

**DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS PÉPTIDOS  
ANÁLOGOS DE TOXINAS DE VENENOS DE ESCORPIONES CON  
POTENCIAL ANTIBIÓTICO FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y  
*Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA METICILINA (SARM)**

**LUDWIG CALDERÓN ROA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA**

**2014**

**DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS PÉPTIDOS  
ANÁLOGOS DE TOXINAS DE VENENOS DE ESCORPIONES CON  
POTENCIAL ANTIBIÓTICO FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y  
*Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA METICILINA (SARM)**

**LUDWIG CALDERÓN ROA**

Trabajo de grado como requisito para optar al título de  
**QUÍMICO.**

Director

**RODRIGO G. TORRES SAEZ**

Bioquímico, *Ph.D.*

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE QUÍMICA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

## Dojo Kun

Buscar la perfección del carácter.  
El camino de la verdad y la honestidad.  
La constancia y el esfuerzo.  
El respeto a los demás.  
Frenar el comportamiento violento.

Uno debe progresar. Aprende a entrenar siempre tu mente por delante de tu cuerpo. No trates de ser mejor que "alguien", trata de ser el mejor, y recuerda que en la manera que entrenes será en la manera en que reacciones. **“Bruce Lee”**  
El hombre combate con su espíritu. Sus manos y sus armas no son más que una extensión de su voluntad, y el error más grande de nuestra época es creer que el equipamiento puede remplazar al espíritu. **Gichin Funakoshi**  
Los grandes obstáculos y la oscuridad que te limita a alcanzar tus sueños esta en tu cabeza. **Ludwig calderón**

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento esta para aquellos seres fundamentales en mi vida, que fueron indispensables para hacer posible este proyecto.

Dios

Mis padres

Nona Hilda (Q.E.P.D)

El profesor Rodrigo Torres Sáez.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	17
1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES.....	23
1.1 GENERALIDADES.....	23
1.2 TOXINAS.....	24
1.3 ANTECEDENTES.....	25
1.4 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAM's).....	30
1.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PÉPTIDOS.....	30
1.6 POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE LOS PAM's.....	33
2. PLAnteamiento del Problema.....	37
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	40
4.1. REACTIVOS Y EQUIPOS.....	40
4.2 Diseño del péptido.....	42
4.3 estandarización de la SÍNTESIS de péptidos.....	44
4.4 CLIVAJE DEL PÉPTIDO.....	58
4.5 PURIFICACION DEL PÉPTIDO.....	60
4.6 CUANTIFICACIÓN DEL PÉPTIDO.....	63
4.7 SIMULACIÓN TEÓRICA DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS PÉPTIDOS.....	64
4.8 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO.....	64
4.8.1 Determinación de Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	64
4.8.1.1 Método en caldo.....	64
4.8.2 Determinación de Concentración mínima bactericida (CMB).....	65
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	66
5.1. Diseño del péptido.....	66

5.2 ESTANDARIZACION DE LA SÍNTESIS PÉPTIDICA Y CLIVAJE .....	72
5.3 PURIFICACION DEL PÉPTIDO .....	74
5.4 CUANTIFICACIÓN DEL PÉPTIDO.....	75
5.5 SIMULACIÓN TEÓRICA DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS PÉPTIDOS .....	76
5.6 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO .....	77
6.3.1 Determinación de CMI y CMB contra <i>Escherichia coli</i> O157:H7 .....	78
6.3.2 Determinación de CMI y CMB contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a Meticilina (SARM).....	79
6. CONCLUSIONES.....	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
ANEXOS .....	93

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Estructura de una proteína definida por cuatro niveles estructurales: estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria y estructura cuaternaria.....	18
Figura 2. Estructuras secundarias .....	20
Figura 3. Modelos de acción de los PAM's A. Modelo toroidal. B. Modelo de alfombra. C. Modelo de ruptura por barril. D. Modelo de canal agregado. (Tomado de Yanmei li <i>et al</i> 2012). .....	33
Figura 4. a Metodología Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida. ....	35
Figura 5. Esquema metodológico .....	41
Figura 6. Datos secuencias péptidos.....	42
Figura 7. Péptidos en formato fasta.....	43
Figura 8. Árboles filogenéticos obtenidos para las secuencias de péptidos de escorpión .....	67
Figura 9. Árbol guía 1,2,4 obtenido a partir de las secuencias de escorpión. ....	68
Figura 10. Árbol guía 3 4 obtenido a partir de las secuencias de escorpión. ....	69
Figura 11. Obtención de secuencias .....	70
Figura 12. Secuencias de péptidos seleccionados para síntesis química.....	71
Figura 13. Espectros de masas de los diferentes péptidos sintetizados .....	76
Figura 14. estructura secundaria de los péptidos sintéticos .....	77
Figura 15. Efecto antimicrobiano de los péptidos sintéticos sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> O157:H7.....	78
Figura 16. Efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de SARM .....	80

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Reactivos y equipos principales empleados .....	40
Tabla 2. Porcentaje Aproximado de acoplamiento de Boc-aminoácido a la resina	45
Tabla 3. Verificación del acople procedimiento 1.....	47
Tabla 4. Verificación del acople procedimiento 2.....	52
Tabla 5. Secuencia de aminoácidos conservados (dominio) de la familia 1 de péptidos de veneno de escorpión .....	70
Tabla 6. Secuencia de aminoácidos conservados (dominio) de la familia 2 de péptidos de veneno de escorpión .....	70
Tabla 7. Secuencia de aminoácidos conservados (dominio) de la familia 3 de péptidos de veneno de escorpión .....	71
Tabla 8. Secuencia de aminoácidos conservados (dominio) de la familia 4 y 5 de péptidos de veneno de escorpión .....	71
Tabla 9. Propiedades fisicoquímicas .....	74
Tabla 10. Masa experimental y calculada de los péptidos sintetizados .....	75
Tabla 11. Actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos sobre <i>E. coli</i> O157:H7	79
Tabla 12. Actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos sobre SARM .....	81

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pág.</b>
Anexo A. Aminoácidos (AA).....	93
Anexo B. Grupos protectores.....	94
Anexo C. Formato de síntesis .....	95
Anexo D. Secuencias de toxinas de venenos .....	96
Anexo E. Cromatogramas.....	107

## RESUMEN

**TÍTULO: DISEÑO, SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS PÉPTIDOS ANÁLOGOS DE TOXINAS DE VENENOS DE ESCORPIONES CON POTENCIAL ANTIBIÓTICO FRENTE A *Escherichia coli* O157:H7 Y *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A LA METICILINA (SARM) \***

**AUTOR:** Calderón Roa Ludwig \*\*

**PALABRAS CLAVE:** Actividad antimicrobiana, síntesis de péptidos, toxinas escorpión.

### DESCRIPCIÓN:

Las toxinas de escorpiones han sido ampliamente utilizadas en el área de la medicina, no sólo como compuesto biológicos con potencial tóxico, sino que su uso se ha extendido también al tratamiento de múltiples enfermedades. En este trabajo de investigación, se diseñaron cinco péptidos sintéticos basados en estructuras de toxinas provenientes del veneno de escorpión con potencial antimicrobiano utilizando herramientas bioinformáticas. A continuación, se llevó a cabo la síntesis de péptidos en fase sólida utilizando la metodología de síntesis Fmoc. Los péptidos se desalinizaron y se eliminaron las delecciones mediante cromatografía utilizando las fases estacionarias Sephadex G-10 y Sepac C18. Posteriormente, los péptidos se purificaron por cromatografía líquida en fase reversa (RP-HPLC), y caracterizaron e identificaron por espectrometría de Masas con Desorción-Ionización con Láser asistida por Matriz con detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF/TOF) usando una matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHA). Finalmente, los péptidos fueron evaluados frente a bacterias patógenas de *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). En general, los péptidos demostraron propiedades inhibitorias frente a las bacterias patógenas. En consecuencia, los resultados obtenidos en este estudio sugieren que la comunidad de toxinas de escorpiones es extensa, diversa, y constituye una potencial fuente para el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos.

---

\* Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Director: Rodrigo Torres Sáez.

## ABSTRACT

**TITLE: PRELIMINARY ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TYPE I PKS GENES IN ACTINOMYCETES ISOLATED FROM LEAF CUTTER ANTS *Atta cephalotes*.**\*

**AUTHOR:** Calderón Roa Ludwig \*\*

**KEYWORDS:** Antimicrobial activity, synthesis of peptides, scorpion toxins

### SUMMARY

Toxins from scorpions have been widely utilized in medicine area, not only as compounds with toxic potential, if not its use has been also extended to treatment of several diseases. In this research work, five peptides based on toxin structures from scorpion venom with antimicrobial potential were designed using bioinformatics tools. Then, peptide synthesis by solid phase chemistry was carried out using Fmac synthesis methodology. Synthesized peptides were desalted and deletions were eliminated through chromatography using Sephadex G-10 and Sepac C18. Subsequently, peptides were purified by reverse phase-liquid chromatography (RP-HPLC), characterized and identified by Mass Spectrometry with Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization with time of flight detector (MALDI-TOF/TOF) using  $\alpha$ -ciano-4-hydroxycinnamic acid (CHA) as matrix. Finally, peptides were evaluated against pathogen bacteria *Escherichia coli* O157:H7 and Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). In general, these peptides demonstrated inhibitory properties again pathogen bacteria. In consequence, obtained results in this study suggest that scorpion toxin community is extensive, different and constitutes a potential source for development of new antimicrobial compounds.

---

\* Degree work

\*\* Science Faculty, School of Chemistry. Director: Rodrigo Torres Sáez.

## ABREVIATURAS EN ORDEN ALFABETICO

<b>Aa</b>	Aminoácido
<b>ACC</b>	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxinámico
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ATF</b>	Ácido Trifluoroacético
<b>B</b>	
<b>BHI</b>	Infusión cerebro-corazón
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool
<b>Boc</b>	terc-Butoxicarbonilo
<b>BOP</b>	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(dimetilamino) fosfonio
<b>BZL</b>	Benzil
<b>C</b>	
<b>CMB</b>	Concentración mínima bactericida
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>C-terminal</b>	Carboxi-terminal
<b>D</b>	
<b>DC</b>	Dicroísmo circular
<b>DCC</b>	N,N'-diciclohexilcarbodiimida
<b>DIPC</b>	N,N'-Diisopropilcarbodiimida
<b>DMAP</b>	N,N'-Dimetil-4-aminopiridina
<b>DMF</b>	N,N'-Dimetilformamida
<b>E</b>	
<b>EDA</b>	Enfermedad diarreica aguda
<b>F</b>	
<b>Fmoc</b>	9-flurenilmetoxicarbonilo
<b>FT-IR</b>	Infrarrojo con transformada de Fourier

<b>H</b>	
<b>HBTU</b>	(2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio Hexafluoro-fosfato)
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia
<b>HOBT</b>	1-Hidroxibenzotriazol
<b>HOAT</b>	1-Hidroxi-7-azabenzotriazol
<b>M</b>	
<b>μM</b>	Micromolar
<b>μL</b>	Microlitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MALDI</b>	Desorción/Ionización Láser asistida por una Matriz
<b>MBHA</b>	4-metilbencilhidrilamina
<b>P</b>	
<b>PAM</b>	4-hidroximetilfenilacetamidometil
<b>PAMs</b>	Péptidos antimicrobianos
<b>PVA</b>	Polivinilalcohol
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>R</b>	
<b>Rink</b>	4-(2',4'-dimetoxifenil-aminofenil) fenoximetilpoliestireno
<b>S</b>	
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio
<b>SLN</b>	Solución
<b>SPFS</b>	Síntesis de péptidos en fase solida
<b>T</b>	
<b>TBTU</b>	(2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate)
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TFE</b>	2,2,2-Trifluoroetanol
<b>TFS</b>	Tampón Fosfato de Sodio

**TOF**      Detector de Tiempo de vuelo  
**U**  
**UFC**      Unidades formadoras de colonias

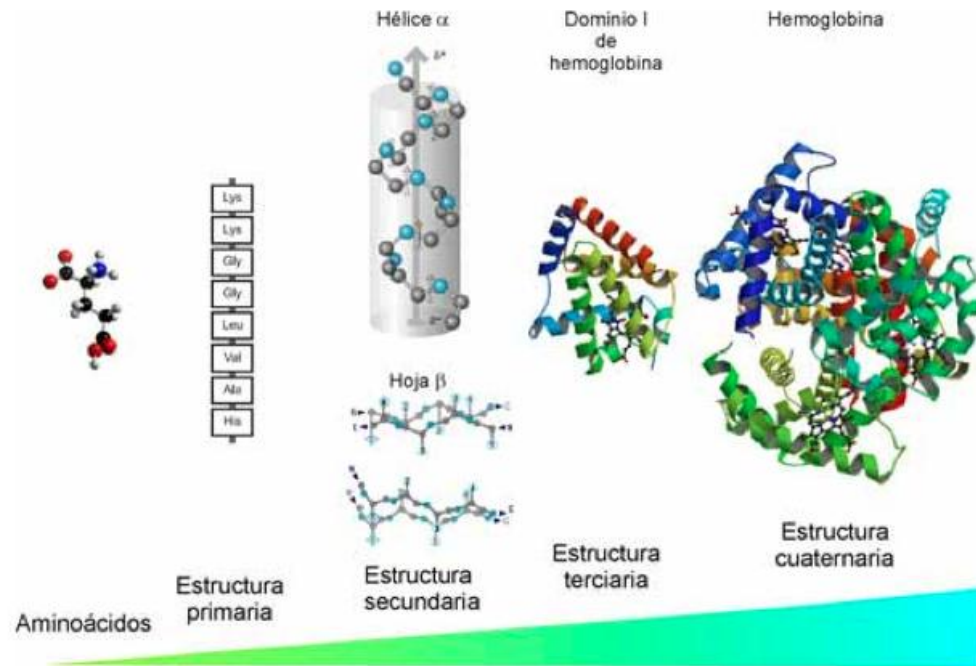
## INTRODUCCIÓN

Una de las macromoléculas biológicas más importantes de las células son las proteínas, las cuales están compuestas por pequeñas unidades llamadas aminoácidos. Estos están constituidos principalmente por 20 tipos diferentes que en combinación son capaces de alcanzar una diversidad de estructuras, funciones y propiedades muy sorprendentes. Los aminoácidos se encuentran estructurados, lo cual les permite alcanzar cuatro niveles de organización estructural [1]

El ordenamiento de aminoácidos de una proteína (secuencia) es conocida como la estructura primaria. Las estructuras generadas por la interacción entre grupos N-H y C=O de la cadena principal definen la estructura secundaria; Algunos de los más importantes tipos de estructuras secundarias se encuentran los giros  $\beta$ , las hojas  $\beta$  y las hélices  $\alpha$ . En los giros  $\beta$  normalmente solo se ven involucrados 3 o 4 residuos de aminoácidos, los cuales dan origen al giro formado por la interacción entre residuos separados por una o dos posiciones. En las hojas  $\beta$ , el patrón de enlaces de hidrógeno involucra segmentos extendidos en la cadena peptídica. Las hélices  $\alpha$  tiene una organización helicoidal por la interacción consecutiva por enlace de hidrógeno entre el grupo -NH de cada residuo  $i$  con el grupo C=O de cada residuo  $i+4$ . [2]

La estructura terciaria se refiere a la organización espacial de los elementos de estructura secundaria de la cadena polipeptídica. La estructura cuaternaria se refiere a la organización de varias cadenas polipeptídicas en un solo complejo (Figura 1).

Figura 1. Estructura de una proteína definida por cuatro niveles estructurales: estructura primaria, estructura secundaria, estructura terciaria y estructura cuaternaria.



El diseño de péptidos y proteínas se ha enfocado normalmente en obtener complejos pequeños, con el objeto de entender los mecanismos que producen la estabilidad de las proteínas. Posteriormente, este objetivo se ha ampliado hasta también a conferirles propiedades y actividades específicas. En este sentido, los métodos de síntesis química de péptidos y la expresión de proteínas recombinantes han permitido manipular las secuencias peptídicas para obtener nuevas proteínas, como nuevas modificaciones de las proteínas naturales [3,4]

Con el aumento del conocimiento por el cual las proteínas se organizan en su estructura molecular, se hace cada vez más necesario la introducción de

algoritmos computacionales en el diseño de nuevos péptidos y proteínas estables o con nuevas funciones. [5]

La gran variedad de funciones que tienen los péptidos y las proteínas en la naturaleza va relacionada con la forma en que va interaccionando con otros elementos. [6]

Uno de los desafíos del diseño de nuevas proteínas es la introducción de pequeñas moléculas o cofactores dentro de su estructura. La actividad de muchas enzimas está relacionada con la presencia en sus estructuras de moléculas pequeñas, tanto orgánicas como inorgánicas. Se han diseñado proteínas capaces de unir metales o algunas moléculas orgánicas como flavinas o grupos hemo. [7] En este sentido, los péptidos con actividad antibacteriana son componentes conservados evolutivamente, están presentes en la respuesta inmune innata y se encuentran entre todas las clases de vida. Existen diferencias fundamentales entre las células procariotas y eucariotas que pueden representar posibles dianas para péptidos antimicrobianos.[8]

Estos péptidos son potentes antibióticos de amplio espectro, que demuestran potencial como nuevos agentes terapéuticos. Los péptidos antimicrobianos han demostrado utilidad para matar bacterias Gram positivas y Gram negativas (incluyendo cepas que son resistentes a los antibióticos convencionales), micobacterias (incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*), virus con envoltura, hongos y células cancerígenas.

A diferencia de la mayoría de los antibióticos convencionales, los péptidos antimicrobianos tienen también la capacidad de mejorar la inmunidad al funcionar como inmunomoduladores.[9]

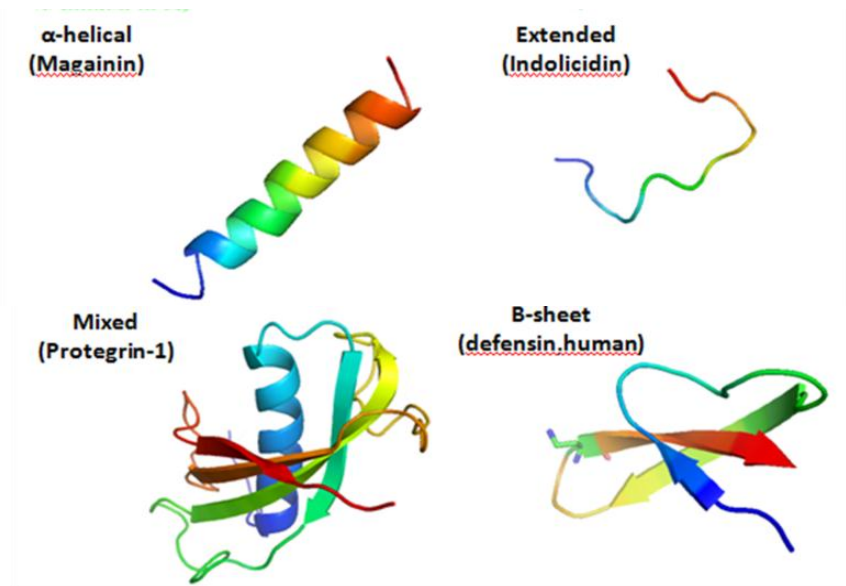


Figura 2. Estructuras secundarias

Los péptidos antimicrobianos son un grupo único y diverso de moléculas, que se dividen en subgrupos sobre la base de su composición de aminoácidos y estructura. Los péptidos antimicrobianos están conformados generalmente entre 12 y 50 aminoácidos. Estos péptidos incluyen dos o más residuos cargados positivamente, carga conferida principalmente por arginina, lisina o, en ambientes ácidos, histidina, y una gran proporción (generalmente > 50%) de residuos hidrófobos. Las estructuras secundarias de estas moléculas antimicrobianas pueden ser divididos en 4 grupos estructurales: i)  $\alpha$ -helicoidal, ii)  $\beta$ -cadena debido a la presencia de 2 o más enlaces disulfuro, iii)  $\beta$ -horquilla o bucle debido a la presencia de un único enlace disulfuro y / o ciclación de la cadena peptídica, y iv) extendidos. [10,11]

Muchos de estos péptidos son no estructurados en solución libre, y se pliegan en su configuración final cuando interactúan con las membranas biológicas. Contienen residuos de aminoácidos hidrófilos alineados a lo largo de un lado y los residuos de aminoácidos hidrófobos alineados a lo largo del lado opuesto de una molécula helicoidal. Este anfipaticidad de los péptidos antimicrobianos permite su

partición en la bicapa lipídica de la membrana. La capacidad para asociarse con las membranas es una característica definitiva de los péptidos antimicrobianos. Estos péptidos tienen una variedad de actividades antimicrobianas que van desde la permeabilización de la membrana a la acción de una serie de diferentes dianas citoplásmicas. [12]

El modo acción por el cual los péptidos antimicrobianos matan las bacterias es muy diverso e incluye perturbación de las membranas, interferencia del metabolismo, e interacción con componentes citoplasmáticos.

El contacto inicial entre el péptido y el organismo objetivo es electrostático. Como la mayoría de las superficies bacterianas son aniónicas, o hidrofóbicas, los péptidos antimicrobianos se caracterizan por tener una composición aminoacídica que le da una anfipaticidad, carga catiónica y tamaño molecular adecuado para permitir un ataque e inserción en bicapas de membrana plasmática actuando por mecanismos a través de la formación de poros de 'barril-bastón', 'alfombra' o poro 'toroidal'. [13]

Alternativamente, pueden penetrar en la célula para unirse a moléculas intracelulares que son cruciales para la vida celular. En general, la actividad antimicrobiana de estos péptidos se determina mediante la medición de la concentración mínima inhibitoria (CMI), que es la concentración más baja de fármaco que inhibe el crecimiento bacteriano.

Aquí, consideramos, por primera vez, el uso de péptidos antimicrobianos (PAM) como moléculas de reconocimiento para las bacterias en un ALF. Los PAM se distribuyen ampliamente en las especies de bacterias, protozoos, hongos, plantas y animales multicelulares, y se han descubierto hasta la fecha más de 1.200 diferentes péptidos de origen natural. Los PAM son generalmente pequeños, compuestos por entre 15 y 45 aminoácidos con carga positiva y anfipáticos. La

mayoría de PAM muestra una actividad de amplio espectro, y debido a su amplia capacidad de unión a membranas pueden ser explotados para la detección específica de bacterias. [14]

Se han usado varios métodos para determinar los mecanismos de la actividad de los péptidos antimicrobianos. En particular, los estudios de RMN de estado sólido han proporcionado una explicación a nivel atómico de la disrupción de la membrana por los péptidos antimicrobianos. [15]

# 1. MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

## 1.1 GENERALIDADES

Los escorpiones, conocidos desde tiempo inmemorial como animales altamente tóxicos siempre temidos por el hombre, han vivido casi sin modificaciones morfológicas por más de 350 millones de años y se han adaptado a todos los cambios climáticos que ha venido sufriendo la tierra desde entonces. Sólo recientemente se han comprendido, en parte, los mecanismos que explican la extrema letalidad de sus venenos, con el uso conjunto de técnicas fisiológicas y de ingeniería de proteínas. Los escorpiones poseen un par de glándulas venenosas localizadas a nivel del telson, en el extremo distal del abdomen, que termina en un aguijón.

El veneno es una secreción apocrina, compuesta químicamente por una variedad de compuestos proteicos (neurotoxinas, enzimas como la hialuronidasa, fosfolipasa A2, acetilcolinesterasa, proteasas, etc. y proteínas estructurales), indoles y aminoazúcares (Zavaleta, 1983) y péptidos de bajo peso molecular, activos sobre canales de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , y  $\text{Cl}^-$ , que modifican la excitabilidad celular. [16]

Las neurotoxinas son los principales compuestos tóxicos del veneno de escorpión, capaces de actuar sobre una amplia variedad de seres vivos, produciendo la parálisis de presas como insectos, arañas y crustáceos; sin embargo, en el hombre, el efecto del veneno puede ser inocuo o fatal, dependiendo de la especie que se trate. Es así que los escorpiones más peligrosos para el hombre pertenecen a los géneros *Tityus* (Norte y Sudamérica), *Centruroides* (México), *Androctomus*, *Buthacus*, *Leiurus*, *Buthotus* y *Buthus* (Mediterráneo y norte de África) y *Parabuthus* (Sudáfrica). En México la especie de *Centruroides* son

responsables de la muerte de personas, especialmente de niños menores de 9 años (Zavaleta, 1983). La letalidad de estas neurotoxinas varía según la especie y la evolución que ésta haya tenido frente a su depredador y a su dieta, resultando en algunos de los venenos más potentes conocidos, toxinas con una muy alta especificidad. [17]

## 1.2 TOXINAS

Se han generado esfuerzos para la generación de medidas terapéuticas efectivas (incluyendo la producción de inmunoglobulinas específicas) para combatir el efecto venenoso de los venenos de serpientes, las cuales son de data reciente a pesar de que anualmente se registran fatalidades como consecuencia del envenenamiento por estos arácnidos en países de las regiones tropicales y subtropicales del mundo.

Los venenos producidos por los escorpiones son mezclas complejas que contienen entre 100 y 200 componentes, incluyendo péptidos y proteínas con masas moleculares entre 3 y 8 kDa, los cuales son, predominantemente, agonistas o antagonistas específicos de varios canales iónicos, entre los cuales destacan los de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  sensibles al voltaje. [18]

Adicionalmente, se han aislado toxinas que modifican selectivamente la función de canales para  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ . Algunas de estas neurotoxinas son especie-específicas, habiéndose aislado componentes capaces de distinguir entre canales iónicos de vertebrados, insectos o crustáceos. Inclusive, se han identificado componentes letales para parásitos tripanosomatídeos. Otros componentes, aunque minoritarios, como es el caso de la enzima hialuronidasa, contribuyen con la difusión de las toxinas hacia sus blancos farmacológicos, o como algunos

péptidos, con actividad antimicrobiana y antifúngica, protegiendo las glándulas productoras de veneno contra el ataque de agentes patógenos. [19]

### 1.3 ANTECEDENTES

En general, las toxinas aisladas de venenos de escorpiones han mostrado tener acción sobre insectos, crustáceos y roedores, y la mayoría de ellas son toxinas que afectan los canales de sodio o de potasio. Considerando el efecto tóxico del veneno hacia los insectos, algunos estudios se han realizado con la finalidad de aislar estas toxinas y evaluar su potencial uso bioinsecticida. [20]

Así por ejemplo, Zlotkin *et al.* (1971) aislaron la AaIT, una insecto toxina del veneno de *Androctonus australis*, que aparentemente es específica para insectos ya que no afecta a crustáceos ni roedores. A su vez, de la misma especie purificaron y determinaron la secuencia de aminoácidos de otro potente insecto toxina, la AaIT5.

Del veneno del escorpión *Buthus martensii* Karsch se han purificado y cristalizado tres insecto-toxinas. Dos de ellas, la BmKI1 y BmKI4, muestran fuerte toxicidad en insectos, mientras que la BmKI6 es relativamente débil. Todas ellas tienen un evidente efecto analgésico en ratones, siendo ésta una función biológica nueva de las insecto toxinas.[21]

Se han aislado también nuevas toxinas, TbIT-1 y la Tb2-IT, a partir del veneno de *Tityus bahiensis*. Una de ellas específica para insectos y la otra con acción sobre insectos y roedores.

Los venenos de escorpión se caracterizan por tener acción paralizante, bloquear por completo la transmisión neuromuscular, producir secreción abundante y

obstrucciones en los bronquiólos, generar contracciones de los músculos laríngeos y bronquiales que contribuyen a una parálisis respiratoria, lo que puede producir la muerte por inhibición del diafragma [22].

Actualmente, se sabe que las toxinas de venenos de escorpión que afectan a insectos, se caracterizan por unirse a canales de sodio y tener de 60 a 76 aminoácidos estabilizados por cuatro puentes disulfuro. Además, esta familia de proteínas mantiene una estructura conservada que está dada por un núcleo compacto formado por una  $\alpha$ - hélice y tres hojas  $\beta$ - plegadas.

Así por ejemplo, mantienen esta estructura las insecto toxinas LqhIT, CsEv3 y LqqIII, de los venenos de *Leirus quinquestriatus hebracus* (Lebreton *et al.*, 1994), *Centruroides sculpuratus* (Babin *et al.*, 1974) y *Leirus quinquestriatus quinquestriatus* (Krimm *et al.*, 1999), respectivamente. Una excepción a esta regla es la toxina Bj\_xtrIT del veneno del escorpión *Buthotus judaicus*, la cual presenta una estructura compuesta por 2  $\alpha$  hélices y tres hojas  $\beta$  plegadas.[23]

Por otro lado, en algunos casos, a partir de la secuencia de aminoácidos de la insecto toxina, se ha establecido la correspondiente secuencia nucleotídica del gen y se ha logrado expresar en *E. coli*. Tal es el caso de la toxina recombinante AaIT del veneno del escorpión *Androctonus australis*, la cual ha mostrado toxicidad y especificidad en cultivos celulares de insectos, más no en células humanas.[24]

### ***Escherichia coli* O157:H7**

*Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH), especialmente la del serotipo O157:H7, constituye un importante patógeno emergente para los seres humanos, capaz de provocar desde una diarrea no sanguinolenta hasta una colitis hemorrágica (CH), con el síndrome urémico hemolítico (SUH) o la púrpura trombocitopénica trombótica. Desde su reconocimiento como patógeno en 1982,

*E. coli* O157:H7 se ha identificado como responsable de innumerables brotes y casos esporádicos de CH y de SUH.

La presentación clínica más común es la CH, caracterizada por un cuadro grave de dolor abdominal y diarrea sanguinolenta que cursa generalmente sin fiebre y que aproximadamente en el 15% de los pacientes culmina con el desarrollo del SUH. Este síndrome afecta fundamentalmente a los niños y se caracteriza por la presencia de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y fallo renal agudo, que puede requerir diálisis e incluso trasplante, con una mortalidad de entre el 5 y el 10% y graves secuelas en el 12 al 30% de los pacientes.

ECEH no es un microorganismo invasivo, las verotoxinas de *Escherichia coli* deben absorberse a través del epitelio intestinal para acceder a la circulación sistémica donde se transportan unidas a los leucocitos polimorfonucleares. De esta manera, la toxina absorbida a través del epitelio intestinal es transportada en la circulación desde el colon hasta sus órganos diana. Concretamente, las verotoxinas se unen al glucoesfingolípidio globotriaosilceramida (receptor Gb3), circunstancia que tiene lugar en las células endoteliales, mesangiales y epiteliales de los glomérulos renales, además de otros tipos celulares, como macrófagos, monocitos, neutrófilos y en otras localizaciones orgánicas, como el cerebro. Por otro lado, La acción de las verotoxinas sobre las células endoteliales microvasculares da lugar a una disminución tanto de su actividad antitrombótica como de su actividad fibrinolítica, y el daño de la célula endotelial conduce a la formación de multímeros anormales del factor de Von Villebrand y la consecuente agregación plaquetaria y trombocitopenia.[67]

### ***Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (SARM)**

*Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM) es un patógeno que causa una amplia gama de infecciones, desde la leves como infecciones localizadas de piel, hasta las graves como sepsis bacteriana.

Lo anterior se debe a que *Staphylococcus aureus* es un patógeno versátil que puede expresar una serie de factores de virulencia, incluyendo adhesinas por ejemplo, de unión a proteínas de fibronectina (FnBPs) y proteína A, que median la unión a las células huésped, enzimas por ejemplo proteasas y lipasas, modulinas solubles en fenol y polisacáridos capsulares (Kaplan *et al.* 2005).

Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* son capaces de sintetizar proteínas extracelulares adicionales que producen su acción en zonas distantes del foco de infección. La expresión de éstas proteínas esta regulada por un gen accesorio regulador de proteínas (agr) y pueden ser codificadas por el ADN cromosómico o plasmídico. Entre las más destacadas encontramos:

- • *Leucocidina de Panton-Valentine*: Sintetizada por el 2-3% de las cepas, ésta compuesta por dos subunidades proteicas, la F y S, que actúan en forma sinérgica sobre las membranas de células fagocíticas.
- • *Enterotoxinas*: Producidas por el 30-50% de las cepas de *Staphylococcus aureus*. Son termoestables y resistentes a las enzimas digestivas, siendo responsables de intoxicaciones alimentarias con emesis y cuadros de enterocolitis.
- • *Toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1)*: Es una proteína termoestable sintetizada por genes cromosómicos. Actúa como un superantígeno, induciendo la liberación de citocinas por linfocitos T y macrófagos.
- • *Hemolisinas*: Se conocen cuatro, denominadas *alfa*, *beta*, *gamma* y *delta*. Poseen capacidad hemolítica y citolítica actuando sobre determinadas células eucariotas del huésped como plaquetas, macrófagos, fibroblastos y leucocitos.

Las toxina *alfa* es la mejor estudiada, interviene en el desarrollo de edema y daño tisular como consecuencia de los cambios de permeabilidad inducidos en las células endoteliales.

Por otro lado, la resistencia a Meticilina de *Staphylococcus aureus*, implica resistencia intrínseca a todos antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, incluidos cefalosporinas y carbapenemes. Esta resistencia es mediada la mayoría de veces por un gen denominado *mecA* que codifica la síntesis de una proteína de unión a penicilina (PBP2A) de la bacteria. Este gen se encuentra localizado en una isla genética llamada *cassette* cromosómico *mec* (SCC*mec*).

Las cepas adquiridas en la comunidad llevan el SCC*mec* IV a diferencia de las circulantes dentro del hospital donde prevalecen del I al III. Tienen un patrón de susceptibilidad antimicrobiano diferente a las cepas de origen hospitalario. Demuestran solamente resistencia a meticilina y buen nivel de susceptibilidad a clindamicina, cotrimoxazol y tetraciclinas. Provocan infecciones de la piel preferentemente (85-90% de los casos) y en aproximadamente 10% causan infecciones graves como sepsis o neumonía necrosante más frecuentemente que pueden ocasionar la muerte del paciente.

La resistencia a Meticilina no mediada por el gen *mecA*, implica dos mecanismos. El primero es por la hiperproducción de penicilinasas, las cuales sintetizan una cantidad importante de  $\beta$ -lactamasa, y el segundo es mediante la modificación de las PBPs habituales en *S. aureus*, estas cepas presentan una modificación en la afinidad de sus PBPs normales frente a los  $\beta$ -lactámicos, lo cual puede ser debido a la hiperexpresión de algunas de estas PBPs o la consecuencia de mutaciones genéticas que alteren la afinidad de la proteína final por el antibiótico. [66]

#### 1.4 PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS (PAM's)

Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas efectoras del sistema inmune innato, con un amplio espectro de actividad antibiótica sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos y parásitos. Los PAMs juegan un papel importante en procesos anticancerígenos, inmunomoduladores, e inflamatorios, desempeñando una función significativa en la patogenésis de muchas enfermedades.[25]

Los PAMs son moléculas con una masa molecular menor de 10 KDa, y en general catiónicos, lo que significa que tienen una carga positiva a un pH fisiológico, debido al gran contenido de arginina y lisina (residuos cargados positivamente) en relación con el de ácido aspártico y ácido glutámico (residuos cargados negativamente), generalmente, con una carga neta entre +2 y +9 y una proporción substancial ( $\geq 30\%$ ) de residuos hidrofóbicos (Povey *et al.*, 2008). Además, este carácter catiónico puede ser reforzado por una amidación en el extremo C terminal. Frecuentemente, los péptidos antimicrobianos adoptan estructuras anfipáticas con extremos hidrofóbicos que encaran otros hidrofílicos, lo que les confiere propiedades para interactuar con las membranas. [26]

Los PAMs se han clasificado de acuerdo con la estructura tridimensional en los siguientes grupos: a) *PAMs con estructura  $\beta$ -plegada*, b) *PAMs de  $\alpha$ -hélice*, c) *PAMs ricos en cisteína* d) *PAMs ricos en aminoácidos regulares* y e) *PAMs compuestos de aminoácidos modificados* [27].

#### 1.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PÉPTIDOS.

Existen diferentes estudios sobre la relación estructura-función de los PAMs. Las propiedades biofísicas de los PAMs, como: estructura secundaria, carga total e hidrofobicidad, influyen en la interacción con membranas modelo y células

biológicas. La interacción inicial de los péptidos antimicrobianos con las bacterias, generalmente, es producida por su carga positiva y su atracción electrostática hacia las superficies polianiónicas de las paredes, ya sea por los ácidos teicoicos y lipoteicoicos en las bacterias Gram positivas o los lipopolisacáridos en las bacterias Gram negativas. Después de esta interacción, los péptidos antimicrobianos generan áreas de inestabilidad en la membrana externa, permitiendo la translocación de estos mismos a través de la bicapa externa; una vez localizados en la membrana, pueden sufrir modificaciones en su conformación y producir daños en la membrana o al interior de la célula. [28,29,30]

Teniendo en cuenta la información disponible, se han propuesto cuatro modelos que explican el mecanismo de acción de los PAMs]

- Modelo toroidal.

En este modelo, los péptidos se unen a la membrana al alcanzar una concentración límite que hace que los lípidos se doblen formando un canal delimitado por la cabeza de los grupos lipídicos asociados a los péptidos, formando un canal mixto del péptido con los lípidos de la membrana. Este tipo de mecanismo se ha encontrado en péptidos como magainina y melitina.

- Modelo de alfombra

En el mecanismo de alfombra, los péptidos no se insertan en la membrana, sino que permanecen asociados con la cara externa y, al alcanzar un punto crítico, forman una especie de alfombra capaz de debilitar la membrana y causar su colapso en una configuración de micelio; eventualmente, se produce la muerte celular por pérdida del citoplasma. Este tipo de mecanismo se ha encontrado en péptidos como laticín Ltc2a, derivado del veneno de la araña *Lachesana tarabaei*.

- Modelo de ruptura por barril.

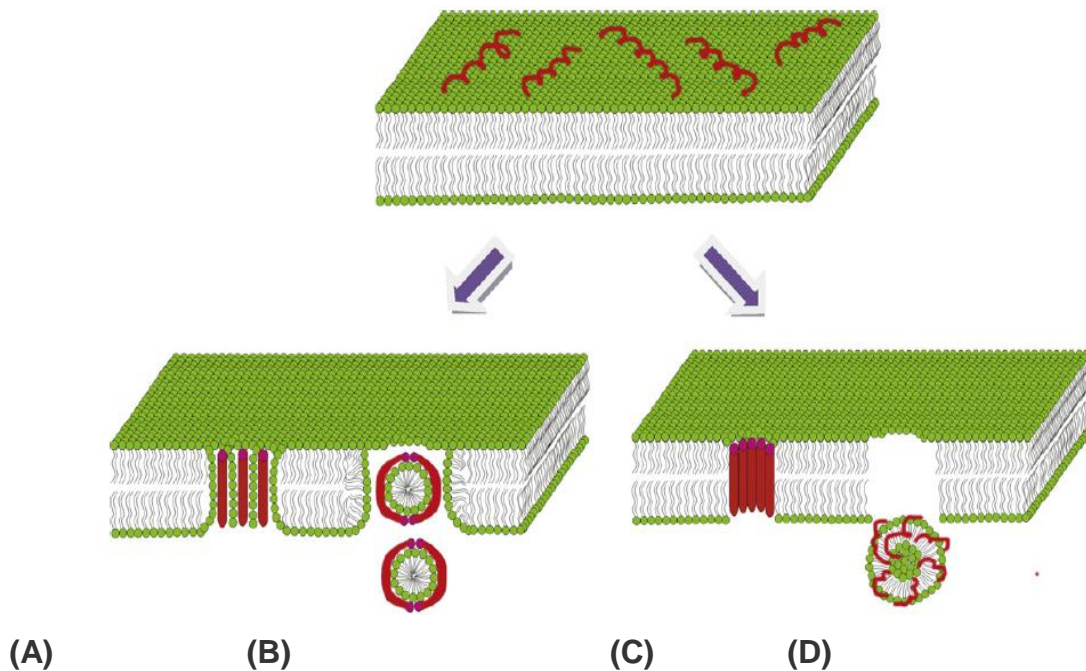
En este mecanismo, luego de interactuar con la membrana y alcanzar un nivel crítico entre péptido y lípido, los péptidos se reorientan de forma perpendicular formando una empalizada con sus cadenas laterales hidrofóbicas que encaran el centro hidrofóbico de la membrana y sus cadenas polares, y enfrentan el centro creando un poro hidrofílico. La formación de este tipo de poros es irregular en tamaño y duración, lo que genera, finalmente, una pérdida del equilibrio osmótico y del potencial de membrana.

- Modelo de canal agregado.

Este mecanismo es similar a la función de los detergentes, el péptido se une a la membrana y, a una concentración suficiente, se reorienta, lo que permite la formación de estructuras parecidas a los micelios que se extienden en la bicapa en un complejo péptido lipídico. Estos agregados aleatorios transmembrana de lípido péptido y agua, forman un canal por el cual se liberan iones, causando la muerte celular por pérdida del contenido citoplasmático, o pueden desintegrarse espontáneamente, lo que lleva a la translocación de los péptidos hacia el citoplasma donde pueden afectar blancos de acción interna.

En la siguiente figura (4) se resumen los 4 mecanismos:

Figura 3. **Modelos de acción de los PAM's** **A.** Modelo toroidal. **B.** Modelo de alfombra. **C.** Modelo de ruptura por barril. **D.** Modelo de canal agregado. (Tomado de Yanmei li *et al* 2012).



## 1.6 POTENCIAL ANTIBACTERIANO DE LOS PAM's.

Los PAM's se presentan en la actualidad como una de las moléculas más prometedoras en la lucha contra las bacterias debido a sus múltiples zonas de acción y a su citotoxicidad reducida.[32]

A continuación se dan a conocer los PAMs sintéticos más relevantes y su potencial antimicrobiano:

En el año 2011, Soudy y colaboradores sintetizaron 6 péptidos análogos de la Microcina J25 (MccJ25), un péptido antimicrobiano de 21 residuos aminoacídicos

con estructura de lazo, altamente efectivo frente a bacterias Gram-negativas. Se evaluó la actividad de éstos análogos de la MccJ25, mostrando valores destacados de inhibición bacteriana para dos de sus análogos.[33]

En otro estudio realizado en el año 2008, Bolscher y colaboradores diseñaron y sintetizaron una estructura quimérica que contiene aminoácidos de lactoferrina (17-30) y aminoácidos de la lactoferrampina (265-284). Los resultados evidenciaron que la actividad bactericida de este nuevo péptido sintetizado era más fuerte en comparación con los péptidos originales, lo cual se demostró por la necesidad de obtener péptidos más activos y estables a alta fuerza iónica.[34]

En una investigación realizada por Jang y colaboradores en 2012, se sintetizaron análogos sintéticos del péptido Buforin III mediante la sustitución de aminoácidos en la región bisagra del péptido, los residuos hidrófobos y los primeros cuatro aminoácidos del péptido (RAGL). Como resultado de estas modificaciones, aumentó la actividad antimicrobiana dos veces y el índice terapéutico de los análogos Buforin IIIb y IIIc mejoraron 7 veces en comparación con el Buforin IIIb.[35]

Por otro lado, Kyu Lee y colaboradores en 2011, sintetizaron un péptido de 18 residuos (BAMP-18) y sus análogos (BMAP-18-W, BMAP-18-L, BMAP-18-I y BMAP 18-f). El péptido BMAP-18 y sus análogos mostraron una disminución de la actividad hemolítica y mantuvieron su actividad antimicrobiana. [36]

Figura 4. a Metodología Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida.

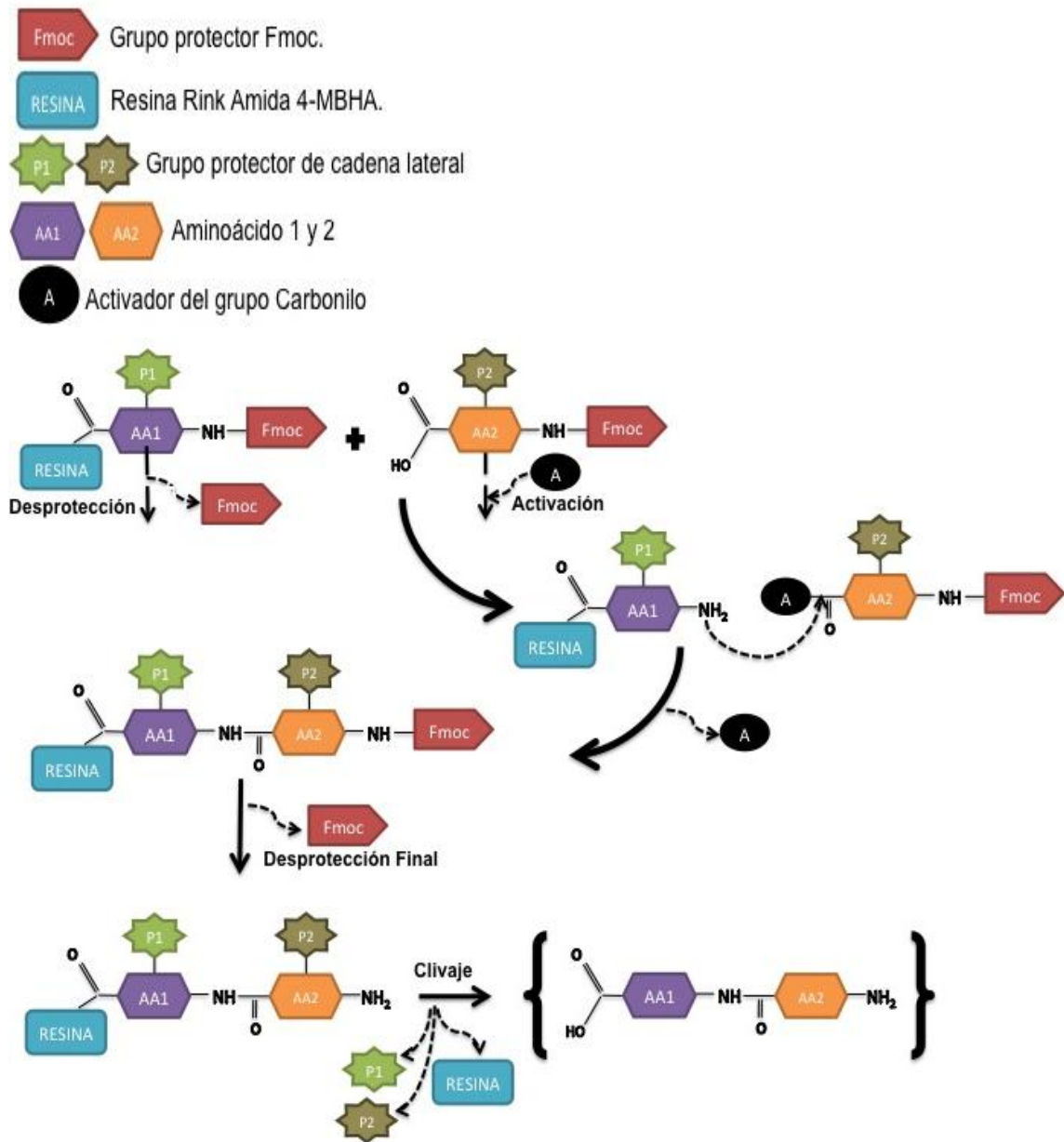
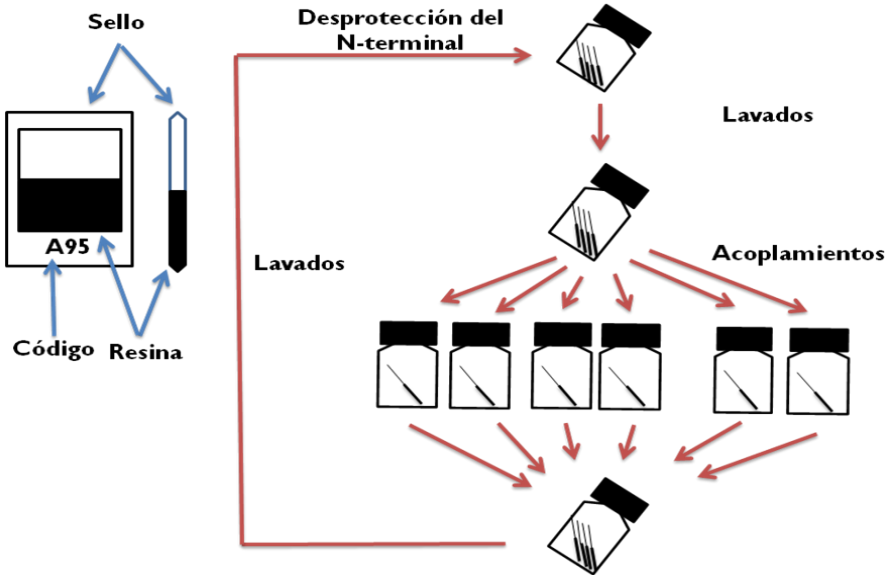


Figura 4.a Metodología Fmoc para la síntesis de péptidos en fase sólida.

4b Metodología experimental de la síntesis múltiple en fase sólida en bolsitas de té.



## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Alrededor del mundo se han venido realizando múltiples estudios en base al veneno de escorpión, y debido a los casos de escorpionismo, es decir, al envenenamiento accidental que ocurre en un ambiente urbano o semi-rural, producto de la inoculación del veneno de escorpión, se ha estudiado la actividad biológica y potencial terapéutico de estas toxinas.

Se ha estudiado también el efecto del veneno del escorpión azul sobre tumores gliales, así como los aspectos toxicológicos e inmunoquímicos del veneno de escorpiones.

Se ha encontrado evidencia que las toxinas del veneno de diferentes especies de escorpiones tienen más de una actividad biológica. Además, el mal uso constante de antibióticos, ha ayudado a que bacterias de diferentes cepas, creen resistencia hacia ellos. Por esta razón, actualmente se buscan nuevas fuentes de principios biológicos con propiedades antibacterianas.[37]

Por esta razón, esta investigación pretende determinar si los péptidos que constituyen los venenos escorpión poseen algún potencial como agente antibacteriano. Por otra parte, se han llevado a cabo estudios a nivel internacional, sin que en Colombia se hayan logrado avances en este tipo de investigaciones. [38]

Es por ello que se propone ampliar el conocimiento en este campo, mediante el estudio de los péptidos provenientes de venenos de escorpión, las cuales hacen parte de la biodiversidad colombiana, y así evaluar su potencial antimicrobiano. Adicionalmente, este estudio se constituye en una primera aproximación al

descubrimiento y desarrollo de nuevos péptidos antimicrobianos derivados de venenos de escorpión.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar, sintetizar, purificar, caracterizar, péptidos sintéticos basados en secuencias de péptidos de venenos de escorpión con actividad antimicrobiana (AMPs) mejorada contra las bacterias patógenas *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* resistente a Metilicina (SARM).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diseñar por medio de herramientas bioinformáticas péptidos con propiedades biológicas antimicrobianas.
- Sintetizar análogos de péptidos sintéticos con posible actividad antimicrobiana con una estructura alfa-hélice o beta-plegada.
- Llevar a cabo la síntesis de los péptidos usando la técnica de síntesis química en fase sólida.
- Purificar los péptidos por HPLC, sephadex G-10, sepak C-18 y caracterizarlos por técnicas de espectrometría de masas MALDI-Tof.
- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los péptidos nanoestructurados en cepas infectivas de *Escherichia coli* O157:H7, y *Staphylococcus.aureus* resistente a Metilicina.

## 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 4.1. REACTIVOS Y EQUIPOS

Los reactivos y aminoácidos utilizados en la síntesis de péptidos en fase sólida mediante la metodología Fmoc fueron adquiridos de la casa productora Chempep Inc; los solventes de síntesis usados fueron grado HPLC. Los reactivos empleados en la preparación de medios de cultivo y en el tratamiento de los microorganismos, fueron de grado bacteriológico y analítico.

La bacteria *E. coli* O157:H7 fue donada por el cepario de la Universidad Pontificia Javeriana de Colombia y SARM fue donada por el cepario del Hospital Universitario de Santander (Escuela de Bacteriología).

El agua utilizada para la preparación de todas las soluciones acuosas fue Agua MiliQ. Los reactivos y principales equipos utilizados durante esta investigación se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Reactivos y equipos principales empleados

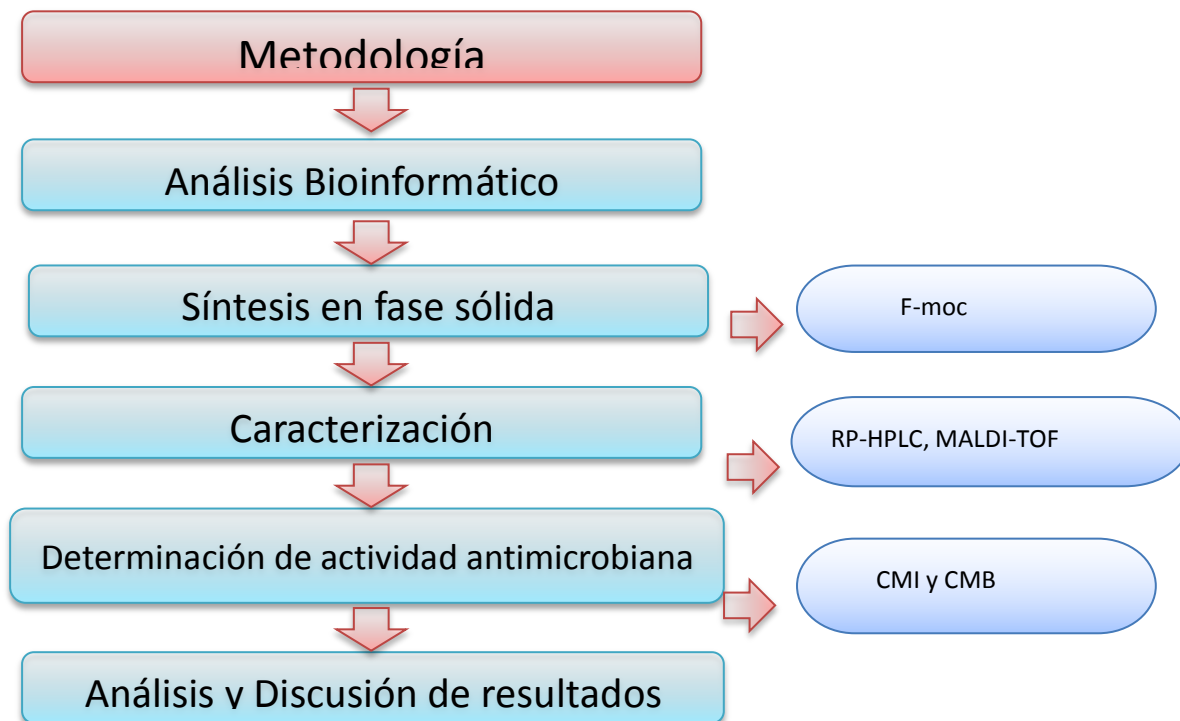
REACTIVOS	CASA PRODUCTORA
Fmoc Amino ácido - Ala	Chempep inc.
Fmoc Amino ácido - Arg	
Fmoc Amino ácido - Asn	
Fmoc Amino ácido - Asp	
Fmoc Amino ácido - Cys	
Fmoc Amino ácido - Gln	
Fmoc Amino ácido - Glu	
Fmoc Amino ácido - Gly	
Fmoc Amino ácido - His	
Fmoc Amino ácido - Ile	
Fmoc Amino ácido - Leu	
Fmoc Amino ácido - Lys	
Fmoc Amino ácido - Met	
Fmoc Amino ácido - Phe	
Fmoc Amino ácido - Pro	
Fmoc Amino ácido - Ser	
Fmoc Amino ácido - Thr	
Fmoc Amino ácido - Trp	
Fmoc Amino ácido - Tyr	
Fmoc Amino ácido - Val	
HBTU	

REACTIVOS	CASA PRODUCTORA
HOAT	
TBTU	
Fmoc-OH (9-fluorenil-metanol)	
Piperidina	
Acido clorhídrico	
Dimetilformamida	
Diclorometano	Merck
Acetonitrilo	
Ácido Trifluoroacético	
Lana de vidrio	
Azul de bromofenol	
Brain Heart Infusion Agar	
Luria Bertani	Oxoid
Müeller-Hinton-Broth	

EQUIPOS	CASA PRODUCTORA
Agitador vortex classic	VELP Scientific
Cabina de bioseguridad clase MCS	Biobase
Cabina de extracción de gases	MJ Research Inc.
Micropipetas monocanal volumen variable	Brand
HPLC	Agilent
MALDI TOF-TOF	Bruker
Agitador orbital MAXQ 4450	
Centrífuga IEC CL31 Multispeed	Thermo Scientific

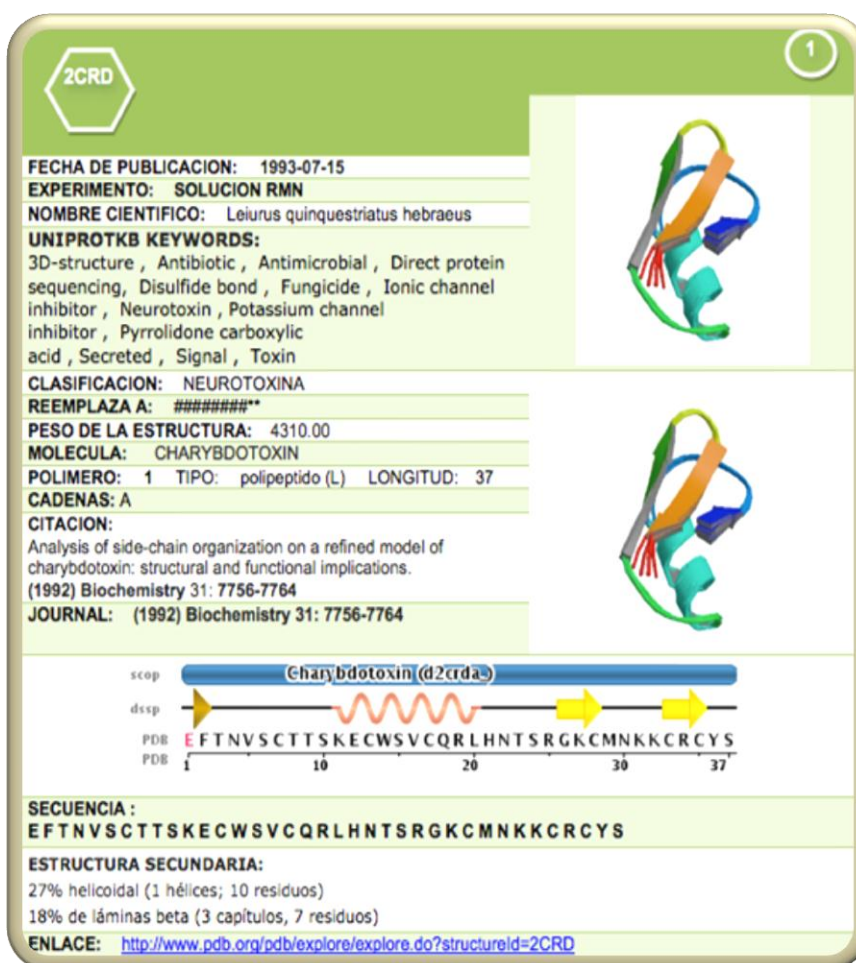
Figura 5. Esquema metodológico



## 4.2 DISEÑO DEL PÉPTIDO

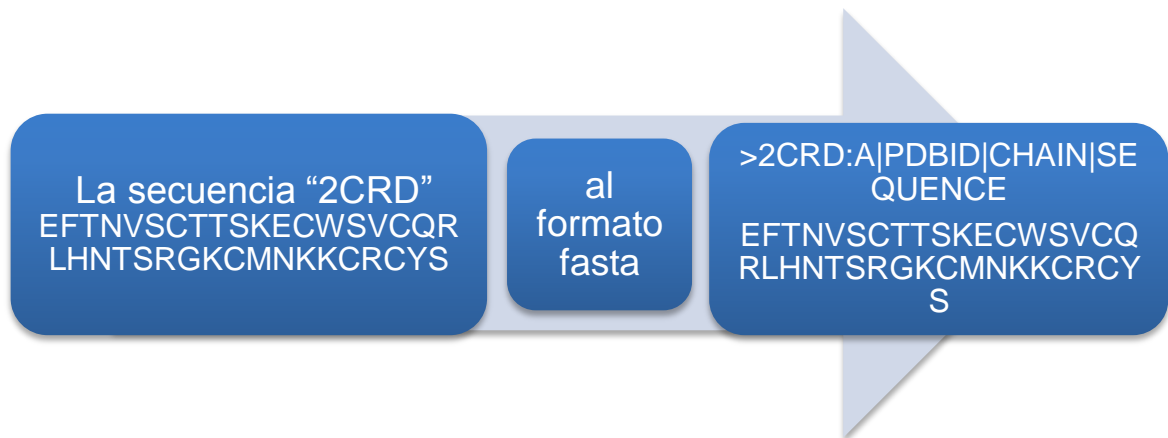
El diseño de las secuencias se inició con la búsqueda de secuencias de toxinas peptídicas de diferentes especies de escorpiones. Como primer paso se realizó una búsqueda de toxinas de escorpiones en la base de datos (PDB, Protein Data Bank) ([www.pdb.com](http://www.pdb.com)), y se extrajo la información inherente a la toxina obteniendo lo siguiente: código de la toxina, peso molecular, secuencia, publicación, Clasificación, estructura secundaria. Se obtuvo un total de 137 toxinas, Ver anexo E. [39]

Figura 6. Datos secuencias péptidos



Se procedió a revisar las secuencias de las toxinas y se escogieron solo aquellas secuencias que fueran provenientes de toxinas de escorpión en el 100% de su composición, sin mezclas o modificaciones, resultando 128 secuencias definitivas para proceder al análisis bioinformático. Las 128 secuencias se modificaron a formato “fasta” quedando de la siguiente manera.

Figura 7. Péptidos en formato fasta



Una vez se obtuvieron las secuencias en formato Fasta, se procedió a realizar un alineamiento de las secuencias usando las herramientas Blast y ClustalW ([WWW.genome.jp/tools/clustalw/](http://WWW.genome.jp/tools/clustalw/)). [40,41]

A continuación, se realizó un alineamiento de las secuencias entre cada una de las ramas o familias principales del árbol filogenético, donde se observó los determinantes para extraer los dominios conservados.

A partir de estos resultados, se obtuvieron las secuencias en las cuales mas aminoácidos estuvieran en dominios conservados por grupo de familias, y así obtener las secuencias de péptidos que fueron sintetizados de acuerdo con los dominios más conservados, utilizando de esta forma una estrategia racional de diseño.

### 4.3 ESTANDARIZACION DE LA SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

Los péptidos se obtuvieron mediante síntesis química en fase sólida, utilizando 3 metodologías Fmoc diferentes.

Para los procedimientos **1** y **2** se requiere de la preparación de las soluciones **necesarias para la realización del test de Kaiser, Azul de bromo-fenol** y para los procedimientos **3** solo debe prepararse la solución de **Azul de bromo-fenol**.

#### PREPARACION DE SOLUCIONES PARA EL TEST DE KAISER

El objetivo es verificar mediante una reacción colorimétrica el porcentaje de acople de cada aminoácido en la síntesis de péptidos en fase sólida.

1. Fueron preparadas las soluciones que llamaremos 1 y 2 para formar las soluciones A y B:
  - 1.1 **Solución 1:** Se disolvieron 40 g de fenol en 10 mL de etanol absoluto y se guardado en un frasco ámbar.
  - 1.2 **Stock de KCN:** Se disolvieron 65 mg de KCN en 100 mL de agua.
  - 1.3 **Solución 2:** Luego se tomó 1 mL de esta solución y se llevó hasta 50 mL con piridina.
  - 1.4 **Solución A:** Fueron mezcladas las soluciones 1 y 2 en proporción de volúmenes de 1:10 y almacenadas en la oscuridad.
  - 1.5 **Solución B:** Se disolvieron 1.25 g de Ninhidrina en 25 mL de etanol absoluto. [44]

#### TEST DE KAISER

1. Fue colocada una pequeña cantidad de la resina-péptido a ensayar en el respectivo tubo de ensayo(4-6) cristales.
2. Se adicionaron 3 gotas de la solución A y 1 gota de B agitando continuamente y realizando un blanco de reactivos.

3. Calentar los tubos de ensayo en una plancha de calentamiento por 3 minutos a 100°C.
5. Resultados posibles:
  - a. Resina-péptido y solución azul a verdosa: ensayo positivo.
  - b. Resina-péptido incolora: ensayo negativo.

Tabla 2. Porcentaje Aproximado de acoplamiento de Boc-aminoácido a la resina

<b>% ACOPLAMIENTO APROXIMADO</b>	<b>COLOR EN EL ENSAYO DE NINHIDIRNA</b>
76.0	Sólido y solución azul oscuro
84.0	Sólido azul oscuro y solución moderadamente azul
94.0	Sólido moderadamente azul y solución azul clara
99.4	Sólido ligeramente azul y solución con trazas de azul

#### **PREPARACION DE SOLUCION DE AZUL DE BROMOFENOL.**

1. Se disolvieron 0.25 g de azul de Bromofenol en 25 mL de DMF.
2. Se añadió una pequeña cantidad de resina-péptido en un tubo de microcentrífuga de 0.6 mL.
3. Se adicionaron 5 gotas de la solución del reactivo, agitando continuamente.
4. Resultados Posibles:
  - a. Resina-péptido azul: ensayo positivo.
  - b. Esferas incoloras: ensayo negativo.

OBSERVACION: Ya que este reactivo detecta la presencia de amina libre, trazas de DIPEA pueden dar el ensayo como positivo, por lo tanto, la DIPEA se eliminó en su totalidad durante la síntesis de los péptidos.

## **PROCEDIMIENTO 1:**

### **EQUIPOS**

Cabina de extracción b) Plancha de calentamiento c) Termómetro d) Agitador mecánico orbital (Shaker) e) Balanza Analítica f) Vortex g) Micropipetas automáticas de volumen ajustable de 200 y 1000  $\mu\text{L}$ .

### **MATERIALES Y REACTIVOS**

#### **Materiales**

a) Probetas graduadas de diferentes volúmenes b) Embudos c) Espátulas d) Tubos de ensayo (0.5 mL) e) Jeringas (3 mL, 5 mL) con filtros de polipropileno (reactor) f) Viales de vidrio de 7 mL

#### **Reactivos**

a) Resina Rink amida 4MBHA (100-200 mesh, Loading: 0.63 mmol/gramo) b) 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato) (HBTU) c) 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato) (TBTU) d) N-hidroxibenzotriazol (HOBt) e) Diclorometano (DCM) f) N-metilpirrolidona (NMP) g) Piperidina h) N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) i) N,N-dimetilformamida (DMF) j) Ninhidrina k) Fenol l) Cianuro de potasio m) Azul de bromofenol n) Anhídrido acético

#### **Aminoácidos**

a) N-Fmoc-L-Ala x  $\text{H}_2\text{O}$  (**A**) b) N-Fmoc-L-Arg (Pbf)-OH (**R**) c) N-Fmoc-Asn(Trt)-OH (**N**) d) N-Fmoc-Asp(tBu)-OH (**D**) e) N-Fmoc-L-Cys(Trt)-OH (**C**) f) N-Fmoc-L-Gln (Trt)-OH (**N**) g) N-Fmoc-L-Glu(tBu)-OH (**D**) h) N-Fmoc-Gly-OH (**G**) i) N-Fmoc-L-His(Trt)-OH (**H**) j) N-Fmoc-L-Ile-OH (**I**) k) N-Fmoc-L-Leu-OH (**L**) l) N-Fmoc-L-Lys(tBu)-OH (**K**) m) N-Fmoc-L-Met-OH (**M**) n) N-Fmoc-L-Phe-OH (**F**) o) N-Fmoc-L-Pro-OH (**P**) p) N-Fmoc-L-Ser(tBu)-OH (**S**) q) N-Fmoc-L-Thr(tBu)-OH (**T**) r) N-Fmoc-L-Trp(Boc)-OH (**W**) s) N-Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH (**Y**) t) N-Fmoc-L-Val-OH (**V**)

## PREPARACION DE LA RESINA RINK AMIDA PARA EL PRIMER ACOPLE

1. Se pesaron 100 mg de resina en una jeringa con filtro (Reactor).
2. Se realizaron 3 lavados a la resina con DCM de la siguiente forma:  
Una vez (1x) durante 3 minutos y Una vez (1x) por 5 minutos
3. La resina RinK amida 4-MBHA posee un grupo amino protegido con el grupo Fmoc. Esta debe ser desprotegida para poder realizar el acople del primer residuo de aminoácido. La desprotección se realizó adicionando 1.5 mL de piperidina al 5% en DMF a la resina y agitando por 1 minuto, y drenando la jeringa (realizado dos veces por 1 minuto y dos más durante 5 minutos).
4. El lavado de la resina se realizó de la siguiente forma:  
Tres (3) veces con DMF por 1 minuto  
Tres (3) veces con DCM por 1 minuto
5. Se repitió el punto 4 chequeando la **resina** con una solución de Ninhidrina y el **último lavado** con DMF con una solución de azul de Bromofenol al 5% en DMF:

Tabla 3. Verificación del acople procedimiento 1.

RESINA	ULTIMO LAVADO
<p><b>5.1. Colocar unas pocas esferas de resina en un tubo de ensayo.</b></p> <p><b>5.2 Adicionar 6 gotas de A y 2 gotas de B y agite.</b></p> <p><b>5.3 Colocar el tubo de ensayo en un bloque de calentamiento por 3 minutos a 80°C.</b></p> <p>Resultados Posibles:</p> <p>✓ Perlas y solución azul a verdosa: ensayo positivo.</p> <p>✓ Perlas incoloras: ensayo negativo</p> <p>Si el ensayo es positivo, continuar con el apartado 6. Si el ensayo es negativo, repetir el procedimiento del apartado 3.</p>	<p><b>5.1. Colocar unas pocas esferas de resina en un tubo de microcentrifuga de 0.6 mL</b></p> <p><b>5.2 Adicionar 5 gotas de la solución del reactivo, agitar y observar.</b></p> <p>Resultados Posibles:</p> <p>✓ Solución azul o verdosa: ensayo positivo</p> <p>✓ Solución incolora: ensayo negativo</p> <p>Si el ensayo es positivo, proceda a repetir los pasos del apartado 4 y vuelva a repetir el ensayo del apartado 5.</p>

## **ACOPLAMIENTO DEL PRIMER RESIDUO DE AMINOACIDO**

1. Se pesó el aminoácido a acoplar y disolvió en 1 mL de DMF.
2. Se agregaron 8 equivalentes de DIPEA con respecto al aminoácido Fmoc al vial que contiene la solución de aminoácido y agitó por 5 minutos.
3. Se agregaron 4 equivalentes del reactivo de acoplamiento ( HBTU o TBTU) con respecto al aminoácido Fmoc, al vial que contiene la solución de aminoácido y la base. Se agitó esta mezcla de reacción por 5 minutos.
4. Se adicionó la solución anterior al reactor que contiene la resina ya desprotegida.
5. Se dejó en agitación constante y a temperatura ambiente por espacio de 1 hora.
6. Finalizada la hora, se drenó la jeringa (sin descartar la solución).
7. A continuación, se lavó la resina-primer residuo de la siguiente forma:
  - 7.1. Tres (3) veces con DMF por 2 minutos
  - 7.2. Tres (2) veces con DCM por 1 minuto
  - 7.3. Se repitieron los puntos 7.1 y 7.2
8. Se realizó el test de Kaiser para verificar que el acoplamiento ha sido completo. Cuando el ensayo dio positivo, se adicionó la solución que no se descartó a la jeringa y se dejó por 30 minutos más.
9. Si el ensayo era negativo se realizó un “capping” (en este caso, es la acetilación de los grupos amino de la resina RinK amida 4-MBHA que no reaccionaron) de la siguiente forma:
  - 9.1 Se adicionó a la jeringa 1.5 mL de una solución que contenía (los volúmenes de cada uno de los reactivos son para preparar 3 mL de la solución de acetilación): 15% Anhídrido acético: 0.45 mL, 40 % DMF seco: 1.2 mL, 40 % DCM seco: 1.2 mL, 5 % de DIPEA: 0.15 mL
  - 9.2 Se dejó en agitación constante y a temperatura ambiente por 30 minutos.
10. Se lavó la resina-primer residuo de la siguiente forma:
  - 10.1 Tres (3) veces con DMF por 2 minutos.

10.2 Tres (2) veces con DCM por 1 minuto.

10.3 Repetir los apartados 10.1 y 10.2 [45]

## **ESTIMACION DE LA UNION DEL PRIMER RESIDUO DE AMINOACIDO A LA RESINA**

13 Una vez que se haya acoplado el primer residuo de aminoácido, se debe proceder a determinar el loading (este procedimiento se realiza sólo una vez). Esto se realizó de la siguiente manera:

14 Desprotección del grupo Fmoc:

12.1 Se adicionó 1.5 mL de una solución de piperidina al 5% en DMF-NMP (1:1) a la resina y agitó por 1 minuto. Se drenó la jeringa y recogió la solución en un balón volumétrico de 100 mL. Se repitió una vez más.

12.2 Se adicionó 1.5 mL de una solución de piperidina al 5% en DMF-NMP (1:1) a la resina y agitó por 1 minuto. Se drenó la jeringa y recogió la solución en un balón volumétrico de 100 mL. Se repitió una vez más.

15 Se lavó la resina-primer residuo de la siguiente forma (no se descartan los lavados, sino que se vierten dentro del balón volumétrico) :

13.1 Tres (3) veces con DMF por 2 minuto.

13.2 Tres (2) veces con DCM por 1 minuto.

13.3 Se repitieron los apartados 13.1 y 13.2

## **ACOPLAMIENTO DE UN AMINOACIDO A LA RESINA-PÉPTIDO**

14 Se pesó el siguiente aminoácido a acoplar. Se repitió el procedimiento desde el punto 1 hasta el punto 10. Se repitieron estos pasos hasta acoplar el ultimo aminoácido.

## **DESPROTECCION DEL GRUPO Fmoc**

- 15 Una vez que se acopló un residuo de aminoácido y el acoplamiento fue completo, se procedió a la desprotección del grupo Fmoc, procedimiento que ya fue realizado en el apartado 3.1.
- 15.1 Se adicionó 1.5 mL de una solución de piperidina al 5% en DMF-NMP (1:1) a la resina y agitó por 1 minuto y drenó la jeringa. Se repitió una vez más.
- 15.2 Se adicionó 1.5 mL de una solución de piperidina al 5% en DMF-NMP (1:1) a la resina y agitó por 1 minuto y drenó la jeringa. Se repitió una vez más.
- 16 Se repitieron los procedimientos desde el apartado 1 hasta el 5. [46]

## **PROCEDIMIENTO 2:**

### **EQUIPOS**

Cabina de extracción b) Plancha de calentamiento c) Termómetro d) Agitador mecánico orbital (Shaker) e) Balanza Analítica f) Vortex g) Micropipetas automáticas de volumen ajustable de 200 y 1000  $\mu$ L.

## **MATERIALES Y REACTIVOS**

### **Materiales**

a) Probetas graduados de diferentes volúmenes b) Embudos c) Espátulas d) Tubos de ensayo (0.5 mL) e) Jeringas (3 mL, 5 mL) con filtros de polipropileno (reactor) f) Viales de vidrio de 7 mL

### **Reactivos**

a) Resina Rink amida 4MBHA (100-200 mesh, Loading: 0.63 mmol/gramo) b) 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato) (HBTU) c) 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato) (TBTU) d) N-hidroxibenzotriazol (HOBt) e) Diclorometano (DCM) f) N-metilpirrolidona (NMP) g) Piperidina h) N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) i) N,N-dimetilformamida (DMF) j) Ninhidrina k) Fenol l) Cianuro de potasio m) Azul de bromofenol n) Anhídrido acético

## Aminoácidos

a) N-Fmoc-L-Ala x H<sub>2</sub>O (**A**) b) N-Fmoc-L-Arg (Pbf)-OH (**R**) c) N-Fmoc-Asn(Trt)-OH (**N**) d) N-Fmoc-Asp(tBu)-OH (**D**) e) N-Fmoc-L-Cys(Trt)-OH (**C**) f) N-Fmoc-L-Gln (Trt)-OH (**N**) g) N-Fmoc-L-Glu(tBu)-OH (**D**) h) N-Fmoc-Gly-OH (**G**) i) N-Fmoc-L-His(Trt)-OH (**H**) j) N-Fmoc-L-Ile-OH (**I**) k) N-Fmoc-L-Leu-OH (**L**) l) N-Fmoc-L-Lys(tBu)-OH (**K**) m) N-Fmoc-L-Met-OH (**M**) n) N-Fmoc-L-Phe-OH (**F**) o) N-Fmoc-L-Pro-OH (**P**) p) N-Fmoc-L-Ser(tBu)-OH (**S**) q) N-Fmoc-L-Thr(tBu)-OH (**T**) r) N-Fmoc-L-Trp(Boc)-OH (**W**) s) N-Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH (**Y**) t) N-Fmoc-L-Val-OH (**V**)

## PREPARACION DE LA RESINA RINK AMIDA PARA EL PRIMER ACOPLA

1. Se pesaron 100 mg de resina en una jeringa con filtro (Reactor).
2. Se realizaron 2 lavados a la resina con DCM de la siguiente forma:
  - a. Una vez (1) x 1 minuto y Una (1) vez x 5 minutos
3. La resina Rink amida 4-MBHA posee un grupo amino protegido con el grupo Fmoc. Esta debe ser desprotegida para poder realizar el acople del primer residuo de aminoácido. La desprotección se realizó adicionando
  - a. 2 mL de piperidina al 20% en DMF a la resina y agitar por 2 minutos y drenó la jeringa (realizado dos veces 2 minutos y dos últimas de 5 minutos).
4. El lavado de la resina se realizó de la siguiente forma:
  - a. Tres (3) veces con DMF por 1 minuto
  - b. Tres (3) veces con DCM por 1 minuto
  - c. Fueron repetidos los apartado 4.
5. Chequeando la **resina** con una solución de Ninhidrina y el **último lavado** con DMF con una solución de azul de Bromofenol al 1% en DMF:

Tabla 4. Verificación del acople procedimiento 2.

RESINA	ULTIMO LAVADO
<p><b>5.2. Colocar unas pocas esferas de resina en un tubo de ensayo.</b></p> <p><b>5.3 Adicionar 6 gotas de A y 2 gotas de B y agite.</b></p> <p><b>5.3 Colocar el tubo de ensayo en un bloque de calentamiento por 3 minutos a 80°C.</b></p> <p>Resultados:</p> <p>✓ Perlas y solución azul a verdosa: ensayo positivo.</p> <p>✓ Perlas incoloras: ensayo negativo</p> <p>Si el ensayo es positivo, continuar con el apartado 6. Si el ensayo es negativo, repetir el procedimiento del apartado 3.</p>	<p><b>5.2. Colocar un pocas esferas de resina en un tubo de microcentrifuga de 0.6 mL</b></p> <p><b>5.3 Adicionar 5 gotas de la solución del reactivo, agite y observe.</b></p> <p>Resultados:</p> <p>✓ Solución azul o verdosa: ensayo positivo</p> <p>✓ Solución incolora: ensayo negativo</p> <p>Si el ensayo es positivo, proceda a repetir los pasos del apartado 4 y vuelva a repetir el ensayo del apartado 5.</p>

### ACOPLAMIENTO DEL PRIMER RESIDUO DE AMINOACIDO

1. Fue pesado el aminoácido a acoplar y disuelto en 0.5 mL de DMF.
2. Se agregaron 8 equivalentes de DIPEA con respecto al aminoácido Fmoc al vial que contiene la solución de aminoácido y agitar por 1 minuto.
3. Se agregaron 4 equivalentes del reactivo de acoplamiento ( HBTU o TBTU) con respecto al aminoácido Fmoc, al vial que contiene la solución de aminoácido y la base. Agitando por 2 minutos.
4. Se adiciono la solución anterior al reactor que contiene la resina ya desprotegida.
5. Se Dejo en agitación constante y a temperatura ambiente por espacio de 2 horas.
6. Finalizada la hora se dreno la jeringa (sin descartar la solución).
7. Lavar la resina-primer residuo de la siguiente forma:
  - 7.1 Tres(3) veces con DMF por 1 minuto
  - 7.2 Tres (3) veces con DCM por 1 minuto
  - 7.3 Repetir los apartados 7.1 y 7.2
8. Se realizó el test de kaiser para verificar que el acoplamiento ha sido completo. Cuando el ensayo dio positivo se adiciono la solución que no se descarto a la jeringa y se dejo por 30 minutos más.

9. Si el ensayo es negativo se realizó un “capping” (en este caso, es la acetilación de los grupos amino de la resina RinK amida 4-MBHA que no reaccionaron) de la siguiente forma:

9.1 Se adicionar a la jeringa 1.5 mL de una solución que contiene (los volúmenes de cada uno de los reactivos son para preparar 3 mL de la solución de acetilación): 15% Anhídrido acético: 0.45 mL, 40 % DMF seco: 1.2 mL, 40 % DCM seco: 1.2 mL, 5 % de DIPEA: 0.15 mL

9.2 Se dejó en agitación constante y a temperatura ambiente por 45 minutos.

10. Se lavo la resina-primer residuo de la siguiente forma:

10.1 Tres (3) veces con DMF por 1 minuto.

10.2 Tres (3) veces con DCM por 1 minuto.

10.3 Repetir los apartados 10.1 y 10.2 [45]

## **ESTIMACION DE LA UNION DEL PRIMER RESIDUO DE AMINOACIDO A LA RESINA**

11. Una vez que se haya acoplado el primer residuo de aminoácido, se debe proceder a determinar el loading (este procedimiento solo se realizará una vez). Esto se realizara de la siguiente manera:

12. Desproteger el grupo Fmoc:

12.1 Adicionar 1.5 mL de una solución de piperidina al 20% en DMF-NMP (1:1) a la resina y agitar por 1 minuto. Drenar la jeringa y recoger la solución en un balón volumétrico de 100 mL. Repetir una vez más.

12.2 Adicionar 1.5 mL de una solución de piperidina al 20% en DMF-NMP (1:1) a la resina y agitar por 1 minuto. Drenar la jeringa y recoger la solución en un balón volumétrico de 100 mL. Repetir una vez más.

13. Lavar la resina-primer residuo de la siguiente forma (no descarte los lavados, viértalos dentro del balón volumétrico) :

a. Tres (3) veces con DMF por 1 minuto.

- b. Tres (3) veces con DCM por 1 minuto.
- c. Repetir los apartados 13.1 y 13.2

## **ACOPLAMIENTO DE UN AMINOACIDO A LA RESINA-PÉPTIDO**

- 2. Pesar el siguiente aminoácido a acoplar. Repetir el procedimiento desde el apartado 1 hasta el apartado 10. Se repitieron estos pasos hasta acoplar el ultimo aminoácido.

### **DESPROTECCION DEL GRUPO Fmoc**

- 3. Una vez que se ha acoplado un residuo de aminoácido y el acoplamiento fue completo, se procede a la desprotección del grupo Fmoc, procedimiento que ya fue realizado en el apartado 3.1.
  - a. Adicionar 1.5 mL de una solución de piperidina al 20% en DMF-NMP (1:1) a la resina y agitar por 1 minuto y drenar la jeringa. Repetir una vez más.
  - b. Adicionar 1.5 mL de una solución de piperidina al 20% en DMF-NMP (1:1) a la resina y agitar por 1 minuto y drenar la jeringa. Repetir una vez más.

Se repitieron los procedimientos desde el apartado 1 hasta el 5. [46]

### **PROCEDIMIENTO 3:**

#### **SÍNTESIS CONTROLADA DE PÉPTIDOS POR LA METODOLOGIA f-moc**

#### **EQUIPOS**

- a) Selladora b) Plancha de calentamiento c) Termómetro d) Balanza Analítica
- e) Vortex f) Micropipetas automáticas de volumen ajustable de 200 y 1000  $\mu\text{L}$  g) Cabina de extracción

#### **MATERIALES Y REACTIVOS**

##### **Materiales**

- a) Tubos Falcón de diferentes volúmenes b) Pipetas graduadas c) Embudos
- d) Malla polipropileno (Nº de malla de 100-200 mes) h) d) Espátulas e) Toallas de papel
- f) Tubos eppendorf 1.5 y 2 ml g) Pinzas h) pipetas Pasteur
- i) Pipetas graduadas de vidrio de 10 mL j) Rapidógrafo de punta fina

## Reactivos

- a) Resina Rink amida 4MBHA (100-200 mesh, Loading: 0.63 mmol/gramo) b) 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato) (HBTU) c) 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato) (TBTU) d) N-hidroxibenzotriazol (HOBt) e) Diclorometano (DCM) f) N-metilpirrolidona (NMP) g) Piperidina h) N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) i) N,N-dimetilformamida (DMF) j) Ninhidrina K) Azul de bromofenol

## Aminoácidos

- a) N-Fmoc-L-Ala x H<sub>2</sub>O (**A**) b) N-Fmoc-L-Arg (Pbf)-OH (**R**) c) N-Fmoc-Asn(Trt)-OH (**N**) d) N-Fmoc-Asp(tBu)-OH (**D**) e) N-Fmoc-L-Cys(Trt)-OH (**C**) f) N-Fmoc-L-Gln(Trt)-OH (**N**) g) N-Fmoc-L-Glu(tBu)-OH (**D**) h) N-Fmoc-Gly-OH (**G**) i) N-Fmoc-L-His(Trt)-OH (**H**) j) N-Fmoc-L-Ile-OH (**I**) k) N-Fmoc-L-Leu-OH (**L**) l) N-Fmoc-L-Lys(tBu)-OH (**K**) m) N-Fmoc-L-Met-OH (**M**) n) N-Fmoc-L-Phe-OH (**F**) o) N-Fmoc-L-Pro-OH (**P**) p) N-Fmoc-L-Ser(tBu)-OH (**S**) q) N-Fmoc-L-Thr(tBu)-OH (**T**) r) N-Fmoc-L-Trp(Boc)-OH (**W**) s) N-Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH (**Y**) t) N-Fmoc-L-Val-OH (**V**)

## PROCEDIMIENTO GENERAL

### 3.1. FABRICACION Y LLENADO DE BOLSAS

- 1.1 Se cortaron cuadrados de malla de polipropileno de dimensiones (3 x 3) cm
- 1.2 Las bolsas fueron selladas solo por tres lados y dejar el cuarto abierto para adicionar la cantidad de resina deseada dentro de la bolsa
- 1.3 Se llenaron las bolsas con 50 mg de resina 4-MBHA y selladas.
- 1.4 Se probaron las bolsas con resina, siendo agitadas por lo menos 15 minutos en DCM
- 1.5 Transcurrido este tiempo, se filtró el solvente utilizando un embudo con un cono hecho con la malla de polipropileno. Se observó y revisó el cono para asegurar que no hubieron restos de resina en el fondo. Las bolsas fueron sacadas del recipiente, secadas y revisadas por duplicado cada una. [46]

### **3.2. PREPARACION DE LA RESINA RINK AMIDA PARA EL PRIMER ACOPLA**

1. Se tomaron 2 bolsas de síntesis llenas de resina para sintetizar cada péptido (Reactor).
2. En un frasco debidamente rotulado con el nombre del péptido se depositaron las bolsas selladas con resina en el interior.
3. Para activar la resina se realizó el lavado de la resina de la siguiente forma:  
una (1) vez con DMF por 10 minutos  
una (1) vez con DCM por 1 minuto  
una (1) vez con DCM por 5 minutos
4. Para desproteger la resina se realizaron 2 lavados con piperidina al 25% en DMF durante 20 minutos cada uno.
5. Se realizaron 3 lavados a la resina con DMF de la siguiente forma:  
Tres veces de un minuto (3) x 1 minuto.
6. Se realizó 1 lavado a la resina una (1) vez con IPA por 1 minuto
7. Se realizó 1 lavado a la resina una (1) vez con con Azul de Bromofenol por 2 minutos.
8. Se realizaron 2 lavados a la resina con DMF de la siguiente forma:  
dos veces de un minuto (2) x 1 minuto.

### **3.3. ACOPLA**

- 3.1 En un frasco debidamente rotulado con el nombre del aminoácido correspondiente se pesó la cantidad de aminoácido necesaria para el acopla, se disolvió en DMF o DCM (Casi todos los aminoácidos utilizados se disuelven en DCM o DCM, excepto el triptófano (W) y la histidina (H) que se disuelven 9:1 DMF/DCM.
- 3.2 Se adicionó la cantidad calculada de DCC
- 3.3 Se adicionó la cantidad pesada de TBTU en un mL de DMF mas la cantidad calculada de DIPA
- 3.4 Se introdujeron las bolsas correspondientes a cada aminoácido Se agitó durante 4 horas

- 3.5 Se desmontó la reacción, y se realizó el lavado de la resina de la siguiente forma una (1) vez con DMF por 10 minutos
- 3.6 Transcurrido este tiempo, se lavaron las bolsas con DCM 1 minuto y esto se repitió tres veces.

### **3.4. MONITOREO DE LA REACCIÓN DE ACOPLAMIENTO**

- 4.1 En cada acople se realizó un ensayo de azul de Bromofenol para ir monitoreando cada acople. Se colocaron todas las bolsas en un frasco de polietileno y se adicionó suficiente cantidad de azul de Bromofenol al 1% para cubrir las bolsas.
- 4.2 Se realizaron 2 lavados con DMF y se realizó el acople.
- 4.3 Al desmontar el acople se secaron las bolsitas y se observó la coloración. Si la coloración presente es azul indica que el aminoácido no desplazó el Azul de bromo fenol, y por tanto, el acople no fue exitoso. Pero si por el contrario el azul de Bromofenol fue desplazado y la resina presenta una coloración blanca o beige el acople fue exitoso y se procede a realizar el siguiente acople.

Este método detecta la presencia de amina libre, trazas de DIPEA pueden dar el ensayo positivo, por lo tanto la DIPEA debe eliminarse en su totalidad.

Si el ensayo es positivo se repiten los procedimientos de acople para el siguiente aminoácido.

También puede realizar las siguientes variaciones enumeradas a continuación teniendo en cuenta el siguiente orden de prioridad: A) Cambiar el solvente de acople o usar una mezcla de ellos. B) Utilizar como activador TBTU, así: 1 equivalente de aminoácido por un equivalente del activador, por 1.5 equivalente de DIPEA al 100%.

Los aminoácidos glicina y ácido glutámico no se deben neutralizar y su tiempo de acople debe ser máximo de 2 horas. Cuando se atrase una bolsa de monómero o polímero, dejarla esperando para que entren al tiempo con su correspondiente pareja al acople siguiente.[44]

### **3.5. DESPROTECCION**

Se colocaron todas las bolsas y se adicionó suficiente cantidad para cubrir las bolsas de una solución TFA al 55%, agitó durante 30 minutos, retiró el TFA, y se procedieron a hacer varios lavados: por 1 minuto con DCM 1 vez, luego se retiró el DCM y lavó por un 1 minuto con IPA 2 veces, y finalmente se retiró el IPA y lavó por 1 minuto con DCM 2 veces.

### **4.4 CLIVAJE DEL PÉPTIDO**

El procedimiento tiene por objetivo la separación de los péptidos de la resina usada como soporte en la síntesis, lo cual se resume en la formación repetida de enlaces amida entre funciones amina y carboxilo de L-  $\alpha$ - aminoácidos adyacentes.

EL soporte utilizado en síntesis peptídica es un polímero microporoso de estireno que contiene un 1% de p-divinilbenceno. El grado de sustitución de esos soportes está en un rango comprendido entre 0.2 y 1.0 mmol/g. Cuando las esferas de poliestireno se encuentran secas, presentan un diámetro de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ , en presencia de los disolventes más comúnmente utilizados en la síntesis de péptidos, diclorometano (DCM) y N,N-dimetilformamida (DMF), y acostumbran a aumentar su volumen hasta 2.5-6.0 veces de su volumen inicial.[45]

## **Equipos**

Centrifuga, Micropipetas de 100- 1000  $\mu$ l, Agitador shaker, Desecador, Cabina de extracción de gases.

## **Materiales y reactivos**

Ácido trifluoroacético (TFA) grado síntesis, Agua grado HPLC, 1,2-Etanoditiol, Triisopropilsilano (TIS) grado síntesis, Tubos Falcon, Éter etílico, Pentóxido de fósforo, solución o cóctel de clivaje

## **Procedimiento**

1. Se secó la resina-péptido en un desecador por lo menos 3 horas. En caso contrario se puede dejar toda la noche secando.
2. Se adicionó la resina-péptido a un tubo Falcon rotulado con el nombre del péptido.

La solución de clivaje se preparó dependiendo del péptido sintetizado para la mayoría de péptidos se prepara la solución de clivaje A y para los péptidos que contienen Triptófano, Metionina o Cisteína se utilizó la solución B. Cada mililitro de solución de clivaje se usó para desanclar de 10 a 15 miligramos de péptido en la resina.

Solución A 1 mL contiene 95% de TFA, 2,5% H<sub>2</sub>O, 2,5% TIS

Solución B 1 mL contiene 92.5% de TFA, 2,5% H<sub>2</sub>O, 2,5% TIS, 2,5% de 1,2-Etanoditiol.

3. Se adicionó a la resina-péptido la solución de clivaje
4. Se dejó en agitación durante 3 horas.
5. Al finalizar se filtró la resina con una jeringa con filtro o bolsas de síntesis para retirar la resina.
6. Se lavó con una solución de ácido trifluoroacético (TFA) al 95% y (TIS) al 5%

7. Se precipitó la solución filtrada con éter frío y centrifugó a 10.000 revoluciones por minuto durante 15 minutos. Al precipitar se vio la aparición de un sólido de apariencia lechosa que corresponde al péptido sintetizado.
8. Se lavó 10 veces con éter frío centrifugando cada vez.
9. Se dejó secar bajo la cabina de extracción de gases hasta la evaporación del éter.
10. Se disolvió en agua y congeló.

#### **4.5 PURIFICACION DEL PÉPTIDO**

##### **DESALINIZACIÓN DE PÉPTIDOS SINTÉTICOS POR SEPHADEX G-10**

El objetivo de la purificación con Sephadex G10 fue eliminar sales y otros contaminantes presentes en las muestras de péptidos sintéticos generados mediante síntesis química. El gel de filtración de cromatografía permite la separación en función de su tamaño molecular. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es un gel hidratado que se introduce en la columna y está constituido por partículas esféricas que tienen poros de un determinado tamaño. Las moléculas de pequeño tamaño difunden a través de los poros de las partículas del gel y por ello son retardadas en su paso por la columna. Las moléculas grandes no entran en los poros de las partículas del gel y por ello eluyen rápidamente en lo que se denomina “volumen muerto” de la columna, se dice que son excluidos del gel. De esta forma, las moléculas se separan en función de su tamaño, eluyendo en orden decreciente de peso molecular.

Intervalo de fraccionamiento:

Valores extremos (máximo y mínimo) de pesos moleculares entre los cuales el gel tiene capacidad de separar.

Volumen de elución: Volumen necesario para eluir un compuesto de una columna.

Sephadex: Gel de dextrano (polímero ramificado de glucosa, entrecruzado y formado en pequeñas bolitas). Existen distintos tipos, según el tamaño de poro, proporcionando límites de exclusión comprendidos entre 1 y 200 000 daltons. Estos geles se identifican por una denominación de G-10 hasta G-200, lo que se refiere a la capacidad de retención de agua del gel multiplicada por 10.

### **Equipos**

balanza analítica

agitador magnético

### **Materiales y reactivos**

Lana de vidrio, pipetas Pasteur de vidrio, soporte universal, Micropipeta y puntas  
Ácido acético 1%, Agua grado HPLC, Sephadex G-10, Tubos eppendorf de 1,5ml  
Azida de sodio al 0.01%, Viales de centelleo

### **Procedimiento**

1. Se hidrató o resuspendió el Sephadex G-10 en agua grado HPLC por lo menos 2 horas antes de utilizarlo (idealmente el tiempo de hidratación debe ser de una noche, en su defecto 2 horas en agitación). La cantidad de agua que se utilizó fue de aproximadamente 100 mL por cada mg de partes de Sephadex G-10
2. Se puso la lana de vidrio en el fondo de la pipeta Pasteur, ayudado por una pinza metálica aproximadamente 1 o 2 centímetros de altura.
3. Se tomó la fase hidratada con una micropipeta y rellenó la pipeta Pasteur con el gel de tal manera que ocupe aproximadamente un centímetro de espacio entre el inicio de la lana y el borde de la pipeta.
4. Se observó que el goteo fuera seguido y constante en todas las columnas, de no ser así, habrían problemas con la lana de vidrio que estaría en exceso.
5. Una vez empacada la resina en la pipeta, se debió lavar con abundante agua HPLC para estabilizar el gel.

6. Se pesó aproximadamente 5 mg de péptido por pipeta, nunca más de 10 mg por pipeta.
7. Se disolvió 5 mg del péptido en 100 ml de agua HPLC.
8. Se dejó bajar el agua en la pipeta, de tal manera que esta alcance el nivel del gel, en ese momento se cargó la muestra.
9. Cuando la muestra alcance el nivel del gel adicionar agua HPLC. En este momento se comienza a recibir la muestra en el vial, esto se hizo de 500 en 500  $\mu$ L hasta completar el volumen de 6 mL por pipeta.
10. Al finalizar lavar el gel con 50 ml de agua HPLC , se lavó la pipeta con 10 mL de ácido acético al 0.01% y guardó la columna a 4 °C en azida de sodio al 0.01% [47]

### **Purificación de péptidos sintéticos por sepack C-18**

Se realizó la purificación de péptidos utilizando columnas C-18, con diferentes porcentajes de acetonitrilo

#### **Equipo**

Jeringas empacadas con sepack C-18, bomba de vacío

#### **Procedimiento**

1. Para iniciar el procedimiento se debió preparar las columnas sepack, a las cuales se les realizó 3 lavados con metanol y 3 lavados con acetonitrilo,
2. Los lavados debieron hacerse de un gradiente lineal de acetonitrilo 10% hasta llegar a una concentración de acetonitrilo al 100% empleando así el sistema de Manifold. Se reguló la velocidad de eluido a 1ml/min.
3. La purificación se inició adicionando el péptido en la columna a una concentración de un (1) mg/ml pasándolo 4 veces con agua destilada.
4. Se recogieron 2ml y se procedió realizar el mismo procedimiento con cada concentración de (ACN) al 10, 20, 30, 40, 60 y 100% (v/v) recogiendo 2 ml con cada concentración, y retirando inicialmente las sales hasta extraer los péptidos de interés.

5. Se recogieron 2 mL en viales sellados con parafilm y se guardaron a una temperatura de -20°C [48].

#### 4.6 CUANTIFICACIÓN DEL PÉPTIDO

**Determinación de la pureza de los péptidos sintetizados mediante la cromatografía líquida de alta resolución analítica:** La cromatografía en fase reversa (del inglés, *Reverse Phase -High Performance Liquid Chromatography*) equilibrada utilizando dos sistemas de solventes se realizó en un cromatógrafo Agilent serie 1100 empleando columnas Vydac C-18 (250mm X 10mm). Los solventes usados en la cromatografía se dispusieron bajo dos modalidades, (1) agua con 0.1%v/v de Ácido Trifluoroacético (TFA) y (2) Acetonitrilo con 0.1 %v/v de TFA. Los péptidos fueron diluidos en un gradiente isocrático A/B de 70:30 ACN-TFA y H<sub>2</sub>O. Luego, se inyectaron 10 µL de cada muestra, con un tiempo de corrida de 30 minutos a temperatura ambiente. La detección de la señal se logró con el uso de un detector UV-VIS con seguimiento a 220nm.

**Análisis de espectrometría de masas.** Los espectros de masas se registraron utilizando un espectrómetro de masas Bruker MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) (desorción/ionización láser asistida por matriz) y TOF por el detector de iones que se acopla al MALDI y cuyo nombre procede también de sus siglas en inglés *Time-Of-Flight*. Los ensayos se llevaron a cabo por este instrumento usa una radiación láser en N<sub>2</sub> a una longitud de onda de 337 nm con pulsos de 3 ns. La matriz usada en este trabajo fue ácido α- ciano-4-hidroxicinámico (ACC). La matriz ACC fue preparada como una solución saturada en 1 mL 30%TFE/70% de H<sub>2</sub>O en 0.1% de ATF. La muestra fue disuelta en ATF para obtener una concentración de 100 pmol/pL. Las muestras fueron preparadas para análisis MALDI-TOF diluyendo la solución en la matriz saturada a una concentración de 10 pmol/µL. A continuación, se puso una alícuota de 0.5 µL de

la mezcla muestra-matriz dentro del plato para el blanco, se dejó secar y se analizó el espectrograma correspondiente para cada péptido.

#### **4.7 SIMULACIÓN TEÓRICA DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS PÉPTIDOS**

Se realizó la simulación computacional de la estructura secundaria, Estas secuencias diseñadas fueron evaluadas en CPH Models 3.0 la cual es una herramienta bioinformática de simulación por homología de la estructura secundaria de péptidos y permite la visualización por Pymol Viewer 1.0.

#### **4.8 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO**

##### **4.8.1 Determinación de Concentración mínima inhibitoria (CMI)**

4.8.1.1 Método en caldo. El método de microdilución para la estimación de los valores de CMI fue realizado en placas multipocillo de ELISA de acuerdo con los protocolos publicados por otros autores [50,51].

Inicialmente, se preparó un preinóculo de *E. coli* O157:H7 en caldo Luria-Bertani (LB), durante 14h a 37°C y 200rpm hasta alcanzar una concentración bacteriana de  $4,6 \times 10^8$  UFC/mL. De igual manera, se preparó un pre-inóculo de *S.aureus* resistente a Meticilina (SARM) en caldo Muller-Hilton (MH), en las mismas condiciones hasta alcanzar una concentración bacteriana de  $7 \times 10^8$  UFC/mL.

Posteriormente, se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento empleando 100  $\mu$ L de este inóculo bacteriano durante 9h, en microplacas que previamente contenían péptido a diferentes concentraciones (entre 0.25 y 80  $\mu$ g/mL) a 37°C con una agitación de 200rpm. Las medidas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro lector de microplaca ELISA (Biorad, imarck) a 595 nm. La CMI fue definida como la menor concentración de péptido que produce una inhibición

en el crecimiento de la bacteria. Los valores de CMI<sub>99</sub>, CMI<sub>90</sub> y CMI<sub>50</sub> corresponden a las dosis de péptidos que inhiben el 99%, 90% y 50% del crecimiento bacteriano, respectivamente.[53,54]

4.8.2 Determinación de Concentración mínima bactericida (CMB). Posterior a la determinación de la CMI, se determinó la CMB. Para ello se trabajó con aquellos cultivos de *E.coli* y *S.aureus* que fueron inhibidos por péptido durante la determinación de CMI. Se tomaron muestras de estos cultivos y se inocularon en un caldo de cultivo compuesto por una Infusión de cerebro-corazón (BHI). Los cultivos fueron llevados a cabo en tubos Eppendorf a 37°C durante 24 horas.

A continuación, se tomó una alícuota de cada tubo y se llevó a cabo siembra en superficie de cajas de Petri que contenían BHI agar con el fin de corroborar el efecto bactericida en aquellas donde no hubo crecimiento de colonias bacterianas. El valor de CMB se determinó como aquella concentración donde el 100% del crecimiento bacteriano fue inhibido completamente en comparación con el control positivo (sin tratamiento con péptido).[55,56]

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. DISEÑO DEL PÉPTIDO

Las secuencias peptídicas pertenecientes a toxinas de escorpión extraídas de la “PDB” Protein Data Bank correspondieron a 137. A continuación, se llevó a cabo una depuración revisando las secuencias de toxina y escogiendo únicamente aquellas secuencias provenientes de toxinas de escorpión en el 100% de su composición, sin mezclas o modificaciones, resultando 128 secuencias definitivas. Las 128 secuencias se encuentran en el anexo D, las cuales se presentan en formato Fasta. A continuación, se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias usando la herramienta ClustalW disponible en internet como software libre de análisis de secuencias ([www.genome.jp/tools/clustalw/](http://www.genome.jp/tools/clustalw/)).

Los alineamientos de parejas son computados con un método todos contra todos y las similitudes son guardadas en una matriz. Esta es luego convertida en una matriz de distancias, donde la longitud de la distancia refleja la distancia evolutiva entre cada par de secuencias.

De esta matriz de distancias, es creado un árbol de guía o filogenético utilizando un algoritmo de clustering neighbour-joining para determinar el orden en que los pares de secuencias serán alineados y combinados con alineamientos previos. Las secuencias son alineadas progresivamente en cada punto de ramificación empezando por los pares de secuencias más cercanos.

Como resultado, el alineamiento nos proporcionó un árbol guía o árbol filogenético, mostrando las principales 5 ramificaciones o familias agrupadas de los péptidos de escorpión. (Ver figuras 8, 9 y 10). [40,41]

Figura 8. Árboles filogenéticos obtenidos para las secuencias de péptidos de escorpión

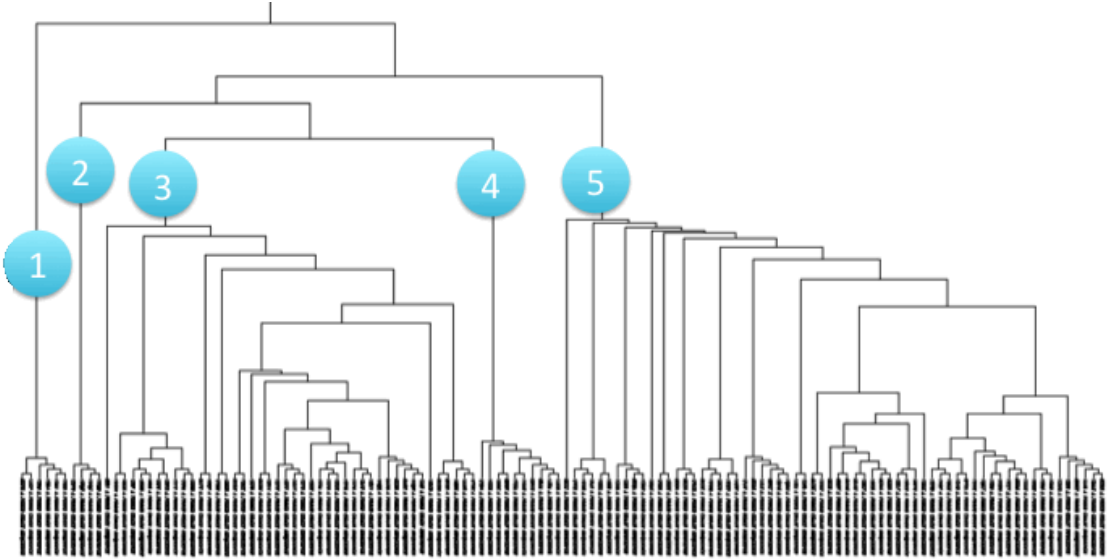
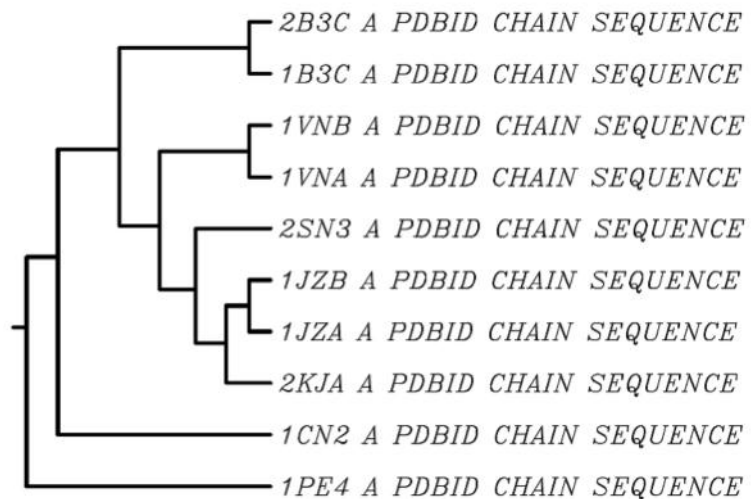


Figura 9. Árbol guía 1,2,4 obtenido a partir de las secuencias de escorpión.

Árbol guía 1 y 2



Árbol guía 4



Árbol guía 5

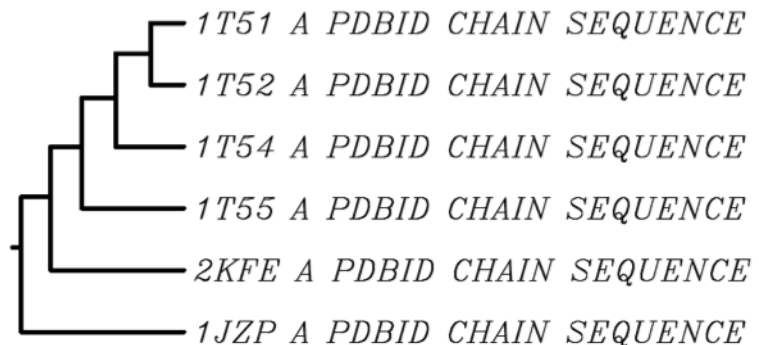
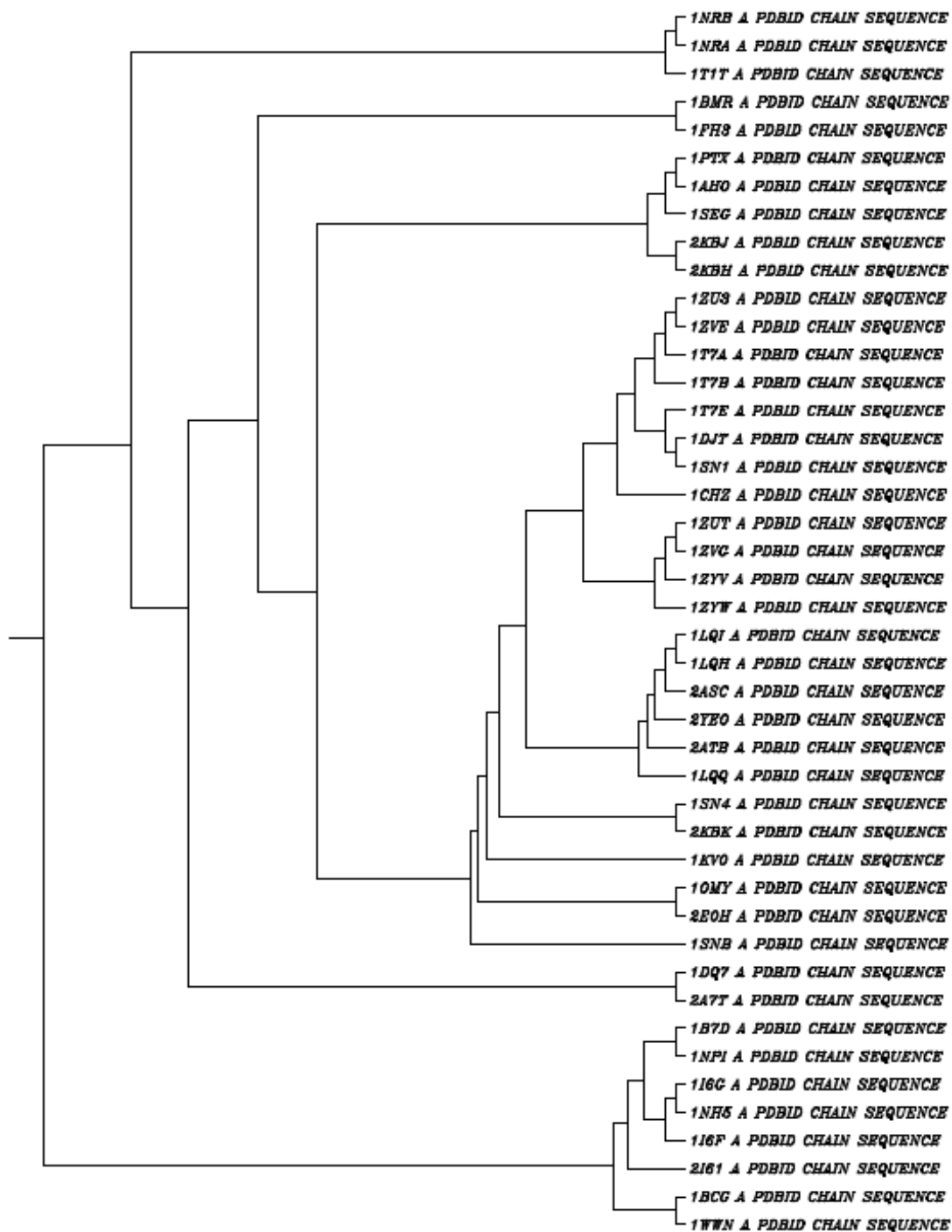


Figura 10. Árbol guía 3 4 obtenido a partir de las secuencias de escorpión.



Posteriormente, se realizó un alineamiento entre cada una de las 5 ramas o familias principales del árbol filogenético. Al realizar alineamiento a cada familia comparando los diferentes péptidos que presentaban alta homología, se obtuvo 5 determinantes principales de alineamiento en donde los aminoácidos que más se conservan dieron origen a las secuencias peptídicas a sintetizar (Ver figura 11).

Figura 11. Obtención de secuencias

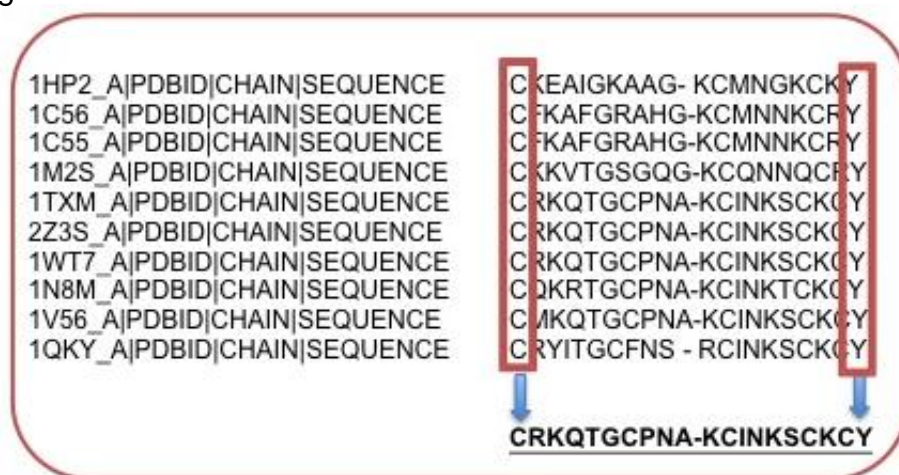


Tabla 5. Secuencia de aminoácidos conservados (dominio) de la familia 1 de péptidos de veneno de escorpión

<b>Familia 1 (A)</b>	<b>GVIINVKCKHS</b>	<b>11 Aminoácidos</b>
<b>Familia 1 (B)</b>	<b>SPQCLKPCKAMRGF</b>	<b>14 Aminoácidos</b>
<b>Familia 1 (C)</b>	<b>GKCMGKCKCT</b>	<b>10 Aminoácidos</b>

Tabla 6. Secuencia de aminoácidos conservados (dominio) de la familia 2 de péptidos de veneno de escorpión

<b>Familia 2 (A)</b>	<b>KEGYLVNKSTGCKYGCLKLGNE</b>	<b>23 Aminoácidos</b>
<b>Familia 2 (B)</b>	<b>GCNKECKAKNQGGSYGYCYAFACWCE</b>	<b>26 Aminoácidos</b>
<b>Familia 2 (C)</b>	<b>GLPESTPTYPLPNK</b>	<b>14 Aminoácidos</b>

Tabla 7. Secuencia de aminoácidos conservados (dominio) de la familia 3 de péptidos de veneno de escorpión

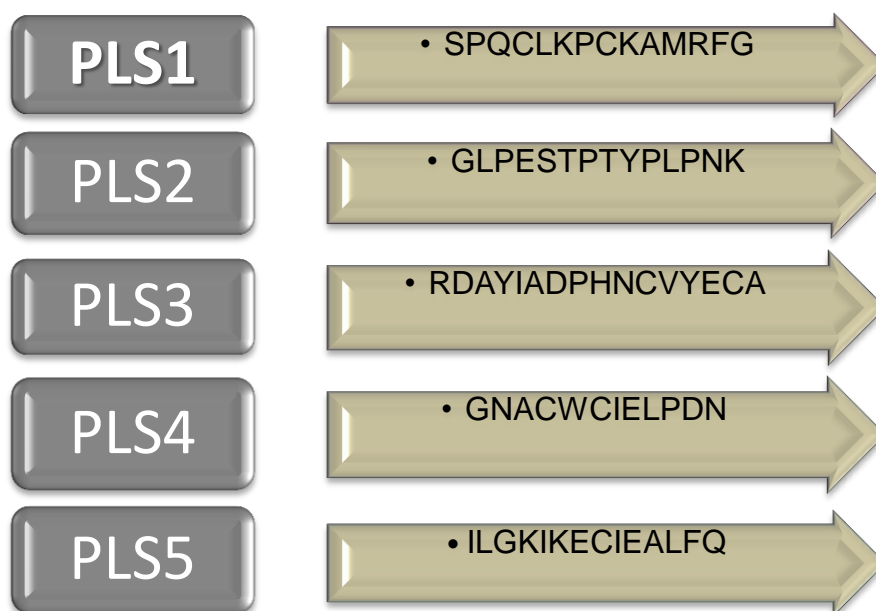
<b>Familia 3 (A)</b>	<b>RDAYIADPHNCVYECA</b>	<b>16 Aminoácidos</b>
<b>Familia 3 (B)</b>	RN	2 Aminoácidos
<b>Familia 3 (C)</b>	EYCNDLC	7 Aminoácidos
<b>Familia 3 (D)</b>	TKNGAKSGYCQWVGKY	16 Aminoácidos
<b>Familia 3 (E)</b>	GNACWCIELPDN	12 Aminoácidos
<b>Familia 3 (F)</b>	VPIRVPG	7 Aminoácidos

Tabla 8. Secuencia de aminoácidos conservados (dominio) de la familia 4 y 5 de péptidos de veneno de escorpión

<b>Familia 4 y 5 (A)</b>	<b>ILGKIKECIEALFQ</b>	<b>14 Aminoácidos</b>
--------------------------	-----------------------	-----------------------

Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a seleccionar las secuencias de aminoácidos más conservadas para cada posición de aminoácidos (dominio conservado) por grupo de familias, obteniendo así las secuencias definitivas a sintetizar las cuales numeradas del 1 al 5 y nombradas con una abreviatura de PLS (Peptide Ludwig Scorpion). Las secuencias fueron designadas como PLS1, PLS2, PLS3, PLS4 y PLS5.

Figura 12. Secuencias de péptidos seleccionados para síntesis química



## 5.2 ESTANDARIZACION DE LA SÍNTESIS PÉPTIDICA Y CLIVAJE

Se utilizaron tres procedimientos de síntesis química en fase sólida, con la finalidad de encontrar el método más eficiente, práctico y económicamente sostenible para la síntesis de péptidos. La síntesis de péptidos se realizó de manera manual mediante síntesis química en fase sólida, mediante la utilización de jeringas de polietileno con filtro de polipropileno o bolsas de polipropileno.

Todos los productos fueron purificados para posteriormente ser analizados por diferentes técnicas analíticas: cromatografía líquida de alta eficiencia y espectrometría de masas.

Los tres procedimientos de síntesis empleados permitieron seleccionar el método de síntesis más adecuado. Para ello, se tuvieron en cuenta las siguientes tópicos (incorporación del primer aminoácido, practicidad de los lavados, determinación de los acoples, desprotección del grupo Fmoc, incorporación de aminoácidos, eliminación de grupos protectores, clivaje.)

La incorporación del primer aminoácido C- terminal en la resina se realizó mediante la formación de un enlace amida que en algunas ocasiones en condiciones no controladas se pueden generar racemizaciones o formación de dipéptidos. Para minimizar este efecto, los péptidos contienen grupos protectores en su extremo  $\alpha$  – amino y cadena lateral. [44]

El seguimiento de los acoples permitió verificar el porcentaje de acoplamiento del primer aminoácido en la resina y los siguientes acoples de cada aminoácido, en donde se observó detalladamente las diferentes etapas de lavado del péptido y la eliminación del grupo protector e incorporación del siguiente aminoácido.

Durante la eliminación del grupo Fmoc, el grupo fue removido empleando piperidina como base para realizar la desprotección del aminoácido n- terminal,

siendo verificado por colorimetría por medio del azul de Bromofenol o por el test de Ninhidrina dependiendo de la metodología; los aminoácidos se fueron acoplando con TBTU, HBTU, HOat, DCC como grupos activadores del grupo carboxilo disueltos en DMF dependiendo del procedimiento.

La consideración importante es abrumadoramente para generar extremadamente alto rendimiento en cada paso. Por ejemplo, si cada etapa de acoplamiento fuera a tener un rendimiento del 99%, un péptido de 26 aminoácidos se sintetiza en 77% de rendimiento final; si cada paso era 95%, que se sintetizó con un rendimiento del 25%. Por lo tanto se añade cada aminoácido en gran exceso y el acoplamiento de los aminoácidos juntos es altamente optimizado por una serie de agentes bien caracterizados.

Los péptidos en síntesis tienen una situación de cuidado cuando aumenta su longitud (mas de 25), lo cual aumenta el riesgo de agregación de cadenas, obstaculizando el fácil acople de los aminoácidos, necesitando algo más de tiempo de reacción en algunos acoples. Los aminoácidos mas problemáticos son Lisina, Arginina y Histidina. [46]

Eliminación de grupos protectores y clivaje; terminada la síntesis el péptido finalizado debe ser retirado de la resina y realizar una desprotección simultánea de las cadenas laterales de aminoácidos, la desprotección del grupo Fmoc se realizó utilizando Piperidina con DMF, después de estos lavados se procedió a realizar el clivaje y desprotección en una sola etapa en medio ácido utilizando el coctel adecuado para cada péptido esperando un par de horas que el soporte sea separado del péptido se filtró para obtener el péptido en solución, se añadió éter frío para producir la precipitación del péptido, centrifugar y almacenar el péptido obtenido a -20 °C.[47,48]. Este procedimiento permitió la obtención de los péptidos deseados para luego ser purificados.

### 5.3 PURIFICACION DEL PÉPTIDO

Una vez finalizada la desalinización y purificación de los péptidos con sephadex G-10 y sepack C1-8 se realizó una purificación por cromatografía líquida de alta eficiencia hasta obtener el grado de pureza deseado para poder realizar los ensayos de actividad antibacteriana, previo a la purificación se establecieron las condiciones de elución para cada péptido. En esta purificación se empleó un equipo Agilent de inyección automática, como fase estacionaria una columna C-18 y un gradiente isocrático de 70% ACN 30% agua 0.1% TFA con un tiempo de corrida de 15 minutos.

El producto final se obtuvo con un grado de pureza del 96-98%, con diferentes tiempos de retención indicando que los péptidos interactuaban de forma diferentes con la fase estacionaria de la columna los cromatogramas se encuentran en el anexo E. [49]

Tabla 9. **Propiedades fisicoquímicas**

Péptido Sintético	PM (Da)	Numero de AA	Carga neta pH 7	Punto isoeléctrico	GRAVY	Tiempo de retención (min)
PLS 1	1565,93	14	3	9.9	-0.35	6.321
PLS 2	1513,71	14	0	6.8	-0.97	7.103
PLS 3	1840,20	16	-2	4.3	-0.42	5.276
PLS 4	1334,48	12	2	3.0	-0.15	3.109
PLS 5	1588,17	14	0	6.4	0.67	2.722

**GRAVY: Hidrofobicidad calculada de la suma de los valores de la hidrofobicidad**

## 5.4 CUANTIFICACIÓN DEL PÉPTIDO

El análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF permitió confirmar para todos los péptidos antimicrobianos sintetizados: PLS1, PLS2, PLS3, PLS4, PLS5, la masa molecular a partir de sus espectros de masas (Ver Figura 13).

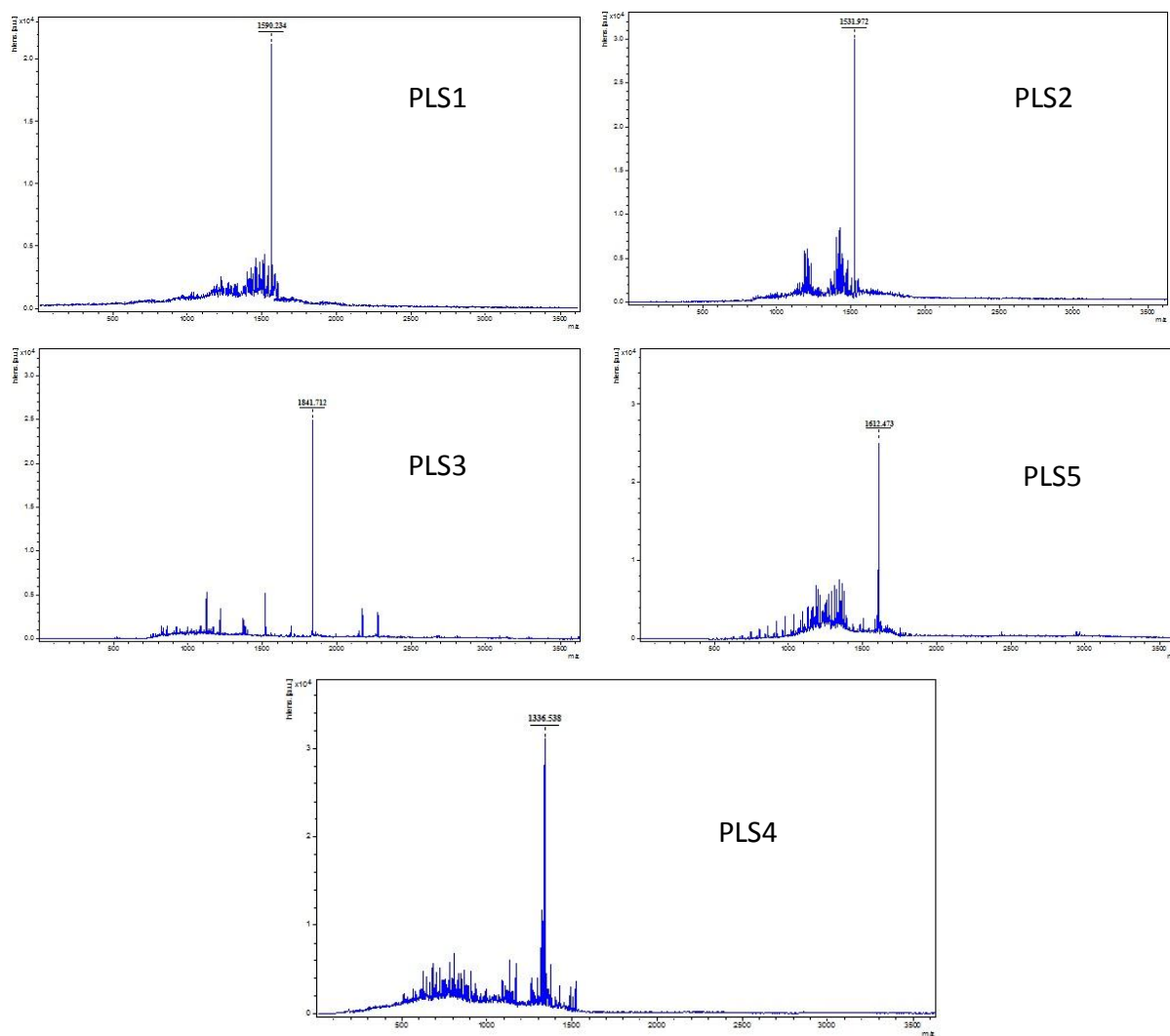
Los resultados obtenidos por el análisis por MALDI-TOF son representados en la Tabla 9, los datos experimentales de m/z (unidades de masa) para cada péptido fueron acordes con sus respectivas masas moleculares obtenidas teóricamente.

En los espectros de masas se presentan señales después del ion molecular, las cuales son debido a la presencia de átomos hidrógeno o iones magnesio, sodio o potasio ( $H^+$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ), los cuales forman aductos catiónicos salinos con los péptidos por interacción electrostática y son comunes y parte de la técnica analítica usada.

Tabla 10. **Masa experimental y calculada de los péptidos sintetizados**

<b>Péptido Sintético</b>	<b>PM (Da) Teórica</b>	<b>Relación m/z Experimental</b>
PLS 1	1565,93	1590,23
PLS 2	1513,71	1531,97
PLS 3	1840,20	1841,71
PLS 4	1334,48	1336,53
PLS 5	1588,17	1612,47

Figura 13. Espectros de masas de los diferentes péptidos sintetizados

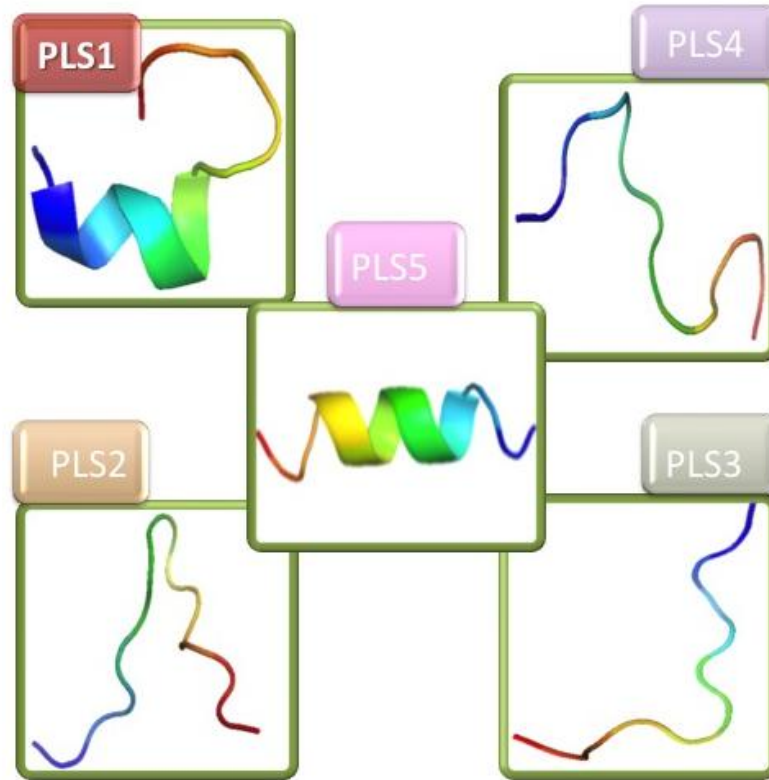


## 5.5 SIMULACIÓN TEÓRICA DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS PÉPTIDOS

Se realizó la simulación computacional de la estructura secundaria usando el modelo molecular de CPH Models 3.0 una herramienta de simulación por homología de estructura secundaria de péptidos y fueron visualizados en PYMOL Viewer. Los péptidos visualizados fueron PLS1, PLS2, PLS3, PLS4, PLS5, obteniéndose 4 estructuras secundarias irregulares y una estructura secundaria  $\alpha$ -

hélice en el péptido PLS5. Algunos aminoácidos debieron ser enlazados en SPDBV 4.04 con minimización de energía. El análisis teórico de la predicción de la estructura secundaria se observa en la figura 14.

Figura 14. Estructura secundaria de los péptidos sintéticos



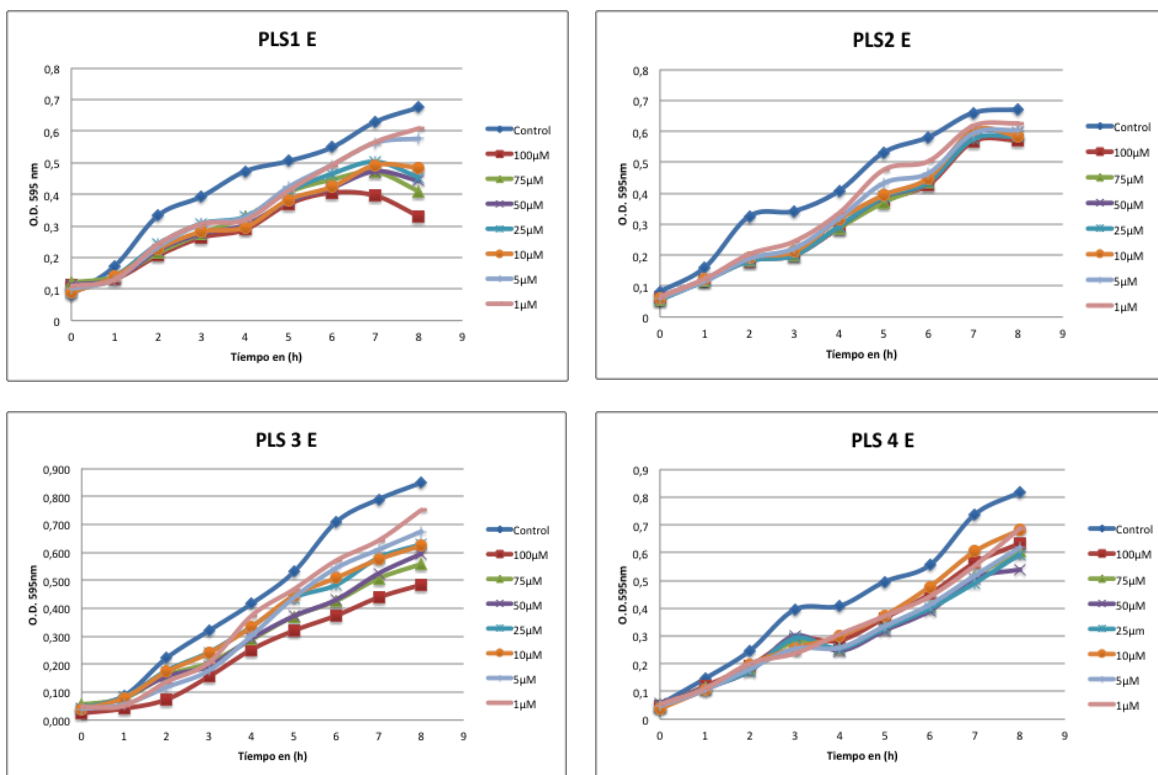
## 5.6 DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO

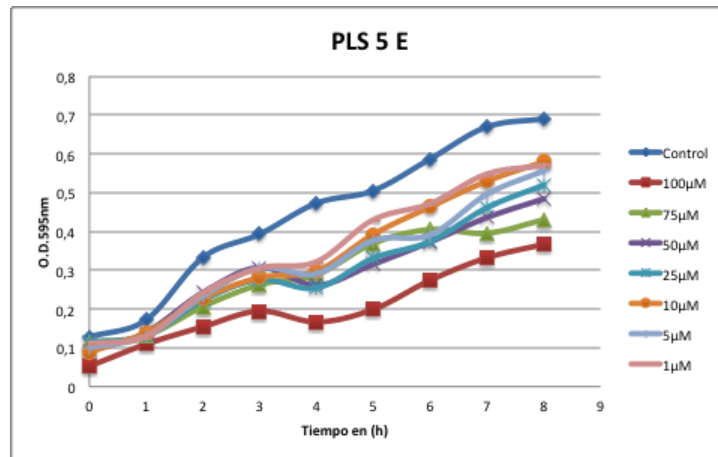
Se llevó a cabo la determinación del efecto antibacteriano de los péptidos sintetizados frente a *E. coli* O157:H7 y *S. aureus* resistente a Meticilina (SARM) como modelos de bacterias Gram-negativa y Gram-positiva, respectivamente. La determinación del efecto antibacteriano se llevó a cabo empleando la metodología de microdilución en caldo y usando un lector de micro placas ELISA para la determinación del crecimiento celular.

La evaluación de las propiedades antimicrobianas de los péptidos PLS1, PLS2, PLS3, PLS4, y PLS5 se realizaron por triplicado. El error no fue mayor del 1%. Se determinó el crecimiento celular midiendo la densidad óptica del cultivo cada hora a 595nm durante 8 horas de incubación.

**Determinación de CMI y CMB contra *Escherichia coli* O157:H7.** Se evaluó la cinética de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de diferentes concentraciones de péptido. La figura 15 muestra las cinéticas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de diferentes concentraciones de péptido. En ella se observa el mayor efecto inhibitorio de los péptidos sobre el crecimiento microbiano a mayores concentraciones del péptido..

Figura 15. Efecto antimicrobiano de los péptidos sintéticos sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7





En la figura 15 se observa que para *E. coli* O157:H7 el tiempo necesario para cursar la fase de latencia es solo una hora, y en presencia de los péptidos no se evidencia aún un efecto inhibitorio significativo.

Tabla 11. Actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos sobre *E. coli* O157:H7

Péptido	CMI <sub>50</sub> (μM)	CMI <sub>90</sub> (μM)	CMI <sub>99</sub> (μM)	CMB (μM)
PLS 1	>50	>100	>100	>100
PLS 2	>100	>100	>100	>100
PLS 3	>80	>100	>100	>100
PLS 4	>100	>100	>100	>100
PLS 5	>50	>100	>100	>100

**Determinación de CMI y CMB contra *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM).** Se realizó la cinética de crecimiento de *S. aureus* resistente a Meticilina (SARM) en presencia de los péptidos sintetizados a diferentes concentraciones siguiendo la metodología descrita. La figura 16 muestra que el efecto inhibitorios e incrementa a medida que se adiciona una concentración mayor péptido. En las cinéticas de crecimiento de *E. coli* O157:H7 en presencia de péptido se obtuvo un resultado similar.

Figura 16. Efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de SARM

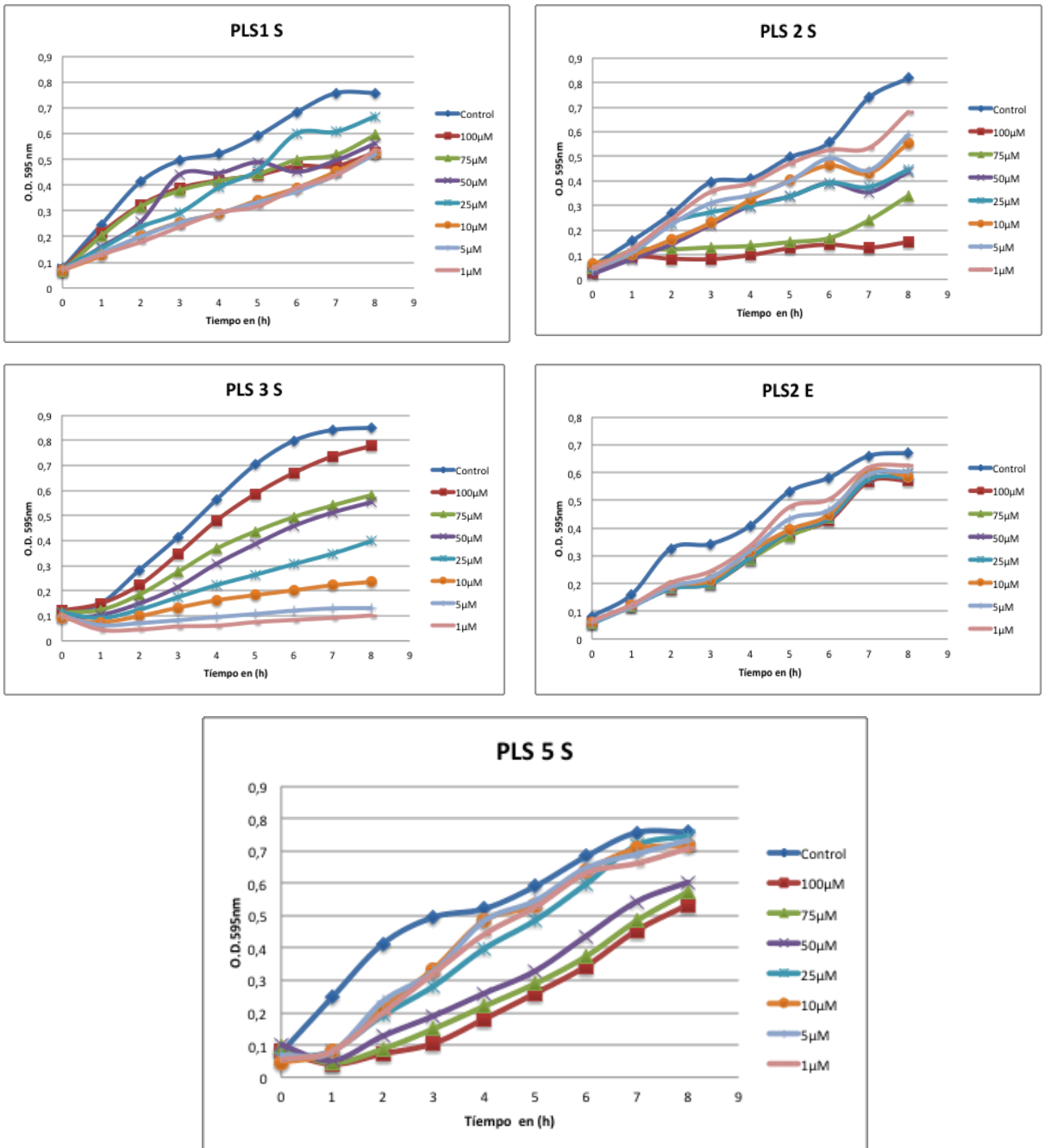


Tabla 12. Actividad antimicrobiana de los péptidos sintéticos sobre SARM

Péptido	CMI <sub>50</sub> (μM)	CMI <sub>90</sub> (μM)	CMI <sub>99</sub> (μM)	CMB (μM)
PLS 1	50	>100	>100	>100
PLS 2	25	60	>100	>100
PLS 3	25	50	100	100
PLS 4	>100	>100	>100	>100
PLS 5	>100	>100	>100	>100

En las tablas 10 y 11 se resumen los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano por el método de microdilución en caldo. Al igual que para *E. coli* O157:H7, el efecto inhibitorio y actividad antibacteriana de los péptidos contra *S. aureus* resistente a Meticilina presentó un orden descendente de actividad.

Sin embargo, al comparar los resultados de actividad antibacteriana, se observó que los valores de concentración mínima inhibitoria y bactericida fueron menores para la cepa Gram-positiva (*S. aureus*) que para la cepa Gram-negativa (*E. coli*) para la mayoría de los péptidos evaluados. Se sabe que la diferencia entre la pared externa de las bacterias Gram-positivas y negativas de las bacterias está dada por el grado de permeabilidad, con un límite de exclusión de sustancias con un peso molecular de más de aproximadamente 600 Da para las células Gram-negativas. [55]

Adicionalmente, las bacterias Gram-positivas tienen una pared celular constituida por un heteropolímero, el peptidoglicano mureína, que está muy desarrollado y puede presentar hasta 40 capas y contiene ácidos teitoicos. Los ácidos teitoicos son cadenas de moléculas de glicerina o ribitol esterificadas entre sí por puentes fosfato, que poseen una fuerte carga negativa y se unen probablemente a la mureína a través del fosfato formando una amida. Por el contrario, la pared celular de las bacterias Gram-negativas contiene grandes cantidades de lipoproteínas y lipopolisacáridos que representan hasta el 80 % del peso seco de la pared celular, y presentan una interna red de peptidoglicano de mureína de una sola capa. La

función del lipopolisacárido en las bacterias es la de incapacitar las defensas del huésped, proporcionar carga negativa a la superficie de la membrana y estabilizarla. Así pues, en ambos casos, las bacterias se hacen susceptibles a interacciones electrostáticas cuando están en presencia de agentes antibacterianos de carga positiva. [56]

La pared externa de bacterias Gram-negativas actúa como una barrera de permeabilidad debido a la presencia de una capa de lipopolisacáridos que es capaz de excluir a las macromoléculas y las sustancias hidrófilas, por lo tanto puede ser responsable de la resistencia intrínseca de bacterias Gram-negativas. Por lo tanto, *S. aureus* resistente a meticilina es más susceptible a los efectos bactericidas de los péptidos sintetizados.

## 6. CONCLUSIONES

- Se diseñaron 5 péptidos derivados de péptidos naturales presentes en venenos de escorpión utilizando técnicas bioinformáticas de análisis de homología de secuencias.
- Se lograron sintetizar en fase sólida las secuencias peptídicas PLS1, PLS2, PLS3, PLS4, PLS5.
- De los 3 procedimientos de síntesis, el procedimiento 3, la metodología de la síntesis múltiple en fase sólida en bolsitas de te.
- fue el más confiable de los 3 por su pureza y rendimiento.
- El estudio conformacional de la estructura secundaria de los péptidos demostró que en un ambiente simulado no son capaces de formar  $\alpha$ -hélices antipáticas.
- Los péptidos sintéticos tuvieron mayor efecto antimicrobiano contra SARM que contra *E. coli* O157:H7.
- Los péptidos sintéticos diseñados a partir de péptidos naturales encontrados en venenos de escorpión no presentaron en general un efecto anti microbiano importante, ya que los valores de CIM no fueron inferiores a 25 micromolar y los valores CMB fueron superiores a 100 micromolar.
- El péptido que presentó un mayor efecto anti microbiano fue el péptido PLS5 frente a SARM.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64(1):i3–i10.
- [ 2] Fischbach MA, Walsh CT Antibiotics for emerging pathogens. *Science.* 325 2009;5944:1089-1093
- [3] Griffin P.M, Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. In Eds. *Infections of the Gastrointestinal Tract.* New York: Raven Press Ltd. 1995; 739-761
- [ 4] Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1998;352:1207–1212
- [ 5] Tilden Jr J, Young W, McNamara AM, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair MA, et al. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* 1996;86:1142–1145
- [6] Mattar S, Vásquez E. *Escherichia coli* O157:H7. Infection in Colombia. *Emerging Inf. Dis.* 1998; 4: 126-127.
- [7] DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2010;375:1557–68.
- [ 8] De Kraker ME, Wolkewitz M, Davey PG, Koller W, Berger J, Nagler J, et al. Clinical impact of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay related to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1598–1605.

- [ 9] Jones, D. T. Structural biology. Learning to speak the language of proteins. *Science* 2003; 30: 1347-1348.
- [ 10] Toke O. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers Pept Sci* 2005;80(6):717–35.
- [ 11] Sperstad S, Haug T, Blencke H, Styrvold O, Li C, Stensvåg K. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptides discovery. *Biotechnology Advances* 2011; 29: 519-530.
- [12] Shepherd CM, Vogel HJ, Tieleman DP. Interactions of the designed antimicrobial peptide MB21 and truncated dermaseptin S3 with lipid bilayers: molecular-dynamics simulations. *Biochem. J* 2003;370:233–43.
- [ 13] Aliste MP, MacCallum JL, Tieleman DP. Molecular dynamics simulations of pentapeptides at interfaces: salt bridge and cation–pi interactions. *Biochemistry* 2003; 42:8976–87.
- [ 14] Tossi A, Tarantino C, Romeo D. Design of synthetic Antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. *Eur J Biochem* 1997;250(2):549–58.
- [ 15] Hocquellet, A., Odaert, B., Cabanne, C., Noubhani, A., Dieryck, W., Joucla, G., et al. Structure–activity relationship of human liver-expressed antimicrobial peptide 2. *Peptides*. 2010; 31: 58-66.
- [16] Arboleda, E.; Meneses, O Y Aguilar, P. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. III: El veneno del escorpión de Lambayeque. *Rev. Per.* 1973; Ent. 16 (1): 78 - 82.

- [17] Simard J, Watt D. Venoms and toxins. En: Polis GA, ed. The biology of scorpions. Stanford: Stanford University Press; 1990. p. 414-44.
- [18] Calderon, S Y Aguilar, P. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. X: Efecto del veneno de *Brachistosternus ehrenbergi* sobre ratones albinos. Rev. Per. 1981; Ent. 30: 91-93.
- [19] Darbon, H.; Zlotkin, E.; Kopeyan, C.; Van Rietschoten, J. And Rochat, H. 1982. Covalent structure of the insect toxin of the North African scorpion. *Androctonus australis* Hector. Int. J. Peptide Protein Res. 20: 320.
- [ 20] Guan, R.-J.; Liu, X.-Q.; Liu, B.; Wang, M. And Wang, D.-C. Crystalization and preliminary X-ray analyses of insect neurotoxins with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensii* Karsh. Acta Cryst. 2000;D56; 1012-1014.
- [ 21] Babin, D. R.; Watt, D. D.; Goos, S.M. And Mlenjek, R.V. Amino acid sequence of neurotoxic protein variants from the venom of *Centruroides sculpturatus* Ewing. Arch. Biochem. Biophys. 1974;164: 694-706
- [ 22] Bucherl, W. Escorpionismo no Brasil, Memorias Instituto Butantan. 1969;34: 9-24.
- [ 23] Cáceres, I.; Aguilar, P Y Meneses, O. Escorpiones y escorpionismo en el Perú. II: Efectos del veneno de escorpión de los pedregales en la costa central. Rev. Per. 1972; Ent. 15 (1): 38-43.
- [ 24] Acosta, L. Y Ochoa, J. Nueva especie de *Orobothriurus* Maury del Perú (Scorpiones: Bothriuridae). Revue Arachnologique, 2000.;13 (10): 135 -144.

[ 25] Lamberty M, Caille A, Landon C, Tassin-Moindrot S, Hetru C, Bulet P, Vovelle F. Solution structures of the antifungal heliomicin and a selected variant with both antibacterial and antifungal activities. *Biochem* 2001; 40(40):11995–12003.

[ 26] Brogden NK, Brogden KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals?. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38(3):217-25.

[ 27] Arenas G, Guzmán F, Cárdenas C, Mercado L, Marshall SH. A novel antifungal peptide designed from the primary structure of a natural antimicrobial peptide purified from *Argopecten purpuratus* hemocytes. *Peptide* 2009;30(8):1405-11.

[ 28] Mor A. Peptide based antibiotics: a potential answer to raging antimicrobial resistance. *Drug Dev Res* 2000;50(3-4):440–7.

[ 29] Brogden NK, Brogden KA. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals?. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(3):217-25.

[ 30] Bisht GS, Rawat DS, Kumar A, Kumar R, Pasha S. Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2007;17(15), 4343-46.

[ 31] Maróti G, Kereszt A, Kondorosi E, Mergaert P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Res Microbiol* 2011;162(4):363-74.

- [ 32] Van Der Kraan MIA, Groenink J, Nazmi K, Veerman ECI, Bolscher JGM, Nieuw Amerongen AV. Lactoferrampin: A novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides* 2004;25(2):177-83.
- [ 33] Haney E., Nazmin, K., Lau, F., Bolscher, J. and Vogel, H. Novel lactoferrampin antimicrobial peptides derived from human lactoferrin. *Biochimie* 2009; 91: 141-154.
- [ 34] Van der Kraan, M., Groenink, J., Nazmin, K., Veerman, E., Bolscher, J., Amerong, J.A., Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1- domain of bovine lactoferrin. *Peptides*. 2004; 25: 177-183.
- [ 35] Drago Serrano C. María. Actividades antimicrobianas de la Lactoferrina (Antibacterial activities of lactoferrin). Departamento de Sistemas Biológicos, UAMN-Xiuchimilco. *Enfermedades infecciosas y Microbiología*. 2012;26 (2), 58-63
- [36 ] Baltzer SA, Brown MH. Antimicrobial peptides-promising alternatives to conventional antibiotics. *J Mol Microb Biotech* 2011;20(4):228-35.
- [ 37] Escobar, E.; Rivera, C.; Tincopa, L. Y Rivera. D. Purificación parcial de las toxinas HI1, HI2 y HI3 del veneno del escorpión *Hadruroides lunatus* koch, 1867 (Scorpiones : Vejovidae). *Rev. Peru. Biol.* 2002; 9 (1): 3 -10.
- [38] Escobar, E Y Ochoa, J. Confirmación de la presencia de *Centruroides margaritatus* en el Perú. Gervais 1841 (Scorpiones: buthidae). Libro de resúmenes de la XII Reunión Científica ICBAR. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima -Peru. 2003; 52-56
- [ 39] De Lucca AJ, Walsh TJ. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999;43(1): 1–11.

[ 40] Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. ClustalW and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 2007; 23:2947–8.

[41] Cubellis M, Cailliez F, Lovell S. Secondary structure assignment that accurately reflects physical and evolutionary characteristics. *BMC Bioinformatics* 2005; 6: 1-9.

[ 42] Brogden N, Brogden K. Will new generations of modified antimicrobial peptides improve their potential as pharmaceuticals?. *Int J Antimicro Ag* 2011; 38: 217-25.

[ 43] Van Der Kraan Mi, Van Marle J, Nazmi K, Groenink J, Van 'T Hof W, Veerman EC, et al. Ultrastructural effects of antimicrobial peptides from bovine lactoferrin on the membranes of *Candida albicans* and *Escherichia coli*. *Peptides* 2005; 26(9):1537-42.

[44] Solid phase Synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acid, *International Journal of peptide Protein research*, 1989; 33; 1-55.

[ 45] SARIN V.K., TAM J.P., MERRIFIELD R.B., “Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction”, *Anal. Biochem.* 1981; 117, 147-157.

[ 46] Houben-Weyl. *Methods of Organic Chemistry, Synthesis of peptides and peptidomimetics*, 2002; Vol E 22, 822-823.

[ 47] Bio rad Laboratories Applied Biosystems, *Introduction to Cleavage Techniques*, 1995 2<sup>nd</sup> Ed, USA: 13-29.

- [ 48] Tossi A, Tarantino C, Romeo D. Design of synthetic Antimicrobial peptides based on sequence analogy and amphipathicity. *Eur J Biochem* 1997;250(2):549–58.
- [ 49] Chan WC, White PD. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis*. Oxford University Press, Oxford, UK 2000: 303–327.
- [ 50] Martinez, Fidel. Olive, Peggy. Banuelos, Adriana. Orrantia, Erasmo. Niño, Nereyda. Morales, Elpidio. Ruiz, Facundo. Bach, Horacio. Av-Gay, Yossef. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine: NBM*. 2010; 6(5), 681-8.
- [ 51] Panacek, Ales. Kvitek, Libor. Pucek, Robert. Kolar, Milan. Vecerova, Renata. Pizurova, Nadezda. Sharma, Virender. Nevecna, Tatjana. Zboril, Radek. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *J Phys Chem B*. 2006; 110: 16248-53.
- [ 52] Wayne. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardia, and other aerobic actinomycetes. CLSI; 2003.
- [ 53] Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standards M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards: 2002.
- [ 54] Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL . International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3884-9.

[ 55] Wayne, P. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standards M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards: 2002.

[ 56] Espinel-Ingroff A, Barchiesi F, Cuenca-Estrella M, Pfaller MA, Rinaldi M, Rodriguez-Tudela JL . International and multicenter comparison of EUCAST and CLSI M27-A2 broth microdilution methods for testing susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3884-3889.

[55] Cruz J, síntesis de nanopartículas de Plata funcionalizadas con péptidos análogos de lactoferrina con potencial antibiótico contra *Escherichia coli* O157:H7. 2012; 25-92.

[56] Paredes D, ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA SOBRE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*; 2011; 56-74

[57] Avendaño G, Garnica C, Síntesis en fase sólida y caracterización por espectrometría de masas MALDI-TOF de un péptido con patrón de cisteínas similar a las conotoxinas presentes en el veneno de *Conus Purpurascens*. 2013; 34-52

[ 58] Andreu D, Albericio F, Solé NA, Munson MC, Ferrer M, Barany G. Peptide Synthesis Protocols. *Methods in Molecular Biology* 1994;35.

[ 59] Krchnák V, Wágner J, Šafář P, Lebl M. Noninvasive continuous monitoring of solid-phase peptide synthesis by acid–base indicator. *Collect Czech Chem Commun* 1988; 53:2542–8.

[ 60] Mant CT, Kondejewski LH, Cachia PJ, Monera OD, Hodges RS. Analysis of synthetic peptides by high-performance liquid chromatography. *Methods in Enzymology* 1997; 289:426-469.

[61] Standing KG. Peptide and protein de novo sequencing by mass spectrometry. *Current Opinion in Structural Biology* 2003; 13:595–601.

[ 62] Sperstad S, Haug T, Blencke H, Styrvold O, Li C, Stensvåg K. Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptides discovery. *Biotechnology Advances* 2011; 29: 519-530.

[ 63] Hancock EW, Gill Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology* 200;8:402-410.

[ 64] Chan D, Prenner E, Vogel H. Tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptides: Structures and mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes* 2006; 1758:1184-1202.

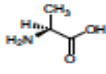
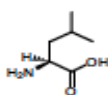
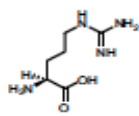
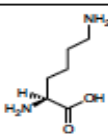
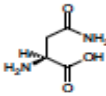
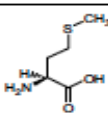
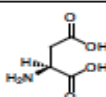
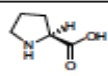
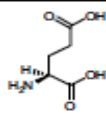
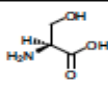
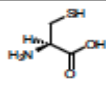
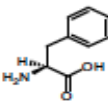
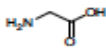
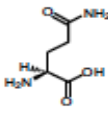
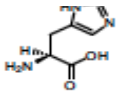
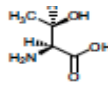
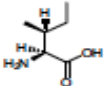
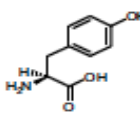
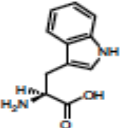
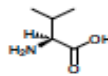
[ 65] Lesmes LP, Bohorquez MY, Carreño LF, Patarroyo ME, Lozano JM. A C-terminal cationic fragment derived from an arginine-rich peptide exhibits in vitro antibacterial and anti-plasmodial activities governed by its secondary structure properties. *Peptides* 2009;8:1-11.

[66] Purcell K, Fergie J. Epidemic of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a 14-year study at Driscoll Children's Hospital. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2005; 159: 980-5


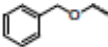
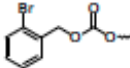



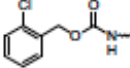
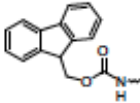
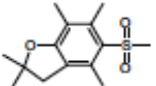
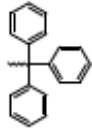
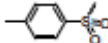
[67] Slutsker L, Ries AA, Greene KD, Wells JG, Hutwagner L, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: Clinical and epidemiologic features. *Ann Intern Med.* 1997;126:505–13.

## ANEXOS


### Anexo A. Aminoácidos (AA)

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

## Anexo B. Grupos protectores

Estructura	Nombre	Abreviatura
	Bencilo	Bn
	$\pi$ -benciloximetilo	Bom
	2-bromobenciloxicarbonilo	BrZ
	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo	Boc
	<i>tert</i> -Butil	tBu
	Ciclohexil	cHex
	2-clorobenciloxicarbonilo	ClZ
	9-fluorenilmetoxicarbonilo	Fmoc
	2,2,5,7,8-Pentametildihidrobenzofurano-5-sulfonilo	Pbf
	Tritilo	Trt
	Tosilo	Tos

## Anexo C. Formato de síntesis

<b>ACOPLE NUMBER 1</b>					
Ala : reactor 1					
Asn : reactor 2					
Gln : reactor 3					
Lavado con DMF (1x10') <input type="checkbox"/> Lavado con DCM (1x1') <input type="checkbox"/> (1x5') <input type="checkbox"/>					
<b>DESPROTECCIÓN DE LA RESINA</b>					
Fecha		Hecho por		Revisado por	
Piperidina 5% + DMF 95% (3x20')		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Lavado con DMF (5x1')		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Lavado con IPA (1x1')		<input type="checkbox"/>			
Lavado con azul de Bromofenol / DMF (1x2')		<input type="checkbox"/>			
Lavado con DMF (2x1')		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
<b>HORA DE ACOPLE Y DESCRIPCIÓN DE LA ESTRATEGIA</b>					
Ciclo.	Descripción de la estrategia	Fecha	Hora	Hecho por	Revisado por
	Sencillo A.A + TBTU+ DIPEA + DMF				
	Doble AA DCC+HOAT				
	Triple				
	Cuarto				
<b>DESPUÉS DE CADA CICLO Y ANTES DEL TEST DE KAISER</b>					
Lavado con DMF (2x1')		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Lavado con IPA (1x1')		<input type="checkbox"/>			
Lavado con DCM (3x1')		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>			
Prueba de nihidrina:		azul <input type="checkbox"/>	incolora/amarilla <input type="checkbox"/>		
<b>RESULTADOS ENSAYO DE KAISER</b>					
Reactor N°	NN desprot	Sencillo	Doble	Triple	Cuarto
<b>CAPPING</b>					
(Anhido acético 15% + DMF seco 40% + DCM seco 40% + DIPEA 5%) x 30'					
Lavado primer residuo			Hecho por	Revisado por	
Lavado con DMF (3x1')			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
Lavado con DCM (3x1')			<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		
<b>TABLA DE CALCULO</b>					
N° de Exc.	mg AA	mg DCC	mg HOAT	mg TBTU	ml DIPEA
PRUEBA CLORANILO (comprueba un acople después de la prolina)				positiva <input type="checkbox"/>	/ negativa <input type="checkbox"/>

## Anexo D. Secuencias de toxinas de venenos

>2CRD:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
EFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS

>2SN3:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KEGYLVKKS DGCKY GCLKLG ENEGCDTECKAKNQGGSYGYCYAFACWCEGLPE  
STPTYPLPNKSC

>1VNB:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KEGYLVKKS DGCKYDCFWLGKNEHCNTECKAKNQGGSYGYCYAFACWCEGLP  
ESTPTYPLPNKSC

>1VNA:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KEGYLVKKS DGCKYDCFWLGKNEHCNTECKAKNQGGSYGYCYAFACWCEGLP  
ESTPTYPLPNKSC

>1PNH:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
TVCNLRRCQLSCRSLGLLGKICIGVKCECVKH

>1SIS:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
MCMPCFTTDPNMAKKCRDCCGGNGKCFGQPQCLCNRX

>1PTX:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VKDGYIVDDVNCTYFCGRNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPD  
HVRTKGPGRCH

>1CHL:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR

>1NRB:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KKDGYPVDSGNCKYECLKDDYCNDLCLERKADKGYCYWGKVSCYCYGLPDNSP  
TKTSGKCNPA

>1NRA:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KKDGYPVDSGNCKYECLKDDYCNDLCLERKADKGYCYWGKVSCYCYGLPDNSP  
TKTSGKCNPA

>1SXM:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNNX

>1CMR:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
CTTSKECWSVCQRLHNTSKGWCDHRGCICES

>1BAH:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
EFTNVSCTTSEAWSVCQRLHNTSRGKCMNKKARCYS

>1SCO:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFKCMNGKCHCTPK

>1LQI:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
MVRDAYIAKNYNCVYECFRDAYCNELCTKNGASSGYCQWAGKYGNACWCYALP  
DNVPIRVPGKCR

>1LQH:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
MVRDAYIAKNYNCVYECFRDAYCNELCTKNGASSGYCQWAGKYGNACWCYALP  
DNVPIRVPGKCR

>1ACW:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VSCEDCPEHCSTQKAQAKCDNDKCVCEPI

>1SNB:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GRDAYIADSENCTYFCGSNPYCNDVCTENGAKSGYCQWAGRYGNACYCIDLPA  
SERIKEGGRCG

>1TXM:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGCX

>1TSK:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VVIGQRCYRSPDCYSACKKLVGKATGKCTNGRCDC

>1AHO:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VKDGYIVDDVNCTYFCGRNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPD  
HVRTKGPGRCH

>2PTA:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
TISCTNPKQCYPHCKKETGYPNACMNRKCKCFGR

>1LQQ:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VRDAYIAKNYNCVYECFRDSYCNLDCTKNGASSGYCQWAGKYGNACWCYALPD  
NVPIRVPGKCH

>1LIR:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

EFTQESCTASNQCWSICKRLHNTNRGKCMNKKCRCYS  
>1BCG:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
MKKNGYPLDRNGKTTECSGVNAIAPHYCNSECTKVYYAESGYCCWGACYCFGL  
EDDKPIGPMKDITKKYCDVQIIPS  
>2B3C:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KDGYLVEKTGCKKTCYKLGENDFCNRECKWKHIGGSYGYCYGFGCYCEGLPDS  
TQTWPLPNKTC  
>1B3C:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KDGYLVEKTGCKKTCYKLGENDFCNRECKWKHIGGSYGYCYGFGCYCEGLPDS  
TQTWPLPNKTC  
>2BMT:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
EFTNVSCSASSQCWPVCKKLFGTYRGKCMNSKRCYS  
>1CN2:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KEGYLVDKNTGCKYECLKLGDNDYCLRECKQQYGKGAGGYCYAFACWCTHLYE  
QAIVWPLPNKRCSX  
>1BKT:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VGINVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFKGCINGKCDCTPKX  
>1BIG:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
EFTDVKCTGSKQCWPVCKQMFVKPNGKCMNGKRCYS  
>1BMR:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VRDGZIAQPENCVYHCFPGSSGCDTLCKEKGGTSGHCGFKVGHGLACWCNALP  
DNVGIIVEGEKCHSX  
>1B7D:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKV  
WDRATNKC  
>1SN4:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VRDAYIAKPENCVYHCAGNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPD  
DVPIRVPGKCH  
>1SN1:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

VRDAYIAKPHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCWVVGKYGNGCWCIELPD  
NVPIRVPGKCH  
>1CZ6:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
RSVCRQIKICRRRGGCYYKCTNRPY  
>1QKY:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
DEAIRCTGTKDCYIPCRYITGCFNSRCINKSCKCYGCT  
>1DU9:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VGCEECPMHCKGKNAKPTCDDGVCNCNV  
>1C49:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
TISCTNEKQCYPHCKKETGYPNACKMNRKCKCFGR  
>1CHZ:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VRDAYIAKPHNCVYECARNEYCNNLCTKNGAKSGYCWVVGKYGNGCWCIELPD  
NVPIRVPGKCH  
>1QUZ:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRX  
>1C56:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKRCY  
>1C55:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
WCSTCLDLACGASRECYDPCFKAFGRAHGKCMNNKRCY  
>1FH3:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VRDGYIAQPENCVYHCFPGSSGCDTLCCKEKGGTSGHCGFKVGHGLACWCNALP  
DNVGIIVEGEKCHSX  
>1C6W:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GDCLPHLKLCKENKDCCSKKCKRRGTNIEKRCR  
>1DJT:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VRDAYIAKPHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCWVVGKYGNGCWCIELPD  
NVPIRVPGKCH  
>1DQ7:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GEDGYIADGDNCTYICTFNNYCHALCTDKKGDGACDWWVPYGVVVCWCEDLPT  
PVPIRGSKCR

>1HP2:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VFINAKCRGSPECLPKCKEAIGKAAGKCMNGKCKCYP

>1I6G:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KDGYPVDSKGCKLSCVANNYCDNQCKMKKASGGHCYAMSCYCEGLPENAKVS  
DSATNICG

>1I6F:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KDGYPVDSKGCKLSCVANNYCDNQCKMKKASGGHCYAMSCYCEGLPENAKVS  
DSATNICG

>1JLZ:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
ACGSCRKKCKGSGKCINGRCKCY

>1JZB:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KEGYLVNKSTGCKYGCLKLGGENEGCDKECKAKNQGGSYGYCYAFACWCEGLPE  
STPTYPLPNKSCS

>1JZA:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KEGYLVNKSTGCKYGCLKLGGENEGCDKECKAKNQGGSYGYCYAFACWCEGLPE  
STPTYPLPNKSCS

>1JZP:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
TSAQKAKAEERKRRKMSRGLX

>1HP9:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GHACYRNCWREGNDEETCKERC

>1LGL:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
RPTDIKCSesyqcfpvcksrfgktngrcvngfcdcf

>1J5J:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
RPTDIKCSesyqcfpvcksrfgktngrcvngfcdcf

>1NH5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KDGYPVDSKGCKLSCVANNYCDNQCKMKKASGGHCYAMSCYCEGLPENAKVS  
DSATNICG

>1NPI:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KEGYLMDHEGCKLSCFIRPSGYCGRECGIKKGSSGYCAWPACYCYGLPNWVKV  
WDRATNKC

>1NE5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
DRDSCVDKSRCAKYGYQECQDCCKNAGHNGGTCMFFKCKCA

>1IE6:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GDCLPHLKRCKADNDCCGKKCKRRGTNAEKRCR

>1N8M:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
IEAIRCGGSRDCYRPCQKRTGCPNAKCINKTCKCYGCS

>1Q2K:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
AACYSSDCRVKCVAMGFSSGKCINSKCKCYK

>1OMY:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
MVRDAYIAQNYNCVYHCARDAYCNELCTKNGAKSGSCPYLGEHKFACYCKDLP  
DNVPIRVPGKCH

>1KV0:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VRDGYIALPHNCAYGCLNNEYCNNLCTKDGAKIGYCNIVGKYGNACWCIQLPDNV  
PIRVPGRCHPA

>1HLY:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
TVIDVKCTSPKQCLPPCKAQFGIRAGAKCMNGKCKCYPH

>1RJI:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
TPYPVNCKTDRDCVMCGLGISCKNGYCQGCT

>1R1G:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
AACYSSDCRVKCVAMGFSSGKCINSKCKCYK

>1PJV:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
AVCVYRTCDKDCKRRGYRSGKCINNACKCYPY

>1M2S:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
FGLIDVKCFASSECW TACKKVTGSGQGKCQNNQCRCY

>1PVZ:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
TPFAIKCATDADCSRKCPGNPPCRNGFCACT

>1PE4:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
RDGYPLASNGCKFGCSGLGENNPTCNHVCEKKAGSDYGYCYAWTCYCEHVAE  
GTVLWGDSTGTPCRS

>1PX9:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

DRDSCVDKSRCAKYGYQECQDCCKNAGHNGGTCMFFKCKCA  
>1WM8:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VGCEECPMHCKGKNANPTCDDGVCNCNV  
>1WM7:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
ATCEDCPEHCATQNARAKCDNDKCVCEPK  
>1SEG:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VKDGYIVKNYNCTYFCFRNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPD  
HVPIRVPGKCH  
>1T7E:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
NSVRDAYIAKSHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNGCWCIEL  
PDNVPIRVPGKCH  
>1T7B:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
NSVRDAYIAQPHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNGCWCIEL  
PDNVPIRVPGKCH  
>1T7A:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
NSVRDAYIADPHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNGCWCIEL  
PDNVPIRVPGKCH  
>1WPD:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPYGKCMNRKCKCNRC  
>1WMT:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VHTNIPCRGTSDCYEPCEKKYNCARAKCMNRHCNCYNCPW  
>1T55:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
ILGKIWKPIKKLFX  
>1T54:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
ILGKIAEGIKSLFX  
>1T52:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
ILGKIWKGIKSLFX  
>1T51:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
ILGKIWEGIKSLFX  
>1WT7:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

WCSTCLDLACTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC  
>1WQE:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
NDPCEEVCIQHTGDVKACEEACQ  
>1WQD:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHPVEY  
>1WQC:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
DPCYEVCLQQHGNVKECEEACKHPVE  
>1S8K:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
ETQCQSVRDCQQYCLTPDRCSYGTCYCKTTX  
>1V56:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
IRCSGSRDCYSPCMKQTGCPNAKCINKSCKCYGCX  
>1WZ5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
LVKCRGTSDCGRPCQQQTGAPNSKINRMCKCYGA  
>1WT8:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
TPYPVNCKTDRDCVMCGLGISCKNGYCQGCT  
>1T1T:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KIDGYPVVDYWNCKRICWYNNKYCNDLCKGLKADSGYCWGWTLSCYCQGLPDN  
ARIKRSGRCRA  
>2A7T:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GEDGYIADGDNCTYICTFNNYCHALCTDKKGDGACDWWVPYGVVWCWEDLPT  
PVPIRGSGKCR  
>1Y2P:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC  
>1WWN:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KKNGYAVDSSGKVSECLLNNYCNNICTKVYYATSGYCCLLSCYCFGLDDDKAVLK  
IKDATKSYCDVQII  
>1ZYW:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
NSVRDAYIADSHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNWCWCIEL  
PDNVPIKVGGKCH  
>1ZYV:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

NSVRDAYIADSHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNWCWCIEL  
PDNVPIKGPVKCH

>1ZVE:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

NSVRDAYIAGPHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNWCWCIEL  
PDNVPIRVPGKCH

>1ZUT:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

NSVRDAYIADSHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNWCWCIEL  
PDNVPIKVPGKCH

>1ZU3:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

NSVRDAYIAAPHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNWCWCIEL  
PDNVPIRVPGKCH

>2AXK:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

EIDTNVKCSGSSKCVKICIDRYNTRGAKCINGRCTCYP

>1ZVG:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

NSVRDAYIADSHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNWCWCIEL  
PDNVPIRVPGKCH

>2ATB:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

MVRDAYIADDVNCVYECFRDAYCNELECTKNGASSGYCQWAGKYGNACWCYAL  
PDNVPIRVPGKCR

>2ASC:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

MVRDAYIAKNYNCVYECFRDAYCNELECTKNGASSGYCQWAGKYGNACWCYALP  
DNVPIRVPGKCR

>2I61:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

MDGYIKRRDGCKVACLIGNEGCDKECKAYGGSYGYCWTWGLACWCEGLPDDK  
TWKSETNTCG

>2DDL:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

AFCNLRMCQLSCRKSLGCLLGKCIKCKCYGC

>2CK5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

CKISRQCLKPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPK

>2CK4:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

GVIINVKCKISRQCLKPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPK  
>2E0H:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VRDAYIAQNYNCVYHCARDAYCNELCTKNGAKSGSCPYLGEHKFACYCKDLDPN  
VPIRVPGKCH  
>2Z3S:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GVPINVSTGSKDCYAPCRKQTGCPNAKCINKSCKCYGC  
>2UVS:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GVEINVKCSGSPQCLKPCKDAGMRFKCMNRKCHCTPK  
>2K4U:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VGINVKCKHSRQCLKPCKDAGMRFKCTNGKCHCTPK  
>3E8Y:X|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
AACYSSDCRVKCVAMGFSSGKCINSKCKCYK  
>2KJA:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
KEGYLVNKSTGCKYGCLLLGKNEGCDKECKAKNQGGSYGYCYAFGCWCEGLPE  
STPTYPLPNKSCS  
>2K9O:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
AAASCVGSPECPPKCRAQGCKNGKCMNRKCKCYC  
>2KBJ:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VKDGYIADDRNCPYFCGRNAYCDGECKKNRAESGYCQWASKYGNACWCYKLP  
DDARIMKPGRCNGG  
>2KBH:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VKDGYIADDRNCPYFCGRNAYCDGECKKNRAESGYCQWASKYGNACWCYKLP  
DDARIMKPGRCNGG  
>2KBK:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
VRDAYIAKPENCVYECGITQDCNKLCTENGAESGYCQWGGKYGNACWCIKLPDS  
VPIRVPGKCQ  
>2KIR:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
INVKCSLPQQCIKPCKDAGMRFKCMNKKCRCYS  
>2KFE:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GRGREFMSNLKEKLSGVKEKMKN

>2KQL:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GDCLPHLKLCKENKDCCSKKCKRRGTNIEKRCR

>3ODV:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GVEINVKCSGSPQCLKPCKDAGMRFKCMNRKCHCTPK

>2KTC:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GSVGCAECPMHCKGKMAKPTCENEVCKCNIGKKD

>2YEO:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
MVRDAYIAKNYNVCYECFRDAYCNELCTKNGASSGYCQWLGKYGNACWCYALP  
DNVPIRVPGKCR

>2KYJ:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
DFPLSKEYESCVRPRKCKPPLKCNKAQICVDPNKGW

>2KY3:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE  
GSAFCNLRRCELSRSLGLLGKCIGEECKCVPY

## Anexo E. Cromatogramas

