

**SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA Y CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA
DE MASAS MALDI-TOF DE UN PÉPTIDO CON PATRÓN DE CISTEÍNAS
SIMILAR A LAS α -CONOTOXINAS PRESENTE EN EL VENENO DE *CONUS
PURPURASCENS***

**CRISTIAN CAMILO GARNICA RUIZ
GLORIA STEFANY AVENDAÑO MORA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2013**

**SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA Y CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA
DE MASAS MALDI-TOF DE UN PÉPTIDO CON PATRÓN DE CISTEÍNAS
SIMILAR A LAS α -CONOTOXINAS PRESENTE EN EL VENENO DE *CONUS
PURPURASCENS***

**CRISTIAN CAMILO GARNICA RUIZ
GLORIA STEFANY AVENDAÑO MORA**

**Trabajo de Grado para optar al título de
QUÍMICO**

DIRECTOR:

PhD. HERMINSUL DE JESÚS CANO CALLE

CODIRECTOR:

Qca. JOHANNA MARCELA FLÓREZ CASTILLO

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

2013

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	18
2. MARCO TEÓRICO	21
2.1. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS	21
2.2. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPPS)	22
2.3. SOPORTE SÓLIDO EN SPPS	24
2.4. FORMACIÓN DE ENLACES DISULFURO	26
3. OBJETIVOS	28
3.1. OBJETIVO GENERAL	28
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4. SECCIÓN EXPERIMENTAL	28
4.1. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO LINEAL	28
4.1.1. Pruebas cualitativas	29
4.1.2. Acoplamiento de aminoácidos	30
4.1.3. Acetilación	31
4.2. PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO LINEAL Y OXIDADO	31
4.2.1. Liofilización	31
4.2.2. Análisis cromatográfico por RP-HPLC	31
4.2.3. Extracción en fase sólida	32
4.2.4. Desalinización	32
4.3. OXIDACIÓN DEL PÉPTIDO	32
4.4. CARACTERIZACIÓN POR MS-MALDI-TOF	32
5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
5.1. REACCIONES GENERALES DEL PROCESO DE SÍNTESIS	34
5.1.1. Desprotección del grupo fmoc con piperidina	34
5.1.2. Detección de grupos amino libres	36
5.1.3. Activación de los aminoácidos a acoplar	37
5.1.4. Reacción de acoplamiento	39
5.1.5. Separación del péptido de la resina	40
5.2. SÍNTESIS No.1	42
5.2.1. Análisis RP-HPLC	42

5.3. SÍNTESIS No. 2	47
5.3.1. Oxidación del péptido y posterior aislamiento por spe	47
5.3.2. Aislamiento del péptido reducido y oxidado con protección de la cadena lateral selectiva	49
5.4. SÍNTESIS No. 3	51
5.4.1. Acondicionamiento de la resina	51
5.4.2. Acetilación	52
5.4.3. Estimación de la unión del primer residuo aminoacídico a la resina	55
5.5. SÍNTESIS FINAL	55
5.5.1. Desprotección del fmoc con el tiempo	55
5.5.2. Detección residuos remanentes	57
5.5.3. Detalles de la síntesis final	58
5.6. MONITOREO DE SÍNTESIS USANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF	59
CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES	66
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	67
BIBLIOGRAFÍA	71

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Lesiones características de la enfermedad de Alzheimer	16
Tabla 2.	Estudios actuales sobre conotoxinas con potencial farmacéutico	19
Tabla 3.	Protocolo para activación de resina Rink AM	29
Tabla 4.	Protocolo para la acetilación de la peptidil-resina	31
Tabla 5.	Detalles de la reacción de acople en cada residuo adicionado	57
Tabla 6.	Relaciones <i>m/z</i> calculados y observados	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama organizacional para las conotoxinas	20
Figura 2.	Esquema general de la síntesis en fase sólida	23
Figura 3.	Resina Rink-amida AM	25
Figura 4.	Representación esquemática de la estructura porosa de una resina	26
Figura 5.	Características del precursor reducido	33
Figura 6.	Aducto Fmoc-piperidina	35
Figura 7.	Comprobación de grupos amino libres en la resina	36
Figura 8.	Cromatograma RP-HPLC del crudo reducido en la síntesis No.1.	42
Figura 9.	Cromatograma RP-HPLC del crudo reducido obtenido al aumentar la concentración de fase móvil y modificar el gradiente de elución 15-85% A a 30-70%B	43
Figura 10.	Acercamiento de la zona de elución del crudo reducido obtenido al modificar el gradiente de elución 100% A a 100%B usando una concentración de 80% de ACN en la fase móvil B	44
Figura 11.	Espectros de masas de fracciones recolectadas por HPLC	45
Figura 12.	Espectro de masas de SGC(Acm)CKHPAC(Acm)GKNRC	48
Figura 13.	Ampliación en el intervalo cercano del pico de interés	49
Figura 14.	Espectro de masas de α -conotoxina purificada por SPE	50
Figura 15.	Volúmenes relativos de una resina de poliestireno y de peptidil-resina en presencia o ausencia de moléculas de disolvente	51
Figura 16.	Resina Rink-AM (a) antes y (b) después de la solvatación con DCM	51
Figura 17.	Espectro de masas obtenido del péptido SGCKHPACGKNRC en su estado reducido y sin acetilar. Último espectro de masas obtenido del péptido SGCKHPACGKNRC oxidado y acetilado.	53
Figura 18.	Espectro de masas MALDI del péptido KNRC	55
Figura 19.	Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-GKNRC.	56
Figura 20.	Comprobación de grupos amino libres en último lavado, antes y después de adicionar azul de bromofenol.	56
Figura 21.	Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-C(Acm)GKNRC (rojo) y blanco matriz DHB (azul).	59
Figura 22.	Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-AC(Acm)GKNRC	60
Figura 23.	Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-PAC(Acm)GKNRC	60
Figura 24.	Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-HPAC(Acm)GKNRC	61

Figura 25.	Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-KHPAC(Acm)GKNRC	62
Figura 26.	Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-CKHPAC(Acm)GKNRC	62
Figura 27.	Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-C(Acm)CKHPAC(Acm)GKNRC.	63
Figura 28.	Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-GC(Acm)CKHPAC(Acm)GKNRC	63

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Procedimiento de acople del primer aminoácido	28
Esquema 2.	Mecanismo de reacción de desprotección del grupo Fmoc con piperidina	32
Esquema 3.	Reacción de azul de bromofenol con grupo amino libre	34
Esquema 4.	Mecanismo de activación del grupo carboxilo del aminoácido con TBTU en presencia de DIPEA	35
Esquema 5.	Mecanismo de formación del enlace peptídico	36
Esquema 6.	Reacción general de clivaje.	38
Esquema 7.	Mecanismo de formación de los puentes disulfuro usando la estrategia de protección selectiva y yodo como agente oxidante	45

ABREVIATURAS

ACh	Receptor acetilcolina de tipo nicotínico
Acm	Grupo acetamidometilo
ACN	Acetonitrilo
ANIS	Potencializadores colinérgicos de tipo nicotínico
Bn	Grupos tipo bencilo
Boc	Grupo tert-butoxicarbonil
DCM	Diclorometano
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DIPEA	N,N-diisopropiletildiamina
DMF	Dimetilformamida
EA	Enfermedad de Alzheimer
Fmoc	Grupo 9-fluorometoxicarbonilo
IPA	Alcohol isopropílico
LC	Cromatografía líquida
MS	Espectrometría de masas
NMR	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
SPPS	Síntesis de péptidos en fase sólida
TBTU	2-(1 <i>H</i> -Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato
tBu	Grupos del tipo tert-butil
TFA	Ácido trifluoroacético
TIPS	Triisopropilsilano
trt	Grupo tritilio

RESUMEN

TÍTULO: SÍNTESIS EN FASE SÓLIDA Y CARACTERIZACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF DE UN PÉPTIDO CON PATRÓN DE CISTEÍNAS SIMILAR A LAS α -CONOTOXINAS PRESENTE EN EL VENENO DE *CONUS PURPURASCENS**

Autor(es): Garnica, Cristian^{**} . Avendaño, Gloria^{**} .

Palabras clave: SPPS, N-Fmoc, estandarización, SPE, MALDI-TOF.

DESCRIPCIÓN

Se sintetizó la conotoxina de secuencia SGCKHPACGKNRC, presente en el veneno del caracol *Conus purpurascens*. Este péptido posee un patrón de cisteínas (C₁C₂-C₃-C₄) propio de la familia de las α -conotoxinas, las cuales tienen una actividad biológica contra enfermedades neurodegenerativas e intervienen en los procesos de la sinapsis colinérgica, razón por la cual se hace interesante el estudio de la secuencia mencionada.

La síntesis del péptido reducido se llevó a cabo por medio de la metodología en fase sólida (SPPS), usando la estrategia 9-fluorenilmetoxicarbonilo (N-Fmoc) y la protección selectiva de los residuos de cisteína con dos grupos diferentes, el acetamidometilo para las C₁C₃, y el tritilio para las C₂C₄. La oxidación o formación de enlaces disulfuro intramoleculares se realizó utilizando una solución de yodo en un solvente determinado, se realizó con el péptido unido al soporte y en solución. Se purificó por liofilización y extracción en fase sólida (SPE) usando una columna C-18 y gradientes de soluciones desde 0 hasta 100% de ACN/H₂O con 0.1% de TFA.

Por último, se caracterizó el péptido reducido y la conotoxina por espectrometría de masas MALDI-TOF, monitoreando la síntesis en cada uno de los acoples. Se mejoró las condiciones de síntesis para esta secuencia obteniendo el mayor grado de pureza.

*Proyecto de grado

**Facultad de ciencias. Escuela de Química. Director: Hermínsul Cano Calle, *Ph. D.* Codirector: Johanna Flórez Castillo, Qca.

SUMMARY

TITLE: SOLID PHASE SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION BY MASS SPECTROMETRY MALDI-TOF OF A CYSTEINE PATTERN PEPTIDE SIMILAR TO α -CONOTOXINS PRESENT IN THE *CONUS PURPURASCENS* VENOM*

Autor(es): Garnica, Cristian** . Avendaño, Gloria** .

Palabras clave: SPPS, N-Fmoc, standardization, SPE, MALDI-TOF.

DESCRIPTION

Synthesized sequence conotoxin SGCKHPACGKNRC, present in the venom of the snail *Conus purpurascens*. This peptide has a cysteine pattern (C₁C₂-C₃-C₄) characteristic of the family of α -conotoxins, which have biological activity against neurodegenerative diseases and are involved in the processes of cholinergic synapse, why it is interesting to study the mentioned sequence.

Reduced peptide synthesis was performed by solid phase methodology (SPPS), using the strategy 9-fluorenylmethoxycarbonyl (N-Fmoc) and the selective protection of the cysteine residues with two different groups, acetamidomethyl for C₁C₃, and trityl for C₂C₄. Oxidation or intramolecular disulfide bonding was achieved using a solution of iodine in a given solvent, was performed with the peptide bound to the support and in solution. Purified by lyophilization and solid phase extraction (SPE) using a column C-18 and gradients of solutions from 0 to 100% of ACN/H₂O with 0.1% de TFA.

Finally, the peptide reduced and conotoxin were characterized by MALDI-TOF. Improved synthesis conditions for this sequence obtaining the highest degree of purity.

*Degree Project

**Faculty of science. School of Chemistry. Director: Hermínsul Cano Calle, *Ph. D.* Codirector: Johanna Flórez Castillo, Qca.

INTRODUCCIÓN

Uno de los retos más importantes que tiene la farmacología, consiste en la búsqueda de nuevas sustancias activas que interfieran en los principales procesos neurodegenerativos que afectan a la población actual^{1,7}; debido a esto, una de las líneas de investigación en este campo se enfoca en la búsqueda de fármacos que prevengan, retarden o disminuyan la sintomatología propia provocada por la alteración en los niveles de los principales neurotransmisores celulares como la acetilcolina, la dopamina y el glutamato⁵, los cuales están relacionados con los principales trastornos tanto cognitivos como conductuales de enfermedades como Alzheimer (EA), Parkinson e ICTUS (Esclerosis lateral amiotrófica, accidente cerebro vascular, infarto cerebral y apoplejía)^{1,2}.

En el caso de EA, condición neurodegenerativa progresiva que actualmente no puede ser tratada con objetividad en el campo de la salud⁴, actualmente existen 24 millones de personas que padecen esta enfermedad a nivel mundial⁷; se ha encontrado que las lesiones cerebrales propias de esta enfermedad (Tabla 1) se deben a una disminución en el proceso de transmisión sináptica (bajos niveles de acetilcolina en la sinapsis colinérgica^{4,5}) el cual es necesario para mantener el ritmo hipocámpal normal, que está involucrado en la actividad motora, en los procesos de memoria y asociación.⁹

Tabla 1. Lesiones características de la enfermedad de Alzheimer.⁷

LESIONES
1. Pérdida sináptica y neuronal.
2. Placas difusas y neuríticas.
3. Ovillos neurofibrilares con filamentos helicoidales emparejados.
4. Neuritas distróficas.
5. Microanglopatía amiloide.
6. Atrofia cortical.

Debido a esto, la acetilcolina ha sido objeto de intervención farmacológica y los tratamientos actuales de la EA han estado principalmente dirigidos a corregir la disrupción en la transmisión sináptica provocada por este neurotransmisor,² por lo que una de las líneas de investigación en este campo está dirigida al desarrollo de moléculas que regulen el proceso de sinapsis colinérgica,^{1,8} donde una buena opción es el desarrollo de agonistas para los receptores colinérgicos de tipo nicotínicos (canal iónico formado por 5 unidades glucoproteicas que es permeable a cationes Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺)⁶ responsables de transmitir la señal hacia el interior de la célula.^{5,9}

Esta estrategia sustitutiva de la acetilcolina desarrolla potencializadores colinérgicos de naturaleza química diversa conocidos como ANIS y son considerados la primera generación de fármacos antidemencia.³ Las moléculas con mayor potencial ANIS identificadas en la fase preclínica son aminas biogénicas, algunos aminoácidos, péptidos y proteínas,⁵ los cuales cumplen con las siguientes características:

- Ejercen una actividad biológica frente al receptor nicotínico de acetilcolina.⁸
- Tienen una solubilidad adecuada, capacidad de atravesar barreras y razonable estabilidad metabólica para evitar la degradación.³
- Pueden ser suministrados a seres humanos en la fase clínica del estudio.^{3,8}

Por esta razón, la industria farmacéutica tiene gran interés en la proteómica, en especial por el tipo de tecnología (LC, MS, LC-MS, NMR, entre otros) aplicado a los estudios de síntesis en fase sólida (rama de gran relevancia en la síntesis de ANIS) y determinación del potencial farmacológico de muchos péptidos y proteínas.⁸

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El potencial marino como fuente de fármacos aún no ha sido explorado ya que del 95% de los organismos vivos que habitan en el mar, menos del 1% han sido estudiados con este propósito;¹³ cerca de 50 compañías mundiales investigan sobre la obtención de compuestos activos de origen marino, representando un 10 % del total de instituciones que trabajan en este tema.¹¹ Las algas, esponjas y moluscos son las especies más estudiadas, de las cuales se han obtenido moléculas pequeñas de carácter peptídico de sutileza estructural, que pueden ser calificadas como medicinas del futuro.^{12,13}

El éxito de estos péptidos radica en que son compuestos con alta especificidad al momento de interactuar con un receptor celular en particular, resultado de un complejo proceso de evolución molecular y de interacciones funcionales que se han dado en la naturaleza a lo largo de millones de años.^{12,14} Las investigaciones biomédicas de los productos marinos se centran en toxinas que actúen como agonistas sobre membranas del sistema nervioso central, agentes antitumorales, antivirales y antiinflamatorios;¹¹ se han descrito más de 15000 compuestos marinos con potencial farmacéutico, la mayoría con aplicaciones en el área del cáncer.¹³

Una de las principales fuentes de moléculas blanco es el veneno producido por los moluscos gasterópodos conocidos como *Conus* (aproximadamente 500 especies productoras de veneno de variadísima gama de toxinas que afecta diferentes puntos de la transmisión nerviosa y la actividad muscular),^{15,16} donde cada especie presenta un perfil farmacológico de su veneno diferente al de otra especie.¹⁰

Las conotoxinas son las moléculas más abundantes en estos venenos, tienen entre 10 a 30 aminoácidos y presentan un elevado número de residuos de cisteína (generalmente 4 o 6) en posiciones muy bien definidas dentro de la secuencia peptídica; estas cisteínas además de formar puentes disulfuro intramoleculares (proporcionando gran rigidez necesaria para el desarrollo de su actividad

biológica),^{10,11,13} permiten clasificarlas en familias que tienen como blanco receptores y canales iónicos neuromusculares específicos (Figura 1).¹²

De este modo, estudios realizados sobre conotoxinas ponen de manifiesto la utilidad de estas en el tratamiento de algunas enfermedades neuronales, siendo consideradas herramientas ideales en uso para ciertos estudios neurofisiológicos (Tabla 2). Esto se debe a su elevada especificidad y a la posibilidad de ser caracterizadas químicamente.^{10,12} Aun así, obtener grandes cantidades para realizar los estudios farmacológicos resulta difícil, puesto que estas moléculas suelen ser aisladas en muy pequeñas proporciones¹⁴ lo que hace necesario aplicar tecnología de optimización química, principalmente en los métodos de síntesis.^{13,14}

Tabla 2. Estudios actuales sobre conotoxinas con potencial farmacéutico.¹⁷

Conotoxina	Nombre	Acción	Estado del estudio	Compañía que desarrolla el estudio	Comentario
α -Vc1.1 (<i>C. victoriae</i>)	ACV1	Bloqueo competitivo del receptor neuronal ACh del tipo nicotínico	Ensayo en humanos	Metabolic Pharmaceuticals Ltd, Australia	Efectivo contra neuropatía periférica y dolor post-operatorio
ω -CVID (<i>C. catus</i>)	AM336	Bloqueo de los canales de calcio tipo N	II	AMRAD corp. Univ. of Queensland, Australia	Desarrollado para el dolor neuropático
ω -M VIIA (<i>C. magus</i>)	Ziconotide Prialt	Bloqueo de los canales de calcio tipo N	FDA probado	Elan corporation, USA	Calma el dolor en pacientes con cáncer
P-TIA (<i>C. tulipa</i>)	-	Inhibidor reversible no competitivo de los receptores α -1 adrenérgicos	Preclínico	Xenome Ltd, Australia	-

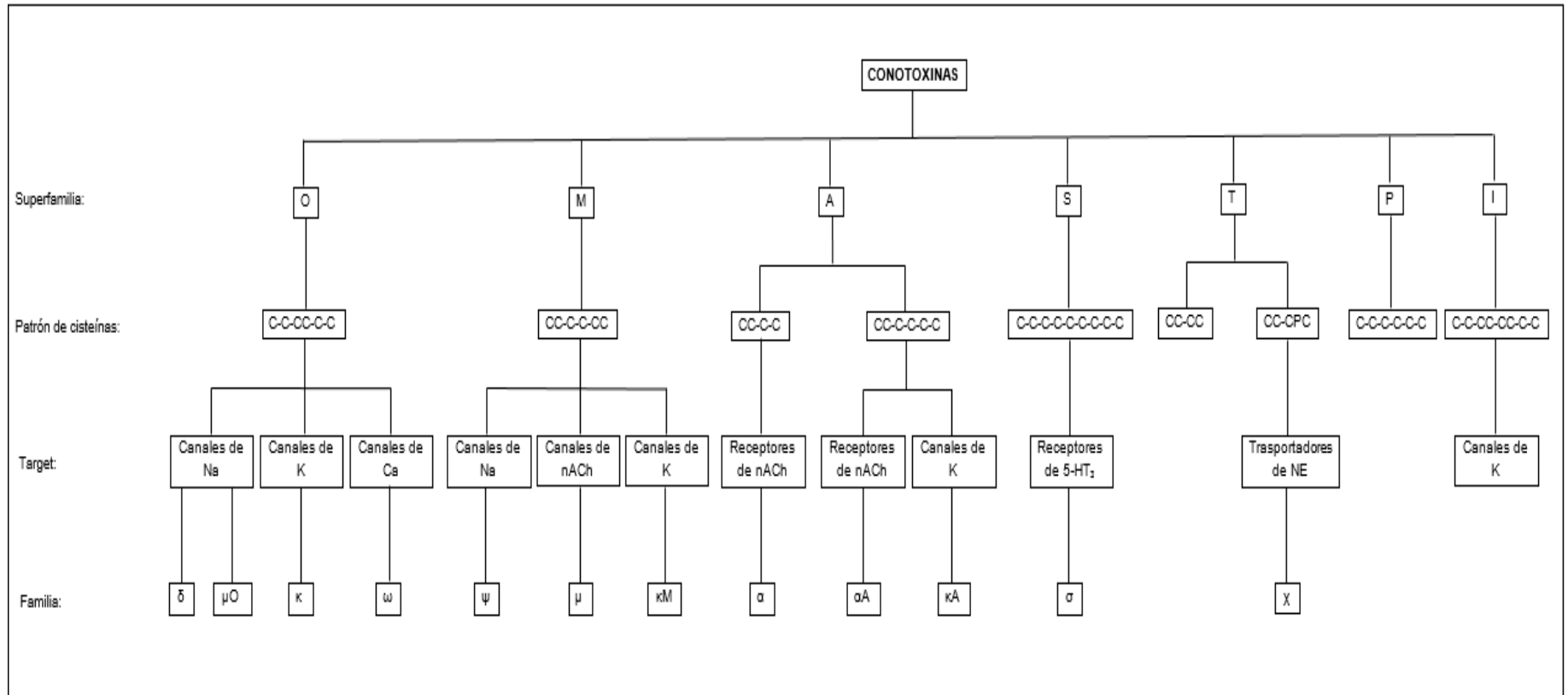


Figura 1. Diagrama organizacional para las conotoxinas. Principales familias objeto de estudio: α -conotoxinas (discrimina los receptores de acetilcolina neuromusculares de los neuronales), μ -conotoxinas (bloquean los canales de sodio sensibles a voltaje de las células musculares) y ω -conotoxinas (bloqueadores potentes y específicos de los canales de calcio tipo N).¹⁶

2. MARCO TEÓRICO

2.1. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

Los péptidos y proteínas son moléculas presentes en todos los organismos que desempeñan funciones importantes en las células, desde la organización estructural básica hasta su metabolismo y regulación, variando según su secuencia y estructura. Se le denomina péptido a aquellos compuestos formados por menos de 100 residuos de aminoácidos y por encima de este número se consideran proteínas.

Las principales características de los aminoácidos son:^{18,19}

1. Existen 20 clases diferentes conocidos como esenciales que forman los péptidos (Anexo 1), todos ellos coinciden estructuralmente en que llevan unido un grupo carboxílico (-COOH) y un grupo amino (-NH₂) al átomo de carbono tetraédrico denominado carbono α , al cual también está unido un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (R) que le confiere las características a cada aminoácido.
2. Debido a que presentan un centro quiral (excepto la glicina), se pueden encontrar dos estereoisómeros para cada uno; los péptidos y proteínas están formados por los enantiómeros L (aminoácidos que desvían el plano de la luz polarizada a la izquierda).
3. Un aminoácido enantiomérico puede convertirse en su imagen especular en un proceso denominado racemización, donde una mezcla de partes iguales de enantiómeros se conoce como modificación racémica y sólo puede ser resuelta por reactivos ópticamente activos.

Los aminoácidos se unen entre sí mediante un enlace amida, conocido como enlace peptídico, el cual se forma por la reacción del grupo carboxilo de un aminoácido α -amino protegido con el grupo amino de un segundo aminoácido α -carboxilo protegido; una vez completada la reacción se procede a eliminar un grupo protector del dipéptido y repetir la reacción hasta completar la secuencia

deseada.²⁰ Actualmente la facilidad con la que se pueden sintetizar secuencias aminoacídicas se debe a la eficiencia de la técnica empleada.

El desarrollo de las técnicas o métodos de síntesis comenzó en 1901, cuando Emil Fisher obtuvo el dipéptido glicilglicina, comprobando la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos y estableciendo las bases de la síntesis de proteínas. Después de esto la evolución de la técnica fue lenta, ya que se presentaban problemas al combinar diferentes aminoácidos por ser moléculas polifuncionales y poder formar homopolímeros.²¹ En 1932, Max Bergmann y Leonidas Zervas lograron un avance importante al encontrar un compuesto químico capaz de bloquear el grupo α -amino del aminoácido, evitando la unión de aminoácidos de la misma especie, este fue el carbobenzoxilo que es fácilmente removible después de la formación del enlace peptídico y su extracción no afecta la síntesis del péptido. En 1953 Vincent du Vigneaud sintetizó el primer péptido funcional, la hormona Oxitocina, por lo que recibió el Premio Nobel de Química en 1955. Finalmente en 1963, Bruce Merrifield optimizó la técnica al lograr sintetizar el tetrapéptido leucilalanilglicilalanina utilizando un soporte sólido insoluble, este método se conoce como síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)²² y permitió sintetizar en 1969 la enzima ribonucleasa pancreática bovina A de 124 residuos en 6 semanas; debido a sus aportes en el campo de la síntesis de péptidos, Merrifield recibió el Premio Nobel de Química en 1984.^{18,21}

2.2. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPPS)

En este método se une el primer aminoácido α -amino protegido a un soporte sólido y posteriormente se elonga la cadena adicionando secuencialmente aminoácidos hasta completar el péptido, al finalizar este se desprende del soporte (Figura 1). Cabe mencionar que esta síntesis se realiza de forma contraria a la biosíntesis peptídica, con el fin de evitar problemas de racemización o quiralidad.

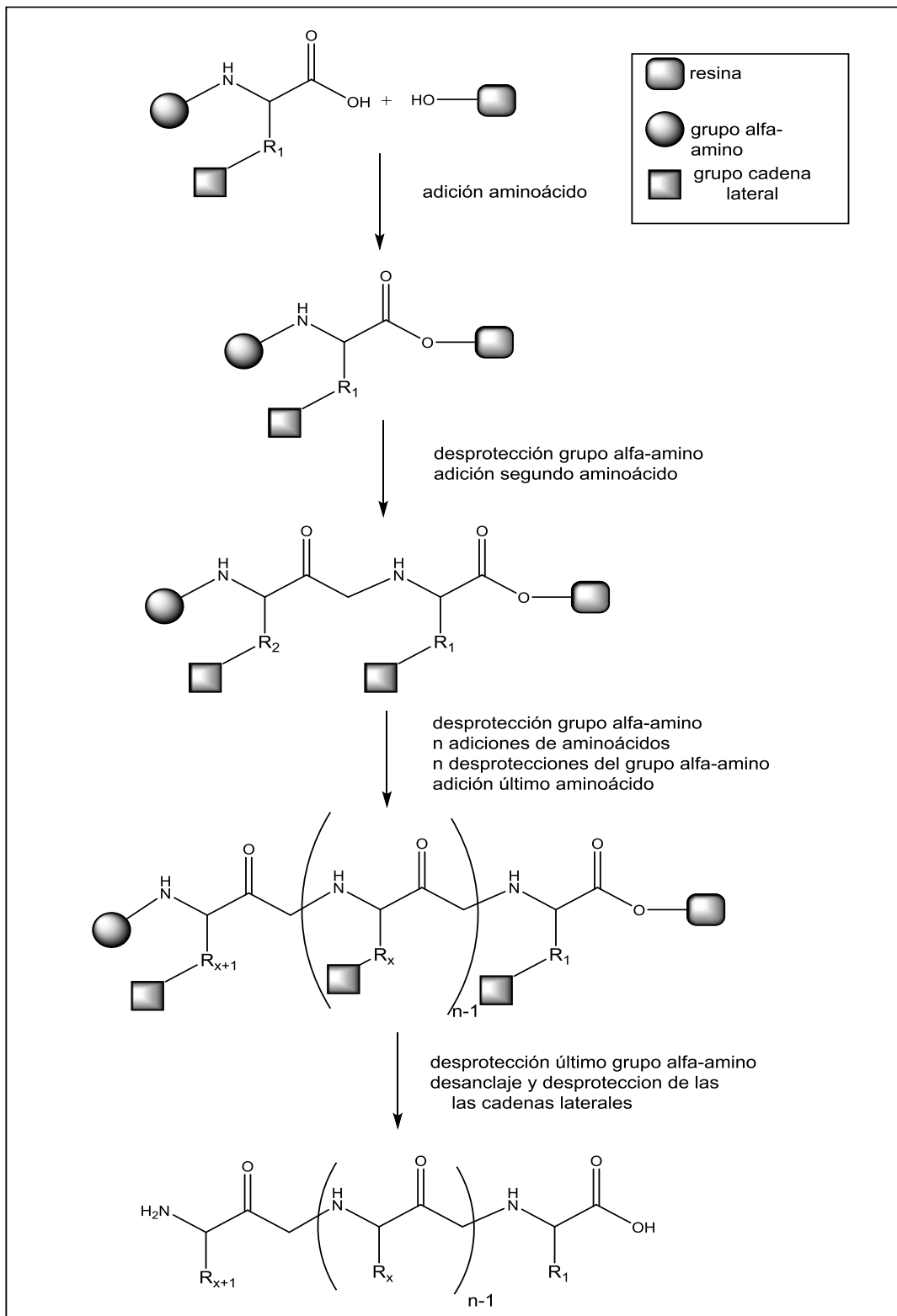


Figura 2. Esquema general de la síntesis en fase sólida.⁶

Las principales ventajas de esta técnica son:²³

1. Altos rendimientos y bajas pérdidas mecánicas ya que el péptido se encuentra unido al soporte sólido.
2. Eliminación fácil de excesos de reactivos.
3. Operaciones de lavado y filtrado sencillos para cada ciclo de la síntesis.
4. Posibilidad de automatizar el método.

Existen dos estrategias principales en la SPPS. La primera estrategia Boc/Bn presenta el grupo tert-butoxicarbonilo (Boc) como protector de los grupos α -amino y grupos del tipo bencilo (Bn) como protectores de las cadenas laterales; el grupo Boc se elimina con soluciones ácidas de fuerza moderada (33% de ácido trifluoroacético en diclorometano), los grupos Bn de las cadenas laterales y el desanclaje del producto final de la resina se realiza con ácidos fuertes (generalmente fluoruro de hidrógeno anhidro) que pueden alterar la integridad de la secuencia aminoacídica y necesitan espacios especiales para su manipulación; la segunda estrategia Fmoc/tBu utiliza el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) como protector temporal de los grupos α -amino y grupos del tipo tert-butilo (tBu) como protectores de las cadenas laterales; el grupo Fmoc se elimina con bases de fuerza moderada (20-25% de piperidina en dimetilformamida), los grupos tBu de las cadenas laterales y el desanclaje del producto final de la resina se realiza en condiciones ácidas más suaves que la primera estrategia (ácido trifluoroacético).²³⁻

26

2.3. SOPORTE SÓLIDO EN SPPS

La matriz polimérica y el grupo funcional enlazado son conocidos como soporte sólido o resina; dependiendo del tipo de enlazador que se utilice se obtiene un producto con características diferentes, por esto se debe tener cuidado a la hora de elegir la resina a usar en la SPPS; por ejemplo, la resina NovaSyn TGA tiene en su extremo el ácido hidroximetilfenoxiacético, que permite obtener péptidos carboxilados, ya que al reaccionar con el grupo carboxilo del primer aminoácido se forma un éster; está compuesta por poliestireno y polietilenglicol, donde el PEG actúa como un espaciador que permite funcionalizarse con grupos que sean

lábiles en medio ácido.²³ Resinas de este tipo suelen ser usadas para la síntesis de péptidos complejos, de gran tamaño, para elaborar bibliotecas combinatorias, entre otros.

Por otro lado, existen resinas mucho más versátiles que permiten obtener péptidos sencillos y hasta realizar la automatización de las reacciones; estas resinas sólo están compuestas por poliestireno, y generalmente con 1-2% de divinilbenceno para darle un entrecruzamiento. Por ejemplo, se tiene la resina Wang que tiene como grupo espaciador un alcohol bencílico para formar un éster con el aminoácido entrante, por lo que genera péptidos carboxilados.²⁷ La resina Rink AM (Figura 3), permite la formación de péptidos amidados, debido a que tiene un grupo amino primario en su extremo, disponible para la reacción con el aminoácido C-activado.

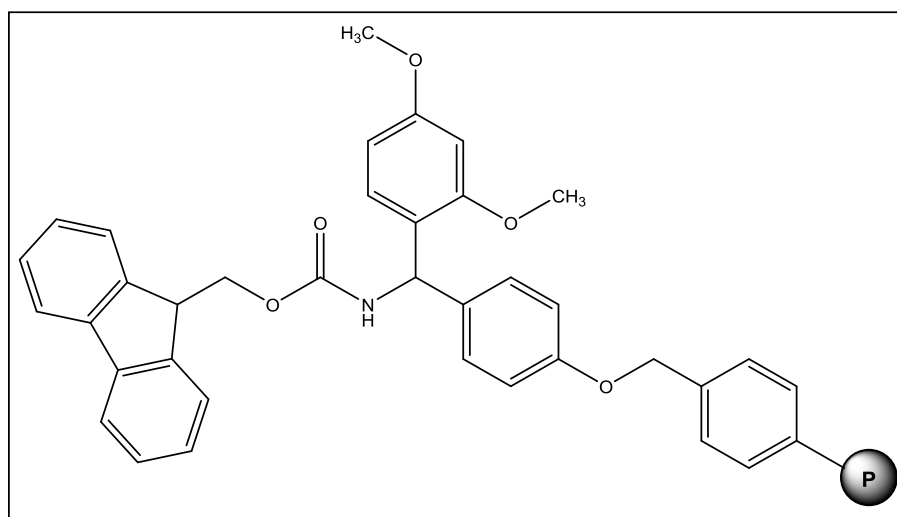


Figura 3. Resina Rink-amida AM.

El soporte sólido es considerado como un soporte inerte que permanece durante las reacciones sucesivas de la síntesis, permitiendo la entrada y salida de reactivos, por lo que la accesibilidad al punto activo de reacción se ve afectado por el ambiente que la parte polimérica le ofrezca dentro de la perla. Las resinas de poliestireno son las más utilizadas, debido a que tienen una mayor estabilidad química, son altamente porosas y permiten la difusión de los reactivos a través de

la reticulación dentro de las perlas, más no en los espacios entre cada uno de los granos de polímero.²⁸

La resina Rink AM presenta un entrecruzamiento del 1% de divinilbenceno, cuyas perlas son de 70 a 150 micrometros (μm) de diámetro, donde los grupos funcionales se encuentran en su interior y la distribución es heterogénea, por lo que algunos puntos activos para la reacción son menos propensos que otros; el grado de entrecruzamiento es importante, ya que a mayor porcentaje de divinilbenceno con relación al estireno, forma regiones de mayor densidad y aíslan el sitio de reacción. Las resinas de poliestireno son macroporosas por lo que sus perlas tienen una estructura de micro glóbulos poliméricos heterogéneos (Figura 4).

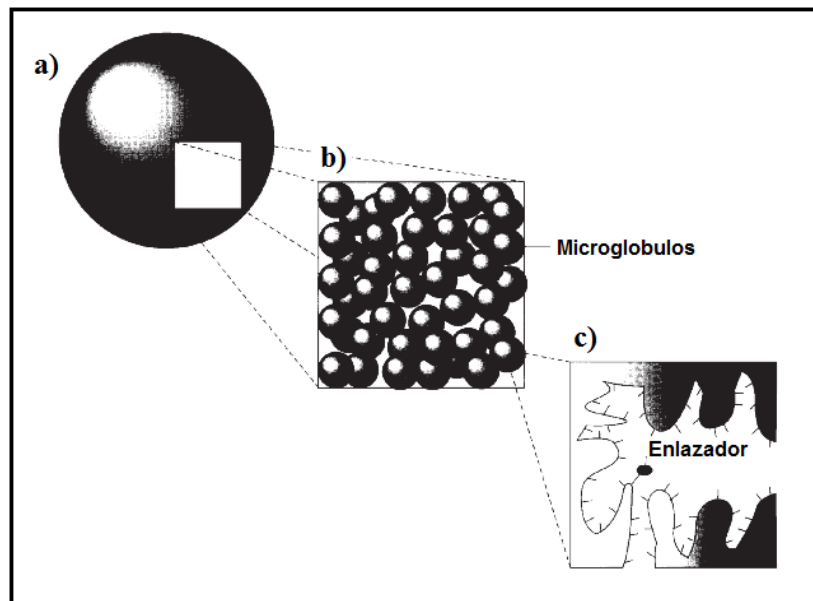


Figura 4. Representación esquemática de la estructura porosa de una resina; a) Perla de resina ArgoPore™, b) Microglobulos y c) estructura interna del poro.²⁸

2.4. FORMACIÓN DE ENLACES DISULFURO

Muchos péptidos y proteínas como hormonas, enzimas, factores de crecimiento y toxinas, presentan enlaces disulfuro entre cisteínas con posiciones específicas en la secuencia, estos tienen un papel importante en el plegamiento y la estabilidad

ya que unen porciones de la cadena polipeptídica que se encuentran muy lejanas la una de la otra.¹⁸

Para la formación de los puentes disulfuro pueden tomarse dos caminos. El primero, es la oxidación de los grupos tiol de las cisteínas libres, es decir, al finalizar la síntesis del precursor lineal, se realiza la desprotección de todos los grupos protectores permanentes, incluidos los de las cisteínas presentes; posteriormente el péptido es sometido a diferentes condiciones para lograr la formación del puente disulfuro, entre las cuales se destacan: la oxidación con aire, método más utilizado pues sólo necesita el oxígeno presente en la atmósfera; la oxidación en presencia de amortiguadores Redox, la cual aumenta la velocidad y la eficiencia de la reacción, con respecto a la oxidación con aire; la oxidación mediada por ferricianida de potasio, que es un reactivo oxidante muy suave usado ampliamente, y finalmente, la oxidación con dimetilsulfóxido (DMSO), que puede ser llevada a cabo en un rango de pH más amplio y se pueden usar grandes concentraciones para acelerar la reacción.¹⁸

La segunda opción, es la oxidación directa de las cisteínas protegidas por la oxidación por el ion yoduro, el cual necesita que los grupos protectores sean el S-Trt y el S-Acm; la oxidación con trifluoracetato de talio (III) que puede usarse en sustitución al anterior, dando mejores resultados, pero es altamente tóxico, y, la oxidación por sulfóxido y clorosilano, donde la mezcla para la formación óptima del puente disulfuro, depende del grupo protector.¹⁸

La oxidación con yodo fue propuesto por Kamber y Rittel para la formación de enlaces disulfuro con cisteínas protegidas con el grupo Trt, pero se puede utilizar para otros grupos protectores como Acm, Tacm, Phacm y derivados de Tmb.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar la α -conotoxina con secuencia aminoacídica $\text{SGC}_1\text{C}_2\text{KHPAC}_3\text{GKNRC}_4$ presente en el veneno de *Conus purpurascens*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el péptido lineal con secuencia $\text{SGC}_1\text{C}_2\text{KHPAC}_3\text{GKNRC}_4$.
- Formar selectivamente los enlaces disulfuro intramoleculares $\text{C}_1\text{-C}_3$ y $\text{C}_2\text{-C}_4$
- Purificar y caracterizar la α -conotoxina utilizando diferentes técnicas instrumentales

4. SECCIÓN EXPERIMENTAL

4.1. SÍNTESIS DEL PÉPTIDO LINEAL

El péptido fue sintetizado por medio de la síntesis en fase sólida, utilizando aminoácidos protegidos con el grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) en el amino terminal. Las cisteínas en las posiciones 1 y 3 se incorporaron protegidas con el grupo acetamidometilo (Acm) y las cisteínas 2 y 4 con el grupo tritilio (Trt). Se utilizó una resina Rink amida AM con una funcionalización de 0.56 mmol/g la cual se activó utilizando el protocolo descrito en la Tabla 3. Los solventes utilizados durante la síntesis fueron diclorometano (DCM), dimetilformamida (DMF) y alcohol isopropílico (IPA). Cada aminoácido fue activado con N,N-diisopropiletildiamina (DIPEA) y 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) durante 10 minutos, en relación 1:4:2 respectivamente. La remoción del grupo Fmoc se realizó con una solución de piperidina al 25% con 0.5% TritónX100 en DMF. Se permitió la reacción de acoplamiento durante dos horas para la formación del enlace peptídico. Se midió el pH de cada una de las soluciones de aminoácido activado antes y después de cada acople.

Para retirar el péptido del soporte sólido se utilizó una solución de agua: triisopropilsilano (TIPS): ácido trifluoroacético (TFA) (2.5%:2.5%: 95%). El

péptido se precipitó con dietil eter frío y se separó por centrifugación. Las reacciones se realizaron en reactores de 10 ml durante dos horas.

Tabla 3. Protocolo para activación de resina Rink AM

ETAPA	FUNCIÓN	REACTIVOS/DISOLVENTES	TIEMPO
1	Solvatar	DCM	3 x 2 min
2	Desproteger	2 mL Piperidina 25% / 0.5% Tritón X100 en DMF	2 x 15 min
3	Lavar	DMF IPA DCM	3 x 2 min 3 x 2 min 3 x 2 min
4	Comprobar	1% Azul de bromofenol/DMF	1 x 1 min Temperatura ambiente

4.1.1. Pruebas cualitativas

Test Azul de bromofenol (Prueba para aminas primarias)

Se colocó una pequeña cantidad de peptidil-resina en un tubo eppendorf de 2 ml y se adicionaron 3 gotas de una solución al 1 % de azul de bromofenol en DMF. Se agitó por un minuto y se observó la coloración obtenida.

Test de cloranilo.¹⁸

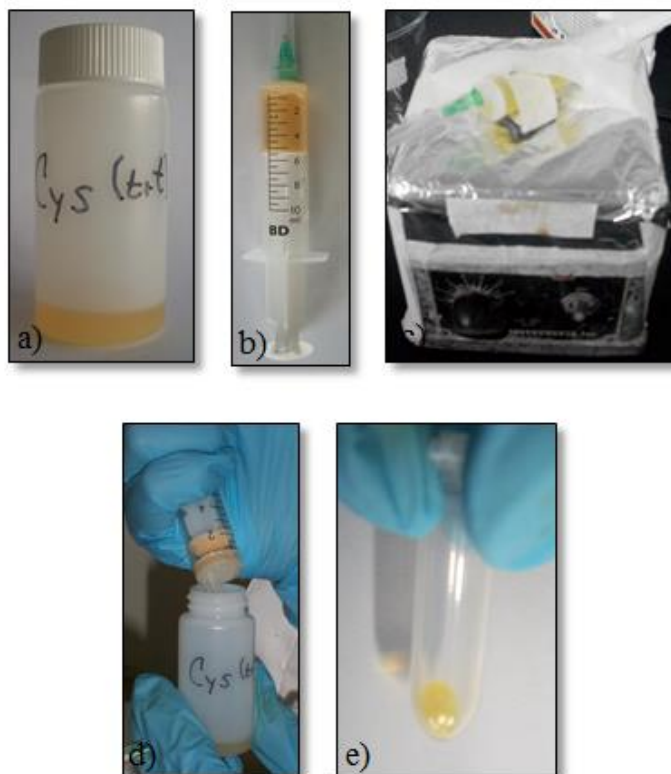
Este ensayo permite detectar aminas secundarias libres y es usado principalmente en los acoples siguientes al aminoácido prolina.

Se tomó una pequeña cantidad de muestra de la peptidil-resina y se depositó en un eppendorf de 2 mL, se agregaron 5 gotas de una solución saturada de 2,3,5,6-tetracloro-1,4-benzoquinona (cloranilo) en tolueno y 20 gotas de acetona, se agitó por cinco minutos a temperatura ambiente y se observó la coloración obtenida. Una coloración azul-verdosa de las perlas indica la presencia de aminas secundarias libres.

4.1.2. Acoplamiento de aminoácidos

Se preparó la solución de aminoácido a acoplar, usando entre cinco y siete veces de exceso de los reactivos. Para esto se adicionaron al aminoácido 2 mL de DMF y los excesos requeridos de DIPEA, se agitó por 2 minutos y finalmente se agregó el activador TBTU; la mezcla resultante se agitó por 10 minutos. Una vez tomó la coloración característica como se observa en el Esquema 1a, la solución se succionó en el reactor y se dejó en agitación constante a temperatura ambiente por dos horas.

Terminado el acople se drenó el reactor y se realizó las etapas 3 y 4 del procedimiento de lavado como se indicó en la Tabla 2.



Esquema 1. Procedimiento de acople del primer aminoácido a) solución de aminoácido activado, b) reactor con resina y aminoácido activado, c) sistema de agitación para acoplamiento, d) drenaje de la solución restante y

e) prueba de amina primaria con azul de bromofenol. Fotografías tomadas por los autores

4.1.3. Acetilación

Después de acoplar el primer aminoácido (es decir, el último de la secuencia aminoácídica por el extremo C-terminal) y de extraer los reactivos remanentes, fue necesario realizar la acetilación de los grupos amino de la peptidil-resina, como se indica en la tabla 4.

Tabla 4. Protocolo para la acetilación de la peptidil-resina. ²⁹

ETAPA	FUNCIÓN	REACTIVOS/DISOLVENTES	TIEMPO
1	Acetilar	1.5 mL de Solución: 15% anhídrido acético/40% DMF seco/40% DCM seco y 5% DIPEA.	Agitación 30 min
2	Lavar	DMF	3 x 2 min
		DCM	3 x 2 min

Se procedió a desproteger el grupo amino de la peptidil-resina siguiendo el protocolo descrito en la tabla 2 modificando la etapa 1 en la cual se utilizó DMF. Todos los reactivos y solventes usados en esta desprotección se recogieron y se midió la absorbancia a 301 nm.³¹

4.2 PURIFICACIÓN DEL PÉPTIDO LINEAL Y OXIDADO

4.2.1. Liofilización

Se utilizó un equipo LABCONCO modelo 79340, donde la temperatura de la cámara de enfriamiento fue de -86 °C, la presión en el sistema de 0.006 mBar y el tiempo de trabajo de 24 horas.

4.2.2. Análisis cromatográfico por RP-HPLC

Se utilizó un equipo Agilent modelo 1100 con detector de arreglo de diodos DAD G1315B y columna ZORBAX Eclipse XDB-C18. Las longitudes de onda de

detección fueron 210, 220 y 230, el volumen de inyección de la muestra fue de 50 μ L y la velocidad de flujo de 1 μ L/min. Se utilizaron diferentes gradientes de elución mezclando las fases móviles A y B, donde A fue 0.1 % TFA/H₂O y B fue una solución de 60 a 100% de ACN con 0.1% TFA/H₂O. Adicionalmente, la concentración de ACN en la solución B se varió de 60% a 100%. El tiempo de análisis se mantuvo constante en 100 minutos. La muestra de péptido se preparó en una mezcla 1:1 de ACN:H₂O con 0.1% TFA.

4.2.3. Extracción en fase sólida

Se activó un cartucho C-18 de SPE con agua tipo MQ. Se agregó una solución de péptido en agua de 20 000 ppm. Se utilizó como fase móvil ACN en agua a una concentración de 10% hasta 100% con 0.1% TFA. Se recolectó la muestra cada 2 mL hasta completar un volumen de 10 mL.

4.2.4. Desalinización

Se preparó una columna de separación utilizando sephadex G10 hidratado. Se cargó la solución de péptido y se recolectaron los primeros 6 mL de elución. Finalmente, se lavó la columna con 50 mL de agua MQ y 10 mL de ácido acético al 0.01 %, se guardó con azida de sodio al 0.01 % a 4 °C.

4.3. OXIDACIÓN DEL PÉPTIDO¹⁷

A una solución 0.01 M de péptido en DMF (1 mL), se adicionó una solución de yodo 0.013 M en DCM (9 mL). Se agitó por 5 minutos y se adicionó una solución 0.065 M de ácido ascórbico en buffer citrato (2 mL, pH 5). Se agregó 2 mL de agua para diluir y se agitó a 0 °C por 2 horas.

4.4. CARACTERIZACIÓN POR MS-MALDI-TOF

La matriz empleada fue una solución sobresaturada de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) en ACN/Agua en una relación 1:2 con 0.1 % de TFA. La muestra se preparó por el método de mezclado y se depositó 1 μ L en el porta muestra, se dejó cristalizar a temperatura ambiente para su posterior análisis.

El equipo utilizado fue un espectrómetro de masas MALDI-TOF, ultraflexreme Bruker, con una resolución de 40.000 FWHM, exactitud 1 ppm, láser de 337 nm y un rango de masas de 500 a 3000 Da en modo positivo.

5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La conotoxina de este trabajo fue sintetizada a partir de la oxidación del péptido reducido, cuyas cisteínas 1,3 estaban protegidas estratégicamente con el grupo Acm. Debido a las características de la resina utilizada, la conotoxina posee una amida en el extremo C-terminal; el proceso de purificación se logró por SPE y por medio del monitorio usando MALDI-TOF se obtuvo el producto en la síntesis final sin ninguna delección o formación de péptidos paralelos.

Se realizaron tres síntesis previas que permitieron definir las mejores condiciones para obtener el péptido reducido y la conotoxina con la mayor pureza; los resultados encontrados en cada una de ellas se discutirán más adelante. El orden de acoplamiento y los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos, se muestran en la figura 5; únicamente en la síntesis 1 se utilizaron todas las cisteínas protegidas con Trt y en las demás se implementó la estrategia de protección selectiva mencionada.

secuencia	S	G	C₁	C₂	K	H	P	A	C₃	G	K	N	R	C₄
orden de acoplamiento	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
grupo protector	tBu		Acm	Trt	Boc	Trt			Acm		Boc	Trt	Pbf	Trt

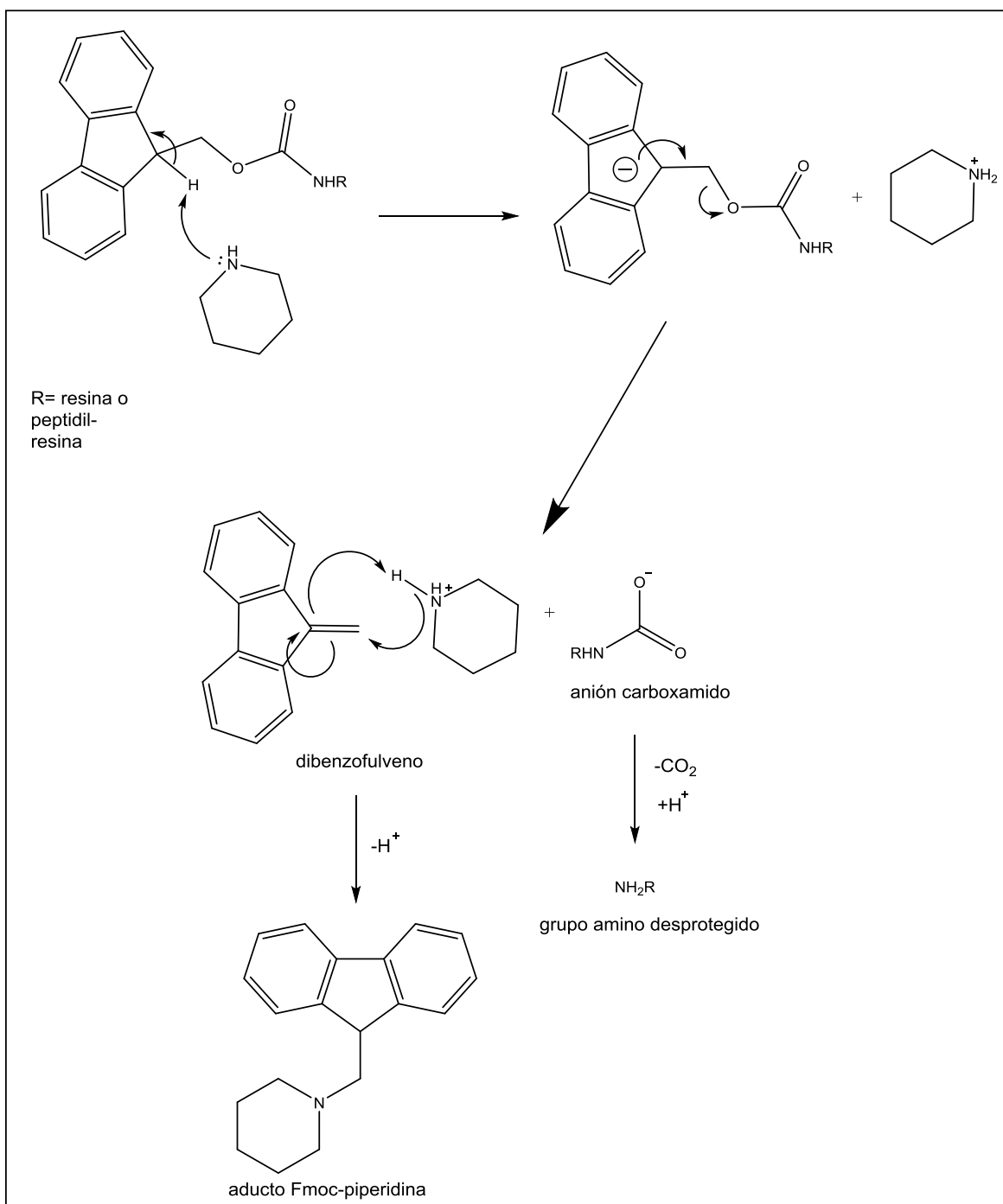
Figura 5. Características del precursor reducido

5.1. REACCIONES GENERALES DEL PROCESO DE SÍNTESIS

5.1.1. Desprotección del grupo Fmoc con piperidina

En todas las síntesis la desprotección de los grupos Fmoc se logró con una solución de piperidina en DMF a través de un mecanismo de β -eliminación.³² En el Esquema 2 se observa que el átomo de hidrógeno unido al carbono 9 es activado por la aromaticidad de los anillos que se encuentran a su alrededor, la piperidina actúa como base abstrayendo el protón y promueve la ruptura de la molécula, generando un doble enlace exocíclico en los tres anillos restantes. El producto generado que se conoce como dibenzofulveno reacciona con la piperidina formando el aducto Fmoc-piperidina (figura 6). El segundo producto formado es el

anión carboxamido que finalmente libera dióxido de carbono y el grupo amino libre.³²



Esquema 2. Mecanismo de reacción de desprotección del grupo Fmoc con piperidina.



Figura 6. Aducto Fmoc-piperidina. Fotografía tomada por los autores

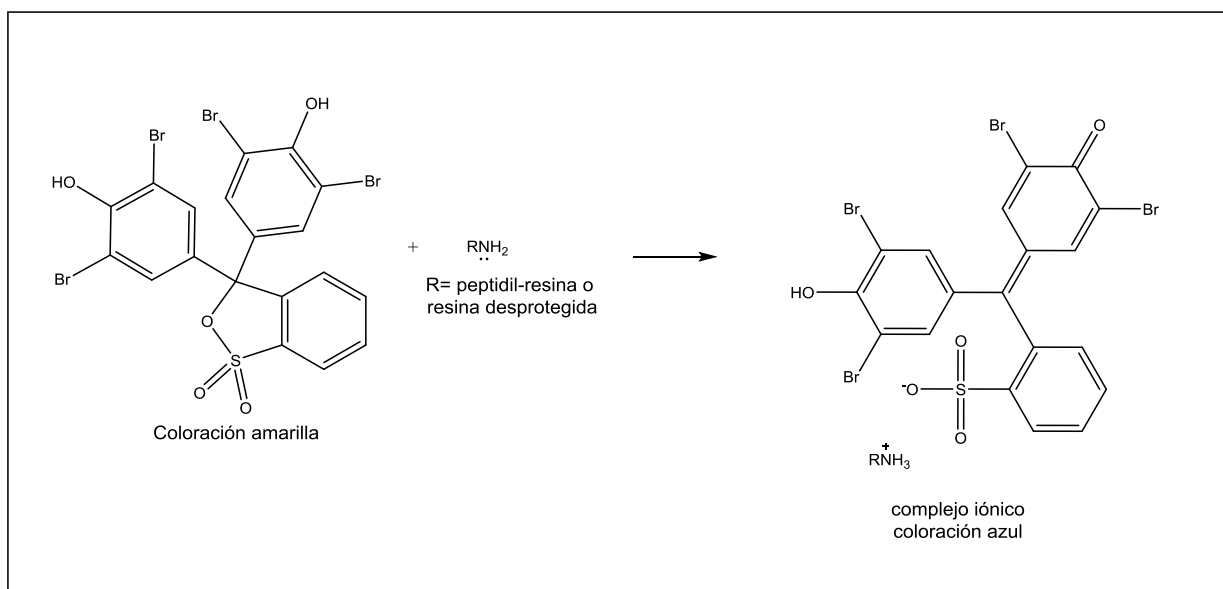
La reacción se produce más rápido en dimetilformamida que en diclorometano y no hay desprendimiento de gas durante la desprotección, porque el dióxido de carbono está enlazado a la piperidina en forma de sal. El grupo Fmoc es resistente a la acidólisis, y, por lo tanto, es ortogonal (no se remueve al realizar el desanclaje del péptido de la resina) para los grupos protectores de las cadenas laterales basados en bencilo y terc-butilo.³²

5.1.2. Detección de grupos amino libres

El ensayo de azul de bromofenol permitió detectar de forma cualitativa la presencia de grupos amino libre, por lo que se utilizó como control de las reacciones de desprotección y acoplamiento a lo largo de la síntesis. El indicador (3',3'',5',5''-tetrabromofenolsulfoftaleina) se desprotona por la presencia de aminas cuya forma ionizada cambia rápidamente de color amarillo ($\lambda_{\text{máx}}$ 429 nm) a azul oscuro ($\lambda_{\text{máx}}$ 600 nm)³³ (Esquema 3). En este análisis se retiró una muestra de resina del reactor y se trató con el indicador (figura 7).

El test de ninhidrina es el más utilizado para la detección de aminas primarias durante la síntesis de péptidos; sin embargo, se ha demostrado que el número de grupos amino libres determinados cuantitativamente con azul de bromofenol proporciona resultados consistentes con el análisis cuantitativo de ninhidrina.³³ Por esta razón, se consideró que los resultados cualitativos obtenidos con el ensayo

de azul de bromofenol son comparables con los cualitativos que se obtendrían con el test de ninhidrina.



Esquema 3. Reacción de azul de bromofenol con grupo amino libre.

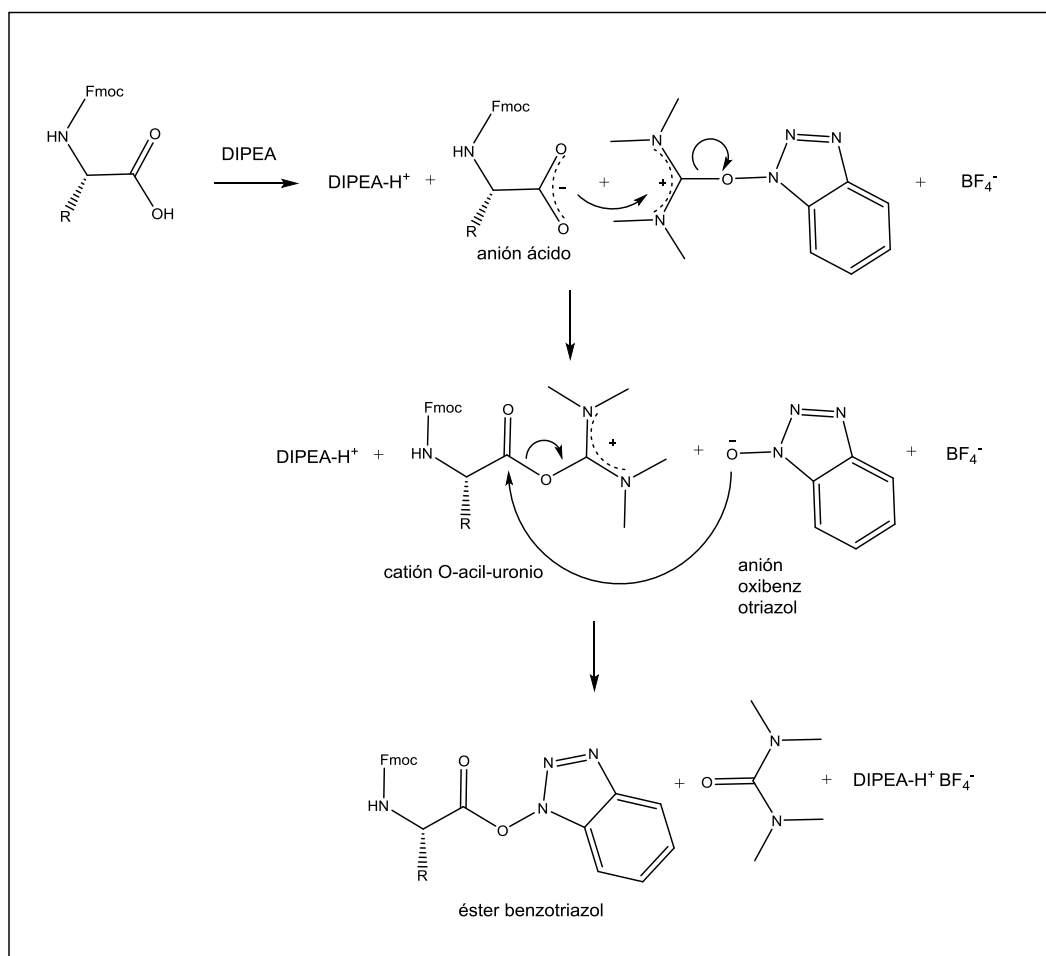


Figura 7. Comprobación de grupos amino libres en resina AM. Fotografía tomada por los autores

5.1.3. Activación de los aminoácidos a acoplar

Se usó el agente de acoplamiento $\text{BtOC}^+(\text{NMe}_2)_2.\text{BF}_4^-$ o TBTU (O-benzotriazolotetrametiluronio tetrafluoroborato) para lograr la activación del grupo carboxilo del aminoácido. El DIPEA al ser una amina terciaria con pK_a de 10.4 remueve el protón del carboxilo y por su impedimento estérico no interacciona con otros protones que puedan ser susceptibles. El ácido conjugado que se libera se neutraliza con el contra ión del TBTU.²⁰ Luego, el ión carbenio es atacado por el

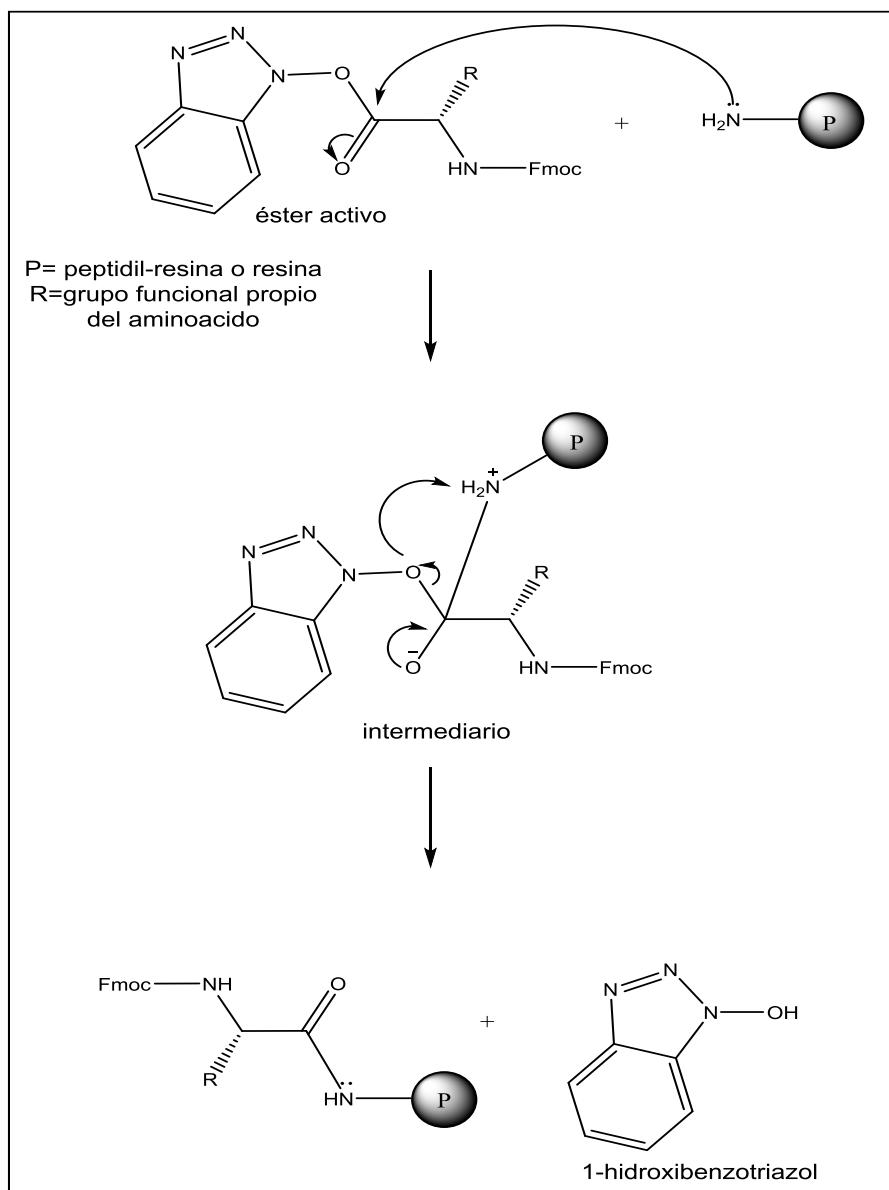
anión ácido formando el catión O-acil-uronio y el anión oxibenzotriazol como se observa en el Esquema 4. Posteriormente, se forma el éster de benzotriazol que genera la coloración amarilla característica del aminoácido activado (Esquema 1a metodología).²⁰ El DIPEA también cumple la función de reducir la racemización durante el acoplamiento y permite una mayor eficiencia de reacción a diferencia de otras bases como la N-metilpirrolidona y piridina. El pH de cada solución de aminoácido activado antes y después de cada ciclo de acople fue básico.



Esquema 4. Mecanismo de activación del grupo carboxilo del aminoácido con TBTU en presencia de DIPEA.

5.1.4. Reacción de acoplamiento

Una vez el aminoácido fue activado y se adicionó al medio en exceso, se produjo la reacción de acoplamiento para formar el enlace peptídico. El mecanismo se muestra en el Esquema 5, donde el átomo de nitrógeno nucleofílico del amino ataca el carbono electrofílico del éster generando el desplazamiento de un par de electrones formando el compuesto intermediario; este rápidamente reordena los electrones y forma el enlace amida liberando el 1-hidroxibenzotriazol.



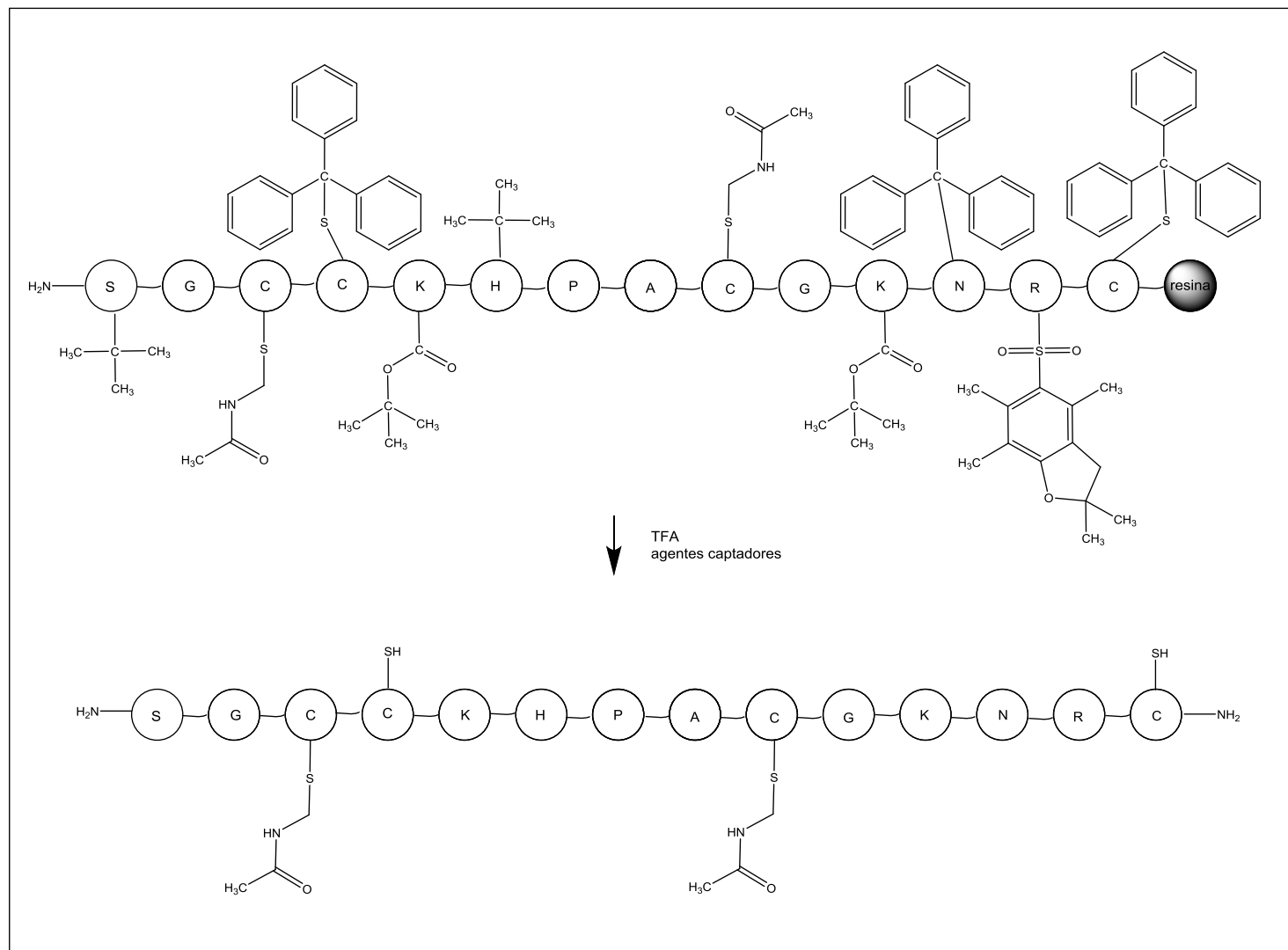
Esquema 5. Mecanismo de formación del enlace peptídico.²⁰

5.1.5. Separación del péptido de la resina

El objetivo de este procedimiento fue retirar el péptido reducido o la conotoxina del soporte y simultáneamente eliminar los grupos protectores de las cadenas laterales (Esquema 6). Algunos aminoácidos de la secuencia de trabajo tienen cadenas laterales potencialmente reactivas que generan iones carbenio y otras especies durante la separación, por lo que, se deben usar captadores para impedir que ocurran reacciones colaterales.

La elección de la mezcla de reacción se hizo teniendo en cuenta la naturaleza del enlazador AM que unió el péptido a la resina, los grupos protectores y las propiedades reactivas de la cadena lateral desprotegida; el reactivo principal fue el TFA que logró escindir el enlace entre el soporte y el péptido, así como eliminar los grupos protectores tipo bencilo (Bn).

La arginina presente en el péptido al tener una cadena lateral potencialmente reactiva puede formar iones carbenio y otras especies durante la reacción, lo que hizo necesario el uso de captadores, como el TIPS y el agua que rodean dichas especies en el medio e impiden reacciones colaterales. El tiempo de reacción dependió del anillo de imidazol de la histidina porque puede acilarse, del grupo protector Pbf de la arginina que necesita máximo 2 horas para lograr escindirse de la cadena y de los grupos protectores Trt de las cisteínas (C₁, C₃) e histidina que tienen cadenas laterales susceptibles a degradarse en medio ácido si se exponen por tiempos prologandos.



Esquema 6. Reacción general de clivaje

5.2. SÍNTESIS No.1

Inicialmente, se sintetizó el péptido de secuencia mostrada (Figura 5) con las cuatro cisteínas protegidas por un solo grupo protector en su cadena lateral, el tritilio (Trt).

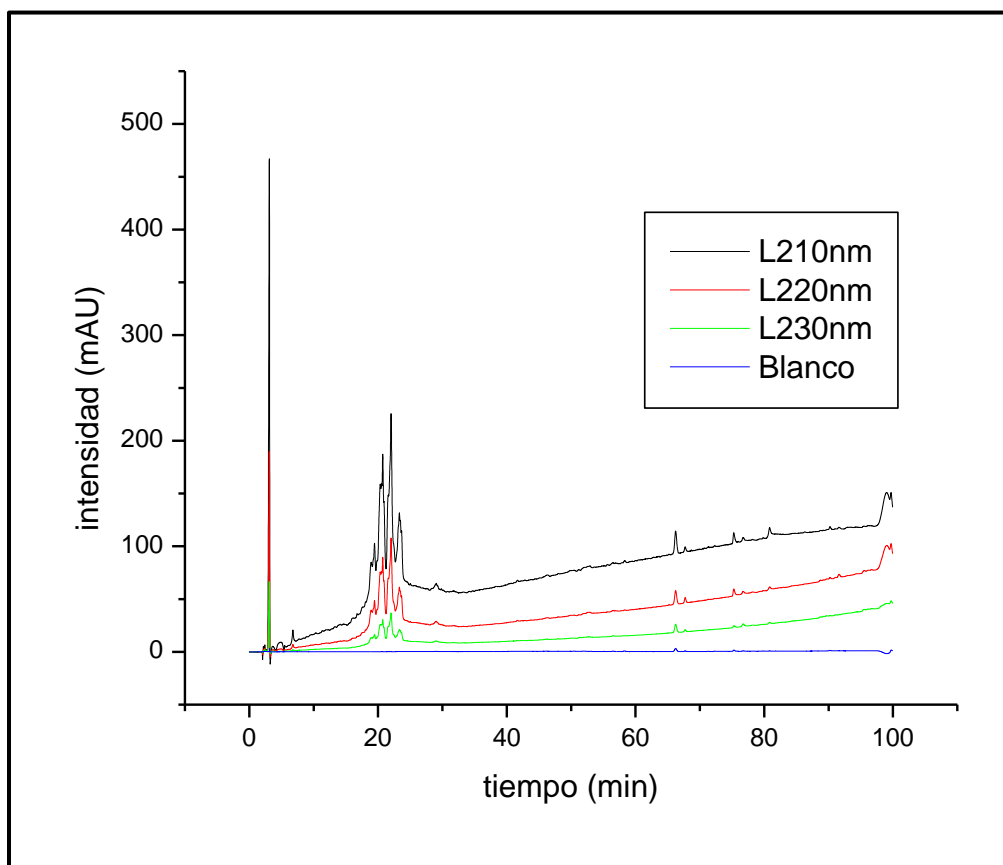
5.2.1. Análisis RP-HPLC

El crudo obtenido después del proceso de separación del péptido de la resina se analizó por RP-HPLC, con el fin de conocer la pureza del compuesto.

❖ **Fase móvil A: 0.1 % TFA/Agua**

Fase móvil B: 60% ACN/0.1% TFA/Agua.

Se usó un gradiente de 100% de fase móvil A a 100% de fase móvil B por 100 min. En el perfil cromatográfico se observó la presencia de una mezcla compleja de péptidos que eluyeron en el intervalo de 20 a 30 minutos (Figura 8).



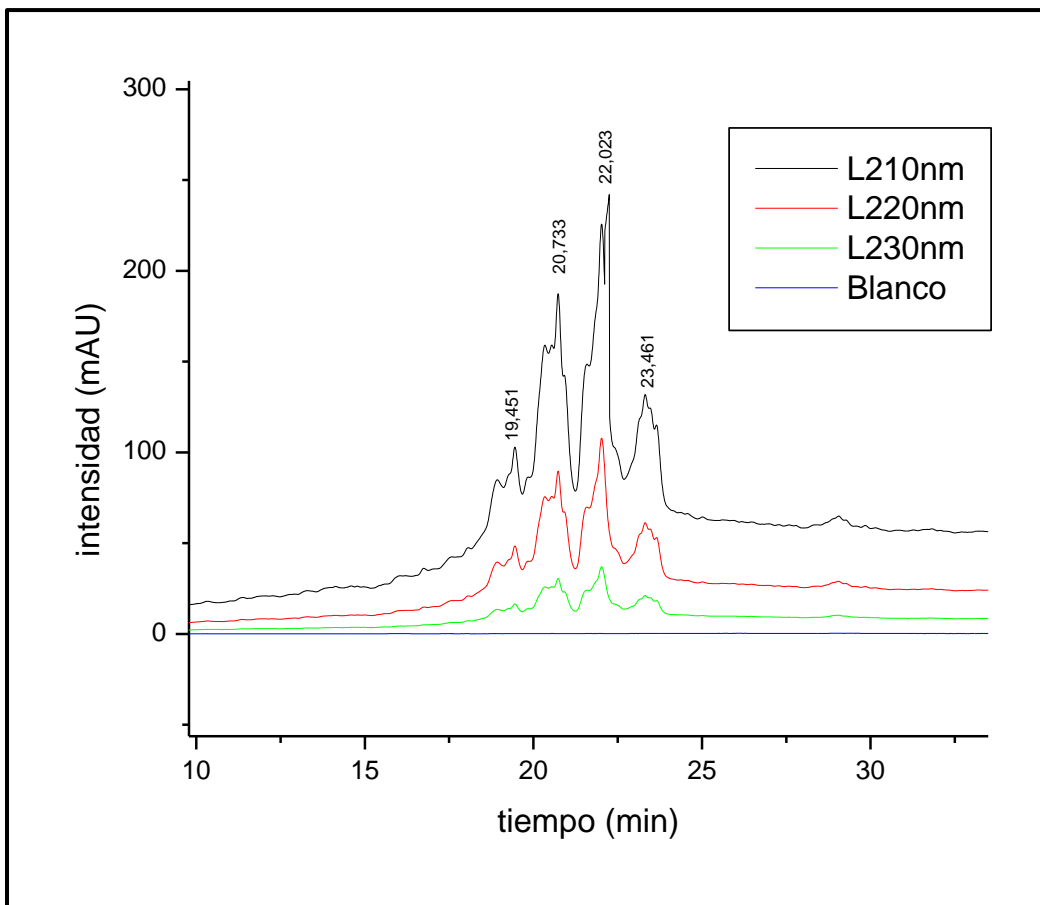


Figura 8. Cromatograma RP-HPLC del crudo reducido en la síntesis No. 1 (superior, pág 42), acercamiento de las bandas de interés (inferior).

Con base en este resultado, se modificó el gradiente y se aumentó la concentración de la fase móvil B, con el objetivo de lograr una separación entre las bandas.

❖ **Fase móvil A: 0.1 % TFA/Agua**

Fase móvil B: 80%ACN/0.1% TFA/Agua.

Se usó el gradiente de 15-85% A a 30-70%B. Esta vez las bandas eluyeron a partir de los 40 minutos del análisis, pero en comparación con un gradiente de 70-30 usada en una prueba anterior, la separación entre los picos aumentó en unos cuantos minutos (Figura 9).

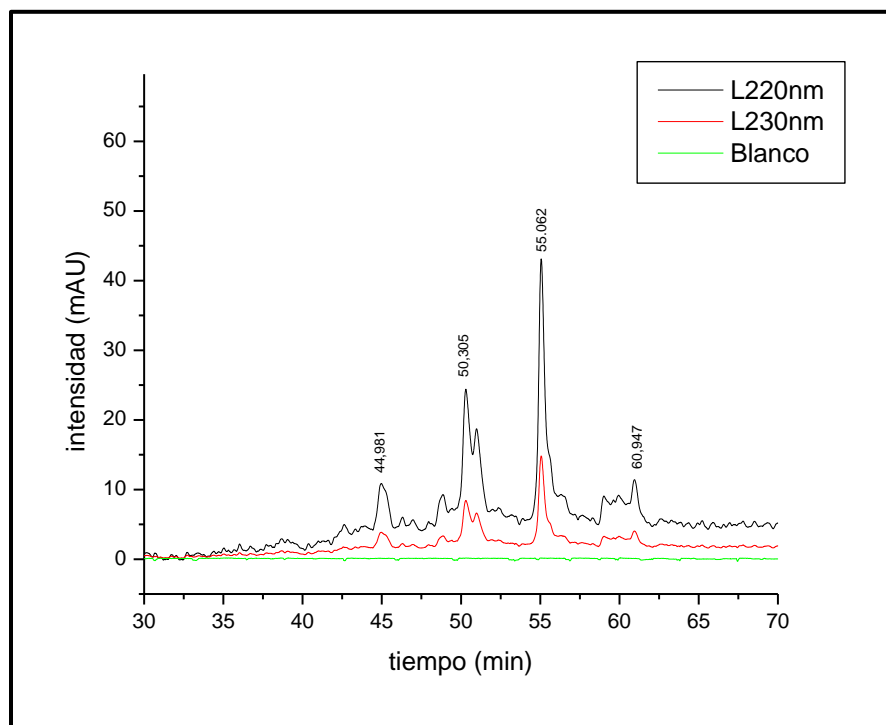
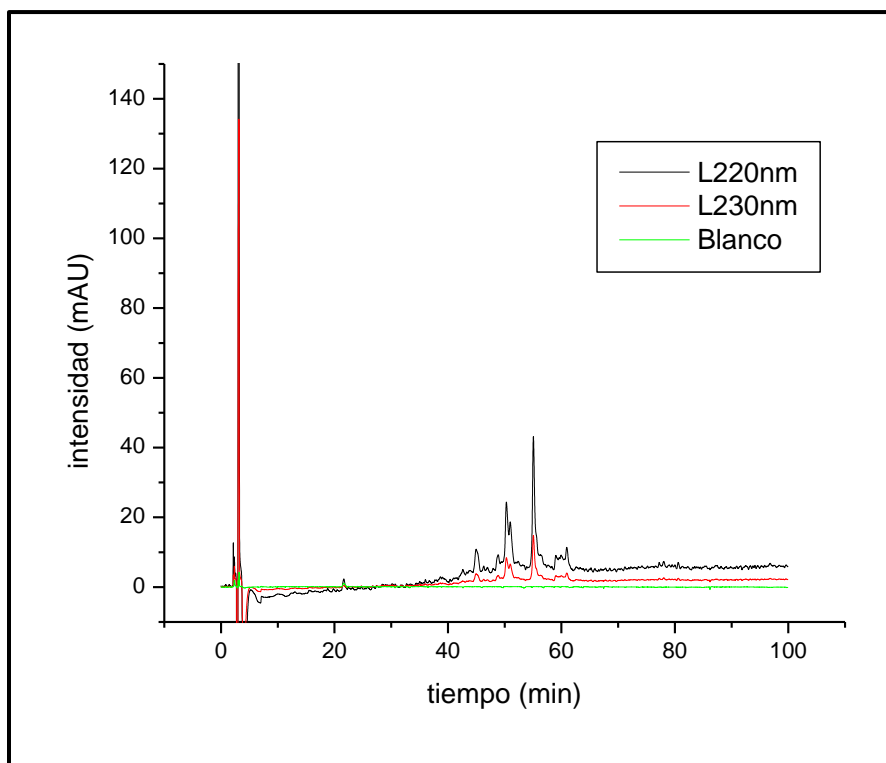


Figura 9. Cromatograma RP-HPLC del crudo reducido obtenido al aumentar la concentración de fase móvil y modificar el gradiente de elución 15-85% A a 30-70%B (superior), acercamiento de la zona de interés (inferior).

Como la concentración de la fase móvil B se aumentó y se modificó el gradiente de elución pero su efecto fue aumentar el tiempo de retención al momento de eluir los compuestos; se decidió usar estas concentraciones de fase móviles usando el primer gradiente de 100% de A a 100 % de B (Figura 10)

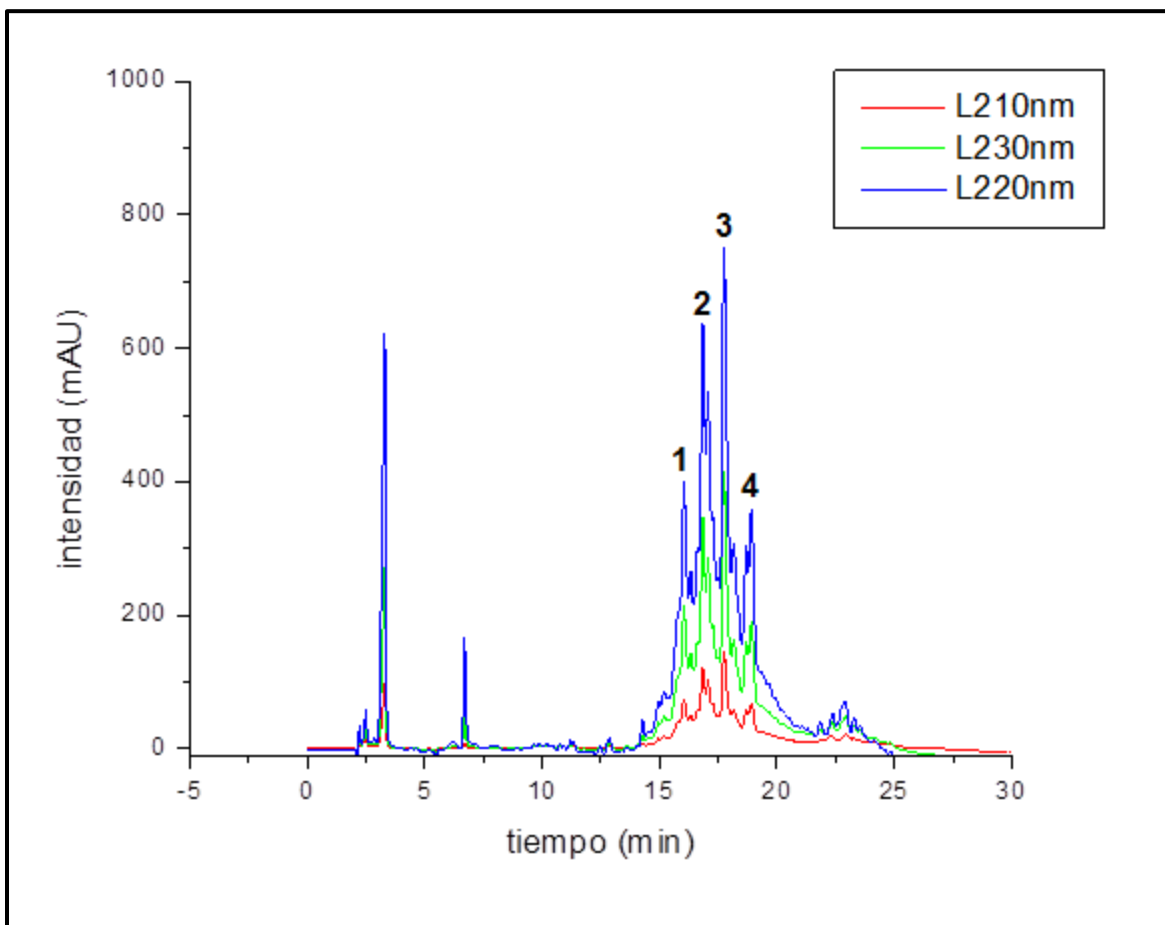


Figura 10. Acercamiento en el Cromatograma de la zona de elución del crudo reducido obtenido al modificar el gradiente de elución 100% A a 100%B usando una concentración de 80% de ACN en la fase móvil B.

Este perfil cromatográfico presentó mejor separación entre los picos y su elución en los primeros 20 minutos; se recogió las cuatro señales principales para caracterizar por espectrometría de masas MALDI y poder identificar en qué fracción se encontraba el péptido reducido. El resultado fue la presencia de una señal con relación m/z de 1462.62, en tres de las cuatro fracciones recogidas (2, 3 y 4), al igual que muchas otras señales de relación m/z que posiblemente se

deben a subproductos de la reacción o posibles deleciones en algún acople (Figura 11). El estudio entonces se enfocó en minimizar la formación de productos colaterales mejorando los procesos de eliminación de reactivos remanentes en cada ciclo de acoplamiento y de desprotección.

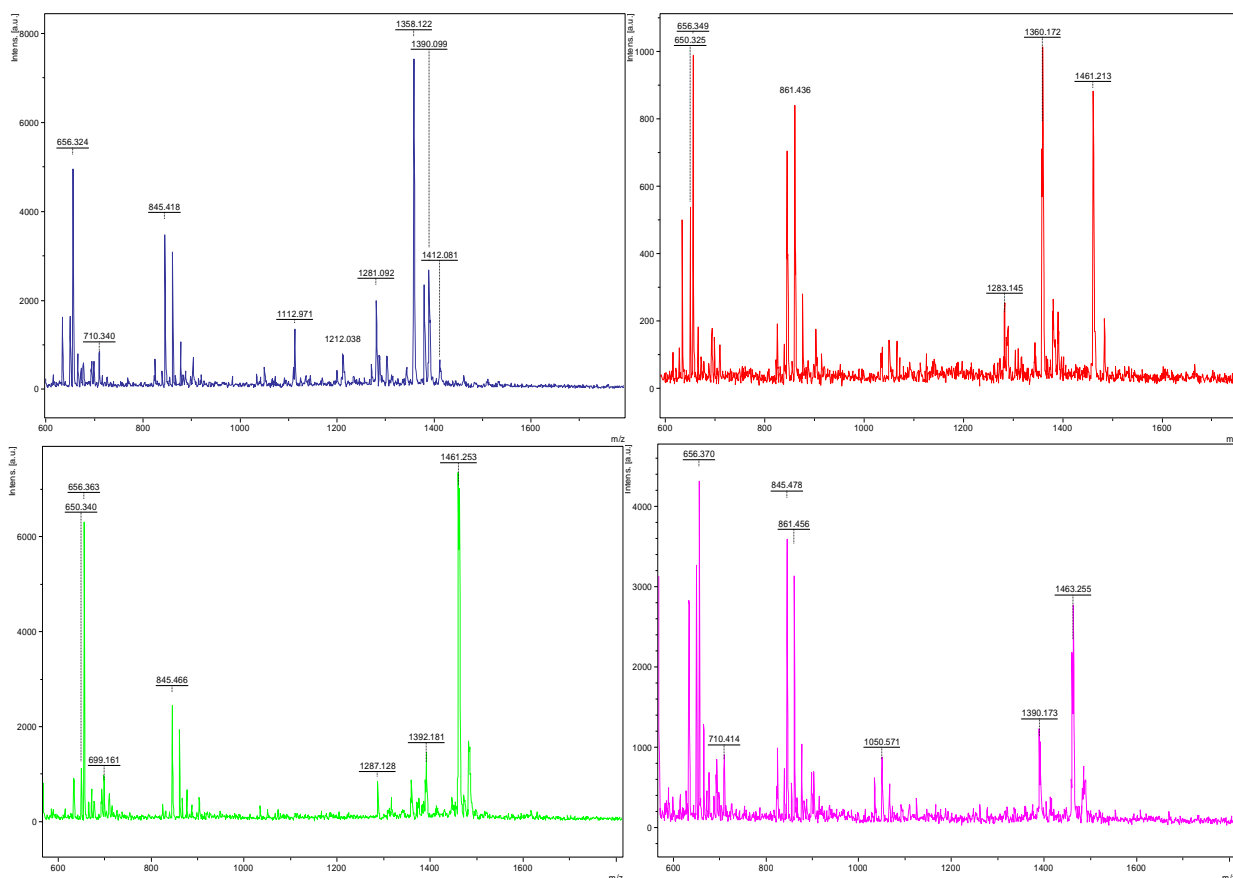


Figura 11. Espectros de masas de fracciones recolectadas por HPLC; espectro color azul (Fracción 1), espectro color rojo (Fracción 2), espectro color verde (Fracción 3), espectro color rosa (Fracción 4).

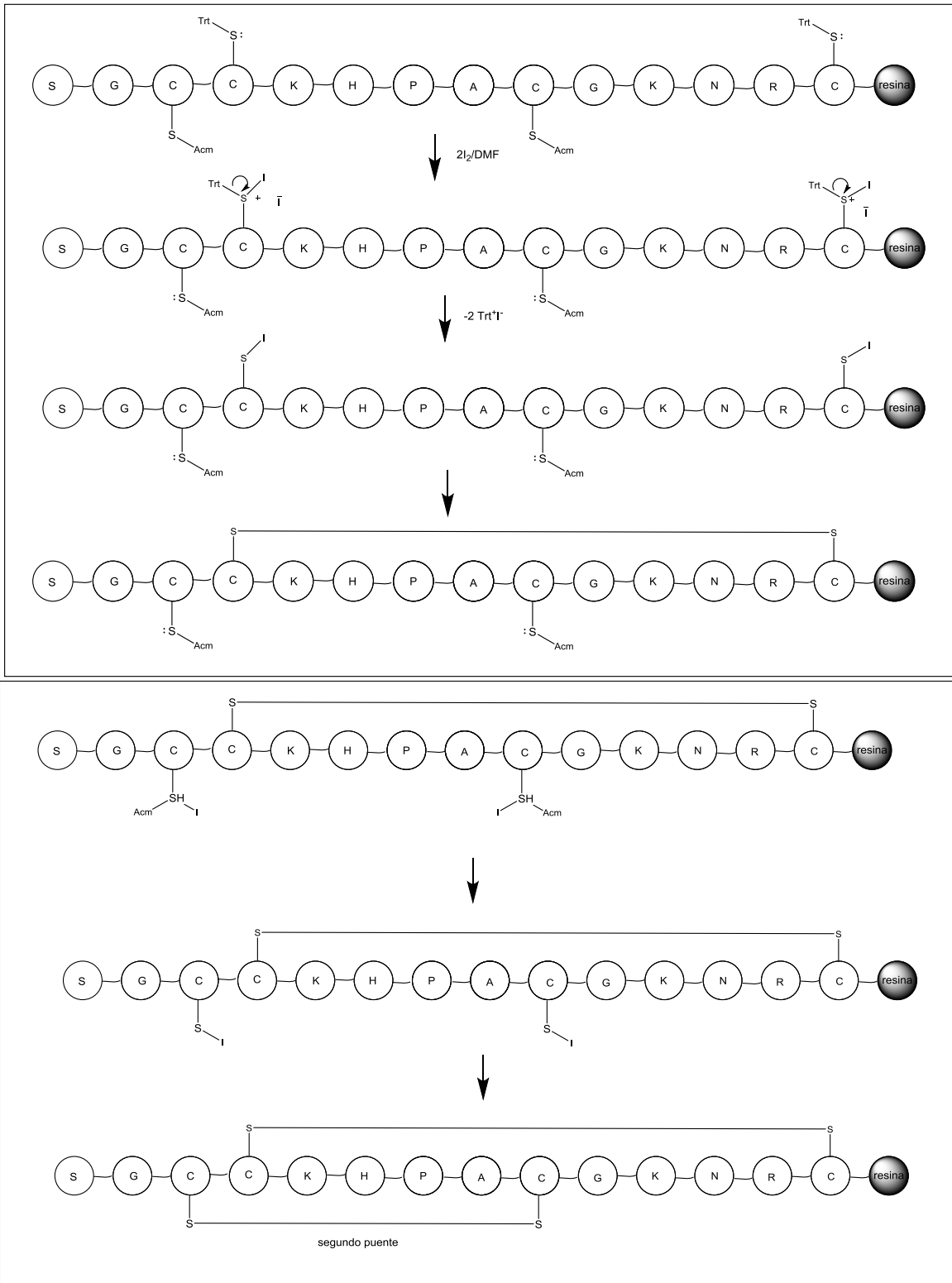
Finalmente, esta técnica de purificación se descartó ya que las condiciones encontradas para realizar el análisis no lograron satisfacer las necesidades de separación requeridas en el producto final; además el equipo analítico empleado en la investigación no permitió obtener cantidades suficientes del péptido lineal para análisis posteriores.

5.3. SÍNTESIS No. 2

5.3.1. Oxidación del péptido y posterior aislamiento por SPE

Como en la síntesis No. 1 no fue posible separar el péptido en su estado reducido, porque se obtuvieron mezclas de péptidos, se implementó la incorporación de cisteínas protegidas con el grupo Acm, así en la oxidación posterior se lograría formar selectivamente los enlaces disulfuro entre las cisteínas 1,3 y las cisteínas 2,4.

El agente oxidante utilizado fue el yodo, capaz de formar un puente disulfuro a la vez, por oxidación directa de los grupos tiol, o por oxidación en presencia de los grupos protectores (como el Acm). En el Esquema 7, se presenta el mecanismo de oxidación del péptido con yodo, este reacciona con el átomo de azufre divalente de la cisteína protegida con el Trt formando el ión yodosulfonio, el cual es transformado en yodosulfenil y sale el catión tritilio. El enlace disulfuro es luego formado por interacción de dos yodosulfenil o por reacción entre el átomo de azufre electrofílico de péptido-S-I y el átomo nucleofílico de azufre de una segunda cisteína-S-Trt. Una vez se logra la oxidación de las cisteínas C₂C₄ que culmina en los primeros 5 minutos de reacción, se procede a la oxidación de las cisteínas C₁C₃ por un mecanismo similar pero esta reacción ocurre en los siguientes 115 minutos, para un tiempo de reacción total de 2 horas. El solvente causa un efecto importante en el tiempo de reacción: por ejemplo si se usara metanol las cisteínas con Trt se oxidarían de 3 a 5 segundos y las de Acm en 72 segundos. Por eso, en este trabajo se uso el DCM.³⁵



Esquema 7. Mecanismo de formación de los puentes disulfuro usando la estrategia de protección selectiva y yodo como agente oxidante.

5.3.2. Aislamiento del péptido reducido y oxidado con protección de la cadena lateral selectiva

El crudo reducido se retuvo en un cartucho de columna C-18 a temperatura ambiente y presión atmosférica, después de lavar con diferentes proporciones de fase móvil se logró eluir el péptido de relación m/z 1605,395 sólo con las concentraciones de 40 y 50% de ACN, como se observa en la Figura 12. Este resultado es coherente con los obtenidos usando la cromatografía de RP-HPLC. Las señales observadas por debajo de m/z 600 corresponden al blanco de la matriz. En la Figura 13, se observan las diferencias en relación m/z de la señal principal m/z 1605,395 con m/z 1534,321 que corresponde a delección de una alanina y con $m/z=1734,569$ que corresponde a la presencia de una lisina adicional.

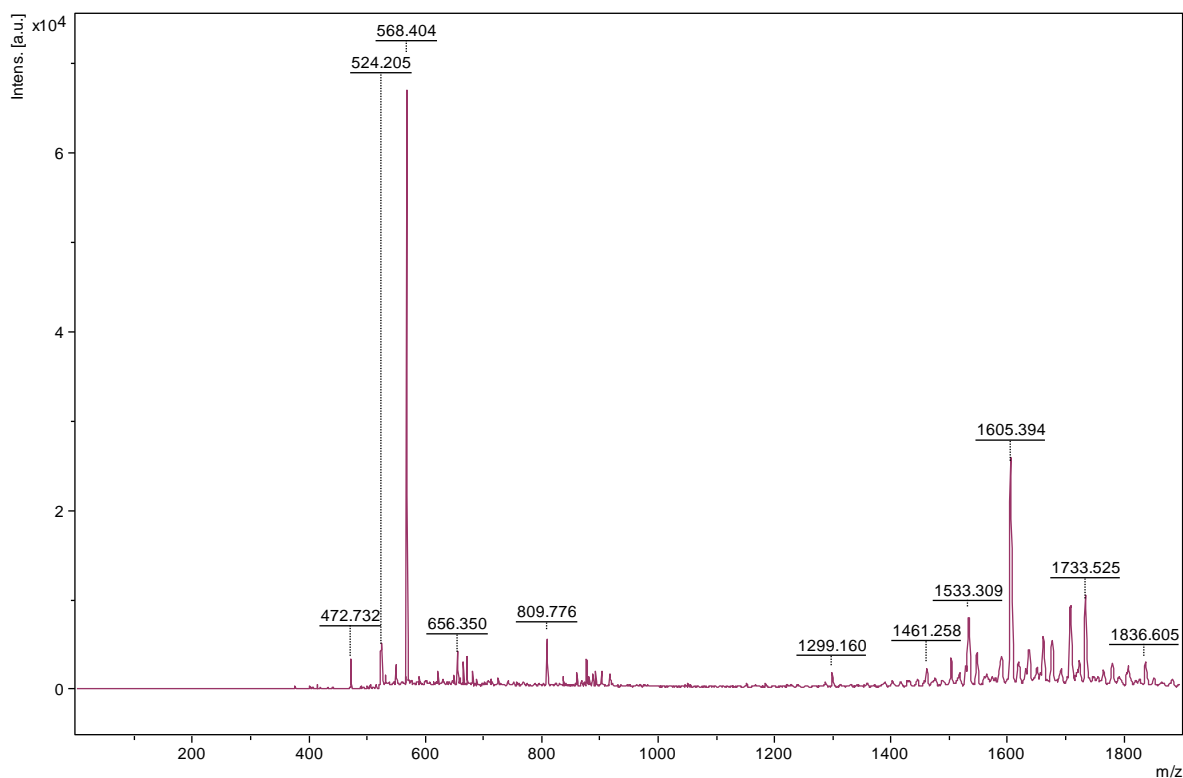


Figura 12. Espectro de masas de SGC(Acm)CKHPAC(Acm)GKNRC

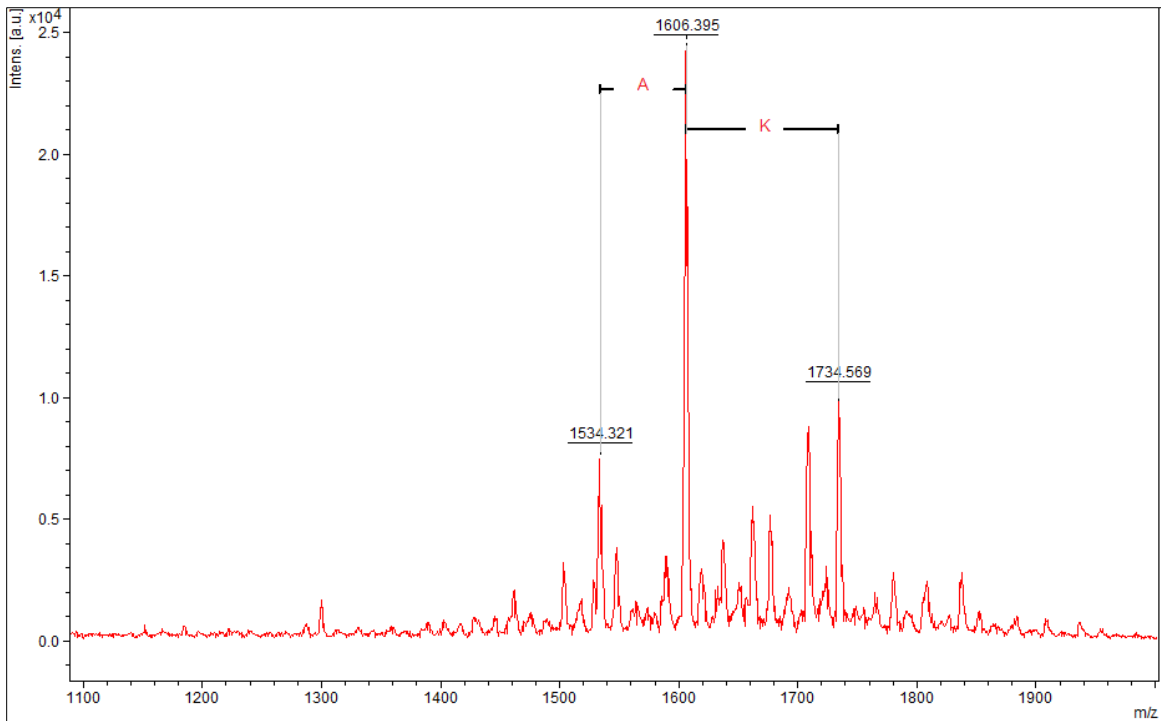


Figura 13. Ampliación en el intervalo cercano del pico de interés.

Con base en los resultados anteriores, la separación obtenida usando la concentración de 50% de ACN se liofilizó, oxidó y nuevamente se realizó la extracción en fase sólida, pero modificando los volúmenes de recolección, es decir, se usaron 10 mL de cada concentración de fase móvil, recogiendo 5 muestras cada 2 mL. Los resultados indicaron que usando una solución de 20% ACN con 0.1% de TFA en la cuarta porción de extracción, se logró purificar el péptido oxidado; en el espectro de masas obtenido se observa dos picos, el primero de m/z 1458,539 que corresponde al péptido oxidado y el segundo m/z 1586.631 que corresponde a la misma secuencia con una lisina adicional (Figura 14).

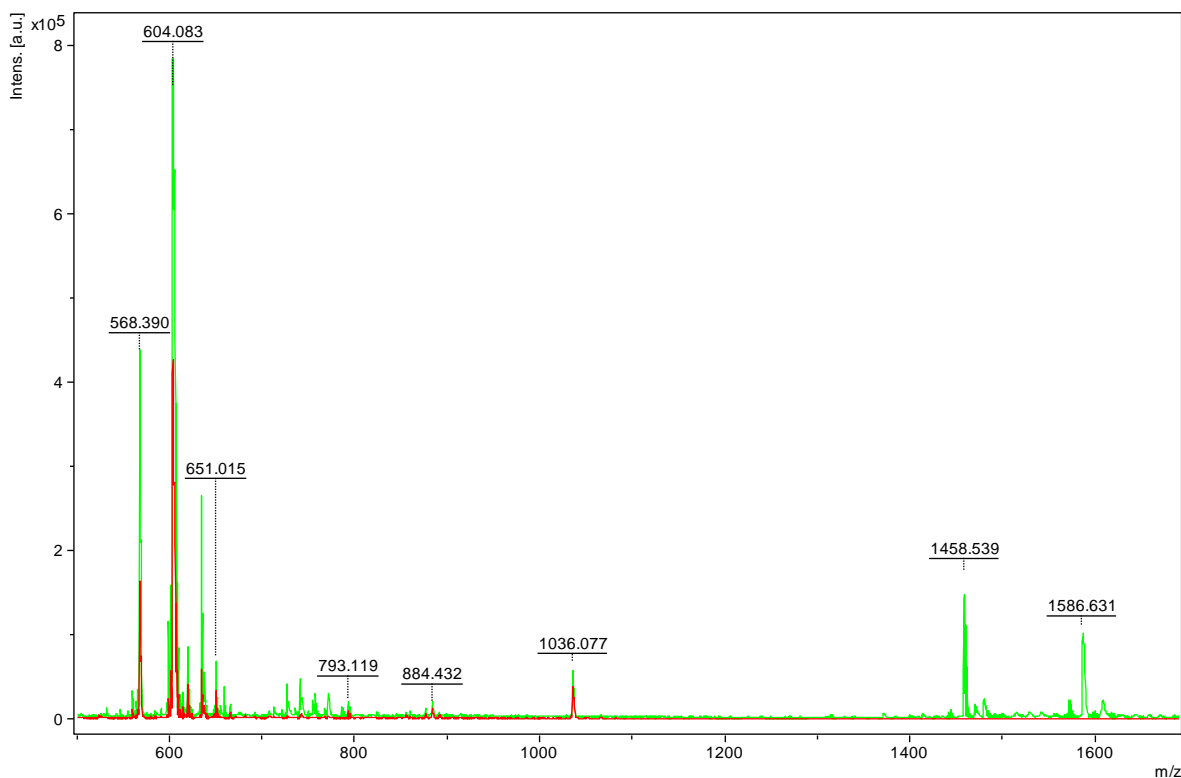


Figura 14. Espectro de masas de α -conotoxina purificada por SPE. La línea roja corresponde al blanco de la matriz y la línea verde a la muestra.

5.4. SÍNTESIS No. 3

5.4.1. Acondicionamiento de la resina

En las síntesis 1 y 2, se encontró que el péptido se obtenía en una mezcla compleja, debido a deleciones que se dieron en acoplamientos incompletos desde el inicio de la síntesis; esto condujo al análisis de la interacción de la resina y de la peptidil resina con cada uno de los solventes utilizados.

Se encontró que el DCM logra la mejor solvatación inicial de la resina antes del primer acople, ya que tiene polaridad semejante al soporte del mismo exponiendo los grupos amino protegidos con Fmoc. La proporción de la dilatación de la resina de poliestireno teóricamente alcanza hasta 3 veces su tamaño en DMF y 6 veces en un disolvente menos polar (Figura 15).³⁰ El grado de solvatación con DCM va disminuyendo durante la síntesis del péptido debido a que el material va perdiendo sus características hidrofóbicas a medida que se van acoplando los demás residuos; en la Figura 16 se presenta la resina antes y después de la solvatación

con DCM. La disminución de la solvatación provoca que los sitios activos se oculten o aíslen. Por esta razón se alternaron ciclos de lavado con disolventes que aumentaban y disminuían el diámetro de las perlas de resina, ayudando a exponer adecuadamente los sitios activos.

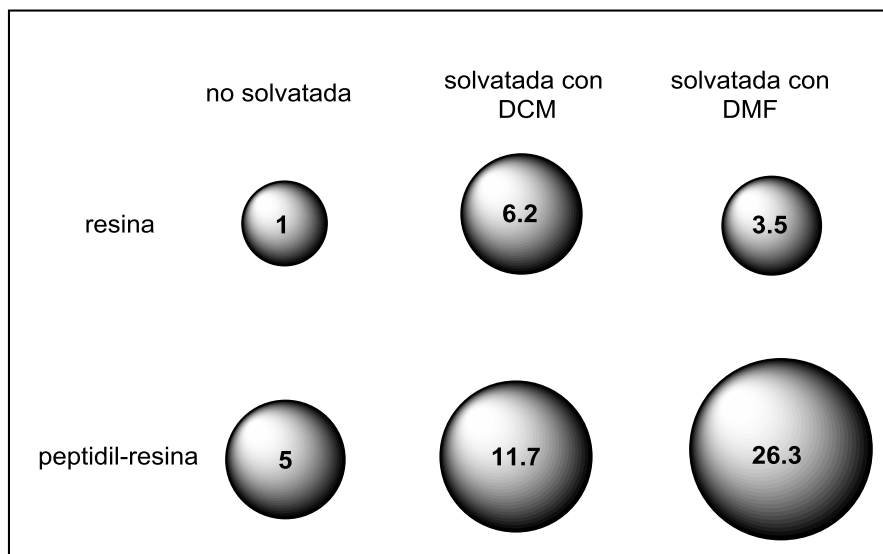


Figura 15. Volúmenes relativos de una resina de poliestireno y de peptidil-resina en presencia o ausencia de moléculas de disolvente.³⁰

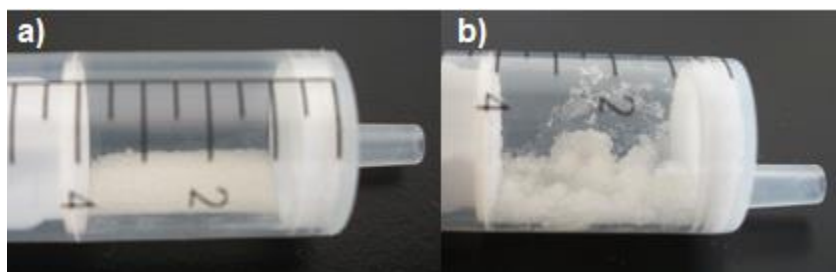


Figura 16. Resina Rink-AM (a) antes y (b) después de la solvatación con DCM.

Fotografía tomada por los autores

5.4.2. Acetilación

Pese al uso de reactivos en exceso, en el primer ciclo de acoplamiento aún quedan aminas activas en la resina. La acetilación de estas aminas disminuyó la formación de cadenas peptídicas no deseadas las cuales se observaron en una síntesis previa en la que no se realizó este proceso. En la Figura 17 se comparan

los espectros de masas de los péptidos obtenidos sin y con acetilación antes del segundo acople. En el espectro superior se observa el pico de m/z 1462,649 que corresponde al péptido en su estado reducido, por debajo de este valor se observan señales de deleciones de varios aminoácidos y por encima del mismo el péptido aún con el grupo Fmoc (m/z 1682,701); esto se debe a que no se eliminó la reactividad del grupo amino para asegurar y evitar que aquellos puntos activos que posiblemente quedaron sin reaccionar en el primer acople formen cadenas alternas a la de interés. En el espectro inferior, se observa el péptido final oxidado cuya masa esperada m/z 1458,926 corresponde al compuesto de interés sin ninguna deleción ni impureza.

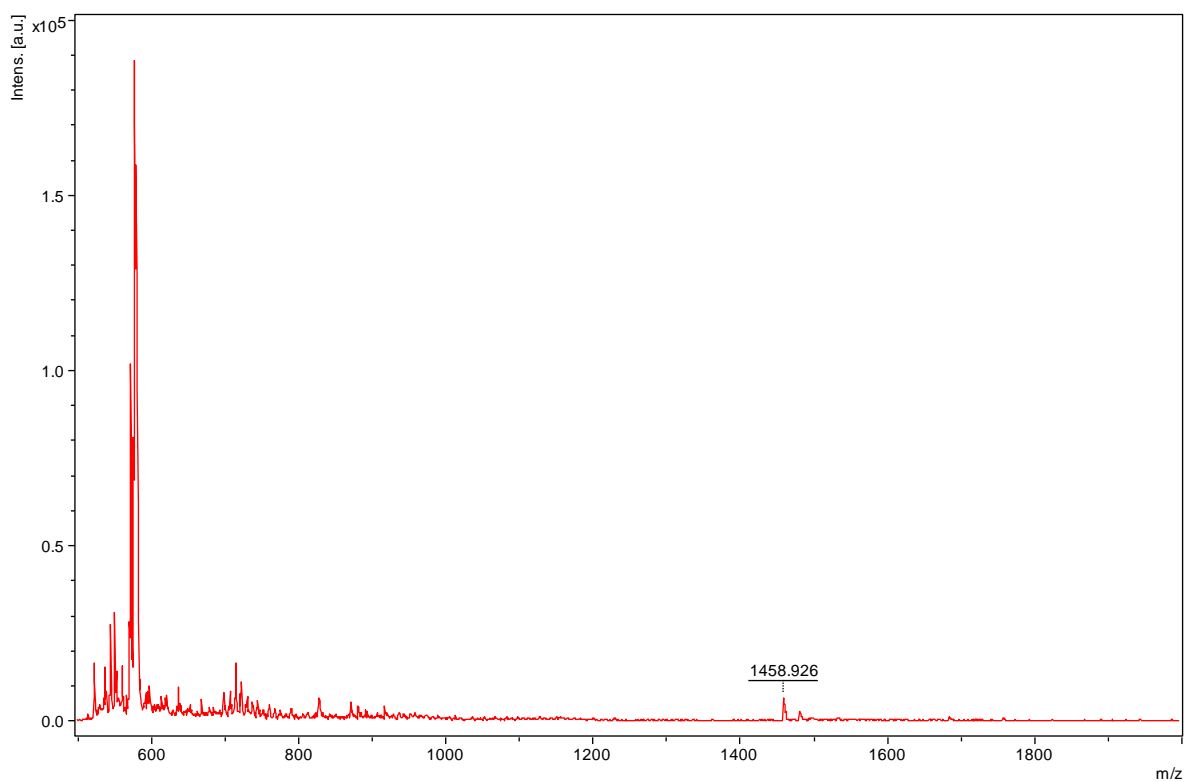
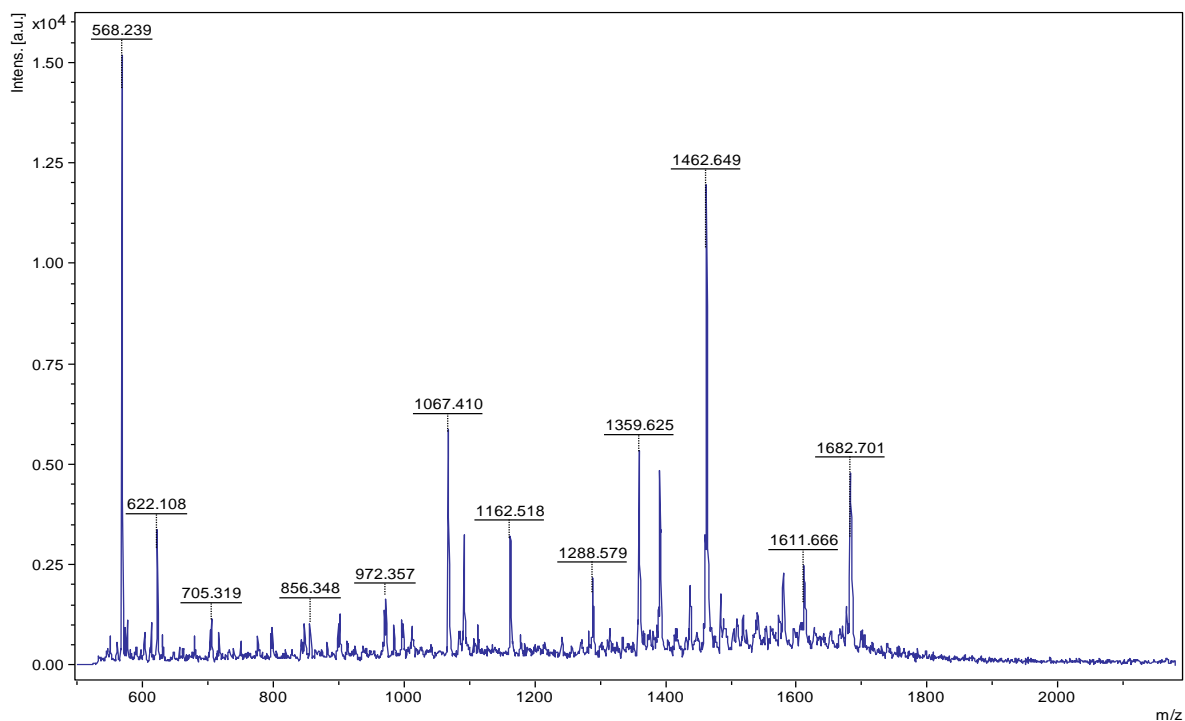


Figura 17. Espectro de masas obtenido del péptido SGCKHPACGKNRC en su estado reducido y sin acetilar (superior); Último espectro de masas obtenido del péptido SGCKHPACGKNRC oxidado y acetilado (inferior).

5.4.3. Estimación de la unión del primer residuo aminoacídico a la resina

La cuantificación de los grupos funcionales activos después de la acetilación permitió determinar la capacidad de carga (Loading) sobre el soporte. Este número de grupos funcionales activos disponibles, se expresa típicamente en milimoles de grupo funcional por gramos de resina (mmol/g resina). Como la reacción procede sobre el soporte, el peso molecular del compuesto unido a la resina incrementa, causando una reducción en la cantidad milimolar de cada grupo funcional por gramo de soporte, resultando en un decrecimiento del loading.³³ Aprovechando que se forma el aducto dibenzofulveno en la desprotección del grupo Fmoc y que absorbe en la región de UV-VIS a 301 nm, se puede hacer una medida indirecta del loading, usando la siguiente ecuación:

$$\text{Loading} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{dilución}} \times \text{Volumen}_{\text{dilución}} \times \text{FD}}{\text{g resina} \times 7800 \times 10 \text{ cm}}$$

Donde, la absorbancia para este caso particular fue de 0.413 para una alícuota de 5 mL con un factor de dilución (FD) igual a 10; se usó 0.1 g de resina y 7800 es el coeficiente de extinción molar. Es decir, que el loading real con el que se trabajó fue de 0.26 mmol/g de resina. Esta medida sólo se realizó en la primera etapa, no fue necesario en los demás acoples.

5.5. SÍNTESIS FINAL

En esta síntesis se realizó la estimación de la unión del primer aminoácido teniendo en cuenta el mejoramiento de cada una de las condiciones mencionadas en las síntesis anteriores, por lo que se obtuvo un loading de 0.44 mmol/g es decir que aproximadamente el 80% de los puntos activos iniciales en la resina reaccionaron con el primer aminoácido

5.5.1. Desprotección del fmoc con el tiempo

La peptidil-resina del acople 4, que corresponde a la secuencia KNRC se almacenó sin realizar la desprotección del grupo Fmoc por 48 horas. Se analizó por masas MALDI-TOF una pequeña cantidad de muestra que se retiró

previamente del soporte; en la Figura 18 se presenta el espectro obtenido, donde se observan dos señales importantes de relación m/z 519,843 que corresponden al peso del péptido KNRC sin el grupo Fmoc y m/z 742,021 al mismo péptido con el grupo Fmoc. De esta manera sería posible obtener falsos positivos con la prueba de azul de bromofenol los cuales podrían llevar a la formación indeseada de péptidos pequeños. El hecho por el cual la peptidil-resina que se guarda sin realizar la desprotección del grupo Fmoc, puede remover este protector es porque pese a lavados sucesivos pueden quedar trazas de DIPEA o de la mezcla de aminoácido después del acople y como es una solución básica puede reaccionar y promover la eliminación del Fmoc.

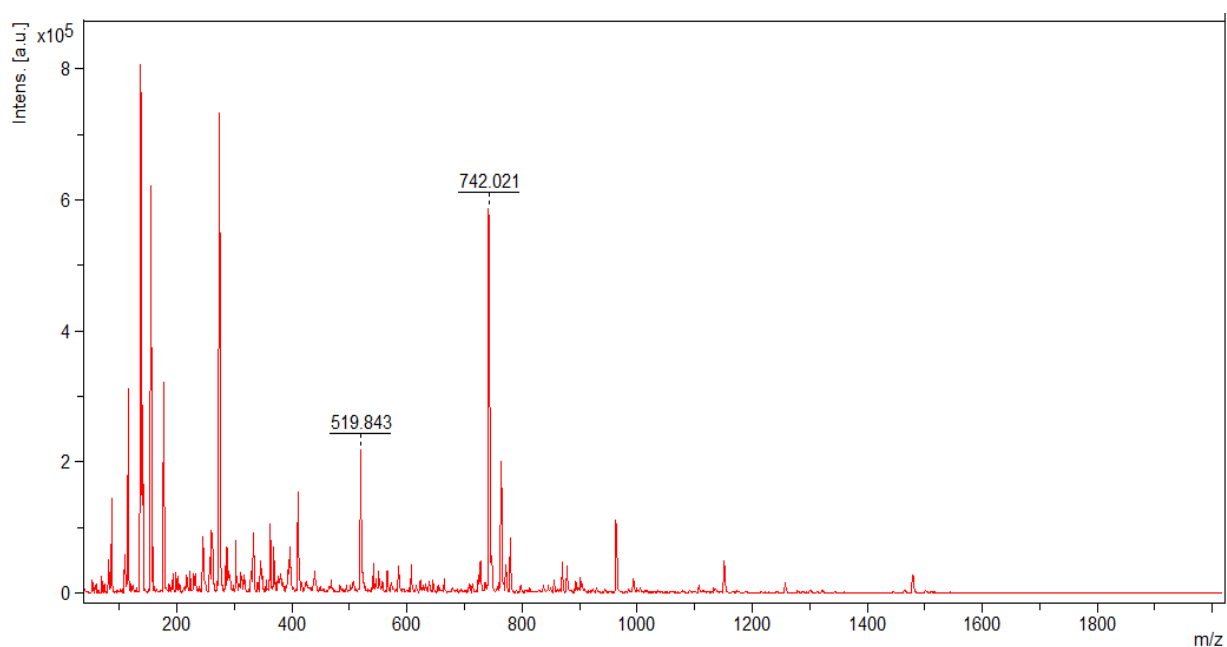


Figura 18. Espectro de masas MALDI del péptido KNRC.

Se realizó otra prueba en el acople 5, donde se almacenó la peptidil-resina por 12 horas y se procedió a tomar la muestra para el análisis de la secuencia por masas MALDI-TOF. Se encontró que durante este tiempo no ocurre la remoción del Fmoc (Figura 19) por lo que se decidió almacenar la peptidil-resina de los siguientes acoples máximo por 12 horas.

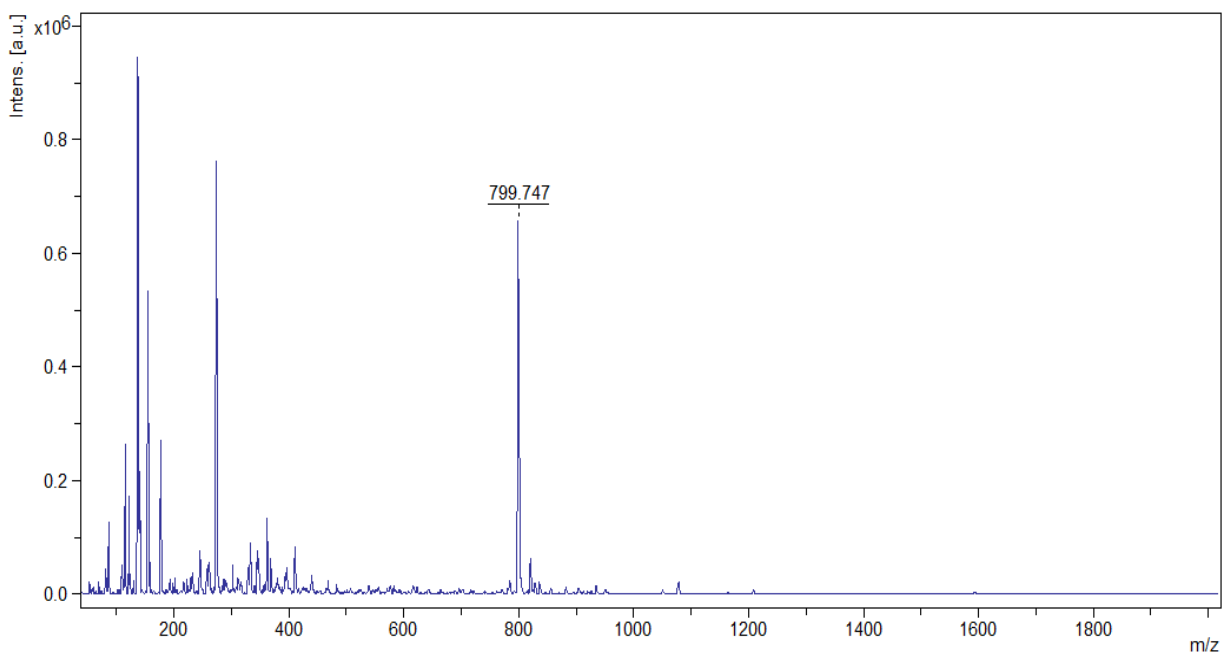


Figura 19. Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-GKNRC de m/z 799,747.

5.5.2. Detección residuos remanentes

En esta síntesis también se implementó la prueba de azul de bromofenol de forma paralela, en la que se añadió una solución del indicador al disolvente recogido después de cada lavado de desprotección para confirmar la ausencia de residuos de piperidina y de acoplamiento confirmando la ausencia de residuos de DIPEA; donde se observó una coloración amarilla sólo hasta el último lavado (Figura 20), indicando que se eliminaron del medio con tan sólo tres ciclos.

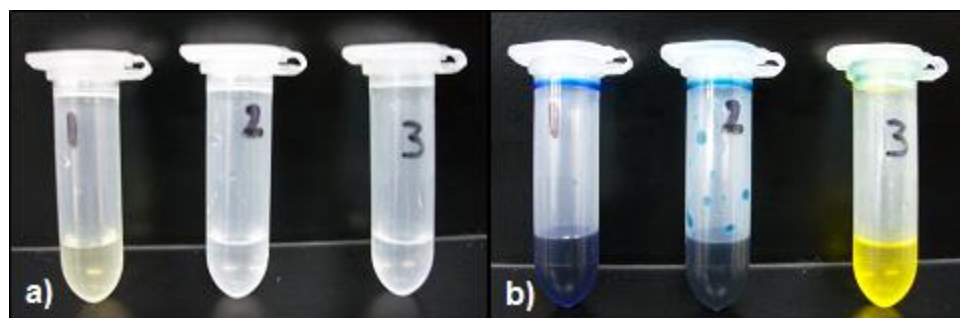


Figura 20. Comprobación de grupos amino libres en último lavado, antes de adicionar azul de bromofenol (a) y después de agregarlo (b). Fotografía tomada por los

autores

5.5.3. Detalles de la síntesis final

En la tabla 5 se describe cada una de las observaciones referentes a la síntesis final en cada acople.

Tabla 5. Detalles de la reacción de acople en cada residuo adicionado

ACOPLE	EXCESOS	OBSERVACIONES
2	5	El acople duró 2 horas y no presentó ningún inconveniente
3	5	El acople duró 2 horas y no presentó ningún inconveniente
4	5	El acople duró 2 horas, se hizo los lavados y se observó que el acople no fue completo. Se dejó 30 min más con la misma solución La peptidil resina se dejó seca sin desproteger por 48 horas. De aquí en adelante se tomó muestra para monitorear la síntesis por MALDI en cada acople.
5	5	El acople duró 2 horas. La peptidil resina se dejó seca sin desproteger por 12 horas.
6	5	Debido a que no se dio un acople eficiente se dejó 30 min más con la misma solución.
7	5	En la prueba de azul de bromofenol se observó pocas perlas de peptidil-resina de color azul claro por lo que se dejó 30 minutos de acople con la misma solución.
8	5	Se dejó 30 minutos más de acople con la misma solución.
9	7	El acople se dejó por 2 horas; se hizo la prueba de cloranilo, indicando que el acople se dio eficientemente. También se hizo la prueba de azul de bromofenol, las perlas se tornaron de color azul claro La agitación fue mecánica, vigorosa y fuerte.
10	7 y 3	Después de 2 horas y 30 minutos, el acople no fue eficiente por lo que se dejó 1 hora más con 3 excesos.
11	7	Se dejó el acople 30 minutos más, debido a que la solución de prueba presentó coloración azul leve.
12	10	Se dejó el acople 30 minutos más, debido a que la solución de prueba presentó coloración azul leve.

13	7	Se dejó el acople 30 minutos más, debido a que la solución de prueba presentó coloración azul leve.
14	7	Se dejó el acople 40 minutos más, debido a que la solución de prueba presentó coloración azul leve.

5.6. MONITOREO DE SÍNTESIS USANDO ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF

Se implementó el monitoreo por espectrometría de masas MALDI en cada uno de los acoples, iniciando en el número 4. En la Tabla 6, se resumen los valores m/z calculados³⁴ de cada una de las secuencias obtenidas a lo largo de la síntesis, comparados con los valores observados experimentalmente, estos datos presentan desviaciones debido a que no fue posible usar un patrón de calibración para el método.

Tabla 6. Relaciones m/z calculados y observados

A.A.	SECUENCIA	m/z calculados	m/z observados
4	Fmoc-KNRC	742,532	742,021
5	Fmoc-GKNRC	799,553	799,747
6	Fmoc-C(Acm)GKNRC	973,563	972,763
7	Fmoc-AC(Acm)GKNRC	1044,598	1043,872
8	Fmoc-PAC(Acm)GKNRC	1141,652	1140,980
9	Fmoc-HPAC(Acm)GKNRC	1278,711	1278,180
10	Fmoc-KHPAC(Acm)GKNRC	1406,806	1406,503
11	Fmoc-CKHPAC(Acm)GKNRC	1509,815	1509,740
12	Fmoc-C(Acm)CKHPAC(Acm)GKNRC	1683,824	1684,049
13	Fmoc-GC(Acm)CKHPAC(Acm)GKNRC	1740,846	1741,081

Los espectros de masas del acople 4 y 5 se muestran en las Figuras 18 y 19 respectivamente. En la Figura 21, se observa el espectro obtenido para el péptido del acople 6 superpuesto con el blanco de la matriz DHB, este análisis permitió identificar las señales que corresponden al blanco las cuales se encuentran por debajo de m/z 600; la señal de m/z 972,763 corresponde al pico esperado para la secuencia protegida y la señal de m/z 899,648 corresponde a la misma secuencia sin el grupo Acm.

A partir de esta secuencia se reportan los espectros sólo del péptido, iniciando desde la relación masa-carga 600 hasta 2000 Da, para visualizar mejor los resultados.

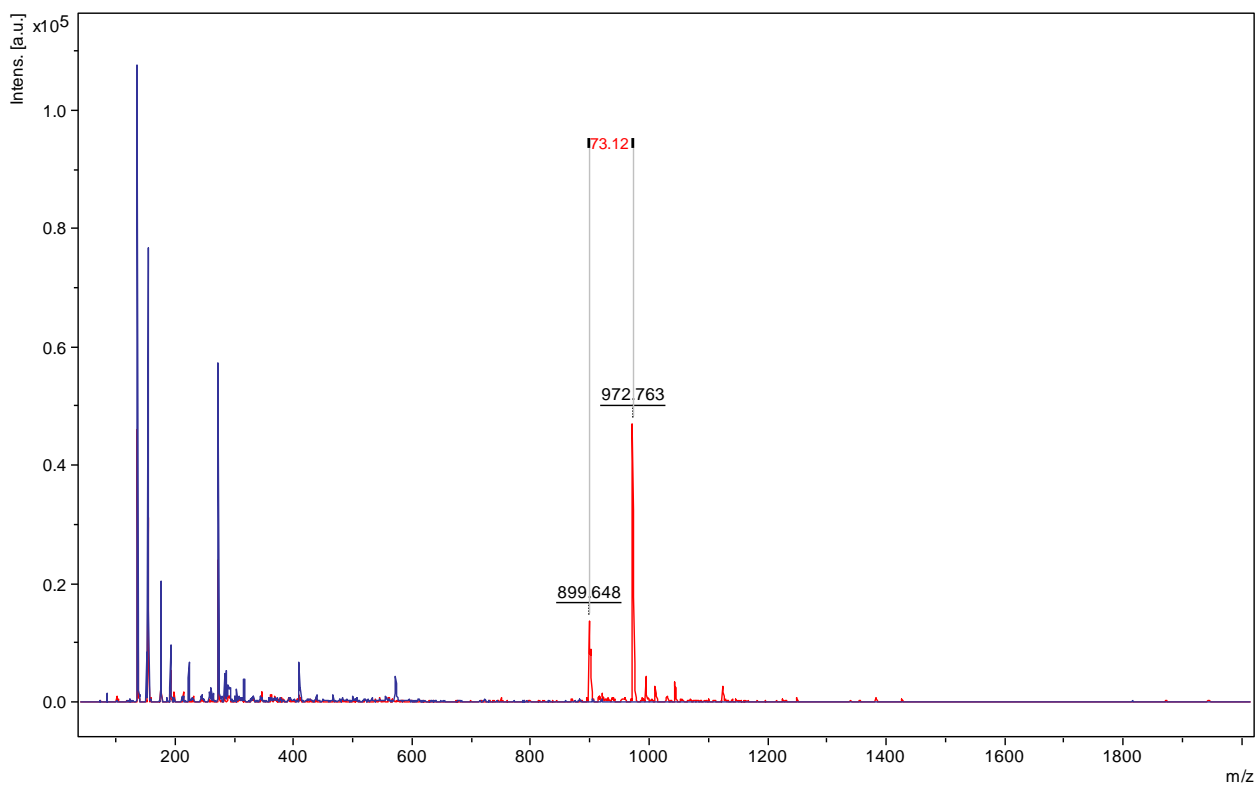


Figura 21. Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-C(Acm)GKNRC (rojo) y blanco matriz DHB (azul).

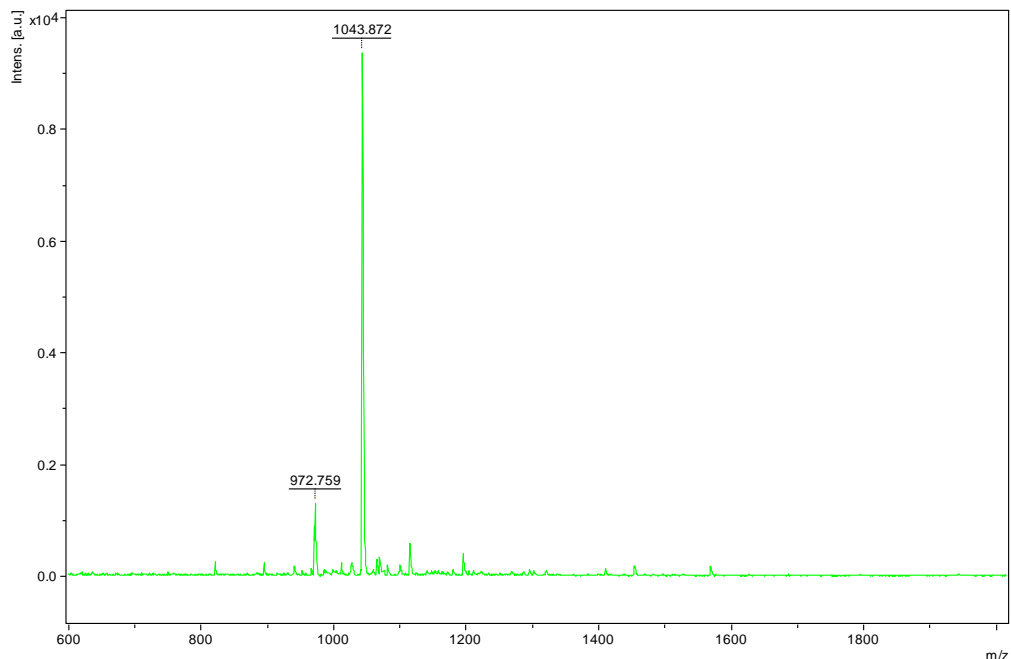


Figura 22. Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-AC(Acm)GKNRC.

En la figura 23, se observa la señal m/z 1140,980 que corresponde a la secuencia Fmoc-PAC(Acm)GKNRC, la diferencia de 73,12 corresponde a la pérdida por ionización de Acm, el tercer pico es de impureza dado que la muestra estaba muy diluida.

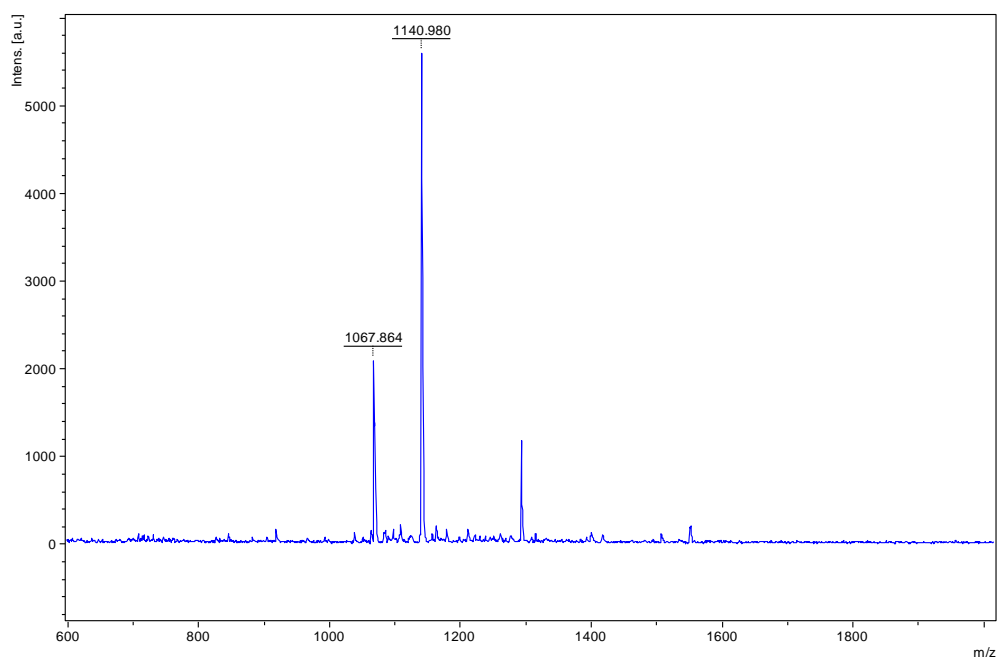


Figura 23. Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-PAC(Acm)GKNRC.

En la figura 24, se observa la señal $m/z=1278,180$ que corresponde a la secuencia Fmoc-HPAC(Acm)GKNRC; la diferencia de 73,15 corresponde nuevamente a la ionización del grupo Acm. Las figuras 25 a 28 presentan dos señales características, una relación m/z que corresponde al valor esperado y otro correspondiente a la ionización del péptido en el enlace formado con el grupo Acm (Figuras 25 y 26) y una señal adicional debido a una segunda ionización del grupo Acm de la segunda cisteína (Figuras 27 y 28).

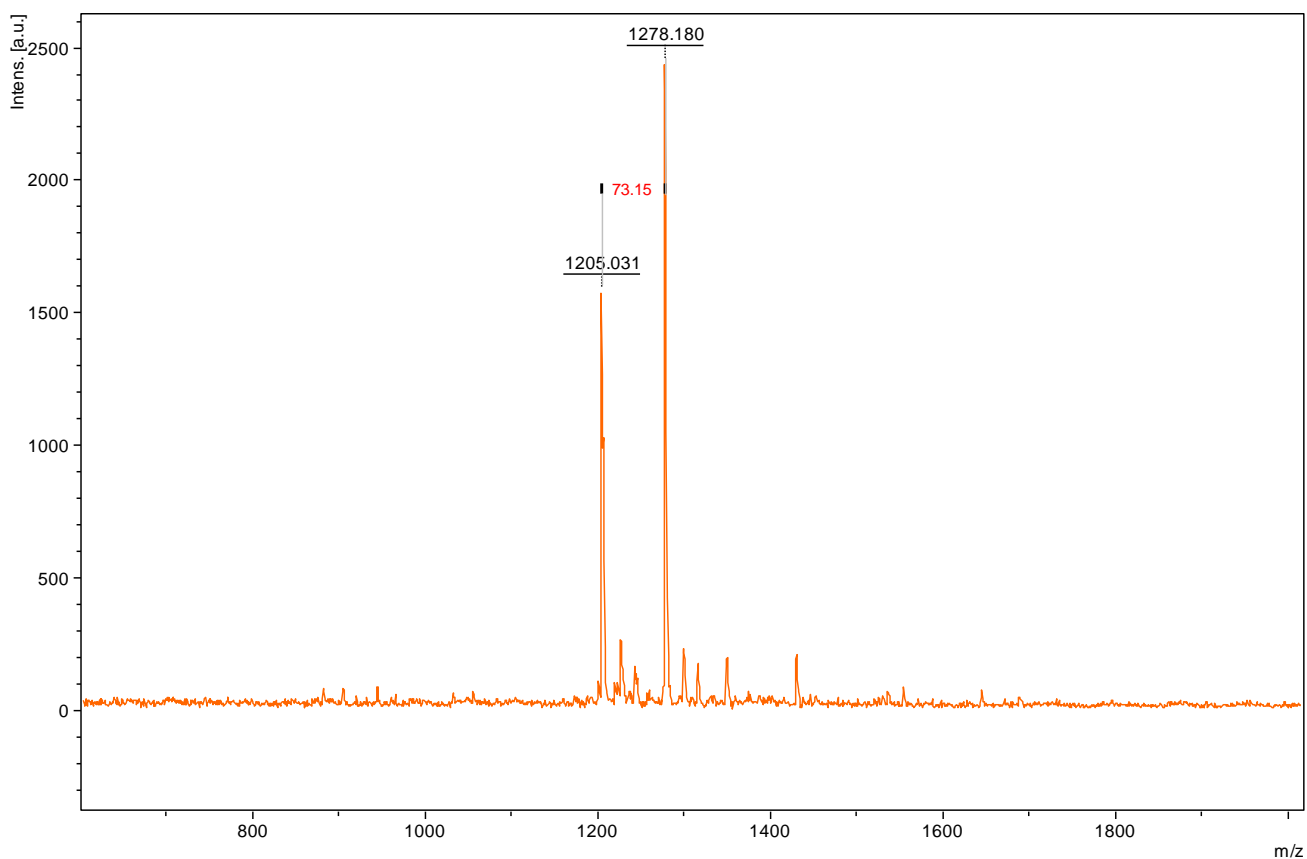


Figura 24. Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-HPAC(Acm)GKNRC.

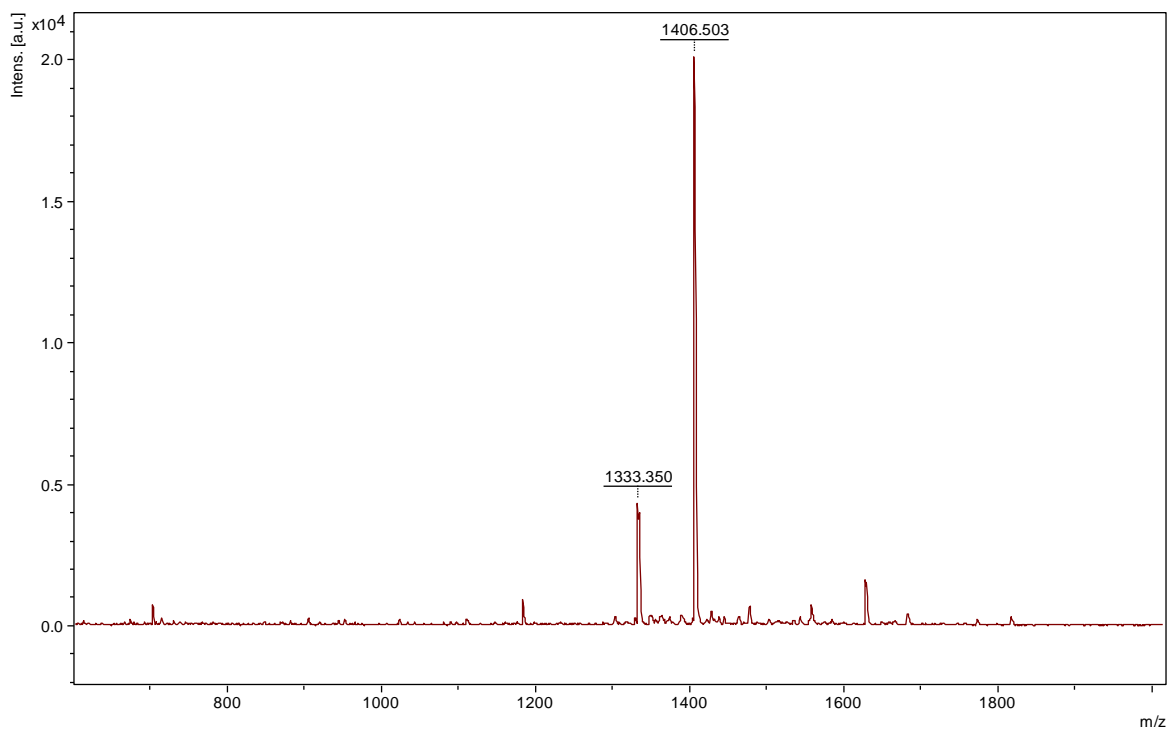


Figura 25. Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-KHPAC(Acm)GKNRC.

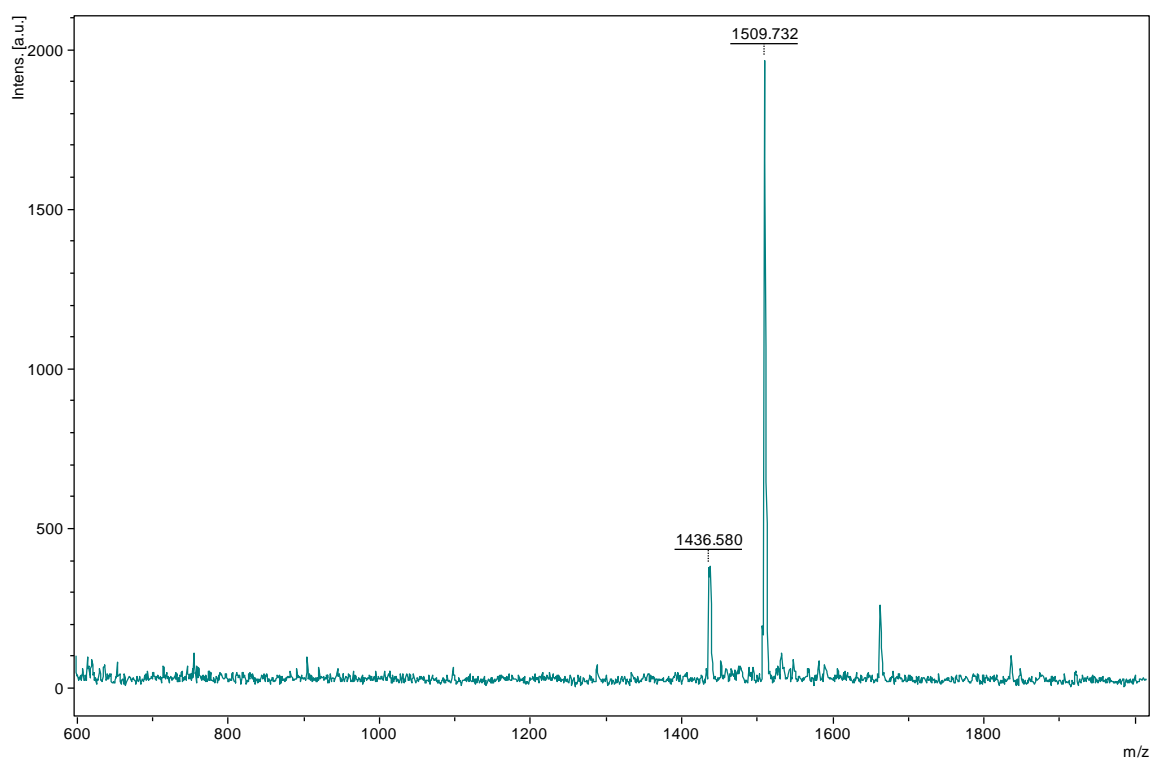


Figura 26. Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-CKHPAC(Acm)GKNRC.

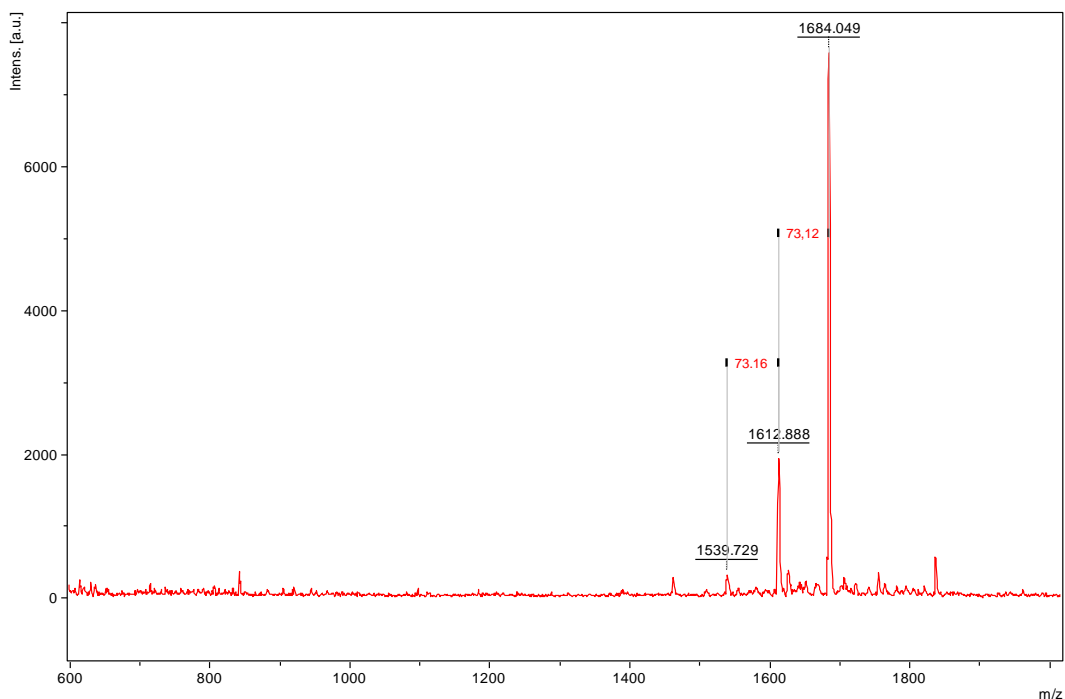


Figura 27. Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-C(Acm)CKHPAC(Acm)GKNRC.

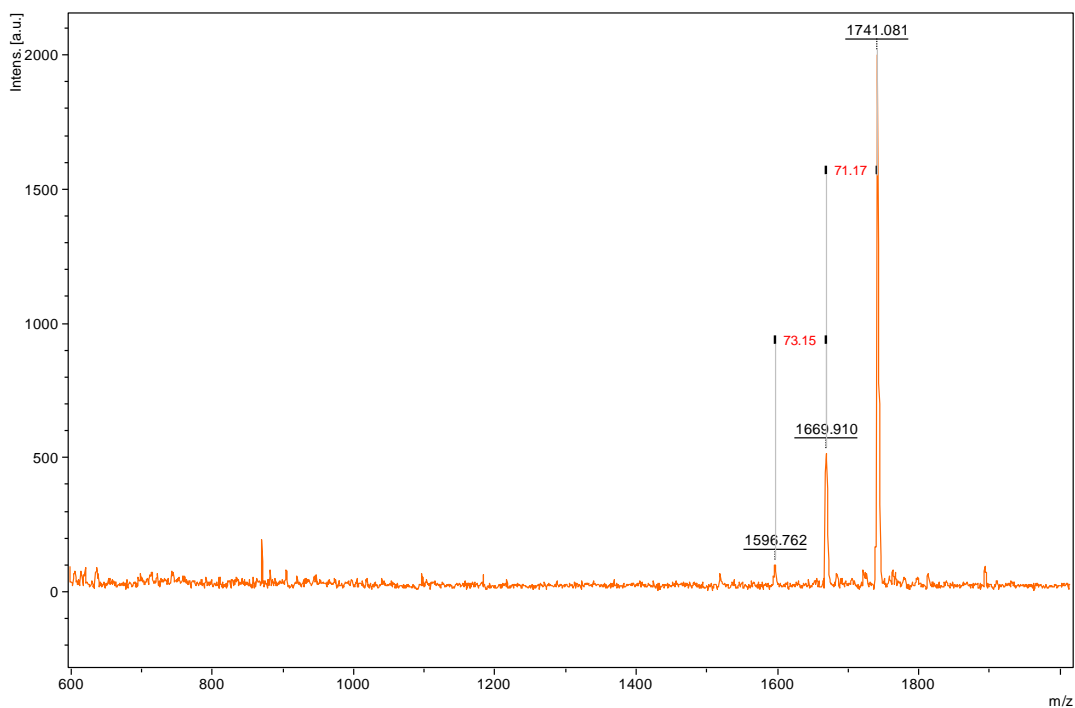


Figura 28. Espectro de masas MALDI del péptido Fmoc-GC(Acm)CKHPAC(Acm)GKNRC.

CONCLUSIONES

- ❖ Se logró sintetizar la conotoxina de secuencia SGCKHPACGKNRC con el extremo C-terminal amidado, a partir de la oxidación del péptido reducido formando selectivamente los enlaces intramoleculares (C_1C_3 y C_2C_4).
- ❖ Se logró purificar y aislar la conotoxina por medio de la extracción en fase sólida y por medio del monitorio con MALDI-TOF se obtuvo el producto en la síntesis final sin ninguna delección o formación de péptidos paralelos.
- ❖ Los resultados cualitativos obtenidos con el ensayo de azul de bromofenol son comparables con los cualitativos que se obtendrían con el test de ninhidrina. Esta prueba es confiable para la síntesis de péptidos en fase sólida.
- ❖ La técnica de RP-HPLC analítica no permitió la separación de las bandas, ya que para la purificación de péptidos se deben usar columnas más largas y de tipo semipreparativa o preparativa.
- ❖ El yodo logró oxidar los dos tipos de cisteína tanto en el soporte como en solución, esta técnica reduce la formación de compuestos indeseados a lo largo de la síntesis y de la separación del péptido de la resina.
- ❖ Los resultados obtenidos en el mejoramiento del proceso de síntesis son útiles para la síntesis de otros péptidos, cuyo grado de pureza es importante en pruebas posteriores.
- ❖ El uso de DCM como solvente inicial en la preparación de la resina aumento la capacidad de carga o loading en el primer acople.
- ❖ La acetilación de los grupos amino libres después del primer acople disminuyó la formación de cadenas peptídicas no deseadas, lo que se ve reflejado en la pureza del producto obtenido
- ❖ La peptidil-resina con el grupo Fmoc se desprotege en 48 horas de almacenamiento, el tiempo máximo para almacenar con el grupo Fmoc para evitar que su remoción cause interferencias y formación de secuencias indeseadas es de 12 horas.

RECOMENDACIONES

La secuencia aminoacídica sintetizada en este trabajo tanto en su estado reducido como oxidado presenta gran porcentaje de actividad biológica y potencial farmacológico, por lo que se recomienda realizar ensayos de actividad antimicrobiana y ensayos fármacológicos que puedan combatir enfermedades como EA o Parkinson.

La estructura tridimensional de esta conotoxina debe ser confirmada para poder designarla como una α -conotoxina, por lo que se recomienda realizar este estudio por medio de la técnica espectroscópica RMN.

Implementar este método de síntesis para la obtención de diferentes péptidos con enlaces intramoleculares entre residuos aminoacídicos específicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. JORDÁN, Joaquín. Avance en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. OFFARM. 2003; 22: 101-111.
2. FUENTES, Patricio y SLACHEVSKY, Andrea. Enfermedad de Alzheimer: actualización en terapia farmacológica. Rev. Méd. Chile. 2005; 133: 224-230.
3. CACABELOS, Ramón. Enfermedad de Alzheimer: presente terapéutico y retos futuros. RCP. 2001; 30: 323-350.
4. LILIBRE, Juan y GUERRA, Milagros. Enfermedad de Alzheimer: situación actual y estrategias terapéuticas. Rev. Cubana Med. 1999; 38: 134-142.
5. SEGURA, T. y colaboradores. Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. REV NEUROL. 2003; 36: 1047-1057.
6. GONZALES, A. y FLORÉZ, J. Transmisión colinérgica fármacos agonistas colinérgicos. Farmacología humana. 2003. 13: 213-227.
7. SEGOVIA, José y MORA, Francisco. Enfermedades neurodegenerativas. Farmaindustria. 2002: 183-210.
8. GOMEZ, María y CÁSCALES, María. Las ómicas en el desarrollo de nuevos fármacos. Farmacología humana 1: 21-42.
9. FLORES, M. y SEGURA, J. Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. Rev. Mex. Neuroci. 2005; 6: 315-326.
10. LÓPEZ, Joaquim. Conotoxinas. Spira. 2001; 1:7-11.

11. GARATEIX, Anoland. El mar fuente de nuevos fármacos. Elementos. 2005; 58: 39-47.
12. GARATEIX, Anoland y colaboradores. Compuestos de origen marino como instrumentos para el estudio del sistema nervioso. Avicennia. 2003; 16: 22-25.
13. DE LA CALLE, Fernando. Fármacos de origen marino. Treballs de la SCB. 2007; 58:141-155.
14. GUTIERREZ, Ángel y ESTÉVEZ, Ana. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de fármacos en el siglo XXI. Rev. R Acad Cienc. Exact. Fis. Nat. 2009; 103: 409-419.
15. BECKER, Stefan y TERLAU, Heinrich. Toxins from cone snail: properties, applications and biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008; 79: 1-9.
16. TERLAU, Heinrich y OLIVERA, Baldomero. Conus venom: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. Physiol. Rev. 2004; 84: 41-68.
17. ALONSO, D. y colaboradores. Drugs from the sea: conotoxins as drug leads for neuropathic pain and other neurological conditions. MRMC. 2003; 7: 785-787.
18. LIRA, Erandi. Síntesis de péptidos. Universidad Nacional Autónoma de México. 2007.
19. BENOITON, Leo. Chemistry of peptides synthesis Fundamental of peptides synthesis. Taylor & Francis group. 2006; 1-23.
20. BENOITON, Leo. Chemistry of peptides synthesis Methods for the formation of peptides bonds. Taylor & Francis group. 2006; 25-64.

21. SURESH, Babu. One Hundred years of peptide chemistry. Resonance. 2001; 7: 640-647.
22. MERRIFIELD, R. Solid phase peptide synthesis the synthesis of a tetrapeptide. ACS. 1963; 85: 2149-2154.
23. PÉREZ, Teresa. Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV). Universidad de Barcelona. 2007.
24. CRUZ, Jennifer. Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con péptidos análogos de la lactoferrina con potencial antibiótico contra Escherichia coli O157:H7. Universidad Industrial de Santander. 2001.
25. RODRIGUEZ, Carlos. Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptina con actividad antileishmanial. Universidad Nacional de Colombia. 2011.
26. AMBLAR, Muriel y colaboradores. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. Molecular Biotechnology. 2006; 33: 239-254.
27. BORRELL, B. Química combinatorial gestión de los productos de partida. Industria farmacéutica; 1999: 67-73.
28. LABADIE, Jeff. Polymeric support for solid phase synthesis. Combinatorial chemistry. 1998; 2: 346-352.
29. GÚZMAN, Fanny. Diseño, síntesis y aplicaciones de los péptidos sintéticos. Laboratorio de genética y biología molecular. UIS. 2008
30. SANTINI, Richard y colaboradores. A measure of solvent effect on swelling of resins for solid phases organic synthesis. Tetrahedron letters. 1998; 39: 8951-8954.

31. BENOITON, Leo. Chemistry of peptides synthesis Desprotector and methods of desprotection. Taylor & Francis group. 2006; 1-23.
32. DALCIN, M. Analytical methods for the monitoring of solid phase organic synthesis. Farmaco, 2002; 497-510.
33. SHERRY, Ulo. Introduction to Peptides and Proteins. CRC press, 2009; 199-212
34. Dirección web: Protein prospector
<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msproduct>.
Fecha de consulta: 15 de julio de 2013.
35. BENOITON, Leo. Chemistry of peptides synthesis Solid phases synthesis. Taylor & Francis group. 2006; 1-23.
36. KIMURA, T. Synthesis of cystine peptides. Specific Methods. 22: 142-162.

BIBLIOGRAFÍA

ALONSO, D. y colaboradores. Drugs from the sea: conotoxins as drug leads for neurophatic pain and other neurological conditions. MRMC. 2003; 7: 785-787.

AMBLAR, Muriel y colaboradores. Methods and protocols of modern solid phase peptide synthesis. Molecular Biotechnology. 2006; 33: 239-254.

BECKER, Stefan y TERLAU, Heinrich. Toxins from cone snail: propierties, applications and biotechnological production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008; 79:1-9.

BENOITON, Leo. Chemistry of peptides synthesis Desprotector and methods of desprotection. Taylor & Francis group. 2006; 1-23.

BENOITON, Leo. Chemistry of peptides synthesis Fundamental of peptides synthesis. Taylor & Francis group. 2006; 1-23.

BENOITON, Leo. Chemistry of peptides synthesis Methods for the formation of petides bonds. Taylor & Francis group. 2006; 25-64.

BENOITON, Leo. Chemistry of peptides synthesis Solid phases synthesis. Taylor & Francis group. 2006; 1-23.

BORRELL, B. Química combinatorial gestion de los productos de partida. Industria farmacéutica; 1999: 67-73.

CACABELOS, Ramón. Enfermedad de Alzheimer: presente terapéutico y retos futuros. RCP. 2001; 30: 323-350.

CRUZ, Jennifer. Síntesis de nanopartículas de plata funcionalizadas con péptidos análogos de la lactoferrina con potencial antibiótico contra *Escherichia coli* O157:H7. Universidad Industrial de Santander. 2001.

DAL CIN, M. Analytical methods for the monitoring of solid phase organic synthesis. *Farmaco*, 2002; 497-510.

DE LA CALLE, Fernando. Fármacos de origen marino. *Treballs de la SCB*. 2007; 58:141-155.

Dirección web: Protein prospector: <http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msproduct>. Fecha de consulta: 15 de julio de 2013.

FLORES, M. y SEGURA, J. Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev. Mex. Neuroci.* 2005; 6: 315-326.

FUENTES, Patricio y SLACHEVSKY, Andrea. Enfermedad de Alzheimer: actualización en terapia farmacológica. *Rev. Méd. Chile*. 2005; 133: 224-230.

GARATEIX, Anoland y colaboradores. Compuestos de origen marino como instrumentos para el estudio del sistema nervioso. *Avicennia*. 2003; 16: 22-25.

GARATEIX, Anoland. El mar fuente de nuevos fármacos. *Elementos*. 2005; 58: 39:47.

GOMEZ, María y CÁSCALES, María. Las ómicas en el desarrollo de nuevos fármacos. *Farmacología humana* 1: 21-42.

GONZALES, A. y FLORÉZ, J. Transmisión colinérgica fármacos agonistas colinérgicos. *Farmacología humana*. 2003. 13: 213-227.

GUTIERREZ, Ángel y ESTÉVEZ, Ana. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de fármacos en el siglo XXI. Rev. R Acad Cienc. Exact. Fis. Nat. 2009; 103: 409-419.

GÚZMAN, Fanny. Diseño, síntesis y aplicaciones de los péptidos sintéticos. Laboratorio de genética y biología molecular. UIS. 2008

JORDÁN, Joaquín. Avance en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. OFFARM. 2003; 22: 101-111.

KIMURA, T. Synthesis of cystine peptides. Specific Methods. 22: 142-162.

LABADIE, Jeff. Polymeric support for solid phase synthesis. Combinatorial chemistry. 1998; 2: 346-352.

LILIBRE, Juan y GUERRA, Milagros. Enfermedad de Alzheimer: situación actual y estrategias terapéuticas. Rev. Cubana Med. 1999; 38: 134-142.

LIRA, Erandi. Síntesis de péptidos. Universidad Nacional Autónoma de México. 2007.

LÓPEZ, Joaquim. Conotoxinas. Spira. 2001; 1:7-11.

MERRIFIELD, R. Solid phase peptide synthesis the synthesis of a tetrapeptide. ACS. 1963; 85: 2149-2154.

PÉREZ, Teresa. Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV). Universidad de Barcelona. 2007.

RODRIGUEZ, Carlos. Síntesis y determinación estructural de péptidos derivados de Dermaseptita con actividad antileishmanial. Universidad Nacional de Colombia. 2011.

SANTINI, Richard y colaboradores. A measure of solvent effect on swelling of resins for solid phases organic synthesis. *Tetrahedron letters*. 1998; 39: 8951-8954.

SEGOVIA, José y MORA, Francisco. Enfermedades neurodegenerativas. *Farmaindustria*. 2002: 183-210.

SEGURA, T. y colaboradores. Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *REV NEUROL*. 2003; 36: 1047-1057.

SHERRY, Ulo. *Introduction to Peptides and Proteins*. CRC press, 2009; 199-212

SURESH, Babu. One Hundred years of peptide chemistry. *Resonance*. 2001; 7: 640-647.

TERLAU, Heinrich y OLIVERA, Baldomero. Conus venum: a rich source of novel ion channel-targeted peptides. *Physiol. Rev*. 2004; 84: 41-68.