

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE PÉPTIDOS
DE CADENA CORTA (5 – 30 AMINOÁCIDOS) POR
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

RUBIELA PÉREZ BAUTISTA



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA
2014

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE PÉPTIDOS
DE CADENA CORTA (5 – 30 AMINOÁCIDOS) POR
ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

RUBIELA PÉREZ BAUTISTA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título
de QUÍMICA

DIRECTOR:

Dr. HERMINSUL DE JESÚS CANO CALLE, QUÍMICO, *Ph. D.*



UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA

2014

QUÍMICA ha sido una carrera con muchos OBSTÁCULOS, RETOS, enfrentar las DIFICULTADES y LIMITACIONES ha sido motivo de una creciente PERSEVERANCIA EN MI, CONVICCIÓN de que es lo que quiero ser y lo que quiero hacer, poco a poco supere cada día del pregrado y con la ayuda de ustedes hoy logro está meta, Muchas gracias por todo su cariño, acompañamiento y ánimos:

AGRADECIMIENTOS A MI FAMILIA, Padrinos y familiares:

Especialmente a mis padres Porfirio y Alicia por llevarme desde niña en el sendero de la educación, su compañía, sus oraciones, su amor interminable y a mis hermanos Rafael e Ismary, por sus consejos, sus constantes enseñanzas, oraciones, siempre desear lo mejor para mí.

AGRADECIMIENTOS A: mis padrinos Stella Rodríguez Ovando y Pablo Sánchez, Jeneth Samira Sánchez su constante apoyo durante toda mi vida, cariño.

AGRADECIMIENTOS A Familiares: Napoleón Pérez, Bertha Pérez, Mercedes Pérez, Jazmín Pérez, Julián Pérez, Rosa María Pérez, Isabel Orduz, Yolanda Buítrago Hernández.

AGRADECIMIENTOS A Pbro. QUERIDOS:

Al Pbro. Gabriel Solano Jaimes Sus oraciones, acompañamiento constante durante todo el pregrado, amistad, cariño, solidaridad

Al Pbro. Freddy Ramírez, oraciones, respaldo y acompañamiento en mis decisiones en el ámbito académico y todo su cariño, solidaridad

Al Pbro. Eleazar Muñoz por sus oraciones de Sanación espiritual que contribuyeron a fortalecer mi paz interior.

Al Pbro. Manuel Rolón y Pbro. Julio Cesar Muñoz por sus constantes acompañamientos y ánimos.

AGRADECIMIENTOS A DIRECTOR Y CALIFICADORES:

Al Dr. HERMINSUL DE JESÚS CANO CALLE, por su dirección en el proyecto, sus ánimos, acompañamiento, colaboración, paciencia, aportes en química y culminar exitosamente este proyecto de grado II.

A la Dra. Martha Cecilia Daza Espinoza, por su acompañamiento. Tiempo dedicado a realizar la evaluación y aportes como calificadora.

Al Dr. Julián Andrés Zapata Ochoa de la Universidad de Antioquía, por desplazarse desde su ciudad para calificar mi tesis, su objetividad, tiempo dedicado para leer la tesis, además realizar aportes y evaluar como calificador.

AGRADECIMIENTOS A MAESTROS Y GUÍAS:

A la profesora Esperanza Aguilar, por sus consejos y sus aportes, por haberme orientado y apoyado durante mi carrera.

A la Dra. Ivonne Suárez, por su cariño, guías y apoyo cuando y donde lo necesitaba.

Al Dr. Juan Manuel Urbina González, por sus sugerencias y su apoyo incondicional, siempre dispuesto a resolver mis inquietudes y además brindar tranquilidad en todo momento.

A los profesores amigos de siempre por su apoyo moral y por todo su cariño en estos años de estudio en pregrado: William Larrotta, Leonardo Moreno, O.E.P.D Nelsón Gualdrón, José Carlos Gutiérrez Gallego, Ángela Marcela Montaña, Marianny Yajaira Combariza M, Daniel Sierra, María Isabel Crioles, Guillermo Gómez Moya.

A los técnicos por su dedicación, contribución y por hacer de mis laboratorios un lugar agradable: Alejandro Torres, Alejandro niño y la colega Mónica Fernández.

AGRADECIMIENTOS A LOS INTEGRANTES ADMINISTRATIVOS: La Universidad Industrial de Santander y al Vicerrector Académico **Dr. Álvaro Gómez Torrado, Janeth Aide Perea Villamil**, por mí apreciada auxiliatura y ánimo constante, Olga Cecilia González Noriega una mujer amiga, sincera, amable y solidaria. A los que me acompañaron constantemente: Martha Cecilia Osorio, Marysoll Arevalo, Jesús Nuncira Guerra, Javier Manuel Quintero Navas.

BIENESTAR UNIVERSITARIO: Por sus innumerables atenciones, cariño, apoyo y solidaridad; Por haberme orientado y apoyado durante mi carrera Dr. Isnardo Ardila, Dra. Martha Villamizar, Dra. Elsa Arciniegas, Dr. Carlos H. Gómez, Dra. María Claudia Caballero Badillo, Gloria Paulina Uribe, Dr. Jorge Niño, Ing. Ángela Gómez Lombana, Dra. Elida Ramírez Sierra, Edna Rocio Hernández Osorio, José Piñerez Hernández, Angélica Lozano Flórez.

AGRADECIMIENTOS AL GRUPO LEGIÓN DE MARÍA JUVENIL: Por las oraciones, motivación y alegrías a los amigos(as): Sthefanny Plata, Lady niño Hernández, Katriona Sanabria, Isa Bustamante, Néstor Pinto, Adriana Marcela León, Arelyz Días Fonseca y demás integrantes.

AGRADECIMIENTOS A LOS AMIGOS que por su alegría, ánimos, confianza, guías y cariño A: Roberto Antonio Gómez Molina, Diana Consuelo Camargo Bedoya, Luz Dary Abaunza, Lucía Nocua de Rodríguez, Ing. Carlos Camargo, Javier Manuel Quintero, Virginia Gavilán, Claudia Patricia Galvis, María Isabel Fonseca, Angélica, Laureano Almeida, Martha Cecilia Osorio Rodríguez, Agustín Cárdenas Jaimes, Luz Dary Abaunza.

AGRADECIMIENTOS A LOS AMIGOS DE SIEMPRE Y AMIGOS PRESENTES EN LAS ETAPAS DE MI VIDA: Me gustaría aprovechar esta oportunidad para expresar mi gratitud a mis amigos, motivadores, solidarios, sinceros, alegres, siempre a mi lado con su cariño, amigos en todos los momentos difíciles y alegrías: quienes me escucharon, aconsejaron y acompañaron teniendo paciencia en los momentos críticos y siempre cuento con ellos: Gloria Avendaño Mora, Stella Vesga Rueda, Sandra Ríos, Gladis Xiomara Lizcano Barajas Laura Marcela Noguera, María Antonia Amado, Alexander Tunarosa R, Lucia Cristina Novoa, Diego Pérez, Jenny Carolina Espinosa, Deiber Arley Vargas Medina, Edgar Mendoza, Beatriz Sanabria Arenas, Nazly Viviana Olave, Yulí Pauling, Adriana Luque, Lina Patricia Jaramillo Jennifer Pilar, Lorena Duarte, Fabián Leonardo Monares, Jessica Viviana Antolinez, Jesús A. Vargas, Tatta Pimiento, Diana Carolina Sandoval, Taylor Sharlotte, Adriana Liseth Rodríguez, Cristian Camilo Garnica, Luis Fernando Jiménez, Henry Zarate, Cristian Leguizamo, Ronald Sánchez Prada, Yesid Hazzas Elo, Nanita Sandoval, David Alexis Solano, Luis Santiago Luna Mercado, Cristian Martínez, Leofan Marín Sanabria, Janeth Fernández, Erika Celis, Yeni Bueno Duarte, Jennifer Cruz Laiton, Luis Rodríguez, Silvia Andrea Mora y familia, Manuel Ávila, Juan Carlos Villadiego, Julio César Araque, Mónica Arenas H, Raúl Bregulla Muñoz, Hugo Galvis, Leandro, Luis Fdo Arenas, Jesús Alberto Padilla, Alexander Angarita, Miguel Ángel Castrillón y familia, Tony L. Coba, Ana Milena García, Fabio Madrid, Deisy Castañeda, Sandra Margarita Cote, Luis Hernando Bernal, Ángel Alonso Holguín, Adriana Serrano Martínez, Hugo serrano, Doña Miryam Villamizar de Martínez e Isleini Martínez Villamizar, Elianys Gómez Sierra, Daisy Hernández de Visbal, Andrea Medina Delgado, Carlos Angarita Díaz, Laura Rueda, Laura Mendoza, Carlos Rizzo, Luz Dary del C.E.Q y Mary del C.E.M, Carlos Monroy, Ricardo Eslava, Juan Pablo López, Leidy Johanna Forero Gamboa Vanessa Cruz, Nicolás Cuellar, Alan Amado, Elizabeth Acelas, Maya Milena Moreno, Gladis Madrido, Ana Duarte, Laura Camacho, María Teresa Jaimes, Juan Pablo Fuentes, Cristina Cordón, Silvia Villalba, José Fernando Enciso Quiñonez, María Alejandra Moreno Gaviria, Silvia Viviana Bautista Cáceres, Sergio López Anaya, Rocío Rueda Chía, Lisbi Viviana afanador, Edwing Vargas, Carlos Torres, Juan Pablo López, Alejandro Tapiero Ariza, Ed Pérez, Mónica Ramírez, Mónica Margarita Orduz B, Gerardo Andrés Barbosa, Gisel Andrea Ovico, Luciano Paolo Bellutini Gracci, Sara Morales Ballesteros, Juan Carlos Gutiérrez, Arredondo, Freddy Alfonso Herrera, Martha Quiñonez, Jorge Gaitán, Álvaro Niño, Nataly Archila, Pablo Eduardo, Carlos Julio

AGRADECIMIENTOS A LOS NUEVOS AMIGOS: Un Apoyo Social, Guía y Respaldo, Al Colectivo de Mujeres UIS, Pastoral UIS, Comité Derechos Humanos UIS, Comunicación social U. pontificia (María Alejandra y Marcela) Defensoría del Pueblo (kadir C. Pilonieta, Claudia P. Cadena, Nancy Chaparro), CARACOL T.V (Willson Quimbay, Oscar G. Hernández), TRO, TVC- defensor de los motociclistas (José Velásquez), Jueza 8va penal del circuito (Esperanza Otero Rodríguez, Secretario. Leonardo), juzgado 4to del Administrativo de Slder (Maeistrada Solano Blanco Villamizar, Secretaria María del Rosario Rodríguez)

¡¡¡¡Por Fin!!!! Empieza mi vida profesional, la UIS una experiencia bella en aprendizaje y sacrificios ¡GRACIAS!

DEDICATORIA A: *DIOS Omnipotente y Todo Poderoso*

VIRGEN MARÍA INTERCESORA MÍA, GRACIAS MADRE QUERIDA.

Pedí con Fe a DIOS cada día al empezar mi pregrado en Química, ante cada obstáculo y hoy obtengo el título de Química, DIOS siempre presente en mi vida, iluminando mi camino, tu amor en todas las circunstancias, misericordioso; nunca permitió desfalleciera para obtener este título, fortaleciéndome con su ESPÍRITU e iluminándome en la maravillosa oportunidad de estudiar en la UIS. Una fuerza interior tan grande que me permitió vencer tristezas, obstáculos, arbitrariedades. Dios brindando la oportunidad de estudiar mi pregrado y trabajar simultáneamente durante toda mi carrera. Por todo lo que has hecho en mí, nunca me dejaste sola, por todo lo que no se expresar en palabras y está en mi corazón.

DEDICATORIA A MI FAMILIA:

A mis Padres Porfirio Pérez Orduz, Alicia Bautista Hernández

*Por tantos esfuerzos y sacrificios, su apoyo
Incondicional, Amor Sincero e Inagotable, Oraciones,
paciencia, por encaminarme en el sendero de estudio y
educación desde niña, por creer en mis capacidades.*

A mis hermanos Rafael Darío e Ismary

*Por tantos ánimos, compañía, solidaridad, Consejos,
oraciones, amor y apoyo*

iiiiiiMi familia, mi tesoro máspreciado, LOS QUIERO!!!!!!

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	23
2. MARCO TEÓRICO	26
2.1 ESPECTROSCOPIA ULTRA VIOLETA VISIBLE (UV-VIS).....	26
2.2 FLUORESCENCIA	29
2.2.1 Fenómeno De Fluorescencia.....	30
2.2.2 Conversión Interna	31
2.2.2.1 Conversión Interna Y Conversión Externa.	32
2.2.2.2 Factores En La Conversión Interna	32
2.2.2.3 Factores En La Conversión Externa	32
2.2.3.4 Factores Importantes En Fluorescencia.....	33
2.3 TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA.....	33
2.3.1 Espectro De Emisión O Fluorescencia Convencional	33
2.3.2 Espectro Excitación.....	33
2.3.3 Espectro Sincrónico	34
2.3.4 Formas De Variar Parámetros De Espectros Sincrónicos	34
2.4 ESTADOS EXCITADOS QUE PRODUCEN FLUORESCENCIA.....	34
2.4.1 Características De Fluorescencia	36
2.4.2 Fluorescencia Y Variables	37
2.5 FLUORESCENCIA Y APAGAMIENTO	38
2.5.1 Rodamina B (RB).....	40
2.5.2 Fluorescencia Intrínseca.....	42
3. MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1 METODOLOGÍA EMPLEADA EN ESPECTROS DE FLUORESCENCIA Y EXCITACIÓN PLB	48
3.2 METODOLOGÍA EMPLEADA EN ESPECTROS DE FLUORESCENCIA Y EXCITACIÓN PG	50

3.3 METODOLOGÍA EMPLEADA EN ESPECTROS DE FLUORESCENCIA Y EXCITACIÓN RB.....	52
3.4 INSTRUMENTACIÓN DE ESPECTROSCOPIA VISIBLE.....	53
3.5 CALIBRACIÓN DEL UV-VIS.....	54
3.6. ANÁLISIS MALDI-TOFF-MS.....	58
3.7 INSTRUMENTACIÓN Y FLUORESCENCIA	63
3.8. ADQUISICIÓN DE DATOS EN FLUORESCENCIA PARA PLB	66
3.9. ADQUISICIÓN DE DATOS EN FLUORESCENCIA PARA PG	67
3.10. ADQUISICIÓN DE DATOS EN FLUORESCENCIA PARA RB	69
3.11 FLUORESCENCIA EN TRIPTÓFANO.....	70
3.11.1 Metodología Empleada En Espectros De Fluorescencia Del Triptófano.....	71
4. CURVAS DE CALIBRACIÓN Y ANÁLISIS DESCRIPTIVO.....	72
4.1. DATOS EXPERIMENTALES ESPECTRO DE FLUORESCENCIA PLB.....	72
4.2 DATOS EXPERIMENTALES ESPECTRO DE FLUORESCENCIA PG	76
4.3 ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE DATOS OBTENIDOS EN LA PARTE EXPERIMENTAL	76
4.3.1 Regresión Lineal Para PLB Y PG	76
4.3.2 Curva De Calibración Para PLB.....	78
4.3.3. Resultados Gráficos Para PLB	80
4.4. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA PG	80
4.4.1 Resultados Gráficos Para PG	82
5.CONCLUSIONES	87
6. RECOMENDACIONES	88
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
BIBLIOGRAFÍA	94

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Absorción de Luz Ultravioleta por los Aminoácidos Trp y Try	27
Figura 2. Diagrama de Fluorescencia Jablonski	30
Figura 3. Diagrama Energía Parcial del Fenómeno Luminiscente	31
Figura 4. Estados Excitados.....	35
Figura 5. Estructura RB.....	40
Figura 6. Marcadores fluorescentes mas usados.....	41
Figura 7. Metodología empleada en espectros de Emisión/Excitación de PLB.....	49
Figura 8. Metodología empleada en espectros de Emisión/Excitación de PG	51
Figura 9. Metodología empleada en espectros de Emisión/Excitación de RB.....	52
Figura 10. Pasos en la preparación del colorante Fluorescente RB	53
Figura 11. Celda de Cuarzo	53
Figura 12. Espectrofotómetro U.V-Vis 2400 Shimadzu	54
Figura 13. Purificador de Agua Tipo I.....	54
Figura 14. Espectrofotómetro U.V-Vis y Compartimento de Muestra.....	54
Figura 15. Espectro U.V-Vis para PLB	55
Figura 16. Espectro U.V-Vis para Trp	56
Figura 17. Espectro U.Vis Buffer Britton Robinson	56
Figura 18. Espectro U.V-Vis PLB en Buffer Britton Robinson	56
Figura 19. Espectro U.V Para PG	57
Figura 20. Espectro U.V- Vis Buffer Tris-HCl	57
Figura 21. Espectro U.V- Vis PG en Buffer Tris-HCl	57
Figura 22. Espectro U.V- Vis RB.....	58
Figura 23. Espectro MALDI-TOFF-MS Matriz para PLB y PG	59
Figura 24. Espectro MALDI-TOFF-MS Buffer Britton Robinson	59
Figura 25. Espectro MALDI-TOFF-MS Buffer Tris - HCl	59
Figura 26. Espectro MALDI-TOFF- para PLB	61

Figura 27. Espectro MALDI-TOFF-MS Duplicado para PLB Y PG.....	62
Figura 28. Espectro MALDI-TOFF-MS para PG.....	62
Figura 29. Toma de Datos en Espectrofotómetro de Fluorescencia	63
Figura 30. Descripción Externa del Espectrofotómetro de Fluorescencia.....	64
Figura 31. Celda de Cuarzo con patrón RB	64
Figura 32. Espectrofotómetro de Fluorescencia PTI/QM 40	65
Figura 33. Espectros de Fluorescencia PLB	66
Figura 34. Espectro de Fluorescencia PLB obtenidos experimentalmente	67
Figura 35. Espectro de Fluorescencia del péptido PG	68
Figura 36. Espectros de Fluorescencia PG obtenidos experimentalmente	68
Figura 37. Espectro Emisión RB	69
Figura 38. Estructura de Triptófano.....	70
Figura 39. Metodología empleada para el Triptófano.....	71
Figura 40. Fluorescencia Triptófano en Buffer Robinson	71
Figura 41. Fluorescencia Triptófano en Buffer Tris-HCL.....	72
Figura 42. Espectros de Fluorescencia de PLB	73
Figura 43. Curva de Calibración para PLB.....	74
Figura 44. Espectros de Fluorescencia PG.....	74
Figura 45. Curva de Calibración PG	75
Figura 46. Espectro Raman de Agua Tipo I	83
Figura 47. Espectro Raman del Agua y PLB.....	84

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Propiedades Fisicoquímicas PLB	17
Tabla 2. Propiedades Fisicoquímicas PG.....	19
Tabla 3. Fluorescencia de aminoácidos aromáticos en agua PH neutro.....	42
Tabla 4. Datos Analíticos de Fluorescencia en PLB	73
Tabla 5. Datos Analíticos de Fluorescencia en PG.....	75
Tabla 6. Parámetros de verificación resultados para PLB	78
Tabla 7. Parámetros de verificación resultados para PG	81

ABREVIATURAS O SIGLAS PRINCIPALES USADAS

Abreviatura o sigla	Nombre completo
PLB	Péptido LacTofferrampina Bovina WKLLSKAQEKFGKNKSR
PG	Péptido AGDDADYFCQVWASRDDH
RB	Rodamina B
SPFS	Síntesis en Fase Sólida
λ	Longitud de Onda
L.B	LacTofferrina Bovina
nm	Nanómetro
s	Desviación Estándar
M	Molar (mol/L)
L	Litro
μ L	Micro-litro
μ M	Micro-molar
SRL	Sistema de Regresión Lineal
N° AA	Número de Aminoácidos

RESUMEN

TÍTULO: IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE PÉPTIDOS DE CADENA CORTA (5 – 30 AMINOÁCIDOS) POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA *

AUTOR: RUBIELA PÉREZ BAUTISTA**

PALABRAS CLAVES: Fluorescencia, Péptidos, Espectro de Fluorescencia, Marcador Fluorescente.

DESCRIPCIÓN

Este trabajo presenta la fluorescencia de PLB y PG de secuencias WKLLSKAQEKFGKNKSR, AGDDADYFCQVWASRDDH, respectivamente. Los péptidos PLB y PG tienen triptófano, el péptido PLB presenta una actividad biológica antibacteriana contra *Bacillus Subtilis*, *Escherichia Coli* O157:H7, el péptido PG posee cualidades antigénicas, podría generar anticuerpos específicos que brindarían información de los procesos predominantes implicados en la fisiopatología que sirve en el diagnóstico o pronóstico del *Síndrome Coronario Agudo*, razón por la cual se hace interesante el estudio de fluorescencia de las secuencias mencionadas.

La interacción entre PLB y el Buffer Britton Robinson, PG y el Buffer Tris-HCl, se realizó bajo condiciones controladas de pH, para evitar desnaturalización de PG y PLB, de esta forma, la muestra no se degrada con el tiempo y permanece estable al ser analizada por espectroscopia de fluorescencia. Los experimentos comprobaron la fluorescencia intrínseca del triptófano y por ello *no se realiza marcaje en Rodamina B*, la cantidad de emisión Fluorescente aumentó considerablemente en la intensidad de fluorescencia al aumentar la concentración, propio efecto de la fluorescencia intrínseca de las muestras PLB y PG. Para caracterizar las muestras inicialmente se tomaron espectros de absorción U.V-Vis y Maldi Toff Ms, posteriormente se evalúa por espectroscopia de emisión (fluorescencia) cada muestra PLB y PG. Los coeficientes de correlación para PLB (0.93) y PG (0.98), con desviaciones se encuentran por debajo del 1% y 5%, son evaluadas en diluciones que involucraron el rango de trabajo de la curva estándar. Las curvas de calibración para PG y PLB, el método aplicado a las muestras PLB Y PG donde los límites de detección obtenidos fueron: 7.95×10^{-6} [mol/L] y 2.12×10^{-7} [mol/L], los límites de cuantificación 2.65×10^{-5} [mol/L] y 7.06×10^{-5} [mol/L] respectivamente. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo la fluorescencia es un método altamente sensible, haciendo disoluciones mínimas e incluso trazas.

*Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director Trabajo de Grado II: Herminul de Jesús Cano Calle, *Ph.D.*

ABSTRACT

TITLE: IMPLEMENTATION OF A METHOD OF ANALYSIS OF PEPTIDES DECADENA CUTS (5 - 30 AMINO ACIDS) FOR ESPECTROSCOPIA OF FLUORESCENCE *

AUTHOR: RUBIELA PEREZ BAUTISTA **

KEYWORDS: Fluorescence, Spectroscopic, Peptides, Spectrum of Fluorescence, Scoreboard Fluorescent.

DESCRIPTION

This paper presents the fluorescence of PLB and PG WKLLSKAQEKFGKNKSR sequence, AGDDADYFCQVWASRDDH respectively. The PLB and PG tryptophan peptides have the PLB peptide presents an antibacterial biological activity against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* O157: H7, the peptide has antigenic qualities PG could generate specific antibodies that would provide information to the predominant processes involved in the pathophysiology serving in the diagnosis or prognosis of acute coronary syndrome, which is why the study of fluorescence of the sequences mentioned is interesting.

The interaction between PLB and Britton Robinson buffer, PG and Tris-HCl Buffer, was held under controlled conditions of pH, to avoid denaturation of PG and PLB, in this way, the sample does not degrade over time and remains stable be analyzed by fluorescence spectroscopy. The experiments proved the intrinsic fluorescence of tryptophan and thus no Rhodamine B-labeling is performed, the amount of fluorescent emission intensity increased significantly in fluorescence as the concentration increases, the effect itself of intrinsic fluorescence of the PLB and PG samples. To initially characterize the samples UV-Vis spectra and absorption Maldi Ms Toff taken subsequently evaluated by emission spectroscopy (fluorescence) and PG each sample PLB. The correlation coefficients for PLB (0.93) and PG (0.98), with deviations are below 1% and 5% dilutions are evaluated involving the working range of the standard curve. Calibration curves for PG and PLB, the method applied to the PLB and PG samples where obtained detection limits were: 7.95×10^{-6} [mol / L] and 2.12×10^{-7} [mol / L], the limits of quantification 2.65×10^{-5} [mol / L] and 7.06×10^{-5} [mol / L] respectively. According to the results obtained in this work the fluorescence is a highly sensitive method, with minimal and even trace solutions.

* Undergraduate work.

** Science Faculty, School of Chemistry. Work Manager Grade II Directed by: Hermínsul de Jesús Cano Calle, *Ph.D.*

INTRODUCCIÓN

Este trabajo está presentado de la siguiente forma y consta de dos partes organizadas así: A) Péptidos de estudio PLB Y PG. B) técnicas instrumentales de Análisis (Espectroscopia, Maldi Toff Ms, Fluorescencia). Ahora se explicará cada uno de estos.

✓ Péptidos

Los péptidos están formados por un pequeño número de aminoácidos, son producto de la unión de aminoácidos mediante enlace peptídico, el cual es un “enlace amida” encargado de unir los aminoácidos entre ellos, de tal forma que el α -carboxilo de un aminoácido se une covalentemente al grupo α -amino de otro.

Los péptidos sencillos que contienen dos, tres, cuatro o más restos aminoácidos es decir, los di-péptidos, tri-péptidos, tetra-péptidos, etc., se hallan unidos covalentemente, proceden de la hidrólisis parcial de cadenas poli-peptídicas de proteínas mucho más largas, se nombran a partir de los restos de aminoácidos que componen la secuencia que comienza con el amino terminal (abreviadamente N-terminal). En los péptidos el comportamiento ácido-base viene determinado por el grupo α -amino libre del resto N-terminal, por el grupo α -carboxilo libre del resto N-terminal.

Las muestras de péptidos PLB y PG que se utilizaron en el actual trabajo fueron seleccionados como péptidos modelo para este trabajo debido a su importancia biológica, péptidos con más de 5 aminoácidos (lo cual es importante para el estudio porque el objetivo principal es obtener su fluorescencia intrínseca), y por su fácil disponibilidad.

PLB y PG que contienen 17 y 18 residuos de aminoácidos respectivamente con un peso molecular entre ellos de 2048.4 Da y 2070.8 Da, ambos péptidos PLB y PG contienen un residuo triptófano, así como tirosina y fenilalanina, que son residuos aromáticos que presentan fluorescencia intrínseca, sin embargo, el principal responsable de la fluorescencia de PLB y PG es el triptófano. Cuando se tienen triptófano y tirosina presentes en la muestra, el triptófano será dominante porque su absorbancia es 4 veces mayor (Figura 1). La fenilalanina no presenta absorbancia a 280 nm y su presencia es menor en comparación con tirosina. [1,13]

Los péptidos PLB y PG fueron obtenidos en el el Laboratorio de Bioquímica e Ingeniería de Proteínas de la Universidad Industrial de Santander utilizando la metodología SPFS. La síntesis orgánica en fase sólida (SPFS) fue desarrollada originalmente para la preparación de péptidos por R. B. Merrifield. La síntesis de péptidos ha mantenido un gran interés en el desarrollo de nuevos métodos de preparación en vista de que muchas hormonas y toxinas son de origen peptídico. Posteriormente fue modificada SPFS por Sheppard. [6]

La SPFS se basa en la unión del aminoácido carboxi-terminal (C-Terminal a un soporte insoluble) y posterior elongación secuencial, aminoácido tras aminoácido, de la cadena peptídica. Presenta numerosas ventajas como: mayores rendimientos, lavado y filtrado sencillo de los péptidos, y posibilidad de automatización de procesos de síntesis. Se aplicó la estrategia 9-fluorometoxicarbonil/terc-butil (Fmoc/tBu) emplea el grupo Fmoc como protector temporal del grupo amino y grupos del tipo tBu para proteger las cadenas de los aminos terminales trifuncionales. [7]

✓ Péptido PLB

El péptido PLB (WKLLSKAQEKFGKNKSR), la L.B antimicrobiano de origen sintético, dentro de sus propiedades antibacterianas se resalta su actividad contra *Bacillus Subtilis*, *Escherichia Coli* O157:H7. Los péptidos antimicrobianos (PAMs) son moléculas efectoras del sistema inmune innato que tienen funciones contra gérmenes y que poseen un amplio espectro de acción antibiótica (incluyendo bacterias, hongos y virus). Los PAMs juegan un papel muy importante, aunque poco conocido hasta el momento, en los procesos inflamatorios, inducción inmune y cicatrización, cumpliendo un papel muy importante en la patogénesis de muchas enfermedades. LB es un péptido antimicrobiano catiónico formado por 17 aminoácidos, las características fisicoquímicas se registra en la Tabla 1. ^[7]

Tabla 1. Propiedades Fisicoquímicas PLB

Secuencia Péptido	PM(Da)	Nº AA	Tiempo de Retención (min)
WKLLSKAQEKFGKNKSR	2047.1923	17	15.182

Fuente: ^[7]

La muestra PLB fue proporcionada por el Laboratorio de Bioquímica e Ingeniería de Proteínas de la Universidad Industrial de Santander, PLB se obtuvo en la Tesis de Maestría “Síntesis de Nanopartículas de plata funcionalizadas con péptidos análogos de L.B con potencial antibiótico contra *escherichiacoli* O157:H7” trabajo efectuado por la profesional en química Jenniffer Cruz Laíton, el péptido está amidado en su carbono terminal y se sintetizó en fase sólida empleando la estrategia Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), se entregó en forma pura, con datos preestablecidos y corroborados. ^[7]

✓ Péptido PG

El péptido PG (AGDDADYFCQVWASRDDH). Formado por 18 aminoácidos posee varias características fisicoquímicas, los datos mencionados se encuentran registrados en la Tabla 2, el péptido PG es de origen sintético. ^[8]

PG posee cualidades antigénicas, sirve en el diagnóstico o pronóstico del *Síndrome Coronario Agudo (SCA)* cuyo ejemplo característico es la Arterioesclerosis; es de interés médico y científico por su alto grado de daño en la pared de las arterias, al punto que las arterias se endurecen y se ve afectada la conducción de la sangre desde el corazón a los órganos; la enfermedad involutiva de la pared de las arterias provoca el engrosamiento, endurecimiento de la pared vascular y la posterior degeneración de la túnica intima de las arterias, es decir causa formación de las placas de ateroma.^[8] Las manifestaciones clínicas, los hallazgos del electrocardiograma (González 2004), las diferencias en la extensión y duración de los trastornos isquémicos; han permitido clasificar a SCA con supra desnivel, que incluye el infarto agudo de miocardio (IAM) y SCA sin supra desnivel, que comprende la angina inestable (AI) y el Infarto Agudo de Miocardio (Antman y col., 2000). Recientemente, se ha centrado la atención en proteínas que puedan ser marcadores de la formación y progresión de las lesiones arterioescleróticas (Vivanco, 2005). Las causas que intervienen en el desarrollo de la enfermedad y los procesos implicados en su fisiopatología aún son objeto de investigación, es por ello que péptidos como PG podrían generar anticuerpos específicos que brindarían información de los procesos predominantes implicados en la fisiopatología de los SCA. La Arterioesclerosis es la principal causa de muerte tanto en hombres, como en mujeres, mayores de 45 años, superando las muertes violentas o las producidas por los diferentes tipos de cáncer. (Beltrán y col., 2008). Las características fisicoquímicas se registran en la Tabla 2. ^[8]

Tabla 2. Propiedades Fisicoquímicas PG

Secuencia Péptido	PM (Da)	N° AA	Tiempo de Retención (min)
AGDDADYFCQVWASRDDH	2069.8	18	6.308

Fuente: [8]

La muestra PG fue proporcionada por el Laboratorio de Bioquímica e Ingeniería de Proteínas de la Universidad Industrial de Santander, PG se obtuvo para el desarrollo del trabajo “Péptidos sintéticos de interés diagnóstico en pacientes colombianos con infarto agudo de miocardio sin supra desnivel”, trabajo efectuado por la profesional en química Yeni Bueno Duarte; el péptido se sintetizó en fase sólida empleando la estrategia Fmoc, se entregó con datos preestablecidos y corroborados. [8]

✓ Espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia UV-Vis se utiliza para la caracterización de muestras PLB y PG, se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética, las radiaciones Ultravioleta (UV) y visible comprende sólo una pequeña parte del espectro electromagnético, la longitud de onda normalmente se expresa en nanómetros ($1\text{nm}= 1\times 10^{-9}\text{ m}$), se considera que la radiación con longitud de onda más corta tendrá la mayor energía, en el rango de longitudes de onda del UV-Vis;(180-800 nm) que puede absorber o transmitir la muestra en función de la cantidad de sustancia presente. Cuando se toman espectros UV-Vis de PLB y PG se mide la absorbancia, también los espectros UV-Vis permiten determinar el contenido y fuerza de una sustancia [9].

✓ **Maldi Toff Ms**

La metodología Maldi Toff usada en la caracterización de las muestras PLB y PG, permite obtener espectros altamente resueltos que se alcanzan con el espectrómetro de masas MALDI-TOFF, 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. El software permite obtener un análisis "*top-down*" (las proteínas intactas, es decir, sin previa digestión, se analizan directamente por Ms), la ventaja es que se evita la manipulación de la muestra y su modificación por (métodos químicos o bioquímicos), además facilita y acelera la interpretación de datos para la identificación de proteínas, en este tipo de metodologías ^[30,31].

✓ **Espectroscopia de Fluorescencia**

Es importante comprender el estudio de péptidos mediante la técnica de Fluorescencia y sus ventajas. La Fluorescencia es un proceso de emisión en el cual se excitan las moléculas por absorción de radiación electromagnética. Las especies se relajan a un estado de menor energía o estado fundamental, liberando su energía en forma de fotones. Una de las principales ventajas de la fluorescencia es su alta sensibilidad. ^[1]

La Técnica de Espectroscopia en Fluorescencia se implementa en el análisis de péptidos PLB y PG para observar en forma independiente su comportamiento fluorescente, es una técnica con variables favorables como: usar poca cantidad de muestra (ppm y ppb), al hacer medidas por fluorescencia la muestra no se altera y conserva su propiedad además de exhibir gran facilidad al realizar ensayos, resulta de importancia analizar el comportamiento de las muestras PLB y PG bajo las propiedades de la fluorescencia para conocer el comportamiento fluorescente, mejora la reproducibilidad de los espectros para el análisis.

En este trabajo se presentan los resultados de la obtención de espectros de fluorescencia (emisión) para PG y PLB, aplicando el método científico y además se estudió la variación de las propiedades fluorescentes (intensidad) Vs (concentración), Las muestras tienen fluorescencia intrínseca otorgada por el triptófano.

Este nuevo conocimiento con la técnica espectroscopia de fluorescencia se ha usado para explorar la estructura y propiedades de moléculas en sistemas químicos y biológicos, para estudiar fenómenos relacionados con sueros, muestras sanguíneas y otros^[1].

El apagamiento “Quenching” de la fluorescencia es una disminución de la fluorescencia de un analito fluorescente, denominado fluoroforo, por una molécula denominada apagador. El apagamiento se ha utilizado para determinar la ubicación de fluoroforos en macromoléculas con base en la accesibilidad de estos a los apagadores, el principio de Franck-Condon, expresa que el tiempo de vida relativamente más largo de la emisión de fluorescencia permite una variedad de otras interacciones como el caso del apagamiento. La intensidad de la fluorescencia de un fluoroforo se puede disminuir a través de diferentes interacciones moleculares que incluyen, reacciones de estado excitado, rearreglos moleculares, transferencia de energía, formación de un complejo de estado fundamental y apagamiento colisional.^[1]

Se hace uso del método científico, se presentan referencias y fundamentación teórica de Espectroscopias de Absorción y Fluorescencia, además de conceptos asociados con Fluorescencia y obtención de espectros Fluorescentes en PLB y PG. Los buffers como Britton Robinson y Tris-HCl evitan la desnaturalización de las muestras se garantiza la estabilidad y evitan cambios bruscos en el pH por incremento de la temperatura al aplicar la técnica de fluorescencia.

Los resultados indicaron que la intensidad de la fluorescencia en las muestras PLB y PG fue óptima, *la buena señal obtenida en la intensidad de fluorescencia es debido al triptófano presente en PLB y PG*, lo que sugiere que no es necesario el uso de Rodamina B para interactuar con las muestras.

Finalmente no se realiza el uso experimental con el marcador fluorescente Rodamina B en las muestras PLB y PG ^[1, 19, 20,24], aun así, por curiosidad científica personal de observar el fenómeno fluorescente en RB, se llevaron a cabo algunas pruebas con el fin de determinar sus cualidades fluorescentes, se identifica su absorción y fluorescencia, al igual que se establece metodología en el equipo PTI/QM 40 en forma independiente para cada péptido y para RB, por lo anterior la fluorescencia es obtenida en forma individual para PLB,PG, RB y se obtiene un óptimo resultado para PLB,PG, RB.

En las muestras PLB y PG se detectan parámetros fisicoquímicos de intensidad de fluorescencia respecto a la concentración, obtenidas por separado y en forma independiente para cada péptido, las pruebas UV-Vis y Maldi Toff Ms donde se encuentra la pureza en las muestras usadas, además se determina estadísticamente LQC,LDC, R^2 , la sensibilidad de calibración entre otros.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

✓ PROBLEMA

En el presente trabajo se evalúan las características de las muestras PLB y PG, las características de la técnica de fluorescencia, además se busca implementar la técnica en péptidos de más de 5 aminoácidos, para lo cual se propone usar el Espectrofotómetro de Fluorescencia PTI/QM 40 (Photon Technology Internacional/Quanta Master) del laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad Industrial de Santander en el análisis de PLB y PG. Y desarrollar una alternativa en la toma de espectros de fluorescencia, con lo cual se espera encontrar una óptima fluorescencia tratando las muestras PLB y PG por separado y únicamente usando la fluorescencia intrínseca, para ello se debe controlar el pH en PLB y PG, bajo condiciones óptimas que garanticen la estabilidad de la muestra y la no desnaturalización.

De ser así, se describe una metodología independiente para cada péptido que permita obtener una buena sensibilidad e investigación del fenómeno de fluorescencia de un péptido; además encontrar un posible marcador que pueda utilizarse si no se obtiene fluorescencia intrínseca óptima. Es necesario que la técnica en fluorescencia se incremente en el desarrollo de investigaciones biológicas y sea utilizada como futura herramienta para el análisis de muestras con fluorescencia intrínseca y marcadores que contribuyan a la fluorescencia extrínseca.

✓ JUSTIFICACIÓN

En Colombia, aún no se han hecho estudios de péptidos por espectroscopia de fluorescencia, sin embargo, en países como China, Japón, Estados Unidos, entre otros, se han realizado diversos estudios que muestran un nuevo campo de investigación al aplicar la fluorescencia en muestras biológicas encontrando información que se ha utilizado en diferentes sectores de la industria farmacológica, así:

- En la identificación de diferentes conformaciones en el estado fundamental que revelan características de las muestras con triptófano. ^[5,21,22,23]
- Cambios estructurales en proteínas cuando la fluorescencia varía las interacciones en enlaces de hidrogeno debido a cambios es la temperatura y Buffers ^[32]
- Aplicación de fluorescencia e interacciones biológicas^[34]
- Análisis por fluorescencia de péptidos y sus interacciones^[35]
- Péptidos y proteínas por fluorescencia en presencia de triptófano ^[36]

Algunos autores han hecho trabajos de espectroscopia de fluorescencia en “péptidos de la familia conus” ^[2,3] investigado los péptidos “conotoxinas” y han encontrado un potencial marino como fuente de fármacos que 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. ^[33], así:

- En procesos de inhibición del dolor mediante fármacos como el Elziconotide (proveniente del *conus magus*).
- (*Conus victoriae* -caracol cono reina victoria- y el *Conus geographus*) se encuentran en ensayos clínicos y preclínicos para su uso analgésico y para posibles tratamientos del Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la epilepsia.

El éxito de la técnica de fluorescencia en péptidos radica en la simplicidad del método, para estudiar la interacción de drogas con biomacromoléculas debido a que esta tiene las ventajas de alta sensibilidad, rapidez y es de fácil implementación ^[18].

La técnica fluorescencia permite conocer el comportamiento de la muestra, sus interacciones, al incrementar el uso de la técnica fluorescencia en instituciones educativas e industriales se podría conocer y analizar con más detalle diversos tipos de muestras biológicas y sus interacciones. Se considera importante ir realizando estudios del marcador, RB es una opción como marcador a usar en este trabajo, debido a que en aplicaciones biológicas presenta excelentes propiedades fotoquímicas tales como: Alto rendimiento cuántico de fluorescencia, excitación y una buena foto estabilidad. ^[24]

Es importante que se tenga en cuenta el Quenching o apagamiento al analizar la interacción entre muestra y marcador, se puede obtener variación de temperatura en los experimentos con el empleo de termostatos.

2. MARCO TEÓRICO

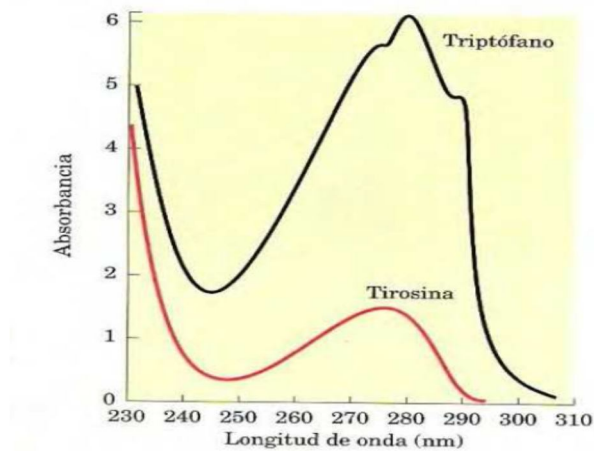
2.1 ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA VISIBLE (UV-Vis)

La Espectroscopia estudia las transiciones que se producen entre estados cuánticos de un sistema material inducidas por la radiación electromagnética. Si se irradia una muestra de un compuesto con un haz de radiación de frecuencia variable y se mide la intensidad de la radiación emergente en función de la frecuencia, se obtiene el espectro del compuesto. ^[9]

La Espectroscopia UV-Vis presenta el rango de longitudes de onda del ultravioleta y visible, (180-800 nm) que puede absorber (tomar) o transmitir (dar) una muestra en función de la cantidad de sustancia presente; las técnicas de absorción hablan de una radiación que incide sobre una muestra y produce una absorción parcial de esta radiación, lo que hace que se produzca una transición entre los niveles energéticos de la sustancia: átomo, molécula, ion, pasando esta al estado excitado, el resto de radiación es transmitida.^[9]

La espectroscopia UV-Vis ha tenido aplicación en el análisis cualitativo, las bandas de absorción UV-Vis se correlacionan con la estructura química del analito, cuando la molécula o ion absorbe la radiación ultravioleta o visible sufre un cambio en su configuración de electrones de valencia. Los electrones de valencia en el analito ocupan enlaces sigma (σ), enlaces pi (π) y orbitales moleculares no enlazantes (n), cuantizados. Cuatro tipos de transiciones entre niveles de energía cuantizados se consideran para el espectro molecular UV-Vis ^[9] En el caso específico de los péptidos PG y PLB, el triptófano y la Tirosina, y en mucho menor grado la fenilalanina, absorben la luz ultravioleta (Figura 1). Esto explica la fuerte absorbancia de la luz característica de la mayoría de las proteínas a una longitud de onda de 280 nm, propiedad aprovechada para la caracterización de proteínas.

Figura 1. Absorción de Luz Ultravioleta por los Aminoácidos Trp y Try.



Fuente: David, L. Nelson, Michael M. Cox. Lehninger Principios de Bioquímica. 2006. cuarta Edición. Pág. 80 capítulo 3.

Cromóforo: La mayor parte de la absorción de los compuestos orgánicos resulta de la presencia de enlaces π (es decir, insaturados). Un cromóforo es un grupo molecular que normalmente contiene un enlace π .^[9]

La presencia de una banda de absorbancia a una determinada longitud de onda es una buena indicación de la presencia de un cromóforo. Sin embargo, la posición del máximo no es fija sino que depende, en parte, del entorno molecular del cromóforo y del disolvente. El pH y la temperatura, también pueden causar cambios tanto en la intensidad como en la longitud de onda de los máximos de absorbancia. Conjugando el doble enlace con otros dobles enlaces, aumenta tanto la intensidad como la longitud de onda de las bandas de absorción.^[9]

La Espectroscopia De Absorción Molecular basada en la medida de transmitancia (T_0) de absorbancia (A) de disoluciones que se encuentran en celdas transparentes con camino óptico de (b)cm. La concentración [c] de un analito está relacionada linealmente con la absorbancia de acuerdo con la siguiente ecuación, conocida como la ley de Beer: $A = -\log T = \epsilon b[c]$

Donde (ϵ) es el coeficiente de absortividad molar e indica concentraciones del analito expresadas en moles/L. Es una propiedad molecular característica de las especies químicas absorbentes, que depende de la longitud de onda de la luz pero no de la concentración o espesor de la muestra.^[9]

La Espectroscopia UV-Visible es usada para identificar algunos grupos funcionales de moléculas, determina el contenido y fuerza de una sustancia^[9]. El análisis cualitativo de la Espectroscopia UV-Visible puede utilizarse para determinar muchas características físico-químicas de los compuestos y, por tanto, puede proporcionar información como la identidad. Los enlaces y los grupos funcionales que dan lugar a la absorción de la radiación ultravioleta y visible son llamados cromóforos.^[9]

Temperatura de Fusión de las Proteínas, Péptidos: Los espectros de absorbancia de las proteínas resultan principalmente de la presencia de los aminoácidos aromáticos como triptófano, tirosina y fenilalanina. Una proteína a temperatura ambiente tiene una estructura o conformación terciaria específica que crea un entorno electrónico determinado para los aminoácidos aromáticos. Si se calienta la proteína, a una cierta temperatura, se desdobla o funde y pierde su conformación terciaria específica debido al calor, el cual afecta los enlaces de hidrógeno principalmente. En este proceso, el ambiente electrónico cambia, lo que resulta en cambios o variaciones espectrales (proceso de desnaturalización)^[10]

2.2 FLUORESCENCIA

Cuando una molécula o átomo en estado basal absorbe energía electromagnética, un electrón es excitado a un estado de energía más alto y casi inmediatamente se precipita regresando a su estado base inicial; en el proceso de colapso de energía la molécula se relaja y puede liberar energía como un fotón fluorescente. ^[12]

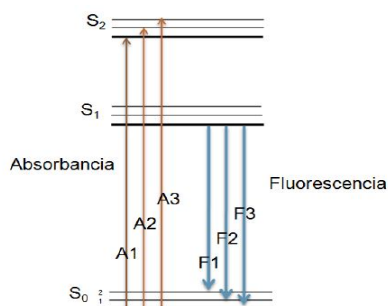
La fluorescencia molecular se ha usado para el análisis cuantitativo directo o indirecto de analitos en diferentes matrices. El análisis cuantitativo es posible cuando el rendimiento cuántico de la fluorescencia del analito es favorable. La fluorescencia generalmente es observada en moléculas donde la energía de absorción más baja es una transición $\pi \rightarrow \pi^*$, aunque algunas transiciones $n \rightarrow \pi^*$ presentan una débil fluorescencia ^[12]. La primera observación de fluorescencia sucede en 1845 por Sir John Frederick Guillermo Herschel, de una solución de quinina a la luz del sol; la quinina en agua al ser excitada por la luz ultravioleta del sol, al pasar del estado excitado y regresar al estado basal o fundamental emite luz azul con una $\lambda = 450 \text{ nm}$.^[13]

Una de las características más atractivas de los métodos de fluorescencia es su sensibilidad. No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican mucho menos que los métodos de absorción debido al número relativamente limitado de sistemas químicos que se pueden hacer fluorescer. La fluorescencia permite realizar determinaciones analíticas con cierto grado de selectividad y límites de detección son muy bajos respecto a los métodos basados en absorción. Sus límites de detección, dependiendo de la sustancia que se trate y la potencia de la fuente empleada, pueden ir desde algunos ppm hasta ppb y en algunos casos hasta ppt. La potencia de la emisión fluorescente es directamente proporcional a la concentración de analito, lo cual permite su utilización con fines analíticos; pero también depende del tipo de analito y de factores instrumentales. ^[13]

2.2.1. Fenómeno de Fluorescencia

En el proceso de liberar energía, el fotón fluorescente emitido normalmente presenta una frecuencia baja de vibración y una longitud de onda más larga que la del fotón que fue absorbido. El fenómeno de fluorescencia presenta típicamente un periodo de vida de 10^{-8} segundos. El tiempo de vida de un material Fluorescente o Fluoróforo es el tiempo medio entre la excitación y el retorno a su estado base de los electrones. Una representación del cambio de energía de los electrones de una molécula fluorescente es el diagrama de Jablonski en el que en cada nivel de energía electrónico, los fluoróforos pueden llegar a existir en un número de niveles de energía vibracional S_0 , S_1 , S_2 , F_1 , F_2 , F_3 , ilustrados en la figura 2. Las transiciones ocurren en aproximadamente 10^{-15} segundos, un tiempo demasiado corto para el desplazamiento significativo de los núcleos, este corto tiempo de vida de absorción, de acuerdo con el principio de Franck - Condon, no permite ninguna interacción molecular durante el proceso, mientras que el tiempo de vida relativamente más largo de la emisión de fluorescencia permite una variedad de otras interacciones como el caso del apagamiento. En el diagrama se excluye varios números de interacciones y se ilustran las transiciones entre los estados (Líneas Verticales que exponen la naturaleza instantánea de la absorción de la luz). ^[13]

Figura 2. Diagrama de Fluorescencia Jablonski.

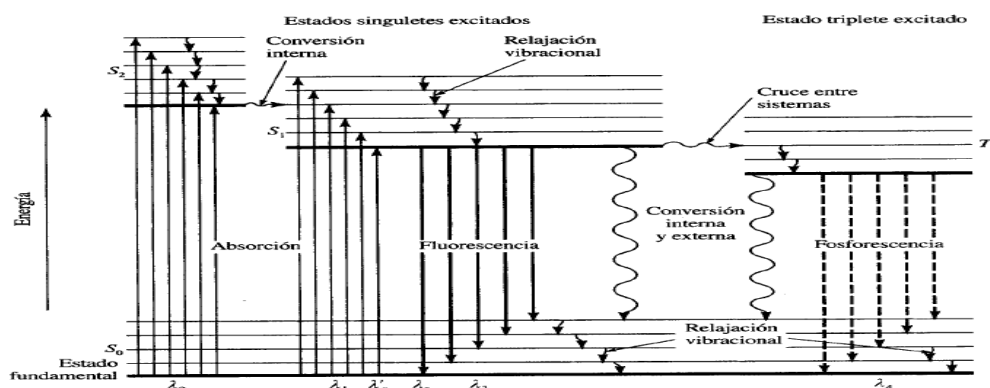


Fuente: Lakowics Joseph. Principles of Fluorescence Spectroscopy.

2.2.2 Conversión Interna:

La molécula absorbe energía y pasa de un estado singulete fundamental a un estado electrónicamente excitado (S_1 o S_2). La energía de separación entre los estados excitados singuletes, en moléculas aromáticas es más pequeña que en la separación del estado S_1 y el estado basal S_0 ; significa que el nivel vibracional 0 de S_2 se solapará con los niveles vibracionales S_1 más altos, dando lugar a un alto grado de acoplamiento entre los niveles vibracionales, de tal manera que la molécula sufre una conversión interna de S_2 al nivel vibracional más bajo de S_1 , el nivel vibracional 0 de S_1 se solapa con los niveles vibracionales S_0 más altos (figura 3), el electrón se mueve de regreso al orbital enlazante no lleno y la molécula se relaja rápidamente al nivel vibracional más bajo de S_0 , la molécula se somete a relajación vibracional o conversión interna donde la energía se emite en forma de calor (proceso no radiativo) y conducen rápidamente a la molécula al más bajo nivel vibracional del estado S_1 . En los procesos no radiativos la molécula experimenta un decaimiento, el fotón emitido tiene menos energía que el fotón incidente. Este cambio de energía se llama corrimiento de Stokes y su magnitud depende del fluoróforo, así como del entorno que le rodea. [14]

Figura 3. Diagrama Energía Parcial del Fenómeno Luminiscente.



Fuente: Skoog, D. A; Holler, F.J. y Nieman T. A. Principios de análisis instrumental. Pág.384

2.2.2.1 Conversión Interna y Conversión Externa

El exceso de energía que tiene la especie excitada se pierde por choques moleculares, los choques moleculares suceden entre la especie excitada y el solvente, es decir la especie excitada pasa energía al solvente, este proceso es llamado desactivación o relajación vibracional y se aumenta la temperatura del medio (flechas pequeñas entre niveles energéticos). ^[14]

2.2.2.2 Factores que suceden en la Conversión Interna

Los procesos intermoleculares por los cuales una molécula pasa a un estado electrónico de más baja energía sin emitir radiación. Cuando dos niveles de energía electrónicos están suficientemente próximos para que haya solapamiento de los niveles de energía vibracional y se pierde probablemente energía por fluorescencia desde un estado vibracional más alto o estado excitado más alto. ^[14]

2.2.2.3 Factores que suceden en la Conversión Externa

Las moléculas excitadas interactúan con el solvente u otros solutos. La transición no radiativa desde los estados excitados, singulete y triplete, al estado fundamental involucran estas transiciones.

En estas relajaciones electrónicas hay transferencia de energía acompañada de un aumento de temperatura de la solución, ya que el exceso de energía vibracional se pierde, como consecuencia de las colisiones que se presentan entre las moléculas excitadas y el solvente. ^[14]

2.2.2.4 Factores Importantes en Fluorescencia

Alguna energía se pierde en el proceso de regreso al estado basal luego de un electrón ser excitado, entonces el fotón emitido presenta una frecuencia baja de vibración y una λ más larga que la del fotón que fue absorbido. El fenómeno de fluorescencia presenta un tiempo de vida de 10^{-8} segundos, lo cual quiere decir que el tiempo de vida es el tiempo medio entre la excitación y el retorno a su estado basal. ^[1,14] La emisión fluorescente siempre tiene lugar a menor energía que la absorción, y que el espectro de excitación y el espectro de emisión se superpone de forma ligera. La fluorescencia está favorecida por la rigidez de la molécula ya que esta disminuye la velocidad de relajación no radiante, de tal manera que hay el tiempo suficiente para que ocurra la fluorescencia. ^[1,14]

2.3 TÉCNICAS DE FLUORESCENCIA

2.3.1 Espectro de Emisión o Fluorescencia Convencional

Se obtiene mediante la variación de λ en el monocromador de emisión, se mantiene fija la λ de excitación.

2.3.2 Espectro de Excitación

Se obtiene mediante el escaneo de diferentes longitudes de onda de excitación, manteniendo la λ de emisión constante y se varía la λ en el monocromador de excitación.

2.3.3 Espectro Sincrónico

Se obtiene al variar simultáneamente la longitud de onda de excitación y de emisión.

2.3.4 Formas de variar Parámetros de Espectros Sincrónicos

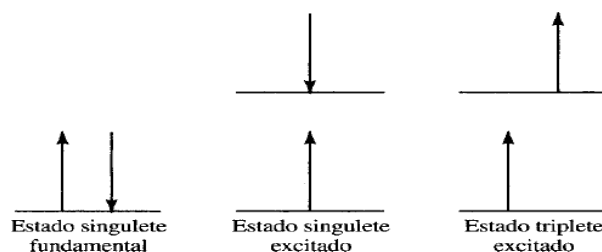
Con la longitud de onda constante: si la velocidad de barrido es constante en ambos monocromadores (excitación y emisión), un intervalo de longitud de onda se mantiene constante ($\Delta\lambda$), que se encuentra enmarcado entre la longitud de onda de emisión y longitud de onda de excitación. Longitud de onda variada: si la λ de emisión y excitación varía simultáneamente pero la velocidad de barrido es diferente para ambos monocromadores, se pueden construir ángulos entre 45° y 90° al eje x de excitación a lo largo de todo el espectro.

2.4 ESTADOS EXCITADOS QUE PRODUCEN FLUORESCENCIA

El principio de exclusión de Pauli establece que en un átomo no puede haber 2 electrones con los cuatro números cuánticos iguales, máximo 2 electrones con espines opuestos por orbital, debido al apareamiento de espines, la mayoría de moléculas son diamagnéticas (no presentan un campo magnético neto), los radicales libres con electrones desapareados tienen momento magnético y son atraídos por campos magnéticos y por esto se llaman paramagnéticos. Cuando todos los electrones están apareados se dice “estado singulete” y al exponerse a un campo magnético (se produce desdoblamiento de energía), se puede observar en la figura 4 un estado fundamental para un radical libre, el cual es un estado doblete (por la orientación que puede tomar el spin en un campo magnético), cuando un electrón es excitado a niveles de energías mayores, se forma el estado singulete o triplete.

El estado singlete excitado (el electrón del espín excitado) continúa apareado con el electrón del estado fundamental. En el estado triplete los dos electrones se han separado y están en forma paralela. El estado triplete excitado es menos energético que el estado singlete excitado. ^[15]

Figura 4. Estados Excitados



Fuente: Skoog, D. A; Holler, F.J. y Nieman T. A. Principios de análisis instrumental. Pág.383

Asociación de sucesos atribuidos al Diagrama de Energía Parcial, Fenómeno Luminiscente y diagrama de Jablonski representados en la Figura 3:

La línea horizontal gruesa en la parte baja de la figura, representa el estado basal o fundamental de la molécula en estado singlete S_0 . Energía de prácticamente todas las moléculas en disolución.

- Las líneas gruesas superiores son los niveles de energía de estados vibracionales fundamentales de los tres estados excitados. Las dos líneas situadas a la izquierda representan los estados electrónicos singlete primero S_1 y singlete segundo S_2
- La línea de la derecha T_1 representa la energía del primer estado electrónico triplete (energía menor a S_1 Singlete), donde el electrón cambia la multiplicidad de espín, en el estado excitado triplete, T_1 , la molécula cae de nuevo

bajo relajación vibracional antes de liberar la energía para regresar a su estado fundamental, en un proceso conocido como fosforescencia. Esta transición es “prohibida” por las reglas cuánticas clásicas y como tal la velocidad es mucho menor que la fluorescencia (fosforescencia $10^{-4} - 10^{-1}$ s).

Las líneas finas horizontales muestran cada estado electrónico que tiene asociados varios niveles de energía vibracionales.

- La energía de emisión es menor que la de absorción y por ello la señal de fluorescencia se observa a menores energías.
- La excitación de una molécula por absorción de dos bandas de radiación, una centrada alrededor de la λ_1 ($S_0 \rightarrow S_1$) y la segunda alrededor de la λ más corta λ_2 ($S_0 \rightarrow S_2$); la molécula puede entonces pasar a cualquier estado excitado vibracional.^[1,7,14]

2.4.1 Características de Fluorescencia

El desplazamiento de Stokes es la rápida relajación vibracional en el estado excitado pasando a niveles vibracionales más bajos, los fluoróforos (compuesto que emiten luz en la región ultravioleta visible) caen a niveles vibracionales elevados del estado fundamental, es decir; para desactivarse una molécula del estado singulete excitado S_1 puede transferir su energía electrónica a un nivel vibracional fuertemente excitado del estado electrónico fundamental S_0 . Los fluoróforos sufren efectos de desplazamiento Stokes por efectos del solvente, reacciones en el estado excitado, formación de complejos y por transferencia de energía.^[14]

Basados en los espectros de absorción y emisión se usa la siguiente ecuación, donde λ_2 y λ_1 corresponden a las longitudes de onda de emisión y absorción.

$$\Delta\nu \approx \left(\frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\lambda_1 + \lambda_2} \right) \quad (1)$$

En el espectro de emisión de fluorescencia, cuando la excitación se realiza a niveles electrónicos y vibracionales elevados, el exceso de energía es rápidamente disipado, llevando al fluoróforo al nivel vibracional más bajo del primer estado electrónico excitado S_1 .

La Imagen especular es una consecuencia de transferir su energía electrónica a un nivel vibracional fuertemente excitado del estado electrónico fundamental S_0 en la fluorescencia; el espectro de emisión es una imagen especular del espectro de absorción, debido a que los estados de vibración de S_0 y S_1 son similares. ^[14]

2.4.2 Fluorescencia y Variables

- Longitudes de onda de excitación cortas: pueden provocar la ruptura de enlaces o incrementar un estado de disociación desactivándose la molécula por esa ruta



- La emisión ocurre desde el estado excitado de menor energía, siendo por tanto la radiación No Resonante
- Solvente: Un cambio en la polaridad del solvente influye en la estabilización del estado excitado.

- En la mayoría de las moléculas polares el estado excitado es más polar que el estado fundamental; por ello, al aumentar la polaridad del disolvente se tiende hacia una estabilización del estado excitado
- pH: Los cambios en la emisión de los compuestos de este tipo provienen del número de especies resonantes diferentes que están asociadas con las formas ácidas o básicas de las moléculas. Diferente valor de las K_a en el estado excitado
- El oxígeno: atenúa la fluorescencia debido fundamentalmente a sus *propiedades oxidantes y a sus características paramagnéticas*.
- El paramagnetismo del oxígeno molecular, al igual que otros átomos paramagnéticos, favorece el cruzamiento entre sistemas (lo cual conduce hasta el estado triplete); el cruzamiento entre sistemas se da por una transición no radiativa a un nivel vibracional excitado del estado electrónico triplete T_1 , y está provocado por el acoplamiento espín-orbital entre estados electrónicos de diferente multiplicidad. También va acompañado de la correspondiente relajación vibracional.^[7]

2.5 FLUORESCENCIA Y APAGAMIENTO

La desactivación (o Quenching) hace que se reduzca la intensidad de la fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia se ve afectada por diferentes aspectos que hacen que disminuya la intensidad, entre estos están: Transferencia de energía, reordenamientos moleculares, formación de un complejo en el estado basal y apagamiento colisional. ^[13, 15,17] El apagamiento colisional se produce cuando el fluoróforo en estado excitado se desactiva al entrar en contacto con alguna otra molécula en solución.

Las moléculas no son modificadas químicamente durante este proceso. [15,17]

El apagamiento colisional se describe mediante la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = \exp(K_q \tau_o [Q]) = \exp K_{sv} Q$$

Donde F_0 y F son la intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia del apagador, respectivamente, K_q es la constante bimolecular de apagamiento, τ_o es el tiempo de vida promedio del fluoróforo en ausencia del apagador, Q es la concentración del apagador y K_{sv} es la constante de Stern-Volmer de apagamiento.

En la ecuación de Stern-Volmer (ecuación 1), la relación $\frac{F_0}{F}$ no es lineal y muestra una curvatura hacia arriba en altas concentraciones del apagador. A bajas concentraciones la expresión exponencial puede escribir así:

$$\exp K_{sv} Q \approx 1 + K_{sv} Q$$

De esta manera la relación de la concentración con el apagamiento lineal. Por tanto la ecuación puede expresarse de la siguiente forma:

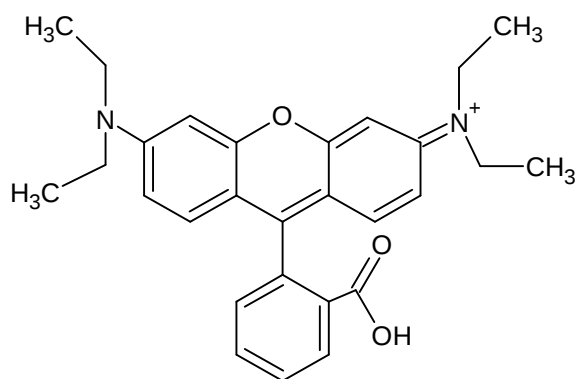
$$\frac{F_o}{F} = 1 + K_{sv} Q$$

Cuando los péptidos se unen con el marcador Rodamina B y ocurre una disminución en la intensidad de la fluorescencia. [14,20]

2.5.1 Rodamina B

La preparación y uso de RB debe ser cuidadosa debido a que evidencias han demostrado que los colorantes de la rodamina tienen un potencial de carcinogenicidad para los animales y los seres humanos [19, 20].

Figura 5. Estructura de RB

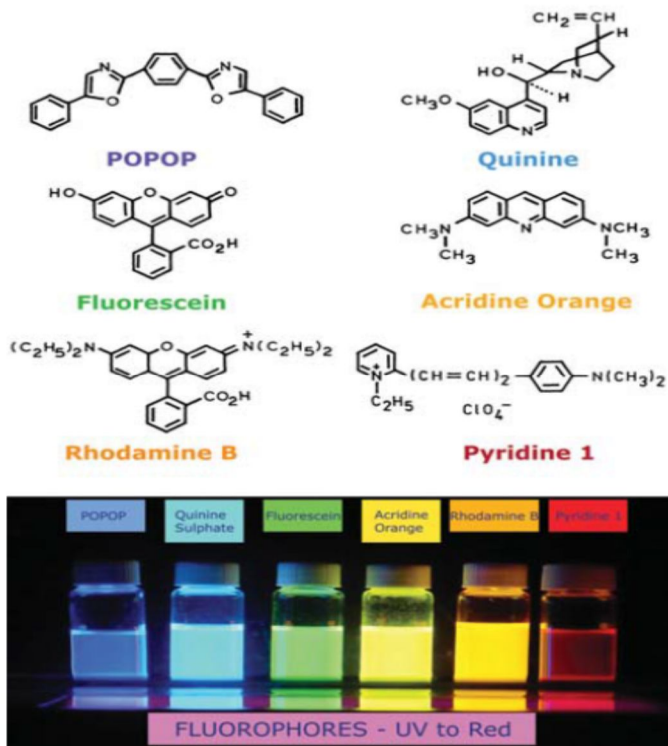


RODAMINA B

La rodamina B ($C_{28}H_{31}N_2O_3$), es un colorante sintético y se utiliza como marcador fluorescente. La naturaleza del compuesto es apolar aunque presenta un poco de polaridad que le otorgan los grupos funcionales amino y ácido carboxílico, los grupos amino laterales puede causar impedimento estérico. [19,20] La RB influye en el rendimiento fluorescente debido a que posee fluorescencia intrínseca y si se realizará marcaje con RB en los péptidos PG y PLB podría existir apagamiento en la fluorescencia. La rodamina B tiene como máximos de excitación y emisión aproximadamente 565 y 590. [20] La RB que se caracterizó por UV-Vis es de Eastman Kodak, también se le llama Tetrametilrodamina, Punto de Fusión 199-201 ° C, solubilidad en agua 15 g 20°C, masa molar 479.02 g/mol, soluble en ácido acético al 30 % aproximadamente 400 g/L. “la RB se prepara en ácido acético al 25 % debido a que en condiciones ácidas aumenta afinidad por los aminoácidos”. La Rodamina B se torna de color Rosa Intenso y se puede apreciar en la Figura 10, es por ello su uso para teñir material textil y plástico. [19,20]

El marcador fluorescente RB debe cumplir algunos parámetros químicos, por ejemplo: Reactividad baja, estabilidad de pH y los requisitos fotofísicos por ejemplo: un cierto límite en absorción máxima, emisión máxima, y un cierto tiempo de vida fluorescente los cuales fueron detallados en el (2011) por Birgit Rudat , Esther Birtalan, Sidonie B.L. Vollrath , Daniel Fritz , Dominik K. Kölmel, Klaus Müllen , Hans-Jürgen Eisler , Uli Lemmer , Stefan Bräse^[20]

Figura 6. Marcadores fluorescentes más usados.



Fuente: Lakowicz Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition. Pág.2

2.5.2 Fluorescencia Intrínseca

La fluorescencia en Proteínas y Péptidos se debe a los fluoróforos intrínsecos como triptófano (Trp), Tirosina (Tyr), Fenilalanina (Phe) ^[1,13]

Tabla 3. Fluorescencia de Aminoácidos aromáticos en agua a PH neutro.

Aminoácido	Absorbancia λ máx(nm)	Fluorescencia λ máx (nm)	Rendimiento Cuántico	Tiempo de Vida (ns)
Trp	295	353	0.13	3.1
Tyr	275	304	0.14	3.6
Phe	260	282	0.02	6.8

Fuente: Lakowicz Joseph. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Pág. 64

El triptófano es sensible a la polaridad del solvente; el grupo indol absorbe por 280 nm y emite cerca al 340 nm. La emisión del grupo indol se desplaza hacia el azul si el grupo está atrapado dentro de una proteína nativa, y su emisión puede pasar a mayores longitudes de onda cuando la proteína se desdobla. ^[1]

La intensidad de la fluorescencia del triptófano depende de la constante dieléctrica del entorno en la proteína. ^[13]

Cuando las cadenas laterales con triptófano son expuestas al medio acuoso de una constante dieléctrica baja, la intensidad de la fluorescencia disminuye. ^[21]

En los PG y PLB la emisión se desplaza al rojo. En solventes polares, la emisión del indol se desplaza al rojo de la emisión observada en un solvente no polar. Los

espectros de fluorescencia de los péptidos que contienen triptófano demuestran la sensibilidad en el estado excitado atribuido al cromóforo indol.

Este tipo de sensibilidad conformacional tiene influencia en las propiedades fluorescentes del triptófano. ^[22]

La tirosina, fenilalanina y el triptófano, con sus cadenas laterales aromáticas, son relativamente apolares; todos ellos pueden participar en interacciones hidrofóbicas.

El grupo hidroxilo de la tirosina puede formar puentes de hidrógeno. La tirosina y el triptófano son significativamente más polares que la fenilalanina debido al grupo hidroxilo de la tirosina y al nitrógeno del anillo indólico del triptófano, por lo anterior, el grupo indol es el principal causante de que en la emisión el desplazamiento sea al rojo en el triptófano.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

✓ Parte Experimental

En esta sección se describe en forma detallada cada paso ejecutado para este estudio. Se implementó una metodología de investigación, cualitativa, descriptiva y estadística para la fluorescencia en las muestras PLB y PG, es importante aclarar que en los diferentes artículos leídos los autores procedieron de forma semejante con muestras biológicas en proteínas y péptidos. [5, 19, 20, 21,23, 33, 34, 35,36]

En los múltiples ensayos preliminares elaborados en este trabajo se estableció:

- Tratamiento de la muestra
- Buffers
- Las secciones 3.1, 3.2 y 3.3 se planteó la estrategia a seguir en el equipo espectrofotómetro de fluorescencia PTI/QM 40, se logró identificar la fluorescencia en RB, PLB y PG.
- Se realiza un análisis de Intensidad, área bajo la curva y concentración que se puede observar en la sección 3.8.

✓ Tratamiento de la Muestra PLB

La muestra de Péptido PLB se encontraba en estado sólido, la apariencia física es de color amarillo, se refrigera aproximadamente 10°C a 15° C, se rotula, se guarda en cónicos de plástico con tapa y además se cubre con Parafilm. Se preparó el péptido PLB disolviendo inicialmente en agua tipo I para tomar el espectro de absorción UV-VIS y determinar el máximo de absorbancia, la solución patrón [PLB] = 8.611×10^{-4} M, la apariencia de la solución es traslúcida, no se observa turbidez, luego se cubre con Parafilm y papel aluminio para evitar desnaturalización, se agitó por 15 min para homogenizar y se mide pH= 7.2, se llevó a la nevera; 3 días después se observa que sigue en condiciones iguales y se mide pH= 7.2.

Se toman espectros UV-Vis 1 mes después y hay pequeñas modificaciones. según la literatura las propiedades de las sustancias varían significativamente con variaciones pequeñas de pH.^[24] El péptido PLB se diluyó en Buffer Tris-HCl se caracteriza con UV-Vis y Maldi Toff Ms y no se observó en comparación con PG ninguna diferencia, se mide pH, para evitar cambios en el pH afectando la estabilidad del método.^[12,13]

Por lo anterior y queriendo diferenciar PLB de PG, se prepara un buffer diferente de Tris-HCl y se decide usar Buffer Britton Robinson en PLB debido a que se contaba con los materiales para su preparación y por curiosidad científica en su capacidad de tamponamiento respecto al Buffer Tris-HCl usado en PG, se mide pH debido a que los cambios de pH son sensibles a la fluorescencia; según la literatura las propiedades de las sustancias varían significativamente con variaciones pequeñas de pH.^[24] Se mide pH diariamente para evitar cambios que afecten la estabilidad del método.^[12,13]

✓ Tratamiento de la Muestra PG

La muestra PG estaba en una solución de Buffer Tris- HCl ,se rotula, se guarda en vial de vidrio de 1.5 ml con tapa y además se cubre con Parafilm "M". con las siguientes especificaciones: Concentración 2600 ppm depositada en un vial de 1.5 ml con Buffer Tris- HCl, de la solución stock de PG se tomó 0.820 mL y se diluye a 30 mL para obtener la solución patrón $[PG] = 3.431 \times 10^{-5}$ M. Se tomó el espectro de absorción UV-VIS y determinar el máximo de absorbancia, la solución patrón $[PG] = 3.431 \times 10^{-5}$ M, la apariencia de la solución es traslúcida, sin turbidez, se agitó por 15 min para homogenizar y se mide pH= 7.1, se llevó a la nevera aproximadamente 10°C a 15° C; 3 días después se observa que sigue en condiciones iguales y se mide pH= 7.1 una vez por semana y durante 3 meses se midió pH y se mantuvo constante.

✓ Buffer Britton Robinson^[26]

Se preparó el Buffer Britton Robinson y se realizó la toma del espectro de absorción UV-VIS. Se utilizó 0,127 gramos de H_3BO_3 , 0.04 M; se preparó 0,11 mL de H_3PO_4 , 0.04 M y densidad: 1.685 g/mL; se preparó 0,11 mL de ácido Acético y densidad: 1.049 g/mL; se utilizó 0,800 gramos de NaOH, 0.2 M.

Para evitar alteraciones en el pH debido a que los cambios bruscos son sensibles a la fluorescencia, en la preparación de las diluciones de la muestra PLB se controló pH durante la refrigeración y desrefrigeración a temperatura ambiente, teniendo en cuenta que las propiedades de las sustancias varían significativamente con variaciones pequeñas de pH.^[12,13]

✓ **Buffer Tris-HCl**^[26]

Se preparó el Buffer Tris- HCl y se realizó la toma del espectro de absorción UV-VIS, se mantienen las condiciones de pH en la muestra PG y se procedió a realizar las diluciones en el Buffer Tris- HCl (usado como solvente) y así mantener las mismas condiciones iniciales de la muestra PG. Se tiene en cuenta el pka de 8.06, lo que aporta capacidad tamponante efectiva a un intervalo de pH entre 7.0 y 9.2. Se utilizó en la forma ácida o Hidro-cloruro (Tris:HCl), debido a que PG contiene Histidina y aumenta la afinidad ácida.^[20]

Se mide pH durante la preparación de las diluciones y se controló pH durante el tiempo de refrigeración y también al desrefrigerarse a temperatura ambiente para evitar alteraciones en el pH debido a que los cambios bruscos son sensibles a la fluorescencia, se cubre con Parafilm, teniendo en cuenta que las propiedades de las sustancias varían significativamente con variaciones pequeñas de pH.^[12,13]

✓ **RB**^[24]

Las muestras PG y PLB no se marcaron con RB, aun así formaba parte del planteamiento inicial del trabajo y se pensó que en caso de que no hubiera fluorescencia presente en las muestras se usaría RB debido “la RB se hubiera diluido en ácido acético al 25 % debido a que en condiciones ácidas aumenta su afinidad”. La solución patrón de [RB]= 1.0437×10^{-3} M rodamina B se reparó con 0.5 gramos de RB diluida en 1000 mL (0,11 mL de ácido acético al 25%).

RB siempre se cubre con Parafilm y se protege en la oscuridad con papel aluminio, para evitar que la luz pueda inducir a cambios fotoquímicos.

3.1 METODOLOGÍA EMPLEADA EN ESPECTROS DE FLUORESCENCIA Y EXCITACIÓN PLB

En una celda de cuarzo se depositaron 3mL de diversas disoluciones de concentraciones PLB, los parámetros elegidos se esbozan en la figura 7 además de los siguientes: integración 1.0 segundo y tamaño de paso a 1.5nm.

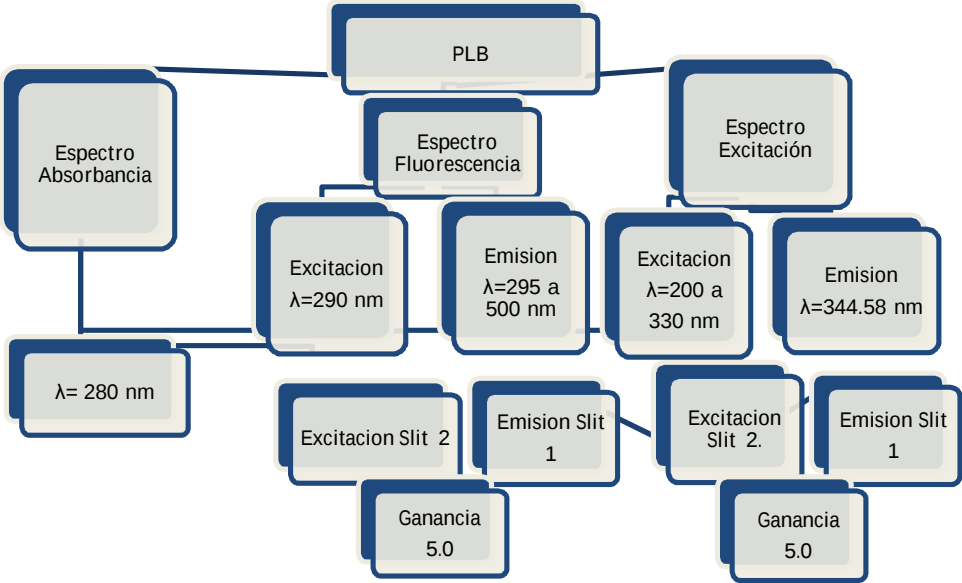
Para obtener óptimos espectros de fluorescencia en PLB:

En el Equipo de fluorescencia en el Modo Emisión (Emisión Scan): La emisión es escaneada entre dos longitudes de onda (Emisión λ = 295nm a 500nm), mientras la longitud de onda de excitación esta fija (Excitación λ = 290nm). La intensidad en la emisión es medida como función de la longitud de onda de excitación. Debido a la naturaleza de la fluorescencia, la longitud de onda de excitación se fija a una longitud de onda menor que el rango de longitud de onda de emisión.

Para obtener óptimos espectros de Excitación en PLB:

Modo Excitación (Excitation Scan): La excitación es escaneada entre dos longitudes de onda (Excitación λ = 200 nm a 300nm), mientras la longitud de onda de emisión esta fija (Emisión λ = 344.58nm). La intensidad en la emisión es medida como función de la longitud de onda de excitación. Debido a la naturaleza de la fluorescencia, la longitud de onda de emisión se fija a una longitud de onda mayor que el rango de longitud de onda de excitación.

Figura 7. Metodología Empleada en Espectros de Emisión/Excitación de PLB.



Fuente: autora

3.2 METODOLOGÍA EMPLEADA EN ESPECTROS DE FLUORESCENCIA Y EXCITACIÓN PG

En una celda de cuarzo se depositaron 3mL de diversas disoluciones de concentraciones PG, los parámetros elegidos se esbozan en la figura 8 además de los siguientes: integración 1.0 segundo y tamaño de paso a 1.5 nm.

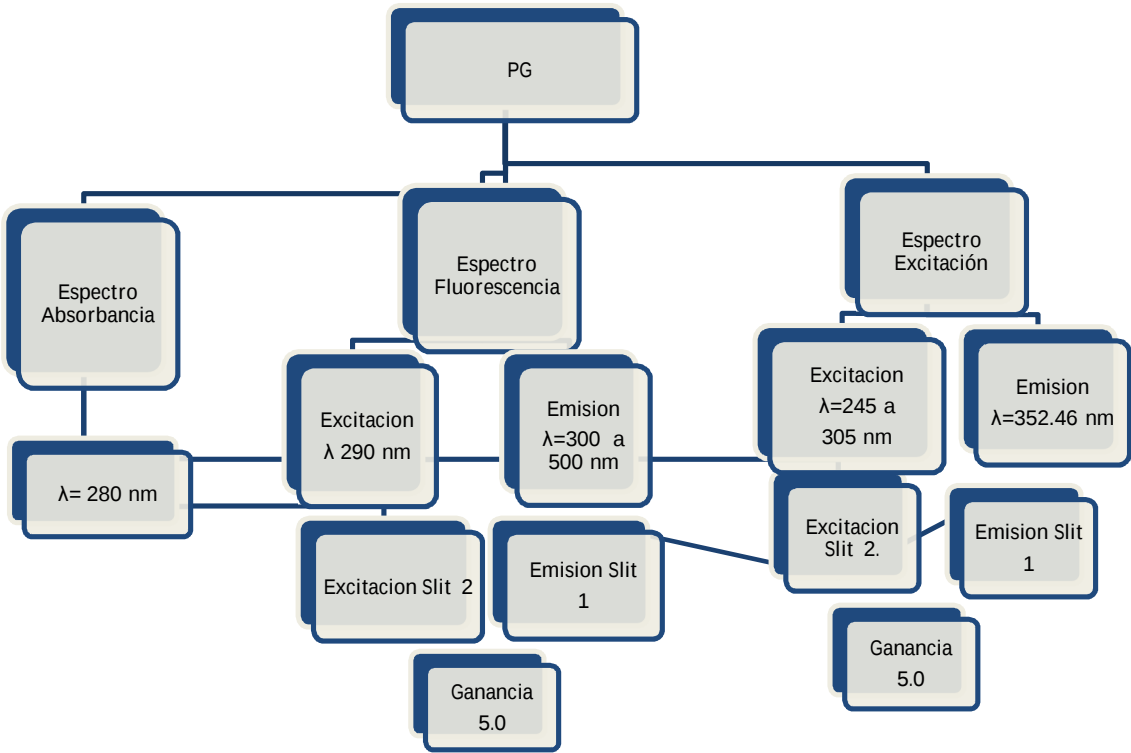
Para obtener óptimos espectros de fluorescencia en PG:

En el Equipo de fluorescencia en el Modo Emisión (Emisión Scan): La emisión es escaneada entre dos longitudes de onda (Emisión λ = 300 nm a 500nm), mientras la longitud de onda de excitación esta fija (Excitación λ = 290nm). La intensidad en la emisión es medida como función de la longitud de onda de excitación. Debido a la naturaleza de la fluorescencia, la longitud de onda de excitación se fija a una longitud de onda menor que el rango de longitud de onda de emisión.

Para obtener óptimos espectros de Excitación en PG:

Modo Excitación (Excitation Scan): La excitación es escaneada entre dos longitudes de onda (Excitación λ = 245 nm a 305 nm), mientras la longitud de onda de emisión esta fija (Emisión λ = 352.46 nm). La intensidad en la emisión es medida como función de la longitud de onda de excitación. Debido a la naturaleza de la fluorescencia, la longitud de onda de emisión se fija a una longitud de onda mayor que el rango de longitud de onda de excitación.

Figura 8. Metodología Empleada en Espectros de Emisión/Excitación PG.



Fuente: autora

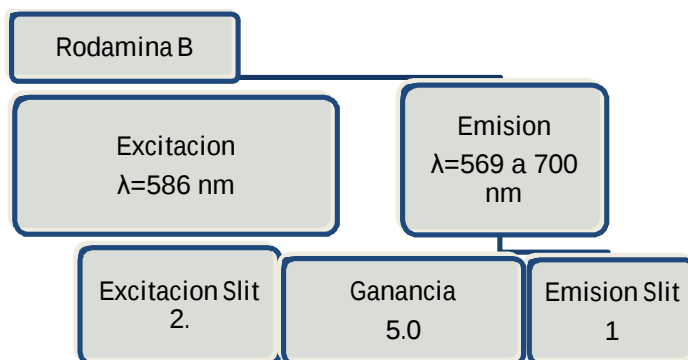
3.3 METODOLOGÍA EMPLEADA EN ESPECTROS DE FLUORESCENCIA Y EXCITACIÓN RB

En una celda de cuarzo se depositaron 3 mL de diversas disoluciones de concentraciones RB, los parámetros elegidos se esbozan en la figura 9 además de los siguientes: integración 1.0 segundo y tamaño de paso a 1.5 nm.

Para obtener óptimos espectros de fluorescencia en RB:

En el Equipo de fluorescencia en el Modo Emisión (Emisión Scan): La emisión es escaneada entre dos longitudes de onda (Emisión λ = 569 nm a 700 nm), mientras la longitud de onda de excitación esta fija (Excitación λ = 586 nm). La intensidad en la emisión es medida como función de la longitud de onda de excitación. Debido a la naturaleza de la fluorescencia, la longitud de onda de excitación se fija a una longitud de onda menor que el rango de longitud de onda de emisión.

Figura 9. Metodología empleada para Emisión/Excitación de RB



Fuente: autora

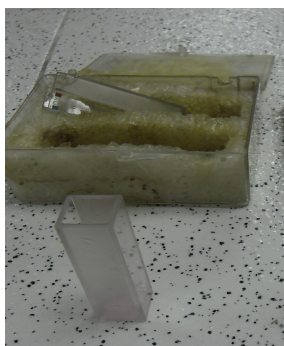
Figura 10. Pasos en la preparación del colorante Fluorescente RB. Fotografía tomada por la autora



3.4 INSTRUMENTACIÓN USADA PARA ESPECTROSCOPIA VISIBLE

El espectro de absorción UV-Vis fue tomado con el espectrofotómetro UV-2400 PC Shimadzu, celda para espectrofotometría de absorción de cuarzo, rectangular con dos de los lados de la celda esmerilados, camino óptico 10 mm, con espesor de base y ventana de 1.25 mm, volumen nominal 3.5 mL.

Figura 11. Celda de Cuarzo. Fotografía tomada por la autora



Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Instrumentación Química UIS.

Figura 12. Espectrofotómetro UV-Vis 2400 Shimadzu. Fotografía tomada por la autora



Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Instrumentación Química UIS.

Figura 13. Purificador de Agua Tipo I. Fotografía tomada por la autora



El agua destilada se deposita en el purificador mostrado en la figura 13 y al cabo de un tiempo se obtiene el agua Tipo I.

Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Instrumentación Química UIS.

3.5 CALIBRACIÓN DEL U.V-Vis

Figura 14. Espectrofotómetro U.V-Vis y compartimento de Muestra.



Fotografía tomada por la autora en el laboratorio de Instrumentación Química UIS

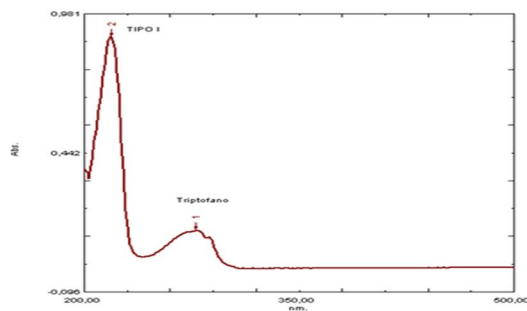
Para calibrar el equipo y monitorear la reproducibilidad respecto al deterioro de la celda, se examina su línea base, se utilizaron dos celdas bajo las siguientes condiciones, así:

- Se depositó en las dos celdas Agua Tipo I y se monitoreo Agua Tipo I vs Agua Tipo I.
- También se depositó en una celda Agua Tipo I y en la otra celda Aire, se monitorio Agua Tipo I Vs Aire

El descontaminar las celdas, evita ruido en la línea base y mala resolución en los espectros.^[14]

Una vez calibrado el Espectrofotómetro U.V-Vis, se usan las siguientes condiciones para la toma de espectros de absorción PLB y PG, $\lambda = 200 \text{ nm}$ a 600 nm , velocidad de escaneo media, intervalo de muestreo 1.0 nm , modo de escaneo automático, ancho de rendija 0.5 nm .

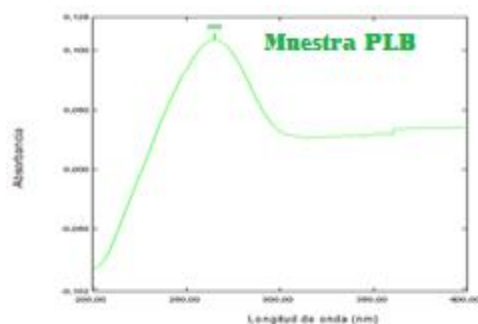
Figura 15. Espectro U.V-Vis para Trp



El espectro UV-Vis para el triptófano puro en agua Tipo I es según la figura 15 es aproximadamente 280nm.

Fuente: autora

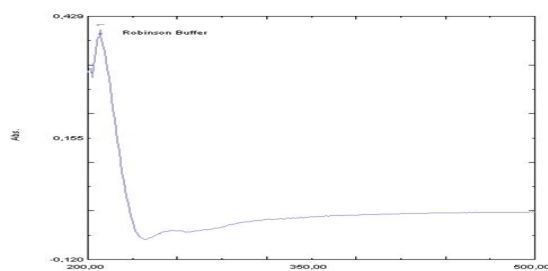
Figura 16. Espectro U.V-Vis para PLB



Se comprobó la presencia de triptófano en la muestra PLB y se establece el rango de longitud de onda entre 200nm y 400nm, donde se observa según la figura 16, un único pico en 260 nm.

Fuente: autora

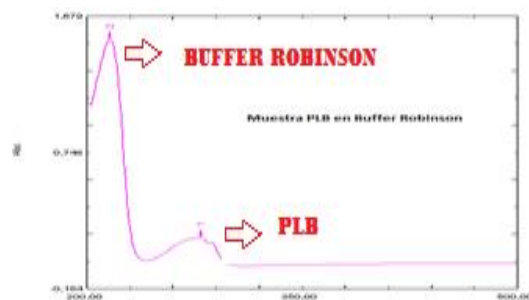
Figura 17. Espectro U.V-Vis Buffer Britton Robinson



Espectro UV-Vis para el Buffer Britton Robinson, figura 17, $\lambda = 213$ nm.

Fuente: autora

Figura 18. Espectro U.V-Vis PLB en Buffer Britton Robinson



Para PLB en Buffer Britton Robinson se observan dos picos correspondientes al Buffer Robinson (pico 2) y PLB (pico 1), longitudes de onda 216nm y 280 nm.

Fuente: autora

Se procede a comprobar que el triptófano se encuentre presente en la muestra PG y se obtuvo en el rango de longitud de onda entre 250nm y 300nm, según UV-VIS:

Figura 19. Espectro U.V – Vis Para PG

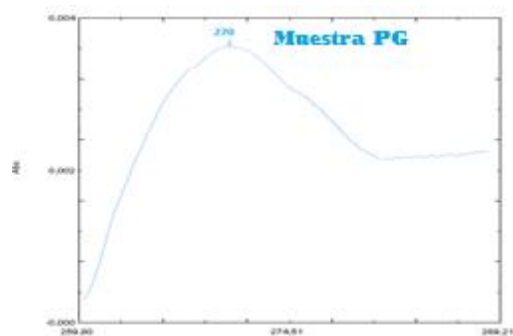


Figura 19 muestra un pico en 270 nm para la muestra PG pura

Fuente: autora

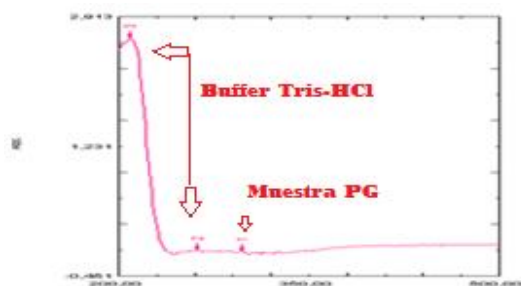
Figura 20. Espectro U.V – Vis Buffer Tris- HCl.



El espectro en la figura 20 corresponde al Buffer Tris-HCl (2 picos) cuyas longitudes de onda son 262nm y 253nm.

Fuente: autora

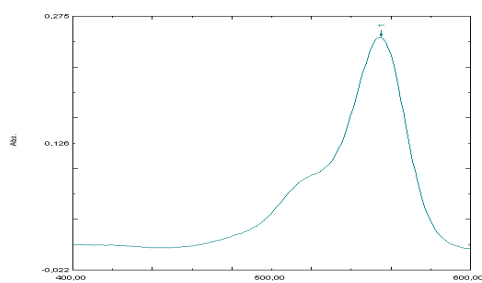
Figura 21. Espectro U.V-Vis de PG en Buffer Tris-HCl



PG en Buffer Tris-HCl, se observan perfectamente la muestra PG (pico 1) y al Buffer Tris-HCl (pico 2 y 3).

Fuente: autora

Figura 22. Espectro U.V-Vis RB



Espectro UV-VIS de la RB, la longitud de onda se registró en 552 nm.

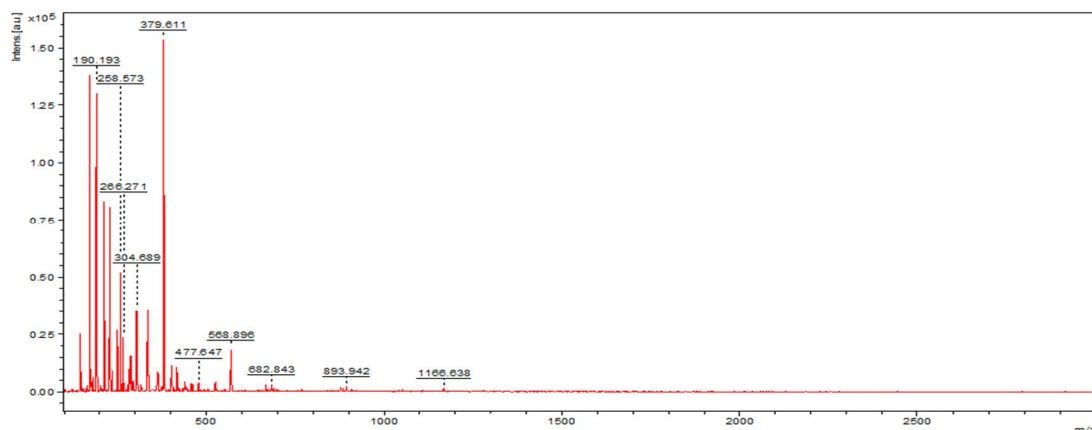
Fuente: autora

3.6 ANÁLISIS MALDI-TOFF-MS

La espectrometría de masas (MS) es usada para verificar y medir la composición de iones derivados de moléculas a través del uso de fotones de alta energía, El método “MALDI” según sus siglas en inglés se conoce como el método que identifica la desorción/ionización por láser asistida por la matriz.

Se presentan los espectros de las dos muestras analizadas PLB y PG en este estudio, El equipo utilizado fue un espectrómetro de masas MALDI-TOFF ultraflexextreme Bruker, con una resolución de 40.000 FWHM, bajo las condiciones de adquisición: exactitud 1 ppm, láser de 337 nm rango de masas de 500 a 3000 Da en modo positivo, se usó para las matriz Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -HCCA), CAS Number 28166-41-8, la matriz Manufacturada por Bruker Daltonik GmbH, 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. La muestra PLB que estaba en estado sólido se liofiliza.

Figura 23. Espectro MALDI-TOFF-MS Matriz para PLB y PG



En la matriz se depositaron los Buffers Tris- HCl, Buffer Britton Robinson y se realizan duplicados para obtener mejor toma de muestras, comparar y se presentan los mejores espectros MALDI-TOFF-MS en las figuras 24 y 25.

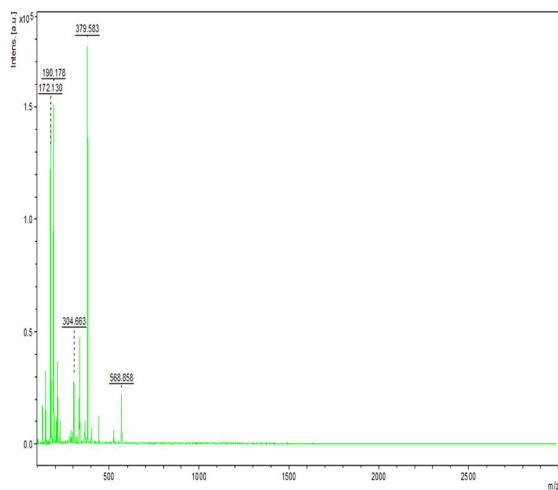
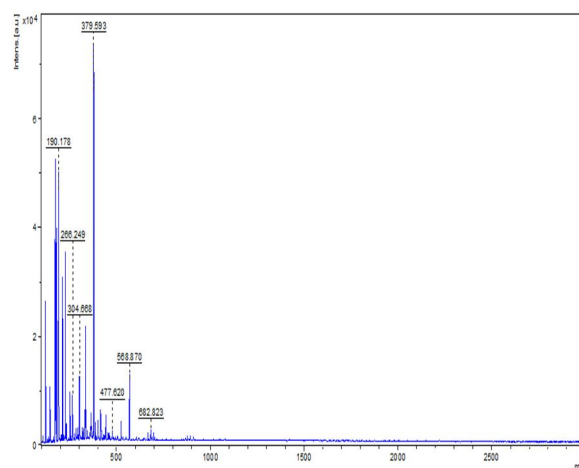


Figura 24. Espectro MALDI-TOFF-MS
Buffer Britton Robinson

Figura 25. Espectro MALDI-TOFF-MS
Buffer Tris- HCl



Para obtener óptimos espectros de PLB y PG en MALDI-TOFF-MS, se realizó:

Se colocó una pequeña cantidad de la matriz y la muestra PLB, se depositó en la TARGET, se realizaron duplicados. Se tomó una pequeña cantidad de muestra PG y se colocó una pequeña cantidad de la matriz y se realizan duplicados. Posteriormente se escogieron los espectros donde se encontraba la mejor señal.

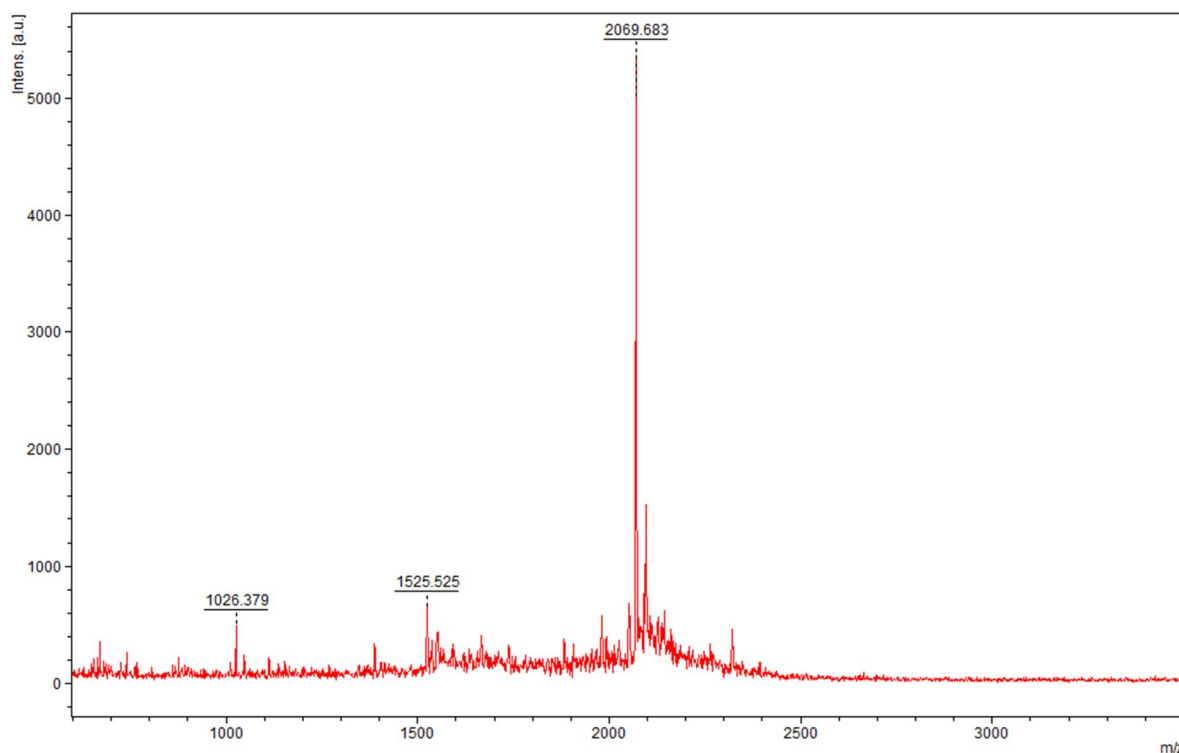
Para retirar el péptido del soporte sólido (clivar), se utilizó una solución de: agua (MQ), triisopropilsilano (TIPS), Etanoditiol, ácido trifluoroacético (TFA), en las siguientes concentraciones (2.5%:2.5%:2.5%:2.25%). Posteriormente el péptido se precipitó con dietil eter frío y se separó por centrifugación; se agrega una pequeña cantidad de agua y para purificarla se liofilizó (por sublimación se retiran agua y residuos). La reacción de clivaje se realizó en reactor de 10 ml durante dos horas. Se utilizó para liofilizar el equipo LABCONCO modelo 79340, donde la temperatura de la cámara de enfriamiento fue de -83 °C, la presión en el sistema de 0.010 mBar y el tiempo de trabajo de 24 horas.

El péptido PG en Buffer Tris-HCl **no se liofiliza** por encontrarse en forma líquida.

El Procesamiento usado corresponde a **Flex-Analysis 3.3**, es un software de post-procesamiento para espectros adquiridos con espectrómetros de masas de tiempo de vuelo de la serie flex de Bruker. El software **Flex-Analysis 3.3** proporciona herramientas de fácil manejo de detección automatizada, auténtica e interactiva de picos (*SNAP*, *Centroid* y *Sum peakfinder*) que facilitó el análisis de los espectros y su visualización en una ventana emergente son plenamente identificadas con la herramienta de anotar picos (*annotate*), según el aminoácido correspondiente, junto con sus masas y sus intensidades correspondientes. El uso de MALDI-TOFF y la preparación de la muestra, logra la generación de espectros que alcanzan una precisión de aproximadamente ~10 ppm y fragmentos de 8 kDa resueltos mono-isotópicamente. ^[28]

Espectros obtenidos de PLB y PG en MALDI-TOFF-MS:

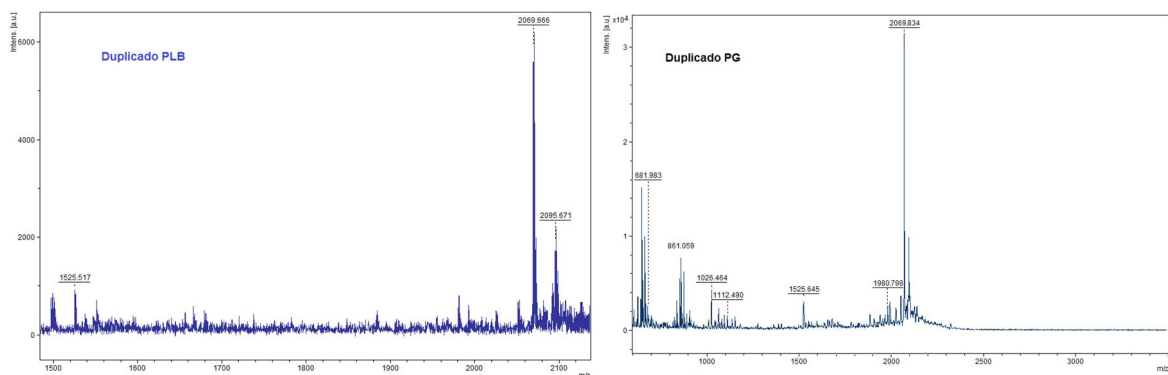
Figura 26. Espectro MALDI-TOFF-MS para PLB.



Fuente: autora

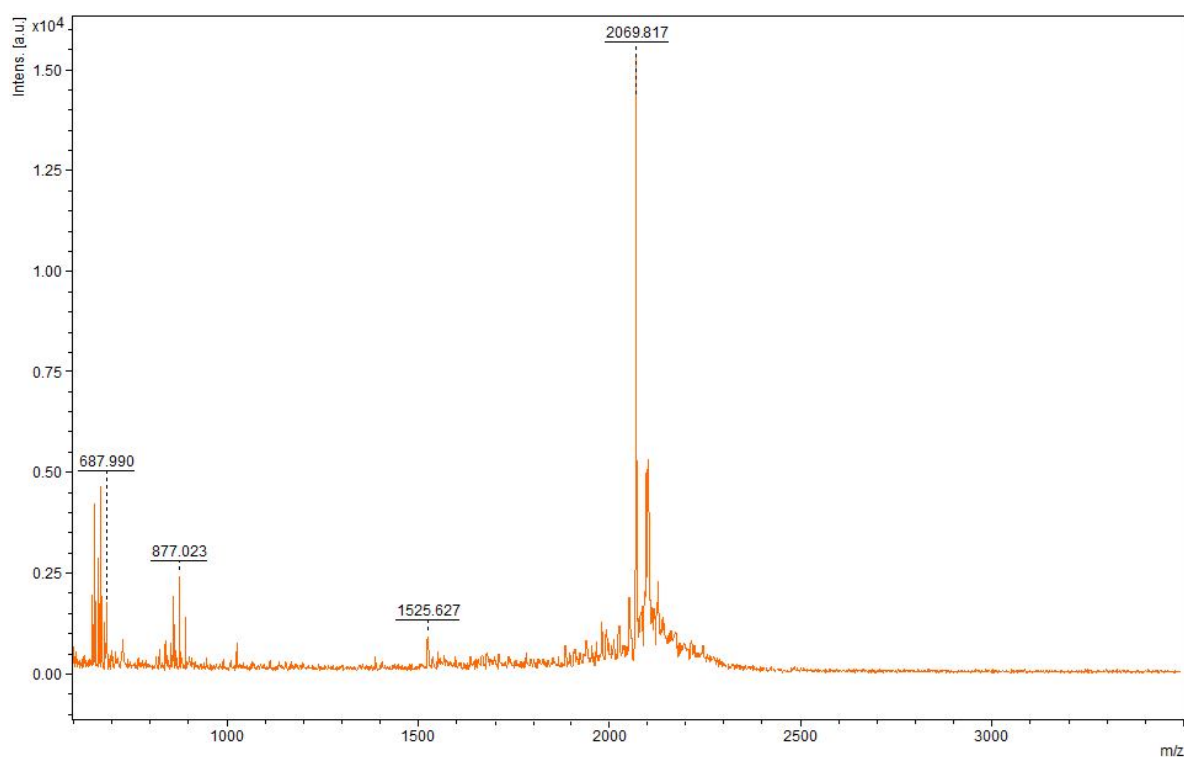
En la Figura 26 se observa el péptido PLB en ausencia del Buffer y la matriz, para caracterizar PLB por espectrometría de masas MALDI-TOFF-MS es importante aclarar: la Tabla 1 reporta una masa m/z de 2047.1923. PLB está amidado en su carbono terminal y la ganancia por ionización del Na^{2+} cuya masa m/z es 22 da como resultado el valor del pico cuya masa m/z es 2069.683 que se resalta con la herramienta de anotar picos (*annotate*).

Figura 27. Espectro MALDI-TOFF-MS Duplicado para PLB y PG



Fuente: Autora

Figura 28. Espectro MALDI-TOFF-MS para PG.



Fuente: Autora

En la Figura 28 se observa el péptido PG, para caracterizarlo por espectrometría de masas MALDI-TOFF-MS en la tabla 2 reporta una masa m/z de 2069.8 PG está amidado en su carbono terminal y la ganancia por ionización del Na^{2+} cuya masa m/z es 22 da como resultado el valor del pico cuya masa m/z es 2069.817.

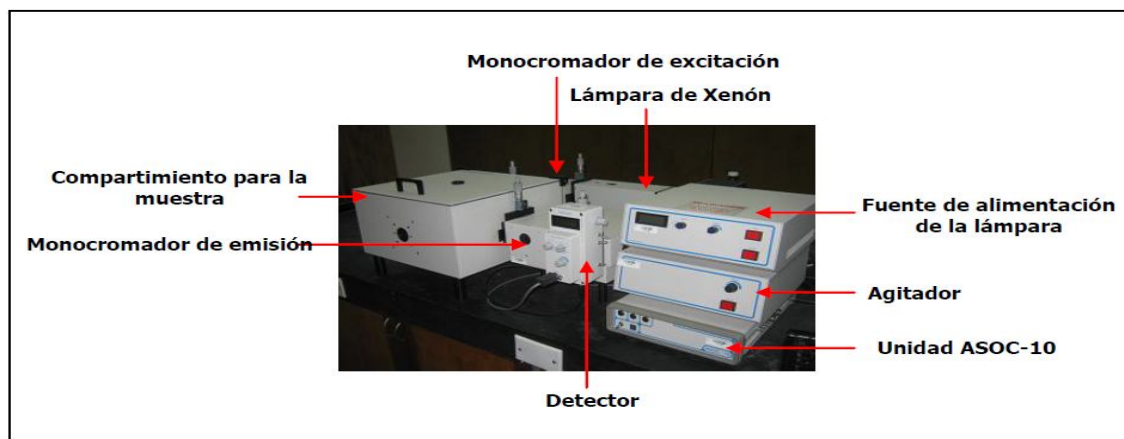
3.7 INSTRUMENTACIÓN Y FLUORESCENCIA

Figura 29. Toma de Datos en Espectrofotómetro de Fluorescencia Fotografía tomada por la autora



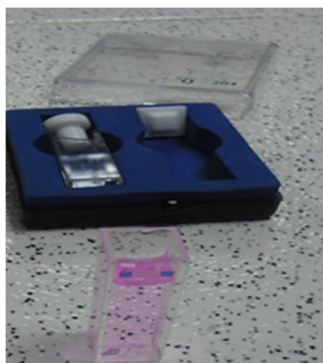
Para la adquisición de espectros de Emisión y espectros de Excitación de los Péptidos PLB, PG y RB se utilizó el Espectrofotómetro de Fluorescencia PTI/QM 40 (PhotonTechnology Internacional/Quanta Master) del laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad Industrial de Santander, entre las características del equipo están una lámpara de Arco de Xenón, 2 Rendijas de excitación de ancho 0.5 mm, ancho de las 2 rendijas de emisión 0.25 mm, tamaño de paso 1.5 nm, integración 1 segundo, correcciones de excitación y RCQC (emisión) habilitadas, compartimento para muestra, Filtros, monocromadores (excitación y emisión), Detector, Agitador; se encuentra conectado a un computador donde está instalado el SoftwareFelixGX usado para la obtención de datos matemáticos y parámetros gráficos de fluorescencia. Posteriormente en software OriginPro 8 se realiza el procesamiento de datos matemáticos. Además el equipo cuenta con un compartimento de la muestra que permite hacer análisis de fluorescencia a diferentes temperaturas. El control de temperatura se hace con un termostato. Antes de depositar cada solución en la celda fue necesario realizar el lavado de ésta, para evitar que residuos de soluciones anteriores en ella.

Figura 30. Descripción Externa del Espectrofotómetro de Fluorescencia



Fuente: Instructivo Espectrofotómetro de Fluorescencia del laboratorio de Instrumentación Química de la Universidad Industrial de Santander. Pág 6.

Figura 31. Celda de cuarzo con patrón RB. Fotografía tomada por la autora



Fuente: Fotografía tomada en el Laboratorio de Instrumentación Química UIS

La cubeta o celda utilizada para fluorescencia suele ser de sílice o cuarzo, se utilizó de cuarzo, un centímetro de paso del haz, tienen capacidad máxima de 5 ml de volumen de solución, ninguno de los lados de la celda es esmerilado dado que el vidrio absorbe la luz UV requerida para excitar, la diferencia de las celdas usadas en el espectrofotómetro de fluorescencia y espectrofotometría de

absorción, radica en las cuatro caras ópticamente transparentes, es decir las cuatro caras están hechas de cuarzo por tanto es preciso tener especial cuidado al manipularlas para no dejar huellas de dedos marcadas, que puedan interferir con la medición. Para hacer reproducibles las medidas se marca la cara de la cubeta que siempre se enfrentará al haz de luz incidente.

Para eliminar residuos y material interferente que se producen por el uso con las soluciones de PG y PLB, se lavó la celda antes y después de usarla, se usó para el lavado Extran + Solución del 50% de HNO_3 + Solución 2M de HCl seguida por agua, para remover detergentes que contienen material fluorescente y se lava varias veces con agua destilada y también con Agua Tipo I.

El secado de la celda se realizó por succión usando acetona y una pipeta pasteur recubierta de un tubo plástico evitando rayar las superficies de la celda

Figura 32. Espectrofotómetro de Fluorescencia PTI/QM 40



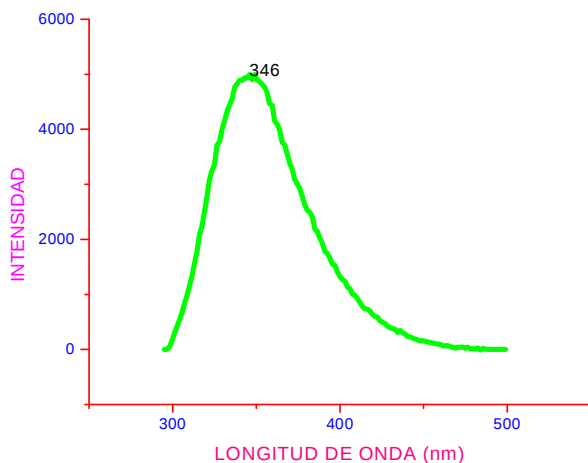
Fuente: Fotografía Tomada en el Laboratorio de Instrumentación Química UIS

3.8 ADQUISICIÓN DE DATOS EN FLUORESCENCIA PARA PLB

Se preparó solución patrón [PLB]= 8.611×10^{-4} M; Diluciones en balones aforados de 5 mL de Solución Patrón: (1) 8.611×10^{-4} M, (2) 7.578×10^{-4} M, (3) 6.544×10^{-4} M, (4) 1.894×10^{-4} M, (5) 1.550×10^{-4} M. Se trabaja entre longitudes de 295nm a 499nm. Temperatura 293 K. $\lambda_{ex} = 275$ nm.

Se integró cada espectro entre 295 nm a 499 nm realizando la sumatoria de cada una de las intensidades, de esta forma se determina el área bajo la curva del espectro, se realizaron tres réplicas y se tomó el espectro de fluorescencia para analizar la reproducibilidad del método. Se hizo uso del software Origin Pro 8 y la herramienta Excell 2010 para el tratamiento estadístico de datos y gráficas. Se aprecia en la Figura 33 la variación de la Intensidad de la fluorescencia respecto a la concentración en las diferentes diluciones de correspondientes a PLB.

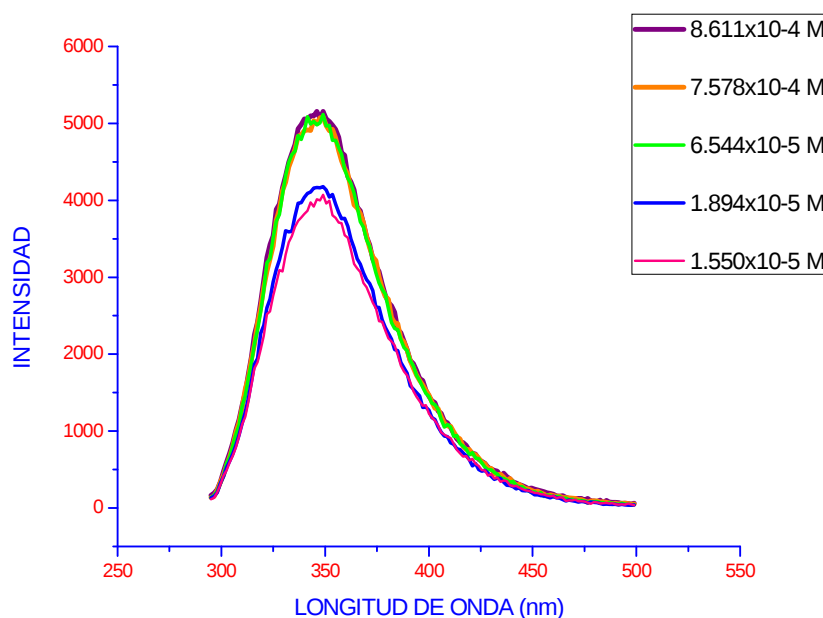
Figura 33. Espectro de Fluorescencia PLB



Fuente: Autora

Puede observarse un pico a $\lambda = 346$ nm

Figura 34. Espectro de Fluorescencia PLB obtenidos Experimentalmente

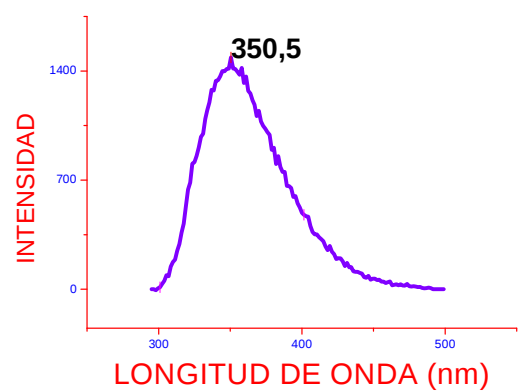


Fuente: Autora

3.9 Adquisición de datos en Fluorescencia para PG

La solución patrón inicial se encuentra a 2600 ppm o 1.255×10^{-3} M en Buffer Tris-HCl. Se tomó 0.820 mL y se diluye en 30 mL de Buffer Tris-HCL obteniéndose la solución patrón $[PG] = 3.4311 \times 10^{-5}$ M; se hacen diluciones en balones aforados de 5 mL de Solución Patrón: (1) 3.4311×10^{-5} M, (2) 1.5783×10^{-5} M, (3) 1.0979×10^{-6} M, (4) 8.5778×10^{-6} M, (5) 2.7449×10^{-6} M. Se trabaja a longitudes entre 295 nm a 499 nm. Temperatura 293 K. $\lambda_{ex} = 275$ nm. Se integró realizando una sumatoria de cada una de las intensidades, rango de 295 nm a 499 nm, se determina el área bajo la curva del espectro, se realizaron tres réplicas, se tomó el espectro de fluorescencia para analizar la reproducibilidad del método.

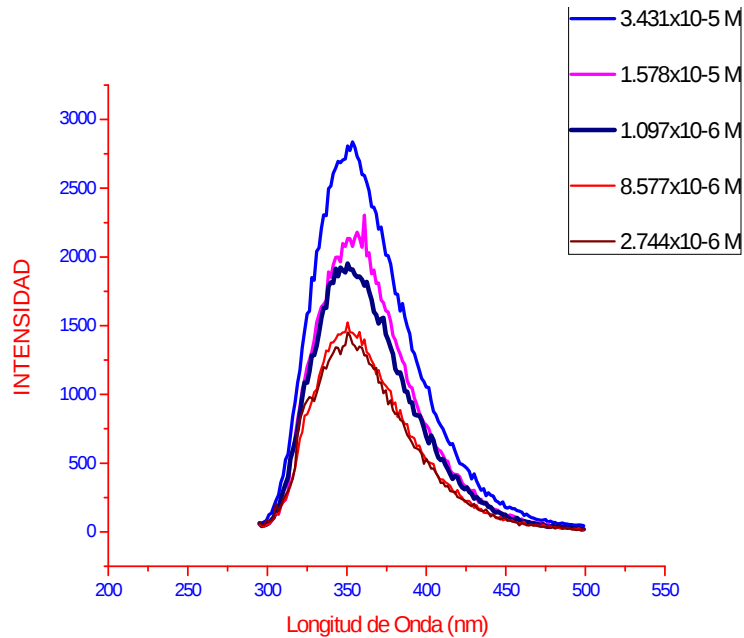
Figura 35. Espectro de Fluorescencia del péptido PG.



Fuente: Autora

Figura 36. Espectro de Fluorescencia PG obtenidos Experimentalmente.

Se representa la Concentración Vs Intensidad del espectro de Fluorescencia PG

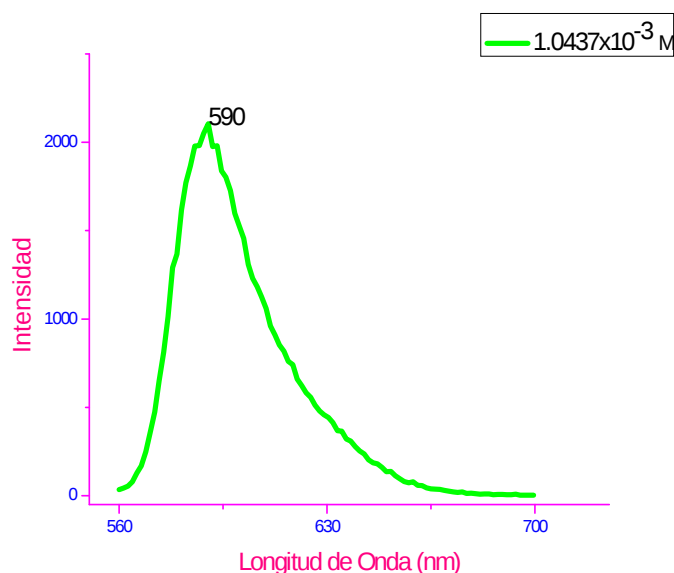


Fuente: Autora

3.10 Adquisición de datos en Fluorescencia para RB

No se empleó Rodamina B, debido a que PLB y PG poseen fluorescencia intrínseca, no se hace necesario marcar con RB; aun así y debido al interés científico personal se realizó la toma de espectro de fluorescencia de RB y se puede observar en la figura 37. En caso de usarse la Rodamina B como marcador fluorescente en muestras que contengan triptófano, **se realiza la observación** de la disminución en la intensidad de la señal (fenómeno conocido como “Quenching” o “Apagamiento”), donde Huai-Hong Cai, Xing Zhong, Pei-Hui Yang, Wei Wei, Jianan Chen, Jiye Cai, introducen un nuevo método de Apagamiento en 2010. [24]

Figura 37. Espectro Emisión RB



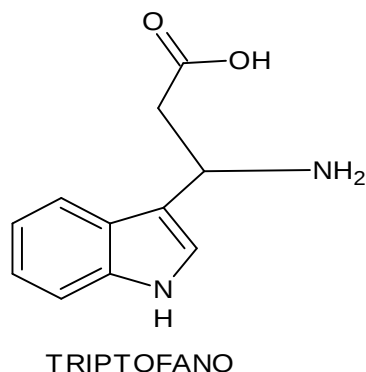
Fuente: autora

Puede observarse un pico máximo de Emisión a 590 nm.

3.11 Fluorescencia en Triptófano

Los péptidos PG y PBL presentan fenilalanina, estudios demuestran que cuando están presentes en un péptido la fenilalanina y el triptófano como en nuestro caso, la presencia del triptófano será la que se destaque. ^[12,13] El triptófano tiene un anillo aromático, grupo indol y un grupo amino, los grupos mencionados contienen pares de electrones disponibles, además el grupo amino en presencia del anillo aromático es un GDE (grupo donador de electrones), el anillo aromático con electrones π “es causante de la buena fluorescencia en el triptófano”, y la fluorescencia intrínseca es característica propia de la molécula. ^[1, 12,13]

Figura 38. Estructura del Triptófano

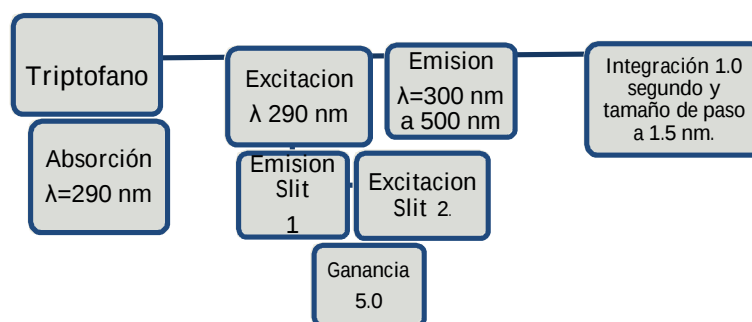


La fluorescencia puede ser usada para estimar la naturaleza del microambiente del triptófano que puede cambiar si se usan desnaturalizantes. Si hay desnaturalización del péptido, por ejemplo: si una proteína que contiene un único triptófano en su núcleo "hidrofóbico" se desnaturaliza con el aumento de temperatura, aparece un cambio de color en el espectro de emisión rojo. Esto se debe a la exposición del triptófano a un medio ambiente acuoso en contraposición a una proteína hidrofóbica interior. La adición de un tenso activo a una proteína que contiene triptófano, que se encuentra expuesto al solvente acuoso, causará un cambio al espectro azul de emisión, si el triptófano está incrustado en la vesícula o micela de surfactante. La fluorescencia del triptófano es dominante sobre la que se presenta en la tirosina y fenilalanina. ^[12,13]

3.11.1 Metodología empleada en Espectros de Fluorescencia del Triptófano

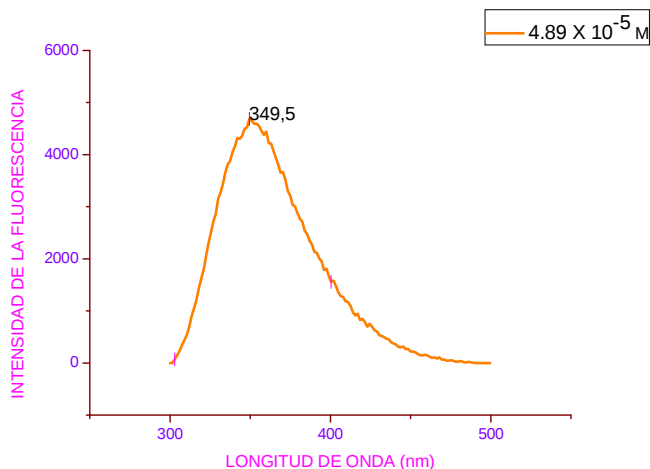
Se depositó en la celda 3mL de triptófano puro en: Buffer Tris HCL y Buffer Robinson, se observó el comportamiento experimental del triptófano en los Buffers y se hacen comparaciones con los péptidos PLB y PG que contienen triptófano.

Figura 39. Metodología empleada para Emisión/Excitación del Triptófano



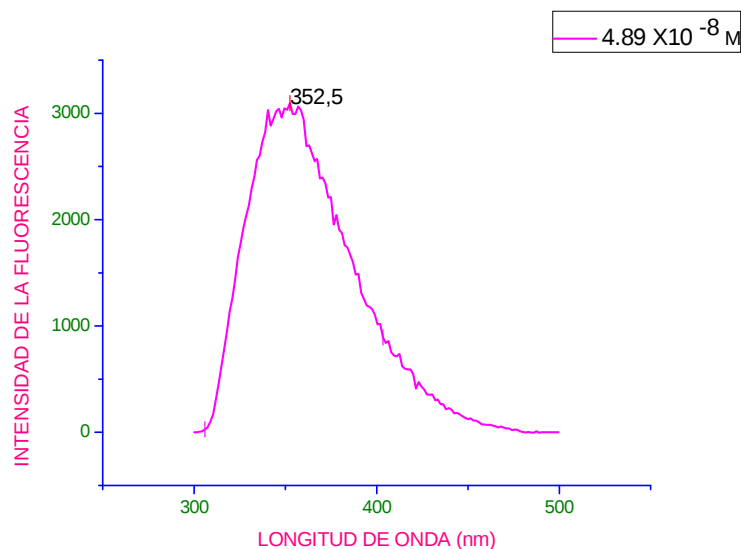
Fuente: autora

Figura 40. Fluorescencia Triptófano en Buffer Robinson



Fuente: autora

Figura 41. Fluorescencia Triptófano en Buffer Tris- HCl



Fuente: autora

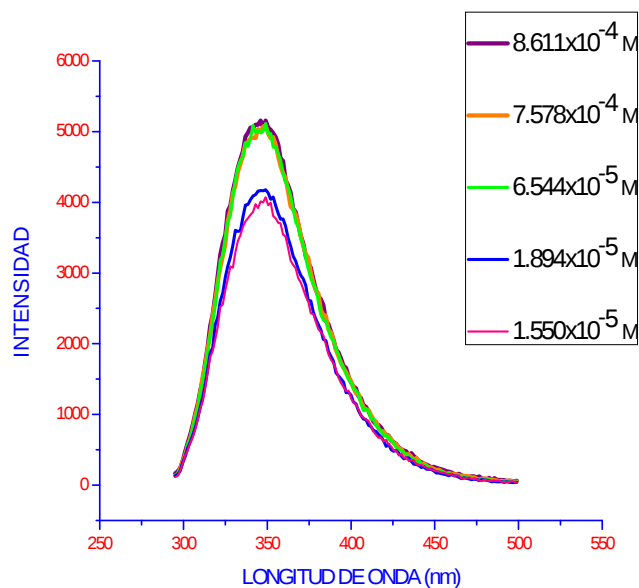
4. Curvas de Calibración y Análisis Descriptivo

4.1 Datos Experimentales de Espectro de Fluorescencia PLB

Los espectros de fluorescencia de la solución patrón $[\text{PLB}] = 8.611 \times 10^{-4} \text{ M}$; y las diluciones en balones aforados de 5 mL de Solución Patrón: (1) $8.611 \times 10^{-4} \text{ M}$, (2) $7.578 \times 10^{-4} \text{ M}$, (3) $6.544 \times 10^{-4} \text{ M}$, (4) $1.894 \times 10^{-4} \text{ M}$, (5) $1.550 \times 10^{-4} \text{ M}$. presentan una banda de Emisión máxima de fluorescencia a una longitud de onda característica.

La curva de calibración de cada dilución confirma este comportamiento. El valor del coeficiente de regresión, R^2 , indica que el ajuste lineal es adecuado.

Figura 42. Espectros de Fluorescencia PLB



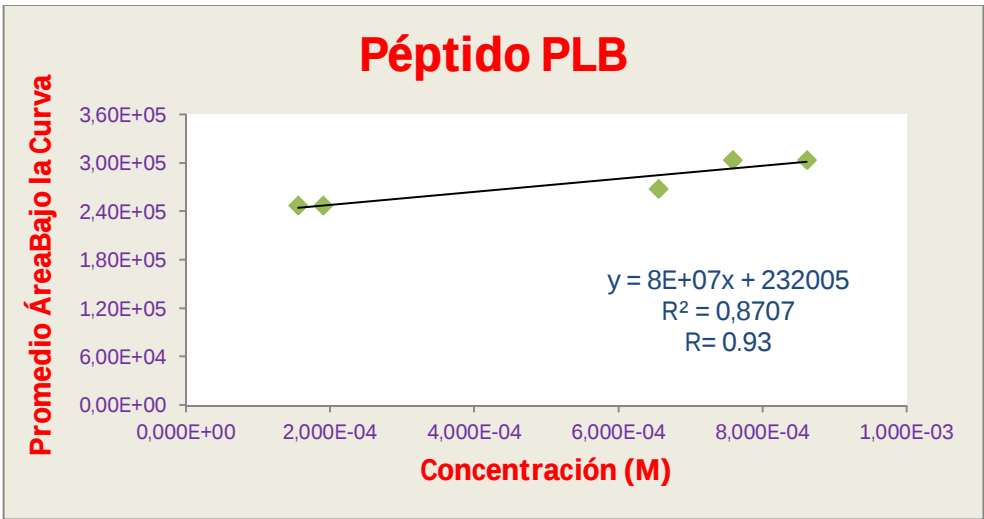
Fuente: autora

Tabla 4. Datos Analíticos de Fluorescencia PLB

Concentración PLB (M)	Area Bajo La Curva Espectro	Area Bajo la Curva Replica 1	Area bajo la curva Replica 2	Area bajo la curva Replica 3	Promedio del Area bajo la curva	Varianza	Desviación Estándar del Blanco (s)	Desviación Estándar conjunto mediciones (s)	% Coeficiente de variación
1,550E-04	2,54E+05	2,49E+05	2,44E+05	2,44E+05	2,48E+05	1,02E+10	2,12E+02	4,58E+03	2,10
1,895E-04	2,54E+05	2,49E+05	2,44E+05	2,44E+05	2,48E+05	1,02E+10	2,12E+02	4,59E+03	1,85
6,545E-04	3,03E+05	2,87E+05	1,89E+05	2,93E+05	2,68E+05	1,37E+10	2,12E+02	5,32E+04	19,84
7,578E-04	3,04E+05	3,05E+05	3,05E+05	3,04E+05	3,04E+05	1,54E+10	2,12E+02	8,50E+02	0,28
8,612E-04	3,04E+05	3,04E+05	3,05E+05	3,05E+05	3,04E+05	1,54E+10	2,12E+02	8,18E+02	1,34
Áreas Bajo la Curva de PLB									
Regresión Lineal (mol /L)	Coeficiente de Correlación			Límite de Detección	de	Límite de Cuantificación	Sensibilidad		
y = 8E+7x + 232005	0,93			7,95E-06		2,65E-05	8,00E+07		

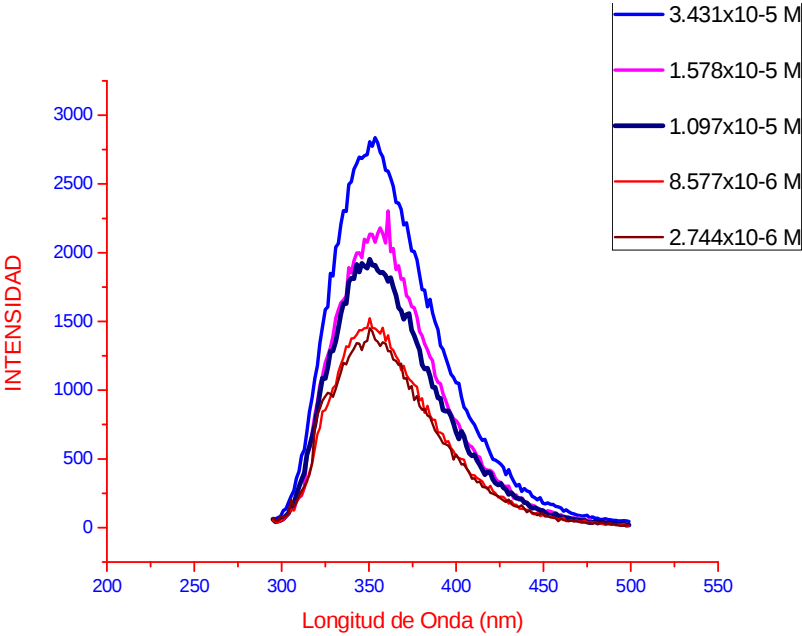
Fuente: autora

Figura 43. Curva de Calibración para PLB



Fuente: autora

Figura 44. Espectros de Fluorescencia PG



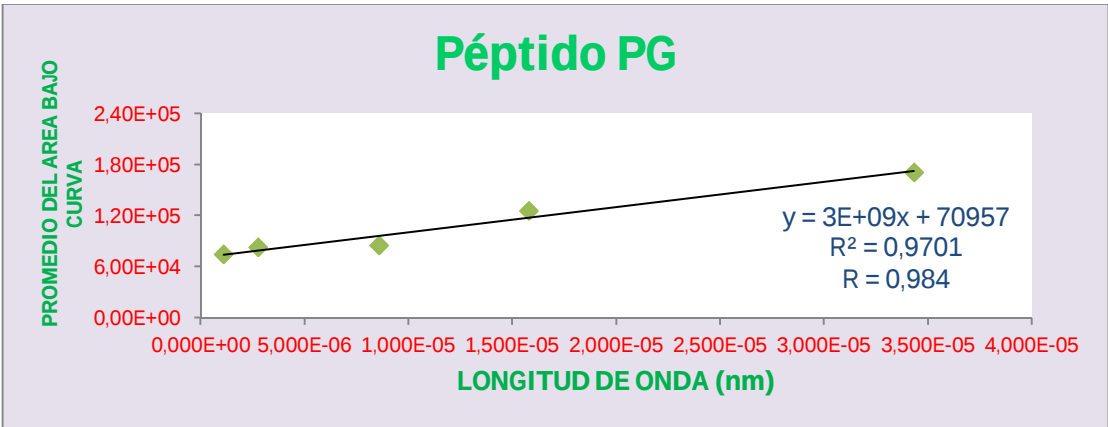
Fuente: autora

Tabla 5. Datos Analíticos de Fluorescencia PG

Concentración PG (M)	Area Bajo La Curva	Area Bajo la Curva	Area bajo la curva	Area bajo la curva	Promedio del Area bajo la curva	Varianza	Desviación Estándar del Blanco (s)	Desviación Estándar del conjunto de mediciones (s)	% Coeficiente de variación
	Espectro	Replica 1	Replica 2	Replica 3					
2,745E-06	8,25E+04	8,33E+04	8,67E+04	8,78E+04	8,28E+04	1,20E+09	2,12E+02	2,59E+03	2,10
8,578E-06	8,28E+04	8,39E+04	8,67E+04	8,88E+04	8,55E+04	1,22E+09	2,12E+02	2,74E+03	3,20
1,098E-06	1,37E+04	1,36E+04	1,36E+04	1,35E+04	7,45E+04	2,79E+09	2,12E+02	8,60E+04	3,70
1,578E-05	1,19E+05	1,21E+05	1,30E+05	1,33E+05	1,26E+05	2,66E+09	2,12E+02	6,90E+03	5,49
3,431E-05	1,70E+05	1,70E+05	1,73E+05	1,72E+05	1,71E+05	4,88E+09	2,12E+02	1,70E+03	1,34
Áreas Bajo la Curva de PG									
Regresión Lineal (mol /L)		Coeficiente de Correlación		Límite Detección		de		Límite de Cuantificación	Sensibilidad
y = 3E+09x + 62975		0,984		2,12E-07				7,07E-05	3,00E+09

Fuente: autora

Figura 45. Curva de Calibración para PG



Fuente: autora

4.2 Datos Experimentales de Espectro de Fluorescencia PG

4.3 Análisis Descriptivo de Datos Obtenidos en la Parte Experimental

Se analiza fluorescencia de aproximadamente un total de 27 muestras en (soluciones patrón, 1 toma inicial y 3 réplicas) entre los péptidos PG y PLB en diferente concentración. En PLB y PG el triptófano al tener dominio hidrofóbico queda orientado en su plegamiento hacia el interior de la molécula, en contacto con sus semejantes y alejados del agua. En consecuencia, la internalización de los grupos hidrófobos aumenta la aleatoriedad del sistema y, por consiguiente, produce un aumento de entropía al doblarse. Este aumento de entropía produce una contribución negativa a la energía libre del plegado ^[10]. Por lo anterior y para evitar la desnaturalización del péptido en medio acuoso se determinó hacer uso de Buffers Robinson y Tris-HCl, usados en PLB y PG respectivamente y observándose cambios en las absorbancias. ^[11]

4.3.1 Regresión Lineal para PLB y PG

La curva de calibración correspondió al modelo de regresión lineal sencillo por mínimos cuadrados (SRL) de medidas repetidas, se realizaron otras comparaciones con modelos de regresión logarítmica y cuadrática, la SRL obtiene mejores ajustes y además se obtiene una buena respuesta en LOD, LQD y coeficiente de correlación (R^2); igualmente la SRL presenta mejor ajuste en la expresión de datos de confianza o intervalos. Se integró cada espectro “para ello se realiza suma de todas las intensidades”, así se tiene un intervalo de confianza intrínseco, y se construye la gráfica usando el área de la integración del blanco (Buffer) como desviación estándar (s), garantizando una exactitud o cercanía al valor verdadero. Al realizarse la integración se tomó toda el área debajo de la

curva entre 295 nm a 499 nm debido a que no existe presencia de hombros en el espectro de fluorescencia obtenido. Con esta integración se obtiene un 99% garantizando más cercanía al valor verdadero para evaluar y cuantificar las muestras. De acuerdo a la IUPAC, puede calcularse el (LQD) y (LOD) de un método analítico a partir del conocimiento de la desviación estándar atribuible a la respuesta de una muestra y la pendiente de la recta del calibrado del analito, la expresión que se aplicó para este cálculo varía en función del método instrumental empleado corrige la señal frente al blanco. (AGUIRRE ORTEGA, L., et al.,2001). Se calcula la desviación estándar (medida de la dispersión respecto a la media) y se calcula la varianza que representa la relación lineal que existe entre 2 variables.

% Coeficiente de Variación (Desviación estándar Relativa) CV:

$$CV = \frac{S}{x} * 100$$

Donde x es el promedio de áreas bajo la curva de cada muestra

S es la desviación estándar típica

El límite de detección (LOD) es la mínima concentración de analito que es detectada con confiabilidad, la respuesta obtenida más baja para medir concentraciones de analito es, se calcula así:

$$LOD = \frac{3 * s}{b} \text{ Donde } b \text{ es la pendiente de la recta.}$$

S es la desviación estándar típica

El límite de Cuantificación (LQD) concentración más baja del analito que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables.

$$LQD = \frac{10 * s}{b} \text{ Donde } b \text{ es la pendiente de la recta, } S \text{ es desviación estándar típica}$$

Coeficiente de correlación o determinación (R²) con el objetivo de realizar comparaciones entre las medidas de concentración, que tan relacionadas están la intensidad y la concentración basado en la linealidad de la recta.

4.3.2 Curva de Calibración para PLB

La regresión lineal se realizó entre el área de la señal de emisión de triptófano en la muestra PLB los picos ubicados entre 346 nm y 347.5 nm además de la concentración utilizada en la sección 2.8. Se realizó la muestra patrón y tres (n=3) repeticiones, para establecer errores en los puntos de la curva de calibración.

En la SRL se observa el ajuste en la expresión de datos de confianza según la figura 42. La probabilidad es alta y la predicción de la información relativa brindada por SRL. La información presentada en las tablas 4 y 6 como resumen de los datos analíticos de la calibración que corresponde a LOD, LOQ, pendiente y coeficiente de correlación (R²).

Tabla 6. Parámetros de Verificación resultados para PLB

<u>Porcentaje</u> <u>variación</u>	<u>Coeficiente de</u> <u>desviación es</u> $\%CV = \frac{\text{es tan dar}}{\text{Pr omedio}} * 100$ <u>Área</u> <u>bajolacurva</u>	<u>El límite de</u> <u>detección</u> <u>(LOD)</u>	<u>El límite de</u> <u>Cuantificación</u> <u>(LOQ)</u>	Coeficiente de correlación (R ²).
En promedio total fue: 5.08		7.95 X 10 ⁻⁶	2.65 X 10 ⁻⁵	0.93

Fuente: autora

La pendiente en la curva de calibración para PLB (figura 43) es positiva, indica que hay una relación de correlación directa, es decir: Cuanto cambia la variable área respecto al cambio de concentración, a mayor concentración mayor área e intensidad de fluorescencia, además la linealidad en la gráfica indica la sensibilidad de calibración y la presencia de un solo fluoróforo que para este trabajo es el triptófano. Los resultados reportados en las tablas las tablas 4 y 6 indican valores obtenidos propios del método, se obtiene precisión propia del análisis de muestra, es decir, siguiendo el protocolo de preparación de muestras y adquisición de espectros, el método establecido es viable para el análisis de péptidos de cadena corta en forma independiente. La recta no pasa cerca del origen de coordenadas significa que el método está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. No existen diferencias apreciables entre los valores experimentales.

Parámetros Analíticos

(R²): El coeficiente de correlación obtenido en la tabla 4, indica el grado de relación entre la variable x (concentración muestra PLB), y la variable y (Promedio área Bajo la curva). Su valor máximo es 1, si (R²) es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. (AGUIRRE ORTEGA, L., et al., 2001)

(LOD) y (LOD) registrados en la tabla 4 y deducidos de la curva de calibración se encuentran dentro de los rangos determinados por los estudios interlaboratorios de la literatura de estandarización (Eaton *et al.*, 2005). El límite de detección de la muestra y la recta obtenida muestra la relación entre el ruido y la señal de la muestra PLB, el resultado obtenido en el límite de cuantificación demuestra que se detecta presencia de la muestra. (AGUIRRE ORTEGA, L., et al., 2001)

4.3.3 Resultados gráficos para PLB

La información presentada en la sección 3.1 se describe bajo la metodología independiente para PLB empleada en la Figura 7, el pico de intensidad máxima que se obtuvo partiendo de la línea base y así no tener inconvenientes en el cálculo de integración del espectro al mantenerse la longitud de onda de emisión en 341,5 nm donde el espectro cumple con las condiciones de no presentar hombros. Se puede observar en la figura 33, la señal de fluorescencia es intensa, el ancho de banda en el espectro es 205 nm, da origen a la construcción del espectro de fluorescencia con anchura y forma bien definidas, se observa la curva gaussiana sin hombros en su contorno, a medida que se aumenta la concentración del péptido la fluorescencia se hace más intensa y puede observarse en el espectro de fluorescencia obtenido experimentalmente, para ser mejor apreciado a la vista, se usaron varios colores para diferenciar las concentraciones utilizadas y se detallan en la figura 42, los espectros de fluorescencia que se obtuvieron confirman la fluorescencia del triptófano en la muestra PLB.

4.4 Curva de Calibración para PG

La regresión lineal se realizó entre el área de la señal de emisión del triptófano en la muestra PG, los picos oscilan entre 350 nm - 350.5 nm y la concentración utilizada en la sección 3.1. Se pasó por el equipo la muestra patrón y tres (n=3) repeticiones, para establecer errores en los puntos de la curva de calibración. En la SRL se observa el ajuste en la expresión de datos de confianza según la figura 45. La probabilidad y la predicción de la información relativa brindada por SRL. La información presentada en las tablas 5 y 7 es un resumen de los datos analíticos

de la calibración que corresponde a LOD, LOQ, pendiente y coeficiente de correlación (R^2).

Tabla 7. Parámetros de Verificación resultados para PG

<u>% Coeficiente de Variación</u> <i>desviación es</i> $\%CV = \frac{\text{es tan dar}}{\text{Pr omedio}} * 100$ <i>Área</i> <i>bajolacurva</i>	<u>El límite de</u> <u>detección</u> <u>(LOD)</u>	<u>El límite de</u> <u>Cuantificación</u> <u>(LOQ)</u>	Coeficiente de correlación (R^2).
Promedio: 3.17	2.12×10^{-7}	7.07×10^{-5}	0.984

Fuente: autora

La pendiente en la curva de calibración para PG según la figura 44 es positiva, lo que indica que hay una relación de correlación directa, es decir: La asociación entre la Intensidad y la cooncentración, a mayor concentración mayor área e intensidad de fluorescencia, además la linealidad en la gráfica indica la presencia del fluoróforo natural “el triptófano”. Los resultados reportados en las tablas 5 y 7 indican la reproducción del método independiente establecido para PG, se obtiene precisión o reproducibilidad propias de la muestra, es decir el protocolo de preparación de muestras establecidos y la adquisición de espectros. La linealidad muestra que la recta no pasa cerca del origen de coordenadas; significa que el método está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado. No existen diferencias apreciables entre los valores experimentales.

Parámetros Analíticos:

(R²): El coeficiente de correlación obtenido en la tabla 4, indica el grado de asociación entre la variable x (concentración muestra PLB), y la variable y (Promedio área Bajo la curva), también muestra la sensibilidad de calibración obtenida. Su valor máximo es 1, si (R²) es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. (AGUIRRE ORTEGA, L., et al., 2001)

(LOD) y (LOD) que se encuentran registrados en la tabla 4 y deducidos de la curva de calibración se encuentran dentro de los rangos determinados por los estudios interlaboratorios de la literatura de estandarización (Eaton *et al.*, 2005). El límite de detección de la muestra, la sensibilidad y el ruido, son propias de la señal obtenida para la muestra PLB, el resultado obtenido en el límite de cuantificación demuestra que se detecta W en la muestra. (AGUIRRE ORTEGA, L., et al., 2001)

4.4.1 Resultados gráficos para PG

Se puede observar en la figura 34, la señal de fluorescencia es intensa, la anchura de banda en el espectro es 200 nm, da origen a la construcción del espectro de fluorescencia con anchura y forma bien definidas, la curva gaussiana no presenta hombros en su contorno, a medida que aumenta la concentración del péptido la fluorescencia se hace más intensa, en el espectro de fluorescencia obtenido experimentalmente para PG se aprecia las diferencias en las concentraciones por la distinción de varios colores utilizados en la figura 35, los espectros de fluorescencia que se obtuvieron confirman la fluorescencia del triptófano en la muestra PG y el pico máximo detectado es de 350,5 nm.

Buffers: en el espectro de masas Maldi Toff MS para el Buffer Britton Robinson, se observa claramente la señal propia y se destaca en la figura 23 con color verde.

Para el Buffer Tris-HCl se registran señales y se destacan en la figura 24 con color Azul, precisamente la similitud en las señales MaldiToff MS para el Buffer Britton Robinson y Buffer Tris-HCl, ocasionan un comportamiento tampón similar.

Las soluciones tampón son especialmente útiles en sustancias biológicas (proteínas, péptidos...etc.), algunas como el Buffer Robinson contienen ácido fosfórico, ácido bórico, la pureza de los reactivos usados influye en los resultados para obtener optimas condiciones de tamponamiento. (Michaelis, *J. Biol. Chem.*, 1930, 87, 33).

El Buffer Britton Robinson se considera un tamponador con resultados satisfactorios dentro del gran número de soluciones tampón disponibles ^[26].

Se experimentó en el péptido PLB el Buffer Britton Robinson debido a la inquietud científica personal de observar cual sería la diferencia en los Buffers durante la fase experimental, además de enriquecer el trabajo experimental con un Buffer diferente al usado en el péptido PG, se puede entonces decir que el éxito en el uso de los Buffer está en la preparación adecuada y un cuidadoso control en el pH, el éxito tamponante permaneció aún con tres meses de haberse preparado los Buffers y se comprobó con el equipo pHmetro 3505 JENWAY, el Buffer Britton Robinson cuya mezcla ácida es calibrado de pH= 7.2. Se utilizó el Buffer Tris-HCl en forma ácida a pH 7.3 debido a que PG contiene Histidina y aumenta la afinidad ácida. ^[20]

Espectro Raman

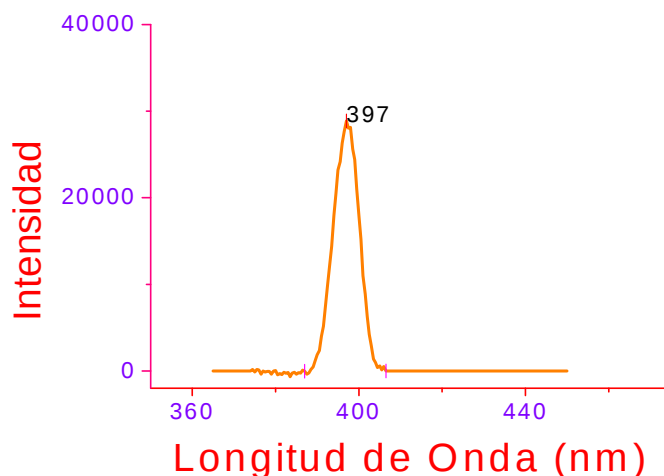
Se mencionó que se hizo uso del agua Tipo I (al agua destilada se le pasa por Purificador de Agua EasyPure II PF/PU ThermoScientific que está en el Laboratorio de Instrumentación Química UIS y se puede observar en la figura 13, las muestras de péptidos PLB Y PG se diluyeron inicialmente con agua tipo I para realizar ajustes de parámetros, pero antes se toma el espectro Raman, sirve como

medio de calibración y así saber el estado del equipo “Antes de Correr las muestras”.

Realizando una comparación entre el efecto Raman y Fluorescencia, se establece lo siguiente: en el efecto Raman el fotón perturba al sistema y le induce a que sufra una transición, pero la molécula excitada nunca alcanza un estado excitado como situación intermedia y no permanece, por lo tanto, un tiempo de vida media en él, una de las características del efecto Raman es la independencia de la frecuencia de radiación incidente.

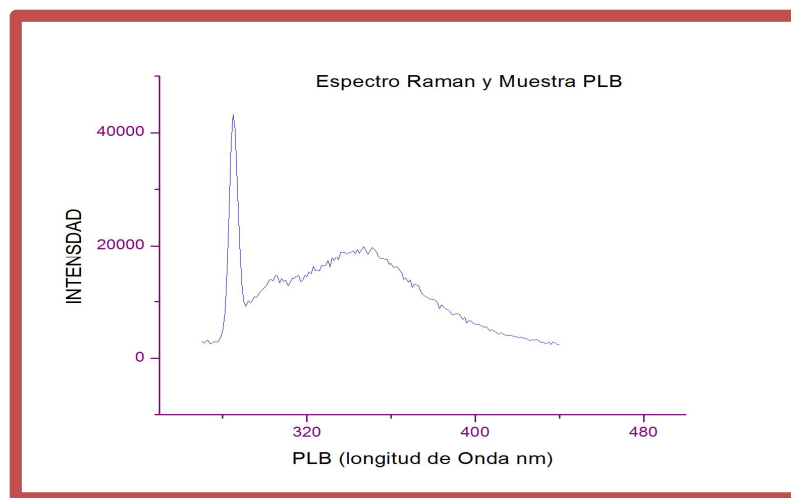
No hay relación alguna con el proceso de Fluorescencia en que se absorbe un fotón y posteriormente se emite otro, tras un tiempo de vida del sistema en estado excitado. [5]

Figura 46. Espectro Raman de Agua Tipo I.



Fuente: autora

Figura 47. Espectro Raman del Agua y PLB



Fuente: autora

El análisis que se realizó al agua Tipo I se llama Espectroscopia de Raman; Cuando la luz pasa a través de muestra transparente, la mayor parte se transmite mediante la muestra. Una diminuta cantidad de luz (alrededor de 1 fotón en 10^4) se dispersa en la muestra en algún ángulo y sale a otro ángulo. Esta luz posee la misma frecuencia que la luz que entra, y el grado de dispersión de la luz es inversamente proporcional a la 4ta potencia de su longitud de onda. Este fenómeno recibe el nombre de dispersión de Rayleigh. La dispersión de Rayleigh puede considerarse como colisiones elásticas entre moléculas y fotones. Una cantidad aún más pequeña de luz (alrededor de 1 fotón en 10^7) se dispersa y cambia de frecuencia: es posible considerar esta situación como colisiones inelásticas entre moléculas y fotones. [5] Este fenómeno recibe el nombre de *dispersión de Raman*, en honor al físico indio (Sir Chandrasekhara Venkata), a quien se le da el crédito de haber descubierto el efecto Raman en 1928, relacionado con la difusión de la luz por las moléculas, los átomos y los iones. La dispersión de Raman es interesante porque los cambios de energía de los fotones que salen corresponden a los cambios en los niveles de energía

cuantizada de las moléculas en la muestra: ΔE (Fotón) = ΔE (niveles de energía), un espectro de Raman constituye una gráfica de la diferencia de energía entre la luz de entrada y la luz de salida. Si la luz de entrada se encuentra en la parte visible del espectro, la luz de salida también está en la parte visible del espectro, cambios en la energía de los fotones son los que resultan iguales a las diferencias de energía vibracional, en lugar de energías absolutas de los fotones ^[23]

El pico obtenido (397) no corresponde a Fluorescencia, debido a que la luz dispersada es observada a una longitud de onda mayor que la de excitación. La longitud de onda del máximo de banda de Raman depende de la λ de excitación es una medida de energía vibracional del enlace H-O.^[23] “La observación del efecto Raman es importante porque permite medir las energías rotatorias y vibratoria en una región del espectro”.

CONCLUSIONES

La metodología cualitativa y descriptiva utilizada en la investigación permitió obtener fluorescencia de triptófano en PLB y PG. Estas muestras presentaron una buena distribución en la forma de los espectros de fluorescencia y se caracterizaron por medio de sus espectros de absorción UV/Vis y Maldi Toff Ms.

La metodología estadística por Regresión Lineal Simple presenta una pendiente que corresponde a la sensibilidad de calibración, la recta no pasa cerca del origen de coordenadas y significa que el método está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo escogido

Los valores obtenidos para PLB y PG con valor de R es 0,93 y 0,98 aunque se obtuvieron valores cercanos a 1, no son los más adecuados pues existen reportes en la bibliografía consultada donde R se obtuvo con el 0,99, cuando el valor máximo es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada.

La metodología establecida para PTI/QM-40 al establecer fluorescencia en péptidos, se representa en las curvas de calibración figuras 43 y 44, la sensibilidad para PLB de 8×10^7 y PG de 3×10^9 . Es posible haber afectado la sensibilidad durante el tiempo en que se corrieron las muestras PLB y PG debido a que el equipo se usaba para correr otras muestras diferentes de este trabajo y no se recalibro el equipo.

Por otro lado, los espectros de fluorescencia siguen la huella del triptófano, las muestras PLB y PG se trataron en forma independiente, el espectrofotómetro PTI/QM 40 detecta a bajas concentraciones pero para este trabajo se detectó PLB y PG en el orden $8.612 \times 10^{-4} \text{ M}$ y 3.431×10^{-5} respectivamente.

RECOMENDACIONES

Revisar el método en otros péptidos con mayor número de aminoácidos, para establecer si existen modificaciones en el mismo y además revisar la interacción muestra-ligando.

Emplear la prueba de Fluorescencia realizando mezclas de péptidos, debido a que en el presente trabajo se trataron los péptidos en forma individual.

Emplear la prueba de Fluorescencia en muestras del sistema inmunitario

Emplear el método usando apagadores y aplicado a mayor cantidad de muestras patrones y realizando mayor número de réplicas, para ver su variabilidad y comportamiento.

Emplear el método de fluorescencia establecido a péptidos y aprovechar el compartimento de la muestra que permite realizar análisis de fluorescencia a diferentes temperaturas y determinar su variabilidad en intensidad de señal. Para el control de temperatura podría usarse un termostato.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Lakowicz Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition. Springer (2006) 5-10.
- [2] YanagawaYuchio, Abe Teruo, Satake Mei, Shoji Odani,s Junichi Suzuki,II and Kiichilshikawall. A Novel Sodium Channel Inhibitor from *Conusgeographus*: Purification, Structure, and Pharmacological Properties. American Chemical Societv. *Biochemistry*, vol27, 6256-6262,1988.
- [3] Loughnan Marion L., Nicke Annette, Alun Jones, Adams David J., Alewood Paul F., and Lewis Richard J. Chemical and Functional Identification and Characterization of Novel Sulfated r-Conotoxins from the Cone Snail *Conus anemone*. J. Med. Chem. Vol 47, N° 1234-1241, 2004
- [4] Wayne P. Kelley, Joseph R. Schulz,Jennifer A. Jakubowski,William F. Gilly,and Jonathan V. Sweedler. Two Toxins from *Conusstriatus* That Individually Induce Tetanic Paralysis. American Chemical Society. *Biochemistry*, Vol. 45, No. 47, 2006.
- [5] Cable J. R., Tubergen Michael J., and Donald H. Levy. Fluorescence Spectroscopy of Jet-Cooled Tryptophan Peptides.*J. Am. Chem. SOC.*vol1 1 1 ,N° 25, 1989
- [6] Merrifield, R .B. Angew Chem. 1985, 97, 801; Angew, Chem. Int. Ed. Engl., 1985, 24, 799. (b) Merrifield, R. B. Advan. Enzymol.1969, 32, 221. (c) Merrifield, R. B. J. Am. Chem. Soc.,1963, 85, 2149. (d) Barany, G.; Merrifield, R. B. The peptides, Vol3, Gross, E. and Meienhofer, J., Ed. Academic Press, Nueva York,1979.

- [7] Cruz Laítón Jenniffer, *Síntesis de Nanopartículas de Plata Funcionalizadas con Péptidos Análogos de LacTofferrampina con Potencial Antibiótico contra EscherichiaColi O157:H7*. Tesis Maestría, Departamento de Química, Universidad Industrial de Santander. (2012): 23-27
- [8] Bueno Duarte Yeni, *Péptidos Sintéticos de Interés Diagnóstico en Pacientes Colombianos con Infarto Agudo de Miocardio sin Supradesnivel*. Trabajo de Investigación, Departamento de Química, Universidad Industrial de Santander. Pág 7-12
- [9] Requena, Alberto, *Espectroscopía*, Departamento de Química, Universidad de Murcia, ISBN: 84-205-3677-6, (2004).
- [10] Owen Tony, *Principios y aplicaciones de espectroscopía UV-visible*, Alemania, Agilent Technologies, 2000.
- [11] Mathews,C. k; Van Holde, K.E et Ahern, K.G (2003), Pearson Education Technology. Pág 204
- [12] Nelson, D. L., Cox, M.M. Lehninger. *Principios de Bioquímica*. 4ta Edición. Pág 147
- [13] D. B. Murphy “Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging”; Wiley-Liss. Inc.; 2001.
- [14] Skoog Douglas A, Holler James F, Nieman Timothy A. *Análisis Instrumental*. 5ta Ed. Mc Graw-Hill. (1962) 15: 385-390
- [15] Neil Chadborn, Jason Bryant, Angus J. Bain and Paul O’Shea. Ligand – Dependent Conformational Equilibria of Serum Albumin Revealed by Tryptophan Fluorescence Quenching
- [16] Glossary of terms used in photochemistry. S.E. Braslavsky y K.N. Houk. Pure and applied Chemistry, 1998, Vol. 60, Num 7, P, 055-1106, IUPAC.

- [17] Yvonne Groemping, Nadja Hellmann. Spectroscopic Methods for the Determination of Protein Interactions. Current Protocols in Protein Science (2005) 20.8.1-20.8.27
- [18] Valeur Bernard. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. 2001 Wiley-VCH Verlag GmbH
- [19] Md. Maidul Islam, Maharudra Chakraborty, Prateek Pandya , Abdulla Al Masum, Neelima Gupta , Subrata Mukhopadhyay; Binding of DNA with Rhodamine B: Spectroscopic and molecular modeling studies. Dyes and Pigments 99 (2013) 412-422
- [20] Birgit Rudat, Esther Birtalan, Sidonie B.L. Vollrath, Daniel Fritz, Dominik K. Kölmel, Martin Nieger, Ute Schepers, Klaus Müllen, Hans-Jürgen Eisler, Uli Lemmer, Stefan Bräse; Photophysical properties of fluorescently-labeled peptoids. European Journal of Medicinal Chemistry 46 (2011) 4457- 4465
- [21] Sunil Kumar Saini, Esam Tolba Abualrous, Anca-Sarmiza Tigan, Kathryn Covella, Ursula Wellbrock, Sebastian Springer. Not all empty MHC class I molecules are molten globules; Tryptophan fluorescence reveals a two-step mechanism of thermal denaturation. Molecular Immunology 54 (2013) 386– 396
- [22] J. R. Cable, Michael J. Tubergen, and Donald H. Levy; Fluorescence Spectroscopy of Jet-Cooled Tryptophan Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 9032-9039.
- [23] Navarrete Erandi Lira. *Síntesis de Péptidos*. Cuernavaca, Morelos. Junio de 2007. Pág. 29
- [24] Huai-Hong Cai, Xing Zhong, Pei-Hui Yang, Wei Wei, Jianan Chen, Jiye Cai; Probing site-selective binding of rhodamine B to bovine serum albumin. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 372 (2010) 35–40.

[25] Ball W. David, *Fisicoquímica*. 1ra Edición. Ed. Thomson (2004) Pág. 511-512

[26] Britton Stanley Thomas H, Robinson Robert A; Britton and Robinson:
Universal Buffer Solutions. *J. Am. Chem. SOC*, 1931. Pág. 1456

[27] Aguirre Ortega, L., et al., *Validación de métodos analíticos*, ed. A.E.F.
Industria. 2001, España.

[28] Resemann, Anja y Suckau, Detlev. Automated Acquisition of MALDI-MSD Spectra for the N- and C-terminal Sequence Determination of Intact Proteins.[prod.] Bruker Daltonik. Bremen, Germany : Bruker Daltonics, 2009. Technical Notes, Vol. 11. #267187.

[29] Lewis, J. Kathleen y Wei, Jing y Siuzdak, Gary. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis. Septiembre de 2006. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Vols. p.5880–5894. Disponible en Wiley Online Library.

[30] Hardouin, Julie. *Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry*. 2007. *Mass Spectrometry Reviews*, Vols. 26, No.5. Disponible en Wiley Online Library.

[31] Hoffman, Edmond de y Stroobant, Vincent. Analysis of biomolecules. [aut. libro] Edmond de y Stroobant, Vincent Hoffmann. *Mass spectrometry: principles and applications*. Tercera. Chichester : Wiley, 2007, 8.1, págs. 305- 402.

[32] Faridbod Farnoush, Mohammad Reza Ganjali, Bagher Larijani , Siavash Riahi, Ali Akbar Saboury, Morteza Hosseini, Parviz Norouzi, Christoph Pillip. Interaction study of pioglitazone with albumin by fluorescence spectroscopy and molecular docking, *Spectrochimica Acta Part A* 78 (2011) 96–101

[33] De La Calle, Fernando. Fármacos de origen marino. Treballs de la SCB. 2007; 58:141-155.

[33] Matos M. Pedro, Franquelim G. Henri, Castanho A.R.B. Miguel, Santos C. Nuno. Quantitative assessment of peptide–lipid interactions. Ubiquitous fluorescence methodologies, Biochimica et Biophysica Acta 1798 (2010) 1999–2012

[34] Loura M.S. Luís, de Almeida F.M. Rodrigo, Coutinho Ana, Prieto Manuel. Interaction of peptides with binary phospholipid membranes: application of fluorescence methodologies, Chemistry and Physics of Lipids 122 (2003) 77 _ 96

[35] Muñoz M. , Rojo N. , Haro I. , Girona V., Mestres C. , Busquets M.A. Fluorescence analysis of the interaction of two peptide sequences of hepatitis GB virus C with liposomes, Talanta 60 (2003) 483_ 491

[36] Hermenegildo F. Bruno, Pereira Goreti, Abreu S. Ana, Castanheira M.S. Elisabete, Ferreira M.T. Paula, Queiroz R.P. Maria-Joao. Phenanthrenyl-indole as a fluorescent probe for peptides and lipid membranes, Jour of Photochem and Photobiol A: Chem 221 (2011) 47–57

BIBLIOGRAFÍA

Aguirre Ortega, L., et al., *Validación de métodos analíticos*, ed. A.E.F. Industria. 2001, España.

Ball W. David, *Fisicoquímica*. 1ra Edición. Ed. Thomson (2004) Pág. 511-512

Birgit Rudat, Esther Birtalan, Sidonie B.L. Vollrath, Daniel Fritz, Dominik K. Kölmel, Martin Nieger, Ute Schepers, Klaus Müllen, Hans-Jürgen Eisler, Uli Lemmer, Stefan Bräse; Photophysical properties of fluorescently-labeled peptoids. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46 (2011) 4457- 4465

Bueno Duarte Yeni, *Péptidos Sintéticos de Interés Diagnóstico en Pacientes Colombianos con Infarto Agudo de Miocardio sin Supradesnivel*. Trabajo de Investigación, Departamento de Química, Universidad Industrial de Santander. Pág 7-12

Britton Stanley Thomas H, Robinson Robert A; Britton and Robinson: Universal Buffer Solutions. *J. Am. Chem. SOC*, 1931. Pág. 1456

Cable J. R., Tubergen Michael J., and Donald H. Levy. Fluorescence Spectroscopy of Jet-Cooled Tryptophan Peptides. *J. Am. Chem. SOC*. vol 111, Nº 25, 1989

Cruz Laíton Jenniffer, *Síntesis de Nanopartículas de Plata Funcionalizadas con Péptidos Análogos de LacToferrampina con Potencial Antibiótico contra Escherichia Coli O157:H7*. Tesis Maestría, Departamento de Química, Universidad Industrial de Santander. (2012): 23-27

D. B. Murphy "Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging"; Wiley-Liss. Inc.; 2001.

De La Calle, Fernando. Fármacos de origen marino. Treballs de la SCB. 2007; 58:141-155.

Faridbod Farnoush, Mohammad Reza Ganjali, Bagher Larijani , Siavash Riahi, Ali Akbar Saboury, Morteza Hosseini, Parviz Norouzi, Christoph Pillip. Interaction study of pioglitazone with albumin by fluorescence spectroscopy and molecular docking, *Spectrochimica Acta Part A* 78 (2011) 96–101

Glossary of terms used in photochemistry. S.E. Braslavsky y K.N. Houk. *Pure and applied Chemistry*, 1998, Vol. 60, Num 7, P, 055-1106, IUPAC.

Hardouin, Julie. *Protein sequence information by matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry*. 2007. *Mass Spectrometry Reviews*, Vols. 26, No.5. Disponible en Wiley Online Library.

Hermenegildo F. Bruno, Pereira Goreti, Abreu S. Ana, Castanheira M.S. Elisabete, Ferreira M.T. Paula, Queiroz R.P. Maria-Joao. Phenanthrenyl-indole as a fluorescent probe for peptides and lipid membranes, *Jour of Photochem and Photobiol A: Chem* 221 (2011) 47–57

Hoffman, Edmon de y Stroobant, Vincent. *Analysis of biomolecules*. [aut. libro] Edmond de y Stroobant, Vincent Hoffmann. *Mass spectrometry: principles and applications*. Tercera. Chichester : Wiley, 2007, 8.1, págs. 305- 402.

Huai-Hong Cai, Xing Zhong, Pei-Hui Yang, Wei Wei, Jianan Chen, JiyeCai; Probing site-selective binding of rhodamine B to bovine serum albumin. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 372 (2010) 35–40.

J. R. Cable, Michael J. Tubergen, and Donald H. Levy; Fluorescence Spectroscopy of Jet-Cooled Tryptophan Peptides. *J. Am. Chem. SOC.* 1989, *111*, 9032-9039.

Lakowicz Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition. Springer (2006) 5-10.

Loura M.S. Luís, de Almeida F.M. Rodrigo, Coutinho Ana, Prieto Manuel. Interaction of peptides with binary phospholipid membranes: application of fluorescence methodologies, *Chemistry and Physics of Lipids* 122 (2003) 77 _ 96

Lewis, J. Kathleen y Wei, Jing y Siuzdak, Gary. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis. Septiembre de 2006. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Vols. p.5880–5894. Disponible en Wiley Online Library.

Loughnan Marion L., Nicke Annette, Alun Jones, Adams David J., Alewood Paul F., and Lewis Richard J. Chemical and Functional Identification and Characterization of Novel Sulfated r-Conotoxins from the Cone Snail *Conus anemone*. *J. Med. Chem.* Vol 47, Nº 1234-1241, 2004

Matos M. Pedro, Franquelim G. Henri, Castanho A.R.B. Miguel, Santos C. Nuno. Quantitative assessment of peptide–lipid interactions. Ubiquitous fluorescence methodologies, *Biochimica et Biophysica Acta* 1798 (2010) 1999–2012

Mathews, C. k; Van Holde, K.E et Ahern, K.G (2003), Pearson Education Technology. Pág 204

Md. Maidul Islam, Maharudra Chakraborty, Prateek Pandya , Abdulla Al Masum, Neelima Gupta , Subrata Mukhopadhyay; Binding of DNA with Rhodamine B: Spectroscopic and molecular modeling studies. *Dyes and Pigments* 99 (2013) 412-422

Merrifield, R .B. *Angew Chem.* 1985, 97, 801; *Angew, Chem. Int. Ed. Engl.*, 1985, 24, 799. (b) Merrifield, R. B. *Advan. Enzymol.* 1969, 32, 221. (c) Merrifield, R. B. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, 85, 2149. (d) Barany, G.; Merrifield, R. B. *The peptides*, Vol3, Gross, E. and Meienhofer, J., Ed. Academic Press, Nueva York, 1979.

Muñoz M. , Rojo N. , Haro I. , Girona V., Mestres C. , Busquets M.A. Fluorescence analysis of the interaction of two peptide sequences of hepatitis GB virus C with liposomes, *Talanta* 60 (2003) 483_ 491

Navarrete Erandi Lira. *Síntesis de Péptidos*. Cuernavaca, Morelos. Junio de 2007. Pág. 29

Nelson, D. L., Cox, M.M. Lehninger. *Principios de Bioquímica*. 4ta Edición. Pág 147

Neil Chadborn, Jason Bryant, Angus J. Bain and Paul O'Shea. Ligand – Dependent Conformational Equilibria of Serum Albumin Revealed by Tryptophan Fluorescence Quenching

Owen Tony, *Principios y aplicaciones de espectroscopía UV-visible*, Alemania, Agilent Technologies, 2000

Resemann, Anja y Suckau, Detlev. Automated Acquisition of MALDI-MS/MS Spectra for the N- and C-terminal Sequence Determination of Intact Proteins. [prod.] Bruker

Daltonik. Bremen, Germany : Bruker Daltonics, 2009. Technical Notes, Vol. 11. #267187.

Requena, Alberto, *Espectroscopía*, Departamento de Química, Universidad de Murcia, ISBN: 84-205-3677-6, (2004).

Sunil Kumar Saini, EsamTolbaAbualrous, Anca-SarmizaTigan, Kathryn Covella, Ursula Wellbrock, Sebastian Springer. Not all empty MHC class I molecules are molten globules; Tryptophan fluorescence reveals a two-step mechanism of thermal denaturation. *Molecular Immunology* 54 (2013) 386– 396

Skoog Douglas A, Holler James F, Nieman Timothy A. *Análisis Instrumental*. 5ta Ed. Mc Graw-Hill. (1962) 15: 385-390

Valeur Bernard. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. 2001 Wiley-VCH Verlag GmbH

Wayne P. Kelley, Joseph R. Schulz, Jennifer A. Jakubowski, William F. Gilly, and Jonathan V. Sweedler. Two Toxins from *Conus striatus* That Individually Induce Tetanic Paralysis. American Chemical Society. *Biochemistry*, Vol. 45, No. 47, 2006.

Yvonne Groemping, Nadja Hellmann. Spectroscopic Methods for the Determination of Protein Interactions. *Current Protocols in Protein Science* (2005) 20.8.1-20.8.27

Yanagawa Yuchio, Abe Teruo, Satake Mei, Shoji Odani, Junichi Suzuki, Il and Kiichi Ishikawa. A Novel Sodium Channel Inhibitor from *Conus geographus*:

Purification, Structure, and Pharmacological Properties. American Chemical Society. *Biochemistry*, vol27, 6256-6262,1988.