



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
METALURGIA**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE
POLI(CISTEÍNA) POR REACCIÓN DE
BIOCONJUGACIÓN**

Tesis

que para obtener el título de:

INGENIERO EN MATERIALES

Presenta

Han Noé Umaña Kossio

Hermosillo, Sonora

diciembre de 2018

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

DEDICATORIA

A mis padres

Edgardo Noé Umaña Gautrín y

Ana Valentina Kossio Barajas

A mí abuela

María Elena Barajas Olvera

A mí hermana

Uma Elena Umaña Kossio

A mi alma gemela

María Ley Flores

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ofrecerme la oportunidad de completar mis estudios en esta alma mater.

Al Dr. Paul Zavala Rivera por guiar este trabajo hasta su conclusión.

Al Dr. Armando Lucero Por ofrecer su asesoría y conocimientos.

Al Dr. Ramón Moreno Corral por su asistencia y apoyo al trabajo.

A la Dra. Rosa Elena Navarro y a la Dra. Yedith Soberanes por auxiliar los estudios contenidos en este trabajo.

A la M.C. Anya Argüelles y al M.C Marco Antonio Vizcarra por compartir su conocimiento y experiencia a la realización de este estudio.

A María del Carmen Ley Flores por su apoyo y presencia en todas las instancias de este trabajo.

Al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Sonora, por proporcionar el material, equipo e instalaciones para la compleción de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	ix
NOMENCLATURA	x
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Introducción.....	2
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos particulares.....	4
II. ANTECEDENTES	5
2.1. Aminoácidos y péptidos.....	6
2.2. Enlace amida.....	7
2.3. Química de la bioconjugación.....	8
2.4. Acoplamiento por carbodiimidas.....	9
2.5. Mecanismos de reacción.....	10
2.6. Reacciones competitivas.....	12
2.7. Ésteres succinimida.....	13
2.8. Condiciones óptimas de reacción.....	14
2.9. Métodos de caracterización.....	16
2.9.1. Espectroscopía infrarroja.....	16
2.9.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear RMN.....	19
2.9.3 Espectrometría de masas.....	22
III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	25

3.1. Instrumentación	26
3.2. Materiales	26
3.3. Metodología de reacción.....	27
3.3.1. Metodología de bioconjugación por EDC	28
3.3.2. Muestra control de L-cisteína en agua.....	29
3.3.3. Metodología de bioconjugación por DCC	30
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1 Separación de productos	32
4.1.1. Separación de la bioconjugación con EDC.....	32
4.1.2. Separación de la bioconjugación con DCC.	33
4.2. Preparación de muestras para caracterización.....	35
4.2.1. Muestras de la bioconjugación por EDC.....	35
4.2.2. Muestras de la bioconjugación por DCC	36
4.3. ATR-FTIR	37
4.4. ¹ H RMN.....	41
4.5. Espectrometría de masas	43
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
5.1 Conclusiones	46
5.2 Recomendaciones	47
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	48
VII. ANEXO	55
Anexo A. ¹ H RMN del precipitado de L-cistina extraído de la bioconjugación por EDC.....	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de L-cistina a partir de la oxidación de la L-cisteína.....	7
Figura 2. Formación de un enlace amida mediante la reacción de condensación de una amina y un ácido carboxílico.	8
Figura 3. Estructura de las carbodiimidias DCC y EDC junto a sus respectivas ureas DCU y EDU.	10
Figura 4. Mecanismo de reacción para el acoplamiento de un grupo amina y un grupo carboxilo, mediante el uso de DCC.....	11
Figura 5. Acoplamiento de dos moléculas de L-cisteína asistida por el uso de carbodiimidias mediante el mecanismo expuesto previamente.	12
Figura 6. Reordenamiento desde O-acilisourea hacia N-acilurea.	13
Figura 7. Reacción de NHS activado con un grupo amina formando un enlace amida, NHS es liberado como grupo saliente.	14
Figura 8. Mecanismo de bioconjugación mediante el conjunto de EDC y NHS para mejorar el rendimiento de la O-acilisourea.....	15
Figura 9. Diagrama de un interferómetro de Michelson usado en la espectrometría IR.....	18
Figura 10. Equipo de espectroscopía FT-IR con módulo ATR.	19
Figura 11. Esquema del proceso de absorción característica de un núcleo atómico bajo la influencia de un campo magnético B_0	20
Figura 12. Equipo de espectroscopía RMN.....	22
Figura 13. Diagrama del proceso de fragmentación y análisis llevado a cabo por un espectrómetro de masas.....	23
Figura 14. Espectrómetro de masas (ionización por electro esparayado).....	24
Figura 15. Mecanismo para la formación de poli(L-cisteína); nótese en rojo los grupos funcionales que participan en el acoplamiento.....	28

Figura 16. Diagrama de la metodología de reacción para la bioconjugación de L-cisteína.....	29
Figura 17. Imágenes de: (a) producto rojo obtenido desde el rotavapor, (b) precipitado blanco (L-cistina) recuperado desde el filtro.....	32
Figura 18. Imágenes de: (a) extracción líquido-líquido con Cl_3CH , (b) Producto obtenido de la fase acuosa, (c) DCU extraída desde la fase orgánica.....	34
Figura 19. Muestras de RMN de: (a) el producto obtenido de la bioconjugación por EDC y (b) el producto obtenido de la bioconjugación por DCC.	35
Figura 20. Muestras para el análisis de masas de: (a) Producto de la bioconjugación por DCC, (b) Producto de la bioconjugación con EDC.....	36
Figura 21. Espectro de L-cistina formada tras la oxidación de L-cisteína en H_2O (muestra control) y el precipitado extraído de la bioconjugación con EDC.	37
Figura 22. Espectro FT-IR del producto soluble de la bioconjugación por EDC	38
Figura 23. Espectro FT-IR del producto soluble obtenido de la bioconjugación por DCC.....	39
Figura 24. Espectros FT-IR de: (a) L-cisteína, (b) producto de la reacción antes de la eliminación de DCU y (c) producto tras la eliminación de DCU.....	40
Figura 25. Espectro ^1H RMN del producto insoluble obtenido a partir de la bioconjugación con DCC.....	41
Figura 26. Espectro ^1H RMN del producto soluble obtenido a partir de la bioconjugación con EDC.....	42
Figura 27. Espectro de masas del producto acuoso obtenido en la bioconjugación por DCC.	43
Figura 28. Espectro de masas del producto acuoso obtenido en la bioconjugación por EDC.	44

RESUMEN

La L-cisteína, es un aminoácido que naturalmente constituye una parte esencial de la estructura de múltiples poliaminoácidos; ella permite a estas estructuras tener una respuesta a los diferentes ambientes químicos encontrados en los organismos. Esta respuesta, se debe al característico grupo funcional tiol, contenido en la estructura del aminoácido, que responde selectivamente al potencial de reducción del ambiente que lo rodea.

En este estudio se desarrollan procesos de síntesis, para la formación y caracterización del péptido poli(L-cisteína), mediante agentes entrecruzantes de cero espaciamento tipo carbodiimida: N,N'-diciclohexilcarbodiimida y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; las síntesis documentadas se llevaron tanto en medio acuoso como en medio orgánico, implementando N-hidroxisuccinimida como estabilizador de la reacción.

NOMENCLATURA

- 1) ATR-FTIR: Infrarrojo de transformada de Fourier con reflexión total atenuada
- 2) CHCl_3 : triclorometano (cloroformo)
- 3) DCC: 1,3-Diciclohexilcarbodiimida
- 4) DCU: 1,3-Diciclohexilurea
- 5) EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
- 6) EDU: urea derivada del 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
- 7) ESI-MS: Espectrometría de masas de ionización por electroesprayado
- 8) HCL: Ácido clorhídrico
- 9) ^1H RMN: (NMR) Resonancia magnética nuclear de protones
- 10) IR: infrarrojo
- 11) L-cys: L-cisteína
- 12) NaOH: hidróxido de sodio
- 13) NHS: Hidroxisuccinimida

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1. Introducción

Existe una gran variedad de aminoácidos, que funcionan como bloques de construcción para la síntesis de polipéptidos [1]; estos constituyen estructuras poliméricas, que extraen provecho de las propiedades biocompatibles de sus moléculas constituyentes, facilitando su uso en aplicaciones tales como: (i) modificación de superficies para dispositivos médicos, y (ii) sistemas liberadores de fármacos. Es en esta última, la modulación de los grupos funcionales dentro de estas cadenas peptídicas, permiten controlar su reacción a estímulos diversos; así como las condiciones necesarias para la liberación farmacológica, para potenciales sistemas de liberación [2].

Se encuentran documentadas diversas metodologías para la síntesis de poliaminoácidos [3, 4], involucrando la amidación de grupos carboxílicos y grupos amina, pertenecientes a este tipo de biomoléculas. El implementar agentes de acoplamiento, es práctica frecuente para concebir dichas reacciones de síntesis; entre estos agentes se encuentran las carbodiimidas, un grupo de agentes deshidratantes que facilitan la formación de enlaces peptídicos [5]. Estos agentes trabajan formando compuestos ésteres intermediarios con ácidos carboxílicos, los cuales tienden a recibir ataques de grupos nucleófilos, como las aminas, subsecuentemente formando enlaces amida. Esto mismo conlleva a la polimerización de aminoácidos como la L-cisteína, cuya respuesta a contrastes ambientales en el potencial oxido-reductor, son de relevancia para posibles aplicaciones en sistemas liberadores de fármacos [2, 6].

1.2. Justificación

Las últimas décadas han testimoniado grandes avances en el desarrollo de sistemas liberadores de fármacos (DDS), por sus siglas en inglés [7]. Estos sistemas ofrecen la posibilidad de modular la liberación de fármacos de manera selectiva, como también de optimizar los tiempos de retención dentro del organismo [8].

Los DDS basados en polímeros funcionalizados con grupos tiol, han captado interés debido a sus posibles aplicaciones para la liberación intracelular de fármacos citotóxicos [9]. Ello se debe a la única capacidad de los grupos tiol a formar enlaces disulfuro, los cuales pueden ser seccionados en presencia de ambientes reductores, como los encontrados dentro de la matriz celular [10].

Estas propiedades son de particular interés para la administración de fármacos teranósticos, puesto que las células cancerígenas albergan un ambiente altamente reductor dentro de sus paredes celulares [11]. En efecto, al interior de estas células, las concentraciones del tripéptido glutatona, un agente reductor, alcanza a ser hasta el cuádruple que el de células sanas [9].

Por consiguiente, el estudio de la presente tesis hace uso de técnicas y conocimientos pertenecientes a la química orgánica, con las que se pretende caracterizar y establecer, una metodología práctica sintetizar poliaminoácidos funcionalizados con grupos tiol. Esto, con el fin de abrir un camino para indagar las propiedades de estas biomoléculas, y sus posibles aplicaciones farmacológicas.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Desarrollar una estrategia de síntesis de cadenas poliméricas, basadas en el aminoácido L-cisteína, mediante reacción de bioconjugación, haciendo uso de agentes entrecruzantes tipo carbodiimida.

1.3.2. Objetivos particulares

- Establecer 2 metodologías de bioconjugación de L-cisteína, basadas en los entrecruzantes EDC y DCC, por medio acuoso y orgánico respectivamente.
- Determinar las diferencias fundamentales de las diferentes metodologías (por medio acuoso y orgánico), para la bioconjugación de L-cisteína.
- Establecer un procedimiento para la separación de los productos formados a partir de la síntesis.
- Someter los productos de síntesis a análisis de espectroscopía FTIR, ¹H RMN para confirmar la formación de poli(cisteína).
- Analizar la distribución de pesos moleculares de los productos de síntesis por espectrometría de masas.

II. ANTECEDENTES

2.1. Aminoácidos y péptidos

Los aminoácidos son unidades funcionales, que permiten la construcción de cadenas poliméricas lineares denominadas poliaminoácidos; a la vez estas biomoléculas llegan a conformar cadenas más complejas y extensas, denominadas péptidos. Los organismos vivientes hacen uso de 21 aminoácidos naturales para la síntesis de péptidos[12]. A su vez estas cadenas de polímeros conforman estructuras tridimensionales complejas y específicas llamadas proteínas, mismas que cumplen funciones especializadas y vitales para el metabolismo de cualquier ser vivo [12, 13].

Cada aminoácido conforma un bloque de construcción con propiedades distintas; las proteínas se enriquecen de estas características para dedicar sus estructuras a tareas únicas, requiriendo una proporción ideal de aminoácidos dentro de sus cadenas peptídicas, para alcanzar un balance de interacciones intermoleculares, tales como: puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas [14].

Los aminoácidos comúnmente se clasifican dentro de las siguientes categorías:

- a) Aminoácidos hidrofóbicos con grupos alifáticos no polares
- b) Aminoácidos polares con grupos R neutrales, pero con carga distribuida de manera inequitativa
- c) Aminoácidos con carga positiva, estos tienen carga positiva a pH fisiológico
- d) Aminoácidos con carga negativa, estos tienen carga negativa a pH fisiológico

Dentro de los aminoácidos polares se puede encontrar la L-cisteína (L-cys); un α -aminoácido, implicando la presencia de un grupo funcional en su carbono α . Este grupo es denominado sulfhidrilo (tiol) [1, 15]. Una característica notoria de este grupo funcional, es su tendencia a oxidarse en soluciones acuosas para la

formación de puentes disulfuro [11, 16]; estos puentes permiten el entrecruzamiento entre cadenas de proteínas, sirviendo de puntos de anclaje para la conformación de estructuras terciarias. En el caso específico de la cisteína, 2 aminoácidos pueden unirse por puentes disulfuro para la formación de cistina como en la figura 1. [17, 18].

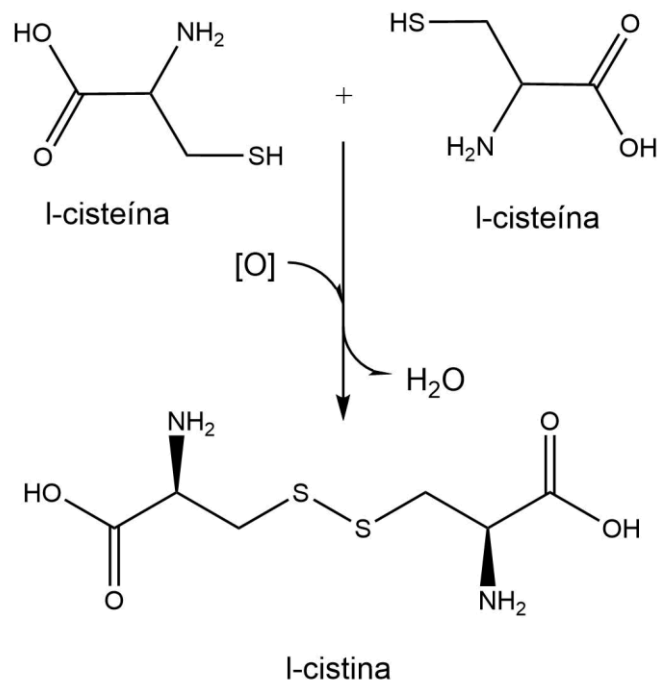


Figura 1. Formación de L-cistina a partir de la oxidación de la L-cisteína.

2.2. Enlace amida

Como se mencionó con anterioridad, el enlace peptídico (amida) es crucial para la construcción de cadenas de amino ácidos, este resulta de una reacción de condensación entre un ácido carboxílico y una amina, los cuales, por medio de una deshidratación, resultan en la formación de una amida y una molécula de agua, tal como se muestra en la figura 2 [19].

Dicho esto, la reacción no es favorecida termodinámicamente, es por ello que los organismos hacen uso de enzimas y ATP, como forma de energía libre para llevar a cabo esta reacción [20]. Una vez formado, el enlace amida es notoriamente estable en medio acuoso, con tiempos de vida rondando los 1000 años. La formación de enlaces tipo péptido son una de las estrategias más habituales en la bioconjugación de moléculas [12, 20].

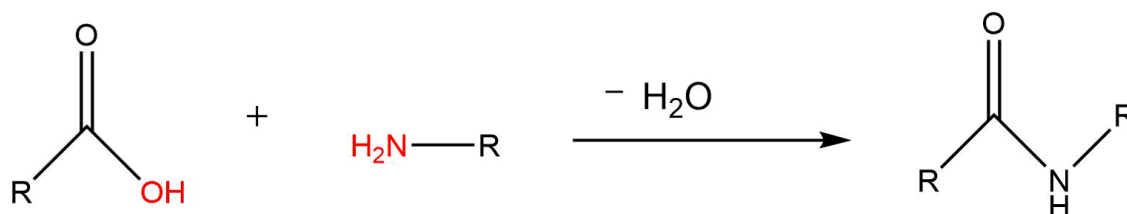


Figura 2. Formación de un enlace amida mediante la reacción de condensación de una amina y un ácido carboxílico.

2.3. Química de la bioconjugación

La bioconjugación es el proceso por el cual se forma un enlace covalente entre dos moléculas, siendo al menos una de estas, una biomolécula [21]. Existen varias estrategias para llevar a cabo este proceso; la bioconjugación es de gran utilidad en la modificación de proteínas, adición de biomarcadores, manipulación de enzimas y síntesis de biomoléculas. Toda estrategia de conjugación requiere el conocimiento de la reactividad específica entre los grupos funcionales presentes, e.g. (la reacción de condensación entre grupos amina y carboxilo para la formación de amidas) [21, 19].

Existe una reactividad muy limitada entre los grupos funcionales nativos en las biomoléculas, es por eso que la conjugación de estas es asistida con el uso de agentes entrecruzantes, estos se eligen en base a los grupos funcionales

objetivo: aminas primarias (-NH₂), carboxilos (-COOH), sulfhidrilo (-SH) y carbonilos (-CHO) [22, 20].

Los "zero-length crosslinkers" (agentes entrecruzantes de longitud cero), son una clasificación de entrecruzantes que permiten la conjugación de dos moléculas sin la adición de átomos entremedio [21], significando que un enlace covalente se establece directamente entre un átomo de la primera molécula con un átomo de la segunda. El tipo más común de estos entrecruzantes son las carbodiimidas [19], estas puede mediar la formación de amidas entre los grupos amina y carboxilo ya mencionados [23, 24].

2.4. Acoplamiento por carbodiimidas

Las carbodiimidas, son agentes entrecruzantes que permiten la formación de enlaces amida entre ácidos carboxílicos y aminas. Su uso es común para la bioconjugación de proteínas oligonucleótidos y péptidos [20]. Existen carbodiimidas solubles en agua y carbodiimidas insolubles en agua. Estas últimas son usualmente preferidas debido a que gran mayoría de las biomoléculas existentes son solubles en agua. Además, esto implica que los productos secundarios (ureas) generados son también solubles en el medio de la reacción, facilitando así los procesos de purificación [21].

El hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida o EDC, es una carbodiimida soluble en agua de uso extensivo [25, 26]. Existe una gran variedad de síntesis que emplean su uso. Una de las razones por las que es preferido, es por el producto secundario que genera, el cual es soluble en agua y puede ser removido por procesos simples de diálisis o filtración por gel [27].

La dicilohexilcarbodiimida o DCC, es una carbodiimida insoluble en agua [28] [29]. Esta ha sido empleada en la síntesis de péptidos desde hace varias décadas. Contrario a lo sucedido con el EDC, el subproducto principal de la DCC,

la dicitclohexilurea o DCU, es poco soluble en soluciones acuosas, y solo ligeramente soluble en solventes orgánicos; esquemas de estas especies químicas se pueden apreciar en la figura 3 [20, 29].

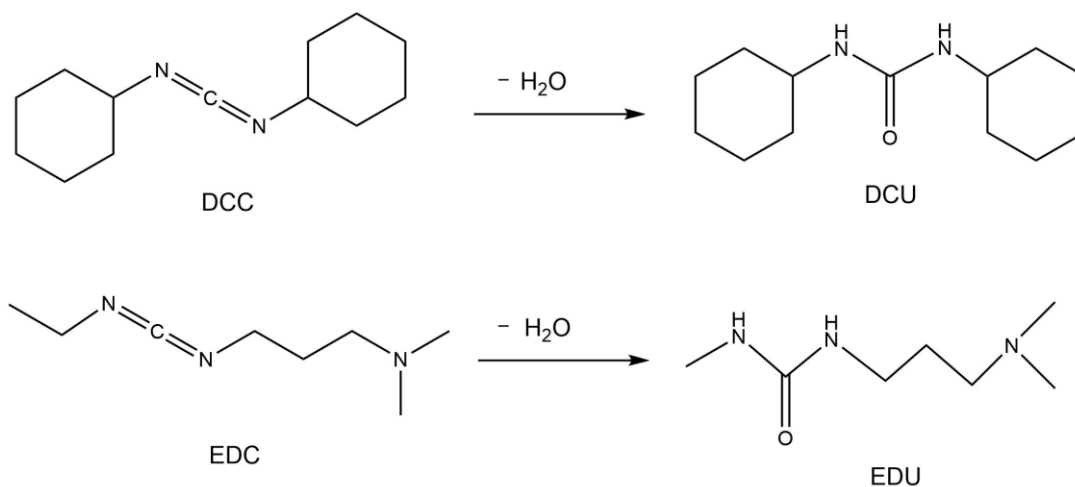


Figura 3. Estructura de las carbodiimidas DCC y EDC junto a sus respectivas ureas DCU y EDU.

2.5. Mecanismos de reacción

La conjugación de aminoácidos por medio de carbodiimidas se produce por medio de la activación del grupo carboxilo [30]. Tomando el caso específico de la DCC como agente entrecruzante, el primer paso que se dará, es la adición del agente al grupo carboxilo, para formar una o-acilisourea como intermedio de la reacción.

En la figura 4, se puede observar que el par desapareado de electrones de uno de los nitrógenos en la carbodiimida, induce la deprotonación del ácido carboxílico, dejándolo como un ion carboxilato (carga negativa); al recibir el protón, la carbodiimida pierde densidad electrónica en su carbono central, formando un carbocatión expuesto a un ataque nucleofílico, por parte del ion carboxilato [31].

El ataque nucleofílico del ion carboxilato termina con la formación de un éster o-acilisourea, implicando un enlace entre el oxígeno del grupo carboxilo y el carbono central de la carbodiimida [28]. Tras esto, la incorporación de la amina es posible, puesto que el éster intermedio tiene una densidad electrónica menor en el carbono de su grupo carbonilo, causa de la electronegatividad combinada de los dos oxígenos aledaños; la amina actuando como nucleófilo ataca al carbono expuesto, resultando en un enlace amida y la liberación de una urea, DCU en el caso particular evaluado [31].

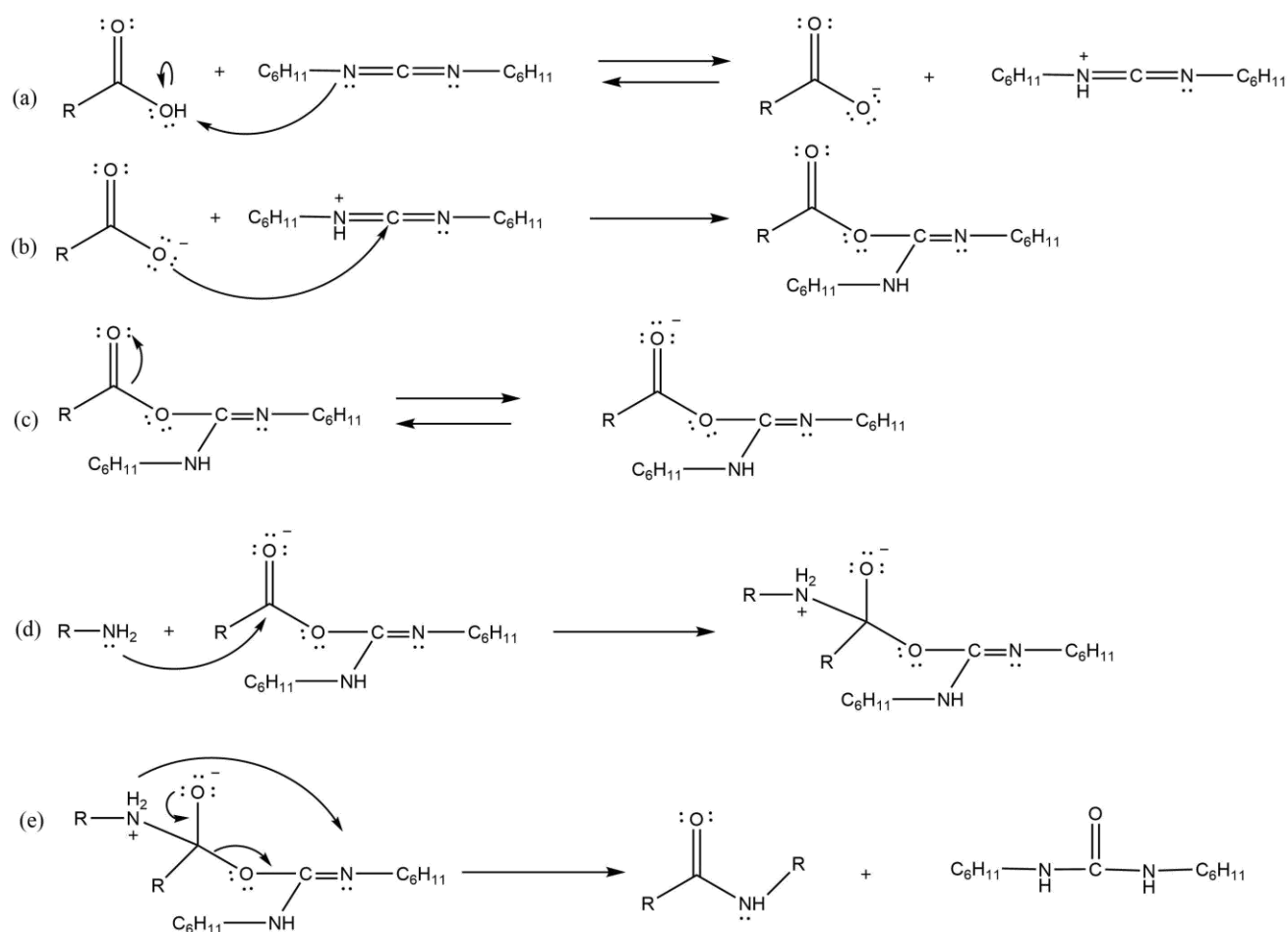


Figura 4. Mecanismo de reacción para el acoplamiento de un grupo amina y un grupo carboxilo, mediante el uso de DCC.

La reacción propuesta en este trabajo de tesis se da entre moléculas del aminoácido L-cisteína formando un poliaminoácido. Con anterioridad se mencionó la característica de los aminoácidos de poseer los dos grupos funcionales, (carboxilo y amina) necesarios para dar lugar al acoplamiento. Esta misma característica es aprovechada para que la L-cisteína se acople entre sí [32], formando enlaces tipo amida, como puede verse en la figura 5.

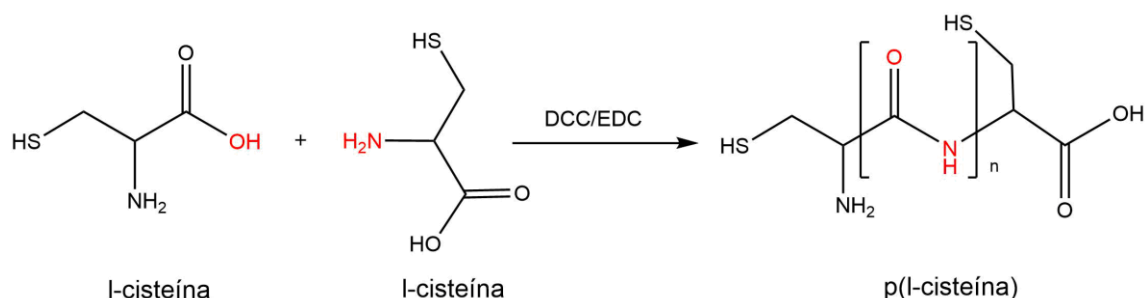


Figura 5. Acoplamiento de dos moléculas de L-cisteína asistida por el uso de carbodiimidas mediante el mecanismo expuesto previamente.

2.6. Reacciones competitivas

Como ya se mencionó, el éster activado (o-acilisourea) presente en la reacción de carbodiimidas, tiende a ser reactivo hacia grupos nucleófilos; fuera de las ya mencionadas aminas primarias (-NH₂), existen además otros nucleófilos que compiten con el acoplamiento al éster activado. Estos pueden ser grupos sulfhidrilo, llevando a la formación de tioésteres, los cuales no poseen la misma estabilidad que el grupo amida [33, 20].

Por otra parte, los ésteres o-acilisourea pueden pasar por un reordenamiento indeseado hacia la N-acilurea, tal como en la figura 6. Estos subproductos son inertes hacia grupos nucleófilos, reduciendo el rendimiento química de la bioconjugación [31].

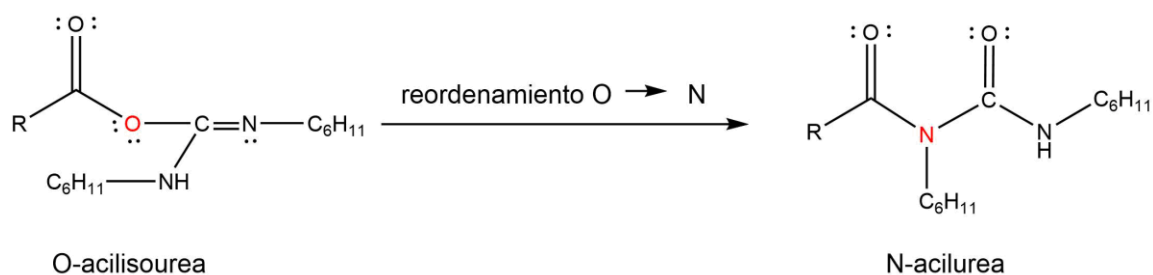


Figura 6. Reordenamiento desde O-acilisourea hacia N-acilurea.

Como última consideración, el oxígeno encontrado en la molécula de agua puede intervenir como nucleófilo, llevando a la hidrólisis del éster activado, una causa común de su inactivación [33], llevando a la formación de una isourea y regenerando el grupo carboxilo; agregando el hecho de que el agua puede inactivar la propia carbodiimida por medio de una hidratación. El tiempo de vida media de carbodiimidas como EDC en agua a pH 5.0 y 7.0, varía desde 0.16 h a 0.43 h respectivamente, muestra de la susceptibilidad de estas bioconjugaciones a sufrir pérdidas de rendimiento [25].

2.7. Ésteres succinimida

Las N-hidroxisuccinimidas (NHS) son reactivos de uso común para la creación de grupos acilo reactivos, denominados ésteres de hidroxisuccinimida [20, 34]. Estos agentes permiten mejorar el rendimiento de bioconjugaciones por carbodiimidas. Los ésteres activados tipo o-acilisourea, resultantes de la reacción de ácidos carboxílicos y carbodiimidas, pueden ser fácilmente atacados por NHS [26], para formar un éster NHS. A su vez este nuevo éster funge como grupo saliente, que puede reaccionar con grupos nucleófilos [20]. En caso de tratarse de una amina, la reacción resultara en una conjugación por enlace amida y la liberación de un grupo saliente NHS, como se observa en la figura 7.

Cabe mencionar que la reacción de dichos ésteres con grupos sulfhidrilo e hidroxilo, no es capaz de producir conjugados estables; esto se debe a la

susceptibilidad de los enlaces tioéster y éster, a sufrir una hidrólisis en ambientes acuosos, como también la tendencia a enlazarse a amidas, formando un conjugado con enlace tipo amida [20].

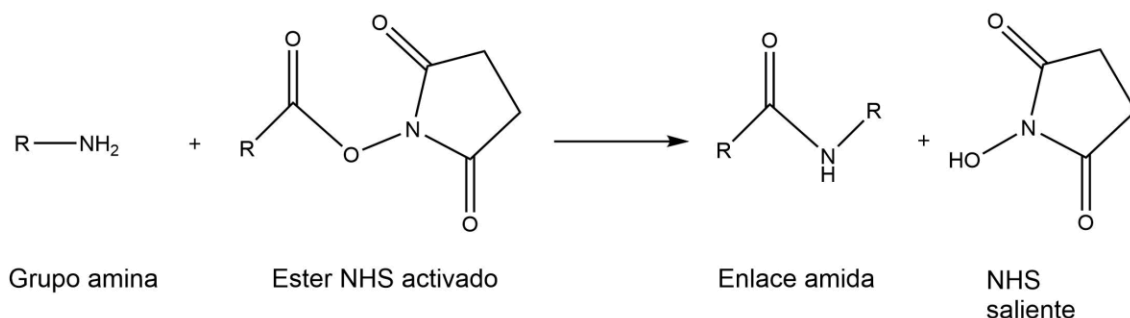


Figura 7. Reacción de NHS activado con un grupo amina formando un enlace amida, NHS es liberado como grupo saliente.

Existen varios agentes NHS, entre ellos se destacan los sulfo-NHS, ya que tienen un comportamiento hidrofílico, permitiéndoles conjugarse de manera rápida con grupos amina, y mantener una estabilidad duradera en soluciones acuosas. En contraparte, gran mayoría de los NHS exhiben características hidrofóbicas, y requieren de soluciones previas en solventes orgánicos [35].

2.8. Condiciones óptimas de reacción

El rendimiento del acoplamiento por carbodiimidas puede ser optimizado al variar las condiciones de pH de la reacción. Estudios sobre la reacción de EDC muestran que la activación de los grupos carboxilo ocurre más efectivamente a pH 3.5-4.5; también la formación de amidas tiene un rendimiento mayor a pH 4-6 [31]. Sin embargo, es conocido que la hidrólisis de EDC aumenta conforme baja el pH. Para llegar a un punto intermedio, es recomendado llevar a cabo bioconjugaciones con EDC a pH entre 4.5 y 7.5. Es importante notar que la modificación del pH en la reacción, debe evitar el uso de buffers que contengan grupos carboxilo ajenos, para impedir la competitividad [30].

La adición de NHS en conjunto con carbodiimidas permite aumentar la efectividad del acoplamiento con aminas primarias, evitando los efectos de hidrólisis sufridos por la o-acilisourea, que impiden la formación de la amida [26]. El ataque de la amina hacia el éster NHS es más eficiente conforme aumenta el pH, sin embargo el aumento de pH también fomenta la hidrólisis de los ésteres. La vida media de un éster NHS cambia de 4-5 h a 1 h de pH 7.0 a pH 8.0 respectivamente [36]. Este mecanismo se observa con detalle en la Figura 8.

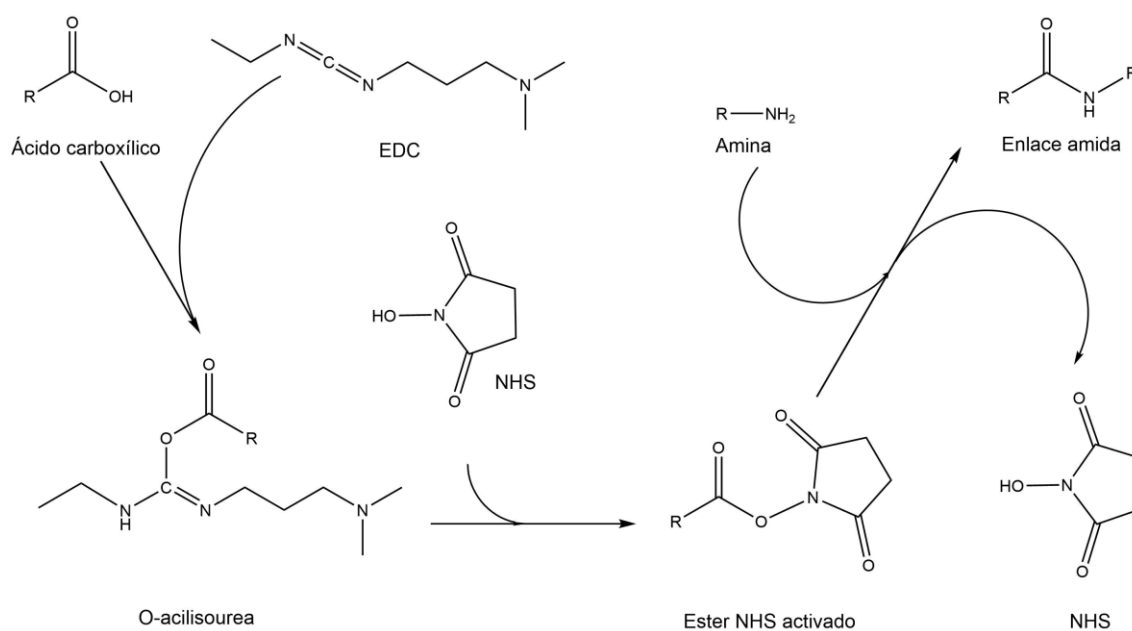


Figura 8. Mecanismo de bioconjugación mediante el conjunto de EDC y NHS para mejorar el rendimiento y prevenir la desestabilización de la O-acilisourea.

2.9. Métodos de caracterización

2.9.1. Espectroscopía infrarroja

Se trata de una de las técnicas de caracterización más versátiles y habituales, esta permite la determinación de grupos funcionales presentes en una sustancia [37].

La técnica hace provecho de la radiación infrarroja, más específicamente del infrarrojo medio, comprendiendo un número de onda de 400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} [38], esta región del espectro electromagnético, engloba un rango de energías que caracterizan la gran mayoría de los movimientos relativos entre átomos presentes en una molécula; estos movimientos reciben el nombre de "modos de vibración" [39].

Los modos vibracionales que son percibidos por la espectrometría de infrarrojo, tienen la característica de inducir una variación en el momento dipolar eléctrico de la molécula [40]. Tal es el caso de un estiramiento del enlace en una molécula heteronuclear diatómica, donde se percibe un cambio en el momento dipolar; por el contrario, en el caso de una molécula homonuclear diatómica, el momento dipolar se mantiene constante, implicando que este modo vibracional no sea activo en espectroscopia de infrarrojo [40].

Existen energías características que se presentan para cada modo de vibración, estas son influidas por los tipos de enlaces y los elementos que participan en estos modos, así como de la naturaleza del movimiento vibracional. Estas energías se pueden traducir en un número de onda respectivo, gracias a la ecuación Planck-Einstein: $E = h\nu$, en la cual E es la energía, h es la constante de Planck, c es la velocidad de la luz y ν es el número de onda [39].

Los espectros son generalmente colectados en un rango infrarrojo mencionado. Por debajo de los 1500 cm^{-1} se puede encontrar lo que se conoce como la región

de la huella digital. Aquí el espectro adopta una forma intrincada, combinando señales de varios modos de vibración en conjunto; esta zona es útil para confirmar la presencia de un grupo funcional [39]. Por otro lado, arriba de los 1500 cm^{-1} se encuentra una zona cuyas absorciones pueden atribuirse a grupos funcionales fijos, estas absorciones son la información clave que ofrecen los espectros IR [37].

A través de los equipos de espectrometría de infrarrojo, es posible determinar las energías características de una muestra, al incidir a través de ella un haz de luz monocromático. Cuando la frecuencia del haz coincide con la frecuencia de un modo vibracional de la muestra, el haz será absorbido y esta absorción puede ser detectada por los sensores del instrumento.

Los equipos de FTIR-ATR son de los más implementados hoy en día [41]. Estos son preferidos gracias a que ofrecen una mayor rapidez de adquisición de datos y una mayor razón de señal-ruido. La instrumentación FTIR hace uso de un arreglo denominado: interferómetro de Michelson [38], este arreglo difiere de la espectroscopia dispersiva en los siguientes puntos.

La espectroscopia dispersiva hace uso de un haz de luz monocromático y realiza un barrido individual de cada número de onda a lo largo de un rango determinado. Por otro lado, en el interferómetro de Michelson se opta por incidir un haz policromático, y hacerlo pasar por un separador de haz, este dividirá el haz en 2 haciendo pasar uno por la muestra y un espejo fijo y el otro por un espejo móvil para luego hacerlos converger y superponerse antes de llegar al detector [37]. Este arreglo es ilustrado en la Figura 9.

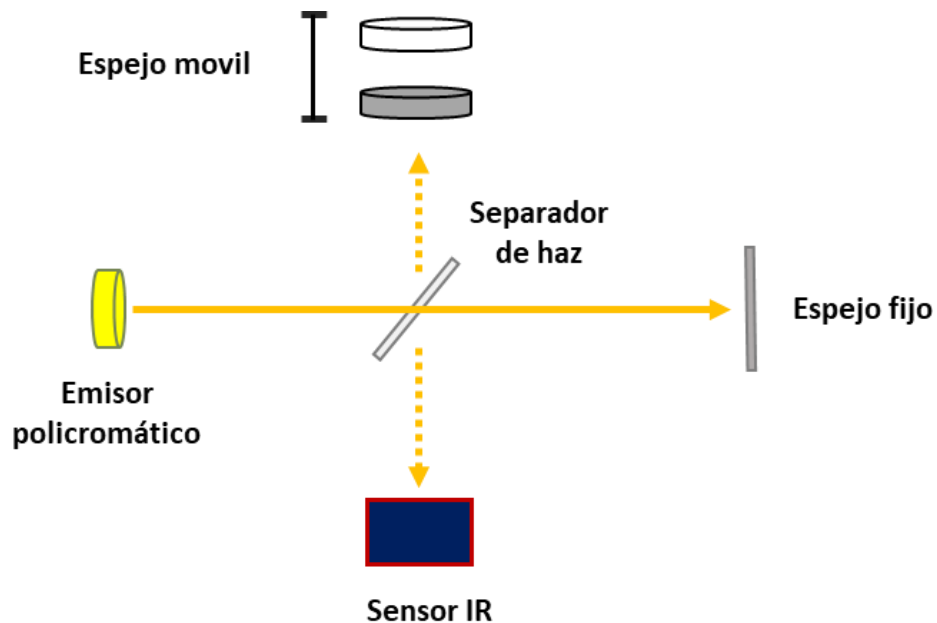


Figura 9. Diagrama de un interferómetro de Michelson usado en la espectrometría IR.

Al medir simultáneamente la luz en el detector y el desplazamiento discreto del espejo móvil, se obtiene lo que se conoce como un interferograma. Este interferograma se obtiene de un solo desplazamiento del espejo, y su calidad puede mejorarse mediante subsecuentes barridos [42].

Mediante la operación matemática denominada "Transformada de Fourier", es posible descomponer la señal del interferograma en las diferentes frecuencias que la componen, para obtener el espectro IR correspondiente [42].

La otra ventaja, se le atribuye al modo ATR (Reflectancia Total Atenuada), a diferencia de los métodos tradicionales, que requieren que el haz de luz atraviese una solución de la muestra, el modo ATR permite hacer mediciones de muestras directamente en estado sólido con mínima o ninguna preparación [39]. En la Figura 10 se observa el equipo IR usado para este estudio. Este modo consiste en poner en contacto la muestra con un cristal, por el cual se hace incidir un haz, mismo que es reflejado por la superficie interna del cristal en contacto con la

muestra. Esto permite al haz incidente interactuar con las ondas evanescentes generadas por las ondas electromagnéticas de la muestra, una interacción análoga a la que se experimenta en los métodos de transmitancia llevando igualmente, a la formación de un espectro infrarrojo [38] .

Figura 10. Equipo de espectroscopía FT-IR con módulo ATR.



2.9.2. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear RMN

Desde su descubrimiento en 1945, esta técnica ha añadido una crucial herramienta a la química analítica, otorgando las herramientas necesarias para la elucidación de estructuras moleculares [43]. La técnica se fundamenta sobre las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos, cuyos momentos magnéticos difieren de cero (^1H y ^{13}C comúnmente) [43].

De manera específica, los equipos RMN basan su funcionamiento en las interacciones de los dipolos magnéticos de dichos núcleos, y un campo magnético externo inducido \mathbf{B}_0 . Esta interacción lleva a la formación de 2 estados discretos (Spin-up y Spin-down), estado excitado y estado basal respectivamente. Manteniendo como convención que, el estado excitado está

alineado con \mathbf{B}_0 . Bajo la influencia del campo \mathbf{B}_0 [43]. En la Figura 11, se ilustra el fenómeno en el que los núcleos pueden hacer transición del estado basal al excitado, mediante la absorción de un fotón de energía suficiente. Adicionalmente el proceso inverso puede suceder, gracias al fenómeno de emisión estimulada. En este fenómeno, un núcleo excitado absorbe un fotón, causando su caída a un estado basal junto con la liberación de un fotón de misma energía [44].

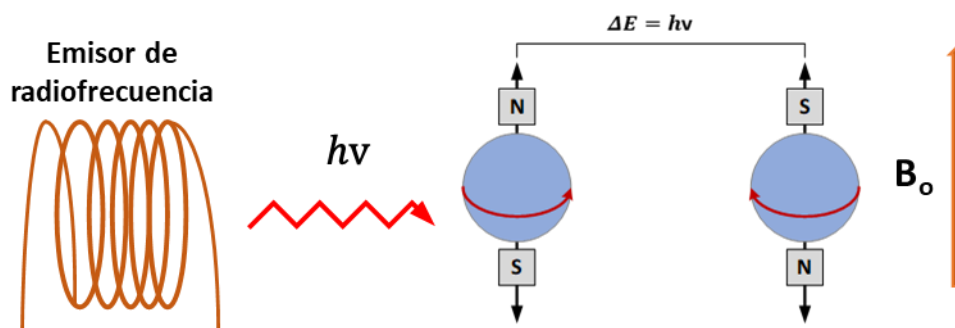


Figura 11. Esquema del proceso de absorción característica de un núcleo atómico bajo la influencia de un campo magnético B_0 .

La energía o frecuencia de transición entre los estados basal y excitado de un núcleo atómico, es característica tanto del tipo de núcleo, como también del ambiente químico que lo rodea [45]. Estas variaciones de frecuencia son conocidas como desplazamiento químico, y es medido en partes por millón (ppm), en respecto a la frecuencia de referencia para el isotopo específico. Este desplazamiento se identifica con la letra griega (δ) [44]. El desplazamiento químico se usa para determinar cuál es el entorno de las señales registradas por los equipos RMN [44].

Aparte del desplazamiento químico, existe también un efecto causado por el acoplamiento de espines cercanos que tienen un desplazamiento químico diferente. Tal es el ejemplo de dos protones (H_a y H_b) enlazados a átomos de carbono adyacentes, cuyos ambientes químicos sean diferentes [45]. Esta

situación causa que la señal de \mathbf{H}_a se divida en 2 picos, correspondientes a los 2 estados en que se puede encontrar \mathbf{H}_b (spin-up y spin-down) [45].

Para casos de acoplamientos más complejos, los picos de las señales de un protón se dividen en $n + 1$ picos, siendo n el número de protones vecinos. Esto representa una información crucial para la determinación de estructuras moleculares[44].

La operación de un equipo RMN, consiste en inducir un campo magnético \mathbf{B}_0 sobre la muestra, misma que se contiene en un tubo. Esto se logra mediante imanes criogénicos superconductores, los cuales son mantenidos a temperaturas de alrededor 2.3 K, buscando formar campos de hasta 17.5 T o más [45].

Aparte, los equipos cuentan con un solenoide transmisor que irradia la muestra con un pulso de corta duración, (entre 10-50 μ s) a lo largo del rango espectral de frecuencias; añadido a esto se cuenta con un solenoide receptor que lee las señales provenientes de la muestra [45]. Estas señales pueden ser descompuestas en las frecuencias que la componen mediante la ya discutida transformada de Fourier, para dar como resultado el espectro RMN [44].

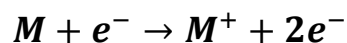


Figura 12. Equipo de espectroscopía RMN.

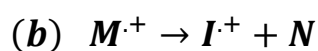
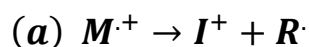
2.9.3 Espectrometría de masas

Es una técnica que permite determinar la distribución de pesos moleculares de las especies de una muestra, dota de una alta sensibilidad y muy bajos límites de detección. Recientemente la técnica ha ganado lugar dentro de la bioquímica, especialmente en la caracterización de cadenas de aminoácidos, recurrentes en el estudio de la proteómica y aminoácidos [46].

La espectrometría de masas se basa en la producción de iones gaseosos a partir de un analito, para crear lo que se conoce como ion molecular (producido por ionización por electrones) [47].



Este ion molecular puede sobrellevar fragmentaciones subsecuentes, debido a su número impar de electrones, dando como resultado tanto un radical y un ion con número par de electrones, o una molécula neutra y un radical catión [48].



Los equipos hacen la medición de la relación masa y carga (m/z) de los iones y fragmentos generados, logrando formar un espectro.

La ionización por electrospray (ESI, por sus siglas en inglés), es el método más común para la ionización de muestras, especialmente para la ionización de macromoléculas, gracias a su reducida tendencia a inducir fragmentación en la molécula analito, permitiendo su detección completa [49]. En la figura 13 se muestra un esquema del proceso de electrospray sobre una muestra.

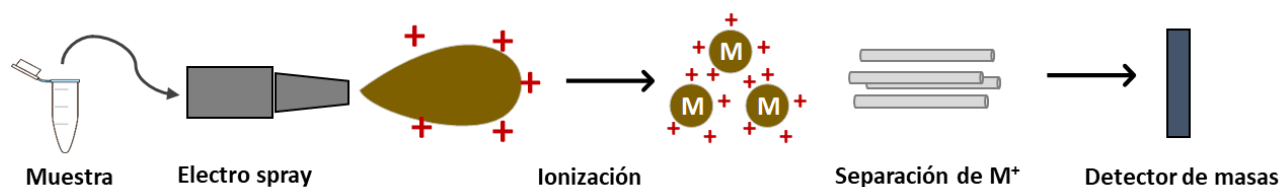


Figura 13. Diagrama del proceso de fragmentación y análisis llevado a cabo por un espectrómetro de masas.

Los sistemas ESI operan aplicando un voltaje (alrededor de 3000 V) a un capilar por donde se hace pasar la muestra en solución, esta muestra es nebulizada en gotas cargadas, el solvente se evapora hasta llegar al límite Rayleigh. Es en este punto que las repulsiones coulombicas y las dimensiones reducida de la gota conllevan a la formación de iones en fase gaseosa [50].

El uso de ESI sobre biomoléculas resulta en iones formados por la protonación o deprotonación de estas, estos son comúnmente expresados como $(\mathbf{M} + \mathbf{H})^+$ y $(\mathbf{M} - \mathbf{H})^-$ respectivamente; la aportación de iones por disociación o fragmentación es mínima [49].

Para que la lectura de un espectro sea posible, es necesario tener control sobre la relación m/z de los iones detectados. Para hacer posible esto, los espectrómetros incorporan lo que se conoce como un *quadrupole* [51], el cual consta de 4 rodillos paralelos que inducen un voltaje variable, ejerciendo un campo eléctrico sobre los iones que transitan entre los tubos en dirección paralela a estos. Se hace uso de las diferentes trayectorias que toman los iones en el campo magnético inducido, para permitir el paso de una relación m/z selectiva y hacer barrido a lo largo de un rango m/z . Permitiendo finalmente la compleción de un espectro de masas [47, 51].

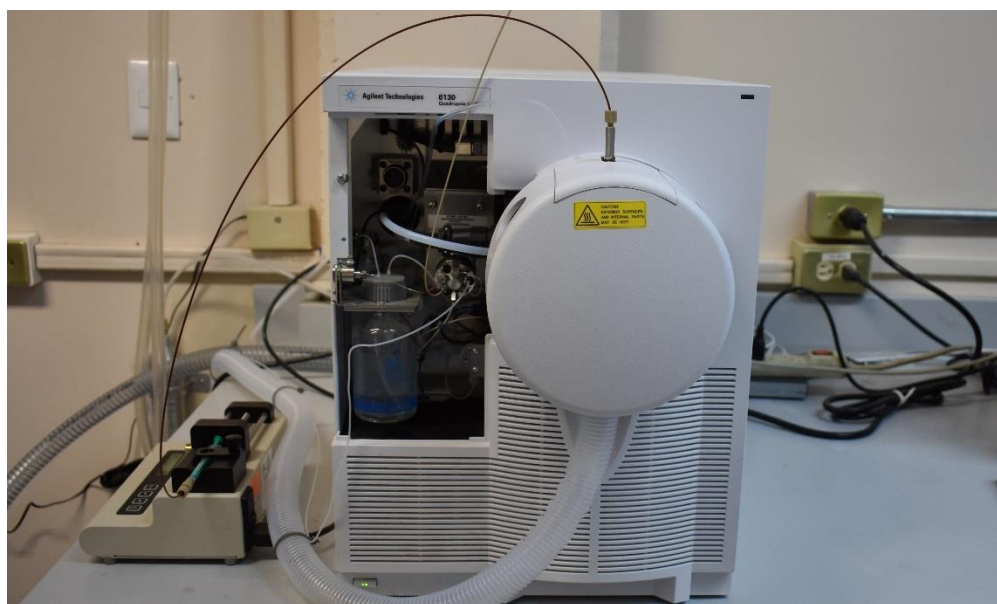


Figura 14. Espectrómetro de masas (ionización por electro esparayado).

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentación

FT-IR: Los espectros FT-IR fueron tomados con un Nicolet iS50 de ThermoFisher Scientific, las mediciones se tomaron dentro de un rango de 4000 a 500 cm^{-1} , resolución de 4 cm^{-1} y 64 barridos por muestra, todas las mediciones tomadas fueron en estado sólido modo ATR.

NMR: Todos los espectros se tomaron en un Bruker Advance, a 400 MHz y 298 K. Las concentraciones de los péptidos se encontraban en el rango de 10-15 mg usando CDCl_3 y D_2O .

Espectrometría de masas: Para los espectrómetros de masas se usó un 6130 LC/MS quadrupole de Agilent Technologies con ionización por electrospray (ESI-MS), en modo positivo y un rango de detección de 10 a 3,000 m/z.

Los monitoreos de pH de las reacciones se llevaron a cabo con un pH 2700 de OAKTON. Para rotavaporar se hizo uso de un Rotavapor R-100 de BUCHI.

3.2. Materiales

Se usaron los siguientes solventes:

- 1) Acetona grado ACS de Sigma-Aldrich
- 2) Cloroformo de Sigma-Aldrich
- 3) El agua usada en las reacciones es desionizada.
- 4) CDCl_3 Sigma-Aldrich se usó para los espectros ^1H NMR
- 5) Oxido de deuterio (D_2O) Sigma-Aldrich

Se emplearon los siguientes reactivos:

- 1) L-cisteína de alta pureza de Amresco (6681 Cochran Road, Solon, Ohio)
- 2) NHS 98% de pureza proveniente de Sigma-Aldrich
- 3) N,N'-dicilohexilcarbodiimida (DCC) obtenida de Alfa Aesar (Ward Hill, MA, USA).

4) EDC fue adquirido de Sigma-Aldrich

En todo momento, las carbodiimidias y el NHS se almacenaron bajo refrigeración (-4 °C). Las soluciones 1M de NaOH se pesaron a partir de hidróxido de sodio de Sigma-Aldrich.

3.3. Metodología de reacción

Se realizaron dos métodos de reacción, usando EDC y DCC como agentes entrecruzantes, en conjunto con NHS. Estos siguen el mecanismo propuesto en la Figura 15. Este mecanismo se basa en bioconjugaciones reportadas para la síntesis de poliaminoácidos y péptidos [20, 52]. Para cada síntesis se empleó la relación 3:2:1 de NHS, DCC/EDC y L-cys respectivamente, buscando compensar la pérdida de carbodiimida y NHS éster durante la reacción.

Todas las soluciones fueron preparadas en matraces aforados de 10 mL con agitador magnético y las reacciones se llevaron a cabo en vasos de precipitado de 50 mL. Todas las filtraciones se hicieron con la ayuda de vacío usando un embudo Milipore para filtros PVDF de 50 mm; las recolecciones del filtrado se guardaron en tubos falcon de 12 mL.

En las dos síntesis se hicieron dos soluciones por separado, en un mismo medio de reacción, una corresponde a la solución de la carbodiimida y NHS, la otra corresponde a la L-cisteína. Las síntesis se condujeron en dos pasos, primero se mezclaron los reactivos a pH 5.5, regulado por HCl 1M para permitir la protonación de la carbodiimida [31] [26]. Pasados los 15 min este se elevó a pH 8.0 con el uso de NaOH 1M, con la intención de fomentar la deprotonación de las aminas primarias de la L-cys [33]. Los productos finales se caracterizaron por ¹H RMN, espectrometría de masas ESI-MS y espectroscopía FT-IR.

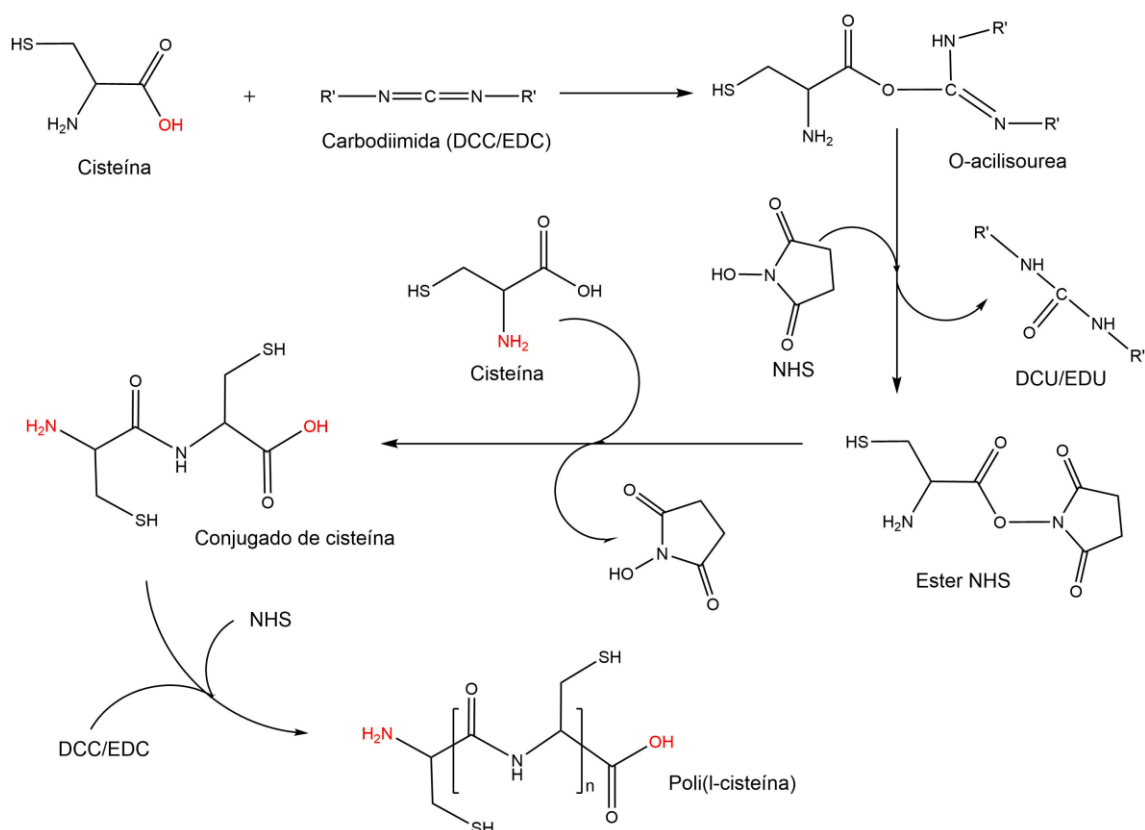


Figura 15. Mecanismo para la formación de poli(L-cisteína); nótese en rojo los grupos funcionales que participan en el acoplamiento.

3.3.1. Metodología de bioconjugación por EDC

Se empleó agua desionizada como medio de reacción, se pesó 0.11028 g de EDC y 0.09931 g de NHS en un matraz aforado; el pH de la solución se ajustó a 5.5, adicionando una solución de HCl 0.1M. Por separado se pesó 0.03485 g de L-cys en un matraz; igualmente se ajustó el pH a 5.5 con HCl 0.1M.

Una vez aforados con agua, las dos soluciones se vertieron simultáneamente en un vaso de precipitado en baño de hielo a aproximadamente 3 °C, se mantuvo la

agitación todo el transcurso de la reacción y se monitoreó el pH de manera constante. Un diagrama de este proceso se puede observar en la Figura 16

Transcurridos 15 min, se adiciono NaOH 0.1M hasta elevar el pH a 8.0; la reacción se dejó en agitación y baño de hielo por 6 h, tras esto se retiró el vaso del baño y se detuvo la agitación. El crudo de la reacción se transfirió a un tubo de centrifugación dejándose reposar por 24 h.

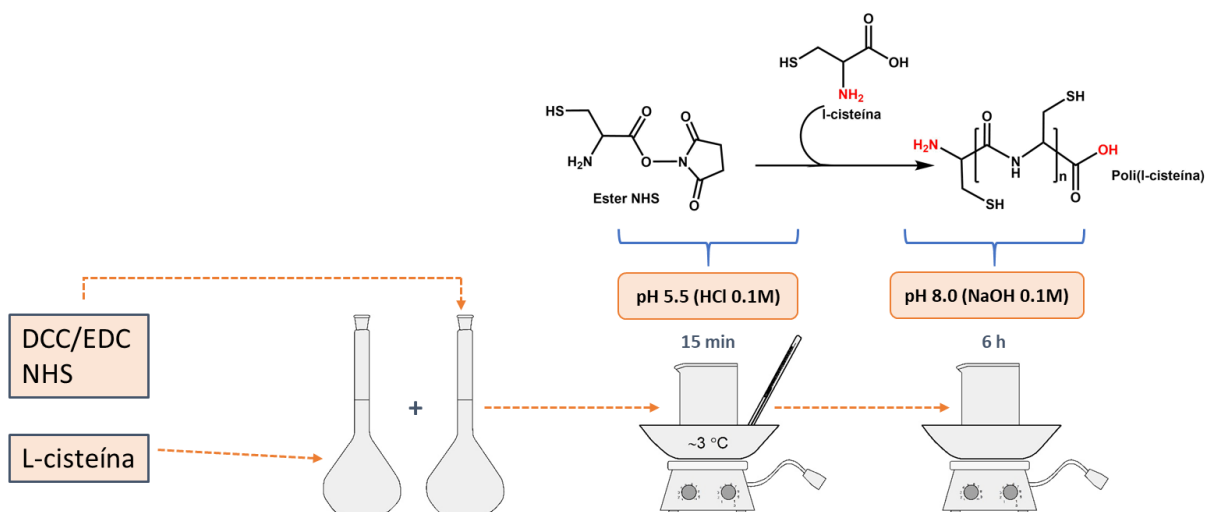


Figura 16. Diagrama de la metodología de reacción para la bioconjugación de L-cisteína.

3.3.2. Muestra control de L-cisteína en agua

Para examinar la pérdida de reactivo por la formación de L-cistina en una solución de L-cisteína en agua, se preparó una solución de 10 mL de agua desionizada y 0.1 g de cisteína. Esta se puso en agitación por 24 h tras las cuales se aisló 0.065 g de un precipitado mediante filtrado, este se recolectó y analizó por FTIR, confirmando la presencia de L-cistina.

3.3.3. Metodología de bioconjugación por DCC

Se pesó 124.30 mg de DCC y 104.01 mg de NHS en un matraz, este se aforó con acetona; 36.5 mg de L-cys fueron pesados en un matraz y se aforaron con una solución de acetona con 25% en volumen de agua con la ayuda de 10 μ L de una solución 0.1M de HCL.

Se mezclaron las dos soluciones en un vaso de precipitado en agitación constante y baño de hielo. El pH de la solución se ajustó a 5.5, y se dejó reaccionar por 15 min, tras los cuales se añadió NaOH 0.1M, elevando el pH a 8.0. La reacción se dejó continuar por 6 h. Al final se retiró el hielo y la agitación y la reacción se dejó en reposo por 24 h.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Separación de productos

4.1.1. Separación de la bioconjugación con EDC.

Transcurridas las 24 h después de la reacción, el crudo se filtró, recolectando la solución filtrada y recuperando un precipitado blanco del filtro. El precipitado filtrado se lavó con agua y acetona, después se dejó secar y se pesó (8 mg), finalmente se colectó en un tubo para su posterior análisis.

La solución filtrada se concentró y seco en rotavapor a 45 °C, llegando a obtenerse un sólido rojo (23 mg), este a su vez se conservó para su posterior análisis. Los productos de este proceso pueden verse en la Figura 17.

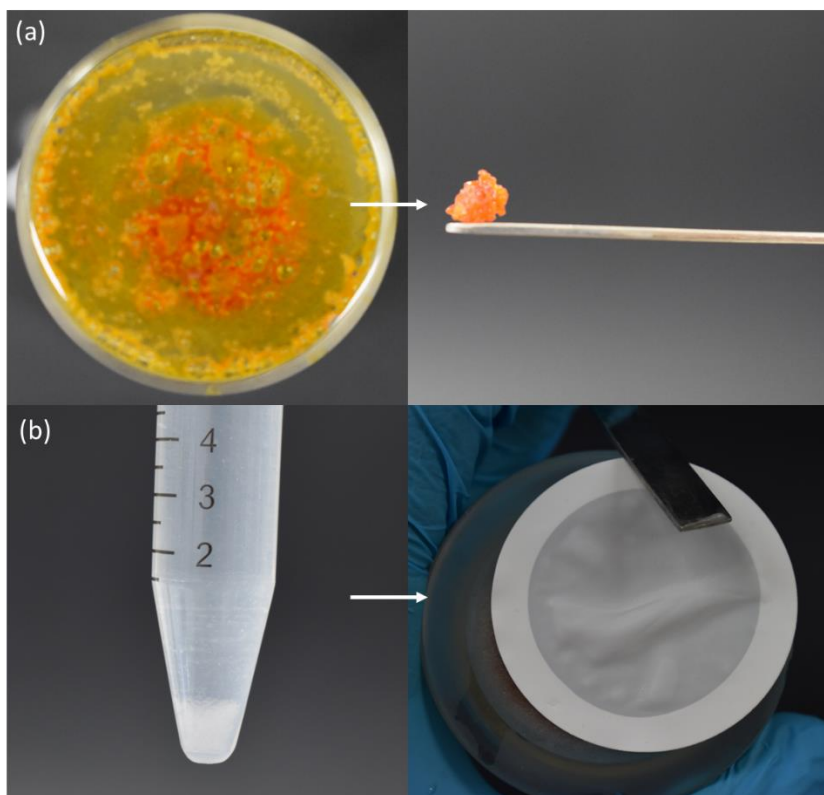


Figura 17. Imágenes de: (a) producto rojo obtenido desde el rotavapor, (b) precipitado banco (L-cistina) recuperado desde el filtro.

4.1.2. Separación de la bioconjugación con DCC.

Partiendo del crudo de la reacción en reposo, se procedió a un filtrado, donde se rescató una gran cantidad de precipitado cristalino. La solución filtrada fue sometida a un proceso de extracción líquido-líquido, con el propósito de eliminar residuos de DCU. se extrajo una fase orgánica conteniendo DCU y una fase acuosa con. al concentrar el volumen de esta extracción por rotavaporación a 45 °C, se apreció la formación de un precipitado. Mediante un segundo filtrado se recuperó un sólido blanco como precipitado (13 mg) y se sometió a una diálisis en agua por 48 h, para la eliminación de residuos solubles en agua. Las fracciones obtenidas de la extracción se pueden ver en la Figura 18.

El precipitado salido de la diálisis se dejó secar en una placa a 45 °C y se almacenó para su caracterización, asimismo, la solución resultante del segundo filtrado se secó por rotavapor, consiguiendo un sólido rojo (15 mg) como en el caso de la bioconjugación de EDC.

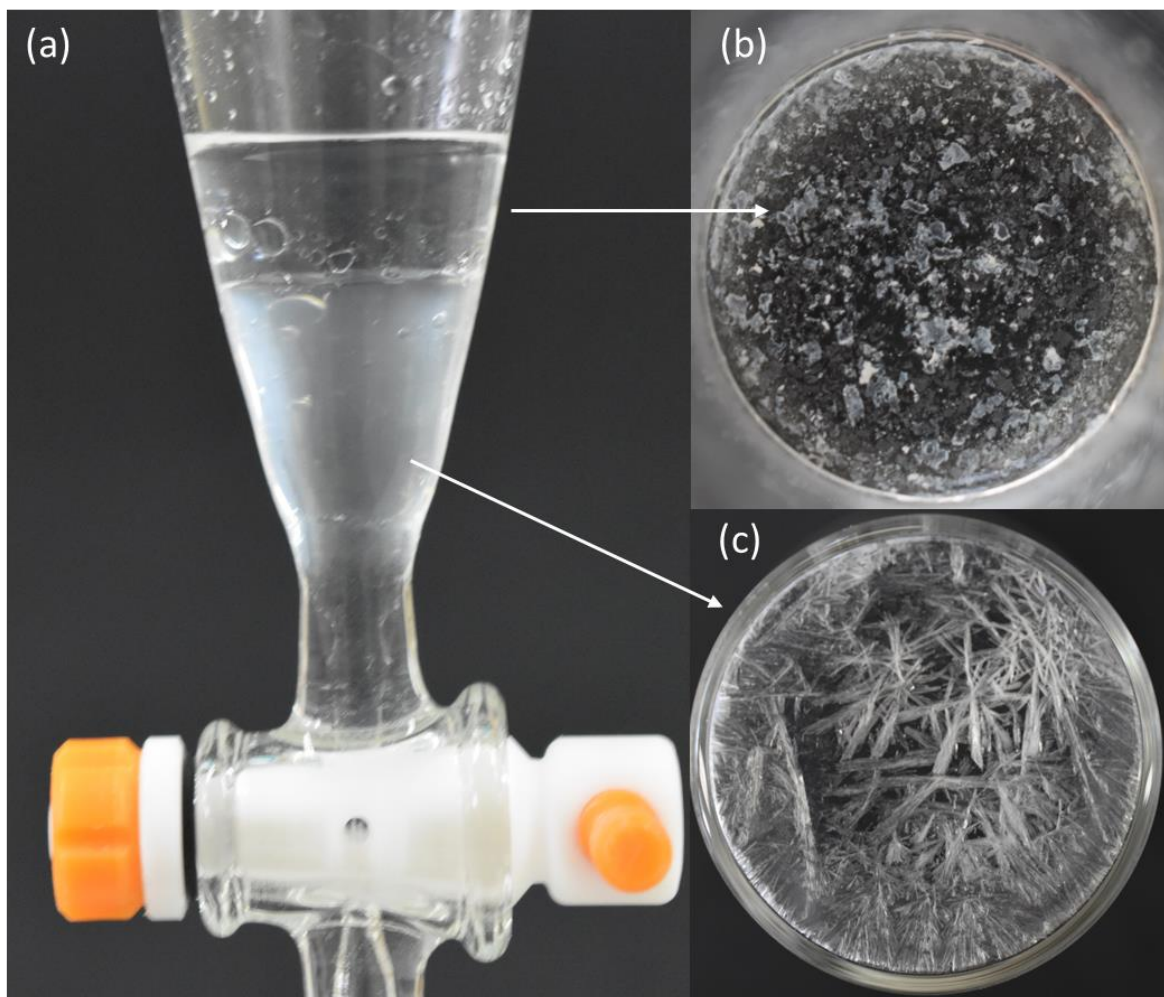


Figura 18. Imágenes de: (a) extracción líquido-líquido con Cl_2CH_2 , (b) Producto obtenido de la fase acuosa, (c) DCU extraída desde la fase orgánica.

4.2. Preparación de muestras para caracterización

4.2.1. Muestras de la bioconjugación por EDC

Se tomaron espectros FTIR-ATR del precipitado obtenido a partir de la diálisis, y del precipitado rojo en seco a partir de la solución filtrada. 10 mg de estos mismos precipitados fueron disueltos en D₂O con la ayuda de K₂CO₃ para su análisis ¹H RMN. Los estudios de masas de estas sustancias se realizaron igualmente en solución acuosa. La

Figura 19 muestra los tubos RMN con los productos de reacción.



Figura 19. Muestras de RMN de: (a) el producto obtenido de la bioconjugación por EDC y (b) el producto obtenido de la bioconjugación por DCC.

4.2.2. Muestras de la bioconjugación por DCC

Se realizaron espectros FTIR del crudo de la reacción y de la urea eliminada en el segundo filtrado, para corroborar su identidad. También se analizaron por esta técnica las fases acuosa y orgánica de la extracción líquido-líquido, corroborando la presencia de DCU en esta última y el producto en la primera. Una vez extraído el precipitado del producto puro, se le sometió a caracterización por infrarrojo, así como a una muestra seca del sólido rojo proveniente de la solución sin precipitado. Se llevaron a cabo espectros ^1H RMN del precipitado blanco disuelto en D_2O . Por otra parte las espectrometrías de masas se tomaron disolviendo los productos en agua. Los productos disueltos se observan en la Figura 20.

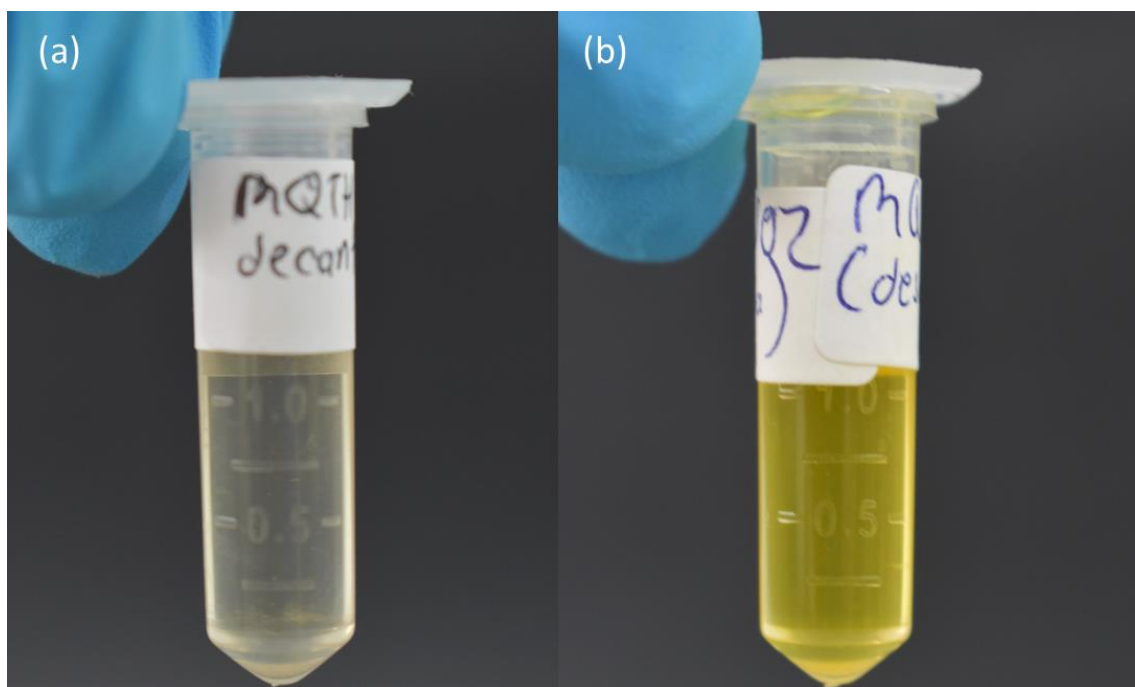


Figura 20. Muestras para el análisis de masas de: (a) Producto de la bioconjugación por DCC, (b) Producto de la bioconjugación con EDC.

4.3. ATR-FTIR

Los espectros de los precipitados de la bioconjugación con EDC en comparación con el FT-IR de la muestra control de cisteína en agua, evidencian la clara aparición de L-cistina, la cual precipita a partir de la solución de reacción. Este precipitado insoluble en agua persiste en todos los acoplamientos realizados mediante EDC. La L-cistina se forma a partir de la oxidación de L-cys, donde dos moléculas de esta se unen mediante puentes disulfuro, esta oxidación es favorecida en medio acuoso y exposición al oxígeno atmosférico [32] como se muestra en la Figura 21.

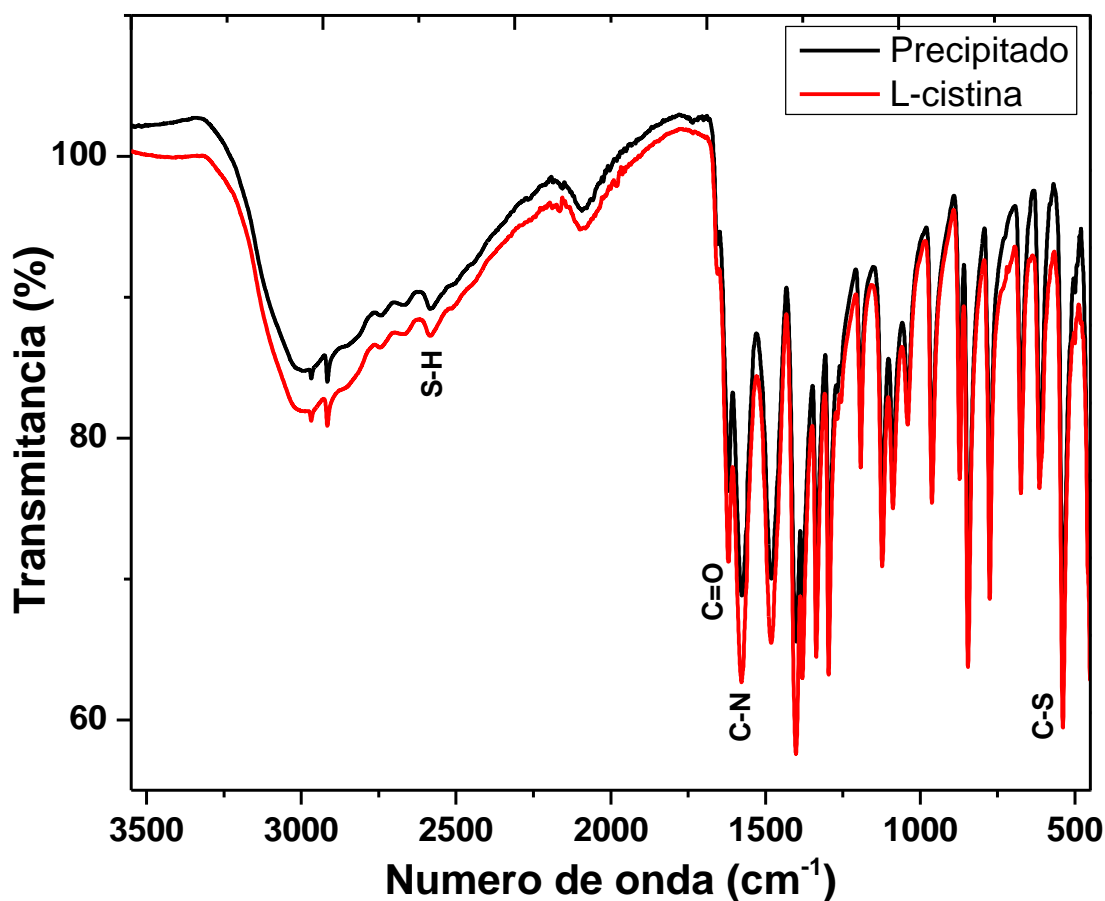


Figura 21. Espectro de L-cistina formada tras la oxidación de L-cisteína en H₂O (muestra control) y el precipitado extraído de la bioconjugación con EDC.

Se analizó además el producto, (precipitado rojo), aislado de la bioconjugación por EDC. El espectro se muestra en la Figura 22, el cual muestra bandas de absorción a 1636 cm^{-1} , típicas de un estiramiento C=O de una amida [38]. Se encuentra además una banda a 1557 cm^{-1} correspondiente a grupos N-H y estiramiento C-N [53]. En el espectro también están presentes las absorciones correspondientes a los grupos C-S a 665 cm^{-1} y estiramientos N-H a 3262 cm^{-1} [53],

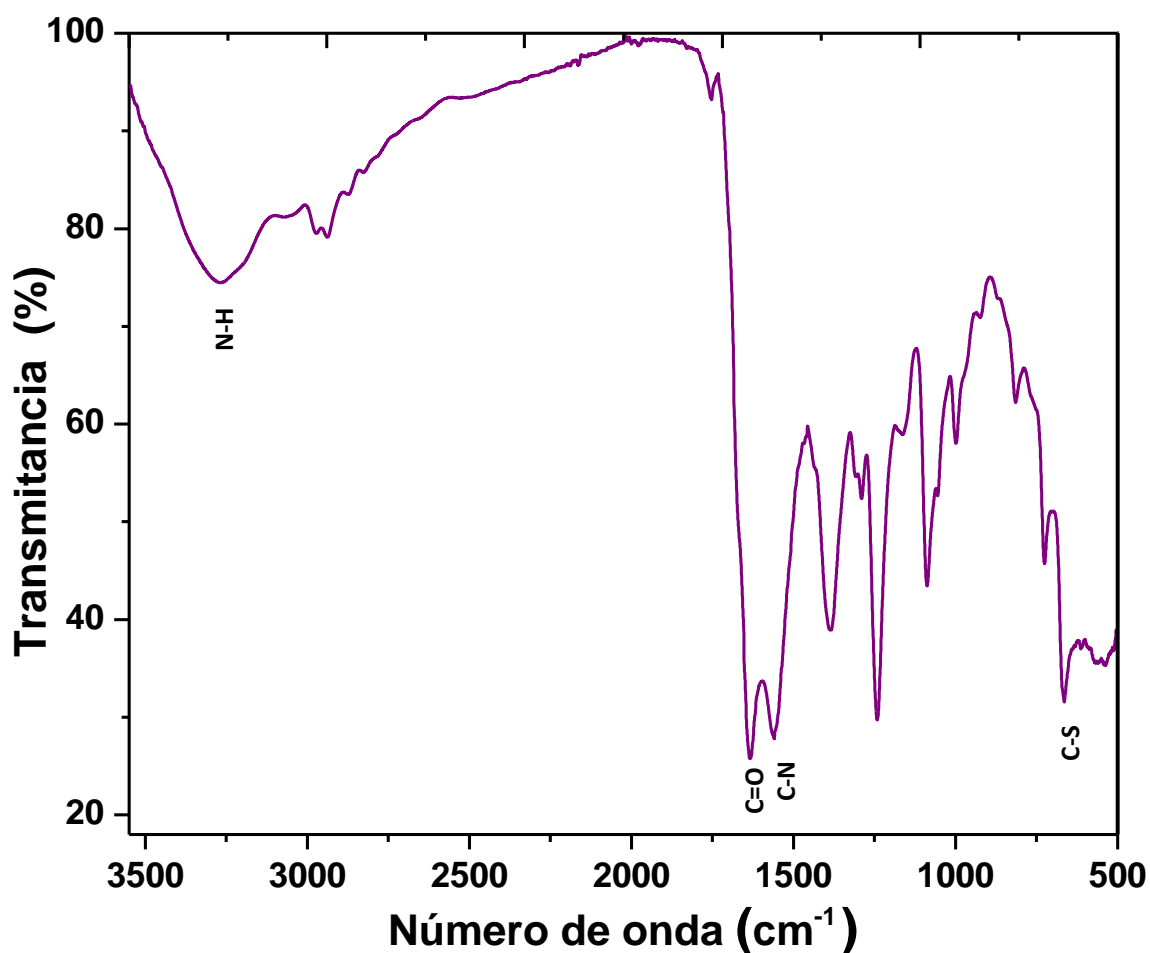


Figura 22. Espectro FT-IR del producto soluble de la bioconjugación por EDC

La Figura 23. muestra los espectros IR del producto soluble obtenido del acoplamiento con DCC, el cual exhibe características similares al anterior. Está presente una banda a 1638 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C=O de una amida, en 1571 cm^{-1} se presenta una banda que refiere al grupo N-H y C-N [37], en 665 cm^{-1} se encuentra el estiramiento C-S [53]. Además, una banda del estiramiento N-H se nota a 3358 cm^{-1} . Finalmente se nota una absorción S-H a 2451 cm^{-1} ,

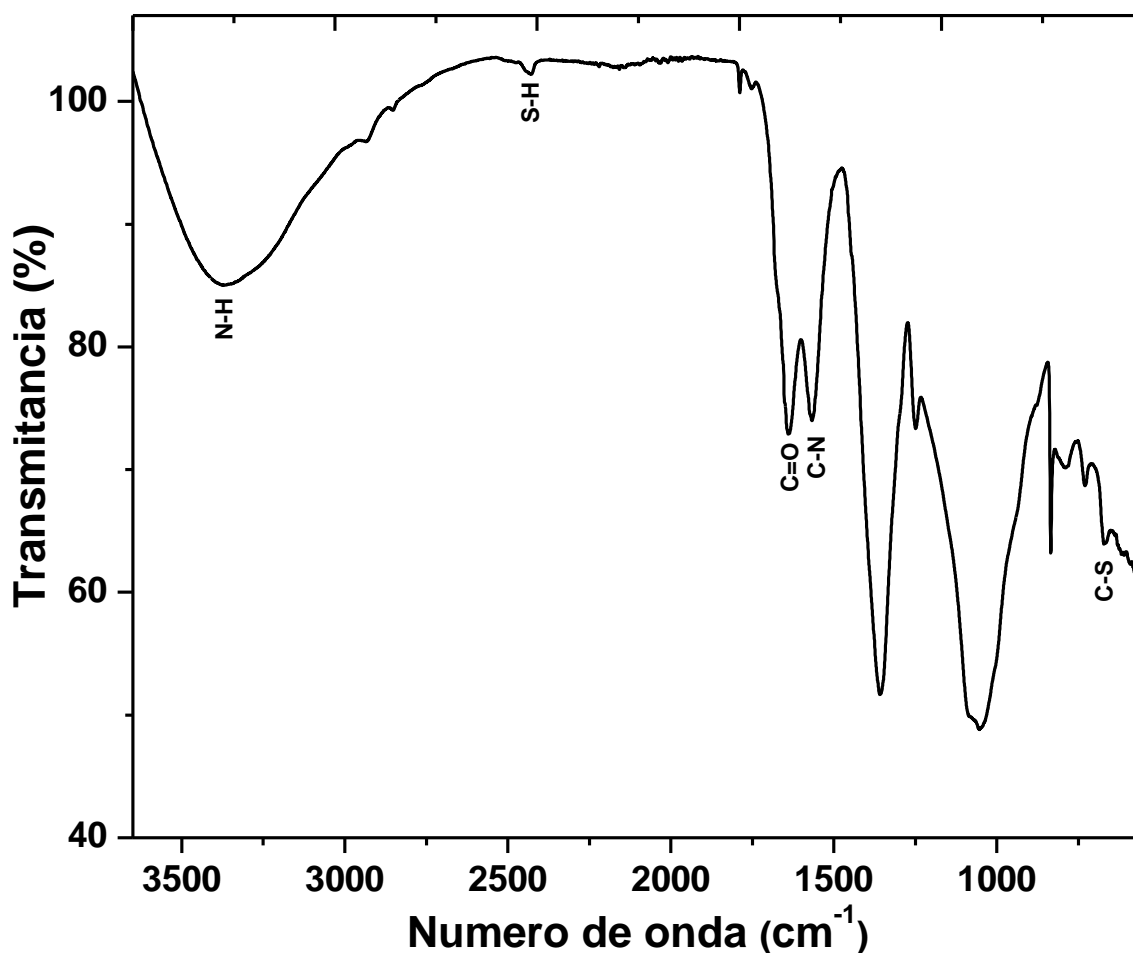


Figura 23. Espectro FT-IR del producto soluble obtenido de la bioconjugación por DCC.

Para el caso del acoplamiento con DCC, los espectros FT-IR del producto insoluble, representados en la Figura 24, mostraron la eliminación del subproducto DCU, mediante la ya comentada extracción líquido-líquido. Tras este proceso se pone en evidencia la aparición de absorciones propias de enlaces amida, pudiéndose observar una banda del estiramiento C=O en 1686.52 cm^{-1} [37]. Además de esto es posible apreciar la permanencia de las bandas de absorción características: S-H 2644.03 cm^{-1} 2539.34 cm^{-1} , $638.24\text{ C-S cm}^{-1}$ y N-H 3122.39 cm^{-1} [38] [53].

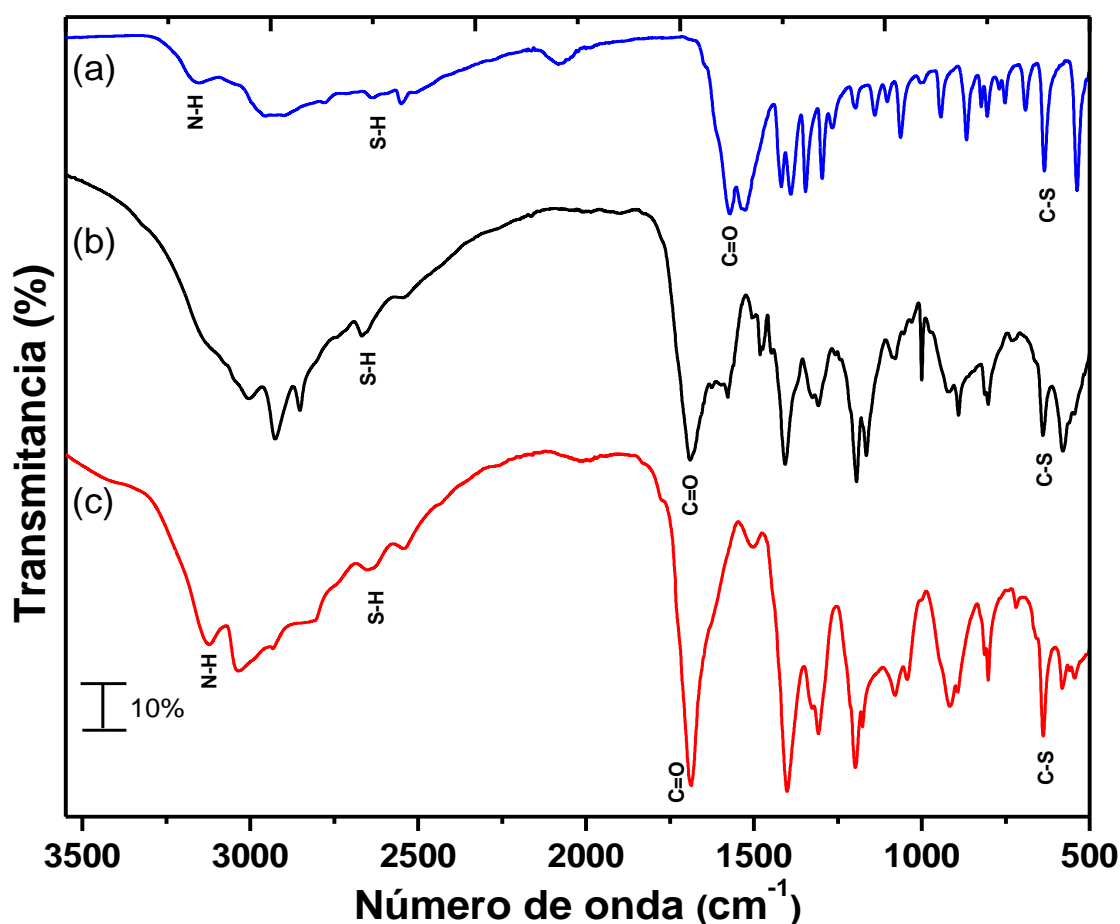


Figura 24. Espectros FT-IR de: (a) L-cisteína, (b) producto de la reacción antes de la eliminación de DCU y (c) producto tras la eliminación de DCU.

4.4. ^1H RMN

El espectro obtenido a partir del producto de la bioconjugación por DCC, se presenta en la Figura 25. Se encontraron señales de $\text{CH}_2\text{-SH}$ en $\delta_{\text{H}}=1.84$ (1H, s, H-7). Señales de protones $-\text{CH}_2-$ se encuentran en $\delta_{\text{H}}=2.34$ (2H, m, H-8), al igual que protones $\text{R}_3\text{-CH}$ en $\delta_{\text{H}}=3.04$ (1H, t, H-9).

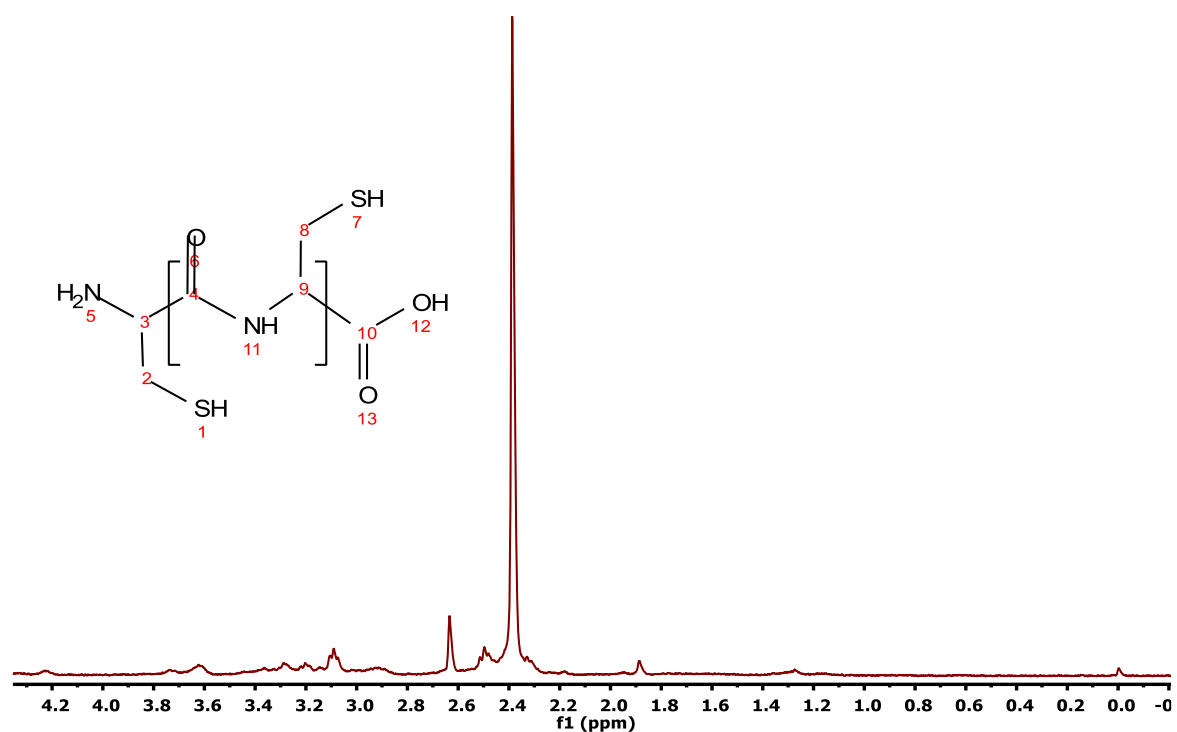


Figura 25. Espectro ^1H RMN del producto insoluble obtenido a partir de la bioconjugación con DCC.

En la Figura 26, se presenta el análisis ^1H RMN del precipitado extraído de la bioconjugación por EDC, en este se observan señales propias de $\text{CH}_2\text{-SH}$ en $\delta_{\text{H}}=1.84$ (1H, s, H-7). Por otro lado, señales correspondientes a protones $-\text{CH}_2-$, se encuentran en $\delta_{\text{H}}=2.34$ (1H, d, H-8), aparte de señales de protones $\text{R}_3\text{-CH}$ en $\delta_{\text{H}}=3.04$ (1H, t, H-9). Además, una señal de amina N-H secundaria se aprecia en $\delta_{\text{H}}=8.40$ (1H, s, H-11). Finalmente, la formación del subproducto L-cistina es nuevamente confirmado por el espectro ^1H RMN del precipitado que se encuentra en el Anexo A.

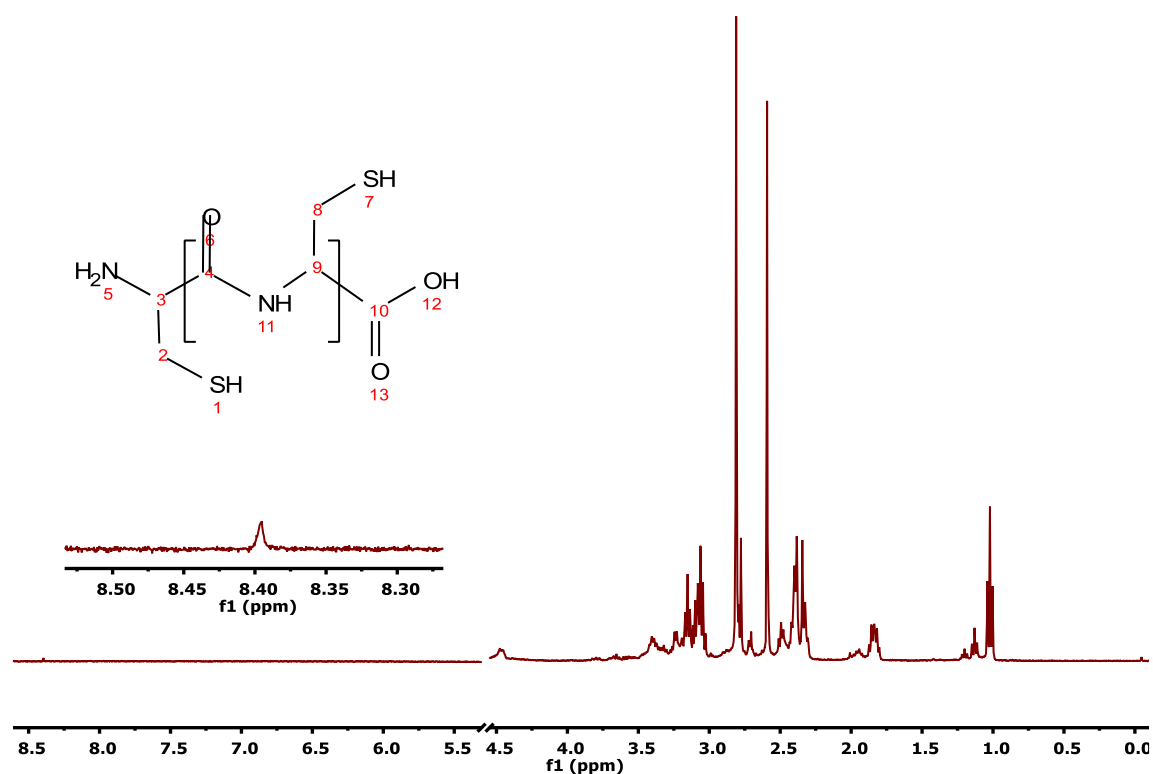


Figura 26. Espectro ^1H RMN del producto soluble obtenido a partir de la bioconjugación con EDC.

4.5. Espectrometría de masas

En la Figura 27, se muestran los espectros ESI-MS de la bioconjugación por DCC que muestran una distribución de variada de pesos moleculares (desde 138 a 1602 m/z). Varias de estas señales pueden atribuirse a diferentes múltiplos de la cadena de péptidos de L-cys. Los picos correspondientes al m/z 1566 y 1463 puede asignarse a $[p(\text{L-cys})_{15}+\text{H}]^+$,y $[(\text{L-cys})_{14}+\text{H}]^+$ respectivamente. Por otro lado, algunos picos sugieren la presencia de bloques de L-cisteína en cadenas de poliaminoácido, m/z 1185 puede atribuirse a $[(\text{L-cys})_7+(\text{L-cistina})_2+\text{H}]^+$. Por último, es apreciable en m/z 224 la presencia del dipéptido $[\text{L-cisteinil-L-cisteína}]^+$. [54].

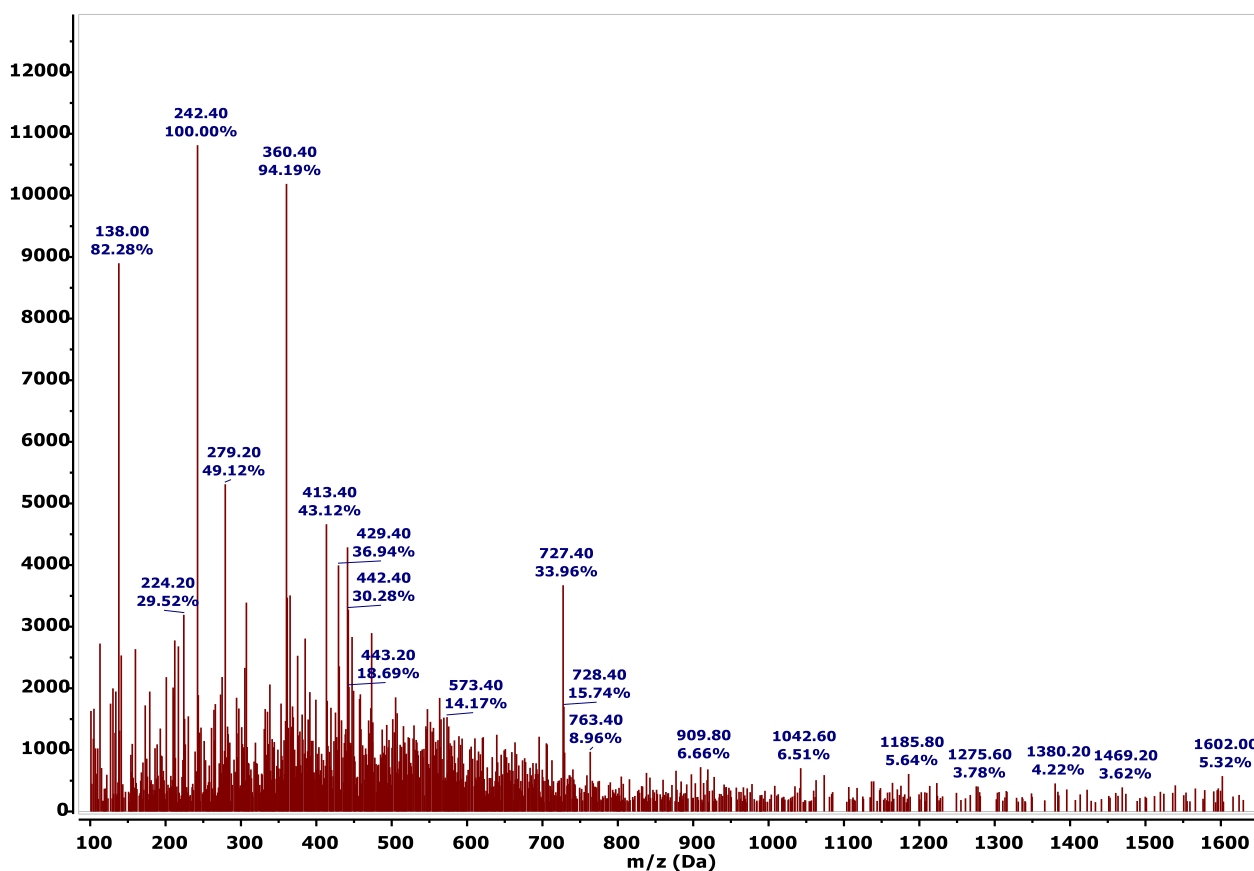


Figura 27. Espectro de masas del producto acuoso obtenido en la bioconjugación por DCC.

De manera similar, se muestra en la Figura 28 el análisis de masas del producto soluble obtenido de la bioconjugación por EDC, este comprende un rango de señales (desde 107 a 1598 m/z). Dentro de este rango m/z 1565, 1462, 1359, 636 y 224 pueden atribuirse a [(L-cys)₁₅ +H]⁺, [(L-cys)₁₄ +H]⁺, [(L-cys)₁₃ +H]⁺, [(L-cys)₆ +H]⁺ y [l-cisteinil-L-cisteína]⁺ respectivamente. Al igual que el espectro anterior, se encuentran señales que sugieren la presencia de L-cistina en las cadenas de péptidos e.g. m/z 447 y 1289 puede ser atribuido a [(L-cys)₂+(L-cistina)+H]⁺ y [(L-cys)₈+(L-cistina)₂+H]⁺.

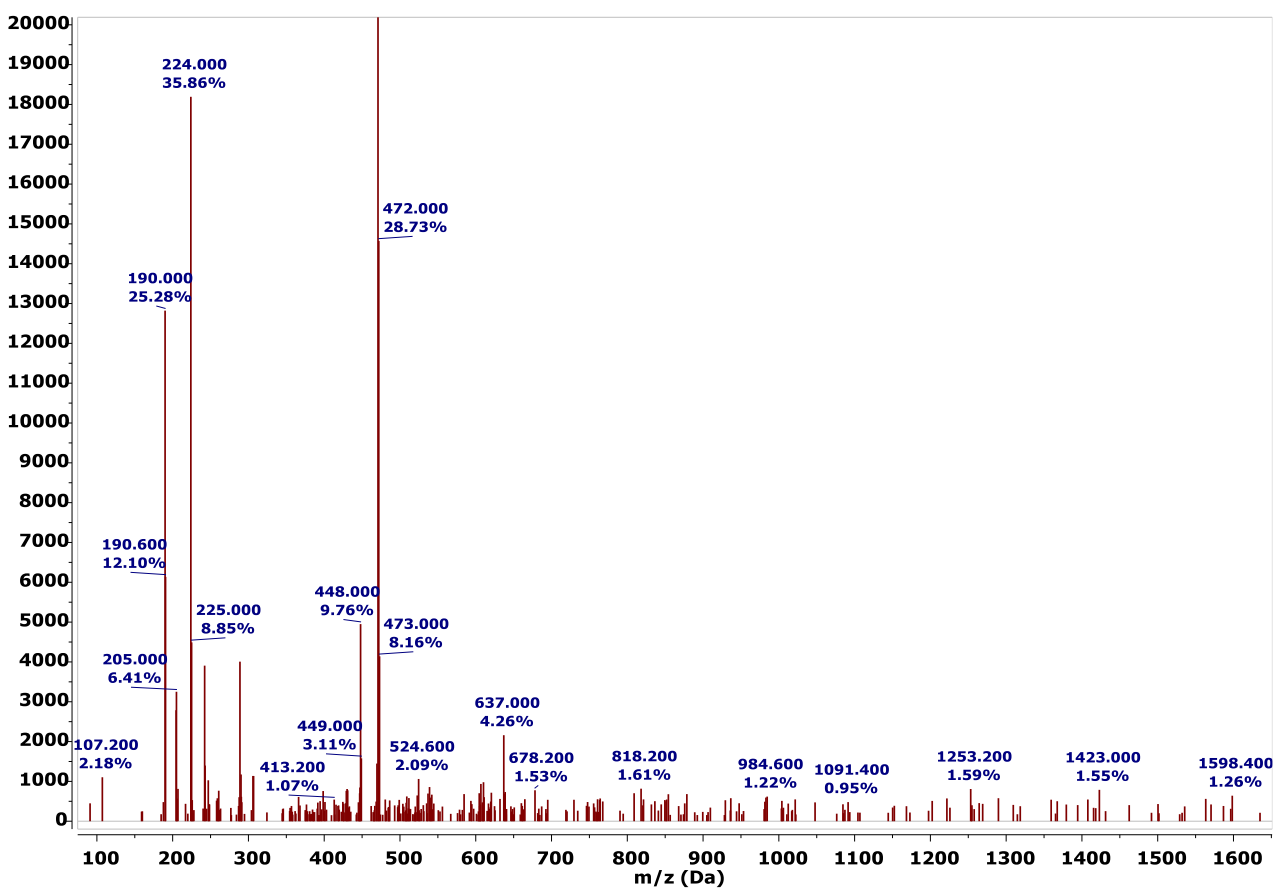


Figura 28. Espectro de masas del producto acuoso obtenido en la bioconjugación por EDC.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se establecieron dos métodos de síntesis de poli(cisteína); en medio acuoso y medio orgánico, para el uso de entrecruzantes EDC y DCC respectivamente.
- El análisis FT-IR y ^1H RMN de los subproductos evidencia desventajas de rendimiento en la bioconjugación por medio acuoso, al confirmar la formación de L-cistina por este método. En contraste, la síntesis por medio orgánico no presenta la formación de L-cistina.
- Por medio de operaciones unitarias de filtrado y extracción líquido-líquido, se separaron los productos deseados de síntesis de los subproductos L-cistina y DCU.
- Se confirmó la presencia de grupos funcionales amida y sulfhidrilo, correspondientes a poli(L-cisteína), mediante análisis espectrométrico FT-IR y ^1H RMN.
- El análisis ESI-MS de los productos acuosos sintetizados, por los dos métodos de síntesis, revela la presencia de iones moleculares, correspondientes a cadenas de poli(L-cisteína) de diferentes unidades de repetición.

5.2 Recomendaciones

- Realizar estudios analíticos por cromatografía para cuantificar las especies resultantes de las síntesis de bioconjugación.
- Plantear metodologías de síntesis que permitan reducir pérdidas de rendimiento en bioconjugaciones en medio acuoso, a causa de la oxidación de L-cisteína a L-cistina.
- Realizar estudios de peso molecular de los productos obtenidos, para determinar la posibilidad de controlar el grado de polimerización del producto, a través del método de síntesis propuesto.
- Estudiar la respuesta de los productos formados en diferentes ambientes de pH para evaluar la formación de sistemas particulados y/o hidrogeles.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. R. Kricheldorf, "Polypeptides and 100 years of chemistry of α -amino acid N-carboxyanhydrides," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 45, no. 35, pp. 5752–5784, 2006.
- [2] D. Yang, W. Chen, and J. Hu, "Design of controlled drug delivery system based on disulfide cleavage trigger," *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 43, pp. 12311–12317, Oct. 2014.
- [3] B. Ariei, N. Junzo, and K. Ephraim, "poly-L-cysteine," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 78, no. 17, pp. 4483–4488, 1956.
- [4] J. Han, D. Zhu, and C. Gao, "Fast bulk click polymerization approach to linear and hyperbranched alternating multiblock copolymers," *Polym. Chem.*, vol. 4, no. 3, pp. 542–549, 2013.
- [5] J. Howl, *Peptide Synthesis and Applications*, vol. 298. 2005.
- [6] B. Gyarmati, Á. Némethy, and A. Szilágyi, "Reversible disulphide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications," in *European Polymer Journal*, 2013, vol. 49, no. 6, pp. 1268–1286.
- [7] H. Wu, L. Zhu, and V. P. Torchilin, "PH-sensitive poly(histidine)-PEG/DSPE-PEG co-polymer micelles for cytosolic drug delivery," *Biomaterials*, vol. 34, no. 4, pp. 1213–1222, Jan. 2013.
- [8] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, and R. Langer, "Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy," *Nature Nanotechnology*, vol. 2, no. 12. Nature Publishing Group, pp. 751–760, 01-Dec-2007.
- [9] P. Zhang, J. Wu, F. Xiao, D. Zhao, and Y. Luan, "Disulfide bond based polymeric drug carriers for cancer chemotherapy and relevant redox environments in mammals," *Medicinal Research Reviews*, Wiley-Blackwell,

17-Jan-2018.

- [10] L. Liu and P. Liu, "Synthesis strategies for disulfide bond-containing polymer-based drug delivery system for reduction-responsive controlled release," *Frontiers of Materials Science*, vol. 9, no. 3. Higher Education Press, pp. 211–226, 03-Sep-2015.
- [11] M. H. Lee, J. L. Sessler, and J. S. Kim, "Disulfide-Based Multifunctional Conjugates for Targeted Theranostic Drug Delivery," *Acc. Chem. Res.*, vol. 48, no. 11, pp. 2935–2946, Nov. 2015.
- [12] J. M. (Jeremy M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, *Bioquímica*. Reverté, 2008.
- [13] E. Oommen *et al.*, "IgA antibodies to myeloperoxidase in patients with eosinophilic granulomatosis with polyangiitis (Churg-Strauss)," *Clin. Exp. Rheumatol.*, vol. 35, no. 1, pp. 98–101, 2017.
- [14] M. A. Fox and J. K. Whitsell, *Organic Chemistry*. Brooks/Cole, Cengage Learning, 1997.
- [15] M. Kuhlmann, O. Reimann, C. P. R. Hackenberger, and J. Groll, "Cysteine-functional polymers via thiol-ene conjugation," *Macromol. Rapid Commun.*, vol. 36, no. 5, pp. 472–476, 2015.
- [16] G. Rajpal and P. Arvan, "Disulfide Bond Formation," in *Handbook of Biologically Active Peptides*, Academic Press, 2013, pp. 1721–1729.
- [17] O. Schäfer, D. Huesmann, and M. Barz, "Poly(S-ethylsulfonyl- l -cysteines) for Chemoselective Disulfide Formation," *Macromolecules*, vol. 49, no. 21, pp. 8146–8153, 2016.
- [18] C. S. Sevier and C. A. Kaiser, "Formation and transfer of disulphide bonds in living cells," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 3, no. 11. Nature Publishing Group, pp. 836–847, 01-Nov-2002.

- [19] N. L. Benoiton and F. Group, *CHEMISTRY OF PEPTIDE SYNTHESIS*. Broken Sound Parkway NW: CRC Press, 2006.
- [20] G. T. Hermanson and G. T. Preceded by: Hermanson, *Bioconjugate techniques*. Rockford, Illinois, USA: Academic Press, 2008.
- [21] J. P. da Costa, R. Oliveira-Silva, A. L. Daniel-da-Silva, and R. Vitorino, "Bionanoconjugation for Proteomics applications - An overview," *Biotechnology Advances*, vol. 32, no. 5. Elsevier Inc., pp. 952–970, 2014.
- [22] T. I. Al-Warhi, H. M. A. Al-Hazimi, and A. El-Faham, *Recent development in peptide coupling reagents*, vol. 16, no. 2. King Saud University, 2012, pp. 97–116.
- [23] K. L. Carraway and D. E. Koshland, "Reaction of tyrosine residues in proteins with carbodiimide reagents," *BBA - Protein Struct.*, vol. 160, no. 2, pp. 272–274, Jun. 1968.
- [24] D. G. Hoare and D. E. Koshland, "A Procedure for the Selective Modification of Carboxyl Groups in Proteins," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 88, no. 9, pp. 2057–2058, May 1966.
- [25] M. A. Gilles, A. Q. Hudson, and C. L. Borders, "Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution," *Anal. Biochem.*, vol. 184, no. 2, pp. 244–248, Feb. 1990.
- [26] S. Sam *et al.*, "Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces," *Langmuir*, vol. 26, no. 2, pp. 809–814, 2010.
- [27] J. Sheehan, P. Cruickshank, and G. Boshart, "Notes- A Convenient Synthesis of Water-Soluble Carbodiimides.," *J. Org. Chem.*, vol. 26, no. 7, pp. 2525–2528, Jul. 1961.
- [28] Z. W. MAREK SLEBIODA, "Formation of optically pure N-acyl-N,N'-"

- dicyclohexylurea in N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-mediated peptide synthesis," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 35, no. 6, pp. 539–541, 1990.
- [29] J. C. Sheehan and G. P. Hess, "A new method of forming peptide bonds," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 77, no. 4, pp. 1067–1068, Feb. 1955.
- [30] N. Nakajima and Y. Ikada, "Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media," *Bioconjug. Chem.*, vol. 6, no. 1, pp. 123–130, Jan. 1995.
- [31] M. B. Smith, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*,. 2001.
- [32] D. Ulkoski and C. Scholz, "Synthesis and application of aurophilic Poly(Cysteine) and Poly(Cysteine)-containing copolymers," *Polymers*, vol. 9, no. 10. 2017.
- [33] T. Iwasawa, P. Wash, C. Gibson, and J. Rebek, "Reaction of an introverted carboxylic acid with carbodiimide," *Tetrahedron*, vol. 63, no. 28, pp. 6506–6511, 2007.
- [34] C. Y. Lim *et al.*, "Succinimidyl ester surface chemistry: Implications of the competition between aminolysis and hydrolysis on covalent protein immobilization," *Langmuir*, vol. 30, no. 43, pp. 12868–12878, 2014.
- [35] J. V Staros, "Corrections: N-Hydroxysulfosuccinimide Active Esters: Bis(N-hydroxysulfosuccinimide) Esters of Two Dicarboxylic Acids Are Hydrophilic, Membrane-Impermeant, Protein Cross-Linkers: (Biochemistry (1982) 21(17) (3950–3955) (10.1021/bi00260a008))," *Biochemistry*, vol. 22, no. 2. p. 524, 17-Aug-1983.
- [36] C. B. (Christian B. Anfinsen, J. T. (John T. Edsall, and F. M. (Frederic M. Richards, *Advances in protein chemistry. Volume 30*. Academic Press, 1976.

- [37] *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Wiley, 2001.
- [38] B. H. Stuart, *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*, vol. 8. Wiley, 2004.
- [39] H. Günzler and H.-U. Gremlich, *IR spectroscopy: an introduction*. Wiley-VCH, 2002.
- [40] A. Vincent, *Molecular Symmetry and Group Theory: A Programmed Introduction to Chemical Applications*. Wiley, 2013.
- [41] PIKE technologies, "Design and Performance Features of ATR Crystal Plates for Single Reflection ATR Accessories for FTIR," pp. 2–5, 2000.
- [42] P. Griffiths and J. A. De Haseth, *Fourier transform infrared spectrometry*, vol. 83. Wiley-Interscience, 1986.
- [43] H. Gunther, *NMR Spectroscopy: Basic Principles, Concepts and Applications in Chemistry*. Siegen: Wiley-VCH, 2013.
- [44] N. E. Jacobsen, *NMR Spectroscopy Explained: Simplified Theory, Applications and Examples for Organic Chemistry and Structural Biology*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2007.
- [45] R. K. Harris, "Nuclear Spin Properties & Notation," in *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 1996, pp. 3301–3314.
- [46] J. Chapman, "Spectrometry of Proteins and Peptides," *Upload.Vnuki.Org*, vol. 146, p. 538, 2000.
- [47] R. A. W. J. Christopher G. Herbert, *Mass Spectrometry Basics*. New York, Washington: CRC Press, 2003.
- [48] J. H. Gross, *Mass Spectrometry*, no. Mmd. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.

- [49] S. K. Srivastava, "Electron Impact Ionization," in *Wiley Encyclopedia of Electrical and Electronics Engineering*, Springer-Verlag, 1999, p. 383.
- [50] R. S. Irma Lavagnini, Franco Magno, *Quantitative Applications of Mass Spectrometry*, vol. 4, no. 3. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons, 2006.
- [51] P. H. Dawson, *Quadrupole mass spectrometry and its applications*. Elsevier Scientific Pub. Co., 1995.
- [52] C. A. G. N. Montalbetti and V. Falque, "Amide bond formation and peptide coupling," *Tetrahedron*, vol. 61, no. 46. Pergamon, pp. 10827–10852, 14-Nov-2005.
- [53] S. F. Parker, "Assignment of the vibrational spectrum of l-cysteine," *Chem. Phys.*, vol. 424, pp. 75–79, 2013.
- [54] S. Roy, G. Palui, and A. Banerjee, "The as-prepared gold cluster-based fluorescent sensor for the selective detection of AsIII ions in aqueous solution," *Nanoscale*, vol. 4, no. 8, p. 2734, 2012.

VII. ANEXO

Anexo A. ^1H RMN del precipitado de L-cistina extraído de la bioconjugación por EDC.

