



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

Trabajo Final de la Lic. en Biotecnología y Biología Molecular
Análisis del efecto de un tensioactivo derivado de aminoácido
sobre células planctónicas y biofilms preformados de
bacterias

Tesinista: Agustina Prat
Directora: Dra. G. Paula Di Santo Meztler
Co-Directora: Dra. María Elisa Fait

La Plata, Argentina
- Marzo de 2022 -

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas, por brindarme educación pública, gratuita y de excelencia.

A todo el equipo del CIProVe, en especial a Pau, Eli, Su y Meli, por su confianza, el tiempo dedicado, paciencia y enseñanza.

A Beltina por su gran predisposición y asistencia en el desarrollo de los ensayos.

A Sann, por compartir el último tiempo de esta etapa, por tantas risas.

A mis amigos Carli, Emi, Lu y Mica, personas increíbles que tuve el placer de conocer en este camino, gracias por todos los momentos compartidos que recordar por siempre.

A Ra, por alegrar los días enteros de estudio con mucho mate de por medio, fue hermoso coincidir en esta etapa con vos.

A Sofi, por tantas anécdotas divertidas, gracias amiga.

A mi familia, por el cariño y apoyo incondicional de siempre y por creer en mí.

Índice general

Agradecimientos

iii

1. Introducción	1
1.1. Bacterias y agentes antimicrobianos	1
1.1.1. Anatomía bacteriana	1
1.1.2. Envoltura celular de las bacterias Gram positivas	2
1.1.3. Envoltura celular de las bacterias Gram negativas	3
1.1.4. Membrana citoplasmática bacteriana	4
1.2. Biofilms	4
1.2.1. Dónde se encuentran	5
1.2.2. Desarrollo del biofilm: Etapas	5
1.2.3. Matriz	6
1.2.4. Gradientes dentro del biofilm	7
1.2.5. Tolerancia del biofilm a los antimicrobianos	7
1.3. Surfactantes	9
1.3.1. Definición y clasificación	9
1.3.2. Surfactantes derivados de aminoácidos	9
1.3.3. Surfactantes catiónicos derivados de arginina	10
1.3.4. Surfactantes catiónicos como antimicrobianos: modo de acción	11
2. Objetivos	13
2.1. Objetivos generales del plan de trabajo	13
2.2. Objetivos específicos del plan de trabajo	13
3. Materiales y Métodos	15
3.1. Reactivos	15
3.2. Obtención de Bz-Arg-NHC ₁₀ ·HCl	15
3.2.1. Preparación del biocatalizador	15
3.2.2. Síntesis y extracción de Bz-Arg-NHC ₁₀	15
3.2.3. Purificación y desalado de Bz-Arg-NHC ₁₀ ·HCl	16
3.2.4. Preparación de los <i>stocks</i> de Bz-Arg-NHC ₁₀ ·HCl	16

3.3. Ensayos microbiológicos	16
3.3.1. Microorganismos	16
3.3.2. Medios de cultivo	16
3.3.3. Preparación de los <i>stocks</i> de bacterias	17
3.3.4. Preparación de los cultivos planctónicos	17
3.3.5. Evaluación de la capacidad de formación de biofilms	17
3.3.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Bz-Arg-NHC ₁₀ -HCl sobre cultivos planctónicos y biofilms preformados de bacterias	18
3.3.6.1. Determinación de las concentraciones inhibitoria (CIM) y bactericida mínima (CBM) de Bz-Arg-NHC ₁₀ -HCl	18
3.3.6.2. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM _b) y de erradicación (CE) en biofilms	19
3.3.7. Ensayos de disrupción de biofilms preformados	19
3.4. Análisis estadístico	20
4. Resultados y discusión	23
4.1. Obtención de Bz-Arg-NHC ₁₀	23
4.1.1. Síntesis y purificación del surfactante	23
4.2. Efecto antimicrobiano de Bz-Arg-NHC ₁₀ sobre bacterias planctónicas y biofilms preformados	24
4.2.1. Evaluación de la capacidad formadora de biofilm de los microorganismos indicadores en diferentes medios	24
4.2.2. Análisis del efecto antimicrobiano de Bz-Arg-NHC ₁₀ sobre cultivos planctónicos y biofilms bacterianos	25
4.2.3. 4.2.2.1. Determinación de las CIM y CBM	25
4.2.2.2. Determinación de la CIM _b y CE	27
4.3. Evaluación del poder disruptivo de Bz-Arg-NHC ₁₀ sobre biofilms preformados para diferentes tiempos de tratamiento	30
5. Conclusiones	33
Bibliografía	35

Acrónimos

- % Inh: porcentaje de inhibición del crecimiento
- ACN: acetonitrilo
- ALA: arginina- \mathcal{N} -lauril amida (también Arg-NHC₁₂)
- AN: agar nutritivo
- ANOVA: one-way analysis of variance
- ATCC: American Type Culture Collection
- ACA: arginina- \mathcal{N} -caproil amida (también Arg-NHC₁₀)
- BAEE / Bz-Arg-OEt: \mathcal{N}^{α} -benzoil-L-arginina etil éster
- Bz-Arg-NHC₁₀: \mathcal{N}^{α} -benzoil-L-arginina decilamida
- BS: biosurfactantes activos de superficie CAM: caproil-L-arginina-metil éster
- CE: concentración de erradicación en biofilms
- CIM: concentración inhibitoria mínima
- CIMb: concentración inhibitoria mínima en biofilms
- CIProVe: Centro de Investigación de Proteínas Vegetales
- CN: caldo nutritivo
- CBM: Concentración Bactericida Mínima
- DMSO: dimetilsulfóxido
- DO₆₀₀: densidad óptica a 600 nm
- DO₅₅₀: densidad óptica a 550 nm DTT 1,4-ditio-D, L-treitol
- eDNA: ácido desoxirribonucleico extracelular
- EDTA: ácido etilendiaminotetra-acético
- HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia (en inglés high performance liquid chromatography)
- IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)
- LAM: \mathcal{N}^{α} -lauril-L-arginina-metil éster
- LPS: lipopolisacárido
- PBS: buffer fosfato salino (en inglés phosphate buffered saline)
- PD: poder de disrupción
- PE: fosfatidiletanolamina
- PG: fosfatidilglicerol
- QACs: compuestos de amonio cuaternario
- SF: solución fisiológica

Índice de figuras

1.1. Envoltura de las bacterias Gram positivas. Figura adaptada de Brown 2015.	2
1.2. Envoltura de las bacterias Gram negativas. Figura adaptada de Brown 2015.	3
1.3. Formación de biofilm de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 cultivada en medio mínimo FAB con glucosa (descrito por Heydorn 2000). Figura adaptada de Rasamiravaka 2015.	6
1.4. Mecanismos de tolerancia a antimicrobianos de los biofilms	8
1.5. Clasificación de los surfactantes derivados de aminoácidos según su estructura: (a) de cadena simple, (b) diméricos o gémuni, (c) del tipo glicerolípidos. Figura adaptada de Morán 2004	10
1.6. Estructura de surfactantes derivados de arginina de cadena simple. Figura adaptada de Pinazo 2016.	11
3.1. Esquema de reacción para la síntesis de Bz-Arg-NHC ₁₀ , utilizando papaína adsorbida en poliamida (pap/pol) como biocatalizador.	16
3.2. Esquema de la evaluación de la capacidad de formación de biofilms.	21
3.3. Esquema de la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM _b) y de erradicación (CE) en biofilms.	22
4.1. Estructura del surfactante catiónico N ^α -benzoiL-L-arginina-decilamida (Bz-Arg-NHC ₁₀). ...	23
4.2. Aspecto macroscópico de los biofilms producidos por <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> sobre microplacas de poliestireno en CN (medio rico) y M63 (medio mínimo) suplementado con triptona (T) y/o glucosa (G), teñidos con cristal violeta (0,1%).	24
4.3. Cuantificación espectrofotométrica de la capacidad formadora de biofilms de <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> en CN y M63 suplementado con G y/o T. .	25
4.4. Porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico en función de la concentración de Bz-Arg-NHC ₁₀ para <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i>	26
4.5. Cuantificación espectrofotométrica del crecimiento planctónico de las células presentes en los biofilms de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i>	28
4.6. Determinación de la CE en biofilms preformados. Arriba <i>P. aeruginosa</i> , abajo <i>S. aureus</i> creciendo sobre agar nutritivo.	29
4.7. Efecto del tiempo de tratamiento sobre el poder de disrupción de biofilms preformados de <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i> para Bz-Arg-NHC ₁₀ a las respectivas CIM _b . Los valores se graficaron como la media ± SD.	30

Índice de tablas

4.1. CIM y CBM de Bz-Arg-NHC ₁₀ sobre cultivos planctónicos; CIM _b y CE de Bz-Arg-NHC ₁₀ sobre biofilms preformados.	27
--	----

Capítulo 1

Introducción

1.1. Bacterias y agentes antimicrobianos

La resistencia de las bacterias a las drogas terapéuticas representa una amenaza creciente a la salud pública mundial [1, 2]. En Estados Unidos y el Reino Unido entre el 40 y el 60% de las cepas hospitalarias de *S. aureus* son resistentes a la meticilina (un antibiótico betalactámico del grupo de las penicilinas). Además, las infecciones hospitalarias asociadas a estos y otros microorganismos se asocian con una morbilidad y mortalidad considerables [1, 3]. Los biocidas tuvieron un papel fundamental en las prácticas de control clínicas y domésticas durante más de medio siglo. Hoy en día, el uso de estos es cuestionado, porque la sobreexposición de los microorganismos a los mismos podría conducir no solo al desarrollo de mecanismos de resistencia a estos agentes, sino a resistencia cruzada a antimicrobianos no relacionados, incluidos antibióticos [4, 5].

En general, los biocidas tienen un espectro de actividad más amplio y, mientras que los antibióticos tienden a tener objetivos intracelulares específicos, los biocidas pueden tener múltiples objetivos. Entre estos, los compuestos de amonio cuaternario (QACs) como el cloruro de benzalconio, ha sido utilizado como antimicrobiano [6]. Sin embargo, debido a su considerable toxicidad y su cuestionada biodegradabilidad, se ha propuesto reemplazarlos por otros menos tóxicos como los antimicrobianos surfactantes catiónicos derivados de aminoácidos [7]. Un objetivo común de estos compuestos es la membrana citoplásmica bacteriana. Para alcanzar este objetivo, las moléculas deben atravesar las envolturas celulares. Por tanto, el conocimiento de la biología celular bacteriana puede ayudar al diseño racional de nuevos agentes antibacterianos con capacidades biocidas mejoradas [8].

1.1.1. Anatomía bacteriana

Las bacterias son células procariotas, con formas esféricas (cocos), bastoncillos (bacilos) o de espiral (espirilos, espiroquetas). Estos microorganismos muestran diferentes agrupamientos según la especie: unidades individuales (cocos), pares (*Neisseria gonorrhoeae*), cadenas (*Streptococcus* spp.) o racimos (*Staphylococcus* spp.). En algunos casos, pueden presentar formas variables y se denominan pleomórficas (micoplasmas o *Bacillus anthracis*). También varían en tamaño, con diámetros que oscilan entre los 0,1 y los 50 μm , siendo el diámetro promedio alrededor de 1 μm [9].

Con respecto a la anatomía celular, la envoltura celular procariota puede definirse como un complejo de membranas y macromoléculas asociadas que forman el límite entre el interior y el exterior de la célula. Básicamente, la misma se encuentra formada por la membrana citoplasmática y la pared celular [10]. Sus funciones son variadas e imprescindibles para el desarrollo normal celular: da forma y rigidez a las células, las protege contra la lisis osmótica, actúa como barrera de permeabilidad selectiva y participa en la división celular, entre otras.

Teniendo en cuenta la estructura de la envoltura celular, las bacterias pueden dividirse en dos grupos principales: las Gram positivas (Figura 1.1) y las Gram negativas (Figura 1.2) [11]. Ambos tipos de bacterias muestran una permeabilidad diferente al tinte utilizado en la prueba de Gram debido a diferencias estructurales y de composición.

1.1.2. Envoltura celular de las bacterias Gram positivas

La pared celular de las bacterias Gram positivas es el principal componente de la envoltura de este grupo de microorganismos (Figura 1.1). Se encuentra formada por una capa homogénea de peptidoglicano, un polímero constituido por una secuencia alternante de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico (unidos mediante enlaces β -1,4) con un tetrapéptido (formado por L- y D-aminoácidos alternados) unido a través del extremo amino terminal al carboxilo del ácido *N*-acetilmurámico. Las cadenas de polisacáridos se conectan a través de sus pentapéptidos o por interpuentes, formando entre 20 y 40 capas [12].

La síntesis de peptidoglicano es un proceso de varios pasos que se ha estudiado en detalle para la bacteria Gram positiva *S. aureus* y a su vez es el blanco de acción de antibióticos como la vancomicina, la penicilina, la cefalosporina y derivados [13, 14].

La pared celular de este grupo de bacterias contiene también una gran cantidad de ácidos teicoicos (polímeros de glicerol y ribitol unidos por grupos fosfato, con aminoácidos como la D-alanina o azúcares como la glucosa unidos). Los ácidos mismos pueden estar unidos al peptidoglicano mediante un enlace covalente con el hidroxilo seis del ácido *N*-acetilmurámico, o bien, a los lípidos de la membrana plasmática, en cuyo caso se denominan ácidos lipoteicoicos [15]. Los ácidos teicoicos se extienden hasta la superficie del peptidoglicano y, como están cargados negativamente, contribuyen a la carga negativa de la superficie de las células. Estas moléculas pueden ser fundamentales para mantener la estructura de la pared celular y participan en el proceso de adhesión a superficies [7].

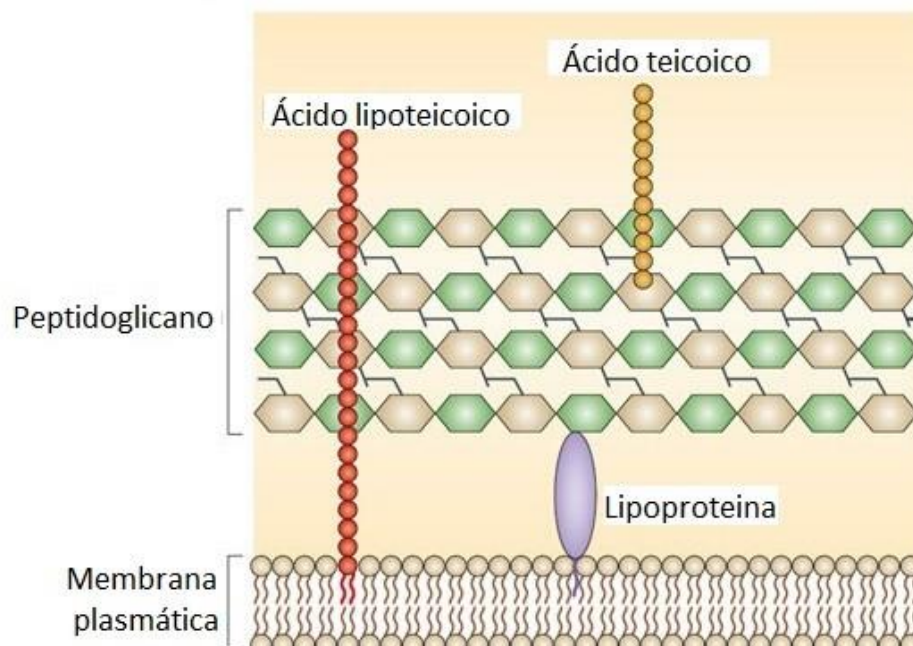


Figura 1.1. Envoltura de las bacterias Gram positivas. Figura adaptada de Brown 2015.

1.1.3. Envoltura celular de las bacterias Gram negativas

La pared celular de bacterias Gram negativas es mucho más compleja que la de las Gram positivas (Figura 1.2). Está formada por solo una o dos capas de peptidoglicano y se ubica entre la membrana citoplasmática y la membrana externa. La proteína de membrana más abundante es la lipoproteína de Braun, una pequeña lipoproteína unida covalentemente al peptidoglicano subyacente, e incluida en la membrana externa a través de su región hidrofóbica [12].

La membrana externa contiene lipopolisacáridos (LPS), los cuales son moléculas grandes y complejas [10]. Están formadas tanto por lípidos como por hidratos de carbono, haciendo que la superficie celular sea altamente hidrofílica. Los LPS están formados por tres componentes: el lípido A (endotoxina), un polisacárido central o core, y la cadena lateral O (antígeno). El lípido A se encuentra inserto en la membrana externa, mientras que el resto de la molécula sobresale de la superficie. Los LPS son importantes por varias razones, entre las que se destacan la estabilización de la estructura de la membrana y su contribución a la carga negativa de la superficie bacteriana, ya que el polisacárido central presenta normalmente azúcares cargados negativamente y grupos fosfato.

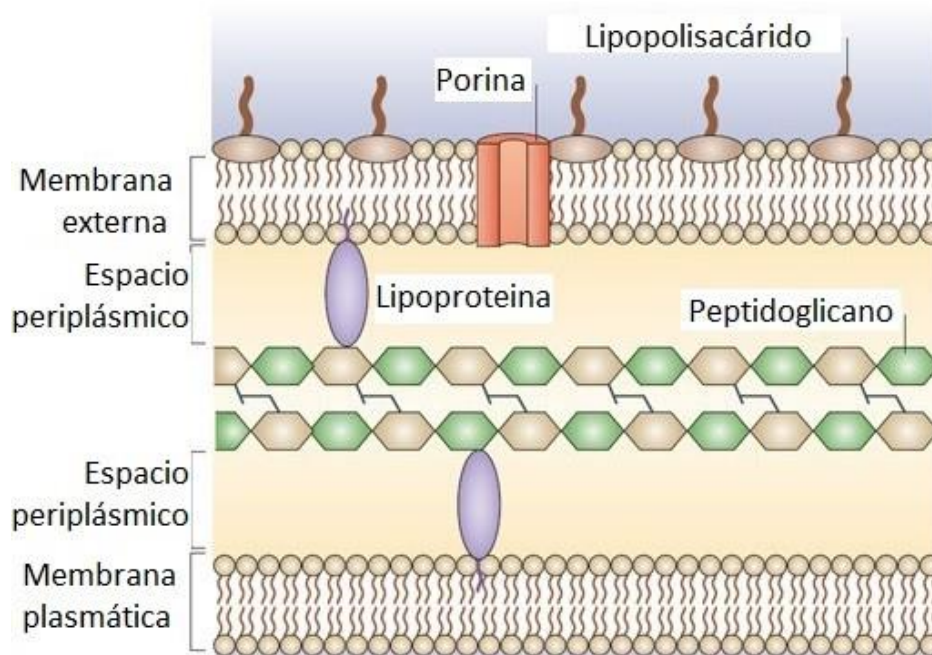


Figura 1.2. Envoltura de las bacterias Gram negativas. Figura adaptada de Brown 2015.

Una de las funciones más importantes de la membrana externa es la de barrera protectora. Por un lado, evita o disminuye la entrada de sales biliares, antibióticos y otras sustancias tóxicas que podrían destruir o lesionar a la bacteria [16]. Sin embargo, su permeabilidad a moléculas pequeñas, como la glucosa y otros monosacáridos, es mayor que la de la membrana plasmática. Esto se debe a la presencia de proteínas, incluyendo porinas, que se agrupan y se extienden a través de la membrana externa para formar canales estrechos por los cuales pueden ingresar moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular [17]. Moléculas mayores a los 600 a 700 Da requieren la presencia de transportadores específicos para transportarse a través de la membrana externa.

1.1.4. Membrana citoplasmática bacteriana

La membrana plasmática es la capa más interna de la envoltura celular de las bacterias, ya sean Gram positivas o Gram negativas [16]. Esta barrera semipermeable consiste en una bicapa de fosfolípidos en la que se insertan diversas proteínas. Su proporción proteínas:lípidos es superior a la de las membranas celulares eucarióticas, llegando a alcanzar valores relativos de 80:20. Esta estructura es de suma importancia para la célula debido a sus roles metabólico y estructural, ya que no sólo sirve como barrera osmótica y selectiva, sino que participa en la generación de energía a través de la respiración celular y en la síntesis de componentes de la pared celular, así como también en el anclaje del material genético y la señalización [18].

Muchos biocidas tienen como objetivo la membrana citoplasmática, sin embargo, para alcanzarla, deben ser capaces además de atravesar el resto de la envoltura celular [19].

Si bien pueden ocurrir cambios en la composición lipídica dependiendo de las condiciones del medio de crecimiento, el concepto de una composición típica de lípidos de las membranas celulares se encuentra aceptado. Asimismo, la composición de fosfolípidos y glicolípidos de un grupo a otro dentro de las bacterias Gram positivas varía en mayor medida que entre grupos Gram negativas. En cualquier caso, una característica común es la presencia de grandes cantidades de fosfolípidos cargados negativamente (como el fosfatidilglicerol o PG) y zwitteriónicos (como la fosfatidiletanolamina o PE), y la ausencia de colesterol. En general, mayores cantidades de PE se encuentran en la membrana interna de bacterias Gram negativas en comparación con la membrana citoplasmática de las bacterias Gram positivas. Por ejemplo, el PG y sus derivados son los únicos fosfolípidos de la membrana de *S. aureus*, mientras que el PE es el componente dominante (82%) de la membrana citoplasmática de *Escherichia coli* [20].

1.2. Biofilms

Uno de los mayores avances en microbiología que se ha realizado en los últimos 50 años ha sido el conocimiento sobre el crecimiento y el desarrollo de microorganismos sobre diferentes superficies en la forma de complejas estructuras denominadas *biofilms* [21, 22, 23].

Las bacterias pueden crecer en la naturaleza bajo dos formas o estados: en forma planctónica, es decir suspendidas libremente en un medio fluido, o en forma sésil adheridas a superficies formando estructuras complejas denominadas biofilms. Resulta interesante que el 99% de todas las células bacterianas existen en calidad de biofilms, mientras que tan solo el 1% vive en estado planctónico [24, 25].

Un biofilm es una comunidad estructurada de células microbianas inmersas en una matriz polimérica, que puede asociarse o adherirse de forma irreversible a una superficie o interfase incluyendo agregados y flóculos microbianos [26, 21]. La adhesión microbiana a superficies y posteriormente el desarrollo del biofilm ha sido reportado en gran variedad de ambientes. Los biofilms constituyen un modo protegido de crecimiento y desarrollo, que le permite a los microorganismos sobrevivir en ambiente hostiles, siendo su comportamiento y fisiología significativamente diferente de la de aquellos microorganismos que crecen en medio líquido [27, 28].

Actualmente, la combinación de técnicas de observación tridimensionales de alta resolución, colorantes moleculares fluorescentes específicos y el desarrollo de equipamiento especializado para el crecimiento y el cultivo de biofilms, ha demostrado que no se trata de simples agregados pasivos de células adheridos a una superficie, sino que constituyen sistemas biológicos complejos, tanto desde el punto de vista estructural como dinámico. La importancia de estas estructuras

microbianas reside en la existencia de un nivel de diferenciación que requiere un sofisticado sistema de comunicación célula-célula y un alto grado de especialización celular [29]. Se sabe que no existe un solo tipo de biofilm y que su formación depende de las especies de microorganismos que lo integran, las interacciones con los efectores inmunes del huésped (si existieran) y las propiedades fisicoquímicas y mecánicas del microambiente. Todo esto se ve reflejado en el elevado nivel de complejidad de las técnicas necesarias para su estudio y el desarrollo de antimicrobianos realmente efectivos para su erradicación [30].

1.2.1. Dónde se encuentran

Los biofilms pueden ser beneficiosos o perjudiciales dependiendo de la superficie donde se encuentren situados y de su composición microbiana [31]. Son uno de los modos de vida más ampliamente distribuidos y exitosos en la Tierra para los microorganismos [32], e impulsan los procesos de los ciclos biogeoquímicos de la mayoría de los elementos en ambientes acuáticos, suelos, sedimentos [33] y subsuperficies [34]. Las aplicaciones biotecnológicas de estas comunidades incluyen la filtración de agua potable, la degradación de aguas residuales y residuos sólidos, y la biocatálisis en procesos como la producción de biocombustibles y diversos productos químicos [35].

Todos los organismos superiores pueden ser colonizados por biofilms [36], cuyo desarrollo puede derivar en infecciones persistentes en plantas y animales, incluidos los humanos [37]. Además, los biofilms son responsables de la bioincrustación y contaminación del agua [38], el deterioro de la calidad higiénica del agua potable [39] y la corrosión de muchos materiales [40].

1.2.2. Desarrollo del biofilm: Etapas

La formación de estas estructuras sobre las superficies es una estrategia adaptativa que sigue un proceso secuencial dinámico y complejo que permite su predicción [41]. Si bien el establecimiento de etapas concretas y definidas en la formación y desarrollo de un biofilm es una simplificación de los procesos que ocurren en condiciones reales [30], se ha llegado a un consenso acerca de las etapas que atraviesa un biofilm en desarrollo.

Inicialmente, las células bacterianas se adhieren a la superficie (ya sea biótica o abiótica) a través de interacciones inespecíficas [42] (Figura 1.3 a, Etapa I). Esta etapa implica interacciones fisicoquímicas atractivas y repulsivas entre las bacterias y la superficie, donde las fuerzas de Lifshitz-van der Waals, las interacciones electrostáticas y las fuerzas hidrofóbicas ácido-base de Lewis son predominantes [43, 42]. El resultado neto entre las fuerzas atractivas y repulsivas dicta la fuerza de la adhesión bacteriana, que es variable dependiendo de la superficie, la especie microbiana y el medio circundante [44].

En muchos casos, tanto el flagelo [45] como el pili [46, 47] poseen un papel importante durante el establecimiento de las interacciones iniciales de las células con la superficie. Otros factores como la rugosidad, la porosidad, la topología de los poros, la carga y la hidrofobicidad/hidrofilicidad de la superficie son igualmente relevantes e influyen directamente en la adherencia bacteriana [48, 49, 50, 51]. Estas primeras interacciones les permiten a las bacterias no solo detectar la superficie, sino también adaptarse progresivamente a ella mediante sucesivos eventos de unión-retracción [52, 53]. Asimismo, la señalización intracelular impulsada por la mecanotransducción contribuye a la producción/expresión de más adherencias para reforzar la adhesión [54, 53].

Una vez lograda la adhesión irreversible de las bacterias a la superficie (Figura 1.3 b, Etapa II), estas crecen y se dividen [21, 55, 56, 57], lo que implica la proliferación celular y la colonización de la superficie y conduce a la activación de segundos mensajeros, comunicación intercelular y secreción inicial de la matriz extracelular [58].

Progresivamente, las microcolonias bacterianas se expanden generando un biofilm más estructurado. (Figura 1.3 c, Etapa III). Posteriormente, los espacios no colonizados se cubren de bacterias, que finalmente colonizan toda la superficie (Figura 1.3 d, Etapa IV). Estas dos últimas etapas contribuyen al crecimiento tridimensional del biofilm.

Finalmente, las bacterias vuelven a entrar en estado “planctónico” y pueden dispersarse para así propagarse y colonizar nuevas superficies (Figura 1.3 e, Etapa V) [59, 60].

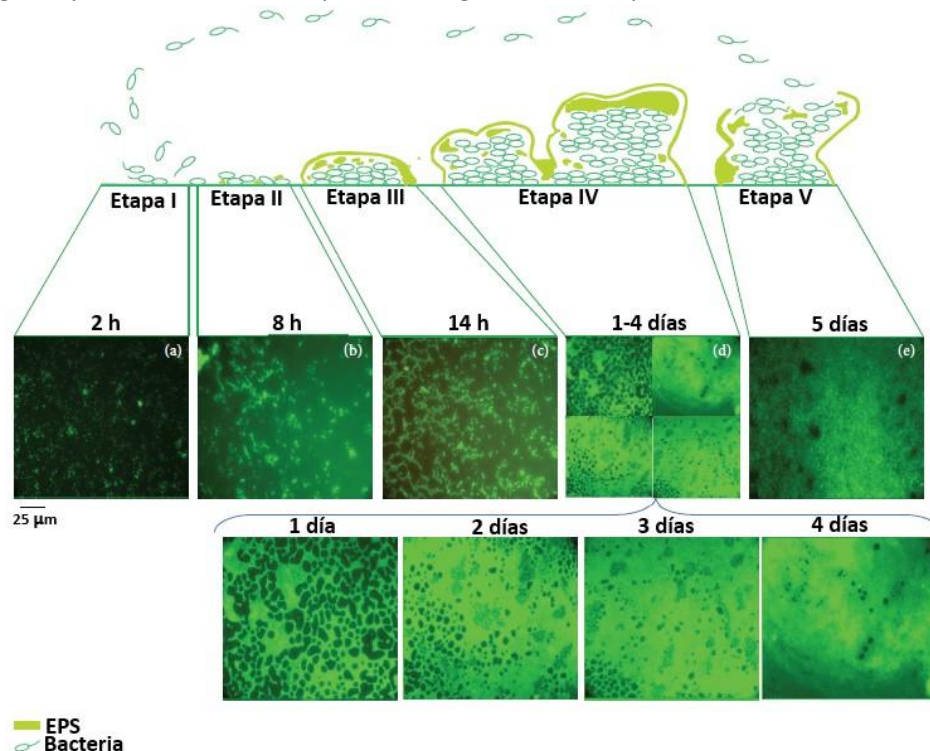


Figura 1.3. Formación de biofilm de *P. aeruginosa* PAO1 cultivada en medio mínimo FAB con glucosa (descrito por Heydorn 2000). Figura adaptada de Rasamiravaka 2015.

1.2.3. Matriz

Las comunidades bacterianas que conforman el biofilm se encuentran embebidas en una matriz conformada por sustancias poliméricas extracelulares (EPS, siglas del inglés *Extracellular polymeric substances*) que mantiene unidas las células microbianas entre sí y a su vez a la superficie [28, 59].

La composición química de la matriz es variable y está influenciada por el medio circundante, la temperatura, el estrés físico y mecánico y las interacciones intercelulares [61]. Su principal componente es el agua, que representa hasta el 97% de su contenido [62]. Los elementos moleculares que confieren las propiedades estructurales y funcionales de la matriz están contenidos en el 3% restante. Entre estos, los exopolisacáridos son una fracción importante de la matriz. En bacterias Gram negativas, algunos de estos polisacáridos son neutros o polianiónicos, incluyendo el alginato y el xantano. Para algunas bacterias Gram positivas, la composición de la

matriz puede ser muy diferente y principalmente catiónica [28]. Las proteínas son el segundo componente más abundante en la matriz, aunque en algunos casos se ha informado que están presentes en mayor proporción que los polisacáridos [63]. Las proteínas estructurales, como las asociadas a la superficie de la célula y las que se unen a los carbohidratos (lectinas), están implicadas en la formación y estabilización de la matriz y constituyen un enlace entre la superficie bacteriana y las EPS [64, 65]. Dependiendo del estado fisiológico de las células, la síntesis y expresión de proteínas puede variar espacial y temporalmente dentro del biofilm [66, 67].

La matriz del biofilm es un complejo de polímeros secretados, nutrientes, metabolitos, productos de la lisis celular y material particulado del entorno. Por lo tanto, además de peptidoglicanos, lípidos, fosfolípidos y otros componentes celulares, contiene todas las clases principales de macromoléculas como proteínas, polisacáridos, ADN y ARN [64].

Se han detectado muchas enzimas extracelulares en los biofilms, muchas de las cuales están implicadas en la degradación de polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y compuestos insolubles como celulosa, quitina y lípidos, lo que permite el crecimiento del biofilm en una amplia variedad de sustratos. Estas enzimas, también ayudan a la descomposición de los biopolímeros de las EPS para ser utilizados como fuentes de carbono y energía en condiciones de escasos nutrientes. Algunas enzimas pueden estar involucradas en la degradación de las EPS estructurales para promover el desprendimiento y dispersión del biofilm [64, 65].

Otro componente importante y abundante en la matriz son los ácidos nucleicos, específicamente el ADN extracelular (eDNA, sigla del inglés “extracellular DNA”). Se ha documentado su importancia para la adhesión a la superficie y el desarrollo del biofilm [68], como fuente de material genético en la transferencia horizontal de genes [69], como fuente de carbono y energía en condiciones de escasos nutrientes [70]. Todos estos componentes se distribuyen entre las células en un patrón no homogéneo, generando numerosos microambientes que pueden variar espacialmente y temporalmente [65]. Las EPS inmovilizan las células del biofilm y las mantienen próximas entre sí, lo que permite una mayor interacción y comunicación entre ellas y la formación de microconsorcios sinérgicos. Además, ecológicamente, la competencia y cooperación en el espacio confinado de la matriz conduce a una adaptación constante de la población [65].

1.2.4. Gradientes dentro del biofilm

Las células bacterianas ocupan diferentes regiones dentro de la arquitectura de un biofilm y, como consecuencia, dentro del mismo existen gradientes de concentración de oxígeno [71], pH [72], y/o de nutrientes [73]. En la parte más interna de los biofilms, la concentración de oxígeno es baja, por lo que se genera una atmósfera anaeróbica y de bajo pH.

Otros fenómenos que ocurren por las alteraciones del microambiente son la disminución del metabolismo bacteriano y de los tiempos de replicación [74].

Además, existe una gran diversidad genética entre las bacterias vivas dentro de los biofilms, lo que se deduce de la presencia de subpoblaciones bacterianas que muestran diferentes fenotipos [75, 76].

1.2.5. Tolerancia del biofilm a los antimicrobianos

Tanto resistencia como “tolerancia” son términos que se utilizan para referirse a una mayor capacidad de un organismo para sobrevivir a la exposición a compuestos que son letales para los organismos susceptibles. En este trabajo, utilizamos el término “resistencia” para denotar una característica genética y hereditaria que se adquiere por mutación o por intercambio de genes y

que permanece incluso cuando las células del biofilm se dispersan. Por el contrario, utilizamos el término “tolerancia” para denotar una característica que es específica del biofilm [77, 78] y que se pierde después de la dispersión a células bacterianas de vida libre [79, 80].

Se ha demostrado que las células bacterianas que componen un biofilm pueden ser hasta mil veces más tolerantes que las células planctónicas frente a un gran número de antibióticos de amplio espectro (como la ampicilina, la estreptomycin y las tetraciclinas) y de biocidas oxidantes del tipo del cloro o el yodo [71, 81, 82]. Algunos de los principales mecanismos de tolerancia de los biofilms frente a los antimicrobianos se resumen a continuación (Figura 1.4).

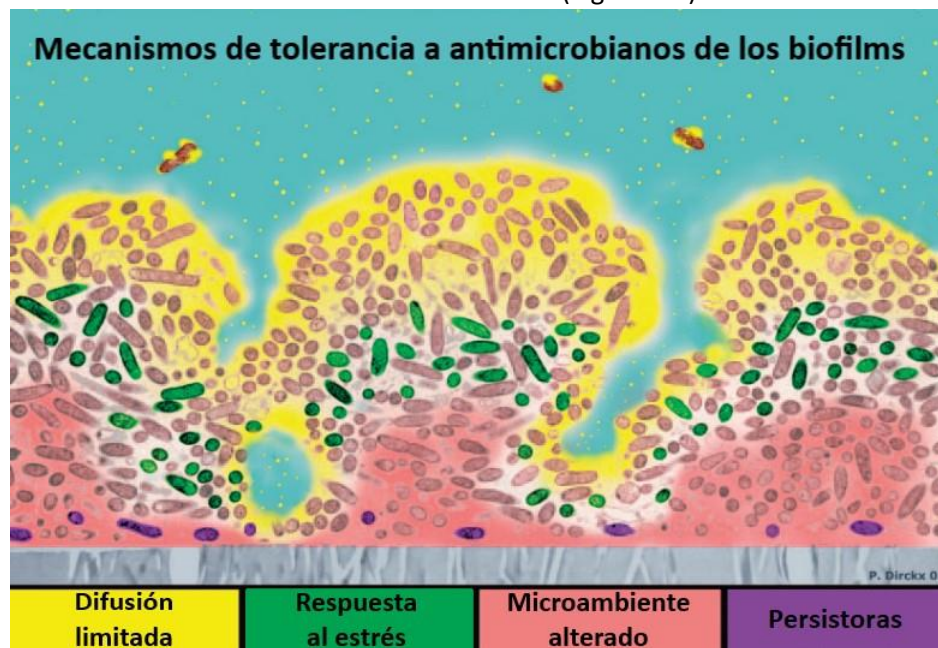


Figura 1.4. Cuatro posibles mecanismos de tolerancia del biofilm a los antimicrobianos formados sobre una superficie (en gris). (a) Inhibición de la penetración de biocidas en zonas externas del biofilm (en amarillo); (b) respuesta al estrés por parte de algunas bacterias (en verde); (c) Alterar el microambiente del biofilm como respuesta (zona rosa); y (d) bacterias tolerantes por diferenciación fenotípica (en violeta). Figura adaptada de Chambliss 2006.

■ Inhibición de la penetración de los antimicrobianos

Varios estudios han concluido que las características fisicoquímicas de la matriz extracelular tienen la habilidad de repeler o retardar la penetración de la mayoría de los agentes antimicrobianos que actualmente se comercializan [83, 84]. La repulsión o el retardo se explican por las diferencias de cargas entre los antimicrobianos y la matriz extracelular. Por ejemplo, los antibióticos aminoglucósidos que poseen una carga positiva quedan atrapados entre las cargas negativas de los EPS de la matriz [85].

■ Alteración del microambiente

Debido a la alta densidad de células en el biofilm, existen gradientes como los descritos en la sección 1.2.4 y surgen condiciones de estrés, produciendo fenotipos que se encuentran como células “durmientes”. Entre ellas están las células inactivas metabólicamente y las células persistoras [86, 87, 88]. La baja tasa de crecimiento se genera por las condiciones del microambiente, ya sea por la poca disponibilidad de oxígeno o de nutrientes en las zonas profundas del biofilm, en donde estas células bajan su actividad metabólica [89].

■ Formación de células microbianas persistentes

La persistencia es la capacidad no heredable de una subpoblación (generalmente menos del 1%) para tolerar la exposición prolongada de antimicrobianos o condiciones de estrés [90]. Esta tolerancia no resulta de mutaciones genéticas que modifican la resistencia celular, sino que estas células constituyen una variante fenotípica sobre la cual la gran mayoría de los antibióticos, que requieren organismos metabólicamente activos, no pueden actuar [91, 92]. La persistencia se observa típicamente cuando la mayoría de la población bacteriana muere rápidamente mientras que una subpoblación sobrevive, a pesar de que la población sea clonal. Estas células “persistentes” entran espontáneamente en un estado de dormancia, donde no crecen ni mueren en presencia de agentes bactericidas, exhibiendo tolerancia a múltiples fármacos [77].

1.3. Surfactantes

1.3.1. Definición y clasificación

El término surfactante es un neologismo adaptado de las palabras inglesas *Surface Active Agent*. Son moléculas de naturaleza anfifílica que poseen una doble afinidad polar-no polar. Estas moléculas pueden reducir la tensión superficial del medio donde se encuentren solubilizados, así como también la tensión interfacial de fluidos inmiscibles [93]. La porción hidrofóbica de la mayoría de estos compuestos consiste en una o dos cadenas hidrocarbonadas (ramificadas, lineales o aromáticas) pudiendo estar eventualmente halogenadas, como en el caso de los fluorosurfactantes, que contienen colas hidrofóbicas fluorocarbonadas.

La clasificación más aceptada para los surfactantes se basa en la naturaleza química y la carga de la región hidrofílica de la molécula. De esta manera, los surfactantes pueden clasificarse en no iónicos, cuando no poseen ningún grupo cargado (como el Tritón X-100, un éster de polietilenglicol), o iónicos, cuando la cabeza polar es portadora de una carga neta. Si la carga neta de la región polar es negativa, dada por ejemplo por la presencia de grupos sulfato, sulfonato o fosfato, el surfactante será aniónico (por ejemplo, el lauril sulfato de sodio o SDS). Contrariamente, si la carga neta es positiva, como en el caso de las sales de amonio cuaternario, se tratará de un surfactante catiónico (como el bromuro de hexadecil-trimetilamonio o bromuro de cetiltrimetilamonio, conocido como CTAB, uno de los principales componentes del Cetrimide). Por otro lado, los surfactantes anfotéricos o zwitteriónicos, presentan una región hidrofílica con ambas cargas, pero sin carga neta (como en el caso de los N-álquil aminoácidos) [94].

Estos compuestos también pueden ser clasificados de acuerdo a su origen en surfactantes sintéticos o naturales, también conocidos como biosurfactantes. Estos últimos son producidos por organismos vivos, principalmente microorganismos, y abarcan moléculas anfifílicas (como glicolípidos y lipopéptidos [95]) que han servido como inspiración para el diseño y obtención de surfactantes basados en estructuras naturales, como es el caso de los derivados de aminoácidos [96, 97, 8, 98].

1.3.2. Surfactantes derivados de aminoácidos

Los surfactantes derivados de aminoácidos son obtenidos a partir de materias primas renovables y su estructura mimetiza la de lipoaminoácidos naturales. Son una de las opciones más utilizadas para aplicaciones en alimentación, farmacéutica y cosmética.

Los aminoácidos tienen al menos dos grupos funcionales: el grupo α -carboxilo y el grupo α -amino. Estos compuestos pueden convertirse fácilmente a surfactantes de cadena simple con una molécula reactiva portadora de una cadena hidrofóbica, como ácidos grasos, alcoholes, ésteres o aminas grasas [99]. La cadena hidrofóbica puede introducirse en la estructura del aminoácido a través de enlaces del tipo amida o éster.

Dado que la región polar de la molécula estaría dada por la porción aminoacídica, el uso de aminoácidos ácidos, básicos o neutros como material de partida daría lugar a tensioactivos aniónicos, catiónicos o no iónicos, respectivamente. Esta región estaría implicada además en la determinación de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los compuestos resultantes. Desde el punto de vista económico y ambiental, los surfactantes con solo un aminoácido en la región polar y una única cadena alquílica (Figura 1.5 a) son compuestos altamente atractivos por tener una vía sintética más simple [8]. Sin embargo, las cadenas alifáticas y los aminoácidos pueden combinarse de distintas maneras generar otros tipos de estructuras. En el caso de los surfactantes del tipo gémuni, la molécula se encuentra formada por dos restos anfifilos iguales, constituidas cada uno por una cabeza polar y una cola hidrofóbica, unidos covalentemente entre sí mediante un espaciador (Figura 1.5 b). Los glicerolípidos por su parte, consisten en una cabeza polar unida a una o dos colas hidrofóbicas a través de un esqueleto de glicerol (Figura 1.5 c) [100].

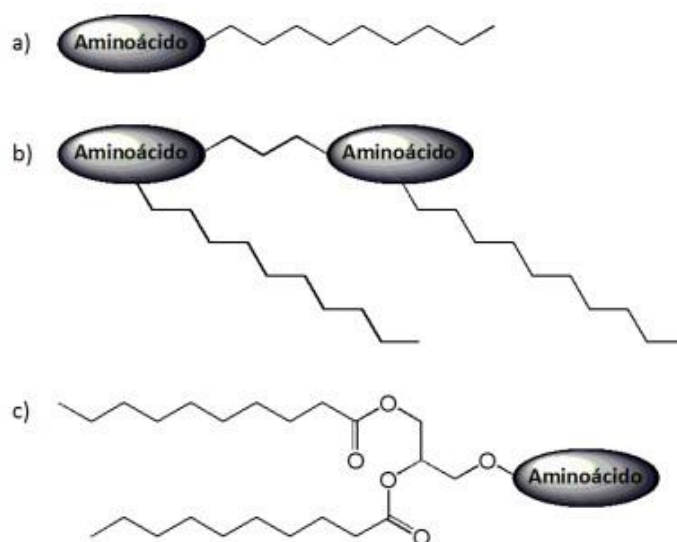


Figura 1.5. Clasificación de los surfactantes derivados de aminoácidos según su estructura: (a) de cadena simple, (b) diméricos o gémuni, (c) del tipo glicerolípidos. Figura adaptada de Morán 2004

La obtención de surfactantes derivados de aminoácidos se ha llevado a cabo tanto por síntesis química [101, 102, 103] como quimioenzimática [104, 105, 106]. El concepto de surfactante de base biológica ha llevado a la consideración de hacer uso de métodos biotecnológicos, como aquellos catalizados por células enteras o enzimas aisladas. Este proceso de obtención, denominado biocatálisis, ha mostrado varias ventajas y ofrece una perspectiva de diseño de procesos industriales limpios, con numerosas aplicaciones. De esta manera se contribuiría al desarrollo de alternativas más benignas para el medio ambiente, utilizando materias primas renovables y reduciendo el consumo de energía y la contaminación en sus propios orígenes [107, 108].

1.3.3. Surfactantes catiónicos derivados de arginina

Entre los surfactantes monocatenarios catiónicos derivados de aminoácidos, los derivados de arginina tienen excelentes propiedades de agregación y adsorción, actividad antimicrobiana de amplio espectro, buena biodegradabilidad, baja toxicidad potencial y bajo impacto ambiental [8]. La presencia del grupo guanidinio en estas estructuras anfífilas proporciona una amplia variedad de compuestos con buenas propiedades biológicas [106].

Los mismos pueden clasificarse en tres tipos: los N^α -acil arginina alquil ésteres (Figura 1.6 a), en los cuales la cadena hidrocarbonada va unida al grupo α -amino de la arginina mediante un enlace amida; las arginina- N -alquilamidas (Figura 1.6 b); y los arginina- O -alquil ésteres (Figura 1.6 c). Las principales diferencias entre estas familias de compuestos incluyen el tipo de enlace que participa en la unión de la cola hidrocarbonada al residuo de arginina, la posición del mismo respecto del carbono α de la arginina (unión a través del grupo α -amino o del α -carboxilo) y la cantidad de cargas positivas presentes en la porción hidrofílica de la molécula [100].

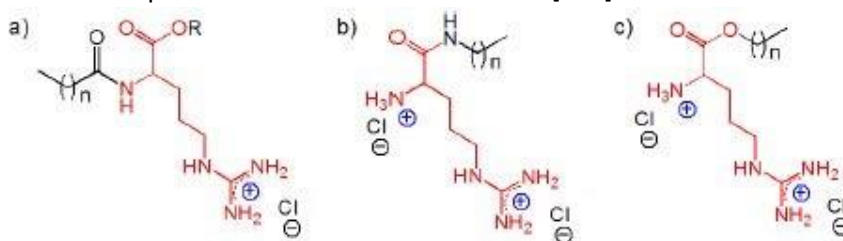


Figura 1.6. Estructura de surfactantes derivados de arginina de cadena simple. Figura adaptada de Pinazo 2016.

1.3.4. Surfactantes catiónicos como antimicrobianos: modo de acción

La superficie exterior de las células lleva una carga negativa neta, estabilizada a menudo por la presencia de cationes divalentes como el Mg^{+2} y el Ca^{+2} . Esta carga se encuentra asociada a la presencia de los ácidos teicoicos y polisacáridos en las bacterias Gram positivas, el lipopolisacárido (LPS) en las bacterias Gram negativas y al predominio de fosfolípidos zwitteriónicos (fosfatidiletanolamina) y lípidos cargados negativamente (fosfatidilglicerol y cardiolipina) en la membrana citoplasmática de ambos tipos de bacterias. Teniendo en cuenta esto, no resulta sorprendente que muchos agentes con actividad antimicrobiana sean catiónicos y tengan una alta afinidad de unión a la membrana plasmática de las células bacterianas [109].

Un factor común en la estructura de numerosos agentes antimicrobianos es la presencia de una fuerte carga positiva junto con una región hidrofóbica, como en los casos de los tensioactivos catiónicos, donde los compuestos de amonio cuaternario (QACs) representan los biocidas más utilizados. El modo de acción de estos biocidas catiónicos involucra la integración de las moléculas de surfactante en la membrana citoplasmática de las células bacterianas: luego de interaccionar electrostáticamente, los monómeros de surfactante penetran en la membrana plasmática, ubicándose la región hidrofóbica de los mismos en el interior de la bicapa lipídica y quedando la cabeza polar alineada con la región hidrofílica de los fosfolípidos [110].

Trabajos previos de nuestro grupo sugieren que la presencia del grupo benzoilo unido a la cabeza polar de (Bz-Arg-NHC₁₀) podría conducir a una inserción efectiva del surfactante en la bicapa lipídica de las membranas microbianas y sería la responsable del aumento de la actividad

antimicrobiana contra las bacterias en comparación con otros tensioactivos derivados de arginina que carecen de este grupo [111]. Este comportamiento se podría atribuir a la presencia del grupo benzoilo, que aumentaría el carácter hidrófobo de la molécula, mejorando su capacidad de penetrar a través de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Interesantemente, esta tendencia también fue notada por Perinelli y colaboradores, quienes encontraron que la presencia de un grupo análogo en tensioactivos derivados de aminoácidos mejoraron el efecto antimicrobiano de este tipo de compuestos [112].

Capítulo 2

Objetivos

2.1. Objetivos específicos del plan de trabajo

1. Obtener el surfactante derivado de arginina Bz-Arg-NHC₁₀ empleando papaína inmovilizada por adsorción en poliamida como biocatalizador.
2. Purificar el compuesto obtenido mediante cromatografía de intercambio catiónico.
3. Realizar un *screening* en diferentes medios (ricos y mínimos) para evaluar la capacidad formadora de biofilms de las cepas propuestas como microorganismos indicadores.
4. Determinar las concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas (CIM y CBM, respectivamente) de Bz-Arg-NHC₁₀ frente a *P. aeruginosa* y *S. aureus*.
5. Evaluar el efecto de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre bacterias sésiles a través de la determinación de las concentraciones inhibitorias y de erradicación en biofilms (CIMb y CE, respectivamente).
6. Poner a punto un protocolo que permita conocer el efecto de los compuestos obtenidos sobre biofilms bacterianos preformados.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1. Reactivos

En el presente trabajo se emplearon los siguientes reactivos: el extracto crudo de papaína (EC 3.4.22.2, del látex de frutos de *Carica papaya*; 3,11 UI/ mg sólido, una unidad enzimática – UI – hidroliza 1,0 μmol de N $^{\alpha}$ -benzoil-arginina etil éster hidrocloreuro por minuto a pH 6,2 y 25 °C) y tamices moleculares (4°A) de Fluka, la Poliamida-6 (EP-700, tamaño de partícula <800 μm , diámetro promedio de poro 50–300 nm, área específica calculada según el método BET 8,4 $\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) fue una contribución de Akzo, decilamina y N $^{\alpha}$ -benzoil-L-arginina etil éster (BAEE) de Sigma Aldrich, y 1,4-ditiotreitol (DTT) de Invitrogen. El resto de los reactivos y solventes empleados en este trabajo fueron de calidad analítica o superior.

3.2. Obtención de Bz-Arg-NHC₁₀·HCl

3.2.1. Preparación del biocatalizador

Como biocatalizador para las reacciones de condensación enzimática, se preparó papaína adsorbida sobre poliamida según se describe en Morcelle *et al.* 2009 [113]. Para ello, se disolvieron 100 mg de extracto enzimático junto con 150 mg de DTT en 1 ml de buffer bórico-borato (0,1 M), pH 8,5 conteniendo EDTA (1 mM). A continuación, se le agregó 1 g de poliamida como soporte sólido y se homogeneizó agitando vigorosamente en vórtex. Finalmente, el biocatalizador se liofilizó y almacenó a -20 °C hasta su utilización.

3.2.2. Síntesis y extracción de Bz-Arg-NHC₁₀

Para la preparación de la mezcla de reacción se disolvió BAEE (20 mM) y decilamina (30 mM), en acetonitrilo anhidro (ACN, previamente almacenado con tamices moleculares) conteniendo 0,25% (v/v) de agua. La reacción de síntesis fue iniciada por el agregado de 1 g del biocatalizador a 10 ml de la mezcla de reactivos bajo atmósfera de nitrógeno, en un erlenmeyer cerrado herméticamente con tapa esmerilada, con agitación constante (150 rpm) a 37 °C durante 72 h. Luego de la incubación, se separó el biocatalizador del medio de reacción por filtración a través de papel. A continuación, se realizaron 3 lavados del mismo con 10 ml de ACN, agitando con vórtex y filtrando con papel en cada etapa, y 3 lavados con 10 ml de éter sulfúrico, repitiendo la metodología, con el objetivo de eliminar la amina remanente sin reaccionar. Se descartó el filtrado y el biocatalizador fue colocado en desecador al vacío durante 20 min, con el fin de eliminar el resto del solvente. Finalmente, se extrajo el producto de reacción adsorbido en la superficie del biocatalizador mediante 3 lavados con 10 ml de

una mezcla MeOH/H₂O 4:1. El extracto obtenido fue filtrado con una membrana de nylon 0,22 μ m (Osmonics) y el producto se separó por cromatografía de intercambio catiónico.

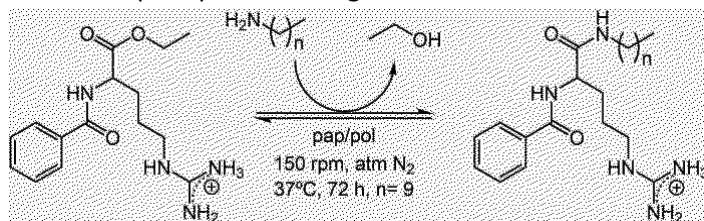


Figura 3.1. Esquema de reacción para la síntesis de Bz-Arg-NHC₁₀, utilizando papaína adsorbida en poliamida (pap/pol) como biocatalizador.

3.2.3. Purificación y desalado de Bz-Arg-NHC₁₀·HCl

La purificación del surfactante Bz-Arg-NHC₁₀, se realizó por cromatografía de intercambio catiónico en un equipo Akta Purifier 10 (GE Healthcare), utilizando una columna (12 ml³ volumen de lecho) con un relleno SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) según lo descrito por Fait *et al.*, (2015) [114]. Las fases móviles empleadas fueron buffer bórico-borato 0,01 M, pH 8,5 con 50% (v/v) de etanol (buffer A) y buffer bórico-borato 0,01 M, pH 8,5 con 50% (v/v) de etanol y NaCl 1 M (buffer B). En cada corrida cromatográfica se inyectó 1 ml de muestra. El material no retenido fue eluido mediante el lavado con dos volúmenes de columna (VC) de buffer A. La elución del surfactante se logró seguidamente aumentando la concentración de buffer B al 31% durante 2 VC. Finalmente, la columna fue lavada con buffer B, y reequilibrada a las condiciones iniciales previamente a iniciar una próxima corrida cromatográfica. El flujo se mantuvo a 1 ml/min a lo largo de todo el proceso y la detección de los picos cromatográficos se realizó espectrofotométricamente a 215 y 254 nm. Las fracciones recolectadas conteniendo el surfactante purificado (Bz-Arg-NHC₁₀·HCl), fueron reunidas y concentradas mediante evaporación del solvente en rotavapor (Heidolph). Finalmente, el producto fue desalado por precipitaciones sucesivas con etanol absoluto (3×10 ml), centrifugación para separar las sales (9000×g, 15 min, 8 °C, centrifuga Hermler) y evaporación del solvente en rotavapor.

3.2.4. Preparación de los stocks de Bz-Arg-NHC₁₀·HCl

El *stock* de Bz-Arg-NHC₁₀·HCl se preparó en DMSO estéril a una concentración 50 mM y se almacenó a -20 °C.

3.3. Ensayos microbiológicos

3.3.1. Microorganismos

Para los ensayos microbiológicos se emplearon dos cepas de bacterias Gram negativas *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, y una Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

3.3.2. Medios de cultivo

Los medios líquidos de cultivo empleados para el crecimiento de los microorganismos fueron caldo nutritivo (CN, Biokar Diagnostics) y medio mínimo M63 suplementado con triptona (T), glucosa (G) o ambos. El medio M63 se preparó de acuerdo a las especificaciones de [115]. El agar nutritivo (AN) se preparó mediante la adición de agar al CN en una concentración 1,5% (p/v). Todos los medios de cultivo fueron preparados según las indicaciones de cada fabricante y esterilizados a 121 °C durante 20 min y 1 atm de sobrepresión.

3.3.3. Preparación de los *stocks* de bacterias

Los *stocks* glicerolados usados para este trabajo se prepararon a partir del estriado de las cepas de referencia (conservadas en glicerol a -80 °C) sobre placas de AN a 37 °C, *overnight*. Una colonia aislada sobre la estría se seleccionó para realizar el cultivo líquido a 37 °C, con agitación orbital (150 rpm), *overnight*. Luego de la incubación, a 780 μ l del cultivo se le añadieron 220 μ l de glicerol estéril. Se almacenaron algunas alícuotas a -20 °C para uso cotidiano y otras a -80 °C como *stock* de resguardo. Las cepas fueron caracterizadas por la inspección de la morfología de sus colonias creciendo sobre AN y observación microscópica, previa tinción de Gram.

3.3.4. Preparación de los cultivos planctónicos

A partir de los *stocks* glicerolados se realizó un aislamiento en estrías sobre placas de AN incubando *overnight* a 37 °C. A partir de una colonia aislada se prepararon cultivos planctónicos en tubos Falcon estériles conteniendo 3 ml de CN. Se incubó *overnight* a 37 °C con agitación orbital (150 rpm) para garantizar la correcta oxigenación del cultivo. Con la finalidad de remover el medio, los cultivos fueron centrifugados a 5000 rpm por 15 min. Luego se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en el medio indicado para cada ensayo. Finalmente, se ajustó la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de las suspensiones de acuerdo a cada ensayo.

3.3.5. Evaluación de la capacidad de formación de biofilms

Se evaluó la capacidad de formación de biofilms de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli* en CN (medio rico) y M63 (medio mínimo) suplementado con T y/o G. Se utilizó el método de cultivo en microplacas estériles de poliestireno de 96 pocillos.

Para la preparación de las suspensiones bacterianas se utilizó la metodología descrita en la sección 3.3.4, resuspendiendo las bacterias y ajustando su DO_{600} a 0,2 en CN, M63 con T, M63 con G o M63 con T y G.

Para el ensayo se sembraron 125 μ l de las suspensiones de bacterias preparadas en los medios previamente indicados en la microplaca. La placa se incubó a 37 °C en cámara húmeda durante 24 h. Luego de la incubación, el crecimiento planctónico se evaluó trasvasando el sobrenadante con las células planctónicas a una hilera de pocillos vacíos en la placa y midiendo DO_{600} . Sobre los pocillos conteniendo los biofilms se realizaron cuidadosamente 2 lavados con pipeta y agua destilada con el fin de remover las células no adheridas. Posteriormente, la placa se dejó secar durante 30 min en estufa a 60 °C para fijar la biomasa sécil.

La tinción de los biofilms se llevó a cabo por adición de 150 μ l en cada pocillo de una solución acuosa conteniendo 0,13% (p/v) de CV con 5% (v/v) de EtOH y 2% (v/v) de formol. Se incubó durante 10-15 min a temperatura ambiente; se descartó el colorante por inversión de la placa sobre un recipiente de descarte y se realizaron 2 lavados con agua destilada, sumergiendo secuencialmente la placa en dos recipientes preparados para tal fin.

Se dejó secar la placa sobre papel absorbente para eliminar el líquido *overnight*.

Para la extracción del colorante fijado en los pocillos se agregaron 200 μ l de solución decolorante (ácido acético (AcH) 30% (v/v) en H₂O) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. El contenido de cada pocillo se homogeneizó y 125 μ l se trasladaron a una nueva microplaca para la medida de la absorbancia a DO₅₅₀ nm en el lector de microplacas Tecan (Infinite M200 Pro). Se realizó un ANOVA y luego un postest para comparar en todas las condiciones cuales fueron significativamente diferentes. Para este ensayo se incluyeron controles negativos (medios de cultivo en ausencia de inóculo).

3.3.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de Bz-Arg-NHC₁₀·HCl sobre cultivos planctónicos y biofilms preformados de bacterias

Utilizando los microorganismos que fueron capaces de formar un biofilm moderado o fuerte, se estudió el efecto antimicrobiano del tensioactivo sobre cultivos planctónicos y biofilms preformados según las condiciones optimizadas en la sección 3.3.5.

3.3.6.1. Determinación de las concentraciones inhibitoria (CIM) y bactericida mínima (CBM) de Bz-Arg-NHC₁₀·HCl

■ Determinación de la CIM

La actividad antimicrobiana del surfactante Bz-Arg-NHC₁₀·HCl fue evaluada frente a cultivos planctónicos de *P. aeruginosa* y *S. aureus* según el ensayo de microdilución (diluciones seriadas a la mitad (1/2) de las soluciones del surfactante) en CN, utilizando microplacas estériles de 96 pocillos (Extragene).

Con el objetivo de obtener un valor más aproximado de la CIM y considerando los valores obtenidos en el ensayo anterior, se realizó la determinación de la CIM utilizando un rango de concentraciones acotado. Para ello, se colocaron 125 μ l de soluciones de distinta concentración de Bz-Arg-NHC₁₀·HCl preparadas en CN. Luego se añadieron 2,5 μ l de las suspensiones bacterianas correspondientes, preparadas según la sección 3.3.4 en solución fisiológica estéril (SF, 8,5 g/l NaCl) y ajustando la DO₆₀₀ de las mismas a 0,15 (equivalente al 0,5 de la escala de McFarland, $1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

Se incluyeron controles positivos de crecimiento (pocillos que no contenían surfactante; estos fueron inoculados con 2,5 μ l de la suspensión bacteriana sobre 125 μ l de CN) y controles negativos (pocillos que solo contenían 125 μ l CN, sin inóculo). Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se realizó la medida de la DO₆₀₀ de cada pocillo antes (tiempo 0) y después de la incubación (tiempo 24 h) utilizando un lector de microplacas.

Para cada cepa, la actividad antibacteriana fue expresada como porcentaje de inhibición del crecimiento (% Inh), según la siguiente ecuación: $\%Inh = [1 - (DO_c/DO_0)] \times 100$, donde DO_c representa el cambio de la DO_{600} por efecto del tratamiento con el surfactante mientras que DO_0 es la DO_{600} del pocillo control (la DO_{600} media de las bacterias crecidas en CN y ausencia del surfactante se consideró como 100% de viabilidad). La CIM fue definida como la mínima concentración del surfactante capaz de inhibir completamente el crecimiento microbiano (% Inh > 95%).

■ Determinación de la CBM

Para la determinación de la CBM, se tomaron alícuotas de 10 μ l de los pocillos que no evidenciaron crecimiento visible (cambio en la $DO_{600}=0$) y mediante la siembra en gota, se sembraron en AN libre del surfactante. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C. La CBM para cada microorganismo se definió como la mínima concentración del surfactante en el que no se observó el desarrollo visible de colonias.

3.3.6.2. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM_b) y de erradicación (CE) en biofilms

■ Formación del biofilm

Este ensayo consta de varias etapas. La primera etapa es la formación del biofilm para la cual se inocularon los pocillos de la microplaca con 100 μ l de la suspensión de bacterias ajustada su DO_{600} 0,1. Se incluyeron controles positivos (100 μ l de la suspensión de inóculo) y controles negativos (pocillos con 100 μ l de CN). Las placas se incubaron en aerobiosis a 37 °C durante 24 h en cámara húmeda. Luego de la incubación se descartó suavemente el sobrenadante utilizando una pipeta automática. Los pocillos se lavaron una vez con 150 μ l de buffer fosfato salino (PBS) para eliminar las células planctónicas.

■ Preparación de las diluciones del surfactante y tratamiento

La segunda etapa consiste en el tratamiento del biofilm con el surfactante. Basándonos en los valores obtenidos la CIM planctónica y la CBM, se realizaron diluciones del surfactante en CN relativizadas a este valor, considerando un rango de concentraciones de entre 1 y 10 veces la CIM correspondiente para cada cepa. Sobre los biofilms previamente formados, se colocaron 200 μ l de las diluciones de Bz-Arg-NHC₁₀-HCl siguiendo la serie de diluciones. A los controles positivos y negativos se les agregó 200 μ l de CN. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en cámara húmeda.

■ Etapa de recuperación

La tercera etapa es la recuperación del biofilm post-tratamiento con el surfactante. Luego de transcurridas las 24 h, se retiró el sobrenadante cuidadosamente con pipeta automática y se lavaron suavemente los pocillos con 200 μ l de PBS estéril para remover las células no adheridas.

A continuación, se agregaron 200 μ l de CN y las células adheridas se resuspendieron mediante el raspado del biofilm con la punta del tip. Para el raspado se definió una secuencia de movimientos que se repitió en todos los pocillos. Se incubaron las microplacas en aerobiosis durante 6 h 37 °C sin agitación. Finalmente, se trasvasaron 100 μ l del medio de recuperación con

las bacterias a una nueva placa y se midió la DO_{600} en un lector de microplacas para evaluar el crecimiento planctónico. Se estableció la CIM_b como la menor concentración del surfactante en la cual no se detectó crecimiento comparado con el control negativo. Se evaluó la diferencia entre la CIM y CIM_b para conocer el incremento de la tolerancia al antimicrobiano en el biofilm.

■ Determinación de la CE

De los pocillos donde no se observó crecimiento, se tomaron alícuotas de 10 μ l de cada uno de los pocillos del medio de recuperación y se sembraron sobre placas conteniendo AN, las cuales se incubaron durante 24 h a 37 °C. Para cada bacteria se estableció la CE como la menor concentración de surfactante para la cual no hubo crecimiento de colonias por observación macroscópica.

3.3.7. Ensayos de disrupción de biofilms preformados

Se evaluó el poder disruptivo del surfactante sobre biofilms preformados para diferentes tiempos de tratamiento empleando el protocolo descrito por O'Toole et al. (2011) [115] con modificaciones menores. Para ello se preformaron biofilms sobre placas de 96 pocillos siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.3.6.2. Luego de la eliminación de bacterias no adheridas por lavado con PBS, se añadió a cada pocillo 200 μ l el surfactante en CN a una concentración igual a la CIM_b correspondiente a cada microorganismo.

La incubación con Bz-Arg-NHC₁₀-HCl se realizó a intervalos de tiempo preestablecidos incubando la placa a 37 °C en cámara húmeda. El tiempo de tratamiento se estableció en intervalos de 30 min para un rango que incluyó los 120 y 300 min de exposición al surfactante. Se incluyó como control positivo pocillos con biofilms preformados incubados con CN (sin tratamiento) y controles negativos (sólo CN). Para la cuantificación de la disrupción sobre los pocillos conteniendo los biofilms, se realizaron 2 lavados con agua destilada para remover las células no adheridas. Luego, la placa se dejó secar durante 30 min en estufa a 60 °C para fijar la biomasa sécil. La tinción de los biofilms se llevó a cabo por adición de 200 μ l de una solución acuosa 0,13% (p/v) de cristal violeta (CV) según el protocolo detallado en la sección 3.3.5. El efecto sobre los biofilms fue expresado como el porcentaje de disrupción del biofilm respecto al control positivo.

3.4. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados al menos por triplicado. Los resultados fueron contrastados utilizando el análisis de varianza (ANOVA, one-way analysis of variance) y el test de Tukey utilizando el software GraphPad Prism®. P-values < 0,05 fueron considerados como significativos.

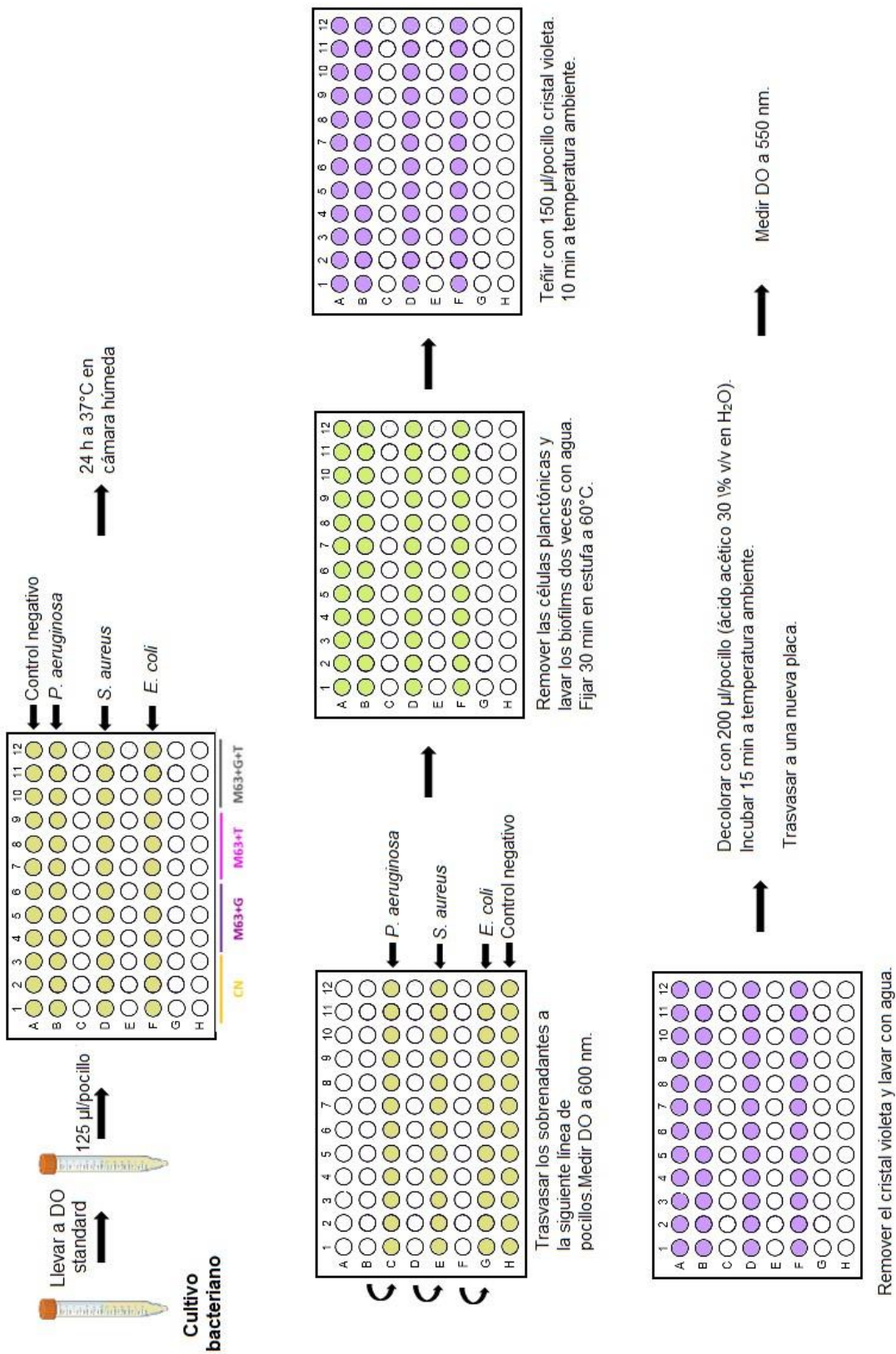


Figura 3.2. Esquema de la evaluación de la capacidad de formación de biofilms.

Capítulo 4

Resultados y discusión

En este trabajo, se caracterizó la actividad antimicrobiana del compuesto Bz-Arg-NHC₁₀ frente a células planctónicas y sobre biofilms preformados. En primer lugar, se evaluó la capacidad de formación de biofilm en CN y Medio mínimo M63 suplementado, de dos bacterias Gram negativas, *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, y una Gram positiva, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. En segundo lugar, se determinaron la CIM y CBM del compuesto en cultivos planctónicos y en base a esos valores se caracterizó su actividad antimicrobiana frente a biofilms a través de la estimación de la CIM_b y la CE. Finalmente, se evaluó el poder de disrupción de biofilms preformados a tiempos cortos.

4.1. Obtención de Bz-Arg-NHC₁₀

4.1.1. Síntesis y purificación del surfactante

El compuesto Bz-Arg-NHC₁₀ fue obtenido empleando una estrategia biocatalítica que involucra la condensación enzimática del reactivo comercial *N*^α-benzoyl-L-arginina etil éster (BAEE) y decilamina, utilizando papaína inmovilizada por adsorción en poliamida como biocatalizador, según la metodología descrita en la sección 3.2. El surfactante fue purificado por cromatografía de intercambio catiónico y desalado por precipitaciones sucesivas con etanol absoluto, obteniéndose un compuesto de alta pureza, de color amarillo-anaranjado y textura levemente oleosa. La estructura química de Bz-Arg-NHC₁₀·HCl se presenta en la Figura 4.1.

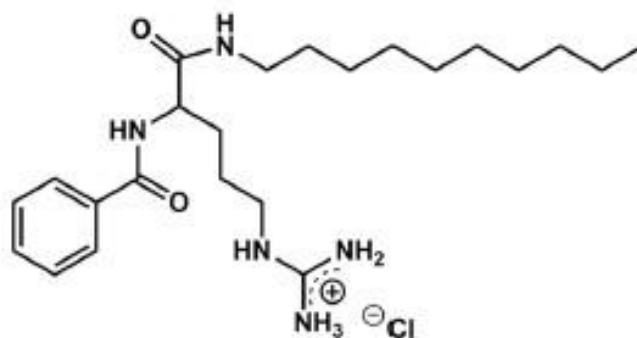


Figura 4.1. Estructura del surfactante catiónico *N*^α-benzoyl-L-arginina-decilamida (Bz-ArgNHC₁₀).

La estrategia de inmovilización enzimática elegida para la preparación del biocatalizador representa una serie de ventajas a la hora de su manipulación, como lo son la facilidad de separación del medio de reacción y un aumento considerable en la estabilidad de la enzima. La estrategia de purificación involucra el uso de solventes de baja toxicidad, como el etanol, constituyendo una metodología de bajo impacto ambiental en sí misma y contribuyendo al desarrollo de procesos eco-

amigables, compatibles con los principios de la química verde. Investigaciones previas han puesto en evidencia actividad biocida de amplio espectro de Bz-Arg-NHC₁₀, observada tanto frente a bacterias, como hongos y levaduras [114, 116]. Considerando estos antecedentes y teniendo en cuenta las potenciales aplicaciones biomédicas del compuesto, el presente trabajo se centró en la evaluación del efecto antimicrobiano de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre biofilms bacterianos preformados.

4.2. Efecto antimicrobiano de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre bacterias planctónicas y biofilms preformados

4.2.1. Evaluación de la capacidad formadora de biofilm de los microorganismos indicadores en diferentes medios

Se analizó la capacidad formadora de biofilm de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*, en diferentes medios sobre microplacas de poliestireno. Los medios ensayados fueron CN (medio rico) y M63 (medio mínimo) suplementado con triptona (T) y/o glucosa (G). La Figura 4.2 muestra los biofilms formados en los distintos medios luego de 24 h de incubación a 37 °C, teñidos con cristal violeta. La cuantificación de la biomasa adherida se realizó mediante la solubilización del cristal violeta en AcH 30% (V/V) y posterior medida de la absorbancia a 550 nm. El análisis estadístico (Figura 4.3) reveló que *S. aureus* y *P. aeruginosa* en CN fueron capaces de formar un biofilm fuerte y moderado, respectivamente. Por otro lado, el biofilm formado por *E. coli* fue débil en todas las condiciones ensayadas.

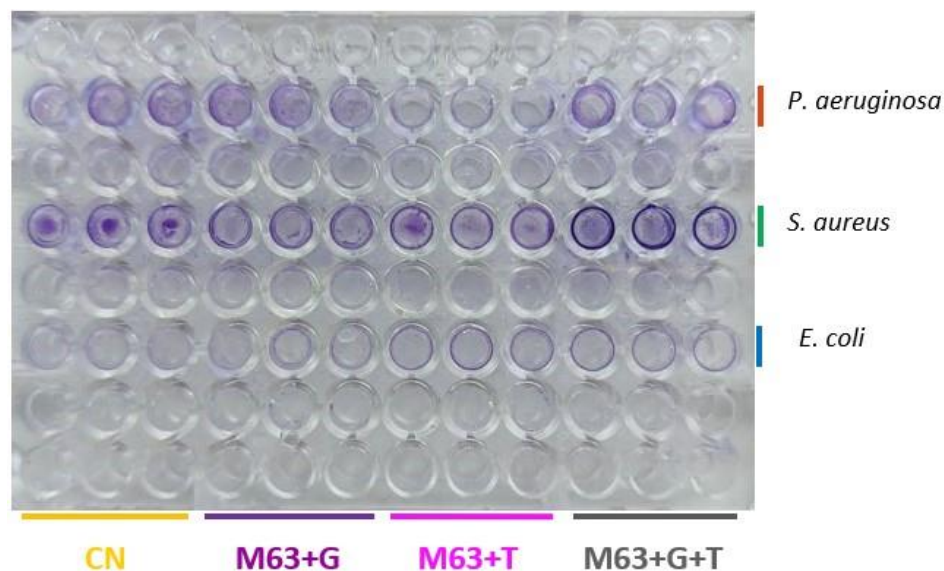


Figura 4.2. Aspecto macroscópico de los biofilms producidos por *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli* sobre microplacas de poliestireno en CN (medio rico) y M63 (medio mínimo) suplementado con triptona (T) y/o glucosa (G), teñidos con cristal violeta (0,1%).

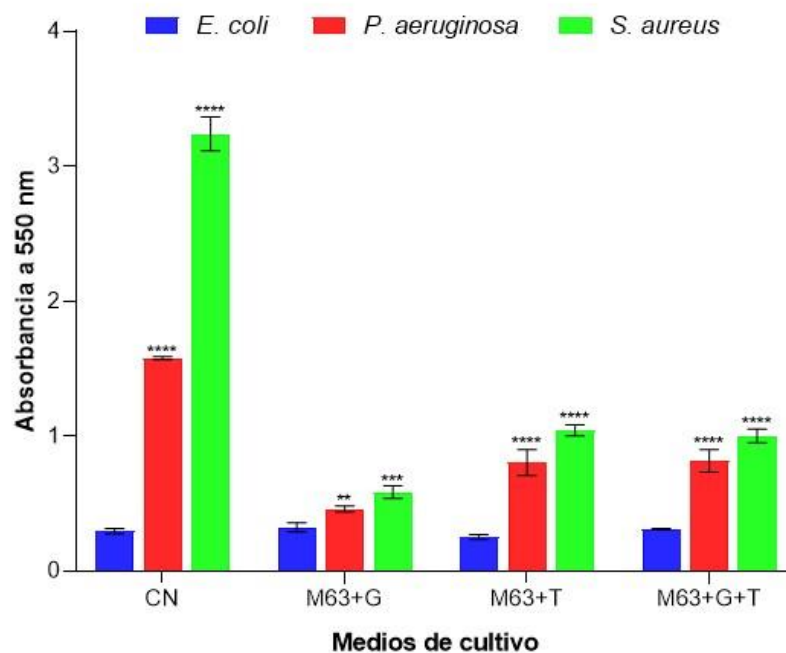


Figura 4.3. Cuantificación espectrofotométrica de la capacidad formadora de biofilms de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* en CN y M63 suplementado con G y/o T.

Los resultados se expresan como el valor medio y su respectiva desviación estándar (SD). Los valores fueron comparados según el análisis de varianza (ANOVA), seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. P-values < 0,05 fueron considerados significativos. El asterisco (*) indica la magnitud de significancia de las diferencias entre las distintas condiciones.

La metodología elegida permite realizar un *screening* de la capacidad formadora de biofilms microbianos en una amplia variedad de condiciones de cultivo [46]. El cristal violeta es un colorante básico que se une a moléculas cargadas negativamente, tiñendo tanto células vivas como muertas, e incluso los componentes de la matriz y moléculas liberadas al medio, como ADN, proteínas y/o exopolisacáridos [117]. Es una técnica rápida para la cuantificación de la biomasa total, siendo la absorbancia del colorante fijado directamente proporcional a la cantidad de biofilm formado, aunque no proporciona información acerca del número de células viables en el mismo [117].

De acuerdo con los resultados obtenidos, se eligió CN (medio rico) como el medio más apropiado para la formación de biofilm de las bacterias *P. aeruginosa* y *S. aureus*, excluyendo a *E. coli* de los ensayos posteriores dada su baja capacidad de formación de biofilm en las condiciones ensayadas.

4.2.2. Análisis del efecto antimicrobiano de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre cultivos planctónicos y biofilms bacterianos

4.2.2.1. Determinación de las CIM y CBM

Se realizó una prueba de susceptibilidad al tensioactivo derivado de arginina frente a las cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Para ello se estimaron las CIM y CBM sobre cultivos planctónicos mediante el método de dilución en microplaca detallado en la subsección 3.3.6.1.

En una primera aproximación, se utilizaron diluciones seriadas 1:2 a partir de una solución del compuesto preparada en CN con una concentración igual a 1000 μM , obteniéndose valores de CIM de 125 μM para *P. aeruginosa* y 62 μM para *S. aureus*. Con el objetivo de obtener un valor más acotado de estos parámetros y considerando los valores anteriores, se determinaron las CIM utilizando un rango de concentraciones más específico. Para el caso de *P. aeruginosa* las nuevas concentraciones ensayadas fueron de 55 a 600 μM mientras que para *S. aureus* fueron de 5 a 300 μM .

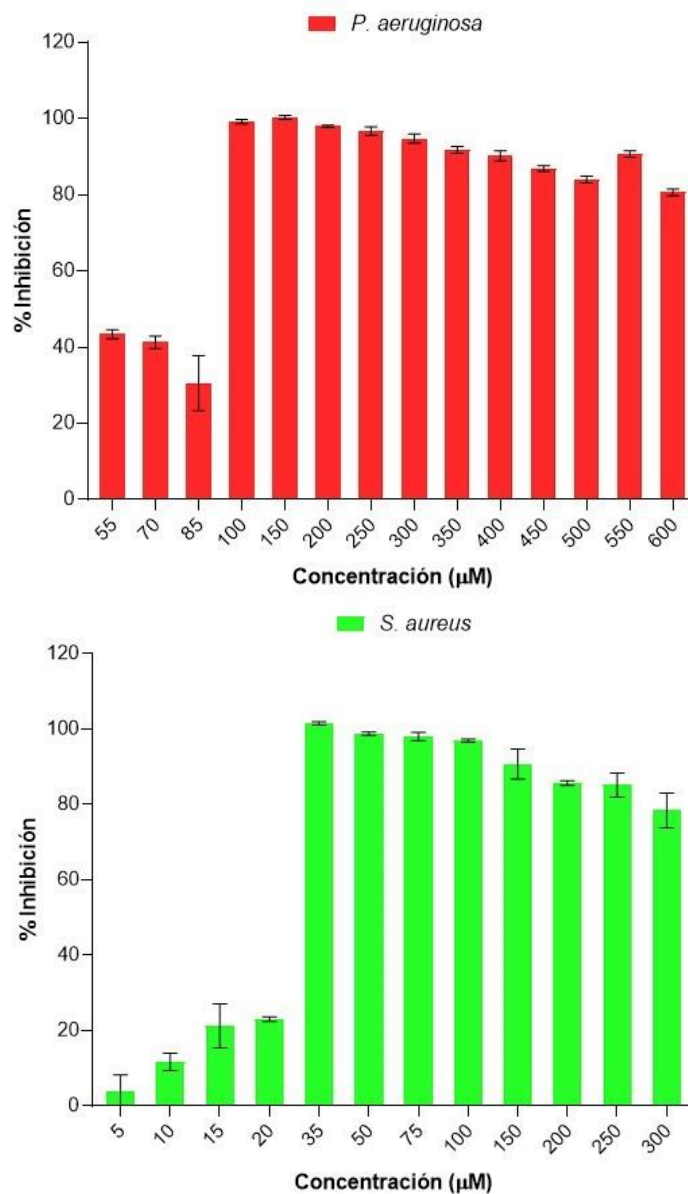


Figura 4.4. Porcentaje de inhibición del crecimiento planctónico en función de la concentración de Bz-Arg-NHC₁₀ para *P. aeruginosa* (arriba) y *S. aureus* (abajo). Los valores se graficaron como la media \pm SD.

En la Figura 4.4 se muestra los porcentajes de inhibición del crecimiento planctónico en función de la concentración de Bz-Arg-NHC₁₀ para *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente. A partir de estos

gráficos se calcularon las CIM, definidas como la menor concentración del surfactante que inhibió el 95% del crecimiento microbiano (% Inh > 95%).

Bz-Arg-NHC₁₀ fue capaz de inhibir el crecimiento de ambas bacterias, con una CIM igual a 100 μM para *P. aeruginosa* y 35 μM para *S. aureus*. En ambos casos el compuesto evidenció actividad bactericida, con valores de CBM iguales a 300 μM y 50 μM , respectivamente (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. CIM y CBM de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre cultivos planctónicos; CIM_b y CE de BzArg-NHC₁₀ sobre biofilms preformados.

Microorganismo	CIM (μM)	CIM _b (μM)	CBM (μM)	CE (μM)
<i>P. aeruginosa</i>	100	300	300	900
<i>S. aureus</i>	35	87,5	50	>350

Se ha reportado el estudio de la actividad antimicrobiana de surfactantes derivados de arginina estructuralmente similares a Bz-Arg-NHC₁₀, como ACA (arginina-*N*-caproil amida (también Arg-NHC₁₀)) y CAM (*N* ^{α} -caproil-L-arginina-metil éster), que llevan cadenas hidrocarbonadas de 10 carbonos de longitud [106, 118]. Comparando los resultados obtenidos para *P. aeruginosa*, mientras que Bz-Arg-NHC₁₀ registró una CIM de 45,4 $\mu\text{g/ml}$ (100 μM), ACA mostró un valor de 128 $\mu\text{g/ml}$ (331,3 μM) y CAM no afectó el crecimiento de esta cepa en las concentraciones probadas [106]. Por otro lado, frente a *S. aureus*, Bz-Arg-NHC₁₀ reveló un valor de CIM de 15,8 $\mu\text{g/ml}$ (35 μM), mientras que para ACA y CAM este parámetro fue igual a 32 (82,8 μM) y 256 $\mu\text{g/ml}$ (676 μM), respectivamente [106].

Las diferencias observadas en los valores de CIM registrados para los distintos surfactantes derivados de arginina podrían atribuirse a las diferencias estructurales entre los mismos: mientras que ACA presenta dos cargas positivas (ya que, si bien su estructura se asemeja más a la de Bz-Arg-NHC₁₀, poseen el grupo α -amino desprotegido), CAM tiene una sola, con la cola hidrofóbica unida al grupo α -amino de la arginina y el grupo carboxilo involucrado en un enlace éster con un metilo. Estudios anteriores han descrito que la presencia de un grupo bencilo en la molécula le otorgaría a la misma una marcada hidrofobicidad, favoreciendo su interacción y penetración a través de las membranas biológicas [112], lo que explicaría la mayor actividad antimicrobiana en el caso de Bz-Arg-NHC₁₀. Asimismo, las diferencias en la composición de las membranas celulares explicarían el mayor efecto antimicrobiano de Bz-Arg-NHC₁₀ en el caso de *S. aureus*.

4.2.2.2. Determinación de la CIM_b y CE

Considerando las CIM obtenidas previamente, se procedió a la caracterización del efecto antimicrobiano de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre biofilms preformados de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Para ello se determinaron la CIM_b y la CE, probando un rango de concentraciones del compuesto de entre 1 y 10 veces la CIM correspondiente para cada bacteria.

La estimación de la CIM_b se realizó de manera indirecta, cuantificando espectrofotométricamente el crecimiento planctónico de las bacterias presentes en el biofilm luego de una etapa de recuperación. La misma consistió en resuspender los biofilms tratados en medio fresco libre del tensioactivo, seguido de la incubación a 37°C durante un período de tiempo suficiente para cuantificar el crecimiento celular mediante la medida de la DO₆₀₀.

La Figura 4.5 muestra el crecimiento planctónico de las células presentes en los biofilms de *P. aeruginosa* y *S. aureus* tratados con Bz-Arg-NHC₁₀, respectivamente. Mientras que *P. aeruginosa* no mostró crecimiento planctónico cuantificable luego de la etapa de recuperación en concentraciones del tensioactivo superiores a 300 μM, para *S. aureus* solo se observó crecimiento en el medio de recuperación para los biofilms tratados con concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₀ menores a 87,5 μM.

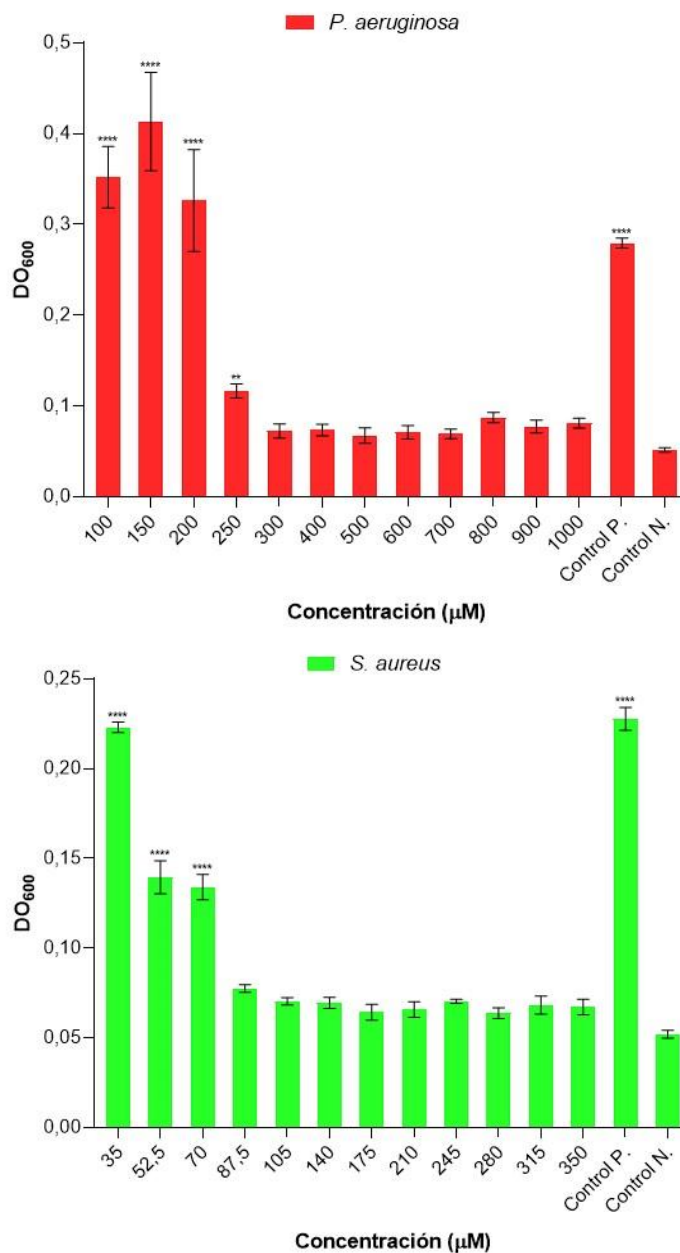


Figura 4.5. Cuantificación espectrofotométrica del crecimiento planctónico de las células presentes en los biofilms de *P. aeruginosa* (arriba) y *S. aureus* (abajo) tratados con distintas concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₀. Las medidas de DO₆₀₀ fueron realizadas luego de resuspender el biofilm en medio fresco libre del surfactante y la incubación de las células durante 6 h a 37 °C. Los valores se graficaron como la media \pm SD.

A su vez, para la determinación de la CE, se evaluó la viabilidad de las células presentes en los biofilms tratados mediante observación macroscópica de las colonias crecidas en AN. La CE se determinó como la menor concentración del surfactante para la cual no hubo crecimiento bacteriano (Figura 4.6).

A partir de estos resultados y considerando las definiciones de CIM_b y CE, los valores obtenidos para las cepas ensayadas se resumen en la Tabla 4.1.

Con el objetivo de analizar el incremento de la tolerancia a N α -benzoil-L-arginina decilamida hidrocloreuro en los biofilms, se compararon los valores obtenidos de CIM y CIM_b para cada microorganismo. Este análisis dio como resultado una CIM_b 3 veces mayor que la CIM planctónica para *P. aeruginosa*, mientras que para *S. aureus*, la CIM_b se estimó en 2,5 veces la correspondiente CIM. Resulta interesante el hecho de que, si bien el aumento de la tolerancia fue relativamente similar en ambos casos, *S. aureus* resultó más sensible a la acción del tensioactivo, registrando una menor CIM_b. Sin embargo, y si bien se había observado un efecto bactericida para esta cepa en estado planctónico, el compuesto no fue capaz de erradicar el biofilm a la máxima concentración ensayada, que se corresponde a 7 veces la CBM.

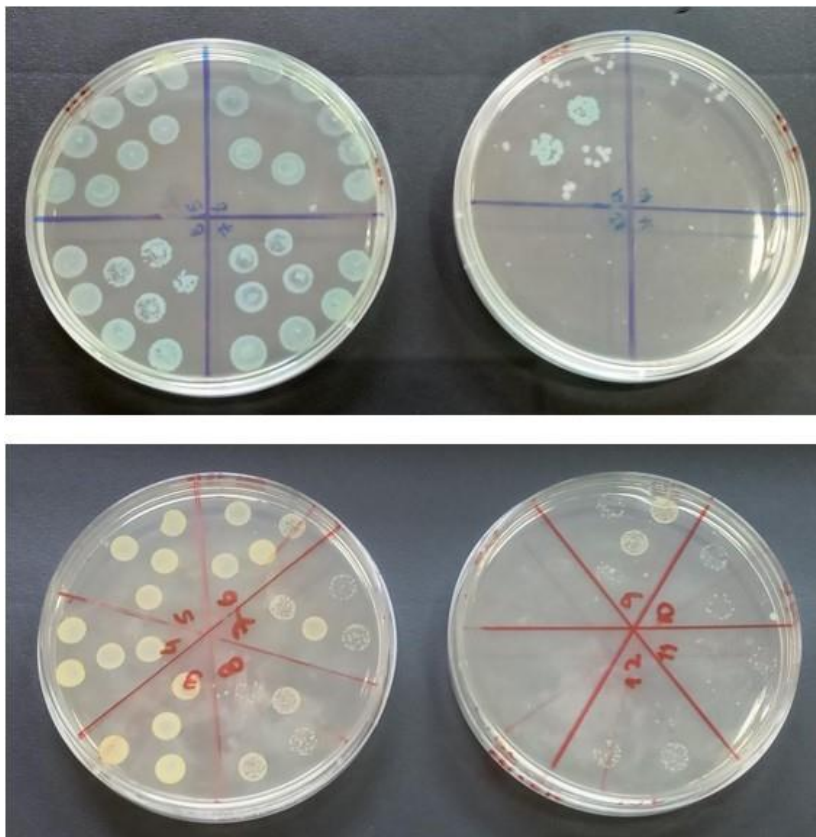


Figura 4.6. Determinación de la CE en biofilms preformados. Arriba *P. aeruginosa*, abajo *S. aureus* creciendo sobre agar nutritivo.

En base a los resultados obtenidos, la tolerancia al surfactante observada en los biofilms se podría atribuir a las propiedades emergentes producto de la vida en comunidad [84, 61]. La actividad antimicrobiana de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre biofilms preformados podría atribuirse tanto a su carga catiónica como a su carácter hidrofóbico. Un mecanismo propuesto para la erradicación de biofilms por tensioactivos catiónicos implicaría la perturbación y desagregación de la matriz extracelular polimérica a través de interacciones electrostáticas, lo que dispersaría al biofilm y expondría a las células liberadas al agente antimicrobiano, causándoles la muerte celular [119]. Si bien podría pensarse que la carga catiónica de Bz-Arg-NHC₁₀ podría ocasionar un retardo en la difusión del compuesto, la presencia del grupo benzoilo en la molécula aumentaría su hidrofobicidad, favoreciendo su interacción y penetración a través de las envolturas celulares [112, 111]. Por otro lado, se sabe que la baja tasa de crecimiento debido a las condiciones de estrés a las que están expuestas las células presentes en un biofilm es responsable de la aparición de células persistoras y durmientes, que se caracterizan por ser metabólicamente inactivas [86, 87, 88]. Si bien esta característica podría ser un impedimento para muchos agentes antimicrobianos, particularmente en el caso de muchos antibióticos [91, 92], la acción de los surfactantes como Bz-Arg-NHC₁₀ sería lo suficientemente inespecífica como para afectar incluso a estas células con bajo metabolismo. En este sentido, se sabe que el mecanismo antimicrobiano de Bz-Arg-NHC₁₀ involucraría la permeabilización y la pérdida de integridad de la membrana celular, causando además la inducción de estrés oxidativo [120]. Si bien estos estudios corresponden a cultivos planctónicos, es probable que estos fenómenos también se observen sobre las células creciendo en forma de biofilm.

4.3. Evaluación del poder disruptivo de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre biofilms preformados para diferentes tiempos de tratamiento

Empleando los valores de CIM_b previamente obtenidos, se evaluó el poder de disrupción de los biofilms (PD) preformados en función del tiempo de tratamiento (entre 120 y 300 min), cuantificando el efecto por el método del cristal violeta por comparación con los biofilms incubados en ausencia del surfactante (Figura 4.7).

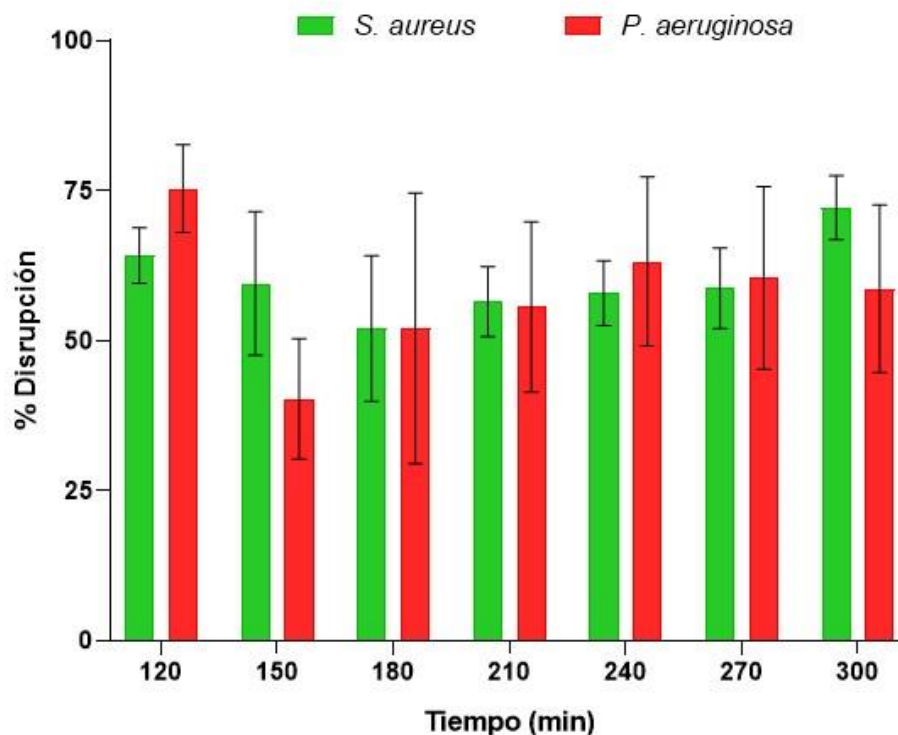


Figura 4.7. Efecto del tiempo de tratamiento sobre el poder de disrupción de biofilms preformados de *P. aeruginosa* y *S. aureus* para Bz-Arg-NHC₁₀ a las respectivas CIM_b. Los valores se graficaron como la media \pm SD.

Para ambas bacterias se evidenció una disrupción de los biofilms de alrededor del 60% respecto del control sin tratar, aunque el análisis estadístico de los resultados no mostró diferencias significativas en relación al tiempo de incubación para el intervalo ensayado. Las desviaciones observadas para las diferentes series de repeticiones pueden ser producto de variaciones en el crecimiento microbiano y en los microambientes propios de cada biofilm individual. En particular, los ensayos que involucran la formación de biofilms en placas *multiwell* se caracterizan por una gran variabilidad, no solo de un experimento a otro, sino también entre pocillos [121, 122, 123]. Teniendo esto en cuenta, si bien estos ensayos representan una herramienta de gran valor para una detección rápida y de alto rendimiento, no debe perderse de vista la gran complejidad del modelo y sus limitaciones para simular los biofilms que pueden encontrarse en el mundo real.

Estudios recientemente publicados han descrito el análisis de la actividad antimicrobiana sobre biofilms de surfactantes derivados de arginina estructuralmente similares a Bz-ArgNHC₁₀ con cadenas hidrocarbonadas de 12 carbonos de longitud: ALA (Arg-*N*-dodecilamida) y LAM (*N* ^{α} -dodecil-Arg-metil éster) [124]. En estos estudios, los investigadores observaron el efecto de los tensioactivos sobre biofilms preformados de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), evidenciando disrupciones de entre 70 y 90% luego de 24 h de tratamiento en presencia de ALA y LAM respectivamente a una concentración igual a 40 μ g/ml. Comparando estos resultados con los obtenidos para los biofilms de *S. aureus* tratados con Bz-Arg-NHC₁₀, se observa una mayor eficiencia para este

compuesto, registrando una disrupción del 72% luego de tan solo 2 h de incubación en presencia del tensioactivo a la correspondiente CIM_b (87,5 μ M o 39,7 μ g/ml).

Capítulo 5

Conclusiones

El uso de tensioactivos para controlar el crecimiento, la presencia o la adhesión de microorganismos a diversas superficies y, en última instancia, la formación de biofilms y bioincrustaciones, se ha vuelto una práctica cotidiana. Sin embargo, los tensioactivos sintéticos actualmente disponibles presentan numerosas desventajas, como su alta toxicidad tanto para las personas como para el medio ambiente. Como alternativa, el descubrimiento y uso de surfactantes de base biológica innovadores e interesantes con actividad antimicrobiana de amplio espectro ha ganado interés en el último tiempo.

La evidencia experimental recopilada en el presente trabajo ha puesto en evidencia la potencial aplicación de Bz-Arg-NHC₁₀, un tensioactivo catiónico derivado de arginina obtenido mediante biocatálisis enzimática, como agente antimicrobiano de amplio espectro. Este compuesto ha mostrado su efectividad frente a bacterias tanto en estado planctónico como sésil, siendo estas últimas más resistentes a la acción del compuesto, como es esperable para esta forma de crecimiento.

El mecanismo de acción de los tensioactivos derivados de arginina sobre los biofilms propuesto por Pérez y colaboradores sugiere que las moléculas de estos compuestos serían capaces de penetrar en la matriz polimérica extracelular de los biofilms, para luego ejercer su acción antimicrobiana sobre las células sésiles [124]. Considerando las similitudes estructurales entre estos compuestos y Bz-Arg-NHC₁₀, podría sugerirse un mecanismo de acción similar para nuestro compuesto frente a esta forma de crecimiento bacteriano.

Bibliografía

- [1] Levy, S. B. & Marshall, B. *Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses*. Nature medicine, 10, 12, S122, 2004
- [2] Russell, A. *Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations*. The Lancet infectious diseases, 3, 12, 794, 2003
- [3] Climo, M. W., Yokoe, D. S., Warren, D. K., Perl, T. M. et al. *Effect of daily chlorhexidine bathing on hospital-acquired infection*. New England Journal of Medicine, 368, 6, 533, 2013
- [4] Braoudaki, M. & Hilton, A. *Adaptive resistance to biocides in Salmonella enterica and Escherichia coli O157 and cross-resistance to antimicrobial agents*. Journal of clinical microbiology, 42, 1, 73, 2004
- [5] Gnanadhas, D. P., Marathe, S. A. & Chakravorty, D. *Biocides—resistance, crossresistance mechanisms and assessment*. Expert opinion on investigational drugs, 22, 2, 191, 2013
- [6] McDonnell, G. & Russell, A. D. *Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance*. Clinical microbiology reviews, 12, 1, 147, 1999
- [7] Castillo, J. A. *Comparative study of the antimicrobial activity of bis (N -caproyl-Larginine)-1,3-propanediamine dihydrochloride and chlorhexidine dihydrochloride against Staphylococcus aureus and Escherichia coli*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 57, 4, 691, 2006
- [8] Pinazo, A., Manresa, M., Marques, A., Bustelo, M. et al. *Amino acid–based surfactants: New antimicrobial agents*. Advances in Colloid and Interface Science, 228, 17, 2016
- [9] Castillo Expósito, J. A. *Studies on antimicrobial activity of arginine-based surfactants and chemo-enzymatic synthesis of novel amphiphiles based on L-arginine and D-fagomine*. Universidad Autónoma de Barcelona, 2007
- [10] Costerton, J., Ingram, J. & Cheng, K. *Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria*. Bacteriological reviews, 38, 1, 87, 1974
- [11] Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. *The bacterial cell envelope*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2, 5, a000414, 2010
- [12] Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R. & Casadevall, A. *Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi*. Nature Reviews Microbiology, 13, 10, 620, 2015
- [13] Hiramatsu, K. *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus: a new model of antibiotic resistance*. The Lancet infectious diseases, 1, 3, 147, 2001
- [14] Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S. & Dessen, A. *Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall*. Protein science, 23, 3, 243, 2014
- [15] Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S. et al. *Microbiología médica*. McGraw-Hill, 2011
- [16] Pérez, M. & Mota, M. *Morfología y estructura bacteriana*. Temas de bacteriología y virología médica, 2006
- [17] McGraw, A. R. M. M. I. & México, H. I. *Son células eucariotes*

-
- [18] Castillo Expósito, J. A. *Studies on antimicrobial activity of arginine-based surfactants and chemo- enzymatic synthesis of novel amphiphiles based on L -arginine and D fagomine*. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona, 2006
- [19] Denyer, S. P. *Mechanisms of action of antibacterial biocides*. International biodeterioration & biodegradation, 36, 3-4, 227, 1995
- [20] Lohner, K. & Prenner, E. J. *Differential scanning calorimetry and X-ray diffraction studies of the specificity of the interaction of antimicrobial peptides with membranemimetic systems*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1462, 1-2, 141, 1999
- [21] Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. et al. *Microbial biofilms*. Annual review of microbiology, 49, 1, 711, 1995
- [22] Thomas, J. G. & Nakaishi, L. A. *Managing the complexity of a dynamic biofilm*. The Journal of the American Dental Association, 137, S10, 2006
- [23] Eraso-Cadena, M. P. & Ríos-Osorio, L. A. *Principales características de las biopelículas relacionadas con procesos patológicos descritos en humanos en los últimos 10 años, revisión sistemática*. Investigaciones Andina, 18, 32, 1491, 2016
- [24] Sanclement, J. A., Webster, P., Thomas, J. & Ramadan, H. H. *Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis*. The Laryngoscope, 115, 4, 578, 2005
- [25] Ramadan, H. H. *Chronic rhinosinusitis and bacterial biofilms*. Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery, 14, 3, 183, 2006
- [26] Carpentier, B. & Cerf, O. *Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry*. Journal of applied bacteriology, 75, 6, 499, 1993
- [27] Elder Jr, G. H. *The life course paradigm: Social change and individual development*. 1995
- [28] Donlan, R. M. & Costerton, J. W. *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clinical microbiology reviews, 15, 2, 167, 2002
- [29] Monds, R. D. & O'Toole, G. A. *The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review*. Trends in microbiology, 17, 2, 73, 2009
- [30] Guzmán-Soto, I., McTiernan, C., Gonzalez, M., Ross, A. et al. *Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in In Vitro and In Vivo biofilm models*. Iscience, 102443, 2021
- [31] Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y. et al. *Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches*. Frontiers in microbiology, 11, 928, 2020
- [32] Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. *Biofilms as complex differentiated communities*. Annual Reviews in Microbiology, 56, 1, 187, 2002
- [33] Ehrlich, H. & Newman, D. *Geomicrobiology of mercury*. Geomicrobiology, 5th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 265–278, 2008
- [34] Meckenstock, R. U., Elsner, M., Griebl, C., Lueders, T. et al. *Biodegradation: updating the concepts of control for microbial cleanup in contaminated aquifers*. Environmental science & technology, 49, 12, 7073, 2015
- [35] Halan, B., Buehler, K. & Schmid, A. *Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses*. Trends in biotechnology, 30, 9, 453, 2012

-
- [36] De Vos, W. M. *Microbial biofilms and the human intestinal microbiome*. NPJ biofilms and microbiomes, 1, 1, 1, 2015
- [37] Costerton, J. W., Cheng, K., Geesey, G. G., Ladd, T. I. et al. *Bacterial biofilms in nature and disease*. Annual Reviews in Microbiology, 41, 1, 435, 1987
- [38] Flemming, H.-C., Wingender, J. & Szewzyk, U. *Biofilm highlights*, tomo 5. Springer Science & Business Media, 2011
- [39] Wingender, J. & Flemming, H.-C. *Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens*. International journal of hygiene and environmental health, 214, 6, 417, 2011
- [40] Little, B. J. & Lee, J. S. *Microbiologically influenced corrosion: an update*. International Materials Reviews, 59, 7, 384, 2014
- [41] Kumar, C. G. & Anand, S. K. *Significance of microbial biofilms in food industry: a review*. International journal of food microbiology, 42, 1-2, 9, 1998
- [42] Bos, R., Van der Mei, H. C. & Busscher, H. J. *Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions—its mechanisms and methods for study*. FEMS microbiology reviews, 23, 2, 179, 1999
- [43] Ren, Y., Wang, C., Chen, Z., Allan, E. et al. *Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing*. FEMS microbiology reviews, 42, 3, 259, 2018
- [44] An, Y. H. & Friedman, R. J. *Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces*. Journal of biomedical materials research, 43, 3, 338, 1998
- [45] Nakamura, S. & Minamino, T. *Flagella-driven motility of bacteria*. Biomolecules, 9, 7, 279, 2019
- [46] O'Toole, G. A. & Kolter, R. *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. Molecular microbiology, 30, 2, 295, 1998
- [47] Yang, D. C., Blair, K. M. & Salama, N. R. *Staying in shape: the impact of cell shape on bacterial survival in diverse environments*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 80, 1, 187, 2016
- [48] Feng, G., Cheng, Y., Wang, S.-Y., Borca-Tasciuc, D. A. et al. *Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough?* npj Biofilms and Microbiomes, 1, 1, 1, 2015
- [49] Fletcher, M. *Attachment of Pseudomonas fluorescens to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance*. Journal of Bacteriology, 170, 5, 2027, 1988
- [50] Friedlander, R. S., Vlamakis, H., Kim, P., Khan, M. et al. *Bacterial flagella explore microscale hummocks and hollows to increase adhesion*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110, 14, 5624, 2013
- [51] Singh, A. V., Vyas, V., Patil, R., Sharma, V. et al. *Quantitative characterization of the influence of the nanoscale morphology of nanostructured surfaces on bacterial adhesion and biofilm formation*. PloS one, 6, 9, e25029, 2011
- [52] Lee, C. K., De Anda, J., Baker, A. E., Bennett, R. R. et al. *Multigenerational memory and adaptive adhesion in early bacterial biofilm communities*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115, 17, 4471, 2018

-
- [53] Li, G., Brown, P. J., Tang, J. X., Xu, J. et al. *Surface contact stimulates the just-in-time deployment of bacterial adhesins*. *Molecular microbiology*, 83, 1, 41, 2012
- [54] Hug, I., Deshpande, S., Sprecher, K. S., Pfohl, T. et al. *Second messenger-mediated tactile response by a bacterial rotary motor*. *Science*, 358, 6362, 531, 2017
- [55] Read, R. R., Eberwein, P., Dasgupta, M. K., Grant, S. K. et al. *Peritonitis in peritoneal dialysis: bacterial colonization by biofilm spread along the catheter surface*. *Kidney international*, 35, 2, 614, 1989
- [56] Conrad, J. C., Gibiansky, M. L., Jin, F., Gordon, V. D. et al. *Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in P. aeruginosa*. *Biophysical journal*, 100, 7, 1608, 2011
- [57] Laventie, B.-J., Sangermani, M., Estermann, F., Manfredi, P. et al. *A surface-induced asymmetric program promotes tissue colonization by Pseudomonas aeruginosa*. *Cell host & microbe*, 25, 1, 140, 2019
- [58] Sauer, K. & Camper, A. K. *Characterization of phenotypic changes in Pseudomonas putida in response to surface-associated growth*. *Journal of Bacteriology*, 183, 22, 6579, 2001
- [59] Karatan, E. & Watnick, P. *Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms*. *Microbiology and molecular biology reviews*, 73, 2, 310, 2009
- [60] Davey, M. E., Caiazza, N. C. & O'Toole, G. A. *Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in Pseudomonas aeruginosa PAO1*. *Journal of bacteriology*, 185, 3, 1027, 2003
- [61] Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P. et al. *Biofilms: an emergent form of bacterial life*. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 9, 563, 2016
- [62] Zhang, X., Bishop, P. L. & Kupferle, M. J. *Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers*. *Water science and technology*, 37, 4-5, 345, 1998
- [63] Jahn, A., Griebe, T. & Nielsen, P. H. *Composition of Pseudomonas putida biofilms: accumulation of protein in the biofilm matrix*. *Biofouling*, 14, 1, 49, 1999
- [64] Sutherland, I. W. *The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment*. *Trends in microbiology*, 9, 5, 222, 2001
- [65] Flemming, H.-C. & Wingender, J. *The biofilm matrix*. *Nature reviews microbiology*, 8, 9, 623, 2010
- [66] Rani, S. A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R. A. et al. *Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states*. *Journal of bacteriology*, 189, 11, 4223, 2007
- [67] Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. et al. *Stratified growth in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. *Applied and environmental microbiology*, 70, 10, 6188, 2004
- [68] Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., Mattick, J. S. et al. *Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation*. *Science*, 295, 5559, 1487, 2002
- [69] Allesen-Holm, M., Barken, K. B., Yang, L., Klausen, M. et al. *A characterization of DNA release in Pseudomonas aeruginosa cultures and biofilms*. *Molecular microbiology*, 59, 4, 1114, 2006

-
- [70] Finkel, S. E. & Kolter, R. *DNA as a nutrient: novel role for bacterial competence gene homologs*. Journal of bacteriology, 183, 21, 6288, 2001
- [71] De Beer, D., Stoodley, P., Roe, F. & Lewandowski, Z. *Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport*. Biotechnology and bioengineering, 43, 11, 1131, 1994
- [72] Hunter, R. C. & Beveridge, T. J. *Application of a pH-sensitive fluoroprobe (C-SNARF4) for pH microenvironment analysis in Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Applied and environmental microbiology, 71, 5, 2501, 2005
- [73] Ciofu, O. & Tolker-Nielsen, T. *Tolerance and resistance of pseudomonas aeruginosabiofilms to antimicrobial agents-how P. aeruginosaCan escape antibiotics*. Frontiers in Microbiology, 10, MAY, 2019
- [74] Lebeaux, D., Ghigo, J.-M. & Beloin, C. *Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 78, 3, 510, 2014
- [75] Boles, B. R., Thoendel, M. & Singh, P. K. *Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101, 47, 16630, 2004
- [76] Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R. & Kolter, R. *Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community*. Genes & development, 22, 7, 945, 2008
- [77] Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. Q. *Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment*. Nature Reviews Microbiology, 14, 5, 320, 2016
- [78] Olsen, I. *Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 34, 5, 877, 2015
- [79] Thuptimdang, P., Limpiyakorn, T., McEvoy, J., Pruß, B. M. et al. *Effect of silver nanoparticles on Pseudomonas putida biofilms at different stages of maturity*. Journal of Hazardous Materials, 290, 127, 2015
- [80] Königs, A. M., Flemming, H.-C. & Wingender, J. *Nanosilver induces a non-culturable but metabolically active state in Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in microbiology, 6, 395, 2015
- [81] Brown, M. L., Aldrich, H. C. & Gauthier, J. J. *Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) biofilms*. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1, 187, 1995
- [82] Cochran, W. L., McFeters, G. A. & Stewart, P. S. *Reduced susceptibility of thin Pseudomonas aeruginosa biofilms to hydrogen peroxide and monochloramine*. Journal of applied microbiology, 88, 1, 22, 2000
- [83] Davies, D. *Understanding biofilm resistance to antibacterial agents*. Nature reviews Drug discovery, 2, 2, 114, 2003
- [84] Stewart, P. S. *Diffusion in biofilms*. Journal of bacteriology, 185, 5, 1485, 2003
- [85] Nichols, W. W., Dorrington, S., Slack, M. & Walmsley, H. *Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 32, 4, 518, 1988

-
- [86] Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. et al. *Antibiotic resistance of bacterial biofilms*. International journal of antimicrobial agents, 35, 4, 322, 2010
- [87] Stewart, P. S. & Costerton, J. W. *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. The lancet, 358, 9276, 135, 2001
- [88] Percival, S. & Cutting, K. *Microbiology of wounds*. CrC press, 2010
- [89] Walters III, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. et al. *Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of Pseudomonas aeruginosa biofilms to ciprofloxacin and tobramycin*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 47, 1, 317, 2003
- [90] Lewis, K. *Persister cells, dormancy and infectious disease*. Nature Reviews Microbiology, 5, 1, 48, 2007
- [91] Yang, G., Trylska, J., Tor, Y. & McCammon, J. A. *Binding of aminoglycosidic antibiotics to the oligonucleotide A-site model and 30S ribosomal Subunit: Poisson-Boltzmann model, thermal denaturation, and fluorescence studies*. Journal of medicinal chemistry, 49, 18, 5478, 2006
- [92] Lewis, K. *Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance*. En *Antibiotic resistance*, 121–133. Springer, 2012
- [93] Singh, A., Van Hamme, J. D. & Ward, O. P. *Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects*. Biotechnology advances, 25, 1, 99, 2007
- [94] Salager, J.-L. *Surfactantes tipos y usos*. Cuaderno FIRP, S300A, 1–54, 2002
- [95] Tripathy, D. B., Mishra, A., Clark, J. & Farmer, T. *Synthesis, chemistry, physicochemical properties and industrial applications of amino acid surfactants: A review*. Comptes Rendus Chimie, 21, 2, 112, 2018
- [96] Pinazo, A., Pons, R., Pérez, L. & Infante, M. R. *Amino acids as raw material for biocompatible surfactants*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 50, 9, 4805, 2011
- [97] Bordes, R. & Holmberg, K. *Amino acid-based surfactants—do they deserve more attention?* Advances in Colloid and Interface Science, 222, 79, 2015
- [98] Nitschke, M. & Silva, S. S. e. *Recent food applications of microbial surfactants*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58, 4, 631, 2018
- [99] Pinheiro, L. & Faustino, C. *Amino Acid-Based Surfactants for Biomedical Applications*. En *Application and Characterization of Surfactants*, tomo 6, 111–133. InTech, 2017
- [100] Morán, M. C., Pinazo, A., Pérez, L., Clapés, P. et al. *“Green” amino acid-based surfactants*. Green Chemistry, 6, 5, 233, 2004
- [101] Pérez, L., Torres, J. L., Manresa, A., Solans, C. et al. *Synthesis, aggregation, and biological properties of a new class of gemini cationic amphiphilic compounds from arginine, bis (Args)*. Langmuir, 12, 22, 5296, 1996
- [102] Scorzza, C., Godé, P., Martin, P., Miñana-Pérez, M. et al. *Synthesis and surfactant properties of a new “extended” glucidoamphiphile made from D-glucose*. Journal of Surfactants and Detergents, 5, 4, 331, 2002

- [103] Infante, M. R., Pérez, L., Pinazo, A., Clapés, P. et al. *Amino acid-based surfactants*. *Comptes Rendus Chimie*, 7, 6-7, 583, 2004
- [104] Clapés, P., Morán, C. & Infante, M. *Enzymatic Synthesis of Arginine-Based*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999
- [105] Piera, E., Infante, M. R. & Clapés, P. *Chemo-enzymatic synthesis of arginine-based gemini surfactants*. *Biotechnology and Bioengineering*, 70, 3, 323, 2000
- [106] Morán, C., Infante, M. R. & Clapés, P. *Synthesis of glycerol 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, 2001
- [107] Clapes, P. & Rosa Infante, M. *Amino acid-based surfactants: enzymatic synthesis, properties and potential applications*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20, 4, 215, 2002
- [108] Bommarius, A. S. & Riebel-Bommarius, B. R. *Biocatalysis: fundamentals and applications*. John Wiley & Sons, 2004
- [109] Gilbert, P. & Moore, L. E. *Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet*. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 4, 703, 2005
- [110] Vieira, D. B. & Carmona-Ribeiro, A. M. *Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: Mode of action*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 4, 760, 2006
- [111] Hermet, M., Elisa Fait, M., Vazquez, R. F., Mate, S. et al. *Interaction of cationic surfactants with DPPC membranes: effect of a novel N α -benzoylated arginine-based compound*. *Amino Acids*, 53, 4, 609, 2021
- [112] Perinelli, D. R., Petrelli, D., Vitali, L. A., Vllasaliu, D. et al. *Quaternary ammonium surfactants derived from leucine and methionine: Novel challenging surface active molecules with antimicrobial activity*. *Journal of Molecular Liquids*, 283, 249, 2019
- [113] Morcelle, S. R., Liggieri, C. S., Bruno, M. A., Priolo, N. et al. *Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57, 1-4, 177, 2009
- [114] Fait, M. E., Garrote, G. L., Clapés, P., Tanco, S. et al. *Biocatalytic synthesis, antimicrobial properties and toxicity studies of arginine derivative surfactants*. *Amino Acids*, 47, 7, 1465, 2015
- [115] O'Toole, G. *Microtiter Dish Biofilm Formation Assay*. *JoVE*, 47, 1, 2011
- [116] Fait, M. E., Bakas, L., Garrote, G. L., Morcelle, S. R. et al. *Cationic surfactants as antifungal agents*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 1, 97, 2019
- [117] Merritt, J. H., Kadouri, D. E. & O'Toole, G. A. *Growing and analyzing static biofilms*. *Current protocols in microbiology*, 22, 1, 1B, 2011
- [118] Pérez, L., Garcia, M. T., Ribosa, I., Vinardell, M. P. et al. *Biological properties of arginine-based gemini cationic surfactants*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 6, 1279, 2002
- [119] Jennings, M. C., Ator, L. E., Paniak, T. J., Minbiole, K. P. et al. *Biofilm-Eradicating Properties of Quaternary Ammonium Amphiphiles: Simple Mimics of Antimicrobial Peptides*. *ChemBioChem*, 15, 15, 2211, 2014

-
- [120] Fait, M. E., da Costa, H. P. S., Freitas, C. D. T., Bakás, L. et al. *Antifungal Activity of Arginine-Based Surfactants*. *Current Bioactive Compounds*, 15, 3, 351, 2019
- [121] Grand, I., Bellon-Fontaine, M.-N., Herry, J.-M., Hilaire, D. et al. *Possible overestimation of surface disinfection efficiency by assessment methods based on liquid sampling procedures as demonstrated by in situ quantification of spore viability*. *Applied and environmental microbiology*, 77, 17, 6208, 2011
- [122] Harmsen, M., Yang, L., Pamp, S. J. & Tolker-Nielsen, T. *An update on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation, tolerance, and dispersal*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59, 3, 253, 2010
- [123] Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. et al. *Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci*. *APMIS*, 115, 891, 2007
- [124] Pérez, L., Pons, R., de Sousa, F. F. O., del Carmen Morán, M. et al. *Green cationic arginine surfactants: Influence of the polar head cationic character on the self-aggregation and biological properties*. *Journal of Molecular Liquids*, 339, 116819, 2021