

## Producción de un agente antimicrobiano con potencial actividad tensioactiva mediante el empleo de tecnologías amigables con el medio ambiente

Production of an antimicrobial agent with potential surfactant 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>

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

**Keywords:** arginine- derivatives, biocatalysis, papain, antimicrobial activity

### ABSTRACT

Papain is an endopeptidase obtained from *Carica papaya latex* 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 production, purification and determination of antimicrobial activity of an arginine-based compound with potential surfactant activity synthesized using papain as biocatalyst.

The synthesis was carried out through a condensation reaction between

Na-benzoyl-arginine ethyl ester and 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 through 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 through 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 had a conversion of 86.2%. Antimicrobial activity of an aqueous Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> solution (60.0 µg.ml<sup>-1</sup>) 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.

The purified compound had a MIC of 15.6 µg.ml<sup>-1</sup> for *B. cereus*, 62.5 µg.ml<sup>-1</sup> for *St. aureus* and 250.0 µg.ml<sup>-1</sup> for *E. coli*, whereas *Ps. aeruginosa* was not inhibited. MBC were of 250.0 µg.ml<sup>-1</sup>, 62.5 µg.ml<sup>-1</sup> and 250.0 µg.ml<sup>-1</sup> for *B. cereus*, *St. aureus* and *E. coli*, respectively.

### 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, purificación y determinación del poder antimicrobiano de un compuesto derivado de arginina con potencial actividad tensioactiva, sintetizado mediante el empleo de papaína como biocatalizador.

La síntesis se llevó a cabo por condensación del éster etílico de Na-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%. Se determinó la actividad antimicrobiana de una solución acuosa de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> (60.0 µg.ml<sup>-1</sup>) 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.

El compuesto puro presentó una CIM de 15.6 µg.ml<sup>-1</sup> para *B. cereus*, 62.5 µg.ml<sup>-1</sup> para *St. aureus* y 250.0 µg.ml<sup>-1</sup> para *E. coli*, en tanto que no afectó el crecimiento de *Ps. aeruginosa*. Las CBM fueron 250.0 µg.ml<sup>-1</sup>, 62.5 µg.ml<sup>-1</sup> y 250.0 µg.ml<sup>-1</sup> para *B. cereus*, *St. aureus* y *E. coli* respectivamente.

<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.

<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.

<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

<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

\*Autor para correspondencia: +54 221 423-5333 int 57

## INTRODUCCIÓN

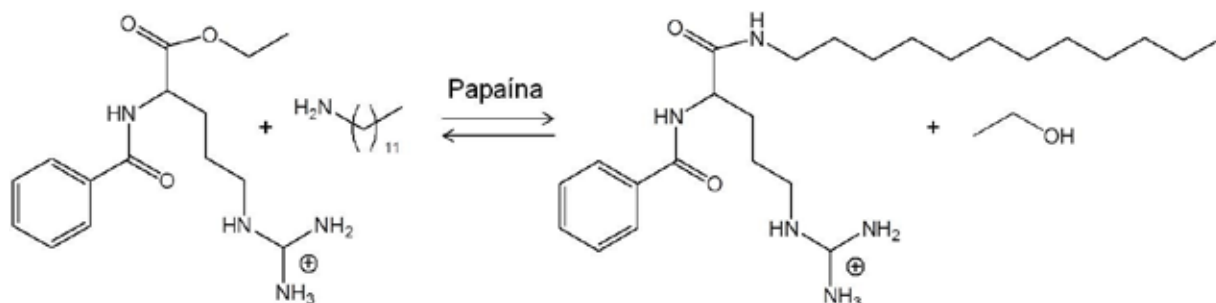
Los surfactantes (*surface active agents*) (Resnik *et al.*, 2010) son compuestos anfífilos que pueden reducir la tensión interfacial superficial acumulándose en la superficie de fluidos inmiscibles y aumentando la solubilidad y movilidad de compuestos orgánicos hidrofóbicos o insolubles (Singh *et al.*, 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.

Si bien la mayor parte de las aplicaciones de las proteasas se refiere a reacciones hidrolíticas en medio acuoso para la degradación de moléculas complejas a moléculas más simples, su empleo en reacciones reversas ha sido muy estudiado. Para que las peptidasas puedan actuar como biocatalizadores en la formación de enlaces peptídicos debe manipularse el equilibrio de la reacción, por ejemplo, mediante la disminución de la actividad acuosa del medio de reacción o la activación de los sustratos. Ciertos péptidos empleados en la industria alimentaria y farmacéutica tales como aspartamo (Nakaoka *et al.*, 1998), alitamo (Kim & Shin, 2001) y kiotorfina (Lee *et al.*, 1993), y diversos derivados de hormonas como insulina (Moriyama, 1987),

encefalinas (Clapés *et al.*, 1995), etc., han sido sintetizados empleando proteasas como catalizadores. En general, 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 aminoácil alquilamidas es la que presentaría una mejor relación costo-beneficio para la obtención de este tipo de compuestos (Nuijens *et al.*, 2011).

La 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 fácil de obtener que las peptidasas de origen microbiano. Como biocatalizador en química orgánica, la papaína es una de las enzimas más empleadas en la síntesis de diversos derivados peptídicos, debido a su amplia especificidad y robustez.

Morcelle *et al.* (2009) sintetizaron en microescala una novedosa alquilamina derivada de arginina con potencial actividad tensioactiva, mediante una reacción de condensación entre el éster etílico de *N*<sup>o</sup>-benzoil-arginina y dodecilamina (*N*<sup>o</sup>-benzoil-arginina dodecilamida, Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>) catalizada por distintas cisteín peptidasas vegetales. Tomando como base dicho estudio, se plantea en el presente trabajo la obtención a escala semipreparativa de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> empleando papaína como biocatalizador (Figura 1), la optimización de su extracción, su purificación mediante técnicas eco-compatibles y la evaluación de su actividad antimicrobiana.



**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 de 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 *Rhodotorula* sp., aislada del ambiente.

### Preparación del biocatalizador

La papaína (100 mg) fue disuelta en 1 ml de buffer bórico-borato pH 8.0, conteniendo 1 mM de ácido etilendiamino tetraácetico, sal disódica (EDTA) 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>o</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 solución conteniendo acetonitrilo anhidro (almacenado con tamices moleculares) con 0.25% (v/v) de agua. Las reacciones se llevaron a cabo individualmente por incubación del biocatalizador (100 mg) en presencia de la mezcla de reactivos durante 72 horas 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) y la fase líquida resultante fue separada del biocatalizador. La extracción del producto de síntesis adsorbido en el biocatalizador se realizó mediante dos lavados sucesivos del mismo con la mencionada mezcla de solventes (1 ml cada vez) y los extractos se reunieron con la fase líquida previamente separada (Clapés *et al.*, 1999). Paralelamente se ensayó el uso de la mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O en proporción 4:1 siguiendo el procedimiento antes descrito.

Cada una de las mezclas mencionadas, constituidas por los productos y reactivos remanentes disueltos en el solvente inicial donde se llevó a cabo la reacción junto con aquello que fuera extraído con las distintas mezclas ensayadas, fue filtrada a través de membranas de nylon (tamaño de poro 0.45  $\mu$ m) y analizado por HPLC (Agilent

1100 LC) utilizando una columna Lichrosorb 100 propilciano (250×4 mm, 5  $\mu$ m, 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.

### **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) y dodecilamina (0.3 mmol) en 10 ml de acetonitrilo anhidro (almacenado con tamices moleculares) 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). La reacción fue detenida y el producto extraído utilizando la mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O en proporción 4:1 (3×10 ml), reuniendo los extractos de igual manera que la descrita para la síntesis en microescala. Los mismos fueron filtrados a través de una membrana de nylon (0.22  $\mu$ m). La purificación de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> contenida en los extractos 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 ml.min<sup>-1</sup> durante todo el procedimiento, detectándose los picos eluidos espectrofotométricamente a 215 y 254 nm.

Las fracciones conteniendo el producto fueron recolectadas y secadas por evaporación. 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 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 mg.ml<sup>-1</sup> 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 del área del pico cromatográfico, utilizando una curva de calibración del surfactante disuelto en una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1).

### 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 µg.ml<sup>-1</sup>. Asimismo se analizó la actividad del compuesto para una concentración igual a su máxima solubilidad en agua (60.0 µg.ml<sup>-1</sup>). 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 µl de una suspensión del microorganismo a analizar en solución fisiológica, ajustando previamente su turbidez al 0.5 de la escala de McFarland (~1.5x10<sup>8</sup> 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: % de inhibición = [1 - (DO<sub>c</sub>/DO<sub>0</sub>)] × 100, donde DO<sub>c</sub> representa la densidad óptica a 600 nm del pocillo correspondiente a la solución del surfactante de concentración igual a C, y DO<sub>0</sub>, 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<sub>600</sub> = 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<sub>600</sub> = 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).

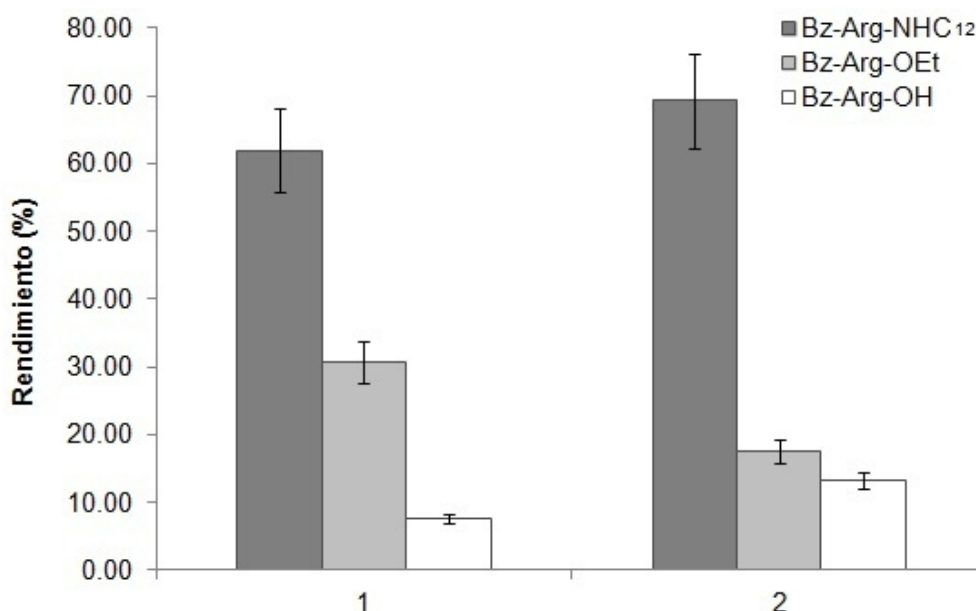
Todas las determinaciones se llevaron a cabo al menos por triplicado.

## 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, fue 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.

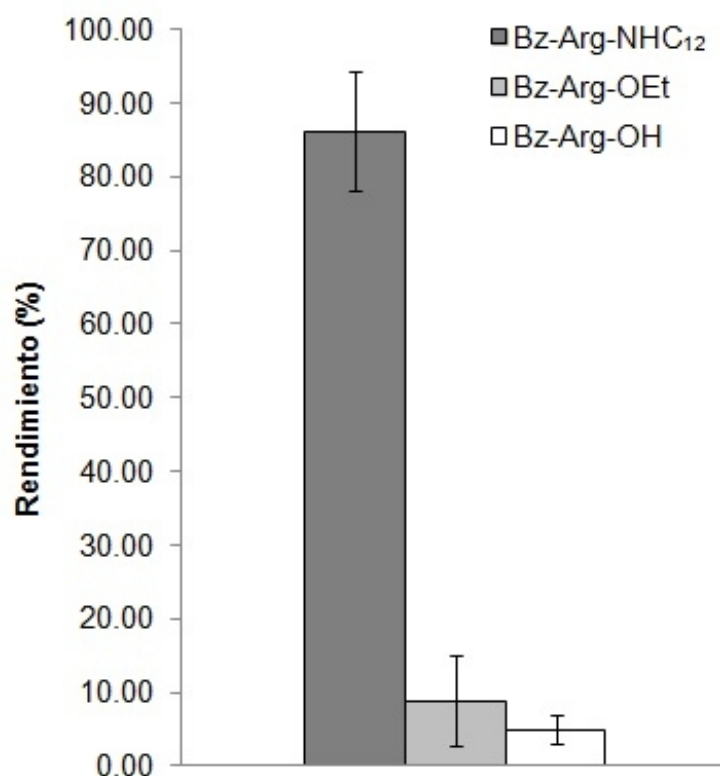


**Figura 2.** Síntesis de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> catalizada por papaína adsorbida en poliamida luego de 72 h de reacción. Los rendimientos para los productos de condensación y de hidrólisis, así como el sustrato remanente se muestran para las mezclas de extracción (1) MeOH/AcOH 4:1 y (2) MeOH/H<sub>2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

**Figure 2.** Synthesis of Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> catalyzed by papain adsorbed onto polyamide at 72 h reaction. Yields for condensation and hydrolysis products as well as the remaining 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, 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 del 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 remaining substrate (Bz-Arg-OEt) yields are also shown.

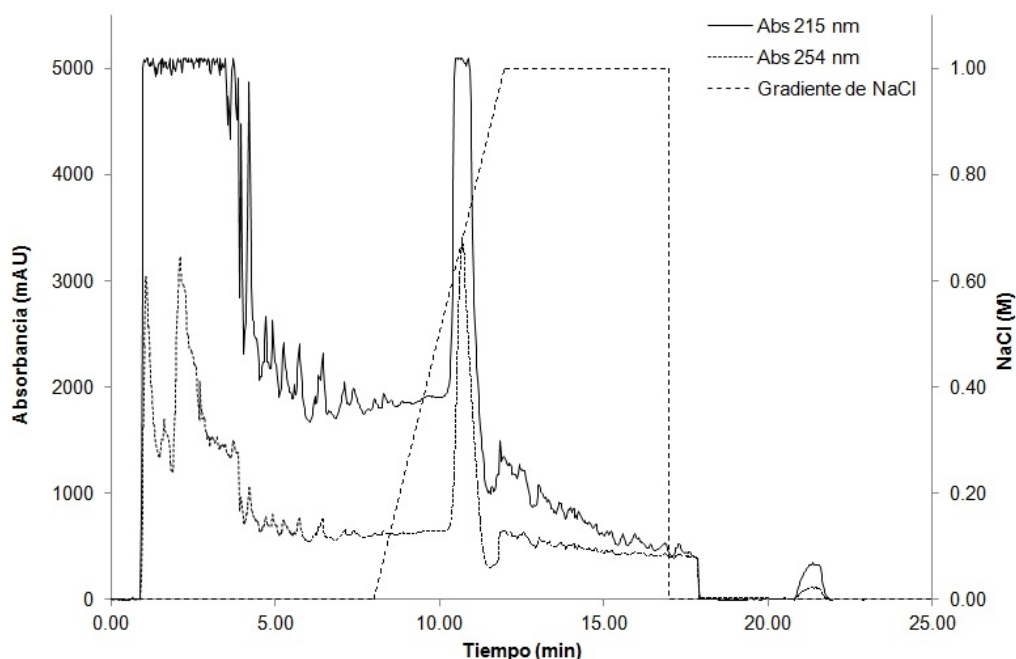
El producto de síntesis fue separado de los demás componentes presentes en el extractivo por cromatografía de intercambio catiónico empleando como fase estacionaria una columna constituida por una matriz de poliestireno/divinilbenceno funcionalizada con grupos metilsulfonato (Amersham Biosciences, 2011). 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 (Figura 5b). Con este propósito, la mezcla cruda de extracción fue también analizada en las

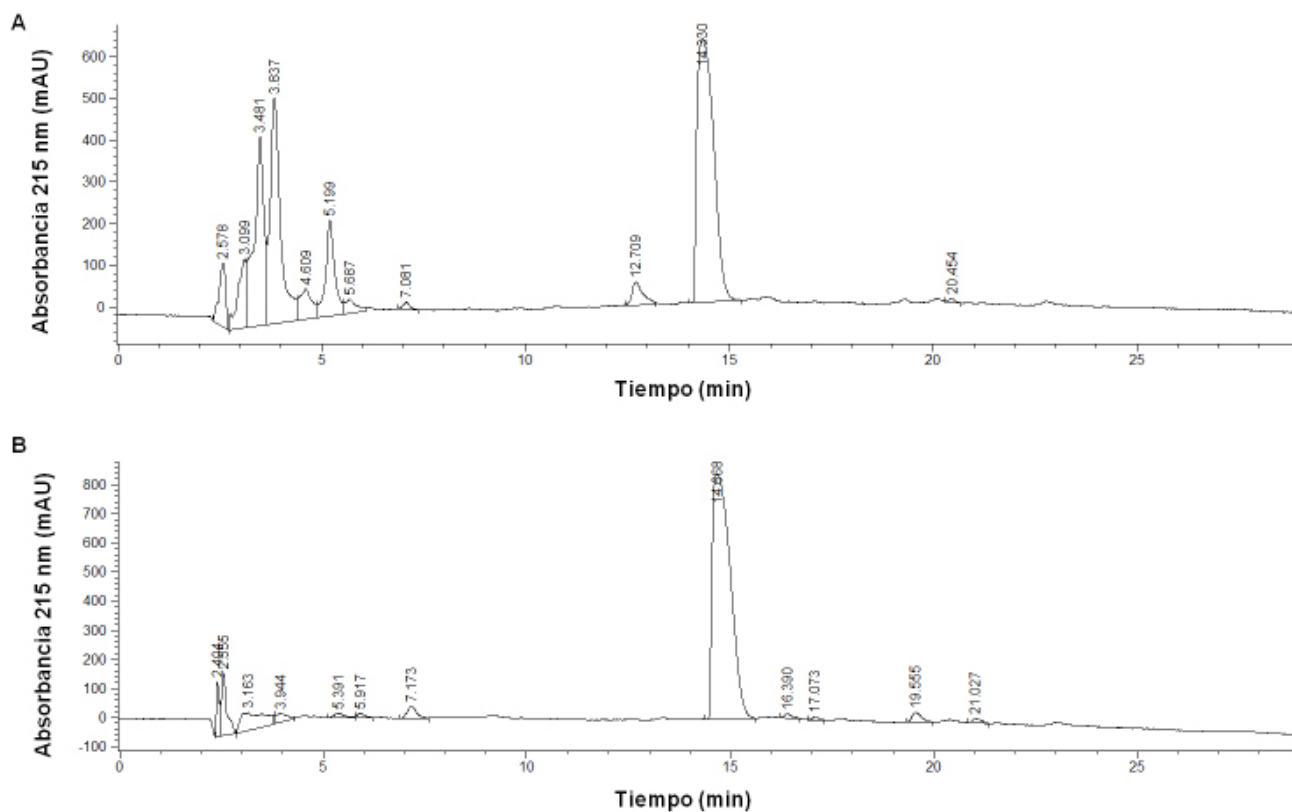
mismas condiciones (Figura 5a). Luego de la purificación, puede apreciarse una notable disminución en el área del pico correspondiente al reactivo remanente (tiempo de retención del patrón Bz-Arg-OEt: 5.4 min; tiempo de retención: 5.199 min en la Figura 5a, y 5.391 min en la Figura 5b) y la desaparición del pico correspondiente al sustrato hidrolizado (tiempo de retención de Bz-Arg-OH patrón: 4.7 min; tiempo de retención: 4.609 min en la Figura 5a). Asimismo, el cromatograma de la Figura 5b muestra la eliminación de los picos correspondientes a otras impurezas. La identidad del producto fue verificada por espectrometría de masas exactas ( $[M+H]^+$  = 446.34662). La masa exacta del aducto Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> con H<sup>+</sup> calculada según el software on-line ChemCalc (2012).



**Figura 2.** Plan Maestro de San Sebastián: Barrios y etapas de desarrollo

**Figure 2.** Master Plan of San Sebastián: Neighborhoods and stages of development





**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 tendrían un rol importante (Colomer *et al.*, 2011).

Luego de determinarse la solubilidad del compuesto en agua, 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 1.

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

Microorganismo	<i>B. cereus</i>	<i>K. rizophila</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. flexneri</i>	<i>Rhodotorula sp.</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>P. anomala</i>	<i>K. maritimus</i>
% Inhibición	100	100	90	93	99	95	95	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

**Tabla 1.** 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 1.** Percentages of growth inhibition for a 60.0 µg.ml<sup>-1</sup> (0.135 µM) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> solution. R: resistant.

externas de ciertas bacterias Gram negativas frente a compuestos anfífilicos (Morán et al., 2001).

Asimismo, se determinaron las concentraciones inhibitorias y bacteridas

mínimas (CIM y CBM, respectivamente) 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 2).

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

**Tabla 2.** Poder antimicrobiano de suspensiones de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>. R: resistente.

**Table 2.** Antimicrobial activity of Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>. R: resistant.

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>o</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.

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se sintetizó a escala semipreparativa un producto derivado de arginina mediante una reacción de condensación entre Bz-Arg-OEt y dodecilamina catalizada por papaína adsorbida en poliamida. Dicho compuesto había sido sintetizado previamente mediante catálisis enzimática sólo en microescala (Morcelle *et al.*, 2009). A escala semipreparativa, se logró una conversión del 86% en el mencionado producto, lo que hace a esta metodología muy interesante para su aplicación industrial. Por otro lado, se diseñó una estrategia de purificación del compuesto obtenido empleando como principal metodología cromatografía de intercambio catiónico, en la que se utilizó como fase móvil mezclas hidroalcohólicas de baja toxicidad y bajo impacto ambiental. El Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> obtenido y purificado demostró tener actividad inhibitoria del crecimiento de 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). La determinación de masas exactas por HPLC-MS ESI fue realizada por el Dr. Guillermo Labadie en el IQUIR-UNR-CONICET, Rosario, Santa Fe, Argentina. MEF es becaria CONICET. GLG y SRM pertenecen a la Carrera del Investigador de CONICET.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ChemCalc. 2012. ChemCalc: Isotopic distribution calculation - Mass spectra simulation. <http://www.chemcalc.org>. Accedido online: 12/03/2012
- Clapés P, Torres JL & Adlercreutz P. 1995. Enzymatic peptide synthesis in low water content systems: preparative enzymatic synthesis of [Leu]- and [Met]-enkephalin derivatives. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 3: 245-255
- 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
- Amersham Biosciences. 2011. Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing. Principles and Methods. [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
- Kim C & Shin CS. 2001. Solvent-free enzymatic synthesis of alitame precursor using eutectic substrate mixtures. *Enzyme and Microbiology Technology*, 28: 611-616
- Lee H-H, Fukushi K, Oyama K & Aso K. 1993. PEG-papain catalyzed synthesis of a kyotorphin derivative in aqueous organic media. *Biotechnology Letters*, 15: 833-836
- 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 *Funaria 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
- Morihara K. 1987. Using proteases in peptide synthesis. *Trends in Biotechnology*, 5: 164-170
- Nakaoka H, Miyajima Y & Morihara K. 1998. Papain-catalyzed synthesis of aspartame precursor: a comparison with thermolysin. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 85: 43-7
- Nuijens T, Cusan C, Schepers ACHM, Kruijtz 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(Args), by ion exchange chromatography. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 31: 259-274