

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

Fait ME¹, Costa H², do Santos Queiroz A², Lorenzo J³, Garrote G⁴, Bakas L¹, Morcelle Sr¹

¹CIPROVE, Dpto. de Cs. Biológicas, Fac. de Cs. Exactas, UNLP, La Plata, Argentina

²Laboratório de Toxinas Vegetais, Dpto. de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Ceará, Brasil.

³Institut de Biotecnologia i de Biomedicina, UAB, Bellaterra, Barcelona, Spain.

⁴CIDCA, CONICET-UNLP, La Plata, Argentina.

e-mail: mefait86@gmail.com

Introducción

Tanto la búsqueda como el desarrollo de compuestos bioactivos deben cumplir con requisitos de inocuidad, multifuncionalidad, eficacia, competitividad y bajo impacto ambiental. Una de las estrategias para conseguir tensioactivos ecológicamente aceptables es la preparación de moléculas cuya estructura mimetice la de compuestos naturales, como los lipoaminoácidos. Los surfactantes derivados de arginina son tensioactivos catiónicos con múltiples aplicaciones en la industria y amplia actividad biológica, cuya síntesis puede llevarse a cabo mediante catálisis enzimática. En este sentido, papaína (E.C. 3.4.22.2), una endopeptidasa cisteínica vegetal obtenida del látex de *Carica papaya*, es una de las enzimas más empleadas en procesos biocatalíticos, entre ellos la síntesis de derivados peptídicos, debido a su robustez y amplia especificidad.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo son la síntesis enzimática, purificación, evaluación de la actividad antimicrobiana contra bacterias y hongos, y del perfil citotóxico de dos tensioactivos catiónicos derivados de arginina (*N*^ε-benzoil-arginina decilamida, Bz-Arg-NHC₁₀, y *N*^ε-benzoil-arginina dodecilamida, Bz-Arg-NHC₁₂).

Materiales y métodos

Los tensioactivos Bz-Arg-NHC_n (n=10 ó 12), fueron obtenidos por condensación enzimática de *N*^ε-benzoil-arginina etil éster con decilamina y dodecilamina, respectivamente. Papaína adsorbida sobre poliamida fue utilizada como biocatalizador y el medio de reacción fue ACN con 0,25% (v/v) de agua. En cada caso, el producto fue extraído con una mezcla MeOH:H₂O (4:1) y purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico, utilizando como fase móvil buffer bórico-borato 0,01 M (pH 8,5):EtOH (1:1) y un gradiente de elución en NaCl. Para ambos compuestos se estudió la actividad antimicrobiana mediante ensayos de dilución en microplaca contra cepas de *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. rhizophila*, *E. faecalis*, *S. marcescens*, *B. subtilis*, *S. flexneri* y *E. faecium*. Asimismo se estudió el efecto de los surfactantes sobre la supervivencia de *E. coli* y *S. aureus* para concentraciones iguales a la CIM y la CIM/2 correspondientes, determinándose el recuento de microorganismos viables a los 0, 15, 30, 60, 180 y 360 min de incubación en presencia de los surfactantes. Por otro lado se evaluó la actividad antifúngica de los surfactantes, analizándose la capacidad de inhibición de la germinación de microconidios de dos especies de *Trichophyton* (*T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, hongos filamentosos dermatófitos) y la actividad fungistática/fungicida frente a dos cepas de *C. albicans* (una levadura patógena humana capaz de desarrollar una forma filamentosa). Finalmente se realizaron estudios de toxicidad frente a eritrocitos humanos, evaluándose también la viabilidad celular en cultivos de HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) y 1BR.3.G (fibroblastos epiteliales humanos) a las 24 y 72 h de exposición utilizando el ensayo del MTT. En todos los casos los resultados fueron comparados con los obtenidos para un surfactante catiónico comercial (Cetrimide).

Resultados

Se realizó la síntesis a escala semipreparativa de Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ utilizando papaína adsorbida en poliamida como biocatalizador, con rendimientos del 98% y 85% respectivamente. La purificación de los productos se llevó a cabo por cromatografía de intercambio catiónico, empleando mezclas acuoso-etanólicas de bajo impacto ambiental como solventes. Ambos compuestos sintetizados demostraron poseer actividad antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de todos los microorganismos ensayados e incluso demostrando un efecto bactericida en la mayoría de los casos, con una reducción del 99% de la carga bacteriana inicial luego de tan solo 1 h de incubación. Por otro lado, los compuestos Bz-Arg-NHC_n demostraron menor actividad hemolítica e irritabilidad ocular que el surfactante catiónico comercial Cetrimide. Una tendencia similar pudo observarse con respecto a la citotoxicidad frente a líneas celulares de hepatocitos y fibroblastos humanos, ya que ambos derivados de arginina fueron menos tóxicos que Cetrimide. Los ensayos de actividad antifúngica revelaron la capacidad de los tres compuestos ensayados para la inhibición de los microconidios de *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, con un efecto fungistático similar en todos los casos. Finalmente, Bz-Arg-NHC_n también mostraron actividad fungistática frente a *C. albicans*, siendo además fungicida en el caso de Bz-Arg-NHC₁₀.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en estos estudios preliminares señalan a Bz-Arg-NHC_n como una alternativa a los surfactantes catiónicos comerciales, especialmente para su uso como aditivos en formulaciones tópicas.