



Universidad De Guanajuato
Campus Guanajuato
División De Ciencias Naturales Y Exactas
Posgrado En Química



ParisTech
L'ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE
DE CHIMIE DE PARIS



École Nationale Supérieure de Chimie de Paris
Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé

**NANOTUBOS PEPTÍDICOS COMO NUEVOS
SOPORTES PARA SEPARACIONES
ELECTROFORÉTICAS: DISEÑO, SÍNTESIS Y
CARACTERIZACIÓN**

TESIS

Que para obtener el grado de:
DOCTOR EN QUÍMICA

Presenta:

QUÍM. MARÍA DÁMARIS CORTEZ DÍAZ

Dirigido por:

Dra. Silvia Gutiérrez Granados (UG)

Dra. Anne Varenne (ENSCP)

Guanajuato, Gto., 25 de julio 2016

Guanajuato, Gto., a 25 de julio de 2016

A quien corresponda

Por medio de la presente, nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del trabajo de investigación titulado:

“NANOTUBOS PEPTÍDICOS COMO NUEVOS SOPORTES PARA SEPARACIONES ELECTROFORÉTICAS: DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN”

Realizado por la Lic. en Química *María Dámaris Cortez Díaz* para obtener el grado de **Doctor en Química**, en las instalaciones del Departamento de Química de la DCNyE de la Universidad de Guanajuato (Guanajuato, México) y l’Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS)-Chimie Paris Tech, de l’École Nationale Supérieure de Chimie de Paris (Paris, Francia).

ATENTAMENTE
Directoras de Tesis

Dra. Silvia Gutiérrez Granados
Universidad de Guanajuato

Dra. Anne Varrene
École Nationale Supérieure de
Chimie de Paris

Guanajuato, Gto., a 25 de julio de 2016

Miembros del Jurado del Examen de titulación que para obtener el grado de Doctor en Química presenta la Lic. en Química María Dámaris Cortez Díaz, con el trabajo titulado:

“NANOTUBOS PEPTÍDICOS COMO NUEVOS SOPORTES PARA SEPARACIONES ELECTROFORÉTICAS: DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN”

Dr. Alberto Flores Martínez (UG)

Presidente

Dr. Oracio Serrano Torres (UG)

Secretario

Dr. Fethi Bedioui (ENSCP, Francia)

Vocal

Dra. Margarita Miranda Hernández (UNAM)

Vocal

Dr. Bernardo Frontana Uribe (CIQS, UNAM-UAEM)

Vocal

Dr. Juan Maríquez Rocha (CIDETEQ)

Suplente

A:

Mi madre Victoria Díaz y mis tíos José y Gregorio Díaz: Por ser mis padres y mentores de toda la vida, por mostrarme que tener un corazón valiente no es suficiente, hace falta trabajar y luchar a cada instante por nuestros sueños para materializarlos. Por su apoyo, sacrificios y amor. Aquí el fruto de todo lo que hemos construido juntos.

A mis hermanas Bere y Mayra:

Quienes me han apoyado en todo este camino, me han entendido y han aprendido conmigo. Honremos siempre a nuestra abuelita.

A mi prometido Bernd Thoma:

Por apoyarme, amarme e inspirarme en todo momento. Por siempre escucharme, alentarme y comprenderme, por llevarme en los momentos difíciles. Gracias por estar siempre a mi lado, en cada uno de nuestros esfuerzos y logros. Por enloquecer conmigo y aprender a amar mi vocación y mi pasión por mi profesión

A todos los amo, gracias por su fe en mí y en mi trabajo, por soñar conmigo y ser parte de mi todo.

.....
“No esperes a que suceda el milagro, dedícate a provocarlo”

“Para obtener lo que pocos tienen hay que estar dispuesto a hacer lo que pocos harían”

“Don't do your best, just do what is required”

-M. Debayle

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, mi hermana y mi prima Mayra por ser los motores de mi vida y de mis esfuerzos, por reír a mi lado, por preocuparse por mí, por levantarse conmigo en cada caída y celebrar en cada éxito. Las amo con todo mi corazón. A mis tíos Goyo y Pepe por ser mis padres, mis grandes amigos y mis grandes pilares de vida. Gracias a todos ustedes por acompañarme en esta gran aventura, que hoy culmina con este trabajo que forma parte importante de mi vida y mi formación profesional.

A mis mejores amigos Fer, Cynthia y Cristol por preocuparse por mí y animarme siempre que los experimentos no salían, aunque muchas veces no tuvieran idea de que hablaba al decir mis grandes retos con el HPLC, la liofilizadora, el capilar, etc., siempre prestaron atención y me hacían reír al final de todas mis “desgracias”. A mis grandes y emblemáticos amigos de París: Lulú, Vero, Alexandra, Betito, Agnès, Juan Carlos y Efraín por su apoyo, cariño y alegría día a día, por aquellas cenas mexicanas y francesas que tanto disfrutamos, por las risas, las visitas a los museos, castillos, parques y las vacaciones que pasamos juntos.

Agradezco especialmente a la familia Thoma-Becerra por su constante apoyo, por sus bendiciones y su fe en mí. Por el entusiasmo que imprimían al preguntar cómo iba la tesis. Finalmente se ha cristalizado y concluido. Gracias Oma Sofi Kahuam, Sra. Susana, Verena y Bernd, por hacer de este trayecto algo bello y enorgullecedor.

Agradezco plenamente a la Dra. Silvia Gutiérrez Granados, la Dra. Anne Varenne y la Dra. Fanny d’Orlyé por invitarme a trabajar con ellas, por las grandes enseñanzas y experiencias laborales y de vida, que sin duda me han hecho crecer en diferentes sentidos profesionales y personales. Por ser mis guías y mentoras en toda esta aventura que hoy se materializa en este documento. Por los conocimientos que me ayudaron a adquirir, por sus sabios consejos, su apoyo, su paciencia y sobre todo por su gran amistad. Del mismo

modo, agradezco especialmente al Dr. Luis Manuel de León Rodríguez, quien incondicionalmente me asesoró y dirigió a distancia, aun sin conocernos, en el proceso de síntesis de mis compuestos y a quien le tengo una especial admiración por sus grandes conocimientos y experiencia.

Gracias a mis amigos y colegas de l'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris: Abed, Abdelilah, Raja, Lupe, Laura, Eva y Victor... por hacer de mi vida y mi estancia en París algo único y maravilloso, por aprender juntos un nuevo idioma, por aquellos cafecitos en el hall de la escuela, por los afterwork y las cenas internacionales, por compartir parte de su esencia conmigo.

Del mismo modo agradezco especialmente al Dr. Fethi Bedioui y al equipo de trabajo de ParisTech UTCBS por su invitación a participar en un proyecto de co-dirección entre la UG y la ENSCP-ParisTech.

Agradezco al Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Fisicoquímicas y Estructura Molecular, citando especialmente al Dr. Kazimierz Wróbel, a la Dra. María del Pilar González M., al Dr. Mario Ávila Rodríguez y a Paulina Lozano por su apoyo en la caracterización de mis compuestos.

Finalmente tengo el placer de externar mi gratitud a la Comisión Revisora por su tiempo y recomendaciones para mejorar este trabajo, así como a las instituciones que contribuyeron a mi formación profesional y académica, a CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) y la DAIP (Dirección de Apoyo a la Investigación y al Posgrado) por su apoyo financiero para realizar este proyecto.

Índice General

Índice de Figuras.....	10
Índice de Tablas	15
Índice de Esquemas.....	17
Consideraciones Generales	18
Símbolos y Abreviaturas.....	19
Resumen.....	22
Abstract.....	24
Introducción General	26
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	30
I.1 Antecedentes y Justificación.....	30
I.2 Los Péptidos.....	32
I.3 Síntesis de Péptidos.....	33
I.3.1 Síntesis Química de Péptidos.....	34
I.4 Nanomateriales y Nanotubos Peptídicos.....	35
I.4.1 Auto-ensamble de Péptidos en forma de NTPs.....	36
I.4.2 NTPs a partir de PCs.....	38
I.5 Caracterización de los NTPs	44
I.6 Electroforesis Capilar.....	46
I.6.1 Instrumentación de la Electroforesis Capilar	47
I.6.2 Modos de Electroforesis Capilar ^[131, 135]	48
I.6.3 Principales Aplicaciones de la EC	49
I.6.4 Eficiencia de Separación en EC	51
I.6.5 Tipos de Recubrimientos en EC.....	59
I.6.6 Tipos de Detectores en EC.....	60
I.7 Electroforesis Capilar-Espectrometría de Masas (EC-EM).....	62
I.7.1 Eficiencia de la Separación y Detección en EC-IES-EM.....	64
I.8 Propuesta del Trabajo de Tesis	67
I.9 Objetivos.....	70
I.9.1 General.....	70
I.9.2 Particulares.....	70
CAPÍTULO II SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS CÍCLICOS	73
II.2 Metodología Experimental.....	93
II.2.1 Productos Químicos y Reactivos	93
II.2.2 Materiales y Equipos.....	96
II.2.2.1 Sistema de Destilación.....	96
II.2.2.2 Sistema de Agitación y Filtrado.....	97
II.2.2.3 Microscopio Óptico.....	98
II.2.2.4 Sistemas de Evaporación	98
II.2.2.5 Instrumentación de CLAR	99

II.2.2.6	Sistema de CL-EM.....	100
II.2.2.7	Liofilizadora.....	100
II.2.3	Proceso de la SPFS-Fmoc de las 8 Secuencias Peptídicas.....	100
II.2.3.1	Síntesis	101
II.2.3.2	Liberación	102
II.2.3.3	Ciclización Cabeza-Cola.....	105
II.2.3.4	Extracción Líquido-Líquido del PC.....	105
II.2.3.5	Desprotección de las Cadenas Laterales	108
II.2.4	Purificación de los PCs	110
II.2.5	Determinación de la Masa de los PCs por CL-EM.....	110
II.3	Resultados y Discusión.....	110
II.3.1	Carga de la Resina 2CITrt-Cl y Acoplamiento	110
II.3.4	Análisis por CLAR de los PLs Protegidos y PCs Protegidos	115
II.3.5	Análisis por CLAR de los PCs Desprotegidos.....	119
II.3.6	Composición y Masas de los PCs Desprotegidos	122
II.3.7	Rendimiento de los Productos Finales	129
II.4	Conclusiones.....	130
CAPÍTULO III PÉPTIDOS CÍCLICOS: DETERMINACIÓN DE PUREZA Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA POR EC		133
III.1	Análisis de la Estructura Química de las Secuencias Peptídicas	133
III.1.3	Péptidos Cíclicos Serie 1.....	136
III.1.4	Péptidos Cíclicos Serie 2.....	138
III.1.5	Péptidos Cíclicos Serie 3.....	140
III.1.7	Pureza de los Péptidos.....	144
III.2	Metodología Experimental.....	146
III.2.1	Productos Químicos y Reactivos	146
III.2.2	Equipos y Métodos.....	147
III.2.2.1	Ensayos de Solubilidad de los PCs	147
III.2.2.2	Mediciones en EC-UV	148
III.2.2.3	Mediciones en EC-IES-EM	150
III.3	Resultados y Discusión.....	151
III.3.1	Solubilidad de los PCs Nuevos	151
III.3.2	Determinación de la Pureza de los PCs por EC-IES-EM	153
III.3.3	Estabilidad de los PCs en el Tiempo.....	159
III.3.4	Propiedades Físicoquímicas de los PCs por ECZ-UV	160
III.3.5	Determinación de Posibles Ensamblajes por EC-IES-EM	167
III.4	Conclusiones.....	170
CAPÍTULO IV PÉPTIDOS CÍCLICOS A SUPRAESTRUCTURAS.....		174
IV.1	Formación de Supraestructuras de NTPs.....	174
IV.2	Metodología Experimental.....	176
IV.2.1	Productos Químicos y Reactivos	177
IV.2.2	Materiales y Equipos.....	177

IV.2.2.1	Caracterización por Espectroscopía FT-IR	178
IV.2.2.2	Caracterización por Espectroscopía Raman	178
IV.2.2.3	Caracterización por Microscopía SEM y STEM	179
IV.2.2.4	Caracterización por Microscopía HR-TEM	179
IV.3	Resultados y Discusión	180
IV.3.1	Caracterización de los PC en Condiciones Favorables para el Ensamble por Espectroscopía FT-IR	181
IV.3.2	Caracterización de los PCs en Condiciones Favorables para el Ensamble por Espectroscopía Raman	186
IV.3.3	Caracterización de los Ensamblados Supramoleculares por SEM.....	189
IV.3.4	Caracterización de los Ensamblados Supramoleculares por STEM y HR-TEM	193
IV.4	Conclusiones	197
CONCLUSIONES GENERALES		199
TRABAJO FUTURO		202
1	Referencias.....	204
2	Apéndices.....	212
APÉNDICE A Aminoácidos.....		212
APÉNDICE B Patrones Isotópicos		216
APÉNDICE C Mecanismos de Reacción Complementarios		218
3	Anexos	220
Publicación Design, synthesis and characterization of new cyclic D, L – α - alternate amino acid peptides by capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry.....		220

Índice de Figuras

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

- Figura I. 1. Dipéptido producto de una reacción de condensación y formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos (nomenclatura: C-carbono, N-nitrógeno, O-oxígeno, H-hidrógeno, R-cadena alifática). Dicho enlace está formado por 4 átomos en un mismo plano (C, H, O y N), cuya estructura posee un carácter parcial de doble enlace (semi-planar) que impide la rotación del mismo.33
- Figura I. 2. Posibles auto-ensambles moleculares de péptidos en NTPs. Donde: a) Enrollado helicoidal de PLs o laminares, b) Péptidos tipo varilla, que a su vez pueden ensamblarse en ramillete, c) Apilamiento de PCs para formar tubos continuos, y d) Sectores peptídicos tipo cuña ensamblados en discos y éstos en forma de tubos (adaptado de [28]).37
- Figura I. 3. Representación de la formación de NTPs (abajo) a partir del auto-ensamble antiparalelo β -tubular por puentes de hidrógeno aceptores y donadores entre la N-H y C=O de los esqueletos en diferentes PCs (arriba). Donde: a) PC y NTP con α -aminoácidos D, L alternados, b) PC y NTP con β -aminoácidos, c) PC y NTP con α - y γ -aminoácidos, y d) PC y NTP heterocíclicos con ϵ -aminoácidos. Por simplicidad se omiten las cadenas laterales (adaptado de [109]).40
- Figura I. 4. Representación del orden jerárquico del ensamble de los PCs a NTPs y posteriormente en arreglos supramoleculares tipo ramilletes (adaptado de [123]). En el NTP las esferas de colores representan los grupos de las cadenas laterales que controlan la funcionalidad de la superficie externa.43
- Figura I. 5. Cadenas laterales de la Gln (rojo) formando enlaces de hidrógeno inter- e intramoleculares (azul) entre los NTPs, confiriéndole mayor estabilidad y orden molecular. En la figura se ilustran el mayor número de puentes de hidrógeno posibles de la estructura. Por simplicidad los PCs se representan en forma de rectángulos y en color verde los puentes de hidrógeno que dan lugar a los NTPs (adaptado de [96, 124]).44
- Figura I. 6. Diagrama esquemático de los componentes de la Electroforesis Capilar (modo positivo).48
- Figura I. 7. Formación de la doble capa eléctrica que genera el EOF. Los grupos SiO^- prevalecen en las paredes del capilar, los cuales son neutralizados por la adsorción de cationes (Capa Stern) y por la atracción-repulsión de los cationes provenientes del volumen de la solución hasta alcanzar un equilibrio (Capa Difusa), dando lugar a una doble capa eléctrica (adaptado de [131, 135]).52
- Figura I. 8. Migración de los analitos en EC en modo de polaridad positiva. Los cationes de bajo peso molecular y altamente cargados tienen movibilidades grandes, mientras que los cationes de mayor peso molecular y de igual carga se mueven más lento; seguidos de los compuestos neutros que migran a la velocidad del EOF. Los aniones migran mucho más lento, ya que son atraídos por el ánodo, pero también por el EOF hacia el cátodo (adaptado de [131]).54
- Figura I. 9. Arreglo coaxial y concéntrico de 3 tubos para el sistema EC-IES-EM vía SL (izquierda, adaptado de [135]) y la generación de los iones en forma de gas a través de dicho arreglo (derecha).64
- Figura I. 10. Corte del outlet del capilar: a) Corte plano apropiado, y b) Corte irregular no ideal o astillado (adaptado de [165]).65

CAPÍTULO II. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS CÍCLICOS

- Figura II. 1. Resinas de uso común en la SPFS.77
- Figura II. 2. Mecanismo de reacción de activación del aa en el $-\text{COOH}$ usando DIPEA y su posterior anclaje a la resina 2ClTrt-Cl.79
- Figura II. 3. Mecanismo de reacción de remoción del grupo Fmoc del $-\text{NH-R}$ terminal en una cadena peptídica en medio básico (Pip/DMF, 20/80, v/v) en la SPFS-Fmoc.80
- Figura II. 4. Mecanismo de dimerización en medio ácido del indol del Trp: 1) Protonación, 2) ataque nucleofílico del doble enlace del indol al carbocatión, y 3) eliminación del protón.84

Figura II. 5. Tautomerización del imidazol en la His.	84
Figura II. 6. Racemización del carbanion intermediario.....	85
Figura II. 7. Principales reactivos de acoplamiento utilizados en la SPFS.	86
Figura II. 8. Mecanismo de acoplamiento entre aminoácidos con el uso de la carbodiimida DICA (similar para DCC).....	87
Figura II. 9. Estructuras de algunas sales de fosfonio (BOP, PyBOP) y sales de uronio (HBTU, TBTU) que son usadas como agentes de acoplamiento.	88
Figura II. 10. Mecanismo de activación y formación del enlace peptídico usando una sal de uronio (HBTU) en medio básico (DIPEA). El primer paso es la activación del carboxilo con la sal “-onio” seguido del ataque nucleofílico del componente amino al éster activo para formar el enlace amida (peptídico).	89
Figura II. 11. Mecanismo de "capado" de los sitios activos de la resina polimérica 2CITrt-Cl.....	90
Figura II. 12. Estructuras químicas de los diferentes aminoácidos protegidos utilizados en esta SPFS.	94
Figura II. 13. Estructura química de las resinas poliméricas: a) 2CITrt-Cl y b) Rink amida MBHA.	95
Figura II. 14. a) <i>N, N</i> -diisopropiletilamina (DIPEA), b) ácido propanofosfórico anhidro (T3P), c) triisopropilsilano (TIPS), y d) 4-(dimetilamino)piridina (DMAP).....	96
Figura II. 15. Sistema de destilación para Pip y DCM. La cobertura de aluminio permite homogeneizar el calentamiento.	97
Figura II. 16. a) Vórtex mixer para agitar el reactor de síntesis, y b) Sistema de filtración (lavados de reacción) conectado a la bomba de vacío.	98
Figura II. 17. a) Rotavapor, y b) Sistema de evaporación de TFA con trampa de NaOH concentrado y burbujeo con N ₂ (g).....	99
Figura II. 18. Perlas de la resina 2CITrt-Cl-aminoácido observadas al microscopio óptico: a) el aminoácido anclado y el -NH ₂ libre, y b) acoplamiento exitoso de dos aminoácidos en la resina polimérica.	114
Figura II. 19. Imágenes de: a) PC protegido después del proceso de extracción líquido-líquido, y b) PC desprotegido después del proceso de decantación y precipitación.	115
Figura II. 20. Análisis cualitativo por CLAR del proceso de ciclado del compuesto 12aaSer1 protegido usando una columna Phenomenex-Jupiter (C18, 5 μm, 4.60 x 250 mm, 300 Å) equipada con una pre-columna Gemini (C18, 4 x 3 mm). Método de gradiente 60/90 a 10/90 (v/v, H ₂ O _{MO} /ACN con 0.1 % y 0.08 % de TFA) por 30 min, manteniendo una meseta hasta 40 min, a un flujo de 1 mL·min ⁻¹ y detección UV-VIS a λ = 235 nm. PL (T = 20 °C) y PC (T = 27 °C).	116
Figura II. 21. Análisis cualitativo del proceso de ciclado del compuesto 10aaSer2 protegido utilizando las columnas cromatográficas y las condiciones experimentales descritas en la Figura II. 20. PL (T = 19 °C), PC 24 h (T = 21 °C) y PC 48 h con exceso de T3P (T = 24.5 °C).	117
Figura II. 22. Análisis cualitativo del proceso de ciclado utilizando las columnas cromatográficas y las condiciones experimentales descritas en la Figura II. 20. Donde: a) PL (T = 20 °C) y PC (T = 21.5 °C) del compuesto 8aaSer3, y b) PL (T = 22 °C) y PC (T = 18 °C) del compuesto 10aaSer3.	118
Figura II. 23. Cromatograma de purificación del PC8aaSer1 desprotegido realizado en una columna semi-preparativa Jupiter (C18, 10 μm, 10.0 x 250 mm, 320 ± 40 Å) equipada con una pre-columna Gemini (C18, 4 x 3 mm). Utilizando un método de gradiente 60/90 a 10/90 (v/v, H ₂ O _{MO} /ACN con 0.1 % y 0.08 % de TFA) por 30 min, manteniendo una meseta hasta 40 min, a un flujo de 4.71 mL·min ⁻¹ y detección UV-VIS a una λ = 235 nm y una T = 19 °C.	120
Figura II. 24. Cromatogramas de análisis realizados con las columnas cromatográficas y las condiciones experimentales descritas en la Figura II. 20. Donde: a) PC10aaSer2 desprotegido (T = 18 °C) y b) PC10aaSer3 desprotegido (T = 19 °C).....	121
Figura II. 25. Espectros de masas obtenido por CL-IES-EM para el PC8aaSer3: a) experimental y b) teórico. El recuadro azul es una amplificación de los patrones isotópicos experimental (verde) y teórico (gris). Utilizando un equipo CL-EM Bruker Daltonik GmbH en polaridad positiva a un flujo de 50 nL·min ⁻¹ con ACN (0.08 % de HCOOH) como eluyente en el intervalo de <i>m/z</i> = 300 – 1600. Calibrando el sistema con formiato de sodio.	124
Figura II. 26. Espectro de masas obtenido por CL-IES-EM para el PC10aaSer2: a) experimental y b) teórico. El recuadro azul es una amplificación de los patrones isotópicos experimental (azul) y teórico (negro). Con las condiciones experimentales de la Figura II. 25, en el intervalo de <i>m/z</i> = 400 – 1600.....	125

Figura II. 27. Espectro de masas obtenido por CL-IES-EM para el PC10aaSer3: a) experimental y b) teórico. El recuadro azul es una amplificación de los patrones isotópicos experimental (naranja) y teórico (gris). Con las condiciones experimentales de la Figura II. 25, en el intervalo de $m/z = 400 - 1600$ 126

CAPÍTULO III. PÉPTIDOS CÍCLICOS: DETERMINACIÓN DE PUREZA Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA

Figura III. 1 Estructuras químicas de cada uno de los aminoácidos que intergran a los diferentes PCs de cada la Serie 1, 2 y 3. En color rojo (Asp), verde-azul (His), azul (Asn), negro resaltado (DAIa) y verde (Trp) se indican los grupos de las cadenas laterales de cada aminoácido. 135

Figura III. 2. Estructuras del a) PC8aaSer1 y b) PC12aaSer1. En color se indican los grupos -R de las cadenas laterales de los aa's que los conforman, las cuales confieren propiedades específicas a la superficie externa de cada PC. 137

Figura III. 3. Estructuras del a) PC8aaSer2, b) PC10aaSer2, y c) PC12aaSer2. En color se indican los grupos -R de las cadenas laterales de los aa's que los conforman, las cuales confieren propiedades específicas a la superficie externa de cada PC. 139

Figura III. 4. Estructuras del a) PC8aaSer3, b) PC10aaSer3, y c) PC12aaSer3. En color se indican los grupos -R de las cadenas laterales de los aa's que los conforman, las cuales confieren propiedades específicas a la superficie externa de cada PC. 141

Figura III. 5. Diagrama gráfico de la carga teórica neta de los PLs y PCs de las Series 1, 2 y 3 dependiendo del pH del medio de la solución (calculados a partir de los PL en LifeProtein [179]). 142

Figura III. 6. Electroferogramas MSD (Detección de EM, por sus siglas en inglés) de la EC-IES-EM en modo SCAN y SIM para la Serie 3 (a-c) y su correspondiente Espectro de Masas (d-f) de los PCs de 8, 10 y 12 aa. Los insertos en las figuras (D-F) corresponden a los Espectros de Masas Isotópicos de los iones de masa molecular de carga simple (Condiciones experimentales ver sección III.3.3 Equipos y Métodos). 156

Figura III. 7. Electroferogramas MSD de la EC-IES-EM en modo SCAN para el PC10aaSer3, tanto en solución fresca como almacenada durante 7 meses (0-4 °C) en $BGE_{10,8}$ (Condiciones experimentales ver sección III.3.3 Equipos y Métodos). El inserto corresponde al Espectro de Masas del modo SCAN de la solución envejecida. 160

Figura III. 8. Movilidades electroforéticas de los compuestos de la Serie 3 modificando tanto el pH del BGE ($BGE_{10,8}$ a 20 kV y $BGE_{10,3}$ a 18 kV) como de la solución del PC (pH 9.0 y 2.0). ECZ-UV: capilar de sílice fundida previamente activado $d_{in} = 75 \mu m$ ($d_{ex} = 380 \mu m$), $L = 35$ cm, $l = 26.5$ cm, $[PC] = 150 \mu M$, inyección de zonas aplicando 30 mbar MN- BGE -Muestra (3, 1.6, 3 s) y usando una presión de 50 mbar durante el análisis, $T = 25$ °C, $\lambda = 200$ nm; $n = 4$ repeticiones experimentales. El inserto corresponde a los electroferogramas ECZ-UV de los posibles ensambles de la Serie 3 disueltos a pH 2.0 y analizados en $BGE_{10,3}$ (50,50, v/v), cuyos picos se superponen con el MN. 162

Figura III. 9. Espectro de masas del compuesto 8aaSer3 disuelto a pH 2.0, $[PC] = 2$ mM, $BGE_{10,3}$, 50/50 (v/v) a 18 kV por EC-IES-EM. Capilar de sílice fundida previamente activado $d_{in} = 75 \mu m$ ($d_{ex} = 380 \mu m$), $L = 80$ cm, $l = 22$ cm, inyección de zonas aplicando 30 mbar Muestra- BGE -MN- BGE (12, 15, 6, 6 s) y usando una presión de 50 mbar durante el análisis, $T = 25$ °C, $\lambda = 200$ nm. (Condiciones experimentales IES-EM ver sección III.3.3 Equipos y Métodos-Estudio de pureza), $n = 3$ repeticiones. Los insertos corresponden a los patrones isotópicos teóricos de los ensambles. 168

CAPÍTULO IV. PÉPTIDOS CÍCLICOS A SUPRAESTRUCTURAS

Figura IV. 1. Formación de geles y suspensiones en las soluciones acidificadas (pH 2.0) de los PCs 22 mM después del reposo por 72 h en refrigeración y del proceso de lavado-centrifugado. Donde: a) Gel de 8aaSer1, b) Gel de 12aaSer1, c) Gel de 8aaSer2, d) Gel-suspensión de 12aaSer2, e) Gel de 8aaSer3, f) Suspensión de 12aaSer3, g) Suspensión de 10aaSer3, y h) Gel-suspensión de 10aaSer2. 181

Figura IV. 2. Espectros FT-IR de las bandas de vibración del compuesto PC8aaSer1 y del mismo compuesto después de ser acidificado para promover el posible ensamble en forma de NTPs. Condiciones experimentales descritas en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos.	182
Figura IV. 3. Espectros FT-IR de las bandas de vibración de estiramiento correspondientes al enlace de puente de hidrógeno C=O···H-N intermolecular por apilamiento antiparalelo tipo β -hoja de los ensambles de los PCs Serie1-3.	183
Figura IV. 4. Espectros FT-IR de las bandas de vibración de estiramiento correspondientes a la Amida I (C=O), II (C=O) y III (N-H) propias del apilamiento intermolecular antiparalelo tipo β -hoja para los ensambles de los PCs Serie1-3.	185
Figura IV. 5. Espectros Raman de las bandas de vibración correspondientes a la Amida I, II y III presentes en apilamiento intermolecular antiparalelo tipo β -plegada para los ensambles de los PCs Serie1-3.	187
Figura IV. 6. Espectros Raman de las bandas de vibración de estiramiento correspondientes a los enlaces C-C y C-N presentes en las estructuras tipo β -plegada para los ensambles de los PCs Serie1-3.	188
Figura IV. 7. Fotografía de los cristales de NTPs asociados en forma de ramilletes del compuesto 10aaSer3 observados en los análisis de Microespectroscopía Raman, utilizando las condiciones experimentales descritas en la sección IV.2.2.2 Caracterización por Espectroscopía Raman, con una apertura rectangular 50 x 50 μm y 20 kx aumentos en el objetivo del microscopio.	189
Figura IV. 8. Micrografía SEM de los arreglos supramoleculares de NTPs para el compuesto 8aaSer1 a una concentración 2 mM obtenidos por el método de preparación y tratamiento descritos en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos.	190
Figura IV. 9. Micrografías SEM de los ensambles peptídicos supramoleculares a) 8aaSer2, b) 8aaSer3, c) 10aaSer2 y d) 10aaSer3, a una concentración 2 mM obtenidos por el método de preparación y tratamiento descritos en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos.	191
Figura IV. 10. Micrografías SEM de los NTPs de a) 8aaSer1, b) 8aaSer2 y c) 12aaSer3, a una concentración 22 mM obtenidos por el método de preparación y tratamiento descritos en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos.	192
Figura IV. 11. Micrografías STEM y HR-TEM de los arreglos supramoleculares de NTPs a partir del péptido 8aaSer1 (22 mM, obtenidos por la metodología de preparación y tratamiento descritos en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos). Donde: a) STEM en rejilla con recubrimiento de carbono. El inserto sepia (izquierda superior) es una amplificación STEM y el inserto azul (derecha superior) es una amplificación HR-TEM de la misma muestra, y b) HR-TEM de un arreglo supramolecular de NTP en una rejilla sin recubrimiento, el inserto es la amplificación sobre una rejilla con recubrimiento de carbono.	194
Figura IV. 12. Micrografías HR-TEM de los arreglos supramoleculares de los NTPs de los compuestos peptídicos: a) 8aaSer1 y b) 10aaSer3 (expuesto a calentamiento prolongado con lámpara de IR). Supra-nanoestructuras de NTPs obtenidos por la metodología de preparación y tratamiento descritos en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos, a una concentración 22 mM, depositados sobre rejilla sin recubrimiento de carbono.	195
Figura IV. 13. Micrografías HR-TEM y STEM de los arreglos supramoleculares de los NTPs del péptido 8aaSer1 (22 mM) obtenidos por la metodología descrita en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos, depositados sobre una rejilla sin recubrimiento de carbono. Donde: a) HR-TEM de los NTPs (expuestos a calentamiento de 5 min x 5 min de descanso con lámpara de IR. Se circula la zona quemada por el láser, y b) HR-TEM de las supra-nanoestructuras peptídicas (expuestos a calentamiento prolongado con lámpara de IR). El inserto es una ampliación STEM de este mismo arreglo quemado por el láser.	196

APÉNDICES

Figura A. 1. Estructura general de un aminoácido caracterizada por la presencia de un C_{α} central unido a un -COOH, un $-NH_2$, un -H y la cadena lateral -R.	212
Figura A. 2. Estructura catiónica, anónica y el zwitterion (formado en el pI) de un aa determinado.	213
Figura A. 3. Diagrama de las diferentes propiedades fisicoquímicas de los aa de acuerdo a su cadena lateral -R.	213
Figura A. 4. Mecanismo de reacción propuesto de la liberación del PL protegido, una vez que ha sido desprotegido el grupo $-NH_2$ terminal.	218

Figura A. 5. Mecanismo de reacción propuesto para la ciclización cabeza-cola del PL protegido, cuyos grupos –COOH y –NH₂ terminales se encuentran libres.219

Índice de Tablas

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

Tabla I. 1. Efecto del d_{in} del capilar en la diferencia de temperatura entre la pared interna y el centro del capilar (adaptado de [149]).	57
Tabla I. 2. Código, secuencia, fórmula y masa teórica de los PCs a sintetizar en el presente proyecto de tesis.	69

CAPÍTULO II. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS CÍCLICOS

Tabla II. 1. Principales diferencias de las técnicas de SPFS Fmoc y Boc.	76
Tabla II. 2. Grupos protectores comunes de la cadena lateral -R de los aa's empleados en este proyecto [24]	82
Tabla II. 3. Carga experimental de la resina 2CITrt-Cl-1aa.	113
Tabla II. 4. Tiempos de las fracciones de recolección en el proceso de purificación por CLAR (columnas y condiciones experimentales indicadas en la Figura II. 23) de los PCs desprotegidos.	120
Tabla II. 5. Composición química de los PCs sintetizados y sus masas teóricas y experimentales con sus respectivos patrones isotópicos obtenidos con el software DataAnalysis v. 4.1.	127
Tabla II. 6. Rendimientos netos porcentuales de los Péptidos Cíclicos sintetizados.	129

CAPÍTULO III. PÉPTIDOS CÍCLICOS: DETERMINACIÓN DE PUREZA Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA

Tabla III. 1. Estructura primaria y secundaria de los péptidos de la Serie 1, su hidrofobicidad en función del pH, hidrofilia/hidrofobia y pI de cada PC.	137
Tabla III. 2. Estructura primaria y secundaria de los péptidos de la Serie 2, su hidrofobicidad en función del pH, hidrofilia/hidrofobia y pI de cada péptido.	138
Tabla III. 3. Estructura primaria y secundaria de los péptidos de la Serie 3, su hidrofobicidad en función del pH, hidrofilia/hidrofobia y pI de cada péptido.	140
Tabla III. 4. Composición de los <i>BGE</i> (pH 8.0) en los cuales se solubilizan los PCs.	151
Tabla III. 5. Solubilidad del PC10aaSer3 con diferentes fuerzas iónicas.	152
Tabla III. 6. Movilidades electroforéticas de los 8 PCs sintetizados obtenidas de las separaciones de EC-IES-EM (Condiciones experimentales ver sección III.3.3 Equipos y Métodos).	154
Tabla III. 7. Masa teórica (Teo.) y experimental (Exp.), y la intensidad relativa de los PCs y sus isótopos, correspondientes a la forma protonada y sus formas de aductos con una carga global, de los estudios de EC-IES-EM*.	157
Tabla III. 8. Masa teórica (Teo.) y experimental (Exp.), y la intensidad relativa de los PCs y sus isótopos, correspondientes a la forma protonada y sus formas de aductos con dos cargas globales, de los estudios de EC-IES-EM*.	158
Tabla III. 9. Movilidades electroforéticas por ECZ-UV de los 8 PCs (Serie 1, 2 y 3) a diferente pH del <i>BGE</i> (pH 8.0 y 3.0) y de la solución del compuesto (pH 9.0 y 2.0); n = 4 repeticiones (Condiciones experimentales ver pie de la Figura III. 8).	164
Tabla III. 10. Movilidad electroforética del péptido 8aaSer3 a 150 μ M y 2 mM a diferente pH del <i>BGE</i> (pH 8.0 y 3.0) y de la solución del PC (pH 9.0 y 2.0); n = 4 repeticiones (Condiciones experimentales ver pie de la Figura III. 8).	167
Tabla III. 11. Masa teórica (Teo.) y experimental (Exp.), y la intensidad relativa de los patrones isotópicos correspondientes a los ensambles de los PCs Serie3, en su forma protonada y de aductos con carga global de los estudios por EC-IES-EM DataAnalysis v. 4.1) de los posibles ensambles de los PCs de la Serie 3.	169

CAPÍTULO IV. PÉPTIDOS CÍCLICOS A SUPRAESTRUCTURAS

Tabla IV. 1. Bandas de vibración correspondientes al arreglo antiparalelo β -laminar por enlaces de puentes de hidrógeno N-H \cdots O=C entre los esqueletos de los PCs de cada Serie por Espectroscopía FT-IR.184

APÉNDICES

Tabla A. 1. Clasificación de los péptidos según su número de aminoácidos.....213

Tabla A. 2. Isótopos de algunos elementos presentes en moléculas orgánicas (C, H, O, N, P, S, Cl, Br, Na, K) * ..216

Índice de Esquemas

CAPÍTULO II. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS CÍCLICOS

Esquema II. 1. Principio básico de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS).....	74
Esquema II. 2. Diagrama de flujo de la SPFS en la resina 2CITrt-Cl de las 8 secuencias peptídicas de este proyecto.	103
Esquema II. 3. Diagrama de flujo del protocolo de liberación del PL protegido en las -R y con los grupos -COOH y -NH ₂ terminales libres.	104
Esquema II. 4. Diagrama de flujo del protocolo de ciclización Cabeza-Cola en condiciones de alta dilución y monitoreo del proceso por CLAR.	106
Esquema II. 5. Diagrama de flujo del proceso de extracción del PC protegido en las cadenas laterales.	107
Esquema II. 6. Diagrama de flujo del proceso de desprotección de las cadenas laterales del PC.	109

Consideraciones Generales

Una parte de los resultados más relevantes y producto del desarrollo de este trabajo de tesis, han sido publicados y expuestos, como se describe a continuación:

- Una publicación en la revista *Analytical Biochemistry*, Science Finder (material que puede encontrarse en la sección de ANEXOS de este manuscrito):
María Dámaris Cortez-Díaz, Fanny d'Orlyé, Silvia Gutiérrez-Granados, Luis Manuel de León-Rodríguez, Anne Varenne. Design, synthesis and characterization of new cyclic D, L – α - alternate amino acid peptides by capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, 502 (2016) 8-15.
- Participación en dos congresos nacionales organizados por la Sociedad Mexicana de Electroquímica (SMEQ). Obteniendo la distinción de primer lugar en modalidad de póster, siendo acreedora a presentar una parte del trabajo de tesis en la reunión bianual de la Electrochemical Society.
- Participación en cuatro congresos internacionales organizados por The International Society of Electrochemistry (ISE y the ISE student meeting), por la ECS y la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica (SIBAE).
- De estas participaciones se cuentan con dos memorias en extenso de los trabajos presentados, una a nivel nacional y otra a nivel internacional.
- Actualmente la estudiante es miembro activo de la SMEQ y de la ECS.

Símbolos y Abreviaturas

Símbolo	Descripción
ρ	Densidad ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
μ_{EP}	Movilidad electroforética del analito ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$), <i>EP</i> (Electrophoretic)
μ_{EOF}	Movilidad del flujo electroosmótico ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$), <i>EOF</i> (Electroosmotic Flow)
μ_{APP}	Movilidad electroforética aparente del analito ($\text{cm}^2\cdot\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$), <i>APP</i> (Apparent)
λ	Longitud de onda (nm)
2CITrt-Cl	Resina polimérica 2-clorotritil cloruro
aa/aa's	Aminoácido/ aminoácidos
ACN	Acetonitrilo
AcOH	Ácido acético
E_{PC}	Ensamblados de péptidos cíclicos
BGE	Electrolito de fondo o soporte, <i>BGE</i> (Background Electrolyte)
BGE_{10, 8}	Carbonatos de amonio 10 mM (pH 8.0)/EtOH
BGE_{10, 3}	Formiatos de amonio 10 mM (pH 3.0)/EtOH
BGE_{1, 8}	Carbonatos de amonio 1 mM (pH 8.0)/EtOH
BGE_{0.1, 8}	Carbonatos de amonio 0.1 mM (pH 8.0)/EtOH
Boc	Tert-butoxicarbonilo
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
DCM	Diclorometano o cloruro de metileno
d_{ex}	Diámetro externo (μm o Å)
d_{in}	Diámetro interno (μm o Å)
DIPEA	<i>N, N</i> -diisopropiletilamina
DMA	<i>N, N</i> -dimetilacetamida
DMAP	4-(<i>N, N</i> -dimetilamino)-piridina
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Electroforesis Capilar
ECZ	Electroforesis Capilar en Zona
EIC	Corriente del Ion Extraído, <i>EIC</i> (Extracted Ion Current)

EM	Espectrometría de Masas
EOF	Flujo Electroosmótico, <i>EOF</i> (Electroosmotic Flow)
eq.	Equivalente (s)
EtOH	Etanol
f.i.	Fuerza iónica (M, mM)
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo
FT-IR	Espectroscopía Infrarrojo con Transformadas de Fourier, FT-IR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
IES	Ionización Electrospray
GN	Gas Nebulizador
GP	Grupo protector permanente
GS	Gas de Secado
GT	Grupo protector temporal
H₂O_{MQ}	Agua MilliQ desionizada (18 MΩ/cm, 25 °C)
HBTU	Hexafluorofosfato <i>N, N, N', N'</i> -tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio, hexafluorofosfato O-(benzotriazol-1-il)- <i>N, N, N', N'</i> -tetrametiluronio
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
HR-TEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución, HR-TEM (High Resolution-Transmission Electronic Microscopy)
IsoPrOH	Isopropanol o 2-propanol
L	Longitud total del capilar (cm)
<i>l</i>	Longitud efectiva de detección del capilar (cm)
MeOH	Metanol
MN	Marcador Neutro
MSD	Detección de Espectrometría de Masas, MSD (Mass Spectrometry Detection)
Mtt	4-trimetiltritilo
NTP/NTPs	Nanotubo Peptídico/Nanotubos Peptídicos
OtBu	Tert-butiléster
<i>P</i>	Presión (mbar)
Pip	Piperidina
P.M.	Peso Molecular (g·mol ⁻¹)
PC/PCs	Péptido Cíclico/ Péptidos Cíclicos
PL/PLs	Péptido Lineal/ Péptidos Lineales

P_{eb}	Punto de ebullición a 1 atm
pI	Punto isoeléctrico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SD	Desviación Estándar, SD (Standar Deviation)
SEM	Microscopía electrónica de barrido, SEM (Sanning Electron Microscopy)
SIM	Monitoreo de un Sólo Ión, SIM (Single Ion Monitoring profile)
SL	<i>Sheath Liquid</i> (Líquido de soporte o líquido de cobertura)
STEM	Microscopía electrónica de barrido de transmisión, STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy)
T	Temperatura (°C)
T3P/50% AcOEt	Solución del anhídrido propanofosfónico en 50 wt. % de acetato de etilo
TEM	Microscopía electrónica de transmisión, TEM (Transmission Electron Microscopy)
TFA	Ácido trifluoroacético, TFA (Trifluoroacetic Acid)
TFE	2,2,2-trifluoroetanol
TIPS	Triisopropilsilano
t_m	Tiempo de migración (min)
Trt	Tritilo o trifenilmetilo
UV-Vis	Ultravioleta visible
Vaso de ppdo.	Vaso de precipitado
WD	Distancia de trabajo, WD (Work Distance)

Resumen

De la gran variedad de nanotubos existentes, los más estudiados han sido los nanotubos de carbono (NTCs), debido a sus propiedades estructurales, mecánicas y eléctricas únicas. Sin embargo, los NTCs son poco solubles y su tamaño es poco homogéneo, son un poco tóxicos y su fabricación es costosa. Además, presentan oportunidades limitadas de modificación de su superficie. Por el contrario, algunos bionanotubos como los nanotubos peptídicos (NTPs) permiten la funcionalización de su superficie, son biocompatibles y su producción es de bajo costo. Los NTPs son capaces de formar mediante enlaces reversibles no covalentes ensamblajes supramoleculares y se han identificado como herramientas interesantes para tratamientos antimicrobianos, para biosensores y dispositivos ópticos, liberadores de inhibidores de genes, como canales selectivos transportadores de iones transmembrana, y como nanoplataformas. En este contexto, los NTPs son identificados como potenciales instrumentos del tipo nanosportes/nanoplataformas para las separaciones electrocinéticas como la electroforesis capilar (EC), por lo que la caracterización de estos NTPs y sus precursores es de vital importancia para su posterior aplicación.

El auto-ensamble de los NTPs depende de la estructura y naturaleza química de los péptidos cíclicos (PCs) monoméricos, influyendo en sus propiedades. Por lo tanto, la elección de los monómeros peptídicos y la caracterización de su estructura son vitales para su posterior uso. En este trabajo se diseñó y sintetizó (por síntesis de péptidos en fase sólida y ciclización en alta dilución) por primera vez un nuevo conjunto original de ocho secuencias de PCs conformadas por 8, 10 y 12 α -aminoácidos D, L alternados, cuyo diámetro interno está comprendido entre 7 y 13 Å, el cual está controlado por la longitud de la cadena aminoacídica. Estos PCs presentan una amplia variedad de propiedades (diámetro, carga global superficial, hidrofobicidad, etc.) que pueden abrir el paso a nuevas aplicaciones.

La estructura de estos nuevos PCs fue determinada gracias al acoplamiento de las técnicas de Electroforesis Capilar-Ionización Electrospray-Espectrometría de masas (EC-IES-EM), desarrollada por primera vez para este propósito. Esta metodología de separación fue optimizada

y los PCs fueron separados satisfactoriamente en un electrolito soporte básico e hidro-orgánico (pH 8.0; 50/50, H₂O/EtOH (v/v)), y analizados en modo positivo para la detección en EM. Se estudió el efecto de la estructura de los PCs en la movilidad electroforética, cuyos electroferogramas y sus correspondientes espectros de masas fueron analizados profundamente, encontrando que en muchos casos el comportamiento electroforético va de acuerdo con la carga global teórica y la masa de los compuestos. Pudiendo verificar mediante los patrones isotópicos y la presencia de aductos la alta pureza de los ocho PCs sintetizados, así como la ausencia de sus precursores lineales. Del mismo modo, esta metodología permitió realizar el estudio de su estabilidad en muestras almacenadas en solución básica durante varios meses, encontrando una desnaturalización de hasta un 2 % del PC en forma de péptido lineal. Por lo tanto, se desarrolló una nueva metodología de EC-IES-EM para el control de la estructura y pureza de los potenciales precursores de NTPs que podrían ser empleados, por ejemplo, como nanoplataformas en diagnóstico o como objetos de tamizaje para propósitos separativos.

En vista del posible auto-ensamble de los PCs para obtener NTPs, se desarrolló una metodología basada en EC en zona con detección UV-Vis, analizando el efecto del pH del medio en la movilidad electroforética de los PCs para el estudio de sus propiedades fisicoquímicas en medio básico y su posible auto-ensamble en medio ácido, encontrando que el electrolito soporte de análisis impone la carga final a los compuestos. En este sentido, la metodología EC-IES-EM previamente desarrollada y optimizada permitió, a través de los espectros de masas permitió evidenciar el inicio de la formación de pequeños ensamblados.

Por otro lado, mediante los estudios por las espectroscopías Infrarrojo y Raman fue posible confirmar la asociación intermolecular de los PCs en forma β -plegada por puentes de hidrógeno. Mientras que, las microscopías electrónicas proporcionaron información que permite verificar la presencia de los NTPs asociados en forma de fibrillas, en un ensamble supramolecular. Pudiendo, a su vez, optimizar la concentración y las condiciones de acidificación para la formación de los auto-ensambles de PCs. Además, fue posible confirmar las propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas de los compuestos. Finalmente, se observó un fenómeno interesante debido al calentamiento prolongado de los ensamblados bajo la luz infrarroja, obteniendo nanoestructuras fundidas en una especie de red.

Abstract

There is a great variety of nanotubes; one of the most studied have been carbon nanotubes (CNTs), due to their unique structural, mechanical and electronic properties. However, CNTs have poor solubility and size homogeneity, and are quite toxic and expensive to produce. They furthermore present limited opportunities for surface modifications. On the contrary, bionanotubes as peptide nanotubes (PNTs) allow surface functionalization, biocompatibility, and low production cost. PNTs lead to reversible noncovalent bonded supramolecular assembly and they have been identified as interesting tools for antimicrobial treatments, biosensors and optical devices, gene delivery inhibitors, selective transmembrane transport ion channels, and as nanoplatforms. In this context, PNTs are identified as potencial tools like nanosupports/nanoplatforms for electrokinetic separations as capillary electrophoresis (CE), and then it is of great importance to characterize these NTPs and their precursors for the next application.

The self-assembly of PNTs depends on the structure and chemical nature of cyclic peptide (CPs) monomers, affecting their properties. Therefore, the choice of the CP monomers and their structure characterization are of high challenge for their further use. In this work, we designed and synthesized (by solid phase peptide synthesis and high dilution cyclization) for the first time a new set of eight original CP sequences shaped of 8, 10 and 12 D, L α -alternate amino acids with an internal diameter from 7 to 13 Å, which is controlled by the amino acidic chain length. These CPs present a variety of properties (diameter, global surface charge, hydrophobicity) that can open the way to new applications.

The structure of these new CP was determined thanks to a coupled Capillary Electrophoresis–Electro Spray Ionization–Mass Spectrometry (CE–ESI–MS) methodology, developed for the first time for this purpose. The CE–ESI–MS separation was optimized and the CPs were successfully separated in a basic hydro-organic background electrolyte (pH 8.0; 50/50 H₂O/EtOH (v/v)), and analyzed in positive mode for MS detection. The effect of CPs structure on electrophoretic mobility was studied; their electropherograms and corresponding mass spectra

were deeply analyzed, finding that in many cases the electrophoretic behavior is in agreement with theoretical global charge and mass compounds. This methodology allowed to verify through isotopic patterns and adducts presence the high purity of the eight synthesized CPs, and the absence of their linear peptide precursors. As well as their stability studies when basic solution samples are stored during several months, finding a denaturalization by 2 % of CP as linear peptide. We therefore developed a new CE–ESI–MS methodology for the structure and purity control of interesting potential precursors for PNTs that could be employed as nanoplateforms in diagnostics or pseudo sieving tools for separative purposes.

In view to the possible CPs self-assembly to obtain PNTs, we developed a methodology based on CE in zone with UV-Vis detection, analyzing the pH media effect CPs in electrophoretic mobility for the study of physical chemistry properties in basic media and the possible self-assembly in acid media, finding that background electrolyte of analysis gave the final charge to the compounds. In this way, the methodology previously developed and optimized CE–ESI–MS, through mass spectra allowed to evidence a beginning of auto-assembly of the CPs.

On the other hand, Infrared and Raman spectroscopy allowed to prove the intermolecular CP association in β -sheet type by hydrogen bondings. While, electronic microscopies could evidence the presence of PNTs associated in bundles, in a supramolecular assembly. Further, it was possible to optimize concentration and acidify conditions to obtain self-assembled CPs. Therefore we confirmed the hydrophilic and hydrophobic properties of the compounds. Finally, we observed an additional phenomenon due to the long heating of the assemblies with infrared light, obtaining melted nanostructures as a kind of net.

Introducción General

El desarrollo e innovación de las metodologías analíticas ha tenido un gran impacto en la actualidad en aplicaciones biomédicas, toxicológicas, medioambientales, de diagnóstico, entre otras. En este sentido, los métodos electrocinéticos representan una gama de herramientas de gran alcance que permiten separaciones ultrasensibles (nivel traza y ultra-traza) y altamente selectivas. Las cuales son de fácil ejecución, versátiles, de alta eficiencia, requieren poca cantidad de muestra y pueden ser automatizados. Además, si se consideran los fenómenos que se presentan en solución en los métodos electrocinéticos, es posible generar nuevos tipos de interacciones que permitan mejorar la resolución de los analitos mediante la integración de nuevos nanosportes dentro de los capilares o microcanales, para incrementar la selectividad de las separaciones y generar interacciones específicas con algunos analitos. Por ejemplo, en EC es posible modificar la superficie interna del capilar por la adición de sustancias o estructuras al electrolito soporte. En este contexto, los nanotubos de carbono (NTCs) funcionalizados han sido ampliamente estudiados como pseudo-fases estacionarias. Por lo que, en este trabajo de tesis doctoral se propone el desarrollo de nuevos NTPs con propiedades de superficie interna y externa específicas, como nuevos nanosportes que sean capaces de modificar la naturaleza interna de los capilares, ya que su estructura puede ser muy diversa, ofrece superficies potencialmente funcionalizables, son biocompatibles y son muy estables en un amplio intervalo de medios. Además, su estructura cilíndrica podría ser utilizada en el electrolito como herramienta de tamizaje para la separación de compuestos pequeños, amplificando sus posibles aplicaciones.

De este modo, en función de los resultados obtenidos, el trabajo futuro podrá orientarse para emplear a los ensambles tubulares supramoleculares obtenidos para su evaluación como potenciales pseudo-nanosportes en EC-UV o EC-IES-EM, innovando una o ambas técnicas analíticas de tal modo que sean altamente selectivas, específicas y sensibles para el análisis de especies de interés biológico en matrices complejas, en el análisis de microfluidos, la resolución de enantiómeros, de fármacos u otros analitos que podrían ser afines a la superficie selectiva de los nuevos NTPs propuestos.

Cabe destacar que, el desarrollo de nuevos elementos biocompatibles con propiedades específicas como los NTPs, demanda a su vez la necesidad de establecer una metodología de síntesis y caracterización de estos nuevos nanobiomateriales. Pudiendo desarrollar una metodología que sea altamente sensible y selectiva que permita verificar la estructura y pureza de los compuestos de partida, así como de los auto-ensambles. En este contexto, debido a que la obtención de los NTPs depende de la secuencia peptídica del monómero cíclico y de su concentración, es de crucial importancia verificar la pureza, estructura y composición de los compuestos de partida. Así como, realizar posteriormente su caracterización fisicoquímica. El desarrollo de una nueva metodología de caracterización basada en la propia EC en diferentes medios y cambiando varios parámetros puede permitir estudiar adicionalmente el auto-ensamble de los monómeros peptídicos en NTPs.

Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo se enfoca en diseñar, sintetizar y caracterizar ocho nuevos PCs, potenciales formadores de NTPs, estudiando sus propiedades fisicoquímicas para determinar las condiciones del auto-ensamble. Puesto que los NTPs podrían ser atractivos modificadores de la superficie interna de los capilares de sílice en EC.

Bajo esta propuesta, en el Capítulo I se describen conceptos básicos que permiten adentrarse en el tema de la obtención de NTPs y cuales han sido las principales técnicas de caracterización. De aquí, que se hace la propuesta del diseño de una nueva metodología a base de EC para la caracterización de estos nuevos compuestos. Entonces, se abordan temas relacionados con la instrumentación de esta técnica, los modos de experimentación que ofrece la EC, las potenciales aplicaciones que ha tenido, las posibles modificaciones, los parámetros que influyen en la eficiencia de las separaciones y los detectores que pueden integrarse a dicha metodología. En este último punto, se profundiza en los detectores de masas y sus modos de acoplamiento con la EC, así como los parámetros que deben optimizarse para lograr una alta eficiencia de resolución y sensibilidad. Finalmente, se plantea la propuesta de trabajo desglosada y la serie de objetivos perseguidos.

En el Capítulo II se detallan los conceptos básicos de la Síntesis de Péptidos en Fase Sólida-Fmoc para la obtención de péptidos. Seguida de la metodología que describe el proceso

de síntesis de los ocho péptidos nuevos, la caracterización y purificación de éstos por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), así como la determinación de su estructura y composición por EM.

En el Capítulo III se describe a detalle el análisis de la estructura química de las nuevas secuencias peptídicas sintetizadas y algunas propiedades fisicoquímicas, que posteriormente fueron estudiadas experimentalmente por la metodología EC-IES-EM. Además, se profundiza sobre las condiciones de almacenamiento de los péptidos para su preservación, abordando al mismo tiempo las principales técnicas para la determinación de su pureza. A continuación, se detalla la metodología desarrollada para la determinación de la solubilidad de los PCs, el diseño de una nueva metodología basada en EC con detección de masas (EC-IES-EM) para la verificación de la pureza y estabilidad de los compuestos. Asimismo, se detalla el estudio de las propiedades fisicoquímicas de los PCs en diferentes medios y su posible auto-ensamble en forma de NTPs.

En el Capítulo IV se puntualiza sobre la formación de los NTPs y los ensamblajes supramoleculares que éstos pueden generar. Entonces, se describe la metodología de obtención y la caracterización de los ensamblajes supramoleculares, verificando la formación de estos ensamblajes por las técnicas de espectroscopía Infrarrojo y Raman, así como por diferentes microscopías electrónicas.

Finalmente, se plantean las conclusiones generales de este trabajo y las perspectivas del proyecto.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

En este capítulo se abordan los antecedentes y la justificación del proyecto de tesis. Seguido del desglose de temas básicos que permiten adentrarse en la obtención de los NTPs empezando por tópicos tales como: ¿Qué son los péptidos?, ¿Cómo se obtienen?, ¿Cómo se forman los NTPs a partir de péptidos?, las principales técnicas de caracterización que permiten verificar la estructura de estos nanotubos, etc. Posteriormente, se hace la propuesta de emplear una nueva técnica de caracterización como la EC para los nuevos PCs que son posibles formadores de NTPs. Por lo que, se describen a detalle la instrumentación de esta metodología, los modos de EC, sus aplicaciones, los parámetros que permiten la eficiencia de las separaciones, las modificaciones que pueden realizarse en los capilares y los tipos de detectores que suelen usarse en EC. Dentro de éstos, se enfatiza en la EM, cuya separación y eficiencia depende del tipo de acoplamiento empleado, el cual también se describe detalladamente. Finalmente, se aborda la propuesta de tesis doctoral como tal, su desarrollo y los objetivos por alcanzar.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

I.1 Antecedentes y Justificación

Recientemente en el área de química analítica se ha trabajado fuertemente en la innovación de las técnicas de análisis y generación de sistemas analíticos modernos que permitan satisfacer las necesidades actuales de la sociedad, con especial atención en campos como biomedicina, inmunodiagnóstico, ecotoxicología y medio ambiente. Al respecto, una de las prioridades ha sido desarrollar nuevas metodologías selectivas (detección de una especie en una matriz muy compleja) y ultrasensibles (análisis a nivel traza y ultra-traza). En este contexto, los métodos electrocinéticos se han vuelto las técnicas separativas más atractivas, dado que requieren muy bajo consumo de muestra y productos químicos, por su gran eficacia, su facilidad de utilización y de automatización, y la gran variedad de compuestos que pueden ser detectados y separados. Además presentan: A) una amplia flexibilidad para elegir el “diseño” y los parámetros de análisis [1, 2], B) una elección importante de fenómenos que se pueden implementar durante la separación, C) la posibilidad de acoplarse a otros métodos sensibles de detección [3-5], y D) la integración en sistemas miniaturizados (“laboratorios en un chip”) [6-8]. Lo que amplía sus posibles aplicaciones, pudiendo diseñar una técnica de acuerdo a los analitos de interés, incrementando las posibilidades de optimizar las separaciones [4, 5].

Si se consideran los fenómenos en solución que se presentan en los métodos electrocinéticos es posible generar nuevos tipos de interacciones que permitan mejorar la resolución y la selectividad en las separaciones. Por ejemplo, mediante la integración de nanosopores dentro de los capilares o microcanales, que sean capaces de incrementar la selectividad de las separaciones y generar interacciones específicas con algunos analitos. En Electroforesis Capilar (EC), es posible modificar la superficie interna de los capilares de sílice recubriéndolos con polímeros o por la adición de sustancias o estructuras disueltas en el

electrolito de soporte, de tal modo que puedan interactuar de forma específica con los analitos de interés [9]. En este sentido, se ha percibido a los nanotubos como potenciales “objetos” para la innovación analítica en el desarrollo de nuevas metodologías electrocinéticas. Hasta ahora, sólo los NTCs funcionalizados (incorporando grupos como $-\text{COOH}$) y sin funcionalización han sido estudiados en EC como posibles modificadores del soporte (fungiendo como pseudo-fases estacionarias) [10, 11], y también se han estudiado como objetos de captura de bacterias [12]. Por otro lado, los NTPs, son compuestos que han sido poco explotados y que presentan numerosas ventajas sobre los NTCs. Tal como, su diversidad química (por su naturaleza estructural modificable), con actividad de superficie potencialmente más grande (debido a los aminoácidos y/o aminoácidos derivatizados que los conforman) que la de los NTCs, su biocompatibilidad y su estabilidad térmica y cinética. Además, podrían reconocer de forma específica a diversos analitos, ya sea por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o no covalentes, debido a la presencia de los grupos $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$ o aromáticos, en los aminoácidos que forman los NTPs. Si se funcionaliza su superficie externa, por ejemplo, con biomacromoléculas como los aptámeros, pueden ser capaces de interactuar con otras biomoléculas tales como las enzimas y antígenos [13].

Por su estructura química, los NTPs podrían ser funcionalizados fácilmente con diversas moléculas, desde marcadores de detección (mejorando la sensibilidad en bioanálisis a nivel de traza y ultra-traza) hasta macromoléculas biológicas (anticuerpos, proteínas, aptámeros,...) para desarrollar nuevas interacciones que permitan optimizar la selectividad de las separaciones. Adicionalmente, la estructura cilíndrica de los NTPs podría aprovecharse como herramientas de selección para compuestos de tallas pequeñas (contaminantes orgánicos o inorgánicos, principios activos) y a altas concentraciones podrían servir como medio de tamizaje de estos pequeños compuestos, lo que ampliaría su campo de aplicación.

En este contexto, con la finalidad de aportar en el desarrollo de nuevas metodologías y/o innovación de las técnicas de análisis para satisfacer las necesidades antes mencionadas, se ha trabajado ampliamente con métodos electrocinéticos como la EC y en microanálisis a través de microsistemas. Por lo que, sería interesante optimizar las separaciones en EC mediante la integración de NTPs en los capilares de sílice, de tal modo que funjan como pseudo-nanosoportos

durante la resolución de los analitos. Dado que, la formación de los NTPs depende de la secuencia peptídica del oligómero que lo conforma y la concentración de éste, es importante estudiar su pureza y sus propiedades fisicoquímicas. Particularmente, la técnica de EC es útil para determinar propiedades tales como viscosidad, conductividad y absorbancia ^[14], coeficientes de difusión ^[15], parámetros de interacción y pureza ^[16]. Las condiciones del medio podrían producir estructuras específicas, por lo que es necesario estudiarlas para optimizar las condiciones de análisis. Pudiendo estudiar el comportamiento bajo un campo eléctrico, con el fin de conocer la estabilidad de los NTPs y medir su movilidad electrocinética para posteriores estudios de interacción con algunos compuestos de interés. De este modo, podría proponerse a los NTPs como pseudo-nanosoportes en EC, volviendo la técnica altamente selectiva, la cual puede hacerse más específica a través de la formación de nanoespecies híbridas (por ejemplo, enlazándolos con biomoléculas), y más sensible (con una molécula como marcador electroquímico o fluorescente) para posteriormente llevarlo a un sistema para microanálisis ^[17, 18].

Con el propósito de comprender más a fondo lo que involucra el tema y proponer a los NTPs como nuevos nanosoportes para EC es importante familiarizarse con éste método electrocinético, con los péptidos, su obtención, sus propiedades, los diferentes medios y técnicas que se han empleado para el estudio de su estructura y propiedades, bajo qué circunstancias generan NTPs, así como las técnicas que permiten determinar su formación, entre otros tópicos que se describen a continuación.

I.2 Los Péptidos

Un péptido se forma por la unión entre los grupos carboxilo (-COOH) y amino (-NH₂) de unidades básicas llamadas aminoácidos (ver APÉNDICE A), generando la estructura primaria de una cadena proteica, de aquí que posean una estructura similar, pero de menor longitud. El enlace covalente entre dos aminoácidos (aa's) es una amida y se denomina enlace peptídico (Figura I. 1), pudiendo enlazar varios aa's hasta obtener una cadena peptídica ^[19, 20], la cual puede poseer una amplia variedad estructural y química, dependiendo de la secuencia.

Los péptidos son importantes porque participan en una serie de actividades biológicas, por

ejemplo: como intermediarios en la formación de proteínas, en el control del potencial de óxido-reducción de la célula (péptido glutatión), lo que es clave para la transferencia de electrones en los sistemas, algunos poseen actividad antibacteriana como la penicilina G (antibiótico común compuesto por Val, Cys y ácido fenilacético). Otros péptidos sirven como factores de crecimiento (ácido fólico), algunos otros fungen como hormonas y otros cuantos aparecen como constituyentes de un grupo de compuestos denotados alcaloides como la ergotamina, que es un alcaloide peptídico compuesto por Lys, Ala, Pro y Phe [19].

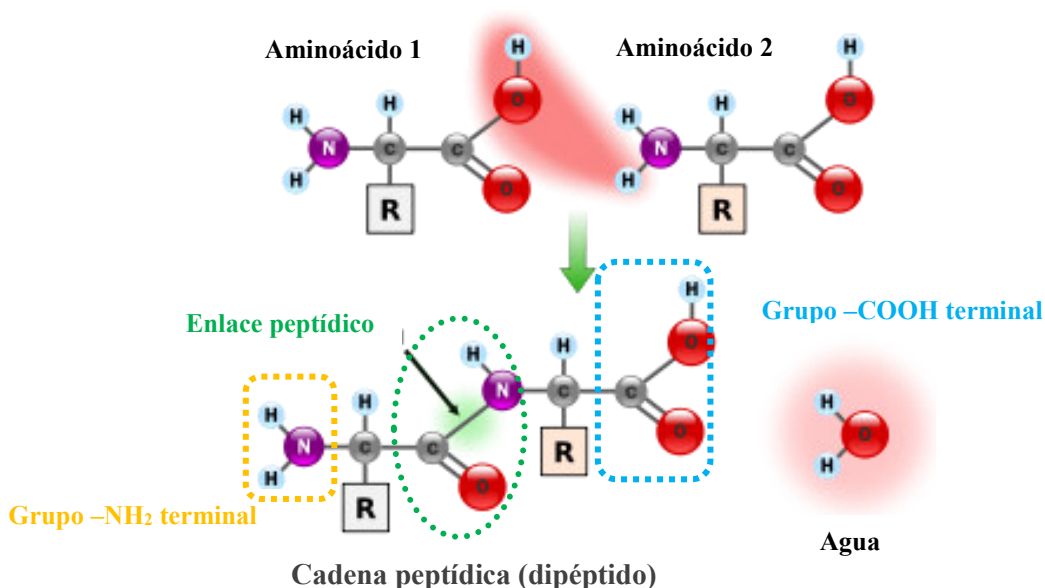


Figura I. 1. Dipéptido producto de una reacción de condensación y formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos (nomenclatura: C-carbono, N-nitrógeno, O-oxígeno, H-hidrógeno, R-cadena alifática). Dicho enlace está formado por 4 átomos en un mismo plano (C, H, O y N), cuya estructura posee un carácter parcial de doble enlace (semi-planar) que impide la rotación del mismo.

I.3 Síntesis de Péptidos

Básicamente se tienen 3 métodos de obtención de péptidos: *mediante el uso de microorganismos recombinantes, utilizando plantas o animales transgénicos y la síntesis química*, de las cuales nos interesa ésta última.

I.3.1 Síntesis Química de Péptidos

La síntesis química de los péptidos se realiza a través del acoplamiento del grupo carboxilo terminal (-COOH) de uno de los aa's con el grupo amino terminal (-NH₂) de otro, formando un enlace peptídico y una molécula de agua [19]. Para obtener una determinada secuencia peptídica se requiere de varias etapas que pueden comprender la protección de grupos funcionales que no se desea que reaccionen, la unión o acoplamiento entre los aminoácidos, la desprotección de los grupos que se habían protegido al inicio, tratamiento y purificación del producto, caracterización, etc.

I.3.1.1 Síntesis de Péptidos en Fase Líquida (SPFL)

Este tipo de síntesis es de gran utilidad para la producción a gran escala (industrial) y se basa en pasos de química orgánica clásica, donde todas las reacciones se efectúan en fase homogénea. En cada una de las etapas, el producto obtenido es purificado por métodos físicos sencillos (precipitación, cristalización, cromatografía, etc.), pudiendo caracterizar los intermediarios [21]. Una ventaja de esta metodología es que sólo los productos purificados serán usados en el siguiente paso de reacción. Las limitantes son el tiempo empleado en cada etapa y la baja solubilidad de los péptidos protegidos [22]. Empero, para solucionar estos inconvenientes se propuso la síntesis de péptidos en fase sólida, la cual se usa principalmente a nivel laboratorio, simplificando los pasos de purificación y tiempo, pudiendo automatizar el proceso.

I.3.1.2 Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPFS)

En 1963 Merrifield [23, 24] propone la SPFS, facilitando en gran medida el proceso de obtención de péptidos y su manipulación química. Esta técnica de síntesis es una reacción heterogénea que comienza con la unión covalente entre un soporte sólido insoluble (resina polimérica) y el primer derivado de un aminoácido activo soluble en fase líquida [23, 24], quedando anclando el grupo -COOH (o -NH₂) terminal a la resina y dejando en la “cola” el grupo -NH₂ (o -COOH) terminal del aa, listo para el siguiente acoplamiento.

I.4 Nanomateriales y Nanotubos Peptídicos

Últimamente ha habido un enorme interés en los nanomateriales y un acelerado progreso en su desarrollo, puesto que son materiales inteligentes muy prometedores, tales como los nanocables, los nanotubos y los nanocristales, los cuales muestran propiedades físicas y químicas superiores a los materiales másicos o a gran escala. Por ejemplo, en ciencia de materiales se usan como bloques de construcción para dispositivos miniatura, ópticos, magnéticos y electrónicos, en catálisis, para nanoláseres, nanofluidos, nanolitografía, liberación de fármacos y transporte molecular, ingeniería de tejidos, biosensores y medicina [25, 26], nanocontenedores y para fenómenos y tecnologías de separación. En nanotecnología se usan algunos materiales peptídicos o lipídicos como plantillas de síntesis y ensamblado de semiconductores y nanocables magnéticos, pero también se han propuesto nanoestructuras para la promoción del crecimiento del tejido óseo [27]. De todos estos compuestos, los nanotubos han capturado la atención de los investigadores por su variada composición desde zeolitas, grafito, nitruros de boro, complejos inorgánicos, lípidos, proteínas, péptidos hasta ciclodextrinas [28-31].

Desde 1990, los nanotubos más estudiados han sido los NTCs [32], debido a sus propiedades únicas estructurales, mecánicas y electrónicas [33]. Sin embargo, son muy poco solubles, carecen de uniformidad e hidrofobicidad, son un poco tóxicos y de producción costosa [29]. Además, presentan oportunidades limitadas de modificación covalente de su superficie. Por el contrario, los nanotubos orgánicos permiten la funcionalización de su superficie, son biocompatibles y de bajo costo [25, 28].

En este contexto, las nanoestructuras tubulares formadas a partir de péptidos son prometedoras e interesantes. En primer plano porque se forman a temperatura ambiente (20–25 °C) y presión atmosférica. En segundo plano, por su naturaleza y características topológicas, que afectan significativamente sus propiedades químicas, físicas y biológicas. Por ejemplo, la hidrofobicidad puede modificarse, pueden formar puentes de hidrógeno y otros enlaces específicos con biomoléculas; además, pueden derivatizarse haciéndose más o menos solubles. Las nanoestructuras peptídicas son el resultado de un ensamble supramolecular de enlaces no covalentes reversibles, adquiriendo tamaños que van de 10 nm a varios μm , cuyas estructuras y

formas son bien definidas. Las principales ventajas que ofrecen los NTPs es que su estructura y dimensiones (longitud y diámetro) pueden controlarse por medios externos como surfactantes, solventes, temperatura y pH [34, 35]. Además, su estructura puede definirse bien a nivel molecular a través del diseño/modificación del péptido de partida [36]. Por ello, los NTPs se han identificado como herramientas interesantes para aplicaciones biológicas y no biológicas, por ejemplo, en el análisis de patógenos [37] y estudios medioambientales (organofosfatos en agricultura)[38], tratamientos antimicrobianos y citotóxicos [39-41], fotosistemas artificiales [42], biosensores y dispositivos ópticos [28, 43-47], biomateriales en ingeniería tisular [25, 28, 48, 49], dispositivos electrónicos [25, 28, 47, 50, 51], catálisis química [28], polímeros supramoleculares fotosensibles [52, 53], vehículos de liberación de genes inhibidores (antivirales y antibacteriales) [39, 41, 54-56] y de fármacos [25, 28], como canales selectivos de transportadores de iones transmembrana (para Na⁺, K⁺, Li⁺, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cs⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ y Ba²⁺, en solución acuosa) [39, 46, 49, 57-70], tamices moleculares o en sistemas de transporte microfluídico [28], canales submicrométricos para EC o como nanoreactores continuos [56]. También como nanoplataformas para el ensamble de macromoléculas [48, 71-73] o nanoestructuras (nanocables[74], chips para microfluidos[75]), incluso como coberturas de otras nanoestructuras (NTCs de pared simple) confiriéndoles propiedades de biocompatibilidad para el monitoreo o marcaje biológico [76].

I.4.1 Auto-ensamble de Péptidos en forma de NTPs

En la Figura I. 2 se ilustran las principales plegamientos moleculares para la obtención de NTPs, siendo: el enrollamiento helicoidal de moléculas peptídicas lineales o laminares [29, 31, 34, 77-79], el ensamble de péptidos tipo varilla [80-82], el ensamble de sectores peptídicos tipo cuña en ciclos y éstos en tubos, y finalmente el apilamiento de PCs (planos tipo β -plegada) [28, 83-85]. Todas estas nanoestructuras tubulares se forman a partir de un auto-ensamble, que básicamente es impulsado por enlaces de hidrógeno [83, 86-89], y auxiliado por otras interacciones débiles como las tipo π - π , de Van der Waals, hidrofóbicas y electrostáticas [64, 90, 91]. En este contexto, Choi et al. [35] encontraron que la segunda fuerza impulsora del apilamiento para la formación de NTPs, tanto para péptidos lineales (PLs), como para péptidos cíclicos es la hidrofobicidad y las interacciones de las nubes aromáticas tipo π - π (mejor conocido como π *stacking*) de los grupos aromáticos de las cadenas laterales de aminoácidos como el Trp.

Los posibles auto-ensamble moleculares presentados en la Figura I. 2 dependen de varios parámetros fisicoquímicos como el pH, la fuerza iónica (f.i.), el solvente, la luz y la temperatura, entre otros [34, 35, 92, 93]. Por ejemplo, en el caso de los PLs el ensamble es función principalmente de la longitud del péptido, la composición aminoacídica, la quiralidad prevalente y la naturaleza del medio de ensamble (pH, solventes, aditivos). Además, el radio promedio de los poros del NTP depende de la periodicidad y el número de aminoácidos por ciclo. La periodicidad puede controlarse variando la cantidad de enlaces de hidrógeno que puedan formarse en el esqueleto del péptido, ya sea modificando los aminoácidos con ramificaciones β o γ en las cadenas laterales, cambiando el solvente o la longitud del péptido [28]. En el caso de los NTPs formados a partir de sectores tipo cuña, el tamaño de poro está definido por el grado de plegamiento (asociación entre las “cuñas”, como en los péptidos dendríticos [94]) y del tamaño del anillo formado, lo que demanda un alto orden de auto-ensamble [28]. En este sentido, un método que permite controlar rigurosamente el tamaño de poro de los NTPs y diseñar la naturaleza fisicoquímica de las superficies externa e interna de los nanotubos es la estrategia de apilamiento de PCs. Con este último método, es mucho más sencillo optimizar las condiciones para formar NTPs, puesto que los PCs son muy estables y se apilan fácilmente, al contrario de los PLs que requieren de condiciones experimentales más delicadas.

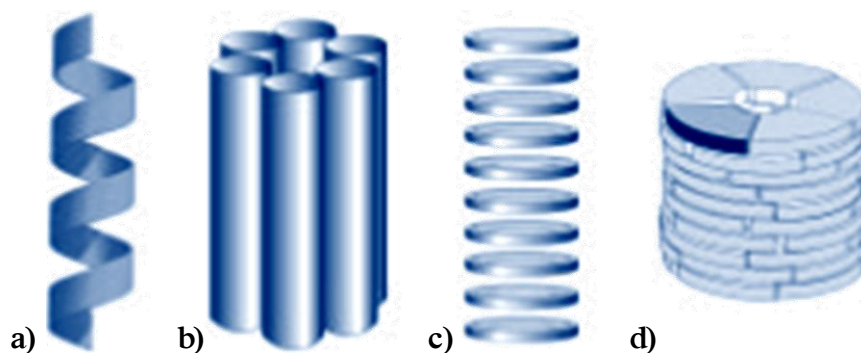


Figura I. 2. Posibles auto-ensambles moleculares de péptidos en NTPs. Donde: a) Enrollado helicoidal de PLs o laminares, b) Péptidos tipo varilla, que a su vez pueden ensamblarse en ramillete, c) Apilamiento de PCs para formar tubos continuos, y d) Sectores peptídicos tipo cuña ensamblados en discos y éstos en forma de tubos (adaptado de [28]).

Digno de mencionarse, los estudios realizados por Choi et al. [35] revelaron que existe una diferencia significativa en el comportamiento auto-ensamblante de los PLs y de los PCs; así

como de su morfología y estabilidad térmica. Por ejemplo, en las estructuras lineales se han observado nanoagregados irregulares, cuya estabilidad térmica decae hasta 48 % a temperaturas mayores a 80 °C. Mientras que, los PCs llegan a formar estructuras esféricas regulares y homogéneas con diámetros bien definidos, puesto que dependen de la cadena peptídica de partida. Generalmente la morfología y dimensiones de las estructuras peptídicas permanecen invariables a temperaturas por debajo de 100 °C. Resultado de ello, Shimizu et al. [95] han reportado puntos de fusión de NTPs de hasta 235 °C, lo cual es bastante conveniente para su aplicación en nanodispositivos. La diferencia en la estabilidad térmica de estos NTPs podría radicar en las condiciones de análisis, ya que una fue realizada en estado sólido (cristales), lo que hace a los NTPs más resistentes que en medio acuoso, puesto que en estado sólido los NTPs tienen una naturaleza cooperativa mayor de auto-ensamble que refuerza las interacciones no covalentes a través de la red cristalina [96].

I.4.2 NTPs a partir de PCs

En 1972 Hassal [49] fue el primero en proponer la formación de NTPs a partir de PCs, sintetizando péptidos cíclicos de cuatro miembros con α - y β -aminoácidos alternados, validando parcialmente su propuesta dos años después, mediante estudios de cristalografía. En 1974 De Santis et al. [97] hicieron análisis teóricos sobre la formación de NTPs a partir de PCs β -plegados. Encontrando en estos estudios que, los PCs β -plegados con número par de α -aminoácidos D, L alternados eran capaces de apilarse a través de enlaces por puentes de hidrógeno entre los esqueletos, generando un ensamble equivalente a una nueva estructura secundaria, denominada β -tubular, β -plegada o NTPs. Dicha idea fue confirmada experimentalmente por Ghadiri et al. [59, 92, 98], quienes fueron los primeros en obtener NTPs sintéticos con diámetros internos de Van der Waals entre 7 y 13 Å.

Como se mencionó anteriormente, la principal ventaja de los NTPs formados a partir de PCs es el control del diámetro, alcanzado a través del número de aminoácidos del anillo de la secuencia peptídica, obteniendo una escala subnanométrica en el intervalo de 1–17 Å [39-41, 45, 46, 54, 59-62, 64, 92, 99-106], lo cual es difícil de alcanzar desde otras nanoestructuras. Además, las propiedades de la superficie externa de estos NTPs están controladas por la composición de los

aminoácidos que forman la secuencia y por la posible funcionalización de estos residuos y/o de las cadenas laterales de los aminoácidos [107, 108], o bien por la incorporación covalente de polímeros, produciendo corazas poliméricas alrededor de los NTPs [29]. Finalmente, las propiedades de la pared interna de los NTPs pueden ser controladas mediante la incorporación de aminoácidos artificiales con ciclohexanos y anillos aromáticos [83, 87, 100, 109, 110], por ejemplo.

Por otro lado, el control del diseño de los oligómeros cíclicos permite adaptar la arquitectura molecular para aplicaciones nuevas y específicas [109]. En la literatura, los PCs más estudiados han sido los formados por α -aminoácidos D y L alternados, en los cuales se invierten los ángulos diedrales del esqueleto de la secuencia peptídica para proporcionar un anillo plano con interacción mínima entre las cadenas laterales de los aminoácidos del oligómero [28, 83, 96, 97, 99, 106, 109, 111-113]. Otros PCs muy bien estudiados son los β -péptidos [63, 83, 109, 114], los cuales están constituidos por β -aminoácidos alternados. Del mismo modo, se han estudiado ampliamente, los α - γ -péptidos [87, 109], α - β -péptidos [109], α - ε -péptidos [115] y los δ -péptidos, que resultan de las combinaciones de residuos aminoacídicos α -, γ -, δ -, y ε -alternados [63, 87, 109, 110, 116-119], de los cuales algunos contienen grupos aromáticos [83].

De manera independiente, los grupos de Ghadiri [92], y de Karlström y Undén [120], han reportado que la acidificación controlada de soluciones peptídicas alcalinas lleva a la formación espontánea de NTPs, debido al apilamiento β -tubular de los PCs, puesto que en soluciones ácidas estas subunidades son menos solubles y gozan del número máximo de protonaciones y contactos por puentes de hidrógeno entre sus esqueletos, además de las interacciones de tipo cadena lateral-cadena lateral entre las subunidades. Por otro lado, en condiciones alcalinas existe una repulsión electrostática intermolecular entre las cargas de los grupos de las cadenas laterales, desfavoreciendo el apilamiento de los anillos planos y promoviendo al mismo tiempo la disolución de los PCs. Adicionalmente, Granja et al. [83] mostraron la influencia del solvente (acuoso y orgánico) en la estabilidad del π *stacking* de los centros aromáticos de las cadenas laterales de los PCs, así como del pH de la solución. Observando que se favorece el auto-ensamble en medio acuoso ácido debido a la hidrofilia. Destacando que, en el caso de los PCs con Trp se presenta un aumento en la fluorescencia de las soluciones cuando el auto-ensamble ocurre, debido a las interacciones aromáticas adicionales de tipo π - π entre los grupos aromáticos.

El apilamiento esqueleto-esqueleto (plegamiento- β antiparalelo) de los PCs formadores de NTPs se debe a los enlaces por puentes de hidrógeno entre los anillos planos orientados de forma antiparalela, en que los grupos amida N-H y los grupos carbonilo C=O de cada PC están en forma perpendicular al plano del anillo. De esta forma, un grupo N-H de un PC se enlaza por puente de hidrógeno con un C=O de otro PC. Este apilamiento vertical forma la longitud del NTPs, dejando las cadenas laterales de los aminoácidos del PC proyectadas en forma pseudo-ecuatorial hacia el exterior de la estructura hueca. En la Figura I. 3 se muestra un esquema sencillo de un PC con α -aminoácidos D, L alternados y su respectivo apilamiento en forma de NTP, así como de otras variantes de PCs formadores de NTPs, en que se observa que los ensambles por puentes de hidrógeno pueden ser por interacciones α - α , β - β , γ - γ , etc.

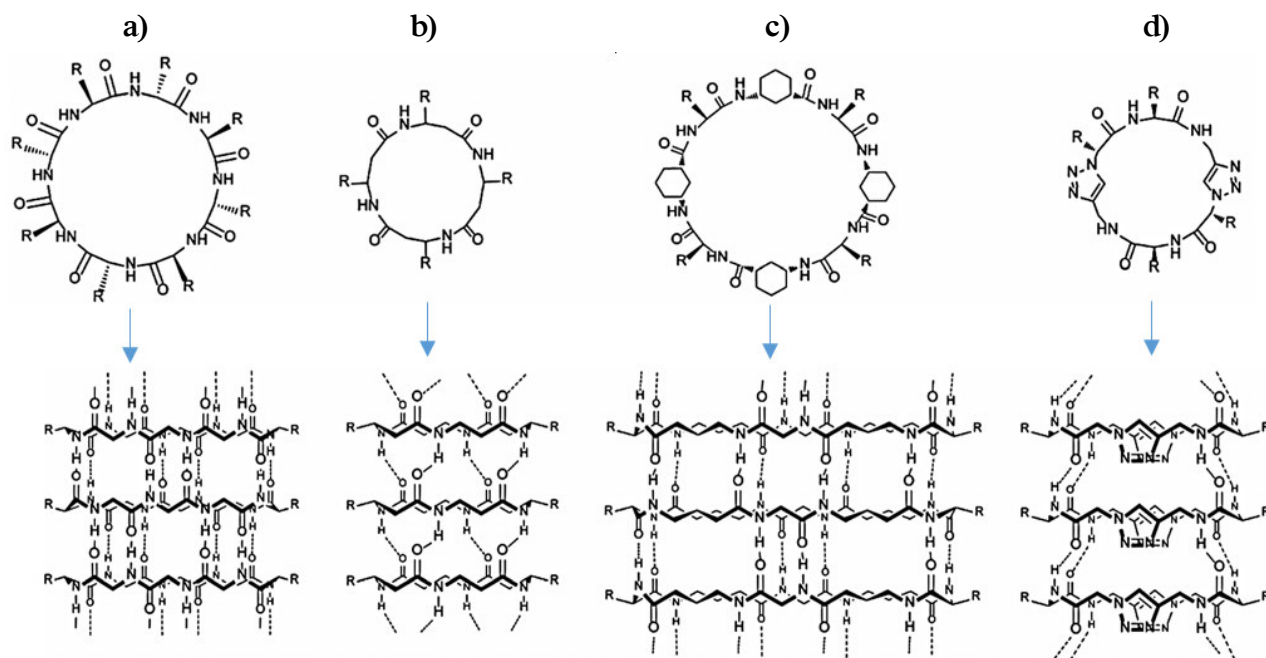


Figura I. 3. Representación de la formación de NTPs (abajo) a partir del auto-ensamble antiparalelo β -tubular por puentes de hidrógeno aceptores y donadores entre la N-H y C=O de los esqueletos en diferentes PCs (arriba). Donde: a) PC y NTP con α -aminoácidos D, L alternados, b) PC y NTP con β -aminoácidos, c) PC y NTP con α - y γ -aminoácidos, y d) PC y NTP heterocíclicos con ϵ -aminoácidos. Por simplicidad se omiten las cadenas laterales (adaptado de [109]).

Los puentes de hidrógeno donadores y aceptores del apilamiento β -tubular (antiparalelo y paralelo) y su termodinámica han sido ampliamente estudiados [96, 98, 121], encontrando que el proceso es exotérmico ($\Delta H^{\circ}_{298} < 0$) y espontáneo ($\Delta G^{\circ}_{298} < 0$). Demostrando, a su vez que la contribución entálpica de las interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno (-3 a 6 kcal·mol⁻¹ por cada interacción de enlace de hidrógeno [122]) es la fuerza impulsora del proceso de auto-ensamble, ganando energía libre de estabilización conforme el número de ciclos planos se va apilando. Al respecto, Kobayashi et al. [121] estudiaron el proceso de auto-ensamble antiparalelo y paralelo para la formación de NTPs a partir de PCs de dos enantiómeros, usando uno sólo y la combinación de ambos enantiómeros, mediante enlaces por puentes de hidrógeno entre los esqueletos de los PCs. Encontrando que, el auto-ensamble antiparalelo está favorecido termodinámicamente para los PCs de un sólo enantiómero y el paralelo para la combinación 1:1 de los dos enantiómeros. Sin embargo, los resultados experimentales muestran que la constante de asociación (K_a) del auto-ensamble antiparalelo ($K_a = 2540 \text{ M}^{-1}$, 293 K) es casi 4 veces mayor que el ensamble paralelo ($K_a = 640 \text{ M}^{-1}$, 293 K) [121]. Además, en este proceso, los enlaces por puentes de hidrógeno son el factor crucial de la estabilidad del ensamble. Adicionalmente, Hartgering et al. [96] efectuaron estudios que demuestran que el auto-ensamble antiparalelo está, a su vez, mucho más favorecido en PCs heteroquirales (y de un mismo enantiómero), puesto que el impedimento estérico es menor. Mientras que, el auto-ensamble paralelo está más favorecido en PCs homoquirales (de un mismo enantiómero), por la misma razón.

Hartgering et al. [96] también, han reportado la alta estabilidad de los cristales de NTPs formados a partir de PCs, por ejemplo, en medios acuosos fuertemente ácidos (pH 1.0) y fuertemente básicos (pH 14.0), mostrando supervivencia al agua en ebullición. Adicionalmente, los NTPs son muy estables en los solventes orgánicos polares y no polares más comunes, etanol (EtOH), metanol (MeOH), isopropanol (IsoPrOH), acetona, acetonitrilo (ACN), alcohol hexafluoroisopropílico, dimetilformamida (DMF) y dimetilsulfóxido (DMSO), puesto que no se disocian en sus respectivos subunidades monoméricas. Del mismo modo, se ha observado que algunos NTPs presentan propiedades de tensión que superan a materiales como el colágeno y el hueso esponjoso y compacto [123], lo cual es realmente impresionante.

I.4.2.1 PCs con α -Aminoácidos D, L Alternados

El grupo de Ghadiri [59, 92, 98, 109, 112, 121] se ha especializado en la obtención de NTPs formados a partir de PCs con un número par de α -aminoácidos D y L alternados, los cuales adoptan una conformación cíclica plana de baja energía, con diámetros internos de Van der Waals entre 2–13 Å y longitudes de cadena peptídica de 4, 6, 8, 10 ó 12 aminoácidos [59, 92, 98, 109], es decir, ciclos integrados por 12 a 36 átomos.

De estas estructuras, las secuencias peptídicas más estudiadas por Ghadiri et al. [59, 92, 106] son el octapéptido y el decapéptido ciclo[-(DAla-Glu-DAla-Gln-)_{2 y 3}-], las cuales poseen cadenas laterales hidrofóbicas que son ideales, por ejemplo, para su uso en bicapas lipídicas no polares y cuyos NTPs han sido útiles como poros transmembranales para el transporte y medición de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de dichas capas.

Dependiendo de la secuencia peptídica, los NTPs formados a partir de PCs con α -aminoácidos D y L alternados pueden asociarse lateralmente formando una especie de fibras tubulares o ramilletes que dan lugar a estructuras con dimensiones de varios micrómetros de ancho por cientos de micrómetros de largo como se muestra esquemáticamente en la Figura I. 4. En este sentido, los NTPs que son considerados una estructura secundaria nueva, pueden empacarse tridimensionalmente como ocurre en el plegamiento 3D de las proteínas, hasta formar cristales. Así, los NTPs individuales forman un arreglo supramolecular (equivalente a la estructura terciaria de las proteínas), cuyo ensamble es más complejo, puesto que es el resultado de varias interacciones no covalentes intertubulares (puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, de van de Waals e hidrofóbicas) en medio acuoso del tipo cadena lateral-cadena lateral, entre los grupos funcionales de dichas cadenas (esferas de color mostradas en el esquema del NTP de la Figura I. 4), las cuales se encuentran expuestas en la superficie externa de cada PCs que conforma a los NTPs individuales y que controlan la funcionalidad de dicha superficie.

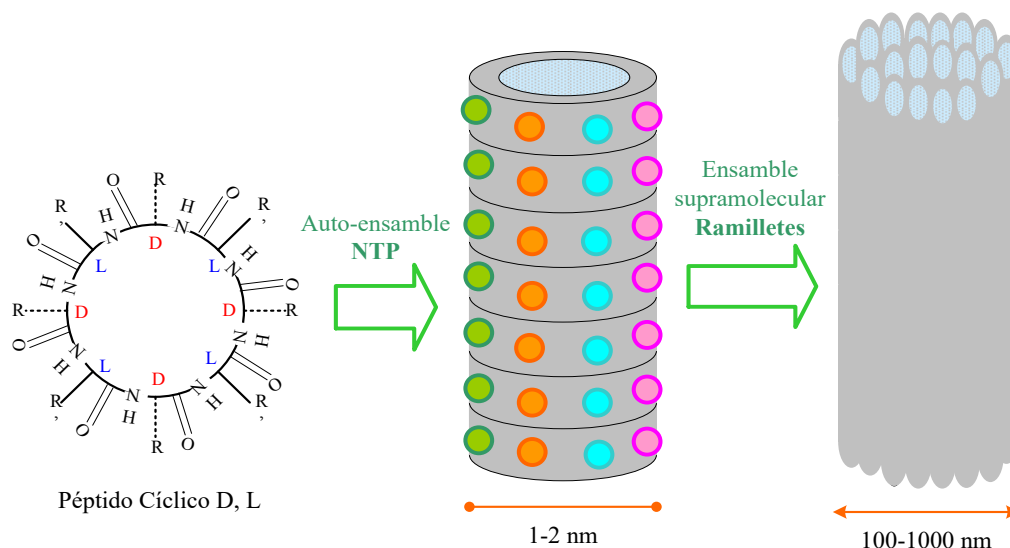


Figura I. 4. Representación del orden jerárquico del ensamble de los PCs a NTPs y posteriormente en arreglos supramoleculares tipo ramilletes (adaptado de [123]). En el NTP las esferas de colores representan los grupos de las cadenas laterales que controlan la funcionalidad de la superficie externa.

Un ejemplo concreto de este tipo de interacción intertubular, se da en la glutamina (Gln), aminoácido polar que posee la capacidad de formar puentes de hidrógeno donador-aceptor participando en interacciones intra- e intertubulares mediante estos enlaces, confiriéndole estabilidad adicional a la estructura y mayor orden al sistema. En la Figura I. 5 se ilustran dichas interacciones.

Al respecto, varios autores han confirmado por estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), la formación de cristales peptídicos (ramilletes o fibrillas) que resultan del alto empaque (intermolecular) organizado de los NTPs individuales. Observando, que el ancho de las estrías longitudinales de los cristales corresponden a los diámetros internos de Van der Waals de los PCs en forma de anillo plano individual, representando a cada NTP empaçado uno a lado del otro en paralelo.

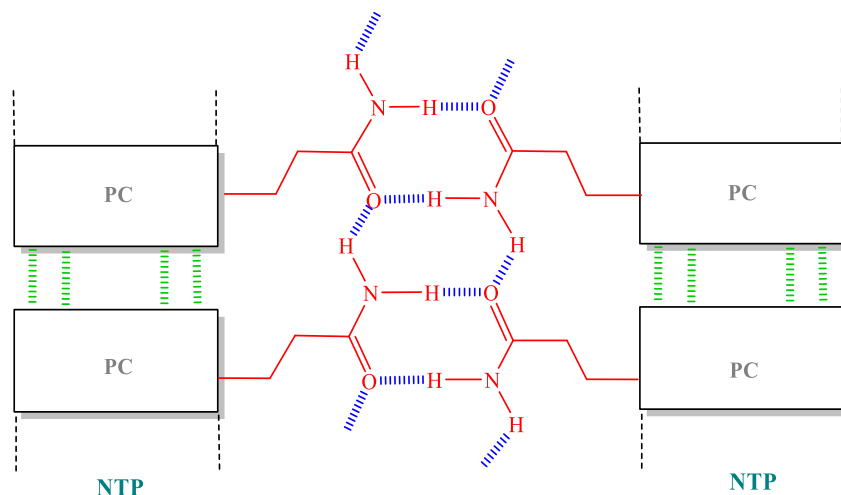


Figura I. 5. Cadenas laterales de la Gln (rojo) formando enlaces de hidrógeno inter- e intramoleculares (azul) entre los NTPs, confiriéndole mayor estabilidad y orden molecular. En la figura se ilustran el mayor número de puentes de hidrógeno posibles de la estructura. Por simplicidad los PCs se representan en forma de rectángulos y en color verde los puentes de hidrógeno que dan lugar a los NTPs (adaptado de [96, 124]).

I.5 Caracterización de los NTPs

La caracterización estructural, morfológica y dimensional de los arreglos supramoleculares y de los NTPs se ha hecho principalmente por: microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés) y TEM [35, 63, 92, 100, 125, 126], las cuales permiten observar nanocristales individuales de los NTPs correspondientes a la organización de los NTPs en forma de ramilletes, pudiendo medir su longitud, anchura y las pequeñas estrías dentro del nanocristal, las cuales corresponden a los diámetros internos de cada NTP individual. La difracción electrónica [96] se ha utilizado para confirmar que las estrías vistas en criomicroscopía pertenecen a los diámetros de Van der Waals de cada monómero cíclico, los cuales representan a los NTPs individuales empaçados lado a lado y en paralelo. Mientras que, la difracción de rayos-X [87, 92, 114, 127] dona información sobre el arreglo de los nanocristales (medidas de la celda unitaria), demostrando que los NTPs son estructuras cristalinas y con empaçamento altamente ordenado. Los estudios de espectroscopía FT-IR (por sus siglas en inglés, Espectroscopía Infrarrojo con Transformadas de Fourier) [59, 67, 87, 92, 96, 100, 125] y espectroscopía Raman [125] proveen información de los enlaces característicos de los PCs, identificando principalmente los enlaces intramoleculares y las bandas

de vibración de los grupos de las cadenas laterales; y también se obtiene información sobre la redes intermoleculares formadas por puentes de hidrógeno debido al apilamiento antiparalelo de los monómeros cíclicos por interacciones esqueleto-esqueleto que forma una estructura tipo β -tubular. La resonancia magnética nuclear (RMN) [67, 87, 92, 100, 127] y la EM [67, 87] permiten confirmar la estructura y pureza de los precursores cíclicos. Asimismo, la RMN permite verificar la formación de ensamblajes por interacciones de puentes de hidrógeno entre los PCs, a través de los desplazamientos químicos y las constantes de asociación.

La microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) [100, 126] proporciona información sobre las estructuras supramoleculares formadas por los NTPs, pudiendo conocer sus dimensiones y propiedades de la superficie. Por microscopía óptica (luz polarizada y fluorescencia) [35, 126] se obtienen imágenes de los arreglos supramoleculares de los NTPs que permiten observar los dominios de las estructuras β , formadas por interacción intermolecular de puentes de hidrógeno; además, es posible observar la alineación de los NTPs en los ramilletes y determinar las propiedades de la superficie externa de éstos. La espectroscopía de dicroísmo circular [35, 100] y la dispersión dinámica de luz [100] se utilizan para estudiar el ensamblaje de los PCs en NTPs en solución, pudiendo determinar el punto de auto-ensamble y las constantes de asociación. Finalmente, el modelamiento molecular computacional [49, 64, 92, 96, 111, 112, 118] permite realizar simulaciones y cálculos de los estados de equilibrio de las estructuras tubulares, que dan información sobre la configuración que los PCs exhiben en el auto-esamblaje tubular, enfatizando en el arreglo tridimensional del empacamiento antiparalelo, pudiendo determinar la extensa red formada por las interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno. Con la finalidad de enriquecer los métodos de caracterización, recientemente se ha integrado la caracterización nanomecánica que permite medir de tenacidad, dureza, elasticidad y otras propiedades mecánicas de los ensamblajes [123].

Como se mencionó anteriormente, existe una alta necesidad de verificar la estructura exacta de los compuestos de partida. De tal forma que, se pueda garantizar la sintonía de las dimensiones, propiedades y estabilidad los NTPs formados a partir de péptidos. En este sentido, la caracterización de los péptidos tradicionalmente se ha hecho por técnicas como CLAR, RMN y EM. En este proyecto, se propone el desarrollo de una nueva metodología para la caracterización

de los monómeros cíclicos y de los NTPs, basada en un método electrocinético como la EC, por ejemplo, en zona y acoplada a EM. Lo que permitirá estudiar las propiedades de los compuestos, conocer su estructura, su composición, pureza, entre otras características.

Por ello, es importante abordar los fundamentos y conceptos básicos que permitan familiarizarse con este método electrocinético, de tal modo que pueda diseñarse una metodología optimizada para el estudio de los compuestos sintetizados. En las siguientes páginas de este capítulo, se hará énfasis en la instrumentación, modos de EC, modificadores de los capilares y los detectores más utilizados en EC. Al respecto, se tiene especial interés por la detección de masas acoplada a EC, por lo que es importante conocer los principales parámetros que permiten la eficiencia y selectividad en las separaciones y detecciones de este acoplamiento.

I.6 Electroforesis Capilar

La electroforesis es una técnica instrumental de análisis que permite separar moléculas por su carga y tamaño, migrando sobre una superficie hidratada de un soporte sólido (celulosa), matriz porosa (gel) o en dilución (electroforesis libre) al aplicar un campo eléctrico [128, 129]. Los principales factores que afectan la separación electroforética son la intensidad del campo eléctrico, el potencial, la resistencia y la temperatura. De este modo, al determinar la velocidad de movimiento de las moléculas bajo un campo eléctrico, considerando el pH y el electrolito tampón, se puede conocer un reporte de la carga y volumen.[130].

En la electroforesis clásica, la muestra se deposita en una línea horizontal sobre un extremo de una tira recubierta de material poroso e impregnado de un electrolito, se sumerge en dos depósitos separados que contienen al electrolito tampón y que están unidos por dos electrodos a una fuente de poder. La distancia de migración se mide usando como referencia un marcador interno neutro, la placa se revela con sales de plata [128]. Esta electroforesis inicialmente fue desarrollada en 1937 por Tiseluis sobre agarosa y gel de poliacrilamida [131] y en 1967 fue traspasada por Hjertén [132] a un capilar milimétrico, naciendo así la EC. Más adelante, en 1970 Virtanen y Mikkers desarrollaron separaciones electroforética en capilares de vidrio y teflón con diámetro interno de 200 μm [133]. Finalmente, en 1980 Jorgenson y Lukacs, mediante técnicas

avanzadas, lograron obtener los primeros capilares de sílice fundida con diámetros internos de 75 μm .

Los principales atractivos de la EC es que permite reducir el efecto Joule, pudiendo disipar el calor a lo largo de la superficie del capilar, evitando diferencias de viscosidad del electrolito soporte (*BGE*, por sus siglas en inglés) manteniendo el flujo homogéneo en toda el área del capilar y sobre todo evitando que los compuestos se descompongan con el aumento local de la temperatura. Además, es una técnica analítica simple, rápida, versátil y puede ser automatizada. La alta resistencia de los capilares delgados permite la aplicación de altos voltajes (100–500 V/cm) con la mínima generación de energía, puesto que la relación superficie de área/volumen permite la disipación eficiente del calor generado. Así mismo, el uso de voltajes altos resulta en tiempos de análisis cortos y alta eficiencia de resolución, que frecuentemente excede 10^5 platos teóricos [132], pudiendo separar mezclas complejas de analitos con y sin carga, desde biomoléculas o células, hasta compuestos de peso molecular muy pequeño. Además, el consumo de muestra está en el intervalo de 1-10 nL, dependiendo de las dimensiones del capilar y la viscosidad del electrolito tampón. Dada la carencia de una fase estacionaria, esto permite estudiar diferentes tipos de interacciones sin la presencia de interacciones parásitas.

De este modo, dado que la EC permite trabajar con varios métodos de separación de especies, es posible caracterizar las interacciones en solución para obtener información sobre la estequiometría y afinidad de interacción de los analitos con el medio de separación [7, 8], pudiendo determinar algunas propiedades fisicoquímicas.

I.6.1 Instrumentación de la Electroforesis Capilar

La separación por EC consiste en la migración de los analitos bajo la acción de un campo eléctrico dentro de un capilar angosto, abierto de ambos extremos, relleno de *BGE* y conectado a dos viales. En esta técnica la resolución de la muestra involucra, además de la movilidad electroforética, la presencia de un flujo electroosmótico (*EOF*, por sus siglas en inglés). En la Figura I. 6 se muestran los componentes básicos de la EC, que consta de un capilar de separación (20–80 cm de longitud y diámetros internos de 25–100 μm), una fuente de poder de alto voltaje

(hasta ± 30 kV), un detector próximo a uno de los extremos del capilar (*outlet*), un par de electrodos de Pt, el recipiente de la muestra y dos viales que contienen el *BGE*, los cuales permiten cerrar el circuito eléctrico del sistema. El voltaje se aplica de un extremo del capilar al otro, ya sea en modo positivo (o normal, del ánodo al cátodo) o negativo (del cátodo al ánodo) para realizar las separaciones, cuyas señales son graficadas en un *electroferograma* que indica la movilidad electroforética aparente de la muestra en las condiciones de análisis.

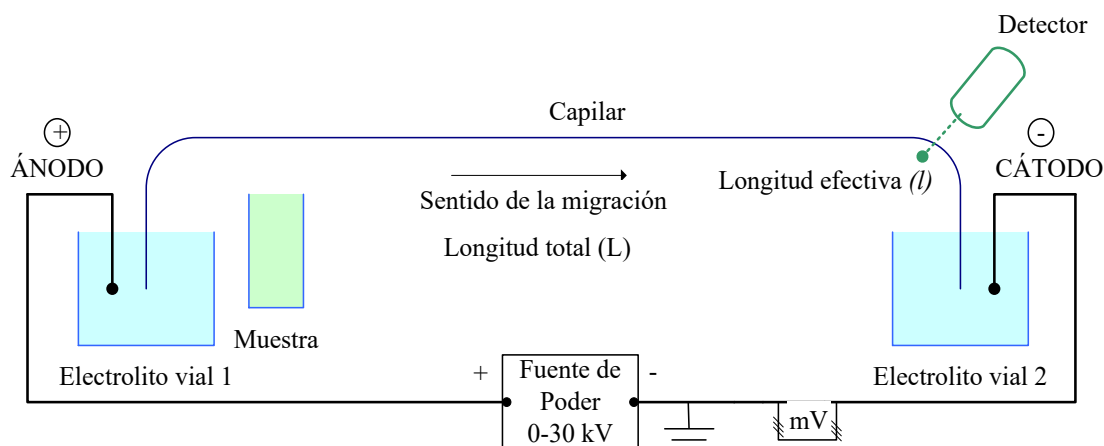


Figura I. 6. Diagrama esquemático de los componentes de la Electroforesis Capilar (modo positivo).

Los principales *BGE* que suelen usarse en estos sistemas son: fosfatos, acetatos, boratos, citratos, formiatos, succinatos, imidazol, taurina, tricina, glicina, beta alanina, bicina, TRIS (tris(hidroximetil)aminometano), HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) y MOPS (ácido 3-(N-molfolino)propanosulfónico), entre otros [134].

I.6.2 Modos de Electroforesis Capilar [131, 135]

- Electroforesis Capilar en Zona (*ECZ*) o en dilución libre: en esta modalidad los analitos migran en función de una relación dentro de su carga y su volumen, de modo que los analitos de tamaño similar pueden separarse eficientemente, si no tienen la misma densidad de carga, y esto en diferentes tiempos de migración. En la *ECZ*, el capilar de separación se llena de *BGE*, una zona de muestra se introduce en un extremo del capilar, se aplica un potencial y cada componente migra hasta un detector.

- Cromatografía Electrocinética Micelar (*MEKC*, por sus siglas en inglés): es una variante del modo anterior, agregando a la fase móvil un surfactante catiónico o aniónico para formar micelas cargadas. Estas micelas inmiscibles retienen los compuestos neutros por afinidad hidrófoba, modificando así la movilidad aparente.
- Electroforesis Capilar en Gel (*CGE*, por sus siglas en inglés): el *BGE* contiene un gel de poliacrilamida o agarosa. Se produce un efecto de filtración que hace lenta la movilidad de las moléculas grandes, minimizando la convección y difusión. Los analitos migran en función de su tamaño.
- Isoelectroenfoque Capilar (*CIEF*, por sus siglas en inglés): se usa un gradiente de pH, generado por una mezcla de anfóteros en el *BGE*, aplicando un campo eléctrico. Los compuestos migran hasta encontrar su punto isoeléctrico (pI), donde no tienen carga y entonces se enfocan.
- Electro cromatografía Capilar (*CEC*): se crea una fase estacionaria en el capilar y la separación es debida a la movilidad y las interacciones con esta fase estacionaria.
- Isotacoforesis Capilar (*CITP*, por sus siglas en inglés): se basa en el movimiento de las fronteras. Se suele usar como método de preconcentración para mejorar la detección, por lo general se usa en análisis a nivel traza y de residuos de análisis de muestras biológicas o medioambientales [11].

De estas variantes, el modo más utilizado es la ECZ debido a su sencillez de operación y versatilidad de aplicación en análisis biológico-ambientales, así como en la validación de pureza, detección de modificaciones proteicas y estudios conformacionales [131], entre otros. Además, nuestra propuesta va en torno a esta metodología, por lo que se profundizará en esta modalidad de EC.

I.6.3 Principales Aplicaciones de la EC

La EC es una técnica que permite determinar con éxito la composición de una mezcla, pudiendo analizar desde pequeños iones hasta algunas células. Determinando sus constantes fisicoquímicas (constantes de ionización o disociación (pK_a)) y valores de pI, constantes de enlace y coeficientes de partición octanol-agua y de difusión [135], entre otras propiedades.

Al variar los parámetros de análisis es posible separar básicamente todo tipo de compuestos. Por ejemplo, para la resolución y determinación de la concentración de compuestos inorgánicos (quelatos metálicos, iones de lantánidos y metales pesados ^[133]), productos de degradación y combustión de biodiesel u otros hidrocarburos ^[133] para evaluar su eficiencia e impacto ambiental, así como procesos de purificación y monitoreo ^[134]. Se pueden estudiar cationes metálicos, aniones, ácidos orgánicos (ácido fórmico, acético, benzoico y sórbico), catecolaminas ^[135], la composición de carbohidratos (maltosa y lactosa) en polisacáridos y de alimentos (vino, cerveza y leche ^[136, 137]) para el control de calidad y el estudio de las propiedades organolépticas y nutrimentales de éstos. Asimismo, es posible analizar biofluidos (cocaína en orina o sangre) y componentes farmacológicos (paracetamol, aspirina, antiepilépticos, morfina, hipoglucémicos) ^[135]. Identificar y determinar microorganismos (bacterias ^[138], virus y células enteras ^[132]) en muestras biológicas complejas para evaluar sus efectos en la salud (ensayos inmunológicos y enzimáticos), análisis del plegado de proteínas ^[134] y digestiones enzimáticas, separación de ácidos nucleicos, oligonucleótidos, nucleósidos, nucleótidos ^[135], aminoácidos, péptidos y proteínas ^[139, 140].

Otras aplicaciones se encuentran en el área biomedicina para la resolución de neurobioquímicos, marcadores genéticos y productos de biología molecular para el estudio de su pureza, terapia génica y peritajes forenses ^[133]. En control ambiental para identificar contaminantes y metabolitos de pesticidas, metales pesados ^[133], iones inorgánicos como los surfactantes y pigmentos orgánicos ^[131]. En el análisis de pequeñas moléculas mono- o polidispersas ^[141] para el control de calidad de formulaciones comerciales de detergentes. En biofarmacéutica para el control de calidad y pureza de productos farmacológicos y biotecnológicos, quimioterápicos y compuestos de estructura quiral (separación de enantiómeros y componentes acivos) ^[11, 135]. El monitoreo y separación de metaloproteínas y glicoproteínas ^[134] para el análisis de su actividad biológica. En el análisis de la distribución oligomérica de polímeros ^[142], separación de macromoléculas como colágeno (tipo I, II, V, IX y XI) ^[143] para la resolución de los diferentes polímeros que forman. Para el estudio de polidispersión de liposomas ^[144] y el estudio de estabilidad de coloides ^[145]. Así como, en la caracterización (estabilidad, tamaño, potencial zeta y verificación de las etapas de funcionalización) de nanopartículas para diagnóstico ^[146].

I.6.4 Eficiencia de Separación en EC

Para lograr en EC una alta eficiencia en la detección (sensibilidad) y separación es importante considerar varios parámetros, tales como las dimensiones del capilar, el voltaje, la concentración y zona de amplitud de la muestra, el *EOF*, la composición del *BGE*, etc. En este sentido, empezaremos por definir dos conceptos básicos: el *EOF* y la movilidad electroforética, para comprender más a fondo las separaciones electroforéticas.

I.6.4.1 Flujo Electroosmótico

El *EOF* es el flujo eléctrico inducido debido a la presencia de una doble capa eléctrica en la interfase sólido/líquido al aplicar un campo eléctrico, debido a un leve exceso de cargas en la superficie del capilar (potencial zeta), que migran hacia al polo de carga opuesta. El *EOF* depende del tipo de capilar, de la naturaleza química del *BGE*, de su viscosidad y su constante dieléctrica.

Por ejemplo, en los capilares de sílice los grupos silanol (SiOH , pK_a 4.5–7) son ionizados en función del pH del electrolito tampón, pudiendo generar cargas negativas (iones SiO^-) en la superficie del capilar; estableciendo una doble capa eléctrica en la interfase sílice/líquido para preservar la neutralidad (ver Figura I. 7). En que, el exceso de cationes en el volumen de la solución migra hacia el cátodo, generando el *EOF*, cuya distribución es plana y su velocidad es transversal al diámetro del capilar, obteniendo un flujo constante a lo largo del mismo [131]. Para sistemas con electrolitos diluidos (10^{-6} a 10^{-5} M) el grosor de la doble capa eléctrica es de 100–1000 nm. Mientras que, en sistemas más concentrados (0.1 a 1 M) el grosor es de 0.1–1 nm [147]. Un incremento en la concentración del *BGE* o un pH más ácido disminuyen el *EOF*, debido a la protonación de los grupos silanol. Además, el *EOF* permite obtener eficacias elevadas (10^5 platos teóricos [132]) debido a que, el movimiento del *BGE* es un perfil plano a diferencia del perfil parabólico, típico de la CLAR.

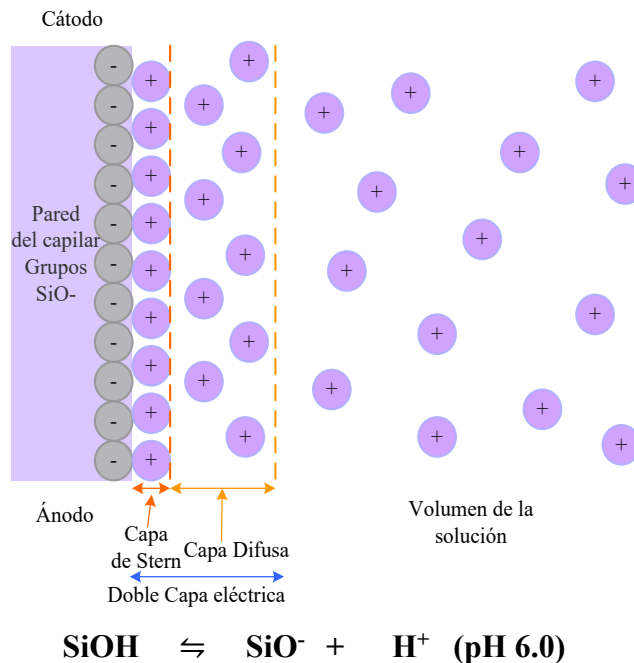


Figura I. 7. Formación de la doble capa eléctrica que genera el *EOF*. Los grupos SiO^- prevalecen en las paredes del capilar, los cuales son neutralizados por la adsorción de cationes (Capa Stern) y por la atracción-repulsión de los cationes provenientes del volumen de la solución hasta alcanzar un equilibrio (Capa Difusa), dando lugar a una doble capa eléctrica (adaptado de [131, 135]).

I.6.4.2 Movilidad Electroforética (μ_{EP})

Como se mencionó antes, en EC la separación de los analitos se logra a través del movimiento de éstos bajo la fuerza de un campo eléctrico, movimiento que está gobernado por la movilidad electroforética (μ_{EP} , EP por sus siglas en inglés).

La movilidad está definida por la velocidad promedio ($\vec{V} = m\mathbf{x}\vec{E}$, donde: \vec{V} = velocidad, m = masa del analito y \vec{E} = campo eléctrico aplicado) con la cual los iones de los analitos se mueven bajo la influencia del campo eléctrico aplicado, en función de su masa. Los dos principales factores que afectan dicha movilidad incluyen la *fuerza del campo eléctrico aplicado* (\vec{F} , Ecuación 1), el cual depende a su vez de la carga del ion (q) y el campo eléctrico (\vec{E} , V/cm.); y la *fuerza de fricción o rozamiento* (\vec{F}_r , Ecuación 2) que siente la molécula al moverse a través

de una solución, que a su vez depende de parámetros como la viscosidad del electrolito (η), la velocidad del ion (\vec{v} , cm/s) y el tamaño molécula analizada (r = radio de la molécula).

$$\vec{F} = q\vec{E} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\vec{F}_f = 6\pi\eta r\vec{v} \quad \text{Ecuación 2}$$

En el equilibrio estas dos fuerzas están balanceadas y la velocidad electroforética queda como se expresa en la Ecuación 3. Donde, la μ_{EP} (Ecuación 4) se obtiene al normalizar la velocidad electroforética por el campo eléctrico.

$$\vec{v} = \frac{q\vec{E}}{6\pi\eta r} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\mu_{EP} = \frac{\vec{v}}{\vec{E}} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad \text{Ecuación 4}$$

Las propiedades que resultan de la μ_{EP} de un ion son:

1. Es directamente proporcional a la carga del ion.
2. Es inversamente proporcional a la viscosidad del disolvente.
3. Es inversamente proporcional al radio de la partícula que está en movimiento (representada por el coeficiente de difusión).

En la Figura I. 8 se muestra un diagrama de migración de los analitos de diferentes tamaños con cargas positivas, neutras y negativas, en presencia del *EOF* en EC en modo de polaridad positiva. En que los componentes de menor peso molecular y positivamente cargados, serán los primeros en eluir del sistema, mientras que los iones de menor peso molecular y cargados negativamente serán los últimos en ser detectados.

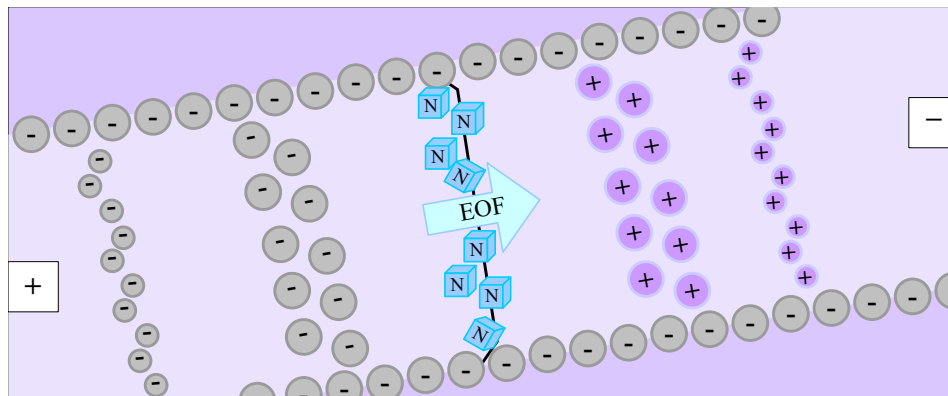


Figura I. 8. Migración de los analitos en EC en modo de polaridad positiva. Los cationes de bajo peso molecular y altamente cargados tienen movilidades grandes, mientras que los cationes de mayor peso molecular y de igual carga se mueven más lento; seguidos de los compuestos neutros que migran a la velocidad del EOF. Los aniones migran mucho más lento, ya que son atraídos por el ánodo, pero también por el EOF hacia el cátodo (adaptado de [131]).

Es bastante fácil considerar la contribución del EOF, puesto que la velocidad de este flujo da una componente adicional de velocidad a los iones que migran en el campo eléctrico. Dado que, la velocidad (vectorial: es direccional y va alineado o en contra del campo eléctrico) aparente (determinada experimentalmente) es la suma de la velocidad electroosmótica y la velocidad electroforética efectiva del ion. Así que, cuando se habla en términos de movilidad (la velocidad normalizada por el campo eléctrico aplicado), se tiene la expresión de la Ecuación 5, cuyas movilidades efectivas son positivas para los cationes y negativas para los aniones.

$$\mu_{app} = \mu_{EP} + \mu_{EOF} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde, μ_{APP} es la movilidad aparente del ión, μ_{EP} es la movilidad electroforética efectiva del ión y μ_{EOF} la movilidad del flujo electroosmótico.

Por lo que, es bastante fácil considerar la contribución del EOF, si la velocidad de éste flujo da un componente adicional de velocidad a los iones que migran en el campo eléctrico, en que la velocidad aparente de cada molécula será la suma vectorial de la velocidad efectiva y del EOF.

La movilidad de un marcador neutro (MN), molécula sin carga, permite medir la μ_{EOF} . Si se considera que no hay interacción entre el MN y nada más en el sistema.

I.6.4.3 Características del Capilar

El material del capilar de la EC debe ser químicamente y eléctricamente estable, transparente a la luz Ultravioleta (UV) y flexible. Hoy en día, los capilares de sílice fundida son los universalmente usados, aunque también los hay de Teflón® y otros materiales. Los tubos se fabrican con SiO_2 de alta pureza, el mismo que se usa en las fibras ópticas [135], cuya flexibilidad se consigue protegiendo la parte externa con una capa de poliacrilamida (que no es transparente a la luz UV). Este material polimérico es removido de una zona del capilar para obtener una ventana de detección. Dicha remoción puede hacerse con una flama suave de encendedor de butano, por calentamiento eléctrico, con un baño de ácido sulfúrico concentrado a 100 °C o bien utilizando una navaja de afeitar. Aunque, la mayoría de los investigadores usan capilares de sílice cilíndricos, también los hay rectangulares, que ofrecen un paso óptico más grande, pero son mucho más frágiles y sus propiedades ópticas no son tan buenas.

El efecto del diámetro interno (d_{in}) del capilar es extremadamente dramático en la resolución y detección de los analitos. Inicialmente, Hjertén [132] observó que utilizando capilares con $d_{\text{in}} = 300 \mu\text{m}$ se obtenía una buena separación y detección en UV, reconociendo que los capilares con diámetros pequeños reducen los efectos térmicos de los altos voltajes, disipando el calor rápidamente (ver sección I.6.4.4 Efecto Joule), lo que mejora la separación debido a la reducción de la difusión del analito, manteniendo el perfil de flujo del *BGE*, eliminando el ensanchamiento de picos asociados a los empujes de inyección [148]. Más adelante, estos estudios se extendieron a los tubos de Pyrex® con $d_{\text{in}} = 200\text{--}500 \mu\text{m}$, observando resultados similares.

Estudios recientes han mostrado que esta eficiencia de separación es constante para capilares con $d_{\text{in}} < 80 \mu\text{m}$, puesto que arriba de 100 μm dicha eficiencia decae fuertemente. De este modo, aunque existen capilares comerciales con $d_{\text{in}} = 2 \mu\text{m}$, se utilizan más frecuentemente los de 25–75 μm , prefiriendo los capilares de 50 μm [135], con diámetros externos (d_{ex}) de 360 μm . Sin embargo, la ventaja de usar capilares con d_{in} más grandes es el aumento de la sensibilidad

debido al incremento del paso óptico en la detección. Empero, este aumento en el diámetro va acompañado del ensanchamiento de picos y efecto Joule [135].

Adicionalmente, se ha observado que los capilares angostos dan flujos pequeños de *BGE* para una misma cantidad de inyección de muestra haciendo que los analitos estén menos diluidos en el capilar. Por lo que, una mayor concentración de la muestra se traduce en mejor sensibilidad de detección.

Por otro lado, se ha observado que al usar capilares con longitudes (L) > 80 cm se obtiene alta eficiencia de separación. Sin embargo, dado que la resistencia del capilar es directamente proporcional a la longitud es de esperar que al incrementar la corriente de paso, se generé más poder y por consiguiente más calor.

En cuanto al espesor de la pared del capilar, se ha encontrado que al aumentar su grosor y por consiguiente el diámetro externo (d_{ex}) del capilar, se reduce la eficiencia de disipación de calor. Es recomendable usar capilares con $d_{ex} = 150 \mu\text{m}$ [148], pero éstos son muy frágiles. Así que, se prefieren los capilares con $d_{ex} = 360 \mu\text{m}$, manteniendo el balance.

Finalmente, es importante considerar la composición química de la pared interna del capilar, por ejemplo, si se quieren separar péptidos o proteínas en capilares de sílice debe prestarse atención a la posible adsorción (ver sección I.6.4.7 Adsorción), porque ésta podría degradar la eficiencia de la separación, obteniendo picos anchos y/o semi-desaparecidos [148].

I.6.4.4 Efecto del Voltaje

Los equipos de EC comerciales pueden operar con voltaje (V) o corriente (μA) constante. La mayoría de las separaciones realizadas a voltaje constante presentan buena reproducibilidad, pero si no se tiene control de temperatura es preferible operar a corriente constante [134]. La selección de la fuerza del campo es una compensación entre la resolución y el tiempo de análisis, por ejemplo, operar a altos voltajes reduce el tiempo de análisis, pero incrementa el ancho de banda debido a efectos térmicos. Si se opera a bajos voltajes se reduce el calentamiento, pero

incrementa el tiempo de análisis y el ancho de banda por difusión. Además, la selección del voltaje y la polaridad, dependerá de la composición de la muestra, el tipo de capilar y el propósito del estudio.

I.6.4.5 Efecto Joule

El efecto Joule es el calor generado por el paso de corriente eléctrica a través de una superficie. El incremento de temperatura depende de la potencia generada ($V \cdot A = J/s$) y está determinado por las dimensiones del capilar, la conductividad del *BGE* y el voltaje aplicado. Dicho efecto puede generar diferencias de viscosidad, modificación o destrucción del compuesto y dar lugar a la deformación del pico de detección en EC.

La eficiencia de la disipación térmica depende fuertemente del radio interno del capilar, del grosor de las paredes, del grosor de la capa del polímero que cubre el capilar y del coeficiente de transferencia de calor de los alrededores. Al respecto, Grunshka et al. [149] encontraron que capilares con $d_{in} < 100 \mu m$ presentan mejor disipación de calor, ya que el flujo del *BGE* es similar en las paredes y en el centro del capilar (ver Tabla I. 1). Por arriba de estas dimensiones la diferencia de temperatura es significativa ($> 5 K$ de diferencia) y se reduce la eficiencia de disipación de calor.

Tabla I. 1. Efecto del d_{in} del capilar en la diferencia de temperatura entre la pared interna y el centro del capilar (adaptado de [149]).

Diámetro Interno (μm)	Diferencia de T (K)
25	0.53
50	1.39
75	3.14
100	5.58
125	8.72

Minimizando la sección del área transversal del flujo de corriente se logra disipar efectivamente el calor, ya que la cantidad de corriente que fluye a través del capilar es una

función de este parámetro. Si se reduce el radio de la columna de sílice en un factor de 10, la sección del área transversal se reduce por 100 ($A = \pi r^2$), reduciendo la corriente en el mismo orden. Por otro lado, pequeños potenciales de corriente se traducen en pequeños gradientes de temperatura y el calor generado es mejor disipado a través de la superficie del tubo, puesto que la superficie de área ($a = 2\pi rL$) del capilar es mucho más grande que su volumen ($V = \pi r^2L$), en una relación $a/V = 2/r$. Estos dos parámetros combinados hacen que el gradiente de temperatura entre el centro y la pared del capilar caiga súbitamente.

I.6.4.6 Inyección de la Muestra

Es importante determinar la cantidad de muestra para obtener una buena resolución y detección. Se ha observado que si la muestra es diluida ($< 1\%$) comparada con la fuerza iónica del *BGE*, la eficiencia de separación es muy buena, sin distorsión de pico. Para ello, se requiere un volumen óptimo de inyección en el capilar, que por lo general es 1 ó 2 % del volumen total del tubo para minimizar el ensanchamiento de picos. En este sentido, para no sobrepasar los límites óptimos de inyección suele realizarse una técnica de “*stacking*” para preconcentrar la muestra dentro del capilar de tal manera que se incremente su carga por diferencia de fuerza iónica entre la muestra y el *BGE*. Lo que se logra disolviendo la muestra con un electrolito de menor fuerza iónica, 10 a 50 veces más diluido que el *BGE*. Este protocolo puede dar un proceso de concentración de la muestra en el capilar de hasta 10 veces, obteniendo muy buena resolución y detección.

I.6.4.7 Adsorción

Las principales causas de adsorción en las paredes de la sílice fundida son las interacciones iónicas entre los solutos catiónicos y las cargas negativas de la pared, así como de las interacciones hidrofóbicas. En este sentido, la relación $a/V = 2/r$ que beneficia la disipación del calor incrementa la probabilidad de adsorción, especialmente de péptidos grandes y proteínas, sobretodo porque estas especies tienen muchas cargas positivas y por sus centros hidrofóbicos.

Existen varias estrategias para reducir tales interacciones. Por ejemplo, es posible cambiar la carga relativa de la molécula trabajando a pH extremo, puesto que varias moléculas poseen grupos ácidos (carboxilato, sulfato, fosfato) o básicos (amina, amida). A pH bajo ($\text{pH} < 2-3$) los grupos silanol serán esencialmente protonados y sin carga, el *EOF* será casi cero, y los analitos como las proteínas estarán cargados positivamente migrando hacia el cátodo. A pH elevado ($\text{pH} > 9-10$) las paredes del capilar y la muestra estarán desprotonados y cargados negativamente, por lo que las interacciones estarán limitadas a pura repulsión. Otro modo, es incrementar la concentración del *BGE*, disminuyendo así las interacciones del soluto por reducción de la superficie efectiva cargada, además la fuerza iónica alta disminuye el *EOF*. Las principales limitantes de este método es la posible adsorción del contra-ion, en algunos casos la absorción en UV, así como, la posible generación de efecto Joule debido a la alta concentración [134].

Las interacciones también pueden disminuirse introduciendo en el *BGE* aditivos como sales inorgánicas (tetraalquil aluminio), solventes orgánicos (MeOH, IsoPrOH, ACN), urea (incrementa la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos en agua), ácido fosfónico, surfactantes (dodecil sulfato de sodio), aminas, etc. Las ciclodextrinas, son aditivos que en la fase acuosa bajo la modalidad de electrocromatografía micelar pueden fungir como pseudo-fases estacionarias, cuya estructura tridimensional cónica permite la incorporación en su interior de sustancias hidrófobas [133]. Una alternativa adicional, para disminuir la interacción del soluto con la superficie del capilar podría ser la modificación de la pared interna del capilar utilizando recubrimientos.

I.6.5 Tipos de Recubrimientos en EC

Existen dos tipos de modificación de la pared interior de los capilares de sílice:

1. *Recubrimiento dinámico*: su preparación es sencilla, se introduce de manera continua una sustancia disuelta en el *BGE* que interactúa físicamente con la sílice alterando la carga y la hidrofobicidad de la pared del capilar. Estas sustancias pueden ser surfactantes (aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitterionicos), polímeros hidrofílicos lineales (celulosas alquílicas, acetato de celulosa, alcohol polivinílico, dextranos, polibreno,

polietilemina) o aminas cuaternarias. La principal ventaja de estos aditivos es que son muy estables, ya que continuamente se regeneran, permitiendo gran reproducibilidad. Sin embargo, una limitante es el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio y obtener una superficie reproducible, además muchos análisis post-columna son sensibles a estos recubrimientos [131].

2. *Recubrimientos permanentes o covalentes*: se ligan a la pared con enlaces químicos como la sililación (Si-O-Si-R, donde R= poliacrilamida, aril pentafluoro, resinas epóxicas, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, N-acrilolaminoetixietanol, proteínas o aminoácidos, ácidos sulfónicos o polisacáridos), el acoplamiento directo Si-C (que es muy estable), surfactantes como el octadeciltriclorosilano que forma una fase hidrofóbica enlazada covalentemente, y polímeros adsorbidos como la metilcelulosa que después del calentamiento sufre una transición vítrea recubriendo la superficie interna del capilar. Estos recubrimientos le confieren al soporte propiedades hidrofílicas que van de fuertes a moderadas e hidrofóbicas igualmente fuertes a moderadas. Este tipo de modificación no requiere mucho mantenimiento, pero desafortunadamente la estabilidad de las coberturas es limitada, impactando en la reproducibilidad [131].

De esta forma, los capilares recubiertos permiten la determinación de analitos como proteínas, ADN, drogas tóxicas, barbitúricos, orina, etcétera [150].

I.6.6 Tipos de Detectores en EC

La detección en EC puede efectuarse en línea (espectroscopía UV, fluorescencia, detección radioquímica y electroquímica) o post-columna (EM, RMN, espectroscopía Raman). Siendo los detectores más comunes la espectrofotometría UV-Visible (UV-Vis), la fluorescencia, la EM [129, 130] y recientemente los electroquímicos, cuya elección depende del tipo de analito.

El detector UV-Vis (longitudes de onda (λ) =190–700 nm, con lámparas de deuterio para λ =190–360 nm y de tungsteno para la zona visible) como otros detectores en línea, requiere de un paso óptico que está formado por el capilar, por lo que la sensibilidad depende del diámetro interno de éste [134]. El detector UV-Vis se considera de carácter universal, puesto que permite

determinar una gran variedad de analitos como microorganismos [139], fármacos [11], fenoles [151], triazinas [152], bifenilos policlorados [153] y complejos metálicos [154], por citar algunos ejemplos. Mientras que, con la detección UV-Vis indirecta se pueden determinar compuestos con grupos no cromóforos, empleando un electrolito o alguna sustancia adicional absorbente, detectando el analito por ausencia o disminución de la absorción (picos negativos), por ejemplo, en la detección de moléculas pequeñas como cationes y aniones inorgánicos [155]. Adicionalmente, la detección UV-Vis con arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés) permite la detección a varias λ para una misma muestra, obteniendo un electroferograma por cada longitud de onda, pudiendo comparar los espectros experimentales con patrones de referencia.

El detector de fluorescencia ofrece una mayor sensibilidad (sub-femtomol) y selectividad, sobre todo en el análisis a nivel traza en matrices complejas. El inconveniente es que muy pocos compuestos fluorescen por lo que generalmente se recurre a la derivatización de los analitos (aminas, carboxilos, hidroxilos con reactivos como oftalaldehído, naftalen dicarboxialdehído o fluoresamina). Las principales aplicaciones de detección con fluorescencia se encuentran en bioquímica y análisis clínicos [139] para la secuenciación de ADN, el diagnóstico de enfermedades, en genética, el mapeo de genoma y el estudio de compuestos aminados [135]. También es posible realizar una detección indirecta de los analitos, adicionando una sustancia fluorescente al electrolito pudiendo analizar materiales de referencia certificados y aguas residuales industriales [7].

En el caso de los detectores electroquímicos, los más comunes son los conductimétricos y amperométricos. Un ejemplo de detección conductimétrica es el análisis de iones inorgánicos pequeños, ácidos carboxílicos y carbohidratos en vinos tintos [136], cuyo límites de detección están alrededor de sub-picomol [135]. El detector amperométrico posee alta selectividad y detecta compuestos electroactivos facilitando las separaciones en matrices biológicas (fluidos corporales como el plasma) y complejas, por ejemplo en el análisis de catecolaminas (neurotransmisores, dopamina, epinefrina, norepinefrina, isoproterenol, hidroquinona) [156].

En este contexto, debido a las distintas limitantes de los detectores expuestos, se ha propuesto el uso de metodologías que acoplan la técnica de EC con la Espectrometría de Masas

(EM) obteniendo alta selectividad (diferenciación de picos) y sensibilidad en las separaciones por la distinta relación masa-carga (m/z) de los analitos, obteniendo a la vez información del peso molecular y/o estructural [157]. La interface más recurrente en el acoplamiento de estas técnicas es la IES que, generalmente une el *outlet* del capilar de la EC con la entrada del espectrómetro de masas a presión atmosférica.

La técnica EC-IES-EM es muy valiosa en el análisis medioambiental, biológico [158] y forense, por ejemplo, en la resolución de drogas en muestras complejas, estudios farmacocinéticos, en la cuantificación de ingredientes farmacéuticos activos y sus posibles impurezas, así como de sus metabolitos en muestras biológicas. En el análisis y separación de compuestos aquirales y quirales con el uso de ciclodextrinas [159], análisis de alimentos [11], de péptidos y proteínas, de compuestos inorgánicos pequeños, pigmentos, toxinas, agentes químicos de guerra, carbohidratos complejos y nucleótidos, entre otros [135].

I.7 Electroforesis Capilar-Espectrometría de Masas (EC-EM)

El acoplamiento EC-EM es la fusión de dos técnicas muy poderosas, puesto que la EC requiere de bajo consumo de insumos (nL), tiempos cortos de análisis, permite alta eficiencia de separación, es de operación sencilla y está libre de fases estacionarias. En tanto que, EM es una técnica de detección universal bien establecida que proporciona información estructural para la identificación inequívoca de los analitos. De tal modo que, la EC-EM ofrece bajos límites de detección y tiempos de respuesta rápidos, proporcionando información cualitativa (tiempos de migración) y cuantitativa (área de pico), así como las masas moleculares y/o patrones de fragmentación en una misma corrida.

La combinación EC-EM tiene más de dos décadas e inició cuando Smith et al. [160] introdujeron por primera vez un módulo de interface para proveer robustez, estabilidad, sensibilidad y mantener la eficiencia de separación. Las fuentes de ionización que se han desarrollado para esta interface son la IES, ionización química a presión atmosférica, ionización fotoquímica a presión atmosférica, MALDI (desorción/ionización láser asistida por matriz, MALDI por sus siglas en inglés), ICP (plasma acoplado inductivamente, ICP por sus siglas en

inglés) y FAB (bombardeo rápido de átomos, FAB por sus siglas en inglés). De éstas, la IES se considera la técnica ideal para la interface en línea, porque facilita la transferencia de los analitos de la fase líquida de la EC a fase gaseosa para la EM, produciendo directamente iones a presión atmosférica con elevada abundancia. Además, permite detectar analitos con masa molecular grande debido a la generación de iones de carga múltiple que caen dentro de los límites de detección m/z de muchos de los analizadores de masas.

En 1917, Zeleny et al. ^[161] describió por primera vez el fenómeno IES, cuya metodología fue desarrollada tiempo después por Dole et al. ^[162] y Fenn et al. ^[163]. El proceso de electrospray consiste en la aplicación de un potencial eléctrico sobre un capilar lleno de solución causando que en la punta el solvente se rompa en hilos delgados, los cuales se transforman en finas gotas cargadas que se van encogiendo a través de la evaporación del solvente hasta obtener una fase gaseosa de iones con alta densidad de carga ^[147]. En los últimos se han desarrollado 3 técnicas de interface IES para el acoplamiento EC-IES-EM, siendo:

1. Interface sin líquido soporte (*Sheathless*), donde el capilar de separación está conectado directamente al emisor de nanoelectrospray por una unión metálica de Au o Ag.
2. Interface de unión líquida (tipo T), consiste en pequeño espacio lleno de líquido entre el capilar de separación y el emisor IES.
3. Interface con líquido de soporte (*Sheath Liquid, SL*), a través de un flujo coaxial de tres elementos: el *BGE*, el líquido soporte y un gas de arrastre, fluyendo de manera constante por lo que no hay volumen muerto. El *SL* asegura siempre un buen contacto eléctrico entre la columna de la EC y la aguja del electrospray, amplificando la señal de la detección.

De estos métodos, nos enfocaremos en el *SL*, dispositivo de acoplamiento de uso más frecuente por su fácil fabricación, implementación y confiabilidad. En esta interface se usa un arreglo coaxial y concéntrico conformado por 3 tubos, donde el capilar de la EC está insertado en un tubo de acero inoxidable de diámetro más grande que pertenece al emisor *IES*, el cual a su vez se encuentra rodeado de un tubo que lleva un gas de arrastre (gas nebulizador (GN) o *sheath gas*) que es bombeado para asistir la formación del spray, manteniéndolo estable ^[147, 148]. Así, se

mezclan el *BGE*, el *SL* y el GN en una misma línea. En la Figura I. 9 se muestra un esquema de dicho arreglo y una ampliación del proceso de formación de las gotas (punta del capilar) hasta reducirse en iones gaseosos altamente cargados, que posteriormente se dirigen a la entrada del capilar de transferencia, donde son apoyados por un gas de secado (GS) para completar la transferencia de los iones en fase gas al analizador de EM.

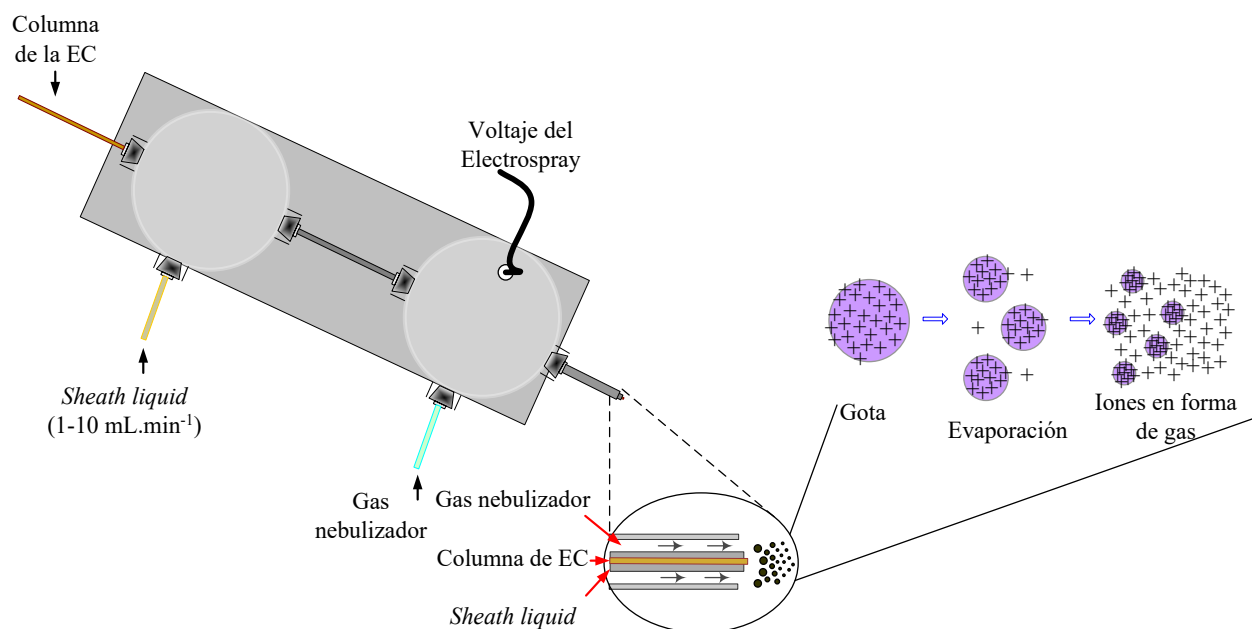


Figura I. 9. Arreglo coaxial y concéntrico de 3 tubos para el sistema EC-IES-EM vía *SL* (izquierda, adaptado de [135]) y la generación de los iones en forma de gas a través de dicho arreglo (derecha).

I.7.1 Eficiencia de la Separación y Detección en EC-IES-EM

Como se ha mencionado, el acoplamiento EC-IES-EM es muy útil para el análisis de diversos analitos y para obtener una separación eficiente, selectiva y con gran sensibilidad es importante considerar la optimización de varios parámetros. Aquellos relacionados con la EC, tales como: la longitud (L), el d_{in} y d_{ex} del capilar, la longitud y forma del *outlet* del capilar, la composición química de la pared interna del capilar; así como el uso de electrolitos volátiles y de tensoactivos (para aumentar la señal de fondo) en el *BGE*. Además, los parámetros relativos a la interface IES-EM como: la composición y flujo del *SL*, el flujo del gas de secado y del gas de

nebulización, el voltaje aplicado en la interfase, así como los efectos de dilución y succión que pueden generarse en la dicha interface.

Al respecto, se han abordado los temas relacionados a la eficiencia de separación en EC (sección I.6.4 sobre Eficiencia de Separación en EC, principalmente en la sección I.6.4.3 de las Características del Capilar de la EC), así que, sólo queda puntualizar la longitud y forma del outlet del capilar. En este sentido, considerando el uso de capilares estrechos que permiten generar flujos pequeños de *BGE* para obtener gotas más finas en la interface EC-IES-EM que aumenten la eficiencia de la ionización del analito. Se ha reportado que la longitud saliente del *outlet* del capilar de la EC en el arreglo coaxial concéntrico (ver Figura I. 9, zoom aguja del *SL* y columna EC) suele ser entre 0.1–0.2 mm [3, 4, 164], de tal modo que puedan obtenerse gotas pequeñas para el electrospray. Además, se ha observado que es preferible trabajar con un corte plano en la superficie del *outlet* del capilar, en lugar de un corte dentado o irregular (ver Figura I. 10), puesto que afecta la generación de gotas homogéneas y por consiguiente la estabilidad del flujo del spray, así como la buena ejecución del acoplamiento^[148]. Incluso los bordes dentados pueden actuar como sitios de adsorción de los componentes de la muestra ^[165].

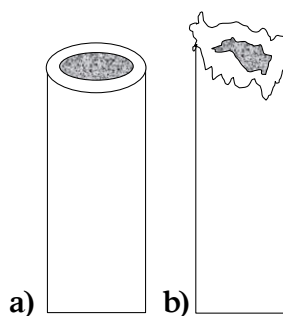


Figura I. 10. Corte del *outlet* del capilar: a) Corte plano apropiado, y b) Corte irregular no ideal o astillado (adaptado de [165]).

I.7.1.1 Composición del *BGE*

En EC se usa una amplia variedad de electrolitos con la detección UV, sin embargo, muchas sales no son compatibles con la IES. Para el sistema EC-IES-EM se requieren soluciones acuosas y/u orgánicas (5–100 %) ^[166] con componentes de alta presión de vapor como el ácido

acético (AcOH), ácido fórmico (HCOOH), acetatos, formiatos, sales de amonio o amoniaco. Usualmente, el intervalo de concentración del *BGE* es de 5–100 mM con pH de 2.5–5.0 y 8.0–10.0. Las principales ventajas de estos electrolitos es su baja conductividad (mejora la resolución), la tendencia a cargar los analitos (aumenta la sensibilidad), no generan ruido de fondo y pueden formar aductos con los analitos sin reducir la sensibilidad de la detección [148]. Además, este tipo de electrolitos permiten que las gotas cargadas formadas en la interface EC-IES-EM provenientes de la EC sean rápidamente reducidas de tamaño por la evaporación del solvente, resultando una disgreación repetida de gotas en gotitas extremadamente pequeñas y altamente cargadas capaces de formar un gas de iones. El mecanismo de ionización de estas gotas, se debe a la desolvatación de gotas muy pequeñas que van dejando iones individuales por evaporación del solvente; proceso que se facilita si los componentes del *BGE* tienen alta presión de vapor. Así, la nube gaseosa de iones individuales se transfiere con el gas de arrastre a la entrada del EM. En este punto, el alto voltaje suministrado permite la desorción/ionización de las gotas y al mismo tiempo el calentamiento el emisor del electrospray.

I.7.1.2 Parámetros de la Interface IES

Ahora, se abordará lo que respecta al balance de los parámetros involucrado en la interfase IES-EM, que comprenden la posición del capilar, la composición y velocidad del flujo del *SL*, la velocidad del flujo del GN y del GS.

Posición del capilar: para el buen control del acoplamiento, tanto el equipo de EC como el EM deben estar colocados de forma que el *inlet* del capilar este horizontal al *outlet* del capilar que va a la entrada del detector EM. Cualquier diferencia en la posición podría generar efectos de succión del *BGE* en el capilar, problemas de inyección o la contaminación del capilar con *SL*. Además la posición es esencial para la intensidad de la señal en EM.

Composición del *SL*: generalmente son soluciones acuosas/orgánicas en una composición de 5–100 % del solvente orgánico (MeOH, EtOH, IsoPrOH, ACN) y la adición de un porcentaje de un modificador ácido o básico (AcOH, HCOOH, hidróxido de amonio) que promueve la

ionización en modo positivo o negativo, según sea el caso [166]. La composición afecta la separación, solubilidad y formación molecular (presencia de aductos).

Velocidad de flujo del *SL* y efecto de dilución: la velocidad del flujo del *SL* afecta notablemente la sensibilidad de la detección debido a la dilución del analito. Además, los flujos relativamente grandes forman gotas de tamaño menos uniforme y el spray es menos estable. Se ha encontrado que los flujos óptimos de *SL* están entre 1–10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, puesto que los flujos pequeños incrementan considerablemente la relación señal/ruido.

Efecto de succión: depende de parámetros como la temperatura del *GS*, la longitud saliente del capilar de la *EC* en el arreglo concéntrico de la interface y de la mezcla de los fluidos involucrados en este *outlet* del capilar de la *EC*: el *GN*, el *SL* y sobre todo *BGE*, así como sus respectivos flujos [3]. Es importante considerar este efecto porque aumenta la velocidad de migración de los analitos.

I.8 Propuesta del Trabajo de Tesis

En base a los antecedentes abordados, en este proyecto de tesis doctoral se propone el diseño, síntesis y caracterización de nuevos nanobiomateriales como los *NTPs* que pueden formarse a partir de *PCs* constituidos por α -aminoácidos *D, L* alternados, desarrollando al mismo tiempo una nueva metodología altamente sensible y selectiva que permita verificar la estructura y pureza de los compuestos de partida, así como de los auto-ensambles.

Mediante el diseño de una metodología de *EC-UV* pueden estudiarse las diferentes propiedades fisicoquímicas de los nuevos *PCs* observando su comportamiento en medios acuosos bajo un campo eléctrico a diferentes condiciones de *pH*, *BGE*, etc., para conocer su estabilidad, movilidad electrocinética y el posible auto-ensamble de los monómeros cíclicos. El ensamble de los *PCs* y la formación de los *NTPs* pueden verificarse por técnicas tales como las espectroscopías Infrarrojo y Raman, así como por la microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión. En este contexto, resulta interesante estudiar el proceso de auto-ensamble de los *PCs* en *NTPs* por medio de *EC-UV* o *EC-IES-EM* a través del diseño de

diagramas de fases que permitan conocer las condiciones de auto-ensamble de los monómeros, puesto que la formación de los NTPs depende de la naturaleza del precursor cíclico y la concentración de éste, entre otros factores.

Bajo este marco, el desarrollo del proyecto se encuentra dividido principalmente en dos fases. La primera realizada en la División de Ciencias Naturales y Exactas en el Departamento de Química de la Universidad de Guanajuato (Guanajuato, México) y la segunda en la Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (UTCBS) de L'École Nationale Supérieure de Chimie de Paris, ParisTech (París, Francia).

La primera fase se efectúa en el grupo de la Dra. Silvia Gutiérrez Granados y en el grupo del Dr. Luis Manuel de León Rodríguez (UG), iniciando con el diseño y análisis de la estructura química de las nuevas secuencias peptídicas, seguida de la síntesis, ciclización y purificación de los péptidos. En este punto, cabe destacar que la presencia de los PCs deseados se ha verificado en las fracciones de purificación mediante espectrometría de masas con el apoyo del Dr. Kazimierz Wróbel (UG). Obteniendo 8 PCs con 8, 10 y 12 α -aminoácidos D, L alternados por síntesis de péptidos en fase sólida, cuyos diámetros internos de Van der Waals se encuentran en el intervalo de 7–13 Å, los cuales que pueden ser capaces de formar NTPs en solución acuosa ácida. Estos compuestos se encuentran clasificados en 3 familias que han sido denotadas como Serie 1, Serie 2 y Serie 3, tal como se enlistan en la Tabla I. 2.

De manera general, se espera que los compuestos de la Serie 1 presenten mayor posibilidad de carga debido a los –COOH de los Asp, lo que podría comprometer el auto-ensamble debido a la repulsión electrostática. Sin embargo, su mayor simetría molecular puede facilitarlos, suponiendo que el ensamble sea de tal forma que se traslapen los mismos aminoácidos de manera antiparalela. Por otro lado, los compuestos de la Serie 2 se espera que presenten una menor carga, puesto que sólo poseen un –COOH (un Asp). Además, en el proceso de auto-ensamble se pronostica que esté favorecido debido a la presencia de grupos aromáticos en las cadenas laterales, los cuales pueden presentar interacciones de las nubes aromáticas del tipo π - π . Mientras que, los péptidos de la Serie 3, adicional a la presencia de los grupos aromáticos, podrían

presentar menor carga, con tendencia a neutra, de tal modo que esto favorezca aún más el auto-ensamble.

Tabla I. 2. Código, secuencia, fórmula y masa teórica de los PCs a sintetizar en el presente proyecto de tesis.

Código del Péptido*	Secuencia del Péptido	Fórmula condensada del PL**/ PC	Masa teórica exacta del PL / PC
8aaSer1	[-(DAla-Asp-DAla-Asn)-] ₂ -]	C ₂₈ H ₄₄ N ₁₀ O ₁₅ / C ₂₈ H ₄₂ N ₁₀ O ₁₄	760.2982 / 742.2876
12aaSer1	[-(DAla-Asp-DAla-Asn)-] ₃ -]	C ₄₂ H ₆₅ N ₁₅ O ₂₂ / C ₄₂ H ₆₃ N ₁₅ O ₂₁	1131.4423 / 1113.4317
8aaSer2	[-DAla-Asp-DAla-Asn-DAla-Trp-DAla-Asp-]	C ₃₅ H ₄₉ N ₁₁ O ₁₃ / C ₃₅ H ₄₇ N ₁₁ O ₁₂	813.3400 / 831.3506
10aaSer2	[-DAla-Asp-DAla-Asn-DAla-Asp-DAla-Asn-DAla-Trp -]	C ₄₂ H ₅₉ N ₁₃ O ₁₇ / C ₄₂ H ₅₇ N ₁₃ O ₁₆	1017.4146 / 999.4041
12aaSer2	[-DAla-Asp-DAla-Asn-DAla-Asp-DAla-Asn-DAla-Trp-DAla-Asn-]	C ₄₉ H ₇₀ N ₁₆ O ₂₀ / C ₄₉ H ₆₈ N ₁₆ O ₁₉	1202.4947 / 1184.4841
8aaSer3	[-DAla-Asp-DAla-Asn-DAla-His-DAla-Asn-]	C ₃₀ H ₄₆ N ₁₂ O ₁₃ / C ₃₀ H ₄₄ N ₁₂ O ₁₂	782.3302 / 764.3196
10aaSer3	[-DAla-Asp-DAla-Asn-DAla-His-DAla-Asn-DAla-Trp-]	C ₄₄ H ₆₁ N ₁₅ O ₁₅ / C ₄₄ H ₅₉ N ₁₅ O ₁₄	1039.4466 / 1021.4360
12aaSer3	[-DAla-Asp-DAla-Asn-DAla-His-DAla-Asn-DAla-Trp-DAla-Asn-]	C ₅₁ H ₇₂ N ₁₈ O ₁₈ / C ₅₁ H ₇₀ N ₁₈ O ₁₇	1224.5266 / 1206.5161

* Código del péptido: el número de aa de la secuencia es usado como prefijo y la referencia de la familia de cada secuencia como subfijo (Serie 1 = Ser1, Serie 2 = Ser2 y Serie 3 = Ser3).

La segunda fase del proyecto se realiza en el grupo de investigación de la Dra. Anne Varenne y Dra. Fanny d'Orlyé (UTCBS-ENSCP, Francia). Donde se ha desarrollado una metodología para la determinación de la pureza y algunas propiedades fisicoquímicas de los PCs mediante las técnicas de EC-IES-EM y EC-UV. Estudiando el comportamiento de los monómeros de partida en medios acuosos y posteriormente durante la promoción del auto-ensamble de los PCs en forma de NTPs, manipulando el pH de la solución. Así mismo, se evidencia la formación de estas nanoestructuras mediante diferentes estudios por espectroscopías, microscopías, etc., realizando ésta última parte y el cierre del proyecto en la UG con el apoyo de los profesores: Dra. María del Pilar González, Dr. Mario Ávila y la técnico Paulina Lozano, del Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Fisicoquímicas y Estructura Molecular.

En función de los resultados obtenidos, el trabajo ha sido orientado en prospectiva para emplear a los ensamblados tubulares supramoleculares obtenidos para su evaluación como potenciales pseudo-nanosoportos en EC-UV o EC-IES-EM, innovando una o ambas técnicas analíticas de tal modo que sean altamente selectivas, específicas y sensibles para el análisis de especies de interés biológico en matrices complejas, en el análisis de microfluidos, la resolución de enantiómeros, de fármacos u otros analitos que podrían ser afines a la superficie selectiva de los nuevos NTPs propuestos. Dado que, estos materiales ofrecen una gran variedad química (pudiendo funcionalizarse) y estructural, estabilidad térmica y cinética, así como su capacidad de reconocer de forma específica a diversos analitos de interés biológico/ambiental por su biocompatibilidad y facilidad de funcionalización.

I.9 Objetivos

I.9.1 General

- ✦ Diseñar, sintetizar y caracterizar 8 PCs con α -aminoácidos D, L alternados, los cuales son potenciales formadores de NTPs, estudiando las propiedades fisicoquímicas de los monómeros cíclicos por EC para determinar las condiciones del auto-ensamble supramolecular de éstos, puesto que dichos ensamblados podrían fungir como nanosoportos selectivos en EC para la resolución de compuestos de interés biológico.

I.9.2 Particulares

- ✦ Realizar el diseño de 8 secuencias peptídicas con α -aminoácidos D, L alternados que podrían ciclarse y proporcionar distinta naturaleza química en su superficie externa.
- ✦ Sintetizar por el método de síntesis de péptidos en fase sólida las 8 secuencias peptídicas lineales nuevas conformadas por 8, 10 y 12 α -aminoácidos D, L alternados.
- ✦ Ciclar estas 8 secuencias peptídicas para obtener los respectivos macrociclos.
- ✦ Diseñar una metodología basada en el acoplamiento EC-IES-EM para la determinación de la pureza de los PCs.

- ↳ Desarrollar una metodología basada en EC-UV para la caracterización fisicoquímica de los PCs.
- ↳ Determinar mediante las metodologías desarrolladas de EC–IES–EM y EC-UV el posible auto-ensamble de los macrociclos en diferentes medios acuosos.
- ↳ Encontrar las condiciones óptimas para el auto-ensamble de los PCs en forma de NTPs y caracterizarlos por diferentes técnicas analíticas, tales como espectroscopías Raman e Infrarrojo, Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopía Electrónica de Transmisión.
- ↳ Hacer un análisis estructural de los diferentes NTPs y proponer una posible aplicación de éstos como modificadores de soportes en EC para optimizar el análisis y separación compuestos de interés biológico.

CAPÍTULO II

SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS CÍCLICOS

En este capítulo se describe a detalle los principios básicos de la Síntesis de Péptidos en Fase Sólida por la técnica Fmoc y del proceso de ciclización cabeza-cola para obtener los 8 nuevos PCs propuestos en este trabajo. Así como, las principales caracterizaciones tradicionales de los péptidos. Posteriormente, se detalla la metodología experimental y los resultados del proceso de obtención de los PCs, su seguimiento y purificación por CLAR; así como, la determinación de su estructura y composición por Cromatografía de Líquidos con EM.

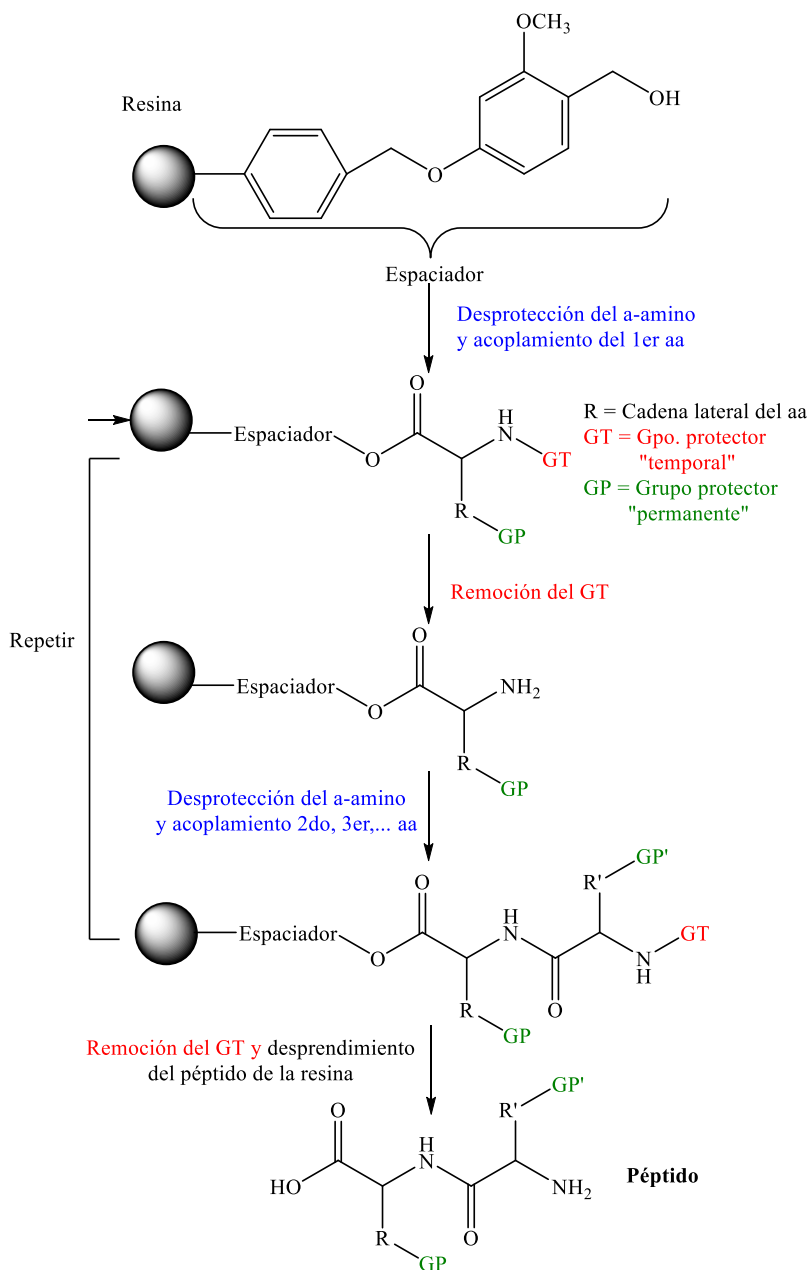
CAPÍTULO II

SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS CÍCLICOS

II.1 Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPFS)

La SPFS permite simplificar significativamente el proceso de síntesis y purificación de péptidos relativamente pequeños, cuyo principio resumido se muestra en el Esquema II. 1 y cuyos fundamentos y conceptos se explicaran en las siguientes páginas. En esta síntesis heterogénea se usa un soporte sólido insoluble mezclado con la solución de un derivado aminoacídico activado cuyo C-terminal (con el grupo $-\text{COOH}$ o $-\text{NH}_2$) será anclado a la resina. La cual, al final del proceso de acoplamiento será capaz de proporcionar un $-\text{COOH}$ o $-\text{NH}_2$ terminal. Para el éxito de obtención del péptido deseado es importante que los grupos de las cadenas laterales se encuentren enmascarados por un grupo protector “permanente” (GP), que no será afectado en las condiciones de reacción empleadas durante la formación de dicho péptido. Mientras que, los grupos N^α -amino estarán protegidos por grupos temporales (GT), los cuales serán removidos antes del acoplamiento del siguiente aminoácido y así, sucesivamente hasta obtener el péptido objetivo. En todos los casos, se sugiere emplear un exceso de reactivos para ayudar a direccionar y garantizar la conclusión eficiente del nuevo enlace peptídico.

Posterior al acoplamiento, el exceso de reactivos y los solventes son separados fácilmente de los intermediarios peptídicos mediante filtración y lavados del soporte polimérico, aplicando vacío. En el paso final, el péptido es liberado o desanclado de la resina polimérica y las cadenas laterales de los aminoácidos son removidos. En este sentido, las condiciones de remoción son relativamente suaves, manteniendo la integridad del péptido.



Esquema II. 1. Principio básico de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS).

Aunque la SPFS ofrece diversas ventajas sobre otros tipos de síntesis, tiene algunas limitantes, ya que para secuencias peptídicas con más de 50 residuos aminoácidos de longitud presentan pureza moderada, ya que el aumento de la longitud de la cadena peptídica dificulta la separación de los subproductos e impurezas de los reactivos, los cuales se van acumulando en la

resina durante el proceso de síntesis contaminando el producto final. Además, la remoción del GT y las reacciones de acoplamiento empiezan a ser incompletas.

En el siguiente listado se presentan las principales ventajas y limitantes de la SPFS:

- ✓ Economía de tiempo y reducción de las etapas de purificación.
- ✓ El uso de reactivos en exceso permite optimizar el rendimiento de reacción.
- ✓ Las pérdidas de material intermediario y producto final son mínimas, puesto que las reacciones y etapas no requieren remoción del péptido del reactor.
- ✓ Es posible automatizar el proceso.
- ✗ El rendimiento de la síntesis estaría comprometido por reacciones incompletas si los reactivos no son suficientes en cada paso de reacción o si existen problemas que inhiban el acoplamiento de los aminoácidos.
- ✗ Bajos rendimientos en las primeras etapas repercuten fuertemente en el rendimiento final.
- ✗ Las reacciones secundarias se deben principalmente a las impurezas de los reactivos.
- ✗ El monitoreo de los pasos intermediarios de la síntesis se hace mediante pruebas analíticas cualitativas, principalmente colorimétricas.

Se tienen dos vertientes de la técnica de SPFS, dependiendo del GT. La SPFS-Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) y la SPFS-Boc (tert-butoxicarbonilo), cuyas principales características se encuentran resumidas en la Tabla II. 1.

La técnica de SPFS-Boc requiere el uso de equipo de laboratorio especial para realizar tanto la desprotección (remoción del grupo Boc) como el desanclaje péptido-resina, los cuales requieren de HF anhidro. Mientras que, el desanclaje de los péptidos sintetizados por la SPFS-Fmoc se realiza con TFA, por lo que no es necesario utilizar equipo especial. La solubilidad de los péptidos obtenidos por la SPFS-Boc suele ser mayor que la solubilidad de los péptidos sintetizados por Fmoc, puesto que las sales de fluoruro son más solubles que las sales de trifluoroacetato. En cuanto al inconveniente de la agregación, principalmente se debe a que la remoción del grupo Boc en la SPFS-Boc genera grupos amino con carga positiva; mientras que, en la SPFS-Fmoc los grupos amino quedan neutros. En este sentido, la carga positiva genera

repulsión electrostática, evitando la agregación durante la síntesis. Finalmente, la SPFS-Fmoc se considera una técnica de síntesis ortogonal debido a que, la desprotección del grupo amino terminal (remoción Fmoc) se hace en condiciones suaves en medio básico. Mientras que, el desanclaje de péptido-resina se efectúa en condiciones ácidas. En este contexto, el método Boc utiliza condiciones ácidas para ambos propósitos.

Tabla II. 1. Principales diferencias de las técnicas de SPFS Fmoc y Boc.

Característica	Boc	Fmoc
Equipamiento especial	Sí	No
Costo de reactivos	Bajo	Alto
Solubilidad de los péptidos	Mayor	Menor
Pureza de los péptidos hidrofóbicos	Elevada	Puede ser menor
Problemas de agregación	Poco frecuente	Relativamente frecuente
Tiempo de síntesis por acoplamiento	20 min	20–60 min
Desprotección final	HF	TFA*
Seguridad	Potencialmente peligrosa	Segura
Protección ortogonal	No	Sí

*TFA: ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés).

De estas técnicas nos enfocaremos en la SPFS-Fmoc, de la cual los soportes poliméricos, modificadores, grupos protectores, agentes de acoplamiento, etc., cumplen funciones específicas y es importante conocerlos más a fondo para comprender el proceso de síntesis de péptidos bajo esta modalidad.

II.1.1 Soportes Poliméricos (Resinas)

La resina es un soporte polimérico insoluble que contiene un grupo modificador o enlazante que determina el grupo funcional que se anclará a la resina y que será liberado al final

del proceso de síntesis, pudiendo ser un $-\text{COOH}$ terminal o un $-\text{NH}_2$ terminal. En la Figura II. 1 se muestran las principales resinas poliméricas empleadas en la SPFS.

Inicialmente las resinas eran sólo de poliestireno y recientemente se han mezclado con ~1% de m-divinilbenceno (DVB), pudiendo obtener perlas esféricas altamente porosas y de tamaño homogéneo; además, el aditivo le confiere a las resinas mayor estabilidad térmica y mejora sus propiedades de hinchamiento [167]. Por ello, las partículas de estas resinas se hinchan fácilmente con solventes orgánicos de polaridad media como diclorometano (DCM), tolueno y DMF. Por otro lado, están las resinas derivadas de la poliacrilamida que son menos hidrofóbicas que los soportes de poliestireno. Mientras que, las resinas a base de polietilenglicol (PEG) presentan mejores propiedades debido a los arreglos entre los enlaces C-O formando estructuras helicoidales que pueden convertir la resina en hidrofóbica, de polaridad media o hidrofílica, diversificando su compatibilidad con los solventes.

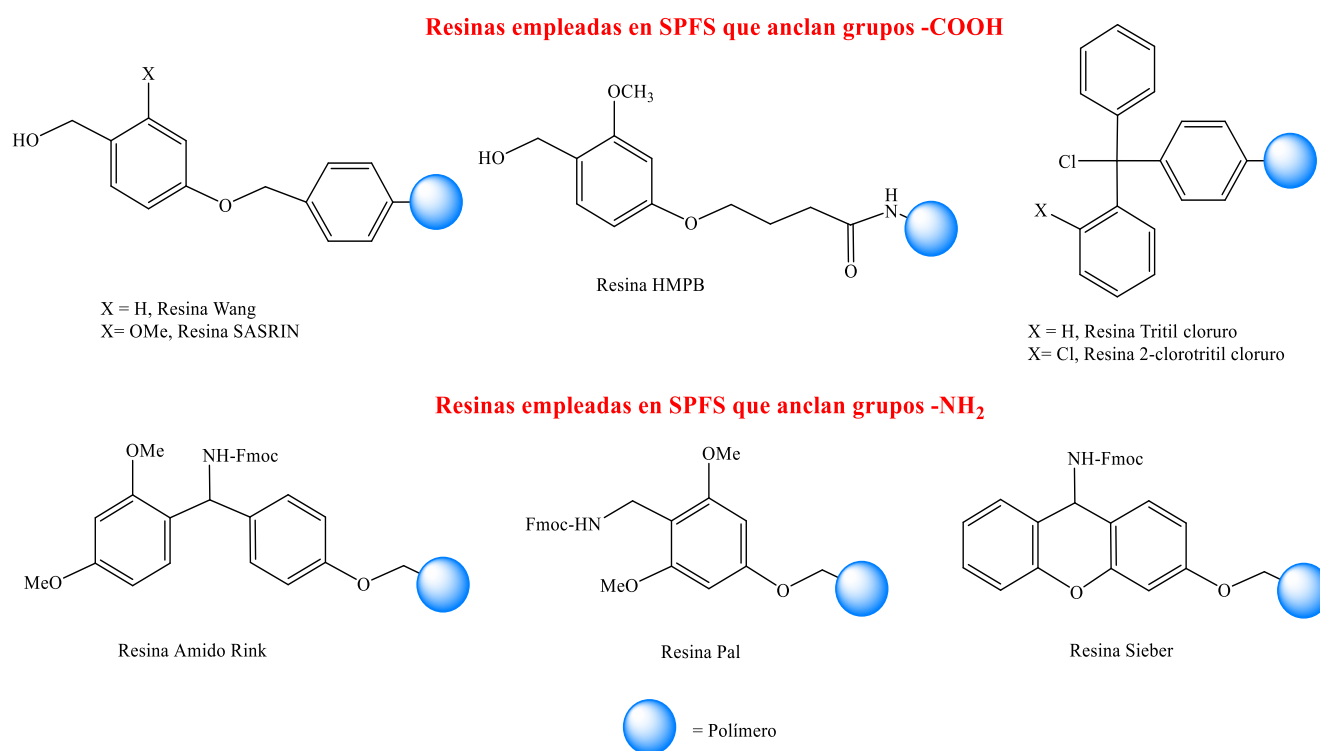


Figura II. 1. Resinas de uso común en la SPFS.

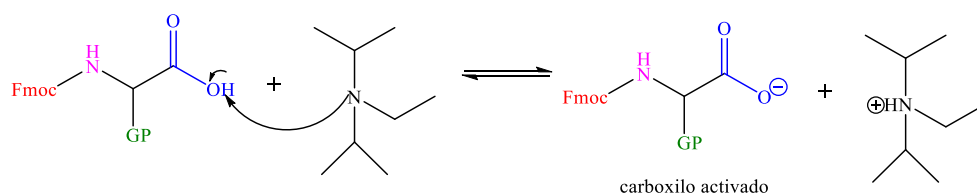
En la SPFS generalmente se usan perlas resinosas para la síntesis de más de 50 μmol de producto y es importante satisfacer ciertos requisitos: la resina debe ser insoluble en los solventes usados y mecánicamente estable por las etapas de agitación, lavado y filtrado; el enlace resina-aminoácido debe ser altamente estable (no debe interaccionar con el medio de reacción); el aa deberá tener protegidos los grupos funcionales de las cadenas laterales y el grupo funcional del C-terminal ($-\text{COOH}$ o $-\text{NH}_2$), de tal modo que sean estables en las condiciones de reacción usadas durante toda la síntesis peptídica y/o acoplamiento, manteniendo la integridad de la secuencia peptídica.

II.1.2 Modificadores o Enlazantes de Resinas

Los enlazantes de la resina son grupos funcionales que fungen como modificadores de las propiedades físicas o químicas de los soportes poliméricos, obteniendo derivados que pueden liberar al péptido en medios ácidos fuertes, moderados o débiles, en medios básicos, por fotólisis, hidrogenólisis u otros procedimientos. Otra función de los enlazantes es proveer un enlace reversible entre la cadena peptídica deseada y la resina. A la vez, este enlace debe ser capaz de proteger el grupo del C-terminal del primer aa anclado al polímero durante toda la síntesis [24].

La mayoría de los modificadores están diseñados para liberar péptidos ácidos o amidas mediante un tratamiento con TFA, por lo que la elección del modificador determinará el grupo funcional del C-terminal del producto final. Por ejemplo, en la Figura II. 2 se muestra el mecanismo de reacción de la activación del aa en solución (con el carboxilo activado utilizando DIPEA) y el mecanismo del proceso de anclaje del primer aminoácido activado a la resina 2-clorotritil cloruro (2ClTrt-Cl, enlaza grupos carboxilo), la cual proporcionará un grupo $-\text{COOH}$ terminal al final del proceso de síntesis.

Mecanismo de activación del aminoácido en solución



Mecanismo de anclaje del aa activo con la resina 2-Clorotritil cloruro

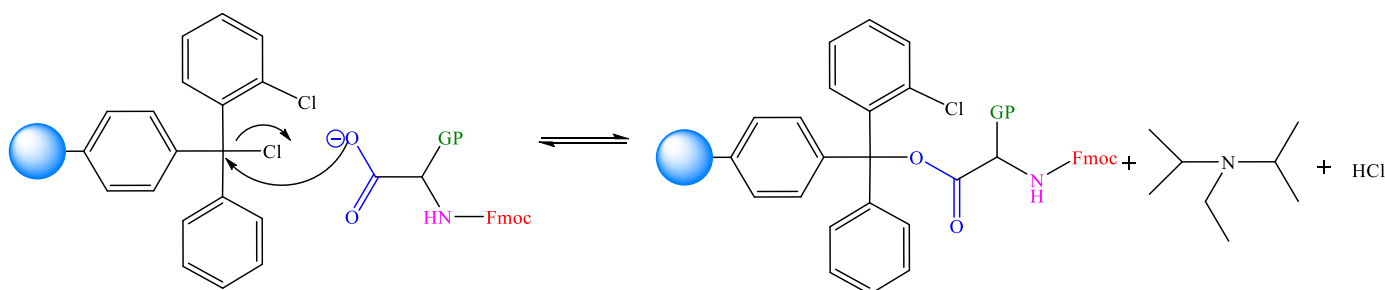


Figura II. 2. Mecanismo de reacción de activación del aa en el $-\text{COOH}$ usando DIPEA y su posterior anclaje a la resina 2ClTrt-Cl.

II.1.3 Grupos Protectores

Como se mencionó anteriormente, los aminoácidos utilizados en la SPFS cuentan con los grupos funcionales (amino, tiol, carboxilo, alcohol,...) protegidos, los cuales son afectados químicamente diferente (de manera ortogonal), de tal modo que sean estables en las condiciones de síntesis y de fácil remoción en condiciones suaves, como se explica a continuación.

II.1.3.1 Grupos Protectores (Temporales) de Grupo N^α -amino

El GT o protector del $-\text{NH}_2$ terminal (N^α -amino) bloquea el amino de tal modo, que prevenga la polimerización descontrolada, permaneciendo estable durante el acoplamiento y pudiendo reactivarse posteriormente en condiciones suaves que no afecten a la secuencia peptídica [24, 168]. Las principales características del GT son: conferirle alta solubilidad al péptido protegido en la mayoría de los solventes, prevenir la formación de isómeros durante el acoplamiento, ser removido rápidamente, ser eficiente, ser libre de reacciones laterales y que los subproductos puedan eliminarse fácilmente. En este contexto, Carpino y Han [169] fueron los primeros en proponer al grupo Fmoc como protector del α -amino, cuya remoción requiere del

uso de bases como piperidina (Pip, 20–50 % en DMF, v/v,) o morfolina (1:1 en DMF, v/v) [168], generando una cadena tipo resina-péptido-NH₂, sin necesidad de efectuar una neutralización. En estos medios de remoción son estables los grupos: Boc, benziloxycarbonilo (Z), tritilo (Trt), aliloxycarbonilo (Alloc) y p-Nitrobenziloxycarbonilo (pNZ) [168].

El grupo Fmoc es estable en medios ácidos, por lo que las cadenas laterales de los aminoácidos en cuestión pueden protegerse con grupos que, en condiciones ligeramente ácidas se remuevan y que, en medios básicos permanezcan estables. El grupo Fmoc es más fácil de trabajar que el Boc, puesto que requiere menos etapas y consume menos solventes (no requiere neutralización después de su remoción). En la Figura II. 3 se ilustra el mecanismo de reacción de remoción del Fmoc (circundado en **color azul-verde**), en que el paso clave es la desprotonación inicial del anillo fluoreno para generar un tipo de intermediario ciclopentadieno aromático (carga -), que se elimina rápidamente para formar dibenzofulveno y el compuesto NH₂-péptido-resina (vía descarboxilación). El dibenzofulveno reacciona a su vez con la Pip para proporcionar el aducto 1. Los productos de la desprotonación pueden ser monitoreados por detección UV, ya que absorben a una $\lambda = 304 \text{ nm}$ [24].

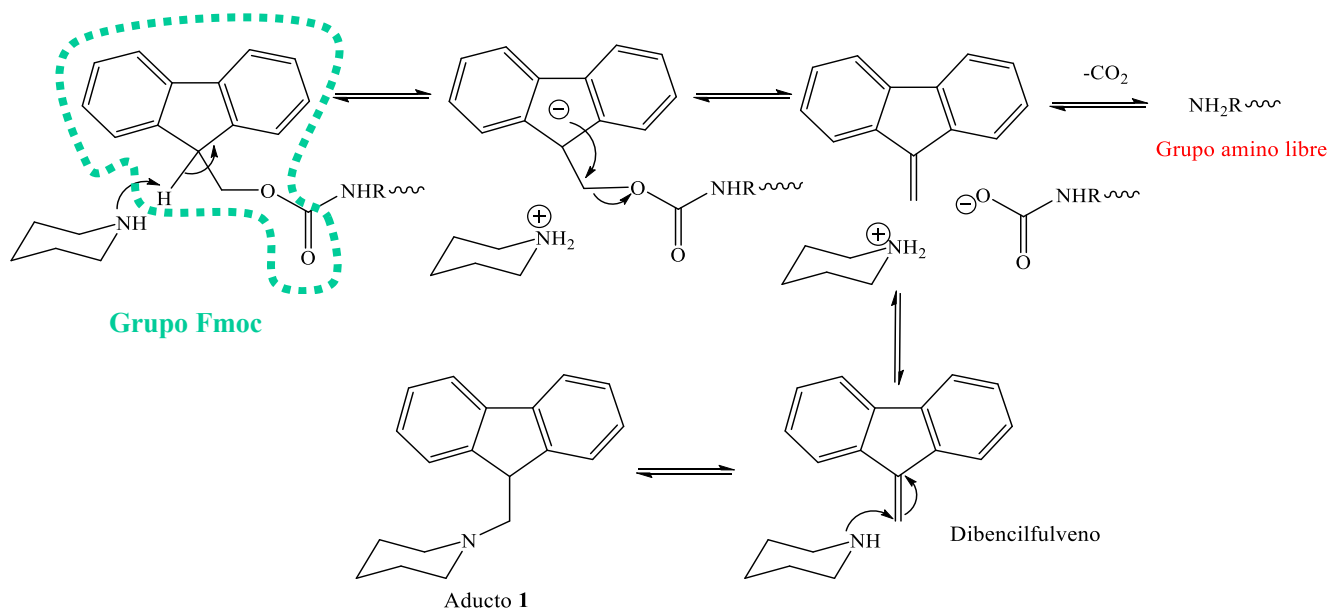


Figura II. 3. Mecanismo de reacción de remoción del grupo Fmoc del -NH-R terminal en una cadena peptídica en medio básico (Pip/DMF, 20/80, v/v) en la SPFS-Fmoc.

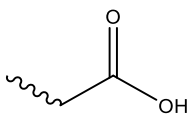
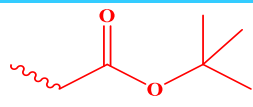
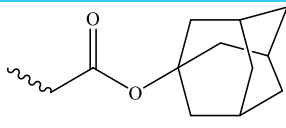
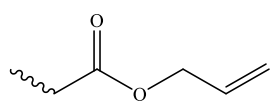
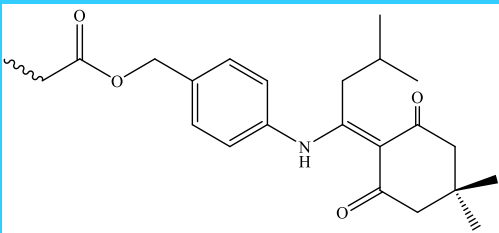
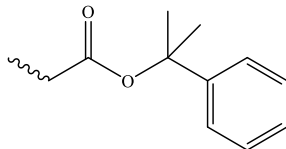
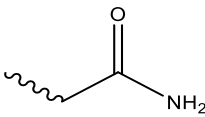
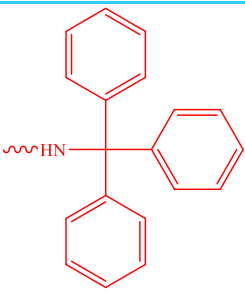
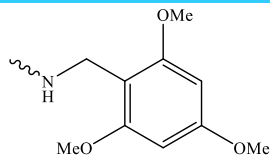
Es importante recordar que bajo esta modalidad de síntesis y protección, el grupo α -COOH terminal se encuentra enlazado a la resina, la cual funge como grupo protector.

II.1.3.2 Grupos Protectores (Permanentes) de las Cadenas Laterales

El GP de las cadenas laterales (-R) de los aa's involucrados en el proceso de SPFS-Fmoc permiten que los grupos de dichas cadenas no interactúen durante la síntesis del péptido, por lo que son muy estables en las condiciones de reacción. Los principales GP's de los aa's empleados en este trabajo se muestran en la Tabla II. 2, algunos de los cuales pueden ser removidos selectivamente, posterior al desanclaje del péptido final de la resina. A continuación se mencionan las principales razones de elección de los GP's:

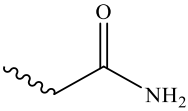
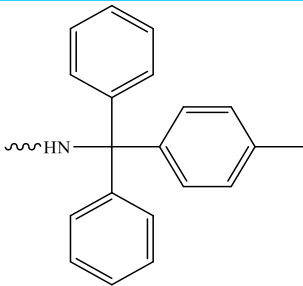
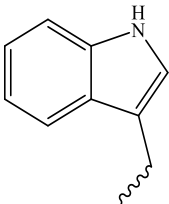
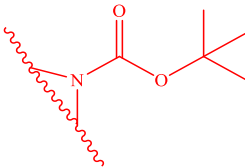
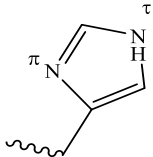
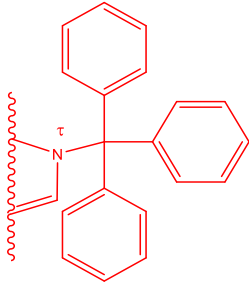
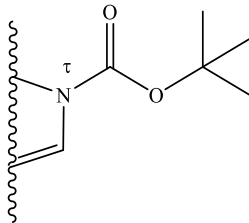
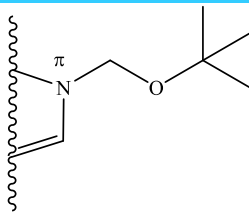
1. **Aminoácidos Asp y Glu:** los grupos -COOH de sus cadenas laterales son protegidos para prevenir la formación de aspartamida y posibles ciclados intramoleculares no deseados, del mismo modo pueden interferir en la formación del enlace peptídico. El GP más usado en la técnica Fmoc es el OtBu.
2. **Aminoácidos Asn y Gln:** la protección del -NH₂ de la cadena lateral no sólo previene reacciones laterales, si no que a la vez le confiere mayor solubilidad al aa. Los GP's más usados en Fmoc son Trt y Mtt, por su fácil remoción.
3. **Aminoácido Trp:** el grupo indol del Trp es capaz de atrapar reactivos electrofílicos y es lábil de oxidación, alquilación e incluso dimerización irreversible en medio ácido (como se muestra en la Figura II. 4). Por ello, es indispensable recurrir a la protección de dicho anillo aromático, siendo el más usual en Fmoc el grupo Boc.
4. **Aminoácido His:** el imidazol de este aa tiene dos centros nucleofílicos (N^τ y N^π) que forman tautómeros (ver Figura II. 5). En caso de no usar un sistema de bloqueo en el anillo existe una elevada tendencia a la racemización y acilación durante el proceso de síntesis. Para evitar dichos efectos se usa generalmente en Fmoc el GP Trt en el N^τ de la His.

Tabla II. 2. Grupos protectores comunes de la cadena lateral –R de los aa’s empleados en este proyecto ^[24]

Aminoácido	Grupo Protector	Estructura	Condiciones de Remoción
<p>Asp/Glu</p> 	<p>OtBu (tert-butiléster)</p>		<p>90 % v/v TFA, 30 min</p>
	<p>01-Ada (Adamantilo)</p>		<p>TFA</p>
	<p>OAll (Aliloxicarbonilo)</p>		<p>Pd(Ph₃P)₄-AcOH-NMM Pd(Ph₃P)₄(0.02eq)- PbSiH₃ (1.2-2eq) en DCM 10-30 min</p>
	<p>ODmab (γ-4-[N-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutil]-amino]benzil éster)</p>		<p>2 % NH₂NH₂·H₂O en DMF, 5-10 min</p>
	<p>Opip (2-fenilisopropil) éster</p>		<p>4 % TFA en DCM, 15 min</p>
<p>Asn/Gln</p> 	<p>Trt (Tritilo o trifenilmetilo)</p>		<p>90 % v/v TFA, 30-60 min</p>
	<p>Tmob (2,4,6-trimetoxibencilo)</p>		<p>90 % v/v TFA, 1 h</p>

*Se indica en **rojo** los aa’s protegidos utilizados en la síntesis de los péptidos obtenidos.

Tabla II. 2 (Continuación). Grupos protectores comunes de la cadena lateral –R de los aa's empleados en este proyecto [24].

Aminoácido	Grupo Protector	Estructura	Condiciones de Remoción
<p>Asn/Gln</p> 	<p>Mtt (4-trimetiltritilo)</p>		<p>95 % v/v TFA, 30 min</p>
<p>Trp</p> 	<p>Boc (tert-butoxicarbonilo)</p>		<p>90% v/v TFA, 1 h, seguido de 1 % TFA en H2O, 1-2 h</p>
<p>His</p> 	<p>Trt</p>		<p>50 % TFA en DCM, 30 min</p>
	<p>Boc</p>		<p>90 % v/v TFA, 30 min</p>
	<p>Bum (π-butiloximetilo)</p>		<p>95 % v/v TFA, 1-2 h</p>

*Se indica en **rojo** los aa's protegidos utilizados en la síntesis de los péptidos obtenidos.

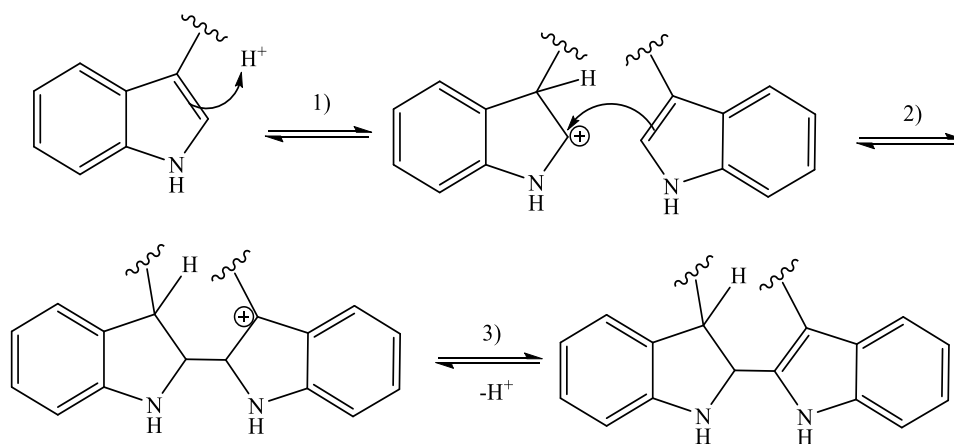


Figura II. 4. Mecanismo de dimerización en medio ácido del indol del Trp: 1) Protonación, 2) ataque nucleofílico del doble enlace del indol al carbocatión, y 3) eliminación del protón.

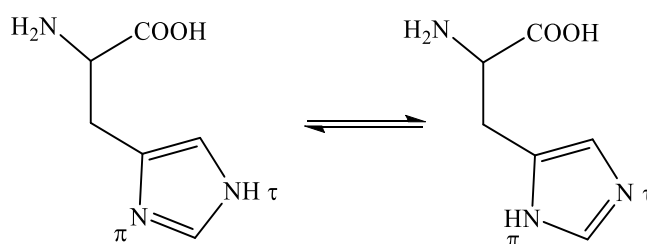


Figura II. 5. Tautomerización del imidazol en la His.

II.1.4 Reactivos de Acoplamiento

El acoplamiento es un ataque nucleofílico del grupo -NH_2 del aa anclado a la resina al grupo -COOR del aa activado previamente en solución (cuyo mecanismo de reacción de muestras en la parte superior de la Figura II. 2). La formación de este enlace peptídico suele realizarse empleando agentes de acoplamiento que producen ésteres activos, facilitando la reacción. La selección de dicho agente es relevante para lograr una reacción eficiente, rápida y con un grado mínimo de racemización en el aa activo [170]. En este contexto, el paso crucial del acoplamiento es la activación del carboxilo mediante una reacción de acilación que da lugar a un carbanión intermediario (ion plano), debido a la acidez del protón (amplificándose fuertemente cuando el carboxilo es activado), que puede recuperarse colocándose en cualquier lado de la

molécula y dependiendo de qué cara se vuelva a protonar, se obtendrá uno u otro enantiómero como se muestra en la Figura II. 6.

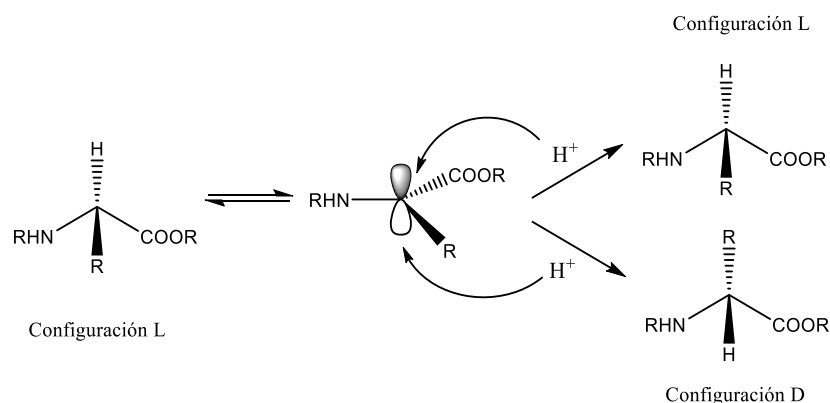


Figura II. 6. Racemización del carbanion intermediario.

De los 20 aa's esenciales 19 pueden mostrar enantiomerización (la Gly es aquiral), por lo que mantener la integridad de los centros quirales es de vital importancia para conservar las propiedades del producto deseado. De este centro quiral, el H ácido es potencialmente sustituible, cuyo reemplazo se traduce en un mecanismo de enantiomerización, poniendo en riesgo la integridad quiral del péptido durante el acoplamiento, puesto que la acidez de este protón se amplifica fuertemente cuando el carboxilo es activado en medio básico, por ejemplo, con DIPEA.

Los reactivos o agentes de acoplamiento se usan a elevada concentración con tiempos de reacción de hasta 30 min, de tal modo que pueda obtenerse una reacción eficiente. Los principales reactivos de acoplamiento que activan el carboxilo se mencionan a continuación.

II.1.4.1 Carbodiimidias

La primer carbodiimida utilizada como reactivo de acoplamiento en la síntesis de péptidos es la *N, N'*-diclohexilcarbodiimida (DCC, Figura II. 7.), la cual sigue vigente y regularmente se usa para trabajar en medios apolares con resinas de poliestireno. Otro reactivo es la *N, N'*-diisopropilcarbodiimida (DICA, Figura II. 7.), cuyos subproductos (ureas) son muy solubles. Sin embargo, la limitante de estos compuestos es que son muy reactivos y pueden racemizar el aa.

Para solucionar este inconveniente se han propuesto a las oximas aromáticas como la 1-hidroxibenzotriazol (HOBt, Figura II. 7.) y el 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol (HOAt, Figura II. 7.)^[170]. Estas sustancias forman un éster menos reactivo y con menor posibilidad de racemización.

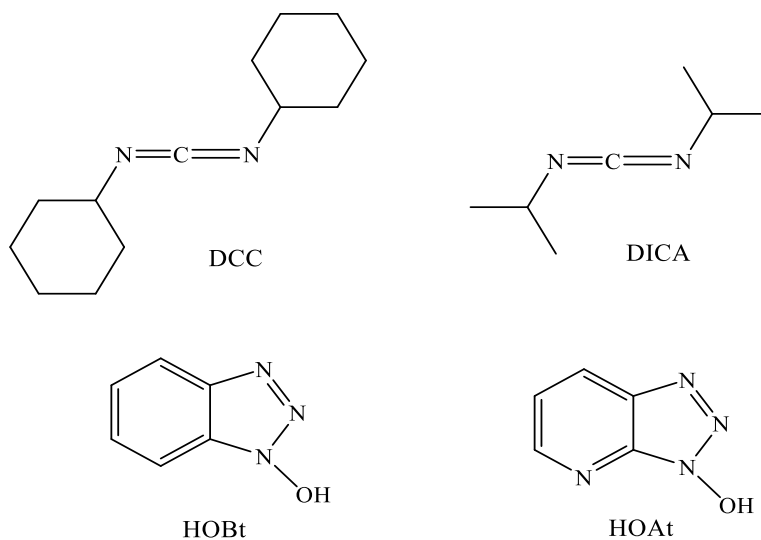


Figura II. 7. Principales reactivos de acoplamiento utilizados en la SPFS.

En la Figura II. 8 se muestra el mecanismo de reacción de la carbodiimida DICA en el proceso de acoplamiento de aminoácidos.

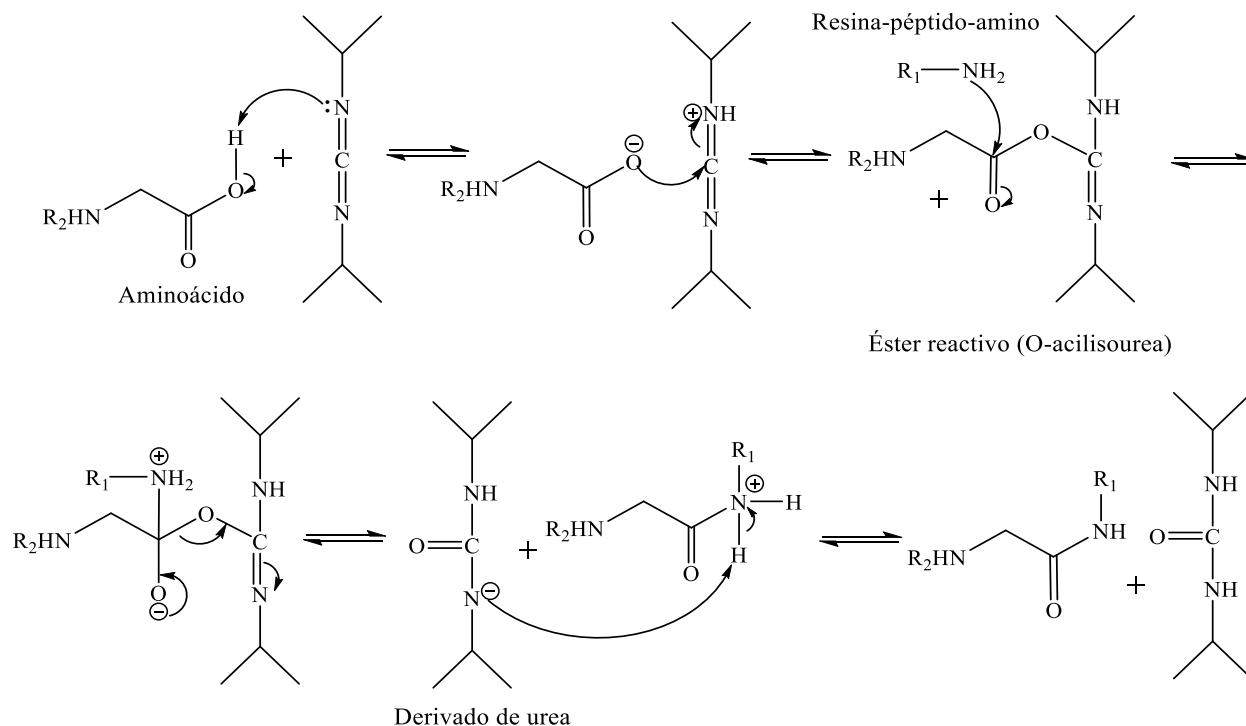


Figura II. 8. Mecanismo de acoplamiento entre aminoácidos con el uso de la carbodiimida DICA (similar para DCC).

II.1.4.2 Sales de Fosfonio y Sales de Uronio

En los últimos años han surgido nuevos reactivos de acoplamiento como las sales de fosfonio y uronio, las cuales minimizan la formación de productos no deseados a la vez que reducen los tiempos de reacción. Estas sales, en presencia de una base convierten el carboxilo del aa en una especie activada. Entre las más empleadas están: el hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(dimetilamino) fosfonio (BOP), el benzotriazoliloxitrispirrolidino fosforo hexafluorofosfato (PyBOP), hexafluorofosfato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanaminio (HBTU) y el tetrafluoroborato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanaminio (TBTU), cuyas estructuras se muestran en la Figura II. 9.

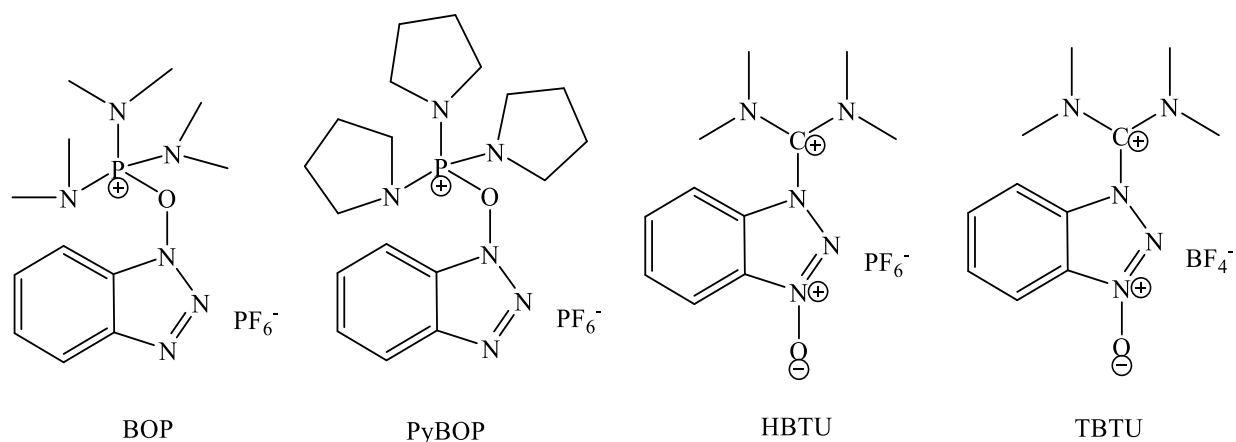


Figura II. 9. Estructuras de algunas sales de fosfonio (BOP, PyBOP) y sales de uronio (HBTU, TBTU) que son usadas como agentes de acoplamiento.

El BOP genera acoplamientos altamente eficientes y rápidos [24], inicialmente se usó en la síntesis homogénea y en la estrategia Boc/TFA para la SPFS. Este compuesto sólo reacciona con sales de carboxilato y es estable en presencia de ácidos carboxílicos, mientras que el PyBOP es más activo y altamente efectivo en acoplamientos complejos. La mayoría de estas sales dan un éster activo, que se forma *in situ* muy rápido y velozmente obteniendo un enlace peptídico. En la Figura II. 10 se detalla el mecanismo de reacción de las sales de fosfonio en medio básico, el cual involucra un intermediario aciloxifosfonio que posteriormente se transforma en un éster activo tipo oxibenzotriazol. Estos compuestos (el intermediario y el éster activo) pueden reaccionar con nucleófilos, siendo más activo el éster. Adicionalmente, si se agrega a la mezcla de reacción un aditivo como el HOBt es posible acelerar la transformación del intermediario y direccionar la reacción. En esta etapa, la preactivación *in situ* del aa con reactivos de acoplamiento durante 5 min permite optimizar los rendimientos del proceso.

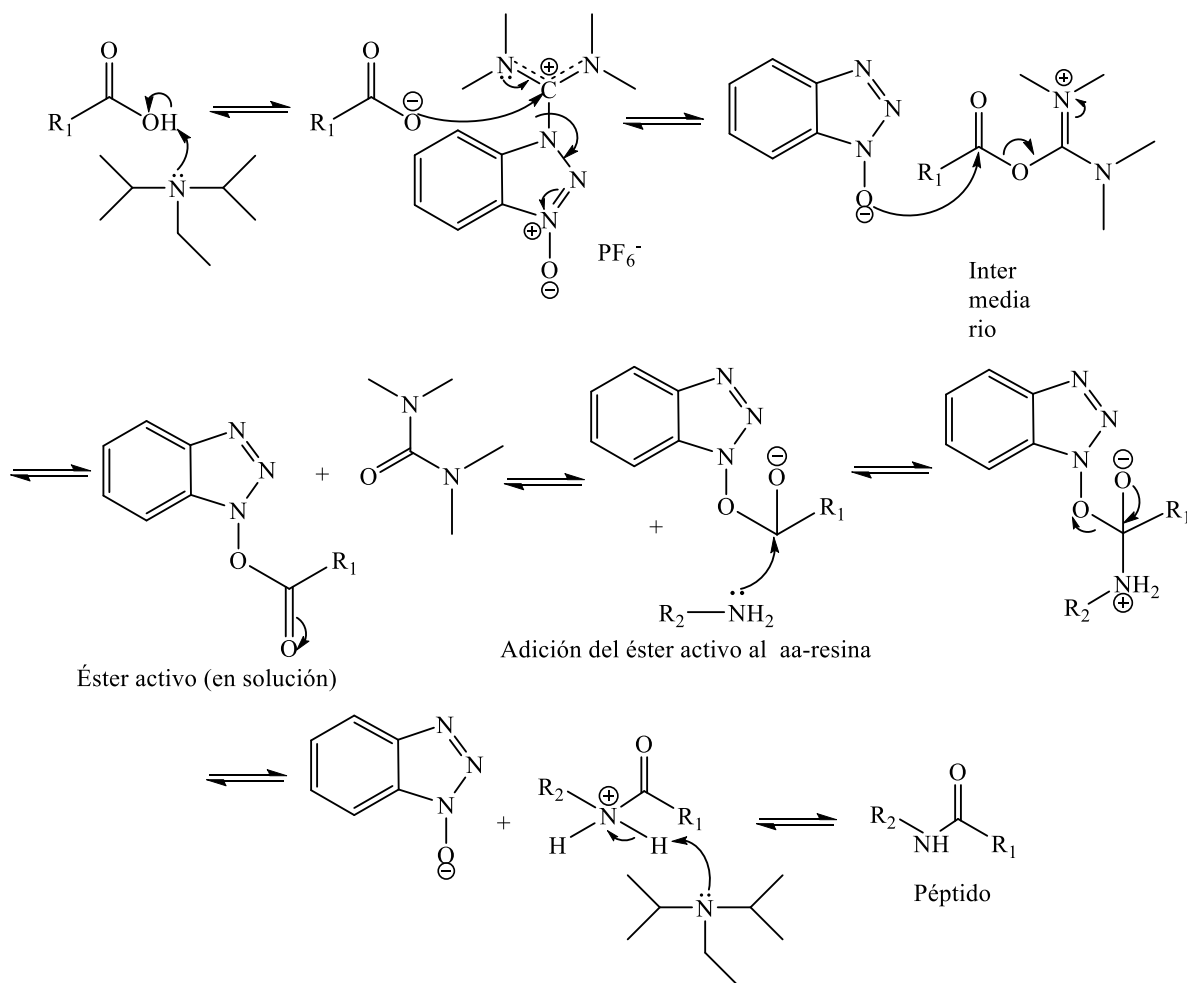


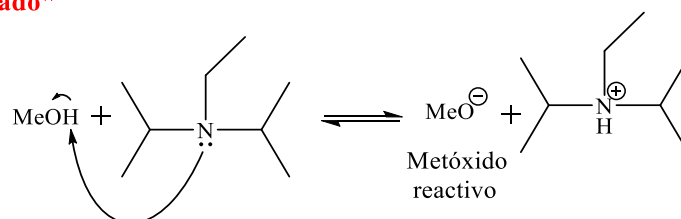
Figura II. 10. Mecanismo de activación y formación del enlace peptídico usando una sal de uronio (HBTU) en medio básico (DIPEA). El primer paso es la activación del carboxilo con la sal “-onio” seguido del ataque nucleofílico del componente amino al éster activo para formar el enlace amida (peptídico).

II.1.5 Primer Acoplamiento o Anclaje

Previo al proceso de acoplamiento aa-aa, se realiza el anclaje del primer aminoácido a la resina polimérica a través del C-terminal. Paso que es de vital importancia, puesto que en él radica el rendimiento y éxito de la síntesis del producto deseado. Los sitios de la resina que no hayan reaccionado en este proceso de anclaje deben ser bloqueados para evitar la formación de subproductos. Inicialmente la resina es hinchada con un solvente libre de agua, por lo que debe ser tridestilado usando un material desecante. Este mismo solvente será utilizado para el anclaje del primer aminoácido. Posteriormente se procederá al “capado”, que consiste en la inactivación

de los sitios no anclados a un aa. Por ejemplo, si se utiliza la resina 2ClTrt-Cl, se prepara una mezcla de MeOH con DIPEA para generar metóxidos activos que puedan reaccionar con la resina, bloqueando los sitios activos de ésta, en la Figura II. 11. se muestra el mecanismo de reacción de dicho proceso.

1. Mezcla de "Capado"



2. Capado de la resina

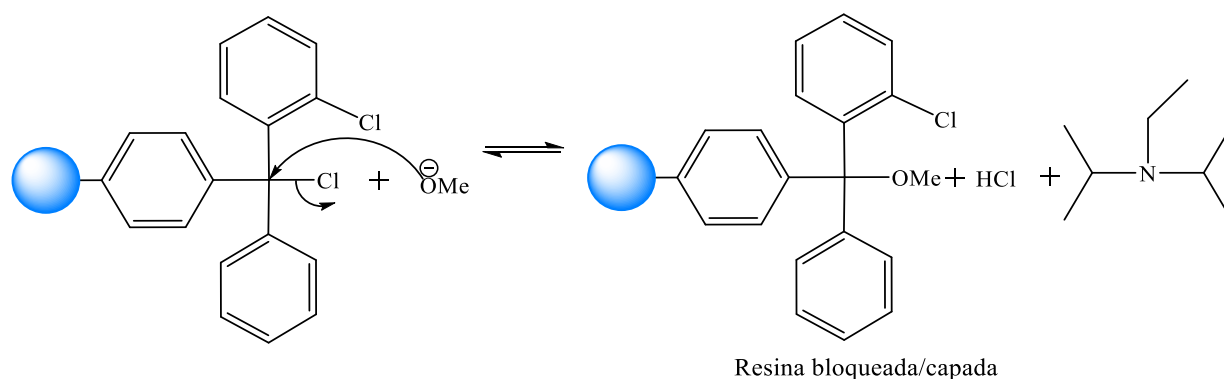


Figura II. 11. Mecanismo de "capado" de los sitios activos de la resina polimérica 2ClTrt-Cl.

Después del capado, se continúa con la etapa de acoplamiento de los siguientes aminoácidos al primer aa anclado a la resina. El monitoreo del proceso en la SPFS-Fmoc generalmente es muy simple, puesto que involucra pruebas colorimétricas cualitativas para detectar la presencia de los aminos libres y los aminos anclados. Las principales técnicas para el seguimiento son *la Prueba de Kaiser* y *la Prueba de azul de bromofenol*.

Prueba de Kaiser: la prueba es simple y rápida, la ninhidrina reacciona con una amina primaria produciendo un color azul-púrpura intenso (púrpura de Ruhemann) [171]. Si reacciona con aminas secundarias se observa un color anaranjado-amarillo café (en ocasiones difícil de distinguir). Cuando el amino terminal de un péptido está protegido, la prueba se muestra incolora o amarilla.

Prueba de azul de bromofenol: a pH neutro la solución con bromofenol emite luz azul. A pH ácido absorbe esta luz y luz UV, observando una solución amarilla. Cuando el amino terminal del péptido está libre, la prueba es positiva y se torna azul, mientras que en el acoplamiento la resina se mantiene amarilla (prueba negativa). El bromofenol es un indicador que cambia de coloración, de azul a amarillo en la protonación. Para realizar la prueba basta con dejar caer unas 3 gotas de 1% de bromofenol/DMA (m/m) sobre la resina contenedora del producto de acoplamiento.

II.1.6 Ciclización Cabeza-Cola de Péptidos Lineales

La conformación molecular D, L alternada de los precursores peptídicos lineales es la responsable de facilitar las macrociclizaciones de estos péptidos, si se comparan con las dificultades que presentan los PLs que sólo poseen una conformación D o L. Puesto que estos péptidos con una sola conformación prefieren adoptar una configuración extendida, de tal modo que tiendan a minimizar las interacciones entre los grupos alílicos, colocando sus terminales reactivas lejos unas de otras [172]. Mientras que, los péptidos con aminoácidos D, L alternados prefieren una configuración tipo β -plegada que se adquiere en la ciclización de la molécula [173]. En este contexto, la macrociclización intramolecular tipo cabeza-cola (entre el grupo $-\text{NH}_2$ terminal y el grupo $-\text{COOH}$ terminal) es altamente favorecida en condiciones de elevada dilución que minimizan los procesos intermoleculares indeseados como las oligo- y polimerizaciones [174]. Generalmente, dichas diluciones son del orden de 10^{-3} a 10^{-4} M, por lo que el proceso suele ser lento y en el cual se ha demostrado que el DMAP es el aditivo efectivo para promover la ciclización cabeza-cola [175], obteniendo monociclos y no agregados poliméricos.

II.1.7 Caracterización de los Péptidos

II.1.7.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

Al caracterizar un compuesto es importante considerar las posibles impurezas y subproductos que podrían estar presentes. En la síntesis peptídica los principales subproductos suelen ser isómeros y péptidos de cadenas más pequeñas. En este sentido la CLAR (también

denotada como *HPLC*, por sus siglas en inglés) es una técnica cromatográfica que permite separar, identificar y cuantificar mezclas de compuestos con una sensibilidad de hasta ppb ^[176], dependiendo del tipo de detector empleado. La separación se efectúa inyectando un poco de muestra disuelta en un solvente o mezcla de ellos, dentro de un flujo de solventes (fase móvil) bombeados bajo presión a lo largo de una columna empacada con un material sólido (fase estacionaria). La velocidad de desplazamiento del compuesto depende de las interacciones compuesto-fase móvil/fase estacionaria. De este modo, los componentes más afines a la fase estacionaria se moverán más lento, mientras que los menos afines eluirán con mayor rapidez hacia fuera de la columna.

La CLAR en fase inversa es la herramienta analítica estándar para el control de pureza de los péptidos sintéticos, puesto que ofrece un amplio intervalo de manipulación de las características tanto de la fase móvil como estacionaria para mejorar la eficiencia y velocidad de las separaciones cromatográficas. El análisis más común se lleva a cabo en columnas con 3-5 μm y 100-300 Å de tamaño de poro de sílice modificada químicamente con hidrocarburos C_8 o C_{18} . La elección del tamaño de poro dependerá del tamaño de la molécula a analizar, por ejemplo, se usan poros grandes para péptidos generalmente > 30 aa's.

En esta técnica las muestras de péptidos son eluidas con un gradiente formado por agua y ACN, en que un agente ionizante se agrega a los solventes para mejorar la resolución y selectividad, tales como TFA, acetato de amonio, fosfato de trietilamonio, etc., en una concentración de 50 a 100 mM y en un intervalo de pH 4–7. En el caso de péptidos nuevos es importante comenzar con un gradiente exploratorio que vaya de un 5% de ACN y suba hasta 90 % por un periodo de 20–40 min, dependiendo del tamaño de partícula de la sílice, la longitud y diámetro de la columna, monitoreando el proceso a una $\lambda = 210\text{--}230$ nm.

II.1.7.2 Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas (CL-EM)

La CL-EM es una herramienta extremadamente poderosa para el análisis de péptidos puesto que permite analizar los péptidos disueltos y obtener información de su pureza y estructura, a través de la medición de la relación m/z , la cual está correlacionada con el peso

molecular del compuesto. Mediante la comparación de los patrones isotópicos experimentales contra los patrones teóricos es posible determinar la pureza del péptido. En este sentido, es importante mencionar que la distribución de los patrones isotópicos dependerá de los elementos presentes en la molécula, considerando que sólo 21 elementos tienen un sólo isótopo estable y todos los demás tienen al menos 2, los cuales varían dependiendo del elemento (ver APÉNDICE B). Además, es importante recordar que la diferencia de la relación m/z entre los isótopos es de 1.0 para carga simple, 0.5 para dobles cargas, 0.3 cargas triples, y así sucesivamente.

II.2 Metodología Experimental

A continuación se describe detalladamente la metodología experimental optimizada para la SPFS de las 8 secuencias peptídicas propuestas en este trabajo, seguida de la descripción del proceso de ciclado para obtener los PCs, cuya evolución fue monitoreada por CLAR. Los PCs fueron purificados y posteriormente analizados por CL-EM para verificar la presencia y la masa de los compuestos.

II.2.1 Productos Químicos y Reactivos

Los aminoácidos usados como reactivos para el acoplamiento por la SPFS de los 8 péptidos de este trabajo fueron: Fmoc-D-Ala-OH (pureza $\geq 99.00\%$, P.M. = $311.33 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), Fmoc-Asp(OtBu)-OH ($\geq 99.00\%$, P.M. = $411.50 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), Fmoc-Asn(Trt)-OH ($\geq 99.00\%$, P.M. = $596.70 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) y Fmoc-His(Trt)-OH ($\geq 99.00\%$, P.M. = $619.72 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) de AnaSpec (USA); y Fmoc-Trp(Boc)-OH novabiochem ($\geq 99.70\%$, P.M. = $526.58 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) obtenido de Merck Millipore (Alemania), cuyas estructuras químicas se ilustran en la Figura II. 12. Las resinas poliméricas empleadas para el monitoreo de desprotección del grupo Fmoc-NH-R y para la síntesis fueron: Rink Amide MBHA novabiochem (100-200 mesh, $0.70 \text{ mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) comprada de Merck Millipore (Alemania) y la 2ClTrt-Cl (200-400 mesh, $1.55 \text{ mmol Cl}\cdot\text{g}^{-1}$) obtenida de AnaSpec (USA), en ese orden. Las estructuras de estas resinas se muestran en la Figura II. 13.

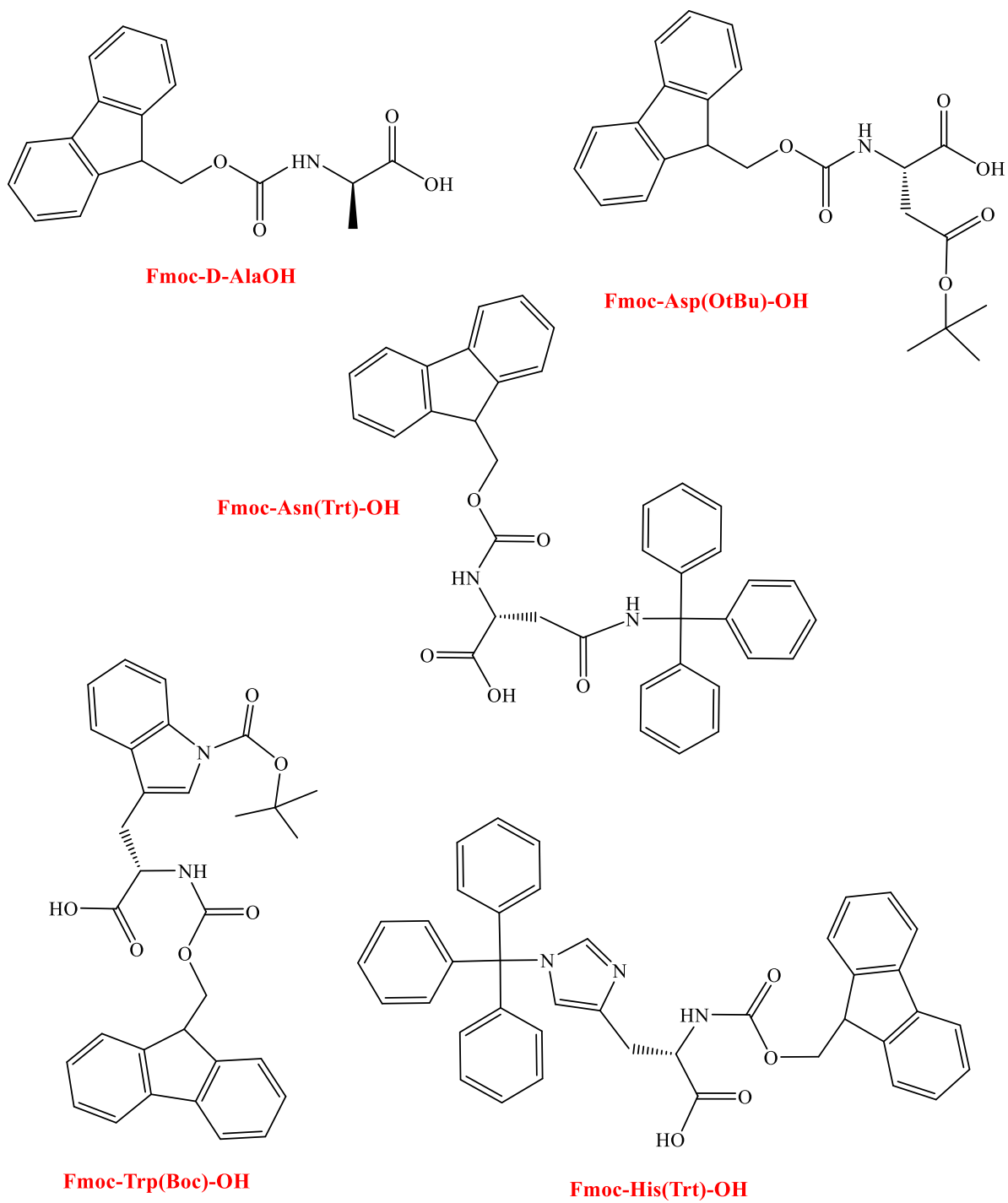


Figura II. 12. Estructuras químicas de los diferentes aminoácidos protegidos utilizados en esta SPFS.

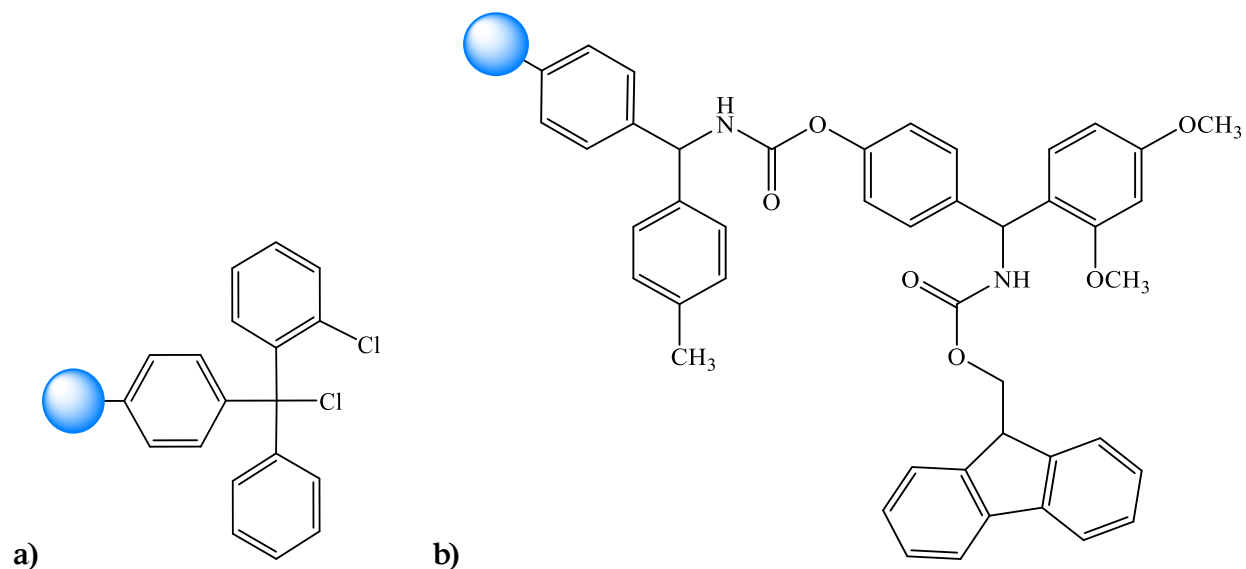


Figura II. 13. Estructura química de las resinas poliméricas: a) 2CITrt-Cl y b) Rink amida MBHA.

Otros reactivos utilizados para la síntesis fueron: la *N,N*-diisopropiletilmina (DIPEA $\geq 99.50\%$, P. M. $129.25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, $\rho = 0.742 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$, ver Figura II. 14a), Pip ($\geq 99.00\%$, $P_{\text{eb}} = 104\text{--}106 \text{ }^\circ\text{C}$), *N,N*-dimetilacetamida (DMA $\geq 99.00\%$) e indicador azul de bromofenol en polvo, todos provistos por Sigma-Aldrich (USA); HBTU ($\geq 98.00\%$, P.M. = $379.30 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) adquirido de Merck Millipore (Alemania); TFA (100.00%) conseguido de J.T. Baker (USA); HOBt ($\geq 97.00\%$, P.M. = $135.13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$), 2,2,2-trifluoroetanol ReagentPlus (TFE $\geq 99.00\%$), solución del anhídrido propanofosfónico en $\geq 50 \text{ wt.}\%$ de acetato de etilo (T3P/50% AcOEt, ver Figura II. 14b), triisopropilsilano (TIPS $\geq 99.00\%$, ver Figura II. 14c) y la 4-(dimetilamino)piridina (DMAP $\geq 99.00\%$, ver Figura II. 14d) fueron obtenidos de Aldrich Chemical Company (USA); el AcOH glacial ($\geq 99.70\%$) fue comprado en J. T. Baker (México) y la dimetilformamida (DMF $\geq 99.80\%$) fue provista por J. T. Baker (Arabia Saudita).

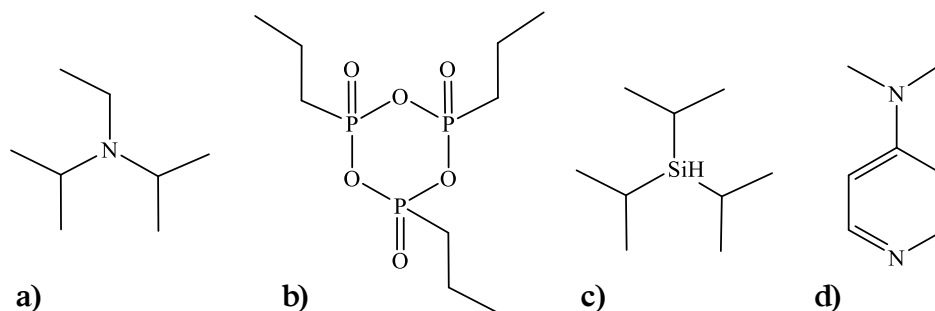


Figura II. 14. a) *N, N*-diisopropiletilamina (DIPEA), b) ácido propanofosfórico anhídrido (T3P), c) triisopropilsilano (TIPS), y d) 4-(dimetilamino)piridina (DMAP).

Por otro lado, se utilizaron también reactivos de secado como: hidruro de calcio anhídrido ($\text{CaH}_2 \geq 95\%$) e hidróxido de potasio en hojuelas ($\text{KOH} \geq 90\%$) obtenidos de Fluka (USA) y Sigma-Aldrich (USA), respectivamente; sulfato de sodio anhídrido ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \geq 99.0\%$) comprado de Karal (México). Algunos solventes tales como: dietil éter anhídrido ($\geq 99.0\%$) conseguido de Sigma-Aldrich (USA), ACN ($\geq 99.90\%$) obtenido de Fisher Scientific (USA); DCM grado HPLC/Spectro ($\geq 99.90\%$, $P_{\text{eb}} = 40\text{ }^\circ\text{C}$), n-hexanos grado HPLC/Spectro ($\geq 95.00\%$, $P_{\text{eb}} = 69\text{ }^\circ\text{C}$) y MeOH anhídrido ($\geq 95.00\%$, 10-50 ppm H_2O) fueron provistos por Tedia (USA); y Agua MilliQ desionizada (18.0 M Ω .cm) obtenida fresca de un sistema de flujo B-Pure Barnstead y un Water Pro plus Labconco (# Serie 070570564 F, USA).

II.2.2 Materiales y Equipos

II.2.2.1 Sistema de Destilación

Se usó un sistema de destilación con el material (matraz de bola, refrigerante, colector de destilación y uniones) completamente seco (estufa a $100\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h) y bajo atmósfera de N_2 (g) como el que se muestra en la Figura II. 15, para secar la Pip. El mismo montaje se utilizó para secar el DCM.



Figura II. 15. Sistema de destilación para Pip y DCM. La cobertura de aluminio permite homogeneizar el calentamiento.

II.2.2.2 Sistema de Agitación y Filtrado

Se utilizó un Vórtex mixer de Fischer Scientific (USA) provisto con 10 velocidades y equipado con un plato para agitación de viales de 20 mL, ideal para colocar el reactor de síntesis que contiene la resina, los reactivos de anclaje y los solventes de lavado, pudiendo agitar mecánicamente los componentes durante todo el proceso. Dicho sistema se ilustra en la Figura II. 16a.

Para hacer los lavados y filtrados se utilizó una bomba de vacío DryFast Vacuum Pump de Welch Rietschle Thomas (115 V, 146 bar, USA) acoplada a un sistema como el que se muestra en la Figura II. 16b.

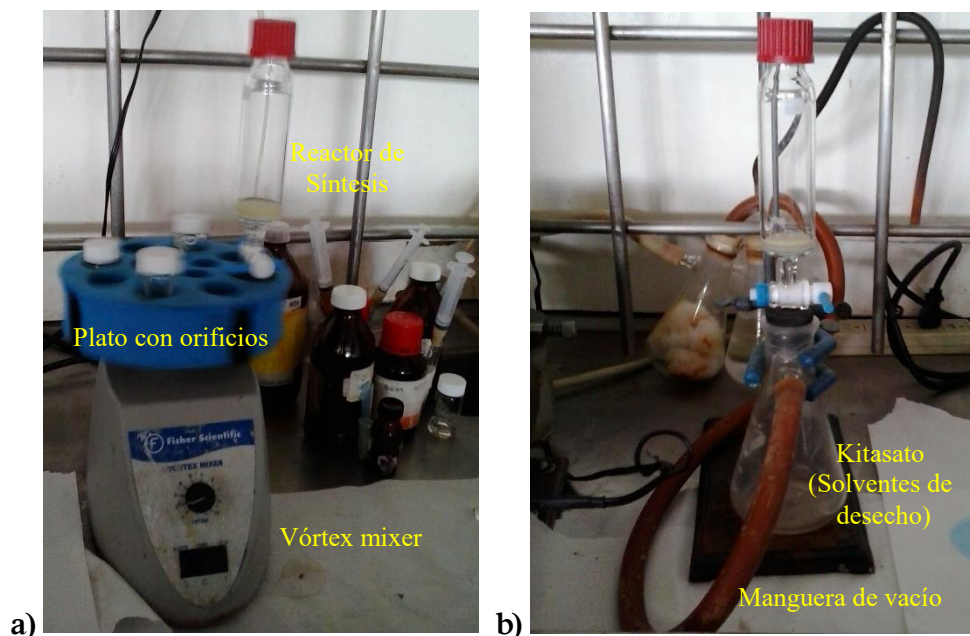


Figura II. 16. a) Vórtex mixer para agitar el reactor de síntesis, y b) Sistema de filtración (lavados de reacción) conectado a la bomba de vacío.

II.2.2.3 Microscopio Óptico

Para visualizar las perlas de la resina en el proceso de acoplamiento y remoción del grupo Fmoc se utilizó un microscopio estereoscópico Greenough Leica S8 APO con zoom apocromático 8:1 y distancia de trabajo 7.5 cm, con aumentos de hasta 80 x y ángulo de visión de 38 °.

II.2.2.4 Sistemas de Evaporación

Se usaron dos equipamientos diferentes de evaporación. El primero consta de un sistema de evaporación con rotavapor como el que se muestra en la Figura II. 17a para evaporar los solventes provenientes de la mezcla de liberación del PL (AcOH:TFE:DCM y n-hexanos). Mientras que, el segundo sistema de evaporación permitió obtener los PCs desprotegidos libres de TFA, en que se usó una trampa provista de una solución altamente concentrada de NaOH y se trabajó bajo el flujo de N₂ (g) en un montaje como el que se muestra en la Figura II. 17b.

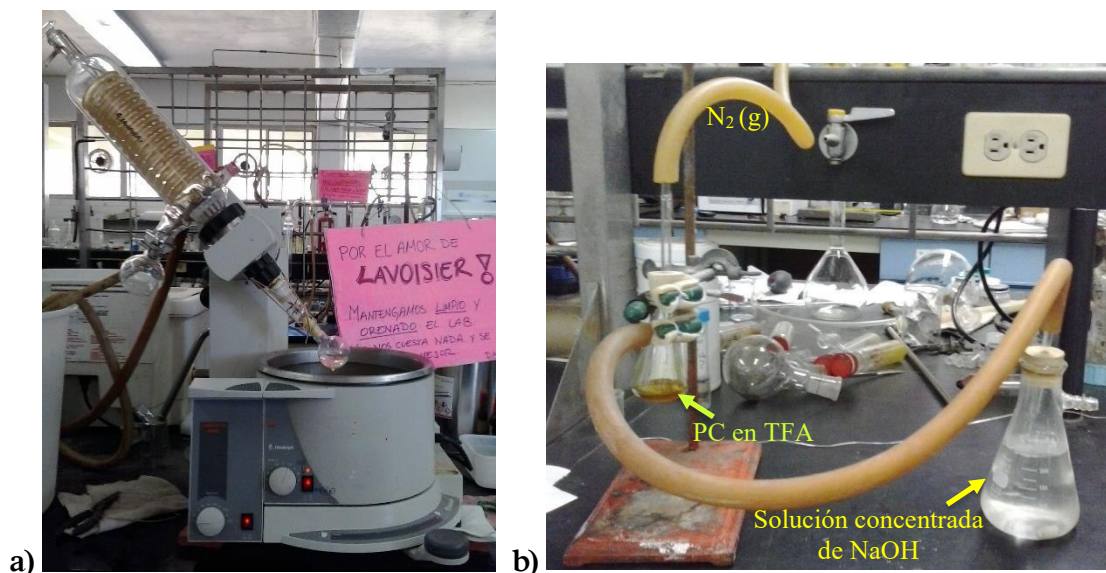


Figura II. 17. a) Rotavapor, y b) Sistema de evaporación de TFA con trampa de NaOH concentrado y burbujeo con N_2 (g).

II.2.2.5 Instrumentación de CLAR

La cuantificación del proceso de remoción del grupo Fmoc, el monitoreo de ciclización de los PLs sintetizados y su posterior purificación fue realizada por la técnica de CLAR que consta de un equipo Agilent Technologies 1200 Series de Hewlett-Packard provisto de un Desgasificador G1322A (Serial # JP62357447), una Bomba Cuaternaria G1311A (Serial # DE62959695) y un Detector G1314B (Serial # DE63058222) con una lámpara de Deuterio (190-600 nm). El equipo de CLAR utiliza como software de análisis de datos el Agilent ChemStation B.03.01.

Para la cuantificación del grupo Fmoc se utilizó una columna analítica Agilent–Eclipse XDB – C18, 5 μ m, 4.6 x 150 mm, con # lote B07005 (USA) y tamaño de poro 80 Å. Mientras que para análisis cualitativo del proceso de ciclado se utilizó una columna Phenomenex–Jupiter C18, 5 μ m, 4.60 x 250 mm, con # *batch* 5243-18 (USA) y tamaño de poro 300 Å. Finalmente, para el proceso de purificación se empleó una columna semi-preparativa Jupiter C18, 10 μ m, 10.0 x 250 mm, con # *batch* 5245-13 (USA) y tamaño de poro 320 \pm 40 Å. Utilizando en todos los estudios cromatográficos una pre-columna Gemini C18, 4 x 3 mm (ASQ-4287).

II.2.2.6 Sistema de CL-EM

Para corroborar las masas de las fracciones recolectadas del proceso de purificación de los PCs se utilizó un sistema CL-EM Bruker Daltonik GmbH equipado con un método de IES y un analizador de tiempo de vuelo (TOF), utilizando el software DataAnalysis versión 4.1 (Bruker Daltonics Inc. and Affiliates) para procesar y analizar los datos.

II.2.2.7 Liofilizadora

Las fracciones obtenidas del proceso de purificación por CLAR fueron recolectadas y liofilizadas para obtener los PCs en forma de polvos secos utilizando una liofilizadora Labconco Free Zone 2.5 Plus (# Serie 040823971 D) equipada con una bomba de vacío híbrida (MTR mod. T55JXCFH-1280, ½ H.P., vacío óptimo 0.006 mbar).

II.2.3 Proceso de la SPFS-Fmoc de las 8 Secuencias Peptídicas

A continuación se describen los protocolos experimentales por los cuales se obtuvieron los 8 PCs con 8, 10 y 12 aa D, L alternados. Con la finalidad de agilizar esta parte del manuscrito se emplean diagramas de flujo para la descripción de los procesos de SPFS, liberación de la resina, ciclización de los PLs, etc.

En este punto es importante mencionar que para familiarizarse con la técnica de síntesis y optimizar, tanto la obtención, como el proceso de ciclado de los péptidos nuevos se efectuó la síntesis de dos PCs descritos en la literatura y ampliamente estudiados por el grupo de Ghadiri et al. [59, 92, 106], quienes han trabajado con el ciclo[-(-Gln-DAla-Glu-DAla)₂-] (denotado como PC8aaRef) y ciclo[-(-Gln-DAla-Glu-DAla)₃-] (denotado como PC12aaRef). De los cuales sólo se muestra los rendimientos totales obtenidos al final de este capítulo.

II.2.3.1 Síntesis

24 horas antes del acoplamiento del primer aminoácido a la resina se secó la Pip con el sistema de destilación descrito en la sección II.2.2.1 Sistema de Destilación. Se colocaron 200 mL de Pip (color amarillo ámbar) en un matraz de bola (250 mL) adicionando ~ 5 g de KOH como agente desecante. Se calentó el sistema hasta llegar al punto de ebullición del compuesto, entonces se sometió a reflujo bajo atmósfera de N₂ (g), continuando con la agitación magnética. Se retuvo el destilado 2 veces en el colector y la tercera vez se transfirió la Pip (color transparente) en un recipiente ámbar, sellándolo con un tapón de goma hermético. Con este destilado se preparó una mezcla Pip/DMF, 20/80 (v/v), almacenándola en un frasco ámbar (solución de remoción del grupo Fmoc).

El día del inicio de la SPFS se secó DCM con el mismo sistema de destilación usado para la Pip. Se colocaron 100 mL del solvente con ~1.5 g de CaH₂ como agente desecante, bajo atmósfera de N₂ (g) y agitación magnética. Una vez alcanzado el punto de ebullición del DCM se procedió al reflujo. El destilado se retuvo en el colector 2 veces y la tercera vez se transfirió a un frasco ámbar con tapa de baquelita. Entonces, se preparó una solución de capado con 4 mL de DCM seco y 720 µL de DIPEA.

El primer acoplamiento de la SPFS se efectuó con la estrategia Fmoc utilizando 0.5 mmol de resina 2CITrt-Cl, la cual se hinchó con DCM seco (30 min) para remover todas las burbujas de aire, formando una suspensión del material polimérico. Luego se aplicó vacío para remover el solvente. Se agregó a la resina el primer aa activado en solución (se agitó por 5 min la mezcla: 3.5 eq. del primer aa + 2.8 eq. DIPEA+ 1 mL DCM) agitando por 2 h. Después se filtró el solvente, se lavó con 3 mL de DCM seco x 5 veces y se secó la resina dejando el vacío por 10 min. La resina se volvió a hinchar, pero ahora con 4 mL de MeOH anhidro agitando por 20 min, se filtró el solvente y se agregó 3–4 mL de la mezcla de capado agitando por 30 min, entonces se filtró el solvente, se lavó con 2 mL de DMF x 10 veces seguido de 2 mL de DCM x 5 veces y se secó al vacío por 10 min. En este punto se hizo la cuantificación del Fmoc, tomando una muestra de 1-3 mg de resina-1er aa-Fmoc y 1-3 mg de la resina control (Rink amida MBHA). Cada resina se colocó en un frasco (previamente pesado) y se agregó 1 mL de la solución de remoción de

Fmoc. Las soluciones se dejaron en agitación por 24 h. Posteriormente se hicieron diluciones con una mezcla 50/50 (v/v) de ACN/H₂O_{MQ} (0.08 %/0.1 % de TFA) para obtener 100-200 µL de cada resina a una misma concentración (orden de 10⁻⁴ mM). Las resinas se analizaron por CLAR utilizando la columna analítica Agilent–Eclipse descrita anteriormente en la sección II.2.2.4 Instrumentación de la CLAR, utilizando un método isocrático con una mezcla de solventes 62%/38% de H₂O_{MQ}/ACN (0.1 %/0.08 % de TFA) a un flujo de 1 mL·min⁻¹ y a una presión de 110-111 bar, durante 6 min. Todo este protocolo y los pasos para los acoplamientos posteriores, a partir del 2do hasta el 8vo, 10mo ó 12vo aminoácido se describen de manera práctica y clara en el Esquema II. 2.

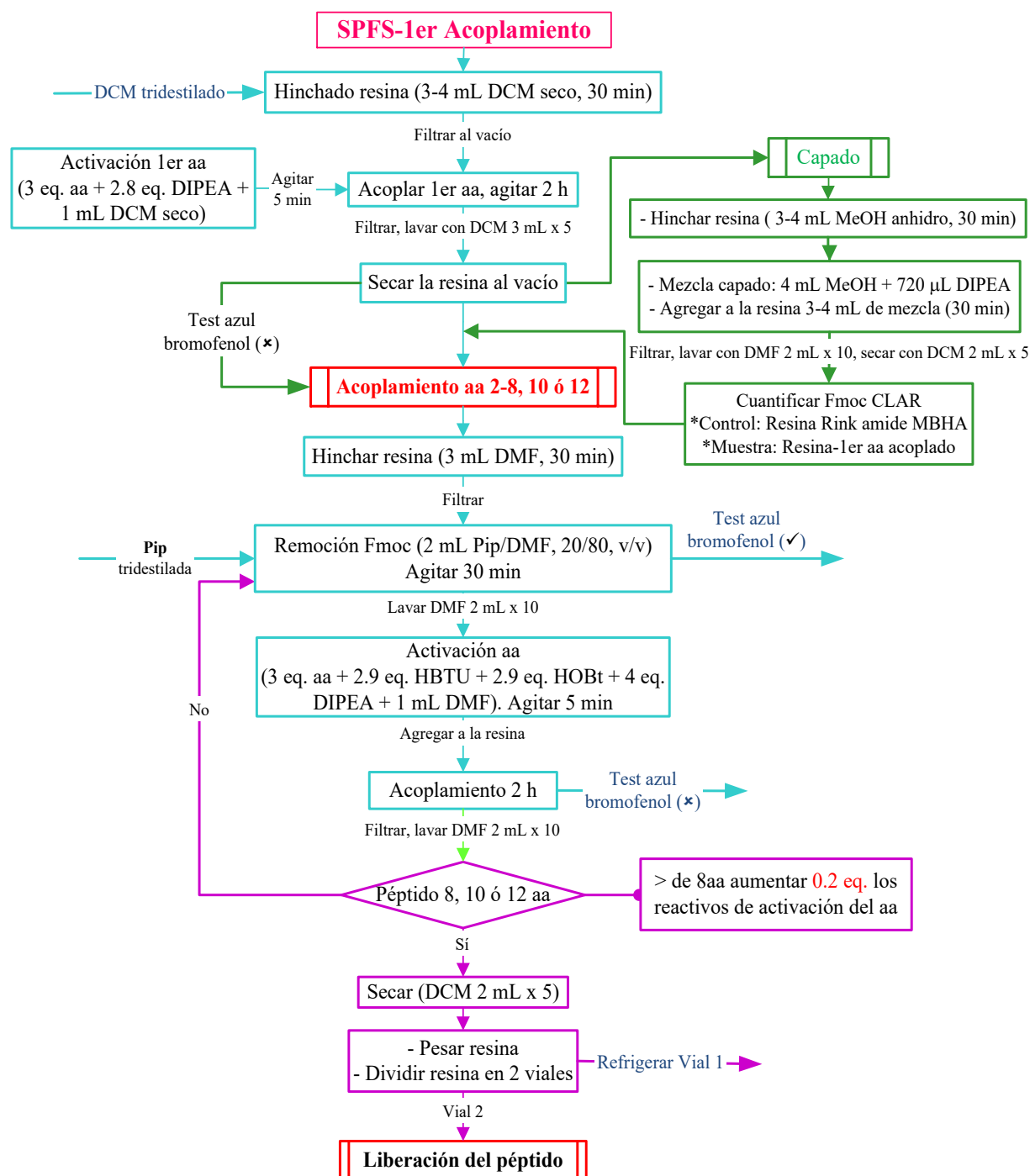
En el proceso de acoplamiento-remoción del Fmoc se usó el Test de azul de bromofenol, cuya solución se preparó con 1 mg de azul de bromofenol disuelto en 1 mL de DMA, almacenando la solución (amarilla) en un frasco ámbar con tapa de baquelita.

Al final del proceso de síntesis, la resina se secó aplicando vacío por 10 min después de lavar con DCM. La resina-péptido-Fmoc se pesó junto con el reactor (el cual se pesa previamente vacío y seco) y se divide para el posterior tratamiento y/o almacenamiento.

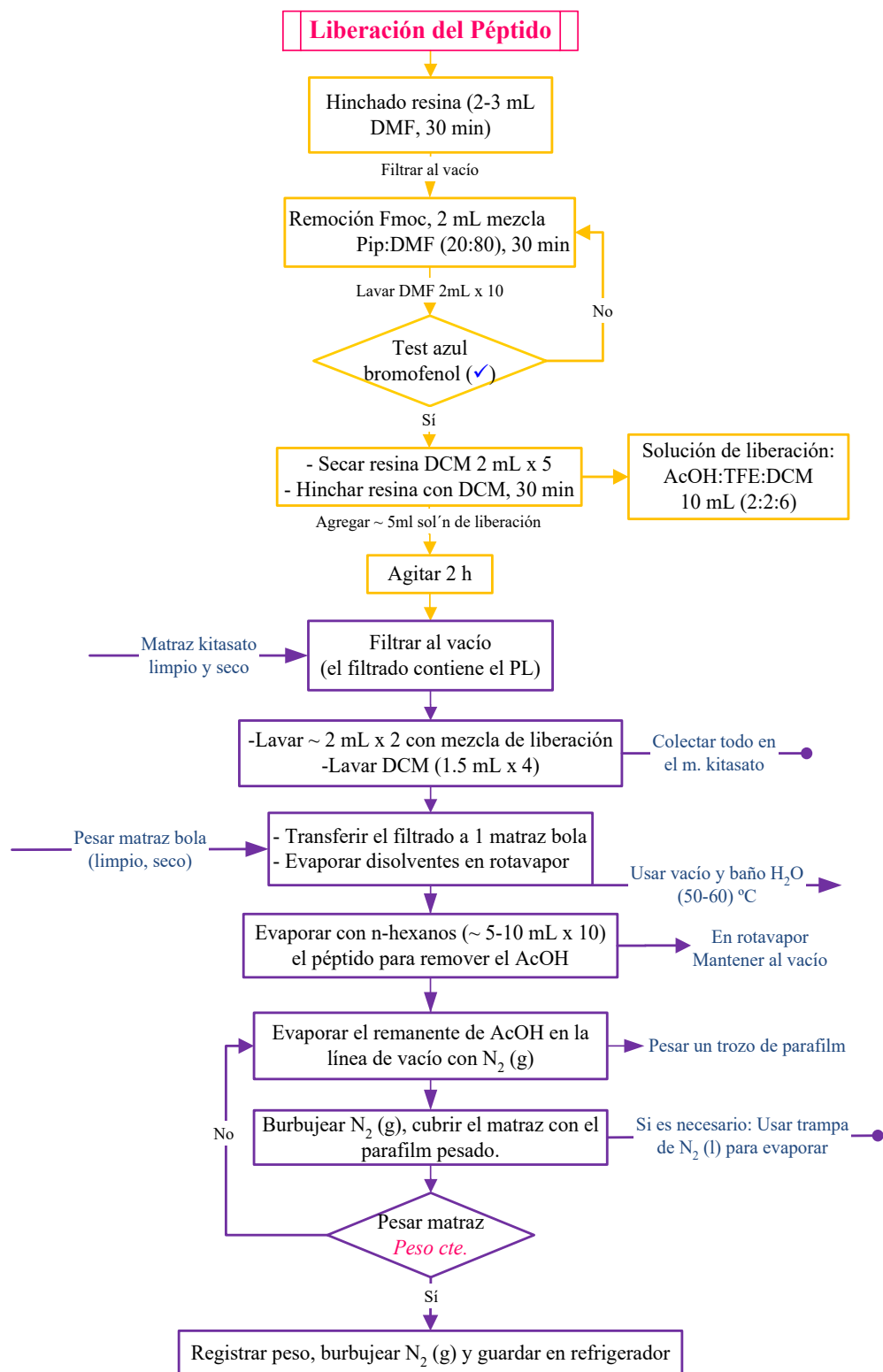
II.2.3.2 Liberación

El péptido es separado de la resina de acuerdo al protocolo descrito en el Esquema II. 3. El PL obtenido en este proceso se encuentra aún protegido en las cadenas laterales con los GPs, pero tiene los grupos –COOH y –NH₂ terminales libres y listos para realizar el siguiente procedimiento. De aquí la importancia de mantener el matraz contenedor del PL sellado con un tapón de hule para mantener la atmósfera inerte dentro del recipiente.

En el APÉNDICE C se muestra el mecanismo de reacción propuesto para el proceso de desanclaje de los PLs protegidos de la resina 2CITrt-Cl.



Esquema II. 2. Diagrama de flujo de la SPFS en la resina 2CITrt-Cl de las 8 secuencias peptídicas de este proyecto.



Esquema II. 3. Diagrama de flujo del protocolo de liberación del PL protegido en las –R y con los grupos – COOH y –NH₂ terminales libres.

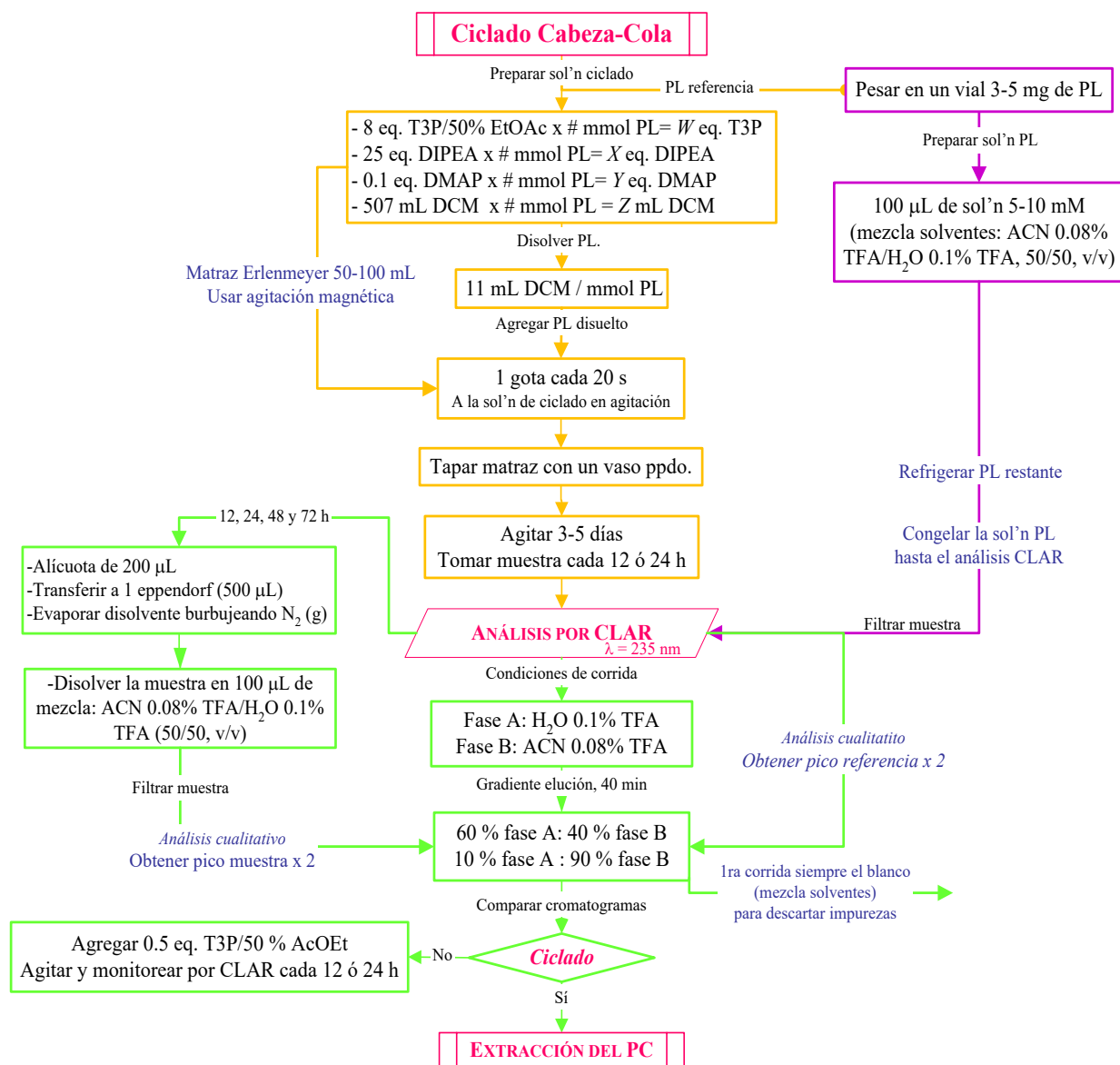
II.2.3.3 Ciclización Cabeza-Cola

El siguiente paso es la ciclización cabeza-cola, cuyos reactivos clave para lograr monociclos intramoleculares son la mezcla de T3P/50% AcOEt + DIPEA + DMAP, a la cual se agrega el PL disuelto en DCM, dicha adición se hizo a una velocidad moderada y en condiciones de alta dilución. El protocolo experimental de la ciclización se detalla paso a paso en el diagrama de flujo mostrado en el Esquema II. 4. Mientras que, en el APÉNDICE C se ilustra el mecanismo de reacción propuesto para el proceso de macrociclización de los PLs protegidos, con los grupos carboxilo y amino terminales libres con los reactivos antes mencionados.

El proceso de ciclado se monitoreó por CLAR cada 12 ó 24 h durante 3 a 5 días, comparando en cada caso el producto de ciclado con la referencia (el PL). El análisis cualitativo se efectuó con la columna Phenomenex–Jupiter descrita anteriormente (sección II.2.2.4 Instrumentación de la CLAR), utilizando un flujo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, detección UV-VIS a una $\lambda = 235 \text{ nm}$, bajo la modalidad de gradiente de elución 60/90 a 10/90 (v/v) de las fases A/B descritas en el diagrama de flujo (Esquema II. 4), por 30 min, seguido de una meseta hasta completar 40 ó 50 min, dependiendo del péptido analizado. En cada análisis las muestra fueron filtradas usando un filtro no-estéril de *PVDF* (por sus siglas en inglés, fluoruro de polivinildeno, con tamaño de poro = $0.45 \mu\text{m}$) de Whatman.

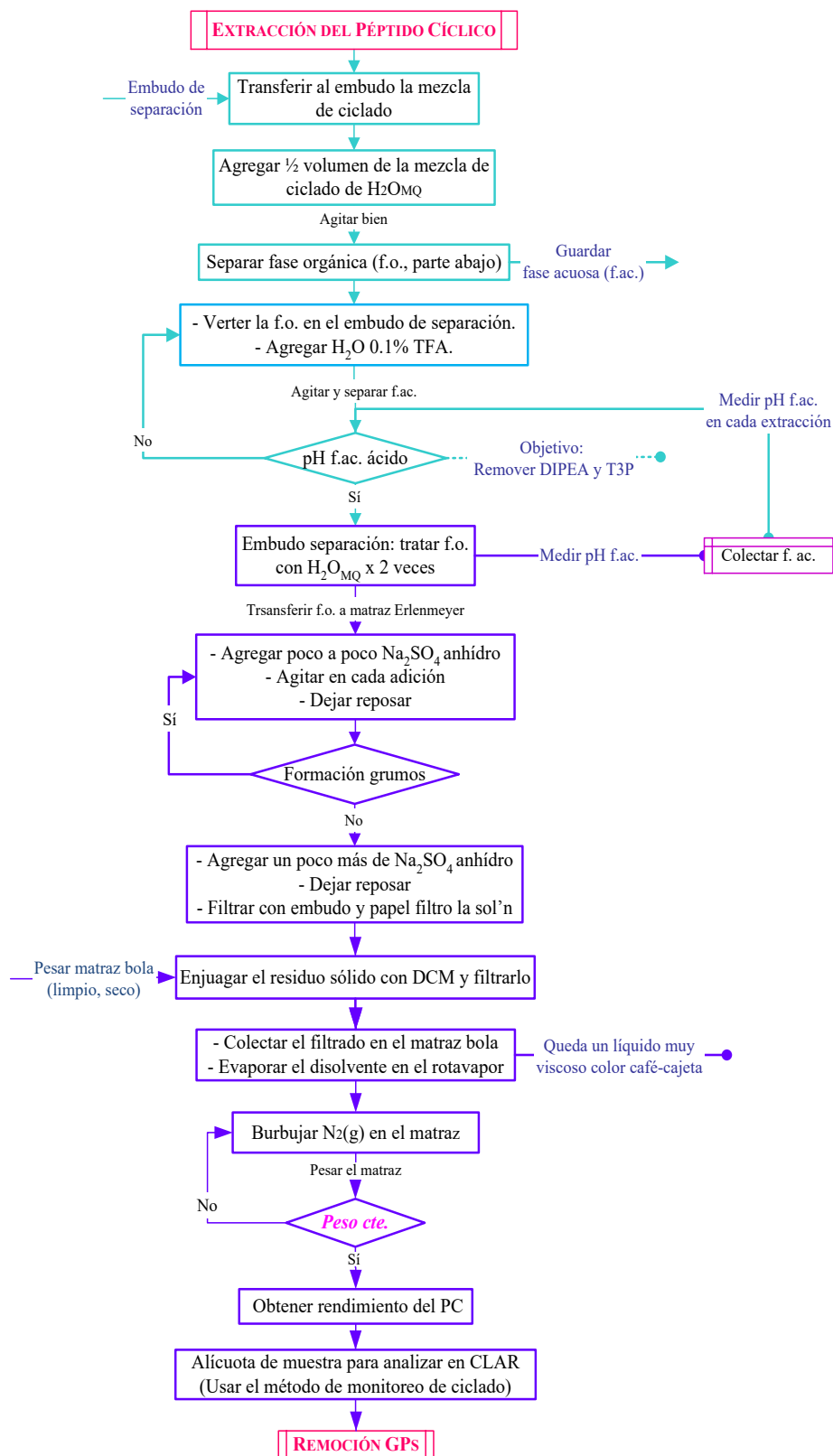
II.2.3.4 Extracción Líquido-Líquido del PC

El producto ciclado protegido en las cadenas laterales con los GPs se extrajo utilizando la técnica líquido-líquido detallada en el Esquema II. 5. La apariencia física del producto evaporado en este proceso es viscosa o plasticosa. El objetivo principal de este tratamiento es la eliminación de los compuestos básicos (DIPEA y DMAP) mediante la acidificación (pH 2.0), obteniendo sales solubles en agua y a su vez eliminar en la parte acuosa, el producto ácido del T3P generado en el proceso de ciclado cabeza-cola.



Esquema II. 4. Diagrama de flujo del protocolo de ciclización Cabeza-Cola en condiciones de alta dilución y monitoreo del proceso por CLAR.

CAPÍTULO II. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS CÍCLICOS

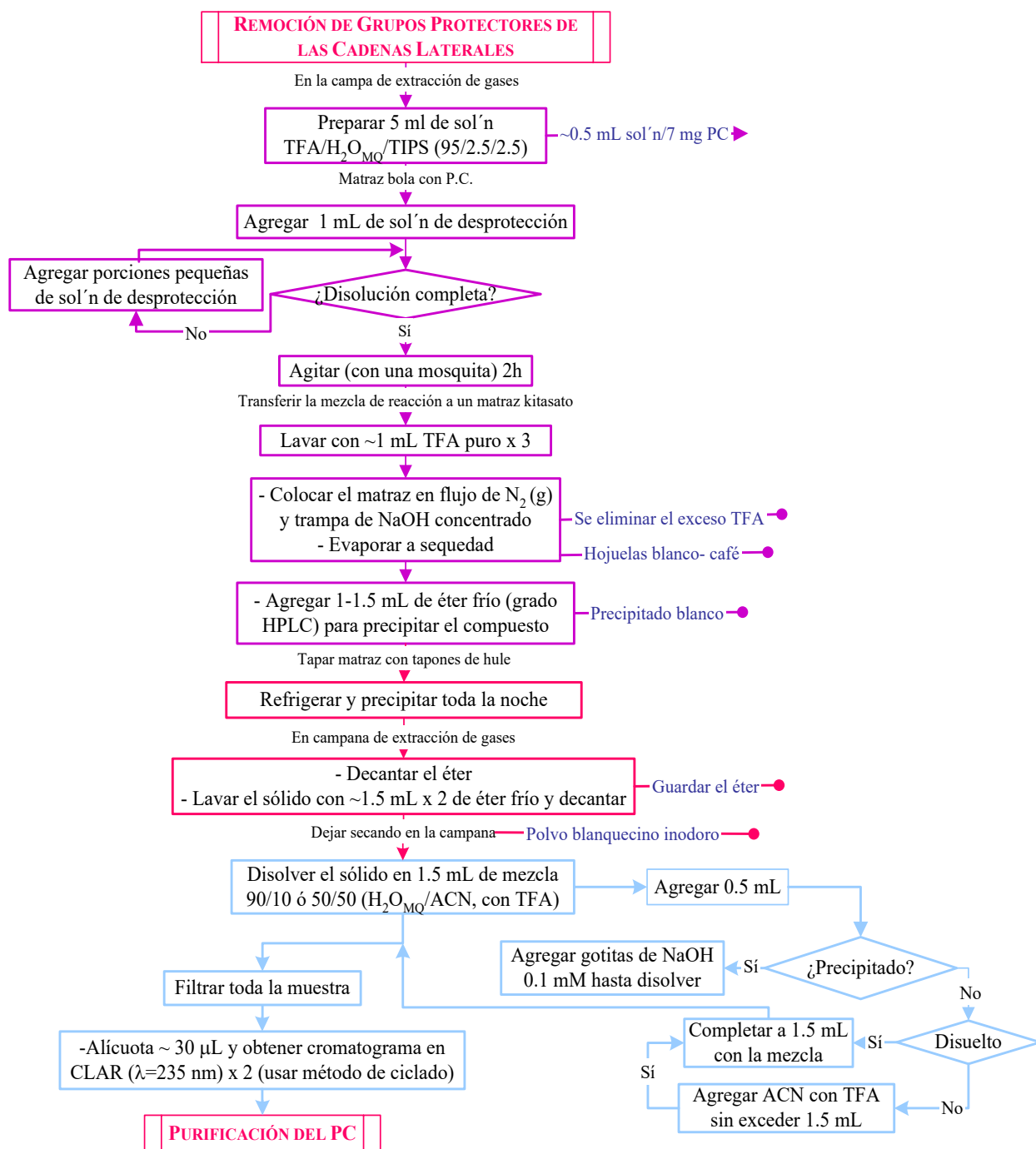


Esquema II. 5. Diagrama de flujo del proceso de extracción del PC protegido en las cadenas laterales.

II.2.3.5 Desprotección de las Cadenas Laterales

A continuación, se remueven los grupos protectores de las cadenas laterales del PC en medio ácido, siguiendo los pasos descritos en el Esquema II. 6. Los solventes del proceso de desprotección se evaporaron con flujo de N_2 (g) utilizando una trampa de NaOH concentrado en un sistema como el descrito en la sección II.2.2.3 sobre Sistemas de Evaporación. El producto obtenido fue precipitado adicionando éter frío, dejando reposar 24 h y observando una especie de hojuelas que van de blanco a café claro. Después, el éter dietílico fue decantado, añadiendo dos veces más éter frío, decantando para eliminar el TFA y los residuos solubles. El producto obtenido se dejó secar en una campana de extracción de gases para terminar de evaporar las sustancias remanentes hasta obtener un polvo blanco.

En este punto, se separaron los PCs llevando a purificación por CLAR todos menos los PCs de 10 aa's que sólo fueron tratados con solvente, puesto que sus cromatogramas de análisis mostraron únicamente una señal. Además, se ha reportado previamente la purificación sólo por precipitación con solvente ^[177]. Los PCs 10aaSer2 y 10aaSer3 fueron almacenados en refrigeración en frascos con tapón de hule y atmósfera de N_2 (g) después del proceso de decantación y evaporación del éter. El resto de los PCs fueron disueltos en una mezcla 90/10 ó 50/50 (v/v) de H_2O_{MQ}/ACN con TFA (0.1 % y 0.08%, respectivamente), dependiendo del PC y a continuación filtrados con filtros Whatman no-estériles de *PVDF* (tamaño de poro = 0.45 μm) para su posterior purificación. Para ello, se efectuó un análisis cromatográfico previo utilizando las mismas condiciones de análisis del proceso de ciclado.



Esquema II. 6. Diagrama de flujo del proceso de desprotección de las cadenas laterales del PC.

II.2.4 Purificación de los PCs

Los PCs disueltos y filtrados fueron purificados por CLAR en la columna semi-preparativa Jupiter como la descrita en la sección II.2.2.4 de la Instrumentación de CLAR. Utilizando detección UV-Vis a una $\lambda = 235$ nm y un flujo de $4.71 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en un método de gradiente 60/40 a 10/90 ($\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$, 0.1 % TFA/ACN 0.08 % TFA) por 30 min, manteniendo una meseta hasta alcanzar 40 min. Las diferentes fracciones observadas en CLAR se colectaron en tubos Corning (previamente pesados y marcados), se congelaron a -70 °C para su conservación y posterior liofilización, utilizando un sistema como el descrito anteriormente en la sección II.2.2.6 sobre la Liofilizadora.

II.2.5 Determinación de la Masa de los PCs por CL-EM

Los 8 PCs con aminoácidos D, L- α alternados obtenidos fueron analizados por la técnica CL-EM descrita en la sección II.2.2.5 del Sistema de CL-EM, confirmando la composición y masa de los compuestos. Las condiciones de análisis fueron realizadas en modo de polaridad positiva, calibrando el sistema con formiato de sodio, usando como eluyente ACN con 0.08 % de HCOOH, un flujo de inyección de $50 \text{ nL}\cdot\text{min}^{-1}$ y recolectando los datos de las corridas experimentales en un intervalo de m/z de 200–2800.

II.3 Resultados y Discusión

En las siguientes páginas se describen los resultados obtenidos de la síntesis y las primeras caracterizaciones de los 8 péptidos cíclicos de este trabajo.

II.3.1 Carga de la Resina 2CITrt-Cl y Acoplamiento

La determinación de la carga real de la resina 2CITrt-Cl se hizo por CLAR, utilizando una pre-columna Gemini C18 unida a una columna analítica Agilent–Eclipse XDB – C18, $5 \mu\text{m}$, 4.6×150 mm, con tamaño de poro 80 \AA . Calculando la remoción del grupo Fmoc para conocer la

cantidad de sitios activos reaccionantes resina-1er aa. El cálculo se realizó como se muestra a continuación:

Resina Control (Rink amida MBHA)

Se disolvió 1.2 mg de resina control (RC) en 1 mL de mezcla de remoción de Fmoc obteniendo $8.4 \times 10^{-4} \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Fmoc removidos.

$$0.7 \text{ mmol Fmoc} - 1 \text{ g de RC}$$

$$X - 0.0012 \text{ g de RC}$$

$$\text{Donde } X = 8.4 \times 10^{-4} \text{ mmol de Fmoc, así } [\text{RC}] = 8.4 \times 10^{-4} \text{ mmol de Fmoc} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Se tomaron 100 μL de solución concentrada de RC y se diluyeron con 100 μL de solución 50/50 (v/v) de $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$ 0.1 % TFA/ACN 0.08 % TFA, obteniendo una $[\text{RC}] = 4.2 \times 10^{-4} \text{ mmol de Fmoc} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Resina 2ClTrt-Cl con el 1er aa acoplado (2ClTrt-Cl-1aa)

Se pesaron 1.1 mg de resina 2ClTrt-Cl-1aa y se trataron con 1 mL de mezcla de remoción de Fmoc obteniendo un resultado teórico de $1.705 \times 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Fmoc removidos.

$$1.55 \text{ mmol Cl} - 1 \text{ g de resina 2ClTrt-Cl}$$

$$X - 0.0011 \text{ g de resina 2ClTrt-Cl-1aa}$$

$$\text{Donde } X = 1.705 \times 10^{-3} \text{ mmol de Fmoc, por tanto } [2\text{ClTrt-Cl-1aa}] = 1.705 \times 10^{-3} \text{ mmol de Fmoc} \cdot \text{mL}^{-1}$$

Se tomaron 100 μL de solución concentrada de 2ClTrt-Cl-1aa y se diluyeron con 100 μL de solución $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$ 0.1 % TFA/ACN 0.08 % TFA, 50/50 (v/v) para determinar por CLAR la carga experimental neta de la resina de síntesis.

Con las soluciones diluidas se realizaron tres análisis por CLAR de cada resina (RC y 2CITrt-Cl-1aa), obteniendo un promedio de las mediciones de altura y área para determinar la cantidad de mmol de sitios activos de la resina 2CITrt-Cl como sigue:

Resultados de altura

$$4.2 \times 10^{-4} \text{ mmol de Fmoc} \cdot \text{mL}^{-1} - \text{altura promedio RC: } 194.0256$$

$$Y - \text{altura promedio 2CITrt-Cl: } 347.4$$

$$\text{Donde } Y = 7.52 \times 10^{-4} \text{ mmol de Fmoc} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ en la resina 2CITrt-Cl-1er aa}$$

Resultados de área

$$4.2 \times 10^{-4} \text{ mmol de Fmoc} \cdot \text{mL}^{-1} - \text{área promedio RC: } 2913.044$$

$$Y' - \text{área promedio 2CITrt-Cl: } 6427.0$$

$$\text{Donde } Y' = 9.27 \times 10^{-4} \text{ mmol de Fmoc} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ en la resina 2CITrt-Cl-1er aa}$$

Tomando los resultados obtenidos de la altura y considerando que las muestras fueron diluidas 1:2, entonces se tiene $Y \times 2 = (7.52 \times 10^{-4}) (2) \text{ mmol de Fmoc} \cdot \text{mL}^{-1} = 1.504 \times 10^{-3} \text{ mmol de Fmoc} \cdot \text{mL}^{-1}$ en la resina 2CITrt-Cl-1er aa, que equivalen a $1.504 \times 10^{-3} \text{ mmol de Fmoc}$.

Para determinar la carga total de la resina 2CITrt-Cl-1aa se compara el resultado teórico de grupos Fmoc removidos contra la remoción experimental determinada por CLAR de la siguiente manera:

$$100 \% \text{ de carga} - 1.705 \times 10^{-3} \text{ mmol de Fmoc 2CITrt-Cl-1aa}$$

$$Z - 1.504 \times 10^{-3} \text{ mmol de Fmoc 2CITrt-Cl-1aa}$$

$$\text{Donde } Z = 88.21 \%$$

Considerando esto, se tiene que:

$$100 \% \text{ de carga} - 1.55 \text{ mmol de Cl} - 1 \text{ g de resina 2CITrt-Cl}$$

$$88.21 \% - Z' \text{ de mmol Fmoc} - 1 \text{ g de resina 2CITrt-Cl-1aa}$$

$$Z' = 1.3673 \text{ mmol de Fmoc} \cdot \text{g}^{-1} \text{ de resina 2CITrt-Cl-1aa}$$

O bien:

$$\text{Carga de la resina} = \frac{1.504 \times 10^{-3} \text{ mmol de Fmoc}}{0.0011 \text{ g resina-1aa}} = 1.3673 \text{ carga de Fmoc 2ClTrt-Cl-1aa}$$

Este método se utilizó para calcular en todas las síntesis efectuadas la carga real de la resina 2ClTrt-Cl-1aa, cuyos resultados se muestran en la Tabla II. 3.

Tabla II. 3. Carga experimental de la resina 2ClTrt-Cl-1aa.

Resina 2ClTrt-Cl-1aa	Carga de la Resina (mmol de Fmoc·g ⁻¹)
Síntesis 1	1.4093
Síntesis 2	1.3673
Síntesis 3	1.1661
Síntesis 4	1.1064
Síntesis 5	0.8015

La disminución de la carga de la resina es de esperarse, puesto que la resina va perdiendo con el paso del tiempo sitios activos (pierde los cloros activos) que le permiten anclar el primer aminoácido, principalmente debido a la humedad, a pesar de que se guarde en un desecador. Además, se debe considerar que en el primer acoplamiento no siempre se lleva a cabo el anclaje a un 100 %. Por estas razones, es de vital importancia hacer el cálculo de la carga experimental, ya que en función de ello se realizan los cálculos para los siguientes acoplamientos.

II.3.2 Acoplamiento y Remoción

La prueba cualitativa que se usó para hacer el seguimiento de la remoción del grupo Fmoc del amino y su posterior acoplamiento fue el Test de azul de bromofenol. Esta prueba dio positivo cuando el grupo amino se encontraba libre en el aminoácido acoplado a la resina y listo para otro acoplamiento, revelando perlas de coloración azul rey al microscopio como se muestra

en la Figura II. 18a. Mientras que, durante el acoplamiento de dos aminoácidos el Test dio negativo, mostrando perlas de color **amarillo-transparente** al microscopio óptico, como se presenta en la Figura II. 18b.

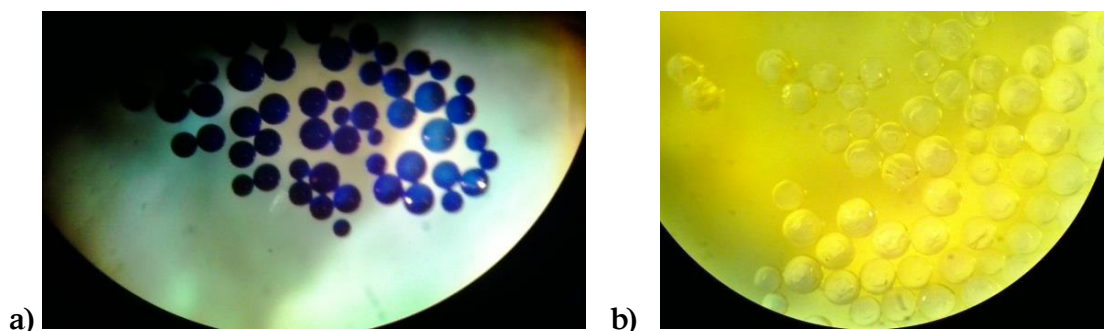


Figura II. 18. Perlas de la resina 2CITrt-Cl-aminoácido observadas al microscopio óptico: a) el aminoácido anclado y el $-NH_2$ libre, y b) acoplamiento exitoso de dos aminoácidos en la resina polimérica.

II.3.3 PC Protegido y PC Desprotegido

A continuación, se muestran las imágenes de la apariencia física de los PCs después de ciertos tratamientos. En la Figura II. 19a se muestra el PC protegido en las cadenas laterales, después del proceso antes descrito (extracción líquido-líquido y evaporación de solventes). Dicho péptido muestra una apariencia viscosa que se va secando hasta obtener una especie de plastiquito café pegado al matraz de bola.

En la Figura II. 19b se muestra el PC después del tratamiento con TFA para la desprotección de los grupos de las cadenas laterales, obteniendo posterior a la decantación con dietil éter anhidro, precipitación y secado un polvo blanco-crema.

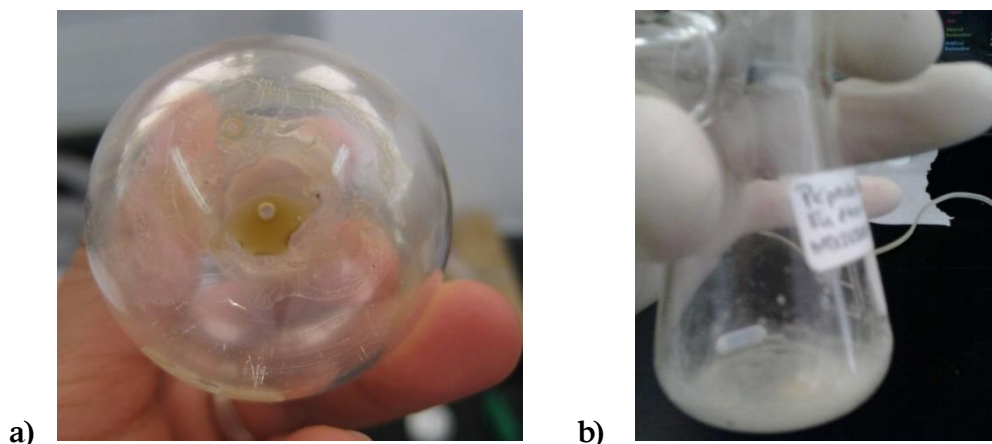


Figura II. 19. Imágenes de: a) PC protegido después del proceso de extracción líquido-líquido, y b) PC desprotegido después del proceso de decantación y precipitación.

II.3.4 Análisis por CLAR de los PLs Protegidos y PCs Protegidos

En esta sección se muestran algunos cromatogramas de los compuestos, en que se compara el PC protegido contra el PL protegido (referencia o control). Estos cromatogramas fueron adquiridos en diferentes etapas del monitoreo de ciclización de los péptidos sintetizados, utilizando una pre-columna Gemini C18 unida a una columna Phenomenex–Jupiter C18, 5 μm , 4.60 x 250 mm y tamaño de poro 300 Å.

En la Figura II. 20 se muestran los cromatogramas de análisis del proceso de ciclado del péptido 12aaSer1 después de 72 h de reacción. El pico correspondiente al PL tiene un tiempo de elución de 33.75 min, mientras que el PC eluye a un tiempo mayor (37.33 min). Esto es de esperarse puesto que al tener en la fase móvil TFA (pH 2.0), el grupo $-\text{NH}_2$ terminal libre del PL es fácilmente ionizable, eluyendo a tiempos menores. Mientras que el PC, además de poseer los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, ahora tiene un enlace peptídico que le confiere más hidrofobicidad, por lo que su tiempo de elución aumenta respecto al PL. En el caso del PC12aaSer1 fue suficiente un tiempo de ciclado de 72 h para agotar la materia prima en las condiciones de reacción descritas previamente.

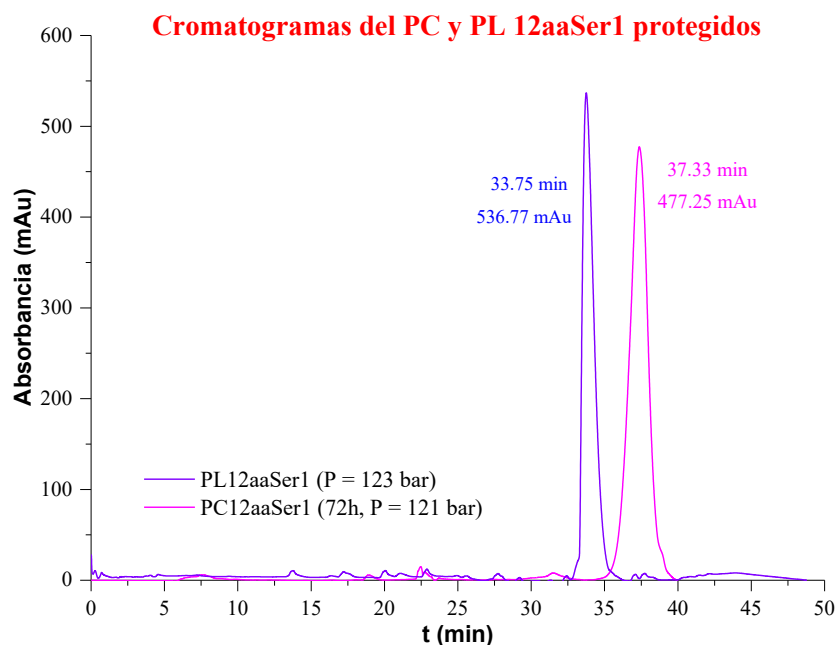


Figura II. 20. Análisis cualitativo por CLAR del proceso de ciclado del compuesto 12aaSer1 protegido usando una columna Phenomenex-Jupiter (C18, 5 μm , 4.60 x 250 mm, 300 \AA) equipada con una pre-columna Gemini (C18, 4 x 3 mm). Método de gradiente 60/90 a 10/90 (v/v, $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$ con 0.1 % y 0.08 % de TFA) por 30 min, manteniendo una meseta hasta 40 min, a un flujo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y detección UV-VIS a $\lambda = 235 \text{ nm}$. PL ($T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$) y PC ($T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$).

Por otro lado, el monitoreo de ciclado del compuesto de 10aaSer2 por CLAR mostrado en la Figura II. 21 pone en evidencia un comportamiento similar al compuesto de 12aaSer1 en cuanto a la elución del PL (25.66 min) y PC (30.30 min), por razones similares. Sin embargo, el tiempo de ciclado que requirió es diferente, dada la composición química y la longitud de la cadena peptídica. Aquí observamos que, después de 24 h de reacción, la proporción de PL y PC presentes en la muestra son ~50/50. Por lo que, se adicionó un exceso de 0.5 eq. de T3P/50 % AcOEt para continuar el proceso cada 24 h. Así, después de 48 h de reacción, posterior a la adición de T3P se observó la conclusión de la conversión del PL al PC.

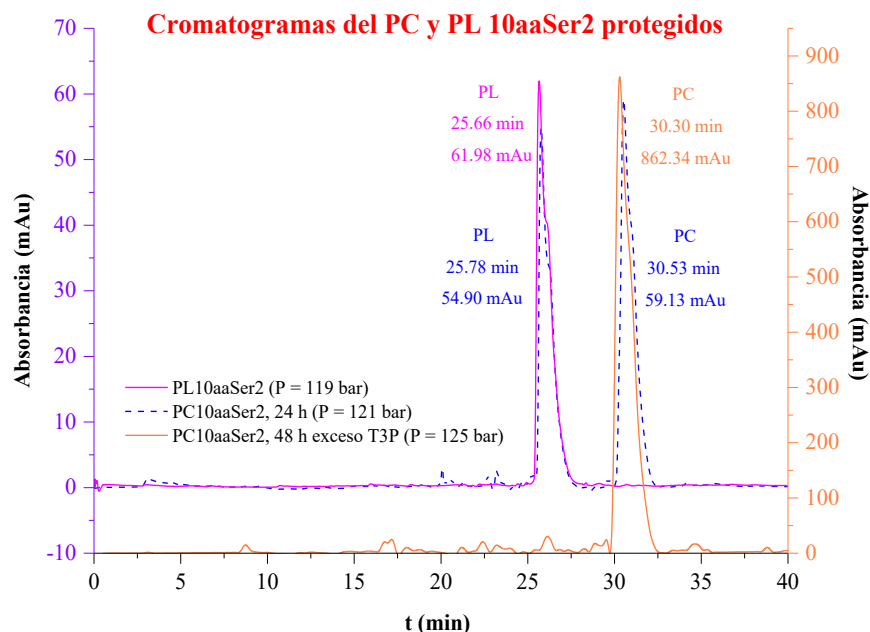


Figura II. 21. Análisis cualitativo del proceso de ciclado del compuesto 10aaSer2 protegido utilizando las columnas cromatográficas y las condiciones experimentales descritas en la Figura II. 20. PL (T = 19 °C), PC 24 h (T = 21 °C) y PC 48 h con exceso de T3P (T = 24.5 °C).

En el caso de los compuestos de la serie 3 mostrados en la Figura II. 22, se tiene que para el péptido de 8aaSer3 (Figura II. 22a) se requirió de la adición de 0.5 eq. de T3P/50 % AcOEt y de un tiempo extra de ciclado de 24 h para agotar el PL (19.85 min) y obtenerlo en forma de PC (25.82 min). Mientras que el compuesto de 10aaSer3 (Figura II. 22b) en un tiempo de 72 h de reacción fueron suficientes para transformar el PL (24.70 min) en el compuesto ciclado (33.57 min), sin necesidad de adicionar T3P/50 % AcOEt.

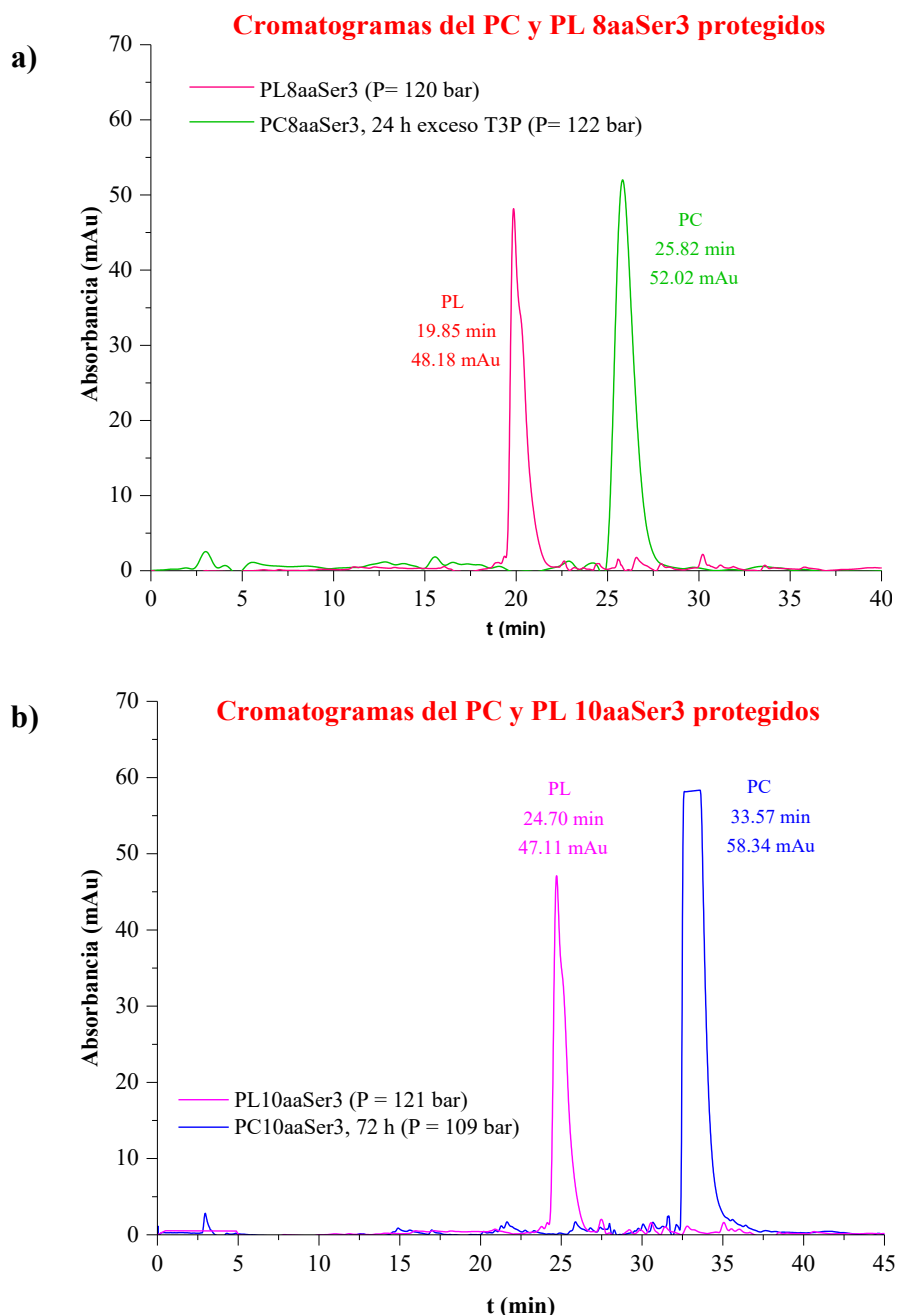


Figura II. 22. Análisis cualitativo del proceso de ciclado utilizando las columnas cromatográficas y las condiciones experimentales descritas en la Figura II. 20. Donde: a) PL (T = 20 °C) y PC (T = 21.5 °C) del compuesto 8aaSer3, y b) PL (T = 22 °C) y PC (T = 18 °C) del compuesto 10aaSer3.

Entonces, de manera general se observó que el proceso de ciclado para obtener monociclos de 8, 10 y 12 aa se requiere de un tiempo de reacción en condiciones de alta dilución de 3 a 5 días. Al término del tercer día es necesaria la adición de 0.5 eq. de T3P/50 % AcOEt y a las 24 h

(el día 4) otra adición más de 0.5 eq. de T3P/50 % AcOEt para concluir el proceso de transformación del compuesto lineal al cíclico. En cada toma de alícuota siempre se restauró el nivel de solvente en la mezcla de reacción, adicionando hasta 10 mL de DCM.

II.3.5 Análisis por CLAR de los PCs Desprotegidos

En esta parte, se muestra un cromatograma que ilustra los tiempos de elución de los PCs desprotegidos durante el proceso de purificación, en que las fracciones de cada cromatograma fueron recolectadas para ser liofilizadas y analizadas, pudiendo determinar la fracción correspondiente al PC deseado.

En la Figura II. 23 se muestra el cromatograma de purificación del PC8aaSe1, en que se observan dos fracciones, una a 7.27 min y la otra a 20.50 min. Si se comparan estos tiempos de elución con los del PC protegido es mucho menor. Este comportamiento es de esperarse, puesto que el PC ha perdido hidrofobicidad al retirar los grupos protectores como el OtBu y el Trt, liberando los grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{NH}_2$ (de la amida) de las cadenas laterales de los aa's constituyentes del compuesto. De estos grupos liberados, el $-\text{CONH}_2$ puede ser ionizado, debido a la presencia significativa del TFA en el medio de análisis, volviendo a los PCs más hidrofílicos, por lo que su elución en CLAR será a tiempos relativamente cortos.

En la Tabla II. 4 se resumen los resultados obtenidos de las fracciones recolectadas en el proceso de purificación de cada uno de los PCs desprotegidos. En esta tabla se excluyen los PCs de 10aaSer2 y 10aaSer3. Como se mencionó antes, estos péptidos sólo fueron purificados por precipitación con solvente, dado que los cromatogramas de análisis mostraron la evidencia de sólo un pico. En el caso del PC10aaSer 2 a un tiempo de 2.97 min (ver Figura II. 24a) y el PC10aaSer3 a un tiempo de 2.82 min (ver Figura II. 24b).

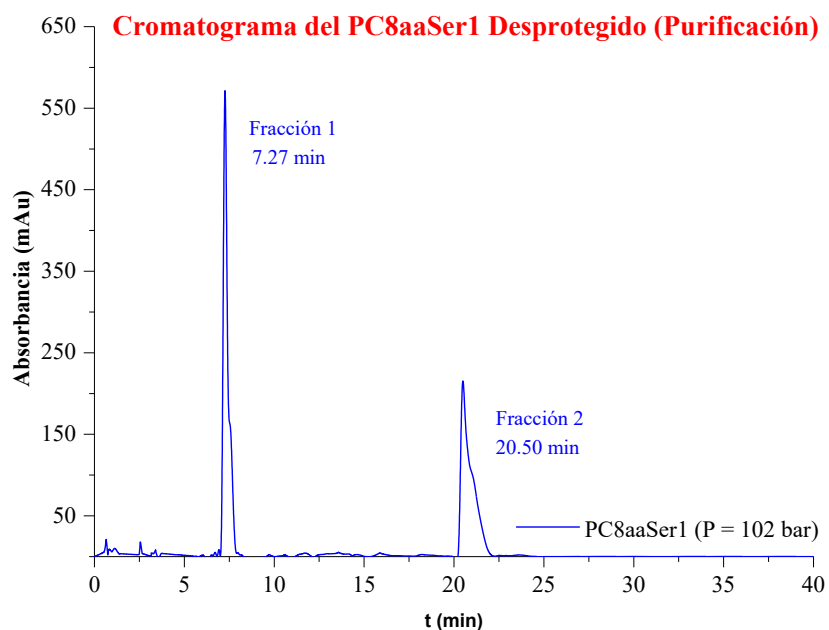


Figura II. 23. Cromatograma de purificación del PC8aaSer1 desprotegido realizado en una columna semi-preparativa Jupiter (C18, 10 μm , 10.0 x 250 mm, $320 \pm 40 \text{ \AA}$) equipada con una pre-columna Gemini (C18, 4 x 3 mm). Utilizando un método de gradiente 60/90 a 10/90 (v/v, $\text{H}_2\text{O}_{\text{Mq}}$ /ACN con 0.1 % y 0.08 % de TFA) por 30 min, manteniendo una meseta hasta 40 min, a un flujo de $4.71 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y detección UV-VIS a una $\lambda = 235 \text{ nm}$ y una $T = 19 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabla II. 4. Tiempos de las fracciones de recolección en el proceso de purificación por CLAR (columnas y condiciones experimentales indicadas en la Figura II. 23) de los PCs desprotegidos.

PC Desprotegido	Fracción 1 (CLAR)	Fracción 2 (CLAR)
8aaSer1	7.27 min	20.50 min
12aaSer1	3.01 min	16.13 min
8aaSer2	3.78 min	----
12aaSer2	2.86 min	----
8aaSer3	2.80 min	7.21 min
12aaSer3	3.00 min	7.34 min

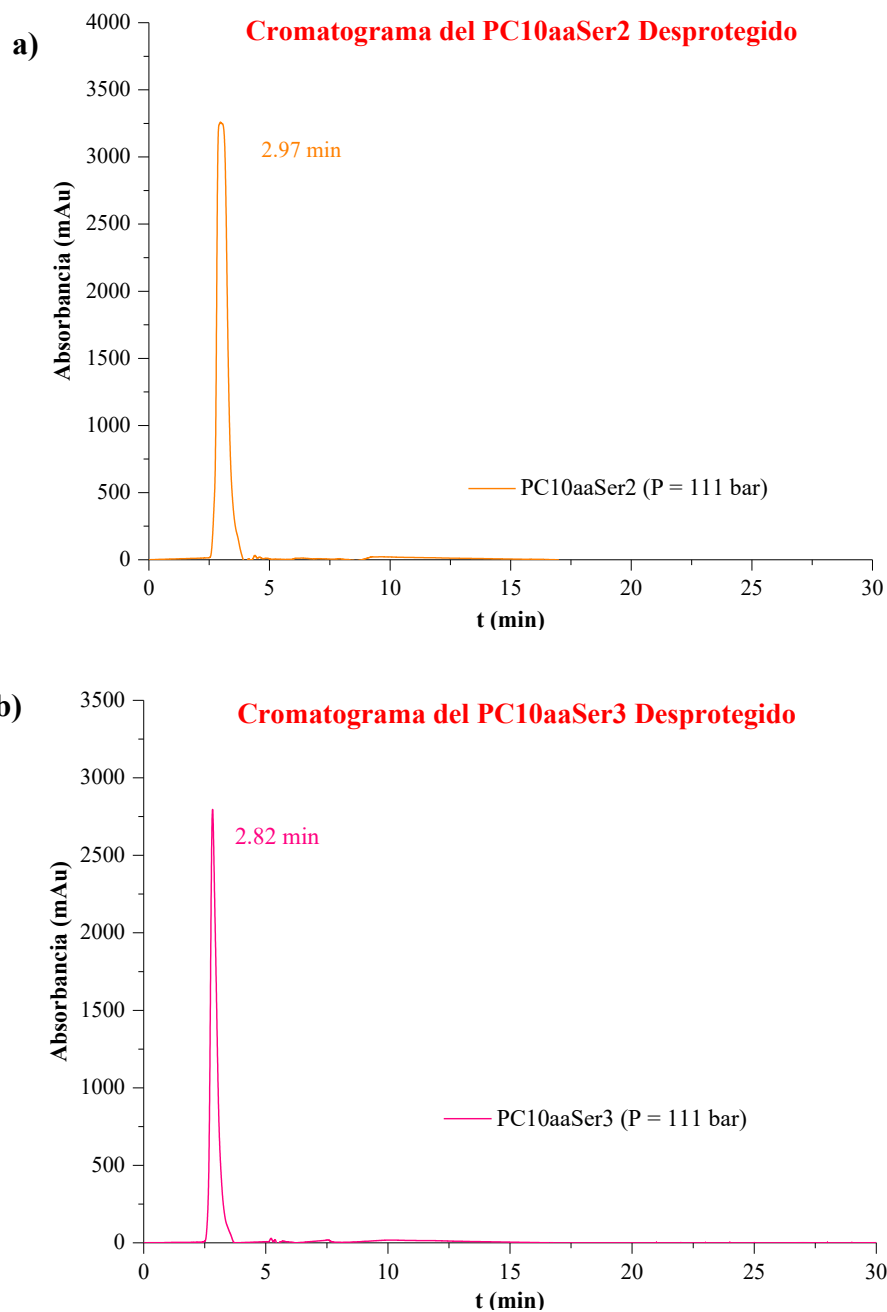


Figura II. 24. Cromatogramas de análisis realizados con las columnas cromatográficas y las condiciones experimentales descritas en la Figura II. 20. Donde: a) PC10aaSer2 desprotegido ($T = 18\text{ }^{\circ}\text{C}$) y b) PC10aaSer3 desprotegido ($T = 19\text{ }^{\circ}\text{C}$).

II.3.6 Composición y Masas de los PCs Desprotegidos

Los análisis por CL-EM de las diferentes fracciones recolectadas en el proceso de purificación por CLAR ponen en evidencia que la fracción 1, en todos los casos, corresponde al PC deseado. Estos primeros estudios son para determinar que fracción corresponde al compuesto deseado, posteriormente, en el Capítulo III se detallan las estructuras peptídicas cíclicas y se profundiza en los estudios de pureza por EC-IES-EM, analizando los diferentes iones formados (carga simple, doble y aductos) de cada compuesto. De este modo, se tiene, por ejemplo, en la Figura II. 25a el espectro experimental de masas del PC8aaSer3 de la fracción 1 (2.80 min), observando el ion molecular del compuesto $[M+H]^+ = 765.3225$, el cual es congruente con el ión molecular teórico $[M+H]^+ = 765.3274$ (ver Figura II. 25b). En el recuadro azul de la misma figura se encuentra una amplificación del ion molecular (experimental y teórico), en que se observan el patrón isotópico del PC8aaSer3 con una $m/z = 765.3225$, 766.3325 y 767.3405 , cuya composición química es: $C_{30}H_{44}N_{12}O_{12}$ y que corresponde a la estructura mostrada en la Figura II. 25. En color verde, se indica el grupo que le pueden conferir la carga +1 al PC, debido a la protonación en el $-N=$, puesto que el imidazol posee un pK_b 7.2 (su basicidad es mucho mayor a las amidas $-CONH_2$, cuyo pK_b es 15.0-16.0). De este modo, la comparación de los patrones isotópicos experimentales y teóricos del PC8aaSer3 mostró que, existe una correspondencia de señales que confirman la presencia del compuesto cíclico deseado.

Del mismo modo, se confirmó la composición química y la masa de los PCs de 10aa, observando adicionalmente la presencia de un ion de doble carga. En la Figura II. 26a se tiene el espectro experimental de masas del PC10aaSer2 cuyo ion molecular es $[M+H]^+ = 1000.4162$ y su ion de doble carga es $[M+2H]^{2+} = 519.6837$, valores que son congruentes con los observados en el patrón teórico (ver ión molecular en la Figura II. 26b). Dichos valores, corresponden a la composición química $C_{42}H_{57}N_{13}O_{16}$ perteneciente a la estructura mostrada en la Figura II. 26. Además, en el recuadro azul de la misma figura, se muestra una amplificación de los patrones isotópicos del ion molecular experimental con una $m/z = 1000.4162$, 1001.4184 , 1002.4204 y 1003.4230 , así como del respectivo ión molecular teórico ($m/z = 1000.4119$, 1001.4147 , 1002.4173 y 1003.4197), cuyos valores son congruentes entre sí. En color azul, se señala en la estructura cíclica del compuesto los grupos $-CONH_2$ (pK_b 15.0-16.0) de las cadenas laterales, que

le pueden conferir la carga +1 y +2 al mismo, puesto que el $-NH-$ del indol (pK_b 17.6) es un poco menos básico, comparado con las amidas (en el Capítulo III se discute más a fondo sobre la formación de iones de cargas simple, dobles y aductos). De esta forma, la comparación de los patrones isotópicos experimentales y teóricos del PC10aaSer2 mostró que, existe una correspondencia de señales que confirman la presencia del compuesto deseado.

En la Figura II. 27 se presenta el espectro de masas experimental (a) y teórico (b) del compuesto PC10aaSer3. Observando el ion molecular $[M+H]^+ = 1022.4475$ y el ion de doble carga $[M+2H]^{2+} = 511.7259$ del compuesto, cuyos valores son congruentes con los valores teóricos. En el recuadro azul de la Figura II. 27 se presenta la comparación de los patrones isotópicos del ion molecular, cuyos valores experimentales de m/z son 1022.4475, 1023.4486, 1024.4502, 1025.4521, los cuales son congruentes con los valores teóricos (ver recuadro). La composición química correspondiente es $C_{44}H_{59}N_{15}O_{14}$, propia de la estructura mostrada en la Figura II. 27. En la que se indica en color naranja los grupos: imidazol (pK_b 7.2) y $-CONH_2$ (pK_b 15.0-16.0) que le pueden conferir la carga +1 y +2 al PC por protonación del nitrógeno $-N=$ y el $-C=O$ de la amida, respectivamente. De esta manera, la comparación y correspondencia de valores y señales de los patrones isotópicos experimentales y teóricos de ion molecular permite verificar la presencia del compuesto deseado en la fracción analizada.

CAPÍTULO II. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS CÍCLICOS

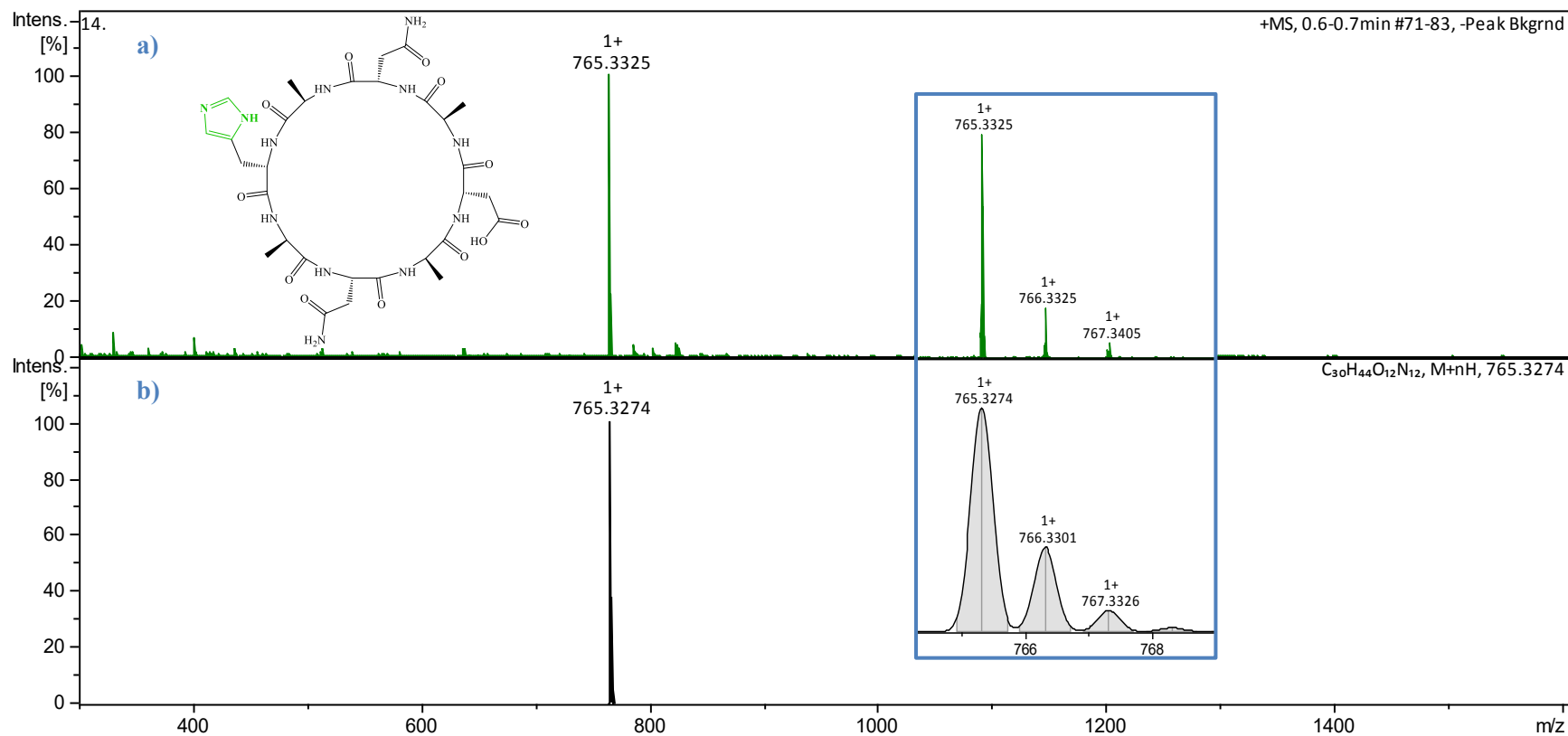


Figura II. 25. Espectros de masas obtenido por CL-IES-EM para el PC8aaSer3: a) experimental y b) teórico. El recuadro azul es una ampliación de los patrones isotópicos experimental (verde) y teórico (gris). Utilizando un equipo CL-EM Bruker Daltonik GmbH en polaridad positiva a un flujo de 50 nL·min⁻¹ con ACN (0.08 % de HCOOH) como eluyente en el intervalo de $m/z = 300 - 1600$. Calibrando el sistema con formiato de sodio.

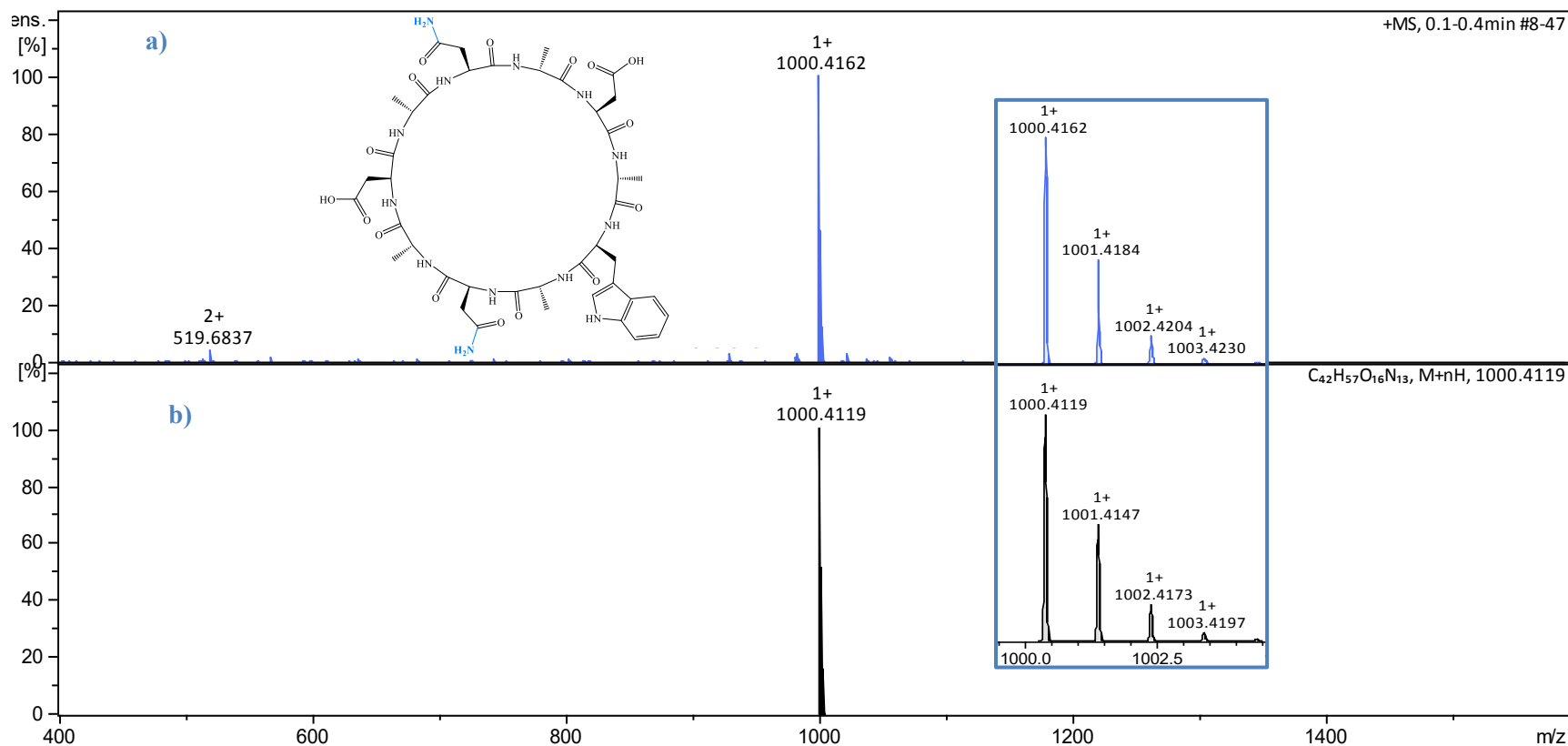


Figura II. 26. Espectro de masas obtenido por CL-IES-EM para el PC10aaSer2: a) experimental y b) teórico. El recuadro azul es una ampliación de los patrones isotópicos experimental (azul) y teórico (negro). Con las condiciones experimentales de la Figura II. 25, en el intervalo de $m/z = 400 - 1600$.

CAPÍTULO II. SÍNTESIS QUÍMICA DE PÉPTIDOS CÍCLICOS

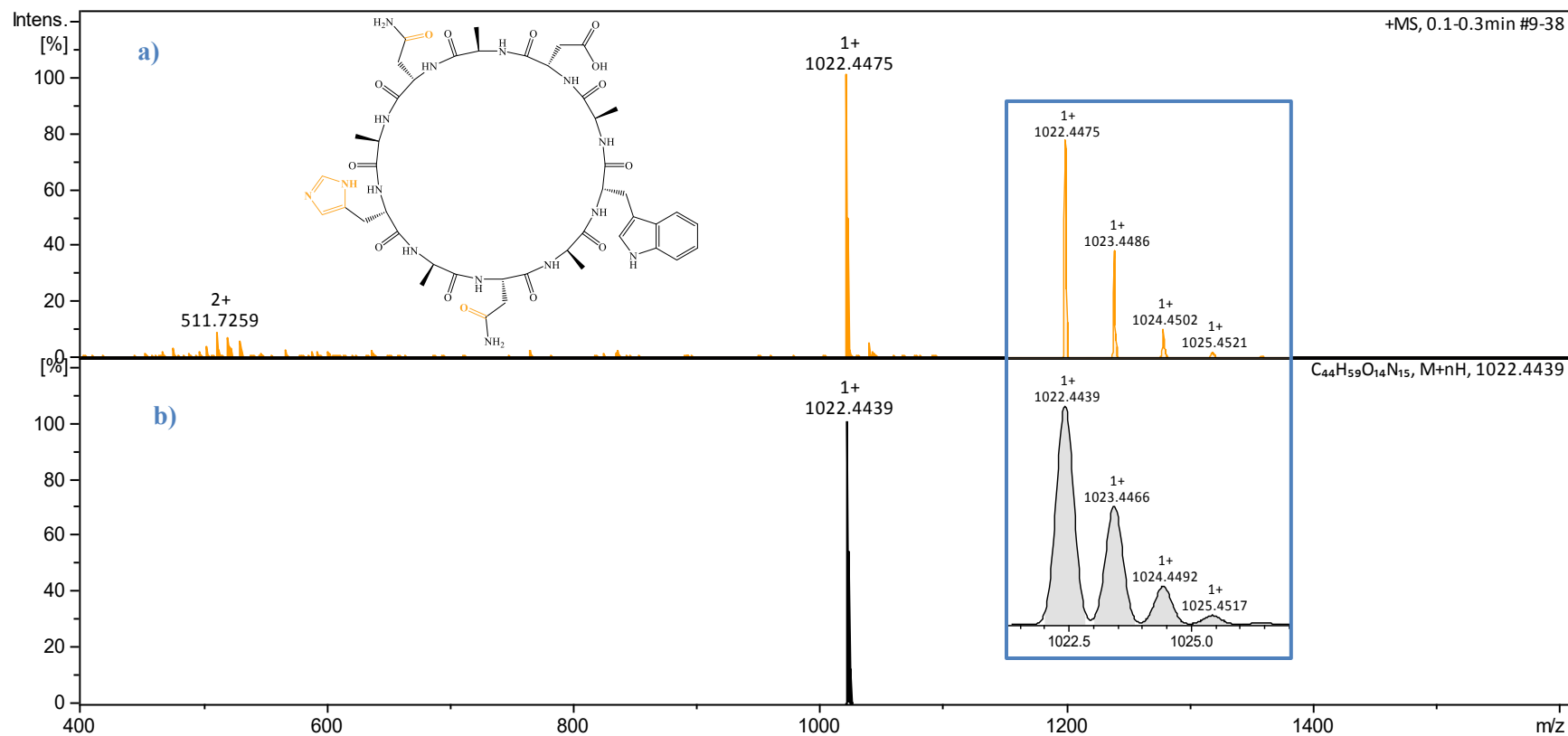


Figura II. 27. Espectro de masas obtenido por CL-IES-EM para el PC10aaSer3: a) experimental y b) teórico. El recuadro azul es una ampliación de los patrones isotópicos experimental (naranja) y teórico (gris). Con las condiciones experimentales de la Figura II. 25, en el intervalo de $m/z = 400 - 1600$.

En la Tabla II. 5 se resumen los resultados de la composición química de los PCs, las masas exactas teóricas y experimentales con los correspondientes iones moleculares y sus respectivos patrones isotópicos que confirman la presencia de los PCs deseados.

Tabla II. 5. Composición química de los PCs sintetizados y sus masas teóricas y experimentales con sus respectivos patrones isotópicos obtenidos con el software DataAnalysis v. 4.1.

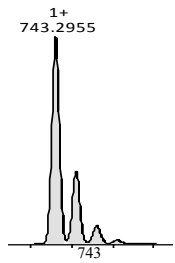
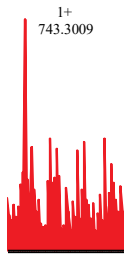
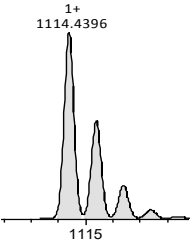
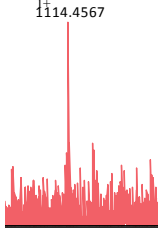
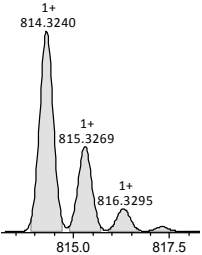
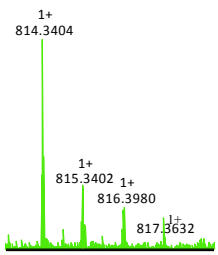
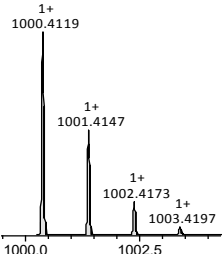
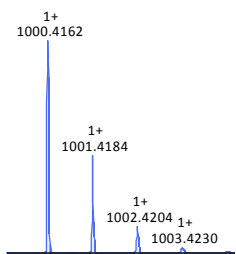
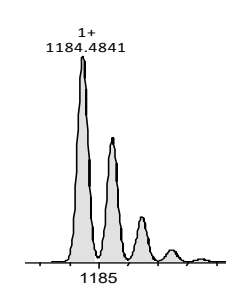
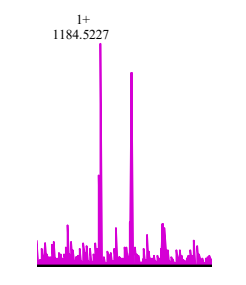
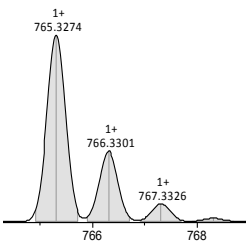
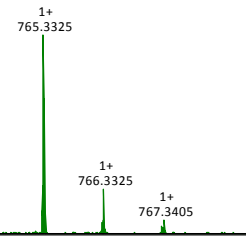
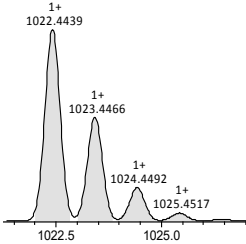
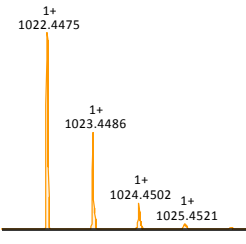
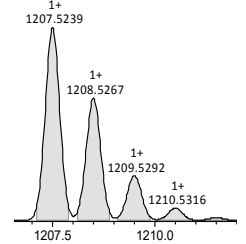
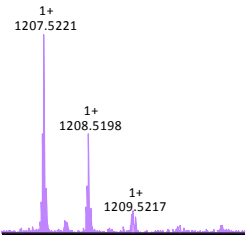
PC sintetizado	Composición Química (M)	Masa Teórica Exacta/Masa Experimental Exacta [M+H] ⁺	Patrón Isotópico Teórico (m/z)	Patrón Isotópico Experimental (m/z)
PC8aaSer1	C ₂₈ H ₄₂ N ₁₀ O ₁₄	743.2955 / 743.3009		
PC12aaSer1	C ₄₂ H ₆₃ N ₁₅ O ₂₁	1114.4396 / 1114.4567		
PC8aaSer2	C ₃₅ H ₄₇ N ₁₁ O ₁₂	814.3240 / 814.3404		
PC10aaSer2	C ₄₂ H ₅₇ N ₁₃ O ₁₆	1000.4119 / 1000.4162		

Tabla II. 5 (Continuación) Composición química de los PCs sintetizados y sus masas teóricas y experimentales con sus respectivos patrones isotópicos obtenidos con el Software DataAnalysis v. 4.1.

PC sintetizado	Composición Química (M)	Masa Teórica Exacta/Masa Experimental Exacta [M+H] ⁺	Patrón Isotópico Teórico (m/z)	Patrón Isotópico Experimental (m/z)
PC12aaSer2	C ₄₉ H ₆₈ N ₁₆ O ₁₉	1184.4841 / 1184.5227		
PC8aaSer3	C ₃₀ H ₄₄ N ₁₂ O ₁₂	765.3274 / 765.3325		
PC10aaSer3	C ₄₄ H ₅₉ N ₁₅ O ₁₄	1022.4439 / 1022.4475		
PC12aaSer3	C ₅₁ H ₇₀ N ₁₈ O ₁₇	1207.5239 / 1207.5221		

II.3.7 Rendimiento de los Productos Finales

El rendimiento total de los PCs sintetizados se determinó considerando todos los rendimientos de las etapas de: síntesis, extracción y purificación y/o precipitación. Considerando la carga neta de la resina. En la Tabla II. 6 se enlistan los rendimientos totales de los PCs desprotegidos finales.

Tabla II. 6. Rendimientos netos porcentuales de los Péptidos Cíclicos sintetizados.

PC sintetizado	Rendimiento neto (%)
PC8aaRef	48.8
PC12aaRef	40.1
PC8aaSer1	89.9
PC12aaSer1	50.6
PC8aaSer2	53.1
PC10aaSer2	78.6
PC12aaSer2	76.4
PC8aaSer3	82.2
PC10aaSer3	71.6
PC12aaSer3	68.2

Dentro del reporte de los rendimientos totales de los PCs se decidió incluir los resultados de los compuestos descritos previamente por Ghadiri et al. [59, 92, 106], ya que fueron de gran utilidad para ensayar y optimizar las condiciones de síntesis de los PCs nuevos. El rendimiento de los PCs usados como referencia es de 40–49 %. En tanto que, nuestros productos muestran rendimientos de 51 hasta 90 %. En este punto, es importante recordar que los PCs: 10aaSer2 y 10aaSer3, fueron purificados sólo por decantación y precipitación, mostrando rendimientos netos de 76 y 72 %, respectivamente.

De manera global, se puede decir que el rendimiento de los PCs sintetizados fue dentro de 40 y 90 %. El cual es muy satisfactorio, puesto que es mejor al reportado por otros autores como Brady et al. [177], quienes también obtuvieron PCs por ambos métodos de síntesis y purificación (SPFS y purificación por CLAR y por recristalización-precipitación con solventes) consiguiendo rendimientos globales de 18–69 %. Al respecto, nosotros tenemos tres posibles explicaciones de la mejora en el rendimiento final de los PCs, las cuales radican básicamente en el proceso de ciclado.

1. Brady et al. [177] hicieron la síntesis de diferentes secuencias peptídicas, tanto de naturaleza química, como de longitud (4 a 6 aa's), los cuales son factores importantes para favorecer o desfavorecer el proceso de ciclado.
2. Por otro lado, Brady et al. [177] utilizaron difenilfosforil azida como reactivo promotor de la ciclización. Nosotros usamos una combinación de nuevos reactivos altamente eficientes para este propósito, siendo el T3P/50% AcOEt, la DIPEA, el DMAP en DCM bajo condiciones de alta dilución (10^{-3} – 10^{-4} M) a una temperatura de 25–27 °C para obtener monociclos, puesto que frecuentemente las bajas temperaturas desfavorecen el proceso.
3. Normalmente la macrociclización lleva unas 24 a 48 horas, aunque el monitoreo constante del proceso por CLAR muestra que la ciclización no es al 100 %. En este caso, nosotros preferimos incrementar los tiempos de ciclado hasta por 5 días, agregando un exceso de 0.5 eq. de T3P/50% AcOEt y aumentando la cantidad de solvente hasta por 10 mL, de tal modo que se lograra agotar el péptido de partida.

II.4 Conclusiones

Se obtuvieron 8 péptidos cíclicos nuevos de 3 tamaños diferentes de diámetro (8, 10 y 12 aa) mediante la optimización de las condiciones de síntesis y del proceso de ciclado. Encontrando que un punto crucial es la adición de 0.2 eq. extra en los reactivos de acoplamiento a partir del 8vo aminoácido y de 0.5 eq. de T3P/50% AcOEt en la macrociclización monomérica entre el día 3 y 4 del proceso, pudiendo agotar el PL en un periodo de 3 a 5 días. Restaurando siempre el nivel de solvente en la mezcla de reacción de ciclado. De este modo se lograron obtener

rendimientos en el intervalo de 40–90 %, que son mejores a los previamente reportados en la literatura.

Por otro lado, se encontraron las condiciones óptimas de purificación de los nuevos PCs en una columna semi-preparativa Jupiter (C18, 10 μm , 10.0 x 250 mm, $320 \pm 40 \text{ \AA}$) equipada con una pre-columna Gemini (C18, 4 x 3 mm) trabajando con un método de gradiente 60/40 a 10/90 ($\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$, 0.1 % TFA/ACN 0.08 % TFA) por 30 min, manteniendo una meseta hasta alcanzar 40 min utilizando detección UV-Vis a una $\lambda = 235 \text{ nm}$ y un flujo de $4.71 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

Se caracterizó cualitativamente a los PCs por CLAR, identificando la formación del enlace peptídico cabeza-cola entre el grupo carboxilo y amino, por la ganancia de hidrofobicidad en los PCs protegidos al mostrar tiempos de retención más largos que los PLs protegidos. Mientras que, los PCs desprotegidos mostraron tiempos de elución mucho más cortos, puesto que las cadenas laterales con grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{CONH}_2$ les confieren mayor hidrofilia, de éstos el grupo $-\text{CONH}_2$ puede ionizarse a un pH 2.0, que es proporcionado por la fase móvil y los solventes de dilución.

Se confirmó la composición química y la estructura de los PCs nuevos por CL-EM observando los iones moleculares $[\text{M}+\text{H}]^+$ de cada compuesto y sus respectivos patrones isotópicos, los cuales fueron fieles a los patrones teóricos. Observando adicionalmente en los PC10aa iones de doble carga.

CAPÍTULO III

PÉPTIDOS CÍCLICOS: DETERMINACIÓN DE PUREZA Y CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA POR EC

En este capítulo se hace el análisis estructural y químico de las secuencias peptídicas sintetizadas, se describen las recomendaciones de almacenamiento de los péptidos purificados y las principales técnicas con las que se suele determinar la pureza de éstos. A continuación, se detalla la metodología experimental y los resultados obtenidos de las pruebas de solubilidad de los PCs. Así como, la nueva metodología basada en EC-IES-EM para la determinación de la pureza y caracterización de los PCs, la cual también permitió hacer estudios de estabilidad de los compuestos almacenados en solución por tiempos prolongados. Por otro lado, se detalla los estudios electroforéticos para la determinación de las propiedades fisicoquímicas de los PCs y la determinación de posibles ensambles de éstos en medio ácido, verificando la información por EC-IES-EM.

CAPÍTULO III

PÉPTIDOS CÍCLICOS: DETERMINACIÓN DE PUREZA Y CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA POR EC

III.1 Análisis de la Estructura Química de las Secuencias Peptídicas

Para comprender claramente las propiedades fisicoquímicas de los PCs y de sus subsecuentes auto-ensambles supramoleculares (NTPs y ramilletes o fibrillas de NTPs) es importante recordar las estructuras primaria, secundaria y terciaria de las proteínas (y por consiguiente de los péptidos) formadas a partir de las diversas interacciones inter- e intramoleculares. Del mismo modo, se aborda un poco las propiedades de los aa's que conforman a cada uno de los péptidos sintetizados.

III.1.1 Estructura Peptídica

La **estructura primaria** es relativamente simple, se refiere a la secuencia de aminoácidos que constituyen el polipéptido, unidos mediante enlaces peptídicos de carácter semi-planar.

La **estructura secundaria** es la formación de una hélice o plegamiento local debido a la presencia de puentes de hidrógeno. Generalmente, la estructura plegada es un espiral (α -hélice o estructura tubular) o una lámina (hoja- β), a través de la cual los aa's vecinos se unen por puentes de hidrógeno (denotado como \cdots , 2.79 Å, $\Delta H = 5-8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) intramoleculares entre los grupos $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$, estabilizando la conformación estructural. Adicional a estos plegamientos, se ha encontrado un plegamiento secundario aleatorio que suele presentarse en péptidos que contienen Ile, Glu y/o Asp, debido a la repulsión entre sus grupos $-\text{R}$ [19].

La **estructura terciaria (3D)** es el plegamiento tridimensional de la(s) cadena(s) peptídica(s) o el plegado global del péptido mediante diversas fuerzas, tales como puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, interacciones hidrofóbicas e interacciones iónicas intermoleculares.

En este contexto, se destacan las posibles propiedades que podrían presentar de manera general los péptidos dependiendo de su estructura primaria. Por ejemplo, a pH fisiológico los grupos -R de Glu y Asp presentan carga negativa (-COO⁻), mientras que Arg, His y Lys poseen carga positiva. En este sentido, en la Figura III. 1 se presentan las estructuras de los aminoácidos que conforman a cada uno de los diferentes PCs de las Series 1-3. En este contexto, considerando las propiedades descritas en el APÉNDICE A, vemos que los aa's empleados, tales como, **Asp** e **His** son hidrofílicos, polares y cargados (el primero negativamente en medio básico y el segundo positivamente en medio ácido), mientras que **Asn** es únicamente hidrofílico y polar. La **Ala** es hidrofóbica, apolar y alifática, mientras que **Trp** es aromático y polar¹. Por otro lado, los PCs, cuyo plegamiento corresponde a la estructura secundaria tipo β -plegada, tendrá propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas características en las superficie interna y externa, dependientes de la estructura primaria. Mientras que, la asociación de los PCs en forma de estructuras tipo β -tubular o β -plegada, será la consecuencia de las interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno entre los PCs. De tal modo, que los NTPs formados podrán formar una estructura más compleja, que dependerán a su vez de las propiedades de los grupos de las cadenas laterales de las estructuras secundarias (PCs), obteniendo asociaciones tipo 3D entre los NTPs.

¹ En este párrafo se indican con diferentes colores los aa's hidrofílico-polares, los hidrofóbico-apolares, etc. para su fácil identificación en las estructuras cíclicas descritas posteriormente.

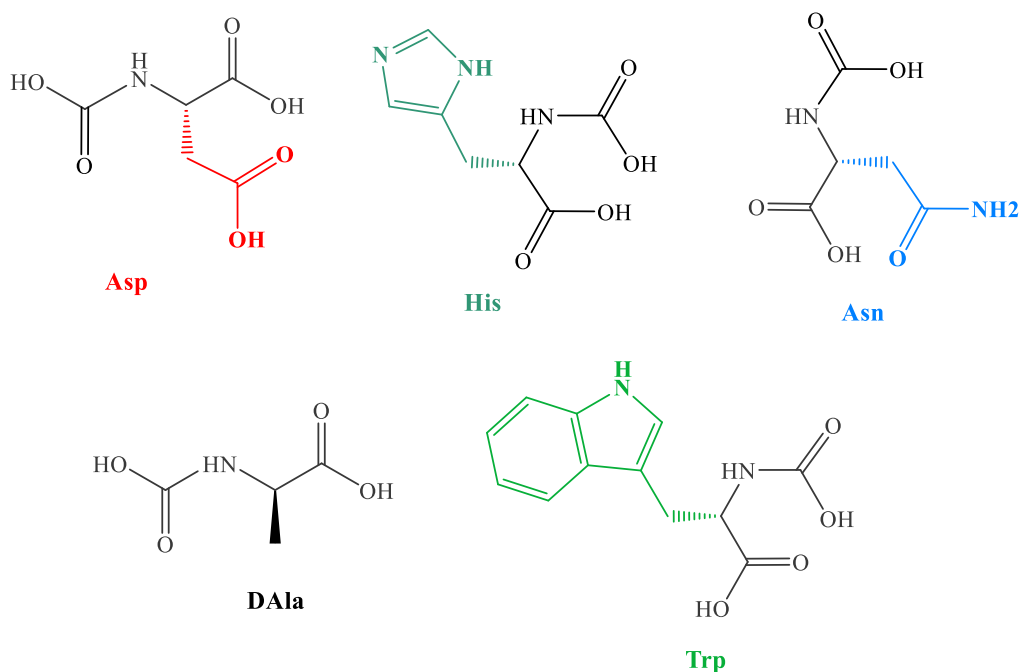


Figura III. 1 Estructuras químicas de cada uno de los aminoácidos que intergran a los diferentes PCs de cada la Serie 1, 2 y 3. En color rojo (Asp), verde-azul (His), azul (Asn), negro resaltado (DAla) y verde (Trp) se indican los grupos de las cadenas laterales de cada aminoácido.

III.1.2 Solubilidad de los Péptidos

Dependiendo de la composición aminoacídica, los péptidos pueden adquirir carga positiva, negativa o cero, debido a las propiedades ácidas, básicas o neutras de los aa's, de las cuales depende fuertemente la solubilidad. Considerando esto, los péptidos básicos son potencialmente solubles en medio acuoso, aumentando la solubilidad mediante la adición de AcOH (10–30 %) y de ser necesario unos 10–15 μL de TFA concentrado. Los péptidos ácidos generalmente son solubles en tampones de fosfato (pH 7.4), pero si se dificulta el proceso puede agregarse una pequeña cantidad de NH_4HCO_3 (0.1 M) o $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (al 10 %). En tanto que, los péptidos neutros suelen ser solubles en solventes orgánicos, pudiendo empezar con la adición de ACN, MeOH o IsoPrOH. En el caso de ser muy hidrofóbicos se puede hacer una prueba con DMSO y posteriormente con agua ^[178].

Es posible predecir si un péptido será soluble en determinado solvente según algunas características. Por ejemplo, los péptidos con aa's como Asp y Glu, serán potencialmente solubles en tampones básicos o NH_4OH . Los péptidos que tengan una hidrofilia $> 25\%$ con aa's cargados (His, Glu, Asp, Arg y Lys) y $< 25\%$ de aa's hidrofóbicos usualmente se disolverán en medio acuoso. Los péptidos con $> 50\%$ de aa's hidrofóbicos serán insolubles o parcialmente solubles en agua, pero sobre todo más solubles en solventes orgánicos. Mientras que, aquellos péptidos que en su composición química posean $> 75\%$ aa's hidrofóbicos, difícilmente serán solubles en agua como primer solvente. Por lo que, se requiere de solventes muy fuertes como TFA y HCOOH para comenzar la solubilización, ya que estos péptidos podrían precipitar con la adición de agua o algún tampón acuoso [178].

Por otro lado, como ya se mencionó en el Capítulo I, se sabe que los PCs forman puentes de hidrógeno, debido a la presencia de los grupos de los $\text{C}=\text{O}$ y $\text{H}-\text{N}$ en los esqueletos de los monociclos. Además, es posible la formación de puentes de hidrógeno mediante la interacción entre las cadenas laterales de los aa's de estos PCs, puesto que existen, tanto elementos donadores, como aceptores en las estructuras de los aa's componentes. Tal es el caso del Trp que posee un H donador en el anillo del indol. En tanto que, el Asp y el Asn poseen H donadores ($-\text{NH}_2$ o $-\text{COOH}$) como H aceptores ($\text{RHN}-\text{C}=\text{O}$ o $-\text{COOH}$). En este sentido, los péptidos que posean $> 75\%$ de aa's hidrofílicos (Asp, Glu, His, Lys, Asn, Gln, Arg, Ser, Thr y Tyr) son capaces de formar estos enlaces intermoleculares por puentes de hidrógeno y pueden dar lugar a geles en soluciones acuosas concentradas [178].

III.1.3 Péptidos Cíclicos Serie 1

En la Tabla III. 1 se enlistan las principales propiedades fisicoquímicas de los péptidos de la Serie 1 (8aaSer1 y 12aaSer1, en ese orden), las cuales fueron determinadas a partir de los aa's constituyentes del PL utilizando el programa de LifeProtein [179]. En la Figura III. 2 se muestran las estructuras cíclicas de estos péptidos, señalando con colores los grupos $-\text{R}$ de los aa's (Rojo para $-\text{COOH}$ del Asp y azul para la amida primaria del Asn), los cuales le confieren ciertas propiedades hidrofílicas a la superficie externa de cada PC. Finalmente, en la Figura III. 5 se

presenta un diagrama de colores de la densidad de carga neta estimada teóricamente para cada péptido de la Serie 1 en función del pH.

Tabla III. 1. Estructura primaria y secundaria de los péptidos de la Serie 1, su hidrofobicidad en función del pH, hidrofilia/hidrofobia y pI de cada PC.

Estructura primaria (PL)	Estructura Secundaria (PC)	H ^a	Hidrofilia/Hidrofobia ^b	pI ^c
8aaSer1 [-(DAla-Asp-DAla-Asn-) ₂ -]	Ver Figura III. 2a	8.75 (pH 2) -3.5 (pH 7)	4/4	~ 3
12aaSer1 [-(DAla-Asp-DAla-Asn-) ₃ -]	Ver Figura III. 2b	8.75 (pH 2) -3.5 (pH 7)	6/6	~ 3

^a H = Hidrofobicidad. Información obtenida del promedio de hidrofobicidad de cada uno de los aa's constituyentes del péptido al pH indicado. (H = suma de todos los aa's/ # de aa's de todo el péptido al pH indicado).

^b Número de grupos hidrofílicos/ número de grupos hidrofóbicos.

^c pI = Punto isoeléctrico del PC.

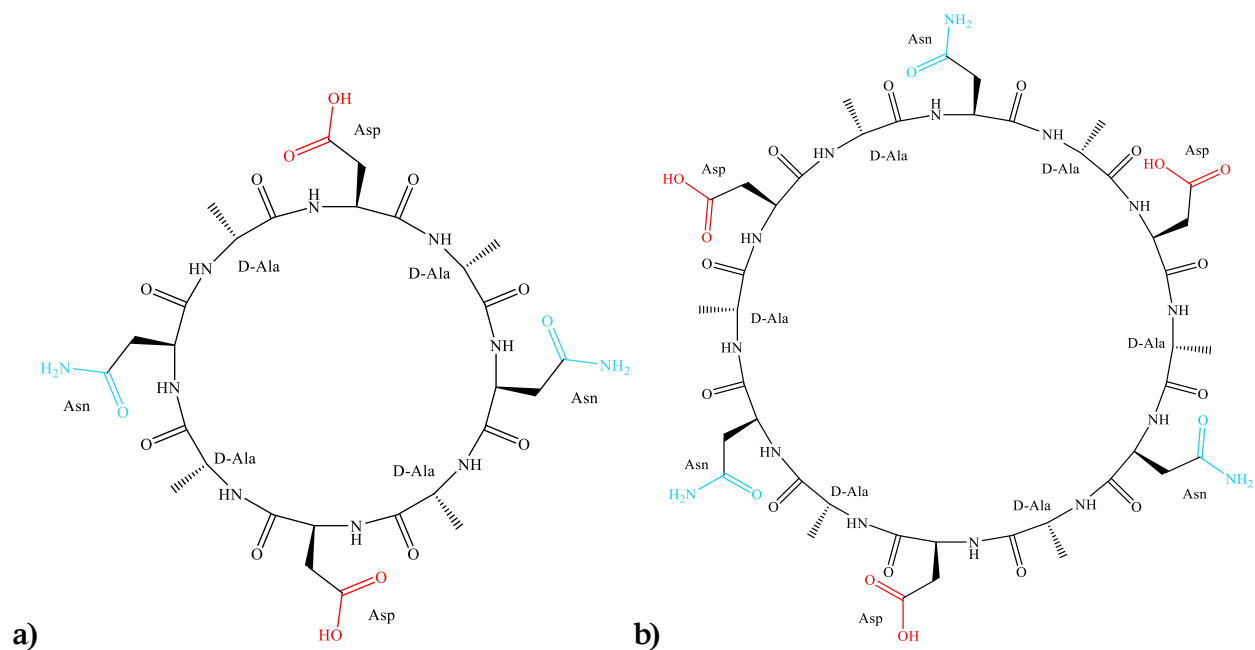


Figura III. 2. Estructuras del a) PC8aaSer1 y b) PC12aaSer1. En color se indican los grupos -R de las cadenas laterales de los aa's que los conforman, las cuales confieren propiedades específicas a la superficie externa de cada PC.

Los compuestos sólidos de la Serie 1 son péptidos ácidos con 50% de hidrofilia y podrían ser disueltos inicialmente en agua pura, adicionando unos 50 μ L de una solución diluida de NH_4OH o bien, agregando pequeñas gotas de NaOH 0.1M [179].

III.1.4 Péptidos Cíclicos Serie 2

En la Tabla III. 2 se encuentran las principales propiedades fisicoquímicas de los péptidos de la Serie 2 (8aaSer2, 10aaSer2 y 12aaSer2, en ese orden) calculadas a partir de la secuencia de aa's del PL utilizando el programa indicado en la referencia [179]. En la Figura III. 3 se ilustran las estructuras cíclicas de estos péptidos, señalando con colores los grupos -R de los aa's (Rojo para -COOH del Asp, azul para la amida primaria del Asn y verde para el anillo indol del Trp), los cuales le confieren propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas a la superficie externa de cada PC. Finalmente, en el Figura III. 5 se tiene un diagrama de colores de la densidad de carga neta estimada teóricamente para cada péptido de la Serie 2 en función del pH.

Tabla III. 2. Estructura primaria y secundaria de los péptidos de la Serie 2, su hidrofobicidad en función del pH, hidrofilia/hidrofobia y pI de cada péptido.

Estructura primaria (PL)	Estructura Secundaria (PC)	H ^a	Hidrofilia/Hidrofobia ^b	pI ^c
8aaSer2 [-DAla-Asp-DAla-Asn- DAla-Trp-DAla-Asp-]	Ver Figura III. 3a	24.38 (pH 2) 13.75 (pH 7)	3/5	~ 3
10aaSer2 [-DAla-Asp-DAla-Asn- DAla-Asp-DAla-Asn- DAla-Trp -]	Ver Figura III. 3b	20.10 (pH 2) 11.00 (pH 7)	4/6	~ 3
12aaSer2 [-DAla-Asp-DAla-Asn- DAla-Asp-DAla-Asn- DAla-Trp-DAla-Asn-]	Ver Figura III. 3c	17.25 (pH 2) 9.17 (pH 7)	5/7	~ 3

^a H = Hidrofobicidad. Información obtenida del promedio de hidrofobicidad de cada uno de los aa's constituyentes del péptido al pH indicado. (H = suma de todos los aa's/ # de aa's de todo el péptido al pH indicado).

^b Número de grupos hidrofílicos/ número de grupos hidrofóbicos.

^c pI = Punto isoeléctrico del PC.

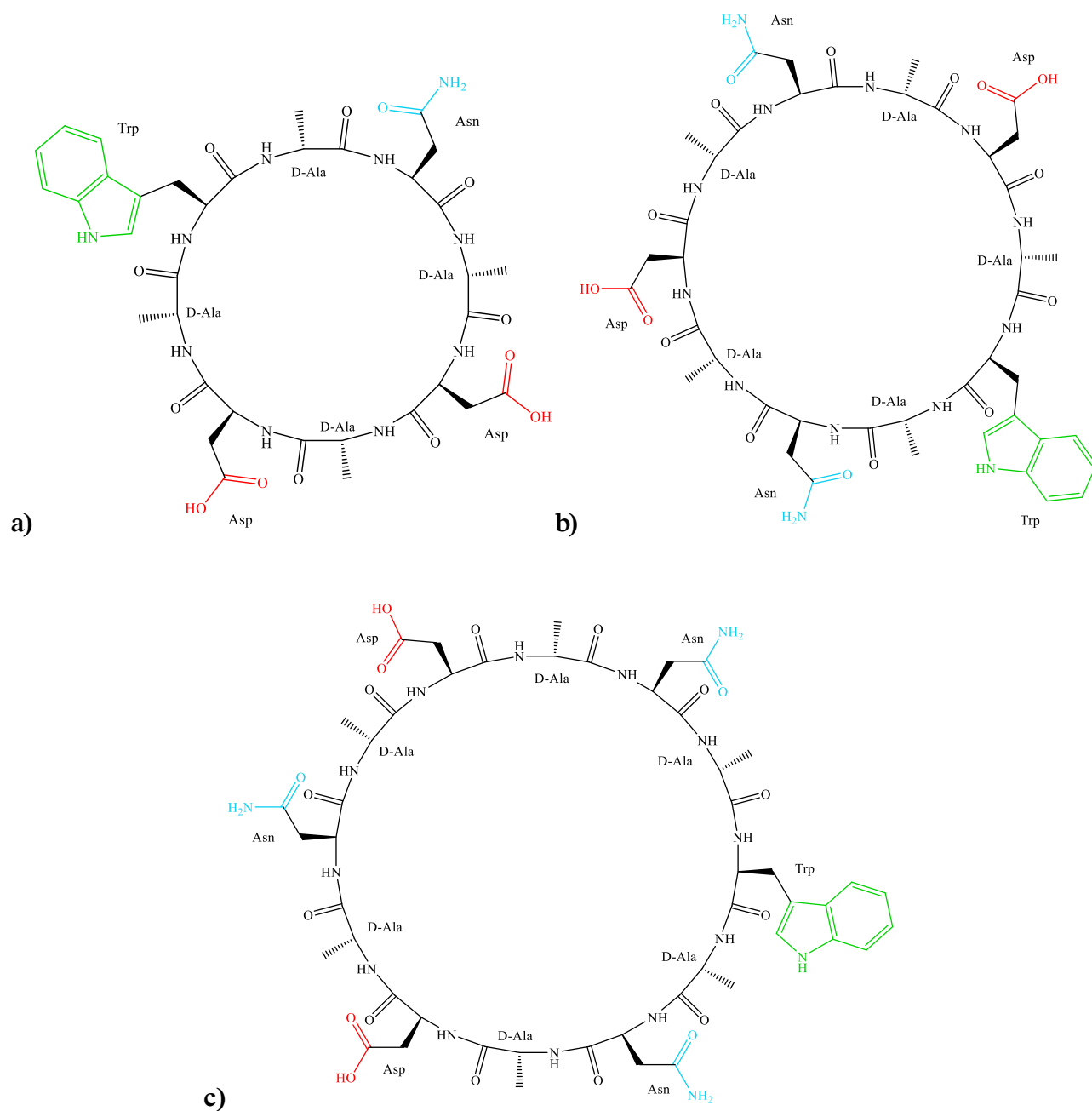


Figura III. 3. Estructuras del a) PC8aaSer2, b) PC10aaSer2, y c) PC12aaSer2. En color se indican los grupos -R de las cadenas laterales de los aa's que los conforman, las cuales confieren propiedades específicas a la superficie externa de cada PC.

Los péptidos ácidos de la Serie 2 son teóricamente 38, 40 y 42 % hidrofílicos (8aaSer2, 10aaSer2 y 12aaSer2, respectivamente) y podrían disolverse inicialmente en agua desionizada, agregando gotas de 50 µL de NH₄OH diluido o bien, agregando pequeñas gotas de una solución básica como NaOH 0.1 M [179].

III.1.5 Péptidos Cíclicos Serie 3

En la Tabla III. 3 se muestran las principales propiedades fisicoquímicas de los péptidos de la Serie 3 (8aaSer3, 10aaSer3 y 12aaSer3, en ese orden) calculadas a partir de los aa's componentes del PL utilizando el software antes mencionado. En la Figura III. 4 se encuentran las estructuras de los PCs, indicando con colores los grupos -R de los aa's (Rojo para el -COOH del Asp, azul para la amida primaria del Asn, verde para el anillo indol del Trp y azul fuerte para el imidazol de la His), los cuales son responsables de las diferentes propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas a la superficie externa de cada PC.

Tabla III. 3. Estructura primaria y secundaria de los péptidos de la Serie 3, su hidrofobicidad en función del pH, hidrofília/hidrofobia y pI de cada péptido.

Estructura primaria (PL)	Estructura Secundaria (PC)	H ^a	Hidrofília/Hidrofobia ^b	pI ^c
8aaSer3 [-DAla-Asp-DAla-Asn- DAla-His-DAla-Asn-]	Ver Figura III. 4a	5.75 (pH 2) 4.38 (pH 7)	4/4	4.82
10aaSer3 [-DAla-Asp-DAla-Asn- DAla-His-DAla-Asn-DAla- Trp-]	Ver Figura III. 4b	17.70 (pH 2) 17.30 (pH 7)	4/6	4.82
12aaSer3 [-DAla-Asp-DAla-Asn- DAla-His-DAla-Asn-DAla- Trp-DAla-Asn-]	Ver Figura III. 4c	15.25 (pH 2) 14.42 (pH 7)	5/7	4.82

^a H = Hidrofobicidad. Información obtenida del promedio de hidrofobicidad de cada uno de los aa's constituyentes del péptido al pH indicado. (H = suma de todos los aa's/ # de aa's de todo el péptido al pH indicado).

^b Número de grupos hidrofílicos/ número de grupos hidrofóbicos.

^c pI = Punto isoeléctrico del PC.

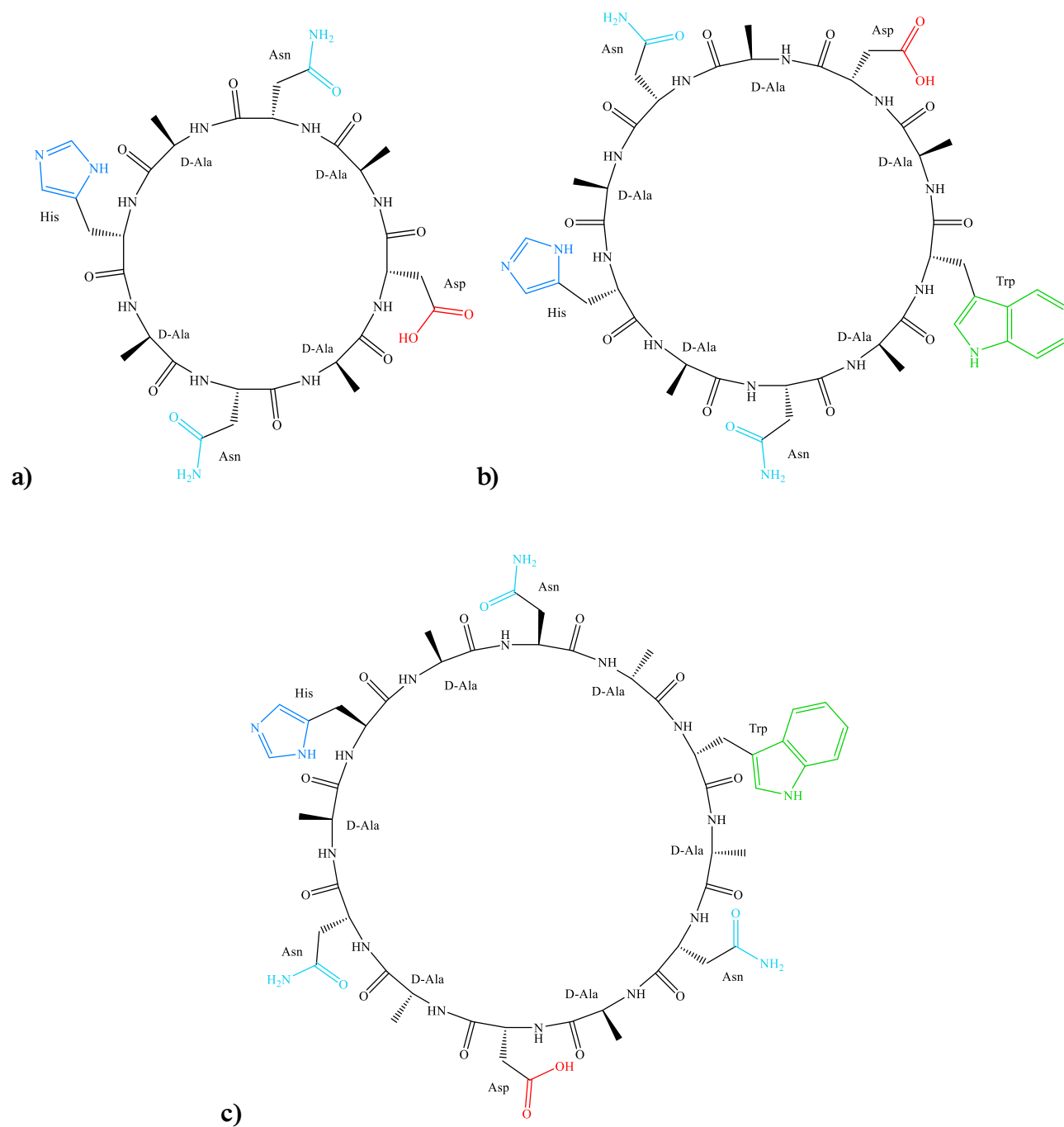
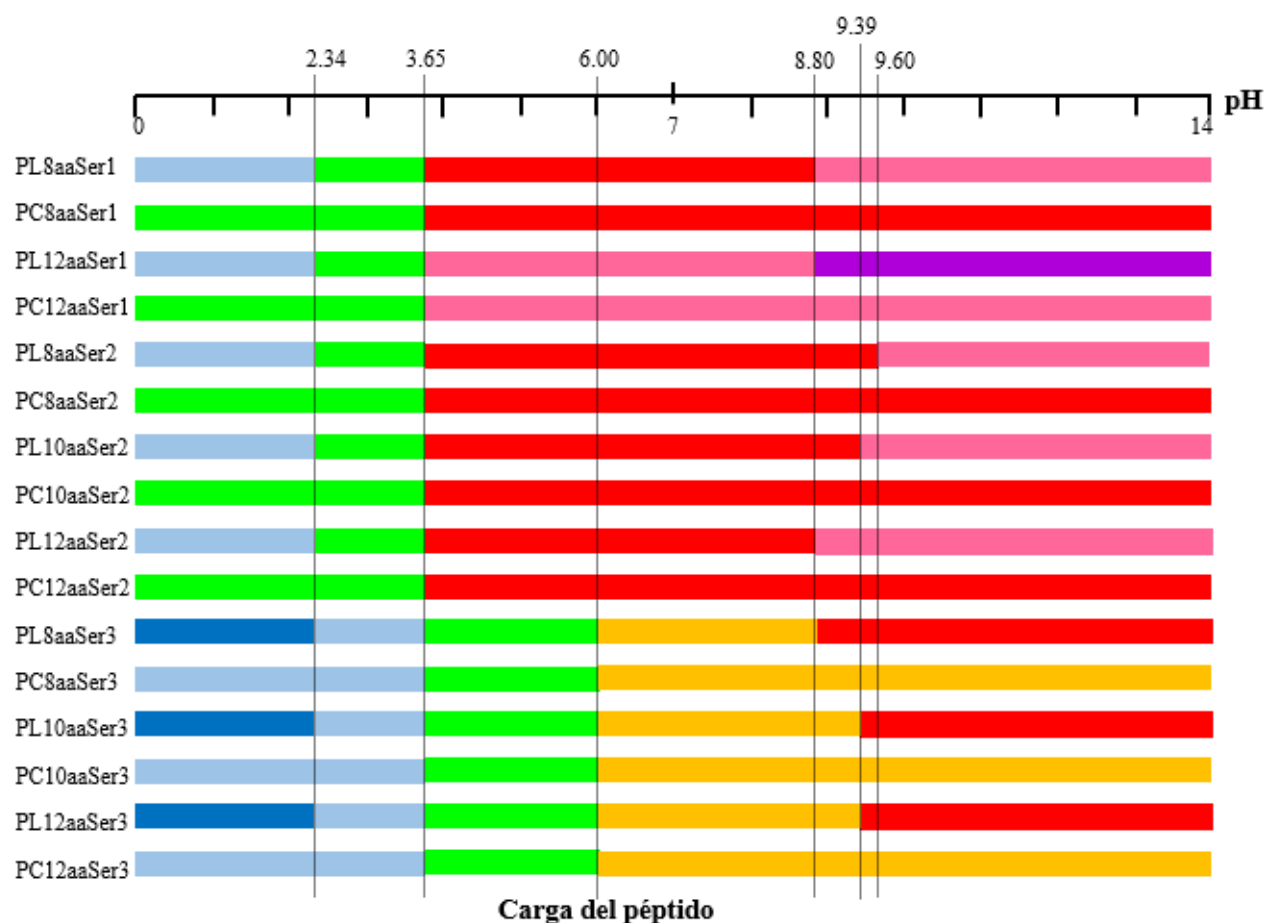


Figura III. 4. Estructuras del a) PC8aaSer3, b) PC10aaSer3, y c) PC12aaSer3. En color se indican los grupos -R de las cadenas laterales de los aa's que los conforman, las cuales confieren propiedades específicas a la superficie externa de cada PC.

En el Figura III. 5 se encuentran esquematizadas en colores las densidades de cargas netas estimadas teóricamente para los diferentes péptidos de la Serie 3 en función del pH.

Los péptidos de esta serie son considerados neutros en forma de polvo sólido y presentan 50, 40 y 42 % de hidrofilia teórica, para 8aaSer3, 10aaSer3 y 12aaSer3, respectivamente. Estos PCs, puesto que son neutros, podrían ser potencialmente solubles en solventes orgánicos, tales como ACN, MeOH e IsoPrOH, pudiendo adicionar agua pura para diluir [179].



Nomenclatura de colores:



Figura III. 5. Diagrama gráfico de la carga teórica neta de los PLs y PCs de las Series 1, 2 y 3 dependiendo del pH del medio de la solución (calculados a partir de los PL en LifeProtein [179]).

El diseño de las diferentes series se hizo con la finalidad de obtener diversas funcionalidades. Como se observó anteriormente los péptidos de la Serie 1 proveen grupos amino y carboxilo, la Serie 2 grupos amino, carboxilo e indol; y la Serie 3 grupos amino, carboxilo, indol e imidazol. En este sentido, la presencia de los grupos aromáticos facilita la detección de los PC de la Serie 2 y 3 en UV-Vis. Además, la longitud de las secuencias peptídicas y la composición aminoacídica proveen a los PCs con α -aminoácidos D, L alternados diferentes diámetros internos, en el intervalo de 7–13 Å, de acuerdo a la literatura [59, 92, 98], así como diferentes propiedades para su futuro uso.

III.1.6 Almacenamiento de los Péptidos

Los péptidos son muy estables a temperatura ambiente si se encuentran liofilizados y en envases sellados. Generalmente, los péptidos en solución se utilizan inmediatamente y suelen guardarse en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero su estabilidad está comprometida si se dejan por largos periodos de tiempo (más de 3 meses [107]) pudiendo degradarse, sobre todo si se encuentran a pH de 5–7. Si se desea mantenerlos almacenados por periodos largos es importante liofilizarlos y conservarlos a temperaturas bajas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pero preferentemente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) con algún desecante en el medio y en recipientes sellados para evitar su degradación por bacterias, oxidación o formación de otras estructuras peptídicas [180]. Bajo estas condiciones es posible conservarlos por 3 meses y hasta por 5 años [107].

Al utilizar un péptido es recomendable permitir que el polvo liofilizado se equilibre con la temperatura ambiente, de preferencia en un desecador. Entonces, puede abrirse el recipiente contenedor del péptido y pesarse. De lo contrario, la apertura prematura del recipiente podría ocasionar que el polvo adsorba agua del medio (algunos péptidos tienden a ser higroscópicos) inmediatamente y afecte no sólo la pesada, sino también la posterior estabilidad del compuesto. Una vez que se ha pesado la cantidad de péptido deseada se recomienda almacenar inmediatamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ el compuesto, sobre todo si el compuesto contiene Cys, Met, Trp, Asn, Gln y/o Glu, ya que tienden a presentar más riesgos de descomposición que otros [180].

III.1.7 Pureza de los Péptidos

La pureza de los péptidos es primordialmente determinada por la técnica de CLAR, aunque también se han usado otras técnicas de caracterización como RMN y EM. Su determinación es de vital importancia, puesto que las posibles impurezas (péptidos más cortos, secuencias modificadas o truncadas, residuos de aa's o péptidos parcialmente desprotegidos) afectan significativamente las propiedades de los posibles ensamblés en forma de NTPs y de sus posteriores supraestructuras.

Las limitantes de usar la técnica cromatográfica para la determinación de la pureza radica en que es imposible observar en la estructura de los péptidos la presencia de agua, puesto que el medio de análisis está compuesto de una porción de fase acuosa y los péptidos pueden ser higroscópicos. Así como, la presencia de sales de trifluoroacetato, debido a la ionización de los péptidos en medio acuoso con TFA. Habitualmente, los procesos de análisis de péptidos por CLAR involucran la presencia de TFA y los grupos de las cadenas laterales de aa's como Arg, Lys e His pueden formar sales tipo trifluoroacetatos, lo que deja pequeñas cantidades de TFA y agua en las estructuras, contaminando los péptidos. En muchos casos el agua permanece aún después de la liofilización, debido a los enlaces no covalentes que la unen al péptido.

Por otro lado, dado que los nanotubos orgánicos como los NTPs se han convertido en interesantes herramientas para una amplia variedad de aplicaciones en diferentes campos como óptica, catálisis, electrónica, tratamientos microbianos, biosensores, biomateriales, fotosistemas artificiales, polímeros supramoleculares fotosensibles, liberación de fármacos, transporte molecular e iónico, y como nanoplataformas para el ensamble de moléculas mucho más grandes, entre otras potenciales aplicaciones. Los NTPs permiten la funcionalización de su superficie, presentan biocompatibilidad y su producción es de bajo costo. Además, los NTPs producen auto-ensambles supramoleculares mediante enlaces reversibles no covalentes.

Como se discutió anteriormente, en el Capítulo I (ver sección I.4.1 sobre Auto-ensamble de Péptidos en forma de NTPs), los NTPs puede producirse de acuerdo a diferentes posibilidades de plegamiento molecular del tipo β . Destacando que, en todos éstos las estructuras

supramoleculares de auto-ensamble están dirigidas, básicamente, por enlaces de puentes de hidrógeno [83, 88, 109], pero ayudadas por otras interacciones débiles, tales como, interacciones de las nubes aromáticas tipo π - π , fuerzas de van der Waals, hidrofobicidad e interacciones electrostáticas [64, 90]. El auto-ensamble por apilamiento esqueleto-esqueleto de los PCs tipo β -plegada, se debe a la interacción por puentes de hidrógeno entre los grupos amida N-H y carboxilo C=O ubicados de forma antiparalela, entre un PC y otro. Estos grupos, se caracterizan por estar localizados en forma perpendicular al plano del anillo. De tal modo, que el arreglo del apilamiento de los PCs uno sobre otro, da lugar a la longitud del NTP, dejando las cadenas laterales de los péptidos proyectados pseudo-ecuatorialmente hacia el exterior de la estructura hueca. Este tipo de apilamiento formado por puentes de hidrógeno en las estructuras cíclicas tipo β -plegada y su termodinámica ha sido bien estudiada previamente [96, 121].

Adicionalmente, recordando que, la principal ventaja de los NTPs formados por PCs es el control del diámetro interno de los NTPs, el cual depende de la longitud de la cadena peptídica. Considerando que, el control de la naturaleza química de la superficie externa depende de la naturaleza aminoacídica de los monómeros cíclicos y de la posible funcionalización de los aminoácidos y/o de sus cadenas laterales [24, 107]. Mientras que, las propiedades de la superficie interna pueden ser controladas a través de la incorporación de aminoácidos modificados con ciclohexanos o anillos aromáticos [83, 87, 100, 109, 110], por ejemplo. Entonces se tiene que, el diseño y control de los monómeros cíclicos permite adaptar la arquitectura supramolecular para aplicaciones nuevas y específicas [109].

El auto-ensamble por apilamiento de PCs se promueve en condiciones acuosas ácidas, mientras que la solubilidad de los PCs se lleva a cabo en medio básico acuoso, debido a repulsiones electrostáticas [92, 120]. Así que, para caracterizar la estructura, la morfología, las dimensiones y las condiciones óptimas para el auto-ensamble de los PCs en NTPs, es importante caracterizar los monómeros cíclicos y sus respectivos ensambles supramoleculares, por ejemplo, por técnicas como SEM, TEM, espectroscopias FT-IR y Raman, difracción de rayos X, etcétera. Sin embargo, considerando que existe una alta necesidad de verificar de la manera más fácil posible, la estructura exacta de los PCs sintetizados para poder sintonizar las dimensiones, propiedades y estabilidad de los NTPs. En este capítulo, se presenta la caracterización de los ocho

nuevos PCs sintetizados en este trabajo de tesis, los cuales son prometedores precursores de nuevos NTPs. La caracterización estructural de estos monómeros cíclicos y de sus posibles ensamblajes se efectuó mediante el desarrollo de una nueva metodología electrocinética basada en electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas utilizando una interface de ionización electrospray. Puesto que la EC es un método de separación poderoso, que ofrece alta resolución, eficiencia y versatilidad, el análisis se adquiere en tiempos cortos y demanda pequeñas cantidades de muestra. La metodología EC-IES-EM permite la determinación de la masa molecular e información estructural, es un método suave que combina la eficiencia, versatilidad, alta resolución y sensibilidad de ambas técnicas.

III.2 Metodología Experimental

En las siguientes páginas se describe como se determinaron las condiciones y el medio óptimo para solubilizar los PCs sintetizados. Seguida de la caracterización, por el acoplamiento EC-IES-EM optimizado, en términos de perfiles electroforéticos y la adquisición de los espectros de masas de las secuencias peptídicas para verificar la pureza, la estructura, la composición y las masas moleculares de los compuestos. Asimismo, se provee un método sencillo, rápido y de bajo consumo de muestra para el estudio del envejecimiento de los PCs almacenados por tiempo prolongado en solución. Mediante la metodología desarrollada de EC-IES-EM, fue posible estudiar y determinar la formación de posibles ensamblajes a partir de PCs. Adicionalmente, se desarrolló y optimizó una metodología electrocinética basada en ECZ-UV para el estudio de las propiedades fisicoquímicas de los PCs en diferentes ambientes, variando las condiciones de análisis, tales como el pH del medio y el pH del solvente, entre otros.

III.2.1 Productos Químicos y Reactivos

Para los estudios de solubilidad y por EC-IES-EM se requirieron los siguientes productos químicos y reactivos: NH_4HCO_3 (pureza $\geq 99.5\%$) fue comprado de Fluka (Francia), $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (con $\geq 30.0\%$ de NH_3), AcOH ($\geq 99.7\%$) y DMF fueron comprados de Sigma-Aldrich (Francia). TFA (100 %) fue obtenido de J.T. Baker (USA), ACN ($\geq 99.9\%$) fue conseguido de Fisher scientific (USA). D (+) –Glucosa (R. P. Normapure), EtOH (grado HPLC, $\geq 99.9\%$) e IsoPrOH

(grado HPLC, $\geq 99.9\%$) fueron adquiridos de Carlo Erba (Francia). Las soluciones de NaOH ($\geq 99.9\%$) 1.0 y 0.1 M fueron compradas de VWR (Francia). Todos los tampones fueron preparados frescos usando agua MilliQ desionizada (18.2 M Ω .cm) de un Sistema Purelab flex de ELGA Labwater (Veolia water, Francia).

Para los estudios de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos se prepararon tampones frescos, usando los mismos carbonatos de los estudios de pureza y solubilidad, con agua MilliQ desionizada (18.2 M Ω .cm) de un Sistema Purelab flex de ELGA Labwater (Veolia water, Francia). Adicionalmente, se requirieron NH₄COOH ($\geq 97.0\%$), HCOOH (grado LC-MS, $\geq 98.0\%$) obtenidos de Fluka (Alemania), NH₄OH (con 28.0–30.0 % de NH₃) y DMF comprados de Sigma-Aldrich (Francia) y EtOH (grado HPLC, $\geq 99.9\%$) obtenido de Carlo Erba (Francia).

III.2.2 Equipos y Métodos

III.2.2.1 Ensayos de Solubilidad de los PCs

Para los ensayos de solubilidad se utilizó un Vórtex IKA-Vibro-Fix (hand permanent, Alemania) y un sonicador Bioblock Scientific de Geprüfte Sicherheit (Alemania) para homogeneizar y acelerar el proceso de solubilización de los compuestos.

Basado en composición estructural, la solubilidad teórica y las propiedades ácido-base de los PCs en función del pH, se realizaron diferentes pruebas de solubilidad en medio acuoso. Considerando que a un pH básico (≥ 6.0), según el Figura III. 5, los PCs adquieren carga teórica negativa, la cual les permitiría disolverse en medio acuoso. Para ello se prepararon tampones de carbonatos de amonio ((NH₄)₂CO₃/NH₄HCO₃) a pH 8.0 con diferentes fuerzas iónicas (0.1, 1.0, 10.0, 20.0, 30.0, 50.0 mM) y se probaron, adicionando pequeñas cantidades de EtOH o IsoPrOH hasta disolver completamente. Entonces se adicionó más tampón para diluir hasta la concentración deseada.

Una vez conocidas las condiciones óptimas de solubilidad, se preparó un lote de soluciones de PCs a dos concentraciones diferentes (150 μ M y 2 mM) y se adicionó a cada una 1-2 μ L de

HCOOH concentrado para cambiar las condiciones del medio e impulsar el auto-ensamble de los PCs por puentes de hidrógeno.

III.2.2.2 Mediciones en EC-UV

Estudios de Pureza: las separaciones electroforéticas fueron realizadas en un sistema de Electroforesis Capilar modelo 7100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) equipado con un detector UV-DAD. Capilares de sílice fundida con $d_{in} = 50$ y $75 \mu\text{m}$ ($d_{ex} = 380 \mu\text{m}$) x 80 cm de longitud (longitud de detección UV de 22 cm desde la entrada del capilar) de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA) fueron usados después de ser activados mediante el flujo sucesivo (935 mbar) con soluciones de NaOH 1.0 M y 0.1 M NaOH, H₂O MilliQ y *BGE* durante 15 minutos cada uno. La inyección hidrodinámica sucesiva de las zonas de análisis se realizaron aplicando una presión de 30 mbar en la entrada del capilar en el siguiente orden: MN-*BGE*-Muestra-*BGE*, 6, 15, 12 y 6 s, respectivamente. El voltaje aplicado fue de 20 kV con polaridad positiva a la entrada del capilar y usando una presión de 50 mbar durante el análisis de separación. La temperatura del cartucho del capilar se mantuvo a 25 °C. La detección UV fue a una longitud de onda de 200 y 214 nm.

Después de la optimización, el *BGE* fue compuesto de una mezcla 50/50 (v/v) de carbonatos de amonio con f.i. 10 mM (pH 8.0)/EtOH (denotado como *BGE*_{10, 8}). Los diferentes PCs se disolvieron a una concentración de 2 y 3 mM en una mezcla 50/50 a 95/5 (v/v) de carbonatos de amonio con f.i. 1 mM (pH 8.0)/EtOH, dependiendo de la solubilidad del PC. El MN fue una mezcla de 0.002 % de DMF y de 0.5 mM de D-(+)-Glucosa en *BGE*_{10, 8}, de manera que sea compatible con la detección UV y EM, respectivamente. Después de cada separación los capilares fueron lavados con *BGE*_{10, 8} durante 3 min.

Estudios de las Propiedades Físicoquímicas: las separaciones electroforéticas se efectuaron en el mismo equipo de EC anterior, utilizando capilares de sílice fundida con $d_{in} = 75 \mu\text{m}$ ($d_{ex} = 380 \mu\text{m}$) x 35 cm de longitud (longitud de detección UV de 26.5 cm desde la entrada del capilar) de Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). Estos capilares fueron activados antes de ser usados haciendo pasar el flujo de NaOH 1.0 M y 0.1 M NaOH, H₂O MilliQ y *BGE* durante 15

minutos cada uno a una presión de 935 mbar. La inyección sucesiva e hidrodinámica de las zonas de análisis se realizó aplicando una presión de 30 mbar en la entrada del capilar en el siguiente orden: MN-*BGE*-Muestra-*BGE*, 1.6, 3, 3, y 3 s, respectivamente (las muestras diluidas en medio ácido fueron inyectadas en el siguiente orden: Muestra-*BGE*-MN-*BGE*, 3, 15, 1.6, 3 s, respectivamente). El análisis se efectuó aplicando un voltaje de 20 ó 18 kV en polaridad positiva a la entrada del capilar y usando una presión de 50 mbar durante la separación. La temperatura del cartucho del capilar se mantuvo a 25 °C y la detección UV se hizo a una longitud de onda de 200 y 214 nm. Después de cada separación los capilares fueron lavados con *BGE* durante 3 min.

En estos análisis se usaron dos *BGE* diferentes, el primero fue el *BGE*_{10,8}, antes descrito y el segundo compuesto de una mezcla 50/50 (v/v) de formiatos de amonio con f.i. 10 mM (pH 3.0)/EtOH (denotado como *BGE*_{10,3}). En ambos casos el MN fue una mezcla de 0.002 % de DMF en *BGE*_{10,8}, o en *BGE*_{10,3}. Entonces, para el análisis de las muestras, fueron preparados 4 lotes diferentes de soluciones de PCs, trabajando con dos concentraciones distintas. Los lotes se prepararon disolviendo los PCs a una concentración de 150 µM (2 lotes) y 2 mM (2 lotes) con una mezcla 50/50 a 95/5 (v/v) de carbonatos de amonio con f.i. 0.1 mM (pH 8.0)/EtOH (denotado como *BGE*_{0.1,8}, adicionando hasta 1 µL de NH₄OH para obtener un pH 9.0 en la solución), según la solubilidad del PC. De estas soluciones se tomó un lote de 150 µM y un lote 2 mM, a los cuales se adicionó de 1-2 µL de HCOOH concentrado hasta obtener un pH 2.0–3.0.

Estudios de los Posibles Ensamblajes de los PCs: las separaciones electroforéticas se realizaron utilizando el mismo equipo de EC, los capilares y las condiciones de análisis para EC-IES-EM descritos en la sección de estudios de pureza de este capítulo y las soluciones 2 mM preparadas con *BGE*_{0.1,8} a las cuales se adicionó HCOOH concentrado, trabajando en *BGE*_{10,3}, aplicando un voltaje de 18 kV en modo de polaridad positiva.

En todos los casos, para almacenar los capilares de sílice fundida usados fueron lavados con fueron *BGE*_{10,8}, o *BGE*_{10,3}, H₂O MilliQ desionizada y se secaron con aire.

III.2.2.3 Mediciones en EC-IES-EM

Para la determinación de la pureza y los posibles ensambles de los PCs se utilizó un espectrómetro de masas Agilent Series 1100 MSD de un cuadrupolo (Agilent Technologies, Alemania) equipado con una fuente ortogonal de electroespray, IES, utilizada en modo de ionización positiva. Utilizando nitrógeno gaseoso como GN y como GS. En las condiciones optimizadas la temperatura del GN y del GS se fijaron a 100 °C (presión de 10 psi \equiv 69 kPa) y 250 °C (flujo de 6 L \cdot min⁻¹), respectivamente. Los voltajes optimizados del spray y el skimmer fueron 3000 V y 70 V, correspondientemente. La EC fue acoplada con una interface de IES usando un tubo nebulizador con arreglo coaxial triple de Agilent Technologies con conexión a tierra. El *SL* coaxial optimizado, se compuso de una mezcla de EtOH /H₂O_{MQ} (90:10, v/v) conteniendo como modificador 2 % de AcOH, que fue lanzado a una velocidad de flujo de 6 μ L \cdot min⁻¹ mediante una bomba isocrática HPLC 1100 Series (Agilent Technologies) equipada con un divisor de spray (1:100). En la interfase, la punta del capilar de separación se mantuvo a una distancia de 0.1–0.2 mm fuera de la aguja de acero del *SL* para alcanzar el máximo de sensibilidad, como se ha reportado previamente en el equipo de trabajo [3, 4] y por Cole et al. [164].

La primera adquisición de las señales se realizó en modo SCAN ($m/z = 100\text{--}400$ y $m/z = 400\text{--}3000$) y registrando la abundancia de las señales de la corriente de los iones extraídos (*EIC*, por sus siglas en inglés), entonces el espectro de masas se extrajo de cada pico para la identificación de las señales. La segunda adquisición de las señales fue realizada en el modo de monitoreo de un sólo ión (*SIM*, por sus siglas en inglés) para cada valor de m/z identificado y característico de cada compuesto. Los experimentos se llevaron a cabo cuatro veces. Los datos numéricos se procesaron usando el software OriginPro 9.5 (Origin Lab Corporation). Los patrones isotópicos de los datos de EM de los iones moleculares y de los aductos se obtuvieron usando el software DataAnalysis Version 4.1 (Bruker Daltonics Inc. and Affiliates). Las desviaciones estándar de las repeticiones se calcularon y en las figuras de resultados se muestran las barras correspondientes a \pm una desviación estándar.

III.3 Resultados y Discusión

III.3.1 Solubilidad de los PCs Nuevos

En la Tabla III. 4 se muestran los resultados de solubilidad de los PCs en *BGE* de carbonatos de amonio (pH 8.0), mezclado con solvente orgánico (IsoPrOH o EtOH) e indicando la carga teórica que presentarían los compuestos en dichas condiciones. En general, se observa que la diferencia entre las proporciones de la mezcla de carbonatos de amonio (f.i. 50 mM, pH 8.0) e IsoPrOH y la mezcla con EtOH no difieren mucho. Además, considerando que en la composición del *SL* es una mezcla de H₂O_{MQ}/EtOH, es preferible usar, en primera instancia una mezcla de solventes similar para reducir las variables experimentales.

Tabla III. 4. Composición de los *BGE* (pH 8.0) en los cuales se solubilizan los PCs.

PC	Mezcla carbonatos de amonio*/IsoPrOH	Mezcla carbonatos de amonio*/EtOH	Carga Teórica a pH 8.0
PC8aaSer1	52/49	45/55	-2
PC12aaSer1	95/5	92/8	-3
PC8aaSer2	43/57	50/50	-2
PC10aaSer2	70/30	71/29	-2
PC12aaSer2	37/63	55/45	-2
PC8aaSer3	47/53	62/38	-1
PC10aaSer3	40/60	57/43	-1
PC12aaSer3	---**	---**	-1

* *BGE* de carbonatos de amonio [NH₄HCO₃, (NH₄)₂CO₃], fuerza iónica 50 mM, pH 8.0, conductividad = 4.83 mS/cm.

** El ensayo no se hizo debido a la poca cantidad disponible de sólido purificado.

De todos los PCs, se tomó el PC10aaSer3 para realizar las pruebas de solubilidad a diferentes fuerzas iónicas, puesto que la disponibilidad del compuesto lo permitió. En la Tabla III. 5 se presentan los resultados de solubilidad. Observando que la proporción de *BGE* aumenta

gradualmente de 47 hasta 67 %, al aumentar la fuerza iónica del solvente, puesto que el péptido es teóricamente 40 % hidrofílico.

Para determinar la fuerza iónica adecuada del disolvente del PC, se optimizaron las condiciones de análisis por EC para el PC10aaSer3 (resultados no mostrados en este texto), observando que la resolución y detección (picos bien definidos) del PC son satisfactorias si éste se encuentra disuelto en un tampón de carbonatos de amonio con f.i. 1 mM (pH 8.0)/EtOH (denotado como $BGE_{1,8}$), 50/50 (v/v) y utilizando como electrolito de análisis el $BGE_{10,8}$ (50/50, v/v). Este resultado, es congruente con la teórica, puesto que la muestra se preconcentra al haber una diferencia de fuerza iónica 1:10 entre el disolvente y el electrolito de análisis. Estas condiciones, fueron extrapoladas para el resto de los compuestos.

Tabla III. 5. Solubilidad del PC10aaSer3 con diferentes fuerzas iónicas.

PC	Fuerza Iónica BGE	Mezcla carbonatos de amonio*/EtOH	Carga Teórica a pH 8.0
PC10aaSer3	0.1 mM	47/53	-1
PC10aaSer3	1.0 mM	50/50	-1
PC10aaSer3	10.0 mM	56/44	-1
PC10aaSer3	20.0 mM	58/42	-1
PC10aaSer3	30.0 mM	67/33	-1

BGE de carbonatos de amonio [NH_4HCO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$], pH 8.0, conductividad = 4.83 mS/cm.

Los compuestos de la Serie 3 y la Serie 2 se disolvieron en $BGE_{1,8}$, 50/50 (v/v). El PC12aaSer1 se disolvió en una mezcla 95/5 (v/v) de carbonatos de amonio 1 mM (pH 8.0)/EtOH, mientras que el PC10aaSer2 se disolvió en una mezcla 70/30 (v/v) de carbonatos de amonio 1.0 mM (pH 8.0)/EtOH. Posteriormente, estas mismas proporciones de solventes se optimizaron (resultados no mostrados en este texto) para los estudios de las propiedades fisicoquímicas de los péptidos por ECZ-UV, disolviendo los PCs en un tampón de carbonatos de amonio 0.1 mM (pH 8.0)/EtOH (denotado como $BGE_{0.1,8}$)

III.3.2 Determinación de la Pureza de los PCs por EC-IES-EM

Las separaciones electroforéticas fueron optimizadas primero (resultados no mostrados en este texto). Así, los diferentes PCs cargados negativamente (ver Tabla III. 4) fueron analizados en medio básico en *BGE*_{10,8} (50/50, v/v), permitiendo la separación en modo de polaridad positiva en pocos minutos (valor de la $\mu_{\text{EOF}} = 3.81 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). En este sentido, debido a la carga negativa de los compuestos, no se observó adsorción de los PCs en las paredes del capilar de sílice fundida activa. Del mismo modo, la interfase IES se optimizó para alcanzar el mejor rendimiento de ionización-desorción (resultados no mostrados en este texto), el cual fue obtenido con un *SL* compuesto por una mezcla 10/90 (v/v) de H₂O_{MQ}/EtOH con 2 % de AcOH. La adquisición de los espectros de masas se realizaron en modo SCAN y SIM con polaridad positiva [181]. Primero en modo SCAN para obtener el análisis cuantitativo dentro de un intervalo amplio de *m/z*, aunque con sensibilidad limitada, pudiendo detectar varios iones en una misma corrida, de tal modo que se identifiquen los componentes químicos presentes en la muestra, a través de sus iones. De esta forma, una vez determinado el ion o iones de estudio, se realizó el análisis cuantitativo de los iones seleccionados, pudiendo mejorar la sensibilidad en 10 a 100 veces, aunque con una reducción en los límites de detección.

La μ_{EP} de cada PC fue calculada considerando los tiempos de migración y las longitudes de detección corregidas, como se ha reportado previamente en el grupo de trabajo [182]. Los resultados se muestran en la Tabla III. 6, observando que para los PCs con el mismo número de aminoácidos, la μ_{EP} al parecer decrece de la Serie 1 a la Serie 3, lo cual está totalmente en concordancia con las diferencias de carga y masas. Dentro de la Serie 1, se tiene un incremento teórico de carga (de -2 a -3, PC8aaSer1 y PC12aaSer1, respectivamente) y un incremento de masas teórica ocurre cuando se aumenta la longitud de la cadena del péptido de 8aa a 12 aa. Consultando en la Tabla III. 6 al parecer la diferencia de carga entre estos dos compuestos tiene mayor impacto en la μ_{EP} que la diferencia de su masa. Por otro lado, la carga teórica de los compuestos de la Serie 3 permanece constante, por consecuente, la μ_{EP} disminuye lógicamente cuando la cadena peptídica del PC incrementa. Finalmente, una evolución bastante inesperada ocurre en los compuestos de la Serie2, para los cuales la carga global teórica debería ser la misma (-2), en los cuales la μ_{EP} incrementa conforme aumenta la longitud de la cadena peptídica del PC.

Una posible hipótesis para una evolución de este tipo podría ser la diferencia de configuración entre las secuencias peptídicas que llevan a radios hidrodinámicos inesperados de las secuencias.

Tabla III. 6. Movilidades electroforéticas de los 8 PCs sintetizados obtenidas de las separaciones de EC-IES-EM (Condiciones experimentales ver sección III.3.3 Equipos y Métodos).

PCs	8 aa	10 aa	12 aa
	μ_{EP} (10^{-5} cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	μ_{EP} (10^{-5} cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	μ_{EP} (10^{-5} cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)
Serie 1	-9.78 ± 0.13	--	-10.93 ± 0.34
Serie 2	-4.49 ± 0.06	-9.56 ± 0.16	-10.61 ± 0.23
Serie 3	-4.40 ± 0.37	-3.69 ± 0.31	-2.86 ± 0.35

Para cada PC, el espectro de masas permitió identificar los valores de m/z correspondientes al ion molecular $[M+H]^+$ (iones de carga simple) y algunos iones de carga doble como el $[M+2H]^{2+}$. Además, fueron identificados valores m/z correspondientes a aductos en algunos casos como: $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+H+Na]^{2+}$, $[M+H+NH_4]^{2+}$, $[M+Na+NH_4]^{2+}$, $[M+2Na]^{2+}$ and $[M+2Na-H]^+$. Todos estos valores de m/z fueron comparados con los datos obtenidos del software DataAnalysis Version 4.1, en términos de los isótopos y sus respectivas intensidades. En que los isótopos se deben básicamente a las abundancias relativas de los diferentes átomos presentes y la combinación de éstos, siendo los principales isótopos el C¹³ y el O¹⁸, que dan lugar a varias combinaciones (C¹³, C¹³-C¹³, C¹³-C¹³-C¹³, C¹³-C¹³-O¹⁸,..., etcétera.).

En la Figura III. 6 se presentan los electroferogramas MSD TIC (Detección de EM en Corriente Total Iónica) en modo SCAN y modo SIM con sus respectivos espectros de masas para el PC8aaSer3 (Figura III. 6 a y d), el PC10aaSer3 (Figura III. 6 b y e) y el PC12aaSer3 (Figura III. 6 c y f). En todos los casos, los electroferogramas presentan un sólo pico, el cual corresponde a la relación m/z esperada, como se demuestra en el modo SIM. Además, el espectro de masas pone en evidencia la ausencia del correspondiente PL, del péptido protegido o parcialmente protegido, y del ensamble o agregación del péptido, en las condiciones de análisis (el auto-ensamble se promueve en medio ácido). Estos resultados prueban el éxito de la síntesis y la pureza de las muestras. En la Figura III. 6 es normal observar en el modo de adquisición SIM un

decremento de los límites de detección en uno o dos órdenes de magnitud, puesto que al ganar sensibilidad se pierde resolución.

Los espectros de masas presentan los valores m/z correspondientes a los PCs protonados con carga simple y doble y sus respectivos aductos formados con sodio y amonio. En la Tabla III. 7 y en la Tabla III. 8 se resumen los valores de las relaciones m/z obtenidos (con la sensibilidad de estas condiciones experimentales) para todos los PCs de las tres Series, con los iones de una sola carga y de dos cargas, respectivamente. Como un ejemplo, se tiene el espectro de masas del PC8aaSer3, el cual presenta un pico principal a una relación $m/z = 765.3$ (isótopos a $m/z = 766.3$ y 767.3), el aducto de sodio a una $m/z = 787.3$ (isótopos a $m/z = 788.3$ y 789.3), y los picos pertenecientes a los iones de doble carga $[M+2H]^{2+}$, $[M+H+NH_4]^{2+}$ y $[M+H+Na]^{2+}$, a las relaciones $m/z = 383.2$, 391.8 y 394.1 , respectivamente. Del mismo modo, se tienen los iones de carga simple y doble del PC10aaSer3, el cual presenta un pico principal con una relación $m/z = 1022.4$ (isótopos a $m/z = 1023.4$ y 1024.5), el aducto de sodio $[M+Na]^+$ con $m/z = 1044.4$ (isótopos a $m/z = 1045.4$ y 1046.4), y los picos correspondientes a los iones de doble carga $[M+2H]^{2+}$, $[M+H+NH_4]^{2+}$, $[M+H+Na]^{2+}$ y $[M+2Na-H]^{2+}$ con las relaciones $m/z = 511.8$, 520.3 , 522.8 y 1066.4 (isótopo a una $m/z = 1067.4$), respectivamente.

Para cada pico, los valores experimentales y teóricos están indicados en términos del valor de la relación m/z y de intensidad. Considerando los valores m/z , la diferencia entre los valores experimentales y teóricos es menor que 0.1. La diferencia (en %) de la intensidad para los isótopos está entre 0.5 % y 10.9 %, cuando son comparados con los valores generados por el software Data Analysis versión 4.1.

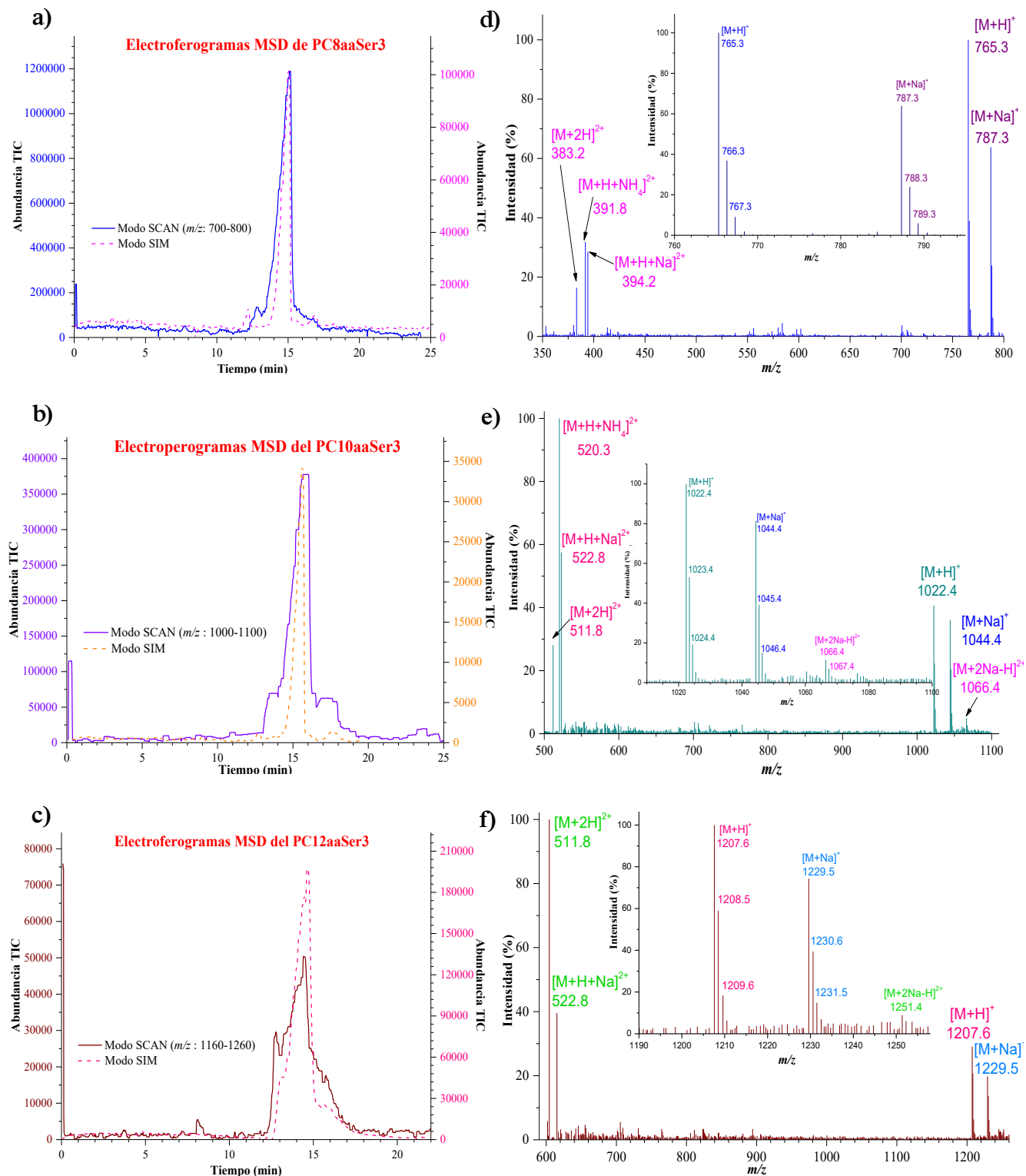


Figura III. 6. Electroferogramas MSD (Detección de EM, por sus siglas en inglés) de la EC-IES-EM en modo SCAN y SIM para la Serie 3 (a-c) y su correspondiente Espectro de Masas (d-f) de los PCs de 8, 10 y 12 aa. Los insertos en las figuras (D-F) corresponden a los Espectros de Masas Isotópicos de los iones de masa molecular de carga simple (Condiciones experimentales ver sección III.3.3 Equipos y Métodos).

Tabla III. 7. Masa teórica (Teo.) y experimental (Exp.), y la intensidad relativa de los PCs y sus isótopos, correspondientes a la forma protonada y sus formas de aductos con una carga global, de los estudios de EC-IES-EM*.

PC	[M+H] ⁺				[M+NH ₄] ⁺				[M+Na] ⁺				[M+2Na-H] ⁺			
	m/z		Intensidad (%)		m/z		Intensidad (%)		m/z		Intensidad (%)		m/z		Intensidad (%)	
	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.
8aaSer1	743.3	743.3	100.0	100.0	760.3	760.3	100.0	100.0	765.3	765.3	100.0	100.0	787.3	787.3	100.0	100.0
	744.3	744.3	27.0	35.0	761.3	761.3	38.2	35.4	766.3	766.3	32.8	35.0	788.3	788.3	34.0	34.9
	--	--	--	--	762.3	762.3	16.9	9.0	767.3	767.3	9.3	8.8	789.3	789.3	8.8	8.8
12aaSer1	1114.4	1114.4	100.0	100.0	1131.4	1131.5	100.0	100.0	1136.3	1136.4	100.0	100.0	--	--	--	--
	1115.4	1115.4	50.7	52.0	1132.4	1132.5	47.2	52.8	1137.3	1137.4	62.0	52.0	--	--	--	--
	--	--	--	--	1133.4	1134.5	22.6	18.0	1138.3	1138.4	22.0	17.8	--	--	--	--
8aaSer2	814.3	814.4	100.0	100.0	831.4	831.4	100.0	100.0	836.3	836.3	100.0	100.0	858.3	858.3	100.0	100.0
	815.3	815.4	53.8	42.9	832.3	832.4	46.7	43.3	837.3	837.3	40.4	42.9	859.3	859.3	50.0	42.9
	816.3	816.4	15.4	11.4	833.3	833.4	15.0	11.6	838.4	838.3	10.6	11.4	--	--	--	--
10aaSer2	1000.5	1000.4	100.0	100.0	1017.5	1017.4	100.0	100.0	1022.5	1022.4	100.0	100.0	--	--	--	--
	1001.5	1001.4	52.2	51.5	1018.5	1018.4	52.4	51.8	1023.5	1023.4	57.8	51.4	--	--	--	--
	1002.5	1002.4	17.4	16.3	1019.5	1019.4	20.0	16.5	1024.5	1024.4	18.7	16.3	--	--	--	--
	--	--	--	--	1020.5	1020.5	4.8	3.9	1025.5	1025.4	4.7	3.8	--	--	--	--
12aaSer2	1185.4	1185.5	100.0	100.0	1202.5	1202.5	100.0	100.0	1207.5	1207.5	100.0	100.0	--	--	--	--
	1186.5	1186.5	60.6	60.4	1203.5	1203.5	55.4	60.8	1208.4	1208.5	53.1	60.4	--	--	--	--
	1187.5	1187.5	22.5	21.8	1204.5	1204.5	18.6	22.1	1209.4	1209.5	15.6	21.8	--	--	--	--
8aaSer3	765.3	765.3	100.0	100.0	--	--	--	--	787.3	787.3	100.0	100.0	--	--	--	--
	766.3	766.3	36.7	37.8	--	--	--	--	788.3	788.3	36.8	37.8	--	--	--	--
	767.3	767.3	8.9	9.4	--	--	--	--	789.3	789.3	8.8	9.4	--	--	--	--
10aaSer3	1022.4	1022.4	100.0	100.0	--	--	--	--	1044.4	1044.4	100.0	100.0	1066.4	1066.4	100.0	100.0
	1023.4	1023.4	53.3	54.3	--	--	--	--	1045.4	1045.4	49.3	54.3	1067.4	1067.4	60.0	54.3
	1024.4	1024.4	18.9	17.4	--	--	--	--	1046.4	1046.4	17.8	17.3	--	--	--	--
12aaSer3	1207.6	1207.5	100.0	100.0	--	--	--	--	1229.5	1229.5	100.0	100.0	1251.4	1251.5	100.0	100.0
	1208.5	1208.5	63.0	63.2	--	--	--	--	1230.6	1230.5	52.3	63.2	--	--	--	--
	1209.6	1209.5	19.6	23.2	--	--	--	--	1231.5	1231.5	16.9	23.1	--	--	--	--

* En todos los casos el doble guion (--) significa que el valor de la relación m/z no fue observado experimentalmente con una intensidad significativa en MSD.

Tabla III. 8. Masa teórica (Teo.) y experimental (Exp.), y la intensidad relativa de los PCs y sus isótopos, correspondientes a la forma protonada y sus formas de aductos con dos cargas globales, de los estudios de EC-IES-EM*.

PC	$[M+2H]^{2+}$				$[M+H+NH_4]^{2+}$				$[M+H+Na]^{2+}$				$[M+2Na]^{2+}$			
	Isótopos		Intensidad (%)		Isótopos		Intensidad (%)		Isótopos		Intensidad (%)		Isótopos		Intensidad (%)	
	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.
8aaSer1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
12aSer1	--	--	--	--	566.6	566.7	100.0	100.0	--	--	--	--	579.7	579.7	100.0	100.0
8aaSer2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
10aaSer2	--	--	--	--	509.2	509.2	100.0	100.0	511.8	511.7	100.0	100.0	522.6	522.7	100.0	100.0
12aaSer2	--	--	--	--	--	--	--	--	604.7	604.7	100.0	100.0	615.2	615.2	100.0	100.0
8aaSer3	383.2	383.2	100.0	100.0	391.8	391.7	100.0	100.0	394.1	394.2	100.0	100.0	--	--	--	--
10aaSer3	511.8	511.7	100.0	100.0	520.3	520.2	100.0	100.0	522.8	522.7	100.0	100.0	--	--	--	--
12aaSer3	604.3	604.3	100.0	100.0	--	--	--	--	615.3	615.8	100.0	100.0	--	--	--	--

* En todos los casos el doble guion (--) significa que el valor de la relación m/z no fue observado experimentalmente con una intensidad significativa en MSD.

Al comparar las tres Series de compuestos, éstos pudieron ser diferenciados por la ausencia o presencia de algunos iones de carga simple o doble ($[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$, $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+H+Na]^{2+}$, $[M+H+NH_4]^{2+}$, $[M+Na+NH_4]^{2+}$, $[M+2Na]^{2+}$ y $[M+2Na-H]^+$). En cuanto a la Serie 1, el péptido de 8aa de longitud presenta sólo 4 iones de carga simple. Mientras que, el péptido de 12 aa presenta 3 iones de carga simple ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ y $[M+NH_4]^+$) y dos iones de carga doble ($[M+H+NH_4]^{2+}$ y $[M+2Na]^{2+}$). Esto podría ser explicado por la mayor cantidad de sitios de protonación del compuesto de 12aaSer1 que los del compuesto de 8aaSer1. Respecto a la Serie 2, el ion $[M+2Na-H]^+$ no figura en los compuestos de 10 y 12 aa de longitud, mientras que los iones de doble carga $[M+H+Na]^{2+}$, $[M+H+NH_4]^{2+}$ y $[M+2Na]^{2+}$ no aparecen para el compuesto de 8aa de longitud, tal vez debido a la disponibilidad de los iones Na^+ y NH_4^+ en la muestra y debido al impedimento estérico. Por otro lado, los compuestos de la Serie 3 fueron los únicos que presentaron valores de m/z correspondientes al ion $[M+2H]^{2+}$. Empero, esta Serie 3 no presenta valores de m/z propios de los iones $[M+NH_4]^+$ y $[M+2Na]^{2+}$, y en el caso del ion $[M+2Na-H]^+$ sólo para el PC8aaSer3.

III.3.3 Estabilidad de los PCs en el Tiempo

Gracias al desarrollo de la metodología de EC–IES–EM, el envejecimiento de los PCs sintetizados pudo ser estudiado. Todas las Series en forma de polvo sólido (liofilizado) fueron almacenadas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ y las muestras disueltas en *BGE* (pH 8.0) fueron guardadas a $0\text{--}4\text{ }^\circ\text{C}$. En ambos casos los compuestos fueron constantemente congelados y descongelados para su análisis. De estos estudios se desprende que los PCs presentan una muy ligera degradación, cuando son almacenados por un tiempo prolongado (7 meses) en solución a una temperatura de $0\text{--}4\text{ }^\circ\text{C}$, de alrededor de 2 %. Dicho hallazgo es congruente con lo reportado en la literatura, en que las degradaciones son posibles a partir de 3 meses de almacenamiento en solución [107].

Esta degradación corresponde a la deciclización de los PCs, dejando los correspondientes PLs. En la Figura III. 7 se presenta el envejecimiento del péptido 10aaSer3, para el cual aparece un pico electroforético adicional a un tiempo de migración ligeramente mayor (correspondiente a la movilidad electroforética del PL, $\mu_{EP} = -6.2218 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), presentando el espectro de masas del correspondiente PL en el inserto de la Figura III. 7. El espectro de masas del pico

adicional posee un pico principal a una relación $m/z = 1040.4$ (con isótopo $m/z = 1041.4$) correspondiente al ion de carga simple $[M+H]^+$, y un aducto de sodio $[M+Na]^+$ a 1062.5 (con isótopo $m/z = 1063.5$). Por lo que, el acoplamiento de EC–IES–EM demuestra ser una metodología sencilla y rápida para el análisis de envejecimiento de los PCs en solución.

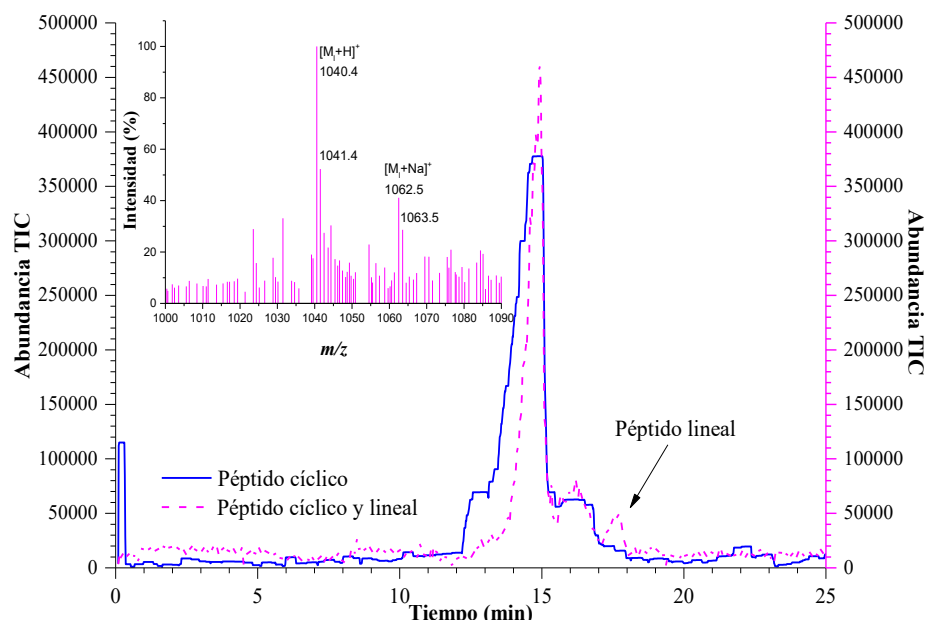


Figura III. 7. Electroferogramas MSD de la EC-IES-EM en modo SCAN para el PC10aaSer3, tanto en solución fresca como almacenada durante 7 meses (0-4 °C) en $BGE_{10,8}$ (Condiciones experimentales ver sección III.3.3 Equipos y Métodos). El inserto corresponde al Espectro de Masas del modo SCAN de la solución envejecida.

III.3.4 Propiedades Físicoquímicas de los PCs por ECZ-UV

Los estudios electroforéticos de los PCs se optimizaron (resultados no mostrados en este texto), encontrando que las condiciones idóneas de separación son con una mezcla 50/50 (v/v) de $BGE_{10,8}$, disolviendo el MN en el mismo BGE y disolviendo las muestras en una matriz de $BGE_{0.1,8}$, 50/50 (v/v) (adicionando hasta 1 μ L de NH_4OH para obtener un pH 9.0 en la solución para disolver el PC y obtenerlo ionizado con carga negativa, de acuerdo a la Figura III. 5, donde se muestra la carga teórica en función del pH del medio), en modo de polaridad positiva aplicando un voltaje de 20 kV, pudiendo efectuar las separaciones en menos de 10 min. Usando estas condiciones experimentales se modificaron otros parámetros para determinar el

comportamiento electroforético de las muestras bajo diferentes ambientes como el pH del *BGE* (pH 8.0 ó 3.0, puesto que a pH entre 8.0 y 9.0 el PC se encuentra idealmente cargado netativamente y a $\text{pH} \leq 3.0$ el compuesto se encuentra teóricamente con carga neutra (Serie 1 y 2) o carga positiva (Serie 3)), el pH de la solución matriz del PC (pH 9.0 ó 2.0; para cambiar el pH de las muestras a 2.0 se adicionaron de 1-2 μL de HCOOH concentrado) y la concentración de la solución (150 μM y 2 mM). Debido a la carga negativa, neutra o positiva de los compuestos, no se observó adsorción de los PCs en las paredes del capilar de sílice fundida activa.

Comportamiento Electroforético a Diferente pH (solución matriz y *BGE*)

Las separaciones electroforéticas fueron optimizadas (resultados no mostrados en este texto) para el realizar la caracterización de los PCs variando el pH de la solución del compuesto y luego del *BGE* de análisis, permitiendo la separación en modo de polaridad positiva en pocos minutos (valor de la $\mu_{\text{EOF}} = 2.94 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$). Para observar claramente el comportamiento electroforético de los PCs a diferentes valores de pH (*BGE* y solución del PC) se realizó un análisis comparativo de las movilidades electroforéticas, cuyos valores fueron calculados tomando en cuenta los tiempos de migración, la movilidad electroosmótica, las longitudes de detección corregidas como se describe en el artículo de Varenne et al. [182]. Por ejemplo, en el gráfico de la Figura III. 8 se presentan los resultados de las μ_{EP} para los compuestos de la Serie 3, reiterando que para los PCs de esta Serie, analizados en medio básico (*BGE*_{10,8}) y disueltos a pH básico (pH 9.0), la μ_{EP} decrece conforme aumenta la longitud de la cadena peptídica a una misma carga teórica neta negativa (-1), con valores similares ($\mu_{\text{EP}} \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = -4.32 \pm 0.11, -3.23 \pm 0.03$ y -2.94 ± 0.18 , para 8, 10 y 12 aa, respectivamente) a los reportados en los estudios previos por EC-IES-EM. Cuando los PCs de la Serie 3 son analizados en un *BGE* ácido (*BGE*_{10,3}) y disueltos a pH básico (pH 9.0) el valor de la μ_{EP} se hace positivo ($\mu_{\text{EP}} \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = 1.11 \pm 0.02, 1.19 \pm 0.03$ y 0.50 ± 0.01 , para 8, 10 y 12 aa, respectivamente), probablemente debido a cierto grado de protonación de los sitios disponibles, generando un cambio de carga en los compuestos de -1 a +1 (ver Figura III. 5, compuestos cíclicos Serie 3 a pH 3.0). Observando que el comportamiento electroforético para los compuestos 8aaSer3 y 10aaSer3 es

aproximadamente igual, mientras que, para el compuesto de 12aaSer3 el valor es menor, lo cual es normal, puesto que el tamaño de la molécula es mayor.

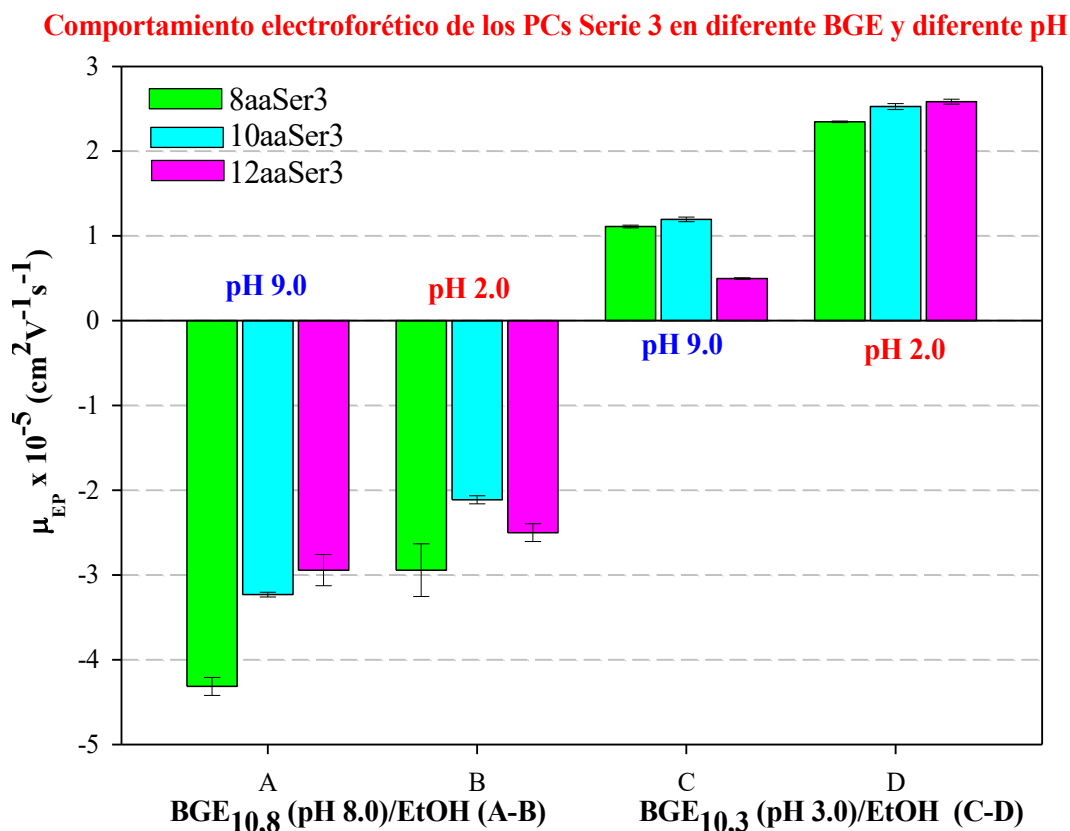


Figura III. 8. Movilidades electroforéticas de los compuestos de la Serie 3 modificando tanto el pH del *BGE* ($BGE_{10,8}$ a 20 kV y $BGE_{10,3}$ a 18 kV) como de la solución del PC (pH 9.0 y 2.0). ECZ-UV: capilar de sílice fundida previamente activado $d_{in} = 75 \mu m$ ($d_{ex} = 380 \mu m$), $L = 35$ cm, $l = 26.5$ cm, $[PC] = 150 \mu M$, inyección de zonas aplicando 30 mbar MN-*BGE*-Muestra (3, 1.6, 3 s) y usando una presión de 50 mbar durante el análisis, $T = 25$ °C, $\lambda = 200$ nm; $n = 4$ repeticiones experimentales. El inserto corresponde a los electroferogramas ECZ-UV de los posibles ensambles de la Serie 3 disueltos a pH 2.0 y analizados en $BGE_{10,3}$ (50,50, v/v), cuyos picos se superponen con el MN.

Por otro lado, cuando los PCs están disueltos a pH ácido (pH 2.0) y son analizados en *BGE* ácido, el valor de la μ_{EP} es positivo ($\mu_{EP} \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = 2.35 \pm 0.01, 2.53 \pm 0.04$ y 2.58 ± 0.03 , para 8, 10 y 12 aa, respectivamente), presentando una magnitud que es aproximadamente similar. Bajo estas condiciones de análisis, se espera que los compuestos de la Serie 3 presenten una carga positiva +1 (ver Figura III. 5, compuestos cíclicos Serie 3 a pH 2.0–3.0). Al respecto,

debido a que la presencia de H^+ permite saturar los sitios activos formadores de puentes de hidrógeno, se plantea la hipótesis del posible inicio de la formación de auto-ensambles entre los PCs por interacciones intermoleculares por puentes de hidrógeno. Finalmente, se encontró que para los PCs disueltos a pH ácido (pH 2.0) y analizados en *BGE* básico, la μ_{EP} parece decrecer de manera irregular ($\mu_{EP} \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} = -2.94 \pm 0.31, -2.11 \pm 0.05$ y -2.50 ± 0.10 , para 8, 10 y 12 aa, respectivamente), tal vez debido a un proceso de desprotonación parcial de los sitios activos de los compuestos o bien, se plantea la hipótesis de una posible deasociación de los supuestos ensambles.

De esta forma, se encontró que el medio de disolución modifica la carga de los compuestos peptídicos, pero el medio de separación impone una carga final a éstos mismos, dependiendo de la separación. Así que, cuando el compuesto es disuelto en medio básico, la carga de éste permanecerá negativa si el medio de separación también es básico, pero su carga se hará positiva si el medio de separación es ácido (aunque mucho menos que, si el péptido es disuelto directamente en medio ácido). Y viceversa, cuando el compuesto es disuelto en medio ácido, se encontrará positivamente cargado si es separado en un medio igualmente ácido, pero su carga será negativa si el péptido es separado en medio básico (aunque mucho menos que, si el compuesto es disuelto en medio básico). Entonces, el parámetro más importante en este sentido es el medio de separación, que impone la carga global final del compuesto peptídico. En este contexto, se observa una evolución no lógica en ciertos casos, que podría indicar la existencia de un posible ensamblaje entre los PCs, aunque esto más bien es una hipótesis que se plantea y que, hasta este punto no se ha verificado. Por otro lado, se propone también, la posible protonación/desprotonación reversible, incluso si existiera un ensamblaje.

Para los compuestos de la Serie 2, los resultados que se presentan en la Tabla III. 9 confirman que la μ_{EP} de los PCs disueltos a pH 9.0 y analizados en *BGE*_{10,8} aumenta con el tamaño de la cadena peptídica para una misma carga teórica (-2), una hipótesis para un comportamiento de este tipo podría ser la diferencia de configuración entre las secuencias peptídicas que llevan a radios hidrodinámicos inesperados en esta Serie, como se discutió antes en los estudios de EC-IES-EM. Estos mismos péptidos, pero ahora en *BGE*_{10,3} muestran una μ_{EP} que se hace positiva y cuya magnitud es cuasi constante para todos los compuestos de esta Serie.

Tabla III. 9. Movilidades electroforéticas por ECZ-UV de los 8 PCs (Serie 1, 2 y 3) a diferente pH del BGE (pH 8.0 y 3.0) y de la solución del compuesto (pH 9.0 y 2.0); n = 4 repeticiones (Condiciones experimentales ver pie de la Figura III. 8).

PCs (pH) y BGE (pH)	8 aa	10 aa	12 aa
	μ_{EP} (10^{-5} cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	μ_{EP} (10^{-5} cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)	μ_{EP} (10^{-5} cm ² V ⁻¹ s ⁻¹)
Serie 1 (pH 9.0) <i>BGE</i> _{10,8} , 50/50, (v/v)	- 8.11 ± 0.01	--	- 12.64 ± 0.13
Serie 2 (pH 9.0) <i>BGE</i> _{10,8} , 50/50, (v/v)	- 3.90 ± 0.06	- 7.05 ± 0.13	- 7.00 ± 0.18
Serie 3 (pH 9.0) <i>BGE</i> _{10,8} , 50/50, (v/v)	-4.32 ± 0.11	-3.23 ± 0.03	-2.94 ± 0.18
Serie 1 (pH 9.0) <i>BGE</i> _{10,3} , 50/50, (v/v)	- 1.66 ± 0.10	--	- 1.50 ± 0.04
Serie 2 (pH 9.0) <i>BGE</i> _{10,3} , 50/50, (v/v)	0.80 ± 0.05	0.80 ± 0.01	0.79 ± 0.02
Serie 3 (pH 9.0) <i>BGE</i> _{10,3} , 50/50, (v/v)	1.11 ± 0.02	1.19 ± 0.03	0.50 ± 0.01
Serie 1 (pH 2.0) <i>BGE</i> _{10,3} , 50/50 (v/v)	2.84 ± 0.02	--	2.58 ± 0.17
Serie 2 (pH 2.0) <i>BGE</i> _{10,3} , 50/50 (v/v)	2.67 ± 0.10	2.79 ± 0.02	2.65 ± 0.04
Serie 3 (pH 2.0) <i>BGE</i> _{10,3} , 50/50 (v/v)	2.35 ± 0.01	2.53 ± 0.04	2.58 ± 0.03
Serie 1 (pH 2.0) <i>BGE</i> _{10,8} , 50/50 (v/v)	- 5.78 ± 0.21	--	- 8.21 ± 0.10
Serie 2 (pH 2.0) <i>BGE</i> _{10,8} , 50/50 (v/v)	- 1.96 ± 0.12	- 2.07 ± 0.18	- 2.28 ± 0.21
Serie 3 (pH 2.0) <i>BGE</i> _{10,8} , 50/50 (v/v)	- 2.94 ± 0.31	- 2.11 ± 0.05	- 2.50 ± 0.10

Donde la composición de los tampones es: *BGE*_{10,8} = carbonatos de amonio 10 mM (pH 8.0)/EtOH y *BGE*_{10,3} = formiatos de amonio 10 mM (pH 8.0)/EtOH.

El análisis de los PCs de la Serie 2 disueltos a pH 2.0 y analizados en *BGE*_{10,3} tienen valores positivos de μ_{EP} casi constantes. Bajo estas condiciones de análisis, estos compuestos peptídicos adquieren carga teórica neutra (ver Figura III. 5, compuestos cíclicos Serie 2 a pH 2.0). En este sentido, se propone la hipótesis de un posible auto-ensamble entre los PCs, debido a la presencia de H^+ en el medio. Por otro lado, los valores positivos de las movilidades electroforéticas podrían indicar que se tienen cargas positivas y negativas, las cuales son poco accesibles en estas conducciones. Finalmente, el análisis de estos mismos PCs a pH 2.0 en *BGE*_{10,8/EtOH}, exhiben una μ_{EP} negativa cuyo valor aumenta ligeramente. Como se observa, estos resultados no van conforme a los valores teóricos de carga. Por lo que, dicho fenómeno podría explicarse por el posible auto-ensamble de los PCs, mediante la protección de las cargas negativas por el ensamble y la configuración de las cargas positivas hacia el exterior del mismo.

Por otro lado, el comportamiento electroforético de la Serie 1, que se encuentra resumido en la Tabla III. 9, deja ver que los PCs disueltos a pH 9.0 y analizados en *BGE* básico tienen una μ_{EP} que aumenta conforme aumenta la carga neta teórica de los compuestos (-2 y -3, compuesto de 8aa y 12 aa, respectivamente) como se describió previamente en los estudios de pureza. Cuando los PCs disueltos a pH 9.0 se analizan en *BGE* ácido, el valor de la μ_{EP} permanece negativo y disminuye, probablemente debido al efecto de la protonación parcial de los sitios activos. Si bajo estas condiciones ambos péptidos de la Serie 1 adquirieran una carga neta de -1 por la protonación parcial, la magnitud de la μ_{EP} sería resultado del volumen de la molécula (μ_{EP} 8aa > 12aa). Adicionalmente, el valor de la μ_{EP} para los PCs disueltos a pH 2.0 y analizados en *BGE* ácido es positiva y tiende a disminuir ligeramente al aumentar el tamaño de la cadena peptídica. Puesto que, bajo estas condiciones de pH los PCs pueden adquirir carga neutra (eluyen sobre el pico del MN) y podrían llegar a formar ensambles, cuyos grupos $-COOH$ de las cadenas laterales podrían a su vez formar puentes de hidrógeno, siendo mayor la tendencia para el compuesto de 12aaSer1 que para 8aaSer1, disminuyendo las posibles cargas parciales. Por último, se tiene el estudio de los PCs disueltos a pH 2.0 y analizados en *BGE* básico, en que la μ_{EP} que es negativa, parece aumentar con el tamaño de la cadena peptídica (8 a 12 aa). En este sentido, si a pH 2.0 se pudieran formar ensambles de los compuestos, éstos podrían sufrir desprotonaciones en los sitios activos de las cadenas, donde 12aaSer1 perdería más protones que 8aaSer1, por lo que su movilidad dependería más fuertemente de su carga que de su masa.

Recapitulando, hasta este punto observamos que el comportamiento de las Series 1 y 2 no es sencillo de explicar. Sin embargo, si se considera la naturaleza química de las secuencias peptídicas que componen a los PCs de cada Serie, se tiene que, los monómeros cíclicos de la Serie 1 poseen mayor carga que los compuesto de la Serie 2. Por lo que, habría repulsión electrostática, pero al ser una molécula más simétrica en cuanto a la distribución de los grupos de las cadenas laterales, tales como, $-\text{NH}_2$ y $-\text{COOH}$ (ver Figura III. 2 sobre PCs Serie 1 y Figura III. 3 sobre PCs Serie 2), el auto-ensamble antiparalelo por puentes de hidrógeno entre los esqueletos PC-PC se encuentra mayormente favorecido.

En resumen, a través de estos estudios fue posible determinar el comportamiento electroforético de los diferentes PCs en medio ácido y básico, planteando la hipótesis de la posibilidad de protonación/desprotonación de los diferentes sitios activos de los compuestos, que a su vez podrían indicar estados intermediarios y la posibilidad de que éstos presenten ensambles. En este último punto, se ha encontrado reportado en la bibliografía [120] que PCs con α -aminoácidos D, L alternados con presencia de grupos aromáticos como el Trp forman ensambles a concentraciones $\geq 100 \mu\text{M}$, por lo que es plausible que, a la concentración que trabajamos ($150 \mu\text{M}$), pudieran existir dichos ensamblajes.

Efecto de la Concentración

En los estudios previos se ha evaluado el efecto del pH de la solución matriz y del *BGE* de análisis, pero no el de la concentración. A manera de ejemplo, se muestran en la Tabla III. 10 los valores de la μ_{EP} del péptido 8aaSer3 estudiado a dos concentraciones diferentes ($150 \mu\text{M}$ y 2 mM) en las condiciones de acidez y basicidad antes probadas. Como se observa, en todos los casos el comportamiento electroforético es esencialmente el mismo. El PC $150 \mu\text{M}$ y 2 mM , disuelto a pH 9.0 y analizado en *BGE*_{10,8} muestra en ambos casos una μ_{EP} de magnitud $-4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. En el caso de los PCs $150 \mu\text{M}$ y 2 mM , disuelto a pH 2.0 y analizado a *BGE*_{10,3} presenta en ambos casos un valor de μ_{EP} de $2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Lo mismo para los otros análisis, lo que indica que en el intervalo de concentración de $0.15\text{--}2 \text{ mM}$, el comportamiento electroforético de los PCs sintetizados es constante. Para los siete PCs restantes, se observó el mismo comportamiento (resultados no mostrados en este texto).

Tabla III. 10. Movilidad electroforética del péptido 8aaSer3 a 150 μM y 2 mM a diferente pH del *BGE* (pH 8.0 y 3.0) y de la solución del PC (pH 9.0 y 2.0); n = 4 repeticiones (Condiciones experimentales ver pie de la Figura III. 8).

PCs (pH) y <i>BGE</i> (pH)	8aaSer3 (150 μM) μ_{EP} ($10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	8aaSer3 (2 mM) μ_{EP} ($10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
PC (pH 9.0) <i>BGE</i> _{10,8} , 50/50 (v/v)	-4.32 ± 0.11	-4.01 ± 0.08
PC (pH 9.0) <i>BGE</i> _{10,3} , 50/50 (v/v)	1.11 ± 0.02	1.00 ± 0.04
PC (pH 2.0) <i>BGE</i> _{10,3} , 50/50 (v/v)	2.35 ± 0.01	2.37 ± 0.02
PC (pH 2.0) <i>BGE</i> _{10,8} , 50/50 (v/v)	-2.94 ± 0.31	-3.40 ± 0.09

III.3.5 Determinación de Posibles Ensamblajes por EC-IES-EM

Para determinar la posibilidad del auto-ensamble de los PCs disueltos a pH 2.0 en *BGE* ácido (50,50, v/v) se analizaron los compuestos de la Serie 3 a una concentración 2 mM por la metodología optimizada de EC-IES-EM. Las separaciones electroforéticas se realizaron con las condiciones de análisis descritas en la sección III.3.3 sobre Equipos y Métodos (estudios de pureza), preparando soluciones 2 mM de los PCs disolviéndolos en *BGE*_{0,1,8} y adicionando 1–2 μL de HCOOH concentrado para obtener un pH 2.0. Las muestras se analizaron, tanto en *BGE*_{10,3}, 50/50 (v/v), como en *BGE*_{10,8}, 50/50 (v/v) en modo de polaridad positiva, aplicando un voltaje de 18 y 20 kV, respectivamente.

Los resultados de masas en ambos *BGE* arrojaron espectros que indican el posible ensamble de dos o más PCs, al mostrar patrones isotópicos característicos de dímeros y tetrámeros con doble y cuádruple carga, respectivamente. En la Figura III. 9 se presenta el espectro de masas del compuesto de 8aSer3, señalando el ion molecular de doble carga del dímero y el aducto con sodio del mismo dímero, con sus respectivos isótopos. En los insertos se

presentan los patrones isotópicos teóricos de dichos iones, observando congruencia entre las señales experimentales y teóricas.

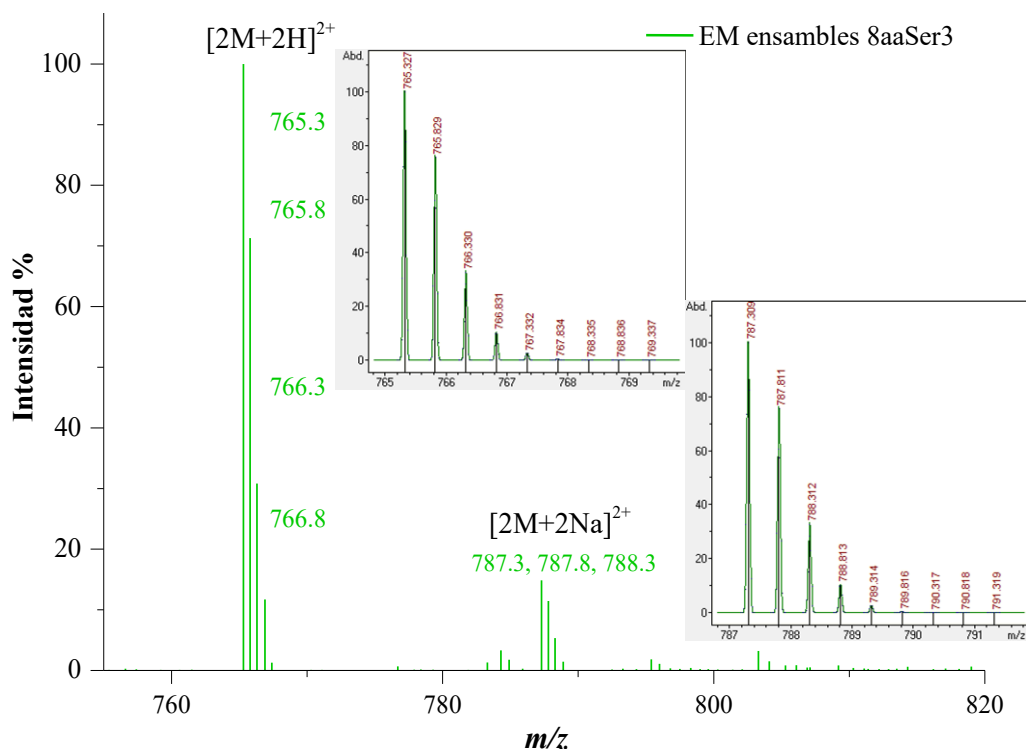


Figura III. 9. Espectro de masas del compuesto 8aaSer3 disuelto a pH 2.0, [PC] = 2 mM, BGE_{10,3}, 50/50 (v/v) a 18 kV por EC-IES-EM. Capilar de sílice fundida previamente activado $d_{in} = 75 \mu\text{m}$ ($d_{ex} = 380 \mu\text{m}$), $L = 80 \text{ cm}$, $l = 22 \text{ cm}$, inyección de zonas aplicando 30 mbar Muestra-BGE-MN-BGE (12, 15, 6, 6 s) y usando una presión de 50 mbar durante el análisis, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 200 \text{ nm}$. (Condiciones experimentales IES-EM ver sección III.3.3 Equipos y Métodos-Estudio de pureza), $n = 3$ repeticiones. Los insertos corresponden a los patrones isotópicos teóricos de los ensamblajes.

En la Tabla III. 11 se resumen sólo los datos numéricos de los patrones isotópicos y sus respectivas intensidades experimentales y teóricas para los posibles ensamblajes de los compuestos de la Serie 3. En este sentido, se destaca que la relación m/z de los compuestos es similar a la de los PCs no asociados, pero el patrón isotópico es muy diferente en los posibles ensamblajes, cuyos iones moleculares están asociados a otro patrón isotópico.

Tabla III. 11. Masa teórica (Teo.) y experimental (Exp.), y la intensidad relativa de los patrones isotópicos correspondientes a los ensambles de los PCs Serie3, en su forma protonada y de aductos con carga global de los estudios por EC-IES-EM DataAnalysis v. 4.1) de los posibles ensambles de los PCs de la Serie 3.

PC	[2M+2H] ²⁺				[2M+2Na] ²⁺			
	m/z		Intensidad (%)		m/z		Intensidad (%)	
	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.
8aaSer3	765.3	765.3	100.0	100.0	787.3	787.3	100.0	100.0
	765.8	765.8	72.3	75.6	787.8	787.8	76.5	75.6
	766.3	766.3	30.8	33.2	788.3	788.3	35.6	33.1
	766.8	766.8	11.7	10.7	788.8	788.8	10.1	10.6
12aaSer3	1207.5	1207.5	74.5	79.1	1229.5	1229.5	79.8	79.1
	1208.0	1208.0	100.0	100.0	1230.0	1230.0	100.0	100.0
	1208.5	1208.5	66.1	68.2	1230.5	1230.5	71.2	68.2
	1209.0	1209.0	30.7	33.0	1231.0	1231.0	31.2	33.0
	1209.5	1209.5	11.5	12.6	1231.5	1231.5	12.0	12.6
PC	[4M+4H] ⁴⁺				[4M+4Na] ⁴⁺			
	m/z		Intensidad (%)		m/z		Intensidad (%)	
	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.	Exp.	Teo.
10aaSer3	1022.4	1022.4	38.9	40.6	1044.4	1044.4	39.5	40.6
	1022.7	1022.7	86.7	88.2	1044.7	1044.7	87.1	88.2
	1022.9	1022.9	100.0	100.0	1044.9	1044.9	100.0	100.0
	1023.2	1023.2	77.0	78.5	1045.2	1045.2	76.9	78.5
	1023.4	1023.4	43.7	47.9	1045.4	1045.4	44.2	47.8
	1023.7	1023.7	22.6	24.1	1045.7	1045.7	22.1	24.0
	1023.9	1023.9	13.3	10.4	1045.9	1045.9	12.3	10.4

De este modo, se comprueba la hipótesis de que los PCs disueltos a pH 2.0 llegan a formar ensambles, de al menos dos monómeros asociados.

III.4 Conclusiones

Se determinaron las condiciones óptimas de solubilidad de los PCs, encontrando que éstos son solubles en una mezcla de carbonatos de amonio pH 8.0 con fuerza iónica 1.0 ó 0.1 mM/EtOH, en una relación que va de 50/50 a 95/5 (v/v).

Se desarrolló una nueva metodología basada en Electroforesis Capilar acoplada en línea a EM, a través de una interface de Ionización Electrospray. Después de optimizar varios parámetros, la metodología EC-IES-EM demostró ser una herramienta innovadora por su rapidez para la caracterización de los PCs sintetizados, pudiendo verificar la pureza, la estructura y la composición de éstos. La técnica también permitió estudiar la estabilidad de los PCs almacenados en solución por tiempos prolongados. Del mismo modo, fue posible verificar por EC-IES-EM la formación de ensamblajes de los PCs en condiciones ácidas.

Los espectros de masas evidenciaron la alta pureza de los PCs, exhibiendo iones de carga simple y doble correspondientes a las masas de los iones moleculares y/o aductos formados con sodio y con amonio. A la vez, se comprobó la ausencia de los PLs, protegidos total o parcialmente, y de ensamblajes peptídicos, en las condiciones de análisis descritas. Además, se pudo verificar la estructura y composición de los compuestos. Así que, estos precursores cíclicos podrían ser potenciales formadores de NTPs de interés, que podrían ser empleados como nanoplataformas en estudios de diagnóstico o bien como herramientas tipo pseudo-tamiz con fines de mejorar las separaciones.

En cuanto al estudio del envejecimiento de las muestras en solución básica, se encontró que la degradación lleva a la deciclización del compuesto; observando hasta un 2 % del compuesto lineal en soluciones almacenadas por un periodo de 7 meses a temperaturas de 0–4 °C.

Respecto a los estudios electroforéticos, se encontró que en muchos casos la movilidad electroforética está en concordancia con la carga global teórica y la masa, mientras que los

comportamientos inesperados pueden ser debido a las configuraciones específicas de los péptidos, como consecuencia de la naturaleza química de su secuencia.

Se encontró que los PCs disueltos en medio básico (pH 9.0) y analizados en *BGE* básico presentan un comportamiento electroforético de acuerdo a las diferencias de carga y masas observadas en los estudios de pureza. Pero, los mismos PCs analizados en *BGE* ácido ponen en evidencia la posible protonación de los sitios activos. Por otro lado, los compuestos peptídicos disueltos en medio ácido (pH 2.0) y analizados en *BGE* ácido mostraron la posibilidad de formación de ensamblajes. Mientras que, éstos mismos analizados en *BGE* básico, expusieron que de existir los posibles ensamblajes, éstos podrían sufrir desprotonación de los sitios activos de las cadenas laterales. En resumen, se encontró que el medio de disolución modifica la carga de los compuestos peptídicos, pero el medio de separación impone la carga final a éstos mismos, dependiendo de la separación. De este modo, en muchos casos, el compuesto disuelto en medio básico tendrá carga teórica negativa si el medio de separación también es básico, pero su carga se hará teóricamente positiva si el medio de separación es ácido. En tanto que, el compuesto disuelto en medio ácido estará con carga teórica positiva si se separa en un medio ácido, cuya carga será teóricamente negativa si el péptido es separado en medio básico. Por lo que, el parámetro más importante en este sentido es el medio de separación, del que depende la carga global final del compuesto peptídico. Así, se propone la hipótesis de la posible formación de ensamblajes en las condiciones de acidez descritas, puesto que la densidad de carga es una estimación teórica y aproximativa, y que los enlaces entre los diferentes aminoácidos pueden modificar el pK_a .

Adicionalmente, se encontró que los resultados antes descritos no varían en el intervalo de concentraciones de 0.15–2 mM. De este modo, a través del comportamiento electroforético de los diferentes PCs en medio ácido y básico, se reveló la presencia de cargas globales negativas y neutras, así como la posibilidad de protonación–desprotonación de los diferentes compuestos que a su vez, podrían indicar estados intermediarios, así como la presencia de posibles ensamblajes en medios ácidos.

Finalmente, los estudios de EC–IES–EM permitieron identificar la formación de ensamblajes de PCs en soluciones ácidas (pH 2.0), identificando los iones moleculares de carga doble y

cuádruple, pertenecientes a los dímeros y tetrameros de los péptidos cíclicos. En este sentido, se puede decir que los PCs en medio ácido y a una concentración 2 mM pueden formar al menos dímeros de los compuestos.

CAPÍTULO IV

PÉPTIDOS CÍCLICOS A SUPRAESTRUCTURAS

En este capítulo se describe la formación de supraestructuras moleculares a partir de NTPs conformados por los PCs sintetizados. Posteriormente, se detalla la metodología experimental de obtención y análisis de los NTPs, confirmando por las espectroscopías FT-IR y Raman la presencia de puentes de hidrógeno intermoleculares, característicos del apilamiento antiparalelo β -plegado entre PC-PC en medio ácido. Finalmente, se presentan los estudios por SEM, STEM y HR-TEM, que permiten verificar la presencia de supraestructuras tipo fibrilla o ramillete formadas por los NTPs de los PCs.

CAPÍTULO IV

PÉPTIDOS CÍCLICOS A SUPRAESTRUCTURAS

IV.1 Formación de Supraestructuras de NTPs

Como se mencionó anteriormente, los PCs conformados por α -aminoácidos D, L alternados poseen una estructura tipo β -plegada que les proporciona un arreglo anular planar con las interacciones mínimas entre las cadenas laterales de los aminoácidos. De tal modo, que este plegamiento, les permite mantener una superficie interna, cuyas propiedades hidrofóbicas dependen básicamente de los enlaces peptídicos que forman el anillo, como es el caso de los PCs sintetizados. Mientras que, las propiedades hidrofílicas y/o hidrofóbicas de la superficie externa dependen de las cadenas laterales que forman a cada PC y de las posibles funcionalizaciones que se realicen. En este sentido, los PCs de la Serie 1, adquieren propiedades hidrofílicas debido a la presencia de los grupos carboxilo **-COOH (Asp)** y las amidas primarias **-CONH₂ (Asn)**. Los PCs de la Serie 2 mostrarán propiedades hidrofílicas debido a la presencia de los grupos carboxilo **-COOH (Asp)** y las amidas primarias **-CONH₂ (Asn)**, así como propiedades aromáticas polares debido al **anillo indol del Trp**. Los PCs de la Serie 3 presentarán propiedades igualmente hidrofílicas, dado los grupos carboxilo **-COOH (Asp)**, las amidas primarias **-CONH₂ (Asn)** y adicionalmente el **anillo imidazol de la His**, así como propiedades aromáticas polares por el **anillo indol del Trp**.

Los esqueletos de los PCs formados sólo por enlaces peptídicos contienen los grupos $-C=O$ y $-RNH$, los cuales son potenciales formadores de enlaces de puentes de hidrógeno. Si las soluciones de los PCs se acidifican con diluciones de TFA (1 % en ACN, v/v [92]), se promueve el auto-ensamble en forma de NTPs por el apilamiento e interacción por puentes de hidrógeno de éstos esqueletos cíclicos. Al respecto, se ha encontrado que la formación de los NTPs está controlada por la quiralidad y/o modificación de los PCs. Si se mezclan enantiómeros de los

precursores cíclicos en una relación 1:1 es posible obtener NTPs mediante el apilamiento en paralelo de los esqueletos. Sin embargo, este tipo de asociación es 4 veces menos estable que la asociación producida por PCs de un sólo enantiómero, cuyo apilamiento esqueleto-esqueleto por puentes de hidrógeno ocurre de manera antiparalela. En este sentido, la adición de un modificador en un aminoácido (por ejemplo, tert-leucina) cambia el tipo de apilamiento (de paralelo a antiparalelo) de los enantiómeros mezclados en la misma proporción, obteniendo NTPs a partir de contracciones entre 300–500 μM [113]. Por otro lado, si sólo se trabaja con un enantiómero, la formación de NTPs mediante apilamiento antiparalelo de los esqueletos se consigue a concentraciones mayores de 5mM [113, 183], con precipitaciones instantáneas a una concentración de 25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (20 mM) en un periodo de varias horas [92]. Aunque Carrick et al. [93] encontraron que si se dejan las soluciones de los PCs acidificadas con TFA pueden alcanzar el equilibrio hasta en 5 días [93]. Adicionalmente, Chapman et al. [183] han reportado el proceso contrario, la posibilidad de desagregar los ensamblados peptídicos, obteniendo los monómeros cíclicos. Los NTPs son calentados a 60 °C por 2 h en DMF, sin dañar la estructura de los PCs de partida.

Por otro lado, como se mencionó en el Capítulo I, es posible la formación de un ensamble más complejo entre los NTPs, mediante interacciones intertubulares de los grupos de las cadenas laterales de éstos (ver Figura I. 5), principalmente por puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Generalmente, estos ensambles 3D suelen aparecer físicamente en forma de geles en soluciones concentradas y ácidas, los cuales han sido observados a través de estudios de criomicroscopía como TEM y HR-TEM (TEM de alta resolución, por sus siglas en inglés), mediante la presencia de estrías (puesto que esta última técnica permite visualizar dimensiones cristalográficas de hasta $\leq 1 \text{ \AA}$) en los arreglos tubulares en forma de fibras o ramilletes, correspondientes a los NTPs individuales, como lo han reportado anteriormente investigadores tales como Hartgerink et al. [96] y Rubin et al. [123].

En este sentido, considerando la naturaleza formadora de puentes de hidrógeno intermoleculares de los grupos de las cadenas laterales de los PCs sintetizados, se espera que los compuestos de la Serie 1 al poseer, tanto grupos $-\text{CONH}_2$ como $-\text{COOH}$, se obtengan estructuras supramoleculares tipo ramilletes, debido a la asociación de los NTPs, por dichas interacciones.

Considerando la simetría y disposición (50 % de componentes hidrofílicos) de estos grupos formadores de puentes de hidrógeno (ver sección III.1.3 Péptidos Cíclicos Serie 1, Figura III. 2) de los compuestos de esta Serie, el ensamble sería doblemente favorecido. Los compuestos de la Serie 2 se espera que también formen ensamblajes 3D, puesto que presentan los mismos grupos –CONH₂ y –COOH, aunque en menor proporción (38, 40 y 42 %, para 8, 10 y 12 aa, respectivamente). Adicionalmente, el H del anillo indol del Trp es potencialmente formador de puentes de hidrógeno intermoleculares (ver sección III.1.4 Péptidos Cíclicos Serie 2, Figura III. 3), aunque al ser voluminoso podría generar ciertas limitantes entre dichos enlaces. Los péptidos de la Serie 3 poseen igualmente grupos formadores de puentes de hidrógeno intermoleculares por parte de los grupos carboxilo y amida (-CONH₂, -COOH). De manera adicional, al protón del anillo indol del Trp y el H del anillo imidazol (-NH- de la posición 1) de la His, contienen el protón del nitrógeno de la posición 3 (=NH-) del imidazol, que también puede formar puentes de hidrógeno, aunque podría existir cierto impedimento estérico. Por lo que, el ensamble tridimensional estaría doblemente comprometido (ver Figura III. 4), comparado con los compuestos de la Serie 2.

IV.2 Metodología Experimental

Para promover la formación de los NTPs, se prepararon diferentes soluciones de los PCs sintetizados a distintas concentraciones, las cuales fueron acidificadas para promover el auto-ensamble de los monómeros en estructuras β -tubulares, que inmediatamente evolucionarían a estructuras tridimensionales. Para verificar esta hipótesis se efectuaron estudios por espectroscopía FT-IR y Raman, con la finalidad de observar la formación de enlaces por puentes de hidrógeno (intermoleculares) entre los esqueletos de los PCs. Optimizando las condiciones para la obtención de los NTPs, realizando estudios de la morfología y dimensiones de éstos por las microscopías SEM, STEM (Microscopía electrónica de barrido de transmisión, por sus siglas en inglés) y HR-TEM.

IV.2.1 Productos Químicos y Reactivos

Para disolver los PCs y preparar las soluciones ácidas se utilizaron los siguientes productos químicos y reactivos: NH_4OH (28.0–30.0 % de NH_3) fue comprado de Karal (México), HCOOH (grado LC-MS, ≥ 98.0 %) obtenido de Fluka (Alemania), TFA (100 %) adquirido de J.T. Baker (USA), ACN (grado HPLC ≥ 99.9 %) y EtOH (grado HPLC, $\geq 99.9\%$) fueron conseguidos de Fisher scientific (USA). Todas las soluciones fueron preparadas usando agua MilliQ desionizada (18.0 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$) obtenida fresca de un sistema de flujo B-Pure Barnstead y un Water Pro plus Labconco (# Serie 070570564 F, USA).

IV.2.2 Materiales y Equipos

La preparación de las soluciones de los PCs se hizo utilizando un Vórtex mixer Genie de Scientific Industries (USA) de 10 velocidades, provisto de un plato para agitación individual tipo hand permanent y un sonicador Digital Ultrasonic Cleaner de GT Sonic (China) para homogeneizar y acelerar el proceso de agitación de los compuestos en medio básico y luego en medio ácido.

Se prepararon en tubos Eppendorf, con las condiciones optimizadas, las soluciones de los PCs a dos concentraciones 2 mM y 22 mM. Los PCs en forma de polvo sólidos, fueron equilibrados a temperatura del cuarto y se pesaron, adicionándoles 100 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$ y 1-2 μL NH_4OH concentrado, hasta disolver el compuesto y obtener un pH 9.0. Entonces se completó el volumen con $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$, hasta obtener la concentración deseada. Posteriormente, se procedió con la acidificación de las soluciones utilizando HCOOH concentrado o TFA (40 % en ACN (v/v) o concentrado), hasta obtener un pH 2.0.

Las soluciones acidificadas de los PCs fueron refrigeradas por 72 h (4 °C). Después de optimizar las condiciones de lavado, las soluciones fueron lavadas 2 veces con $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$ y 1 vez con una mezcla $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}/\text{EtOH}$, 50/50 (v/v); adicionando en cada lavado 50 % del volumen total de la solución de solvente. En cada ocasión, las soluciones fueron centrifugadas utilizando una

centrifuga Sigma Laborzentrifugen 10015 (Alemania) a 10 000 rpm, durante 16 min 30 s, retirando el sobrenadante en cada lavado.

IV.2.2.1 Caracterización por Espectroscopía FT-IR

Los análisis realizados por Microespectroscopía FT-IR para obtener los espectros fueron medidos con una resolución de 8 cm^{-1} con un equipo Perkin Elmer precicely FTIR spectrum 100 (USA) acoplado a un Autoimage FT-IR Microscope, utilizando el software Software Autoimage Microscope. Los espectros obtenidos fueron el resultado de un promedio de 30 scans, con una apertura de enfoque para el láser de $1000 \times 1000\ \mu\text{m}$ en el microscopio, en el intervalo de número de onda de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$. Un disco de Au^0 fue utilizado para calibrar el equipo. Una lámina adhesiva de aluminio fue empleada como blanco de fondo, cuya señal, junto con la del agua del medio fueron restadas de los espectros. Las muestras líquidas ($10\ \mu\text{L}$) fueron colocadas sobre una lámina adhesiva de aluminio soportada en un portaobjetos, dejando secar a $25\text{ }^\circ\text{C}$ en un cuarto libre de humedad, antes de su análisis espectroscópico.

IV.2.2.2 Caracterización por Espectroscopía Raman

Los estudios de Microespectroscopía Raman para el análisis de los compuestos peptídicos se realizaron a una resolución de $1.0\text{--}1.3\text{ cm}^{-1}$ con un equipo Thermo Scientific (USA) provisto de un DXR Raman Microscope con una cámara StCamSwave (x86, V 3.2.0.3011). Los espectros fueron recolectados utilizando un láser con $\lambda = 780\text{ nm}$ a una potencia de 24.0, enfocado con una apertura de ranura de $50\ \mu\text{m}$, usando una rejilla de $21\text{--}1879\text{ cm}^{-1}$. Los tiempos de exposición de la muestra fueron de 1–3 s con 32×32 exposiciones de fondo, enfocando el microscopio a 50kx aumentos. Una lámina adhesiva de aluminio fue utilizada como blanco de fondo, cuya señal y la del agua del medio fueron restadas a cada espectro. El equipo fue calibrado y alineado con el dispositivo interno de Thermo Scientific®. Las muestras líquidas ($15\ \mu\text{L}$) fueron colocadas sobre una lámina adhesiva de aluminio soportada en un portaobjetos, dejando secar a $25\text{ }^\circ\text{C}$ en un cuarto libre de humedad, antes de su análisis espectroscópico.

IV.2.2.3 Caracterización por Microscopía SEM y STEM

Los análisis de morfología y dimensiones de los NTPs inicialmente fueron realizados en microscopía SEM con un equipo SIGMA-HDVP de emisión de campo de Carl Zeiss (Alemania), equipado con un detector de electrones retrodispersos (NTS BSD). Las muestras líquidas (20 μL) fueron depositadas sobre los *stubs* (platinos plateados), dejando secar a 25 °C en un cuarto libre de humedad. Entonces, fueron recubiertas con oro utilizando un equipo FINE-COAT ION SPUTTER JFC-110 de JEOL y analizadas en el microscopio trabajando a 21 kV y al alto vacío, usando distancias de trabajo variables (denotadas como WD, por sus siglas en inglés) y una apertura de 30 μm .

Los estudios de STEM se realizaron utilizando el equipo SIGMA-HDVP de emisión de campo de Carl Zeiss (Alemania), empleado el detector de electrones retrodispersos (NTS BSD) y el detector STEM de electrones transmitidos. Las muestras líquidas (20 μL) fueron depositadas sobre rejillas UC-A-onholey de Cu con y sin recubrimiento de carbono, de 400 mallas adquiridas de TED PELLA INC (USA). Las muestra fueron expuestas al calor de una lámpara Infrarrojo medio (1–4 μm , 110 W) para evaporar los solventes, por periodos de 5–20 min. El microscopio se trabajó a 5–10 kV, al alto vacío, usando WD variables y una apertura de 30 μm .

IV.2.2.4 Caracterización por Microscopía HR-TEM

El estudio de la morfología y tamaño de las nanoestructuras peptídicas se efectuó por microscopía TEM con un equipo TECNAI-F30 de FEI (USA). Utilizando rejillas UC-A-onholey de Cu con y sin recubrimiento de carbono, de 400 mallas compradas de TED PELLA INC (USA). Las muestras líquidas (20 μL) fueron colocadas sobre las rejillas y secadas por exposición a una lámpara infrarrojo (1–4 μm , 110 W), por periodos de 5–20 min, para su posterior análisis en el microscopio, trabajando a 300 kV y al alto vacío.

IV.3 Resultados y Discusión

Se prepararon soluciones a una concentración de 2 mM y 22 mM de los PCs en medio básico (pH 9.0) y se acidificaron (pH 2.0) para adecuar las condiciones experimentales que permiten estar en línea con la posibilidad de inducir el auto-ensamble de los PCs en forma de NTPs, según la literatura [92]. La primera concentración se eligió a partir de los resultados obtenidos en la metodología de EC-IES-EM del Capítulo III, en que se determinó la posibilidad de obtención de ensambles. La segunda concentración se determinó en función de lo reportado en la literatura por el laboratorio de Ghadiri.

En el proceso de acidificación se observó que la adición de 1–2 μL de HCOOH o TFA permite acelerar la formación de geles y de turbidez en la solución, alcanzando un pH 2.0 con menos cantidad de ácido, puesto que el TFA diluido requiere mayor volumen. En la Figura IV. 1 a-h, se observa la presencia de geles y suspensiones en las soluciones acidificadas pH 2.0, 22 mM, después de 72 h de reposo en refrigeración y posterior al proceso de lavado-centrifugado con $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}$ y $\text{H}_2\text{O}_{\text{MQ}}/\text{EtOH}$, 50/50 (v/v). Puesto que la obtención de los NTPs por auto-ensamble lleva de unas horas a varios días, se decidió dejar las muestras en reposo en refrigeración para limitar la evaporación de los solventes en la solución. Mientras que el proceso de lavado, se considero a partir de las recomendaciones de los trabajos de Ghadiri [92], con el propósito de retirar las sales de amonio presentes en la muestra y debido a la presencia de una especie de nata, que se encontraron presentes en los primeros estudios de SEM, impidiendo la visibilidad de las nanoestructuras.

En este punto, es importante recordar lo que se mencionó en el Capítulo I, en que la formación de los NTPs es a partir del auto-ensamble intermolecular de los PCs mediante el apilamiento antiparalelo de éstos. Del mismo modo, los NTPs, pueden formar a través de puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de la superficie externa un ensamble supramolecular más complejo formando ramilletes de NTPs como se muestra en la Figura I. 4 de dicho capítulo.

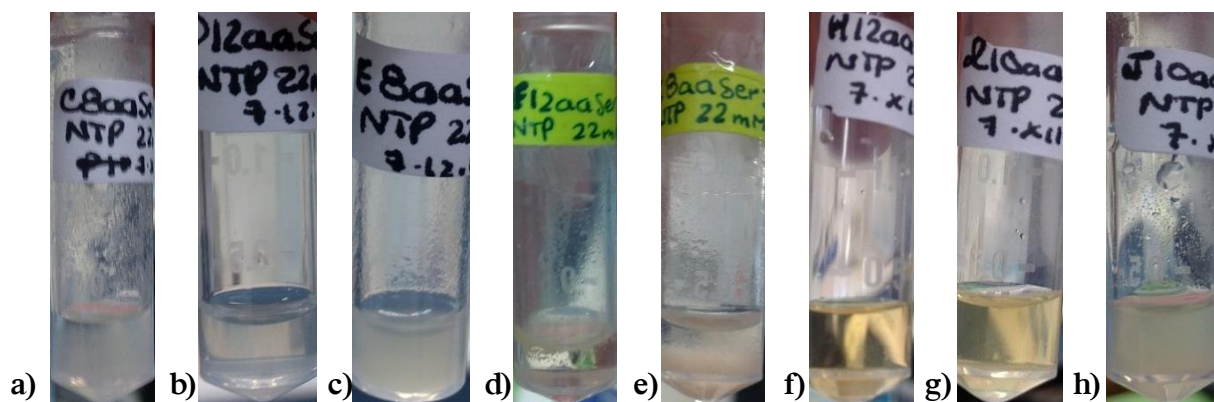


Figura IV. 1. Formación de geles y suspensiones en las soluciones acidificadas (pH 2.0) de los PCs 22 mM después del reposo por 72 h en refrigeración y del proceso de lavado-centrifugado. Donde: a) Gel de 8aaSer1, b), Gel de 12aaSer1, c) Gel de 8aaSer2, d) Gel-suspensión de 12aaSer2, e) Gel de 8aaSer3, f) Suspensión de 12aaSer3, g) Suspensión de 10aaSer3, y h) Gel-suspensión de 10aaSer2.

IV.3.1 Caracterización de los PC en Condiciones Favorables para el Ensamble por Espectroscopía FT-IR

Las soluciones 22 mM de los PCs en medio básico (el compuesto está completamente disuelto y con carga teórica negativa) fueron analizadas por FT-IR y comparadas con las mismas soluciones acidificadas para la posible obtención de ensamblajes por puentes de hidrógeno y sometidas a un procedimiento de lavado con H_2O_{MQ} para remover las sales de amonio y el remanente de TFA presente en la muestra, entonces se secaron sobre una cinta de aluminio a temperatura ambiente y se analizaron. En la Figura IV. 2 se muestran los espectros del PC8aaSer1 disuelto en medio básico y el PC8aaSer1 acidificado para posibilitar la formación de ensamblajes PC-PC por puentes de hidrógeno intermoleculares. Observando que los picos de vibración difieren significativamente, por ejemplo, en la zona de $3000-3600\text{ cm}^{-1}$ la banda de los puentes de hidrógeno está mucho mejor definida para el posible ensamble que para el PC, puesto que la señal es más ancha. Mientras que, en el intervalo de $1100 - 1800\text{ cm}^{-1}$ el patrón de picos difiere significativamente. En el caso del PC se observan las bandas del grupo amida alifática ubicadas entre $3800-3900\text{ cm}^{-1}$ (dos bandas pequeñas) correspondientes al $-NH_2$ y $\sim 1680\text{ cm}^{-1}$ (banda media) correspondiente al $C=O$ de la amida; las bandas de vibración $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ pertenece al estiramiento del enlace C-N de la amida primaria y la banda de estiramiento ~ 1200

cm^{-1} es asignada a un enlace C-N de una amida secundaria (esqueleto del PC). De manera adicional, se observa una banda a $\sim 1390 \text{ cm}^{-1}$ (banda media) que es asignada a los grupos $-\text{CH}_3$ de los DAa que forman parte del monómero cíclico. En el caso de las bandas de vibración del PC tratado para promover su posible ensamble, se describen en el siguiente párrafo.

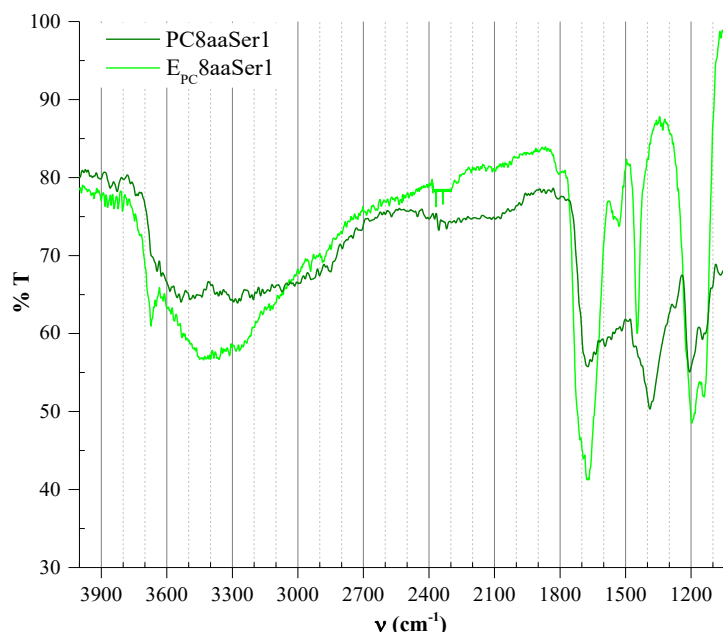


Figura IV. 2. Espectros FT-IR de las bandas de vibración del compuesto PC8aaSer1 y del mismo compuesto después de ser acidificado para promover el posible ensamble en forma de NTPs. Condiciones experimentales descritas en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos.

En la Figura IV. 3 y la Figura IV. 4 se muestran los espectros FT-IR obtenidos para los compuestos preparados a partir de la acidificación (pH 2.0) de las soluciones de los PCs, a una concentración 22 mM, reposados 72 h en refrigeración y tratados por el proceso de lavado-centrifugado. Como se mencionó antes el tiempo de refrigeración, después de la acidificación permite incrementar el tiempo de reacción para el ensamblaje, previniendo la evaporación de los solventes. Mientras que, los lavados y centrifugados permiten retirar las sales de amonio y el exceso de TFA de las muestras. Estas muestras se prepararon y analizaron según la metodología descrita en la sección IV.2.2.1 sobre la Caracterización por Espectroscopía FT-IR. En estos espectros se observa la presencia de las bandas de vibración asignadas a los puentes de hidrógeno formados entre los grupos $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$, las amidas I, II y III que participan en el apilamiento

antiparalelo tipo β -plegado que ocurre en la asociación de los PCs en forma de NTPs. Por ejemplo, en la Figura IV. 3 se presentan las bandas de vibración ubicadas en el intervalo de 3100–3651 cm^{-1} (bandas intensas y amplias), correspondientes al estiramiento de los enlaces intermoleculares (PC–PC) por puentes de hidrógeno entre los grupos $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ de los esqueletos peptídicos. Dentro de esta misma banda suele encontrarse la banda de estiramiento asignada al enlace N-H que participa en los puentes de hidrógeno, con valores entre 3278–3520 cm^{-1} [92, 96, 111, 112, 123, 184], pero difícilmente se distingue, puesto que la banda del tipo $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$, suele enmascararla.

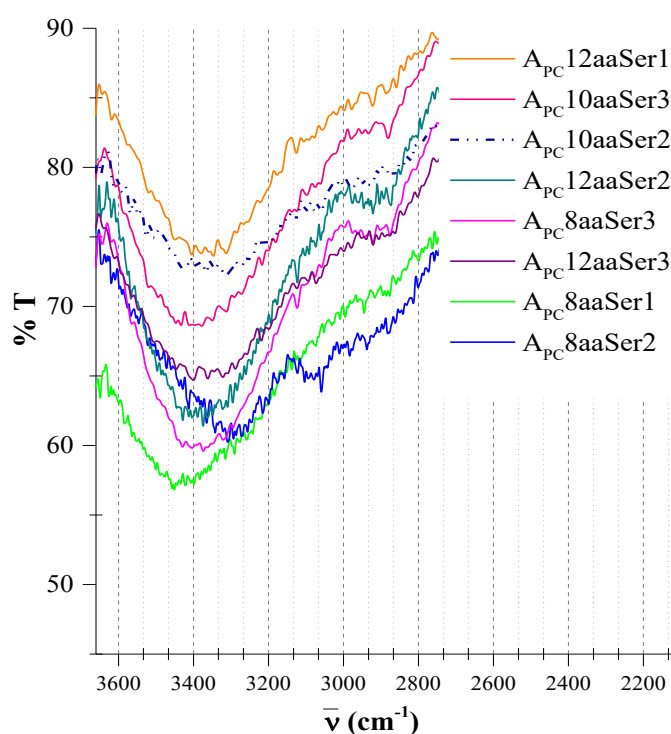


Figura IV. 3. Espectros FT-IR de las bandas de vibración de estiramiento correspondientes al enlace de puente de hidrógeno $\text{C}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{N}$ intermolecular por apilamiento antiparalelo tipo β -hoja de los ensambles de los PCs Serie1-3.

En la Tabla IV. 1 se muestran los valores asignados a cada banda de vibración de puentes de hidrógeno intermolecular para cada compuesto. Valores que son congruentes con los reportados en la literatura [92, 96, 111-113, 183, 184] y que suelen encontrarse entre 3125–3684 cm^{-1} .

Tabla IV. 1. Bandas de vibración correspondientes al arreglo antiparalelo β -laminar por enlaces de puentes de hidrógeno $N-H\cdots O=C$ entre los esqueletos de los PCs de cada Serie por Espectroscopía FT-IR.

E_{PC}^*	Puente H ($N-H\cdots O=C$)** $\bar{\nu}$, cm^{-1}	Amida I ($C=O$)** $\bar{\nu}$, cm^{-1}	Amida II y III ($N-H$)** $\bar{\nu}$, cm^{-1}
8aaSer1	3181 – 3634	1675 y 1614–1616	1525 y 1444
12aaSer1	3150 – 3631	1666 y 1614–1616	1534 y 1444
8aaSer2	3150 – 3651	1666 y 1614–1616	1544 y 1441
10aaSer2	3100 – 3625	1669 y 1614–1616	1534 y 1444
12aaSer2	3111 – 3631	1691 y 1614–1616	1538 y 1447
8aaSer3	3112 – 3650	1694 y 1614–1616	1538 y 1447
10aaSer3	3113 – 3631	1666 y 1614–1616	1541 y 1441
12aaSer3	3113 – 3651	1666 y 1614–1616	1550 y 1440

* E_{PC} = ensambles del péptido cíclico

** Enlace intermolecular

En la Figura IV. 4 se presentan los espectros FT-IR con los dos picos de absorción asociados al movimiento vibratorio del enlace $C=O$ de la amida I (flechas color violeta), los cuales se encuentran en el intervalo de $1666\text{--}1694\text{ cm}^{-1}$ y $1614\text{--}1616\text{ cm}^{-1}$, para el primer (señal fuerte-media) y el segundo pico (señal débil), respectivamente. Estos picos suelen ser característicos de la amida I del enlace antiparalelo por puentes de hidrógeno en un apilamiento tipo β -plegada y los valores encontrados experimentalmente coinciden con los reportados en la bibliografía [59, 92, 93, 96, 106, 111-113, 183-187]. Dichos valores de la literatura están en el intervalo de $1652\text{--}1695\text{ cm}^{-1}$ y $1600\text{--}1631\text{ cm}^{-1}$ para el primer y segundo pico, respectivamente. En la amida I la mayor contribución al estiramiento del enlace $HN\text{--}C=O$, del primer pico es por parte del movimiento del $C=O$, mientras que el segundo pico va asociado al enlace $N\text{--}C$ de la amida. En la Tabla IV. 1 se enlistan los valores experimentales de cada pico de vibración FT-IR de la amida I asignado al posible ensamble de los PCs de cada Serie.

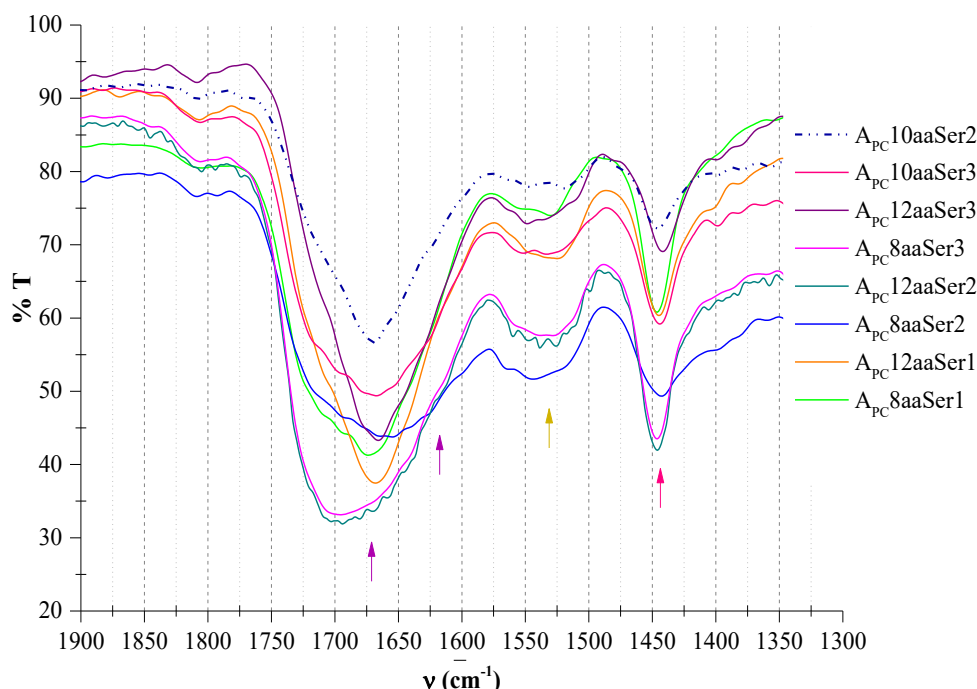


Figura IV. 4. Espectros FT-IR de las bandas de vibración de estiramiento correspondientes a la Amida I (C=O), II (C=O) y III (N-H) propias del apilamiento intermolecular antiparalelo tipo β -hoja para los ensambles de los PCs Serie1-3.

Por otro lado, en la Figura IV. 4 se muestran también las bandas de vibración de las amidas II y III (flecha dorada y rosa, respectivamente), propias del enlace intermolecular por puente de hidrógeno en el apilamiento antiparalelo tipo β -plegada. Estas señales espectroscópicas de las amidas se deben básicamente a la deformación del enlace H-N. Los valores experimentales encontrados para las bandas que se le asignan a estas amidas en los posibles ensambles de los compuestos de los PCs de todas las series oscilan entre 1525–1550 cm^{-1} para la amida II y entre 1440–1447 cm^{-1} para la amida III, cuyos valores individuales se encuentran resumidos en la Tabla IV. 1. Estos valores son congruentes con los datos reportados por otros investigadores, los cuales se ubica en el intervalo de 1512–1550 cm^{-1} [92, 96, 106, 113, 183, 184] para la amida II y ~ 1450 cm^{-1} para la amida III [111, 184].

IV.3.2 Caracterización de los PCs en Condiciones Favorables para el Ensamble por Espectroscopía Raman

Puesto que, los espectros de FT-IR mostraron diferencia entre las bandas de los PCs y los posibles ensambles de éstos. En esta sección sólo se muestran los espectros Raman de los posibles ensambles de los PCs por enlaces intermoleculares por puentes de hidrógeno, los cuales se presentan en la Figura IV. 5 y la Figura IV. 6, obtenidos de las muestras que se prepararon y analizaron según la metodología descrita en la sección IV.2.2.2 sobre Caracterización por Espectroscopía Raman. Estas muestras fueron el resultado del procedimiento de acidificación (pH 2.0) de las soluciones de los PCs, a una concentración 22 mM, las cuales reposaron 72 h en refrigeración y que fueron sometidas a un tratamiento lavado-centrifugado. Dichos tratamientos, como se mencionó anteriormente se efectuaron para 1) acidificación: promover el posible auto-ensamble de los PCs en forma de NTPs y sus respectivas estructuras supramoleculares, y 2) lavado-centrifugado: para remover las sales de amonio y el exceso de TFA de la muestra. En estos espectros Raman se observa la presencia de las bandas de vibración, complementarias a los estudios de espectroscopía por FT-IR, correspondientes al apilamiento antiparalelo de los PCs enlazados por puentes de hidrógeno intermoleculares en una estructura tipo β -plegado que, a su vez conlleva la formación de ensambles en forma de NTPs asociados en ramilletes. Las principales características de estos ensambles se encuentran en las bandas de vibración de las amidas I, II y III, así como la presencia del estiramiento del enlace C-C típico de las estructuras tipo β , entre otras particularidades que ya han sido reportadas y estudiadas ampliamente por otros investigadores [123, 188, 189]. Por ejemplo, en la Figura IV. 5 se observa una banda de vibración ubicada entre 1665–1691 cm^{-1} , la cual se asigna a la amida I, cuya mayor contribución al estiramiento se debe al enlace C=O (~ 80 %) y el resto al estiramiento N-H, típicas de los ensamble β -plegados. La banda de vibración entre 1211–1225 cm^{-1} suele asignarse a una amida III característica de las estructuras β presentes en proteínas y péptidos. Esta banda espectroscópica es mucho más fácil de observar en espectroscopía Raman que en FT-IR, puesto que no involucra la vibración del C=O en el plano del péptido, sino más bien el estiramiento del enlace C-N y el doblamiento N-H. Los picos espectroscópicos ubicados a un valor de 1555–1556 cm^{-1} se asignan a una amida II, cuyas vibraciones se deben al movimiento de doblado del enlace N-H de las cadenas peptídicas en una estructura tipo β -plegada, aunque en ocasiones esta banda

suele disfrazarse con el movimiento de estiramiento C-N (ubicada a 1491 cm^{-1} [188]) de las cadenas laterales de los aminoácidos que componen a los péptidos. Todos los valores de las bandas de los espectros Raman, señalados con flechas azules en la Figura IV. 5, fueron comparados con los valores reportados en la literatura, encontrando que los valores experimentales son congruentes con los reportados por otros autores, en que la amida I presenta picos espectroscópicos Raman de $1628\text{--}1676\text{ cm}^{-1}$ [123, 188, 189], la amidas II entre $1480\text{--}1558\text{ cm}^{-1}$ [188] y la amida III con valores de $1230\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$ [188-190], todas correspondientes a un ambiente de un ensamble antiparalelo tipo β -plegado por puentes de hidrógeno entre péptidos/proteínas.

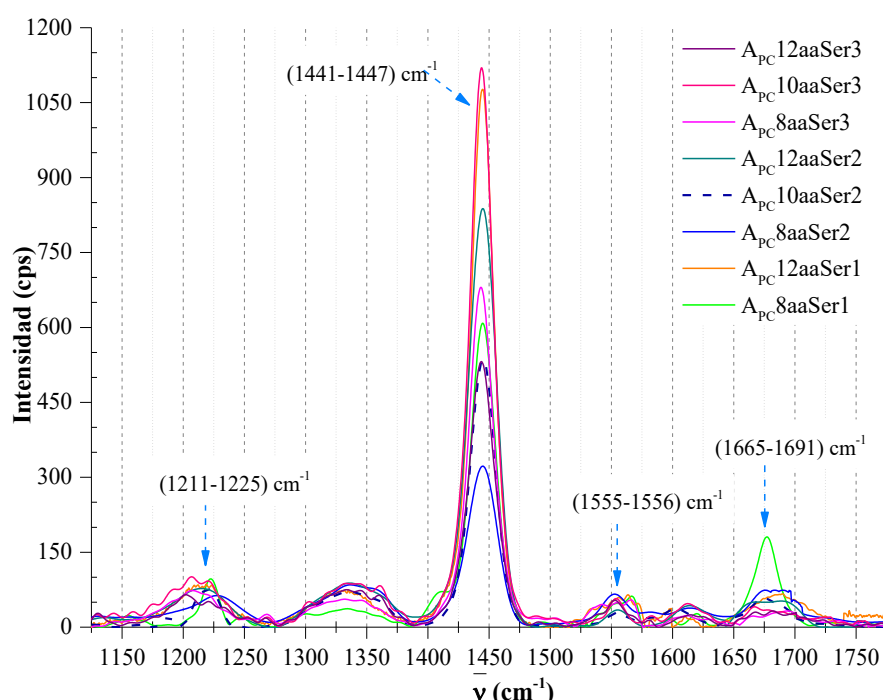


Figura IV. 5. Espectros Raman de las bandas de vibración correspondientes a la Amida I, II y III presentes en apilamiento intermolecular antiparalelo tipo β -plegada para los ensambles de los PCs Serie1-3.

Adicionalmente, se encontró en los espectros Raman de la Figura IV. 5 una banda intensa de vibración en el intervalo de $1441\text{--}1447\text{ cm}^{-1}$, que se asigna al movimiento de doblado de los $-\text{CH}_2-$, como han reportado previamente Pezolet et al. [190], quienes afirman que dichos enlaces son importantes para estimar la cantidad de estructuras β -plegada en los ensambles por puentes de hidrógeno, a través de la relación entre las intensidades normalizadas de la banda de la amida

III contra la banda de vibración de doblamiento de los metilenos ($I_{\text{amidaIII}}/I_{\text{-CH}_2}$), generalmente ubicada a 1450 cm^{-1} . Puesto que la intensidad es relativa a los cambios estructurales.

Mientras que, en la Figura IV. 6 se observa un pico espectroscópico entre $847\text{--}849 \text{ cm}^{-1}$, que se le asigna al estiramiento simétrico del enlace C–N–C, propio de los aminoácidos y proteínas β -plegados. Cuyo valor es cercano al reportado en la bibliografía, el cual se ubica entre $850\text{--}890 \text{ cm}^{-1}$ [188]. Además, en la misma figura se observa una banda de vibración entre $991\text{--}1013 \text{ cm}^{-1}$, asignada al estiramiento del enlace C–C propio de las estructuras tipo β -plegada de proteínas y péptidos, que a su vez podría estar conjugado con la banda de vibración del estiramiento del enlace C–N. Puesto que los valores reportados se aproximan a este intervalo de vibración, en que las bandas del estiramiento del enlace C–C de las estructuras tipo β se encuentran entre $890\text{--}980 \text{ cm}^{-1}$ [188] y para el estiramiento del enlace C–N entre $1083\text{--}1126 \text{ cm}^{-1}$ [188].

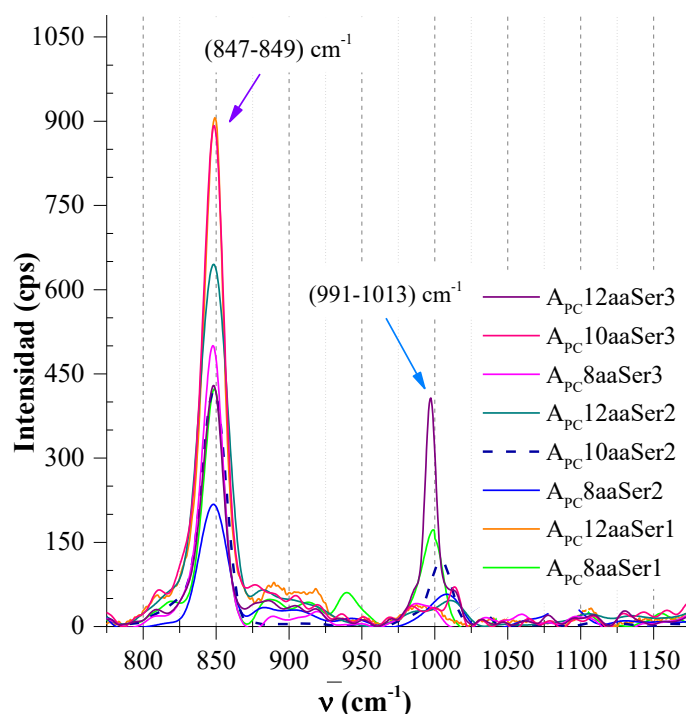


Figura IV. 6. Espectros Raman de las bandas de vibración de estiramiento correspondientes a los enlaces C–C y C–N presentes en las estructuras tipo β -plegada para los ensambles de los PCs Serie1-3.

Finalmente, queda destacar que en el proceso de análisis por Microespectroscopía Raman de las muestras en que se promovió la posible formación de ensambles de los PCs, se observó en una de ellas la presencia física de pequeños cristales, que en primera instancia pone en evidencia a la presencia de los ensambles supramoleculares de los PCs, como se observa claramente en la Figura IV. 7. Dicha imagen es una fotografía que fue tomada con una apertura rectangular de 50 x 50 μm y 20 kx aumentos en el objetivo del microscopio.

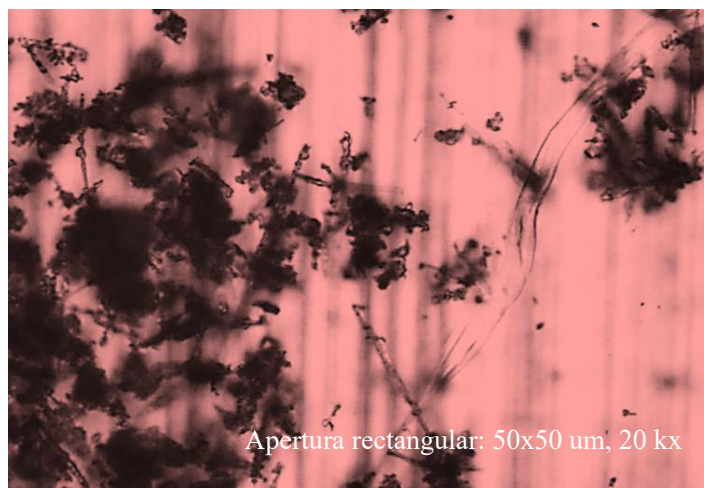


Figura IV. 7. Fotografía de los cristales de NTPs asociados en forma de ramilletes del compuesto 10aaSer3 observados en los análisis de Microespectroscopía Raman, utilizando las condiciones experimentales descritas en la sección IV.2.2.2 Caracterización por Espectroscopía Raman, con una apertura rectangular 50 x 50 μm y 20 kx aumentos en el objetivo del microscopio.

IV.3.3 Caracterización de los Ensambles Supramoleculares por SEM

Los análisis de la morfología y las dimensiones de los ensambles de los PCs en forma de supraestructuras tridimensionales (ramilletes de NTPs) por microscopía SEM, se realizaron con las muestras a concentraciones 2 y 22 mM que fueron acidificadas (pH 2.0), reposando posteriormente durante 72 h en refrigeración, sometidas al proceso de lavado-centrifugado y secadas a 25 $^{\circ}\text{C}$. Las muestras fueron recubiertas con una capa fina de oro para hacerlas electroconductoras y cuyas especificaciones experimentales se describen en la banda al pie de cada figura. Por ejemplo, en la Figura IV. 8 se muestran las supraestructuras tubulares o

ramilletes de NTPs obtenidas a una concentración 2 mM para el compuesto 8aaSer1, cuyas dimensiones aproximadas son al menos mayor a 200 nm de longitud y entre 26– 43 nm de grosor.

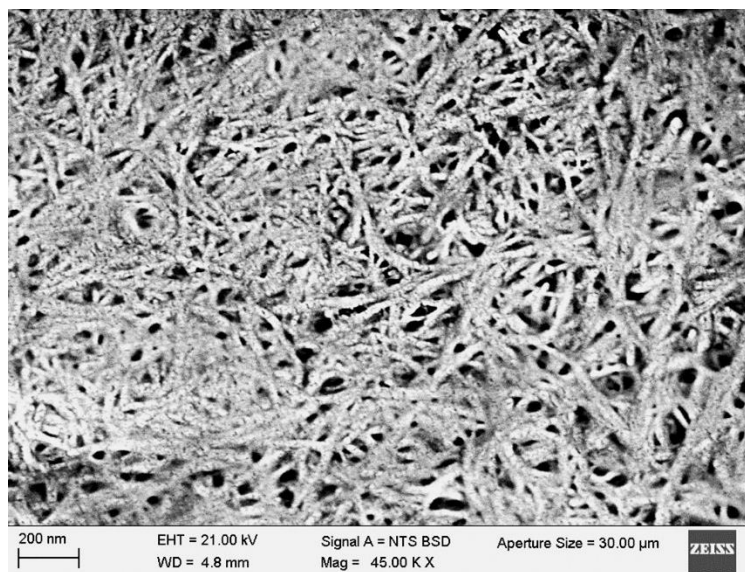


Figura IV. 8. Micrografía SEM de los arreglos supramoleculares de NTPs para el compuesto 8aaSer1 a una concentración 2 mM obtenidos por el método de preparación y tratamiento descritos en la sección IV.2.2.

Materiales y Equipos.

En la Figura IV. 9 se observan las estructuras de los ensambles peptídicos supramoleculares para los compuestos 8aaSer2 (Figura IV. 9a), 8aaSer3 (Figura IV. 9b), 10aaSer2 (Figura IV. 9c) y 10aaSer3 (Figura IV. 9d) a una concentración 2 mM, en que las nanoestructuras supramoleculares tienen dimensiones muy variables, lo cual es de esperarse, puesto que la composición estructural y las dimensiones de cada monómero cíclico y por consiguiente de cada NTP, es diferente en cada compuesto peptídico. Por ejemplo, para el compuesto 8aaSer2 (Figura IV. 9a), los ensambles supramoleculares tienen dimensiones aproximadas de al menos 100 nm de longitud (en la escala mostrada) por 8–23 nm de ancho. Los ensambles supramoleculares del péptido 8aaSer3 presentan dimensiones aproximadas menores a 100 nm (en la escala mostrada) y del mismo modo para los compuestos de 10aaSer2 y 10aaSer3. En el caso de los compuestos de 12aaSer1, 12aaSer2 y 12aaSer3 no fue posible visualizar ensambles supramoleculares de los PCs a esta concentración de estudio.

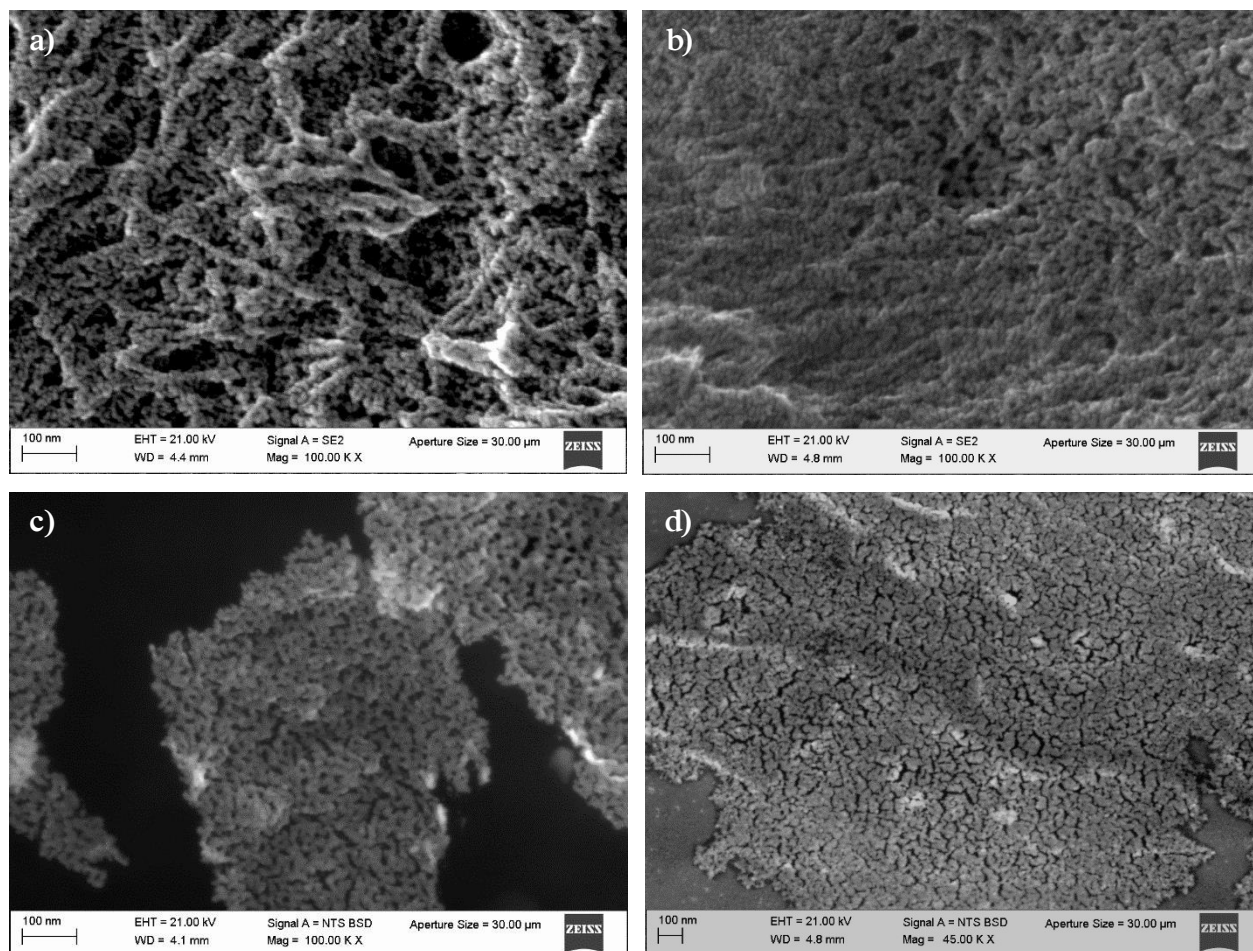


Figura IV. 9. Micrografías SEM de los ensambles peptídicos supramoleculares a) 8aaSer2, b) 8aaSer3, c) 10aaSer2 y d) 10aaSer3, a una concentración 2 mM obtenidos por el método de preparación y tratamiento descritos en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos.

Por otro lado, en la Figura IV. 10 se muestran algunos análisis SEM de los NTPs obtenidos a una concentración de 22 mM. Para el compuesto 8aaSer1 (Figura IV. 10a) se encontró la presencia de estructuras tubulares supramoleculares, las cuales no están dispersas, con al menos 200 nm de longitud (en la escala mostrada) y grosores aproximados entre 13–21 nm. Las nanoestructuras tubulares del compuesto 8aaSer3 (Figura IV. 10b) poseen longitudes aproximadas de al menos 200 nm (en la escala mostrada), con anchuras aproximadas de 27–40 nm. Mientras que los arreglos supramoleculares de NTPs del compuesto 12aaSer3 (Figura IV. 10c) consisten en una serie de ramilletes dispersos que tienen dimensiones aproximadas de al menos 2 μm de longitud y de 72–360 nm de grosor

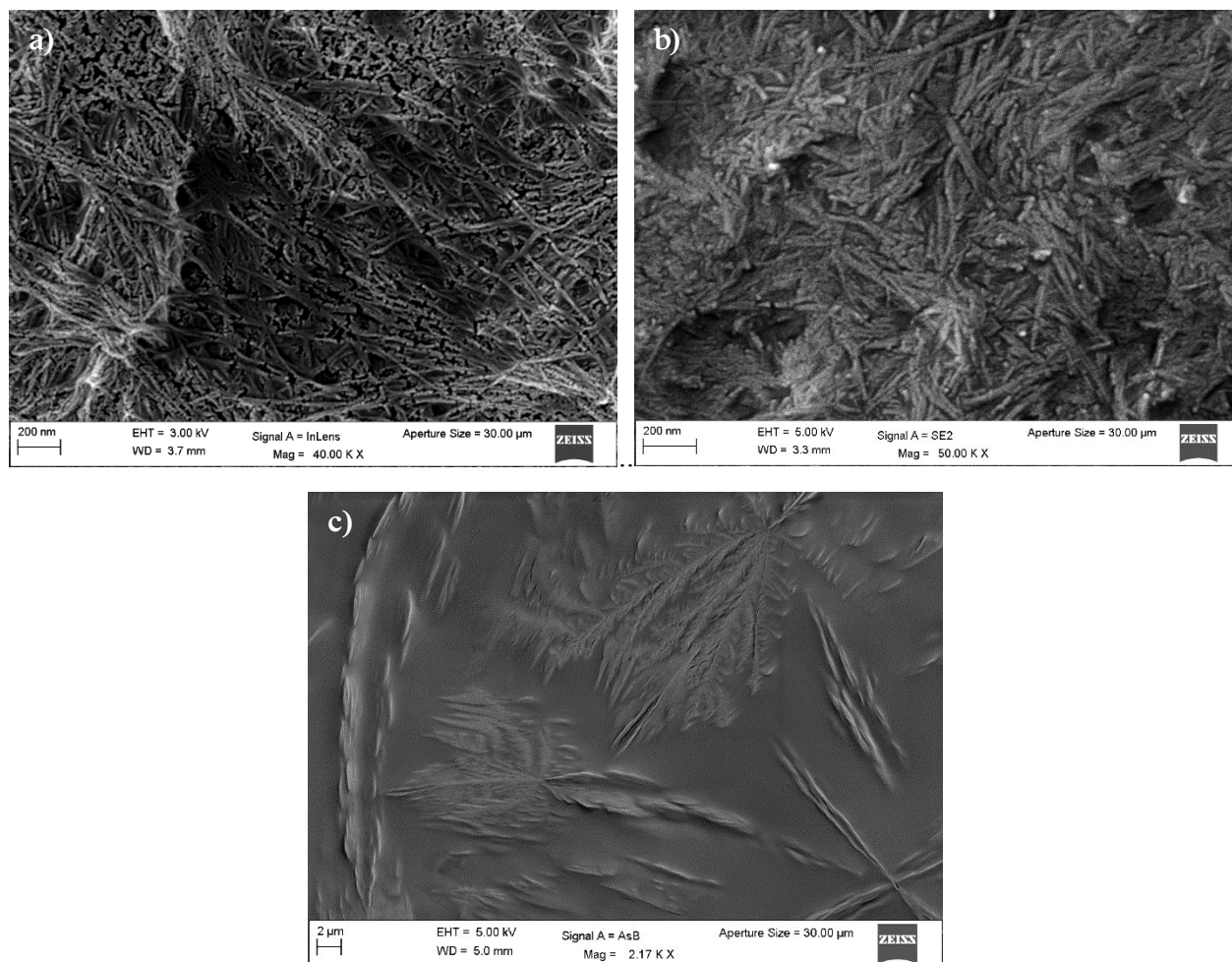


Figura IV. 10. Micrografías SEM de los NTPs de a) 8aaSer1, b) 8aaSer2 y c) 12aaSer3, a una concentración 22 mM obtenidos por el método de preparación y tratamiento descritos en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos.

En un principio los estudios morfológicos y dimensionales por SEM indican que a concentraciones 2 mM es posible observar los ensambles supramoleculares de los NTPs formados a partir de los PCs, aunque no en todos los casos, cuyas dimensiones son al menos unos 100 nm de longitud y aproximadamente unos 43 nm de ancho. Cuando los ensambles supraestructurales se obtienen a una concentración 22 mM, en todos los compuestos, se observan supraestructuras moleculares tubulares que tienen dimensiones aproximadas de 200 hasta 2 000 nm, con anchuras de hasta 360 nm.

IV.3.4 Caracterización de los Ensamblajes Supramoleculares por STEM y HR-TEM

Con la finalidad de corroborar las dimensiones y la morfología de las supraestructuras peptídicas de los compuestos se realizaron estudios por STEM y HR-TEM, pudiendo confirmar a la vez algunas propiedades fisicoquímicas de los compuestos peptídicos.

Los estudios de STEM y HR-TEM se realizaron para las muestras a concentraciones 22 mM que fueron acidificadas (pH 2.0), reposadas por 72 h en refrigeración, sometidas al proceso de lavado-centrifugado, por las razones antes expuestas. Estas muestras fueron depositadas sobre rejillas de Cu con y sin recubrimiento de carbono (400 mallas) y secadas por exposición a luz infrarroja en periodos de 5 min y dejando descansar por 5–10 min, pero también secando por periodos de 15–20min.

En la Figura IV. 11 se presentan las micrografías de STEM y HR-TEM (potencia del láser 300 kV) de las nanoestructuras supramoleculares tubulares e individuales del compuesto 8aaSer1 obtenidas a una concentración 22 mM utilizando la metodología descrita en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos. La Figura IV. 11a muestra varios arreglos supramoleculares dispersos sobre la rejilla con recubrimiento de carbono, cuyas dimensiones de longitud aproximadas son $\leq 1 \mu\text{m}$. En el inserto color sepia de la misma figura se presenta (flecha amarilla y óvalo amarillo) una amplificación STEM (rejilla con recubrimiento de carbono) y la medición de una nanoestructura supramolecular con una longitud de 245.1 nm. Mientras que, en el inserto azul (Figura IV. 11a) se tiene una amplificación HR-TEM (rejilla con recubrimiento de carbono), donde se observa una estructura supramolecular de 1.6 μm de longitud. En la Figura IV. 11b se observa una zona de una estructura supramolecular tubular del compuesto 8aaSer1 (rejilla sin recubrimiento de carbono), cuyo grosor es aproximadamente 41 nm. En el inserto azul de esta figura se presenta una amplificación HR-TEM (rejilla con recubrimiento de carbono) en que las supra-nanoestructuras tubulares exhiben anchuras de 19 y 23 nm.

En este sentido, varios investigadores [92, 96, 106, 113, 123, 124] han reportado que los cristales de las supraestructuras formadas por NTPs asociados en forma de ramilletes o fibrillas (a partir de PC con α -aminoácidos D, L alternados) y analizados por criomicroscopía TEM presentan

dimensiones de 1–10 μm de longitud y un grosor de 50–500 nm. En estos mismos estudios se ha reportado que las supra-nanoestructuras peptídicas presentan estrías periódicas a lo largo del eje x, las cuales corresponden a los diámetros internos de los NTPs individuales, que se encuentran asociados de manera paralela, y que a su vez son el diámetro interno de los PCs. Al respecto, nosotros tratamos de acercarnos a las estructuras peptídicas para visualizar las estrías por HR-TEM, pero no fue posible observarlas debido al recubrimiento de carbono de las rejillas. Además, conforme se focalizaba el láser en la muestra éste iba quemando las supra-nanoestructuras tubulares, debido a la potencia del láser (300 kV, ver inserto Figura IV. 13b).

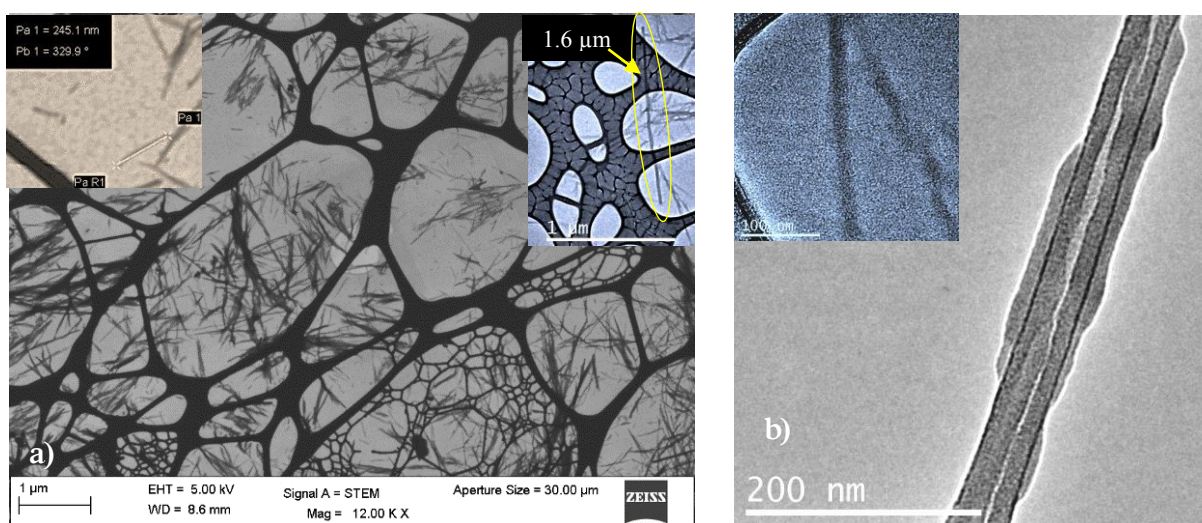


Figura IV. 11. Micrografías STEM y HR-TEM de los arreglos supramoleculares de NTPs a partir del péptido 8aaSer1 (22 mM, obtenidos por la metodología de preparación y tratamiento descritos en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos). Donde: a) STEM en rejilla con recubrimiento de carbono. El inserto sepia (izquierda superior) es una amplificación STEM y el inserto azul (derecha superior) es una amplificación HR-TEM de la misma muestra, y b) HR-TEM de un arreglo supramolecular de NTP en una rejilla sin recubrimiento, el inserto es la amplificación sobre una rejilla con recubrimiento de carbono.

En las micrografías de la Figura IV. 12 se presentan las supra-nanoestructuras de los péptidos 8aaSer1 y 10aaSer3, analizados en rejillas sin recubrimiento de carbono a una concentración de 22 mM. En la Figura IV. 12a se observa que los ensambles supramoleculares de NTPs (cristales oscuros) están sobre las redes de carbono localizadas dentro de la rejilla de Cu. Este comportamiento indica que las estructuras tubulares presentan propiedades hidrofílicas, lo que era de esperarse puesto que tienen grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{CONH}_2$ en las cadenas laterales de la

superficie externa. Grupos que, a su vez les permite formar más fácilmente ensambles supramoleculares, por lo que los ramilletes de los NTPs se visualizan claramente desde concentraciones bajas (2 mM). Por otro lado, en la Figura IV. 12b se tiene la presencia de “acumulados” cristalinos no homogéneos, que cruzan la malla de carbono de la rejilla de Cu. El estado físico de esta muestra es el resultado del calentamiento prolongado (hasta 20 min) por la luz infrarroja en el proceso de secado, lo que ocasionó que las supra-nanoestructuras se fusionaran entre sí. Por otro lado, la disposición sobre la malla de carbono indica que este compuesto es bastante hidrofóbico. Comportamiento que era de esperarse, dada la composición de los péptidos de la Serie 3. En el caso de los compuestos de la Serie 2, se observó (resultados no mostrados en este texto) que los arreglos supramoleculares de los NTPs se colocan sobre los bordes de la malla de carbono, indicando que presentan cierto grado de hidrofilia e hidrofobia, un término intermedio entre los compuestos de la Serie 1 (muy hidrofílicos) y los de la Serie 3 (mayormente hidrofóbicos).

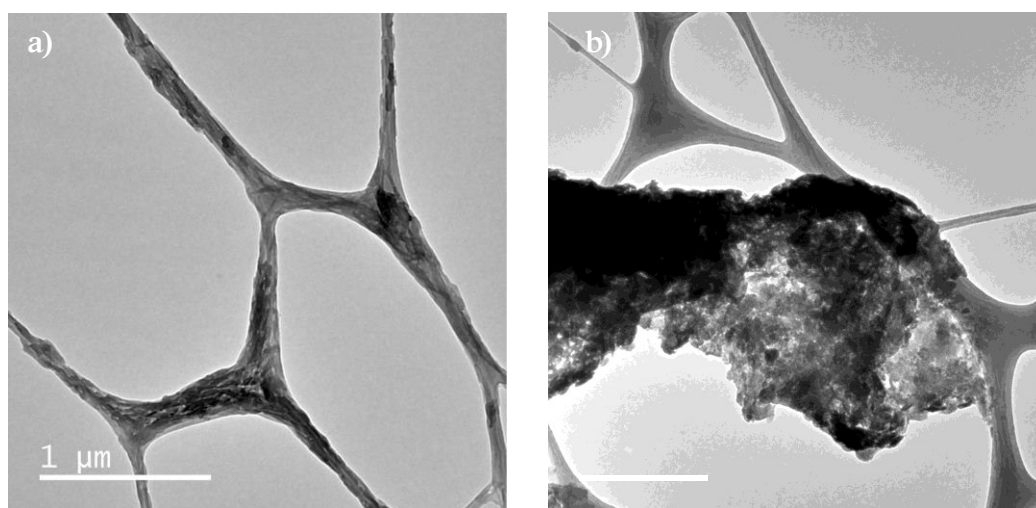


Figura IV. 12. Micrografías HR-TEM de los arreglos supramoleculares de los NTPs de los compuestos peptídicos: a) 8aaSer1 y b) 10aaSer3 (expuesto a calentamiento prolongado con lámpara de IR). Supra-nanoestructuras de NTPs obtenidos por la metodología de preparación y tratamiento descritos en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos, a una concentración 22 mM, depositados sobre rejilla sin recubrimiento de carbono.

Finalmente, en la Figura IV. 13 se muestran las micrografías HR-TEM y STEM del compuesto 8aaSer1 analizado en rejillas de Cu sin recubrimiento de carbono. En la Figura IV.

13a, la muestra fue secada sobre la rejilla por calentamiento con luz infrarroja en periodos de 5 min de exposición por 5 min de descanso. Como se observa los cristales de los arreglos supramoleculares de los NTPs quedaron depositados sobre la malla de carbono, debido a su hidrofilia. En este análisis el propósito era adentrarse en la estructura de las supra-nanoestructuras para visualizar las estrías y las dimensiones de éstas. Sin embargo, no fue posible, porque al acercarnos a la estructura el láser fue quemando el arreglo supramolecular, como se visualizar en las marcas señaladas con círculos verdes (Figura IV. 13a). Por otro lado, la Figura IV. 13b corresponde a la deposición de la muestra sobre la rejilla, sometida a procesos de secado prolongados por exposición a la luz infrarroja en periodos de 20 min x 3 min de descanso. Como se observa, dicho procedimiento afecto la morfología de las supra-nanoestructuras, formando una especie de red. En el inserto de la misma figura se presenta la ampliificación STEM, después del intento de visualizar el estriado del arreglo supramolecular de los NTPs, en que se aprecia cómo se ha quemado el compuesto peptídico debido al láser.

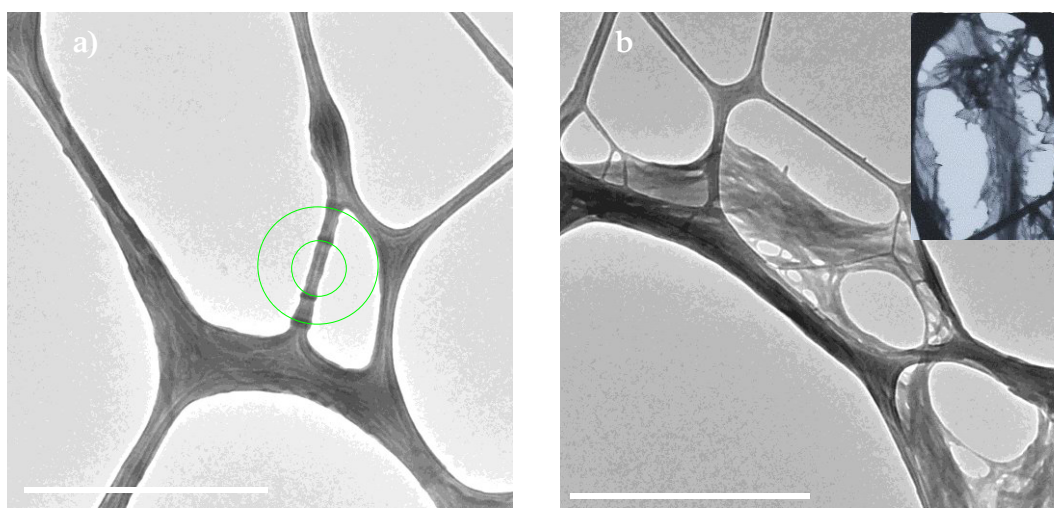


Figura IV. 13. Micrografías HR-TEM y STEM de los arreglos supramoleculares de los NTPs del péptido 8aaSer1 (22 mM) obtenidos por la metodología descrita en la sección IV.2.2. Materiales y Equipos, depositados sobre una rejilla sin recubrimiento de carbono. Donde: a) HR-TEM de los NTPs (expuestos a calentamiento de 5 min x 5 min de descanso con lámpara de IR. Se circula la zona quemada por el láser, y b) HR-TEM de las supra-nanoestructuras peptídicas (expuestos a calentamiento prolongado con lámpara de IR). El inserto es una ampliación STEM de este mismo arreglo quemado por el láser.

IV.4 Conclusiones

En el proceso de inducción del auto-ensamble de los PCs por acidificación (pH 2.0) con ácido concentrado (HCOOH o TFA), a las soluciones básicas (pH 9.0) 2 y 22 mM, con reposo de 72 h y tratadas con lavados y centrifugados, fue posible visualizar la formación de geles y precipitados. Sobre todo en las concentraciones 22 mM. Indicando, en un principio, la posible formación de supra-nanoestructuras peptídicas.

Los estudios por las espectroscopías FT-IR y Raman, permitieron confirmar la asociación intermolecular de los PCs por puentes de hidrógeno, mediante la visualización de la presencia de las bandas de vibración de estiramiento y doblado características de los puentes de hidrógeno intermoleculares, así como de las amidas I, II y III. Todas estas bandas correspondientes a una estructura β -plegada por el apilamiento antiparalelo PC-PC, debido a las interacciones entre los grupos $C=O \cdots H-N$. Esto indica que, efectivamente los geles y precipitados observados en las soluciones acidificadas de los PCs podrían corresponder a ensamblajes supramoleculares peptídicos. Además, en los estudios de Microespectroscopía Raman, fue posible visualizar en una de las muestras, estructuras cristalinas tubulares, que podrían corresponder a los ensamblajes supramoleculares esperados.

En este sentido, el análisis estructural y morfológico por SEM, STEM y HR-TEM de las muestras acidificadas (pH 2.0) a una concentración 2 y 22 mM permitió confirmar la presencia de estructuras tubulares supramoleculares con dimensiones aproximadas entre 100–2000 nm de longitud por 8–360 nm de grosor. Al respecto, se observó que a una concentración de 2 mM, no en todos los casos los péptidos alcanzan la morfología de supra-nanoestructuras tubular, sobre todo en el caso de los monómeros de 12aa. Sin embargo, a concentraciones de 22 mM todos los compuestos peptídicos presentan supra-nanoestructura tubulares, lo cual era de esperarse puesto que para PCs de un mismo enantiómero, se ha reportado que la formación de arreglos supramoleculares de NTPs se observa a concentraciones de 20 mM [92]. Otro factor que influye en la rápida asociación de los NTPs en forma de arreglos supramoleculares para su visualización en microscopía SEM, STEM y HR-TEM es la presencia de grupos formadores de puentes de

hidrógeno intermoleculares, que son más predominantes y están más dispuestos en la superficie externa de los compuestos de la Serie 1. En este contexto, la formación de fibrillas por el ensamble supramolecular decrece en el siguiente orden: Serie 1 > Serie 2 > Serie 3.

Por otro lado, los estudios de microscopía efectuados en rejillas de Cu con y sin recubrimiento de carbono permitieron confirmar las propiedades de la superficie externa de los arreglos supramoleculares de los NTPs, cuya hidrofilia decrece de la Serie 1 a la Serie 3, lo cual es congruente con la disposición de grupos formadores de puentes de hidrógeno, dispuestos en la superficie externa de los monómeros cíclicos.

En cuanto a la determinación de los diámetros internos de los NTPs individuales y por consecuente de los PCs que conforman los arreglos supramoleculares, no fue posible por las técnicas de microscopía utilizadas, ya que al focalizar la energía del láser para visualizar dentro de la supraestructura de los cristales formados por NTPs, los ensambles no resistieron la potencia del láser y se dañaron estructuralmente.

Finalmente, se observó un fenómeno interesante en los estudios de microscopía para las muestras acidificadas y secadas con lámpara de luz infrarroja. En que la exposición por tiempos prolongados de hasta 20 min modificó la morfología de las supraestructuras, fusionando los ramilletes formados por los NTPs y transformándolos en una especie de red tejida.

CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo principal del presente estudio ha sido diseñar, sintetizar y caracterizar ocho péptidos cíclicos nuevos, los cuales pueden proveer nanotubos peptídicos, que a su vez podrían asociarse supramolecularmente para formar fibrillas o ramilletes. Estas estructuras tubulares podrían proporcionar diversas propiedades superficiales. El diseño de estos compuestos difiere en la longitud de la cadena peptídica de las secuencias aminoacídicas y la composición química de los aminoácidos, pudiendo obtener PCs con diferentes diámetros internos de Van der Waals, entre 7 y 13 Å, con diversas propiedades útiles para su uso en varias aplicaciones. Por ejemplo, como nanoplataformas o pseudo-fases estacionarias en métodos electrocinéticos como la electroforesis capilar.

Del producto obtenido en el desarrollo de este proyecto las conclusiones generales y las contribuciones más novedosas se enlistan a continuación:

1. Se optimizó la técnica de SPFS-Fmoc y el proceso de ciclado cabeza-cola de péptidos, pudiendo obtener ocho PCs de tres diámetros diferentes con 8, 10 y 12 α -aminoácidos D, L alternados, los cuales fueron purificados tanto por CLAR, como por precipitación con solventes, obteniendo los productos finales con altos rendimientos.
2. Se diseñó y optimizó un método de caracterización de los PCs por CLAR, que permitió identificar la formación del enlace peptídico cabeza-cola entre los grupos carboxilo y amino de los péptidos de partida. Pudiendo observar una ganancia de hidrofobicidad en los PCs protegidos y una ganancia de hidrofilia en los PCs desprotegidos, debido a la presencia de los grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{NH}_2$ libres en sus cadenas laterales.
3. Se determinaron las condiciones óptimas de solubilidad de los PCs en un *BGE* básico (pH 8.0) órgano-acuoso para su posterior análisis por EC.
4. Se desarrolló una nueva metodología de análisis basada en electroforesis capilar acoplada en línea a espectrometría de masas, a través de una interface de ionización electrospray. Después de optimizar varios parámetros de análisis, la metodología EC-IES-EM demostró ser una herramienta innovadora por su sencillo manejo y por la

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

rapidez para la caracterización de los compuestos cíclicos. Además, esta misma técnica también permitió estudiar la estabilidad de los PCs almacenados en solución por tiempos prolongados, encontrando muy bajo porcentaje de deciclización del compuesto. En este contexto, la alta pureza de los PCs, la verificación de su estructura y su composición, permite proponerlos como potenciales precursores formadores de NTPs de interés, que podrían ser empleados como nanoplataformas en estudios de diagnóstico o bien como herramientas tipo pseudo-tamiz con fines de mejorar algunas separaciones.

5. Los estudios electroforéticos de los PCs mostraron que, en muchos casos la movilidad electroforética está en concordancia con la carga global teórica y la masa, mientras que los comportamientos inesperados pueden ser debido a las configuraciones específicas de los péptidos, como consecuencia de la naturaleza química de su secuencia.
6. El análisis electroforético de los compuestos peptídicos disueltos en medio básico/ácido y en *BGE* básico/ácido, mostraron que el medio de disolución modifica la carga teórica de los compuestos peptídicos, pero el medio de separación impone la carga final a éstos mismos, dependiendo de la separación. Por lo que, el parámetro más importante en este sentido es el medio de separación, del que depende la carga global final del compuesto peptídico.
7. Se encontró, además, que la movilidad electroforética pone en evidencia la posible protonación-desprotonación de los sitios activos de los diferentes compuestos, que a su vez podrían indicar estados intermediarios, así como la posibilidad de formación de auto-ensambles. Al respecto, fue posible verificar por la metodología desarrollada por EC-IES-EM, la formación de ensambles de los PCs, mediante la identificación de dímeros y tetrameros.
8. Se optimizaron las condiciones de acidificación para la posible formación de auto-ensambles de los PCs en NTPs y estos a su vez en supraestructuras moleculares, pudiendo obtener geles y precipitados.
9. Los estudios espectroscópicos realizados por FT-IR y Raman, permitieron confirmar la asociación de los PCs debido a la interacción intermolecular (antiparalela) por puentes de hidrógeno entre los esqueletos PC-PC, mediante los grupos $C=O \cdots H-N$, formando un estructuras tipo β -plegada. Además, los estudios de Microespectroscopía Raman, permitieron observar pequeñas supraestructuras cristalinas tubulares. Indicando que,

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

efectivamente los geles y precipitados observados en las soluciones acidificadas de los PCs podrían corresponder a ensamblajes supramoleculares peptídicos

10. Se confirmó la presencia de las supraestructuras tubulares nanométricas mediante el análisis estructural y morfológico por las microscopías SEM, STEM y HR-TEM. Pudiendo verificar la influencia de los grupos formadores de puentes de hidrógeno de la superficie externa de los compuestos para la formación de ramilletes por el ensamblaje supramolecular de los NTPs. En que, el ensamblaje supramolecular de los NTPs decrece en el siguiente orden: compuestos de la Serie 1 > Serie 2 > Serie 3.
11. Adicionalmente, estos estudios de microscopía permitieron confirmar las propiedades hidrofílicas y/o hidrofóbicas de la superficie externa de los arreglos supramoleculares formados NTPs, cuya hidrofilia decrece de la Serie 1 a la Serie 3.
12. Por otro lado, no fue posible la determinación de los diámetros internos de los NTPs individuales y por consecuente de los PCs precursores de los ensamblajes supramoleculares, por las técnicas de microscopía utilizadas.
13. Finalmente, en los estudios de microscopía, se observó la modificación de la morfología de las supraestructuras peptídicas, debido a la exposición prolongada con luz infrarroja.

TRABAJO FUTURO

En este trabajo de tesis nosotros presentamos el diseño, síntesis y caracterización de ocho PCs que son capaces de auto-ensamblarse en forma de NTPs y, éstos a su vez en estructuras tridimensionales tipo ramilletes o fibrillas. Estas nanoestructuras supramoleculares podrían ser útiles para diversas aplicaciones, por ejemplo, como nanoplataformas en diagnóstico y como pseudo-fases estacionarias en el desarrollo de metodologías como ECZ-UV y EC-IES-EM, entre otras. Sin embargo, para poder realizar su aplicación es importante determinar varios parámetros y propiedades, tales como: el punto de formación de los NTPs, confirmar los diámetros internos de cada NTP, conocer las propiedades fisicoquímicas de las supraestructuras de NTPs, entre otros puntos a tratar. En este sentido, las perspectivas del proyecto se enfocan en:

- ★ La construcción de un tipo de diagramas de fases de cada uno de los compuestos por la optimización de la metodología de ECZ-UV o por la optimización de la técnica de Dispersión Dinámica de Luz, con la finalidad de conocer la concentración mínima requerida para lograr el punto de auto-ensamble de los PCs en forma de NTPs y estos en ensambles supramoleculares.
- ★ Obtener los NTPs formados a partir de esta concentración mínima requerida y confirmar los diámetros internos de Van der Waals de los NTPs individuales por la técnica de criomicroscopía HR-TEM.
- ★ Realizar el estudio de las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los NTPs para conocer, principalmente, la diversidad de la naturaleza de la superficie externa de éstos. Lo cual permitirá, proponerlos como nanoplataformas o pseudo-fases estacionarias en métodos electrocinéticos como la EC.
- ★ Evaluar el potencial de cada una de las Series de compuestos como objetos de selectividad y sensibilidad para el análisis en ECZ-UV. De tal modo, que puedan desarrollarse nuevas metodologías empleando a los NTPs como herramientas de selección y eventualmente como herramientas de detección, encontrando la vía de análisis de nuevos compuestos de interés, o que permitan responder a los nuevos retos sociales de las ciencias analíticas a nivel diagnóstico, en el análisis biomédico y medio ambiental.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- ★ Retomando el último punto, sería interesante evaluar a los NTPs de la Serie 1 como pseudo-nanosportes en EC para la separación, por ejemplo, de isómeros como el catecol y la hidroquinona; puesto que poseen en su superficie externa grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{COO}-\text{NH}_2$. Pudiendo conocer su potencial selectividad al comparar los resultados con los estudios previos realizados por Zhou et al. [12] con NTCs funcionalizados con grupos $-\text{COOH}$, para estas mismas moléculas.

Considerando este último inciso, se hace la propuesta de utilizar a los NTPs como nuevos modificadores en EC para la separación de isómeros. Puesto que, la quiralidad de las moléculas enantioméricas ha cobrado gran importancia en biotecnología, química, agricultura y especialmente en la industria farmacéutica. En este sentido, se estima que un 50 % de los ingredientes activos farmacéuticos son quirales [11]. A pesar de que, la actividad farmacológica y la toxicidad de los ingredientes activos depende altamente de su quiralidad, sólo el 25 % son administrados como enantiómeros puros [11]. Por lo que, la separación quiral de los componentes activos es esencial para obtener únicamente el enantiómero deseado. Sin embargo, la separación de fármaco quirales no suele ser directa debido a la similitud de las propiedades fisicoquímicas.

Las técnicas de separación que ofrecen alta resolución y eficiencia como la CLAR, la cromatografía de gases y la EC, han sido ampliamente utilizadas para la separación de los enantiómeros de fármacos quirales. Hasta ahora, la aproximación más viable para aumentar la sensibilidad de las técnicas ha sido la introducción de grupos fluorescentes a los analitos o mediante la modificación química de las estructuras de éstos, con la finalidad de mejorar las interacciones con la técnica de separación. En EC se han hecho separaciones enantioselectivas de dos enantiómeros empleando selectores quirales dentro del *BGE*, de esta forma los enantiómeros forman dos complejos diastereoisoméricos por interacción molecular. De aquí el interés de enfocar las perspectivas del proyecto en este tipo de separaciones. Puesto que, sería interesante utilizar a los nuevos NTPs de este trabajo como potenciales nanosportes selectivos que permitan separar diversos isómeros, debido a sus propiedades particulares y a las posibles interacciones que podrían tener con diversas moléculas, como los fármacos. En un principio ensayando con la resolución de moléculas muy sencillas como el catecol y la hidroquinona, y posteriormente con algunos componentes enantioméricos de uso farmacológico.

1 Referencias

- [1] F. d'Orlyé, A. Varenne, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, B. Teste, S. Descroix, P. Gareil, Charge-based characterization of nanometric cationic bifunctional maghemite/silica core/shell particles by capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 30 (2009) 2572-2582.
- [2] U. Pyell, Characterization of nanoparticles by capillary electromigration separation techniques, *Electrophoresis*, 31 (2010) 814-831.
- [3] M. Mokaddem, P. Gareil, J. E. Belgaied, A. Varenne, A new insight into suction and dilution effects in capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry via an electrospray ionization interface. Part I-Suction effect, *Electrophoresis*, 29 (2008) 1957-1964.
- [4] M. Mokaddem, P. Gareil, A. Varenne, Online CIEF-ESI-MS in glycerol–water media with a view to hydrophobic protein applications, *Electrophoresis*, 30 (2009) 4040-4048.
- [5] M. Mokaddem, A. Varenne, J.-E. Belgaied, C. c. Factor, P. Gareil, Single-run separation of cationic, anionic, and polyanionic compounds by CE-ESI-MS, *Electrophoresis*, 28 (2007) 3070-3077.
- [6] M. Girardot, F. D'Orlyé, S. Descroix, A. Varenne, Aptamer-conjugated nanoparticles: Preservation of targeting functionality demonstrated by microchip electrophoresis in frontal mode, *Anal. Biochem.*, 435 (2013) 150-152.
- [7] M. Girardot, H.-Y. Li, S. Descroix, A. Varenne, Determination of binding parameters between lysozyme and its aptamer by frontal analysis continuous microchip electrophoresis (FACMCE), *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 4052-4058.
- [8] M. Girardot, H.-Y. Li, S. Descroix, A. Varenne, Aptamer–Target Interaction: A Comprehensive Study by Microchip Electrophoresis in Frontal Mode, *Chromatographia*, 76 (2013) 305-312.
- [9] J. Zavaleta, D. Chinchilla, A. Brown, A. Ramirez, V. Calderon, T. Sogomonyan, F. A. Gomez, Recent developments in affinity capillary electrophoresis: a review, *Curr. Anal. Chem.*, 2 (2006) 35-42.
- [10] Z. Wang, G. Luo, J. Chen, S. Xiao, Y. Wang, Carbon nanotubes as separation carrier in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 24 (2003) 4181-4188.
- [11] L. Suntornsuk, Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398 (2010) 29-52.
- [12] R. Zhou, P. Wang, H.-C. Chang, Bacteria capture, concentration and detection by alternating current dielectrophoresis and self-assembly of dispersed single-wall carbon nanotubes, *Electrophoresis*, 27 (2006) 1376-1385.
- [13] C. H. Devillers, D. Boturyn, C. Bucher, P. Domy, P. Labbé, J.-C. Moutet, G. Royal, E. Saint-Aman, Redox-Active Biomolecular Architectures and Self-Assembled Monolayers Based on a Cyclodecapeptide Regioselectively Addressable Functional Template, *Langmuir*, 22 (2006) 8134-8143.
- [14] Y. François, K. Zhang, A. Varenne, P. Gareil, New integrated measurement protocol using capillary electrophoresis instrumentation for the determination of viscosity, conductivity and absorbance of ionic liquid-molecular solvent mixtures, *Anal. Chim. Acta*, 562 (2006) 164-170.
- [15] F. d'Orlyé, A. Varenne, P. Gareil, Determination of nanoparticle diffusion coefficients by Taylor dispersion analysis using a capillary electrophoresis instrument, *J. Chromatogr. A*, 1204 (2008) 226-232.
- [16] S. Fermas, F. Gonnet, A. Varenne, P. Gareil, R. Daniel, Frontal Analysis Capillary Electrophoresis Hyphenated to Electrospray Ionization Mass Spectrometry for the Characterization of the Antithrombin/Heparin Pentasaccharide Complex, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 4987-4993.
- [17] B. Teste, F. Malloggi, A.-L. Gassner, T. Georgelin, J.-M. Siaugue, A. Varenne, H. Girault, S. Descroix, Magnetic core shell nanoparticles trapping in a microdevice generating high magnetic gradient, *Lab on a Chip*, 11 (2011) 833-840.
- [18] B. Teste, F. Malloggi, J.-M. Siaugue, A. Varenne, F. Kanoufi, S. Descroix, Microchip integrating magnetic nanoparticles for allergy diagnosis, *Lab on a Chip*, 11 (2011) 4207-4213.
- [19] J. Jain, S. Jain, N. Jain, *Fundamentals of biochemistry*, 2004.
- [20] J. Mc Murry, *Organic Chemistry*, 2008.
- [21] M. Bodanszky, E. Wünsch, *Z. Naturforsch.*, 22 B (1967) 1269-1276.
- [22] S. Sakakibara, Synthesis of large peptides in solution, *Biopolymers*, 37 (1995) 17-28.
- [23] J. Howl, *Peptides Synthesis and Applications*, 298 (2005).
- [24] W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: a practical approach*, 2003.

- [25] H. Matsui, *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. Peptide Nanotubes, 8 (2004).
- [26] C. R. a. K. Martin, P., The emerging field of nanotube biotechnology, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2 (2003) 29-37.
- [27] J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers, *Science*, 294 (2001) 1684-1688.
- [28] D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, Self-Assembling Organic Nanotubes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40 (2001) 988.
- [29] S. Scanlon, A. Aggeli, Self-assembling peptide nanotubes, *Nano Today*, 3 (2008) 22-30.
- [30] E. Gazit, Self-assembled peptide nanostructures: the design of molecular building blocks and their technological utilization, *Chem. Soc. Rev.*, 36 (2007) 1263-1269.
- [31] K. Rajagopal, J. P. Schneider, Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 14 (2004) 480-486.
- [32] R. Tenne, L. Margulis, M. Genut, G. Hodes, Polyhedral and cylindrical structures of tungsten disulphide, *Nature*, 360 (1992) 444-446.
- [33] D. Tasis, N. Tagmatarchis, A. Bianco, M. Prato, Chemistry of Carbon Nanotubes, *Chem. Rev.*, 106 (2006) 1105-1136.
- [34] C. Valéry, F. Artzner, M. Paternostre, Peptide nanotubes: molecular organisations, self-assembly mechanisms and applications, *Soft Matter*, 7 (2011) 9583-9594.
- [35] S.-j. Choi, W.-j. Jeong, S.-K. Kang, M. Lee, E. Kim, D. Y. Ryu, Y.-b. Lim, Differential Self-Assembly Behaviors of Cyclic and Linear Peptides, *Biomacromolecules*, 13 (2012) 1991-1995.
- [36] C. Tarabout, S. Roux, F. Gobeaux, N. Fay, E. Pouget, C. Meriadec, M. Ligeti, D. Thomas, M. Ijsselstijn, F. Besselievre, D.-A. Buisson, J.-M. Verbavatz, M. Petitjean, C. Valéry, L. Perrin, B. Rousseau, F. Artzner, M. Paternostre, J.-C. Cintrat, Control of peptide nanotube diameter by chemical modifications of an aromatic residue involved in a single close contact, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108 (2011) 7679-7684.
- [37] R. De La Rica, E. Mendoza, L. M. Lechuga, H. Matsui, Label-free pathogen detection with sensor chips assembled from peptide nanotubes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 47 (2008) 9752-9755.
- [38] J. H. Kim, J. Ryu, C. B. Park, Selective detection of neurotoxin by photoluminescent peptide nanotubes, *small*, 7 (2011) 718-722.
- [39] S. Fernández-López, H.-S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxen, M. R. Ghadiri, Antibacterial agents based on the cyclic D, L- α -peptide architecture, *Nature*, 412 (2001) 452-455.
- [40] J. T. Fletcher, Finlay, J. A., Callow, M. E., Callow, J. A., Ghadiri, M. R. , A combinatorial approach to the discovery of biocidal six-residue cyclic D,L- α -peptides against the bacteria methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *E. coli* and the biofouling algae *Ulva linza* and *Navicula perminuta.*, *Chemistry*, 13 (2007) 4008-4013.
- [41] W. S. Horne, C. M. Wiethoff, C. Cui, K. M. Wilcoxen, M. Amorin, M. R. Ghadiri, G. R. Nemerow, Antiviral cyclic d,l- β -peptides: Targeting a general biochemical pathway in virus infections, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13 (2005) 5145-5153.
- [42] R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, M. Á. Herranz, L. Sánchez, N. Martín, W. Seitz, D. M. Guldi, Electron transfer in Me-blocked heterodimeric β -peptide nanotubular donor-acceptor hybrids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104 (2007) 5291-5294.
- [43] R. J. Brea, M. E. Vázquez, M. Mosquera, L. Castedo, J. R. Granja, Controlling Multiple Fluorescent Signal Output in Cyclic Peptide-Based Supramolecular Systems, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 1653-1657.
- [44] L.-Q. Gu, Dalla Serra, M., Vincent, J. B., Vigh, G., Cheley, S., Braha, O. and Bayley. H., Reversal of charge selectivity in transmembrane protein pores by using noncovalent molecular adapters, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97 (2000) 3959-3964.
- [45] K. Motesharei, M. R. Ghadiri, Diffusion-Limited Size-Selective Ion Sensing Based on SAM-Supported Peptide Nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 11306-11312.
- [46] J. Sánchez-Quesada, M. R. Ghadiri, H. Bayley, O. Braha, Cyclic Peptides as Molecular Adapters for a Pore-Forming Protein, *J. Am. Chem. Soc.*, 122 (2000) 11757-11766.
- [47] N. Ashkenasy, W. S. Horne, M. R. Ghadiri, Design of Self-Assembling Peptide Nanotubes with Delocalized Electronic States, *Small*, 2 (2006) 99-102.
- [48] J. Couet, J. D. J. S. Samuel, A. Kopyshv, S. Santer, M. Biesalski, Peptide-Polymer Hybrid Nanotubes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 44 (2005) 3297-3301.

- [49] J. D. Hartgerink, T. D. Clark, M. R. Ghadiri, Peptide Nanotubes and Beyond, *Chemistry – A European Journal*, 4 (1998) 1367-1372.
- [50] F. Fujimura, S. Kimura, Columnar Assembly Formation and Metal Binding of Cyclic Tri- β -peptides Having Terpyridine Ligands, *Org. Lett.*, 9 (2007) 793-796.
- [51] C. Reiriz, R. J. Brea, R. Arranz, J. L. Carrascosa, A. Garibotti, B. Manning, J. M. Valpuesta, R. Eritja, L. Castedo, J. R. Granja, β -Peptide Nanotube Templating of One-Dimensional Parallel Fullerene Arrangements, *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 11335-11337.
- [52] C. Steinem, A. Janshoff, M. S. Vollmer, M. R. Ghadiri, Reversible Photoisomerization of Self-Organized Cylindrical Peptide Assemblies at Air-Water and Solid Interfaces, *Langmuir*, 15 (1999) 3956-3964.
- [53] M. S. Vollmer, T. D. Clark, C. Steinem, M. R. Ghadiri, Photoswitchable Hydrogen-Bonding in Self-Organized Cylindrical Peptide Systems, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 38 (1999) 1598-1601.
- [54] J. Sánchez-Quesada, M. P. Isler, M. R. Ghadiri, Modulating Ion Channel Properties of Transmembrane Peptide Nanotubes through Heteromeric Supramolecular Assemblies, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 10004-10005.
- [55] V. r. Dartois, J. Sanchez-Quesada, E. Cabezas, E. Chi, C. Dubbelde, C. Dunn, J. Granja, C. Gritzen, D. Weinberger, M. R. Ghadiri, T. R. Parr, Systemic Antibacterial Activity of Novel Synthetic Cyclic Peptides, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49 (2005) 3302-3310.
- [56] N. N. Liang, B. Zhang, Impact of nanomaterials on high throughput separation methodologies, *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 14 (2011) 182-190.
- [57] H. Bayley, Designed membrane channels and pores, *Curr. Opin. Biotech.*, 10 (1999) 94-103.
- [58] T. D. Clark, L. K. Buehler, M. R. Ghadiri, Self-Assembling Cyclic β -Peptide Nanotubes as Artificial Transmembrane Ion Channels, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 651-656.
- [59] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, Artificial transmembrane ion channels from self-assembling peptide nanotubes, *Nature*, 369 (1994) 301-304.
- [60] J. Sánchez-Quesada, H. Sun Kim, M. R. Ghadiri, A Synthetic Pore-Mediated Transmembrane Transport of Glutamic Acid, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40 (2001) 2503-2506.
- [61] J. Sánchez-Quesada, M. P. Isler, M. R. Ghadiri, Modulating Ion Channel Properties of Transmembrane Peptide Nanotubes through Heteromeric Supramolecular Assemblies, *Journal of the American Chemical Society*, 124 (2002) 10004-10005.
- [62] J. R. Granja, M. R. Ghadiri, Channel-Mediated Transport of Glucose across Lipid Bilayers, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 10785-10786.
- [63] J. Montenegro, M. R. Ghadiri, J. R. Granja, Ion Channel Models Based on Self-Assembling Cyclic Peptide Nanotubes, *Accounts Chem. Res.*, 46 (2013) 2955-2965.
- [64] F. Rahmat, Thamwattana, N., and Cox, B. J., Modelling peptide nanotubes for artificial ion channels, *Nanotechnology*, 22 (2011) 1-8.
- [65] Z. Chermahini, A. Chermahini, H. Dabbagh, A. Teimouri, Complexation of all-cis cyclo(L-Pro)₃ and alkali metal cations: a DFT study, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem. (DNLM)*, (2015) 1-9.
- [66] N. T. F. Rahmat, B. J. Cox, Modelling peptide nanotubes for artificial ion channels, *Nanotechnology*, 22 (2011) 445707.
- [67] M. Pérez-Alvite, M. Mosquera, L. Castedo, J. Granja, Toward the rational design of molecular rotors ion sensors based on β -cyclic peptide dimers, *Amino Acids*, 41 (2011) 621-628.
- [68] T. Shimizu, Y. Tanaka, K. Tsuda, Cation binding of bis(cyclic tetrapeptide). 1H n.m.r. and c.d. evidence for conformational fitting of cyclic backbone and covalent CSSC bridge, *Int. J. Biol. Macromol.*, 5 (1983) 179-185.
- [69] M. Tarek, B. Maigret, C. Chipot, Molecular Dynamics Investigation of an Oriented Cyclic Peptide Nanotube in DMPC Bilayers, *Biophys. J.*, 85 (2003) 2287-2298.
- [70] H. Hwang, G. C. Schatz, M. A. Ratner, Steered Molecular Dynamics Studies of the Potential of Mean Force of a Na⁺ or K⁺ Ion in a Cyclic Peptide Nanotube, *J. Phys. Chem. B*, 110 (2006) 26448-26460.
- [71] R. Chapman, K. A. Jolliffe, S. Perrier, Synthesis of Self-assembling Cyclic Peptide-polymer Conjugates using Click Chemistry, *Aust. J. Chem.*, 63 (2010) 1169-1172.
- [72] M. G. J. ten Cate, N. Severin, H. G. Börner, Self-Assembling Peptide-Polymer Conjugates Comprising (d-alt-l)-Cyclopeptides as Aggregator Domains, *Macromolecules*, 39 (2006) 7831-7838.
- [73] X. Gao, H. Matsui, Peptide-Based Nanotubes and Their Applications in Bionanotechnology, *Advanced Materials*, 17 (2005) 2037-2050.
- [74] M. Reches, E. Gazit, Casting metal nanowires within discrete self-assembled peptide nanotubes, *Science*, 300 (2003) 625-627.

- [75] J. Castillo-León, R. Rodríguez-Trujillo, S. Gauthier, A. C. O. Jensen, W. E. Svendsen, Micro-"factory" for self-assembled peptide nanostructures, *Microelectronic Engineering*, 88 (2011) 1685-1688.
- [76] D. A. Tsybolski, E. L. Bakota, L. S. Witus, J.-D. R. Rocha, J. D. Hartgerink, R. B. Weisman, Self-assembling peptide coatings designed for highly luminescent suspension of single-walled carbon nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 17134-17140.
- [77] R. R. Ketchum, W. Hu, T. A. Cross, High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR, *Science*, 261 (1993) 1457-1460.
- [78] D. A. Langa, Three-dimensional structure at 0.86 Å of the uncomplexed form of the transmembrane ion channel peptide gramicidin A, *Science*, 241 (1988) 188-191.
- [79] C. I. Valéry, M. t. Paternostre, B. Robert, T. e. Gulik-Krzywicki, T. Narayanan, J.-C. Dedieu, G. r. Keller, M.-L. Torres, R. Cherif-Cheikh, P. Calvo, F. Artzner, Biomimetic organization: Octapeptide self-assembly into nanotubes of viral capsid-like dimension, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (2003) 10258-10262.
- [80] E. A. Merritt, S. Sarfaty, F. V. D. Akker, C. L'Hoir, J. A. Martial, W. G. J. Hol, Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 pentasaccharide, *Protein Science*, 3 (1994) 166-175.
- [81] L. Song, M. R. Hobaugh, C. Shustak, S. Cheley, H. Bayley, J. E. Gouaux, Structure of Staphylococcal β -Hemolysin, a Heptameric Transmembrane Pore, *Science*, 274 (1996) 1859-1865.
- [82] D. Gauthier, P. Baillargeon, M. Drouin, Y. L. Dory, Self-Assembly of Cyclic Peptides into Nanotubes and Then into Highly Anisotropic Crystalline Materials, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40 (2001) 4635-4638.
- [83] R. J. Brea, C. Reiriz, J. R. Granja, Towards functional bionanomaterials based on self-assembling cyclic peptide nanotubes, *Chem. Soc. Rev.*, 39 (2010) 1448-1456.
- [84] A. Hennig, L. Fischer, G. Guichard, S. Matile, Anion-Macrodipole Interactions: Self-Assembling Oligourea/Amide Macrocyces as Anion Transporters that Respond to Membrane Polarization, *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 16889-16895.
- [85] S. Matile, A. Vargas Jentzsch, J. Montenegro, A. Fin, Recent synthetic transport systems, *Chem. Soc. Rev.*, 40 (2011) 2453-2474.
- [86] M. Amorin, V. Villaverde, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Drug Delivery Sci. Technol.*, 15 (2005) 87-92.
- [87] M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, New Cyclic Peptide Assemblies with Hydrophobic Cavities: The Structural and Thermodynamic Basis of a New Class of Peptide Nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 2844-2845.
- [88] J. Emsley, Very strong hydrogen bonding, *Chem. Soc. Rev.*, 9 (1980) 91-124.
- [89] T. D. Clark, K. Kobayashi, M. R. Ghadiri, Covalent Capture and Stabilization of Cylindrical β -Sheet Peptide Assemblies, *Chemistry – A European Journal*, 5 (1999) 782-792.
- [90] C. A. Hunter, J. K. M. Sanders, The nature of π - π interactions, *J. Am. Chem. Soc.*, 112 (1990) 5525-5534.
- [91] A. Pandit, N. Fay, L. Bordes, C. Valéry, R. Cherif-Cheikh, B. Robert, F. Artzner, M. Paternostre, Self-assembly of the octapeptide lanreotide and lanreotide-based derivatives: the role of the aromatic residues, *J. Pept. Sci.*, 14 (2008) 66-75.
- [92] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture, *Nature*, 366 (1993) 324-327.
- [93] L. M. Carrick, A. Aggeli, N. Boden, J. Fisher, E. Ingham, T. A. Waigh, Effect of ionic strength on the self-assembly, morphology and gelation of pH responsive β -sheet tape-forming peptides, *Tetrahedron*, 63 (2007) 7457-7467.
- [94] V. Percec, A. s. E. Dulcey, V. S. K. Balagurusamy, Y. Miura, J. Smidrkal, M. Peterca, S. Nummelin, U. Edlund, S. D. Hudson, P. A. Heiney, Self-assembly of amphiphilic dendritic dipeptides into helical pores, *Nature*, 430 (2004) 764-768.
- [95] M. Kogiso, M. Masuda, T. Shimizu, Supramolecular Polyglycine II-Type Structure of Glycylglycine Bolaamphiphile, *Supramol. Chem.*, 9 (1998) 183-189.
- [96] J. D. Hartgerink, J. R. Granja, R. A. Milligan, M. R. Ghadiri, Self-Assembling Peptide Nanotubes, *J. Am. Chem. Soc.*, 118 (1996) 43-50.
- [97] P. De Santis, S. Morosetti, R. Rizzo, Conformational Analysis of Regular Enantiomeric Sequences, *Macromolecules*, 7 (1974) 52-58.
- [98] M. R. Ghadiri, K. Kobayashi, J. R. Granja, R. K. Chadha, D. E. McRee, The Structural and Thermodynamic Basis for the Formation of Self-Assembled Peptide Nanotubes, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34 (1995) 93-95.

- [99] M. Engels, D. Bashford, M. R. Ghadiri, Structure and Dynamics of Self-Assembling Peptide Nanotubes and the Channel-Mediated Water Organization and Self-Diffusion. A Molecular Dynamics Study, *J. Am. Chem. Soc.*, 117 (1995) 9151-9158.
- [100] R. Hourani, C. Zhang, R. van der Weegen, L. Ruiz, C. Li, S. Keten, B. A. Helms, T. Xu, Processable Cyclic Peptide Nanotubes with Tunable Interiors, *J. Am. Chem. Soc.*, 133 (2011) 15296-15299.
- [101] H. S. Kim, J. D. Hartgerink, M. R. Ghadiri, Oriented Self-Assembly of Cyclic Peptide Nanotubes in Lipid Membranes, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 4417-4424.
- [102] L. Motiei, S. Rahimpour, D. A. Thayer, C.-H. Wong, M. R. Ghadiri, Antibacterial cyclic d,l-[small alpha]-glycopeptides, *Chem. Commun.*, (2009) 3693-3695.
- [103] M. E. Polaskova, J. N. Lambert, N. J. Ede, Synthesis of Nanotubule-Forming Cyclic Octapeptides via an Fmoc Strategy, *Aust. J. Chem.*, 51 (1998) 535-540.
- [104] T. Suga, S. Osada, H. Kodama, Formation of ion-selective channel using cyclic tetrapeptides, *Bioor. Med. Chem.*, 20 (2012) 42-46.
- [105] J. Taira, S. Osada, R. Hayashi, T. Ueda, M. Jelokhani-Niaraki, H. Aoyagi, H. Kodama, Trans-Bilayer Ion Conduction by Proline Containing Cyclic Hexapeptides and Effects of Amino Acid Substitutions on Ion Conducting Properties, *B. Chem. Soc. Jpn.*, 83 (2010) 683-688.
- [106] N. Khazanovich, J. R. Granja, D. E. McRee, R. A. Milligan, M. R. Ghadiri, Nanoscale Tubular Ensembles with Specified Internal Diameters. Design of a Self-Assembled Nanotube with a 13-Å Pore, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 6011-6012.
- [107] L. A. a. p. t. AAPPTEC, Practical synthesis guide to solid phase peptide chemistry, Synthesis notes, pp. 1-76.
- [108] W. Chan, P. White, Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach, Oxford University Press, USA, New York, 2000.
- [109] R. Chapman, M. Danial, M. L. Koh, K. A. Jolliffe, S. Perrier, Design and properties of functional nanotubes from the self-assembly of cyclic peptide templates, *Chem. Soc. Rev.*, 41 (2012) 6023-6041.
- [110] R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, Large-diameter self-assembled dimers of α,γ -cyclic peptides, with the nanotubular solid-state structure of cyclo-[(L-Leu-D-Me-N- γ -Acp)4-]·4CHCl₂COOH, *Chem. Commun. (Camb.)*, (2007) 3267-3269.
- [111] R. A. Jishi, R. M. Flores, M. Valderrama, L. Lou, J. Bragin, Equilibrium Geometry and Properties Of Cyclo[(Gly-d-Ala)₄] and {Cyclo[(Gly-d-Ala)₄]}₂ from Density Functional Theory, *J. Phys. Chem. A*, 102 (1998) 9858-9862.
- [112] J. P. Lewis, N. H. Pawley, O. F. Sankey, Theoretical Investigation of the Cyclic Peptide System Cyclo [(d-Ala-Glu-d-Ala-Gln) m= 1-4], *J. Phys. Chem. B*, 101 (1997) 10576-10583.
- [113] K. Rosenthal-Aizman, G. Svensson, A. Undén, Self-Assembling Peptide Nanotubes from Enantiomeric Pairs of Cyclic Peptides with Alternating d and l Amino Acid Residues, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 3372-3373.
- [114] D. Seebach, J. L. Matthews, A. Meden, T. Wessels, C. Baerlocher, L. B. McCusker, Cyclo- β -peptides: Structure and tubular stacking of cyclic tetramers of 3-aminobutanoic acid as determined from powder diffraction data, *Helvetica Chimica Acta*, 80 (1997) 173-182.
- [115] W. S. Horne, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, A Heterocyclic Peptide Nanotube, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 9372-9376.
- [116] M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, Folding control in cyclic peptides through N-methylation pattern selection: formation of antiparallel beta-sheet dimers, double reverse turns and supramolecular helices by 3 α,γ cyclic peptides, *Chemistry*, 14 (2008) 2100-2111.
- [117] R. J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, Methyl-Blocked Dimeric α,γ -Peptide Nanotube Segments: Formation of a Peptide Heterodimer through Backbone–Backbone Interactions, *Angew. Chem.*, 117 (2005) 5856-5859.
- [118] R. García-Fandiño, J. R. Granja, M. Dâ€™Abramo, M. Orozco, Theoretical Characterization of the Dynamical Behavior and Transport Properties of β^{\pm} -Peptide Nanotubes in Solution, *J. Am. Chem. Soc.*, 131 (2009) 15678-15686.
- [119] C. Reiriz, L. Castedo, J. R. Granja, New α,γ -cyclic peptides-nanotube molecular caps using α,α -dialkylated α -amino acids, *J. Pept. Sci.*, 14 (2008) 241-249.
- [120] A. Karlström, A. Undén, Association of cyclic peptides in aqueous solution measured by fluorescence quenching, *Biopolymers*, 41 (1997) 1-4.

- [121] K. Kobayashi, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, β -Sheet Peptide Architecture: Measuring the Relative Stability of Parallel vs. Antiparallel β -Sheets, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34 (1995) 95-98.
- [122] <http://gme.in.uib.es/>, Fuerzas de la estructura protéica Adaptado de: Bonding and Protein Structure, David Marcey.
- [123] D. J. Rubin, S. Amini, F. Zhou, H. Su, A. Miserez, N. S. Joshi, Structural, Nanomechanical, and Computational Characterization of d,l-Cyclic Peptide Assemblies, *ACS Nano*, 9 (2015) 3360-3368.
- [124] J. M. Buriak, M. R. Ghadiri, Self-assembly of peptide based nanotubes, *Materials Science and Engineering: C*, 4 (1997) 207-212.
- [125] C. Valéry, E. Pouget, A. Pandit, J.-M. Verbavatz, L. Bordes, I. Boisdé, R. Cherif-Cheikh, F. Artzner, M. Paternostre, Molecular Origin of the Self-Assembly of Lanreotide into Nanotubes: A Mutational Approach, *Biophys. J.*, 94 (2008) 1782-1795.
- [126] R. Mammadov, A. B. Tekinay, A. Dana, M. O. Guler, Microscopic characterization of peptide nanostructures, *Micron*, 43 (2012) 69-84.
- [127] X. Sun, G. P. Lorenzi, On the Stacking of β -Rings: The solution self-association behavior of two partially N-methylated cyclo(hexaleucines), *Helvetica Chimica Acta*, 77 (1994) 1520-1526.
- [128] I. Becerril, *Electroforésis*, 2012.
- [129] C. Galbusera, D. D. Y. Chen, Molecular interaction in capillary electrophoresis, *Curr. Opin. Biotech.*, 14 (2003) 126-130.
- [130] E. J. Maxwell, D. D. Y. Chen, Twenty years of interface development for capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 627 (2008) 25-33.
- [131] D. Heiger, *An Introduction: High performance capillary electrophoresis*, Germany, 2000.
- [132] S. Hjertén, Free zone electrophoresis, *Chromatogr. Rev.*, 9 (1967) 122-219.
- [133] J. M. Castagnino, *Electroforesis capilar*, Congreso CUBRA IV, Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, San Miguel Tucumán, Argentina, 1999, pp. 297-329.
- [134] T. Wehr, R. Rodríguez-Díaz, M. Zhu, *Capillary Electrophoresis of Proteins*, Chromatographic Science Series, 80 (1999).
- [135] P. Camilleri, *Capillary Electrophoresis, Theory and Practice*, 2nd. edition ed., USA, 1998.
- [136] S. Rovio, K. Sirén, H. Sirén, Application of capillary electrophoresis to determine metal cations, anions, organic acids, and carbohydrates in some Pinot Noir red wines, *Food Chemistry*, 124 (2011) 1194-1200.
- [137] T. Wang, X. Yang, D. Wang, Y. Jiao, Y. Wang, Y. Zhao, Analysis of compositional carbohydrates in polysaccharides and foods by capillary zone electrophoresis, *Carbohydr. Polym.*, 88 (2012) 754-762.
- [138] A. Pfetsch, T. Welsch, Determination of the electrophoretic mobility of bacteria and their separation by capillary zone electrophoresis, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 359 (1997) 198-201.
- [139] J. Petr, V. Maier, Analysis of microorganisms by capillary electrophoresis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 31 (2012) 9-22.
- [140] S. Mittermayr, M. Olajos, T. Chovan, G. K. Bonn, A. Guttman, Mobility modeling of peptides in capillary electrophoresis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2008) 407-417.
- [141] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, Separation of Nonionic Surfactants by Capillary Electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1885-1892.
- [142] J. Bullock, Application of capillary electrophoresis to the analysis of the oligomeric distribution of polydisperse polymers, *J. Chromatogr. A*, 645 (1993) 169-177.
- [143] Z. Deyl, V. Rohlicek, M. Adam, Separation of collagens by capillary zone electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 480 (1989) 371-378.
- [144] S. P. Radko, M. Stastna, A. Chrambach, Polydispersity of liposome preparations as a likely source of peak width in capillary zone electrophoresis, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 761 (2001) 69-75.
- [145] J. R. Glynn, B. M. Belongia, R. G. Arnold, K. L. Ogden, J. C. Baygents, Capillary Electrophoresis Measurements of Electrophoretic Mobility for Colloidal Particles of Biological Interest, *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (1998) 2572-2577.
- [146] G. Ramírez-García, F. d'Orlyé, S. Gutiérrez-Granados, M. Martínez-Alfaro, N. Mignet, C. Richard, A. Varenne, Functionalization and characterization of persistent luminescence nanoparticles by dynamic light scattering, laser Doppler and capillary electrophoresis, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 136 (2015) 272-281.
- [147] P. Schmitt-Kopplin, M. Englmann, Capillary electrophoresis – mass spectrometry: Survey on developments and applications 2003–2004, *ELECTROPHORESIS*, 26 (2005) 1209-1220.

- [148] M. A. a. Strege, A. L. Lagu, Capillary electrophoresis of proteins and peptides, *Methods in molecular biology*, 276 (2004) 253-290.
- [149] E. Grushka, R. M. McCormick, J. J. Kirkland, Effect of temperature gradients on the efficiency of capillary zone electrophoresis separations, *Anal. Chem.*, 61 (1989) 241-246.
- [150] K. Jinno, Y. Han, H. Sawada, M. Taniguchi, Capillary electrophoretic separation of toxic drugs using a polyacrylamide-coated capillary, *Chromatographia*, 46 (1997) 309-314.
- [151] S. M. Masselter, A. J. Zemann, Influence of organic solvents in coelectroosmotic capillary electrophoresis of phenols, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1047-1053.
- [152] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, J. Domínguez-Alvarez, J. Hernández-Méndez, Capillary Zone Electrophoresis in Nonaqueous Solvents in the Presence of Ionic Additives, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 4437-4444.
- [153] I. Benito, J. M. Saz, M. L. Marina, J. Jiménez-Barbero, M. J. González, J. C. Diez-Masa, Micellar electrokinetic capillary chromatographic separation of polychlorinated biphenyl congeners, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 77-85.
- [154] M. Aguilar, A. Farran, V. Martí, Capillary electrophoretic determination of cyanide leaching solutions from automobile catalytic converters, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 397-402.
- [155] S. M. Cousins, P. R. Haddad, W. Buchberger, Evaluation of carrier electrolytes for capillary zone electrophoresis of low-molecular-mass anions with indirect UV detection, *J. Chromatogr. A*, 671 (1994) 397-402.
- [156] R. A. Wallingford, A. G. Ewing, Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection in 12.7 mm diameter columns, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1972-1975.
- [157] P. Schmitt-Kopplin, M. Frommberger, Capillary electrophoresis – mass spectrometry: 15 years of developments and applications, *Electrophoresis*, 24 (2003) 3837-3867.
- [158] Y. Takada, M. Yoshida, M. Sakairi, H. Koizumi, Detection of γ -aminobutyric acid in a rat brain using in vivo microdialysis-capillary electrophoresis/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 9 (1995) 895-896.
- [159] K. Otsuka, C. J. Smith, J. Grainger, J. R. Barr, J. D. G. Patterson, N. Tanaka, S. Terabe, Stereoselective separation and detection of phenoxy acid herbicide enantiomers by cyclodextrin-modified capillary zone electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 817 (1998) 75-81.
- [160] J. A. Olivares, N. T. Nguyen, C. R. Yonker, R. D. Smith, On-line mass spectrometric detection for capillary zone electrophoresis, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1230-1232.
- [161] J. Zeleny, Instability of Electrified Liquid Surfaces, *Phys. Rev.*, 10 (1917) 1-6.
- [162] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson, M. B. Alice, Molecular Beams of Macroions, *J. Chem. Phys.*, 49 (1968) 2240-2249.
- [163] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse, Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, 246 (1989) 64-71.
- [164] W. Lu, G. Yang, R. B. Cole, Determination of amino acids by on-line capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry, *Electrophoresis*, 16 (1995) 487-492.
- [165] I. t. H. W. Agilent Technologies, Installing the Agilent CE- ESI-MS Sprayer Kit (G1607A), Preparing the Agilent CE system: Preparing the Capillary, 2000.
- [166] Hewlett-Packard, CE-ESI-MS: An Integrating Solution, techniqueGermany, 1999.
- [167] B. Gutte, Peptides: synthesis, structures, and applications, Academic Press.1995.
- [168] A. Isidro-Llobet, M. Álvarez, F. Albericio, Amino Acid-Protecting Groups, *Chem. Rev.*, 109 (2009) 2455-2504.
- [169] L. A. Carpino, G. Y. Han, 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group, *J. Am. Chem. Soc.*, 92 (1970) 5748-5749.
- [170] N. Benoiton, Chemistry of Peptides Synthesis, 2006.
- [171] E. Kaiser, R. L. Colecott, C. D. Bossinger, P. I. Cook, Color test for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides, *Anal. Biochem.*, 34 (1970) 595-598.
- [172] R. W. Hoffmann, Flexible Molecules with Defined Shape—Conformational Design, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 31 (1992) 1124-1134.
- [173] X.-M. Gao, Y.-H. Ye, M. Bernd, B. Kutscher, Studies on the synthesis of cyclic pentapeptides as LHRH antagonists and the factors that influence cyclization yield, *J. Pept. Sci.*, 8 (2002) 418-430.
- [174] C. J. White, A. K. Yudin, Contemporary strategies for peptide macrocyclization, *Nature Chemistry*, 3 (2011) 509-524.

- [175] Y.-h. Ye, X.-m. Gao, M. Liu, Y.-c. Tang, G.-l. Tian, Studies on the synthetic methodology of head to tail cyclization of linear peptides, *Lett. Pept. Sci.*, 10 (2003) 571-579.
- [176] S. Ahuja, *Chromatography and Separation Science*, California USA, 2003.
- [177] S. F. Brady, S. L. Varga, R. M. Freidinger, D. A. Schwenk, M. Mendlowski, F. W. Holly, D. F. Veber, Practical synthesis of cyclic peptides, with an example of dependence of cyclization yield upon linear sequence, *JOC*, 44 (1979) 3101-3105.
- [178] Lifetein.com, How should I dissolve peptides? , *Peptide Synthesis: Handling and Storage of Synthetic Peptides*.
- [179] Lifetein.com, Protein/Peptide Property Calculator, *Peptide analysis tool*.
- [180] Lifetein.com, *Peptide Synthesis: Handling and Storage of Synthetic Peptides*.
- [181] S. A. Trauger, W. Webb, G. Siuzdak, Peptide and protein analysis with mass spectrometry, *Spectroscopy*, 16 (2002) 15-28.
- [182] A. Varenne, P. Gareil, S. Collic-Jouault, R. Daniel, Capillary electrophoresis determination of the binding affinity of bioactive sulfated polysaccharides to proteins: study of the binding properties of fucoidan to antithrombin, *Anal. Biochem.*, 315 (2003) 152-159.
- [183] R. Chapman, M. L. Koh, G. G. Warr, K. A. Jolliffe, S. Perrier, Structure elucidation and control of cyclic peptide-derived nanotube assemblies in solution, *Chemical Science*, 4 (2013) 2581-2589.
- [184] R. M. Silverstein, F. X. Webster, D. J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, New York, 2005.
- [185] C. Valéry, F. Artzner, B. Robert, T. Gulick, G. Keller, C. Grabielle-Madelmont, M. L. Torres, R. Cherif-Cheikh, M. Paternostre, Self-association process of a peptide in solution: from β^2 -sheet filaments to large embedded nanotubes, *Biophysical journal*, 86 (2004) 2484-2501.
- [186] F. Gobeaux, N. Fay, C. Tarabout, F. Meneau, C. Mériadec, C. Delvaux, J.-C. Cintrat, C. Valéry, F. Artzner, M. Paternostre, Experimental Observation of Double-Walled Peptide Nanotubes and Monodispersity Modeling of the Number of Walls, *Langmuir*, 29 (2013) 2739-2745.
- [187] C. Valéry, E. Pouget, A. Pandit, J.-M. Verbavatz, L. Bordes, I. Boisdé, R. Cherif-Cheikh, F. Artzner, M. Paternostre, Molecular origin of the self-assembly of lanreotide into nanotubes: a mutational approach, *Biophysical journal*, 94 (2008) 1782-1795.
- [188] Z. Movasaghi, S. Rehman, I. U. Rehman, Raman spectroscopy of biological tissues, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 42 (2007) 493-541.
- [189] A. T. Tu, Use of Raman spectroscopy in biological compounds, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 50 (2003) 1-10.
- [190] M. Pezolet, M. Pigeon-Gosselin, L. Coulombe, Laser Raman investigation of the conformation of human immunoglobulin G, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 453 (1976) 502-512.
- [191] <http://www.um.es/~molecula/prot.htm>, Proteínas, Aula virtual de biología
- [192] <http://education.expasy.org/>, Isotope table, Germany, 2016.
- [193] Luis, *Espectrometría de Masas*, 2011.

2 Apéndices

APÉNDICE A

Aminoácidos

Un aminoácido (aa) es una molécula orgánica con un grupo amino ($-\text{NH}_2$) y uno carboxilo ($-\text{COOH}$) unidos a un C central. Los aa's más frecuentes y de principal interés son los que forman parte de las proteínas. Todos los aa's componentes de las proteínas poseen la conformación L- α -aa, están formados por un C_α unido a un $-\text{COOH}$, un grupo ($-\text{NH}_2$), un H y una cadena lateral o radical ($-\text{R}$) de estructura variable (Figura A. 1), que determina la identidad y las propiedades de cada uno de los diferentes aa. Existen cientos de grupos $-\text{R}$ y por consiguiente cientos de aa, pero sólo 20 de éstos forman parte de las proteínas y tienen codones específicos en el código genético.

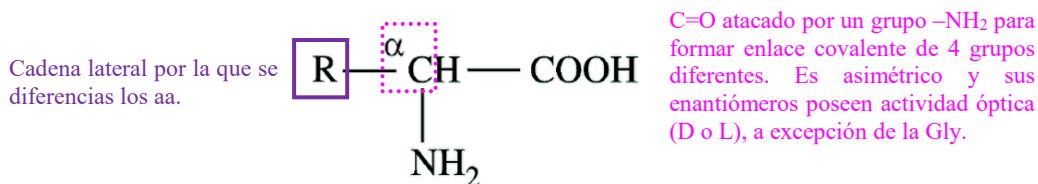


Figura A. 1. Estructura general de un aminoácido caracterizada por la presencia de un C_α central unido a un $-\text{COOH}$, un $-\text{NH}_2$, un $-\text{H}$ y la cadena lateral $-\text{R}$.

Cuando dos aa's se combinan en una reacción de condensación, liberando H_2O , forman un enlace peptídico y dan lugar a un dipéptido, 3 aa's un tripéptido y así hasta formar oligopéptidos, polipéptidos, etcétera. Esta reacción de condensación se da de manera natural en los ribosomas, por ejemplo. Las cadenas peptídicas, dependiendo de su peso y longitud pueden clasificarse de acuerdo a la Tabla A. 1.

Se denominan α -aa, porque el $-\text{NH}_2$ se encuentra a un átomo de distancia del $-\text{COOH}$. Ambos grupos funcionales son susceptibles a cambios de pH, por eso ningún aa se encuentra de esa forma, sino más bien ionizado. A pH ácido los aa se encuentran mayoritariamente en forma catiónica (carga +) y a pH básico en forma aniónica (carga -). Hay un pH específico (pI) para cada aa, en que las cargas + y - son de igual

magnitud, por lo que la molécula es eléctricamente neutra, formando un ion dipolar o zwitterion (Figura A. 2).

Tabla A. 1. Clasificación de los péptidos según su número de aminoácidos.

Tipo de Péptido	Tamaño (aa's)	Peso Molecular (Da)
Oligopéptido	2 – 10	< 1 000
Péptido	10 – 50	1 000 – 5 000
Polipéptido	50 – 100	5 000 – 10 000
Proteína	> 100	> 10 000

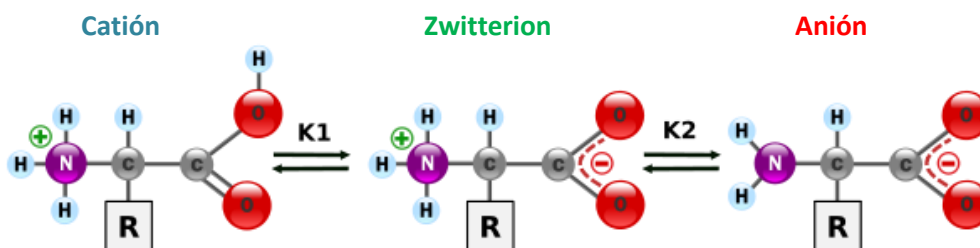


Figura A. 2. Estructura catiónica, anónica y el zwitterion (formado en el pI) de un aa determinado.

La clasificación general de los aa puede ser en función de:

- I. Las propiedades de la cadena lateral (-R) como se muestra en la Figura A. 3.

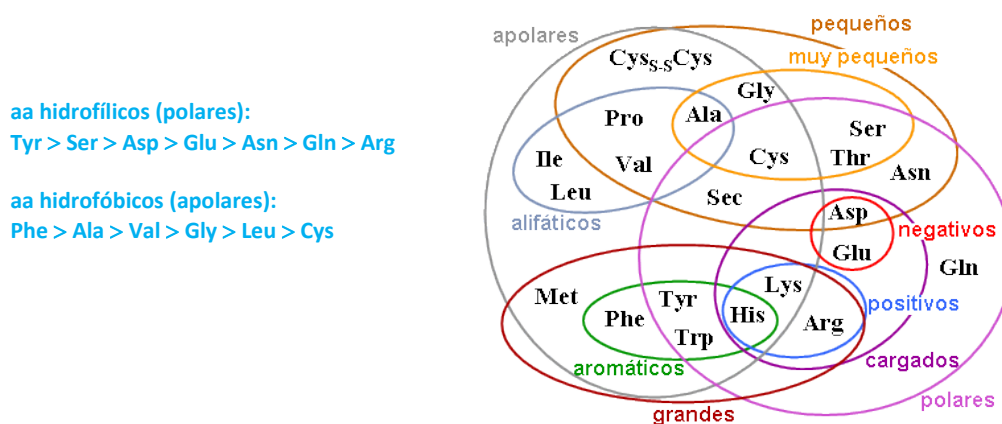


Figura A. 3. Diagrama de las diferentes propiedades fisicoquímicas de los aa de acuerdo a su cadena lateral -R.

De este modo, los péptidos pueden ser:

- a. *Neutros polares, polares o hidrófilos*: serina (Ser, S), treonina (Thr, T), cisteína (Cys, C), glutamina (Gln, Q), asparagina (Asn, N), tirosina (Tyr, Y) y triptófano (Trp, W).
- b. *Neutros no polares, apolares o hidrófobos*: alanina (Ala, A), glicina (Gly, G), Cys-Cys, valina (Val, V), prolina (Pro, P), leucina (Leu, L), isoleucina (Ile, I), metionina (Met, M), fenilalanina (Phe, F) y selenocisteína (Sec, U).
- c. *Con carga (-) o ácidos*: ácido aspártico (Asp, D) y ácido glutámico (Glu, E).
- d. *Con carga (+) o básicos*: lisina (Lys, K), arginina (Arg, R) e histidina (His, H).
- e. *Aromáticos*: Phe, Tyr, y Trp.

De los cuales, los aa's esenciales que necesitan ser ingeridos por el cuerpo son: Val, Leu, Thr, Lys, Trp, His, Phe, Ile, Arg y Met. Los que pueden sintetizarse/producirse en el organismo son: Ala, Pro, Gly, Ser, Cys, Asn, Gln, Tyr, Asp y Glu ^[191].

II. Por la ubicación del grupo amino en el aa:

- a. El $-NH_2$ en el C_2 de la cadena, es decir en el C_α al $-COOH$ (como la mayoría de las proteínas).
- b. El $-NH_2$ en el C_3 de la cadena, o sea, el C_β al $-COOH$.
- c. El $-NH_2$ ubicado en el C_4 , es decir, en el C_γ al $-COOH$.

Algunas otras propiedades de los aa son:

- ⊕ *Ácido-base*: Al ionizarse se comportan como ácido o base, son anfóteros, por lo que los aa y las proteínas se comportan como sustancias tampón.
- ⊕ *Ópticas*: Todos los aa's, menos la Gly, tienen el C_α asimétrico lo que les confiere actividad óptica en disolución desviando el plano de polarización al incidir un haz de luz polarizada. Un desvío a la derecha (sentido horario) significa que la sustancia es dextrógira, si es a la izquierda (sentido antihorario) es levógira. Un aa puede existir en sus 2 formas enantioméricas (dextrógira y levógira), pero en la naturaleza sólo exhibe una de ellas. Estas dos formas enantioméricas, estructuralmente se denominan configuración D o L dependiendo de la orientación relativa en el espacio de los 4 grupos distintos unidos al C_α . Es importante destacar que todos los aa proteicos son L, pero no significa que son levógiros. Los L-aa son derivados del L-Gliceraldehído y D-Gliceraldehído
- ⊕ *Químicas*: La descarboxilación sobre el $-COOH$ y la desaminación sobre el $-NH_2$.

- ⊕ *Solubilidad*: No todos los aa son solubles en H₂O, debido a los grupos -R, si tienen carga iónica aumenta la solubilidad y la molécula conjunta es relativamente soluble.

APÉNDICE B

Patrones Isotópicos

En la naturaleza, casi todos los elementos están formados por mezclas de diferentes isótopos. En la Tabla A. 2 se muestran las abundancias relativas isotópicas de los elementos más frecuentes encontrados en los compuestos orgánicos [192]. Como consecuencia, los compuestos consisten en una mezcla de diversas composiciones isotópicas, las cuales están relacionadas a la abundancia relativa de los isótopos de cada elemento presente en la molécula.

Tabla A. 2. Isótopos de algunos elementos presentes en moléculas orgánicas (C, H, O, N, P, S, Cl, Br, Na, K) *

Elemento	MP	I ₀ **	Ab ₀ **	I ₁	Ab ₁	I ₂	Ab ₂	I ₃	Ab ₃
C	12.0107	12.000000	98.8922	13.003355	1.1078	-	-	-	-
H	1.0079	1.007825	99.9844	2.014102	0.0156	-	-	-	-
O	15.9994	15.994915	99.7628	16.999132	0.0372	17.999160	0.2000	-	-
N	14.0067	14.003074	99.6337	15.000109	0.3663	-	-	-	-
P	30.9738	30.973762	100.0000	-	-	-	-	-	-
S	32.0650	31.972071	95.0180	32.971458	0.7500	33.967867	4.2150	35.967081	0.0170
Cl	35.4530	34.968853	75.7710	36.965903	24.2290	-	-	-	-
Br	79.9040	78.918338	50.6860	80.916291	49.3140	-	-	-	-
Na	22.9898	22.989770	100.0000	-	-	-	-	-	-
K	39.0983	38.963707	93.2581	39.963999	0.0117	40.961826	6.7302	-	-

*Todos los isótopos de los elementos de toda la tabla periódica puede encontrarse en la referencia [192].

** MP = Masa Promedio, Ab = Abundancia, I = Isótopo.

Debido a la existencia de estas diferentes especies isotópicas en el espectro de masas no se detecta un sólo pico molecular, sino varios, que corresponden a las composiciones isotópicas de cada ion molecular obteniendo un pico molecular (M) y sus picos isotópicos (M+1, M+2, etc.). En este contexto, el pico que representa la masa monoisotópica no siempre es el pico isotópico más abundante, aunque se deriva del isótopo más abundante de cada tipo de átomo. Esto se debe al hecho de que al aumentar el número de átomos de un elemento en una molécula aumentan las probabilidades de que haya un incremento en la masa debido a un isótopo más pesado. Por ejemplo, si se tienen 100 átomos de C en una molécula, cada átomo tiene ~ 1% de probabilidad de tener un isótopo más pesado (C¹³), por lo que la molécula completa tiene menos probabilidad de beneficiarse al menos de un C¹³.

De este modo, a partir de los patrones isotópicos se puede determinar la composición elemental de un compuesto. Generalmente, la intensidad relativa del primer pico isotópico normalmente se debe a una especie que contiene un átomo de C^{13} , que dividida por 1.12 (abundancia relativa de este isótopo) daría el número máximo de átomos de C del compuesto ^[193].

En el caso de una molécula orgánica que contenga solamente C, H, O y N, el segundo pico isotópico tendrá una intensidad relativa entre 0.5 y 2.5 con respecto al pico principal. En el caso que existiera un azufre en la molécula, la intensidad relativa del segundo pico isotópico sería del orden de 5, y si existieran más átomos de S la intensidad relativa de dicho pico isotópico aumentaría en 4.4 por cada átomo de azufre presente en la molécula ^[193].

Si además hubiera Cl en la molécula el patrón isotópico tendría el segundo pico isotópico más intenso que el primero en una relación de 3:1. Si tuviera más átomos de Cl la abundancia relativa de cada especie estará dada por la expresión: $(a+b)^2$. Siendo a y b las abundancias relativas del Cl. A causa de los efectos isotópicos del Cl, las moléculas que lo contengan tendrán distribuciones isotópicas muy particulares ^[193]. En el caso del Br el comportamiento es aún más raro debido a la abundancia relativa de sus isótopos (Br^{79} , Br^{78}). En que el pico molecular irá acompañado de un segundo pico prácticamente de la misma intensidad, por lo que los compuestos monobromados son difíciles de distinguir en EM. Sin embargo, si existieran dos átomos de Br la distribución de los isótopos presentaría un segundo pico de doble intensidad al primero, y un cuarto pico igual de intenso al primer pico isotópico.

APÉNDICE C

Mecanismos de Reacción Complementarios

En este apéndice se detallan los mecanismos de reacción propuestos para el proceso de liberación del PL protegido de la resina 2ClTrt-Cl como se observa en la Figura A. 4 y de la macrociclización del PL protegido como se muestra en la Figura A. 5.

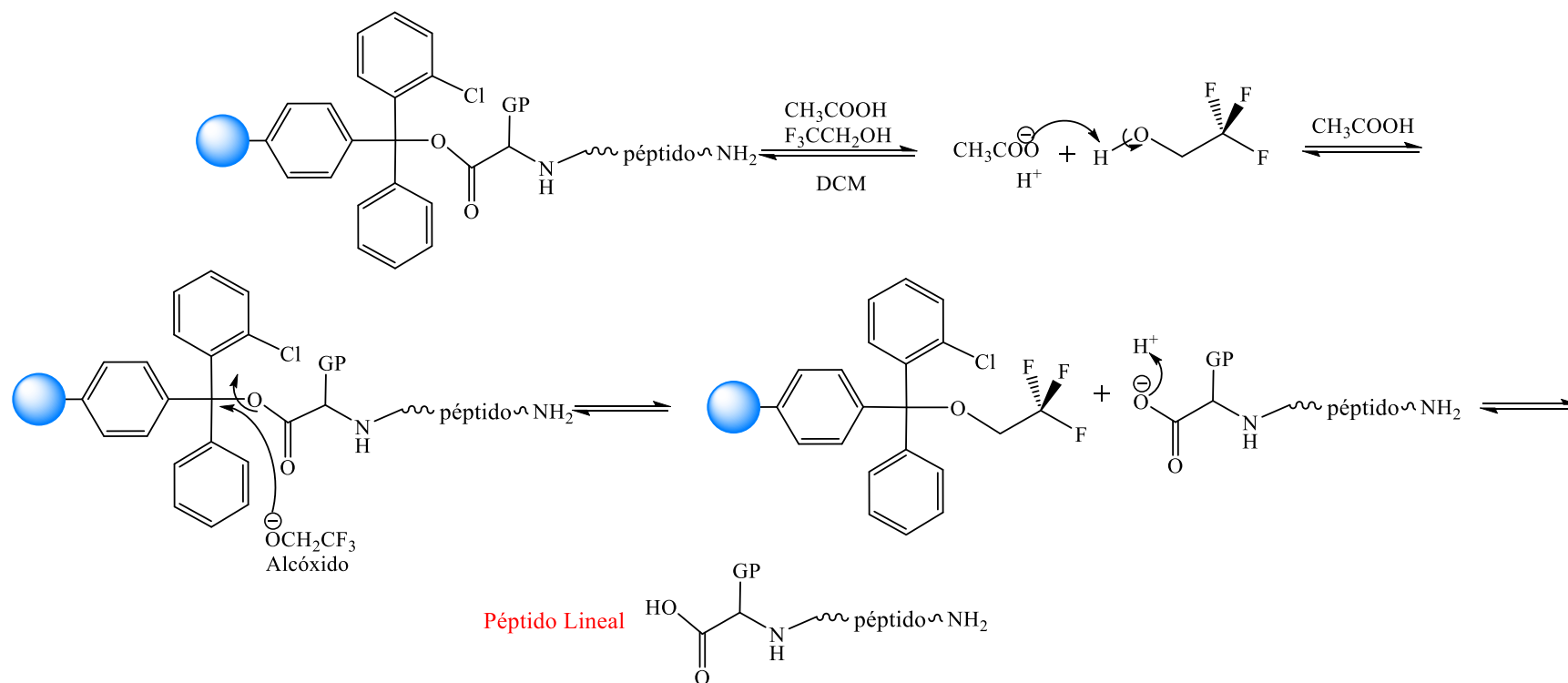


Figura A. 4. Mecanismo de reacción propuesto de la liberación del PL protegido, una vez que ha sido desprotegido el grupo $-NH_2$ terminal.

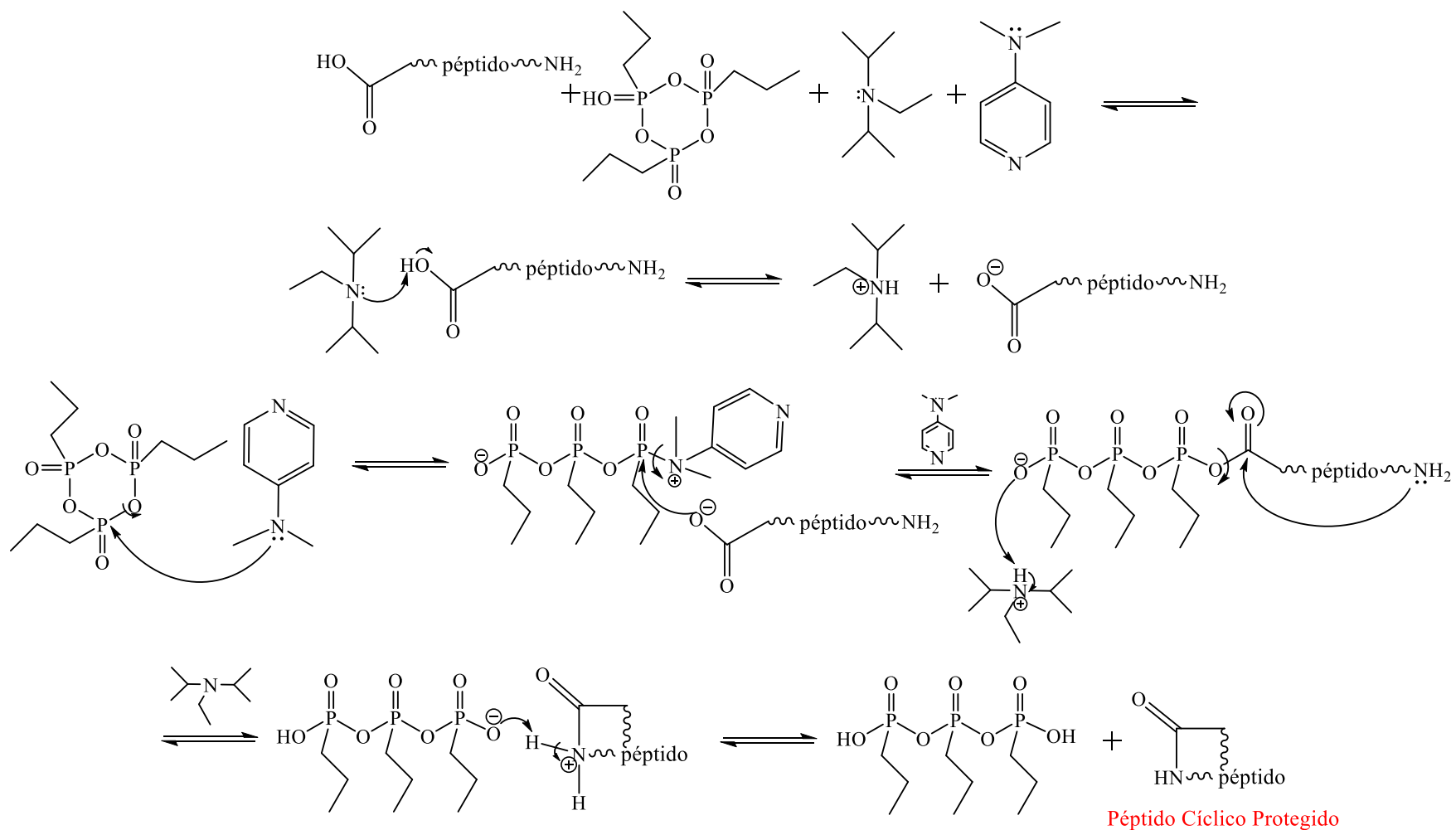


Figura A. 5. Mecanismo de reacción propuesto para la ciclización cabeza-cola del PL protegido, cuyos grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{NH}_2$ terminales se encuentran libres.

3 Anexos

Publicación

Design, synthesis and characterization of new cyclic D, L – α - alternate amino acid peptides by capillary electrophoresis coupled to electrospray ionization mass spectrometry

María Dámaris Cortez-Díaz ¹⁻⁵, Fanny d'Orlyé ¹⁻⁴, Silvia Gutiérrez-Granados ⁵, Luis Manuel de León-Rodríguez ⁵, Anne Varenne ^{1-4*}

¹ PSL Research University, Chimie ParisTech, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé, 75005, Paris, France

² INSERM, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé (U 1022), 75006, Paris, France

³ CNRS, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la santé UMR 8258, 75006 Paris, France

⁴ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Unité de Technologies Chimiques et Biologiques pour la Santé, 75006 Paris, France.

⁵ Departamento de Química, Universidad de Guanajuato, 36050, Guanajuato, México.