



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

**SÍNTESIS DE PÉPTIDOS DE CADENA CORTA
CON POSIBLE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A:
BEATRIZ HERNÁNDEZ OCHOA



MÉXICO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Porque gracias a ellos estoy aquí

y puedo ser lo que soy

Con cariño para mis padres

Ana María y José

por su grandioso cariño y apoyo

brindado todo el tiempo,

A mis hermanas,

Adri, Gaby y Pau

por ser formar de mi vida y hacer de ella

algo maravilloso.

A mi compañero y amigo **Adrian**

por la ayuda brindada.

A todos mis amigos con los que he

recorrido un largo camino.

Contenido

CONTENIDO

	Página
1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	2
2. INTRODUCCIÓN	4
3. FUNDAMENTACION TEÓRICA	6
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
5. OBJETIVOS	43
6. HIPÓTESIS	44
7. MATERIAL Y MÉTODOS	45
8. RESULTADOS Y ANÁLISIS	55
9. CONCLUSIONES	77
10. BIBLIOGRAFÍA	78
11. ANEXOS	82

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

PMPs	Proteínas Microbicidas de Plaquetas
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCU	Diciclohexilurea
HOBt	1-hidroxi-1 <i>H</i> -benzotriazol
CH ₂ Cl ₂	Cloroformiato de metilo
pI	Punto isoeléctrico del aminoácido
BOC	<i>t</i> -butilcarbamato
Cbz o Z	bencilcarbamato
Fmoc	9-fluorofenilmetilcarbamato
Me	Éster metílico
Et	Éster etílico
Bzl	Éster bencílico
Nbz	Éster 4-nitrobencílico
TFA	Ácido trifluoroacético
DMAP	dimetilaminopiridina
SOCl ₂	Cloruro de tionilo
POCl ₃	Cloruro de fofonilo
(COCl) ₂	Cloruro de oxalilo
DMF	Dimetilformamida
THF	Tetrahidrofurano
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
AcOEt	Acetato de etilo
HOBt	1-hidroxi-1 <i>H</i> -benzotriazol
PFF	Pentafluorofenol
ET ₃ N	Trietilamina
CCF	Cromatografías en columna flash
CaH ₂	Hidruro de calcio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
H ¹ RMN	Resonancia magnética nuclear de protón

Abreviaturas y símbolos

C ¹³ RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
DMSO	Dimetilsulfoxido
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millon
s	Singulete
d	Doblete
m	Multiplete

I. INTRODUCCIÓN

El futuro de los péptidos naturales antimicrobianos se fundamenta en la gran preocupación entre los microbiólogos y médicos clínicos sobre la cada vez más común resistencia de las bacterias a la mayoría de los antibióticos clásicos. Hasta hace poco existían algunas cepas resistentes a todos los antibióticos comunes excepto a la vancomicina, sin embargo, recientemente se ha descrito que también han logrado crear resistencia a esta última.¹ Debido a lo anterior se considera a los péptidos antimicrobianos como una alternativa para ser utilizados como agentes terapéuticos.²

Los péptidos antimicrobianos son componentes esenciales de la inmunidad innata, actúan en secreciones, epitelios y fagocitos como primera barrera defensiva frente a las invasiones por agentes patógenos. Su interés clínico se debe a dos características generales: amplio rango de patógenos susceptibles y muy baja inducción de resistencia. Es por ello que en los últimos años se ha desarrollado un interés creciente por la búsqueda y síntesis química de péptidos antimicrobianos de origen natural para su posible uso como agentes terapéuticos.³

Los péptidos antimicrobianos encontrados en el hombre están distribuidos en una variedad de tejidos y células, además se conoce que en las plaquetas de los seres humanos se almacenan proteínas antibacterianas, estos compuestos son llamados proteínas microbicidas de plaquetas (PMPs). En 1992 Darveau y cols.⁴ describieron la actividad antimicrobiana de un péptido que se encontraba relacionado con la terminación carboxílica del factor IV de plaquetas humanas (PF4); posteriormente fue sintetizado un péptido de 13 aminoácidos C13 (PLYKKIHKLLES) correspondiente a dicha región terminal carboxílica y se encontró que este péptido tiene actividad antimicrobiana en contra de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y Gram negativas como *Escherichia coli*.

El péptido C13 y otros análogos han sido sintetizados mostrando un incremento significativo en la actividad antibacteriana, el análogo C18G

Introducción

(ALYKKIIKKLLLESAKKLG) mostró una actividad antimicrobiana significativa en contra de *Escherichia coli*.

Yeaman y cols.⁵ realizaron un estudio en donde probaron la actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos RP-1 (N-ALYKKFKKKLLKSLKRLG-C) y RP-11 (N-ALYKRLFKKLKKF-C), péptidos que guardan similitudes estructurales con el péptido antimicrobiano C18G y encontraron que estos péptidos sintéticos presentaron también una actividad antimicrobiana en contra de *Escherichia coli*.

El objetivo de este trabajo fue la síntesis de un pentapéptido con la siguiente secuencia de aminoácidos NH₂-Tyr-Lys-Arg-Leu-Phe-CO₂H, el cual actuará como precursor para la posterior síntesis de análogos al péptido RP-1. Su preparación se llevó a cabo por medio de la técnica de síntesis de péptidos en solución lineal, utilizando como agente acoplante diciclohexilcarbodiimida (DCC) para el dipéptido y tripéptido y cloroformiato de metilo para el pentapéptido. El pentapéptido y los productos intermediarios fueron purificados por cromatografía en columna y recristalización, además de que fueron confirmados en sus propiedades espectroscópicas.

La síntesis de este pentapéptido utilizando cloroformiato de metilo como agente acoplante mostró mayor rendimiento en la formación de cadenas peptídicas de cadena larga, además de facilitar la purificación de los productos en comparación con la DCC.

II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1. Aminoácidos

Los aminoácidos son las bases estructurales que componen a los péptidos y proteínas, estos son compuestos que poseen en su estructura un grupo **amino** ($-\text{NH}_2$) y un grupo **ácido carboxílico** (CO_2H)⁶. La posición que ocupa el grupo amino respecto del grupo carboxilo dentro de la estructura determinará la clasificación de estos compuestos como aminoácidos α , β , γ , y δ .⁷ (Fig. 1).

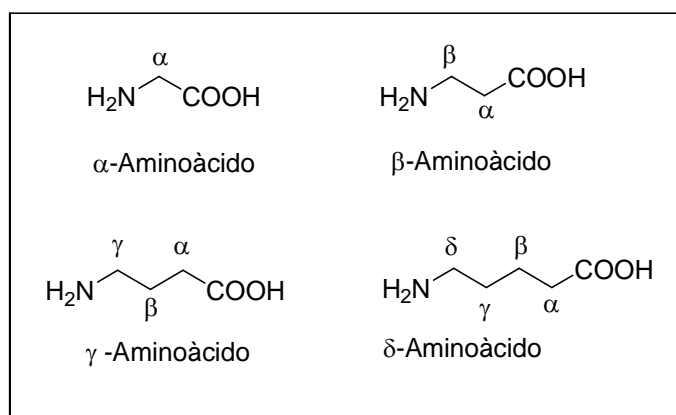


Figura 1. Clasificación de los aminoácidos.

Aminoácidos Proteinogénicos

Los aminoácidos proteinogénicos son un conjunto de veinte α -aminoácidos cuya estructura difiere únicamente en el sustituyente (R) unido al carbono α de la molécula. La amplia variación de estos sustituyentes, a los que se denomina cadena lateral, es la que proporciona la diversidad estructural y, en consecuencia, la variedad funcional de las proteínas. Los α -aminoácidos suelen representarse de la forma $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$, siendo R un radical o cadena lateral característica de cada aminoácido⁸ (Fig. 2).

Fundamentación teórica

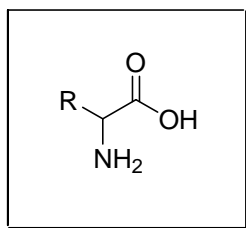



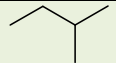
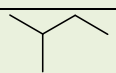
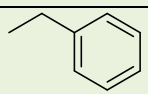
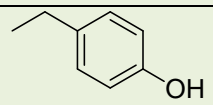
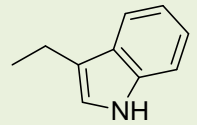
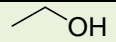
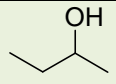


Figura 2. Estructura general de los aminoácidos.

Dependiendo de la naturaleza de la cadena lateral (**R**), los aminoácidos suelen clasificarse en aminoácidos neutros, básicos y ácidos.⁹

Tipo de aminoácido	Nombre	Código de 3 letras	Código de una letra	Estructura de la cadena lateral (R).
Neutros	Glicina	Gly	G	
	Alanina	Ala	A	
	Valina	Val	V	
	Leucina	Leu	L	
	Isoleucina	Ile	I	
	Fenilalanina	Phe	F	
	Tirosina	Tyr	T	
	Triptófano	Tpr	W	
	Serina	Ser	S	
	Treonina	Thr	T	

Fundamentación teórica

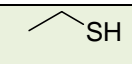
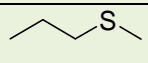
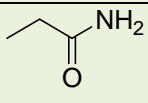
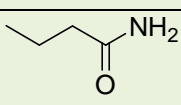
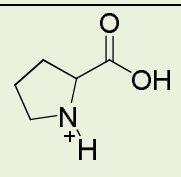
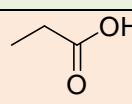
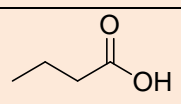
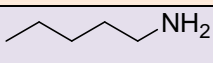
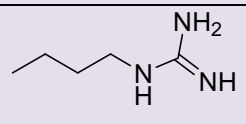
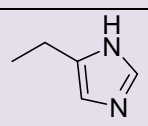
Neutros	Cisteina	Cys	C	
	Metionina	Met	M	
	Asparagina	Asn	N	
	Glutamina	Gln	Q	
	Prolina	Pro	P	
Ácidos	Ácido aspártico	Asp	D	
	Ácido glutámico	Glu	E	
Básicos	Lisina	Lys	K	
	Arginina	Arg	R	
	Histidina	His	H	

Figura 3. Tabla de los α -aminoácidos proteínogénicos.

De los veinte aminoácidos proteínogénicos, diez son considerados esenciales; es decir, el ser humano debe obtenerlos a partir de la dieta debido a que el organismo no es capaz de sintetizarlos o no puede hacerlo en las cantidades adecuadas. Los **aminoácidos esenciales** son arginina, histidina, lueucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina.¹⁰

Aminoácidos no proteínogénicos

Muchos aminoácidos forman proteínas (aminoácidos protéicos), mientras otros nunca se encuentran en ellas (aminoácidos no proteínogénicos) pero pueden desempeñar diversas funciones.

La gran mayoría de los aminoácidos no proteínogénicos se han aislado de productos naturales, en los tejidos y fluidos de animales superiores como los mamíferos y en microorganismos como algas, hongos y bacterias. Muchos de estos aminoácidos son productos finales del metabolismo secundario, mientras otros son intermediarios de rutas metabólicas o se originan del metabolismo de detoxificación.¹¹

Los aminoácidos no proteínogénicos se pueden dividir en 3 grupos:

- A. Serie *D* de los aminoácidos llamados esenciales, por ejemplo: *D*-alanina (**1**), *D*-fenilalanina (**2**), *D*-ácido aspártico (**3**) (Fig. 4).

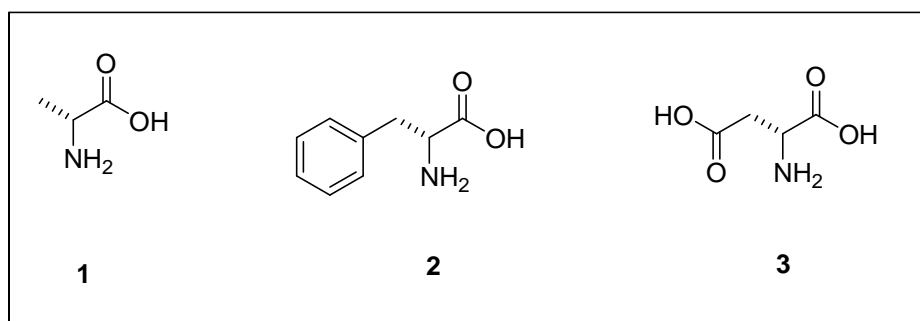


Figura 4. *D*-aminoácidos.

- B. α -aminoácidos no proteínogénicos, como la *L*-ornitina (**4**) y *L*-citrulina (**5**), intermediarios del ciclo de la urea, así como la creatina (**6**), homoserina (**7**), homocisteína (**8**) intermediarios de distintos procesos metabólicos. Tenemos asimismo la dihidroxifenilalanina (**9**) precursor metabólico de la síntesis de catecolaminas, hormonas tiroideas y melanina (Fig. 5).¹²

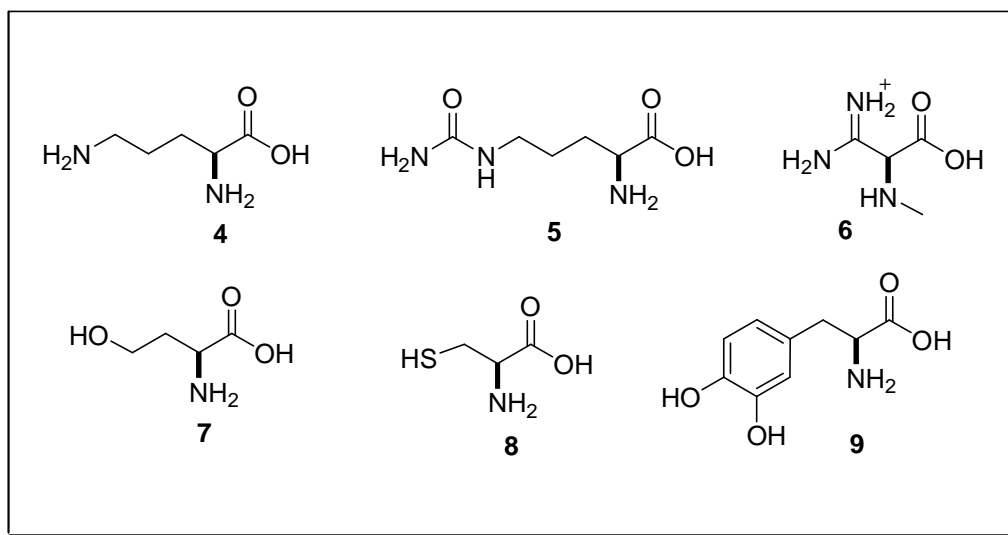


Figura 5. α -aminoácidos no proteínogénicos.

C. ω -aminoácidos y aminoácidos sustituidos en otra posición diferente a la α . Por ejemplo, la β -alanina (**10**) y el ácido γ -aminobutírico (**11**), este último es un importante neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (Fig. 6).¹³

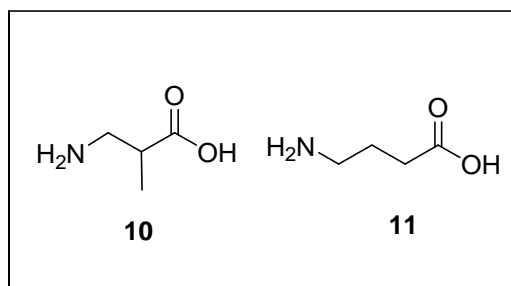


Figura 6. Aminoácidos sustituidos en una posición diferente a la α .

Los aminoácidos no proteínogénicos también se pueden clasificar en alifáticos, aromáticos y heterocíclicos. Estos últimos se diferencian de acuerdo al tipo de heteroátomo, la mayoría posee nitrógeno, y menos frecuentemente se puede presentar oxígeno o azufre.¹⁴

Algunos heterociclos con oxígeno-nitrógeno y nitrógeno-azufre son componentes de pigmentos animales. Muchos de ellos tienen propiedades antibióticas, los cuales han sido aislados de microorganismos como hongos, ó

Fundamentación teórica

forman parte de estructuras más complejas como los depsipéptidos. El compuesto Alplidin (12) (Fig. 7) es un compuesto de origen marino aislado del microorganismo *Aplidium albicans*, y este depsipéptido cíclico está compuesto por siete aminoácidos, un hidroxiaácido y un oxoácido terminal, el cual presenta actividad frente al carcinoma de células renales y sobre el carcinoma medular de tiroides.¹⁵

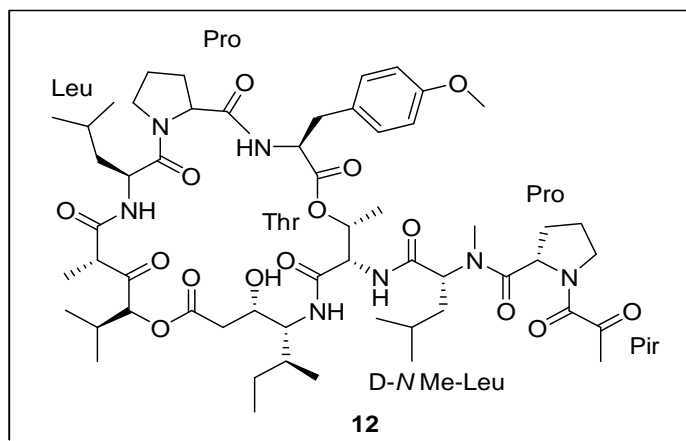


Figura 7. Depsipéptido Alplidin.

CARACTERÍSTICAS DE LOS AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son especies bifuncionales, ya que poseen un grupo ácido y un grupo básico y cuando se encuentran en solución a un pH cercano a la neutralidad, el aminoácido se comporta como un ion dipolar, pues posee en la misma molécula dos cargas: una positiva en el grupo amino y otra negativa en el grupo carboxílico. A este tipo de ion dipolar se le llama zwitterion o anfólito,¹⁶ por lo que a pH fisiológico (pH 7.3), el grupo α -amino se encuentra cargado positivamente y el grupo carboxilo lo está negativamente (Fig. 8).

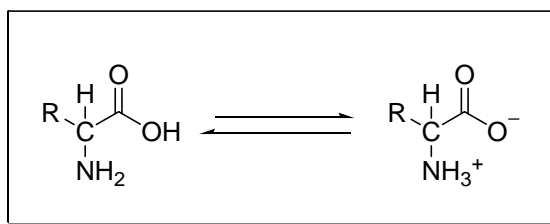


Figura 8. Aminoácido a pH fisiológico.

Fundamentación teórica

Las propiedades ácido-base de un aminoácido están determinadas por los grupos protonables que están implicados en su estructura, pudiendo tener hasta tres grupos con carácter ácido-base: el α -amino, y el carboxilo, en algunos casos, la cadena lateral $-R$, como es el caso del grupo β -CO₂H del ácido aspártico, el γ -CO₂H del ácido glutámico, el ϵ -NH₂ de la lisina y el δ -guanidino de la arginina. Esto hace que, dependiendo del pH, el correspondiente equilibrio pueda desplazarse hacia la forma protonada o hacia la desprotonada.^{16,17}

En solución ácida, un aminoácido se protona y se encuentra principalmente como un catión; en solución básica, se desprotona y esta como un anión, así, existe un pH intermedio en el que el aminoácido está en equilibrio entre la forma aniónica y catiónica y se encuentra como el ión dipolar neutro. A este pH se le llama **punto isoeléctrico, pI**, del aminoácido (Fig. 9).

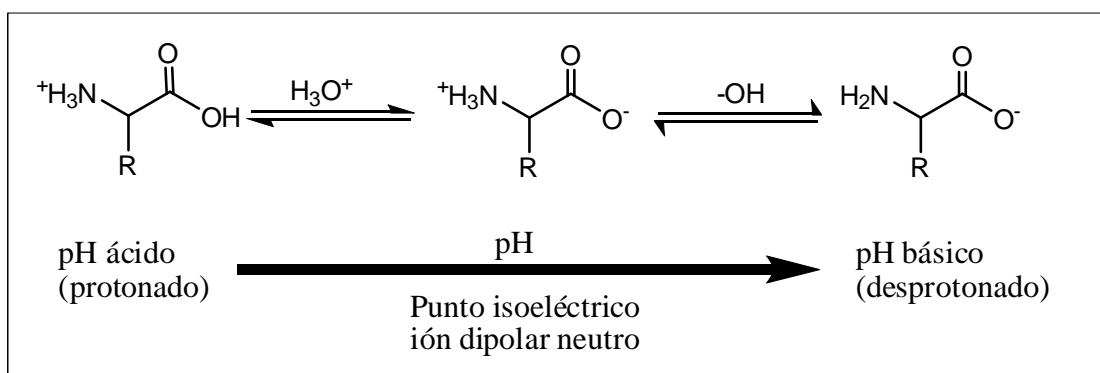


Figura 9. Equilibrio ácido-base de un aminoácido.

Debido a que los aminoácidos son iones dipolares, sus propiedades físicas características son las de los compuestos iónicos, por ejemplo la mayoría de los aminoácidos tienen puntos de fusión relativamente elevados y se descomponen comúnmente a temperaturas superiores a los 200 °C, son muy solubles en agua pero muy poco solubles en disolventes no polares, poseen momentos dipolares grandes y sus soluciones acuosas tienen constantes dieléctricas elevadas.¹⁸

Estereoquímica

El carbono α es un carbono quiral ya que se encuentra rodeado de cuatro grupos diferentes, lo que le confiere una actividad óptica específica a cada aminoácido (a excepción de la glicina), debido a esto se pueden encontrar dos estereoisómeros de cada aminoácido denominados enantiómeros, es decir imágenes especulares que no pueden superponerse una a la otra, lo que les confiere propiedades físicas idénticas exceptuando la dirección en que desvían la luz polarizada. Si un aminoácido produce una desviación de la luz a la derecha se denomina dextrógiro (+) y si la desviación es a la izquierda son denominados levógiros (-). Los 19 aminoácidos con actividad óptica presentes en las proteínas corresponden a la serie *L*-, en su representación de Fisher poseen el grupo carboxilo en la parte superior, la cadena de átomos de carbono en la vertical hacia abajo y el grupo amino hacia la izquierda (Fig. 10).^{18,19}

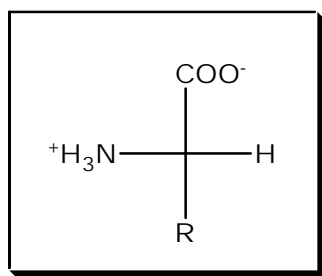


Figura 10. Proyección de Fisher de un aminoácido de la serie *L*.

PÉPTIDOS

Los péptidos son polímeros de aminoácidos, unidos por un enlace peptídico entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del siguiente aminoácido. (Fig. 11).

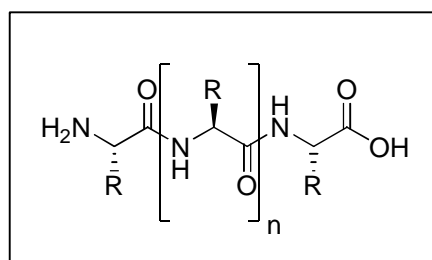


Figura 11. Unión de dos aminoácidos por un enlace peptídico.

La unión entre aminoácidos se lleva a cabo por la reacción que se presenta entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del otro formando un nuevo compuesto denominado péptido mediante la pérdida de una molécula de agua (Fig. 12).¹⁹

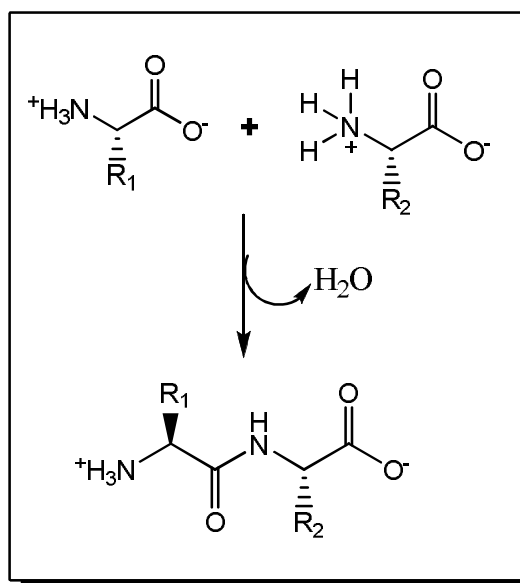


Figura 12. Formación del enlace peptídico.

Fundamentación teórica

Esta unión covalente presenta una geometría planar y características de doble enlace debido a la resonancia existente entre el grupo carboxilo del ácido y el nitrógeno del amino.

En 1951 Pauling y Corey demostraron que la longitud del enlace C-N en una amida, como en el enlace peptídico es más corto que el enlace típico C-N y que el doble enlace C=O es más largo que en aldehídos y cetonas. La deslocalización dentro el péptido le confiere características parciales de doble enlace al enlace C-N (Fig. 13).¹⁸

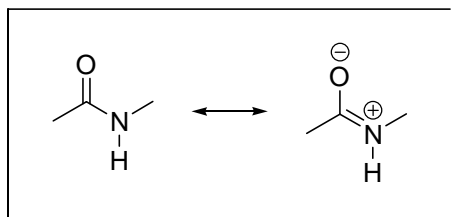


Figura 13. Deslocalización del enlace C-N, en el enlace peptídico.

Los péptidos son clasificados con prefijos griegos como di, tri, tetra, penta,..., dacapéptidos, etc, de acuerdo al número de residuos de aminoácidos incorporados en su estructura. En péptidos más grandes, el prefijo griego puede ser reemplazado por números arábigos; por ejemplo, un decapeptido puede ser llamado como 10-péptido. Antiguamente los péptidos que contenían menos de 10 residuos de aminoácidos fueron clasificados como oligopéptidos y péptidos con 10 a 100 aminoácidos fueron llamados polipéptidos. La expresión proteína fue usada para derivados que contenían más de 100 aminoácidos. Aunque actualmente uno también puede encontrar la notación proteína para polipéptidos de 50 a 100 aminoácidos.

Los péptidos se nombran en función de los aminoácidos que los constituyen empezando por el aminoácido que tiene el grupo amino libre, así el aminoácido final de la cadena peptídica es el **aminoácido N-terminal** mientras que el que tiene el grupo carboxílico libre es el **aminoácido C-terminal**. Para nombrar un

Fundamentación teórica

péptido, cada aminoácido, empezando por el aminoácido *N*-terminal se trata como si fuera un sustituyente alquílico de la siguiente unidad de la cadena con la excepción del aminoácido *N*-terminal.²⁰

La nomenclatura formal considera a los péptidos como *N*-acil aminoácidos, en donde únicamente el residuo carboxílico terminal del aminoácido de la cadena del péptido guarda el nombre original, todos los otros son llamados con el nombre original y el sufijo -il. Así el péptido (**13**) es llamado alanil-lisil-glutamil-tirosil-leucina (Fig. 14).

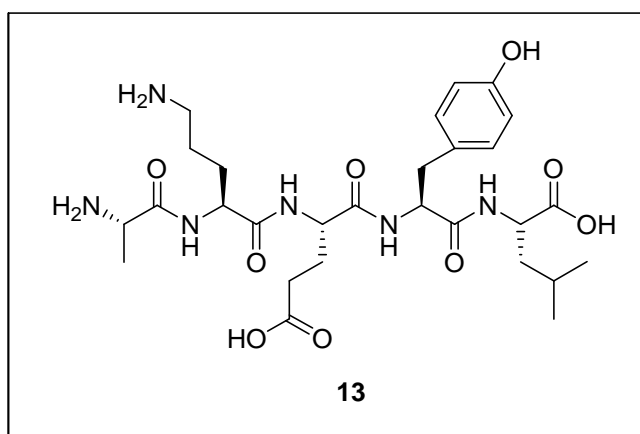


Figura 14. Péptido Ala-Lis-Glu-Tyr-Leu.

Una simplificación del nombre del péptido se puede obtener mediante el uso del código de tres letras de los aminoácidos, de esta manera el péptido de la Figura 14, se puede nombrar: Ala-Lis-Glu-Tyr-Leu.

Los péptidos y proteínas intervienen en un vasto rango de funciones biológicas. Estas moléculas no requieren ser tan grandes para cumplir funciones biológicas importantes en el organismo. Como en el caso de las encefalinas (**14**, **15**) (Fig.15), que son pentapéptidos sintetizados en el organismo para el control del dolor por la unión de estos a sitios receptores específicos en el cerebro.²¹

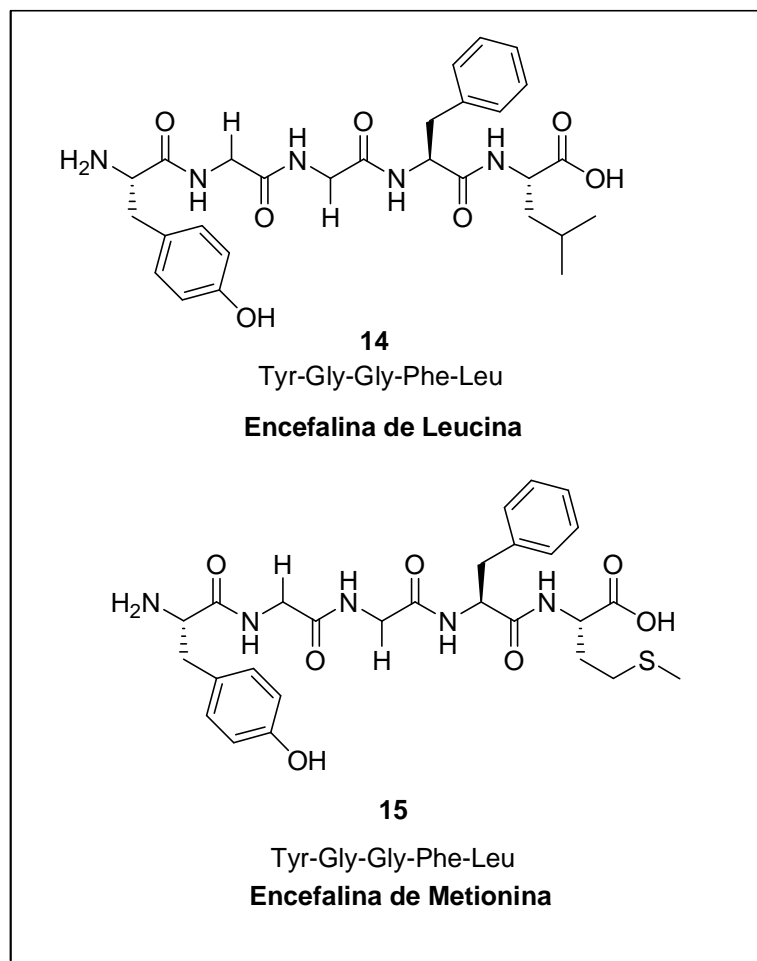


Figura 15. Enkefalinas, pentapéptidos sintetizados en el organismo.

Tres nonapéptidos con función hormonal en el organismo son la bradiquinina (**16**) inhibe la inflamación de los tejidos; la vasopresina (**17**) controla la presión de la sangre regulando la contracción del músculo liso y la oxitocina (**18**) induce la labor de parto y estimula la producción de leche (Fig.16). Tanto la vasopresina como la oxitocina muestran un enlace disulfuro intramolecular y a pesar de que difieren en solo dos aminoácidos presentan diferentes efectos fisiológicos.^{21,22}

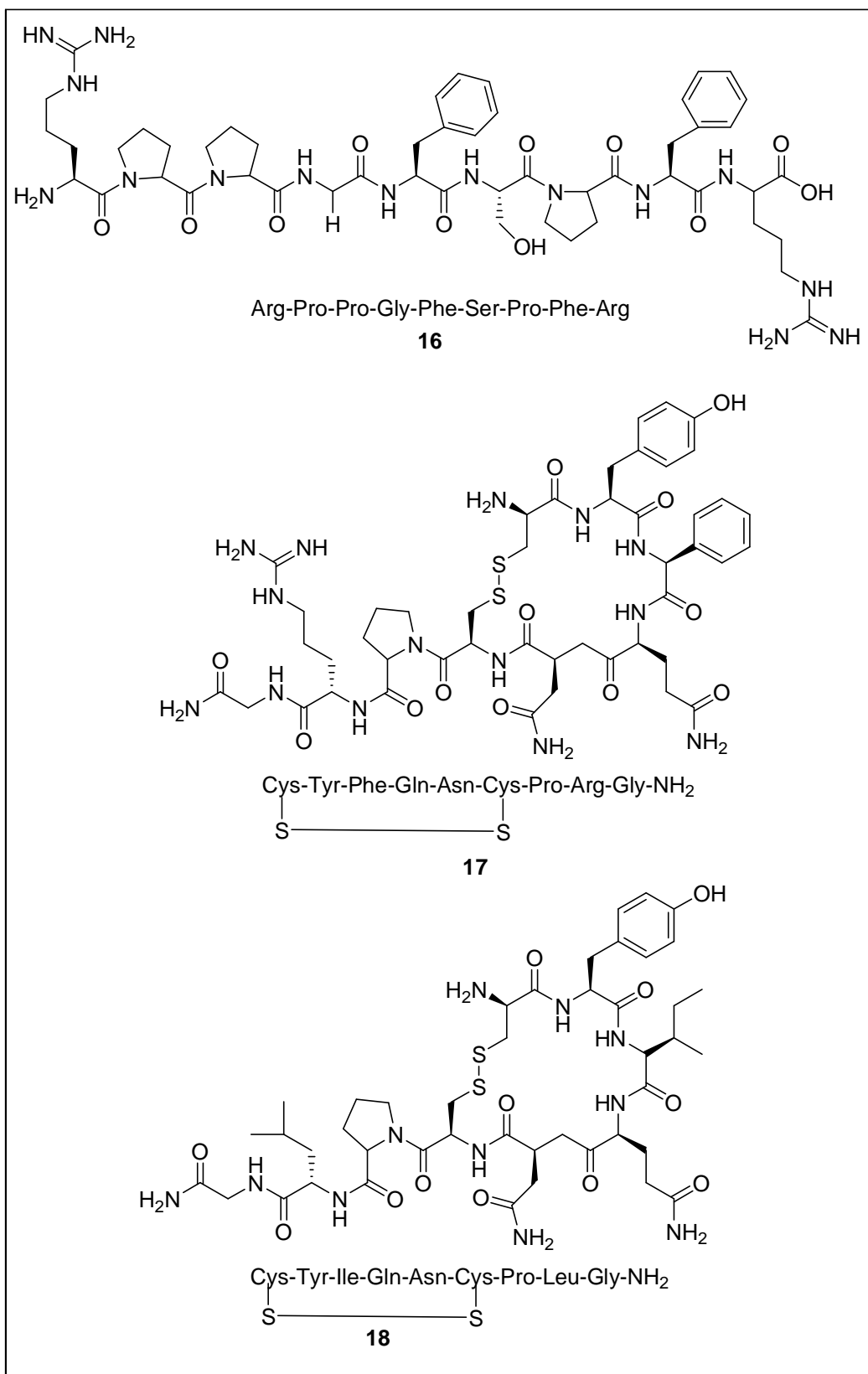


Figura 16. Nonapéptidos con función hormonal en el organismo.

PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

La defensa de un organismo contra microorganismos invasores patógenos mediante la segregación y la utilización de péptidos de origen endógeno pueden ser consideradas como un antiguo y evolucionado mecanismo de inmunidad.²⁶ En los últimos años se ha comenzado a estudiar una nueva clase de compuestos como una posible alternativa para su uso como agentes terapéuticos. Estos productos son denominados péptidos antimicrobianos y han sido aislados de plantas, animales y microorganismos, lo que ha conducido a una gran variedad de compuestos con características similares.^{23, 24}

En años recientes muchos péptidos antimicrobianos han sido aislados y estudiados en su actividad, estructura y organización química. Estos compuestos tienen la característica de ser de cadena corta (entre 10 y 35 aminoácidos), ser péptidos de bajo peso molecular (menos de 10 kDa), poseer una naturaleza catiónica presentando una carga de al menos +2 y comúnmente +4, +5, o +6 dependiendo de la cantidad de residuos de arginina o lisina que el péptido posea en su estructura. Este tipo de péptidos presentan un diseño anfipático tridimensional interno, formando una región hidrofóbica en la cadena originada por aminoácidos no polares, así como una región hidrofílica debida a los aminoácidos polares y a los aminoácidos cargados positivamente.^{25,26}

Estos productos se han clasificado en base a sus propiedades bioquímicas o a sus características estructurales como péptidos aniónicos, dipéptidos aromáticos y péptidos catiónicos, siendo estos últimos los más abundantes y entre los que se pueden destacar a las cecropinas, defensinas, tioninas, catelicidinas y trombocidinas. A la fecha se han descrito cerca de 800 péptidos antimicrobianos distribuidos en el reino animal y vegetal.²⁶ Los péptidos antimicrobianos encontrados en el hombre están distribuidos en una variedad de tejidos y células; estos se sintetizan principalmente en tejidos epiteliales expuestos al ataque microbiano, por ejemplo, la piel humana produce una considerable

Fundamentación teórica

cantidad de péptidos antimicrobianos del tipo de catelicidinas y defensinas; en las células de Panneth del intestino se han identificado β -defensinas; los gránulos de los leucocitos de los vertebrados contienen altas concentraciones de α - defensinas capaces de combatir bacterias Gram positivas y Gram negativas.²⁷

Por el amplio espectro de actividad antimicrobiana descrita en la literatura, a estos péptidos endógenos se les ha denominado como antibióticos naturales, ya que todas estas moléculas son elementos importantes directamente implicados en la respuesta inmune innata del huésped y forman la primera barrera de defensa del huésped.

Además del tipo de células ya mencionadas, se conoce que las plaquetas de los humanos y de conejos almacenan proteínas antibacterianas. Estas proteínas son llamadas proteínas microbicidas de plaquetas (PMPs) y son producidas por los gránulos α de las plaquetas después de su activación con trombina. Los primeros reportes que se tuvieron, describen que el suero de conejo contenía sustancias bactericidas contra bacterias Gram positivas.²⁸ Posteriormente estudios realizados sugieren que las plaquetas fueron el origen de dicha actividad bactericida, desde entonces se han realizado numerosas investigaciones donde se han aislado y descrito moléculas antimicrobianas específicas de plaquetas como son las trombocidinas.^{29,30}

Posteriormente fueron aisladas e identificadas dos trombocidinas por el grupo de investigación de Krijgsveld, siendo denominadas TC-1 y TC-2 las cuales poseían acción antimicrobiana contra *B. subtilis* y *S. aureus*, así como para *E. coli*.³⁰ El grupo de investigación de Yeaman³¹ aislaron e identificaron siete péptidos antimicrobianos de plaquetas humanas después de la estimulación con trombina.

Darveau y cols.⁴ describieron la actividad antimicrobiana de un péptido que se encontraba relacionado con la terminación carboxílica del factor IV de

plaquetas humanas (PF4); con esta referencia fue sintetizado un péptido de 13 aminoácidos denominado C13 (PLYKKIIKKLLES) correspondiente a dicha región terminal carboxílica y se encontró que este péptido tiene actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y Gram negativas como *Escherichia coli*.

El péptido C13 y otros análogos fueron preparados mediante síntesis en fase sólida teniendo como objetivo incrementar la actividad antibacteriana del péptido C13. Dos análogos del péptido mostraron un incremento en la actividad antibacteriana: un compuesto cuya cadena estaba incrementada por 5 aminoácidos y en el que se sustituyó la prolina por alanina en el aminoácido *N*-terminal del péptido para obtener el análogo C18G (ALYKKIIKKLLESAKKLG); otro compuesto fue obtenido cuando un residuo de ácido glutámico fue remplazado con una lisina y dos isoleucinas fueron cambiadas por leucinas para formar el análogo C18X (ALYKLLKLLKLLKSAKKLG). Ambos derivados mostraron una actividad antibacteriana en contra de la bacteria *Escherichia coli*.⁴

El péptido denominado C18G ha mostrado poseer actividad antimicrobiana de gran magnitud tanto *in vitro* como *in vivo*. Trabajos posteriores han estudiado y sintetizado análogos a este péptido con el objetivo de conocer las relaciones estructura-actividad y de esta manera poder mejorar la actividad antimicrobiana del péptido. Yeaman y cols.³² realizaron un estudio en donde probaron la actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos RP-1 (N-ALYKKFKKKLLKSLKRLG-C) y RP-11 (N-ALYKRLFKKLKKF-C), péptidos que guardan similitudes estructurales con el péptido antimicrobiano C18G, encontrando que estos péptidos sintéticos presentan actividad antimicrobiana contra la bacteria *Escherichia coli*.

Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos

Un requisito esencial para la utilización de cualquier agente antimicrobiano es que debe poseer una toxicidad selectiva contra células de microorganismos

Fundamentación teórica

patógenos sin afectar a las células del huésped. Una característica de gran valor de los péptidos antimicrobianos endógenos es su capacidad de discriminar entre las células de estos microorganismos y las células del huésped para desplegar su acción letal.³³

Los péptidos antimicrobianos producen exclusivamente daño en la membrana celular bacteriana, pues sólo tienen afinidad con ésta debido a que la membrana plasmática de las bacterias posee fosfolípidos aniónicos. En contraste, en las células de plantas y animales los fosfolípidos se encuentran en la cara citoplasmática de la membrana, inaccesibles al péptido. Además, la presencia de colesterol en la membrana de las células eucariotas le confiere estabilidad, reduciendo aún más la actividad de los péptidos antimicrobianos.^{33,34}

El primer paso de la interacción entre el péptido catiónico y la membrana aniónica de un microorganismo se lleva a cabo por la atracción electrostática, la cual puede ser inhibida por grandes concentraciones de sal en la solución en la que se lleva a cabo esta interacción. El segundo paso es la permeabilización de la membrana, este mecanismo origina la formación de poros en la membrana debido a la incorporación de los péptidos en la membrana celular, el modelo que describe la acción de la mayoría de los péptidos antimicrobianos es el denominado “barril” (Fig. 17).³⁵ Comienza por una acumulación de moléculas del péptido en la cara externa de la membrana, por interacción de sus cargas positivas por los fosfolípidos aniónicos. Alcanzada una densidad crítica del péptido algunas moléculas del mismo tienden a orientarse perpendicularmente al plano de la membrana, originando poros con flujo de metabolitos y pérdida de la permeabilidad de la membrana por intercambio de fosfolípidos entre ambas caras, lo que provoca la lisis del microorganismo por choque osmótico y la salida del contenido intramolecular.

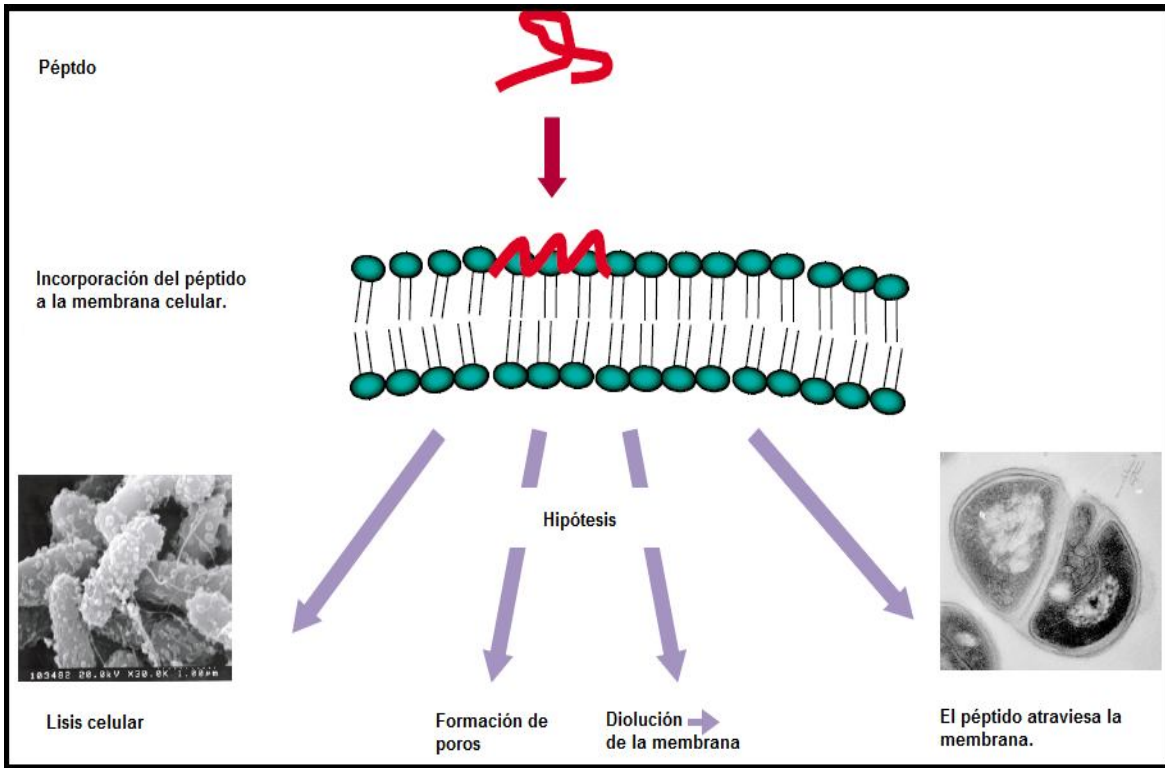


Figura 17. Mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.

Debido a la aparición de cepas resistentes, muchos antibióticos comerciales ya no son efectivos. El problema de resistencia al uso de los antibióticos convencionales ha despertado el interés en el desarrollo de péptidos antimicrobianos como agentes terapéuticos. Por sus características estructurales y funcionales, así como por su baja toxicidad para células eucarióticas, los péptidos antimicrobianos están siendo evaluados como agentes terapéuticos y profilácticos.³⁶

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

La formación del enlace peptídico entre dos aminoácidos para dar como resultado un dipéptido, parece ser un procedimiento químico simple. Los dos aminoácidos se unen mediante un enlace amida (enlace peptídico) con la consecuente eliminación de agua (Fig. 18).³⁷

Fundamentación teórica

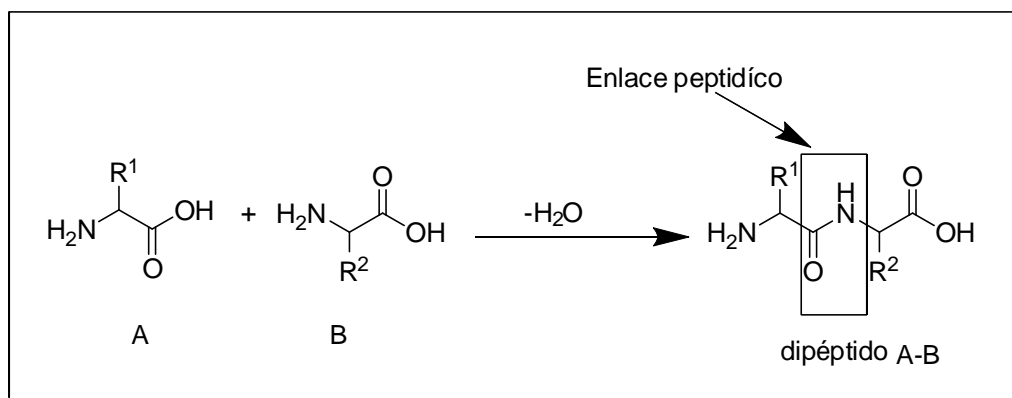


Figura 18. Formación del enlace peptídico.

La síntesis del enlace peptídico bajo condiciones de reacción suaves solo se puede conseguir después de la activación del componente carboxílico (A) de uno de los aminoácidos; el segundo aminoácido, como componente amino (B), ataca al componente carboxílico activado con la formación del dipéptido (A-B). Si el grupo amino del componente carboxílico (A) no está protegido, entonces la formación del enlace peptídico ocurrirá de una manera incontrolada (Fig. 19). Péptidos lineales y cíclicos son formados como productos indeseados.³⁷

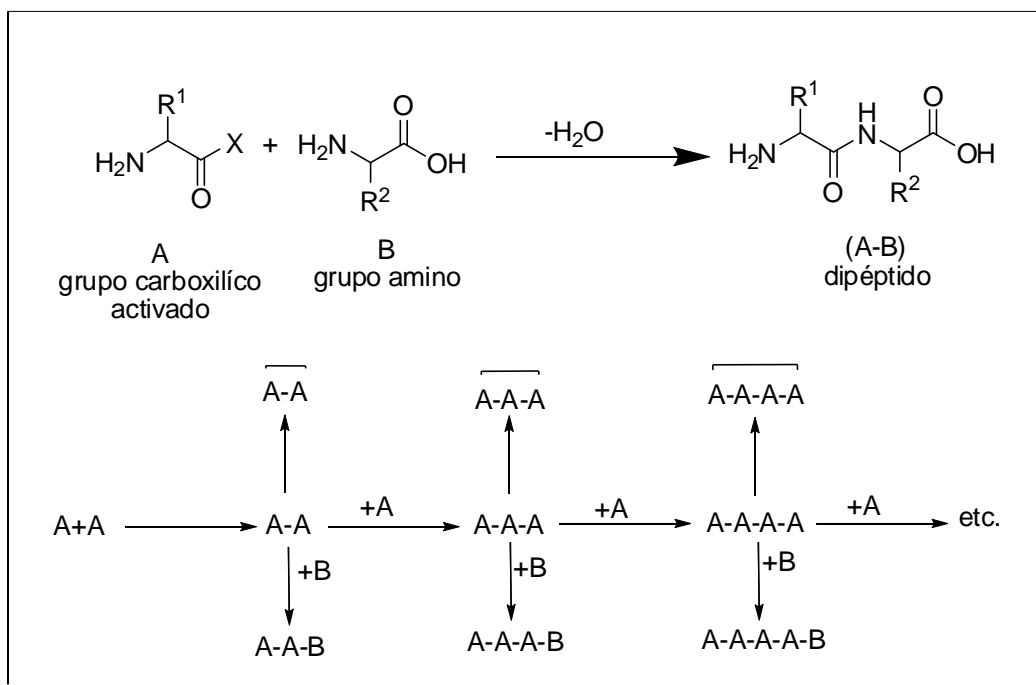


Figura 19. Formación selectiva del dipéptido A-B.

Fundamentación teórica

La formación de cada enlace peptídico es por lo tanto un procedimiento que involucra tres pasos: (Fig. 20)

1. La preparación de un aminoácido protegido parcialmente; después de esta protección, la estructura zwitterion del aminoácido ya no se presenta.
2. La formación del enlace peptídico en dos pasos. El grupo carboxílico del aminoácido *N*-protegido debe ser activado, para ser transformado en un intermediario reactivo.
3. La desprotección selectiva o total de la cadena peptídica. La desprotección total solo es llevada a cabo cuando el péptido final ha sido completado.

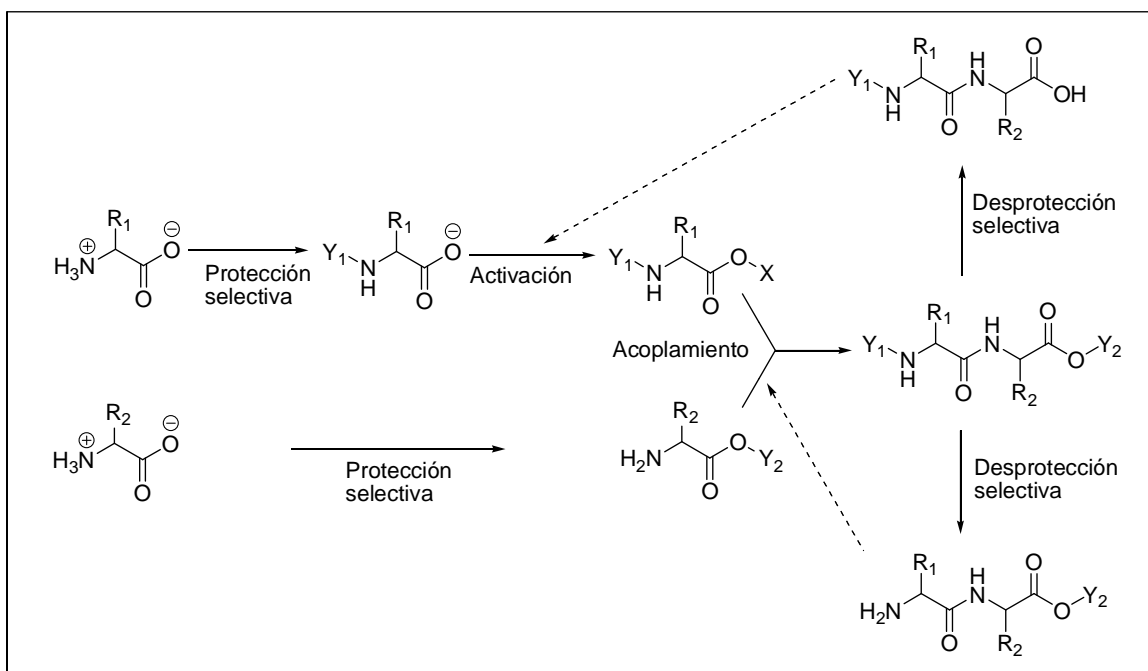


Figura 20. Reacciones involucradas en la síntesis de péptidos.

La síntesis de péptidos puede llegar a ser complicada por el hecho de que 10 de los aminoácidos proteínogénicos (Ser, Thr, Tyr, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Gly y Cys) tienen grupos funcionales en sus cadenas laterales los cuales necesitan ser selectivamente protegidos.

GRUPOS PROTECTORES

Cuando una reacción química es llevada a cabo selectivamente en un sitio de reacción con compuestos que poseen más de un grupo funcional, otros sitios reactivos deben ser temporalmente bloqueados y muchos grupos protectores han sido desarrollados para este propósito. Uno de los principales pasos para la síntesis de péptidos es la protección de los grupos funcionales de los aminoácidos, que deben protegerse para evitar la formación de un enlace peptídico no deseado. Así mismo, la protección de las cadenas laterales de los aminoácidos evita que estos reaccionen con los grupos amino o carboxilo de otros aminoácidos, o que den lugar a reacciones secundarias. Otra razón importante por la que se utilizan grupos protectores es para aumentar la solubilidad de los sustratos en los disolventes orgánicos convencionales, facilitando su manejo y purificación.^{37,38}

Las características que debe tener un grupo protector son la de ser químicamente estable en las condiciones en la que se lleva a cabo la síntesis peptídica y ser fácilmente removible en condiciones suaves que no alteren la formación del enlace peptídico al final o en fases intermediarias de la síntesis. La caracterización, estabilidad y solubilidad de los aminoácidos protegidos deben ser favorables, logrando de este modo su fácil manejo y purificación, además de que la introducción del grupo protector debe conducir a la formación de un derivado del aminoácido donde ya no esté presente la forma zwitterión.³⁸

Con este propósito se pueden clasificar a los grupos protectores como permanentes, los cuales son retenidos hasta que el péptido ha sido completado, o temporales, que son eliminados al final de cada etapa de síntesis.

La elección de los grupos protectores debe llevarse a cabo en términos de la estrategia de síntesis para un péptido específico, así la ortogonalidad entre grupos protectores es un factor clave del éxito en la síntesis de péptidos. Un grupo

ortogonal dentro de un conjunto de grupos protectores, es aquel grupo funcional que no se ve afectado por las reacciones de desprotección de los otros grupos protectores, donde pueden reaccionar en cualquier orden y en presencia unos de otros.

Protección del grupo amino

El objetivo fundamental que se debe lograr al proteger el grupo amino es el de suprimir su reactividad nucleofílica. Una gran cantidad de grupos protectores han sido desarrollados para el grupo amino, los cuales incluyen carbamatos (NCO_2R) usados para la protección de aminoácidos en síntesis de péptidos y proteínas, así como también las amidas (NCOR) utilizadas comúnmente en síntesis de alcaloides y para la protección del nitrógeno en las bases adenina, citosina y guanina en la síntesis de nucleótidos. Se ha observado que los carbamatos pueden ser usados como grupos protectores de aminoácidos en síntesis de péptidos. Estos grupos protectores son formados a partir de una amina con una amplia variedad de reactivos, siendo el más común los cloroformatos; las amidas son formadas a partir del cloruro de ácido.³⁹

Una gran variedad de carbamatos han sido usados como grupos protectores y entre los más representativos en síntesis de péptidos se puede mencionar a los siguientes: el *t*-butilcarbamato (BOC), fácilmente eliminado por una hidrólisis ácida, generalmente por medio de una disolución de ácido trifluoroacético; el bencilcarbamato (Cbz o Z), separado mediante una hidrogenación catalítica en presencia de paladio; el 2,4-diclorobencilcarbamato, es estable a hidrólisis catalizada por ácidos; el 2-bifenilil-isopropilcarbamato, es hidrolizado más fácilmente que el *t*-butilcarbamato en ácido acético; el 9-fluorofenilmetilcarbamato, suprimido por una β -eliminación por el empleo de una base (Fig. 21).³⁹

Fundamentación teórica

El factor más importante a considerar cuando se escoge un grupo protector para un grupo amino es la facilidad con que este se podrá separar o eliminar en las etapas posteriores de la síntesis. Por ejemplo, las aminas se han protegido en forma de amidas cuando se llevan a cabo reacciones de sustitución electrófila aromática en aminas aromáticas, sin embargo una amida no es un grupo protector adecuado en la síntesis de péptidos ya que no habría manera de eliminar el grupo protector sin hidrolizar también los enlaces peptídicos.

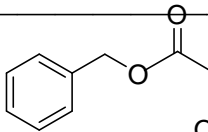
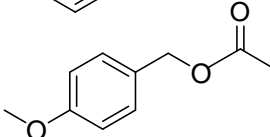
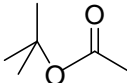
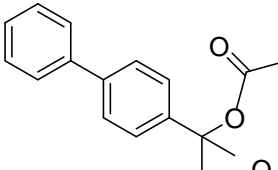
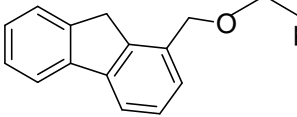
NOMBRE	ABREVIACIÓN	R'-O	ROMPIMIENTO
Benciloxicarbonil	Z		H ₂ /Pd HBr/AcOH
4-metoxibenciloxi carbonil	Z(Ome)		TFA;H ₂ /Pd
<i>tert</i> - Butoxicarbonil	Boc		TFA/CH ₂ Cl ₂ HCl/solvente orgánico
2-(4-bifenilil)-isopropoxi carbonil	Bpoc		80% AcOH Mg(ClO ₄) ₂
Fluorenil-9-metoxicarbonil	Fmoc		piperidina

Figura 21. Grupos protectores del grupo amino.

Protección del grupo carboxilo

La protección del grupo carboxilo no es tan necesaria como la del amino, ya que es menos nucleofílico; sin embargo, los ácidos carboxílicos deben ser protegidos: (1) Para eliminar el protón ácido y que este no interfiera en reacciones catalizadas por base; (2) Para prevenir reacciones de adición nucleofílica al grupo carboxilo; y (3) Para aumentar la solubilidad de la molécula en los disolventes orgánicos. Además, el grupo protector debe también ser removido sin afectar la integridad de la molécula, por esta razón, un gran número de grupos protectores para ácidos han sido desarrollados, los cuales son removidos bajo una variedad de condiciones, incluso la mayoría pueden ser eliminados por una simple hidrólisis en condiciones suaves.^{39,40}

El método común para proteger el grupo carboxilo es mediante la esterificación; la preparación de ésteres puede ser clasificada en dos principales categorías: (1) Activación del carboxilato con un buen grupo saliente y (2) desplazamiento nucleofílico de un carboxilato sobre un halogenuro o sulfonato de alquilo. El método utilizado para la preparación de ésteres es mediante la reacción de un cloruro de ácido o un anhídrido con un alcohol en presencia de una base, como piridina o trietilamina en un disolvente adecuado. Con alcoholes con gran impedimento estérico, la reacción es a menudo lenta, pero puede ser acelerada por la adición de dimetilaminopiridina (DMAP). El método utilizado para la preparación del cloruro de ácido es mediante la reacción del ácido con SOCl_2 ó POCl_3 a reflujo. Un proceso más suave involucra la reacción del ácido con cloruro de oxalilo en presencia de un catalizador como dimetilformamida en cloruro de metileno a temperatura ambiente o a una menor temperatura.⁴⁰

El método más simple y frecuentemente usado para la hidrólisis de los ésteres es mediante el uso de hidróxidos en un medio orgánico acuoso, como metanol-agua. Los ésteres comúnmente preparados para la protección del grupo carboxilo en la síntesis de péptidos son: el éster metílico, etílico, bencílico o

Fundamentación teórica

terbutílico, aunque ocasionalmente se pueden usar los ésteres 2 y 4 nitrobenzilos (Fig. 22).



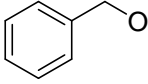
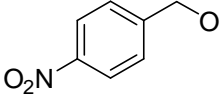
NOMBRE	ABREVIACIÓN	R-O	ROMPIMIENTO
Metil	Me		Alcalino o hidrólisis enzimática
Etil	Et		Alcalino o hidrólisis enzimática
Bencil	Bzl		H ₂ /Pd, HBr/AcOH, hidólisis alcalina
4-Nitrobencil	Nbz		H ₂ /Pd, Hidrólisis alcalina, estable a HBr/AcOH

Figura 22. Grupos protectores del grupo carboxilo.

MÉTODOS DE SINTESIS

Síntesis de péptidos en solución

La síntesis de péptidos en solución, también conocida como el método clásico, es llevada a cabo en distintos disolventes orgánicos, pero para prevenir la formación de oxazolonas se recomienda el uso de acetato de etilo, tetrahidrofurano, o acetonitrilo.

La elongación del péptido por el método clásico puede llevarse a cabo de dos formas: de manera lineal o convergente y la elección dependerá de las necesidades de cada péptido. El primer factor a considerar es que un péptido puede sintetizarse a partir del amino o del carboxilo terminal. Usando el procedimiento de síntesis clásico, el producto debe ser purificado y caracterizado en cada paso de la reacción.⁴⁰

Síntesis de péptidos en fase sólida

El método para la síntesis de péptidos en fase sólida es mediante la aplicación de la técnica de Merrifield.⁴¹ Esta técnica fue introducida por Bruce Merrifield, su idea básicamente consiste en ensamblar en un soporte sólido insoluble (resina) el residuo C-terminal del péptido a sintetizar, con lo cual la cadena de aminoácidos irá creciendo anclada al soporte sólido mediante una estrategia de elongación gradual. Finalmente el producto es desprendido del soporte y su purificación y caracterización se lleva a cabo en solución. De esta manera se permite que entre cada etapa de crecimiento haya una rápida filtración y lavados para deshacerse de reactivos y productos secundarios, en consecuencia no habrá que purificar cada péptido intermediario.⁴¹

Aunque las reacciones se llevan a cabo en disolventes orgánicos como en el método clásico, el nombre de síntesis de péptidos en fase sólida fue dado por el hecho de que el péptido va creciendo anclado a un soporte (Fig.23)

Una de las características particulares de la técnica de Merrifield es el uso de *t*-butoxicarbonil como grupo protector temporal del α -amino y como permanentes el grupo bencil éster. El soporte sólido comúnmente utilizado es una resina de poliestireno clorometilada entrecruzada por la incorporación con una pequeña cantidad de divinilbenceno. El primer aminoácido es pegado a la resina a través de la sustitución nucleofílica del cloruro por parte del carboxilato del BOC-aminoácido en cuestión el cual se encuentra formando la respectiva sal de una amina terciaria, generando el equivalente de un bencil éster. La desprotección es llevada a cabo con una solución de ácido trifluoroacético en diclorometano, le sigue una neutralización para que el siguiente aminoácido pueda ser acoplado por medio de DCC. Las etapas de desprotección, neutralización y acoplamiento son repetidas con los BOC-aminoácidos apropiados hasta que la secuencia ha sido completada. Finalmente el péptido es liberado de la resina por filtración y el producto es recuperado de la solución.⁴¹

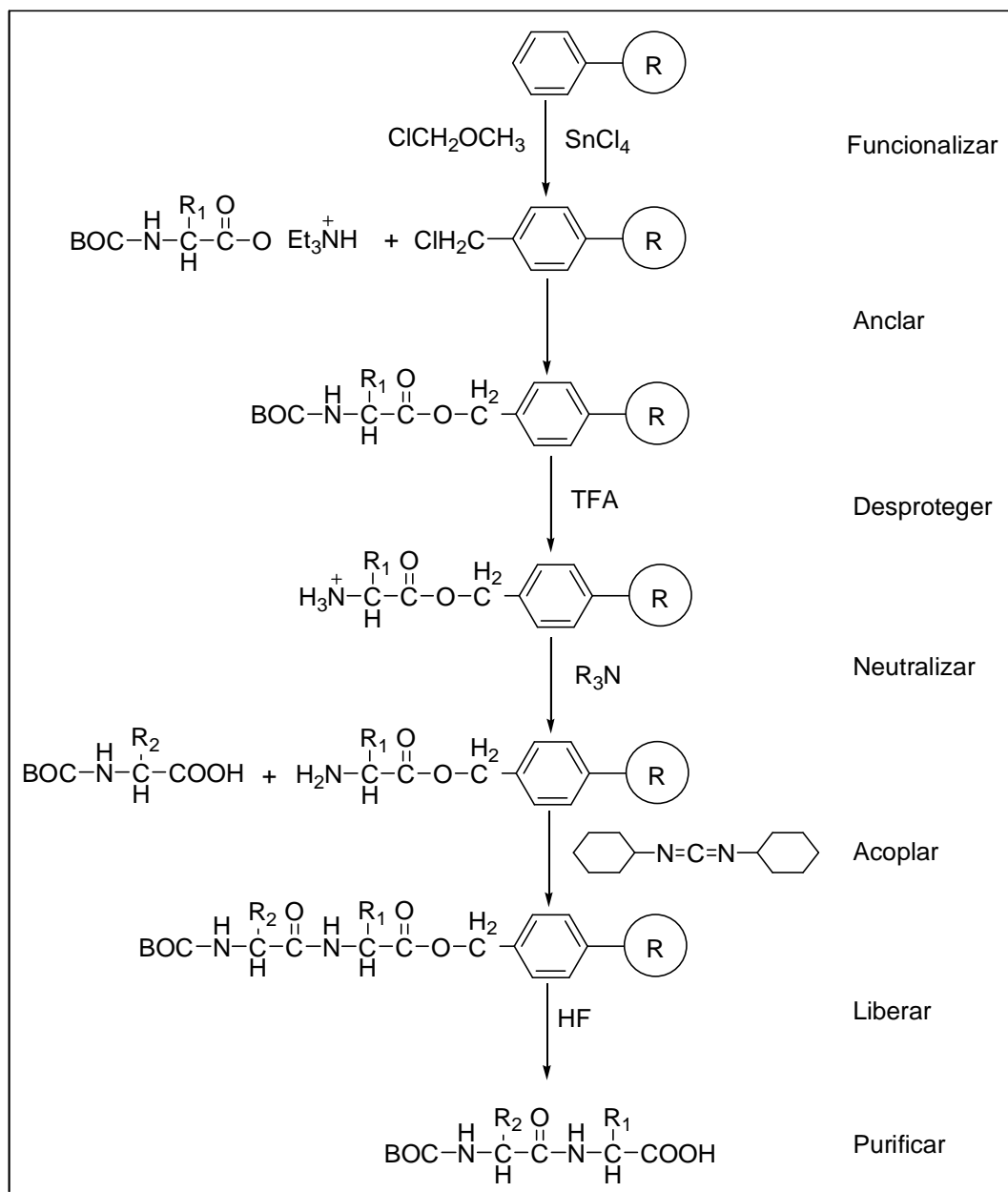


Figura 23. Síntesis de péptidos en fase sólida.

MÉTODOS DE ACOPLAMIENTO

Las reacciones necesarias para formar el esqueleto de una cadena peptídica en solución deben involucrar al grupo amino y ningún otro grupo nucleófilo. Como un ácido carboxílico libre no reacciona fácilmente con aminas para formar amidas, debe de convertirse el ácido en su cloruro de ácido o en el

correspondiente anhídrido de ácido, que poseen grupos salientes mucho mejores que el hidroxilo del ácido carboxílico.

Existen dos aspectos importantes en la síntesis de péptidos, en primer lugar los grupos deben protegerse selectivamente para que la reacción se pueda dirigir hacia la parte de la molécula deseada, por otro lado el grupo carboxílico de un aminoácido debe transformarse en un grupo suficientemente reactivo para formar un enlace amida en condiciones suaves.

Formación del enlace peptídico

La formación del enlace peptídico es una reacción de sustitución, donde se involucra el ataque nucleofílico por parte del grupo amino al centro electrofílico del átomo de carbono carboxílico, donde está involucrado un intermediario tetrahédrico. A pesar de que los ácidos carboxílicos ordinariamente forman sales con las aminas a temperatura ambiente y que la transformación de estas sales en amidas es posible mediante calentamiento, estas condiciones ponen en riesgo la integridad estereoquímica de los aminoácidos involucrados, por lo que es necesaria la activación del componente carboxílico en un derivado que incremente su electrofilicidad para permitir el ataque por parte del componente amino en condiciones de reacción suaves (Fig. 24).⁴²

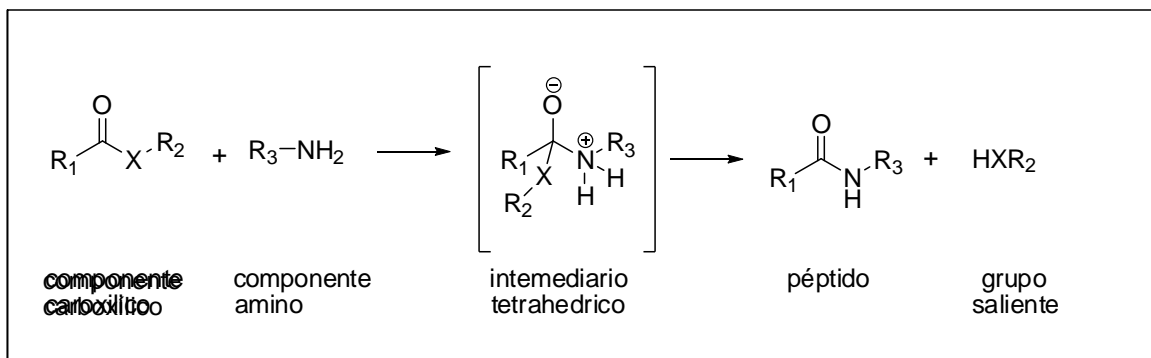


Figura 24. Formación del enlace peptídico.

Fundamentación teórica

La activación del grupo carboxílico por un incremento en su electrofilicidad, es llevada a cabo por la introducción de un grupo electroattractor. Los grupos que ejercen ya sea un efecto inductivo o un efecto mesomérico, disminuyen la densidad electrónica del grupo C=O, favoreciendo el ataque nucleofílico del componente amino generando la formación del enlace péptido.

La variación del grupo electroattractor XR_2 proporciona un amplio espectro de métodos para la formación del enlace péptido. Las formas comunes activadas del grupo carboxilo se presentan en la Figura 25, en el orden del incremento de su complejidad.

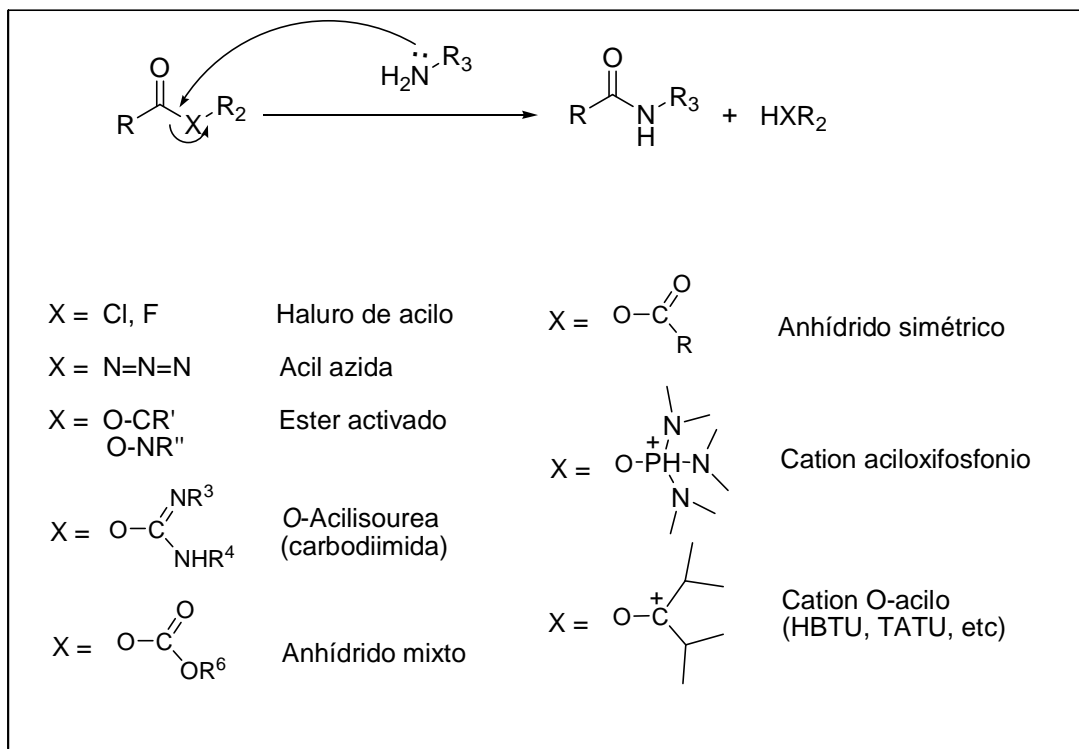


Figura 25. Grupos activantes del grupo carboxílico.

El grupo X puede ser un átomo de halógeno, un grupo azida o un átomo de oxígeno unido a un átomo de carbono con un doble enlace ($\text{O}-\text{C}=\text{O}$), un carbón catiónico ($\text{O}-\text{C}^+$), un átomo de fósforo ($\text{O}-\text{P}^+$), o un átomo de nitrógeno adyacente a un átomo con un doble enlace ($\text{O}-\text{NX}=\text{O}$).⁴¹

Fundamentación teórica

El método comúnmente empleado para la formación de enlaces peptídicos es el de la carbodiimida utilizando la dicitclohexilcarbodiimida (DCC), la cual contiene dos átomos de nitrógeno que son ligeramente básicos, con los que se genera una reacción entre la misma carbodiimida y un ácido. El primer evento de la activación es la formación de una O-acilurea. La DCC actúa convirtiendo el grupo ácido carboxílico en un agente acilante reactivo, que después experimenta una sustitución nucleofílica en el grupo acilo con la amina. La DCC forma un subproducto, la dicitclohexilurea (DCU) el cual es muy poco soluble en la mayoría de los disolventes, por lo que la separación de éste del péptido preparado es muy fácil por diferencia de solubilidades en síntesis de péptidos en solución (Fig. 26).⁴²

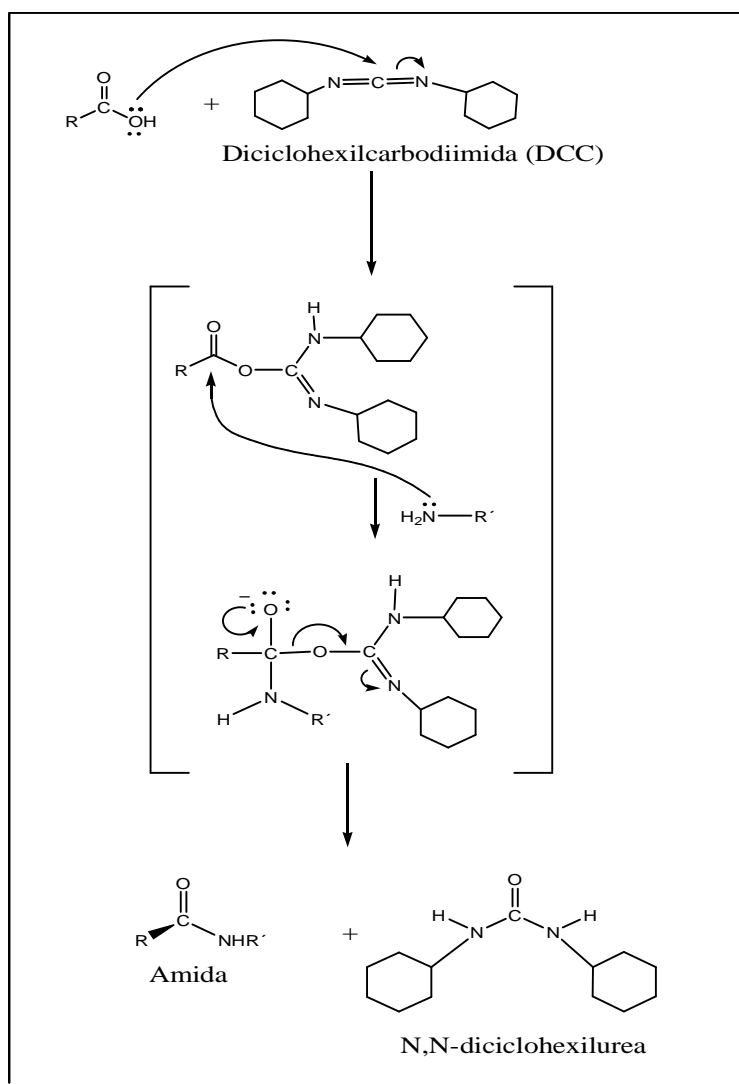


Figura 26. Formación del enlace peptídico mediante DCC.

PROBLEMAS EN LA SÍNTESIS

RACEMIZACIÓN

Un riesgo inherente de racemización está impuesto en todas las reacciones que involucran grupos funcionales conectados a un centro estereogénico de un α -aminoácido que puede ocasionar la pérdida parcial o total de la estereoquímica del péptido. El término racemización en Química Orgánica es usado para referirse a la conversión completa o parcial de un enantiómero en una mezcla racémica; en química de péptidos también es utilizado para referirse a la epimerización parcial o total de un centro quiral. La pureza óptica y la integridad estereoquímica de un péptido sintético dependen principalmente del grado de epimerización parcial durante los pasos de acoplamiento. Como la actividad biológica de un péptido o una proteína depende principalmente de la configuración del centro quiral, la racemización debe ser disminuida durante la síntesis de péptidos.

Aunque los aminoácidos libres son configuracionalmente estables, esta característica puede ser diferente cuando derivados carboxil activados están involucrados. La desprotonación en el carbono alfa lleva a la formación de enolatos (**20**) que pueden ser reprotonados y formar epímeros (**19**, **21**). Los grupos fuertemente electroattractores (por ejemplo cloruros) y el uso de bases fuertes no voluminosas son factores que pueden favorecer que la epimerización ocurra antes que la formación del enlace peptídico se lleve a cabo (Fig. 27).⁴³

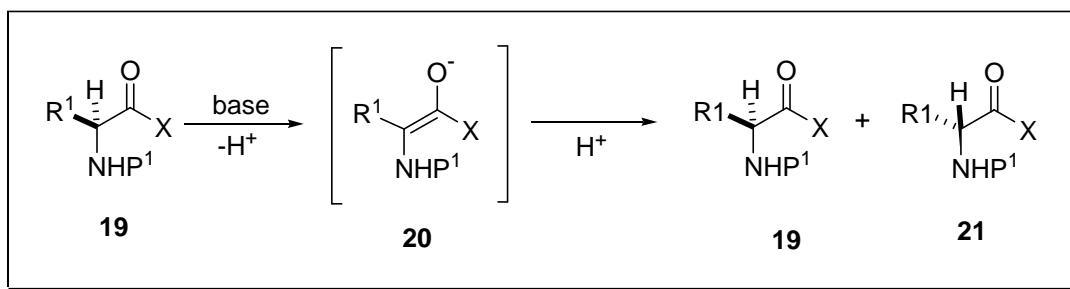


Figura 27. Racemización, formación de enolatos.

Fundamentación teórica

Por otro lado los acil-aminoácidos (**22**) activados bajo la influencia de una base, pueden sufrir ciclización para generar oxazolonas ⁴³ (**24**); estos compuestos en el medio de reacción generan al intermediario (**25**, **26**) que al reprotonarse puede conducir a productos de epimerización (**27**, **29**), (Fig. 28).

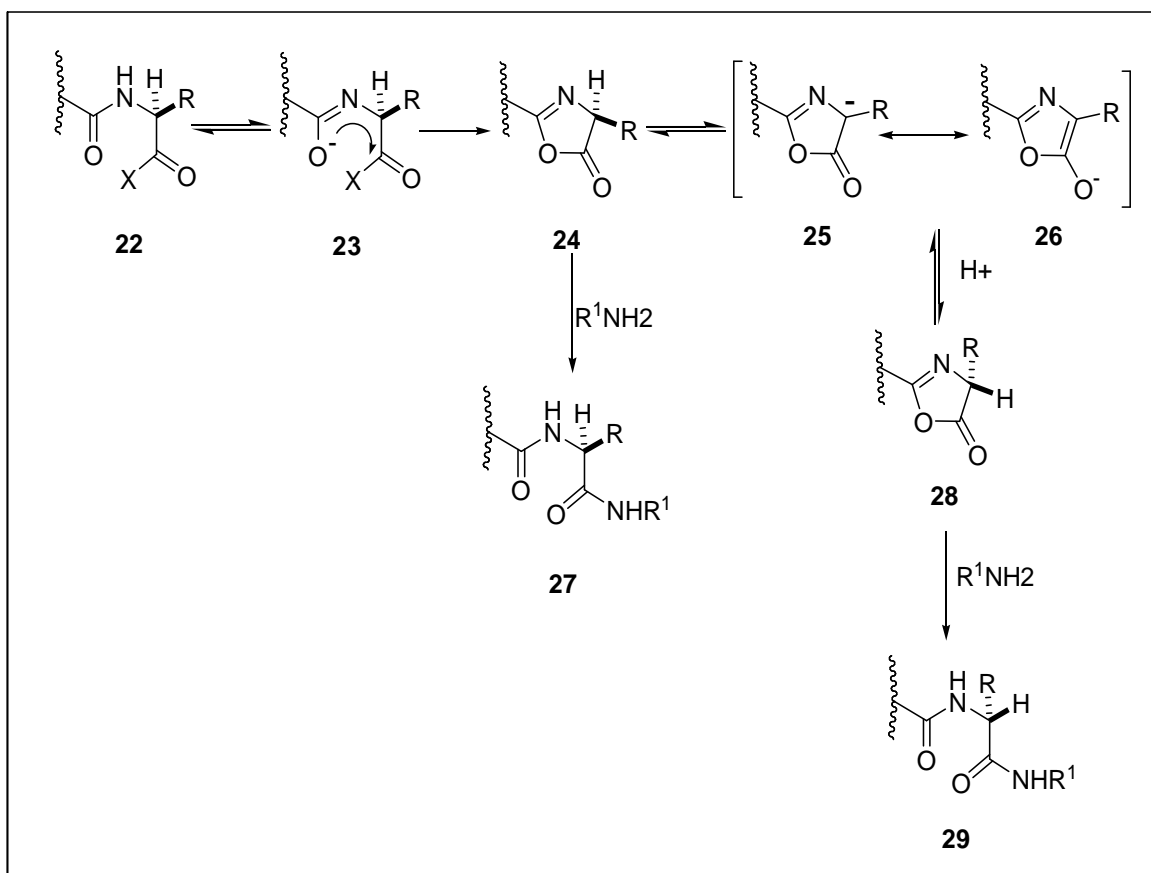


Figura 28. Racemización, formación de oxazolonas.

Si bien las oxazolonas se comportan como agentes acilantes, la formación de epímeros conducirá a productos de acoplamiento diastereoméricos, lo cual disminuye el rendimiento y podría dificultar el proceso de purificación. Para reducir la epimerización que se presenta en la activación de acil- α -aminoácidos, Kônig y Geiger⁴⁴ encontraron que el 1-hidroxi-1*H*-benzotriazol (HOBt, **30**) y la 3-hidroxi-4-oxo-3,4-dihidro-1,2,3-benzotriazina (**31**) son aditivos eficaces que reaccionan con

Fundamentación teórica

la O-acilurea, formando ésteres activos los cuales reaccionan rápidamente con el componente amino y la epimerización es reducida considerablemente (Fig. 29).

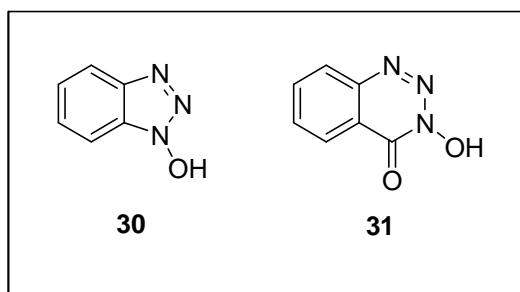


Figura 29. Compuestos que reducen la epimerización.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Reportes recientes han demostrado que los péptidos antimicrobianos pueden ser diseñados y que su preparación mediante técnicas biotecnológicas o mediante síntesis química ha llevado a la obtención de productos puros a gran escala y al mismo tiempo, a la producción de nuevos compuestos con una mayor actividad biológica.¹⁵

Por sus características estructurales y funcionales, así como por su baja toxicidad para células eucarióticas, los péptidos antimicrobianos están siendo evaluados como agentes terapéuticos y profilácticos. Debido a la aparición de cepas resistentes, muchos antibióticos comerciales ya no son efectivos. Por ello, el interés clínico de los péptidos antimicrobianos se debe a dos de sus características generales, amplio rango de patógenos susceptibles y muy baja inducción de resistencia. Ambas características se derivan de su mecanismo de acción; la permeabilización de la membrana del patógeno por la interacción con los fosfolípidos aniónicos de la cara externa de la membrana.³⁶

Estudios recientes han mostrado que las plaquetas de humanos y otros mamíferos contienen un grupo de potentes péptidos antimicrobianos llamados proteínas microbicidas de plaquetas (PMPs), Yeaman y cols.³² realizaron un estudio en donde probaron la actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos RP-1 (N-ALYKKFKKKLLKSLKRLG-C) y RP-11 (N-ALYKRLFKLLKKF-C) (Fig. 30), estos péptidos tienen algunas similitudes estructurales con el péptido antimicrobiano C18G, previamente descrito por Darveau y cols,⁴ y se ha encontrado que estos péptidos sintéticos presentaron actividad antimicrobiana contra la bacteria *Escherichia coli*.

Planteamiento del problema

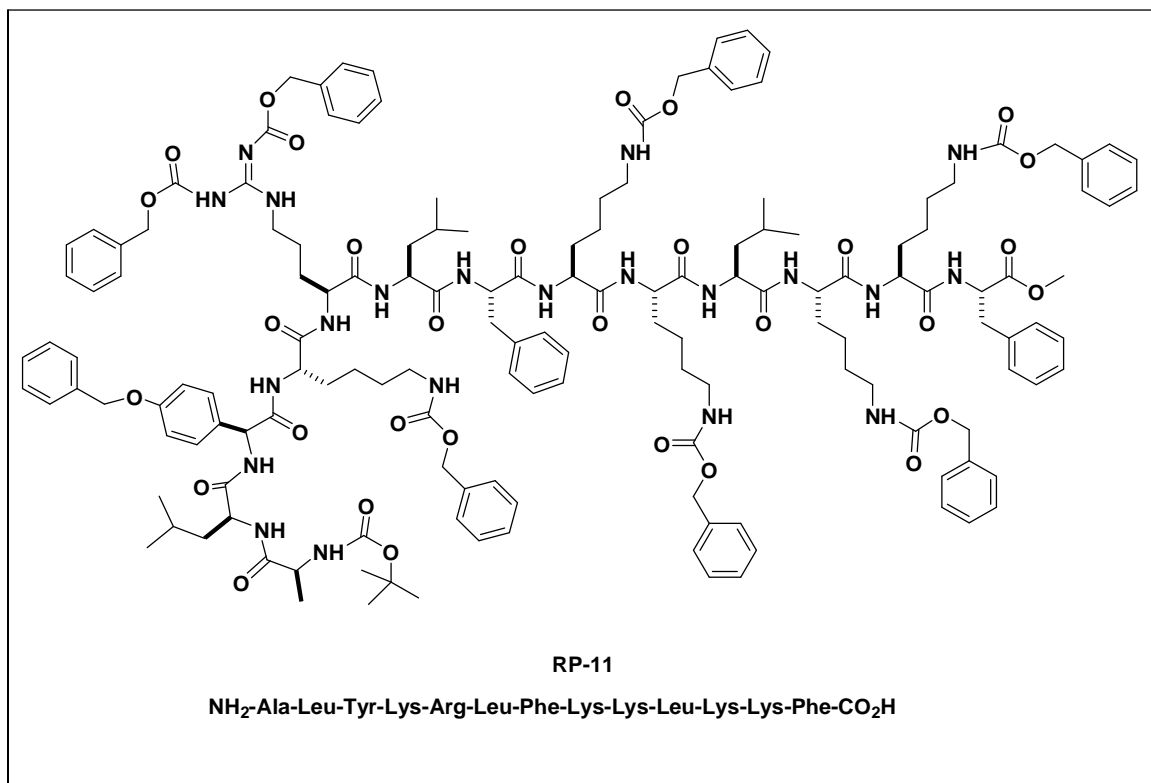


Figura 30. Péptido RP-11

La importancia de llevar a cabo la síntesis del péptido RP-11, consiste en que posteriormente se puedan hacer cambios ya sean estructurales o en la secuencia de sus aminoácidos para obtener diversos análogos al péptido original, ya que es conocido que la modificación estructural de un compuesto bioactivo puede tener repercusiones importantes en sus propiedades fisicoquímicas y cambios en su actividad que pueden ir desde la potenciación hasta la desaparición total de su actividad original y en algunos casos es posible la aparición de propiedades biológicas diferentes.

En un estudio retrosintético del péptido RP-II, este puede ser preparado a través del acoplamiento de los tres fragmentos presentados en la figura 31.

Planteamiento del problema

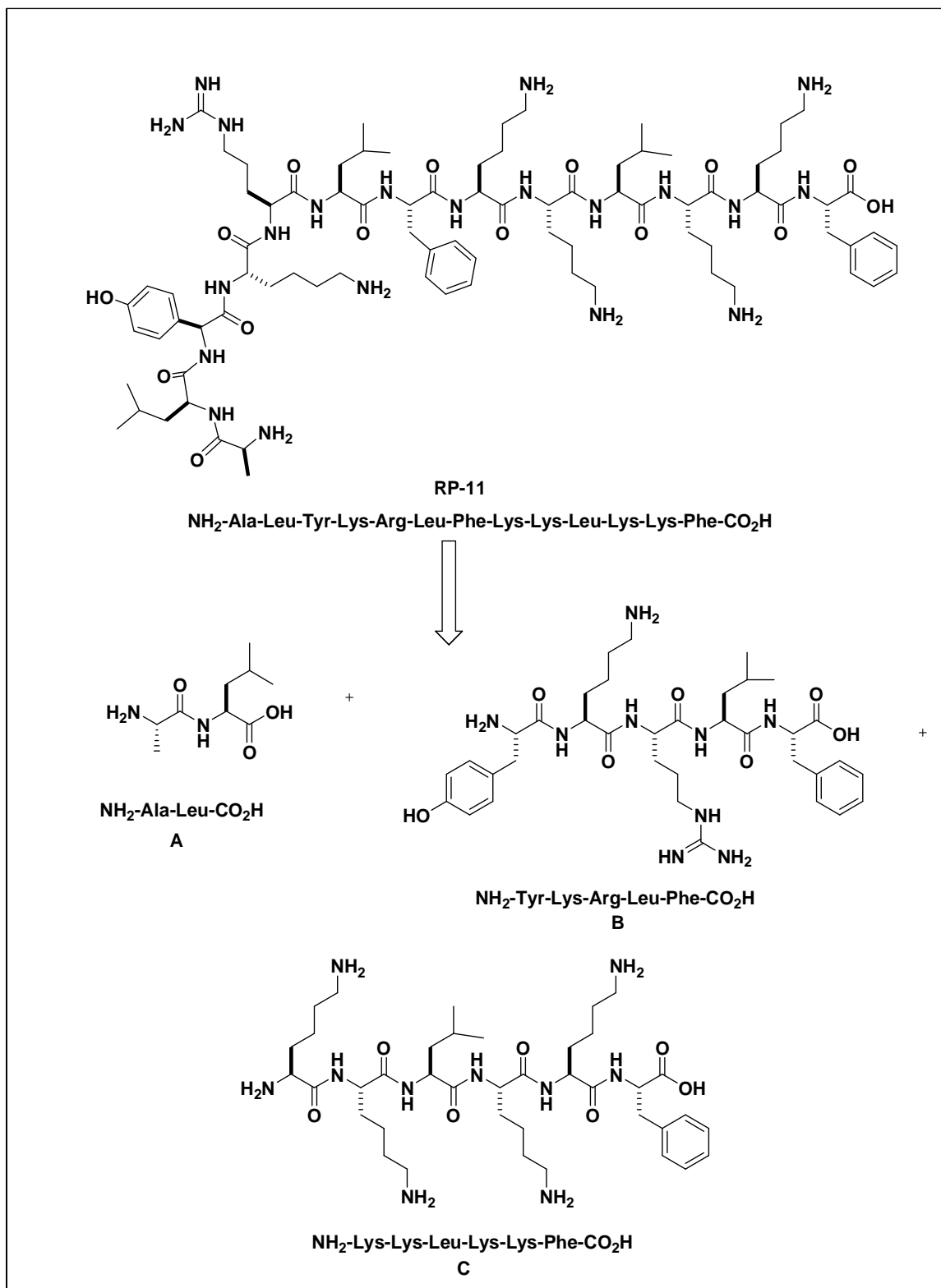


Figura 31. Retrosíntesis del péptido RP-11.

Planteamiento del problema

Por lo que en el presente estudio se pretende llevar a cabo la síntesis del péptido B (**30**) como uno de los tres fragmentos que pueden dar origen al péptido RP-11 (Fig. 32). Este compuesto será un péptido conformado por cinco aminoácidos, cuya síntesis se llevará a cabo de una manera lineal en solución mediante técnicas convencionales de acoplamiento de péptidos.

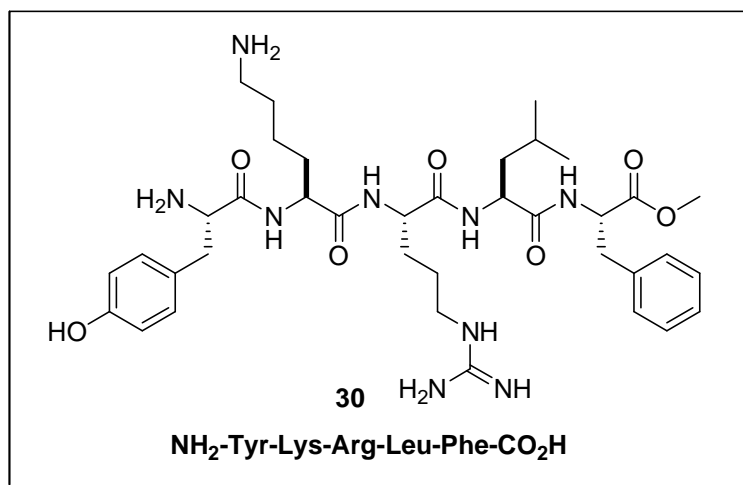


Figura 32. Pentapéptido, fragmento B.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO ESPECIFICO

Desarrollar una metodología de síntesis eficiente y versátil que permita la obtención del pentapéptido $\text{NH}_2\text{-Tyr-Lys-Arg-Leu-Phe-CO}_2\text{H}$, precursor del péptido antimicrobiano RP-11.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Síntesis de un pentapéptido con la siguiente secuencia de aminoácidos: $\text{NH}_2\text{-Tyr-Lys-Arg-Leu-Phe-CO}_2\text{H}$.
- Purificación de productos intermedios y del péptido final.
- Caracterización espectroscópica (IR, RMN^1H , RMN^{13}C y EM) del producto final así como de cada intermediario preparado.

V. HIPÓTESIS

El uso de los aminoácidos Lys, Tyr, Arg, Leu y Phe protegidos adecuadamente con grupos ortogonales favorecerá la formación de los enlaces peptídicos y permitirá una manipulación selectiva de cada uno de los productos intermedarios para la obtención del pentapéptido.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

Boc-Tyr(Bzl)-OH, $\geq 99\%$	Fluka
Boc-Lys(Z)-OH DCHA, $\geq 98\%$	Fluka
Boc-Arg(Z) ₂ -OH, $\geq 98\%$	Fluka
L-Leucina, $\geq 99\%$	Fluka
L-Fenilalanina, $\geq 99\%$	Fluka
Diciclohexilcarbodiimida, $\geq 99\%$	Aldrich
1-hidroxi-1 <i>H</i> -benzotriazol	Aldrich
Pentafluorofenol, $\geq 99\%$	Aldrich
Ácido trifluoroacético, 99%	Aldrich
Trietilamina, 99.5%	Aldrich
Ácido cítrico monohidratado, 98%	Aldrich
Hidróxido de litio, 99.8%	Aldrich
Sílica gel, $\geq 99\%$	Merck
Sulfato de sodio, 99 %	Aldrich
Tetrahidrofurano, 99.9%	J.T. Baker
Hexano, 98.6%	Química Meyer
Acetato de etilo, 99.8%	Química Meyer
Cloruro de metileno, 99.5%	Química Meyer
Tolueno, 99.9%	Mallickodt
Metanol, 99%	Química Meyer

Material y métodos

Material

Matraz balón 14/23	50 y 100 mL
Matraz erlenmeyer	75, 125 y 250 mL
Matraz kitazato	125 y 250 mL
Vasos de precipitado	10 y 100 mL
Embudo buchner	Diferentes medidas
Embudo de talle corto	Diferentes medidas
Probeta	10, 50 y 1000 mL
Barras magnéticas	varios tamaños
Embudo de separación	125 mL
Columna para cromatografía	varios tamaños

Equipo e instrumentos

Balanza analítica	SARTORIUS 2442
Rotavapor	BUCHI Switzerland
Parrilla de calentamiento y agitación	IKA C-MAG MS7
Espectrofotómetro IR	Perkin Elmer Spectrum 400
Espectrómetro RMN	Varian 300 Hz
Espectrometro de masas	JMS-Sy M-102A

7.1 Métodos Generales

Empleando técnicas convencionales, los disolventes anhidros utilizados se destilaron bajo atmósfera de argón antes de usarse, de la siguiente manera: Et₃N, fue destilada sobre CaH₂, tetrahidrofurano (THF) sobre el cetilo de sodio de la benzofenona, CH₂Cl₂ sobre CaH₂; tolueno sobre sodio metálico. Hexano, acetato de etilo y metanol se destilaron bajo Na₂SO₄ previo a su utilización. Todos los experimentos que involucraron compuestos sensibles al aire y/o humedad, se llevaron a cabo en matraces redondos secados en una estufa, provistos de septum de hule, a los cuales se introdujo una aguja adaptada a un globo lleno de nitrógeno. El baño para las reacciones a baja temperatura fue: hielo-agua (0° C).

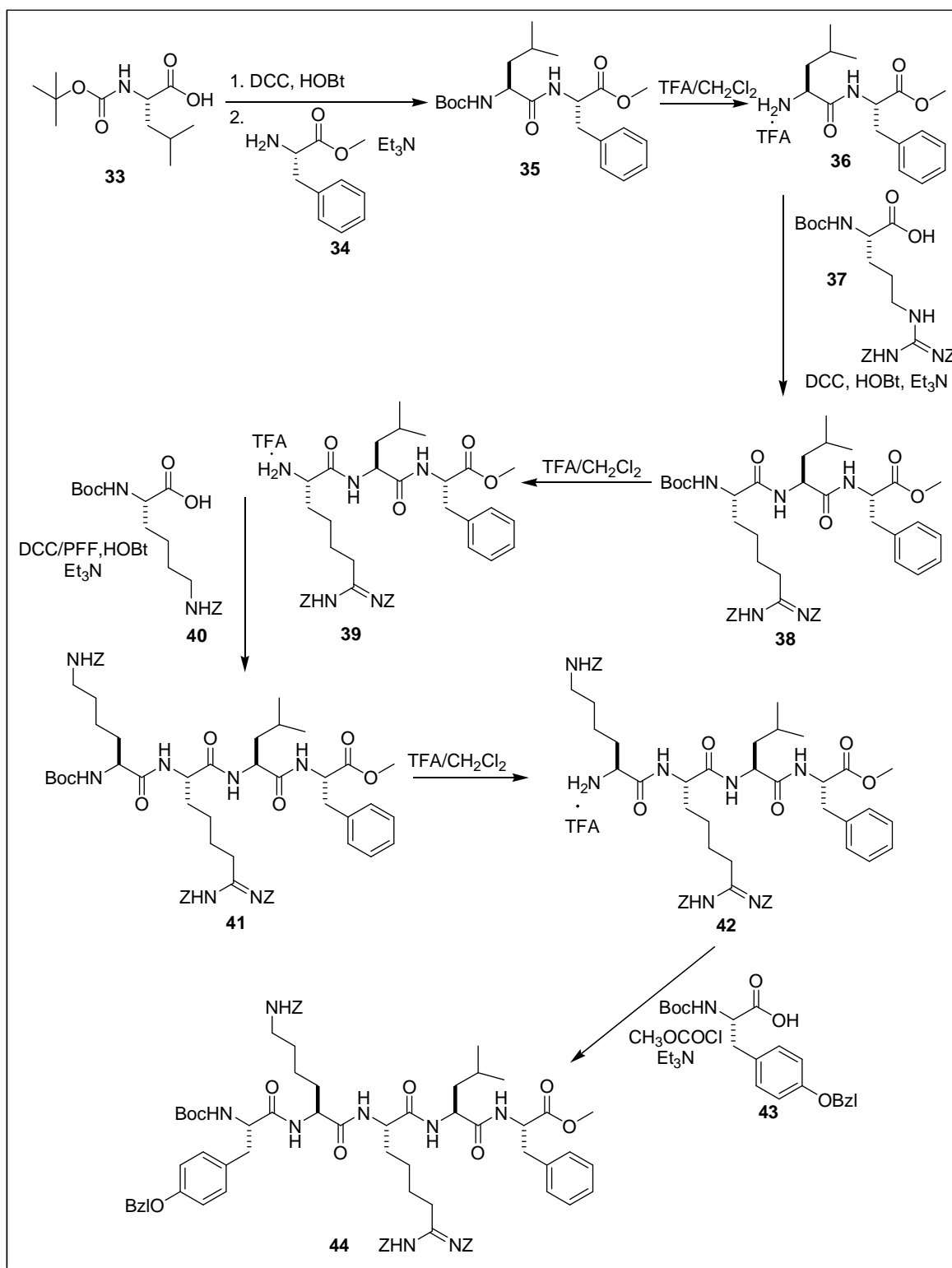
Las cromatografías en capa fina se llevaron a cabo en placas de vidrio (2 x 5 cm) recubiertas (0.25 mm) con sílica gel SIL G 50 UV₂₅₄. Los compuestos fueron detectados por visualización bajo una lámpara de luz ultravioleta o mediante inmersión de la placa en una solución de ácido fosfomolibdico, seguido de calentamiento. Las cromatografías en columna flash (CCF) se llevaron a cabo de acuerdo al procedimiento reportado por Leonard utilizando sílica gel (230-400 mallas) de la marca Macherey Nagel. Todas las mezclas de disolventes usadas como eluyentes se reportan como soluciones v/v.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Thermo Scientific 9200 y no están corregidos.

7.2 Datos espectroscópicos

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrómetro marca Perkin Elmer modelo IRFTIR spectrum 400. Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono (RMN¹H y RMN¹³C) se determinaron en un equipo Varian 300 Hz, generalmente en disoluciones CD₃OD ó DMSO y CDCl₃ a 300 MHz, utilizando TMS como referencia interna.

ESQUEMA SINTÉTICO



7.3 Procedimiento Experimental

7.3.1 Síntesis del compuesto $\text{HCl} \cdot \text{NH}_2\text{Phe-CO}_2\text{CH}_3$ (**34**)

En un matraz redondo se colocaron 50 mL de metanol y se colocó en agitación a 0 °C. Se adicionó lentamente por las paredes del matraz 2 mL de SOCl_2 . Terminada la adición se agregaron 2 g de fenilalanina (12.12 mmol), la reacción se llevó a reflujo durante 2 horas bajo atmósfera de nitrógeno. El metanol se evaporó en un rotavapor, el residuo se agitó con acetato de etilo hasta la formación de un sólido el cual se filtró al vacío y secó. Se obtuvieron 2.14 g (99%) del producto como un sólido blanco.

7.3.2 Síntesis del compuesto $\text{BOC-Leu-CO}_2\text{H}$ (**33**)

En un matraz redondo se disolvieron 2 g (15.3 mmol) de leucina en 50 mL de una mezcla 1:1 de agua: tBuOH, se adicionó 2.14 mL (15.3 mmol) de Et_3N y se dejó en agitación por cuatro horas a temperatura ambiente. El tBuOH se eliminó en rotavapor y la solución se aciduló a pH 3 con solución de ácido cítrico al 10 %. El producto se extrajo con acetato de etilo, la fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se eliminó en rotavapor. Se obtuvieron 3.11 g (88%) del producto como un sólido blanco.

7.3.3 Síntesis del dipéptido $\text{BOC-Leu-Phe-CO}_2\text{CH}_3$ (**35**)

En un matraz redondo se disolvieron 200 mg (0.87 mmol) de $\text{BOC-Leu-CO}_2\text{H}$ (**33**) en 5 mL de THF seco, se adicionaron 180 mg (0.87 mmol) de DCC y se dejó en agitación durante 30 minutos bajo atmósfera de nitrógeno a 0 °C. Transcurrido el tiempo se adicionaron 120 mg (0.88 mmol) de HOBt y se dejó en agitación durante 30 minutos a 0 °C, posteriormente se adicionaron 190 mg (0.88 mmol) del aminoácido $\text{HCl} \cdot \text{NH}_2\text{-Phe-CO}_2\text{CH}_3$ (**34**) y 240 μL (1.73 mmol) de trietilamina dejándose la reacción en agitación a temperatura ambiente por 4 horas. El disolvente se evaporó en un rotavapor, el residuo se disolvió en acetato de etilo y la DCU fue separada por filtración al vacío. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía en columna (Hexano:Acetato de etilo 8:2)

obteniéndose 268 mg (86 %) del producto como un sólido blanco, pf 83.7 °C. IR_{vmax} (cm⁻¹ pastilla): 1164, 1519, 1665, 1732, 1743, 2965, 3307, 3339. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.88-0.92 (6H d, CH₃); 1.43 (9H s, CH₃); 1.61-1.65 (3H m, CH); 3.04-3.12 (2H m, CH₂); 3.67 (3H s, CH₃); 4.15-4.17 (1H d, CH); 4.80-4.86 (1H d, CH); 5.20 (1H m, NH); 6.86 (1H m, NH); 7.10-7.26 (5H m, Ar-CH). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21.98 (CH); 22.89 (CH₂); 24.65 (CH₃); 28.30 (CH₃); 37.90 (CH₂); 41.27 (CH); 52.21 (CH₃); 53.25 (CH); 79.79 (C); 127.02 (CH); 128.49 (CH); 129.30 (CH); 135.90 (C); 155.57 (NHBOC); 171.76 (COOCH₃); 172.45 (CONH).

7.3.4 Síntesis del tripéptido BOC-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**38**)

a) Preparación del compuesto TFA·NH₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**36**)

En un matraz redondo se colocaron 240 mg (0.61 mmol) del BOC-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**35**), se adecuó atmósfera de nitrógeno, se disolvió en 5 mL de CH₂Cl₂ seco y se mantuvo en agitación a 0° C. Mediante una jeringa se adicionó lentamente 1 mL (8.9 mmol) de TFA y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 5 h. El disolvente se eliminó en un rotavapor y el residuo se lavó con tolueno 3 veces para eliminar las trazas de TFA. El producto (**36**) se obtuvo como un sólido de color café oscuro.

b) Reacción de acoplamiento

En un matraz redondo se colocaron 331 mg (0.61 mmol) de Boc-Arg(Z)₂-CO₂H (**37**) y se disolvieron en 5 mL de THF seco, se adicionaron 126 mg (0.61 mmol) de DCC y se dejó la reacción durante 30 minutos bajo atmósfera de nitrógeno a 0 °C en agitación constante. Transcurrido el tiempo se adicionaron 82 mg (0.61 mmol) de HOBt y se dejó en agitación durante 30 minutos a 0 °C, posteriormente se adicionaron 0.61 mmol del dipéptido TFA·NH₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**36**) y 170 µL (1.2 mmol) de Et₃N y se dejó en agitación durante 4 horas a temperatura ambiente.

El disolvente se evaporó en un rotavapor el residuo se disolvió en acetato de etilo y la dicitclohexilurea se filtró al vacío. El disolvente se eliminó en un rotavapor y el residuo se purificó por cromatografía en columna (Hexano:Acetato de etilo 6:4), obteniéndose 300 mg (60 % de rendimiento) como un sólido blanco, pf. 167.2 °C. IR_{vmax} (cm⁻¹ pastilla): 1230, 1535, 1635, 1687, 1719, 2859, 2926, 3319, 3377. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.79-0.82 (6H d, CH₃); 1.41 (9H s, CH₃); 1.51-1.53 (6H m, CH₂); 3.03-3.08 (2H m, CH₂); 3.65 (3H s, CH₃); 3.91-3.96 (1H m, CH); 4.13-4.16 (1H d, CH); 4.29-4.32 (1H m, CH); 4.75-4.78 (2H d, CH₂); 5.16 (2H s CH₂); 5.23 (2H s, CH₂); 5.49-5.51 (1H d, NH); 6.51-6.53 (1H d, NH); 6.65-6.67 (1H d, NH); 7.23-7.40 (15H m, Ar-CH); 9.28 (1H m, NH); 9.39 (1H m, NH). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21.85 (CH); 22.89 (CH₃); 24.55 (CH₂); 24.88 (CH₃); 25.62 (CH₂); 28.38 (CH₃); 33.77 (CH₂); 37.85 (CH₂); 40.48 (CH₂); 44.24 (CH); 49.38 (CH); 51.84 (CH₃); 53.31 (CH); 67.12 (CH₂); 69.05 (CH₂); 80.09 (C); 127.93 (CH); 127.99 (CH); 128.44 (CH); 128.56 (CH); 128.92 (CH); 129.30 (CH); 134.72 (C); 135.89 (C); 136.76 (C); 155.89 (NHBOC); 160.73 (NHCNNH); 163.63 (NHCbz); 171.73 (NHCbz); 171.50 (COOCH₃); 172.44 (NHCO); 175.26 (CONH).

7.3.5 Síntesis del tetrapéptido BOC-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**41**)

a) Síntesis del compuesto TFA·NH₂-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**39**)

En un matraz redondo se colocaron 300 mg (0.37 mmol) del Boc-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**38**), se adecuó atmósfera de nitrógeno, se disolvió en 5 mL de CH₂Cl₂ y se colocó en un baño de hielo a 0 °C con agitación constante. Mediante una jeringa se adicionó lentamente 1 mL (8.9 mmol) de TFA. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente por 5 h. El disolvente se eliminó en un rotavapor y el residuo se lavó con tolueno 3 veces para eliminar las trazas de TFA. El producto TFA·NH₂-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**39**) se obtuvo como un aceite viscoso.

b) Reacción de acoplamiento

En un matraz redondo se colocaron 206 mg (0.37 mmol) de Boc-Lys(Z)-CO₂H DCHA (**40**) y se disolvieron en 5 mL de agua, el matraz se puso en agitación para posteriormente agregar 77 mg (0.37 mmol) de ácido cítrico, se dejó en agitación a temperatura ambiente por 3 horas. El producto se extrajo con acetato de etilo, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en un rotavapor. Se obtuvo el producto como un aceite blanco y se disolvió en 5 mL de acetato de etilo se adicionaron 76 mg (0.37 mmol) de DCC y se colocó en un baño de hielo a 0 °C, se adecuó atmósfera de nitrógeno manteniéndose en agitación constante. Mediante una jeringa se adicionaron 67 mg (37 mmol) de PFF disueltos en 2 mL de AcOEt, la mezcla de reacción se dejó en agitación durante 1 hora a 0 °C. La mezcla de reacción se filtró para eliminar la DCU y el AcOEt se evaporó en el rotavapor. El producto obtenido como aceite transparente se disolvió en 5 mL de THF, se adicionaron 50 mg (37 mmol) de HOBt, el tripéptido TFA·N-Boc-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**39**) y 0.1 mL (0.72 mmol) de trietilamina, la reacción se dejó en agitación durante 4 h bajo atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó en un rotavapor y el producto se purificó por cromatografía en columna (Hexano:Acetato de etilo 6:4), obteniéndose 300 mg (60 %) del producto (**41**) como un sólido blanco. pf. 133.5 °C. IR_{v_{max}} (cm⁻¹ pastilla): 1228, 1510, 1636, 1685, 1717, 2932, 2950, 3303, 3381. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.79-0.84 (6H d, CH₃); 1.25 (4H s, CH₂); 1.41 (9H s, CH₃); 1.47(4H, m CH₂); 1.65-1.78 (7H m, CH₂); 3.11-3.13 (2H m, CH₂); 3.65 (3H s, CH₃); 3.96 (2H m, CH); 4.38 (1H s, CH); 4.76-4.78 (1H d, CH); 5.08 (2H s CH₂); 5.15 (2H s, CH₂); 5.23 (2H s, CH₂); 6.76 (1H d, NH); 6.98 (1H s, NH); 7.10-7.12 (2H d, NH); 7.21-7.37 (20H m, Ar-CH). RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21.62 (CH); 22.40 (CH₂); 22.82 (CH₃); 24.59 (CH₃); 28.23 (CH₃); 29.41 (CH₂); 30.29 (CH₂); 37.66 (CH₂); 40.48 (CH₂); 44.10 (CH); 51.79 (CH₃); 52.17 (CH); 53.33 (CH); 66.50 (CH); 66.92 (CH₂); 68.96 (CH₂); 80.10 (C); 126.80 (CH); 127.84 (CH); 127.90 (CH); 128.01 (CH); 128.28 (CH); 128.78 (CH); 129.19 (CH); 134.60 (C); 136.26 (C); 136.59 (C); 136.67 (CH); 155.69 (NHBOC); 156.84 (NHCNNH); 160.64 (NHCbz);

163.43 (NHCbz); 171.38 (COOCH₃); 171.59 (NHCO); 171.76 (NHCO); 172.96 (NHCO).

7.3.5 Síntesis del pentapéptido BOC-Tyr(Bzl)-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**44**)

a) Síntesis del compuesto TFA·NH₂-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**42**)

En un matraz redondo se colocaron 275 mg (0.26 mmol) del Boc-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**41**), se adecuó atmósfera de nitrógeno, se disolvió en 5 mL de CH₂Cl₂ y se colocó en un baño de hielo a 0 °C con agitación constante. Mediante una jeringa se adicionó lentamente 1 mL (8.9 mmol) de TFA y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 5 h. El disolvente se eliminó en un rotavapor y el residuo se lavó con tolueno 3 veces para eliminar las trazas de TFA. El compuesto TFA·NH₂-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**42**) se obtuvo como un aceite viscoso.

b) Reacción de acoplamiento

En un matraz redondo se colocaron 100 mg (0.118 mmol) de Boc-Tyr(Bzl)-OH (**43**) y se disolvieron en 5 mL de tetrahidrofurano (THF), se adicionaron 22 µL (32 mmol) de cloroformiato de metilo y 45 µL (32 mmol) de trietilamina. Se adecuó atmósfera de nitrógeno y se mantuvo en agitación durante 1 h. Posteriormente se adicionó el tetrapéptido TFA·NH₂-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-OCH₃ (**41**) y 45 µL (32 mmol) de trietilamina, la mezcla de reacción se dejó durante 4 horas en agitación a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó en un rotavapor y el producto se extrajo con diclorometano la fase orgánica se lavó con agua, se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó en un rotavapor. El pentapéptido fue purificado por recristalización por par de disolventes (diclorometano: hexano). Se obtuvieron 240 mg (80%) del producto BOC-Tyr(Bzl)-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-OCH₃ (**44**) como un sólido blanco. pf. 159.1 °C. IR_{vmax} (cm⁻¹ pastilla): 1234, 1511, 1634, 1691, 1716, 2868, 2934, 3032, 3064, 3279. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 0.80-0.89 (6H

Material y métodos

d, CH₃); 1.23 (4H d, CH₂); 1.34 (9H s, CH₃); 1.58-1.63 (7H, m CH₂); 2.88 (CH₂); 3.4-3.10 (2H m, CH₂); 3.64 (3H s, CH₃); 3.95 (2H m, CH); 4.16 (1H t, CH); 4.39 (1H s, CH); 4.77-4.79 (1H d, NH); 5.00 (2H s CH₂); 5.06 (2H s, CH₂); 5.12 (2H s, CH₂); 5.22 (2H s, CH₂); 6.87-7.38 (29H m, Ar-CH); 9.29 (1H s, NH); 9.41 (1H s, NH).
RMN ¹³C (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 21.61 (CH); 22.45 (CH₂); 23.45 (CH₃); 24.06 (CH₃); 25.05 (CH₂); 28.15 (CH₃); 29.26 (CH₂); 32.21 (CH₂); 36.58 (CH₂); 40.38 (CH₂); 50.68 (CH); 51.74 (CH₃); 52.35 (CH); 53.48 (CH); 56.09 (CH); 65.17 (CH₂); 66.18 (CH₂); 68.27 (CH₂); 69.17 (CH₂); 78.11 (C); 114.34 (CH); 126.55 (CH); 127.64 (CH); 127.77 (CH); 127.96 (CH); 128.23 (CH); 128.37 (CH); 128.43 (CH); 130.25 (CH); 135.35 (C); 136.93 (C); 137.11 (C); 137.28 (CH); 155.07 (NHBOC); 156.34 (NHCbz); 156.09 (NHCbz); 159.77 (CONBn); 163.02 (COOCH₃); 170.92 (NHCO); 171.50 (NHCO); 171.77 (NHCO); 172.02 (NHCO).

VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS

En el presente trabajo se realizó la síntesis de un pentapéptido con la siguiente secuencia péptidica $\text{NH}_2\text{-Tyr(Bzl)-Lys(Z)-Arg(Z)}_2\text{-Leu-Phe-OCH}_3$ mediante una síntesis lineal en solución usando el método de carbodiimidias, utilizando principalmente como agente acoplante la dicitclohexilcarbodiimida (DCC). Se eligió este procedimiento por ser un método frecuentemente aplicado en síntesis de péptidos y reportar buenos rendimientos.⁴⁵ Debido a que la DCC reacciona con el grupo carboxilo de los aminoácidos, se lleva a cabo el primer paso para su activación con la formación subsecuente de la *O*-acilurea, lo que favorece el ataque nucleofílico del grupo amino del segundo aminoácido, eliminando el radical alcóxido del grupo carboxilo activado. De esta manera la DCC forma un subproducto, la dicitclohexilurea (DCU), un compuesto poco soluble en la mayoría de los solventes, por lo que la separación de éste producto del péptido sintetizado de la mezcla de reacción se logra convenientemente por diferencia de solubilidades entre ambos compuestos. Sin embargo, existe la posibilidad de que la *O*-acilurea lleve a cabo una reacción de transposición en donde puede transformarse lentamente en *N*-acilurea, reduciendo así el rendimiento de la reacción ya que este producto no puede ser desplazado nucleofílicamente por el grupo amino. Para prevenir este problema se utilizó el 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), ya que al ser un ácido débil protona la *O*-acilurea bloqueando la transposición intramolecular que origina la formación de la *N*-acilurea, con lo cual se puede favorecer que la reacción de acoplamiento se lleve a cabo y se incremente el rendimiento de la reacción.⁴⁴

Para dirigir la síntesis de un péptido de tal modo que solo se obtenga el enlace peptídico deseado, es imprescindible proteger el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxílico del otro aminoácido, y en algunas ocasiones los grupos funcionales de las cadenas laterales, de tal forma que estos no reaccionen bajo las condiciones de formación del enlace peptídico, por lo que la elección del grupo protector adecuado que se mantendrá en el curso de la ruta sintética es

Resultados y análisis

determinante para la obtención del compuesto final. Para esto se tomó en cuenta la ortogonalidad entre los grupos protectores, ya que fue un punto clave para llevar a cabo la manipulación adecuada de cada sustrato e intermediario en las reacciones que se realizaron en la preparación del péptido.

En base a lo anterior, se decidió usar como grupo protector temporal del grupo α -amino de los aminoácidos al *ter*-butoxicarbonilo (BOC) y como grupo permanente en las cadenas laterales al benciloxicarbonilo (Cbz), ya que tomando en cuenta la estabilidad que presentan y que el grupo BOC es sensible a las condiciones ácidas, permite ser eliminado con ácido trifluoroacético sin alterar al grupo Cbz, ya que este último es estable en condiciones ácidas. Por consiguiente estos grupos presentan una ortogonalidad adecuada entre ellos, lo que permitió su elección y manipulación selectiva en cada una de las respectivas etapas de la síntesis reportada. Por otra parte, para la protección del grupo carboxilo de los aminoácidos se determinó su transformación en forma del correspondiente éster metílico, ya que este puede ser fácilmente eliminado mediante una hidrólisis básica bajo condiciones que no afectan a los otros grupos protectores utilizados.³⁹

El primer paso para la síntesis del pentapéptido fue la protección de los aminoácidos fenilalanina (**45**) y leucina (**46**), que de acuerdo al esquema de síntesis que se planteó, el primer aminoácido ancla del cual se partió para crecer la cadena peptídica fue la fenilalanina. La síntesis fue diseñada de manera lineal, por lo que al ser el aminoácido inicial, éste actuó como el componente amínico de la cadena por donde empezó a crecer la cadena peptídica, haciendo necesario proteger primeramente el grupo carboxilo de la fenilalanina como el correspondiente éster metílico por medio de una esterificación (Fig. **33**). Para la formación del producto (**34**) se preparó una solución de cloruro de tionilo en metanol, en donde este último funciona como agente nucleofílico y disolvente de la mezcla de reacción. Debido a que el HCl es generado *in situ*, el aminoácido protegido (**34**) se obtuvo como el clorhidrato correspondiente en forma de un sólido blanco con un rendimiento casi cuantitativo (99%).

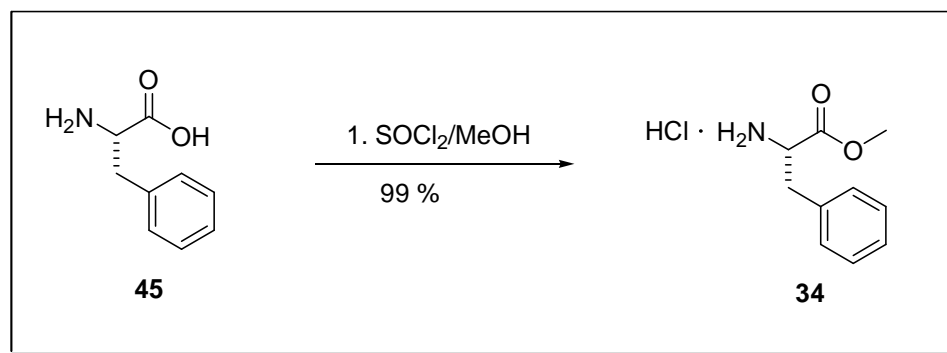


Figura 33. Esterificación de la fenilalanina.

El segundo aminoácido protegido fue la leucina (**47**), la cual actuó como el componente carboxílico para el acomplamiento con la $\text{HCl}\cdot\text{NH}_2\text{-Phe-CO}_2\text{CH}_3$ (**34**), para lo cual primeramente se protegió el grupo amino de la leucina usando el anhídrido BOC (**47**) para la formación del correspondiente carbamato (**33**). La protección de la leucina procedió con el empleo del anhídrido BOC en un medio acuoso utilizando una mezcla de $t\text{BuOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1) en presencia de trietilamina, con lo cual se favoreció la solubilidad del aminoácido, ya que éste se transforma en el carboxilato correspondiente. Terminada la reacción se eliminó el $t\text{BuOH}$ y al acidificar la mezcla de reacción con ácido cítrico a un pH aproximado a 3, el producto (**33**) precipitó y pudo ser separado mediante una extracción con acetato de etilo, obteniéndose un producto blanco con un 93% de rendimiento (Fig. 34).

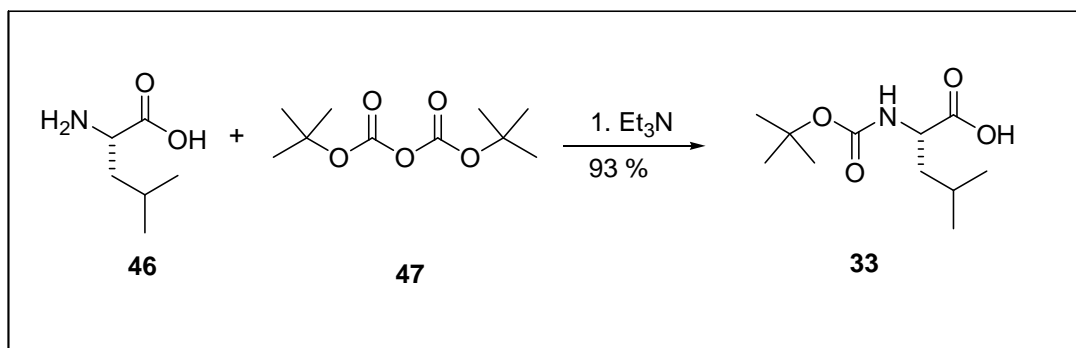


Figura 34. Protección del grupo amino de la leucina.

Con los aminoácidos convenientemente protegidos, el siguiente paso fue la formación del dipéptido $\text{BOC-Leu-Phe-CO}_2\text{CH}_3$ (**35**), usando como agente de

Resultados y análisis

acoplamiento a la diciclohexilcarbodiimida (DCC). En primera instancia se realizó la activación del grupo carboxilo del aminoácido BOC-Leu-CO₂CH₃ (**33**) para incrementar su electrofilicidad por medio del uso de DCC, que al poseer dos átomos de nitrógeno ligeramente básicos fue suficiente para que se llevara a cabo una reacción entre la misma carbodiimida y el ácido, generando en primer lugar la *O*-acilurea. Además, para incrementar la eficiencia de la reacción se hizo uso del 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), puesto que al ser un ácido débil, este protona la *O*-acilurea bloqueando la transposición intramolecular que lleva a la formación de la *N*-acilurea. La *O*-acilurea protonada es un mejor electrófilo que la especie no protonada y más favorable a ser atacada por el nucleófilo presente en la mezcla, es decir la amina libre de la fenilalanina y al mismo tiempo impide la racemización (Fig. 35).

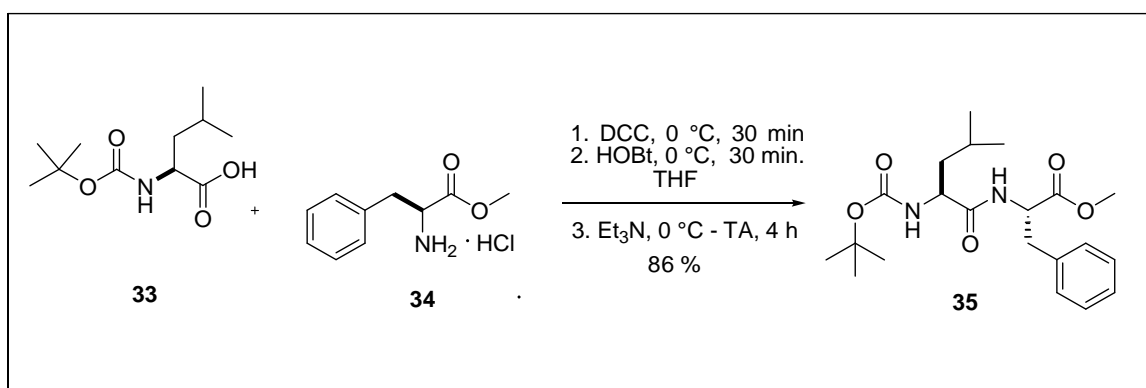


Figura 35. Reacción de acoplamiento de la leucina y la fenilalanina.

Bajo esas condiciones de reacción se aisló el compuesto (**35**) que se purificó por cromatografía en columna, el cual se obtuvo como un sólido blanco con un 86% de rendimiento. Este producto fue caracterizado espectroscópicamente y en el espectro de IR (Anexo 1), se observan las señales características de los grupos funcionales implicados en el dipéptido, como la señal a 1665 cm⁻¹ que corresponde al éster metílico de la fenilalanina, así como dos señales a 3307 y 3339 cm⁻¹ que corresponden a los enlaces N-H presentes en la molécula, además de unas señales a 1732 y 1743 cm⁻¹ asignadas a los grupos carboxilo de las amidas generadas por el enlace peptídico y al del grupo

Resultados y análisis

carbamato y que es identificado igualmente por la señal 1164 cm^{-1} que origina el grupo *t*-Butilo.

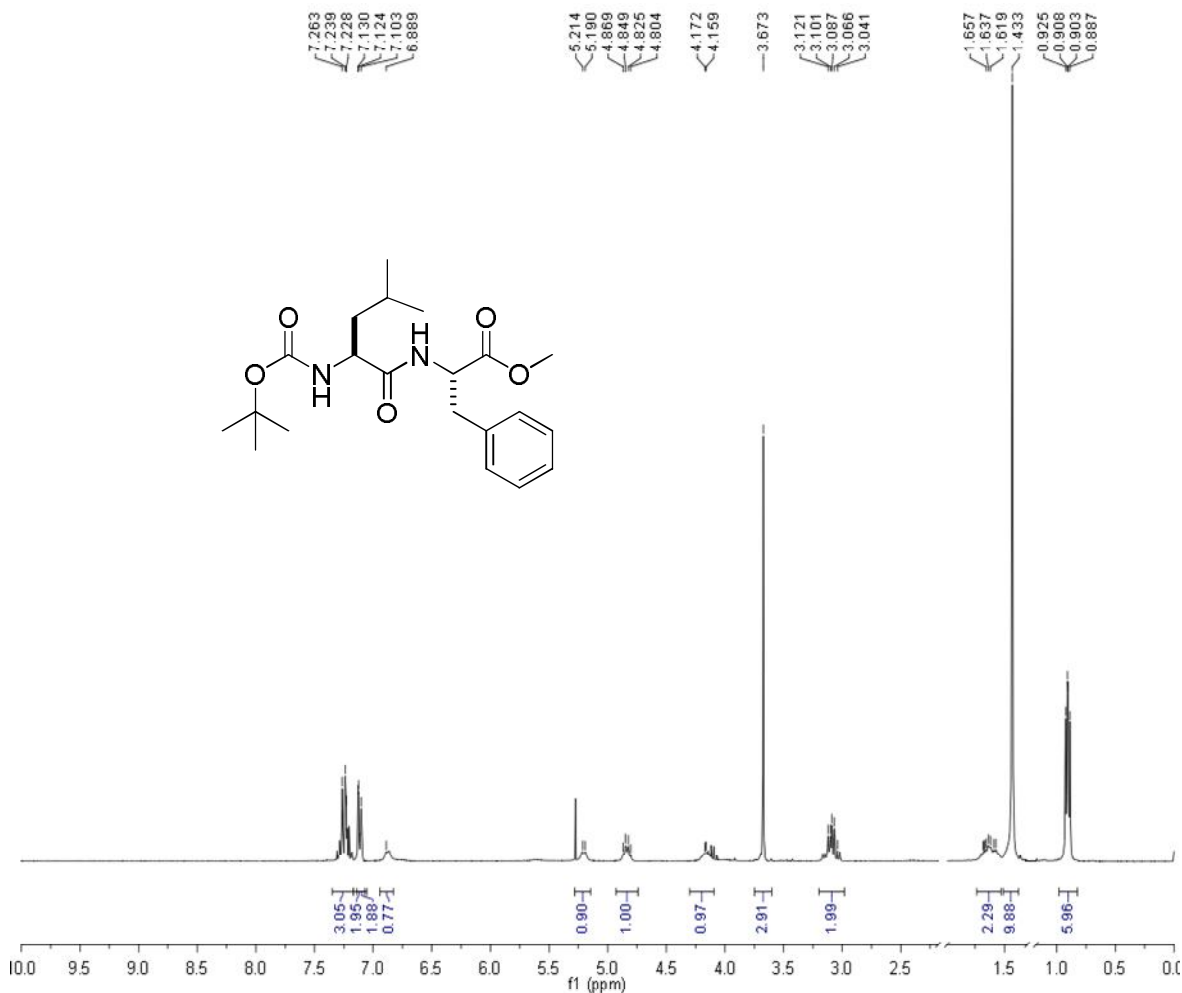


Figura 36. Espectro de RMN¹H del dipéptido BOC-Leu-Phe-CO₂CH₃.

En la Figura 36 se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protón RMN¹H del dipéptido (**35**). Como señales características se pueden observar un singulete a 1.43 ppm correspondiente a los nueve protones de los metilos del grupo BOC de la leucina, así como un singulete a 3.67 ppm correspondiente a los protones del éster metílico de la fenilalanina, estas señales corresponden a los extremos del dipéptido lo cual indica que el compuesto se encuentra constituido por los dos aminoácidos. Por otro lado se observa un doble

Resultados y análisis

de dobles a 0.89 y 0.97 ppm correspondientes a los dos metilos de la cadena lateral de la leucina, que al estar en ambientes electromagnéticos diferentes pueden diferenciarse en el espectro. También se aprecian dos multipletes a 4.17 y 4.83 ppm correspondientes al protón metilénico del carbono α al grupo carboxílico de cada aminoácido, y entre 7.10 y 7.26 ppm se observa un multiplete que integra para cinco protones correspondiente del anillo aromático de la fenilalanina.

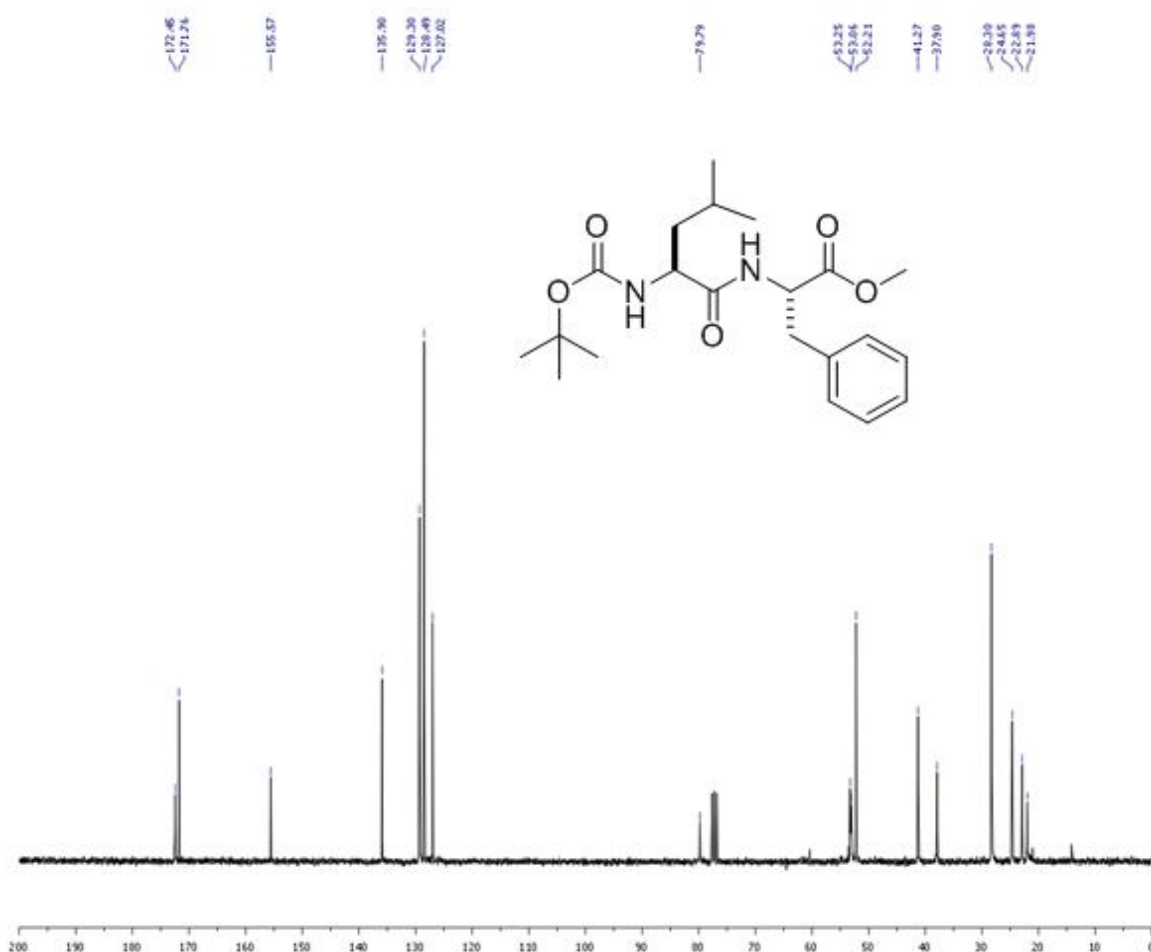


Figura 37. Espectro de RMN^{13}C del dipéptido $\text{BOC-Leu-Phe-CO}_2\text{CH}_3$.

En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Carbono RMN^{13}C (Fig. 37) se observan 16 señales que representan los 21 carbonos del dipéptido $\text{BOC-Leu-Phe-CO}_2\text{CH}_3$ (**35**). A campo bajo se aprecian tres señales en 155, 171 y 172 ppm correspondientes a los tres grupos carbonilo presentes en la molécula y de

Resultados y análisis

igual manera se observan los carbonos respectivos de los grupos metilos del *t*-butilo (28.38 ppm) y una señal a 52.21 ppm correspondiente al éster metílico.

Para la preparación del tripéptido BOC-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**38**) fue necesario el tratamiento del dipéptido (**35**) bajo condiciones ácidas, lo que permitió obtener el producto desprotegido (**36**) en forma de la sal de amonio del ácido trifluoroacético, una vez que el grupo *t*-butoxicarbonil fue hidrolizado (Fig. 38), de esta manera el grupo amino del dipéptido se encuentra disponible para el siguiente acoplamiento con arginina.

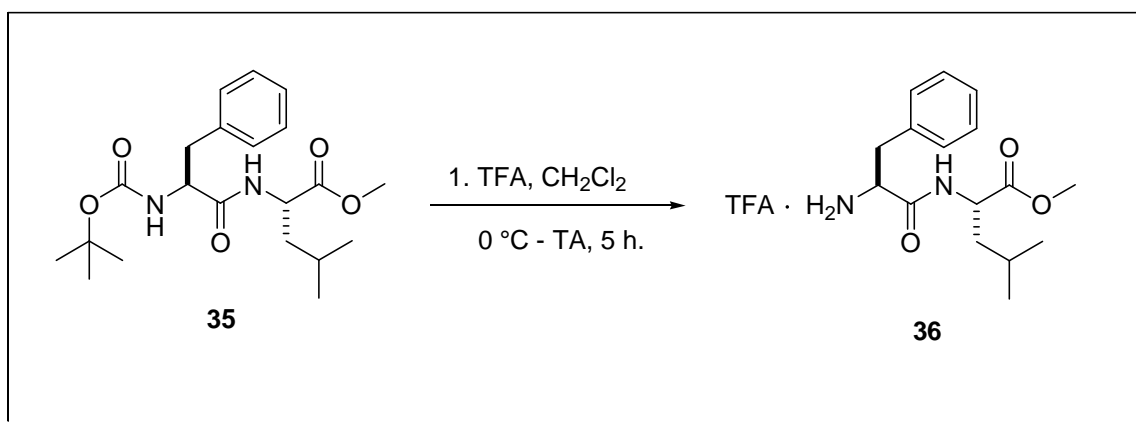


Figura 38. Eliminación del grupo BOC.

En lo que respecta a la arginina (Arg), es un aminoácido que tiene un grupo guanidino en su cadena lateral, este grupo tiene un carácter básico (nucleofílico), por lo que se utilizó el aminoácido protegido con el grupo benciloxicarbonilo (Z) para evitar reacciones secundarias. Puesto que el grupo guanidino posee una alta basicidad (pKa 12.5), esta propiedad permite que este grupo permanezca protonado en la mayoría de las condiciones de reacción usadas en la síntesis peptídica. Sin embargo, si la desprotonación llega a ocurrir, se presenta la desguanidación después de la acilación del grupo guanidino, por lo que la protección de todos los nitrógenos del grupo guanidino es necesaria para enmascarar por completo el carácter nucleofílico del mismo, por lo que este aminoácido se adquirió comercialmente en forma de BOC-Arg(Z)₂-CO₂H (**37**).

La reacción de acoplamiento del compuesto (**36**) con arginina (**37**) se llevó a cabo utilizando el sistema dicitohexilcarbodiimida/hidroxibenzotriazol

Resultados y análisis

(DCC/HOBt) (Fig. 39) y permitió la formación del tripéptido BOC-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ (**38**), compuesto que fue obtenido como un sólido blanco con un rendimiento del 80% después de su purificación por cromatografía en columna de gel de sílice (Hexano:Acetato de etilo:Metanol 7:3:5).

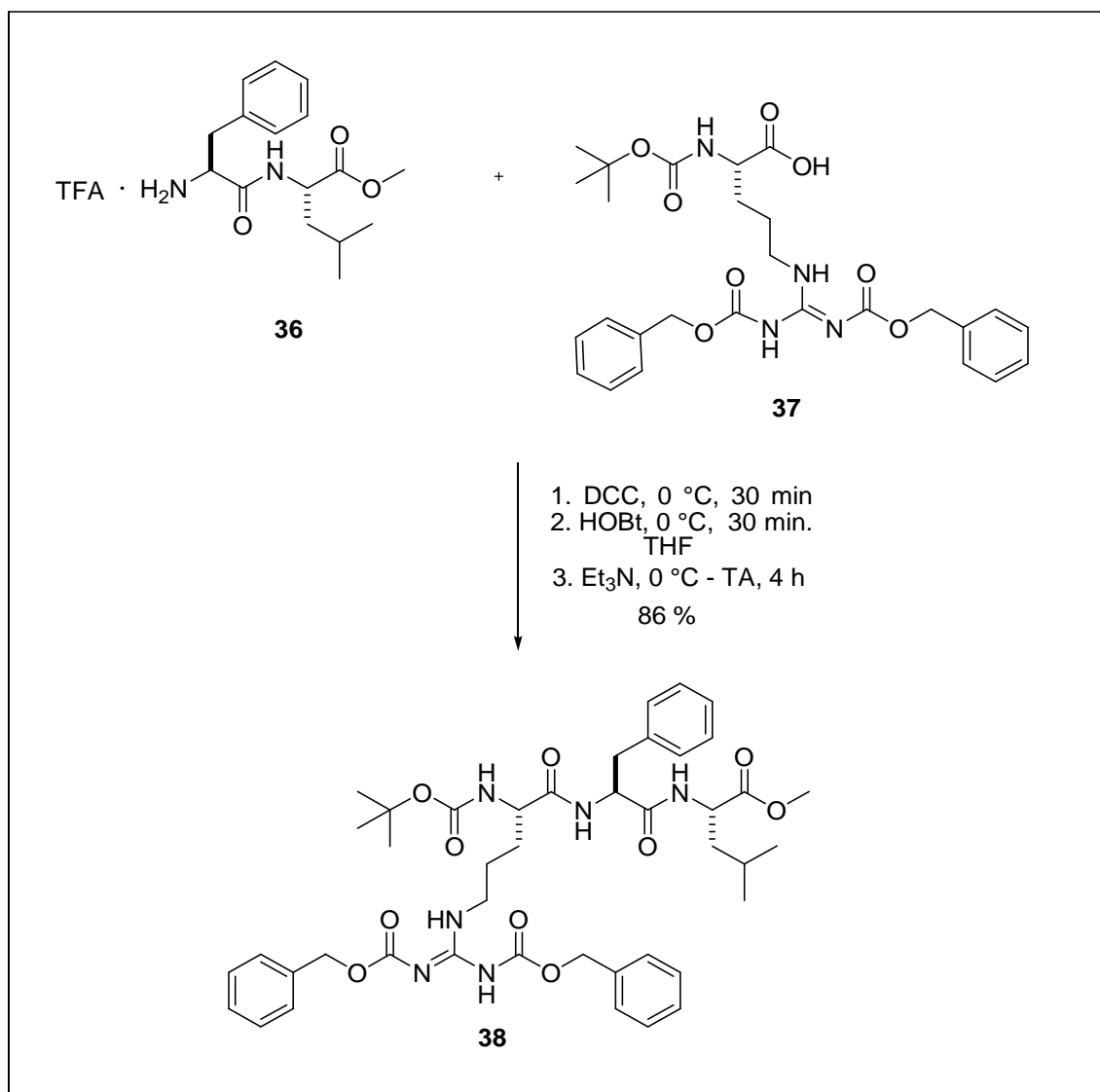


Figura 39. Reacción de acoplamiento del dipéptido BOC-Leu-Phe-CO₂CH₃ y arginina.

El tripéptido (**38**) fue caracterizado convenientemente por sus propiedades espectroscópicas. En el espectro de IR (Anexo 2), se pueden apreciar las señales

Resultados y análisis

características de los grupos funcionales implicados en el tripéptido, como una señal generada por el éster metílico de la fenilalanina a 1645 cm^{-1} , además de la señal generada por el grupo terbutilo a 1228 cm^{-1} , así como las señales a 3382 , 3320 y 3286 cm^{-1} , que corresponden a los enlaces N-H presentes en la molécula, de igual forma se pueden observar las señal a 1721 y 1686 cm^{-1} las cuales corresponden a los grupos carboxilo de las amidas generadas por el enlace peptídico.

El espectro de RMN¹H (Fig. 40) presenta como señales características un singulete a 3.65 ppm correspondiente a los protones del éster metílico de la fenilalanina, un singulete a 1.41 ppm que integra para 9 protones correspondientes a los tres metilos del grupo BOC de la Arg. En campo alto hay un doble doblete a 0.81 y 0.89 ppm generados por los dos grupos metilo de la leucina plenamente diferenciados. En campo bajo se observa un multiplete entre 7.23 y 7.40 ppm que integra para 12 protones aromáticos de la fenilalanina y de los dos anillos del grupo Cbz de la arginina. A 5.16 y 5.23 ppm se observan dos singuletes que integran para cada uno de los dos protones bencílicos correspondientes al grupo Cbz. Además, se observan tres multipletes entre 3.93, 4.14 y 4.30 ppm para los protones metilénicos α a los grupos carboxílicos de cada aminoácido. En campo alto 1.56 y 3.06 ppm se aprecian las multiplicidades correspondientes a protones alifáticos de la cadena lateral de la arginina y fenilalanina. Las señales que aparecen como dobletes integrando para el protón que se observa a 5.51, 6.51, 6.67 9.28 y 9.39 ppm desaparecen con agua deuterada corresponden a los protones base nitrógeno de las cinco amidas que el tetrapéptido posee.

Resultados y análisis

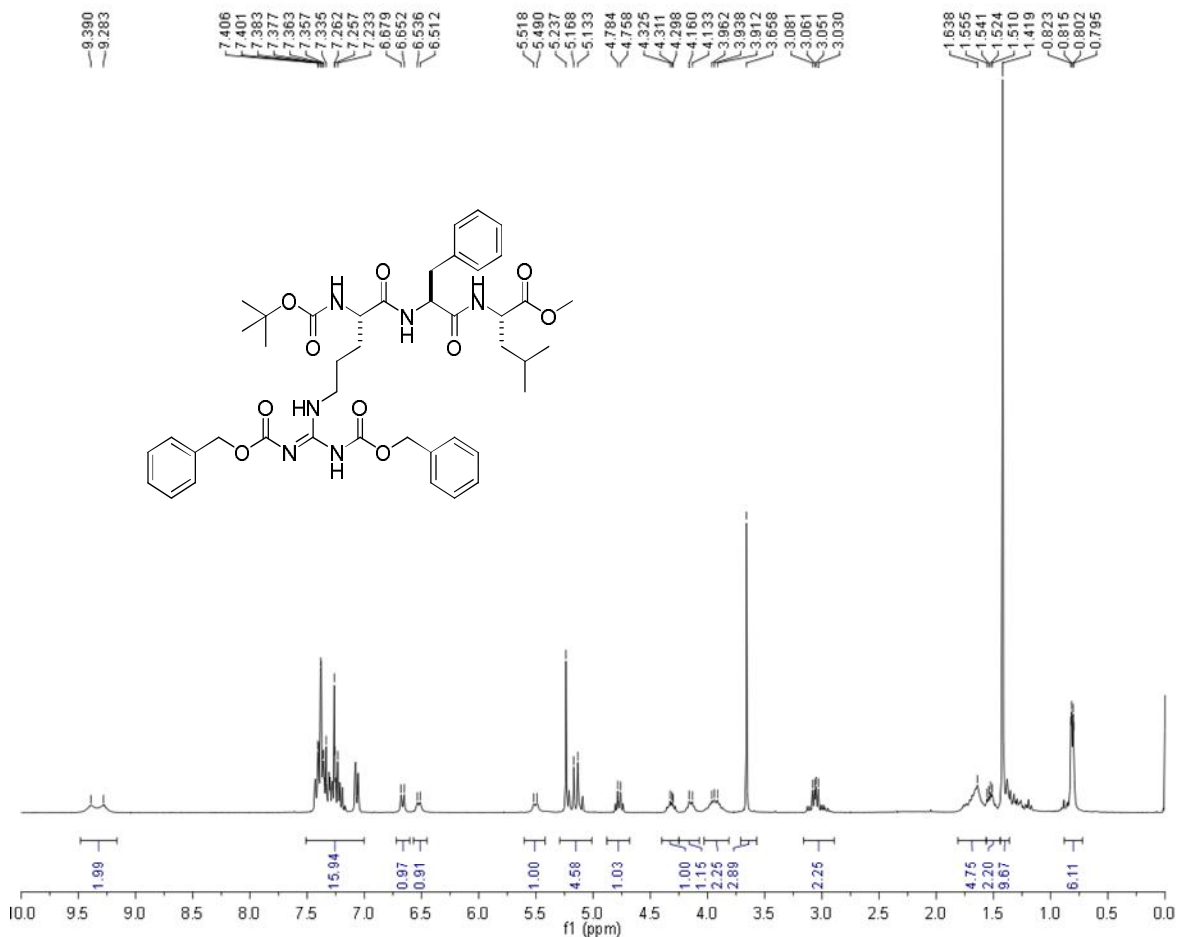


Figura 40. Espectro de RMN¹H del tripéptido BOC-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃.

En su espectro de RMN¹³C (Fig. 41) se observan 37 señales que representan los 43 carbonos del tripéptido (**38**). A campo bajo se aprecian seis señales a 155.8, 160.7, 163.6, 171.5, 171.7 y 175.2 ppm correspondientes a los seis grupos carbonilo presentes en la molécula. En este mismo campo entre 127.93 y 129.30 ppm aparecen los carbonos aromáticos y sobresaliendo en 134.72, 135.88 y 136.76 ppm los carbonos cuaternarios de los tres anillos no sustituidos. Por otra parte se observan a 28.38 ppm los carbonos que corresponden a los grupos metílicos del *t*-butilo, además existe una señal a 81 ppm perteneciente al carbono cuaternario del grupo *t*-butilo; de igual forma se aprecia una señal a 52.34 ppm que es generada por el éster metílico. En campo alto se observan las señales pertenecientes a los carbonos alifáticos de las

Resultados y análisis

cadena laterales de la fenilalanina, leucina y arginina (21.85, 22.89, 24.94, 37.85 y 40.88 ppm).

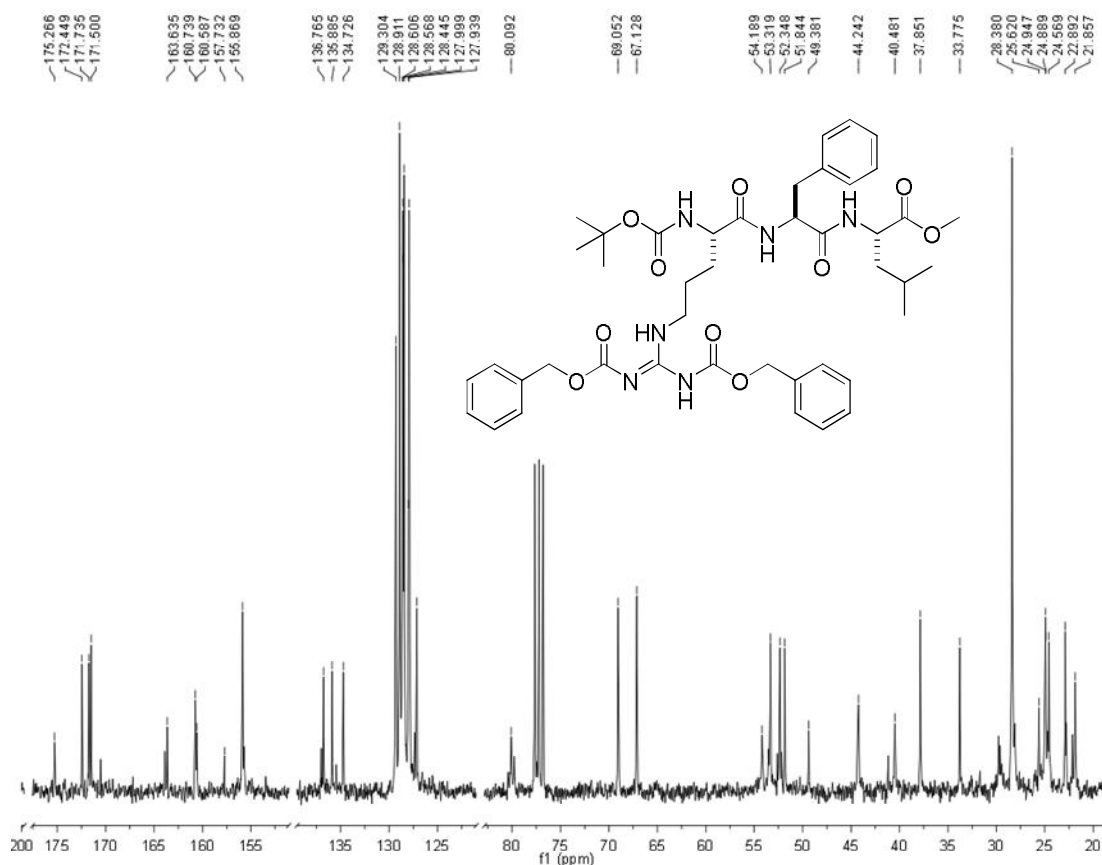


Figura 41. Espectro de RMN¹³C del tripéptido BOC-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃.

El cuarto aminoácido incorporado a la cadena peptídica fue la lisina. Este es un aminoácido que posee un grupo ε-amino con un carácter más básico y nucleofílico que el grupo α-amino, por lo que resulta necesario proteger la cadena lateral de este aminoácido, para lo cual deben seleccionarse grupos protectores ortogonales que lo diferencien del grupo amino que en un paso subsecuente se hará reaccionar para la formación del enlace peptídico. En este caso se utilizó un aminoácido comercial el BOC-Lys(Z)-CO₂H (**40**). Sin embargo, en este paso de la síntesis, al realizar el acoplamiento de la lisina con la cadena del tripéptido (**39**) no se llevó a cabo de manera eficiente al utilizar el sistema DCC/HOBt; ya que el producto deseado no se pudo obtener satisfactoriamente. Al realizar el análisis de la reacción por cromatografía en capa fina se pudo observar materia prima (Lys)

Resultados y análisis

que no reaccionó a pesar de que el tiempo de reacción fue de aproximadamente 12 horas, y cuando se procedió a su purificación por cromatografía en columna se aisló un solo producto que por cromatografía en capa fina mostraba estar libre de impurezas, pero en RMN¹H se podían apreciar las señales que correspondían a la presencia de DCU. Dada la naturaleza polar del péptido se considera que la DCU interacciona fuertemente vía puentes de hidrógeno con los grupos amídicos y carboxílicos del péptido manteniéndose fuertemente unidos, haciendo que la separación de este subproducto por cromatografía no sea eficiente, quedando el tetrapéptido (**41**) contaminado.

Para intentar resolver estos problemas se decidió utilizar otra estrategia de síntesis para la activación del ácido carboxílico del aminoácido lisina (**40**), recurriendo al uso de pentafluorofenol (Fig. 42). Al realizar la síntesis por esta vía, es necesario primero efectuar la activación del grupo carboxílico de la lisina (**40**) utilizando la DCC, de esta manera primero se forma el intermediario (**48**), posteriormente a la mezcla de reacción se adicionó el PFF (**49**), este al ser un compuesto altamente nucleofílico permite que se lleve a cabo un ataque al grupo carboxilo de la lisina generándose tanto el desplazamiento del subproducto DCU como la formación del compuesto (**50**), siendo este último susceptible al ataque nucleofílico por parte del tripéptido (**39**), en este caso la DCU pudo ser eliminada por filtración antes de realizar el acoplamiento del péptido y al mismo tiempo se obtuvo un incremento en el rendimiento de la reacción.

Resultados y análisis

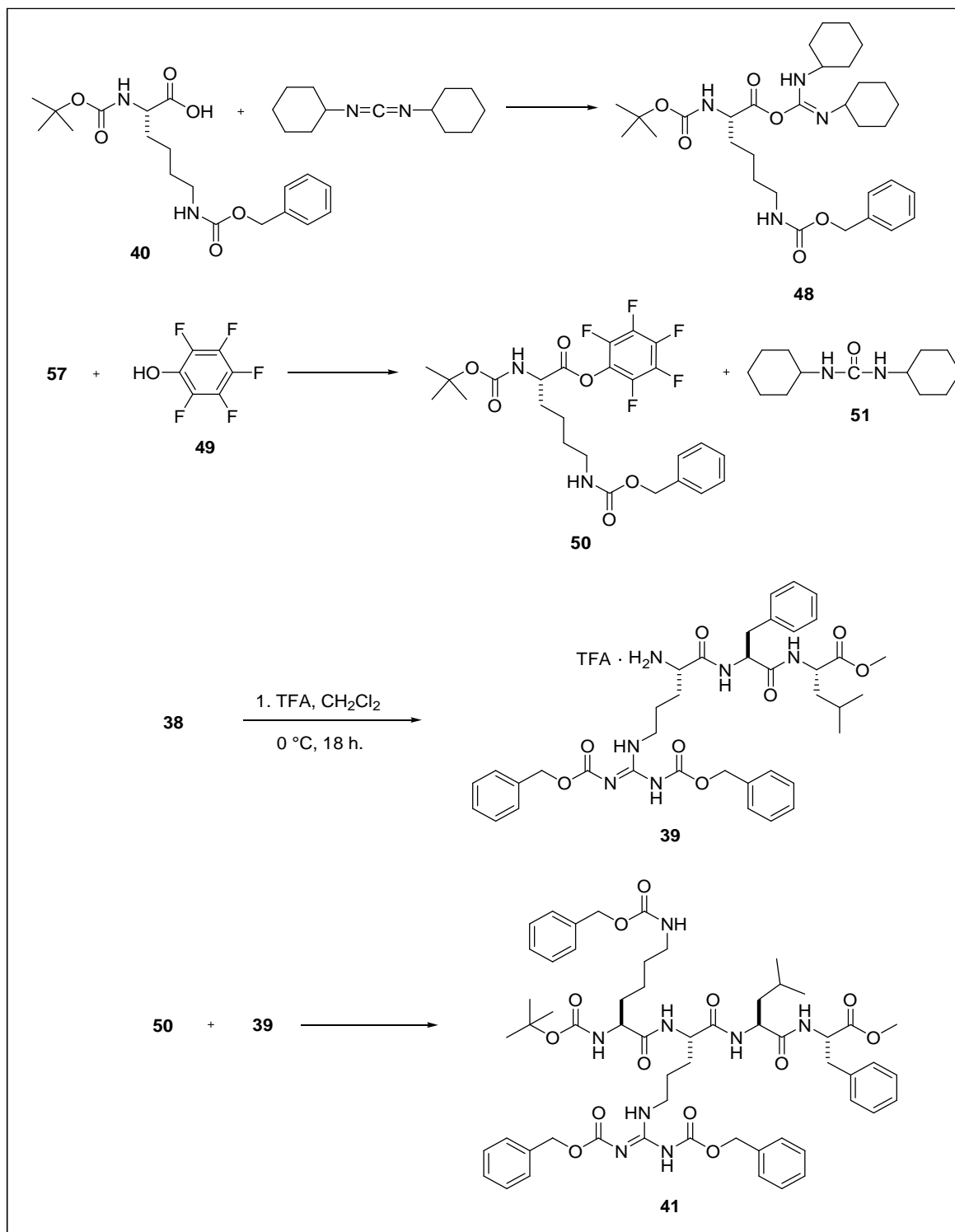


Figura 42. Síntesis del tetrapéptido BOC-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃.

Resultados y análisis

Con estas condiciones de reacción y después de la purificación por cromatografía en columna se logró obtener el tetrapéptido (**41**) con un rendimiento del 75%, como un sólido blanco, el cual fue caracterizado convenientemente en sus propiedades espectroscópicas. El espectro de IR (Anexo 3), se observan las señales características de los grupos funcionales que se han observado desde el dipéptido, como la señal a 1636 cm^{-1} que corresponde al éster metílico de la fenilalanina, así como dos señales a 3303 y 3381 cm^{-1} que corresponden a los enlaces N-H presentes en la molécula, además de unas señales a 1685 y 1717 cm^{-1} asignadas a los grupos carbonilo de las amidas generadas por el enlace peptídico y al del grupo carbamato y que es identificado igualmente por la señal 1228 cm^{-1} que origina el grupo *t*-Butilo.

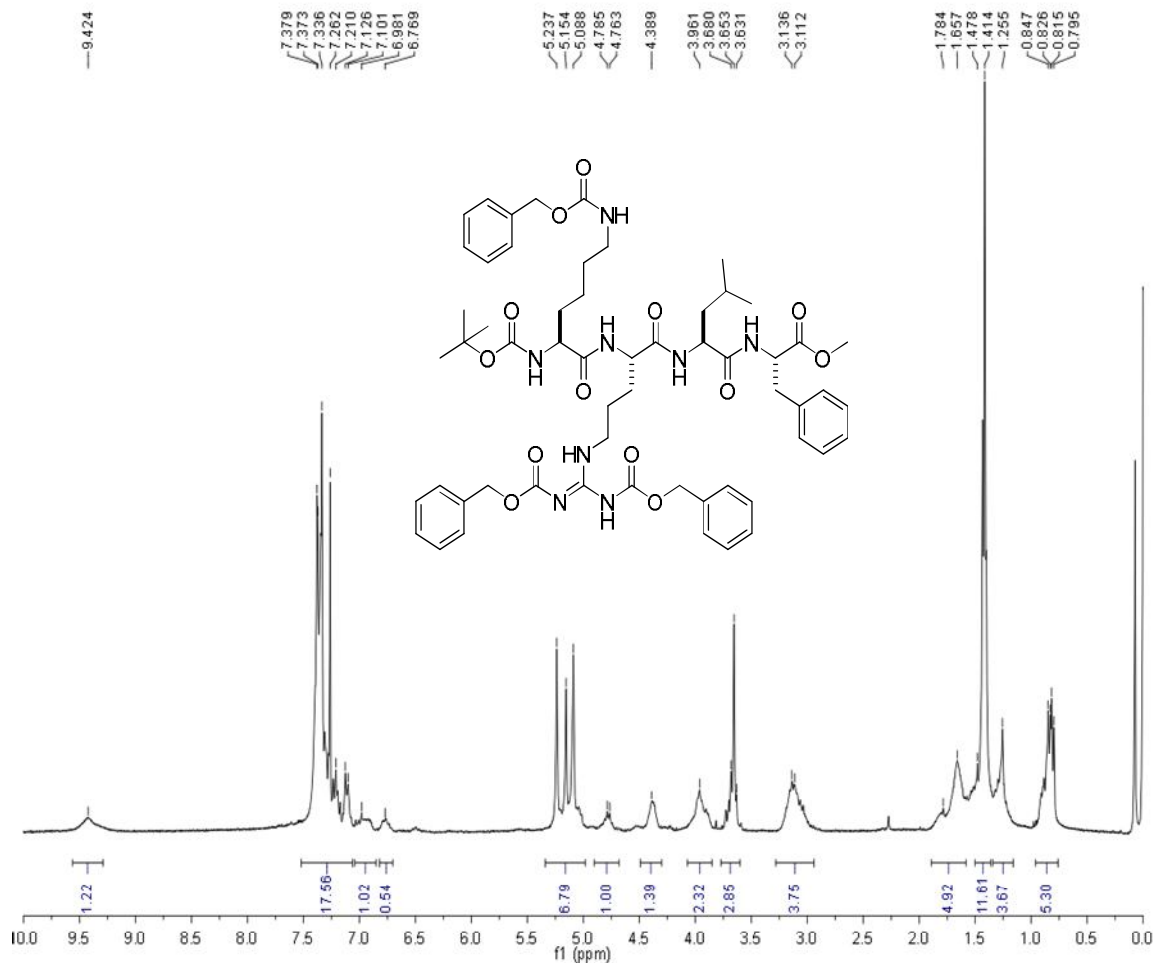


Figura 43. Espectro de RMN¹H del tetrapéptido BOC-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃.

Resultados y análisis

En la figura 43 se observa el espectro de resonancia magnética nuclear de protón del tetrapéptido (**41**), donde se puede apreciar que las señales son parecidas al del tripéptido (BOC-Arg(Z)-Leu-Phe-CO₂CH₃). Sin embargo, en este caso la diferencia radica en que se aprecian las señales más anchas ya que integran para un número mayor de protones.

En el espectro se puede observar un singulete a 3.65 ppm correspondiente a los protones del éster metílico de la fenilalanina y un singulete a 1.41 ppm que integra para 9 protones correspondientes generados por el grupo BOC, estas señales corresponden al extremo ácido y amino del tetrapeptido. En campo alto hay un doble doblete a 0.80 y 0.83 ppm generados por los dos grupos metilo de la leucina plenamente diferenciados, en el mismo campo se puede observar las multiplicidades correspondientes a los 13 protones alifáticos de las cadenas laterales de la leucina, arginina y lisina con las señales observadas principalmente en 1.25, 1.47 y 1.65 y 1.78 ppm. Además que también se aprecian tres multipletes, entre la región de 3.96 y 4.78 ppm, estas señales pertenecen a los cuatro protones metilénicos α a los grupos carboxílicos de cada aminoácido. A 5.08, 5.15 y 5.23 ppm se observan tres singuletes que integran para seis protones correspondientes a los protones bencílicos de los tres grupo Cbz presentes en la molécula. A campo bajo hay un multiplete entre 7.21 y 7.37 ppm que integra para 20 protones aromáticos pertenecientes al anillo aromático de la fenilalanina y a los tres anillos de los grupo Cbz. Los seis protones de las amidas, se asignaron con las siguientes señales 6.76, 6.98, 7.01, 7.12 y 9.42 ppm, esto después de realizar el análisis del espectro una vez que se llevó a cabo el intercambio con deuterio utilizando agua deuterada, ya que estas señales desaparecen (Fig. 44).

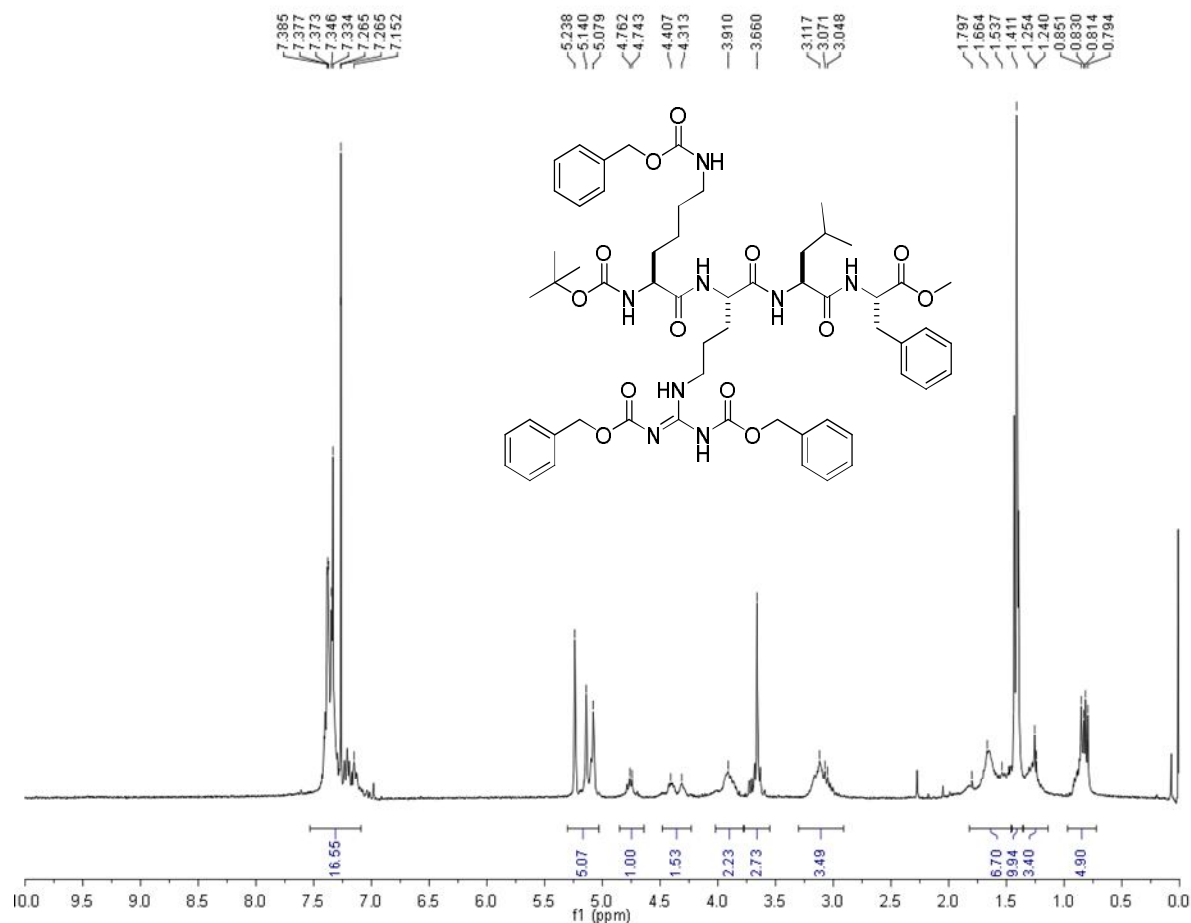


Figura 44. Espectro de RMN¹H del tetrapéptido BOC-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ después del tratamiento con agua deuterada.

Respecto al espectro de resonancia magnética nuclear de carbono 13, (Fig. 45), se puede observar en campo alto nueve señales entre 21.62 y 40.48 ppm que corresponden a los doce carbonos alifáticos de las cadenas laterales de la fenilalanina, leucina, arginina y lisina, las cuales sobresalen en 21.62, 22.40, 22.82, 24.59, 29.41, 30.29, 37.66, 40.08 y 40.48 ppm. La señal correspondiente a los tres carbonos metilénicos del grupo BOC se aprecia a 28.23 ppm y a 80.10 está la señal que corresponde al carbono cuaternario de este mismo grupo. La señal a 51.79 ppm que pertenece al carbono metílico del grupo éster. Los cuatro carbonos alfa a los grupos carboxílicos de cada aminoácido se aprecian a 44.10, 51.79, 52.17, 53.33 ppm. Existen tres señales correspondientes a los carbonos bencílicos de los tres grupos Cbz a 66.50, 66.92 y 68.96 ppm, y en campo bajo se

Resultados y análisis

encuentran las señales que corresponden a los veinte carbonos aromáticos presentes en la molécula entre 126.80 y 129.19 ppm; en campo bajo también se aprecian ocho señales entre 155.69 y 172.97 que corresponden a los carbonos carboxílicos de la molécula.

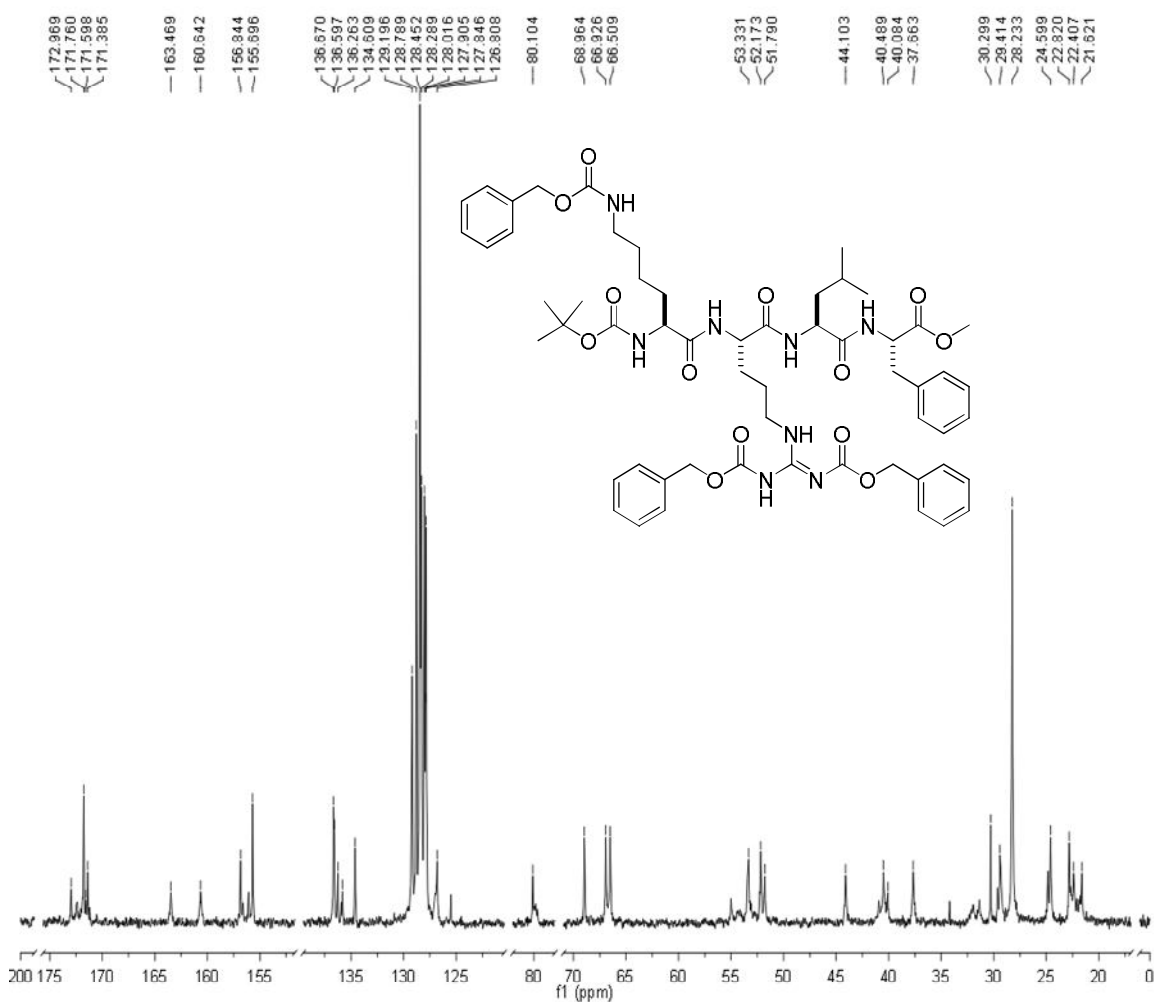


Figura 45. Espectro de RMN¹³C del tetrapéptido BOC-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃.

El último aminoácido incorporado a la cadena peptídica fue la tirosina, para esto fue necesario utilizar el aminoácido con la cadena lateral protegida ya que, una reacción secundaria que se puede presentar es la acilación del grupo fenólico, debido a la nucleofilicidad del ión fenolato bajo condiciones básicas de reacción.

Resultados y análisis

En la síntesis peptídica se utilizó la tirosina con el grupo funcional hidróxilo protegido en su correspondiente éter bencílico (**43**), continuando con la ortogonalidad de los grupos protectores. En este último paso de la síntesis fue necesario recurrir al uso de otro método de acoplamiento, ya que con el uso de la DCC/PFF, se volvieron a presentar problemas en el rendimiento de la reacción, ya que por cromatografía en capa fina se observó que existe materia prima como la tirosina que no reaccionó completamente. Además cuando se intentó purificar el pentapéptido por cromatografía en columna, fue mínima la cantidad (12%) del producto obtenido; ya que el pentapéptido al presentar una polaridad más grande muestra una gran afinidad con la silica de gel utilizada por lo que es retenido fuertemente y al aumentar la polaridad de la fase móvil el compuesto eluye junto con la materia prima que no reaccionó por lo que no pudo obtenerse puro.

Por lo anterior se decidió utilizar el cloroformiato de metilo para activar al grupo ácido de la tirosina en forma de un anhídrido mixto (Fig. 46), el cual fue desplazado nucleofílicamente por el grupo amino del tetrapéptido y formar el enlace péptidico. El análisis de cromatografía en capa fina de la reacción mostró la formación de un solo producto, por lo que el compuesto pudo ser purificado mediante recristalización por par de disolventes (hexano:diclorometano) a partir del residuo que se obtiene después del manejo de la mezcla de reacción, de esta manera el pentapéptido (**44**) se obtuvo como cristales blancos con un 80% de rendimiento.

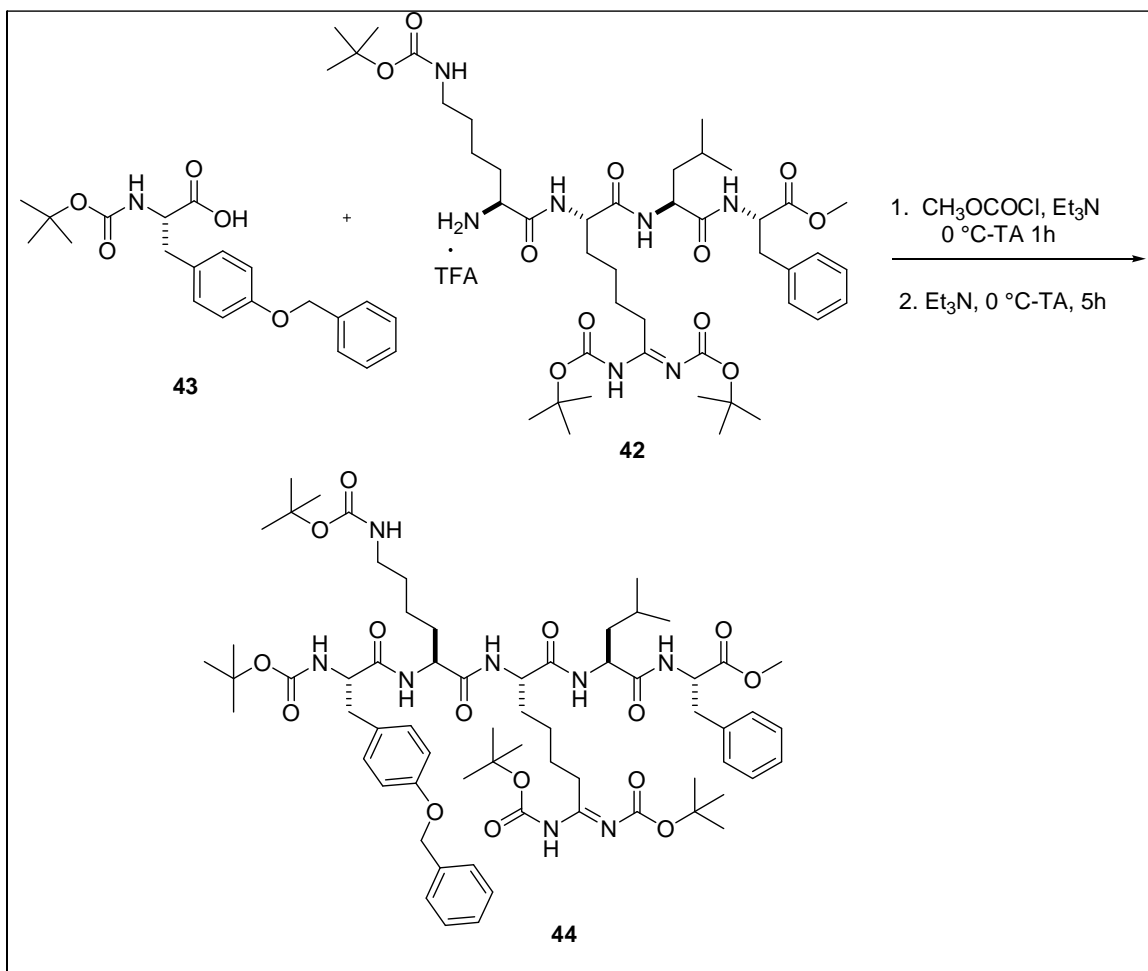


Figura 46. Síntesis del pentapéptido BOC-Tyr(Bzl)-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃.

El pentapéptido (**44**) obtenido mediante esta metodología fue caracterizado espectroscópicamente, en el espectro de IR (Anexo 4), se pueden observar las señales características de los grupos funcionales que se aprecian en el pentapéptido, como la señal a 1634 cm^{-1} que corresponde al éster metílico de la fenilalanina, así como la señal a 3279 cm^{-1} que corresponde a los enlaces N-H presentes en la molécula, además de unas señales a 1691 y 1716 cm^{-1} asignadas a los grupos carboxilo de las amidas generadas por el enlace peptídico y al del grupo carbamato y que es identificado igualmente por la señal 1234 cm^{-1} que origina el grupo *t*-Butilo. En la figura 46 se puede apreciar el espectro de RMN¹H del pentapéptido (**44**) donde se pueden observar además de las señales características en el espectro del tetrapéptido, entre 5.00 y 5.22 ppm 4 señales

Resultados y análisis

correspondientes a los tres grupos Cbz y Bz de los aminoácidos, así como cuatro señales entre 6.87 y 7.06 ppm que pertenecen a cuatro protones aromáticos del anillo *bencénico* de la tirosina.

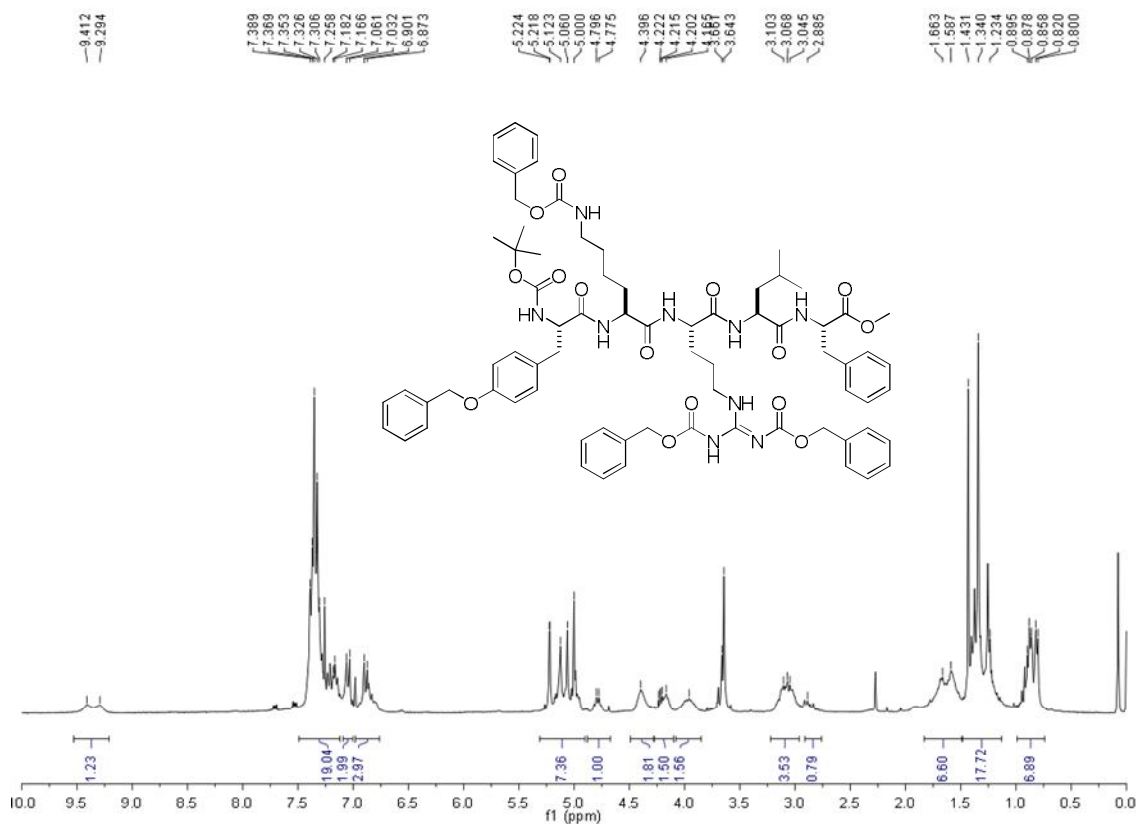


Figura 46. Espectro de RMN¹H del pentapéptido BOC-Tyr(Bzl)-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃.

El espectro de resonancia magnética nuclear de carbono RMN C¹³ del péptapéptido (**44**), se muestra en la figura 47, en el cual se pueden apreciar las mismas señales presentes en el espectro del tetrapéptido, sin embargo, en este último aparecen las señales adicionales correspondientes a la tirosina, como la señal que aparece en campo alto en la región de los carbonos aromáticos donde aparece un singulete a 114 ppm correspondiente a dos de los seis carbonos aromáticos de la tirosina y el otro par de hidrógenos aparecen a 130.25 ppm, así como una señal a 78 ppm que corresponde al carbono bencílico del grupo

Resultados y análisis

rendimientos disminuyeron considerablemente y quedó materia prima sin reaccionar por lo cual se recuperaba una proporción alta del aminoácido que se pretendía acoplar a la cadena peptídica. Esto puede deberse a que conforme el péptido crecía las cadenas laterales de los aminoácidos ocasionan un fuerte impedimento estérico, ya que en solución el péptido no necesariamente puede existir en forma lineal y esto puede ocasionar que el grupo amino libre no lleve a cabo fácilmente su aproximación hacia el carbono activado del ácido carboxílico y el desplazamiento nucleofílico no sea eficiente. Así cuando se disminuyó el tamaño del agente de acoplamiento el rendimiento se vio favorecido. Esto se comprueba cuando se utilizó el cloroformiato de metilo, y un anhídrido mixto se formó como el intermediario activado del grupo ácido del aminoácido, y que fue desplazado eficientemente por el grupo amino del tetrapéptido, a diferencia de cuando se utilizó el PFF como agente acoplante que muestra mayor impedimento estérico, y de esta manera se pudo obtener el pentapéptido en rendimiento superior al 80%.

VIII. CONCLUSIONES

- Se logró obtener el pentapéptido con la siguiente secuencia peptídica Boc-BOC-Tyr(Bzl)-Lys(Z)-Arg(Z)₂-Leu-Phe-CO₂CH₃ mediante una metodología eficiente con un rendimiento global promedio del 30% ya que en cada etapa de la síntesis el rendimiento fue superior o igual al 60%.
- Se logró hacer la caracterización espectroscópica mediante la técnica de RMN¹H, RMN¹³C e IR del pentapéptido y de los productos intermediarios.
- La utilización de grupos protectores fue de vital importancia para lograr la manipulación y acoplamiento de los aminoácidos y así obtener la cadena peptídica deseada.
- Para llevar a cabo la formación de las uniones peptídicas, fueron utilizados reactivos específicos de acoplamiento como la DCC, HOBt, PFF para la obtención del di, tri y tetrapéptido y CH₃OCOCI para la obtención del pentapéptido.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ronconi M, Merino L. *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* resistentes a ampicilina (AMP) gentamicina (GEN), estreptomina (EST) y vancomicina (VAN) aislados de materia fecal de pacientes pediátricos hospitalizados. Clin Infect. Dis. 2001;20:1048-51
2. Boman H. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Annu Rev Immun. 1995;13:61-92.
3. Hancock R. Peptide antibiotics. The Lancet. 1997;349: 418-22.
4. Darveau R, Blake J, Seachord C, Cosand W, Cunningham M, Casiano L, et al. Peptides Related to the Carboxyl Terminus of Human Platelet Factor IV whit Antibacterial Activity. J Clin Invest. 1992;90:447-55.
5. Yeaman M, Gank K, Bayer A, Brass E. Synthetic Peptides That Exert Antimicrobial Activities in Whole Blood and Blood-Derived Matrices. Antimicrob Agents and Chemot. 2002; 46:3883-91.
6. Nelson D, Cox M, Cuchillo C. Lehninger Principios de Bioquímica. 3ra ed. España: Omega; 2001. p. 116-125.
7. Peña A. Bioquímica. Ed Limusa. México; 1998. pp. 65-80.
8. Doonas S. Peptides and proteins. The Royal Society of chemistry. Cambridge (UK); 2002. P. 1-45.
9. McMurry J. Química orgánica. 6a ed. Australia: Thomson; 2004. p. 986-1012.
10. García O, Mendoza R, Muñoz O. Los aminoácidos, eslabones de la vida. Rev. Div. Cient. Tecn. 2001;23:147-58.
11. Voet D, Voet J. Bioquímica. 2ª ed. Barcelona: Médica Panamericana; 2006. p. 71-86.
12. González J. Eukal Herriko Unibertsitatea, Curso de Biomoléculas. Disponible en: <http://www.ehu.es/biomoleculas/AA/aa3.htm>. Consultado diciembre 5, 2010.

Referencias Bibliográficas

13. Koolman J, Roehm K. Bioquímica. Texto y Atlas. 3ra ed. Ed. Médica Panamericana; 2005. p. 58-75.
14. Abannat D, Macielag M, Bush K. novel antibacterial agents for the treatment of serious gram positive infection. *Exp. Opin. Invest. Drug.* 2003;12:379-399.
15. Jimenez J, Giralt E, Albericio F. Péptidos y la industria Farmacéutica. *Anales de la real Sociedad Española de Química.* 2004;10-16.
16. Barrett G. Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids. London New York: Chapman and Hall; 1985. p. 7-13, 20-23, 55-109.
17. Smith M. Organic Synthesis. New York: McGraw-Hill Inc; 1994. p. 567-98.
18. Sewald N, Jakubke H. Peptides: Chemistry and Biology. 2a ed. PAIS: Wiley-VCH; 2002. p. 1589.
19. Ege S. Química Orgánica: estructura y reactividad: 2da ed. Barcelona: Reverté; 1997. p. 1197.
20. Peck K, Darveau R, Feel H. Identification of serum components that inhibit the tumoricidal activity of amphiphilic alpha helical peptides. *cancer Chemothe Pharmacol.* 1993; 32:109-115.
21. Rivas B, Sada E, Hernández R, Tsutsumi V. Antimicrobial peptides in the innate immunity of infectious diseases. *Sálud Pub Méx.* 2006;48:62-71.
22. Sewald N, Jakubke H. Peptides: Chemistry and Biology. 2a ed. Wiley-VCH. 2002. p. 945.
23. Hancock R, Falla T, Brown M. Cationic bactericidal peptides. *Adv Microb Physiol.* 1995;7:135-175.
24. Hancock R. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infect Diseases.* 2001;1:156-164.
25. Hancock R, Chapple D. Peptide Antibiotics. *Antimicrob Agents and Chemot.* 1999; 43:1317-23.

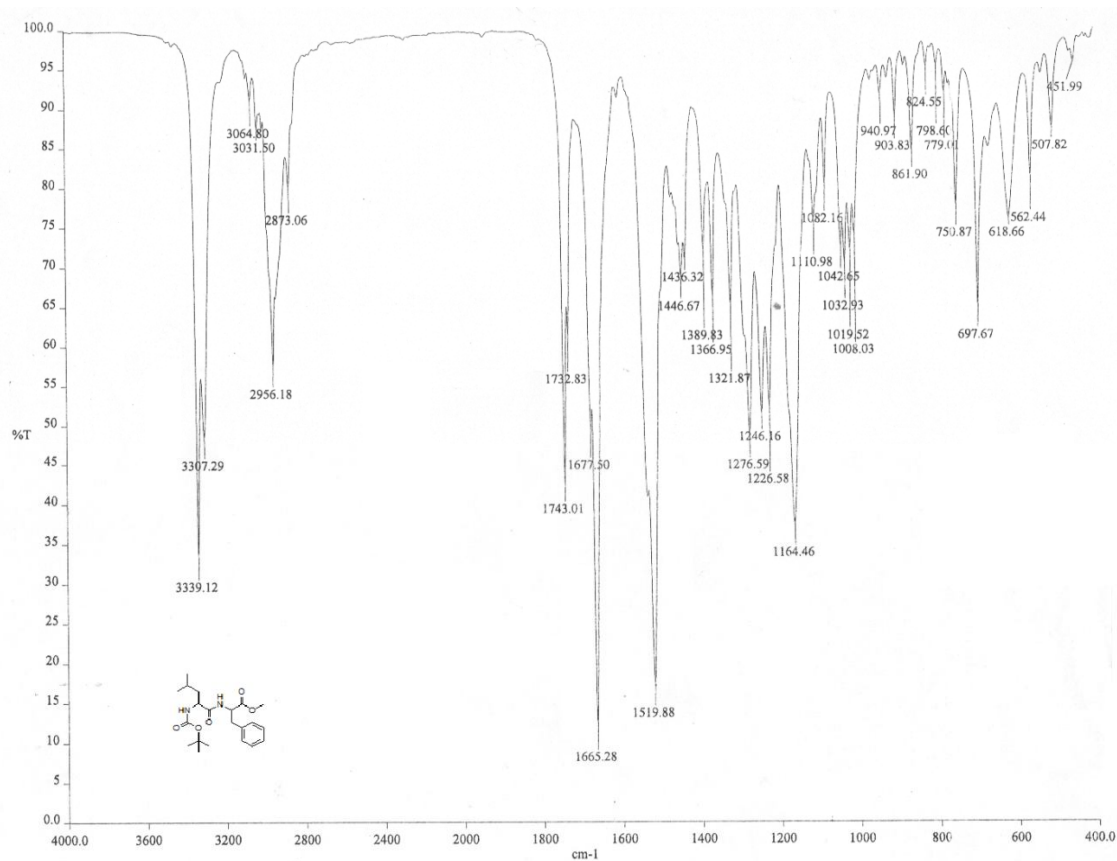
Referencias Bibliográficas

26. Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002;415:389-95.
27. Hancock R, Leher R. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol*. 1998;16:82-8.
28. Tang Y, Yeaman M, Selsted M. Antimicrobial Peptides from Human Platelets. *Infect Immun*. 2002;71:6524-33.
29. Yeaman M, Tang Y, Shen A, Bayer A, Selsted M. Purification and In Vitro Activities of Rabbit Platelet Microbicidal Proteins. *Infection and Immunity*. 1997;65:1023-31.
30. Krijgsveld J, y cols. Thrombocidins, Microbicidal Proteins from Human Blood Platelets, Are C-terminal Deletion Products of CXC Chemokines. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;27:20374-81.
31. Yeaman M, Tang Y, Selsted M. Antimicrobial Peptides from Human Platelets. *Infect Immun*. 2002;71:6524-33.
32. Darveau R, Blake J, Seachord C, Cosand W, Cunningham M, Casiano L, Maloney G. Peptides Related to the Carboxyl Terminus of Human Platelet Factor IV whit Antibacterial Activity. *J Clin Invest*. 1992;90:447-55.
33. Falla T, Karanuratne DN, Hancock RW, Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Bio. Chem*. 1996;271:19298-303.
34. Montaña K, Vargas F. Péptidos antimicrobianos un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro. *Interciencia*. 2002;27:21-27.
35. Brogden K. Antimicrobial peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? *Nature*. 2005;3:238-247.
36. Yeaman M, Yount N. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev*. 2003;55:27-55.
37. Kent S. Chemical Synthesis of Peptides and Proteins. *Annu Rev Biochem*. 1988;57:957-989.

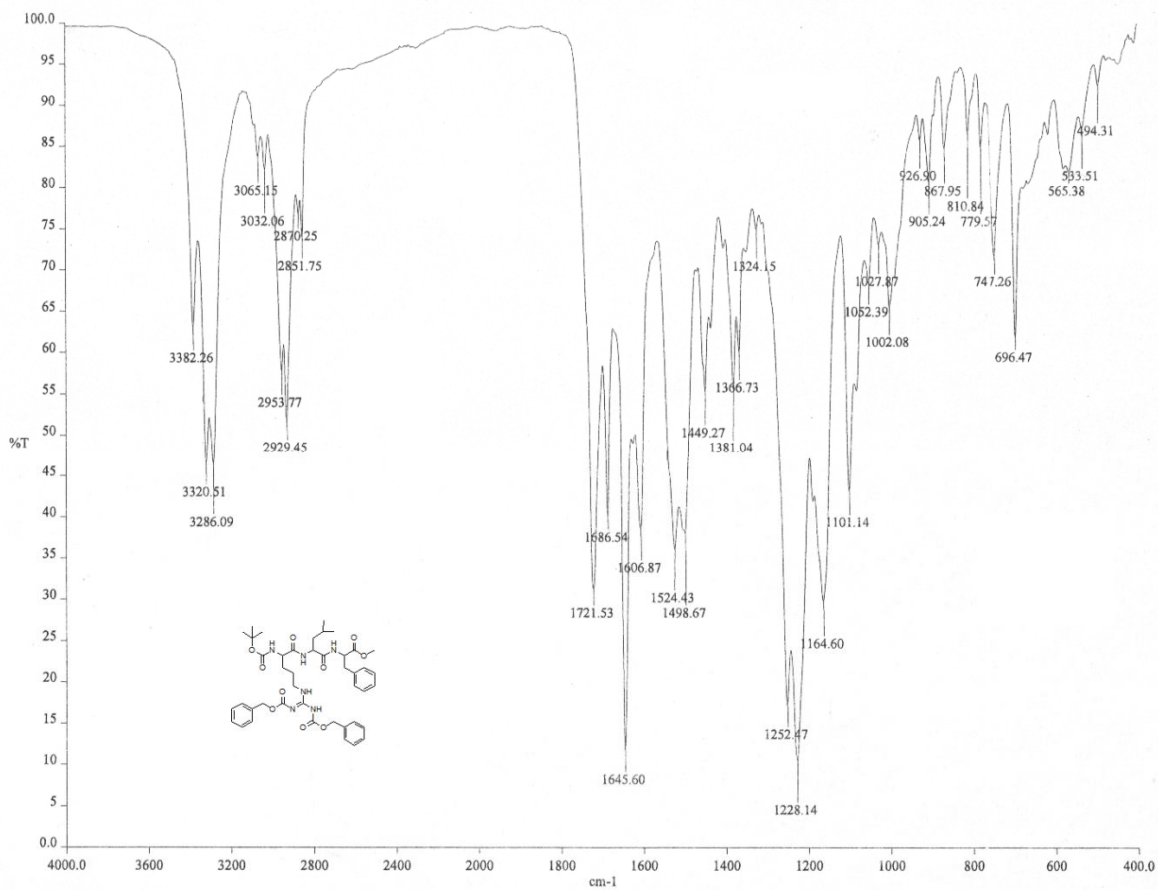
Referencias Bibliográficas

38. Jones J. Amino Acid and Peptide Synthesis. 2a ed. Oxford University Press. 2002. p. 203.
39. Greene T, Wuts P. Greene's Protective Groups in Organic Synthesis. 4a ed. John Wiley and Son S Inc. Publication. 2007.
40. Navarrete E. Síntesis de Péptidos. Métodos físico-químicos en biotecnología. UNAM. 2007. p. 256.
41. Benoiton N. Chemistry of Peptide Synthesis. Taylor and Francis. Group Boca Raton London. 2006.
42. Bodanszky M, Bodanszky A. The practice of Peptide Synthesis. 2a ed. Springer Verlag. 1989; pp. 582.
43. Hong M. Solid-State NMR Studies of the Structure, Dynamics, and Assembly of B-Sheet Membrane Peptides and α -Helical Membrane Proteins with Antibiotic Activities. Acc. Chem. Res. 2005; 325-342.
44. König W, Geiger K. Eine neue Methode zur Synthese Von Peptiden: Aktivierung der Carboxylgruppe mit Dicyclohexylcarbodiimid unter Zusatz von 1-Hydroxy-benzotriazolen. (A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives.) Chem Ber. 1970;103:788-98.
45. Prasad K, Bharathi K, Banu H. Applications of peptide coupling reagents – an update. Intern Journ Pharma Scien Review and Research . 2011;8,108-119.
46. Pretsch E, Clerc T, Seibl J, Simon W. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Alhambra. España; 1980; pp. 689.

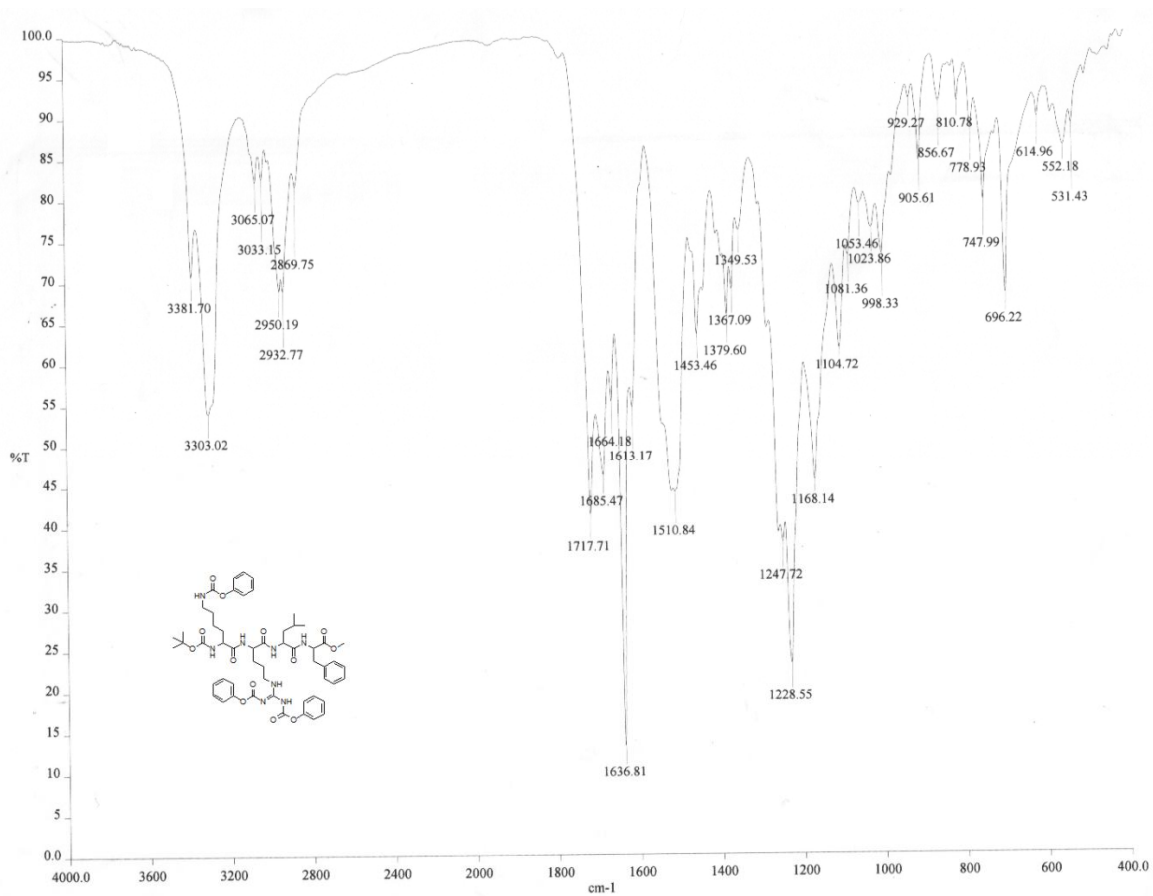
X. ANEXOS

Anexo 1. Espectro de IR. BOC-Leu-Phe-OCH₃

Anexo 2. Espectro de IR. BOC-Arg(Z)-Leu-Phe-OCH₃



Anexo 3. Espectro de IR. BOC-Lys(Z)₂-Arg(Z)-Leu-Phe-OCH₃



Anexo 4. Espectro de IR. BOC-Tyr(Bzl)-Lys(Z)₂-Arg(Z)-Leu-Phe-OCH₃

