

SÍNTESIS BIOCATALÍTICA, ESTUDIOS DE TOXICIDAD Y CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE SURFACTANTES DERIVADOS DE ARGININA PARA SU EMPLEO COMO ADITIVOS EN FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

FAIT, M.E.¹; COSTA, H.²; DO SANTOS QUEIROZ, A.²; LORENZO, J.³; GARROTE, G.⁴; BAKAS, L.¹; MORCELLE, S.R.¹

¹Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIPROVE-CIC-UNLP), Depto. de Cs. Biológicas, Fac. de Cs. Exactas, UNLP, Argentina; ²Laboratório de Toxinas Vegetais, Depto. de Bioquímica e Biología Molecular, Universidade Federal do Ceará, Brasil.; ³Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.; ⁴Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA-CONICET-UNLP), Argentina.; *e-mail: mefait86@gmail.com

Los surfactantes o tensioactivos representan un conjunto de productos químicos consumidos diariamente en gran escala a nivel mundial. Por esta razón, es esencial que tanto su producción como los compuestos en sí mismos sean ambientalmente amigables. Teniendo en cuenta este aspecto, y haciendo uso de la biocatálisis, se han desarrollado moléculas basadas en estructuras naturales anfífilas, tales como los lipoaminoácidos. Debido a su estructura simple y similar a las de origen natural, estas moléculas cumplen con los requisitos de baja toxicidad y buena biodegradabilidad. Entre ellos, los lipoaminoácidos derivados de arginina constituyen una interesante familia de surfactantes catiónicos. Sus excelentes propiedades tensioactivas sumadas a su actividad antimicrobiana de amplio espectro convierten a estos compuestos en potenciales agentes preservativos, pudiendo empleárselos tanto en formulaciones farmacéuticas y cosméticas, como en alimentarias.

INTRODUCCIÓN

1. SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE SURFACTANTES DERIVADOS DE ARGININA

A PREPARACIÓN DEL BIOCATALIZADOR

Papaína (100 mg) disuelta en buffer bórico-borato 0,1 M pH 8,5 con EDTA (1 mM) y DTT (50 mg) + poliamida (1 g)

Liofilización (pap/pol)

B

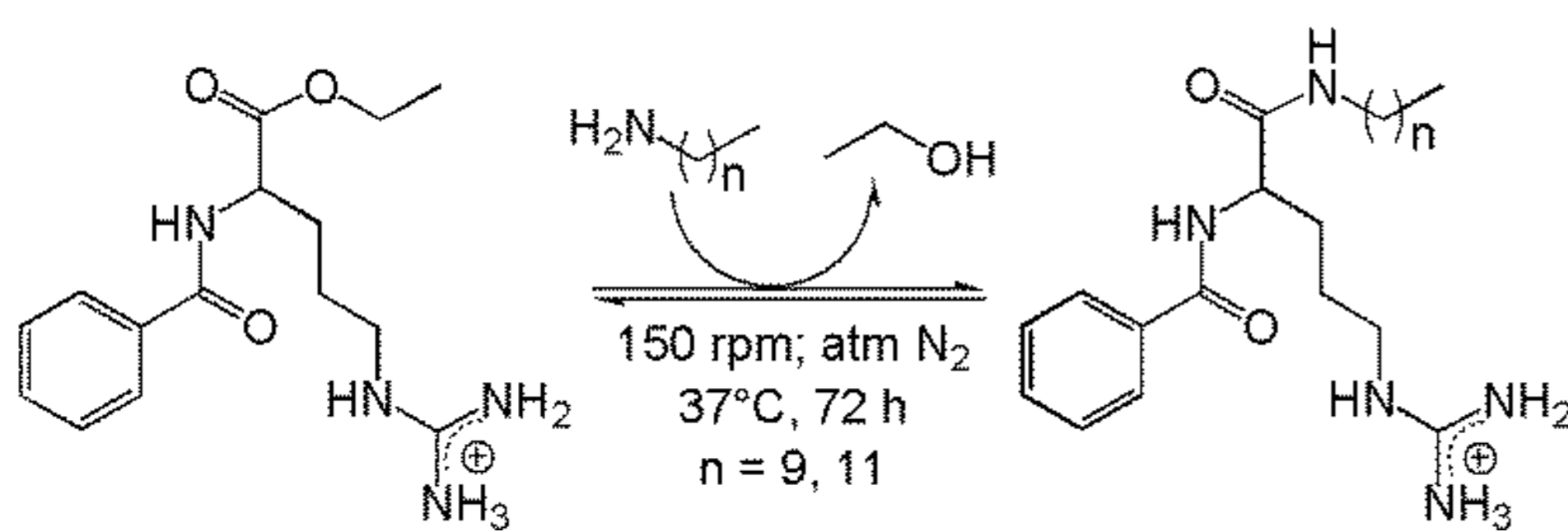


Figura 1.- REACCIÓN DE CONDENSACIÓN ENZIMÁTICA PARA LA SÍNTESIS DE Bz-Arg-NHC_n.

La reacción se lleva a cabo por incubación de 1 g de pap/pol, BAEE o Bz-Arg-OEt (0,2mmol) y decil- ó docecilamina (0,03 mmol) en 10 ml ACN con 0,25% (v/v) H₂O, durante 72 h bajo atmósfera de nitrógeno a 37°C. El producto es extraído con una mezcla MeOH/H₂O (4:1) (3x10ml), previo lavado del biocatalizador con ACN y éter para eliminar la amina remanente.

C

PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO CATIÓNICO

Buffer A: buffer bórico-borato 0,01 M, pH 8,5/etanol (1:1)
Buffer B: buffer bórico-borato 0,01 M, pH 8,5/etanol 1:1, 1 M de NaCl
Intercambiador: SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare); detección λ 215 y 254 nm
Los compuestos purificados fueron desalados e identificados por HPLC, ESI MS y RMN

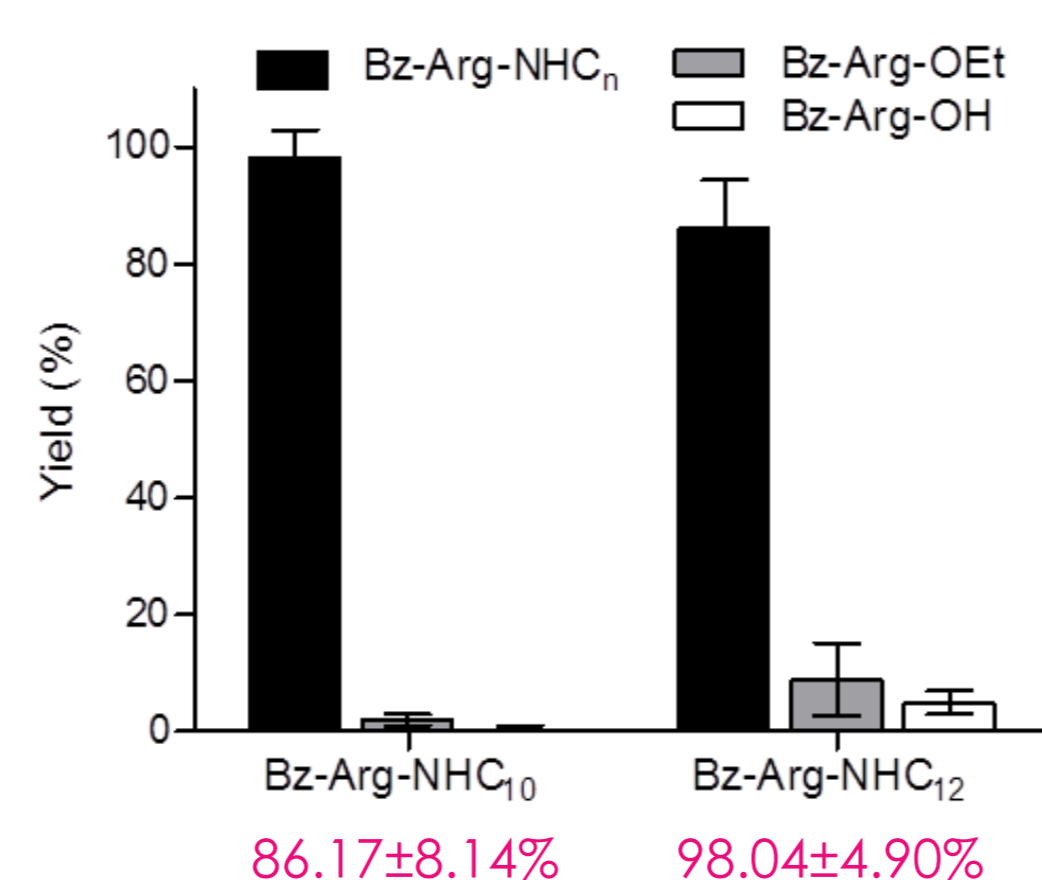


Figura 2.- RENDIMIENTO PARA LA SÍNTESIS SEMIPREPARATIVA DE Bz-Arg-NHC_n.

Se muestran también los rendimientos para el producto de hidrólisis (Bz-Arg-OH) y el sustrato remanente (BAEE o Bz-Arg-OEt).

3. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

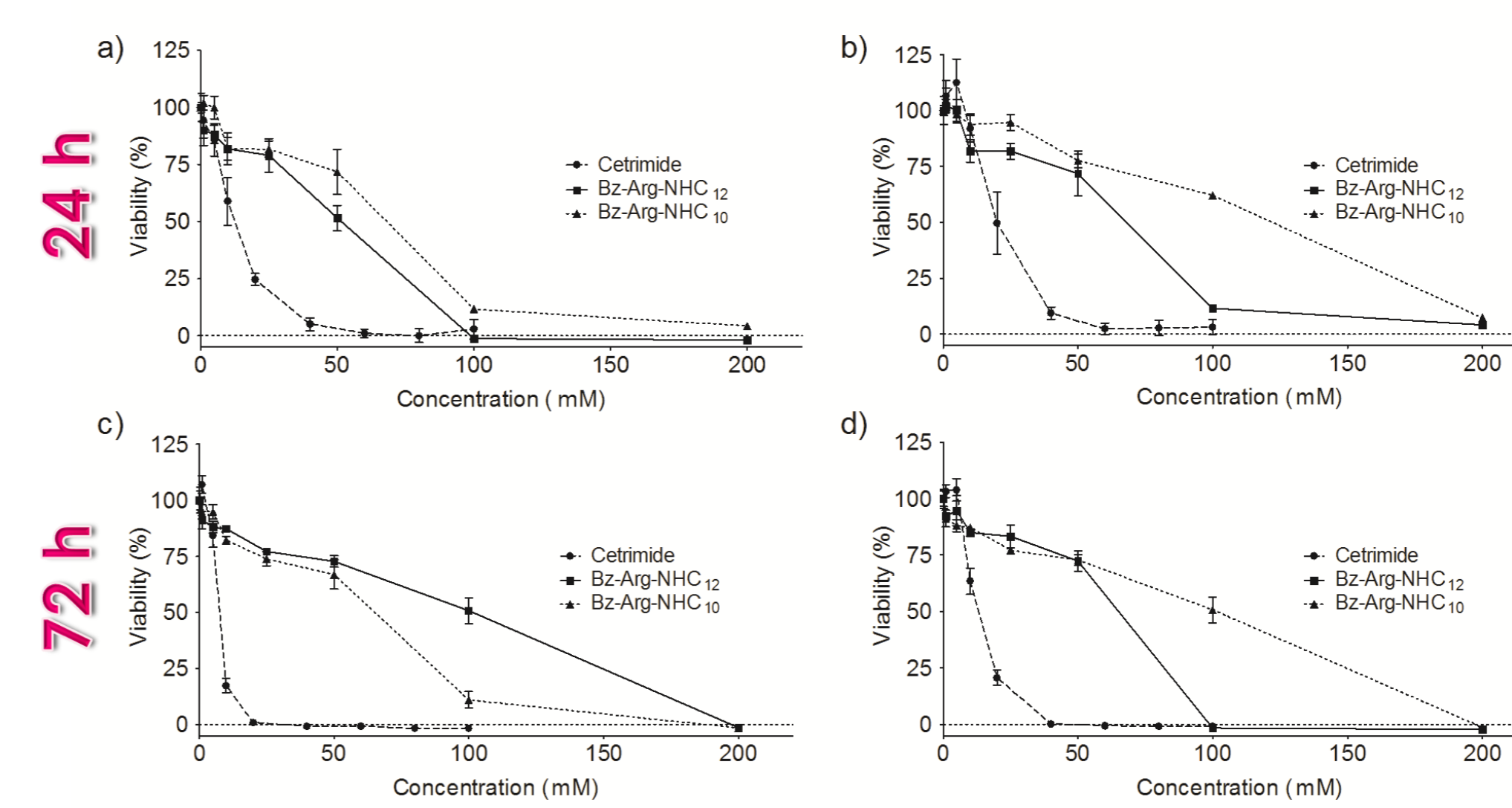


Figura 3.- EFECTO DE Bz-Arg-NHC_n Y Cetrimide SOBRE LA VIALIDAD DE (a-c) 1BR.3.G Y (b-d) HepG2

Tabla 1.- CITOTOXICIDAD DE Bz-Arg-NHC_n EN CÉLULAS 1BR.3.G Y HepG2

Surfactante (PM)	IC ₅₀ ^a (μM)			
	HepG2		1BR.3.G	
	24 h	72 h	24 h	72 h
Bz-Arg-NHC ₁₀ (418,32)	76,7 ± 5,7	104,2 ± 7,2	52,1 ± 6,2	62,3 ± 5,9
Bz-Arg-NHC ₁₂ (446,34)	56,4 ± 5,5	60,8 ± 6,4	31,9 ± 4,4	44,9 ± 5,1
Cetrimide (336,42)	12,4 ± 1,5	20,1 ± 3,1	7,2 ± 0,5	11,7 ± 1,0

A partir de las curvas "% de viabilidad vs. concentración" se calculó la IC₅₀, es decir los valores de concentración que causan la muerte del 50% de la población celular respecto del control en ausencia de los surfactantes.

2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Tabla 2.- VALORES DE CIM Y CBM PARA Bz-Arg-NHC_n

Microorganismo	CIM (μM)			CBM (μM)		
	Bz-Arg-NHC ₁₀	Bz-Arg-NHC ₁₂	Cetrimide	Bz-Arg-NHC ₁₀	Bz-Arg-NHC ₁₂	Cetrimide
Gram-pos						
<i>B. cereus</i>	50	50	1.95	>800	>200	3.91
<i>B. subtilis</i>	50	50	ND	>800	100	ND
<i>E. faecalis</i>	100	25	ND	400	200	ND
<i>E. faecium</i>	50	25	ND	100	200	ND
<i>K. rhizophila</i>	100	25	ND	100	>200	ND
<i>S. aureus</i>	62.5	100	1.95	>800	50	3.91
Gram-neg						
<i>E. coli</i>	200	200	31.25	200	100	31.25
<i>P. aeruginosa</i>	100	50	125	200	>200	250
<i>S. flexneri</i>	100	50	ND	200	200	ND
<i>S. marcescens</i>	50	50	ND	200	100	ND

CIM y CBM: menor concentración de los surfactantes capaz de inhibir el crecimiento medible y el crecimiento total, respectivamente, de las bacterias luego de 24 h de exposición.

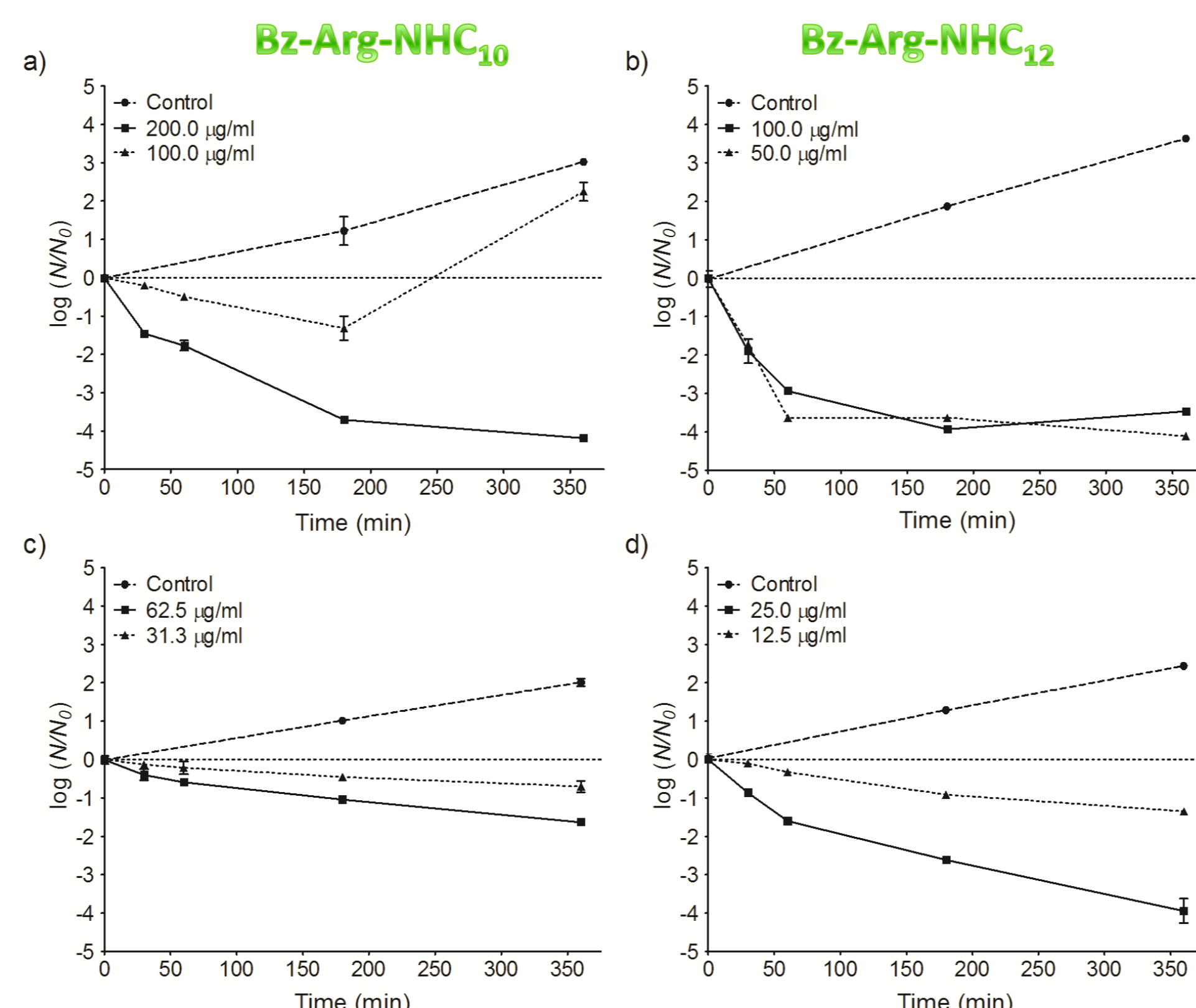


Figura 4.- EFECTO DE Bz-Arg-NHC_n SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE *E. coli* (a, b) Y *S. aureus* (c, d) EN CN ADICIONADO CON LOS SURFACTANTES

4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD HEMOLÍTICA E IRRITABILIDAD OCULAR

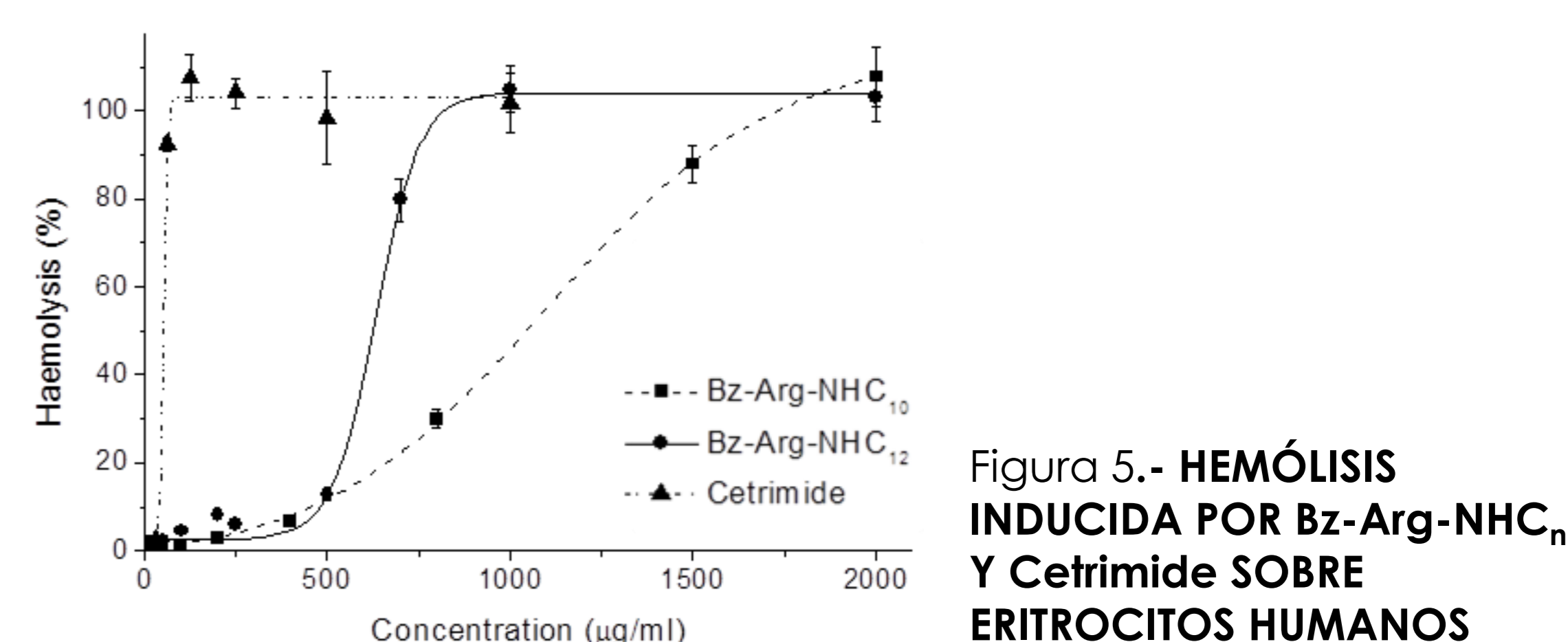


Figura 5.- HEMÓLISIS INDUCIDA POR Bz-Arg-NHC_n Y Cetrimide SOBRE ERITROCITOS HUMANOS

Tabla 3.- ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DE Bz-Arg-NHC_n. Índice de desnaturalización (ID), relación lisis/desnaturalización (L/D) y potencial de irritabilidad ocular

Surfactante (PM)	CMC (μM)	HC ₅₀ (μM)	ID	L/D	Irritabilidad ocular
Bz-Arg-NHC ₁₂ (446,34)	84.70	1412.8 ± 15.8	6.19	137.81	No irritante
Bz-Arg-NHC ₁₀ (418,32)	230.21	2630.5 ± 57.8	7.98	101.82	No irritante
Cetrimide (336,42)	297.25	155.2 ± 13.9	8.58	6.06	Moderada

5. MEDIDAS DE TENSIÓN SUPERFICIAL

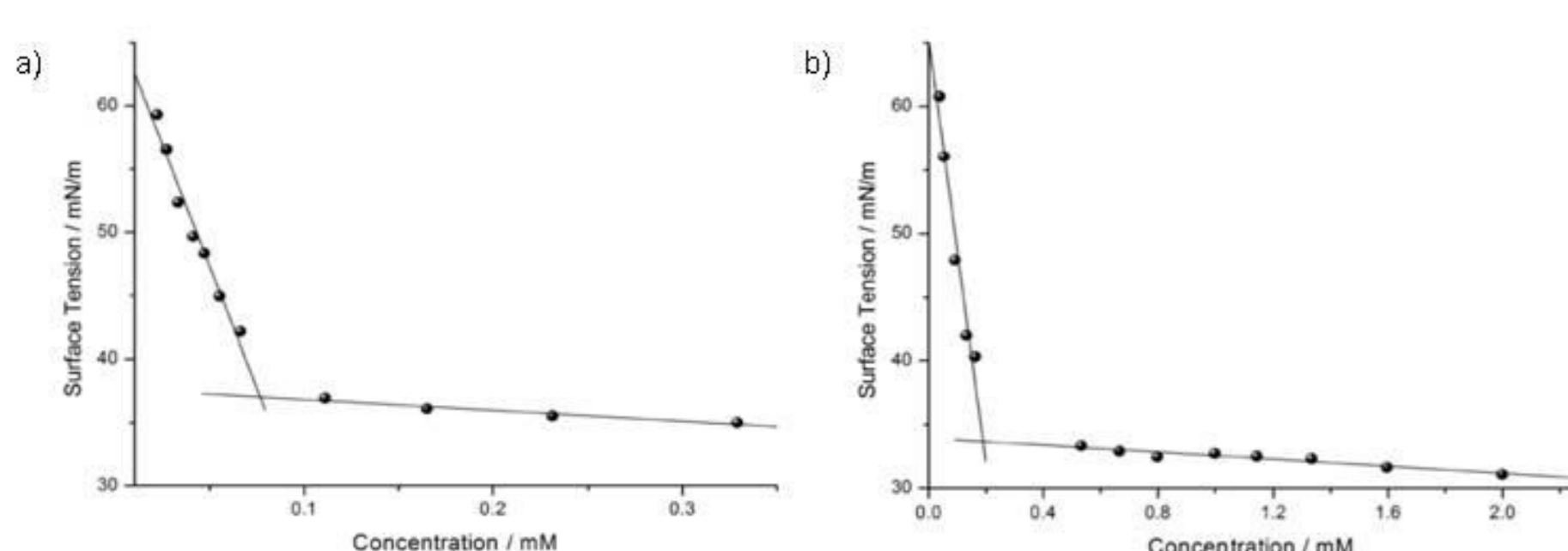


Figura 6.- DEPENDENCIA DE LA TENSIÓN SUPERFICIAL EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE (a) Bz-Arg-NHC₁₂ Y (b) Bz-Arg-NHC₁₀.

6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Tabla 3.- ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE Bz-Arg-NHC_n CONTRA *C. albicans*.

Surfactante	<i>C. albicans</i>			
	ATCC 64548	Clinical isolate		
	CIM (μM)	CFM (μM)	CIM (μM)	CFM (μM)
Bz-Arg-NHC ₁₀	62.5	125.0	125.0	250.0
Bz-Arg-NHC ₁₂	31.2	125.0	62.5	>500.0
Cetrimide	15.6	62.5	18.8	125.0

CIM y CFM: menor concentración de los surfactantes capaz de inhibir el crecimiento medible y el crecimiento total, respectivamente, de las levaduras luego de 24 h de exposición.

Tabla 5.- ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS SURFACTANTES CONTRA ESPECIES DE HONGOS DERMATÓFITOS DEL GÉNERO TRICOPHYTON.

Microorganismo	Surfactante								
	Bz-Arg-NHC ₁₀			Bz-Arg-NHC ₁₂			Cetrimide		
	CIM ₇ ^a (μM)	CIM ₂₁ ^a (μM)	IC ₅₀ ^b (μM)	CIM ₇ ^a (μM)	CIM ₂₁ ^a (μM)	IC ₅₀ ^b (μM)	CIM ₇ ^a (μM)	CIM ₂₁ ^a (μM)	IC ₅₀ ^b (μM)
<i>T. rubrum</i>	125.0	125.0	52.06 ± 4.52	62.5	125.0	32.39 ± 0.26	62.5	125.0	51.48 ± 1.59
<i>T. mentagrophytes</i>	125.0	125.0	58.15 ± 0.45	125.0	125.0	57.85 ± 0.70	62.5	62.5	37.19 ± 1.58

^aMenor concentración de los surfactantes que inhibe completamente el crecimiento fúngico después de 7 (CIM₇) o 21 (CIM₂₁) días de exposición a los mismos. ^bValores de concentración que inhiben el 50% del desarrollo micelial respecto del control luego de 21 días de exposición a los surfactantes (IC₅₀).

CONCLUSIONES

- Mediante catálisis enzimática se sintetizaron dos surfactantes derivados de arginina de cadena simple (Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂), utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador. Los rendimientos en producto de condensación fueron superiores al 80% en los dos casos.
- Se diseñó una estrategia de purificación de los productos empleando solventes y metodologías de baja toxicidad y bajo impacto ambiental.
- Ambos productos mostraron amplia actividad antimicrobiana, ya que inhibieron el crecimiento tanto de bacterias como de hongos (especies dermatófitas y la levadura *C. albicans*), observándose incluso un efecto bactericida y fungicida en la mayoría de los casos.
- En cuanto a la toxicidad, las HC₅₀ y las IC₅₀ determinadas para Bz-Arg-NHC_n fueron superiores a las encontradas para Cetrimide, lo que indicaría que ambos compuestos serían menos tóxicos para las líneas celulares ensayadas.
- La determinación de las relaciones L/D permitió clasificar a para Bz-Arg-NHC_n como no irritantes oculares.
- Los resultados aquí expuestos demuestran la factibilidad de obtener compuestos novedosos, utilizando materias primas simples y procedimientos de bajo impacto ambiental, con potencial aplicación tanto en sectores industriales como de la salud (medicina y farmacia).