



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

***“SÍNTESIS DE COMPUESTOS HÍBRIDOS QUITOSANO
PEPTÍDICOS”***

TESIS

QUE PRESENTA:

I.Q MAYRA OFELIA VARGAS CRUZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

ASESORAS:

D.C. JANETT BETZABE GONZÁLEZ CAMPOS

D.C. JUDIT ARACELI AVIÑA VERDUZCO

MORELIA MICHOACÁN, FEBRERO 2016





Dedicado a mi querido hermano Alejandro.

En el viento que mueve las hojas de los árboles y lleva el olor de la primavera allí estás tú.

Tu vida fue como la de las mariposas corta, pero valiente, llena de viajes, orgullosa y con propósito.....maravillosa!

Tu ser llenó de risas mi casa y de alegría a mi familia, tu presencia física ya no estará más, pero tú esencia y calidez ni un solo día dejarán de entrar por mi ventana.

Con todo mi cariño y amor



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero y antes que a nadie a mi mamá, que ha sido la persona más maravillosa que he conocido, que no hay persona más digna de admiración que ella, estoy tan orgullosa de ser tu hija.

A mi papá por mostrarme cariño incondicional, a Migue, Myrna, Gaby, Cris y Alex, crecer a su lado es lo mejor que en la vida me pudo haber pasado, por reír hasta llorar, por comer hasta desmallar, por jugar hasta ya no poder más, por estar siempre a mi lado, siempre a donde quiera que vaya todos y cada uno de ustedes están conmigo, los amo hermanos, a mi monito por toda la alegría que trajiste a la casa, por tus risas por doquier.

A Martín García Tinajero, no hay persona que me inspiré más que tú, por qué a cada paso que iba hacia atrás tú me hiciste caminar dos hacia adelante, por tu confianza, por tu sonrisa, por tu amistad, por tu bondad, por ser tan positivo siempre, por reírte a carcajadas en el cine, por tu amor.

A la Dra Betzabe porque sin su excelente dirección este proyecto no hubiera sido posible y no sólo es un ejemplo de constancia y dedicación, también es un gran ser humano que me apoyó en las buenas y en las malas, gracias Dra!

A la Dra Judit por ser parte esencial de este proyecto, por exigirme tanto y transmitirme el amor a la química de los péptidos, es una gran persona, gracias Dra!

Al maestro Ramón por siempre tratar de hacerme dudar, sin lugar a duda hizo que siempre investigará más, gracias maestro!

A mis sinodales por tomarse el tiempo de revisar y hacer aportaciones significativas a mi trabajo, gracias! Dras Yliana, Rosy y Gaby.

Al Dr. Juan Diego, el ver la emoción con la que nos impartía las clases de química orgánica en los cursos de inducción hizo que no dudará de mi elección.

También quiero agradecer a mis amigos de la sección: Juanca, Chino, Chava, Techy y Toño. Aunque llegue sin conocer mucho, ustedes me hicieron sentir como en casa, me ayudaron tanto y estoy tan feliz de contar con su amistad.

Juanca no voy a olvidar todo lo que me enseñaste del laboratorio fuiste mi maestro gracias por la paciencia (realmente la mesa de atrás era la mejor jajaja aunque se enojen) gracias Juanca!

Chino las miles de horas estudiando en la biblioteca, con el merecido descanso para reírnos, eres una gran amigo!

Chava eres una persona muy noble, divertida y dormilona jajaja, gracias por tu amistad!

Techy también quiero agradecerte por tu amistad, eres una persona muy divertida y linda! Gracias Techy!



Antonio por favor! Aunque tu letra no se le entienda mucho (jajaja) eres una gran persona! Gracias por tu amistad!

A mis amigos del laboratorio: Gerita realmente eres una persona muy simpática que se gana mi cariño, Lupita por siempre ser tan linda conmigo, eres una excelente persona y amiga, Juan Jourdan por ser divertido y estar dispuesto a ayudar en todo (menos los disolventes), Paquillo por tu amistad! eres un buen amigo (dice la dra que te pongas a trabajar jajaja), Yari siempre tan linda, trabajar contigo es muy divertido, Ale siempre dispuesta a ayudar, muchas gracias por tu amistad, también a Fany, Mary, Julio, Fredy, Angy, Fer y Omar, por hacerme más divertido el trabajo.

A la Maestra Cony, el Doctor Pablo y el Químico Juan Manuel, por el apoyo y la buena disposición que siempre me mostraron.

A mis amigas y compañeras de Mony, Lau y Cecy, porque desde que las conocí siempre me apoyaron, las quiero.

También a mis dos grandes amigas de la vida Alejandra Fletes y Tania Méndez, las quiero mucho, en tantos aspectos de mi vida están presentes y esté no fue la excepción, gracias por alentarme siempre!



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Polímeros en conjunto con el Laboratorio Síntesis de Química Orgánica del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de las DC Janett Betzabe González Campos y Judit Araceli Aviña Verduzco.

Esta tesis contó con financiamiento del el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Se contó con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (295559)

Parte de este trabajo se presentó en:

- XXXVI Encuentro Nacional de La Academia Mexicana de Investigación y Docencia en la Ingenierías Química, celebrado en Cancún Quintana Roo México, del 5 al 8 de mayo del 2015.
- 10^{mo} Congreso Estatal de ciencia, tecnología e Innovación llevado a cabo en Morelia Michoacán del 24 y 25 de Septiembre del 2015.



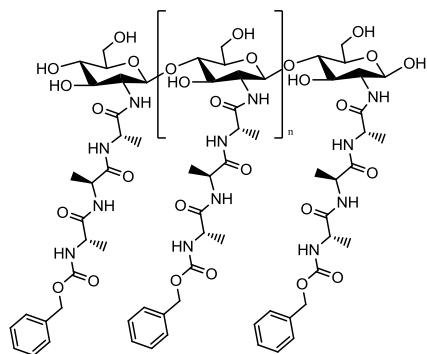
ÍNDICE

Resumen	1
Abstrac	2
Abreviaturas, fórmulas y acrónimos	3
Introducción	5
Antecedentes	9
2.1 Biomateriales.....	9
2.2 Quitosano.....	10
2.3 Péptidos	12
2.4 Compuestos Quitosano Peptídicos.....	14
Justificación	17
Objetivos	18
Objetivo General	18
Objetivos Particulares	19
Metodología	20
Estrategia Sintética: Compuestos peptídicos.....	20
Estrategia Sintética: Síntesis de compuestos híbridos	21
Discusión de Resultados	24
Síntesis de Péptidos.....	24
Síntesis de Compuestos Híbridos	35
Pruebas Adicionales.....	43
Conclusiones	50
Parte Experimental	52
Bibliografía	63

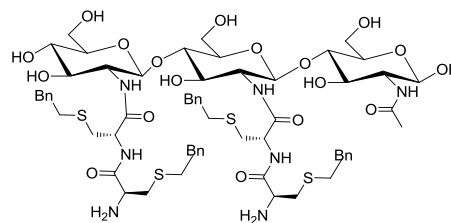
RESUMEN

Los péptidos de bajo peso molecular como los dímeros y trímeros al igual que el quitosano (CTS), un polímero natural derivado de los desechos de la industria pesquera, han mostrado excelente actividad como agentes terapéuticos con potencial aplicación en el área biomédica. Con la combinación de estos compuestos puede darse la posibilidad de obtener nuevas moléculas con propiedades biológicas y mecánicas potenciadas; de acuerdo a reportes recientes la inserción de péptidos a quitosano ha tenido efectos positivos, entre los que se incluyen la mejora de las propiedades mecánicas, estabilidad térmica, morfología, capacidad de descomposición y biofuncionalidad. La influencia de este tipo de péptidos acoplados a quitosano en la síntesis y actividad biológica de biomateriales compuestos ha sido poco explorada, y debido a que la síntesis de péptidos de cadena corta presenta ventajas respecto a la de sus análogos de peso molecular elevado entre las que destacan su relativa facilidad de síntesis, menores reacciones colaterales, rendimiento global más alto, con menores tiempos en el proceso de síntesis, por mencionar algunas, su incorporación al CTS representa un campo de estudio altamente atractivo para la generación de compuestos híbridos con potencial actividad biológica.

Este trabajo presenta la síntesis de compuestos híbridos *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**) y *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-CTS (**8**) y su caracterización espectroscópica mediante FTIR y termogravimétrica. La metodología empleada propone por primera vez el uso de nanofibras de quitosano solubles en agua para la incorporación de quitosano de alto peso molecular, el cual es poco empleado debido a su baja solubilidad.



(7) *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS



(8) *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-CTS

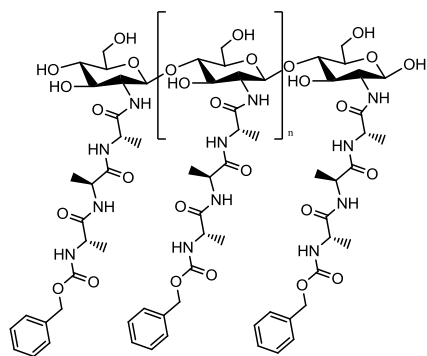
Palabras claves: quitosano, péptidos, compuestos híbridos, polímero, biofuncionalidad.



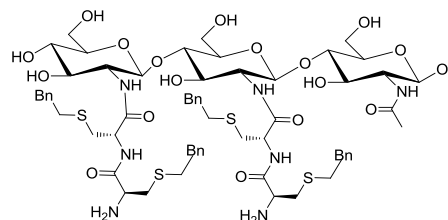
ABSTRACT

Chitosan (CTS), a natural polymer obtained from fish industry waste and low molecular weight peptides such as dimers and trimers have shown excellent activity as therapeutic agents with potential application in the biomedical field. The combination of these compounds may produce new molecules with enhanced mechanical and biological properties; according to recent reports the insertion of peptides to chitosan has produced positive effects including the improvement in mechanical properties, thermal stability, morphology, degradability and biofunctionality. The influence of peptides attachment to chitosan in the synthesis and biological activity of composite biomaterials production is little explored, even though the synthesis of small peptides is more advantageous compared to their high molecular counterparts including relative ease of synthesis, fewer side products and reactions, higher yield, lower synthesis time, to name a few. Therefore, the low molecular peptides attachment to chitosan is a highly attractive field of study for the production of hybrid compounds with potential biological activity.

This work presents the synthesis of *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**) and *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-CTS (**8**) hybrid compounds and their FTIR spectroscopic and thermogravimetric characterization. The methodology of synthesis proposes for the first time the use of water soluble chitosan nanofibers for the incorporation of high molecular weight chitosan which is commonly difficult to handle due to its low solubility.



(7) *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS



(8) *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-CTS

**Abreviaturas, fórmulas y acrónimos**

α	Alfa
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
Aa	Aminoácidos
AcOEt	Acetato de etilo
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asp	Ácido Aspártico
CBPM	Quitosano de bajo peso molecular
CCF	Cromatografía de capa fina
CDCl_3	Cloroformo deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
CH_2Cl_2	Diclorometano
Col	Colaboradores
COSY	Espectroscopia de Correlación Homonuclear
CTS	Quitosano
Cbz	Benciloxycarbonil
CbzCl	Cloroformiato de bencilo
dd	Señal doble de dobles
DMF	Dimetil formamida
DMAc	<i>N,N</i> -Dimetilacetamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
g	Gramos
Glu	Ácido Glutámico
Gly	Glicina
HCl	Ácido clorhídrico
H_2O	Agua



HETCOR.....	Correlación heteronuclear espectroscópica
Hex.....	Hexano
Hz.....	Hertz
i BBCl.....	Cloroformiato de isobutilo
Ile.....	Isoleusina
J.....	Constante de acoplamiento
L.....	Litro
LiOH.....	Hidróxido de litio
m.....	Señal múltiple
Me.....	Metilo
MeOH.....	Metanol
MHz.....	MegaHertz
min.....	Minutos
mL.....	Militros
Mmol.....	Milimoles
Na_2SO_4	Sulfato de sodio
NH_4Cl	Cloruro de amonio
NMM.....	<i>N</i> -metilmorfolina
ppm.....	Partes por millón
RMN de ^1H	Resonancia magnética nuclear de protón
Rto.....	Rendimiento
THF.....	Tetrahidrofurano
TMS.....	Tetrametilsilano
Tyr.....	Tirosina
v.....	Vibración de tensión
δ	Vibración de flexión (IR)
w/w.....	Relación peso/peso



INTRODUCCIÓN

En la actualidad los biomateriales se utilizan ampliamente en aplicaciones médicas, tales como la administración de fármacos y la ingeniería de tejidos [1]. Un biomaterial puede ser cualquier material biocompatible y 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 puede adaptar al cuerpo humano y que desarrolla una función en el mismo [2]. Un biomaterial debe mostrar propiedades mecánicas apropiadas, estabilidad química y dar lugar a una respuesta adecuada de un organismo *in vivo* a partir de células o tejidos *ex vivo* o *invitro* [3].

El contacto directo entre un biomaterial y un tejido es necesario para evaluar y tratar el problema en cuestión, por lo tanto factores como la toxicidad y la antigenicidad deben estar por debajo de los valores del umbral, y la compatibilidad es la única condición indispensable que debe cumplirse [1].

Los biomateriales más utilizados, incluyen aleaciones metálicas, polímeros, cerámicos, sustancias biológicas y materiales compuestos por dos o más componentes. Dentro de los biomateriales compuestos los polímeros, ya sean de origen sintético o natural se han convertido en una fuente muy importante para este fin y han sido ampliamente empleados en catéteres, válvulas del corazón, implantes oculares y biosensores, esto debido a sus propiedades ajustables y singularidades como su fácil manejo, biocompatibilidad, bioabsorbabilidad y bioresorbabilidad. Los polímeros más utilizados son: cloruro de polivinilo, polipropileno, polimetilmetacrilato, poliestireno, ácido poliláctico, y polímeros naturales (biopolímeros) como el quitosano, la celulosa, el ácido hialurónico, el colágeno y la gelatina [4].

En general, los biopolímeros se utilizan en forma de películas, los biopolímeros de alto peso molecular son ampliamente utilizados debido a que proporcionan una gran fuerza de cohesión y capacidad de fusión. El grado de cohesión de la matriz del biopolímero afecta las propiedades tales como la densidad, compacidad, porosidad, permeabilidad, flexibilidad y fragilidad. Casi todos los biopolímeros naturales pueden ser utilizados para la preparación de películas y fibras [5].



Dentro de los biopolímeros, el quitosano es ampliamente utilizado en la fabricación de biocompuestos ya que posee excelentes propiedades biológicas, entre las cuales se encuentran la biocompatibilidad con células humanas, la regeneración de tejidos y su actividad antimicrobiana, aunado su bajo costo debido a que proviene de los desechos de la industria pesquera. Estudios recientes indican que el quitosano es más versátil en la liberación de fármacos, diagnóstico, dispositivos para el reconocimiento de células tumorales y dispositivos quirúrgicos que van desde geles anti-adherentes hasta cubiertas estériles [6].

En este mismo sentido, el uso de péptidos como potenciales agentes terapéuticos tiene como grandes ventajas su alta especificidad y su gran actividad. Esto implica que en general tienen poca toxicidad, pocos efectos secundarios y que se administran en pequeñas dosis, reduciendo así las cantidades de producto a sintetizar. Así mismo no se acumulan en el organismo, ya que poseen una vida media relativamente corta, lo que los hace buenos candidatos para la síntesis de biomateriales compuestos [6].

Los péptidos presentan un amplio espectro de potenciales beneficios clínicos. Actualmente hay seis amplias categorías para la aplicación terapéutica de péptidos: antibióticos/antifúngicos (antimicrobianos), antivirales, desordenes en el sistema inmune, enfermedades cardiovasculares, desordenes neuronales y cáncer [7].

Se han diseñado materiales compuestos a base de péptidos de elevado peso molecular como una nueva clase de biomateriales, debido a sus propiedades químicas, físicas y biológicas únicas, en donde se ha observado que la inserción de péptidos a quitosano en forma de nanofibras ha tenido efectos positivos en los que incluyen la mejora de las propiedades mecánicas la estabilidad térmica, la morfología, la capacidad de descomposición y la biofuncionalidad de las fibras [3]. Algunos ejemplos incluyen polipéptidos tipo elastina, polipéptidos derivados de leucina, péptidos anfifílicos y oligopéptidos iónicos. También se han incorporado nanopartículas de insulina, en películas de quitosano utilizadas como mucoadhesivo bucal [8], mientras que quitosano de bajo peso molecular (CBPM) combinado con nisina (un péptido antimicrobiano con 34 residuos de aminoácidos), presenta muy buena actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* [9].

Los péptidos de bajo peso molecular han mostrado excelente actividad como agentes terapéuticos [10], sin embargo, la influencia de este tipo de péptidos en su acoplamiento a



quitosano para la síntesis de biomateriales compuestos con potencial actividad biológica ha sido poco explorada, aun cuando la síntesis de péptidos de cadena corta presenta ventajas respecto a la de sus análogos de peso molecular elevado entre las que destacan su relativa facilidad de síntesis, no presentar reacciones colaterales, tener rendimiento global más alto y menores tiempos de síntesis, solo por mencionar algunas [11].

En este contexto, se ha demostrado que pentapéptidos antitumorales Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg al ser acoplados a quitosano han demostrado mayor actividad antimetastásica en menores dosis que el péptido parental [12], incluso péptidos de dos residuos de aminoácido de cisteína muestran actividad anticancerígena [13], mientras que el grado de alanilación en la membrana de *S. aureus* ha resultado vital para la actividad de agentes antibacterianos catiónicos [9].

Las técnicas para el acomplejamiento de péptidos a quitosano así como su caracterización no son del todo trivial, y se dividen principalmente en dos; en la primera ocurre una interacción electrostática dadas las características policatiónicas del quitosano, mientras que en la segunda se da por la generación de un enlace formal. Un ejemplo de la formación compuestos mediante interacción electrostática es el caso de la incorporación de *L*-cisteína, un agente antimicrobiano reconocido entre capas de quitosano y alginato de sodio, este compuesto presentó un incremento de un 70 a 90% en la actividad antimicrobiana respecto a su homólogo sin *L*-cisteína [14], mientras que mediante la formación de un enlace formal, se ha sintetizado un complejo de quitosano de bajo peso con un tripeptídico de Ser-Thr-Tyr [15].

La incorporación de péptidos al quitosano ha generado efectos positivos en los que se incluyen: la mejora de las propiedades mecánicas, la estabilidad térmica, la morfología, la capacidad de descomposición y la biofuncionalidad, sin embargo, el uso de péptidos de bajo peso molecular, los cuales poseen una excelente actividad como agentes terapéuticos ha sido poco explorado. De tal forma que la incorporación de éstos péptidos podría dar lugar a la generación de compuestos con propiedades biológicas y físicas mejoradas.

Por otro lado, el manejo de quitosano de alto peso molecular ha representado en general un reto importante en la síntesis de compuestos debido a su difícil solubilidad, aunado al hecho de que la síntesis de compuestos híbridos quitosano-peptídicos emplea agua como medio de reacción y el quitosano es insoluble en este medio. Una alternativa



para el uso de quitosano de alto peso molecular soluble en agua para la síntesis de estos compuestos híbridos, es el uso de nanofibras de trifluoroacetato de quitosano, las cuales son solubles en agua.

Por lo anterior el presente trabajo propone la síntesis de un compuesto híbrido a base de péptidos de bajo peso molecular funcionalizados a quitosano de alto peso molecular. Los péptidos empleados son trímeros de *L*-alanina así como dímeros de *L*-cisteína, y por primera vez se propone el uso de nanofibras de quitosano solubles en agua como materia prima para la generación de compuestos quitosano-peptídicos incorporando así quitosano de alto peso molecular comúnmente de difícil manejo en la síntesis de biomateriales debido a su baja solubilidad.



ANTECEDENTES

2.1 Biomateriales

Un biomaterial puede ser cualquier material biocompatible y 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 puede adaptar al cuerpo humano y que desarrolla una función en el mismo [2].

Un biomaterial debe mostrar propiedades mecánicas apropiadas, estabilidad química y dar lugar a una respuesta adecuada de un organismo *in vivo* a partir de células o tejidos *ex vivo* o *invitro* [3].

Los biopolímeros han sido ampliamente estudiados dadas aplicaciones farmacéuticas en la liberación de principios activos, localización de los fármacos en su diana terapéutica y sobrepaso de barreras fisiológicas (tisulares y celulares). Así mismo, es notable la importancia de su uso para el diseño de nuevos dispositivos biomédicos combinados, en los cuales la necesidad de incorporar sustancias con actividad farmacológica ha llevado a la generación de novedosas alternativas para el tratamiento de enfermedades en el ser humano. La aplicación de estos materiales en el campo biomédico y en sistemas terapéuticos farmacéuticos conlleva a la formación de una interfase con el sistema biológico, que requiere alta biocompatibilidad por parte del polímero. Los polímeros biocompatibles se pueden obtener de fuentes naturales o sintéticas y al ser introducidos en el sistema biológico se consideran biomateriales poliméricos o biopolímeros [16].

Dentro de los biopolímeros, el quitosano ha sido ampliamente utilizado en la fabricación de biocompuestos ya que posee excelentes propiedades biológicas, entre las cuales se encuentran la biocompatibilidad con células humanas, la regeneración de tejidos y su actividad antimicrobiana, aunado a su bajo costo. Estudios recientes indican que el quitosano es más versátil en la liberación de fármacos, diagnóstico, dispositivos para el reconocimiento de células tumorales y dispositivos quirúrgicos que van desde geles anti-adherentes hasta cubiertas estériles [17]. En este mismo sentido, el uso de péptidos como potenciales agentes terapéuticos tiene como grandes ventajas su alta especificidad y su gran actividad, razón por la que se han diseñado compuestos a base de péptidos de elevado peso molecular como una nueva clase de biomateriales, haciendo uso de sus propiedades químicas, físicas y biológicas únicas [2].



2.2 Quitosano

La quitina y el quitosano, su derivado principal, son polímeros naturales y constituyen recursos naturales renovables. Su interés científico es cada vez mayor debido a su amplio campo de aplicación relacionado con la química, bioquímica, farmacología, ciencia de los alimentos y la ciencia macromolecular [17]. El quitosano puede ser definido como una poliamina lineal de alto peso molecular con grupos amino e hidroxilo reactivos (Figura 1). Se comporta como un poli electrólito catiónico y por debajo de pH 6.5 presenta una alta densidad de carga, se adhiere fácilmente a las superficies negativamente cargadas y puede formar quelatos con iones metálicos [17].

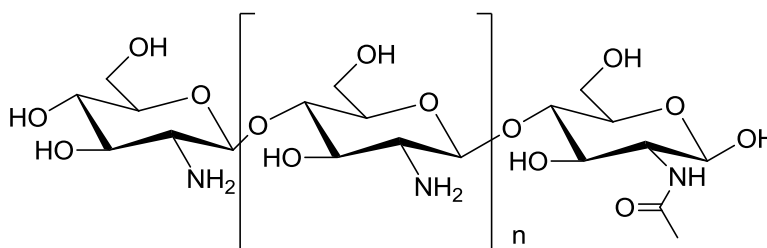


Figura 1. Estructura del Quitosano

El quitosano muy raramente se presenta como tal en la naturaleza. Por lo que suele obtenerse por desacetilación de la quitina en soluciones alcalinas concentradas (Figura 2). La estructura de estos dos compuestos sólo difiere en que presentan una sustitución acetamida, para el caso de la quitina y una sustitución amino en el quitosano. Tan posible es el paso de quitina a quitosano por desacetilación como la reversión de éste a quitina por acetilación [18].

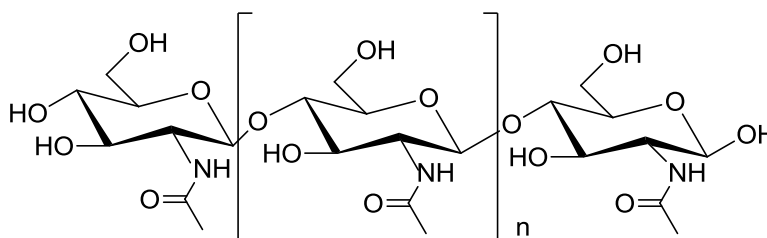


Figura 2. Estructura de la Quitina

Por su naturaleza policatiónica, el quitosano ha sido usado para la complejación de proteínas ácidas en una variedad de fluidos biológicos, los cuales pueden ser manipulados con relativa facilidad [19].

Pocos polímeros biológicos tienen un contenido tan alto de aminas primarias como el quitosano, mismas que confieren importantes propiedades funcionales al quitosano y que pueden ser explotadas para la biofabricación. El pH sustancialmente altera el estado y las propiedades del quitosano; a bajo pH las aminas se protonan y se cargan positivamente, el quitosano se convierte en políelectrolito catiónico soluble en agua, sin embargo a pH altos, las aminas del quitosano se desprotonan por lo que el polímero pierde su carga y se convierte en insoluble en agua, es importante destacar que en el quitosano con un pH cercano a la neutralidad es decir, entre 6 y 6.5, se produce una transición entre soluble e insoluble, el cual es un intervalo particularmente conveniente para aplicaciones biológicas [20]. Cuando se utiliza como soporte liberador de fármacos, el quitosano se caracteriza por su gran biocompatibilidad y por poder ser absorbido totalmente *in vivo*. Por su capacidad de intercambio iónico, el quitosano disminuye apreciablemente el nivel de colesterol de la sangre, de modo similar a como lo hace la colestiramina. Por otra parte se ha estudiado el empleo de membranas de quitosano en el transporte de iones, la diálisis de la sangre y la liberación controlada de medicamentos [17].

Las funciones antibacterianas del quitosano y sus derivados se deben a su naturaleza catiónica, se cree que es el factor primario que contribuye a su interacción con la superficie de la célula microbiana cargada negativamente, produciendo un deterioro de la actividad bacteriana [21]. La actividad antibacteriana del quitosano depende de su grado de acetilación, su peso molecular y el disolvente empleado [22]. Dentro de las aplicaciones farmacológicas, el quitosano ha destacado como: antibacteriano [23], anticancerígeno [24], anticoagulante [25] y antifúngico [26].

De acuerdo con la cantidad de monómeros unidos a la cadena de quitosano, se puede clasificar al quitosano en bajo y alto peso molecular, las características de estos difieren considerablemente, se ha encontrado que el quitosano de alto peso molecular presenta mejoras en las propiedades térmicas y mecánicas, los resultados muestran mejor resistencia a la tracción y alargamiento, sin embargo, el quitosano de bajo peso molecular ha mostrado superior permeabilidad en la formación de membranas y películas [27]. Una de las propiedades físicas que también se ven afectadas es la solubilidad, se ha demostrado que el quitosano de bajo peso molecular muestra una mejora en la solubilidad en soluciones acuosas [28]. Otra de las principales diferencias entre el quitosano de bajo y alto peso

molecular es la actividad biológica, reportes muestran que el quitosano alto peso molecular ha mostrado tener mayor efecto antifúngico [28].

2.3 Péptidos

Un péptido es una cadena de aminoácidos unidos mediante enlaces amida de forma similar a como lo hacen las proteínas (Figura 3).

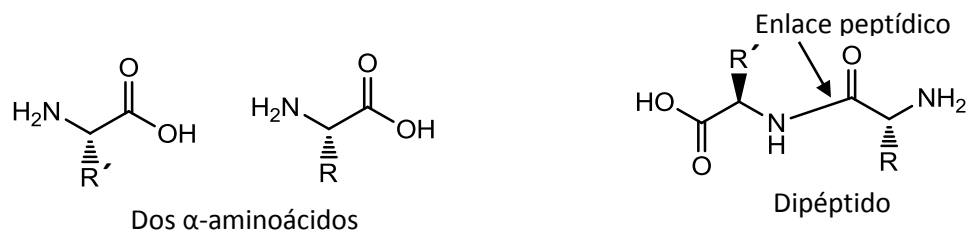


Figura 3. Enlace Peptídico.

Hay 20 aminoácidos naturales denominados proteínogénicos, que son los que se encuentran codificados en el ADN y son los componentes básicos de las proteínas (Tabla 1). Los péptidos también pueden incorporar otros aminoácidos, que se conocen como no naturales, no proteínogénicos o no codificados, además de muchos otros derivados estructurales como heterociclos, azúcares, etc [29, 30].

Aminoácido	Abreviación	Símbolo	Aminoácido	Abreviación	Símbolo
Glicina	Gly	G	Metionina	Met	M
Alanina	Ala	A	Serina	Ser	S
Valina	Val	V	Treonina	Thr	T
Leucina	Leu	L	Lisina	Lys	K
Isoleucina	Ile	I	Arginina	Arg	R
Prolina	Pro	P	Histidina	His	H
Fenilalanina	Phe	F	Asparagina	As	N
Tirosina	Tyr	Y	Glutamina	Gln	Q
Triptófano	Trp	W	Ácido Glutámico	Glu	E
Cisteína	Cys	C	Ácido Aspártico	Asp	D

Tabla 1. Principales 20 Aminoácidos.

Los péptidos presentan un amplio espectro de potenciales beneficios clínicos, actualmente hay seis amplias categorías para la aplicación terapéutica de péptidos: antibióticos/antifúngicos (antimicrobianos), antivirales, desordenes en el sistema inmune, enfermedades cardiovasculares, desordenes neuronales y cáncer [7].

Los péptidos antimicrobianos (PAM) generalmente contienen de 15 a 45 residuos de aminoácidos, son moléculas efectoras de la inmunidad innata que se caracterizan por el amplio rango de patógenos susceptibles y la baja inducción a la resistencia [31]. Se ha encontrado que tanto los péptidos antimicrobianos naturales como los sintéticos muestran un amplio espectro de actividades frente a bacterias gram-negativas y gram-positivas, incluyendo cepas de bacterias, algunos hongos, virus y parásitos [32].

Storm y colaboradores reportaron una clase de péptidos antimicrobianos de cadena corta compuestos de secuencias ricas en Arg y Trp [10]. El análisis farmacóforo en estos péptidos reveló que las cadenas tan cortas como trímeros de secuencias tales como Arg-Trp-Arg y Trp-Arg-Trp tienen actividad antimicrobiana (figura 4).

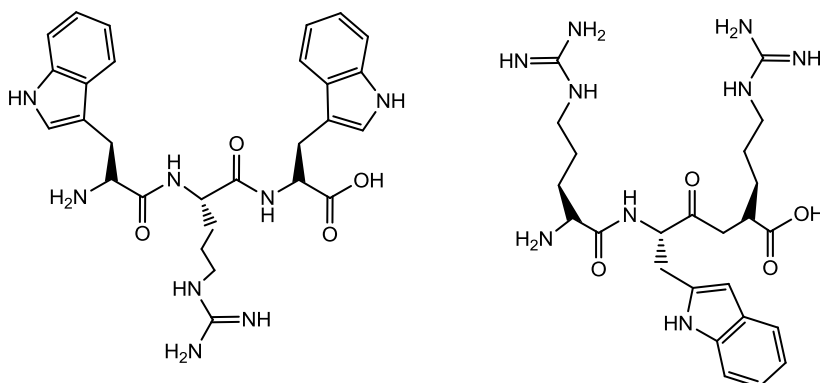


Figura 4. Estructura Arg-Trp-Arg y Trp-Arg-Trp [10].

Por otro lado péptidos antimicrobianos ricos en cisteína son elementos fundamentales de la defensa inmune innata contra las infecciones bacterianas y fúngicas, entre la familia de los artrópodos y en mayor medida entre los invertebrados [33], la cisteína es un aminoácido cuya cadena R es un grupo tiol o sulfidril que le confiere gran reactividad a la molécula.

En un trabajo reciente, Biswadip y colaboradores reportaron la actividad anticancerígena de cuatro dipéptidos antimicrobianos con dos fragmentos de cisteína **A**, **B**, **C** y **D** (Figura 5), mostrando que tenían una potente actividad contra células cancerígenas [13].

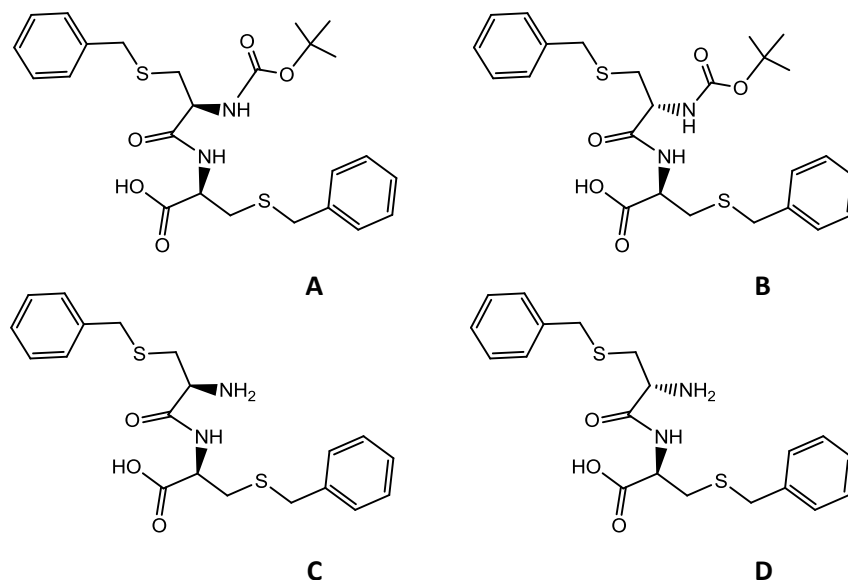


Figura 5. Péptidos antimicrobianos base cisteína con actividad anticancerígena [13].

Estas características incomparables también se han mostrado con las unidades fundamentales de los péptidos, los aminoácidos, Chen reportó que la captación de alanina reduce significativamente la carga de la superficie celular aniónica de *S. aureus*, debilitándola y haciéndola propensa a un agente antibacteriano [9].

2.4 Compuestos Quitosano Peptídicos

La incorporación de péptidos a las cadenas de quitosano se ha reportado a través de dos tipos vías: donde ocurren interacciones electrostáticas y forma través de la formación de un enlace formal.

En los compuestos donde la incorporación se da mediante interacciones por fuerzas electrostáticas, estas ocurren por la naturaleza policationica del quitosano y los grupos cargados negativamente que existen en algunos aminoácidos, por ejemplo el ácido aspártico (Asp) y el ácido glutámico (Glu) [34]. Otro ejemplo de esto es el reportado en 2014 donde se encontró que el aminoácido *L*-cisteína, un agente antimicrobiano reconocido fue incorporado entre capas de quitosano y alginato de sodio sobre una muestra de algodón, la película multicapa con *L*-cisteína mostró mejores propiedades antibacterianas contra *Staphylococcus neumonía aureus* y *Klebsiella*, los resultados son de un 70 a 90% de incremento en la actividad antimicrobiana respecto a su homologo sin *L*-cisteína [14]. A través de este mismo tipo de interacciones, la nisina (un péptido antimicrobiano 34 residuos) se ha incorporado a

quitosano de bajo peso molecular (CBPM) originando un agente antibacteriano catiónico que inhibe el crecimiento bacteriano mediante la interacción con la pared de la célula con carga aniónica [9]. En este mismo sentido también se han incorporado nanopartículas de insulina en películas de quitosano las cuales se han utilizado como mucoadhesivo bucal, el uso de películas de quitosano funcionalizadas produjo una mejora de 1.8 veces comparado con la aplicación *ex vivo* de insulina [8].

A través de la formación de un enlace formal, Nishiyama reporta el acomplejamiento de un péptido de cinco residuos de aminoácido a base de Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg, resultando un material compuesto que ha demostrado mejores resultados en cuanto a la actividad antimetastásica y en menores dosis que el péptido parental, para este compuesto se propuso una síntesis de cinco pasos con el uso de agentes acoplantes y disolventes de características tóxicas como la *N,N*-Dimetilacetamida (DMAc) [12]. Con el uso de condiciones más suaves, se ha reportado la síntesis de un complejo quitosano-peptídico a través de la formación de un enlace entre las cadenas del quitosano de bajo peso molecular y el péptido Ser-Thr-Tyr utilizando como solventes agua y dimetilsulfoxido (DMSO), así como un agente acoplante [15].

Como puede observarse la incorporación de péptidos al quitosano, ya sea a través de interacciones electrostáticas o por la formación de un enlace formal ha mostrado en todos los casos una mejora o potenciación de las cualidades de los componentes actuando individualmente, tomando ventaja de que el quitosano exhibe excelentes propiedades biológicas, como biocompatibilidad, regeneración de tejidos y actividad antimicrobiana al proporcionar sitios que se pueden emplear para el montaje de péptidos y que por su parte los péptidos pueden mejorar las propiedades mecánicas y térmicas de polímero. Los péptidos de cadenas cortas han demostrado poseer una actividad antimicrobiana homóloga a las de sus semejantes de cadenas mucho más extensas, y en el caso de la síntesis se minimiza la producción de residuos secundarios y el uso de grupos protectores. Es así que debido a sus propiedades individuales, la combinación quitosano-péptidos resulta altamente atractiva en el desarrollo de biomateriales compuestos.

Por otro lado, en su mayoría los compuestos quitosano-péptidos hasta ahora desarrollados contienen quitosano de bajo peso molecular debido que el quitosano de alto peso molecular es de difícil manejo dada su baja solubilidad y es el más utilizado en la síntesis de compuestos base quitosano. Es así que la producción estos compuestos



conteniendo quitosano de alto peso molecular representa un reto importante de síntesis. Una alternativa para este fin propuesta en el presente trabajo es el uso de nanofibras de acetato de quitosano como materia prima debido a que son solubles en agua, esto representa una solución viable para la generación de compuestos híbridos quitosano-peptídicos con el uso de quitosano de alto peso molecular.

JUSTIFICACIÓN

Se propone la síntesis y caracterización de compuestos híbridos quitosano-peptídicos con base en los siguientes fundamentos:

El quitosano es un polímero natural abundante, barato, biodegradable, biofuncional y biocompatible, presenta la fácil formación de películas y su acomplejamiento con péptidos ha demostrado tener efectos positivos en sus características funcionales y biológicas, y el uso de quitosano de alto peso molecular en las síntesis de biomateriales representa un reto importante.

Los péptidos de bajo peso molecular, de 2 hasta 5 residuos de aminoácido, han demostrado actividad biológica importante como antimicrobianos y anticancerígenos. 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. Su incorporación a las cadenas del quitosano ha sido poco estudiada.

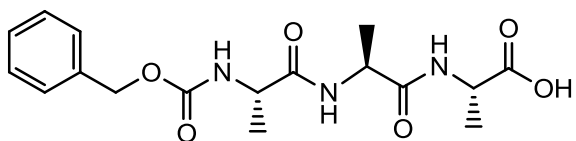
Las características de ambos materiales propicia la funcionalización para la formación del compuesto híbrido, y después de una exhaustiva búsqueda en la bibliografía se encontró que la información sobre la integración de compuestos tan versátiles como los péptidos en la matriz del quitosano es muy escasa, por lo que esta investigación ofrecería información importante sobre la síntesis y caracterización de un biomaterial que ofrece una combinación única de propiedades.



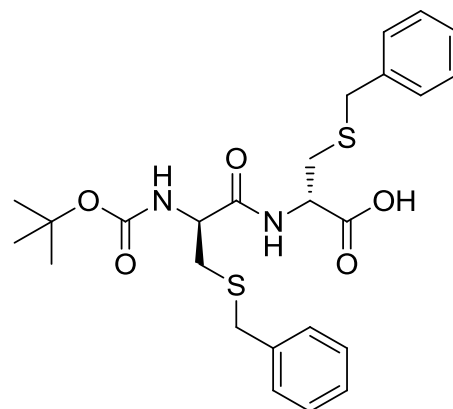
OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

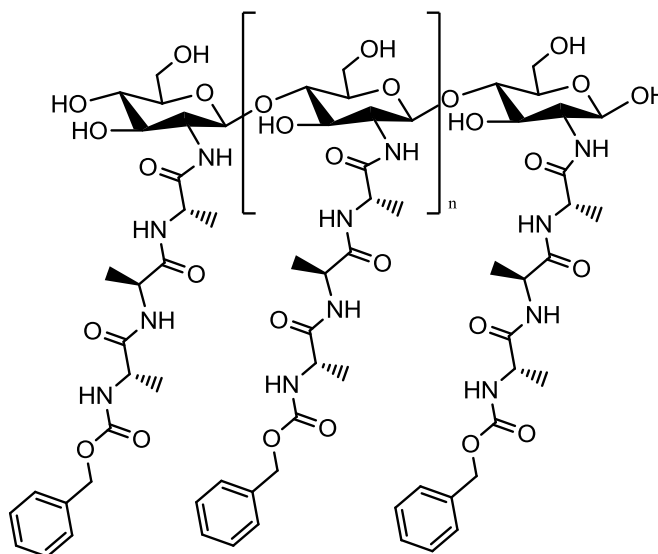
Sintetizar y caracterizar los compuestos basados en los péptidos *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OH (4), *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-OH (6), acoplados a quitosano para dar lugar a los compuestos híbridos: *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (7) y H₂N-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-CTS (8).



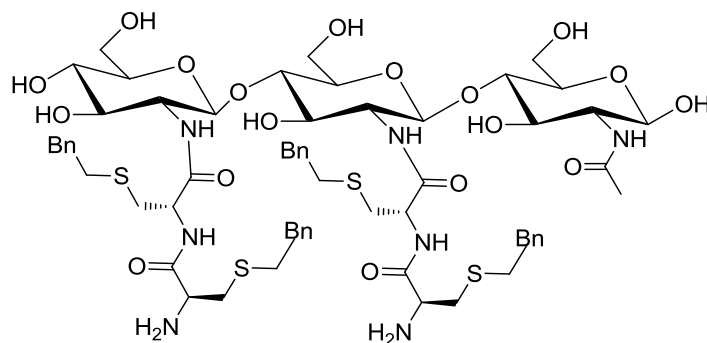
(4) *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OH



(6) *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-OH



(7) *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS



(8) *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-CTS

OBJETIVOS PARTICULARES

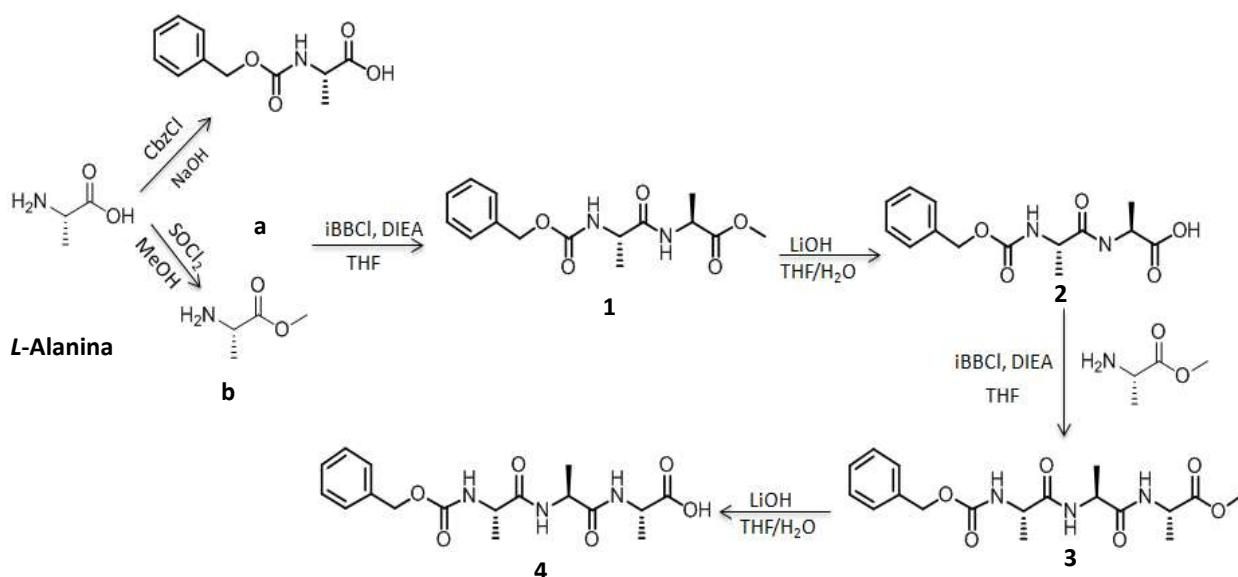
- Síntesis y caracterización de los péptidos **4** y **6** por medio de técnicas espectroscópicas (RMN, IR).
- Acoplamiento de los péptidos **4** y **6** a quitosano de alto peso molecular (CTS).
- Formación y caracterización de películas de los compuestos **7** y **8**.



METODOLOGÍA

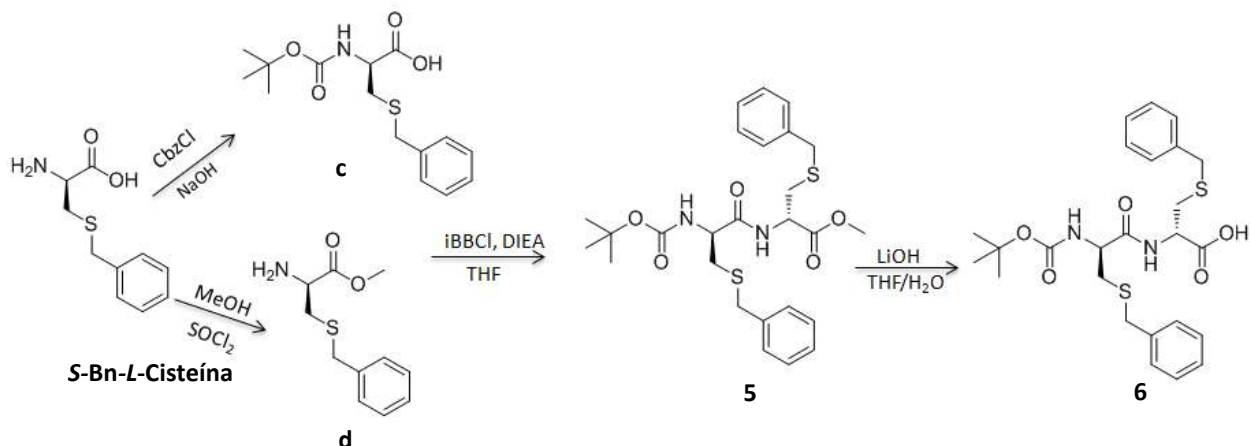
Estrategia Sintética; Compuestos peptídicos.

La obtención del trímero de *L*-alanina **4** describe en el esquema general 1. Inicialmente con el acoplamiento vía anhídridos mixtos del carbamato de *L*-alanina **a** y el aminoéster de *L*-alanina **b** se obtuvo el dímero correspondiente **1** al cual se le realizó una hidrólisis en medio básico obteniendo el producto **2**, mediante una reacción de condensación intermolecular con el aminoéster **a** se dio lugar al trímero diprotegido **3** y como último paso en la ruta sintética, se hidrolizó el trímero diprotegido para la obtención del trímero monoprotegido **4**.



Esquema general 1. Síntesis de *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OH (**4**)

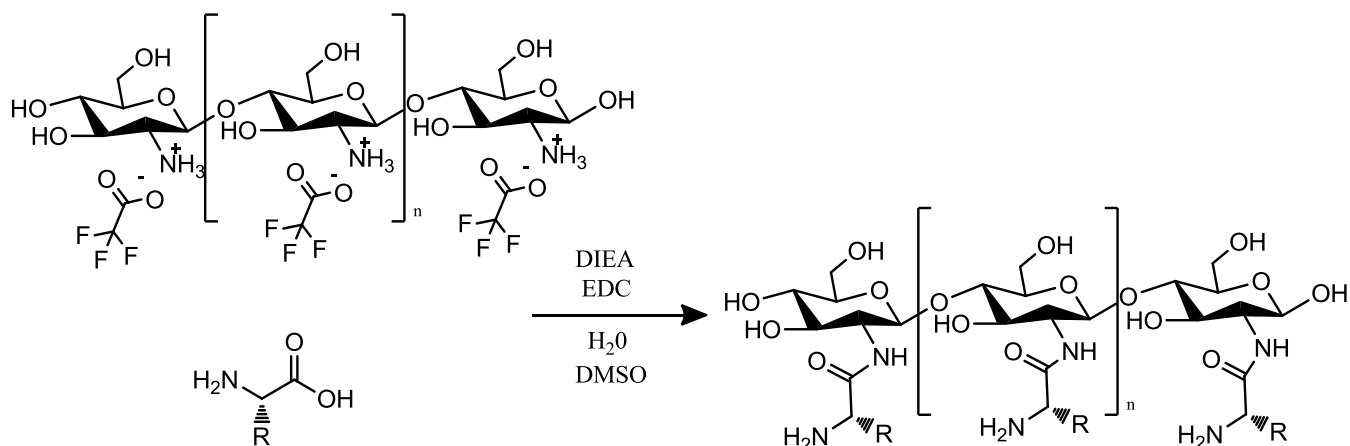
Por otro lado la obtención del dímero de *L*-cisteína **6** (esquema general 2) se inició con la obtención del carbamato **c** y aminoéster **d** de *L*-cisteína, los cuales se acoplaron vía anhídridos mixtos para obtener el dímero correspondiente **5** al cual se le realizó como último paso en la ruta sintética una hidrólisis en medio básico obteniendo el producto **6**.



Esquema general 2. Síntesis de *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-OH (6)

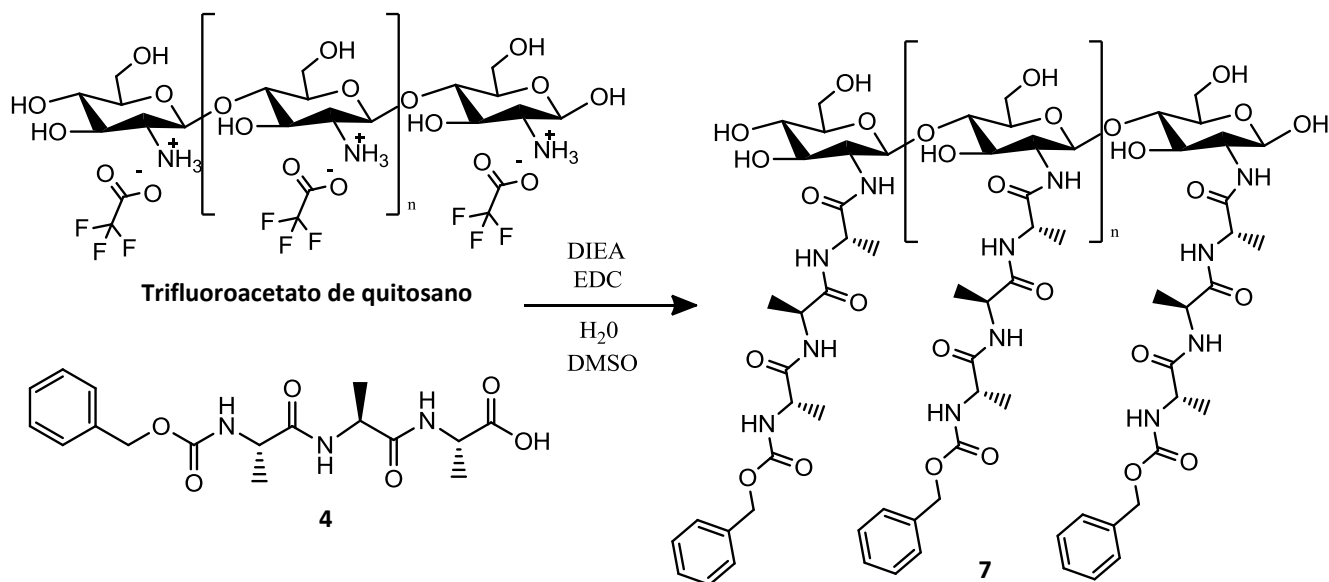
Estrategia Sintética; Síntesis de compuesto híbrido.

Una vez obtenidos los aminoácidos y péptidos objetos de este estudio se procedió con el acoplamiento entre el quitosano y los péptidos utilizando un agente acoplante. Para fines exploratorios se inicia con el acoplamiento con los carbamatos de *L*-alanina **a** y *L*-cisteína **c**, siguiendo la técnica descrita por Jayaraman [15], pero haciendo una significativa variación al utilizar CTS de alto peso molecular el cual ha demostrado tener mejores propiedades tanto morfológicas como biológicas, sin embargo, para emplear CTS de alto peso molecular en el presente trabajo se propone el uso de nanofibras de quitosano las cuales son solubles en agua al presentarse en forma de una sal (trifluoacetato de quitosano). La formación de esta sal se genera por la interacción del quitosano y el disolvente empleado en el proceso de electrospinning, el ácido trifluoroacético. Adicionalmente se emplea un medio neutralizante (base). De acuerdo a lo explicado anteriormente, la ruta sintética queda de la siguiente manera (esquema general 3):

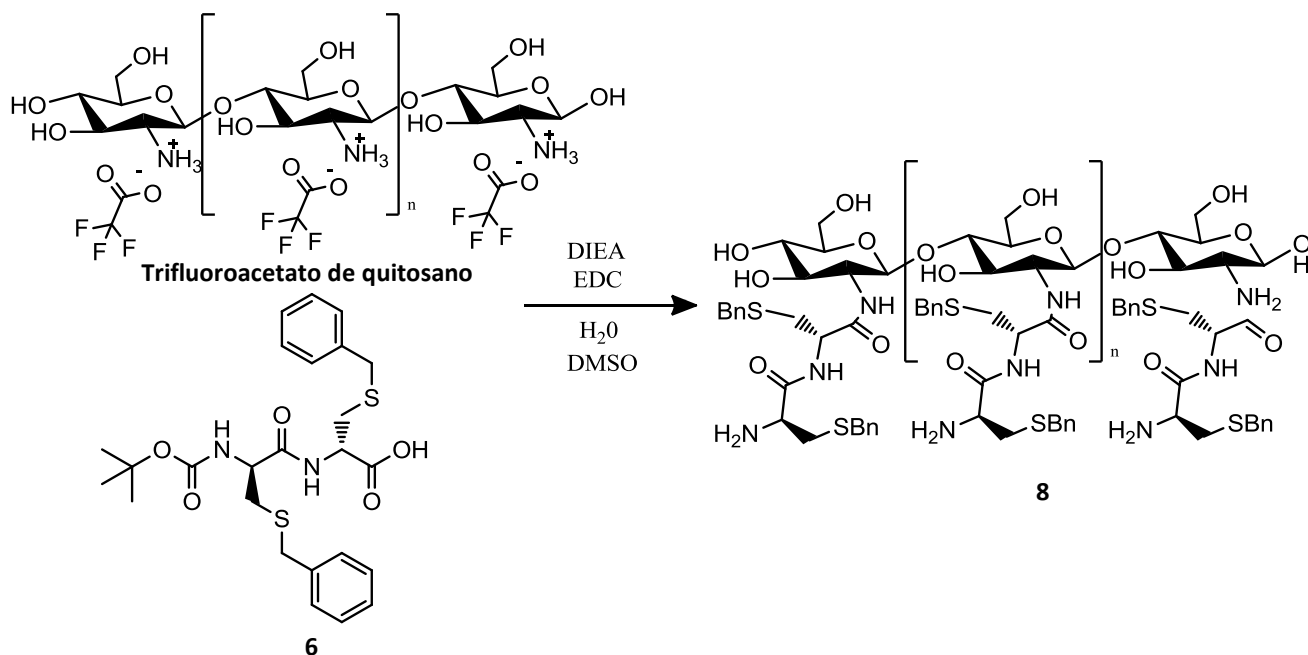


Esquema general 3. Síntesis de compuesto híbrido

Una vez que acoplados los carbamatos de los aminoácidos *L*-alanina **a** y *L*-cisteína **c** para dar lugar a los compuestos híbridos quitosano-aminoácido, se procede con la síntesis de los compuestos híbridos de *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**) y *S*-Bn-*L*-Cys-Cys-CTS (**8**), objetos de este trabajo, empleando la misma metodología descrita para los compuestos híbridos quitosano-aminoácidos. Por lo que se propone los siguientes esquemas de reacción:



Esquema 1. Síntesis del compuesto *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**)



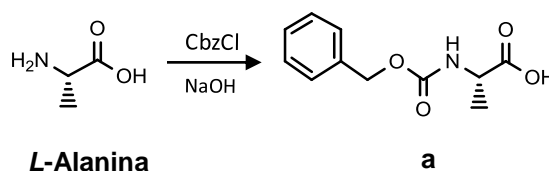
Esquema 2. Síntesis del compuesto S-Bn-L-Cys-Cys-CTS (**8**)



DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Síntesis de Péptidos

De acuerdo al objetivo del presente trabajo, se comenzó con la selección de los aminoácidos y grupos protectores de los péptidos a sintetizar. En cuanto a la obtención del trímero de *L*-alanina, el primer paso en la ruta sintética fue la protección del grupo amino de la alanina con cloroformiato de bencilo y como base NaOH, reaccionado a 0 °C con agitación por 24 h, obteniéndose cristales blancos con un punto de fusión de 72-74 °C, con un rendimiento de 85%.



Esquema 3. Preparación de *N*-Cbz-*L*-Ala-OH (**a**)

El espectro de RMN ¹H de este compuesto (figura 6), muestra en 9.00 ppm una señal característica de OH 12, en 7.30 ppm una señal múltiple característica aromáticos, confirmando la presencia del grupo protector Cbz que integra para 5 hidrógenos, en 5.15 ppm dos señales dobles asignadas al metileno 5 del grupo Cbz la cual integra para dos hidrógenos, en 4.40 ppm se observa una señal múltiple del metino 2 que integra para un hidrógeno y en 1.40 ppm una señal doble del metilo 3, la cual integra para tres hidrógenos.

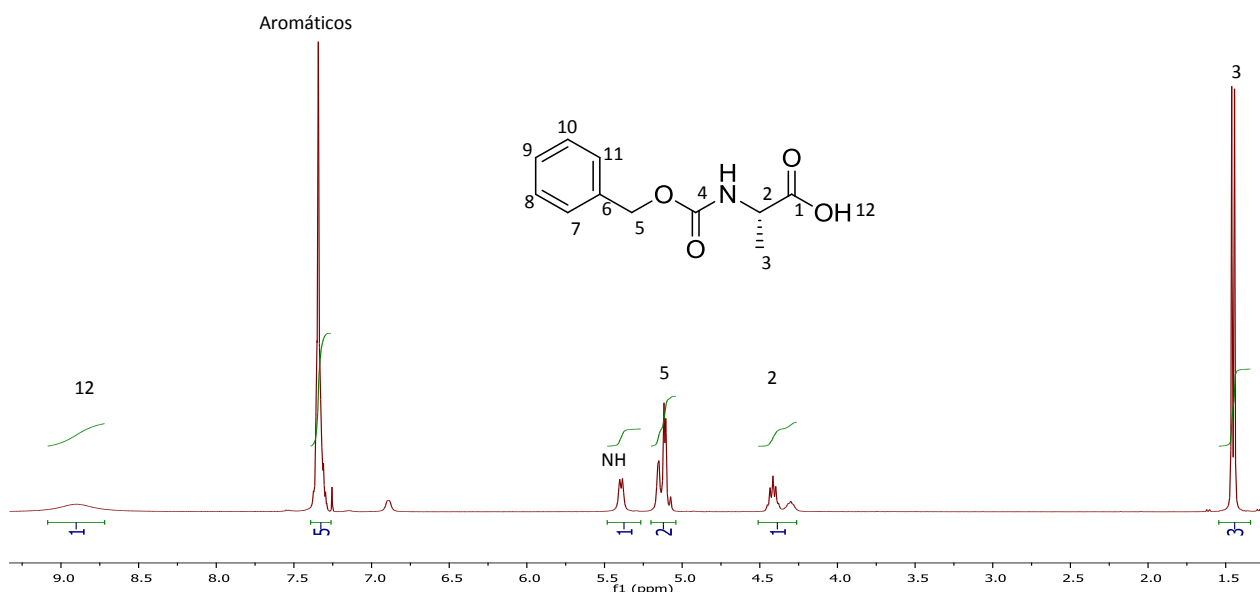
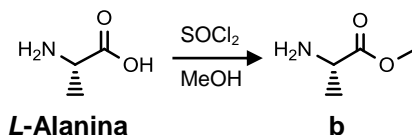


Figura 6. Espectro RMN ¹H de *N*-Cbz-*L*-Ala-OH (**a**) en CDCl₃

Por otro lado, la *L*-alanina se hizo reaccionar con metanol y cloruro de tionilo durante 24 horas a 0 °C en agitación, obteniendo el éster metílico **b** como cristales hidroscolpicos en forma de agujas con un rendimiento de 97%.



Esquema 4. Preparación de H₂N-*L*-Ala-OMe (**b**)

El espectro de RMN ¹H de este compuesto (figura 7), muestra en 4.10 ppm una señal cuádruple del metino 2 que integra para un hidrógeno, en 3.80 ppm una señal simple para el metilo 4 del éster que integra para tres hidrógenos y en 1.50 ppm una señal doble asignada al metilo 3 que integra para tres hidrógenos.

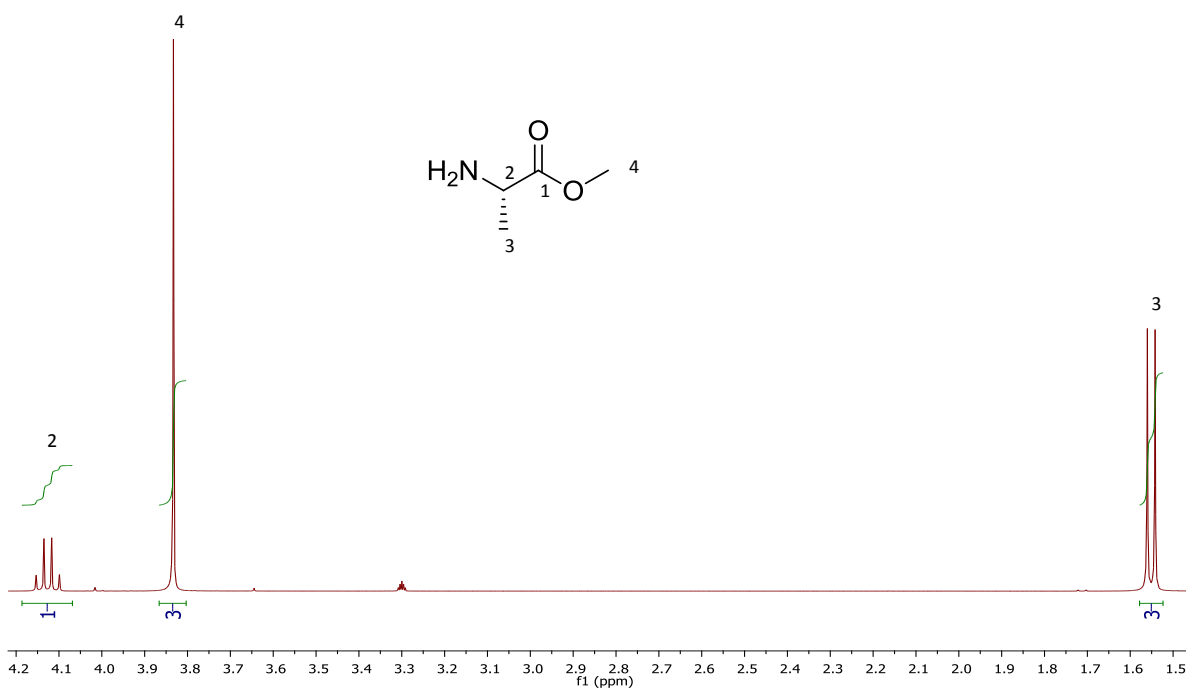
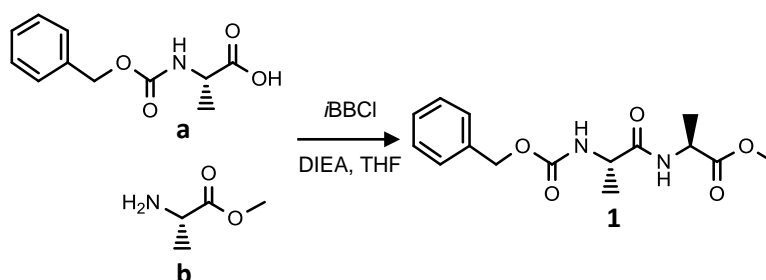


Figura 7. Espectro RMN ¹H de H₂N-*L*-Ala-OMe (**b**) en CD₃OD

Una vez obtenidos **a** y **b** se procedió al acoplamiento vía anhídridos mixtos, utilizando como agente activante el ácido carboxílico *iso*-butilcloroformiato (*i*BBCl), como base diisopropiletilamina (DIEA) y como disolvente tetrahidrofuran (THF), reaccionando durante

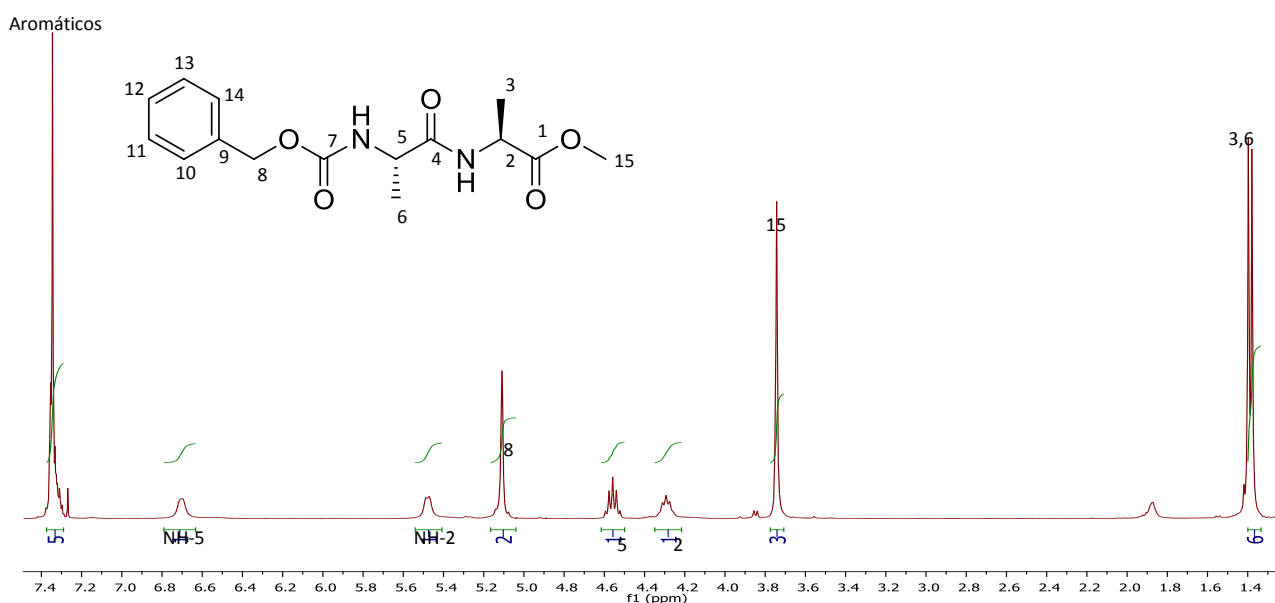


24 h a 0 °C, se obtuvieron cristales blancos con un punto de fusión de 84-86 °C, con un rendimiento de 87%.



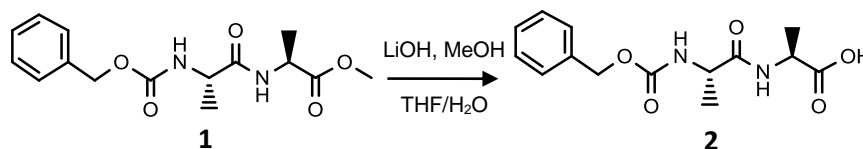
Esquema 5. Preparación de *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-OMe (1)

En el espectro de RMN ^1H de este compuesto (figura 8), se observa en 7.30 ppm una señal múltiple característica de los grupos aromáticos, debido a la presencia del grupo protector Cbz la cual integra para 5 hidrógenos, en 6.70 ppm una señal simple ancha característica de amida NH-5, en 5.50 ppm una señal simple ancha característica de amida NH-2, en 5.15 ppm una señal simple por la presencia del metileno 8 del grupo Cbz la cual integra para dos hidrógenos, en 4.60 ppm una señal múltiple para el metino 5 que integra para un hidrógeno, en 4.30 ppm una señal múltiple para el metino 2 que integra para un hidrógeno, en 3.70 ppm una señal simple por la presencia del metilo 15 del éster la cual integra para tres hidrógenos, en 1.33 ppm dos señales dobles con $J=7.9$ Hz por la presencia de los metilos 3 y 6, la cual integra para seis hidrógenos.

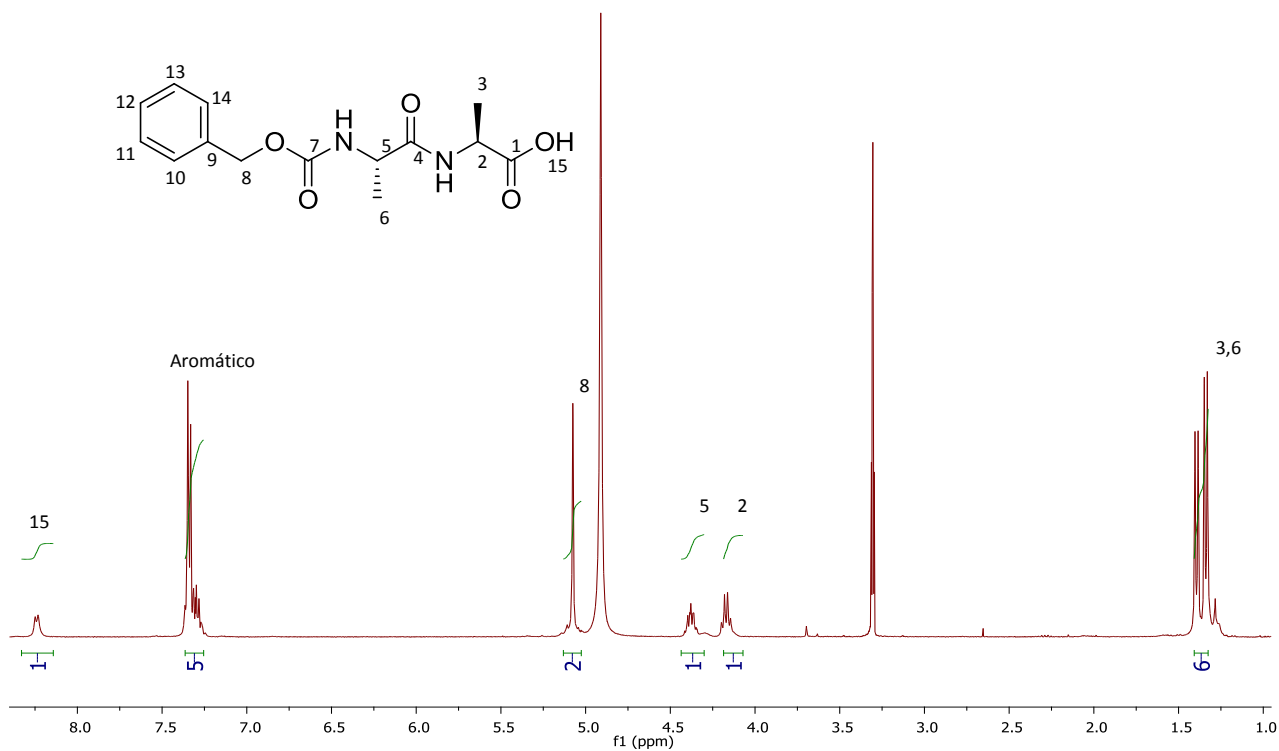


**Figura 8.** Espectro RMN ^1H del *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-OMe (**1**) en CDCl_3

El siguiente paso en la ruta sintética fue la hidrólisis de *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-OMe (**1**) en medio básico con hidróxido de litio (LiOH) y como disolventes THF, H_2O y MeOH, reaccionando por 4 h a 0°C , obteniendo un sólido blanco con punto de fusión $126\text{-}128^\circ\text{C}$ y un rendimiento de 85%.

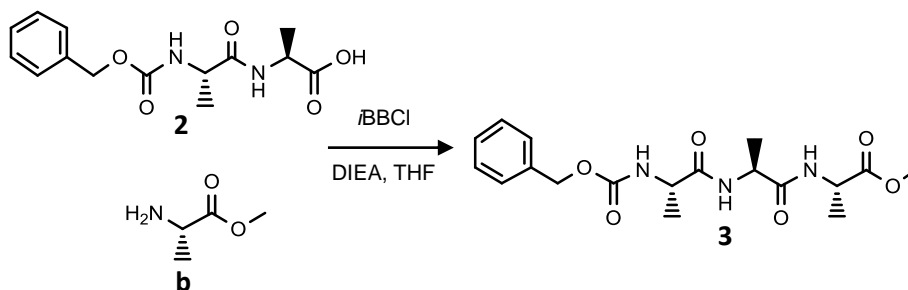
**Esquema 6:** Preparación de *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-OH (**2**)

En el espectro de RMN ^1H de este compuesto (figura 9) se observan las señales características del dipéptido *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-OMe (**1**), a excepción de la señal en 3.70 ppm del metilo del éster que no está presente, corroborando que la reacción de hidrólisis se llevó a cabo correctamente.

**Figura 9.** Espectro RMN ^1H dipéptido del *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-OH (**2**) en CD_3OD



Una vez obtenido *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-OH (**2**) se procedió a acoplarlo al fragmento **b**, vía anhídridos mixtos, como se muestra en el Esquema 7. El tripéptido *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OMe (**3**) se obtuvo en forma de cristales finos con un rendimiento de 57% y punto de fusión de 86-88 °C.



Esquema 7: Preparación de *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OMe (**3**)

El espectro de RMN ^1H de este compuesto (figura 10) exhibe en 7.30 ppm una señal múltiple característica de los grupos aromáticos, por la presencia del grupo protector Cbz la cual integra para 5 hidrógenos, en 7.10 ppm señal doble ancha característica de amida con $J = 6.5$ Hz de NH-8, en 6.90 ppm una señal doble ancha característica de amida con $J = 7.7$ Hz de NH-2, en 5.50 ppm señal doble de amida con $J = 7.1$ NH-5, en 5.10 ppm dos señales dobles con $J = 12.1$ de 11 del grupo Cbz la cual integra para dos hidrógenos, en 4.50 ppm una señal múltiple para los metinos 2 y 8 que integra para dos hidrógenos, en 4.20 ppm una señal múltiple para el metino 5 que integra para un hidrógeno, en 3.70 ppm una señal simple del metilo de éster 18 que integra para tres hidrógenos y en 1.40 ppm tres dobles traslapadas por la presencia de los metilos 3, 6 y 9, con $J = 7.2$ la cual integra para nueve hidrógenos.

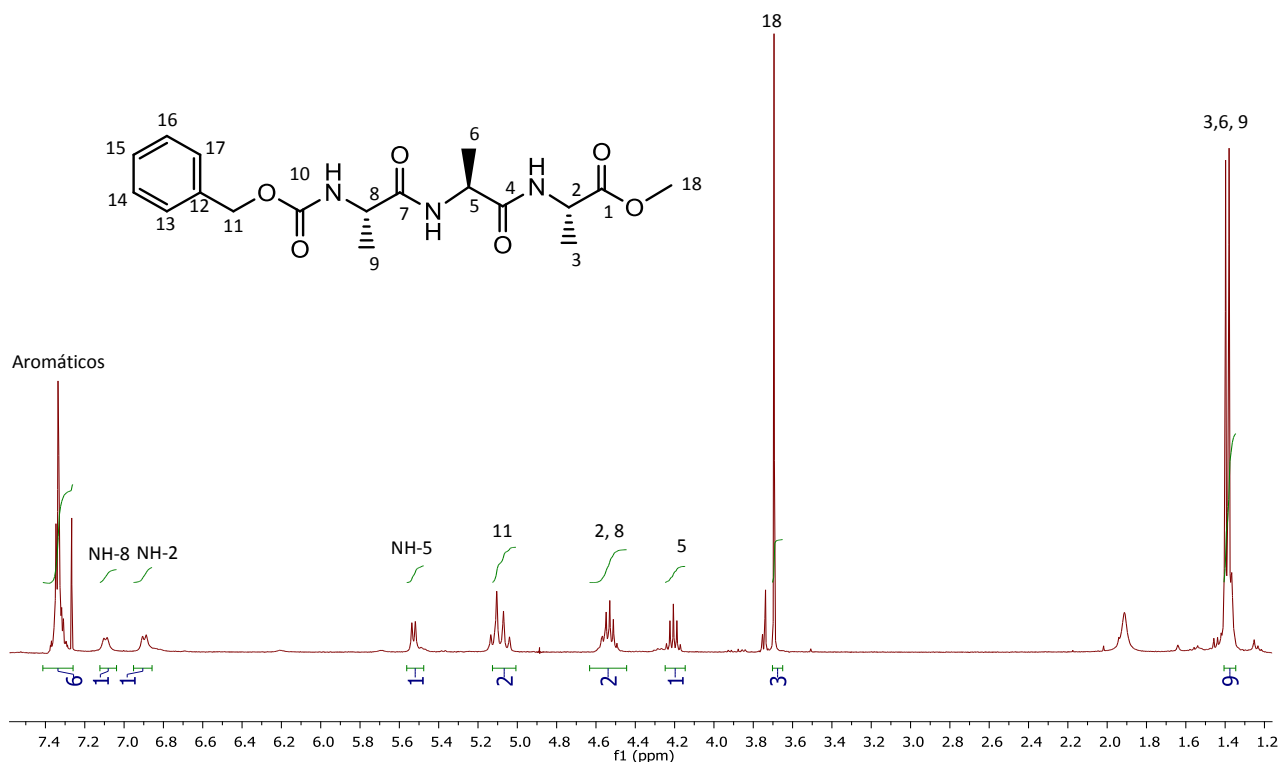
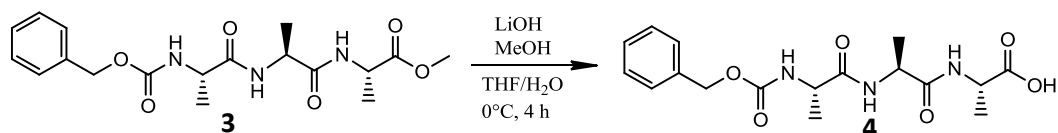


Figura 10. Espectro RMN ^1H del *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OMe (**3**) en CDCl_3

Una vez obtenido el trímero de *L*-alanina diprotegido, el siguiente paso en la ruta sintética fue la hidrólisis en medio básico con hidróxido de litio (LiOH), empleando como solventes THF, H_2O y MeOH, reaccionando por 4 h a 0°C .



Esquema 8. Preparación de *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OH (**4**)

En el espectro de RMN ^1H de este compuesto (figura 11) se observan las señales características del tripéptido *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OMe (**4**), a excepción de la señal en 3.70 ppm del metilo del éster la cual desaparece, corroborando que la reacción de hidrólisis se llevó a cabo correctamente.

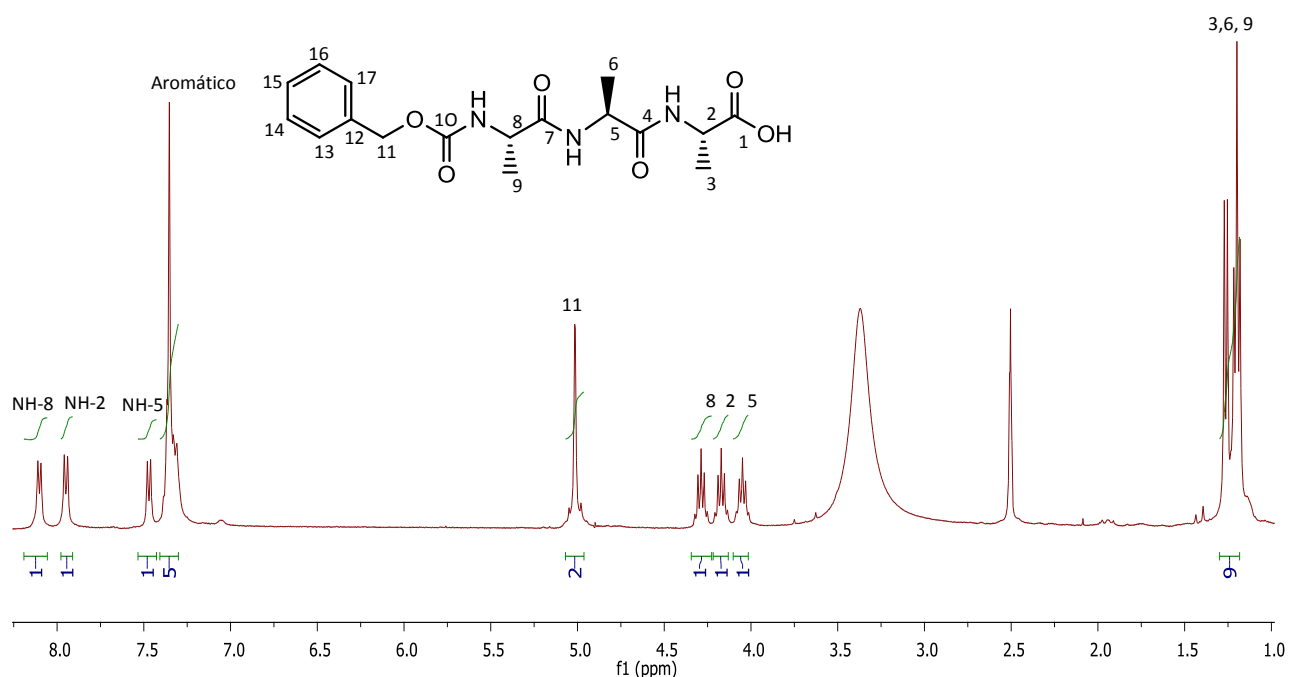
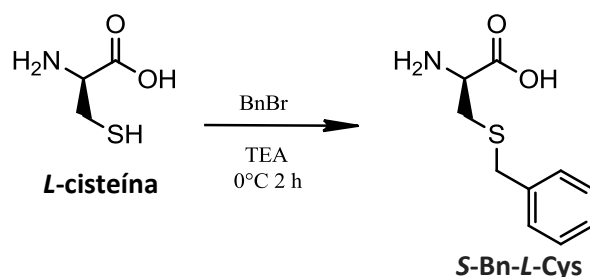


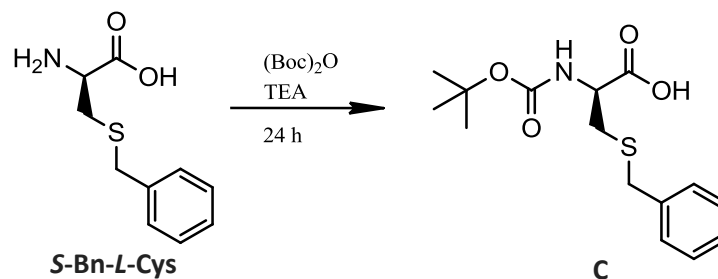
Figura 11. Espectro RMN ^1H del *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OH (**4**) en DMSO_d_6

En cuanto a la obtención del dímero de *L*-cisteína, el primer paso en la ruta sintética fue la bencilación de la *L*-cisteína, la reacción se llevó a cabo por medio de la adición de bromuro de bencilo (BnBr) y TEA a la *L*-cisteína, reaccionando por 2h a 0 °C; obteniéndose el producto como un polvo fino con punto de fusión de 218-220 °C, con un rendimiento 85%.



Esquema 9. Obtención de *S*-Bn-*L*-Cys

Una vez formado el tioéter de la *L*-cisteína el siguiente paso fue la formación del carbamato de *t*-butilo **d**, para lo cual se hizo reaccionar la *S*-Bn-*L*-cisteína con di-*t*-butil dicarbonato (Boc_2O), TEA como base, en una mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, a temperatura ambiente durante 48 h, obteniéndose el producto como una miel amarilla, con un rendimiento 95%.



Esquema 10. Obtención de *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-cisteína-OH (**c**)

En el espectro de RMN ^1H de este compuesto (figura 12) se observa en 7.26 ppm una señal característica de grupos aromáticos, del grupo protector bencilo, en 6.07 ppm señal simple ancha del OH 13, en 5.36 ppm la señal doble con $J= 7.3$ Hz NH, en 4.51 ppm una señal múltiple para el metino 2, en 3.74 ppm una señal simple para el metileno 4 que integra para dos hidrógenos, en 2.90-2.70 una señal doble de dobles para el metileno con $J= 16, 12$ Hz 3 que integra para dos hidrógenos, en 1.45 ppm una señal simple por la presencia de los metilos equivalentes de grupo Boc 12, 12' y 12'', la cual integra para nueve hidrógenos.

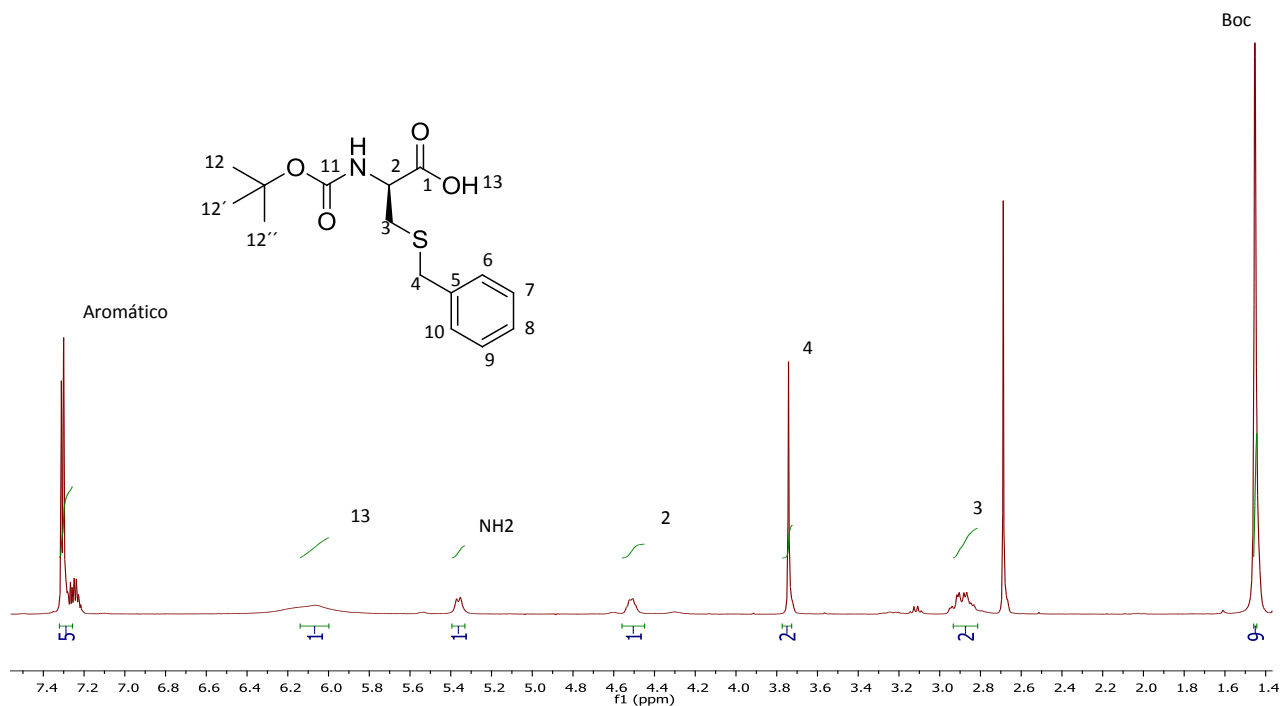
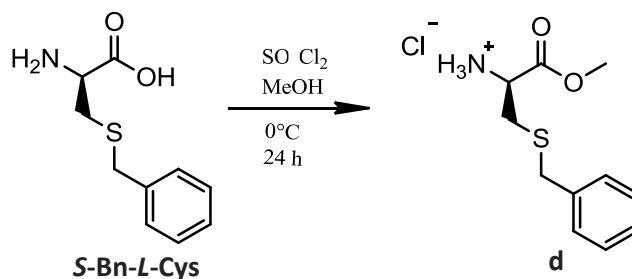


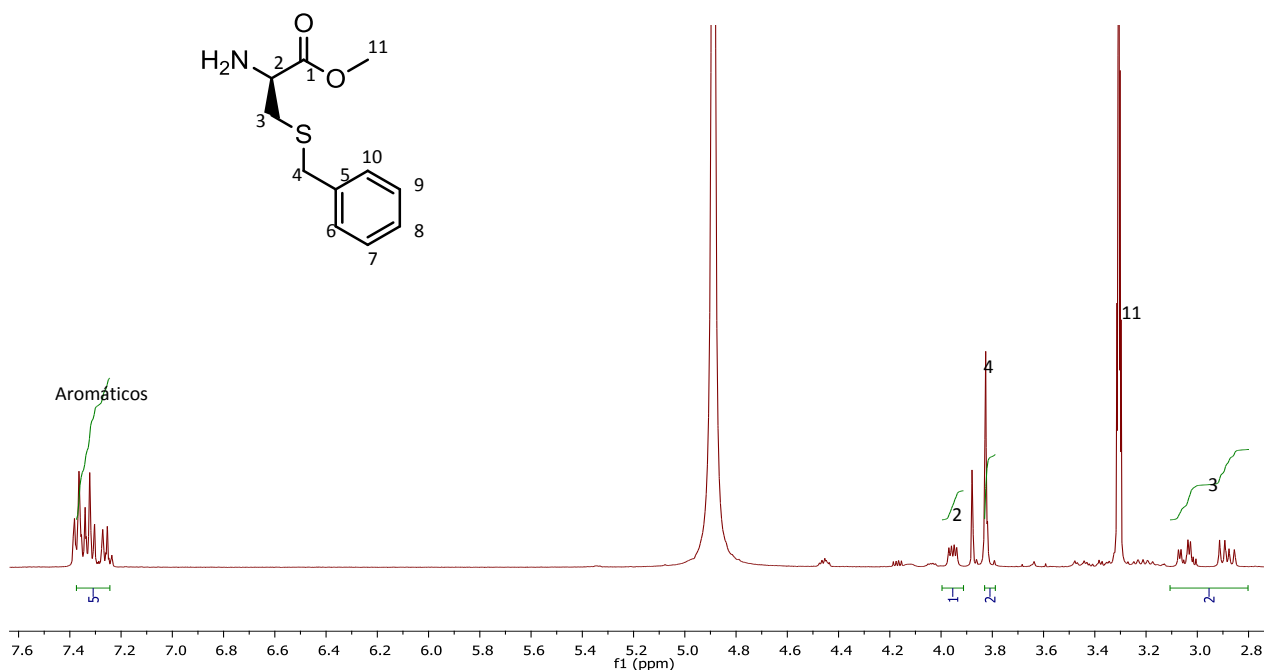
Figura 12. Espectro RMN ^1H de *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-OH (**c**) en CDCl_3

Por otro lado, la obtención del éster metílico de la *L*-cisteína **d** se llevó a cabo mediante la reacción con metanol y cloruro de tionilo a 0 °C, obteniéndose el producto como un polvo fino de punto de fusión de 188-190 °C, con un rendimiento de 65%.



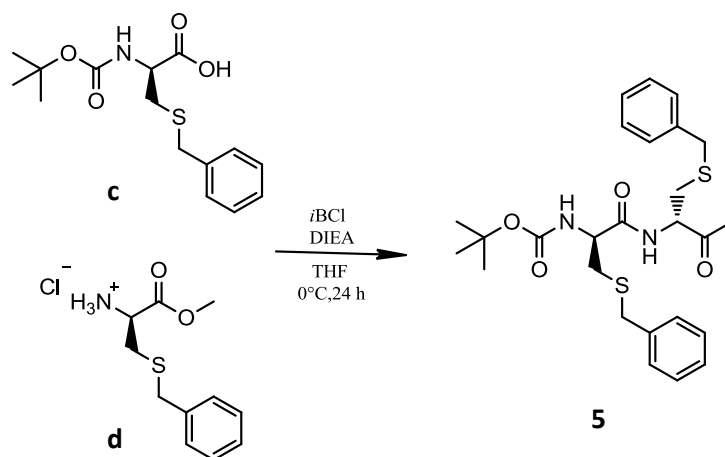
Esquema 11. Obtención de S-Bn-L-Cys-OMe (**d**)

En el espectro de RMN ¹H de este compuesto (figura 13) se observa en 7.31 ppm una señal característica de aromáticos, por la presencia del grupo protector bencilo, en 3.95 ppm una señal doble de dobles con $J = 8.2, 4$ Hz de 2 que integra para un hidrógeno, en 3.80 ppm una señal simple para el metilo 11 que integra para tres hidrógenos y en 2.88-2.70 una señal doble de dobles con $J = 14.8, 8.3$ Hz, para el metileno 3, que integra para dos hidrógenos.



**Figura 13.** Espectro RMN ^1H de *S*-Bn-*L*-Cys-OMe (**d**) en CD_3OD

Una vez obtenidos **c** y **d** se procedió a su acoplamiento vía anhídridos mixtos, utilizando como agente activante al *t*BBCl, como base DIEA y como disolvente THF, reaccionando durante 24 h a 0°C , el producto de la reacción fue una miel amarilla de olor característico.

**Esquema 12:** Obtención de *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-OMe (**5**).

El espectro de RMN ^1H del producto resultante (figura 14) se observa en 7.26 ppm una señal múltiple característica de los grupos aromáticos, por la presencia del grupo protector bencilo la cual integra para 10 hidrógenos, en 4.61 ppm una señal doble con $J= 6.7$ Hz para el metino 2 y 4.31 ppm una señal doble con $J= 4.1$ Hz para el metino 4, en 3.75 ppm una señal doble de dobles con $J= 8.1, 3.4$ Hz para los metilenos 6 y 6' que integra para 4 hidrógenos, en 3.30 ppm una señal traslapada para el metilo del grupo éster 15 y de 2.60 a 3.00 ppm un sistema de dos dobles de dobles para los metilenos 5 y 5' que integra para 4 hidrógenos y en 1.45 ppm una señal doble con $J= 5.2$ Hz que integra para 9 protones por el grupo protector Boc.

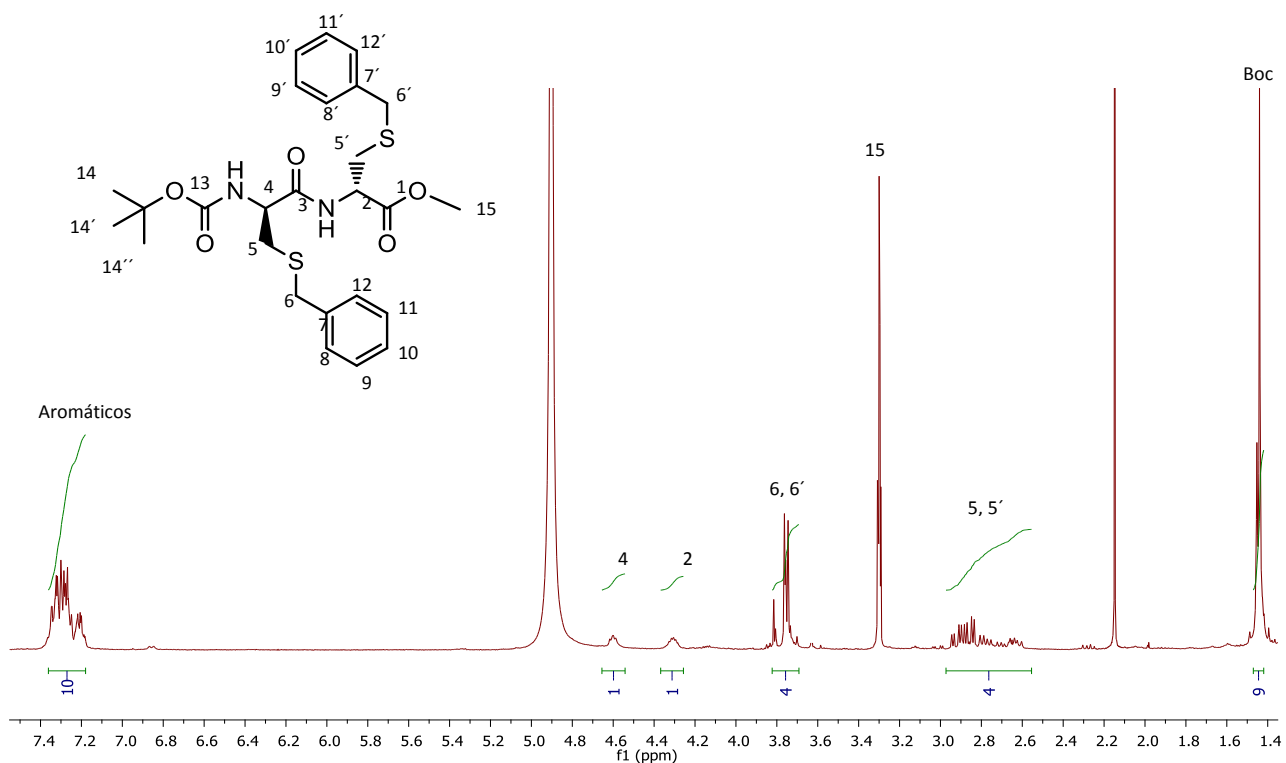
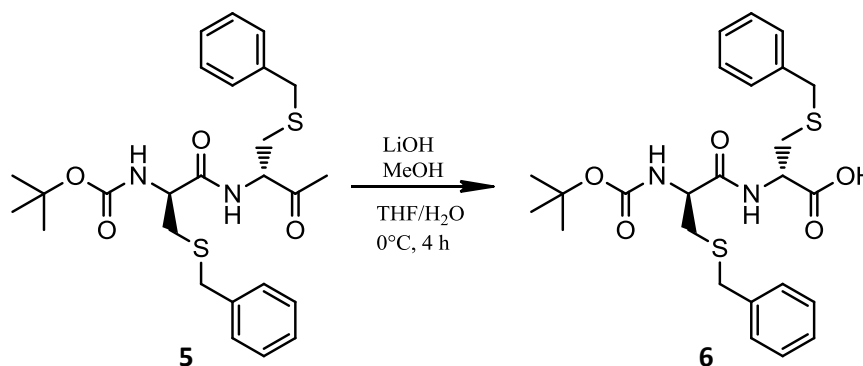


Figura 14. Espectro RMN ^1H de *S*-Bn-*L*-Cys-Cys-OMe (**5**) en CD_3OD

Una vez obtenido el dímero de *L*-cisteína diprotectado **5**, el siguiente paso en la ruta sintética fue la hidrólisis en medio básico con hidróxido de litio (LiOH) empleando como solventes THF, H_2O y MeOH, reaccionando por 4 h a 0°C .



Esquema 13. Obtención de *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-Cys-OH (**6**)



En el espectro de RMN ^1H de este compuesto (figura 15) se observan las señales características del dipéptido, además de apreciar que la señal de 3.30 ppm característica del éster metílico desaparece lo cual es una prueba de la hidrólisis de *N*-Boc-S-Bn-L-Cys-Cys-OMe (5).

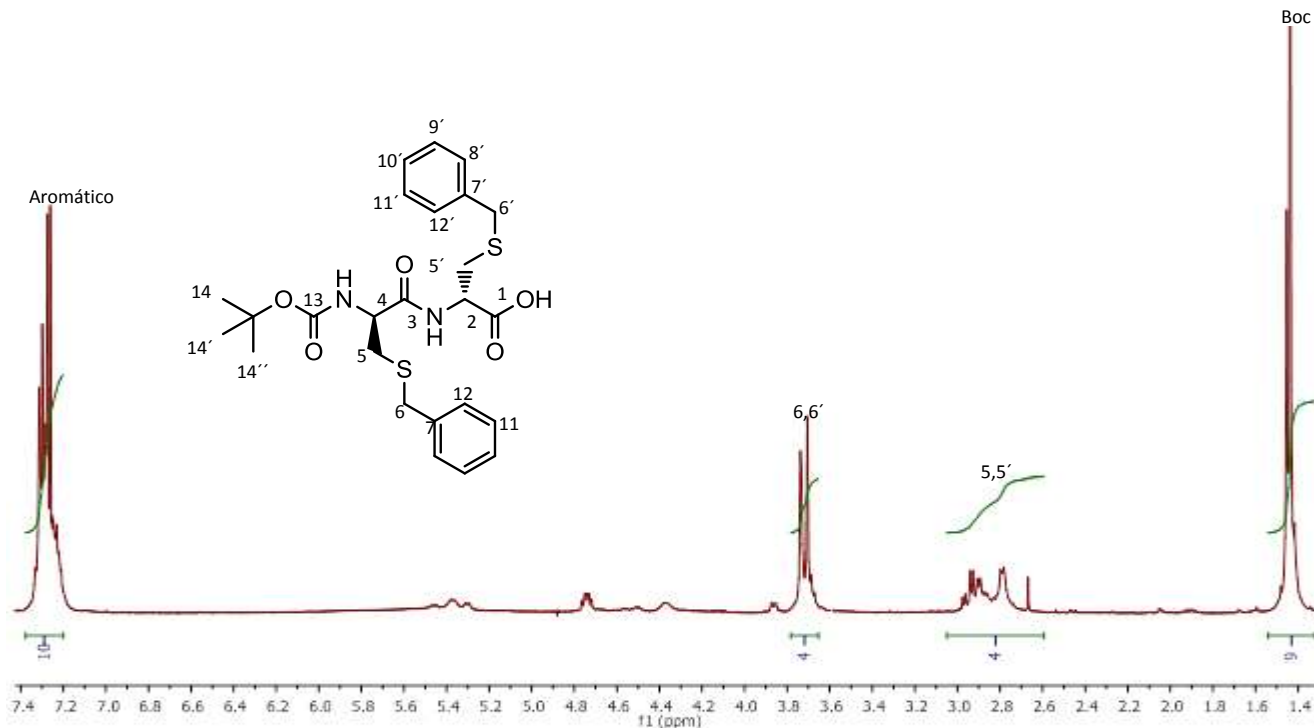


Figura 15. Espectro RMN ^1H de S-Bn-L-Cys-Cys-OH (6) en CDCl_3

Síntesis de Compuestos Híbridos

Una vez sintetizados los compuestos peptídicos, se llevó a cabo la síntesis y caracterización de los compuestos híbridos quitosano-peptídicos, las pruebas preliminares se realizaron con los aminoácidos *N*-protegidos tanto de *L*-alanina **a** como de *L*-cisteína **c**. Una vez obtenidos estos compuestos, se realizaron los acoplamiento peptídicos y se caracterizaron por IR. Adicionalmente, se comparó el efecto de los disolventes en la reacción de acoplamiento y finalmente, se realizó la caracterización mediante RMN de un compuesto híbrido en forma de nanofibras obtenido mediante el proceso de electrospinning.

La reacción de acoplamiento de los aminoácidos se realizó utilizando como medio de reacción la mezcla de disolventes $\text{DMSO}/\text{H}_2\text{O}$, como agente acoplante a la 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y empleando *N,N*-Diisopropiletilamina (DIEA) como medio neutralizante de las nanofibras de quitosano, esta mezcla de sometió a reacción a 0°C durante 3 h obteniéndose como producto una película quebradiza.



El producto resultante se caracterizó mediante espectroscopia de infrarrojo, utilizando la técnica de ATR. La figura 16 muestra un comparativo de los espectros IR de quitosano y el producto de reacción donde es posible observar diferencias importantes: en la banda de 2970 cm^{-1} se observa un cambio atribuido a la vibración de tensión (ν) C-H en específico por la presencia de metilos en el producto de reacción, en 1717 cm^{-1} se evidencia la aparición de una banda de ν C=O de éster por la presencia del carbamato de *L*-alanina, mientras que en las vibraciones en 1640 cm^{-1} y 1532 cm^{-1} se observan cambios significativos con un significativo aumento en su intensidad como un evidente desplazamiento. La primera señal corresponde a la vibración de ν C=O de amida y la segunda a la vibración de flexión (δ) N-H de amida, y sus cambios tanto en intensidad como en posición se atribuyen a la formación de enlaces amídicos entre los grupos NH_2 del quitosano y la *N*-Cbz-*L*-Ala, mientras que en 1061 cm^{-1} y 1026 cm^{-1} se observan señales intensas asociadas a ν de C-OH así como las de C-N. En base a estos cambios se propone que la interacción entre el quitosano y el compuesto híbrido *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (**7a**), se lleva a cabo mediante la formación de enlaces amida. La estructura del producto resultante se propone en el esquema 14 y en el espectro de la figura 16.

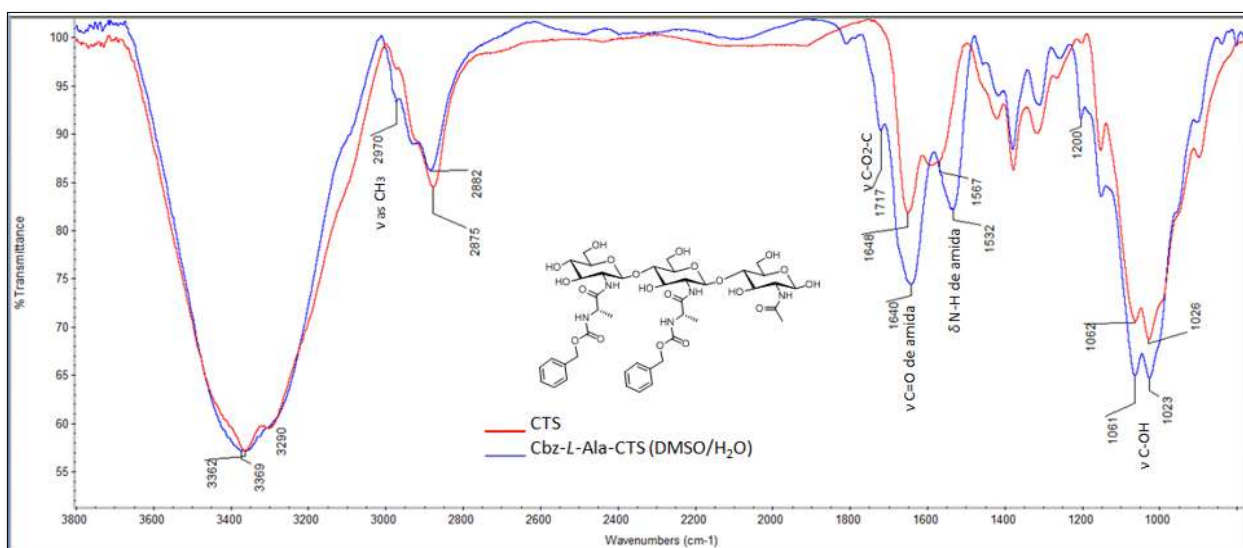
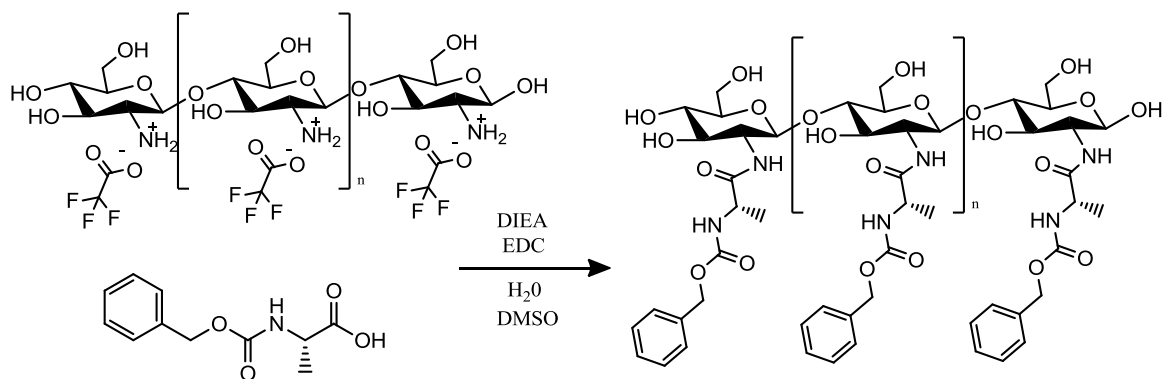


Figura 16. Espectro de FTIR *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (**7a**) vs CTS.



Esquema 14. Obtención de *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (**7a**).

La figura 17 muestra un comparativo de los espectros IR de quitosano y el compuesto resultante de la reacción entre el *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-OH (**c**) y el quitosano. Se observan diferencias importantes: la banda de 2977 cm^{-1} presenta un significativo incremento en la intensidad, así como un evidente desplazamiento lo cual es atribuido a la presencia de vibraciones ν C-H por la presencia de metilenos en la molécula en 1737 cm^{-1} se observa la aparición de una banda que corresponde a vibraciones ν C=O de éster lo que sugiere la formación de un enlace tipo éster entre el grupo carboxilo del aminoácido y los grupos oxidrilo del quitosano, a diferencia del compuesto formado entre el quitosano y la *N*-Cbz-*L*-Ala presentado anteriormente, las bandas de 1651 cm^{-1} y 1567 cm^{-1} atribuidas, la primera a vibraciones ν C=O de amida y la segunda a vibraciones δ N-H de amida no presentan cambios ni en posición ni en intensidad, por lo que se rectifica el acomplejamiento entre el quitosano y el *S*-Bn-*L*-Cys mediante la formación de enlaces tipo éster con los grupos oxidrilo del quitosano, descartando la formación de amidas con los grupos amino libres. Finalmente en 1062 cm^{-1} y 1026 cm^{-1} se observan señales intensas asociadas a ν de C-OH así como de C-N. En base a lo anterior, se propone la estructura mostrada en la figura 17 y el esquema 15.

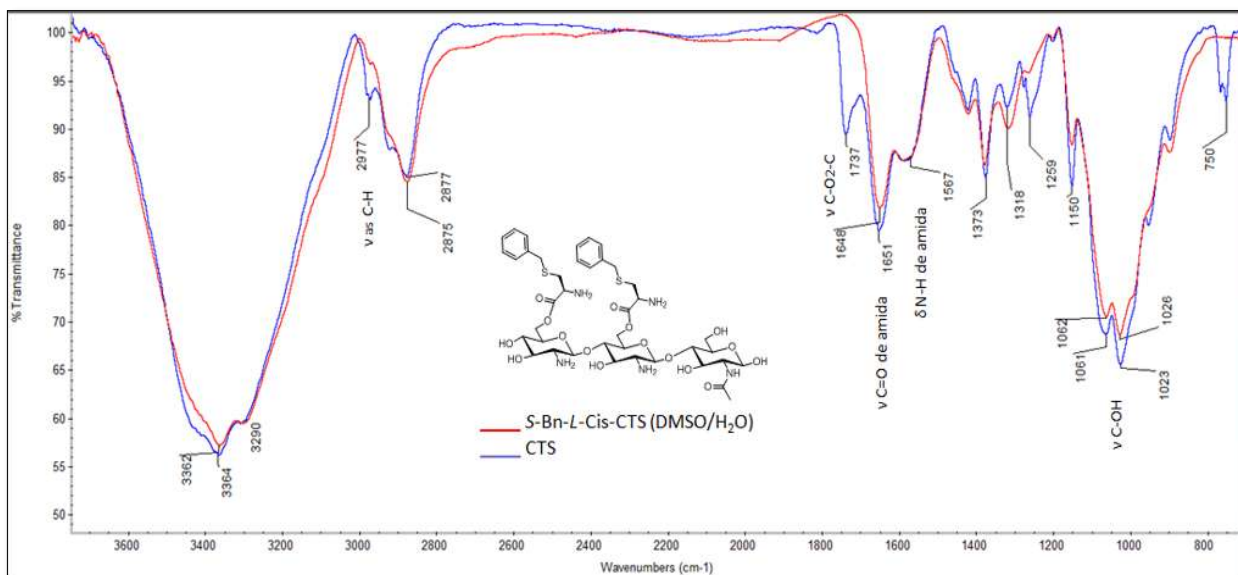
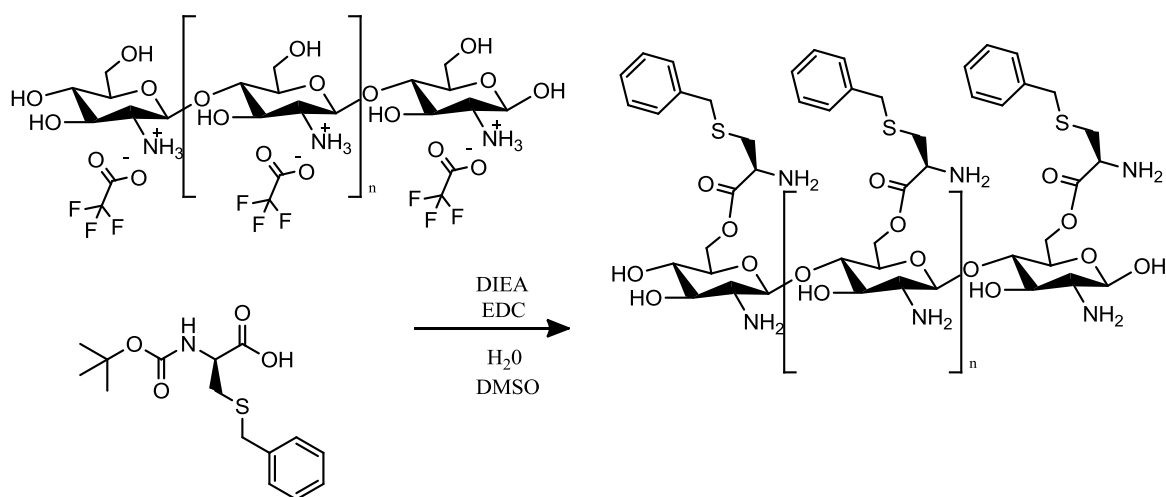
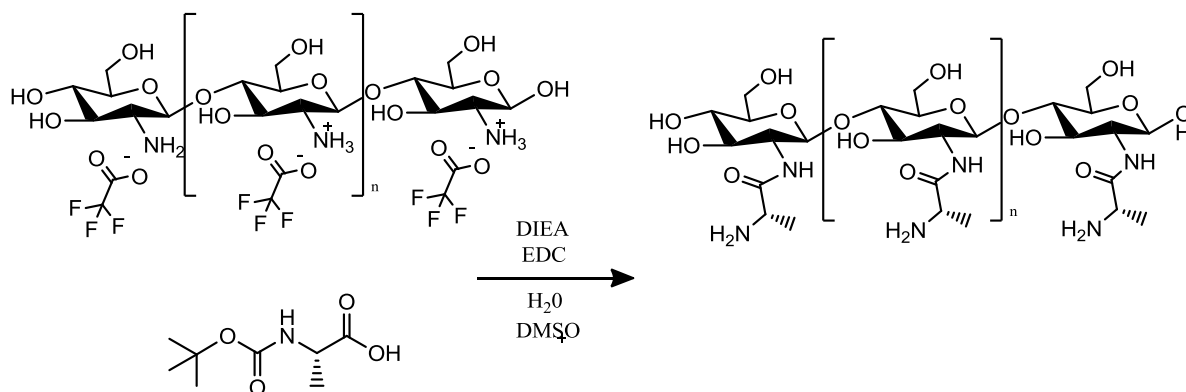


Figura 17. Espectro de FTIR S-Bn-L-Cys-CTS (8a) vs nanofibras de CTS



Esquema 15. Obtención de S-Bn-L-Cys-CTS (8a)

Adicionalmente se acomplejo *N*-Boc-*L*-Ala-OH a quitosano para corroborar la desprotección de grupo protector Boc en presencia del Trifluoroacetato de quitosano de acuerdo al esquema 16.



Esquema 16. Obtención de *L*-Ala-CTS (**7b**).

La figura 18 muestra un comparativo de los espectros IR del quitosano y del compuesto híbrido producto de su reacción con *N*-Boc-*L*-Ala. En la banda de 3362 y 3285 cm^{-1} hay un cambio de desplazamiento así como de intensidad por el cambio en las interacciones por puentes de hidrógeno, de 2927 cm^{-1} se observa un cambio atribuido por la presencia de vibraciones ν C-H, por la presencia de metilos en la molécula, las bandas de 1648 cm^{-1} y 1567 cm^{-1} atribuidas, la primera a vibraciones ν C=O de amida y la segunda a vibraciones δ N-H de amida sufren cambios de intensidad, desplazamiento y ensanchamiento, por lo que se rectifica el acomplejamiento por la formación de amidas con los grupos amino libres del quitosano, mientras que en 1060 cm^{-1} y 1027 cm^{-1} se observan señales intensas asociadas a ν de C-OH así como de C-N. De esta forma como producto de la reacción entre el quitosano y la *N*-Boc-*L*-Ala se propone la estructura mostrada en la figura 18 y el esquema 16.

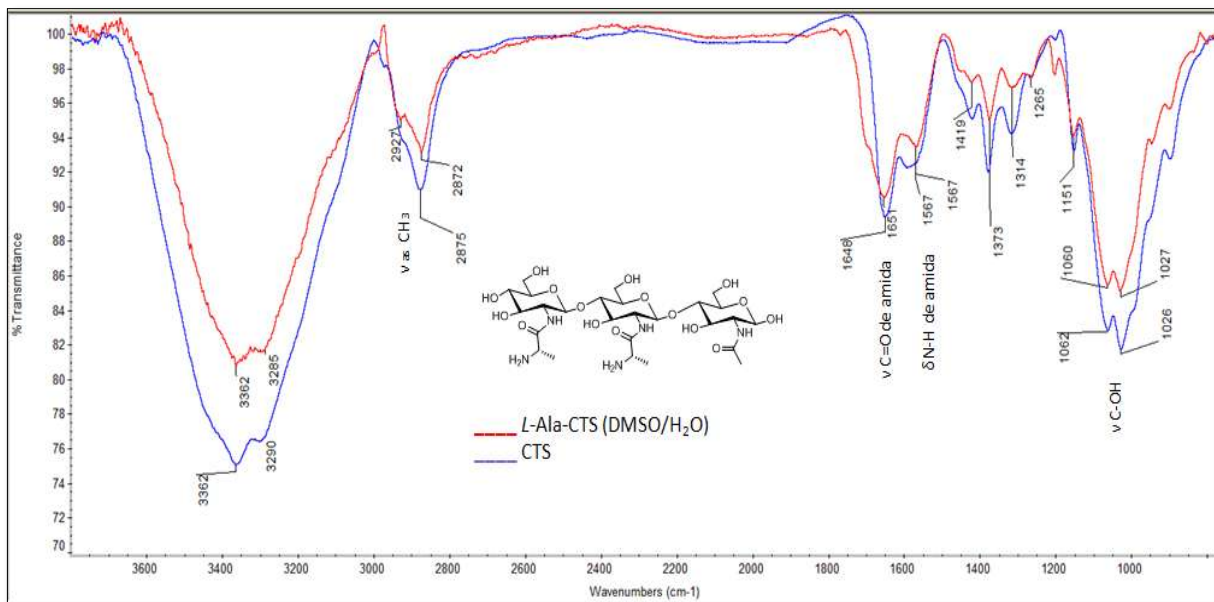


Figura 18. Espectro de FTIR *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (7b) vs CTS.

Una vez caracterizados los compuestos a base de los carbamatos de los aminoácidos, se procedió al acoplamiento con los péptidos (esquema 1). El compuesto resultante se caracterizó mediante espectroscopia de infrarrojo, utilizando la técnica de ATR. La figura 19 muestra un comparativo de los espectros IR de quitosano y el compuesto híbrido resultado de la reacción entre la *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OH (4) y el quitosano donde es posible observar diferencias importantes: la banda de 2971 cm⁻¹ presenta un cambio significativo en intensidad atribuido a la vibración ν C-H por la presencia de metilos en la molécula, en 1719 cm⁻¹ se observa la banda de vibración ν C=O de éster por la presencia del carbamato del péptido, mientras que las bandas de 1640 cm⁻¹ y 1532 cm⁻¹ correspondientes a vibraciones ν C=O de amida y a vibraciones δ N-H de amida respectivamente, presentan cambios evidentes en su intensidad y posición lo cual es atribuido a la formación de enlaces amídicos, mientras que en 1062 cm⁻¹ y 1026 cm⁻¹ se observan señales intensas asociadas a vibraciones ν C-OH así como de C-N. En base a estas observaciones, se propone la estructura mostrada en la figura 19 como producto de reacción entre el quitosano y la *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OH (4).

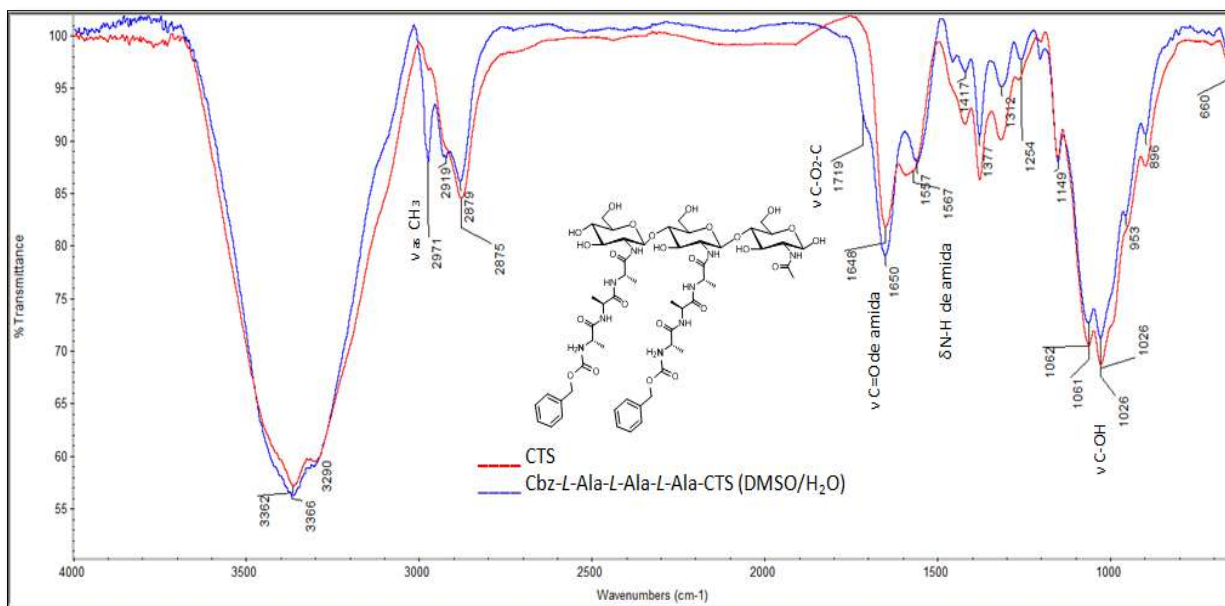


Figura 19. Espectro de FTIR *N*-Cbz-L-Ala-L-Ala-L-Ala-CTS (7) vs CTS.

Otra molécula objetivo de este trabajo es la *S*-Bn-L-Cys-L-Cys-CTS (8) para la cual se siguió la misma ruta sintética (esquema 2). El producto de reacción se caracterizó por espectroscopia de infrarrojo, utilizando la técnica de ATR. La figura 20 muestra un comparativo de los espectros IR de quitosano y el compuesto resultante donde es posible observar diferencias importantes: en las bandas de 2928 Y 2873 cm⁻¹ se observa un cambio atribuido a la presencia de vibraciones ν C-H por la presencia de metilenos y metinos respectivamente en la molécula, otras bandas que se ven claramente modificadas son las de 1648 cm⁻¹ y 1567 cm⁻¹ por vibraciones de ν C=O de amida y δ N-H en respectivamente presentan cambios significativos en intensidad, así como un evidente desplazamiento, esto se atribuye a la formación de enlaces amídicos, mientras que en 1062 cm⁻¹ y 1026 cm⁻¹ se observan señales intensas asociadas a vibraciones ν de C-OH así como de C-N. Con lo anterior, se propone la estructura mostrada en la figura 20.

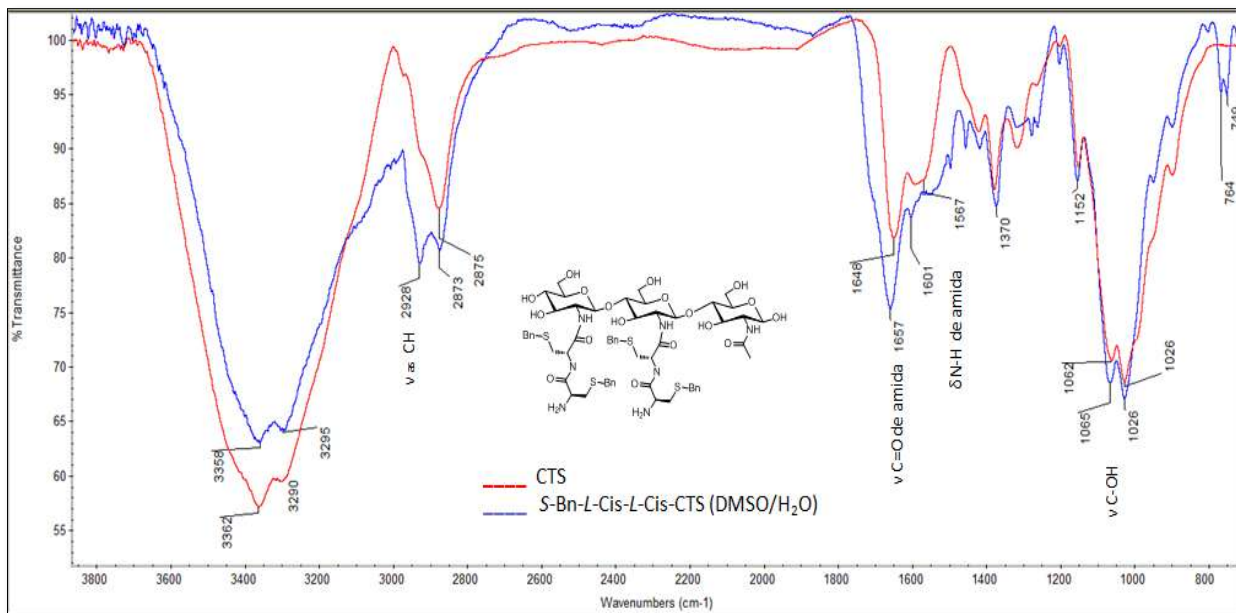


Figura 20. Espectro de FTIR S-Bn-L-Cys-L-Cys-CTS (**8**) vs CTS



PRUEBAS ADICIONALES

Una vez sintetizados los compuestos híbridos *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**) y *S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-CTS (**8**) objetivo del presente trabajo, se hicieron pruebas adicionales para confirmar lo observado en IR. Dichas pruebas se hicieron sobre y en base al compuesto híbrido *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (**7a**). Dentro de estas pruebas se incluyen el electrohilado de un compuesto híbrido *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (**8a**) así como su caracterización por RMN y el comparativo con nano fibras de CTS, sí bien las señales de RMN de compuestos poliméricos son complejas y difíciles de asignar, pueden arrojar información valiosa, de tal forma que para obtener información que pudiera ayudar corroborar la obtención del compuesto híbrido se hizo un comparativo entre nanofibras de quitosano y nanofibras del compuesto *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (**7a**), mismas que se obtuvieron por la técnica de electrospinning. Del análisis del espectro de RMN¹H se observa lo siguiente: a campo bajo en la región de los aromáticos se observa en 7.30 ppm una señal múltiple asociada a presencia del grupo protector Cbz, por otro lado en 4.10 ppm aparece una señal múltiple característica del metino de la alanina y en 1.20 ppm dos señales dobles con *J* de acoplamiento de 1.20 para cada señal característica de grupos metilos y la aparición de señales más angostas es indicativo de la presencia de especies de menor peso molecular.

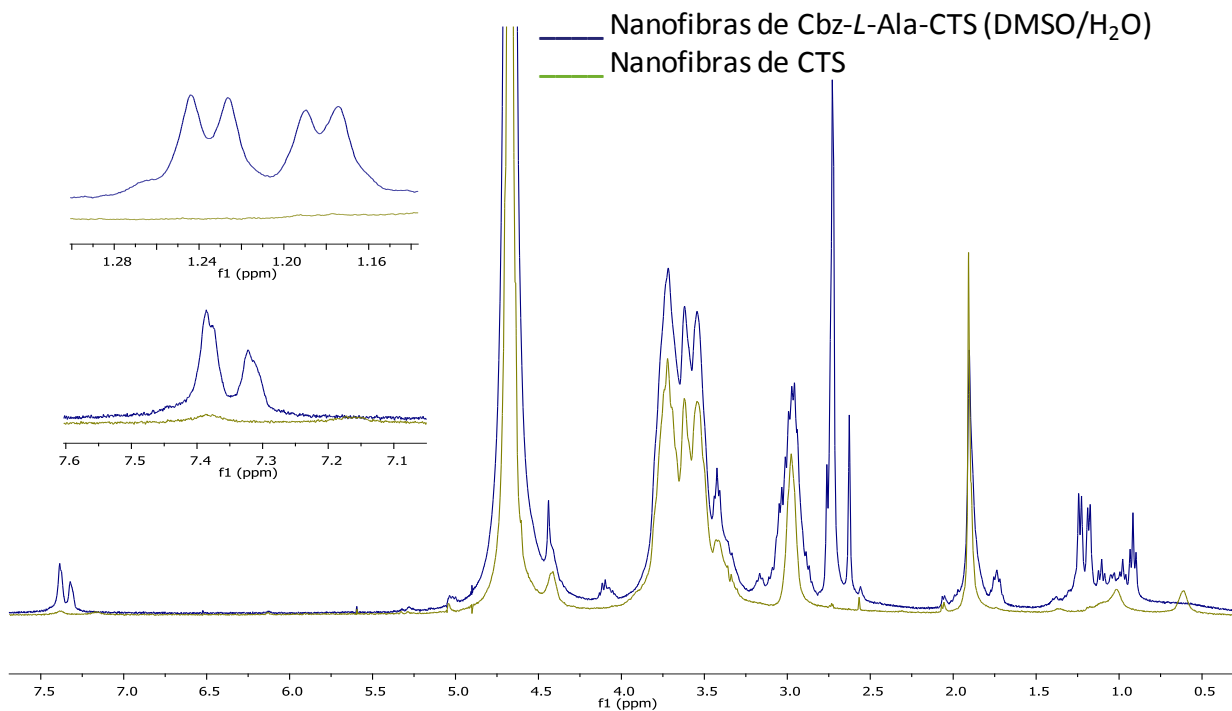


Figura 21. RMN ¹H comparativo de *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (**7a**) vs Trifluoroacetato de CTS en D₂O

También se compararon mediante IR las diferencias entre el compuesto *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (**7a**) producto de la reacción y las interacciones que se pudieran dar entre el CTS y la *N*-Cbz-*L*-Ala-OH (**a**) al ser solamente mezclados, es decir, sin ser acoplados. En la figura 14 se observa el comparativo de los espectros de IR; se evidencian dos especies totalmente diferentes, donde existen diferencias importantes: la banda de 3322 cm^{-1} se ve significativamente alterada en intensidad y desplazamiento, esta banda está asociada a vibraciones OH y NH₂ las cuales se presentan como una sola banda de gran amplitud debido a la formación de enlaces por puentes de hidrogeno, en la banda de 2934 cm^{-1} se observa un cambio atribuido a la vibración ν C-H sp³ en donde hay un cambio de intensidad y desplazamiento debido a la diferencia entre un compuesto que presenta solamente interacción electrostática y un compuesto con enlaces formales, en las bandas de 1693 cm^{-1} y 1532 cm^{-1} correspondientes a vibraciones ν C=O de amida y vibraciones δ N-H de amida respectivamente, se observan diferencias significativas entre los dos espectros; bandas más anchas con una mayor intensidad y un significativo desplazamiento en el espectro del compuesto híbrido en el que se propone la formación de un enlace formal, mientras que las vibraciones en 1061 cm^{-1} y 1023 cm^{-1} asociadas a vibraciones ν de C-OH y C-N experimentan diferencias considerables en su intensidad. Con base en las diferencias tan drásticas de los espectros de la mezcla sin acomplejar respecto del compuesto híbrido en el que se presume existe la formación de enlaces formales, se puede asegurar que se trata de dos productos totalmente diferentes, por lo que es otra prueba adicional que ayuda a ratificar lo propuesto en el presente trabajo.

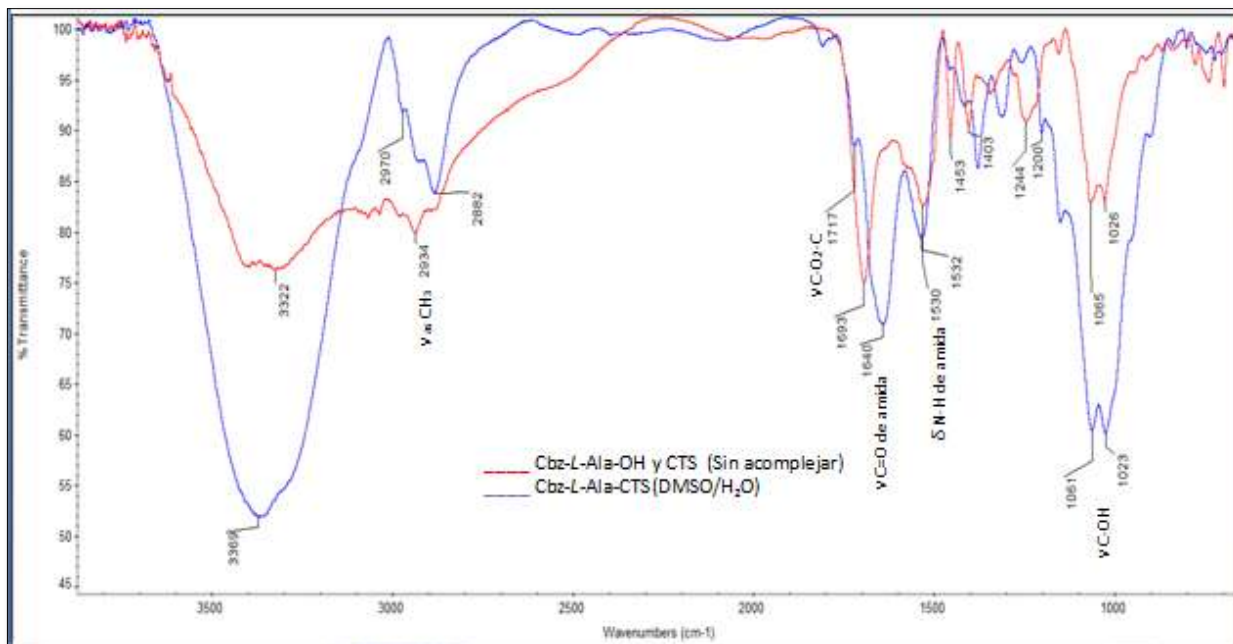


Figura 22. Espectro de FTIR *N*-Cbz-*L*-Ala-OH/CTS sin acoplar vs *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (**7a**).

Con el fin de estudiar el efecto del disolvente en la reacción de acomplejamiento, se utilizó como único medio de reacción DMSO haciendo un cambio a lo reportado por Jayaraman y colaboradores [15] quienes utilizan la mezcla DMSO/H₂O, el resultado de dicho cambio se analizó por espectroscopia de infrarrojo, utilizando la técnica de ATR. La figura 23 muestra un comparativo de los espectros IR empleando los diferentes disolventes. La banda de 3369 cm⁻¹ asociada al acomplamiento de vibraciones OH y NH₂, la cual se presenta como una banda ancha debido a la formación de puentes de hidrógeno, no presenta cambios aparentes, mientras que las bandas de 2925 cm⁻¹ y 2876 cm⁻¹ atribuidas a la ν C-H por la presencia de metilos en la molécula presentan ligeros cambios en su posición e intensidad, la señal en 1732 cm⁻¹ asociada a vibraciones ν C=O de éster por la presencia del carbamato de *L*-alanina mostró un cambio de intensidad y posición, esto posiblemente por la presencia de una mayor cantidad de moléculas de *N*-Cbz-*L*-Ala-OH en la cadena polimérica, las bandas de 1640 cm⁻¹ y 1532 cm⁻¹ asociadas a vibraciones ν C=O de amida y δ N-H de amida respectivamente, experimentan cambios significativos lo que sugiere la formación de enlaces amídicos, mientras que las bandas en 1061 cm⁻¹ y 1026 cm⁻¹ correspondientes a vibraciones ν de C-OH experimentan cambios de intensidad moderados. Es así que el cambio de disolvente pudiera tener como efecto la adición de un número mayor de moléculas de aminoácido a la cadena polimérica.

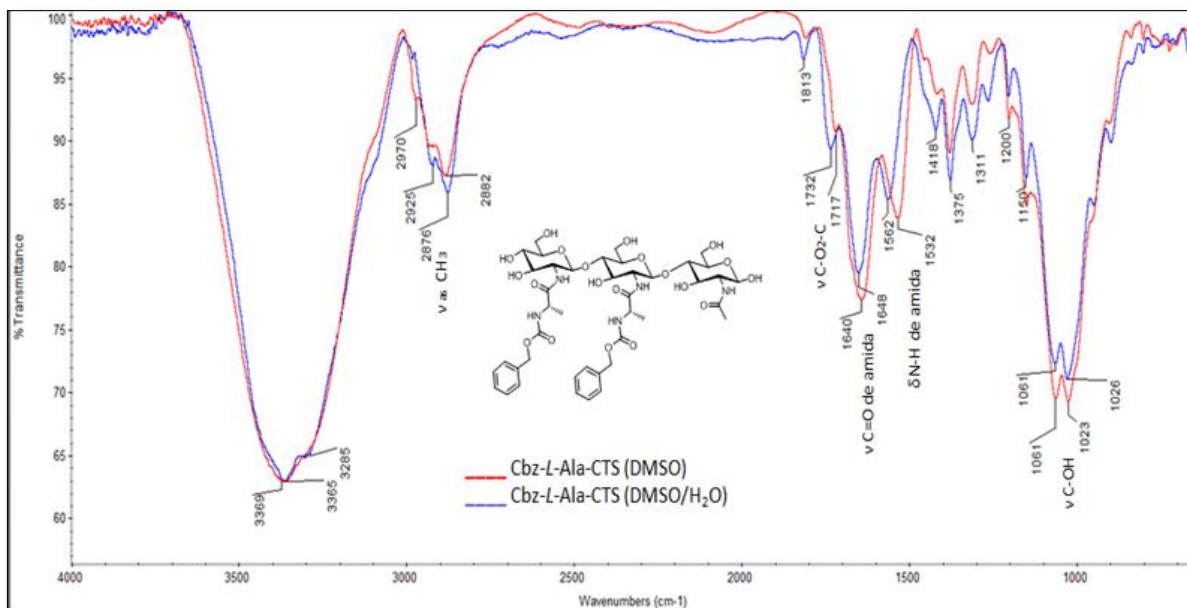


Figura 23. Espectro de FTIR *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (DMSO) vs *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (DMSO/H₂O)

Los materiales poliméricos son susceptibles a los cambios de temperatura, es decir sus propiedades y comportamiento varía en función de está, por lo tanto las técnicas de análisis térmico adquieren especial relevancia en estudios de caracterización de estos materiales.

El análisis termogravimétrico (TGA) es una técnica que mide el cambio en la masa de una muestra respecto al tiempo o a la temperatura mientras se somete la muestra a un programa de temperatura controlado en una atmósfera controlada y permite detectar procesos en los que se origina una variación de la masa tales como descomposiciones, sublimaciones, reducción, desorción y absorción, características particulares de cada compuesto analizado. En este trabajo se realizó un análisis térmico del quitosano, así como a los productos finales; los compuestos híbridos *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**) y *S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-CTS (**8**) con la finalidad de determinar posibles diferencias en el comportamiento térmico de ambos materiales que den pauta a su diferenciación.

La figura 24 muestra un comparativo del comportamiento termogravimétrico del quitosano y el compuesto híbrido *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**). Ambos componentes presentan un comportamiento similar el cual consiste en tres etapas: La primera pérdida de peso se registra al pasar de 30 °C hasta aproximadamente 100 °C con una disminución de un 9.5% de la masa total del quitosano y 3.5% del compuesto híbrido, esta disminución en la



masa se atribuye a la evaporación de humedad contenida en las muestras, la cual está presente debido a que el quitosano es un polímero que absorbe humedad del ambiente muy fácilmente. Generalmente en muestras de este tipo se considera que pueden contener agua “libre” y agua “ligada”. El agua “libre” se libera con gran facilidad y es precisamente la que corresponde a la eliminada en esta primera etapa, a través de este análisis se observa que el compuesto híbrido tiene una menor capacidad de absorción de humedad del ambiente por lo que difiere significativamente del comportamiento común del quitosano puro ante la humedad del ambiente. El mayor contenido de agua libre en el quitosano respecto del compuesto híbrido se debe a que en el quitosano hay una mayor cantidad de grupos amino disponibles para la formación de enlaces por puentes de hidrógeno con el agua, no así en el compuesto híbrido. Con este resultado es posible confirmar que los grupos amino del quitosano están ocupados formando enlaces amido con la *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OH (**4**), tal y como mostraron los resultados por el análisis de IR. La segunda etapa o pérdida de masa se presenta por la degradación térmica de la cadena polimérica del quitosano, en esta etapa el compuesto híbrido muestra significativas diferencias, en la gráfica se observa que la degradación térmica del quitosano ocurre en un rango de 275 a 320 °C perdiéndose un 53.5% de la masa total de la muestra, mientras que el compuesto *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**), presenta una disminución en la masa de un 40% en un rango de 240 °C a 280 °C, es decir, la temperatura de degradación térmica del compuesto híbrido es menor. Finalmente, en una tercera etapa se observa la combustión de carbono; para el quitosano a una temperatura superior a 320 °C y para el compuesto a base de alanina en 280 °C. Otro dato con significativa diferencia es la temperatura de calcinación, para el quitosano oscila entre los 350 °C, mientras que para el compuesto *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**) la muestra se calcina a 500 °C.

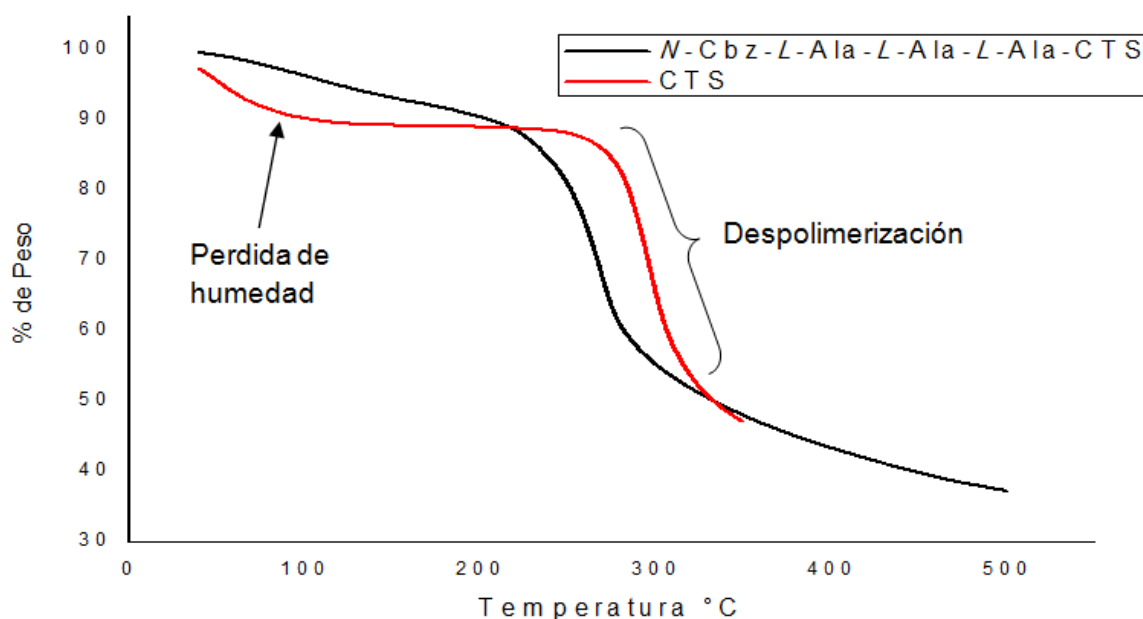


Figura 24. Gráfica TGA de *N-Cbz-L-Ala-L-Ala-L-Ala-CTS* (**7**) vs Quitosano.

También se obtuvo la curva de TGA comparativa del compuesto híbrido a base del dímero de cisteína **6** el cual se muestra en la figura 25. En este caso la humedad contenida en el quitosano puro corresponde a un 10% de la masa total mientras que el compuesto híbrido su contenido es del 5%. Nuevamente se verifica un contenido diferente de agua libre lo que ratifica la ocupación de los grupos amino del quitosano al formar enlaces tipo amida con el dímero de cisteína. Por otra parte, la degradación de la cadena polimérica del quitosano y el compuesto híbrido muestra se presenta a diferentes temperaturas; para el caso del quitosano ocurre en un rango de 275 °C a 320 °C con una pérdida de más de 53.5% y el compuesto se encuentra en un rango de 220 °C a 278 °C perdiéndose un 37% de la masa total de la muestra. La combustión de carbono en el quitosano se presenta por encima de 320 °C, mientras que en compuesto a base de cisteína es por encima de 278 °C. Otro dato con significativa diferencia es la temperatura de calcinación, las cual en quitosano es cercana a 350 °C, pero la del compuesto *S-Bn-L-Cys-L-Cys-CTS* (**8**) es cercana a 500 °C.

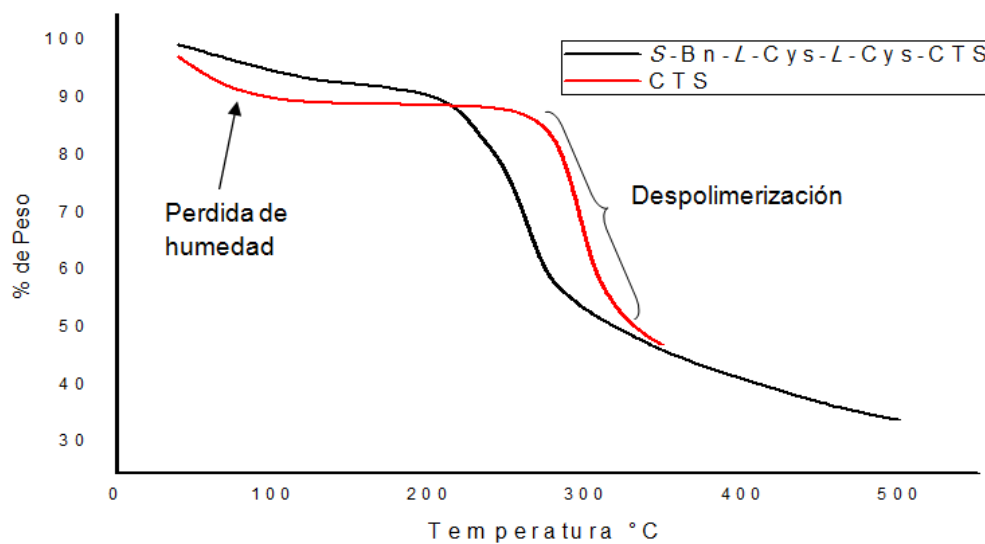


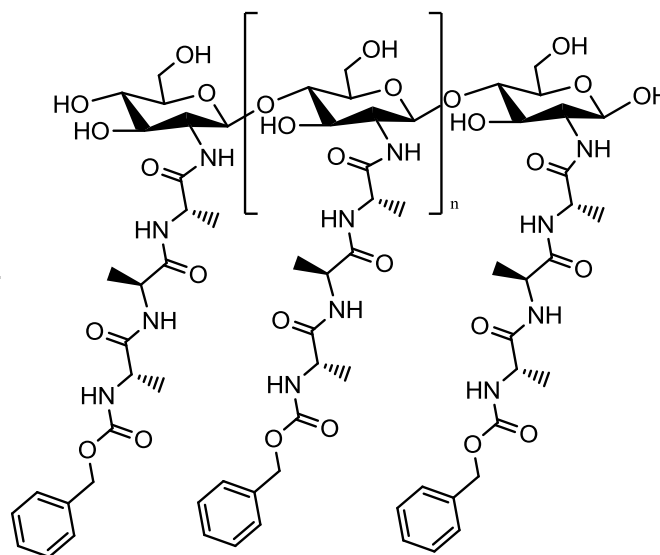
Figura 25. Gráfica TGA de S-Bn-L-Cys-L-Cys-CTS (**8**) vs Quitosano.

A través de estos resultados, es posible corroborar la modificación de las cadenas de quitosano por la formación de los compuestos híbridos propuestos.

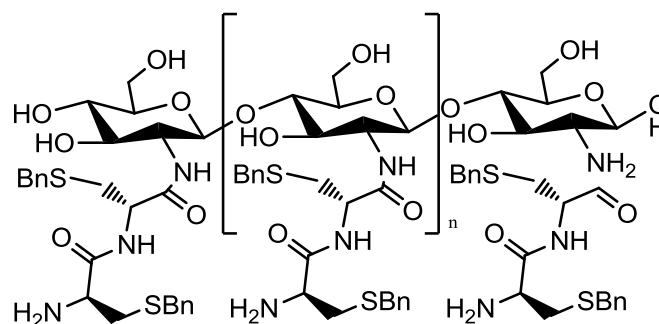


CONCLUSIONES

Se sintetizaron exitosamente los compuestos quitosano-peptídicos *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**) y *S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-CTS (**8**) objetivo del presente trabajo, los cuales fueron caracterizados mediante espectroscopia de infrarrojo, utilizando la técnica de ATR. A través del análisis referido es posible proponer las siguientes estructuras:



N-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**)



N-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-CTS (**8**)

A través del análisis RMN¹H del compuesto *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (**7a**), fue posible ratificar que la síntesis origina la formación de un enlace entre los aminoácidos o péptidos con el quitosano.

Se realizaron modificaciones a la técnica propuesta por Jayaraman [15], utilizando CTS de alto peso molecular que ha probado tener mejores propiedades biológicas y morfológicas. De esta forma, por primera vez se reporta el uso de nanofibras de CTS solubles en agua en una ruta de síntesis de compuestos de esta naturaleza.

Los compuestos quitosano-aminoácidos: Cbz-*L*-Ala-CTS (**7a**) y *S*-Bn-*L*-Cys-CTS (**8a**) que resultaron de pruebas preliminares, así como los compuestos quitosano-peptídicos *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-CTS (**7**) y *S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-CTS (**8**), no han sido descritos en la literatura empleando está o alguna otra forma de síntesis.



PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades

El material de laboratorio utilizado se lavó y se enjuagó con isopropanol, posteriormente se secó en la estufa por 24 horas.

Los reactivos de partida se adquirieron en Sigma-Aldrich. Los disolventes utilizados (AcOEt, Hex, MeOH, CH₂Cl₂), se destilaron antes de su uso.

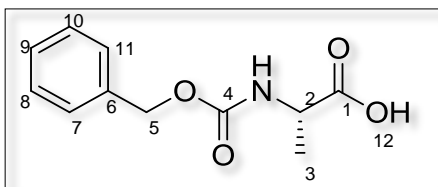
Los compuestos se purificaron por cromatografía de columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice 230-400 Mesh y como sistema eluyente el indicado en cada caso. El monitoreo de las reacciones se realizó por medio de cromatografía en capa fina (CCF) sobre placas de gel de sílice 60-F254 y se revelaron utilizando radiación ultravioleta y vapores de yodo.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (¹H, ¹³C, HETCOR, COSY y DEPT) se obtuvieron en un equipo Varian Mercury Plus 400. El desplazamiento químico se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (*J*) se describen en Hertz (Hz), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los disolvente utilizados para la obtención de los espectros fueron cloroformo deuterado (CDCl₃), metanol (CD₃OD) y dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-*d*₆).

Los puntos de fusión, fueron determinados utilizando el método de Fisher en un equipo Fisher-Johns modelo 4121 y no están corregidos.

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un equipo Mettler Toledo modelo TGA/SDTA 851e, con una masa inicial de muestra de ca. 3 mg en un portamuestra de aluminio en atmosfera de argón, con un velocidad de flujo de 75 mL/min y velocidad de calentamiento de 10°C/min.

La caracterización del compuesto híbrido quitosano-peptídicos se realizó por Espectroscopia de Infrarrojo, en un espectrómetro Nicolet iS10 marca Thermo Scientific utilizando la técnica de ATR.



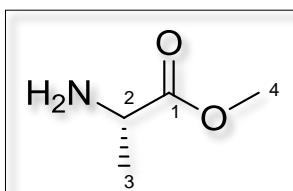
N-Cbz-L-alanina-OH (a)

En un matraz provisto de agitación magnética se suspendió 1.0 g de *L*-alanina (11.36 mmol) en 45 mL de una solución de NaOH 1N a 0 °C, posteriormente se adicionaron 1.8 mL (12.32 mmol) de clorocarbato de bencilo (CbzCl) manteniendo el pH de la reacción en 10. Dejando reaccionar por 24 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, la fase acuosa se lavó con CH₂Cl₂ para extraer el CbzCl remanente, y la fase acuosa se acidificó con HCl 1N hasta pH de 4, posteriormente se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por recristalización en un sistema de disolventes hexano/AcOEt obteniéndose 2.153 g del producto **a**, en un rendimiento del 85% y un punto de fusión 72-74 °C.

RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 1.45 (d, *J*= 7.2 Hz, 3H, 3), 4.41 (m, *J*= 7.1 Hz, 1H, 2), 5.11 (2d, 2H, 5), 5.36 (d, *J*= 20.8 Hz, 1H, NH), 7.10-7.30 (m, 5H, 7 al 11) 8.27 (s.a, 1H, 12).

RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz) δ (ppm): 18.5 (C3), 50.3 (C2), 66.9 (C5), 128.07, 128.09, 128.48 (C7-C11), 136.13 (C6), 155.87 (C4) 173.13 (C1).

[α]²⁰_D -21.08, [C = 10mg/ML, MeOH]



H₂N-L-alanina-OMe (b)

En un matraz balón provisto de agitación magnética y en baño de hielo, se adicionó 1.0 g de *L*-alanina (11.36 mmol) disuelto en 10 mL de MeOH, posteriormente se adicionaron lentamente 0.82 mL (11.36 mmol) de cloruro de tionilo (SOCl₂) y se dejó en agitación por 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó el disolvente en el rotavapor a vacío, empleando una trampa de hidróxido de sodio para neutralizar los vapores del HCl adicionando CH₂Cl₂. El producto se purificó por recristalización con MeOH. Se obtuvieron 1.538 g en forma de cristales blancos con aspecto de algodón hidróscopico, en un rendimiento del 97%.

RMN de ¹H (CD₃OD, 400 MHz) δ (ppm): 4.13 (c, *J*= 7.20, 2H, 2), 3.83 (s, 3H, 4), 1.55 (d, *J*= 7.20, 3H, 3)

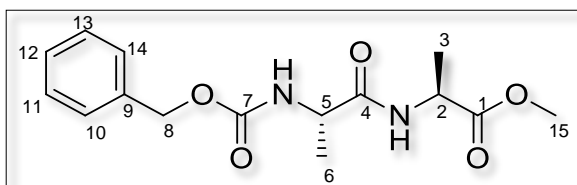
RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) δ (ppm): 16.21 (C3), 49.84 (C2), 53.75 (C4), 171.42 (C1).

Procedimiento general de acoplamiento de aminoácidos vía anhídridos mixtos.

Mezcla A: En un matraz balón provisto de agitación magnética bajo corriente de nitrógeno se adicionaron 1.1 equivalentes del aminoácido O-prottegido en THF/DMSO a una concentración de 0.2 M, posteriormente se adicionaron 2.5 equivalentes de diisopropiletilamina (DIEA), se dejó en agitación por un periodo de 30 min a temperatura ambiente en condiciones anhidras.

Mezcla B: En un matraz balón de 3 bocas provisto de agitación magnética, corriente de nitrógeno, embudo de adición y baño de hielo se pesó 1 equivalente del aminoácido N-prottegido a una concentración 0.2 M de THF, a esta solución se adicionaron 2 equivalentes de DIEA y se dejó en agitación por un periodo de 15 min. Enseguida se adicionaron lentamente 1.05 equivalentes de cloroforniato de isobutilo ($i\text{BbCl}$) a una concentración 0.2 M en THF dejando reaccionar por un periodo de 20 minutos.

Transcurrido el tiempo se le adicionó gota a gota la mezcla **A** al matraz que contenía la mezcla B. Una vez terminada la adición se dejó en agitación una hora en baño de hielo y toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el disolvente de la mezcla de reacción por evaporación en rotavapor a presión reducida, el residuo se resuspendió en AcOEt y se lavó con HCl al 10%, agua (2 X 50 mL), solución saturada de NaHCO_3 (2 X 50 mL) y agua (2 X 50 mL), la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró en el rotavapor a presión reducida.



N-Cbz-L-alanina-L-alanina-OMe (1)

De acuerdo con la metodología descrita anteriormente de acoplamiento se colocaron 0.5 g (2.23 mmol) de N-Cbz-L-alanina-OH

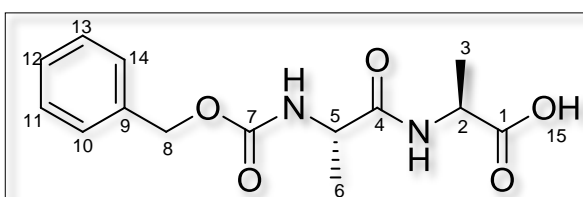
(a) disueltos en 22 mL de THF, la mezcla de reacción se trató con 0.78 mL (4.47 mmol) de DIEA y una solución de 0.30 mL (2.35 mmol) de $i\text{BbCl}$ en 10 mL de THF; posteriormente a la mezcla de reacción se adicionó la solución compuesta por 0.3438 g de $\text{H}_2\text{N-L-alanina-OMe}$ (b) disuelta en 10 mL de THF y 2 mL de DMSO, la cual se trató con 0.913 mL (5.60 mmol) de DIEA. El producto obtenido se recristalizó obteniendo 0.600 g del compuesto **1** en forma de cristales blancos con un rendimiento del 87% y un punto de fusión de 84-86 °C.



RMN de ^1H (CDCl_3 400 MHz) δ (ppm): 1.33 (2d, $J= 7.9$ Hz, 6H, 3 y 6), 3.74 (s, 3H, 15), 4.29 (m, 1H, 2), 4.56 (q, $J= 7.20$ Hz, 1H, 5), 5.09 (s, 2H, 8), 5.48 (d, $J= 6.1$ Hz, 1H, NH 2), 6.70 (s, 1H, NH 5), 7.40–7.29 (m, 5H, 10 al 14).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 100 MHz) δ (ppm): 18.64 (C3) 18.94 (C6), 48.01 (C15), 50.33 (C2), 52.46 (C5), 66.95 (C8), 128.08, 128.09, 128.48 (C10-C14), 136.11 (C9), 155.86 (C7), 171.81 (C4), 173.13 (C1).

$[\alpha]^{20}_{\text{D}} -58.10$, [C = 10mg/ml, MeOH]



***N*-Cbz-*L*-alanina-*L*-alanina-OH (2).**

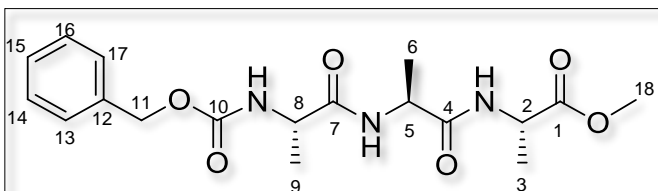
En un matraz balón provisto de agitación magnética y baño de hielo se adicionaron 0.600 g (1.945 mmol) de *N*-Cbz-*L*-Ala-Ala-

OMe (**1**) disueltos en 20 mL de una mezcla de THF/ H_2O (1:1), 3 equivalentes de LiOH (5.835 mmol). Terminada la adición del LiOH se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 2 h. Una vez concluido el tiempo de reacción se concentró en rotavapor hasta sequedad y se acidificó con HCl al 10% a pH de 4, posteriormente se extrajo con AcOEt, se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 0.486 g del compuesto **2** puro, en forma de un sólido blanco con un punto de fusión de 126-128 °C y con un rendimiento de 85%.

RMN de ^1H (CD_3OD 400 MHz) δ (ppm): 1.34 (d, $J= 7.2$ Hz, 3H, H3), 1.34 (d, $J= 7.3$ Hz, 3H, H6), 4.16 (m, 1H, H2), 4.38 (m, 1H, H5), 5.06 (s, 2H, H8), 7.31 (m, 5H, H10-H14), 8.24 (d, $J= 6.4$ Hz, 1H, H15)

RMN de ^{13}C (CD_3OD 100 MHz) δ (ppm): 17.8 (C3) 18.43 (C6), 50.44 (C2), 50.44 (C5), 52.46 (C5), 53.1 (C-5), 67.17 (C8), 128.06, 128.24, 128.53 (C10-C14), 135.99 (C9), 156.21 (C7), 179.96 (C4), 172.66 (C1).

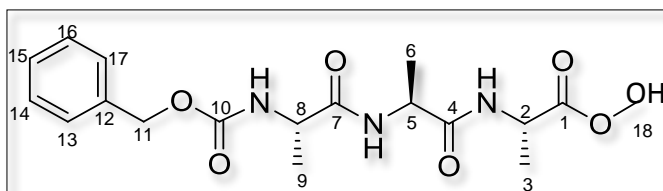
$[\alpha]^{20}_{\text{D}} -34.25$, [C = 7mg/mL, MeOH]



***N*-Cbz-*L*-alanina-*L*-alanina-*L*-alanina-OMe (3)**

De acuerdo con la metodología descrita anteriormente de acoplamiento se colocaron en un matraz 0.500 g (1.698 mmol) de *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-OH (**2**) disueltos en 20 mL de THF, se adiciono 0.74 mL (4.247 mmol) de DIEA y una solución de 0.23 mL (1.783 mmol) de *t*BBCl en 10 mL de THF; posteriormente la mezcla de reacción se adicionó la solución compuesta por 0.260 g (1.868 mmol) de H₂N-*L*-Ala-OMe (**b**) disuelta en 10 mL de THF y 2 mL DMSO, la cual se trató con 0.81 mL (4.67 mmol) de DIEA. El producto obtenido se recristalizó obteniendo 0.367 g del compuesto **3** en forma de cristales blancos con un rendimiento del 57% y un punto de fusión de 86-88 °C.

RMN de ¹H (CDCl₃ 400 MHz) δ (ppm): 1.39 (3d, *J*= 7.2 Hz, 9H, H3, H6 y H9), 3.70 (s, 3H, H18), 4.20 (m, 1H, H5), 4.55 (m, 2H, H2 y H8), 5.10 (2 d, *J*= 12.1 Hz, 2H, H11), 5.53 (d, *J*= 7.1 Hz, 1H, NH5), 6.90 (d, *J*= 7.7 Hz, 1H, NH2), 7.09 (d, *J*= 6.5 Hz, 1H, NH8), 7.30 (m, 5H, H13-H17).



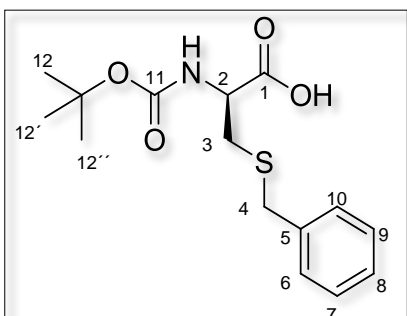
***N*-Cbz-*L*-alanina-*L*-alanina-*L*-alanina-OH (4)**

En un matraz balón provisto de agitación magnética y baño de hielo se adicionaron 0.500 g (1.317 mmol) de *N*-Cbz-*L*-Ala-*L*-Ala-*L*-Ala-OMe (**3**) disueltos en 20 mL de una mezcla de THF/H₂O (1:1), 3 equivalentes de LiOH (3.953 mmol). Terminada la adición del LiOH se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 2 h. Una vez concluido el tiempo de reacción se concentró en rotavapor hasta sequedad y se acidificó con HCl al 10% a pH de 4, posteriormente se extrajo con AcOEt, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 0.288 g del compuesto **4** puro, en forma de un polvo blanco con un punto de fusión de 192-194 °C, con un rendimiento de 60%.

RMN de ¹H (DMSO-d₆ 400 MHz) δ (ppm): 1.19 (d, *J*= 7.2 Hz, 3H, H6), 1.21 (d, *J*= 7.2 Hz, 3H, H3), 1.26 (d, *J*= 7.3 Hz, 3H, H9), 4.04 (dd, *J*= 14.4, 7.2 Hz, 1H, H5), 4.17 (dd, *J*= 14.4, 7.2 Hz,

1H, H2), 4.29 (dd, $J = 14.0, 7.0$ Hz, 1H, H8), 5.01 (s, 2H, H11), 7.34 (m, 5H, H13-H17), 7.47 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH5), 7.97 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH2), 8.10 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, NH8).

RMN de ^{13}C (DMSO-d_6 100 MHz) δ (ppm): 17.17 (C3), 18.20 (C6 y C9), 47.47 (C3), 47.58 (C6), 49.94 (C9), 65.34 (C11), 127.74, 128.35 (C13-C17), 137.02 (C12), 156.04 (C10), 171.95 (C4 y C7), 173.99 (C1).



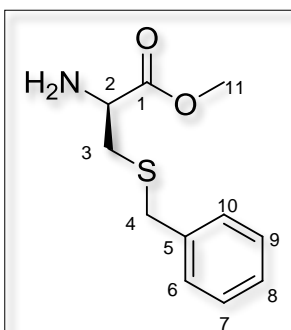
N-Boc-S-Bn-L-cisteína-OH (c)

En un matraz provisto de agitación magnética se suspendió 1.0 g de S-Bn-L-cisteína (4.733 mmol) en 45 mL de una solución (1:1) MeOH/H₂O, posteriormente se adicionaron 0.988 mL (7.099 mmol) de TEA y por último 1.34 g (6.153 mmol) de Boc₂O. Dejando reaccionar por 48 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se

evaporó el MeOH a presión reducida, la fase acuosa se acidificó con HCl 1N hasta pH de 4, posteriormente se extrajo con AcOEt, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Obteniéndose 1.40 g de una miel amarilla con un rendimiento del 95%.

RMN de ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) δ (ppm): 1.45 (s, 9H, 12, 12', 12''), 2.88 (dd, $J = 16, 12$ Hz, 2H, H3), 3.74 (s, 3H, H4), 4.51 (s, 1H, H4), 5.36 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H, NH2), 6.07 (s.a, 1H, H13), 7.26 (m, 5H, H6-H10).

RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 100 MHz) δ (ppm): 28.27 (C12, C12' y C12''), 33.36 (C3), 33.93 (C4), 52.93 (C2), 80.48 (C14), 127.16 (C8), 128.54 (C7 y C9), 128.92 (C6 y C10), 137.66 (C5), 155.92 (C11), 177.7 (C1).



S-Bn-L-cisteína-OMe (d)

En un matraz balón provisto de agitación magnética y en baño de hielo, se adicionó 1.0 g de S-Bn-L-cisteína (4.733 mmol) disuelto en 10 mL de MeOH, posteriormente se adicionaron lentamente 0.516 mL (7.099 mmol) de cloruro de tionilo (SOCl_2) y se dejó en agitación por 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción se evaporó

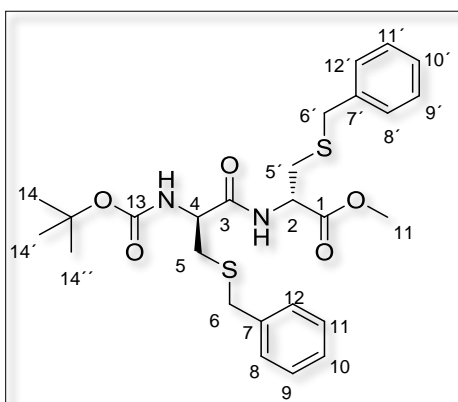


el disolvente en el rotavapor a vacío, empleando una trampa de hidróxido de sodio para neutralizar los vapores del HCl adicionando CH_2Cl_2 . El producto se purificó por recristalización con MeOH. Se obtuvieron 0.804 g de un polvo fino blanco, con un punto de $188\text{ }^\circ\text{C}$ – $190\text{ }^\circ\text{C}$, en un rendimiento del 65%.

RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 2.88 (dd, $J = 14.8, 8.3$ Hz, 2H, H3), 3.21 (s, 3H, H11), 3.84 (m, 2H, H4), 3.95 (dd, $J = 8.2, 4$ Hz, 1H, H2), 7.31 (m, 5H, H6 al H10).

RMN de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) δ (ppm): 32.93 (C4), 37.03 (C3), 48.36 (C11), 49.63 (C2), 128.35 (C8), 129.64 (C7 y C9), 129.71 (C6 y C10), 130.11 (C5), 138.97 (C1).

$[\alpha]^{20}_D -22.26$, [C = 10 mg/mL, MeOH]

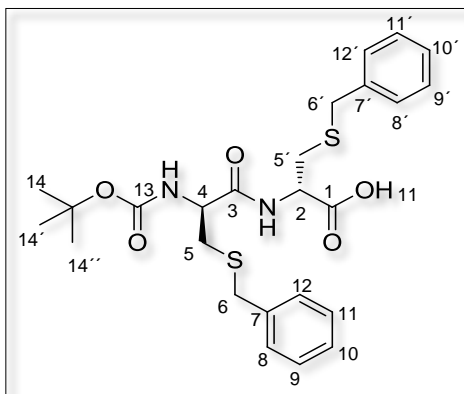


***N*-Boc-*S*-Bn-*L*-cisteína-*L*-cisteína-OMe (5)**

De acuerdo con la metodología descrita anteriormente de acoplamiento se colocaron en un matraz 0.500 g (1.606 mmol) de *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-cisteína-OH (c) disueltos en 20 mL de THF, se adiciono 0.56 mL (3.211 mmol) de DIEA y una solución de 0.22 mL (1.686 mmol) de *i*BBCl en 10 mL de THF; posteriormente la mezcla de reacción se adicionó la solución compuesta por 0.4615 g (1.766 mmol) de *S*-Bn-*L*-cisteína-OMe (d)

disuelta en 10 mL de THF y 2 mL DMSO, la cual se trató con 0.77 mL (4.415 mmol) de DIEA. El producto obtenido fue 0.350 g de una miel amarilla de olor característico con un rendimiento del 42%.

RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz) δ (ppm): 1.45 (d, $J = 5.2$ Hz, 9H, H14, H14', H14''), 2.60-3.00 (2dd, 4H, H5, H5'), 3.30(s, 3H, H15), 3.75 (dd, $J = 8.1, 3.4$ Hz, H6, H6'), 4.31 (d, $J = 4.1$ Hz, 1H, H4), 4.61 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H, H2), 7.27 (m, 10H, 8, 8'-10, 10')



***N*-Boc-*S*-Bn-*L*-cisteína-*L*-cisteína-OH (6)**

En un matraz balón provisto de agitación magnética y baño de hielo se adicionaron 0.500 g (0.967 mmol) de *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-cisteína-*L*-cisteína-OMe (5) disueltos en 20 mL de una mezcla de THF/H₂O (1:1), 3 equivalentes de LiOH (2.903 mmol). Terminada la adición del LiOH se retiró el baño de hielo y la mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 2 h. Una vez concluido el

tiempo de reacción se concentró en rotavapor hasta sequedad y se acidificó con HCl al 10% a pH de 4, posteriormente se extrajo con AcOEt, se secó con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 0.150 g del compuesto 6 puro, en forma de una miel amarillenta, con un rendimiento de 30%.

RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ (ppm): 1.45 (d, *J*= 6.4 Hz, 9H, H14, H14', H14''), 2.60-3.00 (m, 4H, H5, H5'), 3.70 (dd, *J*= 15.8, 9.2 Hz, H6, H6'), 4.11 (m, 1H, H4), 4.73(m, 1H, H2), 7.27 (m, 10H, 8, 8'-10, 10')

[α]²⁰_D -47.93, [C = 5 mg/mL, MeOH]

Procedimiento general para la obtención de nanofibras.

Solución polimérica: En un frasco Schott de 200 mL provisto de agitación se coloca en quitosano/compuesto híbrido en una relación 8:92 w/w soluto/disolvente, el disolvente es una mezcla de TFA/CH₂Cl₂ 70:20 v/v, se agita durante 24 horas a temperatura ambiente.

Condiciones de electrohilado: Se montó la solución polimérica en el equipo de electrospinning, las condiciones a las que se electrohiló la solución polimérica fueron 40 °C a un flujo de 0.04 mL/min a 20 eV, durante 6 horas, la nanofibra obtenida se seca durante 24 horas a 60 °C.

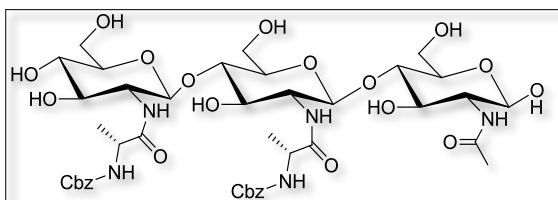
Procedimiento general de acoplamiento para compuestos híbridos.

Mezcla A: En un matraz balón provisto de agitación magnética se coloca el aminoácido/péptido *N*-protegido en una relación 1:1 w/w péptido/quitosano disuelto en

DMSO (2 mL por cada gramo), posteriormente se adicionó diisopropiletilamina (DIEA) 1:1 w/w DIEA/quitosano, se dejó en agitación por un periodo de 15 min a temperatura ambiente, una vez transcurrido el tiempo de reacción, utilizando como agente acoplante a la 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) la cual se dejó reaccionar por 30 min.

Mezcla B: En un matraz balón provisto de agitación magnética se colocó nanofibras de quitosano en una relación en una relación 1:1 w/w péptido/quitosano disuelto en H₂O (10 mL por cada gramo), se dejó solubilizar en agitación por un periodo de 15 min a 0 °C.

Una vez trascurrido el tiempo de reacción, se adicionó el contenido de la mezcla B a la mezcla A, y se dejó reaccionar por 3 h a 0 °C, posterior a esto se filtró en papel filtro de poro fino con MeOH/H₂O a 0°C para barrer el aminoácido/péptido que no reaccionó y el compuesto obtenido se colocó sobre una caja petri y se dejó a secar en estufa a 60 °C durante 24 h.

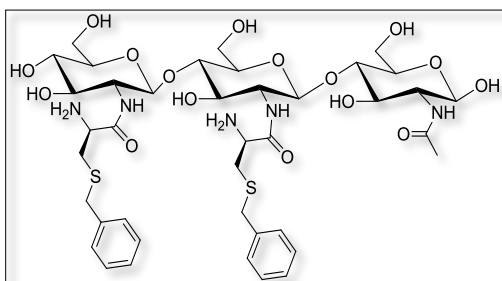


***N*-Cbz-*L*-Ala-CTS (7a).**

De acuerdo con la metodología de acoplamiento de compuestos híbridos descrita anteriormente se colocaron 0.500 g

de *N*-Cbz-*L*-Ala-OH (2.24 mmol), disueltos en 1 mL de DMSO, el aminoácido *N*-protegido se trató con 0.67 mL (3.87 mmol), a la mezcla de reacción se le agregó 0.500 g de EDC, posteriormente se agregaron 0.500 g de nanofibras de quitosano disueltas en H₂O, se hizo reaccionar durante 3 horas, transcurrido el tiempo se filtró y secó obteniéndose 0.250 g de el compuesto híbrido en forma de una película quebradiza amarillenta.

FTIR: 2970 cm⁻¹ (ν C-H), 1717 cm⁻¹ (ν C=O de éster), 1640 cm⁻¹ (de ν C=O de amida), 1532 cm⁻¹ (δ N-H de amida), 1061 cm⁻¹ y 1026 cm⁻¹ (ν de C-OH, C-N).

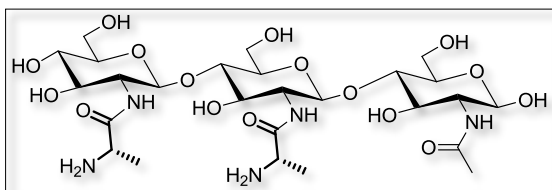


***N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-CTS (8a).**

De acuerdo con la metodología de acoplamiento de compuestos híbridos descrita anteriormente se colocaron 0.500 g de *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-OH (1.60 mmol), disueltos en 1 mL de DMSO, el aminoácido *N*-protegido se trató con 0.67 mL (3.87 mmol) de

DIEA, a la mezcla de reacción se le agregó 0.500 g de EDC, posteriormente se agregaron 0.500 g de nanofibras de quitosano disueltas en H₂O, se hizo reaccionar durante 3 horas, transcurrido el tiempo se filtró y secó obteniéndose 0.150 g del compuesto híbrido en forma de una película quebradiza amarillenta.

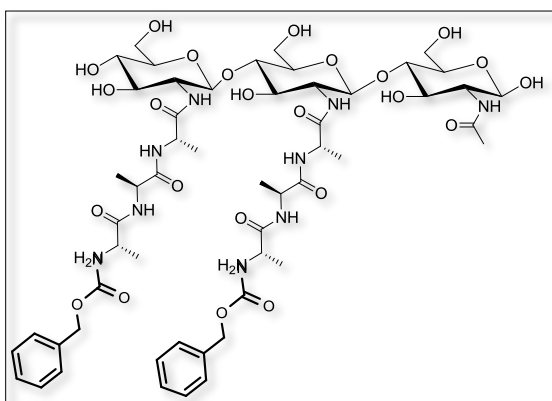
FTIR: 2977 cm⁻¹ (ν C-H), 1737 cm⁻¹ (ν C=O de éster), 1062 cm⁻¹ y 1026 cm⁻¹ (ν C-OH, C-N).



H₂N-L-Ala-CTS (7b).

De acuerdo con la metodología de acoplamiento de compuestos híbridos descrita anteriormente se colocaron 0.500 g de *N*-Boc-L-Ala-OH (2.44 mmol), disueltos en 1 mL de DMSO, el aminoácido *N*-protegido se trato con 0.67 mL (3.87 mmol) de DIEA, a la mezcla de reacción se le agregó 0.500 g de EDC, posteriormente se agregaron 0.500 g de nanofibras de quitosano disueltas en H₂O, se hizo reaccionar durante 3 horas, transcurrido el tiempo se filtró y secó obteniéndose 0.130 g del compuesto híbrido en forma de una película quebradiza amarillenta.

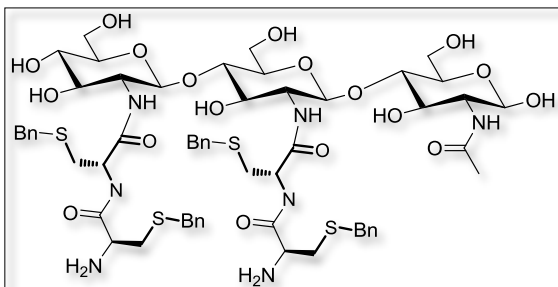
FTIR: 2927 cm⁻¹ (ν C-H), 1648 cm⁻¹ (ν C=O de amida), 1567 cm⁻¹ (δ N-H de amida), 1060 cm⁻¹ y 1027 cm⁻¹ (ν de C-OH, C-N).



N-Cbz-L-Ala-L-Ala-L-Ala-CTS (7).

De acuerdo con la metodología de acoplamiento de compuestos híbridos descrita anteriormente se colocaron 0.500 g de *N*-Cbz-L-Ala-L-Ala-L-Ala-OH (1.31 mmol), disueltos en 1 mL de DMSO, el péptido *N*-protegido se trato con 0.67 mL (3.87 mmol) de DIEA, a la mezcla de reacción se le agregó 0.500 g de EDC, posteriormente se agregaron 0.500 g de nanofibras de quitosano disueltas en H₂O, se hizo reaccionar durante 3 horas, transcurrido el tiempo se filtró y secó obteniéndose 0.200 g del compuesto híbrido en forma de una película quebradiza amarillenta.

FTIR: 2971 cm⁻¹ (ν C-H), 1719 (ν C=O), 1640 cm⁻¹ (ν C=O de amida), 1532 cm⁻¹ (δ N-H de amida) 1062 cm⁻¹ y 1026 cm⁻¹ (ν C-OH, C-N)

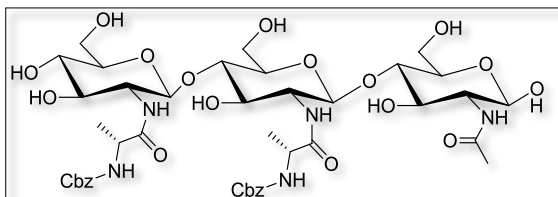


***N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys CTS (8)**

De acuerdo con la metodología de acoplamiento de compuestos híbridos descrita anteriormente se colocaron 0.500 g de *N*-Boc-*S*-Bn-*L*-Cys-*L*-Cys-OH (0.99 mmol), disueltos en 1 mL de DMSO, el péptido *N*-protegido se

trato con 0.67 mL (3.87 mmol) de DIEA, a la mezcla de reacción se le agregó 0.500 g de EDC, posteriormente se agregaron 0.500 g de nanofibras de quitosano disueltas en H₂O, se hizo reaccionar durante 3 horas, transcurrido el tiempo se filtró y secó obteniéndose 0.190 g del compuesto híbrido en forma de una película quebradiza amarillenta.

FTIR: 2928 Y 2873 cm⁻¹ (ν C-H), 1648 cm⁻¹ (ν C=O de amida), 1567 cm⁻¹ (δ N-H), 1062 cm⁻¹ y 1026 cm⁻¹ (ν C-OH, C-N).



Nanofibras de *N*-Cbz-*L*-Ala-OH-CTS (7a)

De acuerdo con la metodología para la obtención de nanofibras, se electrohilo el compuesto *N*-Cbz-*L*-Ala-CTS, y del cual fue

posible obtener una pequeña cantidad de nanofibra de (10 mg), mismas que fueron útiles para la caracterización del mismo.

RMN de ¹H (D₂O, 400 MHz) δ (ppm): 1.20 (2 dd, *J*=1.20 de CH₃), 4.10 (m, de CH), 7.31 (m, de grupo protector Cbz).



BIBLIOGRAFÍA

1. Mitragotri, S., & Lahann, J. (2009). Physical approaches to biomaterial design. *Nature materials*, 8(1), 15-23.
2. Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic press.
3. Khadka, D. B., & Haynie, D. T. (2012). Protein-and peptide-based electrospun nanofibers in medical biomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(8), 1242-1262.
4. http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lim/villela_e_ij/capitulo1.pdf
5. Camacho Elizondo, M., Vega Baudrit, J., & Campos Gallo, A. (2011). Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(4), 292-306.
6. Adessi, C., & Soto, C. (2002). Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Current medicinal chemistry*, 9(9), 963-978
7. Jiménez, J.C., Giral, E., Albericio, F. (2004) Péptidos y la industria farmacéutica, *Ann. R. Soc. Esp. Quím.*, 10.
8. Giovino, C., Ayensu, I., Tetteh, J., & Boateng, J. S. (2013). An integrated buccal delivery system combining chitosan films impregnated with peptide loaded PEG-b-PLA nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112, 9-15.
9. Chen, L. C., Chiang, W. D., Chen, W. C., Chen, H. H., Huang, Y. W., Chen, W. J., & Lin, S. B. (2012). Influence of alanine uptake on Staphylococcus aureus surface charge and its susceptibility to two cationic antibacterial agents, nisin and low molecular weight chitosan. *Food chemistry*, 135(4), 2397-2403.
10. Strom, M.B., Haug, B.E., Skar, M. L., Stensen, W., Stiberg, T., & Svendsen, J. S. (2003). The pharmacophore of short cationic antibacterial peptides. *Journal of medicinal chemistry*, 46(9), 1567-1570.
11. Bailey, P.D. *An Introduction to Peptide Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, **1997**.
12. Nishiyama, Y., Yoshikawa, T., Kurita, K., Hojo, K., Kamada, H., Tsutsumi, Y. & Kawasaki, K. (1999). Regioselective conjugation of chitosan with a laminin-related peptide, Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg, and evaluation of its inhibitory effect on experimental cancer metastasis. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 47(3), 451-453.
13. Banerji, B., Pramanik, S. K., Pal, U., & Maiti, N. C. (2013). Potent anticancer activity of cystine-based dipeptides and their interaction with serum albumins. *Chemistry Central Journal*, 7, 91.
14. Gomes, A. P., Mano, J. F., Queiroz, J. A., & Gouveia, I. C. (2014). New biomaterial based on cotton with incorporated biomolecules. *Journal of Applied Polymer Science*, 131(15).
15. Jayaraman, M. S., Bharali, D. J., Sudha, T., & Mousa, S. A. (2012). Nano chitosan peptide as a potential therapeutic carrier for retinal delivery to treat age-related macular degeneration, *Molecular visión* 18, 2300.



16. Cortés, M. G. R., Díaz, B. M. V., & Perilla, J. E. (2008). Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. *Ingeniería e Investigación*, 28(1), 57-71.
17. Guillén, J. G., & Esbec, I. G. (1996). Quitina y quitosano. Nuevos materiales textiles. *Boletín Intexter del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*, (110).
18. Velásquez, C. L. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 4(2), 91.
19. Hirano S., Noishiki Y., Kinugawa J., Highasijima H. y Hayashi T. (1997) Advances in Biomedical Polymers, C. G. Gebelein. *Plenum Press*, 285.
20. Yi, H., Wu, L. Q., Bentley, W. E., Ghodssi, R., Rubloff, G. W., Culver, J. N., & Payne, G. F. (2005). Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, 6(6), 2881-2894.
21. Chung, Y. C., Su, Y. P., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. L., Wu, J. G., & Lin, J. G. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 932-936.
22. Zheng, L. Y., & Zhu, J. F. (2003). Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 527-530.
23. Yang, T. C., Chou, C. C., & Li, C. F. (2005). Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives. *International journal of food microbiology*, 97(3), 237-245.
24. Kumar, S., Koh, J., Kim, H., Gupta, M. K., & Dutta, P. K. (2012). A new chitosan–thymine conjugate: Synthesis, characterization and biological activity. *International journal of biological macromolecules*, 50(3), 493-502.
25. Wang, J., Hu, W., Liu, Q., & Zhang, S. (2011). Dual-functional composite with anticoagulant and antibacterial properties based on heparinized silk fibroin and chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 241-247.
26. Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerro-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M. & Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 305-315.
27. Huei, C. R., & Hwa, H. D. (1996). Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. *Carbohydrate polymers*, 29(4), 353-358.
28. Seyfarth, F., Schliemann, S., Elsner, P., & Hipler, U. C. (2008). Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *International Journal of Pharmaceutics*, 353(1), 139-148.
29. Morrison R.T., Boyd R. N. *Química Orgánica*, Addison Wesley Longman de Mexico, (1998), Quinta edición, 1323.

30. Carey F. A., Química Orgánica, *The McGraw-Hill Companies, Inc.* (2006), sexta edición, 1123-112.
31. Boman, H. G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of internal medicine*, 254(3), 197-215.
32. Liu, Z., Brady, A., Young, A., Rasimick, B., Chen, K., Zhou, C., & Kallenbach, N. R. (2007). Length effects in antimicrobial peptides of the (RW) n series. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(2), 597-603.
33. Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., & Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*, 23(4), 329-344.
34. Hu, B., Wang, S. S., Li, J., Zeng, X. X., & Huang, Q. R. (2011). Assembly of bioactive peptide–chitosan nanocomplexes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(23), 7515-7523.
35. Park, W. H., Jeong, L., Yoo, D. I., & Hudson, S. (2004). Effect of chitosan on morphology and conformation of electrospun silk fibroin nanofibers. *Polymer*, 45(21), 7151-7157.