

EFFECTO DE LA CONJUGACIÓN DE UN PÉPTIDO ANTIMICROBIANO CON ÁCIDOS GRASOS ACETILÉNICOS, RAMIFICADOS Y METOXILADOS

Verónica Húmpola¹, Carolina Rey¹, Néstor Carballeira³, Arturo Simonetta², Georgina Tonarelli¹.

- ¹ Departamento de Química Orgánica, FBCB-UNL. Santa Fe, 3000, Argentina.
E-mail: mvhumpola@hotmail.com
- ² Cátedras de Microbiología y Biotecnología, Dpto. de Ingeniería en Alimentos, FIQ-UNL. Santa Fe, 3000, Argentina.
- ³ Departamento de Química, Universidad de Puerto Rico, Río Piedras Campus, P.O. Box 23346, San Juan, PR 00931, USA.

Introducción

La mayoría de los péptidos antimicrobianos contienen entre 10 y 40 residuos aminoacídicos, son catiónicos e hidrofóbicos, y adoptan estructuras anfipáticas en las proximidades de la membrana plasmática. A diferencia de los antibióticos convencionales, estas moléculas tienen como principal blanco de acción la membrana microbiana. Se ha demostrado que la conjugación de péptidos con ácidos grasos saturados aumenta la actividad antimicrobiana y amplía el espectro de inhibición, incluyendo a levaduras y hongos filamentosos (1). También se ha reportado que ácidos grasos acetilénicos conteniendo entre 16 y 20 átomos de carbono, aislados de raíces de plantas, presentan propiedades antifúngicas (2).

Por otra parte, el ácido (Z)-17-metil-13-octadecenoico, originariamente aislado de la esponja marina *Polymastia penicillus*, y posteriormente sintetizado por Carballeira y col. (3), presenta actividad antiprotozoaria.

Partiendo de la base de que el ácido decanoico (C10:0) es activo frente a *Candida albicans* a 10 mM, se han sintetizado ácidos grasos saturados metoxilados, entre ellos el 4-metoxidecanoico racémico, que ha demostrado ser 17 veces más potente que el ácido decanoico frente a *Candida albicans* y a *Cryptococcus neoformans* (4).

En este trabajo se utilizó como modelo un péptido antibacteriano cuya secuencia deriva parcialmente de una bacteriocina natural, y se lo conjugó con ácidos grasos saturados e insaturados con diferentes características estructurales, a fin de evaluar el efecto de la conjugación sobre la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram (+) y Gram (-), y cepas del género *Candida*.

Resultados

El péptido antimicrobiano A2 (IKQVKKLFKK) se sintetizó mediante la química Fmoc en fase sólida y se aciló en su extremo N-terminal con los siguientes ácidos grasos: 6-hexadecinoico (C16:1), 6-heptadecinoico (C17:1), 6-nonadecinoico (C19:1), 6-eicosinoico (C20:1), (Z)-17-metil-13-octadecenoico (17-Me- Δ^{13} -18:1), 4-metoxidecanoico (4-OMe-10:0) y decanoico (C10:0), empleando como reactivo de acoplamiento PyBOP/DIEA/HOBt (2:4:2).

Los resultados demostraron que la conjugación con ácidos grasos aumenta la actividad antibacteriana de A2 y le otorga actividad antifúngica. En este sentido, los análogos conjugados con los ácidos grasos 6-heptadecinoico (C17:1), 17-Me- Δ^{13} -18:1, 4-OMe-10:0 y C10:0 fueron los más activos frente a todas las bacterias Gram (+) y (-) ensayadas, con CIM comprendidas entre 1,3 y 21,2 μ M (Tabla 1). Asimismo, frente a las cepas de levaduras los análogos más activos fueron los conjugados con 17-Me- Δ^{13} -18:1 y 4-OMe-10:0, con CIM que van desde 41,6 a 88,7 μ M (Tabla 2).

Se investigó la actividad hemolítica de los análogos frente a glóbulos rojos humanos. Los resultados evidenciaron que la conjugación con ácidos grasos con cadena

hidrocarbonada larga (>C16) confiere a los péptidos una elevada actividad hemolítica, mientras que la conjugación con ácidos grasos de cadena mediana (C10) produjo un leve incremento en la actividad hemolítica, a altas concentraciones.

Se determinó el Índice Terapéutico (IT), el cual se define como la relación entre la Concentración Hemolítica Mínima (CHM, mínima concentración de péptido que produce el 100% de hemólisis) y la CIM.

Los lipopéptidos C10:0-A2 y 4-OMe-10:0-A2 presentaron los mejores valores de IT frente a bacterias Gram (+) (IT= 200,7 y 123,7, respectivamente) y Gram (-) (IT= 571,4 y 176,8, respectivamente), mientras que los demás análogos presentaron bajos ITs debido a que poseen elevada actividad hemolítica (Tabla 1).

Por otro lado, los ITs frente a levaduras fueron muy bajos para todos los análogos estudiados, debido a su elevada actividad hemolítica y moderada actividad antifúngica (Tabla 2), siendo 4-OMe-10:0-A2 el que presentó el mayor IT (IT = 13,5).

Tabla 1. CIM e IT de los análogos sintetizados frente a bacterias Gram (+) y Gram (-)

Péptidos	CIM (µM)							IT	
	Gram (-)				Gram (+)			Gram (-)	Gram (+)
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Salmonella</i> sp.	<i>S. aureus</i> ATCC 25929	<i>S. aureus</i> MR °	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		
A2	12,7	25,4	25,4	6,35	12,7	12,7	50,8	45,8	31,5
*C16:1-A2	5,4	21,4	2,7	5,4	21,4	2,7	21,4	11,5	6,6
*C17:1-A2	1,3	21,2	2,7	2,7	10,6	2,7	1,3	1,8	2,6
*C19:1-A2	5,2	20,9	5,2	2,6	10,4	2,6	10,4	1,5	1,6
*C20:1-A2	5,2	20,7	10,3	10,3	10,3	5,2	20,7	0,5	0,5
17-Me-Δ ¹³ -C18:1-A2	1,3	10,4	1,3	2,6	2,6	2,6	10,4	3,2	2,4
4-OMe-C10:0-A2	2,8	11,1	2,8	1,4	5,5	2,8	11,1	176,8	123,7
C10:0-A2	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	2,12	1,4	571,4	200,7

(*) ácidos grasos acetilénicos; (°) metilino Resistente

Tabla 2. CIM e IT de los análogos sintetizados frente a levaduras

Péptido	CIM (µM)			IT
	<i>C. albicans</i> PECC 2	<i>C. albicans</i> DBFIQ 1	<i>C. tropicalis</i> DBFIQ 3	
A2	>203,4	>203,4	>203,4	< 4
C16:1-A2	171,5	>171,5	>171,5	0,6
C17:1-A2	>170	>170	>170	< 0,07
C19:1-A2	166,8	166,8	>166,8	0,08
C20:1-A2	82,7	>165,3	165,3	0,04
17-Me-Δ ¹³ -18:1-A2	41,6	83,3	41,6	0,2
4-OMe-10:0-A2	44,4	88,7	44,4	13,5
C10:0-A2	90,6	90,6	90,6	8,8

Conclusiones

En base a estos resultados se puede concluir que los péptidos conjugados con ácido 6-heptadecinoico, 17-Me-Δ¹³-18:1, 4-OMe-10:0 y C10:0 son los más promisorios para realizar estudios más extendidos sobre su aplicación como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades que tienen como agentes etiológicos a bacterias Gram (+) y Gram (-) y a levaduras.

Referencias

- 1.-Siano, A.; Húmpola, M.V.; Rey, M.C.; Simonetta, A.; Tonarelli, G.G. (2011). Interaction of acylated and substituted antimicrobial peptide analogs with phospholipid-polydiacetylene vesicles. Correlation with their biological properties. *Chem Biol Drug Des.*, 78:85-93.
- 2.-Li, X-C.; Jacob M.R.; Khan, S.I.; Ashfaq, M.K.; Babu, K.S.; Agarwal, A.K.; ElSohly, H.N.; Manly, S.P.; Clark, A.M. (2008). Potent in vitro antifungal activities of naturally occurring acetylenic acids. *Antimicrob Agents Chemother.*, 52:2442–2448.
- 3.-Carballeira, N.M.; Montano, N.; Balaña-Fouce, R.; Prada, C.F. (2009). First total synthesis and antiprotozoal activity of (Z)-17-methyl-13-octadecenoic acid, a new marine fatty acid from the sponge *Polymastia penicillus*. *Chem Phys Lipids*, 161(1):38-43.
- 4- Carballeira, N.M.; Miranda, C.; Parang, K. (2009). The first total synthesis of (±)-4-methoxydecanoic acid: a novel antifungal fatty acid. *Tetrahedron Lett.*, 50: 5699–5700.