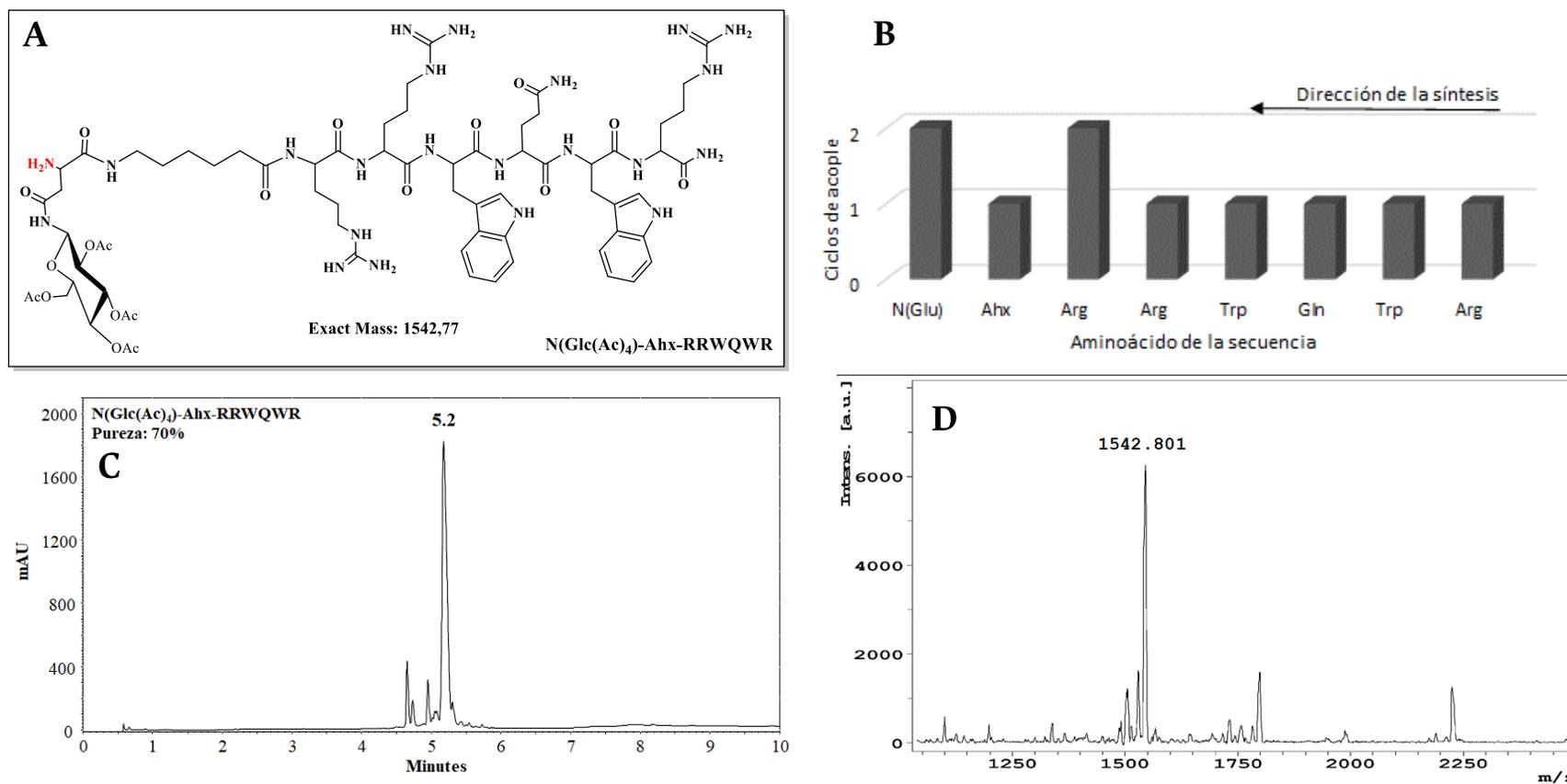


Figura 14. Reporte de síntesis  $N(\text{Glc}(\text{Ac})_4)\text{-Ahx-RRWQWR}$  (9') A. Estructura y masa teórica, B. Comportamiento de síntesis, C. Cromatograma producto puro, D. Espectro de masas MALDI-TOF.

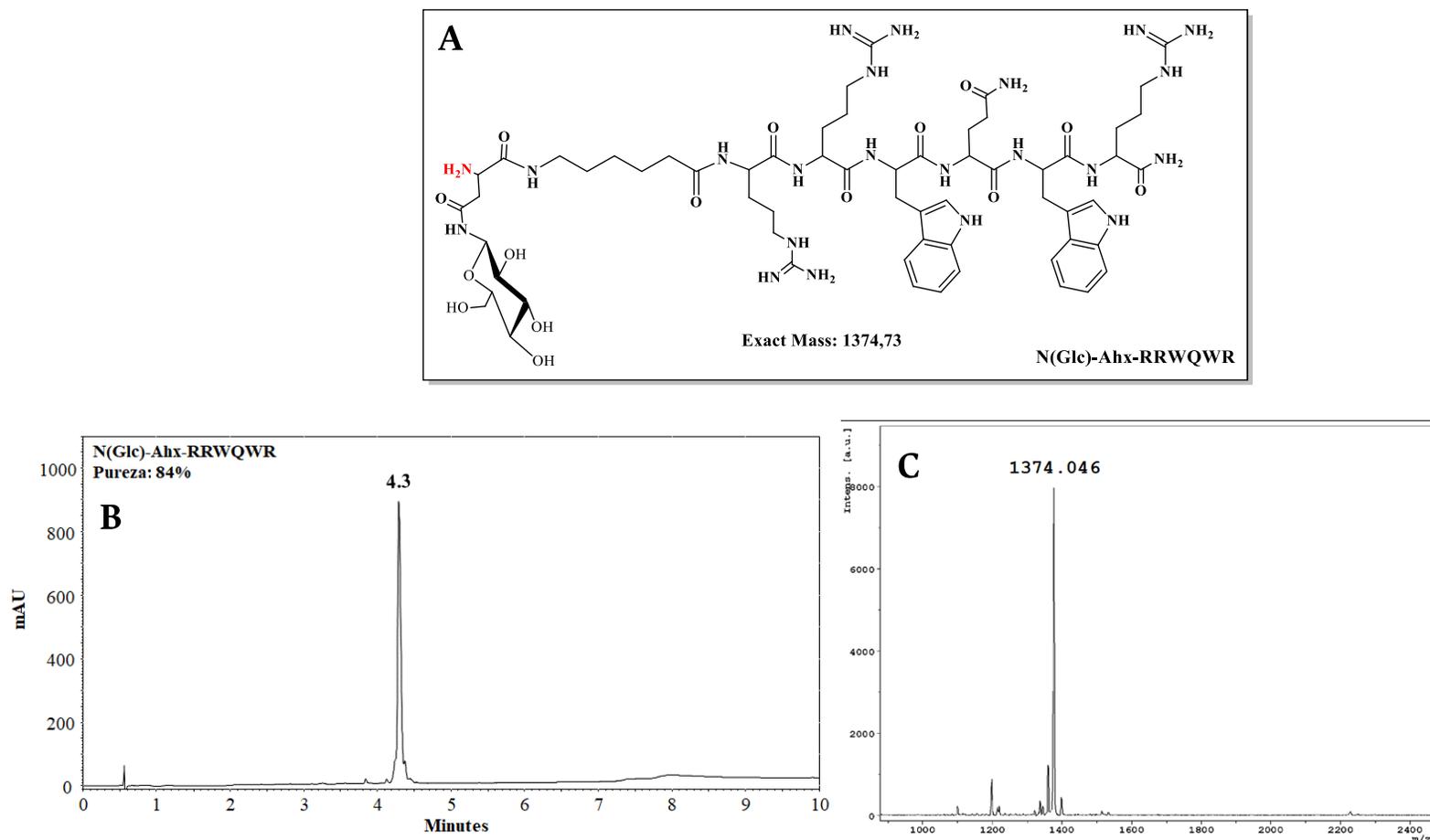


Figura 15. Reporte de síntesis N(Glc)-Ahx-RRWQWR (9) A. Estructura y masa teórica B. Cromatograma producto puro C. Espectro de masas MALDI-TOF.

## Capítulo 3. Actividad antibacteriana de los Péptidos/N-glucopeptidos

### 1. Metodología

#### 1.1 *Activación y mantenimiento de la cepa bacteriana ATCC*

Las cepas bacterianas se activaron de acuerdo con el protocolo del proveedor. Se realizaron 3 pases seriados en Agar Triptona de Soya, hasta obtener una tasa de crecimiento óptima y para confirmar la pureza de la cepa se realizó tinción de Gram. Los cultivos fueron almacenados entre 30 y 60 días a 4°C, al cumplirse este periodo u observar cambios o contaminación en las cajas se tomó un inóculo del cultivo stock y se cultivó realizando pases seriados hasta observar una tasa de crecimiento óptima (por conteo de UFC). Las cepas se almacenaron en crioviales con BHI y Glicerol al 20% a -70° C.

#### 1.2 *Curvas de calibración de las cepas bacterianas (UFC/mL vs ABS)*

Para la curva de calibración se realizó un inóculo inicial de cada cepa de estudio agregando de 2 a 3 colonias del cultivo de trabajo en 6 mL de caldo BHI, se incubó a 37°C por 24 h, luego se realizaron diluciones seriadas con agua peptonada, como se muestra en la Figura 16.

## 48 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

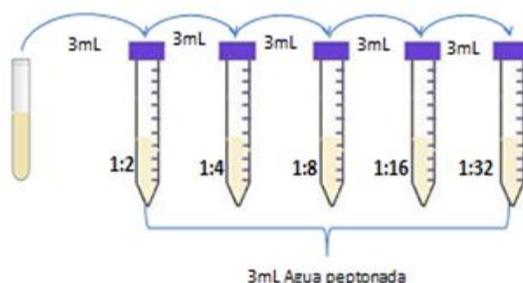


Figura 16. Diluciones seriadas en base 2: (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) de cada una de las cepas de estudio.

Posteriormente se distribuyó las diluciones en una placa multipozos, y se realizó diluciones seriadas en base 10. La absorbancia del microplato se leyó en un lector de Human Reader HS ( $\lambda$  630nm). A continuación, se toman 200  $\mu$ L de cada una de las diluciones y 200  $\mu$ L de agua peptonada (control negativo), se dispensan en cajas de Petri y se determinan la Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

Posteriormente se sembró una alícuota de cada dilución en una placa multipozos y luego se realizaron diluciones seriadas en base 10 y se determinó la absorbancia (Abs) en un lector de Elisa Human Reader HS (630  $\lambda$  nm). A continuación, se tomó 200  $\mu$ L de cada una de las diluciones y se dispensaron en cajas de Petri para determinar la Unidades Formadoras de Colonia (UFC). Se utilizó agua peptonada como control negativo.

Luego de servir las diluciones en las cajas, se agregó 15 mL de Agar SPC, agitando suavemente, se dejó solidificar el medio y se incubó por 48 h a 37°C en atmósfera aerobia. Después se realizó el conteo de las UFC por caja de Petri. Si el número de UFC sobrepasaba de 300 UFC se contaron en 4 cuadrantes, luego se promedió y se multiplicó por el área de la caja. Luego del conteo se procedió a determinar la absorbancia de las diluciones en base 2 (n=3) a 620 nm y las unidades formadoras de Colonia (UFC/mL)<sup>47</sup>.

Siguiendo lo establecido en las normas Global Laboratory Standards for a Healthier World<sup>48</sup>

### 1.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Este ensayo se realizó siguiendo el método de microdilución en caldo, según las normas CLSI<sup>49</sup>. En una caja multipozos se adicionaron 90  $\mu$ L de caldo MH y 90  $\mu$ L del péptido/N-gluco péptido (200-6,2  $\mu$ g/mL). Después, se agregó 10  $\mu$ L del inóculo bacteriano ( $5 \times 10^5$  UFC/mL) y se incubó por 24 h a 37°C. La distribución en la placa se muestra en la Figura 17.

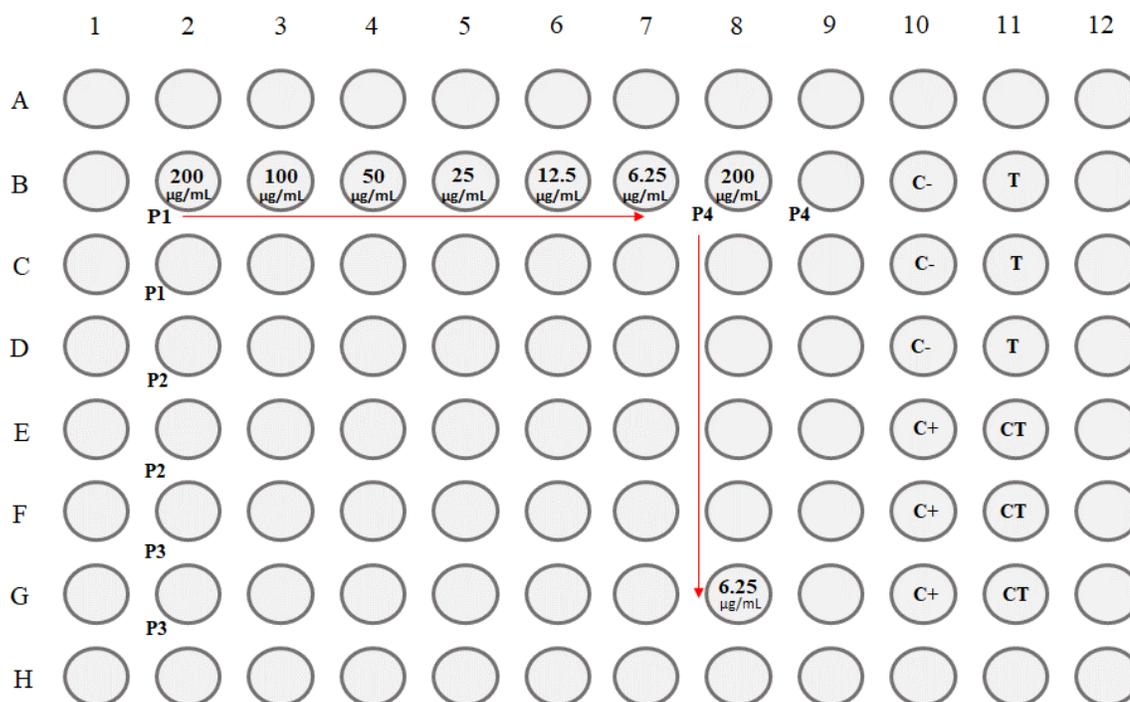


Figura 17. Distribución del plato multipozos para la determinación de la CMI. Se observan las concentraciones finales del péptido/N-gluco péptido ( $\mu$ g/mL). Control negativo (C-), Control positivo (C+) Control de crecimiento (T), Control técnica (CT).

## 50 Síntesis de N-gluco péptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

Luego del periodo de incubación se midió absorbancia a 630 nm. El control positivo para cepa Gram negativa (*E. coli* ATCC 25922) fue 0.2  $\mu\text{g/mL}$  de Ciprofloxacino y para cepa Gram positiva (*S. aureus* ATCC 25923) 3.2  $\mu\text{g/mL}$  de Vancomicina. El control de crecimiento fue la cepa bacteriana en caldo MH y agua destilada estéril como control negativo.

### 1.4 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Después de la lectura para la determinación del CMI, se realizó un subcultivo en una placa de Agar MH, de cada una de las diluciones en donde no se observó crecimiento (Figura 18). La acción bactericida se definió como la concentración mínima del péptido donde no se presenta crecimiento. Cada ensayo se realizó por duplicado<sup>47</sup>.

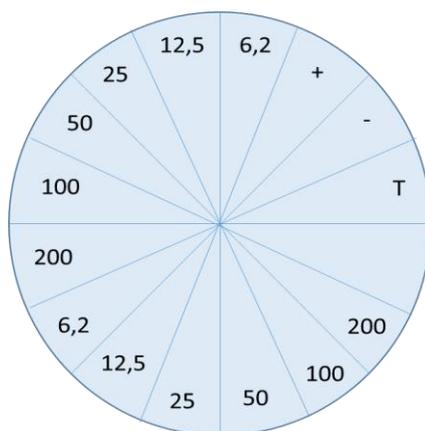


Figura 18. Esquema rotulación de la caja de Petri para ensayos de determinación de la CMB. Los valores indican las concentraciones en  $\mu\text{g/mL}$  del péptido utilizado para el subcultivo.

## 2. Resultados y discusión

### 2.1 Curvas de calibración

Se construyeron las curvas de calibración UFC/mL vs absorbancia (ver **Anexo F**) y se realizaron las comprobaciones a través de un ensayo que consistió en leer la absorbancia de un cultivo de 24 h en caldo BHI y compararla con la lectura de UFC en la caja Tabla 5. En la tabla se observa que todas las curvas presentan un valor de  $R^2$  (coeficiente de determinación) mayor a 0,97, lo que indica que la correlación entre las dos variables es adecuada y se mantiene en el intervalo de medida. El porcentaje de variación entre el valor de UFC obtenido del conteo en la caja de Petri y el valor obtenido por la ecuación, en todas las cepas fue menor al 20%.

Tabla 5. Comprobación de las ecuaciones obtenidas en las curvas de calibración

Bacteria	Ecuación	$R^2$	Valor Curva (UFC/mL x10 <sup>7</sup> )	Caja Petri (UFC/mL x10 <sup>7</sup> )	% Variación
<i>E. coli</i> 25922	$Y = 0.0101x + 0.0131$	0.99	1.67	1.40	16
<i>S. aureus</i> 25923	$Y = 0.0071x + 0.0176$	0.98	2.24	1.98	12

### 2.2 Actividad antibacteriana de los péptidos

Los péptidos fueron agrupados por familias y evaluados contra dos cepas ATCC; cada familia está definida por la secuencia y formada por la disposición del N-glucoconjugado. Los resultados de los CMI y CMB se pueden observar en la Tabla 6 y Tabla 7. (Más información **Anexo G**).

## 52 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

Tabla 6. Valores de MIC y MBC (ug/mL) para los péptidos de la familia LfcinB (20-25)

Péptido	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
	MIC	MIC	
LfcinB(20-25)	RRWQWR	100/100	200/>200
6	N-Ahx-RRWQWR	200/>200	>200/>200
7	RRWQWR-Ahx-N	>200/>200	200/200
8	N-Ahx-RRWQWR-Ahx-N	>200/>200	200/200
9	N(Glc)-Ahx-RRWQWR	>200/>200	>200/>200
10	RRWQWR-Ahx-N(Glc)	>200/>200	>200/>200
11	N(Glc)-Ahx-RRWQWR-Ahx-N(Glc)	>200/>200	>200/>200

Los resultados de actividad antibacteriana contra las cepas evaluadas muestran que la incorporación de N-Ahx en el extremo N-terminal de la secuencia RRWQWR (LfcinB 20-25), disminuye la actividad de la molécula en la cepa Gram negativa *E. coli* ATCC 25922. Adicionalmente, los N-glicopéptidos evaluados, no presentan actividad antibacteriana en ninguna de las cepas evaluadas a concentraciones inferiores a 200 µg/mL.

Tabla 7. Valores de MIC y MBC (µg/mL) para los péptidos de la familia LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub>

Péptido	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
	MIC/MBC	MIC/MBC	
LfcinB(21-25) <sub>Pal</sub>	RWQWRWQWR	25/50	200/>200
12	N-Ahx-RWQWRWQWR	100/100	>200/<200
13	RWQWRWQWR-Ahx-N	200/>200	>200/>200
14	N-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N	>200>200	>200/>200
15	N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR	>200/>200	>200>200
16	RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc)	100/>200	200/>200

Para la familia LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub> se observa una disminución de la actividad antibacteriana en la cepa Gram negativa *E. coli* ATCC 25922, mayormente con la incorporación de residuos en el extremo C-terminal. Los N-glicopéptidos evaluados tienen actividad antibacteriana con concentraciones mínimas inhibitorias superiores a 100 µg/mL.

Es importante resaltar que la búsqueda de agentes terapéuticos que involucran la aproximación ecológica se basa en la inhibición de la adhesión del patógeno al tejido celular sin afectar el patógeno. Por lo tanto, estos N-glicopéptidos pueden ser considerados para estudios de inhibición de la adhesión bacteriana como contribución para el desarrollo de tratamientos que no generen resistencia.

# Capítulo 4. Actividad antifúngica de los Péptidos/N-glucopeptidos

## 1. Metodología

### 1.1 *Curvas de letalidad en C. albicans*

Las curvas de letalidad se realizaron según protocolo EUCAST con modificaciones<sup>50</sup>. En una caja multipozos (de 100 pocillos) se agregó 150 µL de solución de péptido o N-glucopeptido (preparado con caldo Sabouraud) a diferentes concentraciones (666, 333, 165, 82 y 41 µg/mL). Posteriormente se agregó 150 µL del inóculo ajustado a  $5 \times 10^3$  UFC/mL (0.5 de la escala de McFarland). Las muestras se incubaron por 72 h a 35°C con agitación constante. La lectura de la absorbancia se midió cada hora en un equipo Bioscreen C (625 nm). Control negativo (caldo Sabouraud), control de crecimiento (Levadura más caldo Sabouraud) y control positivo fluconazol 0.5 µg/mL y anfotericina B 0.25 µg/mL (antifúngicos conocidos).

### 1.2 *Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)*

Para la determinación de la CMI se suspendió la cepa fungí en caldo Sabouraud para activarla. 0,1 mL del crio preservado se sembró en 1 mL de caldo Sabouraud por 24 h a 37°C. 20 µL de este crecimiento se sembró en una placa de agar Sabouraud y se incubó por 24 h a 37°C. Luego se realizó la identificación microbiológica. Una vez se confirmó género y especie de la levadura se realizó un inóculo en caldo Sabouraud y se incubó por

24 h a 37°C. A partir del inóculo anterior se realizó una suspensión al 0.5 de la escala de McFarland.

Los péptidos o N-glucopéptidos se disolvieron en buffer y se realizaron diluciones seriadas en base 2, luego se sembraron en una placa multipozo y se adicionó 150 ul del inóculo (0.5 en la escala de McFarland). Las muestras se incubaron por 72 h y la lectura de la absorbancia se midió cada hora en un equipo Bioscreen C (625 nm). El control negativo fue caldo Sabouraud, el control de crecimiento fue levadura más caldo Sabouraud y el control positivo levadura con antifúngico. Todas las pruebas se realizaron por triplicado y se realizó el análisis estadístico para verificar el potencial fungistático o fungicida de cada péptido evaluado<sup>51</sup>.

## 2. Resultados y discusión

Los péptidos fueron agrupados por familias y evaluados contra *C. albicans* ATCC SC 5314; cada familia está definida por la secuencia y formada por la disposición del residuo con carácter sacárido. Los resultados de la actividad fungistática y fungicida se pueden observar en la Tabla 8 y Tabla 9. (Las curvas de letalidad se encuentran en el **Anexo H**).

Tabla 8. Valores de efecto fungicida y fungistático (ug/mL) para los péptidos de la familia LfcinB (20-25)

	Péptido	<i>C. albicans</i> ATCC SC 5314	
		Fungistático	Fungicida
LfcinB(20-25)	RRWQWR	666	>666
6	N-Ahx-RRWQWR	>666	>666
7	RRWQWR-Ahx-N	>666	>666
8	N-Ahx-RRWQWR-Ahx-N	>666	>666
9	N(Glc)-Ahx-RRWQWR	>666	>666
11	N(Glc)-Ahx-RRWQWR-Ahx-N(Glc)	>666	>666

## 56 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

Los resultados de actividad antifúngica contra *C. albicans* muestran que la incorporación de la glucosa en la secuencia RRWQWR (LfcinB 20-25) no aumentó la actividad antifúngica de la molécula. Los N-glicopéptidos evaluados no presentaron actividad antifúngica a concentraciones inferiores a 666 µg/mL.

Tabla 9. Valores de efecto fungicida y fungistático (µg/mL) para los péptidos de la familia LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub>

Nombre	Péptido	<i>C. albicans</i> ATCC SC 5314	
		Fungistático	Fungicida
LfcinB(21-25) <sub>Pal</sub>	RWQWRWQWR	165	333
12	N-Ahx-RWQWRWQWR	666	333
13	RWQWRWQWR-Ahx-N	666	333
14	N-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N	>666	>666
15	N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR	>666	>666
16	RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc)	>666	>666

Para la familia LfcinB(21-25)<sub>Pal</sub> se observa una disminución significativa de la actividad antifúngica. Los N-glicopéptidos evaluados no presentaron actividad antifúngica a concentraciones inferiores a 666 µg/mL.

Por lo tanto, estos N-glicopéptidos pueden ser considerados para estudios de inhibición de la adhesión fúngica como contribución para el desarrollo de tratamientos que no generen resistencia.

## Conclusiones

En este trabajo se optimizó la ruta sintética para la síntesis del bloque aminoácido-monosacárido Fmoc-Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-OH (5), logrando obtener el bloque con alta pureza (96%) y buenos rendimientos, sin necesidad de purificar los productos intermediarios, haciendo la síntesis más rápida, eficiente, de menor costo y más amigable con el medio ambiente. La metodología desarrollada permitió escalar la ruta sintética para la obtención de 5.6 g de Fmoc-Asn(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-OH (5) puro y caracterizado.

Por otro lado, se establecieron las condiciones de síntesis para la obtención de los N-glicopéptidos derivados de LfcinB logrando obtener la mayoría de las moléculas con purezas superiores al 90%.

Se implementaron dos metodologías de desprotección del grupo alfa amino de los Fmoc-aminoácidos en la SPPS. (i) La remoción del grupo Fmoc en la SPPS utilizando hidrato de hidracina al 16% (v/v) en DMF como alternativa para la desprotección de Fmoc-aminoácidos en SPPS rutinaria. (ii) La remoción del grupo Fmoc con solución de 4-metilpiperidina diluida al 2.5 (v/v) en DMF para la obtención de péptidos cortos por SPPS manual. Esta metodología nos permitió reducir drásticamente el consumo de 4-metilpiperidina la cual, además de ser nociva para la salud y el medio ambiente está restringida comercialmente.

La búsqueda de estrategias alternativas de purificación permitió desarrollar una metodología de purificación por RP-SPE para moléculas pequeñas como N-glucosilaminoácidos y moléculas más grandes como péptidos y N-glicopéptidos. Esta

## 58 Síntesis de N-gluco péptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

metodología permitió obtener moléculas altamente puras de manera eficiente, rápida y con bajo consumo de solventes.

Los N-gluco péptidos obtenidos no presentaron efecto citotóxico contra *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 y *C. albicans* ATCC SC 5314 sugiriendo que estas moléculas pueden ser consideradas para estudios de actividad anti adhesiva como contribución a la búsqueda de moléculas promisorias en terapias enmarcadas en la aproximación ecológica.

## Bibliografía

- (1) Salvador, L. A.; Elofsson, M.; Kihlberg, J. Preparation of Building Blocks for Glycopeptide Synthesis by Glycosylation of Fmoc Amino Acids Having Unprotected Carboxyl Groups. *Tetrahedron* **1995**, 51 (19), 5643–5656.
- (2) Klysov, A. A. Chapter I. Carbohydrates and Drug Design. In *Glycobiology and Drug Design*; 2012; pp 3–22.
- (3) Billeter, M.; Zervos, M.; Chen, A.; Dalovisio, J.; Kurukularatne, C. Dalbavancin: A Novel Long-Acting Lipoglycopeptide Antibiotic. *Rev. anti-infective agents* **2008**, 46 (2), 577–583.
- (4) Yarema, K. J.; Bertozzi, C. R. Chemical Approaches to Glycobiology and Emerging Carbohydrate-Based Therapeutic Agents. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 49–61.
- (5) Zopf, D.; Roth, S. Oligosaccharide Anti-Infective Agents. *Lancet* **1996**, 347 (9007), 1017–1021.
- (6) Sharon, N.; Ofek, I. Safe as Mother's Milk: Carbohydrates as Future Anti-Adhesion Drugs for Bacterial Diseases. *Glycoconj. J.* **2000**, 17 (7–9), 659–664.
- (7) Holmes, A. R.; Cannon, R. D.; Jenkinson, H. F. Interactions of *Candida Albicans* with Bacteria and Salivary Molecules in Oral Biofilms. *J. Ind. Microbiol.* **1995**, 15 (3), 208–213.

## 60 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

- (8) Hartmann, M.; Papavlassopoulos, H.; Chandrasekaran, V.; Grabosch, C.; Beiroth, F.; Lindhorst, T. K.; Röhl, C. Inhibition of Bacterial Adhesion to Live Human Cells: Activity and Cytotoxicity of Synthetic Mannosides. *FEBS Lett.* **2012**, 586 (10), 1459-1465.
- (9) Carrillo, M. Utilización de Lectinas En La Inhibición de La Adhesión de Pasteurella Multocida. *Rev. Med. Vet.* **2013**, 1 (25), 93-107.
- (10) Meinjohanns, E.; Meldal, M.; Paulsen, H.; A. Dwek, R.; Bock, K. Novel Sequential Solid-Phase Synthesis of N-Linked Glycopeptides from Natural Sources. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1998**, 1 (3), 549-560.
- (11) García, J. Síntesis de N-Glicopéptidos: Estudio de Los Cambios Conformacionales En La Cadena Peptídica Inducidos Por La N-Glicosilación Utilizando Oligosacáridos de D-Manosa., 2006.
- (12) Pinzon, S. M. Síntesis de N - Glucosilaminoácidos Empleando El Anhídrido Cíclico Del Ácido Propilfosfónico T3P<sup>®</sup> Como Agente Acoplante, 2016.
- (13) Hecht, S. *Bioorganic Chemistry Carbohydrates*; 1999.
- (14) Demchenko, A. V. General Aspects of the Glycosidic Bond Formation. In *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*; 2008; pp 1-27.
- (15) Demchenko, A. V. *Handbook of Chemical Glycosylation: Advances in Stereoselectivity and Therapeutic Relevance*; 2008.

- (16) Juaristi, E.; Cuevas, G. Recent Studies of the Anomeric Effect. *Tetrahedron* **1992**, 48 (24), 5019–5087.
- (17) Valeur, E.; Bradley, M. Amide Bond Formation: Beyond the Myth of Coupling Reagents. *Chem Soc Rev* **2009**, 38 (2), 606–631.
- (18) Lis, H.; Sharon, N. Protein Glycosylation: Structural and Functional Aspects. *Eur. J. Biochem.* **1993**, 218 (1), 1–27.
- (19) Kornfeld, R.; Kornfeld, S. Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* **1985**, 54 (1), 631–664.
- (20) Nisic, F.; Andreini, M.; Bernardi, A. Stereoselective Synthesis of N-Glycosyl Amino Acids by Traceless Staudinger Ligation of Unprotected Glycosyl Azides. *European J. Org. Chem.* **2009**, No. 33, 5744–5751.
- (21) Fritz, J. S.; Schenk, G. H. Acid-Catalyzed Acetylation of Organic Hydroxyl Groups. *Anal. Chem.* **1959**, 31 (11), 1808–1812.
- (22) Mohammed, A. I.; Jwad, R. S. Synthesis and NMR Study of Some Important Glucopyranosyl Derivatives. *J. Kerbala Univ.* **2011**, 9 (1), 42–48.
- (23) DeFerrari E., J. O.; Gros, G.; Mastronardi, I. O. Methylation of Carbohydrates Bearing Base-Labile Substituents, with Diazomethane-Boron Trifluoride Etherate II. A New Synthesis of Z-O-Methyl-D-Mannose It. **1967**, 22 (1966), 432–434.
- (24) Caglieri, S. C.; Macaño, H. R. Acetilación de Aminas Alifáticas y Aromáticas: Estudio Teórico. *Inf. Tecnol.* **2016**, 27 (2), 105–110.

## 62 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

- (25) Goebel, M.; Nothofer, H.; Rob, G.; Ugi, I. A Facile Synthesis of Per-O-Alkylated Glycono-6-lactones from Per-O-Alkylated Glycopyranosides and a Novel Ring Contraction for Pyranoses. *Tetrahedron* **1997**, 53 (9), 3123–3134.
- (26) Konstantinovi, S.; Predojevi, J.; Pavlovi, V.; Gojkovi, S.; Csanadi, J. SnCl<sub>4</sub> Induced Formation of C 7 -C 16 -Alkyl D-Glucopyranosides. *J. Serb Chem, Soc* **2001**, 66 (2), 65–71.
- (27) Mattson, B.; Foster, W.; Greimann, J.; Hoette, T.; Le, N.; Mirich, A.; Wankum, S.; Cabri, A.; Reichenbacher, C.; Schwanke, E. Heterogeneous Catalysis: The Horiuti-Polanyi Mechanism and Alkene Hydrogenation. *J. Chem. Educ.* **2013**, 90 (5), 613–619.
- (28) Pinzón, S. M.; Fierro, R.; Iregui, C. A.; Rivera, Z. J.; García, J. E. Novel Synthesis of N-Glycosyl Amino Acids Using T3P®: Propylphosphonic Acid Cyclic Anhydride as Coupling Reagent. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2017**.
- (29) Joullié, M. M.; Lassen, K. M. Evolution of Amide Bond Formation. **2010**, 2010 (viii), 189–250.
- (30) Rákosi, K.; Szolomájer-Csikós, O.; Kalmár, L.; Szurmai, Z.; Kerékgyártó, J.; Tóth, G. K. Synthesis of N-Glycopeptides Applying Glycoamino Acid Building Blocks with a Combined Fmoc/Boc Strategy. *Protein Pept. Lett.* **2011**, 18 (7), 679–683.
- (31) Urge, L.; Kollat, E.; Hollosi, M.; Laczko, I.; Wroblewski, K.; Thurin, J.; Otvos Jr., L. Solid-Phase Synthesis of Glycopeptides: Synthesis of N-Alpha-Fluorenylmethoxycarbonyl L-Asparagine N-Beta-Glycosides. *Tetrahedron Lett.*

- 1991**, 32 (29), 3445–3448.
- (32) Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 39 (1), 301–312.
- (33) Waghmare, A. A.; Hindupur, R. M.; Pati, H. N. Propylphosphonic Anhydride (T3P<sup>®</sup>): An Expedient Reagent for Organic Synthesis. *Rev. J. Chem.* **2014**, 4 (2), 53–131.
- (34) Lundt, B. F.; Johansen, N. L.; Volund, A.; Markussen, J. Removal of T-Butyl and t-Butoxycarbonyl Protecting Groups with Trifluoroacetic Acid. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, 12, 258–268.
- (35) Sureshbabu, V. V.; Narendra, N. Protection Reactions. In *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*; 2011; Vol. 4, p 86.
- (36) J. Afacan, N.; T.Y. Yeung, A.; M. Pena, O.; E.W. Hancock, R. Therapeutic Potential of Host Defense Peptides in Antibiotic-Resistant Infections. *Curr. Pharm. Des.* **2012**, 18 (6), 807–819.
- (37) Giuliani, A.; Pirri, G.; Nicoletto, S. F. Antimicrobial Peptides: An Overview of a Promising Class of Therapeutics. *Cent. Eur. J. Biol.* **2007**, 2 (1), 1–33.
- (38) Fjell, C. D.; Hiss, J. A.; Hancock, R. E. W.; Schneider, G. Designing Antimicrobial Peptides: Form Follows Function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2012**, 11 (1), 37–51.
- (39) Varki, A. Biological Roles of Oligosaccharides: All of the Theories Are Correct. *Glycobiology* **1993**, 3 (2), 97–130.

## 64 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

---

- (40) Tomita, M.; Takase, M.; Bellamy, W.; Shimamura, S. A Review: The Active Peptide of Lactoferrin. *Pediatr. Int.* **1994**, 36 (5), 585–591.
- (41) Huertas, N. D. J.; Jenny, Z.; Monroy, R.; Medina, R. F. 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 (987), 3–11.
- (42) Hao, Y.; Yang, N.; Teng, D.; Wang, X.; Mao, R.; Wang, J. A Review of the Design and Modification of Lactoferricins and Their Derivatives. *BioMetals* **2018**, 31 (3), 331–341.
- (43) Rodríguez, V.; Román, J. T. J. T.; Fierro, R.; Rivera, Z. J. Z. J.; García, J. E. J. E. Hydrazine Hydrate\_ A New Reagent for Fmoc Group Removal in Solid Phase Peptide Synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2019**, 60 (1), 48–51.
- (44) Rodríguez, V.; Pineda, H.; Ardila, N.; Insuasty, D.; Cárdenas, K.; Román, J.; Urrea, M.; Ramírez, D.; Fierro, R.; Rivera, Z.; et al. Efficient Fmoc Group Removal Using Diluted 4-Methylpiperidine: An Alternative for a Less-Polluting SPPS-Fmoc/TBu Protocol. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2019**, 4–6.
- (45) Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Anal. Biochem.* **1981**, 117 (1), 147–157.
- (46) Insuasty, D.; Pineda, H.; Rodríguez, A. V.; García, J.; Mauricio, M.; Fierro, R.; Rivera, Z. J. Synthetic Peptide Purification via Solid-Phase Economical , Fast, and Efficient

Methodology. *Molecules* **2019**, *24*, 1215.

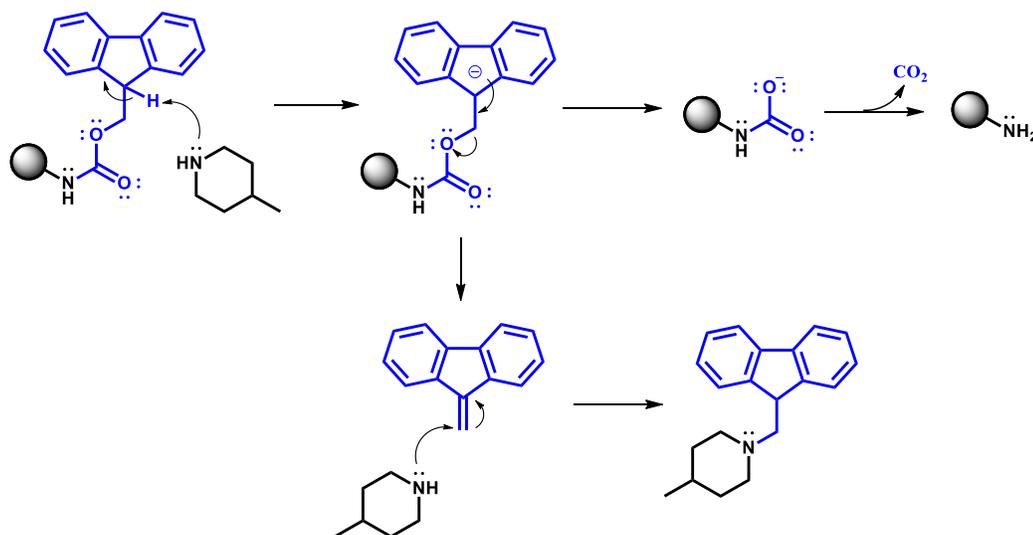
- (47) León-Calvijo, M. A.; Leal-Castro, A. L.; Almanzar-Reina, G. A.; Rosas-Pérez, J. E.; García-Castañeda, J. E.; Rivera-Monroy, Z. J. Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against *Escherichia Coli* ATCC 25922 and *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–8.
- (48) CLSI. M45. *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria ; Proposed Guideline*; 2015; Vol. 35.
- (49) Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, Ninth Edit.*; 2012.
- (50) Arendrup, M. C.; Meletiadis, J.; Mouton, J. W.; Lagrou, K.; Petr Hamal, H.; Guinea, J. Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for Yeasts. **2017**, No. January.
- (51) Grupo de micosis humanas, U. J. *Procedimiento Operativo Estándar (POE). Determinación Concentración Mínima Inhibitoria de Sustancias Con Potencial Fungicida Frente a Candida SPP*; 2012.
- (52) María, J.; Mora, S. *Nuevos Reactivos Poliméricos Para El Acoplamiento y Protección de Aminoácidos*; 2002.

## **Anexo A: Mecanismos de reacción involucrados en la síntesis de péptidos en fase sólida empleando la estrategia Fmoc/tBu**

La síntesis de péptidos en fase sólida está conformada por los siguientes pasos: (i) La remoción del grupo Fmoc presente en la resina y en los residuos que se van incorporando a la secuencia peptídica, (ii) La activación del aminoácido por formación de un éster y (iii) El acople del aminoácido activado en la secuencia peptídica creciente. Los mecanismos más aceptados para cada uno de estos pasos se exponen a continuación.

### **i. Remoción del grupo Fmoc**

El grupo Fmoc es removido en un medio básico débil por una reacción de Beta-eliminación en donde la base remueve el protón terciario del grupo fluorenil y por un rearrreglo de electrones en donde la carga deslocalizada en el sistema aromático forma un doble enlace y se obtiene el grupo amino libre, el dibenzofulveno (DBF) y CO<sub>2</sub> como subproductos de la reacción. El DBF reacciona con otro mol de la base por una adición de Michael, para formar un aducto DBF-base que es soluble y puede ser eliminado por filtración.



## ii. Activación del aminoácido

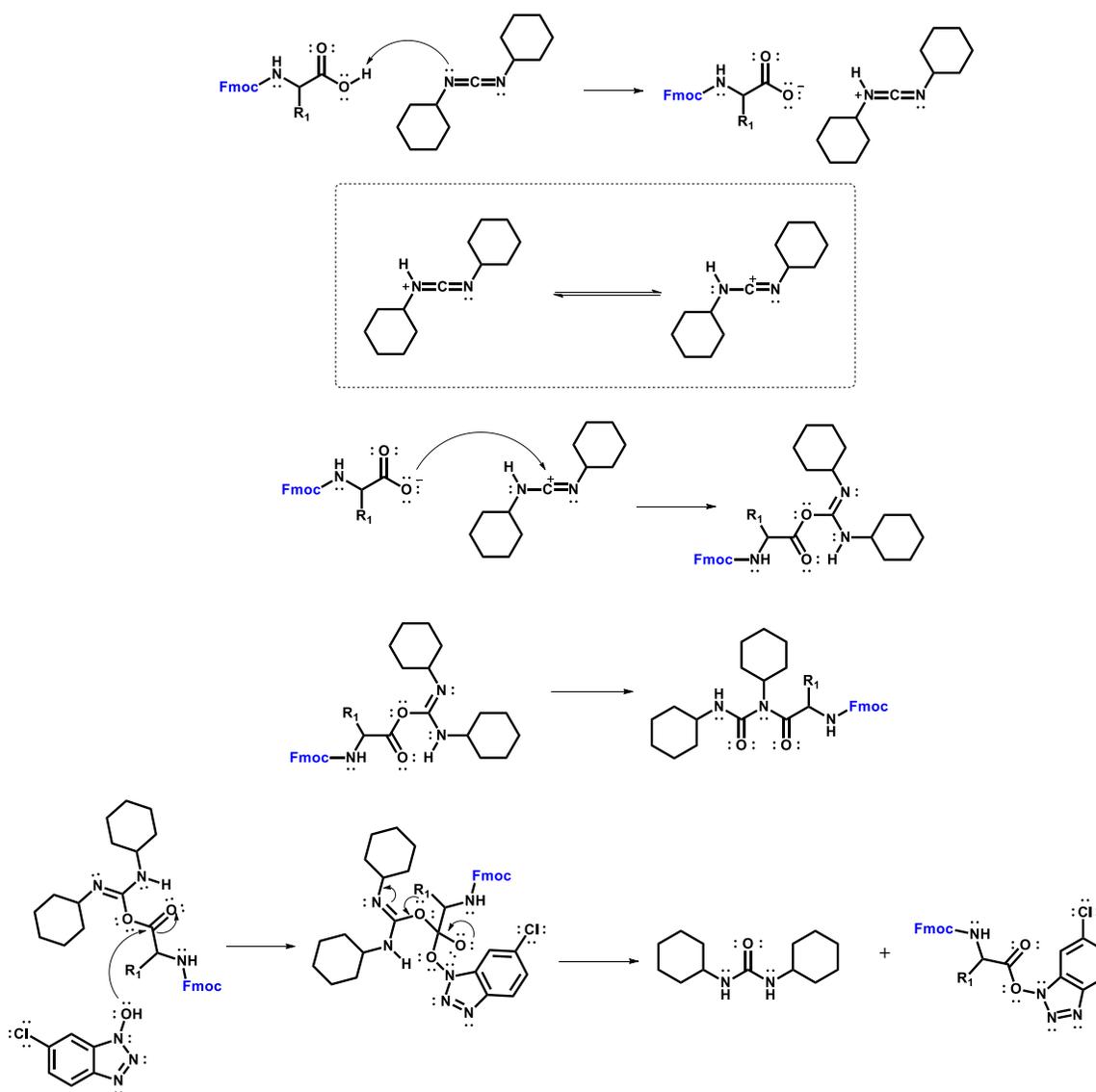
El mecanismo de activación a través de carbodiimidas implica en primer lugar la transferencia de un protón para formar un par iónico intermedio, seguido de la edición del ácido carboxílico, lo que da lugar a una O-acilurea. Este intermediario es muy reactivo y puede sufrir varios procesos:

- Ataque del nitrógeno de una amina para formar la amida correspondiente
- Reordenamiento para dar lugar a la N-acilurea, que no es reactiva, y es un factor de la disminución en el rendimiento del acoplamiento final.
- Reacción con otra molécula de ácido carboxílico, lo que conduce al anhídrido simétrico

Si el ácido carboxílico es un  $\alpha$ -aminoácido con un grupo N-carboxamido, como benzoilo o acetilo, o carbamato, la O-acilurea puede sufrir ciclación intramolecular para dar lugar a una 5(4H)-oxazolona. Las 5(4H)-oxazolonas pueden tautomerizar al enol, a través del cual se provoca un incremento en los niveles de racemización.

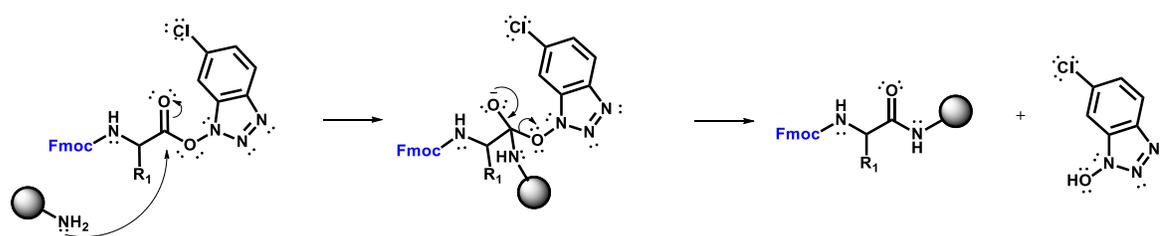
## 68 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

La O-acilisourea se puede atrapar con un nucleófilo, generalmente derivado de hidroxilamina, (HOBt), para generar los correspondientes ésteres activados que suelen ser menos reactivos, pero más estables. Además, la utilización de aditivos derivados de hidroxilamina presenta como principales ventajas el incremento en el rendimiento final del acoplamiento, así como la reducción en los niveles de racemización<sup>52</sup>.



iii. Acople del aminoácido

La formación del enlace peptídico se da por una adición nucleofílica al acilo en donde el nitrógeno de la amina ataca al carbono carbonílico del éster activado.

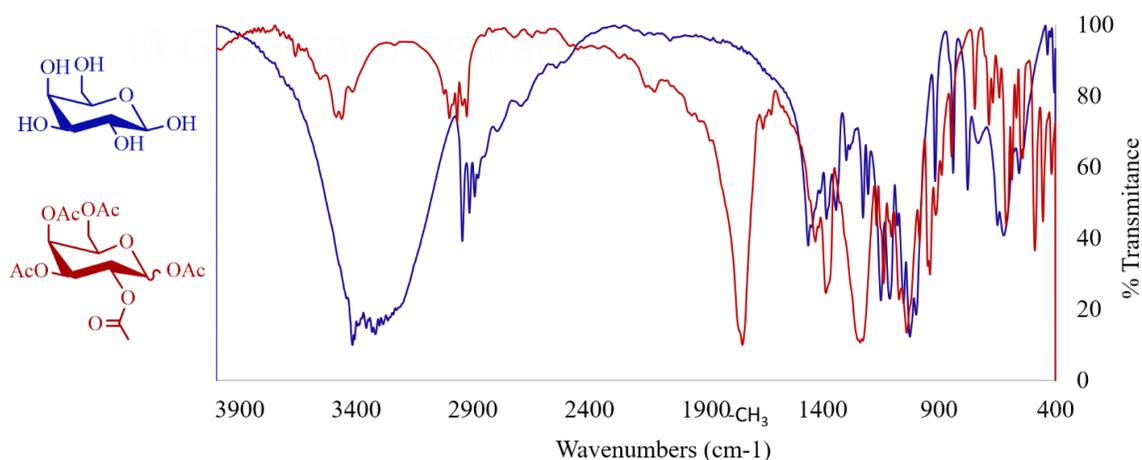




## Anexo B: Monitoreo de reacciones para la obtención de Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu.

Monitoreo de reacciones por espectroscopia infrarrojo para la obtención de Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu. En rojo se muestra el espectro del precursor y en azul el producto de reacción.

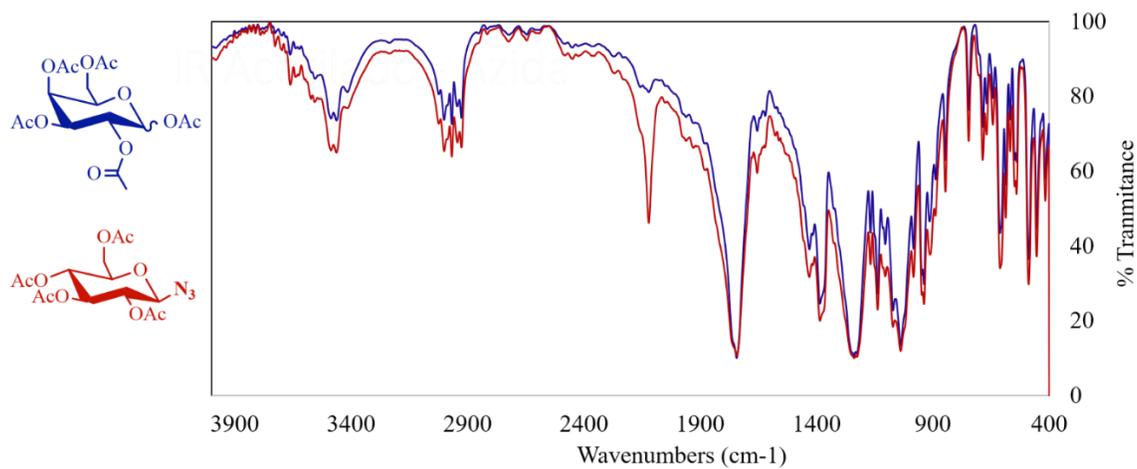
### i. Monitoreo de la síntesis de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil- $\alpha$ -D-glucopiranososa por IR.



Wavenumbers (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional
3350	-OH
2999	-CH <sub>3</sub>
1742	C=O
1238	O-(CO)-CH <sub>3</sub>

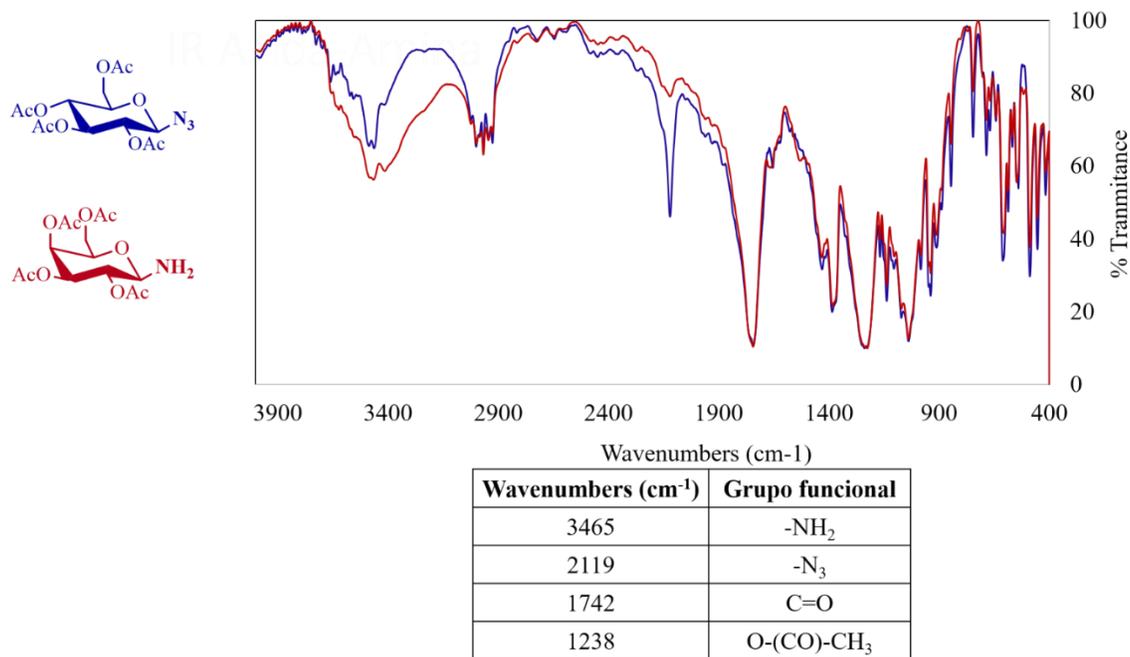
### ii. Monitoreo de la síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosilazida por IR.

## 72 Síntesis de N-glucopeptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

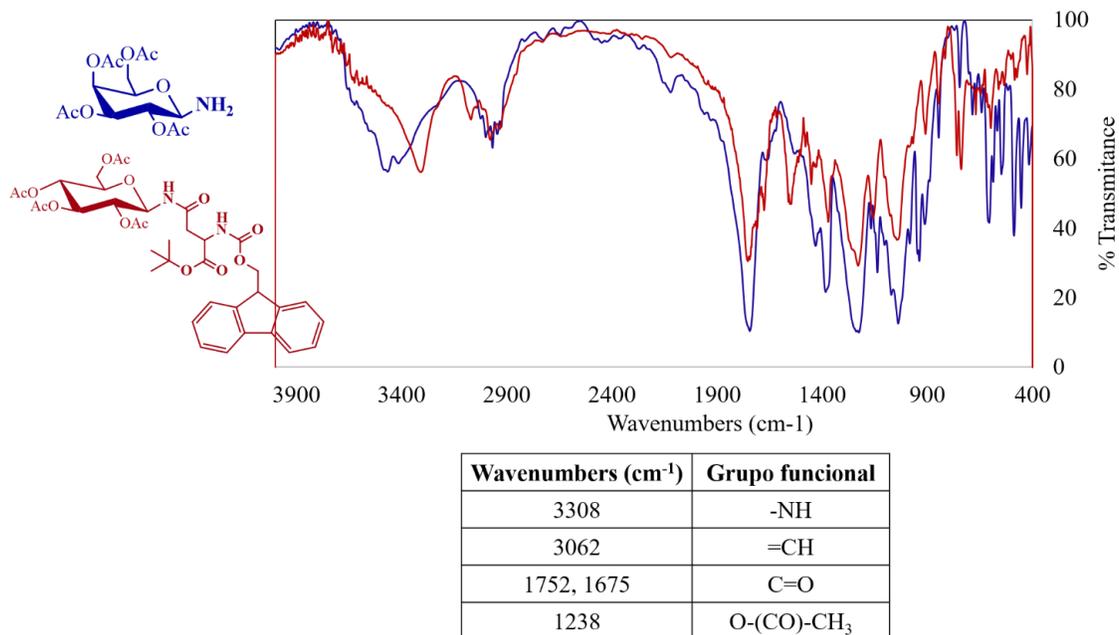


Wavenumbers (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional
2999	-CH <sub>3</sub>
2119	-N <sub>3</sub>
1742	C=O
1238	O-(CO)-CH <sub>3</sub>

iii. Monitoreo de la síntesis de 2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glicopiranosilamina por IR.

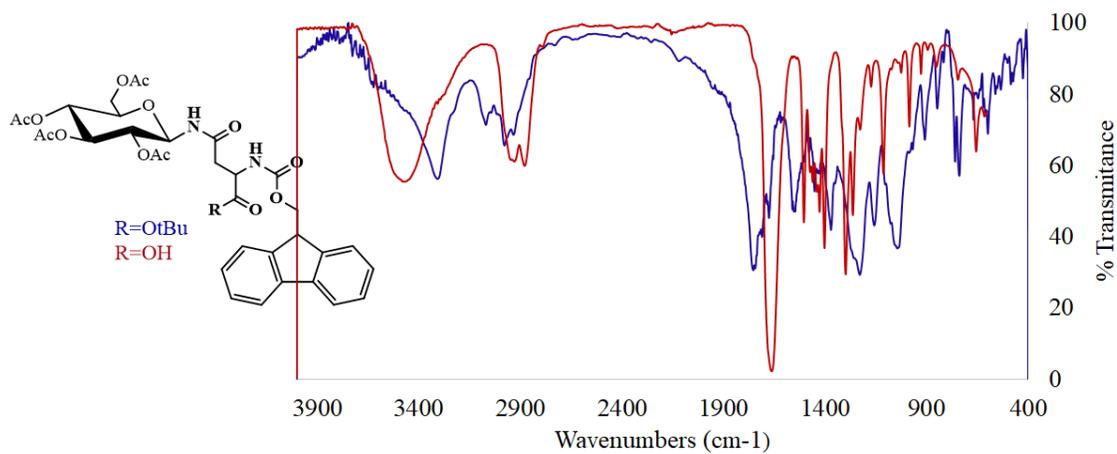


iv. Monitoreo de la síntesis de Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu por IR.



## 74 Síntesis de N-glucopeptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

### v. Monitoreo de la síntesis de Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OH por IR.



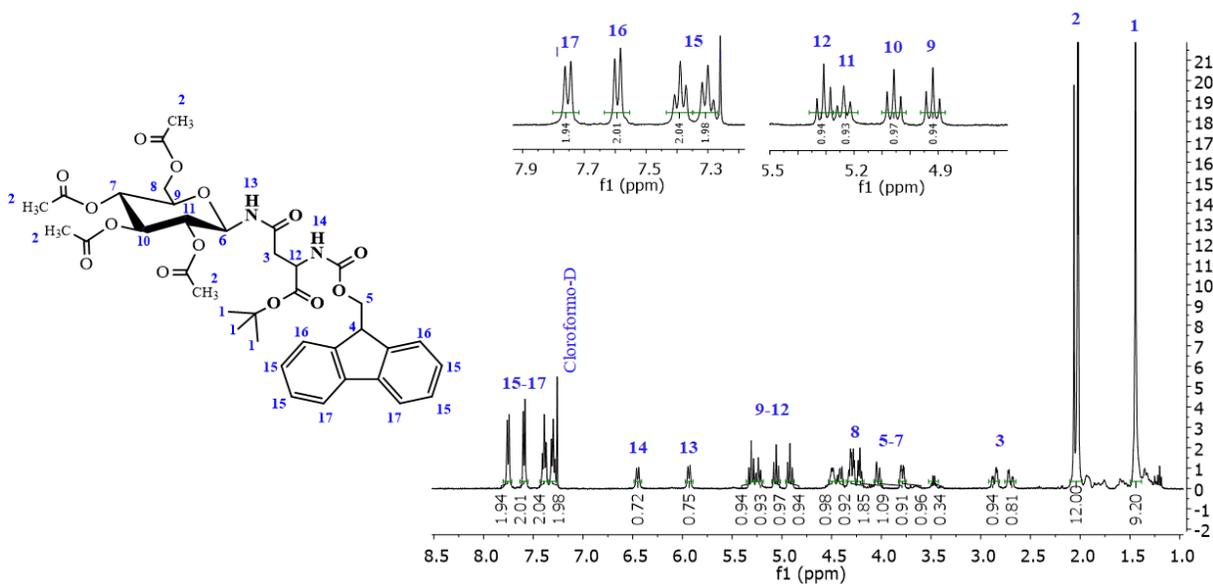
Wavenumbers (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional
3479	-OH
1662	C=O
1289	O-(CO)-CH <sub>3</sub>

## Anexo C: Caracterización RMN de (4) Y (5) Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu/OH

A continuación, se muestran los espectros de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , APT, HSQC, HMBC y COSY para Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu (4) y el Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OH (5) con sus respectivas asignaciones.

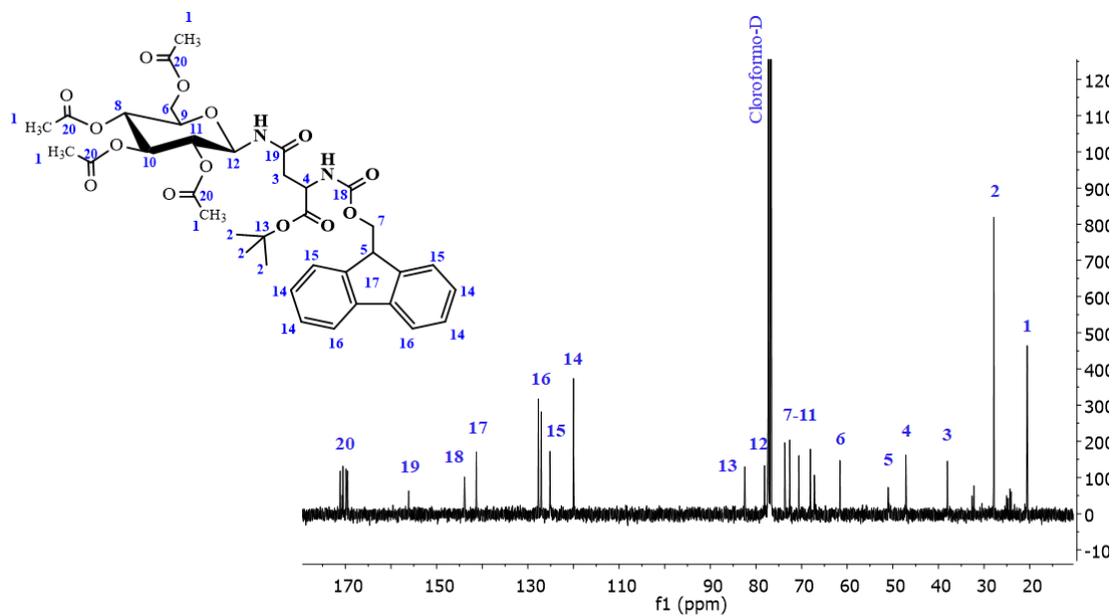
### a. Caracterización RMN de Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu (4)

#### i. $^1\text{H}$ -RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu. (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )

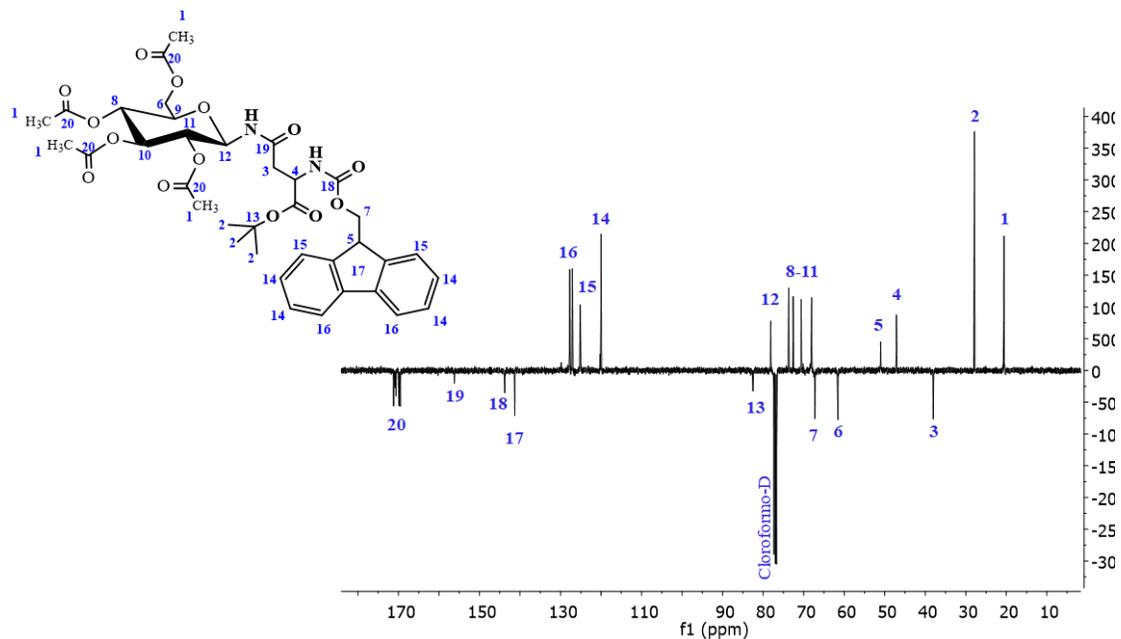


## 76 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

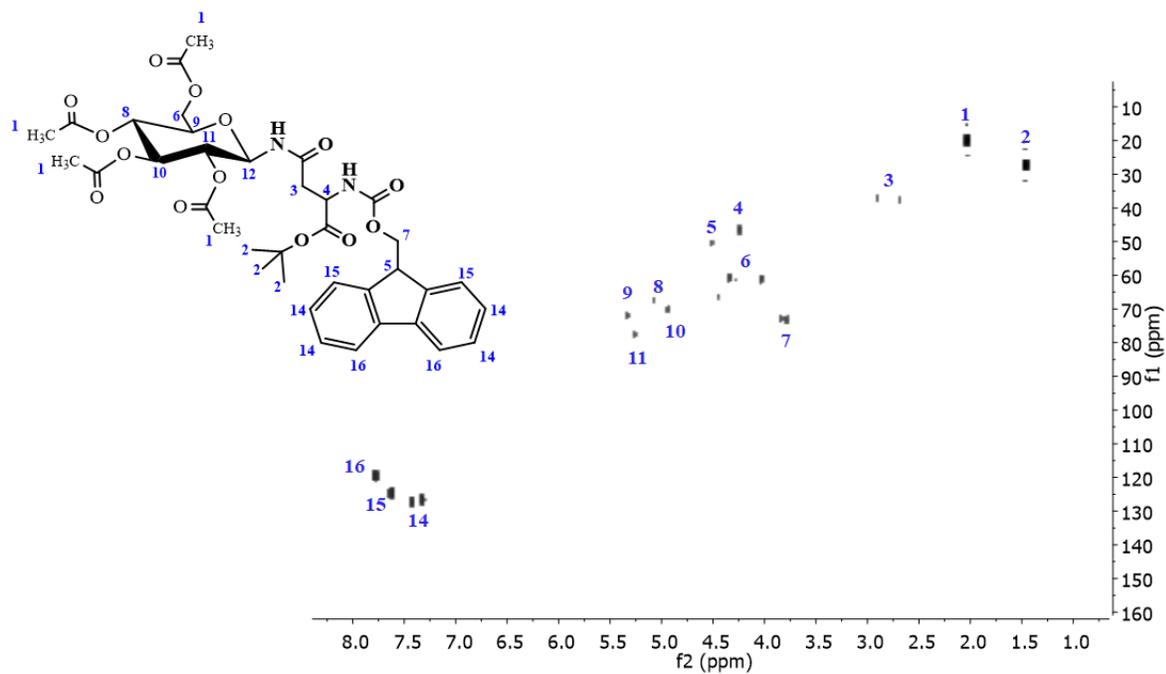
ii.  $^{13}\text{C}$ -RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu. (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



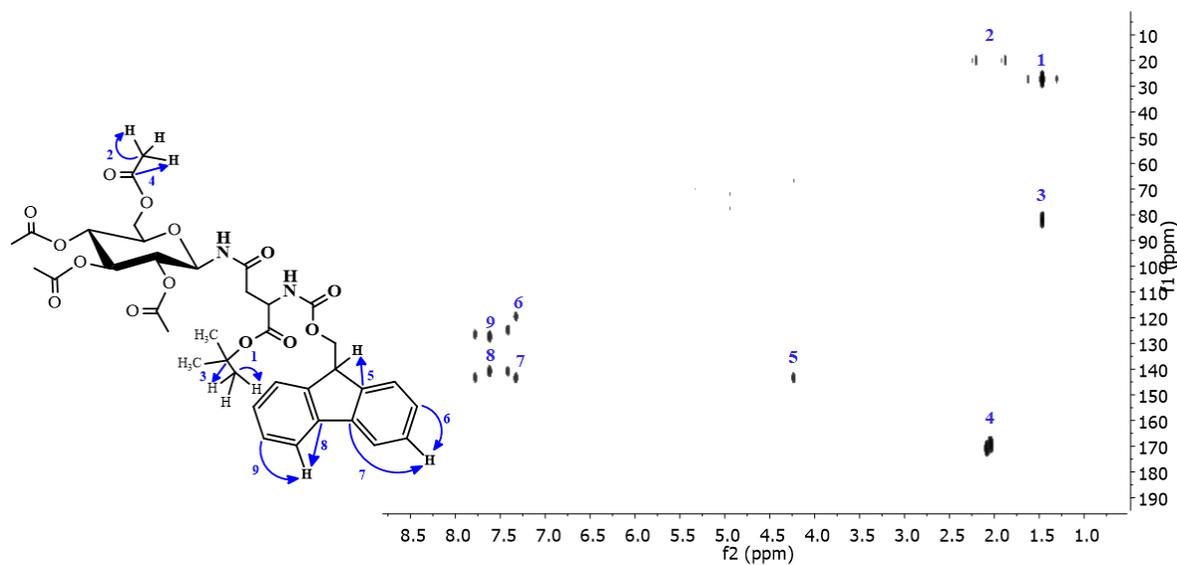
iii. APT-RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetyl-D-glucopiranosil)-OtBu. ( $\text{CDCl}_3$ )



iv. HSQC-RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu. (CDCl<sub>3</sub>)

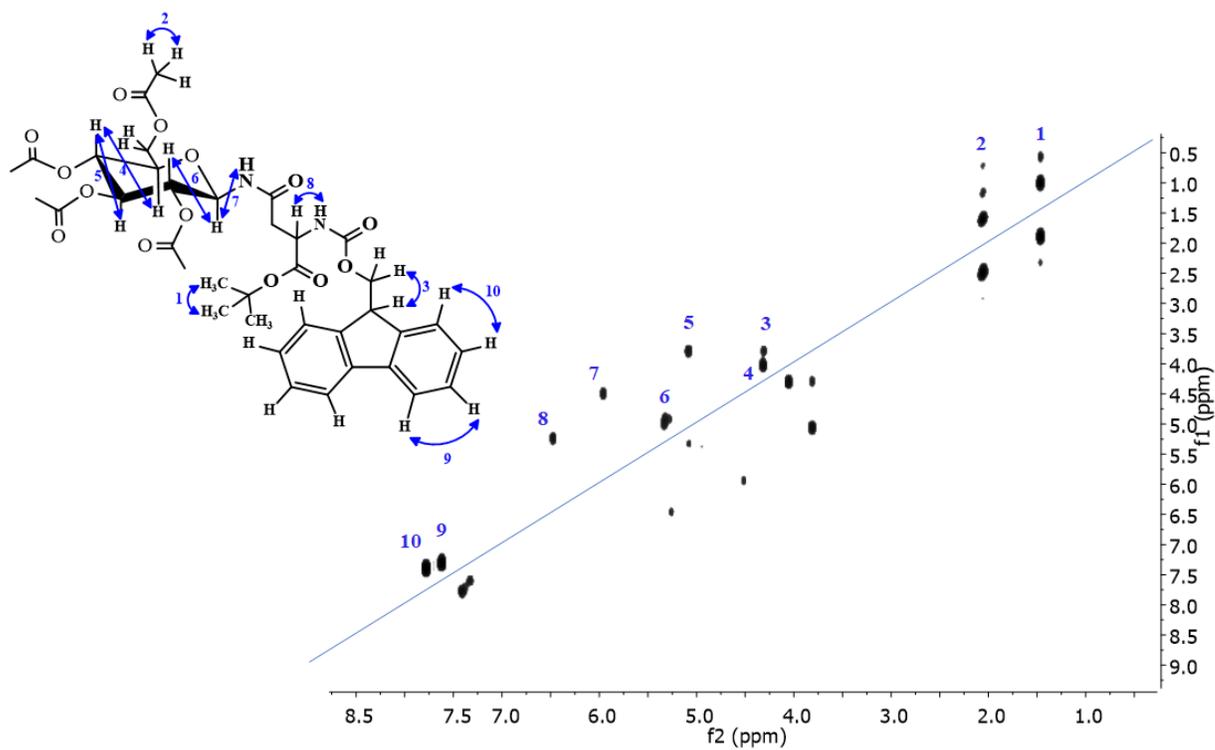


v. HMBC-RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu. (CDCl<sub>3</sub>)



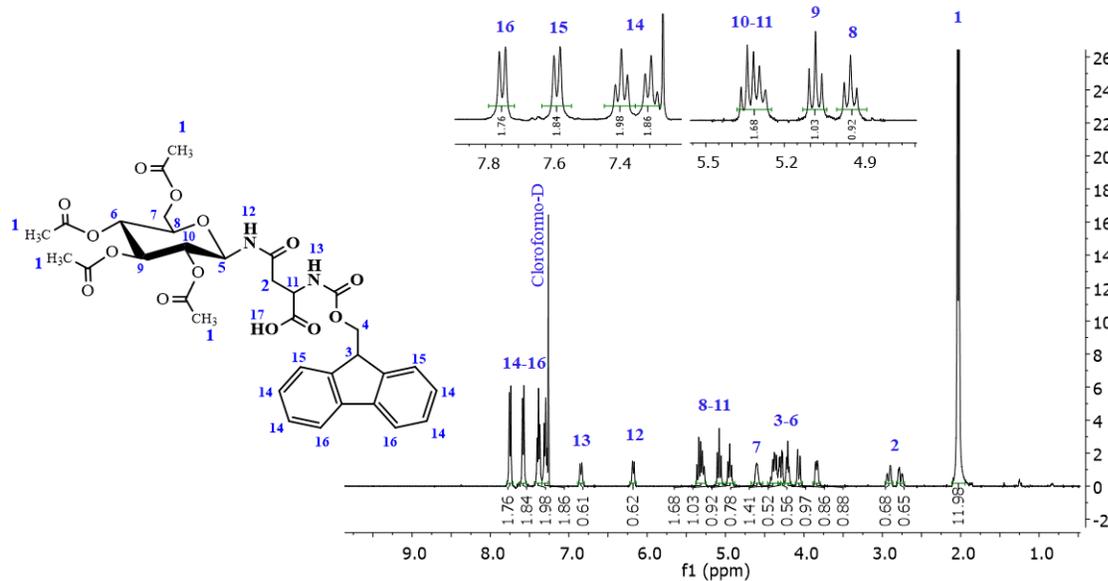
## 78 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

### vi. COSY-RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OtBu. (CDCl<sub>3</sub>)

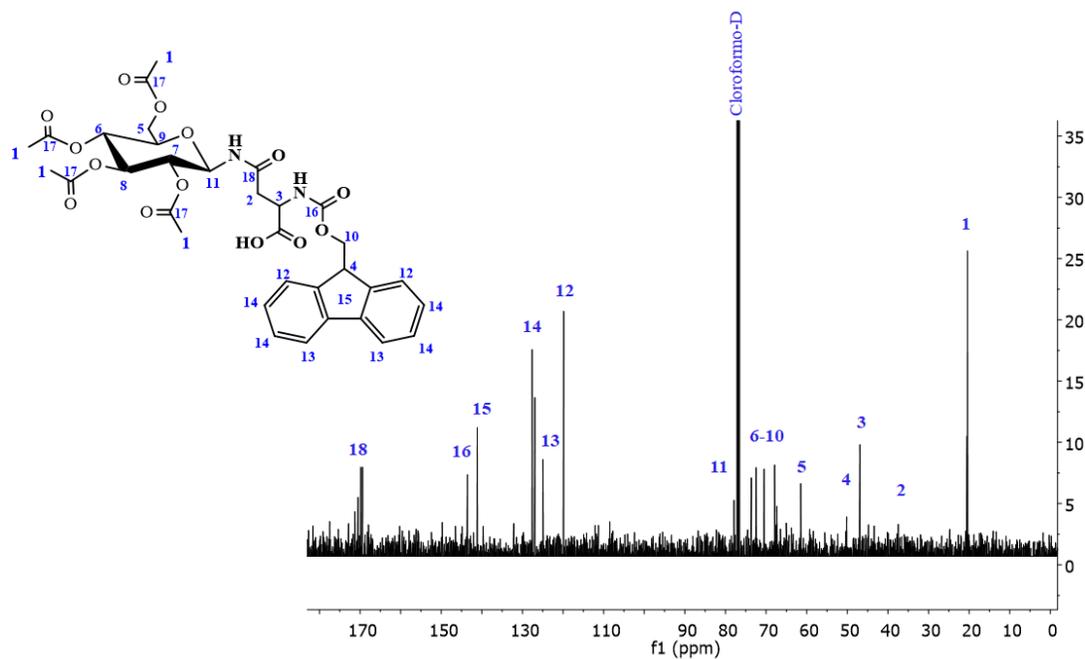


b. Caracterización RMN de Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OH (5)

i.  $^1\text{H}$ -RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OH. (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

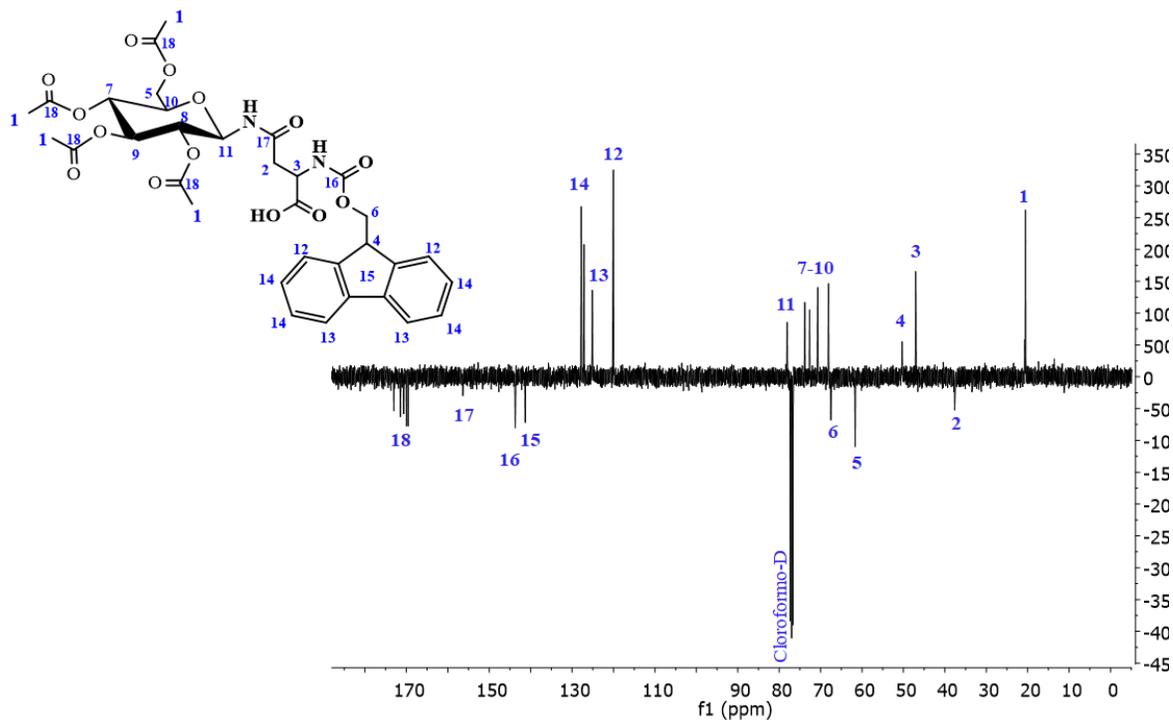


ii.  $^{13}\text{C}$ -RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OH. (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

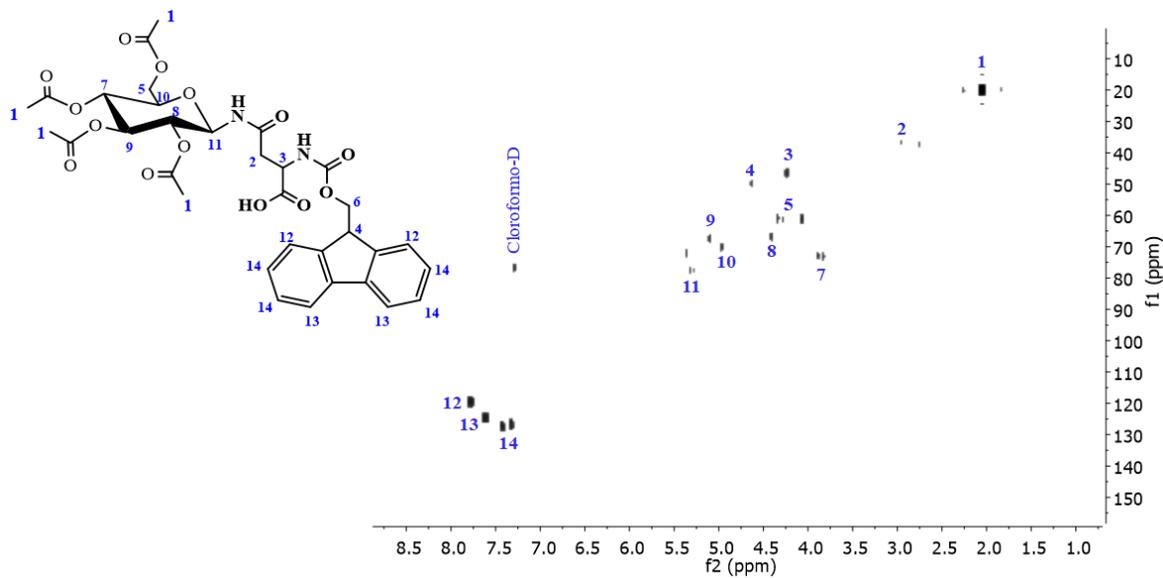


## 80 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

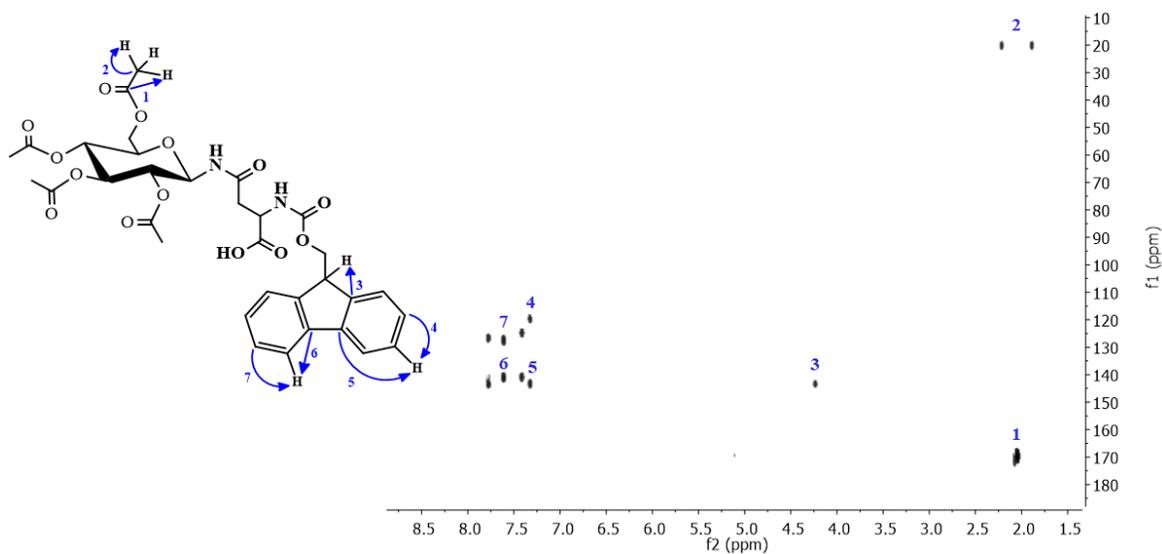
### iii. APT-RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OH. (CDCl<sub>3</sub>)



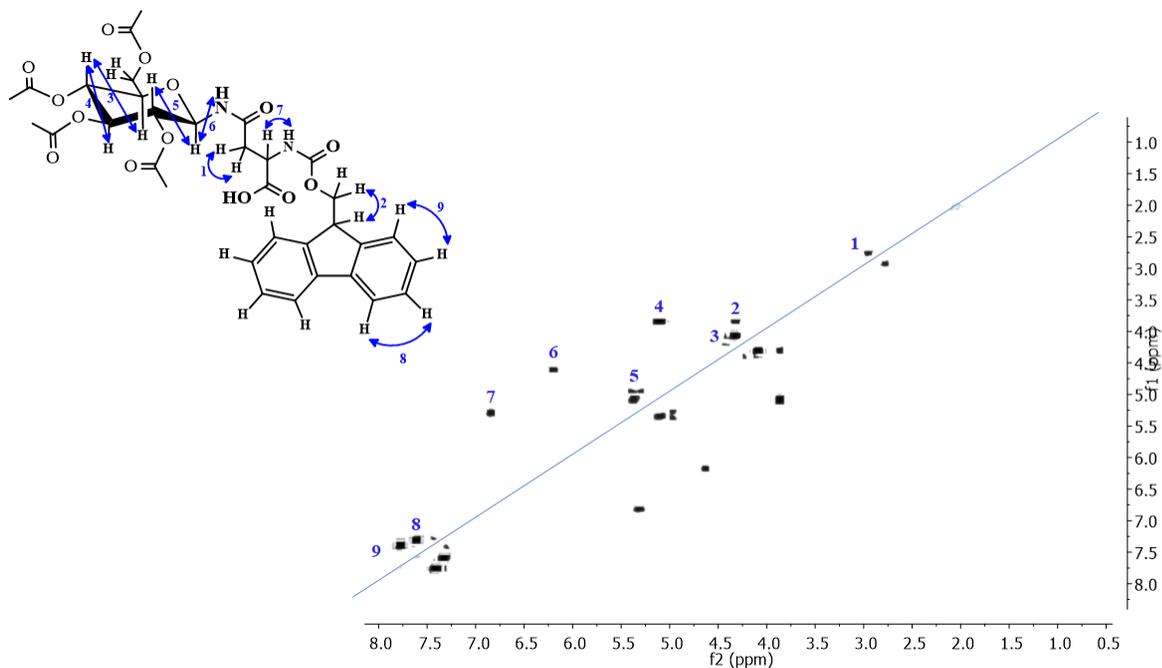
### iv. HSQC-RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OH. (CDCl<sub>3</sub>)



v. HMBC-RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OH. ( $\text{CDCl}_3$ )

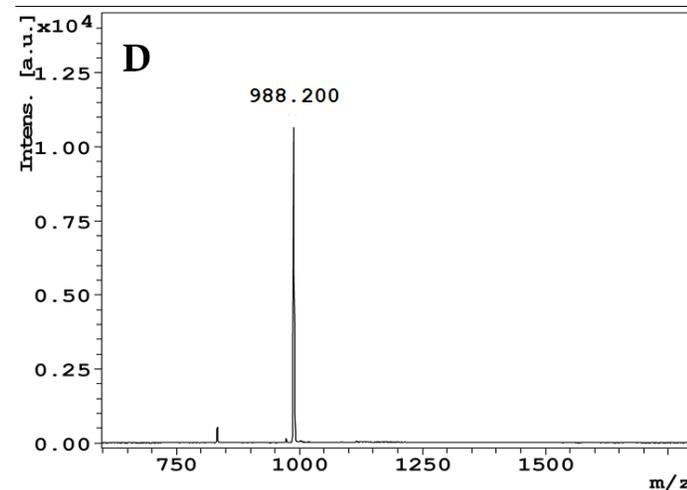
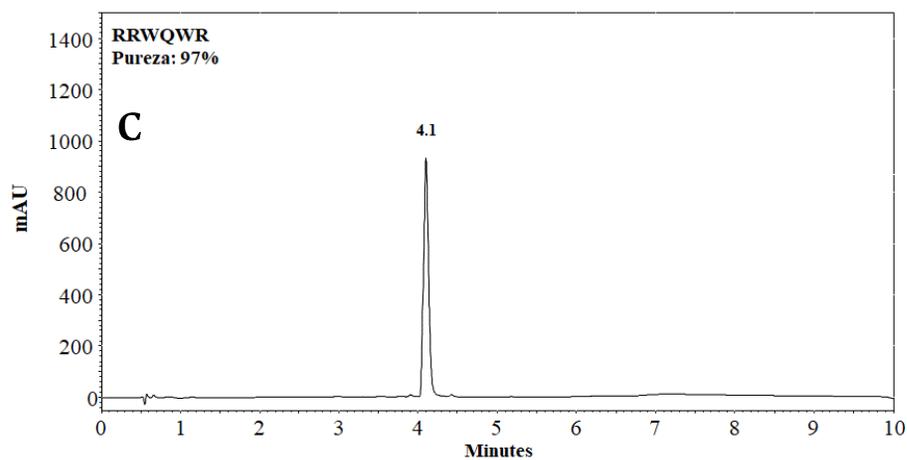
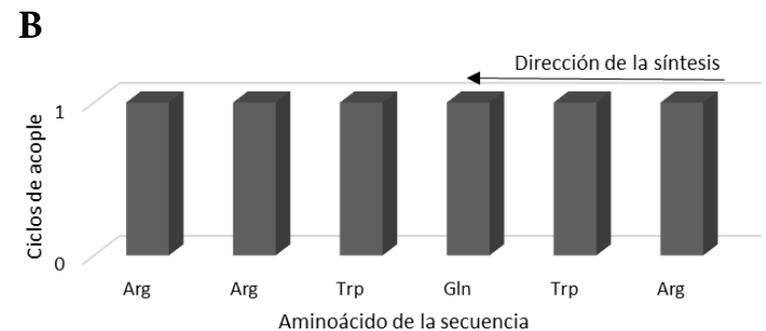
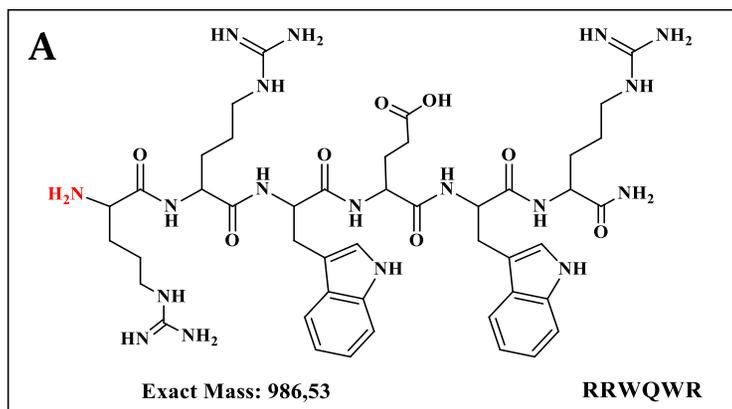


vi. COSY-RMN Fmoc-Asn- $\beta$ (2,3,4,6-tetra-O-Acetil-D-glucopiranosil)-OH. ( $\text{CDCl}_3$ )



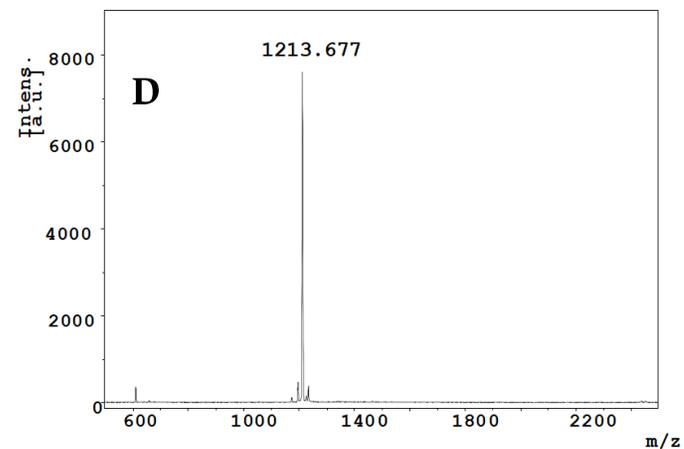
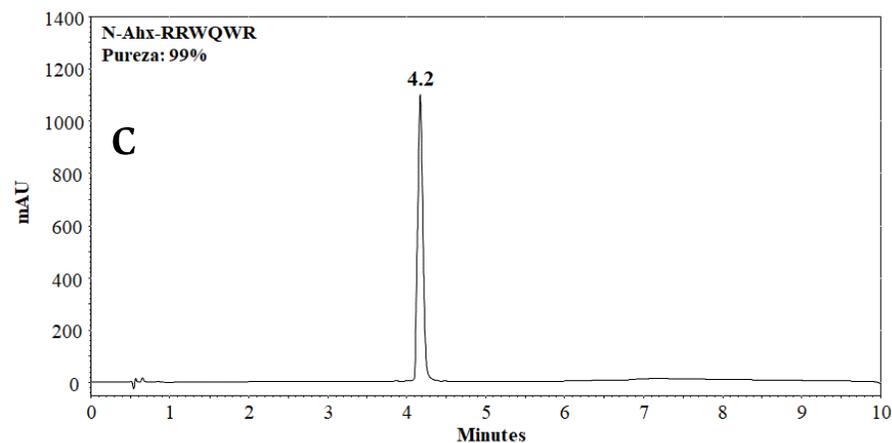
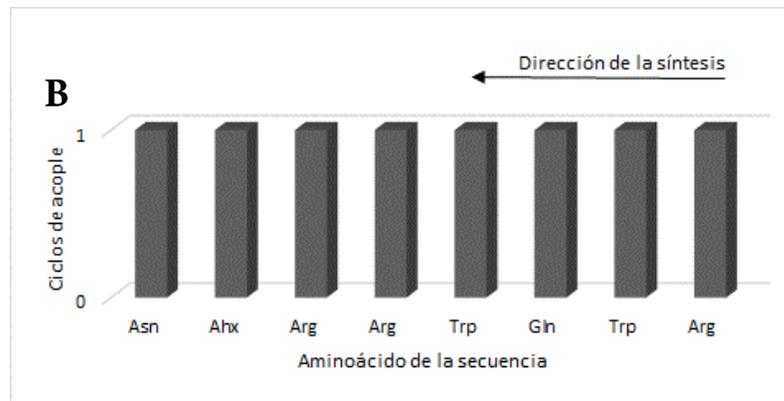
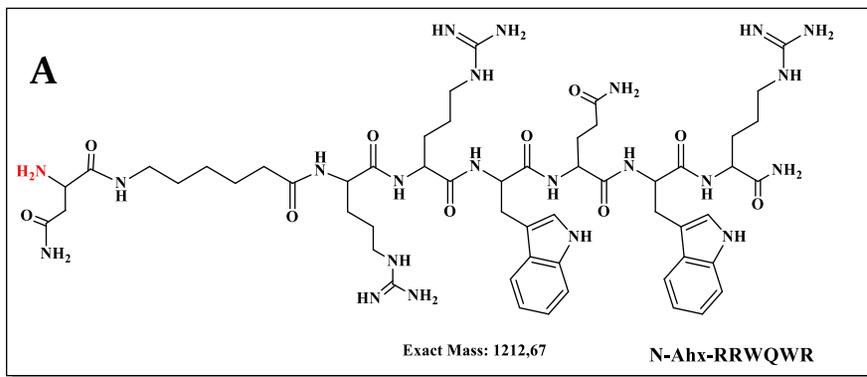
## **Anexo D: Síntesis y caracterización de los péptidos.**

A continuación, se muestran los resultados de la síntesis y caracterización de los péptidos obtenidos en este proyecto. La información está distribuida de la siguiente manera: Panel A. Código, estructura y secuencia del péptido. Panel B. Comportamiento de síntesis, número de ciclos de acoplos necesarios en la inserción de cada uno de los aminoácidos presentes en la secuencia. Panel C. Perfil cromatográfico del producto obtenido después de la purificación. Panel D. Espectro de masas del péptido puro.

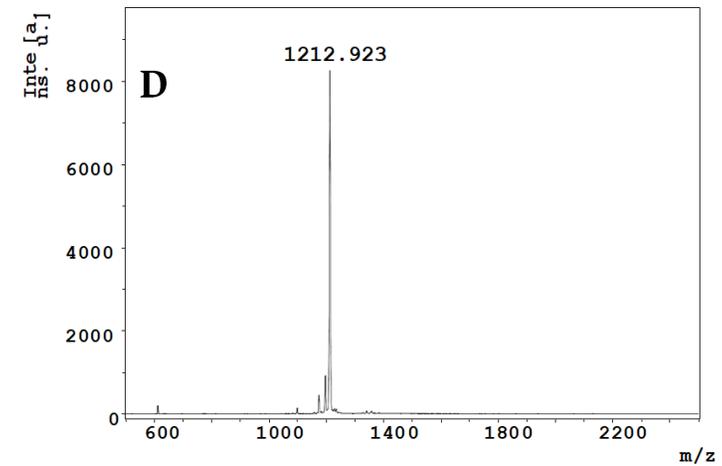
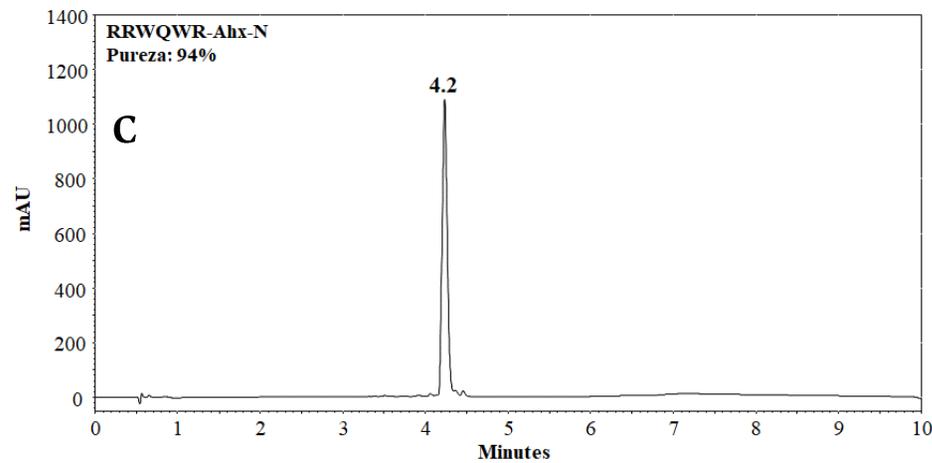
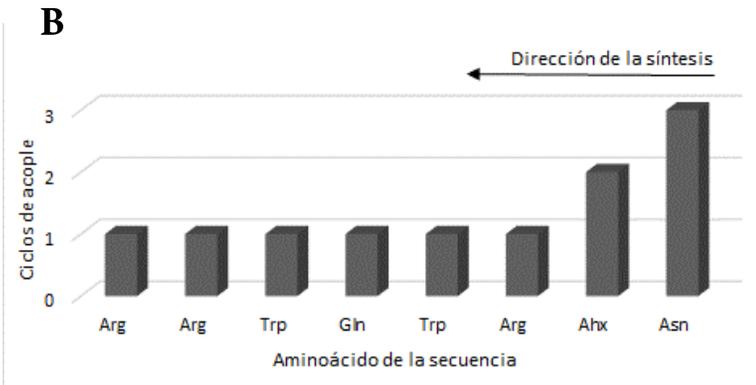
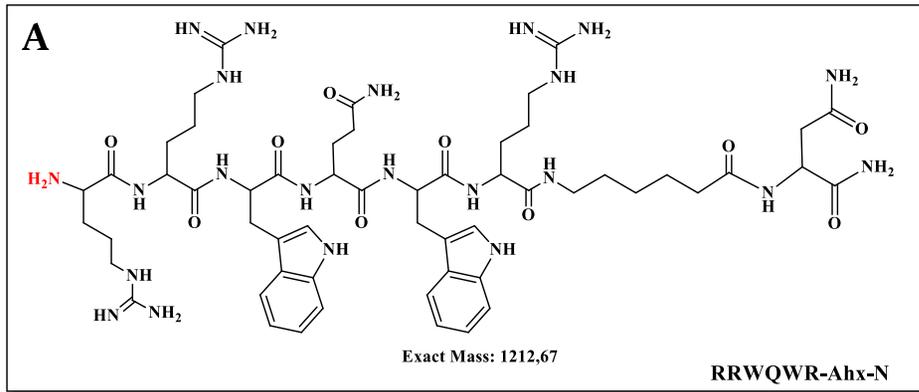


Reporte de síntesis RRWQWR A. Estructura y masa teórica B. Comportamiento de síntesis C. Cromatograma producto puro D. Espectro de masas MALDI-TOF.

# 84 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

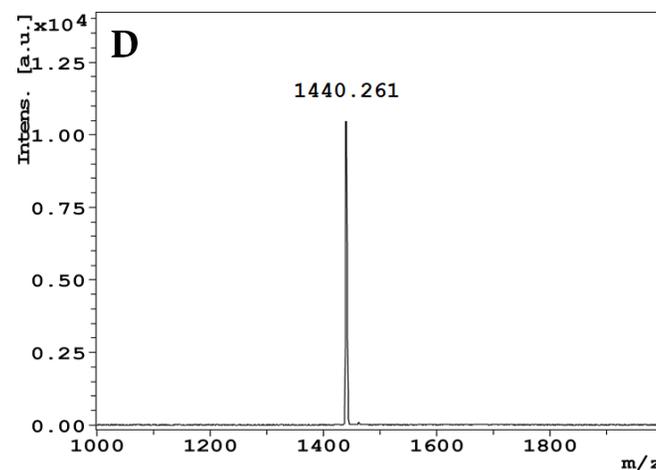
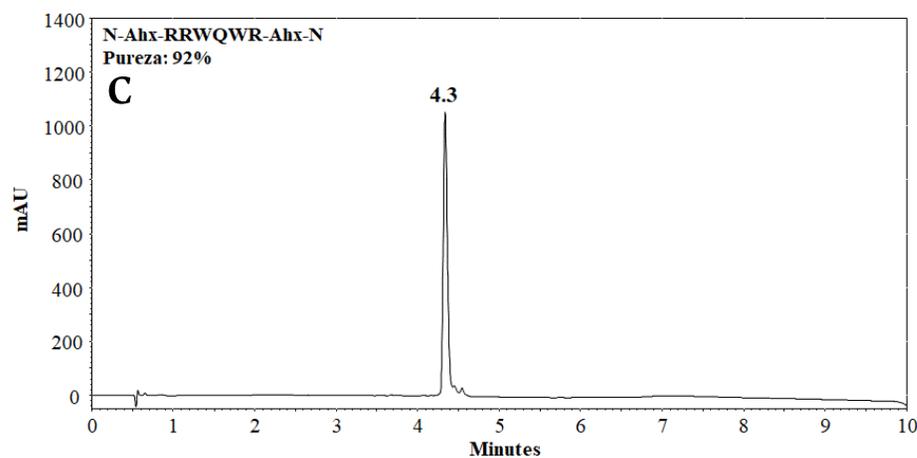
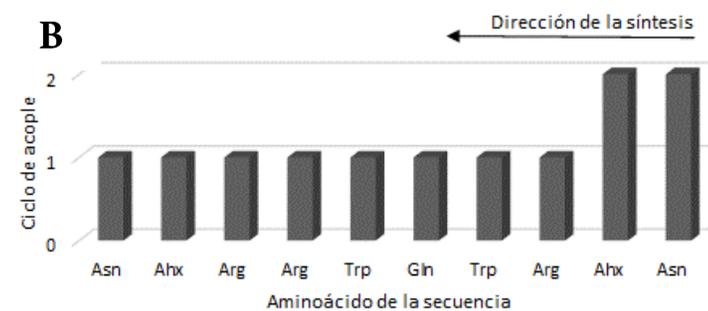
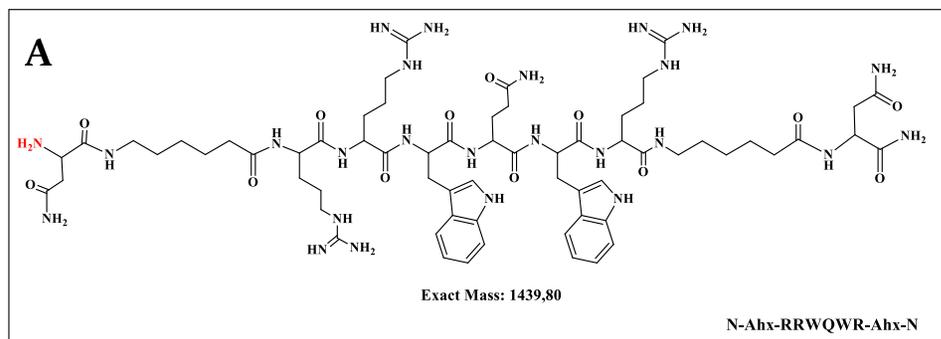


Reporte de síntesis N-Ahx-RRWQWR A. Estructura y masa teórica B. Comportamiento de síntesis C. Cromatograma producto puro D. Espectro de masas MALDI-TOF.

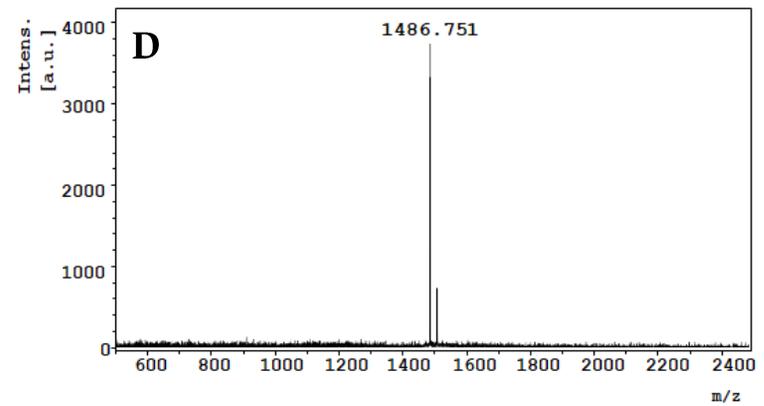
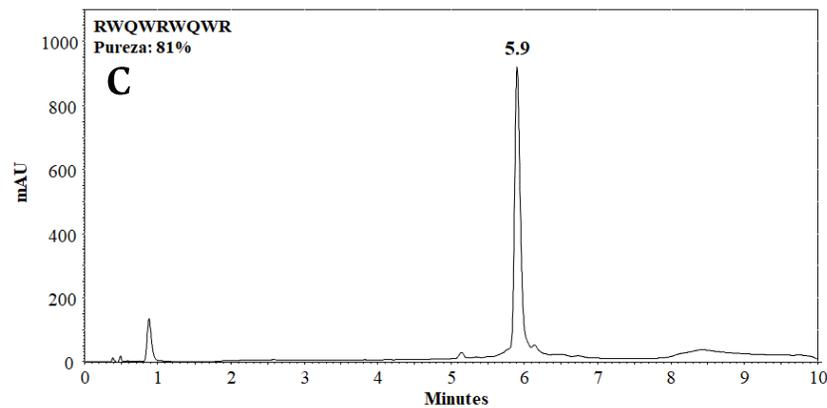
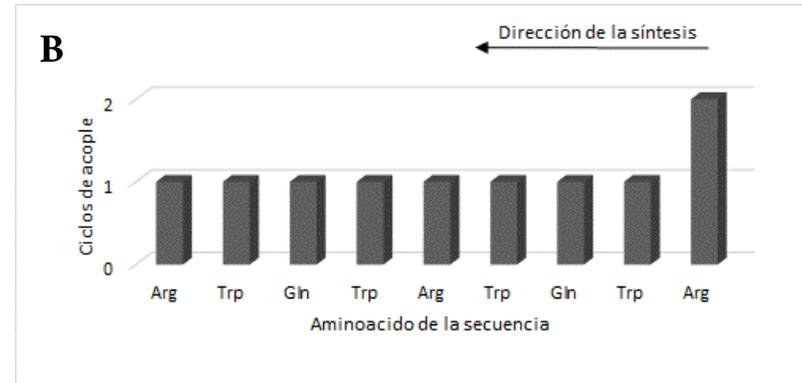
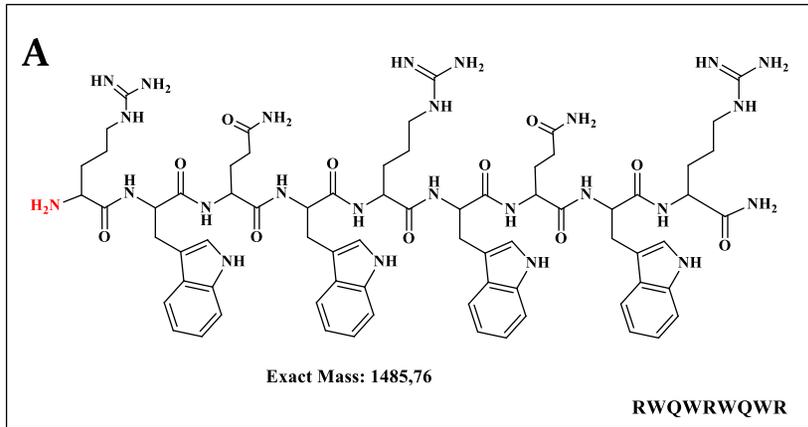


Reporte de síntesis RRWQWR-Ahx-N **A.** Estructura y masa teórica **B.** Comportamiento de síntesis **C.** Cromatograma producto puro **D.** Espectro de masas MALDI-TOF.

86 Síntesis de N-glucopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

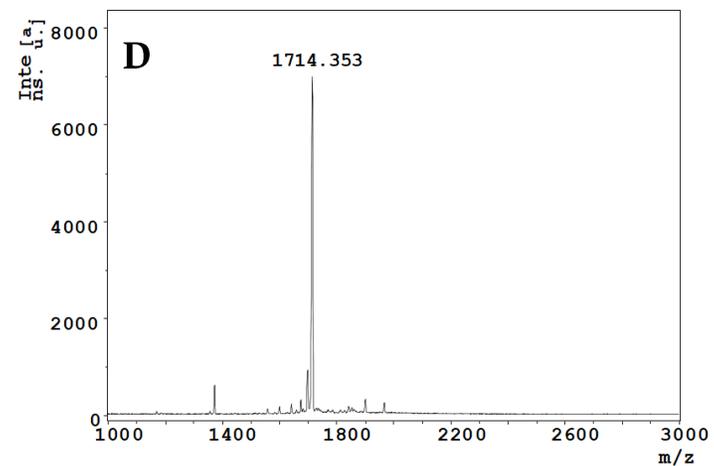
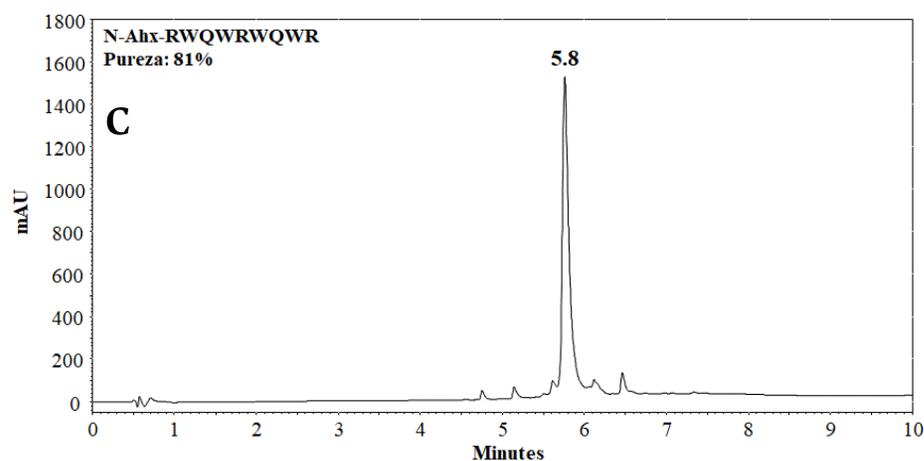
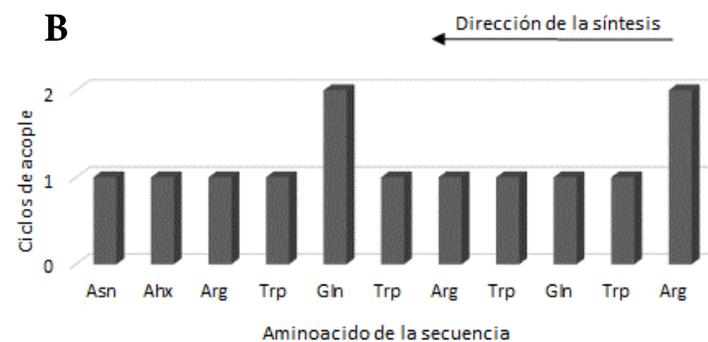
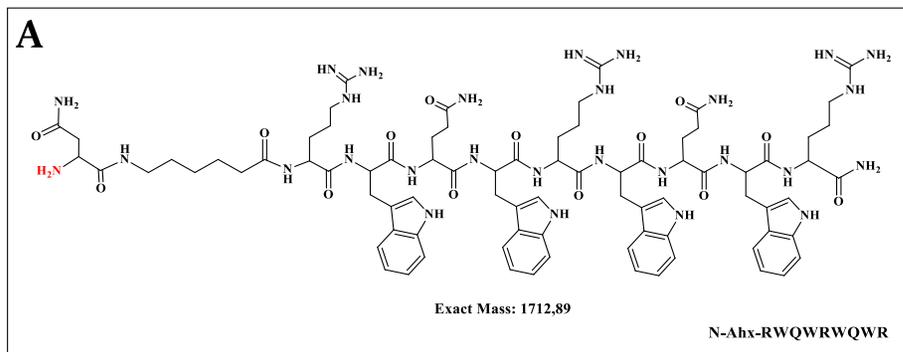


Reporte de síntesis N-Ahx-RRWQWR-Ahx-N A. Estructura y masa teórica B. Comportamiento de síntesis C. Cromatograma producto puro D. Espectro de masas MALDI-TOF.

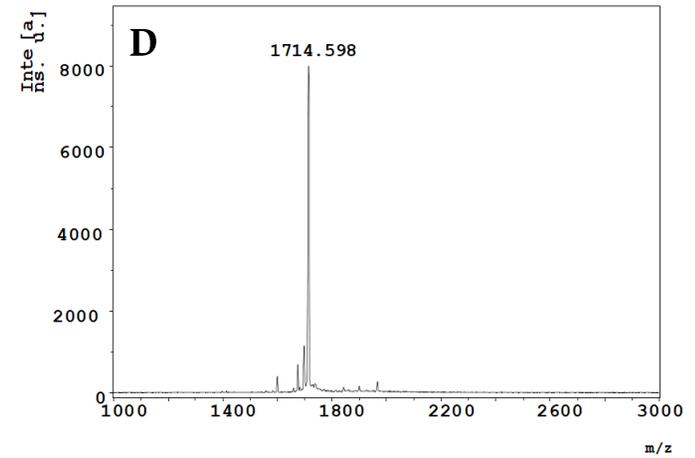
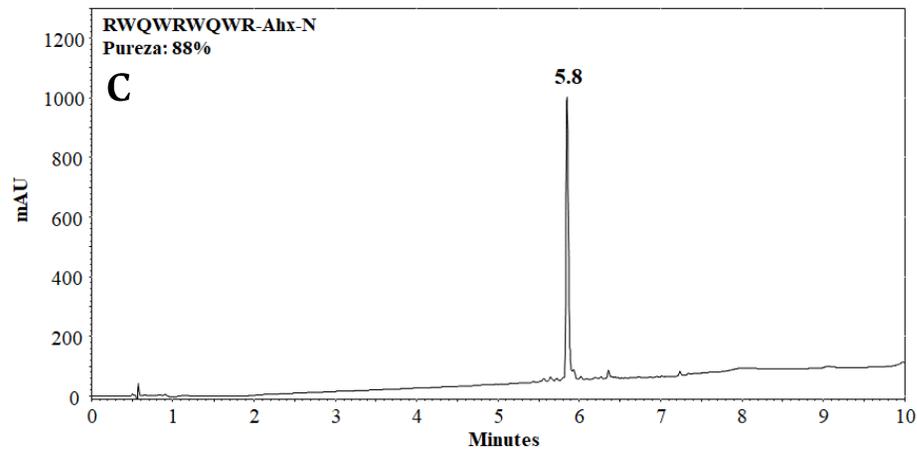
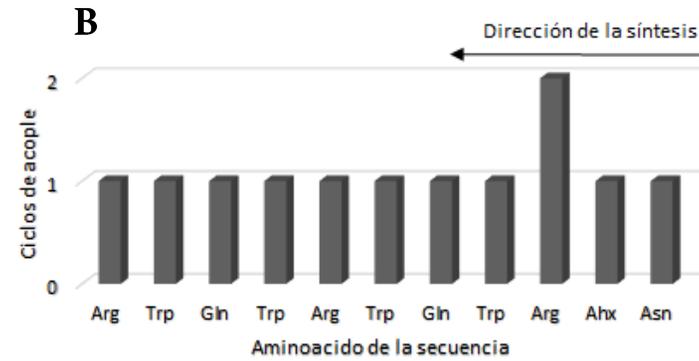
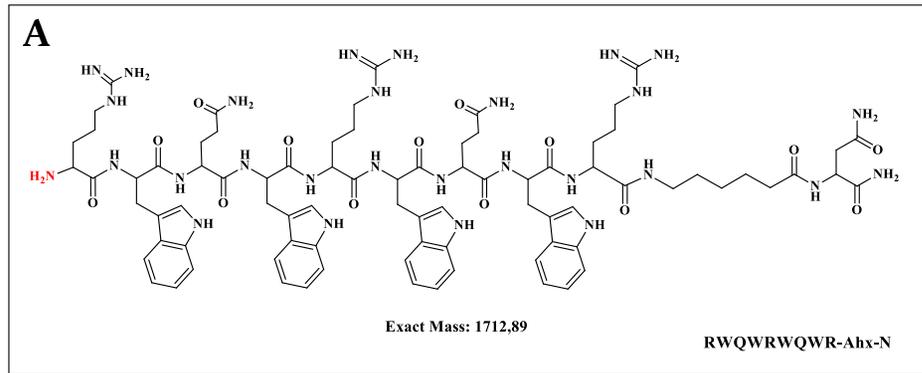


Reporte de síntesis RWQWRWQWR A. Estructura y masa teórica B. Comportamiento de síntesis C. Cromatograma producto puro D. Espectro de masas MALDI-TOF.

# 88 Síntesis de N-glucopeptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

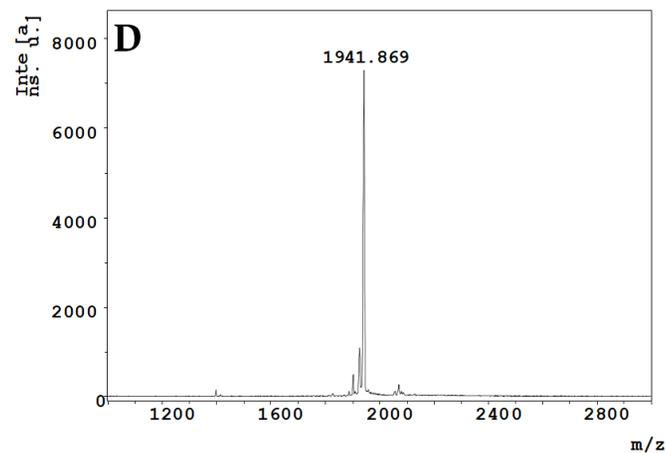
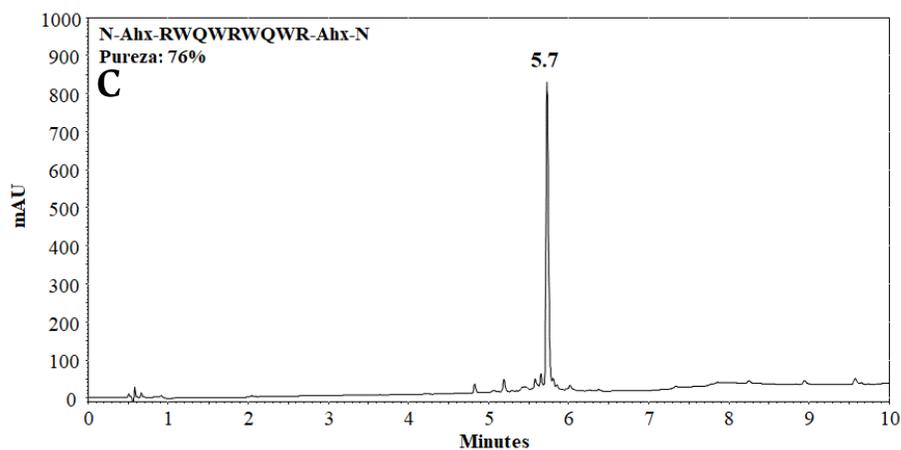
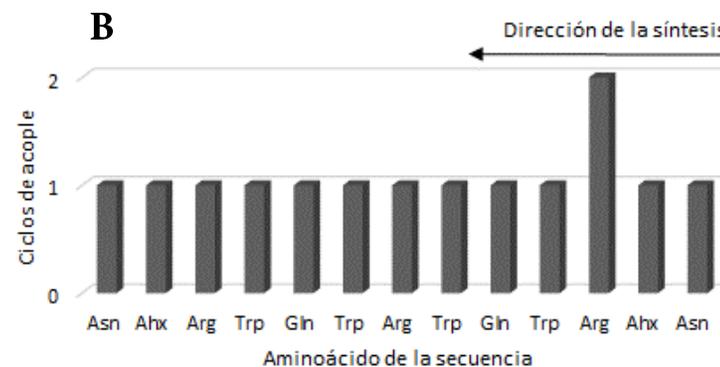
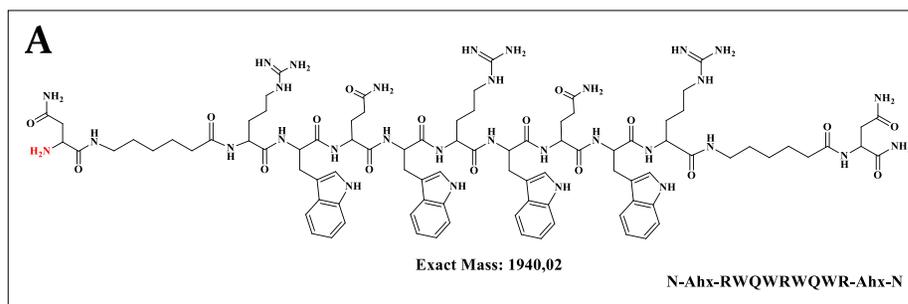


Reporte de síntesis N-Ahx-RWQWRWQWR **A.** Estructura y masa teórica **B.** Comportamiento de síntesis **C.** Cromatograma producto puro **D.** Espectro de masas MALDI-TOF.



Reporte de síntesis RWQWRWQWR-Ahx-N **A.** Estructura y masa teórica **B.** Comportamiento de síntesis **C.** Cromatograma producto puro **D.** Espectro de masas MALDI-TOF.

# 90 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

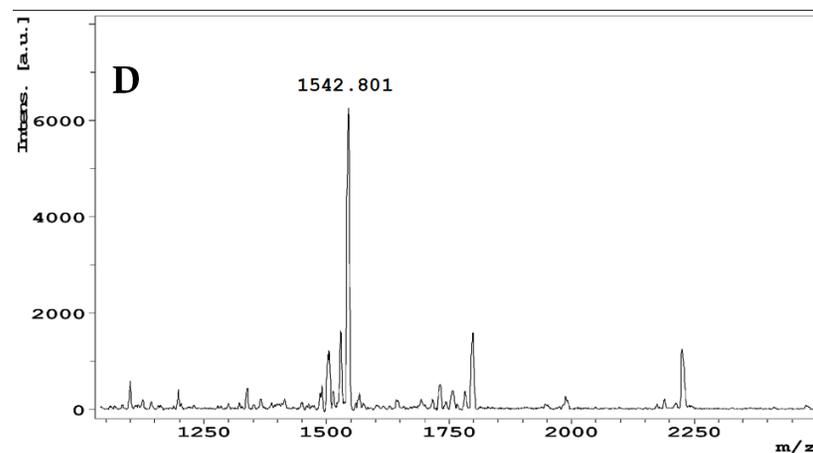
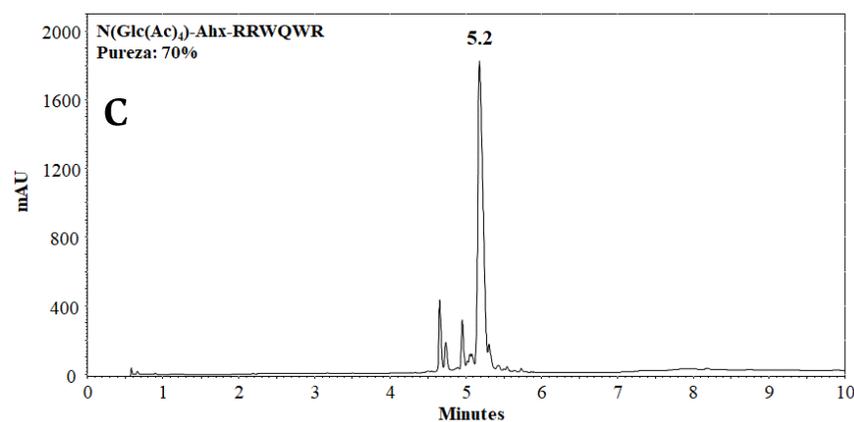
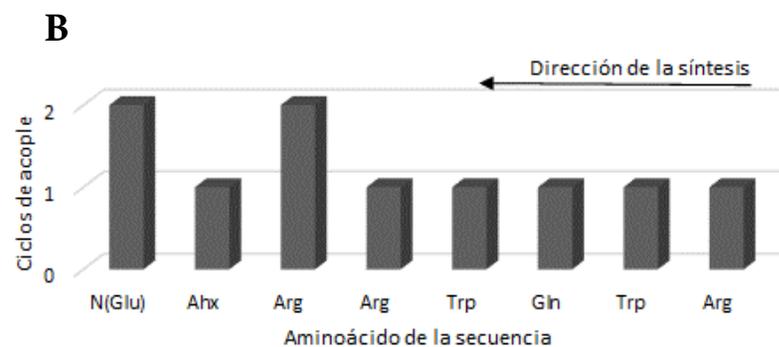
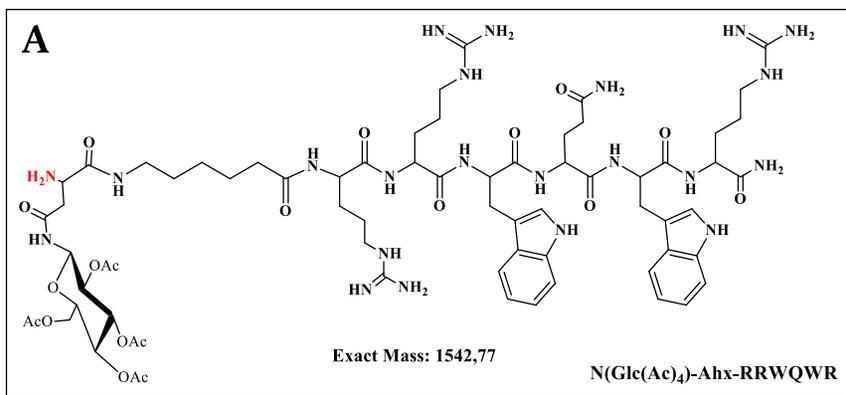


Reporte de síntesis N-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N **A.** Estructura y masa teórica **B.** Comportamiento de síntesis **C.** Cromatograma producto puro **D.** Espectro de masas MALDI-TOF.

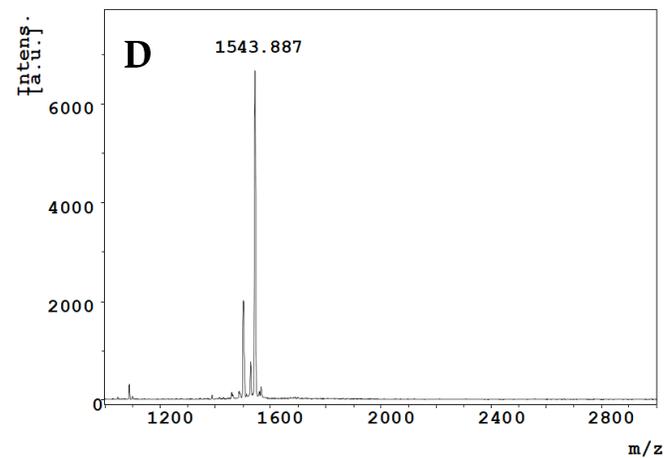
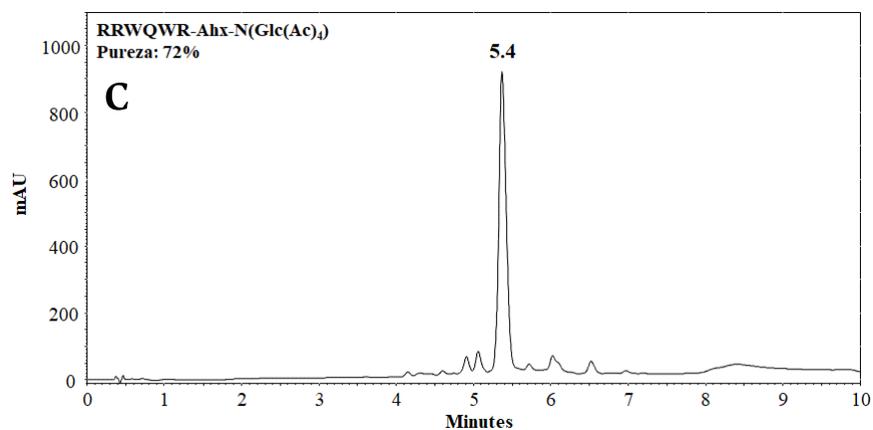
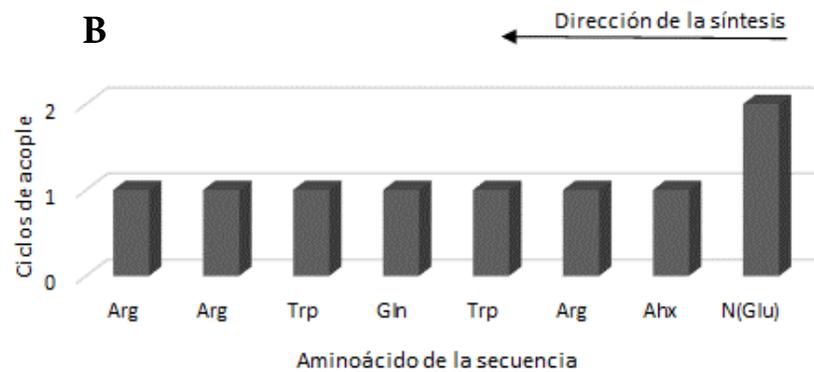
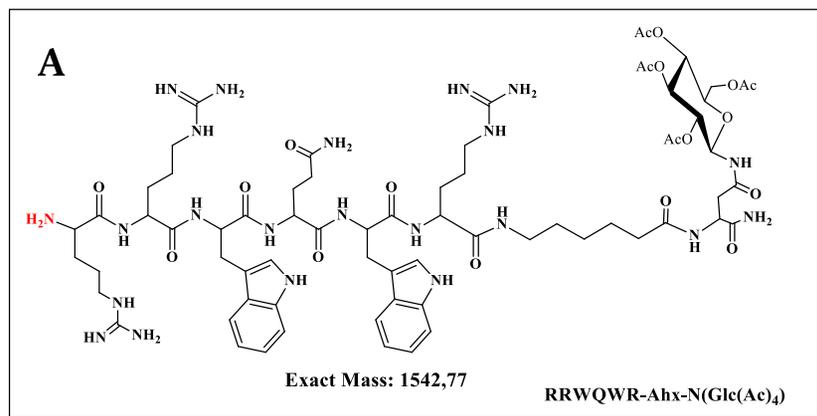
## **Anexo E: Síntesis y caracterización de los N-glicopéptidos diseñados.**

A continuación, se muestran los resultados de la síntesis y caracterización de los N-glicopéptidos obtenidos en este proyecto. La información está distribuida de la siguiente manera: Panel A. Código, estructura y secuencia del N-glicopéptido. Panel B. Comportamiento de síntesis, número de ciclos de acoplos necesarios en la inserción de cada uno de los aminoácidos presentes en la secuencia. Panel C. Perfil cromatográfico del producto obtenido después de la purificación. Panel D. Espectro de masas del N-glicopéptido puro.

## 92 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

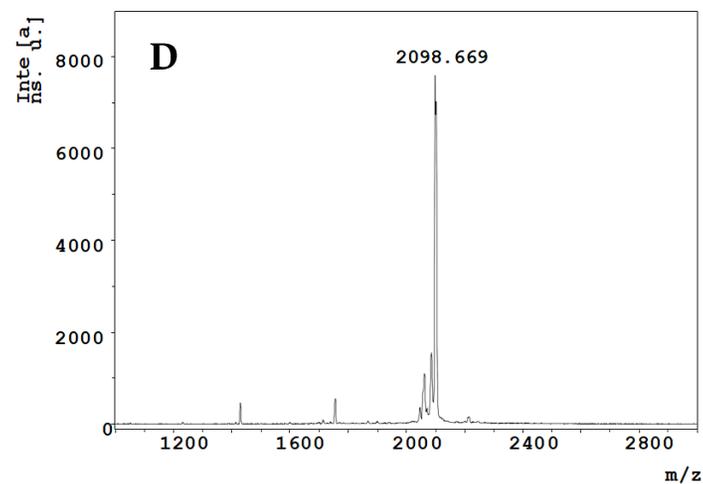
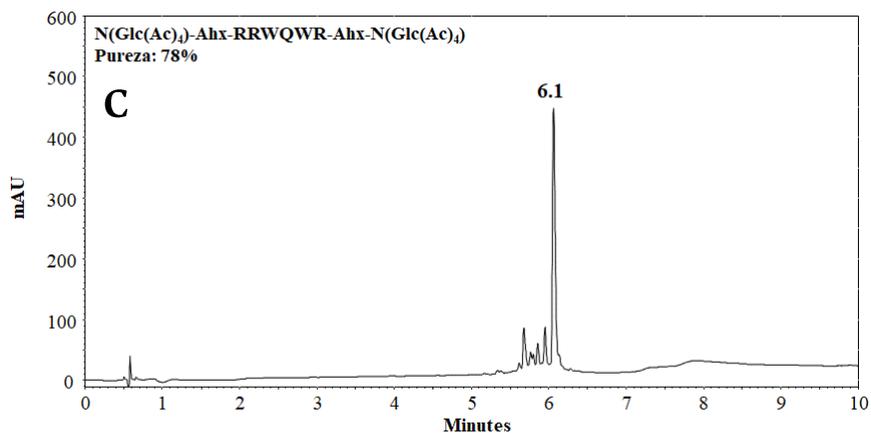
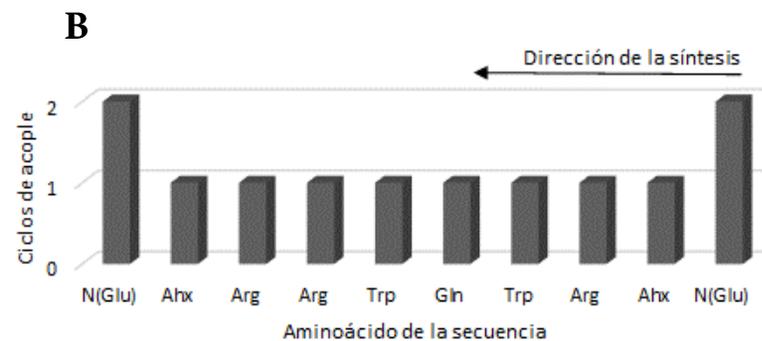
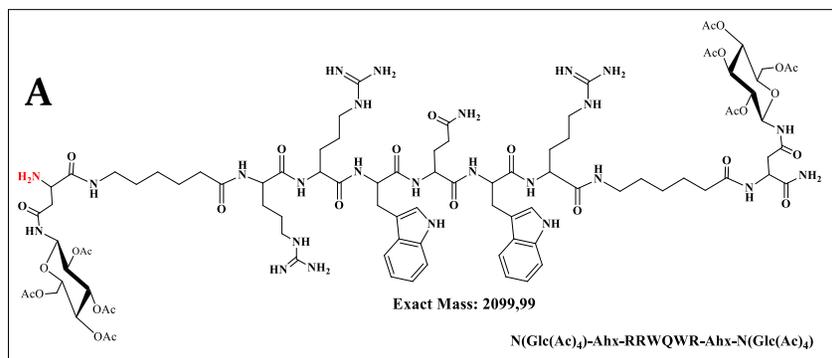


Reporte de síntesis  $N(\text{Glc}(\text{Ac})_4)\text{-Ahx-RRWQWR}$  A. Estructura y masa teórica B. Comportamiento de síntesis C. Cromatograma producto puro D. Espectro de masas MALDI-TOF.

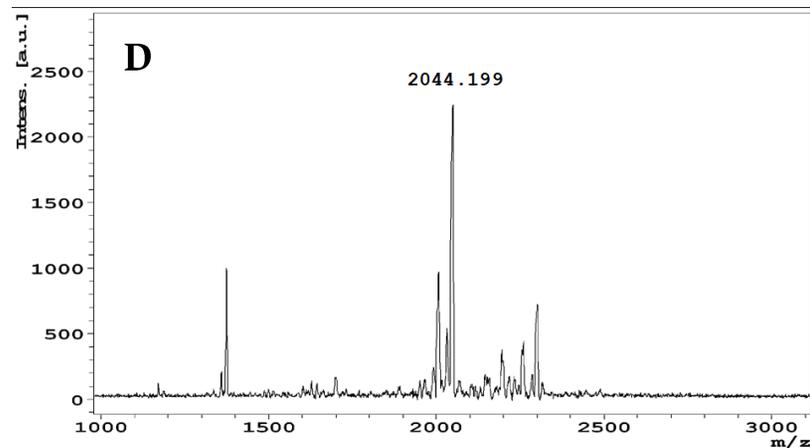
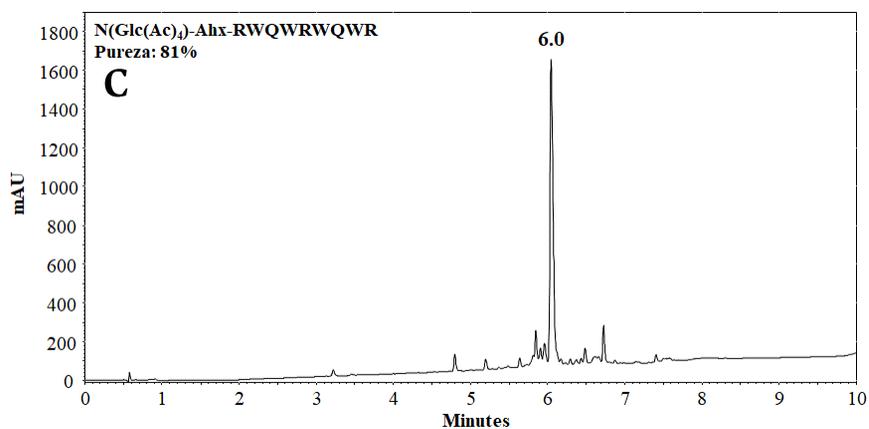
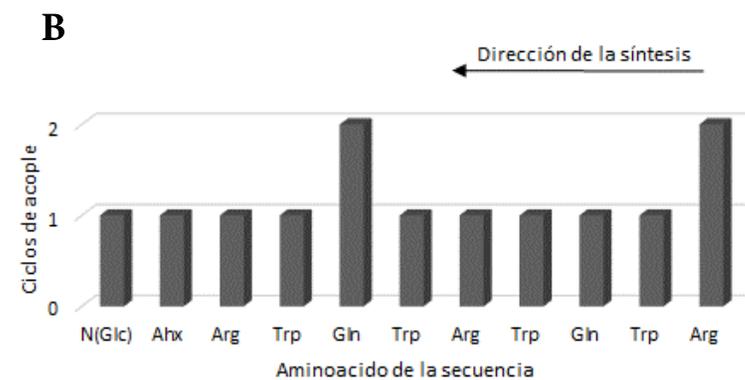
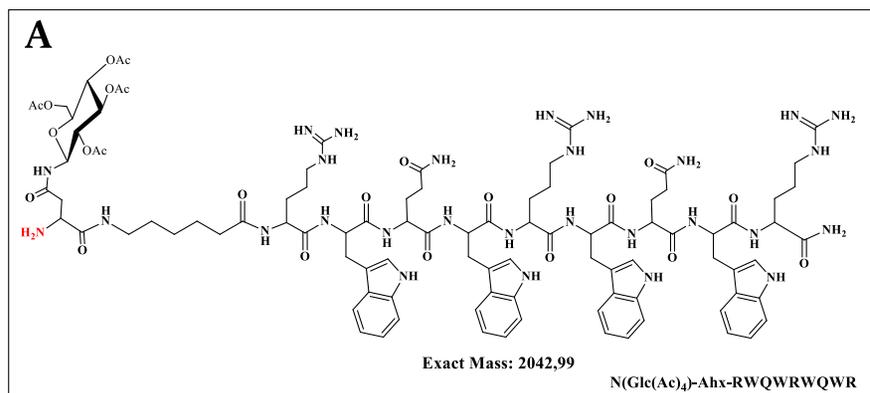


Reporte de síntesis RRWQWR-Ahx-N(Glc(Ac)<sub>4</sub>) A. Estructura y masa teórica B. Comportamiento de síntesis C. Cromatograma producto puro D. Espectro de masas MALDI-TOF.

# 94 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

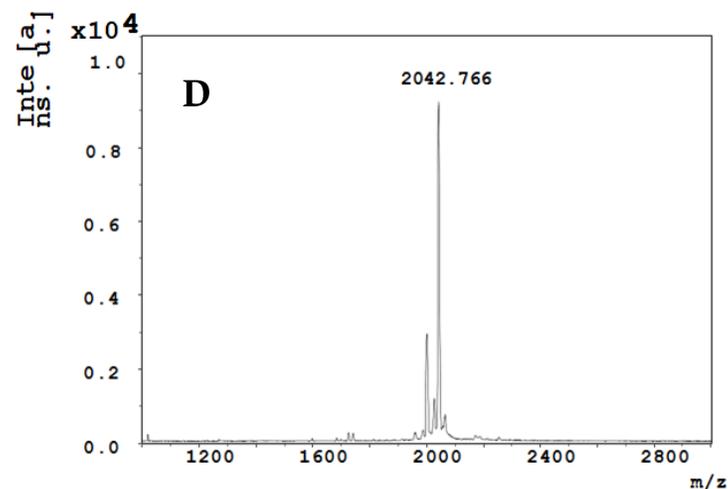
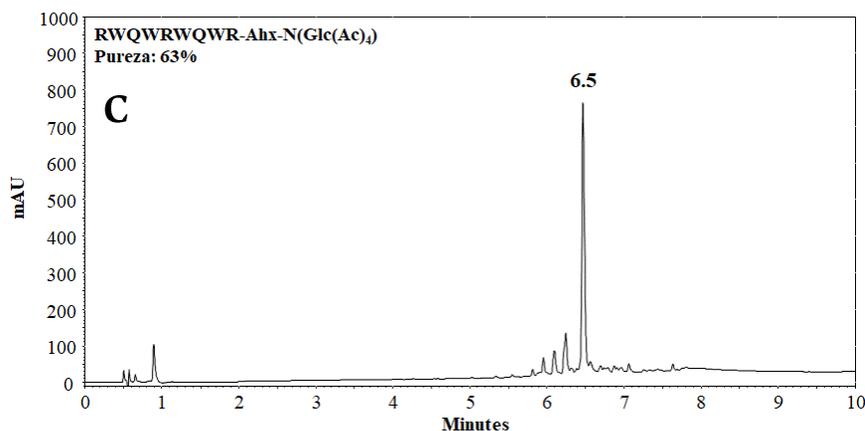
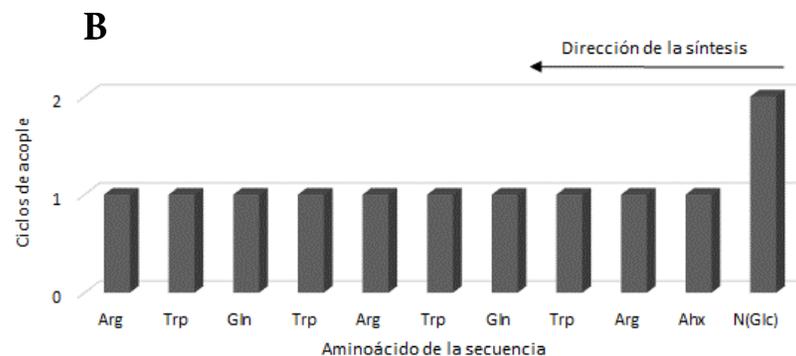
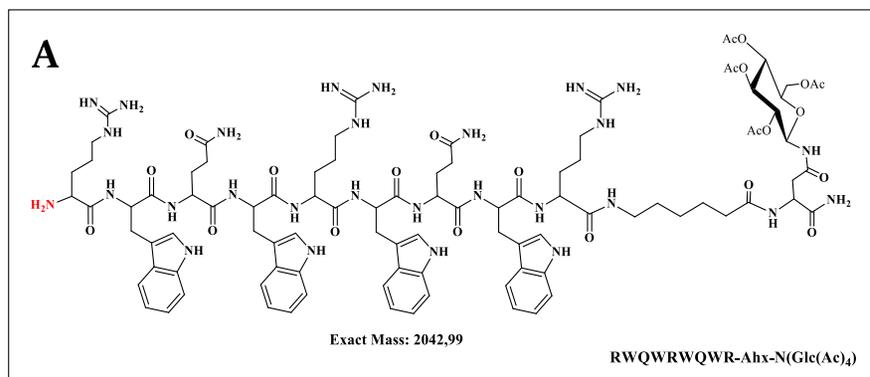


Reporte de síntesis  $N(\text{Glc}(\text{Ac})_4)\text{-Ahx-RRWQWR-Ahx-}N(\text{Glc}(\text{Ac})_4)$  **A.** Estructura y masa teórica **B.** Comportamiento de síntesis **C.** Cromatograma producto puro **D.** Espectro de masas MALDI-TOF.

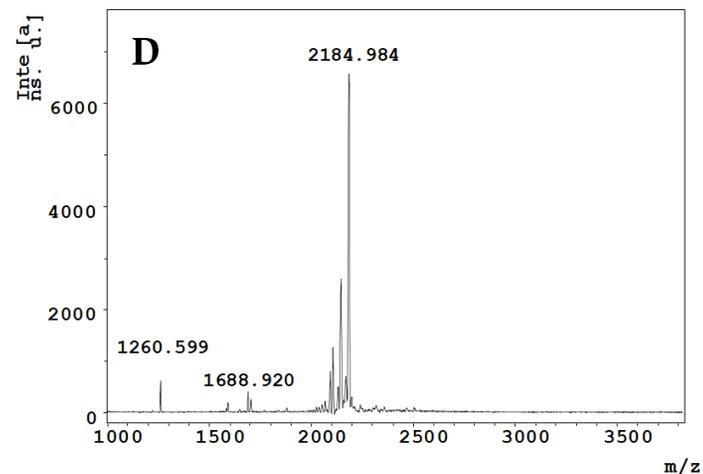
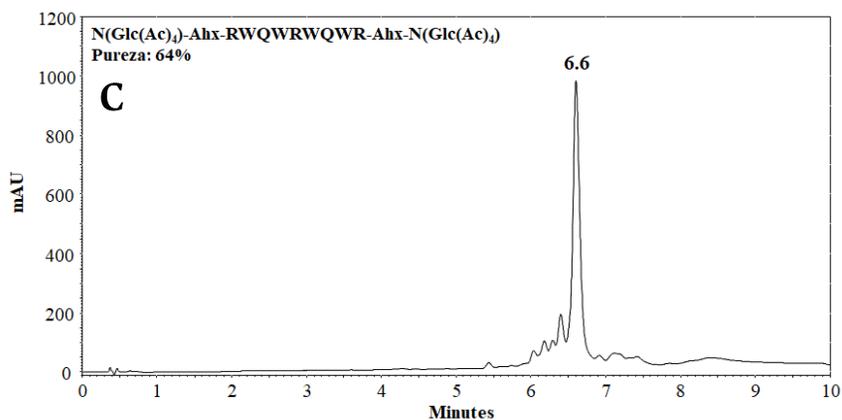
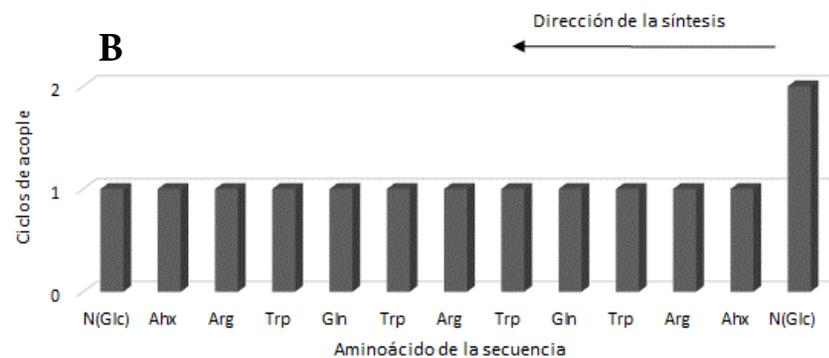
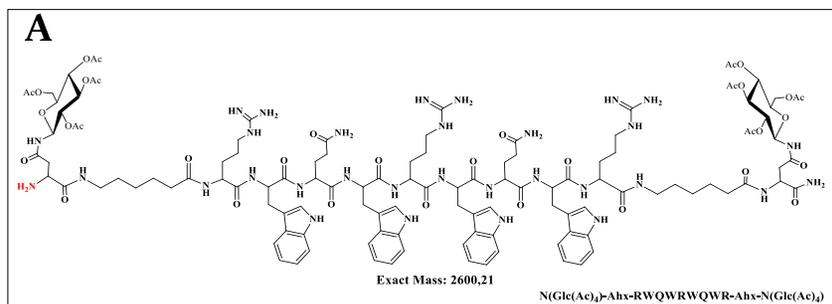


Reporte de síntesis N(Glc(Ac)<sub>4</sub>)-Ahx-RWQWRWQWR A. Estructura y masa teórica B. Comportamiento de síntesis C. Cromatograma producto puro D. Espectro de masas MALDI-TOF.

96 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

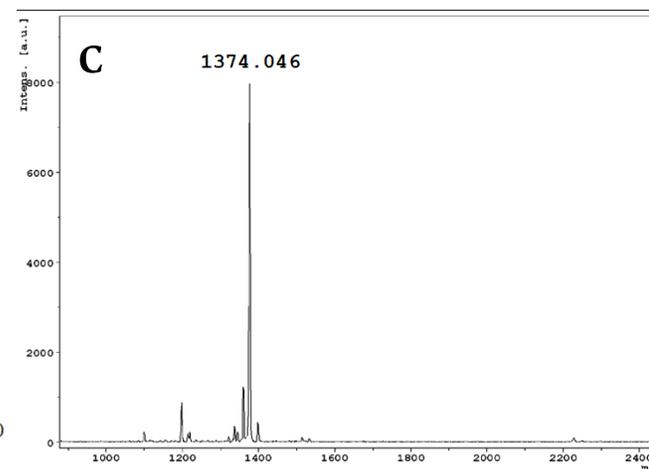
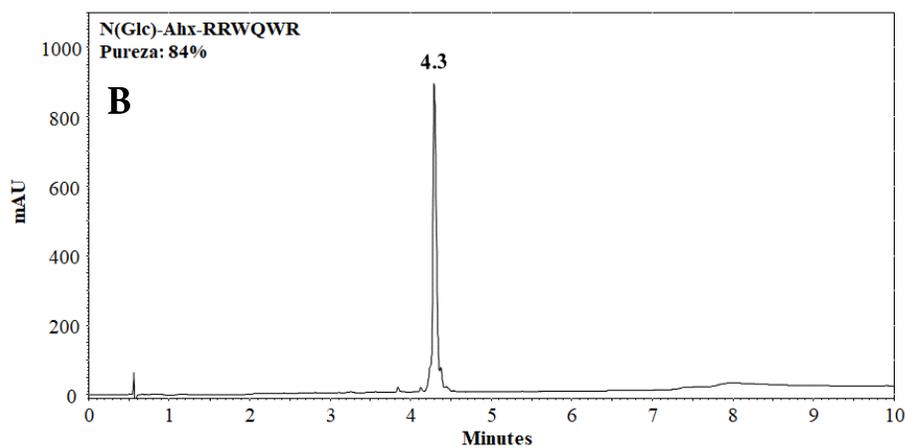
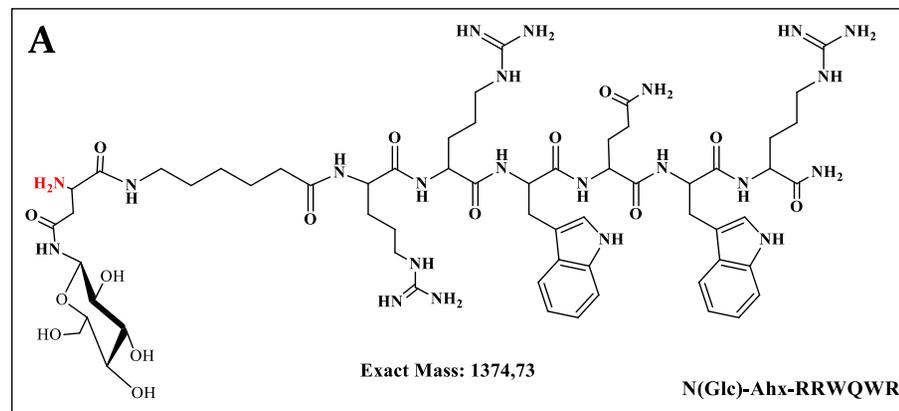


Reporte de síntesis RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc(Ac)<sub>4</sub>) **A**. Estructura y masa teórica **B**. Comportamiento de síntesis **C**. Cromatograma producto puro **D**. Espectro de masas MALDI-TOF.

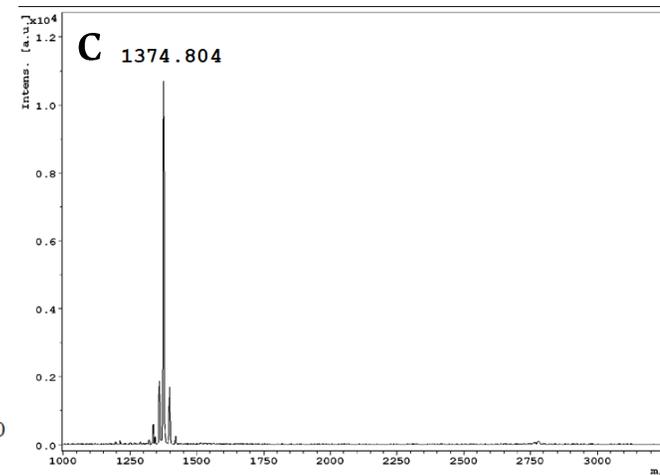
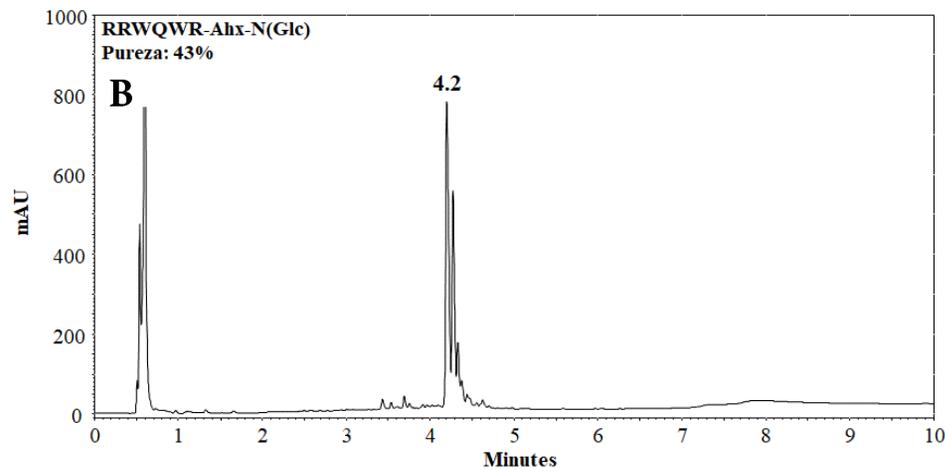
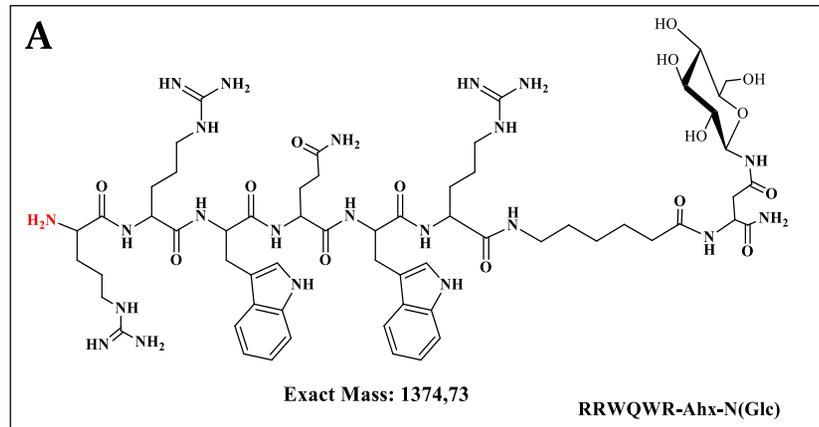


Reporte de síntesis  $N(\text{Glc}(\text{Ac})_4)\text{-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N}(\text{Glc}(\text{Ac})_4)$  **A.** Estructura y masa teórica **B.** Comportamiento de síntesis **C.** Cromatograma producto puro **D.** Espectro de masas MALDI-TOF.

# 98 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

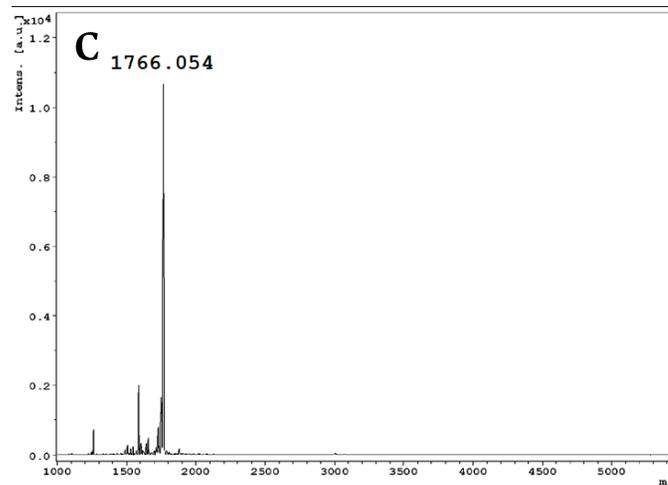
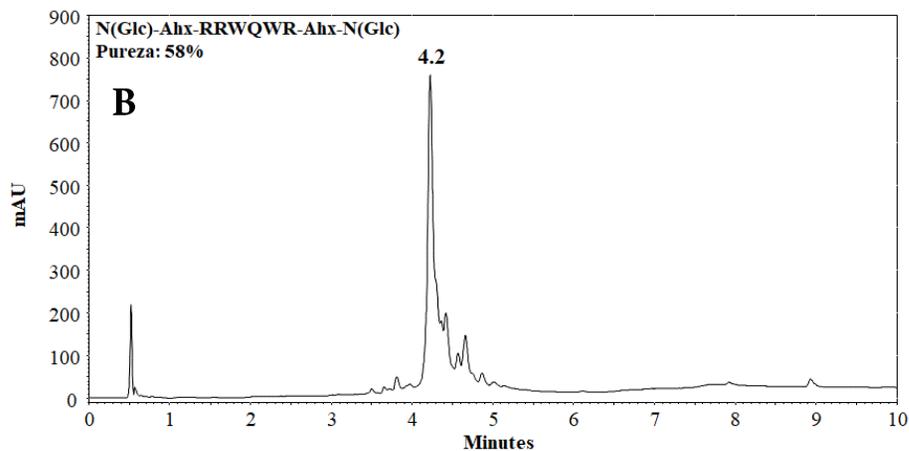
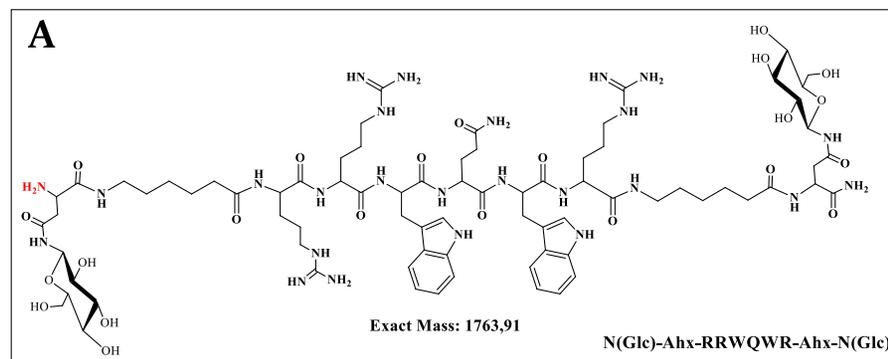


Reporte de síntesis N(Glc)-Ahx-RRWQWR A. Estructura y masa teórica B. Cromatograma producto puro C. Espectro de masas MALDI-TOF.

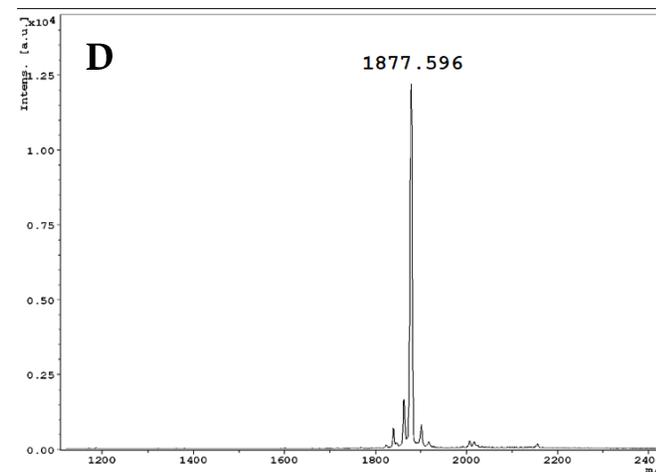
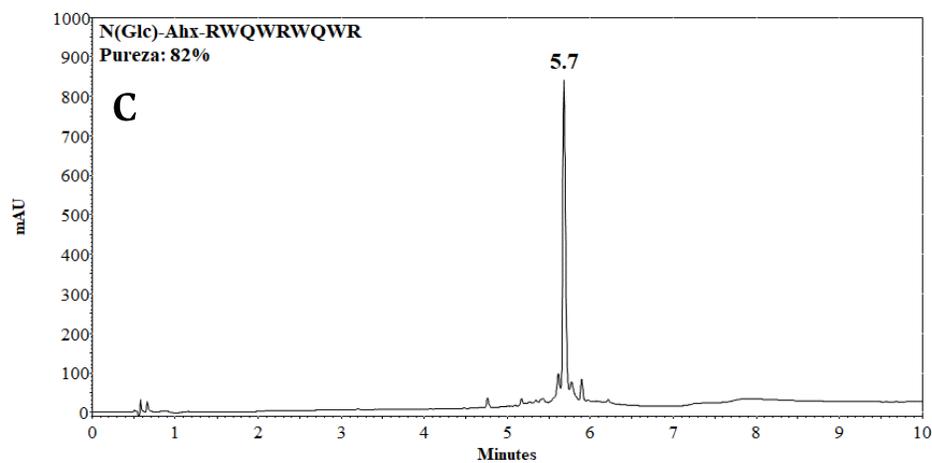
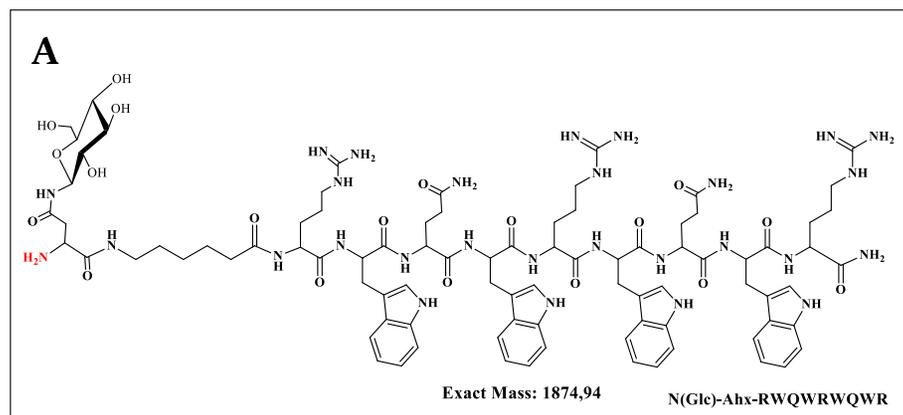


Reporte de síntesis RRWQWR-Ahx- N(Glc) A. Estructura y masa teórica B. Cromatograma producto puro C. Espectro de masas MALDI-TOF.

# 100 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

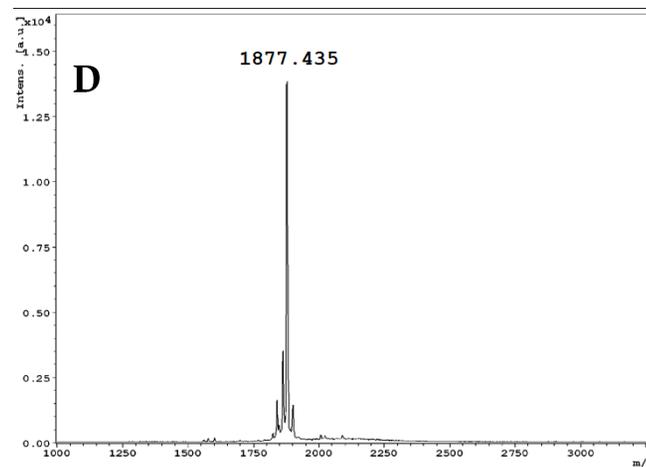
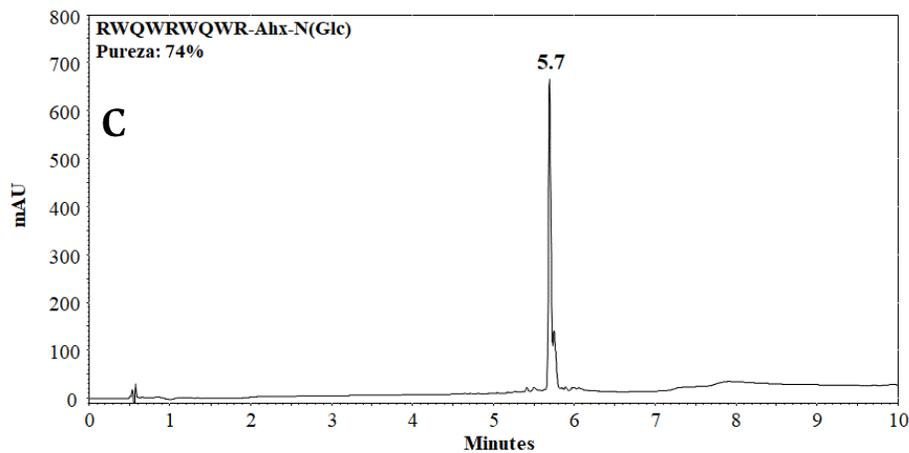
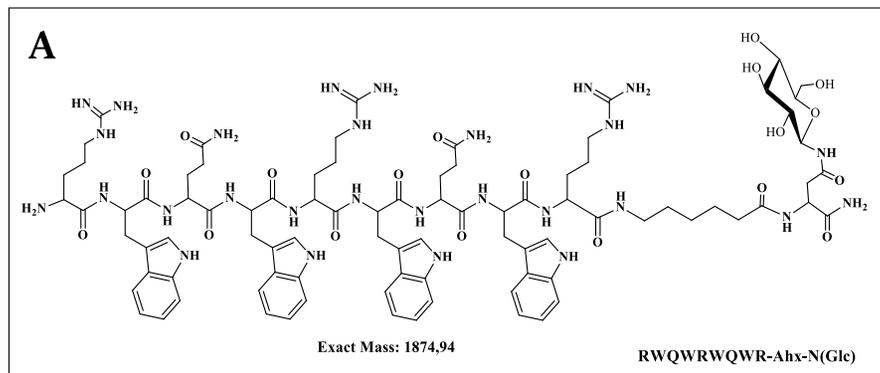


Reporte de síntesis N(Glc)-Ahx-RRWQWR-Ahx-N(Glc) **A**. Estructura y masa teórica **B**. Cromatograma producto puro **C**. Espectro de masas MALDI-TOF.

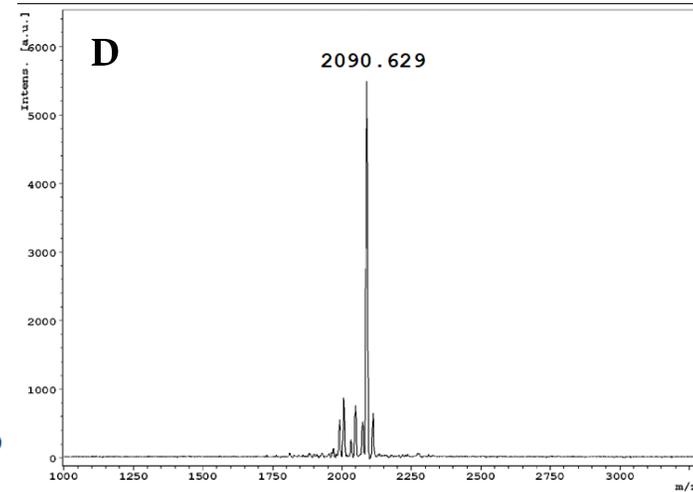
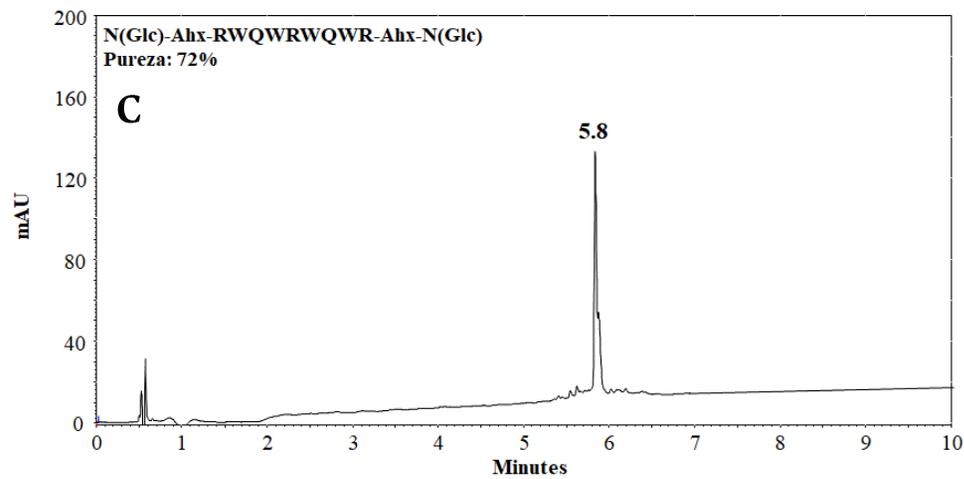
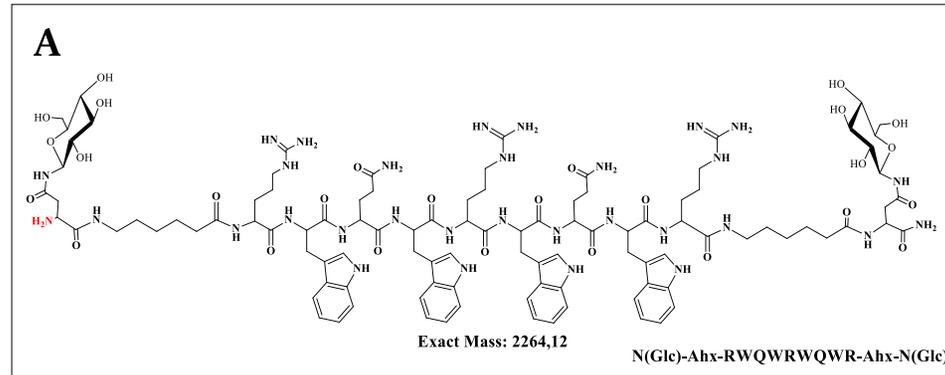


Reporte de síntesis N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR **A.** Estructura y masa teórica **B.** Cromatograma producto puro **C.** Espectro de masas MALDI-TOF.

102 Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica



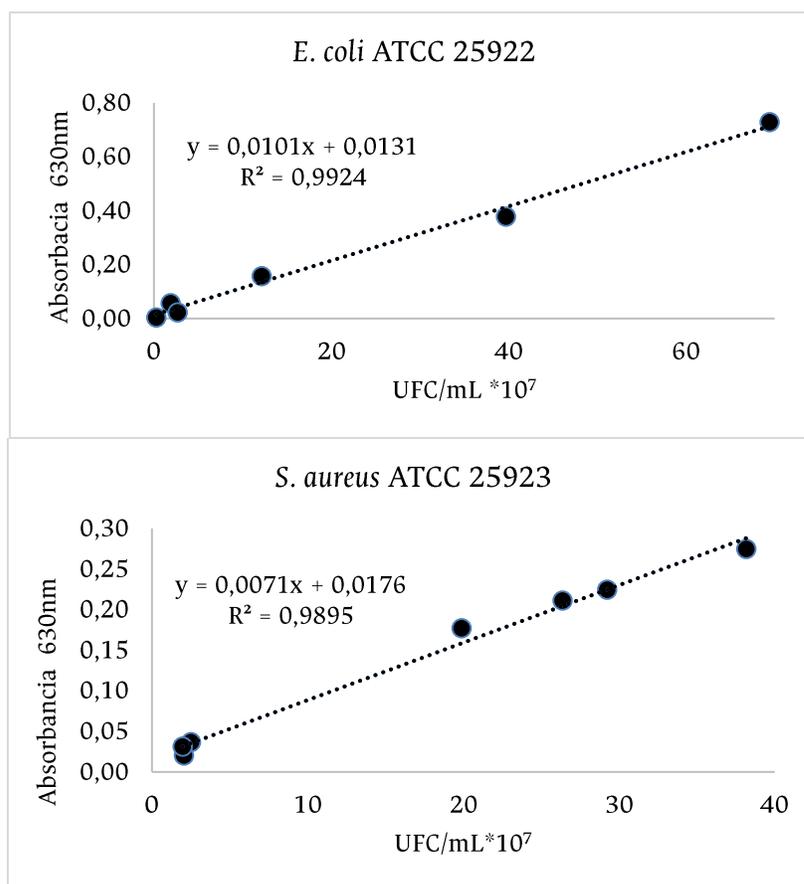
Reporte de síntesis RWQWRWQR-Ahx-N(Glc) A. Estructura y masa teórica B. Cromatograma producto puro C. Espectro de masas MALDI-TOF.



Reporte de síntesis N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc) **A.** Estructura y masa teórica **B.** Cromatograma producto puro **C.** Espectro de masas MALDI-TOF.

## Anexo F: Curvas de calibración de las cepas bacterianas

Se presenta las curvas de calibración con las ecuaciones ajustadas por mínimos cuadrados y el coeficiente de determinación  $R^2$ .



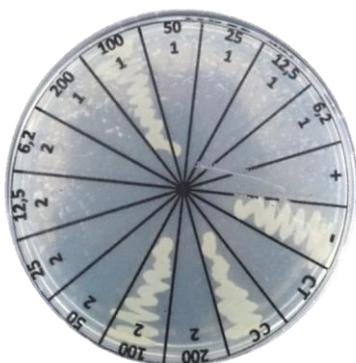
## Anexo G: Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida de péptidos y N-glicopéptidos evaluados.

Valores de las absorbancias (630 nm). En rojo se encuentra la absorbancia determinada como la CMI. (n=2). Los valores de MBC solo fueron determinados para las moléculas que presentaban un MIC inferior a 200 µg/mL

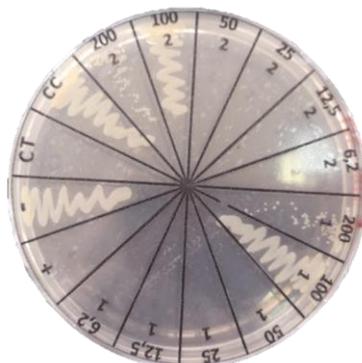
### a. *Escherichia coli* ATCC 25922

Péptido (µg/mL)	Familia RRWQWR Inóculo de 500.000 UFC/mL						Ciprofloxacina Control (+)	Contro I (-)	CT	CC
	200	100	50	25	12.5	6.25				
	<b>RRWQWR</b>									
Rep 1	0.138	0.195	0.662	0.701	0.748	0.791	0.121	0.562	0.137	0.728
Rep 2	0.128	0.161	0.595	0.699	0.738	0.717	0.128	0.554	0.138	0.692
	<b>N-Ahx-RRWQWR</b>									
Rep 1	0.134	0.571	0.654	0.681	0.778	0.824	0.121	0.641	0.113	0.759
Rep 2	0.122	0.567	0.569	0.632	0.539	0.873	0.113	0.671	0.671	0.771

<b>N(Glc)-Ahx-RRWQWR</b>										
<b>Rep 1</b>	0.586	0.759	0.722	0.775	0.785	0.811	0.109	0.647	0.123	0.781
<b>Rep 2</b>	0.637	0.721	0.750	0.778	0.752	0.823	0.105	0.639	0.118	0.803
<b>RRWQWR-Ahx-N</b>										
<b>Rep 1</b>	0.327	0.686	0.796	0.835	0.885	0.893	0.123	0.666	0.114	0.926
<b>Rep 2</b>	0.305	0.680	0.805	0.845	0.850	0.896	0.117	0.660	0.107	0.962
<b>RRWQWR-Ahx-N(Glc)</b>										
<b>Rep 1</b>	0.631	0.701	0.721	0.767	0.785	0.806	0.109	0.647	0.123	0.781
<b>Rep 2</b>	0.637	0.706	0.707	0.750	0.752	0.781	0.105	0.639	0.118	0.803
<b>N-Ahx-RRWQWR-Ahx-N</b>										
<b>Rep 1</b>	0.376	0.737	0.838	0.810	0.870	0.893	0.123	0.666	0.114	0.926
<b>Rep 2</b>	0.376	0.756	0.799	0.827	0.831	0.815	0.117	0.660	0.107	0.962
<b>N(Glc)-Ahx-RRWQWR-Ahx-N(Glc)</b>										
<b>Rep 1</b>	0.672	0.718	0.743	0.700	0.798	0.782	0.109	0.647	0.123	0.781
<b>Rep 2</b>	0.684	0.694	0.730	0.725	0.792	0.786	0.105	0.639	0.118	0.803



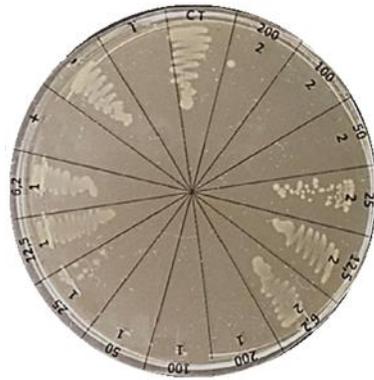
RRWQWR  
MIC: 100 µg/mL  
MIB: 200 µg/mL



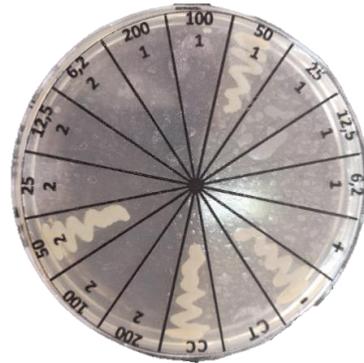
N-Ahx-RRWQWR  
MIC: 200 µg/mL  
MIB: >200 µg/mL

## Síntesis de N-glicopéptidos derivados de la LfcinB y evaluación de su actividad antibacteriana y antifúngica

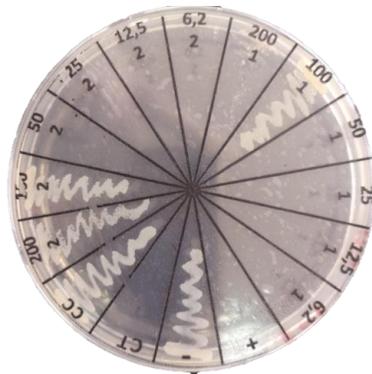
<b>Familia RWQWRWQWR</b>										
<b>Inóculo de 500.000 UFC/mL</b>										
<b>Péptido (µg/mL)</b>	200	100	50	25	12.5	6.25	Ciprofloxacina Control (+)	Control (-)	CT	CC
<b>RWQWRWQWR</b>										
<b>Rep 1</b>	0.140	0.121	0.116	<b>0.121</b>	0.624	0.784	0.105	0.638	0.874	0.107
<b>Rep 2</b>	0.130	0.111	0.107	<b>0.111</b>	0.535	0.670	0.107	0.645	0.846	0.103
<b>N-Ahx-RWQWRWQWR</b>										
<b>Rep 1</b>	0.122	<b>0.115</b>	0.298	0.356	0.505	0.713	0.113	0.659	0.123	0.756
<b>Rep 2</b>	0.118	<b>0.121</b>	0.315	0.395	0.465	0.698	0.111	0.574	0.112	0.859
<b>N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR</b>										
<b>Rep 1</b>	0.234	0.346	0.381	0.701	0.803	0.875	0.122	0.619	0.146	0.970
<b>Rep 2</b>	0.215	0.295	0.447	0.685	0.830	0.888	0.223	0.600	0.139	0.812
<b>RWQWRWQWR-Ahx-N</b>										
<b>Rep 1</b>	<b>0.140</b>	0.407	0.739	0.831	0.813	0.850	0.123	0.681	0.127	0.816
<b>Rep 2</b>	<b>0.250</b>	0.364	0.696	0.801	0.793	0.842	0.126	0.713	0.647	0.813
<b>RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc)</b>										
<b>Rep 1</b>	0.120	<b>0.136</b>	0.669	0.714	0.784	0.750	0.109	0.647	0.123	0.781
<b>Rep 2</b>	0.119	<b>0.115</b>	0.709	0.732	0.780	0.781	0.105	0.639	0.118	0.803
<b>N-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N</b>										
<b>Rep 1</b>	0.205	0.283	0.323	0.350	0.454	0.463	0.105	0.586	0.111	0.866
<b>Rep 2</b>	0.239	0.264	0.324	0.348	0.458	0.570	0.120	0.576	0.102	0.941



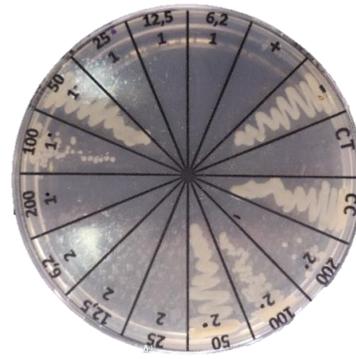
RWQWRWQWR  
MIC: 25 µg/mL  
MIB: 50 µg/mL



N-Ahx-RWQWRWQWR  
MIC: 100 µg/mL  
MIB: 100 µg/mL



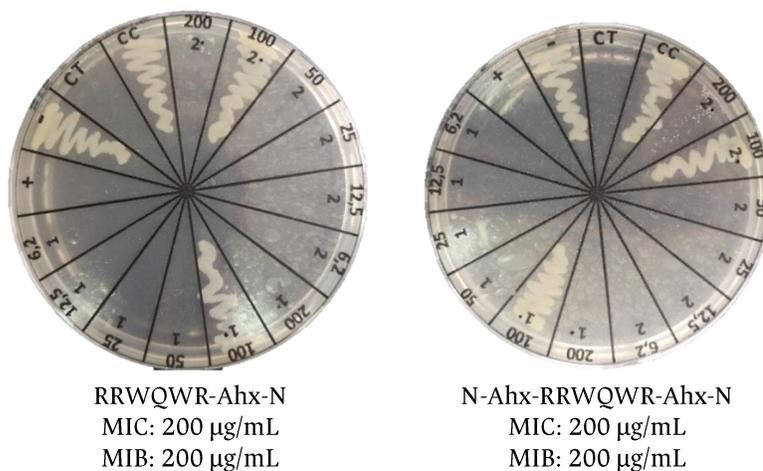
RWQWRWQWR-Ahx-N  
MIC: 200 µg/mL  
MIB: >200 µg/mL



RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc)  
MIC: >200 µg/mL  
MIB: >200 µg/mL

**b. *S. aureus* ATCC 25923**

Péptido ( $\mu\text{g/mL}$ )	Familia RRWQWR						Ciprofloxacina Control (+)	Control (-)	CT	CC
	200	100	50	25	12.5	6.25				
<b>Inóculo de 500.000 UFC/mL</b>										
<b>RRWQWR</b>										
Rep 1	0.255	0.367	0.418	0.426	0.469	0.477	0.119	0.425	0.440	0.124
Rep 2	0.281	0.349	0.501	0.550	0.573	0.544	0.113	0.466	0.439	0.125
<b>N-Ahx-RRWQWR</b>										
Rep 1	0.419	0.582	0.709	0.691	0.694	0.717	0.105	0.491	0.114	0.519
Rep 2	0.420	0.571	0.645	0.681	0.692	0.712	0.293	0.508	0.113	0.481
<b>N(Glc)-Ahx-RRWQWR</b>										
Rep 1	0.533	0.615	0.540	0.652	0.601	0.682	0.128	0.547	0.152	0.623
Rep 2	0.502	0.586	0.645	0.645	0.654	0.652	0.135	0.572	0.116	0.563
<b>RRWQWR-Ahx-N</b>										
Rep 1	0.132	0.422	0.462	0.513	0.623	0.658	0.118	0.416	0.112	0.599
Rep 2	0.114	0.442	0.503	0.539	0.612	0.258	0.350	0.412	0.136	0.595
<b>RRWQWR-Ahx-N(Glc)</b>										
Rep 1	0.432	0.551	0.597	0.649	0.630	0.637	0.128	0.547	0.152	0.623
Rep 2	0.425	0.508	0.624	0.608	0.642	0.603	0.135	0.572	0.116	0.563
<b>N-Ahx-RRWQWR-Ahx-N</b>										
Rep 1	0.120	0.447	0.481	0.516	0.501	0.573	0.118	0.416	0.112	0.599
Rep 2	0.111	0.471	0.507	0.520	0.476	0.588	0.350	0.421	0.136	0.595
<b>N(Glc)-Ahx-RRWQWR-Ahx-N(Glc)</b>										
Rep 1	0.441	0.475	0.584	0.634	0.637	0.620	0.128	0.547	0.152	0.623
Rep 2	0.446	0.602	0.511	0.592	0.619	0.610	0.135	0.572	0.116	0.563

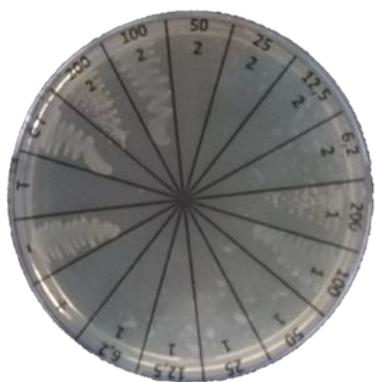


Familia RWQWRWQWR										
Inóculo de 500.000 UFC/mL										
Péptido (µg/mL)	200	100	50	25	12.5	6.25	Ciprofloxacina Control (+)	Control (-)	CT	CC
<b>RWQWRWQWR</b>										
Rep 1	0.155	0.215	0.387	0.457	0.437	0.517	0.119	0.387	0.513	0.114
Rep 2	0.129	0.298	0.375	0.460	0.472	0.497	0.113	0.394	0.557	0.115
<b>N-Ahx-RWQWRWQWR</b>										
Rep 1	0.348	0.483	0.938	1.054	1.008	1.044	0.106	0.781	0.112	1.107
Rep 2	0.325	0.560	0.712	1.023	1.003	1.023	0.112	0.828	0.113	0.931
<b>N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR</b>										
Rep 1	0.260	0.658	0.778	1.004	1.025	1.024	0.106	0.781	0.112	1.107
Rep 2	0.256	0.612	0.857	0.961	0.958	0.955	0.112	0.828	0.113	0.931
<b>RWQWRWQWR-Ahx-N</b>										
Rep 1	0.319	0.410	0.355	0.358	0.367	0.385	0.286	0.339	0.149	0.459
Rep 2	0.352	0.411	0.340	0.348	0.361	0.430	0.112	0.344	0.139	0.404
<b>RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc)</b>										

<b>Rep 1</b>	<b>0.158</b>	0.194	0.472	0.593	0.594	0.624	0.128	0.547	0.152	0.623
<b>Rep 2</b>	<b>0.154</b>	0.216	0.458	0.560	0.590	0.599	0.135	0.572	0.116	0.563

### N-Ahx-RWQWRWQWR-Ahx-N

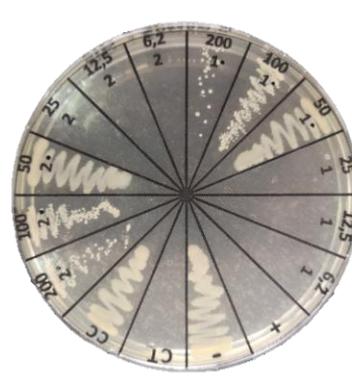
<b>Rep 1</b>	0.460	0.682	0.945	0.971	1.021	0.965	0.106	0.781	0.112	1.107
<b>Rep 2</b>	0.435	0.619	0.907	0.991	0.995	0.913	0.112	0.828	0.113	0.931



RWQWRWQWR  
MIC: 200 µg/mL  
MIB: >200 µg/mL



N(Glc)-Ahx-RWQWRWQWR  
MIC: 200 µg/mL  
MIB: 200 µg/mL



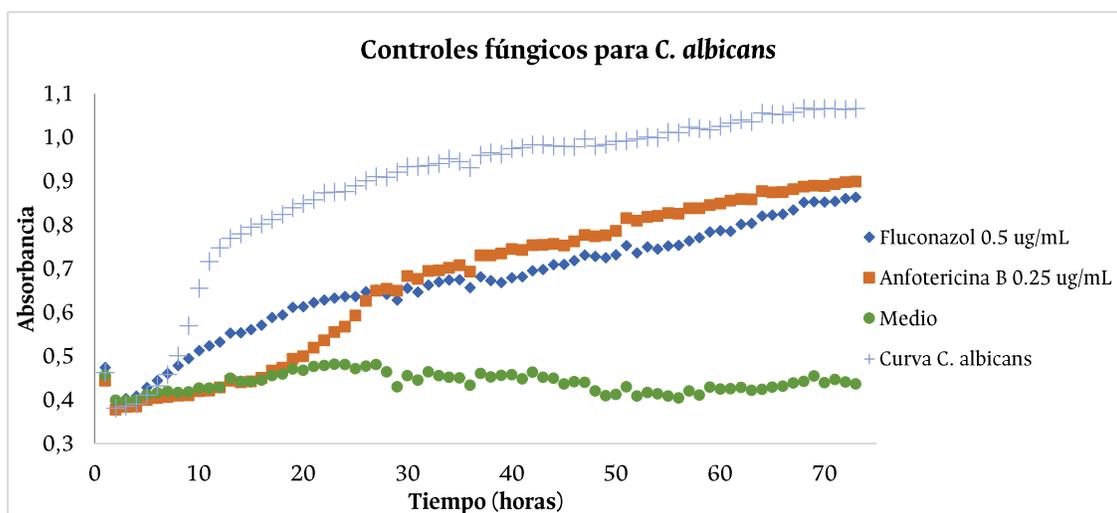
RWQWRWQWR-Ahx-N(Glc)  
MIC: 200 µg/mL  
MIB: >200 µg/mL



## Anexo H: Curvas de actividad antifúngica para *C. albicans*

Curvas de letalidad antifúngica (625 nm). (n=3).

### a. Controles fúngicos *C. albicans*



b. Familia LfcinB (20-25)

