

ESTUDIOS CONFORMACIONALES Y CONFIGURACIONALES DE CICLOLINOPÉPTIDOS EN MUESTRAS DE SEMILLAS DE *LINUM USITATISSIMUM*

Stella M Battista, Alicia B. Pomilio

PRALIB (CONICET, UBA), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, C1113AAD Buenos Aires, Argentina.
e-mail: battistasm@yahoo.com.ar; pomilio@ffyb.uba.ar

Introducción

Los ciclopéptidos son compuestos de interés debido a su bioactividad y al desafío que plantean su aislamiento, purificación, y en especial, su elucidación estructural. Se han descrito en animales, plantas, hongos, bacterias, insectos y seres humanos, con una variedad de actividades, como: citotóxica, citostática, antifúngica, antiviral, antibacteriana, estimulante de las plantas, insecticida, anti-malárica, estrogénica, sedante, nematocida, inmunosupresora e inhibidora enzimática.

Los ciclopéptidos pueden estar formados por *L*- α -aminoácidos proteínogénicos y también por isómeros *D* y aminoácidos no proteínicos. En la naturaleza, los ciclopéptidos y un gran número de péptidos lineales que contienen aminoácidos no proteínogénicos no son sintetizados dentro de los ribosomas mediante la biosíntesis de proteínas, sino más bien mediante complejos multi-enzimáticos, que activan a los aminoácidos como tiorésteres.

En trabajos anteriores [1], hemos destacado la presencia, las estructuras y la bioactividad de los ciclopéptidos en plantas superiores y en hongos superiores. Asimismo, la actividad antimicrobiana que los ubica como potenciales agentes terapéuticos antimicrobianos, cuyos QSARs son de interés para el diseño de nuevas estructuras bioactivas [2]. Estos péptidos presentan generalmente actividad de amplio espectro contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras, hongos y virus.

Más aún, la demostración experimental de la presencia de péptidos antimicrobianos en varios trastornos humanos inflamatorios inexplicables puede proporcionar nuevos enfoques terapéuticos para el tratamiento de la enfermedad.

Si bien hemos estudiado, y continuamos en ello, los ciclopéptidos presentes en hongos superiores como los Basidiomycetes [3,4], en esta oportunidad resultaron de nuestro interés los presentes en el género *Linum* (familia: Linaceae), que ha sido objeto de investigaciones químicas y bioquímicas de otros autores centradas en la semilla oleaginosa común y en los lignanos [5,6,7] para uso en terapia potencial farmacéutica o nutracéutica para algunas formas de cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares y nefritis lúpica [8,9].

El género *Linum* comprende alrededor de 200 especies de hierbas anuales o perennes o subarbustos, de las cuales hemos seleccionado *Linum usitatissimum*, dado que esta especie está muy difundida en Argentina y es utilizada como fuente del aceite de lino, cuya característica distintiva es su alta concentración de ácido α -linolénico (18:3 n-3), y para obtener las fibras para el hilado de lino [9].

El presente trabajo tiene como objetivo analizar los péptidos cíclicos más importantes aislados de semillas de *Linum usitatissimum* (Linaceae), centrando la atención en sus estructuras, estudios espectrales, configuracionales y conformacionales, así como en la bioactividad.

Metodología

Extracción de los péptidos. Se utilizaron dos métodos de extracción, cuyos resultados fueron comparados. En una de ellas las semillas se extrajeron con MeOH en caliente. El extracto metanólico fue purificado por cromatografía.

En el otro método de extracción, las semillas se extrajeron con 100 ml de acetona a temperatura ambiente durante toda la noche. Después de concentrar la mezcla al vacío, se la disolvió en metanol y se la hidrolizó con NaOH 10%. Después de evaporarla a presión reducida, la fracción que contenía péptidos fue aislada por extracción con acetato de etilo, evaporada y usada en la purificación.

Purificación y obtención de los ciclopéptidos: El extracto obtenido fue sometido a cromatografía en columna de resina poliaromática polimérica (tipo poliestireno) adecuada para compuestos hidrofóbicos: Diaion HP-20 o equivalente, con un sistema de gradientes de agua-MeOH. Las fracciones eluidas con MeOH 100% fueron purificadas una vez más mediante cromatografía en columna de silicagel utilizando un sistema de gradientes de CHCl₃-MeOH. La fracción eluida con MeOH 10%, fue purificada por HPLC en fase reversa con una columna C18 y con los sistemas de solventes de MeOH 70-80% y CH₃CN 40-60% para dar los ciclopéptidos: A (0,0070%), B (0,0004%), C (0,0030%), D (0,0012%) y E (0,0002%), como agujas incoloras o polvo incoloro, según el caso.

Identificación de los ciclopéptidos: Se analizó cada uno de los ciclopéptidos por técnicas espectroscópicas: ¹H- y ¹³C-RMN mono y bidimensional y aplicación de distintas técnicas de espectrometría de masa (EM).

Determinación de la configuración de los aminoácidos componentes de cada ciclopéptido:

Se utilizó el método de Marfey para determinar si la configuración de cada aminoácido era *D* o *L*.

Estudio de las conformaciones: Las estructuras electrónicas y el análisis conformacional de los ciclopéptidos se obtuvieron por primera vez a partir de parámetros moleculares sobre la base de métodos AM1 y *ab initio*.

Las geometrías de las moléculas fueron optimizadas a nivel AM1 con el programa Hyperchem [10]. El gradiente de convergencia empleado fue de 0,01 kcal/Å.

Los conformeros de menor energía además estudiados con DFT, implementado en el programa Gaussian [11]. Las optimizaciones de geometría se realizaron de acuerdo al método B3LYP. Se usó el conjunto base 6-31G ** para todos los átomos. El análisis vibracional se realizó en el mismo nivel de teoría como se indicara para todas las geometrías optimizadas a fin de verificar si eran mínimos locales o puntos saddle sobre la superficie de energía potencial de la molécula. Los mapas de energía potencial (MEPs) se calcularon con el programa Gaussian.

Resultados y Discusión

Los péptidos de semillas de lino fueron extraídos mediante dos métodos diferentes que se comparan en este trabajo. El método de extracción aplicado a pH básico elimina todos los péptidos lineales presentes en la muestra, pero también los péptidos cíclicos que contienen los residuos Asp o Glu.

Después de realizar una purificación cuidadosa y controlada en cada etapa, se obtuvieron las estructuras de los ciclopéptidos hidrofóbicos de las semillas de lino, que fueron denominados **ciclolinopéptidos**, en base a 2D RMN, EM y degradación química. Así se identificaron los nonapéptidos cíclicos: **A** [*ciclo*(Pro-Pro-Phe-Phe-Leu-Ile-Ile-Leu-Val)], **B** [*ciclo*(Pro-Pro-Phe-Phe-Val-Ile-Met-Ile-Leu)] y **C** [*ciclo*(Pro-Pro-Phe-Phe-Val-Ile-Met(O)-Leu-Ile)], y los octapéptidos cíclicos: **D** [*ciclo*(Pro-Phe-Phe-Trp-Ile-Met(O)-Leu-Leu)], **E** [*ciclo*(Pro-Leu-Phe-Ile-Met(O)-Leu-Val-Phe)], **F** [*ciclo*(Pro-Phe-Phe-Trp-Val-Met-Leu-Met)] y **G** [*ciclo*(Pro-Phe-Phe-Trp-Ile-Met-Leu-Met)]. Los ciclolinopéptidos D y E se detectaron en pequeñas cantidades; se caracterizaron por

poseer óxido de metionina entre sus aminoácidos componentes. Estos péptidos podrían resultar de la oxidación de sus precursores conteniendo metionina en lugar de su óxido.

Se demostró por el método de Marfey, que todos los aminoácidos presentaban configuración *L*, menos para la configuración del sulfóxido de metionina.

Se obtuvo la conformación de menor energía para las distintas moléculas mediante los métodos AM1 y *ab initio*. Se calcularon los cambios estereoquímicos, la energía total, los potenciales electrostáticos asignados, los cálculos de orbitales moleculares y los momentos dipolares. Se compararon ambos métodos semiempíricos y *ab initio*, demostrando un buen acuerdo. Se discutieron en cada caso las limitaciones de los métodos. Se buscaron motivos estructurales, como β - y γ -turns o β -sheets.

Las principales características de la conformación de los ciclolinopéptidos fueron un β -turn tipo VI centrado en Pro₁-Pro₂, con un enlace peptídico *cis* entre estos residuos [12] y un γ -turn (estructura C₇) centrado en Ile₆. Se observaron dos puentes de hidrógeno intramoleculares en las conformaciones de baja energía.

El ciclolinopéptido A fue uno de los primeros péptidos cíclicos descubierto de fuentes naturales; se conoce desde 1959 [13]; el ciclolinopéptido B se encontró en 1968 [14] y presentó actividad inmunosupresora [15]. El ciclolinopéptido A y sus análogos sintéticos mostraron actividad inmunosupresora [16], cuyo mecanismo es similar al de ciclosporina [17]. El ciclolinopéptido A presenta además actividad antimalárica [18] y propiedades hepatoprotectoras frente a la intoxicación por las toxinas de *Amanita phalloides* [19].

Conclusiones

Las estructuras se elucidaron mediante métodos químicos y técnicas espectroscópicas. Se discuten los análisis configuracionales y conformacionales de algunos de estos ciclopéptidos bioactivos. Los estudios conformacionales de los ciclopéptidos naturales y sus derivados se relacionaron con los requerimientos estereoquímicos de estos compuestos bioactivos.

Referencias

- [1] Pomilio A.B., Battista M., and Vitale A.A. *Curr Org Chem* 2006; 10 (16): 2075-2121.
- [2] Pomilio, A.B., Battista, SM., and Vitale, A.A. 2010. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) studies on bioactive cyclopeptides. Cap. 1. En: *QSPR-QSAR Studies on Desired Properties for Drug Design*. Research Signpost, Kerala. ISBN: 978-81-308-0404-0
- [3] Battista M., Vitale A., Pomilio A.B. *Molecules* 2000; 5: 489-490.
- [4] Pomilio A.B., Battista M., Vitale A. *J Mol Str Theochem* 2001; 536, 243-262.
- [5] Weinges K., Nader F., Künstler K. *Introduction*. En: *Chemistry of Lignans*. Ed Rao CBS, Andhra Pradesh, 1978; 1-38.
- [6] Broomhead A.J., Dewick P.M. *Phytochemistry* 1990; 29: 3839-3844.
- [7] Mohagheghzadeh A., Schmidt T.J., Alfermann A.W. *J. Nat Prod.* 2002; 65: 69-71.
- [8] Broomhead A.J., Dewick P.M. *J Pharm. Pharmacol.* 1988; 40 Suppl: 55P.
- [9] Westcott N.D., Muir A.D. *Chemical studies on the constituents of Linum spp.* Cap. 3. En: *Flax: The genus Linum*. Muir A.D. and Westcott N.D. (eds), Routledge, Taylor & Francis group, London and New York, 2003.
- [10] HyperChem Release 7.5, Hypercube Inc., USA. <http://www.hyper.com>
- [11] Gaussian 98, Revision A.7, Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, RobbMA, Cheeseman JR, Zakrzewski VG, Montgomery JA Jr,Pople J.A. 1998; Gaussian, Inc., Pittsburgh PA.

- [12] Matsumoto T., Shishido A., Morita H., Itokawa H., Takeya K. *Tetrahedron* 2002; 58: 5135-5140.
- [13] Kaufmann H.P., Tobschirbel A. *Chem. Ber.* 1959; 92: 2805-2809.
- [14] Weygand F. *Z. Anal. Chem* 1968; 243: 2-17.
- [15] Morita H., Shishido A., Matsumoto T., Itokawa H., Takeya K. *Tetrahedron* 1999; 55: 967-976.
- [16] Wieczorek Z., Bengtsson B., Trojnar J., Siemion I.Z. *Peptide Res.* 1991; 4: 275-283.
- [17] Gaymes T.J., Cebrat M., Siemion I.Z., Kay J.E. *FEBS Lett* 1997; 418: 224-227.
- [18] Bell A., McSteen P.M., Cebrat M., Picur B., Siemion I.Z. *Acta Pol. Pharm* 2000; 57 (Suppl.):134-136.
- [19] Kessler H., Heupt M., Frimmer K., Zigler K. *Int. J. Peptide Protein Res.* 1986; 29: 621-628.