

PÉPTIDOS HÍBRIDOS CON POTENCIAL APLICACIÓN COMO BIOPLAGUICIDAS PARA EL CONTROL DE PLAGAS DE *Oryzaephilus surinamensis*

de Orellana, Milagros

Laboratorio de Péptidos Bioactivos, Departamento de Química Orgánica, FBCB-UNL

Director: Spinelli, Roque

Co-Director: Siano, Álvaro Sebastián

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: péptidos naturales, bioplaguicidas, inhibidores de las colinesterasas

INTRODUCCIÓN

La aplicación de agroquímicos conlleva a efectos deletéreos como la contaminación de suelo, agua, aire, la eliminación de especies benéficas y la persistencia en el ambiente, así como problemas en la salud humana. Uno de los mecanismos de acción más importantes de los plaguicidas actuales se enfoca en el bloqueo de las enzimas colinesterasas (AChE y BChE), pero estos poseen la desventaja de inhibirlas de modo irreversible ocasionando un daño severo, tanto en la biota como en el personal que lo aplica. Ante estos efectos indeseados, se evidencia la necesidad de desarrollo de métodos alternativos para el manejo de plagas que cumplan la función de proteger a los cultivos pero que, al mismo tiempo, generen un menor impacto ambiental y mayor inocuidad de los alimentos.

Los péptidos naturales o biopéptidos se han posicionado como moléculas pioneras tanto en la medicina como en la biotecnología y su aplicación en la agricultura ha tomado gran importancia. Esto es debido al amplio rango de bioactividades que poseen, entre las que destaca la capacidad de inhibir las colinesterasas (R Spinelli et al., 2023). Entre ellos, de la especie *Boana cordobae* (Anura: Hylidae), se destacan los péptidos Bcl-4 y Bcl-5. El primero posee una notable capacidad de inhibir la AChE, mientras que Bcl-5 una elevada potencia inhibitoria de la BChE, con valores de inhibición superiores a inhibidores de colinesterasas comerciales. Sin embargo, no presentan actividad dual, hecho que los hace excelentes candidatos para la generación de bibliotecas de moléculas híbridas. La síntesis de péptidos en fase sólida es una metodología versátil que permite el diseño racional, y la realización de modificaciones específicas, tanto estructurales como de aminoácidos, para la generación de bibliotecas de moléculas de un amplio espectro (A Petzer y col., 2014).

Título del proyecto: BIOPLAGUICIDAS: LOS PÉPTIDOS COMO PLATAFORMA NATURAL DE BIOPROSPECCIÓN AGROECOLÓGICA.

Instrumento: AsaCTel 2021-077

Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: Agencia santafesina de ciencia tecnología e innovación

Director/a: Roque Spinelli



Este trabajo consistió en el diseño de moléculas híbridas entre Bcl-4 y Bcl-5 con el objetivo de potenciar sus actividades inhibitorias frente a AChE y BChE y actuar como bioplaguicidas. La capacidad inhibitoria de los híbridos se determinó siguiendo el micrométodo de Ellman, y la capacidad insecticida a partir de un ensayo de contacto frente a la plaga gorgojo *Oryzaephilus surinamensis* (gorgojo del maní) y *Ulmoides dermestoides* (gorgojo chino). Todos los péptidos ensayados demostraron inhibir las colinesterasas y contar con actividad insecticida.

OBJETIVOS

- Diseñar y sintetizar bibliotecas de péptidos híbridos mediante la unión de Bcl-4 y Bcl-5, utilizando síntesis en fase sólida Fmoc.
- Evaluar la capacidad biológica in vitro de los híbridos generados frente a las enzimas colinesterasas (AChE y BChE) y la actividad biopesticida frente a gorgojos de la especie *Oryzaephilus surinamensis*.

METODOLOGÍA

Síntesis de los péptidos

Los péptidos fueron previamente sintetizados en el laboratorio empleando síntesis en fase sólida. Se utilizó la resina Rink SS 1 % DVB. La desprotección del grupo Fmoc se realizó con piperidina 20 % en dimetilformamida (DMF), y los acoplamientos con tetrafluorborato de O-(benzotriazol-1-il)-tetrametiluronio (TBTU), en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y diisopropiletilamina (DIPEA), en DMF. La separación de la resina y la eliminación de los protectores fue realizada con ácido trifluoroacético en presencia de scavengers. Se emplearon linkers de 2, 4, 6 y 8 átomos de carbono para unir los péptidos (Bcl-4 y 5), generando un total de 8 híbridos. Éstos fueron analizados mediante HPLC en fase reversa con columnas de C18. Las corridas se realizaron con un gradiente de 5 - 80 % de acetonitrilo/ agua durante 33 min a un flujo de 0,8 ml/min.

Actividad enzimática de las colinesterasas

Para la determinación de la capacidad inhibitoria de los híbridos frente a la AChE y BChE se utilizó un micrométodo basado en el ensayo de Ellman (GL Ellman y col., 1961). Éste se enfoca en la determinación de la cantidad de tiocolina producida por la hidrólisis enzimática de la acetiltiocolina o butiriltiocolina a partir de la reacción continua de la tiocolina con el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), para formar el anión del ácido 5-tio-2-nitrobenzoico de color amarillo. Para el ensayo de inhibición se utilizaron placas de 96 pocillos y se incubó la enzima (AChE o BChE) con concentraciones crecientes de los híbridos (50, 100, 200 y 400 μ M) durante 30 minutos a 25°C. Luego se agregó el sustrato de la enzima (acetiltiocolina o butiriltiocolina) junto con el reactivo de cromogénico (DTNB). Finalmente, se determinó la absorbancia a 405 nm luego de 5 minutos de reacción (R. Spinelli y col., 2019). El cálculo de los porcentajes de inhibición fue realizado mediante la siguiente fórmula: $I\% = 100 - (100 * (absM - absB) / (absC - absB))$, donde absM, absB y absC representan la absorbancia de la muestra, del blanco de reactivos y del basal, respectivamente. Con los porcentajes de inhibición se calcularon los valores de IC50 utilizando el paquete GRmetrics del software R.

Ensayo de capacidad insecticida de los péptidos frente a gorgojos del maní



El efecto insecticida de los péptidos se estudió empleando la metodología descrita por Lagunes y Rodríguez (1989) con algunas modificaciones. Para dicho ensayo se utilizaron insectos adultos jóvenes alimentados de maní (*O. surinamensis*) y avena (*U. dermestoides*) e incubados bajo condiciones controladas, con una temperatura de 25 °C, humedad del 75 % y en oscuridad. 10 insectos fueron colocados en Placas de Petri de 9 cm de diámetro. Posteriormente, se rociaron 500 µl de una solución de 800 µM de péptido en agua Milli Q en cada placa, favoreciendo la distribución de la solución en forma de pequeñas gotas sobre toda la superficie y su contacto con todos los insectos. Luego, se cubrieron las placas con sus correspondientes tapas. El blanco se realizó rociando una placa de 10 insectos con agua Milli Q (únicamente) y para el control positivo se empleó el insecticida comercial Clorpirifós a una concentración de 240 g/L (685 µM). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Todas las placas fueron incubadas a 25 °C en oscuridad. La mortalidad se calculó mediante el recuento de insectos vivos y muertos observados bajo lupa binocular y fue determinada por pérdida de movilidad y falta de respuesta a la estimulación mecánica.

RESULTADOS

Inhibición enzimática de las colinesterasas

En la Tabla 1 se muestran las diferentes secuencias diseñadas y sintetizadas, junto con el análisis mediante HPLC en fase reversa C18 para los híbridos sintetizados. Se demostró que estos poseen una pureza mayor al 90 % en todos los casos. Además, los híbridos demostraron la capacidad de inhibir a ambas enzimas colinesterasas (AChE y BChE). En la Tabla 1 se

Tabla 1: Secuencias sintetizadas y características de los híbridos

Péptido	Secuencia	HPLC	IC ₅₀ (µM) ^(a)		
		T _R ^(a)	AChE	BChE	
ORI	Bcl-4	RMACCCAPR- NH2	15,41	0,90 ± 0,40	NI
	Bcl-5	DDHHSVYTR- NH2	11,28	NI	0,82 ± 0,05
SERIE B	B2		12,14	10,42 ± 1,87	39,51 ± 5,12
	B4	RMACCCAPR - (Linker) -	12,54	19,71 ± 0,44	43,56 ± 0,22
	B6	DDHHSVYTR- NH2	13,27	85,08 ± 2,58	80,92 ± 2,47
	B8		14,01	98,96 ± 1,24	105,98 ± 0,68
SERIE L	L2		14,86	NI	NI
	L4	DDHHSVYTR - (Linker) -	15,03	NI	5,81 ± 1,18
	L6	RMACCCAPR - NH2	17,37	15,85 ± 1,02	1,41 ± 0,13
	L8		17,95	29,52 ± 5,06	2,91 ± 0,57
C	C +	Rivastigmina		34,17 ± 6,00	0,08 ± 0,00

Tabla 1: LC2: Linker de 2 carbonos: β-Alanina; LC4: Linker de 4 carbonos/Ácidos γ y γ-aminobutírico; LC6: Linker de 6 carbonos/Ácido 6 amino hexanoico; LC8: Linker de 8 carbonos/Ácido 8 amino octanoico. (a) Tr es el tiempo de retención en minutos en RP-HPLC C18. IC₅₀ de los híbridos frente a la AChE y BChE expresados en µM. Todos los valores son expresados con un intervalo de confianza del 95%. *NI: no inhibe

muestran los valores de inhibición de los péptidos frente a las enzimas AChE y BChE expresados como IC₅₀. La IC₅₀ informa la concentración de inhibidor necesaria para alcanzar el 50 % de la inhibición de la enzima.

Respecto de la AChE, los péptidos de mayor actividad inhibitoria de la serie B resultaron ser aquellos con linkers de menor longitud (2 y 4 carbonos), alcanzando valores de IC₅₀ de 39,51 y 43,56, respectivamente, mientras que para la serie L los más activos fueron L8 (15,85) y L6 (29,52). Por otra parte, la BChE demostró un comportamiento inhibitorio igual a lo observado para la AChE en ambas series. Numerosos

reportes han demostrado la diferencia que existe entre el comportamiento de distintos híbridos en función de la longitud de los linkers empleados para generarlos.

Capacidad insecticida

Se determinó la actividad de los péptidos híbridos frente a los gorgojos *O. surinamensis*. Los porcentajes de mortalidad se presentan en la Figura 1A. Se evidencia que todos los híbridos lograron niveles de mortalidad superiores al 50 %, siendo L4 el más activo (100 % de mortalidad). Lo siguen B8 y L6 con el 85 y 75 % de mortalidad, respectivamente. El blanco de agua Milli-Q demostró una viabilidad de 100 %, mientras que el control positivo (Clorpirifós) alcanzó un 100% de mortalidad a la concentración ensayada. Además, el porcentaje de mortalidad a las 24 y 48 hs fue el mismo para todos los casos, a excepción de L6 y L8 que evidenciaron un aumento del 5 y del 1 % de mortalidad, respectivamente.

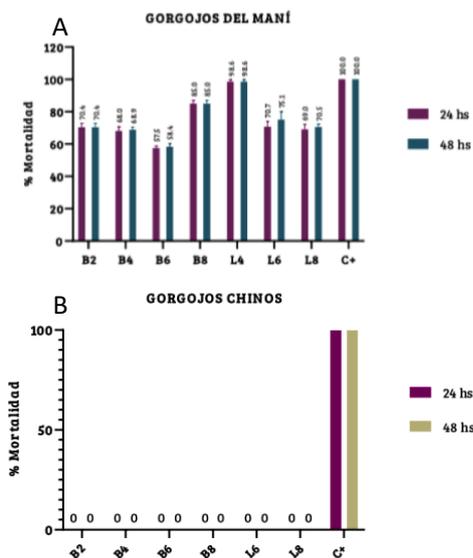


FIGURA 1. Gráfico de barras de porcentaje de mortalidad de gorgojos del maní (A) y chinos (B) para cada grupo de tratamiento, blanco y control positivo a las 24 y 48 hs. Clorpirifós 685 µM.

Para determinar la especificidad que tienen los péptidos en estudio, el ensayo también se efectuó con organismos no blanco, los gorgojos chinos. Los resultados se muestran en la Figura 1B y demuestran que a una concentración de 800 µM los híbridos no produjeron mortalidad para ninguno de los casos. Por otro lado, el Clorpirifós alcanzó el 100 % de mortalidad. La evaluación en organismos no objetivo resulta sumamente importante en las investigaciones de nuevos compuestos bioactivos para garantizar la seguridad ambiental y la preservación de la biodiversidad, así como para evitar efectos secundarios no deseados que pudieran surgir de la exposición a estos compuestos. Los resultados revelan entonces que, a las concentraciones ensayadas, los híbridos no presentan efectos nocivos en los gorgojos chinos, pero sí actúan como plaguicidas efectivos contra los gorgojos del maní.

CONCLUSIONES

Las estrategias de síntesis química en fase sólida lograron conferir actividad inhibitoria dual frente a AChE y BChE, a moléculas que no la poseían. Este hecho es de suma importancia ya que las investigaciones actuales se enfocan en la búsqueda de inhibidores capaces de boquear la actividad de ambas colinesterasas de modo simultaneo. Todos los híbridos mostraron la capacidad de producir mortalidad de gorgojos de la especie *Oryzaephilus surinamensis* con valores que alcanzan hasta el 100 %, siendo además no tóxicos para otras especies no blanco. Los resultados que se desprenden de la presente investigación son alentadores e impulsan la realización de nuevos estudios con mayor profundidad de estos híbridos, a partir de lo cual se plantea la síntesis de nuevas moléculas híbridas a partir de Bcl-4 y Bcl-5 con orientaciones alternativas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA



BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

