



**UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA**

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**“SÍNTESIS DE UN PRODUCTO BASADO EN EL BIOPOLÍMERO
QUITOSANO Y EL PÉPTIDO SBP1 PARA ENCAPSULAR AL
VIRUS SARS-CoV-2 RESPONSABLE DE LA COVID-19”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTORA

MLY MC LEYDY HUIZA MAYTA

ASESOR

DR. MIRKO JUAN ZIMIC PERALTA

COASESOR

DR. JUAN MANUEL LOPEZ SMITH

LIMA – PERÚ

2024

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios y a mis padres, Juan y Ssusy, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida. Agradezco también a mi hermana Myhumy y a toda mi familia, por confiar en mi y siempre brindarme buena compañía y momentos inolvidables.

En segundo lugar, extiendo mi gratitud a mis amigos de laboratorio, Diego, Heldy, Marcelo y Ermerlan cuya colaboración y compañerismo han enriquecido mi experiencia profesional. También agradezco a Robert, por su compañía, su disponibilidad y sus buenos consejos para seguir adelante.

En tercer lugar, quiero agradecer al Centro de Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear por brindarme acceso a su laboratorio, lo cual ha sido fundamental para mi desarrollo académico y profesional. Así también a todos los integrantes de la sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, por siempre estar prestos a ayudarme y colaborar con mi desarrollo.

En cuarto lugar, mi reconocimiento especial va para el Dr. Juan Lopez, la Dra. Helena Maruenda, Dr. Mirko Zimic, y el Dr. Javier Nakamatsu; quienes generosamente compartieron sus conocimientos y contribuyeron significativamente a mi formación.

Por último, pero no menos importante, quiero expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (CONCYTEC), el ente financiero del proyecto “Neutralización de SARS-CoV-2 por derivados de quitosano funcionalizados”, (Contrato N° 154-2020 -FONDECYT). Su respaldo financiero fue crucial para llevar a cabo esta investigación y alcanzar los resultados deseados.

A todos, mi más profundo agradecimiento por ser parte fundamental de mi camino.

SÍNTESIS DE UN PRODUCTO BASADO EN EL BIOPOLÍMERO QUITOSANO Y EL PÉPTIDO SBP1 PARA ENCAPSULAR AL VIRUS SARS-CoV-2 RESPONSABLE DE LA COVID-19

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%	11%	5%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
2	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
3	tesis.pucp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
4	doi.org Fuente de Internet	<1 %
5	patents.google.com Fuente de Internet	<1 %
6	uvadoc.uva.es Fuente de Internet	<1 %
7	Xuefeng Jin, Yuanjing Cui, Junkuo Gao, Jinjun Nie, Wenjie Liu, Guodong Qian. "High thermally stable hybrid nonlinear optical films containing heterocycle chromophores", Thin Solid Films, 2009	<1 %

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
I. INTRODUCCIÓN.....	5
1. ENFERMEDAD DEL CORONAVIRUS 2019	5
1.1 Aspectos generales y problemática.....	5
1.2 Patología de la enfermedad.....	5
1.3 Mecanismo de transmisión del virus	6
2. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA COVID-19.....	7
2.1 Estructura del coronavirus de tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo..	7
2.2 Ciclo de replicación del virus	8
3. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA COMBATIR LA COVID 19	10
3.1 Desarrollo de las vacunas	10
3.2 Desarrollo de los medicamentos	10
4. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA HUMANA 2 COMO BLANCO TERAPÉUTICO	12
4.1 Estructura de la enzima ACE2.....	12
4.2 Función de la enzima ACE2 en el virus de la COVID 19	12
5. DISEÑO Y ESTRATEGIA DE SÍNTESIS DE UN NEUTRALIZADOR DEL VIRUS DE LA COVID 19 BASADO EN LA INTERACCIÓN DE LA ACE2 Y EL DOMINIO RBD DE LA PROTEÍNA S1	14
5.1 Diseño de SBP1, un péptido derivado del ACE2 como inhibidor de la interacción ACE2-RBD.....	14
5.2 Quitosano	15
5.2.1. Aspectos generales	15
5.2.2. Caracterización	16
5.2.3. Quitosano como matriz para moléculas	17
5.3 Optimización de la afinidad del péptido SBP1	18
6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA	19
II. HIPÓTESIS.....	20
III. OBJETIVOS.....	20
1 GENERAL.....	20
2 ESPECÍFICOS.....	20
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
1 ESTRATEGIA DE SÍNTESIS DE QUITOSANO FUNCIONALIZADO CON EL PÉPTIDO SBP1	21
1.1. Etapa 1: Reacción del quitosano con el <i>N</i> -Hidroxysuccinimida-PEG-Maleimido	21

1.2.	Etapa 2: Reacción del Quitosano-PEG-Maleimido con el péptido SBP1	22
2	REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS.....	24
2.1.	Reactivos.....	24
2.2.	Materiales	24
2.3.	Equipos	24
3	METODOLOGÍA.....	25
3.1.	Caracterización de reactivos iniciales.....	25
3.1.1.	Análisis de quitosano.....	26
3.1.2.	Análisis del <i>N</i> -hidroxisuccinimida-PEG-Maleimido	26
3.1.3.	Análisis del péptido SBP1	26
3.2.	Síntesis del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1	27
3.2.1.	Etapa 1: Reacción del quitosano con el <i>N</i> -hidroxisuccinimida-PEG-Maleimido.....	27
3.2.2.	Etapa 2: Reacción del Quitosano-PEG-Maleimido (CS-PEG-MAL) con el péptido SBP1	27
3.2.3.	Etapa 3: Purificación del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1	28
3.2.4.	Etapa 4: Caracterización del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1	28
3.3.	Ensayo de capacidad neutralizante visualizado por micro-aglutinación	28
3.3.1.	Análisis de las muestras vs <i>Salmonella enteritidis</i> modificada.....	28
3.3.2.	Interpretación de resultados de los ensayos de capacidad neutralizante ...	29
V.	RESULTADOS	30
1	CARACTERIZACIÓN DE REACTIVOS INICIALES	30
1.1.	Determinación del grado de acetilación del quitosano por ¹ H-RMN	30
1.2.	Determinación del peso molecular del <i>N</i> -hidroxisuccinimida-PEG-Maleimido por ¹ H-RMN.....	32
1.3.	Determinación de la secuencia de aminoácidos del péptido SBP1 por ¹ H-RMN y ¹ H- ¹ H NOESY y TOCSY – RMN	36
2	SÍNTESIS DEL QUITOSANO FUNCIONALIZADO CON EL PÉPTIDO SBP1	39
2.1.	Caracterización del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1	39
2.2.	Determinación del grado de funcionalización del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1	41
3	CÁLCULOS DE CONCENTRACIÓN DEL CS-PEG-SBP1 Y CS-PEG-L-CISTEÍNA.....	48
4	ENSAYO DE CAPACIDAD NEUTRALIZANTE VISUALIZADO POR MICRO-AGLUTINACIÓN.....	50
VI.	DISCUSIÓN.....	54
VII.	TRABAJOS FUTUROS.....	58

VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
IX. BIBLIOGRAFÍA	60
X. ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación de la glicoproteína S y de la estructural del virus SAR-CoV-2. Abreviaciones: HR1, repetición de la heptada 1 ; HR2, repetición de la heptada 2. Adaptado de Grobbelaar, L. y colaboradores (20).	8
Figura 2: Esquema de la interacción proteína (S) – proteína (ACE2) y la entrada a la célula huésped. Abreviaciones: TMPRSS2, Serina proteasa transmembrana 2. Adaptado de Ryan, P. y Caplice, N. (43)	15
Figura 3: Estructuras moleculares de (a) la quitina y (b) el quitosano.	16
Figura 4 :Ruta de síntesis del quitosano con el péptido SBP1 usando el conector NHS-PEG-MAL. Elaboración propia.	21
Figura 5 : Mecanismo propuesto para la síntesis del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1.	23
Figura 6: Estructura del quitosano. Monómeros desacetilado (D) y acetilado (A).	30
Figura 7: Espectro ¹ H-RMN de quitosano de bajo peso molecular en 20% de DCl/D ₂ O a 70°C, DDA: 76%.....	31
Figura 8: Espectro ¹ H-RMN de N-hidroxisuccimida-PEG-Maleimido en CDCl ₃ a 25°C.	33
Figura 9: Estructura química de la N-hidroxisuccimida-PEG-Maleimido.	33
Figura 10: Espectro ¹ H-RMN del péptido SBP1 en 1mL de la solución de 3% de D ₂ O y 97% buffer fosfato pH 7 a 8°C.....	37
Figura 11: Espectro ¹ H-RMN del péptido SBP1 en 1mL de la solución de 3% de D ₂ O y 97% buffer fosfato pH 7 a 8°C, zona de 6.5 ppm a 9 ppm.	38
Figura 12: Correlación ¹ H- ¹ H NOESY y TOCSY – RMN para confirmar la secuencia de aminoácidos de SBP1 en 3% de D ₂ O y 97% buffer fosfato pH 7 a 8°C.....	38
Figura 13: RMN-DOSY del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 en buffer fosfato pH 7.	40
Figura 14:Espectro ¹ H-RMN del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 en buffer fosfato deuterado pH 7 a 25°C.	41
Figura 15: Estructura química del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 (CS-PEG-SBP1).	41
Figura 16:Espectro ¹ H-RMN del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 tratado con el Software MestReNova. Integración en la región del péptido: 6.73 – 8.22 ppm y región del H7-A: 1.79 – 2.11 ppm.	43
Figura 17: Espectro ¹ H-RMN del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1. Región del H7-A, δ 1.79 – 2.11 ppm deconvolucionada.....	44
Figura 18: Ampliación del espectro ¹ H-RMN del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1. región del H7-A, δ 1.79 – 2.11 ppm.	44
Figura 19: A) Reacción positiva. Presencia de micro-aglutinación. Anticuerpos IgY de gallinas y S. enteritidis modificada. B) Reacción positiva. Presencia de micro-aglutinación. Anticuerpos IgY de gallinas y S. enteritidis tipo salvaje.	50

Figura 20: A) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Quitosano funcionalizado con SBP1 2 mM y S. enteritidis tipo salvaje.....	51
Figura 21: A) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Quitosano funcionalizado con SBP1 a 2 mM y S. enteritidis modificada. B) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Control negativo de CS-PEG-L-cisteína a 2 mM y S. enteritidis modificada.	51
Figura 22: A) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Quitosano funcionalizado con SBP1 a 1 mM y S. enteritidis modificada. B) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Control negativo de CS-PEG-L-cisteína a 1 mM y S. enteritidis modificada.	52
Figura 23: A) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Quitosano funcionalizado con SBP1 a 0.5 mM y S. enteritidis modificada. B) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Control negativo de CS-PEG-L-cisteína a 0.5 mM y S. enteritidis modificada.	52
Figura 24: A) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Quitosano funcionalizado con SBP1 a 0.1 mM y S. enteritidis modificada. B) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Control negativo de CS-PEG-L-cisteína a 0.1 mM y S. enteritidis modificada.	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Desplazamiento químico de los protones del quitosano, monómeros desacetilado (D) y acetilado (A), a 70°C en D ₂ O//DCI.....	31
Tabla 2: Desplazamiento químico de los protones de la N-hidroxisuccimida-PEG-Maleimido a 25°C en CDCl ₃	34
Tabla 3: Integraciones de los protones de la N-hidroxisuccimida-PEG-Maleimido a 25°C en CDCl ₃	34
Tabla 4: Total de átomos de la zona no repetitiva del PEG heterobifuncional.	36
Tabla 5: Integrales normalizadas y absolutas de las regiones seleccionadas.	43
Tabla 6: Área de las señales generadas por deconvolución de la región δ 1.79 – 2.11 ppm.	45
Tabla 7: Integraciones de los protones de la síntesis de CS-PEG-SBP1.....	46
Tabla 8: Integrales normalizadas de los picos de la síntesis de CS-PEG-SBP1 de 3 lotes.....	47
Tabla 9: Porcentaje de funcionalización de la síntesis de CS-PEG-SBP1 de 3 lotes..	47

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1: Flujograma de la caracterización de reactivos iniciales.....	25
--	----

RESUMEN

La enfermedad del coronavirus 2019 (COVID-19), causada por el virus SARS-CoV-2, ha provocado millones de muertes y sigue siendo un gran desafío global. Este virus, que es altamente transmisible, es el más contagioso de la familia Coronaviridae. El genoma del SARS-CoV-2 codifica cuatro proteínas importantes: la proteína Spike (S), la proteína de Envoltura (E), la proteína de Membrana (M) y la proteína Nucleocápside (N). De estas, la proteína S es fundamental para la fusión con la célula huésped, por lo que es un objetivo terapéutico clave. Debido a que el virus ingresa a la célula utilizando la enzima convertidora de angiotensina humana 2 (ACE2), la interacción de esta proteína con la proteína S ha emergido como un punto central en la investigación de tratamientos antivirales. Basándose en la estructura de la ACE2, investigadores del Massachusetts Institute of Technology (MIT) crearon el péptido Spike Binding Protein 1 (SBP1). En ensayos de afinidad, este péptido mostró afinidad por la proteína S, aunque en menor proporción comparada con la afinidad entre la ACE2 y la proteína S. Considerando la necesidad de aumentar la afinidad del SBP1 por la proteína S y sabiendo que el diseño de la interacción SBP1-proteína S es un enfoque trascendental ya que es apta para el virus y sus mutaciones, debido a que el virus utiliza su proteína S para ingresar a la célula, este trabajo de investigación propone un método de síntesis para mejorar la afinidad del péptido SBP1. Para ello, se utiliza el quitosano como matriz y se une al péptido SBP1 utilizando la *N*-hidroxisuccinimida-PEG-Maleimido (NHS-PEG-MAL) como *linker*. El quitosano es un biopolímero ampliamente utilizado debido a su capacidad para modificarse, reaccionar y contener fácilmente otras moléculas, como los péptidos. Esta capacidad de servir como matriz o soporte de moléculas amplifica significativamente la afinidad de estas por sus respectivas proteínas extracelulares del patógeno objetivo. En este estudio se caracterizaron los reactivos iniciales mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). La síntesis del quitosano funcionalizado se realizó en dos etapas: primero, se formó una amida entre la unidad desacetilada del quitosano (glucosamina) y el NHS-PEG-MAL; en la segunda etapa, se llevó a cabo la reacción de Michael para unir el quitosano-PEG heterobifuncional al péptido SBP1, obteniendo finalmente el quitosano funcionalizado con el SBP1. Al final de la síntesis, el producto se purificó y su pureza se verificó mediante RMN. El producto final obtenido fue reproducible, logrando un 14% de funcionalización del SBP1 en el quitosano. Como parte

del estudio, se realizaron pruebas de capacidad neutralizante mediante micro-aglutinación utilizando *Salmonella enteritidis* modificada, una bacteria que presenta la proteína S del virus SARS-CoV-2 en su superficie. Los ensayos se llevaron a cabo con controles positivos y negativos, así como con la muestra de quitosano funcionalizado con el péptido SBP1. Como conclusión del estudio, no se observó aglutinación, lo que podría sugerir que la técnica de micro-aglutinación no fue lo suficientemente sensible o específica para detectar interacciones a nivel molecular. Sin embargo, su bajo costo y simplicidad fueron factores determinantes para iniciar las pruebas de medición de la efectividad del producto sintetizado, agotando primero las opciones de fácil acceso.

Palabras claves: Covid-19, SARS-CoV-2, Proteína Spike, Quitosano, Péptido SBP1, Síntesis química, RMN.

ABSTRACT

The coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by the SARS-CoV-2 virus, has led to millions of deaths and remains a significant global challenge. This highly transmissible virus is the most contagious among the Coronaviridae family. The genome of SARS-CoV-2 encodes four key proteins: Spike protein (S), Envelope protein (E), Membrane protein (M), and Nucleocapsid protein (N). Among these, the Spike protein (S) is crucial for cell entry and serves as a key therapeutic target. The virus enters cells using the human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor, making the interaction between ACE2 and Spike protein pivotal in antiviral research. Inspired by the ACE2 structure, researchers at the Massachusetts Institute of Technology (MIT) developed the Spike Binding Protein 1 (SBP1) peptide. In affinity assays, SBP1 demonstrated binding affinity to the Spike protein, albeit lower compared to ACE2-Spike interaction. Recognizing the need to enhance SBP1's affinity for the Spike protein, crucial for the virus and its mutations, this research proposes a synthesis method. Here, chitosan serves as a matrix, conjugating with SBP1 using N-hydroxysuccinimide-PEG-Maleimide (NHS-PEG-MAL) as a linker. Chitosan, a widely-used biopolymer, is known for its ability to modify, react, and effectively encapsulate molecules like peptides. This capacity to act as a matrix significantly enhances the affinity of these molecules for their respective extracellular protein targets of the pathogen. The study characterized initial reagents using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy. Functionalized chitosan synthesis occurred in two stages: first, an amide formed between the deacetylated chitosan unit (glucosamine) and NHS-PEG-MAL; secondly, Michael addition reaction joined chitosan-heterobifunctional PEG to SBP1 peptide, yielding SBP1-functionalized chitosan. Post-synthesis, the product underwent purification, confirming purity via NMR. The final product demonstrated reproducibility with 14% SBP1 functionalization on chitosan. As part of the study, microagglutination tests assessed neutralizing capability using modified *Salmonella enteritidis*, bearing SARS-CoV-2 Spike protein on its surface. Trials included positive and negative controls, alongside SBP1-functionalized chitosan samples. While no agglutination was observed, suggesting microagglutination's insensitivity or specificity at molecular levels, its affordability and simplicity were pivotal in early effectiveness testing of the synthesized product.

Keywords: Covid-19, SARS-CoV-2, Spike Protein, Chitosan, SBP1 Peptide, Chemical Synthesis, NMR.

I. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DEL CORONAVIRUS 2019

1.1 Aspectos generales y problemática

El SARS-CoV-2, virus responsable de la pandemia del Covid-19, fue identificado por primera vez el 12 de diciembre del 2019 en la ciudad de Wuhan, China (1). El total de casos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) son más de 771 millones, mientras que las muertes bordean los 7 millones (2).

El SARS-CoV-2 es un virus de la familia Coronaviridae de origen zoonótico (3). Este virus ataca principalmente el sistema respiratorio, causando síntomas similares a los del SARS-CoV-1 (coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo) y el MERS-CoV (coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo) (4).

La familia Coronaviridae originalmente incluía seis patógenos, cuatro de los cuales (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-229E y NL63) tienen comportamiento endémico con síntomas leves. Los otros dos patógenos, SARS-CoV-1 responsable de la epidemia de 2003 y MERS-CoV responsable de la epidemia de 2012 presentan una alta tasa de mortalidad y morbilidad (5). Con la aparición del SARS-CoV-2, el número de patógenos en esta familia se elevó a siete. El SARS-CoV-2 es menos letal que sus predecesores, pero más transmisible (6).

1.2 Patología de la enfermedad

El Covid-19, la enfermedad causada por el virus del SARS-CoV-2, ataca principalmente el sistema respiratorio. El virus mayormente ingresa por el tracto respiratorio, aunque también a través de las membranas mucosas de la nariz, la boca y los ojos. Los primeros síntomas generalmente son dolor de garganta, rinorrea y estornudos. Estos síntomas se generan por la replicación del SARS-CoV-2 en el tracto respiratorio superior y se relacionan con casos leves a moderados. En los casos severos, la replicación del SARS-CoV-2 llega al tracto respiratorio inferior infectando los neumocitos, lo cual induce la tormenta de citoquinas generando un flujo de macrófagos y neutrófilos. La tormenta de citoquinas genera la inflamación y colapso de los alveolos, generando síntomas relacionados con la neumonía, el síndrome de dificultad respiratorio aguda y, en los casos más severos, la muerte (7).

1.3 Mecanismo de transmisión del virus

La transmisión del Covid-19 se da principalmente por pequeñas gotas producidas durante la respiración y en menor medida por aerosoles generados al hablar, toser o estornudar. Otra forma de transmisión común es por contacto directo con superficies contaminadas y subsecuente contacto con mucosas respiratorias u oculares.

La diseminación del virus es muy elevada en las fosas nasales y la garganta en los primeros tres días desde que aparecen los síntomas. El periodo previo a la incubación dura alrededor de cinco a siete días pero puede llegar hasta los 14 días. De uno a tres días antes de los síntomas una persona puede contagiar a otras. Se estima en 30% el número de personas infectadas con SARS-CoV-2 que permanecen asintomáticas (7,8).

El desarrollo del Covid-19 en la mayoría de pacientes presenta síntomas leves (40%) a moderados (40%). Cerca del 15% de los pacientes desarrolla una enfermedad severa que requiere de soporte vital de oxígeno, mientras que 5% desarrolla una enfermedad crítica con complicaciones como falla respiratoria, síndrome de dificultad respiratoria aguda, shock séptico, tromboembolismo, entre otros.

2. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA COVID-19

2.1 Estructura del coronavirus de tipo 2 del síndrome respiratorio agudo severo

El SARS-CoV-2, al igual que otros coronavirus, posee un ARN monocatenario de sentido positivo. Tiene un diámetro que oscila entre 50 nm – 200 nm y una longitud de 29,891 nucleótidos (5,9,10). Su genoma codifica las proteínas estructurales Spike (S), Envoltura (E), Membrana (M) y Nucleocápside (N) (11). La proteína N se encuentra en el interior del virus y desempeña un papel en el empacamiento genómico y en la replicación viral (12). Las otras tres proteínas se encuentran en la estructura externa del virus. La proteína M es responsable de determinar la forma de la envoltura viral, la proteína E es importante para la producción y maduración del virus, y la proteína S es la más estudiada debido a su papel en el reconocimiento, adhesión, fusión y entrada a la célula huésped (13–15).

La proteína S desempeña un papel crucial en la fusión de la membrana viral con la membrana del huésped. Esta proteína pertenece a la clase I, y se presenta en forma de trímeros homodiméricos, formando estructuras que sobresalen de la envoltura viral (16) (Figura 1). Además, esta altamente modificada por glicosilación, lo que le confiere protección contra posibles anticuerpos neutralizantes. También desempeña un papel importante en el reconocimiento del receptor en la célula huésped (17).

La proteína S está conformada por dos subunidades: S1, encargada del reconocimiento del receptor, y S2, que permite la fusión de la membrana viral y la del huésped (11). **La subunidad S1 presenta dominios N-terminal (NTD) y C-terminal (CTD). Uno de estos dominios, generalmente el CTD, actúa como dominio de unión al receptor (RBD)**, aunque existe una excepción en el betacoronavirus MHV, donde el NTD desempeña esta función (15,18) (Figura 1).

El RBD determina el tropismo del virus y presenta dos estados conformacionales. Uno de ellos (cerrado) protege la región de unión al receptor, mientras que el otro estado (abierto) expone esta región, lo que permite que la enzima convertidora de angiotensina humana 2 (ACE2), una exopeptidasa de membrana, pueda reconocerla y facilitar la entrada del material genético viral en la célula huésped (19).

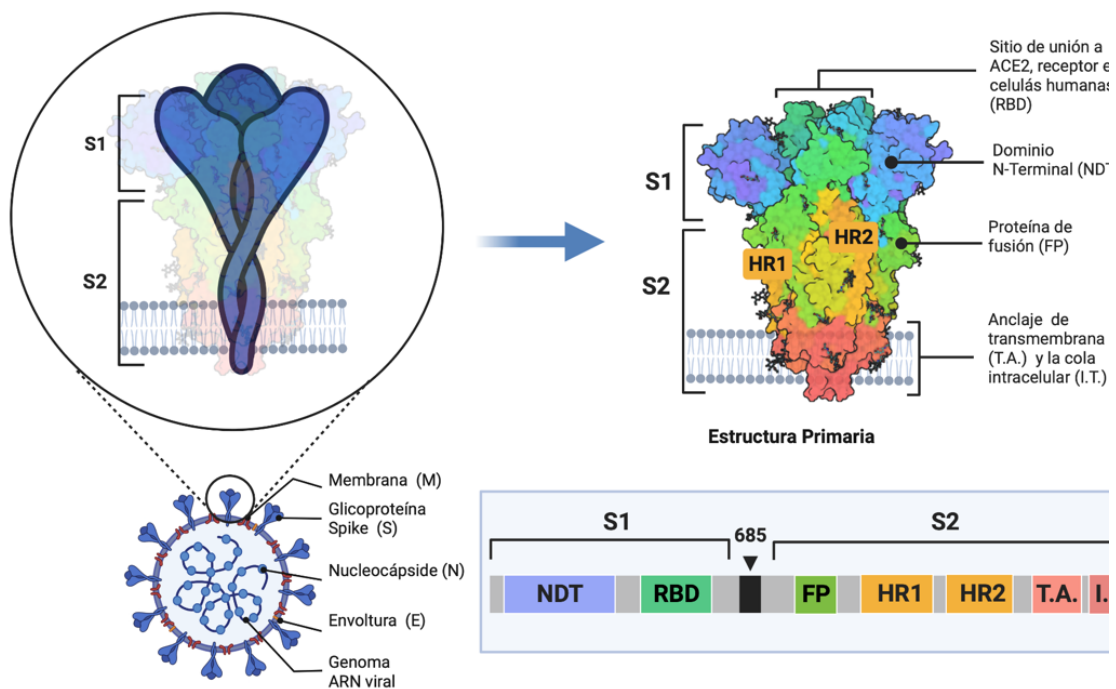


Figura 1: Representación de la glicoproteína S y de la estructura del virus SARS-CoV-2. Abreviaciones: HR1, repetición de la heptada 1 ; HR2, repetición de la heptada 2. Adaptado de Grobbelaar, L. y colaboradores (20).

2.2 Ciclo de replicación del virus

Luego de ser infectado, el ciclo de vida del SARS-CoV-2 consiste de cinco pasos: unión, penetración, biosíntesis, maduración y liberación. En los primeros pasos se enlaza la proteína S del coronavirus a la región extracelular de ACE2. La fusión satisfactoria requiere de la escisión proteolítica de la proteína S en las subunidades S1 y S2 mediante proteasas derivadas de la célula huésped. La subunidad S1 se encarga de la unión del virus a la región extracelular de ACE2, mientras que la subunidad S2 se encarga de la fusión con la membrana celular de la célula huésped.

Una vez adentro de la célula, el ARN viral se libera en el citoplasma celular. Una cadena de ARN(+) se replica en una cadena de ARN(-) para replicarse en otra cadena de ARN(+) o para transcripción en mRNA que puede ser traducido en una variedad de proteínas virales. Dos tercios del genoma del SARS-CoV-2 están conformados por dos grandes marcos de lectura abiertos ORF1a y ORF1b. La traducción de ORF1a y ORF1b produce la poliproteína replicasa 1a (pp1a) y poliproteína 1ab (pp1ab) que, luego de su escisión proteolítica, producen las proteínas necesarias para la replicación del ARN viral. El otro tercio del genoma del SARS-CoV-2 contiene la información necesaria para cuatro

importantes proteínas estructurales que componen un virus maduro: spike (S), membrana (M), envoltura (E) y nucleocápside (N) (7,21).

La traducción del ARN en la proteína N ocurre en el citoplasma, mientras que las formas maduras de las proteínas S, M y E ocurre en el retículo endoplásmico rugoso (ER). La nucleocápside y las estructuras virales se ensamblan consecutivamente en el compartimento intermedio de ER a Golgi. Los nuevos viriones formados en las vesículas de Golgi se fusionan con la membrana y son liberados de la célula infectada via exocitosis (7,21).

3. ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA COMBATIR LA COVID 19

Debido a la relevancia de la proteína S en la entrada del virus al huésped, se considera que esta proteína podría ser un objetivo terapéutico potencial en el tratamiento de la Covid-19 (15). Para hacer frente a esta enfermedad, se han adoptado dos enfoques principales: el desarrollo de vacunas y la búsqueda de medicamentos eficaces.

3.1 Desarrollo de las vacunas

En el contexto de las vacunas, se cuenta con diversas metodologías y tecnologías utilizadas para su desarrollo y producción. Entre estas se incluyen:

Vacunas inactivadas o atenuadas: Estas vacunas se basan en la utilización de virus vivos que han sido inactivados o debilitados para no causar enfermedad. Un ejemplo de este enfoque es la vacuna desarrollada por Sinopharm (22).

Vacunas de ácidos nucleicos: Esta categoría de vacunas utiliza ácidos nucleicos, como ADN o ARNm, para introducir instrucciones genéticas en las células del organismo. Esto permite que las células produzcan la proteína viral deseada y desencadenen una respuesta inmunitaria. La vacuna desarrollada por Pfizer es un ejemplo de este tipo de vacuna, que utiliza ARNm para instruir a las células a producir la proteína S del virus (23).

Vacunas de proteínas recombinantes: Estas vacunas se basan en la producción de proteínas virales específicas utilizando técnicas de ingeniería genética. En el caso de la Covid-19, gran parte de los esfuerzos se han centrado en la proteína S y sus subunidades, ya que desempeñan un papel crucial en la entrada del virus a las células. Estas proteínas recombinantes se utilizan para inducir una respuesta inmunitaria protectora.(24).

Es importante destacar que estas son solo algunas de las metodologías utilizadas en el desarrollo de vacunas contra la Covid-19, la investigación y el desarrollo continúan en curso (24).

3.2 Desarrollo de los medicamentos

En el ámbito farmacológico, se están investigando diversas opciones para tratar la enfermedad. Estos enfoques incluyen el uso de productos químicos, medicina tradicional y agentes biológicos (24). Algunos de estos incluyen:

- Terapias antivirales: Son medicamentos que tienen como objetivo directo inhibir la replicación del virus en el organismo. Estos medicamentos pueden actuar bloqueando la entrada del virus a las células, interfiriendo con la replicación viral o evitando que el virus se propague dentro del cuerpo.
- Terapias inmunomoduladoras: Estas terapias buscan modular la respuesta inmunológica del organismo frente a la infección por el SARS-CoV-2. El objetivo es regular la respuesta inflamatoria excesiva que puede ocurrir en casos graves de la enfermedad y promover una respuesta inmunológica equilibrada y eficaz.
- Terapias con anticuerpos monoclonales: Se están desarrollando anticuerpos monoclonales específicos para neutralizar el virus. Estos anticuerpos, producidos en el laboratorio, pueden administrarse a los pacientes para ayudar a combatir la infección y reducir la gravedad de los síntomas.

Es importante destacar que, a medida que la Covid-19 evoluciona, se están presentando nuevas variantes y mutaciones del virus. Esto plantea la necesidad de continuar investigando y desarrollando nuevos fármacos y vacunas que puedan abordar estas variantes y mantenerse eficaces frente a la enfermedad (25–27).

4. ENZIMA CONVERTIDORA DE ANGIOTENSINA HUMANA 2 COMO BLANCO TERAPÉUTICO

4.1 Estructura de la enzima ACE2

La enzima convertidora de angiotensina humana 2 (ACE2), cuyo descubrimiento se remonta al año 2000, es un homólogo de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). ACE2 es una proteína transmembrana del tipo I que contiene 805 aminoácidos y dos dominios funcionales. El primer dominio consiste en un péptido de señal N-terminal de 17 aminoácidos que contiene un dominio peptidasa, o PD (residuos 19 – 615), con su motivo metalopeptidasa de unión a zinc HEXXH (H por histonas, E por glutamina y X por cualquier aminoácido con carga) que participa en la catálisis de la proteína. Este dominio está formado principalmente por estructuras de alfa hélice, aunque también se encuentran algunas hojas beta. El segundo dominio consiste en un dominio C-terminal de tipo colectorina, o CLD (residuos 616 – 768), que incluye un dominio de cuello plegado de tipo ferredoxina (residuos 615 – 726) que termina en una región transmembrana de alfa hélices hidrofóbicas de 22 aminoácidos seguido de un segmento intracelular de 43 aminoácidos (28–30). El dominio CLD está conformado por hojas beta y es donde se encuentra el sitio activo de unión del virus SARS-CoV-2.

4.2 Función de la enzima ACE2 en el virus de la COVID 19

La función principal de ACE2 radica en la conversión de la angiotensina I (1 al 10) en angiotensina (1 al 9) y de la angiotensina II (1 al 8) en angiotensina (1 al 7) (31). Es importante destacar que la angiotensina II se asocia con la progresión de enfermedades cardiovasculares, respiratorias, hepáticas y renales, mientras que la angiotensina (1 al 7) participa en procesos opuestos, como la anti-proliferación, anti-inflamación y protección vascular, entre otros (31–33). De esta manera, ACE2 contrarresta el impacto negativo del sistema renina-angiotensina en diversos órganos.

ACE2 ha sido reconocida como el receptor funcional tanto para el SARS-CoV como para el SARS-CoV-2, lo que permite la entrada del virus en la célula (34). Varios estudios han demostrado que la infección por el virus provoca una marcada disminución en la expresión de ACE2 (31,35). Esto se relaciona con un estudio realizado en pacientes infectados por SARS-CoV-2 (36), que revela un aumento de los niveles de angiotensina

II. Este aumento podría estar relacionado con una baja expresión de ACE2, ocasionando daño en los pulmones, el miocardio, los túbulos renales, el intestino delgado y la vejiga. Estos órganos ya han sido identificados en otros estudios como sitios de afectación por el virus (37–39). Además, se ha demostrado que la administración de ACE2 puede aliviar la lesión pulmonar (40).

5. DISEÑO Y ESTRATEGIA DE SÍNTESIS DE UN NEUTRALIZADOR DEL VIRUS DE LA COVID 19 BASADO EN LA INTERACCIÓN DE LA ACE2 Y EL DOMINIO RBD DE LA PROTEÍNA S1

5.1 Diseño de SBP1, un péptido derivado del ACE2 como inhibidor de la interacción ACE2-RBD

A medida que se investigan diversos tratamientos, la interacción entre ACE2 y el dominio RBD (ACE2-RBD), conocida como interacción proteína-proteína (PPI), continúa siendo uno de los principales objetivos para el desarrollo de vacunas y medicamentos (Figura 2) (26, 28).

Conforme el virus sigue mutando, sigue siendo un desafío tanto para las vacunas como para los medicamentos en desarrollo garantizar su efectividad contra las variantes mutadas. Sin embargo, el enfoque de utilizar ACE2-RBD sigue siendo válido a medida que surgen nuevas mutaciones en el virus. Esto se debe a que, según algunos estudios, a medida que el virus muta, tiende a aumentar su afinidad de su dominio RBD hacia la proteína ACE2 de las células humanas (41).

Investigadores del Massachusetts Institute of Technology (MIT) han desarrollado un péptido basado en la estructura del complejo ACE2-Proteína S, denominado Spike-binding peptide (SBP1). El péptido SBP1 es una síntesis química de una secuencia de 23 aminoácidos (IEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS). Esta síntesis basada en la cadena α 1-hélice del dominio receptor de la ACE2 fue determinada mediante simulaciones de dinámica molecular como la secuencia crucial donde se une el dominio RBD del virus para ingresar a la célula huésped (42). Probaron y compararon la afinidad del péptido SBP1 de unirse a la proteína S respecto a la proteína ACE2. Mediante ensayos cinéticos de unión utilizando interferometría de biocapa (BLI) testearon la afinidad tanto del SBP1 como de la ACE2 hacia la proteína S aislada de insectos. Los resultados mostraron que el péptido presentaba una menor afinidad hacia el virus ($K_d = 1.3 \mu\text{M}$), comparada a la ACE2 ($K_d = 15 \text{ nM}$) (42).

Estos hallazgos destacan la importancia de mejorar la afinidad del péptido SBP1, ya que esta estrategia de inhibición, basada en el modelo de interacción ACE2-RBD, ofrece una oportunidad prometedora para desarrollar tratamientos más efectivos contra el virus y sus mutaciones.

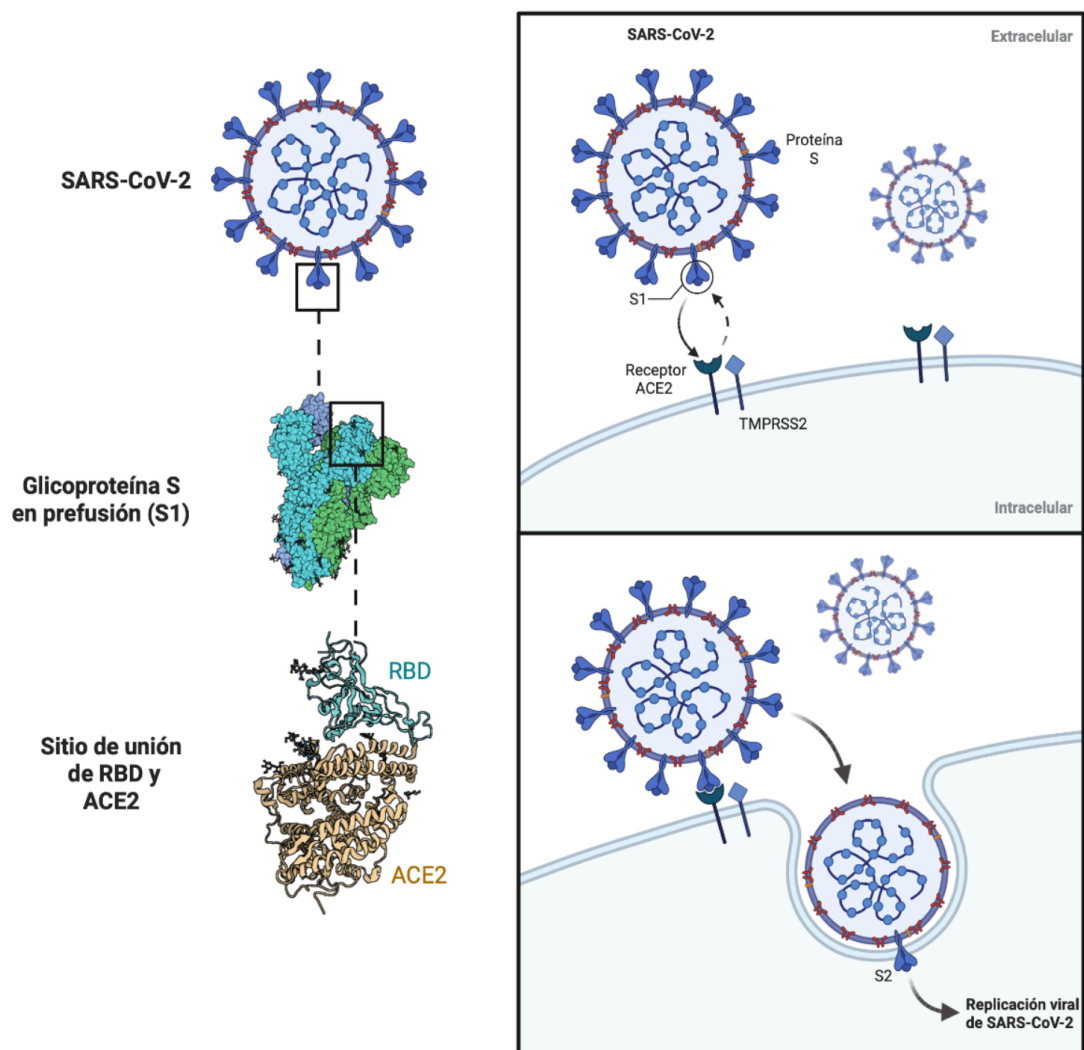


Figura 2: Esquema de la interacción proteína (S) – proteína (ACE2) y la entrada a la célula huésped. Abreviaciones: TMPRSS2, Serina proteasa transmembrana 2. Adaptado de Ryan, P. y Caplice, N. (43)

5.2 Quitosano

5.2.1. Aspectos generales

El quitosano (CS) es un biopolímero no tóxico ampliamente utilizado en diversas industrias debido a sus múltiples aplicaciones. El quitosano se obtiene mediante un proceso de desacetilación a partir de la quitina, un polisacárido de *N*-acetilglucosamina (GlcNac) que se encuentra en el exoesqueleto de crustáceos y otros organismos. Durante este proceso, se remueven los grupos acetilo de la quitina, formando quitosano, un heteropolímero parcialmente desacetilado, compuesto por dos subunidades, la *N*-acetilglucosamina (GlcNac) y la glucosamina (GlcN) (Figura 3). Típicamente se obtienen distintos grados de desacetilación (DDA) entre 50% y 100%. El quitosano, al ser parcialmente desacetilado posee grupos aminos libres. Estos le confieren una mayor

solubilidad en ácidos diluidos, no solo porque puede formar puentes de hidrógeno con el agua, sino también debido a la fuerte interacción electrostática entre el grupo amino con carga positiva y el agua. Además, el quitosano al presentar cargas positivas, puede reaccionar con moléculas de carga negativa e incorporarlas en su matriz, gracias a la fuerte atracción electrostática entre las cargas (44). Estas propiedades hacen que el quitosano sea invaluable en campos como la agricultura, la textilera, la industria papelera, la alimentaria, la farmacéutica y la medicina/biotecnología (45–48).

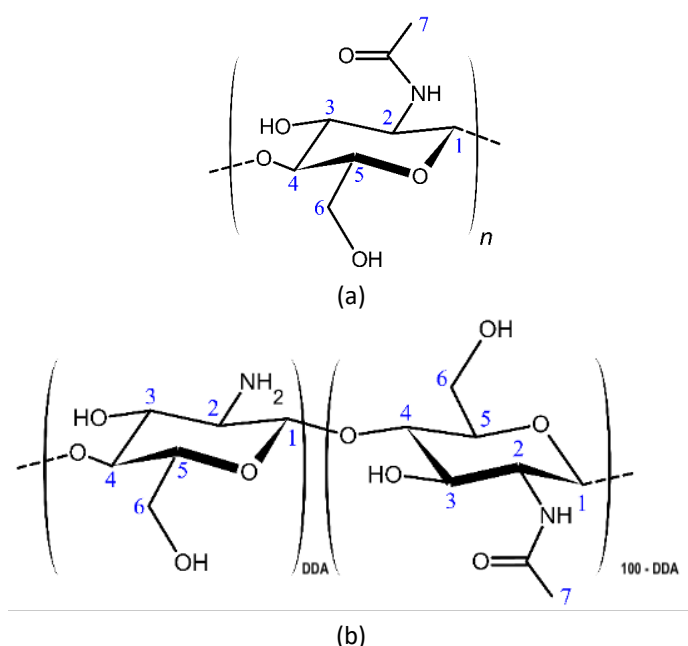


Figura 3: Estructuras moleculares de (a) la quitina y (b) el quitosano.

5.2.2. Caracterización

Las propiedades físicas y químicas de el quitosano dependen de su composición y estructura química (grado de desacetilación), su peso molecular promedio y su distribución molecular. Estas características estructurales varían de acuerdo con el origen natural y el método de desacetilación de la quitina para obtener quitosano (49) Por ello, determinar estas características es importante para conocer con precisión la naturaleza de el quitosano empleada.

El grado de desacetilación de el quitosano se puede determinar por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN). Las señales de los protones del quitosano se determinan de su espectro ^1H -RMN. Luego, la integral de cada señal es directamente proporcional al número de protones que representa dicha señal. De acuerdo con la norma ASTM F2260-18 (50), el DDA de el quitosano se determina usando las Ecuaciones 1-3 mostradas a continuación,

$$\text{Número relativo de residuos desacetilados: } D = \frac{(H1D + H2D)}{2} \quad \text{Ec. 1}$$

$$\text{Número relativo de residuos acetilados: } A = \frac{(H1A + H7A/3)}{2} \quad \text{Ec. 2}$$

$$\text{Grado de desacetilación: } DDA = \frac{D}{A+D} \times 100\% \quad \text{Ec. 3}$$

donde H1D y H2D son las integrales de las señales de los protones 1 y 2 de la unidad desacetilada (D); mientras que H1A y H7A son las integrales de las señales de los protones 1 y 7 de la unidad acetilada (A).

5.2.3. Quitosano como matriz para moléculas

El quitosano es una matriz prometedora para la administración de péptidos y otras moléculas debido a su facilidad para sufrir modificaciones químicas gracias a la presencia de sus grupos amino e hidroxilo. Estas funcionalidades permiten que el quitosano participe en reacciones químicas como la reticulación, la carboximetilación, la eterificación, la copolimerización y la esterificación (51). El quitosano, puede utilizarse como vehículo para fármacos de pequeñas moléculas, péptidos, ácidos nucleicos y biomacromoléculas como proteínas en diversas aplicaciones biomédicas. Además, puede formularse en diversas formas, como nanopartículas, liposomas, hidrogeles, entre otros. (52).

Un estudio realizado por Cesari y colaboradores (53) demostró que el quitosano-amonio injertado con 2-metil- β -ciclodextrina (N+-rCh-MCD) mejoraba la afinidad de la 2-metil- β -ciclodextrina por el neuropéptido dalargina hasta en 20 veces más, en comparación con la afinidad de la 2-metil- β -ciclodextrina sola. Además, este método para la administración oral del neuropéptido mostró que el complejo N+-rCh-MCD presentaba un efecto protector contra la hidrólisis enzimática del péptido.

Así mismo, en otro estudio realizado por Costa F. y colaboradores (54) se vio que la síntesis del quitosano con el péptido Dhvar5 (AMP) aumentó el efecto antiadherente del péptido contra la colonización bacteriana y la subsecuente formación de biopelículas en los dispositivos médicos.

Por otro lado, un estudio realizado por Mochizuki, M y colaboradores (55) demostró que los péptidos derivados de la laminina (A13, A99, AG73 y C16), una proteína de la membrana basal involucrada en la adhesión, migración, diferenciación, soporte y

señalización de las células, conjugados con quitosano, mostraron mayor actividad biológica al unirse a células específicas en comparación con los péptidos actuando solos, sin quitosano.

El quitosano puede complejarse con péptidos, y la adición de polietilenglicol (PEG) puede mejorar la estabilidad de estos complejos, potenciando la afinidad del péptido por su objetivo (56).

5.3 Optimización de la afinidad del péptido SBP1

Existen dos enfoques para mejorar la afinidad del péptido SBP1 hacia el dominio RBD del virus. Por un lado, se está llevando a cabo la síntesis de nuevas secuencias que se centran en analizar los puntos de interacción más relevantes. Esta ruta de investigación se está explorando en diversos estudios. Un ejemplo de ello son los péptidos P1-P10, los cuales fueron diseñados para mimetizar la hélice H1 del receptor ACE2 humano. Se ha observado que la afinidad entre la proteína S y estos péptidos es incluso mayor que la afinidad entre la proteína S y el receptor ACE2. Además, se han sintetizado otros péptidos (péptidos 1 al 6) que han demostrado una notable afinidad en pruebas experimentales a concentraciones bajas (57,58).

Por otro lado, se ha considerado la posibilidad de generar una red o matriz amplia que contenga al péptido SBP1, actuando como un soporte físico. Se ha demostrado que la actividad de los péptidos, que se unen a proteínas de la membrana extracelular, se ve potenciada cuando se conjugan con una matriz de quitosano (55). Esta estrategia busca mejorar la interacción y la eficacia del péptido SBP1 al crear un entorno físico propicio.

6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En el descubrimiento de fármacos, un punto crucial para determinar la efectividad de un compuesto es realizar los ensayos de actividad biológica. Estos ensayos son fundamentales para evaluar cómo el compuesto interactúa con los sistemas biológicos y si cumple con los objetivos terapéuticos previstos. La elección del ensayo biológico ideal es un proceso que requiere una cuidadosa consideración de varios aspectos. Entre ellos, la especificidad, que se refiere a la capacidad del ensayo para detectar el compuesto objetivo en presencia de otros; la sensibilidad, que mide la capacidad del ensayo para detectar pequeñas cantidades del compuesto; el costo, que debe ser razonable para asegurar la viabilidad económica del desarrollo del fármaco; y, sobre todo, la simplicidad, que facilita la ejecución del ensayo y la interpretación de los resultados. La combinación de estos factores garantiza que los ensayos seleccionados proporcionen datos fiables y útiles para avanzar en el desarrollo del fármaco (59).

Teniendo en cuenta la simplicidad y el bajo costo, adaptar un ensayo usado para la detección de anticuerpos en muestras biológicas, como las pruebas de micro-aglutinación, puede ser un buen punto de partida para determinar la efectividad de las moléculas. Este ensayo, que ha sido ampliamente usado durante años, ofrece resultados instantáneos y son conocidos por su fiabilidad y facilidad de uso (60). Aprovechar esta metodología puede permitir evaluar de manera eficiente y económica la eficacia de nuevos compuestos.

El ensayo de micro-aglutinación se basa en la reacción serológica entre el antígeno y el anticuerpo cuya finalidad es la detección de este último (61). Un resultado positivo se determina por la presencia de patrones de aglutinación evaluado visualmente y confirmado con un microscopio (62). Dentro de esta técnica, la inserción de proteínas (ej. antígenos) en la superficie de bacterias vivas ha demostrado ser un método eficaz para la fácil y rápida detección de los anticuerpos (63,64). Para esto, se pueden usar tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas (ej. *Salmonella enteritidis*), siendo la *E. coli* una de las bacterias más usadas (65).

II. HIPÓTESIS

El método de síntesis propuesto para funcionalizar el quitosano con el péptido SBP1 mejorará significativamente la afinidad de este último por el dominio RBD presente en la *Salmonella enteritidis* modificada.

III. OBJETIVOS

1 GENERAL

Funcionalizar el biopolímero quitosano con el péptido derivado del ACE2 (SBP1), capaz de interactuar con el dominio RBD generando micro-aglutinación en el ensayo de capacidad neutralizante en cepas de *Salmonella enteritidis* modificada.

2 ESPECÍFICOS

- **Sintetizar, purificar y caracterizar** el quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 utilizando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) 1D y 2D.
- Evaluar la funcionalidad del producto sintetizado mediante el ensayo de capacidad neutralizante visualizado por micro-aglutinación en cepas de *Salmonella enteritidis* modificada genéticamente que presentan el dominio RBD del virus en su superficie, usando como control positivo los anticuerpos IgY obtenidos de huevos de gallina.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1 ESTRATEGIA DE SÍNTESIS DE QUITOSANO FUNCIONALIZADO CON EL PÉPTIDO SBP1

Para la síntesis del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1, se siguió como base el estudio realizado por Malhotra M. y colaboradores (66). Se propuso la siguiente ruta de síntesis, que se ilustra en la Figura 4.

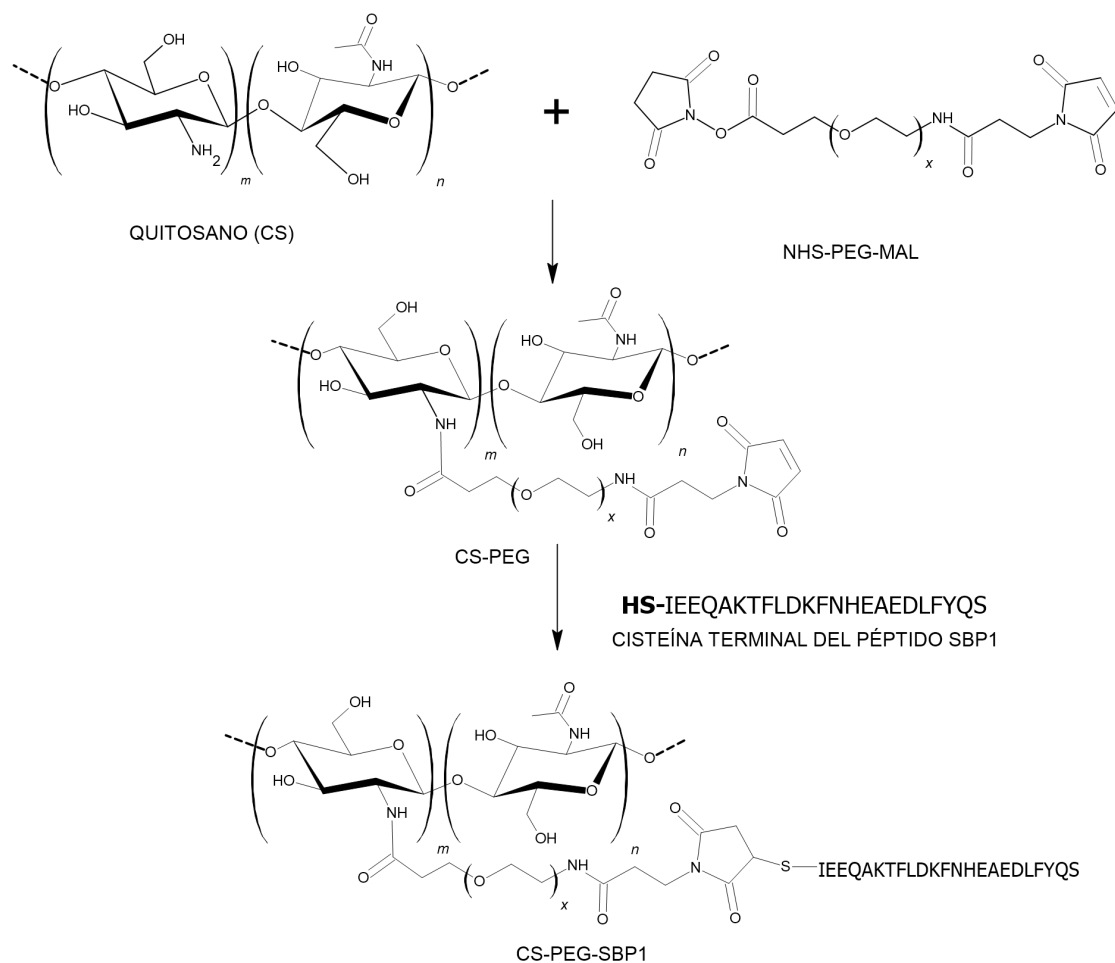


Figura 4 :Ruta de síntesis del quitosano con el péptido SBP1 usando el conector NHS-PEG-MAL.
Elaboración propia.

1.1. Etapa 1: Reacción del quitosano con el *N*-Hidroxisuccinimida-PEG-Maleimido

En el primer paso, se llevó a cabo la reacción entre el quitosano (CS) y el grupo NHS del PEG bifuncional. Es importante destacar que el quitosano está compuesto por dos subunidades, la *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y la glucosamina (GlcN). La GlcN

contiene grupos amino en su estructura, los cuales actuaron como nucleófilos al atacar el carbono del éster *N*-hidroxisuccinimida (NHS), formando un enlace amida y liberando el grupo NHS.

Es importante tener en cuenta que esta reacción es más favorable a pH básico. Sin embargo, debido a la baja solubilidad del quitosano a pH básico, se realizó una primera reacción a pH 5 luego se ajustó a pH a 7.0 y se realizó una segunda reacción con PEG bifuncional. La primera reacción permitió una funcionalización parcial del quitosano suficiente para volverlo soluble a pH básico. La segunda reacción fue mucho más eficiente y permitió obtener un mayor grado de funcionalización.

1.2. Etapa 2: Reacción del Quitosano-PEG-Maleimido con el péptido SBP1

En el segundo paso, se realizó la reacción entre el producto CS-PEG-MAL y el péptido SBP1. Esta reacción se basó en el ataque nucleofílico del grupo tiol de la cisteína al átomo de carbono del doble enlace presente en el grupo maleimido. Conocida como Reacción de Michael, esta transformación química dio lugar a la formación de un tioéter como producto final.

Es importante destacar que todo el proceso de síntesis se realizó en un ambiente acuoso y bajo condiciones normales de temperatura y presión. Esto garantizó una metodología sencilla y segura para la obtención del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1.

En resumen, la Figura 5 muestra una representación visual del mecanismo propuesto.

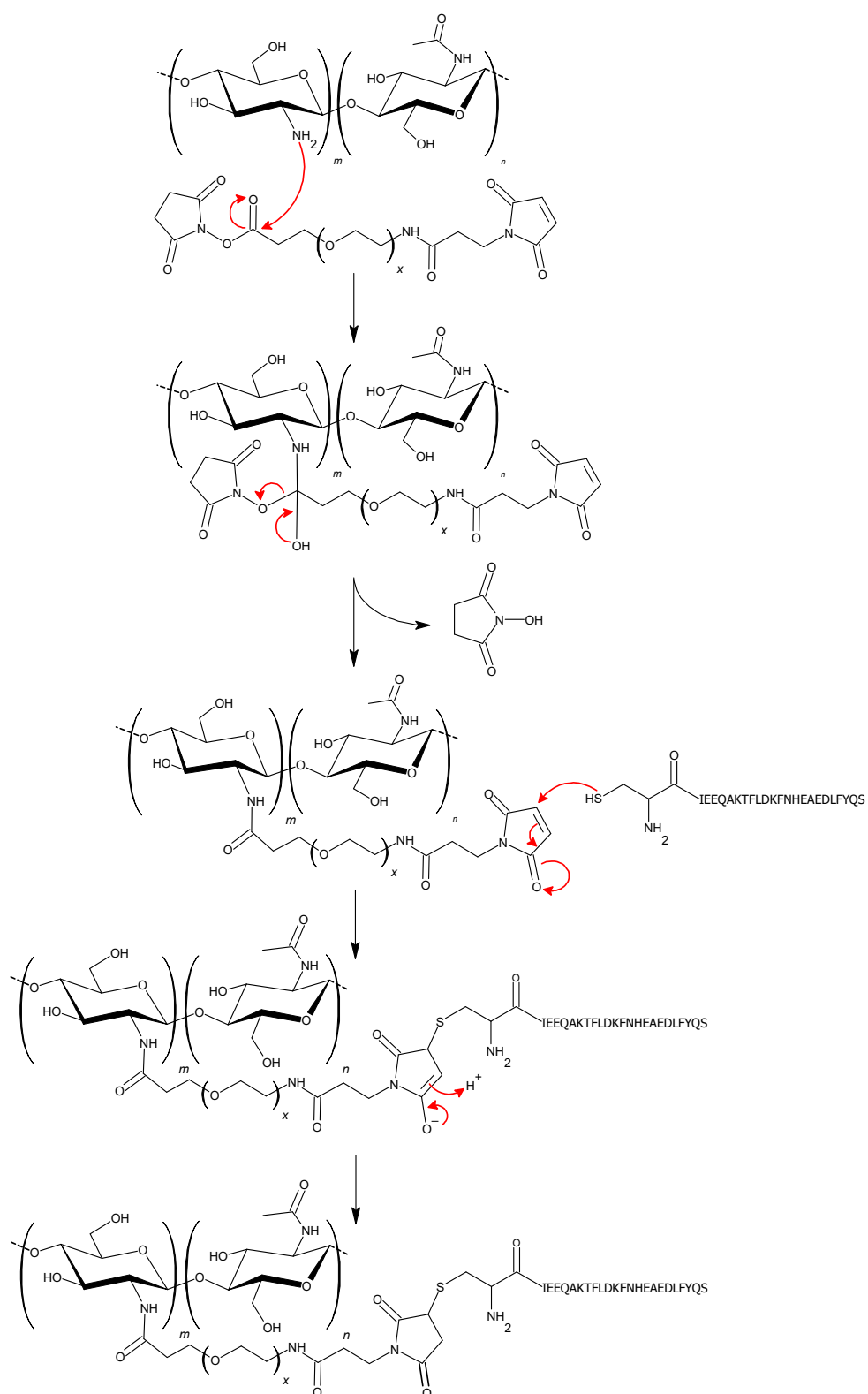


Figura 5 : Mecanismo propuesto para la síntesis del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1.

2 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

2.1. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron proporcionados por el grupo de Espectrometría de Productos Naturales de la Sección de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú. En cuanto a los materiales biológicos, fueron proporcionados por el laboratorio Farvet en colaboración con la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Los reactivos utilizados en la síntesis fueron los siguientes: Quitosano de bajo peso molecular, o CS, (Sigma-Aldrich, USA), Péptido Spike Binding Protein 1, o péptido SBP1, (Synpeptide Co., Ltd, China), Ester N-hidroxisuccimida-PEG-Maleimido, o NHS-PEG-MAL, (Biopharma PEG Scientific Inc., USA), Agua ultrapura (grado Milli Q, pH 6.01 y resistividad $18.2 \times 10^6 \Omega \cdot \text{cm}$) obtenida de un sistema de ósmosis inversa y filtración con filtro de fibra hueca con tamaño de poro de $0.2 \mu\text{m}$ Barnstead D3750 Nanopure.

Fueron adquiridos de Merck KGaA, Alemania, los siguientes reactivos: Ácido acético glacial (CH_3COOH), Bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3), Clorhidrato monohidratado de L-Cisteína ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH} \cdot \text{HCl}$), Clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina o Clorhidrato de TCEP ($\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_6\text{P} \cdot \text{HCl}$), Cloroformo-d (CDCl_3), Dimetilsulfóxido-d6 o DMSO-d6 ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$), Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), Hidróxido de sodio (NaOH) y Óxido de deuterio (D_2O).

2.2. Materiales

Los materiales biológicos utilizados fueron la *Salmonella enteritis*, la *Salmonella enteritis* modificada y los anticuerpos IgY de gallina SPF purificadas a partir de la yema de huevo de las mismas (control positivo), todos fueron proporcionados por la empresa FARVET, Perú.

2.3. Equipos

Los siguientes equipos utilizados para la síntesis fueron proporcionados por el grupo de investigación Espectrometría de Productos Naturales de la Sección de Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP) y el Centro de Espectroscopía de

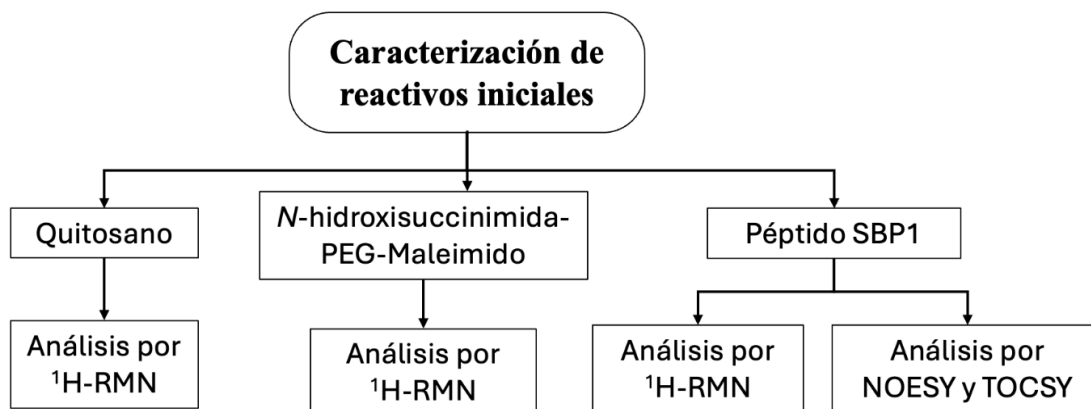
Resonancia Magnética Nuclear (CERMN-PUCP), excepto por el Microscopio invertido comercial, el cual fue proporcionado por la empresa FARVET, Perú.

- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Bruker Ascend de 500 MHz-TCI-He AVANCE III HD (Bruker, Alemania). Para el procesamiento de espectros se utiliza los Softwares TopSpin (v.4.1.4) y MestReNova (v.14.1.1-24571).
- Liofilizador Labconco modelo 4.5L, 10^{-3} mbar y -84°C (Labconco Corporation, USA).
- Concentradores de vacío de mesa CentriVap (Labconco Corporation, USA).
- Membrana de diálisis de Peso Molecular de Corte (MWCO): 50 KDa (Thermo Fisher Scientific Inc., USA).
- Balanza analítica (Mettler-Toledo International Inc., USA).
- Microscopio invertido comercial (Carl Zeiss Microscopy, LLC, USA)

3 METODOLOGÍA

3.1. Caracterización de reactivos iniciales

Se caracterizaron los reactivos iniciales mediante Resonancia Magnética Nuclear para conocer su composición estructural. En el Esquema 1, se observa en detalle este proceso de caracterización.



Esquema 1: Flujograma de la caracterización de reactivos iniciales.

3.1.1. Análisis de quitosano

En un envase se pesó 5 mg de quitosano y se disolvió en 640 uL de D₂O más 9.5 uL de 20 % de DCl/D₂O, mediante agitación y calentamiento a 40°C durante 15 minutos. Luego, se continuó la agitación adicional durante 60 minutos a temperatura ambiente hasta lograr una completa disolución. Este proceso se llevó a cabo siguiendo las pautas de la norma ASTM F2260-03 (2018) (50).

¹H-RMN (500 MHz, D₂O, ppm): δ 2.00 (s, 3H, -CH₃), δ 3.15 – 3.18 (t, H, H2-D), δ 3.61 – 3.87 (m, 12H, H-2/6), δ 4.52 – 4.57 (d, H, H1-A), 4.84 – 4.86 (d, H, H1-D).

3.1.2. Análisis del *N*-hidroxisuccinimida-PEG-Maleimido

En un envase se pesó 5 mg de NHS-PEG-MAL y se agregó, con una pipeta pasteur de vidrio, 1mL de CDCl₃. Se agitó por 5 minutos hasta que se obtuvo una completa disolución.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃, ppm): δ 2.52 – 2.55 (t, 2H, -CH₂-), δ 2.77 (s, 4H, -CH₂-CH₂-), δ 2.84 (s, 4H, -CH₂-CH₂-), δ 3.41 – 3.43 (t, 2H, -CH₂-), δ 3.52 – 3.54 (t, 2H, -CH₂-), δ 3.64 (s, 4H x n, -O-CH₂-CH₂-), δ 3.77 – 3.79 (t, 2H, -CH₂-), δ 3.83 – 3.86 (t, 2H, -CH₂-), δ 4.45 – 4.47 (t, 2H, -CH₂-), δ 6.70 (s, 2H, -CH=CH-).

3.1.3. Análisis del péptido SBP1

En un envase se pesó 20 mg del péptido SBP1 y se disolvió en 1mL de buffer NH₄HCO₃ 50 mM. El péptido disuelto se secó en el CentriVap Benchtop Vacuum Concentrators por 1 día para eliminar el ácido trifluoroacético (TFA) y cambiarle de pH. El péptido ya secado se disolvió en 1mL de la solución que contenía 3% de D₂O y 97% buffer fosfato pH 7.

La correlación NOESY y TOCSY, o también conocida como experimento NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) junto con TOCSY (Total Correlation Spectroscopy), son una técnica avanzada de resonancia magnética nuclear (RMN) utilizada para determinar la secuencia de aminoácidos en un péptido o proteína.

3.2. Síntesis del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1

3.2.1. Etapa 1: Reacción del quitosano con el N-hidroxisuccinimida-PEG-Maleimido

Día 1: En un microtubo se pesó 5 mg de quitosano (CS) y se disolvió en 1 mL de ácido acético 1% llevado a pH 5 con NaOH 1M (5mg de CS/mL). Se dejó disolviendo con magneto toda la noche. **Día 2:** En un microtubo se pesó 8 mg de NHS-PEG-MAL que luego reaccionó con 0.7 mL de la solución de CS a pH 5 preparado el día anterior. Esta nueva muestra se dejó disolviendo con magneto toda la noche (CS-PEG-MAL). Por otro lado, en un tubo falcon se pesó 112.8 mg de SBP1 (38.81 μ mol) y se disolvió en 5 mL de NH_4HCO_3 50 mM. Se vortexeó por 20 minutos y se dejó secando por 3 días en el CentriVap Benchtop Vacuum Concentrators. **Día 3:** En un tubo falcon se diluyó la solución de CS-PEG-MAL a pH 5 (recuperado un día anterior) con aproximadamente 2.5 mL de buffer fosfato pH 7 y se llevó a pH 7 con NaOH 1M. La concentración final se ajustó a 1 mg de CS/mL con buffer fosfato pH 7. Esta nueva solución reaccionó nuevamente con 48 mg de NHS-PEG-MAL, previamente pesado en otro tubo. Se dejó disolviendo con magneto toda la noche. **Día 4:** La muestra del día 3 se colocó en una membrana de diálisis de MWCO: 50 KDa previamente lavada con agua ultrapura por 30 minutos. Se armó la diálisis y se usó un volumen de 2L de buffer fosfato pH 7 como buffer de diálisis por cada cambio. Los tiempos de cambio de buffer fueron 2h, 4h y toda la noche. **Día 5:** La muestra del día 4 se recuperó en un tubo falcon.

3.2.2. Etapa 2: Reacción del Quitosano-PEG-Maleimido (CS-PEG-MAL) con el péptido SBP1

Día 5: En un tubo falcon se pesó 13.7 mg de Clorhidrato de TCEP (47.79 μ mol) y se disolvió en 2 mL de buffer fosfato pH 7 y se llevó a pH 7 con NaOH 1M. Ya a pH 7 se enrasó a 3 mL con el mismo buffer. Esta solución preparada se transfirió al tubo que contenía el péptido SBP1 seco (preparado el día 2) y se agitó hasta obtener completa disolución (muestra TCEP-SBP1). Para la reacción entre el quitosano-PEG-MAL y el péptido SBP1 se vertió la solución recuperada del día 4 a la solución de Clorhidrato de TCEP-SBP1 y se dejó disolviendo con magneto toda la noche.

3.2.3. Etapa 3: Purificación del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1

Día 6: La muestra del día 5 (quitosano funcionalizado con el péptido SBP1) se colocó en una membrana de diálisis de MWCO: 50 KDa previamente lavada con agua ultrapura por 30 minutos. Se armó la diálisis y se usó un volumen de 2L de buffer NH_4HCO_3 50 mM de diálisis por cada cambio. Los tiempos de cambio de buffer fueron 2h, 4h y toda la noche. **Día 7:** La muestra se recuperó en un tubo falcon previamente pesado y se colocó en nitrógeno líquido por 30 min para congelarlo. Una vez congelado, se liofilizó por 3 días. **Día 11:** Se retiró la muestra del liofilizador, se pesó y se determinó la masa obtenida del producto final.

3.2.4. Etapa 4: Caracterización del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1

Día 11: Se tomó aproximadamente 2 mg de la muestra recuperada de la liofilización y se disolvió en 0.6 mL de buffer fosfato deuterado 50 mM pH 7. La muestra se analizó por ^1H -RMN.

3.3. Ensayo de capacidad neutralizante visualizado por micro-aglutinación

Para evaluar la **efectividad** del quitosano funcionalizado, se realizaron ensayos de micro-aglutinación utilizando el microorganismo modificado *Salmonella enteritidis*. Este enfoque innovador, basado en el método tradicional de aglutinación, permitió testear la eficacia del producto sintetizado. La cepa atenuada de *S. enteritidis* de tipo salvaje fue modificada genéticamente para expresar el antígeno RBD del virus SARS-CoV-2 en su superficie. La producción de la *S. enteritidis* modificada fue realizada por el laboratorio FARVET. Se usó los anticuerpos IgY de gallinas SPF vacunas con la proteína RBD del virus SARS-CoV-2 como control positivo y se usó el quitosano funcionalizado con L-cisteína (CSc o CS-PEG-L-Cisteína) como control negativo (Vease la síntesis de CSc en el Anexo 7).

3.3.1. Análisis de las muestras vs *Salmonella enteritidis* modificada

En un portaobjeto se mezclaron 50 μL del control positivo con 50 μL de *S. enteritidis* modificada. La mezcla se agitó suavemente durante aproximadamente 7 minutos. Pasado el tiempo, se colocó el portaobjeto en un microscopio invertido comercial con un aumento

de 100X. Los resultados observados fueron capturados utilizando un teléfono inteligente Apple iPhone 8 con una cámara principal de 12 MP. Posteriormente, se evaluaron las muestras de quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 (CS-PEG-SBP1) y las muestras de quitosano funcionalizado con L-cisteína siguiendo el mismo procedimiento.

Para analizar las muestras de CS-PEG-SBP1 se prepararon cinco concentraciones diferentes: 2 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.1 mM y 0.01 mM. Estas concentraciones estuvieron directamente relacionadas con la cantidad de péptido SBP1 presente en la muestra completa de CS-PEG-SBP1, calculada mediante el porcentaje de funcionalización (porcentaje de SBP1 unido al quitosano). Además, se calculó y determinó la concentración total de polímero presente en la muestra CS-PEG-SBP1. En cuanto al control negativo, para garantizar que cualquier reacción estuviera atribuida al péptido SBP1 y no a la parte del quitosano y PEG, las concentraciones de CSc fueron las mismas que las calculadas para el polímero presente en la muestra CS-PEG-SBP1.

3.3.2. Interpretación de resultados de los ensayos de capacidad neutralizante

Una reacción negativa a la *Salmonella* de tipo salvaje y una reacción positiva a la *Salmonella* modificada dará como resultado una **reacción positiva** entre la *S. enteritidis* y el péptido SBP1 del quitosano funcionalizado, lo que se traduce como una encapsulación de la *S. enteritidis* sugiriendo una probable reacción positiva al virus SARS-CoV-2.

Una reacción negativa a la *Salmonella* de tipo salvaje y una reacción negativa a la *Salmonella* modificada dará como resultado una **reacción negativa** entre la *S. enteritidis* y el péptido SBP1 del quitosano funcionalizado, sugiriendo una probable reacción negativa al virus SARS-CoV-2.

Una reacción positiva a la *Salmonella* de tipo salvaje dará lugar a un **resultado no interpretable**, que probablemente esté asociado a la presencia de factores que reaccionan con *Salmonella*.

V. RESULTADOS

1 CARACTERIZACIÓN DE REACTIVOS INICIALES

1.1. Determinación del grado de acetilación del quitosano por ^1H -RMN

Para determinar el grado de desacetilación del quitosano mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN), se siguió el método descrito en el estudio de Lavertu et al., 2000 (67). El quitosano de bajo peso molecular se analizó a una temperatura de 70°C para reducir su viscosidad. En la Figura 6 se presenta la estructura de los monómeros desacetilados (GlcN) y acetilados (GlcNAc) del quitosano.

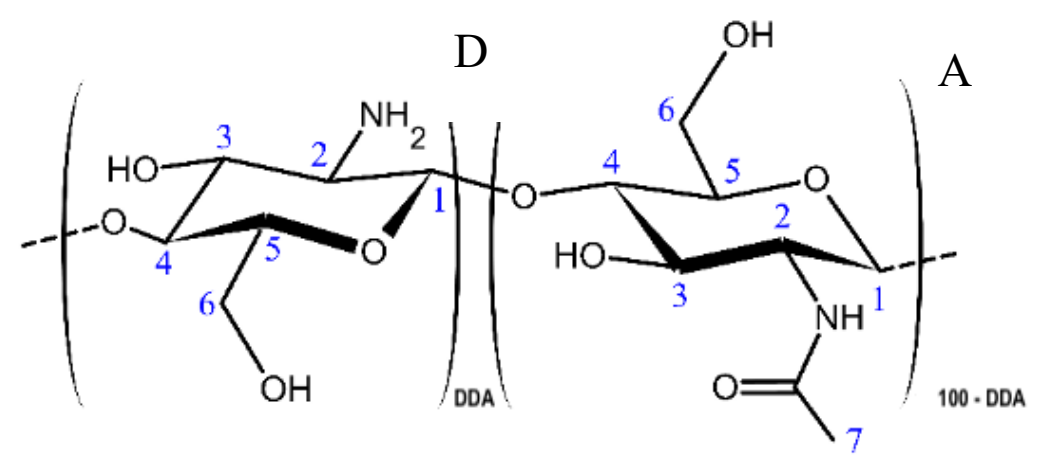


Figura 6: Estructura del quitosano. Monómeros desacetilado (D) y acetilado (A).

En la Figura 7 se muestra el espectro de ^1H -RMN del quitosano, con las asignaciones de los desplazamientos químicos de los protones y sus respectivas integrales. Para mejorar la relación señal/ruido en el espectro, se aplicó una técnica de presaturación selectiva que redujo la señal del protón del solvente (HOD). Para normalizar las integraciones, se utilizó la señal del hidrógeno 1 del monómero desacetilado (H1-D), que presenta un pico claramente definido sin ninguna interferencia, asignándole un valor integral de 1.00. En la Tabla 1 se detallan los desplazamientos químicos de los protones del quitosano.

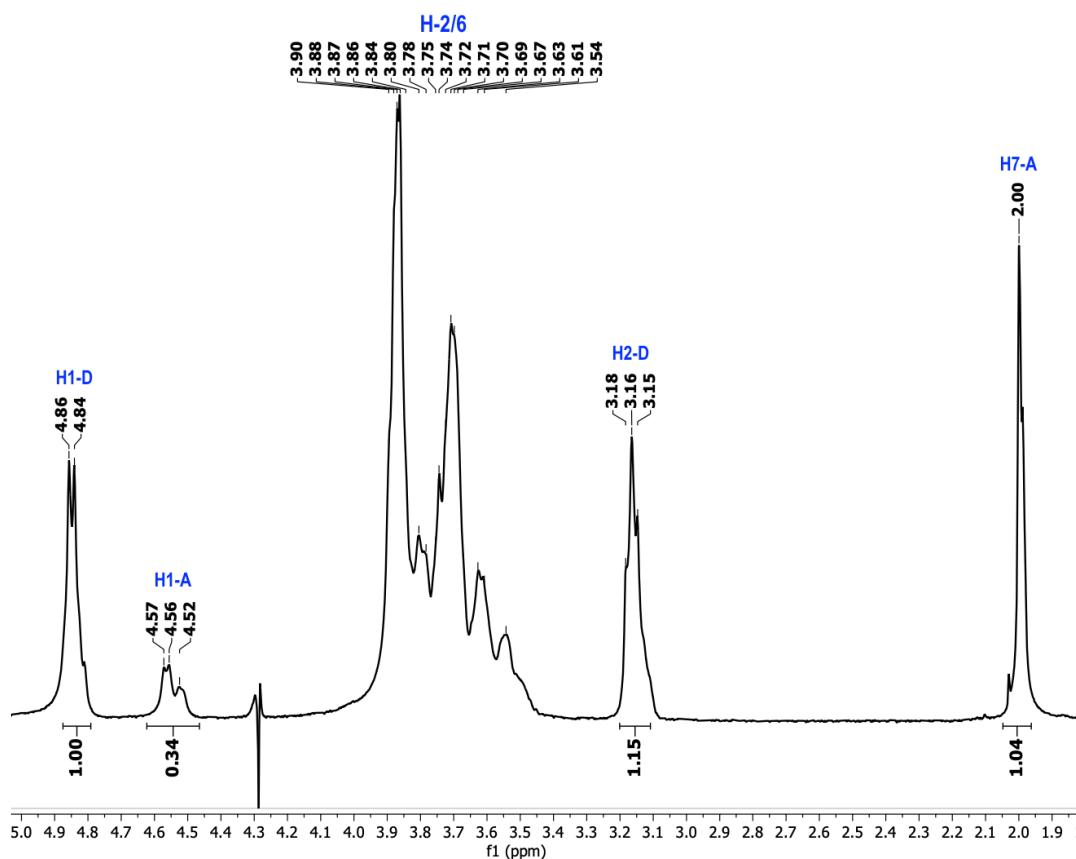


Figura 7: Espectro ^1H -RMN de quitosano de bajo peso molecular en 20% de DCl/D $_2$ O a 70°C, DDA: 76%.

Tabla 1: Desplazamiento químico de los protones del quitosano, monómeros desacetilado (D) y acetilado (A), a 70°C en D $_2$ O//DCl.

Tipo de Protón	Desplazamiento químico δ (ppm)	Multiplicidad
H1-D	4.84 – 4.86	Doblete
H1-A	4.52 – 4.57	Doblete
H-2/6	3.54 – 3.9	Multiplete
H2-D	3.15 – 3.18	Triplete
H7-A	2.00	Singulete

Para calcular el grado de desacetilación, se empleó la (Ec.4), en esta ecuación se usa las integraciones de los picos correspondientes de los protones del monómero desacetilado (D) y del monómero acetilado (A).

$$DDA (\%) = \left(\frac{H1-D + H2-D}{H1-D + H2-D + H1-A + (H7-A)/3} \right) \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

El H7-A integra por tres hidrógenos a diferencia de los otros tipos de hidrógenos que solo integran por uno, es por ello que su integración total se dividió entre tres (ver Figura 4).

Sustituyendo los datos obtenidos del espectro del quitosano, se obtiene lo siguiente:

$$DDA (\%) = \left(\frac{1 + 1.15}{1 + 1.15 + 0.34 + 1.04/3} \right) \times 100$$

$$DDA (\%) = 75.8 \%$$

El porcentaje de desacetilación del quitosano fue de 76%. Calcular el grado de desacetilación del quitosano (DDA) fue esencial para determinar el porcentaje de grupos glucosamina (GlcN) presentes en el quitosano, los cuales posteriormente reaccionarán con el *N*-hidroxysuccinimida-PEG-maleimido.

1.2. Determinación del peso molecular del *N*-hidroxysuccinimida-PEG-Maleimido por ¹H-RMN

La *N*-hidroxysuccinimida-PEG-Maleimido fue analizada a una temperatura de 25°C, como se muestra en la Figura 8, donde se presentan los desplazamientos químicos de los protones con sus respectivas integraciones. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en ppm utilizando la señal del disolvente residual (CDCl₃) a δ = 7.26 (1H, CDCl₃) como estándar interno de referencia. Las señales se identificaron de la letra "A" a la "I" según la estructura de la *N*-hidroxysuccinimida-PEG-Maleimido, que se presenta en la Figura 9 y en la Tabla 2.

En la determinación de la integración, se empleó como punto de referencia la señal de los hidrógenos del grupo maleimido (I). Esta señal integró por un valor de 2.00 ya que corresponde a los dos hidrógenos del grupo maleimido.

Se identificaron las señales de todos los hidrógenos teniendo en cuenta el estudio realizado por Pasek-Allen, L., 2023 (68), donde se presentan las señales características

de los protones de la cadena etilenglicol (EG) (D), así como los protones adyacentes a este (B, C, E, F, G y H). En relación a la identificación de los protones de los grupos funcionales, se consideraron los espectros de ^1H -RMN de la *N*-hidroxisuccinimida (A) y el Maleimido libre (I) como guías. (Anexo 1 y 2).

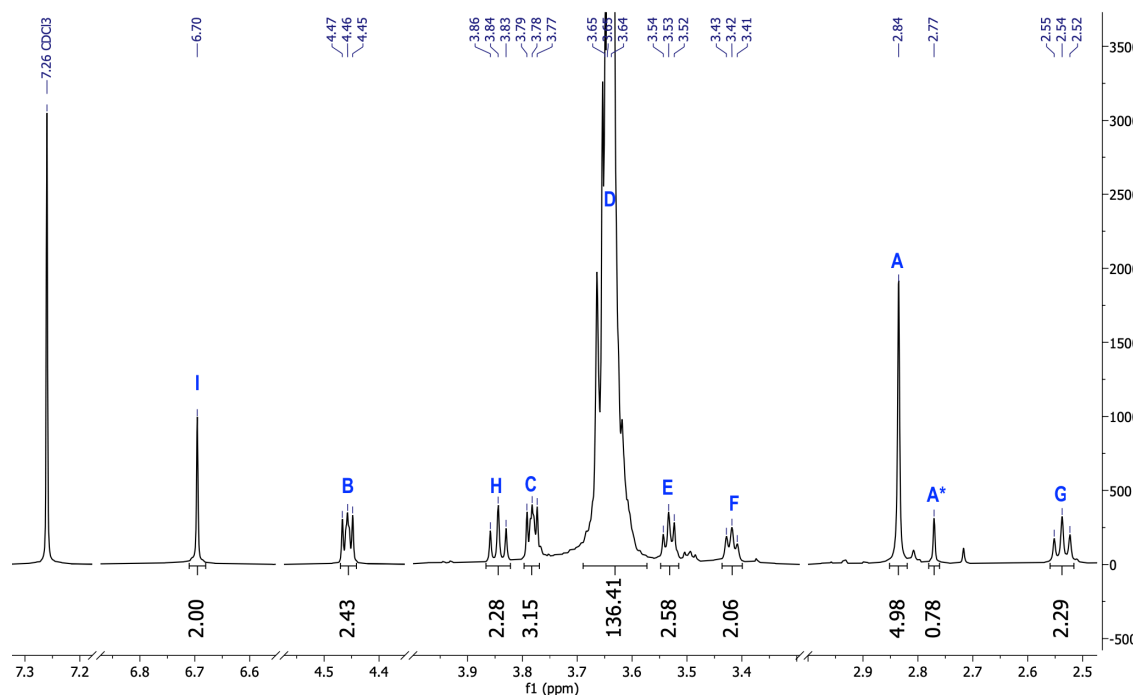


Figura 8: Espectro ^1H -RMN de *N*-hidroxisuccinimida-PEG-Maleimido en CDCl_3 a 25°C .

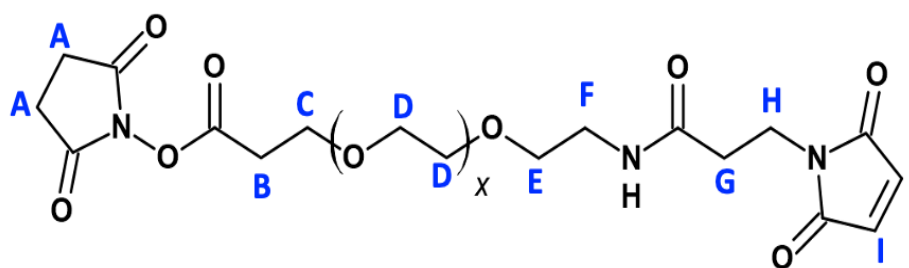


Figura 9: Estructura química de la *N*-hidroxisuccinimida-PEG-Maleimido.

En la Tabla 2, A* representa al grupo *N*-hidroxisuccinimida libre, la cual aparece debido a la hidrólisis de la *N*-hidroxisuccinimida-PEG-Maleimido.

Tabla 2: Desplazamiento químico de los protones de la *N*-hidroxisuccimida-PEG-Maleimido a 25°C en CDCl₃.

Letra de indentificación	Tipo de Protón	Desplazamiento químico δ (ppm)	Multiplicidad
G	-CH ₂ -	2.52 – 2.55	Triplete
A/A*	-CH ₂ -CH ₂ -	2.84/2.77	Singulete
F	-CH ₂ -	3.41 – 3.43	Triplete
E	-CH ₂ -	3.52 – 3.54	Triplete
D	-O-CH ₂ -CH ₂ -	3.65	Singulete
C	-CH ₂ -	3.77 – 3.79	Triplete
H	-CH ₂ -	3.83 – 3.86	Triplete
B	-CH ₂ -	4.45 – 4.47	Triplete
I	-CH=CH-	6.70	Singulete

Los datos presentados en la Tabla 3 correlacionan la cantidad de hidrógenos de las señales del PEG heterobifuncional con sus respectivas integraciones.

Tabla 3: Integraciones de los protones de la *N*-hidroxisuccimida-PEG-Maleimido a 25°C en CDCl₃.

Letra de indentificación	Tipo de Protón	Cantidad de Hidrógenos	Integración
G	-CH ₂ -	2	2.29
A/A*	-CH ₂ -CH ₂ -	4	4.98/0.78
F	-CH ₂ -	2	2.06
E	-CH ₂ -	2	2.58
D	-O-CH ₂ -CH ₂ -	4 x n	136.41
C	-CH ₂ -	2	3.15
H	-CH ₂ -	2	2.28
B	-CH ₂ -	2	2.43
I	-CH=CH-	2	2.00

Para calcular la masa molar del PEG heterobifuncional se dividió en dos regiones. La primera corresponde a la cadena de unidades de EG, compuesta por los átomos presentes

en la región repetitiva (D), y la segunda es la zona no repetitiva, que incluye el resto de átomos del PEG heterobifuncional.

Para determinar la masa molar de las unidades repetidas se utilizó la integración del esqueleto de polietilenglicol dividido por el número de hidrógenos presente en una unidad EG (-O-CH₂-CH₂). Luego a este resultado se le multiplicó la masa molar del monomero, para obtener la masa molar total de la cadena de EG. A continuación se muestra el paso a paso para el cálculo.

$$\bar{M} \text{ (Una unidad EG)} = 44.05 \text{ g/mol}$$

Para calcular la cantidad de unidades de EG presentes en la molécula, se dividió la integración del pico D entre 4, ya que un monómero tiene 4 los hidrógenos.

$$\text{Integración de } n \text{ monómeros de PEG} = 136.41$$

$$\text{Número de monómeros de PEG} = \frac{136.41}{4}$$

$$\text{Número de monómeros de PEG} = 34.10$$

$$\bar{M} \text{ (total PEG)} = 44.05 \text{ g/mol} \times 34.10$$

$$\bar{M} \text{ (total PEG)} = 1502.11 \text{ g/mol}$$

Al concluir el procedimiento, se obtuvo la masa molar total de la cadena de PEG, que resultó ser 1502.11 g/mol. Después de repetir el mismo procedimiento por triplicado, se determinó que el peso molecular del PEG calculado por RMN presentó variaciones que oscilaban entre 1500 ± 50 g/mol. Para efectos de cálculos, se consideró la masa molar del PEG como 1500 g/mol.

En cuanto a la masa molar de la zona no repetitiva, se sumó el número de átomos (oxígeno, carbono, nitrógeno e hidrógeno) y se multiplicó por la masa molar de cada uno de estos átomos. Al final se hizo una suma general. Estos datos se encuentran detallados en la Tabla 4.

Tabla 4: Total de átomos de la zona no repetitiva del PEG heterobifuncional.

Átomo	Cantidad (#)	Masa molar del átomo (g/mol)	Masa molar total (g/mol)
Oxígeno	8	16.00	128.00
Carbono	16	12.01	192.16
Hidrógeno	19	1.01	19.19
Nitrógeno	3	14.01	42.03
Total			381.38

Sumando las masas molares de la zona repetitiva y la no repetitiva se obtuvo la masa molar total de la *N*-hidroxisuccimida-PEG-Maleimido.

$$\bar{M}_{\text{PEG heterobifuncional}} = \bar{M}_{\text{zona repetitiva}} + \bar{M}_{\text{zona no repetitiva}}$$

$$\bar{M}_{\text{PEG heterobifuncional}} = 1502.11 \text{ g/mol} + 381.38 \text{ g/mol}$$

$$\bar{M}_{\text{PEG heterobifuncional}} = 1502.11 \text{ g/mol} + 381.38 \text{ g/mol}$$

$$\bar{M}_{\text{PEG heterobifuncional}} = 1883.49 \text{ g/mol}$$

1.3. Determinación de la secuencia de aminoácidos del péptido SBP1 por ^1H -RMN y ^1H - ^1H NOESY y TOCSY – RMN

Se analizó el péptido SBP1 mediante RMN, tanto unidimensional como bidimensional, con el fin de verificar la correcta correlación de todos los aminoácidos en el péptido. La secuencia reportada por el fabricante fue la siguiente: CIEEQAKTFLDKFNHEAEDLFYQS. Como se mencionó previamente, el péptido SBP1 posee una cisteína añadida adyacente al aminoácido isoleucina (I) en el extremo N terminal, con lo que elevó el número total de aminoácidos a 24. Fue crucial identificar esta cisteína en la secuencia, ya que mediante este aminoácido se llevó a cabo la unión entre el CS-PEG-Maleimido y el péptido SBP1. El peso molecular del péptido SBP1 reportado por el fabricante fue 2906.14 g/mol y el punto isoelectrico calculado fue 4.35 (69). En la Figura 10 se muestra el espectro ^1H -RMN del péptido SBP1.

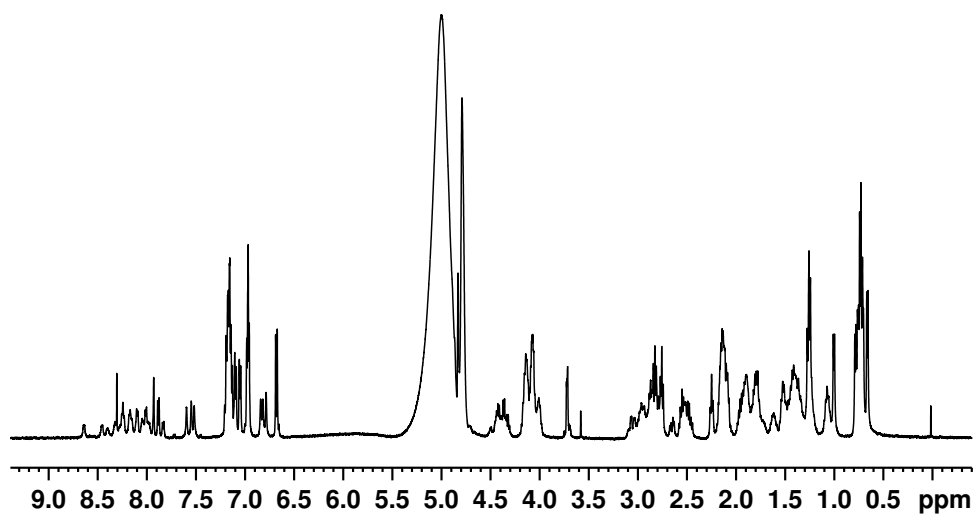


Figura 10: Espectro ^1H -RMN del péptido SBP1 en 1mL de la solución de 3% de D_2O y 97% buffer fosfato pH 7 a 8°C .

El péptido SBP1 exhibió la presencia de 5 aminoácidos aromáticos, compuestos por tres fenilalaninas (F), una tirosina (Y) y una histidina (H) cuyos desplazamientos en un espectro de ^1H -RMN se situaron entre 6.5 ppm y 8.0 ppm. Como se aprecia en la Figura 11, múltiples señales fueron registradas en este rango para el péptido SBP1, correspondientes en su conjunto a las señales de los 21 hidrógenos que conformaban los 5 aminoácidos aromáticos. Dada la dificultad en un espectro ^1H -RMN para identificar qué señal corresponde a cada aminoácido, se llevó a cabo un análisis bidimensional ^1H - ^1H NOESY y TOCSY-RMN para determinar la secuencia del péptido SBP1.

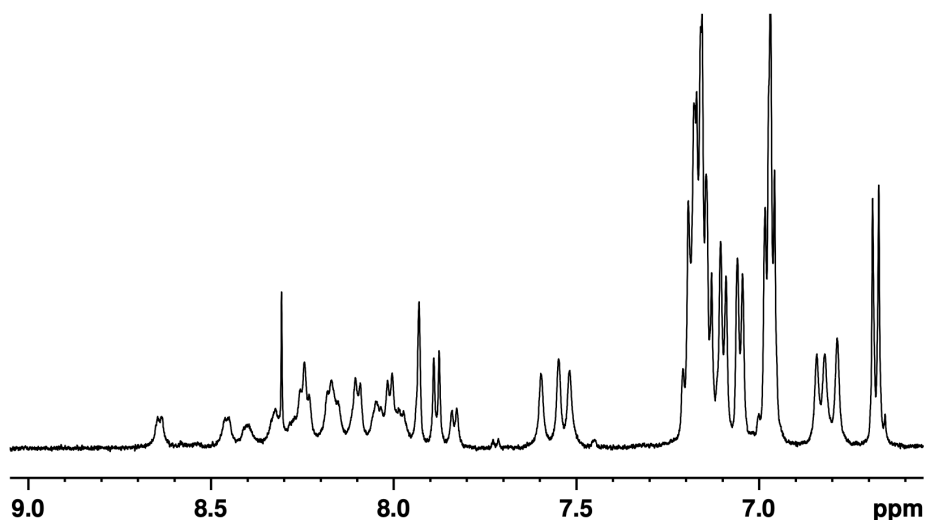


Figura 11: Espectro ^1H -RMN del péptido SBP1 en 1mL de la solución de 3% de D_2O y 97% buffer fosfato pH 7 a 8°C , zona de 6.5 ppm a 9 ppm.

El análisis bidimensional por RMN fue la técnica usada para determinar la secuencia de los aminoácidos en el péptido.

El experimento TOCSY se utilizó para correlacionar resonancias de protones conectados mediante enlaces covalentes, lo que facilitó la identificación de protones en cada aminoácido y permitió seguir la secuencia de la cadena polipeptídica (70).

El experimento NOESY, por otro lado, detectó interacciones espaciales entre protones, incluso cuando estos no estaban directamente conectados. Al correlacionar estas interacciones, se obtuvo información sobre la proximidad tridimensional de los protones en la molécula (71).

De esta forma, en la Figura 12 se muestra la identificación de la secuencia de los aminoácidos del SBP1.

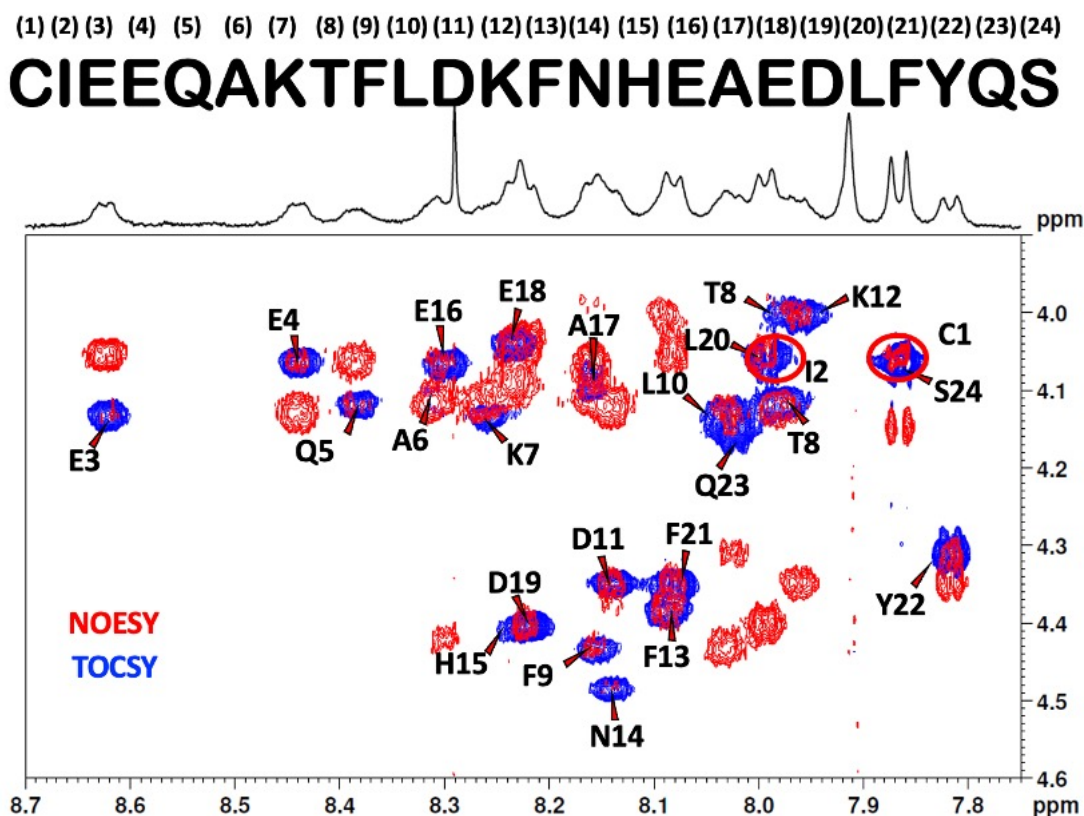


Figura 12: Correlación ^1H - ^1H NOESY y TOCSY – RMN para confirmar la secuencia de aminoácidos de SBP1 en 3% de D_2O y 97% buffer fosfato pH 7 a 8°C .

2 SÍNTESIS DEL QUITOSANO FUNCIONALIZADO CON EL PÉPTIDO SBP1

2.1. Caracterización del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1

La síntesis del producto implicó un proceso continuo que abarcó diversas etapas, culminando en la formación exitosa de la unión entre quitosano y el péptido SBP1. Para verificar el éxito de la reacción, se procedió a caracterizar el producto mediante la técnica de DOSY-RMN.

La técnica de DOSY (Diffusion-ordered spectroscopy) fue útil para separar y analizar las moléculas presentes en la muestra teniendo en cuenta su velocidad de difusión en el campo magnético aplicado. Esta velocidad de difusión estuvo relacionada al tamaño y forma de la partícula. Así, las moléculas más grandes tuvieron un coeficiente de difusión mucho más pequeño comparado con el coeficiente de difusión de las moléculas pequeñas (72).

En la figura 13 se muestra el espectro DOSY del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1. En el espectro se apreció la señal del hidrógeno H7-A del monómero acetilado (GlcNAc) del quitosano a 2 ppm. Por otro lado, también se observó la señal de la cadena de etilenglicol (-O-CH₂-CH₂-) a 3.6 ppm, y la señal de los aminoácidos aromáticos del péptido (AAA-SBP1) que se situaron entre 6.5 ppm y 8.0 ppm.

La particularidad observada en el espectro radica en que los tres compuestos exhiben un coeficiente de difusión idéntico de $0.96 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. Esta uniformidad en el coeficiente de difusión se debe a que los tres componentes estaban unidos, ya no difundiéndose de manera independiente según su tamaño y forma, como lo hizo, por ejemplo, el agua el cual tuvo un coeficiente de difusión de $140 \times 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$. En cambio, al formar una única molécula más grande, la difusión fue igual para todas.

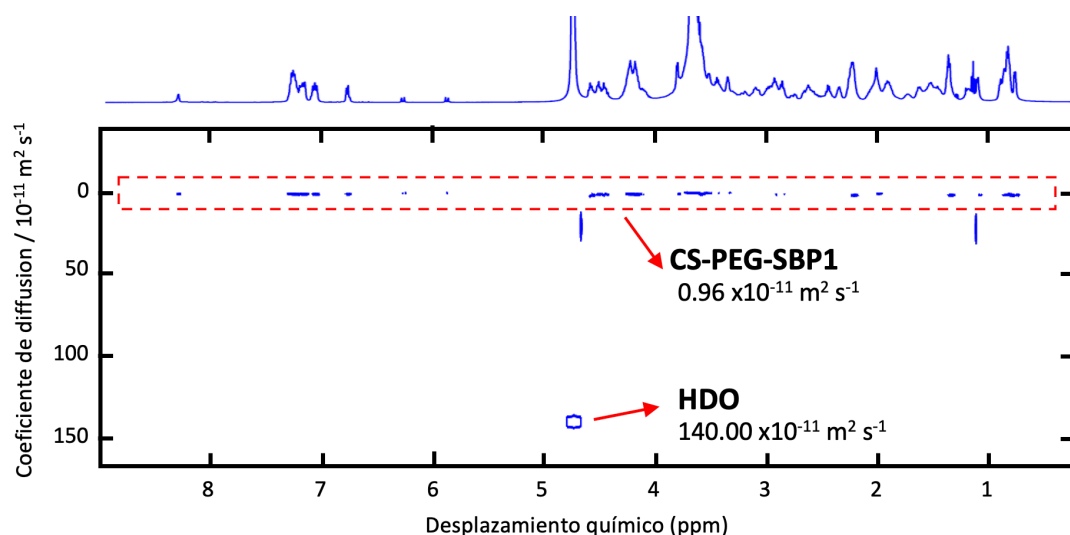


Figura 13: RMN-DOSY del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 en buffer fosfato pH 7.

La confirmación del éxito de la síntesis se realizó mediante ^1H -RMN. En la Figura 14 se presenta un espectro representativo obtenido de la síntesis del quitosano con el péptido SBP1 (CS-PEG-SBP1). Como se había observado previamente en la Figura 11, los hidrógenos aromáticos del péptido se localizaron entre 6.5 ppm y 9 ppm, picos que también fueron claramente visibles en la Figura 14 (AAA-SBP1). Esta evidencia señaló que el péptido SBP1 reaccionó con el CS-PEG.

Adicionalmente, se observó el pico característico del PEG ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, D) y el pico correspondiente al quitosano acetilado ($-\text{CO}-\text{CH}_3$, H7-A). Estos resultados fortalecieron la conclusión de la formación del CS-PEG-MAL-SBP1 y respaldaron el éxito de la síntesis.

En la figura 15 se presenta la estructura final del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1.

Los picos identificados con una X correspondieron al maleimido que, en lugar de estar unido al péptido SBP1, sufrieron una apertura debido a la hidrólisis. La susceptibilidad a la hidrólisis aumenta a medida que aumenta el pH. El maleimido hidrolizado ahora se convirtió en una amida maleica ($-\text{HN}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$) (73), y el desplazamiento de sus dos hidrógenos fue entre 5.8 – 6.3 ppm.

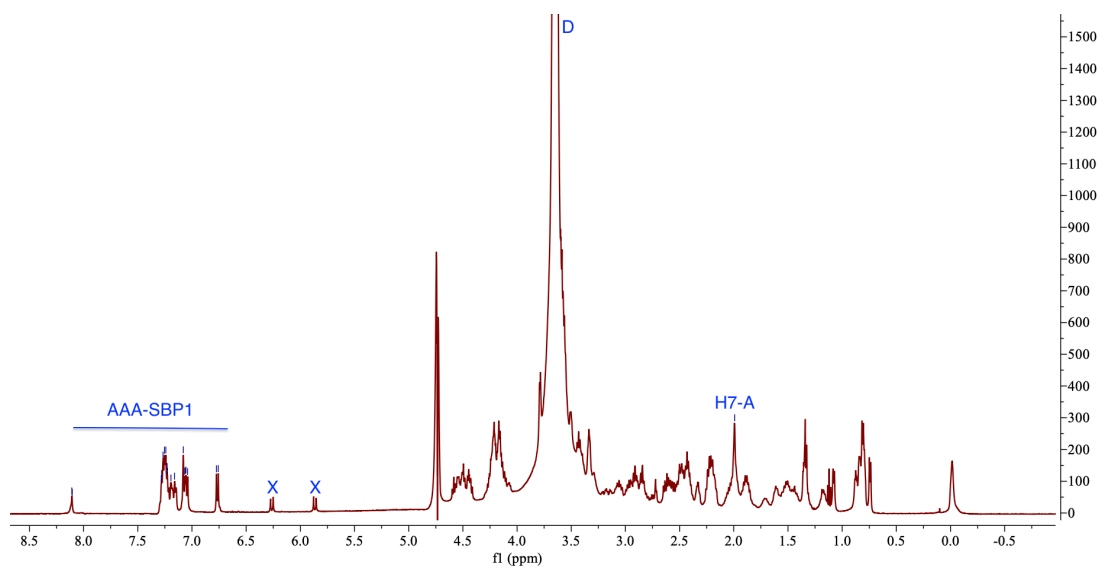


Figura 14: Espectro ^1H -RMN del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 en buffer fosfato deuterado pH 7 a 25°C.

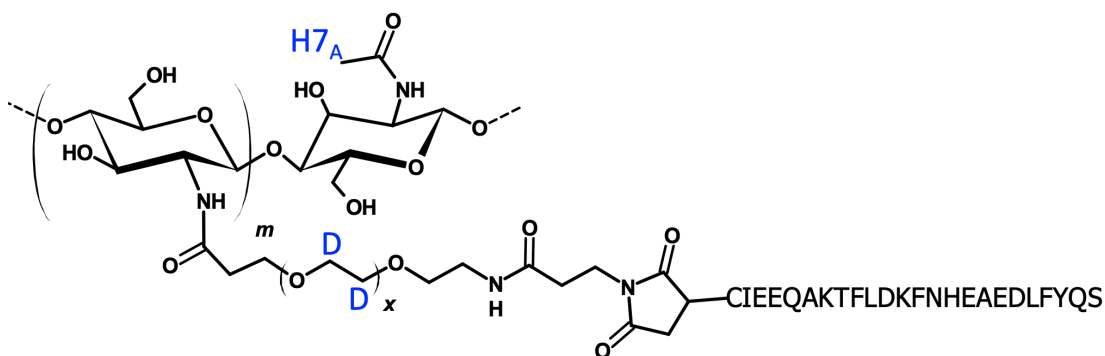


Figura 15: Estructura química del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 (CS-PEG-SBP1).

Se realizó por triplicado la síntesis del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 para corroborar que los resultados sean reproducibles. En los anexos 3 y 4 se muestran los espectros de las otras dos síntesis.

2.2. Determinación del grado de funcionalización del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1

Para determinar el grado de funcionalización (%) de las tres muestras sintetizadas, se usó el espectro ^1H -RMN de cada uno de ellos y se aplicó la siguiente ecuación (Ec. 5).

$$\% \text{ Funcionalización} = \frac{(100 - \%DDA) \times \text{Int. AAA} - \text{SBP1} \times 3}{21 \times \text{Int. H7} - A} \quad (\text{Ec. 5}).$$

Donde:

% DDA, Porcentaje de desacetilación; Int. AAA-SBP1, Integración de los picos de los aminoácidos aromáticos del péptido; 3, Número de hidrógenos del pico H7-A; 21, Número e hidrógenos del pico AA-SBP1 y Int. H7-A, Integración del pico del quitosano acetilado.

Para obtener los datos necesarios para aplicar en la ecuación se analizó los espectros ¹H-RMN, focalizándose exclusivamente en los picos de AAA-SBP1 y el H7-A. Posteriormente, cada uno de estos picos se integró y se sustituyó en la Ec. 5.

En la Figura 14, se exhibe el espectro ¹H-RMN del quitosano funcionalizado con el SBP1, el cual fue procesado mediante el software MestReNova. El espectro de la Figura 16 muestra las integrales en dos regiones específicas. La primera región contiene las señales del péptido y va desde δ 6.73 a 8.22 ppm, mientras que la segunda región esta compuesta por el pico H7-A más otros picos de la muestra, esta región va desde δ 1.79 a 2.11 ppm.

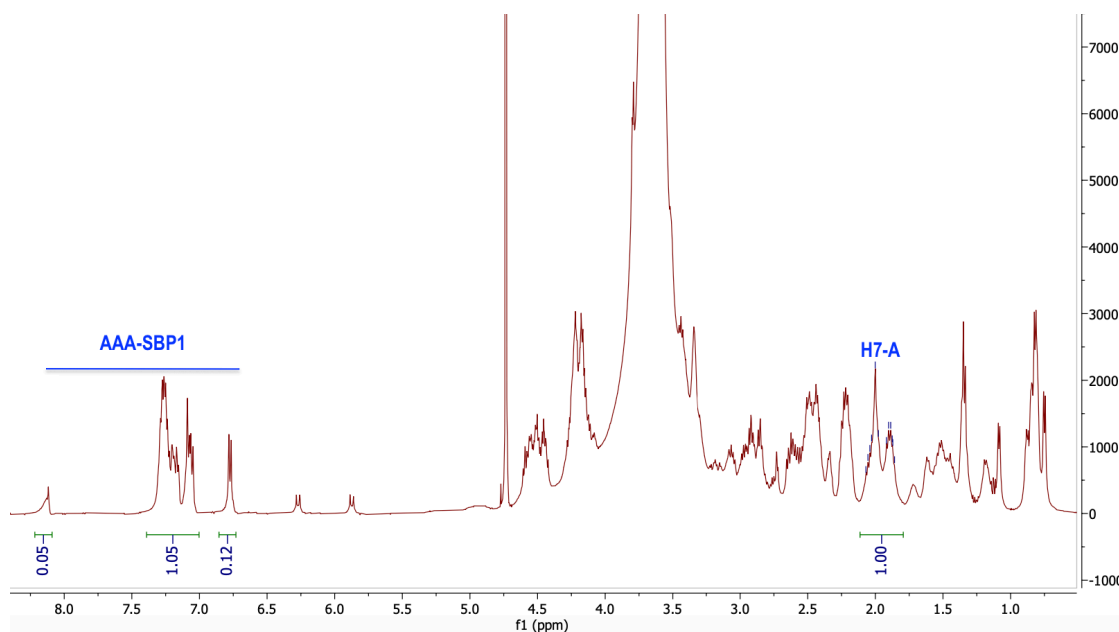


Figura 16: Espectro ^1H -RMN del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 tratado con el Software MestReNova. Integración en la región del péptido: 6.73 – 8.22 ppm y región del H7-A: 1.79 – 2.11 ppm.

En la tabla 5 se muestran los datos de ambas regiones integradas, estas integraciones fueron realizadas mediante el método de cálculo SUMA, el cual genera una tabla automáticamente con los datos adquiridos.

Tabla 5: Integrales normalizadas y absolutas de las regiones seleccionadas.

Región	Rango	Normalizado	Absoluto
	8.09 – 8.22	0.05	10924.63
AAA- SBP1	7.00 – 7.39	1.05	215885.11
	6.73 – 6.86	0.12	24928.71
H7-A + otros picos	1.79 – 2.11	1	206505.51

Dado que el pico H7-A se superponían con otros picos que no son relevantes para el cálculo de funcionalización, se aplicó la técnica GSD (Global Spectral Deconvolution) para determinar la contribución específica del pico H7-A en la integración absoluta.

La "Global Spectral Deconvolution" (GSD) es una técnica que se aplica para separar y analizar los picos superpuestos en un espectro, lo que permite una identificación más

precisa de las señales individuales de las moléculas presentes. En la Figura 17 se muestra los picos que se obtuvieron luego de aplicar la técnica GSD + detección de picos “Peak Picking”.

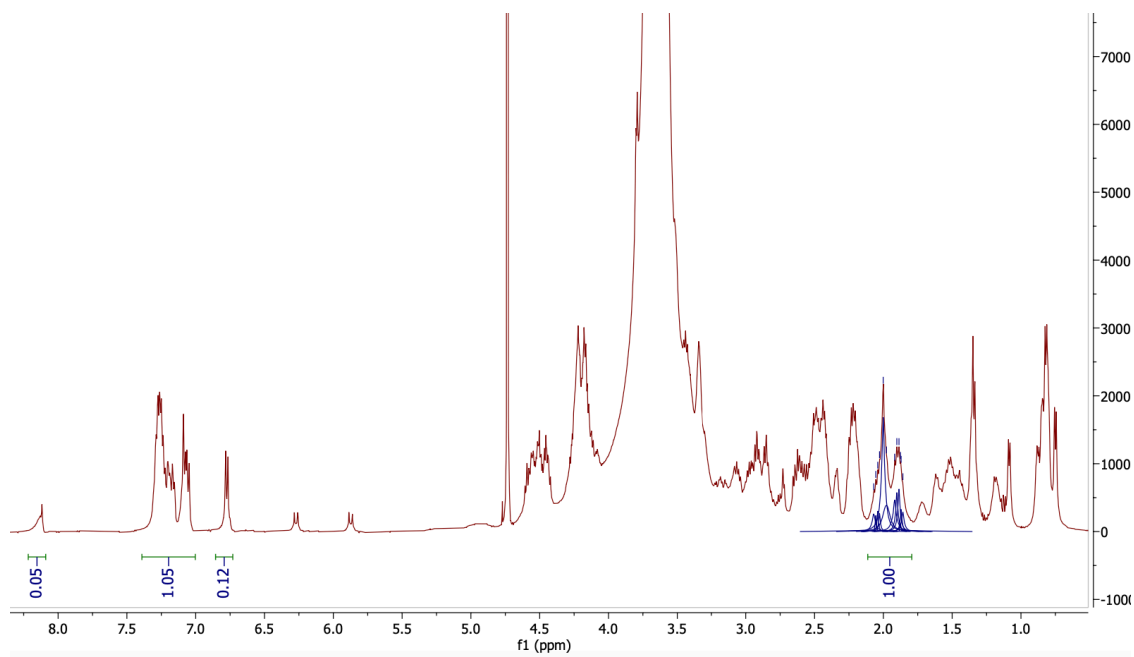


Figura 17: Espectro ^1H -RMN del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1. Región del H7-A, δ 1.79 – 2.11 ppm deconvolucionada.

En la Figura 18, se amplió la región deconvolucionada, lo que permitió la observación detallada de todos los picos generados.

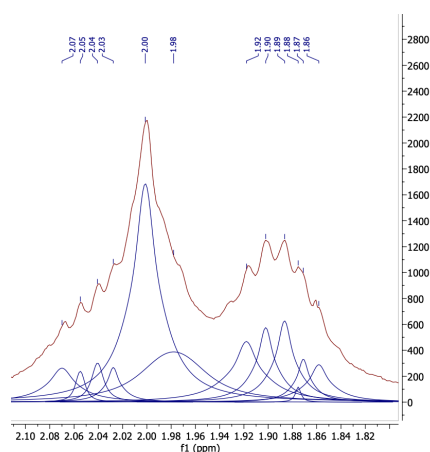


Figura 18: Ampliación del espectro ^1H -RMN del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1. región del H7-A, δ 1.79 – 2.11 ppm.

El pico localizado a δ 2.00 ppm fue el pico H7-A, fundamental para el cálculo de la funcionalización. Una vez que el software identifica los picos en una región específica, genera automáticamente una tabla con datos de intensidad, ancho y área asociados a los nuevos picos. En la Tabla 6, únicamente se muestran los datos de las áreas, ya que para determinar la integral del pico H7-A, solo se necesita el área que dicho pico presenta.

Tabla 6: Área de las señales generadas por deconvolución de la región δ 1.79 – 2.11ppm.

Pico	ppm	Área
1	2.07	9892.18
2	2.05	2729.89
3	2.04	4689.07
4	2.03	5089.78
5	2.00	60996.35
6	1.98	29659.07
7	1.92	19184.3
8	1.9	15038.92
9	1.89	16571.31
10	1.88	813.51
11	1.87	6537.32
12	1.86	8865.4

Para determinar la contribución del pico H7-A en el área de la región δ 1.79 – 2.11 ppm, se calculó el factor de contribución (k), el cual fue obtenido aplicando la siguiente ecuación (Ec. 6).

$$k = \frac{\text{Área del pico H7-A}}{\text{Área absoluta (H7-A + otros picos)}} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde, el área correspondiente al pico H7-A fue extraído de la Tabla 6, y el área absoluta hace referencia a la integral absoluta presente en la Tabla 5. Utilizando estos datos, se procedió al cálculo del factor de contribución.

$$k = \frac{60996.35}{206505.51} = 0.30$$

Una vez obtenido el factor de contribución, ya se pudo calcular la integral de la señal H7-A, simplemente se multiplicó este factor por la integral relativa de la región H7-A + otros picos.

$$Integral\ H7-A = 0.295 \times 1$$

$$Integral\ H7-A = 0.295$$

En la Tabla 7 se muestran los datos finales de las integraciones de los picos AAA-SBP1 y H7-A. Ambos picos necesarios para calcular el porcentaje de funcionalización.

Tabla 7: Integraciones de los protones de la síntesis de CS-PEG-SBP1.

Letra de indentificación	Tipo de Protón	Cantidad de Hidrógenos	Integración
AAA-SBP1	Aromáticos	21	1.220
H7-A	-CH ₃ -	3	0.295

Utilizando los datos de la Tabla 7, se aplicó la Ec. 5 para calcular el porcentaje de funcionalización.

$$\% \text{ Funcionalización} = \frac{(100 - \% \text{DDA}) \times \text{Int. AAA-SBP1} \times 3}{21 \times \text{Int. H7-A}} \quad (\text{Ec. 5}).$$

$$\% \text{ Funcionalización} = \frac{(100 - 76) \times 1.220 \times 3}{21 \times 0.295}$$

$$\% \text{ Funcionalización (\%F)} = \mathbf{14.18\%}$$

El grado de funcionalización del quitosano con el péptido SBP1 se estimó en un 14.2%. Esto indica que del total de quitosano (100%), aproximadamente el 14.2% se encontró enlazado al péptido SBP1 a través del PEG.

Como se mencionó previamente, para verificar la eficiencia y reproducibilidad del procedimiento planteado para obtener el CS-PEG-SBP1, se llevó a cabo la síntesis por triplicado, obteniendo resultados consistentes tanto en la masa obtenida como en el porcentaje de funcionalización.

En la Tabla 8 se proporcionan detalles sobre las integraciones de cada uno de los lotes, y en los Anexos 5 y 6 se muestran los nuevos espectros ^1H -RMN generados con el GSD en el software MestReNova. Estos datos complementarios respaldaron la consistencia y confiabilidad del método planteado para la síntesis.

Tabla 8: Integrales normalizadas de los picos de la síntesis de CS-PEG-SBP1 de 3 lotes.

Lote	AAA-SBP1	Región δ 1.79 – 2.11 ppm	H7-A
1	1.22	1	0.295
2	0.99	1	0.236
3	1.17	1	0.282

Finalmente, en la Tabla 9 se resumen los resultados de los tres lotes obtenidos, detallando la masa total producida para cada uno de ellos, así como los respectivos porcentajes de funcionalización.

Tabla 9: Porcentaje de funcionalización de la síntesis de CS-PEG-SBP1 de 3 lotes.

Lote	Masa (mg)	Grado de Funcionalización (%)
1	17.8	14.2
2	18.80	14.4
3	15.5	14.2

En términos generales, se confirmó la efectividad del proceso de producción, ya que se lograron obtener productos con porcentajes de funcionalización muy similares, situándose en el rango de 14.2% – 14.4% de funcionalización. Este consistente resultado

subraya la reproducibilidad y robustez del método empleado en la síntesis de CS-PEG-SBP1, respaldando así la consistencia en la obtención de los productos deseados.

3 CÁLCULOS DE CONCENTRACIÓN DEL CS-PEG-SBP1 Y CS-PEG-L-CISTEÍNA

La masa molar de cada unidad promedio funcionalizada del CS-PEG-SBP1 se calculó a partir de los porcentajes de funcionalización del SBP1 (%F) y del PEG (%PEG). Ambos porcentajes se determinaron utilizando la Ec. 5 y las integrales respectivas. Además, para el cálculo se requirió conocer el grado de acetilación (1-DDA) (%A). Al disponer de estos tres datos, el porcentaje de la sub-unidad D-glucosamina (%D) se obtuvo por diferencia, ya que la suma total de los porcentajes es 100.

Los detalles sobre la síntesis de la muestra de CS-PEG-L-cisteína se encuentran en el Anexo 7. En esta sección, cálculos de concentración, se explica exclusivamente el método para calcular su masa molar. Para ello, se utilizaron únicamente los datos del porcentaje de acetilación (%A) y el porcentaje de funcionalización de la L-cisteína, debido a que la reacción fue completa (ver Anexo 7). Por tanto el porcentaje de funcionalización fue 76% (máximo porcentaje de alcanzar debido al grado de desacetilación de quitosano utilizado). Para el cálculo se utilizó la Ec. 7.

A partir de estos datos, se emplea la Ec. 6 y Ec.7 para determinar la masa molar de cada unidad promedio funcionalizada del CS-PEG-SBP1 como del CS-PEG-L-cisteína respectivamente.

$$\begin{aligned} \text{Masa Molar } (\bar{M}) = & \%F (\bar{M}_{\text{SBP1}} + \bar{M}_{\text{PEG}} + \bar{M}_{\text{D-gluc.}}) + \\ & \%PEG (\bar{M}_{\text{PEG}} + \bar{M}_{\text{D-gluc.}}) + \%A (\bar{M}_{\text{Acetil-D-gluc.}}) + \%D (\bar{M}_{\text{D-gluc.}}) \end{aligned} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde: $\bar{M}_{\text{SBP1}}$, masa molar del péptido SBP1, 2906.04 g/mol; $\bar{M}_{\text{PEG}}$, masa molar del PEG, 1500 g/mol; $\bar{M}_{\text{D-gluc.}}$, masa molar de la D-glucosamina, 161.2 g/mol y $\bar{M}_{\text{Acetil-D-gluc.}}$, masa molar de la Acetil-D-glucosamina, 203.2 g/mol.

$$\text{Masa Molar } (\bar{M}) = \%F (\bar{M}_{\text{L-cis.}} + \bar{M}_{\text{PEG}} + \bar{M}_{\text{D-gluc.}}) + \%A (\bar{M}_{\text{Acetil-D-gluc.}}) \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde: $\bar{M}_{\text{L-cis.}}$, masa molar del la L-cisteína, 120.16 g/mol.

Finalmente, tras aplicar las fórmulas correspondientes, se determinó que la masa molar del CS-PEG-SBP1 fue de 1173.06 g/mol, mientras que la del CS-PEG-L-cisteína alcanzó los 1402 g/mol. Utilizando estos datos, se calcularon las concentraciones de 2, 1, 0.5 y 0.1 mM para la muestra de CS-PEG-SBP1, y de 13.7, 6.85, 3.42 y 0.68 mM para el CS-PEG-L-cisteína.

Estas últimas concentraciones representaron la cantidad equivalente de quitosano presente en la muestra de CS-PEG-SBP1. La muestra de CS-PEG-L-cisteína se utilizó como control negativo del quitosano total en la muestra de CS-PEG-SBP1. Por consiguiente, a partir de este punto, únicamente se hará mención de las concentraciones del CS-PEG-SBP1 como concentraciones de ambas muestras.

4 ENSAYO DE CAPACIDAD NEUTRALIZANTE VISUALIZADO POR MICRO-AGLUTINACIÓN

Los resultados obtenidos de la micro-aglutinación no fueron los esperados. Aunque los ensayos realizados con el control positivo y el control negativo fueron claros y comprensibles, los resultados obtenidos con la muestra CS-PEG-SBP1 no coincidieron con lo esperados.

En la Figura 19 se muestra el patrón de aglutinación formado tras la reacción entre los anticuerpos IgY de gallinas y la *S. enteritidis* modificada (19A), así como con la *S. enteritidis* tipo salvaje (19B). Ambas muestras presentaron un patrón de aglutinación; sin embargo, al comparar los resultados, se observó una diferencia significativa en los patrones formados. Los patrones de aglutinación en la muestra 19A fueron más prominentes, lo cual se atribuye a la presencia de anticuerpos específicos contra las proteínas de superficie, junto con los anticuerpos anti-RBD.

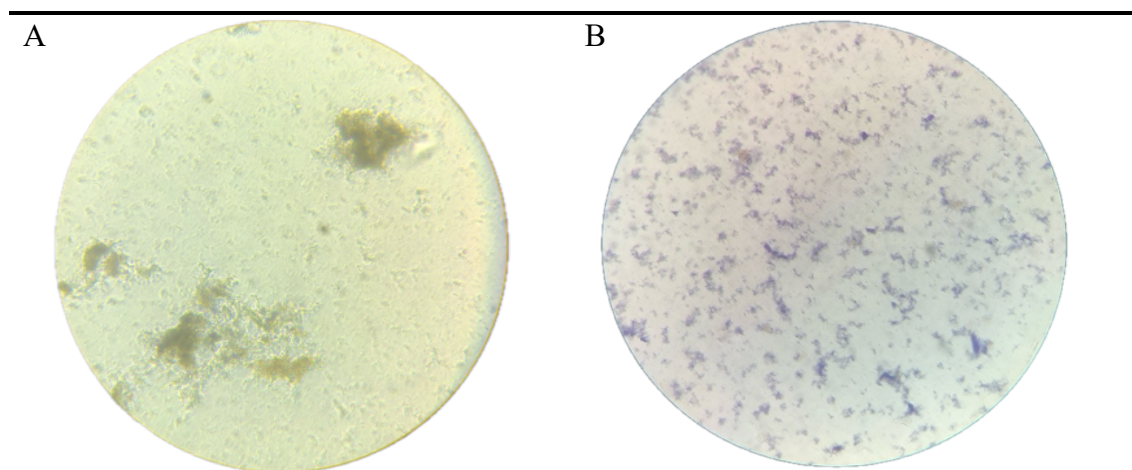


Figura 19: A) Reacción positiva. Presencia de micro-aglutinación. Anticuerpos IgY de gallinas y *S. enteritidis* modificada. B) Reacción positiva. Presencia de micro-aglutinación. Anticuerpos IgY de gallinas y *S. enteritidis* tipo salvaje.

Se analizaron las muestras de CS-PEG-SBP1 2 mM, 1mM, 0.5 mM y 0.1 mM con la *Salmonella enteritidis* tipo salvaje. Todas las pruebas fueron negativas, lo cual fue conforme a lo esperado. En la Figura 20 se exhibe la reacción negativa del CS-PEG-SBP1 a una concentración de 2 mM, una de las muestras probadas.

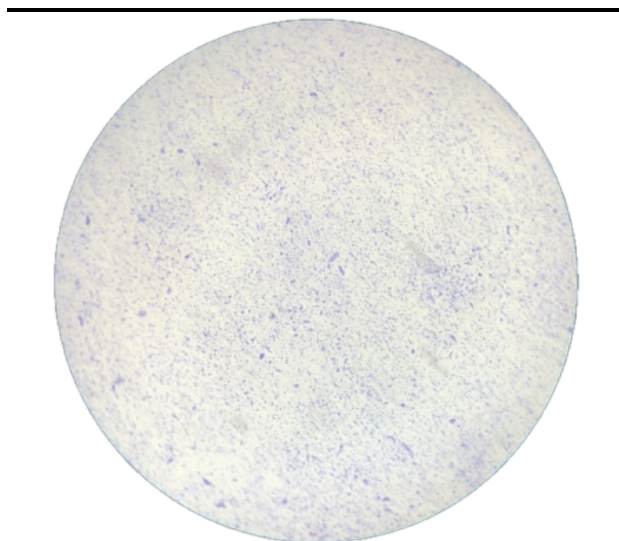


Figura 20: A) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Quitosano funcionalizado con SBP1 2 mM y S. enteritidis tipo salvaje

Al analizar las muestras de CS-PEG-SBP1 con la *S. enteritidis* modificada que presenta el dominio RBD, los resultados no fueron los esperados. No se observó ningún patrón de aglutinación, a diferencia de las muestras de CS-PEG-L-cisteína, que mostraron los resultados esperados. Las Figuras 21, 22, 23 y 24 presentan los resultados del ensayo con *S. enteritidis* modificada utilizando las muestras de CS-PEG-SBP1 y CS-PEG-L-cisteína a concentraciones de 2, 1, 0.5 y 0.1 mM.

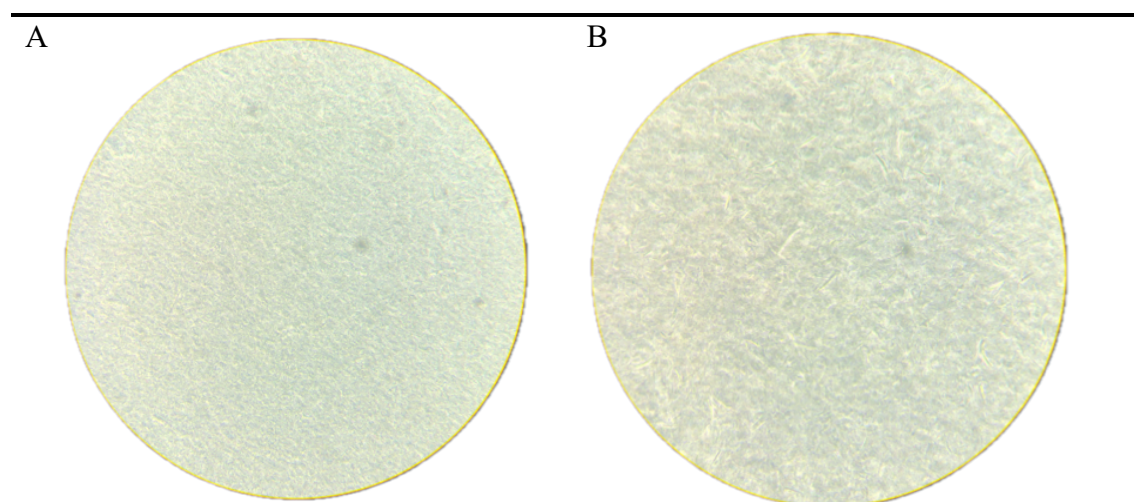
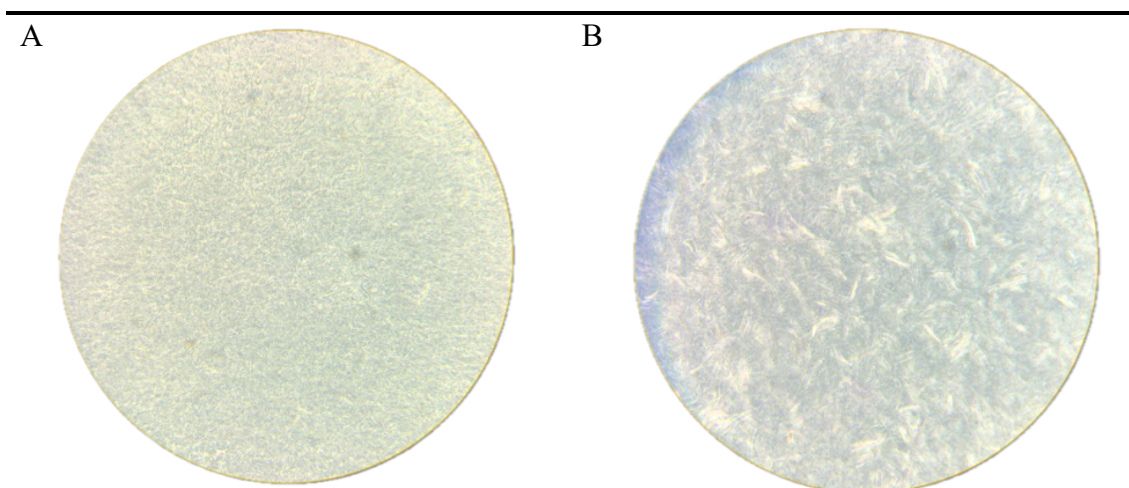
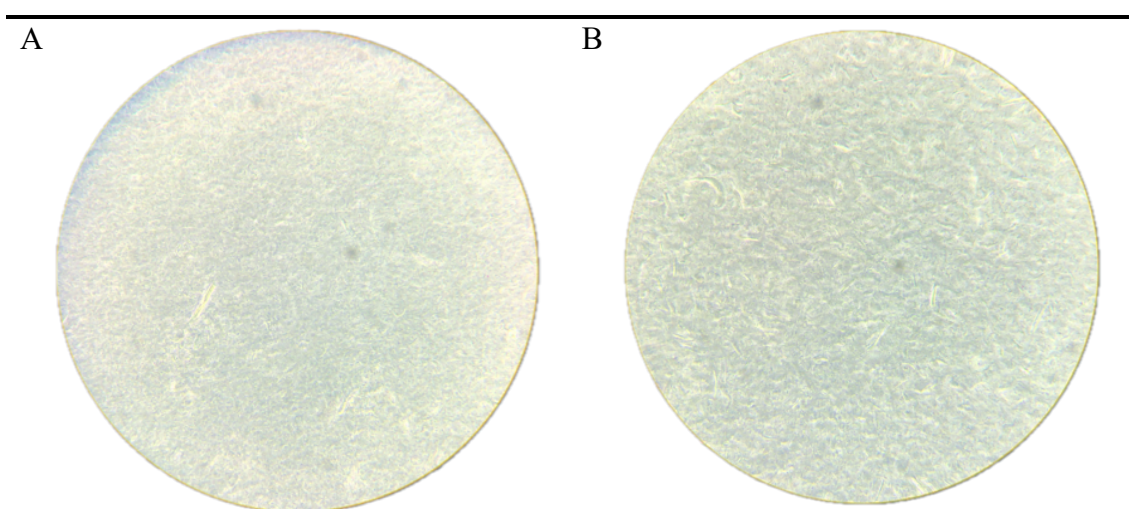


Figura 21: A) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Quitosano funcionalizado con SBP1 a 2 mM y S. enteritidis modificada. B) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Control negativo de CS-PEG-L-cisteína a 2 mM y S. enteritidis modificada.



*Figura 22: A) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Quitosano funcionalizado con SBP1 a **1 mM** y *S. enteritidis* modificada. B) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Control negativo de CS-PEG-L-cisteína a 1 mM y *S. enteritidis* modificada.*



*Figura 23: A) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Quitosano funcionalizado con SBP1 a **0.5 mM** y *S. enteritidis* modificada. B) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Control negativo de CS-PEG-L-cisteína a 0.5 mM y *S. enteritidis* modificada.*

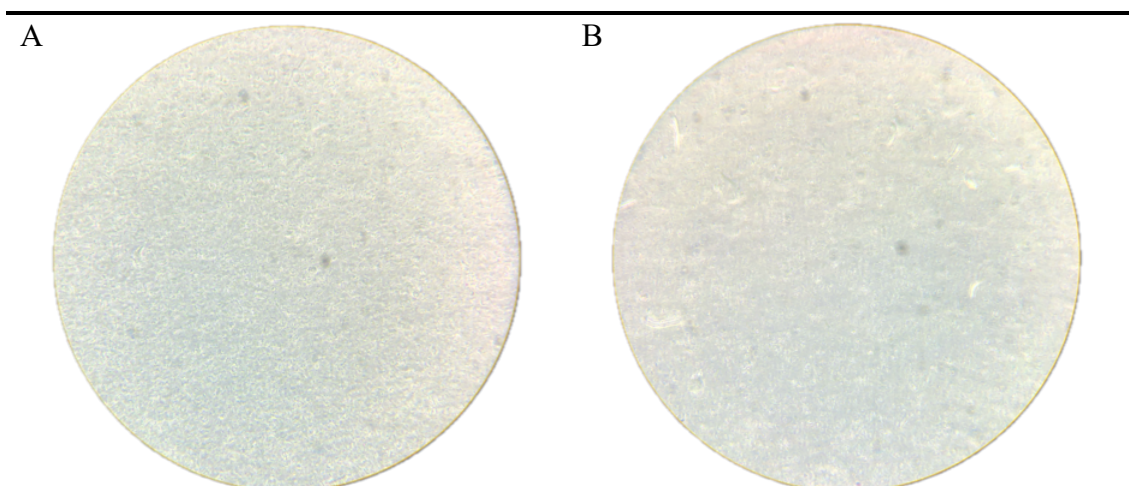


Figura 24: A) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Quitosano funcionalizado con SBP1 a 0.1 mM y S. enteritidis modificada. B) Reacción negativa. Ausencia de micro-aglutinación. Control negativo de CS-PEG-L-cisteína a 0.1 mM y S. enteritidis modificada.

En términos generales, los resultados de los ensayos de micro-aglutinación con el quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 resultaron ser ambiguos y no cumplieron con las expectativas. Las pruebas realizadas con diferentes concentraciones no mostraron signos de aglutinación.

VI. DISCUSIÓN

La síntesis del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 es de gran importancia porque actúa evitando la unión del dominio RBD del virus con la proteína ACE2. La interacción del SBP1 con el RBD seguirá siendo útil incluso si ocurre alguna variación en el RBD, que es poco probable, ya que no afectará la capacidad del péptido para unirse e inactivarlo. Esto se debe a que el virus necesita mantener su capacidad de entrada e infección, lo que favorece la acción del péptido SBP1.

La síntesis del producto representó un desafío, no solo debido al extenso proceso involucrado, sino también por la necesidad de encontrar una manera de compatibilizar los reactivos utilizados.

El quitosano, al ser un polímero, funciona perfectamente como matriz para contener moléculas pequeñas como los péptidos. El grado de desacetilación (DDA) con el cual se trabajó fue del 76%. Este grado proporciona al quitosano diferentes propiedades tanto químicas como físicas ((48)). Cuando una muestra de quitosano se acerca al 100% de desacetilación, su solubilidad en soluciones ácidas se vuelve mucho más favorable, mientras que en agua comienza a volverse soluble. Este hecho contribuye a su uso en diversas aplicaciones (74). Por otro lado, el tamaño del quitosano también está directamente relacionado con su solubilidad. Cuanto más pequeño es el quitosano, tiende a ser más soluble tanto en agua como en soluciones ácidas. Es por ello que, entre los diferentes tipos de quitosano disponibles, de alto, mediano y bajo peso molecular, se optó por utilizar el de bajo peso molecular debido a las razones mencionadas anteriormente.

La *N*-hidroxisuccimida-PEG-Maleimido es un polímero heterobifuncional que posee una extremidad para enlazarse al quitosano (*N*-hidroxisuccinimida o NHS) y otra para enlazarse a la cisteína (Maleimido) presente en el péptido SBP1. La *N*-hidroxisuccimida-PEG-Maleimido es sensible a la humedad (75), ya que puede hidrolizarse con facilidad liberando el grupo NHS. La hidrólisis suele ocurrir principalmente en medios ácidos, por lo que este compuesto siempre se disuelve en soluciones de pH básico. Es por ello que es necesario caracterizar la *N*-hidroxisuccinimida-PEG-maleimido para asegurarse de que

el PEG heterobifuncional con el grupo NHS pueda reaccionar con los grupos amino del quitosano. Esta caracterización también permite verificar que el grupo maleimido siga estando intacto. Por último, se determina el peso molecular del PEG heterobifuncional, un dato crucial para calcular las moles y la concentración. Teniendo en cuenta estos datos, se propuso primero usar un pH de 5 y luego pasar a un pH de 7 para que el quitosano se disuelva y el NHS-PEG-MAL no sufra hidrólisis.

El péptido SBP1 es el componente principal de la síntesis, y su importancia radica en su capacidad para interactuar específicamente con el dominio RBD del virus SARS-CoV-2 (27). Este péptido se obtuvo a partir de la proteína ACE2 mediante métodos de purificación y caracterización (76). Durante la caracterización, se determinó la secuencia completa de sus 23 aminoácidos, lo que permitió identificar la posición de cada aminoácido en la cadena y, lo más importante, identificar la presencia de la cisteína. Esta cisteína es un aminoácido crucial, ya que es indispensable para la unión al quitosano mediante el *linker*, facilitando así la conjugación del péptido SBP1 con el quitosano funcionalizado. Esta caracterización detallada del péptido SBP1 es fundamental para garantizar su correcta funcionalización y su eficacia en la aplicación final.

En la reacción de síntesis del quitosano con el péptido SBP1, se logró una funcionalización de aproximadamente el 14%. La metodología propuesta permitió obtener estos resultados y caracterizarlos adecuadamente mediante RMN. Para mejorar el porcentaje de funcionalización, es necesario trabajar en la solubilidad de la muestra y también en los reactivos más grandes como el quitosano. Se ha observado que algunas modificaciones en el quitosano, como la incorporación de un grupo hidrofílico, como el ácido glucónico (77), o la introducción de un compuesto de poliéster alifático hidrofílico, como el poli(tartrato de butileno) (78), pueden mejorar su solubilidad en soluciones acuosas.

La síntesis del quitosano funcionalizado presentó un desafío significativo: mantener la estabilidad y la integridad estructural de los componentes involucrados, así como asegurar la reproducibilidad y la calidad del producto final en cada etapa del procedimiento. Esta

limitación es especialmente relevante para la escalabilidad en aplicaciones comerciales y clínicas a gran escala, tanto en el manejo como en el almacenamiento. No obstante, a pesar de este desafío, el presente trabajo demostró la posibilidad de obtener resultados con una desviación estándar de 0.12, lo que indica que el procedimiento empleado proporciona resultados reproducibles. Por lo tanto, se logró estandarizar el proceso de producción del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1, lo que promete un escalado reproducible en el futuro.

La producción del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 es económicamente viable y técnicamente factible para su escalabilidad comercial. No requiere un laboratorio altamente controlado, lo que reduce los costos de infraestructura. Los reactivos necesarios son accesibles y de bajo costo. Aunque el proceso es largo, su simplicidad permite la utilización de personal con formación técnica estándar, reduciendo los costos laborales. La alta reproducibilidad del procedimiento, con una desviación estándar de 0.12, garantiza la consistencia y calidad del producto final. En conjunto, estos factores favorecen la producción en masa sin incurrir en costos excesivos.

Esta nueva síntesis del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 es altamente relevante para el desarrollo de medicamentos contra el virus SARS-CoV-2. Gracias a su configuración, mantiene su eficacia incluso frente a las múltiples mutaciones que surgen. Al igual que las bacterias desarrollan resistencia a los antibióticos, algunos de los medicamentos propuestos para tratar la COVID-19 tienden a inducir resistencia en el virus (79,80), lo que puede llevar al fracaso del tratamiento. En este caso, la síntesis propuesta presenta una gran ventaja, ya que utiliza un péptido, SBP1, que se une directamente a la proteína vital para la entrada del SARS-CoV-2 en la célula huésped. De esta manera, el compuesto propuesto tiene un gran potencial como fármaco de amplio espectro, ya que será eficaz tanto para el SARS-CoV-2 tipo salvaje como para sus variantes mutantes.

El ensayo de capacidad neutralizante, visualizado mediante micro-aglutinación y diseñado para el análisis del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1, fue una

prueba innovadora basada en los ensayos de microaglutinación. En lugar de evaluar una muestra de anticuerpos contra sus antígenos, este nuevo ensayo utilizó el quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 para observar su unión al antígeno presentado en la superficie de la bacteria modificada.

Los resultados obtenidos para las muestras de CS-PEG-SBP1 probado con este diseño innovador no fueron los esperados. Sin embargo, estos resultados podrían indicar dos posibilidades: En primer lugar, que no se produjo ninguna reacción entre el péptido SBP1 de la muestra CS-PEG-SBP1 con el antígeno RBD; y en segundo lugar, que si hubo reacción pero no generó aglutinación. Es decir, el SBP1 y el dominio RBD podrían estar interactuando, pero no formando patrones de aglutinación. A pesar que la técnica de micro-aglutinación no demostró ser la más adecuada en terminos de sensibilidad y especificidad para detectar interacciones a nivel molecular, su bajo costo y simplicidad fueron factores decisivos para dar inicio a las pruebas de efectividad del producto sintetizado, priorizando en primera instancia las opciones de fácil acceso antes de recurrir a métodos más complejos. Por lo tanto, se hace necesario llevar a cabo nuevos ensayos, considerando la posibilidad de modificar algunas variables y/o probar enfoques metodológicos alternativos. Estos ajustes son esenciales para obtener resultados más robustos y, finalmente, evaluar con mayor certeza la eficacia de la unión del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 a la proteína Spike del virus SARS-CoV-2.

VII. TRABAJOS FUTUROS

Como investigaciones futuras se preve utilizar variantes del péptido SBP1o librerías de peptidos que demuestren una mayor afinidad y especificidad hacia el dominio RBD del virus SARS-CoV-2 (57,58). Estas modificaciones podrian mejorar la eficacia del tratamiento, asegurando una respuesta más robusta y adaptable frente a posibles mutaciones del virus.

Por otro lado, debido a los resultados ambiguos en los ensayos de micro-aglutinación, se propone realizar estudios adicionales sobre la estabilidad del quitosano funcionalizado y la cinética de liberación del péptido en condiciones fisiológicas para asegurar su funcionalidad en un ambiente in vivo. Asimismo, se buscará incorporar estudios en modelos animales para evaluar la eficacia real del quitosano funcionalizado en un sistema biológico completo. Estos estudios permitirán validar el potencial terapéutico del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 y optimizar su aplicación clínica.

VIII.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se caracterizaron los reactivos iniciales mediante Resonancia Magnética Nuclear. Se obtuvo un porcentaje de desacetilación de 76% para el quitosano comparando las señales de los hidrógenos acetilados y desacetilados del espectro ^1H -RMN. Se obtuvo un peso molecular promedio de 1883 g/mol del *N*-hidroxisuccinimida-PEG-Maleimido empleando las señales de los hidrógenos de la unidad repetitiva y el peso molecular de la zona no repetitiva, previo normalizado de la señal del maleimido. Se identificó y confirmó la secuencia de aminoácidos del péptido SBP1 mediante los espectros de correlación 2D NOESY y TOCSY – RMN.

Se sintetizó exitosamente el quitosano funcionalizado con el péptido SBP1, lo cual se confirmó mediante las técnicas de DOSY-RMN y ^1H -RMN. Se lograron sintetizar tres lotes con un grado de funcionalización de 14 %; es decir que 14 de cada 100 unidades monoméricas del quitosano estaban unidas al péptido SBP1 a través del PEG. Además, empleando la Ecuación 6, se determinó que la masa molar de CS-PEG-SBP1 fue 1173.06 g/mol, mientras que la masa molar de CS-PEG-L-cisteína fue 1402 g/mol.

Finalmente, los resultados del ensayo de capacidad neutralizante siguen siendo ambiguos, ya que no es posible determinar con claridad si la ausencia de patrones de aglutinación entre *S. enteritidis* modificada y las distintas muestras de CS-PEG-SBP1 se debe a que la interacción entre la muestra y el antígeno no está formando patrones de aglutinación, aunque exista una reacción, o si, por el contrario, no hay interacción alguna. Se requieren ensayos adicionales más sofisticados que permitan observar directamente la interacción.

Se recomienda buscar nuevas estrategias que permitan obtener el producto CS-PEG-SBP1 con la misma calidad pero involucrando un menor tiempo de producción. Por otro lado, es importante diversificar las herramientas analíticas para permitir una caracterización más exhaustiva del producto y corroborar los resultados obtenidos medidos mediante RMN. En cuanto a los ensayos biológicos, se recomienda llevar a cabo nuevos ensayos, considerando ajustes en las variables experimentales y la exploración de nuevas metodologías, con el objetivo de obtener resultados más robustos y concluyentes.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Jaimes JA, André NM, Chappie JS, Millet JK, Whittaker GR. Phylogenetic Analysis and Structural Modeling of SARS-CoV-2 Spike Protein Reveals an Evolutionary Distinct and Proteolytically Sensitive Activation Loop. *J Mol Biol*. 2020 May;432(10):3309–25.
2. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard [Internet]. [cited 2023 Nov 19]. Available from: <https://covid19.who.int>
3. Holmes EC, Goldstein SA, Rasmussen AL, Robertson DL, Crits-Christoph A, Wertheim JO, et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell*. 2021 Sep;184(19):4848–56.
4. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *The Lancet*. 2020 Feb 15;395(10223):507–13.
5. Wang R, Simoneau CR, Kulsuptrakul J, Bouhaddou M, Travisano KA, Hayashi JM, et al. Genetic Screens Identify Host Factors for SARS-CoV-2 and Common Cold Coronaviruses. *Cell*. 2021 Jan 7;184(1):106-119.e14.
6. Petersen E, Koopmans M, Go U, Hamer DH, Petrosillo N, Castelli F, et al. Comparing SARS-CoV-2 with SARS-CoV and influenza pandemics. *Lancet Infect Dis*. 2020 Sep 1;20(9):e238–44.
7. Zawilska JB, Lagodzinski A, Berezinska M. COVID-19: from the structure and replication cycle of SARS-CoV-2 to its disease symptoms and treatment. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. 2021 Aug;72(4).
8. Living guidance for clinical management of COVID-19 [Internet]. [cited 2023 Nov 19]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2>
9. Dhama K, Patel SK, Sharun K, Pathak M, Tiwari R, Yatoo MI, et al. SARS-CoV-2 jumping the species barrier: Zoonotic lessons from SARS, MERS and recent advances to combat this pandemic virus. *Travel Med Infect Dis*. 2020;37:101830.
10. Han Q, Lin Q, Jin S, You L. Coronavirus 2019-nCoV: A brief perspective from the front line. *J Infect*. 2020 Apr;80(4):373–7.
11. Chan JFW, Kok KH, Zhu Z, Chu H, To KKW, Yuan S, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan. *Emerg Microbes Infect*. 2020 Jan 1;9(1):221–36.
12. Cubuk J, Alston JJ, Incicco JJ, Singh S, Stuchell-Brereton MD, Ward MD, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nat Commun*. 2021 Mar 29;12(1):1936.
13. Schoeman D, Fielding BC. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol J*. 2019 May 27;16(1):69.
14. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*. 2020 Mar 13;367(6483):1260–3.
15. Samrat SK, Tharappel AM, Li Z, Li H. Prospect of SARS-CoV-2 spike protein: Potential role in vaccine and therapeutic development. *Virus Res*. 2020 Oct 15;288:198141.
16. Yang H, Rao Z. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Nov;19(11):685–700.
17. Zhang S, Go EP, Ding H, Anang S, Kappes JC, Desaire H, et al. Analysis of

Glycosylation and Disulfide Bonding of Wild-Type SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *J Virol*. 2022 Feb 9;96(3):e01626-21.

18. Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins | Annual Review of Virology [Internet]. [cited 2023 Mar 27]. Available from: https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-virology-110615-042301#_i16

19. Gui M, Song W, Zhou H, Xu J, Chen S, Xiang Y, et al. Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding. *Cell Res*. 2017 Jan;27(1):119–29.

20. Grobbelaar LM, Venter C, Vlok M, Ngoepe M, Laubscher GJ, Lourens PJ, et al. SARS-CoV-2 spike protein S1 induces fibrin(ogen) resistant to fibrinolysis: Implications for microclot formation in COVID-19 [Internet]. medRxiv; 2021 [cited 2023 Mar 27]. p. 2021.03.05.21252960. Available from: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.03.05.21252960v1>

21. Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol*. 2021 Jan 22;433(2):166725.

22. Wang C, Chen LY, Lu QB, Cui F. Vaccination with the Inactivated Vaccine (Sinopharm BBIBP-CorV) Ensures Protection against SARS-CoV-2 Related Disease. *Vaccines*. 2022 Jun 9;10(6):920.

23. Thomas SJ, Moreira ED, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine through 6 Months. *N Engl J Med*. 2021 Nov 4;385(19):1761–73.

24. Yan W, Zheng Y, Zeng X, He B, Cheng W. Structural biology of SARS-CoV-2: open the door for novel therapies. *Signal Transduct Target Ther*. 2022 Jan 27;7(1):1–28.

25. COVID is here to stay: countries must decide how to adapt. *Nature*. 2022 Jan 10;601(7892):165–165.

26. Wang R, Chen J, Wei GW. Mechanisms of SARS-CoV-2 Evolution Revealing Vaccine-Resistant Mutations in Europe and America. *J Phys Chem Lett*. 2021 Dec 16;12(49):11850–7.

27. Liu C, Zhou Q, Li Y, Garner LV, Watkins SP, Carter LJ, et al. Research and Development on Therapeutic Agents and Vaccines for COVID-19 and Related Human Coronavirus Diseases. *ACS Cent Sci*. 2020 Mar 25;6(3):315–31.

28. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9 - PubMed [Internet]. [cited 2023 Nov 20]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10969042/>

29. Zhang H, Wada J, Hida K, Tsuchiyama Y, Hiragushi K, Shikata K, et al. Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of ACE2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *J Biol Chem*. 2001 May 18;276(20):17132–9.

30. Effects of Conversion of the Zinc-Binding Motif Sequence of Thermolysin, HEXXH, to That of Dipeptidyl Peptidase III, HEXXXH, on the Activity and Stability of Thermolysin | Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry | Oxford Academic [Internet]. [cited 2023 Nov 20]. Available from: <https://academic.oup.com/bbb/article/77/9/1901/5955306>

31. Ni W, Yang X, Yang D, Bao J, Li R, Xiao Y, et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. *Crit Care*. 2020 Dec;24(1):422.

32. Patel S, Rauf A, Khan H, Abu-Izneid T. Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother*. 2017 Oct;94:317–25.

33. Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, Motta-Santos D, Alenina N, Bader M,

et al. The ACE2/Angiotensin-(1–7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1–7). *Physiol Rev*. 2018 Jan 1;98(1):505–53.

34. Wu J, Deng W, Li S, Yang X. Advances in research on ACE2 as a receptor for 2019-nCoV. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Jan;78(2):531–44.

35. Kuba K, Imai Y, Rao S, Gao H, Guo F, Guan B, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*. 2005 Aug;11(8):875–9.

36. Liu Y, Yang Y, Zhang C, Huang F, Wang F, Yuan J, et al. Clinical and biochemical indexes from 2019-nCoV infected patients linked to viral loads and lung injury. *Sci China Life Sci*. 2020 Mar;63(3):364–74.

37. Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol*. 2004 Jun;203(2):631–7.

38. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. *Front Med*. 2020 Apr;14(2):185–92.

39. Zhang H, Li HB, Lyu JR, Lei XM, Li W, Wu G, et al. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis*. 2020 Jul;96:19–24.

40. Zou Z, Yan Y, Shu Y, Gao R, Sun Y, Li X, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from lethal avian influenza A H5N1 infections. *Nat Commun*. 2014 May 6;5(1):3594.

41. da Costa CHS, de Freitas CAB, Alves CN, Lameira J. Assessment of mutations on RBD in the Spike protein of SARS-CoV-2 Alpha, Delta and Omicron variants. *Sci Rep*. 2022 May 20;12(1):8540.

42. Zhang G, Pomplun S, Loftis AR, Tan X, Loas A, Pentelute BL. Investigation of ACE2 N-terminal fragments binding to SARS-CoV-2 Spike RBD [Internet]. *bioRxiv*; 2020 [cited 2022 Oct 24]. p. 2020.03.19.999318. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.19.999318v2>

43. Ryan PM, Caplice N. COVID-19 and relative angiotensin-converting enzyme 2 deficiency: role in disease severity and therapeutic response. *Open Heart*. 2020 Jun;7(1):e001302.

44. Stefanowska K, Woźniak M, Dobrucka R, Ratajczak I. Chitosan with Natural Additives as a Potential Food Packaging. *Materials*. 2023 Jan;16(4):1579.

45. Crini G. Historical review on chitin and chitosan biopolymers. *Environ Chem Lett*. 2019 Dec 1;17(4):1623–43.

46. Bakshi PS, Selvakumar D, Kadirvelu K, Kumar NS. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *Int J Biol Macromol*. 2020 May 1;150:1072–83.

47. Qu B, Luo Y. Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors – A review. *Int J Biol Macromol*. 2020 Jun 1;152:437–48.

48. Shamshina JL, Kelly A, Oldham T, Rogers RD. Agricultural uses of chitin polymers. *Environ Chem Lett*. 2020 Jan 1;18(1):53–60.

49. Skaugrud Ø, Hagen A, Borgersen B, Dornish M. Biomedical and Pharmaceutical Applications of Alginate and Chitosan. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 1999 Apr;16(1):23–40.

50. ASTM F2260-18. Standard Test Method for Determining Degree of Deacetylation in Chitosan Salts by Proton Nuclear Magnetic Resonance (1H NMR)

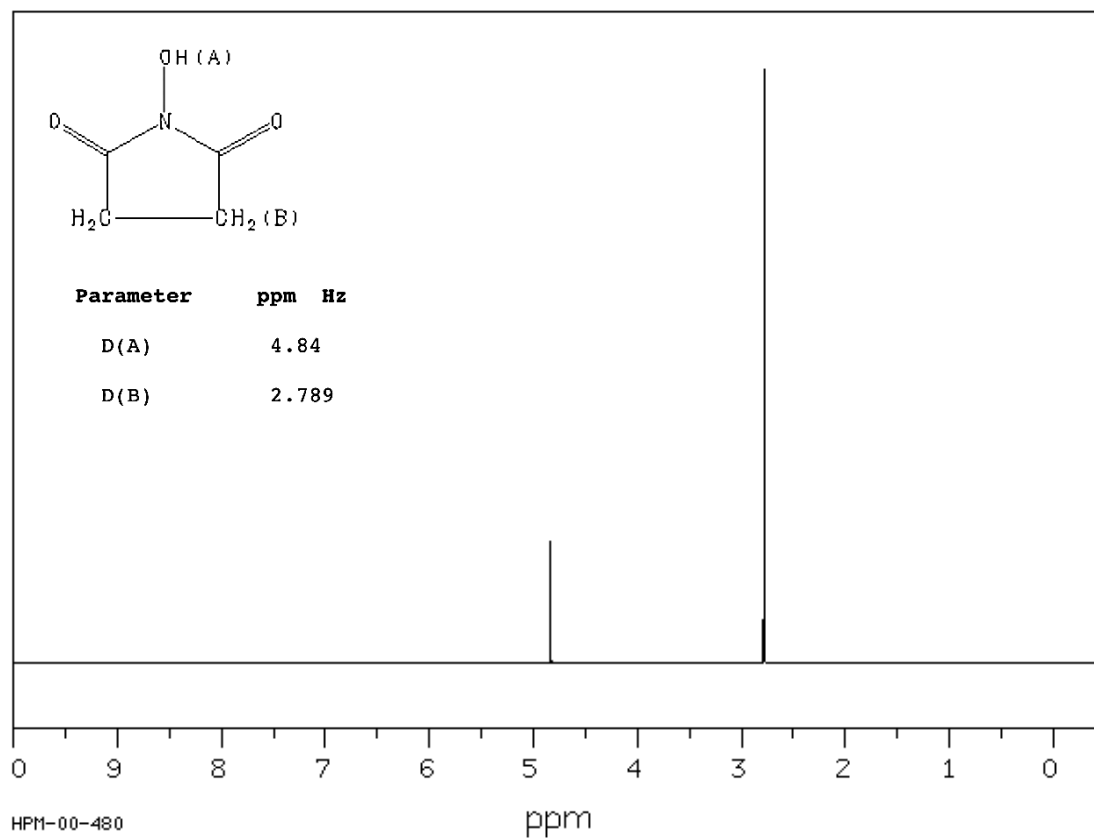
Spectroscopy. 2018;

51. Qavami N, Naghdi Badi H, Labbafi M, Mehregan M, Tavakoli M, Mehrafarin A. Overview on Chitosan as a valuable ingredient and biostimulant in pharmaceutical industries and agricultural products. *Trakia J Sci*. 2017;15(1):83–91.
52. Kho SH. Value-added chitosan scaffolds for biomedical applications. 2019 [cited 2024 Jul 3]; Available from: <https://dr.ntu.edu.sg/handle/10356/137100>
53. Cesari A, Recchimurzo A, Fabiano A, Balzano F, Rossi N, Migone C, et al. Improvement of Peptide Affinity and Stability by Complexing to Cyclodextrin-Grafted Ammonium Chitosan. *Polymers*. 2020 Feb 19;12(2):474.
54. Costa FMTA, Maia SR, Gomes PAC, Martins MCL. Dhvar5 antimicrobial peptide (AMP) chemoselective covalent immobilization results on higher antiadherence effect than simple physical adsorption. *Biomaterials*. 2015 Jun;52:531–8.
55. Mochizuki M, Kadoya Y, Wakabayashi Y, Kato K, Okazaki I, Yamada M, et al. Laminin-1 peptide-conjugated chitosan membranes as a novel approach for cell engineering. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2003 May;17(8):875–7.
56. Abd El-Hack ME, Kamal M, Alazragi RS, Alreemi RM, Qadhi A, Ghafouri K, et al. Impacts of chitosan and its nanoformulations on the metabolic syndromes: a review. *Braz J Biol Rev Brasleira Biol*. 2024;83:e276530.
57. Karoyan P, Vieillard V, Gómez-Morales L, Odile E, Guihot A, Luyt CE, et al. Human ACE2 peptide-mimics block SARS-CoV-2 pulmonary cells infection. *Commun Biol*. 2021 Feb 12;4(1):1–9.
58. Sadremomtaz A, Al-Dahmani ZM, Ruiz-Moreno AJ, Monti A, Wang C, Azad T, et al. Synthetic Peptides That Antagonize the Angiotensin-Converting Enzyme-2 (ACE-2) Interaction with SARS-CoV-2 Receptor Binding Spike Protein. *J Med Chem*. 2022 Feb 24;65(4):2836–47.
59. Rai P, Singh S, Nimesh S. Chapter 14 - Biological assay. In: Bhatt TK, Nimesh S, editors. *The Design & Development of Novel Drugs and Vaccines* [Internet]. Academic Press; 2021 [cited 2024 Jul 7]. p. 203–10. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128214718000143>
60. Golla FL. A PRELIMINARY NOTE ON THE CLINICAL VALUE OF THE ANTITRYPTIC INDEX OF THE BLOOD IN TUBERCULOSIS. *The Lancet*. 1909 Apr 3;173(4466):968–71.
61. Borbolla-Sala ME, García-Vanegas L, Cadenas-Martínez MT, Hernandez R. Leptospirosis durante la contingencia ambiental por inundación en Tabasco 2008. 2009;15(2).
62. Yitzhaki S, Barnea A, Keysary A, Zahavy E. New Approach for Serological Testing for Leptospirosis by Using Detection of *Leptospira* Agglutination by Flow Cytometry Light Scatter Analysis. *J Clin Microbiol*. 2004 Apr;42(4):1680–5.
63. Kang SM, Rhee JK, Kim EJ, Han KH, Oh JW. Bacterial cell surface display for epitope mapping of hepatitis C virus core antigen. *FEMS Microbiol Lett*. 2003 Sep 26;226(2):347–53.
64. Jeong HS, Yoo SK, Kim EJ. Cell surface display of salmabin, a thrombin-like enzyme from *Agkistrodon halys* venom on *Escherichia coli* using ice nucleation protein. *Enzyme Microb Technol*. 2001 Feb 1;28(2):155–60.
65. Lee SY, Choi JH, Xu Z. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol*. 2003 Jan;21(1):45–52.
66. Malhotra M, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Kahouli I, Prakash S. Development and characterization of chitosan-PEG-TAT nanoparticles for the intracellular delivery of siRNA. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:2041–52.

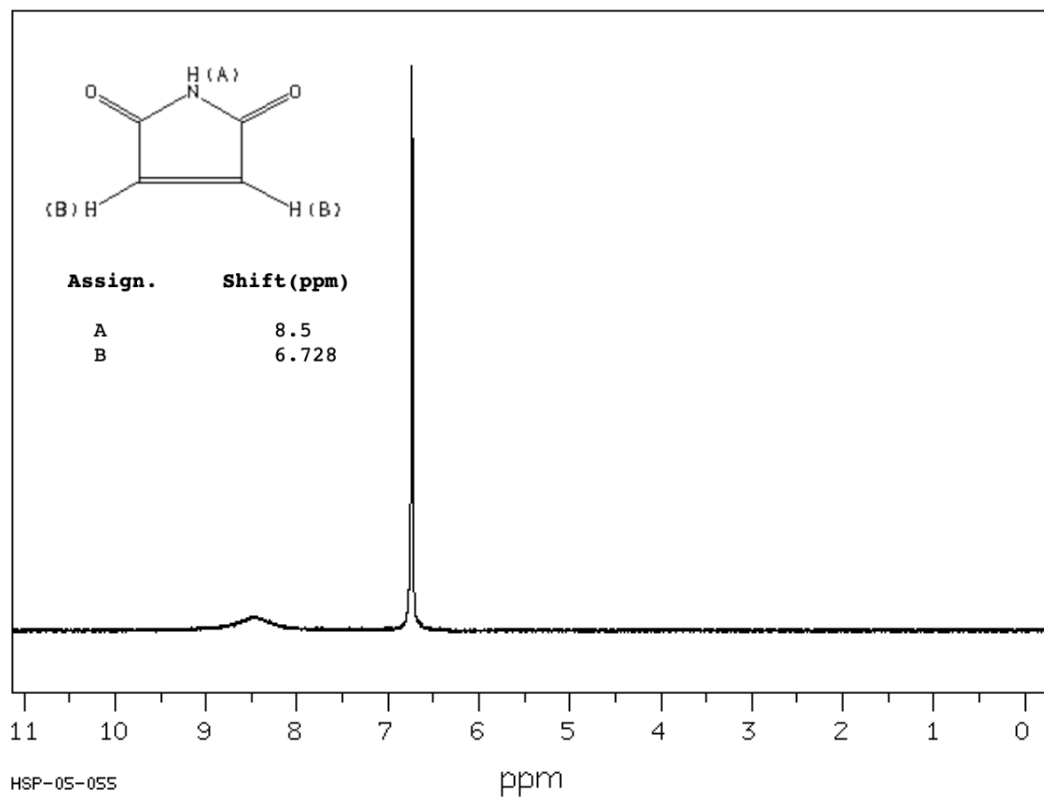
67. Lavertu M, Xia Z, Serreqi AN, Berrada M, Rodrigues A, Wang D, et al. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *J Pharm Biomed Anal.* 2003 Aug 21;32(6):1149–58.
68. NMR Characterization of Polyethylene Glycol Conjugates for Nanoparticle Functionalization | ACS Omega [Internet]. [cited 2023 Oct 8]. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsomega.2c07669>
69. Expasy ProtParam tool [Internet]. [cited 2023 Nov 16]. Available from: <https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>
70. Sandusky P, Raftery D. Use of Selective TOCSY NMR Experiments for Quantifying Minor Components in Complex Mixtures: Application to the Metabonomics of Amino Acids in Honey. *Anal Chem.* 2005 Apr 1;77(8):2455–63.
71. Automated amino acid side-chain NMR assignment of proteins using ¹³C- and ¹⁵N-resolved 3D [1H,1H]-NOESY | Journal of Biomolecular NMR [Internet]. [cited 2023 Nov 20]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10858-008-9259-x>
72. diffusion-nmrpdf.pdf [Internet]. [cited 2024 Jan 10]. Available from: <https://nmr.chem.ox.ac.uk/files/diffusion-nmrpdf>
73. Maleimide Reaction Chemistry [Internet]. Quanta BioDesign. [cited 2024 Jan 10]. Available from: <https://www.quantabiodesign.com/maleimide-reaction-chemistry/>
74. Cho YW, Jang J, Park CR, Ko SW. Preparation and Solubility in Acid and Water of Partially Deacetylated Chitins. *Biomacromolecules.* 2000 Dec 1;1(4):609–14.
75. Mal-PEG-SCM, Maleimide-PEG-Succinimidyl Carboxymethyl Ester - Biochempeg [Internet]. [cited 2023 Oct 8]. Available from: <https://www.biochempeg.com/product/Mal-PEG-SCM.html>
76. Zhang G, Pomplun S, Loftis AR, Loas A, Pentelute BL. The first-in-class peptide binder to the SARS-CoV-2 spike protein [Internet]. *bioRxiv*; 2020 [cited 2023 Jan 30]. p. 2020.03.19.999318. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.19.999318v1>
77. Park JH, Cho YW, Chung H, Kwon IC, Jeong SY. Synthesis and characterization of sugar-bearing chitosan derivatives: aqueous solubility and biodegradability. *Biomacromolecules.* 2003;4(4):1087–91.
78. Chen J, Zheng L, Chen X, Wang Z, Li C, Xiao Y, et al. Synthesis and characterization of water-soluble chitosan grafted with hydrophilic aliphatic polyester. *Int J Biol Macromol.* 2015 Mar;74:433–8.
79. Gammeltoft KA, Zhou Y, Ryberg LA, Pham LV, Binderup A, Hernandez CRD, et al. Substitutions in SARS-CoV-2 Mpro Selected by Protease Inhibitor Boceprevir Confer Resistance to Nirmatrelvir. *Viruses.* 2023 Sep 21;15(9):1970.
80. Hiscox JA, Khoo SH, Stewart JP, Owen A. Shutting the gate before the horse has bolted: is it time for a conversation about SARS-CoV-2 and antiviral drug resistance? *J Antimicrob Chemother.* 2021 Aug 12;76(9):2230–3.

X. ANEXOS

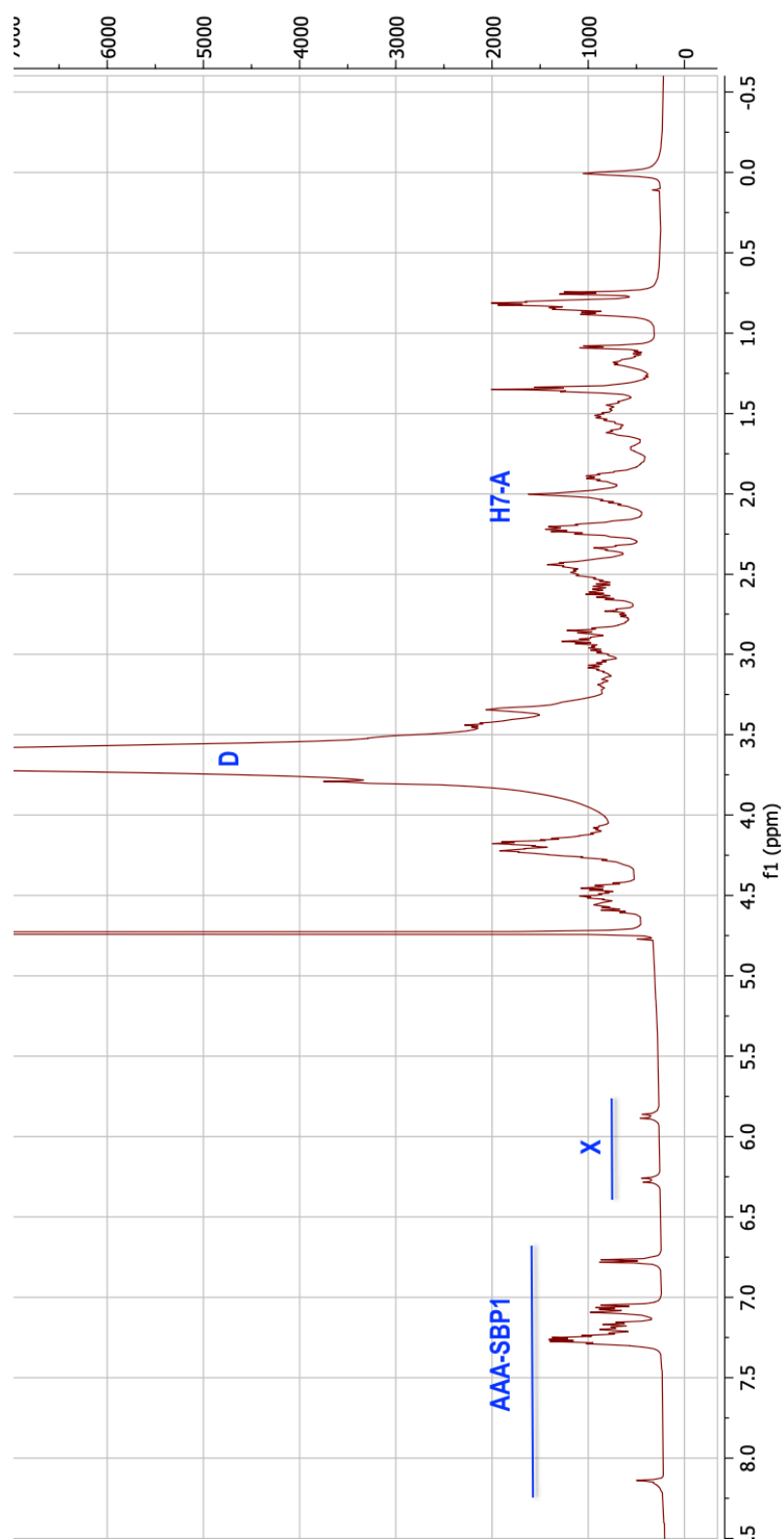
Anexo 1: Espectro ^1H -RMN de *N*-Hidroxisuccinimida. Recuperado de: Spectral Database for Organic Compounds.



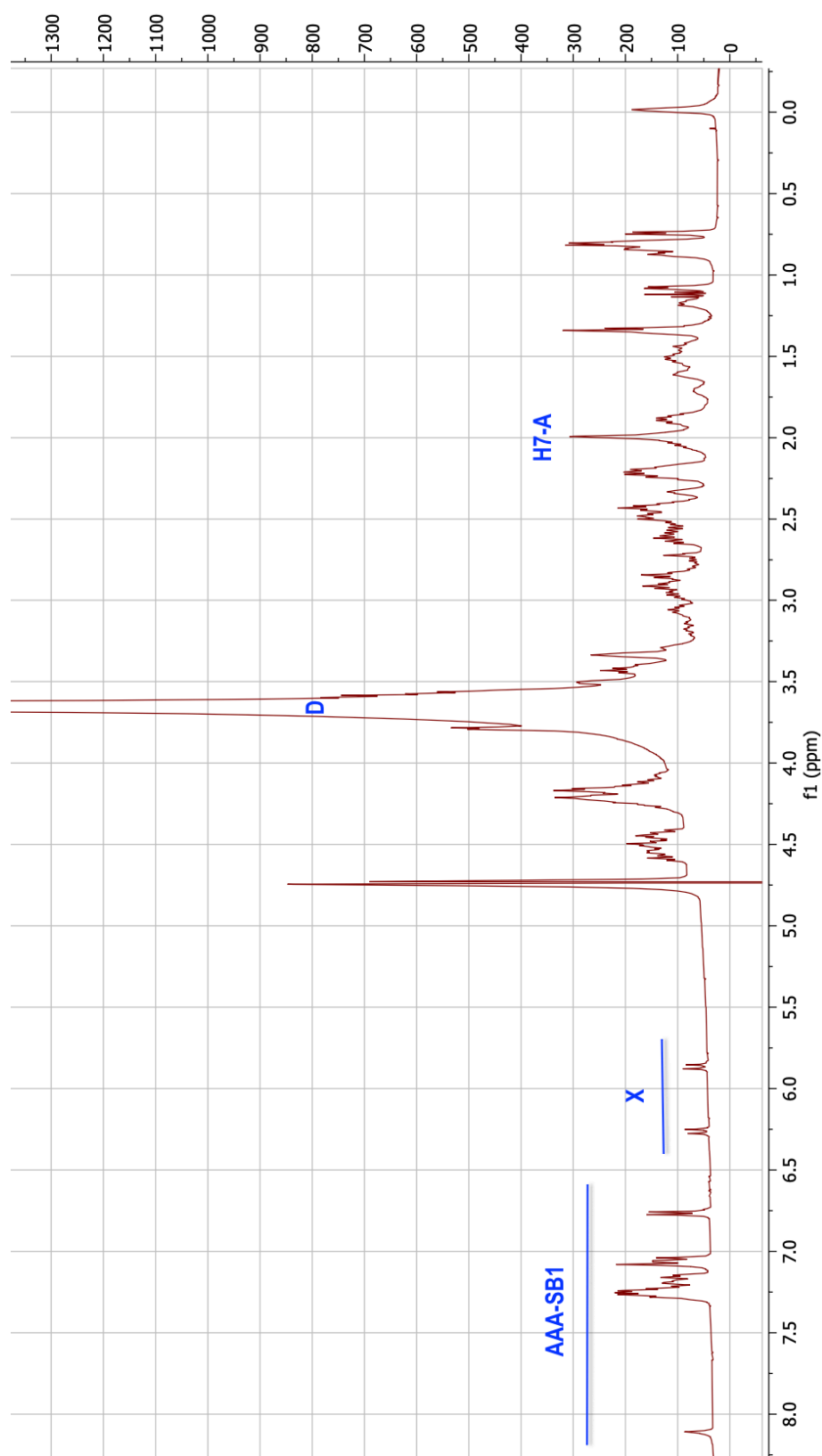
Anexo 2: Espectro 1H-RMN del Maleimido. Recuperado de: Spectral Database for Organic Compounds.



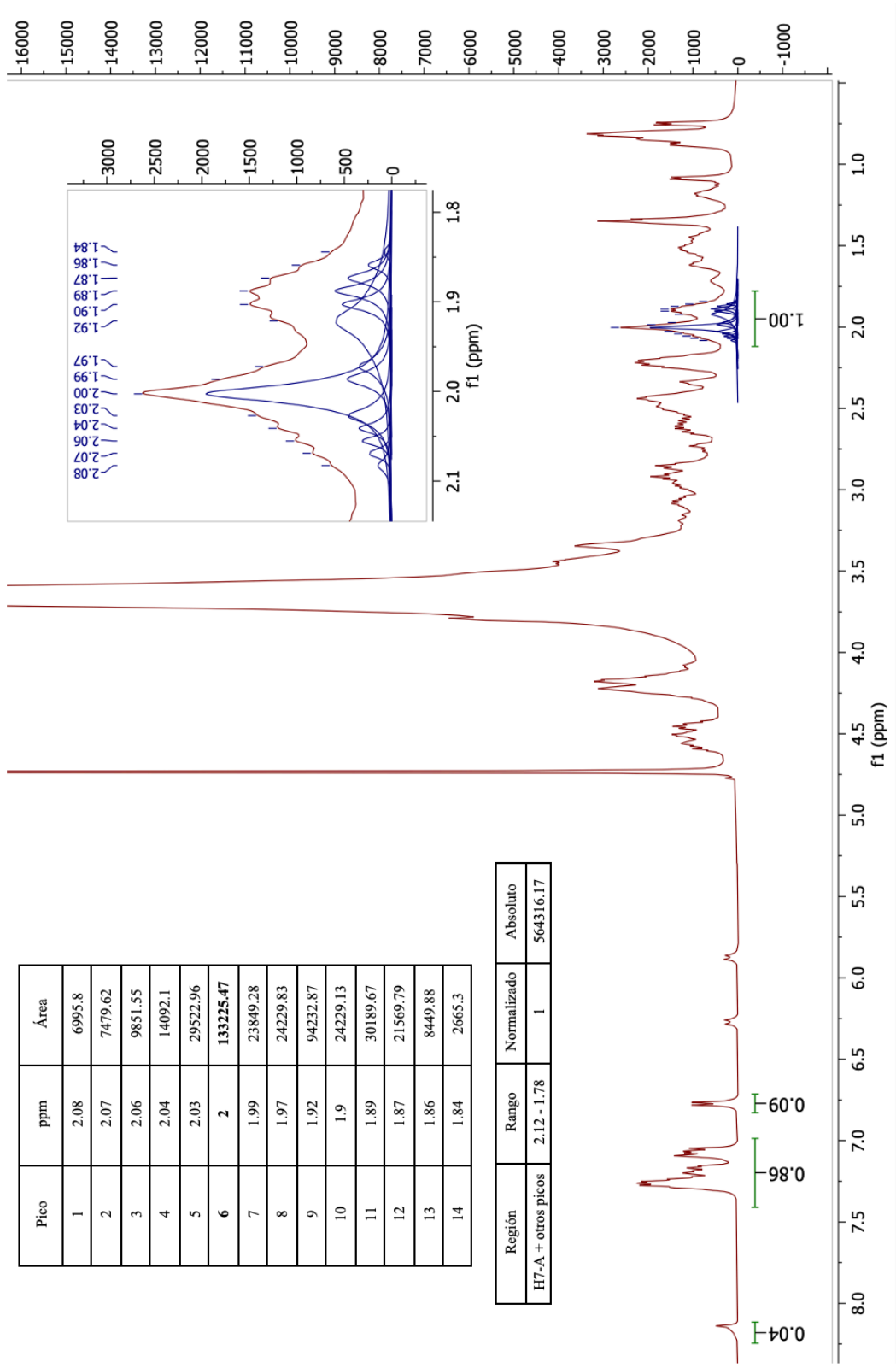
Anexo 3: Espectro ^1H -RMN del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 en buffer fosfato deuterado pH 7 a 25°C (lote 2)



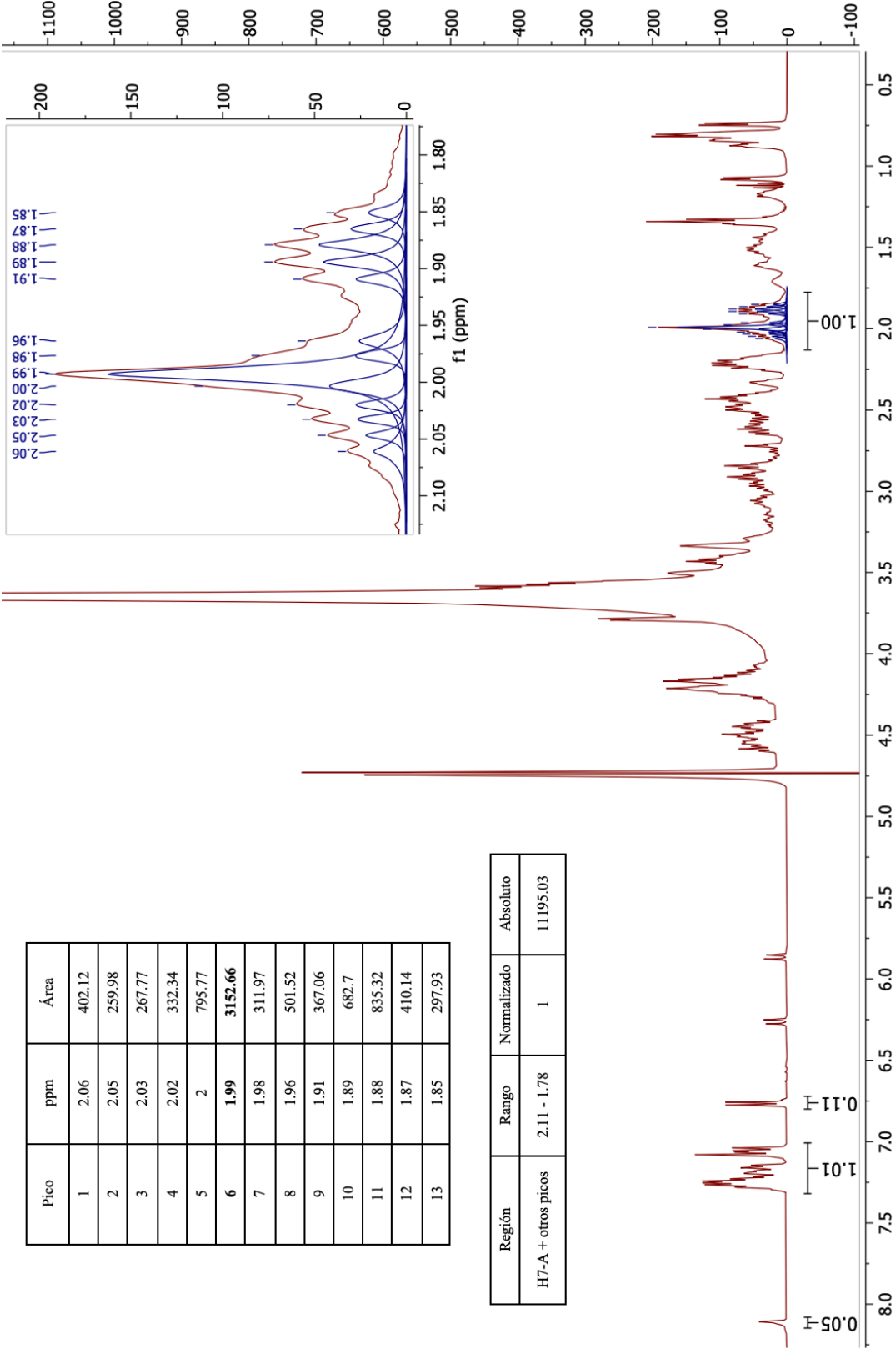
Anexo 4: Espectro ^1H -RMN del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 en buffer fosfato deuterado pH 7 a 25°C (lote 3)



Anexo 5: : Nuevo espectro ¹H-RMN generado apartir del espectro del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 con el software de MestReNova (lote 2).



Anexo 6: Nuevo espectro ¹H-RMN generado apartir del espectro del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1 con el software de MestReNova (lote 3).



Anexo 7: Síntesis del quitosano funcionalizado con L-cisteína.

La metodología empleada en esta síntesis sigue el mismo enfoque que se detalla en la sección 8.4.2, "Síntesis del quitosano funcionalizado con el péptido SBP1". La única excepción se encuentra en el paso 8.4.2.1, Etapa 2, donde se lleva a cabo la reacción del Quitosano-PEG-Maleimido (CS-PEG-MAL) con el péptido SBP1. En esta etapa específica, en lugar del péptido SBP1, se utiliza la L-cisteína. La modificación realizada consiste en lo siguiente:

Se preparó un stock de 300 mM a pH 7 de clorhidrato de L-cisteína en un tampón fosfato de pH 7. De este stock, se tomaron 207 μ L y se añadieron a los 3.5 mL de la muestra CS-PEG-MAL. Esto garantiza una reacción equimolar entre el PEG y la L-cisteína. La muestra resultante (CS-PEG-L-cisteína) se dejó disolver con un magneto durante toda la noche.

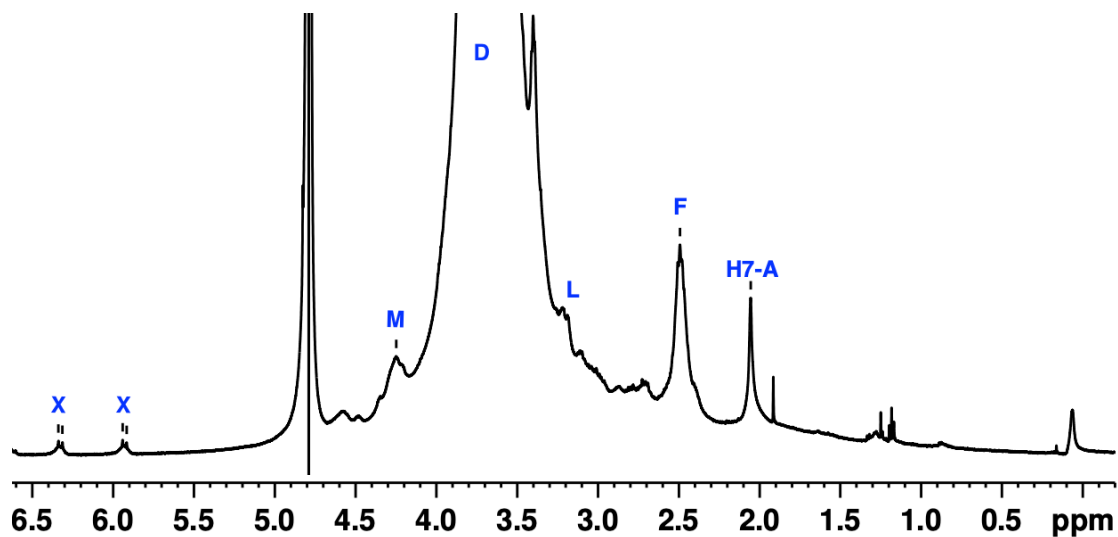
Esta modificación es única en la síntesis del quitosano funcionalizado con L-cisteína; el resto de los pasos se siguieron según lo explicado previamente.

El compuesto CS-PEG-L-cisteína se sintetizó con la intención de utilizarlo como control negativo en las pruebas de micro-aglutinación.

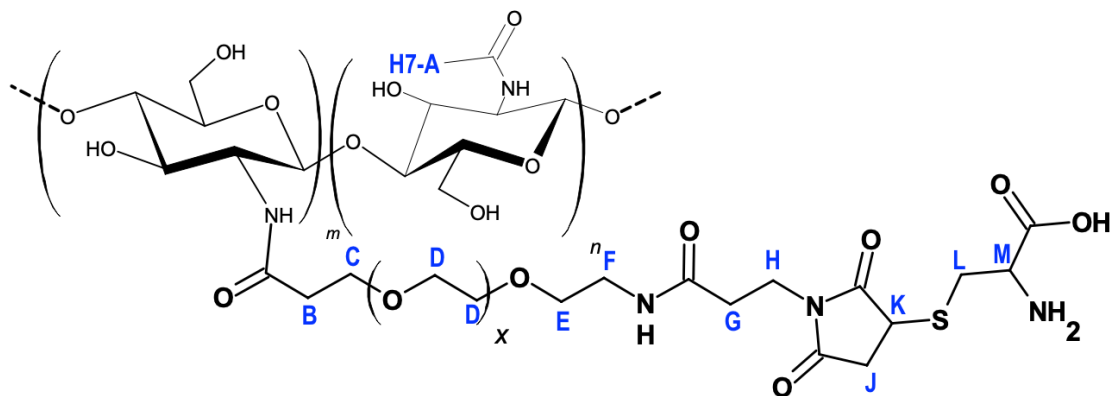
Las figuras del Anexo 7A y 7B muestran el espectro ^1H -RMN y la estructura química del CS-PEG-L-cisteína respectivamente. La identificación de los picos característicos de la muestra sintetizada se llevó a cabo utilizando el espectro ^1H -RMN y ^1H - ^{13}C HSQC del clorhidrato de L-cisteína. Al igual que en la Figura 14, el espectro del CS-PEG-L-cisteína también muestra los picos identificados como X, ya que estos corresponden a la amida que sufrió hidrólisis.

En general, se identificaron todos los picos necesarios para determinar el porcentaje de funcionalización. Este porcentaje fue del 100%, es decir toda la cisteína se unió al PEG y al quitosano (los cálculos se realizan con la Ec. 5 teniendo en cuenta un pico característico de la L-cisteína en vez el SBP1). De izquierda a derecha, el pico M pertenece al hidrógeno

del carbono beta de la cisteína unida ($\text{NH}_2\text{-CH-}$), el pico D es un pico previamente identificado como parte del PEG, el pico L corresponde a los dos hidrógenos de la cisteína unida ($\text{S-CH}_2\text{-}$). Por último, el pico H7-A es el pico de la cadena acetilada del quitosano, ya antes identificado.



Anexo 7A: Espectro ^1H -RMN del quitosano funcionalizado con L-cisteína en buffer fosfato deuterado pH 7 a 25°C.



Anexo 7B: Estructura química del quitosano funcionalizado con la L-cisteína (CS-PEG-L-cisteína).