

**Facultad de Ciencias
Exactas**



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE SURFACTANTES DERIVADOS DE ARGININA FRENTE A LEVADURAS DEL GÉNERO *CANDIDA*>

Laboratorio de procesos biotecnológicos – Año 2020



Patricia Daniela Grillo

Dirección: Dra. María Elisa Fait

Co- dirección: Dra. Susana R. Morcelle del Valle

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



AGRADECIMIENTOS



Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por haberme brindado la oportunidad de formarme, tanto profesional como personalmente.

Al Centro de Investigación de Proteínas Vegetales y su plantel por haberme recibido tan cálidamente y haberme dado la oportunidad de comenzar a desarrollarme profesionalmente.

A mi directora, Dra. María Elisa Fait, por su apoyo incondicional, paciencia, confianza, enseñanzas, y sobre todo por convertir un ámbito laboral y de aprendizaje en uno cómodo y familiar a través de risas, compañerismo y amistad.

A mi co-directora, Dra. Susana R. Morcelle del Valle, por sus enseñanzas, paciencia y apoyo.

A todos los laboratorios de la Universidad Nacional de La Plata que nos abrieron las puertas y prestaron los equipos necesarios para llevar a cabo las investigaciones.

A la Dra. Graciela L. Garrote por su gran predisposición y asistencia tanto en el desarrollo como en el análisis e interpretación de resultados de los ensayos microbiológicos.

Al Dr. Eduardo Prieto por su dedicación en el desarrollo de los análisis por AFM.

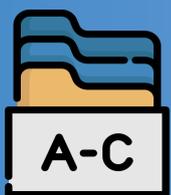
A mi mamá y mi papá por ser mis pilares en la vida, por enseñarme el valor de las cosas, los frutos del esfuerzo y la importancia de los valores, por apoyarme en cada paso con amor y siempre sostener mi mano.

A mis hermanos y sobrinos por acompañarme, por alegrar mis días y contenerme siempre.

A mi novio, mi compañero de vida, por tantos años de apoyo fiel, amor, compañerismo y la paciencia infinita en los días enteros de estudio con mucho café de por medio.

A mis amigas de la vida, hermanas por elección, por compartir risas, llantos, días de estudio, charlas, consejos, momentos lindos y feos, por estar siempre presentes en cada paso.

A las personas hermosas que conocí recorriendo este camino: compañeros de cursada, de estudio, amigas que conocí en esta Facultad y que conservaré conmigo siempre.



ÍNDICES Y ABREVIATURAS

Índice de contenidos

Índice de figuras.....	7
Índice de tablas	8
Abreviaturas.....	9
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	10
1.1 Levaduras: estructura y características.....	11
1.1.1 Levaduras del género <i>Candida</i> como patógenos oportunistas	11
1.1.2 Factores de patogenicidad de <i>C. albicans</i> y <i>C. tropicalis</i>	12
1.1.3 Envoltura celular de levaduras.....	13
1.2 Algunos antifúngicos conocidos y sus mecanismos de acción	14
1.3 Surfactantes.....	15
1.3.1 Surfactantes catiónicos. Modo de acción.....	16
1.3.2 Surfactantes derivados de aminoácidos.....	18
1.3.3 Surfactantes catiónicos derivados de arginina.....	19
1.4 Biocatálisis.....	20
1.4.1 Síntesis de surfactantes derivados de aminoácidos: biocatálisis enzimática.....	20
1.4.2 Empleo de proteasas en biocatálisis.....	21
1.5 Objetivos generales del plan de trabajo	23
1.6 Objetivos específicos del plan de trabajo	24
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 Reactivos	26
2.2 Obtención de tensioactivos derivados de arginina mediante biocatálisis enzimática.....	26
2.2.1 Preparación del biocatalizador.....	26
2.2.2 Síntesis semipreparativa y purificación de los productos obtenidos.....	27
2.3 Estudio de la actividad antifúngica de los compuestos obtenidos frente a levaduras del género <i>Candida</i>.....	28
2.3.1 Medios de cultivo	28
2.3.2 Microorganismos.....	28
2.3.3 Preparación de la suspensión de levaduras.....	28

2.3.4 Preparación de las soluciones stock de los surfactantes	29
2.3.5 Determinación de concentraciones inhibitorias y fungicidas mínimas	29
2.3.6 Ensayos de supervivencia de levaduras expuestas a distintas concentraciones de los tensioactivos	31
2.3.7 Caracterización del mecanismo antifúngico de los tensioactivos sintetizados.....	32
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1 Determinación de las concentraciones inhibitorias y fungicidas mínimas	37
3.1.1 Medida de densidad óptica	38
3.1.2 Método de la resazurina	41
3.2 Ensayos de supervivencia de levaduras expuestas a distintas concentraciones de los tensioactivos	43
3.3 Caracterización del mecanismo antifúngico de Bz-Arg-NHC_n.....	44
3.3.1 Análisis de la integridad de la envoltura celular mediante el empleo de sondas fluorescentes y microscopía de fluorescencia	44
3.3.2 Observación de los cambios morfológicos inducidos por los tensioactivos mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)	49
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	55
4.1 Conclusiones generales	56
4.2 Perspectivas.....	57
CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA.....	58

Índice de figuras

Figura 1.1 Esquema de la estructura de la envoltura celular de los hongos.....	14
Figura 1.2. Estructura química de N ^α -lauroil-L-arginina y dodina. El grupo guanidinio se indica en rojo.....	17
Figura 1.3. Diferentes rutas para la preparación de tensioactivos derivados de aminoácidos de cadena simple.....	18
Figura 1.4. Estructuras de tensioactivos basados en aminoácidos.....	19
Figura 1.5. Estructura de surfactantes derivados de arginina de cadena simple...	20
Figura 3.1. Estructura química de Bz-Arg-NHC ₁₀ , Bz-Arg-NHC ₁₂ y Cetrimide.....	36
Figura 3.2. Ensayo de dilución en microplaca para distintas cepas de <i>Candida</i>	38
Figura 3.3. Reacción de reducción de resazurina.....	40
Figura 3.4. Ensayo de dilución en microplaca con agregado de resazurina para distintas cepas de <i>Candida</i>	41
Figura 3.5. Curvas de supervivencia de <i>C. albicans</i>	42
Figura 3.6. Permeabilización de la membrana inducida en <i>Candida albicans</i> ATCC 3371 por la exposición a Bz-Arg-NHC ₁₀	45
Figura 3.7. Permeabilización de la membrana inducida en <i>Candida albicans</i> ATCC 3371 por la exposición a Bz-Arg-NHC ₁₂	46
Figura 3.8. Porcentaje de células con membrana alterada luego de tratarlas con concentraciones de Bz-Arg-NHC _n	47
Figura 3.9. Esquema del funcionamiento de un equipo de AFM.....	49
Figura 3.10. Efecto de Bz-Arg-NHC _n en las células planctónicas. Altura, fuerza (deflexión del cantilever) e imágenes en 3D por AFM	50
Figura 3.11. Mediciones de la rugosidad celular y la diferencia del área superficial después de la incubación con Bz-Arg-NHC _n	51
Figura 3.12. Mediciones de rigidez celular tras incubación con Bz-Arg-NHC _n	52

Índice de tablas

Tabla 3.1. Concentraciones inhibitorias y fungicidas mínimas (CIM y CFM) obtenidas por el método de DO ₆₀₀ para Bz-Arg-NHC ₁₀ , Bz-Arg-NHC ₁₂ y Cetrimide frente a levaduras del género <i>Candida</i>	39
Tabla 3.2. Valores de CIM y CFM para Bz-Arg-NHC ₁₀ , Bz-Arg-NHC ₁₂ y Cetrimide, frente a levaduras del género <i>Candida</i> (método de la resazurina).....	41

Abreviaturas

ACN = acetonitrilo

AFM = microscopía de fuerza atómica (del inglés *atomic force microscopy*)

AMPs = péptidos antimicrobianos de naturaleza catiónica

ARN = ácido ribonucleico

ATCC = *American Type Culture Collection*

BAEE / Bz-Arg-OEt = N^α -benzoil-L-arginina etil éster

Bz-Arg-NHC₁₀ = N^α -benzoil-L-arginina-decilamida

Bz-Arg-NHC₁₂ = N^α -benzoil-L-arginina-dodecilamida

Bz-Arg-NHC_n = Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂

CFM = concentración fungicida mínima

CIM = concentración inhibitoria mínima

CMC = concentración micelar crítica

CMH = caldo Mueller-Hinton

CTAB = bromuro de cetiltrimetilamonio

DMSO = dimetilsulfóxido

DO₆₀₀ = densidad óptica a 600 nm

DTT = 1,4-ditio-D, L-treitol

eDNA = ácido desoxirribonucleico extracelular

EDTA = ácido etilendiaminotetra-acético

ERG = ergosterol

IP = yoduro de propidio

MEC = matriz extracelular

PBS = buffer fosfato salino (del inglés *phosphate buffered saline*)

PC = fosfatidilcolina

PE = fosfatidiletanolamina

QAC = compuestos de amonio cuaternario

SAP = proteasas aspárticas secretadas (del inglés *secreted aspartic proteases*)

SDB = caldo Sabouraud dextrosa (del inglés *Sabouraud dextrose broth*)

SMA = agar Sabouraud maltosa (del inglés *Sabouraud maltose agar*)

SPM = microscopía de barrido de sondas (del inglés *scanning probe microscopy*)

UFC = unidades formadoras de colonias



CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



1.1 Levaduras: estructura y características

1.1.1 Levaduras del género *Candida* como patógenos oportunistas

A lo largo de la historia, las distintas formas de vida han ido variando enormemente y junto con ellas han surgido microorganismos patógenos capaces de afectar su desarrollo y provocarles enfermedades. La ciencia moderna, de la mano de la medicina convencional, ha logrado desarrollar herramientas para detectar dichos microorganismos y poder aislarlos con el fin de estudiar sus efectos sobre el ser humano, factores de patogenicidad, mecanismos de infección y las posibles vías que podrían intervenir para evitar que produzcan sus efectos nocivos.

El sistema inmune del ser humano ha desarrollado múltiples herramientas para mantener una relación simbiótica con los microorganismos que lo habitan (Belkaid & Oliver J. Harrison, 2017). Pero puede suceder que, en ciertas circunstancias, se produzca un crecimiento y desarrollo diferencial de un tipo de microorganismo por sobre el resto. En estas ocasiones es cuando se genera una infección del organismo hospedador.

Candida albicans es una levadura polimórfica que se encuentra comúnmente como miembro de la microbiota del área mucocutánea, gastrointestinal y genitourinaria del ser humano. Normalmente es inofensivo en un hospedador sano, pero su patogenicidad se dispara cuando el mismo se encuentra inmunocomprometido, provocando lo que se conoce como **candidiasis**. Por este motivo es considerado un importante patógeno oportunista, capaz de colonizar las membranas mucosas en el 30 al 60% de las personas (Lim et al., 2012).

Existen otras especies del género *Candida* capaces de producir infecciones en los seres humanos, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parasilopsis*. En este sentido, *C. albicans* y *C. tropicalis* son consideradas las más patógenas. Estudios *in vitro* han demostrado que estas especies son capaces de adherirse a las células hospederas en mayor grado que aquellas especies relativamente poco infecciosas (Calderone & Braun, 1991).

C. glabrata es la segunda especie más frecuentemente aislada después de *C. albicans* y representa un porcentaje de incidencia relevante en las candidemias (proliferación de *Candida* sp. en sangre). Forma parte de la microbiota normal del hospedador, razón por la cual



históricamente se ha conocido como una levadura no patógena. Sin embargo, la frecuencia de infecciones por este agente ha aumentado significativamente en los últimos años, por lo que se considera un patógeno oportunista emergente.

1.1.2 Factores de patogenicidad de *C. albicans* y *C. tropicalis*

Los factores de virulencia de estos patógenos oportunistas incluyen su habilidad para sobrevivir como comensal, la capacidad de adherencia a células del hospedador y la secreción de enzimas hidrolíticas, en particular las proteasas (Lim et al., 2012). La adhesión, el primer paso esencial para la colonización de un sitio epitelial, depende de los componentes de la superficie de las células fúngicas (Odds, 1994).

Por otro lado, la principal característica biológica de *C. albicans* que afecta la salud humana reside en su capacidad para formar biofilms. En particular, la matriz extracelular (MEC) de sus biofilms desempeña un papel multifacético y, por lo tanto, puede considerarse como un objetivo muy atractivo para combatir las enfermedades infecciosas relacionadas con biofilms (Hirota et al., 2016) (Russell, 2003). Dicha matriz consiste principalmente en sustancias poliméricas extracelulares, como carbohidratos y el ADN extracelular (eDNA), que se han relacionado con diferentes resistencias a fármacos (Flemming & Wingender, 2010). El eDNA es un componente especialmente importante de la MEC de los biofilms de hongos y bacterias, ya que facilita la adhesión a las superficies y se une con otros biopolímeros proporcionando a los biofilms integridad estructural y estabilidad (Sapaar et al., 2014).

C. albicans es un hongo dimórfico capaz de cambiar entre los modos de crecimiento de levadura e hifas. El suero, la temperatura, el pH y el Ca^{2+} se conocen como los principales factores externos que afectan esta transformación morfológica (Holmes et al., 1991). Se cree que las formas hifas juegan un papel importante en la patogénesis de las infecciones por hongos debido a su crecimiento invasivo (Felk et al., 2002).

Como se mencionó anteriormente, las especies de *Candida* tienen muchos atributos de virulencia que ayudan a la invasión de los tejidos del huésped, entre ellos la producción de



enzimas extracelulares. Las enzimas secretadas se consideran parte integral de la patogénesis de *Candida* y se clasifican en dos tipos principales: proteasas, que hidrolizan enlaces peptídicos, y fosfolipasas, que hidrolizan fosfolípidos. Estas enzimas secretadas facilitan la penetración en el hospedador y contrarrestan el sistema de defensa. En particular, las proteasas aspárticas secretadas (SAP) son importantes en la capacidad de la levadura de adherirse a la mucosa e invadir órganos (Schaller et al., 1999) (De Bernardis et al., 1999) y se han identificado tanto en *C. albicans* como en *C. tropicalis* (Parra-Ortega et al., 2009), constituyendo uno de los factores de virulencia más importantes de estas especies.

1.1.3 *Envoltura celular de levaduras*

La pared celular de *C. albicans* es esencial para su patogenicidad desde el momento en que ésta es requerida para su crecimiento, además de que le da rigidez y protección a esta especie y es el lugar de contacto entre la superficie del microorganismo y el medio ambiente (Calderone & Braun, 1991). Las paredes celulares de hongos poseen una superficie aniónica y están compuestas principalmente de polisacárido manano y glucanos (β -1,3-D-glucano, β -1,6-D-glucano y una mezcla de β -1,3-1,6-glucano acompañado con quitina), unidos a través de lipoproteínas a la cara externa de la membrana plasmática, que es una bicapa lipídica compuesta principalmente por lípidos zwitteriónicos, fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingolípidos, lípidos aniónicos y ergosterol (ERG) (Calderone & Braun, 1991); (Lipke & Ovalle 1998) ; (Makovitzki, Avrahami, & Shai 2006); (Kapteyn et al., 1995). La Figura 1.1 muestra un esquema modelo de la pared celular de hongos.

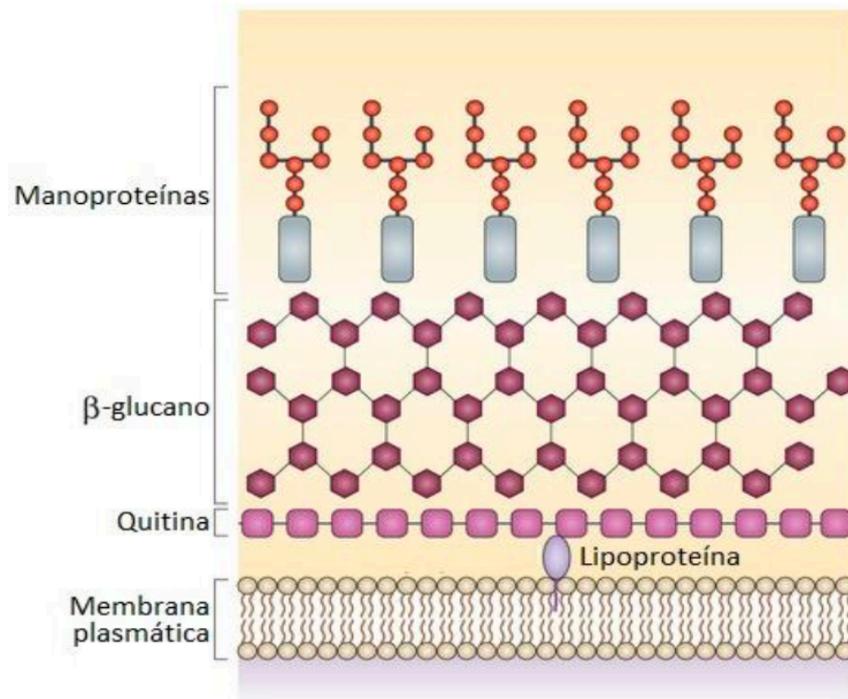


Figura 1.1. Esquema de la estructura de la envoltura celular de los hongos: la membrana plasmática se encuentra rodeada por una pared celular conformada por múltiples capas de quitina, β -glucano y manano (en forma de manoproteínas) (Brown et al., 2015).

1.2 Algunos antifúngicos conocidos y sus mecanismos de acción

La aparición masiva de enfermedades fúngicas asociadas al SIDA en la década de 1980 así como la creciente frecuencia de micosis fatales vinculadas al uso creciente de terapias médicas inmunosupresoras desde la década de 1970, estimularon la investigación dirigida al descubrimiento de nuevos agentes antifúngicos. En este contexto surgieron diversos antimicóticos entre los que se pueden destacar (Odds et al., 2003):

- La griseofulvina, la cual se estima que interfiere en el ensamblaje de microtúbulos.
- La flucitosina, cuyo efecto es la inhibición de síntesis de ARN.
- Los agentes antifúngicos de polieno, como la anfotericina B, que se une al ergosterol (esterol principal de las membranas fúngicas) perturbando la membrana.
- Las alilaminas (como la terbinafina), morfolinás y los azoles antimicóticos



(como los imidazoles o triazoles), que inhiben algún paso de la vía biosintética del ergosterol provocando el agotamiento del mismo y reemplazándolo con esteroides inusuales, alterando la permeabilidad normal y la fluidez de la membrana.

- Las equinocandinas, metabolitos secundarios fúngicos formados por péptidos y lípidos cuya diana es el complejo de proteínas responsables de la síntesis de los polisacáridos de β -1,3-glucano de la pared celular.
- Las sordarinas, que inhiben la síntesis de proteínas al bloquear la función del factor de elongación de traducción fúngica 2 (EF2), aunque no son de uso clínico.

Se ha descrito que diferentes mecanismos están implicados en la actividad antifúngica de los fármacos catiónicos comúnmente empleados para el tratamiento de infecciones fúngicas. En general, los principales objetivos son los polímeros de la pared celular (por ejemplo, glucanos, quitina, manoproteínas), la membrana celular, ergosterol, ADN, la maquinaria de síntesis de proteínas, topoisomerasas, nucleasas, factores de elongación y miristoilación, y las vías de transducción de señales, por ejemplo, proteína quinasas y proteína fosfatasa (Sant et al., 2016).

1.3 *Surfactantes*

Bajo el contexto antes descrito, ha surgido la necesidad de diseñar nuevos compuestos con actividad antimicrobiana que impidan no sólo el desarrollo de resistencia adquirida, sino que puedan ser utilizados tanto sobre productos y bienes de consumo como sobre superficies, de manera de inhibir o demorar su colonización.

Los surfactantes son moléculas anfifílicas, con una porción hidrofílica y otra hidrofóbica, que reducen la tensión en una interfase (Singh et al., 2007). 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. Debido a esto, lo más común es clasificar a los tensioactivos según la naturaleza química y la carga de la región hidrofílica. De esta manera, los



surfactantes pueden clasificarse en *catiónicos*, si la carga neta es positiva, *aniónicos*, si es negativa, o *neutros*, si no poseen ningún grupo cargado.

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 (Gudiña et al., 2016).

Una de las propiedades más atractivas de los surfactantes catiónicos es la antimicrobiana, debido a su baja toxicidad y buena biodegradabilidad (M. C. Morán et al., 2004) (C. Morán et al., 2001); (Fait et al., 2015).

1.3.1 Surfactantes catiónicos. Modo de acción

Teniendo en cuenta el hecho de que la superficie celular de bacterias y hongos lleva una carga negativa neta (asociada a la presencia de polisacáridos, conjugados de glicósidos y lípidos cargados negativamente), no resulta sorprendente que muchos agentes con actividad antimicrobiana sean catiónicos y tengan una alta afinidad de unión a dichas superficies.

A menudo, los antimicrobianos catiónicos requieren solo de una fuerte carga positiva junto con una región hidrofóbica, como en el caso de los surfactantes catiónicos, para interactuar con la superficie celular e integrarse en la membrana citoplasmática. Tal integración es suficiente para perturbar el crecimiento y desarrollo normales y, en ocasiones, causar la pérdida de la fluidez de la membrana con la consecuente muerte celular (Vieira & Carmona-Ribeiro, 2006) (Gilbert & Moore, 2005). La fuente de la carga catiónica puede ser variable, pero en muchos casos, esta propiedad puede atribuirse a la presencia de un grupo amonio cuaternario, como en el caso del surfactante bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), o guanidinio, como en la N^{α} -lauroil-L-arginina y la dodina, cuyas estructuras se ilustran en la Figura 1.2.

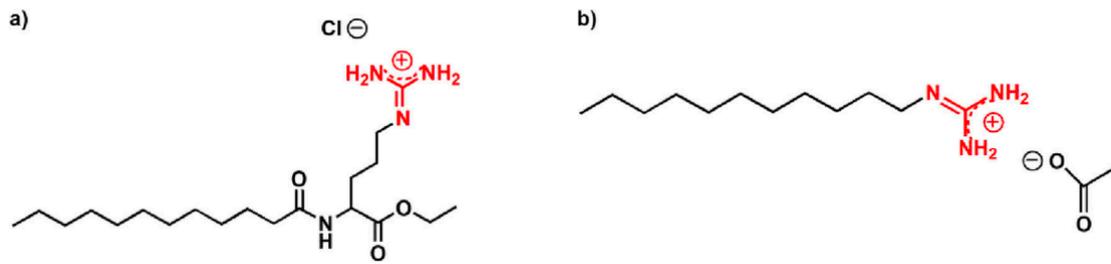


Figura 1.2. Estructura química de a) N^α-lauroil-L-arginina y b) dodina. El grupo guanidinio se indica en rojo.

Se sabe que el grupo guanidinio forma complejos con las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana celular por apareamiento de iones bidentados con enlaces de hidrógeno. Se cree que esta afinidad por los fosfolípidos es responsable de la interacción de estos compuestos con las membranas celulares y su capacidad de penetración celular se traduce en su elevada actividad antimicrobiana (Fait et al., 2019).

Se sabe que los anfífilos interactúan con las membranas lipídicas para afectar su estructura, pudiendo integrarse en las bicapas lipídicas o destruyendo completamente su estructura para formar micelas mixtas de lípido-surfactante (Fait et al., 2017). Los compuestos de amonio cuaternario (QAC), como los bromuros de cetil- y hexadeciltrimetilamonio o el Cetrimide (constituido por una mezcla de sales de amonio cuaternario [$\text{C}_{14}\text{H}_{29}(\text{CH}_3)_3\text{NBr}$; $\text{C}_{16}\text{H}_{33}(\text{CH}_3)_3\text{NBr}$]), son los antisépticos y desinfectantes más utilizados.

Estos compuestos son capaces de penetrar la pared celular y la membrana de células fúngicas, inhibir las enzimas respiratorias localizadas en las mitocondrias y/o destruir las membranas de los orgánulos. Esta evidencia llevó a suponer que los QAC producían cambios en la permeabilidad de la membrana citoplasmática para llegar al interior de la célula (Kourai, 2009). En el ejemplo particular del CTAB, se sugirió que el fenómeno crítico responsable del efecto antifúngico de ese compuesto era la inversión de la carga de la superficie celular de negativa a positiva, sin provocar la lisis de las células fúngicas (Vieira & Carmona-Ribeiro, 2006). A pesar de sus destacables propiedades antimicrobianas, la considerable toxicidad y cuestionada biodegradabilidad de estos compuestos ha impulsado la necesidad de reemplazarlos por otros menos tóxicos, como los surfactantes derivados de aminoácidos (Castillo et al., 2004).



1.3.2 Surfactantes derivados de aminoácidos

Los aminoácidos tienen al menos dos grupos funcionales: el grupo carboxílico y el grupo amino. Estos compuestos se pueden convertir fácilmente en tensioactivos de cadena simple cuando se combinan con una molécula reactiva que posea una cadena hidrófoba, tales como aminas grasas y alcoholes grasos, la cual se puede introducir en la estructura de los aminoácidos a través de un enlace éster o amida (Figura 1.3).

Los aminoácidos con cadenas laterales reactivas como la lisina o la arginina ofrecen oportunidades adicionales para el diseño molecular de los tensioactivos monocatenarios (Pinazo *et al.*, 2016). La porción correspondiente al péptido o aminoácido determina las principales diferencias de adsorción, agregación y actividad biológica entre los surfactantes basados en aminoácidos. Por lo tanto, se pueden obtener surfactantes catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros dependiendo de los grupos funcionales libres.

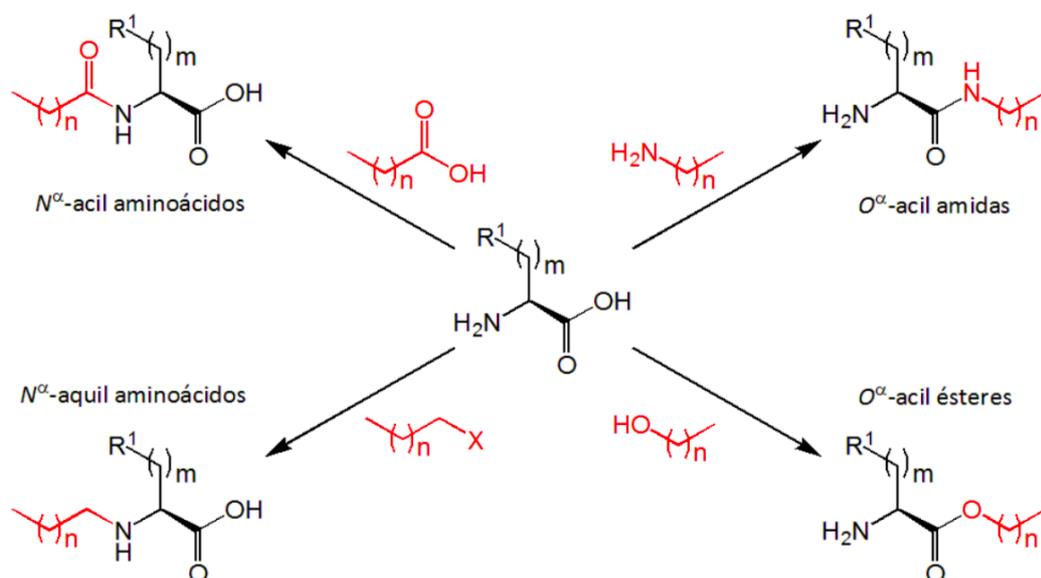


Figura 1.3. Diferentes rutas para la preparación de tensioactivos derivados de aminoácidos de cadena simple (Pinazo *et al.*, 2016).

Los aminoácidos y las cadenas alifáticas largas se pueden combinar entre sí para generar tres estructuras principales de tensioactivos basados en aminoácidos, esquematizadas en la Figura 1.4:



- 1) lineal o monocatenaria, consiste en un aminoácido con una cola hidrofóbica;
- 2) Dimérica o géminis, son estructuras anfipáticas con dos cabezas polares (dos aminoácidos) y dos colas hidrofóbicas por molécula separadas por un espaciador unido covalentemente;
- 3) Estructuras similares a glicerolípidos, consisten en una cabeza polar y uno o dos restos hidrófobos unidos entre sí a través de un esqueleto de glicerol. (M. C. Morán et al., 2004).

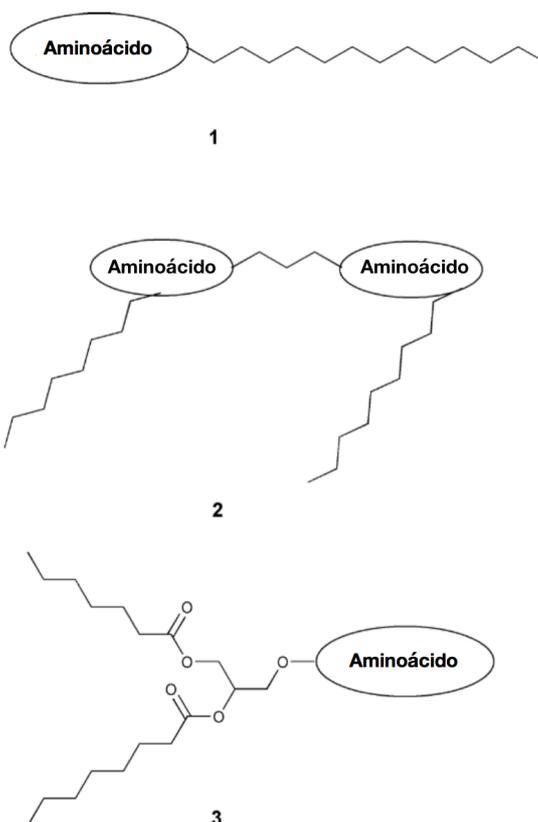


Figura 1.4. Estructuras de tensioactivos basados en aminoácidos: (1) cadena lineal o monocatenaria, (2) dímero o géminis y (3) estructuras de tipo glicerolípidos. El aminoácido constituye la cabeza polar del tensioactivo. La cadena de alquilo de hidrocarburo constituye el resto hidrofóbico.

1.3.3 Surfactantes catiónicos derivados de arginina

Entre los surfactantes catiónicos, los derivados de arginina presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro, buena biodegradabilidad y baja citotoxicidad y toxicidad ambiental (Pinazo et al., 2016). Estas propiedades no sólo permiten la aplicación de estos compuestos en la desinfección de superficies y materiales de uso hospitalario, sino que los



convierten en candidatos ideales para ser incorporados en formulaciones farmacéuticas y cosméticas, ya sea como aditivos o como principios activos en sí mismos.

La actividad antimicrobiana de dichos surfactantes se asocia directamente con la presencia de la carga catiónica del grupo guanidinio protonado de la arginina, lo que mejora la interacción con la membrana celular (Fait & Morcelle, 2017).

Los surfactantes derivados de arginina de cadena simple pueden agruparse según el tipo de enlace a través del cual se une la cadena hidrocarbonada a la porción aminoacídica en tres series de compuestos: (a) N^α -acil arginina metil ésteres, (b) arginina- N -alquilamidas y (c) arginina- O -alquil ésteres. (Figura 1.5).

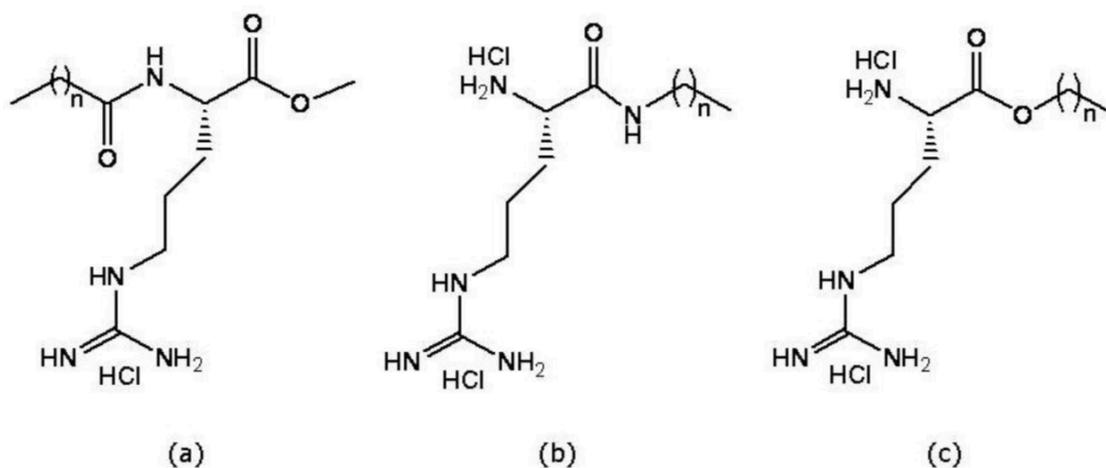


Figura 1.5. Estructura de surfactantes derivados de arginina de cadena simple.

1.4 Biocatálisis

1.4.1 Síntesis de surfactantes derivados de aminoácidos: biocatálisis enzimática

Hasta hace unos años atrás, este tipo de compuestos se obtenía por síntesis química tradicional. Los procedimientos empleados para su síntesis y purificación posterior implicaban reacciones de protección y desprotección, el uso de solventes orgánicos peligrosos y otros químicos dañinos tanto para la salud como para el medio ambiente. También requerían condiciones drásticas para llevar a cabo las reacciones, como altas temperaturas y presiones. Esta metodología de producción podría dar como resultado la presencia de subproductos peligrosos



de materiales de partida que podrían ser tóxicos en las formulaciones finales (Fait et al., 2015). El desarrollo de técnicas más benignas para el medio ambiente para la generación de dichos compuestos cumpliendo con los estándares de la química verde hace que sean ambientalmente más aceptables (Fait et al., 2017)

En este contexto, ha surgido una alternativa muy prometedora: la biocatálisis, referida al uso de enzimas como catalizadores de reacciones químicas que permiten la obtención de productos bajo condiciones de sustentabilidad. Este proceso ha evidenciado diversas ventajas con respecto a la síntesis química tradicional, como 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 (Sanjay Makone & Nivruttirao Niwadange, 2016).

1.4.2 Empleo de proteasas en biocatálisis

Las enzimas desempeñan un papel fundamental como catalizadores metabólicos, cuyo efecto es la disminución de la energía de activación aumentando así la velocidad de la reacción. En particular, las hidrolasas (lipasas y proteasas) son las más estudiadas para la síntesis de surfactantes basados en aminoácidos (Morcelle et al., 2009) (C. Morán et al., 2001).

Las proteasas o peptidasas son enzimas que, en condiciones fisiológicas, catalizan la hidrólisis de las uniones peptídicas y son las de mayor relevancia tecnológica, representando cerca del 60% de las ventas del mercado de enzimas de uso industrial (Chellappan et al., 2006). Su uso en las reacciones de síntesis ha despertado un gran interés siendo empleadas de forma eficiente para la síntesis de diversos péptidos con aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica.

La papaína es una endopeptidasa cisteínica proveniente del látex de frutos de *Carica papaya* utilizada principalmente en las industrias alimentaria, farmacéutica, cosmética, textil y de la curtiembre. Es menos costosa que las enzimas microbianas y tiene buena estabilidad térmica en comparación con otras proteasas (Fait et al., 2015). También se ha demostrado que la papaína



es un catalizador adecuado para la síntesis de arginina-*N*-alquilamidas y derivados de arginina-*O*-éster, incluso a temperaturas tan altas como 65°C (Clapés, 1999).

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). En este contexto, la papaína adsorbida en poliamida ha demostrado ser el catalizador óptimo para la síntesis de varios tensioactivos derivados de arginina y otros aminoácidos (Piera et al., 2000) (Castillo et al., 2006); (Morcelle et al., 2009), lo que la convierte en un biocatalizador ideal para esta aplicación.



1.5 *Objetivos generales del plan de trabajo*

1. Llevar a cabo una búsqueda bibliográfica sobre la obtención de surfactantes derivados de aminoácidos mediante biocatálisis, la purificación de los mismos y la caracterización de su actividad biológica (en particular, antifúngica), así como de su mecanismo de acción.
2. Obtener adiestramiento en el manejo de procedimientos básicos de laboratorio:
 - a.- Preparación de soluciones buffer y otros reactivos de uso común.
 - b.- Preparación de biocatalizadores enzimáticos.
 - c.- Desarrollo de técnicas cromatográficas para la purificación de los productos.
 - d.- Técnicas de esterilización, trabajo en esterilidad y microbiología general.
 - e.- Determinación de las propiedades antifúngicas de los productos obtenidos.
 - f.- Conocimiento y cumplimiento de normas de higiene y seguridad.
3. Desarrollar criterios para analizar y discutir resultados experimentales.
4. Extraer conclusiones críticas del trabajo realizado.
5. Adquirir habilidades para la redacción y la comunicación de resultados en reuniones científicas.
6. Integrarse adecuadamente a un grupo de trabajo.



1.6 Objetivos específicos del plan de trabajo

- a.- Obtener surfactantes derivados de arginina empleando papaína inmovilizada sobre poliamida como biocatalizador.
- b.- Purificar los compuestos obtenidos mediante cromatografía de intercambio catiónico.
- c.- Determinar las concentraciones inhibitorias y fungicidas mínimas (CIM y CFM, respectivamente) de los compuestos obtenidos frente a levaduras del género *Candida*.
- d.- Evaluar las cinéticas de muerte de las levaduras en medio de cultivo adicionado con los tensioactivos.
- e.- Analizar el efecto de los tensioactivos en la integridad de las envolturas celulares utilizando sondas fluorescentes (ioduro de propidio) y microscopía de epifluorescencia.
- f.- Caracterizar cambios en la morfología de las levaduras inducidos por los tensioactivos a través de microscopía de fuerza atómica (AFM).

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS





2.1 Reactivos

Se emplearon 1,4-ditio-D,L-treitol (DTT, Roche), ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA, Anedra), ácido bórico, borato de sodio (Mallinckrodt), *N*^α-benzoil-arginina etil éster hidrocloreuro (BAEE, Sigma), decil- y dodecilamina (Sigma), acetonitrilo (ACN, Baker), MeOH (Baker), éter sulfúrico (Dorwill), NaCl (Biopack), dimetilsulfóxido (DMSO, Merck), resazurina (Merck), molecular Probes: kit LIVE-DEAD BacLight (Invitrogen), isopropanol (Baker) y buffer fosfato salino (PBS), papaína (Fluka), poliamida-6 (EP-700, Azko). El resto de los reactivos empleados en este trabajo fue de calidad analítica.

2.2 Obtención de tensioactivos derivados de arginina mediante biocatálisis enzimática

2.2.1 Preparación del biocatalizador

Se preparó papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador para las síntesis de condensación enzimática, según la metodología descrita por (Morcelle et al., 2009)). Para ello, 100 mg del extracto enzimático, fueron disueltos junto con 150 mg de DTT en 1 ml de buffer bórico-borato 0,1 M pH 8,5 conteniendo EDTA 1 mM. La mezcla se agitó con vórtex hasta disolución total. A continuación, se agregó poliamida y se homogeneizó la mezcla nuevamente con vórtex. Finalmente, el biocatalizador fue liofilizado y almacenado a -20°C hasta su utilización.



2.2.2 Síntesis semipreparativa y purificación de los productos obtenidos

Las síntesis a escala semipreparativa de los tensioactivos derivados de arginina (N^α -benzoil-L-arginina-decilamida o Bz-Arg-NHC₁₀ y N^α -benzoil-L-arginina-dodecilamida o Bz-Arg-NHC₁₂) fueron iniciadas por el agregado de 1 g de biocatalizador a 10 ml de la mezcla de reactivos correspondiente: BAEE 20 mM y decil- o dodecilamina 30 mM en ACN anhidro conteniendo 0,25 % (V/V) de agua. Las reacciones se llevaron a cabo en erlenmeyers cerrados herméticamente con tapa esmerilada, bajo atmósfera de N₂, con agitación orbital (150 rpm), a 37°C durante 72 h.

Para finalizar la reacción y eliminar la alquilamina en exceso, el final de síntesis fue filtrado por papel. A continuación, el biocatalizador se lavó 3 veces con 10 ml de ACN, agitando con vórtex y filtrando con papel en cada etapa, y 3 veces con 10 ml de éter sulfúrico, repitiendo la metodología. Todo el filtrado se descartó ya que el producto de la síntesis quedó adsorbido en el biocatalizador. Con el fin de eliminar los restos de solventes (éter) los biocatalizadores fueron colocados en vacío en desecador durante 20 min.

Para extraer el producto de síntesis de la superficie del biocatalizador, se realizaron 3 lavados más de 10 ml de MeOH:H₂O 4:1. Los extractos obtenidos fueron filtrados con membrana de nylon 0,22 μ m (Osmonics).

Finalmente, los compuestos sintetizados se purificaron por cromatografía de intercambio catiónico en un equipo Äkta Purifier 10 (GE Healthcare). Se utilizó una columna SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare; Volumen de columna: 13 ml) la cual fue equilibrada con el solvente A [buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5 con 50% (V/V) de etanol]. A continuación, se inyectó una alícuota de 1 ml de la mezcla de extracción en la columna. Luego de la elución del no retenido con el solvente A, el producto de interés fue recuperado 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%. Al finalizar el proceso de purificación, se lavó la columna haciendo pasar por ella 39 ml del solvente B (3 volúmenes de columna). Los picos cromatográficos fueron detectados espectrofotométricamente a 215 y 254 nm y la velocidad de flujo fue mantenida en 1 ml/min durante todo el proceso.

Los productos purificados fueron desalados por evaporación del solvente en rotavapor y precipitaciones sucesivas con etanol absoluto, centrifugación a 10000×g por 15 min y posterior evaporación del solvente.



2.3 Estudio de la actividad antifúngica de los compuestos obtenidos frente a levaduras del género *Candida*

2.3.1 Medios de cultivo

Se utilizaron agar Sabouraud maltosa (SMA, Oxoid Ltd), caldo Sabouraud dextrosa (SDB, Britanialab) y caldo Mueller-Hinton (CMH, Sigma). Los mismos fueron preparados según las especificaciones de los fabricantes y esterilizados en autoclave a 121°C y 1 atm de sobrepresión durante 15 min.

2.3.2 Microorganismos

Las levaduras utilizadas para llevar a cabo los ensayos microbiológicos fueron *Candida albicans* colección ATCC 3371, y aislados clínicos de *C. albicans* y *C. tropicalis*, provistos por la cátedra de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Las mismas se crecieron en SMA en pico de flauta y se mantuvieron refrigerados en heladera (1-4°C).

2.3.3 Preparación de la suspensión de levaduras

Para la realización de los ensayos, se preparó una suspensión de los microorganismos en solución fisiológica (NaCl 0,85% p/V) ajustando su turbidez al 0,5 de la escala de McFarland ($DO_{600} = 0,15$; equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/ml para levaduras) a partir de un cultivo fresco *overnight* de las mismas.

2.3.4 Preparación de las soluciones stock de los surfactantes

Para los ensayos se prepararon soluciones stock de los surfactantes (Bz-Arg-NHC_n, n = 10 ó 12 y Cetrimide) 50 mM en DMSO, las cuales fueron almacenadas a -20°C. A partir de estos stocks



se realizaron las diluciones señaladas para cada ensayo, en el medio de cultivo adecuado (SDB o CMH).

2.3.5 Determinación de las concentraciones inhibidorias y fungicidas mínimas

2.3.5.1 Medidas de densidad óptica

Se estudió el efecto inhibitorio de los surfactantes sobre el crecimiento de levaduras según el método de dilución en caldo descrito por Arendrup *et al.* (2012), comparándose los resultados con los obtenidos para el surfactante comercial Cetrimide. Los ensayos fueron llevados a cabo en microplacas estériles de 96 pocillos con fondo plano (Greiner). Se realizaron diluciones seriadas en la microplaca a partir de de 100 µl de soluciones stock de los surfactantes 1000 µM en SDB 2X (medio de cultivo de concentración doble), obteniéndose un rango de concentraciones finales de los mismos de 500 a 31 µM. En cada caso, los pocillos fueron adicionados con 100 µl de la suspensión de las levaduras, preparada según el apartado 2.3.3. Se incluyeron controles negativos de todas las soluciones empleadas (sin inocular con las levaduras) de manera de corroborar la esterilidad de las mismas, controles de crecimiento en caldo y ausencia de los surfactantes y controles de crecimiento con DMSO en lugar de surfactantes, para probar que el solvente no interfiera en el crecimiento de las levaduras. Todos los tratamientos fueron realizados al menos por triplicado.

Finalmente, las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 h. El crecimiento de las levaduras fue monitoreado a través de lecturas de la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) antes y después de la incubación, haciendo uso de un lector de microplacas (Tecan Infinite M200 Pro).

Para cada levadura, la actividad antifúngica fue expresada como porcentaje de inhibición del crecimiento (% Inh) comparando la DO_{600} de los tratamientos con aquella de los pocillos control (la DO_{600} de las células crecidas en SDB y ausencia de los surfactantes fue considerada como el 100% de crecimiento). 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 ($\Delta DO_{600} = 0$) se tomaron alícuotas de 20 μ l y colocaron en placas conteniendo SDA libre de los surfactantes. Se analizó la presencia de colonias luego de 24 h de incubación a 30°C. La *Concentración Fungicida Mínima* (CFM) se definió como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento de las levaduras (ausencia de colonias).

2.3.5.2 Método de la resazurina

Los resultados de la actividad antifúngica determinada mediante medidas de densidad óptica fueron corroborados utilizando el método descrito por Mustafa *et al.* (2018) modificado. Para el ensayo se utilizó una microplaca de 96 pocillos.

Inicialmente, los pocillos de la microplaca fueron adicionaron con diluciones seriadas de cada compuesto partir de una solución stock 500 μ M preparada en CMH y 10 μ l de la suspensión de las levaduras, estandarizada al 0,5 de la escala de McFarland en solución salina estéril. La placa fue incubada durante 5 h a 30°C. Pasado este tiempo, se añadieron a cada pocillo 30 μ l de una solución de resazurina 0,02% (p/V) preparada en agua destilada estéril. Luego de una incubación adicional de 48 h a 30°C, se evaluó la viabilidad celular basándose en el cambio de color en el medio como resultado de la actividad metabólica de las células viables.

Para cada surfactante, la CIM se estableció como la menor concentración a la que no se observa cambio de coloración debido a la reducción del colorante (es decir, máxima concentración a la que se mantiene la coloración azul). La CFM se determinó según la

metodología descrita en el punto 2.3.5.1, tomando alícuotas de los pocillos con coloración azul y transfiriéndolos a placas conteniendo SMA libre de los tensioactivos.

En los ensayos se incluyeron tanto controles de viabilidad como controles negativos. Por un lado, los controles de viabilidad consistieron en incubar las suspensiones de levaduras en CMH libre de los surfactantes, en cuyo caso se espera observar un cambio de coloración debido



a la reducción metabólica del reactivo. Por otro lado, para los controles negativos se incubaron las soluciones de los surfactantes sin agregado de la suspensión de levaduras.

2.3.6 Ensayos de supervivencia de levaduras expuestas a distintas concentraciones de los tensioactivos

Se estudió la supervivencia de las tres cepas de levaduras en SDB adicionado con Bz-Arg-NHC₁₀ o Bz-Arg-NHC₁₂ a concentraciones iguales a las respectivas CIM y al doble de las mismas (2 CIM). Para la realización de los ensayos, se utilizaron cultivos *overnight* de las levaduras creciendo en SDB, a partir de los cuales se realizaron diluciones en solución fisiológica estéril de manera de alcanzar una concentración final de aproximadamente 1×10^6 UFC/ml (equivalente al 0,5 en la escala de McFarland). Por otro lado, se prepararon 4,5 ml de soluciones estériles de los surfactantes en SDB a las concentraciones antes mencionadas, las cuales fueron inoculadas con 500 μ l de las suspensiones de levaduras e incubados a 30°C durante 24 h. De la misma manera, se llevaron a cabo controles de crecimiento en SDB adicionado con DMSO a la máxima proporción alcanzada en las soluciones de los surfactantes. Esto se incluyó para corroborar que la concentración de DMSO alcanzada en las soluciones de los surfactantes no interfiera con el crecimiento de los microorganismos.

Al inicio de la incubación ($t=0$) y a intervalos de tiempo preestablecidos de 1, 3, 6 y 24 h se tomaron alícuotas de cada cultivo, se diluyeron en forma seriada (1/10) en triptona 0,1% (V/V) y se realizó el recuento de microorganismos viables según el método de la microgota. Para ello, se transfirieron 20 μ l de las diluciones a placas conteniendo SMA libre de los surfactantes.

Finalmente, las placas fueron incubadas a 30°C por 24 h, realizándose luego el recuento de colonias.

Para el cálculo de microorganismos viables en cada caso (N) se utilizó la siguiente fórmula:

$$N = \frac{UFC}{ml} = n \times 50 \times 10^{-d}$$



donde “n” es número de colonias promedio obtenido del recuento en placa de la dilución “d”.

Para cada tiempo de incubación se calculó $\log N/N_0$, valor que expresa el crecimiento celular en cada condición respecto del recuento inicial de microorganismos (N_0). Finalmente, este término se graficó en función del tiempo de exposición para cada concentración de cada surfactante.

2.3.7 Caracterización del mecanismo antifúngico de los tensioactivos sintetizados

Para la caracterización del mecanismo de la actividad antifúngica se empleó la levadura *C. albicans* ATCC 3371, evaluándose alteraciones a la permeabilidad de la membrana mediante el uso de sondas fluorescentes y microscopía de fluorescencia, y cambios en la rigidez y la textura de las envolturas celulares por microscopía de fuerza atómica (AFM).

2.3.7.1 Análisis de la integridad de la envoltura celular mediante el empleo de sondas fluorescentes (ioduro de propidio y Syto 9) y microscopía de epifluorescencia

Se analizaron alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática de levaduras tras su exposición a distintas concentraciones de los surfactantes a través del uso de sondas fluorescentes y microscopía de fluorescencia. Las sondas empleadas fueron ioduro de propidio (IP) y SYTO 9, con máximos de excitación/emisión en 490/635 y 480/500 nm respectivamente. El ensayo se llevó a cabo según la metodología descrita por De Freitas *et al.* (2011). Para la

realización del mismo, se preparó una suspensión de las levaduras según la metodología descrita en 2.3.3., realizando 3 lavados de las células con solución salina estéril de manera de remover el medio de cultivo, y soluciones de distinta concentración de los tensioactivos preparadas en solución salina estéril. Volúmenes iguales (100 μ l) de suspensión de levaduras y soluciones de distinta concentración de los surfactantes fueron incubadas durante 30 min a



30°C. A continuación, se adicionaron 50 μ l del stock de cada sonda (preparada en agua destilada estéril según las indicaciones del manual del fabricante), con posterior incubación por 15 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se centrifugaron las muestras a 9000xg por 10 min y se procedió a concentrar la muestra para poder observar más células por campo. A tal fin, se retiraron 470 μ l de solución con una pipeta y el pellet fue resuspendido en los 30 μ l restantes. Se tomaron 10 μ l de muestra para observar, entre porta y cubreobjetos, al microscopio de fluorescencia con un objetivo 60X de inmersión con aceite.

Se incluyeron además: un control de células vivas, que fueron incubadas con NaCl 0,85% (p/V) y ausencia de los surfactantes; un control con DMSO 1% (V/V) para comprobar que el efecto observado fue debido a los tensioactivos y no a la presencia de este solvente; un control de células muertas por calor (tratadas previamente a 80°C durante 15 min); y un control de células muertas por tratamiento con isopropanol 70% (V/V) (incubadas en presencia del desinfectante durante 1 h a 30°C, con agitación cada 15 min).

Las observaciones se realizaron en el microscopio de epifluorescencia Olympus® BX-51 con dos cubos de fluorescencia: con máximos de excitación/emisión de 545/580 y 470/525 nm. Este microscopio dispone de una cámara digital Olympus® A330 adaptada para la captura de imágenes.

2.3.7.2 Observación de los cambios morfológicos inducidos por los tensioactivos mediante microscopía de fuerza atómica

Se evaluó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) el cambio morfológico en las levaduras producto de su exposición a diferentes concentraciones de surfactantes, correspondientes a las respectivas CIM y CFM. Esto aporta información valiosa acerca del efecto

de dichos agentes sobre las envolturas celulares. En este sentido, se registraron imágenes de altura, señal de error e imágenes 3D de las células tratadas. Asimismo, se analizaron cambios en



la rugosidad de las envolturas celulares de las levaduras, contribuyendo a la dilucidación del mecanismo antifúngico (Gonçalves et al., 2017).

Para los ensayos, a partir de un cultivo *overnight*, se preparó una suspensión de las levaduras ajustando su DO_{600} a 0,6 en PBS. Por otro lado, se prepararon soluciones en PBS de los surfactantes a partir de los stocks en DMSO a las CIM y CFM determinadas anteriormente. Para los tratamientos, 20 μ l de la suspensión de levaduras fueron añadidos a 20 μ l de las soluciones de los surfactantes, incubando las muestras durante 30 min a temperatura ambiente. Para las observaciones se utilizaron portaobjetos de vidrio de 0,5 cm de lado recubiertos con poli-L-lisina 0,001% p/V para favorecer la adhesión de las células. En vidrios individuales, se colocaron 20 μ l de las suspensiones tratadas, incubándolos durante 30 min a temperatura ambiente, de manera tal de permitir la adhesión. Pasado este tiempo, los vidrios fueron enjuagados con 1 ml de agua destilada y secados durante 15 min al aire.

Finalmente, las levaduras fueron observadas en un microscopio de fuerza atómica Zeiss Axiovert 200 (Carl Zeiss Micro Imaging, Jena, Alemania). Las mediciones se llevaron a cabo en modo de contacto intermitente a temperatura ambiente, de manera de minimizar el tiempo de interacción de la sonda con la superficie de la célula y, por lo tanto, el posible daño provocado a la muestra. Para ello se utilizaron *cantilevers* sin recubrimiento de silicona (Applied Nano Structures, Mountain View, CA, EE. UU.). Estos *cantilevers* tienen frecuencias de resonancia típicas de 145-230 kHz y constantes de resorte de 20-90 N/m. La velocidad de escaneo se estableció en menos de 1 Hz para imágenes y la resolución de imagen se estableció en 512 \times 512 píxeles para todas las imágenes.

Para la evaluación de la morfología y rugosidad de la superficie de las levaduras se obtuvieron imágenes de la topografía celular. Por otro lado, para analizar los cambios en la rigidez de las células se obtuvieron las curvas de fuerza en distintas ubicaciones de la superficie celular. Estas curvas representan la fuerza ejercida sobre la muestra en función de la distancia entre la punta del *cantilever* y la superficie de la muestra, reflejando las interacciones dinámicas entre ambos. A partir de ellas se obtuvieron parámetros mecánicos de la muestra como el *módulo de*

Young, el cual expresa la relación que se da entre la tensión aplicada sobre la muestra en su eje longitudinal y la deformación medida en ese mismo eje.



Se realizaron, de igual manera, controles con DMSO en lugar de los surfactantes estudiados para comprobar si el mismo produce algún efecto superficial sobre las células, y un control con PBS en lugar de surfactante para tener un dato topográfico de células sanas.



CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Los compuestos con actividad superficial Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ fueron obtenidos empleando una estrategia biocatalítica que involucró el uso de papaína inmovilizada en poliamida (permitiendo una rápida separación del biocatalizador) y una metodología de purificación que en términos generales fue de bajo impacto ambiental. Los surfactantes obtenidos demostraron tener actividad antibacteriana de amplio espectro y baja toxicidad (Fait et al., 2015) y antifúngica contra hongos fitopatógenos y dermatofitos humanos (Fait et al., 2019). En este trabajo, se llevó a cabo una evaluación de su actividad contra levaduras, particularmente dos especies del género *Candida*, realizando además un estudio preliminar del posible mecanismo de acción de dichos compuestos.

Las estructuras químicas de los surfactantes ensayados y del Cetrimide se muestran en la Figura 3.1.

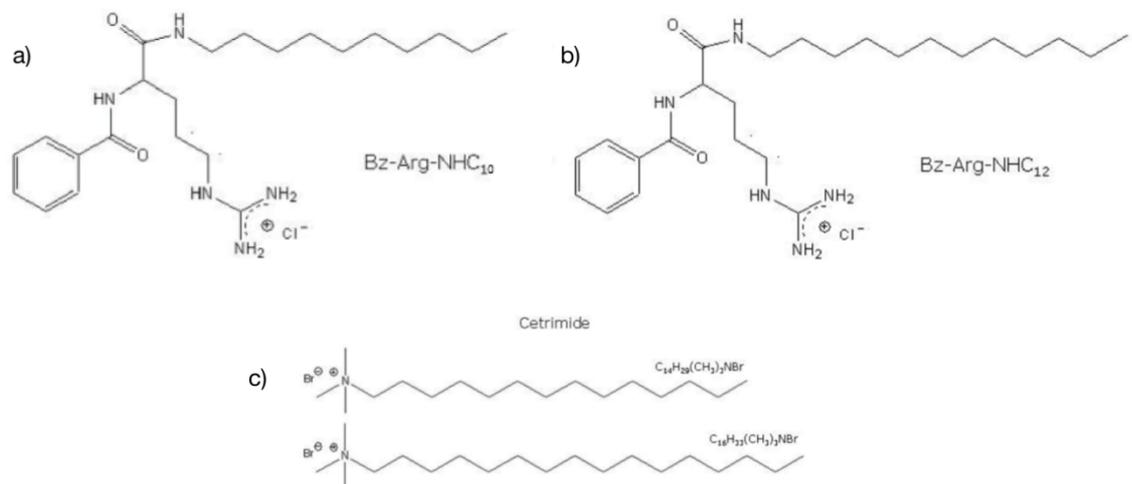


Figura 3.1. Estructura química de (a) Bz-Arg-NHC₁₀, (b) Bz-Arg-NHC₁₂ y (c) Cetrimide.

3.1 Determinación de las concentraciones inhibitorias y fungicidas mínimas

Los compuestos de amonio cuaternario, como el Cetrimide, son los antisépticos y desinfectantes más ampliamente utilizados para limpiar la piel, heridas, quemaduras y almacenar



intrínseca y biodegradabilidad cuestionable han motivado la necesidad de diseñar y obtener compuestos alternativos con aplicaciones similares, como los tensioactivos catiónicos basados en arginina (Castillo *et al.* 2004).

Entre las levaduras, aquellas que pertenecen al género *Candida* son las causas más comunes de infecciones fúngicas en humanos (Das et al., 2011). Teniendo esto en mente, en este trabajo se realizaron pruebas de susceptibilidad a los tensioactivos derivados de arginina frente a aislados de *C. albicans* de colección ATCC y en aislados clínicos de *C. albicans* y *C. tropicalis*. Dichas pruebas de susceptibilidad se llevaron a cabo mediante dos ensayos. En primer lugar, mediante la determinación de la inhibición del crecimiento a partir de las medidas de densidad óptica y, en segundo lugar, mediante la evaluación de la viabilidad celular por el uso de un colorante vital, la resazurina.

3.1.1 Medida de densidad óptica

Se determinaron los porcentajes de inhibición del crecimiento de diferentes cepas y aislados de levaduras pertenecientes al género *Candida*. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante el ensayo de dilución en microplaca, testeándose un rango de concentraciones de 500 a 7 μM tanto para Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂. A través de estos ensayos, se establecieron las concentraciones inhibitorias y fungicidas mínimas (CIM y CFM, respectivamente) para cada cepa y cada surfactante. Los resultados fueron contrastados con los obtenidos para Cetrimide, un desinfectante catiónico comercial muy utilizado en el ámbito hospitalario (Figura 3.1).

Considerando la diferencia de peso molecular entre los surfactantes, los valores de CIM y CFM fueron expresados en μM , a fin de poder realizar una comparación más precisa del poder antifúngico de cada compuesto.

La Figura 3.2 muestra una foto de la microplaca obtenida en uno de los ensayos de medida de densidad óptica para las tres cepas de *Candida* (*C. albicans* ATCC 3371, un aislado clínico de *C. albicans* y un aislado clínico de *C. tropicalis*) luego de 24 h de incubación de las mismas a 30°C en presencia de distintas concentraciones de los surfactantes.

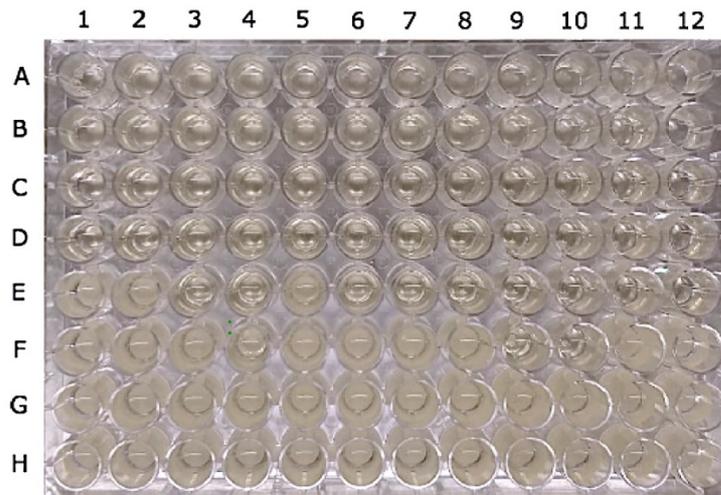


Figura 3.2. Ensayo de dilución en microplaca para distintas cepas de *Candida*. Columnas 1 y 2: *C. albicans* ATCC 3371 con Bz-Arg-NHC₁₀; columnas 3 y 4: *C. albicans* ATCC 3371 con Bz-Arg-NHC₁₂, columnas 5 y 6: aislado clínico de *C. albicans* con Bz-Arg-NHC₁₀; columnas 7 y 8: aislado clínico de *C. albicans* con Bz-Arg-NHC₁₂; columnas 9 y 10: aislado clínico de *C. tropicalis* con Bz-Arg-NHC₁₀; columnas 11 y 12: aislado clínico de *C. tropicalis* con Bz-Arg-NHC₁₂. Las filas desde la A hasta la G contienen concentraciones decrecientes de surfactante logradas mediante diluciones seriadas, desde 500 hasta 7 μ M. La fila H corresponde a control positivo de crecimiento de los microorganismos conteniendo únicamente el medio de cultivo (CS) y las levaduras ensayadas.

Con la finalidad de estudiar el efecto del solvente sobre el crecimiento de los microorganismos, se realizaron controles con soluciones de DMSO sin el agregado del surfactante. En estos casos se procedió de igual manera que en el de las muestras del surfactante, realizando diluciones seriadas 1/2 de las soluciones. Esto permitió la formación de gradientes de concentración de DMSO de 1 a 0,062% en los distintos pocillos de una misma placa. Dichos controles no se muestran en la Figura 3.2.

Se evaluó el cambio en la densidad óptica a 600 nm para cada condición ensayada y se calcularon los porcentajes de inhibición de crecimiento de las levaduras ensayadas y para cada concentración del surfactante (Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂ o Cetrimide) respecto del control en ausencia del surfactante (100% de crecimiento). Se consideró la CIM para cada microorganismo como la mínima concentración del surfactante que demuestra un porcentaje de inhibición del crecimiento igual o mayor al 95%.

Posteriormente, para determinar la CFM se transfirieron alícuotas de cada uno de los pocillos en los que no se observó crecimiento visible a placas de cultivo libres de los compuestos, evaluando la aparición de colonias luego de 24 h de incubación.



RESULTADOS Y DISCUSION

Tabla 3.1. Concentraciones inhibitorias y fungidas mínimas (CIM y CFM) obtenidas por el método de DO_{600} para Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂ y Cetrimide frente a levaduras del género *Candida*.

	CIM $\mu\text{g/ml}$ (μM)			CFM $\mu\text{g/ml}$ (μM)		
	<i>C. albicans</i> ATCC 3371	<i>C. albicans</i> (aislado clínico)	<i>C. tropicalis</i> (aislado clínico)	<i>C. albicans</i> ATCC 3371	<i>C. albicans</i> (aislado clínico)	<i>C. tropicalis</i> (aislado clínico)
Bz-Arg-NHC ₁₀	62	62	31	62	125	31
Bz-Arg-NHC ₁₂	31	31	31	125	250	31
Cetrimide	125	31	15	500	125	250

Ambos tensioactivos derivados de arginina (Bz-Arg-NHC_n, n = 10 y 12) fueron capaces de inhibir el crecimiento de todos los microorganismos ensayados, aunque en diferentes grados, y presentaron, asimismo, actividad fungida. En general, los valores más bajos de CIM (relacionados con una actividad antifúngica más potente) fueron registrados para Bz-Arg-NHC₁₂, independientemente de la especie de levadura ensayada (*C. albicans* o *C. tropicalis*). En estudios anteriores se ha observado para este tipo de compuestos que aquellos con las cadenas de alquilo más cortas de una serie homóloga muestran una actividad antimicrobiana más baja que aquellos con cadenas de alquilo más largas. La combinación de diferentes parámetros fisicoquímicos, como la hidrofobicidad, la adsorptividad, la solubilidad acuosa y la difusión en el medio, dependen de la longitud de la cadena alquílica y determinan la diferente eficacia antimicrobiana de este tipo de compuestos, siendo la solubilidad el paso limitante para el transporte (Cornellas et al., 2011). En el caso de Bz-Arg-NHC₁₂, la interacción cooperativa de estos parámetros mejora la tendencia del tensioactivo a ser adsorbido en la superficie celular y, por lo tanto, ejerce su acción antimicrobiana en concentraciones más bajas (Fait et al., 2015).

Notablemente, Bz-Arg-NHC_n demostraron poseer un efecto inhibitorio del crecimiento de las levaduras comparable al de Cetrimide, lo que se evidencia en los valores de CIM obtenidos. Asimismo, ambos compuestos derivados de arginina mostraron, en general, una actividad fungida mayor que Cetrimide, lo que se deduce por los menores valores de CFM para los primeros.

Por otro lado, los controles llevados a cabo en presencia de medio de cultivo adicionado con DMSO permitieron corroborar que este solvente no afecta el crecimiento de las levaduras a las concentraciones presentes en los tratamientos (resultados no mostrados).

3.1.2 Método de la resazurina

A fin de validar los resultados obtenidos anteriormente, se llevó a cabo una segunda prueba de susceptibilidad a los tensioactivos derivados de arginina empleando un colorante vital como indicador de la actividad metabólica de las levaduras. El método elegido fue el de la resazurina el cual es utilizado frecuentemente para cuantificar la viabilidad celular *in vitro* en cultivos celulares y biofilms en microplacas. Este ensayo se basa en la reducción irreversible de la resazurina a resorufina (Figura 3.3) catalizada por las oxidoreductasas presentes en las células, la cual se evidencia por un cambio en la coloración del colorante, el cual pasa de azul a un rosa intenso.

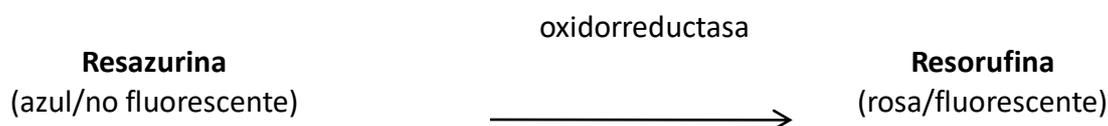


Figura 3.3. Las células metabólicamente activas reducen, mediante la enzima oxidorreductasa, la resazurina no fluorescente a resorufina, que es fluorescente.

Esta reacción solo tendrá lugar en células viables y metabólicamente activas, poniendo en evidencia que el compuesto probado no afecta la actividad metabólica celular en esas condiciones (Mustafa et al., 2018).

En este caso, las condiciones del ensayo fueron similares a las empleadas en el caso de las medidas de densidad óptica, probando el mismo rango de concentraciones ensayado. La CIM fue determinada mediante el agregado de resazurina luego de la incubación inicial de las levaduras en presencia de los tensioactivos, analizándose el viraje del color azul a rosa para cada concentración de los compuestos y cada cepa estudiada. La Figura 3.4 muestra una fotografía de la microplaca del ensayo con los tres aislados de levaduras luego de 48 horas de incubación de las mismas a 30°C.

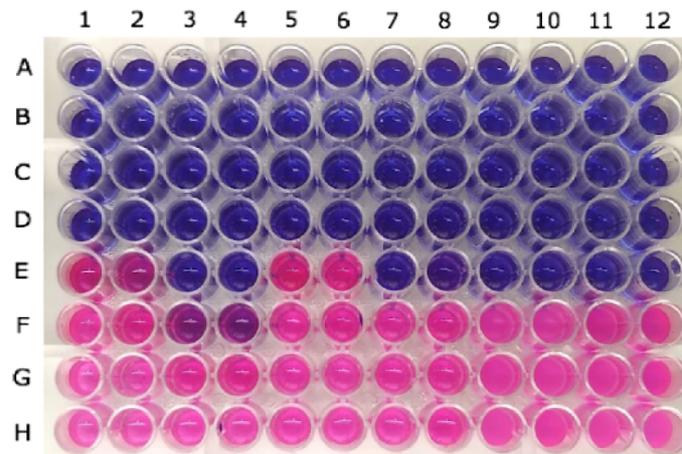


Figura 3.4. Ensayo de dilución en microplaca con agregado de resazurina para distintas cepas de *Candida*. Columnas 1 y 2: *C. albicans* ATCC 3371 con Bz-Arg-NHC₁₀; columnas 3 y 4: *C. albicans* ATCC 64548 con Bz-Arg-NHC₁₂, columnas 5 y 6: aislado clínico de *C. albicans* con Bz-Arg-NHC₁₀; columnas 7 y 8: aislado clínico de *C. albicans* con Bz-Arg-NHC₁₂; columnas 9 y 10: aislado clínico de *C. tropicalis* con Bz-Arg-NHC₁₀; columnas 11 y 12: aislado clínico de *C. tropicalis* con Bz-Arg-NHC₁₂. Las filas desde la A hasta la G contienen concentraciones decrecientes de surfactante logradas mediante diluciones seriadas, desde 500 hasta 7 μ M. La fila H corresponde a control positivo de crecimiento de los microorganismos conteniendo únicamente el medio de cultivo (Mueller-Hinton) y las levaduras ensayadas. No se muestra en esta placa el ensayo con Cetrimide.

Se determinó la CIM como aquella concentración mínima a la que se observó un cambio de coloración visible de azul a rosa en el pocillo de la microplaca. Para la CFM la determinación fue similar a la descrita para el ensayo de densidad óptica. Los valores tanto de CIM como de CFM obtenidos mediante esta técnica se detallan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Valores de CIM y CFM para Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂ y Cetrimide, frente a levaduras del género *Candida* obtenidos por el método de la resazurina.

	CIM μ g/ml (μ M)			CFM μ g/ml (μ M)		
	<i>C. albicans</i> ATCC 3371	<i>C. albicans</i> (aislado clínico)	<i>C. tropicalis</i> (aislado clínico)	<i>C. albicans</i> ATCC 3371	<i>C. albicans</i> (aislado clínico)	<i>C. tropicalis</i> (aislado clínico)
Bz-Arg-NHC ₁₀	62	62	31	62	62	31
Bz-Arg-NHC ₁₂	31	31	31	62	250	62
Cetrimide	125	125*	31	250	250	125

*Valor discrepante con respecto al obtenido por el método de densidad óptica mostrado anteriormente.

Los resultados obtenidos mediante esta técnica corroboraron los anteriores, a excepción del caso del aislado clínico de *C. albicans* tratado con Cetrimide, para el que la CIM calculada según el método de la resazurina fue mayor que el registrado según el método de la densidad

RESULTADOS Y DISCUSION

óptica. En este sentido, se consideraron diferencias significativas entre ambas metodologías cuando los valores obtenidos presentaban diferencias de más una dilución.

3.2 Ensayos de supervivencia de levaduras expuestas a distintas concentraciones de los tensioactivos

Se estudió el efecto de Bz-Arg-NHC_n sobre la supervivencia de las levaduras en el tiempo empleando SDB como medio. Para ello, se analizaron las cinéticas de muerte de las cepas de referencia tratadas con ambos surfactantes a dos concentraciones: sus respectivas CIM y el doble de las mismas (2 CIM). Para cada condición se graficó el log N/N₀ en función del tiempo de incubación, lo que nos permitió evaluar el efecto de los tensioactivos sobre el número de células viables en relación al tiempo de exposición. Las curvas obtenidas se muestran en la Figura 3.5.

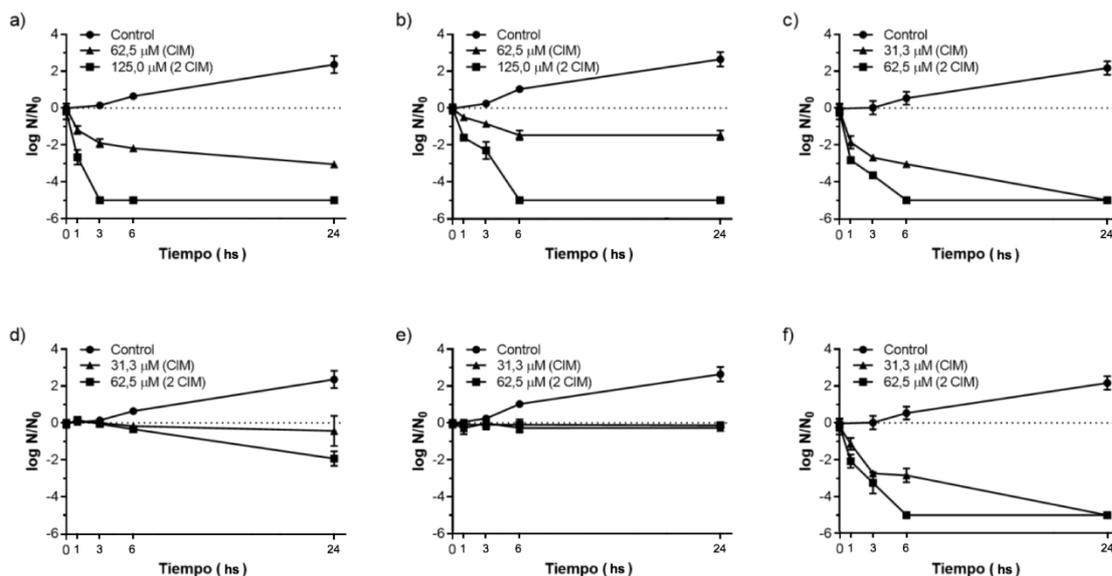


Figura 3.5. Curvas de supervivencia de *C. albicans* ATCC 3371 (a, d), *C. albicans* aislado clínico (b, e) y *C. tropicalis* aislado clínico (c, f) en SDB adicionado con Bz-Arg-NHC₁₀ (a-c) o Bz-Arg-NHC₁₂ (d-f).

En general se observó una disminución de la viabilidad de las levaduras para tiempos cortos de exposición a los compuestos estudiados con una notable reducción en el número de células viables luego de solo unas pocas horas de incubación en la mayoría de los casos. Tanto



Bz-Arg-NHC₁₀ como Bz-Arg-NHC₁₂ demostraron poseer efecto fungicida frente a las tres cepas a las concentraciones ensayadas. En el caso de las cepas tratadas con Bz-Arg-NHC₁₀ a concentraciones iguales a la CIM y *C. tropicalis* tratada con Bz-Arg-NHC₁₂ a esta misma concentración, se observó una disminución de entre uno y tres órdenes de magnitud en el número de microorganismos viables luego de las primeras horas de incubación. Por otro lado, a concentraciones que doblan el valor de CIM, la reducción se amplió a 5 órdenes de magnitud en las primeras 6 h y no se observó crecimiento visible (evidenciado por la aparición de turbidez) durante el tiempo del ensayo. Estos resultados equivalen a una reducción porcentual del 99,999% de la carga inicial de levaduras en estas condiciones. En el caso de *C. albicans*, tanto la cepa ATCC como el aislado clínico, expuesta a Bz-Arg-NHC₁₂ a una concentración igual a la CIM no se registró una reducción apreciable en el número de microorganismos viables luego de las primeras horas de contacto, manteniéndose la carga de levaduras viables constante durante todo el tiempo del ensayo. Este comportamiento es esperable ya que el efecto fungicida de este tensioactivo se manifiesta a concentraciones mayores que las testeadas.

3.3 Caracterización del mecanismo antifúngico de los tensioactivos sintetizados

3.3.1 Análisis de la integridad de la envoltura celular mediante el empleo de sondas fluorescentes y microscopía de fluorescencia

La creciente resistencia de las bacterias y los hongos a los antibióticos disponibles es una preocupación importante en todo el mundo, lo que lleva a enormes esfuerzos para desarrollar compuestos antimicrobianos con modos de acción novedosos (Makovitzki et al., 2006). En este sentido, las características estructurales de los microorganismos tienen una relevancia fundamental para la búsqueda de nuevas dianas o mecanismos de acción. Un blanco potencial



para los nuevos antimicrobianos es la envoltura celular, ya sea la pared o la membrana plasmática. Debido a su carga negativa en hongos y otros microorganismos (Lipke & Ovalle, 1998), se espera que los tensioactivos catiónicos interactúen fácilmente con ella y ejerzan su acción antimicrobiana a ese nivel, como en el caso de los AMPs (péptidos antimicrobianos de naturaleza catiónica) y los lipopéptidos naturales que se asocian con las membranas, causando la despolarización, lisis y muerte celular por la interrupción de la bicapa lipídica (Pinazo et al., 2016).

Considerando que el efecto Bz-Arg-NHC_n podría conllevar la disrupción de la membrana plasmática como parte del mecanismo de acción fungicida, se evaluó su integridad mediante microscopía de fluorescencia y el empleo de sondas fluorescentes. Con este fin se eligió una combinación de fluoróforos que permitió diferenciar las células viables de aquellas que presentaban alteraciones a la permeabilidad de su membrana plasmática (inviabiles): SYTO 9, e ioduro de popidio (IP). Estos colorantes difieren tanto en sus características espectrales como en su capacidad para penetrar en las células.

Por un lado, el colorante SYTO 9 es una molécula pequeña con la capacidad de penetrar las envolturas celulares con relativa facilidad, independientemente de la viabilidad de las células, lo que se pone en evidencia por la aparición de fluorescencia verde dentro de las mismas. Por el contrario, el IP 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 a través de su unión al ADN, la cual se pone de manifiesto por la aparición de fluorescencia roja (Wang et al., 2013).

Así, con una mezcla apropiada de SYTO 9 e IP, todas las levaduras se tiñen de verde, mientras que solo aquella cuya integridad de la membrana celular ha sido comprometida se teñirán de rojo. Los máximos de excitación/emisión para estas sondas fluorescentes son de 480/500 nm para SYTO 9 y 490/635 nm para el IP.

Para validar la experiencia, se ensayaron distintos controles. En este sentido se investigó tanto la autofluorescencia de los surfactantes, como el efecto del DMSO 1% (V/V) utilizado en el medio sobre las marcas fluorescentes y la integridad de las membranas celulares. Asimismo, se incluyeron controles de células inviables tratadas con isopropanol 70% por un lado y sometidas a tratamiento térmico a 80°C por el otro. Los controles demostraron que las sondas fueron eficientes para la diferenciación de las células viables e inviables y que el surfactante no exhibió autofluorescencia (resultados no mostrados). El control con DMSO 1% (V/V) demostró que el mismo no afecta la permeabilidad de la membrana de las células, observación que concuerda con

los resultados obtenidos en los ensayos de CIM y CFM en los que se evidenció que este solvente en el porcentaje señalado no afectaba la viabilidad ni el desarrollo de las levaduras. El control de las células viables, en solución fisiológica sin el agregado de los



RESULTADOS Y DISCUSION

surfactantes, demostró que la integridad de la membrana se mantuvo inalterada durante en el desarrollo de la experiencia. Asimismo, la integridad de la membrana de las células tratadas con alcohol isopropílico 70% pareciera estar más afectada que la de aquellas muertas por calor (a 80°C), por lo que este tratamiento se empleará como control de las células inviables.

La Figura 3.6 muestra algunas imágenes representativas obtenidas del tratamiento de *C. albicans* ATCC 3371 con distintas concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₀, y la Figura 3.7 aquellas del tratamiento con Bz-Arg-NHC₁₂.

Las observaciones se realizaron en el microscopio de epifluorescencia Olympus® BX-51 con dos cubos de fluorescencia: con máximos de excitación/emisión de 545/580 y 470/525 nm.

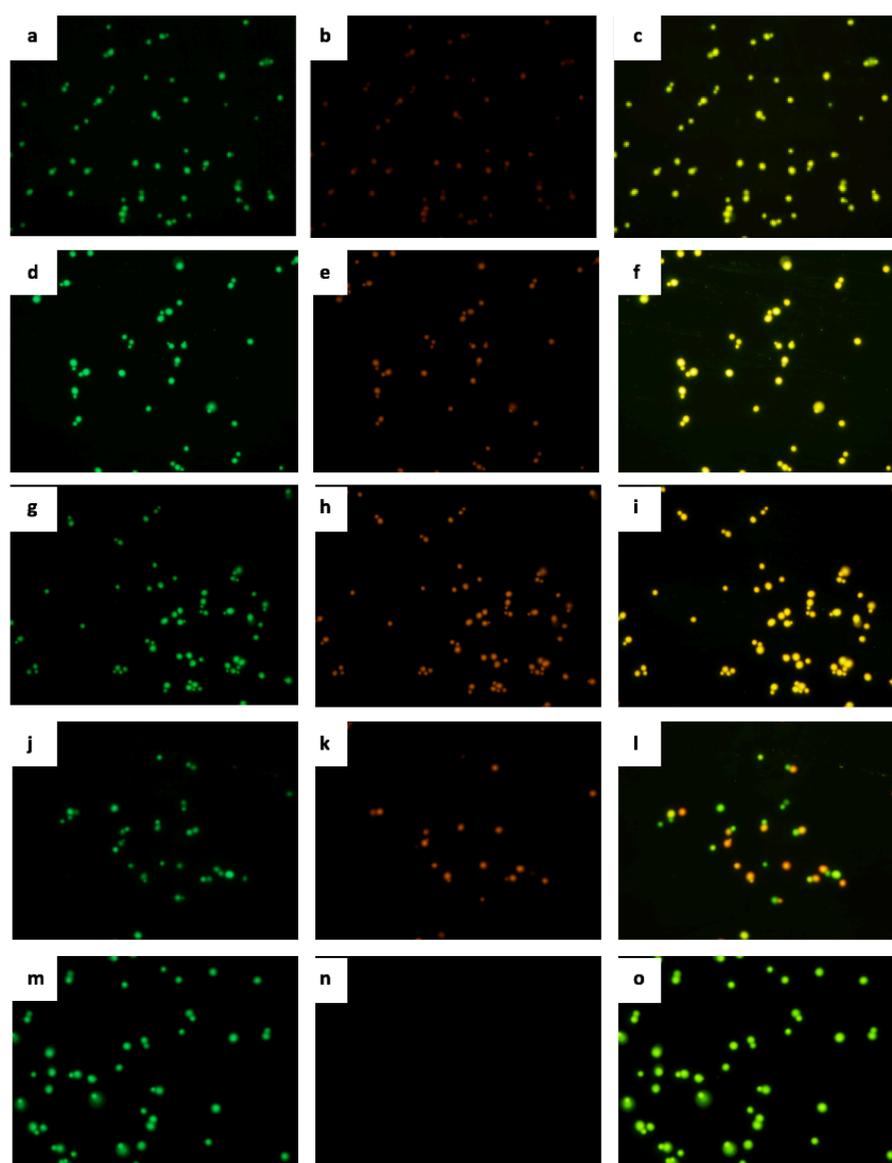


Figura 3.6. Permeabilización de la membrana inducida en *Candida albicans* ATCC 3371 por la exposición a Bz-Arg-NHC₁₀ de concentración (a-c) 500 μ M, (d-f) 250 μ M, (g-i) 125 μ M, (j-l) 62 μ M o (m-o) 31 μ M, visto con filtro que permite emisión del verde (a, d, g, j, m), del rojo (b, e, h, k, n) o la superposición de ambos (c, f, i, l, o).

RESULTADOS Y DISCUSION

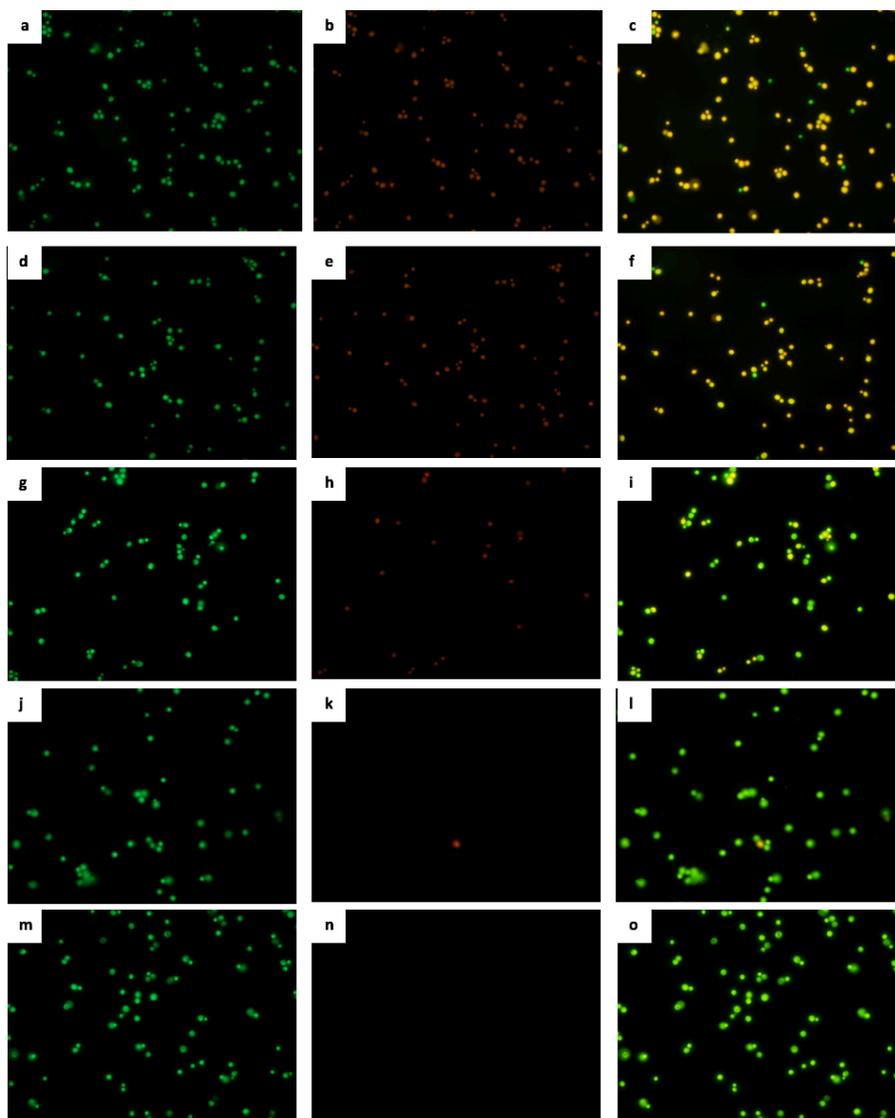


Figura 3.7. Permeabilización de la membrana inducida en *Candida albicans* ATCC 3371 por la exposición a Bz-Arg-NHC₁₂ de concentración (a-c) 500 μ M, (d-f) 250 μ M, (g-i) 125 μ M, (j-l) 62 μ M, (m-o) 31 μ M, visto con filtro que permite emisión del verde (a, d, g, j, m), del rojo (b, e, h, k, n) o la superposición de ambos (c, f, i, l, o).

En ambos casos se observa que todas las células del campo, vivas y muertas, incorporaron el color verde debido a la captación de la sonda SYTO 9 (primera columna de las Figuras 3.6 y 3.7). Las imágenes de las columnas centrales de las figuras anteriores corresponden a la observación con el filtro para la observación de la fluorescencia roja, en las que puede observarse la captación del IP, siendo el efecto de los tensioactivos proporcional a la concentración de los mismos. Para la cuantificación del efecto de los tensioactivos se realizó el recuento de células viables y con evidencia de alteraciones en la integridad de la membrana, calculándose los

porcentajes de células inviables para cada condición. A partir de estos datos se construyeron gráficos que denotan el porcentaje de células inviables tras la exposición a distintas concentraciones de los surfactantes (Figura 3.8).

RESULTADOS Y DISCUSION

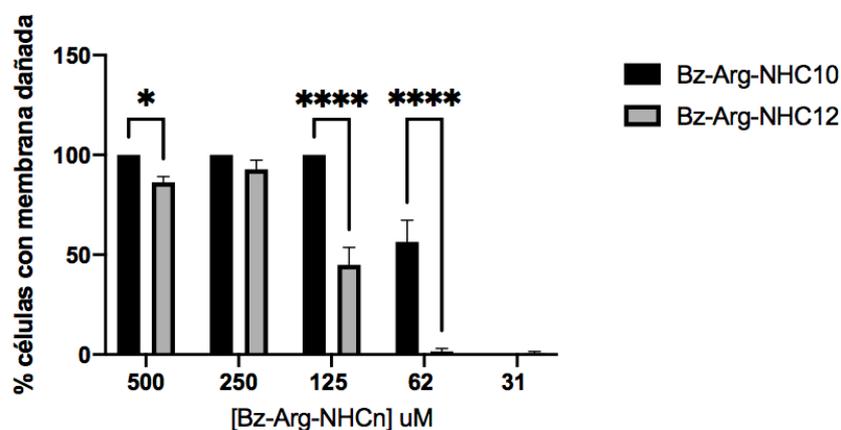


Figura 3.8. Porcentaje de células con membrana alterada luego de tratarlas con concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ entre 500-31 μM . Se realizó un análisis estadístico ANOVA. Los valores se trazaron como la media \pm SD. Los asteriscos indican la existencia y magnitud de diferencias significativas entre los tratamientos.

Se observó un mayor porcentaje de células dañadas tras la exposición a Bz-Arg-NHC₁₀ respecto de su análogo de doce carbonos para todas las concentraciones ensayadas. En general, a mayor concentración de los surfactantes se evidenció un mayor porcentaje de células que sufrieron una alteración en la permeabilidad de su membrana. Los resultados obtenidos sugieren que, gracias a su carga positiva, tanto Bz-Arg-NHC₁₀ como Bz-Arg-NHC₁₂ son capaces de interactuar fuertemente con la envoltura celular comprometiendo la integridad de la membrana de las levaduras.

Diversos estudios han descrito los mecanismos hipotéticos para explicar la acción antimicrobiana de los tensioactivos catiónicos, los cuales incluyen tradicionalmente la interrupción de la bicapa lipídica, involucrando la fuga de K⁺ intracelular y otros iones (Castillo et al., 2006). Sin embargo, otros autores han descrito que el fenómeno crítico responsable del efecto antifúngico de los compuestos catiónicos es la reversión de la carga celular de negativo a positivo (Vieira & Carmona-Ribeiro, 2006). Una explicación más conciliadora ha sido formulada teniendo en cuenta la combinación de ambos mecanismos (Pinazo et al., 2016): 1) unión de la molécula catiónica a las paredes celulares cargadas negativamente a través de enlaces electrostáticos, seguida de 2) la interacción del resto alquilo del tensioactivo con los lípidos de la membrana, alterando su estructura. Los resultados obtenidos hasta el momento no permiten

dilucidar el mecanismo antifúngico por completo, pero se encuentran en concordancia con aquellos observados para conidios de hongos fitopatógenos y dermatofitos (Fait et al., 2019). En este trabajo, los autores demostraron que los efectos de los tensioactivos derivados de arginina sobre



estas especies de hongos incluyen la permeabilización de la membrana y la inducción de estrés oxidativo, sugiriendo la interacción de las moléculas del surfactante con los componentes intracelulares una vez que los monómeros penetran en el interior de la célula.

3.3.2 Observación de los cambios morfológicos inducidos por los tensioactivos mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)

Para evaluar el efecto de los tensioactivos sobre la morfología de *C. albicans* ATCC 3371 se llevaron a cabo observaciones por microscopía de fuerza atómica (AFM). Esta técnica permite generar una imagen topográfica en 3 dimensiones con resolución atómica de la superficie de la muestra.

La AFM se basa en la detección mecánica de fuerzas débiles entre una punta muy delgada, montada sobre un soporte flexible (*cantilever*) posicionado mediante un elemento piezo eléctrico, y la superficie de la muestra (Daza Millone, 2011). El equipo es capaz de medir las deflexiones en el *cantilever* debido a las fuerzas capilares, electrostáticas, de Van der Waals y friccionales entre la punta y la muestra, lo que es detectado por un sistema óptico conectado a un sistema de retroalimentación (Figura 3.9). Este tipo de microscopía permite la visualización de procesos como la cristalización/fusión, difusión, adsorción, asociaciones moleculares e incluso reacciones químicas. En el caso del estudio de estructuras de origen biológico, la AFM permite su observación en un entorno semejante al que se encuentran naturalmente (medio acuoso), en lugar de sufrir un proceso de metalización en el caso de las microscopías electrónicas (Vázquez et al., 2015).

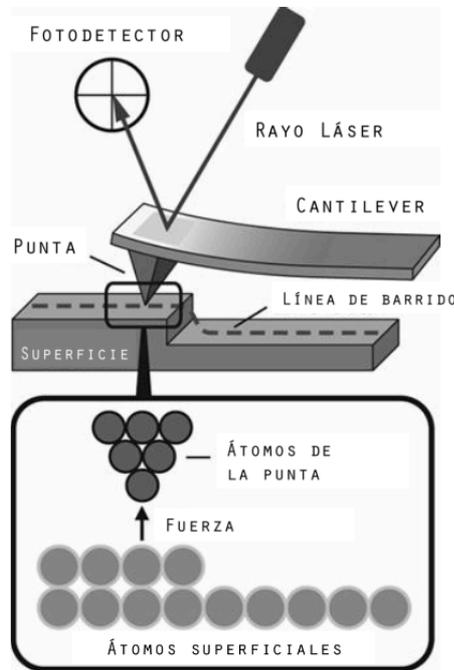


Figura 3.9. Representación esquemática del funcionamiento de un equipo de AFM (Ruiz, 2013).

En cuanto a la forma de operación, el modo de contacto intermitente o *tapping* 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.

Se analizaron células de *C. albicans* ATCC 3371 expuestas a los surfactantes mediante su observación por AFM. Se obtuvieron imágenes de la topografía celular para evaluar las características de la morfología y la rugosidad superficial de las levaduras tratadas, comprándolas con las que se encuentran en condiciones normales (en contacto con PBS).

La Figura 3.10 muestra las imágenes obtenidas para la altura de la muestra, la señal de error determinada por la deflexión del *cantilever* (que expresa la fuerza ejercida sobre la muestra), y las representaciones en 3D de las células, tanto para los distintos tratamientos con Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ en concentraciones correspondientes a sus CIM y CFM, como para el control con PBS. De igual manera, se analizó una muestra de células tratadas con DMSO a la máxima concentración ensayada (imágenes no mostradas) para comprobar si el solvente tiene algún efecto sobre los parámetros evaluados y la morfología celular.

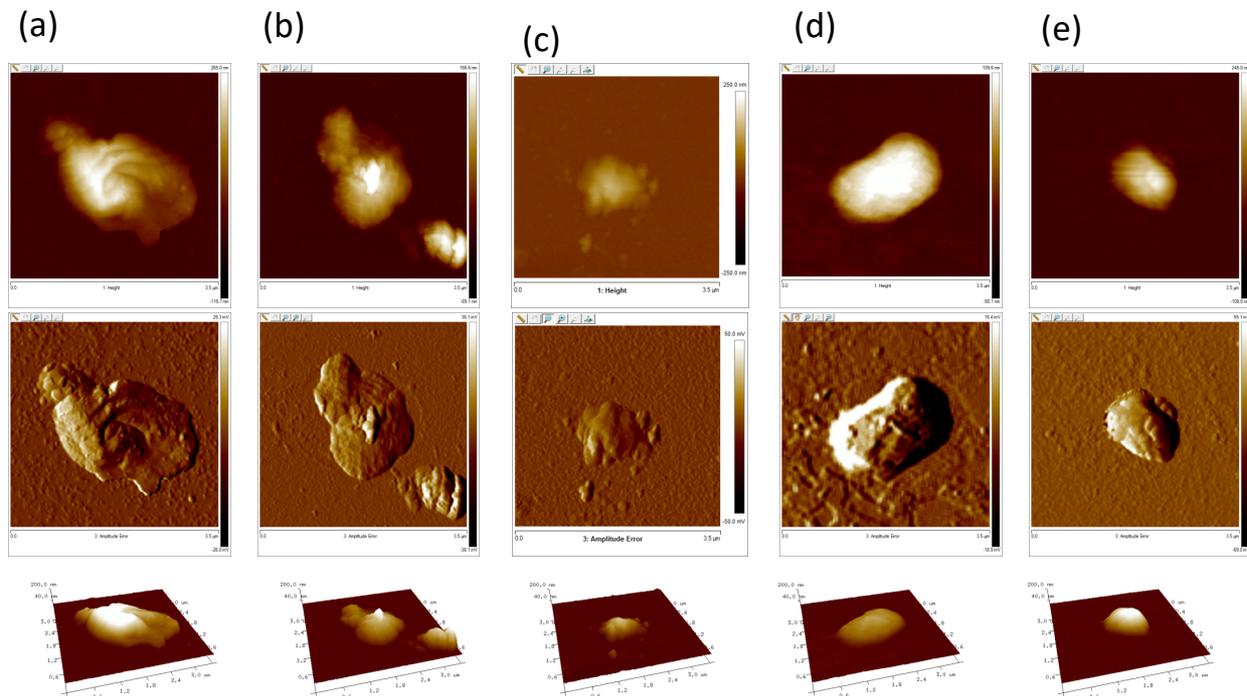


Figura 3.10. Efecto de Bz-Arg-NHC_n en las células planctónicas. Altura, fuerza (deflexión del cantilever) e imágenes en 3D de las células después de 30 minutos de incubación con (a) PBS, (b, c) Bz-Arg-NHC₁₂ y (d, e) Bz-Arg-NHC₁₀ con la CIM (c, e) o CFM (b, d) correspondiente. Las dimensiones de las imágenes son de $3,5 \times 3,5 \mu\text{m}^2$.

Como tendencia general, se observó una disminución en la altura (relacionada con el diámetro) de las células tratadas con los tensioactivos respecto al control en ausencia de los mismos. Asimismo, las levaduras incubadas en presencia de los compuestos mostraron un aspecto más abultado. Esto puede deberse a la acumulación de diversas sustancias, como proteínas u otros componentes celulares liberados del interior de la célula como respuesta a la acción de los surfactantes, combinada con la reducción del volumen celular por la liberación de microvesículas inducida por los monómeros del surfactante o la extracción de componentes lipídicos de sus membranas por las micelas de los mismos (Fait et al., 2018).

La Figura 3.11 muestra el análisis del área superficial y la rugosidad de la superficie de las levaduras.

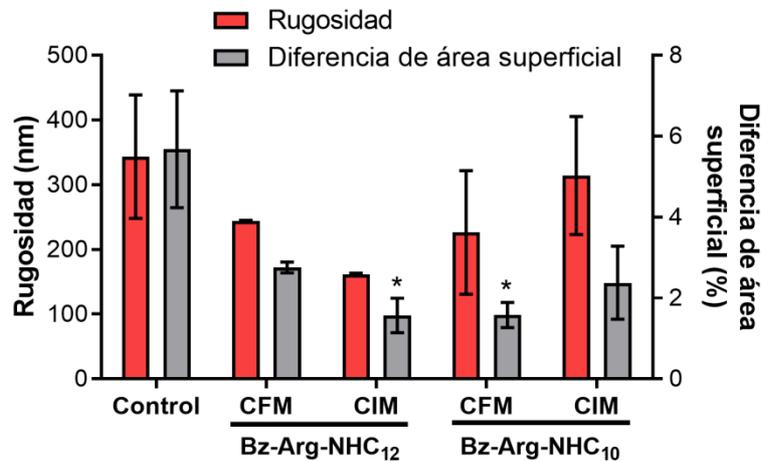


Figura 3.11. Mediciones de la rugosidad celular y la diferencia del área superficial después de la incubación con Bz-Arg-NHC_n. Los datos se obtuvieron de imágenes de altura AFM.

Se sabe que la estructura química de los surfactantes tiene la capacidad de afectar las membranas lipídicas alterando la permeabilidad, lo que permite que las moléculas de tensioactivos se integren en las bicapas lipídicas o que desintegren la estructura de las mismas formando micelas (Vieira & Carmona-Ribeiro, 2006). Debido a esto, las propiedades de la membrana como la fluidez y permeabilidad pueden cambiar. Esto también puede afectar la regulación y función de las enzimas unidas a la membrana que alteran tanto la síntesis de componentes polisacáridos de la pared celular (es decir, β -glucano, quitina y manano), como el crecimiento celular y la morfogénesis (Hammer et al., 2004). Sería de esperar que la combinación de estos efectos resulte en un aumento de la rugosidad de la superficie celular (Tyagi & Malik, 2010). Sin embargo, en las condiciones del ensayo, no se observaron diferencias significativas entre las rugosidades de las superficies celulares de las células control y las tratadas con los surfactantes.

Por otro lado, la diferencia de área superficial se define como el aumento de área de la superficie causado por la rugosidad, es decir, la diferencia porcentual entre el área de superficie real y el área proyectada (Webb et al., 2012). En la Figura 3.11 se observa una tendencia de disminución de la diferencia de área superficial cuando las células fueron tratadas con 1 CIM de Bz-Arg-NHC₁₂ y 1 CFM de Bz-Arg-NHC₁₀. Estas diferencias observadas podrían explicarse a través

de cambios en el volumen celular debido a la liberación de vesículas o la extracción de lípidos como se mencionó anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los cambios morfológicos inducidos por agentes externos también pueden estar asociados a alteraciones en la rigidez de la envoltura celular (Hasim et al., 2017). Las mediciones realizadas a través de la técnica de AFM nos permiten cuantificar la fuerza ejercida sobre la muestra en función de la distancia entre ella y la punta del *cantilever*, reflejando las interacciones dinámicas entre ambas. Entre los parámetros obtenidos se analizó el módulo de Young. Este parámetro es una medida de la elasticidad o rigidez de una muestra: cuanto menor es el módulo de Young, mayor es la deformabilidad de la célula y, por lo tanto, menor es su rigidez (Gonçalves et al., 2017). La Figura 3.12 muestra la distribución de frecuencias del módulo de Young para las concentraciones correspondientes a la CIM y CFM de cada surfactante.

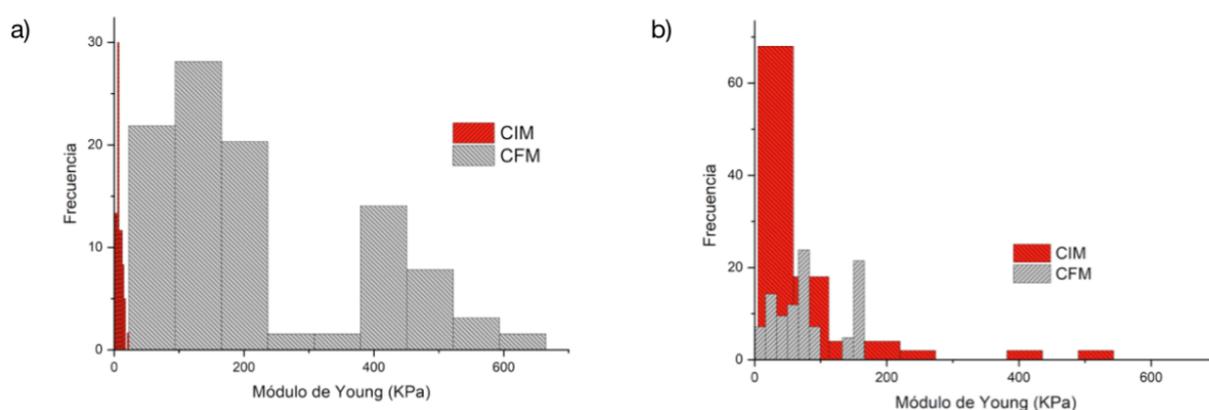


Figura 3.12. Mediciones de rigidez celular (módulo de Young calculado a partir de las curvas de fuerza) después de 30 minutos de incubación con (a) Bz-Arg-NHC₁₂ y (b) Bz-Arg-NHC₁₀ a la CIM o CFM correspondiente.

Los cálculos muestran que las levaduras tratadas con Bz-Arg-NHC₁₀ exponen, mayormente, valores bajos del módulo de Young (menores a 200 kPa) tanto para una concentración igual a la CIM como a la CFM, lo que sugiere que las células poseen baja rigidez. Por otro lado, las levaduras incubadas en presencia de Bz-Arg-NHC₁₂ a una concentración igual a la CFM evidenciaron una distribución más amplia, con valores de módulo de Young de hasta un poco más de 600 kPa, lo que indica que las células tienen rigidez variada, pero por lo general mayor que en el caso de las levaduras tratadas con el derivado de 10 carbonos. En el caso de las células expuestas a una

concentración de Bz-Arg-NHC₁₂ igual a su CIM, las mismas registraron valores muy bajos del módulo de Young, revelando una baja rigidez.

Los resultados antes descritos demuestran que, mayormente, las células de *C. albicans* pierden rigidez después del tratamiento con los tensioactivos, lo que podría explicarse con la



RESULTADOS Y DISCUSION

pérdida de componentes estructural de la membrana celular como los esfingolípidos, responsables de aumentar la rigidez, la estabilidad y la organización estructural de las membranas biológicas (Sullan et al., 2009).

CAPÍTULO 4



CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS



4.1 Conclusiones generales

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo se llegaron a las siguientes conclusiones:

- Se sintetizaron dos surfactantes derivados de arginina (Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂) utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador, los cuales fueron purificados eficientemente mediante cromatografía de intercambio catiónico.
- Tanto Bz-Arg-NHC₁₀ como Bz-Arg-NHC₁₂ demostraron tener actividad antifúngica contra distintas cepas y aislados de *Candida albicans* y *C. tropicalis*.
- Ambos métodos ensayados para la determinación de la CIM y CFM (medida de densidad óptica y resazurina) demostraron ser equivalentes.
- Ambos surfactantes derivados de arginina fueron capaces de reducir la carga fúngica inicial luego de su incubación con las distintas cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis*, observándose mayor eficiencia en el caso del contacto con Bz-Arg-NHC₁₀.
- El análisis de la integridad de la membrana indicó que la permeabilización de la misma es parte del mecanismo involucrado en la actividad fungicida ejercida por Bz-Arg-NHC_n.
- Los análisis por microscopía de fuerza atómica revelaron cambios morfológicos en células tratadas con los surfactantes derivados de arginina, observándose disminución en el tamaño celular y reducción en su rigidez. Son necesarios estudios complementarios para corroborar dichos efectos.



4.2 Perspectivas

Los resultados prometedores obtenidos a partir del trabajo presentado abren una multiplicidad de horizontes que pueden explorarse en relación a este tipo de compuestos, como por ejemplo:

- La síntesis mediante estrategias quimioenzimáticas de surfactantes derivados de otros aminoácidos distintos de la arginina.
- El estudio del poder antimicrobiano frente a un mayor número de microorganismos, incluyendo bacterias y otras especies de *Candida* consideradas como patógenos emergentes, como *C. glabrata*.
- Profundizar en la investigación de los mecanismos de interacción de los tensioactivos derivados de arginina con membranas biológicas como parte del mecanismo antimicrobiano.

CAPÍTULO 5

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- Arendrup MC, M. Cuenca-Estrella, C. Lass-Flörl, & W. Hope. 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)." *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18(7):E246-7.
- Arroyo M, 1998. "Inmovilizacion de Enzimas. Fundamentos, Metodos y Aplicaciones." *Ars Pharmaceutica* 39(2):111-27.
- Belkaid Y, & OJ. Harrison. 2017. "Homeostatic Immunity and the Microbiota - ScienceDirect." *Immunity* 46(4):562-76.
- De Bernardis F, S. Arancia, L. Morelli, B. Hube, D. Sanglard, W. Schäfer, & A. Cassone. 1999. "Evidence That Members of the Secretory Aspartyl Proteinase Gene Family, in Particular SAP2, Are Virulence Factors for Candida Vaginitis." *Journal of Infectious Diseases* 179(1):201-8.
- Brown L, JM. Wolf, R. Prados-Rosales, & A. Casadevall. 2015. "Through the Wall: Extracellular Vesicles in Gram-Positive Bacteria, Mycobacteria and Fungi." *Physiology & Behavior* 176(1):139-48.
- Calderone RA. & PC. Braun. 1991. "Adherence and Receptor Relationships of Candida Albicans." *Microbiological Reviews* 55(1):1-20.
- Castillo JA, MR Infante, A. Manresa, MP Vinardell, M. Mitjans, & P. Clapés. 2006. "Chemoenzymatic Synthesis and Antimicrobial and Haemolytic Activities of Amphiphilic Bis (Phenylacetylarginine) Derivatives." *ChemMedChem* 1(10):1091-98.
- Castillo JA, A. Pinazo, J. Carilla, MR. Infante, MA. Alsina, I. Haro, & P. Clapés. 2004. "Interaction of Antimicrobial Arginine-Based Cationic Surfactants with Liposomes and Lipid Monolayers." *Langmuir* 20(8):3379-87.

- Chellappan S, C. Jasmin, SM. Basheer, KK. Elyas, SG. Bhat, & M. Chandrasekaran. 2006. "Production, Purification and Partial Characterization of a Novel Protease from Marine *Engyodontium Album* BTMFS10 under Solid State Fermentation." *Process Biochemistry* 41(4):956–61.
- Clapés, P. 1999. "Enzymatic Synthesis of Arginine-Based Cationic Surfactants." 0290(June).
- Cornellas A, L. Perez, F. Comelles, I. Ribosa, A. Manresa, & TT. Garcia. 2011. "Self-Aggregation and Antimicrobial Activity of Imidazolium and Pyridinium Based Ionic Liquids in Aqueous Solution." *Journal of Colloid and Interface Science* 355(1):164–71.
- Das I, P. Nightingale, M. Patel, & P. Jumaa. 2011. "Epidemiology, Clinical Characteristics, and Outcome of Candidemia: Experience in a Tertiary Referral Center in the UK." *International Journal of Infectious Diseases* 15(11):e759–63.
- Daza Millone MA. 2011. "Monocapas Autoensambladas de Alcanotioles y α,ω -Alcanoditioles Sobre Oro: Adsorción No Específica de Moléculas Bioactivas, Biomoléculas y Vesículas." 204.
- Fait ME, L. Bakas, GL. Garrote, SR. Morcelle, & MCN. Saparrat. 2019. "Cationic Surfactants as Antifungal Agents." *Applied Microbiology and Biotechnology* 103(1):97–112.
- Fait ME, GL. Garrote, P. Clapés, S. Tanco, J. Lorenzo, & SR. Morcelle. 2015. "Biocatalytic Synthesis, Antimicrobial Properties and Toxicity Studies of Arginine Derivative Surfactants." *Amino Acids* 47(7):1465–77.
- Fait ME, M. Hermet, F. Comelles, P. Clapés, HA. Alvarez, E. Prieto, V. Herlax, SR. Morcelle, & L. Bakás. 2017. "Microvesicle Release and Micellar Attack as the Alternative Mechanisms Involved in the Red-Blood-Cell-Membrane Solubilization Induced by Arginine-Based Surfactants." *RSC Advances* 7(60):37549–58.
- Fait ME, M. Hermet, R. Vazquez, S. Mate, MA Daza Millone, ME Vela, SR. Morcelle, & L. Bakas. 2018. "Volume Expansion of Erythrocytes Is Not the Only Mechanism Responsible for the Protection by Arginine-Based Surfactants against Hypotonic Hemolysis." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 171:134–41.
- Fait ME & SR. Morcelle. 2017. "Estrategias Ecoamigables Para El Desarrollo de Tensioactivos

- Multifuncionales Derivados de Aminoácidos Con Aplicaciones Farmacéuticas y Cosméticas.” *Revista Farmacéutica* 158(2):45–67.
- Felk A, M. Kretschmar, A. Albrecht, M. Schaller, S. Beinhauer, T. Nichterlein, D. Sanglard, HC. Korting, W. Schäfer, & B. Hube. 2002. “Candida Albicans Hyphal Formation and the Expression of the Efg1-Regulated Proteinases Sap4 to Sap6 Are Required for the Invasion of Parenchymal Organs.” *Infection and Immunity* 70(7):3689–3700.
- Flemming HC & J. Wingender. 2010. “The Biofilm Matrix.” *Nature Reviews Microbiology* 8(9):623–33.
- Florence AT, & D. Attwood. 2006. “Physicochemical Principles of Pharmacy.” *American Journal of Pharmaceutical Education* 70(5) Article 122: 1-3.
- de Freitas CDT, JL. De Souza Lopes, LM. Beltramini, R. Sombra Basílio de Oliveira, JT. A. Oliveira, & M. Viana Ramos. 2011. “Osmotin from Calotropis Procera Latex: New Insights into Structure and Antifungal Properties.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1808(10):2501–7.
- Gilbert P, & LE. Moore. 2005. “Cationic Antiseptics: Diversity of Action under a Common Epithet.” *Journal of Applied Microbiology* 99(4):703–15.
- Gonçalves S, PM. Silva, MR. Felício, LN. de Medeiros, E. Kurtenbach, & NC. Santos. 2017. “Psd1 Effects on Candida Albicans Planktonic Cells and Biofilms.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7(June):1–13.
- Gudiña EJ, AI. Rodrigues, V. de Freitas, Z. Azevedo, JA. Teixeira, & LR. Rodrigues. 2016. “Valorization of Agro-Industrial Wastes towards the Production of Rhamnolipids.” *Bioresource Technology* 212:144–50.
- Hammer KA, CF. Carson, & TV. Riley. 2004. “Antifungal Effects of Melaleuca Alternifolia (Tea Tree) Oil and Its Components on Candida Albicans , Candida Glabrata and Saccharomyces Cerevisiae.” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53(6):1081–85.
- Hasim S, DP. Allison, ST. Retterer, A. Hopke, RT. Wheeler, MJ. Doktycz, & TB. Reynolds. 2017. “ β -(1,3)-Glucan Unmasking in Some Candida Albicans Mutants

- Correlates with Increases in Cell Wall Surface Roughness and Decreases in Cell Wall Elasticity.” *Infection and Immunity* 85(1).
- Hirota K, HY, B. Sapaar, T. Matsuo, T. Ichikawa, & Y. Miyake. 2016. “Pathogenic Factors in Candida Biofilm-Related Infectious Diseases.” *Journal of Applied Microbiology* 122(2):321–30.
- Holmes AR, RD. Cannon, & MG. Shepherd. 1991. “Effect of Calcium Ion Uptake on Candida Albicans Morphology.” *FEMS Microbiology Letters* 77(2–3):187–94.
- Kapteyn JC., RC. Montijn, GJP. Dijkgraaf, H. Van Den Ende, & FM. Klis. 1995. “Mannoproteins in Cell Walls of Candida Albicans.” 177(13):3788–92.
- Kourai AS; T. Sumitomo; M. Kurimoto; H. Maseda; K. Hiroki. 2009. “The Mode of the Antifungal Activity of Gemini-Pyridinium Salt against Yeast.” *Biocontrol Science* 14(1):13–20.
- Lim CSY, R. Rosli, HF. Seow, & PP. Chong. 2012. “Candida and Invasive Candidiasis: Back to Basics.” *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 31(1):21–31.
- Lipke PN, & R. Ovalle. 1998. “Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges.” *Journal of Bacteriology* 180(15):3735–40.
- Makovitzki A, D. Avrahami, & Y. Shai. 2006. “Ultrashort Antibacterial and Antifungal Lipopeptides.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(43):15997–2.
- Morán C, MR. Infante, & P. Clapés. 2001. “Synthesis of Glycero Amino Acid-Based Surfactants. Part 1. Enzymatic Preparation of Rac-1-O-(N α -Acetyl-L-Aminoacyl)Glycerol Derivatives.” *Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1* 1(17):2063–70.
- Morán MC, A.Pinazo, L. Pérez, P. Clapés, M. Angelet, MT. García, MP. Vinardell, & MR. Infante. 2004. “Green’ Amino Acid-Based Surfactants.” *Green Chemistry* 6(5):233–40.
- Morcelle SR, CS. Liggieri, MA. Bruno, N. Priolo, & P. Clapés. 2009. “Screening of Plant Peptidases for the Synthesis of Arginine-Based Surfactants.” *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 57(1–4):177–82.

- Mustafa RA, WH. Eldaif, & MH. Arbab. 2018. "Evaluation of Resazurin Micro Titer Assay Method for Detection of Vancomycin Sensitivity for Staphylococcus Aureus." *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology* 4(1):226–29.
- Odds FC. 1994. "Pathogenesis of Candida Infections." *Journal of the American Academy of Dermatology* 31(3):S2–5.
- Parra-Ortega B, H. Cruz-Torres, L. Villa-Tanaca, & C. Hernández-Rodríguez. 2009. "Phylogeny and Evolution of the Aspartyl Protease Family from Clinically Relevant Candida Species." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104(3):505–12.
- Piera E, MR. Infante, & P. Clapés. 2000. "Chemo-Enzymatic Synthesis of Arginine-Based Gemini Surfactants." *Biotechnology and Bioengineering* 70(3):323–31.
- Pinazo A, MA. Manresa, AM. Marques, M. Bustelo, MJ. Espuny, & L. Pérez. 2016. "Amino Acid-Based Surfactants: New Antimicrobial Agents." *Advances in Colloid and Interface Science* 228:17–39.
- Ruiz ME. 2013. "Microscopía de Barrido Por Sondas." *Journal of Chemical Information and Modeling* 53(9):1689–99.
- Russell AD. 2003. "Biocide Use and Antibiotic Resistance: The Relevance of Laboratory Findings to Clinical and Environmental Situations." *Lancet Infectious Diseases* 3(12):794–803.
- Sanjay Makone S., & S. Nivruttirao Niwadange. 2016. "Green Chemistry Alternatives for Sustainable Development in Organic Synthesis." *International Advanced Research Journal in Science, Engineering and Technology* 3(6):113–15.
- Sant DG, SG. Tupe, CV. Ramana, & MV. Deshpande. 2016. "Fungal Cell Membrane—Promising Drug Target for Antifungal Therapy." *Journal of Applied Microbiology* 121(6):1498–1510.
- Sapaar B, A. Nur, K. Hirota, H. Yumoto, K. Murakami, T. Amoh, T. Matsuo, T. Ichikawa, & Y. Miyake. 2014. "Effects of Extracellular DNA from Candida Albicans and Pneumonia-Related Pathogens on Candida Biofilm Formation and Hyphal Transformation." *Journal of Applied Microbiology* 116(6):1531–42.

- Schaller M, HC. Korting, W. Schäfer, J. Bastert, WC. Chen, & B. Hube. 1999. "Secreted Aspartic Proteinase (Sap) Activity Contributes to Tissue Damage in a Model of Human Oral Candidosis." *Molecular Microbiology* 34(1):169–80.
- Singh A, JD. Van Hamme, & OP. Ward. 2007. "Surfactants in Microbiology and Biotechnology: Part 2. Application Aspects." *Biotechnology Advances* 25(1):99–121.
- Sullan RMA., JK. Li, & S. Zou. 2009. "Quantification of the Nanomechanical Stability of Ceramide-Enriched Domains." *Langmuir* 25(22):12874–77.
- Tyagi AK. & A. Malik. 2010. "In Situ SEM, TEM and AFM Studies of the Antimicrobial Activity of Lemon Grass Oil in Liquid and Vapour Phase against Candida Albicans." *Micron* 41(7):797–805.
- Vázquez RF, SM. Maté, VS. Herlax, LS. Bakás, F. Pazos Santos, & C. Álvarez Valcárcel. 2015. "α-HEMOLISINA DE ESCHERICHIA COLI: PROTOTIPO DE LAS TOXINAS RTX (REPEAT IN TOXIN) UN ESTUDIO DE LAS ETAPAS DE SU MECANISMO DE ACCIÓN." 191–213.
- Vieira DB. & AM. Carmona-Ribeiro. 2006. "Cationic Lipids and Surfactants as Antifungal Agents: Mode of Action." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58(4):760–67.
- Wang Q, W. Wang, J. Lei, N. Xu, F. Gao, & H. Ju. 2013. "Fluorescence Quenching of Carbon Nitride Nanosheet through Its Interaction with DNA for Versatile Fluorescence Sensing." *Analytical Chemistry* 85(24):12182–88.
- Webb HK, VK. Truong, J. Hasan, C. Fluke, RJ. Crawford, & EP. Ivanova. 2012. "Roughness Parameters for Standard Description of Surface Nanoarchitecture." *Scanning* 34(4):257–63.