

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias e Ingeniería

**Síntesis de un péptido cíclico y estudios computacionales
utilizando el método semiempírico PM6 para interacción con
metales**

Leonardo Isaías Astudillo Trujillo

César Zambrano Semblantes, PhD., Director de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de
Licenciado en Química

Quito, mayo de 2015

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias e Ingeniería

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Síntesis de un péptido cíclico y estudios computacionales
utilizando el método semiempírico PM6 para interacción con
metales**

Leonardo Isaías Astudillo Trujillo

César Zambrano, PhD.,

Director de Tesis

.....

David Egas, PhD.,

Miembro del Comité de Tesis

.....

Alexis Hidrobo, PhD.,

Miembro del Comité de Tesis

.....

César Zambrano, PhD.,

Decano de la Escuela de Ciencias

Colegio de Ciencias e Ingeniería

.....

Quito, mayo de 2015

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: Leonardo Isaías Astudillo Trujillo

C. I.: 172153495-4

Fecha: Quito, mayo de 2015

Agradecimientos

A mis padres y familiares por todo el apoyo incondicional durante todo este periodo de estudios, estoy completamente seguro que sin Ud. no hubiese podido lograr ningún plan o idea que alguna vez se haya materializado en mi vida. ¡Gracias!

A mis tutores durante este trabajo de titulación, Dr. César Zambrano y especialmente al Ing. Jaroslav Sebestik. César, muchas gracias por toda la ayuda prestada a lo largo de este trabajo así como los útiles consejos para el desarrollo de este trabajo de titulación durante el último año. Jarek, muchas gracias por haberme permitido trabajar en el Instituto UOCHB y por todos los valiosos consejos y enseñanzas dentro y fuera del laboratorio. Aprecio y recuerdo siempre mi tiempo en Praga y todo lo que aprendí allí. Gracias otra vez.

A la Universidad San Francisco de Quito por haberme permitido participar dentro de su familia para la culminación de la primera instancia de mi vida universitaria, así mismo por haberme permitido ser parte del programa IAESTE el cual me permitió desarrollar gran parte de este trabajo.

A mis profesores y compañeros dentro del Departamento de Ingeniería Química, por todo su apoyo y preocupación a lo largo de estos años que han sido grandiosos por ustedes.

A la Dr. Daniela Almeida por todo su apoyo a lo largo de mi último año de estudios.

A Miguel Ángel Méndez, PhD y David Egas, PhD por su apoyo en las preguntas presentadas así como sus recomendaciones; así como al Dr. Alexis Hidrobo y al Dr. Egas por formar parte del comité de titulación

Resumen

Se ha utilizado la síntesis de péptidos de estado sólido para sintetizar un péptido cíclico conformado por (-D-Phe-L-Lys-D-Ser-L-Lys-D-Ser-) y se ha estudiado de forma teórica la capacidad del mismo para poder interactuar con metales como hierro, zinc, calcio y magnesio utilizando métodos de mecánica molecular con el programa Avogadro[®], seguidos de una optimización con el método semiempírico PM6 utilizando el programa Spartan[®]. Se presentan los resultados para el análisis del péptido, los cuales fueron análisis de masas (MALDI-TOF/TOF y ESI MS) así como análisis de aminoácidos (cromatografía de alto desempeño con un analizador de aminoácidos). También se presenta los análisis computacionales describiendo energías mínimas para los complejos péptido-metal, arrojando resultados de una estabilidad mayor dentro del ciclo del péptido (*core*); se han analizado los metales sin carga, y los iones metálicos M^{2+} , y en el caso del hierro M^{3+} también.

Abstract

Solid phase peptide synthesis has been used in order to synthesize a cyclic peptide conformed by (-D-Phe-L-Lys-D-Ser-L-Lys-D-Ser-) amino acids, and its ability to interact with metallic atoms and ions (Fe, Zn, Ca and Mg) was studied theoretically using MM (molecular mechanics) methods with the software Avogadro[®], followed by an optimization with the semi empirical PM6 method, using the software Spartan[®]. The analyses of the peptide were carried with mass analyses (MALDI-TOF/TOF and ESI MS), and also with amino acid analysis (HPLC with amino acid analysis). The theoretical results are also presented describing minimum energies for the peptide-metal interactions, implying that the greatest stability of the complex relays in the core of the system. Uncharged metallic atoms as well as metallic ions of the type M^{2+} were studied (in the case of iron, the ion Fe^{3+} has also been studied).

Tabla de contenido

Introducción.....	13
Grupos de protección.....	18
Formación del enlace peptídico en SPPS.....	21
Resina <i>o</i> -clorotritilo (resina de Barlos).....	24
Desprendimiento de la resina.....	25
Formación del péptido cíclico.....	26
Estudios computacionales de optimización de geometrías y cálculos de energías mínimas para el complejo péptido-metal.....	29
Sección experimental.....	30
Síntesis de Fmoc-D-Ser(tBu)-O-Resina (Resina = 2-chlorotrityl-) (1).....	30
Síntesis de Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina (Resina = 2 clorotritilo-) (2).....	31
Síntesis de Fmoc-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina (Resina = 2 clorotritilo-) (3).....	33
Síntesis de Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina (Resina = 2 clorotritilo-) (4).....	34
Síntesis de Fmoc-D-Phe-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina (Resina = 2 clorotritilo-) (5).....	35

Síntesis de Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Phe-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina (Resina = 2 chlorotriyl-) (6).....	36
Ciclización del péptido D-Phe-L-Lys-D-Ser-L-Lys-D-Ser.....	37
Sección computacional.....	38
Análisis de resultados.....	39
Espectros de masa y análisis de aminoácidos.....	39
Estudio computacional de conformación de complejos del péptido con metales.....	44
Análisis de los estudios computacionales realizados con el método semiempírico PM6.....	51
Conclusiones.....	75
Recomendaciones.....	76
Abreviaturas.....	76
Referencias.....	79

Lista de figuras

Figura 1. Formación del enlace peptídico.....	14
Figura 2. Quiralidad en aminoácidos.....	16
Figura 3. Desprotección de Cbz en un medio ácido.....	19
Figura 4. Desprotección del grupo Boc.....	20
Figura 5. Desprotección del grupo Fmoc.....	21
Figura 6. Anclaje a la resina cloruro de 2-clorotritil.....	25
Figura 7. Activación del aminoácido terminal (anclado) para la agregación de otro aminoácido.....	25
Figura 8. Desprendimiento del péptido desde la resina mediante un medio ácido.....	26
Figura 9. Formación de un enlace peptídico basado en un pseudo reordenamiento de Curtius, formando un isocianato como intermediario.....	26
Figura 10. Fmoc-D-Ser(tBu)-O-Resina.....	31
Figura 11. Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina.....	33
Figura 12. Fmoc-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina.....	34
Figura 13. Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina.....	35
Figura 14. Fmoc-D-Phe-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina...	36
Figura 15. Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Phe-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina.....	37

Figura 16. Análisis de aminoácidos en el péptido cíclico.....	39
Figura 17. Análisis MALDI-TOF para el péptido lineal sintetizado.....	41
Figura 18. Análisis de masas del producto cíclico completamente desprotegido.....	42
Figura 19. Péptido cíclico sin grupos de protección.....	44
Figura 20. Mapa de potencial electrostático para el péptido cíclico, calculado con el semiempírico PM6.....	52
Figura 21. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con Fe ⁰ , calculado con el semiempírico PM6.....	54
Figura 22. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el ion Fe ²⁺ , calculado con el semiempírico PM6.....	56
Figura 23. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el ion férrico, calculado con el semiempírico PM6.....	58
Figura 24. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el ion Zn ²⁺ , calculado con el semiempírico PM6.....	60
Figura 25. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con Zn ⁰ , calculado con el semiempírico PM6.....	62
Figura 26. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el ion Mg ²⁺ , calculado con el semiempírico PM6.....	64

Figura 27. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el Mg^0 , calculado con el semiempírico PM6. Se presenta al átomo de Mg como una esfera azul en el centro.....	66
Figura 28. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con Ca^{2+} , calculado con el semiempírico PM6.....	68
Figura 29. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el Ca^0 , calculado con el semiempírico PM6.....	70
Figura 30. Descripción de la relación existente entre radio iónico y radio metálico [pm] (eje x), con la entalpía estándar de formación para cada complejo [$\Delta H^\circ =$ kJ/mol].....	72
Tabla 1. Radios de las diferentes especies metálicas presentes en el estudio	45
Tabla 2. Energías mínimas calculadas para el péptido cíclico (se ha seleccionado el conformero de menor energía) con MM (<i>molecular mechanics</i>).....	46
Tabla 3. Energías calculadas con MM para el complejo péptido- Fe^0 en diferentes posiciones del macrociclo.....	46
Tabla 4. Energías calculadas con MM para el complejo péptido- Fe^{3+} en diferentes posiciones del macrociclo.....	46
Tabla 5. Distancias calculadas con MM para el complejo péptido- Fe^{3+} en diferentes posiciones del macrociclo.....	47

Tabla 6. Energías calculadas con MM para el complejo péptido-Ca ⁰ en diferentes posiciones del macrociclo.....	48
Tabla 7. Energías calculadas con MM para el complejo péptido-Ca ²⁺ en diferentes posiciones del macrociclo.....	48
Tabla 8. Distancias calculadas con MM para el complejo péptido-Ca ²⁺ en diferentes posiciones del macrociclo.....	49
Tabla 9. Energías calculadas con MM para el complejo péptido-Zn ⁰ en diferentes posiciones del macrociclo.....	50
Tabla 10. Energías calculadas con MM para el complejo péptido-Zn ²⁺ en diferentes posiciones del macrociclo.....	50
Tabla 11. Distancias calculadas con MM para el complejo péptido-Zn ²⁺ en diferentes posiciones del macrociclo.....	50
Tabla 12. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.....	53
Tabla 13. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.....	53
Tabla 14. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.....	55
Tabla 15. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.....	55
Tabla 16. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.....	57
Tabla 17. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.....	57
Tabla 18. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.....	59
Tabla 19. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.....	59

Tabla 20. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.....	61
Tabla 21. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.....	61
Tabla 22. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.....	63
Tabla 23. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.....	63
Tabla 24. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.....	65
Tabla 25. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.....	65
Tabla 26. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.....	67
Tabla 27. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.....	67
Tabla 28. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.....	69
Tabla 29. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.....	69
Tabla 30. Análisis de energía de formación (ΔE) para cada complejo.....	71
Diagrama 1. Pasos para SPPS (solid-phase peptide synthesis).....	23

Objetivos

1. Desarrollar un péptido cíclico aplicando el método de la síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS).
2. Determinar la interacción entre la estabilidad del complejo péptido-metal en base al radio metálico (iónico) del huésped, utilizando análisis computacionales semiempíricos (PM6)

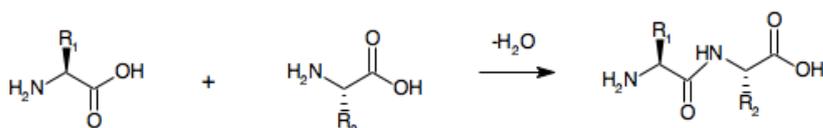
Introducción

Los péptidos son estructuras esenciales para el desarrollo de especies animales y vegetales, siendo el pilar fundamental para el crecimiento de las mismas (Clayden, Greeves, & Warren, 2012). Estas estructuras forman conglomerados, los cuales presentan diferentes conformaciones y a su vez, promueven al desarrollo de las macromoléculas comúnmente llamadas *proteínas*. Siendo este el caso para la naturaleza, el hombre ha querido desarrollar sustancias peptídicas para diversas aplicaciones en el campo de la ciencia y tecnología como pueden ser acarreo de sustancias tóxicas (generalmente metales pesados) fuera de sistemas orgánicos (Kahn & Bertenshaw, 1989), bloques constructores para sensores de alta calidad (Sewald & Jakubke, 2002a), análisis de proteómica que promuevan el conocimiento y formación de organismos (Sewald & Jakubke, 2002a), entre otros. Con esto en mente, es importante revisar ciertos conceptos acerca de la síntesis de péptidos y especialmente un avance académico que sin precedentes aumentó la producción de péptidos y aminoácidos: la síntesis de fase sólida de péptidos (SPPS, por sus siglas en inglés).

La síntesis en fase sólida de péptidos se ha utilizado de manera progresiva desde los estudios de Merrifield, desde su primera publicación en 1963 cambió por completo el panorama de la síntesis de péptidos; y quien en el año de 1984 fue premiado con el Nobel en Química por su descubrimiento (Sewald & Jakubke, 2002b)(Merrifield, 1963)(Anwer & Spatola, 1992)(Kahn & Bertenshaw, 1989)(Kim et al., 2002). Hasta ese momento la síntesis de péptidos se realizaba en fase soluble, lo que conlleva a diferentes problemas, siendo algunos: la pureza del producto final (la que se debe principalmente a la purificación de cada componente de la síntesis), la dificultad para la caracterización de los intermediarios, entre otros. Sin embargo se tiene claros ejemplos de síntesis

exitosas en fase soluble; por ejemplo, la síntesis de la ribonucleasa A (conformada por 124 aminoácidos) la cual fue cristalizada para análisis por difracción de rayos X, por Yajima *et. al.* en 1981 (Sewald & Jakubke, 2002b) obteniendo excelentes resultados en materia de caracterización.

Figura1. Formación del enlace peptídico, paso clave para la síntesis de polipéptidos.



Es conocido que la síntesis de péptidos puede darse mediante varios tipos de reacciones químicas, las cuales se reducen a un principio básico: la formación de un enlace peptídico entre dos aminoácidos para formar un dipéptido, siendo esta estructura la estructura básica para la creación de una proteína la cual podrá adoptar distintas conformaciones como es ya conocido (Koshland, 1951) entre las cuales se encuentran las estructuras primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias (Guerler, Govindarajoo, & Zhang, 2013). En si, la formación de un enlace peptídico es un proceso a primera vista muy simple que incluye la formación de un grupo amido con la eliminación de agua para formar el enlace mencionado, en donde se busca además que las condiciones de reacción no sean agresivas ya que se poseen otros grupos que pueden reaccionar en este tipo de medios (las cadenas laterales de ciertos aminoácidos alfa, por ejemplo). Para obtener el resultado esperado, se pueden simplificar los requerimientos para la reacción de la siguiente manera: la activación del grupo carboxilo de un aminoácido, para que el segundo pueda entrar mediante un ataque nucleofílico del grupo amino al carbono electrofílico, en una reacción intermolecular completamente favorable. Se tiene además un principio muy importante para esta reacción: se necesita la protección de los

grupos amino que no participan en la reacción para evitar una reacción descontrolada, ya que pueden formarse aminoácidos lineales y cíclicos no deseados, en una mezcla con el dipéptido que se quiere formar (Sewald & Jakubke, 2002b). La protección de estos grupos se conoce desde hace varios años en la llamada *química de grupos de protección* (Clayden et al., 2012). En resumen, la formación de un dipéptido sigue algunos pasos:

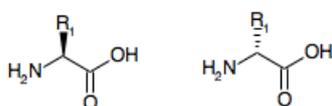
1. La preparación de un aminoácido parcialmente protegido es necesaria, en donde el zwitterion no se encuentra presente.
2. La formación del enlace peptídico ocurre en dos pasos: la activación del grupo carboxilo en el aminoácido (previamente protegido en el grupo amino) para obtener un intermediario reactivo, en donde después ocurre el ataque nucleofílico y se forma el enlace peptídico (enlace amido) (esto puede ocurrir en uno o varias etapas).
3. Al finalizar se busca la salida de los grupos protectores (dependiendo del tipo de síntesis) para poder continuar con la reacción de acoplamiento, o finalizarla al obtener las unidades de aminoácidos necesarias.

A pesar de obtener en detalle todos los requerimientos para la reacción, esta tiende a complicarse ya que 10 de los aminoácidos esenciales tienen un brazo en la posición alfa con grupos funcionales que deben ser protegidos, lo que puede hacerse de varias maneras dependiendo del grupo funcional (King, Fields, & Fields, 1990) (Merrifield, 1964) (SchNölzer, Alewood, Jones, Alewood, & Kent, 1992) (Wahlström & Undén, 2009). La única restricción es que debe diferenciarse el tipo de protección requerida para el grupo alfa amino (el grupo que va a continuar en la reacción química) y la protección para las cadenas laterales de cada aminoácido. En este punto es claro el

reconocer que se busca un grupo protector para el grupo amino que pueda ser expulsado en condiciones que no afecten en lo absoluto a los grupos protectores de las cadenas laterales, y tampoco que interfieran en otro punto crítico de la reacción (la destrucción de enlaces peptídicos previamente formados, por ejemplo). Luego de haber obtenido la protección de los grupos mencionados, se busca la activación del grupo carboxilo, como ya se ha mencionado, para poder formar el enlace peptídico requerido (este paso posee especial importancia y se busca un alto rendimiento con una relación equimolar entre los reactivos utilizados)(Montalbetti & Falque, 2005).

Además, en este tipo de reacciones se debe tomar en cuenta la capacidad de racemización para sitios activos quirales, dentro de la reacción (siendo la glicina la única excepción), en donde cabe mencionar la subdivisión de los aminoácidos quirales: se posee aminoácidos L y D los cuales se pueden determinar mediante el análisis de su estructura de Fischer particular(Clayden et al., 2012) (fig. 2).

Figura2. Quiralidad en aminoácidos: Se busca en la estructura de Fischer la quiralidad del carbono alfa, y se denomina L- si este carbono es *S*, y D- si este carbono es *R*. En la siguiente figura el primer aminoácido es L-, y el segundo es D- (a excepción de la cisteína, en cuyo caso se cambia los nombres a D-, y L- respectivamente).



Por último, se debe analizar a profundidad el factor de la protección química de ciertos grupos funcionales para cada aminoácido presente en la reacción. Es necesario poner mucha atención en los diferentes medios para protegerlos, siendo un elemento importante la facilidad para poder extraerlos al finalizar la reacción (si es que se busca

expulsar los grupos protectores luego de la formación del péptido) o la salida de estos grupos para la extensión del péptido a formarse. Además, se debe determinar una estrategia inicial en la cual se busca la desprotección inicial del grupo amino o del grupo carboxilo. Por ejemplo, si se busca una síntesis en fase soluble se busca la formación de fragmentos cortos para realizar la síntesis total del péptido final (esto se realiza para poder evitar en su mayoría la epimerización de los diferentes aminoácidos que se agregan en la reacción (Carpino et al., 1998), factor que puede ser gobernado por la geometría del péptido al cual se desea agregar una cadena más). Dentro de los grupos protectores temporales o semipermanentes (estos términos se utilizarán de manera intercambiable) (los cuales se ubican en la cadena lateral del aminoácido) se esperan ciertos requerimientos para la factible continuación de la síntesis:

1. No se tiene la presencia de un *zwitterion* cuando el grupo protector ha sido ya introducido.
2. La expulsión del grupo protector no debe dañar la estabilidad del péptido formado.
3. Se debe evitar la racemización de los intermediarios.
4. Se debe hablar de un intermediario estable y con facilidad para determinar el nivel de protección en la muestra.

Es importante recalcar que los grupos semipermanentes (generalmente protegen la cadena lateral del aminoácido) son eliminados al final, debido a que en muchos casos las condiciones en las cuales son eliminados pueden afectar a los grupos de protección semipermanentes. Dentro de este tópico se menciona la inmensa necesidad de que los grupos temporales y los semipermanentes sean *ortogonales*: es decir que las

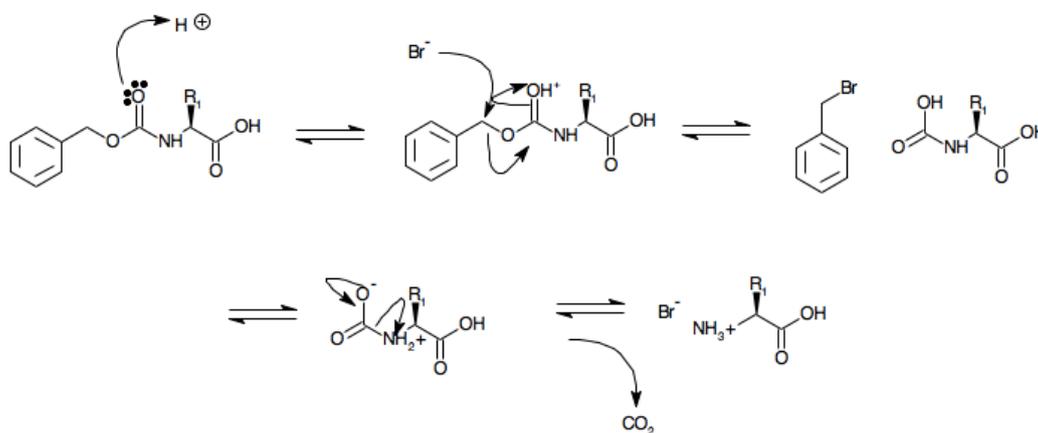
condiciones de expulsión de uno no afecte directamente al otro grupo protector (o grupos protectores), o que a su vez se puede controlar la reacción para obtener un intermediario estable (Barany & Albericio, 1985). Para la protección de grupos amino se tienen varias opciones, la mejor de las cuales se debe determinar basándose en los cuatro puntos anteriores, o en resumen tomando en cuenta la ortogonalidad de los demás grupos protectores (la formación de sales, como un clorhidrato no ofrece la protección requerida ya que el *zwitterion* todavía se encuentra presente, se tiene un nitrógeno cargado en la porción terminal del aminoácido). Entre las inmensas posibles clasificaciones de los grupos protectores resalta una en la que se toma en cuenta los medios para la expulsión del grupo en sí, los cuales son: acidólisis, eliminación por una base, procesos *redox*, sustitución nucleofílica, y fotólisis (se conoce que la más utilizada sigue siendo la eliminación por acidólisis debido a la estabilidad de la mayoría de péptidos en estas condiciones) (Albericio, 2000). En este trabajo se utiliza al grupo de protección Fmoc, por su expandido uso en las últimas décadas y su detallado mecanismo de acción; este grupo protector sin embargo es eliminado mediante el uso de una base moderadamente fuerte: piperidina. El estudio de las reacciones presentes en la protección y desprotección del mismo se revisarán más adelante al ser sumamente importantes para el presente trabajo. Entre otros grupos N-protectores muy utilizados se tienen al benziloxycarbonil y al *tert*-butoxicarbonil, de los cuales se hablará en detalle a continuación. Fmoc se tomó como un grupo para remoción final, mientras otros grupos como Boc y *t*-Bu se tomaron como grupos semipermanentes.

Grupos de protección

El grupo benziloxycarbonil (cuya abreviación es Cbz, o Z en honor a su descubridor Leonidas Zervas) se integra al grupo amino mediante un ataque nucleofílico en presencia de una base (condiciones de Schotten-Baumann) (Kürti & Czakó, 2005). En

un caso, por ejemplo, se utiliza cloruro de benziloxycarbonilo en solventes orgánicos polares (metanol, etanol, en algunos casos agua dependiendo del aminoácido) debido a su reactividad con el grupo amino que se tiene presente. Con este método se obtienen rendimientos superiores al promedio de la utilización de otros grupos protectores por lo que es bastante apetecido en la práctica. La forma más común de poder eliminar el Cbz es mediante acidólisis con HBr 2 M en ácido acético (esto evita las complicaciones de trabajar con una atmósfera de H_2 si es que se busca el medio de la hidrogenación catalítica para eliminar este grupo). Se presenta el mecanismo a continuación (Sewald & Jakubke, 2002b).

Figura 3. Desprotección de Cbz en un medio ácido: se realiza en dos pasos, siendo importante la salida de CO_2 en el paso final como un excelente grupo saliente.

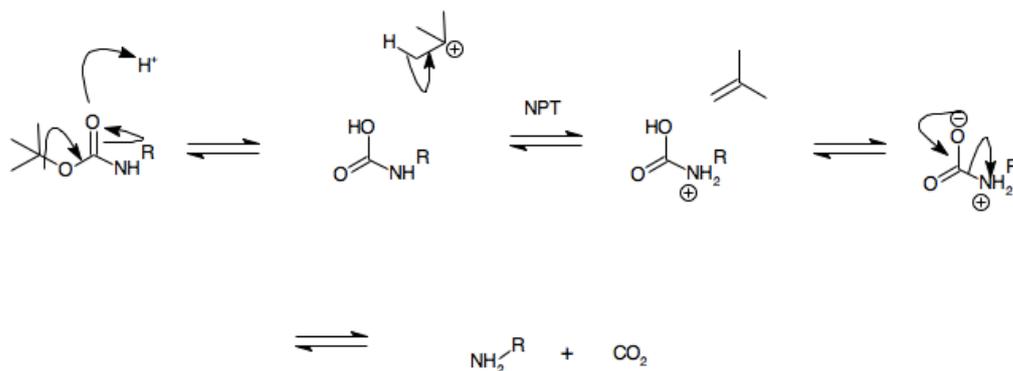


Otro grupo muy importante para la protección de grupos amino es el *tert*-butoxicarbonil (Boc). Este grupo se encuentra junto al Cbz y al Fmoc dentro de los más utilizados, y además es importante recalcar que son del tipo uretano (grupos alquiloxi o carbamato) los cuales forman un producto estable, del cual además se menciona una estabilidad regioselectiva (se forma solo un estereoisómero). Entre los reactivos más utilizados para

la reacción de acilación con este grupo se encuentran el *tert*-butoxicarbonilazida ($t\text{-BuOCON}_3$) y el di-*tert*-butildicarbonato (“anhídrido Boc”) ($t\text{-BuOCO}$)₂. Este grupo puede ser expulsado en condiciones medianamente ácidas y no reacciona con bases inorgánicas o reducciones con sodio/amoniaco líquido. Generalmente se utiliza ácido trifluoroacético para su eliminación. Cabe mencionar que para el presente trabajo las cadenas laterales de los aminoácidos utilizados se han protegido con Boc, y en otras ocasiones se ha utilizado *t*-BuO para la protección del oxígeno del grupo alfa-metilenhidroxi en la serina (en este caso, los dos grupos se extraen en condiciones ácidas por lo que se espera la salida de ambos con un solo proceso)(Sewald & Jakubke, 2002b).

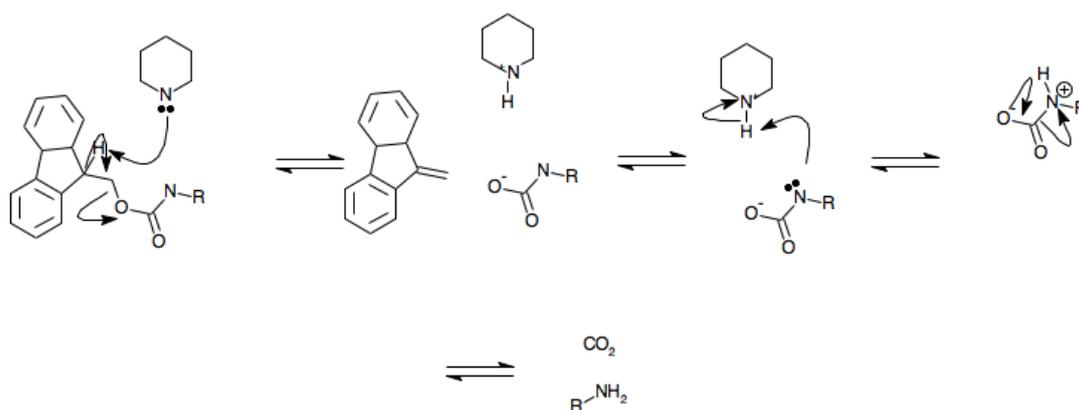
Se utiliza a menudo la protección del éter de *tert*-butilo (*t*-BuO) para la protección de serina, tirosina o treonina dentro de la síntesis con base en Fmoc. Este grupo puede retirarse en condiciones ácidas (TFA 1-2 horas a temperatura ambiente). El mecanismo se presenta en la fig. 4.

Figura 4. Desprotección del grupo Boc.



El grupo Fmoc (fluorenilmetiloxocarbonil) forma una parte importante dentro del estudio de grupos de protección, y su uso se ha extendido hasta tomar un sitio único dentro de la síntesis de estado sólido de péptidos, todo esto debido a la propiedad de ortogonalidad la cual se ha descrito en páginas anteriores: los grupos protectores como Boc o Cbz son lábiles en presencia de ácidos fuertes a diferencia del Fmoc, el cual se elimina de la molécula en condiciones básicas, las cuales no deben ser extremas (se utiliza una solución de piperidina en DMF para este paso). Se presenta el mecanismo a continuación(Kates et al., 1993).

Figura 5. Desprotección del grupo Fmoc en presencia de piperidina como base.



Formación del enlace peptídico en SPPS

La formación de un enlace peptídico corresponde a una reacción de sustitución nucleofílica, en la que el nucleófilo es el grupo amino que ataca al C del grupo carbonilo, interviniendo un intermediario tetraédrico. Sin embargo, el problema existente en esta reacción es que generalmente los ácidos carboxílicos reaccionan con los grupos amino formando sales de amonio en lugar de la amida necesaria. Para evitar este camino se busca la activación del grupo carboxilo, específicamente aumentar la electrofilicidad (de una manera inductiva, o por un efecto mesomérico, o ambos).

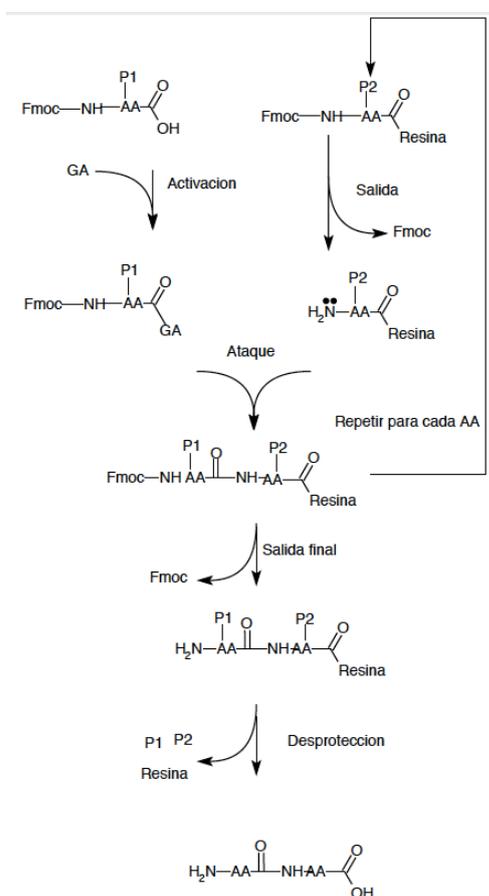
Existen varias formas de activación para el grupo carboxilo, entre las que se encuentran azidas de acilo (se parte del aminoácido, al cual se trata mediante una reacción de hidrasinólisis), el uso de anhídridos, el uso de carbodiimidas (este método se utilizó para la activación del aminoácido, se tratará más adelante), activación de ésteres para producir un intermediario más reactivo *in situ*, cloruros de acilo (en este caso no son muy utilizados ya que pueden darse reacciones secundarias), reactivos basados en fosfonio (Castro, Dormoy, Evin, & Selve, 1975), y reactivos de uronio (Jou, González, Albericio, Lloyd-Williams, & Giralt, 1997) (las cuales, junto a la diisopropilcarbodiimida, se utilizaron para la síntesis del presente trabajo). La sal de uronio utilizada fue el *N*-hidroxibenzotriazol, ya que es la forma más simple para la activación del aminoácido.

Luego de esta breve revisión de los procesos de síntesis para péptidos, se busca una revisión de la síntesis de fase sólida ya que este fue el procedimiento utilizado en este caso. Merrifield propone el uso de una resina insoluble (generalmente un agregado policíclico), en el que el primer péptido (protegido en la parte de la amina terminal) se “anclará” para así evitar la solubilización del mismo y obtener siempre un producto bastante puro al finalizar la reacción (Merrifield, 1963). El diagrama muestra los pasos para estas reacciones, se revisará cada paso.

1. Se debe “anclar” el aminoácido inicial al soporte sólido mediante la activación del mismo.
2. A su vez, se debe realizar la activación del segundo aminoácido (sección carboxílica) mediante cualesquiera de los métodos revisados con anterioridad.
3. Al aminoácido anclado se lo debe desproteger en la sección de la amina terminal, para proceder luego a la formación del enlace peptídico.

4. Luego de esto, se tiene el aminoácido inicial todavía anclado a la resina, mientras que el siguiente aminoácido se encuentra enlazado a este, con su porción terminal amino todavía protegida. Se puede realizar el proceso anterior para colocar cualquier tipo de aminoácido a continuación.
5. Si es que se desea terminar en algún paso subsecuente, lo que deberá realizarse es la desprotección final de las cadenas laterales, y finalmente la desprotección del grupo amino terminal del péptido.
6. Se procede finalmente a la salida del péptido formado, desde el soporte en fase sólida.

Diagrama 1. Pasos para SPPS (síntesis de péptidos en fase sólida, por sus siglas en inglés).



El soporte en fase sólida (generalmente un soporte polimérico) debe tener ciertas características: debe ser inerte químicamente, mecánicamente estable, completamente insoluble en el solvente, poder ser separado fácilmente por filtración, y poseer suficientes sitios reactivos donde el primer aminoácido va a entrar (Sewald & Jakubke, 2002b). Se presenta a continuación una descripción de la resina usada.

Resina *o*-clorotritilo (resina de Barlos)

Para su uso, esta resina debe activarse ya que en diferentes condiciones puede producirse la salida del cloro, y la formación del carbocatión estabilizado. Para ordenar esta situación un agente promotor para la adición de cloro debe utilizarse (SOCl_2), se puede utilizar HCl pero este método ha demostrado ser destructivo hacia la resina (García-Martín, Bayó-Puxan, Cruz, Bohling, & Albericio, 2007). El anclaje del primer aminoácido a esta resina se completa mediante la reacción de sales de carboxilato de amonio (la parte carboxílica del aminoácido se estabiliza generalmente con DIPEA, diisopropiletilamina). En este caso el aminoácido actúa como el nucleófilo en donde se produce la salida de HCl. Debido a su estructura, el grupo clorotritil impide la formación de productos secundarios, siendo el más importante la dicetopiperazina. La eliminación de la resina se puede realizar en condiciones ácidas (TFA 0.5%) en diclorometano, o en presencia de 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol en hexano. El proceso de anclaje se muestra en la fig. 6.

Figura 6. Anclaje a la resina cloruro de 2-clorotritil

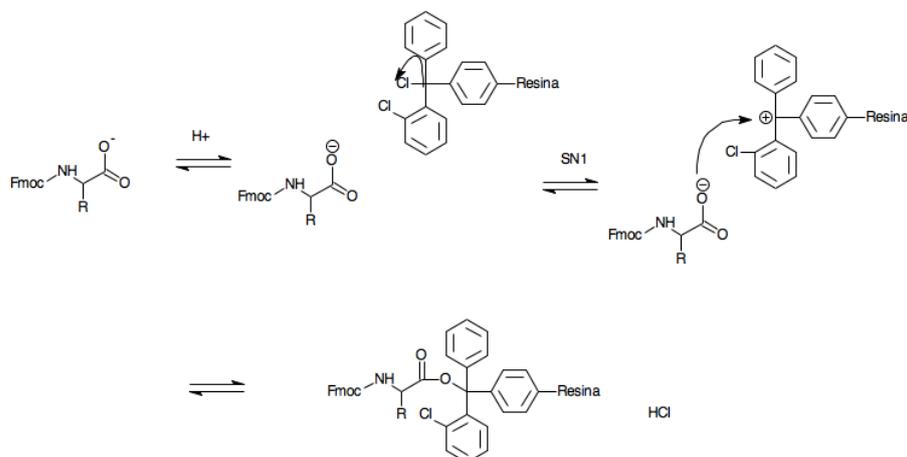
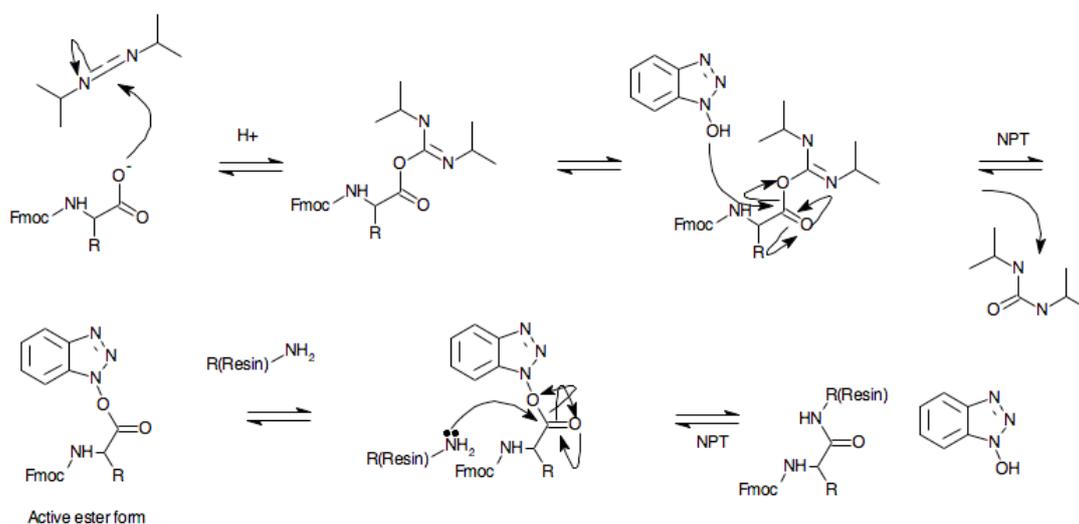


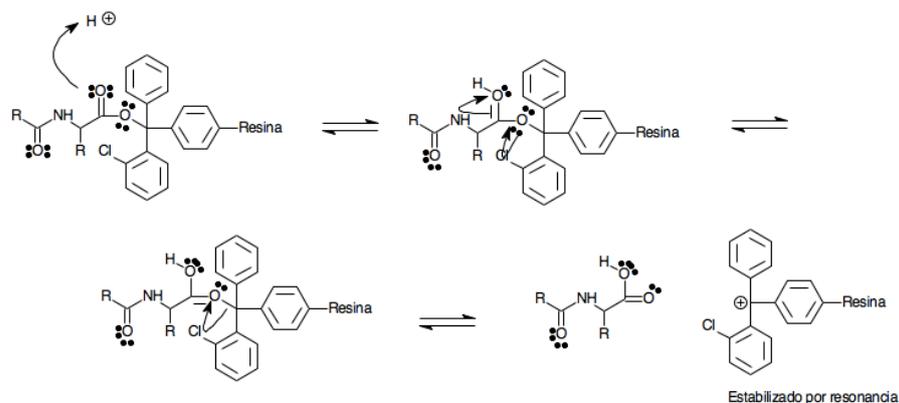
Figura 7. Activación del aminoácido terminal (anclado) para la agregación de otro aminoácido



Desprendimiento de la resina

El mecanismo de la salida de la resina se presenta en la fig. 8, esto se logra en un medio ácido de TFA. Cuando el péptido se ha desprendido completamente puede llevarse a análisis para determinar su pureza.

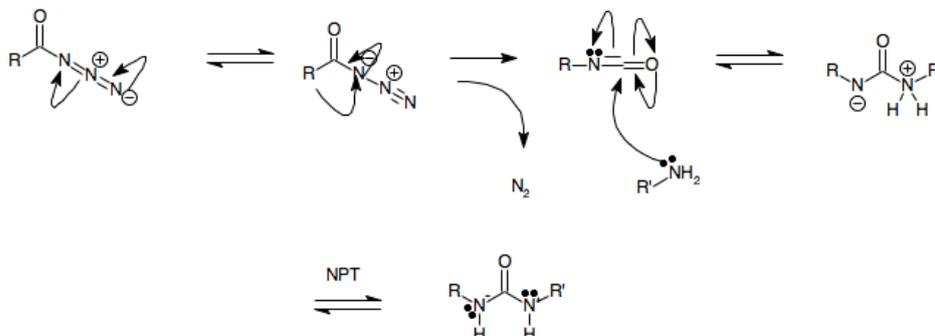
Figura 8. Desprendimiento del péptido desde la resina mediante un medio ácido



Formación del péptido cíclico

La formación de un péptido cíclico genera ciertos inconvenientes, principalmente con la geometría del primer aminoácido anclado a una resina en un trabajo de SPPS. En este caso, se estudiará el protocolo DPPA (diphenylphosphoryl azide) propuesto por Shioiri (Shioiri, Ninomiya, & Yamada, 1972). La salida del péptido de la resina es un paso esencial, así como su purificación previa; sin tomar mucho tiempo ya que la racemización puede aparecer de cualquier manera. Este método evita una racemización del producto, y se usa de manera más aceptada que los mecanismos propuestos con anterioridad para la SPPS de un péptido lineal. Se muestra el mecanismo en la fig. 9 en donde se presenta al grupo amino del segundo aminoácido como parte del ataque nucleofílico.

Figura 9. Formación de un enlace peptídico basado en un pseudo reordenamiento de Curtius, formando un isocianato como intermediario.



En la fig.9 se muestra la formación del ciclo, y se ubica a las cadenas terminales del aminoácido como un grupo azida (carbonilo) y el ataque nucleofílico mediante la amina es el otro extremo de la cadena lineal.

Estudios Computacionales de Optimización de Geometrías y Cálculos de Energías Mínimas para el Complejo Péptido-Metal

Los estudios computacionales de esta molécula se han realizado para mostrar la estabilidad de todo este complejo, al tomar como referencia la capacidad de adsorción que tiene el péptido con diferentes metales y iones metálicos.

Los métodos de mecánica molecular se basan en algunos principios. En primer lugar, se tratan a los núcleos y electrones como si fuesen entes que se asemejan en si a átomos. Las partículas se consideran esféricas con cargas localizadas; además las interacciones se basan en resortes y potenciales clásicos y estas mismas interacciones están dadas para cada átomo en específico. Estas interacciones determinan la distribución espacial y sus energías.

La energía en el sistema se calcula tomando en cuenta el modelo de resortes y potenciales clásicos, en donde la energía total se calcula al sumar la energía de estiramiento, la de torsión, la de flexión y la energía de los átomos que no interactúan (en este caso repulsiones electrostáticas basadas en el radio de van der Waals para cada átomo). El sistema toma en cuenta todos los parámetros y determina la interacción de menor energía como la geometría que va a tomar la conformación seleccionada. Se utilizaron los campos de fuerza preinstalados en Avogadro sin hacer distinción en la parametrización definida para cada uno, es decir, se trabajó con los campos de fuerza para comparar resultados entre sí y argumentar hacia donde iba dirigido el resto del estudio con otros análisis. Se utilizaron en este trabajo los campos de fuerza GAFF, Ghemical, MMFF94, MMFF94s y UFF. Estos arrojaron resultados para el sitio más adecuado de acoplamiento del metal en el péptido.

Al poder conocer hacia donde iba el trabajo (posición del metal), se realizaron estudios en Spartan[®] de tipo semiempírico. Los métodos semiempíricos son versiones simplificadas del modelo Hartree-Fock los cuales utilizan datos empíricos como correcciones para mejorar el manejo del trabajo computacional. Entre los métodos más comunes que se utilizan se encuentran MNDO (Modified Neglect of Differential Overlap), AM1 (Austin Model 1), PM3 (Parametric Model number 3) y PM6 (Parametric Model number 6); y todos estos se basan en la aproximación a la integral NDDO (Neglect of Differential Diatomic Overlap). En este caso es importante mencionar que la energía calculada se presenta como entalpía de formación en lugar de energía total. El método presentado en el estudio es el método PM6 el cual es una modificación de sus antecesores PM3 y PM5, los cuales proveyeron mejores resultados a los métodos tradicionales hasta ese momento. El método PM3 fue desarrollado por Stewart en 1989 (Stewart, 1989), y después Stewart mejoró su parametrización para

poder trabajar con ciertos metales de transición (Zn, Cd y Hg los cuales tienen llenos sus orbitales *d*) y los metales de los grupos principales, siendo este el nacimiento del modelo PM5.

El modelo PM6 fue presentado en el 2007 por Stewart (Stewart, 2007), y las ventajas de este método fueron los parámetros establecidos para metales de transición; algo único hasta el momento. Como se menciona en dicho artículo (Stewart, *Ibid*), la eficiencia del método PM6 para predecir entalpía de formación en campos como la bioquímica, por ejemplo, supera a los métodos HF o B3LYP DFT los cuales usan como funciones base 6-31G. Para un grupo representativo de compuestos, PM6 da un error cercano a los 4.4 kcal/mol; siendo los errores del método HF y de B3LYP 7.4 kcal/mol y 5.2 kcal/mol; además de su relativo bajo costo computacional ya que incluso se menciona que muchos cálculos se realizan en computadoras portátiles. Más adelante se presentan los resultados obtenidos para este trabajo.

Sección experimental

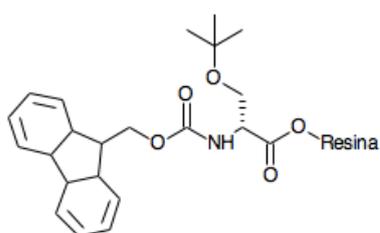
Para la sección experimental se utilizaron los lineamientos establecidos por el Instituto de Química Orgánica y Bioquímica de Praga, República Checa (UOCHB) bajo el mando de Jaroslav Sebestik, PhD.

Síntesis de Fmoc-D-Ser(tBu)-O-Resina (Resina= 2-chlorotrityl-) (1)

La resina (cloruro de 2-clorotritil) fue activada antes de su utilización, para esto se disolvieron 5 g de resina en 50 mL de DCM con 1.5 mL de cloruro de tionilo con agitación continua por dos horas. Luego de este paso, la resina fue filtrada y colocada en un desecador toda la noche bajo una atmósfera reducida. Después de 20 horas en el desecador se asumió que la resina puede ser utilizada. Se utilizó 300 mg de resina para las síntesis a continuación. La resina se colocó en un balón de fondo redondo (10 mL) con 5 mL de DCM previamente seco, y se dejó agitar por 5 minutos; luego de este paso se extrajo el DCM antes de continuar la síntesis. En otro balón de fondo redondo (10 mL) 115 mg de Fmoc-D-Ser(tBu)-OH se disolvieron en 3 mL de DMF y 51 μ L de DIPEA (diisopropiletilendiamina). Esta solución se agitó por 10 minutos. Luego de este paso la solución se transfirió al balón que contenía la resina, y se continuó con una agitación lenta bajo una atmósfera de nitrógeno. Se agitó durante 2 horas. El sobrenadante fue eliminado y la resina fue transferida a una jeringa preparada con un poco de algodón que servirá como filtro. Los sitios en donde la resina no fue anclada por el aminoácido se eliminaron utilizando una solución de DIPEA/MeOH (1 mL, 1:9) y se permitió agitar por 30 minutos. La solución fue eliminada de la jeringa. Después de este paso se procedió a lavar el interior de la jeringa de la siguiente manera: DCM(3 veces, 3 minutos cada una, 3 mL), DMF (4veces, 4minutos cada una, 3 mL), MeOH (1veces, 1minutos cada una, 3 mL), DCM (4veces, 4minutos cada una, 3 mL). Luego de

esto se procedió a secar en un desecador bajo atmósfera reducida la jeringa. Al día siguiente se procedió a determinar el grado de saturación del aminoácido en la resina mediante análisis de Uv-Vis. Se tomaron 5 mg de la resina luego del proceso, se colocó en otra jeringa con 0,5 mL de una solución al 20% de piperidina con DMF y se dejó agitar por 10 minutos. El sobrenadante se guardó y procedió a colocar 1 mL de la misma solución en la jeringa para un segundo paso de desprotección. Se agitó luego de la adición y se procedió a juntar los dos volúmenes. Se colocaron en un balón volumétrico de 25 mL y se aforó con etanol 96%. Una solución base se preparó colocando el mismo volumen utilizado para la desprotección (11 mL de piperidina aprox.) en un balón volumétrico de 25 mL, el cual se aforó con etanol 96%. Se procedió a medir la absorbancia de la última solución para realizar un “blanco”, y obtener una señal de fondo para luego proceder a la toma del espectro de Uv-Vis de la solución luego de las adiciones de desprotección en el primer balón volumétrico.

Figura 10. Fmoc-D-Ser(tBu)-O-Resina

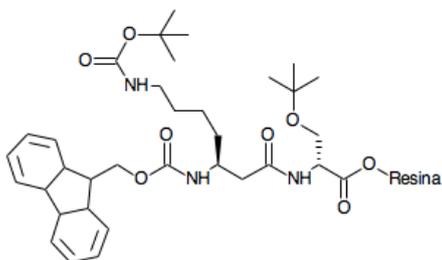


Síntesis de Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina (Resina = 2-chlorotrietyl-) (2)

Antes de la utilización de la resina anterior, se procedió a desproteger el aminoácido del grupo Fmoc mediante la adición de una solución al 20% de piperidina/DMF dos veces en la jeringa (1 mL en donde se agitó por 1 minuto cada vez). Después de esto 2 mL de

DMF se utilizaron para un lavado final. Una solución de Fmoc-S-Lys(Boc)-OH (281.4 mg, 4 eq.) en DMF seco (5 mL) se preparó en un balón de fondo redondo de 10 mL con agitación lenta y constante, a la misma solución se agregó HOBt (82 mg, 4.4 eq) y después DIC (N, N'-diisopropilcarbodiimida) (105 μ L, 4.4 eq), se permitió que se agite a temperatura ambiente por 10 minutos. Después, esta solución se añadió al desprotegido aminoácido inicial, localizado en la jeringa siempre. Nota: los equivalentes determinados se utilizaron al obtener una relación de milimoles cargados de D-Ser(tBu) en mg de resina. Con una agitación lenta y constante bajo una atmósfera inerte se procedió a agitar durante toda la noche. Se determinó el punto final de adición al colocar el indicador azul de bromofenol el cual cambió hasta volverse amarillo, lo que indica la ausencia de grupos amino del primer aminoácido anclado a la resina (el color amarillo indica la pérdida de basicidad al reaccionar el grupo amino con la forma activa del segundo aminoácido). Luego de este paso, se procedió a la desprotección del Fmoc en el nuevo aminoácido anclado, para lo cual se realizaron dos adiciones y lavados con una solución 20% piperidina/DMF (1 mL en donde se agitó por 1 minuto cada vez). Para determinar si la desprotección fue correcta se procedió a colocar 0,5 mL de la solución de piperidina en la jeringa y se agitó por 5 minutos. Luego de esto se tomó 3-4 gotas de sobrenadante y se colocó en un recipiente con agua, en donde se espera la formación de dibenzofulveno el cual es un producto insoluble que se forma luego de la desprotección del Fmoc (esta adición forma en el agua una suspensión blanca bastante notoria). Si este precipitado se ha formado, se realiza por 25 minutos un lavado de 1 mL extra de la solución de piperidina.

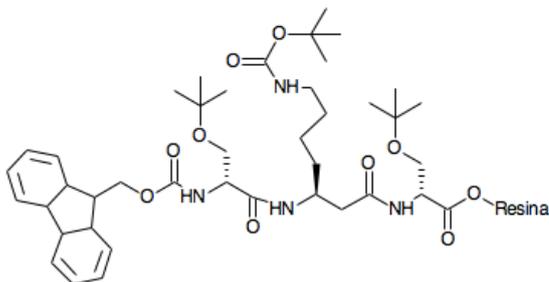
Figura 11. Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina



Síntesis de Fmoc-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina (Resina = 2 chlorotriyl-) (3)

Después del paso de desprotección de la sección 2, se cargó en el sistema aminoácido/resina Fmoc-D-Ser(tBu)-OH. El procedimiento es similar al de la sección anterior: se preparó una solución con 230 mg de Fmoc-D-Ser(tBu)-OH (4 eq) en 5 mL de DMF seco. A esta solución se agregó 82 mg de HOBt (4.4 eq), y después 105 μ L de DIC (4.4 eq). La solución se agitó por 10 minutos antes de colocarla en la jeringa, con el aminoácido anclado en la resina previamente desprotegido de Fmoc. Se añadió azul de bromofenol como indicador para el avance de la reacción. La jeringa contenedora se agitó durante toda la noche, y al día siguiente se determinó que la reacción había procedido al notar el cambio del indicador. Se procedió a desproteger al aminoácido anclado a la resina con el método especificado en la sección anterior antes de proceder a la siguiente adición.

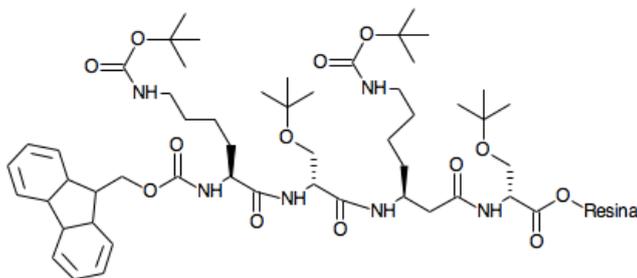
Figura 12. Fmoc-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina



Síntesis de Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina (Resina = 2 chlorotriyl-) (4)

Después del paso de desprotección de la sección 3, se cargó en el sistema aminoácido/resina Fmoc-S-Lys(Boc)-OH. El procedimiento es similar al de la sección anterior: se preparó una solución con 280 mg de Fmoc-DSer(tBu)-OH (4 eq) en 5 mL de DMF seco. A esta solución se agregó 82 mg de HOBt (4.4 eq), y después 105 μ L de DIC (4.4 eq). La solución se agitó por 10 minutos antes de colocarla en la jeringa, con el aminoácido anclado en la resina previamente desprotegido de Fmoc. Se añadió azul de bromofenol como indicador para el avance de la reacción. La jeringa contenedora se agitó durante toda la noche, y al día siguiente se determinó que la reacción había procedido al notar el cambio del indicador. Se procedió a desproteger al aminoácido anclado a la resina con el método especificado en la sección anterior antes de proceder a la siguiente adición.

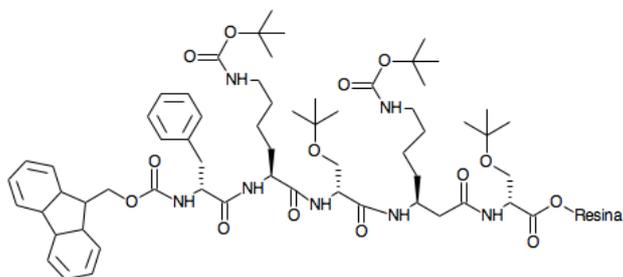
Figura 13. Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina



Síntesis de Fmoc-D-Phe-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina
(Resina = 2 chlorotriptyl-) (5)

Después del paso de desprotección de la sección 4, se cargó en el sistema aminoácido/resina Fmoc-D-Phe-OH. El procedimiento es similar al de la sección anterior: se preparó una solución con 281 mg de Fmoc-D-Phe-OH (4 eq) en 5 mL de DMF seco. A esta solución se agregó 82 mg de HOBt (4.4 eq), y después 105 μ L de DIC (4.4 eq). La solución se agitó por 15 minutos antes de colocarla en la jeringa, con el aminoácido anclado en la resina previamente desprotegido de Fmoc. Se añadió azul de bromofenol como indicador para el avance de la reacción. La jeringa contenedora se agitó durante toda la noche, y al día siguiente se determinó que la reacción había procedido al notar el cambio del indicador. Se procedió a desproteger al aminoácido anclado a la resina con el método especificado en la sección anterior antes de proceder a la siguiente adición.

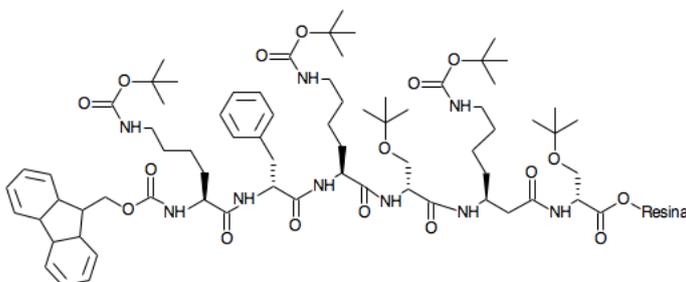
Figura 14. Fmoc-D-Phe-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina



Síntesis de Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Phe-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina (Resina = 2 chlorotriyl-) (6)

Después del paso de desprotección de la sección 4, se cargó en el sistema aminoácido/resina Fmoc-L-Lys-OH. El procedimiento es similar al de la sección anterior: se preparó una solución con 230 mg de Fmoc-L-Lys-OH (4 eq) en 5 mL de DMF seco. A esta solución se agregó 82 mg de HOBt (4.4 eq), y después 105 μ L de DIC (4.4 eq). La solución se agitó por 15 minutos antes de colocarla en la jeringa, con el aminoácido anclado en la resina previamente desprotegido de Fmoc. Se añadió azul de bromofenol como indicador para el avance de la reacción. La jeringa contenedora se agitó durante 4 horas hasta que se observó un cambio de color. Se procedió a desproteger al aminoácido anclado a la resina con el método especificado en la sección anterior.

Figura 15. Fmoc-L-Lys(Boc)-D-Phe-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-L-Lys(Boc)-D-Ser(tBu)-O-Resina



Ciclización del péptido D-Phe-L-Lys-D-Ser-L-Lys-D-Ser

Después de un estudio de los análisis de aminoácidos se descubrió que la última sección L-Lys(Boc) no se había acoplado al sistema (ver sección de Discusión). Se procedió con la formación del ciclo siguiente el proceso de DPPA. Luego de la purificación de la mezcla para evitar la presencia de aminoácidos no anclados a la resina, se liberó a los grupos protectores del aminoácido utilizando TFA 15%, el cual liberó los grupos Boc y tBuO del aminoácido, se dejó agitar por 30 minutos con DMF para poder extraer todos los residuos. Después se añadió TFA en una concentración del 40% para así sacar al aminoácido de la resina y se agitó por 30 minutos más, en donde después de una filtración dentro de una jeringa se pudo obtener el aminoácido desprotegido y fuera de la resina. Se adicionó un equivalente de DPPA (*diphenylphosphoryl azide*) en DMF seguido de una adición de trietilamina (2 eq.) en donde se agitó a 0 C por 3 horas y a temperatura ambiente por toda la noche. Se separó al aminoácido mediante una purificación con HPLC y se realizó un análisis con una porción de este producto para poder observar su composición.

Sección computacional

Se realizaron estudios computacionales para el complejo utilizando dos software: Avogadro[®] (software de libre acceso) (Tofan, 2009) y Spartan[®] (software comercial) (Jonsson, 1995).

En el caso de Avogadro, se han utilizados métodos de mecánica molecular. Estos métodos se utilizan para describir propiedades moleculares y estructurales de una manera bastante rápida y sencilla. Se aplica este método para sistemas que contienen varios átomos, y en el trabajo presente se utilizó como punto de partida para poder describir la posición más favorable del metal (ácido de Lewis) en los diferentes sitios de interacción con el sistema peptídico (bases de Lewis).

Luego de una optimización previa con el software Avogadro, se procedió a utilizar el software Spartan[®] para cálculos semiempíricos de tipo PM6, se utilizó una laptop MacBook Air con cuatro procesadores Core i5, con una velocidad de 1.7GHz.

Equipos utilizados para análisis:

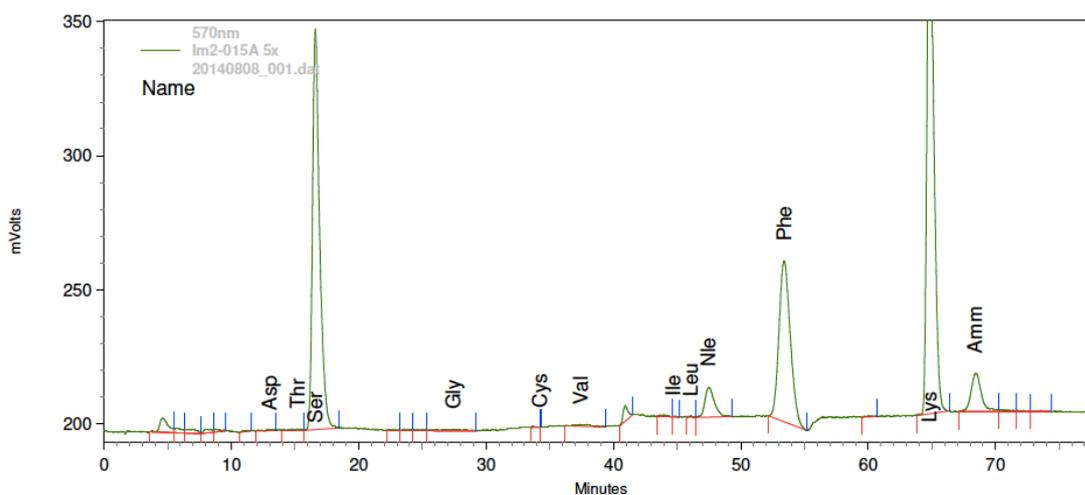
- Biochrom 30 Amino Acid Analyzer.
- MALDI-TOF/TOF (ultraFlex[™]) analizador de masas.
- ESI LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) analizador de masas.

Análisis de resultados

Espectros de masa y análisis de aminoácidos

Las diferentes secciones de la síntesis fueron monitoreadas *in situ*, al eliminar la sección terminal del Fmoc, y a su vez al controlar la reacción mediante un indicador ácido-base. Al terminar la síntesis del péptido lineal, se encontró mediante un análisis cuidadoso que la última sección (Lys) no se acopló con el sistema lineal. Se presenta a continuación el análisis de aminoácidos de la primera sección del experimento.

Figura 16. Análisis de aminoácidos en el péptido (después de la salida de Fmoc y grupos protectores).

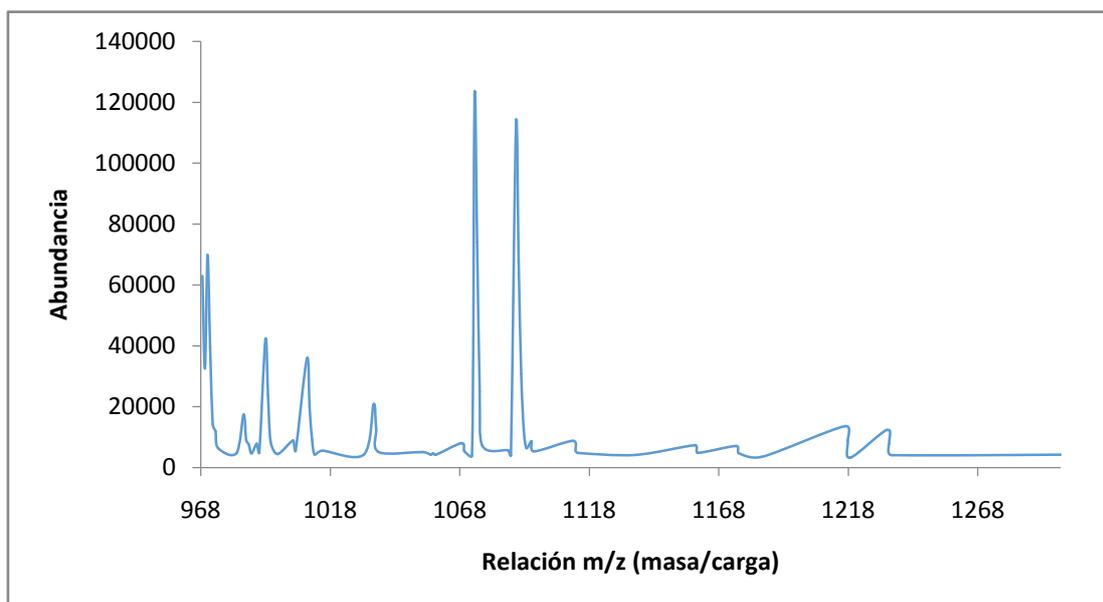


Nombre	Tiempo de retención [min]	Cantidad [nmol]
Ser (serina)	16.60	11.44
Phe (fenilalanina)	53.40	6.77
Lys (lisina)	64.83	13.86

En el análisis anterior se puede observar la relación que existe entre el análisis de cromatografía para poder obtener la cantidad de aminoácido presente en la muestra. Esto se realiza mediante una cromatografía líquida de intercambio iónico, basado en el principio de operación de flujo continuo (Biochrom 30 Amino Acid Analyzer), teniendo una derivatización post-columna con ninhidrina y manteniendo una relación de diferentes buffers de citrato de litio a lo largo del análisis. Se puede observar en el análisis que el péptido sintetizado tiene como componentes principales la serina (Ser), la fenilalanina (Phe) y la lisina (Lys), que se encuentran en un radio de 2:1:2 aproximadamente. Esto concuerda con la síntesis llevada a cabo, a excepción del último aminoácido que se agregó al sistema que fue la lisina. Esto demuestra que el último aminoácido no se acopló al sistema, y puede ser explicado mediante otros análisis también; siendo en este caso el mas objetivo el análisis de masas que se presenta a continuación.

El análisis de masas también se presenta a continuación para el péptido lineal.

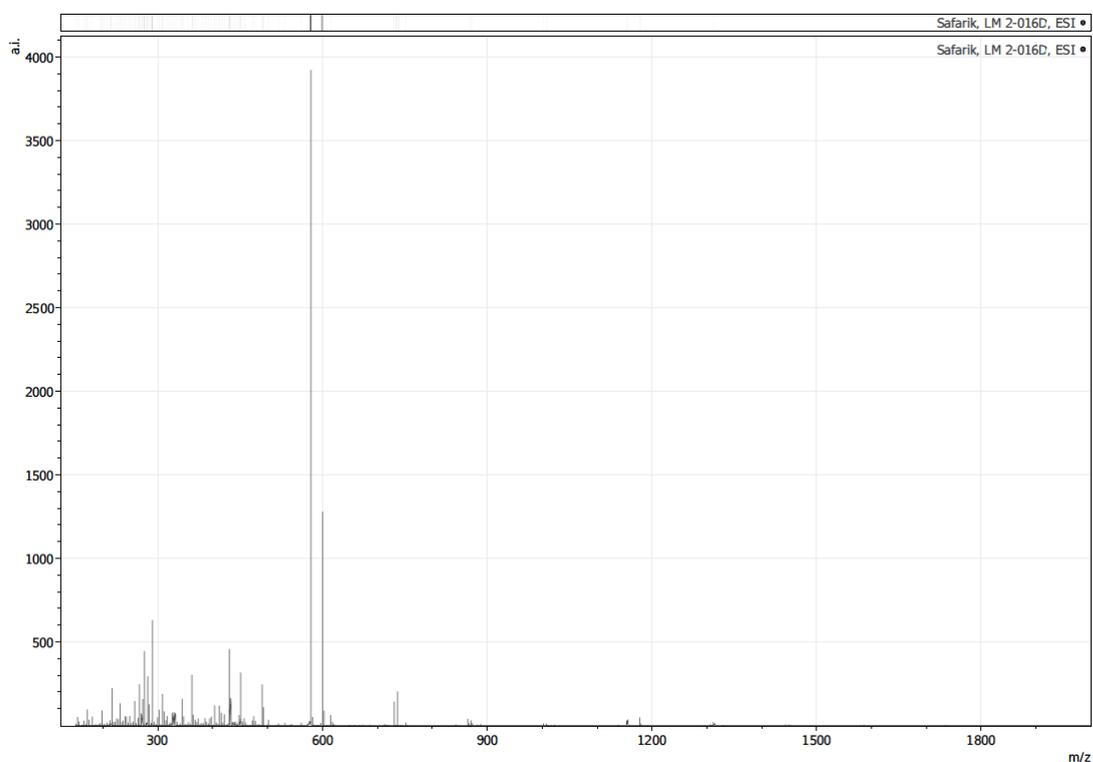
Figura 17. Análisis MALDI-TOF para el péptido lineal sintetizado.

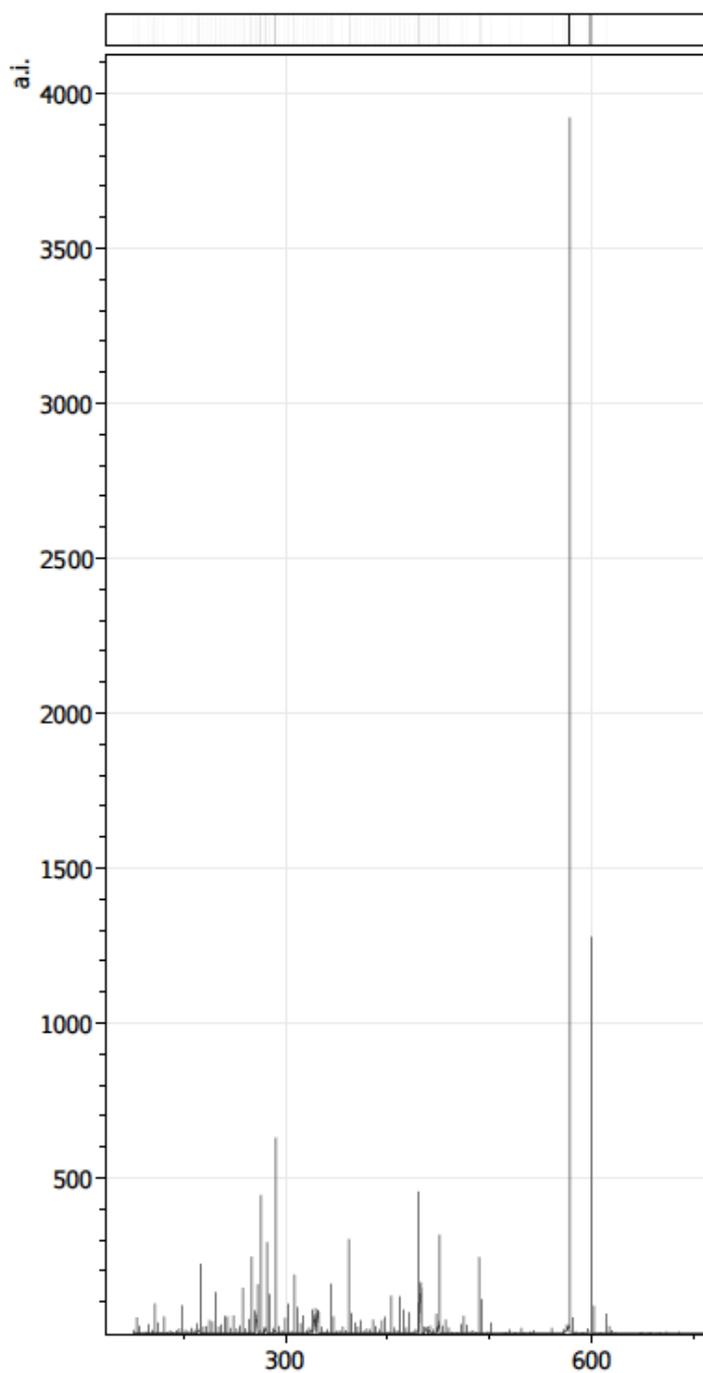


Se utilizó un sistema MALDI-TOF/TOF (ultraFlexTM), en donde los picos más importantes se muestran en 1089.66 M/Z, 1073.68 m/z y 970.6 m/z. Siendo este el péptido lineal, la masa que se espera del sistema Fmoc-Lys(Boc)-Phe-Lys(Boc)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ser(tBu) es de 1341,66 g/mol, por lo que se conoce que un aminoácido no se acopló en la parte final del péptido. El sistema Fmoc-Phe-Lys(Boc)-Ser(tBu)-Lys(Boc)-Ser(tBu) tiene como masa 1113,37 g/mol el cual se acerca mucho más a la masa del sistema. En este caso el análisis MALDI solo nos revela que la masa esperada para nuestro péptido no cumple con todos los requisitos, y por ende es de esperarse que la síntesis del péptido no haya tomado el camino esperado. Sin embargo el análisis de aminoácidos junto al siguiente análisis de masas proveen una idea más clara de lo que consideramos nuestro producto final. El resto de picos podrían llegar a explicarse como subproductos o divisiones en el péptido al haber sido atacado con el láser para el análisis de masas. Este análisis fue realizado dentro del mismo centro de investigación (UOCHB).

El análisis de masas para el compuesto cíclico se presenta a continuación. Se utilizó un análisis de ESI (electrospray ionization) con un aparato LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) que utiliza una trampa de iones conectado a un analizador de masas Orbitrap. Este inicialmente se conecta a un sistema de HPLC, el cuál ha sido seleccionado para poder separar el producto requerido y otros subproductos que pueden encontrarse en la mezcla. Se presenta a continuación el análisis de masas, con un acercamiento al área de interés.

Figura 18. Análisis de masas del producto cíclico completamente desprotegido.



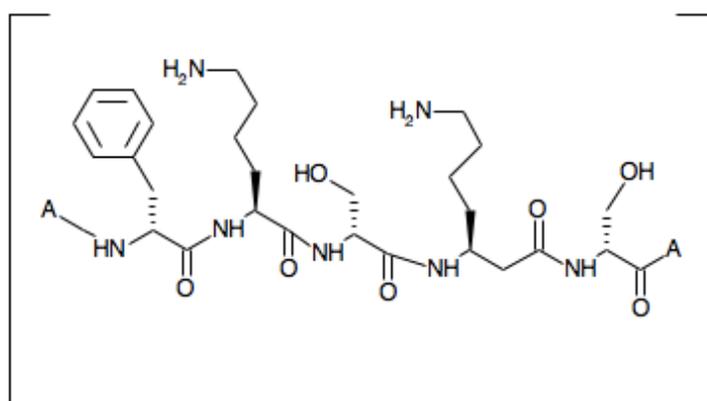


Se puede apreciar un pico entre 550 y 600 m/z, este pico corresponde a un pico de masa 577.67 con carga +1 el cual indica la masa del péptido cíclico sintetizado finalmente. Este péptido tiene la secuencia c(D-Phe-L-Lys-D-Ser-L-Lys-D-Ser), con fórmula molecular $C_{27}H_{43}N_7O_7$ (ver graf.19) (56.14 % C, 7.5% H, 16.97% N, y 19.39 O), el cual

concuerta con la masa esperada para este sistema.

Siendo este análisis junto con el estudio de aminoácidos contudente, se puede aseverar que se ha llevado una ciclización de un péptido compuesto por 5 aminoácidos, el cual ha sido llevado a cabo mediante la SPPS (*solid phase peptide synthesis*).

Figura 19. Péptido cíclico sin grupos de protección.



Estudio computacional de conformación de complejos del péptido con metales

El caso de estudio principal para este trabajo se basó en las propiedades de adsorción que tiene el complejo con diferentes metales. Para esto, se utilizó el programa Avogadro para calcular la energía mínima entre cada complejo formado por las bases de Lewis presentes en la molécula (sitios que pueden ocupar orbitales vacíos de los metales, que van a actuar como ácidos Lewis). Al empezar el trabajo de estabilidad de compuestos se tomó en cuenta al hierro III al considerarse un ion importante en el organismo con quelantes específicos (sideroforos). Para realizar análisis de estabilidad en relación al radio de cada especie, se tomaron tres metales en consideración: Ca, Zn, y Mg, porque pueden encontrarse en el cuerpo humano formando parte de una dieta balanceada, entre otros oligoelementos. Se utilizó un acercamiento de MM (*molecular mechanics*) para

los cálculos en este trabajo, así como diferentes campos de fuerza para poder comparar sus resultados. Los campos de fuerza utilizados fueron: GAFF, Gchemical, MMFF94, MMFF94s y UFF. Es importante denotar que además de la afinidad química existente en el complejo (*hard soft acid base theory*) el tamaño del metal en el complejo es importante para la estabilidad de este sistema. Se presentan los diferentes radios de los metales a continuación:

Tabla 1. Radios de las diferentes especies metálicas presentes en el estudio (Housecroft & Sharpe, 2005)

Metal	Carga	Radio (metálico o iónico, se especifica en cada caso) [pm]
Fe	M^0	126
	M^{2+}	61
	M^{3+}	55
Zn	M^0	137
	M^{2+}	74
Mg	M^0	160
	M^{2+}	62
Ca	M^0	197
	M^{2+}	100

Se presentan los resultados a continuación:

Tabla 2. Energías mínimas calculadas para el péptido cíclico (se ha seleccionado el conformero de menor energía) con MM (*molecular mechanics*)

GAFF [kJ/mol]	Ghemical [kJ/mol]	MMFF94 [kJ/mol]	MMFF94s [kJ/mol]	UFF [kJ/mol]
32,4627	105,035	470,74	485,941	477,314

Cuando se ha colocado un metal en la estructura, se han analizado dos casos: se revisó la interacción entre los metales y la cadena lateral de una de las serinas en el sistema (terminación en grupo amino); y también se analizó la interacción con el núcleo del péptido cíclico que se encuentra copado de grupos carbonilo. Se presentan las tablas a continuación.

Tabla 3. Energías calculadas con MM para el complejo péptido-Fe⁰ en diferentes posiciones del macrociclo.

	Δ GAFF [kJ/mol]	Δ Ghemical [kJ/mol]	Δ MMFF94 [kJ/mol]	Δ MMFF94s [kJ/mol]	Δ UFF [kJ/mol]
Complejo Fe ⁰ - amina	157,752	16,3353	13,9298	104.233	479,58
Complejo Fe ⁰ - núcleo	152,787	8,41619	-833,772	-758.219	426,049

Tabla 4. Energías calculadas con MM para el complejo péptido-Fe³⁺ en diferentes posiciones del macrociclo.

	Δ GAFF [kJ/mol]	Δ Gchemical [kJ/mol]	Δ MMFF94 [kJ/mol]	Δ MMFF94s [kJ/mol]	Δ UFF [kJ/mol]
Complejo Fe ³⁺ -amina	125,2893	-88,6997	-456,8102	-381,708	2,266
Complejo Fe ³⁺ -núcleo	120,3243	-96,61881	-1304,512	-1244,16	-51,265

Tabla 5. Distancias calculadas con MM para el complejo péptido-Fe³⁺ en diferentes posiciones del macrociclo.

	GAFF [Å]	Gchemical [Å]	MMFF94 [Å]	MMFF94s [Å]	UFF [Å]
Complejo Fe ³⁺ -amina (Fe---N)	2.539	2.338	1.916	1.915	2.707
Complejo Fe ³⁺ -núcleo carbonilo 1 (Fe---O)	3.493	2,749	1.913	2.029	2.918
Complejo Fe ³⁺ -núcleo carbonilo 2 (Fe---O)	3.778	2.713	2.042	1.933	3.098

Complejo Fe ³⁺ -núcleo carbonilo 3 (Fe---O)	6.163	5,548	1.972	1.977	5.053
---	-------	-------	-------	-------	-------

Tabla 6. Energías calculadas con MM para el complejo péptido-Ca⁰ en diferentes posiciones del macrociclo.

	Δ GAFF [kJ/mol]	Δ Ghemical [kJ/mol]	Δ MMFF94 [kJ/mol]	Δ MMFF94s [kJ/mol]	Δ UFF [kJ/mol]
Complejo Ca ⁰ - amina	161.861	7.385	257.304	287.518	495.153
Complejo Ca ⁰ - núcleo	151.943	12.109	-120.1	-58.4941	656.669

Tabla 7. Energías calculadas con MM para el complejo péptido-Ca²⁺ en diferentes posiciones del macrociclo.

	Δ GAFF [kJ/mol]	Δ Ghemical [kJ/mol]	Δ MMFF94 [kJ/mol]	Δ MMFF94s [kJ/mol]	Δ UFF [kJ/mol]
Complejo Ca ²⁺ -amina	129,398	-97,650	-213,436	-198,423	17,839
Complejo Ca ²⁺ -núcleo	119,480	-92,926	-590,840	-544,435	179,355

Tabla 8. Distancias calculadas con MM para el complejo péptido-Ca²⁺ en diferentes posiciones del macrociclo.

	GAFF [Å]	Gchemical [Å]	MMFF94 [Å]	MMFF94s [Å]	UFF [Å]
Complejo Ca ²⁺ -amina (Ca---N)	2.401	2.584	2.208	2.427	2.562
Complejo Ca ²⁺ -núcleo carbonilo 1 (Ca---O)	2.48	2.359	2.399	2.351	3.719
Complejo Ca ²⁺ -núcleo carbonilo 2 (Ca---O)	3.273	2.711	2.261	2.285	3.488
Complejo Ca ²⁺ -núcleo carbonilo 3 (Ca---O)	5.429	5.408	2.35	2.394	3.7

Tabla 9. Energías calculadas con MM para el complejo péptido-Zn⁰ en diferentes posiciones del macrociclo.

	Δ GAFF [kJ/mol]	Δ Ghemical [kJ/mol]	Δ MMFF94 [kJ/mol]	Δ MMFF94s [kJ/mol]	Δ UFF [kJ/mol]
Complejo Zn ⁰ -amina	154.859	12.7583	202.315	229.051	480.342
Complejo Zn ⁰ -núcleo	195.726	2.663	-238.337	-180.345	424.405

Tabla 10. Energías calculadas con MM para el complejo péptido-Zn²⁺ en diferentes posiciones del macrociclo.

	Δ GAFF [kJ/mol]	Δ Ghemical [kJ/mol]	Δ MMFF94 [kJ/mol]	Δ MMFF94s [kJ/mol]	Δ UFF [kJ/mol]
Complejo Zn ²⁺ -amina	122,396	-92,277	-268,425	-256,890	3,028
Complejo Zn ²⁺ -núcleo	163,263	-102,372	-709,077	-666,286	-52,909

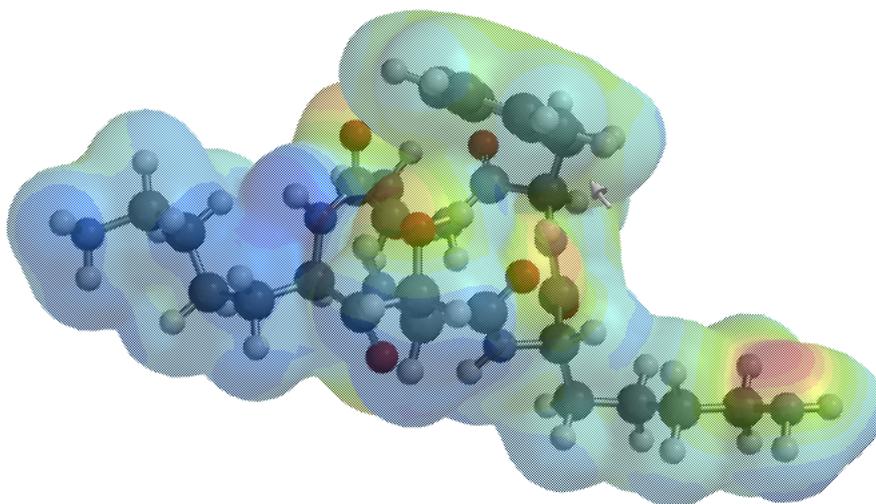
Tabla 11. Distancias calculadas con MM para el complejo péptido-Zn²⁺ en diferentes posiciones del macrociclo.

	GAFF [Å]	Ghemical [Å]	MMFF94 [Å]	MMFF94s [Å]	UFF [Å]
Complejo Zn ²⁺ -amina (Zn---N)	2.912	2.287	2.085	2.092	2.623
Complejo Zn ²⁺ -núcleo carbonilo 1 (Zn---O)	3.92	2.672	2.186	2.223	3.428
Complejo Zn ²⁺ -núcleo carbonilo 2 (Zn---O)	3.561	2.929	2.015	2.097	3.067
Complejo Zn ²⁺ -núcleo carbonilo 3 (Zn---O)	3.543	5.526	2.096	2.185	3.539

Análisis de los estudios computacionales realizados con el método semiempírico PM6

Se presenta a continuación el estudio realizado con el programa Spartan[®] tomando el método PM6. Se presentan mapas de potencial electrostático en cada caso. Para los mapas de potencial electrostático se utiliza una paleta de colores que indica que los colores cercanos al rojo tienen la mayor densidad electrónica, y los colores cercanos al azul la menor densidad electrónica.

Figura 19. Mapa de potencial electrostático para el péptido cíclico, calculado con el semiempírico PM6 (la paleta de colores indica que los colores cercanos al rojo tienen la mayor densidad electrónica, y los colores cercanos al azul la menor densidad electrónica).



Se aprecia en la figura anterior los sitios ácidos y básicos de la molécula (péptido) (esto se logra después de haberse definido que los sitios básicos de una molécula son los de mayor densidad electrónica, y los sitios ácidos los de menor densidad electrónica), en donde se espera una interacción con ácidos de Lewis para su estudio.

Se presenta a continuación el estudio de la interacción de Fe^0 en el centro de la molécula.

Tabla 12. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.

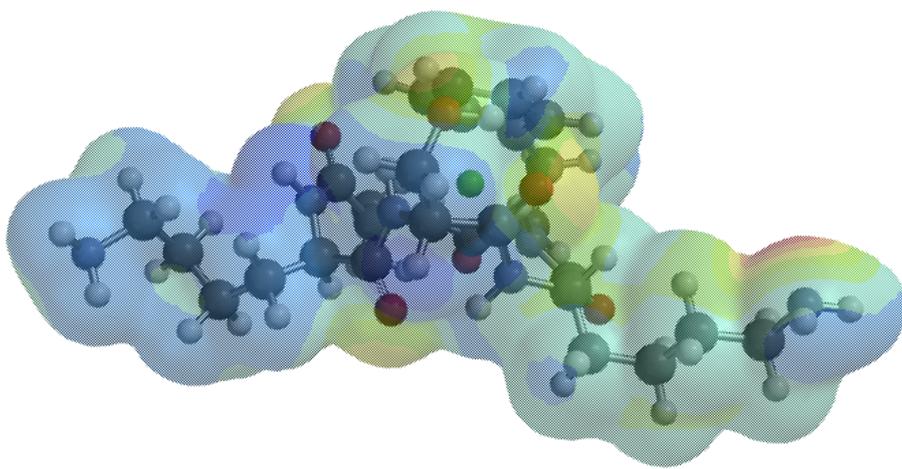
Sistema	Energía (entalpía de formación) [kJ/mol]
Péptido	-1304,44
Hierro	649,5
Péptido—Hierro	-1259,62
Δ Energía	-604,68

Tabla 13. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.

Átomos	Distancia [Å]
C1-Fe	2.377
C2-Fe	2.385
C3-Fe	2,361
C4-Fe	2,398
C5-Fe	2,319
C6-Fe	2,222

Se presenta a su vez el mapa de potencial electrostático para el complejo hierro-péptido dentro del núcleo.

Figura 20. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con Fe^0 , calculado con el semiempírico PM6. El átomo de hierro se muestra con un color verde en el centro.



Se presenta a continuación el estudio de la interacción de Fe^{2+} en el centro de la molécula.

Tabla 14. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.

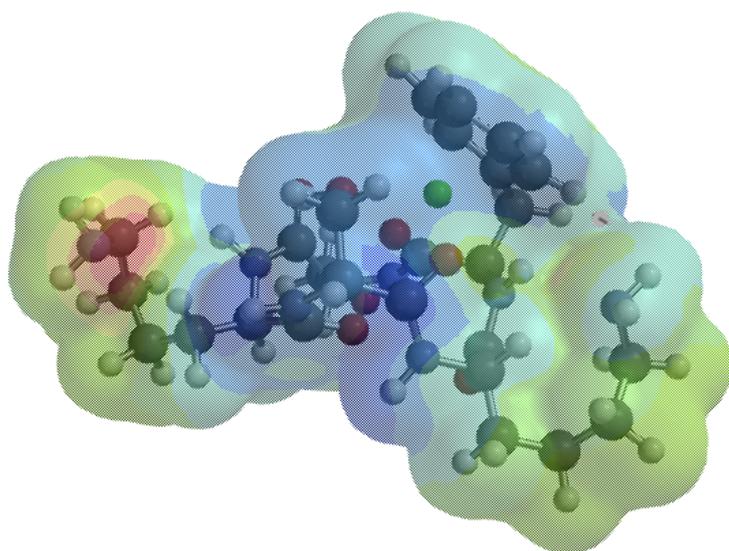
Sistema	Energía (entalpía de formación) [kJ/mol]
Péptido	-1304,44
Hierro	2665,31
Péptido—Hierro	158,03
Δ Energía	- 1202,84

Tabla 15. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.

Átomos	Distancia [\AA]
C1-Fe	2.198
C2-Fe	2.257
C3-Fe	2,178
C4-Fe	2,160

C5-Fe	2,210
C6-Fe	2,091

Figura 21. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el ion Fe^{2+} , calculado con el semiempírico PM6. Se muestra al ion ferroso como una esfera verde en el centro.



Se presenta a continuación el estudio de la interacción de Fe^{3+} en el centro de la molécula.

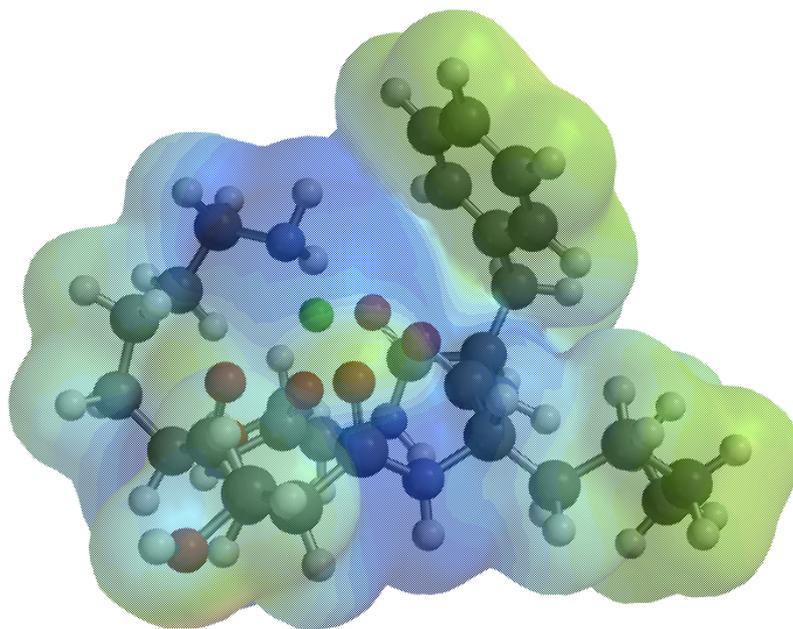
Tabla 16. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.

Sistema	Energía (entalpía de formación) [kJ/mol]
Péptido	-1304,44
Hierro	5343,46
Péptido—Hierro	1223,787
Δ Energía	-2815,233

Tabla 17. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.

Átomos	Distancia [Å]
C1-Fe	2,282
C2-Fe	2,202
C3-Fe	2,233
C4-Fe	2,141
C5-Fe	2,182
C6-Fe	2,147

Figura 22. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el ion férrico, calculado con el semiempírico PM6. Se presenta al ion férrico como una esfera verde en el centro.



Se presenta a continuación el estudio de la interacción de Zn^{2+} en el centro de la molécula.

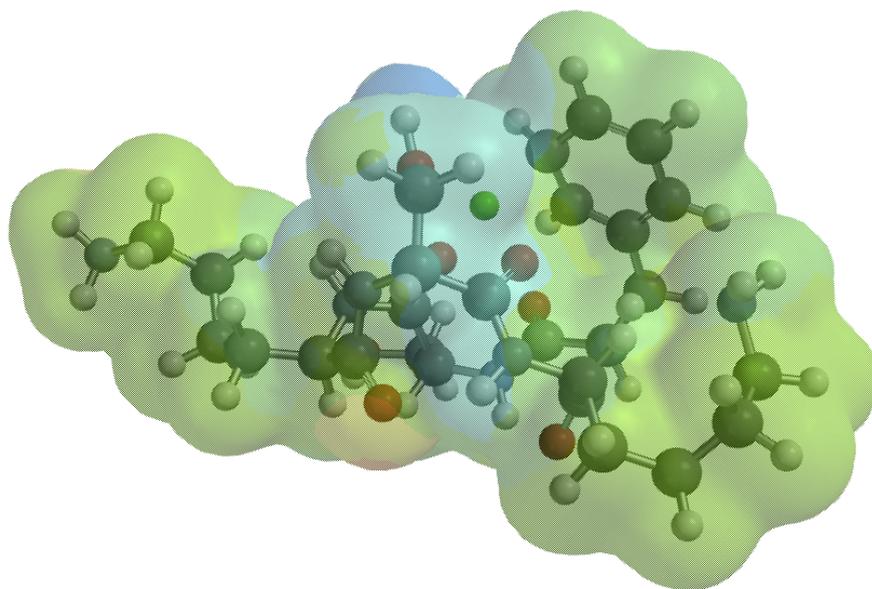
Tabla 18. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.

Sistema	Energía (entalpía de formación) [kJ/mol]
Péptido	-1304,44
Zinc	2771,73
Péptido—Zinc	189,64
Δ Energía	-1277,65

Tabla 19. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.

Átomos	Distancia [Å]
C1-Zn	2.871
C2-Zn	2.091
C3-Zn	3,900
C4-Zn	2,576
C5-Zn	3,900
C6-Zn	3,409

Figura 23. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el ion Zn^{2+} , calculado con el semiempírico PM6. Se muestra al ion zinc como una esfera verde en el centro.



Se presenta a continuación el estudio de la interacción de Zn^0 en el centro de la molécula.

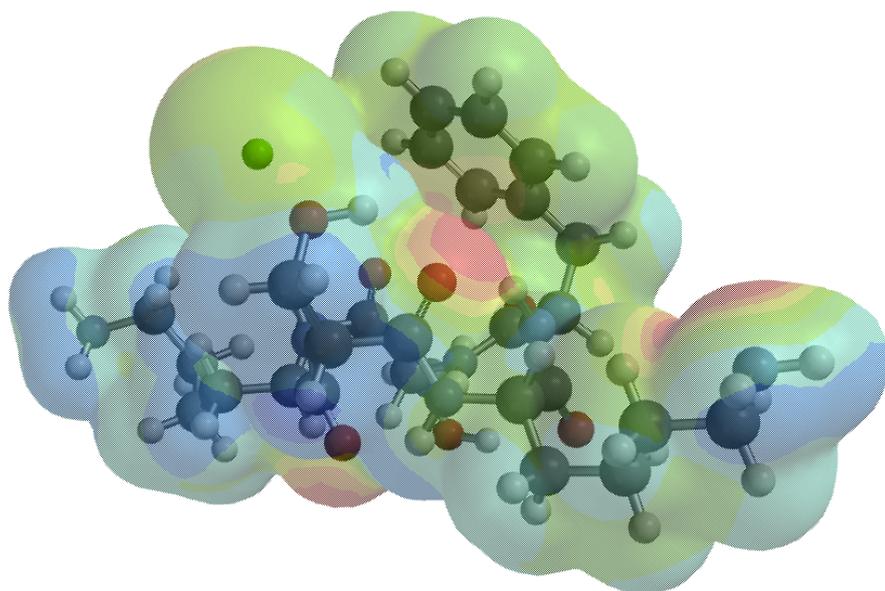
Tabla 20. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.

Sistema	Energía (entalpía de formación) [kJ/mol]
Péptido	-1304,44
Zinc	130,42
Péptido—Zinc	-1248,07
Δ Energía	-74,05

Tabla 21. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.

Átomos	Distancia [Å]
C1-Zn	4,048
C2-Zn	4,569
C3-Zn	4,673
C4-Zn	5,555
C5-Zn	5,64
C6-Zn	6,033

Figura 24. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con Zn^0 , calculado con el semiempírico PM6. Se presenta al zinc como una esfera verde fuera del ciclo.



Se presenta a continuación el estudio de la interacción de Mg^{2+} en el centro de la molécula.

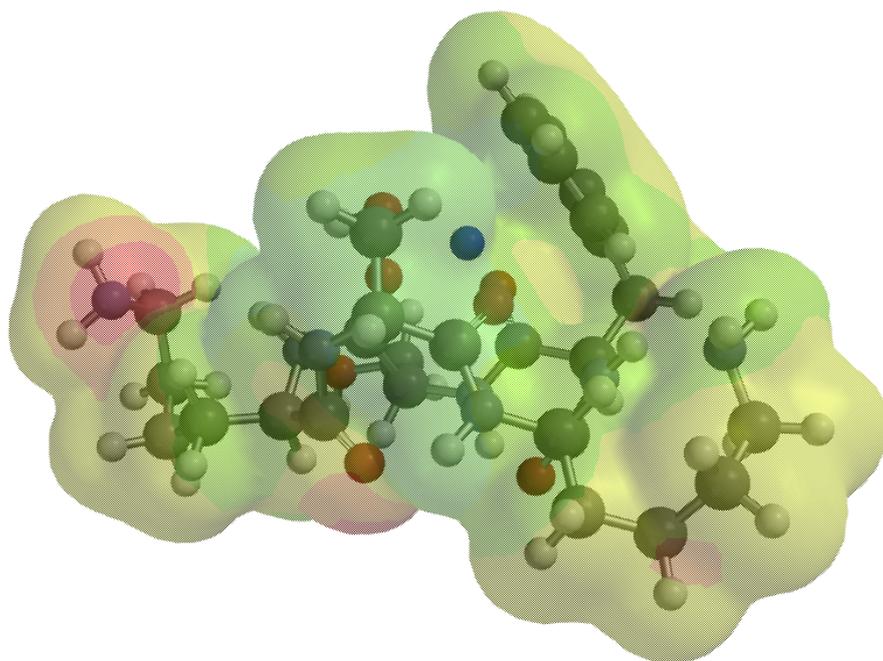
Tabla 22. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.

Sistema	Energía (entalpía de formación) [kJ/mol]
Péptido	-1304,44
Magnesio	2272,31
Péptido—Magnesio	-119,84
Δ Energía	-1087,71

Tabla 23. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.

Átomos	Distancia [Å]
C1-Mg	2,691
C2-Mg	3,116
C3-Mg	2,374
C4-Mg	3,282
C5-Mg	2,516
C6-Mg	2,933

Figura 25. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el ion Mg^{2+} , calculado con el semiempírico PM6. Se muestra al átomo de Mg como una esfera azul en el centro.



Se presenta a continuación el estudio de la interacción de Mg^0 en el centro de la molécula.

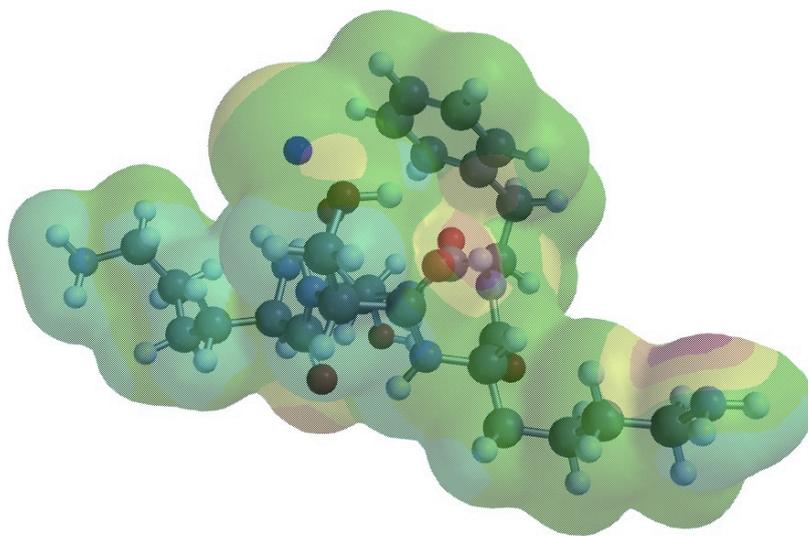
Tabla 24. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.

Sistema	Energía (entalpía de formación) [kJ/mol]
Péptido	-1304,44
Magnesio	146,44
Péptido—Magnesio	-1295,34
Δ Energía	-137,34

Tabla 25. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.

Átomos	Distancia [Å]
C1-Mg	3,084
C2-Mg	3,306
C3-Mg	3,937
C4-Mg	4,296
C5-Mg	4,795
C6-Mg	4,960

Figura 26. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el Mg^0 , calculado con el semiempírico PM6. Se presenta al átomo de Mg como una esfera azul en el centro.



Se presenta a continuación el estudio de la interacción de Ca^{2+} en el centro de la molécula.

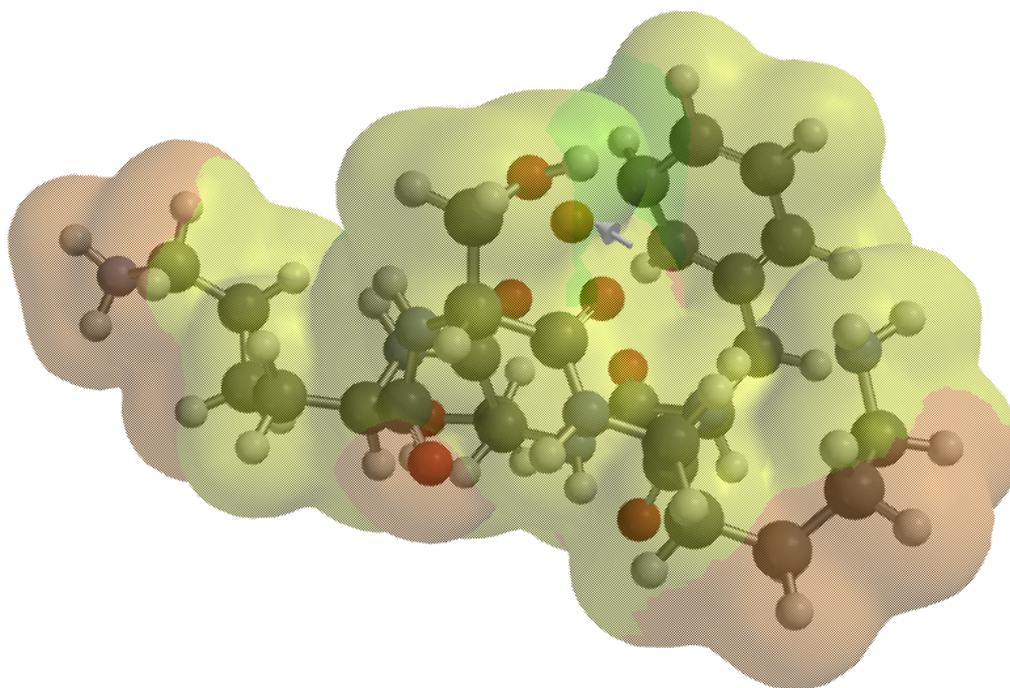
Tabla 26. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.

Sistema	Energía (entalpía de formación) [kJ/mol]
Péptido	-1304,44
Calcio	1704,09
Péptido—Calcio	-91,89
Δ Energía	-491,54

Tabla 27. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.

Átomos	Distancia [Å]
C1-Ca	2,635
C2-Ca	1,760
C3-Ca	3,558
C4-Ca	2,475
C5-Ca	3,858
C6-Ca	3,395

Figura 27. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con Ca^{2+} , calculado con el semiempírico PM6. Se presenta al átomo de Ca como una esfera roja en el centro del complejo (se visualiza con una flecha).



Se presenta a continuación el estudio de la interacción de Ca^0 en el centro de la molécula.

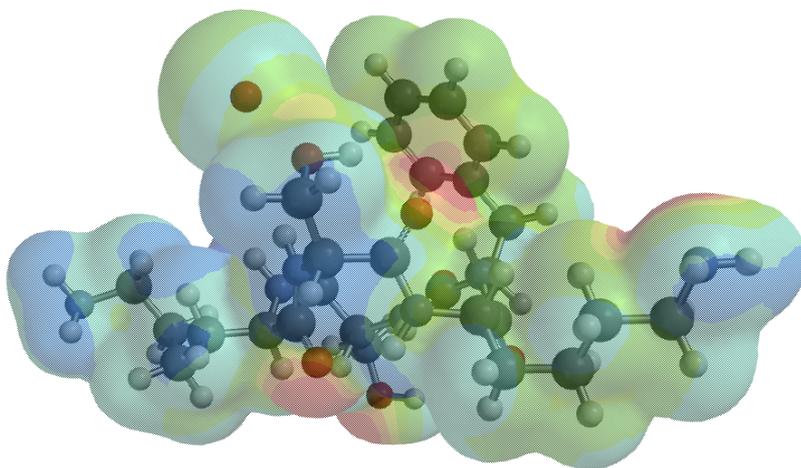
Tabla 28. Energías para los sistemas, en la última fila la energía final del sistema.

Sistema	Energía (entalpía de formación) [kJ/mol]
Péptido	-1304,44
Calcio	178,24
Péptido—Calcio	-1159,63
Δ Energía	-33,43

Tabla 29. Distancias del grupo aromático al átomo metálico.

Átomos	Distancia [Å]
C1-Ca	4,43
C2-Ca	4,934
C3-Ca	5,119
C4-Ca	5,971
C5-Ca	6,125
C6-Ca	6,504

Figura 28. Mapa de potencial electrostático para el complejo del péptido cíclico con el Ca^0 , calculado con el semiempírico PM6. Se presenta al átomo de calcio como una esfera roja fuera del ciclo.



Se presenta a continuación un análisis comparativo de los cambios en energía de formación, en relación para el radio iónico/metálico de cada uno:

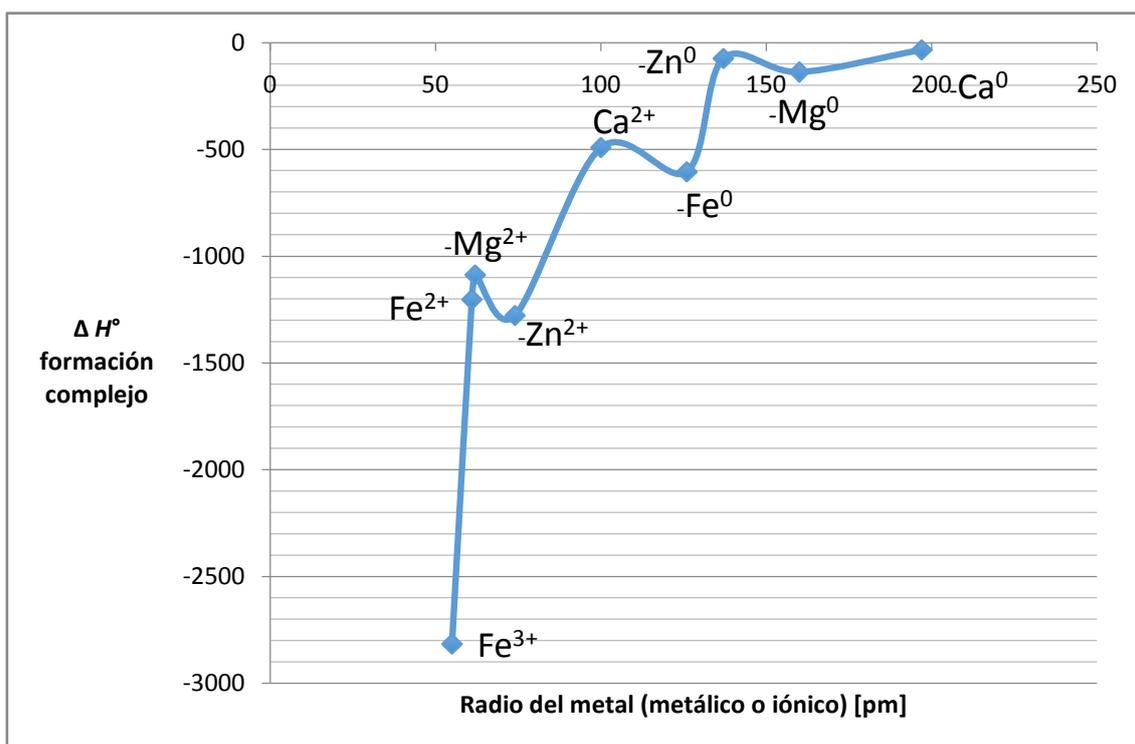
Tabla 30. Análisis de energía de formación (ΔH) para cada complejo

Metal	Carga	Radio (metálico o iónico, se especifica en cada caso) [pm]	ΔH estándar de formación complejo [kJ/mol]
Fe	M^0	126	-604,68
	M^{2+}	61	-1202,84
	M^{3+}	55	-2815,23
Zn	M^0	137	-74,05
	M^{2+}	74	-1277,65
Mg	M^0	160	-137,4
	M^{2+}	62	-1087,71
Ca	M^0	197	-33,43
	M^{2+}	100	-491,54

Como se puede apreciar en el Figura 44, la estabilidad de cada complejo está ligada al tamaño de la especie en el centro del sistema peptídico, en algunos casos una especie

iónica y en otros un átomo metálico. Esto es de esperarse, ya que la estabilidad de un sistema está ligado a componentes estéricos debido a los orbitales ocupados presentes tanto en el metal como en el ligando; también es importante mencionar que las energías presentadas en el cuadro anterior son basadas en entalpía estándar y no toman en cuenta a componentes de entropía, esto es bastante común en un cálculo semiempírico y brinda una idea de cómo el sistema tiende a estabilizarse para poder llegar a un mínimo de energía. Sin embargo, fuera de una secuencia esperada, el complejo con el ion Zn^{2+} se

Figura 29. Descripción de la relación existente entre radio iónico y radio metálico [pm] (eje x), con la entalpía estándar de formación para cada complejo [$\Delta H^\circ = \text{kJ/mol}$]



muestra más estable que el complejo con Mg^{2+} a pesar de sus correspondientes radios iónicos (74 pm y 62 pm, respectivamente). Esto se puede explicar mediante la teoría *HSAB* (*hard soft acid base theory*), según la tabla proporcionada por Huheey *et al.* se

considera al ion Zn^{2+} como un ácido *borderline* mientras que el Mg^{2+} es un ácido fuerte. Al tener sitios Lewis básicos de tipo *soft*, se argumenta que los ácidos que van a encontrarse estabilizados de una mejor manera son los ácidos *soft*, o en su defecto al menos los *borderline* no sin quitar el hecho de que al tener todos los sitios básicos como el grupo aromático de la Phe, o los grupos carbonilos (todos ellos *soft*) se puede llegar a estabilizar el ácido fuerte al mantener rodeado a este por los orbitales de las bases débiles. Sin embargo, la afinidad llega a estar más cerca del ácido *borderline* (Zn^{2+}). Esto debido a los orbitales más grandes y difusos que presenta el zinc al poseer orbitales vacíos de mayor energía (mayor deslocalización) de tipo *s* y *p* (Huheey, 1983). Ocurre lo mismo en el caso del Fe^0 (*soft acid*) y el Ca^{2+} (*hard acid*) en los que se puede observar un comportamiento fuera de la tendencia de la curva relacionada a los radios de las diferentes especies. Un caso importante para mencionar en el análisis de los datos es el del Zn^0 y el del Ca^0 , siendo los dos *soft acids* se esperaría un comportamiento apegado a la idea de que la estabilidad dependerá del radio de cada especie. Se ha encontrado que este defecto puede deberse en si a la parametrización del método PM6. Este método se ha desarrollado explícitamente para suplir las necesidades computacionales de especies que tengan orbitales *d* llenos o parcialmente llenos en su último o penúltimo nivel energético (*n* o *n-1*), en donde se ha encontrado una parametrización correcta para el Zn desde el método PM3 (Stewart, 2007), siendo un *adendum* la parametrización para átomos de los grupos representativos. Esto puede ser explicado además asumiendo que las capas de orbitales *n* y *n-1* se encuentran completamente llenas en el Zn^0 (d^{10}) mientras que solo el último nivel del Ca^0 (*4s*) se encuentra lleno, esto llevando a una población electrónica mayor en el caso del Zn, y por ende una ligera variación que se encuentra cubierta en parte por el radio metálico de la especie Zn^0 . SI se observa el Figura 34, se puede apreciar que el orbital LUMO del Zn^0 viene a tener una orientación

fuera del centro de masa del péptido, con orbitales que localizados para el propio Zn^0 , esto en comparación con el LUMO del Ca^0 en donde la orientación del LUMO tiende a colocarse más cerca del centro de masa que en el primer caso proveyendo cierta estabilidad (todavía se aprecia que el átomo es demasiado grande para localizarse dentro del componente cíclico), pero la estabilidad del mismo de alguna manera se debe a la interacción entre orbitales; efecto que no se puede apreciar en la interacción con el Zn^0 . Para el resto de especies se puede observar una tendencia en la que la estabilidad viene ligada en forma importante a efectos estéricos y de posicionamiento dentro del péptido cíclico.

Conclusiones

Se ha sintetizado un péptido cíclico compuesto por cinco aminoácidos *D-Phe-L-Lys-D-Ser-L-Lys-D-Ser* los cuales fueron analizados *in situ* al formarse el precipitado dibenzofulveno luego de la desprotección del grupo Fmoc en cada uno de los pasos. Para esto se utilizó la síntesis de péptidos en estado sólido (*SPPS*, por sus siglas en inglés), revisando la literatura para obtener mecanismos adecuados durante todo el proceso. El porcentaje de rendimiento no fue una fuente de análisis, sino solo el análisis cualitativo para demostrar la correcta síntesis de este sistema. El análisis de aminoácidos y el análisis de masas (específicamente el ESI-MS) son contundentes al demostrar que los cinco aminoácidos se encuentran formando el péptido cíclico.

Los análisis computacionales realizados con MM (*molecular mechanics*) fueron la base para una optimización inicial para después utilizar un método semiempírico (PM6) el cual ha sido parametrizado para poder trabajar con metales de transición, así como metales representativos en sistemas orgánicos por lo cual fue seleccionado para este trabajo, además de su rapidez y bajo costo computacional. Esto arrojó resultados esperados en cuanto a la dependencia de la estabilidad del complejo basado en el tamaño de la partícula analizada, a excepción de algunos casos en los cuales *HSAB theory* pudo explicar las ligeras variaciones dentro del comportamiento de la estabilidad de cada complejo.

Se ha descubierto que la mayor afinidad para los metales estudiados (y sus respectivos iones) es con el Fe^{3+} basado en su tamaño y en la forma que puede adoptar el complejo alrededor de este.

Recomendaciones

Se recomienda continuar el trabajo utilizando otro tipo de niveles de teoría para el análisis de estabilidad del complejo, los cuales pueden ser B3LYP o algún análisis híbrido para poder confirmar las geometrías establecidas de manera más exacta para cada complejo, si es que puede llegar a utilizarse un servidor que no tenga muchas limitaciones en lo que respecta a costo computacional.

Abreviaturas utilizadas en este trabajo

Boc	butoxicarbonil
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butil
CBZ o Z	benciloxycarbonil
DCM	diclorometano
DIC	<i>N,N</i> -diisopropilcarbodiimida
DIPEA	diisopropiletilendiamino
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DPPA	difenilfosforil azida
ESI-MS	análisis de masas, ionización por electrospray
Fmoc	9-fluorenilmetiloxi
HBr	ácido bromhídrico
HCl	ácido clorhídrico
HOBt	hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alto desempeño, por sus siglas en inglés
HOMO	orbital molecular ocupado de más alta energía, por sus siglas en inglés
HSAB	teoría de ácidos blandos y duros, por sus siglas en inglés
LUMO	orbital molecular sin ocupar de menor energía, por sus siglas en inglés
Lys	lisina
MALDI-TOF	análisis de masa con ionización/desorción por un láser asistido por una matriz, y análisis de tiempo de vuelo (por sus siglas en inglés)
MeOH	metanol

MM	mecánica molecular
Phe	fenilalanina
Ser	serina
SPPS	síntesis de fase sólida de péptidos (por sus siglas en inglés)
TFA	ácido trifluoroacético

Referencias

- Albericio, F. (2000). Orthogonal protecting groups for N α -amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Peptide Science*, 55(2), 123–139. [http://doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:2<123::AID-BIP30>3.0.CO;2-F](http://doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:2<123::AID-BIP30>3.0.CO;2-F)
- Anwer, M. K., & Spatola, A. F. (1992). Cleavage of peptides bound to merrifield resins by potassium carbonate in the presence of a phase transfer reagent. *Tetrahedron Letters*, 33(22), 3121–3124. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)79829-7](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)79829-7)
- Barany, G., & Albericio, F. (1985). Three-dimensional orthogonal protection scheme for solid-phase peptide synthesis under mild conditions. *Journal of the American Chemical Society*, 107(17), 4936–4942. <http://doi.org/10.1021/ja00303a019>
- Carpino, L. A., Ionescu, D., El-Faham, A., Henklein, P., Wenschuh, H., Bienert, M., & Beyermann, M. (1998). Protected amino acid chlorides vs protected amino acid fluorides: Reactivity comparisons. *Tetrahedron Letters*, 39(3–4), 241–244. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(97\)10504-4](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(97)10504-4)
- Castro, B., Dormoy, J. R., Evin, G., & Selve, C. (1975). Reactifs de couplage peptidique I (1) - l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxyltrisdimethylamino phosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Letters*, 16(14), 1219–1222. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)72100-9](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)72100-9)
- Clayden, J., Greeves, N., & Warren, S. (2012). *Organic Chemistry*. Oxford University Press.
- García-Martín, F., Bayó-Puxan, N., Cruz, L. J., Bohling, J. C., & Albericio, F. (2007). Chlorotriyl Chloride (CTC) Resin as a Reusable Carboxyl Protecting Group. *QSAR & Combinatorial Science*, 26(10), 1027–1035. <http://doi.org/10.1002/qsar.200720015>
- Guerler, A., Govindarajoo, B., & Zhang, Y. (2013). Mapping Monomeric Threading to Protein–Protein Structure Prediction. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(3), 717–725. <http://doi.org/10.1021/ci300579r>

- Housecroft, C. E., & Sharpe, A. G. (2005). *Inorganic Chemistry*. Pearson Prentice Hall.
- Huheey, J. E. (1983). *Inorganic chemistry: principles of structure and reactivity*. Harper & Row.
- Jonsson, H. (1995). Research-Level Computers and Software in the Undergraduate Curriculum. *Journal of Chemical Education*, 72(4), 332. <http://doi.org/10.1021/ed072p332>
- Jou, G., González, I., Albericio, F., Lloyd-Williams, P., & Giralt, E. (1997). Total Synthesis of Dehydrodidemnin B. Use of Uronium and Phosphonium Salt Coupling Reagents in Peptide Synthesis in Solution†. *The Journal of Organic Chemistry*, 62(2), 354–366. <http://doi.org/10.1021/jo961932h>
- Kahn, M., & Bertenshaw, S. (1989). The incorporation of β -turn prosthetic units into merrifield solid phase peptide synthesis. *Tetrahedron Letters*, 30(18), 2317–2320. [http://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)80387-7](http://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)80387-7)
- Kates, S. A., Solé, N. A., Johnson, C. R., Hudson, D., Barany, G., & Albericio, F. (1993). A novel, convenient, three-dimensional orthogonal strategy for solid-phase synthesis of cyclic peptides. *Tetrahedron Letters*, 34(10), 1549–1552. [http://doi.org/10.1016/0040-4039\(93\)85003-F](http://doi.org/10.1016/0040-4039(93)85003-F)
- Kim, D. W., Lee, N. S., Kim, C. S., Ryu, H. I., Kim, J. S., Kang, B. M., & Jeon, Y. S. (2002). Syntheses and separating properties of triazacrown and AM18C6 bonded Merrifield peptide resins. *European Polymer Journal*, 38(10), 2101–2108. [http://doi.org/10.1016/S0014-3057\(02\)00083-6](http://doi.org/10.1016/S0014-3057(02)00083-6)
- King, D. S., Fields, C. G., & Fields, G. B. (1990). A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 36(3), 255–266. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00976.x>
- Koshland, D. E. (1951). Kinetics of Peptide Bond Formation¹. *Journal of the American*

Chemical Society, 73(9), 4103–4108. <http://doi.org/10.1021/ja01153a016>

Kürti, L., & Czakó, B. (2005). *Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis: Background and Detailed Mechanisms*. Elsevier.

Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 85(14), 2149–2154.
<http://doi.org/10.1021/ja00897a025>

Merrifield, R. B. (1964). Solid-Phase Peptide Synthesis. III. An Improved Synthesis of Bradykinin*. *Biochemistry*, 3(9), 1385–1390. <http://doi.org/10.1021/bi00897a032>

Montalbetti, C. A. G. N., & Falque, V. (2005). Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 61(46), 10827–10852. <http://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>

SCHNölzer, M., Alewood, P., Jones, A., Alewood, D., & Kent, S. B. h. (1992). In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 40(3-4), 180–193. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1992.tb00291.x>

Sewald, N., & Jakubke, H.-D. (2002a). Introduction and Background. In *Peptides: Chemistry and Biology* (pp. 1–4). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/352760068X.ch1/summary>

Sewald, N., & Jakubke, H.-D. (2002b). Peptide Synthesis. In *Peptides: Chemistry and Biology* (pp. 135–267). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/352760068X.ch4/summary>

Shioiri, T., Ninomiya, K., & Yamada, S. (1972). Diphenylphosphoryl azide. New convenient reagent for a modified Curtius reaction and for peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 94(17), 6203–6205. <http://doi.org/10.1021/ja00772a052>

Stewart, J. J. P. (1989). Optimization of parameters for semiempirical methods I. Method. *Journal of Computational Chemistry*, 10(2), 209–220.

<http://doi.org/10.1002/jcc.540100208>

Stewart, J. J. P. (2007). Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *Journal of Molecular Modeling*, 13(12), 1173–1213. <http://doi.org/10.1007/s00894-007-0233-4>

Tofan, D. C. (2009). Improving Chemistry Education by Offering Salient Technology Training to Preservice Teachers. A Graduate-Level Course on Using Software To Teach Chemistry. *Journal of Chemical Education*, 86(9), 1060.

<http://doi.org/10.1021/ed086p1060>

Wahlström, K., & Undén, A. (2009). A new protecting group for tryptophan in solid-phase peptide synthesis which protects against acid-catalyzed side reactions and facilitates purification by HPLC. *Tetrahedron Letters*, 50(24), 2976–2978.

<http://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.04.014>