



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

“Síntesis y Caracterización de
Leuencefalina”

TESIS

Que para obtener el Título de

QUÍMICO INDUSTRIAL

Presenta:

Rubén Rodríguez Jiménez

Tijuana, B.C. México

Marzo 2010

Folio No.003/09
Tijuana, Baja California
Diciembre 15 /09



MC. Rubén Guillermo Sepúlveda Marqués
Director

ÍNDICE

	Página
Hoja de aprobación	III
Índice	IV
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VII
Índice de Esquemas	VII
Lista de abreviaturas	VIII
Agradecimientos	IX
Resumen	X
CAPÍTULO I Generalidades	1
1.1 Introducción	2
1.2 Objetivos	3
CAPÍTULO II Marco teórico	4
2.1 Propiedades de los aminoácidos	5
2.2 Clasificación de los aminoácidos	9
2.3 Reactividad de los aminoácidos	14
2.4 Polipéptidos y proteínas	18
2.5 Péptidos con actividad biológica importante	20
2.6 Función de las proteínas	22
2.7 Tamaño, composición y propiedades de las proteínas	27
2.8 Los cuatro niveles de la estructura proteica	31
2.9 Breve historia de los opiáceos	33

2.10 Descubrimiento de Encefalinas y Endorfinas	34
2.11 Características principales de Encefalinas y Endorfinas	35
2.12 Funciones de Encefalinas y Endorfinas	36
2.13 Función analgésica	37
2.14 Estructuras químicas	38
CAPÍTULO III Parte experimental	41
CAPÍTULO IV Discusión de resultados	48
CAPÍTULO V Conclusiones	53
CAPÍTULO VI Bibliografía	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura de Leuencefalina	X
Figura 2. Estructura general de los 20 aminoácidos	6
Figura 3. Enantiómeros D y L del aminoácido Fenilalanina	6
Figura 4. La forma de Zwitterión para la L-alanina	7
Figura 5. Dos residuos de cisteína forman un enlace disulfuro	12
Figura 6. Dos formas iónicas de la histidina	14
Figura 7. Estructuras de aminoácidos modificados	15
Figura 8. Reactivos para el análisis de aminoácidos	17
Figura 9. Un péptido donde se muestra la numeración y dirección	19
Figura 10. Glutación en sus formas reducida y oxidada	21
Figura 11. Hormonas de la glándula pituitaria	21
Figura 12. Encefalinas	21
Figura 13. Éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina (Aspartame)	22
Figura 14. Relación entre los cuatro niveles de la estructura proteica	32
Figura 15. Estructura de la Morfina	33
Figura 16. La resina Rink Amida	38
Figura 17. Disolventes en la síntesis de Leuencefalina	39
Figura 18. Agente acoplante HOBt	39
Figura 19. Reacción de la prueba de Ninhidrina	39
Figura 20. Leuencefalina, protegida con el grupo Fmoc	40
Figura 21. Aminoácidos (unidos al grupo Fmoc)	40

Figura 22. Espectro de Infrarrojo	50
Figura 23. Cromatograma de HPLC	51
Figura 24. Espectro de masas	52

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Aminoácidos encontrados en proteínas	5
Tabla 2. Valores de pK de los 20 aminoácidos	9
Tabla 3. Clasificación de aminoácidos según la reactividad y polaridad de la cadena lateral en el pH 7	10
Tabla 4. Propiedades moleculares de algunas proteínas	28
Tabla 5. Ejemplos de proteínas globulares y fibrosas	30
Tabla 6. Datos espectroscópicos de IR	50

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Aminoácidos a distintos pH's	8
Esquema 2: Aminoácidos del grupo I	10-11
Esquema 3: Aminoácidos del grupo II	12
Esquema 4: Aminoácidos del grupo III	13
Esquema 5: Aminoácidos del grupo IV	14
Esquema 6: Formación del enlace peptídico	18

LISTA DE ABREVIATURAS

Da: Dalton (unidad de masa atómica)

KDa: Kilodalton (Dalton *1000)

LCR: Líquido cefalorraquídeo

Fmoc: 9-Fluorenilmetoxycarbonilo

DIC: Diisopropilcarbodiimida

DCM: Diclorometano

DMF: Dimetilformamida

Boc: t-butiloxycarbonilo

TFA: Ácido Trifluoroacético

HOBt: N-hidroxibenzotriazol

DODT: 3,6-dioxa-1,8-octanoditiol

TIS: Triisopropilsilano

MTBE: Éter metil terbutílico

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero darle las gracias a esta, mi Universidad, y especialmente a mi facultad quien me dio alojo durante estos años que sin duda han sido los mejores de mi vida. En parte también tengo que darle un enorme agradecimiento a aquellas personas quienes me han formado como persona y como futuro profesionista:

- A mi familia: A mi padre, quien me aconsejo y me heredo este amor por la química, a mi madre por su paciencia y apoyo, a mi hermana por sus palabras de aliento.
- Al Maestro Manuel Martínez, por dejarme colaborar con el y ayudarme a culminar este trabajo; al Dr. Eduardo Rogel y al Dr. Heriberto Espinoza, quienes sin su apoyo hubiera sido difícil llevar a termino este proyecto.
- A mis Maestros: S. Valera, M. Ramirez, M. Del Valle, R. Ramos Olmos, C. Jáuregui, J.L. Mijangos, P. Haro, I. Rivera, G. Carrillo, E.C. Quiñónez, J. Cruz, G. Rodríguez, E. Velez, R. Sepulveda; quienes me guiaron durante estos años, y siempre les agradeceré por su tiempo, consejos, paciencia y ayuda.
- A mis colegas y amigos(as): Wilfredo, Adrian, Barbara, Bernardo, Laura, Gerardo, Olvia, Eric; con quienes compartí estos años en la carrera, y a quienes nunca olvidare; “que la química siempre los acompañe donde quiera que estén”.

RESUMEN

“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LEUENCEFALINA”

por

Rubén Rodríguez Jiménez

Para obtener el Título de Químico Industrial

Universidad Autónoma de Baja California, Enero 2010

En este trabajo se describe la caracterización y síntesis en fase sólida de la Leuencefalina (Figura 1), el cual es un péptido de cinco aminoácidos, que se encuentra en una variedad de lugares en el cerebro (sistema límbico) y en el conducto gastrointestinal. Para la síntesis de este compuesto se utilizó como soporte a la resina Rink-amida, como grupos protectores al 9-fluorenilmetoxycarbonilo (Fmoc) y ter-butoxicarbonilo (BOC) y como activador en la formación del enlace peptídico entre los aminoácidos a la diisopropilcarbodiimida (DIC). Para la caracterización del péptido, se recurrió al uso de diversas técnicas instrumentales analíticas, tales como: Infrarrojo, Cromatografía de Líquidos de alta resolución y Espectrometría de Masas.

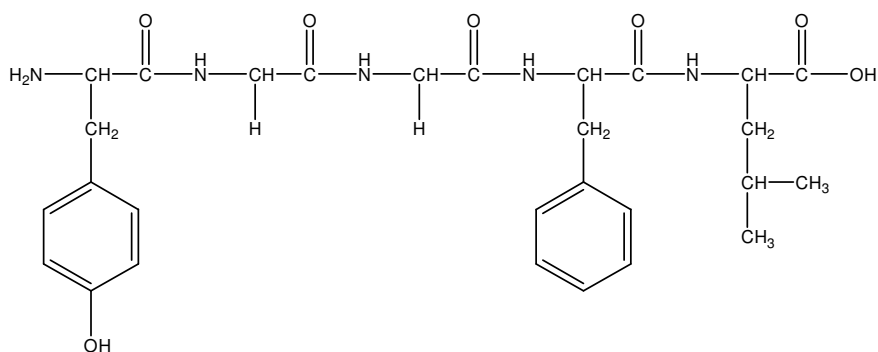


Figura 1.- Estructura química de la Leuencefalina.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

I. GENERALIDADES

1.1 INTRODUCCIÓN

El término proteína fue utilizado por vez primera por el químico alemán Gerardus Mulder, en 1838, para nombrar a un grupo específico de sustancias muy abundantes en todas las plantas y animales. Mulder pronosticó correctamente la importancia de las proteínas; tomó este nombre del vocablo griego *proteios*, que significa primordial o de nivel primario.

Las proteínas son un grupo de biopolímeros contruidos de aminoácidos que exhiben una amplia gama de estructuras y funciones. Los aminoácidos se seleccionan de una reserva de 20 moléculas diferentes, cada una con una estructura química distinta. Cada tipo de proteína tiene una estructura particular definida por su secuencia de aminoácidos, la cual está determinada genéticamente. La información necesaria para incorporar los aminoácidos en la proporción y el orden adecuados reside en la secuencia de bases de nucleótidos de un gen (una región de DNA).

La composición y secuencia de aminoácidos característicos de cada proteína es lo que le permite plegarse en un arreglo tridimensional preciso para que lleve a cabo la función bioquímica para la cual fue diseñada. Las proteínas, como un grupo de biomoléculas, desempeñan una gran variedad de funciones; algunas participan en la contracción muscular y sirven para dar soporte estructural; otras transportan y almacenan moléculas pequeñas.

Los anticuerpos (moléculas que sirven como protección inmunológica) son proteínas, al igual que las enzimas (catalizadores biológicos) y algunas hormonas. Las proteínas pueden llevar a cabo funciones tan diversas por la enorme posibilidad de combinaciones en la composición y secuencia de aminoácidos.

1.2 OBJETIVOS

- 1) Preparación de la resina.
- 2) Unión de leucina a la resina.
- 3) Unión de fenilalanina a leucina.
- 4) Unión de glicina con fenilalanina.
- 5) Unión de tirosina con glicina.
- 6) Eliminación del FMOC con piperidina.
- 7) Eliminación del BOC y la resina con TFA
- 8) Caracterización del producto.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

II. MARCO TEÓRICO

2. 1 PROPIEDADES DE LOS AMINOÁCIDOS

Un aminoácido es cualquier molécula orgánica que posee por lo menos un grupo carboxilo (un ácido orgánico) y un grupo amino (una base orgánica). Según esta definición general, en las células de plantas y animales existen cientos de aminoácidos distintos; sin embargo, nos vamos a enfocar a un grupo selecto: aquellos 20 que son codificados genéticamente para incorporarse en las proteínas (Tabla 1).

Tabla 1. Aminoácidos encontrados en proteínas.

Nombre	Código de una letra	Código de 3 letras
Glicina	G	Gly
Alanina	A	Ala
Valina	V	Val
Leucina	L	Leu
Isoleucina	I	Ile
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Cisteína	C	Cys
Asparagina	N	Asn
Glutamina	Q	Gln
Tirosina	Y	Tyr
Triptófano	W	Trp
Aspartato	D	Asp
Glutamato	E	Glu
Histidina	H	His
Lisina	K	Lys
Arginina	R	Arg

Este grupo de aminoácidos comparte una estructura general que consta de un carbono central (carbono alfa o quiral), rodeado de un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y una cadena lateral R (Figura 2).

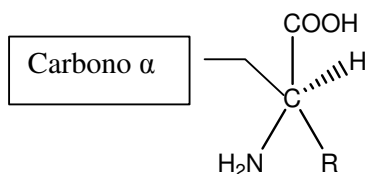


Figura 2. Estructura general de los 20 aminoácidos de las proteínas.

Por esta distribución de los grupos funcionales alrededor del carbono central α , a estos aminoácidos se les llama con frecuencia α -aminoácidos. La naturaleza de la cadena lateral puede variar desde un simple átomo de hidrógeno hasta un complejo sistema de anillos, y es la que determina la reactividad química y biológica que distingue a cada aminoácido.

El carbono α tetraédrico de cada aminoácido, con excepción de la glicina ($R = H$), lleva unidos cuatro átomos o grupos químicos distintos, por consiguiente es un centro de quiralidad. Como resultado de este tipo de arreglo, existen dos estereoisómeros o imágenes especulares que no se pueden superponer (enantiómeros), llamados D y L aminoácidos (figura 3). Las soluciones de cada estereoisómero puro presentan actividad óptica, es decir, rotan el plano de luz polarizada en direcciones opuestas (por esta razón también se les llama isómeros ópticos).

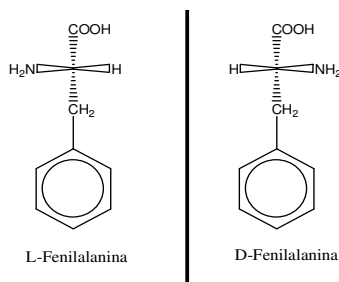


Figura 3. Enantiómeros D y L del aminoácido Fenilalanina. Las dos estructuras son imágenes especulares una de otra. Las líneas punteadas señalan los enlaces hacia los grupos que están detrás del plano, y las cuñas representan los enlaces que sobresalen del plano del carbono α .

Los isómeros D y L existen en forma natural; pero sólo los isómeros L se utilizan para construir las proteínas. El papel crítico de los isómeros L en las funciones proteicas tiene poco de estudiarse y entenderse. Se han encontrado cantidades considerables de ácido D-aspartico en proteínas que se acumulan con la edad en los dientes y en el cristalino del ojo humano. Al parecer, con el tiempo se transforma el ácido L-aspartico en ácido D-aspartico (racemización) en las proteínas almacenadas; estas proteínas modificadas también presentan menos actividad biológica. Bien podría ser que la racemización de aminoácidos de las proteínas, en especial del ácido aspartico, sea un factor importante en el proceso de envejecimiento.

Todos los 20 α -aminoácidos en forma pura son sólidos blancos, cristalinos y con alto punto de fusión; solubles en agua e insolubles en solventes orgánicos como acetona, cloroformo y éter; además, las soluciones acuosas de aminoácidos son conductoras de electricidad.

Tales propiedades son las que se esperarían de los compuestos iónicos o de sus sales, pero no se aprecian en las fórmulas estructurales que se muestran en las figuras 2 y 3. En el pH fisiológico (alrededor de 7.4), los aminoácidos existen como especies iónicas dipolares (Figura 4); es decir, en la misma molécula existen una carga positiva y una negativa. Estas formas se conocen como **zwitteriones**, palabra que en alemán significa “ion híbrido”.

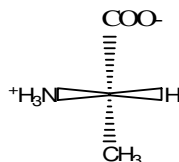
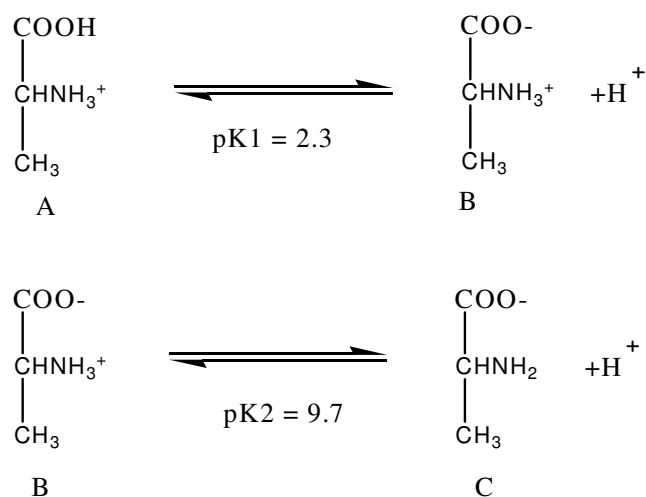


Figura 4. La forma de zwitterión para la L-alanina

Como se ilustra en la figura 4 y en las reacciones siguientes, el grupo carboxilo con un pK_a de 2.3 disocia un protón, al igual que el grupo NH_3^+ con un pK_a de 9.7. Si se supone que la cadena lateral R no tiene carga, la carga neta del aminoácido (a pH neutro) como zwitterión (estructura B) es cero.



Esquema 1: Aminoácidos y sus formas a diferentes valores de pH.

Es importante entender las propiedades ácidas y básicas de los aminoácidos porque eso permite predecir la forma iónica principal localizada a un determinado valor de pH. La predicción de la carga eléctrica de un aminoácido es de particular importancia cuando se considera la estructura y función de una proteína. La tabla 2 presenta un listado de valores de pK de los 20 aminoácidos de las proteínas.

Tabla 2. Valores de pK de los 20 aminoácidos que se encuentran en las proteínas.

Nombre	pK ₁	pK ₂	pK _R
Glicina	2.4	9.8	-
Alanina	2.3	9.9	-
Valina	2.3	9.6	-
Leucina	2.4	9.6	-
Isoleucina	2.4	9.7	-
Metionina	2.3	9.2	-
Fenilalanina	1.8	9.1	-
Prolina	2.0	10.6	-
Serina	2.1	9.2	-
Treonina	2.6	10.4	-
Cisteína	1.8	10.8	8.3
Asparagina	2.0	8.8	-
Glutamina	2.2	9.1	-
Tirosina	2.2	9.1	10.9
Triptófano	2.4	9.4	-
Aspartato	2.0	10.0	3.9
Glutamato	2.2	9.7	4.3
Histidina	1.8	9.2	6.0
Lisina	2.2	9.2	10.8
Arginina	1.8	9.0	12.5

2.2 CLASIFICACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS

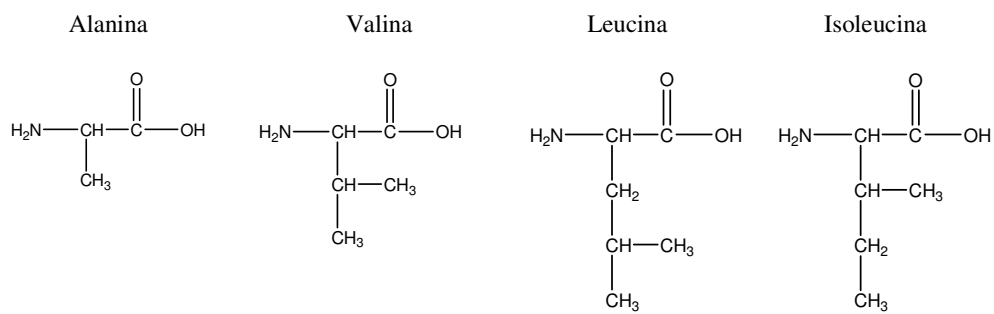
Cada uno de los aminoácidos tiene características específicas dependiendo de la naturaleza de su cadena lateral R, y de eso depende su actividad química y biológica. Los grupos R varían en tamaño, polaridad, carga y reactividad química; al estudiarlos resulta evidente que se pueden dividir en clases según su reactividad (Tabla 3). Esta clasificación es útil para comprender mejor las estructuras y reactividad características propias de cada uno.

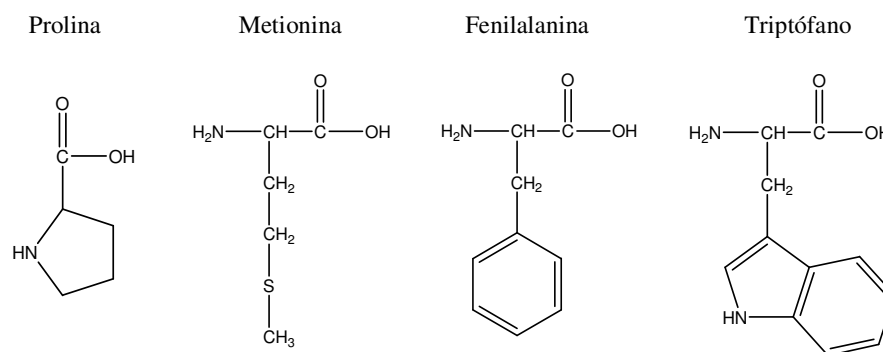
Tabla 3. Clasificación de aminoácidos según la reactividad y polaridad de la cadena lateral en el pH 7.

Grupo I Hidrofóbico	Grupo II Polar, no cargado	Grupo III Ácido	Grupo IV Básico
Ala	Gly	Asp	Lys
Val	Ser	Glu	Arg
Leu	Thr		His
Ile	Cys		
Pro	Tyr		
Met	Asn		
Phe	Gln		
Trp			

2.2.1 GRUPO I: Aminoácidos con cadenas laterales no polares

Los aminoácidos de este grupo son: alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano. Todas las cadenas laterales de los aminoácidos del grupo I tienen grupos alifáticos o aromáticos y, por consiguiente, son hidrofóbicos. Dado que estas cadenas son en su mayoría hidrocarbonadas, su reactividad química es menos importante. Las proteínas disueltas en solución acuosa se pliegan en una forma tridimensional que oculta en su interior los residuos hidrofóbicos de los aminoácidos de este grupo.

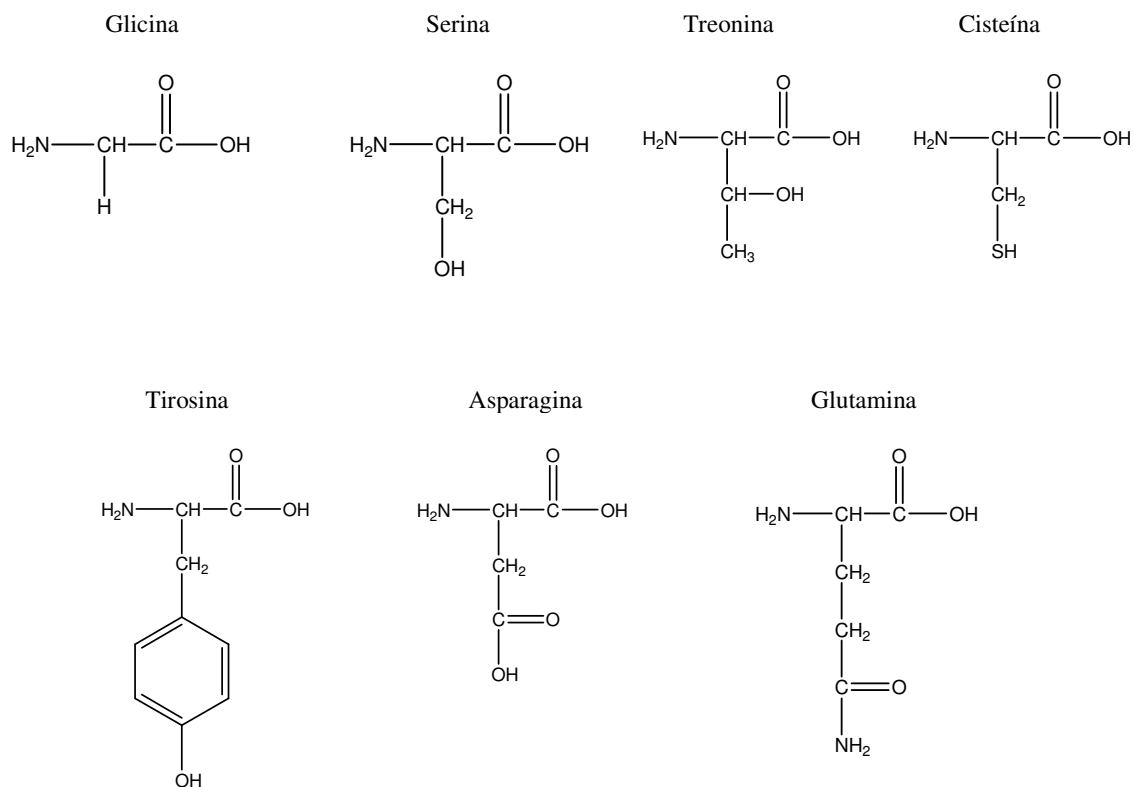




Esquema 2: Aminoácidos del grupo I

2.2.2 GRUPO II: Aminoácidos con cadenas laterales polares, sin carga en el pH fisiológico

Los aminoácidos del grupo II son: glicina, serina, cisteína, treonina, tirosina, asparagina y glutamina. Al examinar las cadenas laterales de los aminoácidos de este grupo, se encuentran grupos funcionales muy variados; pero la mayoría tiene por lo menos un heteroátomo (N, O o S) con un par de electrones disponible para formar puentes de hidrogeno con el agua o con otras moléculas. Quizá el aminoácido mas interesante de este grupo es la cisteína, que posee un grupo –SH (sulfhidrilo) en la cadena lateral. El grupo –SH puede reaccionar en condiciones oxidantes con un grupo –SH de otra cisteína y formar un **enlace disulfuro** (figura 5). Los agentes reductores transforman de nuevo este enlace en grupos sulfhidrilo. El enlace disulfuro que se forma entre las cisternas tiene importancia en las estructuras tridimensionales de las proteínas.



Esquema 3: Aminoácidos del grupo II

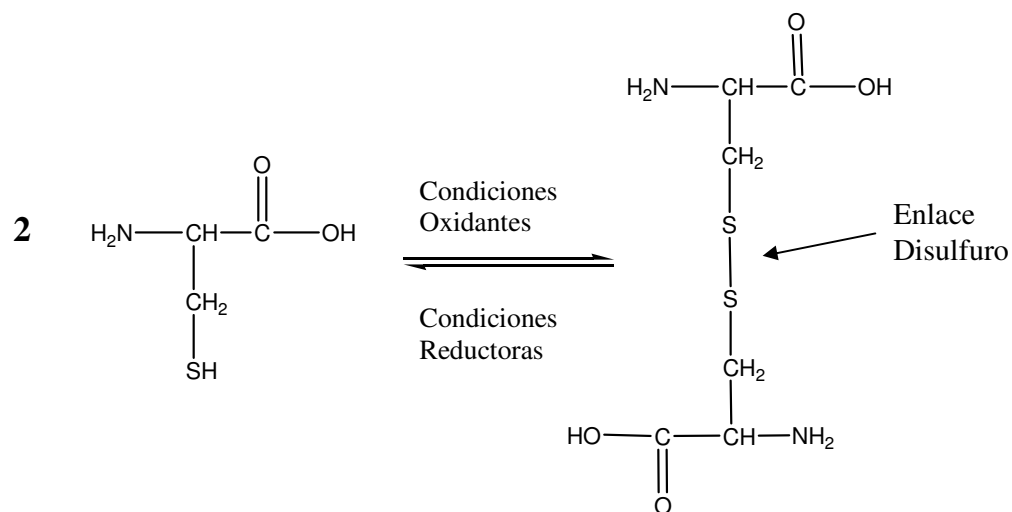
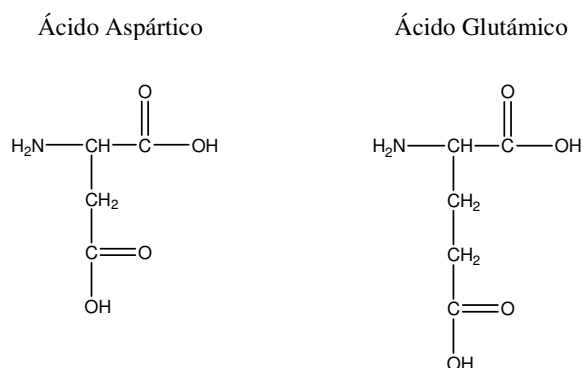


Figura 5. Dos residuos de cisteína forman un enlace disulfuro bajo condiciones oxidantes. Los agentes reductores rompen el enlace disulfuro y se invierte la reacción.

2.2.3 GRUPO III: Aminoácidos con cadenas laterales ácidas

En este grupo solo existen dos aminoácidos: ácido aspártico y ácido glutámico; ambos tienen un grupo carboxílico en la cadena lateral que les confiere sus propiedades ácidas. En el pH fisiológico, los tres grupos funcionales de estos aminoácidos se encuentran ionizados en una especie con carga neta de -1.

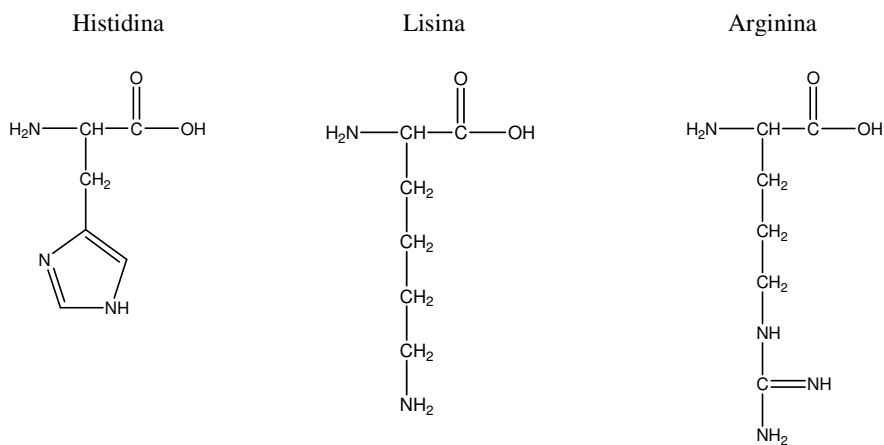


Esquema 4: Aminoácidos del grupo III

2.2.4 GRUPO IV: Aminoácidos con cadenas laterales básicas

Los tres aminoácidos de este grupo son: histidina, lisina y arginina. Cada cadena lateral es básica por lo que cada una puede aceptar un protón. La cadena lateral imidazol de la histidina tiene un pK_a cercano al pH fisiológico, de modo que pueden existir dos formas iónicas, dependiendo de las condiciones en que se presenten *in vivo* (Fig. 6). La lisina tiene un grupo amino en la cadena lateral, y existe principalmente en el estado iónico +1 a pH neutro. El grupo guanidino de la cadena lateral de la arginina es el más básico de todos los grupos R ($\text{pK}_a = 12.5$).

Los aminoácidos de los grupos II, III y IV son hidrofílicos y en un medio acuoso tienden a agruparse en la parte exterior de una proteína.



Esquema 5: Aminoácidos del grupo IV

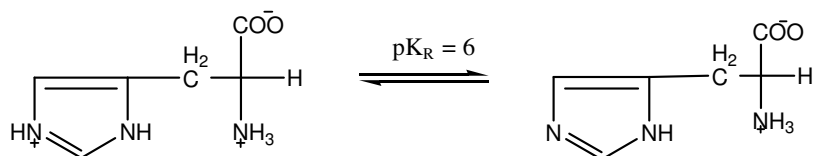


Figura 6. Dos formas iónicas de la histidina pueden estar presentes *in vivo*.

2.3 REACTIVIDAD DE LOS AMINOÁCIDOS

La reactividad de los α -aminoácidos corresponde a la que tienen sus grupos funcionales. Los grupos carboxilo se pueden transformar, en condiciones apropiadas en ésteres y amidas y los grupos amino en amidas. Los grupos hidroxilo de la cadena lateral, como los de la serina, reaccionan con ácidos y forman ésteres; algunas de estas reacciones suceden en condiciones fisiológicas. El grupo carboxilo de un aminoácido puede enlazarse con el grupo amino de otro aminoácido y formar un enlace peptídico o amido.

A veces las proteínas contienen aminoácidos poco usuales que no se incluyen en el conjunto de los 20 originales. Esos aminoácidos se generan casi siempre en reacciones químicas que se llevan a cabo en los aminoácidos estándares después de que se han incorporado en las proteínas. Algunos de los aminoácidos modificados que se encuentran en las proteínas se muestran en la figura 7; éstos les confieren nuevas propiedades bioquímicas a las proteínas. Por lo regular, la célula utiliza una forma química modificada de tirosina, la O-fosfotirosina, para regular la actividad enzimática. Las formas hidroxiladas de prolina y lisina se encuentran en la colágena, una proteína estructural.

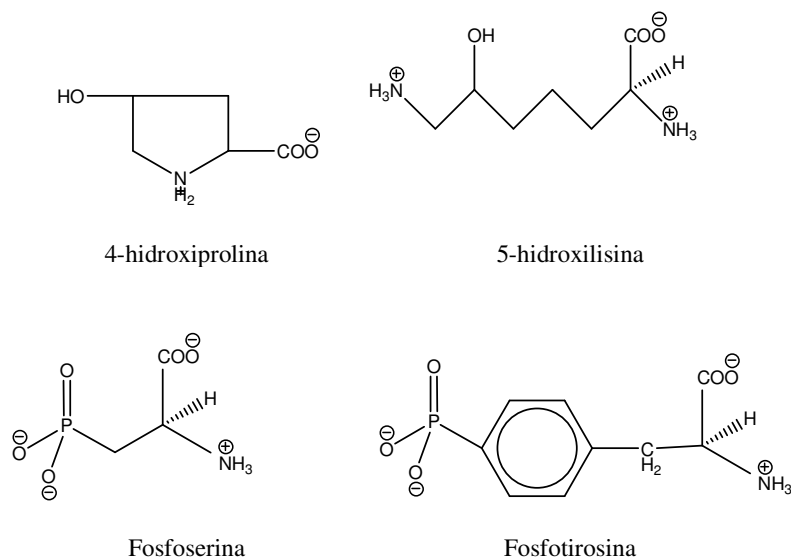


Figura 7. Estructuras de aminoácidos modificados que se encuentran en algunas proteínas. La 4-hidroxiprolina y 5-hidroxisilina se encuentran en la colágena, una proteína estructural de los tendones. La fosfoserina y fosfotirosina cambian la reactividad de proteínas reguladoras.

La importancia de los aminoácidos en los procesos biológicos, ha permitido a los bioquímicos desarrollar varios métodos para analizar mezclas de aminoácidos. La composición de aminoácidos de una proteína se puede determinar por:

1. Degradación de la proteína en sus aminoácidos individuales.
2. Separación de los aminoácidos.
3. Identificación y cuantificación de los aminoácidos.

La cromatografía es una técnica muy utilizada para separar, identificar y medir la cantidad de aminoácidos. La cromatografía de intercambio iónico es especialmente eficaz porque separa los aminoácidos por sus distintas propiedades ácido-base (cargas iónicas). Durante el análisis de aminoácidos suelen presentarse dos problemas:

1. Los aminoácidos por lo común se encuentran en concentraciones muy bajas y por lo tanto se necesitan utilizar técnicas muy sensibles.
2. Los aminoácidos son difíciles de detectar porque tienen pocas propiedades físicas o químicas fáciles de medir.

En la actualidad se cuenta con varios compuestos químicos que reaccionan con los aminoácidos y forman derivados que se pueden detectar con técnicas sensibles como la espectrofotometría de absorción ultravioleta-visible (UV-VIS) y de fluorescencia. En la figura 8 se muestran algunos de estos reactivos. La ninhidrina reacciona con aminoácidos formando un pigmento púrpura (amarillo con prolina). El reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenzono) reacciona con el grupo amino de los α -aminoácidos y forma derivados de color amarillo fácilmente detectables por espectrofotometría. La fluorescamina y el cloruro de dansilo forman derivados fluorescentes de aminoácidos; estos reactivos químicos permiten detectar niveles de aminoácidos del orden de nanomoles (10^{-9} moles) a picomoles (10^{-12} moles).

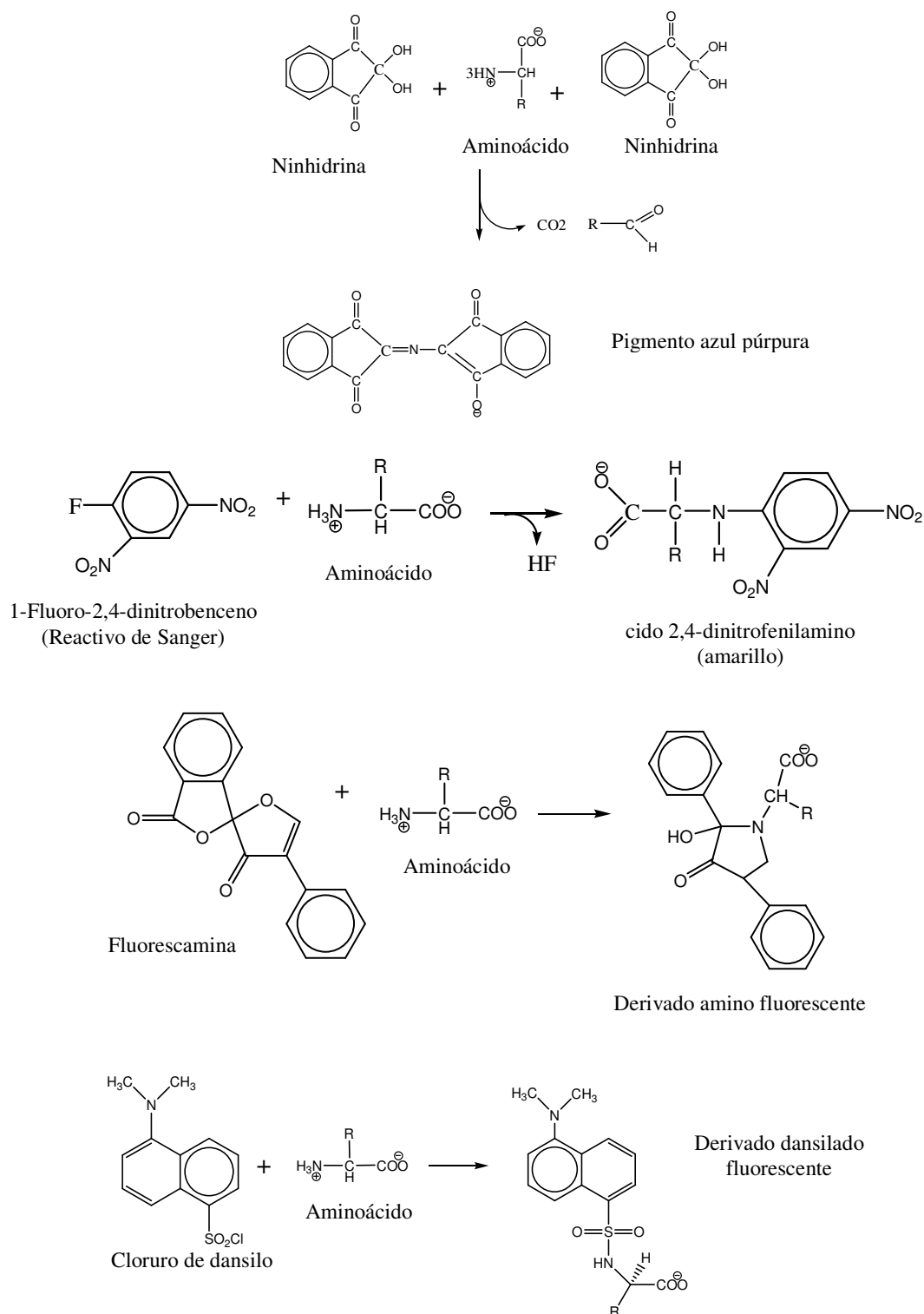
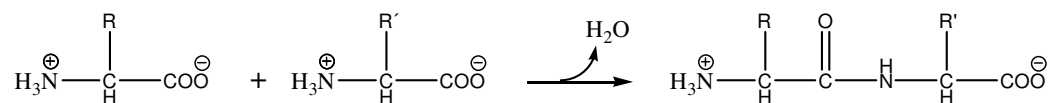


Figura 8. Reactivos para el análisis de aminoácidos. La ninhidrina reacciona con todos los aminoácidos dando un color azul púrpura, con excepción de la prolina, que da un color amarillo. El reactivo de Sanger, la fluorescamina y el cloruro de dansilo reaccionan con los aminoácidos y péptidos formando compuestos coloridos o fluorescentes.

2.4 POLIPÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

Se pueden unir dos α -aminoácidos mediante la formación de un enlace *amido* o también denominado *peptídico*:



Esquema 6: Reaccion de formación del enlace peptidico

Esta reacción, definida como una condensación (pérdida de una molécula de agua), entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino del otro, da lugar a un dipéptido; la reacción se puede repetir con más aminoácidos que se unen en una cadena formando un tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, etc. A cada uno de los aminoácidos incorporados en el polipéptido se le denomina *residuo*. Los péptidos que contienen de dos a diez residuos de aminoácidos normalmente se nombran con el prefijo químico usual para los números (di, tri, tetra, penta, hexa, hepta, octa, nona y decapéptido). Los productos que tienen de 10 a 100 aminoácidos se llaman **polipéptidos**, mientras que aquéllos con más de 100 aminoácidos, **proteínas**.

Por lo general, los polipéptidos y las proteínas que se aíslan de células y tejidos contienen entre 2 y 2000 aminoácidos. Si se supone que el peso molecular promedio de todos los aminoácidos es 110, se puede estimar que el peso molecular de la mayoría de las cadenas de péptidos y proteínas va de 220 a 220 000, aunque también se han encontrado más grandes.

Sin importar cuántos aminoácidos estén unidos por enlaces peptídicos, casi siempre se distinguen dos extremos en la cadena: un amino terminal (o N-terminal) y un carboxilo terminal (o C-terminal). En el dipéptido formado en la reacción anterior, el aminoácido con la cadena lateral R es el N-terminal y el que tiene la cadena lateral R' es el C-terminal.

Por convención, los péptidos se escriben y se numeran desde el extremo amino (a la izquierda) hacia el carboxilo terminal (a la derecha) como se hace en la figura 9.

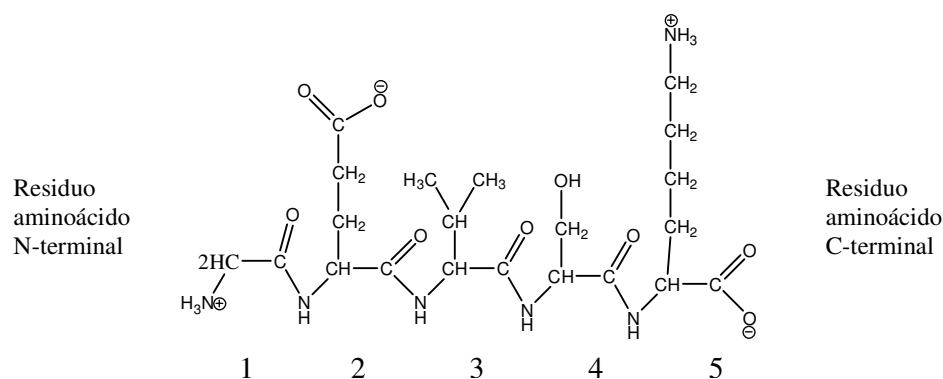


Figura 9. Un péptido donde se muestra la numeración y dirección correctas. El residuo amino terminal, dibujado siempre a la izquierda, comienza con el número 1. La estructura del pentapéptido se escribe como Gly-Glu-Val-Ser-Lys.

Las reacciones químicas de los péptidos son características de sus grupos funcionales. Las cadenas laterales R de los residuos de aminoácidos muestran una reactividad química semejante a la de los aminoácidos libres. Así, por ejemplo, los grupos hidroxilo de los residuos de tirosina y serina se transforman en ésteres al reaccionar con ácido fosfórico. Posiblemente la reacción química más importante es la que implica la ruptura de los enlaces peptídicos por hidrólisis ácida, básica o catalizada por enzimas con liberación de los aminoácidos.

Por tanto, la composición de aminoácidos de proteínas aisladas de células se puede determinar mediante hidrólisis con HCl 6M. La digestión de las proteínas de nuestra dieta implica la hidrólisis de enlaces peptídicos por enzimas llamadas peptidasas o proteasas del estómago e intestino para formar aminoácidos libres.

A diferencia de las reacciones anteriores, la formación del enlace peptídico *in vivo* no es tan simple. La síntesis de péptidos y proteínas no es favorable desde el punto de vista termodinámico, ya que se requiere de una fuente de energía para activar los aminoácidos antes de que sean incorporados a la cadena polipeptídica en crecimiento. Además, se necesitan las instrucciones para colocar los aminoácidos en la secuencia correcta. Las proteínas no tienen una secuencia aleatoria de aminoácidos, estos se ordenan según la información dictada por el DNA.

2.5 PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA IMPORTANTE

En la bioquímica se enfatiza mucho en las proteínas; pero no se debe pensar que las cadenas muy largas de aminoácidos son las únicas que tiene una función biológica.

El glutatión, por ejemplo, es un tripéptido formado por ácido glutámico, cisteína y glicina que tiene un papel importante en la regulación de reacciones de oxidación-reducción y en la destrucción de radicales libres nocivos para la célula (figura 10).

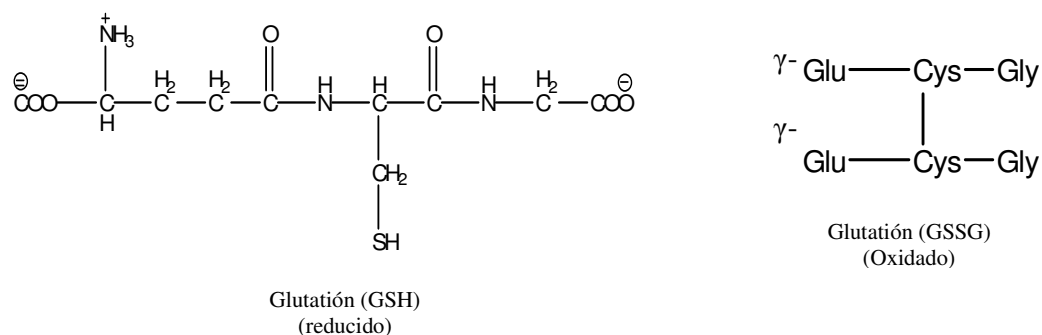


Figura 10. Glutathión en sus formas reducida y oxidada.

Las hormonas de la glándula pituitaria, oxitocina y vasopresina, son nonapéptidos que adoptan estructuras anulares por la formación de un puente disulfuro entre 2 residuos de cisteína (figura 11).

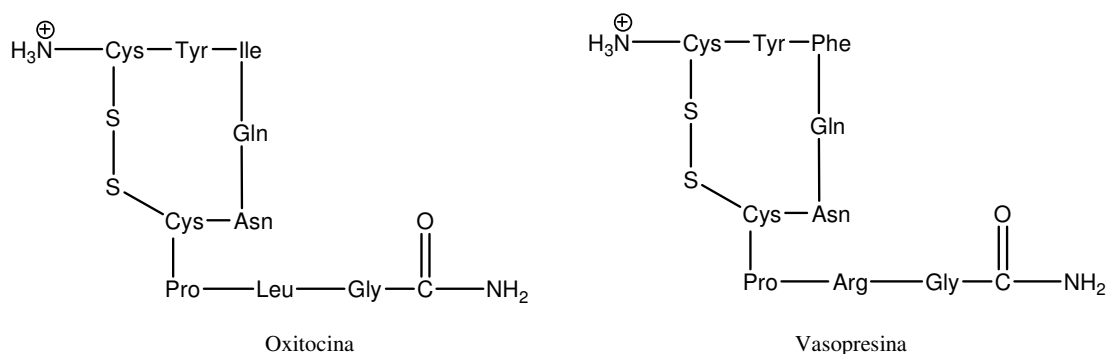


Figura 11. Hormonas de la glándula pituitaria.

Las encefalinas son péptidos localizados en el cerebro y el sistema nervioso que tienen un papel importante en el control del dolor (Figura 12).

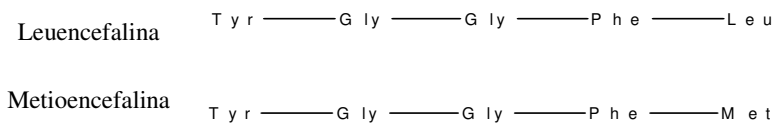


Figura 12. Encefalinas.

Un péptido sintético (no se produce en forma natural en los organismos) que se ha vuelto importante en nuestra vida actual es el de éster metílico L-aspartil-L-fenilalanina (Aspartame o Nutrasweet R, Figura 13). Este dipéptido edulcorante (es casi 200 veces más dulce que el azúcar común, sacarosa) tiene muchas menos calorías que la sacarosa (que tiene 16 Kcal por cucharada contra cerca de 1 Kcal que aporta el Aspartame) y se utiliza en bebidas gaseosas dietéticas y en los productos alimenticios de bajo aporte calórico.

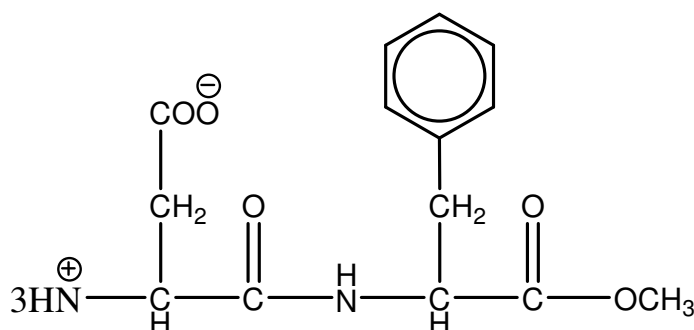


Figura 13. Éster metílico de L-aspartil-L-fenilalanina (Aspartame)

2.6 FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La síntesis de proteínas, efectuada según las instrucciones almacenadas en el DNA, puede producir miles de moléculas distintas en una célula biológica. Cada tipo de proteína, con su secuencia particular de residuos de aminoácidos, tiene forma, tamaño y función biológica características.

2.6.1 PROTEÍNAS ESTRUCTURALES

Muchas proteínas proporcionan soporte mecánico a las células y a los organismos. Así, la resistencia de los huesos, la piel, los tendones y los cartílagos, se debe principalmente a la proteína fibrosa, *colágena*; el componente principal de las plumas, el cabello y las uñas es la proteína insoluble *queratina*; y para ensamblar filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios se utilizan las proteínas del citoesqueleto intracelular. Ejemplos:

- a) Colágenas: proteínas fibrosas que se encuentran en todos los animales; forman redes de cables que sirven como andamiaje para el soporte de tejidos y órganos.
- b) Elastinas: proteínas fibrosas que se hallan en el tejido conectivo de los pulmones y en los vasos sanguíneos, como la aorta, cuyas propiedades elásticas les permiten estirarse varias veces su longitud normal.
- c) Queratinas: proteínas fibrosas que resisten la fuerza mecánica; se encuentran en los vertebrados como componentes principales de la capa epidérmica externa y sus prolongaciones como el cabello, uñas y plumas.

2.6.2 ENZIMAS

Todas las reacciones químicas que suceden en los organismos requieren de un catalizador biológico, a fin de que se completen las reacciones bioquímicas que ocurren en la célula en condiciones moderadas. Permiten aumentar la velocidad de las

reacciones metabólicas. Dentro de las células son variadas y se encuentran en cantidad considerable para satisfacer adecuadamente sus necesidades. Por ejemplo:

- a) 6-fosfofructo-1-cinasa: Enzima glucolítica
- b) Citrato sintasa: enzima del ciclo del ácido cítrico que cataliza la condensación de acetyl-CoA y oxaloacetato para formar citrato
- c) Tripsina: enzima digestiva de los vertebrados que cataliza la hidrólisis proteica.

2.6.3 PROTEÍNAS DE TRANSPORTE

Muchas de las biomoléculas más pequeñas, como O_2 , colesterol y ácidos grasos, deben ser transportadas por todo el organismo para poder utilizarse en el metabolismo energético y en la construcción de los componentes celulares.

Las moléculas pequeñas se unen con las proteínas que las transportan por el torrente sanguíneo y a veces a través de las membranas plasmáticas. Los animales superiores utilizan lipoproteína de la sangre para transportar colesterol, una biomolécula muy insoluble. Ejemplos:

- a) Hemoglobina: proteína globular que contiene hierro y acarrea oxígeno de los pulmones hacia otros tejidos de los vertebrados
- b) Apolipoproteína: componentes de lipoproteínas como la lipoproteína de baja densidad (LDL) que participan en el transporte de triacilglicerol y colesterol

2.6.4 PROTEÍNAS DE ALMACENAMIENTO

Muchos organismos utilizan proteínas para almacenar nutrientes para uso posterior; las plantas y los animales almacenan el hierro, un micronutriente, en la proteína ferritina; las semillas de las plantas almacenan proteínas como el gluten, fuente de energía para la germinación. Las biomoléculas poco solubles en la sangre de los animales, como los ácidos grasos, se transportan por medio de albúminas y globulinas.

Ejemplos:

- a) Caseína: proteína que se halla en la leche y almacena aminoácidos.
- b) Ferritina: proteína que une hierro y se encuentra ampliamente distribuida
- c) Mioglobina: proteína que contiene el grupo hemo que une oxígeno y se halla en los vertebrados.

2.6.5 CONTRACCIÓN MUSCULAR Y MOVIMIENTO

Algunas proteínas son capaces de modificar su forma, dando la posibilidad a las células o tejidos que estén constituyendo de desplazarse, contraerse, relajarse, razón por la cual se encuentran implicadas en los diferentes mecanismos de motilidad, algunos ejemplos son los siguientes:

- a) Actina: componente del músculo esquelético.
- b) Miosina: componente del músculo esquelético.
- c) Dineína: proteína que provoca el movimiento de espermatozoides y protozoarios por medio de flagelos y cilios.

2.6.6 PROTEÍNAS REGULADORAS

Son muchas las proteínas que regulan la actividad fisiológica y celular. Algunos ejemplos bien conocidos son las hormonas insulina, prolactina y tirotropina; otro grupo importante las constituyen las proteínas G que transmiten señales hormonales dentro de las células y las proteínas de unión al DNA que ayudan en la replicación y la regulación de síntesis de proteínas (traducción).

Algunos ejemplos:

- a) Represor lac: interruptor genético que apaga los genes bacterianos implicados en el catabolismo de lactosa.

2.6.7 PROTEÍNAS RECEPTORAS

Muchas proteínas receptoras localizadas en las membranas celulares sirven para transmitir impulsos nerviosos y señales hormonales al interior de la célula. Cuando las moléculas pequeñas de señal como la acetilcolina o la adrenalina se unen con proteínas receptoras en la superficie de las membranas de las células nerviosas, se transmite un mensaje regulador al interior de la maquinaria celular. Por ejemplo:

- a) Insulina: proteína sintetizada en el páncreas que actúa como señal para el estado de saciedad en los animales superiores.
- b) Glucagon: proteína sintetizada en el páncreas que actúa como señal para el estado de hambruna en los animales superiores.

De esta descripción puede verse la gran diversidad funcional que desempeñan las proteínas. Con todo, las distintas funciones de las proteínas se relacionan por una

característica común: la unión selectiva entre moléculas. Para ejercer su función, una proteína a menudo se une en forma preferencial con otra molécula mediante interacciones favorables no covalentes. La otra molécula puede ser pequeña, por ejemplo un reactivo que se une a una enzima, o un neurotransmisor que se une con su receptor, o quizá una molécula de transporte o almacenamiento.

Por su parte, las moléculas grandes también pueden interactuar con las proteínas; durante la formación de filamentos o túbulos, en el citoesqueleto o en la interacción de actina y miosina en la contracción muscular se asocian grandes moléculas para dar origen a los ensamblados supramoleculares.

La acción de los anticuerpos depende de su unión con antígenos específicos, que pueden ser virus, bacterias o moléculas extrañas. La velocidad de síntesis de proteínas también se controla por la unión de proteínas reguladoras con regiones específicas del DNA.

2.7 TAMAÑO, COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES DE LAS PROTEÍNAS

Dado que cada tipo de proteína está codificado por un gen, una región particular de DNA, todas las moléculas de ese tipo tendrán composición y secuencia de aminoácidos idénticas. Este conjunto único de residuos de aminoácidos le confiere a una proteína sus propiedades particulares. El peso molecular es una propiedad importante y puede calcularse al sumar los pesos moleculares de los residuos de aminoácidos. Debido a su complejidad, es mejor estimar este valor, multiplicando el

número de residuos de aminoácidos por el peso molecular promedio de un residuo, que es de 110.

Otra forma de estimar el tamaño de una proteína es definirla en términos de masa, que tiene unidades de daltons. Un dalton equivale a una unidad de masa atómica. Así, una proteína con 250 residuos de aminoácidos tiene un peso molecular aproximado de 27500 daltons o 27.5 Kilodaltons. En la tabla 4 se presentan los pesos moleculares de varias proteínas.

Tabla 4. Propiedades moleculares de algunas proteínas.

Proteína	Peso molecular ^a	No. de residuos de aminoácidos	No. de subunidades
Insulina (bovina)	5733	51	2
Citocromo c (humano)	13000	104	1
Ribonucleasa A (páncreas de bovino)	13700	124	1
Lisozima (clara del huevo)	13930	129	1
Mioglobina (corazón de equino)	16890	153	1
Quimotripsina (páncreas de bovino)	21600	241	3
Hemoglobina (humana)	64500	574	4
Albúmina sérica (humana)	68500	550	1
Inmunoglobulina G (humana)	145000	1320	4
RNA polimerasa (<i>E. coli</i>)	450000	4100	5
Ferritina (bazo de equino)	450000	4100	24
Glutamato deshidrogenasa (hígado de bovino)	1,000,000	8300	40
^a En daltons			

Las proteínas que constan de una sola cadena polipeptídica se denominan monoméricas; el citocromo c es una de estas proteínas y se incluye en la tabla anterior 4. Otras proteínas son oligoméricas; es decir, constan de dos o más cadenas de polipéptidos, y muchas se mantienen unidas por interacciones no covalentes. También se dice que una proteína tiene múltiples subunidades cuando cada péptido se toma como una subunidad; las subunidades de una proteína de este tipo pueden ser idénticas o distintas. La hemoglobina es tetramérica (con cuatro subunidades) y consta de dos

cadenas de proteína tipo α y dos cadenas tipo β . La proteína que almacena hierro, o ferritina, contiene 24 subunidades semejantes. Las proteínas también se clasifican según su composición. Las que se forman sólo de residuos de aminoácidos y no tienen otras biomoléculas son proteínas simples; las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina son proteínas de este tipo.

Otras proteínas que contienen además otro grupo funcional (se conoce como **grupo prostético**) como una molécula orgánica pequeña o un átomo metálico se denominan proteínas conjugadas. Una molécula de hemoglobina consiste de cuatro cadenas de proteína, y cada una se asocia con un grupo prostético hemo que contiene hierro. La enzima deshidrogenasa alcohólica de levadura es una proteína tetramérica que tiene asociado un átomo de zinc a cada subunidad. En general, el par grupo prostético-proteína tiene más efectividad biológica que la proteína simple.

Las propiedades fisiológicas de una proteína también dependen de la naturaleza de las cadenas laterales R de los residuos aminoácidos. La carga eléctrica de una proteína en el pH fisiológico está determinada por la suma de todas las cargas de las cadenas laterales R (al pH neutro). La carga positiva en el N-terminal y la carga negativa en el C-terminal se cancelan mutuamente. La carga de una proteína adquiere importancia cuando se desea caracterizar por electroforesis y por su solubilidad. La electroforesis es una técnica empleada para purificar y medir el tamaño molecular de las proteínas. La solubilidad de las proteínas se entiende mejor separándolas en dos categorías. No todas las proteínas son solubles en agua; de hecho, las proteínas insolubles son esenciales para dar soporte y mantener la integridad estructural de las células y los organismos (Tabla 5).

Las **proteínas globulares** son solubles en agua y desempeñan un papel dinámico en el transporte, la protección inmunológica, la catálisis, etc., estas proteínas se disuelven en los fluidos biológicos como la sangre y el citoplasma, de modo que se espera que tengan un contenido relativamente alto de residuos de aminoácidos con grupos polares y grupos R con carga.

Por el contrario, las **proteínas fibrosas** son insolubles en agua y están representadas por las proteínas estructurales: colágena y queratina. Se podría predecir que las proteínas fibrosas tienen un contenido relativamente alto de residuos de aminoácidos con grupos hidrofóbicos o grupos R neutros; por ejemplo, la seda es una proteína fibrosa con una composición de aminoácidos de 45% de Gly, 30% de Ala, 12% de Ser, 5% de Tyr, 2% de Val y 6% de otros residuos.

Las proteínas fibrosas adoptan en los organismos una conformación ordenada y algo rígida; además, tienen una elevada fuerza de tensión, mientras que las proteínas globulares, solubles en el citoplasma y en otros fluidos biológicos, son más dinámicas y flexibles; sin embargo aún así presentan una estructura tridimensional ordenada

Tabla 5. Ejemplos de proteínas globulares y fibrosas.

Función	
Tipo de proteína	Proteína globular
Hemoglobina	Transporte (transporte de oxígeno)
Mioglobina	Almacenamiento (almacenamiento de oxígeno)
Ribonucleasa	Enzima (hidrólisis de RNA)
Lisozima	Enzima (hidrólisis de pared bacteriana)
Citocromo c	Transporte de electrones
Inmunoglobulina	Defensa (anticuerpo)
Actina	Movimiento (proteína muscular)
Tipo de proteína	Proteína fibrosa
Colágena	Proteína estructural
Queratina	Proteína estructural
Miosina	Movimiento (proteína muscular)
Elastina	Elasticidad

2.8 LOS CUATRO NIVELES DE LA ESTRUCTURA PROTEICA

La actividad biológica de una proteína en las condiciones celulares depende de su plegamiento en una estructura tridimensional particular denominada **conformación nativa**. Dicha conformación y organización de las proteínas se puede establecer en cuatro niveles, como se muestra en la figura 14.

La **estructura primaria** (figura 14a) se define como la secuencia (orden) de residuos de aminoácidos de una proteína; los residuos se unen mediante enlaces peptídicos covalentes. La secuencia de aminoácidos de una proteína tiene importancia genética porque procede de la secuencia de bases de nucleótidos del mRNA, el cual se transcribe a su vez de una secuencia de nucleótidos (gen) que reside en el DNA. En consecuencia, la estructura primaria de una proteína es el resultado inevitable del orden de nucleótidos que hay en el DNA, y prepara a la proteína para los siguientes tres niveles de organización.

Determinadas regiones de la secuencia primaria se pliegan en una estructura regular repetida o **estructura secundaria**, tal como una hélice α o una lámina o conformación β , como se muestra en la figura 14b. Los elementos de la estructura secundaria pueden interactuar y replegarse como una unidad globular compacta denominada **estructura terciaria** (figura 14c). El cuarto nivel o **estructura cuaternaria** (figura 14d) define la asociación de dos o más cadenas polipeptídicas para formar una proteína de varias subunidades.

Figura 14(a)

Estructura primaria

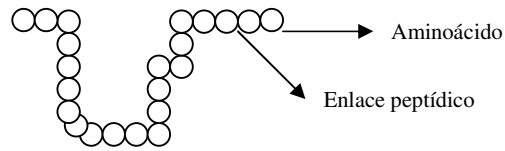


Figura 14(b)

Estructura secundaria

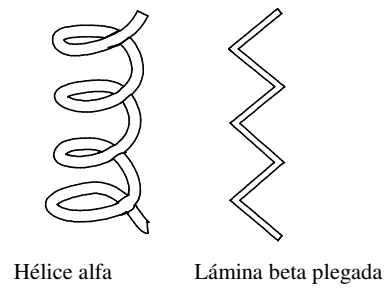


Figura 14(c)

Estructura terciaria

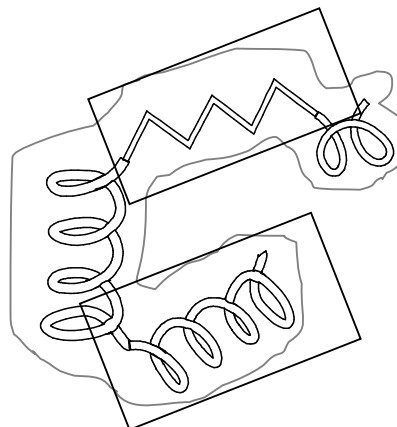


Figura 14(d)

Estructura cuaternaria



Figura 14. Relación entre los cuatro niveles de la estructura proteica: (a) estructura primaria o covalente, (b) estructura secundaria, (c) estructura terciaria, (d) estructura cuaternaria.

2.9 BREVE HISTORIA DE LOS OPIÁCEOS

El ser humano al pasar de los siglos ha buscado nuevas formulaciones de compuestos químicos, con el fin de curar los padecimientos de nuestra especie. La obtención de estos ha sido a partir de origen animal y preferentemente vegetal; y desde tiempo atrás las extracciones de compuestos orgánicos a partir de un sin número de plantas y raíces ha generado conocimientos que se han transmitido de generación en generación.

Una de esas plantas ha sido la amapola o adormidera (*Papaver somniferum*), de esta se obtiene uno de los compuestos más poderosos en cuanto a narcóticos se refiere, el opio. Esta sustancia se obtiene del fruto de la planta, es una cápsula, en forma de globo, al hacer pequeñas incisiones alrededor del fruto, se segrega un líquido del cual se obtiene la ya mencionada sustancia; con esto se sintetizan una serie de compuestos denominados alcaloides u opiáceos. La morfina, la heroína, la codeína, dilaudid (clorhidrato de dihidromorfina), el metopon (metil dihidromorfinona), demerol (clorhidrato de meperidina), son derivados del opio, que también se les conoce como opiáceos. Son sustancias sumamente adictivas, pero su principal acción es analgésica y adormecer a quien la consume.

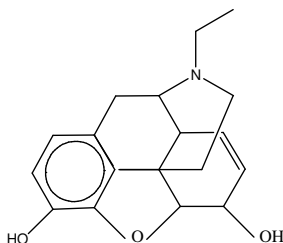


Figura 15. Estructura de la Morfina.

En 1805 Friedrich Sortürner obtuvo la morfina, y fue quien la denominó como tal (haciendo referencia a Morfeo, Dios de los sueños de la mitología griega); su producción a granel llegaría hasta más tarde ya que fue bien utilizada para calmar los dolores de heridos en guerras tales como la guerra civil de Estados Unidos, y en las guerras mundiales.

Estos opiáceos se relacionan íntimamente con sus antagonistas, sustancias endógenas del ser humano, las cuales son las encefálicas (pues se segregan en el encéfalo de muchos mamíferos, incluyéndonos).

2.10 DESCUBRIMIENTO DE ENCEFALINAS Y ENDORFINAS

En 1975, Hughes y Kosterlitz descubrieron que hay algunas sustancias con la misma capacidad de la morfina y además de sintetizarse en el propio organismo; por ello se les denominó genéricamente endorfinas, y más tarde opiáceos endógenos. Después, y en muy poco tiempo, se descubrieron otras sustancias análogas como: encefálicas, β -endorfinas, dinorfina, entre otras. Los estudios que realizaron arrojaron que todos los opiáceos endógenos se localizan en zonas del sistema nervioso que guardan alguna relación con el procesamiento o la modulación del dolor.

La diferencia entre los opiáceos endógenos y exógenos, es el tipo de receptor al cual van unidos, de los cuales existen 3:

- receptores μ (β –endorfinas)
- receptores κ (dinorfina)
- receptores δ (encefalinas)

De ellos se puede mencionar algunas características, tales como los receptores μ y δ , los cuales poseen un peso molecular entre 150,000 y 750-875,000. El receptor κ , posee una estabilidad única, es resistente al calor y posee un peso molecular entre 30,000 – 400,000.

2.11 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE ENCEFALINAS Y ENDORFINAS

Estos opiáceos endógenos se dividen en dos grupos, en las β -endorfinas y en las encefálicas, que a su vez se dividen en 2 péptidos, y la diferencia entre ellos es el último aminoácido de la cadena peptídica, Leucina (Leu) y Metionina (Met). La secuencia del pentapéptido Leuencefalina es la siguiente:

- Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH

En general se puede hablar de las principales funciones de las encefalinas, debido a su naturaleza neurológica se mencionan las siguientes:

- Calma interna
- Sensación de bienestar
- Sentimientos de euforia
- Autoconcepto
- Manejo del dolor
- Alivio al dolor psicológico

Así como su importancia, se debe de considerar cuales son las consecuencias debido a la falta de este opiáceo endógeno, y algunas de ellas son:

- Estados de extrema confusión o agitación
- Miedos, sentimientos de inseguridad
- Sentimientos de inferioridad
- Bajo control del dolor

Como la mayoría de los compuestos en el organismo, requiere de ciertos compuestos para lograr su síntesis, entre los cuales se encuentran:

- D-fenilalanina
- Vitamina B6
- Ácido fólico

2.12 FUNCIONES DE ENCEFALINAS Y ENDORFINAS

La β -endorfina tiene varias funciones, como neurotransmisor y hormona. Hay grandes cantidades en la hipófisis, por lo que se cree que se libera allí. Sus principales órganos de actuación no se han identificado, pero se sabe que incrementa la liberación de prolactina, de hormona de crecimiento y de hormona melanoestimulante, y se reduce la liberación de hormona estimulante de la tiroides y de vasopresina a nivel de la glándula hipofisaria. La β -endorfina provoca efectos analgésicos, además incrementa la síntesis de corticosterona en las células suprarrenales aisladas *in vitro*, se podría deducir que la corteza suprarrenal sería un órgano de actuación. También se encuentra en el líquido cefalorraquídeo (LRC), que posiblemente proviene del sistema nervioso

central, donde se puede modular la actividad nerviosa de grupos de neuronas accesibles.

Las encefalinas tienen una vida media muy corta en sangre por la acción de las peptidasas, por eso no se cree que tengan ninguna acción como agentes circulantes. Su función como neurotransmisor se centra en las fibras nerviosas y en los cuerpos celulares de los ganglios simpáticos de rata y cobaya, así como en las células endocrinas de la médula suprarrenal. Parece que se sitúan a lo largo de todo el tracto gastrointestinal de los animales, incluso en humanos. Éstas se han detectado gracias al radioinmunoensayo en sangre humana (14-140 pg/mL) y en LCR humano (5-29 pg/mL). El elevado contenido de met-enkefalina en la médula suprarrenal y en la sangre venosa indica que la primera podría ser la fuente de los péptidos hallados en sangre.

2.13 FUNCIÓN ANALGÉSICA

Al observar que la morfina inhibía potentemente la contracción de preparados de musculatura lisa a través de mecanismos mediados por receptores que, a su vez, resultaban inhibidos por la naloxona, se pensó que los péptidos opiáceos eran unos compuestos endógenos que poseían propiedades analgésicas.

La enkefalina es un analgésico débil, excepto cuando se inyecta intracerebralmente, debido a su degradación por las peptidasas. La D-ala-met-enkefalina es resistente a este ataque enzimático, cuando se administra por vía endovenosa es efectiva y más potente que la met-enkefalina por vía intracerebral.

Existen otros análogos de las encefalinas también más resistentes a las peptidasas, que son analgésicos efectivos. Por ejemplo el FK-33-824 es 30,000 veces más potente que la met-enkefalina y 1,000 veces más efectivo que la morfina.

La misma β -encefalina es 1,000 veces más potente que la met-enkefalina pero su administración repetida provoca tolerancia y dependencia física. Se ha demostrado que estos péptidos actúan en los mecanismos del dolor. Las encefalinas inhiben la actividad de las neuronas nociceptivas y la β -endorfina inmunorreactiva está en mayores cantidades en LCR en pacientes que experimentan analgesia inducida por la estimulación.

2.14 ESTRUCTURAS QUÍMICAS

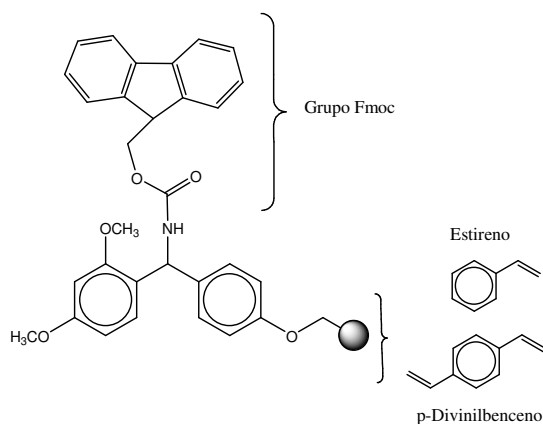


Figura 16. La resina Rink Amida esta constituida por cadenas de estireno y p-divinilbeceno y contiene como grupo protector al Fmoc.

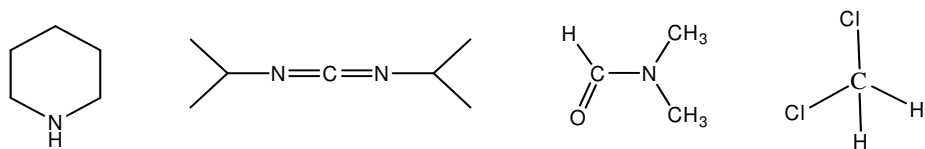


Figura 17. De izquierda a derecha, compuestos utilizados como disolventes en la síntesis de Leucefalina: Piperidina, DIC, DMF y DCM.

N-Hidroxibenzotriazol

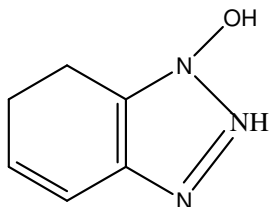


Figura 18. Agente acoplante HOBt, el cual es usado para disminuir la enantiomerización durante la formación del péptido.

Prueba de Ninhidrina:

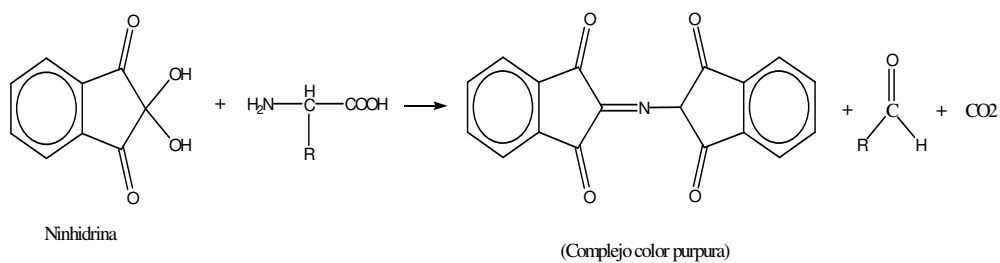


Figura 19. Reacción de la prueba de Ninhidrina.

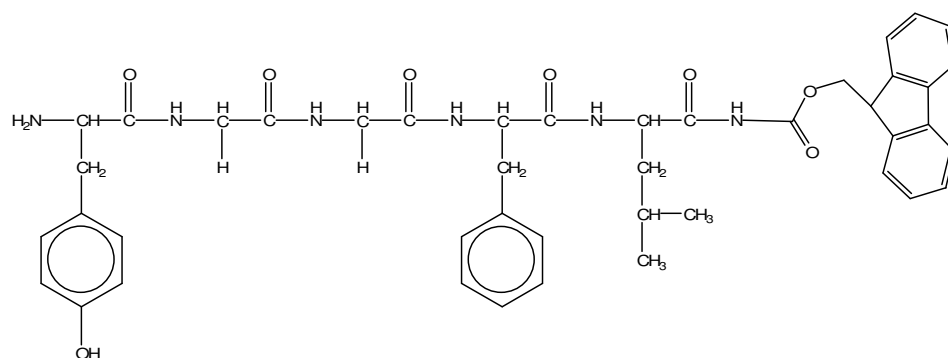


Figura 20. Leuencefalina, protegida con el grupo FMOC.

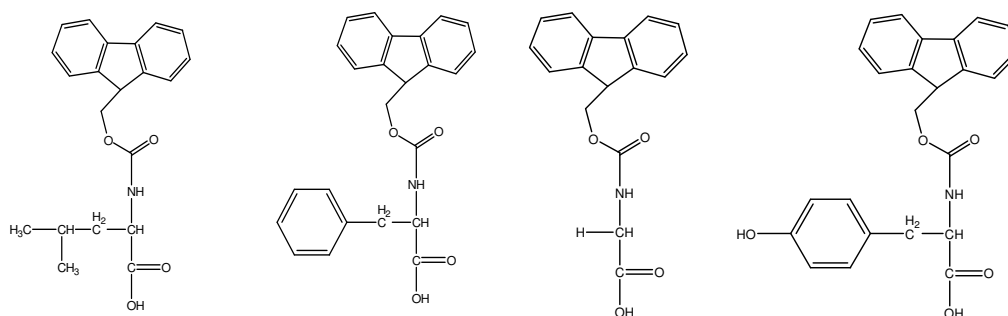


Figura 21. De izquierda a derecha, aminoácidos (unidos al grupo Fmoc) involucrados en la síntesis de Leuencefalina: Leu-Fmoc, Phe-Fmoc, Gly-Fmoc y Tyr-Fmoc.

CAPÍTULO III

PARTE EXPERIMENTAL

III. PARTE EXPERIMENTAL

Se colocó 0.5 g de la resina Rink-NH-Fmoc con un grado de funcionalización de 0.6 mmol/g en una columna con filtro de 25 mL, se adicionó 4 mL de diclorometano y la mezcla se agitó con N₂ por 30 minutos a temperatura ambiente. Se filtró el DCM y posteriormente se agregó 4 mL de dimetilformamida agitando con N₂ durante un minuto.

Se filtró la DMF y el grupo Fmoc unido a la resina se removió usando 25% de piperidina en DMF (4 mL) se agitó con N₂ durante 5 minutos, se filtró y se adicionó 4 mL más de piperidina al 25 %, se agitó con N₂ por 20 minutos. Durante este tiempo se finalizó de remover completamente el grupo Fmoc de la resina. Se filtró y se lavó tres veces con DMF y otras tres con DCM.

Se realizó prueba de ninhidrina (Consta de la preparación de las siguientes disoluciones: Disolución A: 40 g de Fenol en 10 mL de etanol absoluto, se calienta hasta disolución completa. Disolución B: 65 g de KCN en 100 mL de agua desionizada, se disuelven 2 mL de la solución anterior en 98 mL de piridina. Disolución C: 2.5 g de ninhidrina en 50 mL de etanol absoluto. La prueba se realiza tomando una pequeña cantidad de muestra con una pipeta Pasteur y colocándola en un tubo de ensayo; se adicionan a este, tres gotas de disolución A, 4 gotas de disolución B y tres gotas de disolución C; se calienta a 45°C por un periodo de 10 minutos, si la disolución resultante es azul-morado la muestra tiene grupos amino libres, por otro lado, si es

amarillenta-marrón no hay grupos amino libres) para asegurarse de la eliminación del grupo Fmoc.

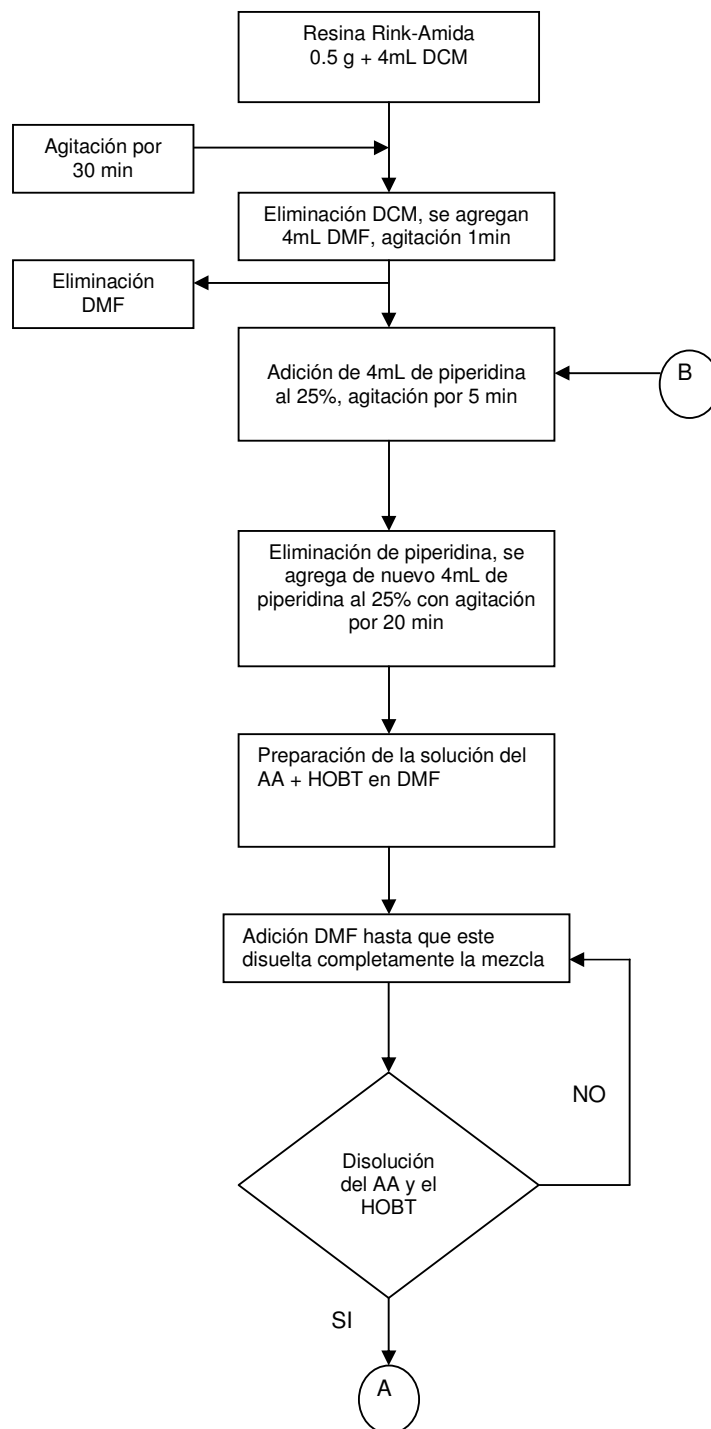
Posteriormente se adicionó a la resina una disolución de 0.316 g (0.9 mmol) de Fmoc-Leu-OH (primer aminoácido), 0.123 g (0.9 mmol) de HOBt en 5 mL de DMF y se agitó con N₂ por 1 minuto; se agregó a la mezcla de reacción 0.14 mL (0.9 mmol) de DIC y se dejó reaccionar por 2 horas en agitación constante con N₂ a temperatura ambiente.

Una vez concluida la reacción, se filtró y se lavó tres veces con DMF y otras tres con DCM. Se realizó prueba de ninhidrina para asegurarse de la formación del enlace peptídico entre el grupo amino de la resina y el grupo carboxilo del primer aminoácido. Se continuó con el mismo procedimiento con el resto de los aminoácidos, utilizando las siguientes cantidades: 0.35 g (0.9 mmol) de Fmoc-Phe-OH, 0.266 g (0.9 mmol) de Fmoc-Gly-OH, 0.266 g (0.9 mmol) de Fmoc-Gly-OH, 0.413 g (0.9 mmol) de Fmoc-Tyr(tBu)-OH. Se emplearon las mismas cantidades para HOBt y DIC con los demás aminoácidos.

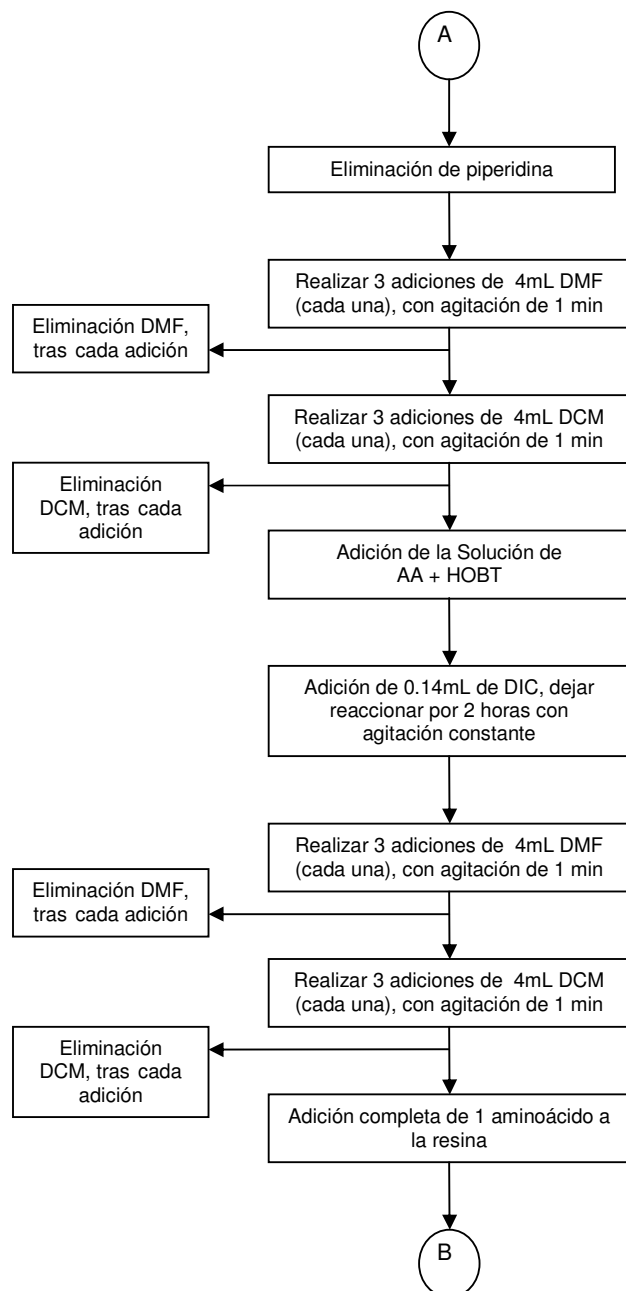
Una vez unido el último aminoácido a la resina, se filtró y se lavó tres veces con DMF y otras tres con DCM. Para la separación del péptido de la resina, se transfirió el péptido unido a la resina a un tubo de ensayo de 50 mL y se añadieron 7 mL de disolución formada por 90% de TFA, 4% de DODT, 2% de TIS y 4% de agua. Se agitó por 3 h.

Se filtró la disolución y el péptido se precipitó adicionando 13 mL de una mezcla a -20°C de 50% de MTBE en éter de petróleo. Se centrifugó y se decantó el líquido. El péptido se lavó tres veces por centrifugación y decantación utilizando cada vez 10 mL de disolución al 50% de MTBE en éter de petróleo. Se dejó secar al aire por 10 min y posteriormente se disolvió con 0.5 mL de acetonitrilo y 4 mL de una disolución al 10% de ácido acético en agua. La mezcla se enfrió utilizando una mezcla de acetona en hielo seco y se liofilizó, obteniéndose 85 mg de un sólido color blanco.

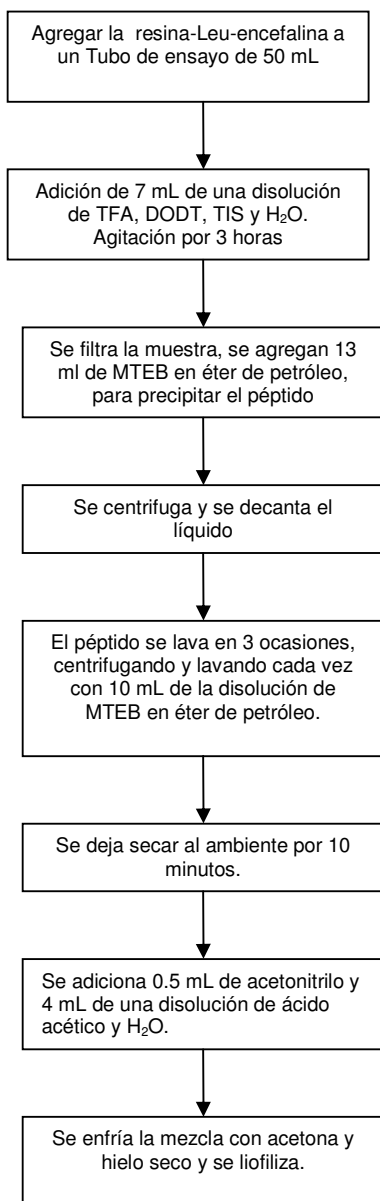
Diagrama de Flujo para la Síntesis de Leuencefalina



Continuación del diagrama de Síntesis de Leuencefalina



Continuación del diagrama de Síntesis de Leuencefalina



CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA INFRARROJO

El espectro infrarrojo que se realizó para la leuencefalina, se muestra en la Figura 2, presentando las siguientes bandas: una banda fuerte y amplia a 3282 cm^{-1} que corresponde a los estiramientos N-H amida, O-H fenólico y carboxílico ya que éstas se encuentran superpuestas en la misma región; una banda fuerte a 3072 cm^{-1} que denota el estiramiento C-H aromático; una banda fuerte a 2956 cm^{-1} que indica el estiramiento asimétrico de los grupos -CH₃, -CH₂- alifáticos; una banda fuerte y amplia a 1667 cm^{-1} correspondiente al estiramiento C=O de los grupos ácido carboxílico y amida; una banda fuerte a 1519 cm^{-1} debida al estiramiento C-N de los grupos amida, sobrepuesto a la flexión N-H; una banda de intensidad media a 1439 cm^{-1} que denota el estiramiento C=C aromático; una banda fuerte y moderadamente amplia a 1197 cm^{-1} que denota el estiramiento C-O aromático; una banda fuerte a 1130 cm^{-1} que indica el estiramiento C-N del grupo funcional amina; dos bandas de intensidad media a 720 cm^{-1} y 699 cm^{-1} correspondientes a la flexión fuera del plano de los grupos C-H aromáticos. Los datos del espectro del infrarrojo de leuencefalina pueden verse en la Tabla 6.

Tabla 6. Datos espectroscópicos de IR para Leuencefalina

Frecuencia (cm ⁻¹)	Intensidad	Vibración	Grupo Funcional	
3282	Fuerte	Estiramiento	N-H, O-H	Amida, fenol, ácido carboxílico
3072	Fuerte	Estiramiento	C-H	Aromático
2956	Fuerte	Estiram. asimétrico	-CH ₃ , -CH ₂ -	Alifático
1667	Fuerte	Estiramiento	C=O	Ácido y amida
1519	Fuerte	Estiramiento	C-N	Amida
1519	Fuerte	Flexión	N-H	Amida
1439	Media	Estiramiento	C=C	Aromático
1197	Fuerte	Estiramiento	C-O	Aromático
1130	Fuerte	Estiramiento	C-N	Amina
720 y 699	Media	Flexión fuera del plano	C-H	Aromático

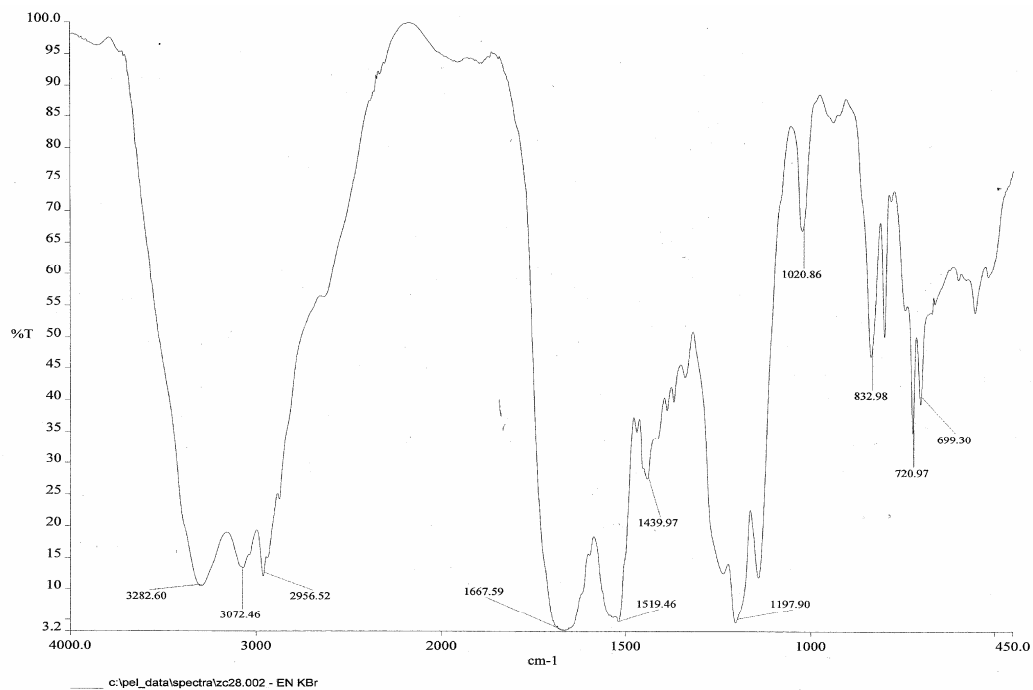


Figura 22. Espectro de infrarrojo de leuencefalina.

4.2 ANÁLISIS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El equipo de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) utilizado para este análisis fué un HPLC marca WATERS 2690 separation module, acoplado con un equipo WATERS 2487 dual absorbance detector.

El cromatograma de la Leuencefalina, presenta tres picos de los cuales, el tercero corresponde al producto obtenido, con un tiempo de retención de 9.288 minutos y un porcentaje de abundancia del 95.89%, lo cual nos indica que el producto contiene una pureza alta.

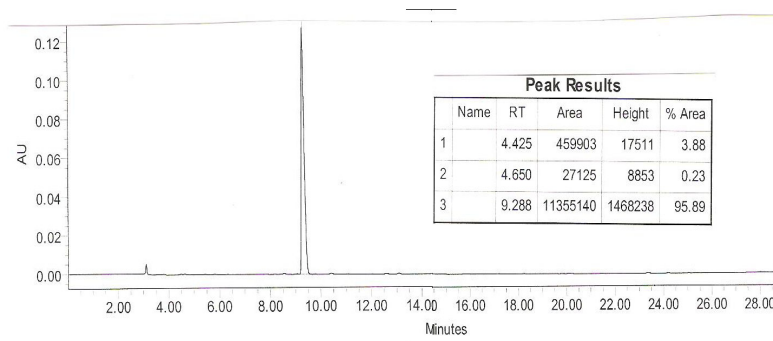


Figura 23. Cromatograma de HPLC para Leuencefalina

4.3 ANÁLISIS DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En el Espectro de masas (Figura 24) se determinó que el M^+ fue de 556.1 el cual corresponde con el peso molecular teórico.

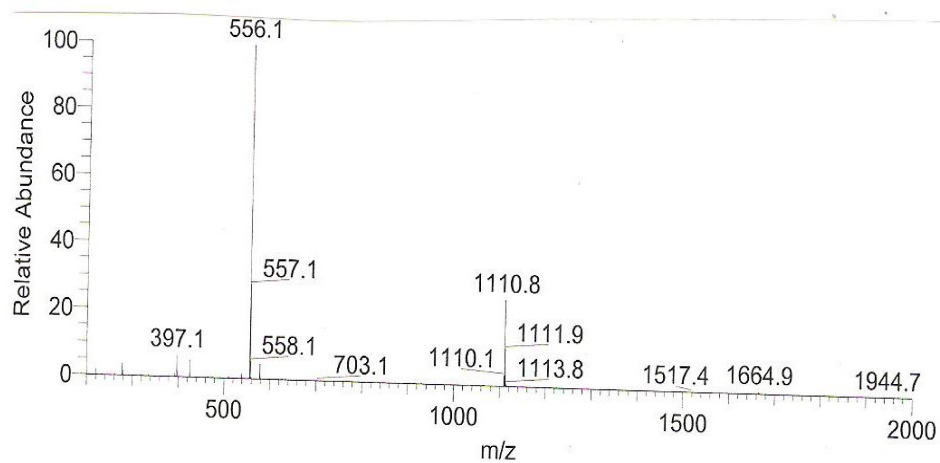


Figura 24. Espectro de masas de Leuencefalina.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

V. CONCLUSIÓN

En base a los análisis realizados se logró la síntesis en fase sólida del pentapéptido leuencefalina. La resina Rink-amida, con un grado de sustitución de 0.06 mmol/g, resultó ser un excelente soporte para dicha síntesis, ya que se obtuvieron excelentes rendimientos y con un buen grado de pureza (96%).

CAPÍTULO VI

BIBLIOGRAFÍA

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avram Goldstein, Lewis Aronow, Summer M. Kalman, 1979. Farmacología (1ra ed.). Editorial Limusa.
2. Lawrence C. Kolb, 1977. Psiquiatría clínica moderna (6ta ed.). Ediciones científicas, La prensa médica Mexicana, S.A.
3. Goldberg, Jeff (1988). Anatomy of a Scientific Discovery. Bantam Books, 1988.
4. Fries, DS (2002). Opioid Analgesics. In Williams DA, Lemke TL. Foye's Principles of Medicinal Chemistry (5 ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
5. Mary K. Campbell, Shawn O. Farrell (2004). Bioquímica. Cengage Learning Editores (4 ed.), Pág. 79
6. Antonio Delgado Cirilo (2003). Introducción a la química terapéutica. Ediciones Díaz de Santos (2 ed.), Pág 295
7. Denis Richard (2002). Las drogas. Siglo XXI, (1 ed.) Pág. 60
8. Virginia Melo Ruiz, Óscar Cuamatzi Tapia (2004). Bioquímica de los procesos metabólicos. Reverté (1 ed). Pág. 253
9. P. Seneci, Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies, Wiley, 2001.
10. F. Zaragoza, Organic Synthesis on Solid Phase: Supports, Linkers, Reactions. Wiley-VCH, Weinheim, 2000.