



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS:

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS PRECURSORES DE
MOLÉCULAS HÍBRIDAS QUITOSANO-AMINOÁCIDOS”**

QUE PRESENTA:

Miguel Angel Elizalde Mendiola

Para obtener el título de:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

ASESORA DE TESIS:

Doctora en Ciencias Janett Betzabe González Campos

CO-ASESORA DE TESIS:

**Doctora en Ciencias Judit Araceli Aviña
Verduzco**



MORELIA, MICHOACÁN; FEBRERO 2015

ABSTRACT

The synthesis of hybrid biomaterials is one of the most attractive and emerging issues in biomedicine because of the needs that this field requires at present, therefore, the development of new biomaterials with enhanced properties, derived from the synergistic effect of two or more molecules with attractive individual properties for potential use in biomedicine is of great interest.

Chitosan is a natural polymer which has functional properties of great potential to be used as biomaterial, because it is biocompatible and biodegradable besides its antibacterial properties and no toxicity. Meanwhile, peptides can play the role of therapeutic molecules to be directed against proteins or receptors in diseases such as cancer, therefore, they are also attractive molecules for use in the synthesis of composite biomaterials. There are some scientific reports on chitosan-peptides combination, however, even if this combination is attractive given the individual properties that these components have individually, this area has been little explored. The existing researches report the synthesis biomaterials based on chitosan combined with high molecular weight peptides, so the combination of chitosan with low molecular weight peptides is still unexplored.

Given that peptides are composed of aminoacids units, this research project reports the synthesis and characterization of chitosan-aminoacids hybrid molecules, allowing to explore into smaller molecules the possible chemical interactions as a result of the coupling of chitosan with low molecular weight peptides. This way, it is possible to obtain composites biomaterials precursors of chitosan-peptides biomaterials which in turn may have potential pharmacological properties.

The synthesis and characterization of chitosan/*L-cysteine* and chitosan/*L-alanine* composites is reported, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) analysis gives evidence the existence of formal chemical bonds.

KEYWORDS: Biomaterials, chitosan, peptides.

RESUMEN

La síntesis de biomateriales híbridos es una de las temáticas más atractivas y emergentes en biomedicina dadas las necesidades que este campo requiere en la actualidad, por esta razón, el desarrollo de nuevos biomateriales con propiedades potenciadas, derivadas del efecto sinérgico de dos o más moléculas con propiedades individuales atractivas para su potencial uso en biomedicina es de gran interés.

El quitosano es un polímero natural que presenta propiedades funcionales de gran potencial como biomaterial debido a que es biocompatible y biodegradable, además de poseer propiedades antimicrobianas y no ser tóxico. Por su parte, los péptidos pueden funcionar como moléculas terapéuticas para ser dirigidas contra proteínas o receptores en enfermedades como el cáncer por mencionar un ejemplo, por lo que son otro tipo de moléculas altamente atractivas para su uso en la síntesis de biomateriales compuestos. Existen algunos reportes científicos de la combinación quitosano-péptidos, sin embargo, aun cuando esta combinación resulta atractiva dadas las propiedades que presentan cada uno de estos componentes de forma individual, esta área ha sido poco explorada. Las investigaciones existentes reportan la generación de biomateriales compuestos de quitosano con péptidos de alto peso molecular, por lo que la combinación de quitosano con péptidos de bajo peso molecular no ha sido aún explorada.

Dado que los péptidos están formados por unidades de aminoácidos, el presente proyecto de investigación, reporta la síntesis y caracterización de moléculas híbridas quitosano-aminoácidos, permitiendo explorar en moléculas más pequeñas las interacciones químicas resultado del acoplamiento del quitosano con péptidos de bajo peso molecular. De esta forma, es posible obtener biomateriales compuestos precursores de biomateriales quitosano-péptidos los cuales a su vez pueden presentar potenciales propiedades farmacológicas atractivas.

Se presenta la síntesis y caracterización de compuestos quitosano/*L*-cisteína y quitosano/*L*-alanina, mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier evidencia la presencia de enlaces químicos formales.

PALABRAS CLAVE: Biomateriales, quitosano, péptidos.



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Biopolímeros así como en el laboratorio de Síntesis Orgánica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la Doctora en Ciencias Janett Betzabe González Campos y la Co-asesoría de la Doctora en Ciencias Judit Araceli Aviña Verduzco. Con el financiamiento como becario del proyecto CONACYT 150767 y CIC-UMSNH.

DEDICATORIA

A esas personas maravillosas en mi vida, que siempre han estado conmigo.
Con todo mi cariño esta tesis se las dedico a ustedes:

A mi papá

Miguel Elizalde Romero

A mi mamá

Ma. Eufemia Mendiola González

A mis hermanas:

Gloria Elizalde Mendiola,

Ana Rosa Elizalde Mendiola,

Liliana Elizalde Mendiola

Teresita de Jesús Elizalde Mendiola

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer a mis asesoras de tesis a la Dra. J. Betzabe González Campos y a la Dra. Judit Araceli Aviña Verduzco gracias por su paciencia y comprensión, por haber estado pendiente de todo en todo momento, por estar siempre dispuestas a ayudarme, por su dedicación, gracias por confiar en mí, en la realización de este proyecto.

A mis revisores de tesis a las Doctoras Yliana López Castro y Gabriela Rodríguez García, a la Maestra en Ciencias Melissa Tapia Juárez, al Maestro en Ciencias Ramón Guzmán Mejía y al Dr. Juan Pablo García Merinos, a ustedes gracias por sus sugerencias y consejos que han permitido enriquecer este trabajo.

Quiero agradecer a la I.Q, Mayra Ofelia Vargas Cruz, por su compañía, ayuda, comprensión, paciencia, por los consejos y tiempo brindado en la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio de síntesis orgánica quiero agradecerles por los buenos momentos que hemos compartido a Juan Carlos, Gerardo, Yaricsa, Francisco Javier, Jourdan, Lupita, Steffany, Héctor, Julio, Karina, Jessica, Angélica, Ilse. A, Alejandra, Perla y Fernando del laboratorio de Biopolímeros.

Mi agradecimiento a dos personas muy especiales a las cuales aprecio mucho, y que me han mostrado en su propio ejemplo lo que significa ser una gran persona, Jessica Steffany Pérez Campos y Rosa del Socorro González Ortiz.

Y por último, y no por ello menos importante, quiero agradecer a toda mi familia el respaldo, comprensión pero sobre todo la confianza depositada en mí en todo aquello que he llevado a acabo. Por estar incondicionalmente animándome y apoyándome en todo momento.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----|
| LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | IX |
| LISTA DE ESQUEMAS | XIV |
| LISTA DE COMPUESTOS | XV |
| 1. - INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2.- ANTECEDENTES..... | 4 |
| 2.1 Quitosano..... | 4 |
| 2.2 Aminoácidos y péptidos..... | 6 |
| 2.2.1 Alanina | 7 |
| 2.2.2 Cisteína | 9 |
| 2.3 Carbodiimidias..... | 11 |
| 2.4 Compuestos quitosano-peptídicos..... | 12 |
| 2.5 Síntesis de compuestos quitosano-péptidos..... | 14 |
| 2.6 Obtención de CTS soluble en agua a través del proceso de Electrospinning..... | 16 |
| 3.- OBJETIVO GENERAL | 19 |
| 3.1 Objetivos específicos | 20 |
| 4.- PARTE EXPERIMENTAL..... | 21 |
| 4.1 Aspectos Generales | 21 |
| 4.2 <i>N</i> -Cbz- <i>L</i> -alanina | 21 |
| 4.3 <i>S</i> -Bencilación de la <i>L</i> -cisteína [<i>L</i> -Cis(SBn)]..... | 22 |
| 4.3.1 <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -cisteína(<i>S</i> -Bn)..... | 22 |
| 4.4 Preparación de la solución CTS 8% w/v TFA/DCM | 23 |
| 4.4.1 Obtención de nanofibras de CTS..... | 24 |
| 4.4.2 Obtención de películas de aminoácidos/CTS | 24 |
| 4.4.2.1 Síntesis de películas <i>N</i> -Cbz- <i>L</i> -Ala/CTS..... | 24 |
| 4.4.2.2 Síntesis de películas <i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Cis(SBn)/CTS..... | 25 |
| 5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 26 |
| 5.1 Preparación de los aminoácidos protegidos..... | 26 |
| 5.2 Preparación de nanofibras de CTS TFA/DCM..... | 29 |
| 5.3 Acoplamiento de los aminoácidos, a las nanofibras de CTS..... | 30 |
| 5.4 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)..... | 32 |

| | |
|--|----|
| 5.4.1 Caracterización de nanofibras del CTS | 33 |
| 5.4.2 Caracterización de las películas CTS/Aminoácidos por medio de FT-IR..... | 35 |
| 6. - CONCLUSIONES..... | 40 |
| 7. - PERSPECTIVAS | 41 |
| 8. - BIBLIOGRAFÍA..... | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|-------------------------|--|
| L-Ala | L-Alanina |
| δ | Desplazamiento químico |
| °C | Grados Celsius |
| aa | Aminoácido |
| AcOEt | Acetato de Etilo |
| BnBr | Bromuro de bencilo |
| Boc₂O | Diterbutil dicarbonato |
| Cbz | Benciloxicarbonilo |
| CbzCl | Cloroformiato de bencilo |
| cm | Centímetros |
| CTS | Quitosano |
| CPPs | Caseinafosfopéptidos |
| CPPNPs | Complejos intrapoliméricos saturados con CPPs |
| L-Cis | L-Cisteína |
| DCM | Diclorometano |
| DIC | Diisopropilcarbodiimida |
| DIEA | Diisopropiletilamina |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DTT | (2S,3S)-1,4-bis(sulfonil)butano-2,3-diol |
| EDC | 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil carbodiimida |
| Eq | Equivalente químico |
| FT-IR | Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier |

| | |
|------------------------|---|
| g | Gramo |
| GRKKRRQRRRPQ | Glicina-arginina-lisina-lisina-arginina-arginina-glutamina-arginina-arginina-arginina-prolina-glutamina |
| h | Hora (s) |
| HAP | Hidroxiapatita |
| HPB | Hiperplasia prostática benigna |
| Hz | Hertz |
| IR | Infrarrojo |
| J | Constante de acoplamiento |
| kDa | KiloDalton |
| Kg | Kilogramo |
| KV | Kilovolts |
| LD₅₀ | Dosis letal media |
| LDL | Lipoproteína de baja densidad |
| LMW-CTS | Quitosano de bajo peso molecular |
| m | Múltiple |
| μL | Microlitro |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligramos |
| min | Minutos |
| mL | Mililitros |
| MHz | Megahertz |
| mmol | Milimol |
| N | Normalidad |
| PET | Polietilentereftalato |

| | |
|---|---|
| pf | Punto de fusión |
| pH | Potencial de hidrógeno |
| PKa | Constante de disociación ácida |
| ppm | Partes por millón |
| Rf | Factor de retención. |
| RMN de ¹H | Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno |
| s | Simple |
| Ser | Serina |
| Ser-Thr-Tir | Serina-treonina-tirosina |
| SPDP | Succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato |
| TAT | Péptido GRKKRRQRRRPQ |
| TBOC | Carbonato de Di- <i>terc</i> -butil |
| <i>t</i>Bu | <i>terc</i> -Butilo |
| TEA | Trietilamina |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| Thr | Treonina |
| TLC | Cromatografía en capa fina |
| Tir | Tirosina |
| UV | Ultravioleta |
| ν cm⁻¹ | Números de onda |
| w/v | Relación peso/volumen |
| %T | Porcentaje de transmitancia |

ISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura de la quitina (a) y del CTS (b).

Figura 2.2 Estructura de la alanina.

Figura 2.3 Isómeros de alanina.

Figura 2.4 Estructura de la cisteína.

Figura 2.5 Estructura de algunas carbodiimidas.

Figura 2.6 Formación de trifluoroacetato de CTS.

Figura 2.7 Esquema de funcionamiento del Electrospinning.

Figura 4.1 Interacción entre el CTS y los grupos trifluoroacetatos

Figura 5.1 Espectro RMN ^1H (400 MHz), *N*-Cbz-*L*-Ala en CDCl_3 .

Figura 5.2 Espectro RMN ^1H (400 MHz), *N*-Boc-*L*-Cis(SBn) en CDCl_3 .

Figura 5.3 Nanofibras de CTS.

Figura 5.4 Cromatografías en capa fina, MeOH:H₂O (1:1).

Figura 5.5 Películas de *N*-Cbz-*L*-Ala acoplada a CTS **4**.

Figura 5.6 Películas de *N*-Boc-Cis(SBn) acoplada a CTS **5**.

Figura 5.7 Comparación de los espectros de FT-IR de nanofibras de CTS y CTS puro.

Figura 5.8 a) Estructura del CTS puro, b) Estructura del CTS en forma de nanofibras.

Figura 5.9 Espectro de FT-IR del compuesto **4** vs CTS puro.

Figura 5.10 Espectro de FT-IR en la región 1775 cm^{-1} a 500 cm^{-1} del compuesto **4** vs CTS puro.

Figura 5.11 Compuesto *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS **4**.

Figura 5.12 Espectro de FT-IR del compuesto **5** vs CTS puro

Figura 5.13 Espectro de FT-IR en la región 700 a 1800 cm^{-1} del compuesto **5** vs CTS puro.

Figura 5.14 *L*-Cis(SBn)-CTS **5**.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 2.1 Formación del enlace peptídico mediante carbodiimidas.

Esquema 2.2 Síntesis del compuesto Ser-Thr-Tir-CTS.

Esquema 2.3 Síntesis del CTS-Péptido TAT.

Esquema 5.1 *N*-Protección de la *L*-Ala **1**.

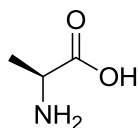
Esquema 5.2 Obtención de *L*-Cis(SBn) **2** y *N*-Boc-*L*-Cis(SBn) **3**.

Esquema 5.3 Reacción general para la síntesis de *N*-Cbz-*L*-Ala acoplado a CTS.

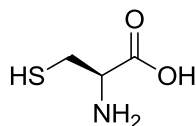
Esquema 5.4 Reacción general para la síntesis de *N*-Boc-*L*-Cis(SBn) acoplado a CTS.

LISTA DE COMPUESTOS

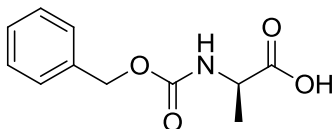
L-Alanina



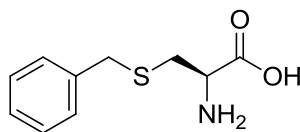
L-Cisteína



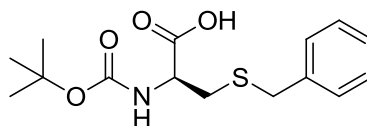
N-Cbz-L-alanina



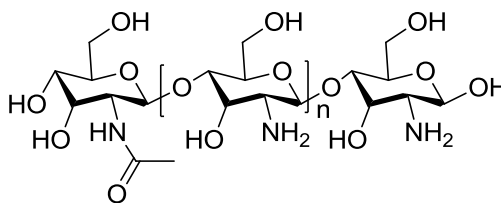
L-cisteína(SBn)



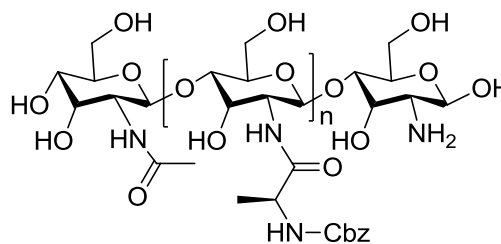
N-Boc-L-cisteína(SBn)



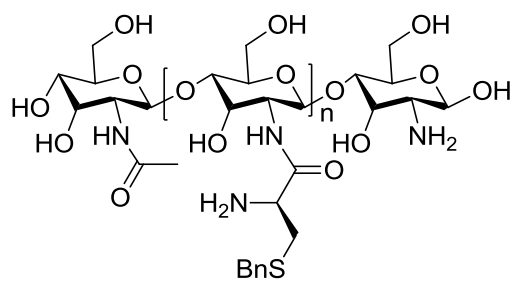
Quitosano (CTS)



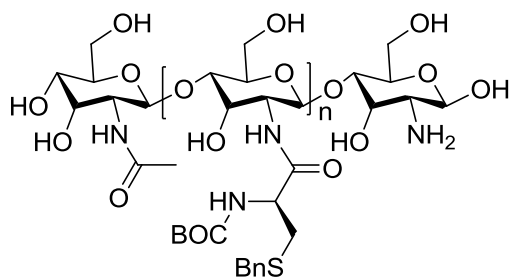
N-Cbz-L-Ala-CTS



L-Cis(SBn)-CTS



N-Boc-L-Cis(SBn)-CTS



1. - INTRODUCCIÓN

Un biomaterial se define como cualquier sustancia, elemento o combinación de estos, ya sea sintético o natural en su origen capaz de ser transformado en un componente que se pueda adaptar al cuerpo humano y que desarrolla una función en el mismo (1). Los biomateriales son elaborados a partir de diversos componentes, principalmente de polímeros sintéticos y naturales (2).

El buen desempeño de los polímeros ha permitido su aplicación como biomateriales, los cuales están diseñados para la recuperación, aumento o reemplazo de las funciones naturales de tejidos vivos u órganos del cuerpo humano. Los biomateriales presentan aplicaciones específicas como sistemas de liberación controlada de sustancias biológicas o farmacéuticas dentro del organismo vivo, parches de aplicación biomédica, soportes para el crecimiento del tejido celular, entre muchos otros (2).

Para la formación de materiales híbridos se ha propuesto la incorporación de moléculas orgánicas discretas (aminoácidos) a polímeros (como el alcohol polivinílico, la polianilina, entre otros), presentando una buena compatibilidad entre ambas fases mediante la formación de enlaces amida (2), con el objetivo de preparar novedosos materiales compuestos con propiedades y características mejoradas para su uso (3).

La característica deseable primordial de estos biomateriales es que sean biológicamente inertes, es decir, que no presenten respuesta inmunológica o daño celular donde se aplique, no ser tóxicos, ni carcinógenos, ser químicamente estables (no presentar degradación con el tiempo) y poseer propiedades mecánicas adecuadas (3).

Uno de los polímeros naturales más empleados para la fabricación de biomateriales es el quitosano (CTS), un polímero natural que se obtiene de la desacetilación parcial de la quitina (2), siendo esta última el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa (4), tiene un gran potencial como biomaterial debido a que es biodegradable, biocompatible y no tóxico, además de tener bajo costo (2), razón por la cual el CTS juega un papel importante como material en muchos propósitos en la industria farmacéutica, médica, alimentaria, de síntesis orgánica y biológica (5). El CTS como soporte proporciona ventajas como: su versatilidad y disponibilidad en diferentes formas (hojuelas, lechos porosos, geles, fibras y membranas), posee baja biodegradabilidad, bajo costo, fácil manejo, alta afinidad con proteínas y no

toxicidad, además presenta propiedades físicas, químicas y biológicas muy particulares debido a sus iones catiónicos ($-\text{NH}_3^+$). Esta carga positiva atrae todo elemento cercano que tenga iones de carga negativa y es una condición singular que permite el uso del CTS en un extenso abanico de aplicaciones (5).

Por su parte los biomateriales base peptídica han sido extensamente investigados para aplicaciones biomédicas debido a su alta versatilidad funcional y estructural. Particularmente, aquellos péptidos que puedan responder a diferentes estímulos, tales como pH, potencial redox, temperatura, luz y enzimas; pueden ofrecer acciones controlables en puntos objetivos del cuerpo humano (6).

Sin embargo, los péptidos no modificados circulan solo durante pocos minutos en la sangre, debido a su predisposición a la degradación enzimática, por ello presentan en general una biodisponibilidad reducida en los tejidos y órganos, lo que limita su utilidad como agentes terapéuticos. Debido a esto, se han generado estrategias para modificar los péptidos con el fin de mejorar el efecto terapéutico de los medicamentos basados en estos, alargando su vida media y distribución (aumento de permeabilidad en tejidos) en el organismo. Un ejemplo de ello es la síntesis de compuestos conjugados CTS-péptidos capaces de mediar la adhesión, fijación y difusión celular similarmente como las integrinas, y debido a las propiedades de mucoadhesión del CTS, al ser incorporado a fármacos base peptídica es posible incrementar la estabilidad y tiempo de residencia del fármaco con lo cual se incrementa la biodisponibilidad del péptido en un sitio deseado (7).

Se ha demostrado que una nanoformulación de CTS-péptido Serina-treonina-tirosina (Ser-Thr-Tir), tiene el potencial para tratar la degeneración macular relacionada con la edad; un trastorno ocular que destruye lentamente la visión central y aguda, lo cual dificulta la lectura y la visualización de detalles finos. Se demostró que esta molécula es un excelente liberador de fármacos para la retina y tiene el potencial de tratar esta enfermedad (8).

Por otro lado, al incorporar *L*-Cisteína (*L*-Cis), un agente antimicrobiano, al quitosano y alginato de sodio, los resultados muestran un aumento del efecto antimicrobiano del CTS hacia *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* debido a la presencia de este aminoácido (9).

Debido a lo anterior, se observa que la combinación CTS-péptido resulta altamente atractiva para la generación de biomateriales con potencial farmacológico con posibles aplicaciones en el área biomédica. Es importante mencionar que aun cuando existen reportes de la combinación CTS-péptidos, esta área de investigación tiene un gran potencial ya que los péptidos empleados en la

literatura son de alto peso molecular, dejando de lado aquellos con menor peso molecular, abriendo así una amplia ventana de posibilidades de estudio en la combinación CTS-péptidos de bajo peso molecular.

Un aspecto importante en la síntesis de moléculas compuestas CTS-péptido es producir una buena compatibilidad entre ambas fases mediante la formación de enlaces amida (2) por lo que resulta de vital importancia determinar el tipo de interacción química que se puede llegar a producir al combinar estas moléculas.

Dado que los péptidos están formados por la unión de varios aminoácidos mediante enlaces peptídicos, la composición de aminoácidos, estructura conformacional, carga y tamaño de los péptidos, son características que determinan su mecanismo de acción y efectividad (10). Es así que el presente trabajo propone la incorporación de los aminoácidos *N*-Cbz-*L*-alanina, *N*-Boc-*L*-cisteína(SBn) al biopolímero CTS con la finalidad de obtener un material compuesto precursor de biomateriales CTS-péptido, lo que permita el análisis y la determinación en menor escala de las interacciones químicas que pueden producirse entre el CTS y péptidos de bajo peso molecular, produciendo a su vez compuestos CTS-aminoácidos con potencial farmacológico.

2.- ANTECEDENTES

2.1 Quitosano

El CTS fue descubierto por Rouget en 1859, quien encontró que al tratar quitina (a), con una solución caliente de hidróxido de potasio se obtiene un producto soluble en ácidos orgánicos al cual llamo “quitina modificada” (b). Más tarde, en 1894, fue estudiada por Hoppe-Seyler quien la denominó “quitosano”. (11)

El CTS es un polímero natural que se obtiene a partir de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. La quitina forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos. La quitina y el CTS son biopolímeros que en los últimos años han encontrado gran cantidad de aplicaciones, especialmente en la industria alimentaria y en la biotecnológica. (12)

La quitina está formada por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). La obtención de CTS a partir de quitina se realiza por desacetilación de la misma, dejando libre el grupo amino del carbono 2, sin embargo este proceso nunca llega al 100% y por ello que el CTS es un copolímero de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa (Figura 2.1). (12)

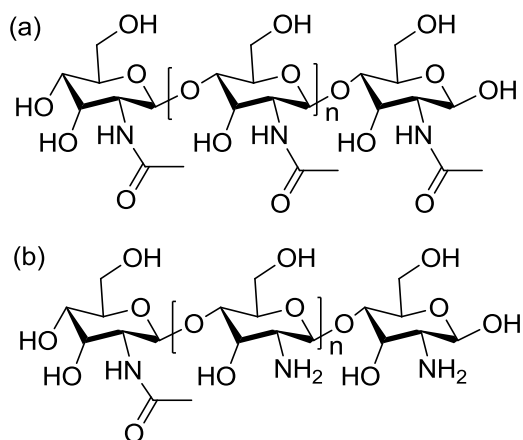


Figura 2.1. Estructura de la quitina (a) y del CTS (b).

La fuente y el método de obtención determinan la composición de las cadenas de CTS y su tamaño. Por este motivo, el grado de desacetilación y el peso molecular promedio son dos parámetros de obligado conocimiento para la caracterización de este polímero (12).

Las principales propiedades físico-químicas del CTS que determinan sus propiedades funcionales son su grado de desacetilación y su peso molecular promedio, aunque la cristalinidad, el contenido de agua, cenizas y proteínas también son características fisicoquímicas a considerar para la aplicación de un CTS específico (12).

En su forma cristalina, es normalmente insoluble en disoluciones acuosas neutras, sin embargo, en disoluciones ácidas diluidas ($\text{pH} < 6.0$), los grupos amino libres de la glucosamina se protonan y posibilitan la solubilidad de la molécula (13).

Dependiendo de la fuente y procedimiento de preparación, el peso molecular del CTS puede variar en el intervalo de 300 a 1000 kDa, y su grado de desacetilación suele abarcar desde un 60 hasta un 95%. Ha sido ampliamente demostrado su carácter biocompatible y biodegradable, ya que promueve la adhesión celular y se reabsorbe mediante procesos de hidrólisis a través de la acción de enzimas presentes en los fluidos fisiológicos (13).

El porcentaje de grupos amino que quedan libres en la molécula de CTS es lo que se denomina grado de desacetilación y está estrechamente vinculado con su solubilidad. Como consecuencia de la hidrólisis del grupo *N*-acetilo, aumenta la capacidad hidrofílica del CTS y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas (acético, fórmico, clorhídrico, entre otros) (12) ya que el pK_a del grupo amino del CTS es de 6.5 (14). La protonación de los grupos amino del CTS en medio ácido le confiere un carácter altamente reactivo (12).

El CTS es un polímero formado por unidades repetidas de *D*-glucosamina, por lo que la longitud de la cadena y, por tanto, su peso molecular, es una característica importante de la molécula (12).

Algunas propiedades funcionales del CTS son: biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad, mucoadhesión, capacidad filmogénica, hemostático, promotor de absorción, actividad antimicrobiana, anticolesterolémica y antioxidante. Constituye un vehículo para la encapsulación del fármaco, protegiéndolo y liberándolo de forma controlada, además de promover su absorción a través del epitelio y presenta una toxicidad por vía oral es baja; se ha descrito una LD_{50} (dosis letal para el 50% de un conjunto de animales de prueba) de 16g/Kg en ratas (12).

Debido a su carácter catiónico y a sus propiedades gelificantes y filmogénicas, el CTS ha sido estudiado en la industria farmacéutica por su potencial en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos. En este sentido, hay que destacar que el hidrocloreuro de CTS fue aprobado por las autoridades e incluido en la cuarta edición de la farmacopea europea (12).

Así mismo, el CTS presenta propiedades necesarias para su uso en dicha industria, como son su biodegradabilidad, biocompatibilidad y no toxicidad. En los últimos años, el estudio del CTS se ha centrado sobre todo en mejorar la liberación y la absorción de las llamadas biomoléculas terapéuticas, como son los fármacos proteicos. Existen resultados contradictorios sobre la mayor eficacia del CTS en solución, en polvo o en forma de nanopartículas en la liberación in vivo. En general, se ha observado que la eficacia de la absorción de macromoléculas en mucosas utilizando nanopartículas de CTS como vehículo de encapsulación es inferior a la obtenida con formulaciones de CTS en solución o en polvo (12).

Entre las aplicaciones del CTS, se ha promovido su utilización en distintos campos como el agrícola, el industrial y la medicina. En agricultura, el CTS se ha probado exitosamente como antiviral en plantas y como aditivo en fertilizantes. Así mismo se ha investigado como agente quelante de metales en agricultura e industria y como agente filmogénico en cosmética. También ha sido utilizado en la industria papelera, en la textil y en tratamiento de aguas residuales (15). En la industria alimentaria se ha utilizado como ingrediente funcional y como fibra alimentaria. Además tiene la capacidad de unirse a grasas, por lo que se utiliza como agente hipocolesterolémico en productos dietéticos (16). Ha sido ampliamente utilizado en el campo de la biomedicina debido a su actividad inmunoestimuladora, propiedades anticoagulantes, acción antibacteriana y antifúngica y por su acción como promotor de la cicatrización de heridas (17).

2.2 Aminoácidos y péptidos

Los aminoácidos como su nombre lo indica, son compuestos bifuncionales, contienen un grupo amino, y un grupo carboxilo. Su valor como bloques biológicos de construcción proviene del hecho de que se pueden asociar en grandes cadenas formando enlaces amida entre el $-NH_2$ de un aminoácido y el $-COOH$ de otro (18); a este se le llama enlace peptídico. Con fines de clasificación, las cadenas de menos de 50 aminoácidos suelen denominarse péptidos, así un dipéptido es una molécula formada por dos aminoácidos unidos por un enlace peptídico. Un tripéptido tiene tres aminoácidos unidos por dos enlaces peptídicos,

un tetrapéptido tiene cuatro aminoácidos, y así sucesivamente. Los péptidos que tienen más de 30 a 50 aminoácidos son polipéptidos (19), en tanto el término proteína se reserva para las cadenas que superan este último tamaño (18).

Los péptidos presentan un amplio espectro de potenciales beneficios clínicos. Actualmente hay seis amplias categorías para la aplicación terapéutica de péptidos: antibióticos/antifúngicos, antivirales, desordenes en el sistema inmune, enfermedades cardiovasculares, desordenes neuronales y cáncer (22). Algunas ventajas de utilizar aminoácidos precursores de péptidos, como base de medicamentos con alta especificidad y actividad, es que estos últimos no se acumulan en los órganos debido a su vida media corta, presentan una toxicidad sistémica baja comparada con la de las moléculas pequeñas y menor antigenicidad que los anticuerpos (23).

Los péptidos tienen diferentes funciones, entre ellas se incluyen su acción como hormonas peptídicas, neuropéptidos, antibióticos, alcaloides, toxinas, etc. (23).

La investigación biológica, química y farmacológica de los péptidos, ha estimulado el estudio de métodos sintéticos para la preparación y modificación estructural de estas poliamidas y de otras moléculas que puedan reemplazar compuestos semejantes de origen natural. Estudios e investigaciones en el campo de la relación entre su estructura y su actividad biológica y farmacológica, han dado lugar a compuestos con mayor estabilidad metabólica, con mayor capacidad para traspasar barreras celulares y por tanto, con una mayor duración y efectividad farmacológica, la amplia utilidad de los péptidos como agentes farmacéuticos ha sido el principal incentivo para el estudio y descubrimiento de métodos eficaces para su síntesis y posterior modificación estructural (24).

Péptidos de bajo peso molecular, de 2 hasta 5 residuos de aminoácido, han demostrado actividad biológica importante como antimicrobianos y anticancerígenos (25). La síntesis de péptidos con potencial actividad terapéutica con 2 y 4 residuos de aminoácidos acoplados a polímeros naturales los hace buenos candidatos en la producción a gran escala.

2.2.1 Alanina

La alanina (Ala) o ácido 2-aminopropanoico, es el aminoácido natural ópticamente activo más sencillo y se encuentra clasificado dentro de los aminoácidos no esenciales, siendo uno de los 20 aminoácidos que participan en la

síntesis de proteínas y participan en el metabolismo de la glucosa para la producción de energía contiene un átomo de carbono asimétrico (Figura 2.2), por lo cual es un compuesto ópticamente activo (26).

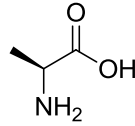


Figura 2.2 Estructura de la alanina.

Existen 2 isómeros de Ala, la *L*-Ala y *D*-Ala (Figura 2.3), ambas tienen propiedades físicas idénticas, exceptuando la dirección de la rotación que imprimen a la luz polarizada en el plano; la cantidad o magnitud de la rotación de los isómeros puros es idéntica. Se clasifica como un α -aminoácido por tener el grupo amino enlazado al primer átomo de carbono contado a partir del grupo carboxilo (26).

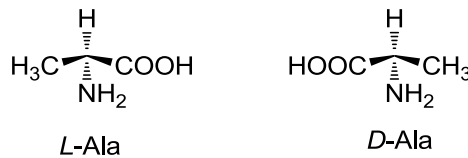


Figura 2.3 Isómeros de alanina.

Se ha demostrado que la Ala ayuda a proteger las células contra daños durante la actividad aeróbica intensa, cuando el cuerpo canibaliza la proteína del músculo para ayudar a producir energía. Es crucial para la preservación de los niveles de equilibrio de nitrógeno y glucosa en el cuerpo, la cual ayuda a regular el azúcar en la sangre. Estudios realizados han demostrado que para las personas con diabetes dependiente de insulina, teniendo una dosis oral de L-Ala impide eficazmente hipoglucemia nocturna. El organismo debe tener Ala para procesar las vitaminas del grupo B, necesarias para la buena salud, en especial la vitamina B5 y B6. Debido a que el líquido en la glándula prostática contiene L-Ala se ha teorizado que este aminoácido puede ayudar a tratar la hiperplasia prostática benigna (HPB.). En un estudio, los participantes con la HPB tomaron 780 mg de Ala, glicina y ácido glutámico por día durante dos semanas y posteriormente 390mg de estos tres aminoácidos para los próximos dos meses y medio, los resultados fueron una reducción significativa en los síntomas (27).

Se ha reportado la síntesis de nanocompuestos oro/Ala con propiedades potenciales para aplicaciones médicas como sensores de radiación mientras que el uso de proteínas fibrosas ricas en Ala han sido investigadas para su uso en ingeniería de tejidos (28). Shan y colaboradores, reportaron la modificación de hidroxiapatita (HAP) usando poliaminoácidos conteniendo a este aminoácido, como resultado obtuvieron nanocristales que poseen una estructura similar a la de los huesos naturales, este biomaterial resulto ser más bioactivo al compararlo con el desempeño de la HAP de forma individual (29). Por tanto los péptidos que contienen Ala en su estructura son atractivos para su uso como biomateriales y en la síntesis de biomateriales compuestos para su potencial uso en biomedicina.

2.2.2 Cisteína

La *L*-Cisteína (*L*-Cis) es un aminoácido proteínogénico con un grupo tiol en su cadena lateral (Figura 2.4), lo que le confiere una gran reactividad. Por oxidación da lugar a un puente disulfuro, esencial para la estructura y función de las proteínas, tales como enzimas, inmunoglobulinas G e insulina. La Cis es una molécula precursora de numerosos metabolitos azufrados necesarios para el desarrollo de la vida (30).

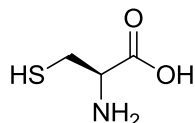


Figura 2.4 Estructura de la cisteína.

Es uno de los pocos aminoácidos que contienen azufre y un componente de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa, un potente tripéptido que destruye radicales libres y neutraliza los compuestos que dañan al hígado y se utiliza por el organismo para producir taurina. Es un aminoácido no esencial producido a partir del aminoácido metionina, su precursor, que debe aportarse en cantidad adecuada para evitar deficiencia de cisteína (31).

Destaca el papel protector de cisteína en cualquier tipo de trastorno hepático y su acción detoxificante en el hígado y las células. También es protector cardiovascular y mucolítico útil en bronquitis crónica, junto a la vitamina C, con un papel fundamental en los fumadores. Fortalece la capa protectora del estómago e

intestinos, que ayuda a prevenir el daño provocado por fármacos y es importante en el funcionamiento del sistema inmune y en la salud de pelo, uñas y piel. Dado que la Cis podría inactivar la hormona insulina, se recomienda evitar su suplementación en diabéticos, así como si existe una candidiasis activa por la fuerte reacción que puede provocar (31).

Algunas otras funciones que desempeña la Cis son: (32)

- Mejora las funciones inmunitarias.
- Favorece la eliminación de metales pesados.
- Previene la oxidación del colesterol malo LDL.
- Previene enfermedades como cataratas, cáncer y diabetes.
- Retrasa el proceso de envejecimiento.
- Optimiza la resistencia atlética.
- Reduce los daños al corazón y los daños causados al cerebro resultado de una embolia.
- Protege los glóbulos rojos de la sangre.

El déficit de Cis puede ocasionar mayor predisposición a alteraciones hepáticas, a intoxicaciones orgánicas, enfermedades degenerativas e infecciones (32).

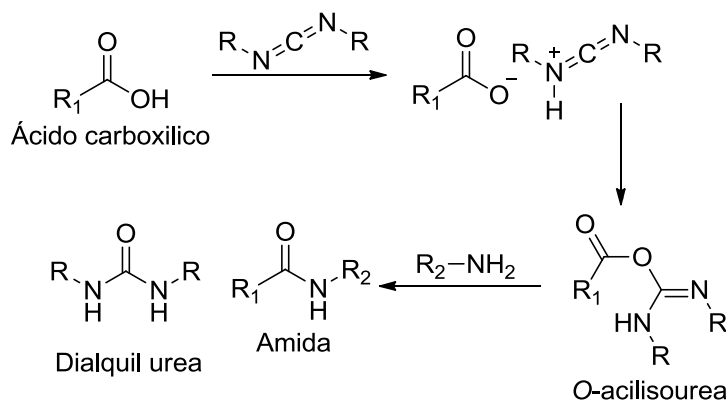
La Cis, principalmente el enantiómero *L*, es un precursor en la industria alimentaria, farmacéutica, y cosmética. Una de las aplicaciones más importantes es la producción de sabores. Por ejemplo, la reacción de Cis con los azúcares en una reacción de Maillard produce sabores similares al de la carne. La adición de *L*-Cis a biomateriales poliméricos mejora la hemo-compatibilidad del polietilentereftalato (PET) (32).

Gouveia y colaboradores reportaron un nuevo proceso biotecnológico en el que se emplea *L*-Cis la cual proporciona un efecto antimicrobiano permanente frente a *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, además de no ser tóxico y efectivo sobre materiales basados en lana. Los autores proponen que el mecanismo biocida está relacionado con el aumento de los grupos de sulfhidrilo en fibras de lana. Este nuevo proceso es fácil de realizar, no tóxico, preserva la calidad de la lana y es un novedoso enfoque biomimético que utiliza los aminoácidos antimicrobianos y puede abrir nuevas vías para el diseño de textiles biomédicos con una amplia gama de aplicaciones en la salud (33).

2.3 Carbodiimidas

Históricamente, una carbodiimida soluble en agua fue usada por primera vez para la modificación de grupos carboxílicos de proteínas en la síntesis de péptidos y en el entrecruzamiento de gelatina. Durante la aplicación de una carbodiimida ocurre la formación de un enlace amida debido a la reacción con los grupos funcionales del biomaterial. Este proceso de entrecruzamiento toma en cuenta la disponibilidad de los grupos aminos y carboxílicos libres de las proteínas que conforman el biomaterial; estos grupos son capaces de unirse a través de enlaces amida covalentes estables en presencia de un agente de acoplamiento de manera directa o mediante puentes formados con otros agentes con doble funcionalidad que contengan grupos aminos y/o carboxílicos. Cuando el agente de acoplamiento es usado en ausencia de agentes con doble funcionalidad, se promueve la formación de un enlace amida entre los grupos reactivos carboxílicos y aminos presentes en el biomaterial. Para esto es necesario que los grupos estén presentes en los aminoácidos, péptidos o proteínas en localizaciones lo suficientemente cercanas para la unión directa sin ningún agente adicional intermediario. Por otro lado, el agente con doble funcionalidad tiene la capacidad de enlazar grupos reactivos más distantes entre ellos (34).

El agente de acoplamiento puede ser una carbodiimida, el cual es un catalizador efectivo en la condensación de ácidos carboxílicos con alcoholes y aminas. Su función es activar los grupos carboxílicos libres para llevar a cabo la reacción de formación del enlace amida o éster. Esta activación se obtiene por medio de la adición de una diimida a un ácido carboxílico, lo que produce el éster de isourea, una *O*-acilisourea, la cual presenta una reactividad similar a un anhídrido o a un halogenuro de acilo; la posterior sustitución nucleofílica de la *O*-acilisourea por una amina produce una amida y la dialquil urea (Esquema 2.1). Además de la carbodiimida, es posible usar otros métodos de acoplamiento, probados en la formación de enlaces amida en la síntesis de polipéptidos. Estos incluyen ésteres activados, anhídridos simétricos y halogenuros de acilo (32).



Esquema 2.1 Formación del enlace peptídico mediante carbodiimidas.

La dicitlohexilcarbodiimida (DCC), diisopropilcarbodiimida (DIC) y 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) son carbodiimidas que se han utilizado ampliamente en síntesis peptídica en solución y en fase sólida (Figura 2.5). De ellas es de destacar la solubilidad de la EDC en agua, la cual permite separar de medio de reacción los restos de EDC sin reaccionar y los subproductos generados, como la urea correspondiente, siendo esto difícil cuando se utiliza DCC (24).

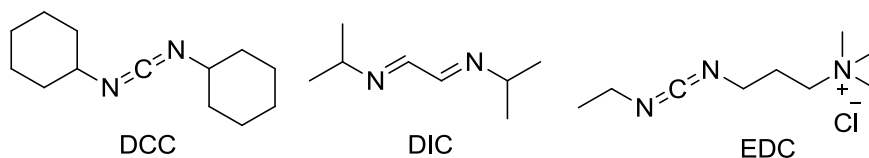


Figura 2.5 Estructura de algunas carbodiimidas.

2.4 Compuestos quitosano-peptídicos

Los péptidos no modificados presentan la desventaja de que circulan solo durante pocos minutos en la sangre, debido a su predisposición a la degradación enzimática, por ello presentan en general una biodisponibilidad reducida en los tejidos y órganos, lo que limita su utilidad como agentes terapéuticos. Debido a esto, se han generado estrategias para modificar los péptidos con el fin de mejorar el efecto terapéutico de los medicamentos basados en estos, alargando su vida media y distribución (aumento de permeabilidad en tejidos) en el organismo. Un ejemplo de ello es la síntesis de compuestos conjugados de CTS-péptido capaces de mediar la adhesión, fijación y difusión celular similarmente como las integrinas,

y debido a las propiedades de mucoadhesión del CTS, al ser incorporado a fármacos base peptídica es posible incrementar la estabilidad y tiempo de residencia del fármaco con lo cual se incrementa la biodisponibilidad del péptido en un sitio deseado (35).

Se han diseñado sistemas a base de CTS especialmente adaptados para la administración oral de péptidos. Estos sistemas incluyen soluciones, microesferas, nanopartículas, nanocápsulas y liposomas de los cuales se ha probado la eficacia y se han propuesto varios mecanismos para su análisis (34).

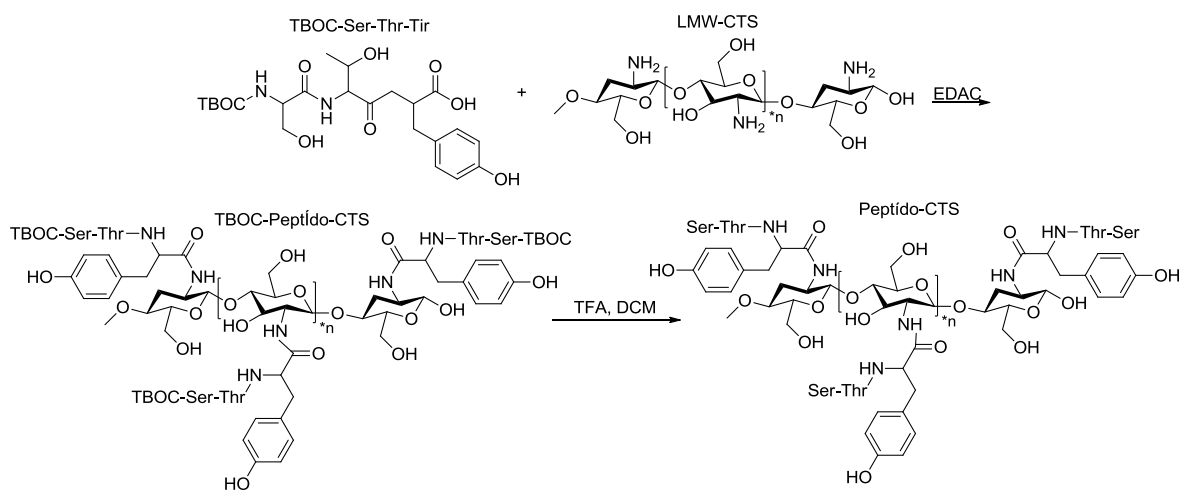
También se ha reportado la conjugación a escala nanométrica de CTS con el péptido TAT (GRKKRRQRRRPQ) derivado de un transactivador de transcripción de virus de inmunodeficiencia humana y es un péptido penetrador celular (CPPs por sus siglas en inglés). La conjugación se realiza vía enlace disulfuro, resultando en un complejo con baja citotoxicidad con potencial uso como vector para biomoléculas (36).

Se ha demostrado que una nanoformulación de CTS-péptido serina-treonina-tirosina (Ser-Thr-Tir), tiene el potencial para tratar la degeneración macular relacionada con la edad; un trastorno ocular que destruye lentamente la visión central y aguda, lo cual dificulta la lectura y la visualización de detalles finos. Se demostró que esta molécula es un excelente liberador de fármacos para la retina y tiene el potencial de tratar esta enfermedad. El CTS, conjugado con el péptido, puede comportarse como una matriz mimética extracelular, haciendo de ella un magnifico andamio para la adhesión de la célula a una transmembrana glicosilada de receptores. La propiedad antiangiogénica permite actuar como un conductor de células retínales y no de recluir estructuras neovasculares. Varias preparaciones de CTS péptido han demostrado la adhesión en varios sitios. Además la ventaja del tamaño nanométrico de la molécula compuesta lo hace un prometedor portador de humedad ocular de mitocondria antioxidante que puede alcanzar un objetivo dentro de la célula para una acción farmacológica. Este puede aliviar el estrés mitocondrial, retardar el proceso degenerativo, y normalizar la fagocitosis. Adicionalmente se mostró evidencia de actividad tirosina quinasa de la nanoformulación CTS-péptido, mientras que el nanoquitosano y el péptido de forma individual no mostraron tal actividad, lo cual confirmó la eficacia de la formulación quitosano-péptido en el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (8).

Por otro lado, al incorporar *L-Cis*, un agente antimicrobiano, a CTS y alginato de sodio, los resultados muestran un aumento del efecto antibacteriano del CTS hacia *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* debido a la presencia de la *L-Cis* (9).

2.5 Síntesis de compuestos quitosano-peptídicos

En la síntesis de compuestos CTS-peptídicos, se ha empleado el péptido Ser-Thr-Tir protegiendo los grupos amino en la Ser con TBOC previo a su conjugación con el CTS (Esquema 2.2). En esta síntesis, al CTS disuelto en agua desionizada se le adicionó el TBOC Ser-Thr-Tir y EDAC disueltos en DMSO manteniendo agitación magnética constante. Posteriormente se removieron las impurezas y el material sin reaccionar con diálisis continua, esta mezcla dializada fue liofilizada para finalmente obtener un polvo constituido por TBOC- Ser-Thr-Tir-CTS. Finalmente el TBOC fue eliminado con una mezcla de ácido trifluoroacético (TFA):diclorometano (DCM)(1:3) y el material final conjugado fue secado en un horno al vacío. Es de destacar que en esta síntesis se ha demostrado la presencia de un enlace formal como resultado de la conjugación ver Esquema 2.2, (8).



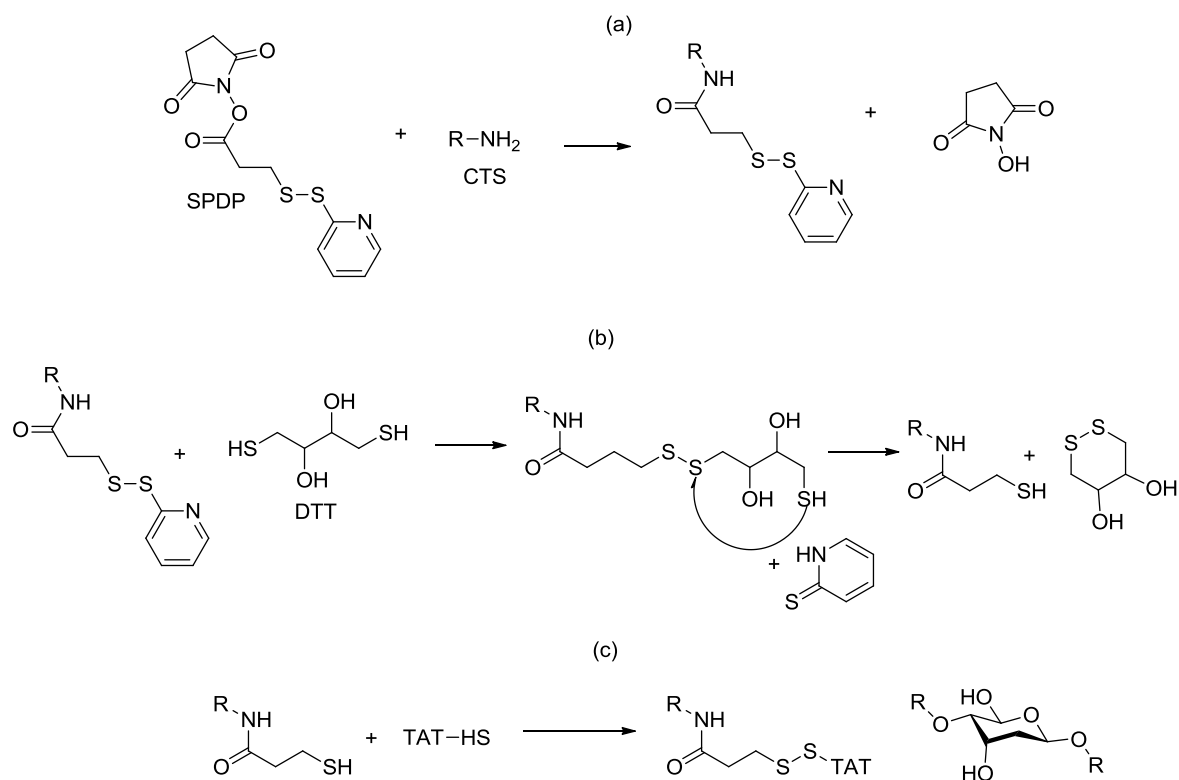
*n=8

Esquema 2.2 Síntesis del compuesto Ser-Thr-Tir-CTS.

El montaje de nanocomplejos a partir de péptidos bioactivos, caseinafosfopéptidos (CPPs por sus siglas en inglés) y CTS ha sido estudiado por Hu y colaboradores. Estos autores proponen que están involucrados tres procesos en la formación del nanocomplejo bioactivo: Primero, el CPPs cargado negativamente absorbe las cadenas del CTS cargado positivamente para formar complejos intrapoliméricos saturados con CPPs (CPPNPs). Subsecuentemente, los CPPNPs cargados negativamente son puenteados por la adición del CTS

cargado positivamente, resultando en la formación de complejos biopoliméricos asociativos prácticamente neutros. Finalmente, la adición en exceso de CTS rompe los puentes asociativos complejos y causa la formación de nanocomplejos positivos esféricos aislados. De acuerdo a estos autores, el enlace entre los péptidos y el CTS se debe principalmente a interacciones electrostáticas (37).

La conjugación de nanopartículas de CTS (producidas por el método de gelificación iónica) con el péptido-TAT se realizó a través del enlace disulfuro por medio de la activación de la superficie del CTS produciendo un grupo CTS-2-piridilditio-terminal como se muestra en el Esquema 2.3a, Posteriormente se realizó la reducción de éste grupo terminal (Esquema 2.3b), para finalmente llevar a cabo la síntesis del CTS-Péptido-TAT resultando en un enlace formal ver Esquema 2.3c, (36).



Esquema 2.3 Síntesis del CTS-Péptido-TAT.

Algunos péptidos de bajo peso molecular, han demostrado actividad biológica importante como antimicrobianos y anticancerígenos y la síntesis de péptidos con potencial actividad terapéutica con 2 y 4 residuos de aminoácidos

acoplados a polímeros naturales los hace buenos candidatos en la producción a gran escala.

2.6 Obtención de CTS soluble en agua a través del proceso de Electrospinning.

Para la reacción de conjugación de aminoácidos con el CTS es necesario que el este último sea soluble en agua, sin embargo, el CTS solo es soluble en medio acuoso ácido. De esta forma, fue necesario idear una estrategia para la obtención del CTS soluble en agua.

Con la experiencia del grupo de trabajo del laboratorio de Biopolímeros y Materiales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas se sabe que una ruta viable para la generación de CTS soluble en agua es a través de la generación de nanofibras por el proceso denominado Electrospinning (electrohilado).

El electrohilado del CTS a través de la técnica de Electrospinning ha mostrado ser difícil, por lo que se ha mezclado con otros polímeros tales como polióxido de etileno (38), seda fibroína (39) y polivinil alcohol (40), sin embargo, la fabricación exitosa de nanofibras de CTS puro se ha logrado con soluciones del biopolímero en TFA o un sistema de co-disolvente (70:30) TFA y DCM (41). Como resultado del proceso de Electrospinning de CTS en soluciones de TFA/DCM (70:30), se obtienen nanofibras solubles en agua, la solubilidad de las nanofibras es producto de la interacción entre los grupos amino del CTS y el TFA dado la formación de una sal ($-\text{NH}_3^+\text{CF}_3\text{COO}^-$) como se muestra en la figura 2.6 (42).

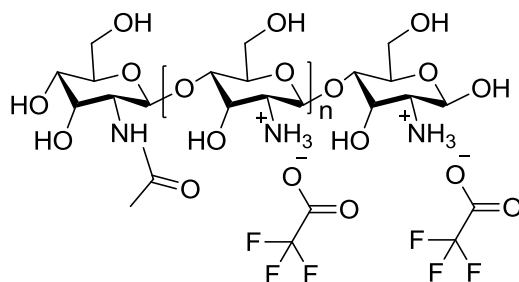


Figura 2.6 Formación de trifluoroacetato de CTS.

El Electrospinning tiene como principio la aplicación de un campo electrostático entre dos polos opuestos, conformados por una aguja o sistema de inyección y una placa metálica o colector donde se depositan las fibras de tamaño nanométrico formando un tejido con textura, color y densidad características, las anteriores variantes dependen fuertemente de las condiciones ambientales, humedad y temperatura (Figura 2.7) (43).

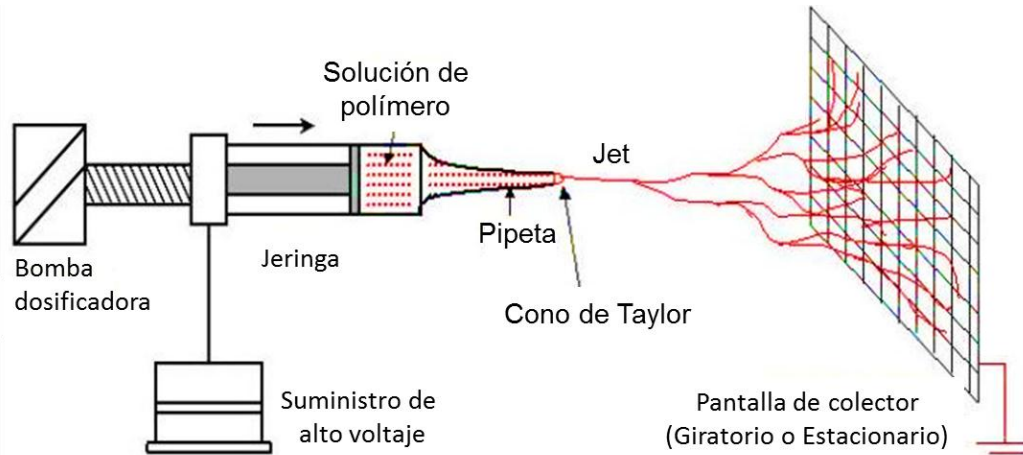


Figura 2.7 Esquema de funcionamiento del Electrospinning.

A escala de laboratorio, un montaje típico de Electrospinning requiere de una fuente de poder de alto voltaje (~30 kV) que proporciona la carga eléctrica (polo positivo) a una solución de un polímero contenida en una jeringa con aguja metálica conectada a la fuente de poder. En el otro extremo, se localiza un colector metálico (polo negativo) conectado a tierra (aluminio, cobre, etcétera), lugar en donde se depositan las nanofibras. El Electrospinning se inicia cuando se aplica voltaje en la punta de la aguja donde se forma una gota en forma de cono (Cono de Taylor) de solución de polímero como consecuencia de su polarización electrostática. Cuando la fuerza del campo eléctrico es mayor que la tensión superficial, la solución de polímero es expulsada hacia el colector en forma de un hilo. En el trayecto hacia el colector, el solvente se evapora para dar lugar a la formación de una nanofibra que se deposita en el colector, formándose una membrana no tejida (43).

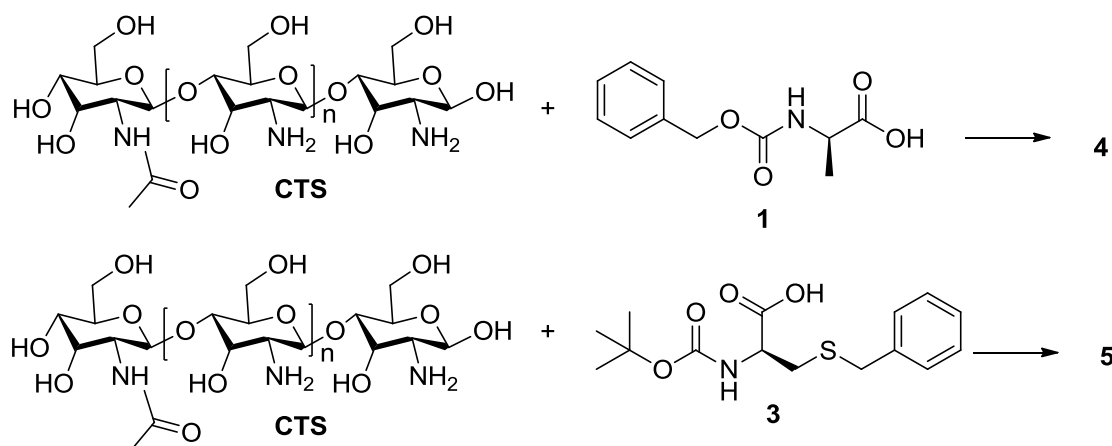
Finalmente y derivado de toda la información anterior, se observa que la combinación CTS-péptido resulta altamente atractiva dadas las características individuales de ambos compuestos; el CTS es biocompatible, biodegradable y no tóxico mientras que los péptidos, específicamente, aquellos que contienen *L-Ala* y *L-Cis* son atractivos para su aplicación en el área biomédica.

Después de una exhaustiva búsqueda en la bibliografía se encontró que la información sobre la integración de compuestos tan versátiles como los péptidos con CTS es muy escasa, por lo que esta investigación ofrece información relevante sobre la síntesis y caracterización biomateriales compuestos con potenciales aplicaciones en biomedicina.

Por esta razón, el presente trabajo de investigación propone el análisis en menor escala de las posibles interacciones químicas que se pueden llevar a cabo en la síntesis de biomateriales CTS-aminoácido incorporando *L-Ala* y *L-Cis* a CTS, lo cual revela información acerca de las interacciones químicas a menor escala. Para la posterior generación de CTS-péptidos, incorporando péptidos de bajo peso molecular.

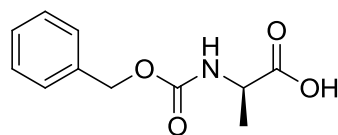
3.- OBJETIVO GENERAL

Síntesis y caracterización de compuestos basados en los aminoácidos *N*-Cbz-*L*-Ala **1**, *N*-Boc-*L*-Cis(SBn) **3**, acoplados a CTS, para la generación de **4** y **5** respectivamente obteniendo compuestos CTS-aminoácidos con potencial farmacológico, para el análisis de las interacciones químicas en la formación de moléculas precursoras de compuestos CTS-peptídicos.



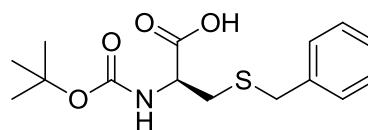
3.1 Objetivos específicos

- a) Preparación de los aminoácidos protegidos **1**, **3** y caracterización por medio de técnicas espectroscópicas (RMN, IR).



1

N-Cbz-*L*-Ala



3

N-Boc-*L*-Cis(SBn)

- b) Acoplamiento de los aminoácidos a una matriz de CTS.
- c) Formación y caracterización de películas de los compuestos **4** y **5**, para el análisis de las posibles interacciones químicas entre los aminoácidos y el CTS por medio de espectroscopía de infrarrojo y resonancia magnética nuclear.

4.- PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Aspectos Generales

El monitoreo de las reacciones se realizó por cromatografía en capa fina (TLC) a partir de cromatofolios de la marca Merk, usando como reveladores luz UV, y vapores de yodo.

Todos los reactivos y aminoácidos utilizados son de la marca Sigma-Aldrich. Los solventes fueron destilados antes de su uso. Las purificaciones realizadas por cromatografía en columna utilizaron como fase estacionaria sílice de 230-400 mesh de la marca Aldrich.

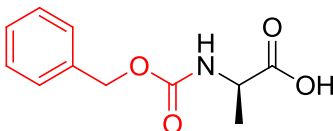
Las nanofibras se generaron en la unidad de Electrospining de NaBond Technologies Co, China.

Los espectros de RMN de ^1H se obtuvieron con un equipo Varian Mercury Plus de 400 MHz y 200 Mhz utilizándose como disolventes CDCl_3 y CD_3OD .

Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrofotómetro ThermoScientific modelo Nicolet iS10 empleando la técnica ATR. Los datos se expresan en números de onda ($\nu \text{ cm}^{-1}$) para los máximos de absorción.

Los puntos de fusión se determinaron por el método Fisher en un equipo marca Fisher-Johns modelo 4121 y no están corregidos.

4.2 *N*-Cbz-*L*-alanina

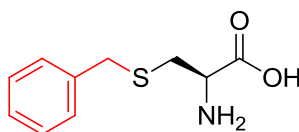


En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética y baño de hielo, se colocaron 0.2 g (5.62 mmol) de *L*-Ala en 20 mL de NaOH 1N. Una vez fría la solución, se adicionaron 0.35 mL (6.29 mmol) de clorofornato de bencilo (CbzCl) y se dejó reaccionar durante 12 horas a temperatura ambiente y un pH de 10. Transcurrido el tiempo de reacción, se hicieron lavados con DCM (1x50 mL), la fase acuosa se acidificó con HCl 10% hasta un pH de 3 y el producto se extrajo

con AcOEt (2x50 mL). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en el rotavapor. El producto se purificó por el método de cromatografía en columna empleando gel de sílice como fase estacionaria móvil Hexano/AcOEt (1:1). Como resultado se obtuvieron 0.390 g (79% de rendimiento) de un sólido blanco con un punto de fusión de 72-74°C.

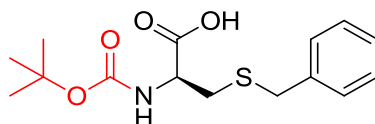
¹H RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 7.42 – 7.19 (m, 5H, H's Aromáticos), 5.39 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, NH), 5.07 (s, 2H, CH₂), 4.40 (t, *J*=7.12Hz, 1H, CH), 1.45 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃).

4.3 S-Bencilación de la L-cisteína [L-Cis(SBn)]



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética y baño de hielo se disolvieron 0.4 g (3.301 mmol) de L-Cis en 10 mL de una solución de MeOH:H₂O (1:1). Posteriormente se adicionaron 2.87 mL de trietilamina (TEA) y 0.47 mL de bromuro de bencilo (BnBr). La mezcla se dejó reaccionar durante 3 h a temperatura ambiente. Posteriormente, el sólido formado se filtró y lavó con hexano, obteniendo 0.660 g de un polvo blanco con un rendimiento del 95%, con un punto de descomposición de 218-220°C.

4.3.1 N-Boc-L-cisteína(S-Bn)



En un matraz de fondo redondo provisto de agitación magnética a temperatura ambiente, se colocaron 0.25 g (1.183 mmol) de L-Cis(SBn) disuelta en 7.5 mL de MeOH. Enseguida se adicionaron 0.25 mL de trietilamina (TEA) dejando reaccionar la mezcla por 30 minutos. En un segundo matraz de fondo redondo

provisto de agitación magnética se disolvieron 0.309 g de diterbutil dicarbonato (Boc_2O) en 7.5 mL de metanol, una vez disuelto, la solución se adicionó lentamente al primer matraz y se dejó reaccionar durante 48 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla de reacción se llevó a sequedad y el producto se acidificó hasta un pH de 3 con una solución de HCl al 10%, el producto se extrajo con AcOEt (3x100 mL). La fase orgánica se colectó y se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna obteniéndose 0.331 g (90% de rendimiento), de un aceite blanco.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 7.37 – 7.20 (m, 5H, H's Aromáticos), 6.07 (s, 1H, OH), 5.36 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NH), 4.66-4.31 (m, 1H, CH), 3.74 (s, CH_3), 2.95 – 2.81 (m, 2H), 1.45 (s, 9H, *t*-Bu).

4.4 Preparación de la solución CTS 8% w/v TFA/DCM

Debido a que la reacción de conjugación de aminoácidos con el CTS requiere que este último sea soluble en agua, fue necesario idear una estrategia para realizar dicha reacción ya que el CTS no es soluble en agua (comúnmente es soluble en medio ácido acuoso).

Para obtener una sal de CTS soluble en medio acuoso fue necesario implementar de la técnica de electrohilado de tal manera que los grupos trifluoroacetatos interaccionan de forma iónica con los grupos amino libres del CTS (Figura 4.1), generando así fibras de escala nanométrica las cuales son solubles en agua.

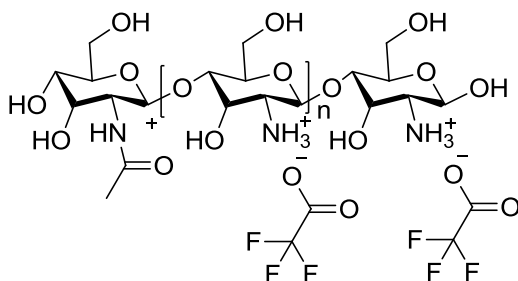


Figura 4.1 Interacción entre el CTS y los grupos trifluoroacetatos.

Para el electrohilado de las soluciones CTS/TFA-DCM se prepararon disoluciones tal y como se describe a continuación: en un frasco provisto con cierre hermético y agitación magnética se colocaron 9 g de CTS, por separado en una probeta se agregaron 75 mL de TFA y 25 mL de DCM, los cuales se

adicionaron al CTS contenido en el frasco, la mezcla resultante se mantuvo en agitación por 12 h para la disolución total del CTS.

4.4.1 Obtención de nanofibras de CTS

Teniendo la solución polimérica preparada, ésta fue inyectada en la unidad de Electrospining de Na Bond Technologies Co. China para la formación de nanofibras con la implícita evaporación del solvente. Las condiciones óptimas del proceso para la obtención de nanofibras fueron: temperatura 40°C, velocidad de inyección 0.03 mL/min, distancia entre electrodos 20 cm, voltaje de 17-22 kV y colector vertical.

4.4.2 Obtención de películas de aminoácidos/CTS

En un matraz provisto de agitación magnética y en baño de hielo se adicionaron 0.15 g de las nanofibras de CTS obtenidas, las cuales se disolvieron en 10 mL de agua destilada.

En un segundo matraz provisto de agitación magnética se disolvieron 0.15 g del a.a. en 1 mL de DMSO, posteriormente se adicionó 1 equivalente de diisopropiletilamina (DIEA), enseguida se agregaron 0.15 g (0.782 mmol) de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Enseguida se adicionó lentamente esta mezcla al primer matraz conteniendo la solución de las nanofibras en medio acuoso y se dejó reaccionar durante un lapso de 3 h. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el disolvente y se realizaron lavados con MeOH.

4.4.2.1 Síntesis de películas *N*-Cbz-*L*-Ala/CTS

En un matraz limpio provisto de agitación magnética y en baño de hielo se agregaron 0.15 g de las nanofibras de CTS, las cuales se disolvieron en 10 mL de agua destilada (matraz 1). En el segundo matraz se colocaron 0.15 g de *N*-Cbz-*L*-Ala (0.675 mmol) disuelta en 1 mL de DMSO y tratada con 0.12 mL de DIEA y 0.15 g de EDC (0.782 mmol). La mezcla final se dejó reaccionar durante 3 h. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el disolvente y se realizaron lavados con MeOH.

4.4.2.2 Síntesis de películas *N*-Boc-*L*-Cis(SBn)/CTS

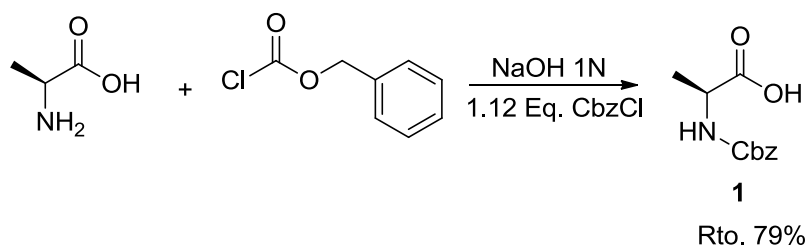
En un matraz limpio provisto de agitación magnética y en baño de hielo se agregaron 0.15 g de las nanofibras de CTS, las cuales se disolvieron en 10 mL de agua destilada (matraz 1). En el segundo matraz se colocaron 0.15 g de *N*-Boc-*L*-Cis(SBn) (0.482 mmol) disuelta en 1 mL de DMSO y tratada con 0.08 mL de DIEA y 0.15 g de EDC (0.782 mmol), dejando esta mezcla de reacción en agitación hasta una total disolución (matraz 2). La mezcla final se dejó reaccionar durante 3 h. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el disolvente y se realizaron lavados con MeOH.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Preparación de los aminoácidos protegidos

De acuerdo con los objetivos planteados, la primera parte del proyecto consistió en la protección de los aminoácidos seleccionados, así como el planteamiento de la estrategia sintética a seguir. Los aminoácidos empleados fueron Ala y Cis de configuración *L*, de igual forma que los encontrados en la naturaleza.

Primeramente se procedió a la protección de los grupos funcionales que no participan en la formación del enlace amida; entre las características que debe tener un grupo protector se encuentran, el de ser químicamente estable en las condiciones en las que se da la síntesis, y ser fácilmente removible en condiciones suaves que no alteren la formación del enlace peptídico al final o en fases intermediarias de la síntesis. Para esto se llevó a cabo la *N*-protección de la *L*-Ala utilizando CbzCl en medio alcalino (Esquema 5.1), para obtener el carbamato **1**. El compuesto obtenido se purificó por cromatografía en columna usando como fase sólida gel de sílice, en un sistema eluyente Hexano-AcOEt (1:1). Después de purificado se obtuvo un sólido amorfo de color blanco, soluble en AcOEt con un rendimiento del 79% y un punto de fusión de 72-74°C.



Esquema 5.1 *N*-Protección de la *L*-Ala **1**.

El espectro de RMN de H¹ del aminoácido *L*-Ala protegido **1** (Figura 5.1), muestra en 7.42-7.19 ppm una señal múltiple que integra para 5 hidrógenos característica de los grupos aromáticos, por la presencia del grupo protector Cbz, en 5.39 ppm una señal doble que integra para un hidrógeno del NH amídico (1), una señal simple en 5.07 ppm que integra para 2 hidrógenos correspondientes al metileno del grupo protector Cbz, así como en 4.40 ppm una señal triple la cual integra para un hidrógeno por la presencia del metino (3) de la Ala, en 1.45 ppm

una señal doble por la presencia del metilo (4), la cual integra para tres hidrógenos de la Ala.

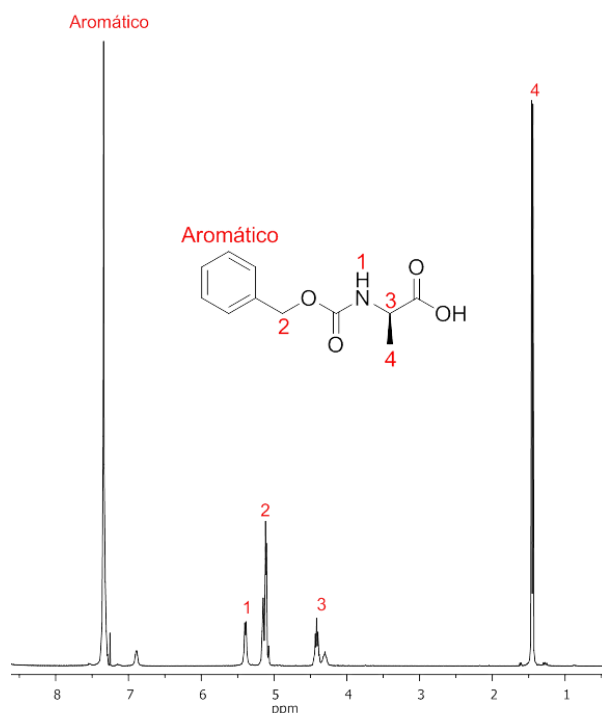
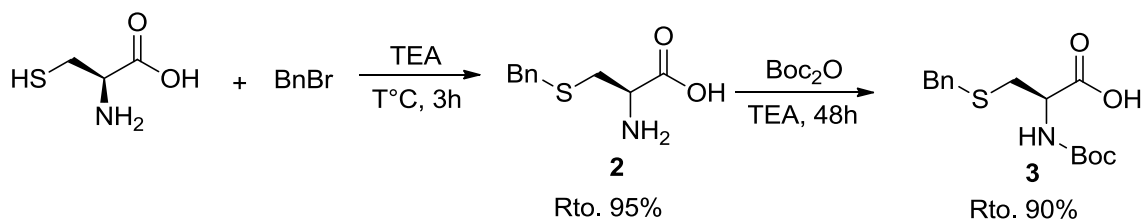


Figura 5.1 Espectro RMN ¹H (400 MHz), *N*-Cbz-*L*-Ala en CDCl₃.

El grupo tiol de la cisteína es de gran importancia, sobre todo si el péptido sintetizado contempla la formación de un puente disulfuro. La protección de este debe llevarse a cabo toda vez que este grupo puede interferir en pasos subsecuentes a la síntesis química. Existen muchos grupos protectores para este aminoácido; para esta reacción se usó BnBr, TEA como base y como disolventes una mezcla MeOH:H₂O, a temperatura ambiente durante 3 h. Obteniendo el compuesto **2** en un rendimiento del 95% (Esquema 5.2).

Una vez formado el tioéter **2** se procedió a la formación del carbamato **3**, para esto se hizo reaccionar la *L*-Cis(SBn), BOC₂O como base y TEA en MeOH como disolvente, a temperatura ambiente por 48 h obteniéndose como producto **3** una miel de color blanco, con un rendimiento del 90% (Esquema 5.2).



Esquema 5.2 obtención de *L*-Cis(SBn) **2** y *N*-Boc-*L*-Cis(SBn) **3**.

La asignación de las señales para el espectro de ^1H de *N*-Boc-*L*-Cis(SBn) se muestra en la Figuras 5.2. Entre 7.37-7.20 ppm una señal múltiple que integra para 5 hidrógenos, característica de los grupos aromáticos, por la presencia del grupo protector bencilo, alrededor de 6.07 ppm una señal simple ancha que integra para un hidrógeno del grupo OH de carboxilo de la Cis, una señal en 5.36 ppm señal doble que integra para 1 hidrógeno asignado al grupo NH amídico (c), en 4.66-4.31 ppm una señal múltiple para el metino (3) la cual integra para 1 hidrógeno, en 3.74 ppm una señal simple para el metileno (4) que integra para 2 hidrógenos, entre 2.95-2.81 ppm una señal múltiple que integra para 2 hidrógenos correspondiente al metileno (5), en 1.45 ppm una señal simple que integra para 9 hidrógenos, por la presencia de los metilos equivalentes del grupo protector Boc (*t*Bu).

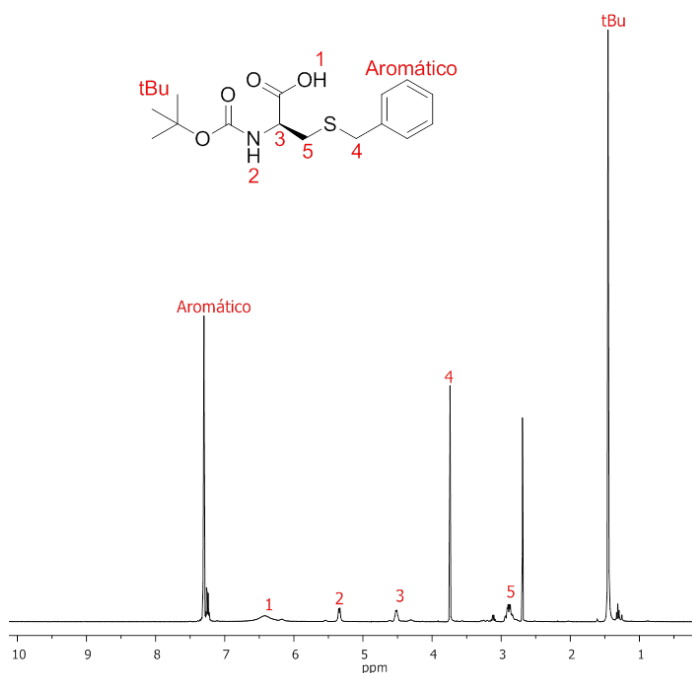


Figura 5.2 Espectro RMN ^1H (400 MHz), *N*-Boc-*L*-Cis(SBn) en CDCl_3 .

5.2 Preparación de nanofibras de CTS TFA/DCM

Dadas las dificultades de disolución del CTS en su forma de hojuelas en solventes orgánicos y agua para la obtención de los compuestos aminoácidos-CTS, se llevó a cabo la preparación de nanofibras del CTS ya que derivado del procesamiento de Electrospinning, las nanofibras resultantes son solubles en agua.

Tras la obtención de la solución CTS en TFA/DCM (70:30), esta fue procesada en el equipo Electrospinning para la síntesis de las nanofibras del polímero, las condiciones a las cuales fue sometida la solución para su posterior generación de nanofibras fueron: temperatura 40°C, velocidad de inyección 0.003 mL/h, distancia entre electrodos 20 cm, voltaje: 20 kV en un colector vertical. Es importante mencionar que la determinación de las condiciones de Electrohilado no es trivial ya que para cada sistema polímero-disolvente es necesario encontrar la combinación adecuada de los mismo para la generación de nanofibras de buena calidad, y en este caso, los valores antes mencionados para la generación de nanofibras de CTS a partir de disoluciones de CTS en la mezcla TFA/DCM (70:30) han sido resultado de varios meses de investigación en el equipo de trabajo del laboratorio de Biopolímeros y Materiales del IIQB.

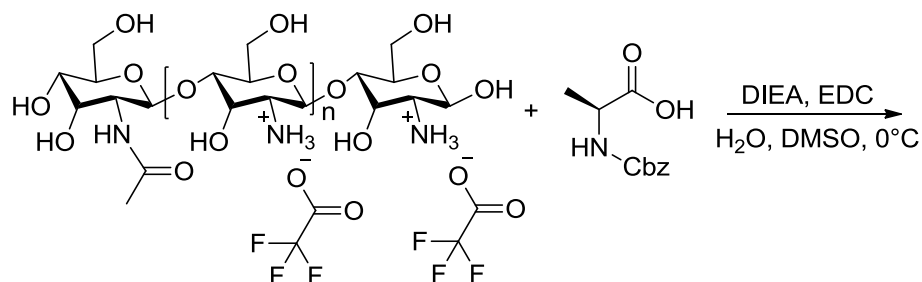
Con la evaporación del solvente derivado del proceso de Electrospinning, las nanofibras obtenidas son solubles en H₂O, MeOH y DMSO. Esta solubilidad se debe a la interacción iónica de los grupos amino protonados del CTS con el trifluoroacetato del TFA (ver Esquema 5.3). Las nanofibras obtenidas se muestran en la Figura 5.3.



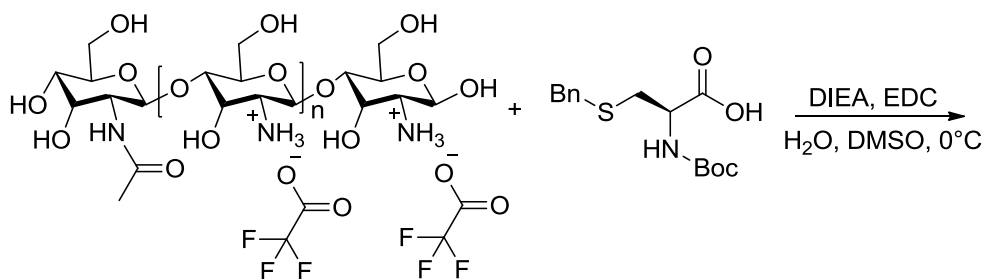
Figura 5.3 Nanofibras de CTS.

5.3 Acoplamiento de los aminoácidos, a las nanofibras de CTS.

Una vez obtenidas las nanofibras del CTS y teniendo protegidos los aminoácidos (*N*-Cbz-*L*-Ala y *N*-Boc-*L*-Cis(SBn)). Se utilizó EDC, como agente acoplante una mezcla de solventes H₂O/DMSO, y como medio neutralizante de las nanofibras se utilizó DIEA, la cual mediante una reacción ácido-base, forma una sal con el TFA libre en el medio de reacción, formando así el trifluoroacetato de diisopropiletilamina. La mezcla se dejó reaccionar durante 3 h a 0°C. Lo anterior se muestra esquemáticamente en los Esquemas 5.3 y 5.4.



Esquema 5.3 Reacción general para la síntesis de *N*-Cbz-*L*-Ala acoplado a CTS.



Esquema 5.4 Reacción general para la síntesis de *N*-Boc-*L*-Cis(SBn) acoplado a CTS.

Al término del tiempo de reacción, a ambos productos se les realizó cromatografía en capa fina, para comprobar si se había suscitado un cambio en el producto, los resultados se muestran en la Figura 5.4.

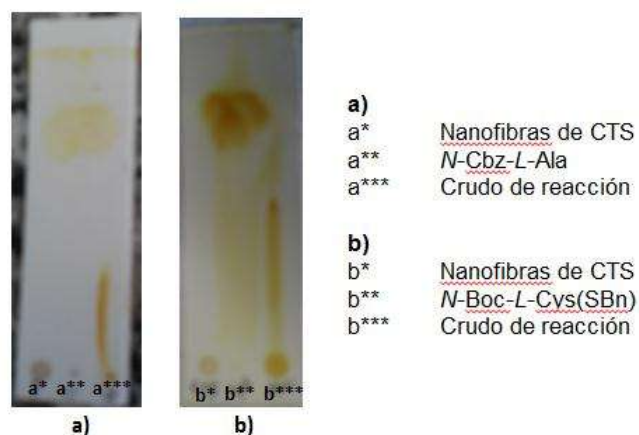


Figura 5.4 Cromatografías en capa fina, MeOH:H₂O (1:1).

Se puede observar un cambio significativo en la cromatografía en capa fina para **a)** la mancha correspondiente a las nanofibras de CTS (a*) no registro desplazamiento quedándose en el punto de aplicación, la siguiente mancha corresponde al aminoácido *N-Cbz-L-Ala* (a**) se desplazó a través de la placa cromatográfica con un R_f de 0.75, mientras que el crudo de la reacción (a***) muestra un patrón de desplazamiento con un R_f de 0.25, lo cual es indicativo de que el producto de la reacción se vio favorecida presentando un cambio significativo. Para el caso de **b)** este se comportó de forma similar al anterior descrito.

El crudo de reacción se observó como una miel de color beige para la *N-Cbz-L-ala* acoplada a CTS **4**, mientras que para la *N-Boc-L-Cis(SBn)* acoplada a CTS **5** fue una miel de color amarillo. A ambos productos se les realizaron lavados con MeOH para eliminar residuos de las ureas remanentes. Finalmente, el producto final para **4** son películas de color ámbar las cuales tienen carácter quebradizo (Figura 5.5) y para **5** se obtuvieron películas transparentes de color amarillo y aspecto quebradizo (Figura 5.6).



Figura 5.5 Películas de *N*-Cbz-*L*-Ala acoplada a CTS 4.



Figura 5.6 Películas de *N*-Boc-Cis(SBn) acoplada a CTS 5.

5.4 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía de infrarrojo se basa en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibración específicas derivadas de los grupos funcionales presentes en su estructura, siendo útil para el análisis de las posibles interacciones químicas presentes entre el CTS y los aminoácidos ensayados.

5.4.1 Caracterización de nanofibras del CTS

La Figura 5.7 muestra la comparación del espectro de FT-IR del CTS puro y el CTS en forma de nanofibras; en ambos espectros se observa una banda muy ancha entre 3000 y 3600 cm^{-1} la cual es resultado de una transposición de vibraciones de los grupos OH y NH_2 del CTS, manifestándose como una sola banda muy ancha debido a la formación de puentes hidrógeno inter e intra moleculares en las cadenas del polímero. Sin embargo es posible observar evidencia de cada una de las vibraciones en 3364 cm^{-1} y 3295 cm^{-1} para los grupos OH y NH_2 respectivamente. Comparando ambos espectros, se observa que la banda en 3364 cm^{-1} del CTS en forma de nanofibras presenta cambios tanto en posición como en intensidad respecto del CTS puro, estos cambios se asocian a la disminución de los puentes de hidrógeno de estos grupos funcionales del CTS como resultado de la formación de la sal al interaccionar el TFA con los grupos amino del CTS. Adicionalmente se observa una clara disminución de la banda en 3295 cm^{-1} (Figura 5.7) la cual es prácticamente imperceptible en el CTS en forma de nanofibras. Otra evidencia de la interacción de los grupos amino del CTS con los grupos trifluoroacetato se observa en el desplazamiento y cambio de intensidad de las bandas en 1645 cm^{-1} y 1576 cm^{-1} las cuales están asociadas a los grupos amido I y vibraciones de torsión del grupos NH_2 del CTS respectivamente. Lo anterior es un indicativo de la formación de interacciones iónicas entre las aminas libres del CTS con los grupos trifluoroacetatos del TFA, resultado de la interacción entre ambos compuestos formando una sal soluble en medio acuoso, lo cual fue confirmado con las pruebas de solubilidad realizadas. Las estructuras correspondientes para cada caso se muestran en la Figura 5.8.

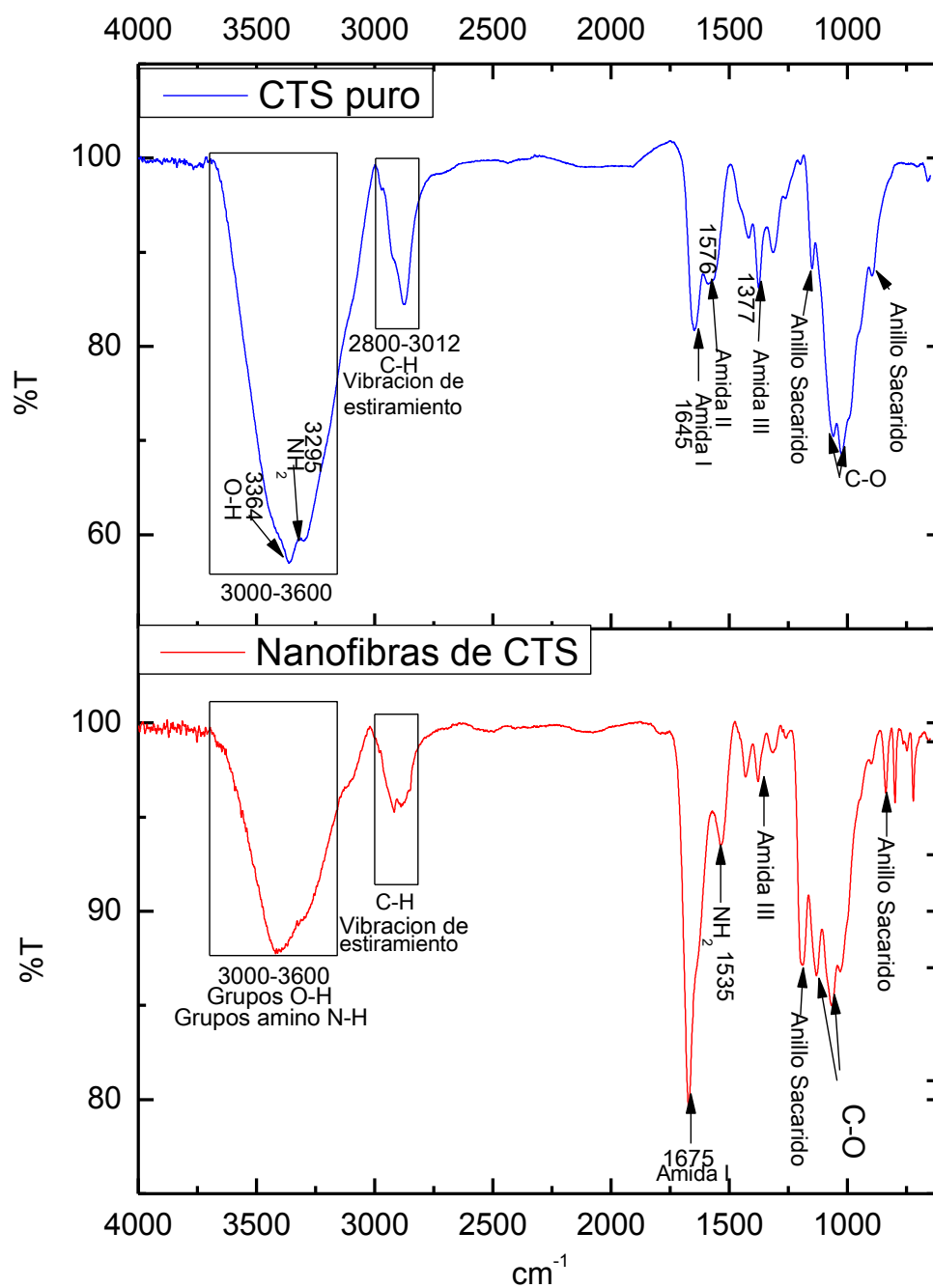


Figura 5.7 Comparación de los espectros de FT-IR de nanofibras de CTS y CTS puro.

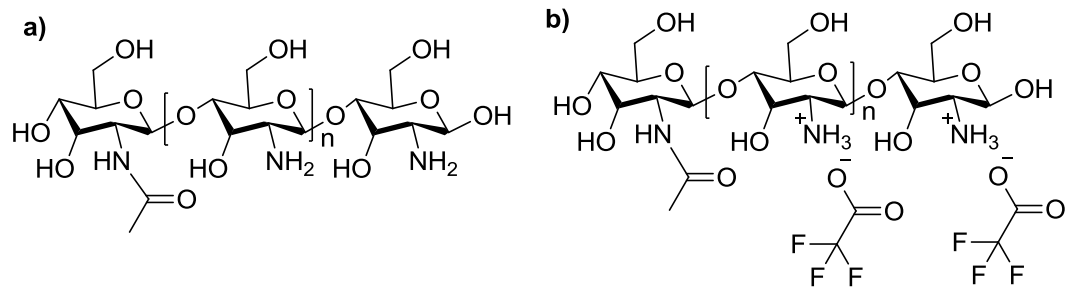


Figura 5.8 a) Estructura del CTS puro, b) Estructura del CTS en forma de nanofibras.

5.4.2 Caracterización de las películas CTS/Aminoácidos por medio de FT-IR.

La superposición de los espectros FT-IR correspondientes al CTS puro y el producto generado por la reacción del CTS y el *N*-Cbz-*L*-Ala (compuesto **4**) se muestra en la Figura 5.9. Ambos espectros exhiben picos característicos de la estructura del CTS; las vibraciones producidas por los grupos OH y NH₂ del CTS puro en 3362 cm⁻¹ y 3294 cm⁻¹ respectivamente, los cuales son picos muy anchos debido a la formación de enlaces por puentes de hidrógeno intramoleculares. En el producto de reacción estas vibraciones se desplazan a 3365 cm⁻¹ y 3274 cm⁻¹ presentando además una disminución en su intensidad y ancho de la banda, lo que se atribuye a una disminución en los enlaces por puentes de hidrógeno debido a una clara interacción química entre el CTS y el *N*-Cbz-*L*-Ala. Esto además indica una disminución de la cantidad de grupos NH₂.

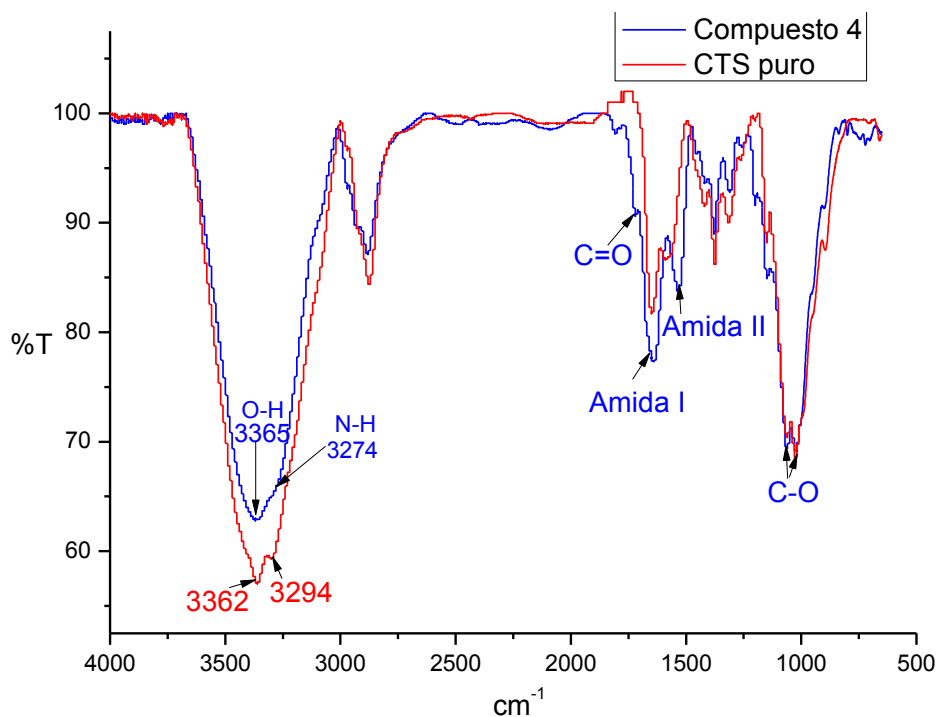


Figura 5.9 Espectro de FT-IR del compuesto **4** vs CTS puro.

Un indicio más claro del tipo de interacción química que puede estarse presentando entre estos dos compuestos se encuentra en la región comprendida entre 1775 cm^{-1} y 500 cm^{-1} la cual ha sido magnificada en la Figura 5.10. Se distinguen 3 bandas principales del compuesto **4**, en 1720 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} y 1530 cm^{-1} . La aparición de la banda en 1720 cm^{-1} respecto del CTS puro corresponde al estiramiento de los grupos C=O de esteres, presentes en el carbamato **1**, mientras que las vibraciones en 1640 cm^{-1} y 1530 cm^{-1} son originadas por los grupos Amida I y NH₂. Ambas vibraciones presentan un claro desplazamiento y un cambio en su intensidad respecto del espectro del CTS puro; el grupo Amida I registra un aumento en intensidad, mientras que el grupo NH₂ una disminución, lo que indica que el acoplamiento del CTS y el *N*-Cbz-*L*-Ala es a través de la formación de enlaces amida con los grupos NH₂ del CTS.

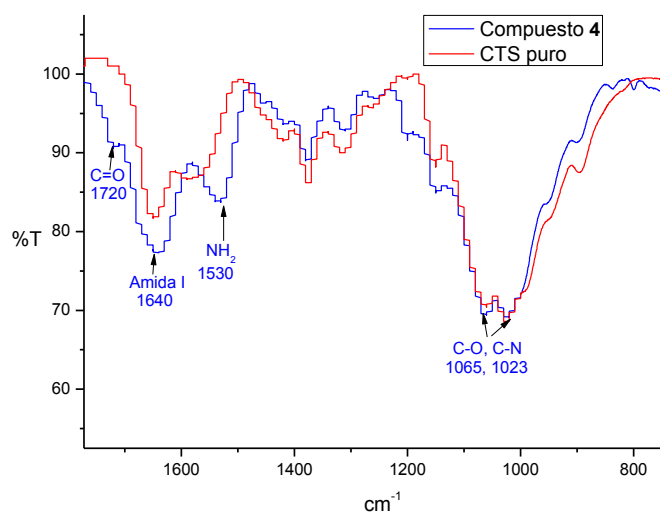


Figura 5.10 Espectro de FT-IR en la región 1775 cm^{-1} a 500 cm^{-1} del compuesto **4** vs CTS puro.

De esta forma, el análisis de FT-IR del compuesto **4** indica que la interacción entre el CTS con el compuesto **1** se lleva a cabo a través de los grupos NH_2 del CTS originando un aumento en la cantidad de grupos amida, lo que ocasiona cambios significativos en las bandas correspondientes a este grupo tal y como se demostró anteriormente. El producto de reacción también evidencia una menor interacción a través de enlaces por puentes de hidrógeno respecto del CTS en forma de hojuelas. Con base en el anterior análisis, la estructura propuesta para el producto de reacción entre el CTS y el compuesto **4** se muestra en la figura 5.11.

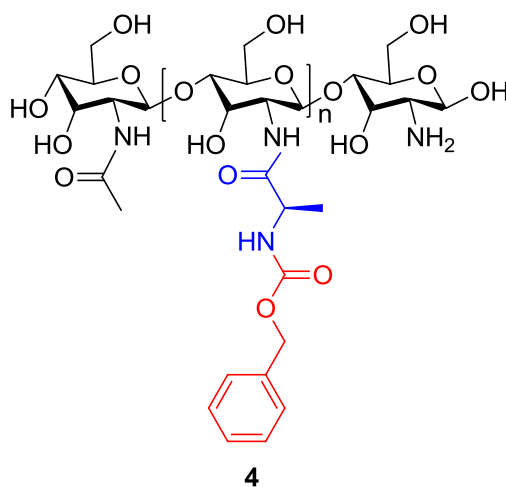


Figura 5.11 Compuesto *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS **4**.

El espectro FT-IR (Figura 5.12) del compuesto **5** presenta también gran similitud con el espectro del quitosano puro. Comparando ambos espectros, se puede observar un desplazamiento y cambio de intensidad en la vibración característica de los grupos OH, desplazándose de 3350 cm^{-1} a 3367 cm^{-1} respecto del CTS puro., además de un ligero cambio en la intensidad de la banda en 3300 cm^{-1} lo cual se propone es originado por la desprotección del grupo amino de la N-Boc-Cis(SBn), producida por el TFA remanente en las nanofibras y el cual se dispersó en el medio de reacción.

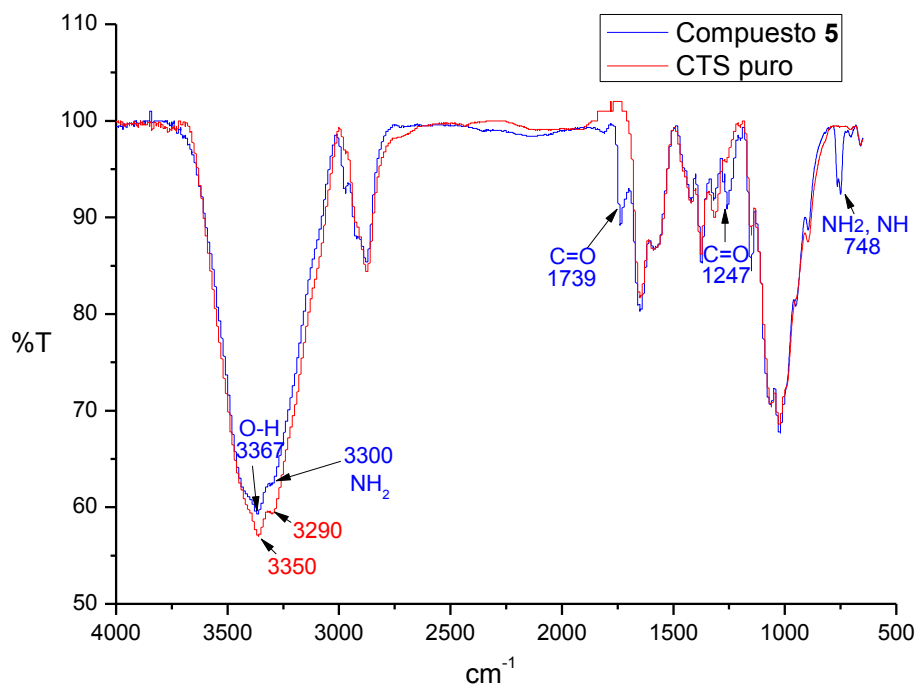


Figura 5.12 Espectro de FT-IR del compuesto **5** vs CTS puro

La diferencia más significativa se encuentra en la región comprendida entre 1800 cm^{-1} y 500 cm^{-1} mostrada en la Figura 5.13. En el espectro del compuesto **5** se observa la evidente la aparición de tres vibraciones diferentes a las características del CTS puro; la primera en 1739 cm^{-1} y otra en 1247 cm^{-1} , ambas vibraciones son originadas por vibraciones de estiramiento del grupo C=O de grupos esteres, mientras que en 748 cm^{-1} se observa una vibración de torsión presente sólo en aminos primarios y secundarios atribuible a la presencia del aminoácido debido a la desprotección del grupo amino.

En este caso, las vibraciones de los grupos Amida I y NH₂ en esta región no presentan cambios significativos en el compuesto **5** respecto de del CTS puro.

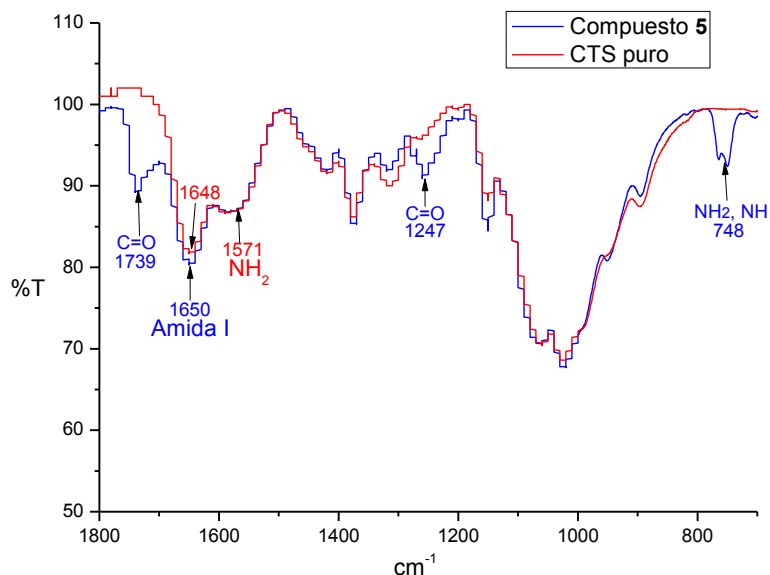


Figura 5.13 Espectro de FT-IR en la región 700 a 1800 cm^{-1} del compuesto **5** vs CTS puro.

En resumen y como resultado del análisis por FT-IR se sugiere que la alternativa más viable del acoplamiento entre el CTS y la *L*-Cis(SBn) es a través de la formación de un éster como resultado de la reacción con los grupos OH del CTS y en este caso no participan los grupos NH_2 , esto puede sustentarse por la aparición de la banda en 1739 cm^{-1} correspondiente a la vibración de estiramiento del grupo carbonilo de éster y al observar las bandas correspondientes a los grupos amino del CTS las cuales no presentan cambios importantes. Como resultado del análisis por FT-IR y aunado al cambio físico significativo de las películas obtenidas respecto a las nanofibras de CTS se propone la estructura mostrada en la Figura 5.14.

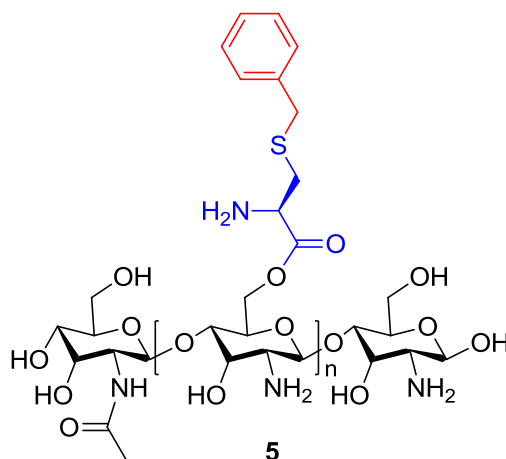
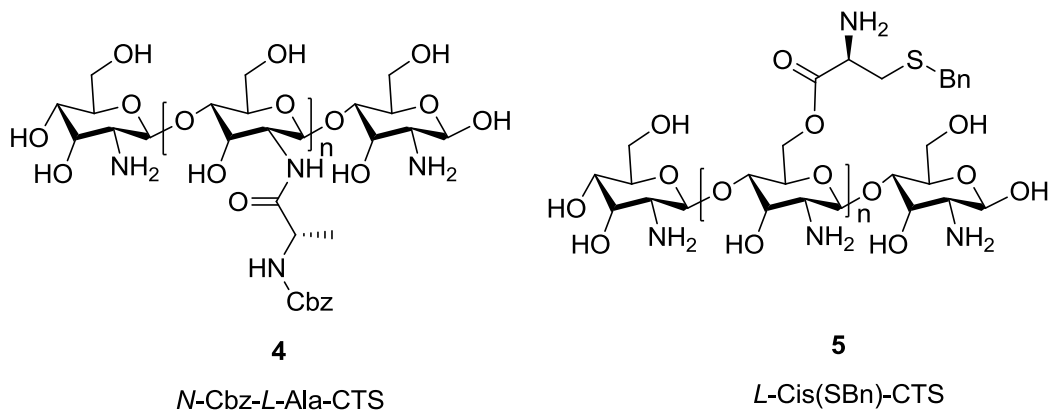


Figura 5.14 *L*-Cis(SBn)-CTS **5**.

6. - CONCLUSIONES

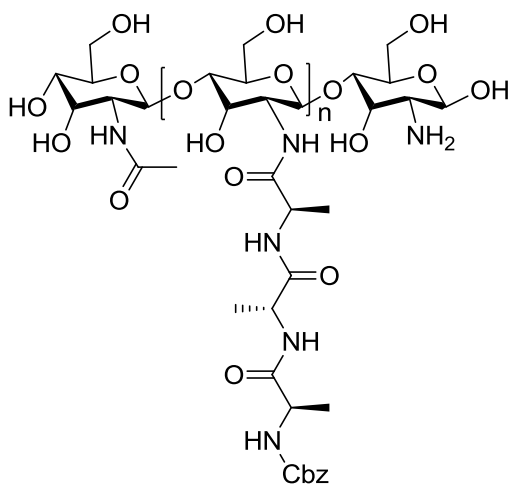
- ✓ Los aminoácidos protegidos fueron obtenidos exitosamente en rendimientos de 79% y 90% para **1** y **2** respectivamente, ambos fueron caracterizados por RMN.
- ✓ La ruta de síntesis propuesta para la incorporación de los aminoácidos protegidos a la estructura del CTS, a partir de nanofibras de CTS solubles en agua ha resultado eficaz. Dicha ruta es una alternativa sencilla para la incorporación de aminoácidos al CTS y por primera vez se propone el uso de nanofibras de sales CTS en una ruta sintética que involucre a este biopolímero.
- ✓ A partir del análisis FT-IR de los productos de reacción entre el CTS y los aminoácidos **1** y **2** se evidencia la formación de enlaces formales entre los componentes y se sugieren las siguientes estructuras:



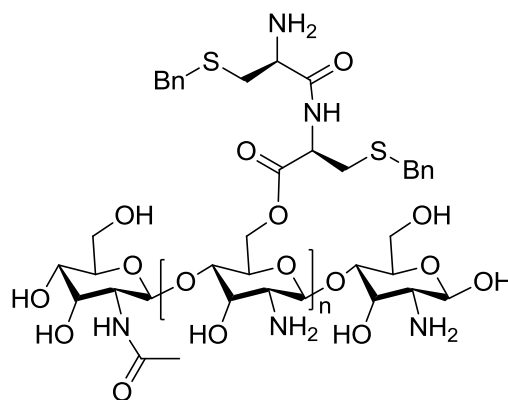
- ✓ Ambos biomateriales tienen la capacidad de formar películas con buenas propiedades mecánicas y con prometedoras aplicaciones en el área farmacológica.

7. - PERSPECTIVAS

Tomando como referencia, la síntesis y caracterización para las reacciones de acoplamiento CTS-aminoácidos se tiene evidencia de la formación de enlaces formales por lo cual es posible obtener los compuestos híbridos: *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS y de *L*-Cis(SBn)-*L*-Cis(SBn)-CTS.



N-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS



L-Cis(SBn)-*L*-Cis(SBn)-CTS

8. - BIBLIOGRAFÍA

1. Salamanca, S., Santiago, E. "Estudio comparativo de la utilidad de los cementos y vidrios basados en fosfatos de calcio como sustitutivos óseos en defectos cavitarios experimentales", Tesis Doctoral. UB, **2004**.
2. García Fernández, M. T. "Materiales híbridos orgánicos-inorgánicos basados en disilanos como unidades estructurales" Tesis Doctoral, UPV, **2012**.
3. Mendoza Rosales, M. Evaluación del comportamiento electroquímico de biomateriales. Tesis de Ingeniería. UNAM, **2011**.
4. Flores Vásquez, J. A., Ly, M., Tapia Huanambal, N. Biorremediación de metales tóxicos en efluentes mineros aplicando biosorción. *Rev. Inst. investig. Fac. minas metal cienc. geogr*, **2001**, 4(7), 46-51.
5. Cifuentes Restrepo, A. D., Rojas Alfaro, D. M. "Inmovilización de lipasa candida rugosa en soporte de quitosano" Tesis Doctoral, UNAL, **2005**.
6. Rodríguez, M. C. La química del oro. *MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide*, **2012**, 5, 35-37.
7. Sandoval, G., Olguín, A., Paniagua, J. Péptidos: aplicaciones en investigación y desarrollo. Biotecnología Farmacéutica, Laboratorios Silanes S. A. de C. V. http://www.biopps.com/article.php?story=pptidos_usos_investigacin_y_desarrollo Fecha de consulta 16 de noviembre del 2014, **2008**.
8. Jayaraman, M. S., Bharali, D. J., Sudha, T., Mousa, S. A. Nano chitosan peptide as a potential therapeutic carrier for retinal delivery to treat age-related macular degeneration. *Molecular vision*, **2012**, 18, 2300-2308.
9. Gomes, A. P., Mano, J. F., Queiroz, J. A., Gouveia, I. C. New biomaterial based on cotton with incorporated Biomolecules. *Journal of Applied Polymer Science*, **2014**, 131(15), 40519.
10. Ramírez-Guerra, H. E., Ramírez Suárez, J. C., Mazorra Manzano, M. A. Propiedades biológicas de péptidos derivados del colágeno de organismos marinos. *Biotecnia*. **2013** XV (3), 34-45.
11. Velásquez, C. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de polímeros*, **2003**, 4(2), 91-109.
12. Expósito Harris, R. "Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos" Disertación Doctoral, UCM, **2010**.

13. Peniche, C., Solís, Y., Davidenko, N., García, R. Materiales compuestos de quitosana e hidroxapatita. *Biotecnología Aplicada* **2010**, 27(3): 202-210.
14. López Mengíbar, M. Á. "Obtención y caracterización de quitosanos modificados: ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y biológicas en la industria alimentaria" Tesis Doctoral, UCM, **2012**.
15. Agulló, E., Mato R., Peniche, C., Tapia, C., Heras, A., San Roman, J., Arguelles, W., Goycoolea F., Mayorga A., Nakamatsu J., Pastor de Abram, A. "Quitina y Quitosano: Caracterización y Aplicaciones" Fondo Editorial, PUCP, **2004**.
16. Gaffrey, M. C. "Mayonesa con quitosano" Tesis de Licenciatura, Universidad de Fasta, **2014**.
17. González Rojas, J. P. "Síntesis de materiales bactericidas basados en nanopartículas matálicas y biopolímeros para terapia periodontal odontológica" Tesis Doctoral, UCh, **2013**.
18. McMurry, J. Química Orgánica. *Editorial Thomson. México. 2008* pp 1075-1076
19. Carey, F. A., Arellano, J. A. V., Pozo, V. G. *Química orgánica*. Madrid, **2006** Spain: McGraw-Hill pp 1155-1156.
20. Ávila, S., Edward, E., Mora, A. J. El enlace puente hidrógeno y sus aplicaciones. ULA, **2004**
21. Weininger, S. J., Stermitz, F. R. *Química orgánica*. Reverte, **1998**, pp 915.
22. Solverano Solano, A. "Síntesis y análisis estructural de dipéptidos lineales incorporando al ácido 2, 4-diaminobutírico, un análogo estructural de GABA", Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, **2013**.
23. Aldwin, L., Mark, M., Willem, P. C. Peptidos de asociacion. *Affymax tecnologías NV*, **1993**, 08, 067-387.
24. Soriano Mora, J. M. "Nuevos reactivos poliméricos para acoplamiento y protección de aminoácidos" Tesis Doctoral", Universidad de Alicante, **2002**.
25. Nishiyama, Y., Yoshikawa, T., Kurita, K., Hojo, K., Kamada, H., Tsutsumi, Y., Kawasaki, K. Regioselective conjugation of chitosan with a laminin-related peptide, Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg, and evaluation of its inhibitory effect on experimental cancer metastasis. *Chem Pharm Bull.* **1999**, 47, 451-453.

26. Griffin, R. W. *Química orgánica moderna*. Reverté, **1981**, pp 277.
27. Penj, J. Alimentos materias primas aminoácidos de grado farmacéutico, L-alanina AJI97. WUHAN SOLEADO TECHNOLOGY CO., http://spanish.everychina.com/f-z51da37d/p90612403food_grade_amino_acids_pharmaceutical_raw_material_amino_acid_l_alanine_aji97.htm Fecha de consulta: 14 de enero del 2015, **2011**.
28. Kearns, V., MacIntosh, A.C., Crawford, A., Hatton, P.V. Silk-based Biomaterials for Tissue Engineering. Book Chapter 1. Topics in tissue engineering, Vol. 4. Eds N. Ashammakhi, R. Reis, F. Chiellini, **2008** pp 1-19.
29. Shan, Y., Qin, Y., Chuan, Y., Li, H., Yuan, M. The synthesis and characterization of Hydroxyapatite- β -Alanine Modified by Grafting Polymerization of γ -Benzyl-L-glutamate-N-carboxyanhydride. *Molecules* **2013**, *18*, 13979-13991.
30. Alvarez, C., Calo, L., Romero, L.C., García, I., Gotor, c. An O-acetylserine(thiol) yase homolog with L-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **2010**, *152*, 656-669.
31. Importancias de las proteínas y AMINOÁCIDOS Aminoácidos: base de las proteínas y de una dieta sana. *Saber alternativo salud, medicina natural, desarrollo personal*. **2014-2015**, *21*, 32.
32. Gappa-Fahlenkamp, H., Duan, X., Lewis, R.S. Analysis of immobilized L-cysteine on polymers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2004**, *171(3)*, 519-27.
33. Gouveia, I. C., Sá, D., Henriques, M. Functionalization of wool with L-cysteine: Process characterization and assessment of antimicrobial activity and cytotoxicity. *Journal of Applied Polymer Science*, **2012**, *124(2)*, 1352-1358.
34. Mendoza Novelo, B. "Efecto de surfactantes, agentes de entrecruzamiento y cisteína sobre las propiedades físicas y químicas de pericardio bovino con aplicaciones cardiovasculares" Tesis de Licenciatura, CICY, **2006**.
35. Prego, C., Torres, D., Alonso, M. J. The potential of chitosan for the oral administration of peptides. *Expert Opin Drug Deliv*, **2005**, *2(5)*, 843-854.
36. Katas, H., Dzulkefli, N. N. S. N., Sahudin, S. Synthesis of a new potential conjugated TAT-peptide-chitosan nanoparticles carrier via disulphide linkage. *Journal of Nanomaterials*, **2012**, *63*, 134607.

37. Hu, B., Wang, S. S., Li, J., Zeng, X. X., Huang, Q. R. Assembly of bioactive peptide–chitosan nanocomplexes. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2011**, *115*(23), 7515-7523.
38. Duan, B., Wu, L., Yuan, X., Hu, Z., Li, X., Zhang Y., Yao, K., Wang, M. Hybrid nanofibrous membranes of PLGA/chitosan fabricated via an electrospinning array, *Journal of Biomedical Materials Research Part*, **2007**, *A*(83.3), 868-878.
39. Park, W. H., Jeong, L., Yoo, D. I., Hudson, S. Effect of chitosan on morphology and conformation of electrospun silk fibroin nanofibers, *Polymer*, **2004**, *45*(21), 7151-7157.
40. Li, L., Hsieh, Y. L. Chitosan bicomponent nanofibers and nanoporous fibers. *Carbohydrate Research*, **2006**, *341*(3), 374-381
41. Ohkawa, K., Cha, D., Kim, H., Nishida, A., Yamamoto, H. Electrospinning of chitosan. *Macromolecular Rapid Communications*, **2004**, *25*(18), 1600-1605.
42. Sangsanoh, P., Supaphol, P. Stability improvement of electrospun chitosan nanofibrous membranes in neutral or weak basic aqueous solutions. *Biomacromolecules*, **2006**, *7*(10), 2710-2714.
43. Gamboa, W., Mantilla, O., Castillo, V. Producción de micro y nano fibras a partir de la técnica electrospinning para aplicaciones farmacológicas”. VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería, La Habana, Cuba (**2007**).