

RESULTADOS CAPÍTULO 3

Síntesis química y caracterización de los péptidos diseñados

Sobre la base de la secuencia reportada para Pediocina PA-1, y teniendo en cuenta, por un lado, las limitaciones tecnológicas que se han descrito en la literatura para la utilización de esta bacteriocina en la preservación de diferentes tipos de alimentos, vinculadas a la pérdida de actividad durante el almacenamiento y a la disminución de actividad con el aumento de pH; y por otro lado, considerando los resultados obtenidos con Pln149a y su especificidad hacia el género *Listeria*, descritos en el Capítulo 2, se planteó el diseño de un híbrido formado por los residuos 1-18 de Pediocina PA-1 y los residuos 6-22 de Pln149a.

La bacteriocina híbrida presenta dos residuos de cisteína en las posiciones 9 y 14, y fue evaluada en los diferentes ensayos en sus dos versiones, lineal (grupos sulfidrilos libres) y cíclica (puente disulfuro intramolecular). Las dos partes que constituyen el híbrido también fueron investigadas, en lo referente a su actividad antimicrobiana y estructura conformacional.

Síntesis química y caracterización del péptido híbrido lineal (PHL) y su extremo C-terminal.

Péptido híbrido lineal (PHL): está formado por los residuos 1-18 de Pediocina PA-1 y 6-22 de Pln149a.

Secuencia: KYYGNGVTCGKHSCSVDWGATAIKQVKKLFFKKKGG-amida

Número de residuos aminoacídicos: 35

Peso Molecular teórico: 3788 Da

Péptido C-terminal (C-T): está formado por los residuos 6-22 de Pln149a

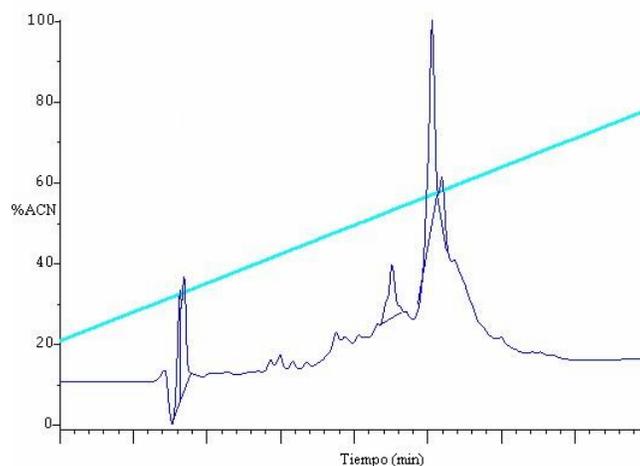
Secuencia: GATAIKQVKKLFFKKKGG-amida

Número de residuos aminoacídicos: 17

Peso Molecular teórico: 1801 Da.

Durante la síntesis de los péptidos PHL y C-T se presentaron dificultades en algunas desprotecciones y acoplamientos de aminoácidos. Las desprotecciones se mejoraron repitiéndolas hasta 3 veces o usando mezclas de desprotección específicas como: piperidina al 20 % en DCM/DMF/NMP (1:1:1) (Zhang y col., 1994). En los casos de acoplamientos dificultosos se aumentó la temperatura hasta 40 ° C y los tiempos de reacción se extendieron desde 30 minutos y hasta 3 horas. En algunos casos, como para I₂₃ fue necesario realizar tres acoplamientos repetitivos y bloquear los grupos amino libres remanentes mediante acetilación (Capping). En la Figura 1-3 se observa el HPLC analítico realizado sobre el producto de la síntesis (PHL), donde el pico mayoritario, correspondiente al producto esperado eluyó con el 56% de ACN.

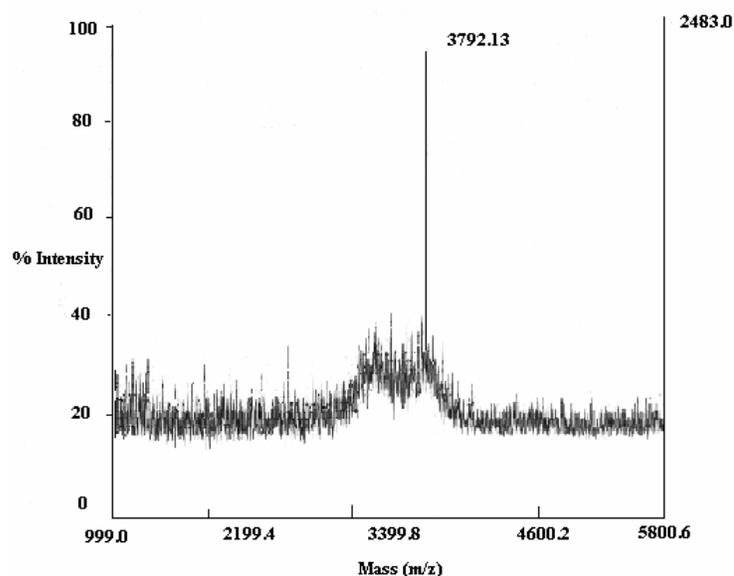
Figura 1-3: HPLC analítico del PHL.



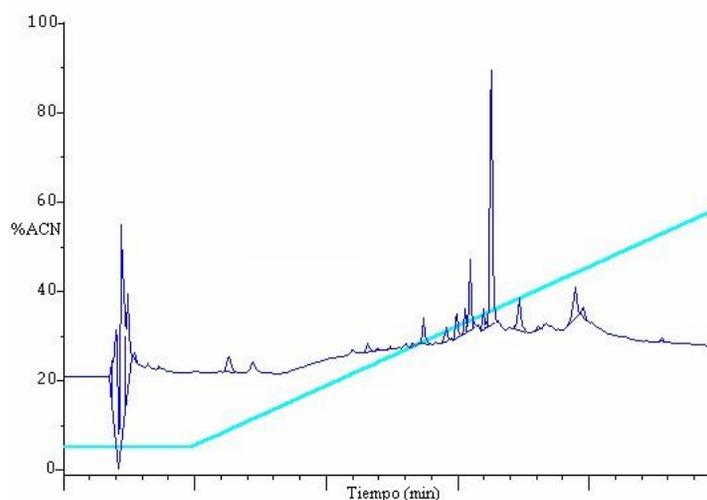
Tiempo de retención correspondiente al pico de mayor porcentaje de área: 25.25 min (50 %).

Condiciones experimentales: Columna Delta-Pak C18, 5 μ m, 300 Å, 3,9 x 150 mm (Waters); gradiente: 20-80 % B (35 min); velocidad de flujo 0.8 mL/min; detección: 220 nm.

Mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) se observó la presencia de un pico mayoritario con relación m/c 3792,13 Da que correspondería al MH⁺. (Figura 2-3).

Figura 2-3: Espectro MALDI-TOF del PHL.

En la Figura 3-3 se observa el cromatograma obtenido mediante HPLC analítico correspondiente al extremo C-T. El pico mayoritario correspondiente al producto sintético principal eluyó con 36 % de ACN.

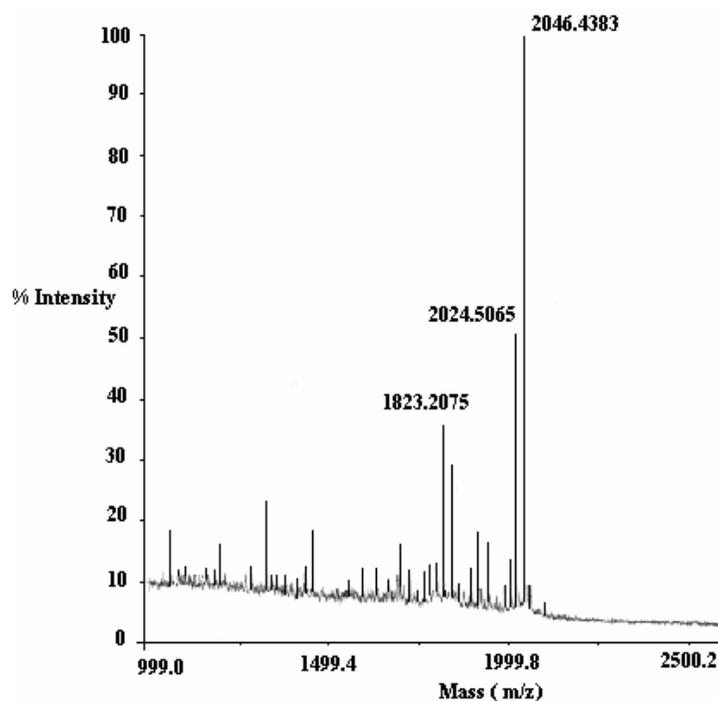
Figura 3-3: HPLC analítico del péptido C-T.

Tiempo de retención correspondiente al pico de mayor porcentaje de área: 16.24 min (18 %).
Condiciones experimentales: Columna Delta-Pak C18, 5 μ m, 300 Å, 3,9 x 150 mm (Waters); gradiente: 5 % B (5 min), 5-60 % B (20 min); velocidad de flujo 0.8 mL/min; detección: 220 nm.

El péptido C-T tiene un peso molecular teórico de 1.801 Da. En el espectro de masas del producto de síntesis, se observa un pico de mayor abundancia relativa, con

relación m/c: 2046,4383 Da que corresponde al péptido protegido con el grupo Fmoc en su extremo N-terminal y el catión sodio $pMNa^+$. Se observan otros dos picos con menores abundancias relativas y relaciones m/c 2024,5065 y 1823,2075, los que corresponden al péptido protegido pM^+ y al péptido desprotegido junto al catión Na^+ : MNa^+ , procedente de la matriz, (Figura 4-3).

Figura 4-3: Espectro MALDI-TOF del péptido C-T.



En función de este análisis se pudo determinar que la desprotección final del grupo Fmoc previo al clivaje del péptido había sido incompleta, siendo éste un ejemplo de la importancia del control de la síntesis en sus distintas etapas por espectrometría de masas. Por lo tanto se procedió a eliminar el grupo Fmoc disolviendo el péptido en DMF/DMSO y desprotegiendo con piperidina al 20%, con agitación durante 3 horas. Luego se precipitó con éter, se liofilizó y controló su pureza mediante HPLC analítico.

Síntesis química y Caracterización del péptido N-terminal (N-T)

Péptido N-terminal (N-T): Está constituido por los residuos 1-18 de Pediocina PA-1.

Secuencia: KYYGNGVTCGKHSCSVDW-amida

Número de residuos aminoacídicos: 18

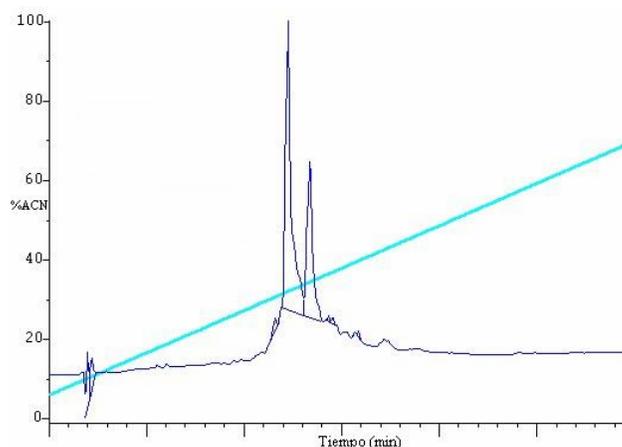
Peso molecular teórico: 2003 Da.

Durante la síntesis del extremo N-T del PHL se observó colapsamiento de la resina. Para solucionar este problema se cambió la mezcla de solvatación por: DCM / DMF / NMP (1:1:1) con 1% de Tritón X100, (Zhang y col., 1994).

Las desprotecciones incompletas se mejoraron con una nueva mezcla compuesta por: DBU / piperidina / DMF (1:1:48) (Wade y col., 1991), mientras que los acoplamientos dificultosos se mejoraron cambiando tanto el activador como el catalizador de la reacción: se utilizó el TBTU y DIPEA en lugar de: PyBOP[®] y NMM, en las siguientes proporciones: 4 equivalentes del aminoácido, 3,95 equivalentes de TBTU y 8 equivalentes de DIEA (Gausepohl y col., 1992).

En la Figura 5-3 se observa el HPLC analítico realizado sobre el crudo de síntesis. El cromatograma muestra un pico mayoritario, que eluye con un 32% de ACN y con un tiempo de retención de 12,24 min. También se observa otro pico, más retenido, que eluye a los 13,36 min correspondiente al péptido protegido. Se procedió de idéntica manera a lo realizado con el péptido C-T para su total desprotección.

Figura 5-3: HPLC analítico del péptido N-T.



Tiempo de retención correspondiente al pico de mayor porcentaje de área: 12.24 min (60 %).

Condiciones experimentales: Columna Delta-Pak C18, 5 μ m, 300 Å, 3,9 x 150 mm (Waters); gradiente: 5-70 % B (25 min); velocidad de flujo 0.8 mL/min; detección: 220 nm.

Síntesis química y Caracterización del pentapéptido N- terminal de Pln149a

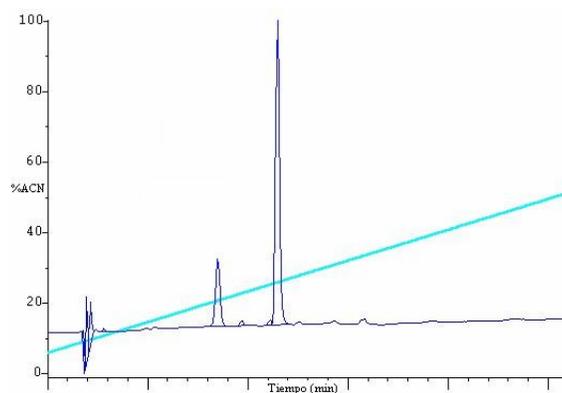
Pentapéptido N- terminal de Pln149a:

Secuencia: YSLQM- amida

Peso Molecular teórico: 640 Da

La escala de síntesis fue de 0,066 mM. Al igual que en la síntesis del péptido N-T, se utilizó el TBTU y DIEA para los acoplamientos. (Figura 6-3).

Figura 6-3: HPLC analítico del pentapéptido de Pln149a.



Tiempo de retención correspondiente al pico de mayor porcentaje de área: 11.48 min (63 %).

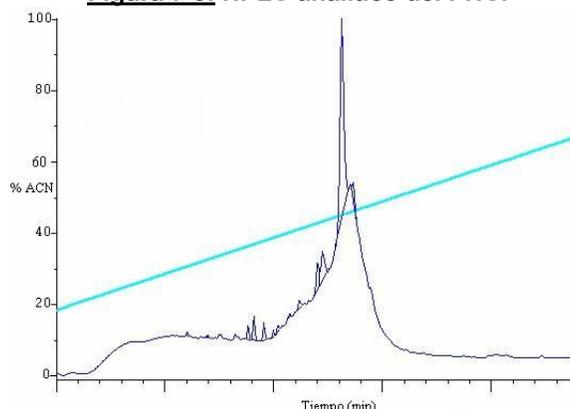
Condiciones experimentales: Columna Delta-Pak C18, 5 μ m, 300 Å, 3,9 x 150 mm (Waters); gradiente: 5-50 % B (25 min); velocidad de flujo 0.8 mL/min; detección: 220 nm.

El pentapéptido N-terminal de Pln149a eluyó con el 26% de ACN, con un tiempo de retención de 11,48 min.

Ciclización de los péptidos PHL y N-T por formación de puentes disulfuro intramoleculares.

El seguimiento de la reacción de oxidación, se hizo mediante el Test de Ellman y controles analíticos por HPLC a distintos tiempos. La oxidación se completó en 14 h, en ambos casos.

En el HPLC analítico de PHC, realizado al terminar la ciclización, se observó un pico mayoritario que eluye con 37 % de ACN y que corresponde al producto ciclado (Figura 7-3).

Figura 7-3: HPLC analítico del PHC.

Tiempo de retención correspondiente al pico de mayor porcentaje de área: 13.09 min (65.7 %).

Condiciones experimentales: Columna Delta-Pak C18, 5 μ m, 300 Å, 3,9 x 150 mm (Waters); gradiente: 20-80 % B (35 min); velocidad de flujo 0.8 mL/min; detección: 220 nm.

Como consecuencia de la ciclización el péptido adquiere una conformación distinta, interaccionando con la columna de fase reversa en forma diferente al péptido lineal (sulfidrilos libres). En este caso se observó un cambio en el tiempo de retención. Los productos de polimerización fueron eliminados de la muestra mediante filtración por geles.

Espectro antimicrobiano de los péptidos diseñados

Los primeros ensayos de difusión en agar se realizaron en buffer fosfato de sodio a pH 5.5 con el PHL, PHC y C-terminal protegido (C-TP), obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 1-3: Espectro antimicrobiano de los distintos péptidos a pH 5.5 y concentración de 1mg/mL.

| Cepas utilizadas | Diámetro de la zona de inhibición (mm) | | |
|---|--|-------------------|--------------------|
| | PHL (264 μ M) | PHC (264 μ M) | C-TP (493 μ M) |
| <i>Pseudomonas</i> sp. DBFIQ P 55 ^a | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> DBFIQ S 21 ^a | - | - | - |
| <i>Listeria monocytogenes</i> DBFIQ LM 3 ^a | 10.5 | 9.6 | 9 |
| <i>Bacillus cereus</i> DBFIQ B 28 ^a | - | - | - |
| <i>Bacillus megaterium</i> DBFIQ B19 ^a | - | - | - |
| <i>Bacillus subtilis</i> DBFIQ B11 ^a | - | - | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> DBFIQ LP 22 ^a | - | - | - |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> DBFIQ LP41 ^a | - | - | - |
| <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DBFIQ LB 42 ^a | - | - | - |

Diámetro de los pozos 7 mm. (-) Ausencia de halo de inhibición. ^aColección de la Cátedra de Microbiología, Fac. Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral, Argentina (FIQ-UNL).

En base a estos resultados, se direccionó el estudio de los péptidos hacia la aparente especificidad antilisteria de los mismos, para lo cual se realizó un nuevo ensayo con 8 cepas de *Listeria* adicionales, ampliándose el estudio a los péptidos N-terminal [lineal (N-TL) y cíclico (N-TC)], los extremos C-TD y el pentapéptido de PIn149a.

Tabla 2-3: Espectro antimicrobiano a pH 5.5 y concentración 2mg/mL de cada péptido.

| Cepas utilizadas | Diámetro de la zona de inhibición (mm) | | | | | | |
|--|--|-----------------|-----------------|-------------------|------------------|------------------|-------------------------|
| | PHC (528 µM) | PHL (528 µM) | C-TP (987µM) | C-TD (1108 µM) | N-TL (997 µM) | N-TC (997 µM) | Pépt. 5 aa (3116 µM) |
| <i>Listeria monocytogenes</i> DBFIQ LM 3 ^a | 10.5 | 9.6 | 10 | 9.5 | - | - | - |
| <i>L.monocytogenes</i> tipo I DTUNLu 328 ^b | 9.5 | 9 | 9 | 10.5 | - | - | - |
| <i>Lmonocytogenes</i> ^b DTUNLu 335 BsAs | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Listeria seeligeri</i> DTUNLu 340 ^b | 11.5 | 10 | - | 10 | - | - | - |
| <i>Listeria welshimai</i> DTUNLu 213 ^b | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Listeria innocua</i> CIP 8011 ^b | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Listeria innocua</i> DTUNLu 13-2 ^b | - | - | - | - | - | - | - |

Diámetro de los pozos: 7 mm; (-) Ausencia de halo de inhibición. ^aColección de la Cátedra de Microbiología, Fac. Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral, Argentina (FIQ-UNL). ^bColección del Departamento de Tecnología, Univ. Nac. de Luján, Argentina,(UNLu).

Como se observa de las Tablas 1-3 y 2-3, no se detectaron diferencias en la actividad antimicrobiana de los péptidos en los ensayos de difusión en agar al aumentar la concentración de 1mg/mL a 2 mg/mL. En ensayos adicionales realizados a una concentración de 6 mg/mL tampoco se observaron variaciones significativas en los diámetros de los halos de inhibición.

A fin de investigar el efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana se hicieron ensayos a pH cercano al fisiológico (pH 7.4) en los cuales se observó un aumento importante de la actividad antimicrobiana. La Tabla 3-3 muestra el cambio en el diámetro de los halos de inhibición obtenidos para cada uno de los dos valores de pH ensayados y a una concentración de péptido de 1 mg/mL.

Tabla 3-3: Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de los péptidos diseñados.

| Cepa sensible | Diámetro de la zona de inhibición (mm) | | | |
|---------------|--|------|---|------|
| | <i>Listeria monocytogenes</i> DBFIQ LM3 ^a | | <i>L.monocytogenes</i> tipo I DTUNLu 328 ^b | |
| | pH 7.4 | pH 5 | pH 7.4 | pH 5 |
| PHL (264 µM) | 11 | 9 | 10.5 | 9 |
| PHC (264 µM) | 12 | 9.5 | 11 | 9.5 |
| C-TP (493 µM) | 11.5 | 10 | 12 | 9 |
| C-TD (552 µM) | 11 | 9.5 | 11.5 | 10.5 |
| Buffer pH:7.4 | - | - | - | - |

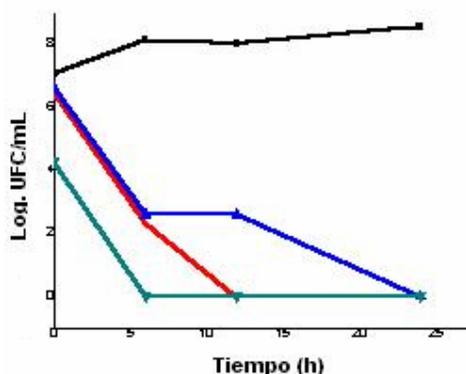
Diámetro de los pozos: 7 mm. (-) Ausencia de halo de inhibición. ^aColección de la Cátedra de Microbiología, Fac. Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral, Argentina (FIQ-UNL). ^bColección del Departamento de Tecnología, Univ. Nac. de Luján, Argentina (UNLu).

A pH 7.4, únicamente para los péptidos PHL y PHC se ensayó la actividad a mayor concentración (3.8 mg/mL) frente a *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3. Los resultados mostraron aumento de la actividad inhibitoria con la concentración solamente para el PHL, pasando de 11 a 14 mm el diámetro del halo de inhibición.

Modo de acción de los péptidos diseñados

A fin de determinar si los péptidos C-TP y C-TD tenían una acción bactericida o bacteriostática se siguió la evolución de la viabilidad de la cepa *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3 en presencia de los mismos, y se comparó con la correspondiente a Pln149a a una concentración de 2 mg/mL y a pH 7.4. En la Figura 8-3 se pueden observar las cinéticas obtenidas en cada caso comparadas con la correspondiente a Pln149a, y la curva correspondiente al cultivo control de la cepa *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3 en ausencia de dichos péptidos.

Figura 8-3: Curvas de Evolución poblacional de *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3 en presencia de los péptidos Pln149a, C-TP y C-TD



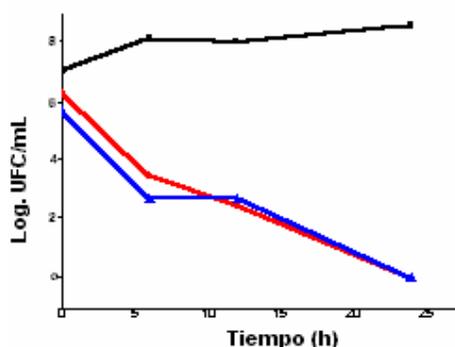
(■) Cultivo testigo de *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3; (▲) Cultivo de *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3 + péptido C-TD 110,8 µM; (●) Cultivo de *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3 + Pln149a 82,4 µM; (▼) Cultivo de *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3 + péptido C-TP 98,7 µM.

Si se comparan las curvas de evolución poblacional obtenidas con Pln149a, CT-P y CT-D se puede ver que, si bien todos los péptidos tienen efecto bactericida en el término de 24 h, hay diferencias notables en las curvas. La rápida acción bactericida del péptido C-TP estaría relacionada con la presencia del grupo hidrofóbico Fmoc sobre el extremo N- terminal de la secuencia.

Según las curvas de evolución poblacional la acción bactericida de Pln149a es más rápida que la de CT-D.

Siguiendo la evolución de la viabilidad de la misma cepa *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3 se determinó también el modo de acción de los péptidos híbridos lineal y cíclico, en concentraciones de 2 mg/mL (Concentración final en el ensayo: 52,8 μ M de cada uno) (Figura 9-3).

Figura 9-3: Curvas de Evolución poblacional de *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3 en presencia de los péptidos PHC y PHL.



(■) Cultivo testigo de *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3; (▲) Cultivo de *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3 + PHL 52,8 μ M; (●) Cultivo de *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3 + PHC 52,8 μ M.

Se puede observar en la figura anterior que los péptidos híbridos lineal y cíclico también presentaron acción bactericida y de igual magnitud entre ellos, en el término de 24 h.

Determinación de la CIM (Concentración Inhibitoria Mínima)

La CIM determinada frente a *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM3 fue mayor a 338 μ M para el PHC y mayor a 709 μ M para el extremo C-TD. El valor obtenido para el péptido C-TD indica que es menos activo que Pln149a, cuya CIM frente a la misma cepa fue de 264 μ M.

Determinación de la actividad hemolítica

Los resultados obtenidos en los ensayos sobre lisis de eritrocitos empleando diferentes concentraciones de péptidos se detallan en la Tabla 4-3.

Tabla 4-3: Actividad hemolítica del PHC, PHL, C-TP y C-TD a distintas concentraciones.

| Péptido | % de hemólisis |
|------------------|----------------|
| PHL (100 µg/mL) | 2.9 % |
| PHL (200 µg/mL) | 5.3 % |
| PHL (300 µg/mL) | 9.5 % |
| PHC (100 µg/mL) | 0.9 % |
| PHC (200 µg/mL) | 0.7 % |
| PHC (300 µg/mL) | 0.5 % |
| C-TP (100 µg/mL) | 8 % |
| C-TP (200 µg/mL) | 8 % |
| C-TP (300 µg/mL) | 8 % |
| C-TD (100 µg/mL) | 9.6 % |
| C-TD (200 µg/mL) | 9.9 % |
| C-TD (300 µg/mL) | 12.2 % |

Como se observa en la tabla anterior, solamente para el PHL la actividad hemolítica aumentó con la concentración.

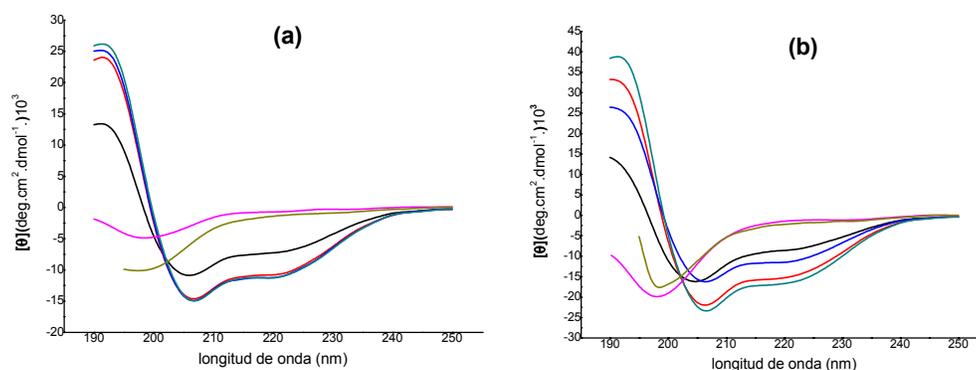
Estudios conformacionales por Dicroísmo circular

La deconvolución de los espectros de DC se realizó utilizando el paquete de programas CDPro, y en particular el programa CONTINLL, que emplea un conjunto de referencia de 48 proteínas.

Dicroísmo circular del PHL y cíclico (PHC)

Los espectros de DC en agua y en PBS (buffer fosfato de sodio pH: 7.4) del PHL y PHC fueron característicos de los péptidos pequeños no estructurados en solución acuosa, presentando ambos un mínimo a 198 nm (Figura 10-3 a y b).

Figura 10-3: Espectros de DC del PHC(a) y PHL (b) en diferentes medios solventes.



Solventes utilizados: (—) 20 % TFE, (—) 40 % TFE, (—) 60 % TFE, (—) 80 % TFE, (—) agua, (—) PBS.

En presencia de TFE, se obtuvieron espectros característicos de moléculas con estructuras predominantemente helicoidales, con mínimos a 207 y 222 nm. Estos espectros fueron similares para la versión lineal y cíclica de la molécula, observándose sólo diferencias en los valores de elipticidad de cada uno de ellos. La estimación de los porcentajes de estructura secundaria del péptido híbrido, a partir de los espectros obtenidos y utilizando el programa CONTILL, arrojaron los resultados indicados en la Tabla 5-3.

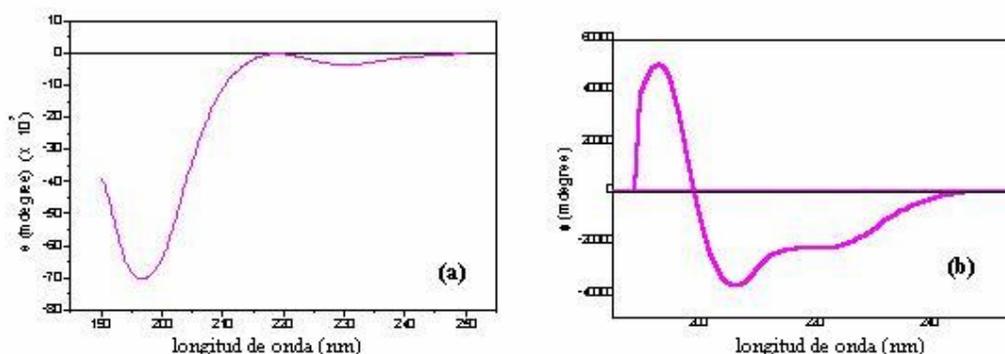
Tabla 5-3: Estimación del contenido de estructura secundaria de los péptidos PHC y PHL a partir de los espectros obtenidos mediante DC.

| Estructura secundaria péptido | % α -hélice | | % lámina- β | | % Turn | | % no ordenada | |
|----------------------------------|--------------------|------|-------------------|------|--------|-----|---------------|------|
| | PHL | PHC | PHL | PHC | PHL | PHC | PHL | PHC |
| Agua | 6.3 | 4 | 1.7 | 16.9 | 4.2 | 9.2 | 87.8 | 69.8 |
| 20 % TFE | 70.8 | 67.5 | 0.5 | 3.3 | 1 | 8.3 | 27.9 | 20.9 |
| 40 % TFE | 99.5 | 95.2 | 0.5 | 1.4 | - | 1.3 | - | 2.1 |
| 60 % TFE | 97.5 | 95.1 | 1.1 | 1.9 | - | 1.3 | 1.5 | 1.6 |
| 80 % TFE | 98.9 | 98 | 1.1 | 1.2 | - | 0.5 | - | 0.2 |

Dicroísmo Circular del péptido C-terminal protegido (C-TP)

El espectro de DC del péptido C-TP realizado en agua presentó un mínimo a 198 nm, En presencia de metanol se observó un cambio notorio en la forma del espectro y en la posición de los mínimos, tal como se muestra en la Figura 11-3b, indicativo de la contribución de estructuras helicoidales.

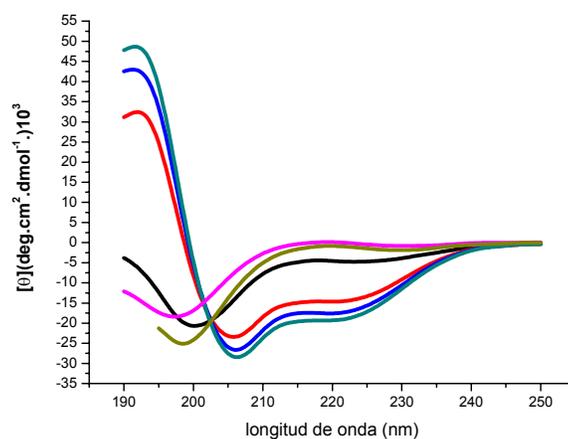
Figura 11-3: Espectro de DC del péptido C-TP en agua (a) y en metanol (b).



Dicroísmo Circular del péptido C-terminal desprotegido (C-TD)

Los espectros de DC del péptido C-TD se realizaron en diferentes condiciones experimentales, incluyendo ensayos en soluciones acuosas y en solventes orgánicos.

Figura 12: Espectro de DC del péptido C-TD en diferentes solventes.



Solventes utilizados: (—) 20 % TFE, (—) 40 % TFE, (—) 60 % TFE, (—) 80 % TFE, (—) agua, (—) PBS.

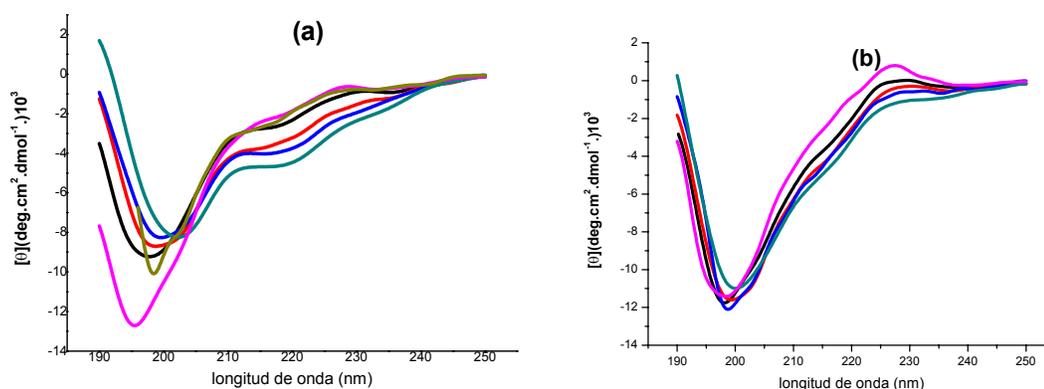
Las deconvoluciones del péptido C-TD en los solventes utilizados, calculados por el programa CONTILL, arrojaron los porcentajes estructurales, para cada caso, detallados en la Tabla 6-3.

Tabla 6-3: Estimación del contenido de estructura secundaria del péptido C-TD a partir de los espectros obtenidos mediante DC.

| Estructura secundaria | % α -hélice | % lámina- β | % Turn | % no ordenada |
|-----------------------|--------------------|-------------------|--------|---------------|
| agua | 5 | 1.4 | 3.3 | 89.6 |
| PBS | 4.5 | - | - | 95.2 |
| 20 % TFE | 21.8 | - | 3.7 | 73.6 |
| 40 % TFE | 100 | - | - | - |
| 60 % TFE | 98.9 | 1.1 | - | - |
| 80 % TFE | 98.9 | - | 1.1 | - |

Dicroísmo circular del péptido N-terminal lineal y cíclico

Los espectros de DC obtenidos para ambos péptidos presentaron características similares (Figura 13-3 a y b).

Figura 13-3 a y b: Espectro de DC del péptido N-TL (a) y N-TC (b) en diferentes solventes.

Solventes utilizados: (—) 20 % TFE, (—) 40 % TFE, (—) 60 % TFE, (—) 80 % TFE, (—) agua, (—) PBS

a) Dicroísmo circular del péptido N- terminal lineal (N-TL)

En agua se observa la presencia de un mínimo a 196 nm y en presencia de TFE se observa un desplazamiento en la posición de este mínimo hacia mayores longitudes de onda, llegando hasta 203 nm en presencia de 80% de TFE. De igual modo se observa, en presencia de TFE, la aparición de un segundo mínimo que se hace más intenso a medida que aumenta la proporción del solvente orgánico en la mezcla.

La deconvolución de los espectros evidenció que en agua el péptido N-TL posee una estructura fundamentalmente no ordenada, la que se ordena ligeramente en presencia de TFE (Tabla 7-3).

Tabla 7-3: Estimación del contenido de estructura secundaria del péptido N-terminal lineal (N-TL) a partir de los espectros obtenidos mediante DC

| Estructura secundaria | % α-hélice | % lámina-β | % turn | % no ordenada |
|-----------------------|------------|------------|--------|---------------|
| péptido | N-TL | N-TL | N-TL | N-TL |
| Agua | 2.3 | 2.7 | 5.3 | 89.7 |
| Buffer pH 7.4 | 0.7 | 17.55 | 11.3 | 70.6 |
| 20 % TFE | 2.2 | 3.7 | 1.8 | 92.4 |
| 40 % TFE | 4.9 | 7.9 | 10.7 | 76.4 |
| 80 % TFE | 14.9 | 3.8 | 9.4 | 72 |

Al aumentar el porcentaje de TFE se incrementa el % de α-hélice, variando éste desde 2 % en agua, y hasta 15% en 80 % TFE. Del mismo modo se observa un incremento en el contenido de estructura β total (lámina β+ β turn) desde 8% en agua y hasta 18.6 % en 40 % TFE. Queda claro que el TFE actúa estabilizando estructuras secundarias, y en particular las α-hélices.

Es interesante observar que en buffer fosfato pH 7.4 la estructura secundaria es bastante más estable (70 % no ordenada) que en agua o en bajos porcentajes de TFE., mostrando una contribución de estructuras tipo β .

b) Dicroísmo circular del péptido N- terminal cíclico (N-TC)

Se observan pocas variaciones en la forma de los espectros obtenidos en agua y en presencia de TFE (Tabla 8-3).

Tabla 8-3: Estimación del contenido de estructura secundaria del péptido N-terminal cíclico (N-TC) a partir de los espectros obtenidos mediante DC.

| Estructura secundaria | % α -hélice | % lámina- β | % turn | % no ordenada |
|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------|---------------|
| Péptido | N-TC | N-TC | N-TC | N-TC |
| Agua | 1.6 | 12.3 | 10 | 76.1 |
| 20 % TFE | 2.7 | 12.4 | 16.9 | 67.9 |
| 40 % TFE | 3.6 | 9.7 | 17.7 | 69 |
| 80 % TFE | 7.9 | 6.9 | 17.9 | 67.4 |

La deconvolución de los espectros pone en evidencia que el péptido N-TC está más ordenado en agua que el péptido lineal, y que su estabilidad se incrementa muy poco en presencia de TFE. Lo más notable para N-TC es el aumento del porcentaje de turn en presencia de bajos porcentajes de TFE.

Los resultados de la predicción de estructura secundaria para el péptido N-terminal empleando el Método Levin (algoritmo basado en homología de secuencia) señalan un 22% lámina β , 6% turn y 72 % de no ordenada.

En forma general, podemos decir que se observa para todos los péptidos sintetizados, una buena correlación entre los resultados de la predicción y los obtenidos experimentalmente mediante la deconvolución de los espectros de DC.

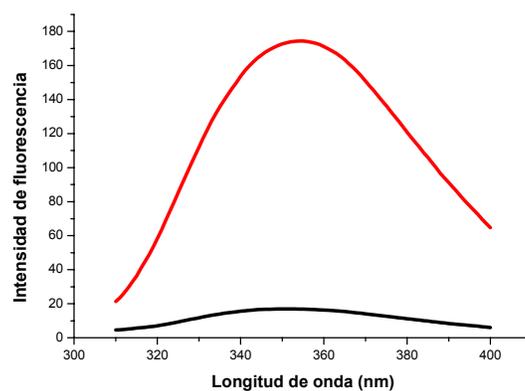
Espectroscopia de fluorescencia

Se realizaron ensayos mediante Espectroscopía de fluorescencia, a fin de estudiar desplazamientos del máximo de emisión y apagamiento mediante IK con el péptido híbrido, que posee un fluoróforo intrínseco en su estructura (W_{18}). Los ensayos se realizaron sobre muestras de péptidos en buffer y en micelas inversas de AOT.

Desplazamientos de la longitud máxima de emisión

En buffer fosfato de sodio pH 7.4 tanto el PHL como el PHC presentaron un $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión a 351 nm, y el triptofano, como aminoácido libre en el mismo medio presentó un $\lambda_{\text{máx}}$ a 352 nm (Figura 14-3). Estos resultados sugieren que el residuo de Trp se expone al ambiente acuoso.

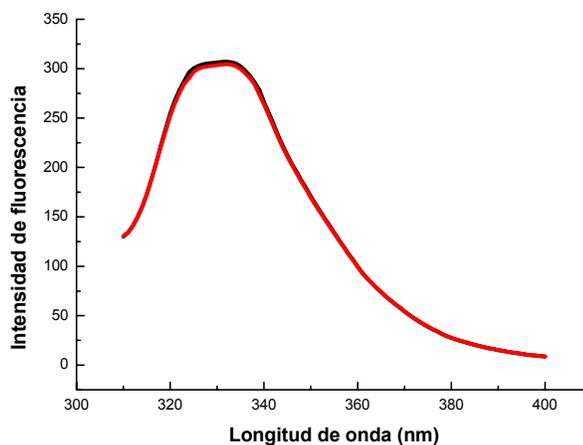
Figura 14-3: Espectro de fluorescencia de PHC y PHL en buffer fosfato de sodio pH 7.4



(—) Triptofano libre 20 μM , (—) PHC y PHL 20 μM . Condiciones experimentales: 25° C, longitud de onda de excitación: 275 nm.

En presencia de micelas de AOT ($W_o=16$) se observó para ambos péptidos un desplazamiento del $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión a menores longitudes de onda (330-332 nm) (Figura 15-3), sugiriendo un ambiente menos polar para el residuo de triptofano.

Figura 15-3: Espectro de fluorescencia de PHC y PHL en presencia de micelas inversas de AOT ($W_o=16$).

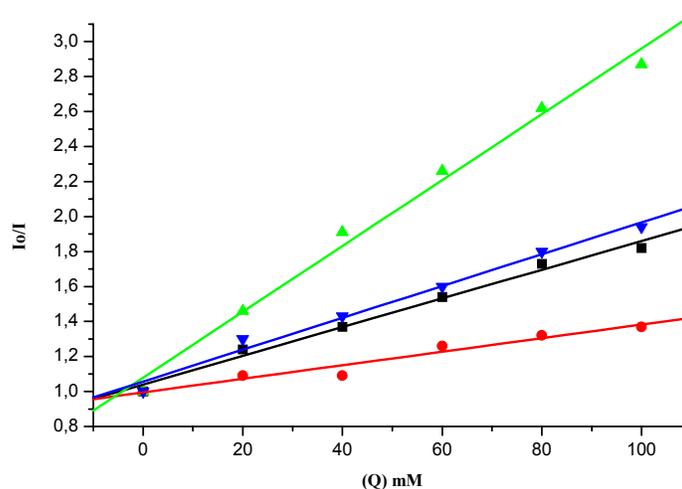


(—) PHL 20 μM , (—) PHC 20 μM . Condiciones experimentales: 25° C, longitud de onda de excitación: 275 nm.

Ensayos de Apagamiento

En los estudios de apagamiento con ión yoduro, en medio buffer, se observó que PHL presenta una pendiente mayor en la curva de apagamiento de Stern-Volmer, en comparación con PHC, lo mismo se observó en presencia de micelas inversas de AOT; sin embargo la diferencia entre las K_{sv} de ambos péptidos fue mayor en medio buffer (0.01 M^{-1}), que en micelas ($0,0049 \text{ M}^{-1}$), (Figura 16-3).

Figura 16-3: Comparación de Apagamientos de la fluorescencia de PHL y PHC en buffer fosfato de sodio pH 7.4 y en micelas inversas de AOT ($W_o=16$).



(▲) PHL 20 μM en buffer fosfato pH 7.4 K_{sv} : 0.0198 M^{-1} ; (▼) PHC 20 μM en buffer fosfato pH 7.4 K_{sv} : 0.0097 M^{-1} ;
 (■) PHL 20 μM en micela de AOT $W_o=16$ K_{sv} : 0.0088 M^{-1} ; (●) PHC 20 μM en micela de AOT $W_o=16$ K_{sv} : 0.0039 M^{-1}
 Condiciones: 25° C , longitud de onda de excitación: 275 nm.

La similitud en los valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión para el PHL y PHC en micelas de AOT, y la escasa diferencia en sus constantes de Stern-Volmer en el mismo medio, sugieren que la ubicación del residuo de W_{18} de ambos péptidos dentro de la micela es similar.