



Seminari de Recerca
Facultat de Farmàcia i Ciències de la Alimentació

Mezclas cataniónicas BioTS/TS:
Nueva aproximación terapéutica antimicrobiana
7 de mayo de 2019



AM Marqués
7-5-2019



Contenido del seminario

1.- Descripción de la línea de investigación

BioTS, definición tipos

BioTS características y aplicaciones

2.- Resistencia bacteriana a antibióticos

Permeabilizadores de membranas

3.- Mezclas catiónicas

4.- Actividad a nivel de membrana de mezcla TsAA/Lch

TENSIOACTIVO- BioTENSIOACTIVO

Tensión superficial: la cantidad de energía que se requiere para incrementar la superficie de un líquido por unidad de área y se mide en mN/m.

Tensioactivo: Molécula anfifílica que modifica la tensión superficial de las interfaces agua/aire, liq./liq. y forma agregados moleculares a concentraciones elevadas

¿POR QUÉ BIOTENSIOACTIVOS?

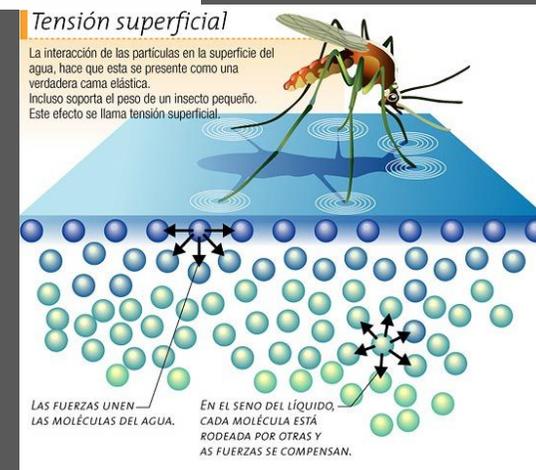
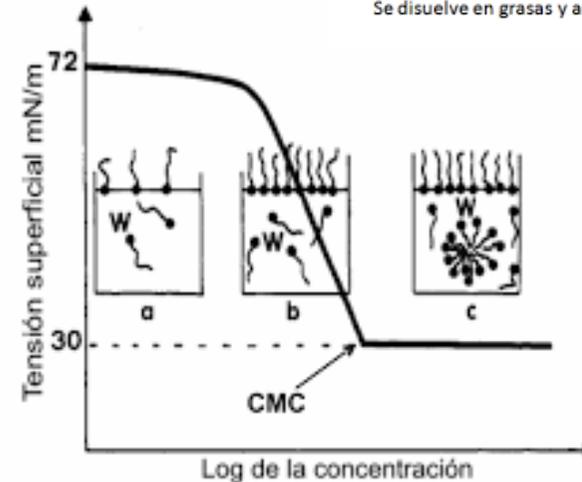
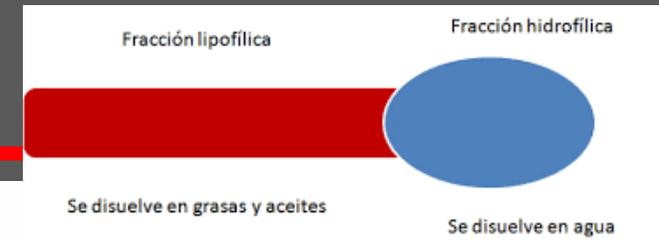
- Biocompatibles
- Biodegradables
- Obtención por química verde

- Propiedades biológicas interesantes para su aplicación ambiental o sanitaria

- Identificación de Nuevos BioTS
- Caracterización de su composición química
- Estudio de sus propiedades biológicas

APLICACIÓN

AM Marqués
7-5-2019



| Familia de tensioactivo | Tipos | Especie productora |
|--|-------------------------|---|
| Bajo peso molecular: tensioactivos | | |
| Glicolípidos | Ramnolípidos | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia rubidea</i> |
| | Trehalosa lipidos | <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Gordonia amycalis</i> |
| | Soforolípidos | <i>Candida bombicola</i> |
| | Manosileritroil lipidos | <i>Candida antactica</i> |
| Lipopéptidos y lipoproteínas | Surfactina | <i>Bacillus subtilis</i> BC12 |
| | Liquenisina | <i>Bacillus liqueniformis</i> |
| | Iturina | <i>Bacillus subtilis</i> RB-14 |
| Acidos Grasos y fosfolípidos | Fengicina | <i>Bacillus subtilis</i> B6-1 |
| | Fosfatidiletanolamina | <i>Sphingobacterium detergens</i> |
| Sideroforos | Acidos grasos | <i>Corynebacterium lepus</i> |
| | Flavolípidos | <i>Flavobacterium sp.</i> |
| Elevado peso molecular: emulsionantes | | |
| Tensioactivos poliméricos | Emulsan | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| | Liposan | <i>Candida lipolytica</i> |
| | Alasan | <i>Acinetobacter radioresistans</i> |
| Tensioactivos particulados | Vesículas | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |



BIOTENSIOACTIVOS

Ventajas:

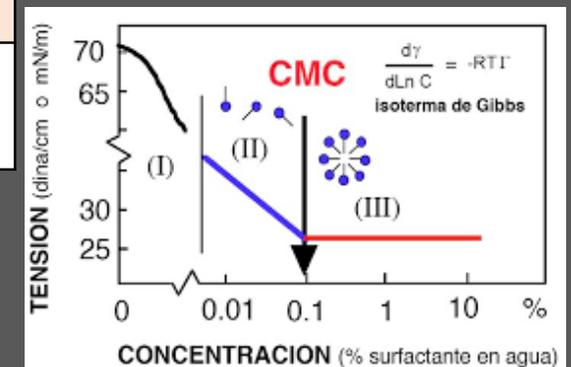
- + Producción sostenible: cultivo a partir de materiales renovables y residuales: Aceites de fritos, melazas
- + Biocompatibles y digestibles
- + Menor toxicidad
- + Estables a condiciones variables de pH, temp, salinidad
- + Emulsionantes

Inconvenientes:

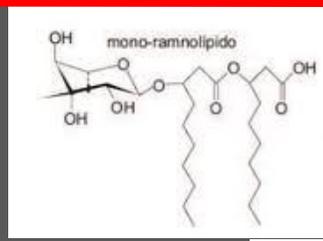
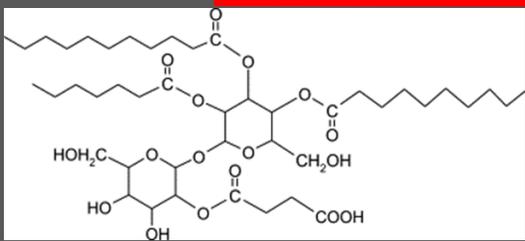
- Bajo rendimiento de producción
- Mezclas de BioTS
- Precio elevado

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

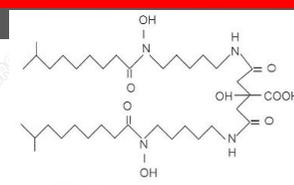
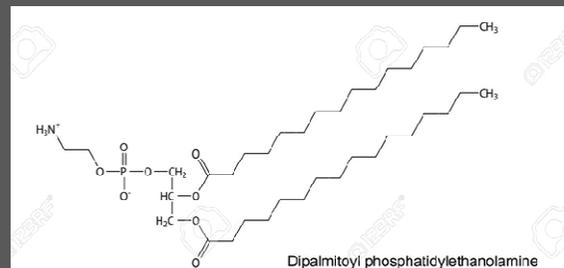
| | Trehalosalípidos | | Ramnolípidos | | Fosfolípidos | "Flavolípidos" | Lipopéptidos |
|--------------------------------|----------------------------------|---|---------------------------------------|--|---|----------------|--|
| | <i>Gordonia amicalis</i> E-05 | <i>Rhodococcus erythropolis</i> 51T7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2ΔAD | <i>Sphingobacterium detergens</i> 6.2S | | <i>Bacillus licheniformis</i> AL1.1 |
| Tensión superficial (Eficacia) | 32,6 mN/m Cultivo entero | 27,9 mN/m | 32,9 mN/m | 31,6 mN/m | 33 mN/m | 22 mN/m | 29-30 mN/m |
| Tensión interfacial | 3,1 mN/m | 5 mN/m | 5,4 mN/m | 5,2 mN/m | 10 mN/m | 8 mN/m | |
| CMC (Eficiencia) | 39,2 mg/L | 300 μM (37mg/L) | 110 μM (104,6 mg/L) | 105 mg/mL | 180 mg/L | 6300mg/L | 14,7 μM (15 mg/L) |
| HLB | | 11 (Emulgente O/A) | 7,2 (Humectante) | | 11-13 (A: 8-6; B: 14-20) (Humectante-detergente) | | 14 (Detergente) |



Caracterización química



Mono- y di-ramnolípidos



Flavolípidio
(Bodour et al., 2004)

Trehalosalípido:
Trehalosa + ac.
Succínico+ 3 ac. grasos

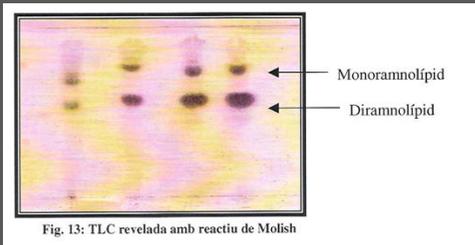
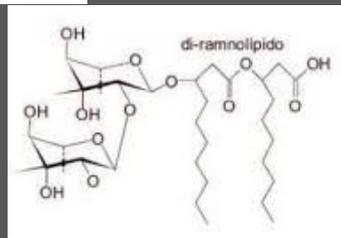
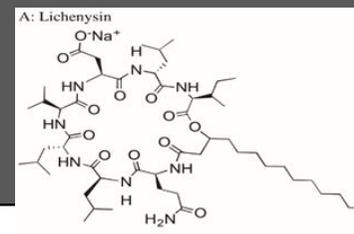


Fig. 13: TLC revelada amb reactiu de Molish



Fosfatidiletanolamina



Liquenisina

| | Trehalosalípidos | | Ramnolípidos | | Fosfolípidos | "Flavolípidos" | Lipopéptidos |
|-----------------------------|---|--------------------------------------|---|---|--|---------------------------------------|---|
| | <i>Gordonia amicalis</i> E-05 | <i>Rhodococcus erythropolis</i> 51T7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2ΔAD | <i>Sphingobacterium detergens</i> 6.2S | | <i>Bacillus licheniformis</i> AL1.1 |
| Peso molecular | 978 | 876 (905-821) | 504-650 | 504-650 | (650) | | 10201 |
| Composició hidrofóbica | C _{14:0} , C _{16:1} , C _{18:0} , C _{18:1} , CH ₃ - C _{10:0} | C _{9:0} , C _{11:0} | C _{8:0} , C _{10:0} , C _{12:0} , C _{12:1} , C _{14:1} | C _{8:0} , C _{10:0} , C _{12:0} , C _{12:1} | C _{16:1} , C _{16:0} , C _{15:0} | C _{16:0} , C _{15:0} | C _{14:0} , C _{15:0} , C _{16:0} |
| Fuente de carbono | C ₁₁₋₁₃ | C ₁₁₋₁₃ | Aceites residuales de fritos | Aceites residuales de fritos | Cometabolismo: glucosa 20 % + C ₁₁₋₁₃ 1,5% | | Melazas |
| Producció Extracto orgánico | 0,5 g/L | 0,48-1,12 g/L | 15 g/L | 19,2 g/L | 0,068 g/L → 0,47 g/L Simple omisió | | 0,21 g/L → 3,2 g/L Superficie de respuesta |

PRODUCCIÓN DE LIQUENISINA

RESULTADOS

| | | | |
|--|---|--|--|
| <u>Medio Mineral-1(g/L):</u> Glucosa (10) NH ₄ NO ₃ (4) KH ₂ PO ₄ (4) Na ₂ HPO ₄ (5,7) FeSO ₄ ·7H ₂ O (0,01) MgSO ₄ ·7 H ₂ O (0,14) CaCl ₂ (7x10 ⁻⁶) Sol.Oligoele. (0,05mL) | <u>Simple omisión:</u> MM2 (g/L) Glucosa (20) (NH ₄) ₂ HPO ₄ (6,6) 30°C | <u>Optimización de la extracción</u> Precipitación acida Extracción orgánica (AcetatoEt: metanol 8:1) | <u>Metodología superficie de respuesta: Diseño rotacional central compuesto.</u> <u>Medio con melazas (g/L)</u> Melazas (107,8) NaNO ₃ (6,4) K ₂ HPO ₄ (4) Na ₂ KH ₂ PO ₄ (5,7) |
| BioTS: 0,21 g/L TSup: 37,7 mN/m | BioTS: 0,55 g/mL TSup: 28,5 mN/m CMC: 15 mg/L | BioTS: 0,86 g/L | BioTS: 3,2 g/L (1g/L purificado) |



| | Glucosa | Melazas |
|-----------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Coste 1Kg | 49,30+iva€/Kg | 0,38 €/Kg |
| Fuente C | Sigma | Agrotterra |
| Producción | 20g glucosa/ 0,86 g/L lich | 107,8g Melazas/ 1g/L lich |
| Coste 100g Lch | 114 € | 4 € |
| Componentes | Medio complejo | Medio simple |
| Tiempo cultivo | 48h | 72h |
| Purificación | Simple | Compleja |

| | | |
|--------------|-------|---------|
| SDS | 1 kg | 1-2,5 € |
| Rhamnolipido | 100 g | 250 € |
| Surfactina | 10g | 279 € |

Aplicación ambiental

Aplicaciones ambientales de BT

- Desorción de Metales Pesados
- Extracción del petróleo
- Biorremediación del petróleo: THL

Aplicación ambiental Degradación de n-alcenos

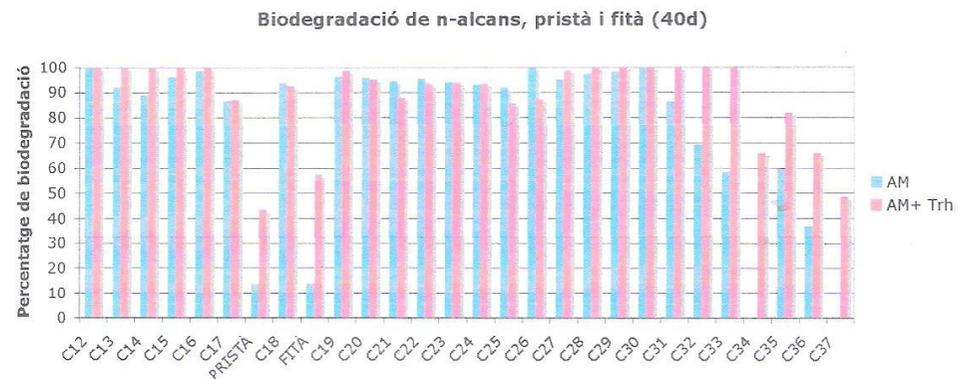
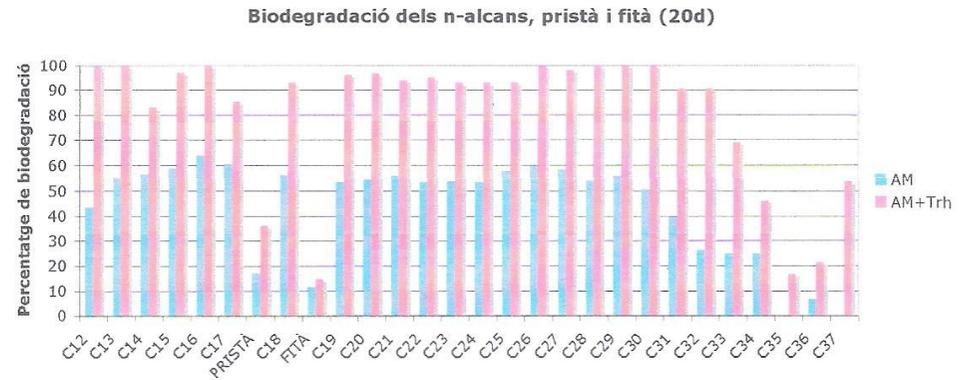
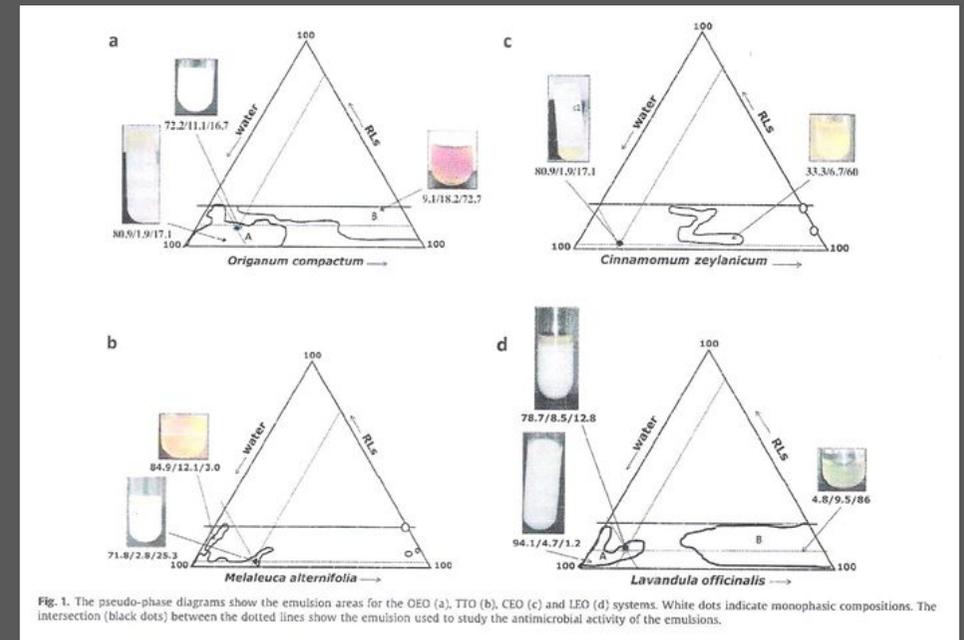
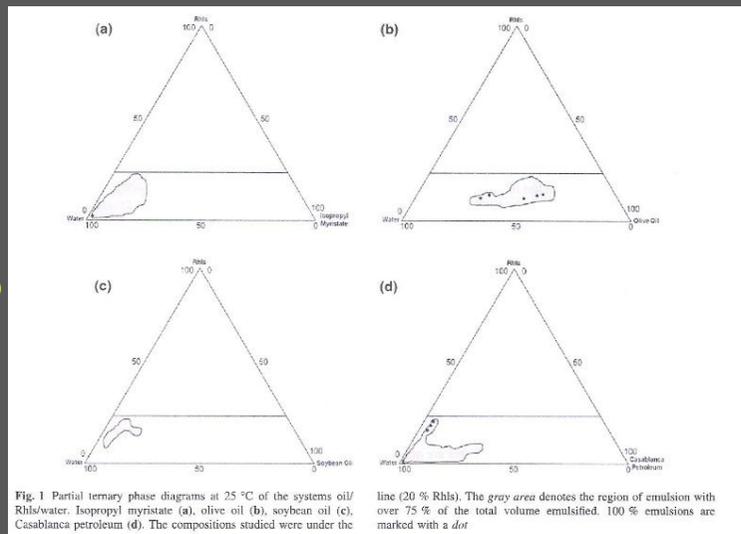
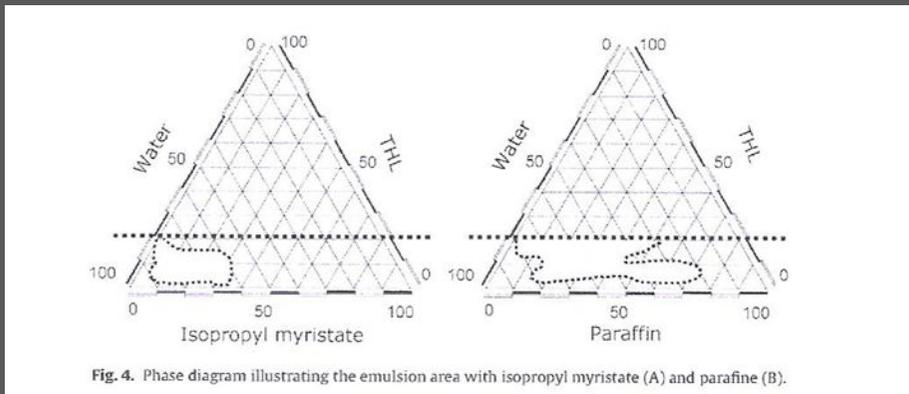


Figura 22. Dades de biodegradació dels n-alcans per a temps 20 dies i 40 dies en les dues condicions de cultiu: Creixement del Consorci en absència del trehalosalipid (blau) i en presència del trehalosalipid (vvermell).

Capacidad emulsionante: diagrama de fases ternario

Trehalosalípidos



Rhamnolípidos

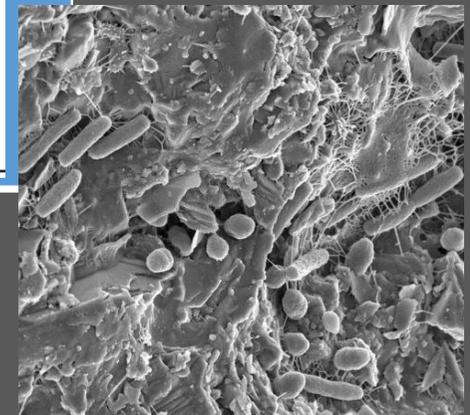
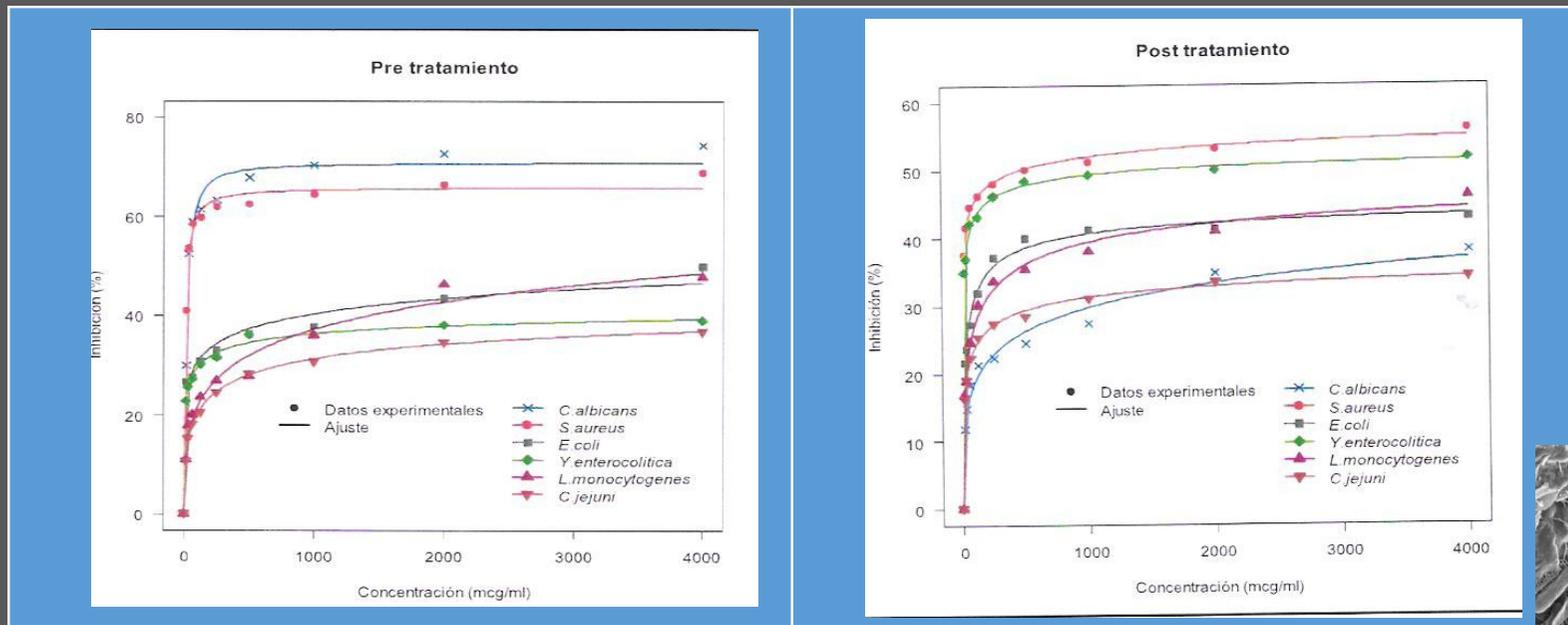
- Aceite de orégano (OEO)
- Aceite de cinamomo (CEO)
- Aceite del árbol del te (TTO)
- Aceite de lavanda (LEO)

Miristato de isopropilo
Aceite de oliva
Aceite de soja
Petroleo Casablanca

LIQUENISINA

RESULTADOS

EFFECTO EN LA FORMACIÓN Y ELIMINACIÓN DE BIOFILMS



Actividad antimicrobiana: CMI >250 μ M

Evaluación de la Citotoxicidad

Trehalosalípidos

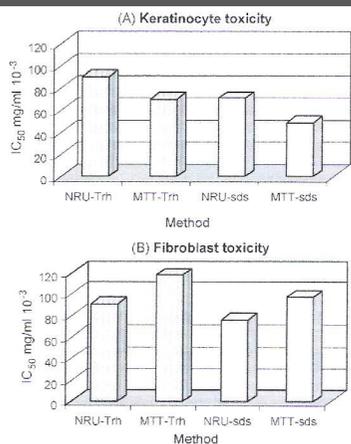


Fig. 7. Comparative cytotoxicity of trehalose lipids from *R. erythropolis* 5117 vs. SDS in keratinocytes (A) and fibroblasts (B) as detected with neutral red uptake NRU and MTT assays. The results are expressed as IC₅₀ (the dose inhibiting viability to 50%).

Rhamnolípidos

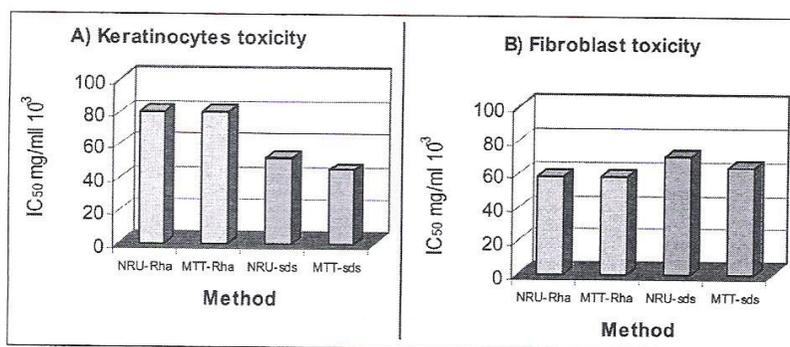


Figure 3. Comparative cytotoxicity of rhamnolipids from *P. aeruginosa* 47T2 vs SDS in keratinocytes (A) and fibroblasts (B) as detected with neutral red uptake NRU and MTT assays. Results are expressed as IC₅₀ (the dose inhibiting viability to 50%). Unpublished information.

Fosfolípidos y Flavolípidos

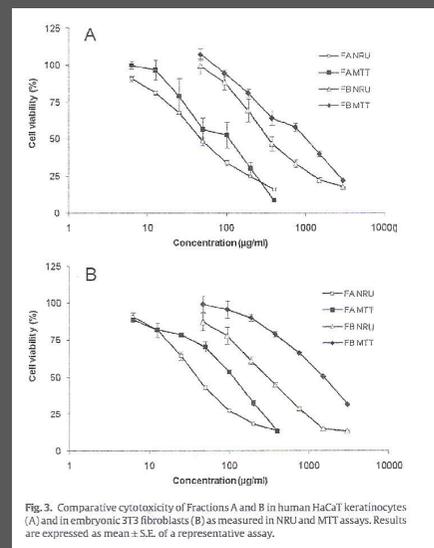
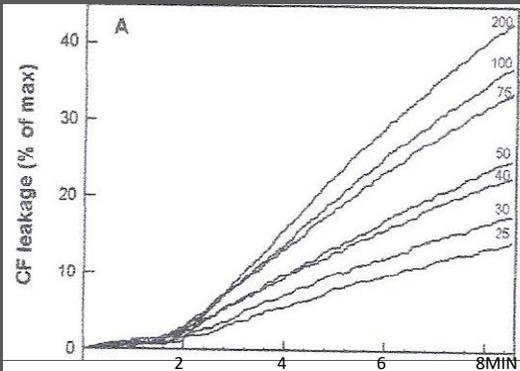


Fig. 3. Comparative cytotoxicity of Fractions A and B in human HaCaT keratinocytes (A) and in embryonic 3T3 fibroblasts (B) as measured in NRU and MTT assays. Results are expressed as mean ± S.E. of a representative assay.

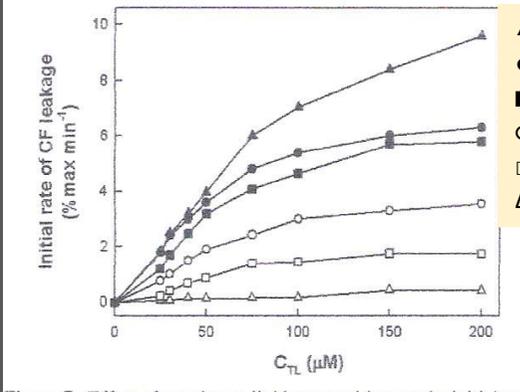
| IC ₅₀ | <i>Rhodococcus erythropolis</i> (µg/mL) | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (µg/mL) | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Mut. (µg/mL) | | <i>Sphingobacterium detergens</i> (apolar) (µg/mL) | | <i>Sphingobacterium detergens</i> (polar) (µg/mL) | | SDS (µg/mL) | |
|------------------|---|------|---------------------------------------|------|---|------|--|------|---|-------|-------------|------|
| | MTT | NRU | MTT | NRU | MTT | NRU | MTT | NRU | MTT | NRU | MTT | NRU |
| Fibroblastos | 117,4 | 91,1 | 57 | 58,2 | 65,1 | 72 | 106,4 | 44,3 | 700 | 345 | 53,5 | 46,3 |
| Queratinocitos | 70 | 90 | 80 | 80 | 60,1 | 53,9 | 132 | 68,3 | 1041,6 | 431,3 | 47,6 | 31,4 |

Interacción con membranas modelo

Trehalosalípidos



- Vesículas de fosfatidilcolina +carboxifluoresceína
- BioTs
- Salida del contenido



- ▲ POPC/lysoPC20:1
- POPC
- POPC/colesterol 5:1
- POPC/POPE
- POPC/Col 2:1
- △ POPC/Col 1:1

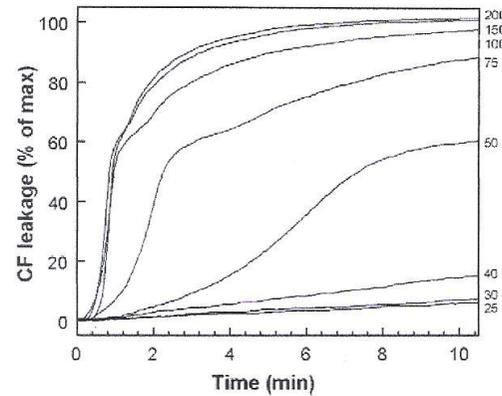


Fig. 2. Time course of CF leakage (increase in fluorescence intensity) in POPC LUV at various dirhamnolipid concentrations. The concentrations of dirhamnolipid (μM) are shown close to the curves. The concentration of POPC was $25 \mu\text{M}$. Temperature was maintained constant at 25°C .

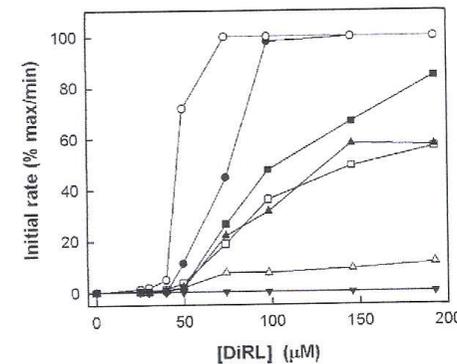


Fig. 5. Dependence of the initial rate of CF leakage on dirhamnolipid concentration. Initial rates were taken from the linear portions of the curves shown in Fig. 4 (panel A). Dirhamnolipid was added from a 5 mM stock solution. The total lipid concentration was $25 \mu\text{M}$ (as lipid phosphorus). The following compositions were assayed: POPC (closed circles), POPC/lysoPC 10:1 (open circles), POPC/POPE 4:1 (closed squares), POPC/POPE 3:1 (open squares), POPC/cholesterol 5:1 (closed up triangles), POPC/cholesterol 2:1 (open up triangles), POPC/cholesterol 1:1 (closed down triangles).

Ramrólípidos

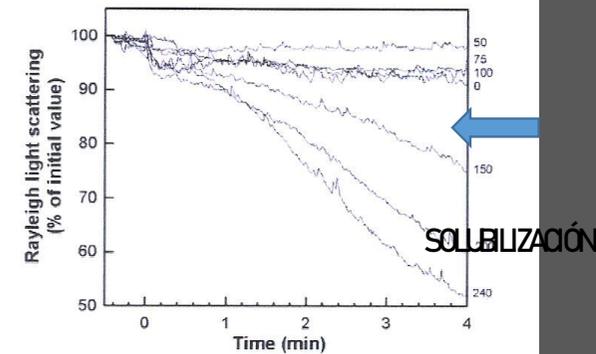


Fig. 3. Effect of dirhamnolipid on the turbidity of POPC LUV suspensions. Dirhamnolipid was added to the final concentration indicated on the curves (μM) from a 5 mM stock solution. Rayleigh light scattering was measured at excitation and emission wavelengths of 400 nm . POPC concentration was $25 \mu\text{M}$, and temperature was maintained at 25°C .

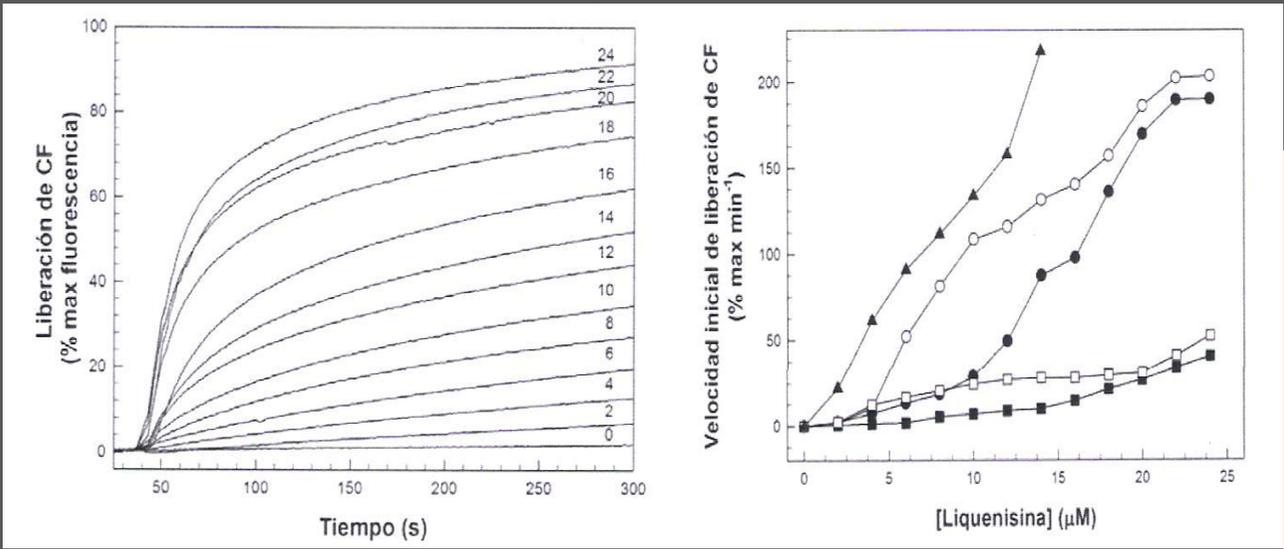
- POPC/Liso 20:1
- POPC
- POPC/POPE 4:1
- ▲ POPC/Col 5:1
- POPC/POPE 3:1
- △ POPC/Col 2:1
- ◆ POPC/Col 1:1

Vesículas de fosfatidilcolina

RESULTADOS

LIQUENISINA

- Vesículas de fosfatidilcolina + carboxifluoresceína
- BioTs
- Salida del contenido



- ▲ Fosfatidilcolina/ lecitina 1:1
- Fosfatidilcolina/ colesterol 2:1
- Fosfatidilcolina
- Fosfatidilcolina: Colesterol 1:1
- Fosfatidilcolina/ Fosfatidiletanolamina 1:1

| | Trehalosalípidos | Ramnoalípidos | Lipopeptidos |
|-----------------------------|---|---|--|
| CMC | 300 μM | 110 μM | 14,7 μM |
| Salida Carboxi-fluoresceína | 200 μM Lag 2 min 40% - 8 min 100% - 2-3h | 200 μM 100% - 4 min | 24 μM Lag 10-20 seg 92% - 5 min 100% - 20 min |
| Características | Lento = turbidez PERMEACIÓN | Rápido PERMEACIÓN/ SOLUBILIZACIÓN | Rápido = turbidez PERMEACIÓN |

Interacción con membranas biológicas

| | Trehalosalípidos | Ramnoalípidos | Fosfolípido | Flavolípidos |
|-------------------------|--|---|---|--|
| CMC | 300 μ M (37 mg/L) | 110 μ M (104,6 mg/L) | 180 mg/L | 6300 mg/L |
| H ₅₀ (20min) | 75 μ M (99 mg/L) | 65 μ M (61,8 mg/L) | 200 mg/L | >1000 mg/L |
| Características | 80 μ M: 40 min hemol 100% Lisis osmótica , poro 34 Å | 80 μ M: 15 min hemol 100% Lisis por solubilización , poros >72 Å | 200 mg/L: 60-120 min hemol 100% Hemólisis total en Agar Sangre | Saturación al 83% hemol Hemólisis parcial en Agar Sangre |

Trehalosalípidos

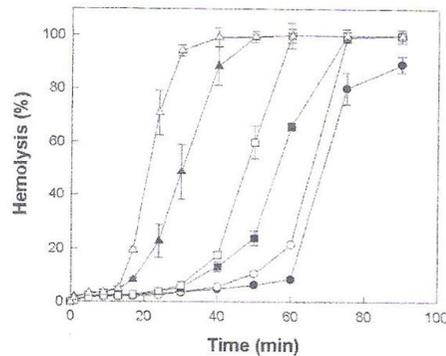


Figure 3. Trehalose lipid-induced hemoglobin release from human erythrocytes as a function of time. Trehalose lipid was added at time zero from a 1 mM stock solution to give final concentrations of 20 (\bullet), 25 (\circ), 27 (\blacksquare), 30 (\square), 60 (\blacktriangle), and 80 μ M (\triangle). Hemoglobin release was determined in a discontinuous assay at 37 °C, as explained under methods. Hemoglobin release of 100% was determined by lysing the cells with distilled water. The data correspond to the average of three independent experiments \pm standard error (error

Rhamnoalípidos

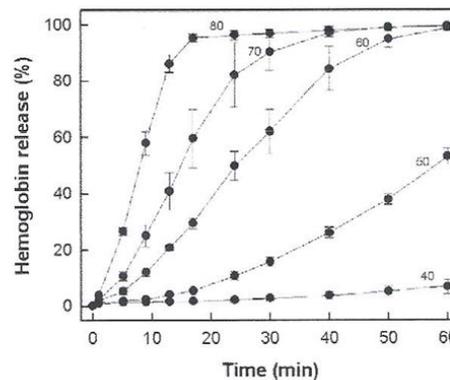


Fig. 7. Dirhamnoalipid-induced hemoglobin release from human erythrocytes. Dirhamnoalipid was added at time zero to the final concentrations indicated (μ M) from a 5 mM stock solution. Hemoglobin release was determined in a discontinuous assay at 37 °C, as explained under Methods. Hundred percent hemoglobin release was determined after lysing the cells with distilled water. The curves correspond to the average of three independent experiments. Error bars indicate the standard error.

Fosfolípidos

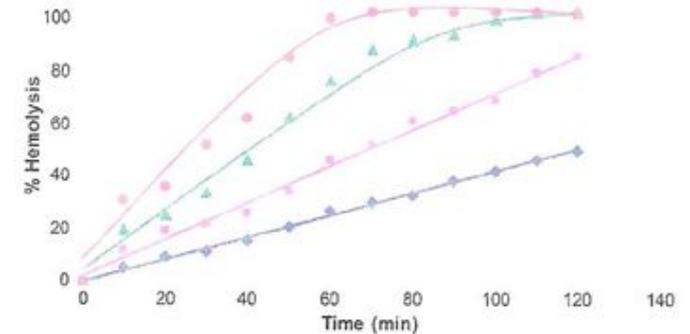


Fig. 2. Haemolysis produced by different concentrations of BS Fraction A. Fraction A was added at time zero from a stock solution to give final concentrations of 0.2 g/L (\circ), 0.15 g/L (\blacktriangle), 0.10 g/L (\blacksquare), and 0.05 g/L (\bullet). Hemoglobin release was determined in a discontinuous assay at 37 °C. The points enclose the error bars of the measurement (data are presented as mean \pm S.E., n=3).

Fosfolípidos "Flavolípidos"

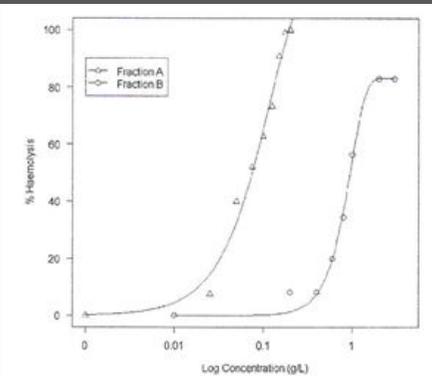
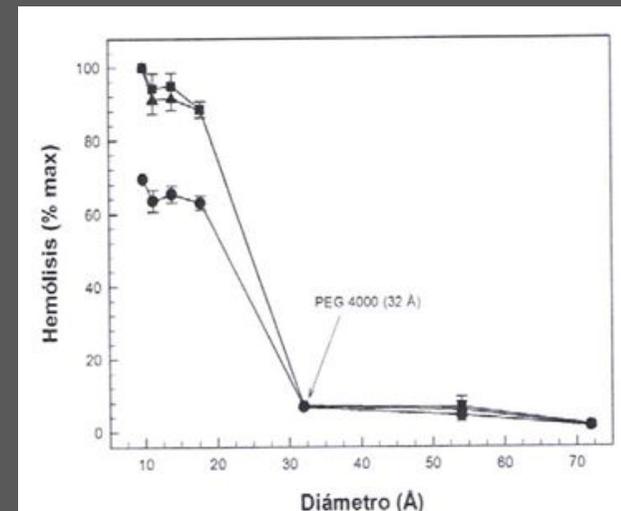
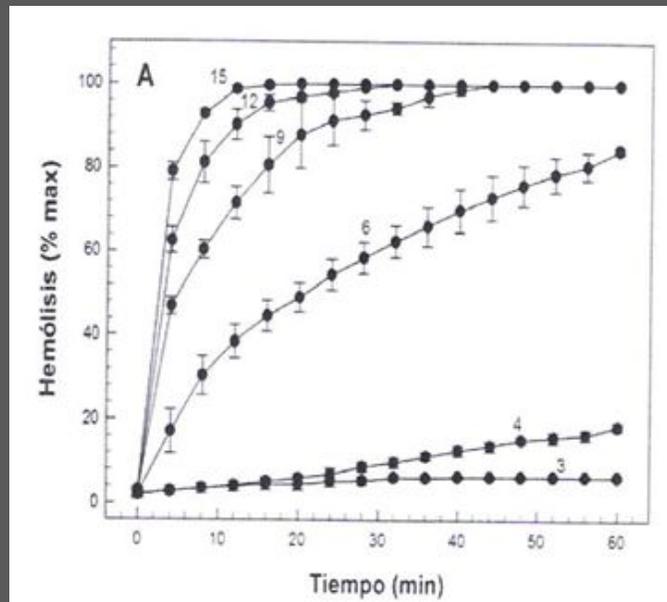


Fig. 1. Haemolysis at different BS concentrations. Erythrocytes were incubated for 1 h at 37 °C. The points enclose the error bars of the measurement (data are presented as mean \pm S.E., n=3).

HEMÓLISIS

RESULTADOS

Lipopéptido: Liquenisina



| | Trehalosalípidos | Ramrólípidos | Fosfolípido | Flavolípidos | Lipopéptido |
|--------------------------|--|--|---|--|--|
| CMC | 300 μ M (37 mg/L) | 110 μ M (104,6 mg/L) | 180 mg/L | 6300 mg/L | 14,7 μ M (15 mg/L) |
| H ₅₀ (20 min) | 75 μ M (99mg/L) | 65 μ M (61,8mg/L) | 200 mg/L | >1000 mg/L | 6 μ M (6,1mg/L) |
| Características | 80 μ M: 40 min hemol 100% Lisis osmótica , poro 34 Å | 80 μ M: 15 min hemol 100% Lisis por solubilización, poros >72 Å | 200 mg/L: 60-120 min hemol 100% Hemólisis total en agar sangre | Saturación al 83% hemol. Hemólisis parcial en agar sangre | 15 μ M: 12 min hemol 100% Lisis osmótica , poro 34 Å |

RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIMICROBIANOS

- Higiene alimentaria
- Vacunas
- Antibióticos

- Calidad de vida elevada
- Expectativa de vida elevada

- Rápida emergencia de bacterias resistentes a antimicrobianos
 - Fenómeno natural de evolución bacteriana
 - Uso incorrecto de antibióticos: aceleración
 - Extensión más rápida de resistencia que su control

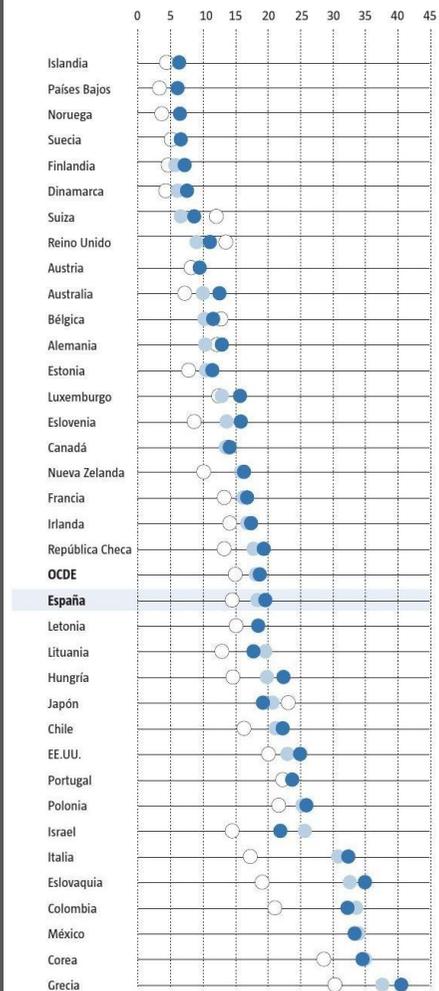


Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE)
2020-2050 → 2,4 millones de muertesii

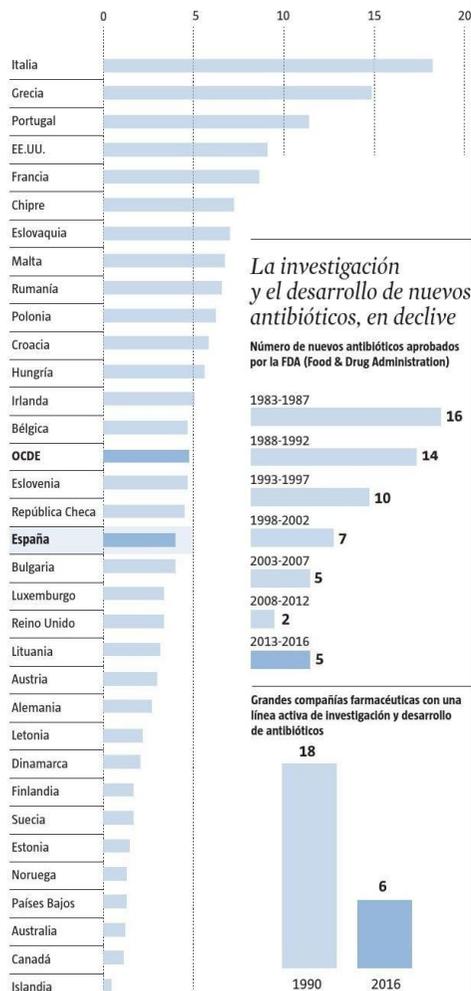
La resistencia a los antibióticos avanza a distintos ritmos

Promedio de infecciones causadas por bacterias resistentes

○ 2005 ● 2015 ● Previsiones 2030

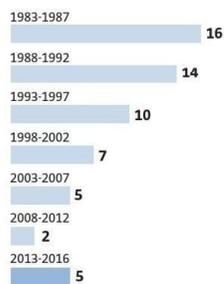


Número de muertes causadas por ocho bacterias resistentes por cada 100.000 personas

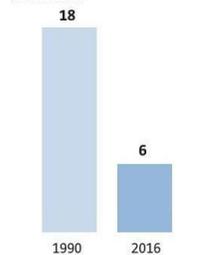


La investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos, en declive

Número de nuevos antibióticos aprobados por la FDA (Food & Drug Administration)



Grandes compañías farmacéuticas con una línea activa de investigación y desarrollo de antibióticos



RESISTENCIA BACTERIANA

Centro Europeo para el Control y prevención de Enfermedades:

Promedio de infecciones por bacterias resistentes 2005, 2015 y 2030

REDUCCIÓN DE MICROORGANISMOS RESISTENTES

Medidas de salud pública

1. Lavado de manos. Incremento higiene hospitalaria.
2. Mayor control en la prescripción antibiótica.
3. Diferenciación analítica bact/virus.
4. Promoción de prescripción diferida
5. Sensibilización pública: 1 solo mundo, 1 sola salud



- Menos farmacéuticas I+D en antibióticos
 - No es rentable
- Menos nuevos antibióticos
 - Investigación larga y difícil

Antibióticos

1. Inversión en Investigación de nuevos antibióticos
2. Uso Correcto
 - Sólo si son necesarios
 - Realizar bien en tratamiento: dosis, duración
3. Prevención:
 - Vacunas
 - Hábitos saludables

RESISTENCIA BACTERIANA

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS:

- Es un mecanismo natural en bacterias consecuencia de adaptación al medio
- Hay mayor nivel en ambientes con uso elevado como antibióticos como hospitales
- Se puede heredar y extender horizontalmente

MECANISMOS DE RESISTENCIA

1. Reducción de captación por cambios de permeabilidad de membrana externa
2. Presencia de bombas de eflujo
3. Pérdida de afinidad o bypass de la diana
4. Producción de enzimas inactivadoras
5. Formación de biofilms

OMS: Prioridad global de patógenos en hospitales,
ESKAPE: *Escherichia coli*

Staphylococcus aureus

Klebsiella pneumoniae

Acinetobacter baumannii

Pseudomonas aeruginosa

Enterococcus faecium



ESTRATEGIAS PARA ABORDAR LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

- ❖ Antibióticos más efectivos
- ❖ Nuevos compuestos químicos con nuevos mecanismos de acción
- ❖ Desarrollo de ADYUVANTES o Potenciadores de antibióticos
 - Capacidad de bloquear mecanismos de resistencia o incrementar la acción del antibiótico.
 - Con actividad antimicrobiana o no



Tipos de Adyuvantes

Clase I: Actúan sobre el patógeno. Trabajan con los antibióticos en las dianas

- Inhibidores de β -lactamasas: ac. clavulánico, sulbactam, y tazobactam
- Inhibidores de bombas de eflujo: Difícil desarrollo e identificación
- **Permeabilizadores de membranas:** incrementan la entrada de antibióticos.

Son compuestos catiónicos anfifílicos (Polimixinas)

- Desestabilizan la M. Ext. y su permeabilidad
- Afectan a la integridad de la M. Cit.
- Pueden tener dianas intracelulares

Clase II: Actúan sobre el huésped. Mejoran los mecanismos de defensa para potenciar la actividad antimicrobiana.

Tensioactivos derivados de aminoácidos o lip aminoácidos

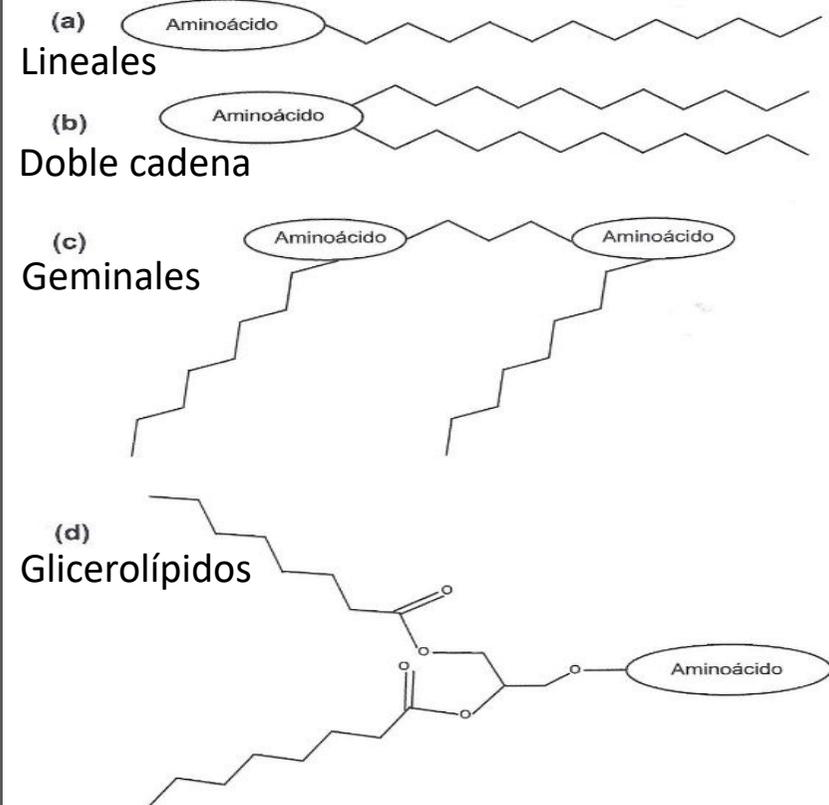
- Cabeza polar con 1 o mas aa obtenidos por síntesis enzimática o hidrólisis de proteínas
- Cola hidrofóbica hidrocarbonada obtenida de aceites naturales.

Síntesis según química verde:

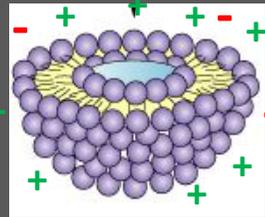
producción de escasos residuos
uso comp. Químicos poco peligrosos
Materias primas renovables

- Actividad superficial elevada
- Propiedades antimicrobianas
- Biodegradables
- Producción sostenible

Estructuras de TS lip aminoácidos

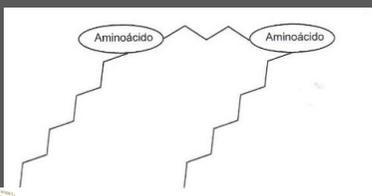
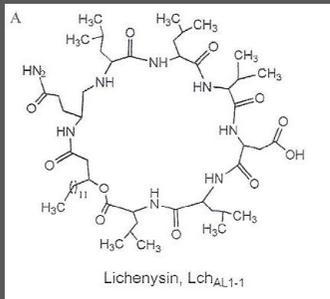


VESÍCULAS CATANIÓNICAS



Propiedades generales:

- Similares morfológicamente a los liposomas
- Se preparan sin consumo de **energía**
- Producen preparaciones termodinámicamente estables
- Pueden prepararse utilizando materiales de **bajo coste**
- Con estructuras variables de la cabeza polar se pueden **modular diferentes propiedades**
- La **sinergia entre los compuestos** que las forman pueden potenciar sus propiedades biológicas
- Pueden solubilizar compuestos hidrofóbicos



Propiedades específicas de

BioTS + Ts derivado de aminoácido

- Se prepararan con componentes biodegradables, no tóxicos en el medio ambiente
- Se prepararán con materiales residuales

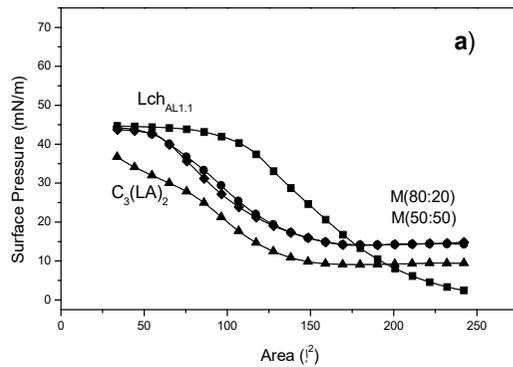
MEZCLAS CATANIÓNICAS

| | Tensioactivo | Características |
|-------------|---|--|
| $C_3(LA)_2$ | Tensioactivo geminal de arginina (2+) N α ,N ω -bis(N α -lauroil-arginina) α,ω dipropilamina | PM: 822,5 g/mol T. sup : 35mN/m CMC: 5x10 ⁻³ mM |
| $C_6(LL)_2$ | Tensioactivo geminal de lisina (2+) N α ,N ω -bis(N α -lauroil-lisina) α,ω -hexilendiamida | PM: 808,6 g/mol T. sup: 30 mN/m CMC: 5x10 ⁻³ mM |
| $C_3(CA)_2$ | Tensioactivo geminal de arginina, (2+) N α ,N ω -bis(N α caproilarginina) α,ω -propildiamina | PM: 766,5 g/mol T. sup: 32 CMC: 4,3 mM |
| CAM | Tensioactivo de cadena simple de arginina, (1+) N α -caproil-arginina metil ester | PM: 378 g/mol T. sup.:40 mN/m CMC: 16 mM |
| Lich | Péptido cíclico con siete aminoácidos como cabeza polar (Gln-Leu-Leu-Val-Asp(-)-Leu-Ile) con una cadena de ácido graso β -hidroxilado de 14-16 carbonos (1-) | PM: 1021,6 g/mol T. sup: 28,5 mN/m CMC: 14,7 μ M |

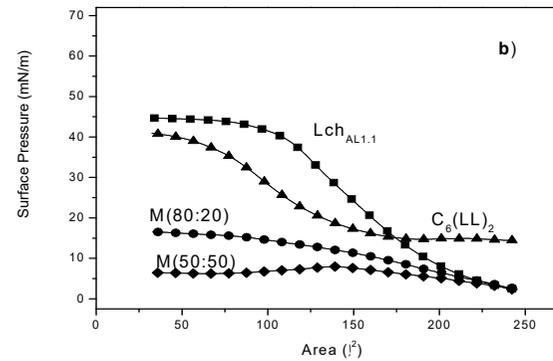
ISOTERMA DE COMPRESIÓN EN MONOCAPA

Mezclas catiónicas

$C_3(LA)_2$

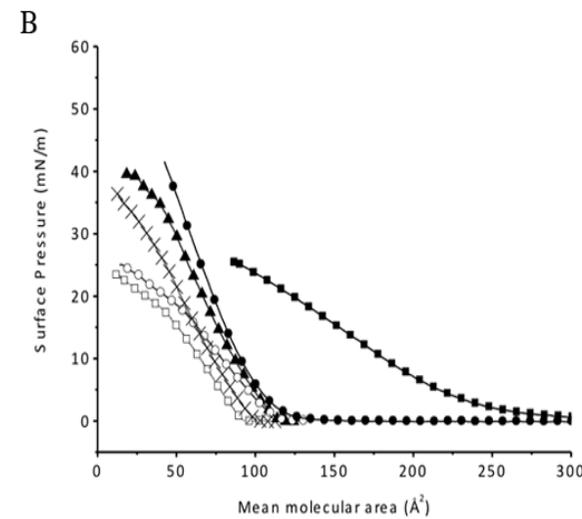
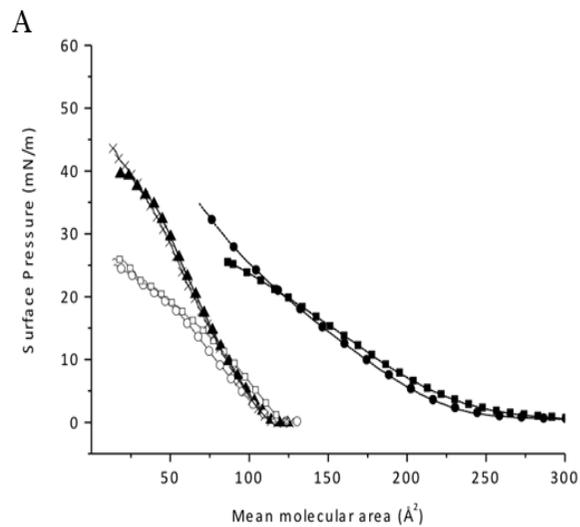


$C_3(LL)_2$



- Lich
- ▲ TS
- M 8:2
- ◆ M 5:5

$C_3(CA)_2$

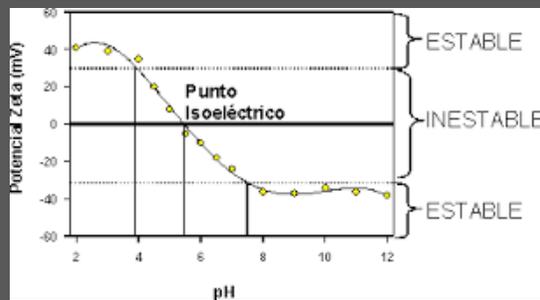


CAM

- Lich
- Ts+ Lich
- ▲ TLE
- + TLE-Ts-Lch
- TLE-Lich
- TLE-Ts

Determinación del Potencial Z

- Medida de la carga eléctrica de la superficie de los agregados
- Valores absolutos >20 indican un sistema electrostáticamente estable por cargas repulsivas



| | Tensioactivo | Potencial Z |
|----------------------------|-----------------------|-------------|
| Tensioactivos individuales | $C_3(CA)_2$ | 60 mV |
| | CAM | 30 mV |
| | $C_3(LA)_2$ | 49,7 mV |
| | Lich | -30 mV |
| Mezclas | $C_3(CA)_2$ -Lich 5:5 | 31,8 |
| | $C_3(CA)_2$ -Lich 8:2 | 26,8 |
| | CAM-Lich 5:5 | -2,8 mV |
| | CAM-Lich 8:2 | 45,5 mV |
| | $C_3(LA)_2$ -Lich 8:2 | 66 mV |
| | $C_3(LA)_2$ -Lich 5:5 | 54 mV |

| Tensioactivo | CMC |
|------------------------|--------------|
| $C_3(CA)_2$ | 4,3 mM |
| CAM | 16 mM |
| Lch | 14,7 μ M |
| $C_3(CA)_2$:Lch (8:2) | 10 μ M |
| CAM:Lch (8:2) | 51 μ M |

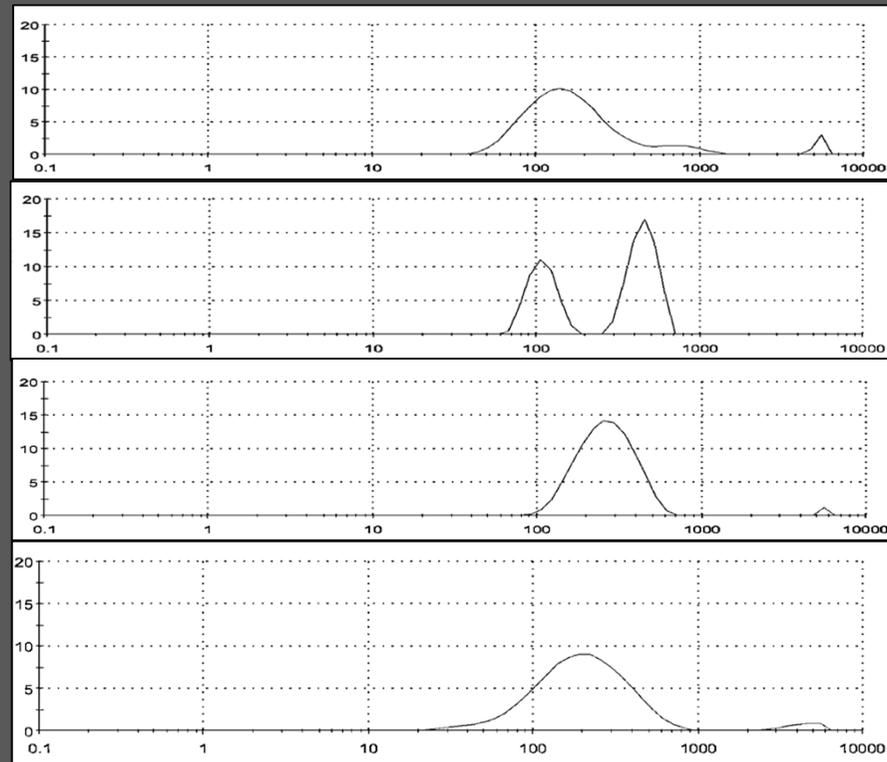
TAMAÑO DE LOS AGREGADOS

$C_3(LA)_2$: 194nm
(30-800)

Lch: 100 y 500 nm
Bimodal como surfactina

$C_3(LA)_2$ +Lch 8:2:
200 nm fuerte interacción

$C_3(LA)_2$ +Lch 5:5:
200 nm fuerte interacción



Tamaño de las partículas en dispersión acuosa (nm) (Dinàmic Light Scatering)

CMIs

RESULTADOS PRELIMINARES

| Microorganismos | CMI Lich (μM) | CMI C ₃ (LA) ₂ (μM) | CMI C ₃ (LA) ₂ -Lich 8:2 (μM) | FIC | CMI C ₆ (LL) ₂ (μM) | CMI C ₆ (LL) ₂ -Lich 8:2 (μM) | FIC |
|--------------------------|---------------|---|---|------|---|---|-----|
| Gram negativas | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | 250 | 125 | 6,2 | 0,05 | 200 | 200 | 0,9 |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | 500 | 125 | 6,2 | 0,04 | 100 | 100 | 0,8 |
| <i>P. aeruginosa</i> | 1000 | 125 | 12,5 | 0,08 | 200 | 200 | 0,8 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1000 | 62,5 | 12,5 | 0,1 | 100 | 100 | 0,8 |
| <i>Y. enterocolytica</i> | >1000 | 7,8 | 3,1 | 0,3 | 100 | 100 | 0,8 |
| Gram positivas | | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | >1000 | 7,8 | 6,2 | 0,6 | 100 | 100 | 0,8 |
| MRSA | 1000 | 7,8 | 6,2 | 0,6 | 100 | 100 | 0,8 |
| <i>S. epidermidis</i> | >1000 | 7,8 | 6,2 | 0,6 | 50 | 50 | 0,8 |
| <i>K. rhizophila</i> | >1000 | 7,8 | 6,2 | 0,6 | 100 | 50 | 0,4 |
| <i>B. subtilis</i> | >1000 | 7,8 | 6,2 | 0,6 | 200 | 50 | 0,2 |
| <i>L. monocytogenes</i> | >1000 | 15,6 | 6,2 | 0,3 | 200 | 200 | 0,8 |
| Levadura | | | | | | | |
| <i>C. albicans</i> | 1000 | 15,6 | 6,2 | 0,3 | 200 | 200 | 0,8 |

| Microorganismos | CMI Lich μM | CMI C ₃ (CA) ₂ (μM) | CMI C ₃ (CA) ₂ -Lich 8:2(μM) | FIC | CMI CAM (μM) | CMI CAM-Lich 8:2 (μM) | FIC |
|--------------------------|-------------|---|--|-----|--------------|-----------------------|-----|
| Gram negativas | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | 1000 | 15,7 | 15,7 | 0,8 | 1000 | >500 | 1 |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | >1000 | 31,3 | 15,7 | 0,4 | 1000 | >500 | 1 |
| <i>P. aeruginosa</i> | >1000 | 31,2 | 31,2 | 0,8 | 1000 | >500 | 1 |
| <i>K. pneumoniae</i> | >1000 | >250 | >250 | 0,9 | 1000 | >500 | 1 |
| <i>Y. enterocolytica</i> | >1000 | 62,5 | 7,8 | 0,1 | 1000 | >500 | 1,8 |
| Gram positivas | | | | | | | |
| <i>S. aureus</i> | 1000 | 7,8 | 7,8 | 0,8 | 250 | 500 | 3,4 |
| MRSA | 1000 | 3,9 | 15,7 | 3,2 | 250 | 500 | 1,6 |
| <i>S. epidermidis</i> | 1000 | 3,9 | 3,9 | 0,8 | 125 | 125 | 6,6 |
| <i>K. rhizophila</i> | >1000 | 3,9 | 3,9 | 0,8 | 250 | 500 | 1,8 |
| <i>B. subtilis</i> | >1000 | 15,7 | 3,9 | 0,2 | 250 | 250 | 1,8 |
| <i>L. monocytogenes</i> | 1000 | 3,9 | 3,9 | 0,8 | 500 | >500 | 0,8 |
| Levadura | | | | | | | |
| <i>C. albicans</i> | >1000 | 15,7 | 7,8 | 0,4 | 500 | >500 | 1 |

$$Fic = MIC_{AM} / MIC_A + MIC_{BM} / MIC_B$$

Donde:

MIC_{AM} = MIC del geminal en la mezcla

MIC_A = MIC del geminal puro

MIC_{BM} = MIC del Lp en la mezcla

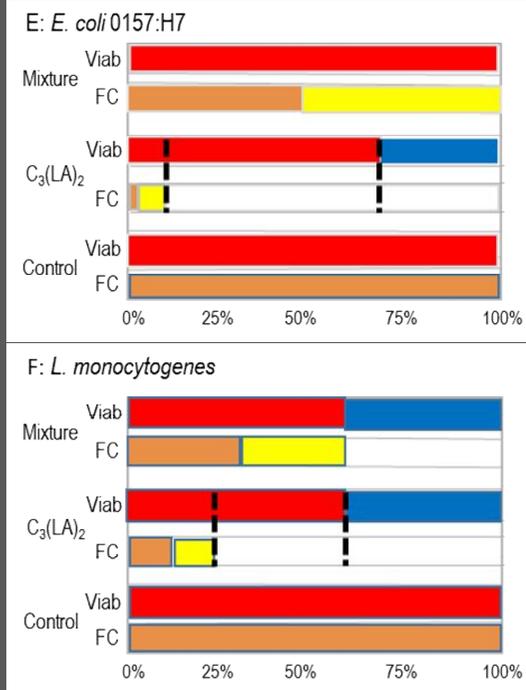
MIC_B = MIC del LP puro

Sinergia = FIC < 0,5

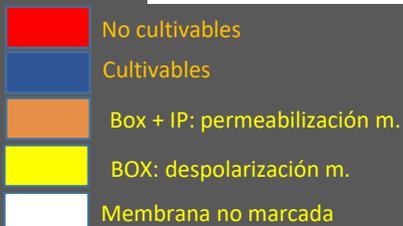
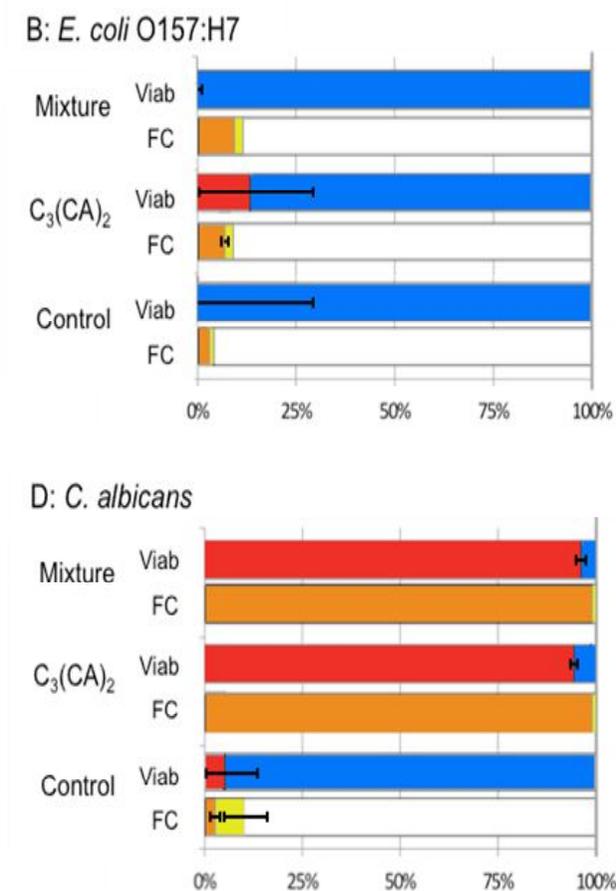
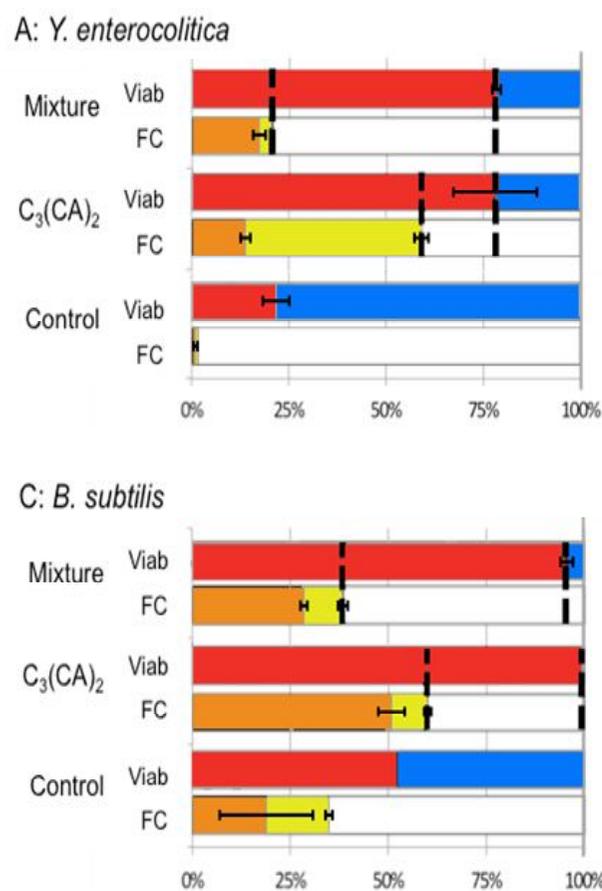
CITROMETRÍA DE FLUJO

RESULTADOS PRELIMINARES

$C_3(LA)_2$



$C_3(CA)_2$



MICROSCOPIA ELECTRONICA

Resultados preliminares

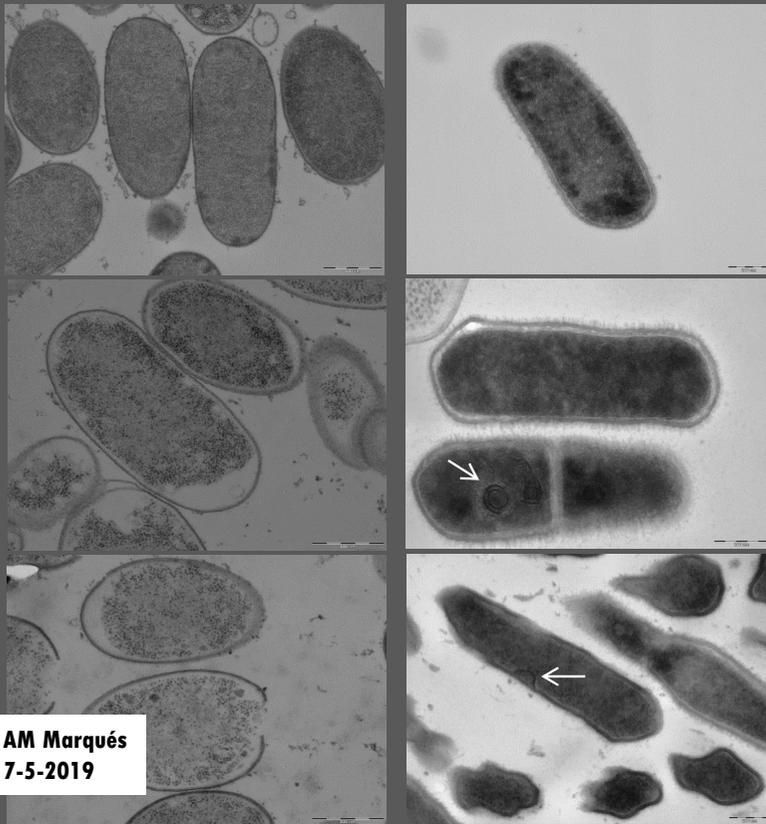
$C_3(LA)_2$

E. coli O157:H7

- Control
- Tratada con $C_3(LA)_2$
- Tratada con $C_3(LA)_2$ -Lich 8:2

L. monocytogenes

- Control
- Tratada con $C_3(LA)_2$
- Tratada con $C_3(LA)_2$ -Lich 8:2



$C_3(CA)_2$



A.1

B.1

C.1

A.2

B.2

C.2

Y. enterocolytica

- Tratada con $C_3(CA)_2$ -Lich 8:2
- Tratada con $C_3(CA)_2$

B. subtilis

- Tratada con $C_3(CA)_2$ -Lich 8:2
- Tratada con $C_3(CA)_2$

C. albicans

- Tratada con $C_3(CA)_2$ -Lich 8:2
- Tratada con $C_3(CA)_2$

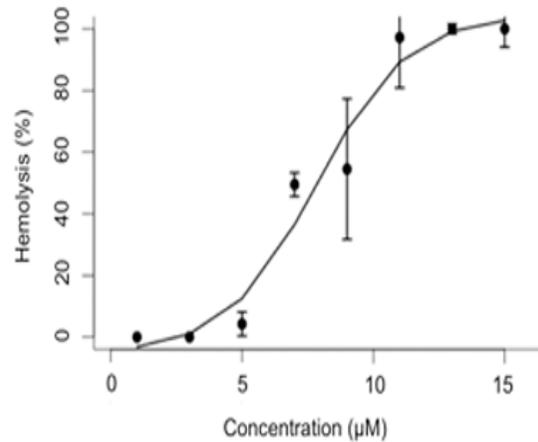
HEMÓLISIS

Resultados preliminares

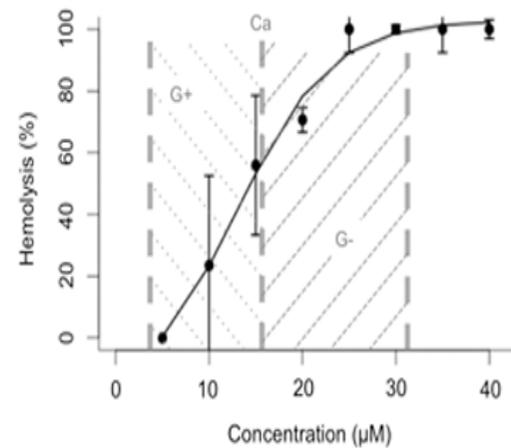
| | H ₅₀ (μM) | DI (%) | Poder irritante |
|----------------------------------|----------------------|--------|------------------|
| Lichenysin | 8.0 | 22.6 | 0.37 (Irritante) |
| C ₃ (CA) ₂ | 13.3 | 36.9 | 0.28 (Irritante) |
| Mezcla | 22.1 | 25.8 | 0.70 (Irritante) |

Poder irritante = H_{50} / DI (Indice desnaturalización)
Valores elevados, menor poder irritante ($>100 < 0,1$)

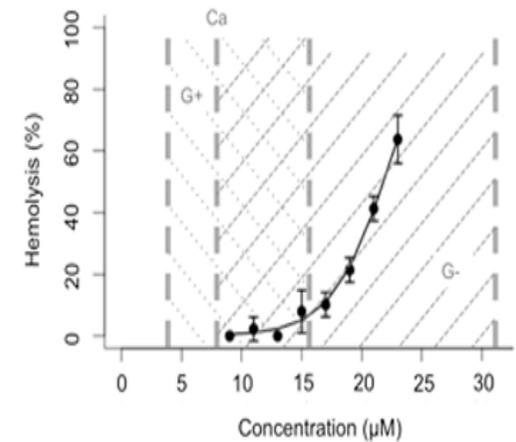
A: Liquenisina



B: C₃(CA)₂



C: C₃(CA)₂ + Liquenisina (8:2)



ÍNDICE TERAPÉUTICO

Resultados preliminares

| Microorganismo | IT _{Lich} | IT _{C₃(CA)₂} | IT _{mezcla} |
|--------------------------|--------------------|---|----------------------|
| <i>E. coli</i> O157:H7 | <0,01 | 0,43 | 1,41 |
| <i>Y. enterocolytica</i> | <0,01 | 0,21 | 2,84 |
| <i>B. subtilis</i> | <0,01 | 0,85 | 5,68 |
| <i>C. albicans</i> | <0,01 | 0,85 | 2,84 |

Índice terapéutico= H_{50} / MIC
Relación entre el efecto nocivo/dosis terapéutica
Valor elevado >> menor riesgo

CONCLUSIONES

- Los TS derivados de Arginina⁽⁺⁾ interactúan con Lch⁽⁻⁾ formando un **pseudoTS** con carga + o neutra formando un sistema catiónico sinérgico.
- Se forman **agregados estables de 200nm**
- Las mezclas catiónicas C₃(LA)₂-Lch 8:2 y C₃(CA)₂-Lch 8:2 tienen **actividad antimicrobiana sinérgica** frente algunos microorganismos
- La **carga catiónica libre** de la mezcla catiónica favorece una interacción electrostática con las bacterias, incrementando su efecto antimicrobiano
- Las mezclas catiónicas **alteran la membrana citoplasmática** y pudiendo tener otra diana alternativa
- La mezcla catiónica posee un Índice Terapéutico mejor