



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y SELECTIVA DE DENDRÍMEROS A  
PÉPTIDOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE LA SEMILLA  
DE AMARANTO.**

**TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**M. en C. ALBERTO ALEJANDRO FAJARDO DE LA ROSA.**

**DR. EDUARDO BÁRZANA GARCÍA.**

**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DEL 2023**



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.



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS.**

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y SELECTIVA DE DENDRÍMEROS  
A PÉPTIDOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS DE RESERVA DE LA  
SEMILLA DE AMARANTO.**

**TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**M. en C. ALBERTO ALEJANDRO FAJARDO DE LA ROSA.**

Ciudad de México, a de 11 de Septiembre del 2023.

*La calidad nunca es un accidente,  
siempre es resultado de un  
esfuerzo de la inteligencia.  
(John Ruskiin).*

Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada a lo largo de mis estudios de Doctorado. N° de becario 769081.

Al Dr. Eduardo Bárzana García, por su apoyo incondicional en todos estos años y por haberme permitido trabajar con él. Ha sido un privilegio enorme aprender tanto de una gran persona como usted y es mi ejemplo a seguir.

Al Dr. Oscar Hernández Meléndez, por su apoyo incondicional, su asesoría y experiencia, sin su ayuda no habría sido posible todo esto. Mil gracias por todo y por la gran amistad que se forjó a lo largo de los años.

A la Dra. María Inés Nicolás Vázquez, por todo el apoyo recibido tras estos años, trabajando de forma presencial y a distancia a pesar de que las condiciones no fueron muy favorables en años pasados por la contingencia sanitaria. De igual manera agradezco mucho la amistad que se forjó y por el espacio de trabajo.

Al Dr. José Manuel Saniger Blesa, por su apoyo en los comités tutorales y en los trabajos realizados.

Al Dr. José de Jesús García Valdés quien a pesar de que no pudo estar con nosotros en este proceso, le agradezco mucho todas sus enseñanzas que han sido significativas y valiosas hasta el último momento de este trabajo y en mi formación profesional.

A mis sinodales por su tiempo y comentarios para enriquecer este trabajo, muchas gracias.

A mi madre que siempre estuvo apoyándome desde el inicio de mi carrera y a quien le doy las gracias por forjar a la persona que soy hoy en día.

A mis mejores amigos: Osiel Legorreta, Alejandro Rubiales, Anaí Soriano, Axel Hernández, Roberto Gaspar, Vanessa Melo, Viridiana Lona. Siempre apoyándome en las buenas y en las malas.

A la USAII por el apoyo en la elaboración de diversos estudios y a sus encargados por la enseñanza en el manejo de estos equipos, así como en el apoyo a la interpretación de los resultados. En especial al Dr. Jorge Herrera por su gran apoyo y enseñanzas que lograron dar el paso determinante en este trabajo.

Este trabajo se realizó en la Facultad de Química de la UNAM, Laboratorio de Ingeniería Química, Laboratorio de Ingeniería Agroindustrial.

Alejandro Fajardo De La Rosa, Oscar Hernández-Meléndez, J. Manuel Saniger-Blesa, Ma. Inés Nicolás-Vázquez and Eduardo Bárzana, **(2023)**. Theoretical–experimental prediction of the selectivity between polyamidoamine dendrimers and bioactive peptides derived from amaranth seeds. *New Journal Chemistry*, 2023,47, 12170-12181.  
<https://doi.org/10.1039/D3NJ01344H>

<b>ÍNDICE GENERAL.</b>		
1	INTRODUCCIÓN.	3
2	ANTECEDENTES.	4
2.1	Alimentos funcionales.	4
2.2	Historia del amaranto.	4
2.3	Producción de amaranto.	5
2.4	Clasificación del amaranto.	6
2.5	Tamaño, estructura y composición de la semilla.	7
2.6	Proteínas de reserva y tipos.	9
2.7	Clasificación de péptidos activos.	10
2.8	Dendrimeros.	12
2.9	Antecedentes históricos sobre la síntesis de dendrimeros PAMAM.	13
2.10	Técnicas generales de síntesis de los dendrimeros PAMAM.	14
2.11	Propiedades ácido base de los dendrimeros PAMAM.	17
2.12	Residuos lignocelulósicos.	18
2.13	Química computacional.	20
3	JUSTIFICACIÓN.	23
4	HIPÓTESIS.	24
5	OBJETIVO.	24
5.1	Objetivos específicos	24
6	MATERIALES Y MÉTODOS.	24
6.1	Materiales.	24
6.2	Síntesis de un dendrimeros PAMAM (Partiendo de un núcleo de etilendiamina [EG]).	25
6.3	Estudio Ácido-Base.	26
6.4	Síntesis del material compuesto dendrimeros-celulosa.	26
6.5	Estudio Computacional.	27
6.6	Semilla de amaranto.	30
7	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE RESERVA: MÉTODO DISOLUCIONES.	30
7.1	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE RESERVA: MÉTODO FENOL.	31
7.2	Determinación de la calidad de proteína SDPAGE 1D.	32
7.3	Hidrólisis de proteínas y captura del péptido por el dendrimeros PAMAM.	32
7.4	IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN LAS FRACCIONES PROTÉICAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC MS/MS).	33

8	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	34
8.1	Síntesis de los dendrímeros.	34
8.2	Caracterización por FT-IR de los dendrímeros.	35
8.3	Caracterización FT-IR y determinaciones teóricas.	36
8.4	Determinaciones ácido-base para la serie de moléculas EG.	38
9	SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL BIO-MATERIAL (BM).	39
9.1	Caracterización por FT-IR de los bio-materiales (Dendrímero EG3 anclado a celulosa).	40
9.2	Determinaciones ácido-base para el bio-material.	41
9.3	Microscopía electrónica de barrido (SEM) para el bio-material.	43
9.4	Microscopía electrónica de transmisión (TEM) para el bio-material.	43
9.5	Análisis teórico de energías de acoplamiento para aminoácidos y el dendrímero PAMAM.	45
9.6	Análisis teórico de energías para péptidos y el dendrímero PAMAM.	48
9.7	Análisis por electroforesis SDPAGE 1D para determinar la calidad de la proteína.	50
9.8	Proceso de hidrólisis enzimática y separación de péptidos mediante columnas empacadas con el biomaterial sintetizado (BM).	51
10	PÉPTIDOS CAPTURADOS EN LAS FRACCIONES PROTÉICAS.	52
10.1	Secuencias de péptidos detectadas.	53
11	Conclusiones.	59
	Referencias.	61
	ANEXO 1. Código de aminoácidos.	67

<b>ÍNDICE DE FIGURAS.</b>		
FIGURA 1	<i>Regiones donde de cultivo nativo de amaranto. Las áreas oscuras son donde se concentran los cultivos de amaranto. Imagen tomada de Arendt et al. (2013).</i>	6
FIGURA 2	<i>Planta de amaranto A. Hypochondiracus.</i>	7
FIGURA 3	<i>Semillas de amaranto y los colores de sus variedades. Imagen tomada de pregon agropecuario®</i>	7
FIGURA 4	<i>Péptidos bioactivos derivados de proteínas de reserva de la semilla de amaranto.</i>	12
FIGURA 5	<i>Características de los dendrímeros. Esquema de un dendrímero (Marcos y Serrano 2009).</i>	13

FIGURA 6	<i>Síntesis de los dendrímeros PAMAM por el método divergente (Tomalia D. 2005).</i>	14
FIGURA 7	<i>Síntesis convergente y divergente PAMAM (Ghazzali., 2016).</i>	16
FIGURA 8	<i>Aplicaciones de los dendrímeros en sistemas biológicos (D'Emanuele, y Attwood, 2005).</i>	17
FIGURA 9	<i>Comportamiento de solubilidad de los dendrímeros PAMAM frente a pH ácido (Izquierda) y pH básico (Derecha) (Gonzalo T. et al. 2009).</i>	18
FIGURA 10	<i>Matriz lignocelulósica. (Brandt et al. (2013).</i>	19
FIGURA 11	<i>Representación molecular de la celulosa. (Lebedev, 2015).</i>	20
FIGURA 12	<i>Algunas propiedades determinadas mediante la química computacional.</i>	22
FIGURA 13	<i>Extracción de fracciones protéicas derivadas de la semilla de amaranto Nutrisol.</i>	31
FIGURA 14	<i>Preparación y purificación de la muestra para ser insertada en el espectrómetro de masas ya que al tratarse de un instrumento de análisis muy fino se requiere un tratamiento previo para poder insertar un analito.</i>	34
FIGURA 15	<i>Espectros de FT-IR para la serie de dendrímeros PAMAM EG con grupos amina terminales.</i>	35
FIGURA 16	<i>Molécula EG1.0 optimizada en B3LYP/6-31G(d,p), donde se observa la distribución de energía más estable.</i>	36
FIGURA 17	<i>Comparación del interferograma teórico y el espectro IR con el espectro IR experimental para el dendrímero EG1.0.</i>	38
FIGURA 18	<i>Perfiles ácido-base (Básico-Ácido) para la serie de moléculas EG.</i>	39
FIGURA 19	<i>Esquema general de síntesis del bio-material, Bagheri M., et al. (2008).</i>	40
FIGURA 20	<i>Espectros de FT-IR para la serie del dendrímero PAMAM EG, celulosa y el bio-material CEG4.</i>	41
FIGURA 21	<i>Perfiles ácido-base (Básico-Ácido) para el biomaterial dendrímero-celulosa (BM).</i>	42
FIGURA 22	<i>Perfiles ácido-base (Ácido-Básico, Básico-Ácido) para el biomaterial dendrímero-celulosa (BM).</i>	42
FIGURA 23	<i>Micrografías SEM tomadas por USAII-UNAM de 250x (1) a 2000x (5). (A) celulosa microcristalina comercial, (B) biomaterial celulosa-dendrímero, (C) biomaterial celulosa-dendrímero posterior a su uso.</i>	43
FIGURA 24	<i>Micrografías TEM tomadas por USAII-UNAM 200x (1) a 2000x (3). (Celulosa microcristalina comercial), (B) Biomaterial celulosa-dendrímero (BM), (C) Biomaterial celulosa-dendrímero posterior a su uso (BM).</i>	44
FIGURA 25	<i>Representación de los complejos formados entre el dendrímero-aminoácido y sus respectivas distancias de interacción puente de hidrógeno. (A) EG1.0-TYR, (B) EG1.0-VAL, (C) EG1.0-ARG, y (D) EG1.0-MET.</i>	46
FIGURA 26	<i>Comparativo de los espectros de IR teórico-experimental e interferograma para el complejo dendrímero PAMAM EG1 y tirosina.</i>	47
FIGURA 27	<i>Interacción dendrímero PAMAM EG1-Tirosina. La ilustración se</i>	47

	<i>basa en el mapeo de un dendrímero y un aminoácido sobre una superficie de densidad electrónica total. En el mapa se muestran los potenciales más positivos (Azul) y más negativos (Rojo), trazados sobre una superficie de densidad electrónica constante.</i>	
FIGURA 28	<i>Interacciones dendrímero-péptido basados en un método de interacción por mecánica molecular (MMFF).</i>	48
FIGURA 29	<i>Interacciones dendrímero-péptido (YLAGKPQQEH) basados en un método de interacción por medio de DFT con estructuras optimizadas y sus energías de acoplamiento para las mejores interacciones con péptidos de interés. La tabla presenta la energía puntual de acoplamiento de los complejos PAMAM EG1-oligopéptido.</i>	49
FIGURA 30	<i>Interacción dendrímero PAMAM G1.0-YLAGKPQQEH. La ilustración se basa en el mapeo de un dendrímero y un péptido sobre una superficie de densidad electrónica total.</i>	50
FIGURA 31	<i>Patrón electroforético de las fracciones de proteínas de reserva de amaranto Nutrisol cultivado en Atlacomulco Edo. México. Carril derecho A) método comparativo de extracción de proteína total por fenol y disoluciones. B) método de extracción sólo por disoluciones. A) extremo derecho, marcador de peso molecular Biorad (Lisozima).</i>	51
FIGURA 32	<i>Diagrama general para la captura de péptidos tras la hidrólisis de las proteínas de amaranto, Utilizando como soporte sólido el biomaterial (BM) en un proceso continuo.</i>	52
FIGURA 33	<i>Diagrama general de la purificación para los péptidos capturados antes de ser colocados en el espectrómetro de masas.</i>	53
FIGURA 34	<i>Secuencia de la proteína identificada en UNIPROT e interacción con el péptido YLQVNSGAK donde se presenta la posible interacción con el dendrímero PAMAM utilizando un método de análisis conformacional y de interacción por mecánica molecular (MMFF).</i>	55
FIGURA 35	<i>Secuencia de la proteína identificada en UNIPROT e interacción con el péptido LLALVIVGFMVIQLIKPIGWPLKR donde se presenta la posible interacción con el dendrímero PAMAM utilizando un método de análisis conformacional y de interacción por mecánica molecular (MMFF).</i>	56
FIGURA 36	<i>Secuencia de la proteína identificada en UNIPROT e interacción con el péptido LVLSHVPLVQEIFGLR donde se presenta la posible interacción con el dendrímero PAMAM utilizando un método de análisis conformacional y de interacción por mecánica molecular (MMFF).</i>	57
FIGURA 37	<i>Secuencia de la proteína identificada en UNIPROT e interacción con el péptido VFSLLMLLTQAR donde se presenta la posible interacción con el dendrímero PAMAM utilizando un método de análisis conformacional y de interacción por mecánica molecular (MMFF).</i>	59

<b>ÍNDICE DE TABLAS.</b>		
TABLA 1	<i>Comparación de la composición proximal entre amaranto y algunos cereales en peso seco. Huerta-Ocampo J. (2012).</i>	8
TABLA 2	<i>Composición de aminoácidos esenciales de semillas de tres especies de amaranto en (g/100g de proteína) Huerta-Ocampo J. (2012).</i>	9
TABLA 3	<i>Actividad biológica detectada en algunas secuencias de péptidos derivados de la semilla de amaranto.</i>	11
TABLA 4	<i>Métodos basados en química computacional (Suarez D. 2012).</i>	21
TABLA 5	<i>Comparación de frecuencias teórico-experimentales, para el dendrímero EG1.0. Utilizando un funcional híbrido B3LYP y un conjunto de bases 6-31G(d,p).</i>	37
TABLA 6	<i>Tabla comparativa de energías de acoplamiento utilizando diferentes niveles de teoría basados en escalamiento teórico.</i>	45
TABLA 7	<i>Secuencias detectadas por el espectrómetro de masas para los diferentes péptidos capturados por el biomaterial tras la hidrólisis de globulinas 11s con Bacillus Licheniformis.</i>	54
TABLA 8	<i>Secuencias detectadas por el espectrómetro de masas para los diferentes péptidos capturados por el biomaterial tras la hidrólisis de globulinas 11s con Aspergillus oryzae</i>	55
TABLA 9	<i>Secuencias detectadas por el espectrómetro de masas para los diferentes péptidos capturados por el biomaterial tras la hidrólisis de glutelinas con Bacillus Licheniformis.</i>	57
TABLA 10	<i>Secuencias detectadas por el espectrómetro de masas para los diferentes péptidos capturados por el biomaterial tras la hidrólisis de la proteína total de amaranto con Bacillus Licheniformis</i>	58

## **RESUMEN.**

Los dendrímeros de tipo PAMAM han tenido una limitante para su aplicación masiva, debido a la manipulación de estas macromoléculas, su costo y recuperación tras su uso, presentando algunas limitantes para la obtención de materiales debido a la complejidad y costo que representan. Se han desarrollado pocos trabajos e investigaciones donde se propongan procesos para la obtención de nuevos materiales con moléculas dendríticas inmovilizadas. En este trabajo se propone una estrategia para el uso continuo de estos materiales para la separación de péptidos bioactivos derivados de proteínas de reserva de amaranto. El amaranto es una planta tradicional mexicana que provee tanto hojas, así como semillas comestibles con un alto valor nutricional. La variante utilizada (Nutrisol, *A. hypochondriacus*), proveniente de Atlacomulco Estado de México y se analizó para extraer péptidos bioactivos con alto valor agregado.

El objetivo de este trabajo es extraer de manera selectiva algunos péptidos bioactivos presentes en las proteínas de reserva de la semilla de amaranto, así como la síntesis de un bio-material para realizar la extracción de bio-moléculas con interés biológico. También se describe el análisis estructural de los dendrímeros, aminoácidos presentes en la semilla de amaranto y péptidos encriptados de interés. Este estudio es realizado por técnicas analíticas instrumentales, así como estudios a nivel teórico, empleando metodologías de la química cuántica. Se analizan las interacciones intermoleculares dendrímero-aminoácido, dendrímero-péptido, con el propósito de reconocer la fuerza de interacción, y de esta manera lograr el aislamiento de péptidos específicos con alto valor agregado. Los análisis de predicción de péptidos activos en estas proteínas han demostrado bioactividad antihipertensiva, inhibidora de proteasas, lunasin (un péptido anticancerígeno) y péptidos antioxidantes, entre otros.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

Los bio-materiales presentan hoy en día una gran importancia por su interacción con sistemas biológicos, estos pueden ser naturales o sintéticos, como es el caso de los dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) acoplados a una matriz de celulosa. Las moléculas dendríticas son macromoléculas que han sido estudiadas por más de 3 décadas y que han presentado diversas aplicaciones en muchas disciplinas. Por otro lado, los dendrímeros PAMAM están siendo de gran interés para futuras aplicaciones en masa debido a sus características.

En este texto se presentan estrategias para la síntesis de bio-materiales a partir de dendrímeros PAMAM y celulosa. La síntesis de los dendrímeros se lleva a cabo de manera controlada, apoyado en estudios teóricos, así como análisis FT-IR y propiedades ácido-base. La síntesis de los bio-materiales se realizó con dendrímeros de tercera generación. El anclaje del dendrímero se realiza por medio de dos ataques nucleofílicos a una molécula que presenta dos grupos isocianato en posición “*para*” (fenil-diisocianato).

El amaranto es clasificado como un pseudocereal de origen americano que fue cultivado por las antiguas civilizaciones residentes de México prehispánico, era empleado en las dietas, junto al maíz y frijol. Posterior a la conquista, el amaranto fue prohibido debido a que se asociaba a cultos religiosos, resultando que pasara a ser un cultivo subutilizado y despreciado. Este cultivo se puede aprovechar de manera más eficiente puesto que ofrece tanto granos y hojas comestibles con alta calidad nutricional. Las semillas de amaranto tienen un alto contenido de proteína (13%-17%) y su composición de aminoácidos es cercana al balance óptimo requerido en la dieta humana (Paredes O. et al. 1990).

El amaranto es un alimento funcional que puede aportar muchos beneficios a la salud y además puede explotarse comercialmente como un producto de alto valor agregado. La investigación sobre las proteínas de la semilla de amaranto va desde una caracterización bioquímica de proteínas de reserva del grano, la hidrólisis, así como el desarrollo de bio-materiales selectivos para la extracción de péptidos específicos.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1 Alimentos funcionales.**

En los últimos años, uno de los temas más importantes de investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos es el desarrollo de alimentos que promuevan la salud. Estos se definen como alimentos capaces de aportar sustancias con funciones fisiológicas definidas, brindando beneficios a quien los consume. Los alimentos funcionales están evolucionando como una estrategia con alto potencial en la prevención de enfermedades crónicas. Se ha demostrado que estos alimentos tienen efectos fisiológicos importantes y específicos al contener compuestos bioactivos que benefician la salud. Los alimentos funcionales tienen características particulares, dado que sus componentes afectan funciones del organismo de manera positiva, dando un valor agregado a estos más allá de la nutrición (Jiménez F. et al. 2013).

### **2.2 Historia del amaranto.**

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) fue un cultivo fundamental para las civilizaciones Mesoamericanas, apreciando su valor alimenticio. Los aztecas lo conocían como “*huautli*” y era utilizado en ritos religiosos, los Incas lo denominaron “*kiwicha*” (pequeño gigante) y lo respetaban principalmente por sus poderes curativos. A la llegada de los españoles se le denominó amaranto que proviene del latín y significa “flor que nunca muere” (Sanchez C. et al. 2007, Asociación Mexicana del Amaranto).

El amaranto fue un cultivo que jugó un papel importante en la economía azteca, este grano fue ampliamente distribuido en la civilización. En la alimentación se utilizaba para preparar alimentos como atole, tamales, pinole, tortillas y las hojas eran consumidas como verduras. Con la semilla de amaranto se preparaba una harina que era mezclada con miel para preparar una masa llamada “*tzoalli*” con la cual se elaboraban figurillas e ídolos. Estas figurillas eran empleadas para tradiciones religiosas donde los grandes sacerdotes lo utilizaban como fuente de fuerza e

iluminación mística. A la llegada de los españoles y debido a las costumbres religiosas, ordenaron la exterminación del cultivo debido a que consideraban que era una forma de perversión a la iglesia católica. Esto casi logra el exterminio del cultivo, sólo pocas personas conservaron la tradición del cultivo de amaranto en pequeñas parcelas y para consumo familiar. Hasta la década de los 80's. El amaranto fue redescubierto y desde entonces han aparecidos numerosos reportes en los cuales se estudia las cualidades agronómicas y nutricionales de este grano (Becerra R. 2000).

### **2.3 Producción de amaranto.**

El amaranto tiene un origen mesoamericano, pero actualmente se encuentra en todo el mundo. Los primeros reportes que se tienen de amaranto en Europa datan de los años 1600, éste fue llevado como parte de las pruebas de la conquista del nuevo mundo. El amaranto se cultiva en varios estados de la República Mexicana como lo son: CDMX, Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, y Tlaxcala (Figura 1) con una producción anual de 2959.98 toneladas, y un rendimiento de 1.295 ton/ha. El principal productor mundial de amaranto es la India. En América del sur, Perú es uno de los productores más importantes. (Silva-Sánchez C. et al. 2008, Grupo Enlace de Amaranto Mexicano).

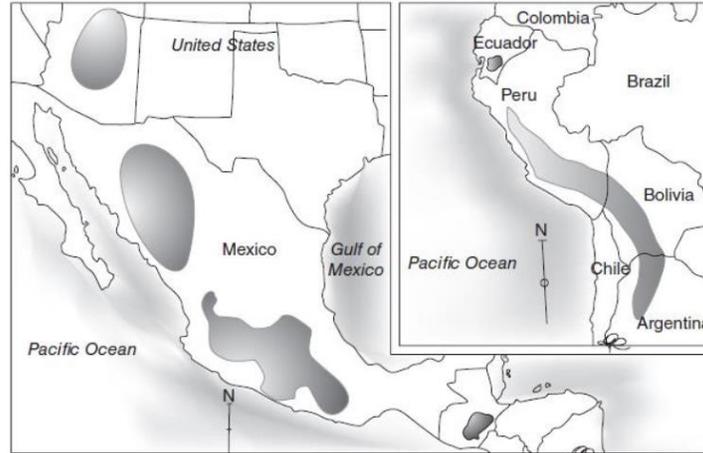


Figura 1. Regiones donde de cultivo nativo de amaranto. Las áreas oscuras son donde se concentran los cultivos más importantes de amaranto en América. Imagen tomada de: Arendt et al. 2013.

## 2.4 Clasificación del amaranto.

La familia *Amaranthaceae* contiene más de 60 géneros y 800 especies de plantas herbáceas, de las cuales sólo tres especies del género *Amaranthus* son cultivadas para la producción de semillas comestibles: *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* que son cultivadas en México, y *A. caudatus*, que es cultivada en Perú (Paredes et al. 1990). El amaranto es una planta considerada como dicotiledónea que produce semillas del tipo cereal, por lo que se le ha denominado como un pseudocereal (Se le denomina pseudocereal ya que posee características similares a los cereales pero sus semillas provienen de flores y no de forma gramínea como el caso del trigo). El amaranto posee hojas simples con una altura de planta que varía de 1.5 a 3.0 m; el número de hojas y el tamaño muestran una gran variabilidad entre especies, además responde a diferentes condiciones de crecimiento mediante cambios en el número de ramificaciones, patrón de ramificación y tamaño de la plántula (Paredes et al. 1990).

La planta de amaranto (Figura 2.) puede ser de ciclo corto, tolerante a la sequía, con un alto valor nutritivo, con múltiples usos y por sus formas de aprovechamiento se considera como un cultivo alternativo para muchos lugares donde hay escasez e irregularidad de lluvias; donde incluso se presentan problemas de abasto de alimentos (Stallknecht G. et al. 1993).



*Figura 2. Planta de amaranto A. Hypochondriacus.*

### **2.5 Tamaño, estructura y composición de la semilla.**

El tamaño de la semilla es variable, entre 1.1 a 1.4 mm de largo por 1.0 a 1.3 mm de ancho, tamaño que es muy pequeño comparado con el del frijol o trigo (Silva-Sánchez et al. 2007). Con lo reportado por (Arendt et al. 2013) se tiene que 1000 semillas pesan de 0.5-1.2 g y 1 gramo puede contener de 850-1700 semillas. Así mismo se reporta que una planta de la misma especie puede producir más de 50,000 semillas con diferentes colores en un mismo cultivo, como es el blanco, amarillo, marrón, negro, oro, crema y negro obsidiana (Figura 3) (Huerta-Ocampo J. et al. 2012).



*Figura 3. Semillas de amaranto y los colores de sus variedades. Imagen tomada de pregon agropecuario®*

La semilla de amaranto contiene aproximadamente 15.1% de proteína en promedio y se puede comparar en la Tabla 1 con semillas convencionales como el maíz con 10.3%, arroz con 8.5%, trigo con 14.0% y soya con 37.0%. El contenido de lípidos es relativamente alto (7.7%), sin embargo, este valor es mucho menor que en algunas leguminosas consumidas como la soya con un valor de 20.0%. Los análisis de composición indican que los contenidos de proteína cruda, lípidos, fibra y cenizas del amaranto son generalmente más altos que en los cereales, pero con un contenido de carbohidratos más bajo (Guzmán-Maldonado H. et al. 1998).

*Tabla 1. Comparación de la composición proximal entre amaranto y algunos cereales en peso seco. (Huerta-Ocampo J. et al. 2012).*

<b>ANALISIS</b>	<b>AMARANTO</b>	<b>MAIZ</b>	<b>ARROZ</b>	<b>TRIGO</b>	<b>SOYA</b>
% Humedad	11.1	13.8	11.7	12.5	19.0
%Proteína cruda	15.1	10.3	8.5	14.0	37.0
% Lípidos	7.7	4.5	2.1	2.1	20.0
% Fibra	2.2	2.3	0.9	2.6	12.0
% Cenizas	4.1	1.4	1.4	1.9	5.0
% Carbohidratos	57.0	67.7	75.4	66.9	7.0

En general el contenido de aminoácidos esenciales del amaranto es adecuado para dietas en personas jóvenes y jóvenes-adultas; muy en particular los aminoácidos azufrados y lisina. Este último corresponde a casi el doble de lo que contiene el maíz, el trigo, o leguminosas importantes como chícharo, frijoles y soya (Dalton W. 1973). La composición de aminoácidos en amaranto (Tabla 2) es poco usual debido a su balance cercano al óptimo requerido en dietas humanas para adultos según la FAO (2011), lo que hace de este grano una cosecha ideal para el futuro como alimento o fuente de proteínas.

Tabla 2. Composición de aminoácidos esenciales de semillas de tres especies de amaranto en (g/100g de proteína) (Huerta-Ocampo J. et al. 2012).

AMINOÁCIDO	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	<i>Amaranthus cruentus</i>	<i>Amaranthus caudatus</i>	FAO/WHU/UNU	
				Adultos	Niños
Isoleucina	2.8 – 3.8	3.4 – 3.7	3.6 – 4.1	1.3	4.6
Leucina	5.0 – 5.8	4.8 – 5.9	5.9 – 6.3	1.9	9.3
Lisina	3.2 – 6.0	4.8 – 5.9	5.7 – 6.4	1.6	6.6
Metionina + Cisteina	2.6 – 5.5	3.8 – 5.4	4.7	1.7	4.2
Fenilalanina + Tirosina	6.9 – 8.5	5.6 – 8.5	6.2	1.9	7.2
Treonina	2.6 – 4.3	3.2 – 4.2	3.8	0.9	4.3
Triptófano	1.1 – 4.3	nd	1.1	0.5	1.7
Valina	3.2 – 4.2	2.4 – 4.0	4.1 – 4.7	1.3	7.2

nd = no determinado.

## 2.6 Proteínas de reserva y tipos.

Estas reservas son movilizadas en el momento de la germinación para mantener el crecimiento de la semilla hasta que esta pueda establecerse por sí sola como una planta fotosintética autotrófica. Las proteínas almacenadas en los cuerpos proteínicos son denominadas proteínas de reserva (Bewley J. et al. 1990). De acuerdo a la clasificación de Osborne T. 1924, las proteínas de reserva se pueden dividir en cuatro grupos de acuerdo a su solubilidad. a) albúminas que son solubles en agua en buffers diluidos a valores de pH neutros; b) globulinas solubles en soluciones salinas pero insolubles en agua; c) Prolaminas que solubilizan en soluciones alcohólicas entre (70-90%); d) glutelinas solubles en medios básicos o ácidos diluidos. En los cereales, las proteínas más abundantes son las prolaminas y glutelinas, mientras que en leguminosas son las globulinas la fracción más importante. Las subunidades pueden contener dos o más cadenas de polipéptidos que pueden estar unidas por puentes de hidrógeno o puentes disulfuro entre los residuos de aminoácidos (Bewley J. et al. 1990). Se ha reportado que la mayor parte de las proteínas de amaranto se encuentran en el embrión, anillo que rodea al

perispermo (Saunders R. 1984).

## **2.7 Clasificación de péptidos activos.**

Una de las definiciones para alimentos funcionales es aquella que además de proporcionar nutrición, ofrecen un beneficio adicional a la salud del consumidor. Una parte muy importante de los alimentos funcionales son los péptidos bioactivos, que se definen como péptidos con alguna actividad biológica y están presentes en los alimentos, ya sea de manera natural o son generados durante los procesos de alimentos (Ayala Garay A. V. et al 2014). Los péptidos bioactivos por lo general están compuestos de 3 a 20 aminoácidos de longitud, tanto las proteínas de origen animal y vegetal contienen secuencias con actividades potenciales (Rutherford-Markwick K.J. et al. 2005). Los péptidos bioactivos más estudiados son los derivados de la leche y huevo, sin embargo, existen también varios reportes donde se puede observar proteínas de origen vegetal que aportan varios péptidos bioactivos de gran interés (Dziuba J. et al. 2003). Los métodos más comunes para el estudio de péptidos bioactivos son realizados en ensayos *in vitro* para demostrar su actividad biológica. Algunas estrategias comunes son la producción por digestión enzimática, hidrólisis química (procesos de alimentos) y síntesis *in vitro*, con el fin de obtener una cantidad suficiente para probar su actividad biológica, Barba-De La Rosa A. et al. 1992 y Rutherford-Markwick K. et al. 2005 agruparon los péptidos bioactivos en grupos de acuerdo a su actividad biológica general. Los grupos propuestos son: antimicrobianos y antifúngicos, reguladores de la integridad intestinal, anti-inflamatorios, antihipertensivos reguladores de colesterol, antitrombóticos, reguladores de absorción de minerales, inmunomoduladores, opioides (analgésicos potentes) y reguladores de funciones gastrointestinales.

Los péptidos bioactivos están compuestos generalmente de 3 a 50 residuos de aminoácidos de longitud, como se muestra en la tabla 3. Tanto las proteínas de origen animal y vegetal contienen secuencias con actividades potenciales (Montoya-Rodríguez A. et al. 2015). Por mucho los péptidos bioactivos más estudiados son derivados de la leche y huevo. Sin embargo, existen varios reportes donde se puede observar que proteínas de origen vegetal como soya y trigo aportan

varios péptidos bioactivos de gran interés. Los métodos más comunes para el estudio de péptidos bioactivos están basados en ensayos *in vitro* para demostrar su actividad biológica. Algunas estrategias comunes son la producción por digestión enzimática, hidrólisis química (procesamiento de alimentos) y síntesis *in vitro*, con el fin de obtener la cantidad suficiente y en algunos casos fracciones de péptidos puros que después son probados para actividad biológica (Venskutonis P. et al. 2013).

Tabla 3. Actividad biológica detectada en algunas secuencias de péptidos derivados de la semilla de amaranto.

ACTIVIDAD	SECUENCIAS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA.	DESCRIPCIÓN
Antitrombótico	PPG, PG, GP	Potencial fibrinolítico y anti coagulación de plasma sanguíneo.
Antiamnésico	PPG, PG, GP	Potencia los procesos de consolidación de la memoria en el sistema nervioso central.
Opioide	NAGA, GYY, PLG, YG, YL, YPF	Actúa como un analgésico potente.
Inmunomodulante	EAE, GFL, KRP, TKPR, YG, YGG	Actúan como inmunopotenciadores.
Antioxidante	HH, HL, LH, LHH	Protege las células de la hiperoxidación.
Ligando	KK	Actúa en el sistema de transporte de oligopéptidos.
Neuropéptido	KPS	Actividad antinociceptiva.
Inmunoestimulante	KEEAE, LGY, LLY	Estimula células fagocíticas, implicadas en la defensa del organismo contra infecciones.
Embriotóxico	RGD	Actividad embriotóxica.
Anorético	PGP	Inhibidor de la secreción de insulina.
Anti inflamatorio	DTEAR	Bloquea la reacción en la piel.

Rutherford-Markwick K. et al. 2005 agruparon los péptidos bioactivos en grupos de acuerdo a su actividad biológica general. Los grupos propuestos son:

Antimicrobianos y antifúngicos: Combaten una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como también algunas levaduras y hongos.

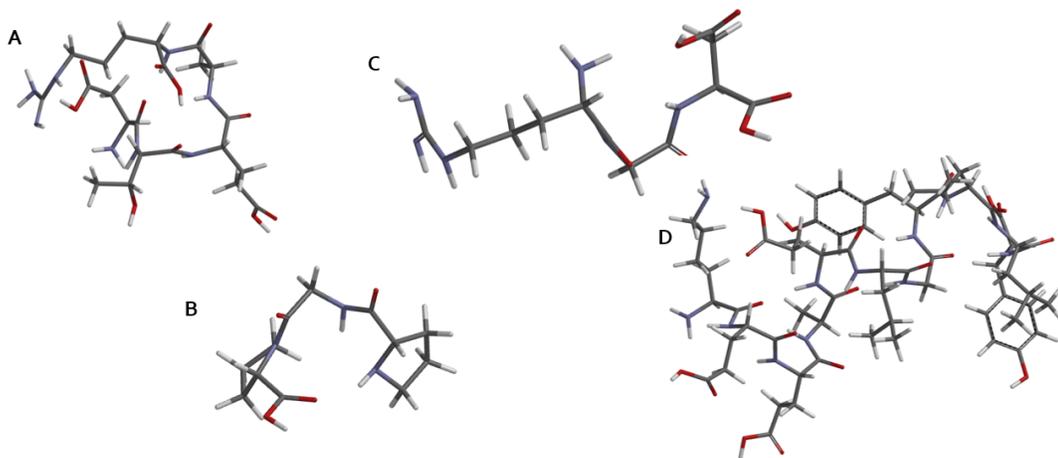
Anti-inflamatorios: Este grupo está formado por algunos factores de crecimiento y péptidos que ayudan a mantener la integridad intestinal previniendo algunas inflamaciones.

Antihipertensivos: Dentro de este grupo se encuentran los inhibidores-ACE (enzima

convertidora de angiotensina); inhiben las enzimas ACE I y II, que están involucradas en el sistema renina-angiotensina, el cual regula la presión sanguínea. Los vaso-relajadores por su parte actúan mediando los receptores Bradaquinina B1, prostacilina y un receptor desconocido de óxido de nitrógeno.

Reguladores de colesterol: Son todos aquellos que ayuden a controlar o disminuir los niveles de colesterol en sangre.

Antitrombóticos: En este grupo se encuentran los péptidos que ayudan a disminuir los riesgos de una trombosis, se incluyen todos aquellos péptidos que inhiben la formación de agregados. Las estructuras para las secuencias descritas se muestran en la figura 4, donde se tiene una estructura teórica optimizada para la mejor conformación espacial (Hariharan P. et al. 1973)



PÉPTIDOS DE AMARANTO CON CAPACIDAD: (A) ANTIINFLAMATORIO, (B) ANORÉTICO, (C) EMBRIOTÓXICO, (D) INMUNOESTIMULANTE.

*Figura 4.* Péptidos bioactivos derivados de proteínas de reserva de la semilla de amaranto.

## 2.8 Dendrímeros.

Los dendrímeros son macromoléculas inorgánicas de estructura bien definida, altamente ramificada y regular, que se sintetizan mediante una serie de reacciones repetitivas que dan lugar a compuestos monodispersos de igual estructura y dimensión (Figura 5). Una de las características más representativas de los dendrímeros es el gran control que se puede ejercer sobre sus propiedades durante el proceso de síntesis, lo que les confiere una alta versatilidad y permite su uso en

numerosos campos de investigación. Entre estos se encuentran la química, la medicina, la ciencia de los materiales, etc. Los componentes fundamentales del esqueleto de un dendrímero son tres: el núcleo, las unidades de ramificación y los grupos terminales (Tomalia D. 1985).

El núcleo puede ser un átomo o una molécula, dando lugar al número y la naturaleza de los grupos funcionales que tendrá en la periferia. Habitualmente suelen ser 3, 4 o 6 ramas las que parten del núcleo y a mayor cantidad de ramificaciones que surgen, se produce una disminución en los huecos internos estructurales. La repetición de esta serie de ramificaciones forma las distintas capas a las que llamamos generaciones. Los grupos terminales forman la superficie externa del dendrímero y está determinado por la generación. Estos factores, junto a la naturaleza química de los átomos que los componen, pueden ser modificados durante el proceso de síntesis, lo que permite alterar la polaridad del dendrímero, la densidad y el tamaño de la macromolécula, etc. (Augustus E. et al. 2017).



Figura 5. Características de los dendrímeros. Esquema de un dendrímero (Serrano M. et al. 2009).

## 2.9 Antecedentes históricos sobre la síntesis de dendrímeros PAMAM.

La primera síntesis de una molécula dendrítica fue descrita por Vögtle F. et al. 1978, se le llamó molécula en cascada. Realizada a partir de una metodología sintética necesaria para la preparación de estos compuestos, que se basa en una adición de Michael de una amina a un acrilonitrilo con posterior reducción del grupo ciano para

generar grupos amino. Tomalia D. en los años 80, diseñó una síntesis basada en la adición de tipo Michael a aminas de acrilato de metilo y posterior ataque con etilendiamina (Figura 6). Este tipo de dendrímeros tipo poliamidoamina hoy en día se comercializan con un núcleo de etilendiamina bajo el acrónimo PAMAM. (Tomalia D. 1985).

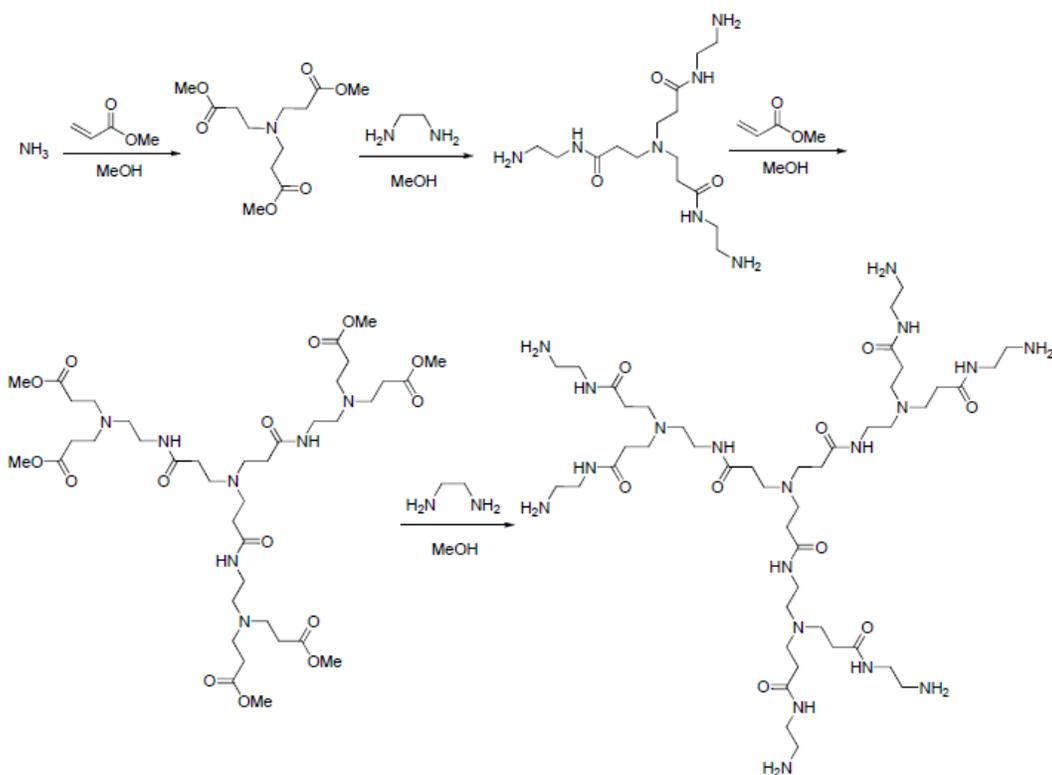


Figura 6. Síntesis de los dendrímeros PAMAM por el método divergente (Tomalia D. 2005).

## 2.10 Técnicas generales de síntesis de los dendrímeros PAMAM.

La preparación de los dendrímeros se realiza de forma sistemática mediante un proceso iterativo de dos etapas: acoplamiento y activación. La repetición de estas dos etapas permite la obtención de estructuras ramificadas y regulares que forman las generaciones del dendrímero. En estos dos procesos es importante que las reacciones sean selectivas y de rendimientos elevados para evitar la formación de defectos en el esqueleto dendrítico. El proceso de crecimiento se puede llevar a cabo mediante dos estrategias sintéticas (Figura 7) o la combinación de ambas.

### Método divergente

En el método divergente, el dendrímero crece desde el núcleo de la estructura hasta la periferia. Para ello, los grupos funcionales que posee el núcleo se hacen reaccionar con la unidad repetitiva seleccionada, dando lugar a la primera generación de la macromolécula (Tomalia D. 1996). A continuación, la activación de los grupos funcionales del extremo terminal del monómero forma los centros de ramificación sobre los que se crecerá la siguiente generación del dendrímero. A medida que aumenta la generación, aumenta la densidad de grupos funcionales en la periferia y, por tanto, aumenta la probabilidad de formación de defectos en la estructura (Tomalia D. 1985).

### Método convergente

A diferencia del método anterior, el método convergente se empieza a construir para cada rama dendrítica (dendrón) de forma independiente, es decir desde la superficie hacia el interior (Wooley K. et al. 1991). Una vez que se alcanza el tamaño adecuado, se anclan las ramas a los grupos funcionales del núcleo. Mediante este método se disminuye la probabilidad de formación de defectos en la estructura, ya que la superficie de cada dendrón posee menos grupos reactivos. Sin embargo, a medida que se crecen los dendrones el impedimento estérico aumenta, haciendo que la unión final al núcleo se vea dificultada (Kawaguchi T. et al. 1995).

### Método mixto

El método mixto supone una combinación de los métodos descritos anteriormente, de este modo, se hacen reaccionar ramas sintetizadas mediante el método convergente con un núcleo sintetizado mediante el método divergente. Así, se pueden evitar los inconvenientes que producen tanto el método divergente como el convergente. (Augustus E. et al. 2017).

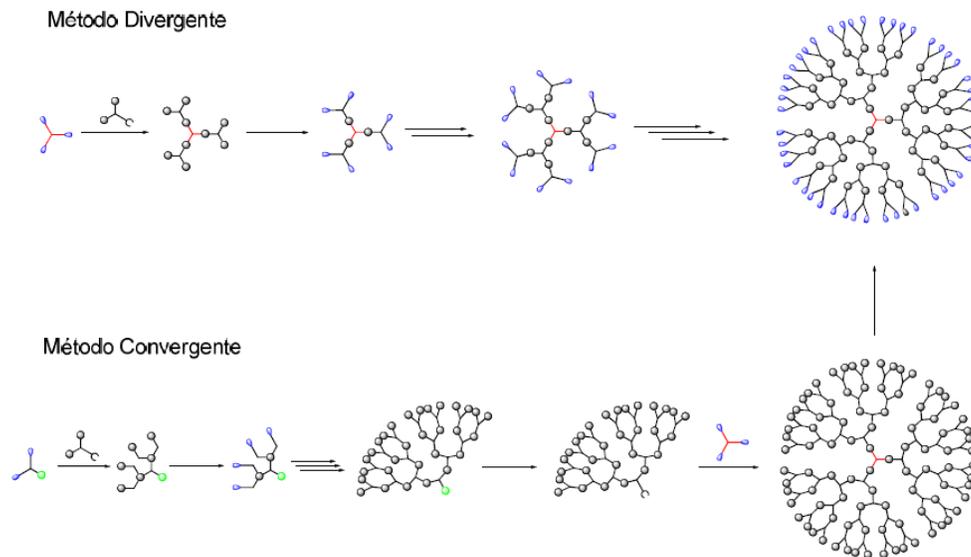


Figura 7. Síntesis convergente y divergente PAMAM (Ghazzali I. 2016).

### *Dendrímeros en aplicaciones médicas y biocompatibilidad:*

Los dendrímeros son sistemas con características ideales para aplicaciones en la medicina actual, usados como transportadores de fármacos y de biomoléculas. Los dendrímeros tienen alta solubilidad en agua, pueden atravesar ciertos tejidos y barreras biológicas, dando lugar a liberaciones controladas de las moléculas que transportan debido a su estructura química y propiedades ácido-base. (Boas U. et al. 2004).

Una de las principales funciones de estas moléculas dendríticas es en el campo de la biomedicina, principalmente en sistemas de liberación controlada de fármacos, nanofármacos, agentes de diagnóstico, transferencia de genes y terapia fotodinámica, por mencionar algunos. (Figura 8) (D'Emanuele A. et al. 2005).

Para poder utilizar los dendrímeros en sistemas biológicos deben tener una serie de características como no ser tóxicos, no inmunogénicos, capacidad de atravesar barreras biológicas, que no se degraden y tengan un diseño conformacional específico respecto a variaciones de pH (Nishiyama N. et al. 2007). Las propiedades y toxicidad están definidas por la estructura del dendrímero y en especial por los grupos funcionales terminales, siendo en los dendrímeros del tipo PAMAM grupos amino primarios terminales expuestos.

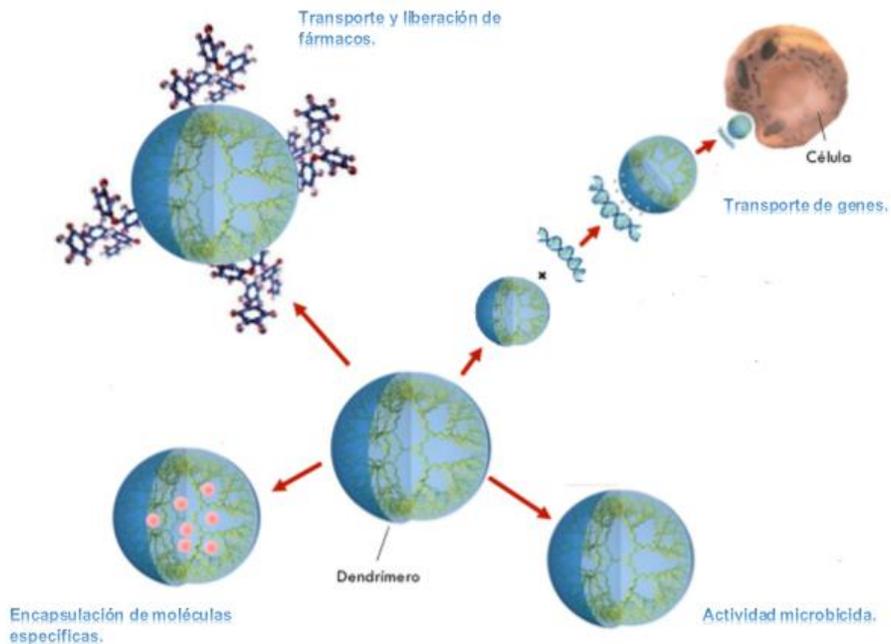
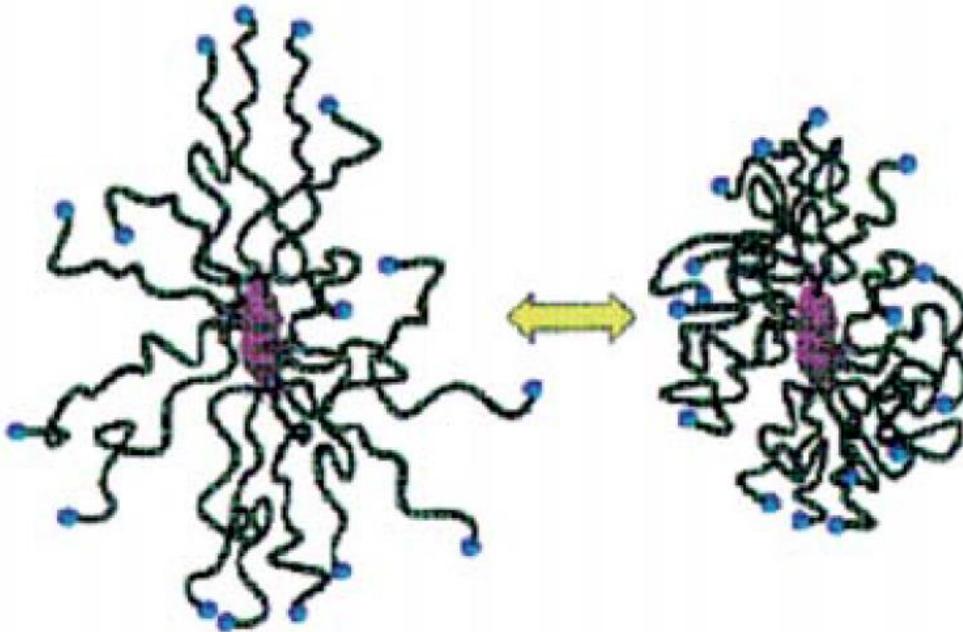


Figura 8. Aplicaciones de los dendrímeros en sistemas biológicos (D'Emanuele A. 2005).

## 2.11 Propiedades ácido base de los dendrímeros PAMAM.

Los dendrímeros PAMAM poseen una estructura ramificada con un núcleo de grupos amino terciarios, conectados por enlaces amida secundarios y terminando con aminos primarios en la capa más externa. Los dendrímeros PAMAM tienen la capacidad de mantener su forma globular, aunque pertenezcan a generaciones de alto peso molecular, donde éstos no están impedidos por su capacidad de ionización, como puede ocurrir con las proteínas. Otras ventajas son su densidad de carga relativamente alta y sitios titulables que son accesibles a disolventes. Por lo tanto, los dendrímeros PAMAM son más sensibles a la fuerza iónica con respecto a una proteína globular regular, lo que lo hace un buen sistema para verificar las diferencias de protonación en cada generación (Reis P. et al. 2018). Estos datos pueden mostrar un escenario posible para observar lo que sucede con los dendrímeros y extrapolar sus propiedades a pH fisiológico. Al bajar el pH, todos los grupos amino terminales del dendrímero PAMAM se protonan y exponen sus cargas, relajando el dendrímero y abriendo su estructura (Figura 9). Esta propiedad puede ayudar al dendrímero a atrapar moléculas específicas con ayuda del pH, gracias a la repulsión entre grupos amino y sus valores de pKa. La variación del pH

permite capturar y acoplar las diferentes moléculas gracias a la protonación del grupo amino, dada la distribución espacial del dendrímero PAMAM (Jiménez A. et al. 2012).



*Figura 9. Comportamiento de solubilidad de los dendrímeros PAMAM frente a pH ácido (Izquierda) y pH básico (Derecha) (Gonzalo T. et al. 2009).*

### **2.12 Residuos lignocelulósicos.**

Los residuos lignocelulósicos son los biopolímeros más abundantes sobre la Tierra, ya que comprenden cerca del 50% de la biomasa existente y su producción anual se encuentra entre 10-50 mil millones de toneladas (Sánchez C. et al. 2008). La biomasa lignocelulósica que se destina a diferentes procesos de obtención de bioetanol de segunda generación puede dividirse en seis grupos: los primeros son los residuos agrícolas, como son los bagazos de caña de azúcar, de maíz, de sorgo azucarado, de paja de trigo, de arroz y de cebada. Los segundos provienen de maderas duras como el álamo. En tercer lugar, se encuentran las maderas blandas como el pino y el abeto; en cuarto lugar, se encuentran los residuos celulósicos como el papel periódico, residuos de papel de oficina y lodos de papel reciclado. El quinto grupo lo constituye la biomasa herbácea, que comprende alfalfa, pasto varilla, alpiste y limoncillo, etc. (Sánchez C. et al. 2008). Las fibras vegetales se consideran como compuestos de fibrillas de celulosa que se mantienen unidos por una matriz

formada por lignina y hemicelulosa (Jayaraman K. 2003), cuya función es actuar como una barrera natural a la degradación microbiana y como protección mecánica (Figura 10).

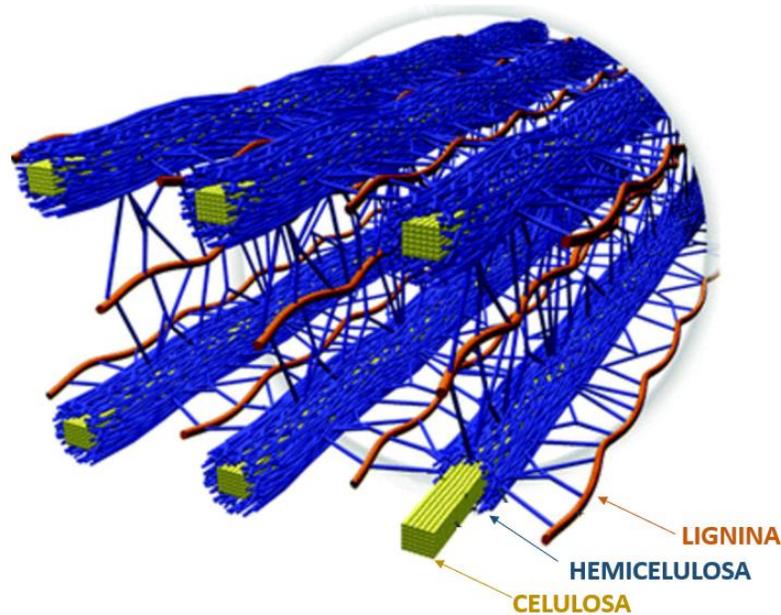


Fig. 10. Matriz lignocelulósica. (Brandt A. et al. 2013).

### **Celulosa.**

La celulosa es un polímero semicristalino que presenta microfibrillas altamente ordenadas y regiones amorfas, susceptibles a ataques por agentes químicos (Chamú-Muñoz A. et al. 2015). Esta se compone de glucosa unida por enlaces  $\beta$ -1,4 glicosídicos que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals intramoleculares (Figura 11), formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis y regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática. La celulosa producida de esta manera existe de forma natural en dos formas. La primera se conoce como celulosa pura, e incluye celulosas producidas en su estado natural, como el algodón y la celulosa bacteriana; y la presentan algunas algas. La segunda se denomina celulosa compleja, e incluye la mayoría de las celulosas presentes en la naturaleza, siendo el componente fundamental de la pared celular de las plantas superiores (Pecoraro E. et al. 2008).

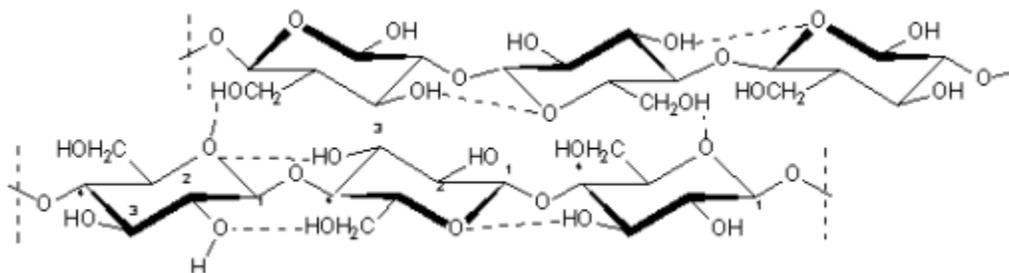


Figura 11. Representación molecular de la celulosa. (Lebedev, 2015).

### 2.13 Química computacional.

La química computacional es la rama de la química que actualmente permite describir sistemas y fenómenos químicos con el uso de software informático, para diferentes propósitos. Nos permite utilizar herramientas de análisis fino en investigación química, fortaleciendo las técnicas clásicas de análisis. Estas técnicas de igual manera han evolucionando gracias al avance exponencial de las herramientas de cómputo, el avance de las matemáticas, la física, y la química teórica, dando métodos numéricos, analíticos y nuevos modelos teóricos.

Hoy en día la química experimental y la química computacional se han vinculado de tal manera que es posible realizar cálculos con niveles elevados y confiables de teoría. De esta manera la química computacional tomó un gran impulso cambiando la idea fundamental de realizar experimentos para determinar propiedades de las moléculas obtenidas. A partir de este momento la química experimental se empieza a ver obligada a realizar predicciones teóricas y comparar éstos con métodos experimentales (Tabla 4). Algunas veces dando ventaja a los modelos teóricos por la facilidad de manejo de información con respecto a los resultados que se obtiene experimentalmente (Cuevas G. et. al. 2003).

Tabla 4. Métodos basados en química computacional (Suarez D. 2012).

Método	Fundamento	Rango de aplicación	Ventajas	Desventajas	Ejemplos
<b>Mecánica Molecular</b>	Potenciales de interacción – Campos de fuerzas	1 – 10 <sup>5</sup> átomos	Es muy eficiente en fases condensadas y tiene gran rapidez	Aplicación delimitada por el potencial MM además de que se requiere datos experimentales	AMBER, GROMOS, REBO y ReaxFF
<b>Mecánica cuántica</b>	Ab Initio	1 – 10 <sup>2</sup> átomos	No requieren datos experimentales y poseen exactitud y precisión controlable	Son lentos y para métodos avanzados su uso es muy complicado	HF, MP2, CCSD y CCSD(T)
	Teoría del Funcional de la Densidad (DFT)	1 – 10 <sup>3</sup> átomos	Más rápidos que los métodos ab Initio	Aplicabilidad más limitada. Existe exceso de métodos y no hay pautas para mejorar resultados de un modo sistemático	B3LYP, BLYP, PW91 y PBE
	Semi-empíricos	1 – 10 <sup>4</sup> átomos	Gran rapidez y fáciles de usar. Fiables en moléculas orgánicas	Poca fiabilidad en moléculas con metales y especies inestables. Errores no sistemáticos	PM3, PM6 y SCC-DFTB

### ¿Qué permite hacer la química computacional hoy en día?

La química computacional es apoyada de modelos matemáticos, permite desarrollar en el ambiente gráfico una estructura posible, donde se tiene un conjunto de núcleos y el número de electrones de cada molécula (Suárez D. 2012). Esto permite calcular propiedades como:

Arreglos geométricos de los átomos en las moléculas y sus estados de transición.

Las energías relativas de una o varias moléculas.

Propiedades como momentos dipolares o polarizabilidad.

Propiedades espectroscópicas como desplazamientos químicos, frecuencias vibracionales, estados excitados por absorción de energía, etc.

Propiedades termodinámicas.

Propiedades cinéticas.

Dependencia de propiedades como cambios de estructuras a lo largo de una reacción o del tiempo.

Estas técnicas son complementarias a las técnicas experimentales tradicionales (Figura 12), algunos resultados obtenidos pueden ser imposibles de obtener con la

otra técnica. El análisis computacional permite entre otras cosas realizar aproximaciones a experimentos de alto riesgo, costosos, o de gran demanda de tiempo y dinero. Dando seguridad al no exponer al usuario a reactivos que puedan ser peligrosos. (Zarco M. 2010).

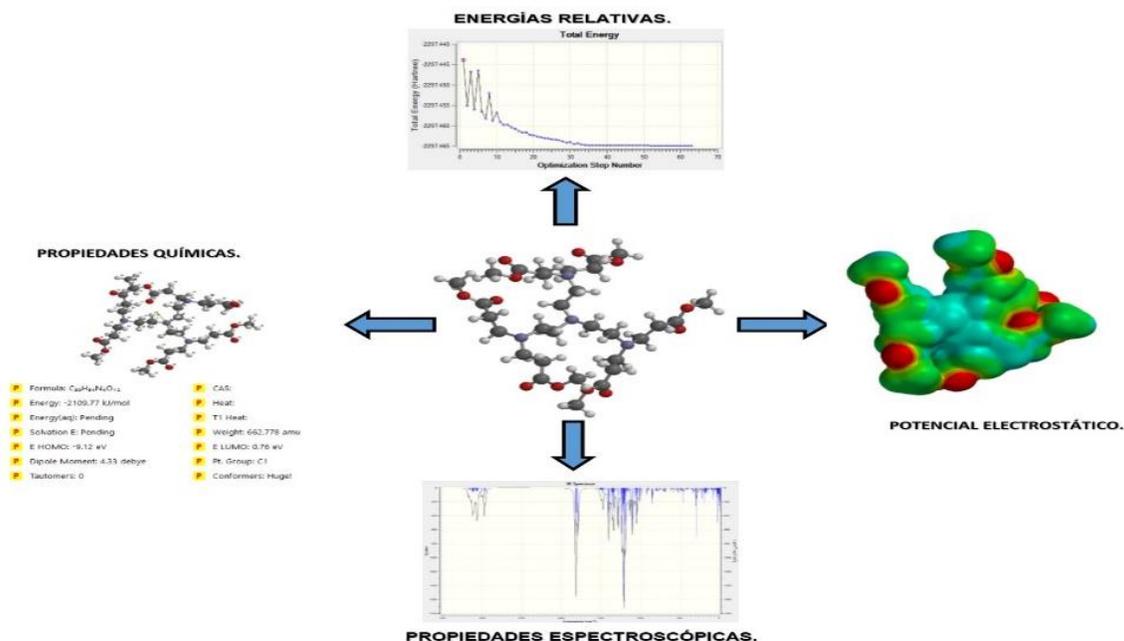


Figura. 12. Algunas propiedades determinadas mediante la química computacional.

### Métodos ab Inito.

Resuelve de modo aproximado la ecuación de Schrödinger mediante constantes físicas fundamentales. Partiendo del método Hartree-Fock para el cálculo de orbitales es posible formular diversos métodos para poner en práctica para métodos ab inito con mayor exactitud pero que hoy en día demandan grandes cantidades de hardware y elevados tiempos de cálculo (Suarez D. 2012).

### Métodos de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT).

Formulan el problema en términos de la densidad electrónica de la molécula, en función de la onda polielectrónica y esto lleva a que la energía electrónica sea función de la densidad. Existen diversos métodos DFT que están disponibles en programas de cálculo (Tabla 4). Una de las desventajas de este tipo de estudios es

que la aproximación DFT siempre es diferente, debido a que la densidad electrónica está dada por una correlación-intercambio. Las desventajas se resumen en: Dificultad para seleccionar un método adecuado, imposibilidad de refinar sistemáticamente los resultados y errores sistemáticos de muchos funcionales. A pesar de los problemas mencionados, estos métodos han ido incrementando su importancia a lo largo del tiempo (Suarez D. 2012 y Frisch M. et al. 2016).

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Este trabajo está enfocado en el desarrollo de un biomaterial que consta de un dendrímero (PAMAM) sintético anclado a un biopolímero (celulosa) donde se pueden aprovechar las propiedades del PAMAM para captar determinadas biomoléculas. Las características de la celulosa son utilizadas para que el dendrímero pueda ser reutilizado, ya que estos dendrímeros al día de hoy no se utilizan en procesos continuos por la difícil recuperación de los dendrímeros (Kannaiyan D et al. 2009). Algunos reportes citan presencia de diversos péptidos derivados de amaranto con propiedades antimicrobianas, antifúngicas, reguladores de funciones, antihipertensivos, entre otras actividades biológicas de interés para la salud (Venskutonis P. et al. 2013 y Hariharan P. et al.1973). Adicional a esto el amaranto tiene propiedades muy sobresalientes como son: altos contenidos de amilopectina que puede ser de interés para la industria alimentaria. Para tener claro los alcances de esta semilla, es importante tener conocimiento de la naturaleza de estas, tamaño de semilla, realizar estudios de su composición, morfología y los derivados que se pueden tener tras el proceso de alimentos. Con este trabajo se logrará tener un punto de partida para el desarrollo de nuevos materiales que puedan tener cierta selectividad para separar ciertos péptidos bioactivos derivados de las proteínas de amaranto. Dichos péptidos pueden aportar muchos beneficios a la salud y en su caso poder comercializarse como un producto con alto valor agregado en la nueva tecnología implementada para los alimentos funcionales que están creciendo exponencialmente.

#### **4. HIPÓTESIS.**

Al obtener una mezcla heterogénea de péptidos que no puede ser separada por métodos convencionales, entonces una serie de dendrímeros en un soporte sólido logrará la separación selectiva y continua de diferentes péptidos afines a la periferia del biomaterial.

#### **5. OBJETIVO.**

A partir de un biomaterial celulosa-dendrímero se realizará la separación selectiva de diferentes péptidos bioactivos presentes en el hidrolizado de amaranto, que puedan ser liberados posteriormente de forma controlada.

##### **5.1 Objetivos específicos.**

Lograr la retención de los dendrímeros en microfibras de celulosa para formar los biomateriales celulosa-dendrímero.

Realizar un análisis teórico para determinar la afinidad de los dendrímeros a cierto tipo de aminoácidos presentes en el amaranto.

Obtener diferentes hidrolizados de proteínas de la semilla de amaranto, mediante un proceso enzimático.

Identificar los diferentes compuestos obtenidos y evaluar la capacidad que tiene el bio-material para un proceso continuo de separación.

#### **6. MATERIALES Y MÉTODOS.**

##### **6.1. Materiales.**

Etilendiamina absoluta 99.5% (GC) (Lot. # STBG3744V), Tris(2-aminoetil) amina 96% (Lot. # SHBH1328), acrilato de metilo 99% (Lot. # SHBG6616V), 4,4-Metillenbis(fenil-isocianato) 98% (Lot. # MKBZ8178B), EDTA R.A (Lot. # JJRT2457), NaOH R.A (Lot. # ), NaCl (Lot. # NGHY3569), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Lot. # FTER24879), Éter etílico (Lot. # HDRE5789), Celulosa microcristalina (Lot. # STGR24579). Suministrados por Sigma Aldrich® y se utilizaron directamente sin ninguna purificación o tratamiento adicional. El metanol 99.8% (Lot. # DCBD3122V)

y etanol 99.9% (Lot. # GTLS224893) fue secado con hidruro de calcio (grado reactivo  $\geq 90\%$  [Lot. # STBF7045V]) y destilado posteriormente para obtener metanol anhidro. Subtilisina A (Lot. # HERS545527), *Aspergillus oryzae* (Lot. #NVFT25863) Pepsina (Lot. # GAMP552187), Tripsina (Lot. # HYTR542155), Tirosina (Lot#GHSL557896), Tris [hidroximetil]aminometano hidroclicrico (Tris-HCl-1M) fue grado biotecnol6gico certificado (Lot#LLSV55478, con una pureza m6nima de 99%. Todos los reactivos fueron suministrados por Sigma Aldrich®. Los reactivos de electroforesis fueron comprados en Biorad (Hercules, California) proporcionados en USAII-UNAM.

El modelado molecular se realiz6 empleando programas especializados para qu6mica computacional, siendo estos: SPARTAN´02® (Modelado), GAUSSVIEW´05® (visualizador) y GAUSSIAN´09® (Desarrollando la determinaci6n te6rica), este 6ltimo para trabajo en paralelo (LANCAD-UNAM-DGTIC-400).

## **M6todos:**

### **6.2 S6ntesis de un dendr6mero PAMAM (Partiendo de un n6cleo de etilendiamina [EG]).**

La s6ntesis de los dendr6meros se llev6 a cabo siguiendo una aproximaci6n divergente (Tomalia D. 1996), siguiendo la metodolog6a modificada descrita por Beezer A. et al. 2003, utilizando 9 equivalentes de etilendiamina por cada grupo 6ster que se sustituye (Castro R. et al. 2017).

#### *Dendr6mero PAMAM con 4-32 grupos amino terminales (EG-0 a EG-3).*

Se a6nadi6 acrilato de metilo (14.3 g, 0.166 mol) lentamente a una disoluci6n de etilendiamina (2.0 g, 33.3 mmol) en metanol (30 ml). La reacci6n se agit6 durante 48 horas (Para todas las reacciones) en ausencia de luz, en un ba6o a 20°C. Los reactivos en exceso y el disolvente se eliminaron al vac6o.

El dendr6mero terminado en 6ster EG-0.5 (2.0 g, 4.95 mmol) se disolvi6 en metanol (20 ml) y se a6nadi6 gota a gota (bajo agitaci6n) una disoluci6n de etilendiamina (22.3

g, 0.371 mol) en metanol (30 ml). La disolución resultante se agitó durante 5-12 días (en ausencia de luz) en un baño a 20°C. El exceso de etilendiamina y disolvente se eliminaron al vacío para dar como resultado el dendrímero EG-0, esto se realizó generación tras generación hasta la generación 3 (EG-3) con 32 grupos amino terminales (Beezer A. et al. 2003 y Calabretta M. et al. 2007).

### **6.3 Estudio Ácido-Base.**

Para cada generación obtenida de los dendrímeros (EG1-EG3), se pesaron de 15 a 20 mg de cada molécula, se colocaron en 15 ml de agua destilada y posteriormente se titularon con HCl (1M). Las adiciones de HCl se realizaron adicionando 4 µL cada 4 seg, por medio de un micro-dispensador Hamilton Microlab 600 Series y las lecturas de pH fueron tomadas con un potenciómetro JENWAY Modelo 3020. Estas muestras después de titularse con HCl se titularon por retroceso con NaOH (1M), repitiendo este procedimiento 3 veces para determinar la estabilidad y el comportamiento de la molécula al tener variaciones importantes de pH. Utilizando el mismo método se determinó el comportamiento ácido-base de los Bio-materiales obtenidos.

### **6.4 Síntesis del material compuesto dendrímero-celulosa.**

Para este acoplamiento se tiene celulosa pura, comercial, el dendrímero G3 sintetizado, perfectamente bien identificado y caracterizado, con el objetivo de que cuente con la menor cantidad de defectos en el proceso de síntesis (Fatemi S. et al. 2020) Posteriormente se siguieron los siguientes pasos para la obtención del material compuesto:

1. Se colocaron 20 ml de Metanol 99.8 % en un matraz de bola de 50 ml.
2. Se colocaron 100 mg de celulosa en el medio y con agitación constante a 40°C por 30 minutos.
3. Una vez concluidos los 30 minutos, se añadieron al medio de reacción 10 mg de 4,4-Metilenbis(fenil-isocianato); se mantuvo en agitación y a 40 °C por 12 horas.
4. Transcurrido el tiempo de reacción se procede a agregar 50 mg del

dendrímtero (cualquiera de los dos mencionados anteriormente). Se mantienen las condiciones de reacción por 6 horas más para completar la reacción.

5. Una vez terminada la reacción se procede a separar el bio-material del medio, separando por filtración y realizando 3 lavados con metanol, para retirar todos los restos de reactivos que pudieran quedar presente.

## **6.5 Estudio Computacional.**

En un trabajo previo, las moléculas dendríticas obtenidas fueron modeladas en SPARTAN'02; a estas moléculas se les realizó un análisis conformacional por medio de mecánica molecular para obtener un confórmero con el que se inicia la optimización a nivel cuántico (Roy D. 2000-20016). El primer paso para desarrollar el análisis teórico es optimizar la molécula, logrando una distribución electrónica lo más cercana a la molécula sintetizada experimentalmente y de esta manera seleccionar el confórmero más estable (Kirkpatrick J. et al. 2021). Las geometrías seleccionadas se optimizaron apropiadamente mediante el nivel de teoría DFT empleando el funcional híbrido B3LYP y el conjunto de funcionales base 6-31G (d, p), en GAUSSSIAN'09 (Parr R. et al. 1989 y Kohn W. et al. 1996). Partiendo de estos cálculos se construyó un método análisis para las moléculas dendríticas acopladas a diferentes aminoácidos presentes en las proteínas de reserva en la semilla de amaranto. Estos cálculos se realizaron con el mismo funcional y el mismo conjunto de funcionales base para optimizar la molécula, pero a diferencia de éstos, se usó el software GAUSSSIAN'16 y un escalamiento en el funcional usado. Los funcionales se definieron de acuerdo a la escalera de Jacob, que es un camino jerárquico que en principio nos permite mejorar los resultados y calidad de las predicciones DFT de una manera sistemática (Becke A. et al. 1988).

Para apreciar si existe una diferencia notable en los niveles de teoría utilizados, se compararon los resultados entre el funcional B3LYP y M062X siguiendo la escalera de Jacob para determinar la correlación que hay entre ambos funcionales, así como la afinidad que tienen las moléculas dendríticas para retener aminoácidos específicos. Estos resultados son comparados con los resultados experimentales

para dar un perfil más detallado de las posibles interacciones que se esperan, así como una aproximación a los péptidos que tendrán mayor afinidad al biomaterial (Lee C. et al. 1988).

Las frecuencias vibracionales obtenidas en forma de interferograma se visualizaron con GAUSSVIEW'6 para transformarlas en bandas de transmitancia aproximada, utilizando los mismos funcionales que en la optimización de las moléculas aisladas. Una vez obtenido un espectro adecuado, se procedió a escalar matemáticamente el nivel de error que se produce durante los cálculos. Se seleccionó la mejor optimización de las energías de interacción entre la macromolécula dendrítica, así como para las biomoléculas y se generaron mapas del potencial electrostático molecular para las interacciones más representativas. Éstas se visualizaron con GAUSSVIEW'6 (Parr R. et al. 1989 y Kohn W. et al. 1996).

El potencial electrostático molecular (MEP) está definido como la energía de interacción entre sistemas, en los que se desprecia la polarizabilidad y los efectos de rearrreglo nuclear con una carga puntual situada en una posición (Politzer P. et al. 1985). Si una molécula tiene una función de densidad electrónica  $\rho(r')$ , entonces su potencial electrostático en cualquier punto ( $r'$ ) viene dado rigurosamente por la siguiente ecuación.

$$V(r) = \sum_A \frac{Z_A}{|R_A - r|} - \int \frac{\rho(r')}{|r' - r|} dr'$$

Donde  $Z_A$  es la carga sobre el núcleo A, localizada a  $R_A$   $-r$  es la densidad electrónica funcional de la molécula. El potencial electrostático molecular (MEP) es una herramienta usada en la interpretación de reactividad molecular de especies electrófilas. Un electrófilo tiende a ir a aquellas regiones en las que el potencial  $V(r)$  tenga los valores más negativos (mínimo local) (Rajeev K. et al. 1990)

#### *Estrategias para el estudio y predicción de péptidos bioactivos.*

El estudio integral para determinar las actividades potenciales de un determinado compuesto con actividad biológica se puede dividir en tres etapas. La primera corresponde a las determinaciones *in vitro* con ensayos químicos y líneas celulares,

así como determinaciones de modelado *in silico* con técnicas computacionales. La segunda etapa consiste en ensayos y determinaciones *in vivo* en sistemas modelo en animales, mientras que la etapa final corresponde a estudios epidemiológicos y ensayos clínicos. Estos estudios implican determinar una fuente de proteínas adecuada para su posterior liberación enzimática o química de los compuestos bioactivos. Estos hidrolizados usualmente son sometidos a técnicas de caracterización por medio de técnicas especializadas como electroforesis (Li-Chan E. 2015).

Utilizando las bases de datos para péptidos bioactivos secuenciados y caracterizados experimentalmente se buscará la ocurrencia exacta los péptidos de interés derivados de la semilla de amaranto para su posterior análisis y aislamiento. Esta primera etapa se realizó utilizando una base de datos de NCBI, donde una vez identificadas algunas secuencias con ocurrencias exactas se procede a clasificar las estructuras de las proteínas que contienen al menos un péptido conocido. Básicamente la única forma de predecir péptidos bioactivos nuevos es por el uso de bases de datos para secuencias de diferentes proteínas caracterizadas. Estas son mayormente secuenciales y contienen los péptidos bioactivos caracterizados, como es el caso de PepBank, Antimicrobial Pptide Database (APD), Biohemia, UNIPROT y BIOPEP. Esta última en especial contiene más de 3000 péptidos identificados de manera teórica para amaranto, a partir de sus proteínas de reserva. Está mayormente enfocada en derivados de proteínas de consumo en dietas, incluyendo información de proteínas precursoras de los péptidos del que derivan. En particular se trabajó con la base de datos de BIOPEP, Biohemia y NCBI, ya que se encuentran más especializadas en la presencia de péptidos bioactivos que provienen de proteínas alimentarias, con estas bases de datos se tiene ID, nombre, masa, actividad y secuencia de los péptidos almacenados (Sánchez C. 2007).

#### *Predicción de péptidos activos en proteínas de reserva de amaranto.*

Se realizó una búsqueda de secuencias para proteínas reportadas en la variedad estudiada en el laboratorio, "*Amaranthus hypochondriacus* de variedad *Nutrisol*", en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>. Estas secuencias fueron analizadas para

obtener el perfil de péptidos activos que están presentes en proteínas de reserva de amaranto usando la base de datos <https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/>

## **6.6 Semilla de amaranto.**

Las semillas de amaranto fueron cultivadas Atlacomulco Estado de México; para la caracterización se empleó la variedad comercial *Nutrisol*. Las semillas se molieron y tamizaron hasta obtener una harina, siguiendo la metodología descrita por Barba de la Rosa et al. 1992. La harina se desengrasó por 2 horas con éter en una relación harina/éter 1:10 (p/v) en agitación magnética a 10°C. La mezcla se centrifugó a 4000 rpm por 5 min. La pastilla resultante libre de grasa se secó a temperatura ambiente. Las semillas y harina tanto entera como desengrasada se almacenaron hasta su uso.

### *Tamaño de semilla.*

La determinación del tamaño de semilla se llevó a cabo manualmente con un vernier de precisión. Se seleccionaron al azar 100 semillas de cada variedad para realizar las mediciones por triplicado y se obtuvo la media promedio.

### *Peso de 100 granos.*

La determinación del peso se llevó a cabo pesando 100 semillas de la variedad, tomadas al azar. Esta determinación se realizó por triplicado.

## **7. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE RESERVA: MÉTODO DISOLUCIONES.**

### *Extracción de fracciones proteicas.*

La extracción de proteínas se llevó a cabo de acuerdo con lo reportado por Barba de la Rosa et al. 1992 (Figura 13). La fracción de albúminas más nitrógeno no proteínico se obtuvo a partir de harina desengrasada y se empleó como agente de extracción agua destilada. Las suspensiones de harina/solvente (1:10 p/v) se extrajeron con agitación magnética por 1h a 10°C y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min. El sobrenadante se colectó para un análisis posterior. La pastilla resultante se resuspendió en 0.1 M NaCl, 0.010 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.5, 0.001 M EDTA para la extracción de globulinas 7S; y se siguió el procedimiento de extracción arriba mencionado. La fracción de globulinas 11S se obtuvo con el buffer 0.8 M NaCl,

0.010 M  $K_2HPO_4$ , pH 7.5, 0.001M EDTA. Las prolaminas se obtuvieron con una solución de etanol al 70% y finalmente las glutelinas con una solución 0.1 M de NaOH. Los sobrenadantes se colectaron y almacenaron a  $-20^\circ C$  hasta su uso.



Figura 13. Extracción de fracciones proteicas derivadas de la semilla de amaranto.

## 7.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE RESERVA: MÉTODO FENOL:

Un gramo de muestra se maceró utilizando *polytron*. La muestra se puso en 6 ml de fenol pH 8.8 y 5 ml de buffer de extracción (100mM tris HCl, pH 8.8, 10mM EDTA, 900 mM sacarosa y 0.4% de 2-betamerceptoetanol) se aplicaron 5 pulsos de 1 min en el politrón alternados por 1 min en hielo, después de los 5 pulsos se mantuvo en hielo 10 min más y se centrifugaron a 4000 rpm durante 30 min, se tomó la fase orgánica y se depositó en un tubo de 50 ml nuevo y se agregaron 25 ml de acetato de amonio 100 mM en metanol se agitó y se dejó reposar 16 h a  $-20^\circ C$ . Posteriormente se centrifugo a 4000 rpm durante 30 min para obtener una pastilla de precipitado y se descartó el sobrenadante, la pastilla se lavó con 5 ml de acetato de amonio en metanol 2 veces y se centrifugo a 4000 rpm por 10 min después de cada lavado, posteriormente se lavó de igual manera la pastilla con acetona al 80%

2 veces y un último lavado con etanol al 70%, la pastilla se resuspendió en 500  $\mu$ l de buffer IEF (*isoelectric focusing*).

## **7.2 Determinación de la calidad de de proteína SDPAGE 1D.**

Se cuantificó la cantidad de proteína en un Nanodrop 2000 en el rango uv-vis (160 nm - 780 nm) y se analizó la integridad de la proteína en un gel de SDS-PAGE 1D. Las muestras se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 12% de acrilamida de una dimensión con un estándar de marcador molecular Precisión Plus de Biorad como referencia de peso molecular para observar su integridad (Figura 14). Se corrió el gel a 120V por 2.5 h Posteriormente se desmontó el gel y con mucho cuidado se colocó en solución de coomassie coloidal.

### **Tinción con Coomassie coloidal.**

Finalizada la electroforesis, se realiza un primer paso de fijación, incubando los geles en una solución 50 % v/v metanol/agua durante al menos 1 h a temperatura ambiente. A continuación, se retira la solución de fijación y se incuban los geles en solución de tinción (8 % p/v sulfato amónico, 2 % ácido fosfórico y 20 % metanol y 0.1 % de Azul de Coomassie G-250) durante, al menos, 16 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se destiñen los geles con agua bidestilada, hasta alcanzar el contraste adecuado para la identificación de manchas.

### **Captura de imágenes.**

Se procedió a la adquisición de la imagen para su análisis densitométrico, en un sistema de densitómetro calibrado GS-900 Biorad.

## **7.3 Hidrólisis de proteínas y captura del péptido por el dendrímero PAMAM.**

Se tomaron alícuotas de glutelinas y globulinas 11s, se precipitaron para obtener 200 mg de proteína. La pastilla se resuspendió en 250 ml de buffer de urea (Urea 6M, Tris 100 mM pH 7.4). El pellet de interés obtenido se resuspendió en una solución de Tris-HCl 0.1M. La fracción obtenida se digirió con subtilisina A de *Bacillus licheniformis*, que hidroliza selectivamente el péptido en los residuos Lys,

Arg y Tyr (Yang T. et al. 2023), se utilizaron 10 µg de proteasa /100 µg de proteína. La hidrólisis se realizó a 30 °C durante 12 h (Bindal S. et al. 2017). Este proceso de hidrólisis se repitió con *Aspergillus oryzae* (cortes en Arg, Thr, Pro, García M. et al. 2001), tripsina (cortes en Arg y Lys, Ajaypal S. et al. 2014) y pepsina (cortes en Thr, Phe y Tyr, Chun C. et al. 2013) para tener un comparativo entre diferentes enzimas y cortes selectivos. La digestión se realizó con las diferentes enzimas antes mencionadas en una relación 1:50 por 14 horas a 30 ± 2 °C. La reacción se detuvo ajustando el pH a 6 con ácido acético concentrado y congelando a -70 °C.

Una vez obtenido el hidrolizado se colocó en una columna de vidrio empacada ( 2 cm de diámetro y 20 cm de largo) con el biomaterial (BM) donde se ajustó el pH=8.5 con NaCl 0.5M, se hizo pasar a través de todo el lecho hasta alcanzar el punto más bajo en la columna. Se dejó por un lapso de 1 min y se colectó la mezcla residual, posteriormente se hizo pasar NaCl hasta generar un lavado de todo el lecho empacado. Como paso final se colectaron los péptidos capturados por el biomaterial cambiando el pH, lavando con HCl= 1M el biomaterial para liberar los péptidos. Los péptidos colectados se sometieron a un proceso de purificado (lavados) para identificar por espectrometría de masas (Ayala-Niño A. et al. 2019).

#### **7.4 IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS EN LAS FRACCIONES PROTÉICAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (LC MS/MS).**

El análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se llevó a cabo preparando la muestra como indica la figura 14 para insertar en un sistema que consiste de un HPLC Agilent 1200 acoplado a un espectrómetro de MALDI-TOF en un aparato Synapt G2 equipado con un detector de iones de alta definición. Se utilizaron los siguientes parámetros: modo de funcionamiento lineal, polaridad positiva y un intervalo de 100-10.000 m/z (Análisis realizado por USAII-UNAM-FQ). (Boas U. et al. 2002 y Klajnert B. et al. 2007) La identificación de péptidos bioactivos se realizó haciendo una búsqueda en la base de datos para péptidos activos <https://biochemia.uwm.edu.pl/biopep-uwm/> y <https://www.uniprot.org/>

Tras obtener los resultados por espectrometría de masas, se llevó a cabo un análisis

de interacción para la molécula dendrítica y el péptido por mecánica molecular MMFF, MMFF94, MMFF94s, para energías conformacionales, energías y geometrías de interacción intermolecular, simulado en SPARTAN'06 (Reis P. et al. 2018).



Figura 14. Preparación y purificación de la muestra para ser insertada en el espectrómetro de masas ya que al tratarse de un instrumento de análisis muy fino se requiere un tratamiento previo para poder insertar un analito.

## 8. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

### 8.1 Síntesis de los dendrímeros.

Los dendrímeros PAMAM obtenidos con 9 equivalentes de etilendiamina presentan resultados muy similares a los obtenidos usando 18 equivalentes (Esquivel R. et al. 2009 y Beezer A. et al. 2009). Como los rendimientos son muy próximos y no hay un cambio considerable en los tiempos de reacción, se tomaron estas moléculas para los análisis correspondientes y el desarrollo del biomaterial. A partir de estos resultados se decidió mostrar solo los resultados para la serie de dendrímeros sintetizados a partir de 9 equivalentes de etilendiamina, ya que los resultados para 18 equivalentes serían repetitivos. Esto aplica para todas las técnicas empleadas en la caracterización de la molécula que se detallan a continuación.

## 8.2 Caracterización por FT-IR de los dendrímeros.

Los dendrímeros sintetizados a partir de un núcleo de etilendiamina, donde se tiene como intermediario un dendrímero terminado en éster en toda la periferia de la molécula, son tratadas con etilendiamina para obtener las moléculas esperadas, que llamaremos "EG". Los dendrímeros con grupos terminales éster son las moléculas precursoras de las generaciones con grupos terminales amino, que se caracterizaron para definir si estaban completamente sustituidos con la finalidad de mantener un control durante toda la síntesis (Lloyd J. et al. 2016).

Con base a los resultados obtenidos, se muestran en la figura 15, los espectros FT-IR para las moléculas obtenidas de la generación 0 a la generación 3. Se puede notar que las bandas características para los dendrímeros PAMAM son muy similares en todo el espectro, ya que se cuentan con los mismos grupos funcionales en cada molécula (Tomalia D. et al. 1985). Para la serie EG de dendrímeros PAMAM se presenta un patrón FT-IR similar en cada una de las moléculas, donde los grupos funcionales nos ayudan a tener una aproximación cualitativa general de la estructura molecular (Beezer A. et al. 2003). Dado este comportamiento se tomó como base el dendrímero EG1 para hacer referencia a todas las generaciones de los dendrímeros EG en los modelados moleculares y análisis teóricos.

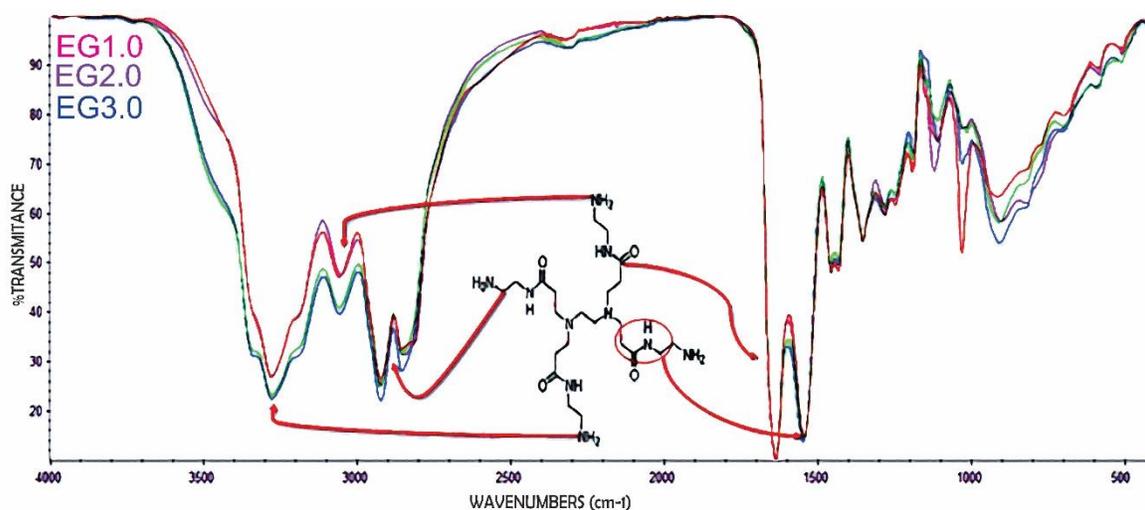


Figura 15. Espectros de FT-IR para la serie de dendrímeros PAMAM EG con grupos amina terminales.

### 8.3 Caracterización FT-IR y determinaciones teóricas.

Tomando como referencia lo reportado por Prakash S. et al. 2013, donde sólo se realizan aproximaciones experimentales, se presenta relación de conjunta entre resultados teóricos y experimentales que describen un seguimiento más exacto a la caracterización de los dendrímeros generación tras generación. Este análisis sirve como apoyo para tener un análisis más profundo, cualitativo y comparativo, tomando como partida las determinaciones de la estructura molecular optimizada y de ciertas características que se detallan en el texto de Hu J. et al. 2009. En este trabajo se desarrolló la optimización de la molécula y el cálculo de propiedades espectroscópicas utilizando métodos DFT con el funcional B3LYP, con el conjunto de bases 6-31G (d,p).

Con este análisis se puede identificar puntualmente cada banda representativa, apoyados de estudios computacionales. Para esto se realizó un análisis conformacional de las moléculas con mecánica molecular MMFFs, con el propósito de obtener un conjunto de confórmeros (Kirkpatrick J. et al. 2021). De los resultados obtenidos se eligieron de dos a tres confórmeros estables del sistema que fueron optimizados específicamente con el funcional B3LYP y el conjunto de funcionales base 6-31G(d,p). Una vez terminado el proceso de optimización, se eligió el confórmero que presentó el estado de energía más bajo (Figura 16).

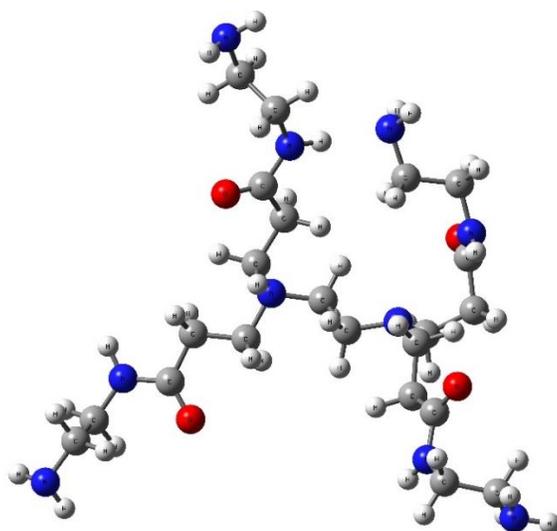


Figura 16. Molécula EG1.0 optimizada en B3LYP/6-31G(d,p), donde se observa la distribución de energía más estable.

Como parte de la caracterización molecular, también fueron calculadas las frecuencias vibracionales e interferograma. Las frecuencias obtenidas en los espectros teóricos fueron escaladas con un factor de corrección de 0.961 con respecto a “NIST 2016”, las principales frecuencias de vibración fueron comparadas con los resultados experimentales como se puede apreciar en la tabla 5. La diferencia entre frecuencias experimentales y calculadas no está tan alejada una de otra, sólo para el caso de las amidas, lo que puede deberse a todas las interacciones que se presentan experimentalmente (Wolski P. et al. 2019). Las frecuencias calculadas ya corregidas se aproximan bastante a los intervalos de absorción ya establecidos para los diferentes grupos funcionales. La diferencia más notable entre ambos tipos de frecuencias puede ser debido al factor de corrección con el que es calculado y tomando en cuenta que las moléculas se encuentran aisladas y en fase gaseosa (Lui Y. et al. 2009).

*Tabla 5. Comparación de frecuencias teórico-experimentales, para el dendrímero EG1.0. Utilizando un funcional híbrido B3LYP y un conjunto de bases 6-31G(d,p).*

	<b>EXPERIMENTAL</b> (cm <sup>-1</sup> )	<b>TEÓRICO</b> <b>ESCALADO</b> (cm <sup>-1</sup> )	<b>% ERROR</b>
<b>NH<sub>2</sub> (ASIMÉTRICO)</b>	<b>3282.28</b>	<b>3303.09</b>	<b>0.99</b>
<b>NH<sub>2</sub> (SIMÉTRICO)</b>	<b>3060.20</b>	<b>3088.49</b>	<b>0.99</b>
<b>CH<sub>2</sub> (ASIMÉTRICO)</b>	<b>2926.85</b>	<b>2873.56</b>	<b>1.01</b>
<b>CH<sub>2</sub> (SIMÉTRICO)</b>	<b>2857.74</b>	<b>2811.68</b>	<b>1.01</b>
<b>C=O</b>	<b>1640.10</b>	<b>1657.89</b>	<b>0.96</b>
<b>RCONHR´</b> (EN EL PLANO)	<b>1550.30</b>	<b>1497.51</b>	<b>1.03</b>

**%Error, donde Experimental corresponde al 100%**

En la figura 16 se puede apreciar que las bandas características para los dendrímeros PAMAM son muy similares en todo el espectro, ya que se cuentan con los mismos grupos funcionales en cada generación, sólo en diferente proporción. Esta serie de dendrímeros PAMAM “EG” con grupos amino terminales nos ayuda a tener una aproximación cualitativa de la estructura molecular (Tomalia D. et al. 1985). Dado este comportamiento se tomó como base el dendrímero EG1.0 para hacer referencia a todas las generaciones de los dendrímeros, teniendo como punto

de referencia la generación más pequeña, escalando a la más grande, utilizada en experimentos posteriores (Tomalia D. et al. 1985). Para la figura 17, tomando en cuenta que a nivel teórico se obtienen bandas finas y bien definidas donde las interacciones intermoleculares son menores. En el espectro experimental tenemos todas las interacciones entre moléculas que se ven representadas como bandas anchas y traslapadas. Dado este comportamiento, se procedió a hacer un análisis donde se comparan las bandas de ambos espectros para tener un marco de referencia entre ambas técnicas y poder definir cada grupo funcional presente.

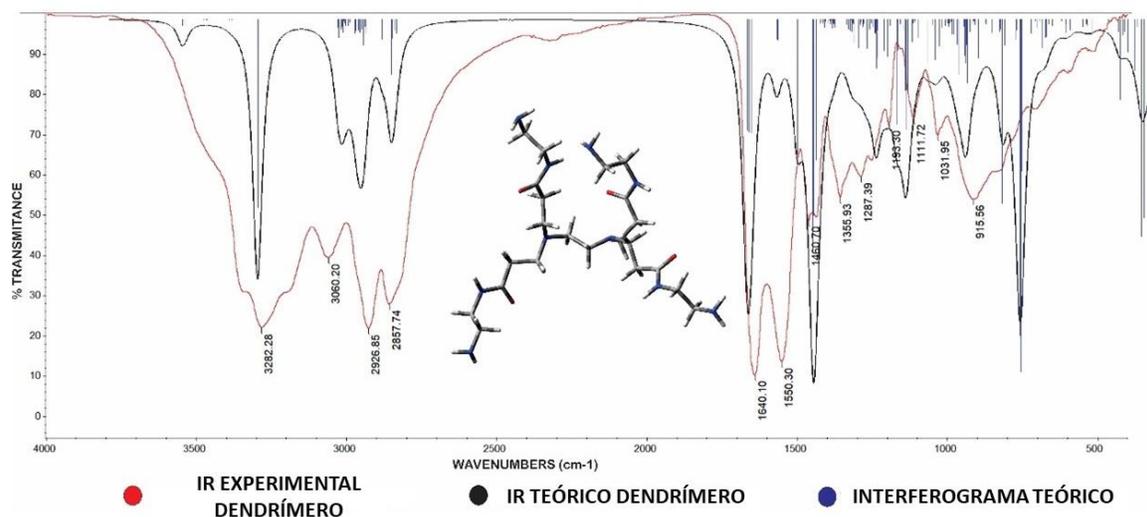


Figura 17. Comparación del interferograma teórico y el espectro IR con el espectro IR experimental para el dendrímoro EG1.0.

#### 8.4 Determinaciones ácido-base para la serie de moléculas EG.

En este tratamiento se puede observar una tendencia similar para las diferentes generaciones de moléculas EG (Figura 18), donde los consumos de NaOH son muy similares en las 4 generaciones analizadas (Hwang et al., 2007). Se pueden apreciar variaciones en el punto de equilibrio, que se deben a la cantidad de dendrímoro colocado inicialmente. Por otro lado, se tiene una zona de amortiguamiento de pH 10 hasta pH 5, donde se puede definir que hay una serie de interacciones entre los grupos amino terminales y amida secundarias presentes en toda la molécula (Maiti P. et al. 2005 y Chen W. et al. 2000). Cabe destacar que la molécula a medida que crece, aumenta la cantidad de interacciones inter e intramoleculares. En este comportamiento observamos que la molécula EG presenta estabilidad a los cambios

de pH, no se destruye y conserva la misma cantidad de grupos funcionales ante los cambios bruscos de pH (Reis P. et al. 2018 y Liu Y. et al. 2009). Con este estudio se seleccionó la molécula que fue utilizada para sintetizar el biomaterial.

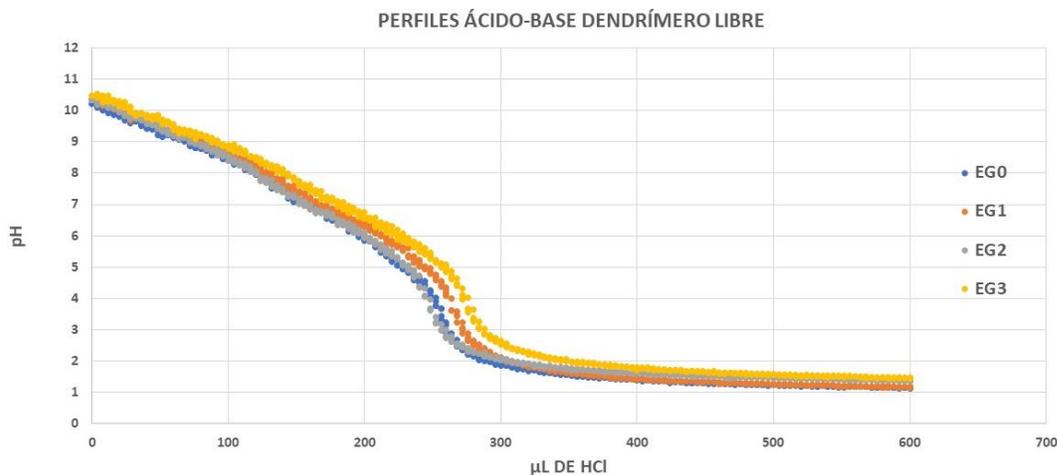


Figura 18. Perfiles ácido-base (Básico-Ácido) para la serie de moléculas EG.

## 9. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL BIO-MATERIAL (BM).

La síntesis de los bio-materiales se realizó utilizando los dendrímeros EG3, debido a que muestran propiedades muy similares a los de generaciones más pequeñas y estos pueden brindar mayores beneficios al material compuesto. Se usan estas macromoléculas ya que pueden retener más partículas en su matriz, así como en su periferia, gracias al tamaño y el incremento de grupos funcionales (Maingi V. et al. 2012 y Reis P. 2018). Estos materiales son sintetizados a partir de celulosa microcristalina y el dendrímero. Por otro lado, el anclaje de los dendrímeros se realizó utilizando 4,4-(fenil-isocianato), que por sus características químicas puede reaccionar con el dendrímero, así como con la celulosa (Beezer A. et al. 2003). Por un lado, reacciona con las microfibrillas formando un enlace uretano con los iones OH de la celulosa, ya que estos se encuentran más expuestos al tratarse de celulosa micro-cristalina. Por otro lado, el grupo isocianato reacciona de manera más rápida con los grupos amina terminales del dendrímero, formando un enlace del tipo amida secundario (Beezer A. et al. 2003). En la Figura 19 se puede observar un esquema general de la reacción que se lleva a cabo para la síntesis del material, donde la

inmovilización del dendrímero puede llevarse de manera física o química. De manera física las interacciones electrostáticas o del tipo puente de hidrógeno en la mezcla pueden acoplar el dendrímero de manera superficial. Para evitar esto se realizaron una serie de lavados con metanol, para tratar de obtener solo la molécula de interés, siendo sólo la que está anclada químicamente por los enlaces uretano y amida posterior a la reacción del 4,4-(fenil-isocianato).

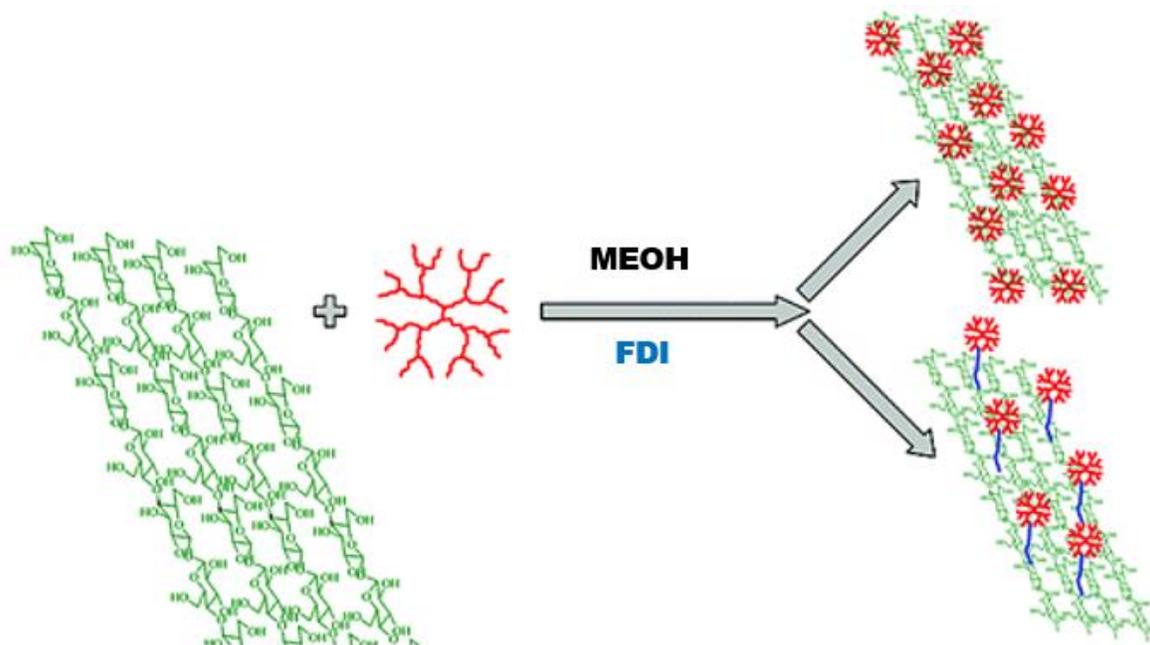


Figura 19. Esquema general de síntesis del bio-material, Bagheri M. et al. (2008).

Una vez obtenido el material de interés de la mezcla de reacción, se caracterizó por espectroscopía FT-IR y microscopía electrónica (SEM y TEM), de la misma manera se determinaron sus propiedades ácido base ya como material compuesto.

### 9.1 Caracterización por FT-IR de los bio-materiales (dendrímero EG3 anclado a celulosa).

Se caracterizó el biomaterial por espectroscopía FT-IR, como podemos observar en la figura 20, se tienen bandas traslapadas de dendrímeros y celulosa con el biomaterial. Al comparar los 3 espectros se muestra una correlación de bandas al tener un material compuesto entre los dos reactivos iniciales. Las bandas más características para el material y los nuevos enlaces formados son: FT-IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3277 ( $\text{NH}_2$ ); 3277 y 3077 ( $\text{C}=\text{ONHC}$ ); 2942 ( $\text{C-H}$  alif.), 1,637 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 1544 ( $\text{CNHOC}$ );

1237 (CC=OOC); 1103 y 1057 (celulosa). Donde vemos que las bandas características para el dendrímero se conservan y se nota la aparición de bandas nuevas alrededor de 1237 y 1057  $\text{cm}^{-1}$  que son representativas para enlaces del tipo éster y las cadenas de celulosa respectivamente (Jiangqi Z. et al. 2015).

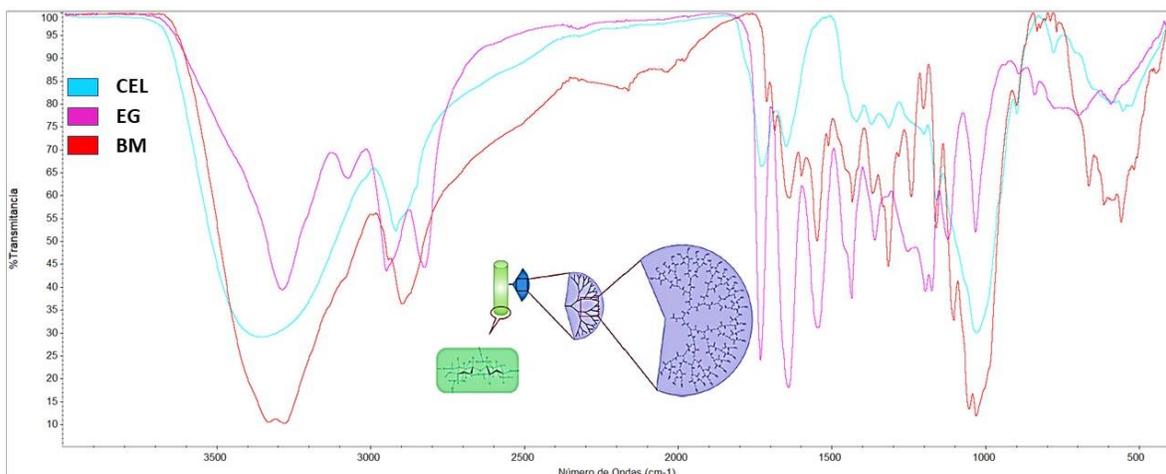


Figura 20. Espectros de FT-IR para la serie del dendrímero PAMAM EG, celulosa y el bio-material CEG4.

## 9.2 Determinaciones ácido-base para el bio-material.

En esta determinación se puede observar el comportamiento que tiene el material CEG3 al cambio de pH (Figura 21), se realizó un duplicado para la misma muestra se determinó que no sufría cambios irreversibles al variar el pH (Kannaiyan D. 2009 y Lee I. et al. 2002). En los resultados se aprecia que el bio-material no se está degradando ante cambios notables de pH y que tiene estabilidad el dendrímero anclado a la celulosa. Por otro lado, se tiene una zona de amortiguamiento de pH 5 hasta pH 9.8, muy similares a los observados en la molécula dendrítica aislada, donde se notan sólo ligeros cambios en el pH inicial. (Qiu Z. 2020), Se puede concluir que la estructura del dendrímero no se ve afectada directamente por los cambios realizados tras el anclaje químico, pero sí se nota una reducción del consumo de HCl, lo que indica que se reducen de manera importante los grupos  $\text{NH}_2$  que pueden ser protonados (Maiti P. et al. 2005).

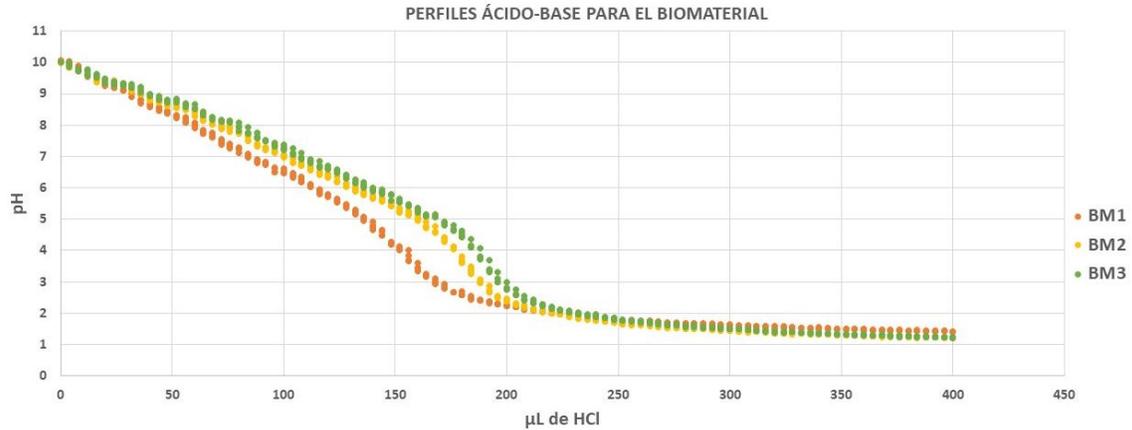


Figura 21. Perfiles ácido-base para el biomaterial dendrímero-celulosa (BM).

Para asegurar el comportamiento de estos bio-materiales, se realizó una titulación por retroceso para determinar si la molécula presenta estabilidad ante los cambios bruscos de pH (altos y bajos). Posteriormente se realizó una comparación de ambos perfiles de titulación para el bio-material CEG3 (Figura 22). En este comportamiento observamos que el material al ser tratado a un pH altos y bajo no se destruye, conserva la misma cantidad de grupos funcionales y presenta una estabilidad a varios ciclos de uso. Esto puede determinar una posible aplicación del material para retener y liberar péptidos al realizar modificaciones ácido-base del medio en que se encuentre, sin que éste pierda sus propiedades, estructura o se pierda el material.

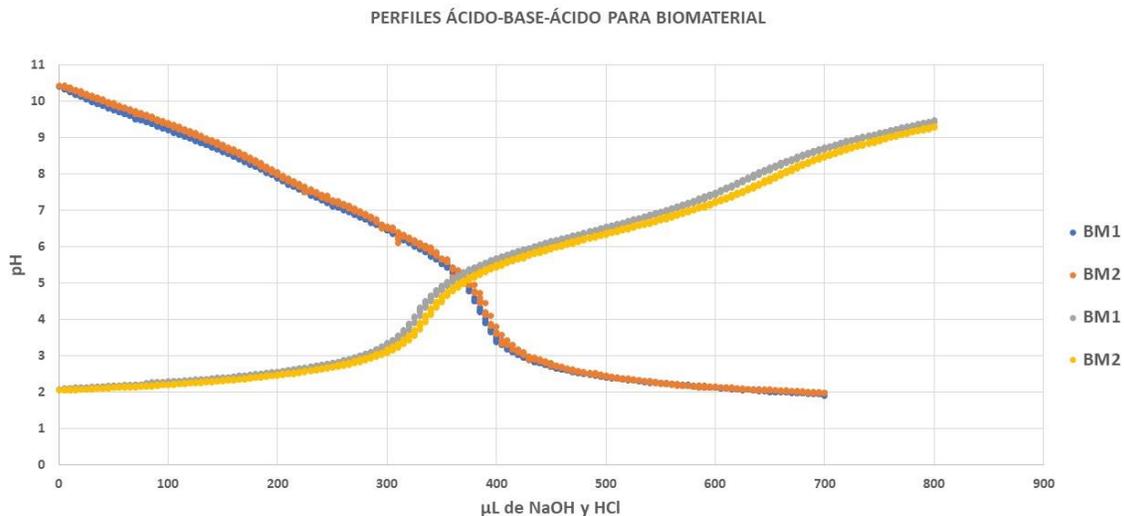


Figura 22. Perfiles ácido-base (Ácido-Básico, Básico-Ácido) para el biomaterial dendrímero-celulosa (BM).

### 9.3 Microscopía electrónica de barrido (SEM) para el bio-material.

El bio-material CEG3 se muestra en la figura 23, donde puede apreciar una muestra de celulosa microcristalina comercial. (Figura 23-A) y el biomaterial celulosa-dendrímico en las siguientes micrografías. La celulosa comercial presenta una estructura más expandida y porosa que en el material CEG3, el cual se encuentra recubierto por los dendrímeros PAMAM EG3 (Figura 23-B-C). Los dendrímeros le confieren una distribución más aglutinada al bio-material, a diferencia de lo que se observa en la celulosa pura. La celulosa con los dendrímeros anclados en la superficie presentan zonas de aglomeración ya que el dendrímico tiende a ser pegajoso en seco. Para este caso se aprecia que el efecto del dendrímico sobre la celulosa genera una especie de aglomerados en estado sólido disperso.

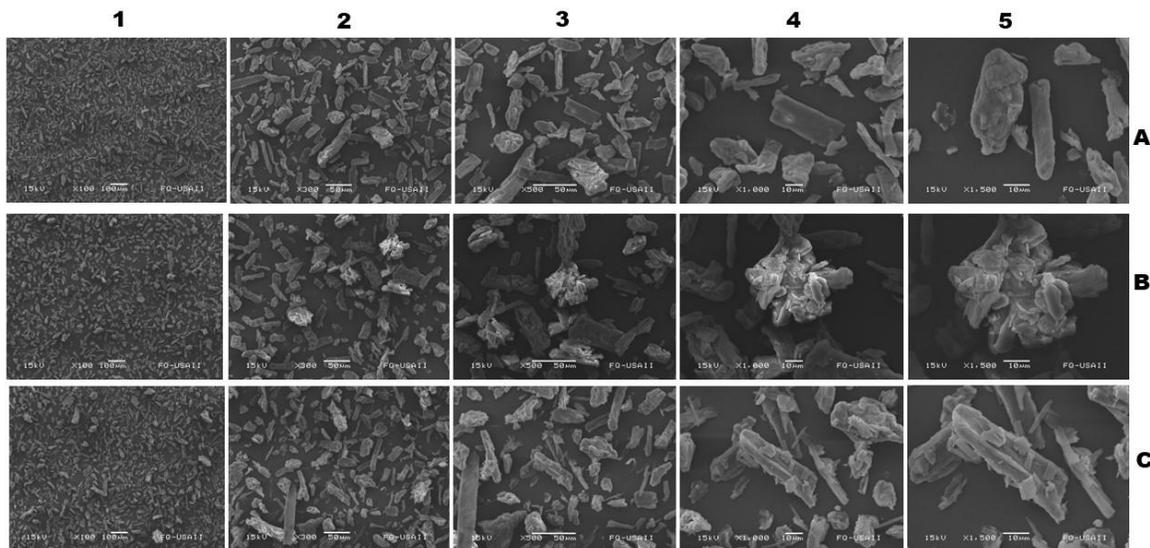


Figura 23. Micrografías SEM tomadas por USAII-UNAM de 250x (1) a 2000x (5). (A) celulosa microcristalina comercial, (B) biomaterial celulosa-dendrímico, (C) biomaterial celulosa-dendrímico posterior a su uso.

### 9.4 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) para el bio-material.

En la figura 24 se muestran las micrografías para el bio-material CEG3, donde se puede hacer una comparación con celulosa microcristalina (24-A) vista por microscopía TEM. Los biomateriales al contener celulosa como soporte no permiten

apreciar totalmente los dendrímeros por este tipo de técnica ya que los cristales son muy grandes y no pueden ser vistos con facilidad bajo el microscopio, pero se puede tener una visión de estos teniendo en cuenta las imágenes tomadas por SEM. Las fibras de celulosa que notamos en SEM pueden verse más a detalle en TEM, ya que el acercamiento es mayor gracias a la reconstrucción electrónica que esta técnica realiza. Aunque no se puede dar una aproximación visual directa, se puede notar que el bio-material tiene una estructura que conserva las características cristalinas de la celulosa. En la figura 24-B-C se aprecia bajo las fibras de celulosa un recubrimiento ajeno a la rejilla que se atribuye al dendrímero PAMAM anclado al biomaterial. Si bien en la imagen no puede apreciarse, de manera experimental se notó una elasticidad al separar el material de la rejilla en la que se tomó la imagen. Puede notarse de igual forma que las fibras de celulosa se ven aglutinadas como se apreció en SEM.

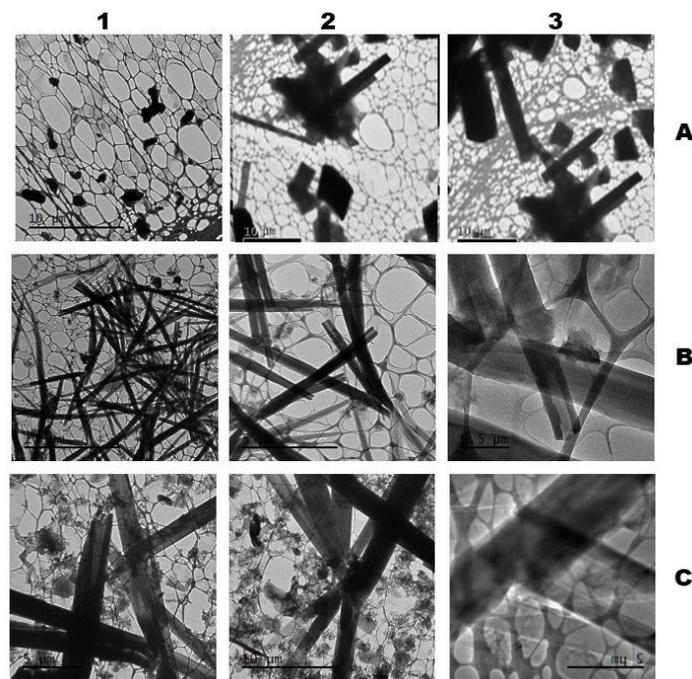


Figura 24. Micrografías TEM tomadas por USAII-UNAM 200x (1) a 2000x (3). (celulosa microcristalina comercial), (B) Biomaterial celulosa-dendrímero (BM), (C) Biomaterial celulosa-dendrímero posterior a su uso (BM).

## 9.5 Análisis teórico de energías de acoplamiento para aminoácidos y el dendrímero PAMAM:

Una vez optimizada la estructura dendrítica y los aminoácidos con el funcional B3LYP, se desarrollaron nuevos cálculos para tener un comparativo a un nivel de teoría mayor con el funcional M062X (Morar C. et al. 2018). A partir de los resultados obtenidos se puede apreciar en la tabla 6 que se tienen valores cercanos en algunos casos con correspondencia para las mejores interacciones PAMAM-aminoácido. Con este estudio se puede tener un nivel de confianza mayor al usar un nivel de teoría más alto o más bajo al analizar moléculas más grandes donde el nivel de teoría no se puede elevar por la gran cantidad de átomos involucrados. Adicional a esto por las diversas interacciones, así como los grados de libertad que tiene cada dendrímero y la biomolécula de interés (Francesca-Ottaviani M. et al. 2004).

*Tabla 6. Tabla comparativa de energías de acoplamiento utilizando diferentes niveles de teoría basados en escalamiento teórico.*

COMPLEJO	ENERGÍA TOTAL DE ACOPLAMIENTO (B3LYP) (kcal/mol)	ENERGÍA DE ACOPLAMIENTO (M062X) (Kcal/mol)	ENERGÍA DE ACOPLAMIENTO (B3LYP) (kcal/mol)	ENERGÍA DE ACOPLAMIENTO (M062X) (Kcal/mol)
D-TYR	-2402.19	-2404.49	-31.25	-33.55
D-VAL	-2118.19	-2116.63	-30.43	-28.87
D-ARG	-2322.36	-2325.07	-30.41	-34.12
D-MET	-2516.38	-2503.82	-29.91	-17.35
D-ALA	-2039.53	-2031.37	-14.37	-6.21
D-TRP	-2345.79	-2342.45	-3.51	-0.17

La figura 25 representa las 4 mejores interacciones descritas en la tabla 6 entre aminoácidos con el dendrímero PAMAM. Los resultados de este trabajo se basan en un estudio teórico fiable que permite la visualización de los complejos dendrímero/aminoácido. Concretamente, permite proponer que los péptidos que contienen aminoácidos laterales Tyr, Val, Arg, Met, Ala e incluso Trp, deberían ser candidatos adecuados para ser separados utilizando moléculas PAMAM. Los sitios activos para las interacciones péptido/dendrimer están asociados con la

disponibilidad de grupos amino terminales situados en la periferia de los dendrímeros para formar enlaces tipo puente de hidrógeno con la cadena lateral del péptido (Desiraju et al. 2001, Buczkowski A. et al. 2014).

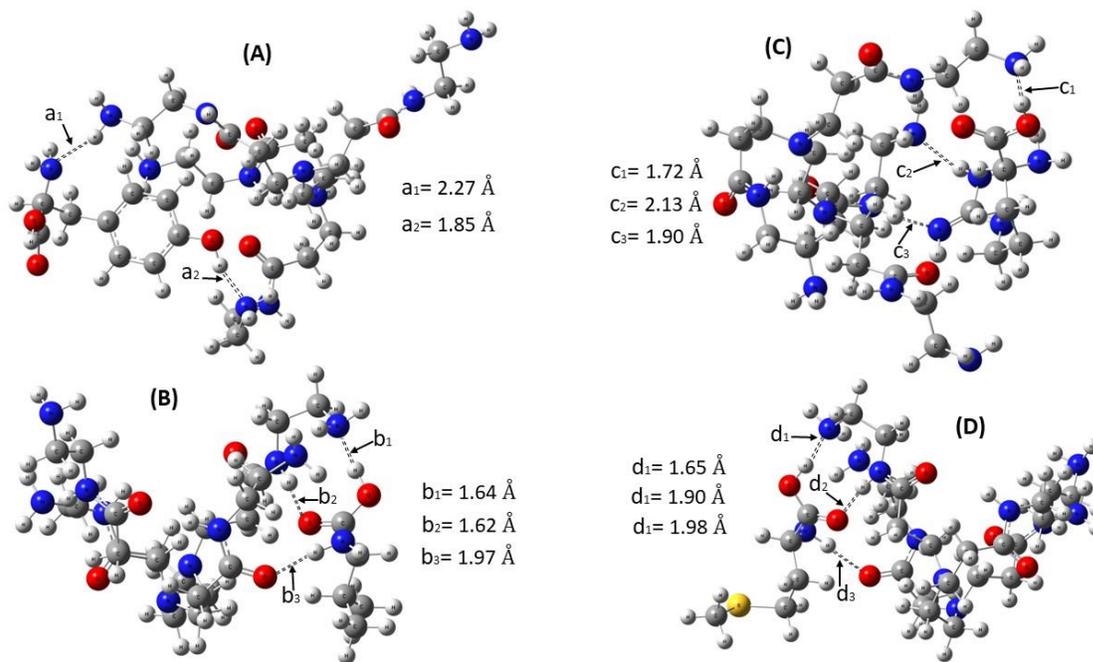


Figura 25. Representación de los complejos formados entre el dendrímero-aminoácido y sus respectivas distancias de interacción puente de hidrógeno. (A) EG1.0-TYR, (B) EG1.0-VAL, (C) EG1.0-ARG, y (D) EG1.0-MET.

Con los resultados teóricos y experimentales presentados anteriormente se tomó como referencia teórica el dendrímero de generación 1 así como el aminoácido tirosina para realizar un análisis que consiste en dos espectros infrarrojos (teórico-experimental) y un interferograma teórico que permite determinar las interacciones de las moléculas que caracterizan cada banda específica (Figura 26). Este tipo de análisis permite observar de manera gráfica las interacciones del tipo puente de hidrógeno que se presentan en el complejo dendrímero-aminoácido. Con este estudio se puede dar una aproximación muy cercana a los resultados experimentales donde podemos apreciar que se tiene una interacción del aminoácido con el dendrímero en los grupos amina y amida que lo conforman (Buczkowski A. et al. 2014).

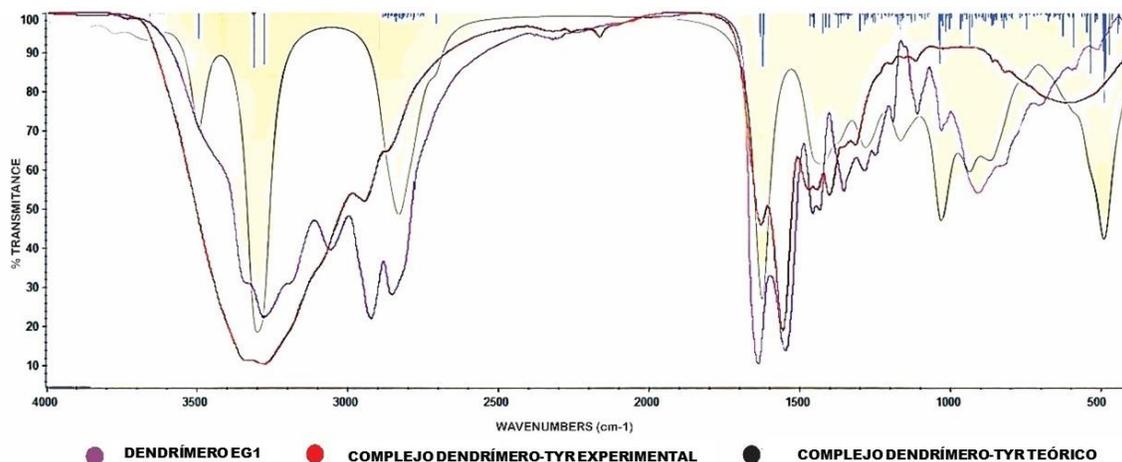


Figura 26. Comparativo de los espectros de IR teórico-experimental e interferograma para el complejo dendrímico PAMAM EG1 y tirosina.

Como seguimiento a los estudios teórico-experimentales, se calculó un mapa de potencial electrostático molecular (Figura 27) que muestra las zonas de mayor densidad electrónica donde ocurre la interacción de Tyr con la molécula dendrítica. De esta manera es posible estimar las interacciones tipo puente de hidrógeno que se generan y la forma en que crean anillos, dando mayor estabilidad al complejo dendrímico-aminoácido (Desiraju et al. 2001, Boas U. et al. 2004). Del mismo modo, se puede demostrar que el aminoácido tiende a interactuar con zonas de mayor densidad electrónica, dando lugar a interacciones estables que pueden ser modificadas para retener o liberar estos aminoácidos o cadenas de ellos de forma controlada mediante un simple ajuste en el pH.

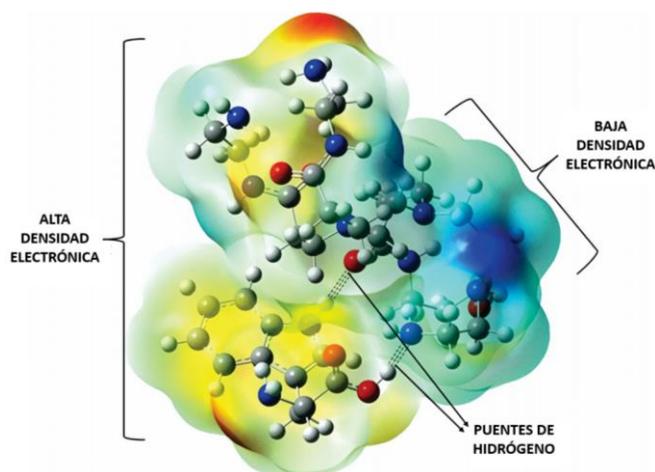


Figura 27. Interacción dendrímico PAMAM EG1-Tirosina. La ilustración se basa en el mapeo de un dendrímico y un aminoácido sobre una superficie de densidad electrónica total. En el mapa se muestran los potenciales más positivos (Azul) y más negativos (Rojo), trazados sobre una superficie

de densidad electrónica constante.

Una vez realizados todos los estudios teóricos entre dendrímeros y aminoácidos de interés, se determinaron las posibles interacciones por mecánica molecular (MMFF) para el complejo dendrímero-péptido, donde se da una primera aproximación a las interacciones que se tendrán entre estas dos moléculas (Buczowski A. et al. 2014). En la figura 28 se muestran dos interacciones entre un péptido antiinflamatorio y un inmunoestimulante que son dos biomoléculas de interés para formar una interacción fuerte con los dendrímeros PAMAM, debido a que en las cadenas laterales se tiene arginina como aminoácido terminal.

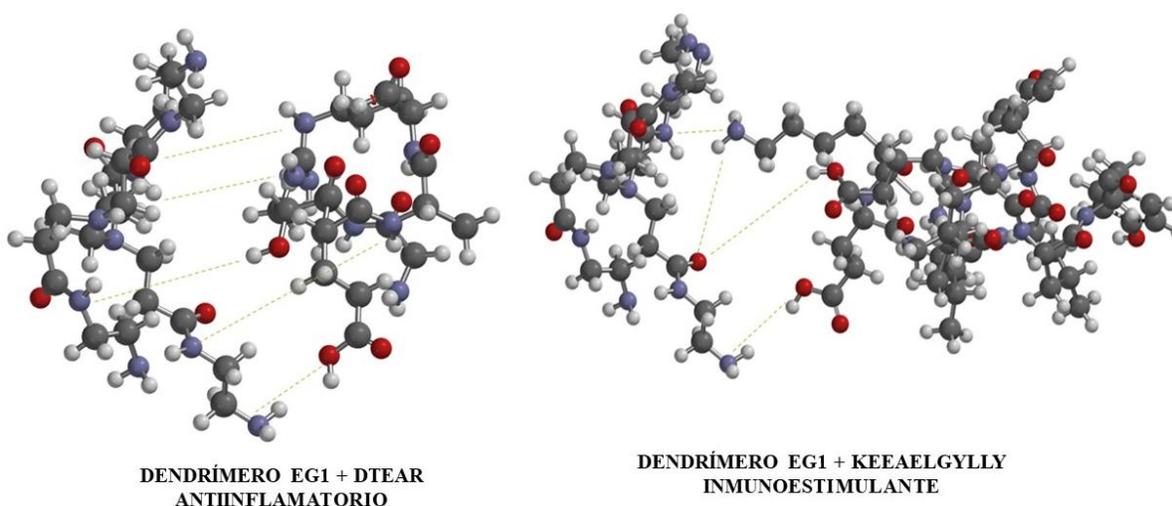


Figura 28. Interacciones dendrímero-péptido basados en un método de interacción por mecánica molecular (MMFF).

## 9.6 Análisis teórico de energías para péptidos y el dendrímero PAMAM:

En la figura 29 se muestra una tabla con las energías de acoplamiento para algunos péptidos con actividad antioxidante formando un complejo con la macromolécula dendrítica, para este caso se tomó como punto de partida el dendrímero PAMAM EG1 y la secuencia de aminoácidos "YLAGKPQQEH". Este péptido al presentar una tirosina terminal cumple con los parámetros observados en las determinaciones teórico-experimentales para aminoácidos aislados. La estructura presentada en la figura 29 muestra también la optimización de la molécula y las interacciones que se tienen entre el péptido YLAGKPQQEH y el dendrímero, así como los puentes de hidrógeno y los anillos que se forman para dar estabilidad al complejo dendrímero-

péptido (Han L. et al. 2010 y Rostami I. et al. 2016)

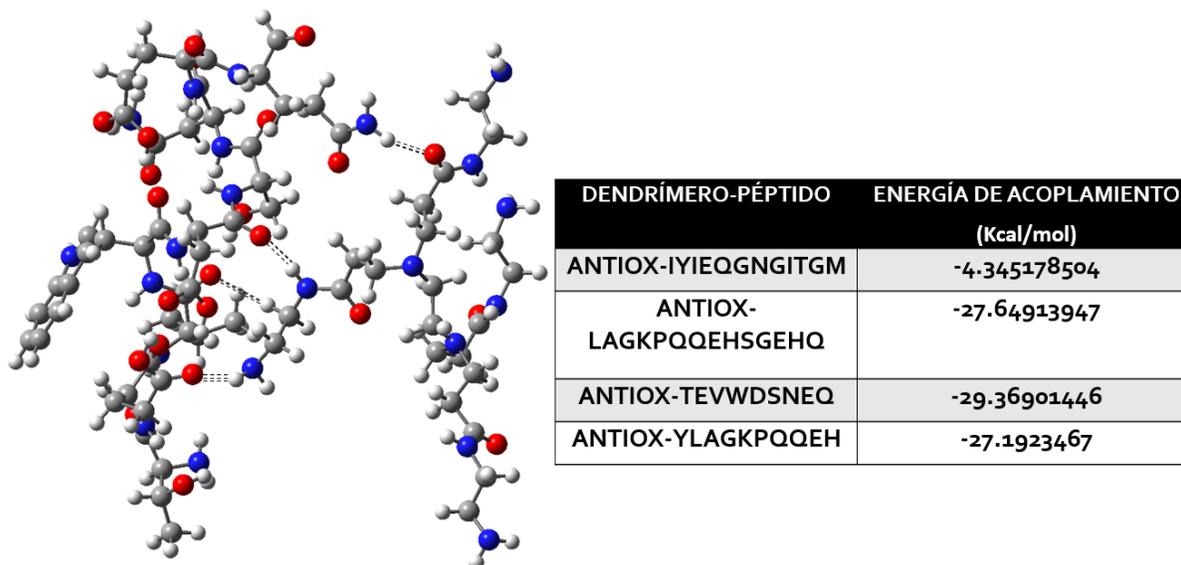


Figura 29. Interacciones dendrímoro-péptido (YLAGKPQQEH) basados en un método de interacción por medio de DFT con estructuras optimizadas y sus energías de acoplamiento para las mejores interacciones con péptidos de interés. La tabla presenta la energía puntual de acoplamiento de los complejos PAMAM EG1-oligopéptido.

Una vez obtenidos los resultados de optimización y acoplamiento de la molécula de interés (YLAGKPQQEH) se realizó el mapa de densidad electrónica total del dendrímoro con la secuencia del péptido derivado de proteínas de reserva de la semilla de amaranto. En la figura 30 se muestra una superficie de densidad electrónica total, trazada sobre una superficie de densidad electrónica constante. Del mismo modo, se presentan las interacciones de este oligopéptido y la molécula dendrítica, dando una aproximación muy específica de cómo y dónde se produce el acoplamiento (Milowska K. et al. 2021). Estos estudios son determinantes para tener una aproximación y dar una perspectiva del tipo de péptidos que se pueden separar de la mezcla que surge tras la hidrólisis de las proteínas de amaranto.

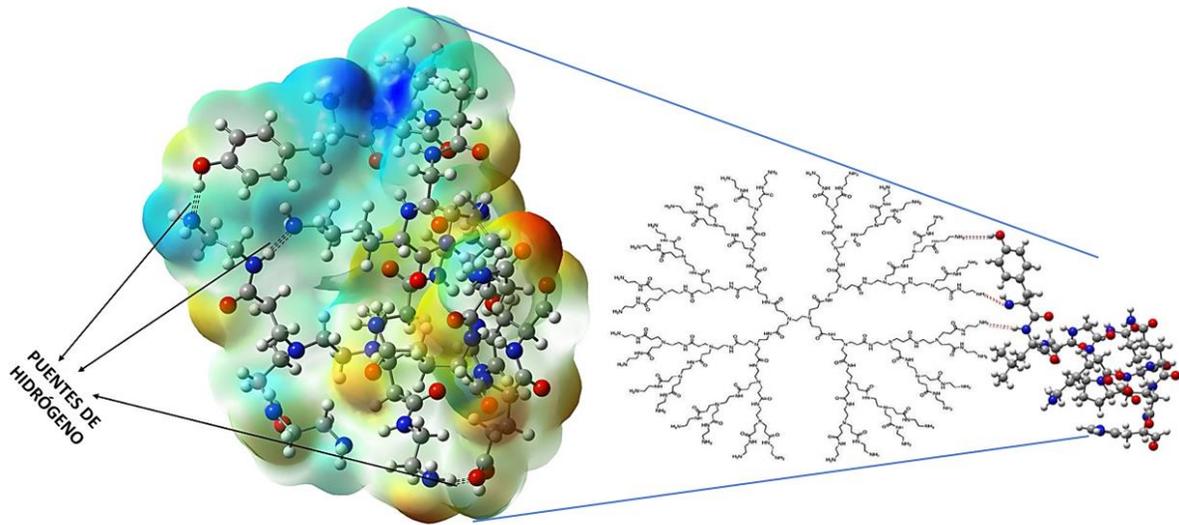


Figura 30. Interacción dendrímero PAMAM G1.0-YLAGKPQQEH. La ilustración se basa en el mapeo de un dendrímero y un péptido sobre una superficie de densidad electrónica total.

### 9.7 Análisis por electroforesis SDPAGE 1D para determinar la calidad de la proteína.

Una vez obtenidos los resultados teóricos se procedió a hacer un análisis de identificación para la separación de las fracciones protéicas de la semilla de amaranto, identificándolas por electroforesis 1D (Figura 31). Este estudio sirve como comparativo entre el método de separación por disoluciones y fenol, donde observamos que ambos métodos son eficientes en la separación de la proteína. El método por fenol es mucho más cuantitativo y protege la integridad de la proteína al no estar tan expuesta al medio, y se puede partir de ese método para posteriormente extraer las fracciones proteicas usando el método de disoluciones. Este proceso evita la degradación de las proteínas como se observa en la imagen 31-B, donde se tiene menos control sobre el proceso, los cambios de temperatura y exposición al ambiente (Huerta-Ocampo J. et al. 2012).

## ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO (Densitometría)

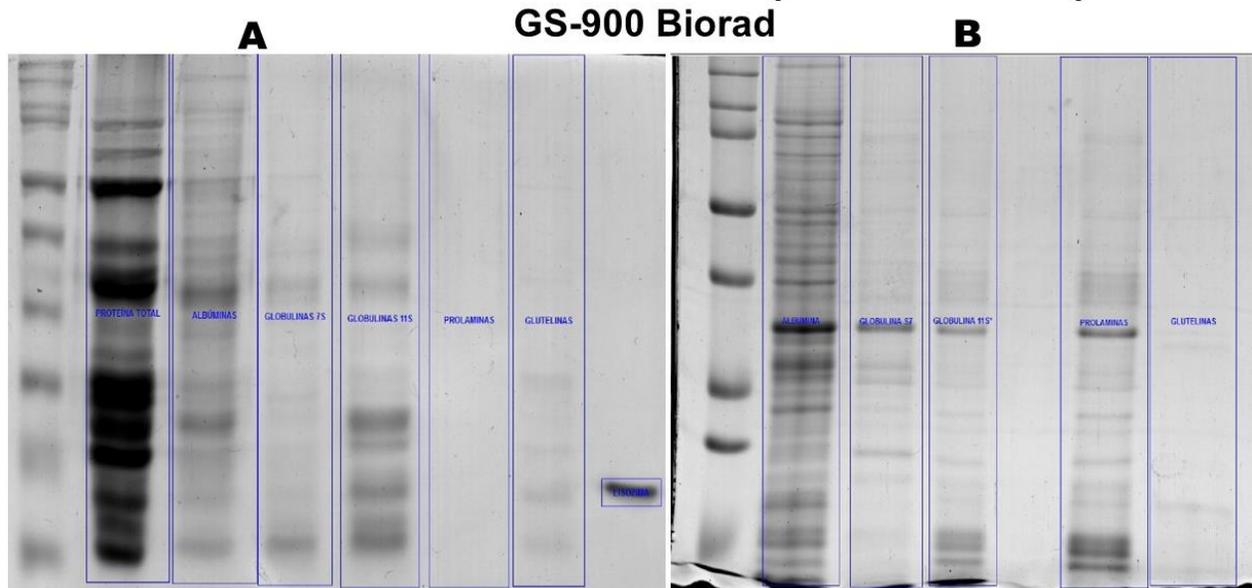


Figura 31. Patrón electroforético de las fracciones de proteínas de reserva de la semilla Nutrisol cultivado en Atlacomulco Edo. México. Carril derecho A) método comparativo de extracción de proteína total por fenol y disoluciones. B) método de extracción sólo por disoluciones. A) extremo derecho, marcador de peso molecular Biorad (Lisozima).

### 9.8 Proceso de hidrólisis enzimática y separación de péptidos mediante columnas empacadas con el biomaterial sintetizado (BM):

Una vez evaluados los resultados teóricos y la determinación de la calidad de proteína en la semilla de amaranto, se procedió a la hidrólisis enzimática de las fracciones de Globulinas 11s, glutelinas y proteína total (Silva-Sánchez C. et al. 2008). Estos péptidos se obtuvieron siguiendo el proceso de hidrólisis propuesto en la metodología y posteriormente se colectaron las diferentes biomoléculas de cada fracción hidrolizada (Bindal S. et al. 2017 y Sabbione A. et al. 2016). El modelo general que se siguió en este proceso se muestra en la figura 32 donde la columna empacada contiene el biomaterial compuesto por celulosa y dendrímeros PAMAM. Los oligopéptidos retenidos por el dendrímero se colectaron en tubos, estas secuencias de oligopéptidos en este punto son desconocidas, pero se procede a la identificación por medio de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas, donde se obtienen relaciones carga-masa que se identifican mediante análisis en bancos de datos por medio de inteligencia artificial y bigdata (Webster J. et al. 2012).

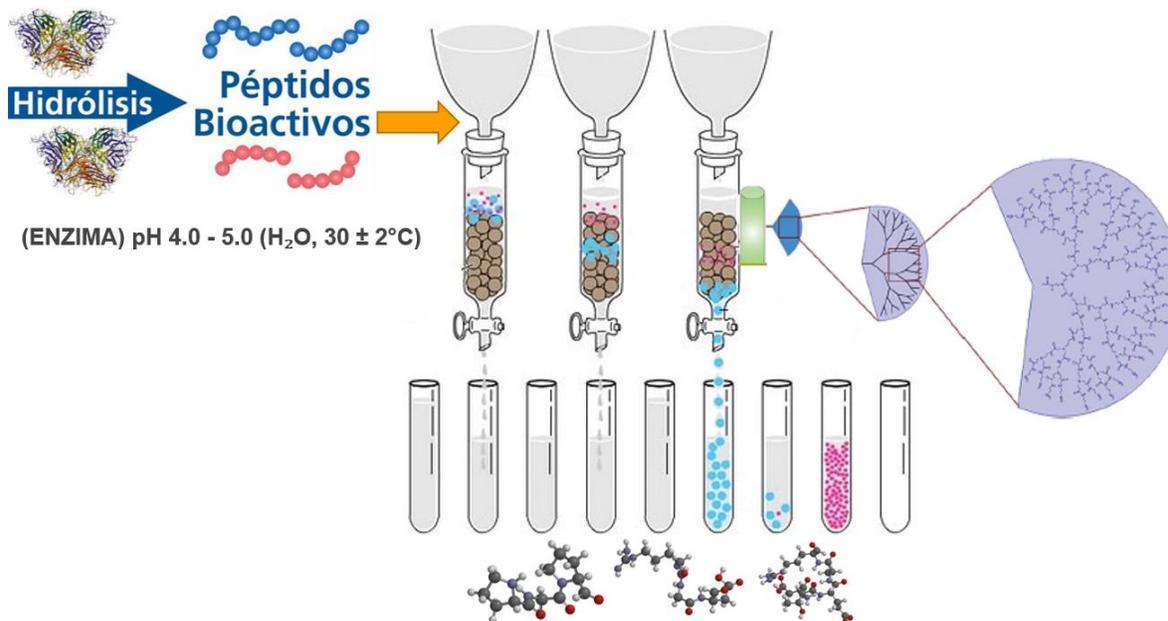


Figura 32. Diagrama general para la captura de péptidos tras la hidrólisis de las proteínas de amaranto, Utilizando como soporte sólido el biomaterial (BM) en un proceso continuo.

## 10. PÉPTIDOS CAPTURADOS EN LAS FRACCIONES PROTÉICAS.

Los oligopéptidos que se colectaron con el soporte sólido celulosa-dendrímico se limpiaron de impurezas y aminoácidos libres procedentes del medio colectado, esto utilizando una columna C18 y una serie de lavados con diferentes soluciones de acetonitrilo y ácido fórmico. Lista la muestra se inyectó en un RP-HPLC-MS con una fase móvil 93% agua-10% acetonitrilo (ACN) de inicio hasta una relación 10% agua-90% ACN final, para controlar los tiempos de retención e identificar de manera detallada y precisa los diferentes péptidos, siguiendo la secuencia mostrada en la figura 33. El resultado de este análisis nos permite obtener un cromatograma que representa la fase móvil vs la intensidad de pico, que al evaluarlo con el software de inteligencia artificial muestra la secuencia detectada con respecto al tiempo de retención por peso molecular (Douat-Casassus C. et al. 2004 y Boas U. et al. 2002).

## PURIFICACIÓN POR C18 PARA INYECTAR A RP-HPLC, HACIA UN DETECTOR DE MASAS MALDI-TOF

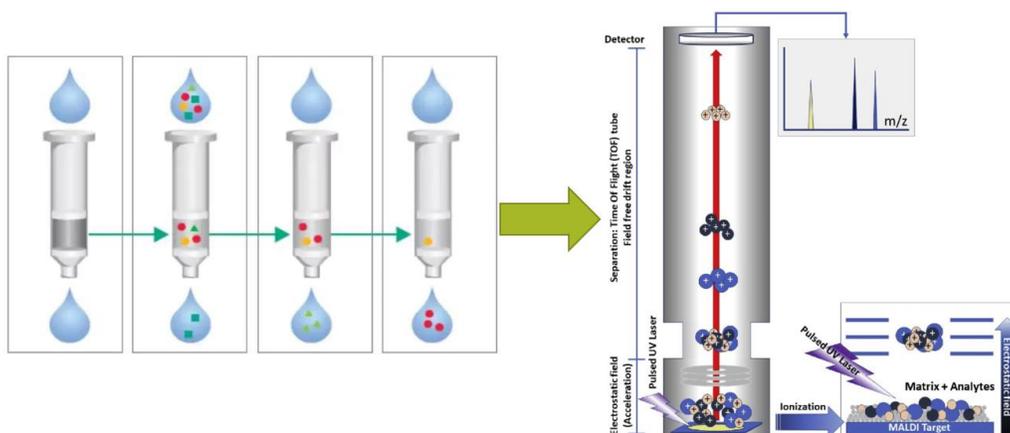


Figura 33. Diagrama general de la purificación para los péptidos capturados antes de ser colocados en el espectrómetro de masas.

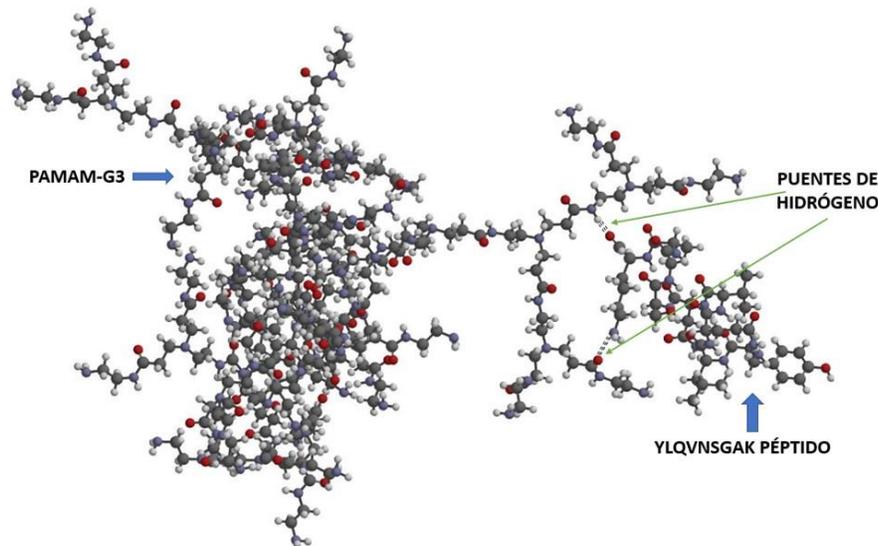
### 10.1 Secuencias de péptidos detectadas.

Los péptidos identificados por espectrometría de masas se representaron en las tablas 7-10, donde se tienen las secuencias de aminoácidos de oligopéptidos retenidos por el dendrímero PAMAM. Estas secuencias se reconstruyeron en SPARTAN'02® y se analizaron por mecánica molecular para representar el conformero más estable que se tiene al obtener la secuencia de aminoácidos acoplada al dendrímero (Han L. et al. 2010 y Rostami I. et al. 2016). En la tabla 7 se muestran los diferentes oligopéptidos secuenciados tras la hidrólisis de globulinas 11s con *Bacillus licheniformis*. El análisis es realizado por espectrometría de masas, entre los que destaca la secuencia "F" ya que contiene Tyr en un extremo de la cadena, mismo que se ha demostrado por análisis teóricos que puede tener una interacción fuerte con el dendrímero para ser retenido y liberado posteriormente (Taghavi P. et al. 2014). De la misma manera se tienen secuencias con Arg y Val en los extremos, dando un importante resultado de correlación entre los estudios teóricos y experimentales.

Tabla 7. Secuencias detectadas por el espectrómetro de masas para los diferentes péptidos capturados por el biomaterial tras la hidrólisis de globulinas 11s con *Bacillus licheniformis*.

SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DETECTADAS ( <i>Bacillus Licheniformis</i> -Globulinas11s).	
A)	<b>IQLIPQNEGDASKER</b>
B)	<b>ECCSAFKEFACPYVSQINDMNSDCAQTMFSYMNIYGNYP TGLFANE CR</b>
C)	<b>EVNISGSQNEGEDDSKETNDVVAQKEVENSKEVTDCDSQKEDEANAGGESKEVNGSVSHDEI GDESK</b>
D)	<b>ETNDVVAQKEVENSKEVTDCDSQKEDEANAGGESKEVNGSVSHDEIGDESKEVNGGSTHKE VDDTQSTTR</b>
E)	<b>EVENSKEVTDCDSQKEDEANAGGESKEVNGSVSHDEIGDESKEVNGGSTHKEVDDTQSTTR</b>
F)	<b>YLQVNSGAK</b>
G)	<b>EVENSKEVTDCDSQKEDEANAGGESK</b>
H)	<b>EVNGGSTHK</b>
I)	<b>VPSDK</b>

La figura 34 representa al péptido YLQVNSGAK (referencia UNIPROT: A0A178WA37) en una perspectiva teórica utilizando mecánica molecular (MMFF) para determinar una posible conformación espacial de lo que se tiene experimentalmente. Obtenidos los resultados y los análisis teóricos se puede determinar que los resultados por DFT si tienen correspondencia con la metodología experimental lo que abre una nueva perspectiva de estudio para este tipo de interacciones donde se pueden hacer estimaciones de lo que se puede separar con un dendrímero PAMAM o al modificar parámetros estructurales (Santos J. et al. 2010 y Buczkowski A. et al. 2014).



MAEEFVIAIPVQLSDHKRKLLENLESEILEQQHAGSIDNDVSVDDDKNASDYCQLKRPKIDDEAVDGLGIGGTVENSGDVESKEFGTEKPIAQSDENQDGNPLIEKVQETIDAEESDNKMEDNGKPEDNQLVTPVV  
 TSQDVSVEFSKIVNISGSGNIGFDBSKETNDVVAQKIVENGSKVEVDCDSQKEDFANAGGESKIVNGSYSHDIFGDFSKIVNGGTHKEVDDTQSTTRRIDVPSSKVGTLIGKGGEMVRYLQVNSGAKIQRDAE  
 ADPSSALRPVEHGTVSCIEKAELINAVIAEVEAGVYPALAAARGVPEQMEIKVPSDKVGVIGRGGETIKNMQTKSRARQLIPQNEGDASKEITVRISGDKRQIDIATALIKDVMYQDGRPSYSGGFNQAYQPR  
 GPGGPPQWGSRGPHGPHSMPYNYHHGGPPYPSQSHFRPPNSGGYPPQHMPPRSGYSGWVQRPPHSGPYDYVGRGGQNPVPSHGASYSQAGAQQTYGQMYDQPHYDNPMMHQSYYGGGQQGYPSAG  
 GQHMQQPSRFPYGMQGSAAEQYGPFRPAAPGDPYQGPPTAAPSYGSTPAAASYGSTPAAPSYGSTPAAAPSYGSTPAAAPSYGSTPAAAPSYGSTPAAAPSYGSTPAAAPSYGSTPAAAPSYGSTPAAAPS  
 VYGQVPTGGYSSYPSTQPAYGNTPAQSNNGYGYGSQPSYGGGNASAYAAPTGTAVSQTAPPQAGYQSATQSAGYAAAPGTAQ

Figura 34. Secuencia de la proteína identificada en UNIPROT e interacción con el péptido YLQVNSGAK donde se presenta la posible interacción con el dendrímero PAMAM utilizando el método de análisis conformacional y de interacción por mecánica molecular (MMFF).

En la tabla 8 se muestran los diferentes oligopéptidos para la hidrólisis de globulinas 11s con *Aspergillus oryzae*. En este análisis es importante tener en cuenta que la secuencia “A y B” contienen ARG en un extremo de la cadena, que se demostró por análisis teóricos una de las mejores 3 interacciones con el dendrímero para ser retenido y liberado posteriormente. Así mismo en la cadena “A” se tiene metionina por un extremo y arginina por el otro, lo que representará una buena interacción del péptido por ambos extremos o formando más anillos que presenten una mejor estabilidad al retener la biomolécula.

Tabla 8. Secuencias detectadas por el espectrómetro de masas para los diferentes péptidos capturados por el biomaterial tras la hidrólisis de globulinas 11s con *Aspergillus oryzae*.

SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DETECTADAS ( <i>Aspergillus oryzae</i> -Globulinas11s).	
A)	MLAISVLLAGAILAILAILAIAVSLRAR
B)	LLALVIVGFMVIQLIKPIGWPLKR
C)	LALLAMAAISLAAVLGHLT
D)	TIQALVITLLSLLPTSLSLLLP

La figura 35 representa al péptido LLALVIVGFMVIQLIKPIGWPLKR (referencia UNIPROT: A0A3M9X6M2) utilizando MMFF para dar una posible estructura

espacial de lo que se espera experimentalmente. En este caso se aprecia la mejor interacción entre el aminoácido arginina y los grupos amida que se tienen en el centro del dendrímero. Los átomos del péptido no interactúan directamente con la periferia como se esperaba inicialmente, se tiene una mayor estabilidad al formar anillos con amidas secundarias (Buczowski A. et al. 2014). Esto representa experimentalmente la posibilidad de que el dendrímero al variar el pH (8-9) se pueda cerrar y retener con facilidad este oligopéptido.

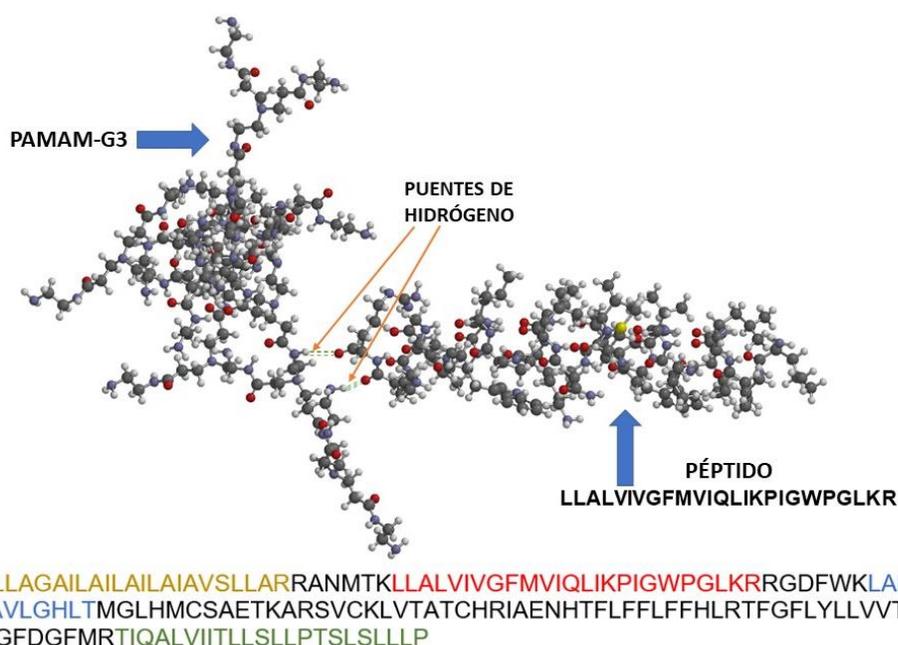


Figura 35. Secuencia de la proteína identificada en UNIPROT e interacción con el péptido LLALVIVGFMVIQLIKPIGWPLKR donde se presenta la posible interacción con el dendrímero PAMAM utilizando un método de análisis conformacional y de interacción por mecánica molecular (MMFF).

En la tabla 9, para la hidrólisis de glutelinas con *Bacillus licheniformis*, sólo se detectaron 2 secuencias de péptidos. En este análisis es importante tener en cuenta que la secuencia “A” (LVLSHVPLVQEIFGLR) contienen Arg como en los casos anteriormente presentados. Así mismo en la cadena “A” un extremo presenta leucina, si bien no presentó relevancia en las determinaciones teóricas, se nota que experimentalmente sí existe una relación entre las interacciones dendrímero-leucina. Para determinar esto posiblemente se puedan realizar cálculos más finos con estructuras peptídicas donde se presenten uno o más fragmentos de leucina en



Finalmente se tiene un análisis de hidrólisis con la proteína total donde se involucran todas las fracciones de proteínas de la semilla de amaranto, este resultado se obtuvo al realizar la hidrólisis con *Bacillus licheniformis* (Barba-De La Rosa A. et al. 2010). La Secuencia de interés en este caso fue la “C” (VFSLLMLLTQAR, referencia UNIPROT: A0A654ECW5) que se muestra en la tabla 10, donde se tiene un péptido con un extremo terminal de valina y por el otro de arginina. Con esto se valida que los resultados teóricos si tienen alta correspondencia en la selectividad de algunas secuencias al estar en contacto con el dendrímero PAMAM. También se puede afirmar que la lisina si presenta una buena interacción en la mayor parte de las estructuras identificadas tras la captura por el péptido, abriendo un nuevo estudio donde se puedan determinar nuevos parámetros para estudiar estas interacciones de forma más detallada.

Tabla 10. Secuencias detectadas por el espectrómetro de masas para los diferentes péptidos capturados por el biomaterial tras la hidrólisis de la proteína total de amaranto con *Bacillus Licheniformis*.

---

SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DETECTADAS ( <i>Bacillus Licheniformis</i> -Proteína total ).
A) LILIFLSATLAGFFVLQK
B) VFSLLMLLTQARK
C) VFSLLMLLTQAR

---

En la figura 37 se aprecia una interacción importante con la periferia del dendrímero y un extremo del oligopéptido VFSLLMLLTQAR, para este caso se construyó y analizó la molécula por MMFF como en los casos previos. Se tiene una aproximación cercana a la posible interacción con valina y los anillos que se forman en la periferia del PAMAM para poder retener el péptido, cabe destacar que esta biomolécula también puede interactuar con el dendrímero por el extremo terminal de arginina (Buczowski A. et al. 2014).

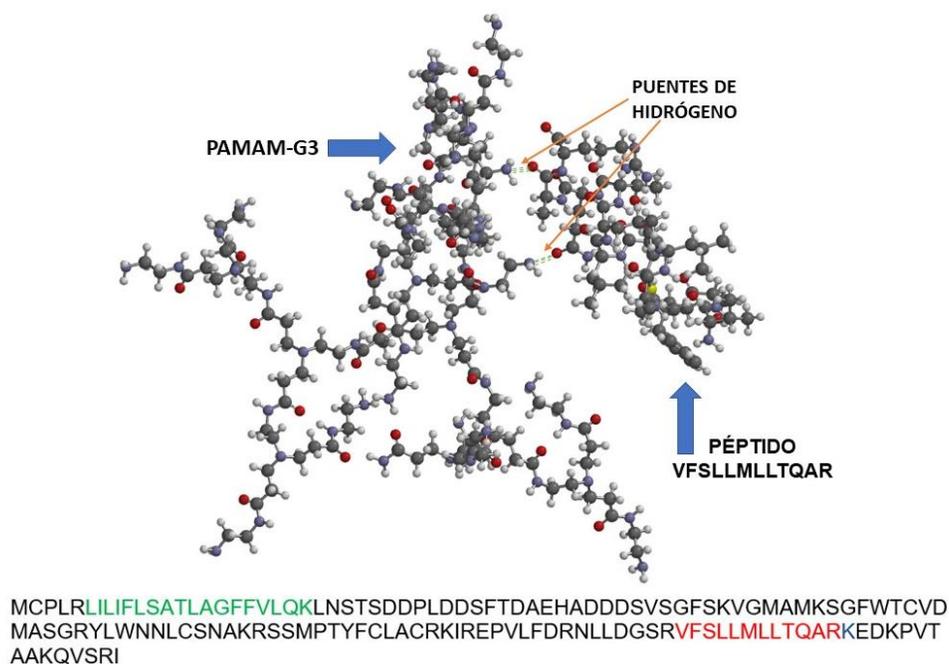


Figura 37. Secuencia de la proteína identificada en UNIPROT e interacción con el péptido VFSLMLLTQAR donde se presenta la posible interacción con el dendrímero PAMAM utilizando un método de análisis conformacional y de interacción por mecánica molecular (MMFF).

## 11. CONCLUSIONES

Este estudio se basó en modelos de teoría funcional de la densidad (DFT), identificando las principales interacciones intermoleculares y propiedades fisicoquímicas que se correlacionaron con estudios experimentales dendrímero-aminoácido y dendrímero-péptido, estableciendo así parámetros para la separación de biomoléculas con actividades funcionales. Los dendrímeros caracterizados por FT-IR se comparan con análisis teórico-experimental que permiten una identificación más precisa de las moléculas antes y después de tener diferentes interacciones con biomoléculas de bajo y alto peso molecular.

Según los cálculos mecánico-cuánticos, se observaron interacciones específicas entre el dendrímero y diferentes aminoácidos, dependiendo de la localización de los heteroátomos presentes en cada uno de ellos. Como resultado, se determinó que existe una fuerte interacción con aminoácidos como tirosina, valina o arginina con una elevada energía de estabilización del complejo, superior a 30 kcal/mol. Así mismo se realizó un escalamiento en el nivel de teoría que permite hacer estudios

con mejor precisión entre moléculas grandes o pequeñas de la misma naturaleza. Esto permite hacer determinaciones con un estudio teórico cada vez más fino que puede ser de gran ayuda para visualizar interacciones con moléculas más grandes con niveles de confianza altos, usando escalamientos. Los resultados teórico-experimentales nos permiten identificar con precisión la interacción aminoácido-dendrímico y en base a ese resultado ofrecer una perspectiva muy detallada de las posibles interacciones péptido-dendrímico. En este estudio la mejor interacción intermolecular se formó con los extremos terminales de cada péptido, dando energías superiores a 27 kcal/mol entre el complejo dendrímico-péptido con secuencias de 5 a 20 aminoácidos.

Con los estudios teóricos de interacción, se puede verificar que las predicciones para aminoácidos específicos como la arginina y la tirosina presentan fuertes interacciones con la molécula dendrítica. Esto permite atraer péptidos de forma más selectiva cuando esos aminoácidos están presentes en los extremos terminales. El estudio teórico se realizó considerando que las moléculas estudiadas se comportan como estructuras rígidas en el vacío, sin tener en cuenta los parámetros del disolvente ni los grados de libertad. A pesar de la diferencia de condiciones (teóricas vs experimentales), se observa que el método utilizado es válido para determinar las interacciones que se producen, abriendo la posibilidad de separar biomoléculas con alto valor añadido mediante interacciones selectivas con dendrímeros PAMAM. Finalmente, este estudio, motiva futuras investigaciones con el objetivo de desarrollar materiales específicos para realizar separaciones complejas reduciendo el costo y la cantidad de productos químicos necesarios. Eventualmente, esta línea de investigación podría facilitar una separación limpia y eficiente de biomoléculas con potencial biológico.

## REFERENCIAS:

- Ajaypal S., Hosahalli R. S., (2014).** "Effect of high-pressure treatment on trypsin hydrolysis and antioxidant activity of egg white proteins" *Int. J. of Food Sci. and Tech.* 49(1), 269-279.
- AOAC Official Methods of Analysis, (1990),** 15 ed. Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC.
- AOAC Official Methods of Analysis, (2015),** 20 ed. Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC.
- Arendt E., Zannini E., (2013).** "Cereal Grains for the food and Beverage Industries Woodhead". Publishing Limited Cap. 13, 439-472.
- Augustus E.N., Allen E.T., Nimibofa A., Donbebe W., (2017)** "A Review of Synthesis, Characterization, and Applications of Functionalized Dendrimers." *American Journal of Polymer Science.* 7(1): 8-14.
- Ayala Garay, A. V. (2014).** "La rentabilidad del cultivo de amaranto (*Amaranthus* spp.) en la región centro de México". *Cienc. Ergo Sum* 21, 47–54.
- Ayala-Niño A., Rodríguez-Serrano G.M., González-Olivares L.G., Contreras-López E., Regal-López P., Cepeda-Saez A., (2019).** "Sequence Identification of Bioactive Peptides from Amaranth Seed Proteins (*Amaranthus hypochondriacus* spp.)" *Molecules.* 21;24(17):3033.
- Balat M., (2011).** "Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review". *Energy Conversion and Management* 52, 858-875.
- Barba de la Rosa A.P., Gueguen J., Paredes-López O, Viroben G. (1992).** "Fractionation procedures, electrophoretic characterization and amino acid composition of amaranth seed protein". *J. Agric. Food Chem.* 40:931-936.
- Barba de la Rosa A. P., Barba Montoya A., Martínez-Cuevas P., Hernández-Ledesma B., Leon-Galvan M. F., De Leon-Rodríguez A.; Gonzalez C. (2010).** " Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amaranth peptides " *Nitric Oxide* 23(2), 106-111.
- Beezer A. E., King A. S. H., Martin I. K., Mitchel J. C., Twyma L. J., Wain C. F., (2003).** "Dendrimers as potential drug carriers; encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives, *Tetrahedron*". 59: 3873–3880.
- Becerra R. (2000).** "El amaranto: nuevas tecnologías para un antiguo cultivo". *Biodiversitas* 5(30):1-7.
- Becke A.D.,** "Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior", (1988) *Phys. Rev.*, 38: 3098–3100.
- Bewley J.D., Greenwood JS. (1990).** "Protein storage and utilization in sedes". En *Plant physiology, biochemistry and molecular biology.* David T Dennis and David H Tuppin (Ed). John Wiley. pp 456-469.
- Bindal S., Sharma S., Singh T.P., Gupta R. (2017).** Evolving transpeptidase and hydrolytic variants of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase from *Bacillus licheniformis* by targeted mutations of conserved residue Arg109 and their biotechnological relevance. *J Biotechnol.* 10;249:82-90.
- Boas U., Heegaard P. M., (2004).** " Dendrimers in drug research". *Chem. Soc. Rev,* 33, 43-63.
- Boas U., Söntjens S.H., Jensen K.J., Christensen J.B., Meijer E.W., (2002).** "New dendrimer-peptide host-guest complexes: towards dendrimers as peptide carriers" *Chembiochem.* May 3;3(5):433-9.
- Brandt A., Gräsvik J., Hallett J., Wellton T., (2013).** "Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids" *Green chemistry.* 15, 550-58.
- Buczowski A., Palecz B., (2014).** "Study of the interactions of PAMAM-NH<sub>2</sub> G<sub>4</sub> dendrimer with selected natural amino acids in aqueous solutions". *The J. of Chem. Therm.,* Volume 70, 95-100.

**Buczowski A., Urbaniak P., Belica S., Sekowski S., Bryszewska M., Palecz B., (2014).** "Formation of complexes between PAMAM-NH<sub>2</sub> G4 dendrimer and l- $\alpha$ -tryptophan and l- $\alpha$ -tyrosine in water" *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Volume 128 , 647-652.

**Castro R., Forero-Doria O. and Guzman L., (2017).** "Perspectives of Dendrimer-based Nanoparticles in Cancer Therapy" *An Acad Bras Cienc.*, Online version ISSN 1678-2690

**Calabretta M. K., Kumar A., McDermott A. M., & Cai C., (2007).** "Antibacterial Activities of Poly(amidoamine) Dendrimers Terminated with Amino and Poly(ethylene glycol) Groups", *Biomacromolecules*. 8 6: 1807–1811.

**Chamú-Muñoz A., Hernández-Meléndez, O., Hernández-Luna M., Alcaraz-Cienfuegos M., Vivaldo-Lima E. and Bárzana E., (2015).** "Ethylene Carbonate used as Reagent and Green Solvent in the Chemical Modification of Corncob" *Macromol. Mater. Eng.*, 300, 810–822.

**Chen W., Tomalia D. A., Thomas J. L., (2000).** " Unusual pH-Dependent Polarity Changes in PAMAM Dendrimers: Evidence for pH-Responsive Conformational Changes". *Macromolecules* 33(25), 9169-9172

**Chun C., Mouming Z., Boen Y. Yuanhong Z., Jiaoyan R., (2013).** " Effect of pH and Pepsin Limited Hydrolysis on the Structure and Functional Properties of Soybean Protein Hydrolysates" *J. of Food Sci.*, 78(12), C1871-C1877.

**Cuervo L., Folch, J.L., Quiroz, R.E., (2009).** "Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol." *bio-Tecnología* vol.13, tomo3.

**Cuevas G. y Cortés F., (2003),** "Introducción a la química computacional" Fondo de Cultura Económica. 1ª. Edición, 172 pp.

**D'Emanuele A., Attwood D., (2005).** "Dendrimer–drug interactions". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 57, 2147-2162.

**Desiraju G.R., Steiner T., (2001).** "The Weak Hydrogen Bond n Structural Chemistry and Biology" . *Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 1, Oxford University Press: Oxford and New York, ISBN 0-19-850252-4

**Douat-Casassus C., Darbre T., and Reymond J.L., (2004).** "Selective Catalysis with Peptide Dendrimers" *J. Am. Chem. Soc.* 126, 25, 7817–7826.

**Dalton, W.J.S. (1973).** "Amaranthus edulis: A high lysine grain amaranth". *World Crops* 25:20.

**Dziuba J, Iwaniak A, Minkiewicz P., (2003).** "Computer-aided characteristics of proteins as a potential precursor of bioactive peptides". *Polimery* 48(1): 50- 53.

**Esquivel R.O., Flores-Gallegos N., Carrera E.M., Dehesa J.S., Angulo J.C., Antolín J. & Soriano-Correa C., (2009).** "Theoretic-information entropies analysis of nanostructures: ab initio study of PAMAM precursors and dendrimers G0 to G3", *Molec. Sim.*, 35, 6: 498-511.

**Fatemi S.M., Fatemi S.J. & Abbasi Z., (2020).** "PAMAM dendrimer-based macromolecules and their potential applications: recent advances in theoretical studies" *Polym. Bull.* 77: 6671–6691.

**FAO., (2011).** "Special Report. Dietary protein quality evaluation in human nutrition, Report" o fan FAO expert consultation 92. 1014-1099.

**Francesca-Ottaviani M., Jockusch S., Turro N., Tomalia D.A., and Barbon A., (2004).** "Interactions of Dendrimers with Selected Amino Acids and Proteins Studied by Continuous Wave EPR and Fourier Transform EPR". *Langmuir*. 20, 23: 10238-10245.

**Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Petersson G. A., Nakatsuji H., and others, in Gaussian 16, revision A. 031; (2016).** Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA.

**García M. T., Conesa A., Østergaard P., Kauppinen S., Williamson G., (2001).** "Hydrolysis of diethyl diferulates by a tannase from *Aspergillus oryzae*". *Carbohydrate Polym.*, 44: 4, 319-324.

**Ghazzali I., (2016),** "Los dendrímeros y la química click. empleo en VIH" Universidad de Sevilla, 40 pp.

**Gonzalo T., Muñoz-Fernández A., (2009).** "Dendrímeros y sus aplicaciones biomédicas". Laboratorio de InmunoBiología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

**Grupo Enlace de Amaranto Mexicano** [grupoamarantomexicano.wordpress.com](http://grupoamarantomexicano.wordpress.com)

**Guzmán-Maldonado H, Paredes-López O. (1998).** "Production of high-protein flours as miik substitutas, functional properties of proteins and lipids". Cap. 5. ACS Symnposium Series.

**Han L., Huang R., Liu S., Huang S., Jiang C., (2010),** "Peptide-Conjugated PAMAM for Targeted Doxorubicin Delivery to Transferrin Receptor Overexpressed Tumors" *Molecular Pharmaceutics* 7(6), 2156-2165.

**Hariharan P. C., Pople J. A.,** "The Influence of Polarization Functions on Molecular Orbital Hydrogenation Energies", (1973). *Theoret. Chim. Acta (Berl.)*, 28: 213-222.

**Hendriks G., Zeeman G., (2009).** "Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass." *Bioresource Technology* 100, 10-18.

**Hu J., Li H., Zhou Z., Yang Z., Cheng T., Fang X., (2009).** "Quantum chemistry study of the PAMAM dendrimer" *Jisuanji Yu Yingyong Huaxue*, 26, 807-810.

**Huerta-Ocampo J.A., Barba De La Rosa A.P. (2011).** "Biochemical and structural characterization of amaranth seed storage proteins". *Amaranto Ciencia y Tecnología* 2012, 293-302.

**Hwang S. H., (2007).** Shreiner C. D., Charles N. Moorefield and Newkome G.R., "Recent progress and applications for metal dendrimers" *New J. Chem.*, 31, 1192–1217.

**Jayaraman, K. (2003).** "Manufacturing sisal–polypropylene composites with minimum fibre degradation". *Composites Science and technology* 63, 367-374.

**Jiangqi Z., Xiaofang Z. Xu H., Meijie X., Wei Z., and Canhui L., (2015).** "A super biosorbent from dendrimer poly(amidoamine)-grafted cellulose nanofibril aerogels for effective removal of Cr(vi)" *J. Mater. Chem. A*, 3, 14703-14711.

**Jiménez A., Gavín B., Alderete B. (2012).** "Scaling trend in diffusion coefficients of low generation G0–G3 PAMAM dendrimers in aqueous solution at high and neutral pH". *Structural Chemistri* 23:123–128.

**Jiménez F.-Colmenero F., (2013).** "Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods". *Food Research International*, 52(1), 64-74.

**Kannaiyan D., Imae T., (2009).** "pH-Dependent Encapsulation of Pyrene in PPI-Core:PAMAM-Shell Dendrimers" *Langmuir* 25(9), 5282-5285.

**Kawaguchi T., Walker K. L., Wilkins C. L., Moore J. S., (1995).** "Rapid Synthesis of Dendrimers by an Orthogonal Coupling Strategy". *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 2159–2165.

**Kawaguchi T., Walker K. L., Wilkins C. L., Moore J. S., (1995).** "Rapid Synthesis of Dendrimers by an Orthogonal Coupling Strategy" ,*J. Am. Chem. Soc.*, 117, 2159–2165.7

**Kirkpatrick J., Mcmorrow B., Turban D., Gaunt A.L., Spencer J.S., Matthews A., Obikalouis A., Thiry L., Fortunato M., Cohen A.J., (2021).** "Pushing the frontiers of density functionals by solving the fractional electron problem" *Science*, 374, 6573: 1385-1389.

**Klajnert B., Cangiotti M., Calici S., Majoral J.P., Caminade A.M., Cladera J., Bryszewska M., Ottaviani M.F., (2007).** "EPR study of the interactions between dendrimers and peptides involved in Alzheimer's and prion diseases" *Macromol Biosci. Aug* 7;7(8):1065-74.

**Kohn W., Becke A.D., Parr R.G.,** "Density Functional Theory of Electronic Structure", (1996). *J. Phys. Chem.*, 100: 12974-12980.

**Lee C., Yang W., Parr R.G.,** "Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density", (1988) *Phys. Rev.*, B 37: 785–789.

**Lee I., Athey B. D., Wetzell A. W., Meixner, W. B., James R. Jr., (2002),** “ Structural Molecular Dynamics Studies on Polyamidoamine Dendrimers for a Therapeutic Application: Effects of pH and Generation” *Macromolecules* 35(11), 4510-4520.

**Li-Chan E. (2015)** “Bioactive peptides and protein hydrolysates: Research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients”. *Current Opinion in Food Science*, 1(1), 28-37.

**Liu Y., Bryantsev V.S., Diallo M.S, Goddard W.A., (2009)** “PAMAM Dendrimers Undergo pH Responsive Conformational Changes without Swelling” *J. Am. Chem. Soc.*, 131, 8: 2798-9.

**Lloyd J. R., Jayasekara P. S., & Jacobson K. A.,** “Characterization of polyamidoamino (PAMAM) dendrimers using in-line reversed phase LC electrospray ionization mass spectrometry”, **(2016)**. *Anal. Meth.: advancing methods and applications.*, 8, 2: 263–269.

**Maiti P. K., Cagin, Tahir L., Shiang T., Goddard W., (2005).** “Effect of Solvent and pH on the Structure of PAMAM Dendrimers”. *A. Macromolecules* 38(3), 979-991.

**Maingi V., Kumar M., Venkata S., Maiti P. K., (2012).** “ PAMAM Dendrimer-Drug Interactions: Effect of pH on the Binding and Release Pattern” *Journal of Physical Chemistry B* 116(14), 4370-4376.

**Milowska K., Rodacka A., Melikishvili S., (2021)** “Dendrimeric HIV-peptide delivery nanosystem affects lipid membranes structure”. *Sci. Rep.* 11, 16810.

**Montoya-Rodríguez A., Milán-Carrillo, J., Reyes-Moreno, C. & de Mejía, E. G. (2015).** Characterization of peptides found in unprocessed and extruded amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) pepsin/pancreatin hydrolysates. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 8536–8554.

**Morar C., Lameiras P., Bende A., Katona G., Gál E. and Darabantu M., (2028).** “ Design, synthesis and structure of novel G-2 melamine-based dendrimers incorporating 4-(n octyloxy)aniline as a peripheral unit ” *Beilstein J. Org. Chem.* 14, 1704–1722.

**Nishiyama N., Jang W.D., Kataoka K., (2007).** “Supramolecular nanocarriers integrated with dendrimers encapsulating photosensitizers for effective photodynamic therapy and photochemical gene delivery” *New. J. Chem.*, 31, 1074–1082.

**Osborne T.B., (1924).** “The vegetable proteins”. *Monographas in Biochemistry*, 2nd ed. Longmans, Green and Co., New York. 25.

**Paredes-López O., Barba de la Rosa, A. P., Hernandez-López, D., Carabez-Trejo, A. (1990).** “Amaranto: características y aprovechamiento industrial”. *Amaranto Ciencia y Tecnología* 2012, 315-330.

**Parr R. G., (1989).** “In Density–functional theory of atoms and molecules”, Oxford University Press, NY, USA, , pp. 1-333.

**Pecoraro É., Manzani D., Messaddeq Y., Ribeiro S. J., (2008).** “Bacterial cellulose from *glucanacetobacter xylinus*: preparation, properties and applications”. *Monomers, polymers and composites from renewable resources*, 17, 369-383.

**Prakash S., Kumar A., Gautam-Madhu T., (2013).** “Synthesis and Analytical Characterization of Ester and Amine Terminated PAMAM Dendrimers” *Global Journal of Medical research Pharma, Drug Discovery, Toxicology and Medicine*, Volume 13, 2249-4618.

**Politzer P., Laurence P.R., Jayasuriya K., (1985).** “Molecular Electrostatic Potentials: An Effective Tool for the Elucidation of Biochemical Phenomena” *Environmental Health Perspectives* Vol. 61, 191-202.

**Pregon agropecuario®** “Variedades y propiedades del amaranto” imagen tomada 02-01-2023. <https://www.pregonagropecuario.com/cat.php?txt=777>

**Qiu Z., Huang J., Liu L., Li C., Cohen S., Martien A., Wang J., (2020),** “ Effects of pH on the Formation of PIC Micelles from PAMAM Dendrimers” *Langmuir* 36(29), 8367-8374.

**Rajeev K., and Shridhar R. (1990)** “Maximal and minimal characteristics of molecular electrostatic potentials” *J. Chem. Phys.* 93, 1770.

**Rutherford-Markwick K.J., Moughan P.J., (2005).** “Bioactive peptides derived from food”. *Journal of AOAC International.* 88(3):955-966.

**Reis P. B. P., Vila-Viçosa D., Campos S., Baptista A. M., and Machuqueiro M., (2018)** “Role of Counterions in Constant-pH Molecular Dynamics Simulations of PAMAM Dendrimers”. *ACS Omega*, 3, 2001–2009.

**Rodríguez A., González de Mejía E., (2008).** “Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:1233-1240.

**Rostami I., Zhao Z., Wang Z., Zhang W., Zhong Y., Zeng Q., Jia X., Hu Z., (2016),** “ Peptide-conjugated PEGylated PAMAM as a highly affinitive nanocarrier towards HER2-overexpressing cancer cells” *RSC Advances* 6(109), 107337-107343.

**Roy D., Dennington I.I., Todd A. Keith and John M. Millam,** “GaussView 6.0.16 (64-bit Windows)” (2000-2016). Copyright (c) Semichem, Inc.

**Sánchez C., (2007)** “Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado en San Luis Potosí” TESIS de doctorado IPICYT San Luis Potosí.

**Sánchez O. J., Cardona C.A., (2008).** “Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feed stocks.”. *Bioresource Technology* 99, 5270-5295.

**Santos J. L., Pandita D., Rodrigues J., Pego A. P., Granja P. L., Balian G., Tomas H., (2010).** “Receptor-Mediated Gene Delivery Using PAMAM Dendrimers Conjugated with Peptides Recognized by Mesenchymal Stem Cells “ *Molecular Pharmaceutics* 7(3), 763-774.

**Saunders R.M, Becker R. (1984).** “Amaranthus: A potencial food and feed resource”. *Advances in Cereal Science and Technology.* Y. Pomeranz Ed. Vol. 6, Cap. 6, p. 357-397.

**Serrano J. L., Marcos M., (2009).** “Esquema de los algunos procedimientos de síntesis de polímeros dendríticos” *Anales. RSEQ.*

**Silva-Sanchez C., (2007).** “Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (*A. Hypochondriacus*) cultivado en San Luis Potosí”. Tesis de doctorado IPICYT.

**Silva-Sánchez C., Barba de la Rosa A. P., León-Galván M. F., de Lumen B. O., De León-Sabbione A. C. Nardo A. E., Anon M. C., Scilingo A., (2016),** “Amaranth peptides with antithrombotic activity released by simulated gastrointestinal digestion “ *Journal of Functional Foods* 20, 204-214.

**Stallknecht G.F., Schulz-Schaeffer J.R., (1993).** “Amaranth rediscovered”. *New crops.* J. Janick and J.E. Simon (eds.), p. 211-218. Wiley, New York.

**Suarez D., (2012)** “Objetivos y características de la química computacional y su aplicación al estudio de los materiales de carbono”. *Dialnet*, 25, 23-28.

**Taghavi P., Negar M., Pelin G., (2014),** “Bioapplications of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers in nanomedicine” *Journal of Nanoparticle Research* 16(4), 2342/1-2342/38, 38 pp.

**Tomalia, D.A. (1995).** “Dendrimer molecules.”. *Scientific. American.* 272, 62–66

**Tomalia D. A., (1996).** “Starburst dendrimers — Nanoscopic supermolecules according to dendritic rules and principles”. *Macromol. Symp.* 101, 243–255.

**Tomalia D. A. (2005)** “The dendritic state”. *Materials Today*, 8: 34–36.

**Tomalia, D.A., Backer H; Dewald J; Hall; Kallos G; S Martín, Roeck J; Smith P. (1985),** “A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules.” *Polimer Journal.* 17, 117–132.

**Tomalia D. A., Frechet JMJ., (2002),** Discovery of dendrimers and dendritic polymers: a brief historical perspective. *J Polym Sci A Polym Chem.* ; 9:2719–2728.

**Vela A. (2016).** “Logros y perspectivas de la química teórica” *Educación química*, 27, 278-285.

Venskutonis, P. R. & Kraujalis, P. Nutritional Components of Amaranth Seeds and Vegetables: A Review on Composition, Properties, and Uses. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **12**, 381–412 (2013).

**Vögtle F., Gestermann S., Hesse R., Schwierz H., Windisch B., (2000).** "Functional dendrimers". Prog. Polym. Sci. 25 (2000) 987–1041.

**Webster J., Oxley D., (2012).** "Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry" Methods in Molecular Biology (New York, NY, United States) 800, 227-240.

**Wolski P., Panczyk T.J., (2019)** "Conformational Properties of PAMAM Dendrimers Adsorbed on the Gold Surface Studied by Molecular Dynamics Simulation" Phys. Chem. C., 123, 36: 22603–22613.

**Wooley K. L., Hawker C. J., Fréchet J. M. J., (1991),** "Design, Synthesis, and Properties of Dendritic Macromolecules". J. Am. Chem. Soc. 113, 4252–4261.

**Yang T., Hu Q., Liu Y., (2023).** "Biochemical characteristics and potential application of a thermostable starch branching enzyme from *Bacillus licheniformis*". AMB Express 13, 8.

**Zarco M., (2010).** "Obtención mediante el protocolo de la química verde de diindolilmetanos derivados del ácido fenilborónico". TESIUNAM, 118 pp.

## ANEXO 1.

# Códigos de Aminoácidos

<b>Aminoácido</b>	<b>Código de tres letras</b>	<b>Código o una letra</b>	<b>Aminoácido</b>	<b>Código de tres letras</b>	<b>Código o una letra</b>
Alanina	<b>Ala</b>	<b>A</b>	Leucina	<b>Leu</b>	<b>L</b>
Arginina	<b>Arg</b>	<b>R</b>	Lisina	<b>Lys</b>	<b>K</b>
Asparagina	<b>Asn</b>	<b>N</b>	Metionina	<b>Met</b>	<b>M</b>
Aspártico	<b>Asp</b>	<b>D</b>	Fenilalanina	<b>Phe</b>	<b>F</b>
Cisteina	<b>Cys</b>	<b>C</b>	Prolina	<b>Pro</b>	<b>P</b>
Glutámico	<b>Glu</b>	<b>E</b>	Serina	<b>Ser</b>	<b>S</b>
Glutamina	<b>Gln</b>	<b>Q</b>	Treonina	<b>Thr</b>	<b>T</b>
Glicina	<b>Gly</b>	<b>G</b>	Triptófano	<b>Trp</b>	<b>W</b>
Histidina	<b>His</b>	<b>H</b>	Tirosina	<b>Tyr</b>	<b>Y</b>
Isoleucina	<b>Ile</b>	<b>I</b>	Valina	<b>Val</b>	<b>V</b>



Cite this: *New J. Chem.*, 2023, **47**, 12170

## Theoretical–experimental prediction of the selectivity between polyamidoamine dendrimers and bioactive peptides derived from amaranth seeds†

Alejandro Fajardo De La Rosa,<sup>a</sup> Oscar Hernández-Meléndez,<sup>a</sup> J. Manuel Saniger-Blesa,<sup>b</sup> Ma. Inés Nicolás-Vázquez<sup>b,c</sup> and Eduardo Bárzana<sup>b,d</sup>

Seed proteins, especially those of amaranth, are characterized using different peptides with important biological functions. The aim of this work is to describe, at a theoretical–experimental level, the selective separation of encrypted peptides with high-added value. The interactions between amino acid–PAMAM and peptide–PAMAM were determined using quantum chemistry and instrumental techniques of structural analysis, with the obtained results showing correlation between both methods of identification and characterization. The molecular properties of amino acids, peptides (models) and PAMAM were determined using density functional theory (DFT), specifically B3LYP and the 6-31G(d,p) basis set. The synthesis of the dendrimer (PAMAM) was carried out by optimizing the traditional process to reduce cost and waste generation. The analysis of the vibrational frequencies between tyrosine and PAMAM using the DFT method correlated satisfactorily with the experimental data. The interaction energy of the most stable complexes was between those of the first generation PAMAM dendrimer, the amino acid tyrosine and the PAMAMAM–YLAGKPGQEH peptide, with a value of  $-31.25 \text{ kcal mol}^{-1}$  and  $-27.19 \text{ kcal mol}^{-1}$ , respectively. Likewise, the molecular electrostatic potential map and the intermolecular hydrogen bonds allowed visualizing the interactions between the captured atoms (amino acids and peptides) and the synthesized PAMAM. This work showed evidence at the molecular level of selectivity of encrypted oligopeptides. The theoretical study was determined to define the types of peptides that could interact with PAMAM after enzymatic hydrolysis, as well as the type of interaction, and the atoms involved in the formation of a dendrimer–peptide complex. Subsequently, at the experimental level, these residues were mapped by mass spectrometry in a MALDI-TOF detector, having results that can be homologated with the theoretical results. This study opens the door to novel studies for the separation of bioactive peptides.

Received 22nd March 2023,  
Accepted 22nd May 2023

DOI: 10.1039/d3nj01344h

rsc.li/njc

### Introduction

Amaranth plants can grow in arid environments, saline soils and under reduced rainfall conditions. Its cultivation is widespread in Mexico due to its vast regions under these conditions.<sup>1,2</sup>

To date, three types of amaranth species are known that can produce seeds with nutritional values: *hypochondriacus*, *cruentus* and *caudatus*, where the first two originated in Mexico and the third one in South America. The most representative molecules for which biological potential has been demonstrated in amaranth sequences are considered as antihypertensive, antioxidant, embryotoxic, immunostimulant, opioid, immunomodulatory, antithrombotic, anti-amnesic, *etc.*<sup>3–5</sup> The Nutrisol Seed is part of the *hypochondriacus* variety and has been purified over time; currently, it is classified as highly pure.<sup>1</sup> The approximate composition of these seeds are in the range of 13–15% of protein, 2.5–5.8% of fiber and 6.5–8.5% of lipids rich in unsaturated fatty acids such as oleic, linoleic, linolenic and squalene.<sup>6</sup>

Amaranth proteins can be classified based on their location, biological functions, solubility in different solvents, or their mixtures, for example, albumins (soluble in water), prolamins

<sup>a</sup> Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

<sup>b</sup> Departamento de Micro y Nanotecnología, Instituto de Ciencias Aplicadas y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

<sup>c</sup> Departamento de Ciencias Químicas, Campo 1, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México. E-mail: nicovain@yahoo.com.mx

<sup>d</sup> Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d3nj01344h>

(soluble in alcoholic solutions), glutelins (soluble in acidic or basic solutions), and globulins (soluble in saline solutions).<sup>3,4</sup> There are currently different extraction and characterization strategies for these proteins, as well as their valuable encrypted peptides.<sup>7</sup> Due to the fact that these extraction methods are expensive and of low yield, in the first stage of this research, a selective separation strategy is proposed based on a theoretical methodology that describes intermolecular interactions between biomolecules (models), focusing on chemical and structural properties, and monodisperse (modifiable) dendrimers of PAMAM.<sup>7,8</sup> It should be noted that to date, there are few reports about the use of a PAMAM peptide dendrimer system for the separation of such complex systems derived from hydrolyzed amaranth proteins.<sup>9</sup> The objective of this work is to theoretically determine the interactions that could be established with the various terminal amino groups present on the periphery of the dendrimer. This information will be useful to develop methodologies for the selective separation of functional peptides and give way to continuous processes to purify these peptides with high performance.

## Methods

### Prediction of active peptides in amaranth reserve proteins

Protein sequences reported for this amaranth variety were searched at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> and analyzed to obtain the profile of active peptides.<sup>10</sup> The search methods were performed with search engines, and the hydrolysis of amaranth reserve proteins was taken as a reference.

The bioactive peptides selected were those consisting mainly of 3 to 20 amino acids and sequences with high biological activity.<sup>11–13</sup> The methods used in bioactive peptide studies are based on laboratory tests to demonstrate their activity and as a benchmark for the search.<sup>14,15</sup> Extraction strategies include enzymatic digestion, chemical hydrolysis, either acid or alkaline, and their purification to proceed to the determination of their biological activity.<sup>15,16</sup>

### General synthesis of the PAMAM dendrimer with 4–32 terminal amino groups (EG 1.0–EG 3.0)

The synthesis of the dendrimers was carried out following a divergent approach already reported<sup>9</sup> that was hereby improved and optimized. This process was performed using 18 equivalents of ethylenediamine for each ester group to be substituted, following a traditional divergent synthesis methodology.<sup>9</sup>

To prepare the 0.5 generation dendrimer (EG 0.5), methyl acrylate (14.3 g, 0.166 mol) was slowly added to a solution of ethylenediamine (2.0 g, 33.3 mmol) in methanol (30 mL). The reaction was stirred for 48 hours in the absence of light in a bath at 20 °C. Excess reagents and solvents were removed under vacuum.

To prepare the 1.0 generation dendrimer, the ester-terminated dendrimer (2.0 g, 4.95 mmol) was dissolved in methanol (20 mL) and an ethylenediamine solution (22.3 g, 0.371 mol in 30 mL methanol) was added dropwise with stirring. The resulting solution was stirred for 5 days (in the absence of light) in a bath

at 20 °C. Excess ethylenediamine and solvents were removed as mentioned. These steps were repeated, increasing the amounts of methyl acrylate, ethylenediamine and reaction times until generation 3.0 of the PAMAM dendrimer was obtained.<sup>17</sup> All infrared spectra were recorded on a PerkinElmer ATR-FTIR Spectrum 400 instrument from liquid thin films on the diamond surface.

### Dendrimer–amino acid activity

In the first stage, the interaction of different amino acids with the PAMAM dendrimer was evaluated, 1 g of dendrimer and a water solution of each of the amino acids (1 mg mL<sup>-1</sup>) were placed separately in a methanol medium (99%) and stirred for 5 min. The pH of the medium was then adjusted to pH 10 with 1 M NaOH. The excess solvent was evaporated, washed with methanol (pH = 10) three times (3 mL),<sup>18</sup> and stored at 0 °C. To determine the amino acid/dendrimer interactions, FT-IR spectra were recorded on a PerkinElmer Spectrum 400 ATR mid-far infrared instrument from liquid thin films on the ATR diamond surface.

### Computational study interaction test

Peptide and dendrimer models were simulated in SPARTAN'06<sup>®</sup>. Conformational analysis was performed using molecular mechanics and a semi-empirical method (PM3)<sup>19</sup> to obtain a conformer of maximum stability with which the optimization process was started. Subsequently, a theoretical study was carried out at the quantum level, using density functional theory (DFT),<sup>20,21</sup> specifically with the hybrid functional B3LYP which includes a mixture of Hartree-Fock exchange and DFT exchange-correlation,<sup>22,23</sup> and 6-31G(d,p) set basis that contains polarized d and p functions on carbon and oxygen atoms,<sup>24,25</sup> using the GAUSSIAN'16<sup>®</sup> program.<sup>26</sup> The interactions were analyzed with theoretical methods for the PAMAM dendrimers with some amino acids present in the reserve proteins of the amaranth with the aim of obtaining a specific approximation of the dendrimers' affinity with said amino acids.<sup>27,28</sup> The electronic distribution of the geometrically optimized molecule closely agrees with that obtained experimentally and allows for the definition of the most stable conformer. The selected geometry was characterized by its space coordinates to calculate the vibration frequencies with the same level of theory.<sup>25</sup>

The vibrational frequencies obtained in the form of an interferogram were visualized with GAUSSVIEW6<sup>®/29</sup> to transform the signals into transmittance bands of approximate intensity, using the same functions as in the optimization of the molecules.<sup>27</sup> Once an adequate spectrum was obtained, we proceeded to perform scaling to make a mathematical adjustment for the level of error that occurs during the calculations. The maps of the molecular electrostatic potential for the most representative interactions were generated from the selection of the best optimization and interaction energies between the dendritic macromolecule and the biomolecules.<sup>30</sup> These were again visualized with GAUSSVIEW6<sup>®</sup>.

### 2.4 Hydrolysis of 11 S globulins and peptide capture by the PAMAM dendrimer

The protein fractions were extracted by adjusting the pH with different buffer solutions, using a 1:10 (w:v) amaranth flour:

solution, and following the protocol previously described with some modifications.<sup>4</sup> The albumins were extracted in water at 4 °C for 2 h in a bath, sonicated for 30 min and centrifuged at 4000 rpm for 30 min. The resulting pellet was resuspended in a buffer solution (NaCl 0.1 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.01 M, EDTA 1 mM, pH 7.5) to obtain the 7S globulin fraction that was sonicated and centrifuged under the same conditions. The pellet was resuspended in a similar solution that contained 0.8 M NaCl, shaken, sonicated, and centrifuged to obtain the 11S globulin fraction. The last fraction obtained was digested with *Bacillus licheniformis* endopeptidase, that selectively hydrolyzes the peptide on the Lys, Arg and Tyr residues (10 µg of protease/100 µg of protein). Hydrolysis was conducted at 36 °C for 12 h.<sup>3,31</sup>

#### Mapping of amaranth peptide masses by MALDI-TOF and the PAMAM-peptide interaction by MMFF

The hydrolysates obtained after digestion with protease were analyzed by MALDI-TOF spectroscopy in a Synapt G2 apparatus equipped with a high-definition ion detector. The following parameters were used: linear mode of operation, positive polarity, and a 100–10 000 *m/z* range.<sup>32</sup> After obtaining the results by mass spectrometry, an interaction analysis was carried out for the dendritic molecule and the peptide by molecular mechanics MMFF that describes “Characterization of MMFF94, MMFF94s, and other widely available force fields for conformational energies and for intermolecular-interaction energies and geometries”<sup>33</sup> simulated in SPARTAN’06<sup>30</sup>.

## Results and discussion

#### FT-IR experimental study: PAMAM dendrimers, PAMAM-amino acids

The synthesis of the dendrimers was successfully carried out with yields greater than 95% following the optimized synthesis proposal.<sup>9</sup> Our synthetic approach provides dendrimer molecules with the same structural characteristics as the ones reported for

the traditional route<sup>9</sup> but with higher yields. The experimental IR spectra for molecules from generation 1.0 to 3.0 are shown in Fig. 1. It can be seen that the characteristic bands for the different generations of the PAMAM dendrimers are quite similar in shape and the wave number maxima, while their intensities increase with the generation number of the dendrimer, since they have identical functional groups but in different amount for each successive generation.<sup>9</sup> Following the Lambert-Beer law, the increase in the band area for each spectrum is associated with an increase in the number of functional groups between generations. Therefore, the generation 1 dendrimer (EG1.0) was taken as the basis to refer to all generations of dendrimers in theoretical-experimental studies.<sup>9,28</sup>

#### Theoretical study

Once the generation 1 dendritic molecule was selected, a set of conformers with the best spatial distribution was obtained.<sup>34</sup> When the re-optimization process was complete, the conformer with the lowest energy state (EG1.0) was chosen for the theoretical calculations. Fig. 2 shows the optimized structure of the EG1.0 conformer, from which theoretical vibrational frequencies were calculated.<sup>35</sup>

Fig. 3 shows the comparison between the experimental IR spectrum and theoretical interferogram of the Generation 1 PAMAM dendrimer. Interferogram and theoretical IR spectrum were obtained from the EG1.0 conformer, which allowed each vibration to be identified specifically and to determine whether the dendrimer complies with the expected characteristics (without precursor intermediaries).<sup>36,37</sup> The analysis carried out by DFT confirmed that the molecule of generation 1.0 corresponds to the signals, vibrations and functional groups corresponding to each band of the experimental spectrum.

The frequencies obtained in the theoretical spectra were scaled with a correction factor of 0.961 with respect to “NIST, 2016”,<sup>37</sup> which were compared with the main experimental vibration frequencies (Table 1), resulting in a very significant

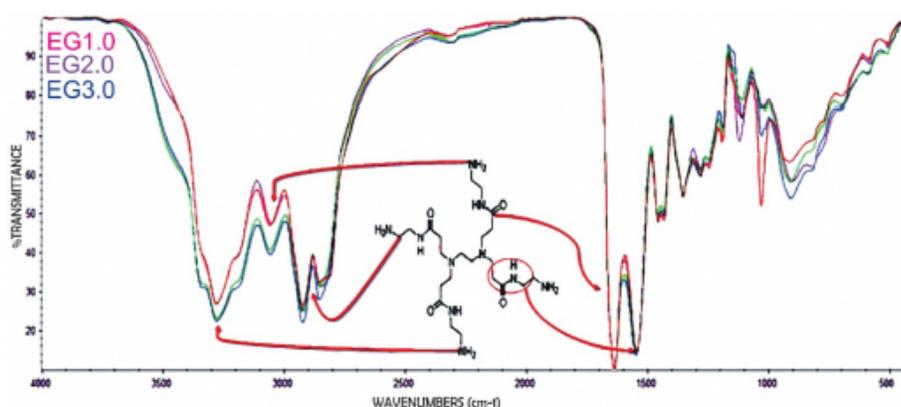


Fig. 1 FT-IR spectra for the PAMAM dendrimer series (generation structure (EG1)–3) with terminal amino groups. For these molecules, the analysis was generated under the same environmental conditions and with the same number of scans.

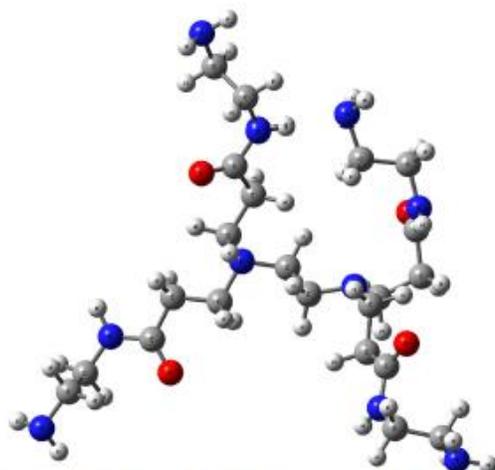


Fig. 2 EG1.0 molecule optimized at the B3LYP/6-31G(d,p), where the most stable energy distribution can be seen that later will serve to determine its interaction with some biomolecules.

correlation between both methods. As can be seen in Table 1, the difference between experimental and calculated frequencies does not vary. Likewise, the calculated and corrected frequencies were quite close to the absorption intervals established for the different functional groups.<sup>38,39</sup> The most notable difference between both types of frequencies is attributed to the correction factor with which it is scaled and to the method used. Considering that the calculations are carried out in the gas phase and with isolated molecules, it implies that at the theoretical level, not all the interactions of the molecule would be present. For this reason, there are well-defined smooth

**Table 1** Comparison of theoretical–experimental frequencies, for the EG1.0 dendrimer, where the experimental spectra are made in thin films on a diamond sample holder with a sweep from 4000  $\text{cm}^{-1}$  to 400  $\text{cm}^{-1}$ . The theoretical spectra are developed under DFT using a functional hybrid B3LYP and a 6-31G(d,p) base set

Band	Experimental ( $\text{cm}^{-1}$ )	Theoretical scaling ( $\text{cm}^{-1}$ )	% Error
NH <sub>2</sub> (asymmetric)	3282.28	3303.09	0.99
NH <sub>2</sub> (symmetrical)	3060.20	3088.49	0.99
CH <sub>2</sub> (asymmetric)	2926.85	2873.56	1.01
CH <sub>2</sub> (symmetrical)	2857.74	2811.68	1.01
C=O	1640.10	1657.89	0.96
RCONHR' (in the plane)	1550.30	1497.51	1.03

%Error, where Exp corresponds to 100%.

bands in the theoretical spectrum and wide overlapping bands in the experimental spectrum.<sup>34,35</sup>

With the calculations of the characteristic parameters in the PAMAM molecules, the interaction of different amino acids with the dendritic molecule was theoretically and experimentally determined. This was based on the analysis of the whole series of essential amino acids, taking the ones with the best intermolecular interaction energy.<sup>39–43</sup> PAMAM dendrimers have a significant affinity with some amino acids to form complexes with high strength of attraction and with stability.<sup>43</sup> Table 2 shows the favorable interaction energies between the EG1.0 dendrimer and tyrosine. The interaction energies for the evaluated amino acids range from  $-3.51$  to  $-31.25$   $\text{kcal mol}^{-1}$ .<sup>44–46</sup> EG1.0 and tyrosine (TYR) form the most stable complex with an intermolecular energy of  $-31.25$   $\text{kcal mol}^{-1}$ . In contrast, EG1.0 and tryptophan (TRP) form the complex with the least interaction energy ( $-3.51$   $\text{kcal mol}^{-1}$ ). These results allowed us to identify the types of amino acids (arginine, methionine, tyrosine and valine) that have greater stability when forming a dendrimer–amino acid complex.<sup>47</sup>

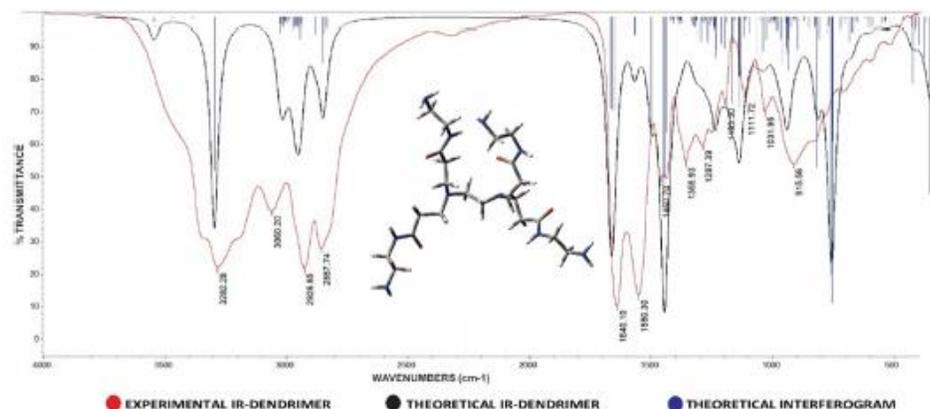


Fig. 3 Comparison of the theoretical interferogram and IR spectrum with experimental IR spectrum for the EG1.0 dendrimer. With this, a correlation and a better approximation are obtained without requiring complex synthesis procedures.

**Table 2** Point energy of coupling of the dendrimer (D)-amino acid complexes and the interaction energy obtained with the functional B3LYP and the set of bases 6-31G(d,p)

Complex	Total energy of the complex (kcal mol <sup>-1</sup> )	Coupling energy (kcal mol <sup>-1</sup> )
D-TYR	-2402.19	-31.25
D-VAL	-2118.19	-30.43
D-ARG	-2322.36	-30.41
D-MET	-2516.38	-29.91
D-ALA	-2039.53	-14.37
D-TRP	-2345.79	-3.51

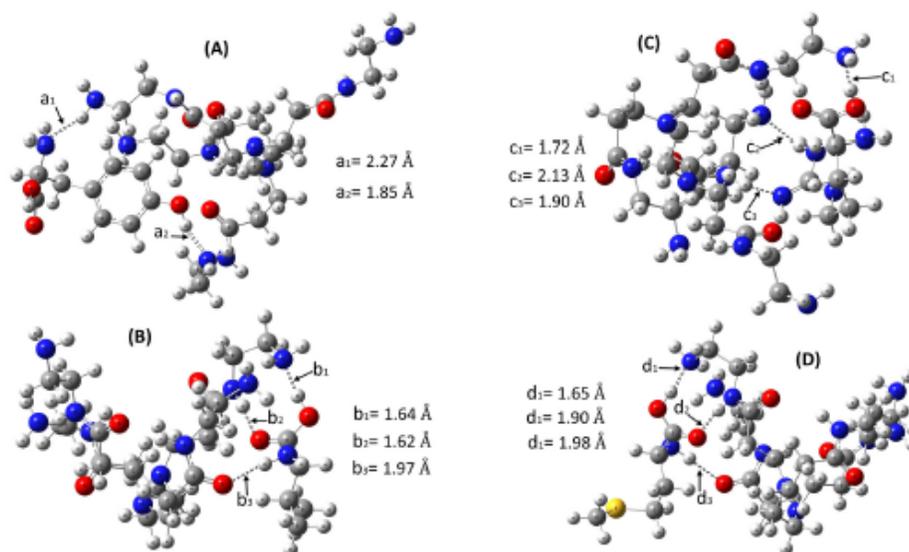
The results reported in Table 2 and Fig. 4 show the four amino acids with the best coupling energies after the analysis of all the essential amino acids. The findings of this work are based on a reliable experimental/theoretical study and contribute to our understanding of the dendrimer/amino acid complexes. Specifically, it allows proposing that the peptides containing TYR, VAL, ARG, MET, ALA and even TRP lateral amino acid chains should be potential candidates that can be separated using EG1.0 PAMAM molecules.<sup>48</sup> The active sites for the peptide/dendrimer interactions are associated with the availability of terminal amino groups located at the periphery of dendrimers to form hydrogen bonds with the peptide lateral amino acid chain.<sup>48-50</sup>

Taking the high coupling energy (dendrimer-tyrosine (D-TYR)) as a reference, the theoretical and experimental IR spectra of the D-TYR system were compared and are shown in Fig. 5, where the experimental EG1.0 is also present as a reference of the spectral changes induced by the interaction of both molecular species. The most important bands that occur before and after the interaction of the dendrimer with the amino acid are presented.<sup>50</sup> A clear

correspondence between the experimental and theoretical spectra for most characteristic bands of the D-TYR is observed<sup>51,52</sup> confirming the good agreement of both approaches. On the other hand, the comparison of the free EG1.0 dendrimers with amino acid shows the interaction between both molecules and the coupling that occurs to form the complex. Evidence is provided by the difference in patterns shown in Fig. 1, 2 and 5. Wider bands are observed when a dendrimer-amino acid complex is present (Fig. 5),<sup>4</sup> which are clearly established by both the theoretical and experimental approaches.

As a follow-up, a molecular electrostatic potential map was calculated (Fig. 6) showing the attraction of TYR with the dendritic molecule.<sup>52-54</sup> It is now possible to estimate the interactions of hydrogen bond types that are generated and the way in which they create rings, giving greater stability to the dendrimer-amino acid complex.<sup>44</sup> Similarly, it can be shown that the amino acid tends to interact with areas of higher electronic density, giving rise to stable interactions that can be modified to retain or release these amino acids or chains of them in a controlled manner by a simple adjustment in the pH.<sup>55,56</sup>

Based on the synthesized molecules, the available amino acids and the theoretical dendrimer-amino acid interaction, the best energy interaction between methionine, tyrosine, valine and arginine was calculated quantitatively, based on previously reported experimental studies.<sup>57,58</sup> We can see that the dendrimer shows some selectivity toward amino acids that ionize and form hydrogen bonds with higher interaction strength. These studies allowed us to predict the type of peptides that can be selectively separated from a complex mixture resulting from the hydrolysis of proteins derived from



**Fig. 4** Representation of the complexes formed between the dendrimer-amino acid and their respective hydrogen bond interaction distances. (A) EG1.0-TYR, (B) EG1.0-VAL, (C) EG1.0-ARG, and (D) EG1.0-MET.

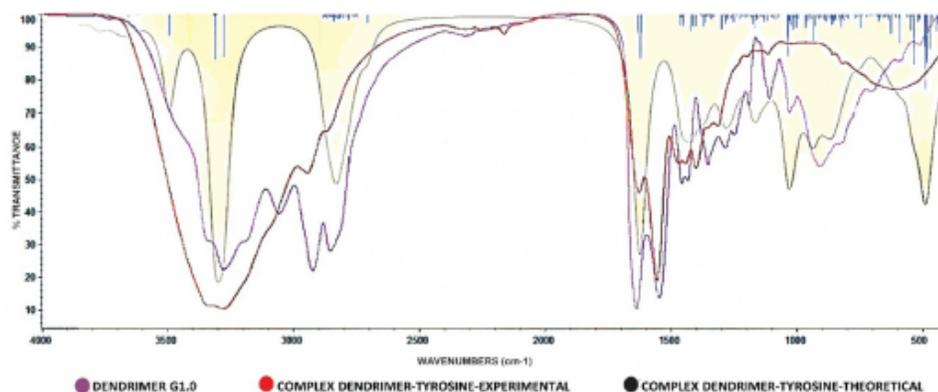


Fig. 5 Experimental EG1.0; theoretical and experimental IR spectra for the PAMAM EG1.0-Tyrosine dendrimer complex, taking the generation 1 dendrimer as the theoretical reference. The analysis consists of three theoretical–experimental infrared spectra and a theoretical interferogram that allows determining the interactions of molecules that characterize the specific band, thus noticing the band and the type of signal based on its vibration.

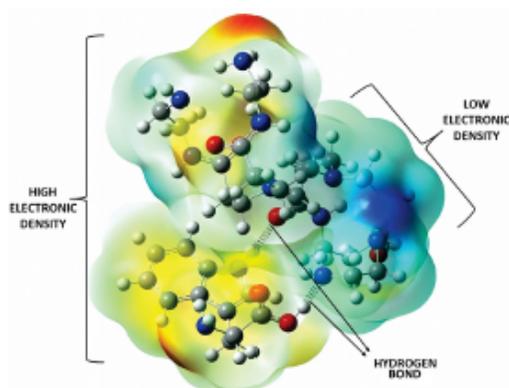


Fig. 6 PAMAM G1.0-Tyrosine dendrimer interactions. The illustration is based on the mapping of a dendrimer and amino acid on a surface of total electron density. The most positive (Blue) and the most negative (Red) potentials are shown on the map, plotted on a surface with constant electron density.

amaranth seeds or oligopeptides of a different nature.<sup>59,60</sup> Previous studies have indicated changes in the chemical environment that favor interactions between amino acids and PAMAM dendrimers.<sup>58,61</sup> Finally, calculations were performed with different peptides derived from amaranth seed proteins to corroborate what was obtained from the study with single amino acids. This study showed that the interaction between the amino acid sequence YLAGKPQEH and the dendrimer PAMAM with first-generation amino terminal groups (Fig. 6) and a calculated coupling energy of  $-27.19 \text{ kcal mol}^{-1}$  was taken as a reference. This oligopeptide was selected because it is part of the encrypted peptides of the 11S globulins derived from the amaranth seeds that are released after hydrolysis.<sup>62</sup> The sequence has a key amino acid at one of its ends, so from

the previous analysis with amino acids, it was possible to demonstrate that there is a high coupling energy between the PAMAM dendrimer and the terminal tyrosine of the oligopeptide. As shown in Table 3, this sequence presented one of the best interaction energies. The interactions of these oligopeptides can benefit from the various protons that can be exchanged in the structure and thus lead to better interaction energies, as has been described in previous studies.<sup>47</sup>

In previously reported theoretical–experimental studies with dendrimers of different natures, it was shown that the interaction with some peptides is stronger in the periphery,<sup>63,64</sup> given the large number of functional groups that give rise to a stable complex.<sup>64</sup> This opens a wide range of possibilities for using a PAMAM dendrimer as a base with high affinity towards different amino acids for the separation of peptides encrypted in a protein hydrolysate. In the same way, these theoretical–experimental investigations could be complemented with a series of NMR characterizations already reported for dendrimers of this type with antimicrobial peptides of different natures.<sup>65</sup> The studies carried out will facilitate the construction of materials and methodologies for the selective separation of peptides, bioactive substances and the transport of biomolecules, using polyamidoamine dendrimers of different generations.<sup>66</sup> The theoretical–experimental analysis in this work defines with great accuracy the types of interactions that will take place between an

Table 3 Point energy of coupling of the PAMAM G1.0-oligopeptide complexes and the interaction energy obtained with the functional B3LYP and the set of bases 6-31G(d,p). This table shows the amino acid chain which has better interaction with the dendritic macromolecule having as a reference the results obtained in Table 2

Dendrimer (D)-oligopeptide	Coupling energy ( $\text{kcal mol}^{-1}$ )
D-IYIEQGNIGTGM	-4.34
D-LAGKPQEHSGEHQ	-27.64
D-TEVWDSNEQ	-29.36
D-YLAGKPQEH	-27.19

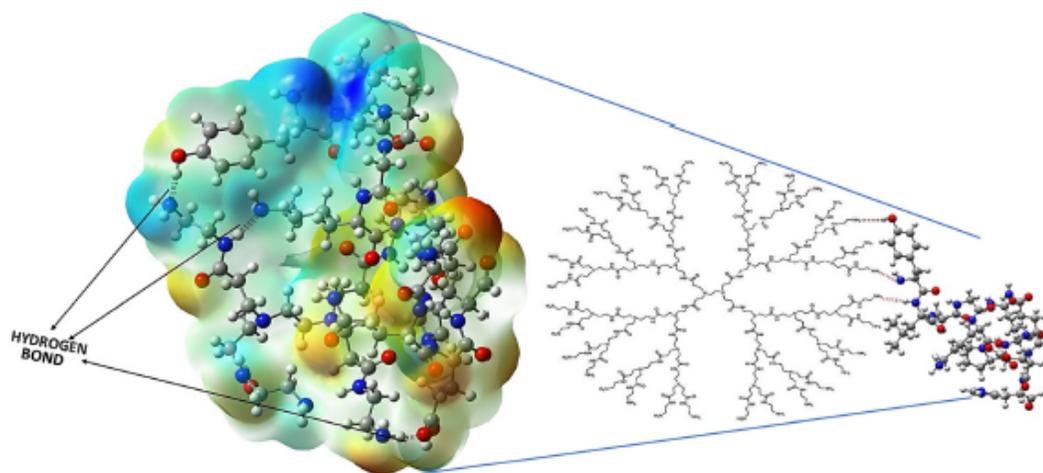


Fig. 7 PAMAM G1.0-YLAGKPQQEH dendrimer interaction. The illustration is based on the mapping of a dendrimer and the sequence of a peptide derived from amaranth seed storage proteins. A surface of total electron density is shown, plotted on a surface with constant electron density. In the same way, the interactions of this oligopeptide and the dendritic molecule are presented, giving a very specific approximation of how and where the coupling is taking place.

oligopeptide and the possible place of electronic interaction.<sup>57</sup> Fig. 7 shows the dendritic molecule with a more positive potential (blue) and the peptide with a more negative potential (red). It can be stated that the oligopeptide has an electron-rich distribution that can interact at different points with the periphery of the dendrimer. This example provides a graphic, precise, and specific view of the interaction site and the coupling energy of the dendrimer-peptide complex.<sup>57,68</sup>

#### HPLC-MS experimental identification

The characterization of peptides with higher affinity (calculated theoretically) obtained after proteolytic degradation was performed by HPLC-MS analysis with a MALDI-TOF detector.<sup>69,70</sup> Molecular mass records of different intensities were obtained and sequenced by correlation analysis with the UNIPROT database. Table 4 shows the main sequences identified after the capture and release of the peptides interacting with the PAMAM dendrimer. The results obtained, based on the type of interaction that retains the dendrimer, are shown in Table 2 and Fig. 6. For peptide sequences, the interactions are shown in Table 3. It can be seen that a sequence with tyrosine at one end

generates a strong interaction between the PAMAM dendrimer and the peptide. At the experimental level, the same peptide (YLAGKPQQEH) was not retained, but the interaction between the terminal amino acids and the dendritic structures is corroborated. Following hydrolysis of 11S globulins, the peptide YLQVNSGAK was identified as having a tyrosine and a lysine terminal amino acid, respectively. This serves as a benchmark to compare the interaction and retention of theoretically modeled peptides with experimental results for PAMAM dendrimers.<sup>70,71</sup>

With the experimental results obtained by mass spectrometry, we can corroborate the interaction between amino acids and the PAMAM dendrimer. In this study, we used a standard methodology for two rigid molecules, assuming it to be a fair approximation, to describe the interaction of two mobile polymeric molecules that have a large number of degrees of freedom.<sup>72</sup> The theoretical methodology used is suitable for describing the interaction of a dendritic molecule (PAMAM) with a single amino acid, avoiding the degrees of freedom of the studied molecules, due to a variable behavior depending on the solvent and pH (Fig. 8).<sup>72,73</sup> Despite the dimensions of the experimental molecule, the structures proposed for interaction are

Table 4 Peptides captured by the PAMAM dendrimer after enzymatic hydrolysis of 11S globulin

#### Amino acid sequences detected

- (A) IQLIPQNEGDAKSKER
- (B) ECCSAFKEFACPYVSQINDMNSDCAQTMFSYMNIYGNYPTGLFANEGR
- (C) EVNISGSQNEGEDDSKETNDVVAQKEVENSKEVTDCCDSQKEDEANAGGESKEVNGSVSHDEIGDESK
- (D) ETNDVVAQKEVENSKEVTDCCDSQKEDEANAGGESKEVNGSVSHDEIGDESKEVNNGGSTHKEVDDTQSTTR
- (E) EVENSKEVTDCCDSQKEDEANAGGESKEVNGSVSHDEIGDESKEVNNGGSTHKEVDDTQSTTR
- (F) YLQVNSGAK
- (G) EVENSKEVTDCCDSQKEDEANAGGESK
- (H) EVNNGGSTHK
- (I) VPSDK



be seen that the method used is valid to determine the interactions occurring, opening the possibility to separate biomolecules with high added value by selective interactions with PAMAM dendrimers. Finally, this study motivates further research with the goal of developing specific materials to perform complex separations at reduced cost and amount of chemicals needed. Eventually, this line of research might facilitate a clean and efficient separation of biomolecules with biological potential.

## Author contributions

Alejandro Fajardo De La Rosa, Oscar Hernández-Meléndez, Ma. Inés Nicolás-Vázquez, and Eduardo Bárzana contributed to the experimental and editorial development of this manuscript. J. Manuel Saniger-Blesa helped in writing this manuscript.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

Thanks to DGAPA-UNAM support through projects PAPIIT-100919 and IN212421. Thanks to CONACyT for doctoral grant 769181 to Mr. Fajardo-de la Rosa. We also thank Dr. Jorge Herrera Diaz from USAII-FQ, and Moises Hernández for their technical assistance. Accessibility of Supercomputer-Miztli from LANCAD-UNAM-DGTIC-400 is also appreciated.

## Notes and references

- C. Silva-Sánchez, A. P. Barba de la Rosa, M. F. León-Galván, B. O. de Lumen, A. De León-Rodríguez and E. González de Mejía, Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus Hypochondriacus*) Seed, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 1233–1240, DOI: 10.1021/jf072911z.
- H. Aguilar-Hernández, J. Martínez and J. García-Pereyra, Amaranth Science and Technology. INIFAP ed, *Eduardo Espitia Rangel*, 2012, DOI: 10.1314/2.1.2981.9684.
- A. P. Barba de la Rosa, O. Paredes-López and J. Gueguen, Characterization of amaranth globulins by ultracentrifugation and chromatographic techniques, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 937–940, DOI: 10.1021/jf00018a003.
- A. P. Barba de la Rosa, J. Gueguen, O. Paredes-López and G. Viroben, Fractionation procedures, electrophoretic characterization, and amino acid composition of amaranth seed proteins, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 931–936, DOI: 10.1021/jf00018a002.
- A. P. Barba de la Rosa, A. Herrera-Estrella, S. Utsumi and O. Paredes-López, Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin, *J. Plant Phys.*, 1996, **149**, 527–532, DOI: 10.1016/S0176-1617(96)80329-4.
- J. A. Huerta-Ocampo, M. F. León-Galván, L. B. Ortega-Cruz, A. Barrera Pacheco, A. De León Rodríguez, G. Mendoza Hernández and A. P. Barba De La Rosa, Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.), *Plant Biol.*, 2011, **13**, 472–482, DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00391.x.
- R. E. Aluko, *Functional Foods and Nutraceuticals*, Springer, Food Science Text Series, pp. 38–39, 2012, ISBN: 978-1-4614-3479-5, DOI: 10.1007/978-1-4614-3480-1.
- Asociacion Mexicana del Amaranto., El amaranto, un alimento con múltiples beneficios. 2022. Available on the internet at: <http://www.amaranto.com.mx/salud/beneficios/beneficios.htm>.
- A. E. Beezer, A. S. H. King, I. K. Martin, J. C. Mitchel, L. J. Twyma and C. F. Wain, Dendrimers as potential drug carriers; encapsulation of acidic hydrophobes within water soluble PAMAM derivatives, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 3873–3880, DOI: 10.1016/S0040-4020(03)00437-X.
- E. Bojórquez-Velázquez, F. A. Talamantes-Herrera, S. Valles Takeshi, I. Cerritos-Castro and A. P. Barba de la Rosa, Molecular Characterisation of Seed Storage Proteins (SSPs) in Grain Amaranth, *Molecular*, 2021, 55–79, DOI: 10.1007/978-3-030-72365-1\_5.
- National Center for Biotechnology Information. 2022. Available on the internet at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- M. C. Condés, A. A. Scilingo and M. C. Añon, Characterization of amaranth proteins modified by trypsin proteolysis. Structural and functional changes, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2009, **42**, 963–970, DOI: 10.1016/j.lwt.2008.12.008.
- M. Delgado, V. A. Tironi and M. C. Anon, Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion, *LWT-Food Sci. Technol.*, 2011, **44**, 1752–1760, DOI: 10.1016/j.lwt.2011.04.002.
- K. J. Ruthe rfurd-Markwick and P. J. Moughan, Food-Derived Bioactive Peptides in Human Health: Challenges and Opportunities, *Nutrients*, 2018, **10**(11), 1738, DOI: 10.3390/2Fnu10111738.
- S. Gorinstein, E. Pawelzik, E. Delgado-Licon, R. Haruendit, M. Weisz and S. Trakhtenberg, Characterisation of pseudocereal and cereal proteins by protein and amino acid analyses, *J. Sci. Food Agric.*, 2002, **82**, 886–891, DOI: 10.1002/jsfa.1120.
- J. Dziuba, A. Iwaniak and P. Minkiewicz, Computer-aided characteristics of proteins as potential precursors of bioactive peptides, *Polimery*, 2003, **48**(1), 50–53, DOI: 10.1431/polimery.2003.050.
- M. K. Calabretta, A. Kumar, A. M. McDermott and C. Cai, Antibacterial Activities of Poly(amidoamine) Dendrimers Terminated with Amino and Poly(ethylene glycol) Groups, *Biomacromolecules*, 2007, **8**(6), 1807–1811, DOI: 10.1021/bm0710888.
- R. Al-Shdefat, M. Kadhim, A. B. Mahdi, H. A. Lafta and A. Kumar, Theoretical evaluation of poly(amidoamine) dendrimers with different peripheral groups as a purinethol drug delivery system in aqueous medium, *Colloids Surf., B*, 2022, **216**, 112534, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2022.112534.
- J. J. P. Stewar, Optimization of parameters for semiempirical methods, I, *J. Comput. Chem.*, 1989, **10**, 209–220, DOI: 10.1007/2F00894-007-0233-4.

- 20 R. G. Parr, *In Density-functional theory of atoms and molecules*, Oxford University Press, NY, USA, 1989, pp. 1–333, DOI: [10.1002/qua.560470107](https://doi.org/10.1002/qua.560470107).
- 21 W. Kohn, A. D. Becke and R. G. Parr, Density Functional Theory of Electronic Structure, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 12974–12980, DOI: [10.1021/jp960669l](https://doi.org/10.1021/jp960669l).
- 22 A. D. Becke, Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior, *Phys. Rev.*, 1988, **38**, 3098–3100, DOI: [10.1103/PhysRevA.38.3098](https://doi.org/10.1103/PhysRevA.38.3098).
- 23 C. Lee, W. Yang and R. G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.*, 1988, **37**, 785–789, DOI: [10.1103/physrevb.37.785](https://doi.org/10.1103/physrevb.37.785).
- 24 P. C. Hariharan and J. A. Pople, The Influence of Polarization Functions on Molecular Orbital Hydrogenation Energies, *Theor. Chim. Acta*, 1973, **28**, 213–222, DOI: [10.1007/bf00533485](https://doi.org/10.1007/bf00533485).
- 25 R. O. Esquivel, N. Flores-Gallegos, E. M. Carrera, J. S. Dehesa, J. C. Angulo, J. Antolín and C. Soriano-Correa, Theoretic-information entropies analysis of nanostructures: ab initio study of PAMAM precursors and dendrimers G0 to G3, *Mol. Simul.*, 2009, **35**(6), 498–511, DOI: [10.1080/08927020902833087](https://doi.org/10.1080/08927020902833087).
- 26 M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson and H. Nakatsuji *et al.* *Gaussian 16, revision A.031*, Gaussian Inc., Wallingford, CT, USA, 2016.
- 27 S. M. Fatemi, S. J. Fatemi and Z. Abbasi, PAMAM dendrimer-based macromolecules and their potential applications: recent advances in theoretical studies, *Polym. Bull.*, 2020, **77**, 6671–6691, DOI: [10.1007/s00289-019-03076-4](https://doi.org/10.1007/s00289-019-03076-4).
- 28 J. R. Lloyd, P. S. Jayasekara and K. A. Jacobson, Characterization of polyamidoamino (PAMAM) dendrimers using inline reversed phase LC electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Methods*, 2016, **8**(2), 263–269, DOI: [10.1039/C5AY01995H](https://doi.org/10.1039/C5AY01995H).
- 29 D. Roy, I. I. Dennington, T. A. Keith and J. M. Millam, 2000–2016, GaussView 6.0.16 (64-bit Windows), Copyright (c) Semichem, Inc.
- 30 J. Kirkpatrick, B. Mcmorrow, D. Turban, A. L. Gaunt, J. S. Spencer, A. Matthews, A. Obikalouis, L. Thiry, M. Fortunato and A. J. Cohen, Pushing the frontiers of density functionals by solving the fractional electron problem, *Science*, 2021, **374**(6573), 1385–1389, DOI: [10.1126/science.abj6511](https://doi.org/10.1126/science.abj6511).
- 31 S. Bindal, S. Sharma, T. P. Singh and R. Gupta, Evolving transpeptidase and hydrolytic variants of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase from *Bacillus licheniformis* by targeted mutations of conserved residue Arg109 and their biotechnological relevance, *J. Biotechnol.*, 2017, **249**, 82–90, DOI: [10.1016/j.jbiotec.2017.03.034](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.034).
- 32 A. Ayala-Niño, G. M. Rodríguez-Serrano, L. G. González-Olivares, E. Contreras-López, P. Regal-López and A. Cepeda-Saez, Sequence Identification of Bioactive Peptides from Amaranth Seed Proteins (*Amaranthus hypochondriacus* spp.), *Molecules*, 2019, **24**(17), 3033, DOI: [10.3390/molecules24173033](https://doi.org/10.3390/molecules24173033).
- 33 T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.*, 1999, **20**(7), 730–748, DOI: [10.1002/\(sici\)1096-987x\(199905\)20:7%3C730::aid-jcc8%3E3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-987x(199905)20:7%3C730::aid-jcc8%3E3.0.co;2-t).
- 34 P. Wolski and T. J. Panczyk, Conformational Properties of PAMAM Dendrimers Adsorbed on the Gold Surface Studied by Molecular Dynamics Simulation, *J. Phys. Chem. C*, 2019, **123**(36), 22603–22613, DOI: [10.1021/acs.jpcc.9b05752](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b05752).
- 35 Y. Liu, V. S. Bryantsev, M. S. Diallo and W. A. Goddard, PAMAM Dendrimers Undergo pH Responsive Conformational Changes without Swelling, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**(8), 2798–2799, DOI: [10.1021/ja8100227](https://doi.org/10.1021/ja8100227).
- 36 D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin and J. Roeck, A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules, *Polym. J.*, 1985, **17**, 117, DOI: [10.1295/polymj.17.117](https://doi.org/10.1295/polymj.17.117).
- 37 NIST, Computational chemistry comparison and Benchmark Database. NIST Standard Reference Database Number 101, 18, ed. D. Russell Johnson III, 2016, <https://cccbdb.nist.gov/>.
- 38 I. Sohail, I. A. Bhatti, A. Ashar, F. M. Sarim, M. Mohsin, R. Naveed, M. Yasir, M. Iqbal and A. Nazir, Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers synthesis, characterization and adsorptive removal of nickel ions from aqueous solution, *J. Mater. Res. Technol.*, 2020, **9**(1), 498–506, DOI: [10.1016/j.jmrt.2019.10.079](https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2019.10.079).
- 39 Y. Zeng, Y. Kurokawa, T. T. Win-Shwe, Q. Zeng, S. Hirano, Z. Zhang and H. J. Sone, Effects of PAMAM dendrimers with various surface functional groups and multiple generations on cytotoxicity and neuronal differentiation using human neural progenitor cells, *Toxicol. Sci.*, 2016, **41**(3), 351–370, DOI: [10.2131/jts.41.351](https://doi.org/10.2131/jts.41.351).
- 40 E. Maldonado-Cervantes, H. J. Jeong, F. León-Galván, A. Barrera-Pacheco, A. De León-Rodríguez, E. G. De Mejía, B. O. De Lumen and A. P. Barba de la Rosa, Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cell, *Peptides*, 2010, **31**, 1635–1642, DOI: [10.1016/j.peptides.2010.06.014](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.014).
- 41 X. Guo, J. Zhang, Y. Cui, S. Chen, H. Sun, Q. Yang, G. Ma, L. Wang and J. Kang, Highly biocompatible jujube polysaccharide-stabilized palladium nanoparticles with excellent catalytic performance, *New J. Chem.*, 2019, **43**, 7646, DOI: [10.1039/C9NJ00950G](https://doi.org/10.1039/C9NJ00950G).
- 42 S. Medina-Godoy, N. C. Nielsen and O. Paredes-López, Expression and Characterization of a His-Tagged 11S Seed Globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Progress*, 2004, **20**(6), 1749–1756, DOI: [10.1021/bp049923e](https://doi.org/10.1021/bp049923e).
- 43 S. Medina-Godoy, A. Valdez-Ortiz, M. E. Valverde and O. Paredes-López, Endoplasmic reticulum-retention C-terminal sequence enhances production of an 11S seed globulin from *Amaranthus hypochondriacus* in *Pichia pastoris*, *Biotechnol. J.*, 2006, **1**(10), 1085–1092, DOI: [10.1002/biot.200600126](https://doi.org/10.1002/biot.200600126).
- 44 J. I. Morales-Camacho, J. Domínguez-Domínguez and O. Paredes-López, Overexpression of a Modified Amaranth

- Protein in *Escherichia coli* with Minimal Media and Lactose as Induce, *Recent Pat. Biotechnol.*, 2013, 7, 61–70, DOI: 10.2174/1872208311307010006ISSN:1872-2083.
- 45 M. Yasir, M. D. Willcox and D. Dutta, Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms, *Materials*, 2018, 11, 2468, DOI: 10.3390/ma11122468.
- 46 H. Romero-Zepeda and O. Paredes-López, Isolation and Characterization of Amaranthin, the 11S amaranth seed globulin, *J. Food Biochem.*, 1996, 19, 329–339, DOI: 10.1111/j.1745-4514.1995.tb00538.x.
- 47 M. Francesca-Ottaviani, S. Jockusch, N. Turro, D. A. Tomalia and A. Barbon, Interactions of Dendrimers with Selected Amino Acids and Proteins Studied by Continuous Wave EPR and Fourier Transform EPR, *Langmuir*, 2004, 20(23), 10238–10245, DOI: 10.1021/la0485881.
- 48 A. Buczkowski and B. Palecz, Study of the interactions of PAMAM-NH<sub>2</sub> G<sub>4</sub> dendrimer with selected natural amino acids in aqueous solutions, *J. Chem. Thermodyn.*, 2014, 70, 95–100, DOI: 10.1016/j.jct.2013.10.022.
- 49 J. Soriano-Santo and H. Escalonada-Buendía, Angiotensin I-Converting Enzyme inhibitory and antioxidant activities and surfactant properties of protein hydrolysates as obtained of *Amaranthus hypochondriacus* L. grain, *J. Food Sci. Technol.*, 2015, 52, 2073–2082, DOI: 10.1007/s13197-013-1223-4.
- 50 J. H. Park, J. S. Park and J. S. Choi, Basic amino acid-conjugated polyamidoamine dendrimers with enhanced gene transfection efficiency, *Macromol. Res.*, 2014, 22, 500–508, DOI: 10.1007/s13233-014-2073-2.
- 51 H. Aldawsari, R. A. Edrada-Ebel, D. R. Blatchford, R. J. Tate, I. Tetley and C. Dufès, Enhanced gene expression in tumors after intravenous administration of arginine-, lysine- and leucine-bearing polypropyleneimine polyplex, *Biomaterials*, 2011, 32(25), 5889–5899, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.04.079.
- 52 Y. Bae, S. Lee, E. S. Green, J. H. Park, K. S. Ko, J. Han and J. S. Choi, Characterization of basic amino acids-conjugated PAMAM dendrimers as gene carriers for human adipose-derived mesenchymal stem cells, *Int. J. Pharm.*, 2016, 501(1–2), 75–86, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2016.01.063.
- 53 J. S. Murray and K. Sem, *Molecular Electrostatic Potentials: Concepts and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1st edn, 1996, November 22, ISBN: 9780080536859.
- 54 A. Buczkowski, P. Urbaniak, S. Belica, S. Sekowski, M. Bryszewska and B. Palecz, Formation of complexes between PAMAM-NH<sub>2</sub> G<sub>4</sub> dendrimer and l- $\alpha$ -tryptophan and l- $\alpha$ -tyrosine in water, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2014, 128, 647–652, DOI: 10.1016/j.saa.2014.02.174.
- 55 G. R. Newkome, C. N. Moorefield and F. Vögtle, Dendritic Macromolecules: Concepts, Syntheses, Perspectives, *J. Chem. Educ.*, 1999, 76(1), 31, DOI: 10.1021/ed076p31.2.
- 56 F. M. Ottaviani, F. Montalti, N. J. Turro and D. A. Tomalia, Characterization of Starburst Dendrimers by the EPR Technique. Copper(n) Ions Binding Full-Generation Dendrimers, *J. Phys. Chem. B*, 1997, 101, 158, DOI: 10.1021/jp962857h.
- 57 B. S. Yang, S. Mallic, Y. E. Kim, Y. J. Kim, G. H. Kim and J. C. Choi, PAMAM Dendrimer Conjugated with Cell-penetrating Peptide-derived Oligopeptides for Enhanced Cell Uptake and Gene Delivery, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2015, 36(10), 2477–2483, DOI: 10.1002/bkcs.10477.
- 58 Y. Cui, J. Zhang, Q. Yu, X. Guo, S. Chen, H. Sun, S. Liu, L. Wang, X. Lai and D. Gao, Highly biocompatible zwitterionic dendrimer-encapsulated platinum nanoparticles for sensitive detection of glucose in complex medium, *New J. Chem.*, 2019, 43, 9076, DOI: 10.1039/C9NJ01101C.
- 59 A. Narsireddy, K. Vijayashree, M. G. Adimoolam, S. V. Manorama and N. M. Rao, Photosensitizer and peptide-conjugated PAMAM dendrimer for targeted in vivo photodynamic therapy, *Int. J. Nanomed.*, 2015, 10, 6865–6878, DOI: 10.2147/IJN.S89474.
- 60 J. Jung, J. Lee, Y. T. Kim, B. Lee, E. Kim, Y. Park, J. Choi and J. Sig, PAMAM Dendrimer Conjugated with N-terminal Oligopeptides of Mouse Fibroblast Growth Factor 3 as a Novel Gene Carrier, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2014, 35(4), 1036–1042, DOI: 10.5012/bkcs.2014.35.4.1036.
- 61 N. Higashi, T. Koga and M. Niwa, Dendrimers with Attached Helical Peptides, *Adv. Mater.*, 2000, 12(18), 1373–1375, DOI: 10.1002/1521-4095(200009)12:18%3C1373::AID-ADMA1373%3E3.0.CO;2-K.
- 62 S. G. Filleria, A. E. Nardo, M. Paulino and V. Tironi, Peptides derived from the gastrointestinal digestion of amaranth 11S globulin: Structure and antioxidant functionality, *Food Chem.*, 2021, 18(3), 100053, DOI: 10.1016/j.fochms.2021.100053.
- 63 I. Neelov, M. Ilyash, V. Bezrodnyi, E. Fatullaev, A. Marchenko and E. Bychkova, Investigation of complex of lysine dendrimer of 2nd generation with molecules of therapeutic KED peptide by computer simulation, *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2019, 1334, 012012, DOI: 10.1088/1742-6596/1334/1/012012.
- 64 K. Milowska, A. Rodacka and S. Melikishvili, Dendrimeric HIV-peptide delivery nanosystem affects lipid membranes structure, *Sci. Rep.*, 2021, 11, 16810, DOI: 10.1038/s41598-021-96194-x.
- 65 C. Chittasupho, C. Aonsri and W. Imaram, Dataset of 1H-nuclear magnetic resonance and mass spectra of surface modified Poly(amidoamine) dendrimers with LFC131 peptide, *Data Brief.*, 2021, 35, 106849, DOI: 10.1016/j.dib.2021.106849.
- 66 J. Markowicz, L. Uram, S. Wolowicz and W. Rode, Biotin Transport-Targeting Polysaccharide-Modified PAMAM G<sub>3</sub> Dendrimer as System Delivering  $\alpha$ -Mangostin into Cancer Cells and *C. elegans* Worms, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(23), 12925, DOI: 10.3390/ijms222312925.
- 67 Z. Chen, F. Lian, X. Wang, Y. Chen and N. Tang, Arginine-glycine-aspartic acid-polyethylene glycol-polyamidoamine dendrimer conjugate improves liver-cell aggregation and function in 3-D spheroid culture, *Int. J. Nanomed.*, 2016, 11, 4247–4259, DOI: 10.2147/ijn.s113407.
- 68 P. Daftarian, A. E. Kaifer, W. Li, B. B. Blomberg, D. Frasca, F. Roth, R. Chowdhury, E. A. Berg, J. B. Fishman, H. A. Al Sayegh, P. Blackwelder, L. Inverardi, V. L. Perez, V. Lemmon and P. Serafini, Peptide-Conjugated PAMAM Dendrimer as a Universal DNA Vaccine Platform to Target Antigen-Presenting

- Cell, *Cancer Res.*, 2011, **71**(24), 7452–7462, DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-11-1766](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1766).
- 69 C. Douat-Casassus, T. Darbre and J. L. Reymond, Selective Catalysis with Peptide Dendrimers, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**(25), 7817–7826, DOI: [10.1021/ja049276n](https://doi.org/10.1021/ja049276n).
- 70 U. Boas, S. H. Söntjens, K. J. Jensen, J. B. Christensen and E. W. Meijer, New dendrimer-peptide host-guest complexes: towards dendrimers as peptide carriers, *ChemBioChem*, 2002, **3**(5), 433–439, DOI: [10.1002/1439-7633\(20020503\)3:5%3C433::aid-cbic433%3E3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020503)3:5%3C433::aid-cbic433%3E3.0.co;2-0).
- 71 B. Klajnert, M. Cangiotti, S. Calici, J. P. Majoral, A. M. Caminade, J. Cladera, M. Bryszewska and M. F. Ottaviani, EPR study of the interactions between dendrimers and peptides involved in Alzheimer's and prion diseases, *Macromol. Biosci.*, 2007, **7**(8), 1065–1074, DOI: [10.1002/mabi.200700049](https://doi.org/10.1002/mabi.200700049).
- 72 C. Chen, N. Bai and Y. Zhang, A theoretical study of the inhibition effect of PAMAM molecule on silica scale, *J. Mol. Model.*, 2017, **23**, 32, DOI: [10.1007/s00894-017-3208-0](https://doi.org/10.1007/s00894-017-3208-0).
- 73 J. L. Santos, D. Pandita, J. Rodrigues, A. P. Pêgo, P. L. Granja, G. Balian and H. Tomás, Receptor-Mediated Gene Delivery Using PAMAM Dendrimers Conjugated with Peptides Recognized by Mesenchymal Stem Cells, *Mol. Pharmaceutics*, 2010, **7**(3), 763–774, DOI: [10.1021/mp9002877](https://doi.org/10.1021/mp9002877).
- 74 S. Kavyani, S. Amjad-Iranagh, M. Dadvar and H. Modarress, Hybrid Dendrimers of PPI(core)-PAMAM(shell): A Molecular Dynamics Simulation Study, *J. Phys. Chem. B*, 2016, **120**(36), 9564–9575, DOI: [10.1021/acs.jpcc.6b05142](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b05142).
- 75 N. Syamila, A. Syahir, S. Ikeno, W. S. Tan, H. Ahmad and A. Ahmad Tajudin, Interaction study of peptide-PAMAM as potential bio-nanogate for detecting anti-hepatitis B surface antigen, *Colloids Surf., B*, 2020, **185**, 110623, DOI: [10.1016/j.colsurfb.2019.110623](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110623) Biointerfaces.
- 76 A. Zarebkohan, F. Najafi, H. R. Moghimi, M. Hemmati, M. R. Bahram and B. Kazemi, Synthesis and characterization of a PAMAM dendrimer nanocarrier functionalized by SRL peptide for targeted gene delivery to the brain, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2015, **78**, 19–30, DOI: [10.1016/j.ejps.2015.06.024](https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.06.024).
- 77 F. Badalkhani-Khamseh, A. Ebrahim-Habibi, N. L. Hadipour and M. Behmanesh, PEGylated PAMAM dendrimers as eptifibatide nanocarriers: An atomistic view from molecular dynamics simulations, *Chem. Eng. Sci.*, 2023, **267**, 118283, DOI: [10.1016/j.ces.2022.118283](https://doi.org/10.1016/j.ces.2022.118283).
- 78 M. A. Azimifar, Z. Salmasi, A. Doosti, N. Babaei and M. Hashemi, Evaluation of the efficiency of modified PAMAM dendrimer with low molecular weight protamine peptide to deliver IL-12 plasmid into stem cells as cancer therapy vehicles, *Biotechnol. Progress*, 2021, **37**, e3175, DOI: [10.1002/btpr.3175](https://doi.org/10.1002/btpr.3175).