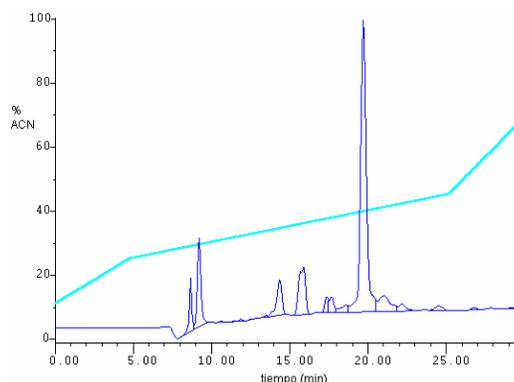


RESULTADOS CAPÍTULO 2

Síntesis y caracterización de Pln149a

El rendimiento de la síntesis del análogo de Plantaricina 149, fue del 34%, obteniéndose 95 mg de péptido crudo (YSLQMGATAIKQVKKLFKKKGG-amida) a partir de 200 mg de resina, escala de síntesis 0.116 mmol (Figura 1-2).

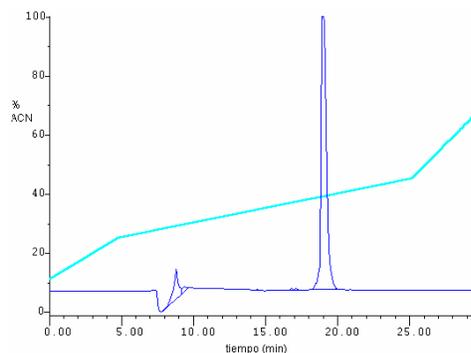
Figura 1-2: HPLC analítico de Pln149a sintética cruda.



Tiempo de retención del pico con mayor porcentaje de área: 19.68 min (69 %). Condiciones experimentales: Columna Delta-Pak C18, 5 μ m, 300 Å, 3,9 x 150 mm (Waters); Gradiente: 10-25 % B (5 min), 25-40 % B (20 min), 40-60 % B (5 min); velocidad de flujo 0.8 mL/min; Detección: 220 nm.

En la Figura 2-2 se puede observar el cromatograma obtenido por HPLC analítico realizado sobre Pln149a purificada. El producto tiene una pureza mayor al 95 %.

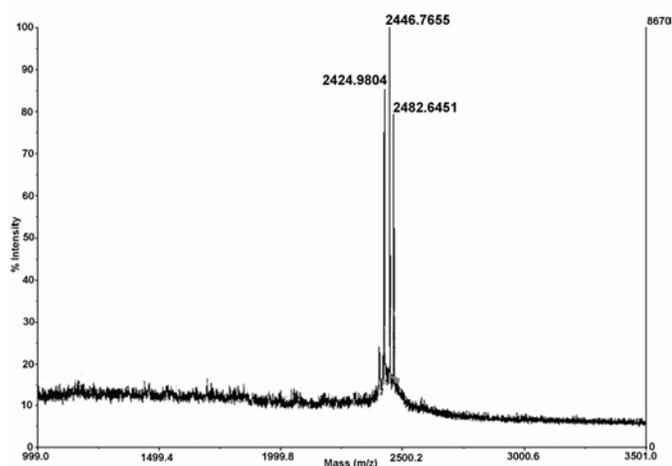
Figura 2-2: HPLC analítico de Pln149a purificada.



Tiempo de retención del pico con mayor porcentaje de área: 19.68 min. (100%). Condiciones experimentales: Columna Delta-Pak C18, 5 μ m, 300 Å, 3,9 x 150 mm (Waters); Gradiente: 10-25 % B (5 min), 25-40 % B (20 min), 40-60 % B (5 min); velocidad de flujo 0.8 mL/min; Detección: 220 nm.

Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF se determinó el peso molecular del producto sintético (Figura 3-2).

Figura 3-2: Espectro MALDI-TOF de Pln149a.



Se observan los valores experimentales de los picos con relación masa/carga (m/z) 2424.9, 2446.8 y 2462.6 Da, que corresponden a los iones MH^+ , Mn^+ y MK^+ respectivamente. Relación masa/carga (promedio teórica): 2423,96 Da.

Posteriormente, la secuencia completa fue confirmada satisfactoriamente mediante secuenciamiento, por el método de Edman automático.

Espectro antimicrobiano y Modo de acción de Pln149a

En la Tabla 1 se observa el espectro inhibitorio de Pln149a. La misma presentó efecto antimicrobiano hacia 6 de las 22 cepas ensayadas, siendo mayor su actividad frente a patógenos de origen alimentario Gram-positivos que frente a cepas de *Lactobacillus*. Pln149a fue activa frente a 4 cepas de *Listeria* y a una cepa de *Staphylococcus aureus* (coagulasa-positivo). El título de la actividad antimicrobiana frente a estas bacterias patógenas Gram-positivas fue de 100 UA/mL (125 μ g/mL), determinado mediante el método de difusión en agar. LA CIM fue de 264 μ M frente a *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3, y mayor a 528 μ M frente a *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21.

La actividad antimicrobiana de Pln149a frente a *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 a pH 5.5 fue menor que la reportada para el péptido aislado a partir de la cepa productora (Kato y col., 1994).

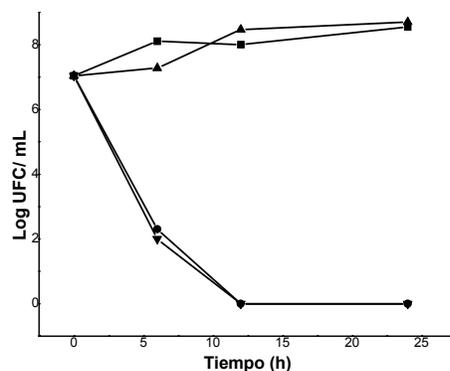
Tabla 1-2: Espectro antimicrobiano de Pln149a (1 mg/mL: 412 μ M).

Cepas indicadoras	Diámetro de la zona de inhibición (mm) a pH 5.5	Diámetro de la zona de inhibición (mm) a pH 7.4
<i>Lactobacillus plantarum</i> DBFIQ LP 28 ^a	-	NE
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP 41 ^a	-	NE
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP 22 ^a	-	NE
<i>L. plantarum</i> DBFIQ LP 38 ^a	-	NE
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	8	NE
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DBFIQ LB 42 ^a	-	NE
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CRL G3 ^c	-	NE
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> NCDO 529 ^b	-	NE
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> NCDO 543 ^b	-	NE
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> DTUNLu 223 ^b	-	NE
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> DTUNLu 245 ^b	-	NE
<i>Staphylococcus aureus</i> DBFIQ S 21 ^a	12	13
<i>Listeria monocytogenes</i> DBFIQ LM 3 ^a	9	10,5
<i>L. monocytogenes</i> ^b DTUNLu 335 BsAs	10.5	11
<i>L. monocytogenes</i> tipo I DTUNLu 328 ^b	8	8
<i>Listeria seeligeri</i> DTUNLu 340 ^b	8	8
<i>Bacillus cereus</i> DBFIQ B 28 ^a	-	NE
<i>Enterococcus</i> DBFIQ (E 25,E 13,E 23,E 24) ^a	-	NE

Diámetro de los pozos: 7 mm; NE: No Ensayado; (-): Ausencia de halo de inhibición. ^aColección de la Cátedra de Microbiología, Fac. Ing. Qca., Univ. Nac. del Litoral, Argentina (FIQ-UNL). ^b Colección del Departamento de Tecnología, Univ. Nac. de Luján, Argentina, (UNLu). ^c Colección de CERELA, CONICET, Argentina (CRL).

A fin de determinar si Pln149a tenía una acción bactericida o bacteriostática frente a *Listeria monocytogenes* DBFIQ LM 3 y *Staphylococcus aureus* DBFIQ S 21, se siguió la evolución de la viabilidad de las dos cepas bacterianas en presencia del péptido en una concentración de 2 mg/mL (concentración final en el ensayo: 82,4 μ M) y al pH al cual mostró mayor actividad (7.4) (Figura 4-2).

Figura 4-2: Efecto bactericida de Pln149a sobre el desarrollo de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* a pH 7.4.



Concentración de péptido: 82.4 μ M

(-■-) Cultivo control de *Listeria monocytogenes*; (-●-) Cultivo de *L. monocytogenes* luego de adicionarle Pln149a;
 (-▲-) Cultivo control de *Staphylococcus aureus*; (-▼-) Cultivo de *S. aureus* luego de adicionarle Pln149a.

Determinación de la actividad hemolítica de Pln149a

La actividad hemolítica de Pln149a fue del orden del 16 % de hemólisis en todo el rango de concentraciones de péptido ensayado (50 a 500 μ g/mL).

Análisis predictivos de estructura secundaria

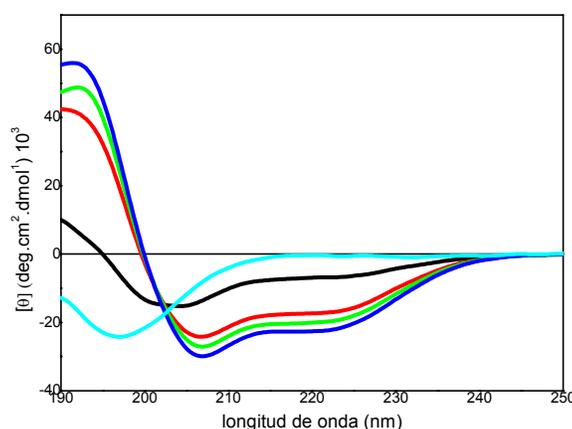
Los porcentajes de estructura secundaria para Pln149a calculados por el programa Antheptrot 4.0, utilizando el método Garnier, fueron de 68 % de α -hélice (entre los residuos Q₄ y K₁₉) 14 %, de lámina beta (entre los residuos Y₁ y Q₄) y 18 % de turn para los tres últimos residuos aminoacídicos (KGG). En forma similar, aplicando el método PSIPRED (Jones, D.T., 1999) sobre la secuencia de Plantaricina 149, se predijo una región helicoidal que se extiende desde M₅ a K₁₉.

Estudios conformacionales por Dicroísmo circular

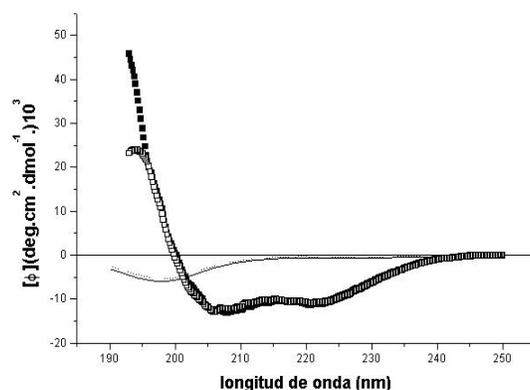
Pln149a presenta en medio acuoso una estructura no ordenada (Figura 5-2a). La deconvolución del espectro de DC confirma lo expuesto, con resultados de 86.4 % de estructura no ordenada, lo cual es consistente con el mínimo pronunciado que se observa en el espectro a 198 nm.

En medio buffer fosfato pH 7.4, el espectro presenta un mínimo aproximadamente a 198 nm (Figura 5-2b). La deconvolución del espectro indica un 68% de estructura no ordenada y un 32% de lámina- β . En medio buffer fosfato pH 5.5 se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con agua, con un 80% de estructura no ordenada, 18% de lámina- β y 2% de estructura α -hélice. El espectro de DC de PIn149a se modificó con el agregado de TFE, solvente que tiene la capacidad de inducir la formación de estructuras secundarias, así como en presencia de micelas inversas de AOT. A diferentes porcentajes de TFE se observaron dos mínimos cercanos a 206 y 223 nm, y un máximo a 190 nm, (Figura 5-2a). Al aumentar el porcentaje de TFE en el medio, el contenido en α -hélice aumentó progresivamente desde 47.3 % de α -hélice al 20 % de TFE, hasta un 99 % de α -hélice al 80 % de TFE. En presencia de micelas inversas de AOT ($W_o=16$) también se observaron cambios conformacionales. El espectro de DC presentó dos mínimos a 206 y 222 nm, y un máximo a 194 nm (Figura 5-2b). Los resultados de la deconvolución evidencian que en presencia de micelas de AOT con buffer fosfato pH 7.4 se produce un incremento en el contenido de α -hélice de hasta 74% y una disminución del porcentaje de estructura no ordenada a 26%; de modo similar, en micelas con buffer fosfato pH 5.5, los cambios ocurren hacia un 78% de α -hélice y 22% de estructura no ordenada.

Figura 5-2 a: Espectros de DC de PIn149a en TFE y agua



(a) (—) PIn149a en TFE (v/v) 20 %; (—) PIn149a en TFE (v/v) 40 %; (—) PIn149a en TFE (v/v) 60 %; (—) PIn149a en TFE (v/v) 80 %; (—) PIn149a en Agua.

Figura 5-2 b: Espectros de DC de Pln149a en buffer y micelas inversas de AOT.

(b) (—) en buffer fosfato pH 5.5; (■) en buffer fosfato pH 5.5 + micelas inversas de AOT ($W_o=16$); (...) en buffer fosfato pH 7.4; (□) en buffer fosfato pH 7.4 + micelas inversas de AOT ($W_o=16$)

En la Tabla 2-2 se muestran los distintos porcentajes de estructura secundaria calculados mediante deconvolución de los diferentes espectros obtenidos.

Tabla 2-2: Estimación del contenido de estructura secundaria de Pln149a a partir de los espectros obtenidos mediante DC.

Estructura secundaria	% α -hélice	% lámina β	% Turn	% No ordenada
agua	4.6	-	7.9	86.4
20% TFE	47.3	14.2	16.8	25
40 % TFE	98.9	1.2	-	-
60 % TFE	98.9	1.2	-	-
80 % TFE	99	1	-	-
buffer fosfato pH 5.5	2	18	-	80
buffer fosfato pH 5.5 + micelas inversas de AOT ($W_o=16$)	78	0	-	22
buffer fosfato pH 7.4	0	32	-	68
buffer fosfato pH7.4 + micelas inversas de AOT($W_o=16$)	74	0	-	26

Espectroscopía de fluorescencia

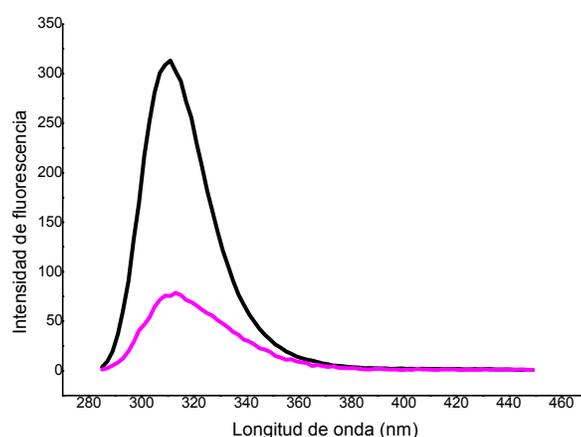
Desplazamientos de la longitud máxima de emisión

Mediante los experimentos de corrimiento espectral (desplazamientos del máximo de emisión) y apagamiento con IK, realizados en presencia de micelas inversas de AOT, se obtuvieron datos que permitieron sugerir la probable ubicación de Pln149a en

la membrana biológica de la célula sensible. En la figura 6-2 se pueden observar los espectros de emisión de PIn149a en buffer fosfato de sodio pH 7.4, y en presencia de micelas inversas con $W_0=16$.

En medio buffer PIn149a presenta un $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión próximo a 310 nm, coincidiendo con lo reportado en la bibliografía para el aminoácido tirosina, en medio acuoso (Lakowicz y col., 1999). La posición del $\lambda_{\text{máx}}$ de emisión de PIn149a no se modificó en presencia de micelas inversas de AOT ($W_0=16$).

Figura 6-2: Espectro de fluorescencia de PIn149a en buffer y micelas inversas de AOT



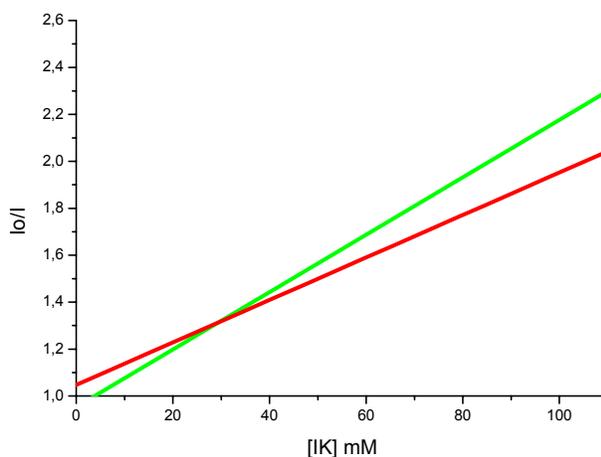
(—) PIn149a, 20 μM en buffer fosfato pH 7.4, (—) PIn149a, 20 μM en micelas de AOT ($W_0=16$)
Condiciones experimentales: 25° C, longitud de onda de excitación 275 nm.

Ensayos de Apagamiento

A través de experimentos de apagamiento se evaluó el grado de accesibilidad del apagador (IK) al fluoróforo (Y_1). Los mismos se realizaron en buffer fosfato de sodio pH 7.4 y en micelas inversas de AOT ($W_0=16$). Se pudo observar mediante los datos de intensidad obtenidos, que la supresión de la fluorescencia ejercida por el apagador sobre el péptido en solución buffer fue similar a la detectada para el aminoácido libre

tirosina en el mismo medio. Los resultados se presentan mediante la curva de Stern-Volmer (Figura 7-2).

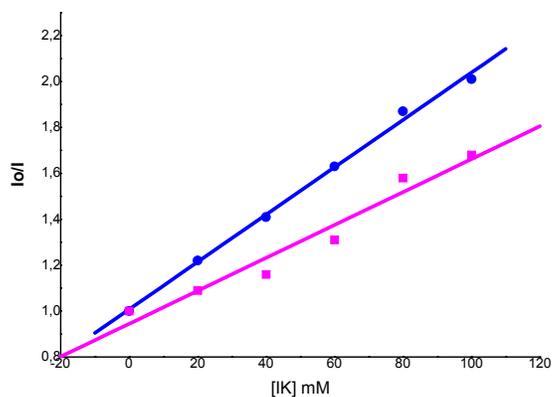
Figura 7-2: Comparación del apagamiento de tirosina libre y Pln149a en buffer.



(—) Tirosina 20 μM , en buffer fosfato pH 7.4, $K_{sv}= 0.012 \text{ M}^{-1}$; (—) Pln 149a 20 μM , en buffer fosfato pH: 7.4, $K_{sv}= 0.009 \text{ M}^{-1}$. Condiciones experimentales: 25 $^{\circ}\text{C}$ y longitud de onda de excitación 275 nm.

Si se compara el apagamiento que presenta Pln149a en medio buffer y en micelas inversas de AOT ($W_o=16$), se observa también que las diferencias no son importantes (Figura 8-2).

Figura 8-2: Comparación del apagamiento de Pln149a en buffer y micelas de AOT.



(—) Pln149a, 20 μM en buffer fosfato pH 7.4, $K_{sv}: 0.0103 \text{ M}^{-1}$; (—) Pln149a, 20 μM en micelas inversas con $W_o=16$ $K_{sv}: 0.007 \text{ M}^{-1}$. Condiciones experimentales: 25 $^{\circ}\text{C}$ y longitud de onda de excitación 275 nm.

Para el análisis de las Figuras 7-2 y 8-2 se debe tener en cuenta que a una misma concentración de apagador (mM), una relación I₀/I mayor, es indicativa de una mayor interacción del apagador con el fluoróforo; en otras palabras, el fluoróforo, ya sea libre o formando parte de una cadena peptídica, está más expuesto a la acción del IK.