

# ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE CICLOLINOPÉPTIDOS DE *LINUM USITATISSIMUM* Y CICLOPÉPTIDOS DE *AMANITA PHALLOIDES*

Stella M. Battista, Alicia B. Pomilio

IBIMOL (ex PRALIB) (UBA, CONICET), 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

## INTRODUCCION

En la actualidad se ve la importancia de elucidar las actividades de los microcomponentes de los distintos productos naturales usados industrialmente, siendo los ciclopéptidos compuestos bioactivos, que presentan un desafío en cuanto al aislamiento, purificación y análisis estructural [1].

Poseen las siguientes actividades: citotóxica, citostática, antifúngica, antiviral, antibacteriana, estimulante vegetal, insecticida, anti-malárica, estrogénica, sedante, nematocida, inmunosupresora e inhibidora enzimática [2].

Presentes en todos los Reinos, por lo que en este trabajo comparamos ciclopéptidos con cadenas de aminoácidos iguales en número y con presencia de un grupo indol en Reino Vegetalia y Reino Fungi.

Compararemos, en particular, el ciclolinopéptido F (CLF) (Fig. 1) y la  $\alpha$ -amanitina (Fig. 2), ambos octapéptidos cíclicos que poseen triptofano (Trp) en su estructura.

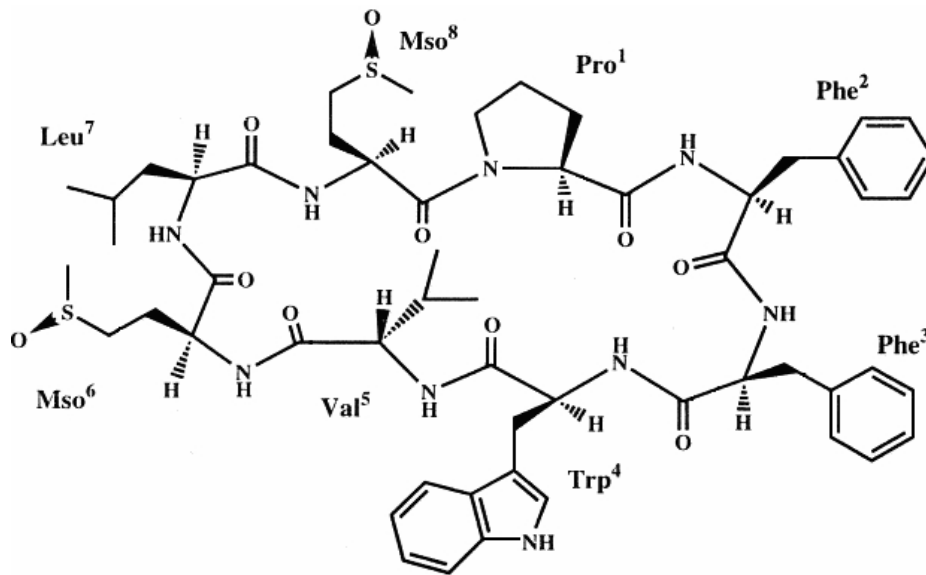
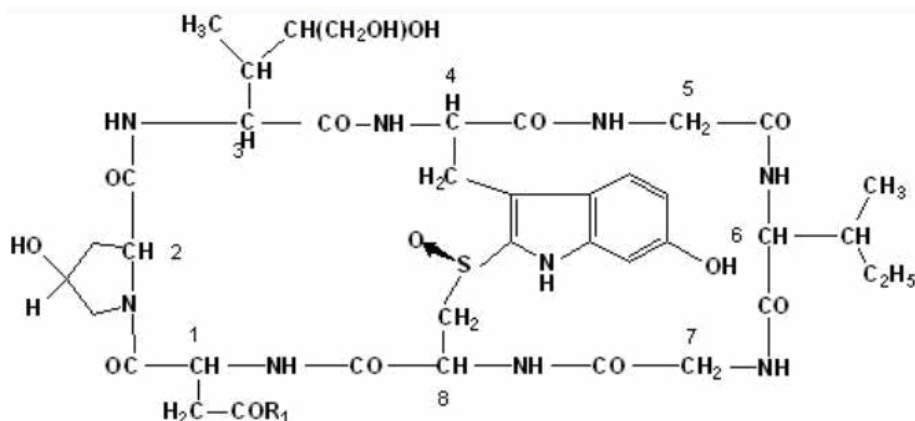


Figura 1: Ciclolinopéptido F (CLF)



$\alpha$ -Amanitina: R<sub>1</sub> = NH<sub>2</sub>  
 $\beta$ -Amanitina: R<sub>1</sub> = OH

Figura 2:  $\alpha$ - y  $\beta$ -Amanitinas.

## METODOLOGÍA

### Semillas de *Linum usitatissimum* (Linaceae):

**Extracción I:** MeOH en caliente, posterior purificación por cromatografía en columna de resina Diaion HP-20 o equivalente, con gradiente de agua-MeOH.

**Extracción II:** acetona a temperatura ambiente toda la noche, concentrar al vacío, disolver en MeOH, hidrolizar con NaOH 10%, evaporar a presión reducida, fracción extraída con acetato de etilo, evaporada.

Las fracciones eluidas con MeOH 100% fueron purificadas en columnas de silicagel usando gradientes de CHCl<sub>3</sub>-MeOH. Las fracciones eluidas con MeOH 10% fueron purificadas por HPLC en fase reversa con columna C<sub>18</sub>, solventes MeOH 70-80% y CH<sub>3</sub>CN 40-60% fracción que contiene los ciclopéptidos.

**Identificación:** Por <sup>1</sup>H- y <sup>13</sup>C-RMN mono y bidimensional, EM. Determinación de la configuración *L* para cada aminoácido por el método de Marfey.

**Estudios conformacionales:** Determinación de la conformación (ciclopéptido extraído) con método de AM1 y *ab initio*.

Las geometrías de las moléculas fueron optimizadas a nivel AM1 con el programa Hyperchem [4]. El gradiente de convergencia empleado fue de 0,01 kcal/Å.

Los conformeros de menor energía fueron, además, estudiados con DFT, implementado en el programa Gaussian [5]. 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.

### Carpóforos de *Amanita phalloides*:

La preparación de la muestra antes del procesamiento de la misma se realizó separando los restos orgánicos e inorgánicos del carpóforo fresco. El material así preparado fue seccionado por medio de cuchillas de acero.

El procesamiento se realizó comparativamente a distintas temperaturas. Cada muestra constaba de 10 g de hongo fresco por cada 100 ml de metanol. Una de las muestras fue extraída en metanol a temperatura ambiente con un tiempo de contacto de una semana aproximadamente. La otra, se la procesó con metanol a reflujo durante 1 hora.

Este alcohol permitió la solubilización de los ciclopéptidos; se filtró al vacío con papel de filtro Whatman 1 con embudo de vidrio fritado. La torta obtenida se siguió extrayendo en caliente una vez más con igual procedimiento.

Para cada muestra los filtrados obtenidos fueron mezclados y llevados a

sequedad a temperatura de 40 °C trabajando a presión reducida. El residuo fue tratado con cloruro de metileno o con éter de petróleo fracción 60-80° varias veces para la extracción y lavado de los compuestos lipídicos. El remanente se resuspendió con metanol, se filtró, se evaporó al vacío, nuevamente se resuspendió en metanol, se filtró y se llevó a concentración de 1g de peso seco por mililitro de solución.

El residuo final en el procesamiento a escala preparativa fue disuelto en agua y se corrió en columna de Amberlite XAD-4 que es un adsorbente polimérico no iónico (Sigma) para la eliminación de sales en los extractos eluidos, quedando retenidos los ciclopeptidos.

La columna se eluyó con agua-etanol (1:1), la purificación se realizó a pH 3 en columna de Sephadex LH-20 seguida de otro desalado con XAD-4 y luego la elución continuó en Sephadex LH-20 a pH neutro.

Cada fracción fue monitoreada por cromatografía en capa delgada (CCD; TLC) y cromatografía en capa delgada de alta resolución (CCDAR; HPTLC). El control de pureza fue realizado por electroforesis capilar de alta resolución.

Para cada compuesto fue ensayada la solubilidad en agua, metanol, etanol, alcoholes superiores, ligroína, cloroformo, piridina, dimetilformamida, dimetilsulfóxido, éter etílico, tolueno y acetato de etilo. La aplicación de electroforesis en gel de poliacrilamida para la definición de los péptidos cíclicos tóxicos presentes en extractos de *Amanita* resultó ser un método muy útil dada su sensibilidad y su reproducibilidad. Se determinaron las movilidades de amanitinas y faloidinas. La sensibilidad de este método de análisis es de 5-10 mg de toxinas en la muestra [6,7].

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Después de realizar una purificación cuidadosa y controlada en cada etapa, se obtuvieron las estructuras de los ciclopeptidos hidrofóbicos de las semillas de lino, que fueron denominados *ciclolinopéptidos*, en base a 2D RMN, EM y degradación química: **A** [*ciclo*(Pro-Pro-Phe-Phe-Leu-Ile-Ile-Leu-Val)], **B** [*ciclo*(Pro-Pro-Phe-Phe-Val-Ile-Met-Ile-Leu)], **C** [*ciclo*(Pro-Pro-Phe-Phe-Val-Ile-Met(O)-Leu-Ile)], **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)].

El octapeptido cíclico F o ciclolinopéptido F (CLP F) fue comparado estructuralmente con el octapeptido cíclico de origen fúngico  $\alpha$ -amanitina: *ciclo*[L-Asp-*trans*-L-4-HOPro-(R)-4,5-diHO-L-Ileu-6-HO-2-mercapto-L-Trp-Gly-L-Ileu-Gly-L-Cys] (4→8)-sulfuro-(R)-S-óxido cíclico.

Las estructuras se elucidaron mediante métodos químicos y técnicas espectroscópicas. Se discuten los análisis configuracionales y conformacionales comparativos de estos ciclopeptidos bioactivos.

Las principales características de la conformación de los ciclolinopéptidos fueron un  $\beta$ -*turn* tipo VI centrado en Pro<sub>1</sub>-Pro<sub>2</sub>, con un enlace peptídico *cis* entre estos residuos [3] y un  $\gamma$ -*turn* (estructura C<sub>7</sub>) centrado en Ile<sub>6</sub>. Se observaron dos puentes de hidrógeno intramoleculares en las conformaciones de baja energía.

CLF presenta dentro de la cavidad al Trp y en la cara interna no hay restos alifáticos.

La  $\alpha$ -amanitina presenta a la unidad plana del indol, con el resto del ciclopeptido en forma lenticular, permitiendo explicar la facilidad de formación de complejos  $\pi$  por interacción de compuestos de naturaleza aromática tanto con la parte superior como con la inferior del heterociclo expuesto.

## 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] Matsumoto T., Shishido A., Morita H., Itokawa H., Takeya K. *Tetrahedron* 2002; 58: 5135-5140.
- [4] HyperChem Release 7.5, Hypercube Inc., USA. <http://www.hyper.com>
- [5] 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.
- [6] Battista M., Vitale A., Pomilio A.B. *Molecules* 2000; 5: 489-490.
- [7] Pomilio A.B., Battista M., Vitale A. *J Mol Str Theochem* 2001; 536: 243-262.