

1. MATERIALES Y MÉTODOS CAPÍTULO 1

Aislamiento, purificación y caracterización de una bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum* LP31.

1.1 Cepas y conservación de cultivos

Se estudió la capacidad inhibitoria del sobrenadante de cultivo obtenido de la cepa *Lactobacillus plantarum* Lp31, seleccionada entre otras cepas pertenecientes a diferentes especies de bacterias del ácido láctico integrantes de la colección propia de la Cátedra de Microbiología y Biotecnología (FIQ-UNL). Esta selección se efectuó en función de su mayor actividad antagonística, determinada por el método de difusión en agar frente a diferentes bacterias alteradoras de alimentos y/o causantes de ETA (Simonetta y col., 1997). Dicha cepa fue aislada de embutidos cárnicos artesanales producidos en la región Santa Fe, Argentina. Se usaron como indicadoras de la actividad antimicrobiana, seis cepas bacterianas pertenecientes a cuatro géneros diferentes: *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21, *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3, *Pseudomonas* sp. DBFIQ P 55, *Bacillus cereus* DBFIQ B 28, *Bacillus megaterium* DBFIQ B19 y *Bacillus subtilis* DBFIQ B11, provenientes del Instituto Nacional de Microbiología “Dr. Carlos Malbrán” (Buenos Aires, Argentina) y de la Colección de la Cátedra de Microbiología y Biotecnología (FIQ-UNL).

También se usaron como indicadoras ocho cepas de bacterias del ácido láctico de colección propia: cuatro de *Lactobacillus plantarum*: *Lactobacillus plantarum* DBFIQ LP 28, 41, 38 y 22, una de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DBFIQ LB 42, una de *Lactobacillus helveticus* DBFIQ Lh15, una de *Streptococcus thermophilus* DBFIQ Sth33 y una de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL G3.

Las cepas indicadoras fueron activadas por tres siembras sucesivas a partir de estrías o conservados (0,1 mL) en 7 mL de Caldo Nutritivo (Merck) para las bacterias no lácticas, o en el mismo volumen de Caldo MRS (Biokar) para las bacterias lácticas. Mediante las técnicas de coloración simple y de Gram se chequeó la morfología de todas las cepas durante las activaciones a partir de estrías y/o conservados. Todas las cepas fueron conservadas por liofilización. Para efectuar las propagaciones, se procedió también a conservarlas por congelamiento a -20° C en caldos de cultivo apropiados (Caldo MRS -Biokar-, para las bacterias lácticas, y Caldo Nutritivo -Merck- para las bacterias no lácticas) con el agregado de un 15 % de glicerol.

1.2 Obtención del sobrenadante libre de células

La cepa *L. plantarum* Lp31 se activó por 3 siembras sucesivas en Caldo MRS (Merck), incubándola a 37 °C durante 24 horas. El cultivo final se desarrolló en 500 mL de Caldo MRS (relación de siembra: 3%), durante 16 - 20 horas a 37 °C y alcanzando un valor de densidades ópticas de 0.80 a 525 nm, correspondiente a poblaciones celulares del orden de $8 \cdot 10^8$ - $1,3 \cdot 10^9$ UFC/mL. El sobrenadante libre de células se obtuvo centrifugando a 11.000 g en centrífuga refrigerada a 5°C (Sorvall RC-2) durante 30 minutos; luego se concentró 10 veces a 70 °C en evaporador rotativo (Büchi RE 121), se ajustó el pH al valor de 5, se filtró a través de membrana Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro, y se ensayó inmediatamente o se almacenó liofilizado hasta su utilización.

1.3 Detección de la actividad antimicrobiana

Para determinar la capacidad inhibitoria se utilizó el método de difusión en agar (Tagg y col., 1971), para lo cual 19 mL de Agar Nutritivo (Difco) o de MRS (Merck) fueron sembrados con 1 mL de cultivos over-night de cada cepa indicadora activada y colocados en placas de Petri estériles. Luego del secado de las mismas, se realizaron pozos de 7 mm de diámetro y se colocaron en ellos 80 µL de la muestra de sobrenadante a ensayar. Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37 °C, procediendo luego a medir el diámetro de los halos de inhibición. A fin de eliminar el efecto inhibitorio del ácido láctico producido por *Lactobacillus plantarum* LP31, se realizó un control, colocando 80 µL de caldo MRS (Merck) concentrado diez veces, en uno de los pozos, con el pH ajustado a un valor igual al del sobrenadante de cultivo.

Para la determinación del título del sobrenadante se realizaron diluciones en serie de la muestra a ensayar, por duplicado, colocando 80 µL de cada dilución en pozos realizados sobre placas conteniendo el microorganismo sensible (Tagg y col., 1971). Las placas fueron incubadas a 37° C durante 18-24 h, examinándose al cabo de dicho tiempo la presencia de zonas de inhibición.

El título antimicrobiano se expresó en unidades arbitrarias (UA/mL), las cuales se definen como la inversa de la máxima dilución que presenta una zona definida de inhibición.

Para los ensayos de rutina sobre actividad antimicrobiana en las distintas etapas de purificación, se utilizaron las siguientes cepas: *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Cada ensayo se realizó por triplicado, expresándose los resultados como promedio de los valores obtenidos. Además, se realizaron controles (blancos de actividad) de todos los reactivos usados en las distintas etapas de purificación.

1.4 Purificación

1.4.1 Extracción en fase sólida de C18

50 mL de sobrenadante de cultivo libre de células concentrado diez veces, liofilizado, reconstituido en agua (tipo Milli-Q) y filtrado (Millipore 0.22 μm), fueron procesados sobre columnas Sep-Pak C18 (10 gr, Waters, Inc.), en alícuotas de 9 mL (volumen de siembra). Previamente, las columnas fueron equilibradas con 6 volúmenes de ACN (Baker) y luego con 6 volúmenes de agua ultrapura calidad HPLC.

Los solventes fueron previamente filtrados por membranas Millipore de 0.45 μm . Solvente A: 0,1% TFA en agua, solvente B: 0,1% TFA en ACN. Las fracciones fueron obtenidas por elución con mezclas conteniendo entre 0 y 80 % de ACN, empleándose 2 volúmenes de columna de cada mezcla. Se usó una velocidad de flujo de 2 mL/min, y se controló la elución a 215 y 280 nm en un espectrofotómetro Cecil 3000 (Lab. FOMECA, FBCB, UNL).

Posteriormente, todas las fracciones eluidas fueron combinadas, evaporadas a sequedad en evaporador rotatorio a 43°C y reconstituidas en 4 mL de agua ultrapura. Dichas fracciones fueron ensayadas en su actividad antimicrobiana frente a las cepas indicadoras. Las fracciones activas fueron reunidas y liofilizadas (Fracción I).

Se realizaron ensayos de actividad sobre blancos de reactivos, utilizando muestras de dichos solventes (agua, TFA, ACN) sometidas al mismo procesamiento post-columna que las muestras en estudio. Todas las columnas se procesaron a 25°C.

1.4.2 Determinación del contenido total de proteína

El contenido proteico de las distintas fracciones fue estimado mediante el método Bradford (Bradford y col., 1976).

El reactivo de Bradford fue preparado disolviendo 100 mg de Coomassie Brilliant Blue (Sigma) en 50 mL de etanol al 95 %, al cual se agregaron luego 100 mL de ácido

fosfórico al 85 % (p/v). La solución se llevó a un volumen final de 1 litro con agua ultrapura, grado Milli Q. Para la realización del ensayo se mezclaron 5 mL de reactivo de Bradford con 100 μ L de muestra a ensayar, se agitó mediante vortex y se midió la absorbancia a 595 nm contra blanco de reactivo. La determinación de la concentración se realizó ingresando a una curva de calibrado el valor medido en densidades ópticas de la muestra incógnita. La curva fue realizada empleando albúmina bovina (Sigma) en el rango de 0 a 100 μ g.

1.4.3 Estimación del peso molecular del compuesto activo

Con la finalidad de determinar en forma aproximada el peso molecular del compuesto activo, 10 mL de Fracción I, con una concentración de 0,25 mg/mL, fue sometida a ultrafiltración empleando tubos Centriprep (concentrador centrífugo, Amicon, cut-off 3000 Da), durante 65 minutos a 25°C y 4700 rpm. Luego se ensayó la actividad antimicrobiana de los volúmenes filtrado y retenido obtenidos luego de la centrifugación, frente a las cepas indicadoras usadas en los ensayos de rutina.

1.4.4 Cromatografía de filtración por geles

La fracción activa (Fracción I) obtenida de la extracción en fase sólida, se aplicó en alícuotas de 12 mL (volumen de siembra correspondiente al 5-10% del volumen del lecho) a una columna de Sephadex G-25 medium (Pharmacia, Uppsala, Sweden) de 50 x 2,5 cm, conteniendo 50 g de soporte con un lecho de 41,5 cm, equilibrada con dos volúmenes de columna (500 mL) de buffer acetato de amonio 30 mM, pH 5, previamente filtrado (Millipore 0.45 μ m) y desgasificado.

La columna fue eluida con el mismo buffer a una velocidad de flujo de 3 mL/min, mediante el uso de una bomba peristáltica (Cole-Parmer Instrument Co. Chicago, USA). Se recolectaron fracciones de 5 mL, cuyas absorbancias fueron leídas a 220 nm en un espectrofotómetro Cecil 3000 (Lab FOMEC, FBCB). Luego fueron concentradas a 3 mL mediante evaporador rotatorio, a una temperatura de 43 °C, y ensayadas inmediatamente en su actividad antibacteriana junto a un blanco del buffer frente a las cepas indicadoras.

Las fracciones que presentaron la mayor actividad fueron reunidas en dos nuevas Fracciones designadas como IIA y IIB.

Se determinó el volumen muerto de la columna (V_0), sembrando 12,5 mL de una solución 20 mg/mL de Albúmina 96 % (Sigma), y se eluyó con el mismo buffer usado para la equilibración, a una velocidad de flujo de 3 mL/min. Se recolectaron fracciones de 5 mL, las cuales fueron leídas a 220 nm. Se determinó el volumen de buffer necesario para la elución de compuestos de peso molecular menor a 1000 Da sembrando una muestra diluida de azul de bromofenol $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ (PM: 669,96 g/mol). Todas las columnas se procesaron a 25 °C.

1.4.5 Sensibilidad a proteasas de las Fracciones IIA y IIB

Con el fin de determinar la sensibilidad a proteasas de los compuestos activos presentes en las Fracciones IIA y IIB, obtenidas de la purificación mediante cromatografía de filtración por geles, alícuotas de 0,5 mL de ambas muestras fueron esterilizadas por filtración (Millipore 0,22 μ m) e incubadas a 30° C por 4 h con igual volumen de cada una de las soluciones enzimáticas en una concentración final de 0.5 mg/mL. Las enzimas utilizadas fueron tripsina (Sigma) en buffer fosfato de sodio pH 7.5, pepsina (Sigma) en buffer fosfato de sodio pH 3.5 y papaína (Sigma) en buffer fosfato de sodio pH 6.2. Luego se determinó la actividad antimicrobiana residual de las fracciones tratadas mediante el ensayo de difusión en agar. A fin de asegurar la ausencia de inhibición debida a las enzimas ensayadas, se efectuaron también ensayos de difusión en agar con las diferentes soluciones enzimáticas.

1.4.6 Análisis de la Fracción IIA mediante Cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

La Fracción IIA fue diluida 5 veces en TFA al 0,1 % en agua (Solvente A) y analizada inyectando volúmenes de 7 μ L en una columna de HPLC analítica Delta Pak (Waters) de C18 (5 μ m, 300 Å, 3,9 x 150 mm), en un equipo Gilson (USA) a un flujo de 0.5 mL/min. Se emplearon dos sistemas solventes: (A) 0,1 % TFA/H₂O y (B) ACN/H₂O conteniendo 0,1 % de TFA. Programa utilizado: isocrático, 3% de solvente B durante 15 minutos, luego 3-60% de solvente B en 30 minutos. El procedimiento cromatográfico se siguió a 220 y 256 nm.

1.4.7 Electroforesis capilar

Asimismo, se realizaron análisis por EC de la Fracción IIA, en un equipo Thermo Separation Products (Laboratorio modelo Fomec de Química de la FBCB), empleando sistema de inyección por vacío, capilar de 70 cm de longitud y 45 μm de diámetro interno, en buffer tetraborato de sodio 20 mM, pH 8, con tiempos de inyección de 2 segundos y de corrida de hasta 10 minutos. La detección se realizó midiendo absorbancia a 220 y 280 nm.

1.4.8 Modo de acción de las Fracciones IIA y IIB

A fin de determinar si el modo de acción de las Fracciones IIA y IIB era bactericida o bacteriostático, se adicionaron por separado 5 mL de cada fracción en estudio y una mezcla constituida por un 50 % de cada una a 50 mL de cultivos en Caldo Nutritivo (Merck) en fase logarítmica de *Pseudomonas* sp., con una concentración celular inicial del orden de 10^6 UFC/mL, incubándolos luego a 37°C durante 24 h.

A intervalos apropiados de tiempo se determinó el número de células viables, comparándolo con el correspondiente a la evolución normal del microorganismo, en el mismo medio sin el agregado de las fracciones (cultivo control). Para determinar el número de células viables, se realizaron distintas diluciones del cultivo en desarrollo y del cultivo control, en soluciones de agua de peptona estéril (desde $1/10^2$ hasta $1/10^7$) y se sembró luego 1 mL de cada dilución en placas de Petri a las que se agregaron 10 mL de Agar Nutritivo (Difco) fundido y enfriado a 45 °C. Cada dilución plaqueada se incubó a 37 °C durante 24 h. Al cabo de ese tiempo se eligieron las placas más apropiadas (las que contenían entre 30 y 300 colonias) y se contó el número de colonias. En todos los casos, las determinaciones se realizaron por duplicado.

1.4.9 Cromatografía de intercambio catiónico

Con la finalidad de evaluar la posibilidad de utilizar intercambio iónico como un paso intermedio en el esquema de purificación, se realizó sobre la Fracción IIA cromatografía de intercambio catiónico. Se emplearon columnas de 2.4 x 10 cm rellenas de 20 g de CG-50 (Sigma), resina de poliestireno de 100-200 μm (intercambiador catiónico débil), previamente lavada mediante agitación al vacío con metanol puro, activada luego con ácido clorhídrico 2M y equilibrada con buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6.8 (solvente A). Se aplicó la Fracción IIA liofilizada y reconstituida

en 13 mL de solvente A. La elución se realizó empleando un gradiente de 0 a 80% de solvente B (buffer fosfato de sodio 20 mM pH 6.8 en ClNa 1M) en solvente A, a una velocidad de flujo de 1mL/min, a 20°C. La elución se controló por lectura a 220 y 280 nm en un espectrofotómetro UV-visible Cecil 3000 (LMQ1-Fomec, FBCB). Se recolectaron 6 fracciones de 5 mL de cada porcentaje del gradiente aplicado, las cuales fueron guardadas a -20°C y liofilizadas, hasta el momento de determinar su actividad antimicrobiana. Posteriormente, las fracciones que presentaron actividad fueron controladas por HPLC analítico y Electroforesis capilar, bajo las mismas condiciones citadas en el ítem 1.4.6 y 1.4.7.

1.4.10 Purificación de la Fracción IIA mediante HPLC.

La Fracción IIA obtenida de la Cromatografía de filtración por geles fue diluida 5 veces en TFA al 0,1 % en agua (Solvente A) y aplicada en volúmenes de 0.5 a 1 mL en una columna de HPLC semipreparativa de fase reversa, C18 (Vydac, 10 x 250 mm, 10 μ m, 300 Å), empleando dos sistemas solventes: (A) TFA/H₂O 0,1 % y (B) ACN/H₂O conteniendo 0,1 % de TFA.

La elución se realizó a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. El gradiente aplicado fue el mismo utilizado en los controles analíticos citados anteriormente. Los picos obtenidos en cada corrida fueron reunidos en pools (IIA₁, IIA₂, IIA₃, IIA₄, IIA₅) junto al lavado de la columna con 80 % de ACN, evaporados a sequedad, redisueltos en el mínimo volumen de agua ultrapura y ensayados en su actividad antimicrobiana, y luego liofilizados para su conservación y posteriores estudios.

La fracción que presentó actividad se denominó Fracción IIA₁. Una alícuota de dicha fracción fue analizada por HPLC empleando una columna analítica de C18 (Kromasil, 150 x 10 mm, 100 Å, 5 μ m), adecuada para péptidos hidrofílicos, a una velocidad de flujo de 0.8 mL /min, lectura a 220 nm, en modo isocrático. Se recolectaron manualmente fracciones de 1,6 mL numeradas como t₁, t₂, t₃, t₄, t₅, t₆ y t₇; sobre las cuales se realizaron análisis por Espectrometría de masas, Electroforesis capilar y determinación del contenido proteico en las mismas condiciones citadas en los ítems previos correspondientes.

1.5 Caracterización del péptido mayoritario

1.5.1 Espectrometría de masas (Técnica MALDI-TOF)

La determinación del peso molecular de los componentes presentes en las fracciones obtenidas por HPLC-C18, según se describió en el punto anterior, fue realizada mediante la técnica MALDI-TOF en un equipo Voyager DE-STR Biospectrometry Workstation (Perspective Biosystems). Este instrumento opera con un láser de nitrógeno a 337 nm. La solución de la matriz empleada se preparó disolviendo 10 mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en 70/30 (v/v) ACN/H₂O en 1 μ L de TFA. Se colocaron 2 μ L de una mezcla matriz/muestra en la proporción de 1:1 sobre el plato de análisis para cada adquisición de los datos de peso molecular.

Los espectros (MALDI-TOF) obtenidos fueron calibrados empleando la misma matriz y la mezcla de péptidos standards Cal Mix 1 y Cal Mix 2 (Applied Biosystems).

1.5.2 Análisis de aminoácidos

Para la determinación de la composición aminoacídica porcentual en nmoles del péptido detectado, una alícuota del mismo fue hidrolizada en HCl 6 N bajo vacío a 155°C durante 45 minutos. Luego la muestra fue evaporada y disuelta en buffer citrato de sodio 0.06 M, pH 2. El análisis de aminoácidos fue realizado en un analizador Beckman System 6300.

2. MATERIALES Y MÉTODOS CAPÍTULOS 2 (a) y 3 (b)

(a) Síntesis química y estudios conformacionales de un análogo sintético de Plantaricina 149 (Pln149a).

(b) Diseño de una bacteriocina híbrida y Estudios Estructura-Función.

2.1. Síntesis química en fase sólida de los péptidos antimicrobianos

Las secuencias de los péptidos empleados en este trabajo se presentan en la Figura 7. Se sintetizó un análogo de Plantaricina 149 (Pln149a) y una bacteriocina híbrida (PH) formada por la región N-terminal de Pediocina PA-1 (residuos 1-18) y los residuos 6-22 de Pln149a: (PA-1(1-18)- Pln149a (6-22)).

Tanto Pln149a como PH y las secuencias nativas que lo constituyen fueron sintetizadas empleando la química del 9-fluorenil-metoxycarbonilo (Fmoc) en fase sólida (Merrifield R.B.,1995), según las secuencias reportadas en la literatura para Plantaricina 149 (Kato y col., 1994) y para Pediocina PA-1 (Henderson y col., 1992).

Figura 7: Secuencias correspondientes a los péptidos sintetizados

Pln149a: YSLQMGATAIKQVKKLFKKKGG**-amida PM: 2425.993 Da**

PH: **KYYGNGVTCGKHSCVDW**GATAIKQVKKLFKKKGG**-amida PM: 3789.47 Da**

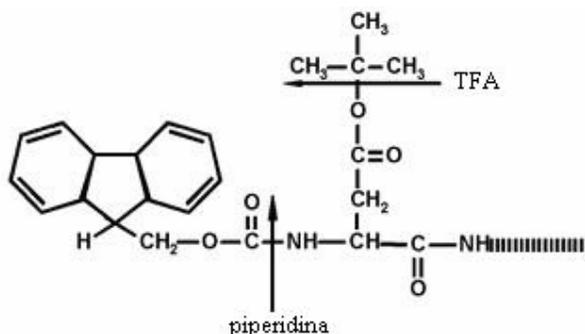
Extremo N-terminal del PH: **KYYGNGVTCGKHSCVDW-amida PM: 2005.245 Da**

Extremo C-terminal del PH: **GATAIKQVKKLFKKKGG-amida PM: 1803.248 Da**

Pentapéptido: YSLQM-amida PM: 641.768 Da

2.1.1 Reactivos utilizados

La síntesis en fase sólida se realiza en el sentido C a N, es decir que el primer aminoácido que se acopla al soporte polimérico corresponde al residuo C terminal de la secuencia. Los aminoácidos utilizados en la síntesis poseen el grupo α -amino protegido con el grupo Fmoc (Figura 8), y en el caso de los aminoácidos con un tercer grupo funcional, éste también se encuentra protegido para evitar reacciones indeseables.

Figura 8: Grupo Fmoc, protector del grupo α -NH₂

Los α -aminoácidos protegidos con el grupo Fmoc fueron adquiridos a Calbiochem-Novabiochem, Corp. (California, USA). Se emplearon los siguientes derivados protegidos en sus cadenas laterales para los aminoácidos trifuncionales: Cys(Trt), Tyr(tBu), Asp(OtBu), Ser(tBu), Glu(OtBu), His(Trt), Asn(Trt), Arg(Pmc), Gln(Trt), Lys(Boc), Trp(Boc). Los protectores de los grupos funcionales de las cadenas laterales fueron seleccionados de acuerdo a la secuencia a sintetizar.

La síntesis se llevó a cabo empleando la 4-(α -[2,4-dimetoxifenil]-Fmoc-aminometil) fenoxi-resina (Figura 9a) para la preparación de péptidos tipo amida. El soporte consiste en un polímero de poliestireno con 1 % de divinilbenceno. Pln149a fue sintetizada sobre 200 mg de resina con una capacidad de 0,58 mmol/g, en una escala de síntesis de 0.116 mmol.

En el caso del PH y sus fragmentos N-terminal y C-terminal, la capacidad de la resina utilizada fue de 0,4 mmol/g, siendo las escalas de síntesis de 0.12 mmol para el PH y su extremo C-terminal y 0.16 para el extremo N-terminal. Para el péptido de 5 aminoácidos se emplearon 100 mg de resina Rink Amida AM (Figura 9 b), con un grado de sustitución de 0.66 mmol/g y en una escala de síntesis de 0.066 mmol.

Para la síntesis del péptido híbrido se pesaron 300 mg de resina y se comenzó la síntesis a partir del aminoácido C-terminal de la secuencia. Luego de acoplar los primeros 17 aminoácidos, la secuencia acoplada a la resina correspondía al péptido C-terminal. El solvente de la síntesis fue DMF. Para la activación "in situ" del grupo carboxilo se empleó PyBOP (NovaBiochem) (Figura 10) en presencia de N-metilmorfolina (NMM) como catalizador.

Figura 9: Resinas utilizadas en la síntesis: (a) 4-(α -[2,4- dimetoxifenil]-Fmoc-aminometil) fenoxi Resina), (b) Rink Amida AM.

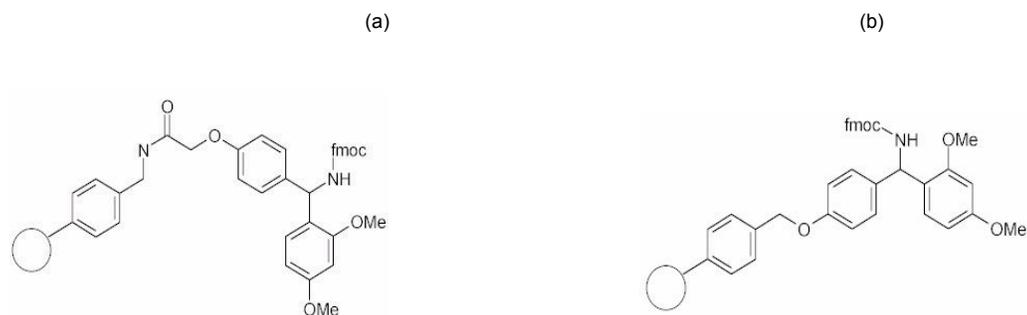
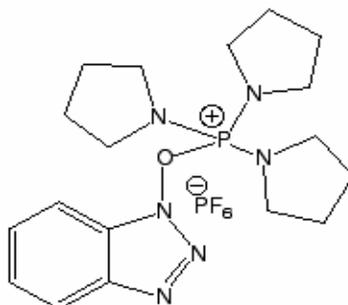


Figura 10: Activador PyBOP



Tanto la resina como el activador fueron adquiridos a Calbiochem-Novabiochem, Corp. (California, USA). La NMM así como los demás reactivos y solventes empleados en la síntesis fueron de alta pureza: piperidina, ninhidrina, TFA, DCM, metanol, fenol, EDT, TIS y éter etílico. Solamente la DMF fue purificada previamente mediante destilación fraccionada al vacío y conservada sobre tamices moleculares. La presencia de aminas en este solvente puede eliminar los grupos Fmoc de los aminoácidos y el agua presente producir la hidrólisis de la DMF. Las aminas presentes pueden detectarse mediante la reacción de Sanger¹. El resto de los solventes utilizados fueron de calidad grado HPLC (Fisher o Aldrich).

¹Reacción de Sanger: Para este ensayo, se agregaron 3,5 μ L de DNFB a 5 mL de etanol absoluto (Reactivo A). Finalmente se mezcló 1 mL de este reactivo con igual volumen de DMF a ensayar, dejando transcurrir la reacción en oscuridad por 30'. Se realizó un blanco (Reactivo A). La presencia de aminas se detectó por el desarrollo de un color amarillo en la solución, mientras que una solución sin colorear indicó la ausencia de éstas (Chan y col., 2000).

2.1.2 Etapas de la síntesis

Durante la síntesis la cadena peptídica en formación está covalentemente unida por una molécula espaciadora (linker) al soporte insoluble, el cual se encuentra solvatado por el solvente orgánico DMF. Como la cadena peptídica está unida a la resina, los reactivos pueden ser eliminados simplemente por filtración. La formación de la cadena se logra mediante la repetición de ciclos de desprotección, lavados, activación del grupo carboxilo, acoplamiento y monitoreo del acoplamiento.

La síntesis de los péptidos antimicrobianos se llevó a cabo en forma manual, empleando como reactores jeringas de polipropileno, con disco filtrante de poliamida (CSPS Pharmaceuticals, Inc, USA). La DMF es un solvente de gran capacidad solvatante que estabiliza las cadenas en formación. Por ello al inicio de cada día de trabajo, la resina se solvató con DMF (2x 15'); en situaciones de colapsamiento de la resina, se sustituyó la DMF por TFE o TFE/DCM 1:4. El grupo protector del alfa-amino (Fmoc) fue eliminado en las etapas de desprotección empleando piperidina al 20 % en DMF (v/v) (2x 15'). La reacción transcurre a través de un mecanismo de eliminación tipo beta.

El grupo Fmoc liberado reacciona con la piperidina en exceso para formar el aducto dibenzofulveno-piperidina², que presenta la característica de absorber radiación UV a 301 nm, por lo que puede utilizarse para el monitoreo de esta etapa. La medición espectrofotométrica del aducto permite cuantificar la cantidad de grupos amino libres luego de la desprotección, y en forma indirecta la cantidad de aminoácido acoplado en el paso anterior. Con posterioridad a la eliminación del Fmoc se realizaron lavados con DMF (lavados A: 4x30" y lavados B: 4x30").

La reacción de acoplamiento se llevó a cabo mediante activación con PyBOP, y utilizando una base débil como catalizador, NMM al 3% (v/v) en DMF. Este reactivo permite obtener ésteres activos del hidroxibenzotriazol y reduce las posibilidades de racemización. El éster formado sufre rápidamente una sustitución nucleofílica sobre el carbono acílico, con formación de un enlace amida entre la cadena peptídica y el residuo aminoacídico. Tanto el activador como el aminoácido correspondiente se pesaron según la cantidad calculada para la escala de síntesis, más un exceso del 100%.

La mezcla aminoácido-activador se mantuvo en seco a -20°C , agregándose la solución conteniendo el catalizador en el momento previo a la realización de la reacción de acoplamiento.

Durante la reacción de acoplamiento la resina se mantuvo homogéneamente suspendida en la mezcla de reacción mediante agitación suave por 30 minutos. Durante el crecimiento de la cadena peptídica anclada a la resina se pueden formar estructuras tipo secundarias o agregados con cadenas peptídicas vecinas o bien con el soporte polimérico; esto ocasiona una disminución de la velocidad de las reacciones implicadas en la síntesis (desprotección y acoplamiento), y consecuentemente la formación de las secuencias incompletas, sumado a un bajo rendimiento de la síntesis. El monitoreo de la síntesis se realizó utilizando el método de Kaiser³. Cuando la reacción de la ninhidrina dio positiva se realizó un segundo acoplamiento, mientras que cuando el resultado fue negativo, se reinició un nuevo ciclo de síntesis a partir de la reacción de desprotección. En algunos casos se realizaron tres acoplamientos sucesivos, como ocurrió con el residuo número 13 incorporado (correspondiente a los residuos I₂₃ de PHL e I₅ de C-T, según secuencia presentada en Figura 7), luego se bloquearon los grupos amino libres mediante acetilación (capping). Se utilizaron 952 μL de anhídrido acético + 1,7 mL DIEA + 2 mL DMF. Preparado el reactivo, se cargó la mitad de la solución en la jeringa y se agitó por un período de 15'. Se repitió nuevamente con la mitad restante de reactivo, para finalmente realizar 6 lavados con 3 mL de DMF durante 30". Se realizó la prueba de la ninhidrina, la cual da negativa si la acetilación fue completa. Al final de cada día de síntesis la resina se lavó adecuadamente con DCM (6x30") y se conservó a 4°C hasta el día siguiente.

²La N-(9-fluorenilmetil) piperidina formada durante la desprotección del alfa-amino absorbe a 301 nm. Para cuantificar la cantidad de Fmoc liberado se deben recolectar las soluciones provenientes de las reacciones de desprotección y de los lavados subsecuentes, diluyéndose a un volumen de 50 mL; una alícuota de esta solución se diluye 100 veces con DMF y se lee la absorbancia a 301 nm. Considerando que la lectura del primer aducto corresponde al número total de grupos aminos disponibles en la resina, se puede conocer con qué eficacia se ha realizado cada acoplamiento comparando la lectura de ese aducto con la del aducto anterior (Chan y col., 2000).

³ Método de Kaiser: la reacción de la ninhidrina puede utilizarse para la detección cualitativa y cuantitativa de los grupos amino libres remanentes luego de la reacción de acoplamiento. Es suficientemente sensible como para distinguir entre un 99,8% y 99,9% de eficiencia de la reacción de acoplamiento. Para el ensayo debe tomarse una muestra de resina, adicionar los reactivos y calentar a 100°C por 5 minutos. Un ensayo positivo se indica con un color azul oscuro en la resina y sobrenadante, mientras que un acoplamiento completo resulta en una muestra sin colorear. La muestra se compara contra un blanco de reactivos. (Chan y col., 2000).

2.1.3 Desprotección y clivaje

Completada la incorporación de todos los residuos aminoacídicos de cada secuencia en particular, se realizó la desprotección del último aminoácido y las resinas se lavaron, primero con DMF (Lavados A y B), y después con una mezcla de DCM/metanol (3: 2) (6 x 30'' con agitación). Finalmente se dejaron secar en vacío.

Luego, los péptidos fueron separados de la resina (clivaje) y simultáneamente los protectores de cadenas laterales fueron eliminados. Esta etapa se realizó con TFA, que produce la acidólisis que libera al péptido totalmente desprotegido, en presencia de agentes de captura (scavengers). La función de estos últimos es atrapar los intermediarios reactivos, generalmente iones carbonio, que se generan durante la eliminación de los protectores de las cadenas laterales. Estas especies reactivas podrían atacar y modificar químicamente a residuos de aminoácidos particularmente sensibles, alterando las propiedades de la secuencia sintetizada.

La mezcla de clivaje y desprotección utilizada fue TFA/H₂O/EDT/TIS (94,5:2,5:2:1). El tiempo óptimo de clivaje se determinó por HPLC. A tal fin se tomaron muestras de clivaje a distintos tiempos y se compararon las áreas correspondientes al péptido protegido versus péptido desprotegido, resultando ser 3 horas el óptimo para todos los péptidos sintetizados. Subsecuentemente, los péptidos fueron aislados de la mezcla de reacción por precipitación con éter etílico frío, lavados cuatro veces con el mismo solvente a baja temperatura, centrifugados y liofilizados.

2.2 Purificación

Pln149a fue purificada mediante HPLC semipreparativo. Las muestras se solubilizaron en agua Milli Q conteniendo 0.1 % de TFA. La solución de péptido (5mg/mL) se aplicó a una columna Vydac 218TP104 C18 (250 x 10 mm ,300 Å, 10 µm) en un equipo Gilson (USA) equilibrada con dos sistemas solventes (A) 0.1% TFA/H₂O y (B) ACN/H₂O conteniendo 0.08 % TFA, velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de inyección 1 mL. Programa aplicado: 0-5min, 10-25 % B; 5-25 min, 25-40 % B; 25-30 min, 40-60 % B. El monitoreo se realizó a 220 nm. Luego se liofilizó dos veces y se almacenó a -20 °C.

2.3 Caracterización de los productos de síntesis

2.3.1 Control analítico por HPLC

El análisis de la pureza de los péptidos sintetizados se realizó mediante HPLC empleando una columna analítica Delta Pak (C18) Waters (300 Å, 3.9 x 150 mm, 5µm) en un equipo Gilson (USA); se trabajó a una velocidad de flujo de 0.8 mL/min y aplicando para cada péptido en particular un gradiente de elución apropiado (detallado debajo de cada figura, en el capítulo de Resultados); empleando los siguientes solventes: solvente A: agua con 0.1 % TFA y solvente B: ACN con 0.08 % TFA. La detección se realizó a 220 nm.

2.3.2 Espectrometría de masas

Los espectros de masas de las fracciones en estudio fueron realizados mediante la técnica MALDI-TOF en un equipo Voyager DE-STR Biospectrometry Workstation de Perspective Biosystems. Cada espectro se obtuvo con un promedio de 100 impactos de laser nitrógeno a 337 nm en modo reflector y polaridad positiva.

Se empleó una solución matriz preparada mediante disolución de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en una mezcla de ACN/agua (70/30, v/v) con 1 µL de TFA. Se utilizaron 2 µL de una mezcla 1:1 de solución matriz a muestra para la realización del espectro. El equipo se calibró externamente con una mezcla de péptidos standard, Cal Mix 1 y 2 (Applied Biosystems).

2.3.3 Secuenciamiento

La secuencia de Pln149a fue confirmada mediante degradación automática de Edman en un secuenciador Shimadzu PPSQ-23 A.

2.4 Ciclización de los péptidos sintéticos por formación de puentes disulfuro

La oxidación de los residuos C₉ y C₁₄ (por formación de un puente disulfuro intramolecular) en los péptidos híbrido y N-terminal se realizó empleando una solución de péptido (0,1 mg/mL) en buffer bicarbonato de amonio 0.1 M (pH: 7,9) y agitación al aire a 25 °C, hasta que la reacción se completó (aproximadamente 10 a 12 horas).

Para el caso del péptido híbrido, trabajando con concentraciones de péptido de 1 mg/mL, se observaron problemas de polimerización por formación de puentes disulfuro intercatenarios. Los péptidos ciclados fueron fraccionados, liofilizados y conservados a

-20°C hasta su utilización. El monitoreo de la reacción de oxidación se realizó mediante la reacción de Ellman⁴ (reactivo que permite detectar en forma cualitativa y/o cuantitativa grupos tiol). Simultáneamente se realizaron análisis por HPLC analítico, los que resultan particularmente importantes cuando los tiempos de retención del péptido reducido/oxidado son diferentes.

⁴ Reacción de Ellman: ácido 5-5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB), reacciona cuantitativamente con los grupos sulfhidrilo libres alifáticos para generar un anión de color amarillo. La reacción se emplea para controlar el progreso de las reacciones de oxidación al aire. Se disuelven 40 mg de DTNB en 10 mL de buffer fosfato de sodio 0.1 M, pH: 8. A distintos tiempos se toman alícuotas de mezcla reactiva que se diluyen a 3 mL con buffer de manera de obtener 0.1 a 0.2 μ moles de péptido, se agrega 0.1 mL de reactivo de DTNB y al cabo de 15 minutos se lee la absorbancia a 410 nm. Se emplea una solución de referencia de DTNB preparada de la siguiente manera: 0.1 mL de DTNB en 3 mL de buffer. Se puede calcular la concentración de grupos sulfhidrilos libres empleando la siguiente ecuación: $[SH] = [A_{410}(\text{muestra}) - A_{410}(\text{referencia})]/13650$, (Chan y col., 2000).

2.5 Cepas sensibles y evaluación de la actividad antimicrobiana

2.5.1 Cepas utilizadas y conservación de cultivos

De la colección de la Cátedra de Microbiología y Biotecnología (FIQ, Universidad Nacional del Litoral, Argentina) se utilizaron: cuatro cepas de *Lactobacillus plantarum* identificadas como DBFIQ LP 22, DBFIQ LP 28, DBFIQ LP 38 y DBFIQ LP 41; *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DBFIQ LB 42; *Pseudomonas* sp. DBFIQ P 55; *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21; *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3; *Bacillus cereus* DBFIQ B 28; y cuatro cepas del género *Enterococcus* identificadas como DBFIQ E 13, DBFIQ E 23, DBFIQ E 24 y DBFIQ E 25. De la colección de CERELA (CONICET, Argentina): *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CRL G3. De la American Type Culture Collection: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. De la colección del Departamento de Tecnología (Universidad Nacional de Luján, Argentina): tres cepas de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* identificadas como NCDO 529, DTUNLu 223 y DTUNLu 245; *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* NCDO 543; *Listeria monocytogenes* tipo I DTUNLu 328; *Listeria monocytogenes* DTUNLu 335 BsAs; *Listeria seeligeri* DTUNLu 340; *Listeria welshimai* DTUNLu 213; *Listeria innocua* CIP 8011; *Listeria innocua* DTUNLu 13-2 y *Listeria innocua* DTUNLu CRL5.

Para efectuar la conservación de estas cepas, se procedió a congelarlas a -20° C en caldos de cultivo apropiados: en Caldo Nutritivo (Merck) para las bacterias no lácticas, Caldo MRS (Merck) o Caldo M 17 (Merck) para las bacterias lácticas, en ambos casos con el agregado de un 15 % de glicerol como agente crioprotector. También se las conservó por liofilización. La pureza de las cepas pertenecientes al

género *Listeria* fue controlada, previo a su utilización como cepas indicadoras, mediante la realización de estrías en medios Oxford y Palcam (Biokar), a partir de cultivos de sus respectivos conservados. Estos dos medios tienen la característica de ser selectivos para el desarrollo de *Listeria*, que es evidenciado por la aparición de color negro alrededor de las colonias.

2.5.2 Condiciones de cultivo

Las bacterias no lácticas fueron reactivadas mediante tres resiembras sucesivas de 24 h cada una, obteniendo luego un cultivo over-night final (16-20 h) desarrollado a 37°C en Caldo Nutritivo (Merck). Las bacterias del ácido láctico fueron propagadas también por tres resiembras sucesivas de 24 h cada una, y se utilizó un cultivo over-night final desarrollado a 37°C en Caldo MRS (Merck) o en Caldo M17 (Merck). Todos los cultivos de las cepas indicadoras se ajustaron a valores de DO= 0.80 a 525 nm, lo que corresponde a poblaciones celulares del orden de $8 \cdot 10^8$ - $1,3 \cdot 10^9$ UFC/mL. Mediante las técnicas de coloración simple y de Gram se controlaron las características morfológicas de todas las cepas durante las activaciones a partir de cultivos en estrías y/o conservados.

2.5.3 Detección de la actividad antimicrobiana

Para determinar la capacidad inhibitoria se utilizó el método de difusión en agar (Tagg y col., 1971), para lo cual 19 mL de Agar Nutritivo (Difco) o Agar MRS (Merck) fueron sembrados con 0.5 mL de cultivos over-night de cada cepa indicadora reactivada previamente y colocados en placa de Petri estériles. Luego del secado de las mismas, se realizaron pozos de 7 mm de diámetro y se colocaron en ellos 80 μ L de la muestra a ensayar. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C, procediendo luego a medir el diámetro de los halos de inhibición. La actividad antimicrobiana se determinó siempre a pH 5, excepto para las cepas de *L. monocytogenes* DBFIQ LM 3 y *S. aureus* DBFIQ S 21, con las cuales se realizaron además ensayos de inhibición a pH 7.4, en buffer fosfato de sodio 50 mM. Cada ensayo fue realizado por triplicado y los resultados se expresaron como el promedio de los valores medidos.

Se determinó el título del análogo sintético frente a *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3 y *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21, el cual se define como la recíproca de la mayor dilución de una solución de la muestra con la cual se observa inhibición de la

cepa indicadora (Tagg y col., 1971). Se partió de una solución 1mg/mL de Pln149a y las diferentes muestras obtenidas por dilución fueron evaluadas por el ensayo de difusión en agar, siguiendo la metodología descrita anteriormente.

2.5.4 Determinación de la CIM (concentración inhibitoria mínima)

La actividad antimicrobiana de los péptidos diseñados fue medida mediante la CIM₅₀ (concentración inhibitoria mínima) que se define como la menor concentración de péptido que reduce en más del 50 % el crecimiento de la cepa sensible ensayada. Para ello se empleó el método modificado para péptidos antimicrobianos catiónicos, basado en el clásico método de microtitulación por dilución en caldo, propuesto por el laboratorio de R.E.W. Hancock (Amsterdam, D., 1996; Wu y col., 1999; Steinberg y col., 1997).

Se realizaron diluciones crecientes del péptido antimicrobiano a ensayar en solución al 0.01% de ácido acético y 0.2% BSA en tubos de polipropileno de la siguiente manera:

- a) Se disolvió el péptido en agua destilada de modo de lograr una concentración correspondiente a 20 veces la concentración máxima a ensayar. Luego se diluyó en igual volumen de solución al 0.02% de ácido acético y 0.4% BSA, de modo de lograr 10 veces la concentración máxima de péptido a ensayar.
- b) Se realizaron diluciones crecientes por duplicado en 0.01% de ácido acético, 0.2% de BSA, logrando las siguientes concentraciones: 1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5 y 2.5 µg/mL. Por otro lado se preparó la suspensión bacteriana reactivando la cepa a utilizar mediante tres resiembras sucesivas de 24 h cada una, obteniendo luego un cultivo over-night final (16-20 h) desarrollado a 37° C en MHB (Merck). Luego el cultivo final se diluyó con caldo MHB de manera de alcanzar una población celular de $2 - 7 \times 10^5$ UFC /ml.
- c) Se dispensaron 100 µL de suspensión bacteriana en los pozos 1 a 11 de una placa de ELISA estéril, dejando el pozo 12 sin suspensión y colocando en su lugar 100 µL de MHB (control de esterilidad y blanco).
- d) Luego se añadieron 11 µL de cada dilución de péptido a cada pozo desde el 1 al 10 (el pozo 11 es el control de la suspensión bacteriana sola, sin péptido). Se incubó la placa a 37°C por 18-24 h, y se leyó en lector de Elisa.

2.5.5 Estudio del modo de acción de los péptidos activos

A fin de estudiar el modo de acción de los péptidos sintetizados sobre las cepas sensibles para determinar si el mismo era bactericida o bacteriostática, se disolvieron 2mg/mL del péptido en estudio, en 10 mL de un cultivo a pH 7.4, en Caldo Nutritivo (Merck) y en fase logarítmica (concentraciones celulares iniciales ubicadas, en la mayoría de los ensayos, en el rango comprendido entre $8 \cdot 10^5$ y $1 \cdot 10^7$ UFC/mL), de la cepa sensible en estudio.

Posteriormente se determinó el número de células viables a intervalos de 6 h, durante un período total de 24 h, aplicando el método de diluciones sucesivas, siembra en profundidad en placas de Agar Nutritivo (Merck) y posterior conteo. Las cepas indicadoras empleadas fueron: *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21 y *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3 para Pln149a, y solamente *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3 para el PH y su extremo C-terminal.

Se realizaron ensayos de control o blancos, sin el agregado de péptido a los 10 mL de los cultivos en Caldo Nutritivo (Merck), en fase logarítmica, de cada una de las cepas indicadoras, y controlando el número de células viables a los mismos intervalos de tiempo ya indicados, durante 24 h. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como promedio de los valores obtenidos (Simonetta y col., 1997).

2.6 Determinación de la actividad hemolítica

La actividad hemolítica de los péptidos se evaluó frente a eritrocitos humanos, aislados a partir de un pool de sangre fresca, mediante la medición espectrofotométrica de la cantidad de hemoglobina liberada como consecuencia de la lisis de las células (Mor y col., 1994 ; Sai y col., 2001).

Distintas muestras de sangre total se lavaron 3 veces con solución fisiológica con el objeto de eliminar el plasma y otras células, separando los eritrocitos por centrifugación a baja velocidad. Las distintas suspensiones de células, una vez aisladas, se mezclaron a fin de obtener un pool lo más representativo posible para llevar adelante los ensayos. El pool obtenido se diluyó 1/50 para obtener aproximadamente 10^5 células/mL. Alícuotas de 0,5 mL de la suspensión diluida de células, en contacto con 1 mL de las soluciones de péptidos en el rango de concentraciones entre 25 $\mu\text{g/mL}$ y 500 $\mu\text{g/mL}$, se incubaron durante 1 h a 37 °C, con

agitación. También se realizó un blanco de reacción con solución fisiológica y un ensayo testigo (100% de hemólisis) con una solución de Tritón X-100 al 1%. Finalizada la incubación, se centrifugó para separar el sobrenadante libre de eritrocitos y determinar la cantidad de hemoglobina presente en el mismo.

Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 540 nm, empleando un espectrofotómetro UV-Visible Metrolab 1700. El porcentaje de hemólisis se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{(\text{Lectura de la muestra} - \text{Lectura del blanco})}{\text{Lectura 100 \% de hemólisis}} \times 100$$

2.7 Estudios conformacionales

2.7.1 Análisis predictivos de estructura secundaria.

Las secuencias de los péptidos sintetizados fueron analizadas mediante los programas PSIPRED (Jones., 1999) y ANTHEPROT 4.0, los cuales permiten predecir la estructura secundaria de una secuencia determinada. Los métodos de predicción Predator, Gibrat, DPM, HM y GOR I comparan, mediante la utilización de diversos algoritmos, una secuencia de aminoácidos dada con bases de datos de proteínas caracterizadas, arrojando resultados con elevados grados de confianza (del orden del 60 -70 %).

2.7.2 Determinación de la estructura secundaria por dicroísmo circular

Los espectros DC fueron realizados en un espectropolarímetro Jasco J715 (Jasco Corporation, Japan) a 25 °C, en el rango de longitudes de onda de 195 a 250 nm. Las mediciones fueron efectuadas en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico sobre muestras de péptidos a concentraciones 30 µM. Las mediciones se realizaron a 20 °C en agua desionizada, en TFE al 20, 40, 60 y 80 % (v/v) y en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 5.5 y 7.4, para Pln149a, el PH lineal y cíclico y sus extremos N- y C-terminales. Para Pln149a se realizaron además mediciones en micelas inversas de AOT con $W_0=16$. Todos los espectros se obtuvieron como el promedio de 16 determinaciones. Los espectros correspondientes a las soluciones micelares fueron substraídos (blancos de micelas) de los correspondientes a las muestras proteicas. La deconvolución de los

espectros se realizó empleando un paquete de programas CDPro y en particular los programas SELCON3 (Self Consistent Method) y CONTILL (Sreerama y col., 1993; Sreerama y col., 2000), que permiten determinar las fracciones de estructura secundaria en las distintas secuencias. Para el análisis de estructura secundaria los espectros obtenidos en la escala mdegree fueron convertidos en elipticidad molar $[\theta]$ considerando el peso molecular del residuo medio y la concentración, (Woody, R. W. 1996).

2.8 Espectroscopía de Fluorescencia

2.8.1 Desplazamiento de la longitud máxima de emisión

Se estudió el comportamiento mediante espectroscopía de fluorescencia de los péptidos sintéticos, a una concentración 20 μM en medio acuoso de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.4, y en presencia de micelas inversas de AOT en ciclohexano.

Los espectros fueron obtenidos a 25° C, en el rango de 280 a 400 nm en un Espectrofluorómetro Hitachi-F2000 (Japón), empleando una cubeta de cuarzo rectangular de 1 cm de paso óptico y longitudes de onda de excitación de 275 nm para PIn149a (Tyr) y de 280 nm para el PH (Trp). Los espectros de fluorescencia de las soluciones buffers fueron abstraídos a fin de eliminar efectos de scattering.

2.8.2 Ensayos de apagamiento o quenching

Para la realización de los experimentos de apagamiento o quenching se utilizó una solución stock concentrada de KI 4 M en buffer fosfato de sodio 50 mM, con el agregado de tiosulfato de sodio 0.1 mM a fin de prevenir la formación del ion I^{-3} . Se añadieron en forma gradual pequeñas alícuotas, del orden de los microlitros, a las muestras peptídicas ($2 \cdot 10^{-5}$ M) disueltas en buffer o en micelas inversas con $W_o=16$. Se realizaron correcciones sobre los datos obtenidos por fluorescencia, antes de procesarlos. En primer lugar se hicieron correcciones a partir de un blanco de solvente.

La segunda corrección corresponde a la dilución de la muestra como consecuencia del agregado del quencher (KI), ya que a medida que la muestra se diluye, el número de fluoróforos disminuye. La tercera corrección que se realizó fue debida a la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de excitación. Para la corrección

estándar por la absorbancia del quencher a la longitud de onda de excitación se aplica la siguiente fórmula: $I_{\text{corregida}} = 10^{\text{abs}_{\lambda, \text{excit}}/2} \cdot I_{\text{medida}}$.

Esta absorbancia resulta no sólo en una disminución en la luz de excitación, sino también en una disminución de la profundidad bajo la cual la luz de excitación penetra. Ambos procesos llevan a una disminución de la fluorescencia detectada.

Luego de aplicar las correcciones citadas, los datos obtenidos se analizaron mediante las curvas de Stern-Volmer aplicando la siguiente ecuación: $F_0/F = 1 + K_q [Q]$, donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia a la longitud de onda de excitación empleada, en ausencia y en presencia del apagador a la concentración $[Q]$, respectivamente, y K_q es la constante de apagamiento de Stern-Volmer (Souto y col., 2000).

2.8.3 Preparación de micelas

Las micelas inversas se prepararon mediante simple solubilización de AOT en la cantidad necesaria de ciclohexano para obtener una concentración final 50 mM, agitando la suspensión mediante vortex, a temperatura ambiente (Souto y col., 2000). Se partió de una solución concentrada de péptido, 10^{-3}M , en buffer fosfato de sodio pH 7.4; se agregaron pequeñas alícuotas (del orden de los μL) de esta solución sobre 1 mL de la suspensión 50 mM de AOT en ciclohexano, agitando vigorosamente hasta homogeneizar y clarificar. La cantidad de solución stock de péptido que se agregó fue controlada de manera de obtener el valor deseado de W_o , el cual se define como la relación entre el número de moléculas de agua y el número de moléculas de AOT presentes en la micela. Se trabajó con un valor de $W_o=16$, que corresponde a un tamaño intermedio de micela.

2.9 Cálculos de hidrofobicidad

La hidrofobicidad de los diferentes péptidos y los momentos hidrofóbicos fueron calculados según lo reportado en la bibliografía (Eisenberg y col., 1984), mediante el empleo de la escala de hidrofobicidad consenso normalizada a un tamaño de ventana de 10 residuos.