

Nanotubos ciclopeptídicos: un camino alternativo para la preparación *prêt-à-porter* de estructuras tubulares diseñadas a medida

Roberto J. Brea, Juan R. Granja

Dedicado al Prof. Luis Castedo por su 70 cumpleaños

Resumen: La nanotecnología se centra en la preparación y caracterización de estructuras nanométricas, y en su utilización como nuevos materiales funcionales. Dentro de este campo destacan especialmente los nanotubos por sus aplicaciones en áreas tan diversas como catálisis, electrónica, farmacología y transporte. En este artículo se describe el diseño, preparación, aplicación y evolución de una nueva clase de estructuras tubulares construidas mediante procesos de autoensamblaje molecular de ciclopeptidos, prestando especial atención a los α,γ -híbridos debido a su capacidad para modular su cavidad interna y a su selectividad en la formación de estructuras homo- y/o heterodiméricas.

Palabras clave: Nanotubos, autoensamblaje, Química Supramolecular, ciclopeptidos, aminoácidos.

Abstract: Nanotechnology focuses on the preparation and characterization of nanometric structures, and their use as novel functional materials. Nanotubes specially stand out in this field due to their applications in areas as wide as catalysis, electronics, pharmacology and transport. In this communication we describe the design, preparation, application and evolution of a new class of tubular structures constructed by molecular self-assembly of cyclic peptides, paying particular attention to α,γ -hybrids because of their ability to modulate their internal cavity and their selectivity in the formation of homo- and/or heterodimeric structures.

Keywords: Nanotubes, self-assembly, Supramolecular Chemistry, cyclic peptides, amino acids.

Introducción

El estudio de materiales de tamaño nanométrico ha experimentado un espectacular incremento durante los últimos años. Actualmente, la nanociencia^[1] ha emergido como un esfuerzo multidisciplinar, en donde el perfecto entendimiento de las propiedades moleculares, ópticas, eléctricas, magnéticas y mecánicas de las nanoestructuras vislumbra una nueva generación de materiales funcionales para un gran número de aplicaciones.

La química ha jugado un papel clave en el desarrollo de la nanociencia. La formación y rotura de enlaces entre átomos o grupos de átomos es un componente fundamental de la química que permite llevar a cabo la obtención de estructuras (moléculas) cuyos tamaños varían entre 0.1 y 10 nm. El desarrollo de nuevos métodos sintéticos ha hecho posible obtener nanoestructuras con nuevas formas (esferas, barriles, cables, cubos) y composiciones (orgánicas, metálicas, óxidos, semiconductores), entre las que destacan ejemplos tan relevantes como nanocristales,^[2] nanohilos,^[3] copolímeros de bloque^[4] y nanotubos.^[5] Algunas de estas nuevas estructuras presentan importantes aplicaciones en el campo de la medicina, electrónica y ciencia de materiales debido a su empleo en el transporte de drogas, reconocimiento molecular, dispositivos ópticos y catálisis.^[6]

Particularmente interesantes son los nanotubos debido a sus potenciales aplicaciones (algunas de ellas inspiradas en estructuras tubulares naturales) en áreas tan diversas como inclusión y separación molecular, catálisis, electrónica, óptica,

quimioterapia y transporte a través de membranas.^[7] Es por ello que se han preparado numerosos nanotubos basados en zeolitas,^[8] carbono grafito,^[9] compuestos inorgánicos,^[10] lípidos^[11] y ciclodextrinas.^[12] Sin embargo, en la mayoría de los casos no es posible garantizar un diámetro interno del nanotubo que sea uniforme, lo que unido a su longitud, es fundamental para el desarrollo de las aplicaciones más relevantes.

Estructuras tubulares autoensambladas

Debido a la complejidad de la construcción de estructuras de tamaño adecuado a través de la formación controlada de enlaces covalentes, actualmente se ha recurrido a su preparación a partir de varias unidades sencillas que se organizan y se unen entre sí de manera espontánea mediante el establecimiento de enlaces no covalentes. Esta técnica de organización se denomina *autoensamblaje molecular*,^[13] y consiste en la formación de construcciones supramoleculares a través de diversos equilibrios de asociación y disociación, los cuales conducen a la estructura termodinámicamente más estable, en donde las distintas subunidades que la conforman se encuentran unidas mediante fuerzas de enlace débil (enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones $\pi-\pi$, ion-dipolo, dipolo-dipolo, ...). Estas interacciones determinan muchas características físicas de las moléculas (como la solubilidad y la organización en agregados) y su explotación para la formación de estructuras con composiciones, formas y propiedades bien definidas, lo cual representa que los procesos de autoensamblaje sean una alternativa viable en nanotecnología a la síntesis covalente. Dentro de dichas fuerzas débiles destacan fundamentalmente los enlaces de hidrógeno debido a su direccionalidad e intensidad, lo que permite que esta interacción adquiera una mayor versatilidad en este tipo de procesos.

Durante las últimas décadas la comunidad científica ha llevado a cabo el estudio de los fundamentos de los procesos de autoensamblaje,^[14] lo que ha permitido construir diversas estructuras de mayor o menor complejidad, asentando así una nueva rama de la Química conocida como *Química Supramolecular*.^[14] Gracias a esta ardua investigación también se han podido establecer las bases termodinámicas de



R. J. Brea



J. R. Granja

Departamento de Química Orgánica
Universidad de Santiago de Compostela
Avenida de las Ciencias, s/n, 15782-Santiago de Compostela
C-e: robertojavier.brea@usc.es; juanr.granja@usc.es
Recibido: 29/04/2008. Aceptado: 26/07/2008.

dichos procesos de autoensamblaje, lo que en muchos casos ha permitido predecir de forma apropiada la estructura supramolecular resultante.

La preparación de construcciones supramoleculares mediante procesos de autoensamblaje molecular conlleva el empleo de fuerzas de enlace débil, por lo que dichos procesos van a estar gobernados por un conjunto de interacciones que cooperan conjuntamente. El balance energético es realmente importante, en el que la entropía adquiere un papel relevante, debido a que los procesos de autoensamblaje suponen la agregación de múltiples moléculas, siendo el factor entrópico generalmente negativo.

En los últimos años se han desarrollado estrategias altamente eficientes para la obtención de estructuras tubulares mediante enlaces no covalentes, con elevados rendimientos y un mayor o menor control del diámetro interno y de su longitud. Muchas de estas aproximaciones se han inspirado en modelos biológicos, aunque en otras ocasiones se han propuesto alternativas sintéticas altamente novedosas. Una primera estrategia consiste en el simple plegamiento (o enrollamiento) de una lámina, lo cual permite el establecimiento de un canal (Figura 1.a).^[15] Un segundo método se basa en la construcción de estructuras helicoidales (helicatos) a partir de moléculas lineales que se pliegan formando una hélice que deja un poro central a lo largo del eje de la misma (Figura 1.b).^[16] Otra alternativa, tipo barril, emplea moléculas rígidas a modo de listones que se agrupan en torno a un orificio (Figura 1.c).^[17] Una cuarta estrategia se basa en la utilización de moléculas con forma sectorial (cuñas), las cuales se asocian en discos o rosetas, y que posteriormente se apilan o enrollan formando una superestructura tubular (Figura 1.d).^[18] Finalmente, la estrategia más reciente consiste en emplear moléculas cíclicas que se pueden apilar dando lugar a nanotubos (Figura 1.e).^[19]

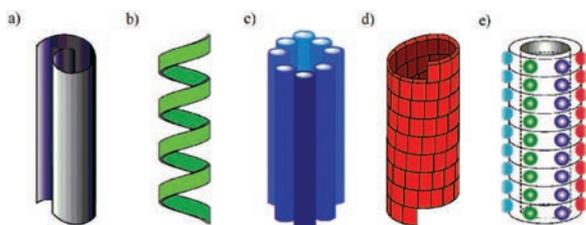


Figura 1. Representación esquemática de las distintas estrategias que permiten la obtención de arquitecturas moleculares con topología tubular. a) Plegamiento de láminas. b) Plegamiento de moléculas lineales en forma de estructuras helicoidales que disponen de un canal central. c) Ensamblaje de moléculas rígidas. d) Asociación de moléculas con forma sectorial (cuña). e) Apilamiento de moléculas cíclicas.

El apilamiento de macrociclos para dar lugar a estructuras tubulares es particularmente atractivo debido a que el diámetro interno del nanotubo está únicamente determinado por la unidad cíclica que lo constituye, facilitando de forma sencilla el control riguroso de dicho diámetro. Esta estrategia de apilamiento de moléculas en forma de disco se emplea en la preparación de los nanotubos ciclopeptídicos.

Nanotubos ciclopeptídicos

Diseño

Los nanotubos ciclopeptídicos se forman mediante el apilamiento de ciclopeptidos, entre los cuales se establecen interacciones de enlace de hidrógeno.^[20] En todos ellos, el

ciclopeptido adopta una conformación plana, en la cual todas las cadenas laterales de los aminoácidos presentan una orientación pseudo-ecuatorial apuntando hacia el exterior del nanotubo, mientras que los grupos amida de los enlaces peptídicos se disponen perpendicularmente al plano del anillo. De esta forma, los grupos C=O se orientan hacia una cara del ciclopeptido y los correspondientes NH se sitúan hacia la otra, de tal forma que se puedan establecer enlaces de hidrógeno entre las subunidades peptídicas debido a la complementariedad entre los grupos dadores y aceptores de enlace de hidrógeno en ambas caras del ciclopeptido (Figura 2).

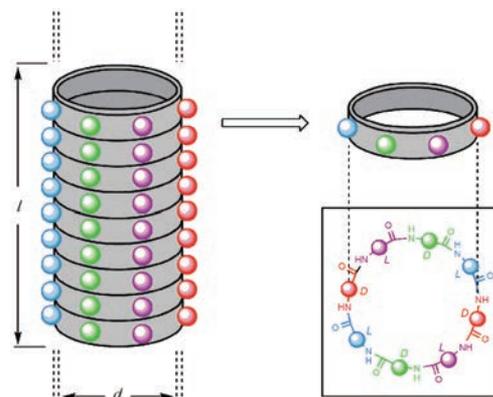


Figura 2. Representación esquemática de la estrategia general para la formación de nanotubos mediante el autoensamblaje de ciclopeptidos.

La formación de nanotubos mediante la estrategia ciclopeptídica tiene dos grandes ventajas respecto a cualquier otra. En primer lugar, el diámetro del anillo y, por lo tanto, el diámetro interno del nanotubo, puede ser fácilmente controlado mediante la variación del número de aminoácidos que constituyen cada subunidad. En segundo lugar, las propiedades de la superficie externa del nanotubo se pueden modificar de forma adecuada variando las cadenas laterales de los aminoácidos. Así, por ejemplo, el autoensamblaje en medios lipídicos o acuosos puede ser promovido a través de la introducción en la unidad ciclopeptídica de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas o hidrofílicas, respectivamente.

El diseño apropiado del ciclopeptido y la optimización de las condiciones de autoensamblaje permiten que las estructuras tubulares resultantes adquieran aplicaciones de gran interés. Gracias a ello, los nanotubos ciclopeptídicos pueden ser usados como materiales sólidos porosos, canales iónicos, agentes antimicrobianos y biosensores.^[21]

Tipos de nanotubos ciclopeptídicos

Debido a las múltiples posibilidades de desarrollo que presentan los nanotubos ciclopeptídicos, han surgido a lo largo de los últimos años numerosas modificaciones en su estructura supramolecular. Es por ello que el estudio de la unidad ciclopeptídica adquiere gran relevancia, ya que un diseño adecuado puede conducir a estructuras tubulares con importantes aplicaciones.

Estructuras nanotubulares constituidas por D,L- α -ciclopeptidos

En 1974, De Santis se basó en un análisis teórico para proponer que los ciclopeptidos constituidos por un número par de α -aminoácidos con estereoquímica D y L alternante daban

lugar a la formación de estructuras tubulares mediante un proceso de autoensamblaje molecular.^[22] Dichos ciclopeptidos adoptarían una conformación plana en la que los grupos C=O y NH quedaban dispuestos perpendicularmente al plano de los anillos, permitiendo el establecimiento de los correspondientes enlaces de hidrógeno con la siguiente subunidad. Además, las cadenas laterales de los ciclopeptidos quedaban situadas hacia el exterior de la estructura resultante. No obstante, los estudios iniciales que se llevaron a cabo para poder verificar de modo experimental dichas predicciones fueron poco concluyentes debido a la baja solubilidad de los péptidos empleados.^[23] Sin embargo, en 1993 el grupo de Ghadiri empleó una sencilla estrategia de variación del pH del medio para inducir la preparación de los primeros nanotubos ciclopeptídicos.^[24]

Los estudios iniciales sobre la formación de nanotubos ciclopeptídicos se llevaron a cabo usando el octapéptido *ciclo[(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)-₂]*, el cual fue seleccionado debido a su gran solubilidad en medio básico acuoso. La formación del nanotubo tuvo lugar al acidificar de manera controlada una disolución del correspondiente ciclooctapéptido, observándose la aparición de agregados microcristalinos que fueron caracterizados mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de electrones y espectroscopia FT-IR. La longitud de dichos cristales variaba entre 10–30 μm , su diámetro entre 100–500 nm y estaban constituidos por haces de nanotubos peptídicos orientados todos ellos hacia la misma dirección. Los análisis realizados también mostraron que la estructura tubular estaba constituida por unidades cíclicas dispuestas en forma de lámina β antiparalela, con una distancia entre subunidades de 4.73 Å y con un diámetro de 14.9 Å (Figura 3).

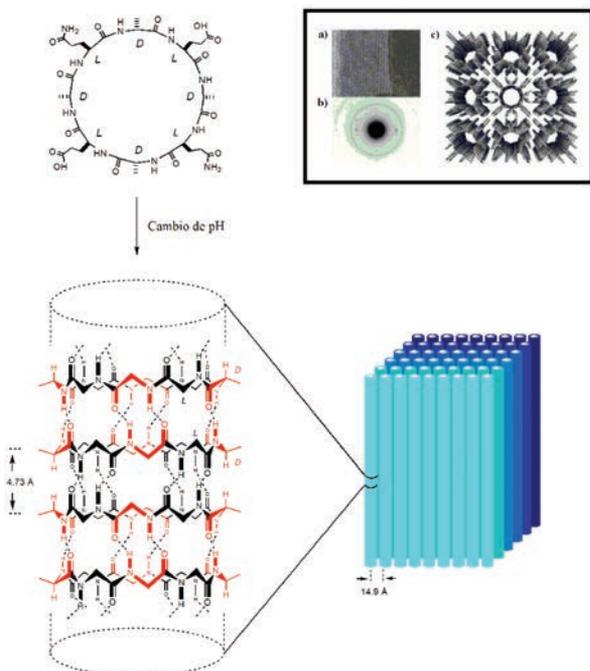


Figura 3. Estructura del ciclopeptido *ciclo[(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)-₂]* precursor de los primeros nanotubos, modelo del nanotubo peptídico en el que se resaltan las interacciones moleculares (enlaces de hidrógeno) entre las distintas unidades ciclopeptídicas y proceso de autoensamblaje que da lugar a los correspondientes agregados microcristalinos. De manera resaltada se muestra la imagen TEM (a) y la difracción de electrones (b) de los correspondientes nanotubos sólidos, junto al modelo computacional propuesto (c).

Esta estrategia también permitió la obtención de agregados microcristalinos de nanotubos con diámetros internos de 13 Å, los cuales estaban constituidos por unidades de *ciclo[(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)-₃]*.^[25] Dicho hallazgo confirmó que el diámetro interno del nanotubo se determina variando simplemente el número de aminoácidos presentes en la unidad ciclopeptídica.

Como hemos visto con anterioridad, la caracterización de los *D,L*-nanotubos ciclopeptídicos se ha llevado a cabo de forma apropiada mediante TEM, difracción de electrones y/o FT-IR, pero hasta la fecha ninguna de estas nanoestructuras ha podido dar lugar a cristales de forma y tamaño adecuados para su resolución a nivel atómico a través de estudios de difracción de rayos X. Con la finalidad de obtener un mejor entendimiento de las interacciones envueltas en el proceso de autoensamblaje, y de llevar a cabo estudios preliminares sobre las posibilidades de estabilización de la estructura nanotubular, el grupo de Ghadiri ha desarrollado sistemas en los cuales únicamente se permite la formación de estructuras constituidas por dos unidades cíclicas (dímeros), eliminando así las complicaciones relacionadas con el apilamiento ilimitado de los ciclopeptidos, como podría ser, por ejemplo, la baja solubilidad de las nanoestructuras resultantes. Esta restricción se consigue mediante alquilación selectiva de los grupos amino en una de las caras del anillo ciclopeptídico, por lo que es necesario proteger únicamente aquellos residuos de aminoácidos que presentan la misma quiralidad (Figura 4).^[26]

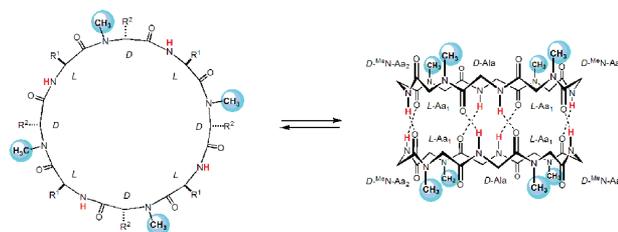


Figura 4. Modelo dimérico de un nanotubo peptídico. La presencia de grupos alquilo (en este caso metilos) en los nitrógenos de aminoácidos de igual configuración bloquea una de las caras del ciclopeptido, por lo que se impide el establecimiento de enlaces de hidrógeno con una tercera unidad cíclica, restringiendo así el crecimiento del nanotubo (las cadenas laterales se han omitido en la estructura dimérica para su mejor visualización).

Los primeros estudios de dimerización se llevaron a cabo empleando *ciclo[(L-Phe-D-MeN-Ala)-₄]* como unidad fundamental, observándose que dicho ciclooctapéptido se autoensamblaba para dar lugar a la correspondiente estructura dimérica con una constante de asociación de aproximadamente 2540 M^{-1} .^[27] Los análisis mediante difracción de rayos X corroboraron la nanoestructura propuesta, mostrando que los cristales obtenidos en una mezcla CH_2Cl_2 /hexanos estaban constituidos por dímeros, en los cuales cada ciclopeptido adoptaba la conformación plana y que se disponían en forma de lámina β antiparalela para facilitar el apilamiento, de manera que los grupos amida de los enlaces peptídicos se situaban de manera perpendicular al plano del anillo. Es de destacar la presencia de moléculas de agua en la cavidad interna de la nanoestructura, lo que pone en evidencia la naturaleza hidrofílica de dicho poro.

Posteriormente, se demostró que los ciclohexapéptidos N-metilados, como por ejemplo *ciclo[(L-MeN-Leu-D-Leu)-₃]*,

dimerizaban con constantes de asociación más pequeñas ($\sim 80 \text{ M}^{-1}$),^[28] mientras que en el caso de tetra-, deca- y dodecaciclopéptidos no se ha observado la presencia de dímeros, debido a la dificultad que muestran dichas unidades para adoptar la conformación plana requerida para el proceso de autoensamblaje.

El estudio de modelos diméricos ha de servir como base para la preparación de nanotubos poliméricos estables constituidos por ciclopéptidos con los grupos amino no alquilados.

Estructuras nanotubulares constituidas por β -ciclopéptidos

Los β -péptidos son una clase de biopolímeros no naturales que en disolución adoptan una gran variedad de estructuras secundarias análogas a la de los α -péptidos, incluyendo láminas plegadas, giros y conformaciones helicoidales de diferente quiralidad y radio.^[29] Su capacidad de resistir la degradación enzimática y sus buenas propiedades conformacionales hacen entrever las interesantes aplicaciones a las que pueden dar lugar.^[30]

Los primeros diseños de β -nanotubos fueron desarrollados por el grupo de Seebach.^[31] Los análisis de modelos moleculares y de cristalografía de rayos X llevados a cabo en ciclotropéptidos constituidos por residuos quirales de β^3 -aminoácidos mostraron que en el estado sólido se apilaban en forma de nanotubos de igual manera que en el caso de los D,L - α -ciclopéptidos. El *ciclo*[(β^3 -HAla)₄] adoptaba la conformación plana requerida y las distintas subunidades se asociaban mediante el establecimiento de cuatro enlaces de hidrógeno, dejando un orificio central de aproximadamente 2.6 Å. De igual modo, se comprobó que la estereoquímica de los β -aminoácidos (con una única cadena lateral en el carbono β) carecía de importancia, ya que el proceso de autoensamblaje tenía lugar tanto en ciclopéptidos constituidos por β -aminoácidos homoquirales (de igual configuración) como en ciclopéptidos con β -residuos de quiralidad alternante (alternancia entre isómeros *S* y *R*).

El grupo de investigación de Ghadiri también llevó a cabo la síntesis de ciclotropéptidos constituidos por β -aminoácidos.^[32] Los ciclopéptidos *ciclo*[(β^3 -HTrp)₄], *ciclo*[(β^3 -HTrp- β^3 -HLeu)₂] y *ciclo*[(β^3 -HLeu)₄] se insertan en membranas lipídicas, dando lugar a la formación de canales a través de membranas (Figura 5). La resistencia que presenta el esqueleto no natural a la digestión por parte de las proteasas, sugiere la utilización de los β^3 -ciclopéptidos en la formación de canales iónicos con potenciales efectos antimicrobianos en presencia de estas enzimas, lo cual sería bastante similar a la actividad desarrollada por algunos β -péptidos helicoidales.^[33]

En los últimos años, se han desarrollado un gran número de β -ciclopéptidos que pueden dar lugar a estructuras tubulares

mediante autoensamblaje, destacando especialmente los empleados por el grupo de Kimura.^[34]

Estructuras nanotubulares constituidas por otros ciclopéptidos

La formación de nanotubos ciclopeptídicos se ha extendido con la incorporación al esqueleto básico de diferentes γ , δ y ϵ -aminoácidos, dando lugar a una serie de híbridos que conllevarían la ampliación del potencial de esta tecnología.

El grupo de investigación de Dory ha llevado a cabo la síntesis de un ciclotropéptido que cristaliza en forma de agregados de nanotubos.^[35] Dicha subunidad está constituida por δ -aminoácidos α,β -insaturados con geometría *trans* en el doble enlace, lo que permite al ciclopéptido adoptar la conformación plana requerida para el autoensamblaje. Dado que el esqueleto peptídico posee un número par de átomos entre el grupo carbonilo y el amino de cada residuo, todos los C=O quedan orientados en la misma dirección, de igual modo que sucedía en el caso de los β -nanotubos peptídicos. Esto provoca que el nanotubo presente un elevado momento dipolar, dando lugar a cristales altamente anisotrópicos. También es de destacar la capacidad que presentan estos nanotubos de δ -ciclotropéptidos para autoorganizarse dando lugar a cristales líquidos, en los cuales cada nanotubo actúa como una pieza fundamental en la formación de estructuras supramoleculares más complejas.^[36]

Recientemente, el grupo de investigación de Ghadiri ha explorado la utilidad de ϵ -aminoácidos derivados de 1,2,3-triazoles disubstituidos en la posición 1,4, llevando a cabo su aplicación en hélices α ,^[37] rígidos giros β y diferentes estructuras tubulares basadas en láminas β . Dichos ϵ -aminoácidos triazólicos pueden ser convenientemente sintetizados a través de reacciones de cicloadición 1,3-dipolar catalizadas por Cu(I) entre aminoácidos que contienen azidas y alquinos,^[38] y su empleo es de gran relevancia para el diseño de nuevos nanotubos ciclopeptídicos. De esta manera, se llevó a cabo la preparación de diferentes α,ϵ -híbridos con la pretensión de abordar la modificación de la cavidad interna del nanotubo mediante la simple introducción de derivados triazólicos.^[39] Estos α,ϵ -nanotubos se han estudiado tanto en disolución como en estado sólido, mostrando que la orientación del triazol es paralela al eje del nanotubo, y no perpendicular, como se podía haber supuesto inicialmente.

La utilización de γ -aminoácidos en la construcción del esqueleto básico del ciclopéptido constituye un nuevo reto dentro del diseño de nanotubos, debido a las posibles modificaciones que se pueden producir en la cavidad interna del nanotubo. Es por ello que es necesario un estudio mucho más amplio, el cual se abordará en la sección principal de este trabajo.

Aplicaciones de los nanotubos ciclopeptídicos

La facilidad con la cual podemos controlar el tamaño y las propiedades de los nanotubos ciclopeptídicos, unido a la regularidad en la orientación que adquieren los grupos funcionales presentes en la superficie externa, han permitido la utilización de dichas estructuras supramoleculares como canales selectivos de transporte a través de membranas,^[40] antibióticos,^[41] biosensores,^[42] biomateriales,^[43] materiales fotosensibles^[44] y dispositivos electrónicos (Figura 6).^[45]

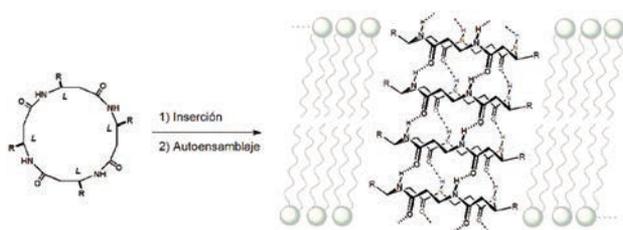


Figura 5. Inserción en membranas lipídicas y proceso de autoensamblaje de ciclotropéptidos constituidos por β -aminoácidos.

Estructuras nanotubulares constituidas por α,γ -ciclopeptidos

Durante los últimos años se han descrito numerosos ejemplos de estructuras peptídicas que presentan γ -aminoácidos en su esqueleto.^[46,47] Las características que llevan asociadas estos γ -residuos, junto con las propiedades que le confieren a la estructura resultante, ha provocado que la introducción de dichos γ -aminoácidos en una secuencia peptídica adquiera gran relevancia en la preparación de nuevos nanotubos ciclopeptídicos funcionales.

Las cavidades internas de los nanotubos D,L - α - y β -ciclopeptídicos son hidrofílicas debido a la presencia de grupos amida que forman enlaces de hidrógeno con otras subunidades, dependiendo algunas de sus potenciales aplicaciones de dicho carácter. Una limitación que presentan estas estructuras es que no es posible modificar las propiedades de sus poros mediante introducción de grupos funcionales en sus superficies internas, debido a que todas las cadenas laterales de los aminoácidos están dispuestas hacia el exterior y a que la sustitución en C_α o C_β interfiere en el autoensamblaje nanotubular. Sin embargo, esta desventaja desaparece cuando empleamos híbridos α,γ -ciclopeptídicos como unidad básica para llevar a cabo la construcción del nanotubo.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo el diseño, síntesis y caracterización de una nueva clase de ciclopeptidos constituidos por α -aminoácidos y unidades de ácido 3-aminocicloalcanocarboxílico (γ -Aca). Dicha familia de γ -aminoácidos cíclicos restringe la flexibilidad del anillo y facilita que estos ciclopeptidos adopten la conformación plana necesaria para la formación de los correspondientes nanotubos. Además, la utilización de dichos γ -derivados nos ha servido como base para llevar a cabo la funcionalización de la cavidad interna del nanotubo.

Diseño

Una característica especialmente relevante de los nanotubos α,γ -ciclopeptídicos, y que los diferencia de todos los demás nanotubos, es que están formados por dos tipos de interacciones debido a que las unidades cíclicas están constituidas por α - y γ -aminoácidos, los cuales orientan sus grupos aceptores (C=O) y dadores (NH) hacia caras opuestas (Figura 7). Ambos aminoácidos están formados por un número impar de átomos, lo que implica que cuando el péptido adopta la conformación plana necesaria para el autoensamblaje, los aminoácidos disponen sus grupos C=O y NH orientados hacia el mismo lado del plano. La disposición alternada de α - y γ -aminoácidos provoca que todos los grupos C=O y NH de los γ -aminoácidos queden orientados hacia una cara del ciclopeptido (**Cara γ**), mientras que hacia la otra cara se sitúan los grupos correspondientes a los α -aminoácidos (**Cara α**). Así, a la hora de establecer interacciones entre estos ciclopeptidos mediante una hoja plegada β antiparalela, se observa que los grupos C=O y NH de la **cara α** lo hacen con los α -aminoácidos de la siguiente subunidad (interacción α - α) y, de la misma forma, los grupos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno de la **cara γ** interaccionan con los de la **cara γ** de la otra subunidad (interacción γ - γ). Por lo tanto, el nanotubo se basa en la alternancia de interacciones entre las **caras α** (Figura 7, enlaces de hidrógeno en color verde) con interacciones entre las **caras γ** (Figura 7, enlaces de hidrógeno en color rosa) a lo largo del mismo.

Nanotubos α,γ (Ach)-ciclopeptídicos

Los primeros estudios en disolución se realizaron con ciclopeptidos especialmente diseñados para la formación de dímeros, de forma que pudiésemos así analizar el proceso de

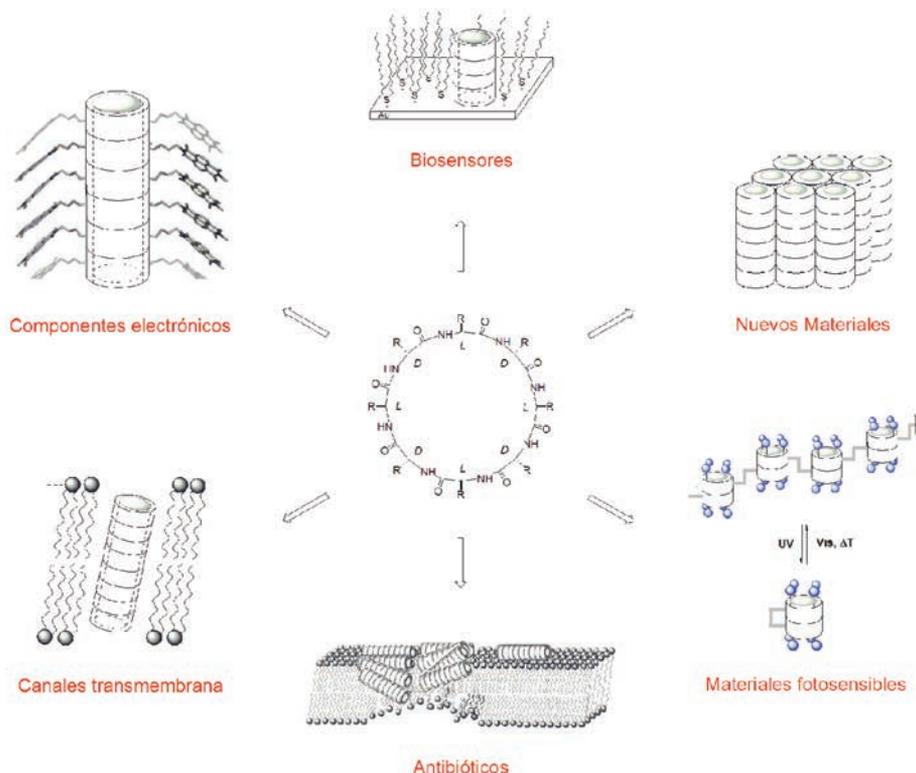


Figura 6. Aplicaciones potenciales de los nanotubos ciclopeptídicos.

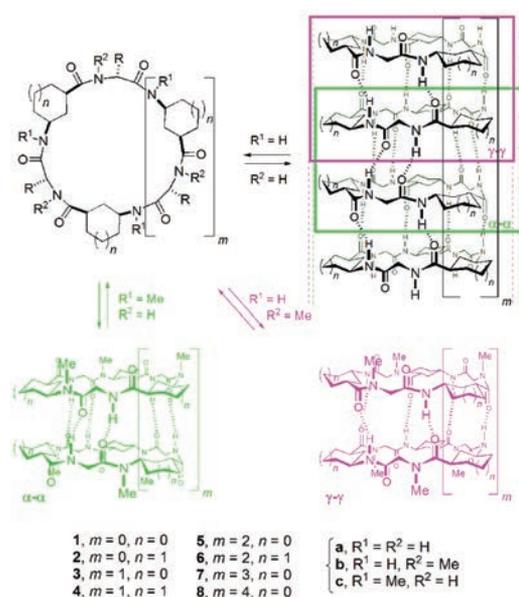


Figura 7. Nanotubos α,γ -ciclopeptídicos preparados a partir de unidades de $\text{ciclo}[(D-\alpha\text{-Aa-L-}\gamma\text{-Aca})_x-]$ ($x = 2-6$), en donde se observa la presencia de dos tipos de interacciones diferentes ($\alpha-\alpha$ y $\gamma-\gamma$). En la parte inferior se muestran los modelos diméricos correspondientes a cada una de dichas interacciones.

autoensamblaje y establecer con ello las bases termodinámicas y estructurales de los mismos. De este modo, se llevó a cabo inicialmente la síntesis de ciclohexapéptidos (anillos de 24 eslabones) N-metilados en los que se alternan diversos α -aminoácidos y unidades de ácido 3-aminociclohexanocarboxílico (γ -Ach).^[48,49] Esto permitió observar los dos tipos de interacciones presentes en la estructura nanotubular. Por una parte se llevó a cabo el estudio de las interacciones $\gamma-\gamma$ mediante la utilización de ciclopeptidos en los que los protones amida de los α -aminoácidos se han sustituido por grupos metilo, obteniéndose el dímero correspondiente (Figura 7, estructura dimérica resultante del autoensamblaje de **4b**) con valores de K_a de aproximadamente 10^2 M^{-1} , los cuales son comparables a los observados para los D,L - α -ciclooctapéptidos. Por otra parte, las interacciones $\alpha-\alpha$ fueron estudiadas a través del empleo de ciclopeptidos con los γ -residuos N-metilados, los cuales dieron lugar a la formación del correspondiente dímero (Figura 7, estructura dimérica resultante del autoensamblaje de **4c**) con elevadas constantes de asociación ($K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$). Así, por ejemplo, el $\text{ciclo}[(D\text{-Phe-L-MeN-}\gamma\text{-Ach})_3-]$ mostró que los dímeros unidos a través de los α -aminoácidos (interacción $\alpha-\alpha$) eran extremadamente estables en disolventes no polares, con valores elevados de K_a . La confirmación de dicho dímero se realizó mediante RMN, FT-IR y, especialmente, rayos X. El análisis cristalográfico corroboró la estructura dimérica, observándose además una molécula de CHCl_3 ocupando su cavidad interna, lo que demuestra el carácter hidrófobo de dicho interior, probablemente debido al efecto del metileno β .

La expansión del anillo hacia ciclooctapéptidos (anillos de 32 eslabones) condujo a resultados análogos a los anteriores, observando de nuevo que la interacción $\gamma-\gamma$ resultaba ser más débil que la $\alpha-\alpha$.^[50] En cuanto a los ciclotetrapéptidos (anillos de 16 eslabones), no se observó la presencia de dímeros para aquellos que interaccionan a través de sus caras γ , mientras que los diseñados para generar interacciones $\alpha-\alpha$ poseen

una constante de asociación débil ($K_a \sim 15 \text{ M}^{-1}$), aunque lo realmente relevante sigue siendo la existencia del dímero.^[51,52]

La menor constante de asociación de las interacciones $\gamma-\gamma$ frente a las $\alpha-\alpha$ se puede atribuir a la menor polaridad de los enlaces NH de los γ -Ach, debido a la mayor distancia del grupo carboxilo que ejerce un mayor efecto inductivo en los α -aminoácidos. Además, la posición del grupo metilo en los nitrógenos de los α -aminoácidos puede desestabilizar la conformación plana del anillo por repulsiones estéricas con el carboxilo y la cadena lateral.

Nanotubos α,γ (Acp)-ciclopeptídicos

Ahondando en la importancia que presentan los γ -Aca en el establecimiento de la conformación plana necesaria para el autoensamblaje ciclopeptídico debido a la rigidez que aporta la unidad cicloalcanica, decidimos seguir explorando dicha familia de compuestos, por lo que nos propusimos llevar a cabo la introducción en la secuencia ciclopeptídica del ácido 3-aminociclohexanocarboxílico (γ -Acp). La utilización de unidades de γ -Acp parece exhibir ciertas ventajas respecto al empleo de γ -Ach. En primer lugar, la obtención del γ -aminoácido cíclico de 5 miembros resulta más sencilla que la preparación del γ -Ach, lo que va a agilizar en gran manera la metodología sintética. En segundo lugar, presenta un ángulo definido en el plano del anillo ciclopeptídico por los enlaces $\text{O}=\text{C}-\alpha$ y $\text{C}\gamma-\text{N}$ mayor que el del γ -Ach (140° frente a 120°), lo que favorece la construcción de anillos ciclopeptídicos de gran tamaño (unidades cíclicas de más de 36 miembros y con diámetros internos superiores a 13 \AA). Además, presenta una superficie hidrófoba externa menor (dos metilenos para γ -Acp frente a tres metilenos para γ -Ach), lo que va a repercutir en las propiedades del nanotubo. Igualmente, hay que destacar de nuevo la orientación del metileno β del grupo ciclopentilo hacia el interior del canal, lo que aporta cierto carácter hidrófobo, a la vez que sirve como base para llevar a cabo cualquier posible funcionalización de dicho poro.

Teniendo en cuenta los resultados previos, decidimos centrar nuestros esfuerzos en modelos diméricos sencillos resultantes de la interacción $\alpha-\alpha$, ya que conlleva la obtención de estructuras supramoleculares de mayor estabilidad. De este modo, se observó que α,γ (Acp)-ciclopeptidos constituidos por 4,^[51,52] 6,^[53] 8,^[54,55] 10^[54] o 12^[54] residuos dimerizaban con elevadas constantes de asociación ($K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$), lo que pone de manifiesto un control significativo del diámetro interno del nanotubo.

Los estudios de homodimerización han permitido confirmar la predisposición de los α,γ -ciclopeptidos para dar lugar a la formación de nanotubos de diferente tamaño y con distintas propiedades en su cavidad interna. Además, también se pudo observar los dos tipos de interacciones presentes en estos nanotubos mediante el estudio de los correspondientes modelos diméricos sencillos.

Heterodímeros α,γ (Ach)/ α,γ (Acp)-ciclopeptídicos

El desarrollo de diferentes motivos estructurales basados en α,γ -ciclopeptidos hace necesario la búsqueda de nuevas metodologías que permitan la preparación de novedosos sistemas supramoleculares. Uno de nuestros primeros estudios fue comparar las interacciones antiparalelas (α,α y $\gamma-\gamma$) frente a la interacción paralela (α,γ), sin que se apreciase en ningún

momento la formación de esta última, confirmando el modelo propuesto con anterioridad para la formación del nanotubo. Posteriormente procedimos a estudiar la formación de heterodímeros. La heterodimerización de péptidos es un proceso común en la naturaleza, constituyendo una sencilla herramienta de diversificación estructural y versatilidad funcional.^[56] Sin embargo, en todos los casos conocidos, la formación del heterodímero está dirigida por interacciones entre las cadenas laterales de los diferentes monómeros. Nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo la preparación de una nueva clase de estructuras heterodiméricas en donde la formación selectiva de los heterodímeros viene dada exclusivamente por las interacciones enlace de hidrógeno que se establecen a nivel del esqueleto peptídico. Dichas heteroestructuras son el resultado de la combinación y asociación no covalente entre un α,γ -ciclopeptido constituido por Ach y otra unidad ciclopeptídica de Acp (Figura 8).^[53,55]

La modificación de la superficie externa de los α,γ -nanotubos mediante la introducción de diversas funcionalidades nos ha permitido el desarrollo de nuevas aplicaciones. De este modo, se ha llevado a cabo la preparación de novedosos híbridos supramoleculares dador-aceptor estables termodinámicamente, para lo cual es necesario disponer de α,γ -ciclopeptidos derivatizados convenientemente en sus cadenas laterales con grupos

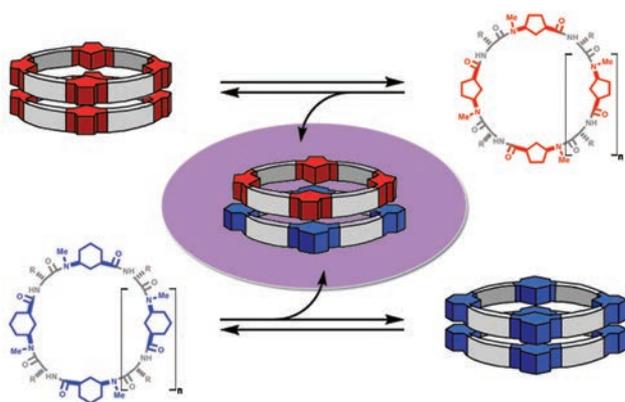


Figura 8. Sistemas supramoleculares heterodiméricos. La combinación de α,γ (Ach)- y α,γ (Acp)-ciclopeptidos permite la formación de una nueva clase de estructuras nanotubulares heterodiméricas.

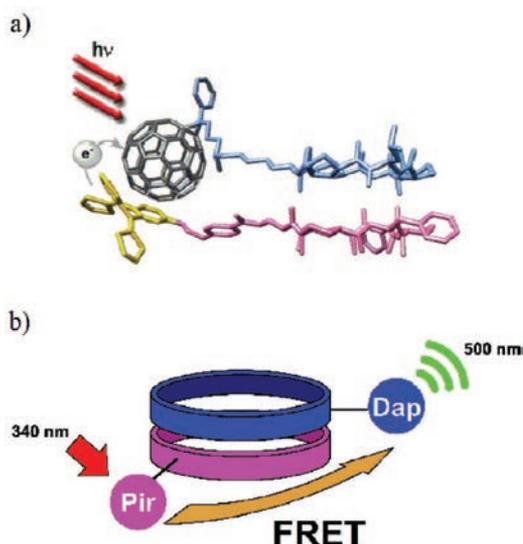


Figura 9. Sistemas supramoleculares dador-aceptor basados en nanotubos α,γ -ciclopeptídicos. a) Transferencia electrónica fotoinducida. b) Transferencia energética de fluorescencia de resonancia (FRET).

dadores y aceptores (Figura 9).^[57,58] Dichas unidades dador y aceptor se conectan selectivamente mediante interacciones enlace de hidrógeno provenientes del autoensamblaje ciclopeptídico, favoreciendo el correspondiente proceso de transferencia electrónica y/o energética a través del espacio. La construcción de estos nuevos sistemas supramoleculares adquiere gran relevancia debido a sus posibles aplicaciones como fotosistemas artificiales, biosensores, sondas moleculares,...

Conclusiones

Los procesos de autoensamblaje molecular, en los cuales componentes individuales se asocian espontáneamente de manera predeterminada, han emergido como una de las herramientas más poderosas para llevar a cabo la preparación de nanoestructuras funcionales. Especialmente interesante resulta la química supramolecular de los ciclopeptidos, los cuales bajo las condiciones apropiadas interactúan a través de enlaces de hidrógeno para formar nanotubos ciclopeptídicos. Crucial para esta interacción es la adopción de una conformación plana en la que las cadenas laterales de los aminoácidos presentan una orientación pseudo-ecuatorial apuntando hacia el exterior, mientras que los grupos carbonilo y amino de los enlaces peptídicos se disponen de manera perpendicular al plano del anillo. Esta conformación puede ser lograda por ciclopeptidos constituidos por una gran variedad de residuos, entre los que destacan los γ -aminoácidos. En todos los casos, los nanotubos resultantes tienen diámetros internos uniformes bien definidos y superficies externas que pueden ser fácilmente dotadas de propiedades específicas mediante modificación de las cadenas laterales. Dichos nanotubos ciclopeptídicos están siendo activamente investigados debido a las potenciales aplicaciones que presentan en diferentes campos como la medicina, farmacología, química, biología y ciencia de materiales.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a todos sus colaboradores en los últimos años por su inestimable contribución al desarrollo en el área de los α,γ -nanotubos peptídicos. De modo particular, queremos mostrar nuestra mayor gratitud al Prof. Luis Castedo, al Dr. Manuel Amorín, al Dr. M. Eugenio Vázquez, al Prof. M. Mosquera y a los grupos de investigación del Prof. M. R. Ghadiri, del Prof. N. Martín y del Prof. D. M. Guldi.

Bibliografía

- [1] La nanociencia incluye el estudio de objetos y sistemas en los cuales una de las dimensiones está comprendida entre 1-100 nm. G. M. Whitesides, *Small* **2005**, *1*, 172–179.
- [2] C. B. Murray, S. Sun, W. Gaschler, H. Doyle, T. A. Betley, C. R. Kagan, *IBM J. Res. Dev.* **2001**, *45*, 47–56.
- [3] C. Qian, F. Kim, L. Ma, F. Tsui, P. Yang, J. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1195–1198.
- [4] M. Lazzari, M. A. López-Quintela, *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1583–1594.
- [5] M. Terrones, W. K. Tsui, H. W. Kroto, D. R. M. Walton, *Top. Curr. Chem.* **1999**, *199*, 189–234.
- [6] C. N. R. Rao, A. K. Cheetham, *J. Mater. Chem.* **2001**, *11*, 2887–2894.

- [7] C. R. Martin, P. Kohli, *Nature Reviews* **2003**, *2*, 29–37.
- [8] P. J. Langley, J. Hulliger, *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 279–291.
- [9] R. H. Baughman, A. A. Zakhidov, W. A. de Heer, *Science* **2002**, *297*, 787–792.
- [10] G. R. Patzke, F. Krumeich, R. Nesper, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2446–2462.
- [11] Q. S. Huo, D. I. Margolese, U. Ciesla, P. Feng, T. E. Gier, P. Sieger, R. Leon, P. M. Petroff, F. Schüth, G. D. Stucky, *Nature* **1994**, *368*, 317–321.
- [12] A. Harada, J. Li, M. Karachi, *Nature* **1993**, *364*, 516–518.
- [13] G. M. Whitesides, J. P. Mathias, C. T. Setho, *Science* **1991**, *254*, 1312–1319.
- [14] Capítulo especial "Supramolecular chemistry and self-assembly". *Science* **2002**, *295*, 2395–2421.
- [15] Esta aproximación ha sido propuesta para la formación de nanotubos de carbono a partir de grafito. S. Iijima, *Nature* **1991**, *354*, 56–58.
- [16] R. B. Prince, L. Brunsveld, E. W. Meijer, J. S. Moore, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 228–230.
- [17] N. Sakai, J. Mareda, S. Matile, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 79–87.
- [18] J. G. Morales, J. Raez, T. Yamazaki, K. Motkuri, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8307–8309.
- [19] J. Hartgerink, T. D. Clark, M. R. Ghadiri, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1367–1372.
- [20] R. J. Brea, J. R. Granja. "Self-assembly of cyclic peptides in hydrogen-bonded nanotubes". En *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*; Eds. J. A. Schwarz, C. I. Contescu, K. Putyera, K.; Marcel Dekker Inc.: New York (Estados Unidos), **2004**; 3439–3457.
- [21] D. T. Bong, T. D. Clark, J. R. Granja, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 988–1011.
- [22] P. De Santis, S. Morosetti, R. Rizzo, *Macromolecules* **1974**, *7*, 52–58.
- [23] L. Tomasic, G. P. Lorenzi, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1012–1016.
- [24] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, N. Khazanovich, *Nature* **1993**, *366*, 324–327.
- [25] N. Khazanovich, J. R. Granja, R. A. Milligan, D. E. McRee, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6011–6012.
- [26] T. D. Clark, J. M. Buriak, K. Kobayashi, M. P. Isler, D. E. McRee, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8949–8962.
- [27] M. R. Ghadiri, K. Kobayashi, J. R. Granja, R. K. Chadha, D. E. McRee, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, *34*, 93–95.
- [28] X. C. Sun, G. P. Lorenzi, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1520–1526.
- [29] D. H. Appella, L. A. Christianson, D. A. Klein, D. R. Powell, X. Huang, J. J. Barchi, S. H. Gellman, *Nature* **1997**, *387*, 381–384.
- [30] R. P. Cheng, S. H. Gellman, W. F. DeGrado, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3219–3232.
- [31] D. Seebach, J. L. Matthews, A. Meden, T. Wessels, C. Baerlocher, L. B. McCusker, *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 173–182.
- [32] T. D. Clark, L. K. Buehler, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 651–656.
- [33] E. A. Porter, X. Wang, H. S. Lee, B. Weisblum, S. H. Gellman, *S. H. Nature* **2000**, *404*, 565.
- [34] F. Fujimura, M. Fukuda, J. Sugiyama, T. Morita, S. Kimura, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 1896–1901.
- [35] D. Gauthier, P. Baillargeon, M. Drouin, Y. L. Dory, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4635–4638.
- [36] S. Leclair, P. Baillargeon, R. Skouta, D. Gauthier, Y. Zhao, Y. L. Dory, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 349–353.
- [37] W. S. Horne, M. K. Yadav, C. D. Stout, M. R. Ghadiri, *M. R. J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15366–15367.
- [38] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599.
- [39] W. S. Horne, C. D. Scout, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9372–9376.
- [40] M. R. Ghadiri, J. R. Granja, L. K. Buehler, *Nature* **1994**, *369*, 301–304.
- [41] S. Fernández-López, H. S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxon, M. R. Ghadiri, *Nature* **2001**, *412*, 452–455.
- [42] K. Motesharei, M. R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 11306–11312.
- [43] J. Couet, J. D. J. S. Samuel, A. Kopyshv, S. Santer, M. Biesalski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3297–3301.
- [44] M. S. Vollmer, T. D. Clark, C. Steinem, M. R. Ghadiri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1598–1601.
- [45] N. Ashkenasy, W. S. Horne, M. R. Ghadiri, *Small* **2006**, *2*, 99–102.
- [46] J. Farrera-Sinfreu, E. Giralt, S. Castel, F. Albericio, M. Royo, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9459–9468.
- [47] D. Seebach, L. Schaeffer, M. Brenner, D. Hoyer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 776–778.
- [48] M. Amorín, V. Villaverde, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2844–2845.
- [49] M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Drug. Delivery Sci. Technol.* **2005**, *15*, 87–92.
- [50] M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 6543–6551.
- [51] M. Amorín, R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4681–4684.
- [52] M. Amorín, R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Heterocycles* **2006**, *67*, 575–583.
- [53] R. J. Brea, M. Amorín, L. Castedo, J. R. Granja, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5710–5713.
- [54] R. J. Brea, L. Castedo, J. R. Granja, *Chem. Commun.* **2007**, *31*, 3267–3269.
- [55] R. J. Brea, R. García-Fandiño, S. Vázquez, L. Castedo, Juan R. Granja, *manuscrito en preparación*.
- [56] P. M. Bowers, S. J. Cokus, D. Eisenberg, T. O. Yeates, *Science* **2004**, *306*, 2246–2249.
- [57] R. J. Brea, M. E. Vázquez, M. Mosquera, L. Castedo, J. R. Granja, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1653–1657.
- [58] R. J. Brea, M. A. Herranz, L. Sánchez, L. Castedo, W. Seitz, D. M. Guldi, N. Martín, J. R. Granja, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 5291–5294.

