



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA Y BIOLÓGICA DE
TENSIOACTIVOS DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS
OBTENIDOS POR BIOCATALISIS ENZIMÁTICA**

Tesista: MARÍA ELISA FAIT

Directora: DRA. SUSANA R. MORCELLE DEL VALLE

Codirectora: DRA. LAURA BAKAS

Año 2017

Marzo 2017 – La Plata, Buenos Aires, Argentina

El presente trabajo para optar al título de *Doctora en Ciencias Biológicas* de la *Facultad de Ciencias Exactas*, se llevó a cabo en el *Centro de Investigación de Proteínas Vegetales* (CiProVe-CICPBA-UNLP) perteneciente al *Departamento de Ciencias Biológicas* de la *Facultad de Ciencias Exactas* de la *Universidad Nacional de La Plata*, bajo la dirección de la *Dra. Susana R. Morcelle del Valle* y la codirección de la *Prof. Dra. Laura Bakas*.

A mi papá y mi mamá

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a los organismos que hicieron posible el presente trabajo de investigación: a la *Universidad Nacional de La Plata*, y a la *Facultad de Ciencias Exactas* en particular, por la formación, gratuita y de excelencia, y al *Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas* (CONICET) por otorgarme la beca para la realización del presente Trabajo de Tesis.

A la *Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica* del *Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva* (ANPCyT-MINCYT) y la *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) que a través del programa de cooperación CAPES/MINCYT Edición 037/2013 me brindaron los medios económicos para la realización de una pasantía en el *Laboratório de Plantas Laticíferas*, perteneciente al *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular* de la *Universidad Federal do Ceará* (Fortaleza, Ceará, Brasil), donde realicé parte del trabajo experimental aquí presentado.

A las personas, que directa o indirectamente me formaron y acompañaron durante el desarrollo de este trabajo, especialmente a mi directora la *Dra. Susana R. Morcelle del Valle*, por su empeño en mi instrucción, tanto científica como personal, desde que era una estudiante de grado y luego durante mi doctorado, por su apoyo incondicional, dedicación, consejos y paciencia infinita.

A mi codirectora la *Prof. Dra. Laura Bakas* por su ayuda infinita y excelente predisposición, por su tiempo, tolerancia y sus enseñanzas.

Al *Prof. Dr. Néstor O. Caffini*, por abrirme las puertas del *Centro de Investigación de Proteínas Vegetales* (CiProVe-CIC-UNLP), el espacio donde este trabajo fue llevado a cabo, y por hacer de él un hogar, por su predisposición y su admirable pasión por la investigación y la enseñanza.

A los todos mis compañeros de laboratorio con los que tuve el placer de compartir el trabajo diario durante todo este tiempo, por su ayuda y sus enseñanzas,

por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. A Melisa, Sabrina y Nahuel por su confianza, paciencia y su invaluable ayuda en el trabajo experimental.

A todos los laboratorios y grupos de trabajo, tanto en Argentina como en España y Brasil, que nos abrieron sus puertas y permitieron enriquecer este proyecto de tesis con los trabajos realizados en colaboración.

A la Dra. Graciela Garrote, por su infinita amabilidad y asistencia tanto en el desarrollo como en el análisis e interpretación de resultados de los ensayos microbiológicos.

A la Dra. Sabina Maté y la Dra. Romina Vázquez por su paciencia, consejos e invaluable ayuda (no olvidemos los mates) con los ensayos con lípidos y monocapas.

Al Dr. Eduardo *Tati* Prieto por los análisis por AFM y al Dr. Ariel Álvarez por su colaboración en la caracterización fisicoquímica de los compuestos.

Al Dr. Juan Padró por su ayuda con el desarrollo de los análisis por HPLC.

A la Prof. Dra. Alicia Cánepa por su ayuda en la interpretación de los espectros de RMN y a la Dra. Leticia Méndez, por sus consejos y colaboración en la purificación de los productos de síntesis.

A la Dra. Julia Lorenzo y el Dr. Sebastián Tanco por su participación en los ensayos de citotoxicidad.

Al Dr. Pere Clapés y el Dr. Francesc Comelles por su colaboración y asistencia en la determinación de las propiedades de superficie de los compuestos sintetizados.

Al Prof. Dr. Márcio Viana Ramos y todo su equipo de trabajo por abrirme las puertas de su laboratorio y la asistencia en los ensayos antifúngicos.

Y por último, a mi familia, amigos y amigos que son familia por el soporte y su apoyo incondicional, a los que están y los que estuvieron, pero que siempre estarán presentes en mi corazón, y sin los que nada de esto hubiera sido posible.

Resumen

Los tensioactivos derivados de aminoácidos son de gran interés en el campo de la investigación y desarrollo de nuevos surfactantes, principalmente debido a su carácter *ecoamigable*. El presente trabajo de Tesis se centra en la síntesis biocatalítica, purificación y caracterización, tanto fisicoquímica como biológica, de aminoacil alquilamidas de diferente longitud de cadena hidrocarbonada. De los biocatalizadores ensayados, papaína reveló una mayor eficiencia, mostrando conversiones superiores al 90% en todos los casos. El uso de solventes amigables con el medio ambiente en la purificación de las alquilamidas derivadas de arginina (Bz-Arg-NHC_n), así como sus prometedoras propiedades fisicoquímicas (solubilidad acuosa y actividad tensioactiva), fueron factores determinantes en la selección de estos productos para la caracterización de sus propiedades biológicas, con la finalidad de la evaluación de su potencial aplicación en la formulación de productos farmacéuticos y/o cosméticos. A través de diferentes ensayos se puso en evidencia el efecto antimicrobiano de Bz-Arg-NHC_n contra un amplio espectro bacterias y hongos, revelando incluso propiedades bactericida y fungicida. Los estudios preliminares acerca del mecanismo antifúngico de Bz-Arg-NHC_n sugirieron que los monómeros de estos compuestos, al intercalarse en la bicapa lipídica, inducirían la formación transitoria de poros, permitiendo la traslocación de moléculas del tensioactivo al citoplasma, donde interactuarían con los componentes intracelulares provocando la inducción de estrés oxidativo. Por otro lado, los ensayos de toxicidad *in vitro* permitieron comparar el perfil citotóxico de los tensioactivos con el de Cetrimide, un surfactante catiónico comercial con propiedades antisépticas empleado comúnmente

en formulaciones dermatológicas. Los resultados revelaron no solo una menor actividad hemolítica para los tensioactivos derivados de arginina, sino una menor irritabilidad ocular, dérmica y hepática. Asimismo, el estudio de interacción de Bz-Arg-NHC_n con membranas de glóbulos rojos humanos reveló que los monómeros no serían las especies responsables del efecto hemolítico observado. En este caso, el mecanismo involucrado depende de la concentración del tensioactivo en el medio: la liberación de microvesículas resultó ser el principal mecanismo involucrado en la solubilización de la membrana para las concentraciones más bajas de Bz-Arg-NHC_n, mientras que para las mayores concentraciones prevalece la extracción de los componentes de membrana (lípidos y proteínas) favorecida por colisiones con las micelas de tensioactivo. Finalmente, el estudio del efecto protector de Bz-Arg-NHC₁₂ contra la lisis hipotónica tanto de glóbulos rojos humanos (GRH) como de carnero (GRC) evidenció un comportamiento bifásico para este tensioactivo, mostrando efectividad en un amplio rango de concentraciones y una dependencia del mecanismo involucrado con la composición de la membrana lipídica. Para esto último se llevaron los cálculos teóricos de la expansión del volumen celular, comprobándose un mayor volumen hemolítico crítico sólo en el caso de los GRC. La evidencia experimental explica la ausencia de este fenómeno en GRH debido a la prevalencia de la solubilización de los componentes de la membrana, ya sea a través de colisiones con los agregados de los surfactantes, y/o la liberación de microvesículas. En general la evidencia experimental señala a Bz-Arg-NHC_n como una alternativa promisoriosa a los tensioactivos catiónicos comerciales, con propiedades biológicas que los convierten en prometedores candidatos como aditivos en formulaciones de aplicación tópica.

Índice general

Abreviaturas	13
Índice de tablas	17
Índice de figuras	19
Capítulo 1 – Introducción y objetivos	23
Capítulo 2 – Síntesis de aminoácil alquilamidas y alquilésteres catalizada enzimáticamente por peptidasas y lipasas vegetales. Caracterización fisicoquímica de los productos obtenidos	63
Capítulo 3 – Caracterización biológica de tensioactivos derivados de arginina: Determinación de su actividad antimicrobiana y antifúngica	133
Capítulo 4 – Caracterización de la interacción de los surfactantes derivados de arginina con membranas biológicas. Estudios de toxicidad	203
Conclusiones generales y perspectivas	281

Abreviaturas

% Inh = porcentaje de inhibición del crecimiento	BAPNA = N^{α} -benzoil-D,L-arginina p -nitroanilida
$A_{540/575/820}$ = absorbancia a 540, 575 o 820 nm	bis(Args) = tensioactivos catiónicos tipo géminis derivados de arginina
AA = aminoácido (Ala, Gly o Leu)	Boc- = grupo tert-butiloxicarbonilo
ACA = arginina- N -caproil amida (también Arg-NHC ₁₀)	BSA = bovine seroalbumin (seroalbúmina bovina)
ACN = acetonitrilo	BSA = seroálbumina bovina
ADN = ácido desoxirribonucleico	Bz- = grupo benzoilo
AFM = microscopía de fuerza atómica	BzA = benzoil-acetona
AFST = <i>Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing</i> (Subcomité para la determinación de la suceptibilidad antifúngica)	Bz-Arg-NHC ₁₀ = N^{α} -benzoil-L-arginina decilamida
Ala = alanina	Bz-Arg-NHC ₁₂ = N^{α} -benzoil-L-arginina dodecilamida
ALA = arginina- N -lauril amida (también Arg-NHC ₁₂)	Bz-Arg-NHC _n = N^{α} -benzoil-arginina alquilamida
A_{min} = área interfacial ocupada por molécula de surfactante	Bz-Arg-OC ₁₀ = N^{α} -benzoil-L-arginina dodeciléster
AN = agar nutritivo	Bz-Arg-OC ₁₂ = N^{α} -benzoil-L-arginina deciléster
ANMAT = Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica	Bz-Arg-OC _n = N^{α} -benzoil-arginina alquiléster
ANOVA = <i>one-way analysis of variance</i>	Bz-Arg-OEt = N^{α} -benzoil-arginina etil éster hidrocloreuro (también BAEE)
ara/pol = araujaína inmovilizada por adsorción en poliamida	C ₁₀ TAB = bromuro de decil-trimetilamonio
Arg = arginina	C ₁₂ TAB = bromuro de dodecil-trimetilamonio
Arg-NHC ₁₀ = arginina- N -caproil amida (también ACA)	C ₅₀ = osmolaridad del medio responsable del 50% de hemólisis
Arg-NHC ₁₂ = arginina- N -lauril amida (también ALA)	cAH _{max} = concentración de surfactante responsable de la máxima protección contra la hemólisis hipotónica
ARN = ácido ribonucleico	CAM = N^{α} -caproil-L-arginina-metil éster
Asp = ácido aspártico	CBM = Concentración Bactericida Mínima
ATCC = <i>American Type Culture Collection</i>	Cbz- = grupo carbobenzoxi (también Z-)
BAEE = N^{α} -benzoil-arginina etil éster hidrocloreuro (también Bz-Arg-OEt)	CFM = concentración fungicida mínima
	CHO = colesterol

CICUAL = Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación	de susceptibilidad antifúngica)
CIM = concentración inhibitoria mínima	FDA = <i>Food and Drug Administration</i>
CiProVe = Centro de Investigación de Proteínas Vegetales	Glu = ácido glutámico
C _{iso} = concentración isosmótica para los GR	Gly = glicina
CMC = concentración micelar crítica	GP = polarización generalizada
CN = caldo nutritivo	GR = glóbulos rojos
C _n (LA) ₂ = N ^α ,N ^ω -bis(N ^α -lauroilarginina) α,ω-dialquilamida	GRC = glóbulos rojos de carnero
COSY = <i>correlation spectroscopy</i>	GRC _f = fantasmas de glóbulos rojos de carnero
CPP = <i>cell-penetrating peptides</i> (péptidos de penetración celular)	GRH = glóbulos rojos humanos
CTAB = bromuro de cetiltrimetilamonio	GRH _f = fantasmas de glóbulos rojos humanos
CTAB = bromuro de cetil-trimetilamonio	HC ₅₀ = concentración de surfactante responsable del 50% de hemólisis
Cys = cisteína	HPLC = <i>high performance liquid chromatography</i> (cromatografía líquida de alta eficacia)
DAB = 3,3'-diaminobenzidina	HSQC = <i>heteronuclear single quantum coherence</i>
DMEM = <i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i> (medio de Eagle modificado por Dulbecco)	Ht = hematocrito (% v/v)
DMPC = dimiristoil-fosfatidilcolina	HTAB = bromuro de hexadecil-trimetilamonio
DMPE = dimiristoil-fosfatidiletanolamina	I _{440/490} = intensidad de emisión de fluorescencia a 440 o 490 nm
DMSO = dimetil sulfóxido	IC ₅₀ = concentración de surfactante responsable del 50% de la muerte de las células
DO _{530/595/600/630} = densidad óptica a 530, 595, 600 o 630 nm	ID = índice de desnaturalización de la hemoglobina
DOPC = dioleoilfosfatidilcolina	IP = ioduro de propidio
DTT = 1,4-ditio-D,L-treitól	IUPAC = <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)
EC = Enzyme Commission number	L/D = cociente <i>lisis/desnaturalización</i>
EDTA = ácido etilendiaminotetra-acético	LAM = N ^α -lauril-L-arginina-metil éster
EPA = <i>Environmental Protection Agency</i> (Agencia de Protección Ambiental)	Leu = leucina
ERG = ergosterol	LPS = lipopolisacárido
ESCMID = <i>Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas</i>	LPVD = <i>Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa</i>
ESI-MS = espectrometría de masas por electrospray	MEM = medio esencial mínimo
EUCAST = <i>European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing</i> (Comité Europeo para la determinación	

NA = enzima neuraminidasa	$S_{\text{sat/sol}}$ = concentración de surfactante necesaria para inducir la saturación (inicio de la hemólisis)/solubilización total de la membrana de los GRH
NC-IUB = <i>Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry</i> (Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica)	$S_w^{\text{sat/sol}}$ = concentración de surfactante libre en agua para la saturación/solubilización de las membranas de los GRH
pAH = potencia antihemolítica	Thr = treonina
pap/pol = papaína inmovilizada por adsorción en poliamida	TLC = thin layer chromatography (cromatografía en capa fina)
PBS = <i>phosphate buffered saline</i> (buffer fosfato salino)	Ucas = unidades caseinolíticas
PC = fosfatidilcolina	UFC = unidades formadoras de colonia
pC_{20} = efectividad de adsorción	UFCe = Universidad Federal de Ceará
PDA = agar papa dextrosa	UI = unidad enzimática internacional
PE = fosfatidiletanolamina	V_0 = volumen normal del GR
PI = fosfatidilinositol	V_a = volumen osmóticamente activo del GR
P_i = fósforo inorgánico	VC = volumen de columna
pI = punto isoeléctrico	V_h = volumen hemolítico crítico
PL_s = fosfolípidos solubles	V_{na} = volumen osmóticamente no activo del GR
PP = potenciadores de penetración	Vol Exp = expansión del volumen celular de GR tratados con los tensioactivos en medio hipotónico
PS = fosfatidilserina	YPD = <i>yeast peptone dextrose</i>
PTA = ácido fosfotúngstico	Z- = grupo carbobenzoxi (también Cbz-)
QACs = <i>compuestos de amonio cuaternario</i>	Z-AA-NHC _n = N^α -carbobenzoxi-aminoácido alquilamida, con AA: Ala, Gly o Leu
R_e = relación efectiva surfactante/lípido	Z-AA-OH = N^α -carbobenzoxi aminoácido
RMN = espectroscopía de resonancia magnética nuclear	Z-Ala-NHC ₁₀ = N^α -carbobenzoxi-L-alanina decilamida
ROS = <i>reactive oxygen species</i> (especies reactivas de oxígeno)	Z-Ala-NHC ₁₂ = N^α -carbobenzoxi-L-alanina dodecilamida
$R_{\text{sat/sol}}$ = relación efectiva surfactante/lípido para la saturación/solubilización total de la membrana de los GRH	Z-Ala-OH = N^α -carbobenzoxi-L-alanina
SDA = <i>agar sabouraud dextrosa</i>	Z-Arg-OMe = N^α -carbobenzoxi-arginina metil éster
SDB = <i>caldo sabouraud dextrosa</i>	Z-Gly-NHC ₁₀ = N^α -carbobenzoxi-L-glicina decilamida
SDS = lauril sulfato de sodio	Z-Gly-NHC ₁₂ = N^α -carbobenzoxi-L-glicina dodecilamida
Ser = serina	Z-Gly-OH = N^α -carbobenzoxi-L-glicina
SLB = supported lipis bilayers (bicapas lipídicas soportadas)	
SM = esfingomielina	
SRD = <i>sterol rich domains</i> (dominios ricos en esteroides)	

Z-Gly-OMe = N^α -carboboixi glicina metil éster

Z-Leu-NHC₁₀ = N^α -carboboixi-L-leucina decilamida

Z-Leu-NHC₁₂ = N^α -carboboixi-L-leucina dodecilamida

Z-Leu-OH = N^α -carboboixi-L-leucina

Z-Leu-OMe = N^α -carboboixi leucina metil éster

γ = tensión superficial

γ_{CMC} = tensión superficial a la CMC

Γ_{max} = máxima concentración de surfactante adsorbida en la interfase aire/líquido

$\lambda_{\text{ex/em}}$ = longitud de onda de excitación/emisión de fluorescencia

Π = presión superficial

Índice de tablas

Capítulo 1	23
<i>Tabla 1.1. Principios de la química verde enunciados por Anastas & Warner</i>	<i>30</i>
Capítulo 2	63
<i>Tabla 2.3.1. Caracterización de los biocatalizadores libres e inmovilizados por adsorción sobre poliamida</i>	<i>99</i>
<i>Tabla 2.3.2. Conversiones máximas alcanzadas y tiempo de reacción necesario para cada derivado aminoacídico utilizando ara/pol y pap/pol como biocatalizadores</i>	<i>104</i>
<i>Tabla 2.3.3. CMC de los surfactantes derivados de arginina obtenida por medidas de conductividad y tensión superficial</i>	<i>114</i>
<i>Tabla 2.3.4. Propiedades fisicoquímicas de distintos surfactantes derivados de arginina</i>	<i>117</i>
<i>Tabla 2.3.5. Parámetros de superficie de Bz-Arg-NHC_n a 25°C</i>	<i>120</i>
Capítulo 3	133
<i>Tabla 3.3.1. Concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas (CIM y CBM) para Bz-Arg-NHC_n y Cetrimide</i>	<i>167</i>
<i>Tabla 3.3.2. Efecto inhibitorio de Bz-Arg-NHC_n en el crecimiento vegetativo de hongos fitopatógenos, expresados en términos de su IC₅₀</i>	<i>172</i>
<i>Tabla 3.3.3. Efecto inhibitorio de los surfactantes sobre la germinación de microconidios de hongos dermatofitos expresada en términos de la CIM y la IC₅₀</i>	<i>190</i>
<i>Tabla 3.3.4. Efecto inhibitorio de los surfactantes sobre el crecimiento de C. albicans expresados en función de las CIM y CFM</i>	<i>192</i>
Capítulo 4	203
<i>Tabla 4.1.1 Composición lipídica (en porcentaje molar) de membranas de GRH y GRC</i>	<i>215</i>
<i>Tabla 4.3.1. Citotoxicidad de los surfactantes en células 1BR.3.G y HepG2 expresadas en términos de las IC₅₀</i>	<i>235</i>

Tabla 4.3.2. Actividad hemolítica de Bz-Arg-NHC _n sobre GRH en términos de su HC ₅₀ , índice de desnaturalización, relación de lisis/desnaturalización y clasificación de los tensioactivos por su potencial de irritación ocular	238
Tabla 4.3.3. Actividad hemolítica de surfactantes derivados de arginina pertenecientes a las series II y III	240
Tabla 4.3.4. Relaciones molares surfactante/lípido (R _{sat} y R _{sol}), CMC y las concentraciones de surfactante libre en agua (S _w) para la lisis de GRH inducida por Bz-Arg-NHC _n	245
Tabla 4.3.5. Actividad hemolítica (HC ₅₀), protección contra la lisis hipotónica (cAH _{max} , pAH) y cálculo teórico del volumen de expansión para GRH y GRC tratados con Bz-Arg-NHC ₁₂	264

Índice de figuras

Capítulo 1	23
<i>Figura 1.1. Estrategias de inmovilización enzimática.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 1.2. Principales tipos de uniones entre la porción hidrofóbica y la aminoacídica de los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple.....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 1.3. Clasificación de los surfactantes derivados de aminoácidos según su estructura.....</i>	<i>50</i>
Capítulo 2	63
<i>Figura 2.1.1. Esquemas de los sitios activos con los residuos involucrados en el mecanismo catalítico de las proteasas</i>	<i>70</i>
<i>Figura 2.1.2. Mecanismo de la hidrólisis de enlaces peptídicos catalizada por proteasas cisteínicas</i>	<i>72</i>
<i>Figura 2.1.3. Síntesis de enlaces peptídicos catalizada por proteasas bajo control termodinámico</i>	<i>73</i>
<i>Figura 2.1.4. Síntesis de enlaces peptídicos catalizada por proteasas bajo control cinético</i>	<i>74</i>
<i>Figura 2.1.5. Representación esquemática de dos posibles complejos enzima-sustrato de papaína con un sustrato peptídico</i>	<i>76</i>
<i>Figura 2.1.6. Estructura de surfactantes derivados de arginina de cadena simple</i>	<i>80</i>
<i>Figura 2.2.1. Morfoanatomía de A. sericifera</i>	<i>83</i>
<i>Figura 2.2.2. Esquema de la reacción de hidrólisis del sustrato sintético BAPNA por acción de una proteasa</i>	<i>87</i>
<i>Figura 2.3.1. Reacciones de condensación enzimática bajo control cinético y termodinámico para la síntesis de alquilamidas y alquilésteres derivados de aminoácidos N-protectados</i>	<i>100</i>
<i>Figura 2.3.2. Cinéticas de síntesis de Z-Gly-NHC_n y Z-Ala-NHC_n bajo control termodinámico catalizadas por pap/pol y ara/pol</i>	<i>101</i>
<i>Figura 2.3.3. Cinéticas de síntesis de Z-Gly-NHC_n y Z-Leu-NHC_n bajo control cinético catalizadas por pap/pol y ara/pol</i>	<i>102</i>
<i>Figura 2.3.4. Cinéticas de síntesis de Bz-Arg-NHC_n bajo control cinético catalizadas por pap/pol y ara/pol</i>	<i>103</i>

Figura 2.3.5. Cinéticas de síntesis de Bz-Arg-OC _n bajo control cinético catalizadas por pap/pol y ara/pol	103
Figura 2.3.6. Optimización de la extracción del producto de condensación para la síntesis de Bz-Arg-NHC ₁₂ catalizada por pap/pol	105
Figura 2.3.7. Rendimientos para las síntesis semipreparativas de Bz-Arg-NHC _n	106
Figura 2.3.8. Rendimientos para las síntesis semipreparativas de Z-Ala-NHC _n y Z-Gly-NHC _n	108
Figura 2.3.9. Representación esquemática de la curva semilogarítmica típica de tensión superficial vs concentración de surfactante	113
Figura 2.3.10. Conductividad en función de la concentración de Bz-Arg-NHC _n	114
Figura 2.3.11. Curvas de tensión superficial en función de la concentración de Bz-Arg-NHC _n	115
Figura 2.3.12. Comparación de las estructuras de las series de surfactantes derivados de arginina	116
Figura 2.3.13. Estructura química del surfactante tipo géminis derivado de arginina C _n (LA) ₂	118
Figura 2.3.14. Imágenes de AFM obtenidas en modo de contacto intermitente para Bz-Arg-NHC _n en aire y en celda fluida	124
Capítulo 3	133
Figura 3.1.1. Esquema de la estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram positivas	140
Figura 3.1.2. Esquema de la estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas	141
Figura 3.1.3. Esquema de la estructura de la envoltura celular de los hongos	146
Figura 3.3.1. Curvas de supervivencia de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> en CN adicionado con Bz-Arg-NHC _n	169
Figura 3.3.2. Cinéticas de crecimiento para <i>F. oxysporium</i> en YPD adicionado con Bz-Arg-NHC _n a diferentes concentraciones	172
Figura 3.3.3. Inhibición de la germinación de esporas de hongos fitopatógenos producida por exposición a Bz-Arg-NHC _n o Cetrimide	174
Figura 3.3.4. Permeabilización de la membrana de esporas de <i>C. lindemuthianum</i> inducida por exposición a Bz-Arg-NHC _n o Cetrimide	177
Figura 3.3.5. Cinética de adsorción de Bz-Arg-NHC _n en la interfase aire-PBS medida con un tensiómetro de Langmuir a 20 C	178

Figura 3.3.6. Cinéticas de inserción de Bz-Arg-NHC _n y cambios en II en función de la II ₀ luego de 10 min de interacción de Bz-Arg-NHC _n para una monocapa lipídica compuesta por DOPC/PE/ERG (2:1:1)	179
Figura 3.3.7. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) en esporas de <i>C. gloeosporioides</i> y <i>F. oxysporium</i> , inducida por la exposición a Bz-Arg-NHC _n o Cetrimide	181
Figura 3.3.8. Modelo propuesto para la inserción de Bz-Arg-NHC _n en las bicapas lipídicas	186
Figura 3.3.9. Corte transversal de un poro de tipo toroidal y detalle de las curvaturas presentes en el mismo	187
Figura 3.3.10. Modelo propuesto para el efecto de Bz-Arg-NHC _n en las membranas de hongos (formación de poros transitorios)	187
Capítulo 4	203
Figura 4.1.1. Modelo de membrana Singer-Nicolson: versión modificada y actualizada según Engelman	212
Figura 4.2.1. Esquema de la deposición del contrastante (ácido fosfotúngstico) en la tinción negativa para la observación bajo el microscopio electrónico de transmisión	227
Figura 4.2.2. Estructura del Laurdan y espectros de emisión de fluorescencia	230
Figura 4.3.1. Viabilidad celular de 1BR.3.G y HepG2 después de 24 y 72 h de incubación en presencia de soluciones de distinta concentración de los tensioactivos	234
Figura 4.3.2. Hemólisis de GRH (cuantificada por liberación de hemoglobina) inducida por distintas concentraciones de los surfactantes en medio isotónico	237
Figura 4.3.3. Efecto hemolítico (cuantificado por disminución de la DO ₅₉₅) de Bz-Arg-NHC _n sobre GRH en medio isotónico para 1 h de incubación a diferentes hematocritos	243
Figura 4.3.4. Concentración total de Bz-Arg-NHC _n necesaria para la saturación de la membrana y solubilización total (S_{sat} y S_{sol}) en función de la concentración de lípidos de membrana de GRH	244
Figura 4.3.5. Cinéticas de hemólisis inducidas por Bz-Arg-NHC _n en medio isotónico para Ht de 0,15% y 0,30% (v/v)	246
Figura 4.3.6. Cinéticas de hemólisis inducidas por Bz-Arg-NHC _n en medio isotónico para Ht de 0,075% y 0,45% (v/v)	247

Figura 4.3.7. Hemólisis (cuantificada por liberación de hemoglobina) y solubilización de la membrana (cuantificada a través de la determinación de PL_5) de GRH inducida por distintas concentraciones de Bz-Arg-NHC _n	248
Figura 4.3.8. Morfología de los GRH	251
Figura 4.3.9. Imágenes de microscopía óptica con contraste de fases de GRH después de la adición de Bz-Arg-NHC _n en medio isotónico.....	253
Figura 4.3.10. Esquema simplificado de los principales mecanismos aceptados para la hemólisis inducida por Bz-Arg-NHC _n	255
Figura 4.3.11. Micrografías electrónicas de las microvesículas liberadas y aisladas por ultracentrifugación luego de la exposición de GRH a Bz-Arg-NHC _n en medio isotónico	257
Figura 4.3.12. Dependencia del grado de hemólisis hipotónica (cuantificada por liberación de hemoglobina) en función de la concentración de Bz-Arg-NHC ₁₂ para GRH	258
Figura 4.3.13. Hemólisis de GRH y GRC (cuantificada por liberación de hemoglobina) inducida por distintas concentraciones de Bz-Arg-NHC ₁₂ en medio isotónico	261
Figura 4.3.14. Dependencia del grado de hemólisis hipotónica (cuantificada por la liberación de hemoglobina) en función de la concentración (escala logarítmica) de Bz-Arg-NHC ₁₂ para GRH y GRC	262
Figura 4.3.15. Lisis osmótica (cuantificada por liberación de hemoglobina) de GRC y GRH en ausencia (control) y presencia de Bz-Arg-NHC ₁₂ a una concentración igual a la CAH_{max} correspondiente en cada caso	264
Figura 4.3.16. Hemólisis y solubilización de la membrana (cuantificada a través de la determinación de PL_5) en el sobrenadante de GRH y GRC inducida por distintas concentraciones de Bz-Arg-NHC ₁₂	266
Figura 4.3.17. Efecto de Bz-Arg-NHC ₁₂ sobre los valores de GP del Laurdan incorporado en la membrana de GRH y GRC	268

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Índice capítulo 1

1. Introducción	27
1.1. <i>La química verde</i>	28
1.1.1. <i>Herramientas biotecnológicas para la química verde: la biocatálisis, inicios y últimos avances</i>	31
1.1.2. <i>Enzimas como biocatalizadores</i>	35
1.1.2.1. <i>Ingeniería de medios</i>	36
1.1.2.2. <i>Inmovilización enzimática</i>	38
1.1.2.3. <i>Aplicaciones industriales</i>	41
1.2. <i>Surfactantes</i>	44
1.2.1. <i>Definición y clasificación</i>	44
1.2.2. <i>Propiedades y aplicaciones. Surfactantes de base biológica y biosurfactantes</i>	45
1.2.3. <i>Surfactantes derivados de aminoácidos</i>	48
1.2.3.1. <i>Usos y características</i>	51
Referencias	54
2. Objetivos	61
2.1. <i>Objetivo general</i>	61
2.2. <i>Objetivos específicos</i>	61

1. Introducción

La humanidad puede responder de diferentes maneras a las señales que nos indican que las emisiones de contaminación y el uso de recursos naturales han crecido más allá de sus límites sostenibles (Meadows et al. 2005). Una de las formas de responder a esta problemática es aliviando las presiones mediante soluciones técnicas (como el tratamiento de efluentes y el establecimiento de límites de concentraciones tóxicas) o económicas (como la baja de la presión tributaria en pos de la integración de las tecnologías y procesos amigables con el medio ambiente al ciclo de investigación, desarrollo y manufactura). Estas medidas son de carácter urgente y muchas de ellas proporcionarán mayor eficiencia ecológica y un alivio temporal. Sin embargo, mediante este enfoque no se eliminan las causas, sólo se retrasarán las consecuencias. La única solución es producir un cambio trabajando sobre las problemáticas.

En 1987, la publicación del *informe Brundtland* por la *Comisión Mundial sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo* marcó el advenimiento del concepto de desarrollo sostenible (Brundtland, 1987). El informe enfrenta y contrasta la postura del desarrollo económico, industrial y social actual con el concepto de sustentabilidad ambiental. Reconoce que el actual avance social se está llevando a cabo a un costo ambiental alto, planteando además la necesidad de reformular las políticas de desarrollo económico globalizado de manera que ese desarrollo sea sostenible en el tiempo. De esta manera, el *desarrollo sustentable* ha sido definido como *el desarrollo que cubre las necesidades de la generación actual sin comprometer la capacidad de generaciones futuras de cubrir sus propias necesidades*. Para ser sustentable, un proceso debe cumplir dos condiciones:

(a) el consumo de recursos naturales debe darse a una velocidad tal que los suministros no se agoten a largo plazo, y (b) la velocidad de generación de residuos debe ser menor a la velocidad de asimilación de los mismos en el medio ambiente. De esta manera, está claro que una sociedad basada en el uso de recursos no renovables (como por ejemplo, recursos fósiles como el carbón y el petróleo) no será sostenible en el futuro (Sheldon 2016).

1.1. La química verde

A mediados de los años '80, se creó conciencia acerca de la necesidad urgente de una química alternativa más limpia, que permitiera reducir la enorme cantidad de residuos generados por la industria química. Claramente se necesitaba un cambio de paradigma de los conceptos tradicionales de eficiencia de reacción y selectividad, centrados en ese entonces en el rendimiento, a otro que priorizara el aprovechamiento de las materias primas, minimizara la eliminación de residuos y evitara el uso de sustancias tóxicas o peligrosas. Todas estas cuestiones condujeron a la aparición de los conceptos de *minimización de los desechos, plantas libres de residuos y química verde*.

La química sustentable, o *química verde*, se comprende como el desarrollo de metodologías que permiten modificar la naturaleza intrínseca de productos y procesos, con la finalidad de minimizar o eliminar las consecuencias adversas y/o los riesgos que derivan de estas prácticas y que puedan impactar tanto en el medio ambiente como en la salud humana. De esta forma, plantea la innovación en el campo de la química con beneficios económicos y ambientales, presentándose como un enfoque integral y fomentando a su vez la interdisciplinariedad, ya que incorpora aspectos de ingeniería, biología, economía y ética (Anastas & Williamson, 1996). La química verde no es un

método basado en la remediación, sino más bien es un enfoque preventivo centrado en evitar el surgimiento de las problemáticas, lo cual es indiscutiblemente más sencillo y menos costoso que lidiar con las mismas una vez instauradas. Se focaliza en el uso de materias primas (preferentemente renovables), disminuyendo o eliminando el uso de materiales peligrosos y/o tóxicos, y reemplazándolos por otros menos perjudiciales. Esta estrategia a su vez disminuye los costos, ya que requiere menor cantidad de materias primas y reduce los gastos asociados al tratamiento de residuos.

Originalmente el término para designar a este tipo de prácticas era el de "*química limpia*". A mediados de la década de los '90, Anastas y colaboradores (pertenecientes a la *Agencia de Protección Ambiental, EPA*) introdujeron el término de "*química verde*", estableciendo 12 principios básicos para guiar el diseño de productos y procesos amigables con el medio ambiente y el ser humano (Anastas & Warner, 1998). Estos principios, enumerados en la Tabla 1.1, son una categorización de los enfoques fundamentales adoptados para lograr el objetivo de la química sustentable (González et al. 2016; Sheldon 2016).

Si bien reducir costos y ser amigable con el medio ambiente son objetivos en los que todos concuerdan, podríamos preguntarnos por qué no se ha logrado alcanzar este objetivo hasta la actualidad. Existen diversos motivos que explican esta situación. Uno de ellos es que los costos ambientales fueron ignorados en los inicios de la industria química. Sin embargo, dado que la remediación de los efluentes recae sobre los fabricantes, existe un gran incentivo financiero para que las industrias y los procesos sean *más limpios*. Otro motivo es que los investigadores, en sus laboratorios de desarrollo y diseño, no ven los riesgos ambientales como un problema que les

concierno, sino que serían algo de lo que se ocuparían más adelante en la etapa de escalado del proceso. El enfoque de la química verde cambia este pensamiento: la incorporación de la consideración de los peligros y consecuencias ambientales en la etapa de investigación y diseño, permite que muchos problemas sean eliminados de raíz, evitando la necesidad de una crear una solución en cualquier etapa posterior (Kazlauskas & Kim, 2011).

Tabla 1.1. Principios de la química verde enunciados por Anastas & Warner (1998).

N°	Descripción	Resumen
1	<i>Es mejor prevenir la formación de residuos que eliminarlos una vez generados</i>	<i>Prevención en lugar de remediación</i>
2	<i>Las síntesis deben diseñarse para maximizar la incorporación en el producto final de todos los reactivos utilizados</i>	<i>Eficiencia atómica</i>
3	<i>Siempre que sea posible, deben desarrollarse metodologías que usen y generen sustancias que no sean tóxicas para la salud y el medio ambiente</i>	<i>Materiales menos peligrosos</i>
4	<i>Los productos químicos deben diseñarse para mantener la eficacia de su función pero reduciendo la toxicidad</i>	<i>Diseño de productos más seguros</i>
5	<i>Las sustancias auxiliares (por ejemplo, solventes, agentes de separación, etc.) deberían ser evitadas en lo posible, e inocuas, en caso de ser necesarias</i>	<i>Solventes y auxiliares inocuos</i>
6	<i>Los requerimientos energéticos deben considerarse y ser minimizados debido a su impacto económico y ambiental. Los procesos deben realizarse a temperatura ambiente cuando sea posible</i>	<i>Eficacia energética</i>
7	<i>Las materias primas deben ser renovables cuando sea técnica y económicamente posible</i>	<i>Uso de materias primas renovables</i>
8	<i>Debe evitarse el uso y generación de derivados (grupos bloqueantes, protección/desprotección, modificación temporal de las condiciones fisicoquímicas) cuando sea posible</i>	<i>Reducir el uso de derivados</i>
9	<i>Las reacciones catalíticas (tan selectivas como sea posible) son mejores que las estequiométricas</i>	<i>Catálisis</i>
10	<i>Los productos químicos deben diseñarse de manera que no persistan en el medio ambiente y puedan degradarse a productos inocuos</i>	<i>Biodegradabilidad</i>
11	<i>Necesidad del desarrollo de metodologías analíticas que permitan analizar, monitorear y controlar la generación de sustancias peligrosas</i>	<i>Análisis y prevención de la contaminación en tiempo real</i>
12	<i>Deben minimizarse el potencial de accidentes químicos, incluyendo escapes, explosiones e incendios.</i>	<i>Procesos más seguros</i>

La química verde plantea una problemática existente en el mundo actual, es decir, deja de manifiesto que existen problemas ambientales y que no basta con continuar enfocando los esfuerzos en solucionar el impacto de la acción del hombre en el mundo, sino que es necesario y urgente diseñar estrategias que tiendan a disminuir ese impacto. En este sentido, la química verde se plantea como un nexo entre las cuestiones netamente químicas y las implicancias en la sociedad. Sin embargo, la completa incorporación de la química verde en la comunidad científica todavía enfrenta importantes obstáculos, tanto económicos, financieros, reglamentarios y técnicos, como de organización y culturales (Roschangar et al. 2015).

1.1.1. Herramientas biotecnológicas para la química verde: la biocatálisis, inicios y últimos avances

En la actualidad, la tarea más difícil para los científicos es crear nuevos productos, procesos y servicios que cumplan con los beneficios sociales, económicos y ambientales que han sido establecidos para los procedimientos y procesos. Esto requiere reducir al mínimo los materiales y los requerimientos energéticos, minimizar o eliminar la diseminación de químicos peligrosos en el ambiente, maximizar tanto como sea posible el uso de recursos renovables y extender la durabilidad y capacidad de reutilización de los productos obtenidos (Makone & Niwadange 2016).

La biotecnología y los procesos biológicos en sí se adaptan naturalmente a los objetivos y principios de la química verde, la cual busca integrar prácticas de manufactura industrial con la naturaleza. El uso de métodos biológicos, donde la sostenibilidad y el reaprovechamiento son parte integral, es un excelente punto de partida para crear un proceso verde para la manufactura industrial.

La biocatálisis representa una excelente herramienta en el campo de los procesos biotecnológicos. Aunque el *bio* convierte esta estrategia en amigable con el medio ambiente, es la parte de *catálisis* la que proporciona las mayores ventajas en lo que concierne a la química verde (Kazlauskas & Kim, 2011). La biocatálisis puede definirse como la aplicación de enzimas y células enteras (catalizadores naturales) en la síntesis química, es decir, con aplicaciones específicas para las que las enzimas/células no han evolucionado naturalmente (Gardossi et al. 2010; Tufvesson et al. 2010).

El campo de la biocatálisis ha alcanzado su nivel industrial actual a través de varias *olas* de investigación tecnológica e innovaciones. Durante la primera etapa del desarrollo de la biocatálisis (hace más de un siglo) los científicos reconocieron la capacidad de aplicar células vivas o alguno de sus componentes a diferentes transformaciones químicas estereo- y regioselectivas (Bornscheuer et al. 2012), cubriendo los principales criterios de sustentabilidad:

- El catalizador (una célula completa o una enzima) proviene de recursos renovables y es biodegradable (a veces incluso comestible), biocompatible y esencialmente no peligroso.
- Evita el uso y la consecuente contaminación (con los consiguientes costos de la posterior eliminación) de los productos con metales como el paladio, platino y rodio, cuya viabilidad comercial a largo plazo es cuestionable.
- Las reacciones son llevadas a cabo en medios acuosos, en condiciones suaves de pH, temperatura y presión. Esto ahorra energía y puede eliminar reacciones secundarias que se producen a temperaturas más altas
- Las reacciones son altamente quimio-, regio- y estereoselectivas y, en general,

no requieren la activación y/o la protección/desprotección de grupos funcionales para controlar la reactividad.

- Debido a la mayor selectividad, los procesos biocatalíticos generalmente dan lugar a productos de mayor pureza.
- Las reacciones biocatalíticas se llevan a cabo en aproximadamente las mismas condiciones de temperatura y presión, y por lo tanto, es relativamente fácil de integrar múltiples reacciones en cascadas eco-eficientes.

En resumen, la biocatálisis cumple con la mayoría de los principios de la química verde. Por todas estas razones, la biocatálisis ha sido reconocida como una tecnología capaz de cubrir las demandas de la manufactura química sustentable (Brenna 2013; Kaslauskas & Kim 2011; Sheldon 2016).

Durante la segunda etapa de la biocatálisis (entre la década de 1980 y principios de los años '90), el desarrollo de tecnologías como la ingeniería de proteínas, basada en ese entonces en la estructura de las mismas, permitió ampliar el abanico de sustratos enzimáticos, facilitando la síntesis de productos e intermediarios inusuales. Este cambio expandió el campo de la biocatálisis a la fabricación de productos intermediarios farmacéuticos y de la química fina. Ejemplos de estas transformaciones incluyen la resolución catalizada por lipasas de precursores quirales, la síntesis de intermediarios para herbicidas y la síntesis de ceras catalizada por lipasas para cosméticos (Bornscheuer et al. 2012).

La tercera y actual etapa de la biocatálisis comenzó hacia finales de la década de 1990. Pim Stemmer y Frances Arnold fueron los pioneros de una metodología de biología molecular que rápida y extensivamente modificaría los biocatalizadores a través

de una versión *in vitro* de la evolución darwiniana, lo que actualmente se conoce como *evolución dirigida* (Bornscheuer et al. 2012; Illanes et al. 2012). Un ejemplo de optimización de biocatalizador enzimático mediante esta técnica fue el desarrollado por la compañía biotecnológica estadounidense Codexis, en colaboración con Pfizer (una compañía farmacéutica también estadounidense), para la producción de 2-metil pentanol, un intermediario importante para la fabricación de productos farmacéuticos y cristales líquidos. En este contexto, la ingeniería de proteínas ha permitido ampliar el rango de sustrato de las transaminasas a cetonas. En un destacable trabajo desarrollado por las empresas Merck y Codexis, la síntesis de sitagliptina, el ingrediente activo de un medicamento líder para la diabetes tipo 2 (*Januvia*), fue sustituida por un nuevo proceso biocatalítico. A través de sucesivas rondas de evolución dirigida se logró el desarrollo de una nueva aminotransferasa con un aumento de su capacidad catalítica de 40000 veces. Este proceso no sólo logró reducir los residuos en un 19%, sino que también produjo un aumento del 13% en el rendimiento general de reacción y un 53% en la productividad. Los científicos de Codexis desarrollaron también una enzima aciltransferasa LovD mejorada, para catalizar la conversión del fármaco lovastatina (una droga para el tratamiento de la hipercolesterolemia) a simvastatina, un derivado semisintético con mayor efectividad (Adrio & Demain 2014).

Los ejemplos expuestos muestran cómo las herramientas de la biocatálisis han sido mejoradas dramáticamente. Los constantes avances en la biología molecular y desarrollos científicos indican que esta mejora será exponencial, llegando a convertirse en una de las tecnologías clave para la manufactura química en la próxima década (Kazlauskas & Kim 2011). No solamente se cree que la producción biotecnológica de compuestos químicos podría aumentar varias veces en los próximos 10-20 años, sino

que un cambio desde la economía basada en la petroquímica a una economía basada en materias primas de base biológica se completaría en los próximos 30-80 años (Meyer & Werbitzky 2011).

1.1.2. Enzimas como biocatalizadores

Hongos y bacterias han servido como una de las fuentes más importantes y útiles para muchas enzimas con aplicaciones en la industria (Demain & Adrio 2008). Las enzimas desempeñan un papel fundamental como catalizadores metabólicos, pudiendo trasladarse su uso a diversas industrias y aplicaciones. El mercado para las enzimas industriales es muy extenso con numerosas aplicaciones comerciales (Adrio & Demain 2005). Muchos procesos industriales, incluyendo la síntesis química para la producción de químicos y fármacos, poseen importantes desventajas como la baja eficiencia catalítica, falta de especificidad enantiomérica por síntesis quiral y la necesidad de altas temperaturas, bajo pH y alta presión. En este sentido, y en el marco de la química verde, las enzimas son mucho más aptas para estas aplicaciones, ya que trabajan en condiciones suaves de reacción (por ejemplo, temperatura, pH, condiciones atmosféricas), no necesitan en general protección de grupos funcionales en el sustrato, tienen una vida media larga, alta regio- y estereo selectividad y, además, actúan sobre sustratos no naturales. Asimismo, las enzimas pueden ser seleccionadas y modificadas genéticamente de manera de mejorar sus propiedades claves: estabilidad, especificidad de sustrato y actividad específica. La necesidad del uso de cofactores sería una desventaja para el caso de algunos tipos de enzimas. Este inconveniente ha sido solucionado en muchos casos mediante diversos enfoques, como el reciclaje de cofactores y el uso de células enteras.

1.1.2.1. Ingeniería de medios

Las enzimas son proteínas que actúan como catalizadores biológicos y, como tales, deben ser activas en condiciones de reacción compatibles con el metabolismo celular. Es así que se puede definir como el medio convencional de reacción para la mayoría de ellas a aquel formado principalmente por agua.

Las enzimas presentan numerosas propiedades (alta quimio-, regio- y enantioselectividad) que las convierten en potenciales y valiosos biocatalizadores en el campo de la química fina, la industria farmacéutica y la agroquímica. Sin embargo, para convertirse en tales, deben ser lo suficientemente robustas como para soportar las duras condiciones de un proceso industrial (Illanes 1999). Asimismo, cuando su empleo se restringe al medio convencional acuoso, su alcance y utilidad se encuentran limitados por una serie de consideraciones. En primer lugar, muchos polímeros y compuestos empleados son insolubles en agua (Dordick 1989) y muchos procesos se caracterizan por poseer un equilibrio termodinámico desfavorable en este medio (Khmelnitsky et al. 1988). Asimismo, en muchos casos, la sola presencia del agua aún en pequeñas cantidades puede dar lugar a reacciones colaterales como hidrólisis o racemizaciones, llevando a la formación de subproductos indeseables o incluso a la degradación y pérdida de los reactivos (Adrio & Demain 2014). Por otro lado, la recuperación de los productos no es un tema trivial, ya que el agua es un solvente difícil de eliminar por su alto punto de ebullición y calor de vaporización. Finalmente, la actividad enzimática también puede verse afectada por la presencia de agua en el medio, ya que puede dar lugar a numerosas reacciones de desactivación irreversibles (Arnold 1990).

Durante los últimos años, el uso de biocatalizadores en la síntesis orgánica se ha convertido en una alternativa atractiva respecto de las síntesis químicas convencionales.

Debido a los problemas expuestos anteriormente, se planteó la idea de modificar el medio de reacción para diferentes bioconversiones reemplazando el agua por solventes orgánicos, es decir, el uso de medios *no convencionales* (Klibanov 2001). Esta metodología, conocida como *ingeniería de medios*, puede ser explotada como una alternativa a la ingeniería de proteínas, y resulta de especial conveniencia para la modificación de precursores de productos farmacéuticos y de la química fina, ya que, en la mayoría de los casos, los mismos son insolubles o poco solubles en agua. Otra de las razones que hace tan atractiva la catálisis enzimática en medios no acuosos son las propiedades novedosas que presentan las enzimas en solventes orgánicos. En este sentido, las enzimas son considerablemente menos activas pero a su vez suelen ser mucho más estables que en medio acuoso, pudiendo catalizar reacciones que son imposibles o difíciles en agua. La biocatálisis en medio orgánico puede realizarse en fase homogénea, si el solvente es miscible con el agua (Castro & Knubovets 2003) o en fase heterogénea, cuando el solvente es inmisible con ésta y constituye una segunda fase, que puede o no ser visible (Krieger et al. 2004). Las enzimas suelen presentar *memoria de pH*, respondiendo al valor de pH del medio desde el cual fueron precipitadas o liofilizadas (Carrea & Riva 2000). Esto es particularmente cierto en el caso en el que no se produzca una alteración de las concentraciones ácido/base durante el transcurso de la reacción; si esto no fuese así, el estado de protonación de la enzima y, por lo tanto, su actividad pueden variar durante la reacción. Además, la selectividad de algunas enzimas puede también diferir e incluso invertirse de un solvente a otro (por ejemplo, reacciones de síntesis pueden llevarse a cabo con enzimas hidrolíticas en medios no acuosos). Entre las ventajas de esta estrategia también cabe destacar la posibilidad de disminuir las reacciones colaterales indeseables, así como los fenómenos de inhibición por sustrato y

producto, y facilitar la recuperación de los productos y el biocatalizador (Laane et al. 1987).

Sin embargo existen limitaciones para el uso de solventes orgánicos en la síntesis biocatalítica, ya que muchos solventes pueden inactivar o desnaturalizar los biocatalizadores. Asimismo, independientemente del medio utilizado, para mantener su actividad catalítica, las enzimas necesitan mantener su estructura nativa, para lo que requiere de la presencia de un contenido mínimo o crítico de agua. Muchas veces, esta fase acuosa está formada por una película de agua molecular unida directamente al biocatalizador, permitiéndole mantener su conformación y por lo tanto, su actividad (Halling 1994). Por otro lado, la presencia de un solvente orgánico puede provocar alteraciones estructurales significativas en la enzima y, como consecuencia de ello, en sus propiedades catalíticas (Barberis & Illanes 1996; Quiroga et al. 2007).

1.1.2.2. Inmovilización enzimática

Por razones técnicas y económicas, los procesos industriales de manufactura química requieren la reutilización y/o el uso continuo de los biocatalizadores durante largos periodos de tiempo. Teniendo en cuenta esto, la inmovilización de los biocatalizadores consiste en una técnica ideal para cumplir con este requisito. El término *inmovilización* se refiere a un proceso mediante el cual se restringen, completa o parcialmente, los grados de libertad de movimiento de las enzimas, células enteras, etc., por unión a un soporte, de forma permanente o temporal, reteniendo sus propiedades y actividades catalíticas, y permitiendo a su vez el flujo de sustratos y productos (Arroyo 1998). La inmovilización combina así la elevada actividad específica de los biocatalizadores con la estabilidad química y mecánica del soporte.

El método de inmovilización a ser elegido depende de la finalidad del biocatalizador, pudiendo clasificarlos en función de la presencia o ausencia de soporte, de las características del mismo, del tipo de unión implicado en la inmovilización, etc. (Arroyo 1998). En el caso de los soportes, los mismos pueden ser agrupados según su naturaleza en orgánicos (por ejemplo, alginatos y agarosa) o inorgánicos (como la sílice), y dentro de cada grupo a su vez en naturales (los polisacáridos como la celulosa por ejemplo) o sintéticos (como los polímeros acrílicos y óxidos de metales). Por otro lado, el tipo de unión suele agruparse en dos grandes grupos: química (como en el caso de los enlaces covalentes) o física (mediante, por ejemplo, fuerzas electrostáticas) (Heering et al. 2004; Wang & Caruso 2005). La Figura 1.1 resume las principales estrategias de inmovilización aplicadas a enzimas, agrupadas según el tipo de unión al soporte.

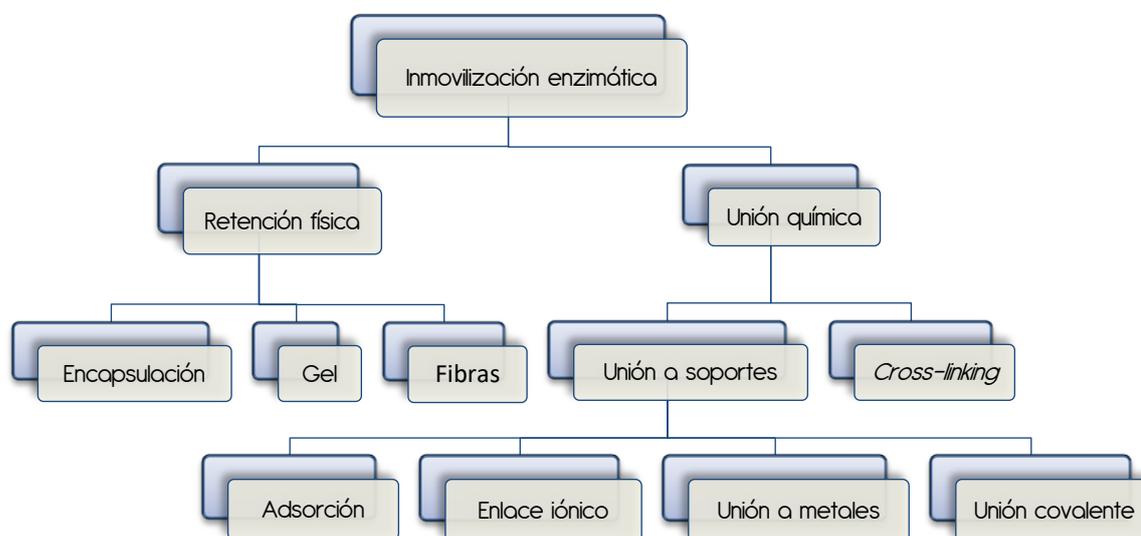


Figura 1.1 Estrategias de inmovilización enzimática (Cantone et al. 2013).

El desarrollo de técnicas de inmovilización eficaces ha permitido optimizar la estabilidad operacional y de almacenamiento, así como también la recuperación y el

reciclaje de enzimas (Hanefeld et al. 2009). Las enzimas inmovilizadas presentan una serie de ventajas sobre su contraparte en solución. Para aplicaciones a escala industrial, el proceso de inmovilización es considerado favorable ya que permite procesos continuos y la reutilización, beneficiando la estabilidad de las enzimas en función del pH y la temperatura y, por lo tanto, haciéndolas menos sensibles a su entorno. Incluso aquellos procesos que emplean enzimas en suspensión en medios orgánicos requieren la inmovilización del biocatalizador de manera de optimizar la dispersión del mismo y mejorar la accesibilidad de los sustratos. En entornos hidrofóbicos, como en el caso de las reacciones con lípidos catalizadas por lipasas, la inmovilización enzimática evita el agregado de las moléculas de enzima (hidrofílica), lo que constituye otra ventaja (Hanefeld et al. 2009). Sin embargo, las aplicaciones de las enzimas a menudo se ven obstaculizadas por la falta de estabilidad operacional a largo plazo, un aumento en la complejidad de los procesos *downstream*, la baja productividad y el riesgo de contaminación. Asimismo, la capacidad catalítica de la enzima puede verse afectada por el proceso de inmovilización en sí (Lartigue 1975), por ejemplo por la velocidad de difusión de sustratos y productos hacia dentro y fuera del sistema. El riesgo de contaminación establece la necesidad de un control sanitario durante el proceso, cuyo costo, sumado al del soporte y el proceso de inmovilización en sí, constituyen una importante barrera económica que encarece el proceso. En este sentido, el anclaje de una enzima a un soporte sólido insoluble debe ser sencillo y rentable, teniendo que ser evaluado cada biocatalizador y reacción enzimática en particular (Miletić et al. 2012). El costo del catalizador debe corresponder a un pequeño porcentaje del costo total de producción y esta restricción, en muchos casos, representa un cuello de botella para la sustentabilidad económica de las síntesis biocatalíticas a escala industrial, especialmente

en el caso de producción de materias primas. Por otro lado, para compensar el costo de la inmovilización, el desempeño de la enzima inmovilizada debe ser superior al de la enzima libre. Esta ventaja debe medirse en términos del aumento de la cantidad de producto obtenido por unidad de enzima, un aumento en las velocidades y la eficiencia volumétrica de la bioconversión, la facilidad de remoción del biocatalizador y el establecimiento de nuevas aplicaciones para una enzima dada.

Si bien la mayoría de las aplicaciones de las enzimas inmovilizadas en la industria son para la síntesis de productos farmacéuticos y de la química fina, también pueden encontrarse numerosos ejemplos en las industrias alimentaria y cosmética (Kirk et al. 2002; Christensen et al. 2003; Hasan et al. 2006; Sheldon 2016). Sin embargo existe un enorme potencial catalítico esperando ser explotado en diferentes procesos. Un ejemplo es el proceso de transesterificación de aceites comestibles catalizada por un granulado de sílica conteniendo la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* Lipozyme TL-IM[®], contenida en un reactor portátil empacado, desarrollado por Novozymes y ADM (Yang et al. 2003). Esta metodología se utiliza para la producción de aceites transesterificados en EE.UU. desde el año 2002. Entre sus mayores ventajas cabe destacar que la operación se lleva a cabo a temperaturas bien por debajo de las necesarias para realizar el proceso mediante catálisis química y que el producto no necesita ser purificado por extracción con agua.

1.1.2.3. Aplicaciones industriales

La demanda de enzimas industriales se encuentra en un continuo aumento, impulsado por una creciente necesidad de soluciones sostenibles. Alrededor de 150 procesos industriales utilizan enzimas o células enteras como biocatalizadores en la síntesis de más de 500 productos (Adrio & Demain 2005). Las aplicaciones actuales de

las enzimas como biocatalizadores se centran en diversos mercados, incluyendo la industria del papel, cuero, detergentes, textil, de biocombustibles, productos farmacéuticos y para el cuidado personal, productos de la química fina, alimentos, bebidas y alimentos balanceados, entre otros. Como biocatalizadores, las enzimas representan una alternativa generalmente mucho más eficiente que los catalizadores químicos. Típicamente, las enzimas muestran números de recambio (k_{cat}) superiores a 100000 seg^{-1} , claramente más favorables que los valores observados para catálisis homogénea y heterogénea (entre $0,01$ y 1 seg^{-1}). Sin embargo, sólo una fracción mínima de los catalizadores biológicos conocidos está siendo aplicada en procesos de biocatálisis a escala industrial: en el caso de las enzimas, de aproximadamente 4000 enzimas conocidas, alrededor de 200 están disponibles comercialmente, de las cuales sólo alrededor de 20 son usadas regularmente en procesos industriales (Li et al. 2012).

De acuerdo a Adrio & Demain (2014), el mercado total mundial de enzimas industriales alcanzó los 3,3 mil millones de dólares en 2010 y se estimaba que llegaría a un valor de 4,4 mil millones en 2015. De las enzimas técnicas (utilizadas en detergentes y en las industrias textil, del papel y de biocombustibles), aquellas empleadas para el tratamiento de cueros y producción de bioetanol fueron responsables de las mayores cifras de ventas. En 2011, las enzimas técnicas tuvieron ingresos de casi 1,2 mil millones de dólares, esperando que alcancen los 1,7 mil millones en 2016, con un aumento de ventas en el mercado de biocombustibles (bioetanol).

El mercado mundial de enzimas industriales constituye un ámbito muy competitivo para numerosas empresas, que pugnan principalmente sobre la base de la calidad de los productos, rendimiento, uso de derechos de propiedad intelectual y la

capacidad de innovación. En la actualidad, este mercado se encuentra liderado por Novozymes (una empresa biotecnológica danesa con representantes en numerosos países), el cual controla aproximadamente el 48% del mercado global de enzimas, seguido por el DSM y DuPont (Adrio & Demain 2005). América del Norte y Europa son los mayores consumidores de enzimas industriales en el mundo, aunque se espera que la región de Asia que incluye a China, Japón e India experimente un rápido incremento en la demanda de enzimas, reflejando el tamaño y la fuerza de las economías de estos países. Se espera que en nuestra región se siga la misma tendencia.

El uso de enzimas (principalmente hidrolasas tales como proteasas, lipasas, amilasas, y celulasas, entre otras) como aditivos en detergentes representa una de las mayores aplicaciones de las enzimas industriales. Entre ellas, las proteasas constituyen aproximadamente el 25% del total de ventas en detergentes y el 60% del mercado mundial de enzimas (Adrio & Demain 2005).

En la industria textil y del procesamiento del cuero, el uso de enzimas como alternativas a los productos químicos ha demostrado eficacia en la mejora de la calidad del producto final y la reducción de la contaminación ambiental. Los avances comerciales más recientes incluyen la aplicación de celulasas para el acabado del denim y lacasas (oxidases) para la decoloración de efluentes y blanqueo de telas (Rodríguez Couto & Toca Herrera 2006) y el desarrollo de un procedimiento alternativo para la producción de algodón, basado en el uso de una pectinliasa (Tzanov et al. 2001). En este último caso, la estrategia biocatalítica se lleva a cabo a temperaturas mucho más bajas y utiliza menos agua que el método clásico.

Otra aplicación de enzimas con creciente importancia es el uso de lipasas,

xilanasas y lacasas en la eliminación de los componentes hidrofóbicos de la madera (principalmente triglicéridos y ceras) en la industria del papel (Farrell et al. 1997).

1.2. Surfactantes

1.2.1. Definición y clasificación

La IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define a los tensioactivos o surfactantes (conjunción del inglés *surface active agents*), como compuestos anfifílicos capaces de disminuir la tensión superficial del medio en el que se encuentran solubilizados, así como la tensión interfacial en la interfase de fluidos inmiscibles (IUPAC 2001). La estructura molecular anfifílica de estos compuestos se encuentra definida desde el punto de vista fisicoquímico como una dualidad polar-apolar. La región polar de la molécula se denomina comúnmente como *cabeza polar* o *hidrofílica* y posee una alta afinidad por los solventes polares, en particular el agua. Esta porción de la molécula exhibe por lo general un alto contenido de heteroátomos, como O, S, P y N, que se encuentran formando parte de grupos alcohol, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida, etc. Por otro lado, la región apolar o poco polar, y por lo tanto con baja afinidad por los solventes polares, llamada *cola hidrofóbica* o *lipofílica*, se encuentra formada generalmente por un grupo hidrocarbonado de tipo alquilo o alquil benceno.

La forma más práctica de clasificar a los surfactantes es de acuerdo a su estructura. La porción hidrofóbica de la mayoría de los agentes tensioactivos es bastante similar: consiste en una o dos cadenas hidrocarbonadas (denominados surfactantes de cadena simple y doble, respectivamente) que pueden ser ramificadas, lineales o aromáticas, y pueden estar eventualmente halogenadas, como en el caso de los

fluorosurfactantes, que contienen colas hidrofóbicas fluorocarbonadas. Debido a esto, lo más común es clasificar a los tensioactivos según la naturaleza química y la carga de la región hidrofílica o *cabeza* polar. De esta manera, los surfactantes pueden clasificarse en *no iónicos*, cuando no poseen ningún grupo cargado (como el Tritón X-100, un éster de polietilenglicol), o *iónicos*, cuando la cabeza polar tiene una carga neta. Si la carga neta de la región polar es negativa, dada por ejemplo por la presencia de grupos sulfato, sulfonato o fosfato, el surfactante será *aniónico* (por ejemplo, el lauril sulfato de sodio, más comúnmente conocido como SDS). Por otro lado, si la carga neta es positiva, como en el caso de las aminas, se tratará de un surfactante *catiónico* (como el bromuro de hexadecil-trimetilamonio o bromuro de cetiltrimetilamonio, conocido como CTAB, uno de los principales componentes del Cetrimide). Finalmente, si un agente tensioactivo presenta una región hidrofílica con ambas cargas pero sin carga neta, se denominará *zwitteriónico* (como en el caso de los *N*-alquil aminoácidos). En muchos casos, la carga neta de la región polar de los surfactantes dependerá del pH del medio.

1.2.2. Propiedades y aplicaciones. Surfactantes de base biológica y biosurfactantes

Los surfactantes se caracterizan por aumentar la solubilidad, movilidad, biodisponibilidad y subsecuente biodegradación de compuestos orgánicos insolubles en agua (Singh et al. 2007). Su estructura anfifílica permite que sus regiones hidrofílica e hidrofóbica se orienten en las interfaces entre fluidos con diferentes polaridades, reduciendo así las tensiones superficiales e interfaciales. Como resultado, estos compuestos facilitan la formación de emulsiones, dispersiones y espuma, haciéndolos esenciales en aplicaciones que requieren la emulsificación, lubricación y espumado, así como la solubilización de compuestos no miscibles o dispersión de fases. Su capacidad

de interactuar con membranas y macromoléculas, tales como ácidos nucleicos, les brinda diversas actividades, exhibiendo en muchos casos propiedades antimicrobianas, antivirales, hemolítica, insecticida, etc. Tienen un amplio rango de aplicaciones, que van desde la limpieza en el hogar, pasando por diversos procesos industriales y usos en agroquímicos, hasta ingredientes activos en productos de cuidado personal (Clapés & Infante 2002; Mnif & Ghribi 2015; Gudiña et al. 2016).

Los surfactantes en solución, cuando están presentes en bajas concentraciones, son adsorbidos en la superficie o interfase de una manera orientada, con una consecuente disminución en la tensión de superficial o interfacial del sistema. La máxima concentración de surfactante en la superficie (Γ_{\max}) mide la eficacia de adsorción y es inversamente proporcional al área interfacial (A_{\min}) ocupada por la molécula de surfactante en la monocapa. En el seno de la solución, las moléculas de surfactante forman agregados de diferentes tamaños y formas (esferas, elipsoides, cilindros), comúnmente conocidos como *micelas*. La concentración a la cual comienza a observarse la formación de agregados es característica de cada surfactantes y se conoce como *concentración micelar crítica* (CMC). La formación de micelas es una característica importante de los tensioactivos ya que un número importante de procesos interfaciales, como la interacción con membranas biológicas, la acción lítica y la solubilización de los compuestos no polares, dependen de este proceso (Clapés & Infante 2002).

Dado su amplio abanico de aplicaciones, los surfactantes representan un conjunto de productos consumidos diariamente en grandes cantidades a escala mundial. Por esta razón, el mercado de tensioactivos se encuentra en continuo crecimiento. Su producción total a nivel mundial se estima en más de 15 millones de toneladas por año,

y se espera que supere las 24 millones de toneladas por un valor de 42 mil millones de dólares para el año 2020 (Gudiña et al. 2016).

La mayoría de los surfactantes disponibles hoy en día deriva de fuentes petroquímicas, lo que consume recursos no renovables, además de contribuir a la contaminación ambiental debido a su baja biodegradabilidad (Morán et al. 2004). Estos puntos han despertado un interés creciente en moléculas surfactantes basadas en estructuras anfifílicas naturales, como aquellas que mimetizan los lipoaminoácidos naturales y los compuestos tensioactivos sintetizados por microorganismos o *biosurfactantes* (glicolípidos, lipopéptidos y polímeros) (Morán et al. 2004; Pinazo et al. 2011; Bordes & Holmberg 2015; Pinazo et al. 2016; Nitschke & Sousa e Silva 2016). Las propiedades mostradas por los surfactantes de base biológica (alta biodegradabilidad y biocompatibilidad, baja toxicidad, alta actividad superficial, estabilidad bajo extremas condiciones de temperatura, pH y salinidad, diversidad estructura, actividad biológica, etc.), sumadas a la utilización de recursos renovables, ofrecen potenciales ventajas sobre los tensioactivos sintéticos convencionales, constituyendo así las principales razones para el creciente interés sobre estas moléculas (Gudiña et al. 2016). Trabajos recientes mostraron que el volumen del mercado global actual de los biosurfactantes se estima en alrededor de las 476.500 toneladas anuales, siendo producidos por 17 empresas a escala industrial en todo el mundo (Sekhon Randhawa & Rahman 2014). El número de patentes de biosurfactantes se ha estimado en cerca de 530 hasta el año 2013, de las cuales aproximadamente el 80% ha sido emitida en la última década debido al creciente interés de los sectores cosméticos y farmacéuticos (Hames et al. 2015). Con el continuo crecimiento de la demanda de estos productos, se estima que el mercado mundial de los biosurfactantes supere los 2 mil millones de dólares en el año 2018

(Nitschke & Sousa e Silva 2016).

1.2.3. Surfactantes derivados de aminoácidos

Entre los tensioactivos de base biológica, los tensioactivos derivados de aminoácidos constituyen una interesante familia de surfactantes con excelentes propiedades de adsorción y agregación, alta biodegradabilidad, baja toxicidad, bajo impacto ambiental y amplia actividad antimicrobiana. La multifuncionalidad de estos compuestos los convierte en aditivos interesantes para diversas formulaciones cosméticas y farmacéuticas, ayudando a la eliminación de ingredientes innecesarios y permitiendo el desarrollo de formulaciones más simples con una reducción en los costos. Desde un punto de vista económico y ambiental, los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple son compuestos altamente atractivos, puesto que pueden ser fácilmente preparados. Se producen en una escala de unos pocos miles de toneladas por año, con importantes aplicaciones en áreas como la salud y el cuidado personal (Clapés & Infante 2002).

Los aminoácidos tienen al menos dos grupos funcionales: el grupo α -carboxílico y el grupo α -amino. Estos compuestos pueden convertirse fácilmente a surfactantes de cadena simple con una molécula reactiva portadora de una cadena hidrofóbica, como ácidos grasos, alcoholes, ésteres y aminas grasas. La cadena hidrofóbica puede introducirse en la estructura del aminoácido a través de enlaces amida o éster (Figura 1.2). La porción aminoacídica o peptídica de la molécula será la que determine las mayores diferencias de adsorción, agregación y actividad biológica entre los surfactantes derivados de aminoácidos. De esta manera, el uso de aminoácidos ácidos, básicos o neutros como material de partida puede dar lugar a tensioactivos aniónicos, catiónicos o

no iónicos, respectivamente. Modificaciones más exhaustivas de estos grupos permitirá la selección específica de sus propiedades para cada una de las aplicaciones en particular. Los aminoácidos como la lisina o la arginina, ofrecen oportunidades adicionales para el diseño molecular de tensioactivos monocatenarios (Pinazo et al. 2016).

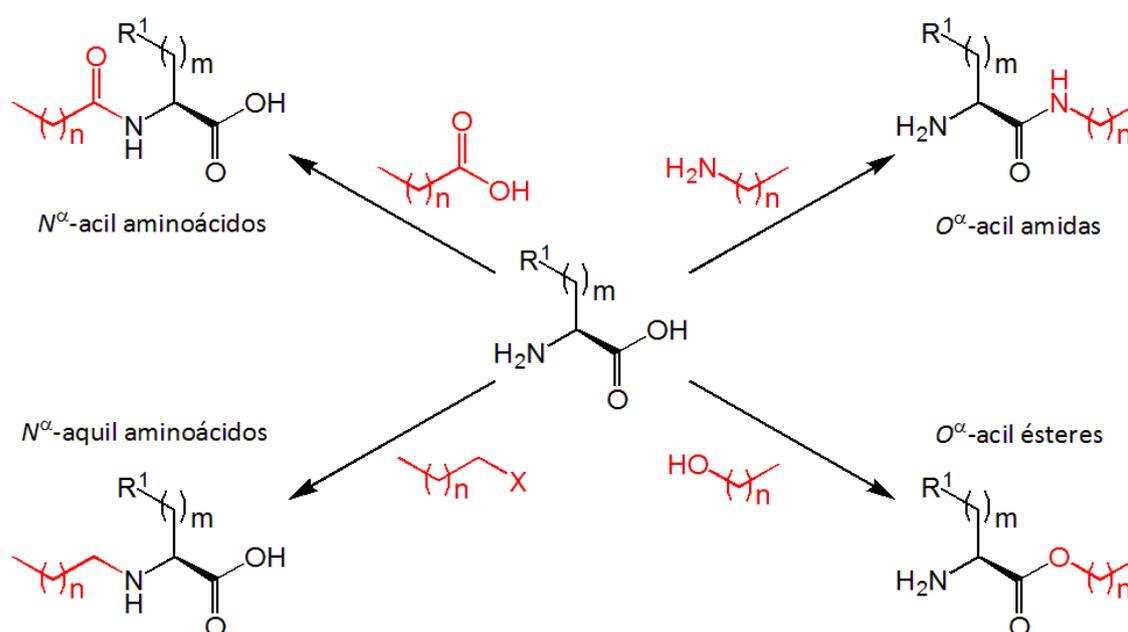


Figura 1.2. Principales tipos de uniones entre la porción hidrofóbica y la aminoácida de los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple. X: Cl, Br o I; R^1 : cadena lateral del aminoácido.

La síntesis de tensioactivos derivados de aminoácidos se ha llevado a cabo tanto por síntesis química (Pérez et al. 1996; Pérez et al. 2002b; Pérez et al. 2004) como quimioenzimática (Clapés et al. 1999; Piera et al. 2000; Morán et al. 2001), haciendo uso de materias primas renovables como aminoácidos, azúcares y aceites vegetales. Sin embargo, el concepto de tensioactivos de base biológica ha llevado a la consideración de

métodos biotecnológicos, es decir, catalizados por microorganismos o enzimas, para su producción, ya que estas metodologías producen menos contaminantes y consumen menos energía y recursos (Clapés & Infante 2002).

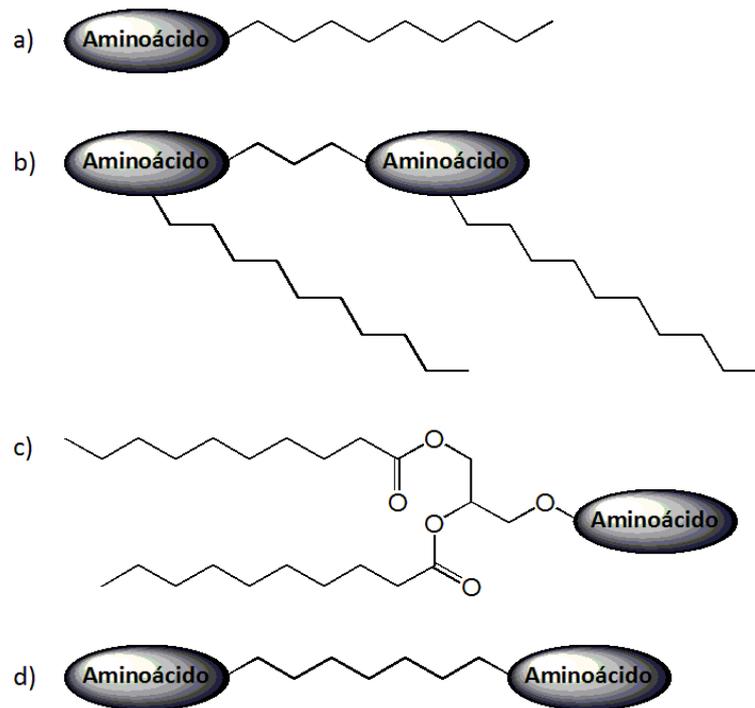


Figura 1.3. Clasificación de los surfactantes derivados de aminoácidos según su estructura: (a) de cadena simple, (b) diméricos o géminis, (c) del tipo glicerolípido y (d) anfífilos tipo bola. El aminoácido constituye la cabeza polar del tensioactivo, mientras que la cadena de alquilo hidrocarbonada constituye la región hidrofóbica de la molécula.

Además de los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple (Figura 1.3a), las cadenas alifáticas y los aminoácidos pueden combinarse entre sí para generar otras tres estructuras principales: diméricos o géminis, del tipo glicerolípido y anfífilos tipo bola (Castillo Expósito 2006). Los surfactantes géminis son estructuras formadas por dos moléculas anfífilas idénticas (constituidas cada una por una cabeza polar y una cola

hidrofóbica) unidas covalentemente entre sí mediante un espaciador (Figura 1.3b). En el caso de las estructuras del tipo glicerolípidos, las mismas pueden ser consideradas análogas de fosfolípidos o de mono- y diglicéridos. Consisten en una cabeza polar unida a una o dos colas hidrofóbicas a través de un esqueleto de glicerol (Figura 1.3c). Finalmente, los anfifilos tipo bola contienen dos cabezas polares unidas en cada extremo de una cadena de hidrocarburo alifático (Figura 1.3d).

1.2.3.1. Usos y características

A diferencia de las sales de ácidos grasos (como el jabón de laurato de sodio), los N^{α} -acil aminoácidos de cadena larga tienen excelente solubilidad acuosa (debido a la presencia de enlaces CO – NH adicionales), alta biodegradabilidad y buena tolerancia al ion calcio (*lime resistance*). Se ha observado que la actividad superficial aumenta y la CMC disminuye al aumentar la longitud de cadena de alquilo y la hidrofobicidad del residuo aminoacídico (Clapés & Rosa Infante 2002).

El uso de vesículas de N^{α} -acil aminoácidos sintéticos como vehículo para diversas drogas (*drug carriers*), así como para la preparación de liposomas funcionales con ligandos de lipopéptidos, ha sido examinada por varios autores (Boeckler et al. 1998; Yagi et al. 2000; Tavano et al. 2014). Las vesículas de N^{α} -acil aminoácidos de cadena alifática larga demostraron eficiencia de encapsulación comparable a la de los liposomas de lecitina convencionales. Por otro lado, se ha reportado el desarrollo de una tecnología para la transferencia de ADN foráneo a células a través de la formación de complejos hidrofóbicos ion apareado no tóxicos entre ésteres de alquilo de cadena larga derivados de arginina con moléculas de ADN (Morán et al. 2004). Los lipoaminoácidos resultan también particularmente atractivos como agentes antimicrobianos y antivirales.

Numerosos trabajos han mostrado la capacidad inhibitoria del crecimiento e incluso bactericida de los surfactantes derivados de aminoácidos (sobre todo de arginina y lisina) frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (Castillo Expósito 2006; Pinazo et al. 2016). En el caso de los virus, ciertos derivados de aminoácidos han mostrado ser efectivos para la inhibición de la enzima neuraminidasa (NA) del virus de la influenza (gripe), presente en la cápside del virus e involucrada en el clivaje de uniones glicosídicas que contribuyen a la movilidad de los viriones (Kondoh et al. 1997).

Se ha encontrado que el enlace amida que conecta la cabeza y la cola hidrocarbonada de los tensioactivos de la familia de los N^{α} -acil aminoácidos participa en la autoagregación de las moléculas (Bordes & Holmberg 2015). Este enlace puede contribuir en la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares, lo que conduce a un empaquetamiento muy apretado, tanto en el caso en que los anfifilos se alinean en una monocapa en la interfase de dos fluidos inmiscibles (aire-agua, por ejemplo), como cuando se agrupan en forma de micelas en solución acuosa (Bordes et al. 2010). Los surfactantes derivados de aminoácidos pueden producirse en forma enantiomericamente pura. La agregación de tales moléculas conduce a la formación de micelas con una superficie quiral (*quiralidad supramolecular*), la cual puede aprovecharse para la síntesis orgánica asimétrica y la inducción de quiralidad en materiales meso-porosos (Gao & Che 2010).

Los principales tipos de enlaces entre el residuo aminoacídico y la cola hidrofóbica son éster y amida. Estos tipos de unión son fácilmente degradados por la acción de enzimas hidrolíticas, como lipasas y peptidasas, lo que significa que la mayoría de los tensioactivos basados en aminoácidos son fácilmente biodegradables y no tóxicos

para los organismos marinos (Pérez et al. 2002a; Morán et al. 2004; Infante et al. 2004; Colomer et al. 2012). Además, la familia de los N^α -acil aminoácidos ha sido ampliamente estudiada, demostrando baja capacidad de irritación y sensibilización de la piel (Bordes & Holmberg 2015).

Teniendo en cuenta todas las propiedades de estos compuestos, los tensioactivos derivados de aminoácidos presentan muchas de las características requeridas para los tensioactivos incorporados en productos de consumo. No resulta sorprendente el hecho de que con la creciente preocupación sobre los efectos biológicos de las sustancias químicas, el interés sobre esta clase de tensioactivos crezca aún más en el futuro.

Referencias

- Adrio JL, Demain AL (2005) Microbial Cells and Enzymes A Century of Progress. En: Microbial Enzymes and Biotransformations. Humana Press, Totowa, NJ, pp 1–27
- Adrio J, Demain A (2014) Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. Biomolecules 4:117–139. doi: 10.3390/biom4010117
- Anastas P, Williamson T (1996) Green Chemistry: An Overview. En: Green Chemistry - Design Chemistry for the Environment. Washington, DC: ACS Symposium Series 626
- Anastas P, Warner J (1998) Green Chemistry: Theory and practice. Oxford: Oxford University Press
- Arnold FH (1990) Engineering enzymes for non-aqueous solvents. Trends Biotechnol 8:244–249. doi: 10.1016/0167-7799(90)90186-2
- Arroyo M (1998) Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. Ars Pharm 39:23–39
- Barberis S, Illanes A (1996) Catálisis enzimática en fase orgánica: aspectos cinéticos y termodinámicos. Ing. Quim. 322:165-73
- Boeckler C, Frisch B, Schuber F (1998) Design and synthesis of thiol-reactive lipopeptides. Bioorganic Med Chem Lett 8:2055–2058. doi: 10.1016/S0960-894X(98)00360-6
- Bordes R, Tropsch J, Holmberg K (2010) Role of an amide bond for self-assembly of surfactants. Langmuir 26:3077–3083. doi: 10.1021/la902979m
- Bordes R, Holmberg K (2015) Amino acid-based surfactants - Do they deserve more attention? Adv Colloid Interface Sci 222:79–91. doi: 10.1016/j.cis.2014.10.013
- Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, et al (2012) Engineering the third wave of biocatalysis. Nature 485:185–194. doi: 10.1038/nature11117
- Brenna E (2013) Synthetic Methods for Biologically Active Molecules. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- Brundtland CG (1987) Our Common Future, The World Commission on Environmental

Development, Oxford University Press, Oxford

- Cantone S, Ferrario V, Corici L, et al (2013) Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chem Soc Rev* 42:6262–76. doi: 10.1039/c3cs35464d
- Carrea G, Riva S (2000) Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angew Chemie Int Ed* 39:2226–2254. doi: 10.1002/1521-3773(20000703)39:13<2226::AID-ANIE2226>3.0.CO;2-L
- Castillo Expósito JA (2006) Studies on antimicrobial activity of arginine-based surfactants and chemo- enzymatic synthesis of novel amphiphiles based on L-arginine and D-fagomine. Universidad Autónoma de Barcelona
- Castro GR, Knubovets T (2003) Homogeneous Biocatalysis in Organic Solvents and Water-Organic Mixtures. *Crit Rev Biotechnol* 23:195–231. doi: 10.1080/714037689
- Christensen MW, Andersen L, Husum TL, Kirk O (2003) Industrial lipase immobilization. *Eur J Lipid Sci Technol* 105:318–321. doi: 10.1002/ejlt.200390062
- Clapés P, Morán C, Infante MR (1999) Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants. *Biotechnol Bioeng* 63:333–43. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990505)63:3<333::AID-BIT10>3.0.CO;2-G
- Clapés P, Infante MR (2002) Amino Acid-based Surfactants: Enzymatic Synthesis, Properties and Potential Applications. *Biocatal Biotransformation* 20:215–233. doi: 10.1080/10242420290004947
- Colomer A, Pinazo A, García MT, et al (2012) pH-Sensitive surfactants from lysine: assessment of their cytotoxicity and environmental behavior. *Langmuir* 28:5900–12. doi: 10.1021/la203974f
- Demain AL, Adrio JL (2008) Contributions of microorganisms to industrial biology. *Mol Biotechnol* 38:41–55. doi: 10.1007/s12033-007-0035-z
- Dordick JS (1989) Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. *Enzyme Microb Technol* 11:194–211. doi: 10.1016/0141-0229(89)90094-X
- Farrell RL, Hata K, Wall MB (1997) Solving pitch problems in pulp and paper processes by the use of enzymes or fungi. En: Eriksson K-EL, Babel W, Blanch HW, et al. (eds)

- Biotechnology in the Pulp and Paper Industry. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 197–212
- Gao C, Che S (2010) Organically functionalized mesoporous silica by co-structure-directing route. *Adv Funct Mater* 20:2750–2768. doi: 10.1002/adfm.201000074
- Gardossi L, Poulsen PB, Ballesteros A, et al (2010) Guidelines for reporting of biocatalytic reactions. *Trends Biotechnol* 28:171–180. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.01.001
- González P, Pérez C, Figueroa-Duarte S (2016) La enseñanza de la química desde la perspectiva de la química verde. *Rev Científica* 24–40. doi: 10.14483/udistrital.jour.RC.2016.24.a3
- Gudiña EJ, Rodrigues AI, de Freitas V, et al (2016) Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresour Technol* 212:144–150. doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.027
- Halling PJ (1994) Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb Technol* 16:178–206. doi: 10.1016/0141-0229(94)90043-4
- Hames EE, Vardar-Sukan F, Kosaric N (2015) Patents on biosurfactants and future trends. En: *Biosurfactants Production and Utilization – Processes, Technologies, and Economics*, pp. 165-243. Kosaric, N., and Vardar-Sukan, F., Eds., CRC Press, Boca Raton
- Hanefeld U, Gardossi L, Magner E (2009) Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev* 38:453–68. doi: 10.1039/b711564b
- Hasan F, Shah AA, Hameed A (2006) Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol* 39:235–251. doi: 10.1016/j.enzmictec.2005.10.016
- Heering HA, Wiertz FGM, Dekker C, De Vries S (2004) Direct immobilization of native yeast iso-1 cytochrome c on bare gold: Fast electron relay to redox enzymes and zeptomole protein-film voltammetry. *J Am Chem Soc* 126:11103–11112. doi: 10.1021/ja046737w
- Illanes A (1999) Stability of biocatalysts. *Electron J Biotechnol* 2:1–9. doi: 10.2225/vol2-issue1-fulltext-2

- Illanes A, Cauerhff A, Wilson L, Castro GR (2012) Bioresource Technology Recent trends in biocatalysis engineering. 115:48–57. doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.050
- Infante MR, Pérez L, Pinazo A, et al (2004) Amino acid-based surfactants. *Comptes Rendus Chim* 7:583–592. doi: 10.1016/j.crci.2004.02.009
- IUPAC (2001) Surface Active Agents, Manual Of Symbols And Terminology For Physicochemical Quantities And Units, International Union Of Pure And Applied Chemistry. http://old.iupac.org/reports/2001/colloid_2001/manual_of_s_and_t/node36.html. Fecha de acceso: 29/12/2016
- Kazlauskas R, Kim BG (2011) Biotechnology tools for green synthesis: enzymes, metabolic pathways, and their improvement by engineering. En: *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*, Tao, J.; Kazlauskas, R. (Eds) 1st Edition, pp 3-19
- Khmelnitsky YL, Levashov A V., Klyachko NL, Martinek K (1988) Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb Technol* 10:710–724. doi: 10.1016/0141-0229(88)90115-9
- Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002) Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* 13:345–351. doi: 10.1016/S0958-1669(02)00328-2
- Klibanov AM (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409:241–246. doi: 10.1038/35051719
- Kondoh M, Furutani T, Azuma M, et al (1997) Acyl amino acid derivatives as novel inhibitors of influenza neuraminidase. *Biosci Biotechnol Biochem* 61:870–874. doi: 10.1271/bbb.61.870
- Krieger N, Bhatnagar T, Baratti JC, et al (2004) Non-aqueous biocatalysis in heterogeneous solvent systems. *Food Technol Biotechnol* 42:279–286.
- Laane C, Boeren S, Vos K, Veeger C (1987) Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvents. *XXX*:81–87. doi: 10.1002/bit.260300112
- Lartigue DJ (1975) Characteristics of free vs. immobilized enzymes. En: *Messing RA (ed) Immobilized enzymes for industrial reactors*. Academic Press, New York, pp 125–127

- Li S, Yang X, Yang S, et al (2012) Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. *Comput Struct Biotechnol J* 2:e201209017. doi: 10.5936/csbj.201209017
- Makone SS, Niwadange SN (2016) Green Chemistry Alternatives for Sustainable Development in Organic Synthesis. 3:2393–2395. doi: 10.17148/IARJSET.2016.3621
- Meadows D, Randers J, Meadows D (2005) *Limits to Growth*. London
- Meyer HP, Werbitzky O (2011) How green can the industry become with biotechnology? En: *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*, Tao, J.; Kazlauskas, R. (Eds) 1st Edition, pp 23-42
- Miletić N, Nastasović A, Loos K (2012) Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications. *Bioresour Technol* 115:126–35. doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.054
- Mnif I, Ghribi D (2015) Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Biopolymers* 104:129–147. doi: 10.1002/bip.22630
- Morán C, Infante MR, Clapés P (2001) Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 1. Enzymatic preparation of rac-1-O-(N α -acetyl-L-aminoacyl)glycerol derivatives. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1:2063–2070. doi: 10.1039/b103132p
- Morán MC, Pinazo A, Pérez L, et al (2004) “Green” amino acid-based surfactants. *Green Chem* 6:233–240. doi: 10.1039/b400293h
- Nitschke M, Sousa e Silva S (2016) Recent Food Applications of Microbial Surfactants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. doi: 10.1080/10408398.2016.1208635
- Pérez L, Torres JL, Manresa A, et al (1996) Synthesis, Aggregation, and Biological Properties of a New Class of Gemini Cationic Amphiphilic Compounds from Arginine, bis(Arg) \dagger . *Langmuir* 12:5296–5301. doi: 10.1021/la960301f
- Pérez L, Garcia MT, Ribosa I, et al (2002a) Biological properties of arginine-based gemini cationic surfactants. *Environ Toxicol Chem* 21:1279–1285. doi: 10.1002/etc.5620210624
- Pérez L, Pinazo A, Vinardell P, et al (2002b) Synthesis and biological

- properties of dicationic arginine–diglycerides. *New J Chem* 26:1221–1227.
doi: 10.1039/B203896J
- Pérez L, Infante MR, Pons R, et al (2004) A synthetic alternative to natural lecithins with antimicrobial properties. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 35:235–242.
doi: 10.1016/j.colsurfb.2004.03.014
- Piera E, Infante MR, Clapés P (2000) Chemo-enzymatic synthesis of arginine-based gemini surfactants. *Biotechnol Bioeng* 70:323–331.
doi: 10.1002/1097-0290(20001105)70:3<323::AID-BIT9>3.0.CO;2-N
- Pinazo A, Pons R, Pérez L, Infante MR (2011) Amino acids as raw material for biocompatible surfactants. *Ind Eng Chem Res* 50:4805–4817.
doi: 10.1021/ie1014348
- Pinazo A, Manresa MA, Marques AM, et al (2016) Amino acid–based surfactants: New antimicrobial agents. *Adv Colloid Interface Sci* 228:17–39.
doi: 10.1016/j.cis.2015.11.007
- Quiroga E, Camí G, Marchese J, Barberis S (2007) Organic solvents effect on the secondary structure of araujiain HI, in different media. *Biochem Eng J* 35:198–202.
doi: 10.1016/j.bej.2007.01.014
- Rodríguez Couto S, Toca Herrera JL (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnol Adv* 24:500–513.
doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003
- Roschangar F, Sheldon RA, Senanayake CH (2015) Overcoming barriers to green chemistry in the pharmaceutical industry – the Green Aspiration Level™ concept. *Green Chem* 17:752–768. doi: 10.1039/C4GC01563K
- Sekhon Randhawa KK, Rahman PKSM (2014) Rhamnolipid biosurfactants: past, present, and future scenario of global market. *Front Microbiol* 5:1–8.
doi: 10.3389/fmicb.2014.00454
- Sheldon RA (2016) Biocatalysis and Green Chemistry. In: Patel RN (ed) *Green Biocatalysis*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, pp 1–15
- Singh A, Van Hamme JD, Ward OP (2007) Surfactants in microbiology and

- biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Adv* 25:99–121. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.10.004
- Tavano L, Pinazo A, Abo-Riya M, et al (2014) Cationic vesicles based on biocompatible diacyl glycerol-arginine surfactants: Physicochemical properties, antimicrobial activity, encapsulation efficiency and drug release. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 120:160–167. doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.04.009
- Tufvesson P, Fu W, Jensen JS, Woodley JM (2010) Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food Bioprod Process* 88:3–11. doi: 10.1016/j.fbp.2010.01.003
- Tzanov T, Calafell M, Guebitz GM, Cavaco-Paulo A (2001) Bio-preparation of cotton fabrics. *Enzyme Microb Technol* 29:357–362. doi: 10.1016/S0141-0229(01)00388-X
- Wang Y, Caruso F (2005) Mesoporous Silica Spheres as Supports for Enzyme Immobilization and Encapsulation. *Chem Mater* 17:953–961. doi: 10.1021/cm0483137
- Yagi N, Ogawa Y, Kodaka M, et al (2000) Preparation of functional liposomes with peptide ligands and their binding to cell membranes. *Lipids* 35:673–680. doi: 10.1007/s11745-000-0572-4
- Yang T, Fruekilde M, Xu X (2003) Applications of immobilized *Thermomyces lanuginosa* lipase in interesterification. *J Am Oil Chem Soc* 80:881–887. doi: 10.1007/s11746-003-0789-7

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

El propósito del plan de trabajo del presente trabajo de tesis doctoral consiste en el empleo de peptidasas vegetales provenientes de fuentes autóctonas como alternativa a las disponibles comercialmente para el desarrollo de nuevos biocatalizadores. Los mismos serán aplicados en la obtención de derivados de aminoácidos con actividad superficial de interés en la industria farmacéutica y de la química fina. Se investigará así, mediante técnicas biotecnológicas de bajo impacto ambiental y mínimos pasos de purificación, la producción de compuestos que mimeticen la estructura de moléculas naturales con propiedades multifuncionales (tensioactiva y antimicrobiana).

2.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos están enfocados hacia la aplicación de proteasas vegetales autóctonas y comerciales para la obtención de conjugados de aminoácidos con alcoholes alifáticos y alquilaminas. Asimismo la evaluación de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los productos obtenidos tiene como finalidad dirigir su posible aplicación en las industrias farmacéutica y cosmética.

1. Seleccionar el biocatalizador más conveniente para la obtención de cada compuesto propuesto a partir de una comparación del desempeño de peptidasas vegetales obtenidas y caracterizadas en el CiProVe con un extracto proteolítico comercial.

2. Optimizar el tipo de reacción (síntesis por control cinético o termodinámico), biocatalizador (araujaína o papaína) y selección de los sustratos de partida para la síntesis de cada uno de los compuestos propuestos.
3. Sintetizar y purificar a escala semipreparativa los potenciales tensioactivos.
4. Caracterizar fisicoquímicamente los surfactantes derivados de aminoácidos mediante medidas de tensión superficial y microscopía de fuerza atómica.
5. Determinar el poder antimicrobiano de los surfactantes obtenidos frente a bacterias, hongos y levaduras.
6. Evaluar el perfil citotóxico de los tensioactivos sintetizados utilizando cultivos celulares como modelo.
7. Estudiar el mecanismo hemolítico de los tensioactivos sintetizados utilizando glóbulos rojos de distintas especies como modelo.

CAPÍTULO 2

**SÍNTESIS DE ALQUILAMIDAS Y ALQUILÉSTERES DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS
N-PROTEGIDOS CATALIZADA ENZIMÁTICAMENTE POR PEPTIDASAS VEGETALES.
CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS**

Índice capítulo 2

1. Introducción	69
1.1. <i>Peptidasas como biocatalizadores en la síntesis de enlaces amida</i>	69
1.1.1. <i>Síntesis por control termodinámico</i>	73
1.1.2. <i>Síntesis por control cinético</i>	73
1.1.3. <i>Papaína como biocatalizador</i>	75
1.1.4. <i>Aplicación de peptidasas en la síntesis de surfactantes derivados de aminoácidos</i>	77
1.2. <i>Surfactantes derivados de arginina de cadena simple</i>	79
1.2.1. <i>Propiedades y aplicaciones</i>	80
2. Materiales y métodos	82
2.1. <i>Reactivos</i>	82
2.2. <i>Preparación de los biocatalizadores</i>	82
2.2.1. <i>Araujia sericifera</i>	82
2.2.1.1. <i>Morfoanatomía</i>	82
2.2.1.2. <i>Proteasas presentes en el látex de A. sericifera</i>	84
2.2.2. <i>Obtención del extracto enzimático con actividad proteolítica de A. sericifera</i>	84
2.2.3. <i>Inmovilización de los extractos proteolíticos por adsorción en poliamida</i>	85
2.3. <i>Caracterización de los biocatalizadores</i>	85
2.3.1. <i>Determinación del contenido de proteínas</i>	85
2.3.2. <i>Determinación de la actividad proteolítica</i>	85
2.3.3. <i>Determinación de la actividad amidolítica</i>	86
2.4. <i>Síntesis en microescala de alquilamidas y alquilésteres derivados de aminoácidos N-protectados</i>	87
2.4.1. <i>Optimización de la extracción del producto de síntesis</i>	87
2.4.1.1. <i>Seguimiento de las reacciones mediante análisis por HPLC</i>	88
2.4.2. <i>Síntesis por control termodinámico de Z-AA-NHC_n</i>	89
2.4.3. <i>Síntesis por control cinético de Bz-Arg-NHC_n, Z-AA-NHC_n y Bz-Arg-OC_n</i>	89
2.4.3.1. <i>Activación de los sustratos por esterificación</i>	89
2.4.3.2. <i>Síntesis por control cinético de alquilamidas derivadas de aminoácidos N-protectados: Bz-Arg-NHC_n y Z-AA-NHC_n</i>	90

2.4.3.3. Síntesis por control cinético de alquilésteres derivados de aminoácidos N-protegidos: Bz-Arg-OC _n	90
2.4.4. Análisis del rendimiento de las reacciones mediante HPLC.....	91
2.5. Síntesis a escala semipreparativa de las alquilamidas derivadas de aminoácidos N-protegidos. Purificación de los productos obtenidos.....	92
2.5.1. Purificación de Bz-Arg-NHC _n por cromatografía de intercambio catiónico....	92
2.5.2. Purificación de Z-AA-NHC _n por cromatografía en sílica.....	93
2.6. Identificación de los productos obtenidos.....	93
2.7. Caracterización fisicoquímica de los productos obtenidos.....	94
2.7.1. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC).....	94
2.7.1.1. Determinación de los parámetros de superficie y de la CMC por medidas de tensión superficial.....	94
2.7.1.2. Determinación de la CMC por medidas de conductividad.....	95
2.7.2. Caracterización de los agregados de los surfactantes por microscopía de fuerza atómica (AFM).....	95
3. Resultados y discusión.....	97
3.1. Caracterización de los biocatalizadores.....	97
3.2. Estudio de la cinética de síntesis en microescala de alquilamidas y alquilésteres derivados de aminoácidos N-protegidos.....	99
3.3. Síntesis semipreparativa y purificación de de alquilamidas derivadas de aminoácidos N-protegidos.....	104
3.3.1. Optimización de la extracción del producto en microescala para la síntesis de Bz-Arg-NHC _n	104
3.3.2. Síntesis semipreparativa de Bz-Arg-NHC _n y purificación por cromatografía de intercambio catiónico.....	106
3.3.3. Síntesis semipreparativa de Z-AA-NHC _n . Purificación por cromatografía en sílica.....	107
3.4. Identificación de los productos obtenidos.....	108
3.5. Caracterización fisicoquímica de los productos obtenidos.....	111
3.5.1. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) por medidas de conductividad y tensión superficial.....	111
3.5.2. Determinación de los parámetros de superficie de Bz-Arg-NHC _n	119
3.5.3. Cálculo del parámetro de empaquetamiento (SPP).....	121

3.5.4. Análisis de la morfología de los agregados de Bz-Arg-NHC _n por microscopía de fuerza atómica (AFM).....	123
4. Conclusiones	125
Referencias	127

1. Introducción

1.1. *Peptidasas como biocatalizadores en la síntesis de enlaces amida*

Históricamente, las proteasas han sido asociadas con la hidrólisis de proteínas. Sin embargo, a finales del siglo XIX surgieron las primeras señales experimentales de una acción inversa, un fenómeno que originalmente se denominó *reacción plasteina*. Se trata de una reacción que posibilita la formación enzimática de uniones peptídicas a partir de aminoácidos que proceden de hidrolizados proteicos, para dar lugar a la generación de nuevos polipéptidos con un peso molecular de aproximadamente 3000 Da (Andrews & Alichanidis 1990; Gutiérrez 2000). Desde este primer paso hasta hoy, donde las proteasas se consideran catalizadores habituales para la síntesis orgánica, existe un largo camino, muy lejos de acabarse todavía. Para el año 2002, alrededor del 10% de todas las publicaciones científicas que involucraban proteasas estaban conectadas en cierta forma con un uso sintético de estas enzimas (Bordusa 2002). Junto con las proteasas, las lipasas y esterasas son las hidrolasas predominantes entre las enzimas reportadas para la síntesis orgánica.

Las proteasas (EC 3.4.N.N), más correctamente denominadas *peptidasas* de acuerdo a la recomendación del *Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica* (NC-IUB, siglas del inglés *Nomenclature Committee of the international Union Of Biochemistry*), pertenecen a la familia de las hidrolasas. En la actualidad, se conocen varios cientos de estas enzimas, y en un sentido general, todas catalizan la misma reacción: la hidrólisis de enlaces peptídicos. Las proteasas son catalizadores estéreo- y regioespecíficos, que actúan generalmente bajo condiciones de reacción suaves con rangos de pH óptimos entre 6 y 8. En la mayoría de los casos, son fáciles de

manejar, no necesitan de cofactores costosos, son relativamente estables y simples en su arquitectura molecular. Estas propiedades "nativas" convierten a las proteasas en herramientas útiles para el clivaje dirigido de péptidos, hidrólisis éster regiospecíficas o la resolución cinética de racematos (Bordusa 2002). 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).

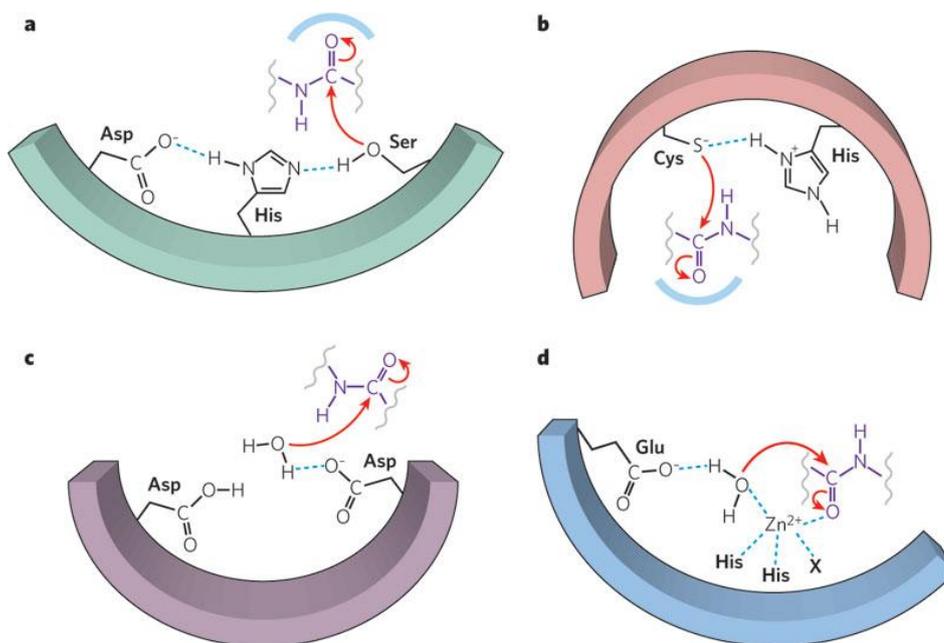


Figura 2.1.1. Esquemas de los sitios activos con los residuos involucrados en el mecanismo catalítico de las proteasas (a) serínicas, (b) cisteínicas, (c) aspárticas y (d) metaloproteasas. En el sitio activo de las proteasas de la serínicas y cisteínicas, el residuo de Ser/Cys generalmente se empareja con un grupo capaz de formar un puente de hidrógeno, promoviendo el ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico. Las metaloproteasas y aspartil proteasas, por otro lado, activan una molécula de agua que servirá como nucleófilo. Finalmente, el proceso general de la escisión del enlace peptídico es esencialmente el mismo para todas las clases de proteasas (Erez et al. 2009).

Las peptidasas pueden agruparse en cinco clases de acuerdo a las características de sus respectivos mecanismos catalíticos y a la naturaleza química de los grupos responsables de la catálisis: serínicas, treonínicas, cisteínicas, aspárticas, glutámicas y metalopeptidasas, en las cuales los aminoácidos serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu) o grupos metálicos, respectivamente, juegan roles primarios en la catálisis (Figura 2.1.1). Por otro lado, también existen peptidasas de mecanismo mixto e incluso desconocido (Erez et al. 2009; Morcelle 2004; MEROPS 2016).

Entre 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 según papaína). Este último residuo, a su vez, se encuentra involucrado en un equilibrio tautomérico entre las formas neutra y zwitteriónica. 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 2.1.2). 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 sulfhidriilo (por conversión en puentes disulfuro) y tienen la capacidad de reactivarse en presencia de agentes reductores (Morcelle 2004).

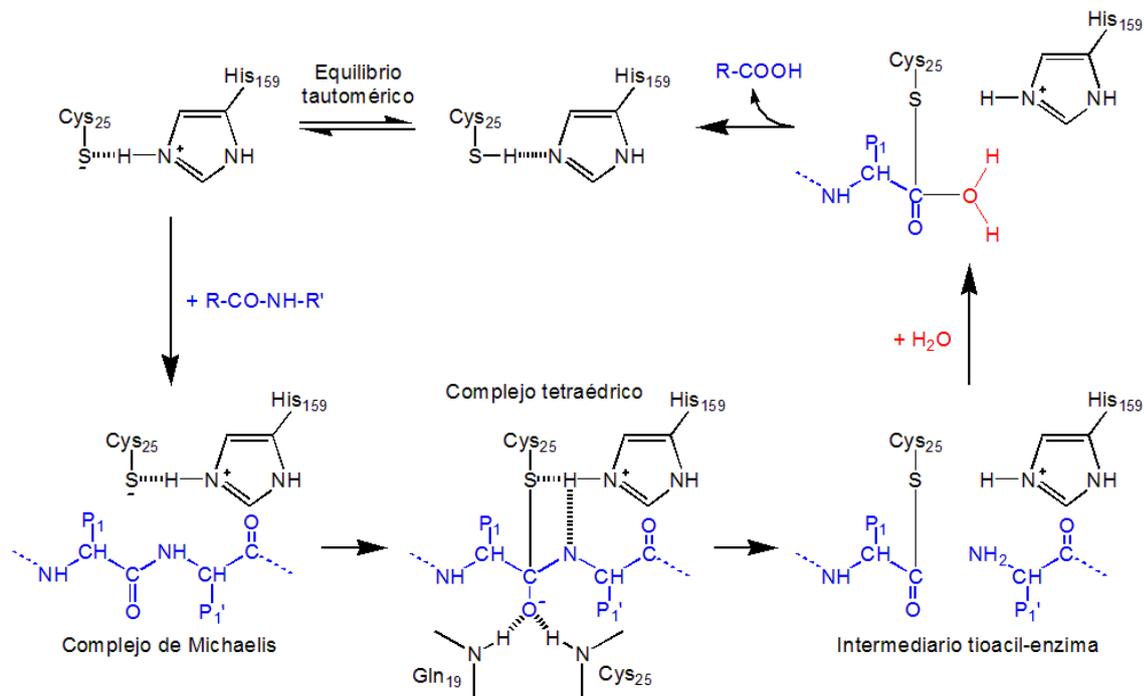


Figura 2.1.2. Mecanismo de la hidrólisis de enlaces peptídicos catalizada por proteasas cisteínicas.

Como catalizadores, las peptidasas alteran la velocidad a la que se alcanza el equilibrio termodinámico de una reacción, sin afectar el equilibrio en sí mismo. Esto implica inevitablemente que estas enzimas funcionan reversiblemente en ambos sentidos de la reacción. Sin embargo, las constantes de equilibrio para la reacción inversa, se encuentran en el rango de 10^{-3} - 10^{-4} l/mol (Borsook 1953). Por este motivo, en condiciones fisiológicas, la posición de equilibrio de reacción estará desplazada hacia la hidrólisis, siendo despreciable para la reacción inversa. Como consecuencia, para que las peptidasas puedan actuar como biocatalizadores en la formación de enlaces peptídicos

debe manipularse el equilibrio de la reacción. En la práctica, dichas manipulaciones pueden llevarse a cabo mediante dos estrategias básicas: el control cinético y el control termodinámico (Bordusa 2002).

1.1.1. Síntesis por control termodinámico

La síntesis catalizada por peptidasas bajo control termodinámico representa la reacción inversa directa de la proteólisis (Figura 2.1.3). 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 que disminuyen la constante dieléctrica del medio. La precipitación o extracción del producto favorece aún más este tipo de reacciones (Bordusa 2002).

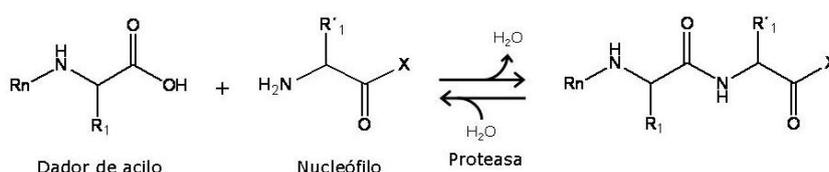


Figura 2.1.3. Síntesis de enlaces peptídicos catalizada por proteasas bajo control termodinámico.

1.1.2. Síntesis por 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 (Figura 2.1.2). El factor clave de este método consiste en el uso de moléculas de dador de acilo 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 2.1.4.

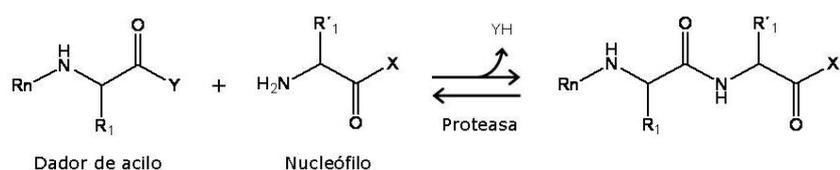


Figura 2.1.4. Síntesis de enlaces peptídicos catalizada por proteasas bajo control cinético.

Mientras que la estrategia termodinámica termina con el establecimiento de un nuevo equilibrio, la cinética se basa en la acumulación de un producto intermedio, pasando por una concentración máxima antes de que la hidrólisis (más lenta) comience a hacerse evidente. Posteriormente, si la reacción no se termina después de que el dador de acilo se consume, el producto será hidrolizado y el equilibrio verdadero será alcanzado. El éxito de síntesis en este caso depende de varios factores, mientras que los parámetros básicos de la reacción (tales como la temperatura, fuerza iónica, concentración de reactivo y el pH) juegan un papel importante. Como regla general, puede considerarse que un aumento de la concentración del nucleófilo y del pH del

medio provocarán un aumento en el rendimiento del producto. Ambas manipulaciones aumentan la eficiencia del ataque nucleofílico del intermediario acil-enzima por el nucleófilo. Por último, la eficiencia de la síntesis depende de la enzima en sí misma. Considerando que la velocidad de reacción está determinada principalmente por la especificidad de la enzima hacia el dador de acilo, una unión específica del nucleófilo a los subsitios S' de la proteasa (Figura 2.1.4) es crucial para conseguir rendimientos elevados. Puesto que la especificidad de los dominios de unión del nucleófilo y el dador de acilo son parámetros específicos de cada enzima, la eficiencia de cada síntesis y, por tanto, la utilidad sintética de cada proteasa para la síntesis orgánica difiere de una enzima a otra.

1.1.3. Papaína como biocatalizador

La papaína (EC 3.4.22.2) es una endopeptidasa cisteínica vegetal obtenida a partir del látex de frutos de *Carica papaya*, usada ampliamente en las industrias alimentaria, cervecera, farmacéutica, veterinaria, cosmética y textil. 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. Su costo es considerablemente menor que el de enzimas microbianas del mismo tipo y su estabilidad térmica es buena con respecto a la de otras proteasas.

La Figura 2.1.5 muestra un esquema del sitio activo de la papaína, el cual se encuentra formado por 7 subsitios (S₁-S₄ y S'₁-S'₃), según la nomenclatura de Schechter y Berger) repartidos a ambos lados del sitio catalítico, identificado con la letra C (Schechter & Berger 1967). Las posiciones de los aminoácidos en el sustrato (P_n) se cuentan a partir del sitio de clivaje y por lo tanto se numeran de acuerdo al subsitio

ocupado por cada uno. Papaína cliva preferentemente aquellos enlaces peptídicos que involucren aminoácidos básicos en la posición P_1 y aminoácidos hidrofóbicos, aromáticos o voluminosos, en la posición P_2 .

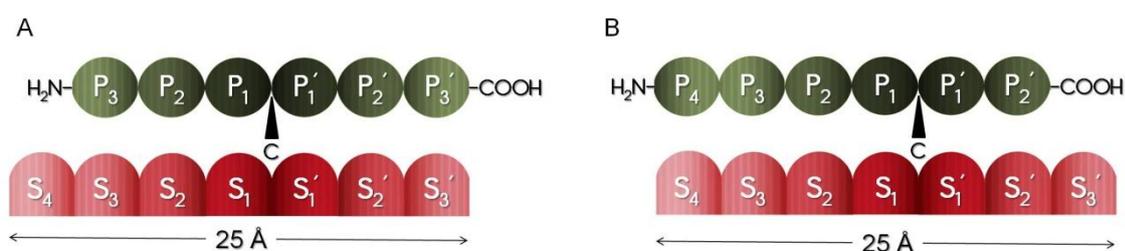


Figura 2.1.5. Representación esquemática de dos posibles complejos enzima-sustrato (A y B) de papaína con un sustrato peptídico compuesto por seis aminoácidos, donde la letra C representa el sitio de clivaje.

Como biocatalizador en la química orgánica, la papaína es una de las peptidasas más empleadas para la síntesis de diversos péptidos y derivados peptídicos debido a su robustez y amplia especificidad. Los productos sintetizados con este biocatalizador incluyen polímeros de un único aminoácido (Narai-Kanayama et al. 2008), endulzantes peptídicos (Nakaoka et al. 1998), hormonas (Klein & Cerovský 1996; Fité et al. 2002) e isómeros derivados de péptidos (Lang et al. 2007; Morcelle et al. 2013). Esta enzima también ha sido exitosamente utilizada como biocatalizador en la síntesis de alquilamidas y alquilésteres derivados de arginina, incluso a temperaturas tales como 65°C (Clapés et al. 1999). En el caso de las reacciones de síntesis que involucren sólo aminoácidos, el requerimiento de un residuo hidrofóbico en la posición P_2 se cubre fácilmente utilizando grupos protectores de la función amino, como el grupo carbobenzoilo (Cbz- o Z-), benzoilo (Bz-) o tert-butiloxicarbonilo (Boc-).

Todas estas propiedades, sumadas a su fácil obtención y preparación a partir de una fuente natural, convierten a la papaína en una herramienta biocatalítica muy versátil para las reacciones que involucren la síntesis de enlaces amida y éster, entre una amplia gama de aminoácidos y una variedad enorme de nucleófilos simples, con motivos amina o alcohol.

1.1.4. Aplicación de peptidasas en la síntesis de surfactantes derivados de aminoácidos

Hasta hace pocos años, la síntesis de surfactantes era sólo considerada dentro de las incumbencias de la química orgánica. Sin embargo, el rápido avance de la biotecnología ha despertado el interés en los tensioactivos obtenidos mediante el empleo de catalizadores biológicos (Valivety et al. 1997). Si bien 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, el uso de proteasas y lipasas para la síntesis de enlaces éster y amida ha sido ampliamente estudiado, como en el caso de los surfactantes derivados de aminoácidos (Castillo-Expósito 2006; Valivety et al. 1997; Clapés et al. 1999; Morán et al. 2001; Morcelle et al. 2009). La síntesis y los métodos de purificación tradicionales de esta clase compuestos involucran numerosos pasos con reacciones de protección y desprotección, así como el uso de solventes orgánicos peligrosos y otros químicos de elevada toxicidad (como el BF_3 , bases orgánicas fuertes y solventes clorados). A su vez, dependiendo del producto final deseado, pueden requerirse condiciones drásticas de reacción, como elevadas temperaturas y presiones e incluso reacciones de hidrogenación (Pérez et al. 1996; Mitin et al. 1997; Piera et al. 1998; Castro et al. 2004a). Por otro lado, el rendimiento global de estas reacciones de

síntesis no supera el 45-60% en el mejor de los casos (Castro et al. 2004b; Pérez et al. 2014). Asimismo, es importante destacar que el uso de estas estrategias químicas no cumple con los requisitos de la química verde, ya que el uso de esta metodología resulta en la aparición de productos tóxicos provenientes de las materias primas empleadas y que pueden estar presentes en las formulaciones finales. Estas desventajas pueden ser evitadas utilizando enzimas como biocatalizadores, las cuales son altamente específicas y pueden emplearse bajo condiciones de reacción suaves.

Papaína inmovilizada por adsorción sobre poliamida demostró ser un biocatalizador eficiente para la formación de enlaces amida y éster en la síntesis de *N*-alquil amidas y *O*-alquil ésteres de arginina, dos familias surfactantes derivados de arginina de cadena simple (Clapés et al. 1999; Morán et al. 2004). La reacción en este caso fue llevada a cabo por condensación enzimática del sustrato sintético carbobenzoxi-arginina metil éster (*Z*-Arg-OMe) y aminas o alcoholes grasos de diferente longitud de cadena, a través del grupo carboxilo de la arginina. En el caso de la preparación de los *O*-alquil ésteres, la síntesis fue llevada a cabo en sistemas libres de solvente, usando el alcohol como medio de reacción. Ambos tipos de compuestos fueron sintetizados enzimáticamente a escala multigramo, con una pureza superior al 99%.

Los glicerolípidos conjugados de arginina constituyen otra clase de lipoaminoácidos con propiedades tensioactivas, formados por dos cadenas alifáticas unidas por una molécula de glicerol a la cabeza polar constituida por el residuo aminoacídico. Estos compuestos han sido sintetizados usando tanto estrategias químicas como enzimáticas (Pinazo et al. 2016). Ambos métodos tienen en común la primera

etapa de la síntesis, que consiste en la preparación enzimática del derivado gliceril-éster de arginina. Esta reacción consiste en la esterificación selectiva catalizada por una proteasa de uno de los grupos hidroxilo primarios del glicerol con el grupo carboxilato de la arginina. El segundo y último paso implica acilación enzimática o química de los dos grupos hidroxilo libres restantes con el correspondiente cloruro ácido de cadena larga.

Finalmente, también se ha reportado la síntesis enzimática de tensioactivos catiónicos tipo géminis derivados de arginina, también llamados *bis(Args)* (Pérez et al. 1996). En este tipo de compuestos, la cadena hidrocarbonada se conecta al grupo N^α -amino de la arginina a través de un enlace amida. La estrategia de síntesis quimio-enzimática empleada en este caso implica la acilación del diamino-alcano espaciador por el N^α -acil-arginina etil éster (con diferentes longitudes de cadena hidrocarbonada), seguida por la reacción catalizada por papaína entre la N^α -acil-arginina y el grupo amino restante del espaciador.

1.2. Surfactantes derivados de arginina de cadena simple

Entre los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple, los derivados de arginina conforman una clase de compuestos catiónicos con excelentes propiedades de agregación y adsorción, actividad antimicrobiana de amplio espectro, buena biodegradabilidad, baja toxicidad potencial y bajo impacto ambiental (Pinazo et al. 2016). Los mismos pueden clasificarse según su estructura en tres series de compuestos: N^α -acil arginina alquil ésteres (Figura 2.1.6a), arginina-*N*-alquilamidas (Figura 2.1.6b) y arginina-*O*-alquil ésteres (Figura 2.1.6c).

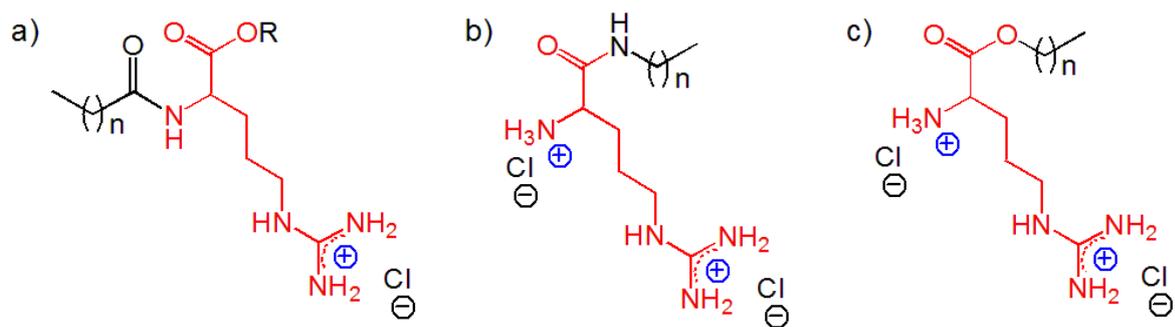


Figura 2.1.6. Estructura de surfactantes derivados de arginina de cadena simple: (a) N^α -acil arginina alquil ésteres con $R=CH_3$ y $n=8$ CAM, $n=10$ LAM, $n=12$ MAM; (b) arginina- N -alquilamidas, $n=9$ ACA, $n=11$ ALA, $n=13$ AMA; y (c) arginina- O -alquil ésteres, $n=7$ AOE, $n=9$ ACE, $n=11$ ALE (Pinazo et al. 2016).

Las principales diferencias entre estas familias de compuestos incluyen el tipo de enlace que participa en la unión de la cola hidrocarbonada al residuo de arginina, la posición del mismo respecto del *carbono* α de la arginina (unión a través del grupo α -amino o del α -carboxilo) y la cantidad de cargas positivas presentes en la porción hidrofílica de la molécula (Morán et al. 2004). En cuanto a la síntesis de los mismos, 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, como se mencionó en la Sección 1.1.4 del presente Capítulo (pág. 77) (Castillo Expósito 2006).

1.2.1. Propiedades y aplicaciones

Se ha reportado el estudio de la adsorción y agregación de los surfactantes derivados de arginina de cadena simple, a diferentes concentraciones y en presencia o ausencia de otros componentes (Pinazo et al. 2016). Estos compuestos presentan generalmente buena solubilidad acuosa y excelentes propiedades tensioactivas, siendo

capaces de disminuir la tensión superficial del agua y de formar agregados en medio acuoso, mostrando valores de CMC definidos. La morfología de los agregados observados en cada caso depende no sólo de la porción hidrofóbica de la molécula, sino también de la temperatura, composición y contenido de electrolitos del sistema (Morán et al. 2004). Por otro lado, los tensioactivos catiónicos derivados de arginina presentaron un perfil satisfactorio toxicidad, alta biodegradabilidad y excelentes propiedades antimicrobianas contra bacterias, hongos y levaduras (Infante et al. 2004; Pérez et al. 2009; Pinazo et al. 2011; Pinazo et al. 2016). Esta última propiedad es el resultado de la combinación de la actividad interfacial de los compuestos y su estructura molecular, siendo factores clave la longitud de la cadena hidrocarbonada y la presencia del grupo básico guanidinio protonado de la arginina (Castillo Expósito 2006). Estas propiedades convierten a los surfactantes derivados de arginina en interesantes alternativas para una amplia gama de aplicaciones industriales tanto la formulación de productos para el cuidado personal, farmacéuticos y agroalimentarios, así como en el diseño y síntesis de biomateriales (Pinazo et al. 2011).

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Se emplearon extracto crudo de papaína (EC 3.4.22.2, del látex de frutos de *Carica papaya*; 3,11 UI/mg sólido, una unidad enzimática – UI – hidroliza 1,0 μmol de N^α -benzoil-arginina etil éster hidrocloreuro por minuto a pH 6,2 y 25°C), dodecilamina, decanol, dodecanol y tamices moleculares (4Å) de Fluka. N^α -benzoil-L-arginina etil éster (Bz-Arg-OEt o BAEE), N^α -carbобензоxi-L-leucina (Z-Leu-OH), seroalbúmina bovina (BSA), Coomassie Brilliant Blue G-250 y N^α -benzoil-D,L-arginina *p*-nitroanilida (BAPNA) fueron comprados a Sigma Aldrich; N^α -carbобензоxi-L-glicina (Z-Gly-OH) y N^α -carbобензоxi-L-alanina (Z-Ala-OH) fueron de Bachem. 1,4-ditio-D,L-treitol (DTT) fue adquirido a Invitrogen. Cloruro de tionilo de Baker. Las cromatografías en capa fina (TLC) se realizaron en cromatofolios de sílica gel 60 F254 (Merck). Sílica gel grado 62 (60–200 mesh, Grace Davidson) fue empleada para cromatografía en columna. Poliamida-6 (EP-700, tamaño de partícula <800 μm , diámetro promedio de poro 50–300 nm, área específica calculada según el método BET 8,4 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$) fue una contribución de Akzo. El resto de los reactivos y solventes empleados en este trabajo fue de calidad analítica o superior.

2.2. Preparación de los biocatalizadores

2.2.1. Araujia sericifera

2.2.1.1. Morfoanatomía

Araujia sericifera Brot. (sinónimo: *Araujia hortorum* E. Fourn.; Apocynaceae, subfamilia Asclepiadaceae) (Figura 2.2.1), 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, blanquecinas y cubiertas 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 2017).



Figura 2.2.1. Morfoanatomía de *A. sericifera*: (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.

2.2.1.2. Proteasas presentes en el látex de *A. sericifera*

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 la fracción solubles del látex extraído de frutos de *A. sericifera* (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.

2.2.2. Obtención del extracto enzimático con actividad proteolítica de *A. sericifera*

Se colectó el látex de frutos inmaduros de *A. sericifera*, cosechados en verano en las cercanías de la localidad de La Plata (Buenos Aires, Argentina), en 200 ml agua destilada conteniendo 5 mM de ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA) y 5 mM de Na₂SO₃, sobre baño de hielo. 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 la cisteína presente en el sitio activo de la enzima. La suspensión resultante fue centrifugada durante media h a 9600xg de manera de separar la fracción soluble, conteniendo las peptidasas (*araujaína*), de las gomas insolubles. Las fracciones separadas fueron liofilizadas y almacenadas a -20°C para las determinaciones posteriores.

2.2.3. Inmovilización de los extractos proteolíticos por adsorción en poliamida

Tanto araujaína como un extracto comercial de papaína fueron inmovilizadas por adsorción en poliamida según se describe en Morcelle et al. 2009. Para ello, los extractos enzimáticos (100 mg) fueron disueltos en buffer bórico-borato 0,1 M pH 8,5 con 1 mM de EDTA (1 ml) en presencia de DTT (150 mg) y mezclados con el soporte sólido (1 g). Las mezclas fueron homogeneizadas por agitación vigorosa en vórtex, liofilizadas y almacenadas a -20°C, denominándose *ara/pol* (araujaína) y *pap/pol* (papaína).

2.3. Caracterización de los biocatalizadores

2.3.1. Determinación del contenido de proteínas

Se prepararon soluciones 0,1% (p/v) de cada extracto enzimático en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,5, realizándose a continuación la determinación del contenido de proteínas según el macrométodo de Bradford (Bradford, 1976). Durante el ensayo, 50 µl de la dilución correspondiente de la muestra fueron incubados con 2,5 ml del reactivo de Bradford. La mezcla se agitó enérgicamente en vórtex durante unos segundos. 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 haciendo uso de una curva de calibración, construida utilizando una solución de seroalbúmina bovina (BSA) en el rango de sensibilidad del método (100-1000 µg proteína/ml).

2.3.2. Determinación de la actividad proteolítica

La actividad proteolítica del extracto crudo de *A. sericifera* (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°C durante 10 minutos. La reacción fue detenida por el agregado de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% v/v. Las muestras fueron dejadas 20 min a 4°C para luego ser centrifugadas a 2500×g durante 20 minutos. Finalmente se midió la absorbancia a 280 nm del sobrenadante de las muestras en un espectrofotómetro Agilent 8453 E (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 sobre una solución de caseína al 1% (p/v) a 37°C.

2.3.3. Determinación de la actividad amidolítica

La determinación de la actividad de las enzimas adsorbidas sobre poliamida fue llevada a cabo utilizando el sustrato sintético *N*^α-benzoil-D,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 2.2.2), reacción que puede monitorearse por el aumento en la absorbancia a 410 nm (Ota et al. 1964).

Los biocatalizadores libres o inmovilizados (5 o 20 mg respectivamente) fueron suspendidos en 1,62 ml de buffer fosfatos 0,1 M, pH 7,4, conteniendo EDTA 1 mM. Luego del agregado de 180 µl de una solución 40 mM de BAPNA en dimetil sulfóxido (DMSO), las mezclas fueron incubadas durante 5 min 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 biocatalizadores fueron separados por centrifugación (9000×g durante 10 minutos) y la absorbancia a 410 nm de los sobrenadantes fue medida en un espectrofotómetro Agilent 8453 E. Para el cálculo de las unidades enzimáticas se elaboró una curva de calibración para la cual se midió absorbancia a 410 nm vs. concentración de *p*-nitroanilina. Las unidades enzimáticas (UI) fueron definidas como los μmoles 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.

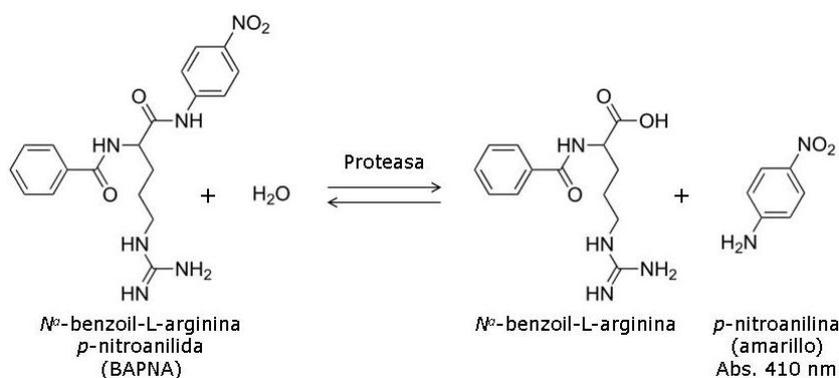


Figura 2.2.2. Esquema de la reacción de hidrólisis del sustrato sintético BAPNA por acción de una proteasa. La liberación de *p*-nitroanilina (amarillo) por hidrólisis del enlace amida puede monitorearse por el aumento de la absorbancia a 410 nm.

2.4. Síntesis en microescala de alquilamidas y alquilésteres derivados de aminoácidos N-protégidos

2.4.1. Optimización de la extracción del producto de síntesis

Con la finalidad de optimizar la recuperación del producto de condensación enzimática se probaron dos mezclas de extracción para la síntesis de N^α -benzoyl-L-arginina-dodecilamida (Bz-Arg-NHC₁₂) utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador. La mezcla de reactivos se preparó disolviendo

0,02 mmol de N^α -benzoil-arginina etil éster (Bz-Arg-OEt o BAEE) y 0,03 mmol de dodecilamina en 1 ml de acetonitrilo anhidro (ACN, previamente almacenado con tamices moleculares) conteniendo 0,25% (v/v) de agua. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes, en viales plásticos de 4 ml cerrados herméticamente, bajo atmósfera de N_2 y agitación orbital (150 rpm) a 37°C por 72 h. Las reacciones fueron iniciadas por el agregado de 1 ml de la mezcla de reactivos a 100 mg del biocatalizador. Luego del tiempo de incubación, las reacciones fueron detenidas y el producto de síntesis extraído por el lavado del biocatalizador con mezclas metanol:agua (MeOH/ H_2O) o metanol:ácido acético (MeOH/AcH) 4:1 (3×1 ml) (Clapés et al. 1999).

2.4.1.1. Seguimiento de las reacciones mediante análisis por HPLC

Todos los extractos fueron filtrados utilizando un filtro de nylon de 0,22 μm (Osmonics) y las cantidades relativas de los productos de condensación, sustratos y producto de hidrólisis fueron determinadas mediante análisis por HPLC (Agilent 1100 LC) utilizando una columna Lichrosorb 100 propilciano (tamaño de partícula: 5 μm , longitud \times diámetro del lecho: 250×4 mm, Hibar). Las condiciones para las corridas cromatográficas fueron: solvente A, H_2O 0,1% (v/v) TFA; solvente B: ACN: H_2O 80:20 0,1% (v/v) TFA; velocidad de flujo 1 ml/min; gradiente de elución 25-95% de B en 25 min; longitudes de onda de detección: 215 y 254 nm. La cuantificación de los productos fue llevada a cabo a través de la determinación de las áreas de los picos respectivos, según el método del estándar externo, utilizando patrones de BAEE y Bz-Arg-OH. Los tiempos de retención para cada producto fueron: Bz-Arg-OH, 4,7 min; BAEE, 5,3 min; Bz-Arg-NHC₁₂, 15,6 min.

El estándar de Bz-Arg-OH fue obtenido por hidrólisis de BAEE (30 mM en buffer fosfatos 0,1 M pH 7,0 conteniendo 5 mM de EDTA y 5 mM de cisteína) con papaína (5 mg) luego de 30 min de incubación a 37°C. La reacción fue detenida por precipitación de la enzima con MeOH, la cual fue removida por centrifugación de la mezcla durante 10 min a 9000×g. El sobrenadante conteniendo Bz-Arg-OH fue evaporado y el sólido remanente fue redisoluto en MeOH.

2.4.2. Síntesis por control termodinámico de Z-AA-NHC_n

Se prepararon soluciones stock de los sustratos con 20 mM de cada dador de acilo (Z-Ala-OH o Z-Gly-OH) y 30 mM de cada nucleófilo (decil- o dodecilamina) en ACN anhidro conteniendo 0,25% (v/v) de agua. Las reacciones de síntesis se llevaron a cabo por triplicado en forma independiente en viales plásticos de 4 ml cerrados herméticamente conteniendo 1 ml de la solución stock de reactivos y 100 mg de biocatalizador (ara/pol o pap/pol), bajo atmósfera de N₂, en un agitador orbital (150 rpm) a 37°C para cada tiempo de reacción (1, 3, 6, 24, 48 y 72 h). Pasado el tiempo de incubación, las reacciones se detuvieron por el agregado de 1 ml de MeOH/AcH 4:1, lavándose a continuación el soporte con la misma mezcla de solventes (2×1 ml) para extraer el producto adsorbido en su superficie.

2.4.3. Síntesis por control cinético de Bz-Arg-NHC_n, Z-AA-NHC_n y Bz-Arg-OC_n

2.4.3.1. Activación de los sustratos por esterificación

Los ésteres metílicos de N^α-carbобензохи-L-glicina (Z-Gly-OMe) y de N^α-carbобензохи-L-leucina (Z-Leu-OMe) fueron obtenidos por esterificación de los sustratos comerciales, Z-AA-OH (AA = Gly o Leu), según el método del cloruro de tionilo

(SOCl₂) (Brenner & Huber 1953). Para las síntesis, 10 g de cada Z-AA-OH fueron colocados en balones independientes y disueltos en 200 ml MeOH con agitación magnética. A continuación, el balón fue colocado en un recipiente Dewar, previamente cargado con EtOH y hielo seco hasta superar el nivel de la mezcla de reacción. Finalmente, se añadió lentamente el SOCl₂ (en una relación molar de 1:5: Z-AA-OH:SOCl₂), haciendo uso de un embudo de adición. La reacción fue llevada a cabo *overnight* a temperatura ambiente en presencia de CaCl₂.

La extracción del producto fue llevada a cabo por adición de AcOEt, seguido por lavados sucesivos con 5% (p/v) NaHCO₃, agua, 5% (p/v) ácido cítrico y solución saturada de NaCl. La reacción fue monitoreada mediante TLC utilizando como fase móvil una mezcla hexano/AcOEt 1:9 y 5,7% (p/v) de ácido fosfomolibdico en EtOH 96° como revelador.

2.4.3.2. Síntesis por control cinético de alquilamidas derivadas de aminoácidos N-protegidos: Bz-Arg-NHC_n y Z-AA-NHC_n

Se prepararon soluciones stock de los sustratos con 20 mM de cada dador de acilo (BAEE, Z-Gly-OMe o Z-Leu-OMe) y 30 mM de cada nucleófilo (decil- o dodecilamina) en ACN anhidro con 0,25% (v/v) de agua. Las reacciones de síntesis fueron llevadas a cabo según lo descrito en la Sección 2.4.1 del presente Capítulo (pág. 87).

2.4.3.3. Síntesis por control cinético de alquilésteres derivados de aminoácidos N-protegidos: Bz-Arg-OC_n

Se estudiaron las cinéticas de síntesis de los ésteres Bz-Arg-OC₁₀ y Bz-Arg-OC₁₂

utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador. En este caso, el dador de acilo (BAEE, 40 mM) fue disuelto en decanol o dodecanol, homogeneizando la mezcla por calentamiento a 50°C con agitación constante hasta la completa solubilización del derivado aminoacídico. Las reacciones fueron iniciadas por el agregado del biocatalizador (100 mg) a 1 ml de la mezcla de reactivos, llevándose luego a cabo en agitación constante (150 rpm) bajo atmósfera de N₂ a 50°C para 24, 48 y 72 h de incubación. Los productos obtenidos fueron extraídos según la metodología descrita previamente.

2.4.4. Análisis del rendimiento de las reacciones mediante HPLC

En todos los casos, las muestras fueron filtradas utilizando una membrana de nylon de 0,22 µm (Osmonics) y las cantidades relativas de los productos de condensación, sustratos y productos de hidrólisis (en el caso de las síntesis por control cinético) fueron determinadas mediante análisis por HPLC (Agilent 1100 LC) según las condiciones descritas en la Sección 2.4.1.1 del presente Capítulo (pág. 88). En cada caso, la cuantificación de las cantidades relativas de los productos de síntesis, hidrólisis (en el caso de las síntesis por control cinético) y el reactivo remanente fue realizada a partir de las áreas de los picos correspondientes mediante el método del estándar externo. Los tiempos de retención para cada producto fueron: BAEE, 5,3 min; Bz-Arg-OH, 4,7 min; Bz-Arg-NHC₁₀, 13,6 min; Bz-Arg-NHC₁₂, 15,6 min; Z-Ala-OH, 6,1 min; Z-Ala-NHC₁₀, 16,3 min; Z-Ala-NHC₁₂, 17,1 min; Z-Gly-OH, 5,1 min; Z-Gly-OMe, 6,5 min; Z-Gly-NHC₁₀, 15,9 min; Z-Gly-NHC₁₂, 16,8 min; Z-Leu-OH, 9,3 min; Z-Leu-OMe, 11,5 min; Z-Leu-NHC₁₀, 17,9 min; Z-Leu-NHC₁₂, 18,9 min; Bz-Arg-OC₁₀, 15,1 min; Bz-Arg-OC₁₂, 16,5 min.

2.5. Síntesis a escala semipreparativa de las alquilamidas derivadas de aminoácidos N-protegidos. Purificación de los productos obtenidos

Con la finalidad de obtener los productos derivados de arginina (Arg), alanina (Ala) y glicina (Gly) en cantidades semipreparativas, las reacciones se llevaron a cabo individualmente a escala semipreparativa en erlenmeyers cerrados herméticamente con tapa esmerilada, bajo atmósfera de N₂, con agitación orbital (150 rpm) a 37°C durante 72 h. En cada caso, la reacción fue iniciada por el agregado de 1 g de biocatalizador (pap/pol) a 10 ml de la solución stock de sustratos correspondiente (20 mM del dador de acilo: BAEE, Z-Gly-OMe o Z-Ala-OH, y 30 mM de cada nucleófilo: decil- o dodecilamina) preparada en ACN anhidro conteniendo 0,25% (v/v) de agua}. Para los derivados de Arg, las reacciones se detuvieron por filtración del biocatalizador y lavado del mismo con ACN (3×10 ml) y éter sulfúrico (3×10 ml), a fin de eliminar la alquilamina en exceso, y luego con una mezcla MeOH/H₂O 4:1 (3×10 ml) de manera de extraer el producto de síntesis de la superficie del biocatalizador. Para los derivados de Gly y Ala, la extracción de los productos fue llevada a cabo por lavado del biocatalizador con MeOH (3×10 ml). Los extractos obtenidos fueron concentrados por evaporación del solvente y filtrados utilizando membranas de nylon de 0,22 μm (Osmonics) para su posterior purificación por cromatografía.

2.5.1. Purificación de Bz-Arg-NHC_n por cromatografía de intercambio catiónico

La purificación de los productos derivados de Arg (Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂) fue llevada a cabo por cromatografía de intercambio catiónico en un equipo Äkta Purifier 10 (GE Healthcare). Para ello, alícuotas (1 ml) de las mezclas de extracción

conteniendo los productos fueron cargadas en una columna SP Sepharose Fast Flow (12 ml volumen de lecho, GE Healthcare), previamente equilibrada con buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5 con 50% (v/v) de etanol (solvente A). El material no retenido fue eluido mediante el lavado con dos volúmenes de columna (VC) del mismo buffer. La elución de cada producto de condensación fue lograda aumentando la concentración del solvente B (buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5 con 50% (v/v) de etanol y NaCl 1 M) al 31%. Finalmente la columna fue lavada con 2 VC del solvente B (100%), y reequilibrada a las condiciones iniciales. El flujo fue mantenido a 1 ml/min a lo largo de todo el proceso y la detección de los picos cromatográficos fue realizada espectrofotométricamente a 215 y 254 nm. Las fracciones purificadas recolectadas de cada producto fueron reunidas y concentradas mediante evaporación del solvente en rotavapor (Heidolph). El desalado de las mismas fue llevado a cabo por precipitaciones sucesivas con etanol absoluto, centrifugación (10000×g, 15 minutos) y evaporación del solvente.

2.5.2. Purificación de Z-AA-NHC_n por cromatografía en sílica

La purificación de los productos derivados de Ala y Gly (Z-Ala-NHC₁₀, Z-Ala-NHC₁₂, Z-Gly-NHC₁₀ y Z-Gly-NHC₁₂) se llevó a cabo por cromatografía en sílica utilizando como fase móvil una mezcla CH₂Cl₂/MeOH 9:1. La separación fue monitoreada mediante TLC utilizando 2% (p/v) de ninhidrina en EtOH con 10% (v/v) de AcH como revelador. Este compuesto reacciona con aminoácidos y aminos en medio ácido (pH 3-4), produciendo por calentamiento un complejo de color púrpura.

2.6. Identificación de los productos obtenidos

En todos los casos, los productos fueron caracterizados por espectrometría de

masas por electrospray (ESI-MS) y su identidad fue confirmada por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) ^1H -RMN y ^{13}C -RMN, utilizando técnicas bidimensionales HSQC (*heteronuclear single quantum coherence*) y COSY (*correlation spectroscopy*).

2.7. Caracterización fisicoquímica de los productos obtenidos

2.7.1. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC)

2.7.1.1. Determinación de los parámetros de superficie y de la CMC por medidas de tensión superficial

Se realizaron medidas de tensión superficial (γ) de soluciones acuosas de distintas concentraciones de los productos sintetizados utilizando un tensiómetro Krüss K-12 con una placa de Wilhelmy. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada y se dejaron equilibrar por 2 h a 25°C en las celdas correspondientes. La efectividad de adsorción (pC_{20} , el logaritmo negativo de la concentración molar del surfactante necesaria para reducir la tensión superficial del agua en 20 mN.m⁻¹), la concentración micelar crítica (CMC), la tensión superficial a la CMC (γ_{CMC}), la máxima concentración del surfactante adsorbida en la interfase aire/líquido (Γ_{max}) y el área por molécula (A_{min}) fueron calculadas a partir de las curvas γ vs. $\log C$ en el equilibrio, utilizando la ecuación de *adsorción de Gibbs* (1):

$$\Gamma_{\text{max}} = -\frac{(\partial\gamma/\partial\log C)}{2.303 nRT} \quad (1)$$

donde $\partial\gamma/\partial\log C$ es la pendiente de la porción recta de la curva γ vs. $\log C$, n es el número de especies en la solución (para surfactantes iónicos, $n=2$), T es la temperatura absoluta en grados kelvin (K) y R es la constante de los gases ideales ($R=8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$). El área mínima ocupada por molécula de surfactante adsorbida en

la interfase aire/líquido (A_{min}), expresada en \AA^2 , fue calculada según la Ecuación (2):

$$A_{min} = \frac{10^{16}}{N_A \times \Gamma_{max}} \quad (2)$$

donde 10^{16} es el factor de conversión de cm^2 a \AA^2 , N_A es el número de Avogadro y Γ_{max} la máxima adsorción del surfactante, expresada en $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$.

2.7.1.2. Determinación de la CMC por medidas de conductividad

Se determinó la concentración micelar crítica (CMC) de los surfactantes conductimétricamente. En cada caso, se prepararon soluciones concentradas de los surfactantes en agua nanopura MilliQ®, las cuales fueron diluidas progresivamente. Para cada medida, las soluciones se equilibraron a 25°C durante 10 minutos, registrándose a continuación su conductividad utilizando un conductímetro WTW Modelo LF 530 (celda WTW LTA K = 0,104). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Los valores de CMC para cada compuesto se obtuvieron a partir de las gráficas de conductividad en función de la concentración del surfactante.

2.7.2. Caracterización de los agregados de los surfactantes por microscopía de fuerza atómica (AFM)

Los agregados de Bz-Arg-NHC_n fueron caracterizados en aire y en celda fluida por AFM en modo de contacto intermitente (*tapping mode*) a 25°C. La concentración del surfactante empleada en cada ensayo fue 5 veces la CMC correspondiente. En todos los casos, 20 μl de la solución correspondiente fueron colocados sobre mica muscovita recientemente descamada. Las muestras para los ensayos en aire fueron secadas bajo corriente de nitrógeno y analizadas con sondas de nitruro de silicio, Si₃N₄ (RTESP, Veeco,

radios de punta 8-12 nm, 271-311 kHz, constante de fuerza 40 N/m). En el caso de las muestras analizadas en celda fluida (agua), se utilizaron sonda NPS10 (radios de punta 8-12 nm, 2-10 kHz, constante de fuerza 0,06 N/m). Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio MultiMode Scanning Probe Microscope Veeco equipado con un controlador Nanoscope V Veeco con una velocidad de escaneo típica (1 Hz).

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de los biocatalizadores

La etapa preliminar de los ensayos de síntesis consistió en la selección del biocatalizador más adecuado para la condensación enzimática de los derivados de aminoácidos con diversos nucleófilos. Para ello se caracterizaron en primer lugar los extractos enzimáticos libres de araujaína (obtenido a partir del látex frutos de la enredadera autóctona *A. sericifera*) y papaína (extracto comercial obtenido a partir del látex de frutos de *C. papaya*), determinándose su contenido total de proteínas por el método de Bradford y su actividad proteolítica, utilizando caseína bovina como sustrato (Tabla 2.3.1). Si bien el extracto crudo de *A. sericifera* mostró un mayor contenido de proteínas totales frente a la preparación comercial de papaína, los resultados obtenidos evidenciaron actividades proteolíticas similares para ambos extractos enzimáticos.

La inmovilización enzimática es una estrategia muy útil empleada en reacciones biocatalíticas llevadas a cabo en medios orgánicos, ya que optimiza la dispersión enzimática, evitando la agregación de las proteínas hidrofílicas, y mejora la accesibilidad a los sustratos (Hanefeld et al. 2009). Por otro lado, la inmovilización permite una fácil separación del biocatalizador de la mezcla de reacción, facilitando la recuperación del producto deseado (Tischer & Wedekind 1999). Debido a la facilidad de preparación y bajo costo, la adsorción física es considerada como la estrategia más apropiada para el uso de enzimas en medios orgánicos (Miletić et al. 2012). Entre los soportes más empleados, la poliamida EP-700 (un polímero orgánico sintético de baja hidrofobicidad) constituye uno de los preferidos para la síntesis de péptidos y derivados peptídicos (Clapés et al. 1999; Morcelle et al. 2006; Morcelle et al. 2009). Este tipo de soporte tiene

la capacidad de adsorber agua en una proporción que asegura una buena flexibilidad enzimática en medios con alta proporción de solventes orgánicos, minimizando a su vez la hidrólisis no deseada de los reactivos (Adlercreutz 1991). Teniendo en cuenta estas ventajas, se decidió inmovilizar los extractos enzimáticos de araujaína y papaína por adsorción en poliamida. Los inmovilizados obtenidos fueron caracterizados mediante la determinación de su actividad amidolítica, utilizando el sustrato sintético BAPNA (Tabla 2.3.1). La elección de este sustrato se basó en el hecho de que el grupo benzoil-arginina (Bz-Arg) es el mismo que se encuentra en el reactivo que posteriormente fue utilizado para la síntesis enzimática de derivados de arginina: N^{α} -benzoil-arginina etil éster (Bz-Arg-OEt o BAEE). Este hecho resulta de suma importancia, ya que la actividad enzimática debe expresarse de acuerdo a una reacción particular catalizada por dicha enzima, y el uso de un sustrato de estructura similar al reactivo de síntesis nos da una idea de la afinidad de la enzima por este sustrato.

Papaína adsorbida en poliamida (*pap/pol*) mostró una actividad amidolítica por mg de preparación inmovilizada 3 veces mayor que la registrada en el caso de araujaína en las mismas condiciones (*ara/pol*). En el caso de la actividad amidolítica específica, expresada en UI/mg de proteína inmovilizada, el rendimiento de *pap/pol* fue 46 veces mayor que el de *ara/pol*. Esta diferencia podría atribuirse a la pérdida de actividad en el caso de araujaína debido al proceso de inmovilización en sí mismo.

Por otro lado, los resultados de actividad amidolítica para las enzimas libres e inmovilizadas mostraron una reducción del 72 y 75% de la actividad para papaína y araujaína respectivamente luego del proceso de inmovilización. De acuerdo a Lartigue (1975), las explicaciones posibles para este comportamiento incluyen la

desnaturalización de la enzima debido al paso de liofilización incluido en el proceso de inmovilización, oclusión del sitio activo de la enzima y/o adsorción de la enzima a través de residuos requeridos para su actividad catalítica (Lartigue 1975). En este proceso en particular, la principal ventaja de la inmovilización enzimática es la fácil detención de la reacción enzimática por remoción del biocatalizador del medio, así como la simplificación del proceso de purificación (Messing 1975).

Tabla 2.3.1. Caracterización de los biocatalizadores libres (extractos enzimáticos de *A. sericifera* y *C. papaya*) e inmovilizados por adsorción sobre poliamida.

		<i>A. sericifera</i>	<i>C. papaya</i>
Extracto enzimático libre	Contenido de proteínas (μg de proteínas/mg de extracto seco)	455,81	254,00
	Actividad proteolítica específica (Ucas/mg de proteínas)	3,39	3,40
	Actividad amidolítica (IU/mg de extracto seco)	0,002	0,045
	Actividad amidolítica específica (IU/mg de proteína)	0,0045	0,176
Inmovilizado por adsorción en poliamida	Actividad amidolítica (UI/mg de inmovilizado)	0,0046	0,013
	Actividad amidolítica específica (UI/mg de proteína inmovilizada)	0,0011	0,051

3.2. Estudio de la cinética de síntesis en microescala de alquilamidas y alquilésteres derivados de aminoácidos N-protegidos

Se llevó a cabo el estudio de las cinéticas de síntesis de *alquilamidas* y *alquilésteres* derivados de aminoácidos N-protegidos empleando los extractos proteolíticos vegetales como biocatalizadores. En primera instancia, se ensayó la síntesis

bajo *control termodinámico* de alquilamidas derivadas de Ala, Gly y Leu, utilizando tanto araujaína como papaína adsorbidas en poliamida como biocatalizadores (Figura 2.3.1b con X=-H, Y=-NH₂, m=9;11, n=10;12, y Z=-NH-).

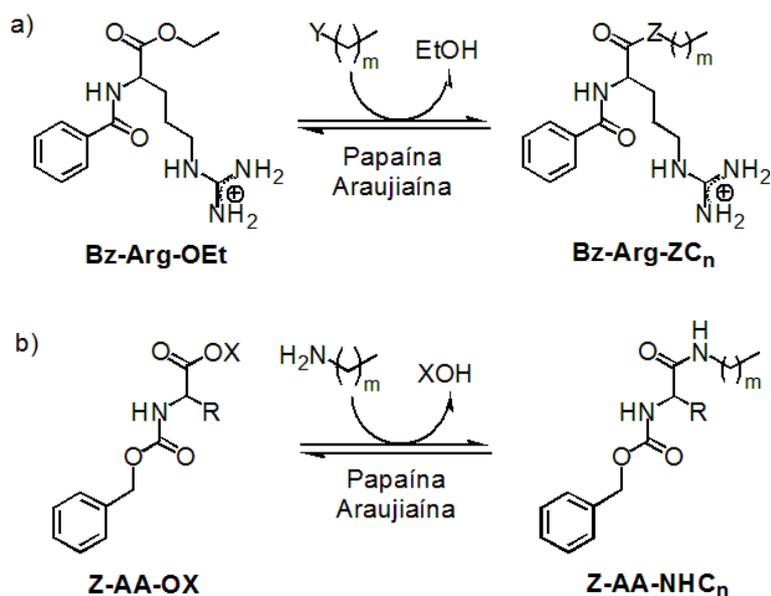


Figura 2.3.1. Reacciones de condensación enzimática bajo control cinético y termodinámico para la síntesis de alquilamidas y alquilésteres derivados de aminoácidos *N*-protegidos a) catiónicos y b) neutros; con AA=Gly, Ala o Leu; X=-H (Control termodinámico) ó -CH₃ (Control cinético); m=9 y n=10 ó m=11 y n=12; Y=-NH₂ (amina primaria) y Z=-NH- (amida); Y=-OH (alcohol primario) y Z=-O- (éster).

Mediante esta estrategia, se obtuvieron conversiones de hasta el 80% para las síntesis de Z-Gly-NHC_n utilizando *ara/pol* como biocatalizador (Figura 2.3.2a), y mayores al 60% para los derivados Z-Ala-NHC_n sintetizados con ambos biocatalizadores (Figura 2.3.2b). En las mezclas de reactivos para las síntesis de Z-Gly-NHC_n y Z-Leu-NHC_n se observó la formación de un aducto insoluble entre el dador de acilo y la amina, disminuyendo el rendimiento en el primer caso e impidiendo la obtención del producto en el último.

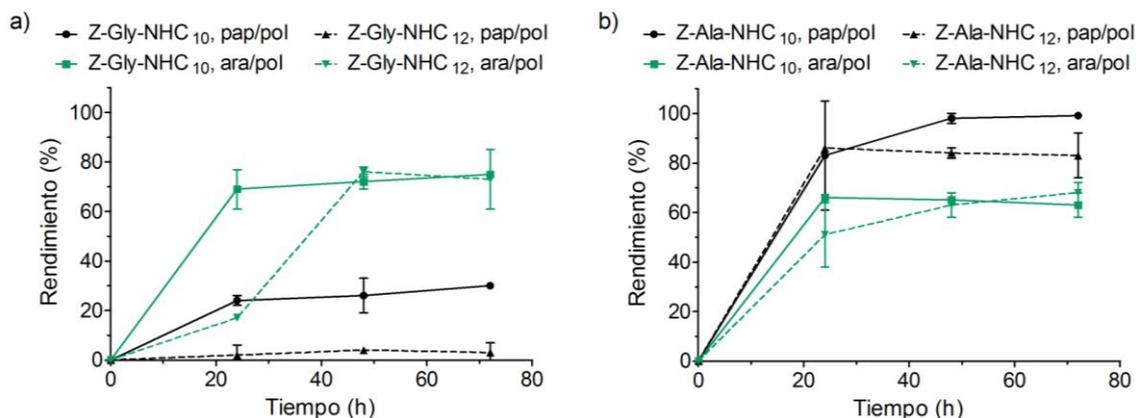


Figura 2.3.2. Cinéticas de síntesis de a) Z-Gly-NHC_n y b) Z-Ala-NHC_n (n=10;12) bajo control termodinámico catalizadas por pap/pol y ara/pol, a 37°C, bajo atmósfera de N₂ con agitación orbital constante (150 rpm).

A fin de mejorar la conversión para las síntesis de Z-Gly-NHC_n y lograr llevar a cabo las reacciones de condensación entre el derivado de Leu y las aminas alifáticas, se planteó realizar estas síntesis bajo *control cinético*, para lo que fue necesario esterificar la función carboxilo de los correspondientes dadores de acilo (Z-Gly-OH y Z-Leu-OH). Esto no fue necesario para las reacciones de obtención de los derivados Bz-Arg-NHC_n, dada la disponibilidad comercial del dador de acilo BAEE, un sustrato clásico para la determinación de actividad enzimática de diversas proteasas, como papaína y tripsina (Walsh & Wilcox 1970). Las Figuras 2.3.3 y 2.3.4 muestran los rendimientos alcanzados en función del tiempo de reacción para las síntesis bajo control cinético de los derivados de Gly y Leu, así como los porcentajes de formación de los productos secundarios de hidrólisis en cada caso.

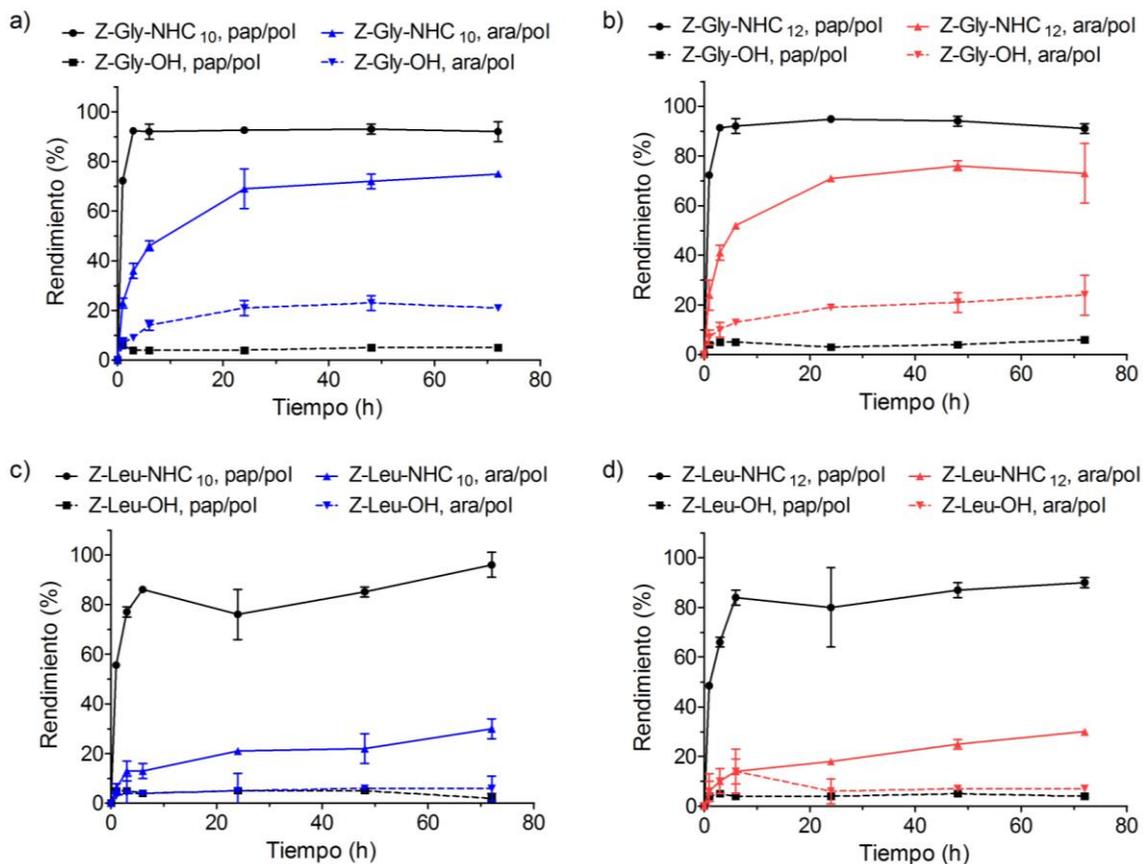


Figura 2.3.3. Cinéticas de síntesis de a) Z-Gly-NHC₁₀, b) Z-Gly-NHC₁₂, c) Z-Leu-NHC₁₀ y d) Z-Leu-NHC₁₂ bajo control cinético catalizadas por pap/pol y ara/pol, a 37°C, bajo atmósfera de N₂ con agitación orbital constante (150 rpm).

Finalmente, en el caso de la síntesis de los ésteres derivados de arginina (Bz-Arg-OC_n, Figura 2.3.1a con Y=-OH, m=9;11, n=10;12, y Z=-O-) utilizando papaína adsorbida en poliamida como biocatalizador se observaron máximos de conversión del 21,0% (24 h) y del 8,0% (72 h) para Bz-Arg-OC₁₀ y Bz-Arg-OC₁₂ respectivamente (Figura 2.3.5).

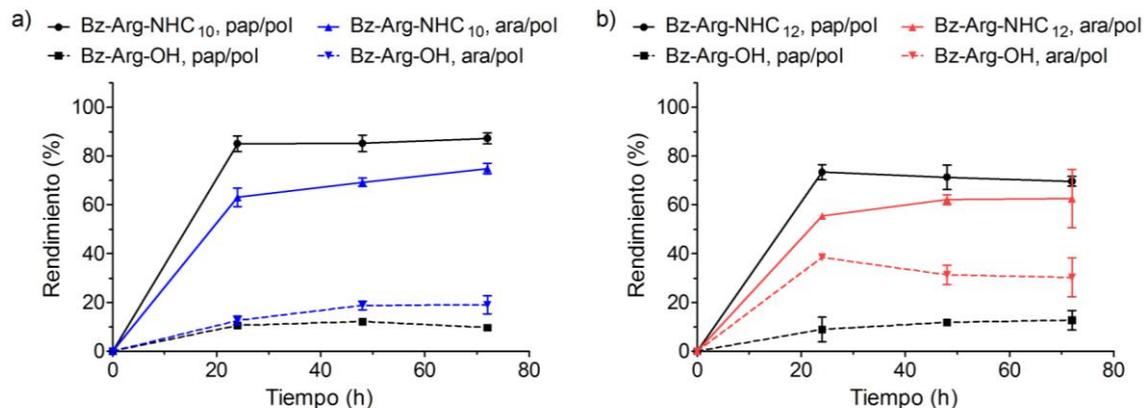


Figura 2.3.4. Cinéticas de síntesis de a) Bz-Arg-NHC₁₀ y b) Bz-Arg-NHC₁₂ bajo control cinético catalizadas por pap/pol y ara/pol, a 37°C, bajo atmósfera de N₂ con agitación orbital constante (150 rpm).

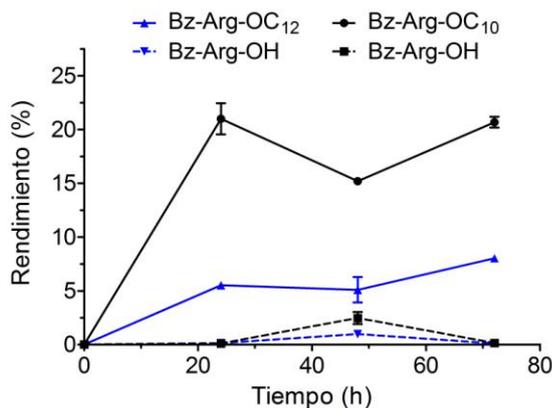


Figura 2.3.5. Cinéticas de síntesis de Bz-Arg-OC₁₀ y Bz-Arg-OC₁₂ bajo control cinético catalizadas por pap/pol, a 50°C, bajo atmósfera de N₂ con agitación orbital constante (150 rpm).

En la Tabla 2.3.2 se resumen los mejores rendimientos para los distintos productos de condensación, junto con el correspondiente tiempo de reacción, para cada biocatalizador ensayado.

Tabla 2.3.2. Conversiones máximas alcanzadas (%) y tiempo de reacción (h) necesario para cada derivado aminoacídico utilizando araujiaina y papaína inmovilizadas por adsorción en poliamida (ara/pol y pap/pol respectivamente) como biocatalizadores.

Biocatalizador	Amidas								Ésteres	
	Bz-Arg-NHC ₁₀	Bz-Arg-NHC ₁₂	Z-Gly-NHC ₁₀	Z-Gly-NHC ₁₂	Z-Ala-NHC ₁₀	Z-Ala-NHC ₁₂	Z-Leu-NHC ₁₀	Z-Leu-NHC ₁₂	Bz-Arg-OC ₁₀	Bz-Arg-OC ₁₂
Pap/pol	87,3% (72 h)	73,0% (72 h)	93,6% (48 h)	94,7% (24 h)	99,1% (72 h)	86,0% (72 h)	86,1% (72 h)	90,8% (72 h)	21,0% (24 h)	8,0% (72 h)
Ara/pol	74,9% (72 h)	62,0% (72 h)	75,2% (72 h)	76,7% (48 h)	66,8% (72 h)	67,9% (72 h)	22,3% (72 h)	30,6% (72 h)	ND	ND

ND: No determinado.

3.3. Síntesis semipreparativa y purificación de de alquilamidas derivadas de aminoácidos N-protegidos

3.3.1. Optimización de la extracción del producto en microescala para la síntesis de Bz-Arg-NHC_n

La síntesis de las N^α-benzoil-L-arginina-alquilamidas (Bz-Arg-NHC_n) fue llevada a cabo en microescala utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador según lo descrito en la Sección 2.4.3.2 del presenta Capítulo (pág. 90) (Figura 2.3.1a). Al final de la reacción, el uso de la mezcla de solventes MeOH/AcH 4:1 tiene dos objetivos principales: la detención de la reacción de síntesis y la extracción de los productos de reacción (Clapés et al. 1999). En este contexto, y teniendo en cuenta que la purificación de los productos de condensación se llevaría a cabo por cromatografía de intercambio catiónico, el pH ácido de la mezcla resultante que debería cargarse en la columna

cromatográfica podría afectar negativamente el proceso de separación de los analitos. Por este motivo, se ensayó el uso de una mezcla de extracción alternativa (MeOH/H₂O 4:1) en escala micropreparativa para la síntesis de Bz-Arg-NHC₁₂ a 72 h de reacción. La composición de las mezclas finales de la reacción en todos los casos fue analizada por HPLC, comparándose los rendimientos obtenidos en ambos casos.

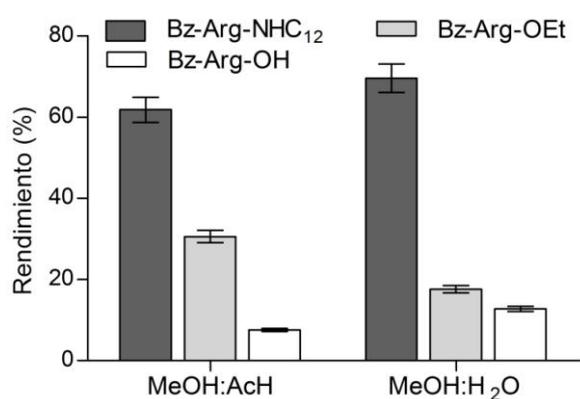


Figura 2.3.6. Optimización de la extracción del producto de condensación para la síntesis de Bz-Arg-NHC₁₂ catalizada por papaína adsorbida sobre poliamida a 37°C, bajo atmósfera de N₂ y agitación constante (150 pm) para 72 h de reacción. Se muestran los rendimientos para los productos de condensación e hidrólisis, así como el reactivo remanente sin reaccionar, para las dos mezclas de extracción utilizadas (MeOH/AcOH 4:1 y MeOH/H₂O 4:1).

Como puede verse en la Figura 2.3.6, no se observaron diferencias significativas en el contenido de Bz-Arg-NHC₁₂, ni en el de los demás analitos, utilizando ambas mezclas de extracción. En base a estos resultados, se decidió emplear la mezcla MeOH/H₂O 4:1 para extraer las alquilamidas derivadas de arginina de la superficie del biocatalizador para su posterior purificación por cromatografía de intercambio catiónico.

3.3.2. Síntesis semipreparativa de Bz-Arg-NHC_n y purificación por cromatografía de intercambio catiónico

La síntesis a escala semipreparativa de los derivados de arginina fue llevada a cabo según la metodología descrita en la Sección 2.5 del presente Capítulo (pág. 92), utilizando la mezcla de extracción MeOH/H₂O 4:1, seleccionada de acuerdo a los resultados expuestos anteriormente. En este caso, los rendimientos en producto de condensación para las 72 h de reacción fueron del 86,17±8,14% para Bz-Arg-NHC₁₂, aproximadamente un 25% mayor que el observado en el proceso a microescala (69,62±3,48%), y 98,04±4,90% para Bz-Arg-NHC₁₀ (Figura 2.3.7). El aumento en el rendimiento observado en el caso Bz-Arg-NHC₁₂ puede ser atribuido al cambio en la geometría del recipiente empleado.

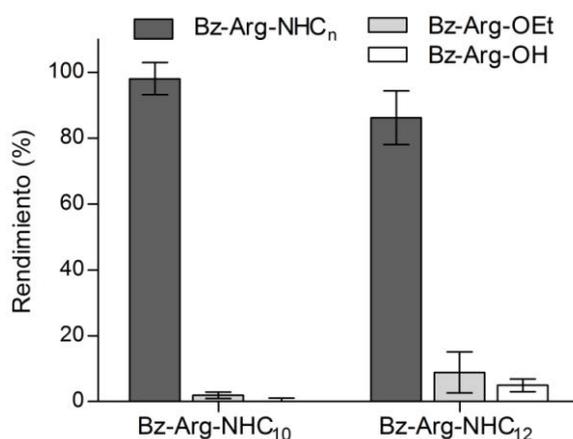


Figura 2.3.7. Rendimientos para las síntesis semipreparativas de Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ para 72 h de reacción utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador. Se muestran también los rendimientos para el producto de hidrólisis (Bz-Arg-OH) y el reactivo remanente sin reaccionar (Bz-Arg-OEt).

La purificación de los compuestos sintetizados fue llevada a cabo por

cromatografía de intercambio catiónico, utilizando como fase estacionaria una matriz de agarosa funcionalizada con grupos sulfopropilo (SP Sepharose Fast Flow). Basados en investigaciones previas (Torres et al. 2001), la fase móvil empleada fue buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5/etanol 1:1. Al pH seleccionado, el producto de hidrólisis (Bz-Arg-OH) se encuentra en su estado zwitteriónico, permitiendo su separación por elución con el material no retenido, mientras que el producto de síntesis permanece cargado y unido a los grupos aniónicos del relleno de la columna. La elución de cada producto de condensación (Bz-Arg-NHC_n) fue llevada a cabo por lavado de la columna con 31% del solvente B (buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5/etanol 1:1 con NaCl 1M). El uso de etanol como cosolvente para la purificación del producto obtenido tiene dos objetivos principales: mantener los solutos en solución, dada la baja solubilidad acuosa de los productos de síntesis, y evitar las interacciones hidrofóbicas con la fase estacionaria. Por otro lado, este solvente posee baja toxicidad y bajo costo, lo cual lo convierte en uno de los co-solventes más amigables con el medio ambiente.

3.3.3. Síntesis semipreparativa de Z-AA-NHC_n. Purificación por cromatografía en sílica

Las síntesis a escala semipreparativa de los derivados amida de Ala y Gly fue llevada a cabo según lo descrito en la Sección 2.5 del presente Capítulo (pág. 92), utilizando MeOH para la extracción de los productos. En todos los casos, los rendimientos en producto de condensación, reactivo remanente y, en el caso que corresponda, en producto de hidrólisis fueron calculados para 72 h de reacción mediante el análisis de las mezclas de extracción por HPLC (Figura 2.3.8). En todos los casos, los rendimientos en producto de condensación fueron mayores al 90%, similarmente a los resultados obtenidos para las síntesis en microescala. Finalmente, la

purificación de los productos de condensación fue llevada a cabo por cromatografía en sílica, utilizando como fase móvil una mezcla $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9:1 y monitoreando la separación por TLC utilizando 2% (p/v) de ninhidrina en EtOH con 10% (v/v) de AcH como revelador.

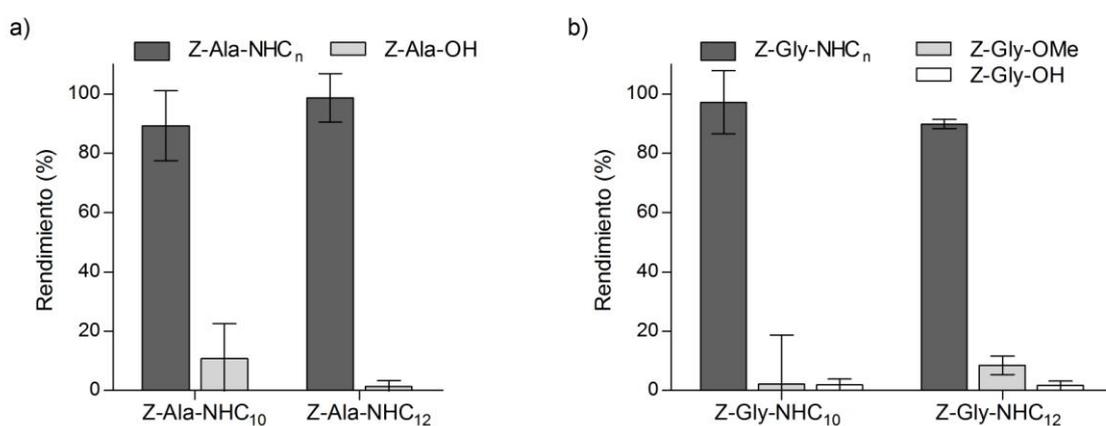


Figura 2.3.8. Rendimientos para las síntesis semipreparativas (a) por control termodinámico de Z-Ala-NHC_n y (b) control cinético de Z-Gly-NHC_n ($n = 10, 12$) para 72 h de reacción utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador. Se muestran también los rendimientos para el producto de hidrólisis (Z-Gly-OH) para la reacción por control cinético y los reactivos remanentes sin reaccionar en ambos casos (Z-Ala-OH o Z-Gly-OMe).

3.4. Identificación de los productos obtenidos

La pureza de todos los productos obtenidos fue analizada mediante HPLC en las condiciones descritas en la Sección 2.4.1.1 de materiales y métodos del presente Capítulo (pág. 88). La identidad de los mismos fue confirmada por espectroscopía de resonancia magnética ^1H -RMN y ^{13}C -RMM, utilizando las técnicas bidimensionales HSQC y COSY, así como también por espectrometría de masas ESI-MS. Las masas teóricas de los compuestos purificados fueron calculadas utilizando la herramienta informática

ChemCalc online service (Patiny & Borel 2013), y comparadas con las obtenidas experimentalmente. Los resultados se resumen a continuación:

Bz-Arg-NHC₁₀: ¹H NMR (400 MHz, CD₃OH) : δ 7.80 – 7.76 (m, 2H, Ph, H-2', H-6'), 7.48 – 7.43 (m, 1H, Ph, H-4'), 7.40 – 7.34 (m, 2H, Ph, H-3', H-5'), 4.74 (s, 6H, NH, COCHNH), 4.46 (dd, J = 8.9, 5.5 Hz, 1H, (NH)₂CHNH), 3.18 – 3.12 (m, 2H, CH₃(CH₂)₈CH₂NHCO), 3.10 (t, J = 7.0 Hz, 2 H), 2.84 – 2.74 (m, 1H), 1.91 – 1.80 (m, 1H), 1.79 – 1.69 (m, 1H), 1.68 – 1.48 (m, 2H), 1.48 – 1.34 (m, 2 H), 1.33 – 1.11 (m, 18 H), 1.10 – 1.03 (m, 1H), 0.79 (m, 4H, CH₃, NH). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 172.45 (NHCHCONH), 168.79 (PhCO), 157.17 (Ph, C-1), 133.63 (NHC(NH)(NH₂), 131.55 (Ph, C-4), 128.14 (Ph, C-3, C-5), 127.11 (Ph, C-2, C-6), 53.47, 40.56, 39.06, 31.60, 29.26, 29.24, 29.01, 28.98, 28.93, 28.89, 26.52, 25.13, 22.28, 12.98. ESI (+)-TOF-MS [M+1] calculada para C₂₃H₄₀N₅O₂: 418.31820; hallada: 418.31889.

Bz-Arg-NHC₁₂: ¹H NMR (400 MHz, CH₃OD) δ 7.88 – 7.85 (m, 2 H, Ph, H-2', H-6'), 7.58 – 7.50 (m, 1 H, Ph, H-4'), 7.46 (ddt, J = 8.2, 6.7, 1.3 Hz, 2 H, Ph, H-3', H-5'), 4.83 (s, 6 H, NH, COCHNH), 4.54 (dd, J = 8.9, 5.7 Hz, 1 H, (NH)₂CHNH), 3.28 – 3.10 (m, 2 H), 2.89 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 2.02 – 1.56 (m, 6 H), 1.49 (dd, J = 13.8, 6.9 Hz, 2 H), 1.40 – 1.22 (m, 20 H), 1.16 (t, J = 7.1 Hz, 1 H), 0.87 (t, J = 6.8 Hz, 3 H, CH₃). ¹³C NMR (101 MHz, CH₃OD) δ 172.47 (NHCHCONH), 168.79 (PhCO), 157.17 (Ph, C-1), 133.62 (Ph, C-4), 128.13 (Ph, C-3, C-5), 127.12 (Ph, C-2, C-6), 53.50, 40.56, 39.36, 39.06, 31.62, 29.34, 29.29, 29.27, 29.26, 29.03, 28.92, 27.20, 26.52, 26.02, 25.14, 22.28, 12.99. ESI (+)-TOF-MS [M+1] calculada para C₂₅H₄₄N₅O₂: 446.34950; hallada: 446.34924.

Z-Gly-NHC₁₀: ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.49 – 7.24 (m, 5H, Ph), 6.03 (brs, 1H, O(CO)NHCH₂), 5.47 (brs, 1H, CH₂NH(CO)O), 5.13 (s, 2H, PhCH₂), 3.84 (d, J = 5.7 Hz, 2H,

NHCH₂CO), 3.24 (q, J = 6.8 Hz, 2H, CONHCH₂CH₂), 1.47 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 1.20-1.34 (m, 16 H), 0.88 (t, J = 6.4 Hz, 3H, CH₂CH₃). ¹³C RMN (126 MHz, DCl₃) δ 168.69 (CH₂CONHCH₂), 156.63 (CH₂OCONH), 136.09 (Ph, C-1), 128.58 (Ph, C-3, C-5), 128.30 (Ph, C-4), 128.11 (Ph, C-2, C-6), 67.24 (PhCH₂), 44.70 (NHCH₂CO), 39.63 (NHCH₂), 31.89, 29.55, 29.54, 29.49, 29.31, 29.27, 26.86, 22.69, 14.12 (CH₂CH₃). **ESI (+)-TOF-MS [M+1]** calculada para C₂₀H₃₃N₂O₃: 349,2481; hallada: 349,2489.

Z-Gly-NHC₁₂: ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.46 – 7.29 (m, 5H, Ph), 6.32 (brs, 1H, O(CO)NHCH₂), 5.77 (brs, 1H, CH₂NH(CO)O), 5.08 (s, 2H, PhCH₂), 3.67 (d, J = 5.7 Hz, 2H, NHCH₂CO), 3.24 (q, J = 6.8 Hz, 2H, CONHCH₂CH₂), 1.43 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 1.21-1.34 (m, 18 H), 0.88 (m, 3H, CH₂CH₃). ¹³C RMN (126 MHz, DCl₃) δ 168.69 (CH₂CONHCH₂), 156.63 (CH₂OCONH), 141.08 (Ph, C-1), 129.51 (Ph, C-3, C-5), 128.75 (Ph, C-4), 128.47 (Ph, C-2, C-6), 67.24 (PhCH₂), 43.94 (NHCH₂CO), 39.63 (NHCH₂), 31.69, 29.55, 29.54, 29.49, 29.31, 29.25, 26.86, 22.69, 14.12 (CH₂CH₃). **ESI (+)-TOF-MS [M+1]** calculada para C₂₂H₃₇N₂O₃: 377,2804; hallada: 377,2786.

Z-Ala-NHC₁₀: ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.41 – 7.28 (m, 5H, Ph), 6.09 (brs, 1H, O(CO)NHCH), 5.38 (brs, 1H, CH₂NH(CO)O), 5.10 (s, 2 H, PhCH₂), 4.35 – 4.10 (m, 1H, NHCHCH₃), 3.39 – 3.13 (m, 2H, CONHCH₂CH₂), 1.47 (d, J = 10.5 Hz, 2H, NHCH₂CH₂), 1.37 (d, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃NH), 1.33 – 1.20 (m, 14 H, 7 CH₂), 0.89 (t, J = 6.1, 3H, CH₂CH₃). ¹³C RMN (126 MHz, CDCl₃) δ 172.00 (CH₂CONHCH₂), 155.98 (CH₂OCONH), 136.16 (Ph, C-1), 128.56 (Ph, C-3, C-5), 128.24 (Ph, C-4), 128.05 (Ph, C-2, C-6), 67.03 (PhCH₂), 50.59 (CHCH₃), 39.61 (NHCH₂), 31.89, 30.09, 29.54, 29.47, 29.31, 29.27, 26.84, 25.48, 22.68, 18.66 (CH₃CH), 14.12 (CH₂CH₃). **ESI (+)-TOF-MS [M+1]** calculada para C₂₁H₃₅N₂O₃: 363,2648; hallada: 363,2639.

Z-Ala-NHC₁₂: ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) δ 7.48 – 7.18 (m, 5H, Ph), 6.04 (brs, 1H, O(CO)NHCH), 5.35 (brs, 1H, CH₂NH(CO)O), 5.11 (s, 2 H, PhCH₂), 4.24 – 4.13 (m, 1H, NHCHCH₃), 3.39 – 3.13 (q, 2H, J = 6.7 Hz, 2H, CONHCH₂CH₂), 1.46 (m, 2H, NHCH₂CH₂), 1.37 (d, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃NH), 1.37 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.26 (m, 18H), 0.89 (t, J = 6.1, 3H, CH₂CH₃). ¹³C RMN (126 MHz, DCl₃) δ 171.98 (CH₂CONHCH₂), 156.02 (CH₂OCONH), 136.16 (Ph, C-1), 128.56 (Ph, C-3, C-5), 128.25 (Ph, C-4), 128.06 (Ph, C-2, C-6), 67.04 (PhCH₂), 50.60 (CHCH₃), 39.62 (NHCH₂), 30.10, 29.66, 29.64, 29.60, 29.54, 29.48, 29.36, 29.27, 26.84, 25.48, 18.65 (CH₃CH), 14.13 (CH₂CH₃). ESI (+)-TOF-MS [M+1] calculada para C₂₃H₃₉N₂O₃: 391,2961; hallada: 391,2960.

3.5. Caracterización fisicoquímica de los productos obtenidos

3.5.1. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) por medidas de conductividad y tensión superficial

Debido a su estructura anfipática, una de las principales características de los surfactantes es su tendencia a ubicarse en las interfases en una forma orientada. Esta orientación ayuda a reducir la repulsión entre los grupos hidrofóbicos de las moléculas de surfactante y el solvente (por ejemplo, agua), produciendo como resultado una disminución en la tensión superficial del medio. Un mecanismo alternativo para reducir estas fuerzas de repulsión es la agregación de las moléculas de surfactante en estructuras macromoleculares organizadas, en un proceso llamado *micelización*. Ambos fenómenos en medio acuoso están estrechamente relacionados con el balance hidrofóbico-hidrofílico de la molécula, siendo favorecidos por el aumento del carácter hidrofóbico y estando estrechamente relacionados con un aumento en la energía libre del agua generado al perturbar su estructura.

Luego de su adición a una solución acuosa, la estructura anfifílica de las moléculas de surfactante (*monómeros*) permite que las mismas se ubiquen en la interfase aire-agua, disminuyendo significativamente la tensión superficial del sistema. Este valor de tensión superficial disminuye a medida que la concentración del surfactante aumenta, alcanzando un mínimo cuando la concentración del tensioactivo llega a un valor crítico. A partir de este punto, si la concentración del surfactante continúa aumentando, la tensión superficial se mantendrá constante y las moléculas del surfactante comenzarán a agruparse en *micelas* (Figura 2.3.9). Las micelas son agregados de tipo coloidal en la que las porciones hidrofóbicas de las moléculas constituyen el núcleo de los mismos, mientras que las cabezas polares se ubican en la interfase micela-agua. La concentración del surfactante a la que los monómeros comienzan a formar estos agregados, llamada *concentración micelar crítica (CMC)*, es una propiedad importante y característica para cada surfactante.

Si bien las medidas de tensión superficial constituyen la principal metodología para la determinación de la concentración micelar crítica, la misma puede ser calculada por otras técnicas, como cambios en el espectro UV-visible de la benzoil-acetona (BzA), espectroscopía de fluorescencia utilizando pireno como sonda, y medidas de conductividad, entre otras (Dominguez et al. 1997).

Teniendo en cuenta la estructura de los productos obtenidos, formada por una cabeza polar unida a una cola hidrocarbonada, se estudiaron las propiedades tensioactivas de los mismos. En este sentido, se determinó la capacidad de los productos sintetizados para reducir la tensión superficial del agua. Las alquilamidas derivadas de Ala y Gly no mostraron propiedades tensioactivas, probablemente debido a su baja

solubilidad acuosa, probada por HPLC según el método del estándar externo. Considerando este resultado, se decidió no sintetizar a mayor escala los derivados de Leu, debido a su mayor carácter hidrofóbico.

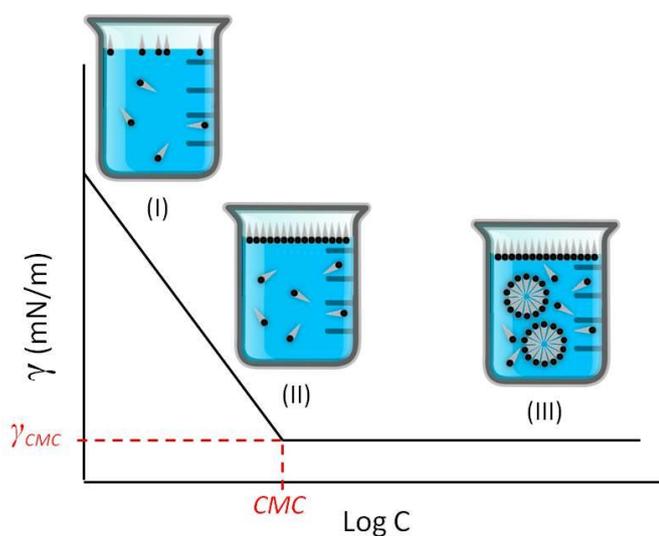


Figura 2.3.9. Representación esquemática de la curva semilogarítmica típica de tensión superficial (γ) vs concentración de surfactante (C_s): (I) por debajo de la concentración micelar crítica (CMC) las moléculas de tensioactivo permanecen como monómeros en solución y γ disminuye a medida que C_s aumenta; (II) la CMC corresponde a la máxima concentración de monómeros libres, registrándose un mínimo de tensión superficial; (III) un aumento en C_s no provoca cambios significativos en la tensión superficial y las moléculas de surfactante se agrupan formando agregados denominados micelas, la concentración de monómeros en solución permanece constante.

Por otro lado, los compuestos derivados de arginina fueron capaces de reducir la tensión superficial del agua a un valor constante. Teniendo esto en cuenta, se llevó a cabo la determinación de la concentración micelar crítica (CMC) por medidas conductimétricas y tensiométricas. En cada caso, se construyeron los gráficos de conductividad o tensión superficial (γ) en función de la concentración del surfactante

(Bz-Arg-NHC_n) en solución acuosa a 25°C (Figuras 2.3.10 y 2.3.11). Los valores de CMC fueron considerados como la concentración de cada surfactante en el punto de intersección de las dos porciones lineales de estos gráficos. Los resultados se resumen en la Tabla 2.3.3. Como se puede observar, por las distintas metodologías se obtuvieron valores diferentes de CMC. En ambos casos Bz-Arg-NHC₁₂ mostró una CMC menor que la de Bz-Arg-NHC₁₀, lo que se explica por el largo de la cadena hidrocarbonada: a mayor hidrofobicidad de la molécula, mayor tendencia a formar agregados, por lo que menor será su CMC.

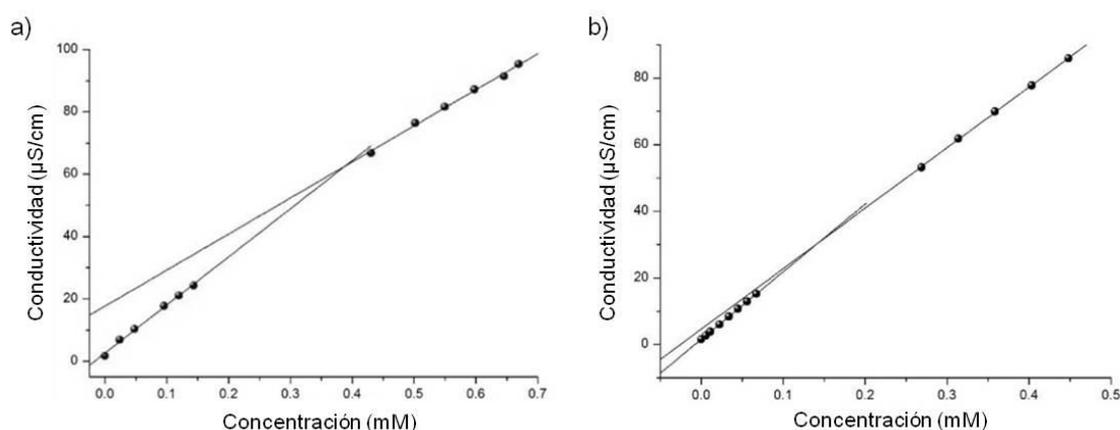


Figura 2.3.10. Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$) en función de la concentración (mM) de a) Bz-Arg-NHC₁₀ y b) Bz-Arg-NHC₁₂.

Tabla 2.3.3. CMC de los surfactantes derivados de arginina obtenida por medidas de conductividad y tensión superficial.

Compuesto	CMC	
	Conductimetría (mM)	Tensión superficial (mM)
Bz-Arg-NHC ₁₀	0,4 ± 0,3	0,23 ± 0,04
Bz-Arg-NHC ₁₂	0,13 ± 0,10	0,085 ± 0,01

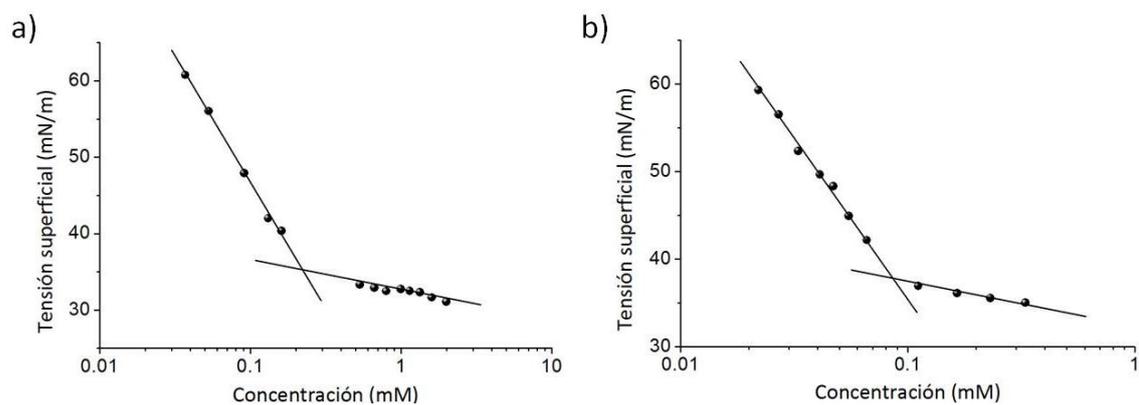


Figura 2.3.11. Curvas semilogarítmicas de tensión superficial (mN/m) en función de la concentración (mM) de a) Bz-Arg-NHC₁₀ y b) Bz-Arg-NHC₁₂.

Se ha reportado la síntesis de surfactantes derivados de arginina con estructura similar a la de Bz-Arg-NHC_n (Morán et al. 2001a; Morán et al. 2004; Infante et al. 2004; Pinazo et al. 2016). Los mismos pueden agruparse en dos series de compuestos: *N*^α-acil-L-arginina-metil ésteres (Figura 2.3.12, Serie II) y arginina-*N*-alquilamidas (Figura 2.3.12, serie III). Dentro de estas familias de compuestos, aquellos con una longitud de cadena hidrocarbonada de 12 carbonos, arginina-*N*-lauril amida (Arg-NHC₁₂, ALA) y *N*^α-lauril-L-arginina-metil éster (LAM), presentan un alto grado de analogía con Bz-Arg-NHC₁₂. Aplicando el mismo criterio a los derivados de 10 carbonos, arginina-*N*-caproil amida (Arg-NHC₁₀, ACA) y *N*^α-caproil-L-arginina-metil éster (CAM) serían los análogos a Bz-Arg-NHC₁₀.

Puede observarse una gran similitud estructural entre los compuestos de la serie III y Bz-Arg-NHC_n, siendo la principal diferencia la desprotección del grupo amino del carbono α perteneciente a la arginina, lo que le otorga a los surfactantes de la serie III una doble carga positiva. En el caso de Bz-Arg-NHC_n, el grupo α-amino del residuo de arginina se encuentra unido a un grupo benzoilo, altamente hidrofóbico. Con respecto a

la serie II, la diferencia estructural con Bz-Arg-NHC_n es más notoria, ya que es el grupo α -amino de la arginina el que participa en el enlace amida que une el núcleo polar a la cadena alifática hidrocarbonada. Asimismo, en esta serie de compuestos el grupo carboxilo de la arginina forma un enlace éster con un metilo. En este caso, la principal similitud de los surfactantes pertenecientes a la serie II con Bz-Arg-NHC_n radica en la presencia de una única carga positiva en el núcleo polar.

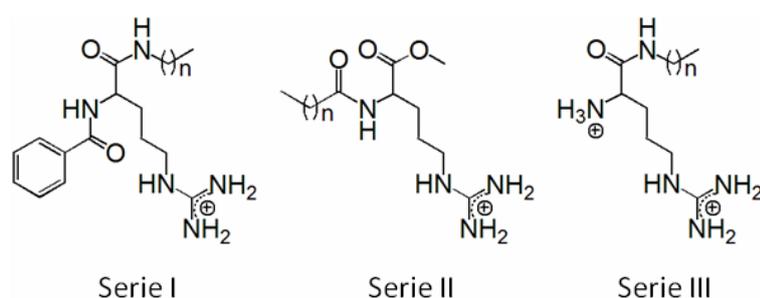


Figura 2.3.12. Comparación de las estructuras de las series de surfactantes derivados de arginina. Serie I: N^α-benzoil-L-arginina-alkilamidas; Serie II: N^α-acil-L-arginina-metil ésteres; Serie III: arginina-N-alkilamidas.

Numerosos estudios se han llevado a cabo acerca de las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos (Piera et al. 1998; Morán et al. 2001a; Infante et al. 2004; Pinazo et al. 2011; Pinazo et al. 2016). La Tabla 2.3.4 resume algunas de ellas. En el caso de la CMC, dentro de cada serie de compuestos pudo observarse el mismo comportamiento: los derivados con colas hidrofóbicas de 12 carbonos de largo presentaron valores de CMC menores que sus contrapartes de 10 carbonos. Asimismo pudo establecerse el siguiente orden de CMC entre las tres series de compuestos: *serie I < serie II < serie III*.

La causa probable de los mayores valores de CMC registrados para ALA y ACA probablemente sea la presencia de dos cargas positivas por molécula (Figura 2.3.12 serie III), lo cual incrementa su hidrofiliidad y, en consecuencia, su solubilidad acuosa, permitiendo la presencia de una mayor cantidad de monómeros de surfactante en el medio acuoso antes de la formación de micelas. Por otro lado, los menores valores de CMC obtenidos para Bz-Arg-NHC_n respecto de los reportados para CAM y LAM pueden ser atribuidos a la presencia del grupo hidrofóbico benzoilo en la serie I, lo cual disminuye su solubilidad acuosa (estimada por HPLC según el método del estándar externo en 0,8 mg/ml –1,91 mM– para Bz-Arg-NHC₁₀ y 0,2 mg/ml –0,45 mM– para Bz-Arg-NHC₁₂) y aumenta su tendencia a autoagregarse en medio acuoso (Vives et al. 1999).

Tabla 2.3.4. Propiedades fisicoquímicas de distintos surfactantes derivados de arginina (Pinazo et al. 2011).

Surfactante	Serie II		Serie III		C ₃ (LA) ₂
	LAM	CAM	ALA	ACA	
N° de carbonos ^(a)	12	10	12	10	12
Cargas positivas	1	1	2	2	2
PM	406,6	378,6	414,46	386,41	822,6
Solubilidad (mg/ml)	92	ND	322,2	343,7	90
CMC (mM)	6,0	16,0	1,8	26,0	0,005 ^(b) 0,5 ^(c)

^(a) Número de carbonos de la cadena hidrofóbica unida a la arginina. ^(b) CMC₁, determinada por medidas de tensión superficial. ^(c) CMC₂, determinada por medidas de conductividad.

Pérez et al. (1996) ha informado la síntesis de surfactantes géminis derivados de arginina con estructura similar a LAM, N^α, N^ω -bis(N^α -lauroil-arginina)- α, ω -dialquilamidas ó $C_n(LA)_2$ (Figura 2.3.13), así como el estudio mediante diferentes metodologías de la CMC de esta familia de compuestos. A partir de los resultados se infirió la existencia de dos valores de CMC, lo que sugiere la formación de diferentes tipos de agregados (Pinazo et al. 2011). La CMC más baja (CMC_1), con valores comprendidos entre 0,002 y 0,005 mM, fue detectada por medidas de tensión superficial. Por su parte, las determinaciones conductimétricas evidenciaron un segundo valor de CMC (CMC_2) aproximadamente 2 órdenes de magnitud mayor que la CMC_1 , con valores entre 0,3 y 0,6 mM. El menor valor de CMC estaría relacionado con la formación de agregados no globulares de bajo número de agregación (moléculas por agregado), mientras que a concentraciones iguales o mayores que la CMC_2 existe una fuerte evidencia de la formación de estructuras globulares tipo micela (Pinazo et al. 2011). A modo de ejemplo, en la Tabla 2.3.4 se incluyen algunas de las propiedades fisicoquímicas reportadas para N^α, N^ω -bis(N^α -lauroil-arginina)- α, ω -dipropilamida ó $C_3(LA)_2$.

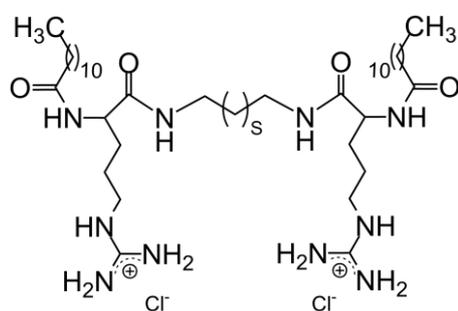


Figura 2.3.13. Estructura química del surfactante tipo géminis N^α, N^ω -bis(N^α -lauroil-arginina) α, ω -dialquilamida ó $C_n(LA)_2$, donde n es el número de átomos de carbono de la cadena espaciadora ($n = s + 2$).

A pesar de las diferencias estructurales, los valores de CMC registrados para los surfactantes gémis $C_n(LA)_2$ fueron del orden de los observados para Bz-Arg-NHC_n, y ambos a su vez menores que los registrados para LAM. En este contexto, las diferencias encontradas en los valores de CMC de Bz-Arg-NHC_n determinados por las distintas metodologías podrían atribuirse a la formación de diversos tipos de agregados.

3.5.2. Determinación de los parámetros de superficie de Bz-Arg-NHC_n

Las medidas de tensión superficial permitieron la investigación de otros parámetros importantes relacionados con las propiedades de superficie de los surfactantes Bz-Arg-NHC_n. La máxima concentración superficial de exceso o adsorción de saturación (Γ_{max}) y el área mínima por molécula (A_{min}) en la interfase aire/agua se calcularon como se describe en la Sección 2.7.1.1 del presente Capítulo (pág. 94). La Tabla 2.3.5 resume estos parámetros junto con γ_{CMC} y pC_{20} , los cuales se utilizan normalmente como indicadores de la eficacia y la eficiencia de adsorción de los surfactantes respectivamente. Menores valores de γ_{CMC} se relacionan con una mayor efectividad del tensioactivo en la reducción de la tensión superficial. En el mismo sentido, cuanto mayor sea el valor de pC_{20} , más eficiente es el surfactante, es decir, una menor concentración del mismo es necesaria para disminuir la tensión superficial del agua pura en 20 unidades. Los valores de γ_{CMC} calculados para Bz-Arg-NHC_n se encontraron en el rango de los 30-37 mN/m, considerado típico para los tensioactivos cuaternarios, incluyendo los derivados de arginina (Infante et al. 2009). Según los parámetros calculados para ambos compuestos, Bz-Arg-NHC₁₂ posee mejores propiedades de superficie que su contraparte de 10 carbonos, hecho que puede atribuirse a la presencia de dos grupos metileno adicionales en su cola hidrofóbica. Este

comportamiento puede explicarse según la *regla de Traube*, la cual establece que en una serie homóloga de tensioactivos, la concentración molar requerida para producir una disminución equivalente de la tensión superficial disminuye tres veces por la adición de un grupo metileno en la cola hidrocarbonada de la molécula (Florence & Atwood, 2006).

Tabla 2.3.5. Parámetros de superficie de Bz-Arg-NHC_n (surfactantes derivados de arginina de simple cadena) a 25°C.

n	γ_{CMC} (mN.m ⁻¹)	pC ₂₀	$\partial\gamma/\partial\log C$	Γ_{max} (x 10 ⁻¹⁰ mol.cm ⁻²)	A _{min} (Å ²)
10	34,0	3,17	-34,547	3,03	54,8
12	36,8	4,47	-40,306	3,53	47,0

La cantidad de surfactante adsorbido por unidad de área en la interfase saturada (Γ_{max}) depende no sólo de la estructura química de la molécula del surfactante y los grupos funcionales presentes, sino también de su orientación en la interfase. Por otra parte, la eficacia de la adsorción está relacionada con el área interfacial ocupada por molécula del surfactante (A_{min}), es decir, cuanto menor sea la superficie transversal del surfactante en la interfase, mayor será su eficacia de adsorción. Los valores de A_{min} encontrados para Bz-Arg-NHC_n (alrededor 50 Å²) fueron menores que los reportados para los derivados de las series II (62-67 Å²) y III (62-90 Å²) (Infante et al. 2004). Nuevamente, si bien todos los compuestos mencionados se encuentran cargados positivamente, los menores valores de A_{min} obtenidos en el caso de Bz-Arg-NHC_n podrían atribuirse a la presencia del grupo benzoilo unido al grupo α-amino de la arginina. Teniendo en cuenta este hecho, podría concluirse que el A_{min} para los tensioactivos

derivados de arginina estaría más afectada por la estructura química de la porción hidrofílica de la molécula que por la hidrofóbica. Para probar esta hipótesis se compararon las A_{\min} calculadas para Bz-Arg-NHC₁₂ y el reportado para ALA, que fueron 47 y 90 Å² respectivamente. En el caso del segundo compuesto, la presencia de dos grupos catiónicos por molécula aumenta las fuerzas de repulsión electrostáticas inter- e intramoleculares, lo cual tiende a separar los monómeros en la interfase, aumentando por lo tanto su A_{\min} .

Dentro de la serie Bz-Arg-NHC_n, el A_{\min} calculado para el derivado de 12 carbonos fue ligeramente menor que el parámetro correspondiente para Bz-Arg-NHC₁₀ (Tabla 2.3.5). Esto podría atribuirse a la mayor hidrofobicidad de Bz-Arg-NHC₁₂, lo que favorecería que las moléculas interactúen más estrechamente entre sí que en el caso de Bz-Arg-NHC₁₀, formando un arreglo más compacto en la interfase.

3.5.3. Cálculo del parámetro de empaquetamiento (SPP)

Las moléculas de los surfactantes en solución pueden formar agregados de tamaños y formas variables (esferas, elipsoides, cilindros, etc.), dependiendo de las características fisicoquímicas de los monómeros. En el caso de los tensioactivos derivados de aminoácidos, Pinazo et al. (2011) sugirió que los homólogos con cadenas hidrocarbonadas más cortas tienden a formar micelas esféricas, mientras que aquellos con cadenas de 14-16 átomos de carbono tienden a formar agregados cilíndricos. La forma en la que las moléculas de surfactante se agrupan puede ser predicha por el parámetro de empaquetamiento (SPP, del inglés *surfactant packing parameter*), definido por la Ecuación (3):

$$SPP = v/A_o \quad (3)$$

donde v es el volumen de la cola hidrofóbica, l es la longitud de la cadena hidrocarbonada en conformación *all-trans* y A_o es el área ocupada por la cabeza polar, la cual puede aproximarse con el valor de A_{min} calculado a partir de las medidas de tensión superficial. Los valores l y v a su vez pueden ser estimados de acuerdo a Tandford (1980) según las siguientes ecuaciones:

$$l \approx (0,154 + 0,1265 n) \text{ nm} \quad (4)$$

$$v \approx (27,4 + 26,9 n) \times 10^{-3} \text{ nm}^3 \quad (5)$$

donde n es el número de carbonos de la cadena hidrofóbica. En general, cuanto mayor sea el valor de SPP, menor será la curvatura de los agregados: valores de SPP entre 0,33 y 0,50 denotan una conformación cilíndrica, mientras que para $SPP < 0,33$ las micelas tienden a adoptar formas esféricas. Los valores de SPP calculados para Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ fueron 0,38 y 0,45 respectivamente, prediciendo la formación de micelas cilíndricas en ambos casos. Pinazo et al. (2011) reportó la agregación del surfactante LAM en micelas esféricas, confirmando la predicción basada en el cálculo del SPP (0,31) por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), medidas de dispersión de luz (*light scattering*) y dispersión de rayos-X en ángulo pequeño (SAXS). Estos resultados establecieron motivos razonables para suponer que las predicciones basadas en el parámetro SPP serían precisas.

3.5.4. Análisis de la morfología de los agregados de Bz-Arg-NHC_n por microscopía de fuerza atómica (AFM)

Una de las principales aplicaciones de la *microscopía de fuerza atómica* (AFM) es el estudio de la topografía a nano- y microescala, permitiendo la visualización de procesos como la cristalización/fusión, difusión, adsorción, asociaciones moleculares e incluso reacciones químicas. En este caso, se estudió el comportamiento de agregación de Bz-Arg-NHC_n en aire y celda fluida, obteniéndose los perfiles de altura en cada caso (Figura 2.3.13). El modo de contacto intermitente (*tapping mode*) empleado en los análisis permite el contacto de la punta con la muestra sólo por periodos cortos de tiempo, minimizando el daño ocasionado a la misma.

La adsorción de las moléculas de surfactante en la mica es producida principalmente por interacciones electrostáticas entre la cabeza polar cargada positivamente del surfactante y la superficie de la mica, dotada con carga negativa. Una vez neutralizada la carga de la mica, la adsorción procede a través de interacciones hidrofóbicas entre las colas hidrocarbonadas de las moléculas de surfactante ya adsorbidas y las de los monómeros en solución. En todos los casos, los perfiles obtenidos evidenciaron la presencia de mono- y bicapas, con un promedio de alturas de entre 3 y 5 nm respectivamente. Las imágenes obtenidas en el caso de los ensayos en aire (Figuras 2.3.14a y 2.3.14c) evidenciaron la presencia de regiones alternadas de mica libre y bicapas de surfactante. Tanto en aire como en celda fluida se observó la adsorción de agregados de los surfactantes por encima de las bicapas, con tamaños entre 5 y 90 nm para Bz-Arg-NHC₁₀, y entre 12 y 40 nm para Bz-Arg-NHC₁₂. La observación de agregados con forma cilíndrica en el caso de las imágenes adquiridas en celda fluida para

Bz-Arg-NHC_n (Figuras 2.3.14b y 2.3.14d), apoya las predicciones basadas en el parámetro SPP descritas anteriormente.

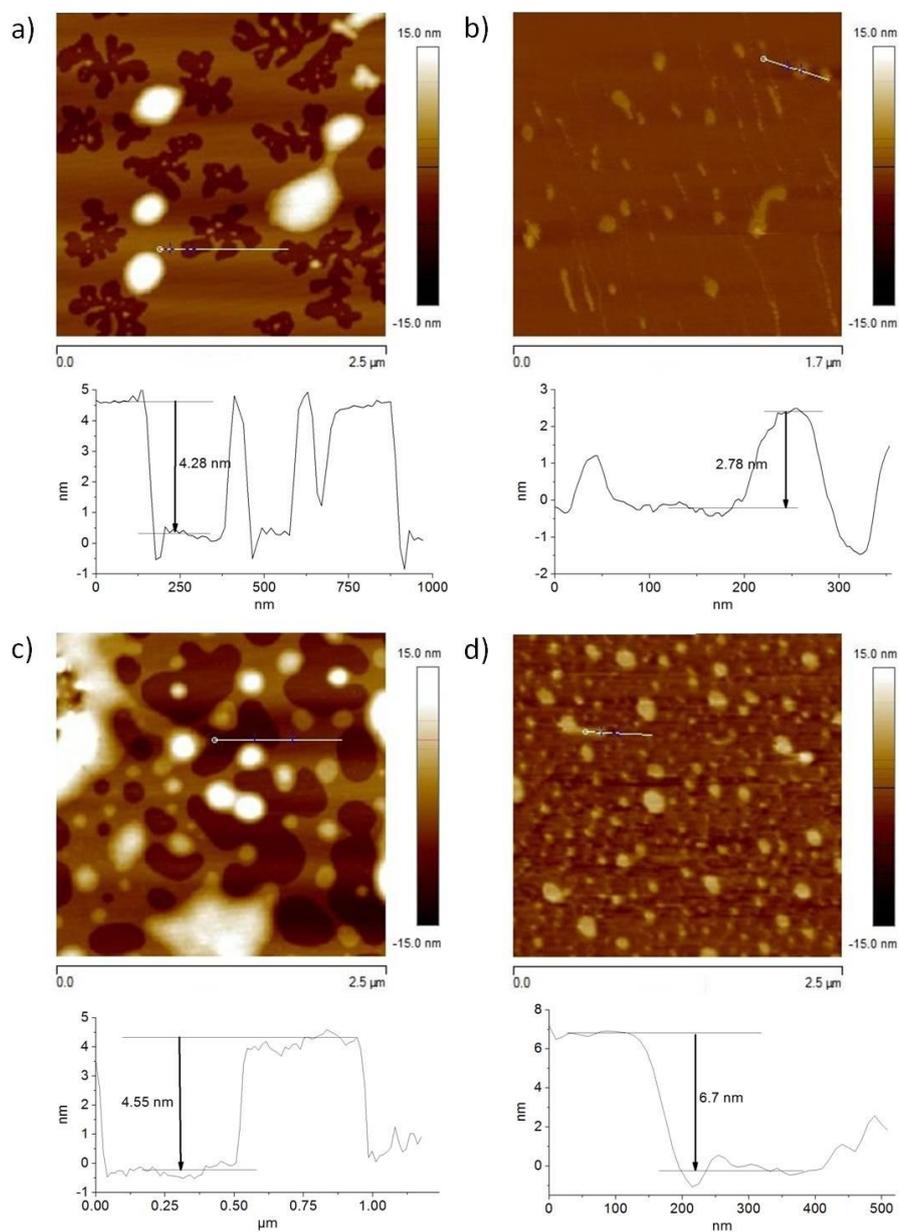


Figura 2.3.14. Imágenes de AFM obtenidas en modo de contacto intermitente para (a, b) Bz-Arg-NHC₁₀ y (c, d) Bz-Arg-NHC₁₂, en aire (a, c) y en celda fluida (b, d). Las imágenes se encuentran representadas en un eje z de 30 nm, representado por la intensidad del color. Las figuras al pie de cada imagen representan el perfil de altura de la sección señalada con una línea blanca.

4. Conclusiones

Se llevaron a cabo eficientemente reacciones de síntesis de alquilamidas y alquilésteres derivados de aminoácidos *N*-protegidos utilizando peptidasas de origen vegetal (papaína y araujaína) adsorbidas sobre poliamida como biocatalizadores.

Papaína adsorbida sobre poliamida demostró ser el biocatalizador más eficiente en las condiciones ensayadas, en tanto que araujaína produjo rendimientos levemente más bajos.

Para la síntesis de las alquilamidas derivadas de Gly y Leu, debido a la formación de un aducto insoluble en la mezcla de reactivos, fue necesario cambiar la estrategia de síntesis de un control termodinámico a uno cinético, para lo cual el dador de acilo fue activado mediante la esterificación de su función carboxilo con un grupo metilo.

La síntesis de los ésteres derivados de arginina mostró bajos rendimientos en las condiciones ensayadas.

La purificación de Bz-Arg-NHC_n por extracción del medio de reacción con la mezcla MeOH:H₂O, seguida de una cromatografía de intercambio catiónico empleando como fase móvil solventes de baja toxicidad y bajo costo, permitió obtener los productos puros en cantidades del orden de los miligramos.

La purificación de Z-AA-NHC_n (AA = Ala, Gly) por extracción, seguida de una cromatografía en sílica, permitió obtener estos productos puros en cantidades del orden de los miligramos para su caracterización.

La obtención de los productos en cantidades semipreparativas permitió la identificación y confirmación de su estructura por espectrometría de masas (ESI-MS) y

distintas técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (^1H -RMN, ^{13}C -RMN y 2D HSQC RMN).

Las alquilamidas derivadas de Ala y Gly no mostraron propiedades tensioactivas, probablemente debido a su baja solubilidad acuosa. Esto llevó a que no se llevara a cabo la síntesis de los derivados de Leu a mayores escalas ni se realizaran otro tipo de determinaciones para estos compuestos.

Los derivados de arginina (Bz-Arg-NHC_n) mostraron propiedades tensioactivas, siendo capaces de reducir la tensión superficial del agua a un valor constante y mostrando valores de CMC definidos.

Las CMC de los compuestos derivados de arginina fueron determinadas tanto por medidas de tensión superficial como por conductimetría. Los valores más bajos de CMC obtenidos en el segundo caso sugieren la formación de diferentes tipos de agregados.

La baja solubilidad acuosa, así como los bajos valores de CMC hallados para Bz-Arg-NHC_n se deben a las fuertes interacciones hidrofóbicas favorecidas por la presencia del grupo benzoilo unido a la cabeza polar de las moléculas de los surfactantes.

Análisis por microscopía de fuerza atómica revelaron la formación de agregados cilíndricos para los surfactantes derivados de arginina, apoyando las predicciones basadas en el parámetro SPP.

Referencias

- Adlercreutz P (1991) On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. *Eur J Biochem* 199:609–614. doi: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16161.x
- Andrews AT, Alichanidis E (1990) The plastein reaction revisited: Evidence for a purely aggregation reaction mechanism. *Food Chem* 35:243–261. doi: 10.1016/0308-8146(90)90015-V
- Australian Weeds Committee (2017). Moth Plant (*Araujia sericifera*) fact sheet. Department of the Environment and Energy, Australian Government. http://www.environment.gov.au/cgi-bin/biodiversity/invasive/weeds/weeddetails.pl?taxon_id=46803. Acceso online: 21/02/2017
- Bordusa F (2002) Proteases in Organic Synthesis †. *Chem Rev* 102:4817–4868. doi: 10.1021/cr010164d
- Borsook H (1953) Peptide Bond Formation. *Adv. Prot. Chem.* 8:127
- Brenner M, Huber W (1953) Herstellung von α -Aminosäureestern durch Alkoholyse der Methylester. *Helv Chim Acta* 36:1109–1115. doi: 10.1002/hlca.19530360522
- Castillo Expósito JA (2006) Studies on antimicrobial activity of arginine-based surfactants and chemo- enzymatic synthesis of novel amphiphiles based on L-arginine and D-fagomine. Universidad Autónoma de Barcelona
- Castro M, Griffiths D, Patel A, et al (2004a) Effect of chain length on transfection properties of spermine-based gemini surfactants. *Org Biomol Chem* 2:2814–20. doi: 10.1039/B410240A
- Castro M, Griffiths D, Patel A, et al (2004b) Effect of chain length on transfection properties of spermine-based gemini surfactants. *Org Biomol Chem* 2:2814. doi: 10.1039/b410240a
- Clapés P, Morán C, Infante MR (1999) Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants. *Biotechnol Bioeng* 63:333–43. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19990505)63:3<333::AID-BIT10>3.0.CO;2-G

- Dominguez A, Fernandez A, Gonzalez N, et al (1997) Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *J Chem Educ* 74:1227. doi: 10.1021/ed074p1227
- Erez E, Fass D, Bibi E (2009) How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* 459:371–8. doi: 10.1038/nature08146
- Fité M, Clapés P, López-Santín J, et al (2002) Integrated process for the enzymatic synthesis of the octapeptide PhAcCCK-8. *Biotechnol Prog* 18:1214–20. doi: 10.1021/bp0256465
- Florence AT, Attwood D (2006) *Physicochemical principles of pharmacy*, 4th edn. Pharmaceutical Press, London
- Gutiérrez JB (2000) *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*. Díaz de Santos, Madrid, España
- Hanefeld U, Gardossi L, Magner E (2009) Understanding enzyme immobilisation. *Chem Soc Rev* 38:453–68. doi: 10.1039/b711564b
- Infante MR, Pérez L, Pinazo A, et al (2004) Amino acid-based surfactants. *Comptes Rendus Chim* 7:583–592. doi: 10.1016/j.crci.2004.02.009
- Infante MR, Pérez L, Morán C, Pons R, Pinazo A (2009) Synthesis, aggregation properties, and applications of biosurfactants derived from arginine. En: *Biobased surfactants and detergents. Synthesis, properties and applications*. D.G. Hayes, D. Kitamoto, D.K.Y. Solaiman, R.D. Ashby Eds. AOCS Press, Urbana, Illinois. pp. 351–387
- Klein JU, Čerovský V (2009) Protease-catalyzed synthesis of Leu-enkephalin in a solvent-free system. *Int J Pept Protein Res* 47:348–352. doi: 10.1111/j.1399-3011.1996.tb01083.x
- Lang A, Hatscher C, Kuhl P (2007) Papain-catalysed synthesis of Z-l-aminoacyl-antipyrine amides from Z-protected amino acid esters and 4-aminoantipyrine. *Tetrahedron Lett* 48:3371–3374. doi: 10.1016/j.tetlet.2007.03.067
- Lartigue DJ (1975) Characteristics of free vs. immobilized enzymes. En: *Messing RA (ed) Immobilized enzymes for industrial reactors*. Academic Press, New York, pp 125–127

- MEROPS (2016) Families of Proteolytic Enzymes. http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/family_index?type=P. Acceso online: 30/12/2016
- Messing RA (1975) Introduction and general history of immobilized enzymes. En: Messing RA (ed) Immobilized enzymes for industrial reactors. Academic Press, New York, pp 2–3
- Miletić N, Nastasović A, Loos K (2012) Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications. *Bioresour Technol* 115:126–35. doi: 10.1016/j.biortech.2011.11.054
- Mitin Y V., Braun K, Kuhl P (1997) Papain catalyzed synthesis of glyceryl esters of N-protected amino acids and peptides for the use in trypsin catalyzed peptide synthesis. *Biotechnol Bioeng* 54:287–290. doi: 10.1002/(SICI)1097-0290(19970505)54:3<287::AID-BIT9>3.0.CO;2-B
- Morán C, Clapés P, Comelles F, et al (2001a) Chemical Structure/Property Relationship in Single-Chain Arginine Surfactants. *Langmuir* 17:5071–5075. doi: 10.1021/la010375d
- Morán C, Infante MR, Clapés P (2001b) Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 1. Enzymatic preparation of rac-1-O-(N^α-acetyl-L-aminoacyl)glycerol derivatives. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1:2063–2070. doi: 10.1039/b103132p
- Morán MC, Pinazo A, Pérez L, et al (2004) “Green” amino acid-based surfactants. *Green Chem* 6:233–240. doi: 10.1039/b400293h
- Morcelle SR (2004). Proteasas de látex de *Funaria 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 SR, Barberis S, Priolo N, et al (2006) Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and *Funaria clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe. *J Mol Catal B Enzym* 41:117–124. doi: 10.1016/j.molcatb.2006.05.007

- Morcelle SR, Liggieri CS, Bruno MA, et al (2009) Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants. *J Mol Catal B Enzym* 57:177–182. doi: 10.1016/j.molcatb.2008.08.013
- Morcelle SR, Cánepa AS, Padró JM, et al (2013) Syntheses of dipeptide alcohols and dipeptide aldehyde precursors catalyzed by plant cysteine peptidases. *J Mol Catal B Enzym* 89:130–136. doi: 10.1016/j.molcatb.2012.12.004
- Nakaoka H, Miyajima Y, Morihara K (1998) Papain-catalyzed synthesis of aspartame precursor: A comparison with thermolysin. *J Ferment Bioeng* 85:43–47. doi: 10.1016/S0922-338X(97)80351-0
- Narai-Kanayama A, Koshino H, Aso K (2008) Mass spectrometric and kinetic studies on slow progression of papain-catalyzed polymerization of L-glutamic acid diethyl ester. *Biochim Biophys Acta* 1780:881–91. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.03.009
- Nielsen PM, Olsen HS (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 WD, Arribére MC, Morcelle Del Valle S, et al (2001) Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J Protein Chem* 20:317–325. doi: 10.1023/A:1010953718679
- Obregón WD (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.
- Ota S, Moore S, Stein WH (1964) Preparation and Chemical Properties of Purified Stem and Fruit Bromelains *. *Biochemistry* 3:180–185. doi: 10.1021/bi00890a007
- Patiny L, Borel A (2013) ChemCalc: a building block for tomorrow's chemical infrastructure. *J Chem Inf Model* 53:1223–8. doi: 10.1021/ci300563h
- Pérez L, Torres JL, Manresa A, et al (1996) Synthesis, Aggregation, and Biological Properties of a New Class of Gemini Cationic Amphiphilic Compounds from Arginine, bis(Arg) †. *Langmuir* 12:5296–5301. doi: 10.1021/la960301f

- Pérez L, Pinazo A, Teresa García M, et al (2009) Cationic surfactants from lysine: Synthesis, micellization and biological evaluation. *Eur J Med Chem* 44:1884–1892. doi: 10.1016/j.ejmech.2008.11.003
- Pérez L, Pinazo A, Pons R, Infante M (2014) Gemini surfactants from natural amino acids. *Adv Colloid Interface Sci* 205:134–55. doi: 10.1016/j.cis.2013.10.020
- Piera E, Comelles F, Erra P, Infante MR (1998) New alquil amide type cationic surfactants from arginine. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 335–342. doi: 10.1039/a705565j
- Pinazo A, Pons R, Pérez L, Infante MR (2011) Amino acids as raw material for biocompatible surfactants. *Ind Eng Chem Res* 50:4805–4817. doi: 10.1021/ie1014348
- Pinazo A, Manresa MA, Marques AM, et al (2016) Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. *Adv Colloid Interface Sci* 228:17–39. doi: 10.1016/j.cis.2015.11.007
- Priolo NS, López LMI, Arribére MC, Natalucci CL, Caffini NO (1991) New purified plant proteinases for the food industry. *Acta Alimentaria*, 20:189-196
- Priolo N, Del Valle SM, Arribére MC, et al (2000) Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J Protein Chem* 19:39–49. doi: 10.1023/A:1007042825783
- Schechter I, Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27:157–162. doi: 10.1016/S0006-291X(67)80055-X
- Tandford C (1980) *The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes*, Wiley-Interscience, New York
- Tischer W, Wedekind F (1999) *Biocatalysis - From Discovery to Application*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- Torre JL, Piera E, Infante MR, Clapés P (2001) Purification of non-toxic, biodegradable arginine-based gemini surfactants, bis(Arg), by ion exchange chromatography. *Prep Biochem Biotechnol* 31:259–74. doi: 10.1081/PB-100104908
- Valivety R, Jauregi P, Gill I, Vulfson E (1997) Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants. *J Am Oil Chem Soc* 74:879–886. doi: 10.1007/s11746-997-0232-8

Vives M., Infante M., Garcia E, et al (1999) Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants. *Chem Biol Interact* 118:1–18.
doi: 10.1016/S0009-2797(98)00111-2

Walsh KA, Wilcox PE (1970) Proteolytic Enzymes. *Methods Enzymol*, 19:31–41

CAPÍTULO 3

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE TENSIOACTIVOS DERIVADOS DE ARGININA:
DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA**

Índice capítulo 3

1. Introducción	137
1.1. <i>Bacterias</i>	138
1.1.1. <i>La envoltura celular de las bacterias Gram positivas</i>	139
1.1.2. <i>La envoltura celular de las bacterias Gram negativas</i>	140
1.1.3. <i>La membrana citoplasmática bacteriana</i>	142
1.2. <i>Hongos</i>	143
1.2.1. <i>La envoltura celular de los hongos</i>	145
1.3. <i>Control del crecimiento microbiano</i>	146
1.3.1. <i>Surfactantes catiónicos como antimicrobianos: modo de acción</i>	151
2. Materiales y métodos	153
2.1. <i>Reactivos</i>	153
2.2. <i>Medios de cultivo</i>	153
2.3. <i>Microorganismos</i>	153
2.3.1. <i>Bacterias</i>	153
2.3.2. <i>Hongos</i>	154
2.4. <i>Actividad antibacteriana</i>	154
2.4.1. <i>Determinación de la concentración inhibitoria y bactericida mínima (CIM y CBM)</i>	154
2.4.2. <i>Efecto de los surfactantes en la supervivencia de patógenos</i>	156
2.5. <i>Actividad antifúngica</i>	157
2.5.1. <i>Preparación de soluciones stock de los surfactantes</i>	157
2.5.2. <i>Preparación de las suspensiones de esporas/microconidios</i>	157
2.5.3. <i>Preparación de la suspensión de Candida albicans</i>	157
2.5.4. <i>Ensayos de inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos</i>	158
2.5.5. <i>Ensayos de inhibición de la germinación de esporas de hongos fitopatógenos</i>	159
2.5.6. <i>Estudio del mecanismo de actividad antifúngica de Bz-Arg-NHC_n contra esporas de hongos fitopatógenos</i>	160
2.5.6.1. <i>Evaluación de la integridad de la membrana por microscopía de fluorescencia</i>	160
2.5.6.2. <i>Estudio de la inserción de los surfactantes en monocapas lipídicas</i> ...	160

2.5.6.3. <i>Detección in situ de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)</i>	161
2.5.7. <i>Ensayos de inhibición de la germinación de microconidios de hongos dermatofitos</i>	162
2.5.8. <i>Ensayos de inhibición del crecimiento de Candida albicans</i>	163
3. Resultados y discusión	165
3.1. <i>Actividad antibacteriana</i>	165
3.1.1. <i>Efecto inhibitorio de Bz-Arg-NHC_n</i>	165
3.1.2. <i>Efecto de los surfactantes sobre la supervivencia de patógenos</i>	168
3.2. <i>Actividad antifúngica</i>	170
3.2.1. <i>Estudio de la actividad antifúngica de Bz-Arg-NHC_n contra hongos fitopatógenos</i>	170
3.2.1.1. <i>Inhibición del crecimiento vegetativo de hongos fitopatógenos</i>	171
3.2.1.2. <i>Inhibición de la germinación de esporas de hongos fitopatógenos</i>	173
3.2.1.3. <i>Estudio del mecanismo de acción antifúngica de los Bz-Arg-NHC_n contra esporas de hongos fitopatógenos</i>	175
3.2.2. <i>Efecto de los surfactantes derivados de arginina en hongos patógenos de humanos</i>	188
3.2.2.1. <i>Inhibición de la germinación de microconidios de hongos dermatofitos</i>	189
3.2.2.2. <i>Suceptibilidad de Candida albicans</i>	191
4. Conclusiones	194
Referencias	196

1. Introducción

La resistencia a las drogas terapéuticas representa una amenaza creciente a la salud pública mundial que involucra gran parte de los principales patógenos microbianos (Russell 2003; Levy & Marshall 2004). En Estados Unidos y el Reino Unido entre el 40 y el 60% de las cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la meticilina (un antibiótico betalactámico del grupo de las penicilinas), encontrándose las mismas asociadas a un mayor número de muertes respecto de aquellas cepas sensibles a este antibiótico. En la actualidad, el número de organismos resistentes, así como las regiones geográficas afectadas y la amplitud de esta resistencia en organismos individuales, son hechos sin precedentes y de creciente importancia. Es así que hoy en día las bacterias clínicamente relevantes se caracterizan no sólo por la resistencia a drogas individuales sino también por la resistencia a múltiples antibióticos — un legado de décadas de uso y abuso de los antimicrobianos. De esta forma ha surgido la necesidad urgente de diseñar nuevos compuestos antimicrobianos que impidan el desarrollo de resistencia adquirida. Una estrategia posible es la preparación de compuestos con nuevos modos de acción y blancos diferentes a los de los antibióticos hasta ahora existentes (Pinazo et al. 2016).

Idealmente, el control del crecimiento de microorganismos en tejidos vivos requiere de agentes terapéuticos que reduzcan o prevengan el crecimiento de bacterias y/o hongos, sin causar daño a las células huésped. En este sentido, el conocimiento de la biología celular de los microorganismos contribuye al diseño racional de nuevos agentes quimioterapéuticos con mejoradas capacidades biocidas (Castillo Expósito 2006).

1.1. Bacterias

Las bacterias son células procariotas, carentes de envoltura nuclear, con formas alargadas (bacilos), esféricas (cocos) o de espiral que, dependiendo la especie, pueden agruparse o no en diferentes arreglos: unidades individuales (cocos), pares (*Neisseria gonorrhoeae*), cadenas (*Streptococcus spp.*) o racimos (*Staphylococcus spp.*). En los casos en los que no existe una forma celular característica asociada a una bacteria, la misma puede ser descrita como *pleomórfica* (micoplasmas o *Bacillus anthracis*). Tienen tamaños variables, con diámetros comprendidos entre 0,1 y 50 μm , siendo el diámetro promedio alrededor de 1 μm (Castillo Expósito 2006). Las bacterias han sido consideradas tradicionalmente como organismos individuales que crecen en poblaciones planctónicas homogéneas. Sin embargo, en ambientes naturales, generalmente forman comunidades de microorganismos capaces de adherirse a diversas superficies, embebidos en una matriz extracelular (formada principalmente por polisacáridos) llamadas *biofilms* (Fux et al. 2003). La *esporulación* o formación de esporas, es otra característica de las bacterias, principalmente en el caso de bacterias Gram positivas. Las esporas bacterianas constituyen entidades complejas, inactivas metabólicamente y resistentes a la inactivación por muchos agentes físicos y químicos, representando un problema grave en la conservación de alimentos y la microbiología médica. Un ejemplo típico de infecciones producidas por esporas bacterianas es el botulismo, una intoxicación alimentaria causada por las toxinas de *Clostridium botulinum* (Russell 1998).

En cuanto a la anatomía celular, la envoltura procariota puede definirse como un conjunto de membranas y macromoléculas asociadas que constituye el límite entre el interior y el exterior de la célula. Básicamente está conformada por la membrana citoplasmática y la pared celular, y cumple con diversas funciones esenciales: da rigidez

y forma a la célula, protege contra la lisis osmótica, actúa como barrera de permeabilidad selectiva y participa en la división celular, entre otras (Poxton 1993). Teniendo en cuenta la estructura de la envoltura celular, las bacterias pueden dividirse en dos grandes grupos: *Gram positivos* (Figura 3.1.1) y *Gram negativos* (Figura 3.1.2), en función de una captación diferencial de los colorantes en la tinción de Gram. Esta diferencia de permeabilidad se debe básicamente a las diferencias estructurales y de composición de las envolturas de ambos tipos de bacterias, los cuales se describen a continuación.

1.1.1. La envoltura celular de las bacterias Gram positivas

El principal componente de la pared celular de las bacterias Gram positivas, cuya estructura se detalla en la Figura 3.1.1, es el peptidoglicano, un polímero formado por una secuencia alternante de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico (unidos mediante enlaces β -1,4) con un tetrapéptido (formado por *L*- y *D*- aminoácidos alternados) unido a través del extremo amino terminal al carboxilo de este último. Los filamentos de peptidoglicano se encuentran interconectados por enlaces cruzados directos entre las cadenas de aminoácidos o a través de puentes peptídicos, formando de 20 a 40 capas. La síntesis de peptidoglicano es el blanco de acción de antibióticos comúnmente empleados, tales como la penicilina, la cefalosporina y derivados.

Por otro lado, los principales componentes externos de la pared celular son los ácidos teicoico y lipoteicoico (anclado a la membrana a través del esqueleto de diacilglicerol de los fosfolípidos), dos polímeros aniónicos que contribuyen a la carga negativa neta de la superficie celular. La función de estos componentes es la participación en el proceso de adhesión y el mantenimiento de la estructura de la pared

celular (Castillo Expósito 2006).

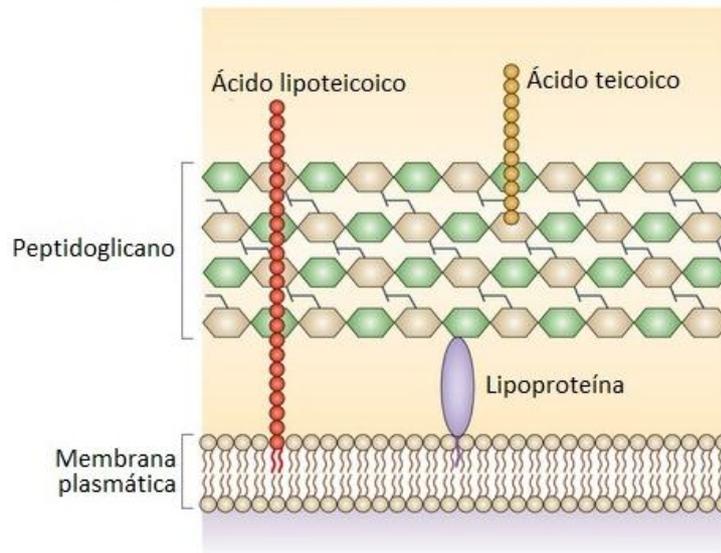


Figura 3.1.1. Esquema de la estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram positivas: la membrana plasmática (una bicapa lipídica) se encuentra rodeada por una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano y ácido lipoteicoico, el cual se encuentra anclado a la membrana a través del esqueleto de diacilglicerol de los fosfolípidos (Brown et al. 2015).

1.1.2. La envoltura celular de las bacterias Gram negativas

La pared celular de bacterias Gram negativas tiene una estructura mucho más compleja que la de las Gram positivas (Figura 3.1.2). En este caso, la envoltura celular se encuentra formada por múltiples capas: la capa de peptidoglicano es mucho más delgada (sólo una o dos capas) y se ubica entre la membrana citoplasmática y una segunda membrana, denominada *membrana externa*. Esta membrana está formada por una bicapa glicolipídica, donde la monocapa interna se encuentra constituida por fosfolípidos, mientras que la externa contiene *lipopolisacáridos* (LPS), haciendo que la

superficie celular sea altamente hidrofílica y otorgándole también una carga neta negativa. Los LPS se encuentran formados por tres regiones: el *polisacárido O* (antígeno), un polisacárido central y el *lípidos A* (endotoxina), embebido en la bicapa lipídica. Algunas bacterias pueden cambiar rápidamente la naturaleza de los LPS para evitar las defensas inmunitarias del huésped. Cumple funciones mecánicas y fisiológicas.

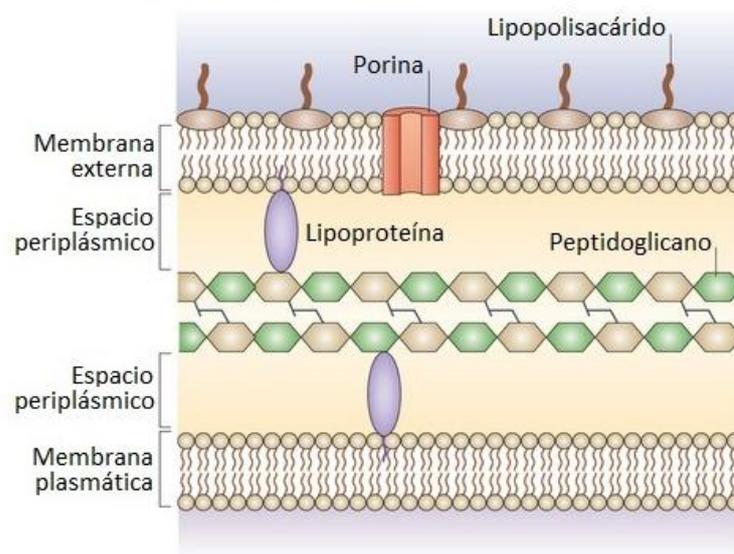


Figura 3.1.2. Esquema de la estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas: en el espacio periplásmico entre las membranas (bicapas lipídicas) citoplasmática y externa se encuentra una fina capa de peptidoglicano; la membrana externa además contiene lipopolisacáridos (LPS) en su cara exterior y facilita el transporte no vesicular a través de canales como porinas y transportadores especializados (Brown et al. 2015).

La membrana externa contiene también una gran cantidad de proteínas, incluyendo *porinas* que crean pequeños canales de alrededor de 1 nm de diámetro y permiten el transporte de moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular, con tamaños de hasta 700 Da aproximadamente. Finalmente, la membrana externa se encuentra

unida al peptidoglicano a través de una lipoproteína cuya región lipídica se encuentra inserta en la membrana, mientras que su porción peptídica se une covalentemente al peptidoglicano.

1.1.3. La membrana citoplasmática bacteriana

La capa más interna de la envoltura celular de las bacterias, ya sean Gram positivas o Gram negativas, está constituida por la *membrana citoplasmática*. Esta barrera semipermeable consiste en una bicapa de fosfolípidos en la que se insertan diversas proteínas. Se diferencia de la membrana citoplasmática de las células eucariotas en la mayor relación proteína:lipido (80:20), así como en la ausencia de colesterol. Esta estructura es de suma importancia para la célula debido a sus fundamentales papeles metabólico y estructural, ya que no sólo sirve como barrera osmótica y selectiva, sino que participa en la generación de energía a través de la respiración celular y la síntesis de componentes de la pared celular, así como también en el anclaje del material genético y la señalización (Castillo Expósito 2006). Por todo esto, muchos biocidas tienen como objetivo la membrana citoplasmática, para lo cual, además, deben ser capaces de atravesar el resto de la envoltura celular (Denyer 1995; Denyer & Stewart 1998).

Si bien pueden ocurrir cambios en la composición lipídica dependiendo de las condiciones del medio de crecimiento, el concepto de una composición típica de lípidos de las membranas celulares se encuentra aceptado. Asimismo, la composición de fosfolípidos y glicolípidos de un grupo a otro dentro de las bacterias Gram positivas varía en mayor medida que entre grupos Gram-negativas. En cualquier caso, una característica común es la presencia de grandes cantidades de fosfolípidos cargados

negativamente (como el *fosfatidilglicerol*, PG) y zwitteriónicos (como la *fosfatidiletanolamina*, PE). En general, mayores cantidades de PE se encuentran en la membrana interna de bacterias Gram-negativas en comparación con la membrana citoplasmática de las bacterias Gram-positivas. Por ejemplo, PG y sus derivados son los únicos fosfolípidos de la membrana de *Staphylococcus aureus*, mientras que el PE es el componente dominante (82%) de la membrana interna (citoplasmática) de *Escherichia coli* (Lohner & Prenner 1999).

1.2. Hongos

A diferencia de las bacterias, los hongos son organismos eucariotas. Como organismos no fotosintéticos, obtienen sus nutrientes de la degradación de materia orgánica a través de la liberación de enzimas hidrolíticas. Son ubicuos y sus actividades están involucradas en muchos aspectos de nuestra vida cotidiana, ya sea como fuente de productos farmacéuticos y alimenticios, o como organismos descomponedores y causantes de enfermedades en plantas y animales, incluyendo al hombre (Hanson 2008).

Los hongos pueden aparecer como organismos unicelulares (*levaduras*), con diámetros que varían entre los 3 y 15 μm , o como organismos filamentosos multicelulares (*hongos filamentosos*). Estos últimos se encuentran formados por túbulos cilíndricos y ramificados denominados *hifas*, que permiten la ramificación y extensión del organismo en su entorno. Estas hifas miden generalmente entre 2 y 10 μm de diámetro y crecen por extensión en longitud desde uno de sus extremos, formando una masa de hifas entrelazadas denominada *micelio*. En algunos casos, las células individuales que componen cada hifa pueden encontrarse separadas por *septos* que

permiten el intercambio de material entre ellas a través de poros (Brock 2006; Hanson 2008).

Si bien la forma usual de reproducción de muchas especies de hongos es sexualmente a través de esporas, muchos pueden desarrollarse vegetativamente a partir de fragmentos del micelio. En las levaduras, la reproducción puede llevarse a cabo de dos maneras: regularmente por *mitosis* (la célula duplica su material genético y se divide en dos células idénticas) o a través de un proceso denominado *gemación* (*budding*, en inglés), durante el cual la célula sufre una mitosis asimétrica, dividiéndose en dos células hijas de diferente tamaño. La más pequeña, denominada yema o brote (*bud*, en inglés), protruye de la superficie de la célula madre y, a diferencia de la división mitótica, continua siendo parte de ésta (Brock 2006).

En el caso de los hongos filamentosos, el micelio puede dividirse en una parte *vegetativa*, destinada a dar sostén, protección y nutrición, y una parte *reproductiva*, formada por el conjunto de hifas fértiles que nacen del micelio vegetativo, pero que se diferencian biológica y morfológicamente para las funciones de reproducción. El micelio reproductivo es el encargado de la generación y liberación de las esporas, pudiendo generarse las mismas en forma sexual o asexual. En el último caso, las esporas tienen origen en estructuras especializadas denominadas *células conidiógenas* o *conidióforos*, cuando las esporas – llamadas *conidios* – son generadas externamente (como en el caso de *Aspergillus niger* y los hongos pertenecientes al género *Penicillium*), o *esporangióforos*, cuando las mismas – *esporangiosporas* – son generadas internamente y contenidas en un saco o *esporangio* (como en el caso de *Rhizopus nigricans*). Los conidios y las esporangiosporas se forman por segmentación en un proceso similar a la

gemación. Por otro lado, en la reproducción sexual, las esporas se forman por unión de dos núcleos y división meiótica, denominándose en este caso *esporas sexuales* o *meiosporas* (Brock 2006). En ambos casos, las estructuras reproductivas pueden ser pigmentadas y estar recubiertas por una capa de polisacárido gelatinoso, la cual facilita su diseminación y adhesión al huésped (Hanson 2008). La morfología de las esporas y conidios es variable y característica de cada especie de hongo, pueden ser ovales, elípticos, estrellados, fusiformes, helicoidales y piriformes, entre otros, y presentar o no tabiques, tanto longitudinales como transversales.

1.2.1. La envoltura celular de los hongos

La pared celular fúngica (Figura 3.1.3) contiene marcadores taxonómicos útiles, siendo también uno de los principales objetivos para los agentes antifúngicos. Está constituida por un complejo de quitina (un polímero de *N*-acetilglucosamina) con distintas manoproteínas y α - y β -1,3-*D*-glucanos, dispuestos en capas y unidos a la cara externa de la membrana plasmática [bicapa lipídica compuesta principalmente por lípidos zwitteriónicos, *fosfatidilcolina* (PC), *fosfatidiletanolamina* (PE), *esfingolípidos*, lípidos aniónicos y *ergosterol* (ERG)] a través de lipoproteínas (Makovitzki et al. 2006). A diferencia de las células de mamíferos, las cuales contienen colesterol, el principal esteroles presente en la membrana citoplasmática de los hongos es el ergosterol (Hanson 2008).

La membrana plasmática fúngica se encuentra organizada en subdominios especializados que varían en tamaño, estabilidad y composición (Douglas & Konopka 2014). Es el caso de los *dominios ricos en esteroles* (SRD, del inglés *sterol rich domains*), que pueden observarse fácilmente en células teñidas con *filipin*, un colorante

fluorescente que se une específicamente a esteroides. Los SRD se encuentran ubicados en sitios de morfogénesis activa, como en las hifas de *Candida albicans* y en las proyecciones reproductivas de *Saccharomyces cerevisiae*, y su presencia está regulada según el ciclo celular (Alvarez et al. 2007).

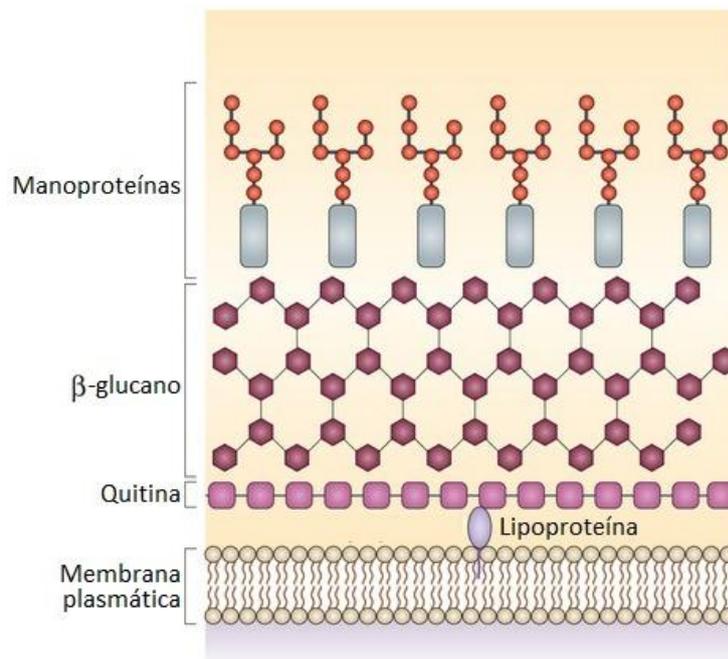


Figura 3.1.3. Esquema de la estructura de la envoltura celular de los hongos: la membrana plasmática se encuentra rodeada por una pared celular conformada por múltiples capas de quitina, β -glucano y manano (en forma de manoproteínas) (Brown et al. 2015).

1.3. Control del crecimiento microbiano

Los microorganismos pueden eliminarse normalmente de objetos inanimados y superficies mediante métodos físicos (calor, radiación o filtración) o a través del uso de agentes químicos especiales con actividad biocida, denominados *desinfectantes*. Sin embargo, debido a la elevada toxicidad de estos compuestos, su aplicación se restringe a

productos de limpieza doméstica e industrial. Asimismo, la utilización de muchos de ellos provoca la liberación al medio ambiente de residuos peligrosos, como metales pesados y fenoles, poniendo en riesgo no sólo la salud de las personas sino la integridad de los ecosistemas naturales.

Por otro lado, el control del crecimiento microbiano en los seres vivos requiere de compuestos con *mayor selectividad y menor toxicidad* que los desinfectantes. En este caso, los *antibióticos* (utilizados para el tratamiento de infecciones en humanos y animales) y *antisépticos* (empleados para desinfectar superficies duras y tejidos externos a través de aplicaciones tópicas) son los productos de elección. En general, los desinfectantes y antisépticos (agrupados como *biocidas*) tienen un espectro de actividad más amplio que los antibióticos y, si bien estos últimos tienden a tener objetivos intracelulares específicos, los biocidas en general pueden tener múltiples blancos (Castillo Expósito 2006).

La mayoría de los antibióticos con actual aplicación clínica han sido descubiertos entre las décadas de 1940 y 1980, y su desarrollo ha sido basado en la capacidad de inhibir o destruir a las bacterias en crecimiento exponencial (Hurdle et al. 2011). Por lo tanto, la mayoría de los mismos tienen como blanco la interrupción de algún proceso esencial para el crecimiento bacteriano, como por ejemplo, la síntesis de los componentes de la pared bacteriana. La toxicidad selectiva de estos compuestos se debe a que el proceso en sí está ausente (como en el caso de la síntesis del peptidoglicano), o difiere significativamente del mismo proceso en las células del huésped (como la síntesis de proteínas, ADN o ARN). Por el contrario, los biocidas tienen múltiples objetivos, y los efectos nocivos observados son proporcionales a la concentración del principio activo. En algunos casos resulta interesante el hecho de que,

a bajas concentraciones, los biocidas pueden ser mucho más selectivos en su acción que cuando son utilizados en mayor proporción, lo cual pone de manifiesto la necesidad de estudiar el efecto de esta clase de químicos incluso a las concentraciones residuales que pudieran quedar luego de su aplicación, por ejemplo, en determinadas superficies. A pesar de las múltiples diferencias entre ellos, se han descrito algunas semejanzas en el modo de acción de ambos tipos de compuestos, incluyendo la penetración de agentes catiónicos en bacterias Gram negativas, la entrada pasiva en bacterias Gram positivas no esporuladas y alguna micobacterias, algunos efectos en la membrana plasmática y cambios morfológicos en las células (Russell 2003).

La resistencia microbiana a los biocidas y antibióticos, en particular la de las bacterias y hongos, dificulta seriamente el control del crecimiento microbiano. En el caso de la resistencia adquirida, la misma resulta de cambios genéticos en una simple célula y surge por la aparición de mutaciones en la misma célula o por adquisición de material genético de otra, como en el caso de la transferencia de plásmidos por conjugación bacteriana. La forma en que puede darse tiene múltiples enfoques: cambios en la permeabilidad de la envoltura celular, modificaciones químicas o degradación del agente antimicrobiano y/o la presencia de sistemas de transporte en la membrana que bombean los agentes antimicrobianos fuera del citoplasma de la célula (Castillo Expósito 2006). Sin embargo, existen múltiples razones para el fracaso de la terapia con antibióticos que exceden la evolución de los microorganismos, como el uso excesivo de antibióticos incorrectos o la prescripción inadecuada, el incumplimiento de los tiempos de terapia prescritos y la incorporación de antibióticos similares a los utilizados en terapia en la alimentación animal (Gorbach 2001). También se sostiene que el uso generalizado de biocidas en hospitales, domicilios particulares e industrias entre otros

ha contribuido al aumento de la tasa de resistencia a los medicamentos.

En este contexto, y en línea con lo que resolvió la FDA (*Food and Drug Administration*, agencia del gobierno estadounidense) pocos meses antes, hacia finales del año 2016 la *Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica* (ANMAT) de la República Argentina emitió una resolución en la que se prohíbe la comercialización de productos antisépticos de venta libre para el lavado de manos y cuerpo que se enjuagan con agua y que contengan como sustancias activas una serie de biocidas. Entre ellos se incluye al *triclosán*, utilizado normalmente en cremas dentífricas, enjuagues bucales, desodorantes, polvos faciales, cremas correctoras y productos para la limpieza de uñas. La reciente medida se encuentra basada en investigaciones que señalan que la exposición regular y a largo plazo ante ciertos ingredientes activos usados en los productos antibacteriales podría presentar riesgos para la salud, como la generación de resistencia a antimicrobianos y efectos hormonales. Además, estos productos se encuentran dirigidos a individuos generalmente sanos, en los cuales tanto el riesgo de infección como el alcance de su propagación son relativamente bajos en comparación con los observados en el ámbito de la atención de la salud, donde los pacientes son generalmente más susceptibles a las infecciones y el potencial de propagación de estas es mayor. La FDA también remarca también que no existen estudios clínicos que avalen una eficacia superior para la prevención de enfermedades o en la reducción del riesgo de infecciones por parte de estos productos frente a aquellos que carezcan de agentes antibacteriales en su formulación cuando son utilizados en el ámbito del hogar y en lugares públicos (FDA 2016; ANMAT 2016).

El problema de la resistencia bacteriana a los biocidas normalmente se

soluciona aplicando altas concentraciones del agente antimicrobiano o un cambio en el tratamiento por una combinación de diversos agentes sin relación que, conjuntamente, se combinen para controlar el crecimiento microbiano (Russell 2003). Otra alternativa es la introducción de modificaciones químicas sobre los fármacos existentes de manera de obtener análogos con actividad mejorada. Como sus precursores, estos análogos son eficaces contra las bacterias metabólicamente activas. Sin embargo, en varios tipos de infecciones, las bacterias encuentran condiciones desfavorables que provocan que las células entren en un estado quiescente de crecimiento lento o incluso nulo. Estos organismos metabólicamente inactivos (como, por ejemplo, las esporas) pueden sobrevivir a altas concentraciones de antibióticos y tratamientos extendidos son necesarios para mantener la eficacia de la droga. Sin embargo, cuando la concentración de la droga cae por debajo de los niveles que matan o inhiben a las células en crecimiento, las bacterias latentes puede reactivar su metabolismo, y el huésped volverá a mostrar síntomas de la enfermedad nuevamente (Hurdle et al. 2011).

Las prácticas de control y prevención de infecciones, así como la eliminación de potenciales contaminaciones microbianas en alimentos y otros productos de consumo, han aumentado el uso de diferentes biocidas, los cuales también han sido incorporados como conservantes en numerosas formulaciones farmacéuticas (Carmona-Ribeiro & de Melo Carrasco 2013). En este contexto, los compuestos de amonio cuaternario, como los bromuros de cetil- y hexadecil-trimetilamonio (CTAB y HTAB, respectivamente) o el Cetrimide (una mezcla compuesta principalmente por bromuro de tetradecil-trimetilamonio y, en menor cantidad, bromuro de dodecil- y hexadecil-trimetilamonio) son los antisépticos y desinfectantes más utilizados. Por ejemplo, soluciones de Cetrimide al 0,1-1% (p/v) se utilizan para la limpieza de la piel, heridas y quemaduras, así

como de catéteres contaminados y para el almacenamiento de material quirúrgico estéril (Florence & Attwood 2006). Debido a su considerable toxicidad y cuestionada biodegradabilidad, se ha propuesto reemplazar a los haluros de amonio cuaternario por tensioactivos con actividad biocida menos tóxicos, como los surfactantes catiónicos derivados de aminoácidos (Castillo et al. 2004). Entre ellos, los derivados de arginina presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro, buena biodegradabilidad y baja toxicidad, propiedades que los convierten en interesantes aditivos alimentarios y formulaciones farmacéuticas, así como en valiosos ingredientes activos en productos dermatológicos y de cuidado personal (Pérez et al. 2002; Pinazo et al. 2016).

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

La membrana plasmática es fundamental independientemente del estado metabólico de la célula, ya que proporciona permeabilidad selectiva para mantener la homeostasis celular y, en algunos casos como en las bacterias, la transducción de energía metabólica. Además, la membrana contiene un tercio de las proteínas de una célula y es el sitio para procesos esenciales, como el transporte activo de nutrientes y desechos, la respiración bacteriana, el establecimiento de la fuerza motriz de protones en asociación con las enzimas respiratorias, la generación de ATP y la comunicación célula-célula (Hurdle et al. 2011).

En el caso de las bacterias, la superficie exterior de las células lleva una carga negativa neta, estabilizada a menudo por la presencia de cationes divalentes como el Mg^{+2} y Ca^{+2} . Esta carga se encuentra asociada a la presencia de los ácidos teicoicos y polisacáridos en las bacterias Gram positivas, el lipopolisacárido (LPS) en las bacterias Gram negativas y al predominio de fosfolípidos zwitteriónicos (fosfatidiletanolamina) y

lípidos cargados negativamente (fosfatidilglicerol y cardiolipina) en la membrana citoplasmática de ambos tipos de bacterias. Teniendo esto en cuenta no resulta sorprendente que muchos agentes con actividad antimicrobiana sean catiónicos y tengan una alta afinidad de unión a la membrana plasmática de las células bacterianas (Gilbert & Moore 2005). En muchos casos, un factor común en la estructura de numerosos agentes antimicrobianos es la presencia de una fuerte carga positiva junto con una región hidrofóbica, como en el caso de los tensioactivos catiónicos, entre los que los *compuestos de amonio cuaternario* (QACs) representan los biocidas más utilizados (Vieira & Carmona-Ribeiro 2006).

El modo de acción de los biocidas catiónicos involucra la integración de las moléculas de surfactante en la membrana citoplasmática de las células bacterianas: luego de interaccionar electrostáticamente, los monómeros de surfactante penetran en la membrana plasmática, ubicándose la región hidrofóbica de los mismos en el interior de la bicapa lipídica y quedando la cabeza polar alineada con la región hidrofílica de los fosfolípidos. Esta integración en las membranas 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*), ya que conlleva a la fuga de material citoplasmático, alterando los procesos fisiológicos esenciales que ocurren a nivel de la membrana, tales como respiración, transporte de solutos y biosíntesis de la pared celular.

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

Se emplearon dimetil sulfóxido (DMSO), ioduro de propidio (IP) y 3,3'-diaminobenzidina (DAB) y el ergosterol (ERG) de Sigma Aldrich. La dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) y la fosfatidiletanolamina (PE) fueron de Avanti Polar Lipids. El resto de los reactivos y solventes empleados en este trabajo fue de calidad analítica o superior.

2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo *agar papa dextrosa* (PDA), *agar sabouraud dextrosa* (SDA), *caldo sabouraud dextrosa* (SDB) e *yeast peptone dextrose* (YPD) fueron de Hi Media Laboratories (Mumbai, India), mientras que el *agar* y el *caldo nutritivo* (AN y CN, respectivamente) fueron de Biokar Diagnostics (Beauvais, France). Todos los medios de cultivo fueron preparados según las indicaciones de cada fabricante y esterilizados a 121°C durante 15 min y una atmósfera de sobrepresión.

2.3. Microorganismos

2.3.1. Bacterias

La actividad antibacteriana de los productos sintetizados con actividad tensioactiva fue estudiada frente a cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Bacillus subtilis*

subsp. *spizizenii* ATCC 6633, *Shigella flexneri* ATCC 9199, *Enterococcus faecium* ATCC 6569), obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA).

Todos los microorganismos fueron mantenidos en CN a 37°C.

2.3.2. Hongos

La actividad antifúngica de los compuestos obtenidos fue estudiada frente a aislados de hongos de diversas especies, tanto fitopatógenos como patógenos humanos. Los aislados de hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporium*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum lindemuthianum*) fueron provistos por el *Laboratório de Proteínas Vegetais de Defesa* (LPVD), perteneciente al *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular* de la *Universidade Federal de Ceará* (UFCE, Fortaleza, Brasil), mientras que los aislados de hongos dermatofitos (*Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*) así como un aislado clínico de la levadura *Candida albicans* fueron provistos por el *Laboratório de Toxinas Vegetais*, también perteneciente al mismo departamento de la UFCE. La levadura *Candida albicans* ATCC 64548, obtenida de la *American Type Culture Collection* también fue empleada como microorganismo indicador. Todos los aislados de hongos fueron mantenidos en SDA en oscuridad, a 27°C y 70% de humedad relativa.

2.4. Actividad antibacteriana

2.4.1. Determinación de la concentración inhibitoria y bactericida mínima (CIM y CBM)

La actividad antibacteriana de los surfactantes N^{α} -benzoil-arginina decilamida (Bz-Arg-NHC₁₀) y N^{α} -benzoil-arginina dodecilamida (Bz-Arg-NHC₁₂) fue evaluada frente a

bacterias Gram positivas y Gram negativas según el ensayo de microdilución, utilizando microplacas estériles de 96 pocillos con fondo plano (TCP-96T-SI, Axygen). Durante los ensayos, 125 μ l de CN estéril fueron añadidos a los pocillos de las columnas 2 a 10 de la microplaca. A continuación, 125 μ l de la solución correspondiente del surfactante preparada en CN (800 μ g/ml para Bz-Arg-NHC₁₀ y 200 μ g/ml para Bz-Arg-NHC₁₂) fueron añadidos a los pocillos de las columnas 1 y 2. A partir del segundo pocillo de cada fila, se transfirieron en forma seriada 125 μ l al pocillo siguiente, descartando 125 μ l de la mezcla en la decima columna, de manera que el volumen final en cada pocillo fuese de 125 μ l. Este procedimiento resultó en diluciones seriadas a la mitad (1/2) de las soluciones de los surfactantes en las primeras 10 columnas de la microplaca. Las columnas 11 y 12 no contenían surfactante alguno y sirvieron como controles positivo y negativo del crecimiento, respectivamente. Todos los pocillos, (exceptuando los de la columna número 12) fueron inoculados con 2,5 μ l de la suspensión bacteriana de interés ajustada al 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) en solución fisiológica (SF) estéril (8,5 g/l NaCl). Las microplacas fueron incubadas a 37°C por 24 h. A tiempo 0 y 24 h se determinó la densidad óptica de los pocillos a 600 nm (DO₆₀₀) utilizando un lector de placas (ELISA Plate Reader SLT Lab instruments Rainbow Reader). La actividad antimicrobiana fue expresada como porcentaje de inhibición del crecimiento (% Inh) comparado con los pocillos control (la DO media de las células crecidas en CN y ausencia de los surfactantes fue considerada como 100% de viabilidad). Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado. Los resultados fueron contrastados utilizando el análisis de varianza (ANOVA, *one-way analysis of variance*) y el *test de Tukey* utilizando el software GraphPad Prism®. P-values < 0,05 fueron considerados como significativos.

Para cada cepa se definió la *Concentración Inhibitoria Mínima* (CIM) como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento visible ($DO_{600} = 0$ y % Inh > 95%). De aquellos pocillos que no presentaron crecimiento visible se tomaron muestras y realizaron estrías en placas conteniendo AN libre de los surfactantes. Se analizó la presencia de colonias luego de 24 h de incubación a 37°C. La *Concentración Bactericida Mínima* (CBM) se definió como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento bacteriano (ausencia de colonias).

2.4.2. Efecto de los surfactantes en la supervivencia de patógenos

Se estudió la supervivencia de patógenos en CN adicionado con Bz-Arg-NHC₁₀ o Bz-Arg-NHC₁₂ a diferentes concentraciones. Para ambos compuestos, se utilizaron *E. coli* y *S. aureus* como microorganismos indicadores y concentraciones iguales a la CIM y la mitad de la CIM (1/2 CIM) correspondiente en cada caso. Durante los ensayos, se diluyeron cultivos *overnight* de las bacterias patógenas en CN de manera de alcanzar una concentración final de aproximadamente 1×10^6 UFC/ml. Se prepararon soluciones estériles de los surfactantes en CN (4,5 ml), las cuales fueron inoculados con 500 µl de las suspensiones bacterianas. A intervalos de tiempo preestablecidos (0 min, 30 min, 60 min, 3 h y 6 h) se tomaron alícuotas de los cultivos, se diluyeron en forma seriada en triptona 0,1% v/v y se sembraron en placas conteniendo AN libre de los surfactantes. Finalmente, las placas fueron incubadas a 37°C por 24 h, realizándose seguidamente el recuento de colonias.

2.5. Actividad antifúngica

2.5.1. Preparación de soluciones stock de los surfactantes

Se prepararon soluciones stock 50 mM de los surfactantes en DMSO, las cuales fueron almacenadas a -20°C. Se prepararon diluciones de estas soluciones utilizando el medio más conveniente (agua milliQ® o medio de cultivo, ambos estériles) en el rango de concentraciones indicado para cada ensayo.

2.5.2. Preparación de las suspensiones de esporas/microconidios

Las suspensiones de esporas/microconidios de las distintas especies de hongos fueron obtenidas a partir cultivos de 15 días de edad creciendo PDA, de manera de favorecer la esporulación. Para los hongos fitopatógenos, las suspensiones de esporas fueron preparadas en agua destilada estéril y su concentración fue calculada por recuento de los mismos utilizando una *cámara de Neubauer* y un microscopio óptico (Olimpus System Microscope BX 60). A partir de estas suspensiones, se prepararon diluciones a la concentración indicada para cada ensayo en agua destilada estéril. En el caso de los hongos dermatofitos, las suspensiones de microconidios se prepararon en SF estéril, ajustándose su concentración por medidas de densidad óptica a 530 nm (DO_{530}) con un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific). Finalmente, se prepararon diluciones a la concentración indicada para cada ensayo en SF estéril.

2.5.3. Preparación de la suspensión de *Candida albicans*

Las levaduras fueron crecidas en SDA a 27°C durante 48 h. Para estandarizar la suspensión de *C. albicans*, las colonias fueron resuspendidas en SF estéril, ajustando su turbidez al 0,5 de la escala de McFarland ($DO_{530}=0,12-0,15$, equivalente a

$1-5 \times 10^6$ CFU/ml). Finalmente se realizó una dilución 1:10 ($1-5 \times 10^5$ CFU/ml) de la suspensión preparada anteriormente, previamente homogeneizada por agitación vigorosa en vórtex.

2.5.4. Ensayos de inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos

Se estudió el efecto inhibitorio de los surfactantes sobre el crecimiento vegetativo de hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporium*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum lindemuthianum*) según la metodología descrita por Broekaert et al. (1990) con algunas adaptaciones. Se prepararon diluciones seriadas de las soluciones stock de los surfactantes en un rango de concentraciones de 800 a 6 μ M utilizando agua milliQ® estéril como solvente. Los ensayos fueron llevados a cabo en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos con fondo plano (Kartell). En cada ensayo, los pocillos fueron adicionados con 10 μ l de una suspensión de esporas en agua (2×10^5 esporas/ml) y 90 μ l de medio YPD 2X. Con la finalidad de permitir la germinación de las esporas, las placas fueron incubadas durante 16 h en oscuridad a 27°C. Pasado este tiempo, 100 μ l de las soluciones de los surfactantes preparadas anteriormente fueron adicionados en los pocillos. Se incluyeron cultivos en presencia de medio YPD y H₂O₂ (100 mM) como controles negativo y positivo para la inhibición del crecimiento respectivamente, así como también controles negativos de todas las soluciones empleadas. Finalmente las placas fueron incubadas en oscuridad a 27°C durante 72 h. El crecimiento vegetativo para cada concentración de surfactante fue monitoreado periódicamente a través de lecturas de densidad óptica a 630 nm (DO₆₃₀), en intervalos de 6 o 12 horas, haciendo uso de un lector de microplacas de ELISA (BioTek ELx800, BioTek Instruments). Con estos datos se construyeron las *curvas de crecimiento*

(DO₆₃₀ vs. tiempo) para cada cepa fitopatógena. Asimismo, con los datos de densidad óptica para 72 h de cultivo se construyeron las gráficas *dosis-respuesta*, calculándose para cada concentración del surfactante el porcentaje de inhibición del crecimiento respecto del control (la densidad óptica de las esporas creciendo en medio YPD y ausencia de los surfactantes fue establecida como el 100% de crecimiento). Haciendo uso del software OriginPro[®], las curvas fueron ajustadas a la *función de Boltzmann* (sigmoidea) determinándose finalmente las IC₅₀ para cada compuesto, definidas como la concentración de surfactante capaz de reducir en un 50% el crecimiento de las hifas respecto del control (YPD).

2.5.5. Ensayos de inhibición de la germinación de esporas de hongos fitopatógenos

El efecto inhibitorio de los surfactantes sobre la germinación de esporas de hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporium*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum lindemuthianum*) fue evaluado según la metodología descrita por Ji & Kuć (1996), adaptada para el uso de placas de polietileno reticuladas (J. Prolab). Durante el ensayo, 10 µl de la suspensión de esporas en agua (2×10^5 esporas/ml) fueron incubados con 10 µl de las soluciones de los surfactantes (800 µM) preparadas según se indicó en la Sección 2.5.1 del presente Capítulo (pág. 157), de manera que la concentración testada de los compuestos fue igual a 400 µM. El mismo procedimiento se llevó a cabo utilizando H₂O milliQ[®] estéril y H₂O₂ (100 mM), constituyendo los controles negativo y positivo para la inhibición de la germinación respectivamente. Las placas fueron incubadas en atmósfera humidificada y oscuridad a 27°C durante 24 h. Pasado este tiempo, el material fue observado bajo microscopio óptico (Olimpus System Microscope BX 60), considerándose como

germinadas aquellas esporas que presentaran tubo germinativo con longitud de, por lo menos, dos veces su largo.

2.5.6. Estudio del mecanismo de actividad antifúngica de Bz-Arg-NHC_n contra esporas de hongos fitopatógenos

2.5.6.1. Evaluación de la integridad de la membrana por microscopía de fluorescencia

Se estudió el daño producido en la membrana de esporas de *C. lindemuthianum* luego de su exposición a los surfactantes según la metodología descrita por de Freitas et al. (2011). La viabilidad celular se evaluó por exclusión del colorante fluorescente ioduro de propidio (IP). Este colorante es incapaz de atravesar la membrana de células intactas; sin embargo, cuando la integridad de la envoltura celular ha sido comprometida, el colorante puede ingresar a la célula y formar un complejo fluorescente por unión al ADN (λ_{ex} 540 nm; λ_{em} 608 nm) (Mesquita et al. 2013). Durante el ensayo, 25 μl de las suspensiones de esporas en agua (10^7 esporas/ml) fueron incubados con 25 μl de las soluciones de los surfactantes (800 μM), preparadas según la Sección 2.5.1 del presente Capítulo (pág. 157), durante 30 min a 25°C. A continuación, se adicionaron 5 μl de una solución de ioduro de propidio 0,1 mM. Luego de 15 min de incubación, la incorporación del colorante a las esporas no viables fue monitoreada utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i), con λ_{ex} 540 nm, λ_{em} 608 nm y un aumento de 400X.

2.5.6.2. Estudio de la inserción de los surfactantes en monocapas lipídicas

Se realizaron medidas de *presión superficial* (II) utilizando un tensiómetro de Langmuir modelo 102A (NIMA Technology, Coventry) a temperatura ambiente ($20\pm 1^\circ\text{C}$)

con una placa Wilhelmy de platino como sensor. En los ensayos de inserción, la mezcla ternaria de lípidos DOPC/PE/ERG (preparada en cloroformo en una relación molar 2:1:1) fue sembrada en la superficie de la subfase (350 μ l de PBS) de manera de alcanzar la presión inicial (Π_0) deseada. Luego de la evaporación del solvente y la estabilización de la presión superficial (5 min), haciendo uso de una microjeringa Hamilton se inyectó la solución del surfactante (Bz-Arg-NHC₁₀ o Bz-Arg-NHC₁₂) en la subfase de manera de alcanzar una concentración final de 30 μ M. El incremento en la presión superficial fue monitoreado en función del tiempo hasta alcanzar una señal estable. Los ensayos de adsorción para cada surfactante fueron llevados a cabo de manera similar pero en ausencia de lípidos.

2.5.6.3. Detección in situ de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Se estudió la producción *in situ* de *especies reactivas de oxígeno* (ROS, del inglés *reactive oxygen species*), tales como el H₂O₂, por esporas de *F. oxysporium* y *C. gloeosporioides* expuestos a los surfactantes según la metodología descrita por Thordal-Christensen et al. (1997). Las ROS son conocidas principalmente como intermediarios de cascadas de señalización intracelular; sin embargo, la producción excesiva de las mismas puede causar estrés oxidativo y pérdida de la funcionalidad celular, lo que en última instancia producirá la muerte celular por apoptosis (Nordberg & Arnér 2001). El método se basa en el uso de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), la cual polimeriza formando un precipitado estable color pardo, visible por observación al microscopio óptico, en presencia de H₂O₂ y otras ROS producidas por las enzimas con actividad peroxidasa intracelulares, permitiendo así la detección *in situ* de este tipo de compuestos. Durante el ensayo, 25 μ l de las suspensiones de esporas en agua

(10^7 esporas/ml) fueron incubados con 25 μ l de las soluciones de los surfactantes (800 μ M), preparadas según se explicó en la Sección 2.5.1 del presente Capítulo (pág. 157), durante 30 min a 25°C. A continuación, se adicionaron 10 μ l de una solución de DAB 1 mg/ml. Luego de 2 h de incubación en oscuridad y a 25°C, se evaluó la aparición del precipitado color pardo dentro de las esporas utilizando un microscopio óptico (Olimpus System Microscope BX 60), bajo un aumento de 400X.

2.5.7. Ensayos de inhibición de la germinación de microconidios de hongos dermatofitos

Se estudió el efecto inhibitorio de los surfactantes sobre la germinación de microconidios de hongos dermatofitos según la metodología descrita por Pereira et al. (2011) con algunas adaptaciones. Se prepararon diluciones de las soluciones stock de los surfactantes en DMSO (preparadas según la Sección 2.5.1 del presente Capítulo, pág. 157) en un rango de concentraciones de 1000 a 6 μ M en SDB 2X. Los ensayos fueron llevados a cabo en microplacas estériles de 96 pocillos con fondo plano (Global Plast, Global Trade Techonolgy). En cada ensayo, los pocillos fueron adicionados con 100 μ l de una suspensión de microconidios en solución salina (ajustada a una densidad óptica de 0,08-0,1 a 530 nm) y 100 μ l de las soluciones de los surfactantes preparadas según se detalló anteriormente. Se incluyeron cultivos en presencia de SDB y H₂O₂ (50 mM) como controles negativo y positivo para la inhibición de la germinación respectivamente, así como también controles negativos de todas las soluciones empleadas. Finalmente las placas fueron incubadas en oscuridad a 27°C durante 21 días. Para cada concentración del surfactante, la germinación de los microconidios fue monitoreada periódicamente a partir del séptimo día de incubación.

Para ello se realizaron lecturas de densidad óptica a 630 nm, en intervalos de 6 o 12 h, haciendo uso de un lector de microplacas de ELISA (BioTek ELx800, BioTek Instruments, USA). Con los datos de densidad óptica se construyeron las *curvas de crecimiento* (DO_{630} vs. tiempo) para cada cepa patógena. Asimismo, con los datos de densidad óptica para 21 días de cultivo se construyeron gráficas *dosis-respuesta*, calculándose para cada concentración del surfactante los porcentajes de inhibición del crecimiento respecto del control (la densidad óptica de las esporas creciendo en SDB y ausencia de los surfactantes fue establecida como el 100% de crecimiento). A partir del ajuste de estas curvas a la *función de Boltzmann* (sigmoidea) haciendo uso del software OriginPro8[®], se determinaron las IC_{50} para cada compuesto, definidas como la concentración de surfactante capaz de reducir en un 50% el desarrollo de los microconidios respecto del control (SDB).

2.5.8. Ensayos de inhibición del crecimiento de *Candida albicans*

Se estudió el efecto inhibitorio de los surfactantes sobre el crecimiento de dos cepas de *Candida albicans* según el método de dilución en caldo descrito por el *Subcomité para la determinación de la susceptibilidad antifúngica* (*Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing, AFST*) del *Comité Europeo para la determinación de susceptibilidad antifúngica* (*European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST*), perteneciente a la *Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas* (ESCMID) (Cuenca-Estrella et al. 2003; Arendrup et al. 2012). Se prepararon diluciones de las soluciones stock de los surfactantes en un rango de concentraciones de 1000 a 6 μ M en SDB 2X. Los ensayos fueron llevados a cabo en microplacas estériles de 96 pocillos con fondo plano (Global Plast, Global Trade Technology). En cada ensayo,

los pocillos fueron adicionados con 100 μ l de una suspensión de las levaduras (preparada según la Sección 2.5.3 del presente Capítulo, pág. 157) y 100 μ l de las soluciones de los surfactantes. Se incluyeron cultivos en presencia de SDB y H₂O₂ (50 mM) como controles negativo y positivo para la inhibición del crecimiento respectivamente, así como también controles negativos de todas las soluciones empleadas. Finalmente las placas fueron incubadas en oscuridad a 27°C durante 48 h. El desarrollo de las levaduras en presencia de cada concentración de los surfactantes fue monitoreado periódicamente a través de lecturas de densidad óptica a 630 nm, en intervalos de 6 ó 12 h, haciendo uso de un lector de microplacas de ELISA (BioTek ELx800, BioTek Instruments). Con estos datos se construyeron las *curvas de crecimiento* (DO₆₃₀ vs. tiempo) para cada surfactante.

3. Resultados y discusión

3.1. Actividad antibacteriana

3.1.1. Efecto inhibitorio de Bz-Arg-NHC_n

Se realizaron pruebas de susceptibilidad a los tensioactivos derivados de arginina mediante la determinación de los porcentajes de inhibición del crecimiento de diferentes cepas bacterianas patógenas de humanos. A través de estos ensayos, se establecieron las *concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas* (CIM y CBM respectivamente) para cada cepa y cada surfactante, resumidos en la Tabla 3.3.1. Los resultados fueron contrastados con los obtenidos para Cetrimide, un desinfectante catiónico comercial, constituido por una mezcla de sales de amonio cuaternario [$C_{14}H_{29}(CH_3)_3NBr$; $C_{16}H_{33}(CH_3)_3NBr$]. Considerando la diferencia de peso molecular entre los surfactantes, los valores de CIM y CBM fueron expresados en μM , a fin de poder realizar una comparación más precisa del poder antimicrobiano de cada compuesto. Ambos tensioactivos derivados de arginina (Bz-Arg-NHC_n) fueron capaces de inhibir el crecimiento de todos los microorganismos ensayados, aunque en diferentes grados. En general, los valores más bajos de CIM (relacionados con una actividad antibacteriana más potente) fueron registrados para Bz-Arg-NHC₁₂, independientemente del tipo de bacteria (Gram positiva o Gram negativa) ensayada. En este sentido, dentro de una serie homóloga de este tipo de compuestos, se ha observado que aquellos con cadenas de acilo más cortas muestran una menor actividad antimicrobiana. La longitud de la cadena hidrocarbonada de la molécula de surfactante determina múltiples parámetros fisicoquímicos, como la hidrofobicidad, adsorción, solubilidad acuosa y el transporte en el medio, los cuales juegan un rol fundamental en la eficacia antimicrobiana (Cornellas

et al. 2011). En el caso de Bz-Arg-NHC₁₂, como para otros surfactantes homólogos de 12 átomos de carbono (Morán et al. 2001a), la interacción cooperativa de estos parámetros aumenta la tendencia del surfactante de ser adsorbido en la superficie bacteriana así como su capacidad de incorporarse en la membrana, permitiendo así que el compuesto exhiba acción antibacteriana a menores concentraciones. Notablemente, Bz-Arg-NHC_n mostró un mayor efecto tanto inhibitorio como bactericida sobre *P. aeruginosa* que Cetrimide, un antimicrobiano ampliamente utilizado como desinfectante en los hospitales.

Se ha reportado el estudio de la actividad antimicrobiana de surfactantes derivados de arginina estructuralmente similares a Bz-Arg-NHC_n, como ACA (Arg-*N*-decilamida), CAM (*N*^α-decil-Arg-metil éster), ALA (Arg-*N*-dodecilamida) y LAM (*N*^α-dodecil-Arg-metil éster), cuya estructura se describe detalladamente en la Sección 3.5.1 del Capítulo 2 (pág. 115) (Morán et al. 2001a; Pérez et al. 2002). A diferencia de los observado para Bz-Arg-NHC_n, los cuales mostraron un efecto antibacteriano tanto contra cepas Gram positivas como Gram negativas, la actividad de estos otros surfactantes derivados de arginina fue mayor contra bacterias Gram positivas (Morán et al. 2001b; Pérez et al. 2014). Comparando los resultados obtenidos para los análogos de 10 carbonos contra *E. coli*, una cepa Gram negativa, Bz-Arg-NHC₁₀ registró una CIM de 200 µg/ml, mientras que ACA y CAM no afectaron el desarrollo de esta cepa. Frente a esta misma cepa, Bz-Arg-NHC₁₂ reveló un valor CIM de 100 µg/ml, que se corresponde con la mitad de la CIM hallada para LAM (253 µg/ml), en tanto que ALA no fue capaz de inhibir el crecimiento de esta bacteria. Por otro lado, los valores de CIM obtenidos para Bz-Arg-NHC_n contra *P. aeruginosa*, otra bacteria Gram negativa, (Tabla 3.3.1) fueron mayores que los registrados para LAM y ALA (32 y 128 µg/ml, respectivamente)

Tabla 3.3.1. Concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas (CIM y CBM) para Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂ y Cetrimide.

Microorganismo	CIM µg/ml (µM)			CBM µg/ml (µM)			
	Bz-Arg-NHC ₁₀	Bz-Arg-NHC ₁₂	Cetrimide	Bz-Arg-NHC ₁₀	Bz-Arg-NHC ₁₂	Cetrimide	
Gram positivos	<i>B. cereus</i>	50,0 (119,5)	50,0 (112,0)	1,95 (5,8)	>800,0 (1912,4)	>200,0 (448,1)	3,1 (11,6)
	<i>B. subtilis</i>	50,0 (119,5)	50,0 (112,0)	ND	>800,0 (1912,4)	100,0 (224,0)	ND
	<i>E. faecalis</i>	100,0 (239,1)	25,0 (56,0)	ND	400,0 (956,2)	200,0 (448,1)	ND
	<i>E. faecium</i>	50,0 (119,5)	25,0 (56,0)	ND	100,0 (239,1)	200,0 (448,1)	ND
	<i>K. rhizophila</i>	100,0 (239,1)	25,0 (56,0)	ND	100,0 (239,1)	>200,0 (448,1)	ND
	<i>S. aureus</i>	62,5 (149,4)	100,0 (224,0)	1,95 (5,8)	>800,0 (1912,4)	50,0 (112,0)	3,9 (11,6)
Gram negativos	<i>E. coli</i>	200,0 (478,1)	100,0 (224,0)	31,2 (92,9)	200,0 (478,1)	100,0 (224,0)	31,25 (92,9)
	<i>P. aeruginosa</i>	100,0 (239,1)	50,0 (112,0)	125,0 (371,5)	200,0 (478,1)	>200,0 (448,1)	250,0 (743,1)
	<i>S. flexneri</i>	100,0 (239,1)	50,0 (112,0)	ND	200,0 (478,1)	200,0 (448,1)	ND
	<i>S. marcescens</i>	50,0 (119,5)	50,0 (112,0)	ND	200,0 (478,1)	100,0 (224,0)	ND

ND = no determinado.

(Morán et al. 2001b). Las diferencias observadas en los valores de CIM y CMB para los distintos surfactantes derivados de arginina pueden atribuirse a las diferencias estructurales entre los mismos: mientras que ACA y ALA presentan dos cargas positivas (ya que, si bien su estructura se asemeja más a la de Bz-Arg-NHC_n, poseen el grupo α -amino desprotegido), CAM y LAM tienen una sola, con la cola hidrofóbica unida al grupo α -amino de la arginina y el grupo carboxilo involucrado en un enlace éster con un metilo. Finalmente, la interacción diferencial (adsorción e inserción) de los surfactantes con las membranas y paredes celulares bacterianas, depende no sólo de la estructura química y el balance hidrofóbico/hidrofílico de las moléculas de surfactante, sino también de la composición particular de estas envolturas.

3.1.2. Efecto de los surfactantes sobre la supervivencia de patógenos

E. coli y *S. aureus* son microorganismos utilizados generalmente en pruebas antimicrobianas para el diseño de formulaciones aplicadas al lavado de manos, desinfectantes, sanitizantes, productos farmacéuticos y formulaciones de cuidado personal. Teniendo esto en cuenta, y considerando que los compuestos sintetizados podrían ser potencialmente empleados como *biocidas*, se estudió la cinética de supervivencia de estos patógenos en CN adicionado con Bz-Arg-NHC_n. Para ello, se analizaron las *cinéticas de muerte* para cada surfactante a dos concentraciones de los mismos, las cuales fueron seleccionadas en base a las CIM correspondientes: en primer lugar se ensayó la supervivencia de los microorganismos a concentraciones iguales a las respectivas CIM, mientras que la segunda concentración fue establecida en un valor igual al 50% de la anterior ($\frac{1}{2}$ CIM). Las curvas obtenidas se muestran en la Figura 3.3.1.

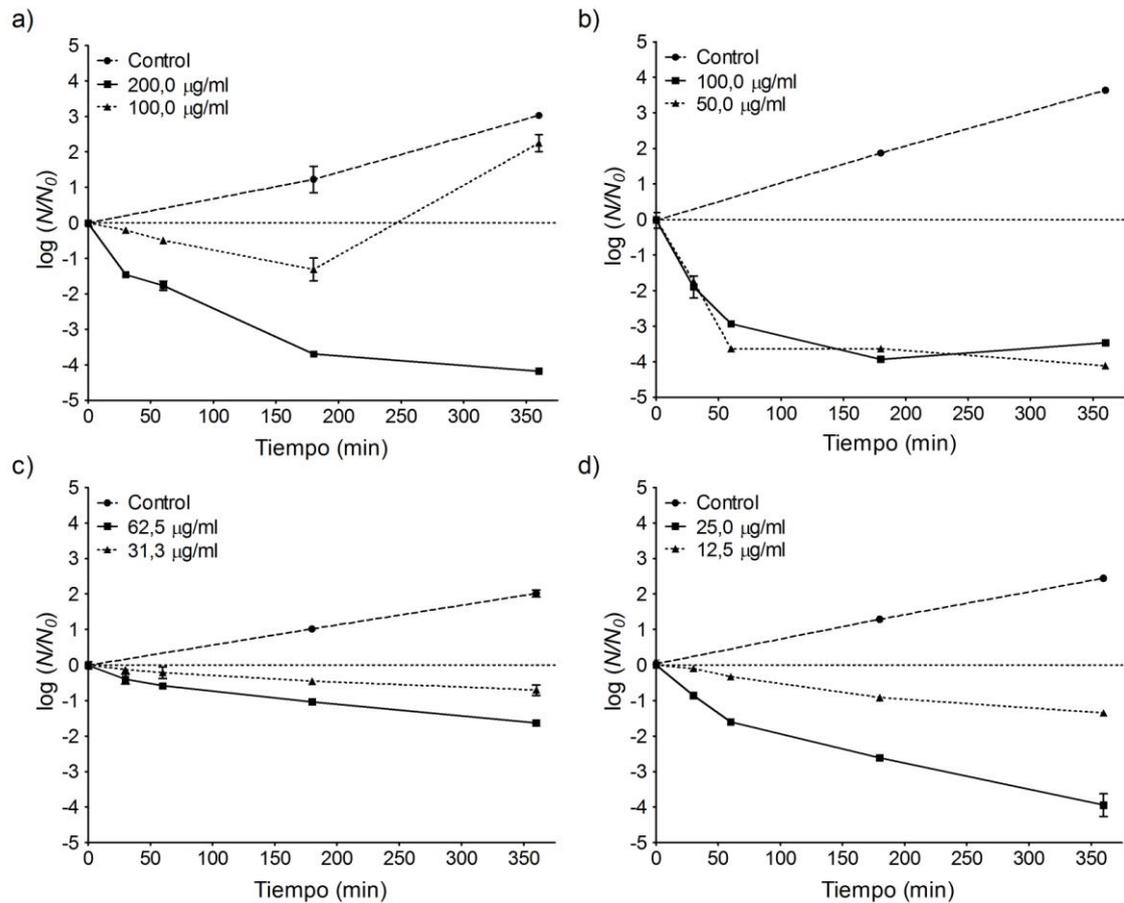


Figura 3.3.1. Curvas de supervivencia de (a, b) *Escherichia coli* y (c, d) *Staphylococcus aureus* en CN adicionado con (a, c) Bz-Arg-NHC₁₀ o (b, d) Bz-Arg-NHC₁₂. El recuento de microorganismos viables en cada caso se grafica como la media \pm SD de tres medidas independientes.

Bz-Arg-NHC₁₂ y Bz-Arg-NHC₁₀ demostraron efecto bactericida para ambos microorganismos ensayados, incluso en concentraciones iguales a la mitad de la CIM. En la mayoría de los casos se observó una notable disminución en el número de microorganismos viables luego de 6 h de incubación en presencia de los tensioactivos. En el caso de *E. coli* tratada con Bz-Arg-NHC₁₀ se observó un efecto bacteriostático para una concentración de $\frac{1}{2}$ CIM hasta 3 h de incubación, registrándose luego un aumento en el número de microorganismos viables (Figura 3.3.1.a).

Las cinéticas de muerte de *E. coli* tratada con Bz-Arg-NHC_n fueron comparadas con las reportadas en literatura para diferentes sales de amonio cuaternario (Vieira et al. 2008). Mientras que Bz-Arg-NHC₁₀ a una concentración igual a 0,45 mM (CIM) causó una reducción de 2 log (es decir, una disminución del 99,0% de la carga microbiana) en la población bacteriana luego de 60 min de tratamiento, para el mismo tiempo de incubación el bromuro de decil-trimetilamonio (C₁₀TAB) produjo sólo una disminución del 70% del inóculo inicial, siendo la concentración ensayada en este caso igual a 0,6 mM. En el caso de Bz-Arg-NHC₁₂ a una concentración correspondiente a ½ CIM (0,1 mM), se observó una reducción de 4 log en el número inicial de bacterias (equivalente a una reducción del 99,99% de la carga bacteriana) en 60 min de interacción, siendo que en condiciones similares para el bromuro de dodecil-trimetilamonio (C₁₂TAB) se registró una supervivencia del patógeno del 11% a una concentración de 0,45 mM. Para *S. aureus* incubado en presencia de Bz-Arg-NHC_n se observó una disminución continua en la población bacteriana, registrándose disminuciones de 2 y 4 log respecto del inóculo inicial luego de 6 h de incubación con Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ respectivamente (Figuras 3.3.1c y 3.3.1d).

3.2. Actividad antifúngica

3.2.1. Estudio de la actividad antifúngica de Bz-Arg-NHC_n contra hongos fitopatógenos

Se estudió la actividad antifúngica de los surfactantes derivados de arginina sobre especies *fitopatógenas*, analizando el efecto tanto sobre la forma proliferativa vegetativa (hifas) como sobre las esporas de reproducción asexual. Las especies fitopatógenas utilizadas como indicadoras fueron hongos *hemibiotróficos* (mantienen a

las células vivas durante las etapas iniciales de infección, pero provocan luego su muerte) responsables de diversas enfermedades en cultivos de interés económico: *Fusarium oxysporium* y *Fusarium solani* son patógenos que producen marchitamiento y putrefacción cortical (Lim et al. 1991; Kistler et al. 1998), mientras que *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum lindemuthianum* son los agentes causales de la enfermedad de antracnosis en frutas y otros cultivos (Podila et al. 1993; Balardin et al. 1997). Asimismo se profundizó en el mecanismo de la actividad antifúngica de Bz-Arg-NHC_n a través del análisis de su interacción con sistemas modelo de membrana utilizando composiciones lipídicas similares a la encontrada en membrana de los hongos. Por otro lado, y con el mismo objetivo, se llevó a cabo el estudio del efecto de los compuestos sobre la integridad de la membrana de las esporas, así como también la producción cualitativa de especies reactivas de oxígeno (ROS) como parte de la respuesta a la exposición de las mismas a los tensioactivos. Los resultados en este caso también fueron comparados con aquellos obtenidos para Cetrimide, utilizado como control durante el estudio de la actividad de los surfactantes frente a bacterias.

3.2.1.1. Inhibición del crecimiento vegetativo de hongos fitopatógenos

Se realizaron pruebas de inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos por tratamiento con los tensioactivos derivados de arginina determinándose los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial para distintas concentraciones de los surfactantes según la metodología descrita en la Sección 2.5.4 del presente Capítulo (pág. 158). En base a estos resultados, se establecieron las IC_{50} para cada cepa y cada surfactante, resumidos en la Tabla 3.3.2. Los tres compuestos estudiados mostraron actividad antifúngica contra los cuatro aislados de hongos

fitopatógenos analizados. Incluso en el caso de *F. oxysporium* tratado con Bz-Arg-NHC₁₂, para el que la determinación de la IC₅₀ no fue posible (los datos obtenidos no pudieron ser ajustados a la típica curva sigmoidea), se observó una importante inhibición del crecimiento vegetativo (Figura 3.3.2).

Tabla 3.3.2. Efecto inhibitorio de Bz-Arg-NHC_n en el crecimiento vegetativo de hongos fitopatógenos, expresados en términos de su IC₅₀ (μM).

Microorganismo	IC ₅₀ ^a (μM)		
	Bz-Arg-NHC ₁₀	Bz-Arg-NHC ₁₂	Cetrimide
<i>C. gloeosporioides</i>	61,3 ± 15,9	168,2 ± 10,6	73,2 ± 2,9
<i>C. lindemuthianum</i>	44,8 ± 2,0	80,3 ± 3,5	79,1 ± 5,7
<i>F. oxysporium</i>	70,7 ± 5,9	ND	80,8 ± 7,4
<i>F. solani</i>	61,6 ± 3,6	21,6 ± 3,2	67,9 ± 17,4

^aIC₅₀ ± SD; concentraciones responsables de la muerte del 50% de la población inicial de hifas luego de 72 h de incubación a los surfactantes. ND = no determinado.

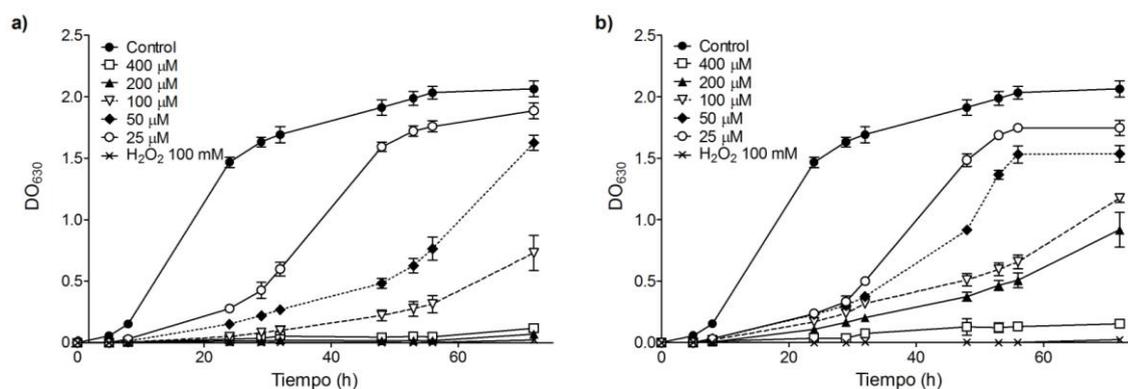


Figura 3.3.2. Cinéticas de crecimiento para *Fusarium oxysporium* en YPD adicionado con (a) Bz-Arg-NHC₁₀ o (b) Bz-Arg-NHC₁₂, a diferentes concentraciones. Los valores se grafican como la media ± SD de tres medidas independientes.

En general, Bz-Arg-NHC₁₀ demostró ser más eficaz frente a las cepas ensayadas que su contraparte de 12 carbonos en la cola hidrofóbica, exhibiendo IC₅₀ equivalentes o incluso inferiores que las obtenidas para Cetrimide. Contrariamente a esta tendencia, el crecimiento de *F. solani* fue afectado en mayor medida por tratamiento con Bz-Arg-NHC₁₂.

3.2.1.2. Inhibición de la germinación de esporas de hongos fitopatógenos

Las esporas son estructuras de supervivencia producidas por algunos organismos (como bacterias, hongos y protozoos) en condiciones adversas y que le permiten a los mismos sobrevivir y/o poder esparcirse en nuevos entornos. Entre ellas, algunas pertenecientes a distintas especies de hongos constituyen las esporas eucariotas ambientalmente más resistentes. Las esporas maduras son metabólicamente quiescentes, lo cual les permite permanecer latentes durante largos períodos de tiempo bajo condiciones de crecimiento desfavorables (por ejemplo, en ausencia de nutrientes). Asimismo, estas estructuras son resistentes al estrés ambiental, provocado por factores como altas temperaturas, desecación y radiación UV, lo que facilita la supervivencia a largo plazo o dispersión a través de grandes distancias alrededor del mundo. Finalmente, cuando las condiciones externas son adecuadas, las esporas pueden volver rápidamente de la dormancia y germinar para reanudar el crecimiento vegetativo (Huang et al. 2015). Debido a la importancia de la germinación de las esporas en el proceso de colonización del huésped, se investigó el efecto de los tensioactivos derivados de arginina en la germinación de las esporas de hongos fitopatógenos. Como puede verse en la Figura 3.3.3, todos los tensioactivos fueron capaces de inhibir la germinación de las

esporas de los aislados estudiados, ya que no se observó la generación de hifas en ninguno de los casos para las condiciones ensayadas.

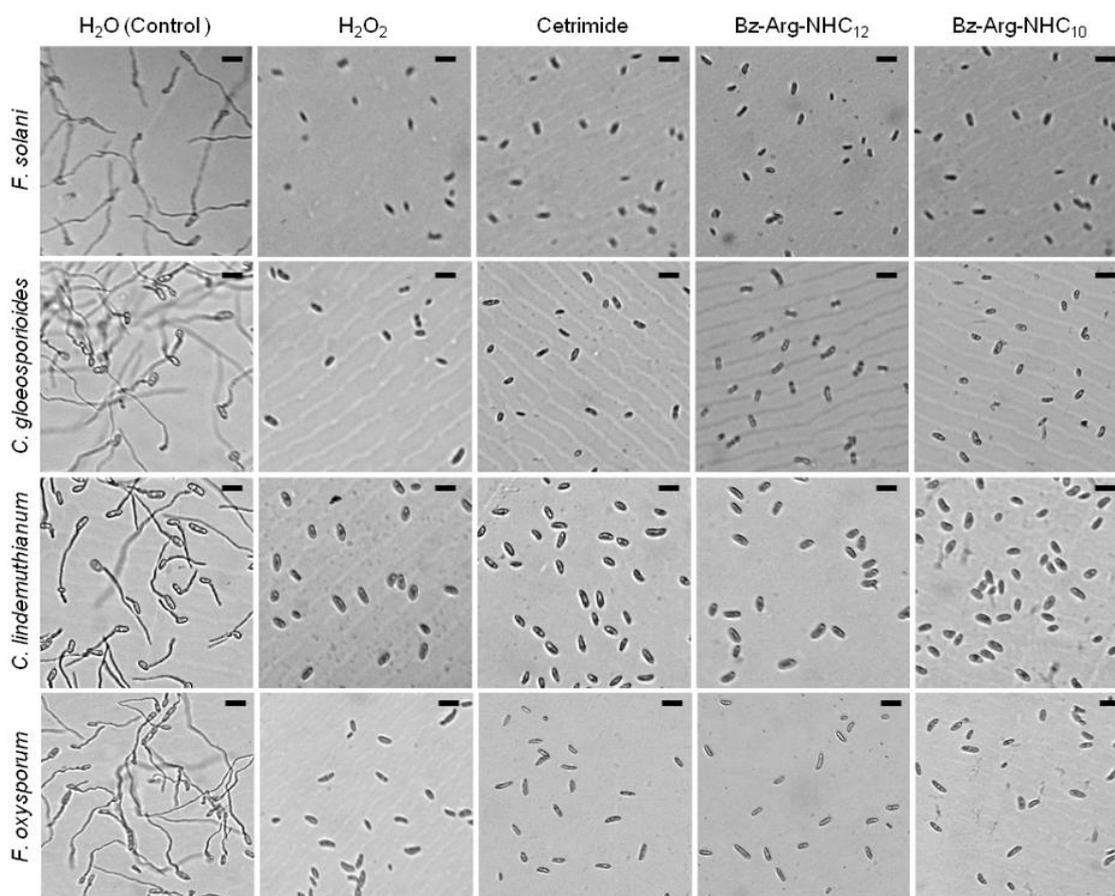


Figura 3.3.3. Inhibición de la germinación de esporas de hongos fitopatógenos producida por exposición a Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂ o Cetrimide (400 μ M) comparado con los controles (se utilizaron agua y H₂O₂ como controles negativo y positivo de la inhibición, respectivamente). Barra: 50 μ m.

Junto con los resultados anteriores, los ensayos revelaron la capacidad de los tensioactivos derivados de arginina de inhibir no sólo el crecimiento vegetativo de los hongos fitopatógenos, sino también el desarrollo de las esporas. Este hallazgo resulta de particular importancia ya que uno de los enfoques más efectivos para la interferencia

del proceso infeccioso consiste en la interrupción de la germinación de las esporas, un paso clave en la patogénesis fúngica.

3.2.1.3. Estudio del mecanismo de acción antifúngica de los Bz-Arg-NHC_n contra esporas de hongos fitopatógenos

La búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos nace de la necesidad de superar el continuo surgimiento de cepas resistentes a los fármacos fungicidas/fungistáticos ya existentes, por lo que constituye un tópico de fundamental interés para la investigación actual. Diversos mecanismos intervienen en la actividad antifúngica de los antibióticos y antisépticos comúnmente empleados para el tratamiento de infecciones micóticas, tales como la inhibición de la síntesis del ergosterol o de la síntesis de la pared celular, la formación de poros por unión a los lípidos de membrana o la inhibición de la división celular por análogos de nucleósidos que bloquean la síntesis de los microtúbulos (Odds et al. 2003).

Cualquiera fuese el mecanismo, la interacción primaria de los compuestos fungicidas con las células se produce a través de la envoltura celular, una estructura de múltiples capas compuesta principalmente por polisacáridos y proteínas (descrita en la Sección 1.2.1 del presente capítulo, pág. 145). La capa más externa de esta envoltura actúa como una barrera impermeable a macromoléculas, mientras que la capa interna es permeable y da resistencia mecánica. Por dentro de la pared celular se encuentra la membrana citoplasmática, compuesta principalmente por lípidos zwitteriónicos, aniónicos y ergosterol (Makovitzki et al. 2006). En el caso de las esporas de hongos, la pared celular se encuentra formada principalmente por polisacáridos (Wang et al. 2013). Debido a la carga negativa de la superficie celular de los hongos, presente tanto en la

forma vegetativa como en las esporas, se espera que los tensioactivos catiónicos interactúen fácilmente con ella. Sin embargo, para ejercer su efecto fungicida, los mismos deberán ser capaces de atravesar la pared celular, interactuar con la membrana plasmática y, dependiendo de su objetivo, eventualmente alcanzar el citoplasma.

En este contexto, el fenómeno responsable del efecto antifúngico de los tensioactivos catiónicos ha sido atribuido a la modificación de la carga de la superficie celular de negativa a positiva, como ha sido previamente demostrado por ensayos de movilidad electroforética (Vieira & Carmona-Ribeiro 2006). Estudios con CTAB (uno de los principales componentes del Cetrimide) han demostrado la capacidad de este compuesto de inhibir el desarrollo de *C. albicans*, evidenciando que el mecanismo antifúngico en este caso no involucra la ruptura de la membrana plasmática ni la lisis celular, lo cual ha sido demostrado por ausencia de la fuga de moléculas que absorben al UV (como ácidos nucleicos y proteínas). El cambio de la carga superficial celular de negativa a positiva favorece la penetración del surfactante a través de la pared celular, permitiéndole al mismo alcanzar la membrana citoplasmática. Por otro lado, el trabajo publicado por Shirai et al. (2009) analiza cómo los compuestos pertenecientes a otra familia de tensioactivos catiónicos, los *gemi-QAT*, son capaces de producir cambios en la permeabilidad de la pared y la membrana citoplasmática de *S. cerevisiae*, penetrar a través de estas envolturas y alcanzar el interior de la célula, donde ejercen su acción a nivel de las enzimas mitocondriales y las membranas de distintas organelas.

Teniendo en cuenta que el efecto antifúngico de Bz-Arg-NHC_n podría involucrar la desestabilización de la membrana plasmática de las esporas, se evaluó la integridad de la misma mediante microscopía de fluorescencia y el empleo de una sonda

impermeable fluorescente. Durante los ensayos se analizó la captación de yoduro de propidio (IP) por esporas de *C. lindemuthianum* tratadas con Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂ o Cetrimide. El IP es un colorante fluorescente que se une al ADN y funciona como una *sonda de viabilidad por exclusión*: cuando la integridad de la membrana plasmática se ve afectada, el IP puede atravesarla y provocar la tinción fluorescente de la célula (Wang et al. 2013). La incorporación de IP en esporas tratadas con los tensioactivos fue evidenciada por la observación de fluorescencia roja intensa, mientras que no se detectó fluorescencia alguna en las esporas incubadas en ausencia de los mismos (Figura 3.3.4). Estos resultados sugieren que, gracias a su carga positiva, tanto Bz-Arg-NHC_n como Cetrimide son capaces de interactuar fuertemente con la membrana celular (cargada negativamente), comprometiendo la integridad de la misma.

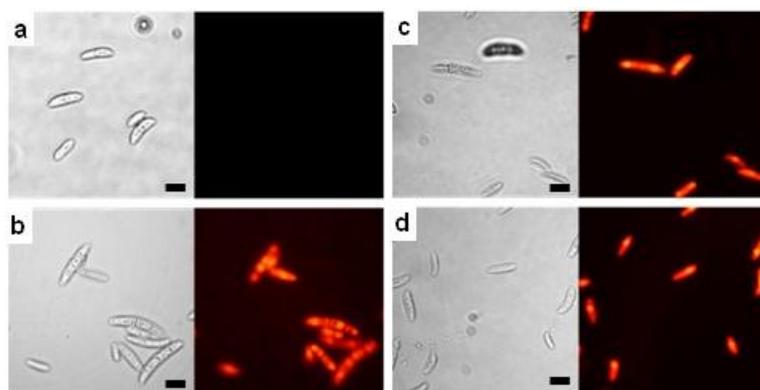


Figura 3.3.4. Permeabilización de la membrana de esporas de *Colletotrichum lindemuthianum* inducida por exposición a (b) Bz-Arg-NHC₁₂ 400 μ M, (c) Bz-Arg-NHC₁₀ 400 μ M o (d) Cetrimide 400 μ M, comparado al control en ausencia de los surfactantes (a). Barra: 10 μ m.

De manera de indagar en el mecanismo antifúngico de Bz-Arg-NHC_n, se estudió la interacción de los surfactantes con monocapas lipídicas como sistema modelo de

membrana, haciendo uso de un tensiómetro de Langmuir como se detalla en la Sección 2.5.6.2 del presente Capítulo (pág. 160). En primer lugar, se estudió la cinética de adsorción de las moléculas de surfactante en la interfase PBS-aire. Luego de la inyección de cada tensioactivo en la subfase acuosa (PBS), la adsorción de los compuestos en la interfase produjo un incremento en la presión superficial (Π), cuya magnitud fue proporcional a la concentración del surfactante (Figura 3.3.5). Para la concentración probada ($30 \mu\text{M}$) se registró un retraso o *fase lag* en la cinética de adsorción de Bz-Arg-NHC₁₀, seguido de un aumento de presión superficial ligeramente superior que el observado para Bz-Arg-NHC₁₂.

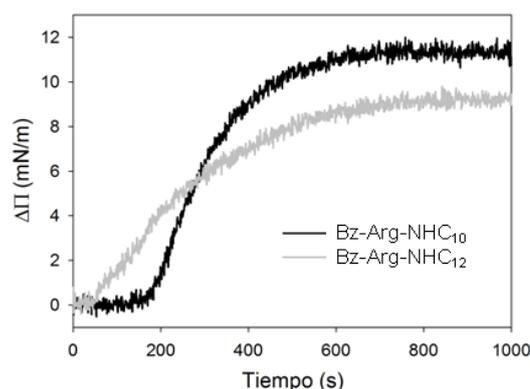


Figura 3.3.5. Cinética de adsorción de Bz-Arg-NHC_n ($30 \mu\text{M}$) en la interfase aire-PBS medida con un tensiómetro de Langmuir a 20 C.

En segundo lugar, y haciendo uso de la misma metodología, se investigó la interacción de ambos tensioactivos derivados de arginina con membranas compuestas por DOPC/PE/ERG en relación molar similar a la encontrada en las membranas de hongos (2:1:1). Las curvas de presión superficial en función del tiempo obtenidas para

cada tensioactivo, junto con las curvas de cambio en la presión superficial para monocapas con distinta presión inicial se muestran en la Figura 3.3.6.

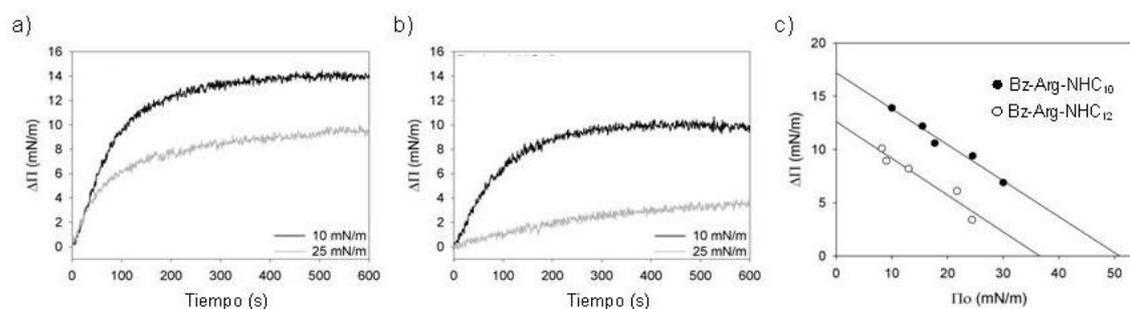


Figura 3.3.6. Cinéticas de inserción de (a) Bz-Arg-NHC₁₀ 30 μ M o (b) Bz-Arg-NHC₁₂ 30 μ M en una monocapa lipídica compuesta por DOPC/PE/ERG en una relación molar 2:1:1 para una presión lateral inicial (Π_0) de 10 o 25 mN/m a $20\pm 1^\circ\text{C}$. (c) Cambios en la presión superficial ($\Delta\Pi$) vs. Π_0 luego de 10 min de interacción de Bz-Arg-NHC_n con una monocapa lipídica DOPC/PE/ERG (2:1:1). Los valores de $\Delta\Pi_c$ fueron obtenidos por extrapolación a $\Delta\Pi=0$.

En ambos casos se observó una rápida interacción de los tensioactivos con las monocapas lipídicas luego de su inyección en la subfase, produciendo cambios de la presión superficial máxima de 14 y 10 mN/m para Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ respectivamente, ambos a una concentración de 30 μ M y una presión superficial inicial de 25 mN/m (Figuras 3.3.6a y 3.3.6b). Con la finalidad de determinar el $\Delta\Pi$ crítico ($\Delta\Pi_c$), es decir, la presión superficial máxima de inserción, se construyeron las gráficas de $\Delta\Pi$ en función de la presión superficial inicial (Π_0) para cada tensioactivo, determinándose el $\Delta\Pi_c$ por extrapolación al *eje de las abscisas* (Figura 3.3.6c). Este parámetro es útil para comparar la cantidad de un compuesto que se inserta en una monocapa de lípidos (Calvez et al. 2009; Calvez et al. 2011). $\Delta\Pi_c$ debe ser superior a 30 mN/m para que

ocurra una interacción eficaz entre el surfactante y la membrana, puesto que este valor se considera equivalente a la presión superficial crítica de la monocapa externa de membrana celular (Seelig 1987). En este caso, los cálculos revelaron valores de $\Delta\Pi_c$ para una membrana de composición similar a la membrana fúngica de 51 y 37 mN/m para Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ respectivamente. Estos resultados indican que ambos compuestos son capaces de interactuar con los lípidos de las monocapas, siendo mayor la interacción en el caso de Bz-Arg-NHC₁₀, resultado que se correlaciona con el mayor poder antifúngico observado para este compuesto (Tabla 3.3.2).

Por otro lado, otro de los posibles efectos involucrados en el mecanismo de la actividad antifúngica es una acción directa de los tensioactivos en el citoplasma: algunas moléculas de surfactante podrían atravesar la pared celular, traslocar a través de la membrana, alcanzar el citoplasma e interactuar con sus componentes, interfiriendo en el metabolismo celular normal (Heerklotz & Seelig 2000). Investigaciones previas han establecido el rol de las *especies reactivas de oxígeno (ROS)*, tales como el H₂O₂, como mediadores en diversas cascadas de señalización intracelular. Sin embargo, la producción excesiva de ROS puede conducir a estrés oxidativo, daño mitocondrial, pérdida de la función y, en última instancia, la muerte celular (Mesquita et al. 2013). Teniendo esto en cuenta, se investigó el estrés oxidativo relacionado con la actividad antifúngica de Bz-Arg-NHC_n, estimando cualitativamente la producción de ROS en esporas de *C. gloeosporioides* y *F. oxysporium* tratadas con los tensioactivos. La producción *in situ* de ROS fue evidenciada por la captación del sustrato 3,3-diaminobenzidina (DAB). Este compuesto polimeriza local e instantáneamente al entrar en contacto con ROS en presencia de actividad de peroxidasa, formando un polímero de color marrón rojizo, detectable por observación al microscopio óptico

(Nordberg & Arnér 2001). Como puede apreciarse en la Figura 3.3.7, la formación del polímero de color marrón oscuro no fue detectada en esporas tratadas con agua (control), lo que indica bajos niveles de producción de ROS. Sin embargo, cuando las esporas fueron incubadas previamente con los tensioactivos, mostraron una intensa coloración rojiza, evidenciando que la inducción de estrés oxidativo podría ser parte del mecanismo antifúngico de los tensioactivos.

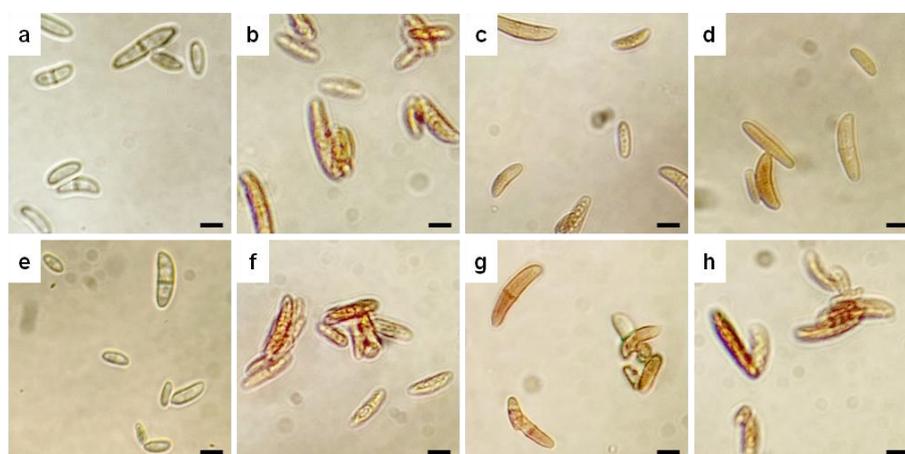


Figura 3.3.7. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) en esporas de (a-d) *Colletotrichum gloeosporioides* y (e-h) *Fusarium oxysporium*, inducida por la exposición a (b, f) Bz-Arg-NHC₁₀ 400 μ M, (c, g) Bz-Arg-NHC₁₂ 400 μ M o (d, h) Cetrimide 400 μ M, comparadas con el control en ausencia de los surfactantes (a, e). Barras: 10 μ m.

Considerando los resultados de todos estos experimentos, la permeabilización de la membrana citoplasmática podría estar implicada en el mecanismo antifúngico de los tensioactivos en las concentraciones probadas. Sin embargo, la muerte celular no puede atribuirse a la lisis inducida por la desorganización de la envoltura celular, ya que si bien el IP fue capaz de penetrar a través de la pared y la membrana de las esporas sometidas al tratamiento con Bz-Arg-NHC_n, indicando que las mismas no eran viables, las

mismas conservaron su morfología (Figura 3.3.4). Este hecho apoya la idea de que el blanco de los tensioactivos serían componentes intracelulares, más que una drástica destrucción de la membrana celular, y que las alteraciones de la permeabilidad de la membrana citoplasmática sería consecuencia de estos efectos intracelulares. Además, el estrés oxidativo podría estar involucrado como parte del mecanismo de muerte celular inducido por Bz-Arg-NHC_n, ya que los surfactantes aumentarían la penetración de oxígeno en las células, lo que también podría provocar alteraciones en la permeabilidad de la membrana citoplasmática. Esta hipótesis se ve reforzada si tenemos en cuenta que los efectos ocurren en una concentración mucho más baja que la correspondiente CMC de los compuestos (Capítulo 2, Sección 3.5.1, Tabla 2.3.3, pág. 114).

La idea que los tensioactivos podrían penetrar la pared celular y la membrana plasmática sin producir la lisis celular, interfiriendo con los procesos intracelulares normales (incluyendo la respiración celular), fue previamente sugerida por Yu et al. (2015), quienes reportaron la despolarización de la membrana mitocondrial en *Candida albicans* causada por CTAB. Si los fenómenos que llevan al ingreso de IP a la célula son producto de la acción de las ROS o de los tensioactivos en sí sigue siendo un tema de debate.

La penetración de Bz-Arg-NHC_n a través de las envolturas celulares de las células de hongos podría ser similar al mecanismo de los *péptidos de penetración celular* (CPP, del inglés *cell-penetrating peptides*). Los CPP son péptidos cortos, cargados positivamente, ricos en residuos de arginina, que tienen la capacidad de atravesar las membranas celulares con mecanismos dependientes y/o independientes de energía, sin involucrar el reconocimiento de receptores específicos (Bechara & Sagan 2013). Esta

propiedad puede atribuirse básicamente a interacciones electrostáticas entre la pared celular (cargada negativamente) y los CCP, a través de los múltiples residuos de arginina de estos últimos. El grupo guanidinio de la cadena lateral de arginina tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno bidentados con los grupos cargados negativamente (fosfato, sulfato y carboxilato) de la superficie celular de una manera más eficiente que el grupo ϵ -amino presente en la lisina (la cual sólo puede contribuir a la formación de un único puente de hidrógeno). Esta observación demuestra que no sería solamente la carga positiva de la cadena lateral del aminoácido la responsable de esta fuerte interacción. Además, la carga positiva de la arginina se encuentra deslocalizada y la formación de un complejo ión apareado que puede difundir a través de la membrana plasmática provoca la atenuación de su polaridad. La presencia de residuos hidrofóbicos en los CPP mejora notablemente la traslocación de los mismos a través de la membrana plasmática, debido a una mayor interacción entre el péptido y la bicapa lipídica (Bechara & Sagan 2013).

Por otro lado, se ha propuesto que los péptidos antimicrobianos ricos en arginina podrían ejercer su efecto por actividad interfacial y/o por partición en la región interfacial de la bicapa, provocando rearrreglos de lípidos y la segregación entre grupos polares y no polares (Rathinakumar & Wimley 2008; Rathinakumar et al. 2009). Hristova & Wimley (2011) sugieren que la arginina es capaz de interactuar electrostáticamente y a través de la formación de múltiples puentes de hidrógeno tanto con las cabezas polares de los lípidos como con el agua, produciendo como respuesta deformaciones en la estructura de la bicapa. Esto significa que los péptidos que contienen arginina podrían penetrar profundamente en la membrana a través de interacciones hidrofóbicas, arrastrando grupos polares de lípidos y moléculas de agua con ellos hacia el seno de la

membrana, lo que produciría una interrupción de la estructura de la bicapa y favorecería el movimiento de más grupos polares de lípidos, moléculas de agua y péptidos (o moléculas que contienen arginina) hacia el núcleo hidrofóbico de la membrana.

En este sentido, se han publicado pocos estudios referentes a la interacción de la arginina con las membranas biológicas fuera del contexto de su papel en la interacción proteína-membrana. El rol del grupo guanidinio en la inserción de L-arginina en interfaces de lípidos fue evaluado por Bouchet et al. (2010). Estos estudios fueron llevados a cabo a través del análisis de los efectos de la inserción de la arginina en monocapas lipídicas compuestas por fosfatidilcolina (PC) o fosfatidiletanolamina (PE), examinando las variaciones en las propiedades de superficie de la membrana y su potencial superficial. La mayor interacción y efecto de la arginina en una monocapa de PE, en comparación con una de PC, podría atribuirse a la carga más negativa de la superficie de la primera respecto de la última. Los resultados experimentales han indicado que la arginina es capaz de insertarse en las membranas de *dimiristoil-fosfatidiletanolamina* (DMPE) tanto en estado fluido como en gel, lo cual podría deberse a un proceso de fluidificación desencadenado por interacciones del tipo puente de hidrógeno específicas.

Por otro lado, Fonseca et al. (2010) publicaron un estudio similar realizado con el derivado de la arginina: N^{α} -benzoil-arginina etil éster (BAEE), en el que el grupo α -amino está protegido por una función *benzoilo* y el grupo α -carboxilo participa en un enlace éster con etanol. El BAEE es el sustrato empleado en la síntesis enzimática de Bz-Arg-NHC_n, por lo que es estructuralmente parecido a estos compuestos: las principales diferencias incluyen la cadena hidrocarbonada más corta unida al grupo α -

carboxilo a través de un enlace éster en lugar de una amida. En este trabajo los investigadores demostraron que la estabilización de una molécula de arginina en una bicapa lipídica implica la inserción del motivo guanidinio en este tipo de entorno: el grupo guanidinio se orienta hacia los grupos fosfato de los lípidos de membrana, formando puentes de hidrógeno con los mismos, mientras que el grupo carboxilato se orienta hacia la fase acuosa. Por el contrario, en el caso del BAEE, el grupo guanidinio se orienta hacia la fase acuosa, mientras que los grupos benzoilo y etílico se insertan en la porción hidrofóbica de la membrana. Teniendo estos resultados en cuenta, se sugirió un modelo de inserción de Bz-Arg-NHC_n en las membranas lipídicas, en el cual tanto el grupo benzoilo como la cadena hidrocarbonada de los surfactantes se insertan en el seno de la membrana, mientras que el grupo guanidinio de la arginina se sitúa en la interfase, orientado hacia la fase acuosa (Figura 3.3.8).

Con el fin de estudiar la interacción de la arginina con bicapas lipídicas de PC y PE, se han descrito estudios de dinámica molecular mostrando una fuerte interacción entre el grupo guanidinio de la arginina y el oxígeno del grupo carbonilo de los lípidos (Herrera et al. 2012). Mientras que para membranas de dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) se evidenció una fuerte interacción entre el grupo guanidinio de la arginina y los fosfatos de los fosfolípidos, en las membranas de DMPE la arginina es estabilizada mediante puentes de hidrógeno con agua y/o con los grupos polares de los lípidos. En esta última clase de membranas, la inserción de las moléculas de arginina provoca una ruptura en la red interna de puentes de hidrógeno entre los grupos polares de los lípidos, aumentando el área ocupada por la molécula de lípido. Por el contrario, en las bicapas de DMPC, la arginina se incorpora mediante la sustitución de las moléculas de

agua ya presentes en la estructura de la membrana, sin cambios significativos en el área de cada lípido.

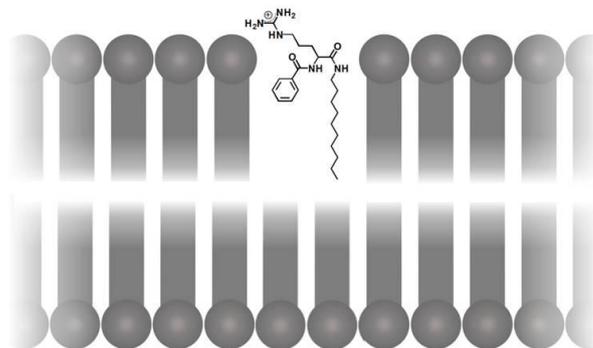


Figura 3.3.8. Modelo propuesto para la inserción de Bz-Arg-NHC_n en las bicapas lipídicas. Las moléculas del surfactante interactúan con los fosfolípidos tanto a través de uniones electrostáticas entre el grupo fosfato cargado negativamente y el motivo catiónico guanidinio (orientado hacia la fase acuosa), como a través de interacciones hidrofóbicas entre el grupo benzoilo y la cadena hidrocarbonada con las colas de los fosfolípidos.

Se han propuesto diferentes modelos para explicar la traslocación de los tensioactivos derivados de arginina a través de la membrana hacia el interior del citoplasma. En primer lugar, la *traslocación directa*, supone la desestabilización de la membrana de forma independiente de energía y temperatura. Otros mecanismos involucran la formación de *micelas invertidas* y/o *poros*. Finalmente, la traslocación puede darse a través de la *permeabilización de la membrana tipo electroporación*. Considerando la estructura molecular de Bz-Arg-NHC_n, la forma de cono invertido de estas moléculas apoyaría la hipótesis de que la *formación de poros transitorios* sería el principal mecanismo involucrado. En general, la formación de poros por moléculas que inducen una curvatura positiva en la bicapa (como los lisofosfolípidos) se explica por la

disminución de energía por unidad de longitud (*tensión de línea*) requerida para formar los bordes del poro, cuya curvatura global geométrica es positiva. Por el contrario, y en base a la misma explicación, los lípidos no lamelares con curvatura intrínseca negativa (tales como PE) aumentan la energía libre para la creación de poros. En un poro de tipo toroidal (Figura 3.3.9), la curvatura positiva se encuentra perpendicular al plano de la membrana, mientras que la curvatura negativa está presente en el plano de la membrana en todo el poro.

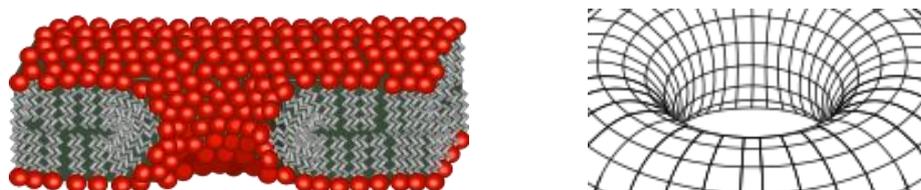


Figura 3.3.9. Corte transversal de un poro de tipo toroidal (izquierda) y detalle de las curvaturas presentes en el mismo (derecha).

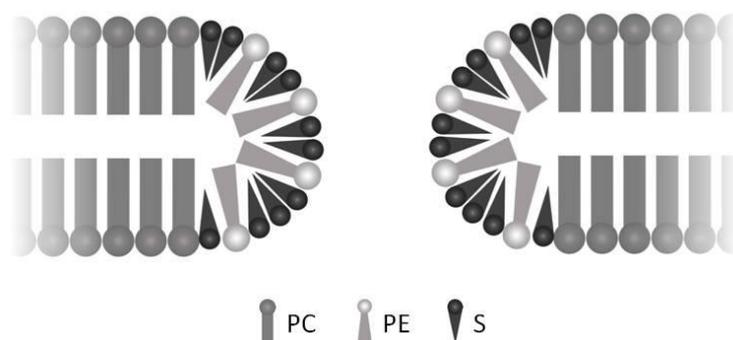


Figura 3.3.10. Modelo propuesto para el efecto de Bz-Arg-NHC_n en las membranas de hongos (formación de poros transitorios). PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; S: Bz-Arg-NHC_n.

Teniendo en cuenta que PE, con forma de cono invertido, puede adoptar diferentes estructuras en la membrana celular (lamelares o de micelas invertidas) y que las membranas fúngicas son ricas en PE (Makovitzki et al. 2006), la formación de poros transitorios a través de las cuales las moléculas del surfactante pueden difundir hacia el citoplasma sería el modelo más apropiado para explicar el mecanismo de antifúngico de Bz-Arg-NHC_n (Figura 3.3.10).

3.2.2. Efecto de los surfactantes derivados de arginina en hongos patógenos de humanos

Existen más de 50000 especies de hongos, pero sólo 200 de ellas causan enfermedades en los animales vertebrados, incluyendo los seres humanos (Castillo Expósito 2006). Los *hongos dermatofitos* son responsables de las enfermedades fúngicas más comunes en los seres humanos, afectando cerca del 25% de la población en todo el mundo. Las *candidiasis* (infecciones producidas por especies del género *Candida*) son también comunes y consisten principalmente en infecciones de las vías orales (como las candidiasis bucal y esofágica) y genitales (especialmente la candidiasis vulvovaginal) (Brown et al. 2012).

Los hongos patógenos de humanos son principalmente exógenos, aunque las micosis más frecuentes son las causadas por especies pertenecientes a la microbiota normal del cuerpo (*patógenos oportunistas*), especialmente en el caso de los pacientes inmunocomprometidos. Si bien la mayoría de las personas en sus vidas se verá afectada por infecciones fúngicas superficiales, relativamente fáciles de curar, un gran número de personas en todo el mundo contraerán infecciones invasivas, de difícil diagnóstico y tratamiento, que amenazarán sus vidas. En este contexto, el surgimiento de la

resistencia a multidrogas nuevamente se presenta como una problemática creciente y primordial importancia (Brown et al. 2012).

Considerando la importancia de las infecciones fúngicas en general, y las micosis superficiales en particular, se probó el efecto de Bz-Arg-NHC_n y Cetrimide contra dos especies del género *Trichophyton* (hongos filamentosos) y *Candida albicans* (levadura unicelular capaz de desarrollar una forma filamentososa).

3.2.2.1. Inhibición de la germinación de microconidios de hongos dermatofitos

Debido a la importancia de la germinación de los microconidios para la patogénesis de los hongos dermatofitos, se estudió la interferencia en este proceso por tratamiento con Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂, comparándola con el efecto observado para Cetrimide. Para ellos se monitoreó espectrofotométricamente la germinación de microconidios de *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* en SDB adicionado con distintas concentraciones de los tensioactivos, durante un período total de incubación de 21 días, calculándose los porcentajes de inhibición del crecimiento en cada caso. La Tabla 3.3.3 resume los valores CIM obtenidos para los días 7 y 21 de incubación junto con las IC₅₀ determinadas para el período de incubación máximo. Como puede verse, los tres tensioactivos fueron capaces de inhibir ambas cepas, exhibiendo valores de CIM similares. Como el tiempo de incubación puede influir en la determinación de la actividad antifúngica, se compararon las CIM registradas para los días 7 y 21 de incubación. Resultó interesante el hecho de que el tiempo de incubación no influyó en las CIM obtenidas en la mayoría de los casos. Sin embargo, en los casos de *T. rubrum* incubado en presencia de Bz-Arg-NHC₁₂ y Cetrimide, un mayor tiempo de incubación produjo un aumento en la CIM de una dilución.

Tabla 3.3.3. Efecto inhibitorio de los surfactantes sobre la germinación de microconidios de hongos dermatofitos expresada en términos de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la IC₅₀

Microorganismo	Bz-Arg-NHC ₁₀			Bz-Arg-NHC ₁₂			Cetrimide		
	CIM ₇ ^a (μM)	CIM ₂₁ ^a (μM)	IC ₅₀ ^b (μM)	CIM ₇ ^a (μM)	CIM ₂₁ ^a (μM)	IC ₅₀ ^b (μM)	CIM ₇ ^a (μM)	CIM ₂₁ ^a (μM)	IC ₅₀ ^b (μM)
<i>T. rubrum</i>	125	125	52,06 ± 4,52	62,5	125	32,39 ± 0,26	62,5	125	51,48 ± 1,59
<i>T. mentagrophytes</i>	125	125	58,15 ± 0,45	125	125	57,85 ± 0,70	62,5	62,5	37,19 ± 1,58

^aMenor concentración de los surfactantes necesaria para inhibir completamente el desarrollo de los microconidios ($DO_{630} = 0$ e $Inh\% = 100\%$) después de 7 (CIM₇) o 21 (CIM₂₁) días de exposición a los surfactantes. ^bMedia ± SD; concentraciones responsables de la inhibición del desarrollo del 50% respecto del control después de 21 días de exposición a los surfactantes (IC₅₀).

La actividad antifúngica de surfactantes tipo géminis, como la *Clorhexidina* (un desinfectante comercial) y otros pertenecientes a la familia de los derivados de bis(fenilacetil)-arginina – $C_n(CA)_2$ – (donde n es el número de grupos metileno en el espaciador), fue probada contra *T. mentagrophytes* (Castillo Expósito 2006). Estos compuestos mostraron valores CIM entre 14 μ M (Clorhexidina) y 312 μ M [$C_{10}(CA)_2$] luego de la exposición durante 48-72 h frente al agente antimicrobiano. En comparación con estos resultados, Bz-Arg-NHC $_n$ y Cetrimide mostraron valores de CIM dentro de este mismo rango (Tabla 3.3.3) luego de 21 días de incubación, siendo las CIM de Bz-Arg-NHC $_n$ más cercanas al valor obtenido para $C_{12}(CA)_2$ (149 μ M), mientras que las obtenidas para Cetrimide fueron del orden de $C_3(CA)_2$.

3.2.2.2. Susceptibilidad de *Candida albicans*

C. albicans es un patógeno humano oportunista responsable de infecciones conocidas como *candidiasis*. Debido a su importancia clínica es considerado un organismo modelo para el estudio de hongos patógenos y fármacos antimicóticos (Kabir et al. 2012), por lo que numerosos estudios preliminares reportan la actividad antifúngica de tensioactivos catiónicos contra este patógeno (Vieira & Carmona-Ribeiro 2006; Castillo et al. 2006; Badawi et al. 2007; Murguía et al. 2008; Kanjilal et al. 2009; Ziani et al. 2011; Obłąk et al. 2013). Teniendo esto en cuenta, se realizaron pruebas de susceptibilidad de *C. albicans* frente a Bz-Arg-NHC $_n$, utilizando tanto una cepa de la colección ATCC como un aislado clínico de esta levadura para el cálculo de la CIM y la CFM (*concentración fungicida mínima*) (Tabla 3.3.4). Los resultados, como en el caso de los demás microorganismos, fueron contrastados con los obtenidos para Cetrimide. Como puede verse, los tres surfactantes fueron capaces de inhibir e incluso matar

ambas cepas de levaduras, a excepción de Bz-Arg-NHC₁₂ que sólo demostró capacidad fungistática frente al aislado clínico.

Numerosos estudios reportan un aumento en la resistencia a antibióticos de aislados clínicos bacterianos obtenidos en hospitales respecto de aquellos aislados obtenidos de pacientes ambulatorios (Hryniewicz et al. 2001; Arslan et al. 2005; Muvunyi et al. 2011). Los valores de CIM y CFM fueron mayores para el aislado clínico que para la cepa de colección estudiada. Este hecho apoya la hipótesis de que ni la pared celular ni la membrana plasmática serían los principales objetivos de la acción antifúngica de los surfactantes, ya que la interacción de los agentes tensioactivos con las mismas sería altamente inespecífica.

Tabla 3.3.4. Efecto inhibitorio de los surfactantes sobre el crecimiento de *C. albicans* expresados en función de las concentraciones inhibitorias y fungicidas mínimas (CIM y CFM).

Surfactante	ATCC 64548		Aislado clínico	
	CIM^a (μM)	CFM^b (μM)	CIM^a (μM)	CFM^b (μM)
<i>Bz-Arg-NHC₁₀</i>	62,5	125,0	125,0	250,0
<i>Bz-Arg-NHC₁₂</i>	31,2	125,0	62,5	>500,0
<i>Cetrimide</i>	15,6	62,5	18,8	125,0

^aCIM: Menor concentración del surfactante capaz de inhibir completamente el crecimiento medible de la levadura ($DO_{630} = 0$ e $Inh\% = 100\%$) luego de 24 h de exposición al mismo. ^bCFM: Menor concentración del surfactante capaz de inhibir completamente el crecimiento la levadura (ausencia de colonias) luego de 24 h de exposición al mismo.

La actividad antifúngica de Bz-Arg-NHC_n sobre *C. albicans* fue comparada con la reportada en literatura para otros surfactantes derivados de arginina (Morán et al. 2001a). En relación a los análogos de 10 carbonos, los compuestos exhibieron valores de CIM similares: mientras que Bz-Arg-NHC₁₀ registró una CIM de 62,5 μM, las mismas para ACA y CAM fueron de 20,1 y 42,0 μM, respectivamente. Asimismo, y a diferencia del derivado de 12 carbonos, Bz-Arg-NHC₁₀ demostró ser capaz de inhibir completamente el crecimiento de *C. albicans* (*actividad fungicida*), hecho que no fue reportado para el resto de los tensioactivos. Por otro lado, si bien LAM reveló un valor de CIM similar al de Bz-Arg-NHC₁₂ (53,0 y 31,2 μM, respectivamente), ALA demostró una mayor actividad fungistática dentro de este grupo de tensioactivos, probablemente debido a su doble carga positiva. Finalmente, se observó la misma tendencia en comparación con otros surfactantes/desinfectantes catiónicos comerciales, como el cloruro de benzalconio (CIM 64 μM) (Murguía et al. 2008) y la Clorhexidina (CIM 55 μM) (Castillo et al. 2006).

4. Conclusiones

Se llevó a cabo el estudio de la actividad antibacteriana de Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, mostrando valores de CIM definidos y un efecto bactericida frente a la mayor parte de las cepas ensayadas.

Ambos surfactantes fueron capaces de reducir en un porcentaje mayor o igual al 99,0% la carga bacteriana inicial luego de tan sólo 1 h de incubación con *E. coli* y *S. aureus*.

La actividad antifúngica de Bz-Arg-NHC_n fue eficiente tanto frente a la forma vegetativa (hifas) como a las esporas asexuales reproductivas de hongos fitopatógenos, así como también frente a especies dermatofitas y a la levadura *C. albicans*, para la cual reveló actividad fungicida.

Los ensayos de interacción con monocapas evidenciaron una mayor interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ con monocapas lipídicas de composición similar a los hongos, resultado que se correlaciona con el mayor poder antifúngico observado para este compuesto.

Dado que los valores de CIM e IC₅₀ para la actividad antifúngica fueron menores que las CMC calculadas para los compuestos, los monómeros serían los principales responsables del efecto observado.

Según la relación *estructura química/actividad* de los surfactantes, a menor longitud de la cadena hidrocarbonada, mayor actividad fungistática contra las especies fitopatógenas y menor actividad bactericida/bacteriostática y fungistática contra las especies de hongos dermatofitos.

El mecanismo sugerido para la acción antifúngica de Bz-Arg-NHC_n involucraría la formación de poros transitorios en la membrana citoplasmática, a través de los cuales las moléculas del surfactante difundirían hacia el citoplasma, donde interactuarían con componentes intracelulares, siendo la inducción de estrés oxidativo una consecuencia de esta interacción.

El modelo propuesto para la inserción de Bz-Arg-NHC_n en las bicapas lipídicas sugiere la interacción de las moléculas de surfactante con los fosfolípidos tanto a través de uniones electrostáticas (entre el grupo fosfato cargado negativamente y el motivo catiónico guanidinio, orientado hacia la fase acuosa) como a través de interacciones hidrofóbicas (entre el grupo benzoilo y la cadena hidrocarbonada del tensioactivo con las colas de los fosfolípidos). La mayor longitud de la cadena hidrocarbonada en el caso de Bz-Arg-NHC₁₂ favorecería las interacciones hidrofóbicas, quedando las moléculas insertas en la bicapa lipídica, mientras que Bz-Arg-NHC₁₀ tendría mayor tendencia a traslocar a través de la membrana y alcanzar los blancos intracelulares.

Referencias

- Alvarez FJ, Douglas LM, Konopka JB (2007) Sterol-rich plasma membrane domains in fungi. *Eukaryot Cell* 6:755–763. doi: 10.1128/EC.00008-07
- ANMAT (2016) Disposicion N° 13832. http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/BO/Disposicion_13832-2016.pdf. Acceso online: 17/01/2017
- Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Hope W (2012) EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clin Microbiol Infect* 18:E246-7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x
- Arslan H, Azap OK, Ergonul O, Timurkaynak F (2005) Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 56:914–918. doi: 10.1093/jac/dki344
- Badawi AM, Mekawi MA, Mohamed AS, et al (2007) Surface and Biological Activity of Some Novel Cationic Surfactants. *J Surfactants Deterg* 10:243–255. doi: 10.1007/s11743-007-1040-8
- Balardin RS, Jarosz AM, Kelly JD (1997) Virulence and Molecular Diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central, and North America. *Phytopathology* 87:1184–91. doi: 10.1094/PHYTO.1997.87.12.1184
- Bechara C, Sagan S (2013) Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett* 587:1693–1702. doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.031
- Bouchet A, Lairion F, Disalvo EA (2010) Role of guanidinium group in the insertion of l-arginine in DMPE and DMPC lipid interphases. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1798:616–623. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.10.019
- Brock DL (2006) *Infectious Fungi*. Chlesea House, New York
- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Vanderleyden J (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *FEMS Microbiol Lett* 69:55–59.

doi: 10.1111/j.1574-6968.1990.tb04174.x

Brown GD, Denning DW, Gow NAR, et al (2012) Hidden Killers: Human Fungal Infections. *Sci Transl Med* 4:1–9. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404

Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A (2015) Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13:620–30. doi: 10.1038/nrmicro3480

Calvez P, Bussi eres S,  eric Demers, Salesses C (2009) Parameters modulating the maximum insertion pressure of proteins and peptides in lipid monolayers. *Biochimie* 91:718–733. doi: 10.1016/j.biochi.2009.03.018

Calvez P, Demers E, Boisselier E, Salesses C (2011) Analysis of the contribution of saturated and polyunsaturated phospholipid monolayers to the binding of proteins. *Langmuir* 27:1373–9. doi: 10.1021/la104097n

Carmona-Ribeiro AM, de Melo Carrasco LD (2013) Cationic antimicrobial polymers and their assemblies. *Int J Mol Sci* 14:9906–46. doi: 10.3390/ijms14059906

Castillo Exp osito JA (2006) Studies on antimicrobial activity of arginine-based surfactants and chemo- enzymatic synthesis of novel amphiphiles based on L-arginine and D-fagomine. Universidad Aut onoma de Barcelona

Castillo JA, Pinazo A, Carilla J, et al (2004) Interaction of Antimicrobial Arginine-Based Cationic Surfactants with Liposomes and Lipid Monolayers. *Langmuir* 20:3379–3387. doi: 10.1021/la036452h

Castillo JA, Infante MR, Manresa A, et al (2006) Chemoenzymatic synthesis and antimicrobial and haemolytic activities of amphiphilic bis(phenylacetylarginine) derivatives. *ChemMedChem* 1:1091–8. doi: 10.1002/cmdc.200600148

Cornellas A, Perez L, Comelles F, et al (2011) Self-aggregation and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium based ionic liquids in aqueous solution. *J Colloid Interface Sci* 355:164–71. doi: 10.1016/j.jcis.2010.11.063

Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, et al (2003) Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the

- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EU. Clin Microbiol Infect 9:467–474. doi: 10.1046/j.1469-0691.2003.00592.x
- de Freitas CDT, Lopes JLDS, Beltramini LM, et al (2011) Osmotin from *Calotropis procera* latex: new insights into structure and antifungal properties. Biochim Biophys Acta 1808:2501–7. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.07.014
- Denyer SP (1995) Mechanisms of action of antibacterial biocides. Int Biodeterior Biodegrad 36:227–245. doi: 10.1016/0964-8305(96)00015-7
- Denyer SP, Stewart GSAB (1998) Mechanisms of action of disinfectants. Int Biodeterior Biodegrad 41:261–268. doi: 10.1016/S0964-8305(98)00023-7
- Douglas LM, Konopka JB (2014) Fungal Membrane Organization: The Eisosome Concept. Annu Rev Microbiol 68:377–393. doi: doi:10.1146/annurev-micro-091313-103507
- FDA (2016) Antibacterial Soap? You Can Skip It—Use Plain Soap and Water. FDA Consumer Update. <http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM378615.pdf>. Acceso online: 17/01/2017
- Florence AT, Attwood D (2006) Physicochemical principles of pharmacy, 4th edn. Pharmaceutical Press, London
- Fonseca AC, Frías MA, Bouchet AM, et al (2010) Role of Guanidyl Moiety in the Insertion of Arginine and N α -Benzoyl-L-argininate Ethyl Ester Chloride in Lipid Membranes. J Phys Chem B 114:5946–5952. doi: 10.1021/jp101007b
- Fux C a, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Costerton JW (2003) Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. Expert Rev Anti Infect Ther 1:667–683. doi: 10.1586/14787210.1.4.667
- Gilbert P, Moore LE (2005) Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. J Appl Microbiol 99:703–715. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x
- Gorbach SL (2001) Antimicrobial Use in Animal Feed — Time to Stop. N Engl J Med 345:1202–1203. doi: 10.1056/NEJM200110183451610
- Hanson JR (2008) Chemistry of Fungi, RSC Publis. Royal Society of Chemistry, Cambridge
- Heerklotz H, Seelig J (2000) Correlation of Membrane/Water Partition Coefficients of

- Detergents with the Critical Micelle Concentration. *Biophys J* 78:2435–2440. doi: 10.1016/S0006-3495(00)76787-7
- Herrera FE, Bouchet A, Lairion F, et al (2012) Molecular dynamics study of the interaction of arginine with phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine bilayers. *J Phys Chem B* 116:4476–83. doi: 10.1021/jp2096357
- Hristova K, Wimley WC (2011) A Look at Arginine in Membranes. *J Membr Biol* 239:49–56. doi: 10.1007/s00232-010-9323-9
- Hryniewicz K, Szczypa K, Sulikowska A, et al (2001) Antibiotic susceptibility of bacterial strains isolated from urinary tract infections in Poland. *J Antimicrob Chemother* 47:773–780. doi: 10.1093/jac/47.6.773
- Huang M, Hebert AS, Coon JJ, Hull CM (2015) Protein Composition of Infectious Spores Reveals Novel Sexual Development and Germination Factors in *Cryptococcus*. *PLOS Genet* 11:e1005490. doi: 10.1371/journal.pgen.1005490
- Hurdle JG, O'Neill AJ, Chopra I, Lee RE (2011) Targeting bacterial membrane function: an underexploited mechanism for treating persistent infections. *Nat Rev Microbiol* 9:62–75. doi: 10.1038/nrmicro2474
- Ji C, Kuć J (1996) Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. *Physiol Mol Plant Pathol* 49:257–265. doi: 10.1006/pmpp.1996.0053
- Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z (2012) *Candida albicans*: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *ISRN Microbiol* 2012:538694. doi: 10.5402/2012/538694
- Kanjilal S, Sunitha S, Reddy PS, et al (2009) Synthesis and evaluation of micellar properties and antimicrobial activities of imidazole-based surfactants. *Eur J Lipid Sci Technol* 111:941–948. doi: 10.1002/ejlt.200800292
- Kistler HC, Alabouvette C, Baayen RP, et al (1998) Systematic Numbering of Vegetative Compatibility Groups in the Plant Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporium*. *Phytopathology* 88:30–32. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.1.30
- Levy SB, Marshall B (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *NatMed* 10:S122–S129. doi: 10.1038/nm1145

- Lim HS, Kim YS, Kim SD (1991) *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 Genetic Transformation and Antifungal Mechanism against *Fusarium solani*, an Agent of Plant Root Rot. *Appl Environ Microbiol* 57:510–6.
- Lohner K, Prenner EJ (1999) Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membrane-mimetic systems. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1462:141–156. doi: 10.1016/S0005-2736(99)00204-7
- Makovitzki A, Avrahami D, Shai Y (2006) Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15997–6002. doi: 10.1073/pnas.0606129103
- Mesquita N, Portugal A, Piñar G, et al (2013) Flow cytometry as a tool to assess the effects of gamma radiation on the viability, growth and metabolic activity of fungal spores. *Int Biodeterior Biodegradation* 84:250–257. doi: 10.1016/j.ibiod.2012.05.008
- Morán C, Clapés P, Comelles F, et al (2001a) Chemical Structure/Property Relationship in Single-Chain Arginine Surfactants. *Langmuir* 17:5071–5075. doi: 10.1021/la010375d
- Morán C, Infante MR, Clapés P (2001b) Synthesis of glycerol amino acid-based surfactants. Part 1. Enzymatic preparation of rac-1-O-(N^α-acetyl-L-aminoacyl)glycerol derivatives. *J Chem Soc Perkin Trans 1* 1:2063–2070. doi: 10.1039/b103132p
- Murguía MC, Vaillard VA, Sánchez VG, et al (2008) Synthesis, Surface-Active Properties, and Antimicrobial Activities of New Double-Chain Gemini Surfactants. *J Oleo Sci* 57:301–308. doi: 10.5650/jos.57.301
- Muvunyi CM, Masaisa F, Bayingana C, et al (2011) Decreased susceptibility to commonly used antimicrobial agents in bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Rwanda: need for new antimicrobial guidelines. *Am J Trop Med Hyg* 84:923–8. doi: 10.4269/ajtmh.2011.11-0057
- Nordberg J, Arnér ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31:1287–1312.

- Obłąk E, Piecuch A, Krasowska A, Łuczyński J (2013) Antifungal activity of gemini quaternary ammonium salts. *Microbiol Res* 168:630–638. doi: 10.1016/j.micres.2013.06.001
- Odds FC, Brown AJP, Gow NAR (2003) Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11:272–279. doi: 10.1016/S0966-842X(03)00117-3
- Pereira F de O, Wanderley PA, Viana FAC, et al (2011) Effects of *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex Bor essential oil on the growth and morphogenesis of *Trichophyton mentagrophytes*. *Brazilian J Pharm Sci* 47:145–153. doi: 10.1590/S1984-82502011000100018
- Pérez L, Garcia MT, Ribosa I, et al (2002) Biological properties of arginine-based gemini cationic surfactants. *Environ Toxicol Chem* 21:1279–1285. doi: 10.1002/etc.5620210624
- Pinazo A, Manresa MA, Marques AM, et al (2016) Amino acid–based surfactants: New antimicrobial agents. *Adv Colloid Interface Sci* 228:17–39. doi: 10.1016/j.cis.2015.11.007
- Podila GK, Rogers LM, Kolattukudy PE (1993) Chemical Signals from Avocado Surface Wax Trigger Germination and Appressorium Formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiol* 103:267–272. doi: 10.1103/1/267 [pii]
- Poxton IR (1993) Prokaryote envelope diversity. *J Appl Bacteriol* 74:1S–11S. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb04337.x
- Rathinakumar R, Wimley WC (2008) Biomolecular Engineering by Combinatorial Design and High-Throughput Screening: Small, Soluble Peptides That Permeabilize Membranes. *J Am Chem Soc* 130:9849–9858. doi: 10.1021/ja8017863
- Rathinakumar R, Walkenhorst WF, Wimley WC (2009) Broad-Spectrum Antimicrobial Peptides by Rational Combinatorial Design and High-Throughput Screening: The Importance of Interfacial Activity. *J Am Chem Soc* 131:7609–7617. doi: 10.1021/ja8093247
- Russell AD (1998) Assessment of sporicidal efficacy. *Int Biodeterior Biodegradation* 41:281–287. doi: 10.1016/S0964-8305(98)00019-5

- Russell AD (2003) Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect Dis* 3:794–803. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00833-8
- Seelig A (1987) Local anesthetics and pressure: a comparison of dibucaine binding to lipid monolayers and bilayers. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 899:196–204. doi: 10.1016/0005-2736(87)90400-7
- Shirai A, Sumitomo T, Kurimoto M, et al (2009) The mode of the antifungal activity of gemini-pyridinium salt against yeast. *Biocontrol Sci* 14:13–20. doi: 10.4265/bio.14.13
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* 11:1187–1194. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11061187.x
- Vieira DB, Carmona-Ribeiro AM (2006) Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. *J Antimicrob Chemother* 58:760–767. doi: 10.1093/jac/dkl312
- Wang Y, Chi EY, Natvig DO, et al (2013) Antimicrobial activity of cationic conjugated polyelectrolytes and oligomers against *Saccharomyces cerevisiae* vegetative cells and ascospores. *ACS Appl Mater Interfaces* 5:4555–61. doi: 10.1021/am400220s
- Yu Q, Zhang B, Ma F, et al (2015) Novel mechanisms of surfactants against *Candida albicans* growth and morphogenesis. *Chem Biol Interact* 227:1–6. doi: 10.1016/j.cbi.2014.12.014
- Ziani K, Chang Y, McLandsborough L, McClements DJ (2011) Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. *J Agric Food Chem* 59:6247–55. doi: 10.1021/jf200450m

CAPÍTULO 4

**CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LOS SURFACTANTES DERIVADOS
DE ARGININA CON MEMBRANAS BIOLÓGICAS. ESTUDIOS DE TOXICIDAD**

Índice capítulo 4

1. Introducción	209
1.1. <i>Interacción membrana-surfactante</i>	209
1.2. <i>La membrana biológica: composición y organización</i>	210
1.3. <i>Sistemas modelo de membrana</i>	213
1.3.1. <i>Glóbulos rojos de mamíferos</i>	214
1.3.2. <i>Mecanismo hemolítico</i>	215
2. Materiales y métodos	217
2.1. <i>Reactivos</i>	217
2.2. <i>Medios de cultivo</i>	217
2.3. <i>Evaluación in vitro de la toxicidad de Bz-Arg-NHC_n en cultivos celulares humanos</i>	217
2.3.1. <i>Cultivos celulares</i>	217
2.3.2. <i>Preparación de soluciones stock de los surfactantes</i>	218
2.3.3. <i>Tratamientos experimentales</i>	218
2.3.4. <i>Ensayo del XTT</i>	218
2.4. <i>Caracterización de la interacción de los surfactantes derivados de arginina utilizando glóbulos rojos de mamíferos como sistema modelo</i>	220
2.4.1. <i>Declaración de ética</i>	220
2.4.2. <i>Preparación de las suspensiones de glóbulos rojos</i>	220
2.4.3. <i>Determinación de la actividad hemolítica de Bz-Arg-NHC_n</i>	221
2.4.4. <i>Evaluación del potencial de irritabilidad ocular</i>	221
2.4.5. <i>Análisis de las cinéticas de hemólisis para la determinación de las relaciones efectivas surfactante/lípido</i>	222
2.4.6. <i>Cuantificación de los lípidos de membrana solubilizados en glóbulos rojos tratados con Bz-Arg-NHC_n</i>	224
2.4.6.1. <i>Determinación de fósforo inorgánico</i>	224
2.4.7. <i>Estudio de los cambios morfológicos de GRH tratados con Bz-Arg-NHC_n por microscopía óptica con contraste de fases</i>	225
2.4.8. <i>Análisis de la liberación de microvesículas inducida por Bz-Arg-NHC_n</i>	226
2.4.8.1. <i>Aislamiento de microvesículas</i>	226
2.4.8.2. <i>Análisis de la presencia de microvesículas por microscopía electrónica de transmisión (MET) con tinción negativa</i>	226

2.4.9. Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC ₁₂ sobre la resistencia de los GR a la lisis hipotónica.....	227
2.4.9.1. Evaluación de la protección contra la hemólisis hipotónica.....	227
2.4.9.2. Cálculo del porcentaje de expansión del volumen celular.....	228
2.4.10. Medidas de polarización generalizada (GP) del Laurdan.....	230
2.4.10.1. Obtención de las suspensiones de fantasmas de glóbulos rojos.....	231
2.4.10.2. Medidas de fluorescencia en estado estacionario.....	232
3. Resultados y discusión.....	233
3.1. Evaluación in vitro de la citotoxicidad de Bz-Arg-NHC _n	233
3.2. Caracterización del mecanismo de interacción de los surfactantes con la membrana de los glóbulos rojos.....	236
3.2.1. Evaluación de la actividad hemolítica de Bz-Arg-NHC _n	236
3.2.1.1. Determinación de las HC ₅₀ y evaluación de la irritabilidad ocular.....	236
3.2.1.2. Cálculo de las relaciones molares efectivas lípido-surfactante (R _e)....	241
3.2.1.3. Análisis de las cinéticas de hemólisis.....	245
3.2.1.4. Solubilización de fosfolípidos de membrana de glóbulos rojos tratados con Bz-Arg-NHC _n	248
3.2.1.5. Estudio del efecto de los surfactantes sobre la morfología de los glóbulos rojos.....	250
3.2.1.6. Liberación de microvesículas en glóbulos rojos tratados con Bz-Arg-NHC _n	256
3.2.2. Efecto de Bz-Arg-NHC ₁₂ sobre la resistencia de glóbulos rojos a la lisis hipotónica.....	257
3.2.3. Efecto de la composición de membrana de los glóbulos rojos en la interacción con Bz-Arg-NHC ₁₂	259
3.2.3.1. Influencia de la composición de la membrana sobre la eficiencia de hemólisis de Bz-Arg-NHC ₁₂	260
3.2.3.2. Análisis del efecto de la composición de membrana sobre la eficiencia de la protección contra la lisis hipotónica de Bz-Arg-NHC ₁₂	261
3.2.3.3. Comparación de la expansión del volumen celular de GRH y GRC en medio hipotónico inducida por Bz-Arg-NHC ₁₂	263
3.2.3.4. Análisis de la solubilización del fosfolípidos de membrana de GRH y GRC inducida por Bz-Arg-NHC ₁₂	266
3.2.3.5. Efecto de Bz-Arg-NHC ₁₂ sobre los valores de polarización generalizada (GP) del Laurdan incorporado en la membrana de GRH y GRC...	267

4. Conclusiones	270
Referencias	273

1. Introducción

1.1. Interacción membrana-surfactante

Las interacciones entre moléculas anfipáticas y las membranas biológicas han sido de gran interés tanto en la fisiología como en la bioquímica. Muchos estudios han reportado el empleo de surfactantes para aumentar la permeabilidad de la membrana de las células intestinales a drogas terapéuticas (Xia & Onyuksel 2000) y en el aislamiento y purificación de proteínas de membrana (le Maire et al. 2000).

La forma en que los surfactantes interactúan con las membranas biológicas es un proceso complejo que aún no se conoce con claridad, aunque se sabe que depende estrechamente tanto de las propiedades de la membrana como de las del tensioactivo en cuestión. Factores tales como el tipo de surfactante, su estructura y concentración, su afinidad por la membrana en particular, la composición de la membrana en estudio y la relación lípido/surfactante, tienen fundamental importancia en la dinámica de esta interacción (Maher & Singer 1984; Xia & Onyuksel 2000; Selim et al. 2009; Preté et al. 2011; Nogueira et al. 2012). Trabajos teóricos y experimentales han demostrado que la interacción surfactante-bicapa durante el proceso de solubilización ocurre en múltiples etapas. En este sentido, se han propuesto diferentes modelos que describen los eventos que ocurren durante este proceso (Preté et al. 2011). Según el modelo descrito por Lichtenberg et al. (2000), la solubilización puede dividirse en *tres etapas* principales: (i) a bajas concentraciones del surfactante y baja relación molar surfactante/lípido, las moléculas del mismo se particionan entre el medio acuoso y la bicapa lipídica hasta que se alcanza una concentración límite de saturación en esta última (C^{sat}); (ii) por encima de

esta concentración, los lípidos son extraídos de la membrana por micelas del surfactante presentes en el medio acuoso previamente formadas, dando lugar a la coexistencia de bicapas que contienen tensioactivo y micelas que contienen lípidos; *(iii)* finalmente, a una concentración de surfactante específica (C^{sol}), ocurre la solubilización total de la membrana. Un aumento en la concentración del surfactante a partir de este punto llevará a la formación de micelas con una relación molar surfactante/lípido mayor.

Como fue descrito en el Capítulo 3, la actividad antimicrobiana de los surfactantes derivados de arginina se encuentra directamente asociada a la presencia de grupos cargados positivamente, los cuales facilitan su interacción con las membranas microbianas. En este sentido, la acción antimicrobiana de los surfactantes se basa en su capacidad de alterar la integridad de la membrana celular de los microorganismos a través de un fenómeno de adsorción electrostática en la interfase agua/membrana, seguido de la desorganización de la membrana por interacciones hidrofóbicas (Castillo et al. 2004). Dado que la perturbación de la membrana celular por estos compuestos es dirigida principalmente a través de procesos fisicoquímicos, los sistemas modelo de membrana pueden aportar información valiosa para comprender su mecanismo de acción.

1.2. La membrana biológica: composición y organización

Las membranas biológicas forman los límites entre el interior de las células (*citoplasma*) y el exterior de las mismas, siendo capaces a su vez de definir compartimentos intracelulares, en los cuales constituyen los límites entre estas organelas y el citoplasma (Peetla et al. 2009). Más allá de su rol estructural, las membranas cumplen un papel fundamental en la vida celular: regulan el transporte de

entrada y salida de iones y metabolitos, gobiernan las comunicaciones intercelulares y cumplen un rol central en la mayoría de los procesos celulares, ya que gran parte de los procesos bioquímicos esenciales para la célula ocurren en las mismas (Brannigan et al. 2006; Selim et al. 2009; Goñi 2014).

Las membranas celulares se encuentran constituidas principalmente por lípidos anfipáticos: *fosfolípidos*, *glicolípidos* y *esteroles*. Debido a su naturaleza anfifílica, estas moléculas en medio acuoso tienden a organizarse en ambos lados de un plano imaginario, con las porciones hidrofóbicas enfrentadas, y las regiones polares orientadas hacia el exterior acuoso. De esta manera, la estructura de doble capa o *bicapa* proporciona un método simple para la estabilización termodinámica de una población de moléculas anfipáticas. Además de los componentes lipídicos, un gran número de hidratos de carbono, proteínas y complejos proteicos se encuentran asociados a las membranas. En el caso de las proteínas, esta unión puede ser a través de los grupos polares de los lípidos (*proteínas periféricas*) o por inclusión en el núcleo hidrofóbico (*proteínas integrales*), atravesando en muchos casos la membrana de lado a lado (*proteínas transmembrana*). Asimismo, actualmente se ha aceptado la existencia de un grupo de proteínas que se une transitoriamente a las membranas por un período de tiempo específico, de manera de cumplir una función específica (Goñi 2014).

En 1972, Singer y Nicolson propusieron un *modelo de mosaico fluido* para explicar la estructura de las membranas celulares (Singer & Nicolson 1972). Este modelo se basa en la hipótesis de que los lípidos y proteínas difunden libremente en el plano de la membrana celular. Desde entonces, el descubrimiento de dominios grandes de membrana (por ejemplo, regiones de la membrana basal, lateral y apical de las células

endoteliales, epiteliales y glandulares) y estructuras de microdominios laterales (por ejemplo, las balsas lipídicas, caveolas y depresiones recubiertas), reveló la complejidad de la estructura de la membrana de la célula, cuyo esquema actualizado se muestra en la Figura 4.1.1 (Peetla et al. 2009).

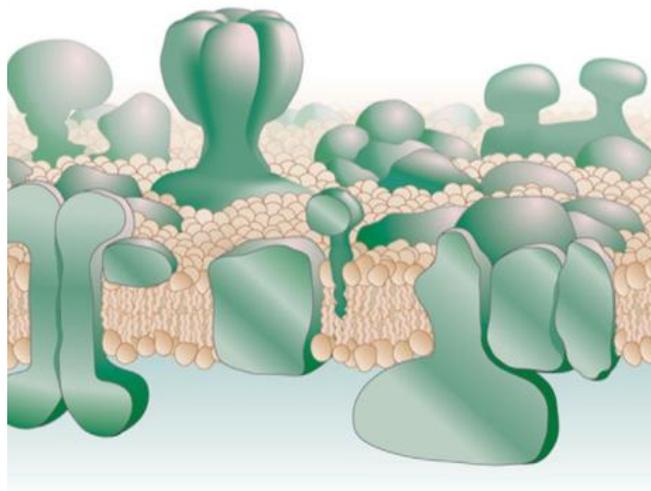


Figura 4.1.1. Modelo de membrana Singer-Nicolson: versión modificada y actualizada según Engelman (2005).

Esta naturaleza polimórfica de los arreglos lipídicos, sumada a una importante variedad de lípidos con propiedades físicas diversas (área transversal, fluidez, carga eléctrica, peso molecular), es la razón por la que las membranas son estructuras extremadamente intrincadas (Peetla et al. 2009). Los lípidos de membrana pueden dividirse en tres grandes grupos de acuerdo a su estructura química: los *fosfolípidos* (derivados del glicerol), los *esfingolípidos* (derivados de ceramidas) y los *esteroles*. Los fosfolípidos, por su parte, pueden clasificarse a su vez según sus principales grupos hidrofílicos: *fosfatidilcolina* (PC), *fosfatidiletanolamina* (PE) y *fosfatidilserina* (PS) son los

predominantes en la membrana celular, mientras que el *fosfatidilinositol* (PI) y la *cardiolipina* se encuentran presentes en menor cantidad. Por otro lado, la base estructural de los esfingolípidos es la *ceramida* (esfingosina con un ácido graso unido al grupo amino mediante un enlace amida) o *N*-acil-esfingosina. Finalmente los esteroides poseen grupos hidroxilos (hidrofílicos) que les permiten interactuar con los principales grupos hidrofílicos de los fosfolípidos, mientras que los grupos esteroides voluminosos interactúan con las cadenas hidrofóbicas de los lípidos, influyendo en la fluidez de la membrana y el empaquetamiento de sus componentes (van Meer et al. 2008; Peetla et al. 2009).

1.3. Sistemas modelo de membrana

La complejidad de la estructura de la membrana celular junto a la naturaleza altamente dinámica de las interacciones lípido-lípido y lípido-proteína en la membrana celular, dificultan la investigación de las interacciones biofísicas de distintas moléculas, como drogas, con las mismas. Estas interacciones resultan de fundamental importancia, ya que sirven como base para la predicción tanto de la toxicidad asociada a fármacos como de su efectividad (Peetla et al. 2009). En este contexto se han desarrollado sistemas simplificados de membranas artificiales, que imitan la organización de los lípidos en las bicapas lipídicas naturales. Algunos de los modelos más usados son las *bicapas lipídicas soportadas* o *SLB* (preparadas en superficies como la silicona o la mica), las *monocapas lipídicas* (formadas en una superficie acuosa usando un tensiómetro de Langmuir) y los *liposomas* (vesículas lipídicas de entre 20 nm y 100 µm, que encierran un compartimiento acuoso interno).

1.3.1. Glóbulos rojos de mamíferos

Diversos motivos convierten a los *glóbulos rojos* (GR) de mamíferos en uno de los sistemas modelo de membrana más populares. Son fáciles de obtener en cantidad y, al ser enucleados y carecer de organelas internas que puedan interferir en las determinaciones, representan un modelo sencillo y útil para medir propiedades de membrana, incluyendo la interacción de los surfactantes con las mismas (Svetina et al. 2004). La membrana de los GR consiste principalmente en una bicapa de fosfolípidos con proteínas integrales de membrana y un citoesqueleto subyacente. Tienen forma de disco con una sección transversal bicóncava, lo que les provee un área superficial máxima para el mismo volumen celular, y su contenido principal es la *hemoglobina* (hemoproteína involucrada en el transporte de oxígeno en la sangre), lo que facilita el estudio de su lisis mediante la cuantificación de su liberación. A pesar de carecer de organelas internas, conservan suficientes funciones comunes con otras células especializadas, por lo que los resultados obtenidos utilizando este modelo pueden ser buenos indicadores de lo observado en condiciones fisiológicas (Vives et al. 1999; Svetina et al. 2004; Selim et al. 2009; Nogueira et al. 2012).

La composición lipídica de las membranas de los glóbulos rojos de distintas especies de mamífero difiere sustancialmente. Por ejemplo, en el caso de los glóbulos rojos humanos (GRH) y de carnero (GRC), cuya composición lipídica es conocida y se detalla en la Tabla 4.1.1, si bien el contenido de colesterol es similar, existen diferencias en la cantidad relativa de fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM): mientras que la primera se encuentra totalmente ausente en los GRC, la proporción de SM en este caso es considerablemente mayor que para los GRH.

Tabla 4.1.1 Composición lipídica (en porcentaje molar) de membranas de glóbulos rojos humanos (GRH) y de carnero (GRC).

Lípidos principales	Fantasma de GRH^(a)	Fantasma de GRC^(b)
Colesterol (CHO)	54,0 ± 3,4	39,2 ± 4,4
Esfingomielina (SM)	12,1 ± 2,1	41,5 ± 3,2
Fosfatidilcolina (PC)	17,7 ± 1,6	0,0 ± 0,1
Fosfatidiletanolamina (PE)	11,7 ± 0,9	14,0 ± 1,7
Fosfatidilinositol/fosfatidilserina (PI/PS)	6,4 ± 0,5	5,1 ± 0,4

^(a) Koumanov et al. 2005; ^(b) Maté et al. 2014.

1.3.2. Mecanismo hemolítico

La interacción de los surfactantes con los GR puede describirse como *bifásica*: a bajas concentraciones, el tensioactivo es capaz de incorporarse en la membrana de los GR y estabilizarla, protegiéndolos contra la lisis osmótica en un medio hipotónico (*hemólisis hipotónica*); por otro lado, mayores concentraciones del mismo pueden provocar la desestabilización de la membrana y la lisis celular (*hemólisis*) (Vives et al. 1999; Sánchez et al. 2007). Ambos fenómenos presentan gran importancia teórica y práctica, ya que se encuentran estrechamente relacionados con la interacción de los surfactantes con las membranas. Si bien los mecanismos a través de los cuales estos fenómenos son llevados a cabo no han sido completamente dilucidados, se sabe que existe una gran dependencia de propiedades tales como el tipo de surfactante, su concentración y las condiciones experimentales, como la fuerza iónica del medio, el pH, la temperatura, etc. (Sánchez et al. 2007). Es sabido que el proceso molecular implicado en la hemólisis inducida por surfactantes se encuentra estrechamente relacionado con la toxicidad de los mismos (Vives et al. 1999). Asimismo, a través de su evaluación pueden

estimarse parámetros tales como la irritabilidad ocular potencial, reemplazando la necesidad de realizar pruebas en animales, un tópico extremadamente controvertido (Pape et al. 1987).

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos

El dimetil sulfóxido (DMSO), el Tritón X-100 y la poli-L-lisina fueron comprados a Sigma-Aldrich. Seroalbúmina bovina fue de Fedesa S.A. El resto de los reactivos y solventes empleados en este trabajo fue de calidad analítica o superior.

2.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de las células eucariotas medio de Eagle modificado por Dulbecco, DMEM (siglas de su nombre en inglés *Dulbecco's Modified Eagle's medium*) y medio esencial mínimo (MEM), fueron comprados a Sigma Aldrich.

2.3. Evaluación *in vitro* de la toxicidad de Bz-Arg-NHC_n en cultivos celulares humanos

2.3.1. Cultivos celulares

La citotoxicidad de Bz-Arg-NHC_n fue probada *in vitro* sobre líneas celulares humanas: HepG2 ATCC HB-8065, una línea celular derivada de hepatocitos (hepatocarcinoma), obtenida de la *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA); y 1BR.3.G (N° cat.: EC90020507), derivada de fibroblastos humanos, obtenida de la *European Collection of Cell Cultures* (Salisbury, Reino Unido). HepG2 fue mantenida en un medio esencial mínimo (MEM) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) inactivado por calor. La línea celular 1BR.3.G fue mantenida en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) conteniendo glucosa 4500 mg/ml, GlutaMAX-I y 10% (v/v) de FBS inactivado por calor. Ambas líneas celulares fueron crecidas a 37°C en

atmósfera altamente humidificada compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂.

2.3.2. Preparación de soluciones stock de los surfactantes

Se prepararon soluciones stock 50-100 mM de los tensioactivos en DMSO, las cuales fueron esterilizadas por filtración y almacenadas a -20°C para su posterior uso. Se prepararon diluciones de estas soluciones en un rango de concentraciones de 2 a 400 µM utilizando el medio de cultivo estéril adecuado para cada línea celular.

2.3.3. Tratamientos experimentales

En ensayos independientes para cada surfactante, se prepararon cultivos celulares de 24 h en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos con fondo plano a una densidad de 6×10^3 células/pocillo para HepG2 y 3×10^3 células/pocillo para 1BR.3.G, sobre los que se añadieron 100 µl de las soluciones de los surfactantes. Asimismo, se incluyeron controles en presencia de medio de cultivo libre de los surfactantes en cada placa (100% de crecimiento). Las placas se incubaron en atmósfera altamente humidificada compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂ a 37°C durante 24 o 72 h. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Luego de la incubación, el efecto de los surfactantes sobre el crecimiento de las líneas celulares se evaluó según el ensayo del XTT.

2.3.4. Ensayo del XTT

El efecto de los surfactantes sobre la viabilidad celular fue evaluado mediante una versión modificada del ensayo del MTT (Mosmann 1983) utilizando el kit comercial

EZ4U para el ensayo de reducción (Biomedica Corp.). El ensayo del XTT [2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido] es un método colorimétrico para la cuantificación de la proliferación, viabilidad y citotoxicidad celular, el cual se basa en la bio-reducción de sales de tetrazolio que se añaden al medio de cultivo. A diferencia del ensayo del MTT, el producto de clivaje del XTT (*formazán*) es soluble en agua. Esta bio-reducción sólo ocurre en células viables, y está relacionada a la producción de NADPH a través de la glucólisis, de manera que la cantidad de formazán producido es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas presentes en el cultivo.

Luego del tratamiento con los tensioactivos, 20 μ l de la solución de XTT fueron añadidos en cada pocillo. A continuación, las placas fueron incubadas durante 3 h en atmósfera altamente humidificada compuesta por 95% de aire y 5% de CO₂ a 37°C. Pasado este tiempo, la formación del producto coloreado (*formazán*) fue cuantificada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 490 nm (A_{490}) en un lector de microplacas (Perkin Elmer Victor3 V). Para cada concentración del surfactante el porcentaje de viabilidad celular se calculó respecto del control (la A_{490} de los cultivos celulares creciendo en ausencia de los surfactantes fue establecida como el 100% de viabilidad), graficándose a continuación las curvas dosis-respuesta para cada tensioactivo. En cada caso, la citotoxicidad fue expresada en términos de la IC₅₀, definida como concentración de cada surfactante responsable de la muerte del 50% de la población celular, calculada a partir de las curvas *dosis-respuesta* por análisis de regresión sigmoideal utilizando el software GraphPad Prism®.

2.4. Caracterización de la interacción de los surfactantes derivados de arginina utilizando glóbulos rojos de mamíferos como sistema modelo

2.4.1. Declaración de ética

Se obtuvo sangre de ovejas sanas según el protocolo aprobado por el *Comité de ética de Investigación* de la *Facultad de Ciencias Veterinarias* de la *Universidad Nacional de La Plata* (CICUAL 129/09), de acuerdo a las normativas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio. La sangre humana fue obtenida de voluntarios sanos pertenecientes a nuestro personal de laboratorio (*Centro de Investigación de Proteínas Vegetales*, CIPROVE-CIC-UNLP, La Plata, Argentina).

2.4.2. Preparación de las suspensiones de glóbulos rojos

Para la preparación de la suspensión de *glóbulos rojos humanos* (GRH) se empleó el protocolo descrito por Pape et al. (1987), utilizando EDTA para prevenir su coagulación. Los GRH fueron aislados por centrifugación a 1300×g durante 15 min a temperatura ambiente, y lavados tres veces con una solución isotónica de buffer fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) conteniendo NaCl 123,3 mM, Na₂HPO₄ 22,2 mM y KH₂PO₄ 5,6 mM en agua nanopura MilliQ® (pH 7,4; 300 mOsmol/l). Finalmente, las células fueron resuspendidas en PBS a una densidad de 8x10⁹ células/ml.

De la misma manera, se utilizó EDTA para prevenir la coagulación en el caso de la preparación de la suspensión de *glóbulos rojos de carnero* (GRC). En este caso, para su conservación, los GRC fueron aislados por centrifugación a 1300×g durante 15 min a temperatura ambiente, y resuspendidos en una solución de *Alsever*, conteniendo dextrosa 113,79 mM, Na₃C₆H₅O₇·2H₂O 27,2 mM y NaCl 71,87 mM en agua nanopura MilliQ® (pH 6,1). El stock de GRC preparado fue almacenado hasta 7 días a 4°C. Para los

ensayos, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en el mismo buffer a una densidad de 1×10^{10} células/ml.

2.4.3. Determinación de la actividad hemolítica de Bz-Arg-NHC_n

La actividad hemolítica de los surfactantes derivados de arginina sintetizados fue comparada con la de Cetrimide, un surfactante catiónico comercial, de acuerdo a Sánchez et al. (2006). Alícuotas de las suspensiones de GR (25 μ l, hematocrito final 2% v/v) humanos o de carnero fueron expuestas a 1 ml de las soluciones de los surfactantes a distintas concentraciones (entre 0,004 y 5 mM para Bz-Arg-NHC_n y entre 0,005 y 3 mM para Cetrimide) preparadas en PBS isotónico (300 mOsm/l) a 37°C por 10 min. Se incluyeron controles con agua nanopura MilliQ® (100% de hemólisis) y PBS isotónico. Los sobrenadantes fueron recuperados por centrifugación a 1300 \times g durante 15 min, cuantificándose la hemoglobina liberada espectrofotométricamente a 540 nm. El porcentaje de hemólisis fue determinado por comparación con el control tratado con agua nanopura MilliQ® (100% de hemólisis). Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado. Con los datos obtenidos se construyeron curvas *dosis-respuesta* para cada uno de los compuestos. Haciendo uso del software OriginPro8®, las curvas fueron ajustadas a la *función de Boltzmann* (sigmoidea) estableciéndose en cada caso la HC₅₀, definida como la concentración de surfactante responsable de la lisis del 50% de las células (50% de hemólisis).

2.4.4. Evaluación del potencial de irritabilidad ocular

A fin de estimar el potencial de irritabilidad ocular para cada surfactante, se evaluó la *desnaturalización de la hemoglobina* mediante el monitoreo de las

absorbancias a 575 nm (A_{575}) y 540 nm (A_{540}) del sobrenadante de los GRH tratados con los tensioactivos a las respectivas HC_{50} . Una solución conteniendo 1 mg/ml de laurilsulfato de sodio (SDS) fue utilizada como control positivo. En cada caso, el índice de desnaturalización (ID) fue calculado según la Ecuación (1):

$$ID (\%) = \frac{R_1 - R_3}{R_1 - R_2} \times 100 \quad (1)$$

donde R_1 , R_2 y R_3 son las relaciones de absorbancia (A_{575}/A_{540}) para los sobrenadantes de los GRH tratados con: (1) agua nanopura MilliQ®; (2) SDS 1 mg/ml y (3) el tensioactivo en estudio. El índice de irritabilidad fue determinado según el cociente *lisis/desnaturalización* ($L/D = HC_{50}/ID$), el cual permite la clasificación de los tensioactivos en no irritantes ($L/D > 100$), ligeramente irritantes ($L/D > 10$), moderadamente irritantes ($L/D > 1$), irritantes ($L/D > 0,1$) o muy irritantes ($L/D < 0,1$) (Sanchez et al. 2006).

2.4.5. Análisis de las cinéticas de hemólisis para la determinación de las relaciones efectivas surfactante/lípido

Se evaluó el grado de hemólisis producido por los tensioactivos en suspensiones de GRH de diferentes hematocritos finales (Ht): 0,075; 0,15; 0,30 y 0,45% (v/v). Las soluciones de Bz-Arg-NHC_n fueron preparadas en PBS (pH 7,4; 300 mOsm/l) por diluciones seriadas en una placa de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U. Para cada ensayo, se añadieron 100 μ l de la suspensión correspondiente de GRH (Ht 2X) a 100 μ l de las diluciones de los surfactantes. Las placas fueron incubadas a 37°C en un detector de multimodo DTX 880 (Beckman Coulter), midiéndose la densidad óptica a 595 nm (DO_{595}) en intervalos de 1 min por un período total de incubación de 60 min. Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por duplicado. Con los datos obtenidos se construyeron las *cinéticas de hemólisis*, graficando la disminución de la

turbidez en función del tiempo. El porcentaje de hemólisis para 1 h de incubación fue calculado de acuerdo a la Ecuación (2):

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{DO_c - DO_x}{DO_c - DO_{tx}} \times 100 \quad (2)$$

donde OD_c es la densidad óptica a 595 nm de los GRH (incubados en PBS), OD_x es la densidad óptica a 595 nm de los GRH tratados con diferentes concentraciones de los tensioactivos y OD_{tx} es la densidad óptica a 595 nm de los GRH incubados en presencia de Tritón X-100 1% (v/v) (100% de hemólisis). Se construyeron *curvas dosis-respuesta* (% hemólisis vs concentración de surfactante) para cada hematocrito, ajustándose cada conjunto de datos a una función sigmoidea (*Boltzmann*) utilizando el software OriginPro8®. Para cada curva se aplicó el análisis de solubilización de la membrana de los GR propuesto por Preté et al. (2002), estableciéndose en cada caso los valores S_{sat} y S_{sol} como la concentración de surfactante necesaria para inducir la saturación (inicio de la hemólisis) y la solubilización total (lisis) de la membrana, respectivamente. Por último, los valores de S_{sat} y S_{sol} obtenidos para las diferentes concentraciones de GRH fueron graficados en función de la concentración de lípidos. Las líneas rectas obtenidas responden a la Ecuación (3):

$$S_t = R_e \times \left(L + \frac{1}{K_b (R_e + 1)} \right) \quad (3)$$

donde S_t y L son las concentraciones totales de tensioactivo (S_{sat} o S_{sol}) y de lípidos en el sistema respectivamente. La pendiente de las rectas resultantes permite el cálculo de las correspondientes relaciones efectivas surfactante/lípido, R_e (R_{sat} o R_{sol}) y la intersección con el *eje y* (ordenadas) corresponde a la concentración de surfactante libre en agua, S_w .

2.4.6. Cuantificación de los lípidos de membrana solubilizados en glóbulos rojos tratados con Bz-Arg-NHC_n

A fin de evaluar la solubilización la membrana de los GR, se analizó la cantidad de *fosfolípidos solubles* (PL_s) en el sobrenadante de GRH y GRC tratados con Bz-Arg-NHC_n. Durante los ensayos, 25 µl de las suspensiones de GR (Sección 2.4.2 del presente Capítulo, pág. 220) fueron expuestos a soluciones de los tensioactivos (1 ml) a diferentes concentraciones, tanto por encima como por debajo de su CMC (230 y 85 µM para Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂.respectivamente), preparadas en PBS isotónico. Luego de la incubación a 37°C por 10 min, los sobrenadantes (900 µl) fueron separados de las células intactas por centrifugación (1300×g, 10 min) y los PL_s fueron extraídos de los mismos utilizando 10 ml de la mezcla de *Folch* (cloroformo/metanol 2:1). La fase orgánica fue separada, evaporada en *SpeedVac* y utilizada para la determinación de fósforo inorgánico (Ahyayauch et al. 2010).

2.4.6.1. Determinación de fósforo inorgánico

La cantidad de PL_s en los sobrenadantes fue cuantificada por determinación colorimétrica de fósforo inorgánico. La metodología utilizada se basa en la capacidad del *molibdato de amonio* para reaccionar en medio ácido con el fósforo para formar *ácido fosfomolibdico*, el cual es reducido por el *ácido ascórbico* a un complejo intensamente coloreado (*azul de molibdeno*) con un máximo de absorción a los 820 nm.

Para los ensayos, los lípidos recuperados de la fase orgánica por evaporación fueron resuspendidos en 50 µl de la mezcla de Folch. Un volumen adecuado de las soluciones de lípidos (entre 2,5 y 14 µl) fue adicionado con 300 µl de HClO₄ al 70% (v/v), agitado enérgicamente en vórtex y carbonizado por incubación a 165°C durante una

noche (*overnight*) en bloque seco bajo campana. Los residuos carbonizados fueron añadidos con 900 μl del reactivo A [126 mg de $\text{MoO}_4(\text{NH}_4)$; 28,5 ml H_2O ; 825 μl de H_2SO_4 y 4,95 ml de una solución de ácido ascórbico al 10% (p/v)] e incubados a 45°C durante 20 min. Finalmente, la absorbancia de las muestras fue cuantificada a 820 nm (Abs_{820}) utilizando un espectrofotómetro Spectronic Helios Beta. Para la cuantificación del fósforo se construyó una curva de calibración [Abs_{820} vs nmoles de fósforo inorgánico (P_i)] utilizando una solución patrón de 1 mM H_2PO_4 (rango de sensibilidad: 2,5-15 nmoles de P_i).

2.4.7. Estudio de los cambios morfológicos de GRH tratados con Bz-Arg-NHC_n por microscopía óptica con contraste de fases

Los cambios morfológicos en GRH inducidos por exposición a Bz-Arg-NHC_n fueron observados por microscopía óptica con contraste de fases. Para ello, alícuotas de los GRH [10 μl , *Ht* 0,075% en PBS adicionado con 1,0% (p/v) de seroalbúmina bovina (BSA)] fueron depositadas en portaobjetos de vidrio revestidos con 0,001% (v/v) de poli-L-lisina. El agregado de BSA tiene la finalidad de evitar la crenación de los GR por contacto con el vidrio (Jay 1975), mientras que el revestimiento de poli-L-lisina favorece la adhesión e inmovilización de las células durante su observación. Los cambios en la morfología celular fueron observados a través de un microscopio óptico con contraste de fases (NIKON Eclipse TS100) luego de la adición de 10 μl de soluciones de distinta concentración de los surfactantes (300 y 1200 μM para Bz-Arg-NHC₁₀; 280 y 1100 μM para Bz-Arg-NHC₁₂) durante 10 minutos. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital NIKON 391CU 3.2M CCD y analizadas utilizando el software Micrometrics SE Premium®.

2.4.8. Análisis de la liberación de microvesículas inducida por Bz-Arg-NHC_n

2.4.8.1. Aislamiento de microvesículas

En ensayos independientes, 13 ml de la solución de tensioactivo preparada en PBS isotónico (previamente esterilizado por filtración a través de membrana de nylon 0,2 µm) fueron añadidos con un volumen igual de la suspensión de GRH, de manera que el *Ht* final fue del 2% (v/v) y la concentración de tensioactivo de 300 y 280 µM para Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ respectivamente. Luego de la incubación de las suspensiones celulares durante 10 min a 37°C, las mismas fueron centrifugadas a 1300×g durante 5 min de manera de separara las células intactas (*pellet*). El sobrenadante fue recuperado y centrifugado nuevamente a 10000×g durante 3 min con la finalidad de separar los fantasmas (*pellet*) que hubiesen quedado presentes en la suspensión. Una vez más, el sobrenadante fue recuperado y las microvesículas aisladas por ultracentrifugación a 100000×g durante 1 h. Finalmente, el sobrenadante fue descartado y las microvesículas resuspendidas en 250 µl de PBS isotónico estéril.

2.4.8.2. Análisis de la presencia de microvesículas por microscopía electrónica de transmisión (MET) con tinción negativa

Inmediatamente después de la obtención de las microvesículas, 50 µl de las mismas fueron fijadas por adición de 10 µl de glutaraldehído. Para las observaciones de las microvesículas al MET, alícuotas de las mismas fueron colocadas sobre grillas individuales con membrana de colodión, utilizándose la técnica de tinción negativa con ácido fosfotúngstico (PTA) al 1% (p/v) como contrastante. La tinción negativa se basa en la deposición del metal pesado (tungsteno en este caso) tanto en las depresiones, intersticios y orificios de las partículas a observar (microvesículas) como en su entorno,

observándose zonas más electrodensas en estos casos y zonas más claras (menos electrodensas) en las regiones con protuberancias (Figura 4.2.1). De esta manera, mediante este procedimiento las partículas no son teñidas en sí, sino que son rodeadas por el contrastante, permitiendo la observación del contorno de las mismas e incluso de irregularidades en su superficie. Para la observación de las muestras se utilizó el microscopio electrónico de transmisión JEM 1200EX II (Jeol) perteneciente al *Servicio Central de Microscopia Electrónica* de la *Facultad de Ciencias Veterinarias* de la *Universidad Nacional de La Plata*.

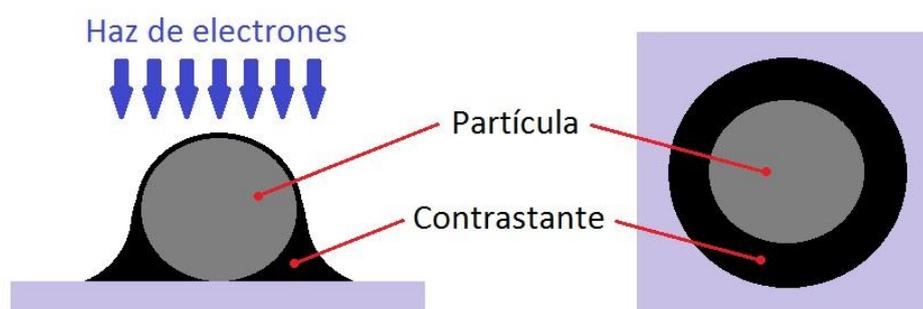


Figura 4.2.1. Esquema de la deposición del contrastante [ácido fosfotúngstico 1% (p/v)] en la tinción negativa para la observación bajo el microscopio electrónico de transmisión: (a) vista lateral y (b) superior. Las zonas en las que se deposita el metal pesado (depresiones, intersticios y orificios de las partículas, así como su entorno cercano) se observan como regiones electrodensas en las micrografías.

2.4.9. Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC₁₂ sobre la resistencia de los GR a la lisis hipotónica

2.4.9.1. Evaluación de la protección contra la hemólisis hipotónica

La protección contra lisis hipotónica de GRH y GRC inducida por BzArgNHC₁₂ fue evaluada según el protocolo descrito por Nogueira et al. (2012). Para ello se

prepararon soluciones de distintas concentraciones del surfactante por dilución seriada de una solución stock (670 μM) en medio hipotónico, preparado por dilución de PBS isotónico (300 mOsm/l) de manera tal que ocasionara el 80-90% de hemólisis de las muestras sin tratar (ausencia de los surfactantes). Durante los ensayos, alícuotas (25 μl) de la suspensión de GR correspondiente fueron añadidas a 1 ml de las soluciones de los surfactantes e incubadas durante 10 min a 37°C, incluyéndose además controles en presencia de agua nanopura MilliQ® (100% de hemólisis) y PBS hipotónico. Luego de la incubación, las muestras fueron centrifugadas a 1300 \times g por 15 min de manera de separar las células intactas. El grado de hemólisis fue determinado según el procedimiento descrito en la Sección 2.4.3 del presente Capítulo (pág. 221), construyéndose con los datos obtenidos curvas *dosis-respuesta* para cada especie. Todas las medidas fueron realizadas al menos por triplicado. En cada caso, se evaluaron las diferencias significativas entre las medias de los distintos grupos de datos mediante el *test one-way ANOVA (analysis of variance)* utilizando el programa GraphPad Prism®, seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples (*P-value* < 0,05). Para cada tensioactivo, a partir de los resultados se estableció la concentración antihemolítica máxima (cAH_{max}), definida como la concentración de surfactante responsable de la máxima protección contra la hemólisis hipotónica. Por otro lado, la potencia antihemolítica (pAH) fue determinada como el porcentaje de reducción de hemólisis alcanzado a la cAH_{max} respecto del valor obtenido en las muestras sin tratar.

2.4.9.2. Cálculo del porcentaje de expansión del volumen celular

Se determinó el porcentaje de expansión del volumen celular inducido por los Bz-Arg-NHC₁₂ sobre GRH y GRC. Para ello, se prepararon soluciones de Bz-Arg-NHC₁₂ a la

cAH_{max} correspondiente en PBS de osmolaridades entre 85 y 205 mOsm/l para los GRH y entre 115 y 235 mOsm/l para los GRC. Durante los ensayos, alícuotas (25 μ l) de las suspensiones de GR fueron incubadas con 1 ml de las soluciones del surfactante, incluyendo además controles en presencia de agua nanopura MilliQ[®] (100% de hemólisis) y de los GR incubados en PBS de las osmolaridades antes detalladas sin la adición del tensioactivo. El grado de hemólisis en cada caso fue determinado por el procedimiento descrito en la Sección 2.4.3 del presente Capítulo (pág. 221). Todas las medidas fueron realizadas al menos por triplicado. Con los resultados obtenidos se construyeron curvas *dosis-respuesta* y, a partir del ajuste de los datos a la función de *Boltzmann* utilizando el programa OriginPro 8[®], se determinó en cada caso la osmolaridad capaz de provocar el 50% de hemólisis (C_{50}). Los cálculos de la expansión de volumen inducido por Bz-Arg-NHC₁₂ fueron llevados a cabo según Ponder (1948), quien propone que la asociación entre el volumen hemolítico crítico (V_h) y la concentración osmótica que produce el 50% de hemólisis (C_{50}) puede ser descrita por la Ecuación (5):

$$V_h = V_{na} + V_a \times \frac{C_{iso}}{C_{50}} \quad (5)$$

donde V_{na} es el volumen osmóticamente no activo del GR, que corresponde al 30% del volumen normal del GR (V_0); V_a es la parte osmóticamente activa del volumen del GR, correspondiente al 70% de V_0 ($V_0 = 98$ fl; $V_{na} = 29,4$ fl y $V_a = 68,6$ fl para los GRH; $V_0 = 34$ fl; $V_{na} = 10,2$ fl y $V_a = 23,8$ fl para los GRC); y C_{iso} es la concentración isosmótica (300 mOsm/l). Finalmente, para cada GR se calculó el aumento porcentual del V_h de las células tratadas respecto del V_h control (ausencia del surfactante).

2.4.10. Medidas de polarización generalizada (GP) del Laurdan

El Laurdan (6-dodecanoil-2-dimetil-aminonaftaleno), cuya estructura se muestra en la Figura 4.2.2a, pertenece a la familia de las sondas fluorescentes sensibles a la polaridad del entorno, y por lo tanto puede ser utilizado para detectar cambios en las propiedades de fase de las membranas y diferencias en el orden de los fosfolípidos a partir de cambios en la fluidez de las mismas. Se inserta en la región hidrofóbica de la bicapa lipídica con la porción de *ácido láurico* alineada en paralelo con las cadenas acilo de los fosfolípidos, mientras que el *residuo naftaleno* (fluorescente) se localiza a nivel del esqueleto de glicerol.

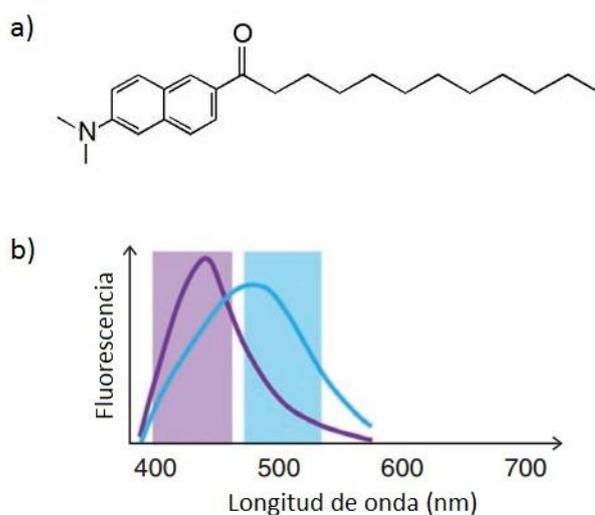


Figura 4.2.2. (a) Estructura del Laurdan y (b) espectros de emisión de fluorescencia: al excitar el fluoróforo a 350 nm, la longitud de onda de emisión máxima se encuentra alrededor de 450 nm (violeta) cuando las moléculas del mismo residen en la fase gel, y cerca de 500 nm (azul) cuando se ubican en la fase líquido cristalina.

Al incorporarse en la membrana, el Laurdan presenta una distribución homogénea, acomodándose tanto en la fase *ordenada* (con un entorno más rígido)

como en la *desordenada* (más fluido). Cuando ocurre un cambio de estado en la misma, se observa un corrimiento del espectro de emisión de aproximadamente 50 nm, hacia el *azul* en fase líquido ordenada y hacia el *rojo* en fase gel (Figura 4.2.2b). Este desplazamiento es atribuido a la reorientación y cambio en la cantidad y/o movilidad de moléculas de agua presentes a nivel del esqueleto del glicerol de los fosfolípidos en las cercanías del Laurdan (proceso de *relajación dipolar*) (Parasassi et al. 1990; Parasassi et al. 1991; Chong & Wong 1993; Bagatolli & Gratton 1999).

Los cambios en el espectro de emisión del Laurdan pueden ser cuantificados mediante el cálculo de la *polarización generalizada* (GP) según la Ecuación (6) (Parasassi et al. 1991). El valor de GP varía entre -1 (exposición total al solvente) y +1 (sin efecto del solvente), siendo mayor cuando se observa una menor relajación dipolar, lo cual indica un entorno más rígido (Owen et al. 2012; Sanchez et al. 2012). Si bien el GP no refleja la movilidad del Laurdan en sí misma, este parámetro es influenciado por la movilidad de moléculas polares en las cercanías del fluoróforo, como el agua que penetra a nivel de las cabezas de los fosfolípidos (Parasassi et al. 1991; Parasassi et al. 1994a; Parasassi et al. 1994b; Parasassi et al. 1994c).

2.4.10.1. Obtención de las suspensiones de fantasmas de glóbulos rojos

Las suspensiones de fantasmas de GRH (GRH_f) y GRC (GRC_f) se prepararon a partir de diluciones de las suspensiones stock de GR (Sección 2.4.2 del presente Capítulo, pág. 220) en PBS isotónico de manera que la densidad celular final fuese de $0,3 \times 10^9$ - $3,0 \times 10^8$ células/ml. Alícuotas de estas suspensiones (1 ml) fueron centrifugadas a $1300 \times g$ durante 15 min de manera de aislar los glóbulos rojos. A continuación se llevó a cabo la lisis hipotónica de las células por el agregado de 1 ml de *buffer de lisis* (buffer

fosfato de sodio 5 mM pH 8,0) e incubación de las suspensiones durante 10 min en baño de hielo. Finalmente, la suspensión resultante fue centrifugada a 10000xg durante 15 min a 4°C, el sobrenadante fue descartado y los fantasmas (*pellet*) fueron lavados tres veces con el mismo buffer y una vez más con PBS isotónico. Los fantasmas fueron resuspendidos en el volumen inicial de PBS (1 ml), por lo que la concentración de las preparaciones fue estimada en $0,3 \times 10^9 - 3,0 \times 10^8$ fantasmas/ml.

2.4.10.2. Medidas de fluorescencia en estado estacionario

Para las medidas de fluorescencia, en ensayos independientes, 25 μ l de las suspensiones de GRH_f y GRC_f fueron incubadas durante 1 h a temperatura ambiente (25°C) en presencia de Bz-Arg-NHC₁₂ a las respectivas cAH_{max} en PBS isotónico (1 ml) y 1 μ l de Laurdan 1 mM. Asimismo, se incluyeron controles en PBS isotónico y ausencia del tensioactivo. Las medidas de polarización generalizada (GP) del Laurdan ($\lambda_{ex} = 350$ nm; $\lambda_{em} = 440$ y 490 nm) fueron llevadas a cabo en un espectrofluorómetro Fluorolog 3 (Horiba/Jobin Yvon) a 25°C. Los valores GP en cada condición fueron calculados mediante la expresión descrita por Parasassi et al. (1998):

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}} \quad (6)$$

donde I_{440} e I_{490} son las intensidades de emisión de fluorescencia a 440 y 490 nm respectivamente.

3. Resultados y discusión

3.1. Evaluación in vitro de la citotoxicidad de Bz-Arg-NHC_n

El efecto de Bz-Arg-NHC_n sobre la viabilidad de dos líneas celulares fue evaluado mediante el método del XTT. Al igual que para la determinación de la actividad antimicrobiana (Capítulo 3), *Cetrimide*, un antiséptico y desinfectante de la piel utilizado principalmente para el tratamiento de la dermatitis seborreica (un trastorno funcional de las glándulas sebáceas) y la limpieza de heridas, fue utilizado como compuesto de referencia. Con la finalidad de realizar una evaluación más confiable de la potencial citotoxicidad de estos compuestos (Nogueira et al. 2011), dos líneas celulares de diferentes orígenes fueron elegidas para los ensayos: *HepG2*, una línea celular de *hepatocarcinoma humano*, y *1BR.3.G*, una línea celular de *fibroblastos de piel humana*. En el caso de la línea HepG2, la elección se basa en que si bien es una línea inmortal derivada de células tumorales, la misma exhibe muchas de las características de un hepatocito normal (Kelly & Darlington 1989). De esta manera, y considerando que las células hepáticas están especializadas en la detoxificación, los resultados obtenidos con la misma proporcionan un buen modelo para el estudio de la toxicidad de compuestos exógenos. Por otro lado, teniendo en cuenta la potencial aplicación de los compuestos como excipientes en formulaciones de aplicación tópica, se eligió la línea celular 1BR.3.G, la cual constituye un modelo *in vitro* adecuado para el estudio de la piel y la irritación transcutánea (Sanchez et al. 2004; Chimutengwende-Gordon et al. 2014).

Durante los ensayos, las líneas celulares mencionadas fueron expuestas a los tensioactivos durante 24 y 72 h, evaluándose a continuación la viabilidad celular mediante la determinación de la capacidad de metabolizar una sal de tetrazolio a

formazán soluble, un derivado coloreado (ensayo del XTT). Los tres tensioactivos estudiados revelaron efectos citotóxicos sobre ambas líneas celulares, evidenciados por la disminución en la reducción de la sal de XTT respecto del control en ausencia de los compuestos. En todos los casos se obtuvieron las *curvas dosis-respuesta* características (Figura 4.3.1.), permitiendo la determinación de la concentración inhibitoria media o IC_{50} (Tabla 4.3.1).

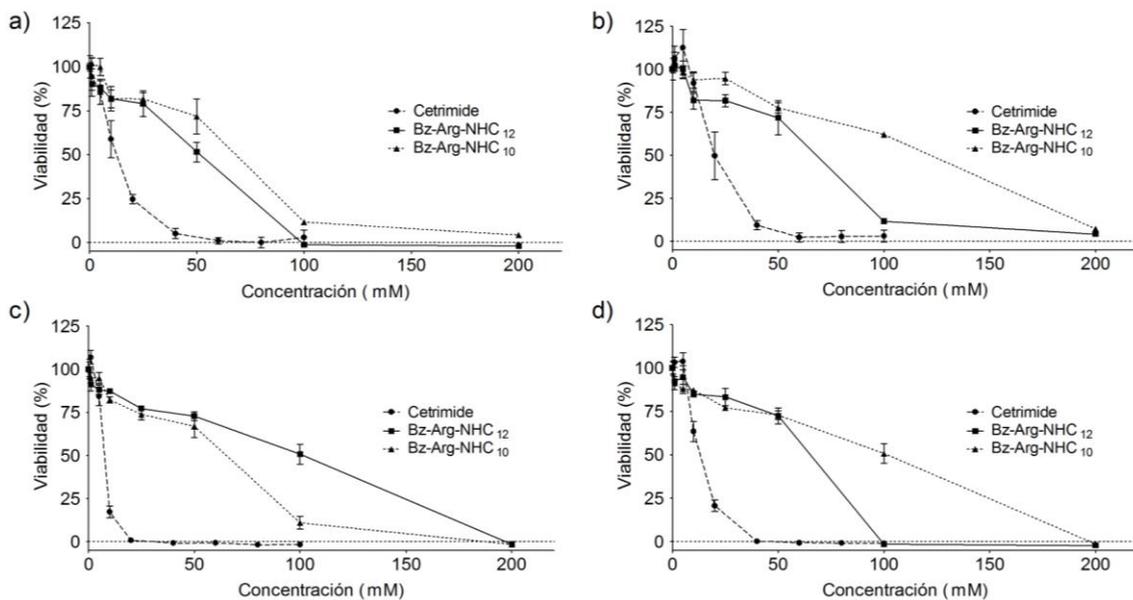


Figura 4.3.1. Viabilidad celular de (a, c) 1BR.3.G y (b, d) HepG2 después de (a, b) 24 h y (c, d) 72 h de incubación en presencia de soluciones de distinta concentración de los tensioactivos.

El menor valor de IC_{50} (mayor actividad citotóxica) para ambas líneas celulares y ambos tiempos de incubación probados fue el registrado para Cetrimide, mientras que Bz-Arg-NHC₁₀ mostró el menor efecto citotóxico. En este contexto, la IC_{50} calculada para Cetrimide fue entre 3 y 4 veces superior que la obtenida para Bz-Arg-NHC₁₂, y de

5 a 6 veces mayor respecto de la registrada para Bz-Arg-NHC₁₀. A pesar de estas diferencias, todos los compuestos probados, resultaron ser levemente más tóxicos frente a los fibroblastos que a la línea celular de hepatocitos.

Tabla 4.3.1. Citotoxicidad de los surfactantes en células 1BR.3.G y HepG2 expresadas en términos de las IC₅₀^a (μM)

Surfactante (PM)	HepG2		1BR.3.G	
	24 h	72 h	24 h	72 h
<i>Bz-Arg-NHC₁₀ (418,32)</i>	76,7 ± 5,7	104,2 ± 7,2	52,1 ± 6,2	62,3 ± 5,9
<i>Bz-Arg-NHC₁₂ (446,34)</i>	56,4 ± 5,5	60,8 ± 6,4	31,9 ± 4,4	44,9 ± 5,1
<i>Cetrimide (336,42)</i>	12,4 ± 1,5	20,1 ± 3,1	7,2 ± 0,5	11,7 ± 1,0

^aMedia ± SD. Concentración de tensioactivo responsable de la muerte del 50% de la población celular (IC₅₀) después de 24 o 72 h de exposición al surfactante.

Los tensioactivos derivados de aminoácidos han demostrado ser, en general, menos citotóxicos que los haluros de amonio cuaternario. En este sentido, los surfactantes catiónicos derivados de lisina resultaron ser aproximadamente cien veces menos tóxicos que el tensioactivo catiónico comercial HTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) sobre la línea celular 3T6a, obtenida de fibroblastos de ratón (Sanchez et al. 2006). Por otro lado, un comportamiento similar fue observado para una familia de surfactantes dicatiónicos derivados de diglicéridos de arginina (Benavides et al. 2004). Los resultados obtenidos para Bz-Arg-NHC_n sugieren que estos compuestos serían menos irritantes para la piel que Cetrimide, convirtiéndolos en interesantes aditivos de potencial uso en formulaciones dermatológicas.

3.2. Caracterización del mecanismo de interacción de los surfactantes con la membrana de los glóbulos rojos

Al agregar un tensioactivo a una suspensión acuosa de glóbulos rojos (GR), las moléculas de surfactante se particionan entre la solución y la membrana de las células hasta alcanzar el equilibrio. A concentraciones sublétricas, la interacción entre los compuestos y la membrana estaría regida por esta partición, la cual se encuentra estrechamente relacionada con la hidrofobicidad del compuesto y la naturaleza de las interacciones iónicas de los grupos polares de que pudieran establecerse. Luego de que la membrana del GR se satura con las moléculas del tensioactivo, comienza a ser evidente la lisis celular (Castillo et al. 2006). En este contexto, los surfactantes capaces de inhibir el crecimiento microbiano o incluso destruir los microorganismos también pueden resultar ser tóxicos frente a otros tipos celulares, como los glóbulos rojos. De esta manera, la determinación de la acción hemolítica es una forma precisa de estimar la citotoxicidad de un determinado compuesto, permitiendo a su vez la evaluación de otras propiedades, como su irritabilidad ocular (Pape et al. 1987).

3.2.1. Evaluación de la actividad hemolítica de Bz-Arg-NHC_n

3.2.1.1. Determinación de las HC₅₀ y evaluación de la irritabilidad ocular

Para la determinación de la actividad hemolítica, se incubaron GRH en presencia de soluciones de distintas concentraciones de los tensioactivos preparadas en medio isotónico (PBS 300 mOsm/l). Tanto para Bz-Arg-NHC_n como para Cetrimide, se calcularon los porcentajes de hemólisis a partir de la cuantificación de la hemoglobina liberada en el sobrenadante en cada caso, construyéndose a continuación las curvas de hemólisis en función de la concentración del surfactante (Figura 4.3.2). Si bien todos los tensioactivos

ensayados demostraron actividad hemolítica, se apreciaron diferencias en la forma de las curvas *dosis-respuesta* obtenidas: mientras que Cetrimide y Bz-Arg-NHC₁₀ mostraron un perfil sigmoidal, en el caso de Bz-Arg-NHC₁₂ se observó un comportamiento hiperbólico. La forma de la curva en este último caso puede ser considerada como un indicador de la presencia de un efecto de cooperatividad en la interacción surfactante-membrana.

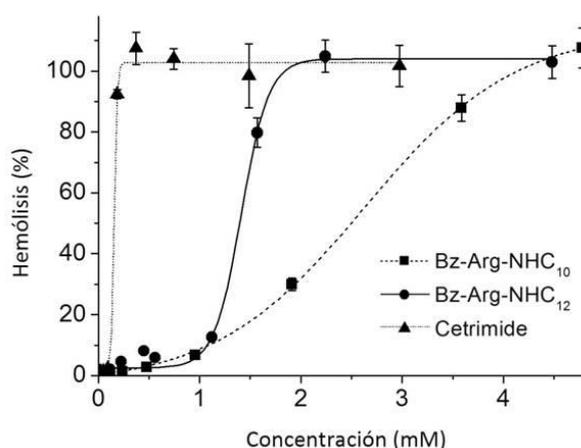


Figura 4.3.2. Hemólisis de GRH (cuantificada por liberación de hemoglobina) inducida por distintas concentraciones de los surfactantes en medio isotónico (PBS 300 mOsm/l). Los valores se grafican como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

A partir del ajuste de cada grupo de datos a la función de Boltzmann, se obtuvieron los valores de HC₅₀ para cada surfactante, es decir, la concentración del mismo responsable del 50% de hemólisis. La Tabla 4.3.2 resume los resultados obtenidos. Como puede apreciarse, para los GRH tratados con Cetrimide, la HC₅₀ encontrada fue menor que las calculadas para los tensioactivos derivados de arginina, sugiriendo una mayor interacción y, por lo tanto, una mayor toxicidad de este

tensioactivo.

Tabla 4.3.2. Actividad hemolítica de Bz-Arg-NHC_n sobre GRH en términos de su HC₅₀^a (μM), índice de desnaturalización (ID), relación de lisis/desnaturalización (L/D) y clasificación de los tensioactivos por su potencial de irritación ocular según la relación L/D.

Surfactante	CMC (μM)	HC₅₀^a (μM)	ID	L/D	Clasificación
Bz-Arg-NHC ₁₀	230,0	2630,5 ± 57,8	7,98	101,82	No irritante
Bz-Arg-NHC ₁₂	85,0	1412,8 ± 15,8	6,19	137,81	No irritante
Cetrimide	297,3	155,2 ± 13,9	8,58	6,06	Irritante moderado

^aMedia ± SD. Concentración de surfactante responsable del 50% de hemólisis (HC₅₀).

Por otro lado, dentro de la serie de los surfactantes derivados de arginina, se observó una relación inversamente proporcional entre los valores de HC₅₀ y la hidrofobicidad de la molécula, siendo menor la HC₅₀ a mayor longitud de la cola hidrocarbonada. En este sentido, el valor de HC₅₀ obtenido para Bz-Arg-NHC₁₀ fue de aproximadamente el doble del calculado para su análogo de 12 carbonos. Estos resultados pueden explicarse considerando que las propiedades fisicoquímicas que rigen la formación de los agregados de moléculas de surfactante (micelas) son las mismas que promueven su interacción con las membranas. En otras palabras, las moléculas de Bz-Arg-NHC₁₂ en solución acuosa tienen mayor tendencia a agregarse (menor CMC), pero en presencia de los GRH, el equilibrio de partición es desplazado hacia la incorporación de las moléculas en la membrana de los mismos.

A pesar de numerosos esfuerzos por demostrar una correlación entre la

actividad hemolítica y la CMC de los surfactantes, hasta la actualidad no se ha logrado encontrar ninguna generalización (Dufour et al. 2005). En nuestro caso, los valores de HC_{50} obtenidos para Bz-Arg-NHC_n fueron al menos un orden de magnitud superior que la CMC correspondiente, con relaciones HC_{50}/CMC de 11,42 y 16,60 para Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ respectivamente. Estos resultados difieren significativamente de los observados para Cetrimide (cuya relación HC_{50}/CMC es de 0,026), sugiriendo mecanismos de hemólisis diferentes. Para tensioactivos altamente hidrofóbicos, con bajos valores de CMC, para una concentración determinada del agente tensioactivo, la cantidad de monómeros libres en solución es considerablemente baja. En este caso, y considerando que los monómeros serían las especies responsables del efecto hemolítico, una concentración mucho mayor del tensioactivo sería necesaria para alcanzar la hemólisis, por lo que el valor de HC_{50} sería inversamente proporcional a la CMC, como fue reportado para ésteres de *L*-fenilalanina y *L*-tirosina (Joondan et al. 2014; Joondan et al. 2015). Contrariamente, en el caso de Bz-Arg-NHC_n, el menor valor de CMC (es decir, la menor concentración de monómeros en solución en equilibrio con micelas) se correlacionó con la mayor actividad hemolítica (es decir, menor HC_{50}).

Por otro lado, se ha estudiado y reportado la actividad hemolítica sobre GRH de los surfactantes derivados de arginina pertenecientes a las series descritas en el Capítulo 2 (Sección 3.5.1, pág. 115) (Piera et al. 1998; Morán et al. 2001; Infante et al. 2004). Los valores de HC_{50} informados en bibliografía para los mismos se resumen en la Tabla 4.3.3. Como puede observarse, todos los compuestos revelaron actividad hemolítica. A su vez, dentro de cada serie se observó un comportamiento similar al observado en el caso de Bz-Arg-NHC_n: los derivados con una cola hidrofóbica de 10

carbonos de largo presentaron menor poder hemolítico que sus análogos de 12 carbonos.

Tabla 4.3.3. Actividad hemolítica de surfactantes derivados de arginina pertenecientes a las series II y III^a.

Surfactante	Serie II		Serie III	
	<i>LAM</i>	<i>CAM</i>	<i>ALA</i>	<i>ACA</i>
<i>HC₅₀ (μM)</i>	51,25	117,92	>2400	>2600
<i>CMC (mM)</i>	6,0	16,0	1,8	26,0

^aDescriptos en el Capítulo 2, Sección 3.5.1, pág. 115.

Es posible proponer que la interacción del surfactante con la membrana tenga lugar en al menos dos etapas: la primera, vinculada con la adsorción del mismo a la membrana del GR, favorecida por interacciones electrostáticas, y la segunda relacionada a su inserción en la matriz hidrofóbica de la membrana. La presencia de dos cargas positivas en la porción polar de los compuestos de la serie III favorecería la primera etapa. Contrariamente, los surfactantes de las series I y II presentan mayor poder hemolítico, evidenciando la importancia de las interacciones hidrofóbicas en el proceso.

Finalmente, la cuantificación del poder hemolítico permitió la evaluación del potencial de irritabilidad ocular de los tensioactivos. El método empleado en este caso se basa en la comparación de los efectos adversos de detergentes y tensioactivos en la membrana plasmática de GRH (*hemólisis*) y el daño observado en las proteínas liberadas (*desnaturalización de la hemoglobina*) (Mitjans et al. 2003; Sanchez et al. 2006). Este tipo de ensayos se ha propuesto como alternativa a la controversial prueba de *Draize*,

llevada a cabo en animales, y constituyen un sistema *in vitro* rápido, sencillo y preciso para la evaluación de la potencial irritabilidad ocular de tensioactivos y/o productos que los contengan (Pape et al. 1987). Durante el ensayo, la cuantificación de la desnaturalización de la hemoglobina fue llevada a cabo espectrofotométricamente a través del cálculo del *índice de desnaturalización* (ID), determinado mediante la comparación del efecto en presencia del surfactante y el observado en el caso del lauril sulfato de sodio (SDS), un tensioactivo aniónico empleado como control positivo. Finalmente, para la determinación del índice de irritabilidad ocular se calculó la *relación lisis/desnaturalización* (L/D) para cada surfactante, definida por el cociente entre las respectivas HC₅₀ y el ID observado en cada caso. La Tabla 4.3.2 resume los ID y las L/D obtenidas para GRH, así como la clasificación de los tensioactivos según su potencial de irritabilidad ocular. Según los resultados obtenidos, ambos compuestos derivados de arginina pueden clasificarse como no irritantes oculares (Sanchez et al. 2006). Por el contrario, Cetrimide mostró un efecto más tóxico, ya que de acuerdo a su relación L/D, este tensioactivo se clasifica como moderadamente irritante, al igual que el surfactante derivado de arginina LAM (Martinez et al. 2006).

3.2.1.2. Cálculo de las relaciones molares efectivas lípido-surfactante (R_e)

Los valores de HC₅₀ representan la cantidad total de un determinado compuesto responsable del 50% de hemólisis, no sólo la fracción del mismo asociada a la membrana y, por lo tanto, realmente responsable de este efecto. Teniendo esto en cuenta, se llevó a cabo la determinación de la relación molar efectiva de moléculas de lípidos y surfactante para el inicio y la completa solubilización de la membrana de GRH. Estos parámetros fueron estimados considerando el *modelo de Lichtenberg*, el cual describe la

interacción de los tensioactivos con membranas lipídicas como un proceso complejo que comprende al menos tres etapas (Kragh-Hansen et al. 1998). Durante la primera, cuando la concentración del tensioactivo es menor que la necesaria para la solubilización de la membrana, las moléculas del surfactante se particionan entre el medio acuoso y la membrana. A mayores concentraciones ocurre el proceso de *micelización*, apreciándose la coexistencia de *membranas saturadas de moléculas de surfactante* junto con *micelas mixtas* (surfactante-lípido). Finalmente, cuando la concentración de surfactante supera la necesaria para la solubilización completa de la membrana, la misma se transforma en *micelas mixtas*. Si bien este modelo ha sido descrito en membranas netamente lipídicas, la formación de agregados mixtos también ha sido evidenciada en membranas más complejas (compuestas por fosfolípidos, colesterol y proteínas) por acción de tensioactivos. La forma de estos agregados depende de la relación molar (R_e) de *anfifilos solubles* (moléculas del surfactante) e *insolubles* (fosfolípidos): por debajo de un valor crítico (R_{sat}) los agregados presentan forma lamelar, mientras que por encima de otra relación crítica (R_{sol}) las membranas se convierten en micelas mixtas de surfactante-lípido-proteína.

Con el fin de establecer el papel de los monómeros de los surfactantes en la solubilización de la membrana de los GRH, se estudió el efecto hemolítico de Bz-Arg-NHC_n sobre GRH para diferentes hematocritos (*Ht*): 0,075; 0,15; 0,30 y 0,45% (v/v) (Figura 4.3.3).

Los valores de S_t (concentración total de tensioactivo necesaria para la saturación y solubilización de la membrana, S_{sat} y S_{sol} respectivamente) fueron calculados a partir de cada curva de *dosis-respuesta* y graficados en función de la

concentración total de lípidos de la membrana del GR (Figura 4.3.4). A partir de estas gráficas se establecieron las relaciones molares surfactante/lípido (R_e) para la saturación y solubilización total de la membrana de los GRH (R_{sat} y R_{sol}), así como las respectivas concentraciones de cada surfactante libre en agua (S_w^{sat} y S_w^{sol}). La Tabla 4.3.4 resume los parámetros obtenidos.

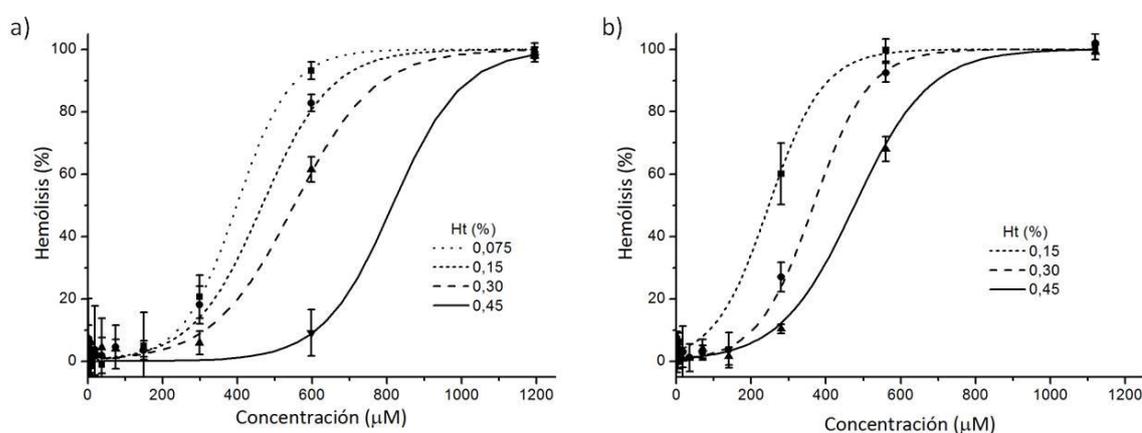


Figura 4.3.3. Efecto hemolítico (cuantificado por disminución de la DO_{595}) de (a) $Bz-Arg-NHC_{10}$ y (b) $Bz-Arg-NHC_{12}$ sobre GRH en medio isotónico (PBS pH 7,4; $300\text{ mOsm}\cdot\text{l}^{-1}$) para 1 h de incubación a diferentes hematocritos (Ht). Los valores se grafican como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

Como puede verse en la Figura 4.3.4, para ambos tensioactivos derivados de arginina se encontró una correlación directa entre los valores de S_t y la concentración de lípidos en la suspensión de GRH, observándose un aumento en los valores de S_{sat} y S_{sol} con el incremento de la concentración de lípidos de membrana. En todos los casos, los valores de S_{sat} y S_{sol} obtenidos para $Bz-Arg-NHC_{10}$ fueron superiores a los calculados para $Bz-Arg-NHC_{12}$. Sin embargo, las relaciones molares surfactante/lípido calculadas para la saturación de la membrana de los GRH (R_{sat}) con ambos tensioactivos no representan

una situación factible, ya que la conservación de la integridad de la membrana luego de la incorporación de 11 o 6 moléculas de tensioactivo por molécula de lípido resulta poco probable. En este sentido, los resultados obtenidos pueden ser explicados en base a la baja solubilidad acuosa de los tensioactivos, ya que la agregación de las moléculas del surfactante a bajas concentraciones puede llevar a una sobrestimación de los parámetros R_{sat} y R_{sol} .

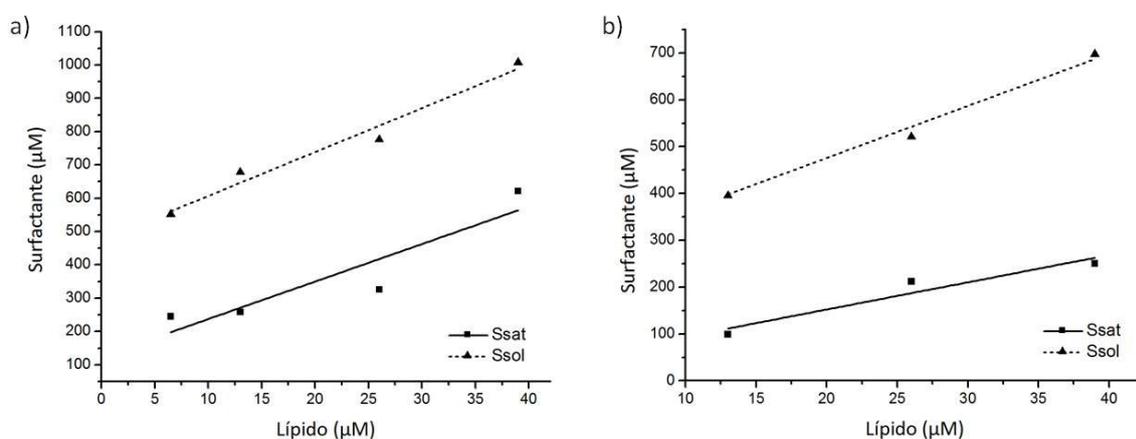


Figura 4.3.4. Concentración total de (a) Bz-Arg-NHC₁₀ o (b) Bz-Arg-NHC₁₂ necesaria para la saturación de la membrana y solubilización total (S_{sat} y S_{sol}) en función de la concentración de lípidos de membrana de GRH. Las relaciones molares surfactante/lípido (R_{sat} y R_{sol}) y la concentración de monómero libre en agua (S_w^{sat} y S_w^{sol}) fueron calculados a partir la pendiente y la ordenada al origen, respectivamente, de las líneas rectas obtenidas por regresión lineal para cada surfactante.

Otro parámetro importante a considerar es la cantidad de surfactante libre en agua (S_w), el cual puede ser interpretado como la CMC del compuesto en presencia de una membrana lipídica. Como puede verse en la Tabla 4.3.4, los valores de S_w^{sat} calculados fueron 1,8 y 2,3 veces más bajos que las CMC determinadas en agua pura

(Capítulo 2, Sección 3.5.1, pág. 115) para Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ respectivamente, destacando la afinidad de los tensioactivos por la membrana del GRH.

Tabla 4.3.4. Relaciones molares surfactante/lípido (R_{sat} y R_{sol}), CMC y las concentraciones de surfactante libre en agua (S_w) para la lisis de GRH inducida por Bz-Arg-NHC_n.

Surfactante	R_{sat}	R_{sol}	CMC (μM)	S_w^{sat} (μM)	S_w^{sol} (μM)
Bz-Arg-NHC ₁₀	11,26	13,18	230,0	125,12	475,25
Bz-Arg-NHC ₁₂	5,81	11,63	85,0	36,23	235,67

3.2.1.3. Análisis de las cinéticas de hemólisis

Por otro lado, y de manera de obtener más información sobre el mecanismo implicado en el proceso hemolítico inducido por Bz-Arg-NHC_n, se estudiaron las cinéticas de hemólisis de GRH a 6 concentraciones diferentes de surfactante, tanto por debajo como por encima de sus respectivas CMC. La Figura 4.3.5 muestra la *variación de la densidad óptica a 595 nm (DO_{595}) en función del tiempo*, para un período total de incubación de 1 h, a dos concentraciones diferentes de lípidos (13 y 26 μM , correspondientes a Ht de 0,15 y 0,30% respectivamente) en presencia de Bz-Arg-NHC₁₀ (Figuras 4.3.5a y 4.3.5b) y Bz-Arg-NHC₁₂ (Figuras 4.3.5c y 4.3.5d).

En el caso de las suspensiones GRH incubadas con Bz-Arg-NHC₁₀, la solubilización de los GRH (evidenciada por una disminución en la DO_{595}) fue observada para todas las concentraciones de surfactante por encima de la CMC (230 μM). Resultó interesante el hecho de que para un Ht de 0,15% (v/v) no hubo cambios significativos en la DO_{595} para las concentraciones de surfactante por debajo de la CMC (Figura 4.3.5a).

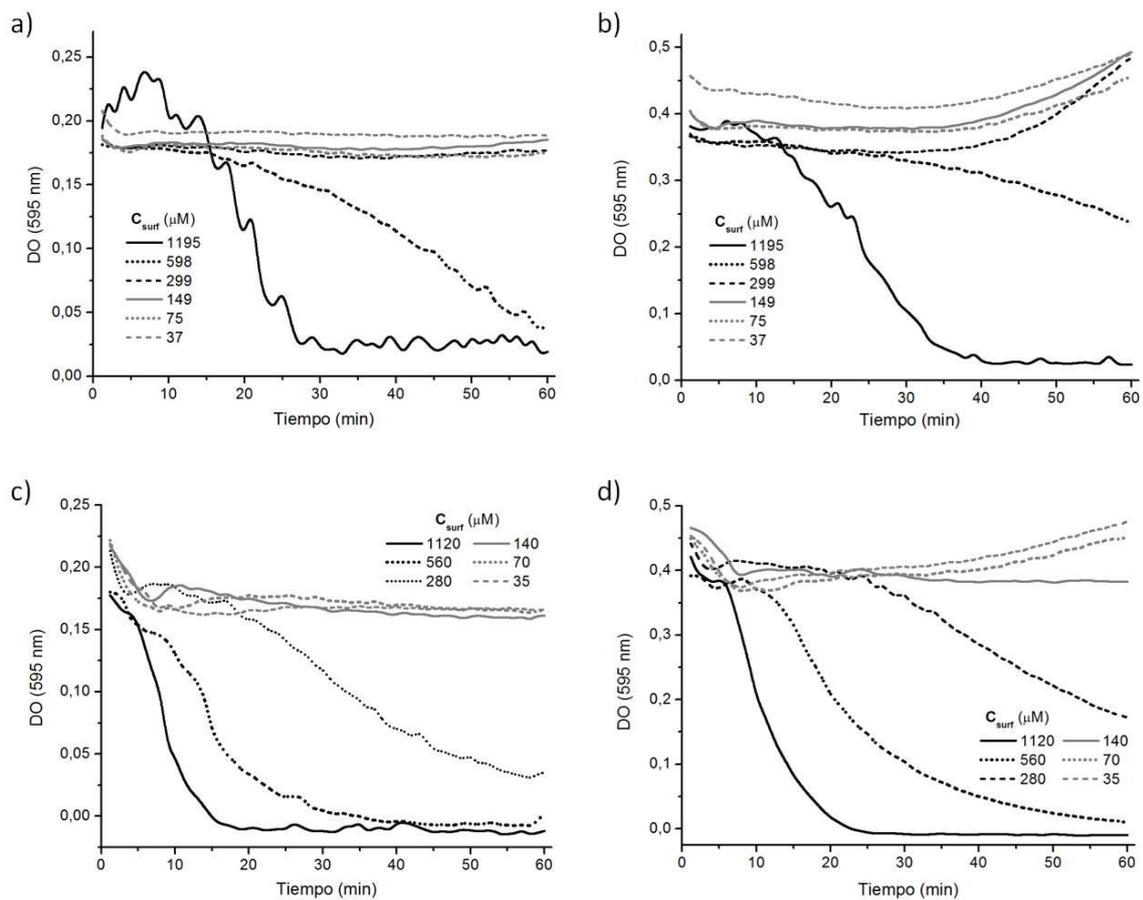


Figura 4.3.5. Cinéticas de hemólisis inducidas por (a, b) Bz-Arg-NHC₁₀ y (c, d) Bz-Arg-NHC₁₂ en medio isotónico para Ht de (a, c) 0,15% y (b, d) 0,30% (v/v). Las concentraciones de cada surfactante empleadas se indican en cada gráfico.

Al aumentar el hematocrito, para tiempos de incubación mayores a los 30 min se observó un pequeño incremento en la DO_{595} para las menores concentraciones de surfactante (Figura 4.3.5b). Este comportamiento podría ser debido a una agregación de los GRH mediada por los surfactantes, favorecida por la neutralización de la carga negativa de la superficie celular, la cual es más evidente si se aumenta el Ht (Figuras 4.3.6b y 4.3.6d). Por otro lado, para los GRH tratados con Bz-Arg-NHC₁₂, se observó un comportamiento similar: la solubilización de la membrana fue evidenciada para las concentraciones ensayadas por encima de su CMC (Figuras 4.3.5c y 4.3.5d). Sin

embargo, cuando la concentración de GRH fue duplicada, la disminución de la DO_{595} fue menos pronunciada (Figura 4.3.5d). Este hecho fue más evidente cuando se analizó la cinética de hemólisis para el mayor Ht probado (0,45%) (Figura 4.3.6d). En este caso, la forma de las gráficas se podría explicar como la combinación de dos fenómenos: la agregación de los GRH (visualizada como un aumento en la DO_{595}) que compite y evita la solubilización de la membrana (evidenciada por una disminución de la DO_{595}).

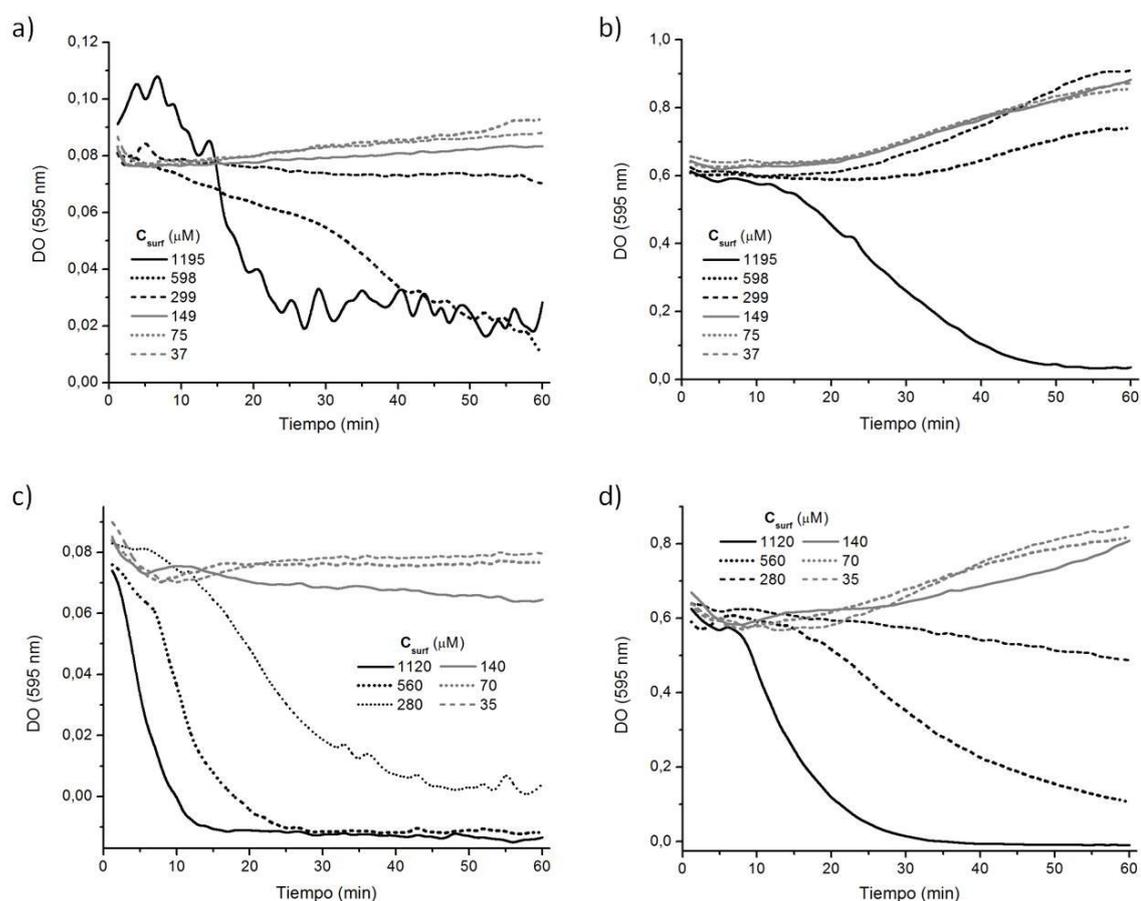


Figura 4.3.6. Cinéticas de hemólisis inducidas por (a, b) Bz-Arg-NHC₁₀ y (c, d) Bz-Arg-NHC₁₂ en medio isotónico para Ht de (a, c) 0,075% y (b, d) 0,45% (v/v). Las concentraciones de cada surfactante empleadas se indican en cada gráfico.

3.2.1.4. Solubilización de fosfolípidos de membrana de glóbulos rojos tratados con Bz-Arg-NHC_n

Con el fin de relacionar la disminución en la DO₅₉₅ con la solubilización de los componentes de membrana de los GRH inducida por Bz-Arg-NHC_n, se cuantificaron los fosfolípidos solubles (PL_s) en el sobrenadante de GRH incubados en presencia los tensioactivos. La Figura 4.3.7 muestra los resultados obtenidos para la solubilización de las membranas de GRH inducida por Bz-Arg-NHC_n a concentraciones tanto por debajo como por encima de sus respectivas CMC, junto con los porcentajes de hemólisis observados en cada caso.

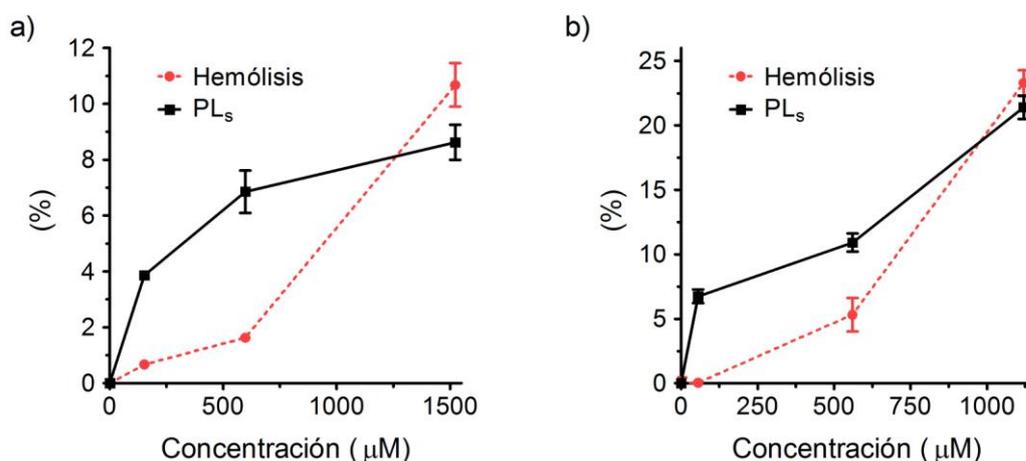


Figura 4.3.7. Hemólisis (cuantificada por liberación de hemoglobina) y solubilización de la membrana (cuantificada a través de la determinación de PL_s) de GRH inducida por distintas concentraciones de (a) Bz-Arg-NHC₁₀ y (b) Bz-Arg-NHC₁₂. Los valores se grafican como la media ± SD de tres experimentos independientes.

Hasta el momento se han descrito dos mecanismos posibles para la hemólisis inducida por tensioactivos: de forma *osmótica* y/o por solubilización de la membrana

plasmática con formación de *micelas mixtas* (Shalel et al. 2002; Manaargadoo-Catin et al. 2016). Sin embargo, la dependencia del mecanismo observado en función de la concentración del tensioactivo dificulta la definición precisa del límite entre ambos. En primer lugar, el mecanismo a través de la *lisis osmótica* ocurre de una manera similar a la hemólisis hipotónica, en la cual los monómeros del surfactante incorporados a la membrana provocan asociaciones y/o cambios conformacionales en las proteínas, generando poros con la consiguiente lisis celular (Manaargadoo-Catin et al. 2016). Este modelo es aplicado principalmente a anfifilos incapaces de traslocar a la monocapa interna, como en el caso de los surfactantes con grupos hidrofílicos voluminosos (como Bz-Arg-NHC_n). En este caso, la incorporación de moléculas de surfactante en la monocapa externa, provocan no sólo cambios en las proteínas, sino un aumento en el área relativa de la misma, generando una inestabilidad que bloquea la incorporación de moléculas adicionales y es aliviada a través de la liberación de *vesículas mixtas* (Stuart & Boekema 2007). Por otro lado, contrariamente a la lisis osmótica (causada por los monómeros del tensioactivo), la presencia de micelas de surfactante en el medio puede llevar a la solubilización de la membrana a través de la extracción de los componentes de la misma. Este mecanismo se caracteriza por la constitución de un sistema dinámico, con un intercambio continuo entre las micelas y la membrana de los GR. Como resultado de estas interacciones los componentes de la membrana son extraídos de la misma para formar micelas mixtas de lípidos/surfactante, proteínas/surfactante y/o lípido/proteína/surfactante (Kragh-Hansen et al. 1998; Manaargadoo-Catin et al. 2016)

La presencia de PL_s en los sobrenadantes de los GRH incubados con los tensioactivos a concentraciones tanto por debajo como por encima de sus respectivas

CMC, incluso en aquellas condiciones en las que la hemólisis es despreciable, sugiere que el mecanismo hemolítico involucra la solubilización de los componentes de membrana. Dado que el efecto hemolítico de ambos tensioactivos se observó por encima de las correspondientes CMC, podría asumirse que el mecanismo involucrado sería la extracción de los componentes de membrana por las micelas de los tensioactivos presentes en el medio. Teniendo esto en cuenta, se estudiaron los cambios morfológicos en GRH inducidos por exposición a los tensioactivos derivados de arginina.

3.2.1.5. Estudio del efecto de los surfactantes sobre la morfología de los glóbulos rojos

Las reorganizaciones en la membrana de los GR pueden derivar en importantes cambios morfológicos. Múltiples estudios han descrito las transformaciones de los glóbulos rojos normales o *discocitos* (con forma de disco bicóncavo, Figura 4.3.8a) por variación de la concentración de electrolitos en el medio (cambios en la osmolaridad), aumento del pH, exposición a anfifilos y otras sustancias e incluso por cambios de temperatura (Tachev et al. 2004). Entre estos cambios de forma, las transiciones más comunes son las de discocito a *estomatocito* (con forma cóncava, con una depresión central elongada y apariencia de copa o estoma, Figura 4.3.8b), o de discocito a *equinocito* (en la que se destacan la presencia de múltiples protrusiones redondeadas distribuidas de manera uniforme, Figuras 4.3.8c y 4.3.8d). Asimismo, en el estadio previo a la lisis, debido a la disminución del volumen celular por pérdida de porciones de membrana puede ocurrir una transformación a la forma esférica o *esferocito* (Bessis 1973).

El hecho de que la membrana aislada de los GR exhiba las mismas formas y cambios en la misma que el glóbulo rojo intacto ha llevado a la conclusión de que,

ambas características se encuentran determinadas exclusivamente por alteraciones en la membrana plasmática (Elgsaeter & Mikkelsen 1991). De esta manera, las variaciones en la morfología de los GR pueden ser interpretadas en términos de modificaciones de la relación entre las áreas de las monocapas interna y externa de la membrana (Vives et al. 1999; Svetina et al. 2004).

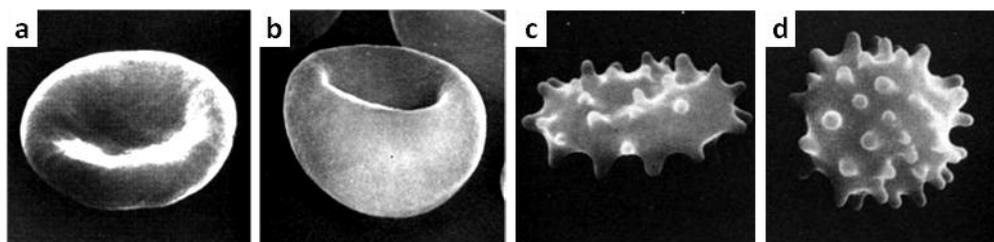


Figura 4.3.8. Morfología de los GRH: (a) discocito (GR normal), (b) estomatocito II, (c) equinocito II (plano), (d) equinocito III (esférico) (Bessis 1973).

Se ha sugerido que al principio de la hemólisis inducida por algunos tensioactivos existe un período de retraso o *tiempo lag* en el que las moléculas del surfactante saturan la monocapa externa de la membrana de los GR y traslocan hacia la monocapa interna (*flipping*). En este contexto, la velocidad de hemólisis depende directamente de la velocidad con la que las moléculas de surfactante trasloquen hacia la monocapa interna: de esta manera la solubilización de la membrana será un proceso lento para tensioactivos con traslocación lenta.

De manera de esclarecer el mecanismo implicado en la solubilización de la membrana de glóbulos rojos mediada por Bz-Arg-NHC_n, se analizaron los cambios en la morfología normal de los GR luego de la exposición a distintas concentraciones de los

surfactantes utilizando un microscopio óptico con contraste de fases. La adquisición de imágenes digitales reveló secuencias morfológicas distintivas dependiendo no sólo de la longitud de la cadena hidrocarbonada del surfactante, sino también de la concentración del mismo. La figura 4.3.9 muestra los cambios de forma de GRH incubados en presencia de diferentes concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₀ (Figuras 4.3.9b y 4.3.9c) o Bz-Arg-NHC₁₂ (Figuras 4.3.9d y 4.3.9e). Asimismo, se obtuvieron imágenes de GRH control (no tratados) durante el mismo período de incubación, revelando la ausencia de cambios morfológicos en ausencia de los tensioactivos (Figura 4.3.9a). Para los GRH tratados con Bz-Arg-NHC₁₀, la secuencia morfológica observada fue *discocito-equinocito-esferocito*, independientemente de la concentración probada (300 o 1200 µM). En el caso de los GRH incubados con Bz-Arg-NHC₁₂, para la menor concentración de surfactante utilizada (280 µM), la secuencia registrada fue *discocito-equinocito-esferoequinocito*, mientras que para la máxima concentración probada (1100 µM) se observó un cambio en la secuencia, siendo la misma *discocito-estomatocito-esferocito*. Durante las observaciones, la completa lisis de los GRH se evidenció visualmente sólo en el caso de los GRH tratados con Bz-Arg-NHC₁₂ 1100 µM luego de 7 min de incubación.

Para explicar las alteraciones en la forma normal de los GRH inducidas por exposición a Bz-Arg-NHC_n, se revisó la *hipótesis del acoplamiento de la bicapa* (Sheetz & Singer 1974; Sheetz et al. 1976). Este modelo establece que ambas monocapas que constituyen una bicapa cerrada (compuesta por proteínas y lípidos polares asimétricamente distribuidos) actúan en forma conjunta (acoplada). En este contexto, aunque ambas monocapas permanezcan acopladas la una a la otra, pueden surgir alteraciones en la forma normal de los GR en respuesta a diferentes perturbaciones y como consecuencia directa de diferencias en el área relativa de cada una de ellas.

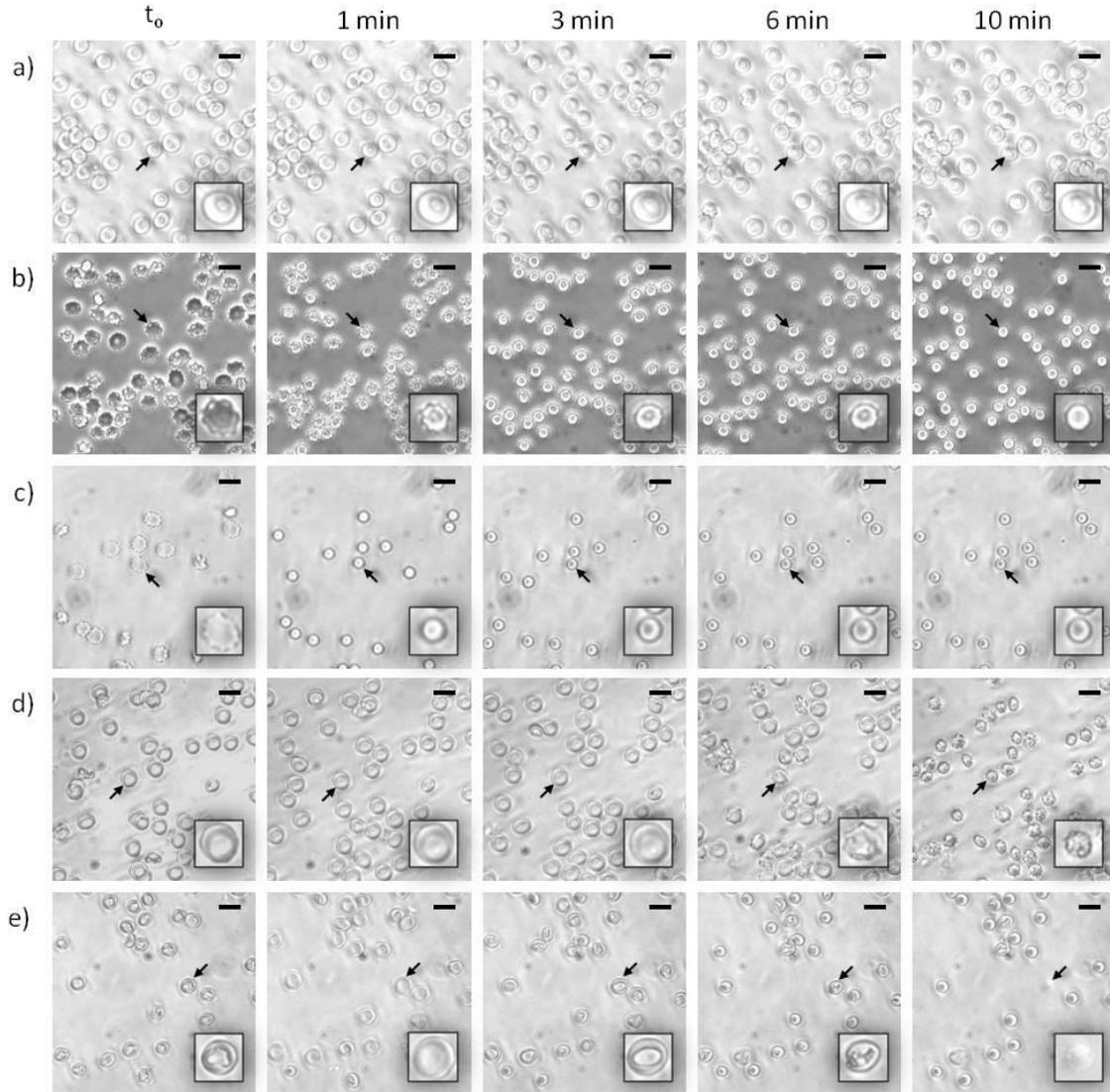


Figura 4.3.9. Imágenes de microscopía óptica con contraste de fases de GRH tomadas inmediatamente (t_0) y 1, 3, 6 o 10 min (indicado sobre la figura) después de la adición de (b) Bz-Arg-NHC₁₀ 300 μ M; (c) Bz-Arg-NHC₁₀ 1200 μ M; (d) Bz-Arg-NHC₁₂ 280 μ M o (e) Bz-Arg-NHC₁₂ 1100 μ M, todos en medio isotónico (Aumento: 400X; barras: 10 μ m). Asimismo se incluyen las imágenes correspondientes a los GRH control (a) incubados con PBS (pH 7,4; 300 mOsm/l) en ausencia de los tensioactivos. Los recuadros muestran las imágenes digitalmente ampliadas (2,5X) de las células señaladas con flechas.

De esta forma, cualquier perturbación que aumente el área de la monocapa externa (como la inserción de moléculas de surfactante de traslocación lenta) favorece

la formación de estructuras que protruyen de la superficie de la membrana, estimulando así la transición *discocito-equinocito*. Por el contrario, la adición de moléculas anfifílicas que se incorporan en la monocapa interna produce una expansión de su área relativa con respecto a la externa, provocando la formación de concavidades en la superficie de la membrana (*estomatocitos*). Por otro lado, las alteraciones en la forma en los GR inducidas por exposición a tensioactivos pueden no sólo ser el resultado de una incorporación asimétrica de moléculas anfifílicas en la bicapa, sino también una consecuencia de la extracción de lípidos y otros componentes de la misma (Vives et al. 1999).

En el caso de Bz-Arg-NHC₁₀ (menos hidrofóbico) luego de la incorporación de los monómeros en la membrana de los GRH, las moléculas de surfactante se localizan en la monocapa externa, induciendo cambios en la forma típica de los GR de *discocito* a *equinocito*. A continuación, la solubilización de los componentes de la membrana y/o liberación de microvesículas contribuirían a la transformación final de las células en *esferocitos* (Figuras 4.3.9b y 4.3.9c). Un comportamiento similar se observó en el caso de Bz-Arg-NHC₁₂ para la menor concentración probada (Figura 4.3.9d). Sin embargo, al aumentar la concentración de este último tensioactivo, la principal morfología observada fueron *estomatocitos* (Figura 4.3.9e). Este hecho puede explicarse sobre la base de un incremento en el número de agregados del tensioactivo, lo que se traduce en un aumento en la extracción de lípidos en relación a la observada en el caso de los agregados de Bz-Arg-NHC₁₀. De esta forma, si bien las moléculas de tensioactivo serían incapaces de traslocar a la membrana interna, la rápida solubilización de los lípidos y otros componentes de membrana conducirían a una disminución substancial del área de la monocapa externa, cambiando la forma del GR de *discocito* a *estomatocito*.

La Figura 4.3.10 muestra un esquema de ambos fenómenos observados. De esta manera, si bien en la literatura se encuentra generalmente aceptada la clasificación de anfifilos como *equinocitogénicos* (crenadores) o *estomatocitogénicos* basada únicamente en la carga neta de la parte polar de las moléculas individuales (negativa o positiva, respectivamente), los resultados obtenidos demuestran que esta generalización podría llevar a conclusiones erróneas.

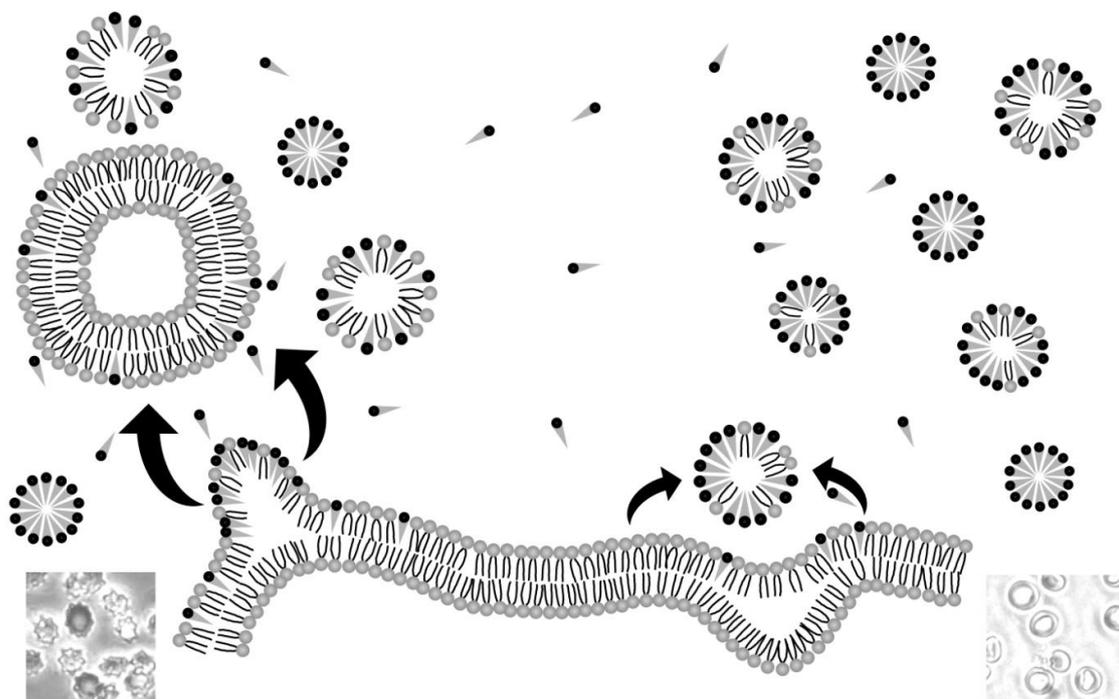


Figura 4.3.10. Esquema simplificado de los principales mecanismos aceptados para la hemólisis inducida por Bz-Arg-NHC_n. (a) La liberación de exovesículas tiene lugar por la desestabilización de la membrana debido a la inserción de monómeros del surfactante (representados como conos) en la bicapa lipídica. (b) Ataque micelar: los lípidos son extraídos de la membrana por colisión entre los GR y los agregados de surfactante.

3.2.1.6. Liberación de microvesículas en glóbulos rojos tratados con Bz-Arg-NHC_n

Con la finalidad de correlacionar la crenación de los GRH expuestos a Bz-Arg-NHC_n con la formación de exovesículas, se estudió la presencia de las mismas en el sobrenadante de GRH expuestos a los tensioactivos a través de su observación al microscopio electrónico de transmisión (MET). Para ello, las microvesículas fueron aisladas por ultracentrifugación a partir de los sobrenadantes de GRH tratados con Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂, separando previamente células intactas y fantasmas por centrifugaciones a baja velocidad. Una vez aisladas, las microvesículas fueron inmediatamente fijadas con glutaraldehído, de manera de conservar su estructura hasta el momento de la observación. Para las observaciones al MET se utilizó la técnica de tinción negativa, empleando ácido fosfotúngstico (PTA) al 1% (p/v) como contrastante. La tinción negativa en microscopía electrónica se basa en la deposición del metal pesado (tungsteno en este caso) tanto en las depresiones, intersticios y orificios de las partículas a observar como en su entorno cercano, observándose zonas más electrodensas en estos casos y zonas más claras (menos electrodensas) en las regiones con protuberancias (Figura 4.2.1, pág. 202). De esta manera, mediante este procedimiento las partículas no son teñidas en sí, sino que son rodeadas por el contrastante, permitiendo la observación del contorno de las mismas e incluso de irregularidades en su superficie. La Figura 4.3.11 muestra las micrográficas electrónicas tomadas, revelando la presencia de microvesículas con un tamaño promedio de 200 nm en el sobrenadante de los GRH tratados como ambos tensioactivos.

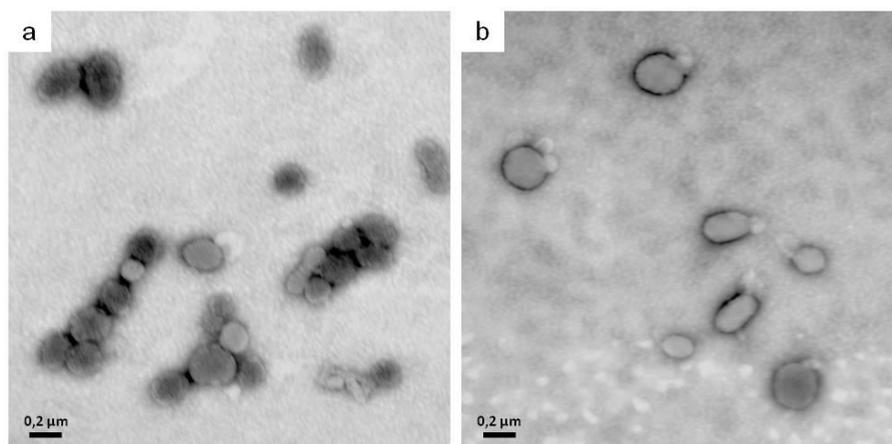


Figura 4.3.11. Micrografías electrónicas de las microvesículas liberadas y aisladas por ultracentrifugación luego de la exposición de GRH a (a) Bz-Arg-NHC₁₀ 300 μM y (b) Bz-Arg-NHC₁₂ 280 μM en medio isotónico (Barras: 200 nm). No se observó la liberación de microvesículas en el caso de los GRC tratados con los tensioactivos. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído y observadas bajo tinción negativa con ácido fosfotúngstico 1% (p/v).

3.2.2. Efecto de Bz-Arg-NHC₁₂ sobre la resistencia de glóbulos rojos a la lisis hipotónica

Muchos surfactantes son capaces de interactuar con las membranas biológicas en una forma bifásica, induciendo la lisis a altas concentraciones y favoreciendo la protección contra la lisis hipotónica a concentraciones más bajas (Sánchez et al. 2007). En este contexto, la eficiencia de los surfactantes en la protección de los GR contra la lisis osmótica puede ser utilizada como indicador de las interacciones de los mismos con la membrana plasmática. Considerando esto, y dado que el tensioactivo derivado de arginina con una cola hidrocarbonada de 12 carbonos de longitud (Bz-Arg-NHC₁₂) demostró una mayor eficiencia hemolítica, el mismo fue elegido para profundizar el estudio del mecanismo de interacción de esta serie de tensioactivos con la membrana de los GR. En este caso se analizó el efecto de Bz-Arg-NHC₁₂ en la lisis osmótica de GRH, utilizando como medio PBS hipotónico, diluido de manera tal que el mismo produjera el

80-90% de hemólisis de los GRH no tratados, en las condiciones descritas en la Sección 2.4.9.1 del presente Capítulo (pág. 227). La Figura 4.3.12 muestra el porcentaje de hemólisis en función de la concentración de Bz-Arg-NHC₁₂. La línea punteada horizontal color rojo señala el porcentaje de hemólisis alcanzado en ausencia del tensioactivo (84,38%), mientras que la línea punteada vertical color azul marca la CMC del compuesto.

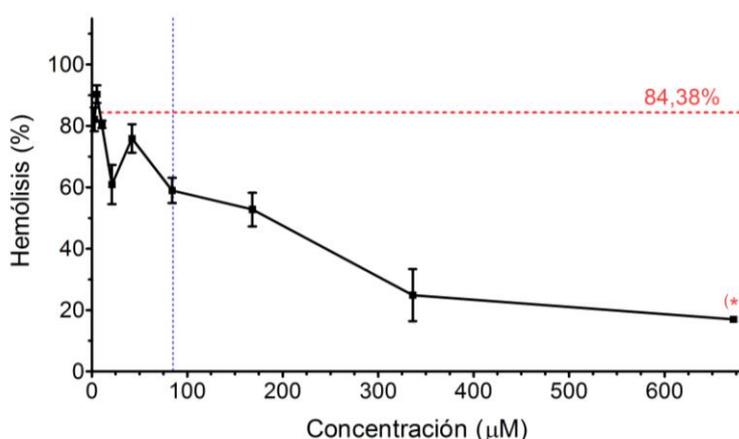


Figura 4.3.12. Dependencia del grado de hemólisis hipotónica (cuantificada por liberación de hemoglobina) en función de la concentración de Bz-Arg-NHC₁₂ para GRH. La línea horizontal punteada de color rojo corresponde al porcentaje de hemólisis en medio hipotónico de los GRH no tratados. La línea vertical punteada color azul señala la CMC de Bz-Arg-NHC₁₂ (85 µM). La CAH_{max} se señala con el asterisco (*). Los valores se expresan como la media ± SD de tres experimentos independientes.

Como puede verse, la disminución del grado de hemólisis en presencia del tensioactivo reveló la capacidad del mismo para proteger a los GRH de la lisis hipotónica en un amplio rango de concentraciones. En cada caso, se evaluaron las diferencias significativas entre las medias de los distintos grupos de datos mediante el *test one-way ANOVA (analysis of variance)*, seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples

(P -value < 0,05). A partir de los resultados se estableció la *concentración antihemolítica máxima* (cAH_{max}), es decir, la mayor concentración del surfactante responsable de la máxima protección contra la hemólisis hipotónica (menor porcentaje de hemólisis). Asimismo, para esta concentración se calculó la *potencia antihemolítica máxima* (pAH), definida como el porcentaje de reducción del grado de hemólisis respecto del valor obtenido de las muestras sin tratar. El valor de cAH_{max} registrado para Bz-Arg-NHC₁₂ en presencia de los GRH (672,1 μ M) se corresponde con un 48% de la respectiva HC_{50} (Sección 3.2.1.1 del presente Capítulo, Tabla 4.3.2, pág. 238). Como puede apreciarse en el gráfico, si bien se observó protección para concentraciones menores que la CMC del compuesto (85 μ M), este efecto fue mayor por encima de la misma, encontrándose una cAH_{max} de aproximadamente 8 veces el valor de CMC con una pAH del 67,32%. De esta manera se comprobó el comportamiento bifásico del tensioactivo estudiado, mostrando un amplio rango de concentraciones protectoras.

3.2.3. Efecto de la composición de membrana de los glóbulos rojos en la interacción con Bz-Arg-NHC₁₂

De manera de profundizar en el mecanismo de interacción de Bz-ArgNHC₁₂ con las membranas biológicas y la posible relación entre los efectos del surfactante y las propiedades biofísicas de la membrana, se estudió la susceptibilidad de los GR de distintas especies de mamíferos frente a este tensioactivo. Los resultados analizados previamente para GRH fueron comparados con los obtenidos para glóbulos rojos de carnero (GRC), los cuales presentan diferencias importantes en la composición molar de lípidos y proteínas de membrana, como se detalló en la Sección 1.3.1 del presente Capítulo (Tabla 4.1.1, pág. 215). Si bien el contenido total promedio de colesterol de las

membranas de los GR de ambas especies es similar, las principales diferencias se encuentran en las cantidades relativas de fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM): mientras que los GRH muestran mayores cantidades de PC y muy poca SM, el análisis de composición de la membrana de los GRC reveló una mayor proporción de SM y ausencia de PC. Por otro lado, en cuanto al contenido de fosfatidiletanolamina (PE), se observa una mayor cantidad de la misma en la membrana de los GRH (22,8%) respecto de la observada en los GRC (cuyo contenido de PE es de tan sólo el 14%) (Koumanov et al. 2005; Maté et al. 2014).

3.2.3.1. Influencia de la composición de la membrana sobre la eficiencia de hemólisis de Bz-Arg-NHC₁₂

Se evaluó la actividad hemolítica (cuantificada a partir de la liberación de hemoglobina) en función de la concentración de Bz-Arg-NHC₁₂ para GRC comparándosela con la obtenida para los GRH (Figura 4.3.13). En ambos casos, el tensioactivo reveló actividad hemolítica, apreciándose diferencias en la forma de las curvas *dosis-respuesta* obtenidas en cada caso: a diferencia del comportamiento hiperbólico observado en el caso de los GRH, Bz-Arg-NHC₁₂ mostró un comportamiento sigmoidal frente a los GRC. Este cambio puede ser considerado un indicador de la presencia de un efecto de cooperatividad en la interacción surfactante-membrana, poniendo en evidencia que el mecanismo hemolítico depende no solo de la naturaleza del surfactante en cuestión, sino también de la composición, y por lo tanto de las propiedades biofísicas, de la membrana.

A pesar de las diferencias en la composición de la membrana, Bz-Arg-NHC₁₂ demostró una potencia hemolítica similar en ambos casos, con valores de HC₅₀

levemente mayores frente a GRC ($1412,8 \pm 15,8 \mu\text{M}$ en el caso de GRH y $1585,3 \pm 26,9 \mu\text{M}$ para GRC). Estos resultados revelan que las diferencias en la composición lipídica de la membrana plasmática de los GR estudiados no afectarían la actividad hemolítica en sí, aunque revelan distintos mecanismos involucrados en cada caso, evidenciados por el cambio en la forma de la curva *dosis-respuesta*.

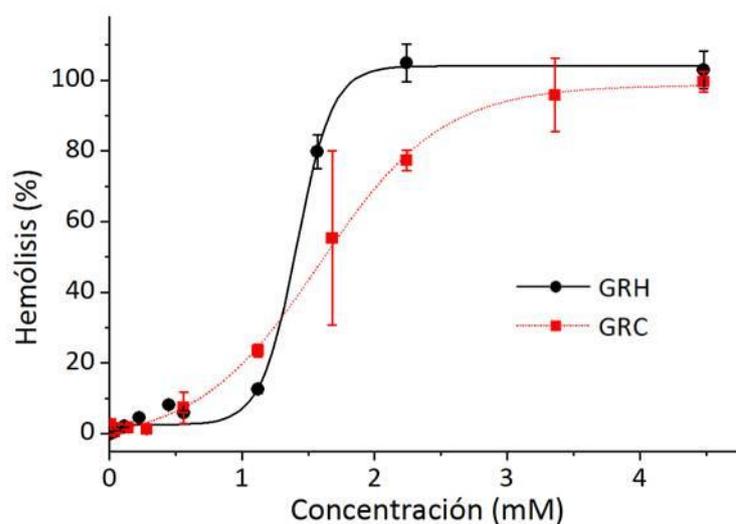


Figura 4.3.13. Hemólisis de GRH y GRC (cuantificada por liberación de hemoglobina) inducida por distintas concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₂ en medio isotónico (PBS 300 mOsm/l). Los valores se grafican como la media \pm SD de tres experimentos independientes.

3.2.3.2. Análisis del efecto de la composición de membrana sobre la eficiencia de la protección contra la lisis hipotónica de Bz-Arg-NHC₁₂

Teniendo en cuenta el comportamiento bifásico observado en el caso de los GRH, se estudió el efecto de Bz-Arg-NHC₁₂ en la protección contra la lisis osmótica de GRC. La Figura 4.3.14 muestra el porcentaje de hemólisis para GRC en función de la concentración de Bz-Arg-NHC₁₂ (en escala logarítmica para una mejor apreciación de las diferencias a bajas concentraciones del tensioactivo) y compara esta curva con la

obtenida para los GRH. Nuevamente, las líneas horizontales (continua y de color rojo en el caso de los GRC, punteada y de color negro para GRH) señalan el porcentaje de hemólisis alcanzado en ausencia del surfactante (86,04 y 84,38% para GRC y GRH respectivamente), mientras que la línea vertical punteada de color azul marca la CMC del compuesto.

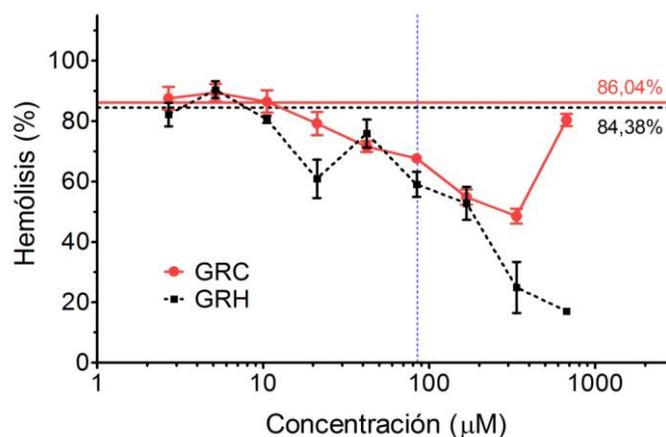


Figura 4.3.14. Dependencia del grado de hemólisis hipotónica (cuantificada por la liberación de hemoglobina) en función de la concentración de Bz-Arg-NHC₁₂ (escala logarítmica) para GRH y GRC. Las líneas horizontales (continua y de color rojo en el caso de los GRC, punteada y de color negro para GRH) corresponden al porcentaje de hemólisis en medio hipotónico de los GR no tratados. La línea vertical punteada de color azul señala la CMC de Bz-Arg-NHC₁₂ (85 μM). Los valores se expresan como la media ± SD de tres experimentos independientes.

De la misma manera que para los GRH, la disminución del grado de hemólisis en presencia del tensioactivo reveló la capacidad del mismo para proteger a los GRC contra la lisis osmótica, con un valor de cAH_{max} de 336,1 μM. Según los resultados, el grado de protección contra la lisis hipotónica en este caso fue aproximadamente un 50% menor que el observado para los GRH (672,1 μM), mostrando un rápido aumento en la

hemólisis para concentraciones del tensioactivo por encima de su cAH_{max} . En este caso, el valor de cAH_{max} registrado para Bz-Arg-NHC₁₂ se correspondió con un 20% de la respectiva HC_{50} , siendo a su vez mayor que el valor de CMC del compuesto (aproximadamente 4 veces). Asimismo, la pAH frente a GRC (37,54%) también se vio disminuida, con un valor de aproximadamente el 45% del observado para los GRH (67,32%).

3.2.3.3. Comparación de la expansión del volumen celular de GRH y GRC en medio hipotónico inducida por Bz-Arg-NHC₁₂

Por otro lado, se estudió la expansión del volumen celular de los GR en medio hipotónico inducida por Bz-Arg-NHC₁₂. Para ello se construyeron, tanto para GRH como GRC, las curvas de hemólisis en función de la osmolaridad del medio en ausencia y presencia del tensioactivo a una concentración igual a la cAH_{max} . Los resultados se muestran en la Figura 4.3.15.

Para ambos GR, la presencia del tensioactivo provoca un desplazamiento de la curva de lisis hacia la izquierda, revelando un aumento en la resistencia osmótica de los GR. A partir del ajuste de cada grupo de datos a la función sigmoideal de Boltzmann, se obtuvieron los valores de C_{50} para cada condición, es decir, la osmolaridad del medio responsable del 50% de hemólisis. En el caso de los GRH, los valores de C_{50} fueron aproximadamente un 10% menores que los correspondientes a los GRC (Tabla 4.3.4), lo que indicaría que los primeros serían capaces de soportar una mayor hipotonicidad del medio.

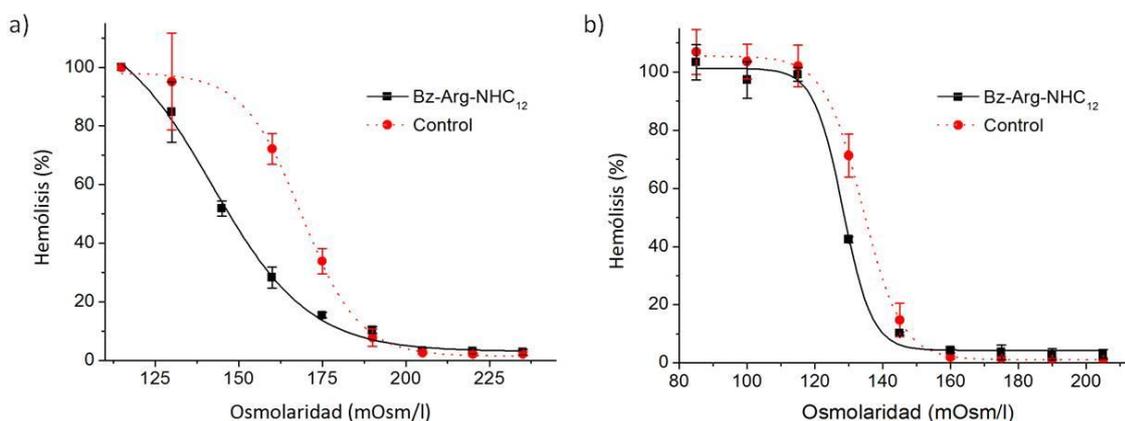


Figura 4.3.15. Lisis osmótica (cuantificada por liberación de hemoglobina) de (a) GRC y (b) GRH en ausencia (control) y presencia de Bz-Arg-NHC₁₂ a una concentración igual a la cAH_{max} correspondiente en cada caso (336 y 672 μM para GRC y GRH respectivamente). Los valores se expresan como las medias \pm SD de tres experimentos independientes.

Por otro lado, los valores de C_{50} obtenidos permitieron el cálculo teórico de la expansión del volumen celular (Tabla 4.3.5) según la relación propuesta por Ponder (1948), descrita en la Sección 2.4.9.2 del presente Capítulo (pág. 229, Ecuación 5). Si bien en el caso de los GRH la expansión del volumen inducida por Bz-Arg-NHC₁₂ fue de tan sólo el 3,8%, para los GRC se encontró un aumento del volumen celular del 15,2%.

Tabla 4.3.5. Actividad hemolítica (HC_{50}), protección contra la lisis hipotónica (cAH_{max} , pAH) y cálculo teórico del volumen de expansión para GRH y GRC tratados con Bz-Arg-NHC₁₂

Especie	HC_{50} (μM)	cAH_{max} (μM)	pAH (%)	C_{50}^a (mOsm/l)	Vol Exp (%)
Humano	1412,8 \pm 15,8	672,1	67,32	128,2 \pm 0,8	3,8 \pm 0,6
Carnero	1585,3 \pm 26,9	336,1	37,54	142,0 \pm 1,0	15,2 \pm 0,7

^aOsmolaridad del medio responsable del 50% de hemólisis (C_{50}) en presencia de una concentración del tensioactivo igual a la cAH_{max} .

Trabajos anteriores en relación con el mecanismo de protección antihemolítica se basan principalmente en la idea de que las moléculas del tensioactivo se intercalan en la membrana celular aumentando la proporción *área de membrana/volumen celular* y/o la capacidad de estiramiento de la bicapa, lo que permitiría que la célula alcance un mayor volumen hemolítico crítico, aumentando la resistencia de la presión osmótica en el medio hipotónico (Isomaa et al. 1986; Sánchez et al. 2007). En este caso, los resultados sugieren que no existe una relación entre la potencia antihemolítica y los cambios en el volumen de los GR, de manera que el aumento del volumen hemolítico crítico no sería el mecanismo general que explicaría el efecto protector contra la lisis osmótica inducido por Bz-Arg-NHC₁₂. Sin embargo, a concentraciones subléxicas, es posible que los agregados de surfactante presentes en el medio extraigan lípidos y otros componentes de la membrana a través de colisiones con la misma o que se genere un desprendimiento de microvesículas mixtas por desestabilización de la bicapa debido a la inserción de monómeros en la monocapa externa, como se describe detalladamente en la Sección 3.2.1.4 del presente Capítulo (pág. 248). En el caso de los GRH, la prevalencia de estos fenómenos podría contrarrestar el aumento del volumen celular, explicando la pobre expansión de las células observada en este caso. Por el contrario, la composición lipídica de la membrana de los GRC, enriquecida en colesterol y esfingomielina (SM) 24:1, obstaculizaría la extracción de lípidos y la liberación de microvesículas (Allan & Michell 1977), pudiendo apreciarse en este caso el aumento del volumen celular como consecuencia de la incorporación de las moléculas del surfactante en la bicapa. Estos resultados evidencian que, a diferencia del caso de los GRH, para los GRC el principal mecanismo de Bz-Arg-NHC₁₂ para la protección contra la lisis hipotónica sería el aumento del volumen hemolítico crítico. De esta manera, los resultados sugieren que,

como en el caso de la hemólisis, el mecanismo por el cual ocurre la protección contra la lisis hipotónica depende crucialmente de la composición de la membrana.

3.2.3.4. Análisis de la solubilización del fosfolípidos de membrana de GRH y GRC inducida por Bz-Arg-NHC₁₂

Con el fin de relacionar la ausencia de la expansión de volumen y la potencia antihemolítica de Bz-Arg-NHC₁₂ observadas en GRH con un mecanismo alternativo que involucre la extracción de lípidos por liberación de microvesículas o por colisiones micelares, se cuantificaron los fosfolípidos solubles (PL_s) en el sobrenadante de GRH incubados en presencia de este tensioactivo. La Figura 4.3.16 muestra los resultados obtenidos para la solubilización de las membranas de GRH y GRC inducida por Bz-Arg-NHC₁₂ a concentraciones tanto por debajo como por encima de su CMC, junto con los porcentajes de hemólisis observados en cada caso.

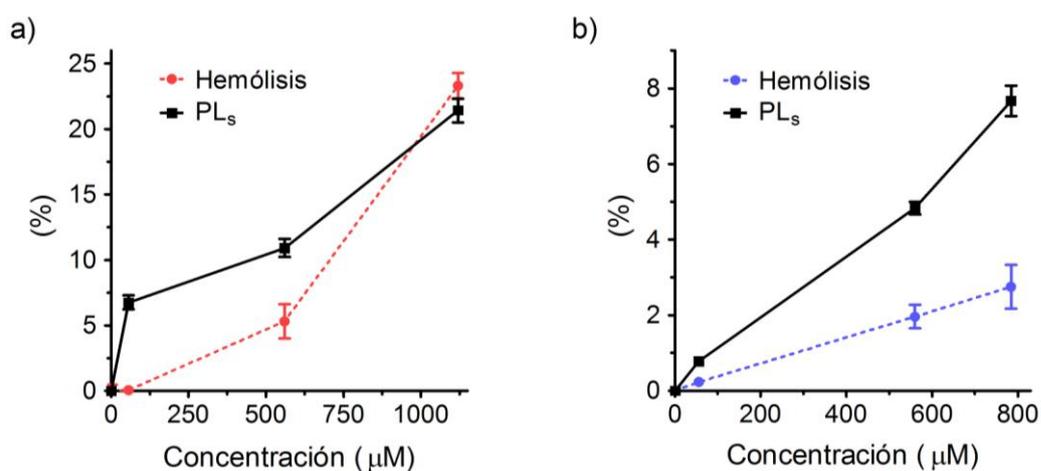


Figura 4.3.16. Hemólisis y solubilización de la membrana (cuantificada a través de la determinación de PL_s) en el sobrenadante de (a) GRH y (b) GRC inducida por distintas concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₂. Los valores se grafican como la media ± SD de tres experimentos independientes.

La presencia de PL_s en el sobrenadante de los GRH tratados con el surfactante podría dar lugar a la explicación de la protección contra la hemólisis hipotónica observada en presencia del tensioactivo a pesar de la ausencia de expansión del volumen de las células. En este sentido, los GRH tratados con Bz-Arg-Arg-NHC₁₂ responderían al estrés hipotónico con la solubilización de los componentes de la membrana, ya sea por liberación de microvesículas o por extracción de lípidos por las micelas de surfactante presentes en la suspensión, como se evidenció en las Secciones 3.2.1.5 y 3.2.1.6 del presente capítulo.

3.2.3.5. Efecto de Bz-Arg-NHC₁₂ sobre los valores de polarización generalizada (GP) del Laurdan incorporado en la membrana de GRH y GRC

La interacción entre las moléculas de surfactante a concentraciones sublípticas y la membrana de los GR se rige en parte por la partición del tensioactivo entre el medio acuoso y la bicapa lipídica. Esta partición, por su parte, se encuentra estrechamente vinculada tanto a la hidrofobicidad del compuesto como a la composición de la membrana de los GR. Con el objetivo de profundizar en la influencia de la composición lipídica de la membrana en la incorporación del surfactante en la membrana de los GR, se realizaron medidas de polarización generalizada (GP) del Laurdan incorporado en la membrana de fantasmas de GRH y GRC en ausencia y presencia de Bz-Arg-NHC₁₂ en medio isotónico. El Laurdan, gracias a su sensibilidad frente a la polaridad de su entorno inmediato, es una sonda fluorescente utilizada para la detección de cambios en las propiedades de fase de membranas como se explicó en la Sección 2.4.10 del presente Capítulo (pág 230). Su unión a las bicapas lipídicas se produce a nivel de la porción de glicerol de los fosfolípidos, donde detecta cambios en el número y/o movilidad de las

moléculas de agua presentes. Considerando que el contenido de agua de la membrana varía como resultado de cambios en el orden de los lípidos que la conforman, el Laurdan resulta sensible a los cambios de fase y las alteraciones de la misma, permitiendo el análisis de su fluidez (Harris et al. 2002). La Figura 4.3.17 muestra los valores de polarización generalizada (GP) del Laurdan para fantasmas de GRH (GRH_f) y de GRC (GRC_f), así como el efecto del tratamiento de los mismos con Bz-Arg-NHC₁₂ a concentraciones iguales a las respectivas cAH_{max} sobre este parámetro.

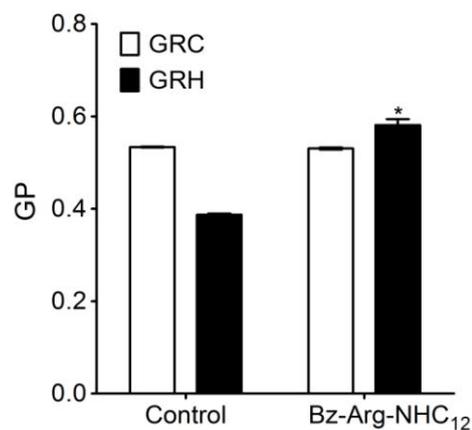


Figura 4.3.17. Efecto de Bz-Arg-NHC₁₂ sobre los valores de polarización generalizada (GP) del Laurdan incorporado en la membrana de glóbulos rojos humanos (GRH) y de carnero (GRC). Los valores se expresan como la media \pm SD de tres experimentos independientes. Los datos fueron comparados según el análisis de varianza (ANOVA) seguido del test de Tukey (P -value $< 0,01$) para comparaciones múltiples. Las diferencias significativas encontradas se señalan con un asterisco^(*).

El valor de GP promedio obtenido para los GRH_f sin tratar fue de $0,387 \pm 0,002$, mientras que los GRC_f mostraron un GP de $0,534 \pm 0,005$. El mayor valor de GP encontrado para membrana de los GRC se atribuye principalmente a la alta proporción de esfingomielina (SM) 24:1 presente en la misma, lo que se traduce en una membrana

con una estructura más compacta y ordenada, lo que ocasiona una disminución en el contenido de agua respecto de las membranas de los GRH. Luego de la incubación con el surfactante a las respectivas cAH_{max} , si bien se observó un aumento en el valor de GP en el caso de los GRH, no hubo diferencias significativas en el caso de los GRC. Interesantemente, sólo se observó expansión del volumen celular en este último caso (Tabla 4.3.5), pudiendo ser este el mecanismo por el que se contrarresta el aumento en el orden de la membrana debido a la incorporación de los monómeros del surfactante.

4. Conclusiones

Se estudió el efecto citotóxico de Bz-Arg-NHC_n frente a líneas celulares de hepatocitos (HepG2) y fibroblastos de piel (1BR.3.G) humanas, evidenciando en ambos casos una menor toxicidad para Bz-Arg-NHC₁₀.

Ambos tensioactivos derivados de arginina (Bz-Arg-NHC_n) resultaron ser levemente más tóxicos frente a los fibroblastos que a la línea celular de hepatocitos.

La evaluación del potencial de irritabilidad ocular de los tensioactivos permitió clasificar ambos compuestos derivados de arginina como no irritantes oculares.

Dentro de la serie de los surfactantes derivados de arginina, se observó una relación inversamente proporcional entre los valores de HC₅₀ (potencia hemolítica) calculados para GRH y la hidrofobicidad de la molécula (correlacionada con una menor CMC), siendo menor la HC₅₀ a mayor longitud de la cola hidrocarbonada (menor CMC).

Los valores de HC₅₀ calculados para Bz-Arg-NHC_n fueron mayores a las respectivas CMC de los compuestos.

Las relaciones molares surfactante/lípido calculadas según el modelo de Lichtenberg para la saturación de la membrana de los GRH (R_{sat}) con ambos tensioactivos no representan una situación factible, por lo que los monómeros no serían las especies responsables del efecto hemolítico observado.

Mediante el análisis de las cinéticas de hemólisis se verificó la ausencia de lisis celular a concentraciones de los tensioactivos menores que las respectivas CMC, incluso a tiempos de incubación largos (1 h).

La cuantificación de los fosfolípidos solubles en el sobrenadante de GRH tratados con los tensioactivos evidenció la solubilización de las membranas de los GR como parte del mecanismo hemolítico, el cual depende de la concentración del tensioactivo.

Para GRH tratados con bajas concentraciones de los tensioactivos (siempre superiores que las respectivas CMC) la secuencia morfológica observada durante un total de 7 min de incubación fue discocito-equinocito-esferocito, siendo la liberación de microvesículas (cuya presencia fue confirmada por MET) el principal mecanismo involucrado en la solubilización de la membrana.

Al aumentar la concentración de Bz-Arg-NHC₁₂ la secuencia morfológica observada fue discocito-estomatocito-esferocito. El cambio se explica sobre la base del mecanismo micelar, ya que un incremento en el número de agregados del tensioactivo se traduce en un aumento de la tasa de extracción de componentes de la monocapa externa, provocando un aumento relativo del área de la interna, favoreciendo la aparición de estomacitos.

Bz-Arg-NHC₁₂ evidenció un comportamiento bifásico, siendo capaz de proteger a los GR de la lisis en medio hipotónico. Este tensioactivo mostró un amplio rango de concentraciones protectoras, siendo mayor el efecto a concentraciones mayores que su CMC.

Si bien Bz-Arg-NHC₁₂ demostró una potencia hemolítica similar frente a GRH y GRC, con valores de HC₅₀ comparables, se observó una disminución de aproximadamente el 50% en el grado de protección contra la lisis hipotónica en los GRC respecto de los GRH.

A través de los cálculos teóricos de la expansión del volumen celular de GRH y GRC inducida por Bz-Arg-NHC₁₂ en medio hipotónico se observó que sólo para los GRC experimentan un aumento del volumen significativo.

La prevalencia de la extracción de los componentes de membrana a través de colisiones con los agregados del surfactante y/o la liberación de microvesículas por desestabilización de la bicapa debido a la inserción de monómeros en la monocapa externa en el caso de los GRH explican la pobre expansión del volumen celular observada en este caso.

El mayor valor de GP del Laurdan encontrado para membrana de los GRC se atribuye principalmente a la alta proporción de esfingomielina, lo que favorece una estructura más compacta y ordenada.

La expansión del volumen celular observada en el caso de los GRC contrarresta el aumento del orden de la membrana debido a la incorporación de los monómeros de Bz-Arg-NHC₁₂.

Referencias

- Ahyayauch H, Bennouna M, Alonso A, Goñi FM (2010) Detergent Effects on Membranes at Subsolubilizing Concentrations: Transmembrane Lipid Motion, Bilayer Permeabilization, and Vesicle Lysis/Reassembly Are Independent Phenomena. *Langmuir* 26:7307–7313. doi: 10.1021/la904194a
- Allan D, Michell RH (1977) Calcium ion-dependent diacylglycerol accumulation in erythrocytes is associated with microvesiculation but not with efflux of potassium ions. *Biochem J* 166:495–499.
- Bagatolli L a, Gratton E (1999) Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophys J* 77:2090–101. doi: 10.1016/S0006-3495(99)77050-5
- Benavides T, Martínez V, Mitjans M, et al (2004) Assessment of the potential irritation and photoirritation of novel amino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal tests. *Toxicology* 201:87–93. doi: 10.1016/j.tox.2004.04.003
- Bessis M (1973) Red Cell Shapes. An Illustrated Classification and its Rationale. In: Bessis M, Weed RI, Leblond PF (eds) *Red Cell Shape: Physiology, Pathology, Ultrastructure*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 1–25
- Brannigan G, Lin LC-L, Brown FLH (2006) Implicit solvent simulation models for biomembranes. *Eur Biophys J* 35:104–124. doi: 10.1007/s00249-005-0013-y
- Castillo JA, Infante MR, Manresa A, et al (2006) Chemoenzymatic synthesis and antimicrobial and haemolytic activities of amphiphilic bis(phenylacetylarginine) derivatives. *ChemMedChem* 1:1091–8. doi: 10.1002/cmdc.200600148
- Castillo JA, Pinazo A, Carilla J, et al (2004) Interaction of antimicrobial arginine-based cationic surfactants with liposomes and lipid monolayers. *Langmuir* 20:3379–87.
- Chimutengwende-Gordon M, Pendegrass C, Bayston R, Blunn G (2014) Preventing infection of osseointegrated transcutaneous implants: Incorporation of silver into

preconditioned fibronectin-functionalized hydroxyapatite coatings suppresses *Staphylococcus aureus* colonization while promoting viable fibroblast growth in vitro. *Biointerphases* 9:31010. doi: 10.1116/1.4889977

Chong PLG, Wong PTT (1993) Interactions of Laurdan with phosphatidylcholine liposomes: a high pressure FTIR study. *BBA - Biomembr* 1149:260–266. doi: 10.1016/0005-2736(93)90209-I

Dufour S, Deleu M, Nott K, et al (2005) Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 1726:87–95. doi: 10.1016/j.bbagen.2005.06.015

Elgsaeter A, Mikkelsen A (1991) Shapes and shape changes in vitro in normal red blood cells. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr* 1071:273–290. doi: 10.1016/0304-4157(91)90017-Q

Engelman DM (2005) Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* 438:578–580. doi: 10.1038/nature04394

Goñi FM (2014) The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1838:1467–1476. doi: 10.1016/j.bbamem.2014.01.006

Harris FM, Best KB, Bell JD (2002) Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1565:123–128. doi: 10.1016/S0005-2736(02)00514-X

Infante MR, Pérez L, Pinazo A, et al (2004) Amino acid-based surfactants. *Comptes Rendus Chim* 7:583–592. doi: 10.1016/j.crci.2004.02.009

Isomaa B, Hägerstrand H, Paatero G, Engblom AC (1986) Permeability alterations and antihemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes. *BBA - Biomembr* 860:510–524. doi: 10.1016/0005-2736(86)90548-1

Jay AW (1975) Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on cell geometry. *Biophys J* 15:205–222. doi: 10.1016/S0006-3495(75)85812-7

- Joondan N, Caumul P, Akerman M, Jhaumeer-Laulloo S (2015) Synthesis, micellisation and interaction of novel quaternary ammonium compounds derived from L-Phenylalanine with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine as model membrane in relation to their antibacterial activity, and their selectivity over human . *Bioorg Chem* 58:117–129. doi: 10.1016/j.bioorg.2015.01.001
- Joondan N, Jhaumeer-Laulloo S, Caumul P (2014) A study of the antibacterial activity of L-Phenylalanine and L-Tyrosine esters in relation to their CMCs and their interactions with 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, DPPC as model membrane. *Microbiol Res* 169:675–685. doi: 10.1016/j.micres.2014.02.010
- Kelly JH, Darlington GJ (1989) Modulation of the liver specific phenotype in the human hepatoblastoma line Hep G2. *Vitr Cell Dev Biol* 25:217–222. doi: 10.1007/BF02626182
- Koumanov KS, Tessier C, Momchilova AB, et al (2005) Comparative lipid analysis and structure of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 434:150–158. doi: 10.1016/j.abb.2004.10.025
- Kragh-Hansen U, le Maire M, Møller J V (1998) The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes. *Biophys J* 75:2932–46. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77735-5
- le Maire M, Champeil P, Møller J V (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1508:86–111. doi: 10.1016/S0304-4157(00)00010-1
- Lichtenberg D, Opatowski E, Kozlov MM (2000) Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1508:1–19. doi: 10.1016/S0304-4157(00)00004-6
- Maher P, Singer SJ (1984) Structural changes in membranes produced by the binding of small amphipathic molecules. *Biochemistry* 23:232–240. doi: 10.1021/bi00297a010
- Manaargadoo-Catin M, Ali-Cherif A, Pognas JL, Perrin C (2016) Hemolysis

- by surfactants — A review. *Adv Colloid Interface Sci* 228:1–16. doi: 10.1016/j.cis.2015.10.011
- Martinez V, Corsini E, Mitjans M, et al (2006) Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different in vitro endpoints as alternatives to the in vivo assays. *Toxicol Lett* 164:259–67. doi: 10.1016/j.toxlet.2006.01.005
- Maté S, Busto J V., García-Arribas AB, et al (2014) N-Nervonoylsphingomyelin (C24:1) Prevents Lateral Heterogeneity in Cholesterol-Containing Membranes. *Biophys J* 106:2606–2616. doi: 10.1016/j.bpj.2014.04.054
- Mitjans M, Martínez V, Clapés P, et al (2003) Low Potential Ocular Irritation of Arginine-Based Gemini Surfactants and Their Mixtures with Nonionic and Zwitterionic Surfactants. *Pharm Res* 20:1697–1701. doi: 10.1023/A:1026164123938
- Morán C, Clapés P, Comelles F, et al (2001) Chemical Structure/Property Relationship in Single-Chain Arginine Surfactants. *Langmuir* 17:5071–5075. doi: 10.1021/la010375d
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Nogueira DR, Mitjans M, Busquets MA, et al (2012) Phospholipid Bilayer-Perturbing Properties Underlying Lysis Induced by pH-Sensitive Cationic Lysine-Based Surfactants in Biomembranes. *Langmuir* 28:11687–11698. doi: 10.1021/la300626y
- Nogueira DR, Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP (2011) Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for in vitro cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. *Int J Pharm* 420:51–58. doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.08.020
- Owen DM, Rentero C, Magenau A, et al (2012) Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nat Protoc* 7:24–35. doi: 10.1038/nprot.2011.419
- Pape WJW, Pfannenbecker U, Hoppe U (1987) Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol Toxicol* 525–536.

- Parasassi T, De Stasio G, d'Ubaldo a, Gratton E (1990) Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys J* 57:1179–1186. doi: 10.1016/S0006-3495(90)82637-0
- Parasassi T, De Stasio G, Ravagnan G, et al (1991) Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys J* 60:179–189. doi: 10.1016/S0006-3495(91)82041-0
- Parasassi T, Di Stefano M, Loiero M, et al (1994a) Influence of cholesterol on phospholipid bilayers phase domains as detected by Laurdan fluorescence. *Biophys J* 66:120–132. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80763-5
- Parasassi T, Di Stefano M, Loiero M, et al (1994b) Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipid bilayers: a fluorescence study using Laurdan probe. *Biophys J* 66:763–768. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80852-5
- Parasassi T, Giusti AM, Gratton E, et al (1994c) Evidence for an increase in water concentration in bilayers after oxidative damage of phospholipids induced by ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65:329–334. doi: 10.1080/09553009414550391
- Parasassi T, Krasnowska EK, Bagatolli L, Gratton E (1998) Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes. *J Fluoresc* 8:365–373. doi: 10.1023/A:1020528716621
- Peetla C, Stine A, Labhasetwar V (2009) Biophysical Interactions with Model Lipid Membranes: Applications in Drug Discovery and Drug Delivery. *Mol Pharm* 6:1264–1276. doi: 10.1021/mp9000662
- Piera E, Comelles F, Erra P, Infante MR (1998) New alkyl amide type cationic surfactants from arginine. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 335–342. doi: 10.1039/a705565j
- Ponder E (1948) Hemolysis and related phenomena. viii, 398.
- Preté PSC, Domingues CC, Meirelles NC, et al (2011) Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction—A spin label study. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1808:164–170. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.10.016

- Preté PSC, Gomes K, Malheiros SVP, et al (2002) Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ethers series. *Biophys Chem* 97:45–54. doi: 10.1016/S0301-4622(02)00042-X
- Sánchez L, Martínez V, Rosa Infante M, et al (2007) Hemolysis and antihemolysis induced by amino acid-based surfactants. *Toxicol Lett* 169:177–184. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.01.003
- Sanchez L, Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP (2006) Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability. *Toxicol Lett* 161:53–60. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.07.015
- Sanchez L, Mitjans M, Infante MR, Vinardell MP (2004) Assessment of the potential skin irritation of lysine-derivative anionic surfactants using mouse fibroblasts and human keratinocytes as an alternative to animal testing. *Pharm Res* 21:1637–41. doi: 10.1023/B:PHAM.0000041459.63362.6f
- Sanchez SA, Tricerri MA, Gratton E (2012) Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:7314–9. doi: 10.1073/pnas.1118288109
- Selim NS, Desouky OS, Ali SM, et al (2009) Effect of Gamma Radiation on Some Biophysical Properties of Red Blood Cell Membrane. *Rom J Biophys* 19:171–185.
- Shalel S, Streichman S, Marmur A (2002) Monitoring Surfactant-Induced Hemolysis by Surface Tension Measurement. *J Colloid Interface Sci* 255:265–269. doi: 10.1006/jcis.2002.8621
- Sheetz MP, Painter RG, Singer SJ (1976) Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes. *J Cell Biol* 70:193–203. doi: 10.1083/jcb.70.1.193
- Sheetz MP, Singer SJ (1974) Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions. *Proc Natl Acad Sci* 71:4457–4461. doi: 10.1073/pnas.71.11.4457
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell

Membranes. *Science* 175:720–731. doi: 10.1126/science.175.4023.720

Stuart MCA, Boekema EJ (2007) Two distinct mechanisms of vesicle-to-micelle and micelle-to-vesicle transition are mediated by the packing parameter of phospholipid-detergent systems. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* 1768:2681–2689. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.06.024

Svetina S, Kuzman D, Waugh RE, et al (2004) The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry* 62:107–113. doi: 10.1016/j.bioelechem.2003.08.002

Tachev KD, Danov KD, Kralchevsky PA (2004) On the mechanism of stomatocyte-echinocyte transformations of red blood cells: Experiment and theoretical model. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 34:123–140. doi: 10.1016/j.colsurfb.2003.12.011

van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:112–124. doi: 10.1038/nrm2330

Vives M., Infante M., Garcia E, et al (1999) Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants. *Chem Biol Interact* 118:1–18. doi: 10.1016/S0009-2797(98)00111-2

Xia WJ, Onyuksel H (2000) Mechanistic Studies on Surfactant- Induced Membrane Permeability Enhancement. *17:612–618*. doi: 10.1023/A:1007581202873

Conclusiones generales y perspectivas

La creciente conciencia ambiental ejercida sobre el sector industrial ha llevado al desarrollo de tensioactivos biodegradables y considerablemente menos tóxicos, con prometedoras aplicaciones biomédicas, gracias a sus excelentes propiedades interfaciales y biológicas. En el presente trabajo, se sintetizaron aminoacil alquilamidas mediante estrategias biocatalíticas, utilizando peptidasas de origen vegetal inmovilizadas por adsorción sobre poliamida como biocatalizadores. En las condiciones ensayadas, papaína reveló una mayor eficiencia como biocatalizador, alcanzando conversiones superiores al 90% en todos los casos. En base a factores como el rendimiento en producto de condensación registrado, la purificación mediante solventes amigables con el medio ambiente y las propiedades fisicoquímicas (solubilidad acuosa, actividad tensioactiva, etc.) de los productos sintetizados, se seleccionaron aquellos compuestos con características más promisorias para su aplicación en la formulación de productos con potencial aplicación farmacéutica y cosmética. De esta manera, las alquilamidas derivadas de arginina (Bz-Arg-NHC_n) se convirtieron en las mejores candidatas para el estudio de sus propiedades biológicas. Estos tensioactivos evidenciaron un efecto antimicrobiano de amplio espectro tanto contra bacterias como contra hongos, revelando incluso efectos bactericida y fungicida. Según la relación *estructura química/actividad* de Bz-Arg-NHC_n, la menor longitud de la cadena hidrocarbonada se correlacionó con la mayor actividad fungistática contra especies fitopatógenas y la menor actividad bactericida/bacteriostática y fungistática contra especies dermatofitas. Asimismo, el estudio preliminar del mecanismo antifúngico de

Bz-Arg-NHC_n puso en evidencia que el mismo involucraría la formación de poros transitorios en la membrana citoplasmática inducida por la inserción de monómeros de los tensioactivos en la membrana, permitiendo la difusión de otras moléculas del surfactante hacia el citoplasma, en donde interactuarían con los componentes intracelulares provocando la inducción de estrés oxidativo.

Por otro lado, los ensayos de citotoxicidad *in vitro* demostraron que Bz-Arg-NHC_n manifiesta una menor toxicidad que Cetrimide (un surfactante catiónico comercial con propiedades antisépticas, empleado en formulaciones dermatológicas) ya que resultaron ser menos hemolíticos, menos irritantes para la piel y los ojos, y menos tóxicos para las células hepáticas que el mismo.

El estudio de la interacción de Bz-Arg-NHC_n con GRH reveló que los monómeros no serían las especies responsables del efecto hemolítico observado, siendo el mecanismo involucrado dependiente de la concentración del tensioactivo. Los resultados evidenciaron que la liberación de microvesículas resultó ser el principal mecanismo involucrado en la solubilización de la membrana para las concentraciones más bajas de Bz-Arg-NHC_n, mientras que para las mayores concentraciones prevalece la extracción de los componentes de membrana favorecida por colisiones con las micelas de los tensioactivos (*ataque micelar*). En este mismo contexto, el modelo propuesto para la inserción de Bz-Arg-NHC_n en las bicapas lipídicas destaca la interacción de las moléculas de surfactante con los fosfolípidos tanto a través de interacciones electrostáticas (entre los grupos fosfatos cargados negativamente y el grupo catiónico guanidinio, orientado hacia la fase acuosa) como a través de interacciones hidrofóbicas

(entre el grupo benzoilo y la cadena hidrocarbonada del tensioactivo con las colas de los fosfolípidos).

Los estudios preliminares con GRC (cuyas membranas poseen propiedades de fase más similares a las del *estrato córneo*, la capa más externa de la piel, que los GRH) permitirían la clarificación de algunos de los mecanismos involucrados en la mejora de la penetración a través de la piel, favorecida por los tensioactivos derivados de arginina. En relación a este tema, el estudio del efecto protector de Bz-Arg-NHC₁₂ contra la lisis hipotónica evidenció un comportamiento bifásico para este tensioactivo, mostrando efectividad en un amplio rango de concentraciones. En este caso, el mecanismo involucrado depende principalmente de la composición de la membrana lipídica. A través de los cálculos teóricos de la expansión del volumen celular de GRH y GRC sólo se observó un aumento del volumen significativo para estos últimos. La ausencia de expansión del volumen en el caso de los GRH podría explicarse por la prevalencia de la extracción de los componentes de la membrana a través de colisiones con los agregados de los surfactantes, y/o la liberación de microvesículas por desestabilización de la bicapa debida a la inserción de monómeros en la monocapa externa.

Los resultados mostraron además una interacción selectiva de Bz-Arg-NHC_n con las bacterias y hongos respecto de la observada para células de mamífero (GRH), revelada por el cálculo de las relaciones HC₅₀/CIM (cuyos valores fueron establecidos entre 7 y 57). De esta manera, estos surfactantes proporcionan una buena selectividad, pudiendo actuar como antimicrobianos a concentraciones no tóxicas para las células de mamífero.

En base a la información recopilada a través de los resultados experimentales de este trabajo se propone profundizar en el estudio de los mecanismos de interacción de los tensioactivos derivados de arginina con membranas biológicas. Estos estudios estarán orientados al potencial uso de Bz-Arg-NHC_n como aditivos en formulaciones cosméticas y/o farmacéuticas de aplicación tópica, donde actuarían como *potenciadores de penetración* (PP), mejorando la adsorción y/o difusión de drogas a través de la piel. En este sentido, se espera que mediante la mayor comprensión de la interacción de estos tensioactivos con la membrana, la elección de los PP deje de ser empírica, aumentando de esta manera el número de medicamentos disponibles para la administración tópica y transdérmica. En el mismo contexto, y con un objetivo similar, se propone la síntesis mediante estrategias quimioenzimáticas de surfactantes derivados de otros aminoácidos, distintos de la arginina, así como la caracterización de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas. Finalmente, todos estos estudios serán aplicados al desarrollo de sistemas de liberación de antioxidantes basados en liposomas deformables de uso tópico.