

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POSGRADO EN QUÍMICA



**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS DE
AMINOÁCIDOS L/D ALTERNADOS CONJUGADOS CON
FERROCENO COMO MODIFICADORES DE SUPERFICIES DE
ELECTRODOS”**

TESIS

**Que para obtener el grado de
DOCTOR EN QUÍMICA**

presenta

M. EN C. VIANEY ASERET HERNÁNDEZ RAMÍREZ

**DIRECTORES DE TESIS:
DRA SILVIA GUTIÉRREZ GRANADOS
DR. LUIS MANUEL DE LEÓN RODRÍGUEZ**

**GUANAJUATO, GTO
DICIEMBRE, 2017**

Guanajuato, Gto., a 9 de diciembre de 2017

A quien corresponda:

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

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS DE AMINOÁCIDOS L/D ALTERNADOS
CONJUGADOS CON FERROCENO COMO MODIFICADORES DE SUPERFICIES DE ELECTRODOS”**

Realizado por la M. en C. Vianey Aseret Hernández Ramírez para obtener el grado de **Doctor en Química**, en las instalaciones del Departamento de Química de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato (Guanajuato, México).

ATENTAMENTE

Directores de Tesis

Dra. Silvia Gutiérrez Granados
Universidad de Guanajuato

Dr. Luis Manuel de León Rodríguez
The University of Auckland

Guanajuato, Gto., a 9 de diciembre de 2017

Miembros del Jurado del Examen de titulación que para obtener el grado de Doctor en Química presenta la M. en C. Vianey Aseret Hernández Ramírez, con el trabajo titulado:

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS DE AMINOÁCIDOS L/D ALTERNADOS
CONJUGADOS CON FERROCENO COMO MODIFICADORES DE SUPERFICIES DE ELECTRODOS”**

Dr. Alberto Flores Martínez
Universidad de Guanajuato
Presidente

Dr. Oracio Serrano Torres
Universidad de Guanajuato
Secretario

Dr. Juan Manríquez Rocha
CIDETEQ
Vocal

Dra. María Damaris Cortés Díaz
Empresa Bureau Veritas
Vocal

Dra. Laura Galicia Luis
UAM, Iztapalapa
Vocal

Dr. Jorge Albino López Jiménez
Universidad de Guanajuato
Suplente

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de Contenido	iii
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	xv
Símbolos y abreviaturas	xvi
RESUMEN	1
Capítulo 1 NANOESTRUCTURAS PEPTÍDICAS PARA BIOSENSORES	4
1.1 INTRODUCCIÓN	4
1.2 ANTECEDENTES	8
1.2.1 Péptidos cíclicos	8
1.2.2 Nanotubos peptídicos	11
1.2.3 Nanotubos peptídicos modificando electrodos	12
1.2.4 Nanotubos peptídicos en biosensores	15

1.2.5 Péptidos conjugados con Ferroceno en biosensores	17
1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	22
1.4. OBJETIVO	24
1.4.1 Objetivo general	24
1.4.2 Objetivo particulares	25
1.5 REFERENCIAS	25
Capítulo 2 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS L/D ALTERNADOS CONJUGADOS CON FERROCENO	28
2.1 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS	28
2.1.1 Síntesis de péptidos en fase sólida	29
2.1.2 Soportes poliméricos	32
2.1.3 Grupos modificadores de los soportes poliméricos	33
2.1.4 Grupos protectores	34
2.1.4.1 Grupos protectores del grupo amino-alfa del aminoácido	35
2.1.4.2 Grupos protectores del grupo sustituyente R del aminoácido	37
2.1.5 Acoplamiento de aminoácidos	39
2.1.5.1 Carbodiimidas	40
2.1.5.2 Sales de fosfonio	41
2.1.5.3 Sales de uronio	41
2.1.6 Evaluación del acoplamiento del aminoácido y remoción del grupo	42
2.1.6.1 Prueba de Kaiser	42
2.1.6.2 Prueba con Azul de Bromofenol	43
2.1.7 Caracterización química de péptidos	44

2.1.7.1 Cromatografía líquida de alta resolución	44
2.1.7.2 Espectroscopía de masas	44
2.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	45
2.2.1 Síntesis de los péptidos	45
2.2.1.1 Hinchado de la resina	45
2.2.1.2 Secado de la resina	46
2.2.1.3 Lavado con DMF	47
2.2.1.4 Activación del aminoácido	47
2.2.1.5 Acoplamiento del aminoácido	48
2.2.1.6 Remoción de grupos protectores.	48
2.2.1.7 Evaluación de los pasos de acoplamiento y remoción de un grupo protector	50
2.2.1.8 Acoplamiento de Boc	50
2.2.1.9 Acoplamiento del grupo redox Ferroceno	51
2.2.1.10 Separación de la secuencia peptídica de la resina	51
2.2.2 Caracterización química	51
2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
2.3.1 Síntesis de los péptidos	54
2.3.2 Purificación y determinación de pureza por HPLC y caracterización por MS	58
2.4 CONCLUSIONES PRELIMINARES	67
2.5 REFERENCIAS	68

Capítulo 3 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LAS SAM'S DE PÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS L/D ALTERNADOS CONJUGADOS CON FERROCENO

3.1 INTRODUCCIÓN	71
3.1.1. Monocapas autoensambladas	71

3.1.2. Métodos de caracterización de las SAM's	73
3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	75
3.2.1 Limpieza electroquímica del electrodo de Au	75
3.2.2 Área real electroactiva del electrodo de Au	76
3.2.3 Modificación del electrodo de Au	77
3.2.4 Estudio mediante voltamperometría cíclica de las SAM's de los péptidos	78
3.2.5 Cálculo del recubrimiento superficial del péptido sobre Au	78
3.2.6 Caracterización por espectroscopia de impedancia de las SAM's de los péptidos.	79
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
3.3.1 Cálculo del área real electroactiva y del factor de rugosidad del electrodo de Au.	80
3.3.2 Estructura de las SAM's.	84
3.3.3 Cálculo del recubrimiento superficial en las SAMs	86
3.3.4 Estudio previo del comportamiento del ferroceno en solución	90
3.3.5 Comportamiento electroquímico del Péptido conjugado con ferroceno en solución	91
3.3.6 Comportamiento electroquímico del Péptido conjugado con ferroceno como monocapa sobre Au	92
3.3.7 Estudio a diferentes velocidades de barrido.	95
3.3.8 Estudio por espectroscopía de impedancia electroquímica de las SAM's	99
3.3.9 Estabilidad de la SAM's	104
3.3.10 Variación en la concentración de péptido de la solución modificadora.	107
3.3.11 Diferentes medios de formación de SAM's	108
3.4 CONCLUSIONES PRELIMINARES	111
3.5 REFERENCIAS	113

Capítulo 4 ESTUDIO CINÉTICO DE AUTOENSAMBLE DEL PÉPTIDO DITIOLOADO	117
4.1 INTRODUCCIÓN	117
4.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	118
4.2.1 Condiciones Experimentales para SEM	118
4.2.2 Condiciones Experimentales para QCM	119
4.2.3 Condiciones Experimentales para AFM	120
4.2.4 Condiciones Experimentales para Espectroscopía Raman.	121
4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	122
4.3.1 Estudio cinético de quimisorción del péptido {1} mediante SEM	122
4.3.2 Cinética de quimisorción del péptido {1} mediante QCM	125
4.3.3 Estudio cinético de quimisorción del péptido {1} mediante AFM	130
4.3.4 Estudio cinético de quimisorción del péptido {1} mediante Espectroscopia Raman	135
4.4 CONCLUSIONES PRELIMINARES	136
4.5 REFERENCIAS	138
CONCLUSIONES GENERALES	140

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1 NANOESTRUCTURAS PEPTÍDICAS PARA BIOSENSORES

Figura 1.1	Las SAM's producidas pueden exponer diversas funciones orgánicas. Superficies terminadas en (A)piridina, (B) hidroxilo y (C) ácido carboxílico	5
Figura 1.2	Esquema representativo de la separación de SWCNTs dependiendo de su quiralidad	6
Figura 1.3	Posibles maneras de ensamble molecular para producir estructuras orgánicas tubulares: (A) moléculas helicoidales, (B) fajos moleculares, (C) anillos y (D) moléculas cuneiformes	7
Figura 1.4	Esquema básico de un péptido de 3 aminoácidos	8
Figura 1.5	(A)Estructura química de la valinomicina (B) Modelo de la valinomicina indicando la complejación con el ion potasio (C) Mecanismo de transporte de la valinomicina trasladando los iones potasio a través de la barrera hidrofóbica	9
Figura 1.6	(A) Estructura química del Gramicidin S (GS). Micrografía de transmisión electrónica de la especie Gram positivo <i>S.aureus</i> (B) sin tratamiento y (C) después del tratamiento con GS, el daño celular es indicado con las flechas	10
Figura 1.7	A) Péptido cíclico de aminoácidos L, D alternados. B) Ensamble de los péptidos cíclicos en nanotubos peptídicos	11

Figura 1.8	(A) Formación de la monocapa de dodecanotiol e incorporación de los PNTs (B) Formación de la monocapa con el depósito simultáneo del dodecanotiol y los PNTs)	13
Figura 1.9	Morfología de anillos y nanotubos de péptidos sobre sustratos de Au	14
Figura 1.10	Pasos para la formación del compuesto PNTs tiolados/Enzima representación esquemática del método DPSA.	16
Figura 1.11	Respuesta amperométrica a adiciones sucesivas de 0.2mM de β -D-glucosa a $E=0.6V$ vs SCE (a) Au/PNTs/GOx (b) Au/GOx. Solución buffer de fosfatos 0.1M +0.1M KCl (pH=7.5)	17
Figura 1.12	Estructuras químicas de sondas redox comunes (A) Ferroceno (B) Ferro/Ferricianuro (C)Hexaminrutenio	18
Figura 1.13	Esquema de (A) Estructura de Fc-pepstatin, (B) Electrodo compuesto SWCNT/AuNPs/Fc-pepstatin/HIV-1PR, (C) acercamiento a AuNPs/Fc-pepstatin/HIV-1PR	19
Figura 1.14	Voltamperogramas cíclicos de electrodo de Au/SWCNT/AuNP/Fc-pepstatin en (a) solución amortiguadora (línea sólida negra), en (b) 75 μ m de HSA(Human serum albumin) en solución amortiguadora (línea entrecortada roja), en (c) 10 nM HIV-1 PR en HSA (línea punteada azul). $v=100$ mV s^{-1}	20
Figura 1.15	(A) Voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados con Au/SWCNT/AuNP/Fc-pepstatin en (a) 0 pM, línea negra (b) 20pM, línea roja (c) 40 pM, línea azul (d) 60 pM, línea vino y (e) 80pM, línea cian. $v= 100mV s^{-1}$. (B) Curva de calibración E^0 vs [HIV-1 PR]	21
Figura 1.16	(A) Péptido semicíclico con un número impar de aminoácidos tipo L,D alternados con residuos de Cys en los grupos terminales amino y carboxilo conjugado con una unidad de Fc en un residuo intermedio. B) Representación del posible enlace de los compuestos conjugados peptídicos sobre sustratos de Au. C) Representación de la formación de seminanotubos de péptido conjugado con Fc sobre sustrato de Au	23

Capítulo 2 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS L/D ALTERNADOS CONJUGADOS CON FERROCENO

Figura 2.1	Etapas de la SPFS	30
Figura 2.2	Polimerización de estireno con divenilbenceno	33
Figura 2.3	Algunas resinas comunes para SPFS	34
Figura 2.4	Remoción del grupo protector Fmoc cuando está enlazado a una secuencia peptídica	36
Figura 2.5	Grupos protectores de la cadena lateral para ácido aspártico, cisteína y lisina.	38
Figura 2.6	Métodos de acoplamiento y formas activadas	39
Figura 2.7	Estructuras químicas de sales de uronio utilizados como agentes de acoplamiento	42
Figura 2.8	Mecanismo de reacción de un aminoácido con ninhidrina	43
Figura 2.9	Estructuras químicas de (a)Rink Amide Novagel; y (b)Rink Amide MBHA	46
Figura 2.10	Estructuras químicas para los reactivos utilizados durante la activación de los aminoácidos protegidos (a) HBTU, (b) HOBt y (c)DIPEA.	47
Figura 2.11	Estructuras químicas para los diferentes aminoácidos reactivos para la SPPS.	49
Figura 2.12	Péptidos propuestos (A) {1}, (B) {2} y (C) {3}.	54
Figura 2.13	Remoción de ivDde y acoplamiento de Fc-COOH sobre Lys durante la síntesis del péptido {1}	56
Figura 2.14	Reemplazo de Fmoc por Boc, remoción de ivDde y acoplamiento de Fc-COOH sobre Lys durante la síntesis del péptido [3].	57
Figura 2.15	Cromatograma del crudo del péptido {1}. (A) $\lambda=255\text{nm}$ y (B) $\lambda=350\text{nm}$.	58
Figura 2.16	Cromatograma del crudo del péptido {2}. (A) $\lambda=255\text{nm}$ y (B) $\lambda=350\text{nm}$.	59
Figura 2.17	Cromatograma del crudo del péptido {3}. (A) $\lambda=255\text{nm}$ y (B) $\lambda=350\text{nm}$.	60
Figura 2.18	Espectros de masas MALDI-TOF para los péptidos (A) {1} (B) {2} y (C) {3}	62
Figura 2.19	Cromatogramas después de la primera purificación para los péptidos (A) {1} (B) {2} y (C) {3}.	65
Figura 2.20	Cromatogramas después de la segunda purificación para los péptidos (A) {1} (B) {2} y (C) {3}. Señales cromatográficas de (a) péptido en fase móvil (b) blanco, correspondiente sólo a fase móvil.	66

Capítulo 3 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LAS MAE'S DE PÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS L/D ALTERNADOS CONJUGADOS CON FERROCENO

Figura 3.1	Esquema básico de una SAM	72
Figura 3.2	Esquema de monocapa autoensamblada sobre Au policristalino, donde se observan defectos superficiales que desorganizan a la monocapa.	73
Figura 3.3	Etapas para la limpieza del electrodo de Au	76
Figura 3.4	Esquema del procedimiento experimental para la modificación del electrodo de Au.	78
Figura 3.5	Voltamperograma cíclico del electrodo de Au policristalino de $A_{geom}=0.0314\text{ cm}^2$ en $\text{H}_2\text{SO}_4\ 0.5\text{M}$. $v=20\text{mV s}^{-1}$. El área sombreada representa la carga para el proceso de formación del AuO .	82
Figura 3.6	Representación de la formación de la plataforma de modificación para (A) los péptidos {2} y {3} y (B) el péptido {1}.	85
Figura 3.7	Esquema del proceso de desorción electroquímica de los péptidos que formaron la SAM	87
Figura 3.8	Voltamperograma cíclico (A) de la desorción electroquímica de los péptidos que formaron la MAE, (B) del electrodo de Au sin péptidos adsorbidos. (A) y (B) en $\text{NaOH}\ 0.5\text{M}$, $v=25\text{ mV s}^{-1}$	88
Figura 3.9	Disposición superficial propuesta para los péptidos (A) {1} (B) {2} y (C) {3} sobre los electrodos de Au	90
Figura 3.10	Voltamperograma cíclico de 3 barridos de potencial para FcCOOH en buffer de fosfatos ($I=0.1$) a 50 mV s^{-1} sobre electrodo de Au	91
Figura 3.11	Voltamperograma cíclico de 3 barridos de potencial para péptido {1} en solución de buffer de fosfatos ($I=0.1$) a 50 mV s^{-1} sobre electrodo de Au	92
Figura 3.12	Voltamperogramas cíclicos de los péptidos (A) {1}, (B) {2} y (C) {3} adsorbidos sobre Au en un medio buffer de fosfatos ($I=0.1$) y una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1}	93
Figura 3.13	Voltamperogramas cíclicos a varias velocidades de barrido de los péptidos (A) {1}, (B) {2} y (C) {3}, en buffer de fosfatos ($I=0.1$) (a)25, (b)50, (c)100, (d)200, (e)300, (f)400 y (g)500 mV s^{-1}	96
Figura 3.14	Variación de i_{pa} y i_{pc} en función de (A) v (B) $v^{1/2}$ y (C) variación de $\log(i_{pa})$ y $\log(i_{pc})$ en función de $\log v$. Para el péptido [3]. Anódico (■) y catódico(◆).	98

Figura 3.15	Variación de ΔE_p en función de v para los péptidos (A) {1} (B) {2} y (C) {3}.	99
Figura 3.16	Señal de perturbación oscilatoria de potencial eléctrico que al aplicarlo al sistema en estudio proporciona una respuesta de corriente también oscilatoria pero desfasada con respecto al tiempo	99
Figura 3.17	Circuito equivalente del electrodo de Au modificado de [44] ajustado a los espectros de EIS obtenidos para los sistemas Au/{1}, Au/{2} y Au/{3}	100
Figura 3.18	Representación Bode-Fase para los espectros de impedancia obtenidos para los sistemas (A) Au/{1}, (B) Au/{2} y (C) Au/{3}. Los datos experimentales corresponden a los círculos y las líneas continuas indican el resultado del ajuste con el circuito equivalente mostrado en la Figura 3.17	101
Figura 3.19	Comportamiento de un dieléctrico en ausencia y presencia de un campo eléctrico	103
Figura 3.20	Voltamperograma cíclico de 50 barridos de potencial para la SAM del péptido {1}. CV en buffer de fosfatos ($I=0.1$) y $v=100 \text{ mV s}^{-1}$. La dirección de las flechas indica el aumento consecutivo de los barridos de potencial.	105
Figura 3.21	Voltamperograma de la desorción electroquímica en (A) el electrodo de Au sin modificación, (B) Electrodo de Au modificado con el péptido y después de 5 barridos de potencial y (C) Electrodo de Au modificado con el péptido y después de 50 barridos de potencial. Representación de los $\Gamma_{\text{péptido}}$ de la SAM sobre el electrodo de Au (D) sin modificación, (E) con SAM de péptido después de 5 barridos de potencial y (F) con SAM de péptido después de 50 barridos de potencial	106
Figura 3.22	Isoterma de adsorción del péptido {1} a partir de soluciones en metanol	107
Figura 3.23	Voltamperogramas cíclicos del péptido {1} en buffer de fosfatos ($I=0.1$) cuando las SAM's fueron ensambladas en (A) metanol + $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de péptido {1} (B) Piridina + $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ de péptido {1}, (C) acetoniitrilo+ $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de péptido, y (D) ACN 50%v-H ₂ O 50%v + $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de péptido. $v=50\text{mV s}^{-1}$.	110

Capítulo 4 ESTUDIO CINÉTICO DE AUTOENSAMBLE DEL PÉPTIDO DITIOLADO

Figura 4.1	Esquema del sistema de medición de QCM.	120
Figura 4.2	Pasos de la preparación de la muestra para la AFM	121
Figura 4.3	Micrografías SEM con 100,000 aumentos de (A) superficie de Au después del proceso de limpieza, superficie de Au con una gota de 100 μ L de una solución 200 μ g/mL del péptido {1} en CH ₃ CN:H ₂ O 50%/50% v:v y tiempo de modificación de electrodo con (B) 5min y (C) 80 min.	123
Figura 4.4	Micrografías SEM con 250,000 aumentos de (A) superficie de Au después del proceso de limpieza, superficie de Au 100 μ L de una solución 200 μ g/mL del péptido {1} en CH ₃ CN:H ₂ O (v:v) (1:1) y tiempo de modificación de electrodo con (B) 1min, (C) 2 min, (D) 5min, (E) 20 min y (F) 80 min.	124
Figura 4.5	Cambio de frecuencia relativa con respecto al tiempo para la transición de H ₂ O hacia la mezcla CH ₃ CN/H ₂ O 50%-50% v/v.	126
Figura 4.6	Cambio de frecuencia relativa con respecto al tiempo para la adsorción del péptido {1} (10 μ g/mL) sobre una superficie de Au.	126
Figura 4.7	Cambio de frecuencia relativa con respecto al tiempo para la adsorción del péptido {1} (200 μ g/mL) sobre una superficie de Au	127
Figura 4.8	Micrografías AFM de las nanoestructuras sobre mica de la adsorción del péptido {1} a partir de una solución recién preparada con concentración 200 μ g/mL en CH ₃ CN:H ₂ O 50%-50% v/v para 10 minutos (A y B) y 1 minuto de adsorción (C y D) sobre la superficie. (A y C) modo topológico, (B y D) modo fase.	131
Figura 4.9	Modelos moleculares para el péptido {1} en diferentes arreglos, como (A) un monómero, (B) una estructura de anillo abierto y (C) arreglo de dímeros. Para mejor claridad en las estructuras los átomos de hidrógeno fueron omitidos.	132
Figura 4.10	Micrografías AFM de las nanoestructuras sobre mica de la adsorción del péptido {1} a partir de una solución almacenada durante 2 meses a 4°C con concentración 200 μ g/mL en CH ₃ CN:H ₂ O 50%-50% v/v para 10 minutos de adsorción (A y C) modo topológico, (B y D) modo fase.	133

Figura 4.11	Esquema del mecanismo de autoensamblado donde se representa (i) autoasociación de las unidades peptídicas para formar nanoestructuras lineales, (ii) reorganización de la nanoestructura a una forma curvada y (iii) formación de un anillo.	135
Figura 4.12	Espectros Raman (A) Péptido {1} sólido, (B) Superficie de Au limpio y (C) Acetonitrilo sobre superficie de Au.	136

ÍNDICE

DE TABLAS

Capítulo 2 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS L/D ALTERNADOS CONJUGADOS CON FERROCENO

Tabla 2.1	Grupos protectores comunes del grupo sustituyente R	37
Tabla 2.2	Proporciones de las soluciones de H ₂ O y ACN, ambos con 0.1% de TFA.	52
Tabla 2.3	Condiciones experimentales para los análisis en cromatografía líquida de alta resolución, donde las soluciones de H ₂ O(A) y ACN (B) cuentan con 0.1% de TFA	53
Tabla 2.4	Pesos moleculares teóricos y experimentales de los péptidos sintetizados	63
Tabla 2.4	Rendimientos de las SPFS	67

Capítulo 3 CARACTERIZACIÓN ELECTROQUÍMICA DE LAS SAM'S DE PÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS L/D ALTERNADOS CONJUGADOS CON FERROCENO

Tabla 3.1	Cargas del proceso de formación de la monocapa de AuO, valores de áreas reales electroactivas y factores de rugosidad para los electrodos.	84
Tabla 3.2	Recubrimientos superficiales molares.	88
Tabla 3.3	Potenciales característicos para los 3 péptidos con aminoácidos L/D alternados, conjugados con Fc, determinados por VC.	94
Tabla 3.4	Parámetros electroquímicos obtenidos del ajuste del circuito mostrado en la Figura 3.16 a los espectros de impedancia mostrados en la Figura 3.17	102

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ácido aspártico	Asp
Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)	DNA
Área geométrica de electrodo	A_{Geom}
Área real electroactiva de electrodo	A_{Real}
Cadena lateral	R
Capacitancia de la doble capa	C_{DL}
Carga debida a la formación del óxido de Au (dato experimental).	Q_{AuO}
Cistamina	CSA
Cisteína	Cys
Coefficiente de difusión	D
Constante velocidad de transferencia electrónica	k_{ET}
corriente de pico	i_{p}
Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)	HPLC
Densidad de corriente	j
Densidad de corriente de pico	j_{p}
Depósito en subpotenciales (underpotential deposition)	UPD
Espectroscopía de masas (Mass Spectroscopy)	MS

Espectroscopía de impedancia electroquímica (Electrochemical Impedance Spectroscopy)	EIS
Fenilalanina	Phe
Glicina	Gly
Glucosa oxidasa	GOx
Glutamina	Gln
Glutaraldheído	GU
Grupo Activador	A
Grupo modificador o espaciador en resinas	MOD
Grupo protector permanente	P
Grupo protector temporal	T
Histidina	His
ionización de electroaspersión (electrospray ionization)	ESI
ionización/desorción láser asistida por matriz (matrix-assisted laser desorption/ionization)	MALDI
Leusina	Leu
Límite de detección	LD
Microbalanza de cristal de cuarzo (Quartz Crystal Microbalance)	QCM
Microscopía de barrido electrónico (Scanning Electron Microscopy)	SEM
Microscopía de fuerza atómica (Atomic Force Microscopy)	AFM
Monocapa autoensamblada (Self Assembled Monolayer)	SAM
Nanopartículas de oro (Au nanoparticle)	AuNP
Nanotubos de carbon de pared sencilla (single walled carbon nanotubes)	SWCNTs
Nanotubos de carbono (Carbon nanotubes)	CNTs
Nanotubos de carbono de pared sencilla perthiolados (perthiolated single walled carbon nanotubes)	ptSWCNTs
Nanotubos peptídicos (peptide nanotubes)	PNTs
Número de electrones	<i>N</i>
Ornitina	Orn

Polietilenimina	PEI
Potencial de circuito abierto (open circuit potential)	OCP
Potencial de pico	E_p
Potencial formal	E_f
Prolina	Pro
Proteasa aspártica codificada por el virus HIV-1.	HIV-1PR
Pseudocapacitancia de adsorción	C_{AD}
Recubrimiento superficial molar	Γ
Resistencia a la transferencia de carga	R_{CT}
Resistencia de la solución	R_{SOL}
Seminanotubos de péptidos (Quasi Peptide Nanotubes)	QPNTs
Síntesis de péptidos en fase líquida	SPFL
Síntesis de péptidos en fase sólida	SPFS
Transferencia electrónica (electron-transfer)	ET
Triptófano	Trp
Valina	Val
Virus de inmunodeficiencia humana (Human immunodeficiency virus)	HIV
Voltamperometría cíclica	VC

RESUMEN

Un área de la electroquímica que continua en crecimiento es el desarrollo de sensores electroquímicos. Mejoras en la selectividad y sensibilidad de tales sensores son muy deseables para enfrentar nuevos desafíos planteados por muestras clínicas y ambientales. Sin embargo, los sensores basados en materiales comunes de electrodo pueden carecer de la capacidad de discriminar entre solutos que poseen características redox similares. Una opción que brinda un gran potencial para vencer el problema de especificidad en los sensores electroquímicos son los electrodos modificados, ya que ofrecen la capacidad de controlar y manipular deliberadamente las propiedades de la superficie. El autoensamblaje molecular de monocapas soportadas sobre electrodos sólidos es una de las técnicas más utilizadas que pueden producir una variedad de estructuras con diferentes tipos de grupos funcionales de superficie y con una topografía variada, que son características atractivas en el área de los biosensores electroquímicos.

Como una alternativa novedosa a los nanotubos de carbono para la modificación de electrodos, se ha propuesto el uso de nanotubos de péptidos conjugados con centros redox para convertirlos en moléculas electroactivas. Los nanotubos peptídicos, al ser biomacromoléculas, son potenciales receptores de biomoléculas ideales para el desarrollo de nuevos biosensores electroquímicos.

En este trabajo se propuso la síntesis de 3 péptidos constituidos por aminoácidos tipo L y D alternados, que inducen la formación de nanotubos de péptidos y que fueron conjugados con una molécula de ferroceno carboxilado que le confiere propiedades electroactivas al péptido.

Además, los 3 péptidos cuentan con al menos un residuo de Cys que le otorga a los péptidos el átomo de S necesario para que se enlace covalentemente a una superficie de Au

Los péptidos con aminoácidos L/D conjugados con ferroceno fueron sintetizados mediante la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida (con la estrategia ortogonal Fmoc), purificados con cromatografía líquida de alta resolución y se confirmó su identidad química por espectroscopía de masas (capítulo 2).

Una vez sintetizados los péptidos, electrodos de Au fueron modificados con estos péptidos y caracterizados electroquímicamente mediante voltamperometría cíclica y espectroscopia de impedancia electroquímica (capítulo 3). En el estudio voltamperométrico se encontró que la señales voltamperométricas atribuidas al par redox ferroceno(Fc)/ferricinio (Fc^+) enlazado a los péptidos que conforma las monocapas autoensambladas se encuentran alrededor de 0.455 V vs Ag/AgCl, NaCl 3M. Para las mismas capas autoensambladas de los 3 péptidos se determinaron los recubrimientos sobre la superficie de Au mediante una desorción electroquímica en un medio básico, donde los recubrimientos indicaron que el péptido {3} se adhiere al electrodo de forma paralela al electrodo de Au, mientras que los péptidos {1} y {2} contaron con un acomodo espacial perpendicular respecto a la superficie del electrodo. Tanto el estudio voltamperométrico a diferentes velocidades de barrido, como el ajuste de los espectros obtenidos en espectroscopia de impedancia electroquímica y ajustados a un circuito equivalente revelaron que la velocidad de transferencia de carga de los péptidos adsorbidos es limitada por la difusión semi-infinita de los aniones del electrolito soporte que mantienen la electroneutralidad con los grupos Fc^+ producidos en el proceso de oxidación electroquímica.

Debido a la posibilidad del péptido {1} para enlazarse en forma de cuasianillo a la superficie de Au, a través de dos enlaces Au-S, se siguió el proceso de autoensamble del péptido {1} en un medio de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50%v/50%v por medio de microscopía electrónica de barrido, microscopía de fuerza atómica y microbalanza de cristal de cuarzo a diferentes tiempos de modificación (capítulo 4). Las evidencias recopiladas en las diferentes técnicas para la cinética del autoensamble del péptido {1} permitió visualizar un mecanismo de formación de las nanoestructuras que consta de 2 pasos rápidos y en equilibrio en los que se forman las estructuras lineales y los cuasi-anillos, para luego presentar un paso lento en el que se forman los anillos a

partir de las primeras estructuras lineales y curvadas. La importancia del trabajo aquí presentado radica en que las aplicaciones reales de estas capas autoensambladas de péptidos con aminoácidos L/D conjugados con ferroceno requieren de un control preciso de las características estructurales que, a su vez, depende críticamente de una mejor comprensión de factores tales como las condiciones y los mecanismos de formación.

Capítulo 1

NANOESTRUCTURAS PEPTÍDICAS PARA BIOSENSORES

1.1 INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevos materiales nanoestructurados de electrodo para generar sensores moleculares electroquímicos es de suma importancia, puesto que estos sistemas permitirían realizar detecciones sensibles y selectivas de un gran número de analitos de interés biológico [1]. Este tema podría tener un gran impacto social y económico si estos sensores permiten el diagnóstico preciso de diversas enfermedades. Como un ejemplo se puede mencionar los sensores amperométricos de glucosa que permiten la detección precisa de los niveles de glucosa en la sangre. En este dispositivo se utiliza la enzima glucosa oxidasa para descomponer la glucosa en peróxido de hidrógeno, el cual se detecta sobre un electrodo de Pt, proporcionando la concentración de glucosa en la sangre [2]. De esta manera, se pueden desarrollar sensores electroquímicos similares para la detección de cualquier otro padecimiento.

El uso de nanomateriales compuestos puede dar una solución a estas necesidades, sin embargo, para alcanzar este nivel de aplicación varios factores deben de ser estudiados de manera más profunda. La formación de plataformas nanométricas puede ser conseguida

mediante las monocapas autoensambladas (SAM, self-assembled monolayers). Las SAM's ofrecen una manera fácil de funcionalizar una superficie de electrodo con moléculas orgánicas que pueden contener diferentes grupos funcionales como tioles, ácidos carboxílicos, aminas, silanos o disulfuros[3], como se ejemplifica en la Figura 1.1. Las monocapas obtenidas en el proceso de autoensamble pueden ser muy versátiles, mediante sus grupos funcionales se puede controlar el ambiente hidrofílico o hidrofóbico, mientras que variando la longitud de la cadena del compuesto orgánico se puede cambiar el espesor de la capa [4].

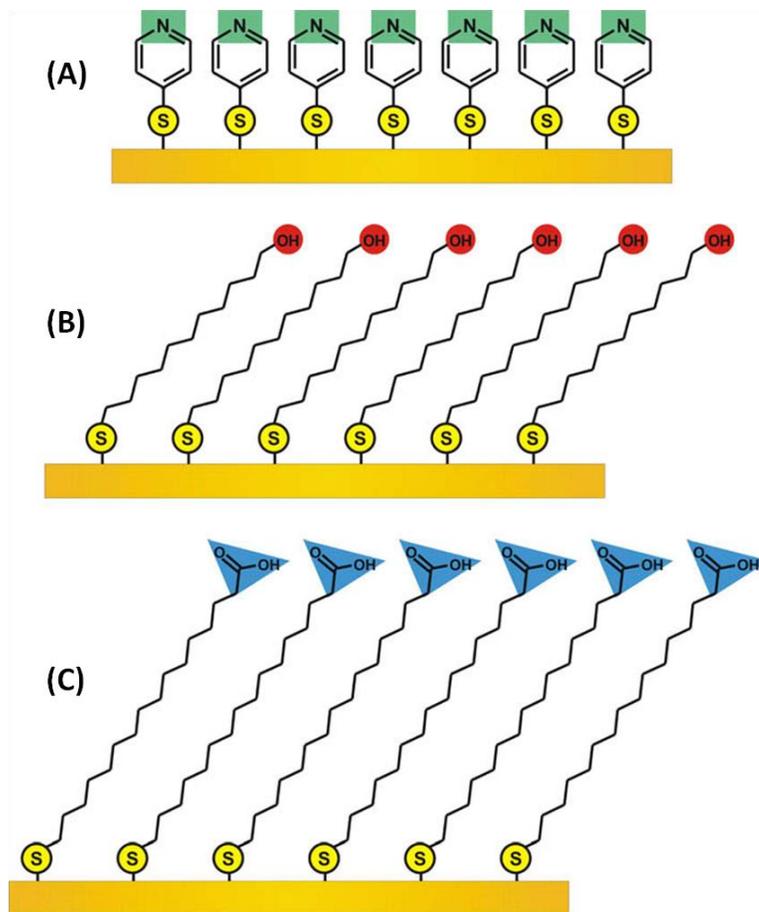


Figura 1.1 Las SAM's producidas pueden exponer diversas funciones orgánicas. Superficies terminadas en (A)piridina, (B) hidroxilo y (C) ácido carboxílico [4].

Entre los nanomateriales más estudiados y aplicados en electrodos modificados, se encuentran los nanotubos de carbono (CNTs, carbon nanotubes) de pared sencilla (SWCNTs, single walled carbon nanotubes) [5,6]. Sin embargo, existen 2 grandes limitaciones para el uso

de SWCNTs: primero los métodos de preparación producen mezclas heterogéneas de nanotubos que varían en longitud, diámetro y tipo electrónico; y segundo, los SWCNTs son muy hidrofóbicos, se aglomeran con facilidad haciéndose difícil que interactúen con biomoléculas [7]. Debido a que los métodos sintéticos producen una mezcla de diferentes tipos de SWCNTs, se han desarrollado diferentes métodos de separación, que incluyen electroforesis [8], adsorción superficial selectiva[9], extracción polimérica [10] , ultracentrifugación [11] y utilización de geles[12].

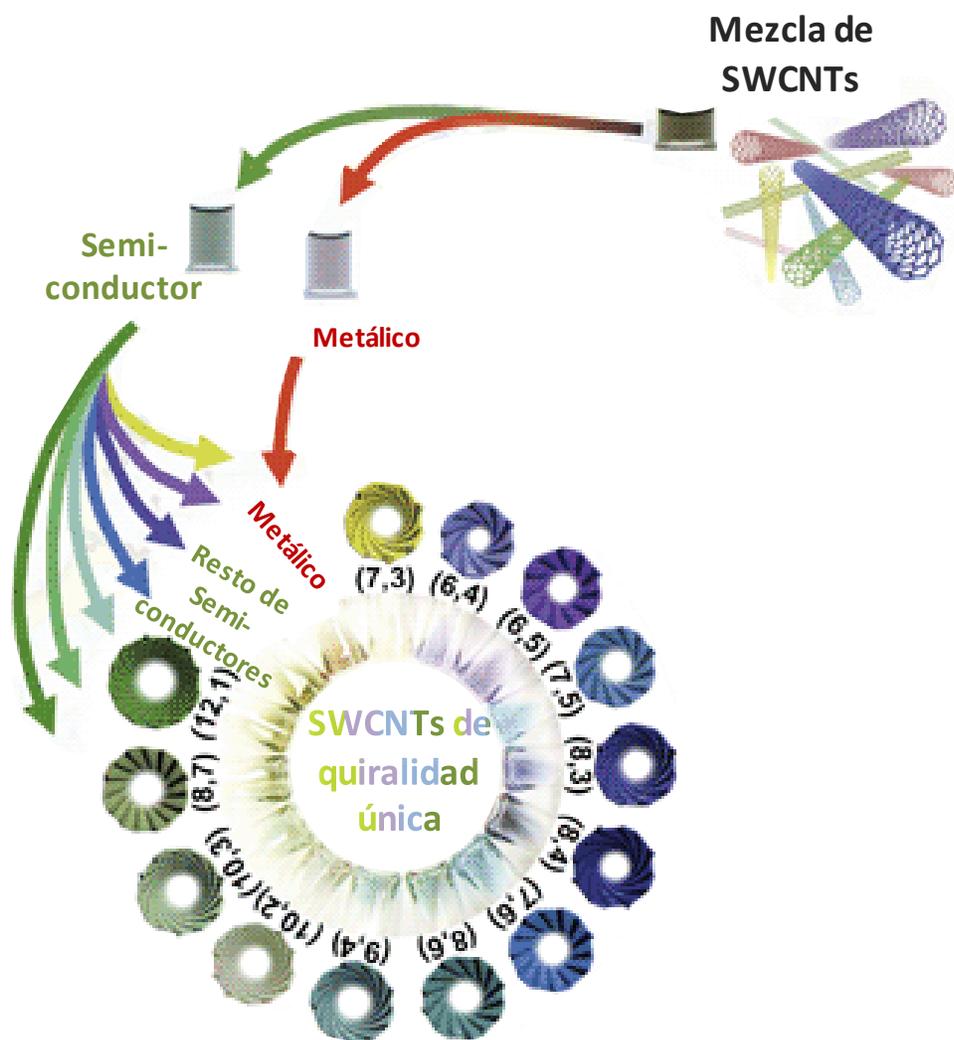


Figura 1.2 Esquema representativo de la separación de SWCNTs dependiendo de su quiralidad [12].

En este último tipo de separación se consiguió la separación de SWCNTs metálicos y semiconductores utilizando un gel de agarosa, además de 13 tipos de SWCNTs de diferente quiralidad con una combinación de dodecilsulfato de sodio y agarosa (Figura 1.2).

Como una alternativa se ha explorado el uso de unidades bioequivalentes, como son los ensamblajes orgánicos tubulares. Existen varias maneras para diseñar estructuras tubulares, como con centros huecos y terminaciones abiertas [13]. Como lo ejemplifica la Figura 1.3, entre las posibles estrategias para el ensamble molecular de estructuras tubulares tenemos (A) moléculas helicoidales que al enrollarse dejan un interior vacío, (B) moléculas en forma de rollos que se aglomeran de forma tal que producen un fajo molecular, (C) macrociclos que se apilan para formar tubos continuos y (D) moléculas cuneiformes que se agrupan para formar discos que a su vez se ensamblan y crean cilindros.

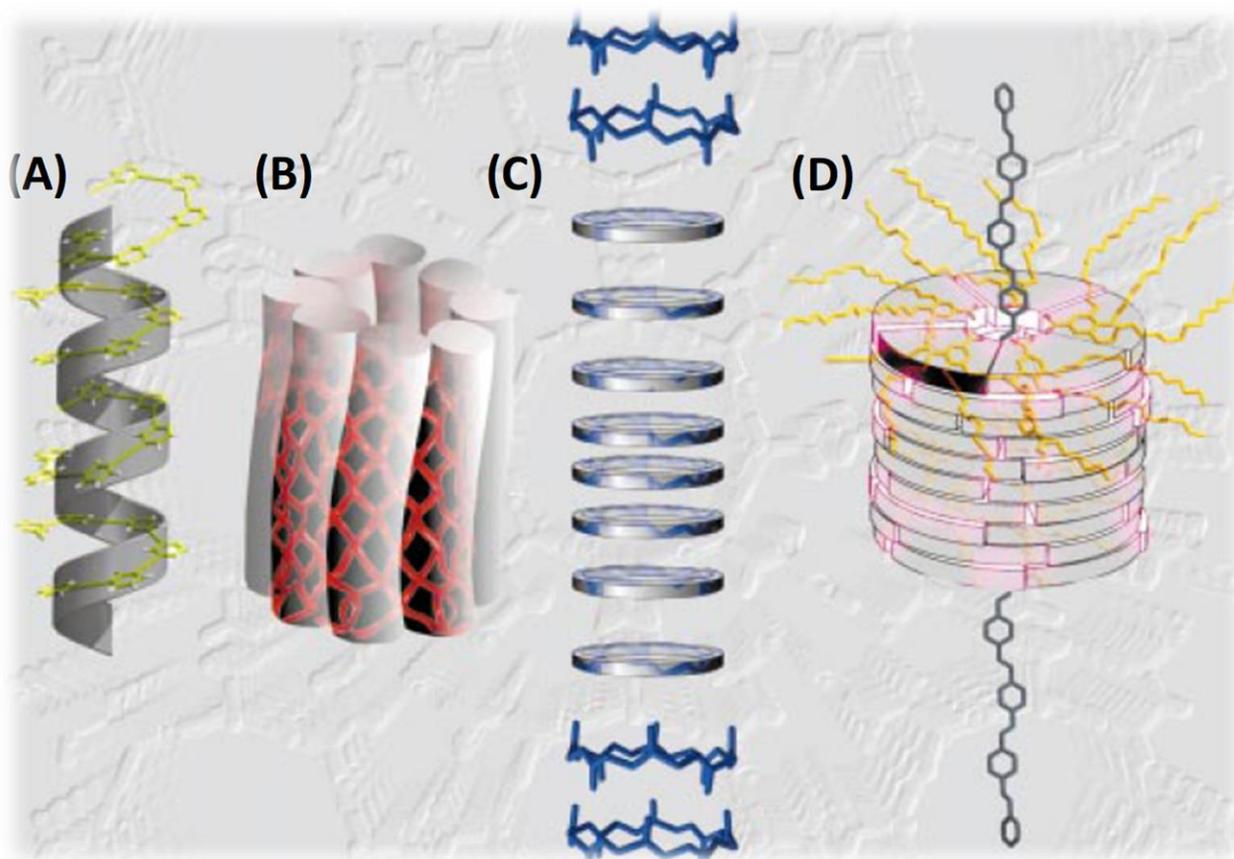


Figura 1.3 Posibles maneras de ensamble molecular para producir estructuras orgánicas tubulares: (A) moléculas helicoidales, (B) fajos moleculares, (C) anillos y (D) moléculas cuneiformes [13].

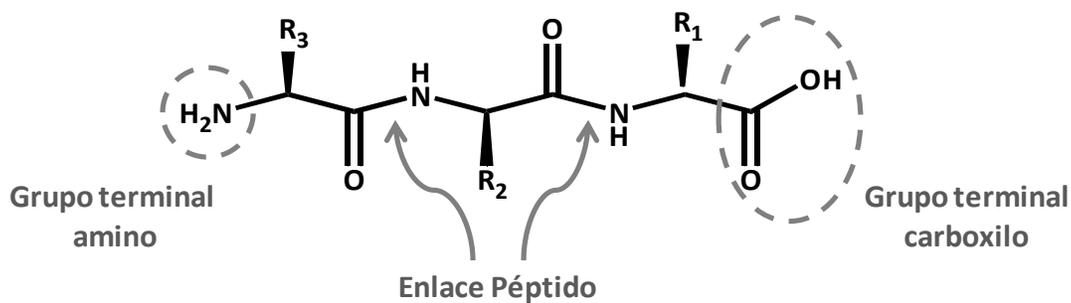
Los nanotubos de péptidos están incluidos en estos ensamblajes moleculares y se han convertido en una de las nanoestructuras más innovadoras en el campo de la nanotecnología y cuentan con gran importancia en aplicaciones médicas [14]. Estas nanoestructuras peptídicas presentan numerosas ventajas como su flexibilidad en el diseño, su habilidad a enlazarse selectivamente, y considerarse como potenciales receptores de biomoléculas como enzimas y antígenos, ya que es posible enlazarlos covalentemente mediante un enlace amida [15].

Sin embargo, las aplicaciones de los nanotubos peptídicos han sido poco exitosas, en comparación con los nanotubos de carbono. Esto se debe al poco conocimiento de los fenómenos involucrados en estos biosistemas. El entendimiento profundo de la influencia del evento de reconocimiento sobre las propiedades electroquímicas del bionanomaterial es de vital importancia. Dado lo anterior, es importante sintetizar y caracterizar nanotubos de péptidos con el objetivo de desarrollar sensores electroquímicos altamente específicos y sensibles hacia analitos de interés biológico.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Péptidos cíclicos

Un péptido se constituye por la unión de varios residuos de aminoácidos, los cuales se unen unos con otros con un enlace covalente específico denominado enlace peptídico (Figura 1.4). Estos contienen grupos terminales amino ($-NH_2$) y carboxilo ($-COOH$) en los extremos de la cadena de aminoácidos que conforman el péptido [16].



R_i = Sustituyente R que define a cada aminoácido

Figura 1.4 Esquema básico de un péptido de 3 aminoácidos.

Muchos procesos biológicos se basan en las propiedades de reconocimiento de los péptidos, por lo cual estos pueden ser utilizados como los elementos bioquímicos de reconocimiento en un sensor electroquímico. Dentro de los ejemplos de procesos de reconocimiento se tiene la gran cantidad de ciclopéptidos están involucrados en el transporte y regulación de sustratos iónicos en células (como es el caso de la valinomicina) o cuentan con funciones de antibióticos (por ejemplo, el Gramicidin S). La valinomicina es un dodecadepsipéptido que consiste en enantiómeros D- y L- de -Valina, D-ácido hidroxivalérico y L-ácido láctico (Figura 1.5 (A)) [17]. La valinomicina tiene una alta especificidad a los iones potasio (K^+), rubidio (Rb^+) y cesio (Cs^+), por lo tanto, funciona como un transportador específico de potasio. La valinomicina se asocia con los iones en el lado externo de la barrera lípida de la membrana (Figura 1.5 (B)), complejo cargado con K^+ se traslada través de la membrana bajo un gradiente de potencial, libera el K^+ en el otro lado de la capa mediante disociación, y la valinomicina regresa vacía al exterior de la membrana (Figura 1.5 (C)) [18,19].

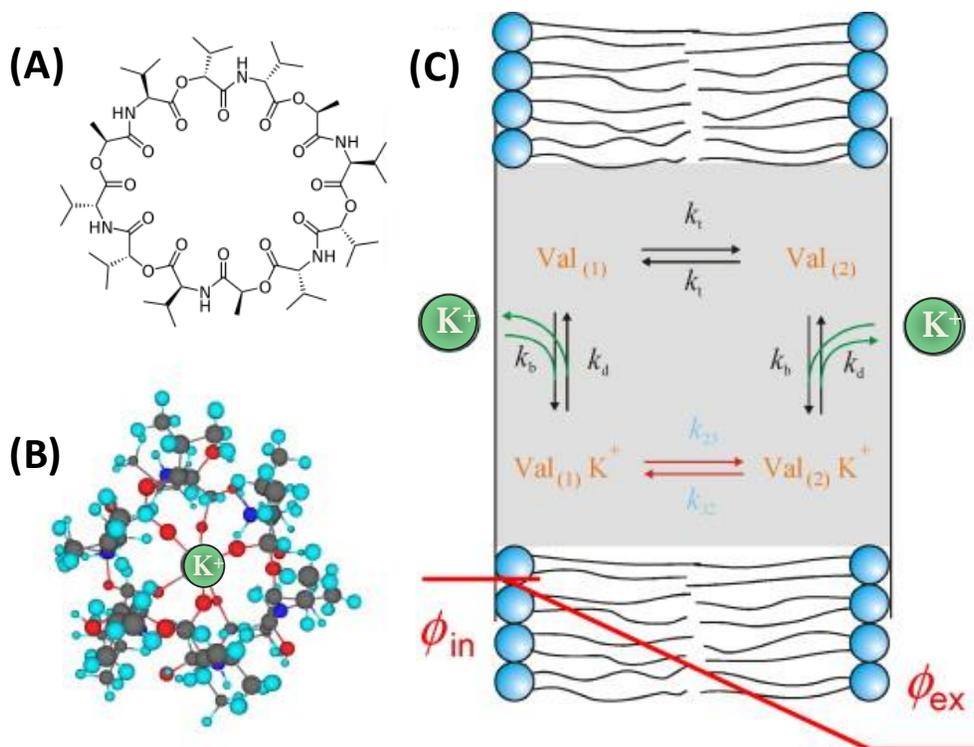


Figura 1.5 (A) Estructura química de la valinomicina (B) Modelo de la valinomicina indicando la complejación con el ion potasio (C) Mecanismo de transporte de la valinomicina trasladando los iones potasio a través de la barrera hidrofóbica [19]

El Gramicidin S es un ciclodecapéptido con estructura ciclo(-Val-Orn-Leu-DPhe-Pro)₂, que es efectivo para combatir bacterias del tipo Gram positivo o Gram negativo y también para algunos hongos (Figura 1.6). El Gramicidin S afecta las propiedades de barrera de la membrana celular causando la muerte de la célula [20,21].

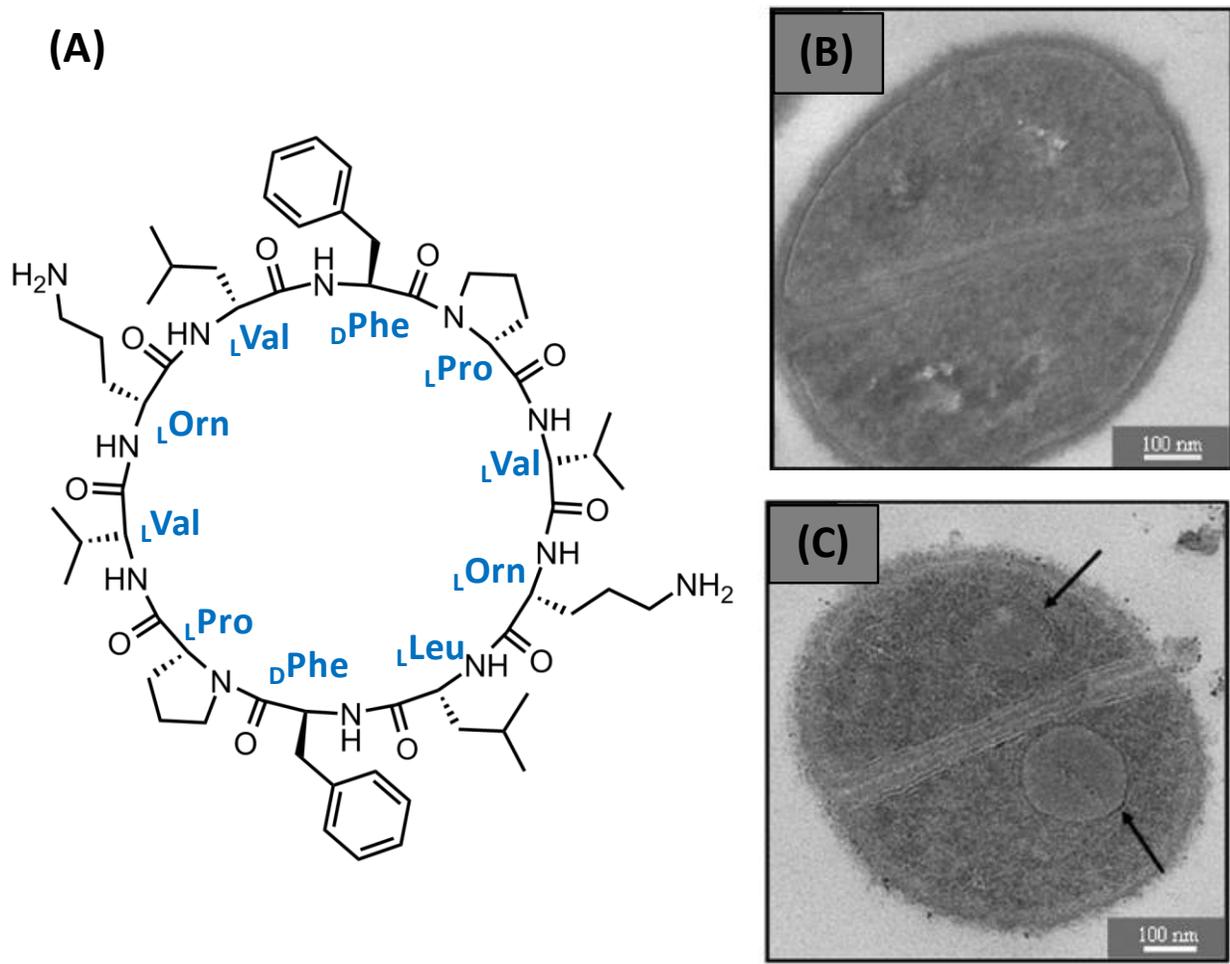


Figura 1.6 (A) Estructura química del Gramicidin S (GS). Micrografía de transmisión electrónica de la especie Gram positivo *S. aureus* (B) sin tratamiento y (C) después del tratamiento con GS, el daño celular es indicado con las flechas [21].

Sin embargo, es complicado aislar estos canales de péptidos para emplearlos en diversos usos, así se ha optado por desarrollar estructuras artificiales con un desempeño equivalente a los canales naturales. Montenegro y col. han producido canales peptídicos sintéticos a partir de péptidos cíclicos, que podrían ser utilizados para la construcción de transportadores artificiales transmembranales, y han puesto especial atención en el control topológico y en la funcionalización de estos péptidos [22,23].

1.2.2 Nanotubos peptídicos

A pesar de las considerables mejoras en las propiedades de los electrodos compuestos basados en SWCNTs, su uso es limitado por consideraciones relacionadas con su producción, uniformidad, hidrofobicidad, reproducibilidad, modificación y costo. En este contexto, los ensamblajes biomoleculares ofrecen una buena alternativa en el desarrollo de sensores electroquímicos, un ejemplo interesante lo componen los nanotubos de péptidos (PNTs, peptide nanotubes) [24].

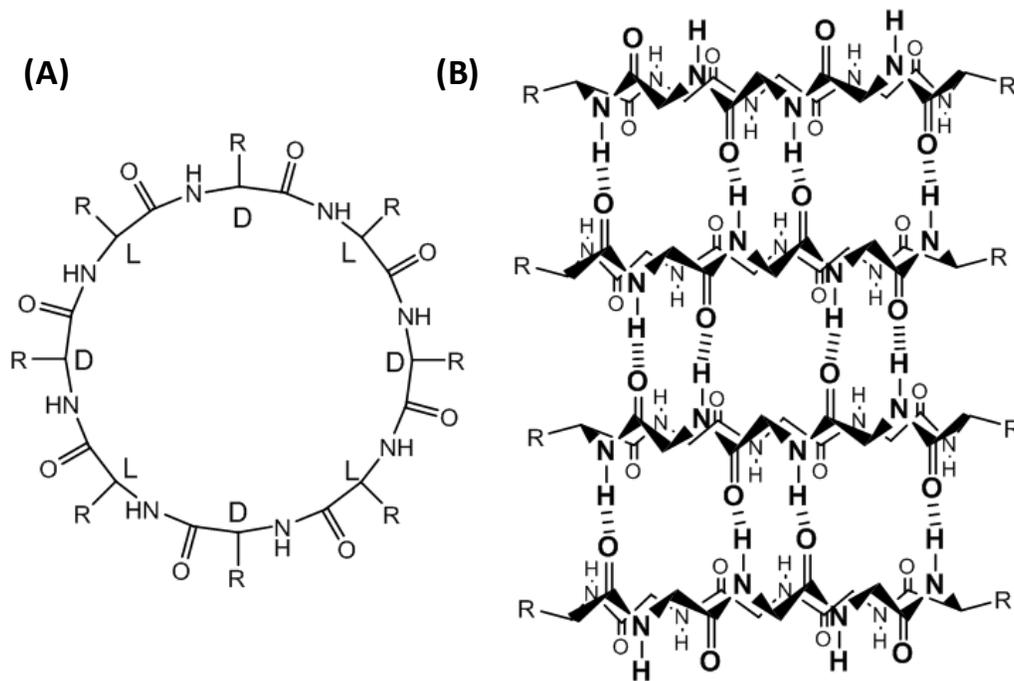


Figura 1.7 A) Péptido cíclico de aminoácidos L, D alternados.
B) Ensamble de los péptidos cíclicos en nanotubos peptídicos [13].

Los péptidos cíclicos se forman con un número par de aminoácidos L- y D- alternados, que tienden a minimizar las interacciones intramoleculares entre las cadenas laterales adoptando una estructura de anillo plano en su columna vertebral (Figura 1.7 (A)) [25].

En el anillo peptídico todos los grupos funcionales amida se posicionan perpendicularmente al plano de la estructura del anillo. Todas las cadenas laterales de los aminoácidos apuntan hacia afuera del centro del anillo formado por los aminoácidos a causa de la estructura local y a las

restricciones estéricas impuestas por la configuración de la columna principal formada por los aminoácidos alternados. Este arreglo deja una estructura tubular con el centro libre. Bajo esta conformación, los anillos peptídicos se apilan formando una red de enlaces de hidrógeno del tipo β -laminar[27], en donde el arreglo antiparalelo es favorecido (Figura 1.7 (B)) [26]. En el empacamiento del tipo β -laminar, las interacciones laterales vencen a la penalización energética de la imposibilidad de curvar la estructura del anillo. [28]

El proceso de autoensamble para la formación de los NTPs es afectado por el tamaño del anillo peptídico empleado, debido a las fuerzas de tensión y estabilidad de la estructura. De manera que los péptidos cíclicos de menos de 6 residuos de aminoácidos tienen un diámetro muy pequeño, produciéndose una tensión muy grande en el anillo que impide el apilamiento de los anillos. Por el contrario, péptidos cíclicos muy largos tiene una flexibilidad demasiado elevada para mantener un anillo plano, imposibilitando las interacciones intermoleculares de enlace de hidrógeno que conducirían a la formación de los nanotubos [29,30].

1.2.3 Nanotubos peptídicos modificando electrodos

Los PNTs ofrecen la ventaja de ser más fácil y baratos de preparar comparados con los CNTs. El uso de los electrodos compuestos de PNTs ha sido documentado en la literatura. Dentro de los trabajos que describen PNTs modificando electrodos se encuentra el reportado por Motesharei y col. [31], donde ellos incorporaron de forma no covalente un péptido cíclico de ocho residuos de unidades alternadas de D-Leu y L-Trp dentro de monocapas de dodecanotioles y octadecanotioles sobre Au. En este caso se observaron diferentes estructuras en la superficie del electrodo dependiendo de las condiciones experimentales usadas para formar la monocapa (Figura 1.8).

En otro trabajo basado en nanotubos de péptidos cíclicos tipo L/D, Okamoto y col. [32] han mostrado que la morfología del ensamble sobre sustratos de oro depende de la secuencia del aminoácido. Se reportó que un ciclohexapéptido con aminoácidos alternados de α Cys y α Gln forman estructuras de nanoanillos cuando se depositó sobre sustratos de Au (Figura 1.9 (A)).

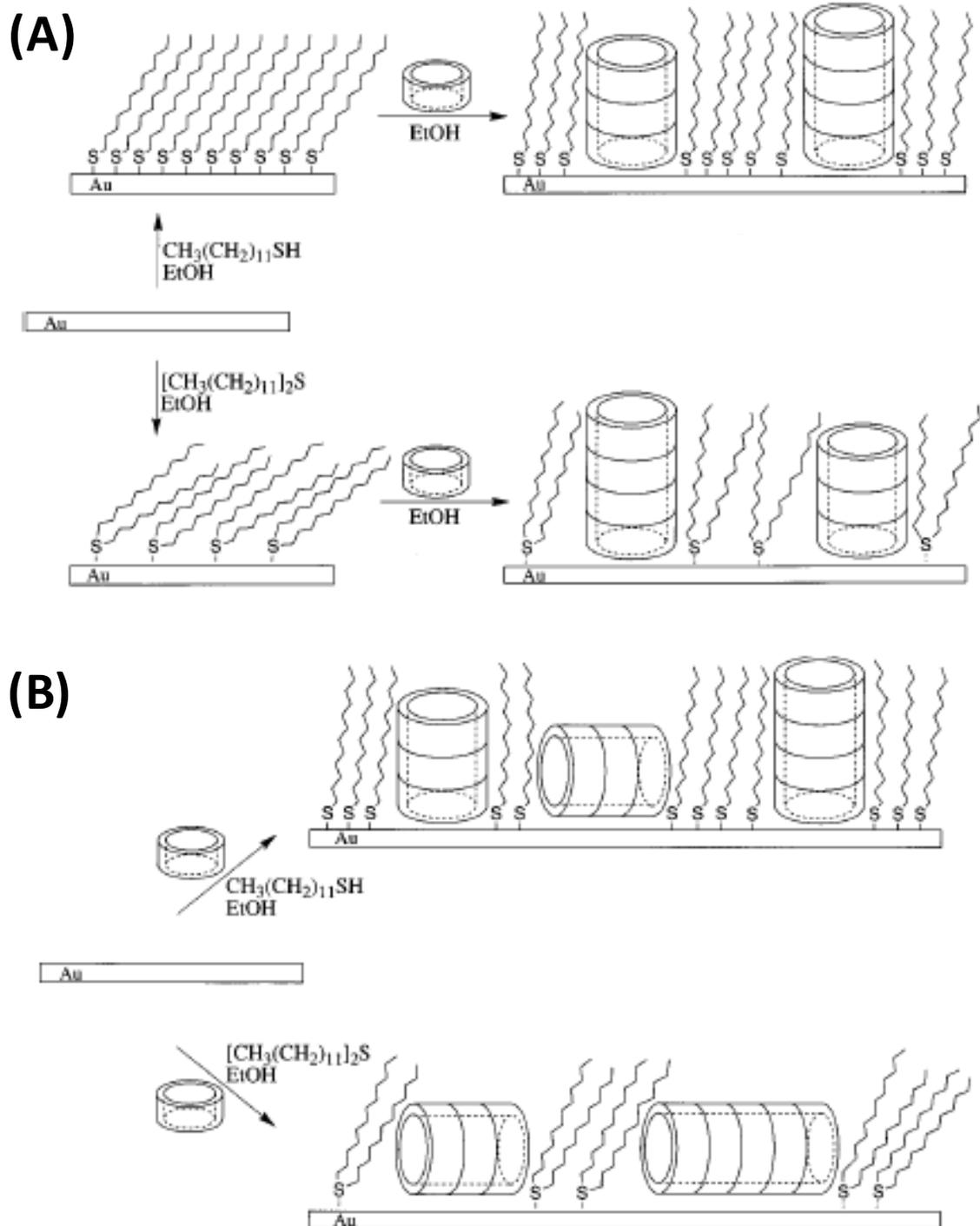


Figura 1.8 (A) Formación de la monocapa de dodecanol e incorporación de los PNTs (B) Formación de la monocapa con el depósito simultáneo del dodecanol y los PNTs [31].

Por otra parte, una secuencia aleatoria de aminoácidos conteniendo una sola Cys dentro de su estructura formó nanotubos individuales (Figura 1.9 (B)). Estos hallazgos permiten inferir que la presencia de 3 unidades de Cys en el péptido cíclico favorece las interacciones entre el Au, dando la posibilidad de formar 3 enlaces Au-S fuertes. Este escenario puede explicar el hecho de que la columna vertebral de estos ciclopéptidos con 3 Cys descansa de forma paralela a la superficie del sustrato (Figura 1.9 (A)).

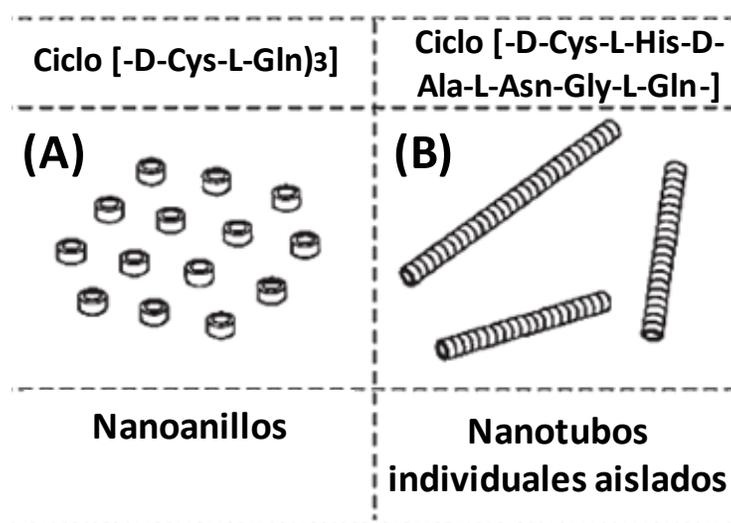


Figura 1.9 Morfología de anillos y nanotubos de péptidos sobre sustratos de Au [32].

Por otro lado, cuando solamente se tiene presente un residuo de Cys existe sólo un posible punto de unión entre la superficie del sustrato y el péptido, explicando la formación de nanotubos individuales (Figura 1.9 (B)). Además, los nanotubos individuales no se aglomeran con otros nanotubos, lo que significa que la secuencia aleatoria de aminoácidos no favorece ninguna interacción entre nanotubos.

Aunque no se puede realizar una comparación directa entre los electrodos modificados con SWCNTs y aquellos modificados con PNTs, es de notarse que se obtienen mejores límites de detección (LD) con los de CNTs. Esto se puede atribuir a las diferencias de conductividad entre ambos sistemas. En este sentido, se ha calculado que los PNTs son conductores pobres ($E_g > 4\text{eV}$), mientras que los SWCNTs son considerados en general conductores buenos ($E_g \sim 1.7\text{eV}$).

Se ha determinado que la secuencia de aminoácidos del péptido tiene una influencia muy grande en las propiedades de conducción del sistema nanoensamblado. Por ejemplo, se demostró que PNTs compuestos de aminoácidos aromáticos apilados y alineados presentan una mejora en su conductividad electrónica (eg. $E_g \sim 2.9$ eV fue calculado para el ciclo (-L-Gln-D-Phe-)₄, mientras que un $E_g \sim 4.1$ eV fue obtenido para el ciclo (-L-Gln-D-Ala-)₄) [33]. Una buena conductividad electrónica en los PNTs con fenilalanina es debida a que una orientación que preserva un sistema π conjugado permite la deslocalización de los electrones a través de la cadena molecular de los anillos aromáticos en los PNTs.

1.2.4 Nanotubos peptídicos en biosensores

El estudio realizado por Mateo-Martí y col. [34] describe la caracterización estructural de un biosensor de DNA basado en capas autoensambladas de moléculas adsorbidas de ácidos nucleicos peptídicos tiolados sobre superficies de oro, donde detectan DNA en muestras naturales. Por otra parte, se ha descrito la preparación, por el método de sol-gel, de un material a base de pasta de carbono y nanotubos de péptidos cíclicos tipo L/D, a los cuales se enlazaron anticuerpos de la *Escherichia coli* O157:H7 [35]. En este trabajo se evalúa la interacción de la *Escherichia coli* O157:H7 con su anticuerpo mediante voltamperometría cíclica en presencia de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como una sonda redox.

El uso de PNTs en aplicaciones como sensor fue reportado por Yemini y col. [36,37], donde usaron un dipéptido de fenilalanina (diPhe), bien conocido por generar PNTs. La Figura 1.10, muestra los pasos o etapas para formar y modificar los PNTs. La primera etapa consiste en formar nanotubos a partir de fenilalanina (paso 1 de la Figura 1.10). Una vez formados los PNTs de diPhe estos fueron tiolados usando el reactivo de Traut (paso 2, Figura 1.10). Una enzima (por ejemplo la etanol deshidrogenasa para la detección de peróxido de hidrógeno o la glucosa oxidasa para la detección de la glucosa) fue fijada en los nanotubos peptídicos de forma no-covalente mediante el uso de glutaraldeído (GU) (paso 3 de la Figura 1.10), después se le añadió el PEI (paso 4 de la Figura 1.10).

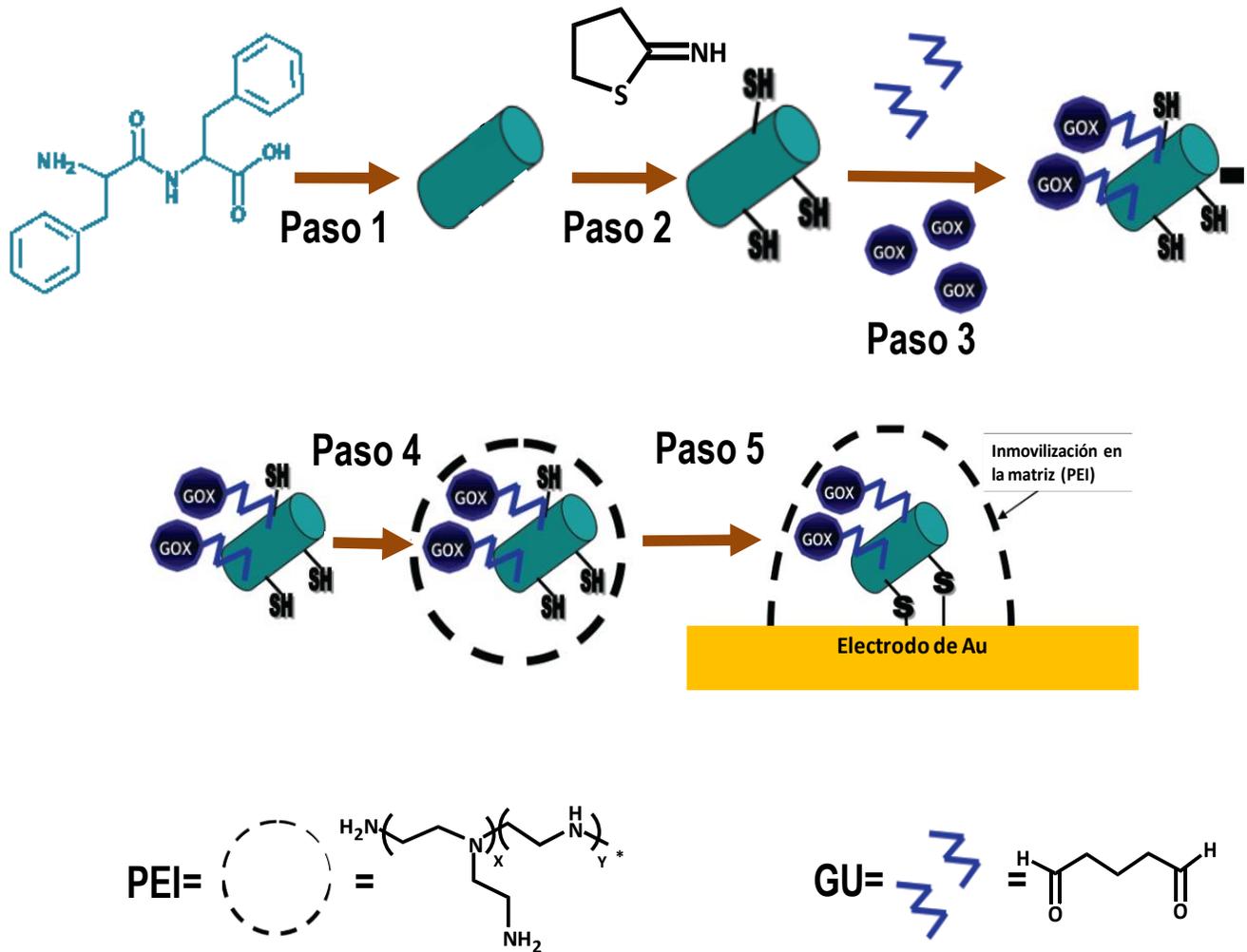


Figura 1.10 Pasos para la formación del compuesto PNTs tiolados/Enzima [37].

El biocompuesto final de PNT tiolados/Enzima fue depositado sobre un electrodo de Au y secado a temperatura ambiente, (paso 5 de la Figura 1.10). La película de PEI tiene la función de mejorar el desempeño de la GOx al proveer de una matriz apropiada para la captura de los intermediarios creados en la reacción enzimática catalizada por la GOx.

Se realizaron pruebas cronoamperométricas a un potencial de 0.6V vs SCE con el electrodo modificado con el biocompuesto y con electrodos de Au sin modificar (Figura 1.11). El electrodo modificado mostró respuesta a las adiciones sucesivas de 0.2mM de β -D- glucosa, mientras que el electrodo de Au no registró un aumento en la corriente con las adiciones de glucosa.

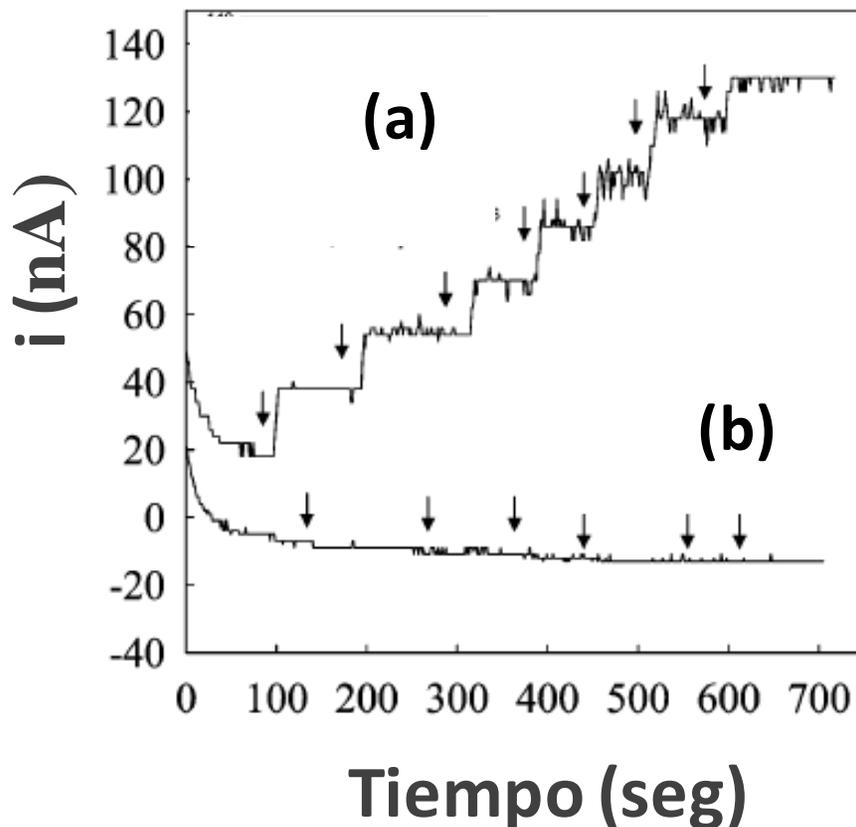


Figura 1.11 Respuesta amperométrica a adiciones sucesivas de 0.2mM de β -D- glucosa a E=0.6V vs SCE (a) Au/PNTs/GOx (b) Au/GOx. Solución buffer de fosfatos 0.1M +0.1M KCl (pH=7.5) [37].

Esto demostró que los sistemas tienen una mejor actividad electroquímica cuando se le compara con un electrodo de Au, la cual se atribuyó a una transferencia electrónica directa entre los sistemas aromáticos espacialmente alineados de los nanotubos peptídicos, contribuyendo así a la conductividad electrónica del material.

1.2.5 Péptidos conjugados con Ferroceno en biosensores

En la mayoría de los casos, las biomacromoléculas, como es el caso de los péptidos, no son electroactivas intrínsecamente, sin embargo, mediante la incorporación de complejos metálicos dentro de un ensamblaje biológico se pueden producir biomateriales redox quienes pueden actuar como sensor [38]. Así los péptidos electroactivos se comportan como receptores selectivos que pueden efectivamente convertir un evento de reconocimiento molecular en una señal electroquímica.

Los complejos metálicos que son seleccionados para unirlos a un biomaterial presentan reacciones electroquímicas reversibles, en la cual ambos estados de oxidación son reversibles. Dentro de los compuestos que cumplen estas características se encuentran el ferroceno, los complejos de amino-Rutenio, los complejos de Osmio y el fullereno.

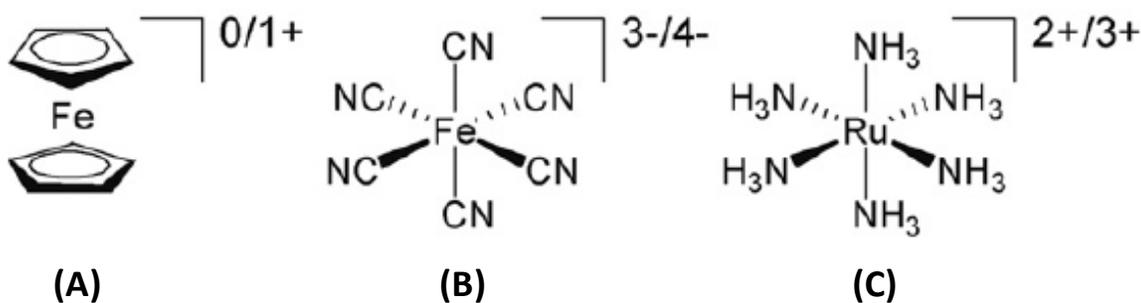


Figura 1.12 Estructuras químicas de sondas redox comunes (A) Ferroceno (B) Ferro/Ferricianuro (C) Hexaminrutenio

Gracias a su buen comportamiento redox reversible y reactividad química amplia, el complejo ferroceno es considerado el componente más conveniente para la construcción de compuestos bioconjugados con propiedades redox. [39]

El ferroceno consta de 2 aniones ciclopentadienilos que tienen 5 enlaces de coordinación cada uno de ellos a un catión de Fe(II), produciendo un complejo que de forma global es neutro (Figura 1.12 (A)). Los estados de oxidación más estables del hierro dentro del ferroceno son Fe(II) y Fe(III). El complejo con Fe(II) es naranja, mientras que el catión de Fe(III) (ion ferricinio) tiene un color azul particular.

Los compuestos conjugados de ferroceno y péptidos han sido utilizados para la detección electroquímica de enzimas. Dentro de este contexto, Mahmoud y col. [40,41] reportaron la modificación de un electrodo de Au para la detección de la proteasa aspártica codificada por el virus HIV-1 (proteasa HIV-1PR). El electrodo de Au se modificó con nanotubos de carbono de pared sencilla periolados (ptSWCNTs, perthiolated single walled carbon nanotubes) y se quimisorbieron nanopartículas de oro (AuNP) sobre los grupos tioles libres de los ptSWCNTs. Sobre las nanopartículas de Au se enlaza el péptido conjugado con Fc (Fc-pepstatin), que es un potente inhibidor de la HIV-1PR. La estructura del Fc-pepstatin se presenta en la Figura 1.13 (A).

El electrodo Au/SWCNT/AuPNs/Fc-pepstatin es sensible a interaccionar con la proteasa HIV-1PR mediante el enlace del inhibidor pepstatin con la HIV-1PR como lo muestra la Figura 1.13 (B) y (C) en un acercamiento.

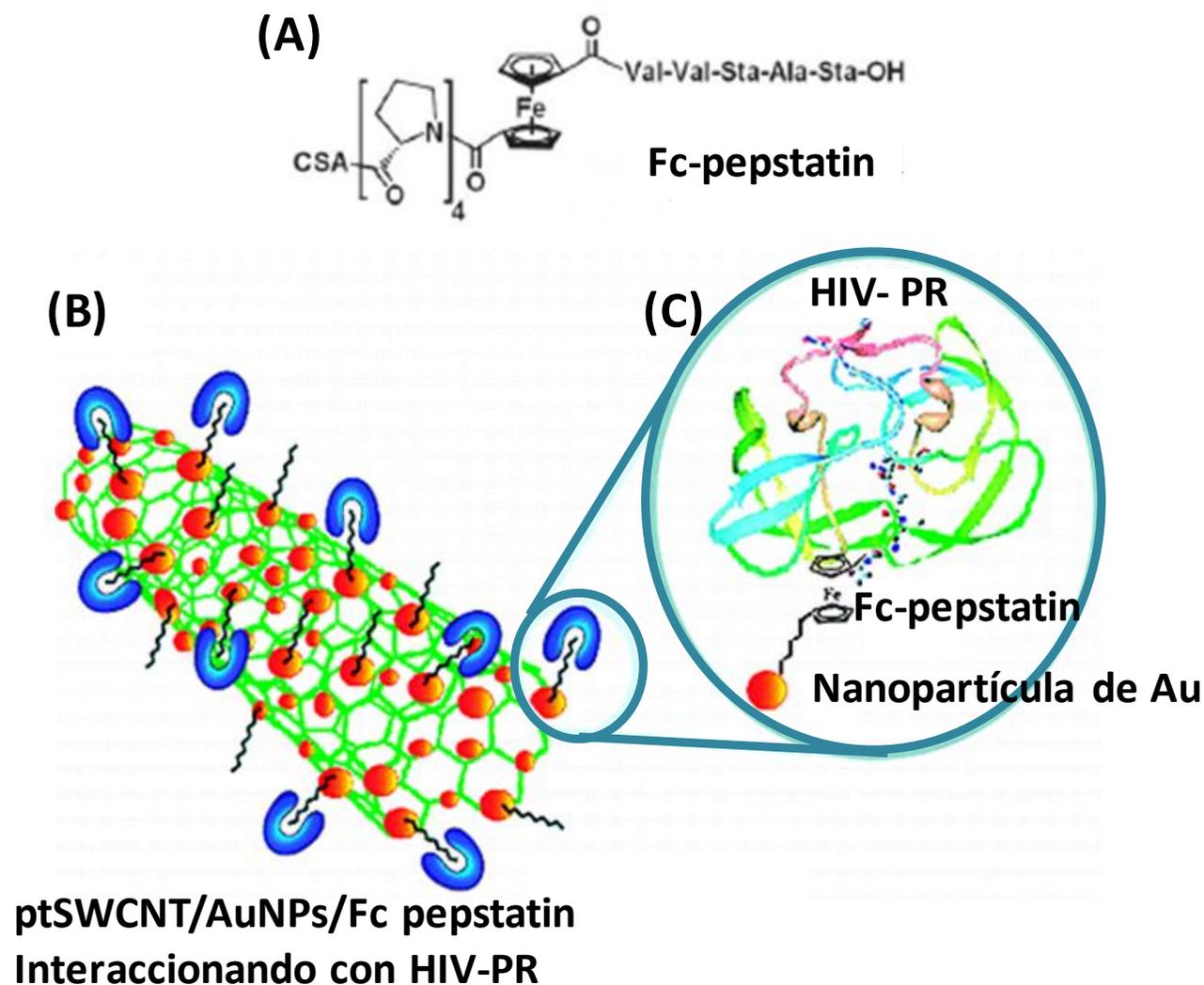


Figura 1.13 Esquema de (A) Estructura de Fc-pepstatin, (B) Electrodo compuesto SWCNT/AuNPs/Fc-pepstatin/HIV-1PR, (C) acercamiento a AuNPs/Fc-pepstatin/HIV-1PR[40].

Con el electrodo Au/SWCNT/AuNP/Fc-pepstatin se realizó un estudio mediante voltamperometría cíclica (Figura 1.14) en solución amortiguadora en ausencia y presencia de la proteasa HIV-1 PR. Cuando la proteasa HIV-1 PR se enlaza selectivamente al péptido inhibidor (Fc-pepstatin), la señal voltamperométrica se desplaza a potenciales más altos y se observa una

disminución de corriente de pico, indicando que la oxidación del grupo Fc en el compuesto Fc-pepstatin es cada vez más difícil.

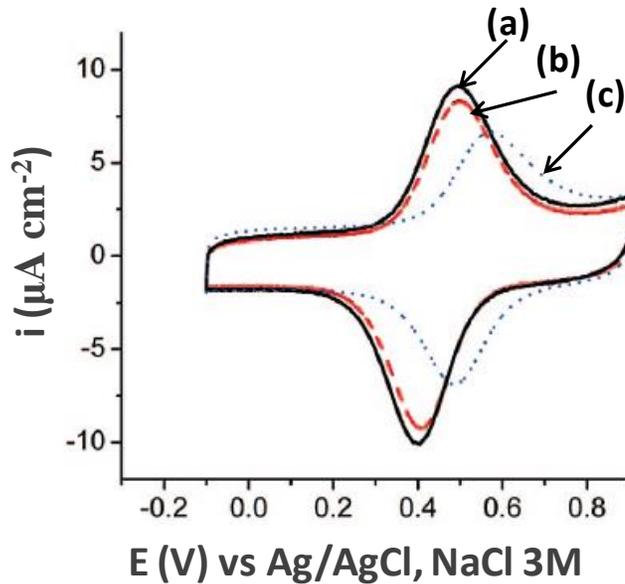


Figura 1.14 Voltamperogramas cíclicos de electrodo de Au/SWCNT/AuNP/Fc-pepstatin en (a) solución amortiguadora (línea sólida negra), en (b) 75 μM de HSA(Human serum albumin) en solución amortiguadora (línea entrecortada roja), en (c) 10 nM HIV-1 PR en HSA (línea punteada azul). $v=100 \text{ mV s}^{-1}$ [40].

Los resultados muestran que la interacción de la enzima- Fc pepstatin fue capaz de bloquear o inhibir la respuesta normal del ferroceno, aumentando el potencial de oxidación de esta especie en 100 mV (de 0.4 V a 0.5 V vs Ag/AgCl, NaCl 3M). Con este sistema, se evaluaron los potenciales formales a diferentes concentraciones de la proteasa HIV-1 PR y se construyó una curva de calibración como lo muestra la Figura 1.15. Después de hacer un análisis estadístico, el LD para la detección de la HIV-1 PR que se alcanzó para esta modificación del electrodo fue de 0.8 pM por la técnica de voltamperometría cíclica. Este valor fue 1000 veces menor al anteriormente reportado (1nM) para electrodos de Au simples modificados con el compuesto conjugado Fc tiolado-pepstatin (Au/Fc-pepstatin) [42]. Además, este LD fue 100 veces menor que para el caso del electrodo de oro modificado con AuNP Fc-pepstatin(Au/AuNPs/Fc-pepstatin), cuyo LD=0.08nM.

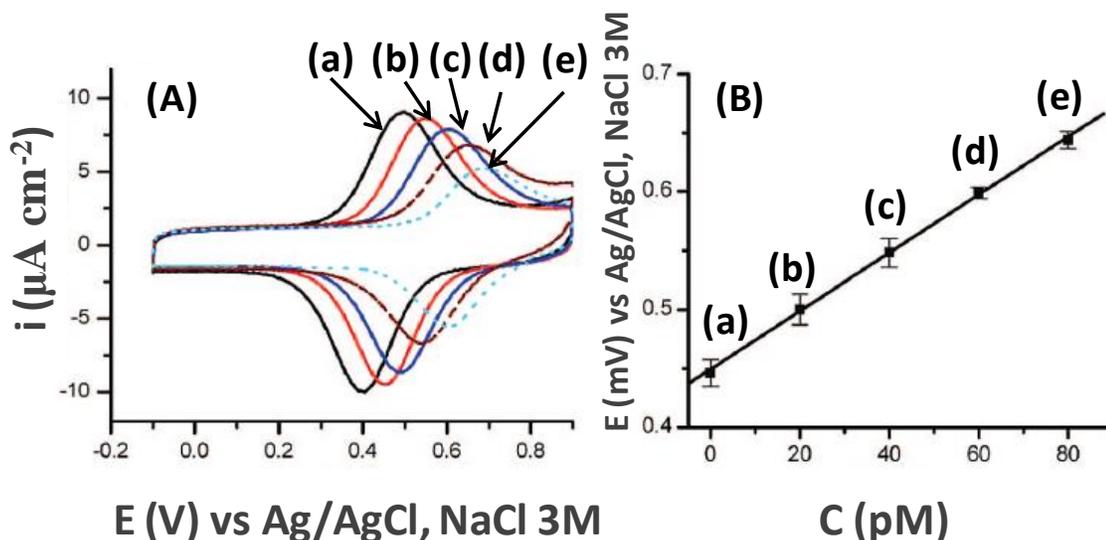


Figura 1.15 (A) Voltamperogramas cíclicos de los electrodos modificados con Au/SWCNT/AuNP/Fc-pepstatin en (a) 0 pM, línea negra (b) 20pM, línea roja (c) 40 pM, línea azul (d) 60 pM, línea vino y (e) 80pM, línea color cian. $v = 100\text{mV s}^{-1}$. (B) Curva de calibración E° vs [HIV-1 PR][41].

A partir de este trabajo es importante destacar los siguientes puntos: primero, los autores demostraron que la interacción de la proteína con el péptido que contiene el Fc modifica la señal electroquímica de este material híbrido péptido-Fc. Segundo, el desempeño del electrodo compuesto es óptimo (mayor sensibilidad) con ptSWCNTs, cuando el nanotubo está presumiblemente enlazado multi-covalentemente paralelo a la superficie del electrodo de oro.

En este sentido, es importante conocer como la señal electroquímica del Fc es modificada por la interacción con la proteína, dado que esto define el mecanismo de detección del sensor. Es probable que las contribuciones electrostáticas de las cargas fijas en la proteína afecten la estabilidad relativa de la especie electroactiva unida, o de una manera más general, el microambiente alrededor de las unidades redox es el que dicta su respuesta electroquímica. Este hecho es confirmado por los resultados reportados por Azzaroni y col. [38], quienes encontraron que en soluciones con valores de pH por debajo del punto isoelectrico de la proteína (streptavidin) conjugada con Fc, el pico de oxidación de la señal voltamperométrica del Fc se desplaza hacia potenciales anódicos. Este comportamiento es debido a que la generación de especies ferricinas (Fc^+) es más difícil en un microambiente positivo. Por otro lado, en valores de pH superiores al

punto isoeléctrico, el potencial redox se desplazó a potenciales catódicos producido por la estabilización del catión Fc^+ , generado en un ambiente cargado negativamente.

Las últimas observaciones explican los cambios en los potenciales redox del sistema bioconjugado de Fc debido al enlace de la proteína. Sin embargo, también podrían existir cambios en el proceso de transferencia electrónica (ET, electron-transfer) dada la interacción con la proteína. En el caso de proteínas y péptidos existen dos modelos de ET propuestos [43]. El primero de ellos es el denominado “modelo de superintercambio”, basado en la teoría de Marcus [44] que considera la matriz peptídica como un medio para el acoplamiento electrónico entre un electrodonador (D) y un electroaceptor (A). El traslape de los orbitales del donador y del aceptor controla la velocidad de la reacción de ET, y la constante de velocidad de transferencia electrónica (k_{ET}) depende exponencialmente de la distancia (r_{DA}) entre los centros redox y el sustrato. El segundo modelo es el modelo de “migración de la carga por etapas” basado en la difusión de la carga vía la oxidación (o reducción) de intermediarios, definiendo al proceso de ET como un proceso de etapas múltiples [45]. La carga migra a través de la proteína usando ciertos aminoácidos como estaciones de relevo o puntos de intercambio electrónico, y la k_{ET} depende del número de puntos de intercambio electrónico (N). En este modelo se considera que un paso largo y lento de electrotransferencia es reemplazado por varios pasos pequeños y rápidos. Por consiguiente, entender el proceso de ET es de una relevancia para el diseño de sensores electroquímicos y sistemas electrónicos moleculares basados en péptidos [33,46].

1.3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Las estructuras peptídicas tienen una gran afinidad con biomoléculas como enzimas o anticuerpos. Esta propiedad los hace adecuados como material de electrodo para desarrollar biosensores. Sin embargo, se requiere de un cuidadoso diseño de la secuencia de aminoácidos del biomaterial, para favorecer la transferencia electrónica, así como la interacción con las biomoléculas. De esta manera, se pueden obtener sensores altamente sensibles y específicos hacia especies de interés biológico.

Así, se propone la síntesis de péptidos que contengan un número impar de aminoácidos L/D alternados con residuos de Cisteína (Cys) en los grupos terminales amino y carboxilo y una unidad de ferroceno (Fc) enlazado a un residuo intermedio (Figura 1.16 (A)).

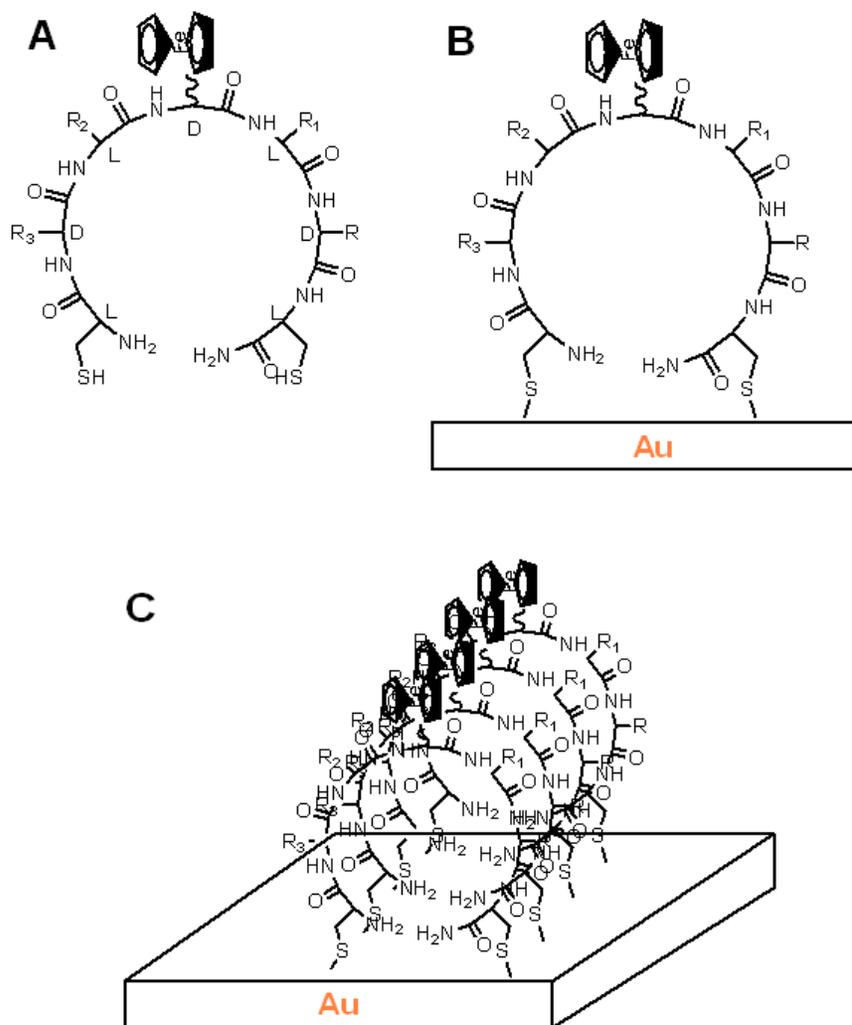


Figura 1.16 (A) Péptido semicíclico con un número impar de aminoácidos tipo L,D alternados con residuos de Cys en los grupos terminales amino y carboxilo conjugado con una unidad de Fc en un residuo intermedio.
 B) Representación del posible enlace de los compuestos conjugados peptídicos sobre sustratos de Au.
 C) Representación de la formación de seminanotubos de péptido conjugado con Fc sobre sustrato de Au.

El diseño de estos péptidos está basado en el siguiente fundamento: los residuos de Cys sobre los grupos terminales del péptido no favorecen el ciclado del péptido dadas sus

restricciones geométricas [47]. Estas últimas características junto con el número impar de aminoácidos fueron seleccionadas como una manera de enlazar el péptido a través de dos puntos sobre el sustrato de Au (Figura 1.16(B)).

Dado el diseño de estos sistemas se espera que estos péptidos podrían ordenarse en seminanotubos de péptidos (QPNTs, quasi peptide nanotubes) sobre sustratos de oro (Figura 1.16 (C)). La unidad de Fc estaría estratégicamente localizada a la mitad de la secuencia, como una manera de estudiar el efecto de la secuencia de los aminoácidos sobre el fenómeno de transferencia electrónica para las cadenas de aminoácidos individuales y/o una posible contribución al aumento de la conductividad en los QPNTs. La secuencia de los aminoácidos permite posicionar especies biológicamente activas, además del Ferroceno, para generar sensores bioactivos específicos, (por ejemplo, derivatizando R₁ o R₂ en el péptido de la Figura 1.16 (A)).

Por lo que este trabajo doctoral aborda la síntesis de las siguientes cadenas peptídicas:

- NH₂-LCys-DPhe-LPhe-DPhe-LLys(Ferroceno)-DAla-LAsp-DAla-DCys-CONH₂
- NH₂-LLys(Ferroceno)-DAla-LAsp-DAla-DCys-CONH₂
- NH₂-LCys-DPhe-LPhe-DPhe-LLys (Ferroceno)-CONH₂

La primera secuencia fue seleccionada puesto que por un lado tenemos sistemas conjugados aromáticos π , los cuales pudieran interaccionar en caso de un arreglo intermolecular de los péptidos en la superficie del electrodo en principio incrementando las propiedades conductivas del seminanotubo peptídico. Mientras que, por el otro lado, se tiene un péptido negativamente cargado que permitiría estudiar el efecto del microambiente en el proceso de transferencia electrónica.

Además, en un futuro, los péptidos conjugados con Fc se pueden ser derivatizados con biomoléculas como enzimas y anticuerpos.

1.4 OBJETIVO

1.4.1 Objetivo general

Sintetizar y caracterizar péptidos con aminoácidos L/D conjugados con ferroceno para su posible uso en el desarrollo de sensor electroquímico de oro modificado con el material peptídico.

1.4.2 Objetivos particulares

1. Sintetizar compuestos conjugados de Ferroceno de seminanotubos de péptidos de tipo L/D y fragmentos de estos.
- 2.- Caracterizar química y electroquímicamente el material obtenido.
3. Estudiar electroquímicamente la influencia de la secuencia de la cadena peptídica del conjugado de Ferroceno y seminanotubo de tipo L/D sobre las propiedades de transferencia electrónica.
4. Estudiar la morfología de las capas autoensambladas del seminanotubo peptídico de tipo L/D cuando se modifican las condiciones de ensamble.

1.5 REFERENCIAS

1. C. Zhu, G. Yang, H. Li, D. Du, Y. Lin, *Analytical Chemistry*, 87, (2015), 230-249.
2. J. Wang, *Analytical electrochemistry*, Wiley VCH, Second edition, (2000), 176-178.
3. K. Chaki, K. Vijayamohan, *Biosensors & Bioelectronics*, 17, (2002), 1-12.
4. N M. Kind, C. Wöll, *Progress in Surface Science*, 84, (2009), 230-278.
5. J. Wang, *Electroanalysis*, 17, (2005), 7-14.
6. C. Hu, S. Hu, *Journal of Sensors*, (2009), 1-40.
7. A. Ortiz-Acevedo, G.R. Dieckmann, *Journal of the American Chemical Society*, 127, (2005), 9512-9517.
8. S. Zhu, J. Zhang, Q.W. Li, H.B. Li, H.H. Jin Q.J., *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40, (2012), 1839-1844.
9. M. C. Lemieux, M. Roberts, S. Barman, Y. W. Jin, J. M. Kim, and Z. N. Bao, *Science*, 321, (2008), 101-104.
10. A. Nish, J. Y. Hwang, J. Doig, R. J. Nicholas, *Nature Nanotechnology*, 2, (2007), 640-646.
11. K. Yanagi, M. Miyata, H. Kataura, *Applied Physics Express*, 1, (2008), 34003-34006.
12. T. Tanaka, H.Liu, S Fujii, *Physics Status Solid RRL*, 9, (2011), 301-306.
13. D.T. Bong, T.D. Clark, J.R. Granja, M. Reza Ghadiri, *Angewandte Chemie*, 40, (2001), 988-1011.

14. A.B. Seabra, N. Durán, *Peptides*, 39, (2013), 47-54.
15. C. H. Devillers, C. Bucher, P. Dummy, *Langmuir*, 22, (2006), 8134-8143.
16. J. Mc Murry. *Organic Chemistry*, Thompson Editorial, (2008).
17. L. Rose, A.T.A. Jenkins, *Bioelectrochemistry*, 70 (2007), 387-392.
18. K. Altendorf, W. Epstein, *Journal of Bacteriology*, 166, 1, (1986) 334-337.
19. W. Knoll, I. Koper, R. Naumann, E. K. Sinner, *Electrochimica Acta*, 53, (2008), 6680-6689.
20. G.M. Grotenbreg, M. Overhand, A.L. Llamas-Saiz, M.J. Van Raaij, *Acta Crystallographica Section D*, 63, (2007), 401-407
21. M. Hartmann, A.S. Ulrich, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, (2010), 3132-3142.
22. J. Montenegro, M. Reza Ghadiri, Juan R. Granja, *Accounts of Chemical Research*, 46 (2013) 2955-2965
23. N. Rodriguez-Vazquez, A. Arcadio, E. Gonzalez-Freire, A. Fuertes, M. Panciera, J. Montenegro, Juan R. Granja, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 14 (2014) 2647-2661.
24. P.A. Baker, M. N. Goltz, A. M. Schrand, D.Y. Yoon, D.S. Kim, *Biosensors and Bioelectronics*, 61, (2014), 119-123.
25. M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovic, *Nature*, 366, (1993) 324-327.
26. I. W. Hamley, *Angewandte Chemie*, 53, (2014), 6866-6881.
27. M. Cuerva, R. García-Fandiño, C. Vázquez-Vázquez, M. A. López-Quintela, J. Montenegro, J. R. Granja, *ACS Nano*, 9, (2015), 10834-10843.
28. C. J. C. Edwardas-Gayle, I. W. Hamley, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15, (2017), 5867-5876.
29. J.D. Hartgerink, J.R. Granja, R.A. Milligan, M. Reza Ghadiri, *Journal of American Chemical Society*, 118, (1996) 43-50.
30. R. Dagani, *Chemical & Engineering News Archive*, 71, (1993), 8-12.
31. K. Motesharei, M. Reza Ghadiri, *Journal of the American Chemical Society*, 119 (1997) 11306-11312.
32. H. Okamoto, T. Yamada, K. Takaeda, *Japanese Journal of Applied Physics*, 44, (2005), 8240-8248.
33. R. Takahashi, H. Wang, *The Journal of Physical Chemistry B*, 111, (2007), 9093-9098.

34. E. Mateo-Martí, C. Briones, C.M. Pradier, J.A. Martín-Gago, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, (2007), 1926.
35. E.C. Cho, J.W. Choi, M. Lee, K.K. Koo, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 95 (2008), 313-314.
36. M. Yemini, J. Rishpon, *Analytical Chemistry*, 77, (2005), 5155-5159.
37. M. Yemini, M. Reches, J. Rishpon, *Journal of Analytical Chemistry*, 77 (2005) 5155-5159.
38. O. Azzaroni, B. Yameen, W. Knoll, *Physical Chemistry Chemical Physics* 10, (2008), 7031-7038.
39. V. Steveren, D.R. Metzler-Nolte. *Chemical Reviews*, 104, 12, (2004), 5931-5934.
40. K.A. Mahmoud, J.H.T. Luong, *ACS Nano*, 2, (2008), 1051-1057.
41. K.A. Mahmoud, J.H.T. Luong, *Analytical Chemistry*, 80, (2008), 7056-7062.
42. K. Kerman, K. A. Mahmoud, H.B. Kraatz, *Chemical Communications*, 37, (2007), 3829-3831.
43. B. Giese, M. Graber, M. Cordes, *Current opinion in Chemical Biology*, 12 (2008), 755-759.
44. R. A. Marcus, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32, (1993), 1111-1121.
45. J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M.E. Michel-Beyerele, *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (1988) 12759.
46. Y. Arikuma, K. Takeda, S. Kimura, *The Journal of Physical Chemistry B*, 113, (2009), 6256-6266.
47. A. Ortiz Acevedo G.R. Dieckmann *Tetrahedron Letters* 45 (2004) 6795-6798.

Capítulo 2

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CON AMINOÁCIDOS L/D ALTERNADOS CONJUGADOS CON FERROCENO

2.1 ANTECEDENTES DE SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

De forma general, los péptidos son sintetizados mediante el acoplamiento del grupo carboxilo (C-terminal) de uno de los aminoácidos con el grupo amino (N-alfa) de otro aminoácido para formar un enlace amida o peptídico y producir una molécula de agua [48]. Para lograr la secuencia deseada de aminoácidos en una cadena peptídica, son necesarias una gran cantidad de etapas de reacción, por ejemplo, la protección de grupos funcionales que no se desea que reaccionen, el acoplamiento entre aminoácidos, la desprotección de los grupos funcionales que se habían protegidos anteriormente y etapas de purificación entre los pasos de reacción.

La síntesis de péptidos en fase líquida (SPFL) es el método clásico de la síntesis de péptidos, en donde todas las reacciones se llevan a cabo en una fase homogénea. Sin embargo, la SPFL, tiene la desventaja de requerir procesos de purificación entre los pasos de reacción siendo estos laboriosos y largos [49]. Por ejemplo, los productos de cada acoplamiento de aminoácidos son purificados por precipitación o métodos cromatográficos, sin embargo, esta purificación ofrece la ventaja de permitir contar con la plena caracterización de los productos de cada paso de reacción.

En la actualidad la SPFL tiene utilidad en la producción a gran escala de péptidos en la industria, sin embargo en la mayoría de los laboratorios la SPFL ha sido reemplazada por la síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS)[50].

2.1.1 Síntesis de péptidos en fase sólida

En 1963, Bruce Merrifield [51] introdujo la SPFS que cambió drásticamente la manera de síntesis y purificación de péptidos, simplificando los pasos largos y tediosos que conlleva la síntesis en solución.

La característica novedosa de la SPFS es la síntesis sobre un soporte sólido, que implica la reacción heterogénea entre una resina insoluble y un derivado de un aminoácido activo soluble en fase líquida [52]. De forma general, la síntesis de un péptido empieza en el carboxilo terminal del péptido, y finaliza con el grupo amino terminal. Esta secuencia es opuesta a la síntesis de proteínas en organismos vivos, ya que la biosíntesis empieza por el grupo amino terminal [50].

Los pasos básicos de la SPFS son esquematizados en la Figura 2.1 [53]. La síntesis del péptido empieza con el anclaje del primer aminoácido sobre la resina (Paso 1 Figura 2.1), mediante la reacción del grupo carboxilo del aminoácido con un grupo funcional de la resina. La resina consta de un soporte polimérico con un grupo modificador o espaciador (MOD), que determinará el grupo funcional que tendrá el péptido en el C-terminal [54]. Algunas condiciones importantes a satisfacer durante SPFS son: que el enlace aminoácido-resina deberá ser lo suficientemente estable para que no interaccione con los reactivos presentes en el medio de reacción durante la síntesis del péptido; el aminoácido debe tener protegidos aquellos grupos funcionales que no deben reaccionar, entre los cuales se encuentran los grupos funcionales de las cadenas laterales del aminoácido (R), los cuales se protegen con un grupo protector denominado permanente (P), que es estable en las condiciones de reacción usadas durante toda la síntesis del péptido [55].

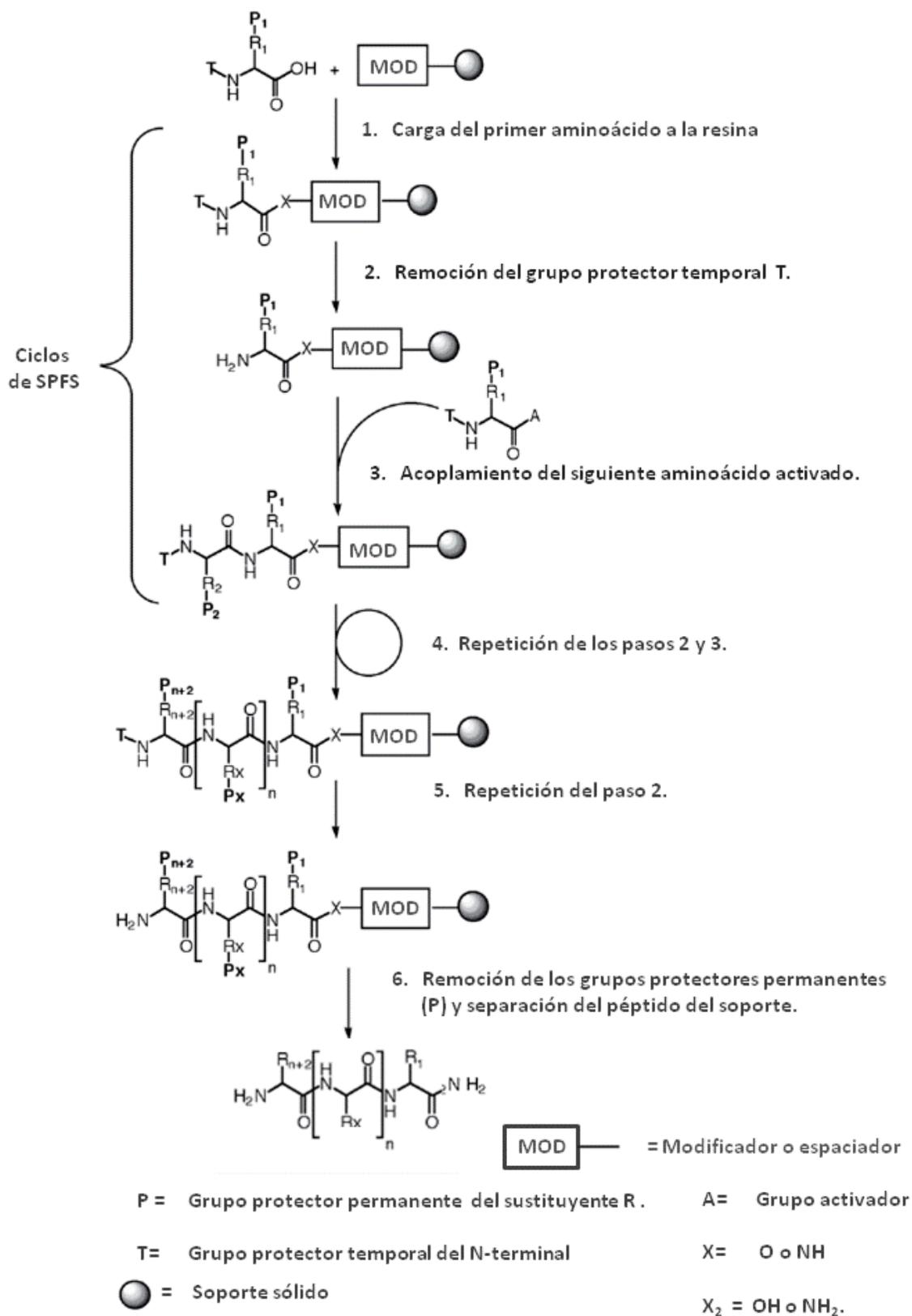


Figura 2.1 Etapas de la SPFS [49].

Por otro lado, el grupo amino alfa se bloquea con un grupo protector temporal (T). El grupo temporal soportará las condiciones de reacción durante el acoplamiento del aminoácido, pero después del acoplamiento debe ser fácilmente removido bajo condiciones experimentales suaves para que conserve la integridad del péptido.

Después de la reacción de anclaje del primer aminoácido, son necesarios pasos de lavado para eliminar los reactivos que no reaccionaron y los subproductos de la reacción que se hayan generado [52].

En el paso 2 de la Figura 2.1, el grupo protector temporal es removido, para dejar expuesto el grupo amino del aminoácido anclado al soporte polimérico para un nuevo acoplamiento con otro aminoácido. Una nueva etapa de lavado es necesaria después de la remoción de T.

Durante el paso 3 del esquema se enlaza un segundo aminoácido al primero. El acoplamiento del segundo aminoácido al primero se realiza mediante la activación del ácido carboxílico del segundo aminoácido dada la formación de un éster activado mediada por un agente de acoplamiento [55]. Después del acoplamiento, el exceso de reactivos es removido y los pasos de remoción del grupo protector del aminoácido [con su lavado y filtración], y el acoplamiento de un siguiente aminoácido (con su lavado y filtración), son repetidos sucesivamente hasta que la secuencia del péptido deseado es obtenida (pasos 4 y 5).

Finalmente, en el paso 6, son removidos los grupos protectores permanentes de los grupos funcionales de las cadenas laterales R y se rompe el enlace péptido-resina para separar el péptido.

Las ventajas que presenta la SPFS con respecto a la síntesis en química convencional (SPFL) son [53]:

- Menor número de etapas de purificación y por lo tanto menor tiempo empleado.
- Se pueden utilizar exceso de reactivos para dirigir las reacciones a altos rendimientos.
- Pérdidas de material minimizadas debido a que las reacciones y las etapas de purificación tienen lugar sin remover el soporte del péptido del recipiente de reacción.
- Las operaciones pueden ser automatizadas [56].

A pesar de sus extraordinarias ventajas, la SPFS también presenta algunas desventajas como [55]:

- El rendimiento de la síntesis se disminuye por reacciones incompletas si los reactivos no alcanzan al péptido en síntesis durante los pasos de reacción. Los efectos de pasos de reacción menores a 100% de eficiencia repercuten dramáticamente en el rendimiento total de la síntesis. Además, el rendimiento total de una SPFS es una función del número total de aminoácidos a acoplar.
- También se presentan reacciones secundarias, y los subproductos e impurezas de los reactivos se acumulan en la resina contaminando el producto final.
- Las técnicas analíticas requeridas para confirmar la estructura de los productos formados en cada paso no pueden ser utilizados en SPFS, y para monitorear los diferentes pasos intermediarios de la SPFS se usan pruebas cualitativas colorimétricas.

Como se puede constatar, la SPFS involucra varios compuestos que tienen funciones específicas, como son los soportes poliméricos, grupos modificadores de los mismo, diferentes tipos de grupos protectores (cuya naturaleza depende del grupo a proteger), agentes de acoplamiento, entre otros. Por lo que a continuación se describirán brevemente sus características.

2.1.2 Soportes poliméricos

Un soporte polimérico adecuado para la SPFS deberá cumplir con las siguientes propiedades [57]:

- Ser inerte bajo las condiciones utilizadas durante todo el proceso de síntesis del péptido.
- Ser insoluble a los disolventes utilizados.
- Ser estable al esfuerzo mecánico para soportar las etapas de agitación, lavado y filtrado.

Las primeras resinas fueron basadas en poliestireno, aunque estas se han mezclado con m-divinilbenceno (DVB) (Figura 2.2) para mejorar sus propiedades[54]. Aquellas resinas que contienen un 1% de DVB son físicamente estables y completamente insolubles en solventes comunes y sus perlas aumentan de volumen (hinchar) en solventes orgánicos de polaridad

intermedia, tal como diclorometano (CH_2Cl_2), tolueno y dimetilformamida (DMF), pero no se hinchan en agua, metanol o hexano.

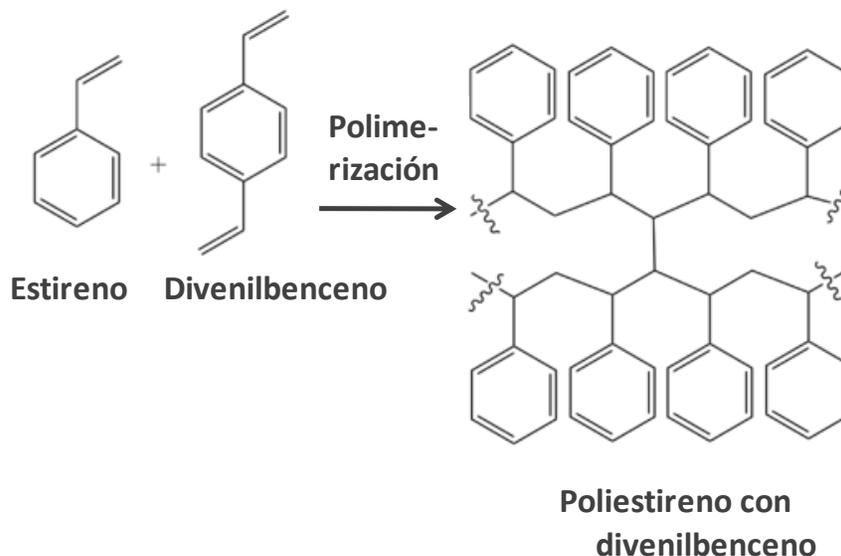


Figura 2.2 Polimerización de estireno con divenilbenceno [5]

Las resinas derivadas de la poli(acrilamida) tienen un carácter menos hidrofóbico que las resinas basadas en poliestireno, se hinchan hasta 10 veces en contacto con DMF, ácido acético y también en H_2O , sin embargo, su hinchamiento no es tan grande en CH_2Cl_2 .

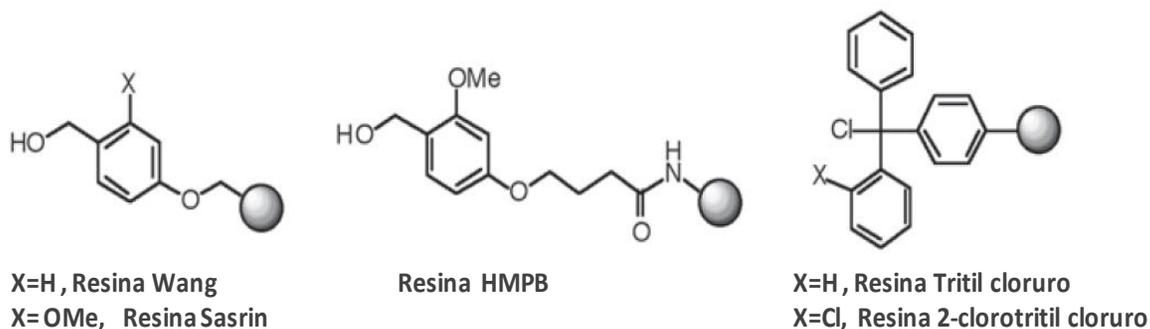
Más recientemente, con el objeto de mejorar sus propiedades, los soportes poliméricos se han basado en el polietilenglicol (PEG)[58]. En estas resinas el PEG se encuentra insertado en una red de poliestireno o poliamida. Estas resinas pueden ser utilizadas en síntesis tanto en flujo estacionario como por lotes.

2.1.3 Grupos modificadores de los soportes poliméricos

Con el objetivo de modificar las propiedades físicas o químicas de los soportes poliméricos, a estos últimos se les insertan diferentes grupos funcionales (modificadores) [52]. Esto es posible porque casi cualquier reacción que se puede llevar a cabo en solución también se puede realizar en materiales poliméricos (especialmente en los derivados de poliestireno). Los derivados de las resinas pueden ser diseñados para una liberación del péptido mediante ácidos fuertes, medios o débiles, por bases y otros nucleófilos, por fotólisis, hidrogenólisis u otros reactivos catalíticos.



Resinas para síntesis de péptidos con terminación amido.



Resinas para síntesis de péptidos con terminación ácido.



Figura 2.3 Algunas resinas comunes para SPFS [49]

Algunos modificadores se introducen más como espaciadores, que para cambiar las condiciones de liberación. Otra función de los modificadores es la protección del grupo carboxilo en el C-terminal del aminoácido anclado durante el proceso de síntesis del péptido [55]. Los espaciadores determinan el grupo funcional en el C-terminal en el péptido sintetizado. Para preparar péptidos con C-terminales en un grupo carboxilo o en un enlace amido se utiliza el ácido trifluoroacético (TFA) durante la liberación del péptido. Ejemplos de diferentes resinas con sus grupos espaciadores son presentados en la Figura 2.3, para SPFS cuando el C-terminal es un grupo amida o un grupo ácido.

2.1.4 Grupos protectores

Los aminoácidos cuentan con varios grupos funcionales nucleofílicos presentes en las cadenas laterales tales como grupos amino, carboxílico, alcohol, tiol, etc., los cuales interfieren

en las reacciones descritas para la síntesis de péptidos. La estrategia que se sigue para solucionar este problema de especificidad es la protección de aquellos grupos funcionales que no deban reaccionar, mientras se dejan libres solamente aquellos grupos funcionales que se quiere que reaccionen.

2.1.4.1 Grupos protectores del grupo amino-alfa del aminoácido

Dentro de los primeros grupos protectores del grupo amino-alfa de un aminoácido utilizados en SPFS está el grupo BOC (tert-butiloxicarbonil). Este grupo se remueve del péptido en síntesis en condiciones ácidas, habitualmente con TFA. Cuando se utiliza BOC como grupo protector temporal, se requieren grupos para la protección de los grupos funcionales de las cadenas laterales R que soporten condiciones más ácidas que las utilizadas para la remoción de Boc, por ejemplo, grupos bencílicos. La remoción de los grupos protectores en los grupos R y la liberación del péptido de la resina al finalizar la síntesis, es lograda mediante la reacción en ácido fluorhídrico (HF). El uso del HF puede ser peligroso y conduce a un grupo amido protonado, en consecuencia, un paso de neutralización es necesario. Además, los aminoácidos-Boc activados tienen una ligera tendencia a descomponerse en un medio no alcalino si no son consumidos rápidamente. La eficiencia de este método disminuye ya que la repetida acidólisis para remover los grupos Boc causan una ligera pérdida de grupos protectores bencílicos, incluyendo el grupo de anclaje a la resina cuando es un éster bencílico no modificado. Sin embargo, para síntesis complejas el Boc es necesario, por ejemplo, cuando se sintetizan péptidos no naturales que son sensibles a las bases (tal como los depsipéptidos).

El grupo Fmoc (9-Fluorenil-metoxi-carbonil) fue utilizado por primera vez como grupo protector del grupo amino-alfa por Carpino [59]. La remoción del Fmoc se lleva a cabo con bases como piperidina (al 20% en DMF) o morfolina, produciendo péptidos del tipo NH_2 -peptido-resina sin la necesidad de pasos de neutralización. El mecanismo relacionado a la desprotección de un aminoácido protegido con Fmoc se muestra en la Figura 2.4. La remoción de Fmoc es un proceso favorecido termodinámicamente dada la formación de dióxido de carbono.

El grupo Fmoc es estable bajo condiciones ácidas, permitiendo el uso de grupos protectores lábiles en medio ligeramente ácido para los grupos funcionales de las cadenas

laterales, los cuales deben ser estables bajo condiciones básicas (ejemplo, Boc y los grupos bencílicos) [60]. La remoción de los grupos protectores de los grupos sustituyentes R de los aminoácidos y la liberación del péptido de la resina se lleva a cabo en medio ácido (TFA) en presencia de sustancias atrapadoras de carbocationes (ejemplo, agua desionizada y triisopropilsilano).

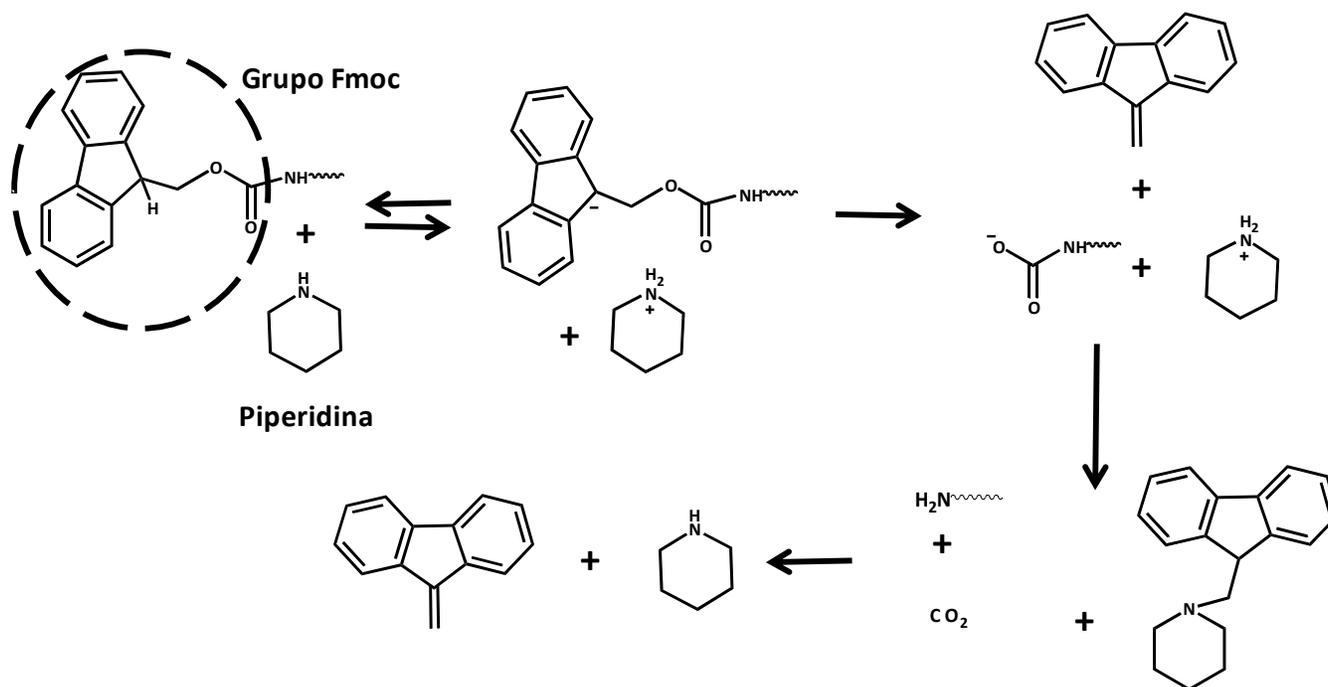


Figura 2.4 Remoción del grupo protector Fmoc cuando está enlazado a una secuencia peptídica [55].

El grupo Fmoc es preferido sobre el Boc, debido a que no es necesario el uso del ácido hidrófluoruro. Los aminoácidos-Fmoc son más caros que los aminoácidos-Boc, pero su uso representa menos pasos, reduciendo el consumo de solvente y así, también el costo de procedimiento global [61].

En ocasiones se requieren grupos protectores ortogonales a los comúnmente empleados en SPFS (Fmoc sensible a condiciones básicas y Boc sensible a condiciones ácidas), es decir que se remuevan a condiciones únicas, pero que sean estables a las condiciones de las reacciones empleadas en SPFS. Un ejemplo de estos grupos protectores es el 4,4-dimetil-1-2,6-dioxociclohexilideno etil (ivDde) que es sensible a la remoción mediante hidracina en

dimetilformamida. Este grupo es estable al TFA y lo suficientemente estable a la piperidina-DMF (1:4), dado que sólo se pierde alrededor de 3% en 2 horas [62].

2.1.4.2 Grupos protectores del grupo sustituyente R del aminoácido

El método SPFS busca que los grupos protectores permanentes sean removidos en las mismas condiciones en que sucede la liberación del péptido, permitiendo que en un solo paso de reacción el péptido se libere y sea desprotegido de manera global [55].

Tabla 2.1 Grupos protectores comunes del grupo sustituyente R [55].

Aminoácido	Grupo Protector	Condiciones de remoción
Asp	tBu	90% v/v TFA, 30 min.
	O1-Ada (Adamantil)	TFA
	OAll (Aliloxicarboni)	Pd(Ph ₃ P) ₄ -AcOH-NMM Pd(Ph ₃ P) ₄ (0.02eq). PbSiH ₃ (1.2-2eq) en DCM 10-30 min.
	ODmab	2% NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O en DMF, 5-10min.
	OPip	4%TFA en DCM, 15 min.
Cys	Trt (Trifenilmetil; tritil)	90% v/v TFA, 30 min.
	Tmob (2,3,6)-trimetoxibencil	5%TFA-3%TES en DCM.
	Mmt	0.5-1% TFA en DCM-TES (95:5), 30 min. 3%v/v TFA, 5-10 min.
Lys	Boc	90% v/v TFA, 30 min
	Alloc	Pd(Ph ₃ P) ₄ (0.1 eq)-PbSiH ₃ (24eq) en DCM, 10 min
	Dde o ivDde	2% NH ₂ NH ₂ ·H ₂ O en DMF, 5-10min.
	Mtt (4-Metiltritil)	1% TFA en DCM, 30min AcOH-TFE-DCM (1:2:7),1h

Sin embargo, también existen grupos protectores permanentes que pueden ser selectivamente removidos antes de la desprotección del péptido si se desea modificar un grupo sustituyente R de un aminoácido específico. Algunos ejemplos de grupos protectores permanentes de los aminoácidos que se utilizan durante el presente trabajo, así como sus condiciones de remoción son enlistados en la Tabla 2.1, además las estructuras químicas de los grupos protectores de la Tabla 2.1 son mostradas en la Figura 2.5.

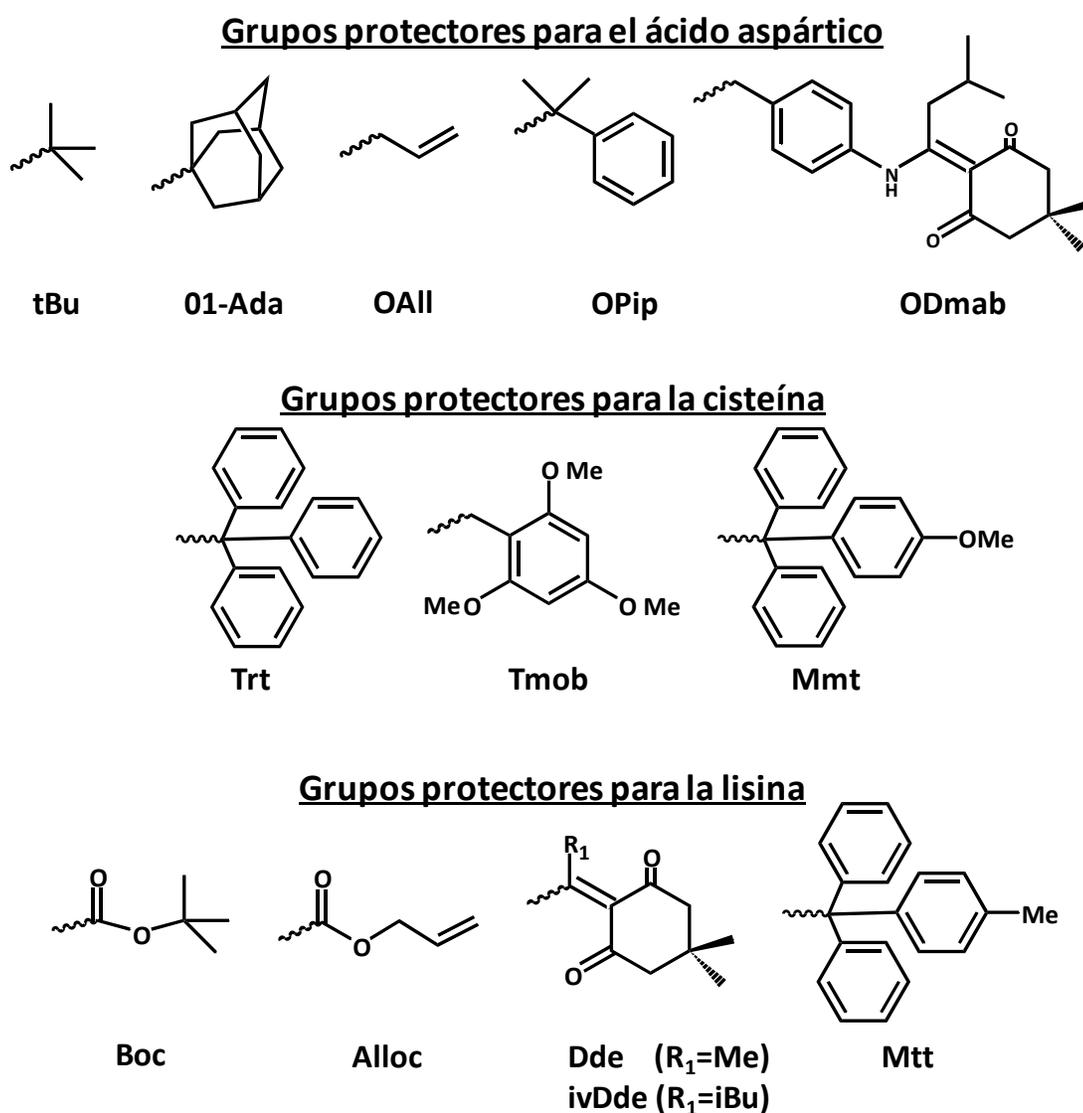


Figura 2.5 Grupos protectores de la cadena lateral para ácido aspártico, cisteína y lisina.

2.1.5 Acoplamiento de aminoácidos

Los procedimientos utilizados para formar un enlace peptídico entre dos aminoácidos son denominados como métodos de acoplamiento [62]. Idealmente el acoplamiento debe ser rápido y completo, aún con componentes difíciles, y debe estar libre de racemización o de reacciones paralelas o parásitas o secundarias [52]. El acoplamiento consiste del ataque nucleofílico por el grupo amino del aminoácido anclado en la resina al átomo del carbono electrofílico en el carbonilo que perteneció al grupo carboxilo del aminoácido a acoplar [49]. Antes del acoplamiento, el carbono electrofílico es activado por la introducción de un grupo electroatractor Y. La Figura 2.6 muestra la amidólisis del compuesto activado para producir el enlace péptido, así como ejemplos de algunas de las formas activadas.

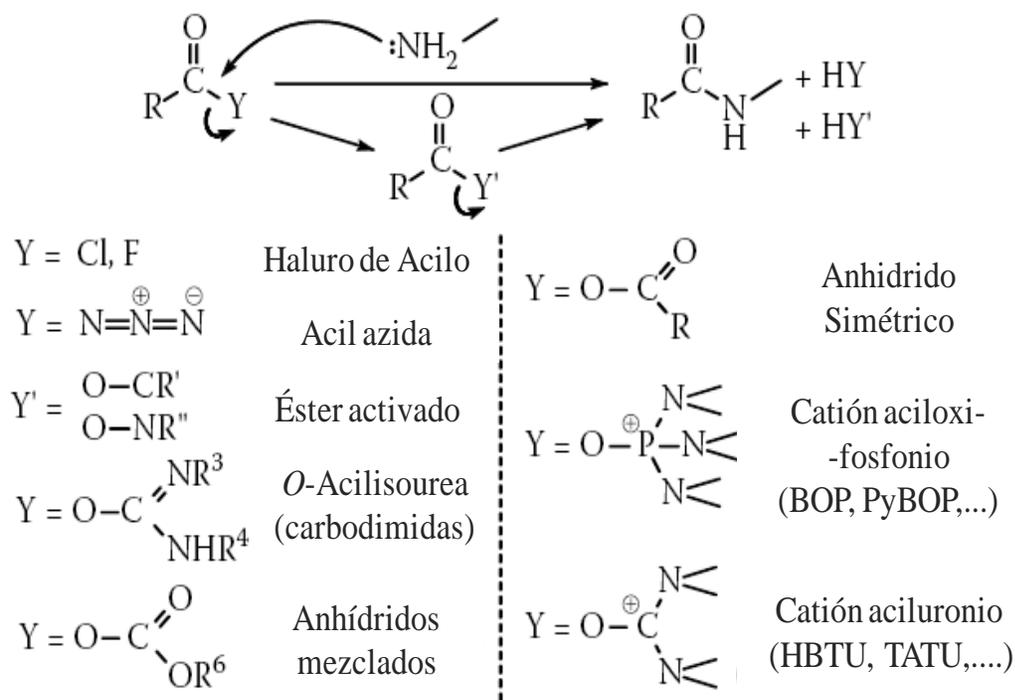


Figura 2.6 Métodos de acoplamiento y formas activadas [62].

Algunas formas activadas son mucho más estables que otras. La forma activada puede ser un reactivo estable en anaquel tal como un éster activado, un compuesto de estabilidad intermedia o como un haluro de acilo, una azida, un anhídrido mezclado o simétrico que pueden ser o no ser aislados, o un intermediario pasajero que no es aislable o detectable. El último,

inmediatamente sufre aminólisis para dar el péptido, o este puede reaccionar con un segundo nucleófilo que se origina de los reactivos o de otro reactivo que fue adicionado para ese propósito, para dar un éster más activado o un anhídrido simétrico $R-C(=O)-Y'$, cuya aminólisis genera el péptido.

2.1.5.1 Carbodiimidas

Los primeros reactivos activadores exitosos para la síntesis en fase sólida fueron las carbodiimidas [63]. Las más comunes son la diciclohexilcarbodiimida(DCC) y la diisopropilcarbodiimida (DIC), y aún son frecuentemente utilizadas. Las carbodiimidas al reaccionar con un ácido carboxílico producen la O-acilisourea (OAIU), que puede:

- (I) reaccionar directamente con un componente amino,
- (II) reaccionar con otro mol del componente carboxílico para dar un intermediario anhídrido simétrico
- (III) rearreglarse en un oxazolona
- (IV) rearreglarse en un N-acilurea inactiva
- (V) en la presencia de un alcohol ácido tal como N^1 -hidroxibenzotriazol, reacciona para dar un éster activado intermediario.

Estas son reacciones competitivas que dependen de las condiciones exactas de reacción. Hudson [64] demostró que la DCC bajo tiempos de preactivación cortos, como 2 minutos, producen la OAIU rápidamente y reacciona con la amina nucleofílica más rápido que con otro mol de carboxilato. Así la reacción sigue directamente sobre el OAIU sin pasar a través del anhídrido. El problema con las carbodiimidas es que son muy reactivas y pueden causar racemización del aminoácido.

Para resolver el problema de racemización, se introdujeron las oximas aromáticas [53]. Dentro de las más importantes están el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y el 1 hidroxí-7-aza-benzotriazol (HOAt). Estas sustancias pueden reaccionar con la O-acetilurea para formar un éster activo que es menos reactivo y con menos posibilidad de racemización.

2.1.5.2 Sales de fosfonio

El reactivo BOP (benzotriazoliloxitris(dimetilamino) fosfonio hexafluorofosfato) promueve acoplamientos altamente eficientes y rápidos [66]. El reactivo BOP fue utilizado en gran medida para la síntesis en solución y para la SPFS usando la estrategia BOC/TFA. BOP reacciona solamente con sales de carboxilato y es estable en la presencia de ácidos carboxílicos. Así en el acoplamiento de un aminoácido-Boc, un péptido con su C-terminal protegido y con una sal de TFA, 3 equivalentes de una base terciaria son requeridos.

El benzotriazoliloxitrispirrolidinofosforo hexafluorofosfato (PyBOP) es otra sal de fosfonio que demostró ser tan activa como BOP y fue más efectiva para los acoplamientos difíciles como el de N-Me-Val. Es conocido que HOBt acelera el acoplamiento del éster activado o mediado por el DCC del α -aminoácido y el ácido N-metilamino, pero el HOBt es de hecho un inhibidor del acoplamiento cuando se utiliza BOP.

2.1.5.3 Sales de uronio

Las sales de uronio son agentes activadores efectivos e incluyen compuestos como el 2-(benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU), el TBTU que contiene el contraion tetrafluoroborato, y también sales de uronio que contienen N-hidroxisuccinimida como el hidroxisuccinimidotetrametiluronio tetrafluoroborato (TSTU)[65].

La mayoría de estos reactivos producen un éster activado, que es formado muy rápidamente in situ y velozmente produce un enlace peptídico con el componente amino. Estos aparentemente no forman anhídridos simétricos bajo las condiciones de síntesis.

En cuanto a la utilización de estos reactivos, Knorr hizo las siguientes recomendaciones:

- TBTU y HBTU son los mejores para síntesis en fase sólida
- TPTU es el mejor para el acoplamiento de segmentos y
- TDBTU es el mejor para la supresión de la racemización.

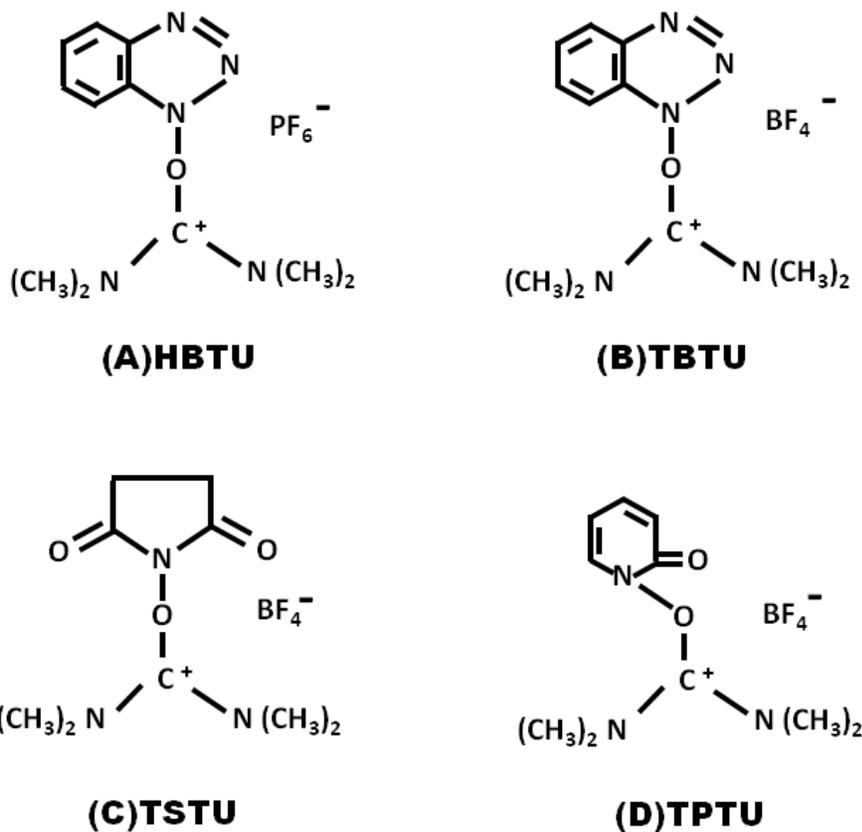


Figura 2.7 Estructuras químicas de sales de uronio utilizados como agentes de acoplamiento [2].

2.1.6 Evaluación del acoplamiento del aminoácido y remoción del grupo Fmoc

Las técnicas para monitorear los pasos de acoplamiento de los aminoácidos y la remoción de los grupos protectores durante la SPSF, son pruebas para detectar si los grupos aminos están libres o no. Estas pruebas son cualitativas y colorimétricas e incluyen la prueba de Kaiser y la prueba con azul de bromofenol.

2.1.6.1 Prueba de Kaiser

La prueba de Kaiser está basada en la reacción de la ninhidrina con aminas primarias (Figura 2.8). Cuando la ninhidrina reacciona con aminas produce un azul o púrpura intenso conocido como púrpura de Ruhemann [67]. Esta prueba es especialmente sensible con aminas primarias, y menos adecuada para aminas secundarias, que producen un color naranja o café

amarilloso. Una concentración baja del orden de 1 parte en 15,00 partes de agua del reactivo de ninhidrina genera la coloración azul intenso con su reacción con aminoácidos [52].

Cuando la cadena peptídica en crecimiento está desprotegida, entonces la prueba de ninhidrina produce el color azul. Si un aminoácido es acoplado y se efectúa la prueba de Kaiser la solución es incolora o amarilla.

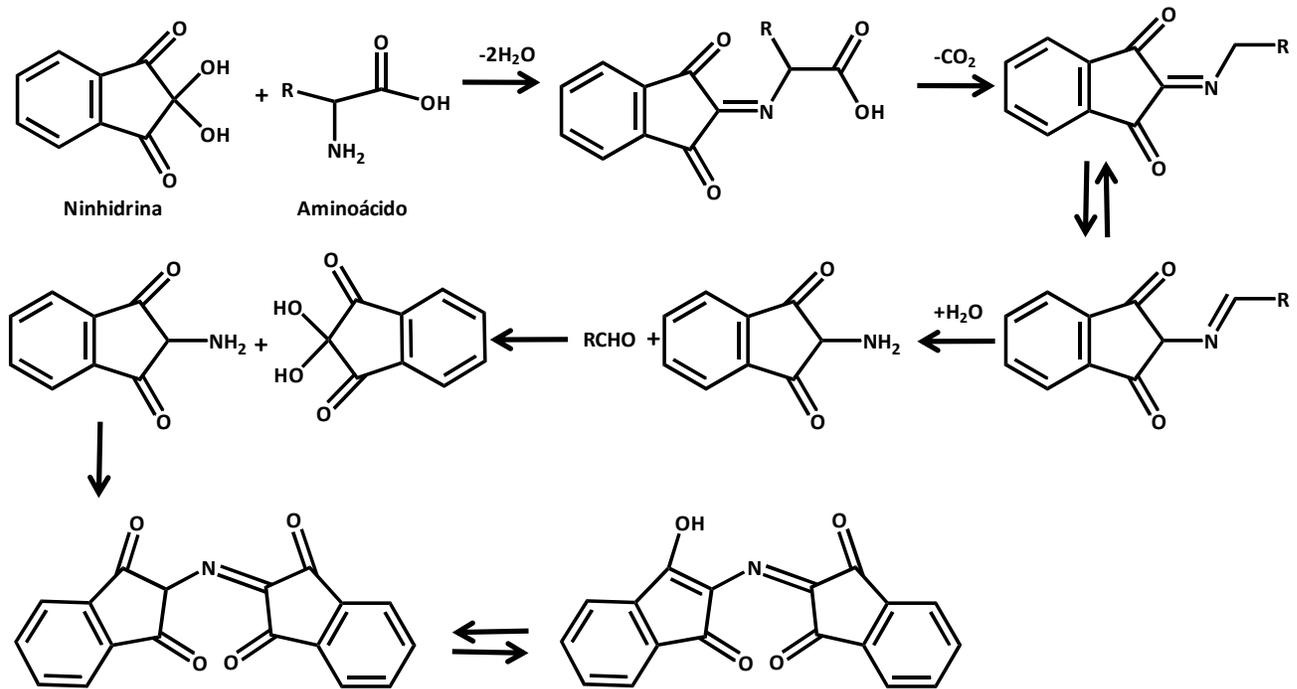


Figura 2.8 Mecanismo de reacción de un aminoácido con ninhidrina

2.1.6.2 Prueba con Azul de Bromofenol

El azul de bromofenol es usado como un tinte, a un pH neutro, la solución con bromofenol absorbe la luz roja y transmite la luz azul, así la solución es azul. A bajos pH, el tinte absorbe la luz azul y la ultravioleta y la solución es amarilla.

Cuando el grupo terminal amino de la cadena peptídica en proceso de síntesis está expuesto, las cuentas de la resina se colorean azul marino en presencia del azul de bromofenol. Mientras que cuando el grupo terminal amino está protegido, las cuentas de resina se mantienen amarillas, como lo es la solución original del azul de bromofenol en dimetilacetamida.

2.1.7 Caracterización química de péptidos

2.1.7.1 Cromatografía líquida de alta resolución

Cuando se aborda la purificación de un péptido de interés, se tiene que tomar en cuenta que las impurezas con las que vendrá acompañado de la etapa de síntesis son compuestos con estructuras químicas muy parecidas. Por ejemplo, durante la síntesis de péptidos mediante SPFS se pueden esperar como impurezas a péptidos incompletos o diastereoisómeros del péptido de interés dada la racemización de los aminoácidos durante la síntesis. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, high-performance liquid chromatography) es una técnica cromatográfica que cuenta con gran versatilidad, ya que permite separar mezclas de compuestos además de identificarlos y cuantificarlos, incluso a nivel de trazas (hasta ppb) [68].

La separación en HPLC se logra cuando se inyecta una muestra disuelta en un solvente dentro de un flujo de solvente (fase móvil), siendo bombeada hacia una columna empacada con un material sólido (fase estacionaria). La velocidad de un compuesto a través de la columna dependerá de las interacciones que el compuesto tenga con la fase móvil y la fase estacionaria. Las interacciones existentes en HPLC son las mismas que las que se presentan en una extracción sólido-líquido, pero bajo un sistema en flujo. Así, los componentes con la más alta afinidad a la fase estacionaria se moverán más lentamente dentro de la columna, mientras que los componentes menos afines a la columna se eluirán con mayor rapidez, desalojando la columna en un tiempo menor, permitiendo la separación de los componentes de una mezcla [69].

2.1.7.2 Espectroscopía de masas.

La técnica de espectroscopía de masas se basa en la medición de la masa, correlacionada con el peso molecular, de un compuesto químico. Cualquier espectrómetro básico tiene 3 componentes primordiales: *una fuente de ionización*, *un analizador de masas* donde los iones son separados según su relación masa/carga (m/z), y, por último, *un detector* donde los iones son contabilizados.

Existen diferentes tipos de técnicas de ionización, dentro de las cuáles tenemos la ionización del electrón y la ionización molecular por impacto (electron impact) que se utilizan

para los gases y los vapores [48]; mientras que para líquidos y muestras biológicas, se utilizan la ionización por electrospray (ESI, electrospray ionization) y la de láser matriz-asistido por desorción/ionización (MALDI, matrix-assisted laser desorption ionization).

Dentro de los analizadores de masas se encuentran los de sector magnético, los de tiempo de vuelo (TOF, time of flight) y los de cuadrupolo (Q). El analizador de masas TOF tradicionalmente se acopla a fuentes de ionización tipo MALDI. Así, un espectrómetro de masas del tipo ESI o MALDI-TOF es el más conveniente para analizar las muestras de los péptidos de aminoácidos alternados L/D conjugados con ferroceno.

2.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.2.1 Pasos experimentales para la síntesis de los péptidos

La síntesis de los péptidos es llevada a cabo en fase sólida con la estrategia Fmoc. Los péptidos se sintetizaron a una escala teórica de 0.1 mmol. Las cantidades de los reactivos utilizados durante las diferentes etapas de la SPPS son expresadas en equivalentes con respecto a los 0.1 mmoles de péptido a sintetizar.

Los detalles experimentales de los pasos a seguir durante la SPFS son descritos a continuación.

2.2.1.1 Hinchado de la resina.

Para la síntesis de los 3 péptidos propuestos se utilizaron dos resinas diferentes. La primera de ellas es la RINK AMIDE NOVAGEL [70] de la marca Novabiochem, con una carga de aminoácido de 0.63 mmol/g (Figura 2.9(a)). Las resinas NovaGel combinan la alta funcionalidad de las resinas de poliestireno con las buenas propiedades de hinchamiento de los soportes tipo PEG-PS [70]. Fue reportado que la resina RINK AMIDE MBHA [71] para la síntesis de péptidos cíclicos del tipo D,L tuvo un buen desempeño, por lo que fue la otra resina utilizada en la síntesis aquí mostrada. La resina Rink Amide MHBA fue de la marca Biochem, con una carga de aminoácido de 0.70 mmol/g (Figura 2.9(b)).

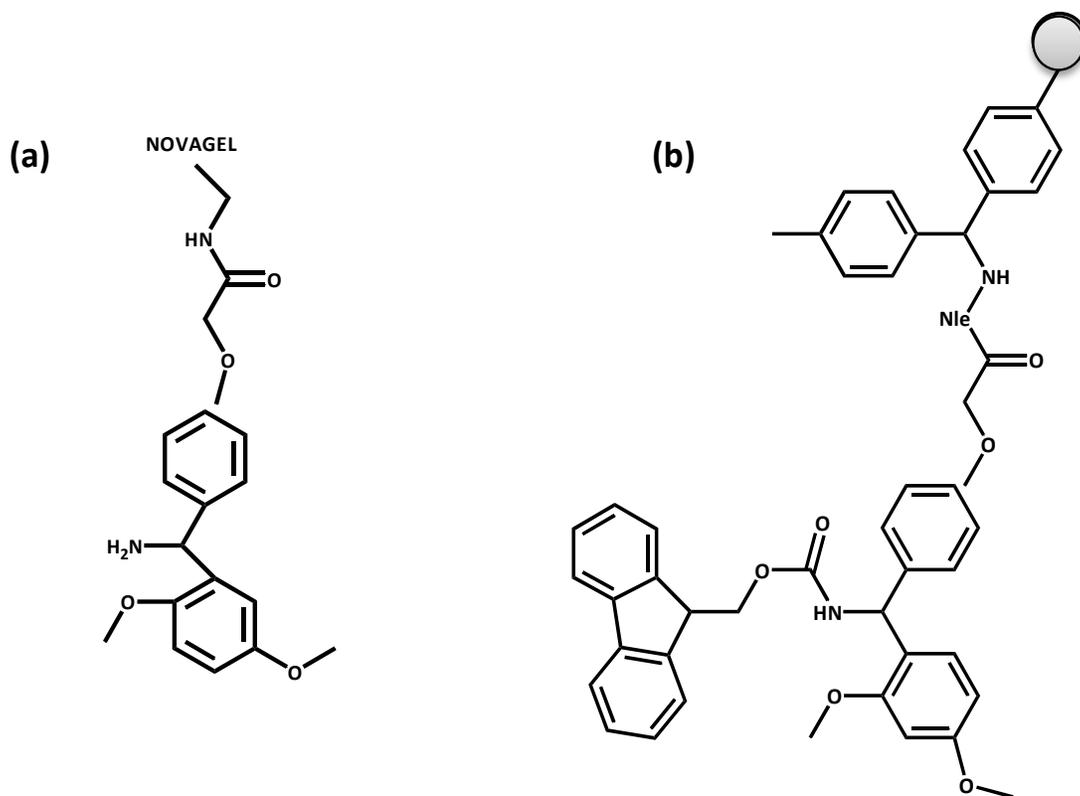


Figura 2.9 Estructuras químicas de (a)Rink Amide Novagel[70]; y (b)Rink Amide MBHA[72].

Para el hinchado de la resina se puso en contacto con DMF y se dejó bajo agitación suave durante 45 min a 1hr para que la resina se hinchara completamente, después de este período de tiempo el DMF se eliminó por filtración.

Las resinas utilizadas para las síntesis producen una terminación amido en el C-terminal del péptido. La Rink Amide MBHA requiere de un paso de remoción del grupo Fmoc, dado que el grupo amino al que se va a enlazar el primer aminoácido está protegido por este grupo. La resina Rink Amide Novagel no necesita la etapa de remoción debido a que el grupo amino al que se enlazará el primer aminoácido a acoplarse no está bloqueado.

2.2.1.2 Secado de la resina.

El secado se realizó con 5 lavados de diclorometano (CH₂Cl₂), cada lavado consistió en la adición del solvente, agitación suave manual y filtrado a vacío. Durante el último lavado se dejó filtrando durante 5 minutos para eliminar completamente el CH₂Cl₂.

2.2.1.3 Lavado con DMF

El lavado consistió de 10 pasos de enjuague con DMF (adición del solvente, agitación suave manual y filtrado). En los pasos de la síntesis donde se remueve el grupo Fmoc, a partir del octavo enjuague se intercambié el matraz kitasato con los desechos de los primeros 8 enjuagues por uno limpio para evitar que los vapores de la piperidina en los residuos alcancen el reactor.

2.2.1.4 Activación del aminoácido

Para la activación de los aminoácidos protegidos se utilizó 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio hexafluorofosfato (HBTU), adquirido de Novabiochem, con fórmula $C_{11}H_{16}N_5OPF_6$ y peso molecular (PM) 37.3 g/mol; 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) proveniente de Aldrich, con fórmula $C_8H_7N_3O$ y PM 135.13 g/mol; N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) de Aldrich, con fórmula $C_8H_{19}N$ y PM 129.25 g/mol. La Figura 2.10 muestra las estructuras de los reactivos utilizados en esta etapa.

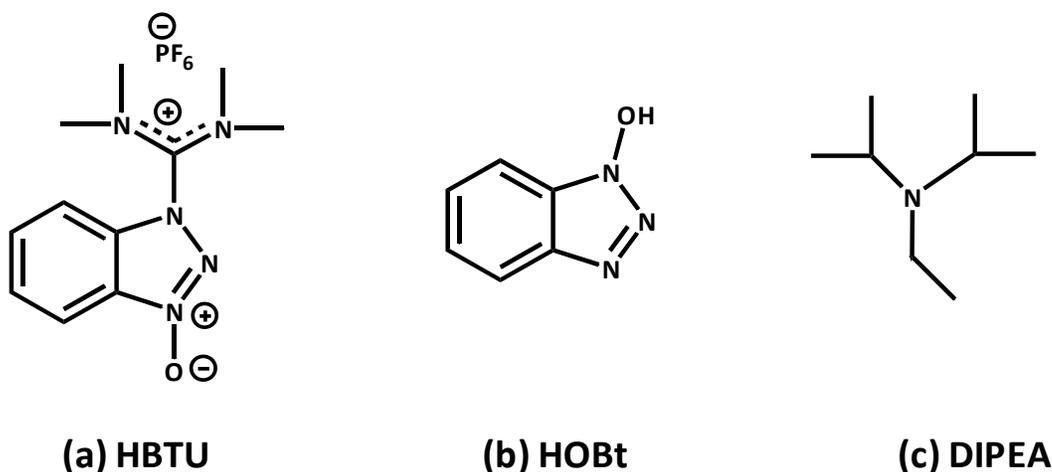


Figura 2.10 Estructuras químicas para los reactivos utilizados durante la activación de los aminoácidos protegidos (a) HBTU, (b) HOBT y (c)DIPEA.

El acoplamiento de un aminoácido a otro se debe realizar con ésteres activos preformados o mediante reactivos de activación que producen ésteres de benzotriazol, bajo condiciones básicas [48,73]. Durante la síntesis realizada para cada uno de los péptidos propuestos fue necesaria la activación del péptido protegido, así antes de cada acoplamiento, el aminoácido protegido con Fmoc fue activado con 2.9 equivalentes de HBTU, 2.9 equivalentes de HOBT y 4

equivalentes de DIPEA en DMF. La activación del aminoácido protegido fue llevada a cabo durante 5 minutos bajo agitación suave. El HOBt es empleado para evitar la racemización y acelerar la reacción, para este mismo fin también se utilizó el HBTU, que es una sal de uronio basada en la estructura del HOBt. Las sales de fosfonio y uronio son conocidos porque pueden convertir el carboxilato del aminoácido protegido en una especie activada al producir un éster de bezotriazol [73].

2.2.1.5 Acoplamiento del aminoácido

Los aminoácidos utilizados como reactivos durante los acoplamientos fueron de Fmoc-LCys(Trt)-OH, Fmoc-DAla-OH, Fmoc-Llys(ivDde)-OH, Fmoc-DPhe-OH y Boc-LCys(Trt)-OH de Novabiochem; Fmoc-LAsp(Otbu)-OH y Fmoc-LPhe-OH de SynPep Corporation. Las estructuras químicas de todos los aminoácidos son presentadas en la Figura 2.11.

Para cada acoplamiento se utilizaron 3 equivalentes en exceso del aminoácido correspondiente. Los aminoácidos fueron adquiridos protegidos con los grupos Fmoc o Boc en el nitrógeno α , según fuera el caso para obtener la secuencia de aminoácidos deseada. Los acoplamientos tuvieron una duración de 2 horas. La validez del acoplamiento fue evaluada por la prueba de Kaiser y la prueba con azul de bromofenol.

2.2.1.6 Remoción de grupos protectores

Para la remoción del grupo protector temporal Fmoc se utilizó piperidina de marca Aldrich al 99.5% de pureza, con PM de 85.15g/mol. En la remoción del grupo Fmoc, la resina previamente hinchada se pone a reaccionar con una solución de piperidina al 20% en DMF al 80% (v/v) durante 30 minutos. A continuación, se desecha la piperidina que no reaccionó mediante el lavado con DMF. Para evaluar si el grupo α -amino del último aminoácido acoplado a la cadena peptídica tiene enlazado al grupo Fmoc o si efectivamente fue removido se utilizó la prueba de Kaiser y la prueba con azul de bromofenol.

Durante la remoción del grupo protector amino 1-4(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutil (ivDde) se empleó hidracina hidratada marca Aldrich. Para la remoción de este grupo protector del aminoácido Lys se emplea una solución de hidracina al 2% en DMF 98% (v/v). La resina se pone en contacto con la solución de remoción de ivDde durante media hora en agitación

suave. Cuando la desprotección termina es necesario realizar el lavado y secado de la resina. Luego se evalúa la remoción con la prueba de Kaiser y la de azul de bromofenol esperándose respuestas positivas (azul).

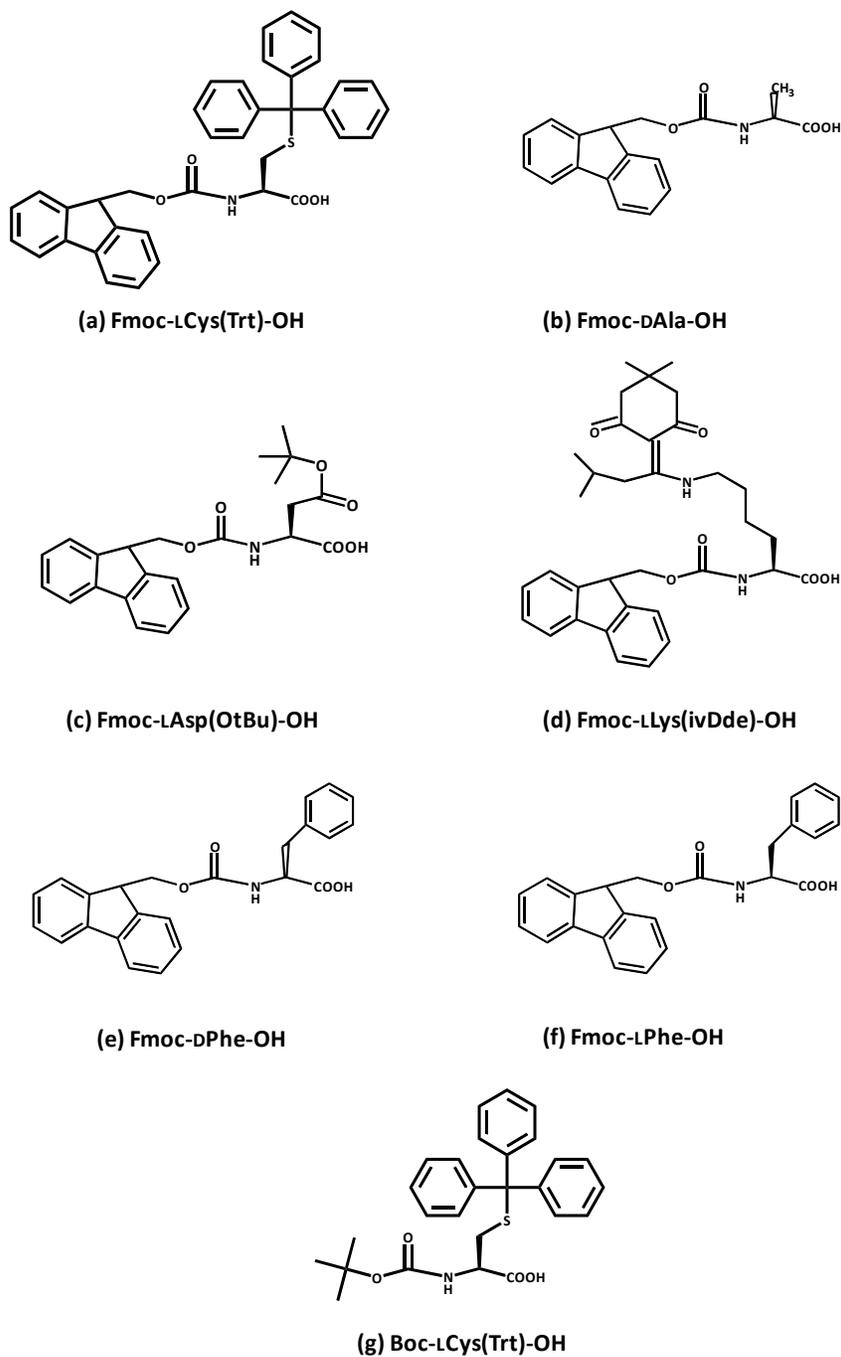


Figura 2.11 Estructuras químicas para los diferentes aminoácidos reactivos para la SPPS.

2.2.1.7 Evaluación de los pasos de acoplamiento y remoción de un grupo protector.

En la prueba de Kaiser se empleó ninhidrina ($C_9H_6O_4$) marca Sigma, cianuro de potasio (KCN) al 96% de marca Karal, fenol (C_6H_5OH) de la marca J.T. Baker. Para realizar esta prueba se utilizaron 3 soluciones, la primera con 0.5 g de ninhidrina en 10 mL de etanol, la segunda con 8 g de fenol en 2 mL de etanol y la tercera tuvo un volumen de 1mL de KCN 0.001M en agua milliQ.

Un par de gotas fueron tomadas de cada una de estas soluciones y se mezcló con unas pocas cuentas de la resina que contiene el péptido después del paso de acoplamiento o remoción a evaluar. El vial con la mezcla se puso bajo calentamiento a aproximadamente $90^{\circ}C$, durante 5 minutos. La solución genera un color azul si los grupos aminos están sin protección. La solución es amarilla o incolora cuando los grupos aminos están bloqueados por algún grupo protector.

En la prueba de bromofenol, se utiliza este último en una concentración $>0.1\%$ en dimetilacetamida. Para realizar esta prueba se tomaron unas cuentas de la resina después del paso de síntesis a evaluar y se mezclaron con un par de gotas de la solución de bromofenol. La solución permanece amarilla durante la prueba, sin embargo, las cuentas se mantienen amarillas si los grupos amino están protegidos, mientras que se volverán azules si los grupos aminos están expuestos para un siguiente acoplamiento.

2.2.1.8 Acoplamiento de Boc

Enseguida del hinchado de la resina en DMF, se mezclaron 5 equivalentes de BOC-dicarbonato y 2 equivalentes de DIPEA y se agitan suavemente en DMF para activar el BOC-dicarbonato. Después de la activación, la solución se mezcla con la resina durante 2 horas agitándose suavemente. Para finalizar, se realiza el lavado y secado de la resina, así como las pruebas de ninhidrina y azul de bromofenol, cuyas respuestas deben ser negativas (color amarillo) indicando que los grupos amino del último aminoácido del péptido están bloqueados con el grupo BOC.

2.2.1.9 Acoplamiento del grupo redox Ferroceno

Durante el acoplamiento del ferroceno, el reactivo manejado fue el ácido ferroceno-carboxílico (Fc-COOH) al 97% de Aldrich, con peso molecular de 230.05 gmol^{-1} y fórmula condensada $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{FeO}_2$. Antes del acoplamiento 3 equivalentes de Fc-COOH se activan en una solución 2.9 equivalentes de HBTU y 4 equivalentes de DIPEA en DMF, bajo agitación suave y por 5 min. Después, la solución de activación del Fc-COOH se puso en contacto con la resina durante 2 horas en agitación suave para la etapa de acoplamiento. Se procede con el lavado y secado. Se termina esta etapa con la prueba de ninhidrina y azul de bromofenol esperándose respuestas negativas (soluciones amarillas), indicando que las aminas están bloqueadas por el enlace del grupo ferroceno-carboxilado.

2.2.1.10 Separación de la secuencia peptídica de la resina

Para la separación del péptido de la resina y remoción de los grupos protectores las soluciones de la acidólisis se prepararon con el TFA al 99% adquirido de Aldrich, triisopropilsilano (TIPS) al 99% de Aldrich. Por otra parte, en la coprecipitación del péptido el reactivo empleado fue el dietil éter anhidro adquirido de Sigma-Aldrich al 99%

Al vial con la resina se le agregó una mezcla de TFA 95%, TIPS 2.5% y H_2O milliQ 2.5%, como fue reportado por Montenegro y col. [74], y se dejó bajo agitación intensa durante 2 horas. La mezcla, que ahora contiene el péptido con TFA, TIPS, H_2O milliQ, se filtró a vacío para separarla de la resina, y se colectó en un matraz kitasato. Esta solución fue secada mediante un flujo de nitrógeno hasta la formación de un aceite (15-30 min), durante la remoción del TFA el gas de salida se burbujeo por una trampa de NaOH concentrado para su neutralización. El aceite se puso en contacto con éter hasta que todo el aceite se transformó en un precipitado color mostaza (12 hrs). Después el péptido fue solubilizado en una mezcla de ACN y H_2O milliQ con 0.1% de TFA bajo diferentes proporciones según la naturaleza química del péptido.

2.2.2 Caracterización química

La purificación y rendimientos de la síntesis de los péptidos se lleva a cabo por cromatografía líquida de alta resolución. Los péptidos son solubilizados en un medio adecuado

para las pruebas de HPLC, en este caso se emplearon soluciones que contienen diferentes proporciones de H₂O milliQ con 0.1% de TFA y ACN con 0.1% de TFA. Los porcentajes de las soluciones de H₂O y ACN, ambos con 0.1% de TFA, para cada péptido se encuentran reportadas en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Proporciones de las soluciones de H₂O y ACN, ambos con 0.1% de TFA.

Péptido Sintetizado	Proporción de H₂O milliQ (0.1% de TFA)	Proporción ACN (0.1% de TFA)
Péptido {1}	35	65
Péptido {2}	65	35
Péptido {3}	42	58

Las cromatografías se llevaron a cabo en un cromatógrafo marca Agilent, con un detector de UV-Vis. La fase móvil utilizada está compuesta de la mezcla de la fase A: H₂O miliQ con 0.1% de TFA y la fase B: acetonitrilo (ACN) con 0.1%TFA.

Las pruebas de HPLC se realizaron a dos diferentes escalas: analítica y semipreparativa. Los experimentos realizados a escala analítica se llevaron a cabo en una columna Jupiter 5 μ C₁₈ 300Å 250 x 4.6mm con una pre-columna C₁₈ 4x3mm (ASO-4287), con un flujo de 1mL min⁻¹. Por otro lado, los experimentos a escala semipreparativa utilizaron la columna Jupiter 10 μ C₁₈ 300Å 250 x 10mm con la misma pre-columna que a escala analítica y con un flujo de 4.73mL min⁻¹.

Estas pruebas cromatográficas se realizaron, a diferentes escalas, flujos, tiempos y con un gradiente lineal de concentración de la fase móvil. La Tabla 2.3 resume las condiciones experimentales de los análisis en cromatografía líquida de alta resolución. Todos los experimentos se realizaron a una longitud de onda de 255nm ($\lambda_1=255\text{nm}$), a excepción de HPLC 1 que se llevó a cabo en dos longitudes de onda $\lambda_2=255\text{nm}$ y $\lambda_1=350\text{nm}$. El análisis cromatográfico se desarrolló utilizando las medidas de seguridad aconsejadas para un equipo de HPLC por V.R. Meyer [75]

Tabla 2.3 Condiciones experimentales para los análisis en cromatografía líquida de alta resolución, donde las soluciones de H₂O(A) y ACN (B) cuentan con 0.1% de TFA.

Experimento	Escala	Flujo (mL min ⁻¹)	Tiempo (min)	Péptido {1}		Péptido {2}		Péptido {3}	
				%A:%B inicial/%A:%B final	%A:%B inicial/%A:%B final	%A:%B inicial/%A:%B final	%A:%B inicial/%A:%B final	%A:%B inicial/%A:%B final	
HPLC 1	Analítica	1.0	35	70:30/20:80	80:20/20:80	80:20/20:80	80:20/20:80	80:20/20:80	80:20/20:80
HPLC 2	Semi-preparativa	4.73	35	70:30/20:80	80:20/20:80	80:20/20:80	80:20/20:80	80:20/20:80	80:20/20:80
HPLC 3	Analítica	1.0	180	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90
HPLC 4	Semi-preparativa	4.73	180	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90
HPLC 5	Analítica	1.0	60	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90	80:20/10:90

La caracterización química de los péptidos se realizó por espectroscopía de masas (EM), con ionización MALDI o electrospray y detección por tiempo de vuelo. Estos experimentos se llevaron a cabo en el CINVESTAV, unidad Irapuato o en el UT Southwestern Medical Center en Dallas, TX.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se presentan los resultados de la síntesis de los tres péptidos propuestos en el capítulo 1 (Figura 2.12). Los péptidos están constituidos por α -aminoácidos tipo L y D alternados [76], que inducen la formación de nanotubos de péptidos [77] a través de las interacciones del tipo puente de hidrógeno en conformación β -laminar [78], y que a su vez tienen conjugada una molécula de Fc carboxilado que le confiere propiedades electroactivas al péptido, que por sí mismo no es activo electroquímicamente. Los péptidos {1} y {2} tienen residuos de fenilalanina (Phe) que proveen al péptido de sistemas conjugados aromáticos π , que pueden aumentar las velocidades de transferencia electrónica del péptido, mediante un arreglo intermolecular que permita utilizar los dobles enlaces para transmitir la carga entre la sonda redox y el sustrato metálico. Por otro lado, los péptidos {2} y {3} tienen un residuo de ácido aspártico (Asp), que bajo condiciones de pH neutro está cargado negativamente, ayudando a

estabilizar la formación del Fc^+ , y disminuyendo el potencial anódico para la oxidación del ferroceno a ferricinio.

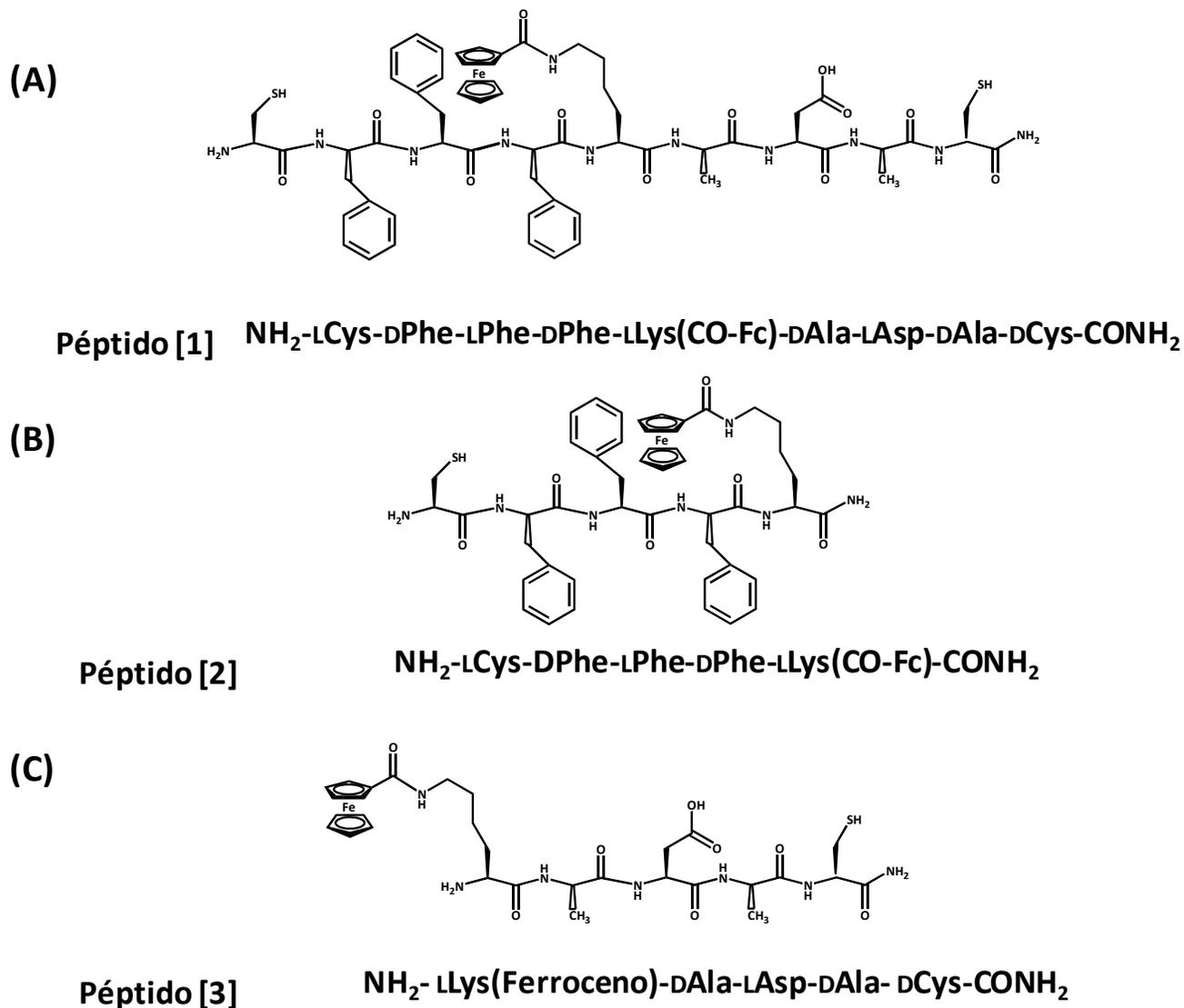


Figura 2.12 Péptidos propuestos (A) {1}, (B) {2} y (C) {3}.

2.3.1 Síntesis de los péptidos

Para la síntesis de los péptidos de este trabajo se emplearon resinas que generan el ácido carboxílico terminal amidado. La ruta sintética utilizada para los 3 péptidos se basó en la estrategia Fmoc. La característica importante al seleccionar esta estrategia es realizar una síntesis bajo un esquema ortogonal, es decir, que permita la reacción de acoplamiento entre

aminoácidos, sin alterar sus grupos funcionales protegidos, y que, al mismo tiempo, los grupos protectores puedan ser removidos en condiciones opuestas de reacción, sin que afecte al péptido en síntesis.

Como se había mencionado en la sección de grupos protectores, en la liberación del péptido de la resina en la estrategia Fmoc se utiliza al TFA. Por lo tanto, para remover los grupos protectores permanentes de los aminoácidos en el mismo paso de reacción que la liberación del péptido, se utilizaron aquellos grupos protectores que se removieran bajo las condiciones de la reacción con TFA. De la Tabla 2.1 es posible observar que en las condiciones de remoción de 90% v/v de TFA durante 30 min, los grupos protectores *t*Bu, Trt y Boc para los aminoácidos Asp, Cys y Lys, en ese orden, son removidos. Así el Asp tendrá los grupos protectores *t*Bu y Fmoc, la Cys tendrá al Trt y el Fmoc, sin embargo, para la Lys se utilizará Fmoc como protector temporal, pero no se utilizará Boc. En el caso de la Lys es necesario un grupo protector permanente con condiciones de remoción diferentes al TFA, debido a que este grupo debe ser retirado del péptido antes que sea liberado, con el objetivo de incorporar en ese lugar al ferroceno-carboxilado (Fc-COOH). Para este aminoácido se emplea el grupo protector ivDde que es removido en una solución de hidracina al 2% en DMF, evitando así que los grupos protectores permanentes de los aminoácidos restantes sean afectados, sin embargo, las condiciones de remoción de ivDde también remueven el grupo Fmoc por lo cual es requerido que el grupo amino alfa terminal del péptido en la resina este protegido con un grupo estable a condiciones básicas, para este trabajo se seleccionó que este grupo fuera Boc. Los acoplamientos de los aminoácidos se llevaron a cabo empleando HBTU como agente activador y el HOBt como aditivo para evitar la racemización durante el ataque nucleofílico del grupo amino del aminoácido anclado al péptido hacia el C-carbonilo de la especie activada.

El acoplamiento del Fc al péptido se llevó a cabo por la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo del reactivo Fc-COOH con el grupo amino epsilon del residuo de Lys, una vez que el grupo ivDde fue removido (Figura 2.13). La creación de este enlace amido se realiza bajo las mismas condiciones en las que se acoplan los aminoácidos, (en una solución de HBTU y DIPEA en DMF durante 2 horas). Sin embargo, no es indispensable el uso de HOBt debido a que

no es necesario evitar la racemización durante el acoplamiento del Fc-COOH, dado que este último no presenta un centro quiral.

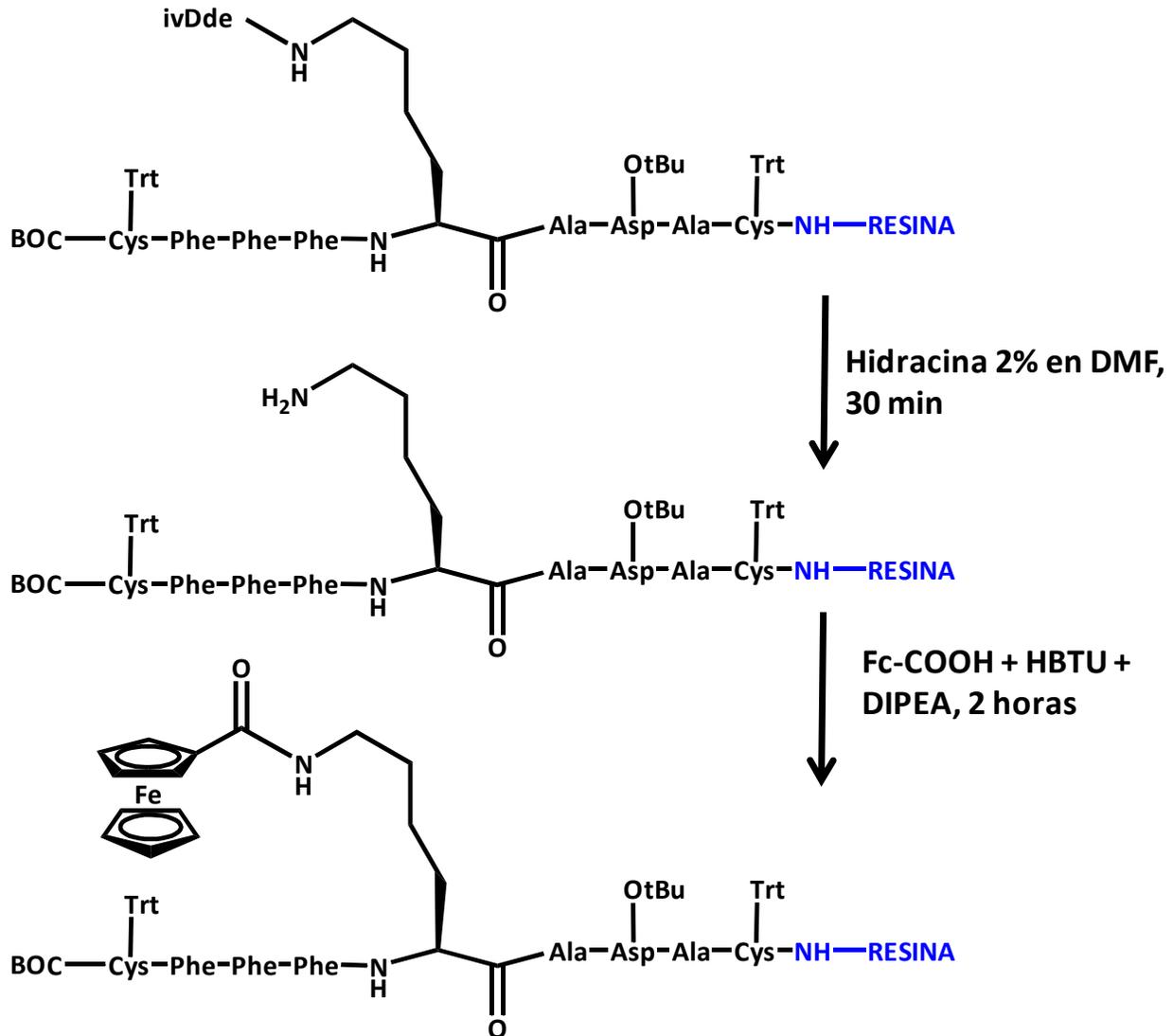


Figura 2.13 Remoción de ivDde y acoplamiento de Fc-COOH sobre Lys durante la síntesis del péptido {1}.

Para el péptido {3} cuyo último aminoácido acoplado fue la Fmoc-Lys(ivDde)-OH como ya se mencionó es necesario reemplazar el grupo Fmoc con el Boc, debido a que la solución de hidracina también remueve el Fmoc (Figura 2.14). Después del reemplazo de Fmoc por Boc, se realiza la remoción del grupo ivDde y acoplamiento del ferroceno carboxilado.

Todos los aminoácidos utilizados en las síntesis, utilizaron el Fmoc como protector temporal a excepción del último residuo de Cys agregado para los péptidos {1} y {2}. El Cys

terminal emplea al Boc que es removido bajo las mismas condiciones de liberación del péptido. Esto permite evitar dos pasos de síntesis (remoción de Fmoc del aminoácido Cys y liberación de péptido y remoción de grupos protectores permanentes *t*Bu y Trt), convirtiéndolos en sólo 1 paso de reacción (liberación del péptido y remoción de los grupos protectores *t*Bu, Trt y Boc) en una solución TFA, TIPS y H₂O. La liberación del péptido {3} también se realizó por acidólisis con TFA.

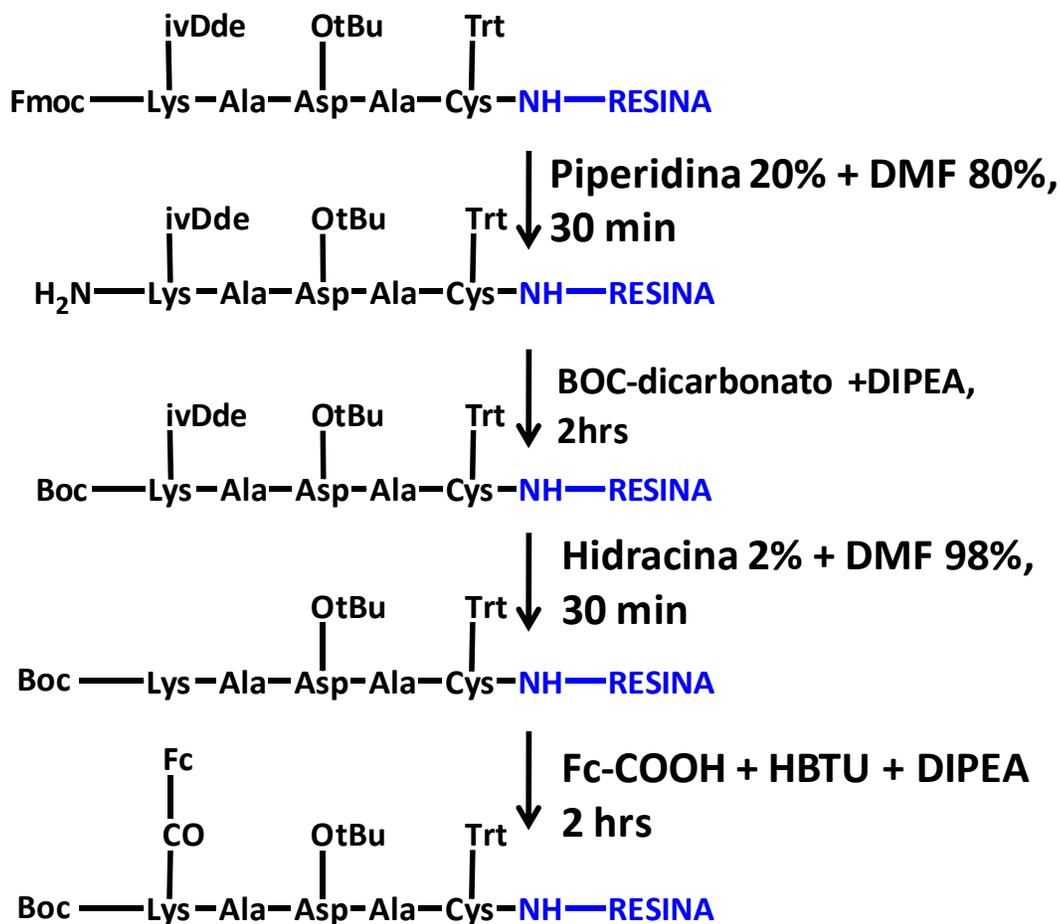


Figura 2.14 Reemplazo de Fmoc por Boc, remoción de ivDde y acoplamiento de Fc-COOH sobre Lys durante la síntesis del péptido {3}.

La adición del TIPS y de H₂O en bajas concentraciones (2.5% para cada uno de ellos), permite que funcionen como secuestradores de los carbocationes generados durante la remoción de los grupos protectores permanentes como el *t*Bu y el Trt.

2.3.2 Purificación y determinación de pureza por HPLC y caracterización por MS

La purificación y determinación de la pureza de los 3 péptidos se llevaron a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución. Como una primera prueba (HPLC 1) se obtuvieron los cromatogramas de los crudos de las síntesis a 2 longitudes de onda: 255nm y 350nm, en un tiempo total de análisis de 35 minutos. En este caso se esperaba que a 255nm se observaran señales correspondientes a la mayoría de los compuestos presentes en las muestras de los crudos y que a 350 nm se observe la señal correspondiente a los péptidos conjugados con ferroceno, ya que es longitud de onda de absorción máxima para el ferroceno.

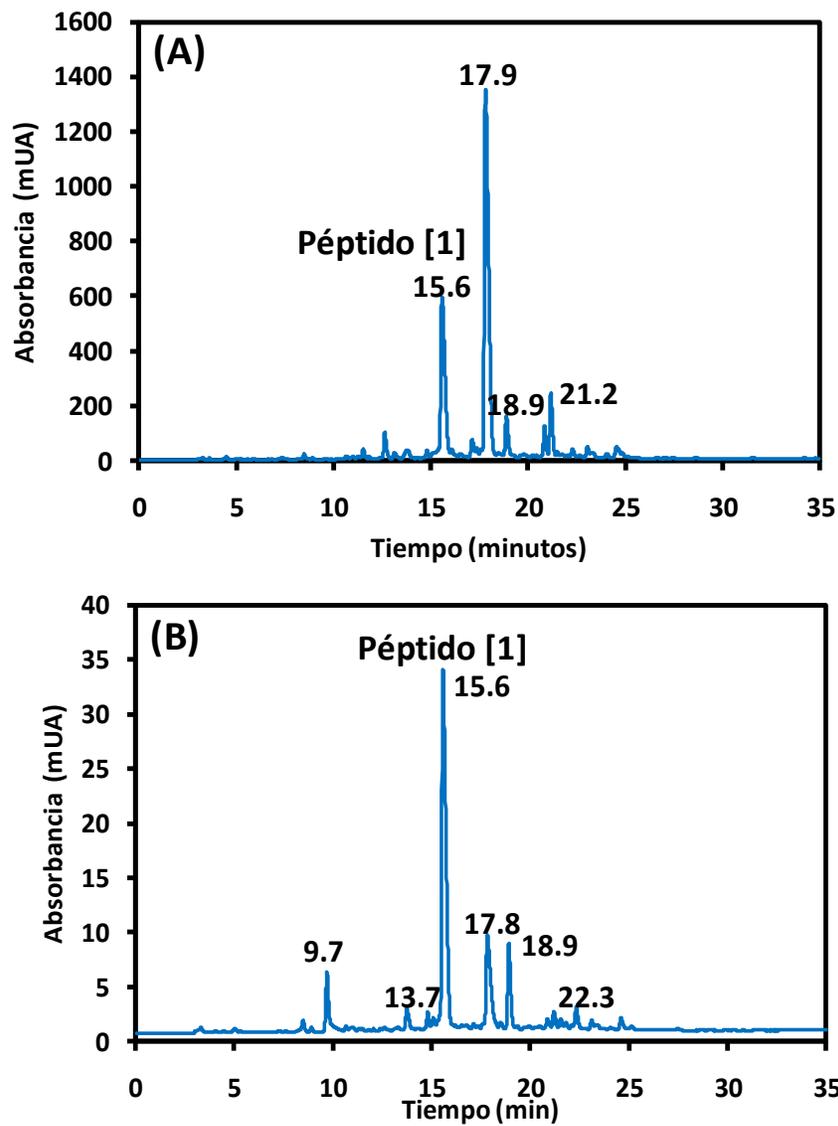


Figura 2.15 Cromatograma del crudo del péptido {1}. (A) $\lambda=255\text{nm}$ y (B) $\lambda=350\text{nm}$.

Comparando las señales a las dos longitudes de onda en la Figura 2.15 se deduce que para el péptido {1} la señal en el tiempo de elución 15.6 minutos es el péptido {1} conjugado con ferroceno. Por otro lado, se presenta una señal en 17.8 minutos que es significativa en $\lambda=255\text{nm}$, representado un subproducto importante de la síntesis que tiene características de hidrofiliidad y tamaño de molécula parecido al péptido {1}, ya que cuenta con un tiempo de retención cercano a 15.6 minutos, es de suponerse que es un péptido al que le falta el ferroceno, pues a una $\lambda = 350\text{ nm}$ su señal disminuye a la señal observada a una $\lambda = 255\text{nm}$. La fracción en el tiempo de elución de 17.8 min al ser significativa también fue analizada por espectrometría de masas.

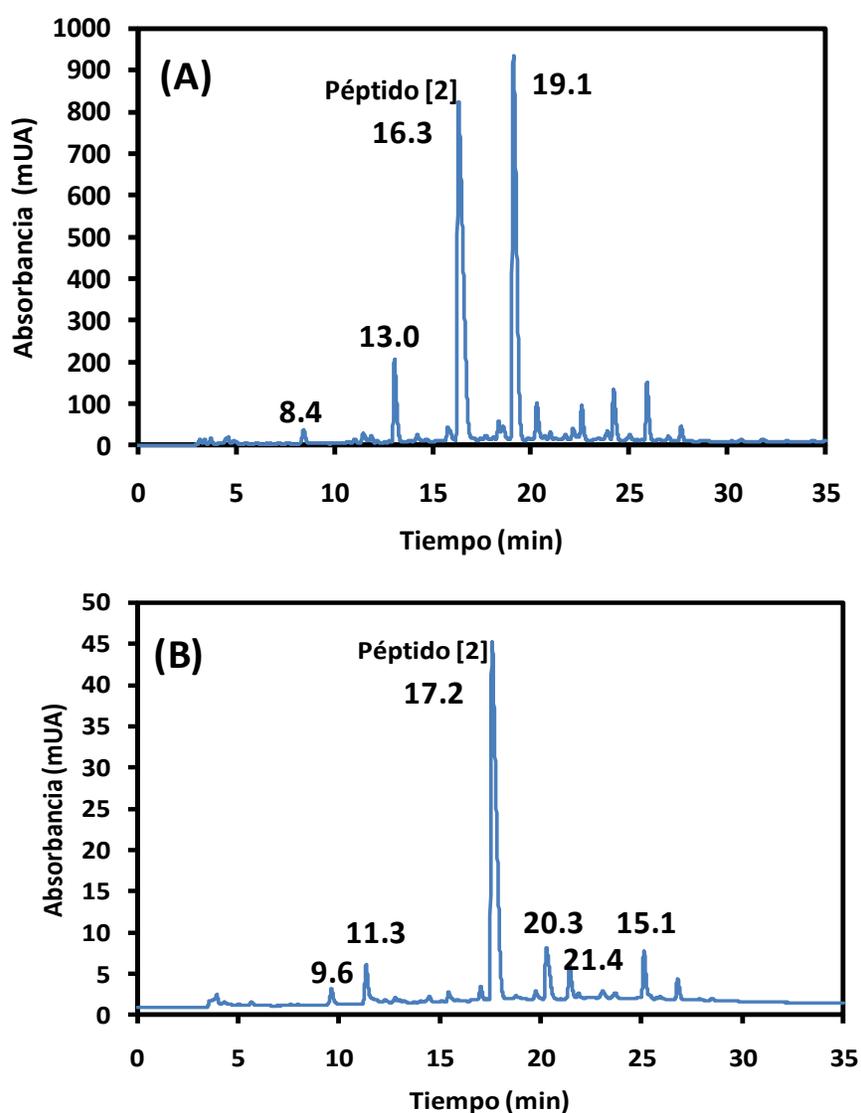


Figura 2.16 Cromatogramas del crudo del péptido {2}. (A) $\lambda=255\text{nm}$ y (B) $\lambda=350\text{nm}$.

En la Figura 2.16 muestran los cromatogramas del crudo de la síntesis del péptido {2} donde se observa que a una $\lambda = 350\text{nm}$ se presenta una señal predominante en un tiempo de elución de 17.2 minutos, atribuido al péptido {2} conjugado con ferroceno. A diferencia de los cromatogramas de los péptidos {1} y {3} los tiempos de elución para el péptido con ferroceno entre los análisis a las diferentes longitudes de onda no coinciden perfectamente, y se atribuye a

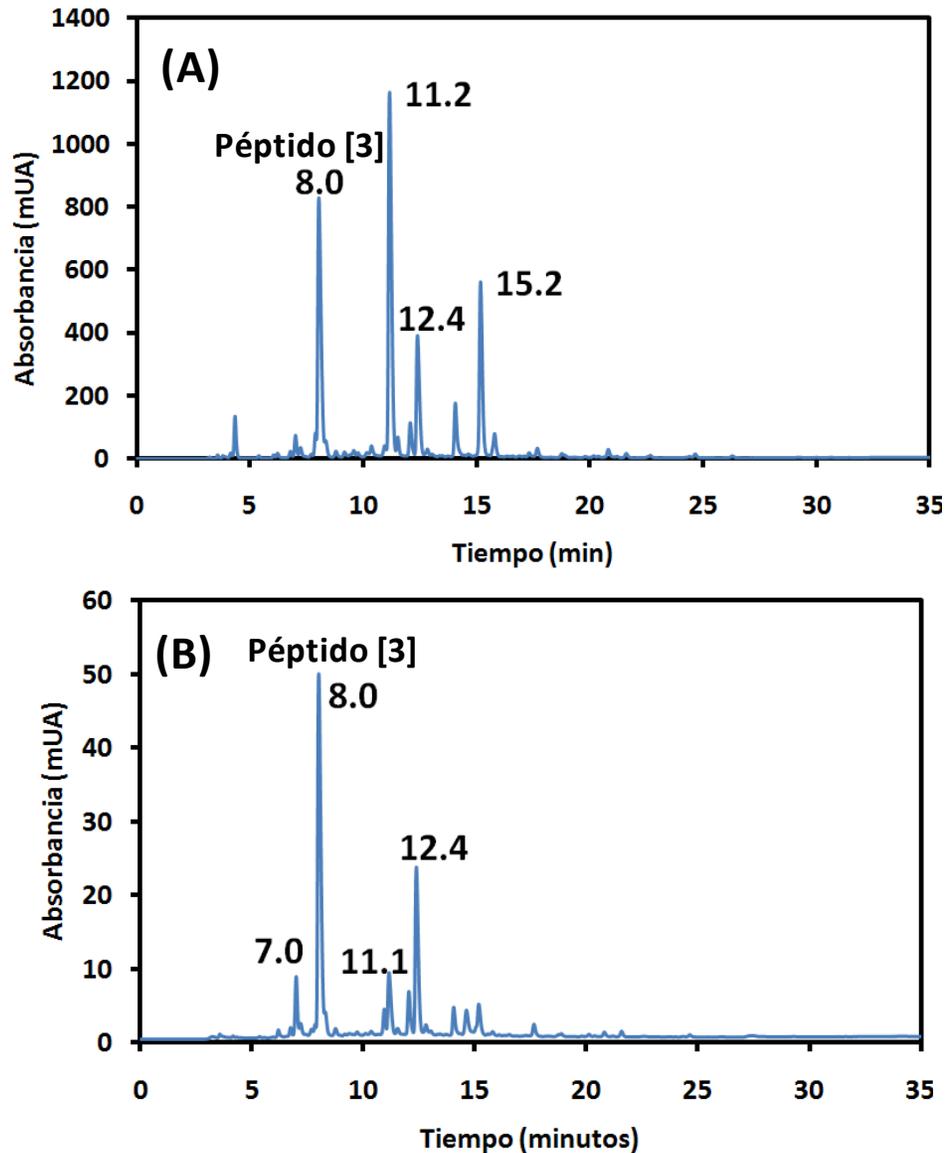


Figura 2.17 Cromatograma del crudo del péptido {3}. (A) $\lambda = 255\text{nm}$ y (B) $\lambda = 350\text{nm}$.

un cambio de temperatura durante los análisis, ya que el equipo de HPLC utilizado no cuenta con una columna cromatográfica que se mantenga a una temperatura constante mediante una

chaqueta de calentamiento. Se estableció que la señal en $\lambda=255\text{nm}$ y $t=19.1$ min corresponde al mismo compuesto en $\lambda=350\text{nm}$ y $t= 17.2$ min, y que en ambos casos es el péptido {2} con ferroceno.

Los cromatogramas del crudo para el péptido {3}, a las dos longitudes de onda mencionadas anteriormente, se muestran en la figura 2.17. La señal a los 8 minutos de elución se atribuye al péptido {3} conjugado con ferroceno pues a una $\lambda=350$ nm es la señal predominante y la mayor absorbancia es asociada a la absorción de la luz monocromática que experimenta el ferroceno. Así como en los péptidos {1} y {2}, para el péptido {3} se presenta una señal a una $\lambda =255\text{nm}$ muy cercana a la atribuida al péptido con ferroceno, que cuenta con una absorbancia significativa y que se considera un subproducto importante de la síntesis, es interesante conocer su identidad química, ya que esto revelaría si un paso de la secuencia de reacción es ineficiente.

La purificación (HPLC 2) de los crudos de los 3 péptidos se efectuó a una escala semipreparativa, bajo condiciones escaladas (detallado en la sección experimental) relativas a la primera prueba cromatográfica en escala analítica (HPLC 1), donde se colectaron las fracciones en los tiempos de elución que anteriormente se identificaron como los 3 péptidos conjugados con ferroceno de interés.

Los péptidos resultantes de la primera purificación se caracterizaron mediante espectroscopia de masas (MS, Mass Spectroscopy), donde se confirmó la composición química mediante la masa de los iones moleculares de cada uno de los péptidos (Figura 2.18).

En la figura 2.18 (A) se presenta el espectro de masas del péptido {1}, donde se observa la presencia del ion molecular protonado $[M+H^+]$ con masa molar de 1262.34 que concuerda con el peso molecular teórico de 1263.1 y que es la señal predominante del espectro. La señal en 1050.42 indicaría la presencia del péptido {1} sin la unidad de ferroceno, cuyo ion molecular protonado $[M+H^+]$ presenta un peso molecular teórico de 1050.5, lo que a su vez nos revelaría que el péptido contiene pequeñas cantidades de otros subproductos de la reacción de síntesis.

El espectro de masas del péptido {2} conjugado con ferroceno se muestra en la figura 2.18 (B) en el que se observa la señal en la masa molar de 902.31 del ion molecular $[M+H^+]$ del péptido {2} con ferroceno que concuerda con el peso molecular teórico de 902.91. Las otras señales de menor magnitud que se presentan en el espectro se atribuyen al patrón espectrométrico, tanto

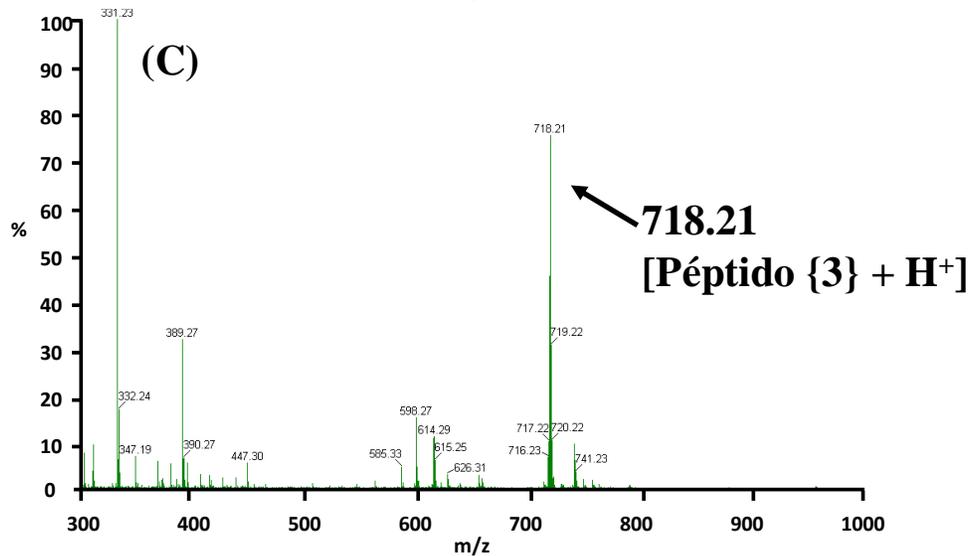
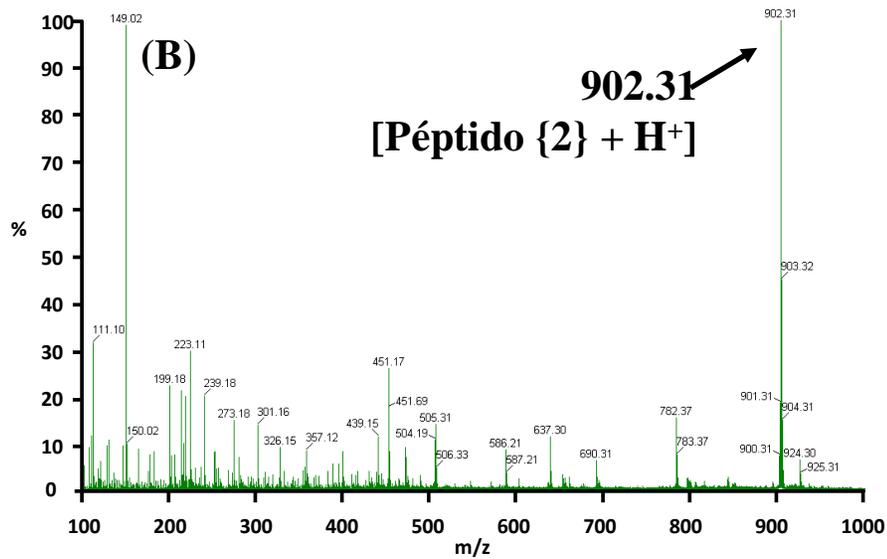
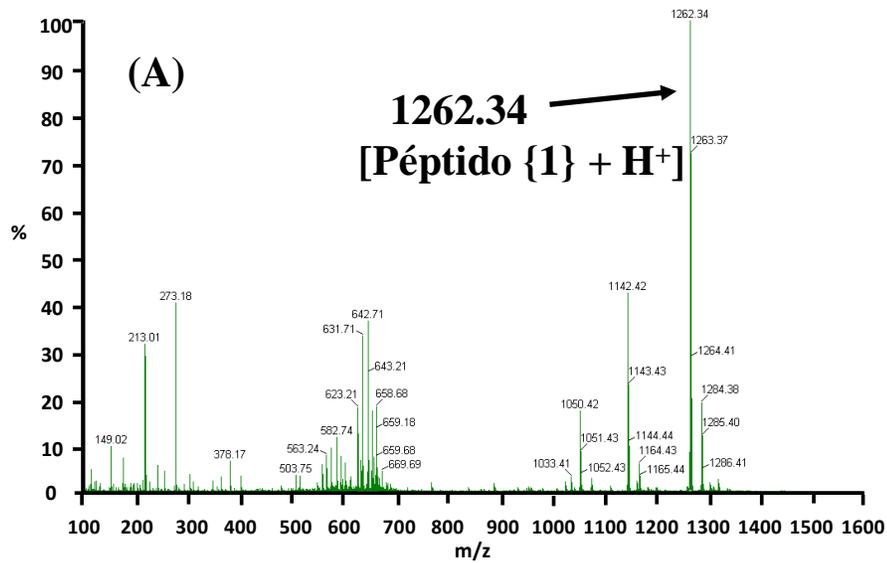


Figura 2.18 Espectros de masas MALDI-TOF para los péptidos (A) {1} (B) {2} y (C) {3}.

del péptido {2} con ferroceno, así como a trazas de subproductos de la síntesis que no fueron eliminados totalmente en la primera purificación. Finalmente, en la figura 2.18 (C) se tiene el espectro de masas del péptido {3} con ferroceno, que confirma la composición química de este péptido presentando una señal de m/z con valor de 718.21 correspondiente al ion molecular $[M+H^+]$ y cuya masa molar teórica es 718.64.

Los pesos moleculares calculados de los péptidos, así como el peso molecular del ion molecular encontrado en espectroscopía de masas se resumen en la Tabla 2.4

Tabla 2.4 Pesos moleculares teóricos y experimentales de los péptidos sintetizados

Péptido Sintetizado	Peso Molecular Calculado del Péptido	Peso Molecular del ion molecular [Péptido + H⁺] teórico	Peso Molecular del ion molecular [Péptido + H⁺] experimental
Péptido {1}	1262.1	1263.1	1263.34
Péptido {2}	901.92	902.92	902.31
Péptido {3}	717.64	718.64	718.21

Adicionalmente a los iones moleculares esperados para cada péptido, los espectros de masas muestran la presencia de impurezas, por lo cual se realizó un perfil de pureza mediante cromatografía (HPLC 3). Las condiciones experimentales bajo las cuales se obtuvieron los perfiles de pureza están descritas en la sección experimental, donde cabe resaltar que el perfil completo se llevó a cabo en 180 minutos para asegurar la separación de las señales correspondientes a los péptidos de interés con respecto a las impurezas. En la Figura 2.19 se muestran los cromatogramas para (A) el péptido {1}, donde la señal en el tiempo de retención de 58.8 min corresponde al péptido, mientras que las señales en 46.03, 55.8, 56.6 y 64.8 min se refieren a impurezas. En la misma figura 2.19, con (B) la señal del péptido {2} se encuentra en el tiempo de retención 58.4 min, por otro lado, la impureza más significativa tiene una señal en el minuto 46.4. Finalmente, para el péptido {3} mostrado en la figura 2.19 (C) le corresponde la señal en 9.6 min y es posible observar la presencia de múltiples impurezas en los tiempos de retención 4.3, 8.1, 11.9, 17.9 y 21.8 principalmente.

El perfil de pureza resultante de cada péptido fue bajo, por lo cual se procedió a realizar una repurificación bajo un gradiente largo (sección experimental para detalles) de tal forma que se logrará eliminar la mayoría de las impurezas (HPLC 4), sin embargo, las impurezas eliminadas no fueron caracterizadas para conocer su estructura química mediante espectroscopía de masas. Durante la re-purificación se logró eliminar las impurezas de la muestra, pero no así los diastereoisómeros de los péptidos de interés, los cuales son productos de procesos de racemización esperados durante la SPFS. Después de la re-purificación se obtuvo nuevamente el perfil de pureza de cada péptido (HPLC 5) cuyos cromatogramas se muestran en la Figura 2.20. Entre cada inyección de péptido se realizó la inyección de un blanco que corresponde únicamente a la fase móvil (línea punteada en los cromatogramas de la Figura 2.20) para verificar si todos los picos observados corresponden a la muestra. Estos experimentos, fueron realizados bajo condiciones distintas a la de los experimentos de re-purificación y las condiciones fueron especificadas en la sección experimental.

Como se observa en el cromatograma de la Figura 2.20 (A) la señal de mayor magnitud en un tiempo de retención de 16.040 min corresponde al péptido {1}, sin embargo aparecen señales pequeñas, en tiempos de 23.5, 24.891 y 25.668 minutos, adicionales al péptido {1}, aún después de la re-purificación exhaustiva. Lo anterior se puede atribuir a productos de oxidación del péptido (formación de puentes disulfuro) consigo mismo, ya que al formarse el enlace S-S el péptido {1} se ciclaría, así disminuye su área superficial en contacto con la fase estacionaria de la columna cromatográfica, reflejándose en una disminución del tiempo de retención. En cuanto a las señales en 25.515, 28.812 y 33.585 min se atribuye a los diastereoisómeros presentes, que son evitados durante la síntesis al utilizar los aminoácidos L,D correspondientes, pero que durante la síntesis una muy pequeña porción de estos aminoácidos pueden sufrir una inversión del centro quiral.

Los cromatogramas para los péptidos {2} y {3} son mostrados en la Figura 2.20 en los incisos (B) y (C), respectivamente. Los péptidos {2} y {3} presentan un comportamiento análogo al péptido {1}, donde se tiene una señal principal debida al péptido de interés ($t = 26.575$ min para el péptido {2} y $t = 8.274$ min para el péptido {3}), y pequeñas señales antes y después de la señal

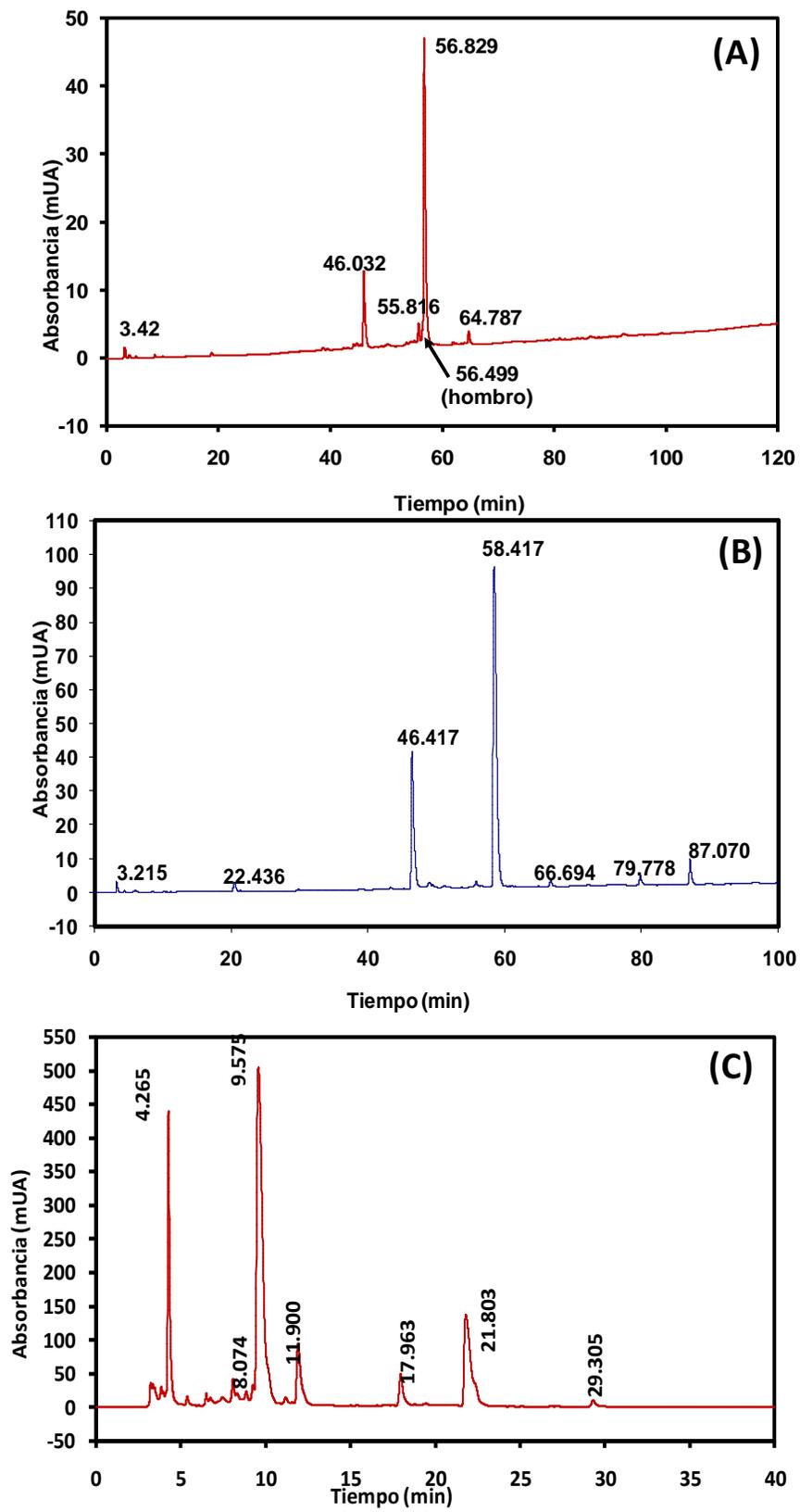


Figura 2.19 Cromatogramas después de la primera purificación para los péptidos (A) {1} (B) {2} y (C) {3}.

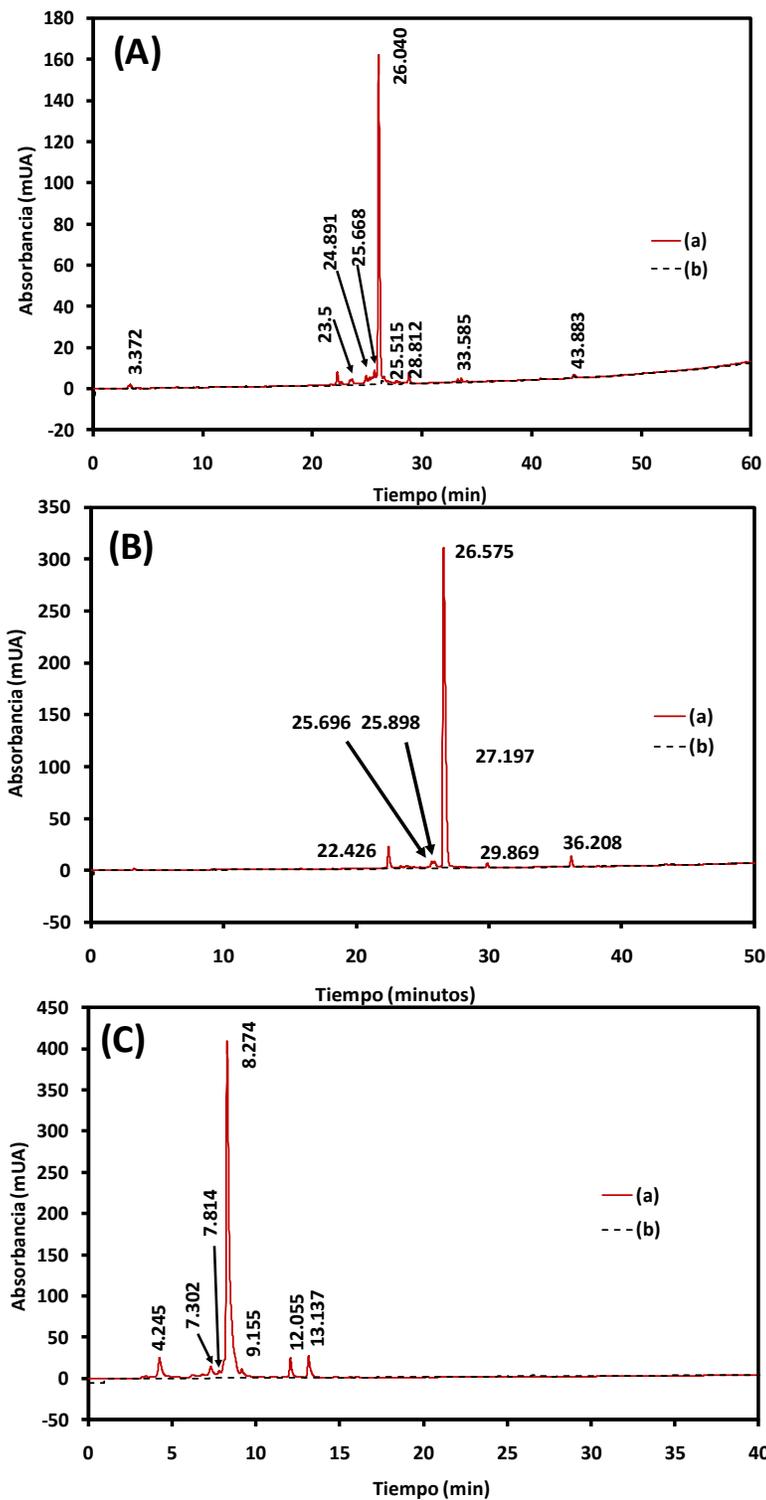


Figura 2.20 Cromatogramas después de la segunda purificación para los péptidos (A) {1} (B) {2} y (C) {3}. Señales cromatográficas de (a) péptido en fase móvil (b) blanco, correspondiente sólo a fase móvil.

del péptido de interés. Como en el caso del péptido {1}, las señales cromatográficas anteriores a la señal principal de los péptidos {2} y {3} se asignan a los mismos péptidos con la formación de puentes disulfuro. Aquellas señales posteriores a la señal principal de los péptidos {2} y {3} se presume que son los diastereoisómeros de dichos péptidos. Sin embargo, la confirmación experimental de esta conclusión sería mediante el análisis de espectroscopía de masas la cual no se realizó. En este punto se supuso que la pureza química de los péptidos sintetizadas es >98% aunque no se puede suponer lo mismo de la pureza esteroquímica. Los rendimientos globales de los péptidos después de la re-purificación se muestran en la Tabla 2.5. Cabe señalar, que el rendimiento para la síntesis del péptido {3} fue baja debido a que se perdió aproximadamente la mitad del péptido total sintetizado en la primera purificación por errores en el desarrollo de la técnica de HPLC semipreparativa, no obstante, se esperaba un rendimiento similar al péptido {2}, ya que el número de residuos de aminoácidos en ambos péptidos es 5, mientras que el péptido {1} contiene 9 residuos de aminoácidos, y con un mayor número de aminoácidos en la cadena peptídica disminuye el rendimiento de la reacción total.

Tabla 2.5 Rendimientos de las SPFS

Péptido Sintetizado	Rendimiento de la Reacción (%)
Péptido {1}	16.7
Péptido {2}	28
Péptido {3}	10

2.4 CONCLUSIONES PRELIMINARES

Se sintetizaron 3 péptidos novedosos con aminoácidos L/D alternados conjugados con una unidad de ferroceno que convierte a estas moléculas en electroactivas. Todas las secuencias peptídicas fueron sintetizadas bajo el protocolo ortogonal de síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc y se les acopló un ferroceno carboxilado en el residuo de aminoácido de lisina en el grupo ϵ -NH₂ de su grupo lateral al reemplazar el grupo protector ivDde.

Se encontró que aún después de la purificación exhaustiva en HPLC de los crudos de las síntesis de los 3 péptidos, persistieron pequeñas cantidades de moléculas diferentes a los

péptidos {1}, {2} y {3}, y que fueron atribuidas a los procesos de oxidación en la formación de enlaces S-S para las moléculas de menor tiempo de elución, mientras que las moléculas con mayor y {3}.

Se confirmó la identidad química de los 3 péptidos conjugados con ferroceno mediante espectroscopía de masas, al observar masas molares de 1262.34, 902.31 y 718.21 de los iones moleculares $[M+H^+]$ de los péptidos {1}, {2} y {3}, respectivamente, que concuerdan los pesos moleculares teóricos de los respectivos iones moleculares.

Al analizar las masas obtenidas de los péptidos {1}, {2} y {3}, se calcularon los rendimientos de la reacción como 16.7%, 28% y 10 %, respectivamente.

2.5 REFERENCIAS

48. J.McMurry. *Organic Chemistry, Seventh Edition*, Thomson Ed, (2008).
49. J. Howl. *Peptides Synthesis and Applications*, (2005), Humana Press Ed., Vol. 298.
50. S. Regmi, página web “Challenges in the large-scale production of peptides”, <https://www.linkedin.com/pulse/challenges-large-scale-production-peptides-sudan-regmi>, consultada el 20 de octubre de 2017.
51. R. B. Merrifield, *The Journal of the American Chemical Society*, 85 (1963) 2149-2154
52. B. Gutte. *Peptides: Synthesis, Structures and Applications*, (1995), Academic Press Inc.
53. Síntesis de Péptidos de la página web: http://en.wikipedia.org/wiki/Peptide_synthesis, consultada el 9 de noviembre de 2012.
54. Archivo pdf “resins for Solid-Phase Peptide Synthesis”, de la página web https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Aldrich/Brochure/al_chemfile_v3_no4.pdf, consultada el 22 de octubre de 2017.
55. W.K. Chan, P.D. White. *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*, (2000), Editorial Oxford University Press, 1a edition, 9-40.
56. R. B. Merrifield, G. R. Marshall, *Biochemistry*, 4, (1965), 2394-2401.
57. R. B. Merrifield, V.K. Sarin, S. B. H. Kent, *The Journal of the American Chemical Society*, 102, (1980), 5463-5470.
58. S. Zalipsky, J. L. Chang. F. Albercio, G. Barany, *Reactive Polymers*, 22, (1994), 243-258.
59. L. A. Carpino, G. Y. Han, *The Journal of Organic Chemistry*, 37, (1972), 3404-3409.

60. K. J. Jensen, P.T. Shelton, S.L. Pederson, *Peptide Synthesis and Application*, 2nd edition, Ed. Humana Press, (2013), 23-41.
61. I. Coin, M. Beyermann, M. Bienert, *Nature Protocols*, 2, (2007), 3247-3256.
62. N.L. Benoiton. *Chemistry of Peptides Synthesis*, (2006), Editorial Taylor & Francis Group.
63. J.C. Sheehan, G.P. Hess, *The Journal of the American Chemical Society*, 77, (1955), 1067-1068.
64. D. Hudson, *The Journal of Organic Chemistry*, 53, (1988), 617-624.
65. M. Junkeres, *Aldrich Chemfiles*, 10 (2010). <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/chemfiles/comu-peptide-coupling-reagent.html>
66. B. Castro, J.R., Dormoy, G. Evin, C. Selve. *Tetrahedron Letters*, 14, (1975), 1219-1222.
67. E. Kaiser, R.L. Colecott, C.D. Bossiriger, P.I. Cook, *Analytical Biochemistry*, 34 (1970) 595.
68. S. Ahuja. *Chromatography and Separation Science*, (2003), Editorial Academic Press, 159-208.
69. V.R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5th edition, Wiley, (2010), 65-79.
70. Página de Merck, http://www.merck-chemicals.com/mexico/life-science-research/rink-amide-novagel/EMD_BIO-855031/p_Brmb.s1OYKEAAAEjzxh9.zLX?WFSimpleSearch_NameOrID=rink+amide+novagel&BackButtonText=search+results, consultada el 19 de abril de 2012.
71. Y. Zhao, L. J. Leman, D. J. Search, R. A. Garcia, D. A. Gordon, B.E. Maryanoff, M. Reza Ghadiri, *ACS Central Science*, 3, (2017), 639-646.
72. Página de Merck- http://www.merck-chemicals.com/mexico/life-science-research/rink-amide-mbha-resin-100-200-mesh/EMD_BIO855003/p_Brmb.s1OYKEAAAEjzxh9.zLX?WFSimpleSearch_NameOrID=rink+amide+mbha&BackButtonText=search+results, consultada el 19 de abril de 2012.
73. P. Li and J.C. Xu. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, 2, (2001), 113-120.
74. J. Montenegro, C. Vázquez-Vázquez, A. Kalinin, K. E. Geckeler, J. R. Granja, *Journal of the American Chemical Society*, 136, (2014), 2884-2491.
75. J. Montenegro, M. Reza Ghadiri, J. R. Granja, *Accounts of Chemical Research*, 46, (2013), 2955-2965.
76. M. Cuerva, R. García-Fandiño, C. Vázquez-Vázquez, M. A. López-Quintela, J. Montenegro, J. R. Granja, *ACSNano*, 9, (2015), 10834-10843.

77. A. Fuertes, M. Juanes, J. R. Granja and J. Montenegro, *Chemical Communications*, 53, (2017), 7861-7871.

78. N. Rodríguez-Vázquez, M. Amorín, J. R. Granja, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 15 (2017), 4490-4505.

Capítulo 3

FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA SAM A PARTIR DE UN MEDIO DE METANOL

3.1 INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se aborda la primera parte de la caracterización electroquímica de las monocapas autoensambladas (SAMs, self-assembled monolayers) de los 3 péptidos con aminoácidos L/D alternados y conjugados con Ferroceno (Fc) sintetizados anteriormente. El estudio de la formación de las SAMs se inició utilizando el metanol como solvente de la solución modificadora que contenía al péptido, mientras que su caracterización fue realizada en un medio de buffer de fosfatos (PBS, phosphate buffer solution). Las pruebas electroquímicas para las SAMs formadas bajo estas condiciones incluyen la voltamperometría cíclica y la impedancia electroquímica.

3.1.1. Monocapas autoensambladas

El autoensamblado molecular es un proceso en el cual una estructura se organiza de manera espontánea a partir de un conjunto de moléculas que no están relacionadas entre sí, en una fase líquida o gaseosa, llevándose a cabo este proceso sobre una interfase heterogénea [79]. Un ejemplo típico de una monocapa autoensamblada está basado en la adsorción de tioles sobre Au, que envuelve una interacción específica sulfuro-oro como la principal fuerza promotora para el ensamblado del compuesto organosulfurado a partir de la solución sobre una superficie de Au [80,81]. Se dice que se trata de un proceso de autoensamblaje, ya que, una vez iniciado el proceso,

no requiere ninguna fuerza externa y se lleva a cabo de manera espontánea, como se mencionó anteriormente [82,83].

En general, los componentes de una SAM incluyen un electrodo que sirve como soporte, un grupo funcional terminal (que puede ser un centro redox para una SAM electroactiva), el puente que une al grupo funcional con el grupo de anclaje que enlaza con el electrodo, como lo muestra la Figura 3.1.

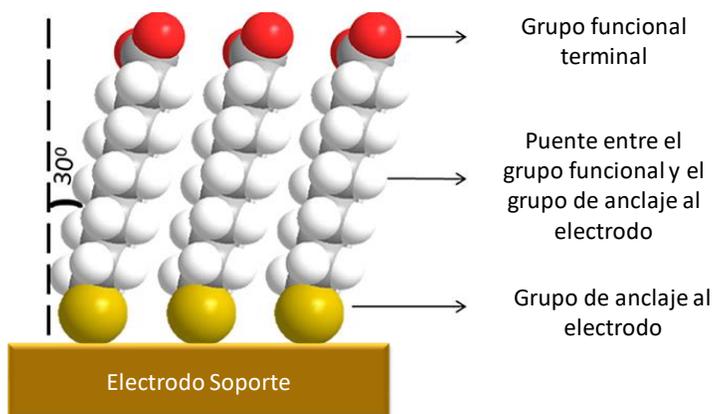


Figura 3.1 Esquema básico de una SAM [84].

Las SAM's son apropiadas para estudios en aplicaciones de nanotecnología debido a que son fáciles de preparar, se pueden formar sobre objetos de diferentes formas y tamaños y es posible funcionalizarlas para un fin específico.

En el desarrollo de sensores electroquímicos, el principal objetivo es producir un sistema con un límite de detección de un analito en particular, que sea lo más bajo y preciso posible. Para alcanzar estos bajos niveles de límites de detección es necesario conocer las características de transferencia electrónica que ocurren en el sistema electroquímico empleado, para así poder mejorarlas. Como ejemplos, se puede pensar en aumentar la velocidad de transferencia electrónica y/o disminuir la corriente capacitiva de la SAM.

De forma tradicional se considera que las SAMs forman estructuras altamente ordenadas que contienen pocos defectos, basándose en que el proceso de autoensamblado está dirigido termodinámicamente. Sin embargo, las SAMs forman estructuras complicadas causadas por diversos defectos como la morfología y limpieza del sustrato o el método de preparación de la

SAM. La superficie del electrodo sobre la que se forma la SAM está llena de defectos, por ejemplo, se tienen límites de grano, cambio de cara cristalina, vacancias atómicas (sitio individual), colapso de la SAM, entre otros defectos. Estos defectos influyen en que la monocapa que se forma no sea uniforme como lo ejemplifica la Figura 3.2.

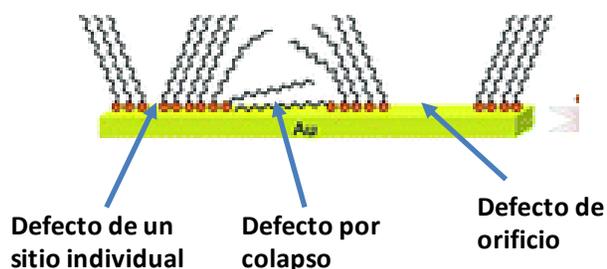


Figura 3.2 Esquema de monocapa autoensamblada sobre Au policristalino, donde se observan defectos superficiales que desorganizan a la monocapa. [85]

3.1.2. Métodos de caracterización de las SAM's.

Diferentes métodos para caracterizar una SAM han sido desarrollados, dentro de los cuales encontramos, tanto electroquímicos, como aquellos basados en otras mediciones de parámetros físicos. La voltamperometría cíclica (CV, cyclic voltammetry) es una técnica electroquímica ampliamente utilizada para caracterizar una SAM. Con esta técnica es posible conocer el comportamiento electroquímico básico de la monocapa, como si es o no conductiva o electroactiva [86], o si cuenta con un comportamiento reversible para un centro activo adsorbido sobre un sustrato conductor, o si la monocapa es altamente ordenada o desordenada [87]. La voltamperometría cíclica es tan versátil que se puede acoplar con otras técnicas para la caracterización de las SAM's, como es el caso de la espectroelectroquímica [88]. Diferentes trabajos han sido reportados sobre el comportamiento electroquímico de biomoléculas conjugadas con una sonda redox. Azzaroni y col. [89] estudiaron mediante VC, el cambio en los valores de potencial de la proteína streptavidin conjugada con ferroceno (Fc) dependiendo del microambiente electrostático que rodeaba a la sonda redox. Ellos observaron que mediante un cambio de pH de 7.4 a 4.6 se modifican las cargas en la proteína de negativa a positivas. En la proteína cargada negativamente el ion ferrocenio se estabiliza provocando un cambio catódico en el potencial redox del Fc. Mientras que con la proteína cargada positivamente el ferrocenio se

desestabiliza por la repulsión de las cargas positivas, observándose un cambio anódico del potencial redox.

Con la técnica de microbalanza de cuarzo (QCM, quartz crystal microbalance), se puede evaluar la masa correspondiente a la monocapa sobre el electrodo y, a partir de ésta, deducir el recubrimiento molar superficial, así como la superficie que ocupa cada molécula de los compuestos que forman la SAM [90]. La técnica de elipsometría permite conocer el grosor de una SAM, sin embargo, presenta la desventaja de que el índice de refracción para el material modificador debe ser conocido o supuesto, además de que el grosor de una SAM calculado por esta técnica es diferente al grosor de la misma SAM en contacto con la solución electrolítica [91,92]. La espectroscopía de impedancia electroquímica (Electrochemical impedance spectroscopy, EIS), es una técnica electroquímica en la que la señal de perturbación del sistema es un potencial sinusoidal con una amplitud pequeña, y se recoge como señal de salida la onda sinusoidal de la corriente eléctrica [93]. Con el ajuste de un circuito equivalente adecuado se pueden determinar parámetros característicos de la SAM, como la velocidad de electrotransferencia o la capacitancia que se establece en la capa [95,96].

En este capítulo, la voltamperometría cíclica fue utilizada para conocer los factores de rugosidad de los electrodos de Au y calcular los recubrimientos superficiales de los péptidos sobre el sustrato de Au. También se realiza un estudio en función de las velocidades de barrido de potencial, para conocer el comportamiento electroquímico básico del Fc en la SAM. Complementariamente se utilizó la técnica de impedancia electroquímica, donde se ajustaron los datos obtenidos experimentalmente a un circuito equivalente para la determinación de parámetros fisicoquímicos de las SAM's de los tres péptidos sintetizados anteriormente. Finalmente, se realizó un estudio voltamperométrico de las SAM's formadas a partir de diferentes medios y diversas concentraciones.

3.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En este apartado se presentan los materiales, equipos y metodologías experimentales empleados para la caracterización electroquímica de las SAM de péptidos con aminoácidos alternados conjugados con Fc.

3.2.1 Limpieza electroquímica del electrodo de Au.

Dado que sobre la superficie del electrodo de Au se llevará a cabo el proceso de autoensamble de las monocapas de péptidos anteriormente sintetizados, es muy importante que la superficie esté completamente libre de impurezas, así la limpieza del electrodo consistió tanto de una limpieza mecánica, como de una limpieza electroquímica.

Para la limpieza del electrodo de oro se siguió la siguiente metodología (Figura 3.3):

1. Se agrega una gota de mezcla crómica (disolución de dicromato sódico o potásico en ácido sulfúrico muy concentrado) a la superficie del electrodo de Au durante 10 segundos y enseguida se enjuaga con agua desionizada.
2. Se enjuaga con HNO_3 al 10% en volumen en agua desionizada y después se enjuaga con solamente agua desionizada.
3. El electrodo se pule sobre un paño marca buehler con alúmina de $0.05 \mu\text{m}$, terminando este paso con un enjuague de agua desionizada.
4. Se procede a hacer la limpieza electroquímica. El electrodo de Au se coloca en una celda electroquímica, donde funciona como electrodo de trabajo y se tiene como el electrodo de referencia el electrodo de Ag/AgCl NaCl 3M (0.21 V vs NHE) y como contraelectrodo un alambre de platino. Para la limpieza electroquímica se desea que se genere H_2 (en forma de burbujas), sobre el electrodo de Au. Para ello se sumerge el electrodo de Au dentro de la celda electroquímica con 10 mL de una solución 0.5 M de H_2SO_4 y la solución se desoxigena con nitrógeno gaseoso durante 10 minutos. Enseguida, se realiza una cronoamperometría, donde se mantiene un potencial constante de $-600 \text{ mV vs Ag/AgCl, NaCl 3M}$ durante un tiempo de 60 segundos y se espera a que el potencial de circuito abierto (Open Potential Circuit, OCP) sea positivo para sacar el electrodo de

la solución. El electrodo de Au se enjuaga con agua desionizada y por último se enjuaga con el disolvente de la próxima disolución en la que se vaya a introducir el electrodo.

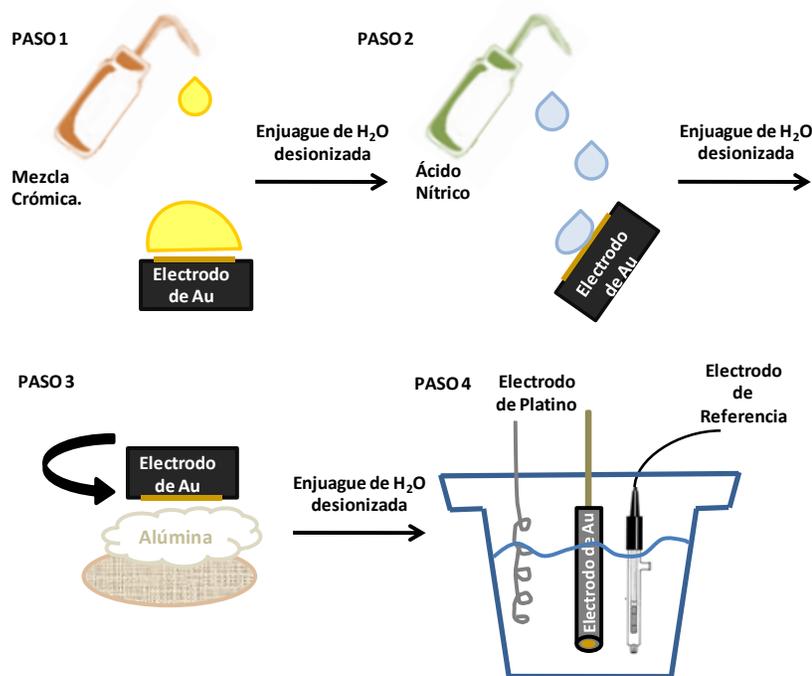


Figura 3.3 Etapas para la limpieza del electrodo de Au.

3.2.2 Área real electroactiva del electrodo de Au

La determinación del área real electroactiva de los electrodos de Au se basó en la formación del AuO en una solución de H_2SO_4 0.5M en agua desionizada. La composición de la solución fue elegida en base a que el comportamiento de la formación de la capa de AuO en estas condiciones ya ha sido reportado [97,98,99] y es posible conocer el intervalo de potencial en el que se debe trabajar para obtener el AuO. La formación del AuO se realizó sobre un electrodo de Au policristalino de 2mm de diámetro, con un área geométrica de 0.0314 cm^2 .

La metodología seguida para la evaluación del área real electroactiva de los diferentes electrodos planos de Au policristalino se describe en los siguientes pasos:

1. Limpiar el electrodo de Au mediante la técnica de limpieza del electrodo descrita en la sección 3.1.1.
2. El electrodo es colocado en una celda electroquímica típica de 3 electrodos, donde el electrodo de referencia es el de Ag/AgCl NaCl 3M (0.21 V vs NHE), el

contraelectrodo es un alambre de platino y el electrodo de trabajo es el de Au. La celda contiene una solución de H_2SO_4 0.5M (10mL) y la solución se desoxigena con nitrógeno gaseoso durante 10 minutos.

3. Se utiliza la técnica de voltamperometría cíclica haciendo un barrido de potencial a una velocidad de 20 mV s^{-1} y empezando en el potencial de circuito abierto de cada electrodo de Au, hacia valores anódicos hasta alcanzar $1.39 \text{ V vs Ag/AgCl NaCl 3M}$. Después se invierte el sentido del barrido hacia valores catódicos hasta $0.29 \text{ V vs Ag/AgCl NaCl 3M}$ y por último, se regresa nuevamente el barrido hacia potenciales anódicos hasta llegar al potencial de circuito abierto.
4. A partir del voltamperograma obtenido, se mide la carga de la formación del AuO.
5. Se realiza el cálculo del área real electroactiva del electrodo de Au siguiendo la ecuación 3.6, que se explica en la sección 3.3.1.

3.2.3 Modificación del electrodo de Au.

La modificación de un electrodo se puede realizar por la inmersión del electrodo en una solución con la molécula que se quiere confinar sobre la superficie permitiendo que se forme una monocapa autoensamblada. Esto también se puede lograr mediante la aplicación de una pequeña cantidad de solución modificadora sobre el electrodo y permitir que se evapore el disolvente. Esta última técnica produce películas con un mayor desorden de las moléculas y menor estabilidad de la modificación. Debido a esto, en el presente trabajo se prefiere modificar los electrodos por la técnica de inmersión, cuya metodología experimental se describe a continuación y es esquematizado en la Figura 3.4:

1. Limpiar el electrodo de Au mediante la técnica de limpieza del electrodo explicada en la sección 3.1.1.
2. Sumergir el electrodo de Au en una solución 1mM de uno de los péptidos con aminoácidos L/D conjugados con Fc en metanol (MeOH) durante al menos 12 horas a temperatura ambiente

3. Se finaliza con un enjuague exhaustivo de agua desionizada y un enjuague del próximo disolvente a utilizar.

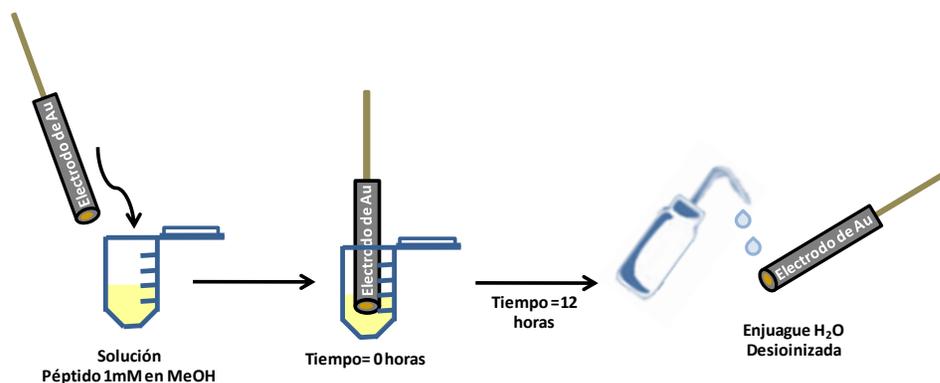


Figura 3.4 Esquema del procedimiento experimental para la modificación del electrodo de Au.

3.2.4 Estudio mediante voltamperometría cíclica de las SAM's de los péptidos

La caracterización electroquímica más básica de una SAM es mediante voltamperometría cíclica. Así, para este estudio, los pasos experimentales son los siguientes:

1. Modificar el electrodo como se describe en la sección 3.2.3.
2. El electrodo de Au modificado funcionará como el electrodo de trabajo en la celda electroquímica con un electrodo de referencia es el de Ag/AgCl NaCl 3M (0.21 V vs NHE) y un contraelectrodo de alambre de platino. Los experimentos se desarrollaron en una solución amortiguadora de fosfatos (pH=7 y $i=0.1$), con un volumen de 10 mL, previamente desoxigenada con nitrógeno durante 10 minutos.

3.2.5 Cálculo del recubrimiento superficial del péptido sobre Au.

Para conocer el número de moles de péptido con aminoácidos L/D alternados conjugados con Fc que se adsorbieron después de la etapa de modificación, se siguieron los siguientes pasos:

1. Se limpió el electrodo como se mencionó en la sección 3.1.1 y se modificó como se describió en la sección 3.2.3
2. El electrodo se introduce en una celda electroquímica con 10 mL de una solución de NaOH 0.5 M, y la solución se desoxigenó con nitrógeno durante 10 minutos.

3. Se utilizó la técnica de voltamperometría cíclica haciendo un barrido de potencial a una velocidad de 25 mV s^{-1} y empezando en el potencial de circuito abierto hacia valores catódicos hasta alcanzar $-1.35 \text{ V vs Ag/AgCl NaCl 3M}$. En seguida se invierte el sentido del barrido hacia valores anódicos hasta $0 \text{ V vs Ag/AgCl NaCl 3M}$ y por último, se invierte el barrido hacia potenciales anódicos hasta llegar nuevamente al potencial de circuito abierto.
4. A partir del voltamperograma obtenido, se mide la carga de la desorción del péptido conjugado con Fc y se calcula el recubrimiento superficial del péptido sobre la superficie de Au, siguiendo la ecuación 3.10, que se explica en la sección 3.3.3.

3.2.6 Caracterización por espectroscopia de impedancia de las SAM's de los péptidos.

La celda electroquímica se mantuvo como anteriormente se describió, con el electrodo de Au o de Au modificado con los péptidos como electrodo de trabajo, un alambre de platino como contraelectrodo y un electrodo de referencia de Ag/AgCl, NaCl 3M (0.21 V vs NHE) y en una solución amortiguadora de fosfatos ($\text{pH}=7$ y $i=0.1$), con un volumen de 10 mL , previamente desoxigenada con nitrógeno durante 10 minutos. Los experimentos de EIS se desarrollaron con un potenciostato-galvanostato IM6 con analizador de frecuencias marca Zhanher-BAS, aplicando un potencial AC igual al potencial termodinámico formal para cada uno de los sistemas estudiados, (E^{θ}), con una amplitud de 10mV y en un intervalo de frecuencias de 100kHz a 50mHz . Se construyó un circuito equivalente (mostrado en la sección de 3.3.9) que fue ajustado computacionalmente a los espectros experimentales mediante el simulador SIM del paquete Thales USB™.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

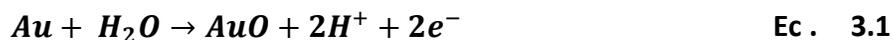
Antes de comenzar todo un estudio de caracterización electroquímica de las SAM's de las estructuras peptídicas conjugadas con Fc y los fragmentos conjugados con Fc, es necesario tener caracterizado el electrodo de Au sobre el que se va a formar la SAM. La caracterización consistió en determinar el área real electroactiva y el factor de rugosidad de cada uno de los 7 electrodos de Au con los que se realizó el estudio.

3.3.1 Cálculo del área real electroactiva y del factor de rugosidad del electrodo de Au.

La mayoría de los parámetros electroquímicos son cantidades extensivas y tienen que estar estandarizados respecto al área interfacial del electrodo, por lo tanto, es importante conocer el área real que estará involucrada en la región interfase-solución. El área superficial geométrica se define como la proyección del área real en un plano macroscópico, y puede ser determinada con herramientas ordinarias diseñadas para medir una longitud visible [100]. Sólo en los líquidos, el área real coincide con el área geométrica, sin embargo, para el caso de los sólidos, el área real suele ser de uno o más órdenes de magnitud mayor al área geométrica, debido a la rugosidad a escala atómica que presenta el material.

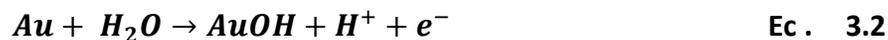
En el caso de electrodos sólidos, diferentes métodos para calcular el área superficial han sido desarrollados, tales como la relación de capacitancias, utilizando el gráfico de Parsons-Zobel [100], en base a la adsorción de hidrógeno a partir de la solución para el caso del electrodo de platino [101], depósito de metales en subpotencial (UPD), como el caso del depósito en subpotencial del Pb sobre Ag [102]. Cuando se trata del oro, un método para determinar su área electroactiva, y de ahí su factor de rugosidad, es la evaluación de la carga en la formación del óxido de Au (AuO) sobre la superficie del electrodo de Au.

La formación del AuO es un proceso global que implica la transferencia de 2 electrones (ecuación 3.1). Sin embargo, el proceso de oxidación consta de 2 pasos, en los que se transfiere un electrón en cada paso [97].



Se ha reportado que la transferencia del primer electrón produce una monocapa de especies OH⁻ sobre la superficie a través de 3 pasos que se resumen en la ecuación 3.12. La formación de la monocapa de AuOH se realiza entre 1.1 V vs NHE y 1.4 vs NHE (~ 0.9 V y 1.2 vs Ag/AgCl, NaCl 3M) en HClO₄ 1mM y 20 mVs⁻¹ e incluye la formación de una subcapa de OH⁻ depositados específicamente entre los aniones adsorbidos del electrolito, seguido por el depósito de OH⁻ acompañados por la desorción de los aniones y simultáneamente la capa se rearregla para

incorporar los OH⁻ en la red cristalina del Au, y se finaliza con el depósito de una tercera capa de iones OH⁻, que completa la monocapa de AuOH.



Mientras que la transferencia del segundo electrón consiste en la transformación de la monocapa de AuOH al AuO, después de 1.4 V vs NHE (~ 1.2V vs Ag/AgCl, NaCl 3M) en HClO₄ 1mM y 20 mVs⁻¹, según la ecuación 3.3.



Angerstein-Kozłowska y col. [103] reportaron una señal principal que empieza en 1.3 V vs NHE (~ 1.1V vs Ag/AgCl, NaCl 3M) durante el barrido catódico que fue asignado a la reducción de la capa de AuOH, donde los OH⁻ se encuentran inmersos en la red de Au (que fue representado como OHM, donde M representa al metal), y que además proponen que dicha reducción se realiza mediante 2 etapas. La primera etapa de reducción de los AuOH es el proceso inverso a la inmersión de los iones OH⁻ en la red de Au, es decir que los OH⁻ que se encuentran en la red de Au migran a la superficie del Au (ecuación 3.4). Dicho proceso es rápido a bajas velocidades de barrido y a temperatura ambiente. La segunda etapa es la reducción electroquímica de los iones expuestos de OH⁻ sobre la superficie de Au, para producir agua sin pasar por la reducción del AuO (ecuación 3.5) .



De lo anteriormente discutido, se puede concluir que durante el barrido anódico se llevan a cabo dos procesos, que en conjunto representan la formación de una monocapa de AuO con intercambio de 2 e⁻, y que la reducción del AuO no es factible realizarla por técnicas electroquímicas. Para obtener el área electroactiva, la carga asociada a la formación del AuO (Q_{AuO}) se compara con una carga registrada para el mismo proceso de oxidación por una unidad de área electroactiva previamente conocida (Q_{AuO}^S) de la siguiente manera

$$A_{real} = \frac{Q_{AuO}}{Q_{AuO}^S}$$

Ec. 3.6

Donde:

A_{real} = Área real electroactiva

Q_{AuO} = Carga asociada a la formación del óxido de Au

Q_{AuO}^S = Carga asociada a la formación del óxido de Au por unidad de área real

electroactiva. Reportada como $200\mu\text{C cm}^{-2}$ [104].

Así, el cálculo del área real electroactiva para los electrodos de trabajo de Au se realizó mediante la evaluación de la carga de la formación del AuO, considerando la corrección de la carga de la doble capa, en una solución de H_2SO_4 0.5 M a $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$, como se muestra en el voltamperograma de la Figura 3.5 para el electrodo Au 2.

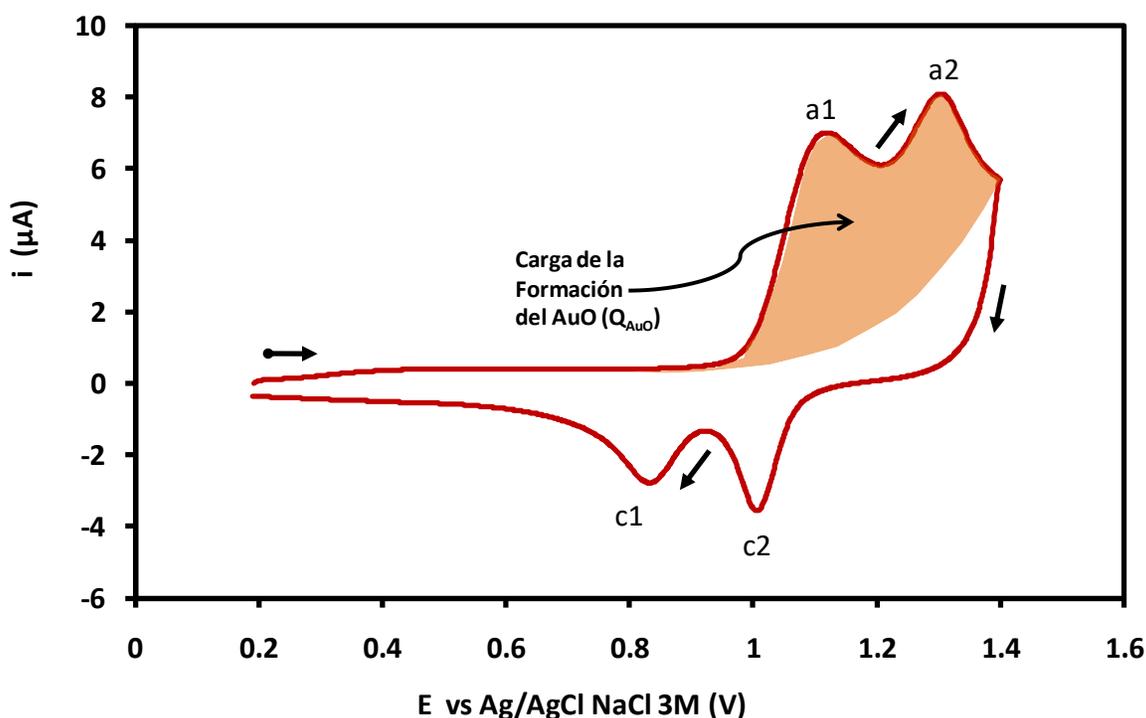


Figura 3.5 Voltamperograma cíclico del electrodo de Au policristalino de $A_{geom} = 0.0314 \text{ cm}^2$ en H_2SO_4 0.5M. $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$. El área sombreada representa la carga para el proceso de formación del AuO.

El proceso de producción de la monocapa de AuOH se observa en la superficie de Au como un traslape de 3 picos anódicos de transferencia de carga parcial en un solo pico denominado a1. La conversión del AuOH a AuO en esta misma solución se manifiesta en el pico anódico a2 de la

Figura 3.5, que se presenta un $E_p=0.850$ V vs Ag/AgCl NaCl 3M y se desarrolla después de 1.2V vs Ag/AgCl, NaCl 3M, concordando con la literatura [103].

En el voltamperograma cíclico de la Figura 3.5 se observan dos procesos catódicos (c1 y c2), que apoyándose en lo reportado por Angerstein-Kozłowska y col. [103], se puede pensar que el proceso c2 se trata del proceso de migración de los iones OH^- que están en la red de Au hasta la superficie del Au (ecuación 3.4). Por otro lado, el pico catódico c1 puede atribuirse a la reducción de los OH^- sobre el Au para producir moléculas de agua (ecuación 3.5). Nótese que ningún pico catódico fue asignado a la reducción del AuO hacia Au-OH u oro metálico, ya que este proceso no se lleva a cabo electroquímicamente.

Para la evaluación de la carga se toma el área bajo la curva de ambos picos anódicos, que representan el proceso total de formación del AuO, tomando en consideración la corrección de la carga de la doble capa, como lo muestra el voltamperograma de la Figura 3.5.

Entonces, para el electrodo Au2 se calculó una carga de formación de AuO=82.97 μC , así el área real electroactiva de este electrodo es:

$$A_{real} = \frac{Q_{AuO}}{Q_{AuO}^S} = \frac{82.97 \mu\text{C}}{200 \mu\text{C cm}^{-2}} = 0.415 \text{cm}^2$$

Dado que el factor de rugosidad (f) se define como:

$$f = \frac{A_{real}}{A_{geom}} \quad \text{Ec. 3.7}$$

Donde:

f = Factor de rugosidad.

A_{real} = Área real electroactiva del electrodo.

A_{geom} = Área geométrica del electrodo.

Y como el área geométrica de los electrodos de Au es igual a 0.0314 cm^2 , el factor de rugosidad para el electrodo 2 es:

$$f = \frac{A_{real}}{A_{geom}} = \frac{0.415 \text{cm}^2}{0.0314 \text{cm}^2} = 13.21$$

El área real electroactiva del electrodo plano de Au representa 13.21 veces al área geométrica. Este factor de rugosidad es debido a todas aquellas irregularidades que se presentan

en la superficie del material y que no pueden ser detectadas por el ojo humano debido a su magnitud.

Los resultados de la carga de la formación del AuO, el área real electroactiva y el factor de rugosidad para los 7 electrodos con los que se cuentan para realizar experimentación, son mostrados en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6 Cargas del proceso de formación de la monocapa de AuO, valores de áreas reales electroactivas y factores de rugosidad para los electrodos.

Número de Electrodo	Carga de AuO (μC)	Área electroactiva (cm^2)	Factor de rugosidad
Au 1	106.42	0.53	16.85
Au 2	82.97	0.41	13.21
Au 3	79.43	0.40	12.65
Au 4	90.93	0.45	14.48
Au 5	90.99	0.45	14.49
Au 6	98.30	0.49	15.65
Au 7	107.58	0.54	17.13

3.3.2 Estructura de las SAM's.

Una de las ventajas más importantes de las SAM'S es que el procedimiento de preparación en el laboratorio es muy simple. La forma más común de producir una SAM es sumergir el sustrato en una solución muy diluida del compuesto que se va a quimisorber por un tiempo específico, seguido por el enjuague del sustrato y el secado. La concentración de la solución y el tiempo de modificación no deberán ser excesivamente grandes, por ejemplo, mayor a 1mM y 6 días, respectivamente, ya que resultará en la formación de multicapas o agregados sobre la superficie del electrodo, más que una monocapa [105].

La metodología experimental que se siguió para la modificación del electrodo es descrita en la sección 3.1.3. La modificación del electrodo para la formación de una monocapa autoensamblada se llevó a cabo mediante la generación del enlace covalente Au-S utilizando el átomo de S en el grupo sustituyente de la Cisteína(s) en los péptidos con aminoácidos L/D alternados conjugados con Fc.

En el estudio de la formación de las SAM's de los 3 péptidos que se sintetizaron previamente se esperan 2 tipos de conformaciones como lo muestra la Figura 3.6, la (A) para los péptidos {2} y {3} y B) para el péptido {1}. Debido a que los péptidos {2} y {3} tienen un residuo de cisteína en uno de los extremos del péptido, es de esperarse que por ese extremo se adsorba químicamente con un enlace covalente al Au, exponiendo al Fc hacia el otro extremo de la capa modificadora (Figura 3.6 (A)). Por otro lado, el péptido {1} que contiene 2 residuos de cisteína, uno en cada extremo de la cadena del péptido, puede conducir a un probable anclamiento por adsorción química de ambos extremos del péptido a la superficie de Au, exhibiendo el grupo redox Fc en el centro del péptido (Figura 3.6 (B)), para su posterior interacción con una solución electrolítica.

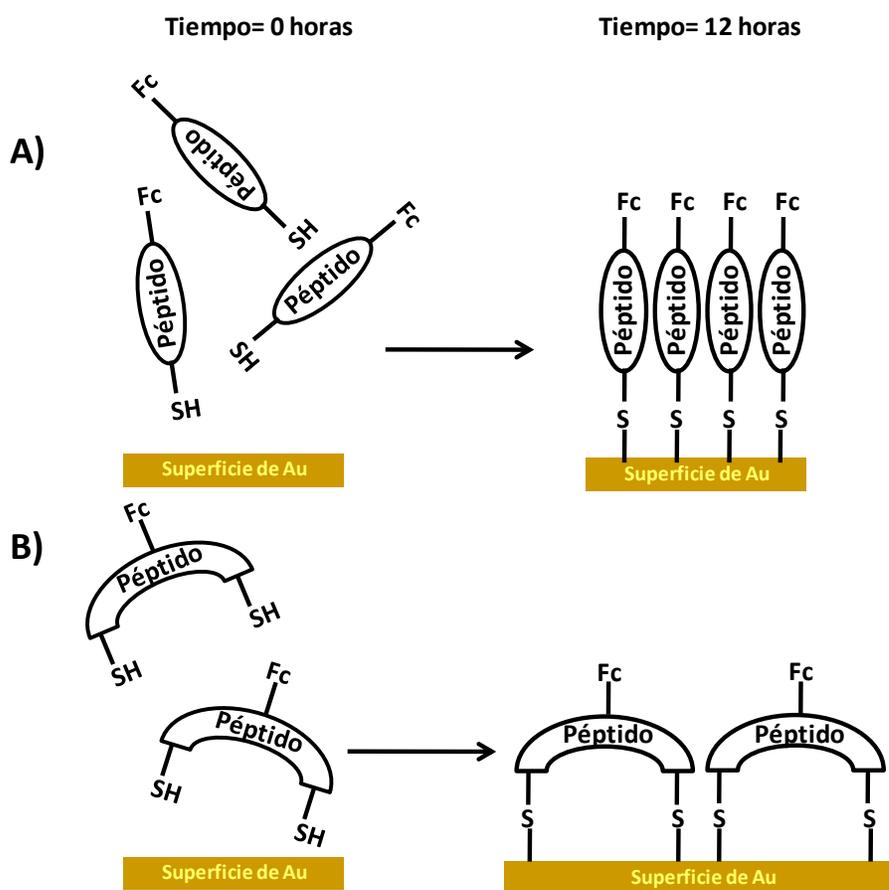


Figura 3.6 Representación de la formación de la plataforma de modificación para (A) los péptidos {2} y {3} y (B) el péptido {1}

3.3.3 Cálculo del recubrimiento superficial en las SAM's

La determinación del recubrimiento superficial de algunas SAM's formadas por quimisorción de compuestos tiolados con y sin moléculas de Fc enlazadas a la cadena tiolada sobre electrodos de Au fue reportado por M.M. Walczak y col. [106]. Este método está basado en la medición voltamperométrica de la carga en la desorción electroquímica de la película de tiol enlazada covalentemente al Au. La desorción electroquímica es un proceso reductivo con el intercambio de 1 electrón que se lleva a cabo en una solución alcalina (pH>11) y se describe por la ecuación 3.8.



La carga se relaciona con el recubrimiento superficial molar (Γ), mediante la ecuación 3.10 [107].

$$\Gamma_{monocapa} = \frac{Q_{monocapa}}{nFA_{real}} \quad \text{Ec. 3.9}$$

Donde:

$\Gamma_{monocapa}$ = Recubrimiento superficial molar de la monocapa tiolada en mol cm⁻².

$Q_{monocapa}$ =Carga de la desorción electroquímica de la monocapa tiolada

n = Electrones transferidos.

F = Constante de Faraday = 96 485 C mol⁻¹.

A_{real} = Área real del electrodo.

Además, se sabe que el área real se define como el área geométrica por el factor de rugosidad como se puede deducir de la ecuación 3.7. En la Figura 3.7 se muestra una representación del fenómeno de desorción electroquímica para los péptidos conjugados con Fc.

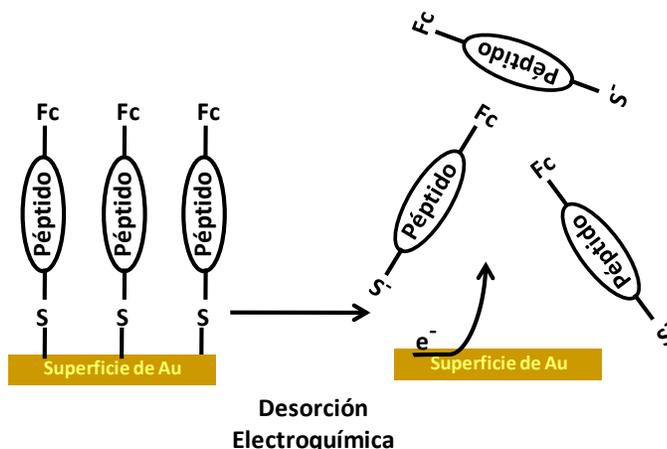


Figura 3.7 Esquema del proceso de desorción electroquímica de los péptidos que formaron la SAM.

Así, para conocer los recubrimientos superficiales que se obtienen para cada uno de los péptidos, se evaluó la carga de la desorción electroquímica en una solución de NaOH 0.5M. En la Figura 3.8 se presentan en la curva (A) el voltamperograma cíclico para el proceso de desorción electroquímica del péptido {1}. El proceso de reducción y rompimiento del enlace Au-S comienza en -0.85 V vs Ag/AgCl, NaCl 3M, y finaliza alrededor de -1.1 V vs Ag/AgCl, NaCl 3M, seguido por la descomposición del medio. En la curva (B) de la misma Figura 3.8 se muestra la respuesta voltamperométrica de un electrodo de Au sin modificar en la solución alcalina (NaOH 0.5M). La señal de la curva (A) entre -0.85 y -1.1 V vs Ag/AgCl 3M no se presenta en la curva (B), asegurándose que la señal es característica de la película modificadora.

La carga para la desorción reductiva es utilizada en la ecuación 3.10 para el cálculo del recubrimiento superficial molar de los péptidos.

$$\Gamma_{Péptido} = \frac{Q_{Péptido}}{nFfA_{geom}} \quad \text{Ec. 3.10}$$

Donde:

n y F tienen su significado habitual

$\Gamma_{Péptido}$ = Recubrimiento superficial molar del péptido en mol cm⁻².

$Q_{Péptido}$ =Carga de la desorción electroquímica del péptido obtenido del voltamperograma.

f = Factor de rugosidad del electrodo de Au.

A_{geom} = Área geométrica del electrodo de Au = 0.0314 cm².

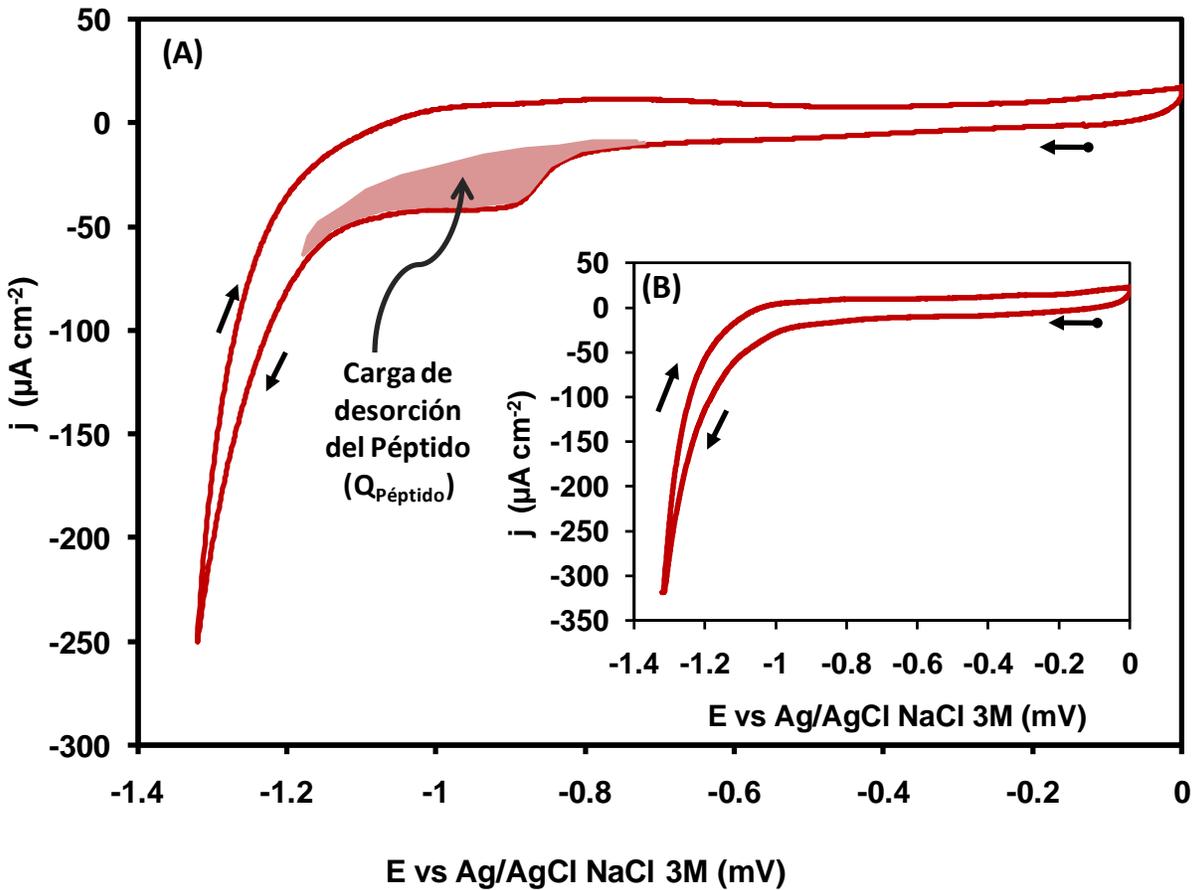


Figura 3.8 Voltamperograma cíclico (A) de la desorción electroquímica de los péptidos que formaron la SAM, (B) del electrodo de Au sin péptidos adsorbidos. (A) y (B) en NaOH 0.5M, $v=25 \text{ mV s}^{-1}$.

Los recubrimientos superficiales ($\Gamma_{\text{péptido}}$) para cada uno de los péptidos que se obtuvieron se encuentran resumidos en la Tabla 3.7

Tabla 3.7 Recubrimientos superficiales molares.

Péptido	$\Gamma_{\text{Péptido}}$ (mol cm^{-2})
Péptido {1}	1.844×10^{-10}
Péptido {2}	1.910×10^{-10}
Péptido {3}	1.076×10^{-10}

Se analizaron los valores de $\Gamma_{\text{péptido}}$ calculados anteriormente para proponer la distribución superficial de los péptidos sobre el Au (que, además, justifica el comportamiento voltamperométrico observado, como se presenta en secciones posteriores). Es posible observar que los péptidos {1} y {2} presentan valores similares, indicando que el péptido {1} se fija al electrodo a través de un solo enlace Au-S y no con dos enlaces, como se estaba contemplando originalmente, ya que se esperaba que el recubrimiento molar superficial del péptido {1} fuera menor que el del péptido {2} y {3}. Esto sería debido a que se esperaba que el péptido {1} ocupará una mayor área transversal sobre el sustrato de Au, reduciendo el número de enlaces Au-S presentes. Sin embargo, los valores de los recubrimientos de los péptidos {1} y {2} son de casi el doble que el valor de recubrimiento del péptido {3}, indicando que los dos primeros péptidos se enlazan de manera perpendicular a la superficie del electrodo. Mientras que el péptido {3} tiene un acomodo paralelo al electrodo, y se espera que se favorezca la transferencia electrónica al disminuir la distancia entre el ferroceno y el sustrato metálico. Es posible deducir que la doble interacción Au-S esperada para el caso del sistema Au/{1} fue termodinámicamente poco favorecida, como lo observó Blanchard y col. [108] cuando estudiaron la formación de SAMs de ditiolos con cadenas hidrocarbonadas de 6, 8 y 9 carbonos concluyendo que no existe evidencia de que estos ditiolos se adhirieran por ambos S a la superficie de Au.

El anclaje de los péptidos {2} y {3} solamente se pueden llevar a cabo con el único grupo tiol que poseen. Por otro lado, se considera que el péptido {1} se adhiere al Au con un enlace Au-S y no con los 2 tioles que tiene disponibles, es de esperarse que los sustratos de Au tengan afinidad predominante por los grupos -SH terminales en las región con carácter hidrofóbico debido a que la solución amortiguadora de fosfatos, que sirve como electrolito soporte, es de carácter hidrofílico, lo que conduciría a los grupos hidrofóbicos del péptido {1} hacia la superficie del electrodo, evitando en la interacción con el electrolito soporte. La Figura 3.9 muestra un esquema de la posible disposición de los péptidos al formar la SAM en el sustrato de Au.

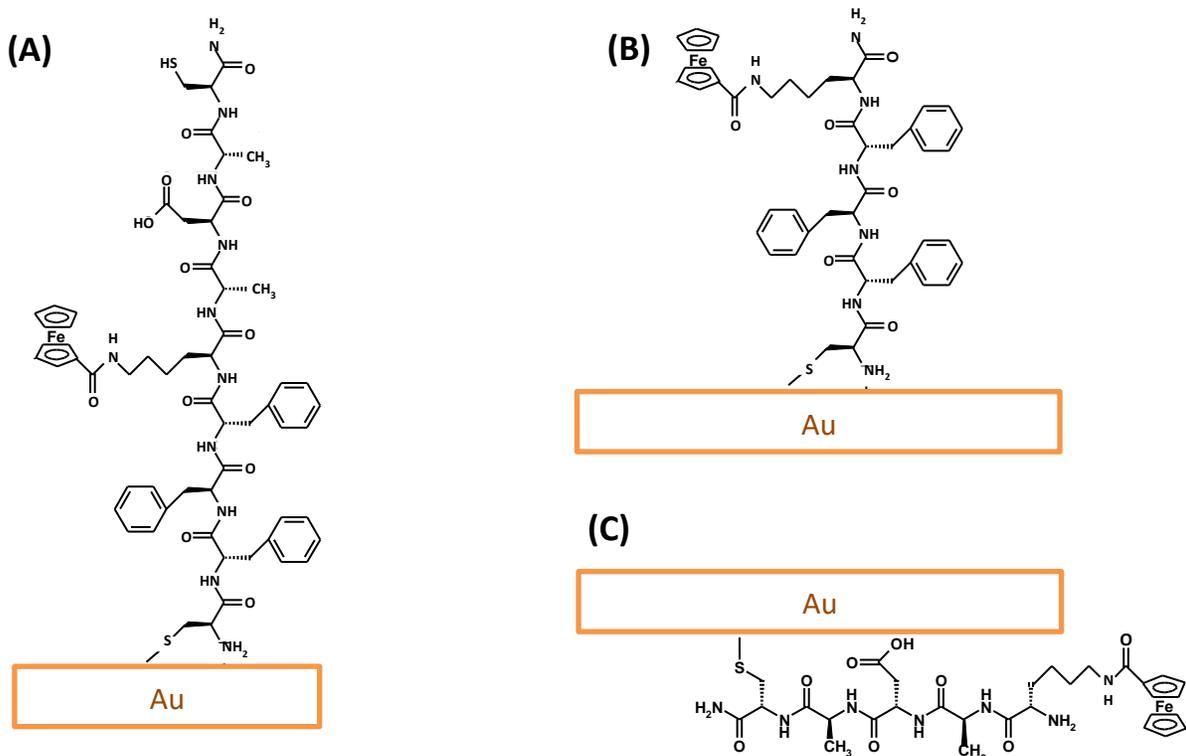


Figura 3.9 Disposición superficial propuesta para los péptidos (A) {1} (B) {2} y (C) {3} sobre los electrodos de Au.

3.3.4 Estudio previo del comportamiento del ferroceno en solución

Con el objetivo de conocer los valores de potencial aproximado en los que el ferroceno conjugado de los péptidos sintetizados y utilizados para formar la SAM brinda las señales de óxido-reducción, se comenzó por obtener el voltamperograma para FcCOOH 0.5mM disuelto en buffer de fosfatos (I=0.1), presentado en la Figura 3.10. El experimento fue realizado por triplicado con diferentes electrodos de oro. En este caso, el FcCOOH presentó un pico de oxidación en $E_{pa}=0.349 \pm 0.007$ V vs Ag/AgCl, KCl 3M; mientras que la señal de reducción se observó en $E_{pc}=0.298 \pm 0.008$ V vs Ag/AgCl, KCl 3M. El cálculo de ΔE_p arroja un valor de 51 mV que es menor a los 60 mV que se esperan para un compuesto redox reversible en solución, donde sólo se presenta difusión como mecanismo de transporte de masa. Los picos de corriente anódica y catódica fueron de $793.3 \pm 9.2 \mu\text{Acm}^{-2}$ y $-548.8 \pm 3.19\mu\text{Acm}^{-2}$, respectivamente. Los valores reportados en esta sección corresponden al segundo barrido de potencial.

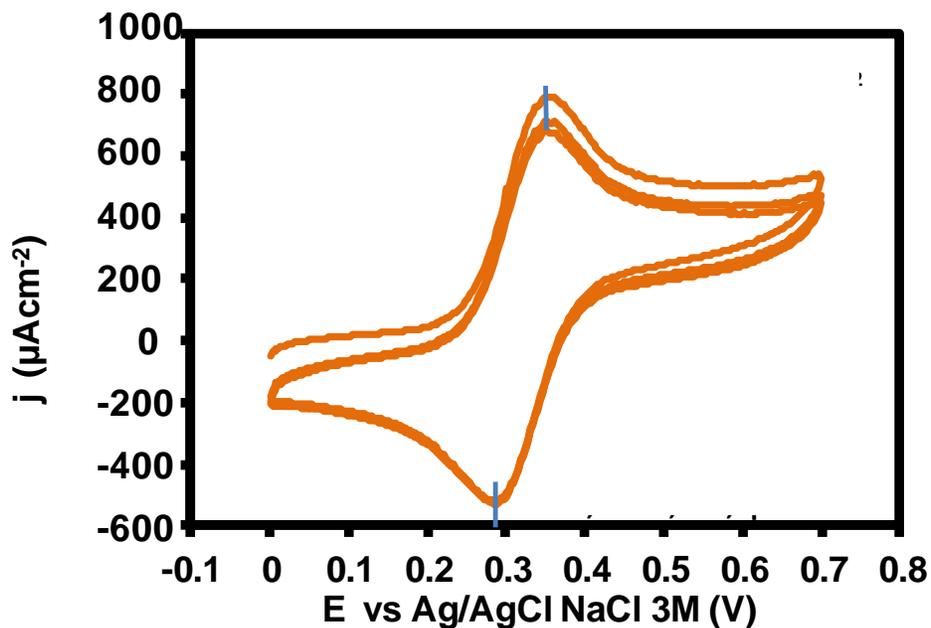


Figura 3.10 Voltamperograma cíclico de 3 barridos de potencial para FcCOOH en buffer de fosfatos ($I=0.1$) a 50 mV s^{-1} sobre electrodo de Au.

3.3.5 Comportamiento electroquímico del Péptido conjugado con ferroceno en solución

Además de que ya se ha observado que el ferroceno en solución de buffer de fosfatos presenta su potencial de pico anódico en $0.349 \text{ V vs Ag/AgCl, KCl 3M}$ y el catódico en $0.298 \text{ V vs Ag/AgCl, KCl 3M}$, se realizó un experimento de voltamperometría cíclica que involucra al péptido {1} en solución de buffer de fosfatos ($I=0.1\text{M}$) con una concentración del péptido 0.5mM . La Figura 3.11 muestra el comportamiento voltamperométrico de uno de los péptidos conjugados con ferroceno en solución de buffer de fosfatos (péptido {1}). El péptido {1} revela potenciales de pico $E_{pa}=0.435 \pm 0.009 \text{ V vs Ag/AgCl, KCl 3M}$ y $E_{pc}=0.410 \pm 0.012 \text{ V vs Ag/AgCl, KCl 3M}$, con una diferencia de potencial (ΔE_p) de 25 mV , que comparándolo con ΔE_p del FcCOOH (51mV), es posible observar una disminución del ΔE_p , que se le puede atribuir a la adsorción química del péptido mediante un enlace Au-S durante el barrido.

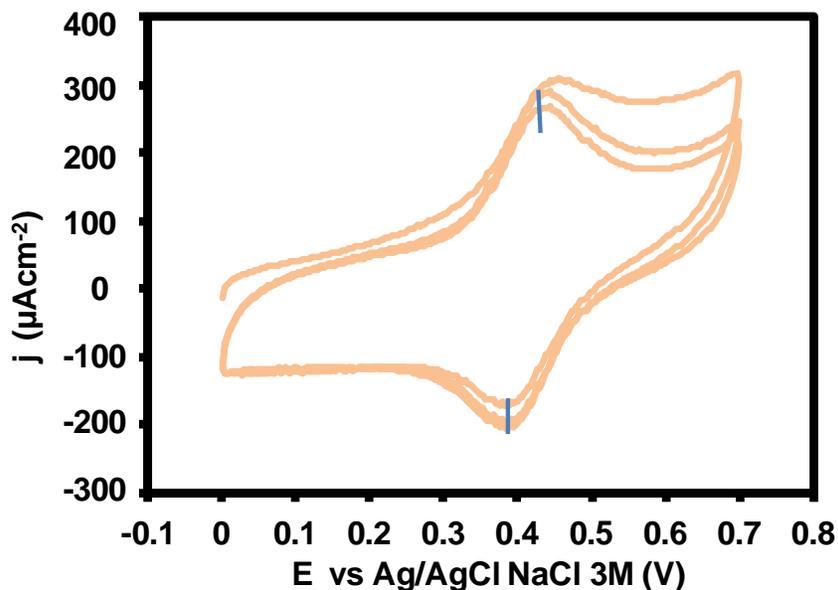


Figura 3.11 Voltamperograma cíclico de 3 barridos de potencial para péptido {1} en solución de buffer de fosfatos ($I=0.1$) a 50 mV s^{-1} sobre electrodo de Au.

Con lo anteriormente expuesto es de esperarse que la señal del ferroceno en el péptido enlazado a la superficie de Au se encuentre en valores cercanos a $0.435 \text{ V vs Ag/AgCl, KCl 3M}$ para la señal de oxidación y $0.410 \text{ V vs Ag/AgCl, KCl 3M}$ para la señal de reducción cuando se trabaja en el mismo medio de buffer de fosfatos ($I=0.1$), esperando una disminución de la intensidad de corriente eléctrica en ambas señales debido al descenso del número de ferrocenos presentes en un monocapa a comparación del número de ferrocenos presente en una solución que llegan a la superficie del electrodo para sufrir la reacción redox.

3.3.6 Comportamiento electroquímico del Péptido conjugado con ferroceno como monocapa sobre Au

Para comprobar la adsorción de los péptidos con Fc sobre la superficie del Au se realiza un estudio con voltamperometría cíclica para los 3 péptidos sintetizados, en una solución de buffer de fosfatos ($I=0.1$). Los voltamperogramas cíclicos de las SAM's de los 3 péptidos sintetizados

realizados en un medio de buffer de fosfatos ($I=0.1M$) y a una velocidad de barrido de 100 mVs^{-1} son mostrados en la Figura 3.12.

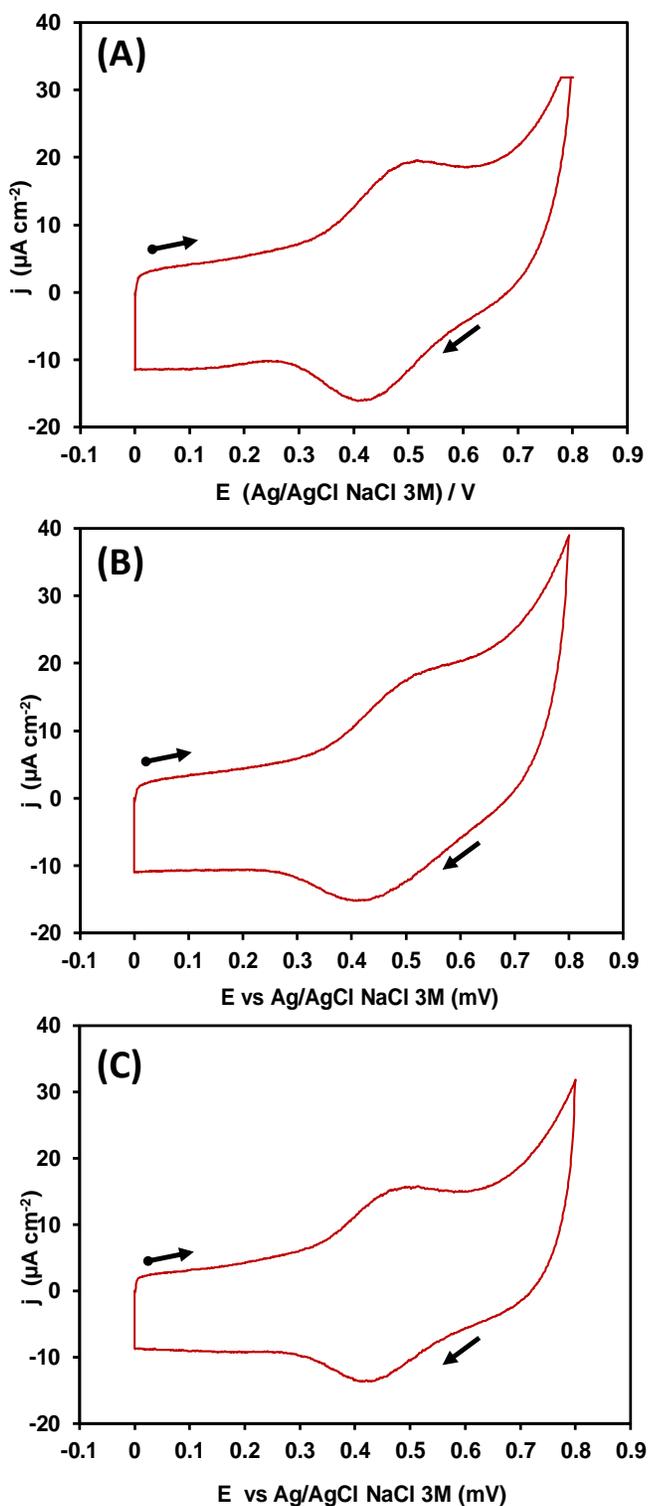


Figura 3.12 Voltamperogramas cíclicos de los péptidos (A) {1}, (B) {2} y (C) {3} adsorbidos sobre Au en un medio buffer de fosfatos ($I=0.1$) y una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} .

Las señales atribuidas al par redox ferroceno(Fc)/ferrocinio (Fc⁺) enlazado al péptido que conforma la SAM sobre la superficie de Au se encuentran alrededor 0.455 V vs Ag/AgCl, NaCl 3M y corresponde a la reacción de la ecuación 3.11.



En la Tabla 3.8 se resumen los valores de potencial formal, potencial de pico anódico, potencial de pico catódico y la diferencia de potenciales de pico obtenidos de los voltamperogramas de la Figura 3.12, para los 3 péptidos, descritos como un promedio de 3 repeticiones del mismo experimento.

Tabla 3.8 Potenciales característicos para los 3 péptidos con aminoácidos L/D alternados, conjugados con Fc, determinados por VC.

Péptido	E _f (V) vs Ag/AgCl, NaCl 3M	E _{pa} (V) vs Ag/AgCl, NaCl 3M	E _{pc} (V) vs Ag/AgCl, NaCl 3M	ΔE _p (V) vs Ag/AgCl, NaCl 3M
Péptido {1}	0.457	0.485 ± 0.17	0.428 ± 0.012	0.057
Péptido {2}	0.454	0.491 ± 0.016	0.418 ± 0.015	0.073
Péptido {3}	0.450	0.463 ± 0.008	0.437 ± 0.011	0.026

En los voltamperogramas de la Figura 3.12 se observan diferencias en el comportamiento electroquímico entre los 3 péptidos. A pesar de que las corrientes capacitivas para los 3 péptidos son muy similares, el péptido {1} y el péptido {3} tienen las señales de oxidación y reducción bien definidas. Sin embargo, la señal de Fc/Fc⁺ para el péptido {2} es menos clara, indicando que la transferencia electrónica entre el Fc y el sustrato de Au a través del péptido {2} es más difícil que en los péptidos {1} y {3}. Además, el péptido {2} presenta un comportamiento menos reversible que los péptidos {1} y {3}, ya que su ΔE_p (73mV) es considerablemente mayor a ΔE_p ideal. Sin embargo, el E_f de 0.454 V es del mismo orden que para los péptidos {1} y {3}.

Considerando la naturaleza química de todos los péptidos, se puede decir que el péptido {2} tiene una secuencia de aminoácidos hidrofóbica debido a la naturaleza no polar de los grupos bencílicos de la cadena lateral de las tres fenilalaninas presentes. Por otro lado, el péptido {3}

tiene un residuo de ácido aspártico que bajo las condiciones de pH en las que se está trabajando, debe estar cargado negativamente (el pKa del -COOH en la cadena lateral para el ácido aspártico puro es 3.65 [109]), lo que le confiere un carácter hidrofílico. Además, el péptido {1} tiene secuencias de aminoácidos de tal manera, que del lado del amino terminal es hidrofóbico y del lado del carboxilo terminal (que se encuentra como una amida) es hidrofílico.

La diferencia en la estructura de los péptidos, sugiere que las fenilalaninas del péptido {2} podrían ocultar al ferroceno (que también posee un carácter hidrofóbico) del seno de la solución acuosa, no favoreciendo el acceso de los contraiones de la solución al ferroceno para que se lleve a cabo la transferencia electrónica y se mantenga la electroneutralidad. Un valor de un ΔE_p mayor puede indicar el proceso de obstrucción de los contraiones.

Por otra parte, el péptido {3} muestra una respuesta que tiende al comportamiento de una molécula adsorbida de manera ideal con un ΔE_p que tiende a 26 mV. Esto puede significar que la secuencia de aminoácidos con carácter hidrofílico no oculta al ferroceno y favorece el acceso de los contraiones de la solución aumentando la velocidad de la transferencia electrónica. El ΔE_p para el péptido {1} es intermedio a los correspondientes a los péptidos {2} y {3}, debido a la presencia de las secuencias, tanto hidrofílica, como hidrofóbica.

3.3.7 Estudio a diferentes velocidades de barrido.

La respuesta voltamperométrica de un par redox adherido a la superficie del electrodo es diferente a aquella correspondiente al mismo par redox en solución. Para una especie redox confinada en la superficie del electrodo, la diferencia entre el E_{pa} y E_{pc} es cero cuando se considera completamente reversible ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 0$). Mientras que, para la transferencia de un electrón en un proceso difusivo, la $\Delta E_p \approx 60$ mV [107]. Debido a que la especie redox se mantiene en un mismo lugar (de manera ideal), la difusión de esta especie no debe tener ninguna contribución durante la reacción electroquímica. Por lo tanto, para una especie inmovilizada en el electrodo, la i_p depende de forma lineal de la velocidad de barrido (i vs v) [110]. Por otro lado, para un proceso difusivo de una especie redox en solución, la i_p es una función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (i vs $v^{1/2}$), como lo describe la ecuación de Randles-Sevcik [93].

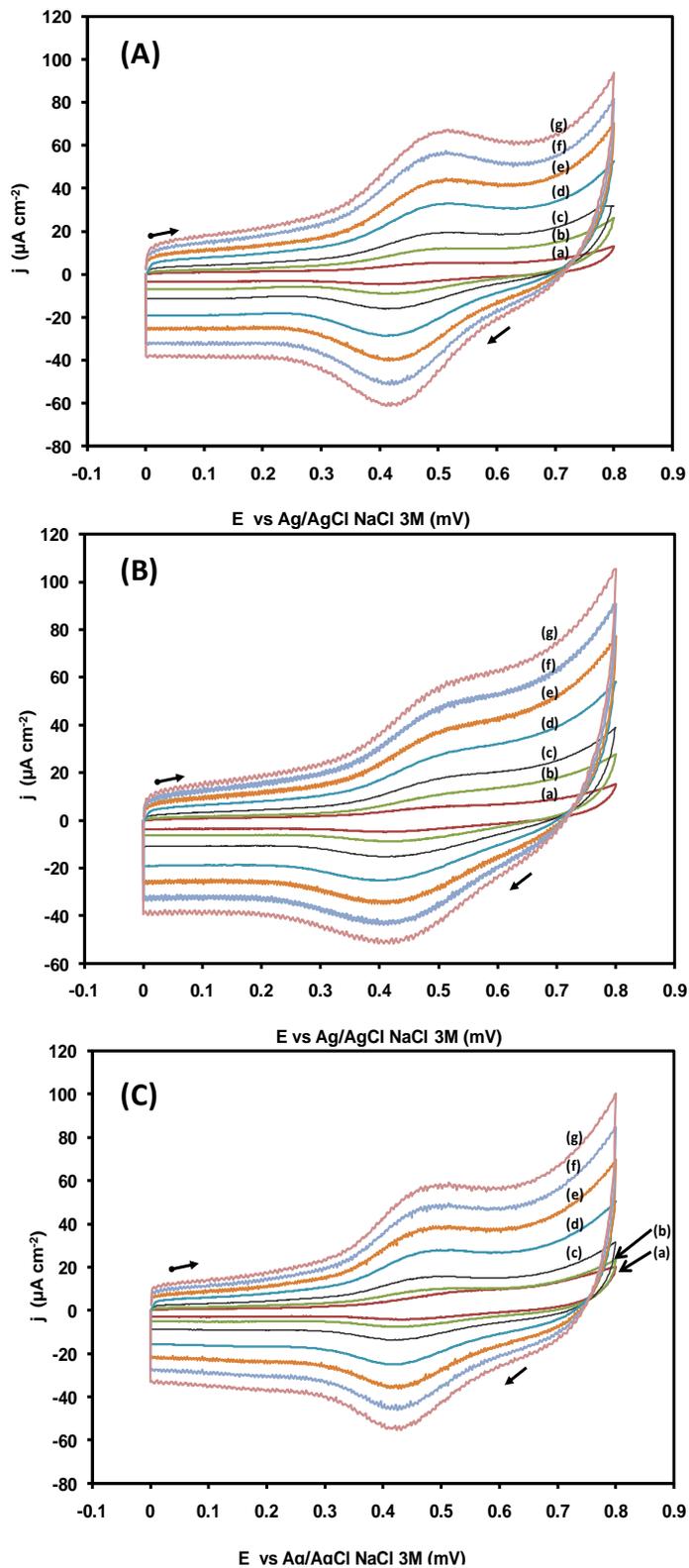


Figura 3.13 Voltamperogramas cíclicos a varias velocidades de barrido de los péptidos (A) {1}, (B) {2} y (C) {3}, en buffer de fosfatos ($I=0.1$) (a)25, (b)50, (c)100, (d)200, (e)300, (f)400 y (g)500 mV s^{-1} .

Los voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido para los 3 péptidos sintetizados son mostrados en la Figura 3.13. Analizando los voltamperogramas es posible observar que los i_{pa} y i_{pc} aumenta conforme aumenta la velocidad de barrido y para verificar que tipo de comportamiento que presentan los 3 péptidos, se graficaron i_p vs v , i_p vs $v^{1/2}$ y $\log i_p$ vs $\log v$ para los 3 péptidos. En la Figura 3.14 se presentan las 3 gráficas mencionadas anteriormente para el péptido {3}, que posee el comportamiento más ideal de los 3 péptidos. Comparando las curvas y sus ajustes a la linealidad en (A) y (B), se deduce que un mejor ajuste a una línea recta se presenta en la gráfica de i_p vs v , verificándose la naturaleza de una sonda redox anclada en el electrodo. La pendiente de la rama anódica es 0.8 y la de la rama catódica es 1.1, confirmándose que se tiene una molécula adsorbida. Dado que dos gráficas confirman que el proceso redox en el péptido {3} no está limitado por la difusión de las moléculas de electrolito que forman los pares iónicos, es otro indicio de que el péptido {3} descansa paralelamente sobre el electrodo de Au y no forma una monocapa gruesa que dificulte el contacto entre el electrolito y la sonda redox, reforzando la teoría mostrada en la Figura 3.9.

Los péptidos {1} y {2} presentan un mejor ajuste en una gráfica i_p vs $v^{1/2}$ (gráficas no presentadas) indicando un comportamiento de tipo difusivo, aunque las pendientes de ambas ramas en la gráfica $\log i_p$ vs $\log v$ son mayores a 1.0, que indica una especie adsorbida sobre el electrodo regida por el proceso de difusión de otra especie química, como el electrolito. Este proceso redox limitado por la difusión de las moléculas de electrolito soporte constituye una prueba de que las SAMs de los péptidos {2} y {3} dificultan el acercamiento del electrolito al estar dispuestas en forma perpendicular a la superficie de Au, como se había mencionado anteriormente.

Se ha reportado en la literatura, que un incremento en los ΔE_p con respecto a la velocidad de barrido puede ser debido a la resistencia que se presenta dentro de la SAM [110]. Al graficar el ΔE_p vs v , para los 3 péptidos (Figura 3.15), se observa que no existe un incremento del ΔE_p conforme aumenta la v , indicando que no existe una resistencia significativa en las SAM's de los péptidos con aminoácidos L/D alternados conjugados con Fc.

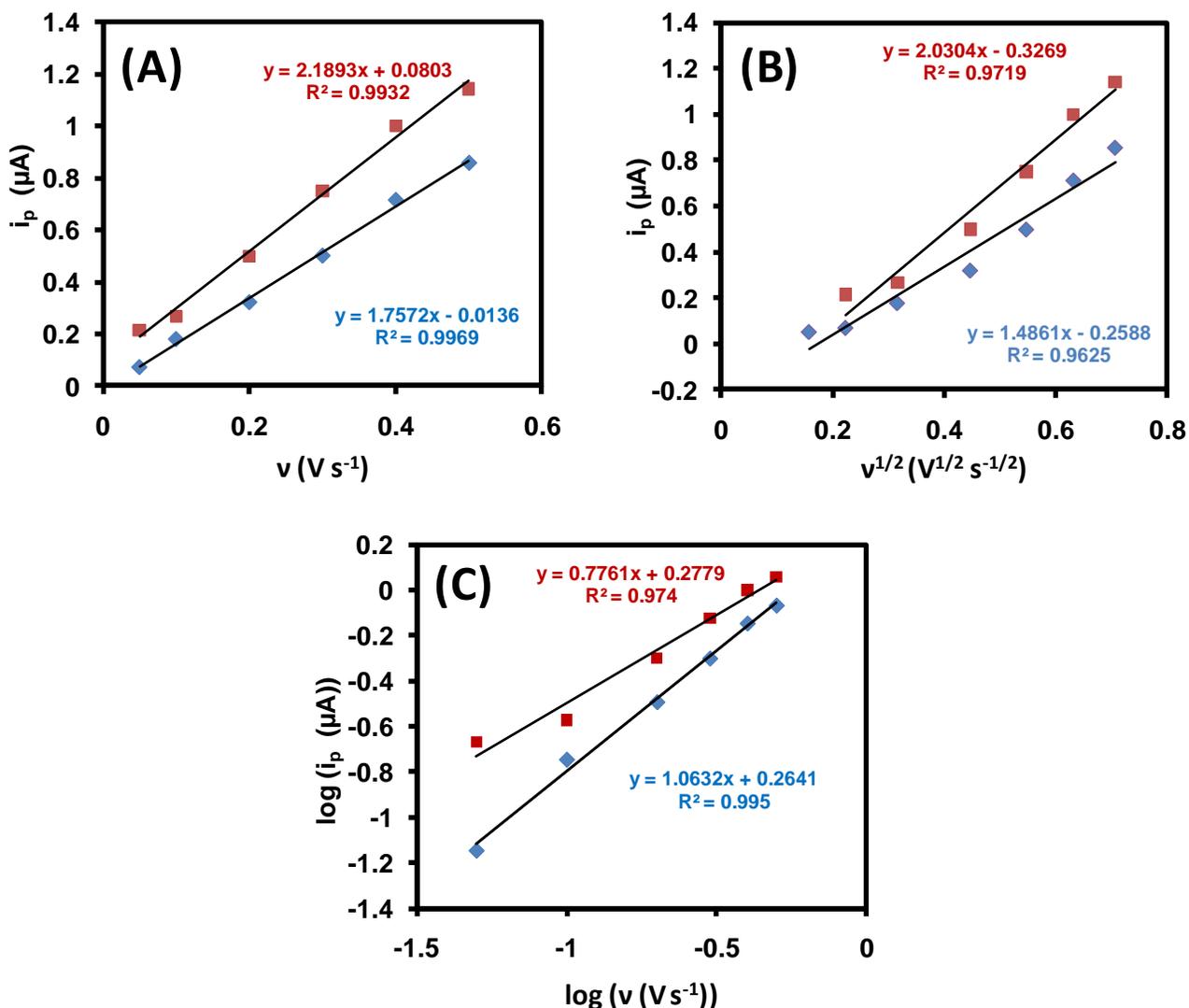


Figura 3.14 Variación de i_{pa} y i_{pc} en función de (A) v (B) $v^{1/2}$ y (C) variación de $\log(i_{pa})$ y $\log(i_{pc})$ en función de $\log v$. Para el péptido {3}. Anódico (\blacksquare) y catódico(\blacklozenge).

Cabe señalar, que una baja resistencia se le puede atribuir a la baja cantidad de moléculas de los péptidos adsorbidos por unidad de área superficial del Au y no necesariamente está relacionado con una SAM altamente ordenada. Hasta aquí, solamente se tiene un análisis cualitativo de lo que sucede en las SAMs. Para un entendimiento más profundo, se evaluarán los valores de resistencia a la transferencia de carga en las monocapas, así como otros parámetros fisicoquímicos mediante espectroscopía de impedancia electroquímica presentada en la siguiente sección.

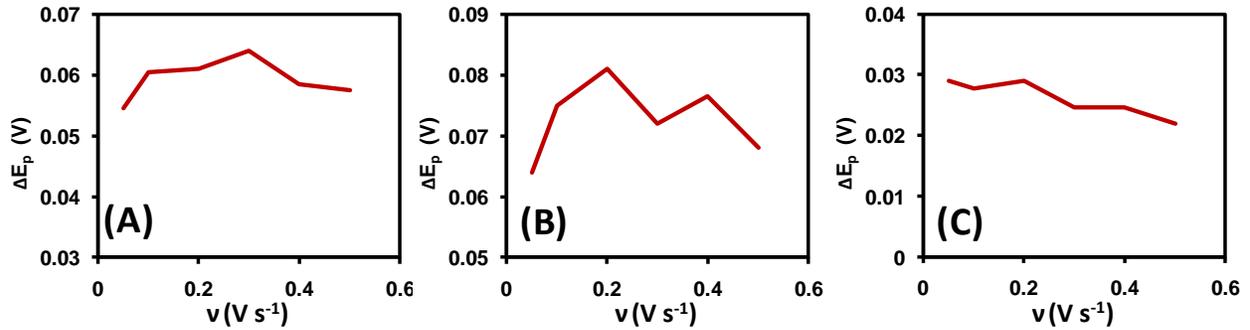


Figura 3.15 Variación de ΔE_p en función de v para los péptidos (A) {1} (B) {2} y (C) {3}.

3.3.8 Estudio por espectroscopía de impedancia electroquímica de las SAM's

En años recientes, la espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS, Electrochemical Impedance Spectroscopy) ha tenido aplicación en la caracterización de materiales, como electrodos modificados[111], baterías[112] y fenómenos de corrosión[113], entre otros. La EIS está basada en la perturbación de un sistema en equilibrio por potencial de corriente alterna (AC, alternating current) de una pequeña amplitud, típicamente entre 5 mV y 10mV (Figura 3.16), induciendo una corriente alterna que puede ser relacionada con la impedancia del sistema [93,94]. Entre otras ventajas, la EIS puede medir las propiedades del sistema en estado estacionario y permite obtener en un solo experimento información sobre los procesos que se desarrollan en diferentes ventanas de tiempo [114].

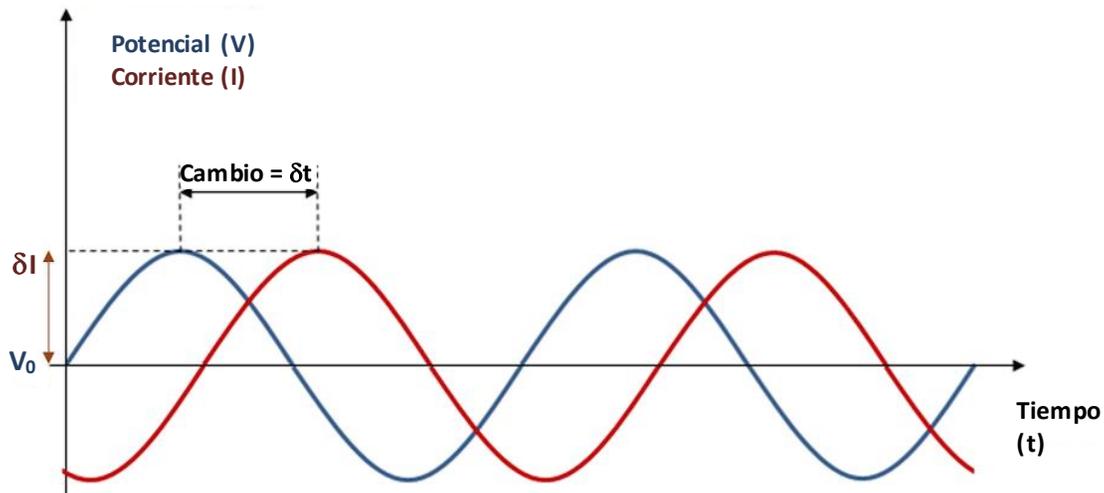


Figura 3.16 Señal de perturbación oscilatoria de potencial eléctrico que al aplicarlo al sistema en estudio proporciona una respuesta de corriente también oscilatoria pero desfasada con respecto al tiempo [115].

La EIS ha sido empleada para calcular parámetros electroquímicos de SAM's, la mayoría de estos estudios se han realizado para películas no electroactivas con diversos grupos funcionales en la molécula modificadora y unidos a electrodos de Au por los enlaces Au-S de un grupo tiol terminal [116 - 118]. En un electrodo modificado, una monocapa puede ser tratada como un resistor (R_{CT}) y un capacitor en paralelo (C_D), y la resistencia en la solución es representada por un resistor (R_s) [119]. Si el estudio de impedancia se realiza con una monocapa no electroactiva y la especie redox está en solución, la impedancia de Warburg (W) a bajas frecuencias describe la difusión del par redox hacia y desde la superficie del electrodo [119].

Aunque pocos, existen estudios mediante EIS sobre SAM's electroactivas, un ejemplo es el análisis de capas de ferrocenilcarboniloxi dodecanotiol en conjunto con moléculas de dodecanotiol que funciona como diluyente en la SAM sobre el Au [120]. En el caso particular de biomoléculas como capas modificadoras, la EIS ha sido utilizada para documentar la actividad de transporte de una SAM conformada por nanotubos de péptidos sobre Au mediante el monitoreo de la capacitancia de las SAMs [121].

En este trabajo, se construyó el circuito equivalente mostrado en la Figura 3.17 y fue ajustado computacionalmente a los espectros experimentales (Figura 3.18) mediante el simulador *SIM* del paquete Thales v.Z1.19 USB. Todos los parámetros ajustados fueron normalizados apropiadamente al área electroactiva (A_e) de los electrodos de oro considerando sus factores de rugosidad, y son reunidos en la Tabla 3.9.

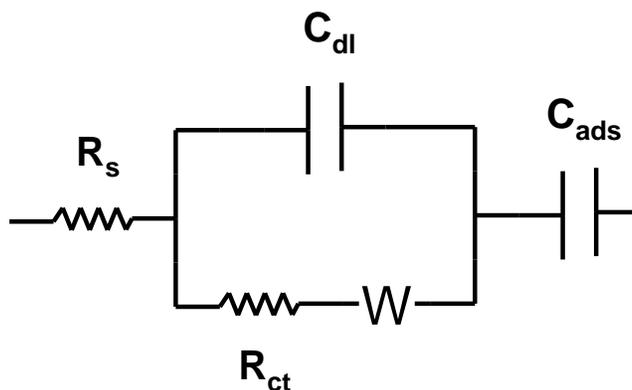


Figura 3.17 Circuito equivalente del electrodo de Au modificado de [122] ajustado a los espectros de EIS obtenidos para los sistemas Au/{1}, Au/{2} y Au/{3}.

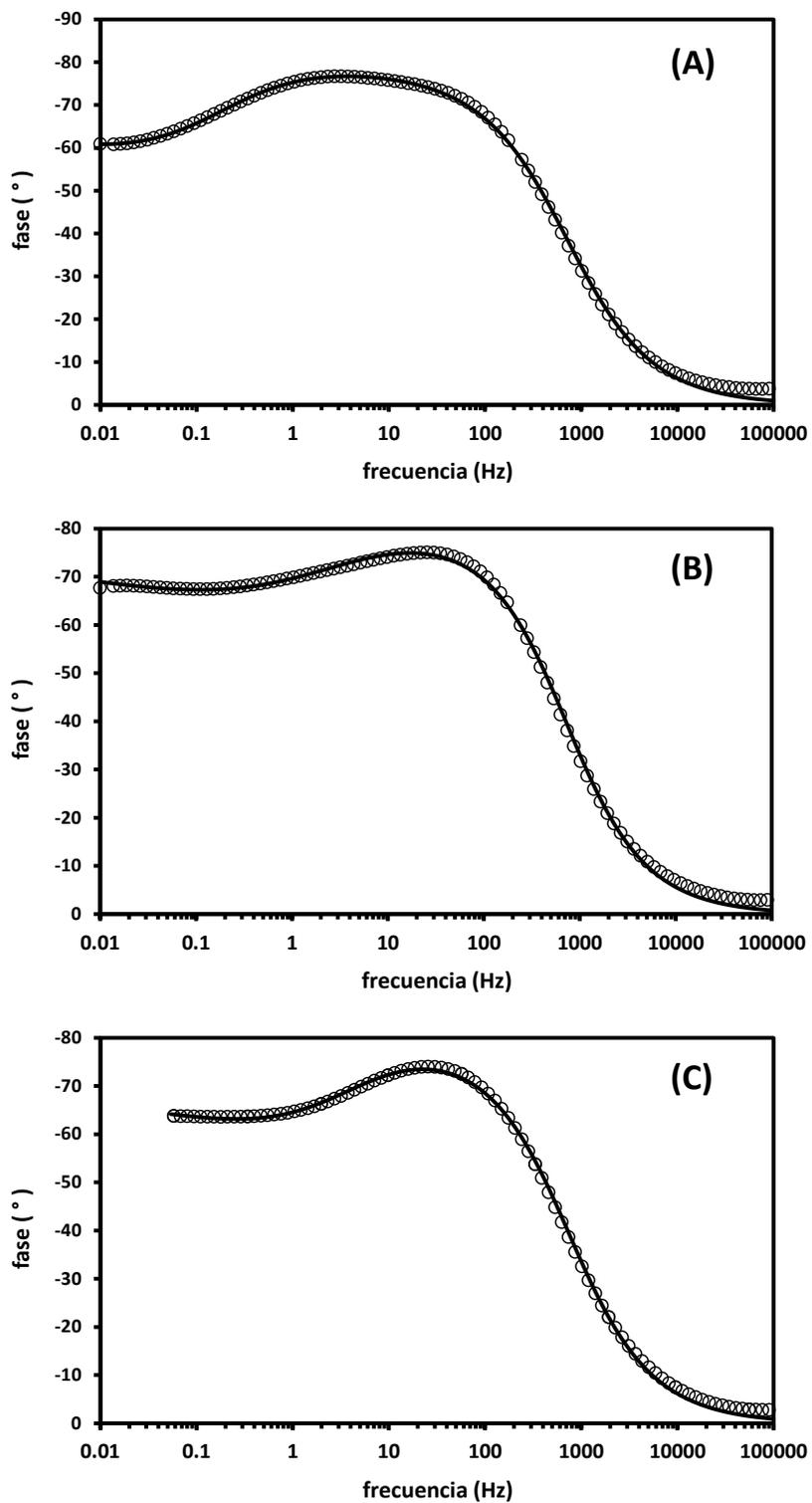


Figura 3.18 Representación Bode-Fase para los espectros de impedancia obtenidos para los sistemas (A) Au/{1}, (B) Au/{2} y (C) Au/{3}. Los datos experimentales corresponden a los círculos y las líneas continuas indican el resultado del ajuste con el circuito equivalente mostrado en la Figura 3.17.

En el circuito equivalente (Figura 3.17), R_s indica la resistencia asociada a la caída óhmica entre los electrodos de oro y referencia, R_{ct} indica la resistencia a la transferencia de carga para el par Fc/Fc^+ del péptido adsorbido, W indica la impedancia a la difusión semi-infinita de aniones ($H_2PO_4^{2-}$, HPO_4^{2-} o PO_4^{3-}) que mantienen la electroneutralidad de los grupos ferrocinio (Fc^+) electrogenerados. Finalmente, las capacitancias de doble capa (C_{dl}) y de adsorción (C_{ads}) indican respectivamente la acumulación interfacial de aniones en la capa de difusión adyacente a la cima [122] o en la región donde la formación de pares iónicos (PI) del tipo anión- Fc^+ es viable [123,124]. Con los parámetros obtenidos del ajuste del circuito equivalente, la constante de electrotransferencia (k^o) se calculó con la ecuación 3.12, donde T es la temperatura absoluta, R es la constante de los gases, F es la constante de Faraday y A_e es el área real electroactiva [125,126].:

$$k^o = \frac{2RT}{F^2 A_e \Gamma R_{ct}} \quad \text{Ec. 3.12}$$

Como ejemplo de cálculo, para el péptido {1} se determinó su constante de electrotransferencia:

$$k^o = \frac{2(8.314 \frac{J}{mol K})(298.15K)}{(96485.3 \frac{C}{mol})^2 (0.415 cm^2) (1.84 \times 10^{-10} \frac{mol}{cm^2}) (188.9 \times 10^3 \frac{\Omega}{cm^2})}$$

$$k^o = 0.0369 s^{-1}$$

Es necesario remarcar que para los péptidos {1}, {2} y {3} se utilizaron los electrodos 2, 7 y 1, respectivamente, cuyas áreas reales electroactivas fueron reportadas en la Tabla 3.1. Los valores de recubrimiento y de resistencia a la transferencia de carga para los 3 péptidos son los enlistados en la Tabla 3.4. Asimismo, las k^o calculadas se resumen en la misma Tabla 3.4.

Tabla 3.9 Parámetros electroquímicos obtenidos del ajuste del circuito mostrado en la Figura 3.16 a los espectros de impedancia mostrados en la Figura 3.17

Sistema	R_s ($\Omega \cdot cm^2$)	C_{dl} ($\mu F/cm^2$)	R_{ct} ($k\Omega \cdot cm^2$)	W ($k\Omega/s^{1/2}$)	C_{ads} ($\mu F/cm^2$)	k^o (s^{-1})
Au/{1}	178.3 ± 11.4	5.50 ± 0.15	188.9 ± 25.1	514.6 ± 75.9	1.63 ± 0.06	0.04
Au/{2}	211.3 ± 11.3	3.37 ± 0.22	17.6 ± 3.7	226.2 ± 39.7	1.65 ± 0.08	0.29
Au/{3}	219.4 ± 10.0	3.02 ± 0.16	13.8 ± 2.5	149.4 ± 25.0	1.36 ± 0.05	0.67

Una inspección de la Tabla 3.4 demuestra, por un lado que los valores estimados para las constantes de transferencia electrónica (k°) y para C_{dl} siguen la tendencia que se esperaba, con la transferencia electrónica más rápida en el péptido de cadena hidrofílica (Au/{3}) y la transferencia electrónica más lenta en el péptido anfifílico (Au/{1}).

Uno de los factores de los que depende el valor de capacitancia es el tipo de dieléctrico que se introduce entre las dos superficies del capacitor, que cuanto mayor sea el valor de la constante dieléctrica del material, mayor será la capacitancia. Al relacionar lo anteriormente mencionado con las películas peptídicas sobre el electrodo y la doble capa que se establece en esta interfase, es posible notar que conforme aumenta el valor de capacitancia de un sistema, se dificultará la transferencia de carga. La transferencia electrónica de los grupos Fc en los sistemas estudiados parecen depender de las propiedades dieléctricas de las regiones peptídicas que separaran (i) al sustrato de los grupos Fc electroactivos (reflejada en términos de C_{dl}) en cada uno de los péptidos.

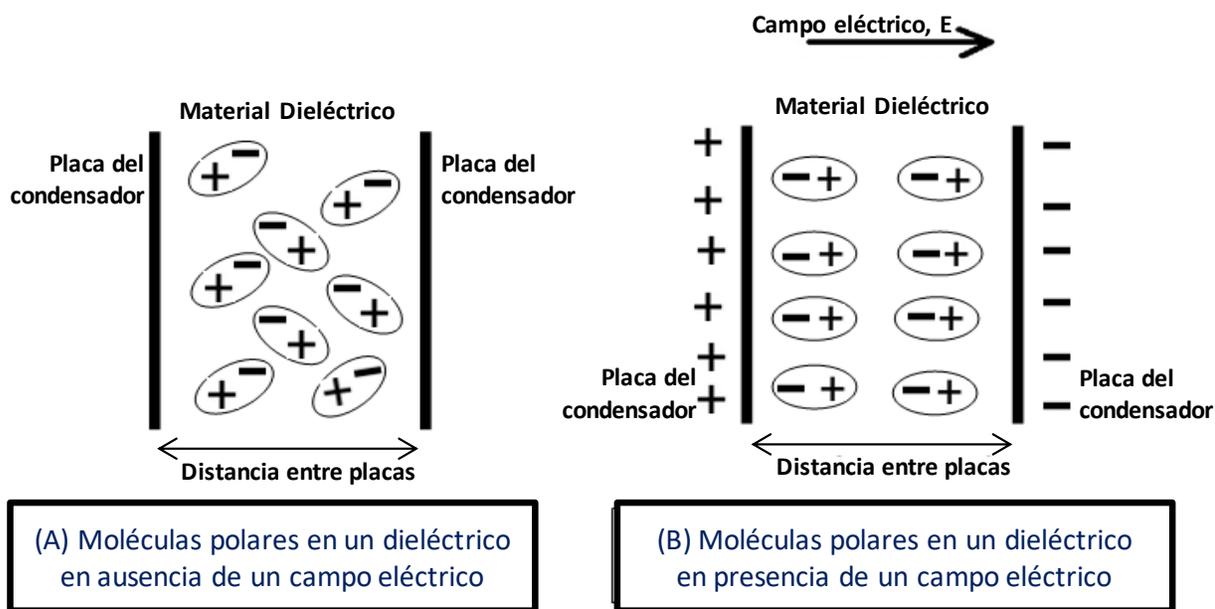


Figura 3.19 Comportamiento de un dieléctrico en ausencia y presencia de un campo eléctrico [127].

Recordando que C_{ads} es un reflejo de los aniones que electroneutralizan a los grupos Fc^+ electrogenerados [128] y observando que el valor de C_{ads} para el sistema Au/{1} no muestra una diferencia significativa con respecto a la pareja de valores para los sistemas Au/{2} y Au/{3}, se puede concluir que la presencia de la cadena de péptidos adicional en el péptido {1} no representa una barrera cinética que retrase en el sistema Au/{1} la interacción entre aniones y sitios Fc^+ electrogenerados. En consecuencia, este resultado confirma que la capacidad de transferencia electrónica en los sistemas estudiados depende predominantemente de las propiedades dieléctricas en las regiones peptídicas que separan al sustrato de los grupos Fc electroactivos en los péptidos confinados.

3.3.9 Estabilidad de la SAM's

Un aspecto que no se debe de ignorar cuando se pretende utilizar SAMs para el desarrollo de biosensores es conocer si la estructura formada permanece igual en el tiempo y/o si una modificación razonablemente pequeña de las condiciones iniciales no altera significativamente la distribución original de la SAM.

Con el objetivo de conocer la estabilidad de la SAM del péptido {1}, se realizaron 50 barridos de potencial en una ventana entre 0.1 y 0.8 V vs Ag/AgCl, 3M NaCl. En la

Figura 3.20 se observa que, tanto el pico anódico, como el pico catódico correspondientes a la oxidación y reducción del centro redox enlazado a la SAM disminuyen sus valores de densidad de corriente conforme aumenta el número de ciclos. La disminución de la densidad de corriente es un indicativo de la modificación de la SAM original, ya sea por la desorganización o por la degradación de la capa modificadora. Un desarreglo en la SAM significaría que el número de ferrocenos activos disminuye cuando las moléculas que forman la SAM bloquean a los centros redox volviéndolos inactivos. Mientras que, la degradación de la capa traería como consecuencia la pérdida de material modificador sobre el sustrato reduciendo el número neto de ferrocenos en la capa.

Para verificar cual es la causa de la alteración de la señal voltamperométrica de la

Figura 3.20, se obtuvieron los recubrimientos superficiales molares de los electrodos modificados después de 5 y 50 ciclos de barrido de potencial en una solución amortiguadora de fosfatos.

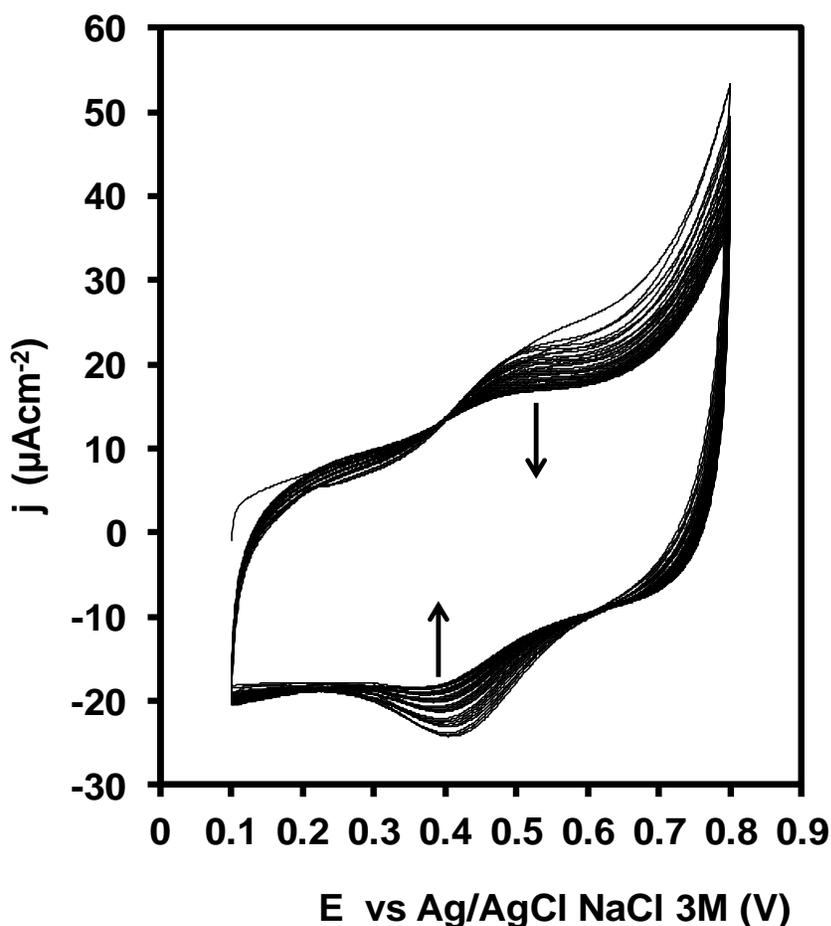


Figura 3.20 Voltamperograma cíclico de 50 barridos de potencial para la SAM del péptido {1}. CV en buffer de fosfatos ($I=0.1$) y $v=100 \text{ mV s}^{-1}$. La dirección de las flechas indica el aumento consecutivo de los barridos de potencial.

La Figura 3.21 muestra los voltamperogramas cíclicos para la reducción electroquímica de los enlaces Au-S de la SAM, después de 5 ciclos de barrido existen sobre la superficie modificada $1.75 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ y una vez que la SAM ha sufrido 50 ciclos de barrido el recubrimiento disminuye hasta $1.04 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. La disminución en el número de enlaces Au-S con respecto al número de barridos indica claramente la desorción de los péptidos, que representa una pérdida del 41%

de los péptidos enlazados originalmente al Au. En la Figura 3.21 incisos (D), (E) y (F), aparecen esquemas representativos de la degradación de la SAM.

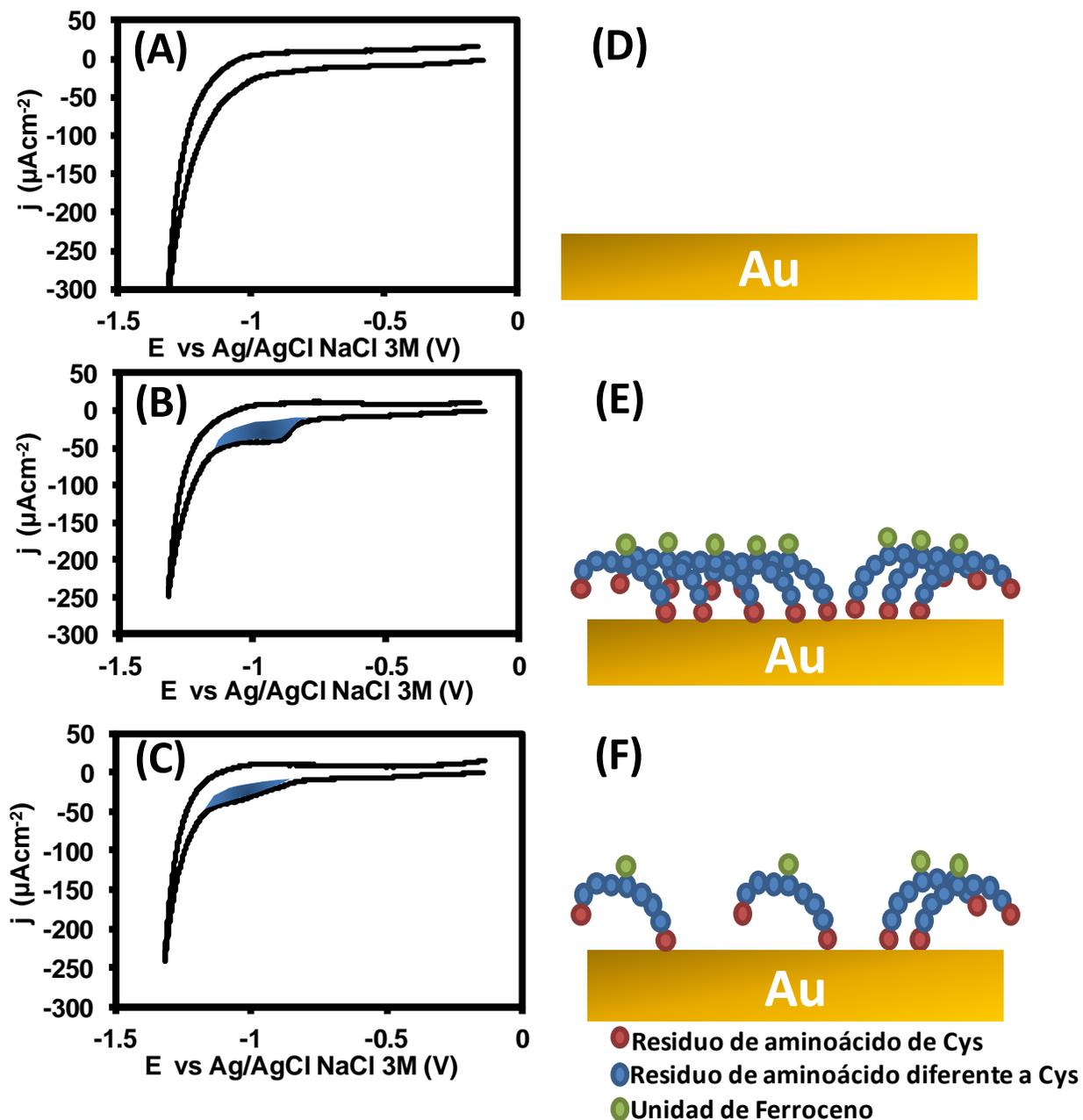


Figura 3.21 Voltamperograma de la desorción electroquímica en (A) el electrodo de Au sin modificación, (B) Electrodo de Au modificado con el péptido y después de 5 barridos de potencial y (C) Electrodo de Au modificado con el péptido y después de 50 barridos de potencial. Representación de los $\Gamma_{\text{péptido}}$ de la SAM sobre el electrodo de Au (D) sin modificación, (E) con SAM de péptido después de 5 barridos de potencial y (F) con SAM de péptido después de 50 barridos de potencial

3.3.10 Variación en la concentración de péptido de la solución modificadora.

En los estudios realizados hasta el momento, la concentración de la solución modificadora es de 1mM. Con el objetivo de conocer la mínima concentración en la que se forma el máximo recubrimiento de péptidos adsorbidos a la superficie del Au, se prepararon soluciones modificadoras con concentraciones del péptido {1} que van desde 1 μM hasta 1000 μM (1mM), y se evaluaron, tanto su comportamiento voltamperométrico en solución tampón de fosfatos, así como el recubrimiento sobre el Au, con el procedimiento de desorción del tior en medio alcalino que se ha manejado hasta ahora. La variación de los valores de recubrimiento de los enlaces Au-S con respecto al cambio de concentración del péptido {1} en la solución modificadora son concentrados en la Figura 3.22.

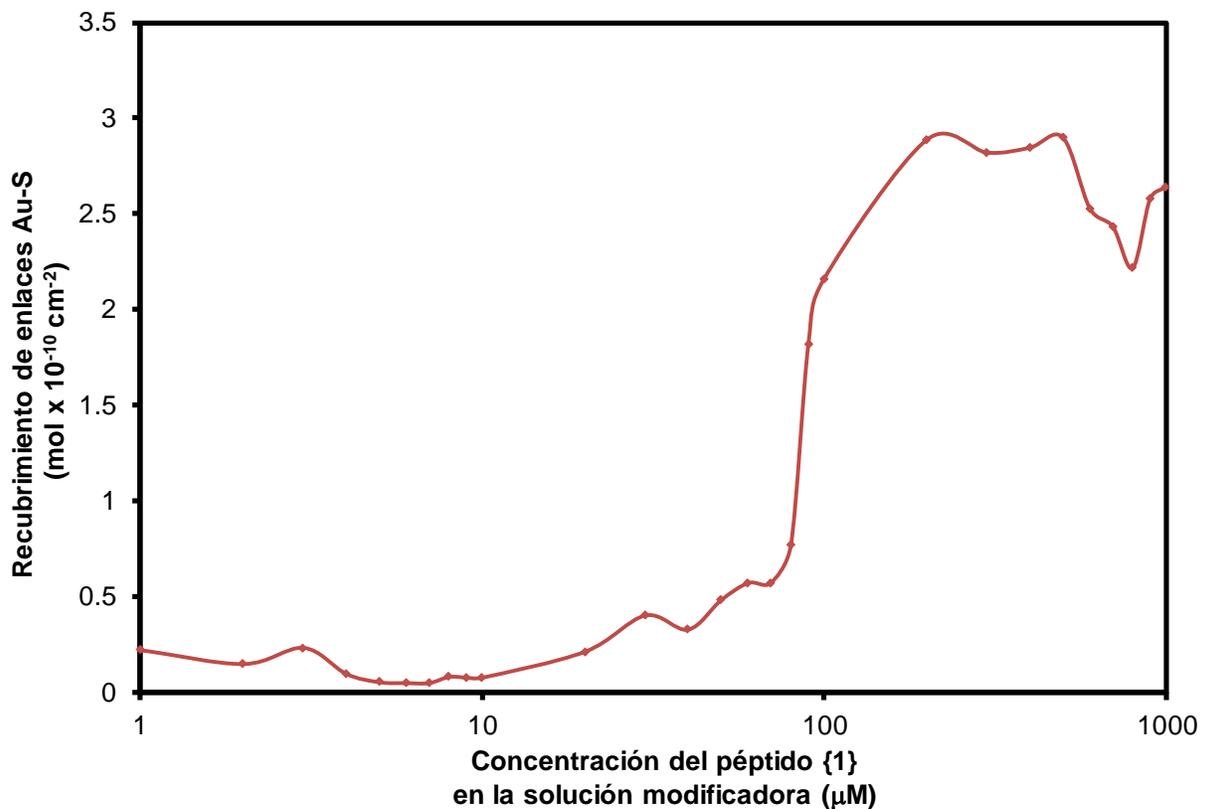


Figura 3.22 Isotherma de adsorción del péptido {1} a partir de soluciones en metanol.

Al analizar la Figura 3.21 es notorio que en concentraciones menores a 10 μM los recubrimientos son prácticamente los mismos y del orden de $0.2 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, atribuido a que

las bajas concentraciones de péptido no favorecen las interacciones necesarias entre las moléculas del péptido y los sitios activos del Au para que se formen los enlaces Au-S de la monocapa autoensamblada. A partir de 10 μM , los recubrimientos elevan su valor gradualmente hasta 50 μM , entonces se presenta un aumento dramático de los recubrimientos entre 60 μM y 200 μM , es en esta región donde se exhibe el comportamiento esperado, donde a mayor concentración del péptido mayor será el recubrimiento sobre el Au.

En el intervalo de concentraciones entre 200 μM y 500 μM , los recubrimientos se mantienen estables alrededor de $3 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$, probablemente debido a la formación de una monocapa casi completa, es decir, existe la saturación de los sitios activos del Au con el péptido modificador. Finalmente, en los últimos valores se presenta un descenso en los recubrimientos, este es un comportamiento inesperado, pero que puede deberse a que, en altas concentraciones del péptido en solución, primero se forman estructuras con varios péptidos entre sí, antes de depositarse sobre el Au. En el caso de que se formen nanoestructuras de más de 1 péptido, por cada péptido en la estructura se deben considerar un par de átomos de S, que deben encontrar el lugar disponible para anclarse sobre el Au. Por dar un ejemplo, para una molécula de péptido {1}, la probabilidad de que 2 átomos de Azufre encuentren 2 átomos de Au vacantes para formar los enlaces es mayor a una estructura con 2 moléculas del péptido {1} que necesita 4 átomos adyacentes de Au libres para la adsorción. Es obvio que conforme aumenta el número de péptidos en una nanoestructura antes del anclaje al Au, menor serán las posibilidades de que encuentre un espacio disponible para la adsorción, una situación similar fue reportada por Kondo y col. para la adsorción de ferrocenilalcano tioles y ferrocenilalcano ditiolos sobre Au y sobre láminas de óxido de titanio y estaño (ITO, Indium-Tin Oxide) [129].

3.3.11 Diferentes medios de formación de SAM's

El trabajo realizado precedentemente consistió en la inmovilización de los péptidos sobre Au, en un medio polar y prótico, el metanol (MeOH). Dentro de los trabajos más recientes del grupo de Dablemont, Esaulov y col. [130,131] se ha demostrado que las películas de monocapas autoensambladas (SAM's) de ditiolos dependen fuertemente de los procedimientos de preparación y de la naturaleza del solvente empleado. Durante la formación de la SAM suceden

interacciones complejas y dinámicas entre el disolvente, la superficie y los adsorbatos, que promueven diferentes conformaciones de la SAM dependiendo del disolvente utilizado.

La caracterización electroquímica de las monocapas autoensambladas indica que el péptido que contiene 2 cisteínas en los extremos C-terminal y N-terminal, se inmovilizó por un solo residuo de cisteína y no como un semicírculo (con ambas cisteínas unidas al sustrato), que era el objetivo primordial del proyecto. Dado que dicho péptido es un ditiol y se tiene la necesidad de mejorar la estructura de la monocapa, es interesante estudiar la influencia de diferentes disolventes en formación de la SAM. Para este efecto, se eligieron solventes con un cierto carácter polar como piridina y acetonitrilo (ACN), que poseen índices de polaridad de 5.3 y 6.2 [132] respectivamente, y que pueden ser considerados cercanos al índice de polaridad del metanol, con valor de 6.6 [132], pero que no son solventes próticos, lo que podría favorecer que no se formen puentes de hidrógeno entre el solvente y el péptido, a su vez, conduciendo al péptido a anclarse de manera más ordenada sobre la superficie del Au. El péptido {1} al ser un compuesto anfifílico presentó bajas solubilidades en piridina y acetonitrilo puro $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Por tal motivo, se propuso utilizar una mezcla ACN 50%-H₂O 50%v como disolvente para mejorar la solubilidad. La mezcla de solventes y el metanol al poseer características hidrofílicas e hidrofóbicas presentaron alto grado de solubilización hacia el péptido {1}, lográndose disoluciones de hasta 1mg mL^{-1} que fue el límite superior explorado para ambos solventes.

En la Figura 3.23, se exponen las voltamperometrías cíclicas realizadas para las SAM's del péptido {1} en buffer de fosfatos ($I=0.1\text{M}$), construidas a partir de diferentes solventes y bajo una concentración de péptido de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, a excepción de la piridina cuyo grado máximo de solubilización respecto al péptido {1} fue de $35 \mu\text{g mL}^{-1}$. Se eligió una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ dado que fue la solubilidad máxima alcanzada en acetonitrilo y poder hacer comparaciones más justas entre solventes al momento de sus voltamperometrías. No se eligió $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ porque, como se observó en la sección pasada, se tiene el antecedente de que el recubrimiento del péptido en el Au cercana a esta concentración fue baja.

Las señales voltamperométricas de la Figura 3.23, corresponden a la oxidación y la reducción del ferroceno en la SAM del péptido {1} sobre Au en buffer de fosfatos como medio

electrolítico. Comparando los voltamperogramas obtenidos a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} , se distingue que la corriente capacitiva de la SAM que se desarrolló en metanol ($2.38 \mu\text{Acm}^{-2}$) es menor a la correspondiente corriente de la monocapas autoensambladas en acetonitrilo ($4.76 \mu\text{A cm}^{-2}$) y en la mezcla ACN 50%v- H_2O 50%v ($4.29 \mu\text{A cm}^{-2}$), y finalmente, la piridina como solvente de modificación del electrodo permite la formación de una SAM que presenta la mayor corriente capacitiva ($15.71 \mu\text{A cm}^{-2}$).

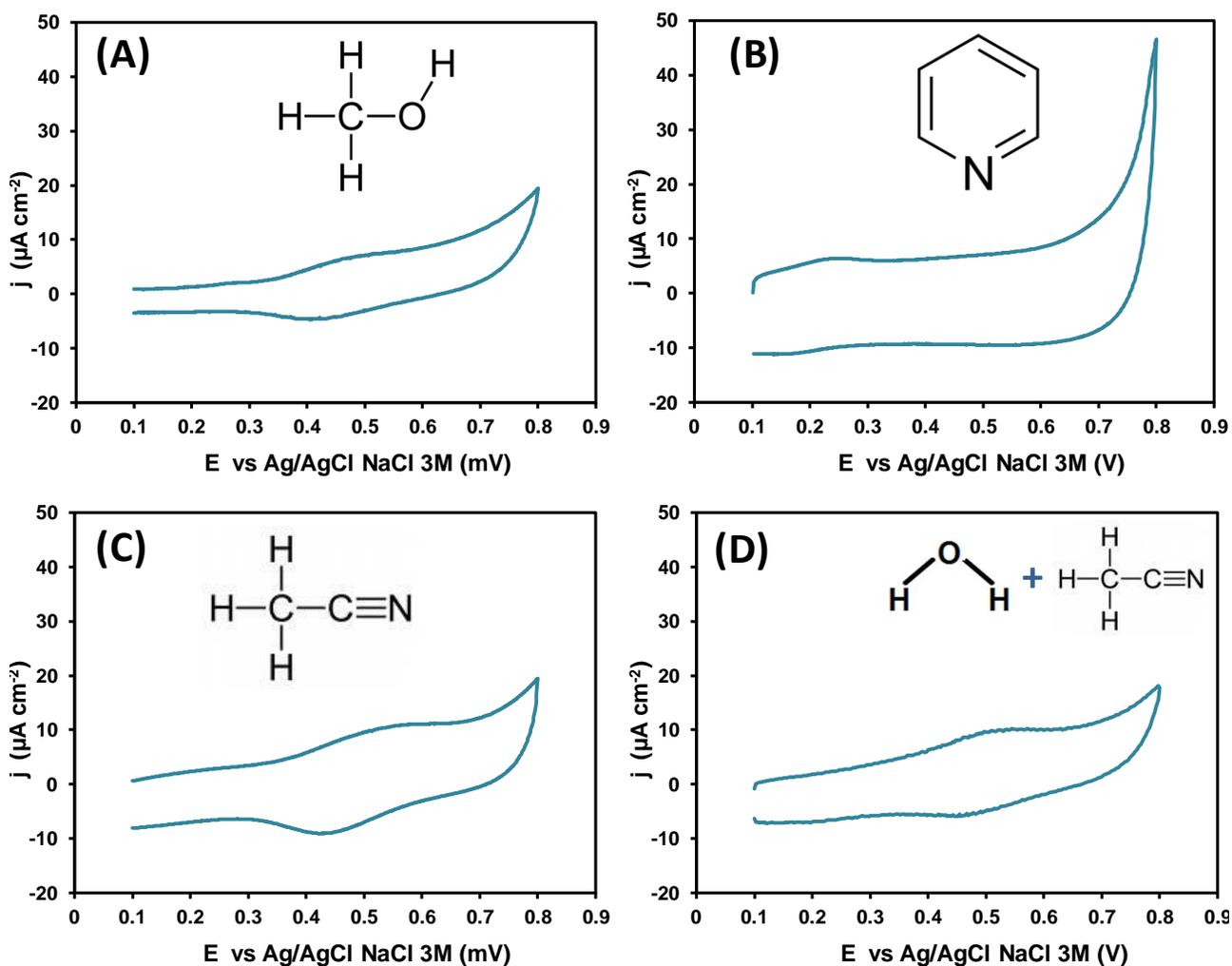


Figura 3.23 Voltamperogramas cíclicos del péptido {1} en buffer de fosfatos ($I=0.1$) cuando las SAM's fueron ensambladas en (A) metanol + $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de péptido {1} (B) Piridina + $35 \mu\text{g mL}^{-1}$ de péptido {1}, (C)acetonitrilo+ $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de péptido, y (D) ACN 50%v- H_2O 50%v + $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de péptido. $v=50\text{mV s}^{-1}$.

Es conocido que los valores de capacitancia varían inversamente con respecto al grosor de las SAM's [133,134], así se puede deducir que la SAM formada en la piridina sería una capa

delgada o el sustrato de Au está carente de moléculas del péptido {1} adsorbidas, indicativo de que este solvente no favorece la construcción de la monocapa en piridina. Al contrario, la monocapa formada en metanol presenta la corriente capacitiva más pequeña, indicando una monocapa con un grosor mayor, mientras que a la SAM's desarrollada en los medios que contienen acetonitrilo, les correspondería valores intermedios en cuanto al espesor. Al aumentar el índice de polaridad de un disolvente parece reducir algunos tipos de defectos encontrados en SAM's (ordenamientos conformacionales, regiones con ausencia de adsorbato, etc.) y promueven monocapas mejor empaquetadas [134,135]. Esto encuentra explicación en una baja solubilidad de los compuestos tiolados en tales disolventes y los bajos calores de adsorción de estos disolventes, que actúan probablemente segregando los tioles en la superficie del metal y dirigiendo eficazmente el proceso de ensamblaje en el que participan.

A pesar de que se espera una monocapa más densamente empacada cuando se forma en MeOH que cuando se forma en un medio que contiene ACN, las señales voltamperométricas del ferroceno son más claras para la monocapa construida en ACN que en aquella edificada en metanol. En consecuencia, el acetonitrilo es un buen candidato como solvente de modificación del electrodo a estudiar. Si bien el comportamiento de la monocapa desarrollada en ACN está mejor definido que el comportamiento que presenta la monocapa construida en la mezcla ACN 50%v-H₂O 50%v, este último solvente nos permite soluciones de modificación con concentraciones más altas, y resulta más interesante estudiar la formación de monocapas en la mezcla ACN 50%v-H₂O 50%v, como se evaluará en el siguiente capítulo.

3.4 CONCLUSIONES PRELIMINARES

Se modificaron electrodos de Au con cada uno de los 3 péptidos conjugados con ferroceno para formar monocapas autoensambladas y se determinaron los recubrimientos molares superficiales de estas monocapas. Los recubrimientos molares superficiales son mayores para los péptidos {1} y {2}, con valores de 1.844×10^{-10} y 1.910×10^{-10} mol cm⁻², respectivamente, y el Los recubrimiento molar superficial es más bajo para el péptido {3} con 1.076×10^{-10} mol cm⁻². Los recubrimientos indicaron que el péptido {3} se adhiere al electrodo de forma paralela al electrodo

de Au, mientras que los péptidos {1} y {2} contaron con un acomodo espacial perpendicular respecto a la superficie del electrodo.

Las SAM's de los 3 péptidos conjugados con ferroceno presentaron señales voltamperométricas atribuidas al par redox ferroceno(Fc)/ferricinio (Fc^+) alrededor de 0.455 V vs Ag/AgCl, NaCl 3M. Basándose en el valor de ΔE_p , el orden decreciente de reversibilidad es péptido {3} > péptido {1} > péptido {2}. Además, se observó que al péptido {3} se le facilita la transferencia electrónica al tener un E_f menor que los dos péptidos anteriores, lo cual se puede atribuir al acomodo espacial del péptido {3}, que permite una distancia menor entre el centro redox del péptido del electrodo, aumentando así la velocidad en la transferencia de electrones.

En el estudio a diferentes velocidades de barrido de las SAM's de los 3 péptidos conjugados con ferroceno se observó que a pesar de que los péptidos no tienen un comportamiento totalmente reversible para una especie adherida al electrodo, al graficarse $\log i_p$ vs $\log v$, los 3 péptidos presentan, pendientes mayores a 1 confirmándose que las especies aún se comportan como especies electroactivas confinadas sobre la superficie del electrodo.

Se estudiaron las SAM's de los 3 péptidos mediante espectroscopía de impedancia electroquímica, donde se construyó un circuito equivalente que se ajustó los espectros experimentales. En el circuito equivalente se incluyeron los parámetros específicos para las SAMS de los péptidos, como la impedancia W (que fue asociada a la difusión semi-infinita de los aniones que mantienen la electroneutralidad con los grupos Fc^+) y la capacitancia de adsorción que indica la acumulación de carga por la formación de los pares iónicos entre los aniones del medio electrolítico y el Fc^+ de la SAM. Con los parámetros obtenidos del ajuste del circuito equivalente se calculó la constante de electrotransferencia (k°) para cada SAM de los 3 péptidos estudiados y se encontró que la k° del péptido {3} es la de mayor magnitud, lo que concuerda con el comportamiento voltamperométrico antes observado, es decir, el péptido {3} cuenta con el proceso más rápido en la transferencia de electrones entre el ferroceno y la superficie de Au.

Se comprobó la estabilidad de la SAM del péptido {1} cuando se somete a barridos continuos en voltamperometría cíclica, observándose la disminución de las señales voltamperométricas del centro redox que fue atribuido a la pérdida del 41% de los péptidos enlazados originalmente al Au.

Se determinaron los recubrimientos molares parciales para las SAM's del péptido {1} formadas a partir de soluciones con concentraciones ente 1 μM y 1000 μM , donde se encontró que los mayores recubrimientos están en el intervalo de concentraciones entre 200 μM y 500 μM atribuido a la formación de una monocapa casi completa.

Se analizó el comportamiento voltamperométrico para las SAM's del péptido {1} formadas a partir de soluciones de diferentes solventes cuando la concentración se mantuvo en 100 mM. En este estudio se determinó que el mejor comportamiento voltamperométrico lo presenta la SAM realizada a partir de acetonitrilo, sin embargo, la solubilidad del péptido {1} en acetonitrilo es relativamente baja. Por otro lado, la SAM del péptido {1} formada en la mezcla $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50%v:50%v presentó un comportamiento voltamperométrico similar a la SAM formada en acetonitrilo puro, pero con una solubilidad por lo menos diez veces mayor, que vuelve más interesante el estudio a profundidad de este medio de modificación.

3.5 REFERENCIAS

79. M. Fujihira, I. Rubinstein, J.F. Rusling, *Encyclopedia of Electrochemistry*. Vol. 10. *Modified Electrodes*, (2007), Editorial Wiley-VCH.
80. A. Ulman, *Chemical Reviews*, 96, (1996), 1533-1554.
81. J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel et al., *Chemical Reviews*, 105, (2005), 1103-1170.
82. D.L. Allara, *Biosensors and Bioelectronics*, 10, (1995), 771-783.
83. G.M. Whitesides, J.P. Mathias, C.T. Seto, *Science*, 254 (1991) 1312-1319.
84. J. K. Bhattarai, D. Neupane, V. Mikhaylov, A. V. Demchenko, K. J. Stine, (2017). Self-Assembled Monolayers of Carbohydrate Derivatives on Gold Surfaces, Carbohydrate, Prof. Mahmut Caliskan -Editor-, InTech, DOI: 10.5772/66194. Available from: <https://www.intechopen.com/books/carbohydrate/self-assembled-monolayers-of-carbohydrate-derivatives-on-gold-surfaces>
85. L. Y. S. Lee, R. B. Lennox, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 9, (2007), 1013-1020.
86. H. Tian, L. Qi, D. Xiang, H Shao, H. Z. Yu, *Electrochimica Acta*, 170, (2015), 369-375.
87. P. Diao, D. Jiang, X Cui, D. Gu, R. Tong, B. Zhong, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 464, (1999), 61-67.

88. O. Aléveque, E. Levillain, L. Sanguinet, *Electrochemistry Communicatios*, 51, (2015), 108-112.
89. O. Azzaroni, B.Yameen. W.Knoll. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 10, (2008), 7031-7038.
90. A.W. Bott, *Current Separations*, 18 (1999), 79-83.
91. J. L. Keddie, *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 6, (2001), 102-110.
92. M. Canepa, G. Maidecchi, C. Toccafondi, O. Cavalleri, M. Prato, V. Chaudharicd, V. A. Esaulov, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, (2013), 11559-11565.
93. P.M.S. Monk. *Fundamentals of Electroanalytical Chemistry*, (2001), Editorial John Wiley & Sons, 1a edición, 162.
94. [http:// www.gamry.com/App_Notes/EIS_Primer/EIS_Primer_2007.pdf](http://www.gamry.com/App_Notes/EIS_Primer/EIS_Primer_2007.pdf)
95. L.V. Protsailo, W.R. Fawcett, *Electrochimica Acta*, 45, (2000), 3497–3505.
96. C. S. S. Sangeeth, A. Wan, C. A. Nijhuis, *Journal of the American Chemical Society*, 136, (2014), 11134–11144.
97. Angerstein-Kozłowska, B.E. Conway, A. Hamelin, L. Stoicoviciu, *Electrochimica Acta*, 31, (1986), 1051-1061.
98. C. Shengli, W. Bingliang, Z. Hong. *Wuhan University Journal of Natural Sciences*, 3, (1998), 102-107.
99. K. Juodkazis, J. Juodkazyte, A. Lukinskas. *Electrochemistry Communications*, 1, (1999), 315-318.
100. S. Trasatti, O. A. Petrii. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 327, (1992), 353-318.
101. A.M. Chaparro, A.J. Martín, M.A. Folgado, B. Gallardo, L. Daza. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34, (2009), 4838-4846.
102. A. Hernández Creus, P. Carro, S. González, R. C. Salvarezza and A.J. Arvia. *Journal of Electrochemical Society*, 139, (1992), 1064-1070.
103. Angerstein-Kozłowska, B.E. Conway, B. Barnett, J. Mozota. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 100, (1982), 417-446.
104. E. Bustos Bustos, tesis doctoral. Centro de investigación y desarrollo tecnológico en electroquímica, S.C. (2007)
105. Y. Taik Kim, R.L. McCarley, A.J. Bard. *Langmuir*, 9, (1993), 1941-1944.
106. M.M. Walczak, D.D. Popenoe, M.D. Porter, *Langmuir*, 7, (1991), 2687-2693.
107. J. Wang. *Analytical Electrochemistry*, (2000), editorial Wiley-VCH, 2da edición, 37.

108. G.J. Blanchard, P. Kholi, *Journal of the American Chemical Society*, 120 (1998) 11962-11968.
109. J. McMurry. *Organic Chemistry, Seventh Edition*, (2008), Editorial Thomson.
110. M.E. Gómez, A. E. Kaifer. *Journal of Chemical Education*, 69 (1992) 502-505.
111. S. Campuzano, M. Pedrero, C. Montemayor, E. Fatás, J. M. Pingarrón. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 586, (2006), 112-121.
112. R.A. Antunes, M.C.L. Oliveira, G. Ett, V. Ett. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, (2010), 3632-364.
113. F. Mansfeld, B. Little, *Corrosion Science*, 32, (1991), 247-272.
114. A.W. Bott. *Current Separations*, 19 (2001), 71-75.
115. <https://www.comsol.com/blogs/electrochemical-impedance-spectroscopy-experiment-model-and-app/> (consultado el 22 de septiembre de 2017)
116. L. Fernández Macías, *Electrochimica Acta*, 140, (2014), 266-274.
117. V. Ganesh, V. Lakshminarayanan, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 619-620, (2008), 87-97.
118. P. Diao, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 495, (2001), 98-105.
119. K.A. Mahmoud J.H.T. *Luong Analytical Chemistry*, 80, (2008), 7056-7062.
120. O. Fontain, H.N. Randriamahazaka, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 632, (2009), 1-7.
121. B. Sindholm-Sethson, *Langmuir*, 12, (1996), 3305-3314.
122. R.P. Janek, W.R. Fawcett, A. Ulman, *The Journal of Physical Chemistry B* 101, (1997), 8550-8558.
123. M.C. Daniel, J. Ruiz, S. Nlate, J. Palumbo, J.C. Blais, D. Astruc, *Electrochemistry Communications*, (2001), 2000-2001.
124. O. Reynes, J.C. Moutet, G. Royal, E. Saint-Aman, *Electrochimica Acta*, 49, (2004), 3727-3735.
125. A.L. Eckerman, D.J. Feld, J.A. Shaw, T.J. Meade, *Coord. Chem. Rev.* 254, (2010), 1769-1802.
126. S. E. Creager, T. T. Wooster, *Analytical Chemistry*, 70, (1998), 4257-4263.
127. Página web <https://www.electrical4u.com/dielectric-material-as-an-electric-field-medium/> (Consultado el 22 de septiembre de 2017).

128. C.E.D. Chidsey, C.R. Bertozzi, T.M. Putvinski, A.M. Majsce, *Journal of the American Chemical Society*, 112, (1990), 4301-4306.
129. T. Kondo, K. Uosaki, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 381, (1995), 203-209.
130. H. Hamoudi, V.A. Esaulov, C. Dablemont, *Surface Science*, 605, (2011), 116-120.
131. M.A. Daza, C. Dablemont, V.A. Esaulov, *Langmuir*, 25, (2009), 12945-12953.
132. Tabla de índice de polaridad, extraída de la página web:
<http://www.cienytech.com/tablas/tabla-miscibilidades.pdf> (Consulta: 30 de agosto de 2017).
133. M. Knichel, P. Heiduschka, W. Beck, G. Jung, W. Göspel, *Sensors and Actuators B*, 28, (1995), 85-94.
134. T. W. Schneider, D. A. Buttry, *Journal of the American Chemical Society*, 115, (1993), 12391-12397.
135. T. Ishida, W. Mizutani, H. Azebara, F. Sato, N. Choi, U. Akiba, M. Fujihira, H. Tokumoto, *Langmuir*, 17, (2001), 7459-7463.

Capítulo 4

ESTUDIO CINÉTICO DE AUTOENSAMBLE DEL PÉPTIDO DITIOLOADO

4.1 INTRODUCCIÓN

En el diseño de capas autoensambladas para electrodos modificados, tanto los factores energéticos en el equilibrio de la película, así como la velocidad y el mecanismo con los que se autoensamblan las estructuras supramoleculares son de vital importancia para lograr ensambles ordenados.

Dentro del mecanismo que presenta cada arreglo molecular se pueden encontrar varias etapas de adsorción, un ejemplo de ello son las etapas del autoensamble para monocapas de alcanotioles presenta un paso inicial que implica la fisorción de las moléculas, seguida por la quimisorción con las moléculas en configuración paralela a la superficie del sustrato formando secciones ordenadas. Al agregar más moléculas ocurre una transición de una estructura paralela a vertical y finalmente se lleva a cabo una corrección de defectos que conduce a una fase más densa y en posición vertical. La configuración vertical maximiza el número de interacciones laterales volviendo más estable a la monocapa [136].

Es posible obtener recubrimientos densos rápidamente (milisegundos a segundos) a partir de soluciones de concentración milimolar. Sin embargo, la maximización de la densidad de moléculas y la disminución en el número de defectos son procesos que involucran una lenta reorganización y requieren horas para llevar a cabo este proceso [137].

El desarrollo de adsorción y reorganización en las películas de organotioles ha sido investigado por varias técnicas que incluyen la microscopía de fuerza atómica (AFM, Atomic Force Microscopy) [138,139], la microscopía electrónica de barrido (SEM, Scanning Electron Microscopy) [140,141], la microscopía de efecto túnel (STM,) [142,143] y las técnicas electroquímicas [144-147], también se han utilizado la espectroscopía de infrarrojo [148,149] y la espectroscopía Raman [150,151], así como por la técnica de microbalanza de cristal de cuarzo (QCM, quartz crystal microbalance) [152,153].

De los péptidos sintetizados anteriormente (reportados en el capítulo 2), el péptido {1} es el más interesante por los dos grupos tiol en las terminales del péptido disponibles para enlazarse al Au mediante un enlace covalente. Hasta ahora, se realizaron estudios mediante voltamperometría cíclica y por espectroscopía de impedancia electroquímica, que permite hacer una imagen mental de las características de la monocapa autoensamblada, pero que no nos da indicios de cómo se forma la capa. El proceso de autoensamble del péptido es un fenómeno importante, puesto que permitiría elucidar las condiciones experimentales adecuadas para la lograr una modificación de electrodo adecuada para el desarrollo de biosensores. En este capítulo se aborda el estudio del autoensamble del péptido {1} a partir del solvente que consiste en la mezcla de acetonitrilo-agua, puesto que en el capítulo 3 se mencionó que es el solvente que permite una buena solubilización del péptido {1} y posee un mejor comportamiento electroquímico si se le compara con las capas modificadores formadas a partir de metanol y de piridina. Basándose en los estudios ya reportados para las SAM's de alcanotioles, en este capítulo se utilizan las técnicas de SEM, AFM, QCM y espectroscopia Raman para el análisis del proceso de autoensamble.

4.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.2.1 Condiciones Experimentales para SEM

Las micrografías SEM se obtuvieron de un microscopio de barrido electrónico S440 LEICA con un filamento de tungsteno. La unidad está controlada por un microordenador DX 486. El microscopio cuenta con un detector de electrones secundarios y retrodispersados en cuatro sectores.

El manejo de la muestra se hizo con pinzas y guantes para evitar la contaminación por residuos orgánicos (grasos) de la piel. Antes de realizar la toma micrográfica por SEM se aseguró que la muestra estuviera libre de polvo y completamente seca. El voltaje de aceleración de electrones fue de 15 keV. Las micrografías fueron tomadas bajo el acercamiento de 100,000 y 250,000 aumentos. Para el ensamble del péptido {1} sobre Au, se utilizó un sustrato de Au nanoestructurado con un espesor de 100 nm de grueso depositado sobre 1 cm² de una hoja de mica monocristalina (hoja de aluminosilicato monocristalino). La superficie de Au fue limpiada con una gota de 50 µL de la mezcla de H₂O₂ 30%:H₂SO₄ 95% 1:1 (v/v) durante 10 minutos. En seguida se colocó una gota de 100 µL con concentración de 200 µg mL⁻¹ del péptido diluido en la solución de CH₃CN:H₂O sobre el sustrato de Au a diferentes tiempos, las imágenes en SEM fueron registradas y son presentadas en la sección 4.3.1.

4.2.2 Condiciones Experimentales para QCM

Para los experimentos de QCM se utilizaron resonadores de cuarzo de 14 mm de diámetro con una frecuencia nominal de 9MHz. Sobre ambos lados de cuarzo se depositaron 250Å de una capa de cromo seguido de una capa de 2000 Å de Au, depositados mediante la técnica de evaporación de metales, el área ocupada por el Au depositado es un círculo con diámetro de 0.5 cm. El resonador fue conectado a un adaptador BNC mediante una conexión con pintura de plata a los hilos metálicos del adaptador. Se utilizó un oscilador para llevar el cristal de cuarzo a 27 MHz, que corresponde al tercer sobretono del cristal. La temperatura de todos los componentes del oscilador electrónico fue controlada a 32 ± 0.1 °C para mejorar la estabilidad de las mediciones. Los experimentos de QCM se realizaron en una celda, en la cual el cristal de cuarzo se colocó entre dos empaques de goma insertados en una celda de polimetilmetacrilato (plexiglass®). La superficie de oro del cristal de cuarzo utilizado en los experimentos se limpió con una gota de 15 µL de una mezcla de H₂SO₄/H₂O₂, 50%-50% v/v durante 30 min y enjuagada con agua doblemente destilada. El volumen de la celda es de 50 µL, que se mantiene bajo un flujo constante de 50 µL/min de las soluciones de interés mediante una bomba peristáltica (Figura 4.1).

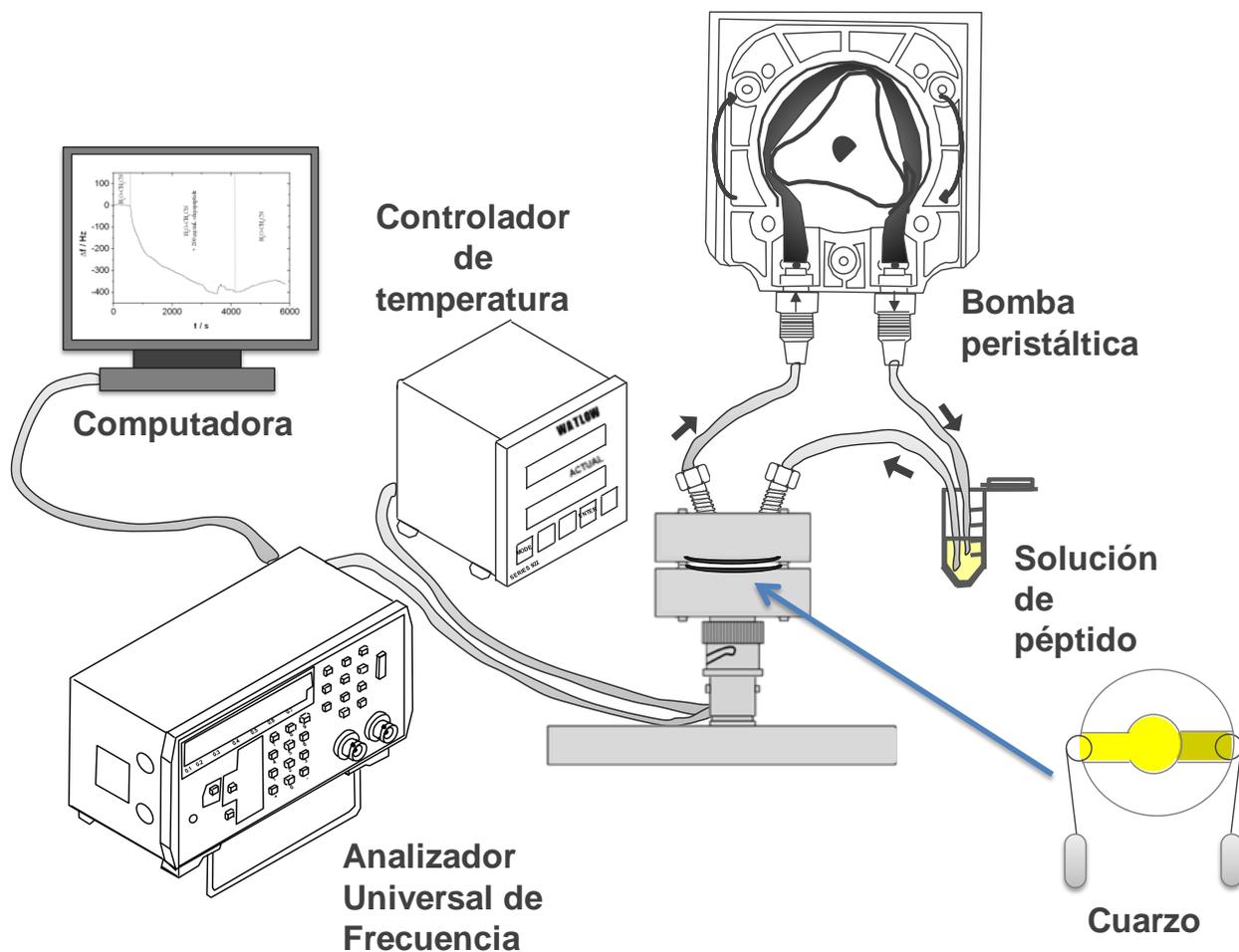


Figura 4.1 Esquema del sistema de medición de QCM.

4.2.3 Condiciones Experimentales para AFM

Las micrografías de AFM fueron realizadas en un ambiente con aire utilizando un instrumento de escaneo molecular en el modo resonante acústico. Un controlador PicoScan 2100 fue conectado a una computadora para dirigir el escaneo y recolectar los datos generados por el impacto del láser sobre el fotodetector. Con este objetivo, la viga voladiza (cantiléver) rectangular recubierta con una punta cónica fue utilizada en el estudio de AFM. La frecuencia de resonancia fue de 280-365Hz, con una constante de estiramiento de 25-50 N m^{-1} .

La adsorción del péptido sobre una superficie de aluminosilicato de potasio (mica de moscovita) fue investigada. Esta superficie fue elegida debido a que es perfectamente plana y es un sustrato adecuado para el estudio de la formación de nanoestructuras aisladas. Una solución fresca de péptido de $200\mu\text{g mL}^{-1}$ en $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50%v/50%v fue preparada y una gota de $50\mu\text{L}$ de

esta solución fue entonces depositada sobre una mica sin utilizar anteriormente y con superficie de 1cm^2 . La solución fue removida después de 10 minutos, limpiada delicadamente con 2mL de la mezcla de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ v:v (1:1) y secada con CO_2 (Figura 4.2). Todas las imágenes de AFM sufrieron un proceso de corrección del plano y son mostradas en la sección 4.3.3.

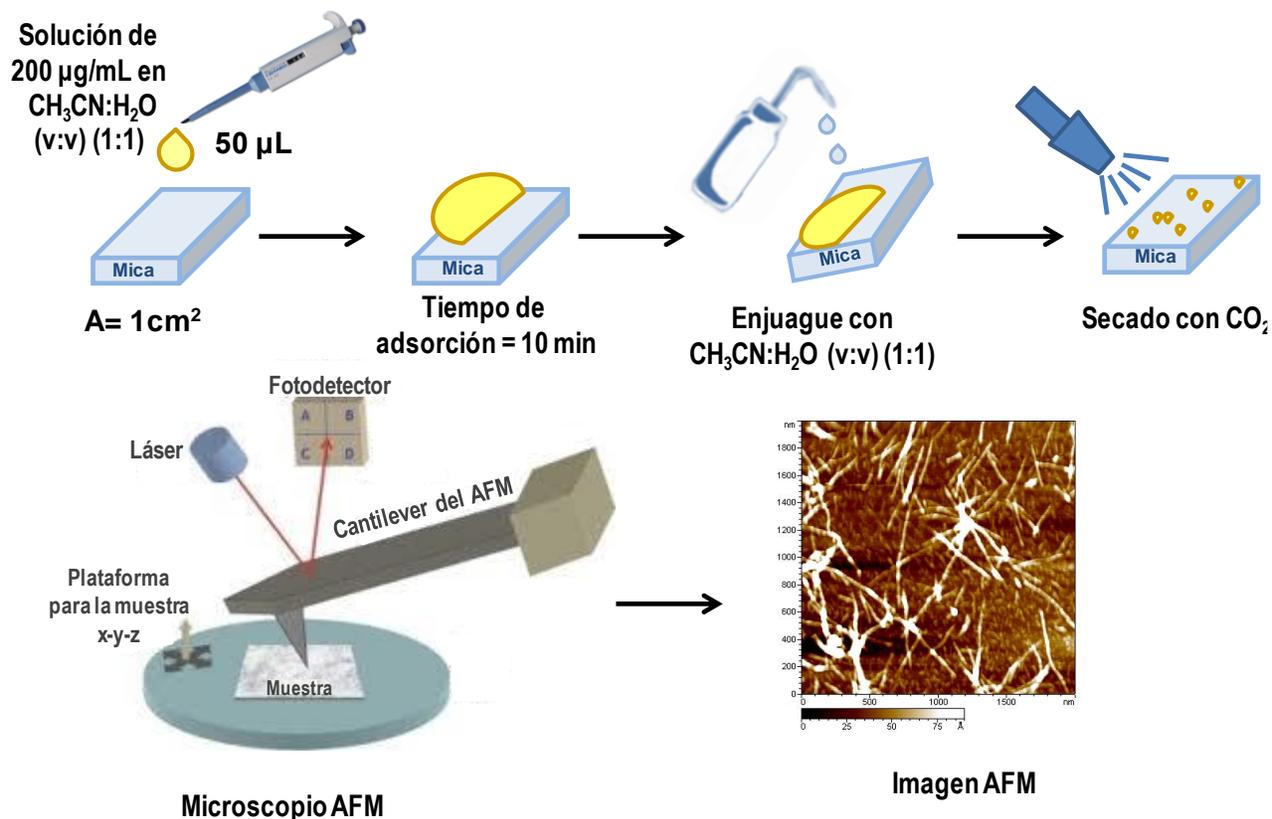


Figura 4.2 Pasos de la preparación de la muestra para la AFM.

4.2.4 Condiciones Experimentales para Espectroscopía Raman.

El equipo de espectroscopía Raman consistió de un microscopio Olympus BX40 acoplado con un espectrógrafo con distancia focal de 300 mm de HORIBA JobinYvon LABRAM con una red holográfica de 1800 órdenes/mm y un detector CDD (Charge-coupled device) enfriado con aire Peltier con una resolución de 1024×256 píxeles. Los espectros fueron obtenidos con una radiación de $632.817\ \text{nm}$ proveniente de un láser interno He-Ne de $10\ \text{mW}$. Un objetivo 50.LWD permitió registrar los espectros Raman con una distancia de trabajo de $8\ \text{mm}$. El orificio confocal fue fijado en $200\ \mu\text{m}$. Los espectros fueron registrados de 250 a $3100\ \text{cm}^{-1}$.

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1 Estudio cinético de quimisorción del péptido {1} mediante SEM

En la microscopía SEM se crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto y su objetivo es visualizar detalles morfológicos de un material determinado a escalas micro y nanométricas. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz concentrado de electrones, que pueden dispersarse en la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Dentro de las señales colectadas se encuentran las de electrones secundarios, electrones retrodispersados, fotones de rayos X, electrones Auger y fotones en la región visible. [154].

La formación de la SAM del péptido {1} fue inicialmente investigada mediante microscopía SEM sobre la superficie de Au nanoestructurada y depositada sobre mica de 1 cm² de área que fue limpiada mediante el procedimiento descrito en la sección 4.2.1. Para este estudio se colocó una gota de 100 µL con concentración de 200 µg mL⁻¹ del péptido diluido en la solución de CH₃CN:H₂O 1:1 (v/v) sobre el sustrato de Au a diferentes tiempos, desde 1 hasta 80 minutos de depósito, y las imágenes en SEM fueron registradas con 100, 000 (Figura 4.3) y 250, 000 aumentos (Figura 4.4).

En la micrografía de 100,000 aumentos para la superficie de Au sin modificar (Figura 4.3 (A)), se observan las islas de Au sobre la mica, mientras que para la superficie de Au modificada con el péptido {1} con 5 y 80 minutos de adsorción, (Figura 4.3 (B) y (C)) ya se ha formado una capa del péptido {1}. Con la finalidad de notar si las características de la película del péptido cambian se obtuvieron micrografías con 250,00 aumentos. En las tomas micrográficas de mayor resolución se observó que para los tiempos de adsorción de 1 y 2 min (Figura 4.4 (B) y (C)), los defectos del Au sobre las islas del metal (Figura 4.4 (A)) se suavizaron debido al depósito de una fina capa de péptido por debajo de 1nm que corresponde a la resolución del equipo de SEM. Para un tiempo de adsorción de 5 min (Figura 4.4 (D)), se observó un depósito de péptido de grosor de 8.1±0.1nm sobre los bordes de las islas de Au. Es interesante notar que las islas de Au se unieron mediante las capas del péptido en algunos puntos, lo que sugiere que el depósito no es homogéneo sobre la superficie del Au, sino que se forman multicapas en estos sitios específicos.

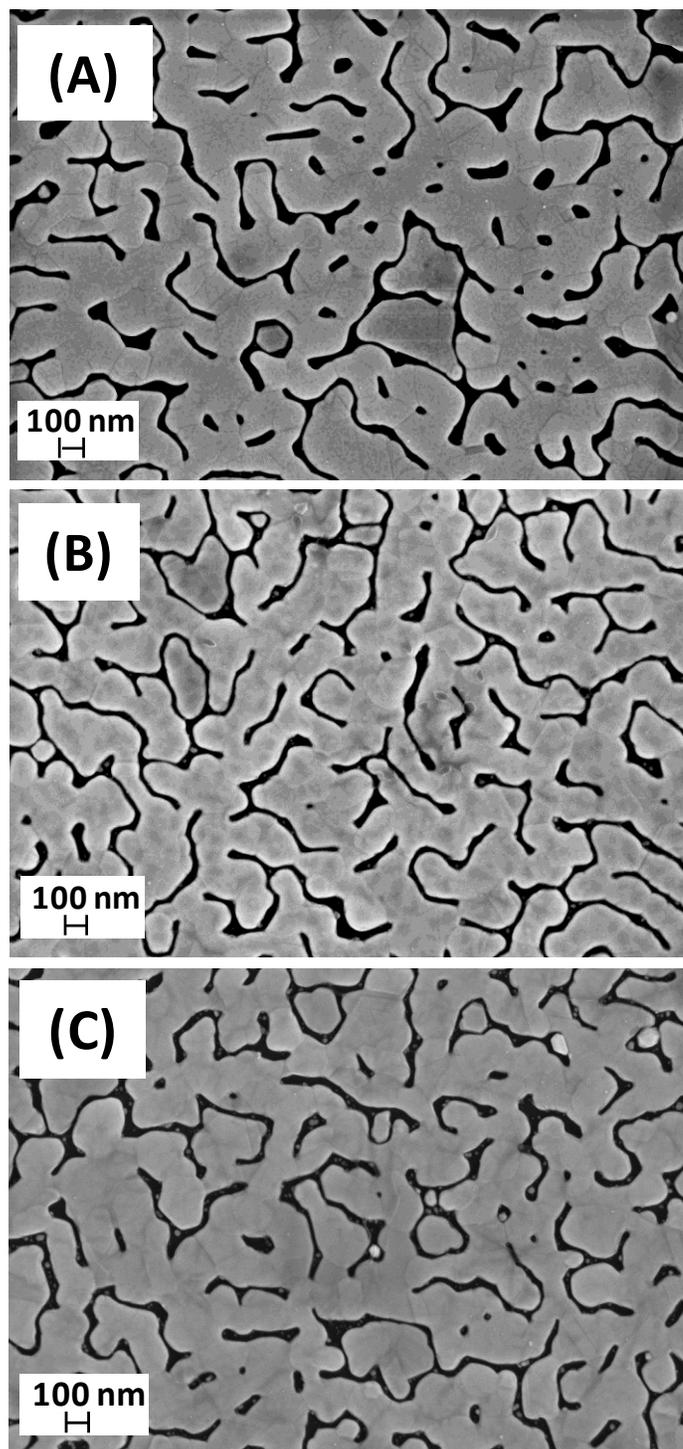


Figura 4.3 Micrografías SEM con 100,000 aumentos de (A) superficie de Au después del proceso de limpieza, superficie de Au con una gota de 100 μL de una solución 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del péptido {1} en $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50%/50% v:v y tiempo de modificación de electrodo con (B) 5min y (C) 80 min.

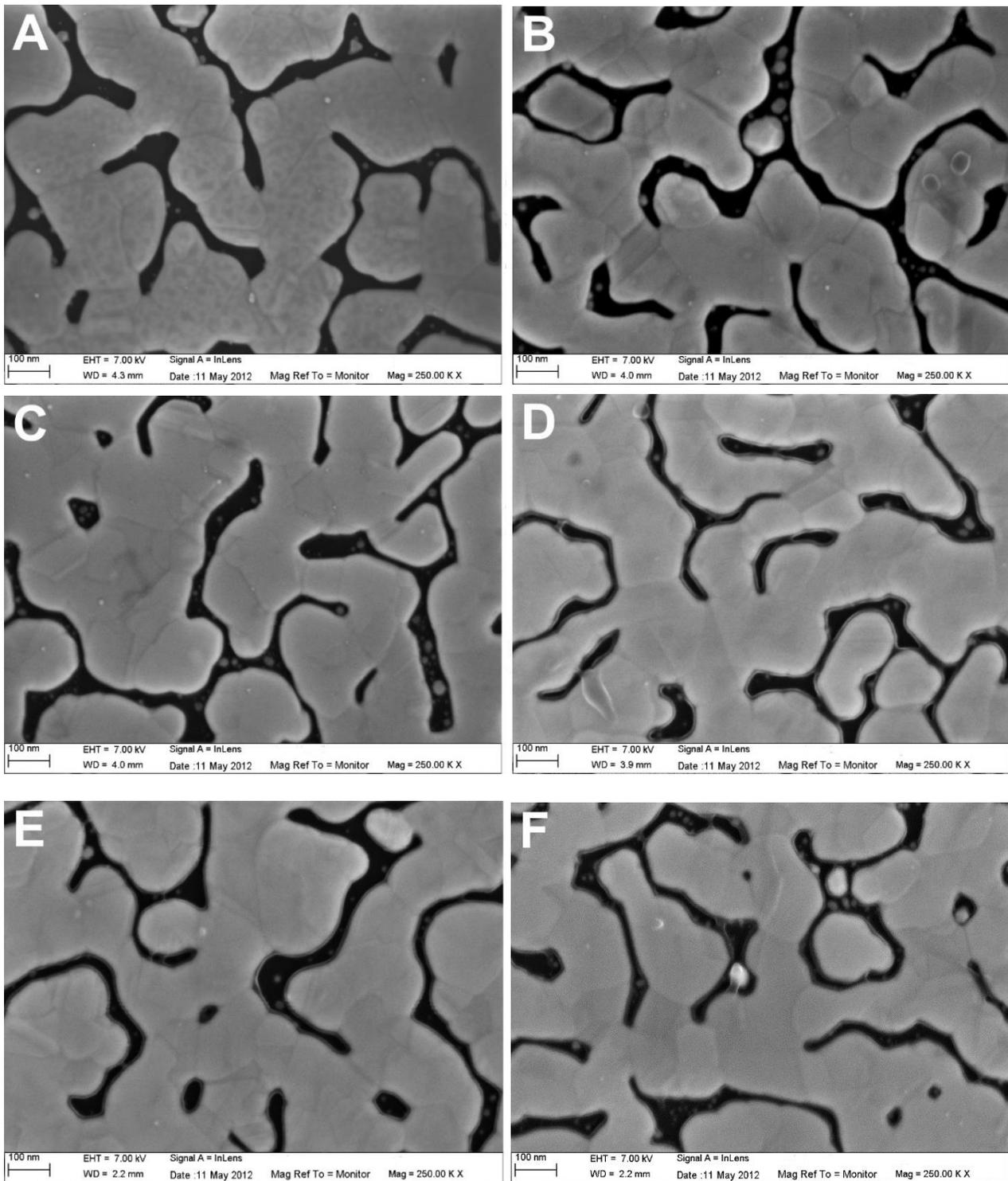


Figura 4.4 Micrografías SEM con 250,000 aumentos de (A) superficie de Au después del proceso de limpieza, superficie de Au 100 μ L de una solución 200 μ g/mL del péptido {1} en $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (v:v) (1:1) y tiempo de modificación de electrodo con (B) 1min, (C) 2 min, (D) 5min, (E) 20 min y (F) 80 min.

El grosor de 8.1 nm de la capa peptídica se sigue manteniendo de manera generalizada en las micrográficas con tiempos de adsorción de 20 y 80 minutos, con la particularidad de que el número de puntos donde se unen dos islas de Au aumenta. El crecimiento no homogéneo de la membrana del péptido {1} continua conforme pasa el tiempo de modificación, en algunos puntos la membrana crece hasta 42 ± 0.1 nm. Este estudio nos indica que existe un tiempo límite para que se obtenga una monocapa, y que a tiempos de modificación mayores tenemos la formación de multicapas, aumentando el desorden de dicha capa.

4.3.2 Cinética de quimisorción del péptido {1} mediante QCM

La microbalanza de cristal de cuarzo es una técnica útil en la caracterización de monocapas autoensambladas sobre un sustrato, que se basa en la medición de la masa a través de los cambios de frecuencia de un cristal de cuarzo piezoeléctrico al ser perturbado por la adición de una masa pequeña [155]. En QCM se puede considerar una relación lineal entre los cambios de frecuencia y masa, que es derivada de la ecuación establecida por Sauerbrey [156],

$$\Delta m = -\alpha \Delta f \quad \text{Ec. 4.1}$$

Donde Δm es el cambio de masa, α es la sensibilidad a la masa y Δf es el cambio de frecuencia. Así, la cinética de adsorción de la película del péptido puede ser investigado utilizando QCM.

Con el propósito de verificar que el sistema de QCM estuviera funcionando correctamente, se obtuvo el cambio de frecuencia relativa (Δf) con respecto al tiempo de la transición del solvente del sistema a partir de H₂O hacia la mezcla CH₃CN/H₂O 50%v/50%v (Figura 4.5). Después de 470 s, se llevó a cabo el cambio de solución, observándose un descenso en la frecuencia del cuarzo asignado al cambio de densidad entre los dos solventes, el aumento en la masa sobre el cuarzo piezoeléctrico conlleva a la disminución de la frecuencia que experimenta. Cuando se tiene un tiempo de 1070 segundos se alcanza a estabilizar la frecuencia y se presenta un cambio de frecuencia de -174Hz.

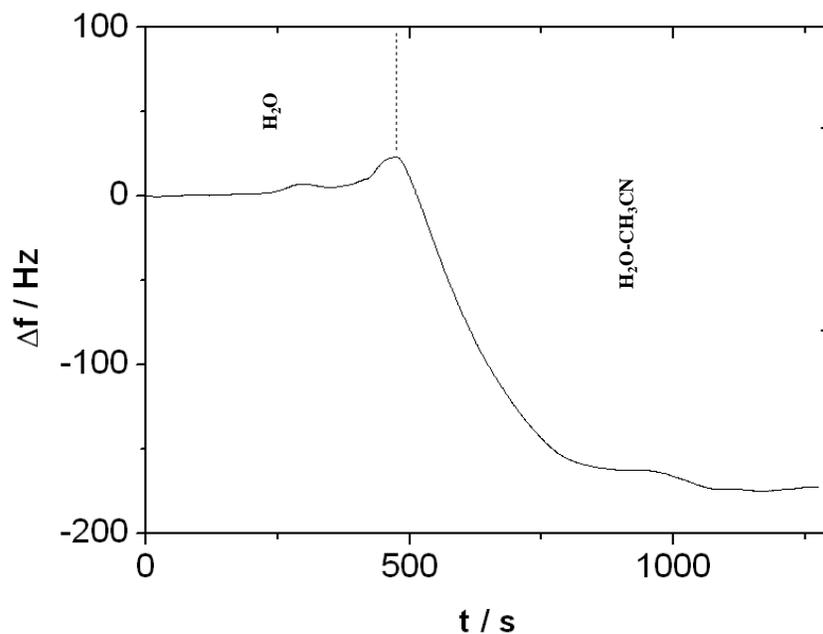


Figura 4.5 Cambio de frecuencia relativa con respecto al tiempo para la transición de H_2O hacia la mezcla $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 50%-50% v/v.

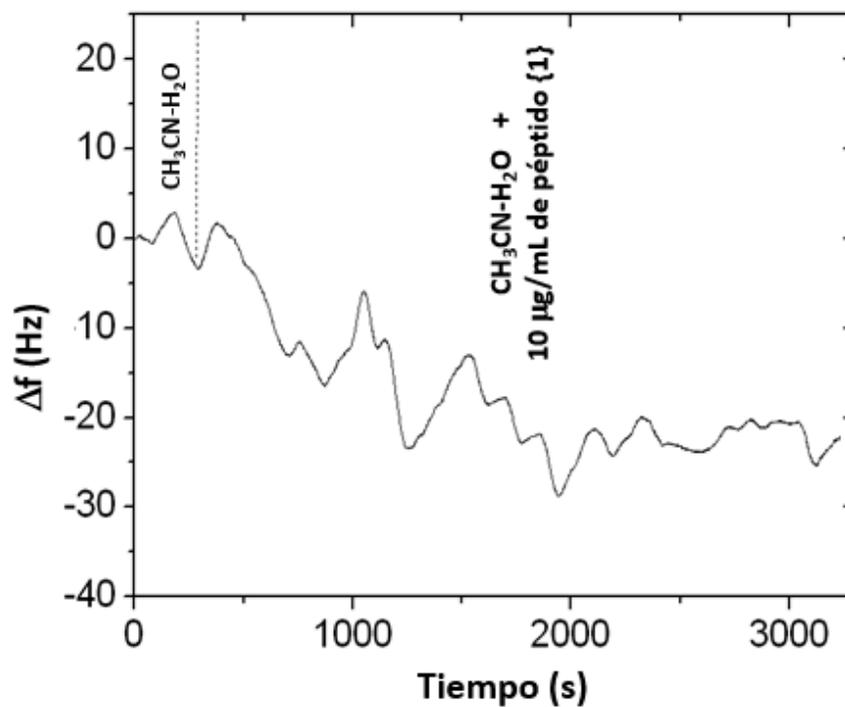


Figura 4.6 Cambio de frecuencia relativa con respecto al tiempo para la adsorción del péptido {1} ($10 \mu\text{g/mL}$) sobre una superficie de Au.

La primera concentración de péptido en la solución de modificación del electrodo que se exploró fue 10 $\mu\text{g/mL}$, con la intención de comprobar que el cambio de masa debido al péptido no sea tan grande como para saturar la señal de salida del dispositivo de la QCM. La Figura 4.6 presenta el cambio de frecuencia en la técnica de QCM para la sustitución de la solución blanco ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 50%-50% v/v) hacia la solución que contiene el péptido, comenzando en 290 s. Posteriormente al seguimiento del cambio de frecuencia de QCM en la solución peptídica durante 2930s, se percibió sólo un ligero cambio de -23 Hz, correspondientes a $0.032 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$. Al distinguir que el cambio de frecuencia es pequeño, es obvio que la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ no satura la señal de la QCM, así que se continuó con el estudio para una concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$, que, en el capítulo anterior, se reveló como la concentración con mayor recubrimiento de péptido {1} cuando el medio modificador era metanol.

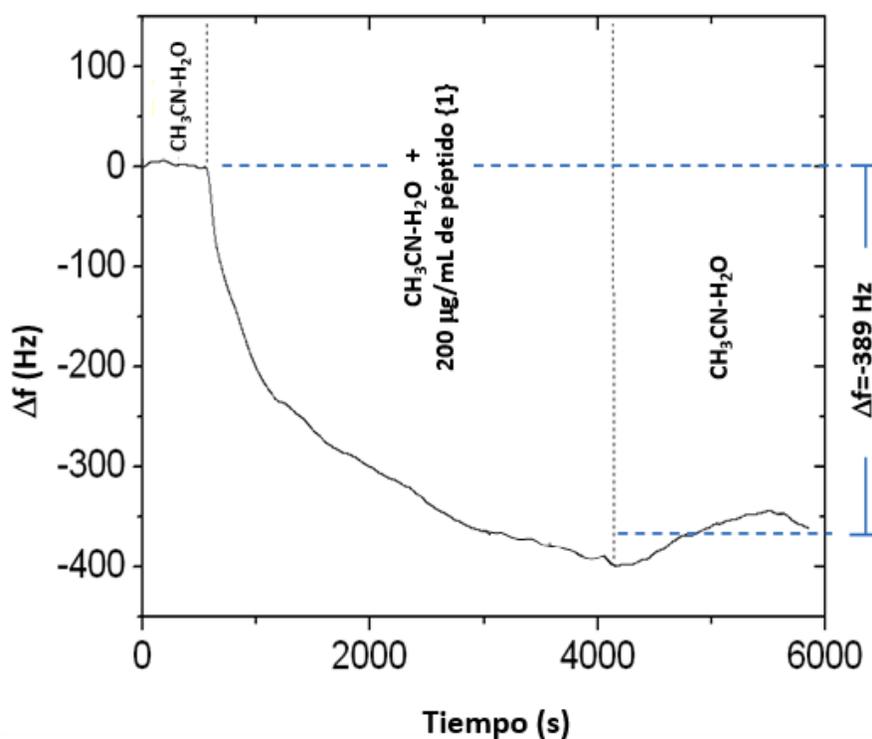


Figura 4.7 Cambio de frecuencia relativa con respecto al tiempo para la adsorción del péptido {1} (200 $\mu\text{g/mL}$) sobre una superficie de Au

En la Figura 4.7 se muestra el cambio de frecuencia de QCM durante la recirculación de una solución en ausencia y en presencia del péptido modificador (con una concentración 200 µg/mL de péptido). Durante los primeros 580 s se registró el Δf de la mezcla CH₃CN/H₂O 50%-50% v/v, y se tomó esta señal como línea base. A partir de 580 s se presentó una disminución de la frecuencia con respecto al tiempo durante la circulación de la solución del péptido {1} en CH₃CN/H₂O 50%-50% v/v, hasta que el valor del Δf tendió a cero. Esto indica que ya no existió un aumento de masa apreciable, alrededor de 4150 s. El Δf igual a -389 Hz fue atribuido a la adsorción química del péptido {1} con la formación de enlaces Au-S de los residuos de cisteínas del péptido a la superficie de Au del cuarzo. Cabe señalar que las moléculas de péptido modificador que se adsorbieron físicamente y que no formaron un enlace Au-S estable fueron desorbidos con un cambio de solución, después de t=4150s. Este fenómeno se corroboró con el aumento de la frecuencia, que a su vez está relacionado con la disminución de masa sobre el cuarzo.

Mediante las micrografías de SEM fue posible observar a los 5 minutos de depósito la formación de una capa de grosor de 8.1 ± 0.2 nm, y fue interesante relacionarlo con la masa obtenida mediante la QCM. Así, se retomó la Ecuación 1, se consideró que la QCM que se utilizó posee una sensibilidad de 350 pg Hz^{-1} y que el cambio de frecuencia atribuido al autoensamble del péptido a los 5 minutos de depósito fue de 159 Hz, se pudo calcular un depósito de 55.65 ng, como se muestra a continuación:

$$\Delta m = -a \cdot \Delta f = -\left(350 \frac{\text{pg}}{\text{Hz}}\right) (-159 \text{ Hz}) = 55.650 \text{ pg}$$

$$55,650 \text{ pg} \cdot \frac{1 \text{ ng}}{1000 \text{ pg}} = 55.65 \text{ ng}$$

Complementariamente, la densidad relativa de la capa del péptido fue estimada utilizando la ecuación 2, donde m es la masa de la película obtenida a partir del experimento de QCM (55.6 ng), h es el grosor de la película estimada por SEM (8.1nm), A es el área geométrica del cuarzo de Au (0.196 cm^2 , cuando el D=0.5cm) y $\rho_{\text{H}_2\text{O}}$ es la densidad del agua (1 g cm^{-3}).

$$\delta = \frac{m}{h A \rho_{H_2O}} \quad \text{Ec. 4.2}$$

$$\delta = \frac{55.65 \times 10^{-9} ng}{(8.1 \times 10^{-7} cm)(.196 cm^2)(1 \frac{g}{cm^3})} = 0.35053$$

Es importante mencionar que el valor del grosor medido mediante SEM podría no ser igual al valor esperado mediante las condiciones de QCM, ya que los experimentos de SEM fueron realizados en vacío, mientras que el experimento de QCM es llevado a cabo en medio acuoso. Así, la densidad determinada por la ecuación 4.2, debería ser mayor a la densidad esperada en solución, dado que el grosor sería más grande debido a la solvatación. La densidad calculada de 0.35 es aproximadamente el 20% de la densidad del péptido cristalizado (d=1.5), indicando que la película del péptido que se ensambla sobre el Au incluye un gran volumen muerto y es probable que sea altamente desordenada.

Está bien establecido que los compuestos que contienen grupos tioles se adsorben químicamente sobre el Au mediante la formación del enlace covalente S-Au. Se tiene como antecedente del capítulo 3 que el péptido {1} (con dos residuos de cisteína terminales) tiene una sección hidrofóbica con residuos de fenilalanina y una sección hidrofílica con un residuo de ácido aspártico. Un modelo propuesto que puede explicar la baja densidad del péptido atado a la superficie y también explicaría porque la capa del péptido observada mediante SEM creció más allá de 8.1 nm y permitió la conexión entre islas de Au. Luego de 5 minutos de depósito se puede pensar que no se logró el enlace de los dos S terminales del péptido {1} con el Au, y que nuevamente se estableció solamente un enlace Au-S con la sección hidrofóbica del péptido, mientras que la sección polar estaría expuesta al disolvente. Bajo este esquema, se esperaría que el péptido enlazado al Au mantuviera interacciones con los péptidos en solución, de manera que se minimice la exposición de los residuos hidrofóbicos del péptido (incluyendo el Fc) al solvente. Se visualiza que una manera de lograrlo es mediante la polimerización del péptido a través de enlaces disulfuro [157].

En seguida, se estudió la respuesta electroquímica del electrodo de Au modificado con el péptido. Para este estudio, la película electroactiva fue preparada mediante inmersión de un electrodo de Au en una solución CH₃CN:H₂O 50%-50% v/v con el péptido en una concentración de 200 µg mL⁻¹ durante 2 horas. Una respuesta lineal de la corriente del pico de oxidación (I_p) con respecto a la velocidad de barrido (v) fue observada y se puede aplicar la ecuación

$$I_p = \frac{z^2 n F^2 A v}{4RT} \quad \text{Ec. 4.3}$$

Donde z es igual al número de electrones transferidos durante la reacción redox, que para el ferroceno vale 1, n es el número de moles de péptido electroactivo en la capa peptídica, F es la constante de Faraday (96,485 C mol⁻¹), A es el área geométrica de la superficie de Au (0.196 cm²) y v es la velocidad de barrido con unidades de V s⁻¹, R es la constante de los gases ideales (8.314 J K⁻¹ mol⁻¹) y T es la temperatura en Kelvin.

El número de péptidos electroactivos calculados utilizando la ecuación 4.3, fue 2.3 x 10⁻¹¹ mol. Con la carga asociada a la desorción del péptido en un medio básico se calculó que el recubrimiento superficial del péptido adsorbido que fue de 1.2 x10⁻¹⁰ mol cm⁻². El número total de unidades peptídicas para la película calculada mediante QCM tomando un cambio de frecuencia de 389 Hz y utilizando la ecuación 4.1 fue 1.1 x10⁻¹⁰ mol, que concuerda con el recubrimiento molar calculado por voltamperometría. La relación entre los péptidos electroactivos calculados por voltamperometría y los péptidos totales adsorbidos en la película calculados por QCM fue de 0.21, indicando que una gran proporción de ferrocenos electroativos (79%) están localizados en microambientes donde la electrotransferencia está impedida.

4.3.3 Estudio cinético de quimisorción del péptido {1} mediante AFM

Hasta ahora se han estudiado diferentes condiciones del autoensamble, como el solvente y el tiempo de modificación, sin embargo, los estudios en las diversas técnicas utilizadas suponen que el péptido {1} se sigue enlazando con solamente una de las dos terminaciones tioladas. Así,

se vuelve interesante investigar la formación de nanoestructuras aisladas. Debido a ello se eligió realizar una serie de experimentos sobre placas de aluminosilicato a dos diferentes tiempos de preparación de la solución modificadora (una solución peptídica recién preparada y otra con 2 meses de almacenamiento o añejamiento), y manteniendo la concentración del péptido en $200\mu\text{g mL}^{-1}$ en $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50%-50% v/v.

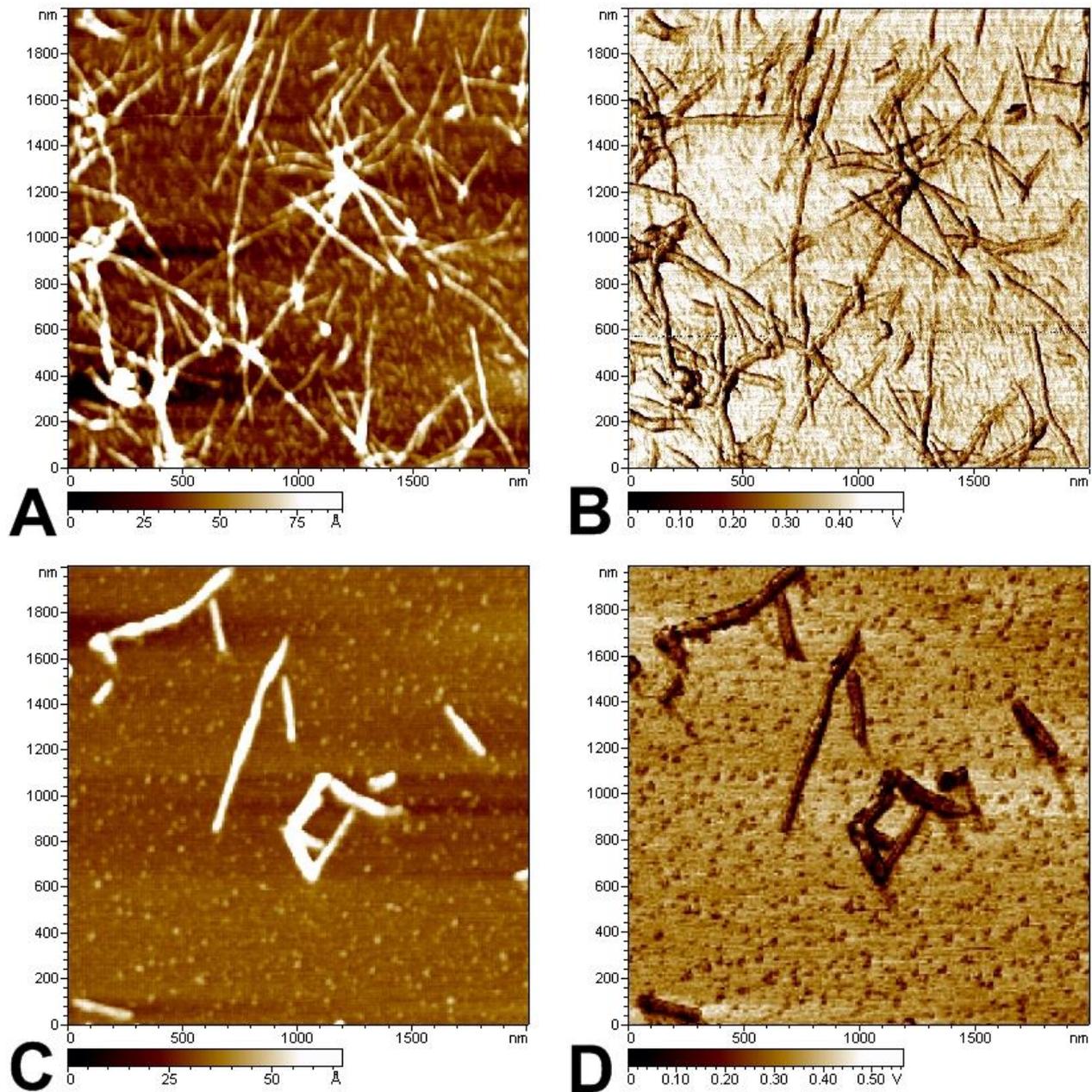


Figura 4.8 Micrografías AFM de las nanoestructuras sobre mica de la adsorción del péptido {1} a partir de una solución recién preparada con concentración $200\mu\text{g/mL}$ en $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50%-50% v/v para 10 minutos (A y B) y 1 minuto de adsorción (C y D) sobre la superficie. (A y C) modo topológico, (B y D) modo fase.

Para el depósito de una gota de 50µL de la solución recién preparada sobre la mica sin utilizar previamente y con tiempo de autoensamble de 10 min sobre la mica se observaron conglomerados de moléculas hasta nanoestructuras lineales. Se midieron 23 nanoestructuras lineales, y presentaron longitudes que van desde 100 nm hasta 1 µm de largo, la longitud promedio fue de 359.3 ± 153.0 nm, tanto en las imágenes en modo topológico (Figura 4.8 (A)), como en modo fase (Figura 4.8 (B)).

Las moléculas del péptido {1} fueron adsorbidas sobre el sustrato de aluminosilicato mediante una adsorción física. Las nanoestructuras pueden ser observadas con más precisión mediante la disminución del tiempo de adsorción a 1 minuto (Figura 4.8 (C), modo topológico, y (Figura 4.8 (D)), modo fase). Al conseguir nanoestructuras aisladas, se midieron las alturas para 22 de estas nanoestructuras con valores de 1.4 ± 0.2 nm para 6 nanoestructuras, 1.5 ± 0.2 para 2 nanoestructuras, 2.7 ± 0.2 para 10 nanoestructuras y 4.0 ± 0.3 nm para 4 nanoestructuras.

Los valores de altura fueron comparables con la longitud de los lados de un prisma rectangular que encierra a una estructura optimizada del nonapéptido conjugado con Fc en diferentes conformaciones (Figura 4.9) con uno de los lados midiendo 1.4 nanómetros para un péptido extendido (A), 2.6 nm para un cuasi-anillo abierto (B). Para un arreglo dimérico, se observaron dos lados que pueden coincidir con las mediciones anteriormente realizadas, 2.7 nm y 4 nm.

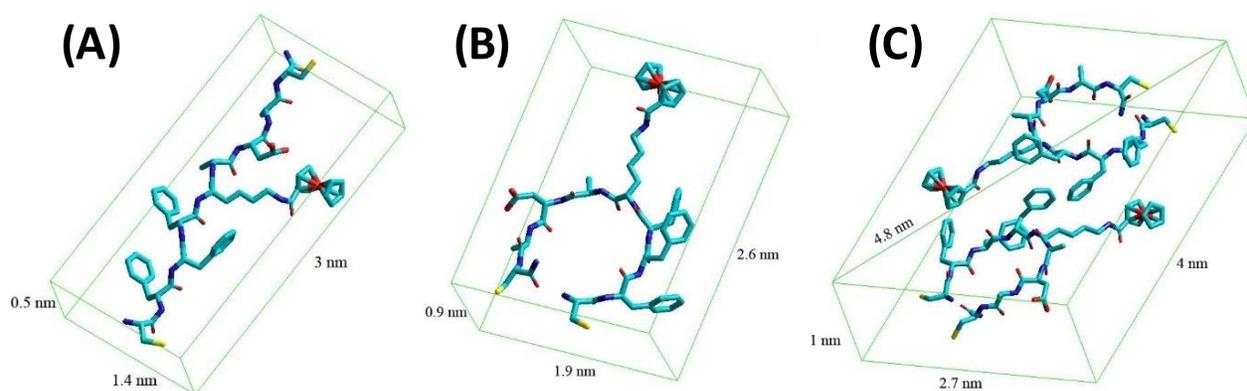


Figura 4.9 Modelos moleculares para el péptido {1} en diferentes arreglos, como (A) un monómero, (B) una estructura de anillo abierto y (C) arreglo de dímeros. Para mejor claridad en las estructuras los átomos de hidrógeno fueron omitidos.

Esto sugiere que una unidad solitaria de nonapéptido conjugado con Fc se autoensambla para formar nanoestructuras lineales descansando sobre la superficie de la mica. La altura mayor (4.0 nm) podría ser atribuida al apilamiento de 2 nanoestructuras, posiblemente por las interacciones aromáticas.

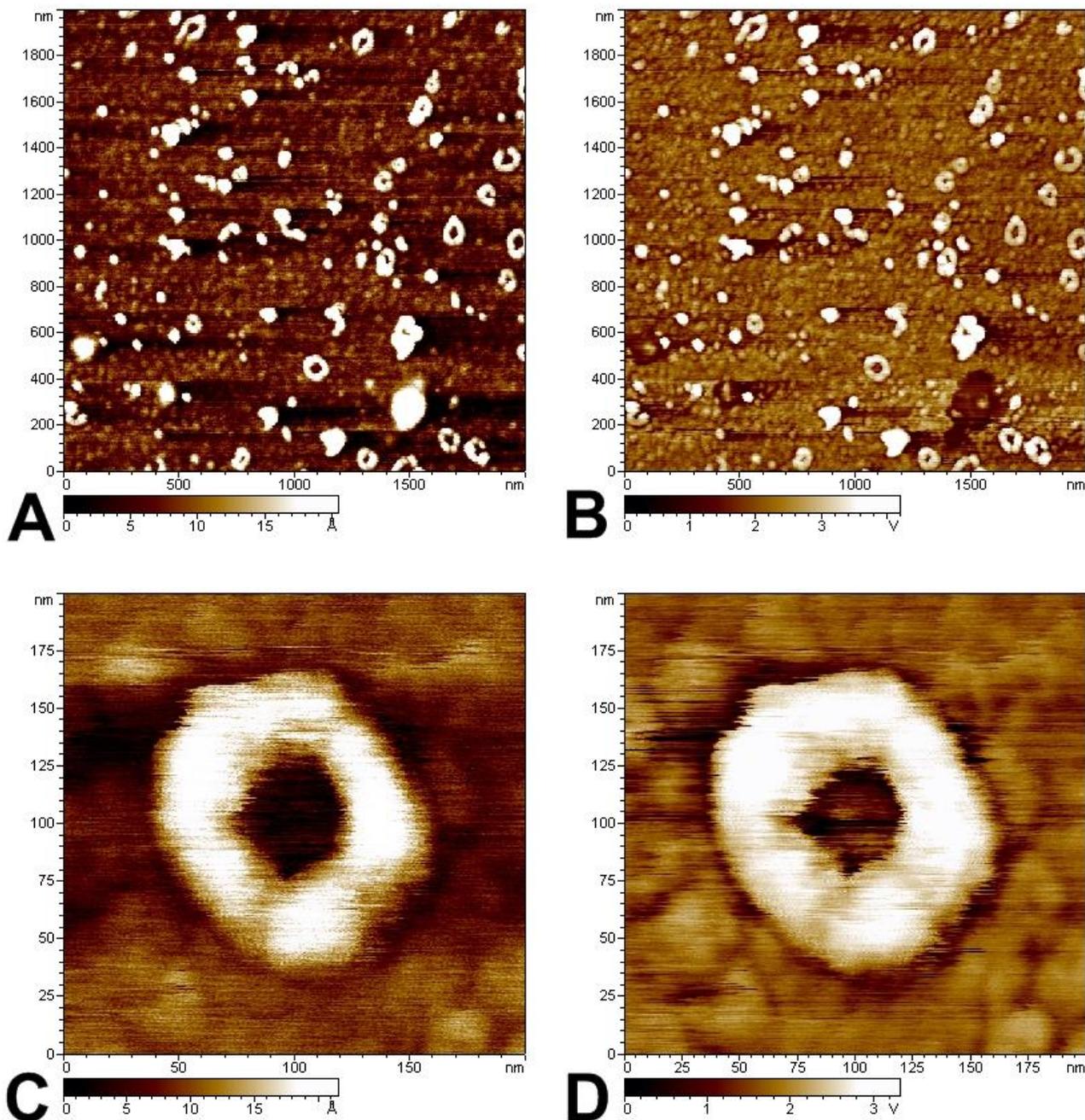


Figura 4.10 Micrografías AFM de las nanoestructuras sobre mica de la adsorción del péptido {1} a partir de una solución almacenada durante 2 meses a 4°C con concentración 200µg/mL en CH₃CN:H₂O 50%-50% v/v para 10 minutos de adsorción (A y C) modo topológico, (B y D) modo fase.

Las imágenes de fase de las nanoestructuras lineales preparadas a partir de soluciones frescas (Figura 4.8 (A) y (C)) tuvieron un contraste más pronunciado que las imágenes correspondientes en el modo topológico (Figura 4.8 Figura 4.(B) y (D)). Esto indica un arreglo molecular cristalino para el ensamble lineal, que concuerda con lo que ha sido reportado para otras nanoestructuras peptídicas [158].

Como se había mencionado anteriormente (capítulo 1), la formación de nanotubos a partir de los péptidos cíclicos que contienen aminoácidos L/D alternados es debido a los enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo de un ciclo y los -NH- de los grupos amida de otro ciclo, estos grupos amida son casi perpendiculares a la columna vertebral de los ciclos planos con conformación antiparalela [159]. Esta clase de arreglo puede ser solamente alcanzado si el péptido adopta una conformación de U, que concuerda con los datos experimentales presentados en este trabajo. Una constante de solubilidad de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a una temperatura de 23°C fue estimada, ya que por debajo de esta concentración no se observó la formación de nanoestructuras.

Con el diámetro se calculó el perímetro del anillo con un valor de 368.3 nm que es similar a la longitud promedio de las nanoestructuras lineales (359.3 nm) observadas en la Figura 4.8. Esta similitud de longitudes sugiere que los anillos se formaron a partir de las estructuras lineales. Para confirmar que los nanoanillos se formaron con la solución peptídica añejada se determinó si las soluciones peptídicas envejecidas permanecieron intactas. Así, se obtuvieron los cromatogramas de HPLC, con su respectivo espectro, tanto de una solución peptídica fresca como de una añejada y no se observó un cambio del perfil cromatográfico. Por lo tanto, ya que el péptido permaneció inalterado cuando se comparan la solución fresca y la añejada y las condiciones para la adsorción del péptido sobre la mica fue la misma en ambos casos, se concluye que el ensamble del péptido en las diferentes morfologías sucede en solución. Un comportamiento similar ha sido reportado previamente para un oligopéptido autoensamblado [160], y entonces se puede inferir que las nanoestructuras lineales sufren, en una primera etapa, una transición a estructuras curvas, y partir de éstas se forman los nanoanillos.

Esto también fue respaldado por la formación de algunas nanoestructuras curvas después de tratar a la superficie de la mica con solución peptídica fresca y tanto nanoestructuras curvas

como en forma de anillos de similares alturas fueron observadas (con 1.6 y 1.4 nm, respectivamente).

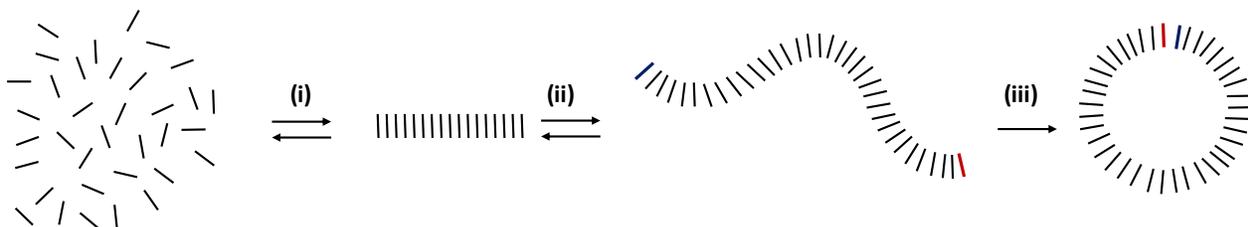


Figura 4.11 Esquema del mecanismo de autoensamblado donde se representa (i) autoasociación de las unidades peptídicas para formar nanoestructuras lineales, (ii) reorganización de la nanoestructura a una forma curvada y (iii) formación de un anillo.

Un mecanismo congruente con las observaciones experimentales, es propuesto en la Figura 4.11

Figura 4., donde (i) las nanoestructuras curvas y lineales son formadas (ambas en equilibrio (ii)) provenientes del autoensamble de las unidades peptídicas; simultáneamente varillas cristalinas son desarrolladas, finalmente, (iii) los nanoanillos que se formaron en la solución añeja son producto de la autoasociación de las terminaciones de los péptidos en una nanoestructura curvada. Esta última hipótesis es consistente con una cinética lenta, donde la probabilidad de colisión entre dos terminaciones del péptido de una nanoestructura de longitud promedio de 359 nm es ineficaz y, también es coherente con la reversibilidad entre las nanoestructuras lineales y curvas y la ausencia de nanoestructuras lineales sobre la mica cuando se utiliza la solución añeja.

4.3.4 Estudio cinético de quimisorción del péptido {1} mediante Espectroscopia Raman

El análisis de los espectros de las muestras mencionadas anteriormente descubre que para el péptido conjugado con Fc se tienen señales características en 1030, 1102, 1158, 1604 y 3060 cm^{-1} , y que para la superficie de Au limpia las señales propias están en 2800 y 2930 cm^{-1} . La comparación de los 3 espectros revela que las bandas en 998 y 1157 cm^{-1} son causadas por CH_3CN remanente en el péptido sólido, mientras que las señales en 1534 y 1580 cm^{-1} son debidas a la presencia del CH_3CN sobre la superficie de Au.

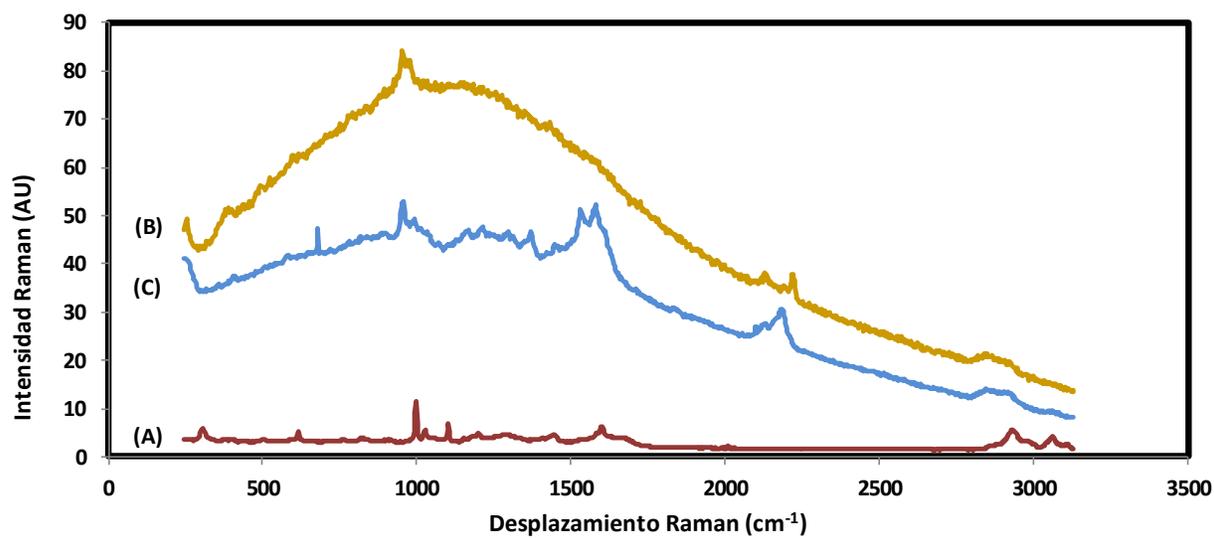


Figura 4.12 Espectros Raman (A) Péptido {1} sólido, (B) Superficie de Au limpio y (C) Acetonitrilo sobre superficie de Au.

Además, se obtuvieron los espectros Raman para las superficies de Au modificadas con péptido conjugado en $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ 50%-50% v/v a diferentes tiempos ($t= 1, 3$ y 6 min), observándose un aumento en la intensidad de las bandas en 1030 y 1102 cm^{-1} , confirmando la quimisorción del péptido sobre el electrodo. Asimismo, se percibió un incremento en la intensidad de las señales atribuidas a la adsorción de CH_3CN en los valores de $1158, 1460, 1534$ y 2187 cm^{-1} .

Finalmente se puede puntualizar que la señal en 994 cm^{-1} corresponde a los enlaces C-C del ciclopentadieno que forma el ferroceno, y las señales en 1027.9 cm^{-1} y 1100.0 cm^{-1} son características de los enlaces C-C en los anillos bencílicos de los residuos de fenilalanina.

4.4 CONCLUSIONES PRELIMINARES

En el trabajo desarrollado en este último capítulo se obtuvieron las micrografías SEM del péptido {1} a partir de una solución de acetonitrilo-agua 50%v/50%v con concentración 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ del péptido a diferentes tiempos de modificación. En el análisis de SEM se observó que en un tiempo de adsorción de 5 minutos se formó una capa de péptido con grosor de $8.1 \pm 0.1\text{nm}$,

con algunos sitios específicos donde la película peptídica alcanzaba un grosor de hasta 42 ± 0.1 nm y que fue atribuido a la formación de una multicapa en lugar de una monocapa.

Se realizó un estudio dinámico de la adsorción del péptido {1} mediante QCM, donde un cambio de frecuencia es relacionado con la masa del péptido que se adsorbió sobre Au. En este estudio para un tiempo de modificación de 5 minutos se obtuvo un $\Delta f = 159$ Hz, correspondiente a 55.56 ng.

Con la altura y la masa de la capa autoensamblada sobre Au (obtenidas por SEM y QCM, respectivamente), se calculó la densidad relativa dicha peptídica con valor de 0.35, que representa el 20% de la densidad del mismo péptido sin adsorberse sobre Au, indicando que la capa autoensamblada es altamente desordenada.

El análisis electroquímico de la película electroactiva preparada a partir una solución de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50%-50% v/v con el péptido en una concentración de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ reveló una respuesta lineal de la corriente del pico de oxidación (I_p) con respecto a la velocidad de barrido (v), se calculó un recubrimiento superficial molar de péptidos totales de $1.2 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ y de ferrocenos electroactivos de $2.3 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$, lo que indica que solamente un 19% de péptidos presentan el microambiente adecuado para sufrir electrotransferencia.

La formación de nanoestructuras autoensambladas, a partir de una solución de $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 50%v/50%v con $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ del péptido {1}, cuando es recién preparada y cuando fue almacenada durante 2 meses fue estudiada mediante AFM. Para la solución fresca se encontraron nanoestructuras con una longitud promedio de 359.3 nm y con alturas de 1.4 ± 0.2 nm, 1.5 ± 0.2 nm, 2.7 ± 0.2 nm y 4.0 ± 0.3 nm que coinciden con la longitud de uno de los lados de un prisma rectangular que encierra una estructura optimizada del péptido en forma lineal, de cuasi-anillo abierto o de un arreglo dimérico. En cambio, para la solución almacenada durante 2 meses a 4°C se encontraron nanoestructuras curvas y de anillo, donde el diámetro externo del anillo tuvo un valor promedio de 117.3 ± 8.1 nm, correspondiente a un perímetro de 368.3 nm que es similar a la longitud promedio de las nanoestructuras lineales observadas en la solución recién preparada.

Después de verificar con un perfil cromatográfico que el péptido {1} en la solución añejada no cambian su estructura química con respecto al péptido en solución fresca, se propuso que el

mecanismo de formación de las nanoestructuras tiene 2 pasos rápidos y en equilibrio en los que se forman las estructuras lineales y los cuasi-anillos, para luego presentar un paso lento en el que se forman los anillos.

Se obtuvieron los espectros Raman para las superficies de Au modificadas con péptido conjugado en CH₃CN 50% - H₂O 50% a diferentes tiempos (t= 1, 3 y 6 min) y se observó un aumento en la intensidad de las bandas en 1030 y 1102 cm⁻¹ que son señales características del péptido {1}, así se confirmó que la quimisorción del péptido sobre el electrodo aumenta durante los primeros 6 minutos de modificación.

4.5 REFERENCIAS

136. K.B. Rodenhausen, M. Schubert, *Thin Solid Films*, 519, (2011), 2817-2820.
137. D. K. Schwartz, *Annual Review of Physical Chemistry*, 52, (2001), 107- 137.
138. C. O. O'Dwyer, G. Gay, B. Viaris de Lesegno, J. Weiner, *Langmuir*, 20, (2004) 8172-8182
139. Y. Zhang, X. Qiu, P. Gordiichuk, S. Soni, T. L. Krijger, A. Herrmann, R. C. Chiechi, *The Journal of Physical Chemistry C*, 121, (2017), 14920-14928.
140. A. Ahmad, L. P. Kee, N. S. Jusoh, *Middle-East Journal of Scientific Research*, 24, (2016), 2152-2158.
141. J. P. Folkers, P.E. Laibinis, G. M. Whitesides, *Langmuir*, 8, (1992), 1330-1341.
142. Q. Guo, F. Li, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16,(2014), 19074-19090.
143. V. Y. Kutseko, Y. Y. Lopatina, L. Bossard-Giannesini, O. A. Marchenko, P. Pluchery, S. V. Snegir, *Nanotechnology*, 28, (2017), 235603-235610.
144. J. Wang, P. Gründler, *Electroanalysis*, 15, (2003), 1756-1761
145. T. M. Uehara, H. B. Aguiar, K. Bergamaski, P. B. Miranda, *Journal of Physical Chemistry C*, 118, (2014), 20374-20382.
146. M. Antuch, D. G. Abradelo, R. Cao, *Electroanalysis*, 27, (2015), 1939-1943.
147. A. L. Eckermann, D. J. Feld, J. A. Shaw, T. J. Meade, *Coordination Chemistry Reviews*, 254, (2010) 1769-1802.
148. V. Chechik, H. Schönherr, G. J. Vancso, C. J. M. Stirling, *Langmuir*, 14, (1998), 3003-3010.

149. A. Ulman, J. F. Kang, Y. Shnidman, S. Liao, R. Jordan, G. Y. Choi, J. Zaccaro, A. S. Myerson, M. Rafailovich, J. Sokolov, C. Fleischer, *Reviews in Molecular Biotechnology*, 74, (2000), 175-188.
150. M. A. Bryant *Journal of the American Chemical Society*, 113, (1991), 8284-8293.
151. N. Hassan, R. Holze, *Russian Journal of Electrochemistry*, 48, (2012), 401-411.
152. P. Y. Blanchard, G. T. Kenfack, E. Levillain, C. Gautier, *Chemistry Select*, 1, (2016), 3171-3174.
153. K. Shimazu, I. Yagi, Y. Sato, K. Uosaki, *Langmuir*, 8, (1992), 1385-1387.
6020-6022.
154. V. Sorrivias de Lozano, A. Morales, M.J. Yáñez, *Principios y práctica de la Microscopia Electrónica*, 1ª Edición, e-Book, (2014), ISBN:978-987-43-4752-7
155. A. R. Hillman, *Encyclopedia of Electrochemistry*, (2007), 230-288.
156. G. Sauerbrey, *Zeitschrift für Physik*, 155, (1959), 206-202.
157. M. Lazerges, H. Perrot, N. Rabehagaso, E. Antoine, C. Compere, *Chemical Communications*, (2005), 6020-6022.
158. R. Stiufiuc, F. Toderas, M. Iosin and G. Stiufiuc, *International Journal of Modern Physics B*, 24, (2010), 757-761.
159. M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature*, 366, (1993), 324-327.
160. V. Haridas, S. Sahu, A. R. Sapala, *Chemical Communications*, 48, (2012), 3821-3823.

CONCLUSIONES GENERALES

El objetivo general de este trabajo fue sintetizar y caracterizar péptidos con aminoácidos L/D conjugados con ferroceno para la modificación de electrodos de Au con un posible uso en el desarrollo de biosensores electroquímicos. En este sentido se logró sintetizar 3 péptidos de aminoácidos L/D alternados y conjugados con ferroceno para producir electrodos de Au modificados como materiales híbridos que poseen características redox, donde el diseño del péptido {1} permite la posibilidad de producir cuasianillos adheridos mediante 2 enlaces Au-S, mientras que el diseño de los péptidos {2} y {3} nos permitió inferir cómo la secuencia de aminoácidos contribuye a la topología de las capas autoensambladas de estos péptidos. Se determinó que los péptidos {1} y {2} que poseen en su estructura aminoácidos con carácter hidrofóbico se enlazan al Au de forma perpendicular al plano del electrodo, mientras que el péptido {3} que posee aminoácidos con carácter hidrofílico se adhiere paralelamente a la superficie del Au. Esta disposición espacial afectó la velocidad de transferencia electrónica, observándose que el péptido {3} posee una mayor rapidez en la electrotransferencia al tener el centro redox más próximo a la superficie del electrodo.

Retomando la idea de que el péptido {1} podría formar cuasianillos sobre superficies de Au, la cinética de formación de este péptido fue estudiada y se demostró que presentó un proceso de ensamblaje desordenado en el que cerca del 80% de los ferrocenos que tiene la SAM están impedidos para presentar una transferencia electrónica. Por otro lado, cuando el péptido {1} se adsorbe en mica presentó una transición morfológica desde nanoestructuras lineales hasta la formación de nanoanillos cuando se les permite a las nanoestructuras formarse durante algunos meses. El trabajo desarrollado hasta el momento es una herramienta útil para ayudarnos en la comprensión de cómo factores de modificación como la secuencia de aminoácidos en el péptido, el solvente y el tiempo de almacenaje de la solución modificadora contribuyen en la formación de estructuras supramoleculares cuando son utilizadas en la modificación de electrodos.