



7<sup>mo</sup>  
Congreso de  
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM  
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

## PRODUCCIÓN DE TENSIOACTIVOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE EL EMPLEO DE TECNOLOGÍAS AMIGABLES CON EL MEDIO AMBIENTE

**Production of surfactants with antimicrobial activity by means of eco-friendly  
technologies**

María Elisa Fait<sup>a</sup>, Graciela L. Garrote<sup>b</sup>, Pere Clapés<sup>c</sup>, Susana R. Morcelle<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900, La Plata, Argentina. [mefait86@gmail.com](mailto:mefait86@gmail.com).

<sup>b</sup>Centro de Investigaciones en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), CONICET-Universidad Nacional de La Plata, Calle 116 y 47, 1900, La Plata, Argentina. [ggarrote@biol.unlp.edu.ar](mailto:ggarrote@biol.unlp.edu.ar).

<sup>c</sup>Grupo de Biotransformaciones y Moléculas Bioactivas, Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC-CSIC), Jordi Girona 18-26, Barcelona, España. [Pere.Clapes@iqac.csic.es](mailto:Pere.Clapes@iqac.csic.es)

<sup>d</sup>Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE), Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 y 115, 1900, La Plata, Argentina. [morcelle@biol.unlp.edu.ar](mailto:morcelle@biol.unlp.edu.ar)

\*Autor para correspondencia: +54 221 4230121 int 57

*Palabras clave: tensioactivos derivados de arginina, biocatálisis, papaína, actividad antimicrobiana*

*Keywords: arginine-based surfactants, biocatalysis, papain, antimicrobial activity*

*Título abreviado: Producción de tensioactivos con actividad antimicrobiana*

**ABSTRACT**

Papain is an endopeptidase obtained from latex of *Carica papaya* fruits, which is widely used in food and pharma industries. It has been successfully applied as biocatalyst in the synthesis of peptide and other related compounds. Arginine-based surfactants consist of a family of cationic surfactants with interesting antimicrobial properties as preservatives for pharmaceutical and food formulations.

The aim of the present work was to study the synthesis of an arginine-based surfactant with antimicrobial activity using papain as biocatalyst.

The synthesis was carried out through a condensation reaction between  $N^{\alpha}$ -benzoyl-arginine ethyl ester with dodecylamine, using papain adsorbed onto polyamide as biocatalyst and acetonitrile (0.25% v/v) as reaction medium. The product, Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, was purified by cationic exchange chromatography using a mixture of boric-borate 0.01 M (pH 8.5)/ethanol (1:1) as eluent, and a NaCl gradient. Antimicrobial activity was tested by the microdilution method against *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Kocuria rhizophila*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* and *Rhodothorula* sp. Growth inhibition percentages were calculated and minimum inhibition concentration as well as minimum bactericide concentration (MIC and MBC, respectively) were determined.

The synthesis of Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> catalyzed by papain adsorbed onto polyamide furnished a conversion of 86.2%. The purified compound had a MIC of 15.6  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  for *B. cereus*, 62.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  for *St. aureus* and 250.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  for *E. coli*, whereas *Ps. aeruginosa* was not inhibited. MBC were of 250.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 62.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  and 250.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  for *B. cereus*, *St. aureus* and *E. coli*, respectively.

Antimicrobial activity of an aqueous Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> solution (60.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) was tested using different bacteria and yeast species. Gram positive microorganisms showed percentages of growth inhibition greater than 90%, whereas the studied Gram negative bacteria and yeasts were resistant.

**RESUMEN**

Papaína es una endopeptidasa extraída del látex de frutos de *Carica papaya* ampliamente empleada en las industrias alimentaria y farmacéutica. Es muy utilizada como biocatalizador en la síntesis de péptidos y otros derivados. Los surfactantes derivados de arginina son una familia de tensioactivos catiónicos con propiedades antimicrobianas interesantes como preservativos para formulaciones farmacéuticas y alimentarias.

El objetivo del presente trabajo fue la obtención de un tensioactivo derivado de arginina con actividad antimicrobiana empleando papaína como biocatalizador.

La síntesis se llevó a cabo por condensación del éster etílico de  $N^{\alpha}$ -benzoil-arginina con dodecilamina como nucleófilo, utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador y acetonitrilo con 0.25% (v/v) de agua como medio de reacción. El producto (Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>) fue purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico utilizando como eluyente una mezcla de buffer bórico-borato 0.01 M (pH 8.5)/etanol (1:1) y un gradiente en NaCl. Se ensayó la actividad antimicrobiana mediante el método de microdilución frente a *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Kocuria rhizophila*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Rhodothorula* sp., calculándose los porcentajes de inhibición de crecimiento y las concentraciones inhibitoria mínima (CIM) y bactericida mínima (CBM).

La síntesis de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> catalizada por papaína adsorbida en poliamida tuvo una conversión del 86.2%. El compuesto puro presentó una CIM de 15.6  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para *B. cereus*, 62.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para *St. aureus* y 250.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para *E. coli*, en tanto que no afectó el crecimiento de *Ps. aeruginosa*. Las CBM fueron 250.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 62.5  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  y 250.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para *B. cereus*, *St. aureus* y *E. coli* respectivamente.

Se determinó la actividad antimicrobiana de una solución acuosa de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> (60.0  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) frente a distintas especies de bacterias y levaduras. Los microorganismos Gram positivos resultaron en general inhibidos en más de un 90%, en tanto las bacterias Gram negativas y levaduras ensayadas fueron resistentes.

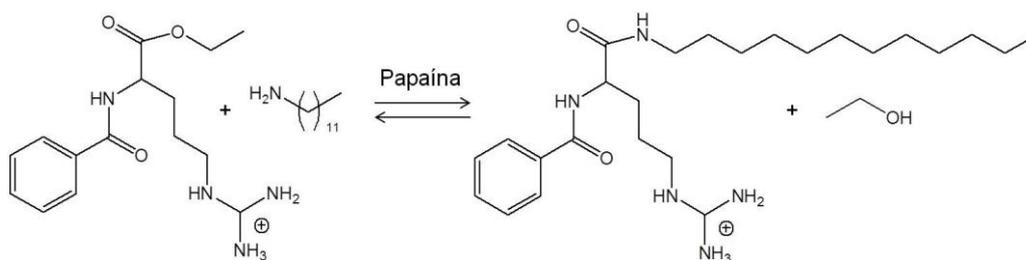
## INTRODUCCIÓN

Los surfactantes (*surface active agents*) (Resnik *et al.*,<sup>2010</sup>) son compuestos anfifílicos que pueden reducir la tensión interfacial superficial acumulándose en la superficie de fluidos inmiscibles y aumentando la solubilidad y movilidad de compuestos orgánicos hidrofóbicos o insolubles (Singh *et al.*, 2007). Los surfactantes de base biológica son estructuras sintéticas que simulan la estructura natural de los

glicolípidos, lipopéptidos, fosfolípidos y ácidos grasos. Los lipoaminoácidos y glicerolípidos han sido estudiados exhaustivamente y han demostrado tener buena actividad superficial, amplia actividad biológica y baja toxicidad (Pérez *et al.*, 2002). Entre ellos, los lipoaminoácidos derivados de arginina consisten en una familia de surfactantes catiónicos no tóxicos con actividad antimicrobiana, propiedades que los vuelven interesantes como agentes preservativos en las industrias farmacéutica y alimentaria, así como ingredientes activos en cosmética.

La aplicación de enzimas como agentes acoplantes constituye una alternativa prometedora, ya que se evita la protección/desprotección de las cadenas laterales de los sustratos, y la especificidad de las reacciones minimiza la aparición de productos secundarios. La síntesis quimioenzimática de péptidos y otros derivados como aminoacil alquilamidas es la que presentaría una mejor relación costo-beneficio para la obtención de este tipo de compuestos (Nuijens *et al.*, 2011). Papaína (E.C. 3.4.22.2) es una endopeptidasa cisteínica vegetal obtenida del látex de *Carica papaya*, empleada principalmente en la industria de panificación, cervecería, textil, farmacéutica y cosmética. Es más barata y más fácil de obtener que las peptidasas de origen microbiano. Como biocatalizador en química orgánica, papaína de las enzimas más empleadas en la síntesis de diversos derivados peptídicos, debido a su amplia especificidad y robustez.

El objetivo del presente trabajo es la obtención y evaluación de la actividad antimicrobiana de una alquilamina derivada de arginina, obtenida mediante catálisis enzimática por condensación entre el éster etílico de *N*<sup>α</sup>-benzoil-arginina y dodecilamina (Figura 1).



**Figura 1.** Síntesis de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> empleando papaína como biocatalizador.

**Figure 1.** Synthesis of Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> catalyzed by papain.

## METODOLOGÍA

### Reactivos

Extracto crudo de papaína (E.C. 3.4.22.2) obtenido del látex de *Carica papaya* [3.11 unidades.(mg sólido)<sup>-1</sup>, una unidad hidroliza 1.0 μmol de N<sup>α</sup>-benzoil-L-arginina etil éster clorhidrato por minuto a pH 6.2 y 25°C], dodecilamina y tamices moleculares (4 Å), fueron de Fluka. N<sup>α</sup>-benzoil-L-arginina etil éster clorhidrato (Bz-Arg-OEt·HCl, BAEE) y N<sup>α</sup>-benzoil-L-arginina *p*-nitroanilida clorhidrato (BAPNA) fueron de Sigma. Poliamida-6 (EP-700, tamaño de particular <800 μm, diámetro medio de poro 50–300 nm, área superficial específica 8.4 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> según el método B.E.T.) fue proporcionada por Azko (Oberburg, Alemania). 1,4-ditio-D,L-treitol (DTT) fue comprado a Invitrogen. El medio de cultivo utilizado para los ensayos microbiológicos fue caldo nutritivo (Biokar Diagnostics, Francia). El resto de los reactivos y solventes utilizados en el presente trabajo fueron de calidad analítica.

## Microorganismos

En los ensayos de actividad antimicrobiana se emplearon como indicadores: *Salmonella enterica serovar Cholerasuis* ATCC 10708, *Serratia marcescens* ATCC 14756, *Shigella flexneri* ATCC 9199, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Enterococcus faecium* ATCC 6569, *Kocuria rhizophila* (anteriormente denominada *Micrococcus luteus*) ATCC 9341, *Listeria innocua* ATCC 33090 y *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, pertenecientes a la American Type Culture Collection. Las levaduras ensayadas fueron: *Pichia anomala* 701, obtenida del Cepario de Levaduras y Hongos Filamentosos del Instituto de Botánica Carlos Spegazzini; *Saccharomyces cerevisiae* CIDCA 8112 y *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154, ambas pertenecientes a la colección del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-UNLP-CIC-CONICET); y *Rhodothorula* sp., aislada del ambiente.

## Preparación de los biocatalizadores

Papaína (100 mg) fue disuelta en buffer bórico-borato pH 8.0, conteniendo 1 mM EDTA (1 ml) en presencia de DTT (150 mg). La solución enzimática fue mezclada completamente con el soporte sólido (1 g) por agitación vigorosa y sometida luego al proceso de liofilización durante 24 horas (Morcelle *et al.*, 2009). La determinación de la

actividad enzimática fue llevada a cabo antes y después de la inmovilización utilizando BAPNA como sustrato (Ota *et al.*, 1964; Morcelle *et al.*, 2009) y la misma fue expresada en unidades internacionales (UI, cantidad de *p*-nitroanilina en  $\mu$ moles liberada por actividad enzimática por minuto, a 37 °C, pH 7.4 y una concentración inicial de BAPNA igual a 3.13 mM).

### **Síntesis enzimática de *N*<sup>α</sup>-benzoil-arginina dodecilamida (Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>) en microescala. Optimización de la extracción del producto de síntesis**

La mezcla de reacción para la síntesis fue preparada disolviendo Bz-Arg-OEt·HCl (0.02 mmol) y dodecilamina (0.03 mmol) en un 1 ml de medio conteniendo acetonitrilo con 0.25% (v/v) de agua. Las reacciones se llevaron a cabo individualmente para diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas) luego del agregado del biocatalizador (100 mg) a la mezcla de reactivos, utilizando tubos cerrados de 4 ml, bajo atmósfera de nitrógeno a 30 °C y agitación constante (150 rpm). En cada caso, la reacción fue detenida por el agregado de una mezcla metanol:ácido acético (MeOH/AcOH) en proporción 4:1 (1 ml). La extracción del producto de síntesis obtenido se realizó por lavado del biocatalizador con la misma mezcla de solventes (2×1 ml) (Clapés *et al.*, 1999). Paralelamente se ensayó el uso de una mezcla de solventes en las mismas proporciones conteniendo agua en lugar de AcOH siguiendo el procedimiento antes descrito.

Todas las mezclas finales de reacción fueron filtradas a través de membranas de nylon (tamaño de poro 0.45  $\mu$ m) y analizadas por HPLC (Agilent 1100 LC) utilizando una

columna Lichrosorb 100 propilciano (250×4 mm, 5 µm, Hibar). Las condiciones cromatográficas fueron: solvente A, H<sub>2</sub>O con 0.1% (v/v) TFA; solvente B, acetonitrilo/H<sub>2</sub>O 80:20 0.1% TFA; velocidad de flujo, 1 ml.min<sup>-1</sup>; longitudes de onda de detección, 215 y 254 nm. La identificación de los picos cromatográficos se llevó a cabo de acuerdo al método del estándar externo, para lo que se analizaron soluciones patrón de Bz-Arg-OEt y Bz-Arg-OH. Para cada mezcla, la cuantificación del producto de síntesis, el reactivo remanente y el producto de hidrólisis por comparación de las áreas de los picos respectivos. Los tiempos de retención para cada compuesto fueron: Bz-Arg-OH, 4.7 min; Bz-Arg-OEt, 5.4 min y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, 14.8 min.

### **Síntesis semipreparativa de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> y purificación por cromatografía de intercambio catiónico**

La mezcla de reacción para la síntesis semipreparativa fue preparada disolviendo Bz-Arg-OEt·HCl (0.2 mmol, 68.4 mg) y dodecilamina (0.3 mmol, 55.7 mg) en 10 ml de CH<sub>3</sub>CN anhidro conteniendo 0.25% (v/v) de agua. La reacción fue llevada a cabo por incubación del biocatalizador (1 g) con la mezcla de reactivos, en un erlenmeyer (100 ml) durante 72 horas, bajo atmósfera de nitrógeno, a 30 °C y agitación constante (150 rpm). El producto de reacción fue extraído utilizando una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O en proporción 4:1 (3×10 ml) y filtrado a través de una membrana de nylon (0.22 µm).

La purificación de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> fue llevada a cabo mediante cromatografía de intercambio catiónico en un Äkta Purifier 10 (GE Healthcare). Alícuotas del filtrado

(1 ml) fueron cargadas en una columna Resource S (volumen de lecho, 1 ml; GE Healthcare) previamente equilibrada con el solvente A, constituido por buffer bórico-borato 0.01 M, pH 8.5/etanol (1:1). El material no retenido fue eluido mediante el lavado de la columna con 8 ml del mismo solvente. La elución del producto fue conseguida a través de un gradiente en 4 minutos desde 0 hasta 100% de solvente B, constituido por buffer bórico-borato 0,01 M, pH 8.5/etanol (1:1) con 1 M de NaCl.

Finalmente, la columna fue lavada con 5 ml del solvente B y reequilibrada a las condiciones iniciales. La velocidad de flujo se mantuvo en  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  durante todo el procedimiento, detectándose los picos eluidos espectrofotométricamente a 215 y 254 nm.

Las fracciones conteniendo el producto fueron recolectadas, evaporándose a continuación el solvente. El sólido así obtenido fue desalado mediante sucesivas precipitaciones con etanol absoluto, filtrado y evaporación del solvente en rotavapor.

La pureza del producto fue analizada mediante HPLC en las condiciones antes descritas. La identidad de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> fue confirmada por espectrometría de masas exactas según el método de ionización por electrospray (ESI MS).

#### **Determinación de la solubilidad de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> en agua**

Se preparó una solución del surfactante  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$  empleando agua desionizada nanopura MilliQ®, la cual fue sometida a sonicación exhaustiva, dejándola luego sedimentar durante 24 horas.

El sólido fue separado mediante centrifugación y el sobrenadante así obtenido fue analizado por HPLC en las condiciones descritas anteriormente. La cantidad de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> en el sobrenadante acuoso fue calculada a partir de las áreas de los picos cromatográficos, utilizando una curva de calibración del surfactante disuelto en una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1). El valor obtenido de solubilidad de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> en agua fue de  $60.0 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ .

### **Ensayos de actividad antimicrobiana**

La actividad antimicrobiana de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> fue evaluada frente a diversos microorganismos indicadores por el método de microdilución (Gudiña *et al.*, 2010), utilizando placas plásticas estériles de 96 pocillos, fondo plano (TCP-96T-SI, Axygen, USA). Se realizaron diluciones seriadas al medio en caldo nutritivo estéril a partir de una suspensión homogénea de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, testeándose un rango de concentraciones de  $1.9$  a  $1000 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ . Asimismo se analizó la actividad del compuesto para una concentración igual a su máxima solubilidad en agua ( $60.0 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$ ). En todos los ensayos se incluyeron controles de esterilidad del surfactante y del caldo nutritivo, así como también de la viabilidad de los microorganismos. Todos los pocillos, excepto aquellos correspondientes a los controles de esterilidad, se inocularon con  $2.5 \text{ } \mu\text{l}$  de una suspensión del microorganismo a analizar en solución fisiológica, ajustando

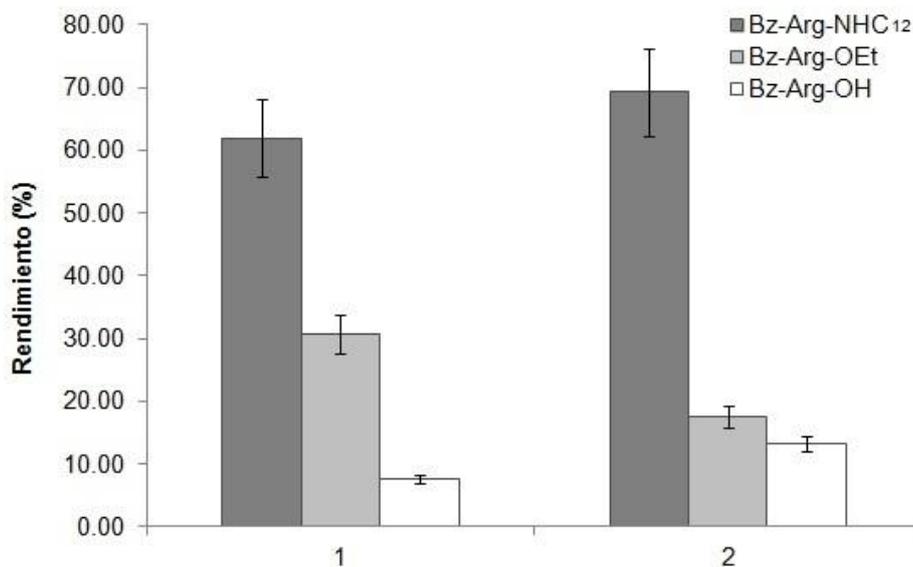
previamente su turbidez al 0.5 de la escala de McFarland ( $\sim 1.5 \times 10^8$  CFU.ml<sup>-1</sup>). Se realizó la lectura de la densidad óptica a 600 nm de la microplaca inmediatamente después del llenado de los pocillos y luego de 24 horas de incubación de la misma a 37 °C, utilizando un lector de microplacas (Tecan microplate reader, modelo SpectraRainbow, SLT Lab Instruments). Para cada microorganismo, el porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano para las distintas concentraciones del surfactante fue calculado como:  $\% \text{ de inhibición}_c = [1 - (DO_c/DO_0)] \times 100$ , donde  $DO_c$  representa la densidad óptica a 600 nm del pocillo correspondiente a la solución del surfactante de concentración igual a C, y  $DO_0$ , la densidad óptica a 600 nm del pocillo correspondiente al control del crecimiento del microorganismo en ausencia del surfactante. La concentración inhibitoria mínima (CIM) para cada cepa fue definida como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento medible ( $DO_{600} = 0$ , % de inhibición > 95%). Se realizaron estrías en placas con agar nutritivo libre del surfactante a partir de todas aquellas diluciones que no presentaron crecimiento visible ( $DO_{600} = 0$ ), las cuales se incubaron durante 24 h a 37 °C, determinándose luego la presencia de colonias. La concentración bactericida mínima (CBM) se definió como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento (ausencia de colonias).

Todas las determinaciones se llevaron a cabo al menos por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se empleó papaína de *Carica papaya* adsorbida en poliamida como biocatalizador para la síntesis de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>. La poliamida resultó ser un soporte apropiado para la inmovilización de peptidasas y así ser empleadas en este tipo de reacciones. Se observó que papaína conservó 29% de la actividad inicial luego del proceso de inmovilización, lo que ya fue previamente observado al emplear otras enzimas adsorbidas en este soporte y otros sustratos (Morcelle *et al.*, 2006). Este porcentaje de actividad recuperada fue suficiente para llevar a cabo la síntesis prevista. El proceso de inmovilización, en este caso, permitió la fácil eliminación por filtración del biocatalizador del medio de reacción, haciendo más simple la purificación del producto obtenido.

Dado que el producto de la reacción es fuertemente adsorbido sobre el biocatalizador, es necesario realizar un paso de extracción. La mezcla MeOH/AcOH 4:1 resultó ser apropiada para este fin (Clapés *et al.*, 1999). Sin embargo, para poder llevar a cabo el siguiente paso de purificación, la mencionada mezcla de extracción no es la más adecuada, ya que afectaría drásticamente la separación por cromatografía de intercambio catiónico de los analitos presentes en el medio de reacción. Para optimizar este proceso, se ensayó la mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 como solvente de extracción luego de realizar la síntesis del producto en microescala: los extractos obtenidos se analizaron por HPLC en las condiciones indicadas. En la Figura 2 puede apreciarse que no hubo diferencias significativas entre lo obtenido usando las distintas mezclas de extracción, con lo cual MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 fue la mezcla empleada para la extracción a mayor escala.

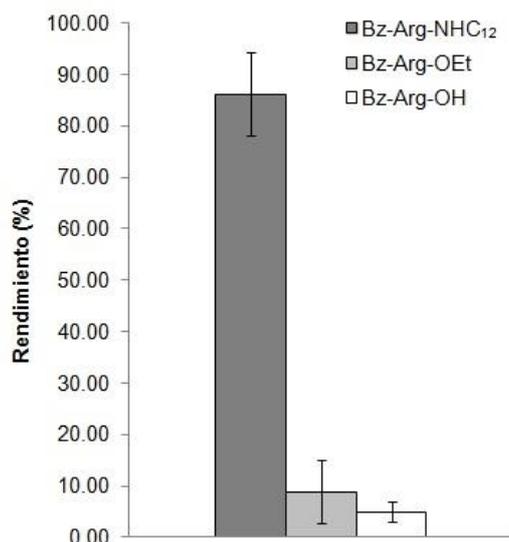


I

**Figura 2.** Síntesis de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> catalizada por papaína adsorbida en poliamida luego de 72 h de reacción. Los rendimientos para los productos de condensación y de hidrólisis, así como el sustrato remanente se muestran para las mezclas de extracción (1) MeOH/AcOH 4:1 y (2) MeOH/H<sub>2</sub>O.

**Figure 2.** Synthesis of Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> catalyzed by papain adsorbed onto polyamide at 72 h reaction. Yields for the condensation and the hydrolysis product, as well as the remanent substrate are shown for (1) MeOH/AcOH 4:1 and (2) MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 extraction mixtures.

Se realizó la síntesis a escala semipreparativa de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> como se indicó en la sección Metodología y utilizando la mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O indicada previamente para extraer los productos de la reacción. En este caso, el rendimiento obtenido para el producto de condensación fue de 85%, mayor que el logrado en la reacción en microescala (Figura 3). Esto pudo deberse al cambio de geometría del recipiente empleado para llevar a cabo la reacción.



**Figura 3.** Síntesis semipreparativa de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> luego de 72 h de reacción empleando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador. El rendimiento en producto de hidrólisis (Bz-Arg-OH) y el sustrato remanente (Bz-Arg-OEt) son también mostrados.

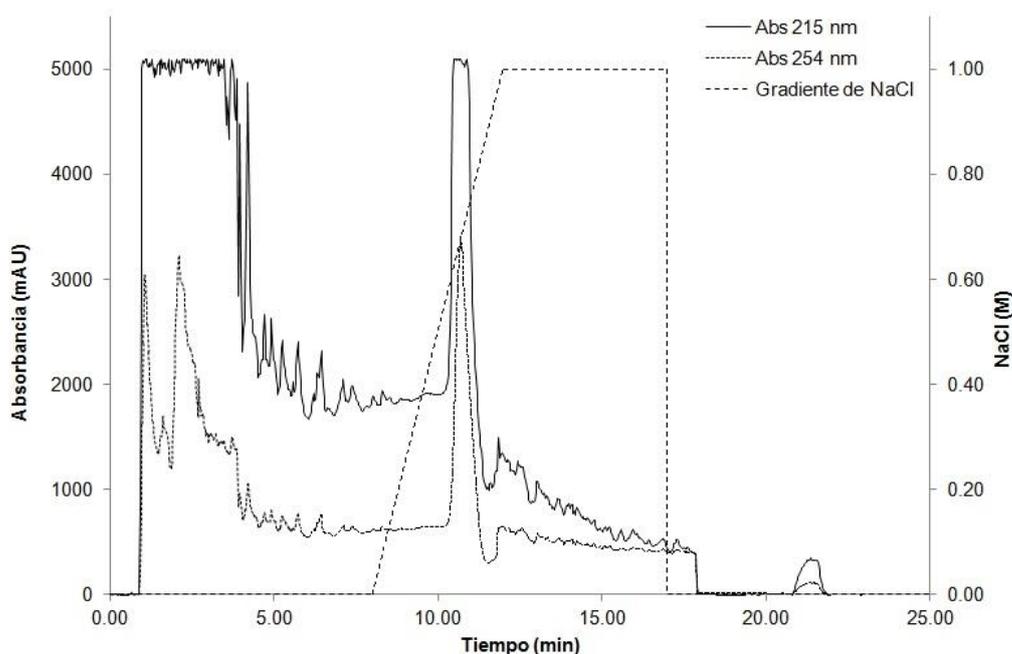
**Figure 3.** Semipreparative synthesis of Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> at 72 h of reaction using papain adsorbed onto polyamide as biocatalyst. Hydrolysis (Bz-Arg-OH) and remanent substrate (Bz-Arg-OEt) yields are also shown.

Los mismos fueron separados por cromatografía de intercambio catiónico empleando como fase estacionaria una columna constituida por una matriz de poliestireno/divinilbenceno funcionalizada con grupos metilsulfonato (Amersham Biosciences, 2011). Basados en investigaciones previas (Torres *et al.*, 2001), la fase móvil ensayada fue buffer bórico-borato 0.01 mM de pH 8.5 conteniendo 50% de etanol. La elución del producto fue lograda mediante la aplicación de un gradiente de NaCl. El pH seleccionado permitió la separación del producto de hidrólisis

(Bz-Arg-OH), el que, debido a su naturaleza zwitteriónica, eluiría con el material que no se unió a la fase estacionaria. El uso de etanol como cosolvente para la purificación del

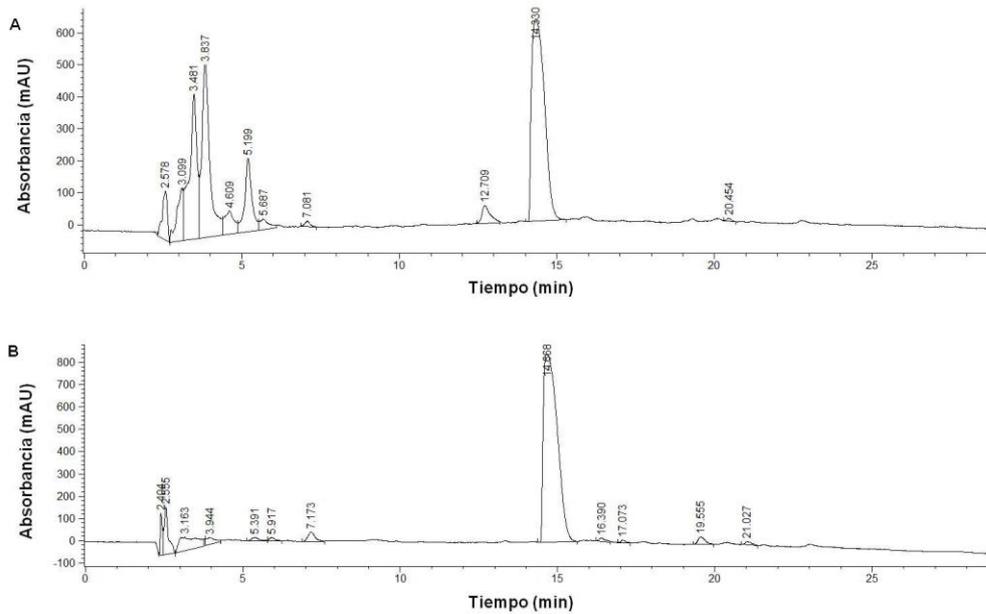
producto tuvo dos objetivos: mantener los solutos en solución y evitar las interacciones hidrofóbicas indeseadas con la fase estacionaria. Cabe destacar que el etanol tiene un bajo potencial tóxico y bajo costo: estas características lo convierten en un cosolvente de elección para los métodos de producción amigables con el medio ambiente.

La Figura 4 muestra el perfil cromatográfico obtenido para la separación de los componentes de la mezcla de reacción. El pico principal con tiempo de retención de 10,4 min fue luego analizado por HPLC con el fin de establecer su pureza. Con este propósito, la mezcla cruda de extracción fue también analizada en las mismas condiciones (Figuras 5a y 5b). La identidad del producto fue verificada por espectrometría de masas exactas ( $[M+Na^+]=468.3297$ ; la masa exacta de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> es 468.3314) (ChemCalc, 2012).



**Figura 4.** Perfil cromatográfico de la purificación a escala semipreparativa de la mezcla de extracción de la síntesis enzimática de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>.

**Figure 4.** Semipreparative cation-exchange profile of crude extraction mixture of Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> enzymatic synthesis.



**Figura 5.** Perfil cromatográfico (HPLC) de (a) mezcla de extracción de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> y (b) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> purificado por cromatografía de intercambio catiónico.

**Figure 5.** HPLC profile of (a) extraction mixture of Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> and (b) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> purified by cation-exchange chromatography.

La actividad antimicrobiana de los surfactantes catiónicos se debe principalmente a la interacción electrostática entre la cabeza cargada positivamente de la molécula con las cargas negativas de la superficie celular bacteriana; las interacciones hidrofóbicas entre la cola no polar del surfactante con la membrana bacteriana también tendría un rol importante (Colomer *et al.*, 2011).

Se determinaron las CIM y CBM de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> sobre *B. cereus*, *St. aureus*, *E. coli* y *Ps. aeruginosa*, empleando diluciones seriadas a partir de una suspensión homogénea de 1 mg.ml<sup>-1</sup> del compuesto (Tabla 1).

**Tabla 1.** Poder antimicrobiano de suspensiones de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>. R: resistente.

**Table 1.** Antimicrobial activity of Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>. R: resistant.

Microorganismo	Bz-Arg-NHC <sub>12</sub>	
	CIM (µg.ml <sup>-1</sup> )	CBM (µg.ml <sup>-1</sup> )
<i>Bacillus cereus</i>	15.6	250.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	62.5	62.5
<i>Escherichia coli</i>	250.0	250.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R

Se han reportado las propiedades antimicrobianas de surfactantes derivados de arginina con estructura semejante a la de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> (Morán *et al.*, 2001). La CIM para *E. coli* del producto obtenido en el presente trabajo fue de 250.0 µg.ml<sup>-1</sup>, resultando similar a la de 256.0 µg.ml<sup>-1</sup> registrada para N<sup>α</sup>-lauril-L-arginina-metil éster clorhidrato (LAM). Por otro lado, la CIM para *B. cereus* (15.6 µg.ml<sup>-1</sup>) resultó menor que las descritas para LAM y ALA (arginina-N-lauril amida diclorhidrato) por Morán *et al.*, (2001). En el caso de *St. aureus*, los valores de CIM fueron de 62.5, 16.0 y 32.0 µg.ml<sup>-1</sup> para Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, ALA y LAM respectivamente. Cabe destacar que a pesar de su

baja solubilidad en medio acuoso, el producto sintetizado mostró actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano.

Seguidamente, se ensayó el poder antimicrobiano de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> en solución acuosa frente a un panel de bacterias Gram positivas y negativas, así como también frente a levaduras. Los resultados obtenidos para la máxima concentración en la que dicho compuesto es soluble (60.0 µg.ml<sup>-1</sup>) se exponen en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Porcentajes de inhibición del crecimiento para una solución de 60.0 µg.ml<sup>-1</sup> (0.135 µM) de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>. R: resistente.

**Table 2.** Percentages of growth inhibition obtained with 60.0 µg.ml<sup>-1</sup> (0.135 µM) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>. R: resistant.

Microorganismo	<i>B. cereus</i>	<i>K. ryzophila</i>	<i>St. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. flexnerii</i>	<i>Rhodothorula sp.</i>	<i>S. cereviciae</i>	<i>P. anomala</i>	<i>K. marxianus</i>
% Inhibic.	100	100	90	93	99	95	95	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Pudo observarse que Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> soluble inhibió en más de un 90% el crecimiento de los microorganismos Gram positivos ensayados (excepto *L. innocua*), mientras que las bacterias Gram negativas y levaduras resultaron resistentes. Este comportamiento podría explicarse por la diferente composición de la pared celular de los microorganismos ensayados y la

impermeabilidad de las membranas externas de ciertas bacterias Gram negativas frente a compuestos anfifílicos (Morán *et al.*, 2001).

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se sintetizó un tensioactivo derivado de arginina mediante una reacción de condensación entre Bz-Arg-OEt y dodecilamina catalizada por papaína adsorbida en poliamida, obteniéndose una conversión del 86% en producto, lo que hace a esta metodología muy interesante para su aplicación industrial. Por otro lado, se diseñó una estrategia de purificación del producto empleando solventes y metodologías de baja toxicidad y bajo impacto ambiental. Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> en medio acuoso (60.0 µg.ml<sup>-1</sup>) no inhibió el desarrollo de bacterias Gram negativas ni levaduras, aunque demostró tener actividad contra la mayoría de las bacterias Gram positivas evaluadas, siendo promisorio su empleo como agente antimicrobiano.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (ANPCyT, PICT 02224), Comisión Nacional de Investigación Científica y Técnica (CONICET, PIP 11420100100150) y Universidad Nacional de La Plata (UNLP, Proyecto X-576). MEF es becaria CONICET. GLG y SRM pertenecen a la Carrera del Investigador de CONICET.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ChemCalc: Isotopic distribution calculation – Mass spectra simulation. <http://www.chemcalc.org>. Accedido online: 12/03/2012.
- Clapés P, Morán C & Infante MR. 1999. Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*, 63: 333-343.
- Colomer A, Pinazo A, Manresa MA, Vinardell MP, Mitjans M, Infante MR & Pérez L. 2011. Cationic Surfactants Derived from Lysine: Effects of Their Structure and Charge Type on Antimicrobial and Hemolytic Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54: 989-1002
- Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA & Rodrigues IR. 2010. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*, 50: 419–424
- Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing. Principles and Methods. Amersham Biosciences. [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/3E56FFCAFE43BCADC1257628001D0EC6/\\$file/11000421AA.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/3E56FFCAFE43BCADC1257628001D0EC6/$file/11000421AA.pdf). Accedido online: 28/06/2011
- Morán C, Clapés P, Comelles F, García T, Pérez L, Vinardell P, Mitjans M & Infante MR. 2001. Chemical structure/property relationship in single-chain arginine surfactants. *Langmuir*, 17: 5071-5075
- Morcelle SR, Barberis SE, Caffini NO, Priolo NS & Clapés P. 2006. Comparative behaviour of proteinases from the latex of *Carica papaya* and

- Funastrum clausum* as catalysts for the synthesis of Z-Ala-Phe-OMe. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41: 117-124
- Morcelle SR, Liggieri CS, Bruno MA, Priolo N & Clapés P. 2009. Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57: 177-182
  - Nuijens T, Cusan C, Schepers ACHM, Kruijtzter JAW, Rijkers DTS, Liskamp RMJ & Quaedflieg PJLM. 2011. Enzymatic synthesis of activated esters and their subsequent use in enzyme-based peptides synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71:79-84
  - Ota S, Moore S & Stein WH. 1964. Preparation and chemical properties of purified stem and fruit bromelains. *Biochemistry*, 3: 180-185
  - Pérez L, García MT, Ribosa I, Vinardell MP, Manresa E & Infante MR. 2002. Biological properties of arginine-based gemini cationic surfactants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21: 1279-1285
  - Resnik GO, Vishwanat P, Pynn MA, Sitnik JM, Todd JJ, Wu J, Jiang Y, Keenan BG, Castle AB, Haskell RF, Smith TF, Somasundaran P & Jarrell KA. 2010. Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1387-1997
  - Singh A, Van Hamme JD & Ward OP. 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25: 99–121
  - Torres JL, Piera E, Infante MR & Clapés P. 2001. Purification of non-toxic, biodegradable Arg-based gemini surfactants, bis(Arg), by ion exchange chromatography. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 31: 259