

## 17. Ciencia, Tecnología, e innovación

### **Actividad antifúngica y antiadhesiva de tensioactivos derivados de arginina frente a levaduras del género *Candida***

Mylek, Silvina; Grillo, Patricia; Morcelle, Susana\*; Fait, María Elisa\*

silvinamylek@gmail.com; patricia\_grillo@hotmail.com;

morcelle@biol.unlp.edu.ar; fait.mariaelisa@biol.unlp.edu.ar

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

---

### **Resumen**

Una de las características del reino Fungi es su capacidad de colonizar superficies inertes o tejidos vivos a través de su adhesión y la formación de comunidades, simples o mixtas, embebidas en una matriz de exopolisacárido, llamadas *biofilms*. Las terapias antimicrobianas a menudo no logran controlar este tipo de comunidades, develando la necesidad de diseñar nuevos compuestos antifúngicos que puedan utilizarse tanto sobre bienes como sobre superficies, de manera de inhibir o demorar su colonización.

El objetivo del presente trabajo es el estudio de la actividad antifúngica y antiadhesiva de tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos frente a levaduras del género *Candida*. Con este fin, se realizó la síntesis de alquilamidas derivadas de arginina (Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>) utilizando papaína adsorbida sobre 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. Ambos compuestos demostraron actividad antifúngica frente a *C. albicans* y *C. tropicalis*. El análisis de las cinéticas de muerte de las levaduras en presencia de los compuestos reveló una reducción de entre uno y cinco órdenes de magnitud del número de microorganismos viables luego de las primeras horas de incubación. Por otro lado, el pre-tratamiento de microplacas de poliestireno con los tensioactivos mostró su efectividad para inhibir la adherencia de las levaduras a esta superficie, registrándose reducciones de la adhesión de entre el 25 y el 83%. En este sentido, Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> mostró un mayor efecto antiadhesivo, siendo *C. tropicalis* más sensible al efecto de los surfactantes.

**Palabras clave:** Surfactantes derivados de aminoácidos, actividad antifúngica, *Candida albicans*, adhesión a poliestireno.

## Introducción

Los hongos son organismos ubicuos y sus actividades afectan casi todos los aspectos de nuestra vida cotidiana, ya sea como fuente de productos farmacéuticos y alimentos o como organismos responsables del deterioro y causantes de enfermedades en plantas y animales (Hanson, 2008). La erradicación y prevención de la propagación de agentes patógenos agresivos e invasores son temas centrales a resolver, no sólo por las consecuencias económicas (Meissle et al., 2010), sino también por los riesgos que la producción de toxinas (como aquellas producidas por los hongos) suponen a la salud humana (Backhaus, 2010; Basler, 2016; Giraud, Gladieux, & Gavrillets, 2010).

La formación de *biofilms* se encuentra asociada a la persistencia de muchas enfermedades. Son sistemas dinámicos estructuralmente complejos, ampliamente difundidos en la naturaleza, que constituyen una de las formas de colonización microbiana más eficientes (Ramage, Saville, Thomas, & Lopez-Ribot, 2005). Están formados por comunidades de una o más especies de hongos y bacterias, embebidas en una matriz de exopolisacárido, y unidas a su vez una superficie inerte o a un tejido vivo (Castrillón Riviera & Palma Ramos, 2012). Esta forma de organización les permite a los microorganismos sobrevivir en ambientes hostiles, dispersarse para

colonizar nuevos nichos y les otorga ventajas significativas en cuanto a la protección contra predadores, biocidas y las fluctuaciones de las condiciones ambientales (Hall-Stoodley, 2004; Jabra-Rizk, Falkler, & Meiller, 2004).

Las propiedades fisicoquímicas de las distintas superficies ejercen una gran influencia en el grado y la extensión de la adherencia de las células microbianas (Hall-Stoodley, 2004). Una vez lograda la adhesión irreversible, las células comienzan a dividirse y a colonizar la superficie, conformando una comunidad cuyos fenotipos son distintivos respecto del de las células que crecen en suspensión (Desai, Mitchell, & Andes, 2014).

Es en este contexto que ha surgido la necesidad de diseñar nuevos compuestos con actividad antimicrobiana que impidan no sólo el desarrollo de resistencia adquirida, sino que puedan ser utilizados tanto sobre productos y bienes de consumo como sobre superficies, de manera de inhibir o demorar la colonización de las mismas.

Teniendo en cuenta el hecho de que superficie celular de bacterias y hongos lleva una carga negativa neta (asociada a la presencia de polisacáridos, conjugados de glicósidos y lípidos cargados negativamente), no resulta sorprendente que muchos agentes con actividad antimicrobiana sean catiónicos y tengan una alta afinidad de unión a las superficies

celulares (Gilbert & Moore, 2005; Vieira & Carmona-Ribeiro, 2006; Wasylnka & Moore, 2000). Los compuestos de amonio cuaternario, como los bromuros de cetil- y hexadecil-trimetilamonio o el Cetrimide son los antisépticos y desinfectantes más utilizados. Sin embargo, debido a su considerable toxicidad y cuestionada biodegradabilidad, se ha propuesto reemplazarlos por otros menos tóxicos, como los surfactantes catiónicos derivados de aminoácidos (Castillo et al., 2004). Entre ellos, los derivados de arginina presentan actividad antimicrobiana de amplio espectro, buena biodegradabilidad y baja citotoxicidad y toxicidad ambiental (Pinazo et al., 2016). Estas propiedades no sólo permiten la aplicación de estos compuestos en la desinfección de superficies y materiales de uso hospitalario, sino que los convierten en candidatos ideales para ser incorporados en formulaciones farmacéuticas y cosméticas, ya sea como aditivos o como principios activos en sí mismos.

## Objetivos

- 1) Obtener surfactantes derivados de arginina (Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>) utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador.
- 2) Determinar la actividad antifúngica de los compuestos obtenidos frente a levaduras del género *Candida*.
- 3) Caracterizar la capacidad de los tensioactivos de inhibir la adhesión de las levaduras a microplacas de poliestireno.

## Materiales y métodos

### Reactivos

Se emplearon extracto crudo de papaína (EC 3.4.22.2), dodecilamina y tamices moleculares (4Å) de Fluka. La *N*<sup>ε</sup>-benzoil-L-arginina etil éster (Bz-Arg-OEt o BAEE), fue comprada a Sigma Aldrich. El 1,4-ditio-D,L-treitol (DTT) fue adquirido de Invitrogen. La Poliamida-6 fue una contribución de Akzo. El resto de los reactivos y solventes empleados en este trabajo fue de calidad analítica o superior.

### Medios de cultivo

Los medios de cultivo *agar sabouraud dextrosa* (SDA) y *caldo sabouraud dextrosa* (SDB) fueron de Hi Media Laboratories (Mumbai, India). Los mismos fueron preparados según las indicaciones del fabricante y esterilizados a 121°C y una atmósfera de sobrepresión durante 15 min.

### Microorganismos

La actividad antifúngica de los compuestos obtenidos fue estudiada frente a dos aislados de levadura del género *Candida* (*C. albicans* y *C. tropicalis*) provistos por la cátedra de Micología de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. La levadura *C.*

*albicans* ATCC 64548, obtenida de la *American Type Culture Collection*, también fue empleada como microorganismo indicador. Todos los aislados de hongos fueron mantenidos en SDA, a 30°C.

### **Síntesis biocatalítica de alquilamidas derivadas de arginina**

#### *Preparación del biocatalizador*

El extracto de papaína fue inmovilizado por adsorción en poliamida según Morcelle et al. 2009. Para ello, 100 mg del extracto fueron disueltos en buffer bórico-borato 0,1 M pH 8,5 con 1 mM de EDTA (1 ml) en presencia de DTT (150 mg) y mezclados con el soporte sólido (1 g). La mezcla fue homogeneizada por agitación vigorosa en vórtex, liofilizada y almacenada a -20°C.

#### *Reacciones de condensación enzimática*

Para la síntesis de los tensioactivos derivados de arginina (*N*<sup>ε</sup>-benzoil-L-arginina-decilamida o Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y *N*<sup>ε</sup>-benzoil-L-arginina-dodecilamida o Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>), las reacciones se llevaron a cabo individualmente en erlenmeyers cerrados herméticamente con tapa esmerilada, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, con agitación orbital (150 rpm) a 37°C durante 72 h. En cada caso, la reacción fue iniciada por el agregado de 1 g de biocatalizador a 10 ml de la solución stock de sustratos correspondiente (BAEE 20 mM y decil- o dodecilamina 30 mM) preparada en ACN

anhidro conteniendo 0,25% (v/v) de agua. Las reacciones se detuvieron por filtración del biocatalizador y lavado del mismo con ACN (3×10 ml) y éter sulfúrico (3×10 ml), a fin de eliminar la alquilamina en exceso, y luego con una mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O 4:1 (3×10 ml) de manera de extraer el producto de síntesis de la superficie del biocatalizador. Los extractos obtenidos fueron filtrados utilizando membranas de nylon de 0,22 μm (Osmonics) para su posterior purificación.

#### *Seguimiento de las reacciones mediante HPLC*

Las cantidades relativas de los productos de condensación, sustratos y producto de hidrólisis fueron determinadas mediante análisis por HPLC (Agilent 1100 LC) utilizando una columna Lichrosorb 100 propilciano (Hibar). Las condiciones para las corridas cromatográficas fueron: solvente A, H<sub>2</sub>O 0,1% (v/v) TFA; solvente B: ACN:H<sub>2</sub>O 80:20 0,1% (v/v) TFA; velocidad de flujo 1 ml/min; gradiente de elución 25-95% de B en 25 min; longitudes de onda de detección: 215 y 254 nm. La cuantificación de los productos fue llevada a cabo a través de la determinación de las áreas de los picos respectivos, según el método del estándar externo, utilizando patrones de BAEE y Bz-Arg-OH. Los tiempos de retención para cada producto fueron: Bz-Arg-OH, 4,7 min; BAEE, 5,3 min; Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, 15,6 min.

### *Purificación de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> por cromatografía de intercambio catiónico*

La purificación de los compuestos sintetizados fue llevada a cabo por cromatografía de intercambio catiónico en un equipo Äkta Purifier 10 (GE Healthcare). Para ello, alícuotas (1 ml) de las mezclas de extracción conteniendo los productos fueron cargadas en una columna SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare), previamente equilibrada con buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5 con 50% (v/v) de etanol (solvente A). El material no retenido fue eluido mediante el lavado con dos volúmenes de columna (VC) del mismo buffer. La elución de cada producto de condensación fue lograda aumentando la concentración del solvente B (buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5 con 50% (v/v) de etanol y NaCl 1 M) al 31%. Finalmente la columna fue lavada con 2 VC del solvente B (100%), y reequilibrada a las condiciones iniciales. El flujo fue mantenido a 1 ml/min a lo largo de todo el proceso y la detección de los picos cromatográficos fue realizada espectrofotométricamente a 215 y 254 nm. Las fracciones purificadas recolectadas de cada producto fueron reunidas y concentradas mediante evaporación del solvente en rotavapor (Heidolph). El desalado de las mismas fue llevado a cabo por precipitaciones sucesivas con etanol absoluto, centrifugación (10000xg, 15 minutos) y evaporación del solvente.

### **Evaluación de la actividad antifúngica de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>**

#### *Preparación de las soluciones stock de los surfactantes*

Se prepararon soluciones stock 50 mM de los surfactantes en DMSO, las cuales fueron almacenadas a -20°C y diluidas en el solvente más conveniente (agua milliQ® o medio de cultivo, ambos estériles) en el rango de concentraciones indicado para cada ensayo.

#### *Preparación de las suspensiones de levaduras*

Las levaduras fueron crecidas en SDA a 30°C durante 24 h. Para los ensayos de actividad antifúngica, las colonias fueron resuspendidas en buffer fosfatos salino (PBS) estéril, ajustando su turbidez al 0,5 de la escala de McFarland (1-5x10<sup>6</sup> CFU/ml). Finalmente se realizó una dilución 1:10 (1-5x10<sup>5</sup> CFU/ml) de la suspensión preparada anteriormente. En el caso de los ensayos de adhesión, la densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de la suspensión fue ajustada a 0,7.

#### *Ensayos de inhibición del crecimiento*

Se estudió el efecto inhibitorio de los surfactantes sobre el crecimiento de levaduras según el método de dilución en caldo descrito por Arendrup, Cuenca-Estrella, Lass-Flörl, & Hope, (2012), comparándose los resultados con los obtenidos para el surfactante comercial Cetrimide. Se prepararon diluciones de los

surfactantes en un rango de concentraciones de 1000 a 6  $\mu\text{M}$  en SDB 2X. Los ensayos fueron llevados a cabo en microplacas estériles de 96 pocillos con fondo plano (Greiner). En cada caso, los pocillos fueron adicionados con 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de las levaduras y 100  $\mu\text{l}$  de las soluciones de los surfactantes. Se incluyeron cultivos en SDB y controles negativos de todas las soluciones empleadas. Finalmente las placas fueron incubadas a 30°C durante 24 h. El desarrollo de las levaduras fue monitoreado a través de lecturas de  $\text{DO}_{600}$ , haciendo uso de un lector de microplacas (Tecan Infinite M200 Pro). Para cada levadura, la actividad antifúngica fue expresada como porcentaje de inhibición del crecimiento (% Inh) comparado con los pocillos control (la  $\text{DO}_{600}$  de las células crecidas en SDB y ausencia de los surfactantes fue considerada como 100% de crecimiento). Se definió la *Concentración Inhibitoria Mínima* (CIM) como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento visible ( $\text{DO}_{600} = 0$  y % Inh > 95%). De aquellos pocillos que no presentaron crecimiento visible se tomaron muestras y realizaron estrías en placas conteniendo SDA libre de los surfactantes. Se analizó la presencia de colonias luego de 24 h de incubación a 30°C. La *Concentración Fungicida Mínima* (CFM) se definió como la mínima concentración del surfactante

que inhibe completamente el crecimiento de las levaduras (ausencia de colonias).

#### *Efecto de los surfactantes en la supervivencia de las levaduras*

Se estudió la supervivencia de las levaduras en SDB adicionado con Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> o Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> a concentraciones relativizadas a las CIM correspondientes. Durante los ensayos, se diluyeron cultivos *overnight* de las levaduras patógenas en SDB de manera de alcanzar una concentración final de aproximadamente  $1 \times 10^6$  UFC/ml. Se prepararon soluciones estériles de los surfactantes en SDB (4,5 ml), las cuales fueron inoculados con 500  $\mu\text{l}$  de las suspensiones bacterianas. A intervalos de tiempo preestablecidos se tomaron alícuotas de los cultivos, se diluyeron en forma seriada en triptona 0,1% v/v y se sembraron en placas conteniendo SDA libre de los surfactantes. Finalmente, las placas fueron incubadas a 30°C por 24 h, realizándose luego el recuento de colonias.

#### *Ensayos de inhibición de la adhesión a poliestireno*

El efecto de los tensioactivos sobre la adherencia de levaduras a poliestireno fue estudiado utilizando el método en microplaca descrito por Jin (2005). Durante los ensayos, cada pocillo fue llenado con 100  $\mu\text{l}$  de soluciones estériles de distinta concentración de los

tensioactivos (preparadas en PBS), incubando a continuación la placa cerrada a 30°C durante 5 h (*fase de recubrimiento*). Los controles positivos de la adhesión se realizaron tratando pocillos con PBS en ausencia de los tensioactivos. Pasada la fase de recubrimiento, las soluciones de los surfactantes fueron removidas y cada pocillo fue adicionado con 100 µl de la suspensión de levaduras preparada anteriormente. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 18 h (*período de adhesión*). Pasado el tiempo de incubación los sobrenadantes fueron descartados por aspiración y los pocillos se lavaron dos veces con 200 µl de PBS estéril de manera de remover las células no adheridas.

#### *Cuantificación por tinción con cristal violeta*

La cuantificación de las levaduras adherentes fue llevada a cabo según el método del cristal violeta (Jin, 2005). Luego del tratamiento experimental, los pocillos fueron lavados dos veces con PBS estéril, seguidos de la fijación de las levaduras por el agregado de 200 µl de formol 2% v/v durante 2 minutos. Pasado este tiempo, los pocillos fueron lavados nuevamente dos veces con PBS estéril y coloreados por adición de 200 µl de una solución acuosa 0,13% p/v de cristal violeta conteniendo 5% v/v de etanol y 2% v/v de formol. Luego de 20 min de incubación, los pocillos fueron lavados con

PBS estéril e manera de remover todo el colorante no retenido. A continuación, el colorante fijado por las células fue extraído por el agregado de 200 µl de una solución de etanol 50% v/v e incubación de las microplacas durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, 100 µl del sobrenadante de cada pocillo fueron transferidos a una nueva microplaca para la cuantificación de la absorbancia a 550 nm haciendo uso de un lector de microplacas Tecan Infinite M200 PRO. Con estos datos se construyeron gráficas *dosis-respuesta*, calculándose para cada concentración del surfactante el porcentaje de inhibición de la adhesión respecto del control (la absorbancia del sobrenadante de las levaduras adheridas en ausencia de los surfactantes será establecida como el 100% de adhesión).

#### *Análisis estadístico*

Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado. Los resultados fueron contrastados utilizando el análisis de varianza (ANOVA) y el *test de Tukey* utilizando el software GraphPad Prism®. P-values < 0,05 fueron considerados como significativos.

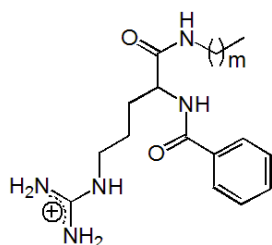
## **Resultados y Discusión**

### **Obtención de alquilamidas derivadas de arginina mediante biocatálisis**

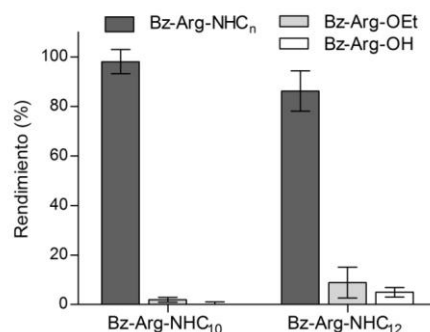
La síntesis a escala semipreparativa de las alquilamidas derivadas de arginina (Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, Fig. 1) fue llevada a cabo

utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador, según la metodología descrita anteriormente. Los rendimientos en producto de condensación para las 72 h de reacción fueron del  $86,17 \pm 8,14\%$  y  $98,04 \pm 4,90\%$  para Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> respectivamente (Fig. 2).

La purificación de los compuestos sintetizados fue llevada a cabo por cromatografía de intercambio catiónico, utilizando como fase estacionaria una matriz de agarosa funcionalizada con grupos sulfopropilo (SP Sepharose Fast Flow). El uso de etanol como cosolvente para la purificación del producto obtenido tiene dos objetivos principales: mantener los solutos en solución, dada la baja solubilidad acuosa de los productos de síntesis, y evitar las interacciones hidrofóbicas con la fase estacionaria. Por otro lado, este solvente posee baja toxicidad y bajo costo, lo cual lo convierte en uno de los co-solventes más amigables con el medio ambiente.



**Fig. 1** Estructura química de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, con  $m=9, 11$  y  $n=m+1$ .



**Fig. 2** Rendimientos para las síntesis de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> para 72 h de reacción utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador. Se muestran también los rendimientos para el producto de hidrólisis (Bz-Arg-OH) y el reactivo remanente sin reaccionar (Bz-Arg-OEt).

### Evaluación de la actividad antifúngica de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>

Las levaduras pertenecientes al género *Candida* son considerados patógenos humano oportunistas responsables de infecciones conocidas como *candidiasis*. Entre ellos, y debido a su importancia clínica, *C. albicans* es considerado un organismo modelo para el estudio de hongos patógenos y fármacos antimicóticos (Kabir, Hussain, & Ahmad, 2012), por lo que numerosos estudios preliminares reportan la actividad antifúngica de tensioactivos catiónicos contra este patógeno (Vieira & Carmona-Ribeiro 2006; Castillo et al. 2006; Badawi et al. 2007; Murguía et al. 2008; Kanjilal et al. 2009; Ziani et al. 2011; Obłak et al. 2013). Teniendo esto en cuenta, se realizaron pruebas de susceptibilidad de



levaduras frente a Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, utilizando tanto una cepa de *C. albicans* de la colección ATCC como aislados clínicos de *C. albicans* y *C. tropicalis* para el cálculo de la CIM y la CFM (*concentraciones inhibitorias y fungidas mínimas*, respectivamente). Los resultados fueron contrastados con los obtenidos para Cetrimide (Tabla 1). Todos los surfactantes fueron capaces de inhibir el crecimiento de las levaduras empleadas como microorganismos indicadores, evidenciando Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Cetrimide además capacidad fungida. Por su parte, Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> sólo mostró actividad fungida en el caso del aislado clínico de *C. tropicalis*.

Numerosos estudios reportan un aumento en la resistencia a antibióticos de aislados clínicos obtenidos en hospitales respecto de aquellos aislados obtenidos de pacientes ambulatorios (Muvunyi et al., 2011). En el caso de *C. albicans*, los valores de CIM y CFM fueron mayores para el aislado clínico que para la cepa de colección estudiada. Considerando estos resultados, podríamos plantear la hipótesis de que ni la pared celular ni la membrana plasmática serían los principales objetivos de la acción antifúngica de los surfactantes, ya que la interacción de los agentes tensioactivos con las mismas sería altamente inespecífica.

La actividad antifúngica de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> sobre la cepa de colección *C. albicans*

ATCC 64548 fue comparada con la reportada en literatura para otros surfactantes derivados de arginina (Morán et al., 2001). En relación a los análogos de 10 carbonos, los compuestos exhibieron valores de CIM levemente mayores: mientras que Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> registró una CIM de 125,0 µM, ACA y CAM presentaron valor de CIM de 20,1 y 42,0 µM, respectivamente. Sin embargo, Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> demostró ser capaz de inhibir completamente el crecimiento de *C. albicans* (*actividad fungida*), hecho que no fue reportado para el resto de los tensioactivos. Por otro lado, si bien LAM reveló un valor de CIM similar al de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> (53,0 y 31,3 µM, respectivamente), ALA demostró una mayora actividad fungistática dentro de este grupo de tensioactivos, probablemente debido a su doble carga positiva. Finalmente, se observó la misma tendencia en comparación con otros surfactantes/desinfectantes catiónicos comerciales, como el cloruro de benzalconio (CIM 64 µM) (Murguía et al., 2008) y la Clorhexidina (CIM 55 µM) (Castillo et al., 2006).

Considerando que los compuestos sintetizados podrían ser potencialmente empleados como *biocidas*, se estudió la cinética de supervivencia de las levaduras en SDB adicionado con Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>. Para ello, se analizaron las *cinéticas de muerte* de los dos aislados clínicos y de la cepa de referencia tratados con ambos

surfactante a concentraciones relativizadas a las respectivas CIM. Las curvas obtenidas se muestran en la Fig. 3. Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> demostraron efecto fungicida para las levaduras ensayadas, incluso en concentraciones iguales a la mitad de la CIM. En la mayoría de los casos se observó una disminución de entre uno y

cinco órdenes de magnitud en el número de microorganismos viables luego de las primeras horas de incubación en presencia de los tensioactivos, registrándose en algunos casos luego un aumento en el número de microorganismos viables (Fig. 3a, 3b y 3e).

**Tabla 1.** Efecto inhibitorio de los surfactantes sobre el crecimiento de levaduras del género *Candida*. Las concentraciones se expresan en  $\mu\text{M}$ .

Surfactante	<i>C. albicans</i> ATCC 64548		<i>C. albicans</i> (aislado clínico)		<i>C. tropicalis</i> (aislado clínico)	
	CIM <sup>a</sup>	CFM <sup>b</sup>	CIM <sup>a</sup>	CFM <sup>b</sup>	CIM <sup>a</sup>	CFM <sup>b</sup>
Bz-Arg-NHC <sub>10</sub>	125,0	250,0	125,0	500,0	31,3	250,0
Bz-Arg-NHC <sub>12</sub>	31,3	>500,0	125,0	>500,0	31,3	125,0
Cetrimide	125,0	500,0	62,5	500,0	15,6	250,0

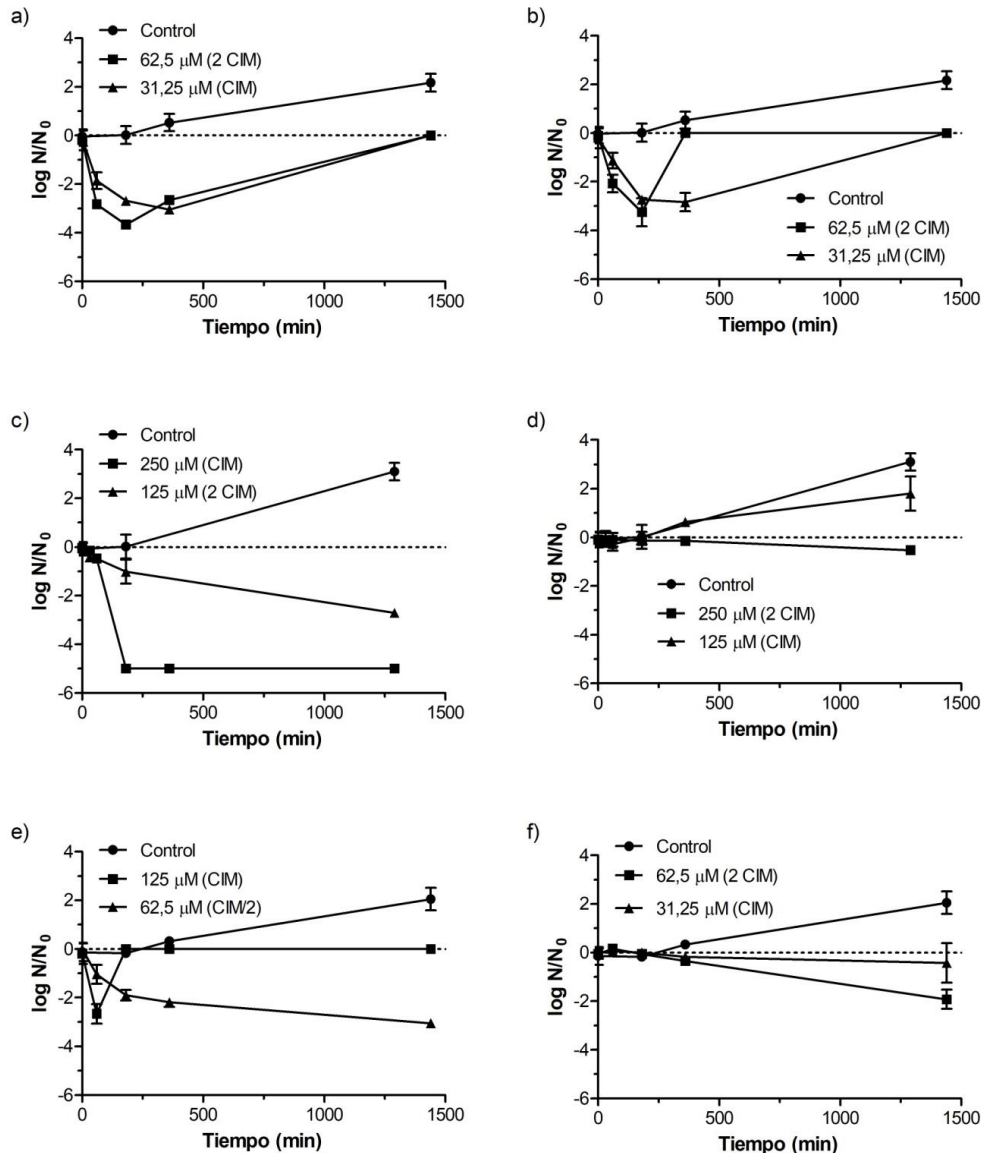
<sup>a</sup>CIM: concentración inhibitoria mínima. <sup>b</sup>CFM: concentración fungicida mínima.

La adherencia de microorganismos patógenos a superficies y tejidos—el primer paso para la formación de biofilms—supone un excelente blanco para las terapias antifúngicas, y el estudio de las propiedades antiadhesivas e inhibitorias de la formación de biofilms de los compuestos con actividad antifúngica resulta de suma importancia. Teniendo en cuenta el hecho de que la deposición de moléculas tensioactivas conteniendo grupos cargados positivamente sobre superficies sólidas ha sido efectiva para prevenir la adhesión y el crecimiento de biofilms (Kugler, 2005), se estudió el

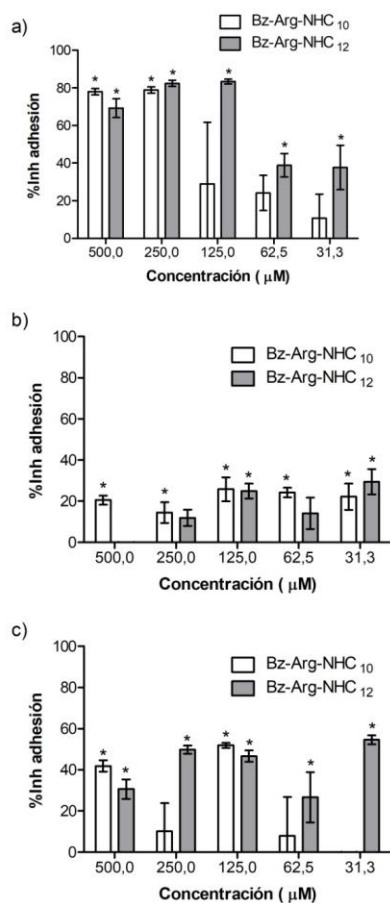
efecto del pre-tratamiento de microplacas de poliestireno con soluciones de distinta concentración de los tensioactivos sobre la adherencia de las levaduras. Los resultados evidenciaron la inhibición de la adhesión de las levaduras a poliestireno debida al pre-tratamiento de las superficies de los pocillos con soluciones acuosas de los tensioactivos, siendo este efecto dependiente de la concentración de los compuestos. El efecto inhibitorio de la adhesión fue mayor en el caso de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, con porcentajes máximos de inhibición de 54,6% para *C. albicans* ATCC 64548 y una concentración del

tensioactivo de 31,3  $\mu\text{M}$ ; 83,4% para el aislado clínico de *C. tropicalis* y una concentración del tensioactivo de 125,0  $\mu\text{M}$ ; y 29,4% para el aislado clínico de *C. albicans* y una concentración del tensioactivo igual a 31,3  $\mu\text{M}$ . En el caso

de Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> los porcentajes máximos fueron de 51,8; 78,9 y 25,8% respectivamente, a concentraciones del compuesto iguales a 250,0  $\mu\text{M}$  en el primer caso y 125  $\mu\text{M}$  para los dos últimos.



**Fig. 3** Curvas de supervivencia de (a, b) *C. tropicalis* (aislado clínico), (c, d) *C. albicans* (aislado clínico) y (e, f) *C. albicans* (ATCC 64548) SDB adicionado con (a, c, e) Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> o (b, d, f) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> a las concentraciones indicadas en cada caso. El recuento de microorganismos viables en cada caso se grafica como la media  $\pm$  SD de tres medidas independientes.



**Fig. 4** Efecto de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> sobre la adhesión de aislados clínicos de (a) *C. tropicalis* y (b) *C. albicans*, y de la cepa de referencia (c) *C. albicans* ATCC 64548, a microplacas de poliestireno pre-tratadas con los tensioactivos a las concentraciones señaladas. El porcentaje de inhibición de la adhesión en cada caso se grafica como la media  $\pm$  SD de cuatro medidas independientes.

## Conclusiones

Se llevaron a cabo eficientemente reacciones de síntesis de alquilamidas derivadas de arginina utilizando papaína (una peptidasa de origen vegetal) adsorbida sobre poliamida como

biocatalizador. La purificación de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> por extracción del medio de reacción seguida de una cromatografía de intercambio catiónico empleando como fase móvil solventes de baja toxicidad y bajo costo, permitió obtener los productos puros en cantidades del orden de los miligramos.

Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> fueron capaces de inhibir el crecimiento y la adhesión de las levaduras empleadas como modelo, revelando además actividad fungicida en el caso del derivado de 10 carbonos.

Estos resultados nos permiten proponer el uso de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> como una alternativa prometedora a las sales de amonio cuaternario como agentes biocidas con aplicaciones biomédicas, en especial para el pre-tratamiento de superficies con el objetivo de inhibir la colonización de las mismas por microorganismos patógenos y la posterior formación de biofilms.

## Bibliografía

- Arendrup, M. C., Cuenca-Estrella, M., Lass-Flörl, C., & Hope, W. (2012). EUCAST technical note on the EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts EDef 7.2 (EUCAST-AFST). *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*,

- 18(7), E246-7.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03880.x>
- Backhaus, G. F. (2010). Regulatory aspects in chemical control of fungal diseases: Impact on efficient plant production. In M. L. G. Ulrich Gisi, Ilan Chet (Ed.), *Recent developments in management of plant diseases* (p. 52). Springer.
- Badawi, A. M., Mekawi, M. A., Mohamed, A. S., Mohamed, M. Z., & Khowdairy, M. M. (2007). Surface and Biological Activity of Some Novel Cationic Surfactants. *Journal of Surfactants and Detergents*, 10(4), 243–255.  
<https://doi.org/10.1007/s11743-007-1040-8>
- Basler, R. (2016). Diversity of *Fusarium* species isolated from UK forage maize and the population structure of *F. graminearum* from maize and wheat. *PeerJ*, 4, e2143.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.2143>
- Castillo, J. A., Infante, M. R., Manresa, A., Vinardell, M. P., Mitjans, M., & Clapés, P. (2006). Chemoenzymatic synthesis and antimicrobial and haemolytic activities of amphiphilic bis(phenylacetylarginine) derivatives. *ChemMedChem*, 1(10), 1091–1098.  
<https://doi.org/10.1002/cmdc.200600148>
- Castillo, J. A., Pinazo, A., Carilla, J., Infante, M. R., Alsina, M. A., Haro, I., & Clapés, P. (2004). Interaction of Antimicrobial Arginine-Based Cationic Surfactants with Liposomes and Lipid Monolayers. *Langmuir*, 20(8), 3379–3387. <https://doi.org/10.1021/la036452h>
- Castrillón Riviera, L. E., & Palma Ramos, A. (2012). Biofilms: A Survival and Resistance Mechanism of Microorganisms. In *Antibiotic Resistant Bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium* (pp. 160–178). InTech. <https://doi.org/10.5772/28504>
- Desai, J. V, Mitchell, A. P., & Andes, D. R. (2014). Fungal Biofilms, Drug Resistance, and Recurrent Infection. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 4(10), a019729–a019729. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019729>
- Gilbert, P., & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 703–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>
- Giraud, T., Gladieux, P., & Gavrillets, S. (2010). Linking the emergence of fungal plant diseases with ecological speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(7), 387–395. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.03.006>
- Hall-Stoodley, L. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews ...*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hanson, J. R. (2008). *Chemistry of Fungi. Annual review of biochemistry* (RSC

- Publis). Cambridge: Royal Society of Chemistry.  
<https://doi.org/10.1039/9781847558329>
- Jabra-Rizk, M. A., Falkler, W. A., & Meiller, T. F. (2004). Fungal Biofilms and Drug Resistance. *Emerging Infectious Diseases*, *10*(1), 14–19.  
<https://doi.org/10.3201/eid1001.030119>
- Jin, Y. (2005). *Characterization of Candida albicans biofilms: their formation, anti-fungal resistance, and differentiation*. University of Hong Kong. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10722/31544>
- Kabir, M. A., Hussain, M. A., & Ahmad, Z. (2012). *Candida albicans: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens*. *ISRN Microbiology*, *2012*, 538694.  
<https://doi.org/10.5402/2012/538694>
- Kanjilal, S., Sunitha, S., Reddy, P. S., Kumar, K. P., Murty, U. S. N., & Prasad, R. B. N. (2009). Synthesis and evaluation of micellar properties and antimicrobial activities of imidazole-based surfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *111*(9), 941–948.  
<https://doi.org/10.1002/ejlt.200800292>
- Kugler, R. (2005). Evidence of a charge-density threshold for optimum efficiency of biocidal cationic surfaces. *Microbiology*, *151*(5), 1341–1348.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.27526-0>
- Meissle, M., Mouron, P., Musa, T., Bigler, F., Pons, X., Vasileiadis, V. P., ... Kiss, J. (2010). Pests , pesticide use and alternative options in European maize production : current status and future prospects, *134*, 357–375.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2009.01491.x>
- Morán, C., Clapés, P., Comelles, F., García, T., Pérez, L., Vinardell, P., ... Infante, M. R. (2001). Chemical Structure/Property Relationship in Single-Chain Arginine Surfactants. *Langmuir*, *17*(16), 5071–5075.  
<https://doi.org/10.1021/la010375d>
- Morcelle, S. R., Liggieri, C. S., Bruno, M. A., 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.08.013>
- Murguía, M. C., Vaillard, V. A., Sánchez, V. G., Conza, J. Di, & Grau, R. J. (2008). Synthesis, Surface-Active Properties, and Antimicrobial Activities of New Double-Chain Gemini Surfactants. *Journal of Oleo Science*, *57*(5), 301–308.  
<https://doi.org/10.5650/jos.57.301>
- Muvunyi, C. M., Masaisa, F., Bayingana, C., Mutesa, L., Musemakweri, A., Muhirwa, G., & Claeys, G. W. (2011). Decreased susceptibility to commonly used antimicrobial agents in bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Rwanda: need for new antimicrobial guidelines. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *84*(6), 923–928.

- <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0057>
- Obłąk, E., Piecuch, A., Krasowska, A., & Łuczyński, J. (2013). Antifungal activity of gemini quaternary ammonium salts. *Microbiological Research*, 168(10), 630–638.  
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.001>
- Pinazo, A., Manresa, M. A., Marques, A. M., Bustelo, M., Espuny, M. J., & Pérez, L. (2016). Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. *Advances in Colloid and Interface Science*, 228, 17–39.  
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.11.007>
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., & Lopez-Ribot, J. L. (2005). Candida Biofilms: an Update. *Eukaryotic Cell*, 4(4), 633–638.  
<https://doi.org/10.1128/EC.4.4.633-638.2005>
- Vieira, D. B., & Carmona-Ribeiro, A. M. (2006). Cationic lipids and surfactants as antifungal agents: mode of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(4), 760–767.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkl312>
- Wasylnka, J. a., & Moore, M. M. (2000). Adhesion of Aspergillus Species to Extracellular Matrix Proteins : Evidence for Involvement of Negatively Charged Carbohydrates on the Conidial Surface Adhesion of Aspergillus Species to Extracellular Matrix Proteins : Evidence for Involvement of Negative. *Infection and Immunity*, 68(6), 3377–3384.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3377-3384.2000>.Updated
- Ziani, K., Chang, Y., McLandsborough, L., & McClements, D. J. (2011). Influence of surfactant charge on antimicrobial efficacy of surfactant-stabilized thyme oil nanoemulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6247–6255.  
<https://doi.org/10.1021/jf200450m>

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Bioquímica Claudia Llanos por suministrar los aislados clínicos de *C. albicans* y *C. tropicalis*, y a la Dra. Graciela Garrote por su asesoramiento y colaboración en los ensayos antifúngicos y de adhesión.

### FINANCIAMIENTO

Subsidio para Jóvenes Investigadores de la UNLP 2017, MINCyT (PICT 2013-2531) y UNLP (X11-682).