



*Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata*

*Obtención semipreparativa de
surfactantes biocompatibles catalizada
por fitopeptidasas. Evaluación de
sus propiedades antimicrobianas
y biodegradabilidad*



Laboratorio de procesos biotecnológicos

Autora: María Elisa Fait

Año 2011



*Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales
Dirección: Dra. Susana R. Morcelle del Valle*

Marzo de 2011 - La Plata, Buenos Aires, Argentina

El presente trabajo para optar al título de Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LiProVe), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Susana R. Morcelle del Valle.

Agradecimientos





A la Universidad Nacional de La Plata por haberme ofrecido la oportunidad de crecer, tanto académica como personalmente.

A la Dra. Susana R. Morcelle del Valle, mi directora, por sus charlas, paciencia, confianza y dedicación, y por sobre todo por su amistad y sus enseñanzas.

Al Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales, su Director Néstor O. Caffini y toda su gente por la calidez, su buena predisposición y por haberme abierto las puertas para dar los primeros pasos en mi desarrollo profesional.

A G.G. por su tiempo, sus enseñanzas y por compartir conmigo sus conocimientos.

A C.A. por su asesoramiento y tiempo dedicado.

Al Dr. Agustín Ponzinibbio por su ayuda en la interpretación de los espectros de RMN.

A todos los laboratorios de la Universidad que nos abrieron sus puertas y prestaron sus equipos para hacer este trabajo posible.

A mi mamá, mi papá, mi abuelo y hermana, porque siempre estuvieron a mi lado, por su paciencia, confianza, contención y apoyo incondicional en estos años de estudio, sin ustedes no hubiera llegado a donde estoy.

A mi madrina, mis primos y familia que a pesar de los kilómetros siempre estuvieron cerca.

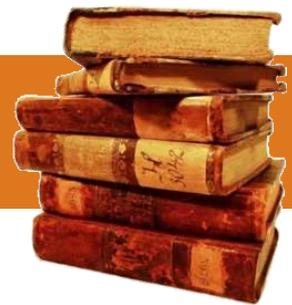
A mis compañeros que empezaron esta aventura conmigo, a los que se quedaron en el camino, a los que vencieron todos los obstáculos y a los que siguen andando, a los que siguieron mi mismo camino y a los que tomaron otros rumbos.

A mis más que compañeros, mis amigos Juan y Barby, gracias por hacer todo más fácil y divertido, por sus locuras, por las horas de estudio, charlas, mates, coffee breaks y salidas compartidas, por llenarme de recuerdos inolvidables y por dejarme ser parte de sus vidas.

A mis amigas y hermanas de toda la vida Yimi, Euge, Flor y Barby, por la catarsis y los consejos, por las horas de estudio multidisciplinario, los litros de mate cebados y kilos de yerba gastada, las charlas y cada uno de los momentos compartidos, porque entre cinco desequilibradas encontramos el equilibrio. Nada sería lo mismo sin ustedes.

A todas esas personitas especiales que el viento amontonó en mi vida, a Nico (tanto que insististe, te hice caso y acá estoy), Ely, Julián, Sonia, Juanma, Sergi, y a esas personitas que llegaron a mi vida hace poco, pero que ya se ganaron un lugar en mi corazón. Gracias por su hombro y apoyo incondicional. Ustedes saben todo lo que significan para mí.

Indices y Abreviaturas





Indice de Contenidos

<i>Indice de tablas</i>	8
<i>Indice de figuras</i>	9
<i>Abreviaturas</i>	11
<i>Capítulo 1. Introducción y Objetivos</i>	12
1.1. Introducción	13
1.2. Introducción a las peptidasas	14
1.2.1. Enzimas: generalidades	14
1.2.2. Peptidasas o proteasas	15
1.2.3. Peptidasas en plantas	16
1.3. Empleo de proteasas en la industria	17
1.3.1. Aplicación de las proteasas en síntesis de péptidos y otros derivados peptídicos	18
1.3.1.1. Control termodinámico	19
1.3.1.2. Control cinético	19
1.4. Surfactantes	20
1.4.1. Generalidades	20
1.4.2. Surfactantes catiónicos	20
1.4.2.1. Surfactantes catiónicos como antimicrobianos: modo de acción	20
1.4.3. Surfactantes derivados de aminoácidos	21
1.5. Objetivos generales del plan de trabajo	23
1.6. Objetivos específicos del plan de trabajo	24
<i>Capítulo 2. Materiales y Métodos</i>	25
2.1. Material vegetal	26
2.1.2. <i>Araujia hortorum</i>	26



2.1.2.1. Morfoanatomía	26
2.1.2.2. Proteasas presentes en el látex de <i>A. hortorum</i>	27
2.2. Preparación y caracterización de los biocatalizadores	27
2.2.1. Obtención de la preparación enzimática de <i>A. hortorum</i>	27
2.2.2. Preparación enzimática de papaína	27
2.2.3. Determinación del contenido de proteínas	28
2.2.4. Determinación de la actividad proteolítica	28
2.2.5. Inmovilización de los extractos enzimáticos por adsorción	29
2.2.6. Determinación de la actividad amidolítica de las enzimas inmovilizadas	29
2.3. Síntesis de surfactantes catiónicos derivados de arginina	30
2.3.1. Síntesis de <i>N</i> ^ε -benzoil-L-arginina-dodecilamida. Selección del biocatalizador y optimización de la extracción del producto	30
2.3.1.1. Análisis por HPLC del progreso de la reacción	31
2.3.2. Síntesis semipreparativa de Bz-Arg-NHC ₁₂	32
2.4. Purificación de Bz-Arg-NHC ₁₂	32
2.4.1. Purificación de Bz-Arg-NHC ₁₂ por cromatografía de intercambio iónico	32
2.4.2. Identificación del producto purificado por ¹ H-RMN, ¹³ C-RMN y espectrometría de masas	33
2.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Bz-Arg-NHC ₁₂	33
2.5.1. Microorganismos y medios de cultivo empleados	33
2.5.2. Ensayo de difusión	34
2.5.3. Ensayo de dilución en microplaca	35
2.5.3.1. Optimización de las condiciones	35
2.5.3.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	37
2.5.4. Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)	38
2.6. Evaluación de la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC ₁₂	38
2.6.1. Preparación del medio mineral	38
2.6.2. Preparación del inóculo	39
2.6.3. Determinación de la biodegradabilidad: ensayo en botella cerrada (OECD 301 D)	39



2.6.3.1. Demanda bioquímica de Oxígeno (DBO)	41
2.6.3.2. Demanda teórica de oxígeno (DTO)	41
2.6.3.3. Porcentaje de degradación y criterio de aceptación	42
Capítulo 3. Resultados y Discusión	43
3.1. Síntesis de surfactantes catiónicos derivados de arginina: selección del biocatalizador	44
3.1.1. Caracterización de los biocatalizadores	44
3.1.2. Análisis de la cinética de la reacción de síntesis de Bz-Arg-NHC ₁₂ y optimización de la extracción del producto	45
3.2. Síntesis de Bz-Arg-NHC ₁₂ y purificación por cromatografía de intercambio iónico	47
3.2.1. Identificación del producto purificado por ¹ H-RMN, ¹³ C-RMN y espectrometría de masas	50
3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Bz-Arg-NHC ₁₂	53
3.3.1. Ensayo de difusión	54
3.3.2. Ensayo de dilución en microplaca: optimización de las condiciones	56
3.3.3. Determinación de las concentraciones inhibitorias (CIM) y bactericidas mínimas (CBM)	59
3.4. Evaluación de la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC ₁₂	63
3.4.1. Definiciones y fundamento del método	63
3.4.1.1. Biodegradación y biodegradabilidad	63
3.4.1.2. Ensayo en botella cerrada (OECD 301 D): fundamento del método ...	64
3.4.2. Determinación de la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC ₁₂	64
Capítulo 4. Conclusiones y Perspectivas	67
4.1. Conclusiones generales	68
4.2. Perspectivas	69
Referencias	71



Indice de Tablas

Capítulo 1. Introducción y Objetivos	12
Tabla 1.1. Clasificación internacional de enzimas	15
Tabla 1.2. Uso de proteasas en distintos procesos	18
Capítulo 2. Materiales y Métodos	25
Tabla 2.1. Composición de los medios de cultivo	34
Tabla 2.2. Composición de las soluciones stock para la preparación del medio mineral	38
Tabla 2.3. Formulación de las soluciones empleadas para el ensayo de determinación de la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC ₁₂	40
Tabla 2.4. Esquema del ensayo de biodegradabilidad realizado	41
Capítulo 3. Resultados y Discusión	43
Tabla 3.1. Caracterización de los biocatalizadores libres (extractos enzimáticos de <i>A. hortorum</i> y <i>C. papaya</i>) e inmovilizados por adsorción sobre poliamida	44
Tabla 3.2. Diámetro de los halos de inhibición registrados en el ensayo de difusión en agar (I) para <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> , <i>St. aureus</i> y <i>Ps. aeruginosa</i>	55
Tabla 3.3. Concentraciones de Bz-Arg-NHC ₁₂ (µg/ml) y DMSO (% v/v) para las diluciones señaladas de las soluciones del producto en DMSO y agua con 10% v/v DMSO	57
Tabla 3.4. Concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas (CIM y CBM, respectivamente) registradas para Bz-Arg-NHC ₁₂ y cetrimide frente a diferentes microorganismos	61
Tabla 3.5. Concentraciones de oxígeno disuelto para cada solución ensayada en los diferentes períodos de tiempo	64
Tabla 3.6. Porcentajes de degradación para Bz-Arg-NHC ₁₂ calculados considerando como productos de degradación CO ₂ , H ₂ O y NH ₃ ó HNO ₃	65



Indice de Figuras

Capítulo 1. Introducción y Objetivos	12
Figura 1.1. Mecanismo catalítico de las proteasas cisteínicas	16
Figura 1.2. Síntesis catalizada por proteasas bajo control termodinámico	19
Figura 1.3. Síntesis catalizada por proteasas bajo control cinético	19
Figura 1.4. Modo de acción de los surfactantes catiónicos	21
Figura 1.5. Estructuras de surfactantes derivados de arginina de cadena simple	22
Capítulo 2. Materiales y Métodos	25
Figura 2.1. Morfoanatomía de <i>A. hortorum</i>	26
Figura 2.2. Esquema de la reacción de hidrólisis del sustrato sintético BAPNA por acción de una proteasa	29
Figura 2.3. Gradiente de elución en HPLC para el análisis cuantitativo de los productos de condensación, sustratos y productos de hidrólisis en las reacciones de condensación	31
Figura 2.4. Gradiente de concentración de NaCl para la purificación de Bz-Arg-NHC ₁₂	32
Figura 2.5. Disposición de los cilindros de vidrio sobre las placas de Petri conteniendo agar nutritivo inoculado con los diferentes microorganismos	35
Figura 2.6. Ensayo de dilución: esquema del llenado de la microplaca	36
Figura 2.7. Botella de DBO de vidrio (250 ml) con cierre hidráulico	39
Figura 2.8. Estructura molecular de Bz-Arg-NHC ₁₂	42
Capítulo 3. Resultados y Discusión	43
Figura 3.1. Condensación enzimática de Bz-Arg-OEt y dodecilamina	45
Figura 3.2. Hidrólisis enzimática de Bz-Arg-OEt	45
Figura 3.3. Análisis de las cinéticas de reacción para la síntesis de Bz-Arg-NHC ₁₂ utilizando papaína inmovilizada sobre poliamida como biocatalizador	46
Figura 3.4. Rendimientos de la reacción de síntesis de Bz-Arg-NHC ₁₂ para papaína y araujaína a las 24, 48 y 72 horas de reacción	47



Figura 3.5. Rendimiento (en porcentaje) de la síntesis semipreparativa de Bz-Arg-NHC ₁₂ luego de 72 horas de reacción, utilizando papaína inmovilizada sobre poliamida como biocatalizador	47
Figura 3.6. Cromatograma correspondiente a la purificación de Bz-Arg-NHC ₁₂ por cromatografía de intercambio catiónico	48
Figura 3.7. Cromatogramas correspondientes al análisis por HPLC del final de síntesis de Bz-Arg-NHC ₁₂ crudo y Bz-Arg-NHC ₁₂ purificado	49
Figura 3.8. Espectro MS correspondiente a Bz-Arg-NHC ₁₂	50
Figura 3.9. Espectros de RMN de Bz-Arg-NHC ₁₂	51
Figura 3.10. Estructuras de Bz-Arg-NHC ₁₂ y ceftrimide	53
Figura 3.11. Ensayo de difusión agar (I) para la determinación de la capacidad inhibitoria de Bz-Arg-NHC ₁₂ sobre el crecimiento de bacterias indicadoras Gram positivas y Gram negativas	54
Figura 3.12. Ensayo de difusión agar (II) para la determinación de la capacidad inhibitoria de Bz-Arg-NHC ₁₂ sobre el crecimiento de bacterias indicadoras Gram positivas y Gram negativas	56
Figura 3.13. Efecto de distintas proporciones de DMSO sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	57
Figura 3.14. Optimización del ensayo de dilución en microplaca utilizando <i>E. coli</i> como cepa indicadora	58
Figura 3.15. Optimización del ensayo en microplaca: efecto de Bz-Arg-NHC ₁₂ en diferentes solventes sobre el crecimiento de <i>E. coli</i>	58
Figura 3.16. Ensayo de dilución en microplaca para <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> , <i>St. aureus</i> y <i>Ps. aeruginosa</i>	59
Figura 3.17. Efecto de Bz-Arg-NHC ₁₂ y ceftrimide sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> , <i>B. cereus</i> , <i>St. aureus</i> y <i>Ps. aeruginosa</i>	60
Figura 3.18. Comparación de las estructuras de Bz-Arg-NHC ₁₂ , Arg-NHC ₁₂ y LAM	62



Abreviaturas

- ^{13}C -RMN = resonancia magnética nuclear de carbono
 ^1H -RMN = resonancia magnética nuclear de hidrógeno
2D HSQC = RMN bidimensional, Heteronuclear Single Quantum Coherence
AcH = ácido acético
ACN = acetonitrilo
ADN = ácido desoxirribonucleico
ALA = arginina-*N*-lauril amida
Arg-NHC₁₂ = arginina-*N*-lauril amida
ATCC = American Type Culture Collection
B.E.T. = Brunauer, Emmett y Teller
BAEE = *N*^o-benzoil-L-arginina etil éster
BAPNA = *N*^o-benzoil-L-arginina *p*-nitroanilida clorhidrato
Bz-Arg-NHC₁₂ = *N*^o-benzoil-L-arginina-dodecilamida
Bz-Arg-OEt = *N*^o-benzoil-L-arginina etil éster
Bz-Arg-OH = *N*^o-benzoil-L-arginina
CBM = concentración bactericida mínima
CIM = concentración inhibitoria mínima
CN 1× = caldo nutritivo de concentración simple
CN 2× = caldo nutritivo de concentración doble
DBO = demanda bioquímica de oxígeno
DMSO = dimetil sulfóxido
DO = densidad óptica
DPMA = Dirección de Protección del Medio Ambiente
DTO = demanda teórica de oxígeno
DTT = 1,4-ditiotreitol
E.C. = enzyme commission number
EDTA = ácido etilendiaminotetra-acético
ELISA = Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay
ESI-MS = espectrometría de masas por electrospray
HCl = ácido clorhídrico
HPLC = cromatografía líquida de alta resolución
ISO = International Organization for Standardization
LAM = *N*^o-lauril-L-arginina-metil éster
OECD = Organisation for Economic Co-operation and Development
ppm = partes por millón
RMN = resonancia magnética nuclear
rpm = revoluciones por minuto
TCA = ácido tricloroacético
TFA = ácido trifluoroacético
TOC = carbono orgánico total
Ucas = unidad caseinolítica
UFC = unidades formadoras de colonias
UI = unidades enzimáticas

Capítulo 1

Introducción y Objetivos





1.1. Introducción

El impacto potencialmente negativo de los procesos industriales sobre el medio ambiente ha llevado al diseño de estrategias destinadas a minimizar la generación de contaminantes que pongan en riesgo los ecosistemas y la salud humana. Las estrategias desarrolladas inicialmente apuntaban a la remediación, es decir a la disminución de la concentración de los contaminantes presentes en residuos y/o efluentes, sin modificar el proceso en sí a través de cual habían sido generados. Actualmente, en vista de la inminente necesidad de frenar el deterioro ambiental, el desarrollo de estas estrategias ha evolucionado hacia un enfoque preventivo, trasladándose los controles ambientales hacia el proceso productivo mismo, al cual deben ser integrados. De esta manera, se apunta a la introducción de modificaciones en los procesos ya existentes, así como también al diseño de nuevos productos y tecnologías factibles y económicamente viables, que permitan reducir (o eliminar si es posible) la generación de la contaminación en sus propios orígenes, minimicen el consumo de energía, permitan el empleo de materias primas renovables y de catalizadores más específicos que permitan simplificar tanto los procesos de purificación de los productos de interés, como el tratamiento de los residuos (Anastas & Warner, 1998; http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/about_gc.html; http://www.epa.gov/oppt/greenengineering/pubs/whats_ge.html).

Los procesos biotecnológicos representan una alternativa para mejorar la sustentabilidad de los procesos preparativos tanto a escala de laboratorio como industrial (Gardossi *et al.*, 2010). La biocatálisis (disciplina en la que convergen la biología y la química) ofrece una perspectiva de diseño de procesos "limpios", haciendo uso de las características propias de los sistemas biológicos, tales como su versatilidad y especificidad de sustrato (estereoselectividad y regioespecificidad). Los biocatalizadores (enzimas y células enteras) se han destacado en el campo de la *química verde* por su capacidad de catalizar múltiples reacciones en forma veloz y eficiente en condiciones de temperatura y presión suaves, encontrando aplicaciones incluso en la preparación de algunos compuestos en los que la transformación química es, hasta ahora, imposible (Aracil *et al.*, 2006).

Tanto las enzimas como las células completas pueden emplearse en estado libre o inmovilizadas, permitiendo en este último caso su reutilización sin pérdida significativa de sus propiedades catalíticas luego de cada reciclado. Por otro lado, los descubrimientos sobre la biodiversidad y los avances en la ingeniería genética permiten el hallazgo de nuevos biocatalizadores capaces de adaptarse mejor a los requerimientos industriales, haciendo posible además la creación de nuevas moléculas proteicas con actividades catalíticas novedosas (Luna, 2004).



Las proteasas forman parte del grupo de las enzimas más empleadas en el terreno de la biocatálisis y biotransformaciones. Las proteasas son relativamente estables y simples en su arquitectura molecular, son altamente estereoespecíficas y regioespecíficas, actúan en condiciones suaves de reacción con valores de pH óptimos comprendidos entre 6 y 8, son fáciles de manipular y no precisan de cofactores costosos (Bordusa, 2002). Al igual que ocurre con otras hidrolasas, por debajo de una concentración límite de agua, la actividad hidrolítica de las proteasas comienza a competir de forma efectiva con la actividad transferasa o sintética. Este hecho, sumado a la relativa estabilidad de las proteasas en medios con baja actividad acuosa, ha promovido su uso en el campo de la biocatálisis para la síntesis de enlaces amida (Gupta & Roy, 2004; Khmelnsky & Rich, 1999).

Los surfactantes, del inglés "*surface active agent*", o tensioactivos, son compuestos anfífilos capaces de disminuir la tensión superficial del medio en el que se encuentran solubilizados y la tensión interfacial en la interfase de fluidos inmiscibles (http://old.iupac.org/reports/2001/colloid_2001/manual_of_s_and_t/node36.html). A su vez se caracterizan por aumentar la solubilidad, movilidad, biodisponibilidad y subsecuente biodegradación de compuestos orgánicos insolubles en agua (Sing *et al.*, 2007). Según su naturaleza química, los surfactantes pueden ser neutros, aniónicos, catiónicos o zwitteriónicos, y tienen un amplio rango de aplicaciones, desde la limpieza en el hogar, pasando por diversos procesos industriales, usos en agroquímicos, cuidado personal, etc. (Clapés & Infante, 2002).

1.2. Introducción a las peptidasas

1.2.1. Enzimas: generalidades

La catálisis enzimática de las reacciones es esencial para los sistemas biológicos, ya que en las condiciones intracelulares (pH neutro, temperaturas suaves, medio acuoso) los sustratos son extremadamente estables y las reacciones necesarias para mantener la vida no podrían darse en una escala de tiempo conveniente.

Las enzimas son generalmente proteínas que actúan disminuyendo la energía de activación, aumentando de esta manera en varios órdenes de magnitud la velocidad a la que las reacciones ocurren (10^5 - 10^{17}) sin llevar a cabo reacciones energéticamente desfavorables, ni tampoco modifican el sentido de los equilibrios químicos. La interacción entre una enzima y el sustrato es altamente específica, lo que hace a la enzima capaz de



discriminar entre su sustrato específico y moléculas estructuralmente muy similares a éste.

Las enzimas se identifican con el número E.C. (Enzyme Commission Number), el cual consta de cuatro dígitos separados por puntos. El primero de los cuatro números corresponde a la clase a la cual pertenece la enzima, distribuyéndose las mismas entre 6 clases principales de acuerdo al tipo de reacción catalizada (tabla 1.1). Los tres números restantes corresponden a las subclases a las que pertenece la enzima dentro de la clase principal, otorgando de esta manera una clasificación progresivamente más específica.

Nº	Clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidoreductasas	Transferencia de electrones
2	Tranferasas	Reacciones de transferencia de grupos
3	Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
4	Liasas	Adición de grupos a dobles enlaces o formación de dobles enlaces por eliminación de grupos
5	Isomerasas	Transferencia de grupos dentro de moléculas dando formas isoméricas
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-S, C-O Y C-N mediante reacciones de condensación acopladas a la hidrólisis de ATP

Tabla 1.1. Clasificación internacional de enzimas.

1.2.2. Peptidasas o proteasas

Las enzimas que hidrolizan la unión peptídica (E.C. 3.4.X.X) desempeñan un rol central en la degradación de proteínas y son comúnmente conocidas como proteasas, peptidasas o enzimas proteolíticas. La principal diferencia de las proteasas con casi todas las demás enzimas es que su especificidad de sustrato resulta difícil de definir. Este hecho llevó a clasificar a esta clase de enzimas en base a las características de sus respectivos mecanismos catalíticos y la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis. Teniendo en cuenta esto, las peptidasas pueden agruparse en cinco clases: serínicas, treonínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas, en las cuales los aminoácidos serina, treonina, cisteína, aspártico o grupos metálicos, respectivamente, juegan roles primarios en la catálisis (Morcelle del Valle, 2004).

Dentro de las peptidasas cisteínicas (EC 3.4.22) pueden mencionarse numerosas proteasas vegetales extensamente estudiadas tales como papaína, ficina, actinidina o bromelaína. La actividad catalítica de este tipo de peptidasas ocurre a través de la



formación de un intermediario covalente e involucra un residuo de histidina «159» y uno de cisteína «25» (numeración de acuerdo a papaína). Este último residuo, a su vez, se encuentra involucrado en un equilibrio tautomérico entre las formas neutra y zwitteriónica (figura 1.1). En la primera etapa (etapa de acilación) el sulfuro aniónico actúa como nucleófilo sobre el grupo carbonilo del sustrato, formándose así un intermediario covalente que se estabiliza a través de la formación de un par iónico con el grupo vecino imidazol de la histidina. La formación de este intermediario procede a través de un estado intermedio de transición tetraédrico cargado negativamente (figura 1.1). Durante la segunda etapa o etapa de deacilación, el intermedio acil-enzima es hidrolizado por una molécula de agua (nucleófilo) para liberar el péptido y restaurar el grupo catalíticamente activo de la proteasa. La deacilación involucra también la formación de un estado de transición tetraédrico, que se produce a través de la reacción inversa a la vía de acilación. Estas enzimas son inactivadas por reactivos bloqueantes de los grupos sulfhidrilo (por conversión en puentes disulfuro) y tienen la capacidad de reactivarse en presencia de agentes reductores (Morcelle, 2004).

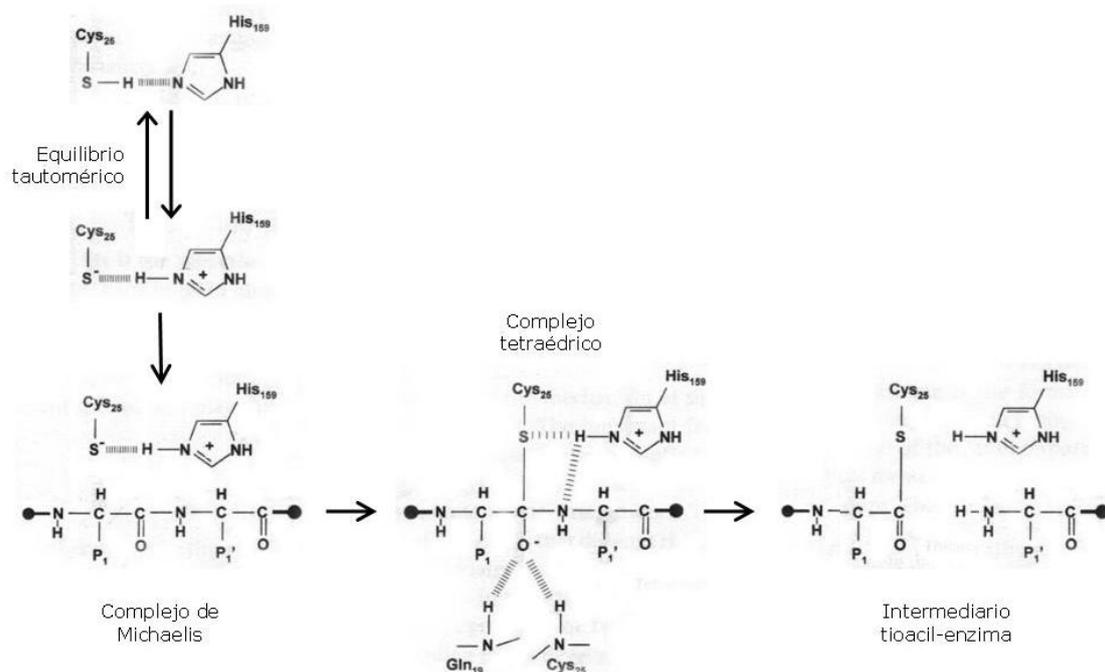


Figura 1.1. Mecanismo catalítico de las proteasas cisteínicas.

1.2.3. Peptidasas en plantas

La proteólisis juega un rol importante en muchos procesos biológicos tales como la digestión, el recambio de proteínas y la defensa de patógenos. En los tejidos vegetales,



las proteasas están involucradas en casi todos los aspectos del crecimiento y el desarrollo de la planta, incluyendo funciones fisiológicas como la degradación de proteínas de reserva durante la germinación de semillas, ritmos circadianos, senescencia de órganos y muerte celular programada. Desempeñan asimismo un papel clave en la regulación de procesos biológicos como el reconocimiento de agentes patógenos y plagas y en la eficaz inducción de respuestas de defensa. Algunas proteasas, como ocurre con la papaína en el látex de la papaya (*Carica papaya*), ejecutan directamente el ataque contra el organismo invasor, mientras que otras parecen ser parte de una cascada de señales, regulando la respuesta defensiva mediante la modificación post-traducciona l de las proteínas del hospedante.

Todas las células vegetales recambian proteínas en el transcurso de su desarrollo y por lo tanto están equipadas con una considerable maquinaria proteolítica. Normalmente estas proteasas están presentes en cantidades relativamente bajas, por lo que su detección es dificultosa a menos que se empleen sustratos altamente sensibles. Sin embargo, algunas especies vegetales poseen una gran concentración de proteasas sumamente activas en ciertos tejidos. Un ejemplo de esto lo constituye el látex obtenido a partir de plantas de diversas familias en el que el contenido de enzimas proteolíticas puede superar el 50 % de las proteínas totales (Morcelle del Valle, 2004).

1.3. Empleo de proteasas en la industria

La aplicación industrial de las enzimas dio comienzo en los comienzos del siglo XX. En 1907, Otto Röhm descubrió la efectividad de las proteasas pancreáticas en el proceso de depilado en la manufactura del cuero. Más tarde, dicha preparación fue utilizada en la formulación de detergentes. A partir de entonces, el empleo de enzimas en distintos procesos industriales fue en aumento (Uhlig, 1998).

Las proteasas son las enzimas de mayor relevancia tecnológica, representando cerca de la mitad del mercado de enzimas de uso industrial (Chellapan *et al.*, 2006), ya que abarcan sectores tan relevantes como la industria de alimentos y bebidas, de detergentes, textil, curtiembre y farmacéutica. Las proteasas de origen animal y vegetal representan en la actualidad aproximadamente el 15% del mercado de enzimas proteolíticas, siendo mayoritarias las de origen microbiano (Nielsen & Olsen, 2002). Ejemplos de los procesos en los cuales las distintas proteasas son empleadas se detallan en la tabla que se muestra a continuación (tabla 1.2).



Peptidasa	Origen	Usos
<i>Papaína</i>	Vegetal	Extractos de levadura y de carne, cervecera, hidrolizados proteicos, ablandamiento de carne, curtiembre, nutrición animal, ayuda-digestivos, anti-inflamatorios
<i>Pepsina</i>	Animal	Quesería
<i>Renina</i>	Animal, fúngica y recombinante	Quesería
<i>Proteasa neutra</i>	Fúngica y bacteriana	Panificación, hidrolizados de proteínas
<i>Proteasa alcalina</i>	Bacteriana	Detergentes, recuperación de agua de cola
<i>Aminopeptidasa</i>	Fúngica y bacteriana	Remoción del amargor en hidrolizados proteicos

Tabla 1.2. Uso de proteasas en distintos procesos.

Las proteasas de origen vegetal representan aproximadamente un 5% del mercado mundial de enzimas industriales. La papaína tiene múltiples aplicaciones en ablandamiento de carnes, clarificación de cerveza, producción de extracto de levadura, en limpieza dental y, en forma purificada, en cosmetología y medicina. La bromelaina en la actualidad es primordialmente empleada en el área médica como anti-inflamatorio, cicatrizante, ayuda-digestivo y supresor del apetito (Illanes, 2009).

1.3.1. Aplicación de las proteasas en síntesis de péptidos y otros derivados peptídicos

La mayor parte de las aplicaciones de las proteasas se refiere a reacciones hidrolíticas en medio acuoso para la degradación de moléculas complejas a moléculas más simples. Sin embargo, su empleo en reacciones reversas ha sido muy estudiado: péptidos empleados en la industria alimentaria y farmacéutica tales como aspartato (Nakaoka *et al.*, 1998), alitamo (Kim & Shin, 2001) y kiotorfina (Lee *et al.*, 1993), y diversos derivados de hormonas como insulina (Moriyama, 1987), encefalinas (Clapés *et al.*, 1995), etc., han sido sintetizados empleando proteasas como catalizadores.

Como se mencionó anteriormente, para que las peptidasas puedan actuar como biocatalizadores en la formación de enlaces peptídicos debe manipularse el equilibrio de la reacción. Dichas manipulaciones consisten en dos estrategias básicas: la síntesis bajo control termodinámico y la síntesis bajo control cinético.



1.3.1.1. Control termodinámico

La síntesis catalizada por peptidasas bajo control termodinámico representa la reacción inversa directa de la proteólisis (figura 1.2). En este caso se emplean sustratos dadores de acilo cuya función carboxilato está libre. Esto permite que cualquier proteasa pueda emplearse como biocatalizador independientemente de su mecanismo catalítico. Las mayores desventajas de esta estrategia consisten en las bajas velocidades de conversión, la gran cantidad de biocatalizador requerida y la necesidad de desplazar el equilibrio hacia la reacción espontáneamente desfavorable. Esto en general se logra mediante el empleo de solventes orgánicos. La precipitación o extracción del producto favorece aún más este tipo de reacciones (Bordusa, 2002).

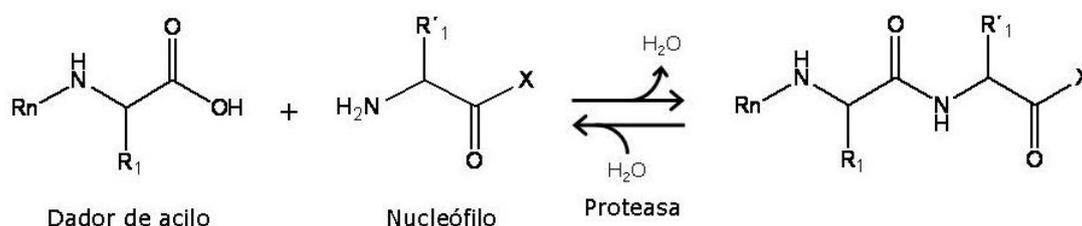


Figura 1.2. Síntesis catalizada por proteasas bajo control termodinámico.

1.3.1.2. Control cinético

La síntesis catalizada por peptidasas bajo control cinético requiere del empleo de proteasas serínicas o cisteínicas capaces de formar el intermediario reactivo acil-enzima. El factor clave de este método consiste en el uso de moléculas de dador de acilos levemente activadas como ésteres o amidas, lo que acelera la velocidad de reacción y minimiza el requerimiento de enzima. El intermediario acil-enzima puede luego ser atacado por un nucleófilo (agua, en el caso de hidrólisis, u otro nucleófilo como una amina, un alcohol, un tiol, etc) para formar el compuesto deseado (Bordusa, 2002). El mecanismo de este tipo de control se ilustra en la figura 1.3.

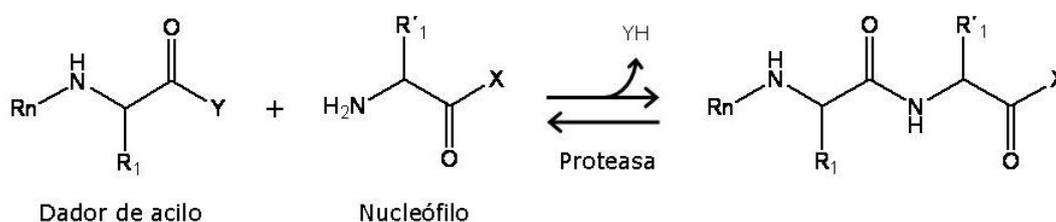


Figura 1.3. Síntesis catalizada por proteasas bajo control cinético.



1.4. *Surfactantes*

1.4.1. *Generalidades*

Los surfactantes representan un conjunto de productos químicos que son consumidos en grandes cantidades diariamente a escala mundial. Por esta razón, es importante que sean compuestos biocompatibles y biodegradables, ya que pueden afectar de manera adversa los ecosistemas acuáticos (Morán *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta este aspecto, y haciendo uso de la biocatálisis, se han desarrollado moléculas basadas en estructuras naturales amfifílicas, como aquellas que mimetizan los lipoaminoácidos naturales. Además de sus excelentes propiedades tensioactivas, y debido a su estructura simple y similar a los de origen natural (biosurfactantes), este tipo de compuestos ha demostrado baja toxicidad y buena biodegradabilidad (Morán *et al.*, 2001a; Morán *et al.*, 2002; Clapés *et al.*, 1999; Castillo *et al.*, 2006a; Morán *et al.*, 2001b; Castillo *et al.*, 2006b).

1.4.2. *Surfactantes catiónicos*

Muchos surfactantes catiónicos son utilizados en las industrias farmacéutica y cosmética como antisépticos, dadas sus propiedades antimicrobianas. Ejemplos de compuestos de este tipo son el cloruro de benzalconio y la clorhexidina, utilizados comúnmente como antisépticos para la piel y heridas, y en formulaciones de pastas dentales, desodorantes y gotas oftálmicas (Castillo, 2006). También han sido empleados para la transferencia de ADN foráneo en células mediante la formación de complejos no tóxicos de naturaleza iónica-hidrofóbica entre las cadenas de ésteres alquílicos de arginina y el ADN (Morán *et al.*, 2004).

1.4.2.1. *Surfactantes catiónicos como antimicrobianos: modo de acción*

Los surfactantes catiónicos son compuestos biocidas que ejercen su acción a nivel de la membrana plasmática, ya que su superficie posee carga neta negativa estabilizada por cationes divalentes (Ca^{+2} y Mg^{+2}). Luego de interaccionar electrostáticamente con la membrana, la parte hidrofóbica del surfactante penetra en el interior de la misma (figura 1.4). Esto conlleva a una fuga de material citoplasmático hacia el exterior



alterando los procesos fisiológicos que ocurren a nivel de la membrana, tales como respiración, transporte de solutos y biosíntesis de la pared celular. Este daño a nivel de la membrana es suficiente para afectar el crecimiento y desarrollo normal del microorganismo (efecto bacteriostático) o, en algunos casos, provocar la muerte de la célula (efecto bactericida).

Los compuestos derivados de amonio cuaternario son estructuras representativas de surfactantes catiónicos con actividad biocida. Ejemplo de este tipo de compuestos es el cetrimide.

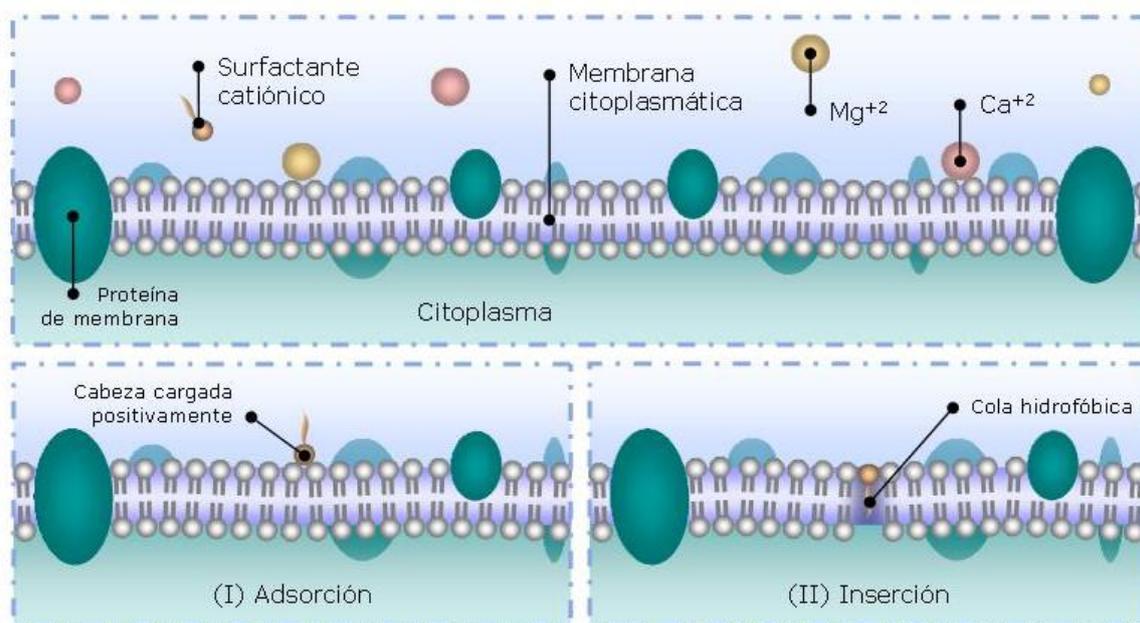


Figura 1.4. Modo de acción de los surfactantes catiónicos.

1.4.3. *Surfactantes derivados de aminoácidos*

Moléculas de surfactantes obtenidos a partir de materias primas renovables que mimeticen lipoaminoácidos naturales consisten en una de las alternativas preferidas para aplicaciones en alimentación, cosmética y farmacia (Morán et al, 2004). Los aminoácidos son una materia prima valiosa para la preparación de surfactantes. Inicialmente, se aplicaron como conservantes con aplicaciones medicinales y cosméticas. Luego se halló que tenían actividad contra bacterias, virus, tumores, etc. La combinación de aminoácidos polares/péptidos (porción hidrofílica) y compuestos no polares de cadena larga (porción hidrofóbica), para producir estructuras anfífilas ha resultado en la



obtención de moléculas con una alta actividad superficial. Existen una amplia gama de este tipo de estructuras con distintas propiedades fisicoquímicas y biológicas.

La porción aminoacídica o peptídico determina las mayores diferencias de absorción, agregación y actividad biológica entre los surfactantes derivados de aminoácidos. Así pueden obtenerse surfactantes aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfotéricos, dependiendo de los grupos funcionales libres. Una modificación más exhaustiva de estos grupos permite dirigir sus propiedades para cada una de las aplicaciones en particular.

Los surfactantes derivados de arginina consisten en una clase de compuestos con actividad antimicrobiana contra un amplio espectro de bacterias, buena biodegradabilidad y baja toxicidad.

Los surfactantes derivados de arginina de cadena simple pueden agruparse según su estructura en tres series de compuestos: *N*^α-acil arginina metil éster (figura 1.5 a), arginina-*N*-alquilamida (figura 1.5 b) y arginina-*O*-alquil éster (figura 1.5 c).

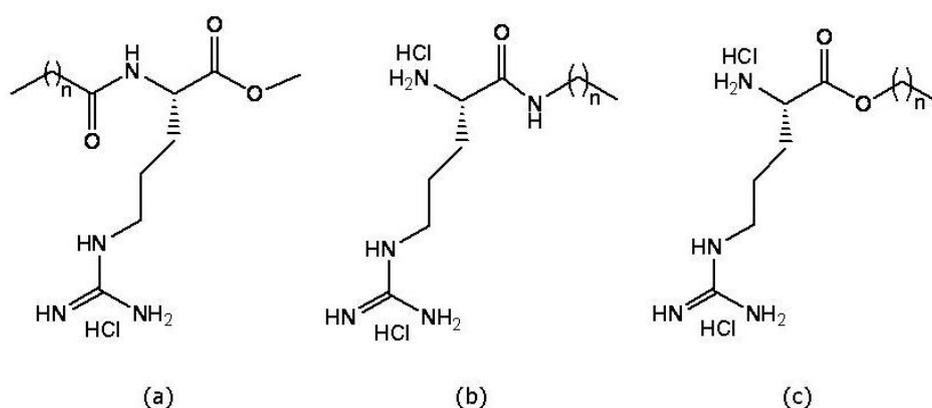


Figura 1.5. Estructuras de surfactantes derivados de arginina de cadena simple: (a) *N*^α-acil arginina metil éster, (b) arginina-*N*-alquilamida y (c) arginina-*O*-alquil éster.

Los compuestos del tipo *N*^α-acil arginina metil éster no han podido ser sintetizados enzimáticamente, en tanto que los del tipo arginina-*N*-alquilamida y arginina-*O*-alquil éster fueron obtenidos exitosamente empleando papaína como biocatalizador (Castillo, 2006).



1.5. Objetivos generales del plan de trabajo

1) Llevar a cabo una búsqueda bibliográfica acerca de proteasas como biocatalizadores en reacciones de síntesis de compuestos de aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria, así como de la obtención por distintas vías de surfactantes catiónicos y las propiedades de los mismos.

2) Obtener adiestramiento en el manejo de procedimientos básicos de laboratorio:

- a. preparación de soluciones buffer y otros reactivos de uso común,
- b. cuantificación de proteínas,
- c. determinación de la actividad enzimática empleando distintos sustratos,
- d. preparación de los biocatalizadores,
- e. desarrollo de distintas técnicas cromatográficas para hacer seguimientos de la cinética de las reacciones y la purificación de los productos,
- f. desarrollo de criterios para determinar la pureza y la identidad de los productos obtenidos,
- g. determinación de algunas propiedades biológicas de los productos obtenidos.

3) Integrarse adecuadamente a un grupo de trabajo e interactuar con otros grupos de investigación.



1.6. Objetivos específicos del plan de trabajo

- 1) Obtención de extractos vegetales con actividad proteolítica.
- 2) Síntesis de surfactantes catiónicos derivados de arginina (Bz-Arg-NHC₁₂) empleando peptidasas cisteínicas vegetales (obtenidas en el punto anterior) depositadas en soportes inertes.
- 3) Escalado de la reacción para obtener cantidades semipreparativas del producto (del orden de los mg) que permitan su caracterización espectroscópica y biológica.
- 4) Purificación del producto por extracción y separación por cromatografía de intercambio catiónico. Selección de las condiciones cromatográficas de separación de los productos realizando pruebas en microescala y escala semipreparativa en un Äkta purifier empleando distintos tipos de columnas (intercambio iónico, interacción hidrofóbica, etc.).
- 5) Determinación de la pureza de los picos cromatográficos por HPLC. Análisis por RMN y espectrometría de masas de los productos purificados.
- 6) Evaluación del poder antimicrobiano (determinación de la concentración inhibitoria mínima, CIM) del producto purificado frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Comparación con el comportamiento de otros antimicrobianos de naturaleza catiónica de uso rutinario (cetrimide).
- 7) Ensayo de la biodegradabilidad del producto.

Capítulo 2

Materiales y Métodos





2.1. Material vegetal

2.1.2. *Araujia hortorum*

2.1.2.1. Morfoanatomía

Araujia hortorum (figura 2.1), de la familia Asclepiadaceae, es una enredadera trepadora nativa de América del Sur, conocida vulgarmente como "tasi", "taso" o "doca". Sus hojas simples y simétricas, de forma ovado triangular, pecioladas, obtusas en la base y discolores (oscuras y glabras -carente de pilosidades- en el haz; albotomentosas -blanquecina y cubierta de pilosidades cortas- en el envés), tienen una longitud que varía entre los 4 y 9 cm. Sus flores se caracterizan por ser perfumadas, en forma de corola y de color blanco o rosado, con apéndice membranáceo en la parte superior y el tubo de la corona soldado a la corola; tienen una longitud promedio de 15 mm, siendo la época de floración desde finales de primavera hasta inicios del otoño. Los frutos, folículos ovoideos, lisos, glabros, con una longitud promedio de 14 cm, son de color verde azulado, tornándose marrones y de textura amaderada a medida que maduran, abriéndose finalmente para liberar las semillas. Estas últimas son de color negro, miden aproximadamente 4 mm de largo y poseen en uno de sus extremos pelos blancos de textura sedosa y 2,5 cm de longitud, los cuales facilitan la dispersión de las mismas por acción del viento (Obregón, 2008; Australian Weeds Committee, 2011).



Figura 2.1. Morfoanatomía de *A. hortorum*. (a) Hojas, flores y frutos. (b) Frutos. (c) Fruto seco con semillas. (d) Látex extraído de tallos. (e) Fruto con semillas. (f) Flores y hojas.



2.1.2.2. Proteasas presentes en el látex de *A. hortorum*

Se ha reportado el aislamiento y caracterización de tres peptidasas cisteínicas “del tipo papaína” (araujaína h I, araujaína h II y araujaína h III) presentes en el látex extraído de frutos de *A. hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001). Las masas moleculares registradas para dichas proteasas varían entre los 23 y 24 kDa (24,031; 23,718 y 23,546 kDa para araujaína h I, h II y h III respectivamente). En todos los casos, el máximo de actividad proteolítica utilizando caseína como sustrato fue observado en un rango de pH comprendido entre 8,0 y 9,0; estimándose los pI (puntos isoeléctricos) en 9,3; 8,9 y 10,5 para araujaína h I, h II y h III respectivamente. La actividad proteolítica se vio favorecida por el aumento de la temperatura, informándose temperaturas óptimas de 60 °C en el caso de araujaína h I y de 70 °C para araujaína h II y araujaína h III.

2.2. Preparación y caracterización de los biocatalizadores

2.2.1. Obtención de la preparación enzimática de *A. hortorum*

Para la preparación del extracto crudo de araujaína se extrajo el látex de 116 frutos (8,2 kg) de *A. hortorum*, cosechados en marzo de 2009 en la localidad de Arana, provincia de Buenos Aires, Argentina. El mismo fue recolectado en 200 ml agua destilada con 5 mM de ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA) y 5 mM de sulfito de sodio (Na₂SO₃). El agregado de EDTA tiene la finalidad de acomplejar cationes divalentes, necesarios para la acción de ciertas oxidasas, mientras que el sulfito de sodio mantiene un ambiente reductor, evitando la oxidación de las cisteínas presentes en los sitios activos de la enzima.

Con el objetivo de eliminar la mayor parte de las gomas y compuestos insolubles, la suspensión fue centrifugada a 10000 × g durante 30 minutos. Finalmente el sobrenadante fue liofilizado y almacenado a 4 °C para su posterior uso.

2.2.2. Preparación enzimática de papaína

A fin de comparar la actividad catalítica del extracto enzimático de *A. hortorum*, se utilizó un extracto comercial de papaína (Fluka, 3,11 unidades/mg sólido, una unidad



hidroliza 1,0 μmol BAEE por min a pH 6,2 y 25 $^{\circ}\text{C}$), la fitoproteasa cisteínica más estudiada, proveniente del látex de *Carica papaya*.

2.2.3. Determinación del contenido de proteínas

Se prepararon soluciones 0,1% p/v de cada biocatalizador en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, realizándose a continuación las diluciones adecuadas y determinando el contenido de proteínas según el macrométodo de Bradford (Bradford, 1976).

Durante el ensayo, 50 μl de la dilución correspondiente de la muestra reaccionaron con 2,5 ml del reactivo de Bradford. Luego de 10 minutos se registró la absorbancia de las muestras a 595 nm en un espectrofotómetro Agilent 8453 E. El cálculo de la concentración de proteínas fue realizado a partir de una curva de calibración, construida utilizando una solución de albúmina bovina (1 mg/ml). En este caso se procedió de igual manera que para las muestras, registrándose la absorbancia a 595 nm para cada concentración de proteínas dentro del rango de sensibilidad del método (100-1000 μg proteína/ml).

2.2.4. Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica del extracto crudo de *A. hortorum* (araujaína) y de la papaína comercial fue determinada utilizando una solución de caseína al 1% p/v en buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 con 5 mM de cisteína. Para ello 0,1 ml de una solución 1 mg/ml del extracto enzimático en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,5 fue incubada con 1,1 ml de la solución de caseína en un baño termostático a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. La reacción fue detenida por el agregado de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% v/v. La absorbancia a 280 nm del sobrenadante de las muestras fue medida luego de ser centrifugadas a 2500 \times g durante 20 minutos (Priolo *et al.*, 1991).

La actividad proteolítica fue expresada en unidades enzimáticas arbitrarias (Ucas). Estas se definen como el incremento de la absorbancia a 280 nm producido por la actividad enzimática de 1 ml de solución de enzima en un minuto a la temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$ sobre una solución de caseína al 1% p/v.



2.2.5. Inmovilización de los extractos enzimáticos por adsorción

Para la preparación de los inmovilizados enzimáticos, 100 mg del extracto crudo de cada extracto proteolítico (araujaína liofilizada y extracto comercial de papaína) fueron disueltos en 1 ml de buffer bórico-borato pH 8,0, 1mM EDTA, conteniendo además 150 mg de 1,4-ditiotreitol (DTT). Estas soluciones enzimáticas fueron a continuación mezcladas completamente con 1 g de soporte sólido (poliamida-6, EP-700, tamaño de partícula < 800 μm , diámetro medio de poro 50–300 nm, área superficial específica 8.4 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ según el método B.E.T.) y liofilizadas (Clapés *et al.*, 1999). Los inmovilizados fueron almacenados en heladera a 4 $^{\circ}\text{C}$.

2.2.6. Determinación de la actividad amidolítica de las enzimas inmovilizadas

La determinación de la actividad de las enzimas adsorbidas sobre poliamida fue llevada a cabo utilizando el sustrato sintético *N*^α-benzoil-L-arginina *p*-nitroanilida clorhidrato (BAPNA). La hidrólisis del enlace amida de este compuesto por acción de una proteasa provoca la liberación de *p*-nitroanilina (figura 2.2), reacción que puede monitorearse por el aumento en la absorbancia a 410 nm (Ota *et al.*, 1964).

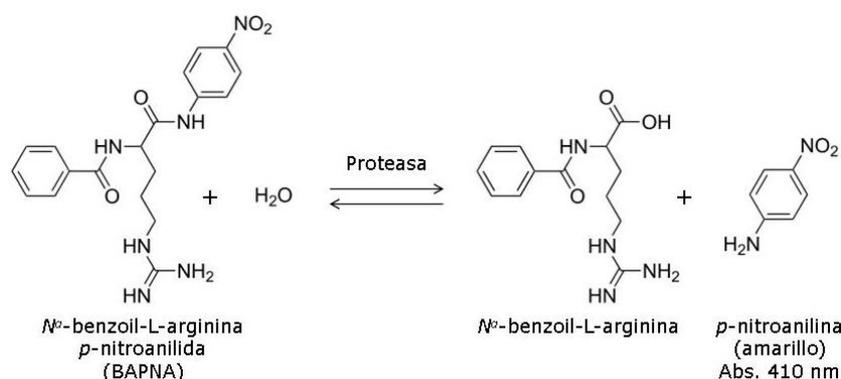


Figura 2.2. Esquema de la reacción de hidrólisis del sustrato sintético BAPNA por acción de una proteasa. La liberación de *p*-nitroanilina (amarillo) por hidrólisis del enlace amida puede monitorearse por el aumento de la absorbancia a 410 nm.



Los biocatalizadores (20 mg) fueron suspendidos en 1,62 ml de buffer fosfatos 0,1 M, pH 7,4, conteniendo EDTA 1 mM. Luego del agregado de 0,18 ml de una solución 40 mM de BAPNA en dimetil sulfóxido (DMSO), las mezclas fueron incubadas durante 5 minutos en agitador orbital (150 rpm) a 37 °C. Las reacciones se detuvieron por el agregado de 0,5 ml de ácido acético (AcH) 30%, los inmovilizados fueron separados por centrifugación ($9000 \times g$ durante 10 minutos) y fue medida la absorbancia a 410 nm de los sobrenadantes.

Para el cálculo de las unidades enzimáticas se elaboró una curva de calibración "absorbancia a 410 nm vs. concentración de *p*-nitroanilina". Las unidades enzimáticas (UI) fueron definidas como los μ moles de *p*-nitroanilina liberados por actividad enzimática por minuto, a 37 °C, pH 7,4 y una concentración inicial de BAPNA igual a 3,13 mM.

2.3. Síntesis de surfactantes catiónicos derivados de arginina

2.3.1. Síntesis de N° -benzoil-L-arginina-dodecilamida. Selección del biocatalizador y optimización de la extracción del producto

Para la preparación de la mezcla de reacción, Bz-Arg-OEt (N° -benzoil-L-arginina etil éster) y dodecilamina fueron disueltos en acetonitrilo (ACN) anhidro (almacenado con tamices moleculares de 4 Å bajo atmósfera de nitrógeno) con 0,25% de buffer bórico-borato 0,1 mM pH 8,5 de manera de obtener concentraciones 20 mM y 30 mM respectivamente (Morcelle *et al.*, 2009).

Seis reacciones independientes de condensación fueron llevadas a cabo con cada biocatalizador inmovilizado, de manera de monitorear el avance de la reacción a distintos tiempos (24, 48 y 72 horas) y ensayar distintas mezclas de solventes (metanol:agua y metanol:ácido acético) para la extracción del producto. Para cada reacción, los inmovilizados (50 mg en el caso de papaína y 100 mg para araujaína) fueron incubados en tubos cerrados en presencia de 1 ml de la mezcla de reactivos, con atmósfera de nitrógeno y agitación constante (120 rpm) a 30 °C.

Luego de transcurrido el tiempo correspondiente, las reacciones fueron detenidas por el agregado de 1 ml de una mezcla metanol:agua o metanol:ácido acético 4:1. La



extracción del producto fue llevada a cabo por lavado del soporte con la respectiva mezcla de solventes (2 × 1 ml). Las muestras fueron filtradas utilizando un filtro de nylon de 0,22 μm (Osmonics) y analizadas por HPLC.

2.3.1.1. Análisis por HPLC del progreso de la reacción

Las cantidades relativas de los productos de condensación, sustratos y productos de hidrólisis fueron determinadas mediante análisis por HPLC (Agilent 1100 LC) utilizando una columna Lichrosorb 100 propilciano (tamaño de partícula: 5 μm, altura × diámetro del lecho: 250 × 4 mm, Hibar). Las condiciones para las corridas cromatográficas fueron: solvente A, H₂O 0,1% (v/v) TFA; solvente B: ACN:H₂O 80:20 0,1% TFA; velocidad de flujo 1 ml/min; longitudes de onda de detección: 215 y 254 nm. El gradiente de elución se resume en la figura 2.3 (Morcelle *et al.*, 2009).

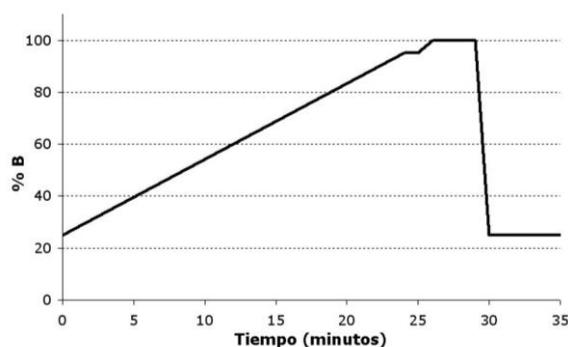


Figura 2.3. Gradiente de elución en HPLC para el análisis cuantitativo de los productos de condensación, sustratos y productos de hidrólisis en las reacciones de condensación. Solvente A: H₂O 0,1% (v/v) TFA; solvente B: ACN:H₂O 80:20 0,1% TFA; velocidad de flujo: 1 ml/min; longitudes de onda de detección: 215 y 254 nm.

La identificación de los picos se hizo mediante la inyección de patrones de Bz-Arg-OEt y Bz-Arg-OH. La cuantificación relativa de los sustratos, los productos de condensación e hidrólisis fue realizada por comparación de las áreas de los picos respectivos. Los tiempos de retención para cada compuesto fueron: Bz-Arg-OEt 5,4 min; Bz-Arg-OH, 4,7 min; Bz-Arg-NHC₁₂, 14,8 min.

El patrón de Bz-Arg-OH se preparó por hidrólisis efectuada por papaína de Bz-Arg-OEt 30 mM a 37°C en buffer fosfatos 0,1 M pH 7,0 durante 30 min. La enzima fue precipitada con metanol y separada por centrifugación. La Bz-Arg-OH fue recuperada por evaporación del solvente y solubilizada en metanol para los análisis por HPLC.



2.3.2. Síntesis semipreparativa de Bz-Arg-NHC₁₂

Una vez determinadas las mejores condiciones para la reacción de síntesis del compuesto Bz-Arg-NHC₁₂, se procedió a la obtención de cantidades semipreparativas del mismo. Para ello, 1 g de papaína inmovilizada fue incubada en presencia de 10 ml de la mezcla de reactivos (Bz-Arg-OEt 20 mM y dodecilamina 30 mM disueltos en ACN anhidro con 0,25% de buffer bórico-borato 0,1 mM pH 8,5), en un erlenmeyer cerrado, bajo atmósfera de nitrógeno y agitación constante (120 rpm) a 30 °C en estufa.

La reacción fue detenida luego de 72 horas de incubación por el agregado de 10 ml de una mezcla metanol:agua 4:1 y el producto de condensación fue extraído por lavado del soporte con la misma mezcla de solventes (2 × 10 ml). El rendimiento de la reacción fue determinado por análisis mediante HPLC.

2.4. Purificación de Bz-Arg-NHC₁₂

2.4.1. Purificación de Bz-Arg-NHC₁₂ por cromatografía de intercambio iónico

La purificación del producto deseado fue llevada a cabo mediante cromatografía de intercambio catiónico en un ÄKTA purifier 10 (GE Healthcare) utilizando una columna Resource S (tamaño de partícula: 15 µm, altura × diámetro del lecho: 30 × 6,4 mm, ligando: metil sulfonato, GE Healthcare). La fase móvil empleada fue buffer bórico-borato 0,01 M, pH 8,5 con 50% de etanol, eluyendo con gradiente de concentración de NaCl de 0 a 1 M (figura 2.4). La velocidad de flujo empleada fue de 1 ml/min y la detección fue realizada a 215 y 254 nm. Las muestras fueron previamente filtradas utilizando un filtro de nylon de 0,22 µm. La cantidad de extracto inyectada fue de 1 ml (Torres *et al.*, 2001).

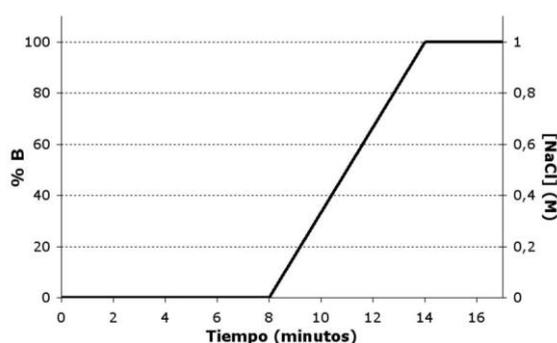


Figura 2.4. Gradiente de concentración de NaCl para la purificación de Bz-Arg-NHC₁₂. Buffer A: buffer bórico-borato 0,01 M, pH 8,5, etanol 50%; buffer B: buffer bórico-borato 0,01 M, pH 8,5, etanol 50%, NaCl 1 M; velocidad de flujo: 1 ml/min; longitudes de onda de detección: 215 y 254 nm.



El pico correspondiente a Bz-Arg-NHC₁₂ (tiempo de retención: 10,8 min) fue recogido. El producto fue desalado mediante sucesivas precipitaciones con etanol absoluto, utilizando un filtro de nylon de 0,22 µm para separar las sales insolubles y evaporando el solvente en rotavapor (Heidolph).

La pureza del producto fue confirmada mediante su análisis por HPLC según las condiciones descritas en el punto 2.4.1.1.

2.4.2. Identificación del producto purificado por ¹H-RMN, ¹³C-RMN y espectrometría de masas

La identificación del producto fue llevada a cabo mediante su análisis por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN). La identificación por espectrometría de masas se hizo según el método de ionización por electrospray (ESI-MS) en un equipo Bruker en el Instituto de Química de Rosario (IQUIR, Fac. de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Argentina). Los espectros RMN, ¹H-RMN, ¹³C-RMN y RMN bidimensional (2D HSQC, *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) se llevaron a cabo disolviendo el producto en DMSO deuterado (Sigma) en un equipo Varian, 250 MHz, en el Laboratorio Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

2.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Bz-Arg-NHC₁₂

2.5.1. Microorganismos y medios de cultivo empleados

Las cepas utilizadas en los ensayos microbiológicos fueron *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 11229, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Para su propagación y en posteriores ensayos, los medios de cultivo utilizados fueron caldo nutritivo (Biokar Diagnostics), agar nutritivo (Biokar Diagnostics) y solución fisiológica, cuya composición se detalla en la tabla 2.1.

Los medios de cultivo, así como todos los materiales empleados en los ensayos microbiológicos, fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de sobrepresión durante 15 minutos.



Medio de cultivo	Componente	Cantidad
Solución fisiológica	NaCl	8,5 g
	Agua destilada	1 litro
Caldo nutritivo	Extracto de carne	5 g
	Triptona	10 g
	NaCl	5 g
	Agua destilada	1 litro
	pH	7,2 ± 0,2
Agar nutritivo	Extracto de carne	5 g
	Triptona	10 g
	Ágar	15 g
	NaCl	5 g
	Agua destilada	1 litro
	pH	7,2 ± 0,2

Tabla 2.1. Composición de los medios de cultivo.

2.5.2. Ensayo de difusión

Se llevaron a cabo ensayos preliminares de difusión en agar para determinar la capacidad inhibitoria de Bz-Arg-NHC₁₂ sobre el crecimiento de diferentes microorganismos. Para ello se utilizaron *E. coli*, *B. cereus*, *St. aureus* y *Ps. aeruginosa* como microorganismos indicadores. Cada uno de ellos fue cultivado en caldo nutritivo a 37°C durante 18-24 horas. El inóculo fue preparado en solución fisiológica, ajustando la turbidez al 0,5 de la escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

El primer ensayo (I) se efectuó sembrando los inóculos de cada microorganismo con hisopo sobre placas de agar nutritivo, en las cuales se realizaron pocillos de 5 mm de diámetro en los que se colocaron 45 µl de soluciones 1 mg/ml, 200 µg/ml, 20 µg/ml y 5 µg/ml de Bz-Arg-NHC₁₂ en agua.

En segundo lugar (II), los microorganismos se sembraron por inclusión en ágar. Para ello, 16 ml de agar nutritivo estéril fundido a 45 °C fueron inoculados con 200 µl de la suspensión de cada microorganismo, homogeneizados en vórtex y vertidos sobre placas de petri de vidrio estériles. Cilindros de vidrio estériles (diámetro externo, 8 mm; diámetro interno, 6 mm; longitud: 10 mm) fueron dispuestos sobre las placas con los distintos microorganismos como se muestra en la figura 2.4 y cargados con 25 µl de soluciones 1 mg/ml, 200 µg/ml, 20 µg/ml y 5 µg/ml de Bz-Arg-NHC₁₂ en agua. A continuación, se permitió la difusión de las soluciones en el agar dejando las placas dentro del flujo laminar durante 20 minutos.



En ambos ensayos, las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas, registrándose a continuación los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (en milímetros).

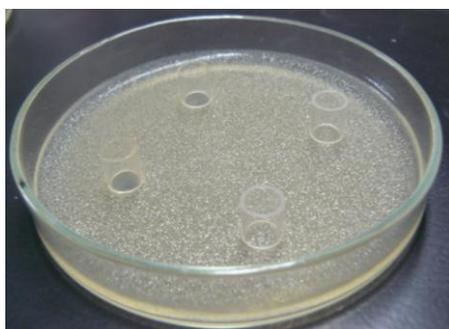


Figura 2.5. Disposición de los cilindros de vidrio sobre las placas de Petri conteniendo agar nutritivo inoculado con los diferentes microorganismos. La imagen corresponde a la placa inoculada con *E. coli* luego de la incubación de la misma a 37 °C durante 24 horas.

2.5.3. Ensayo de dilución en microplaca

2.5.3.1. Optimización de las condiciones

A fin de optimizar la solubilización del producto, se prepararon soluciones 1 mg/ml de Bz-Arg-NHC₁₂ empleando como solventes DMSO, agua con 10% (v/v) de DMSO y agua pura. La actividad antimicrobiana de las soluciones fue ensayada contra *E. coli* de acuerdo al método de microdilución (Gudiña *et al.*, 2010) en placas plásticas estériles de 96 pocillos, fondo plano (TCP-96T-SI, Axygen).

Para la optimización del ensayo, 125 µl de caldo nutritivo estéril de concentración doble (CN 2×,) fueron colocados en los pocillos de la primera columna de la microplaca (figura 2.5), mientras que los pocillos de las columnas 2 a la 10 fueron llenados con 125 µl de caldo nutritivo estéril de concentración simple (CN 1×). A continuación, 125 µl de una solución de Bz-Arg-NHC₁₂ 1 mg/ml en DMSO (filas 1 y 2), agua:DMSO 90:10 (filas 3 y 4) o agua pura (filas 5 y 6) fueron colocados en los pocillos de la primera columna, resultando en una concentración del surfactante igual a 500 µg/ml. Diluciones en serie de esta mezcla fueron realizadas por transferencia de 125 µl de la misma al pocillo siguiente, descartando 125 µl de la mezcla del pocillo de la columna 10, de manera que el volumen remanente en todos los pocillos sea igual a 125 µl. Este proceso resulta en diluciones seriadas 1/2 de las soluciones del surfactante en las primeras 10 columnas de la microplaca (500 µg/ml a 1,95 µg/ml). Finalmente todos los pocillos fueron inoculados con 2,5 µl de una suspensión del microorganismo en solución fisiológica ajustada al 0,5 de la escala de McFarland (1,5x10⁸ UFC/ml), preparada a partir de un cultivo de 16 horas de la cepa en agar nutritivo inclinado. Todas las



determinaciones fueron realizadas por duplicado. Se incluyeron controles de esterilidad de las muestras y del caldo nutritivo, así como también de la viabilidad de los microorganismos. Con la finalidad de estudiar el efecto del solvente (DMSO en las distintas proporciones) sobre el crecimiento de los microorganismos, se realizaron controles con soluciones 100% DMSO (fila 7) y 10% v/v DMSO en agua (fila 8) sin el agregado del surfactante. En estos casos se procedió de igual manera que en el de las muestras del surfactante, realizando diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ de las soluciones. El resultado fueron gradientes de concentración de DMSO de 50 a 0,098% y de 5 a 0,010% respectivamente. Se realizó la lectura de la densidad óptica a 600 nm de la microplaca inmediatamente después del llenado de los pocillos y luego de 24 horas de incubación de la misma a 37 °C, utilizando un lector de microplacas de ELISA Rainbow Reader, SLT Lab Instruments.

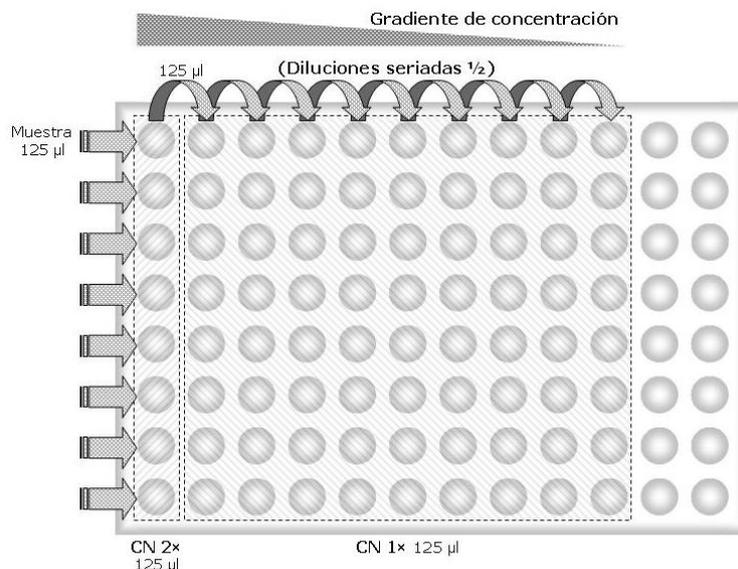


Figura 2.6. Ensayo de dilución: esquema del llenado de la microplaca. Columna 1: 125 µl de caldo nutritivo de concentración doble (CN 2×). Columna 2 a 10: 125 µl de caldo nutritivo de concentración simple (CN ×1). Columna 1: 125 µl de una solución de Bz-Arg-NHC₁₂ 1 mg/ml en DMSO (fila 1 y 2), agua:DMSO 90:10 (fila 3 y 4) o agua pura (fila 5 y 6). Gradiente de concentración: de 500 µg/ml a 1,95 µg/ml (diluciones seriadas $\frac{1}{2}$). Controles: filas 7 y 8, y columnas 11 y 12.

El porcentaje de inhibición del crecimiento fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición} = [1 - DO_c/DO_0] \times 100$$



donde DO_c representa la densidad óptica a 600 nm del pocillo correspondiente a la solución del surfactante de concentración igual a C, y DO_0 , la densidad óptica a 600 nm del pocillo correspondiente al control del crecimiento del microorganismo en ausencia del surfactante.

2.5.3.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

La actividad antimicrobiana del surfactante purificado fue ensayada contra cepas de *E. coli*, *B. cereus*, *St. aureus* y *Ps. aeruginosa* de acuerdo al método de microdilución (Gudiña *et al.*, 2010) en placas plásticas estériles de 96 pocillos, fondo plano (TCP-96T-SI, Axygen). Dicha actividad fue comparada con la del desinfectante catiónico cetrimide [$C_{14}H_{29}(CH_3)_3NBr + C_{16}H_{33}(CH_3)_3NBr$], utilizando una solución 1 mg/ml de este compuesto.

Durante el ensayo con cada cepa, 125 μ l de caldo nutritivo estéril 1 \times fueron colocados en los pocillos de las columnas 2 a la 10 de la microplaca. A continuación, 125 μ l de una solución del surfactante (Bz-Arg-NHC₁₂) o de cetrimide 1 mg/ml en caldo nutritivo fueron colocados en los pocillos de las dos primeras columnas. Diluciones en serie fueron realizadas a partir de la segunda columna, transfiriendo 125 μ l de la mezcla al pocillo siguiente, descartando 125 μ l de la mezcla del pocillo de la columna 10, de manera que el volumen remanente en todos los pocillos fuera igual a 125 μ l. Este proceso resulta en diluciones seriadas 1/2 de las soluciones de los surfactantes en las primeras 10 columnas de la microplaca (1 mg/ml a 1,95 μ g/ml). Finalmente todos los pocillos fueron inoculados con 2,5 μ l de una suspensión del microorganismo preparada como se detalló en el punto 2.7.2.1. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Se incluyeron controles de esterilidad de las muestras y del caldo nutritivo, así como también de la viabilidad de los microorganismos. Se realizó la lectura de la densidad óptica a 600 nm de la microplaca inmediatamente después del llenado de los pocillos y luego de 24 horas de incubación de la misma a 37 °C.

El porcentaje de inhibición del crecimiento fue calculado de acuerdo a la fórmula descrita en el punto 2.7.2.1. La concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada cepa fue definida como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento medible ($DO_{600} \approx 0$, % de Inhibición > 95%).



2.5.4. Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM)

Para determinar la concentración bactericida mínima (CBM), se realizaron estrías de todas aquellas diluciones que no presentaran crecimiento visible ($DO_{600} \approx 0$) en placas con agar nutritivo libre de los surfactantes. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C, determinándose luego la presencia de colonias de la cepa correspondiente. La CBM para cada cepa fue definida como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento (ausencia de colonias).

2.6. Evaluación de la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC₁₂

2.6.1. Preparación del medio mineral

El medio mineral utilizado para solubilizar los compuestos cuya biodegradabilidad se desea determinar fue preparado en el momento del ensayo, adicionando 1 ml de cada una de las soluciones que se detallan en la tabla 2.2 a 1 litro de agua desionizada Nanopure MilliQ, previamente aireada durante al menos 24 horas y mantenida a 20 °C.

<i>Solución</i>	<i>Componente</i>	<i>Concentración</i>
<i>Solución 1</i>	KH_2PO_4	8,5 g/l
	K_2HPO_4	38,0 g /l
	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	33,4 g/l
	NH_4Cl	0,5 g/l
	pH	7,4
<i>Solución 2</i>	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	36,4 g/l
<i>Solución 3</i>	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	25,0 g/l
<i>Solución 4</i>	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	2,5 g/l

Tabla 2.2. Composición de las soluciones stock para la preparación del medio mineral.



2.6.2. Preparación del inóculo

Se recogieron muestras de suelo y agua estancada (volumen final, 250 ml) de la localidad de La Plata (provincia de Buenos Aires, Argentina) en un erlenmeyer e incubadas en condiciones aeróbicas (agitación 150 rpm) a 25 °C, en oscuridad y presencia de glucosa (500 mg) durante 12-24 horas. Pasado este tiempo, la suspensión fue filtrada utilizando un filtro de nitrato de celulosa (0,45 μm , Osmonics). El retenido en el filtro fue resuspendido en 100 ml de medio mineral y reservado para su utilización como inóculo en el ensayo.

2.6.3. Determinación de la biodegradabilidad: ensayo en botella cerrada (OECD 301 D)

El método empleado para la determinación de la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC₁₂ fue el ensayo en botella cerrada OECD 301 D (ISO 10707), en el cual el análisis del oxígeno disuelto cada siete días durante un período de 28 días permite el monitoreo del avance de la degradación del compuesto (Ordenanza N° 01/98 «DPMA», 1998).

El protocolo original establece la realización del ensayo en botellas de vidrio de 250 ml con cierre hidráulico (figura 2.6). Dada la baja cantidad disponible del compuesto a testear, se llevó a cabo una modificación de este protocolo, reemplazando las botellas con cierre hidráulico por frascos de vidrio color caramelo de 50 ml. Estos últimos fueron llenados hasta el tope para evitar la formación de burbujas de aire. Durante el ensayo, y con el objetivo de corroborar que la modificación propuesta no afectó las determinaciones, se realizaron paralelamente controles en ambos tipos de frascos.



Figura 2.7. Botella de DBO de vidrio (250 ml) con cierre hidráulico.



La determinación de la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC₁₂ fue llevada a cabo para dos concentraciones del surfactante. La composición de estas soluciones, así como de las soluciones control se detalla en la tabla 2.3.

<i>Solución</i>	<i>Composición</i>				
	<i>Medio mineral</i>	<i>DMSO</i>	<i>Glucosa</i>	<i>Bz-Arg-NHC₁₂</i>	<i>Solución Bz-Arg-NHC₁₂ 8 mg/l, DMSO 0,1%</i>
<i>Bz-Arg-NHC₁₂ 8,2 mg/l, DMSO 0,1%</i>	1 litro	1 ml	-	8,2 mg	-
<i>Bz-Arg-NHC₁₂ 2,1 mg/l, DMSO 0,025%</i>	750 ml	-	-	-	250 ml
Control positivo	1 litro	-	2,48 mg	-	-
<i>Control negativo medio mineral</i>	1 litro	-	-	-	-
<i>Control negativo DMSO 0,1%</i>	1 litro	1 ml	-	-	-
<i>Control negativo DMSO 0,025%</i>	1 litro	250 µl	-	-	-

Tabla 2.3. Formulación de las soluciones empleadas para el ensayo de determinación de la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC₁₂. Se incluye la composición para el control positivo y los controles negativos con medio mineral y medio mineral con 0,1% y 0,025% (v/v) de DMSO.

Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado, utilizándose frascos de vidrio color caramelo de 50 ml con tapa plástica a rosca y cierre hermético en todos los casos y botellas de DBO para los duplicados de los controles negativos con medio mineral y positivos con glucosa de los días 14 y 21 (tabla 2.4).

Los frascos y botellas rotulados fueron llenados con las soluciones correspondientes e inoculados con la suspensión de microorganismos (preparada según la descripción del punto 2.7.1), añadiéndose 1 ml de la misma en el caso de los frascos de 50 ml, 5 ml en el de las botellas de DBO de 250 ml. A continuación, todos los frascos fueron cerrados herméticamente, asegurándose de que no quedaran burbujas de aire. Finalmente, fueron incubados en oscuridad a 20 °C por los períodos de tiempo correspondientes (7, 14, 21 y 28 días), analizándose el oxígeno disuelto al iniciar el ensayo (tiempo cero) y al finalizar cada etapa (períodos de siete días) mediante el uso de un sensor de oxígeno tipo polarográfico (Mettler-Toledo).



Día	Solución					
	Bz-Arg-NHC ₁₂ 8,2 mg/l DMSO 0,1%	Control DMSO 0,1%	Bz-Arg-NHC ₁₂ 2,1 mg/l DMSO 0,025%	Control DMSO 0,025%	Control glucosa	Control medio mineral
7	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml
14	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 250 ml	 50 ml 250 ml
21	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 250 ml	 50 ml 250 ml
28	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml	 50 ml 50 ml

Tabla 2.4. Esquema del ensayo de biodegradabilidad realizado.

2.6.3.1. Demanda bioquímica de Oxígeno (DBO)

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO), expresada en mg de oxígeno por mg de la sustancia ensayada, se define como la cantidad de oxígeno consumida por los microorganismos al metabolizar la sustancia de interés. La DBO fue calculada para cada período de 7 días de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$DBO = \frac{\text{mg O}_2/\text{l consumido por la sustancia ensayada} - \text{mg O}_2/\text{l consumido por el blanco}}{\text{mg de sustancia ensayada/l}}$$

2.6.3.2. Demanda teórica de oxígeno (DTO)

La demanda teórica de oxígeno (DTO), expresada en mg de oxígeno por mg de la sustancia ensayada, es la cantidad total de oxígeno requerida para oxidar completamente una sustancia. La misma se calcula a partir de la fórmula molecular del compuesto.

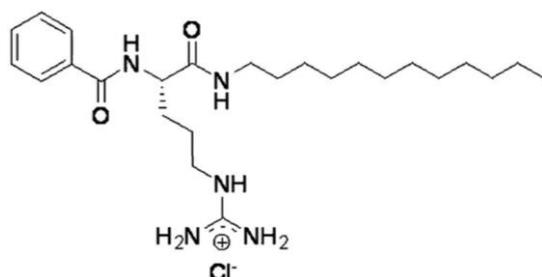


Figura 2.8. Estructura molecular de Bz-Arg-NHC₁₂.

Fórmula molecular: C₂₅H₄₅O₂N₅.

Peso molecular: 446,3 g/mol.

En el caso de Bz-Arg-NHC₁₂ (cuya estructura se muestra en la figura 2.6), la DTO fue calculada teniendo en cuenta la oxidación completa del compuesto a:

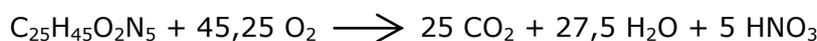
a) CO₂, H₂O y NH₃:



$$\text{DTO} = \frac{31,5 \text{ mmoles O}_2 \times 32 \text{ mg/mmol de O}_2}{1 \text{ mmol Bz-Arg-NHC}_{12} \times 446,3 \text{ mg/mmol de Bz-Arg-NHC}_{12}}$$

$$\text{DTO}_{\text{NH}_3} = 2,258 \text{ mg de O}_2 / \text{mg de Bz-Arg-NHC}_{12}$$

b) CO₂, H₂O y HNO₃:



$$\text{DTO} = \frac{45,25 \text{ mmoles O}_2 \times 32 \text{ mg/mmol de}}{1 \text{ mmol Bz-Arg-NHC}_{12} \times 446,3 \text{ mg/mmol de Bz-Arg-NHC}_{12}}$$

$$\text{DTO}_{\text{HNO}_3} = 3,244 \text{ mg de O}_2 / \text{mg de Bz-Arg-NHC}_{12}$$

2.6.3.3. Porcentaje de degradación y criterio de aceptación

El porcentaje de degradación del compuesto fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Degradación} = \frac{\text{DBO (mg O}_2/\text{mg sustancia ensayada)}}{\text{DTO (mg O}_2/\text{mg sustancia ensayada)}} \times 100$$

Una sustancia es considerada tempranamente biodegradable si dentro de los 28 días del ensayo la disminución de la concentración del oxígeno disuelto es mayor o igual al 60% de la demanda teórica (DTO), siempre y cuando se haya alcanzado el 10% del parámetro diez días antes de haber logrado el valor aceptado.

Capítulo 3

Resultados y Discusión





3.1. Síntesis de surfactantes catiónicos derivados de arginina: selección del biocatalizador

3.1.1. Caracterización de los biocatalizadores

En una etapa preliminar de los ensayos se procedió a seleccionar el biocatalizador más adecuado para la condensación enzimática de derivados de arginina (Bz-Arg-OEt) con dodecilamina. Para ello se caracterizaron los extractos enzimáticos libres de araujiáina (obtenido a partir del látex frutos de la enredadera autóctona *A. hortorum*) y papaína (extracto comercial obtenido a partir del látex de *C. papaya*), determinándose su contenido total de proteínas y actividad proteolítica, utilizando caseína bovina como sustrato (tabla 3.1.). Los resultados obtenidos en estos ensayos evidenciaron una mayor actividad proteolítica específica para el extracto crudo de *A. hortorum* frente a la preparación comercial de papaína, así como también un mayor contenido de proteínas totales.

	<i>Araujiaína</i>	<i>Papaína</i>	
Extracto enzimático	Contenido de proteínas <i>µg de proteínas/mg de extracto</i>	552,20	254,00
	Actividad proteolítica específica <i>Ucas/mg de proteínas</i>	4,11	3,40
Inmovilizado	Actividad amidolítica <i>UI/mg de inmovilizado</i>	0,0013	0,0024
	Actividad amidolítica específica <i>UI/mg de proteína inmovilizada</i>	0,0228	0,0932

Tabla 3.1. Caracterización de los biocatalizadores libres (extractos enzimáticos de *A. hortorum* y *C. papaya*) e inmovilizados por adsorción sobre poliamida.

Para llevar a cabo las reacciones de condensación se eligió inmovilizar las peptidasas por adsorción, utilizando poliamida como soporte. Esta estrategia, como todas las técnicas de inmovilización, otorga una serie de ventajas a la hora de la manipulación del biocatalizador, como lo son la facilidad de separarlo del medio de reacción y un aumento considerable en la estabilidad de la enzima. Los inmovilizados obtenidos fueron caracterizados mediante la determinación de su actividad amidolítica, utilizando el sustrato sintético BAPNA (tabla 3.1.). Papaína adsorbida en poliamida mostró



aproximadamente el doble de actividad amidolítica por mg de preparación inmovilizada que araujaína en las mismas condiciones. La actividad amidolítica específica de papaína adsorbida en poliamida (UI/mg de proteína inmovilizada) fue 4,1 veces mayor que la de araujaína adsorbida en el mismo soporte. Esto podría deberse a que araujaína habría perdido más actividad por efecto de la inmovilización que papaína. Se ha comprobado que papaína pierde alrededor de un 75% de su actividad enzimática inicial (es decir, de la actividad de la enzima libre) luego del proceso de inmovilización por adsorción (Morcelle *et al.*, 2006).

3.1.2. Análisis de la cinética de la reacción de síntesis de Bz-Arg-NHC₁₂ y optimización de la extracción del producto

La reacción de síntesis tiene lugar por condensación enzimática de Bz-Arg-OEt, un derivado de arginina, con dodecilamina, una amina primaria, que actúa como nucleófilo (figura 3.1.). La presencia de agua en el medio de reacción, aún en muy bajas concentraciones, puede provocar la hidrólisis enzimática del reactivo, y por lo tanto, una disminución en el rendimiento de la reacción (figura 3.2).

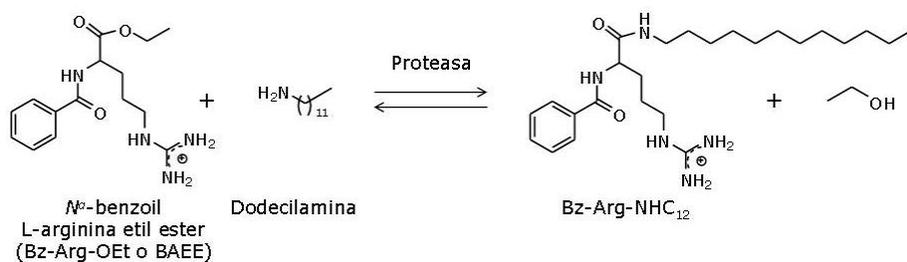


Figura 3.1. Condensación enzimática de Bz-Arg-OEt y dodecilamina.

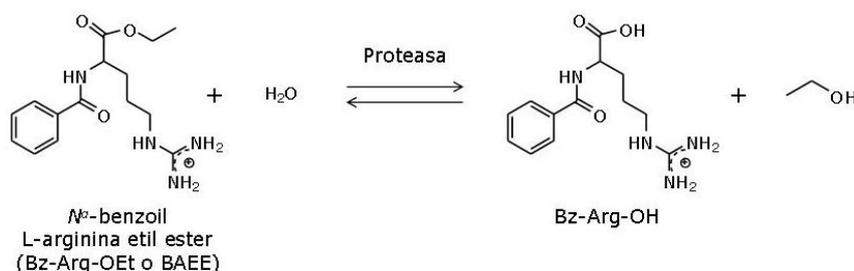


Figura 3.2. Hidrólisis enzimática de Bz-Arg-OEt.



La purificación de esta clase de compuestos puede realizarse por cromatografía de intercambio catiónico (Torres *et al.*, 2001). La selección de la mezcla de extracción adecuada es un paso clave para la recuperación de la mayor cantidad posible del producto sintetizado. Con este fin, se estudió la cinética de síntesis de Bz-Arg-NHC₁₂ utilizando como biocatalizador papaína y mezclas de extracción metanol:AcH (4:1) (Morcelle *et al.*, 2009) y metanol:agua (4:1). Se calcularon los rendimientos (en porcentaje) del producto de condensación, el producto de hidrólisis (Bz-Arg-OH) y el reactivo remanente sin reaccionar (Bz-Arg-OEt) luego de 24, 48 y 72 horas de reacción, deteniendo las mismas por el agregado de las mezclas de reacción mencionadas (figuras 3.3. a y 3.3.b). Los cálculos fueron realizados en base a las áreas de los picos cromatográficos correspondientes obtenidos a partir del análisis de las muestras por HPLC. Las gráficas de la figura 3.3. mostraron rendimientos comparables, independientemente de la mezcla de extracción empleada. El máximo rendimiento de Bz-Arg-NHC₁₂ se registró a las 24 horas de incubación, siendo del 70,09% en producto en el caso de la extracción con la mezcla metanol:AcH y del 73,41% para la extracción con metanol:agua. A partir de estos resultados, y para eliminar posibles interferencias en el proceso de purificación del producto debido a variaciones en las cargas de los analitos a separar, se eligió emplear la mezcla metanol:agua para extraer los productos de la reacción.

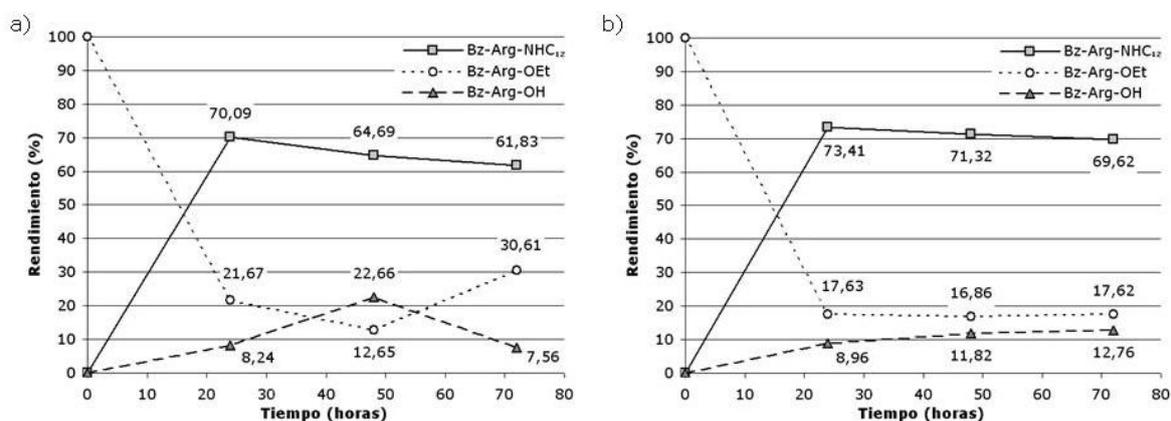


Figura 3.3. Análisis de las cinéticas de reacción para la síntesis de Bz-Arg-NH-dodecilamina (Bz-Arg-NHC₁₂) utilizando papaína inmovilizada sobre poliamida como biocatalizador. Las reacciones de condensación se llevaron a cabo en acetonitrilo con 0,25% de buffer bórico-borato 0,1 mM pH 8,5, a 37 °C, bajo atmósfera de nitrógeno, y fueron detenidas por el agregado de una mezcla (a) metanol:ácido acético 4:1 o (b) metanol:agua 4:1. Se muestran el rendimiento (en porcentaje) del producto de condensación (Bz-Arg-NHC₁₂), el producto de hidrólisis (Bz-Arg-OH), y el reactivo remanente sin reaccionar (Bz-Arg-OEt).



Utilizando la mezcla de extracción elegida, se compararon los rendimientos de Bz-Arg-NHC₁₂ alcanzados luego de 24, 48 y 72 horas de reacción, utilizando papaína y araujaína como biocatalizadores. Los resultados (mostrados en la figura 3.4.) señalan una mayor conversión para papaína para cualquiera de los tiempos ensayados, alcanzándose un rendimiento máximo del 73% a las 24 horas, siendo el máximo registrado para araujaína del 62% luego de 72 horas de reacción. A partir de estos resultados se decidió utilizar papaína como biocatalizador para la síntesis semipreparativa del producto, dado que se necesitaría una masa menor de biocatalizador que si se empleara araujaína para tal fin.

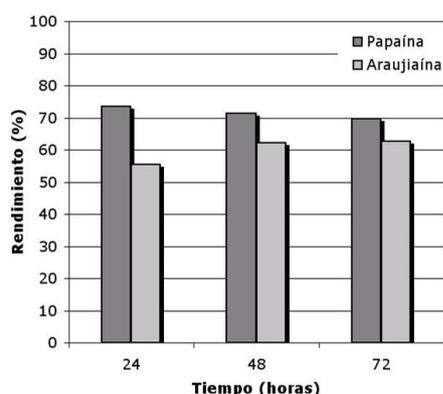


Figura 3.4. Rendimientos de la reacción de síntesis de Bz-Arg-NHC₁₂ para papaína y araujaína a las 24, 48 y 72 horas de reacción. El máximo rendimiento para araujaína se registró a las 72 horas (62%); 73% en el caso de papaína luego de 24 horas de reacción.

3.2. Síntesis de Bz-Arg-NHC₁₂ y purificación por cromatografía de intercambio iónico

Con la finalidad de obtener producto en cantidades del orden de los miligramos, se escaló la reacción de síntesis de Bz-Arg-NHC₁₂ utilizando papaína como biocatalizador. El cálculo de los rendimientos fue realizado a partir de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos en el análisis por HPLC del final de reacción. El rendimiento promedio de la reacción fue del 86,17%. En el caso de la hidrólisis del reactivo, se registró un porcentaje promedio de 8,87%, mientras que un 4,95% permaneció sin reaccionar (figura 3.5.).

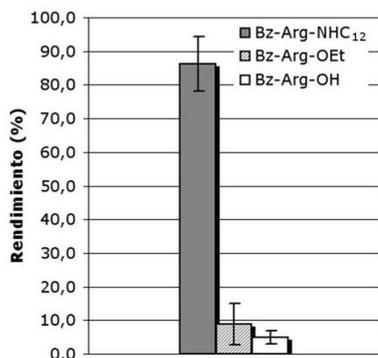


Figura 3.5. Rendimiento (en porcentaje) de la síntesis semipreparativa de Bz-Arg-NHC₁₂ luego de 72 horas de reacción, utilizando papaína inmovilizada sobre poliamida como biocatalizador, en ACN 0,25% v/v buffer bórico-borato 0,1 mM pH 8,5, bajo atmósfera de nitrógeno y agitación constante (120 rpm) a 30 °C. La mezcla de extracción utilizada fue metanol:agua 4:1. Se muestran también el rendimiento del producto de hidrólisis (Bz-Arg-OH) y el reactivo remanente (Bz-Arg-OEt).



La purificación de Bz-Arg-NHC₁₂ se llevó a cabo por cromatografía de intercambio catiónico (figura 3.6.), colectándose el pico correspondiente al producto (tiempo de retención: 10,4 minutos). El surfactante así obtenido fue concentrado por evaporación del solvente y desalado mediante sucesivos pasos de precipitación de las sales con etanol absoluto, filtración y evaporación hasta que no se observara la formación de precipitado. La pureza del producto fue determinada por análisis mediante HPLC. Los cromatogramas para el final de síntesis crudo (figura 3.7.a) y Bz-Arg-NHC₁₂ purificado (figura 3.7.b) muestran una notable disminución en las impurezas.

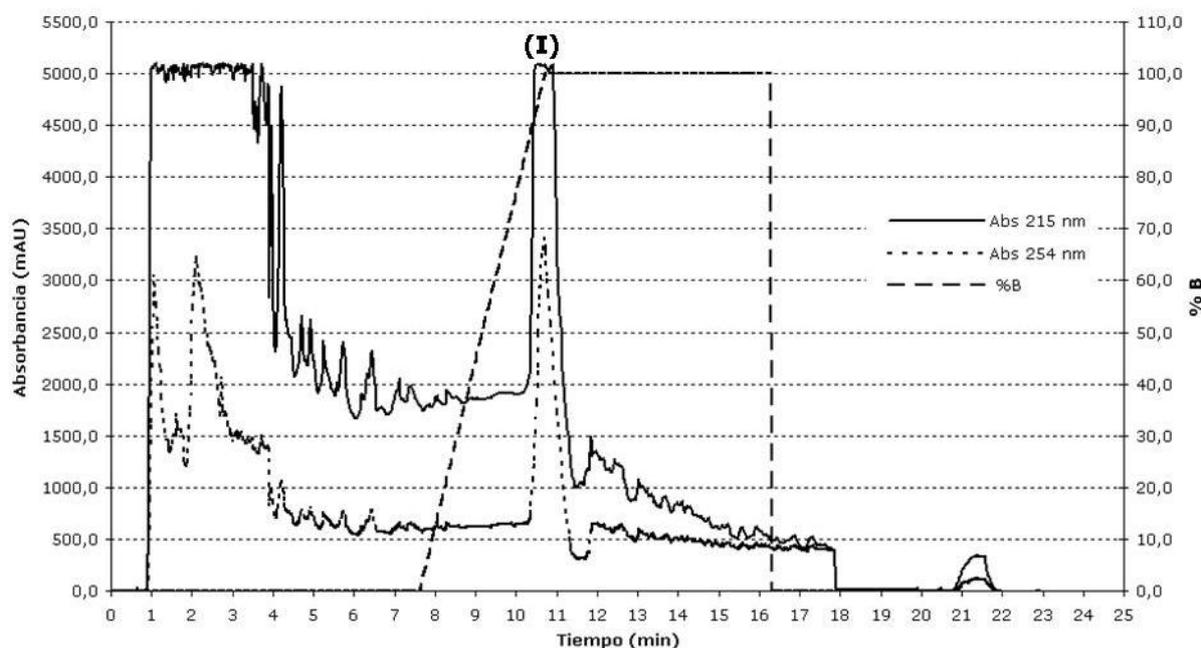


Figura 3.6. Cromatograma correspondiente a la purificación de Bz-Arg-NHC₁₂ por cromatografía de intercambio catiónico. El pico señalado con (I) corresponde al producto de síntesis Bz-Arg-NHC₁₂ (tiempo de retención: 10,4 min; % B: 85%). Se muestran las señales de absorbancia a 215 y 254 nm (las unidades indicadas en el eje principal, a la izquierda, corresponden a las señales a 215 nm). En el eje secundario ("% B", derecha) se muestra el gradiente de elución con buffer bórico-borato 0,01 M, pH 8,5, etanol 50%, NaCl 1 M.

Pudo comprobarse así que la purificación por intercambio catiónico resultó ser un paso muy efectivo para separar las impurezas presentes en el extracto del final de la reacción de síntesis. La combinación de interacciones entre el producto, el cosolvente (etanol) y el NaCl presentes en la fase móvil permiten que Bz-Arg-NHC₁₂ pueda separarse eficientemente del resto de los componentes presentes en la mezcla final de la reacción. La función del etanol en la fase móvil es la de permitir una buena solubilización de Bz-Arg-NHC₁₂, limitar la interacción hidrofóbica del producto con la fase estacionaria



(esto es, con la matriz de estireno/divilbenceno que soporta al ligando metil sulfonato) y favorecer la interacción con los aniones presentes en la fase móvil a medida que la concentración de los mismos aumenta, facilitando así su elución. Esta metodología, además de ser adecuada para la purificación del producto deseado, involucra el empleo de solventes de baja toxicidad y de bajo costo, consistiendo en una alternativa interesante para la producción de este tipo de compuestos a nivel industrial (Torres *et al.*, 2001).

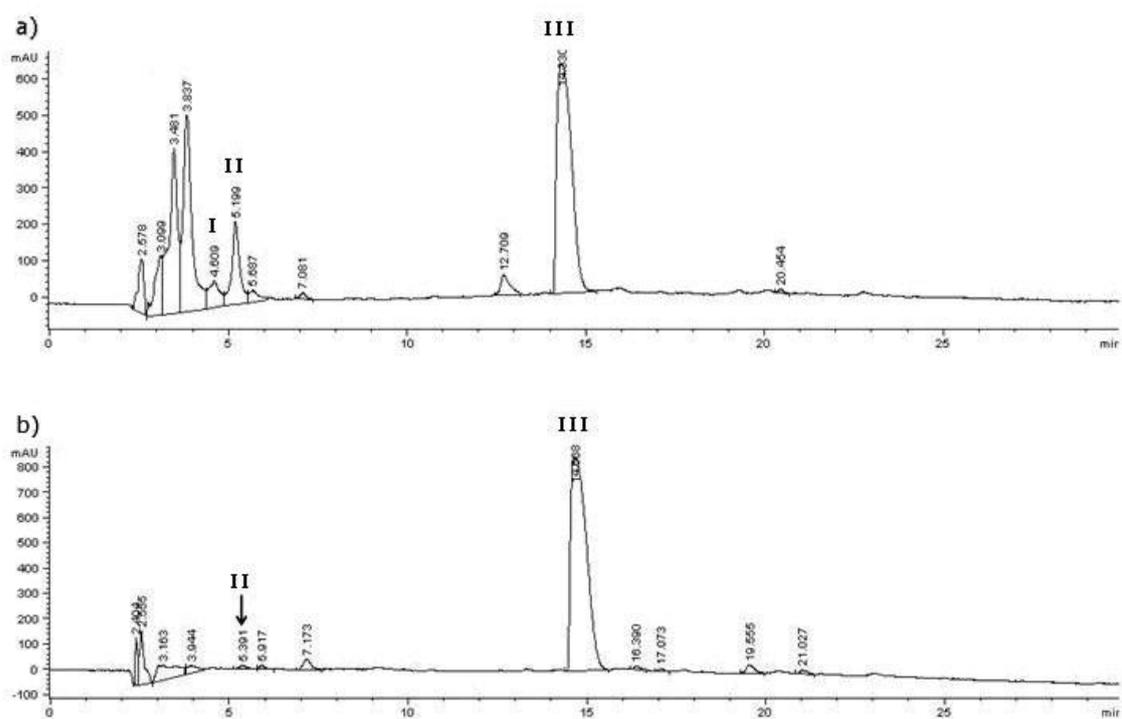


Figura 3.7. Cromatogramas correspondientes al análisis por HPLC del final de síntesis de Bz-Arg-NHC₁₂ crudo (a) y Bz-Arg-NHC₁₂ purificado (b). Las señales corresponden a la absorbancia a 215 nm, señalándose en cada caso los picos correspondientes al producto de hidrólisis (I: Bz-Arg-OH), el reactivo remanente (II: Bz-Arg-OEt) y el producto de síntesis (III: Bz-Arg-NHC₁₂). Los números sobre los picos indican el tiempo de retención correspondiente a cada uno.

El rendimiento porcentual total fue calculado con respecto al rendimiento máximo teórico del producto dado por el reactivo limitante (Bz-Arg-OEt) según la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento total (\%)} = \frac{\text{mg Bz-Arg-NHC}_{12} \text{ recuperados}}{\text{mg Bz-Arg-NHC}_{12} \text{ teóricos}} \times 100$$



En este caso, el rendimiento global de todo el proceso fue de 56,05%. La retención del producto en los filtros utilizados para separar las sales insolubles durante el proceso de desalado podría ser una de las causas de la disminución en el rendimiento final alcanzado.

3.2.1. Identificación del producto purificado por ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y espectrometría de masas

Se verificó la identidad del producto purificado por espectrometría de masas electro spray de alta resolución (ESI-MS) y diversas técnicas de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN, ^{13}C -RMN y 2D HSQC RMN).

La masa teórica de Bz-Arg-NHC₁₂ es de 445,34. La masa hallada corresponde a la del aducto con sodio [M+Na]: 468,33.

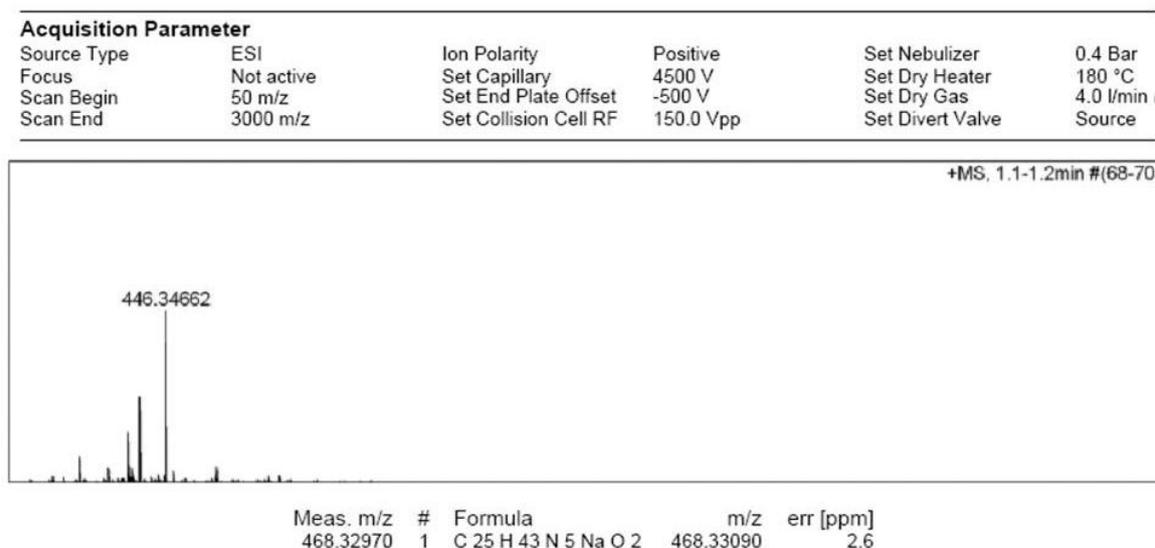
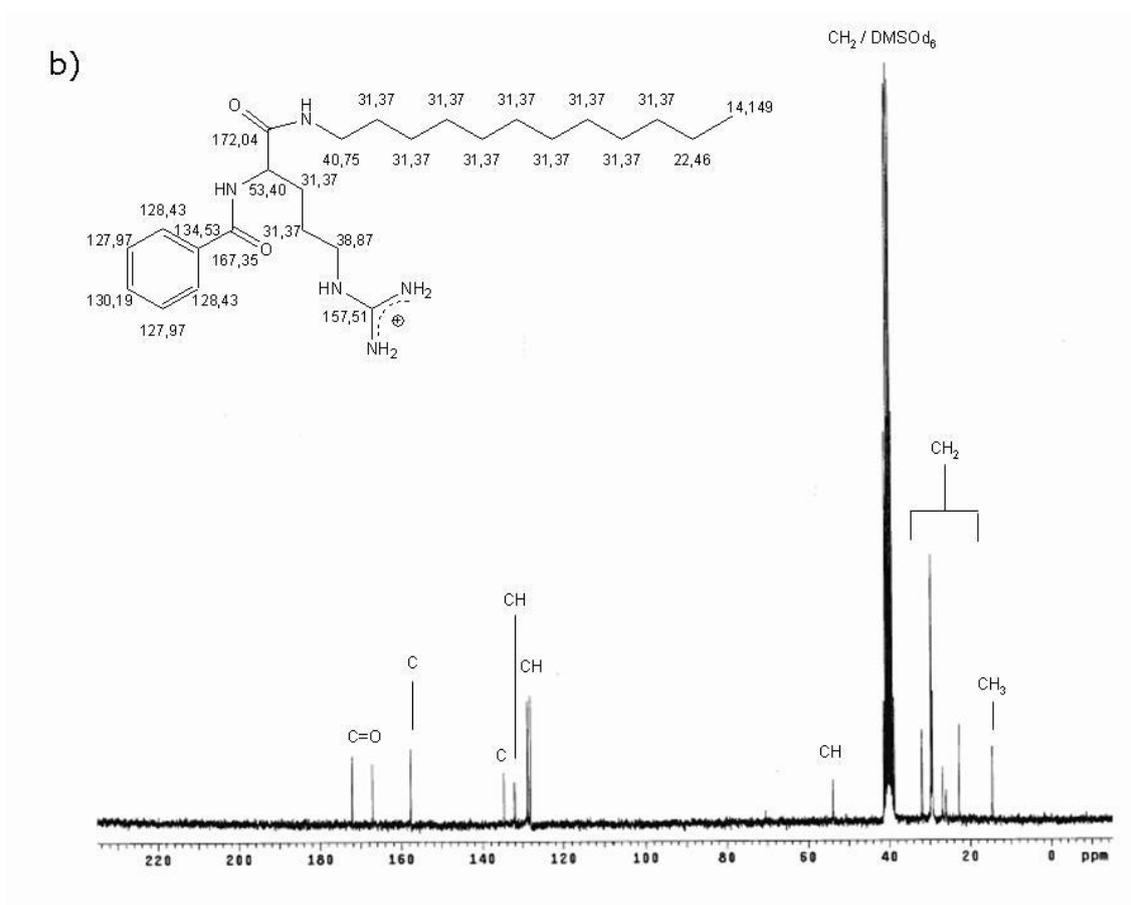
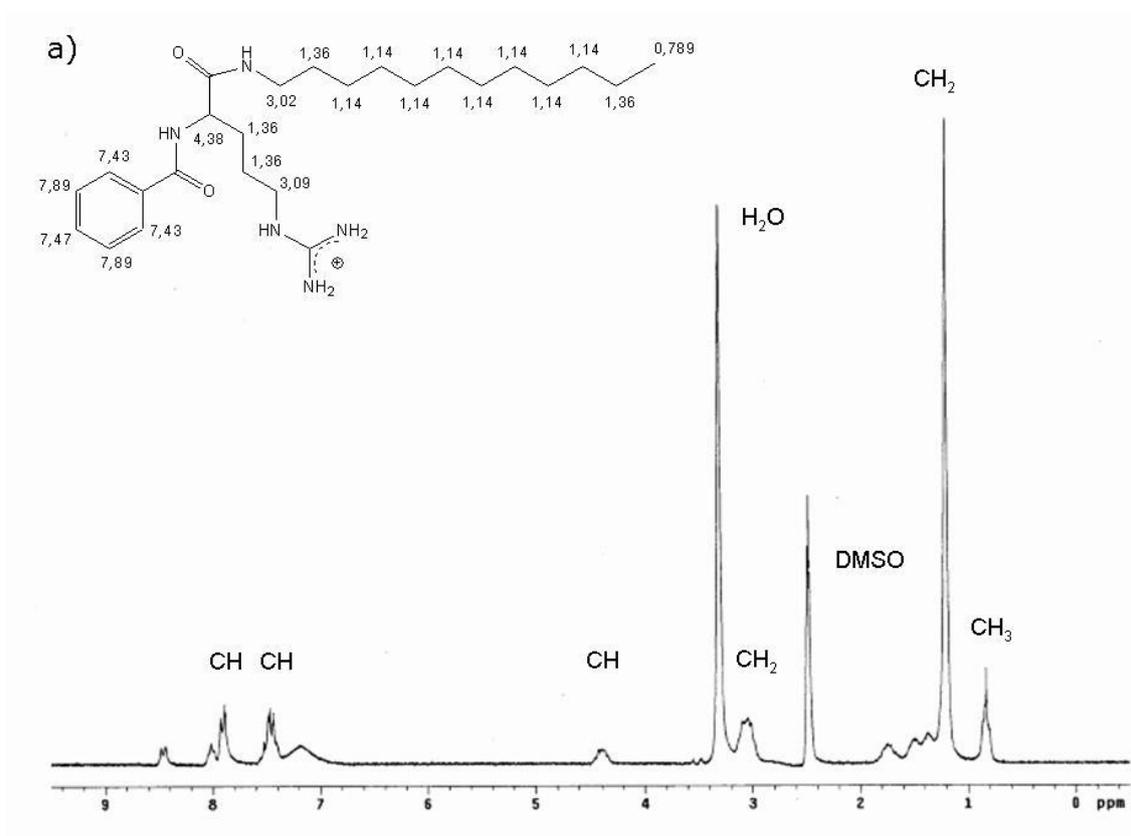


Figura 3.8. Espectro MS correspondiente a Bz-Arg-NHC₁₂.

La estructura del producto purificado fue analizada por RMN. Dada la complejidad de la molécula, se realizaron espectros de RMN de hidrógeno (^1H RMN, figura 3.9.a), de carbono (^{13}C RMN, figura 3.9.b) y la correlación entre ambos (2D HSQC RMN, figura 3.9.c). Los espectros obtenidos confirman la estructura esperada de Bz-Arg-NHC₁₂.



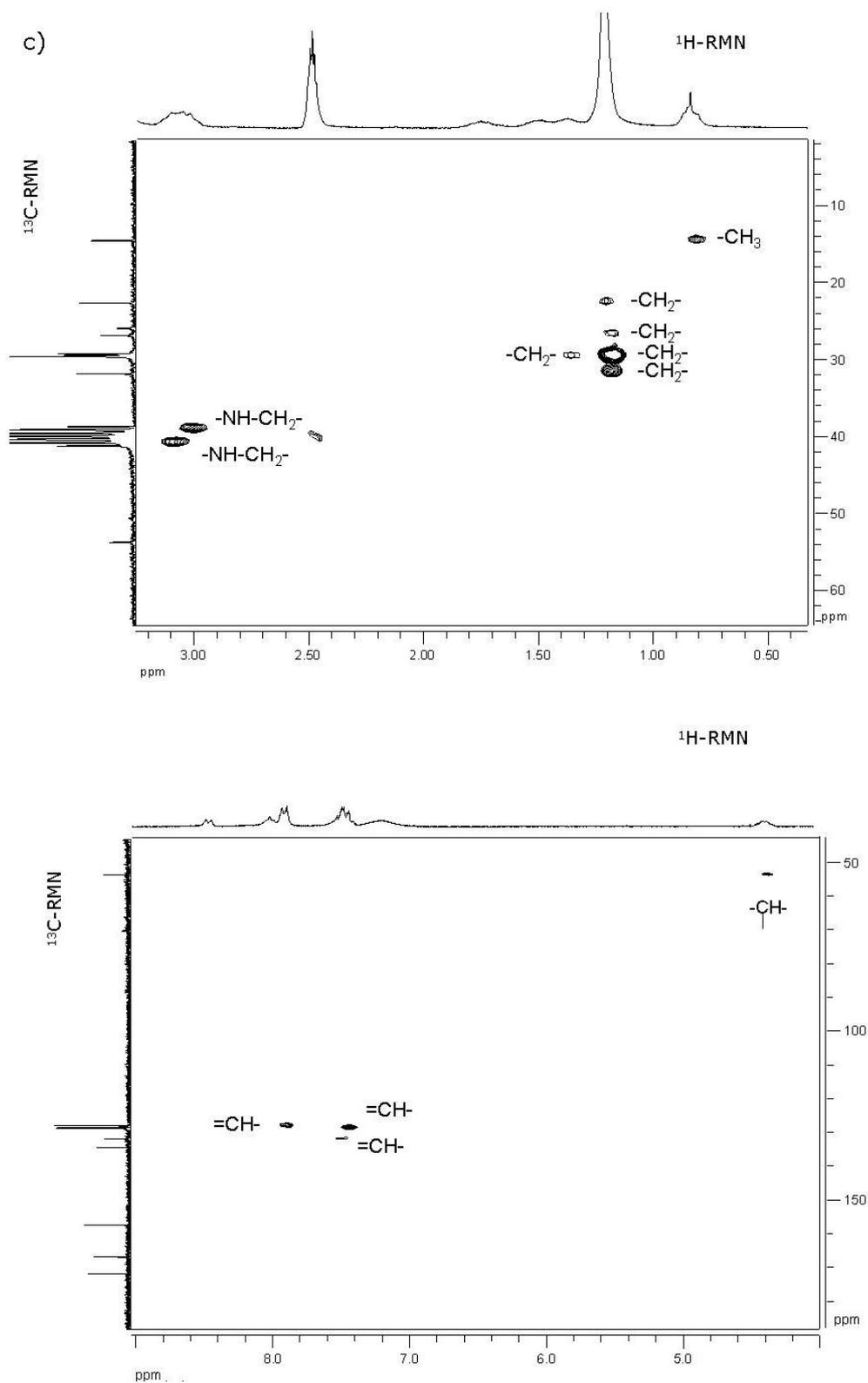


Figura 3.9. Espectros de RMN de Bz-Arg-NHC₁₂. (a) $^1\text{H-RMN}$ y (b) $^{13}\text{C-RMN}$. Se indican los desplazamientos químicos para cada tipo de átomo (en partes por millón, ppm) de los H y C, respectivamente. (c) RMN bidimensional (2D HSQC RMN). Se indican las porciones de la molécula que corresponden a cada señal.



3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Bz-Arg-NHC₁₂

La estructura molecular de Bz-Arg-NHC₁₂ (un región polar, formada por el núcleo de arginina cargada positivamente, y una región altamente hidrofóbica, formada por una cadena alifática) sugería la capacidad del producto de inhibir el crecimiento microbiano además de poseer actividad tensoactiva (Morán *et al.*, 2001; Morán *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha reportado que compuestos de este tipo podrían ser empleados en formulaciones cosméticas y productos para el cuidado personal dadas sus propiedades de biocompatibilidad y su baja toxicidad (Mitjans *et al.*, 2003; Castillo *et al.*, 2006).

Con la finalidad de analizar la actividad antimicrobiana del producto obtenido, se llevaron a cabo ensayos preliminares de difusión en agar utilizando *E. coli* y *B. cereus* como microorganismos indicadores Gram negativo y Gram positivo respectivamente. Dicha actividad también fue ensayada contra *Staphylococcus sp.*, un microorganismo que forma parte de la flora de la piel y *Pseudomonas sp.*, una bacteria frecuentemente relacionada con infecciones producidas en pacientes quemados.

El poder antimicrobiano de Bz-Arg-NHC₁₂ fue contrastado con el de cetrimide, una mezcla de dos compuestos alifáticos de amonio cuaternario cuyas estructuras se muestran a continuación en la figura 3.10:

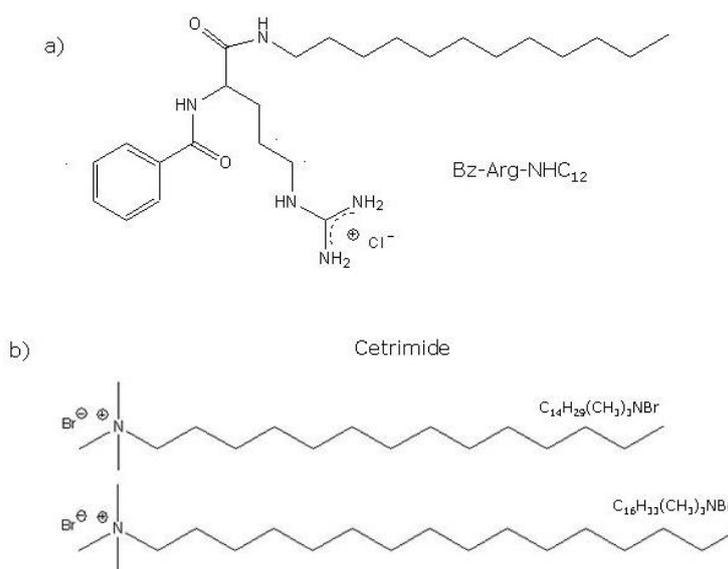


Figura 3.10. Estructuras de (a) Bz-Arg-NHC₁₂ y (b) cetrimide.



El cetrimide es un antimicrobiano y surfactante también de naturaleza catiónica, muy empleado en diversas formulaciones farmacéuticas. Cabe destacar, que también se lo utiliza como componente selectivo de medios de cultivo microbiológicos empleados en el aislamiento de *Ps. aeruginosa* a partir una población bacteriana mixta debido justamente a que actúa como inhibidor del resto de la microflora.

3.3.1. Ensayo de difusión

Las placas correspondientes al primer ensayo de difusión en agar (I) se muestran en la figura 3.11. En el mismo, los microorganismos fueron sembrados sobre la superficie del medio de cultivo y las soluciones del surfactante fueron depositadas dentro de pocillos realizados en el mismo agar.

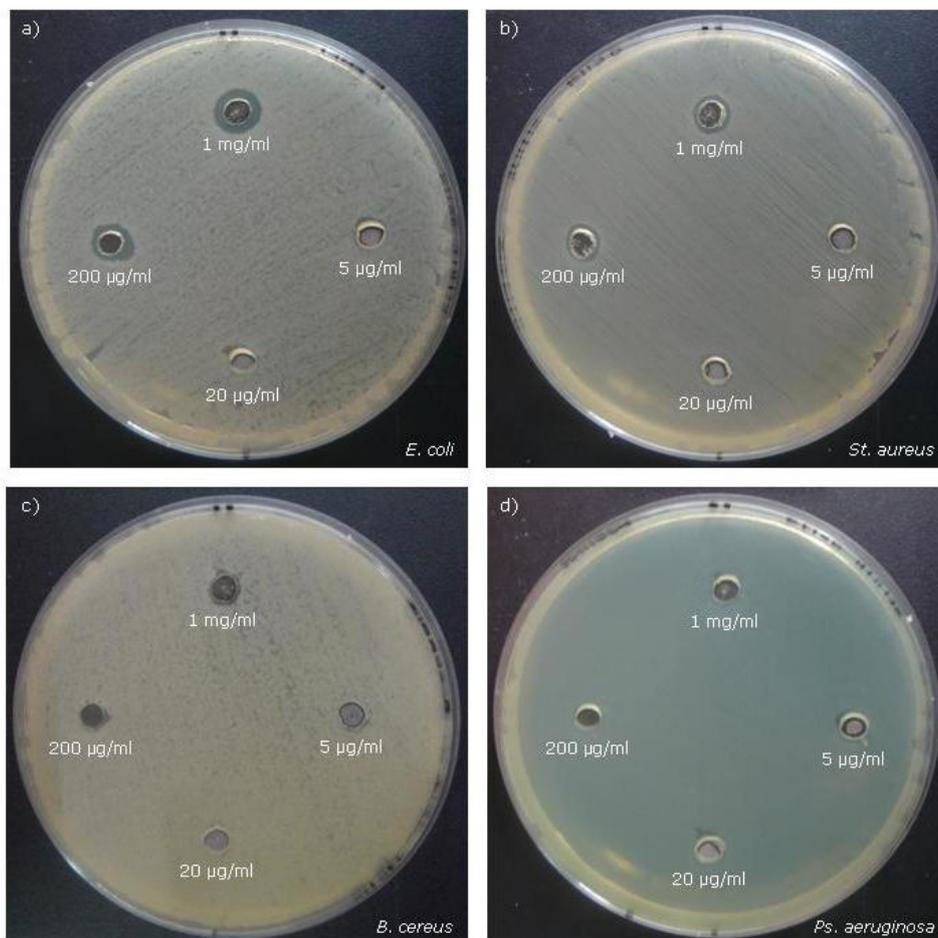


Figura 3.11. Ensayo de difusión agar (I) para la determinación de la capacidad inhibitoria de Bz-Arg-NHC₁₂ sobre el crecimiento de bacterias indicadoras Gram positivas y Gram negativas. Cepas de (a) *E. coli*, (b) *B. cereus*, (c) *St. aureus* y (d) *Ps. aeruginosa*



La tabla 3.2 resume los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento registrados para cada cepa.

Concentración Bz-Arg-NHC ₁₂	Diámetro de halo de inhibición (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
1000 µg/ml	9,0 ± 0,0	6,3 ± 0,6	8,0 ± 1,0	5,7 ± 0,6 **
200 µg/ml	8,3 ± 0,6	5,3 ± 0,6	7,3 ± 0,6	*
20 µg/ml	5,7 ± 0,6	*	5,7 ± 0,6 **	*
5 µg/ml	*	*	*	*

Tabla 3.2. Diámetro de los halos de inhibición registrados en el ensayo de difusión en agar (I) para *E. coli*, *B. cereus*, *St. aureus* y *Ps. aeruginosa*. En los casos señalados con (*), no se observaron halos de inhibición, mientras que en los señalados con (**), el crecimiento observado en los límites de los pocillos fue diferente al registrado en zonas de la placa libre del surfactante.

Se observó un efecto sobre el crecimiento de los microorganismos proporcional a la concentración del surfactante en la muestra, siendo mayor el diámetro del halo de inhibición cuanto mayor fuese la concentración de Bz-Arg-NHC₁₂ probada. En dos de los casos (*St. aureus* y *Ps. aeruginosa* con 20 y 1000 µg/ml de Bz-Arg-NHC₁₂ respectivamente), si bien el crecimiento no se vio completamente inhibido, se observaron diferencias significativas en la morfología de las colonias que crecían en los bordes del pocillo con respecto a aquellas colonias que crecían en regiones de las placas libres del surfactante.

La figura 3.12 muestra las placas obtenidas en el segundo ensayo de difusión (II) inoculadas con *E. coli* (a), *B. cereus* (b) *St. aureus* (c) y *Ps. aeruginosa* (d) luego de su incubación a 37 °C durante 24 horas. En ellas pudo observarse cómo el crecimiento de *E. coli*, *B. cereus* y *St. aureus* se vio inhibido en su totalidad por una concentración de Bz-Arg-NHC₁₂ igual a 1 mg/ml, siendo menor la inhibición a medida que la concentración del producto disminuyó (aparición de colonias). Por otro lado, ninguna de las concentraciones testeadas afectó el crecimiento de *Ps. aeruginosa*. La razón de este comportamiento podría deberse a diferencias en la estructura de *Ps. aeruginosa* con respecto a otras bacterias Gram negativas, como *E. coli*, cuyo crecimiento sí se vio afectado.

El hecho de que los halos de inhibición del crecimiento registrados se limitaron a la circunferencia interior de los cilindros utilizados para contener la solución, podría estar



vinculado a una baja difusión de Bz-Arg-NHC₁₂ en el medio de cultivo, debida a su baja solubilidad en medio acuoso.

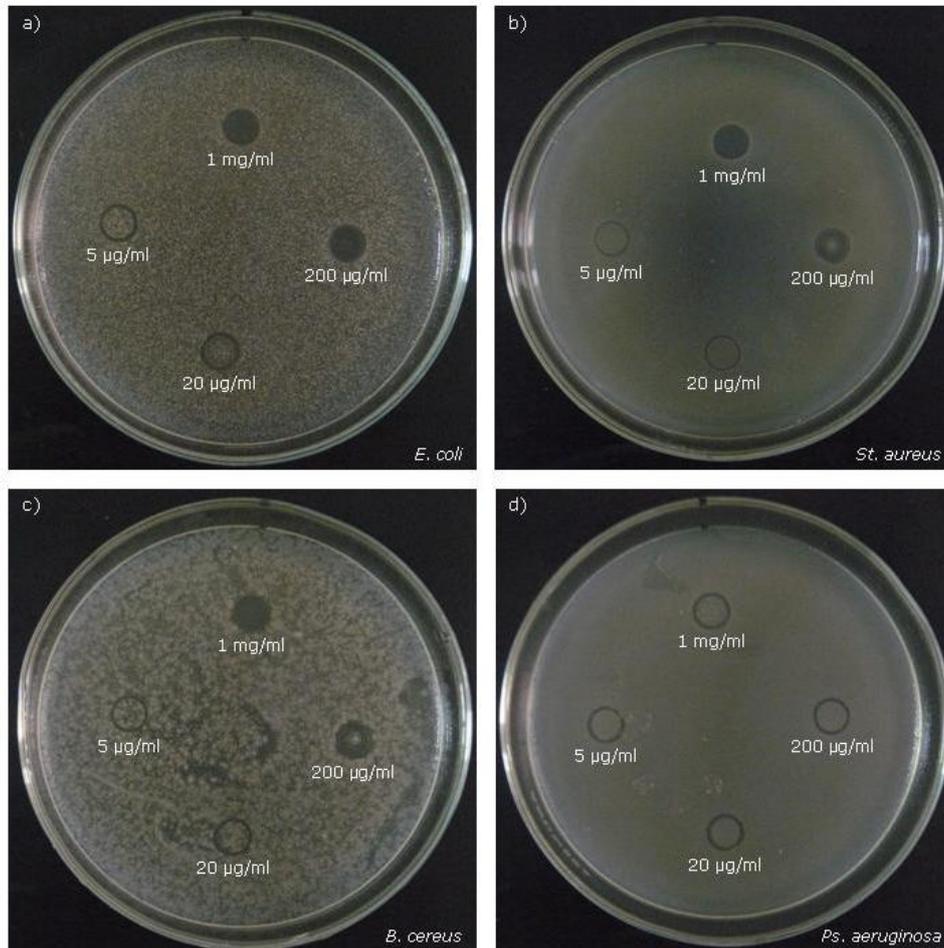


Figura 3.12. Ensayo de difusión agar (II) para la determinación de la capacidad inhibitoria de Bz-Arg-NHC₁₂ sobre el crecimiento de bacterias indicadoras Gram positivas y Gram negativas. Cepas de (a) *E. coli*, (b) *B. cereus*, (c) *St. aureus* y (d) *Ps. aeruginosa*.

3.3.2. Ensayo de dilución en microplaca: optimización de las condiciones

Habiendo observado la capacidad inhibitoria de Bz-Arg-NHC₁₂, se decidió llevar a cabo la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas para las cepas de los microorganismos antes mencionados mediante el método de dilución en microplaca.

Para la puesta a punto de este método, y de manera de aumentar la solubilidad de Bz-Arg-NHC₁₂ en solución acuosa, se planteó el uso de dimetil sulfóxido (DMSO) como cosolvente. A tal fin, se prepararon soluciones de 1 mg/ml del surfactante en DMSO, en



agua con 10% v/v de DMSO y en agua pura. La tabla 3.3 resume las concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₂ y DMSO resultantes para las diluciones ensayadas de las muestras.

Dilución en CN		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024
Bz-Arg-NHC ₁₂ [µg/ml]		500,00	250,00	125,00	62,50	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	0,98
% DMSO	Bz-Arg-NHC ₁₂ 1 mg/ml en DMSO	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10
	Bz-Arg-NHC ₁₂ 1 mg/ml en agua 10% v/v DMSO	5,00	2,50	1,25	0,63	0,3	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01

Tabla 3.3. Concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₂ (µg/ml) y DMSO (% v/v) para las diluciones señaladas de las soluciones del producto en DMSO y agua con 10% v/v DMSO.

Los resultados obtenidos para los controles de crecimiento de *E. coli* en DMSO mostraron que éste se vio afectado por la presencia del solvente en diferentes proporciones en el medio. La figura 3.13 muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli* en función de la concentración de DMSO. El efecto observado fue directamente proporcional al porcentaje del solvente en el medio, registrándose inhibición del crecimiento a partir de una concentración de 0,78% de DMSO, llegando a una inhibición del 100% para concentraciones de DMSO iguales a 50,00; 25,00 y 12,50%.

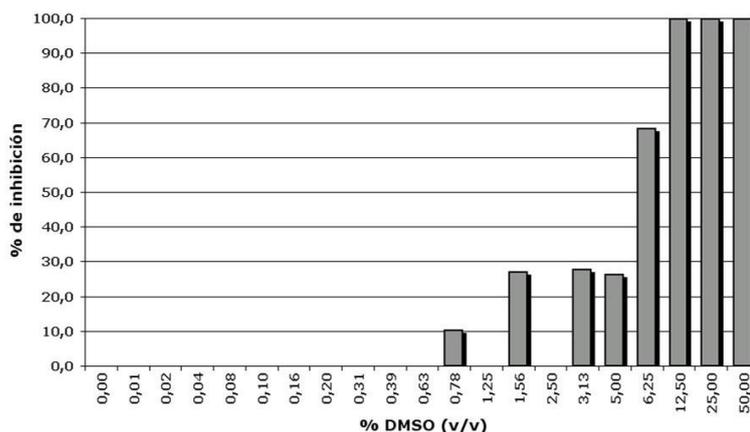


Figura 3.13. Efecto de distintas proporciones de DMSO sobre el crecimiento de *E. coli*. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento respecto del control de la cepa en caldo nutritivo.

La figura 3.14 muestra una fotografía de la microplaca al finalizar la optimización del ensayo para determinar la CIM, luego de haber sido incubada a 37 °C durante 24 horas.

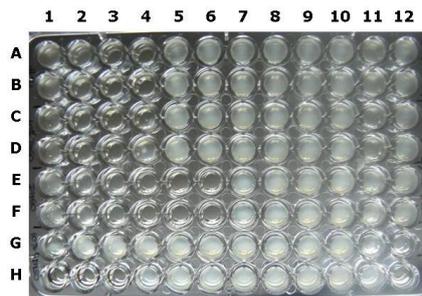


Figura 3.14. Optimización del ensayo de dilución en microplaca utilizando *E. coli* como cepa indicadora. Filas A y B, columnas 1 a 10: Bz-Arg-NHC₁₂ en agua; filas C y D, columnas 1 a 10: Bz-Arg-NHC₁₂ en agua con 10% v/v DMSO; filas E y F, columnas 1 a 10: Bz-Arg-NHC₁₂ en DMSO; fila G, columnas 1 a 10: control de crecimiento de *E. coli* en agua con 10% DMSO; fila H, columnas 1 a 10: control de crecimiento de *E. coli* en DMSO; pocillos 11A y 11B: Bz-Arg-NHC₁₂ en agua (control negativo); pocillos 11C y 11D: Bz-Arg-NHC₁₂ en agua con 10% v/v DMSO (control negativo); pocillos 11E y 11F: Bz-Arg-NHC₁₂ en DMSO (control negativo); pocillos 12A a 12F: control de crecimiento de *E. coli*; pocillo 11G: control negativo agua; pocillo 11H: DMSO (control negativo); pocillo 12G: agua con 10% v/v DMSO (control negativo); pocillo 12H: caldo nutritivo (control negativo).

Luego de medir la densidad óptica a 600 nm de los pocillos de la microplaca, se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento de *E. coli* para cada dilución de las muestras, elaborándose con estos resultados una gráfica “% de inhibición vs. concentración de Bz-Arg-NHC₁₂” (figura 3.15).

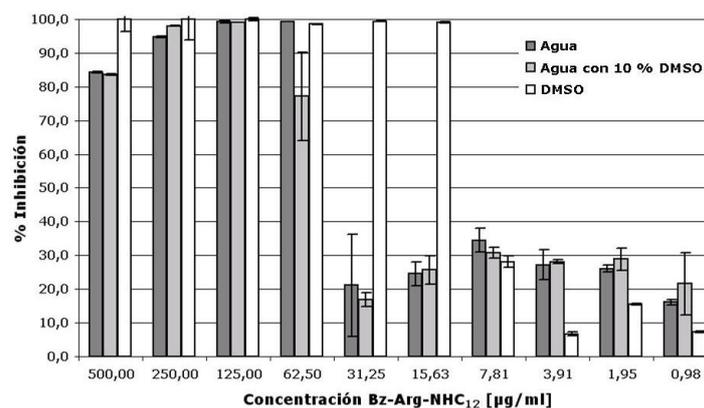


Figura 3.15. Optimización del ensayo en microplaca: efecto de Bz-Arg-NHC₁₂ en diferentes solventes sobre el crecimiento de *E. coli*.

Los resultados para las soluciones de Bz-Arg-NHC₁₂ en agua y agua con 10% v/v de DMSO no mostraron diferencias significativas. Por otro lado, en el caso de la solución del surfactante en DMSO, el crecimiento de *E. coli* se vio afectado aún hasta concentraciones menores a las que se observaron para el producto en agua pura o agua con 10% v/v DMSO.

Relacionando los resultados mostrados en las figuras 3.13 y 3.15, puede decirse que habría un efecto combinado del surfactante y del DMSO sobre la inhibición del crecimiento de *E. coli*. Debido a que se desconoce en qué manera podrían interactuar ambos compuestos, afectando positiva o negativamente la actividad antimicrobiana del tensoactivo, se escogió preparar soluciones acuosas de Bz-Arg-NHC₁₂ para estudiar su actividad antimicrobiana frente a los distintos microorganismos indicadores.



3.3.3. Determinación de las concentraciones inhibitorias (CIM) y bactericidas mínimas (CBM)

La actividad antimicrobiana de Bz-Arg-NHC₁₂ fue determinada calculando el porcentaje de inhibición del crecimiento para cepas de *E. coli*, *B. cereus*, *St. aureus* y *Ps. aeruginosa*. A partir de los resultados obtenidos se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada microorganismo, estableciéndose también, en caso de ser posible, la concentración bactericida mínima (CBM). Las determinaciones se llevaron a cabo mediante el ensayo de dilución en microplaca, testeándose un rango de concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₂ de 1000 a 1,95 µg/ml. Estos resultados fueron comparados con los obtenidos para el desinfectante catiónico cetrimide, cuya actividad antimicrobiana fue probada en el mismo rango de concentraciones.

La figura 3.16 muestra las microplacas obtenidas para ensayos contra *E. coli* y *B. cereus* (a) y *St. aureus* y *Ps. aeruginosa* (b) luego de 24 horas de incubación de las mismas a 37 °C.

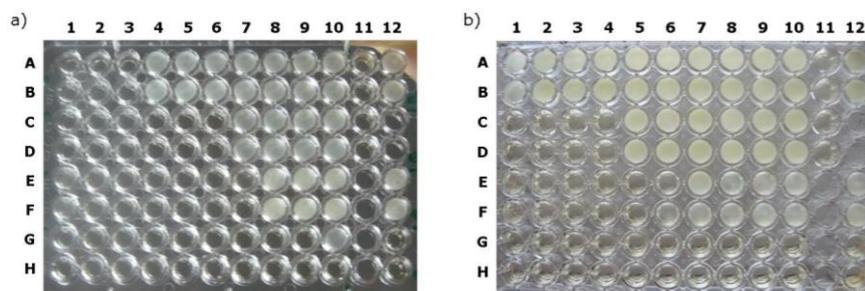


Figura 3.16. Ensayo de dilución en microplaca para *E. coli* y *B. cereus* (a) y *St. aureus* y *Ps. aeruginosa* (b). **(a)** Filas A y B, columnas 1 a 10: *E. coli* con Bz-Arg-NHC₁₂; filas C y D, columnas 1 a 10: *E. coli* con cetrimide; filas E y F, columnas 1 a 10: *B. cereus* con Bz-Arg-NHC₁₂; filas G y H, columnas 1 a 10: *B. cereus* con cetrimide; pocillos 11A y 11B: Bz-Arg-NHC₁₂ (control negativo); pocillos 11C y 11D: cetrimide (control negativo); pocillos 12A y 12B: control de crecimiento *E. coli*; pocillos 12E y 12F: control de crecimiento *B. cereus*; pocillos 12G y 12H: caldo nutritivo (control negativo). **(b)** Filas A y B, columnas 1 a 10: *Ps. aeruginosa* con Bz-Arg-NHC₁₂; filas C y D, columnas 1 a 10: *Ps. aeruginosa* con cetrimide; filas E y F, columnas 1 a 10: *St. aureus* con Bz-Arg-NHC₁₂; filas G y H, columnas 1 a 10: *St. aureus* con cetrimide; pocillos 11A y 11B: Bz-Arg-NHC₁₂ (control negativo); pocillos 11C y 11D: cetrimide (control negativo); pocillos 12A y 12B: control de crecimiento *Ps. aeruginosa*; pocillos 12E y 12F: control de crecimiento *St. aureus*; pocillos 12G y 12H: caldo nutritivo (control negativo).

Se midió la densidad óptica a 600 nm en cada pocillo de las microplacas y se calcularon los porcentajes de inhibición de crecimiento de los distintos microorganismos respecto a la concentración del surfactante (Bz-Arg-NHC₁₂ o cetrimide) tal como se muestra en la figura 3.17.

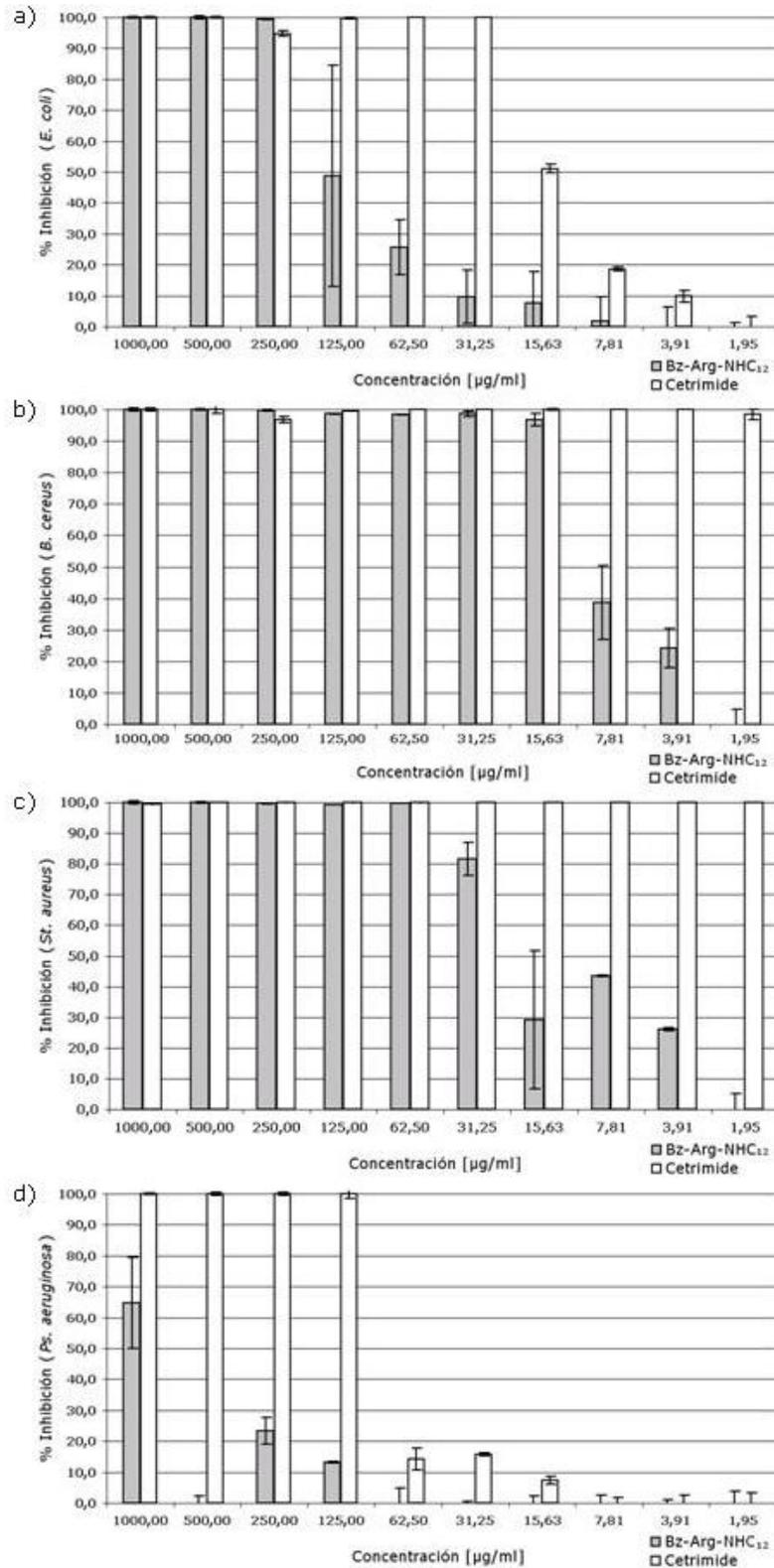


Figura 3.17. Efecto de Bz-Arg-NHC₁₂ y cetrimide sobre el crecimiento de *E. coli* (a), *B. cereus* (b), *St. aureus* (c) y *Ps. aeruginosa* (d). Para cada cepa, la CIM fue definida como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento medible ($DO_{600} \approx 0$, % de Inhibición > 95%). Las CIM registradas para Bz-Arg-NHC₁₂ y cetrimide respectivamente fueron: *E. coli*, 250 µg/ml y 31,25 µg/ml; *B. cereus*, 15,63 µg/ml y 1,95 µg/ml; *St. aureus*, 62,50 µg/ml y 1,95 µg/ml; *Ps. aeruginosa*, R y 125,00 µg/ml. R = el crecimiento del microorganismo no fue afectado por las concentraciones testeadas.



A partir de las gráficas “% de inhibición vs. concentración del surfactante (Bz-Arg-NHC₁₂ o cetrimide)” se determinó la CIM para cada microorganismos, definida como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento medible ($DO_{600} \approx 0$, % de Inhibición > 95%). Estos resultados, junto con los correspondientes a las CBM, se resumen en la tabla 3.4.

	Bz-Arg-NHC₁₂		Cetrimide	
	<i>CIM</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>CBM</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>CIM</i> ($\mu\text{g/ml}$)	<i>CBM</i> ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Escherichia coli</i>	250,00	250,00	31,25	31,25
<i>Bacillus cereus</i>	15,63	250,00	1,95	3,91
<i>Staphylococcus aureus</i>	62,50	62,50	1,95	3,91
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	125,00	250,00

Tabla 3.4. Concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas (CIM y CBM, respectivamente) registradas para Bz-Arg-NHC₁₂ y cetrimide frente a diferentes microorganismos. *R*: el crecimiento del microorganismo no fue afectado por las concentraciones testeadas.

Se ha reportado el estudio de las propiedades antimicrobianas de surfactantes derivados de arginina con estructura similar a la de Bz-Arg-NHC₁₂. Entre ellos pueden mencionarse compuestos como arginina-*N*-lauril amida diclorhidrato (Arg-NHC₁₂, ALA) y *N*^o-lauril-L-arginina-metil éster clorhidrato (LAM) (Morán *et al.*, 2001): la figura 3.18 muestra las estructuras de los estos dos compuestos y de Bz-Arg-NHC₁₂. Puede observarse una gran similitud estructural entre ALA y Bz-Arg-NHC₁₂, siendo la única diferencia la desprotección del grupo amino del carbono α perteneciente a la arginina de ALA, lo que le otorga esta la molécula una doble carga positiva. Para LAM, la diferencia estructural con Bz-Arg-NHC₁₂ es más notoria, ya que es el grupo amino unido al carbono α de la arginina el que participa en el enlace amida que une el núcleo polar a la cadena alifática de doce carbonos. Asimismo, en este compuesto el grupo carboxilo de la arginina forma un enlace éster con una segunda cadena alifática (metilo). La principal similitud de LAM con Bz-Arg-NHC₁₂, además del largo de la cadena alifática (12 C), radica en la presencia de una única carga positiva en el núcleo polar.

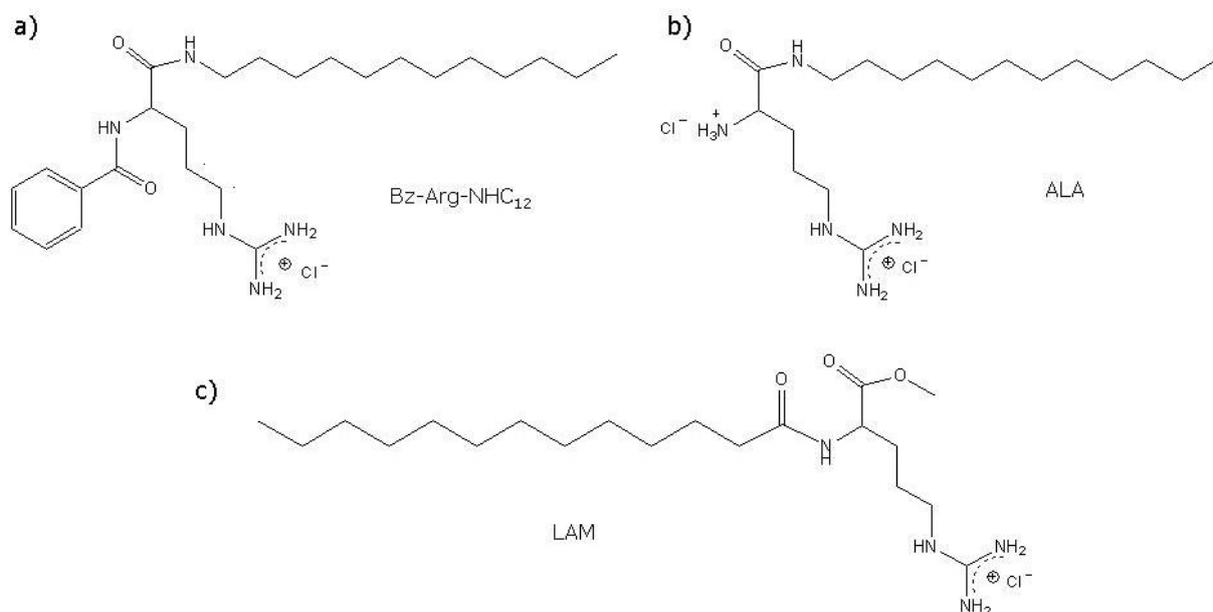


Figura 3.18. Comparación de las estructuras de (a) Bz-Arg-NHC₁₂, (b) ALA: Arg-NHC₁₂ y (c) LAM: *N*^o-lauril-L-arginina-metil éster clorhidrato.

Bz-Arg-NHC₁₂ mostró ser efectivo frente a la mayoría de los microorganismos ensayados. En el caso de la actividad antimicrobiana contra *E. coli*, la CIM obtenida para Bz-Arg-NHC₁₂ (250,00 µg/ml) fue similar a la registrada para LAM (256 µg/ml), mientras que la bacteria resultó ser resistente frente a ALA (Morán *et al.*, 2001). La CIM registrada para *B. cereus* en el caso de Bz-Arg-NHC₁₂ (15,62 µg/ml) resultó ser mucho menor que las correspondientes para ALA (32 µg/ml) y LAM (64 µg/ml). Los valores de CIM más bajos fueron registrados contra la bacteria Gram positiva *St. aureus*, siendo los mismos de 62,50; 16 y 32 µg/ml para Bz-Arg-NHC₁₂, ALA y LAM respectivamente. Por otro lado, si bien el crecimiento de *Ps. aeruginosa* se vio inhibido a concentraciones iguales a 64 µg/ml para ALA y 128 µg/ml para LAM, el mismo no se vio afectado por las concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₂ testeadas. Resulta interesante el hecho de que de las cepas correspondientes a bacterias Gram negativas resultaron ser más resistentes a la acción de los surfactantes que las Gram positivas, tanto en el caso de Bz-Arg-NHC₁₂, como de ALA y LAM. Este fenómeno observado podría explicarse por la impermeabilidad de las membranas externas de determinadas bacterias Gram negativas frente a compuestos anfifílicos (Morán *et al.*, 2001).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, podría proponerse la utilización de Bz-Arg-NHC₁₂ como agente selectivo en medios de cultivo microbiológicos; sin embargo, para confirmar esta idea, sería necesario probar la acción de este compuesto frente a un mayor número de géneros microbianos.



3.4. Evaluación de la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC₁₂

3.4.1. Definiciones y fundamento del método

3.4.1.1. Biodegradación y biodegradabilidad

El proceso de biodegradación de un compuesto orgánico consiste en la oxidación del mismo por acción de agentes biológicos (microorganismos, principalmente bacterias), generando sustancias más simples que pueden ser utilizadas por los mismos para su metabolismo. De este concepto se deduce el de biodegradabilidad, que puede resumirse como la susceptibilidad de un compuesto a la degradación biológica.

En el caso de los tensioactivos, los procesos de biodegradación pueden dividirse en tres categorías:

a) **Biodegradación primaria**; se entiende como la modificación de la molécula del surfactante de manera que se alteren sus propiedades fisicoquímicas características (propiedades tensioactivas). En la práctica, la biodegradabilidad primaria puede ser evaluada por métodos analíticos específicos (cromatografía, electroforesis capilar, espectrofotometría, espectrometría de masas, etc.).

b) **Biodegradación total o mineralización**; consiste en la degradación completa del tensioactivo por acción de microorganismos (principalmente bacterias) para generar compuestos inorgánicos (CO₂, H₂O, NH₃, etc.), energía y biomasa. La biodegradabilidad total es generalmente evaluada en sistemas aerobios, realizando determinaciones no específicas, como la medida del dióxido de carbono producido, el oxígeno consumido durante el proceso o de los niveles de carbono orgánico total que permanecen en solución a lo largo del curso de la biodegradación.

c) **Biodegradabilidad ambientalmente aceptable**; es un tipo de biodegradabilidad primaria en la que los metabolitos resultantes presentan una baja ecotoxicidad, es decir, son ambientalmente inocuos. (Lechuga Villena, 2005).

Dado que surfactantes basados en arginina con estructura similar a la del compuesto estudiado en este trabajo resultaron ser biodegradables en distinto grado (Morán *et al.*, 2001), se investigó la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC₁₂ mediante el método OECD 301 D. Este método se aplica a la evaluación de la biodegradabilidad de productos químicos (entre ellos, compuestos con propiedades tensioactivas) que puedan persistir en el medio acuático utilizados frecuentemente para combatir derrames de



hidrocarburos (Ordenanza Nº 01/98 «DPMA», 1998). Las concentraciones de la sustancia ensayada requeridas son bajas (del orden de los 2 mg/l), siendo por lo tanto el método de elección para la evaluación de la biodegradabilidad de compuestos tóxicos y/o volátiles.

3.4.1.2. Ensayo en botella cerrada (OECD 301 D): fundamento del método

El método se basa en el seguimiento del oxígeno disuelto en una solución de la sustancia de interés inoculada con una población mixta de microorganismos durante un período de 28 días. En el ensayo, una cantidad determinada del producto es disuelta en un medio inorgánico, el cual es a continuación inoculado con un número relativamente pequeño de microorganismos (población mixta encontrada comúnmente en aguas y suelos) y mantenido en botellas cerradas en la oscuridad (para evitar el desarrollo de algas) a temperatura constante (20 °C).

3.4.2. Determinación de la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC₁₂

Las tablas 3.5 y 3.6 muestran las concentraciones de oxígeno disuelto registradas para cada solución en los diferentes períodos de tiempo y los porcentajes de degradación de Bz-Arg-NHC₁₂, respectivamente.

Día	O ₂ disuelto (mg/l)					
	Bz-Arg-NHC ₁₂ 8,2 mg/l DMSO 0,1%	Control DMSO 0,1%	Bz-Arg-NHC ₁₂ 2,1 mg/l DMSO 0,025%	Control DMSO 0,025%	Control glucosa	Control medio mineral
0	8,00	7,96	8,00	8,00	8,00	8,00
7	7,60	7,84	7,60	7,50	3,76	7,20
14	7,84	8,00	7,88	8,00	2,04	7,72
21	7,16	2,00	7,36	2,24	2,40	7,92
28	7,08	2,00	7,24	2,24	2,16	8,00

Tabla 3.5. Concentraciones de oxígeno disuelto para cada solución ensayada en los diferentes períodos de tiempo.



Los resultados mostrados en la tabla 3.5 evidenciarían una baja biodegradabilidad para Bz-Arg-NHC₁₂, siendo un efecto tóxico o inhibitorio del compuesto sobre la población bacteriana utilizada como inóculo la causa más probable de la misma. Esta hipótesis se basa en el hecho de que los controles realizados en presencia de DMSO únicamente presentaron una mayor disminución del oxígeno disuelto que en el caso de las muestras de Bz-Arg-NHC₁₂ en presencia del mismo solvente.

Para las dos concentraciones testeadas del compuesto, los porcentajes de degradación máximos alcanzados se registraron a los 28 días de iniciado el ensayo (tabla 3.6). Considerando CO₂, H₂O y HN₃ como productos finales de degradación, estos porcentajes fueron de 4,97 y 16,03% para los frascos con concentraciones iniciales de Bz-Arg-NHC₁₂ iguales a 8,4 y 2,1 mg/l respectivamente. Por otra parte, en caso de tener en cuenta como productos finales CO₂, H₂O y HNO₃, los porcentajes máximos de degradación alcanzados fueron menores, siendo de 3,46 y 11,16% para 8,4 y 2,1 mg/l de Bz-Arg-NHC₁₂ respectivamente.

% de Degradación				
Día	Bz-Arg-NHC ₁₂ 8,2 mg/l DMSO 0,1%		Bz-Arg-NHC ₁₂ 2,1 mg/l DMSO 0,025%	
	CO ₂ , H ₂ O y NH ₃	CO ₂ , H ₂ O y HNO ₃	CO ₂ , H ₂ O y NH ₃	CO ₂ , H ₂ O y HNO ₃
0	0,00	0,00	0,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00
14	0,00	0,00	0,00	0,00
21	4,10	2,86	11,81	8,22
28	4,97	3,46	16,03	11,16

Tabla 3.6. Porcentajes de degradación para Bz-Arg-NHC₁₂ calculados considerando como productos de degradación CO₂, H₂O y NH₃ ó HNO₃.

Si bien estos resultados indicarían que Bz-Arg-NHC₁₂ no sería tempranamente biodegradable, puede observarse un aumento de la degradación del mismo cuando la concentración del producto disminuye. Esto sugeriría un efecto tóxico sobre los microorganismos utilizados como inóculo causado por las concentraciones del producto alcanzadas en el ensayo Si este fuera el caso, podría agregarse un control adicional (además de los controles positivos y negativos tradicionales) en el cual se testean simultáneamente cantidades similares de la sustancia de interés y una sustancia de referencia, como la anilina (Reuschenbach *et al.*, 2003). Así puede probarse el efecto del



compuesto cuya biodegradabilidad se desea determinar sobre la viabilidad del inóculo, ya que si el mismo es inhibido a la concentración del producto testeada, la sustancia de referencia (cuya biodegradabilidad ha sido probada) no será consumida en el tiempo (Paaga, 1997).

Otra modificación del ensayo consistiría en la exposición previa del inóculo al compuesto de interés de manera favorecer la adaptación de los microorganismos al mismo, algo que es recomendable en algunos casos (Paaga, 1997). Sin embargo, siempre es importante tener en cuenta que el inóculo utilizado para la determinación de la biodegradabilidad de un compuesto tiene un rol central en dicho proceso. El mismo es meramente definido en términos de su origen y estado de aclimatación o pretratamiento, y no debe estandarizarse. Esto quiere decir que debe permanecer como una población mixta de microorganismos para representar lo más fehacientemente posible el ecosistema real en donde la sustancia de interés fuese liberada (Paaga, 1997).

Referencias bibliográficas señalan a ALA y LAM, tensioactivos derivados de arginina con estructura similar a Bz-Arg-NHC₁₂ (figura 3.18), como biodegradables (Morán et al, 2001). La evaluación de la biodegradabilidad total de estos compuestos fue llevada a cabo mediante el método OECD 301 E (ISO 7827), monitoreándose la remoción del carbono orgánico total disuelto (TOC). Este test es aplicado comúnmente a compuestos no volátiles, solubles en agua y requiere concentraciones del producto a ensayar del orden de los 10-40 mg/l (Paaga, 1997). Este ensayo podría ser otra alternativa a tener en cuenta para estudiar la biodegradabilidad de Bz-Arg-NHC₁₂ y poder compararla con otros compuestos semejantes.

Capítulo 4

Conclusiones y Perspectivas





4.1. Conclusiones Generales

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluyó que:

- De los biocatalizadores ensayados, papaína adsorbida en poliamida resultó ser el más apropiado para la síntesis de Bz-Arg-NHC₁₂, por lo que fue seleccionado para la obtención de dicho compuesto en cantidades semipreparativas.
- La extracción de Bz-Arg-NHC₁₂ del medio de reacción empleando la mezcla MeOH:H₂O 4:1 resultó ser apropiada y fue la elegida para el primer paso de purificación del producto.
- El rendimiento en producto obtenido para esta reacción fue del 86,17%.
- La purificación por extracción, seguida de cromatografía de intercambio catiónico empleando como fase móvil solventes de baja toxicidad y bajo costo, permitió obtener el producto puro en cantidades del orden de los miligramos.
- Se confirmó la identidad del producto purificado mediante distintas técnicas de resonancia magnética nuclear (¹H-RMN, ¹³C-RMN y 2D HSQC RMN), así como por espectrometría de masas por electrospray (ESI-MS).
- Bz-Arg-NHC₁₂ demostró tener actividad antimicrobiana contra cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas. En el primer caso, el crecimiento de todas las cepas ensayadas (*B. cereus* y *St. aureus*) se vio afectado por el compuesto. Por el contrario, en el segundo caso, sólo fue efectivo contra una de las cepas testeadas (*E. coli*), en tanto que *Ps. aeruginosa* resultó ser resistente.
- Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) registradas para Bz-Arg-NHC₁₂ (µg/ml) fueron: *B. cereus*, 15,63; *St. aureus*, 62,50; *E. coli*, 250,00.
- Las concentraciones bactericidas mínimas (CBM) registradas para Bz-Arg-NHC₁₂ (µg/ml) fueron: *B. cereus*, 250,00; *St. aureus*, 62,50; *E. coli*, 250,00.
- Bz-Arg-NHC₁₂ demostró poseer baja biodegradabilidad según el método testado (OECD 301 D), siendo la causa más probable de la misma un efecto tóxico o inhibitorio del compuesto sobre la población bacteriana utilizada como inóculo.



4.2. Perspectivas

- Ensayo de otras alquilaminas como nucleófilos con mayor y/o menor número de átomos de carbonos para obtener una familia de compuestos relacionados.
- Ensayo de otros biocatalizadores de origen vegetal (peptidasas de otras especies vegetales, lipasas, etc.) para la síntesis de esta clase de compuestos.
- Ensayo de la síntesis de dichos compuestos en otros medios conteniendo solventes orgánicos de mayor biocompatibilidad (por ejemplo, etanol) con la finalidad de volver el proceso más sustentable.
- Determinación de características fisicoquímicas de los productos tales como la tensión superficial y la concentración micelar crítica.
- Ensayo del poder antimicrobiano frente a un mayor número de microorganismos, incluyendo tanto bacterias como levaduras.
- Determinación de la biodegradabilidad a través de otros métodos.

Referencias





Referencias

- Anastas, P. C.; Warner, J. C. (1998). Green chemistry: Theory and practice. Oxford University Press, New York.
- Aracil, J.; Vicente, M.; Martínez, M.; Paulina, M. (2006). Biocatalytic processes for the production of fatty acid esters. *J. Biotechnol.* **124**:213–223.
- Bordusa, F. (2002). Proteases in organic synthesis. *Chem. Rev.* **102**:4817-4867.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**:248-254.
- Castillo, J. A. (2006). Studies on antimicrobial activity of arginine-based surfactants and chemo-enzymatic synthesis of novel amphiphiles based on L-arginine and D-fagomine. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, Facultad de Química, Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IIQAB-CSIC), Barcelona, España.
- Castillo, J. A.; Clapes, P.; Infante, M. R.; Comas, J.; Manresa, A. (2006a). Comparative study of the antimicrobial activity of bis(*N*^ε-caproyl-L-arginine)-1,3-propanediamine dihydrochloride and chlorhexidine dihydrochloride against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chem.* **57**:691-698
- Castillo, J. A.; Infante, M. R.; Manresa, A.; Vinardell, M. P.; Mitjans, M.; Clapes P. (2006b). Chemoenzymatic synthesis and antimicrobial and haemolytic activities of amphiphilic bis(phenylacetylarginine) derivatives. *Chem. Med. Chem.* **1** 2006:1091-1098
- Castillo, J.A.; Clapés, P.; Infante, M.R.; Comas, J.; Manresa, A. (2006). Comparative study of the antimicrobial activity of bis(*N*^ε-caproyl-L-arginine)-1,3-propanediamine dihydrochloride and clorexidine dihydrochloride against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**:691-698.
- Chellapan, S.; Jasmin, C.; Basheer, S. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from *Engyodontium album* BTMFS 10 under solid state fermentation. *Proc. Biochem.* **41**:956-61.
- Clapés, P.; Infante, M. R. (2002). Amino acid-based surfactants: enzymatic síntesis, properties and potential applications. *Biocatal. Biotrans.* **20**:213-233.
- Clapes, P.; Moran, C.; Infante, M. R. (1999). Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants. *Biotechnol. Bioeng.* **63**:333-343
- Clapés, P.; Morán, M. C.; Infante M. R. (1999). Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants. *Biotechnol. Bioeng.*, **63**:333-343.
- Clapés, P.; Torres, J.L.; Adlercreutz, P. (1995). Enzymatic peptide synthesis in low water content systems: preparative enzymatic synthesis of [Leu]- and [Met]-enkephalin derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **3**:245-55.
- Gardossi, L.; Poulsen, P.B.; Ballesteros, A.; Hult, K.; Švedas, V.K.; Vasic-Racki, D.; Carrea, G.; Magnusson, A.; Schmid, A.; Wohlgemuth, R.; Halling, P.J. (2010). Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. *Trends Biotech.* **28**:171-180.
- Gudiña, E. J.; Rocha, V.; Teixeira, J. A.; Rodrigues, I. R. (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Letts. Appl. Microbiol.* **50**:419–424.
- Gupta, M.N.; Roy, I. (2004). Enzymes in organic media. Forms, functions and applications. *Eur. J. Biotech.* **271**:2575–2583.
- http://old.iupac.org/reports/2001/colloid_2001/manual_of_s_and_t/node36.html. Surface Active Agents, Manual Of Symbols And Terminology For Physicochemical Quantities And Units, International Union Of Pure And Applied Chemistry (IUPAC).



- http://www.epa.gov/greenchemistry/pubs/about_gc.html. Introduction to the Concept Of Green Chemistry. U.S. Environmental Protection Agency.
- http://www.epa.gov/oppt/greenengineering/pubs/whats_ge.html. What is green engineering. U.S. Environmental Protection Agency.
- <http://www.weeds.org.au/cgi-bin/weedident.cgi?tpl=plant.tpl&ibra=all&card=V06>. Australian Weeds Committee, National Weeds Management Facilitator, Moth Plant (*Araujia sericifera*) fact sheet.
- Illanes, A. (2009). Aplicaciones convencionales en reacciones de hidrólisis. En: Enzimas proteolíticas de vegetales superiores, Aplicaciones industriales (Ed. Caffini, N. O.), Mariscal & Asociados, pp. 187-200.
- Khmelnitsky, Y.L., Rich, J.O. (1999). Biocatalysis in nonaqueous solvents. *Curr. Op. Chem. Biol.* **3**:47-53.
- Kim, C.; Shin, C. S. (2001). Solvent-free enzymatic synthesis of alitame precursor using eutetic substrate mixtures. *Enzyme Microbiol. Technol.* **28**:611-6.
- Lechuga Villena M. M. (2005). Biodegradación y toxicidad de tensioactivos comerciales. Tesis doctoral, Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería Química, Granada, España. <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/15522052.pdf>.
- Lee, H.-H.; Fukushi, K.; Oyama, K.; Aso, K. (1993). PEG-papain catalyzed synthesis of a kyotorphin derivative in aqueous organic media. *Biotech. Lett.* **15**:833-6.
- Luna, H. (2004). Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediario para la síntesis de fármacos. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **48**:211-219
- Mitjans, M.; Martínez, V.; Clapés, P.; Pérez, L.; Infante, M.R.; Vinardell, M.P. (2003). Low potential irritation of arginine-based gemini surfactants and their mixtures with nonionic and zwitterionic surfactants. *Pharm. Res.* **20**:1697-1701.
- Moran, C.; Clapes, P.; Comelles, F.; Garcia, T.; Perez, L.; Vinardell, P.; Mitjans M.; Infante M. R. (2001a). Chemical structure/property relationship in single-chain arginine surfactants. *Langmuir* **17**:5071-5075
- Morán, C.; Clapés, P.; Comelles, F.; García, T.; Pérez, L.; Vinardell, P.; Mitjans, M.; Infante, M.R. (2001). Chemical structure/property relationship in single-chain arginine surfactants. *Langmuir* **17**:5071-5075.
- Moran, C; Infante, M. R.; Clapes, P. (2002). Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 2. Lipase-catalysed synthesis of 1-O-lauroyl-rac-glycero-3-O-(Na-acetyl-L-amino acid) and 1,2-di-Olauroyl-rac-glycero-3-O-(Na-acetyl-L-amino acid) derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2002:1124-1134
- Moran, M. C.; Infante, M. R.; Clapes, P. (2001b). Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 1. Enzymatic preparation of rac-1-O-(Na-acetyl-L-aminoacyl)glycerol derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 2001:2063-2070
- Morán, M.C.; Pinazo, A.; Pérez, L.; Clapés, P.; Angelet, M.; García, M.T.; Vinardell, M.P.; Infante, M.R. (2004). «Green» amino acid-based surfactants. *Green Chem.* **6**:233-240.
- Morcelle, S. R. (2004). Proteasas de látex de *Funastrum clausum* (Jacq.) Schlechter (Asclepiadaceae): purificación, caracterización y aplicación en la síntesis de péptidos en medios orgánicos. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Cs. Exactas, Departamento de Cs. Biológicas, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Morcelle, S. R., Barberis, S., Priolo, N., Caffini, N.O., Clapés, P. (2006). Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funastrum clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* **41**:117-124.
- Morcelle, S. R.; Liggieri, C. S.; Bruno, M. A.; Priolo, N.; Clapés, P. (2009). Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic,* **57**:177-182.
- Morihara, K. (1987). Using proteases in peptide synthesis. *Trends Biotech.* **5**:164-170.
- Nakaoka, H.; Miyajima Y.; Morihara, K. (1998). Papain-catalyzed synthesis of aspartame precursor: a comparison with thermolysin. *J. Ferm. Bioeng.* **85**:43-7.
- Nielsen, P. M.; Olsen, H. S. (2002). Enzymatic modification of food protein. En: Enzymes in food technology (R.J. Whitehurst & B.A. Law, eds.), CRC Press, Boca Raton, pp. 109-43.



- Obregón, W. D. (2008). Hidrolasas de látex de especies del género *Araujia*. Purificación y caracterización de las enzimas proteolíticas. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Cs. Exactas, Departamento de Cs. Biológicas, La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Obregón, W. D.; Arribére, M. C.; Morcelle del Valle, S.; Liggieri, C.; Caffini, N.; Priolo, N. (2001). Two new cysteine endopeptidases obtained from latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.*, **20**:317-325.
- Ordenanza Nº 01/98 «DPMA» (1998). Normas para la autorización de uso de productos químicos utilizados para combatir la contaminación por hidrocarburos. Régimen de la protección del medio ambiente, tomo 6, Prefectura Naval Argentina, Buenos Aires, Argentina. Acceso online (15/11/2010): http://www.prefecturanaval.gov.ar/ordenanzas/ordn_pdf/6-1998-1.pdf.
- Ota, S.; Moore, S.; Stein, W. H. (1964). Preparation and chemical properties of purified stem and fruit bromelains. *Biochemistry*, **3**:180-185.
- Pagga U. (1997). Testing Biodegradability with standardized methods. *Chemosphere* **53**:2953-2972.
- Priolo, N. S.; López, L. M. I.; Arribére, M. C.; Natalucci, C. L.; Caffini N. O. (1991). New purified plant proteinases for the food industry. *Acta Alimentaria*, **20**:189-196.
- Priolo, N.; Morcelle del Valle, S.; Arribére, M. C.; López, L.; Caffini, N. (2000). Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.*, **19**:39-49.
- Reuschenbach, P.; Pagga, U.; Strotmann, U. (2003). A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. *Water Research* **37**:1571-1582.
- Sing, A., J. Van Hamme & O.P. Ward (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Application aspects. *Biotech. Adv.* **25**:99-121.
- Torres, J. L.; Piera, E.; Infante, M. R.; Clapés, P. (2001). Purification of non-toxic, biodegradable Arg-based gemini surfactants, bis(Args), by ion exchange chromatography. *Prep. Biochem. & Biotechnol.* **31**:259-274.
- Uhlig, H. (1998). Industrial enzymes and their applications. Wiley-IEEE, New York.