



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Nuevos tensioactivos catiónicos basados en ramnolípidos y aminoácidos: propiedades fisicoquímicas y biológicas

Anderson Ramos da Silva

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient
Secció Microbiologia

Programa de doctorat: Biotecnologia

**NUEVOS TENSIOACTIVOS CATIÓNICOS BASADOS EN
RAMNOLÍPIDOS Y AMINOÁCIDOS: PROPIEDADES
FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS**

ANDERSON RAMOS DA SILVA

2019



Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació
Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient
Secció Microbiologia

Programa de doctorat: Biotecnologia

NUEVOS TENSIOACTIVOS CATIÓNICOS BASADOS EN RAMNOLÍPIDOS Y AMINOÁCIDOS: PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS

Memoria presentada por **Anderson Ramos da Silva** para optar al
título de Doctor por la Universitat de Barcelona

Directoras de Tesis:

Dra. Àngeles Manresa

Dra. Lourdes Pérez

Doctorando:

Anderson Ramos da Silva

2019



Departament de Biologia, Sanitat i Medi
Ambient, secció Microbiologia.
Facultat de Farmàcia
Av. Joan XXIII s/n
08028 Barcelona
Tel.: 934 024 496

Esta tesis doctoral fue parcialmente financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad (Nuevos bioproductos para nuevos retos: desarrollo de biomateriales mediante estrategias microbianas y enzimáticas, proyecto CTQ2014-59632-R) y Lipoaminoácidos y líquidos iónicos biocompatibles para el desarrollo de nuevas estrategias de control antimicrobiano y eliminación de biofilms, proyecto CTQ2017-88948-P).

Dedico esa tesis a todos que luchan por sus sueños. Independiente de sus orígenes y
realidad, eres capaz de alcanzar lo que sea.

Gracias a mis padres por todo amor y dedicación y a mi madrina que hizo con que
mi realidad actual pudiera ser posible.

AGRADECIMIENTOS

Estos últimos años en Barcelona me han proporcionado diversas experiencias que me han hecho madurar, crecer como ser humano y ser más empático. Fueron tantas historias escuchadas, conocí tantas realidades diferentes. Aprendí el real significado de SAUDADES. Son muchos años lejos de mi familia, amigos y mi realidad en Brasil, pero la vida nos sorprende con lo nuevo y el placer de vivir la vida actual. Ha sido una etapa que, aunque repleta de momentos de superaciones y adaptaciones, me ha hecho vivir cosas increíbles. Por todo ello, quisiera agradecer en esta Tesis a todas aquellas personas que, aquí en España o desde Brasil, me han apoyado y acompañado durante este tiempo.

En primero lugar, me gustaría agradecer a la Dra. Àngels Manresa por toda su confianza y dedicación. Sin su sí para que pudiera trabajar en su laboratorio, nada de esto hubiera sido posible. Muchas gracias por recibirme tan bien y estar tan atenta a mis necesidades en todo lo referente a nuestro laboratorio desde el primero momento. ¡GRACIAS! Agradecer a la Dra. Lourdes Pérez del departamento de Tensioactivos y Nanobiotecnología (IQAC - CSIC) por todo su apoyo, paciencia, dedicación y por compartirme sus conocimientos. Fue una persona muy importante para la elaboración de esta tesis. Aún teniendo un poco más de dificultad con el apartado químico de esta tesis, supiste enseñarme de la mejor manera posible para mi mejor comprensión. A estas grandes doctoras, les agradezco su paciencia hasta que me habitué al idioma y con las técnicas del laboratorio.

A la Dra. Aurora Pinazo por su apoyo y conocimientos repasados en la estancia que tuve en el Instituto de Química Avanzada (IQAC – CSIC).

A todos del departamento de Microbiología (Facultad de Farmacia –UB) y del departamento de Tensioactivos y Nanobioteconología (IQAC – CSIC) por el apoyo y amistad en estos años. En especial al Dr. Nacho que me enseñó todo referente al laboratorio con paciencia y amistad. ¡Muchas Gracias!

A Dra. Josefa Badia (coordinadora del programa de biotecnología) por ser tan accesible y capaz de resolver y aclarar dudas con rapidez y paciencia.

A las amistades hechas en el laboratorio que me llevaré para toda la vida. Muchas gracias a Shirin, Yaima, Nadia, Yoran, Edgar, Karen, Ilaria, Teresa, Miryam y Marta por tantos momentos maravillosos vividos en el laboratorio y los fines de semana. La suerte de tenerlos como amigos, fue un gran regalo de la vida.

A mi familia de Brasil por todo el amor. Mi gran mamá Lucinete que amo tanto y que me apoya en todas mis decisiones. Ella que con pocos recursos financieros y sola, consiguió tener a sus dos hijos en el camino del bien, a pesar de la dura realidad de una periferia de Brasil. ¡Muchas gracias MAMÁ! Por la suerte que tuve y tengo de tenerte como guía. Mi papá por siempre ayudarme con lo financiero. Sin él, muchos de estos pasos no hubieran sido posibles. A mis hermanos que quiero tanto. Espero ser un ejemplo para ellos para que puedan seguir creyendo en sus sueños.

A mi madrina Alexandra Petitbò, por todo su amor desde que tenía 10 años. Nos conocimos por una ONG en la que extranjeros ayudan a niños de periferias de Brasil para que tengan una mejor educación. Desde entonces ella es mi segunda mamá. Sin

ella, toda la vida presente tal vez no hubiera sido posible. Mis sinceros agradecimientos por elegirme como un hijo más en tu vida. T´estimo!

A mi familia catalana por toda la aceptación como si fuera de la familia (de sangre). Muchas gracias por todo el amor verdadero y apoyo. Muchas gracias por cada abrazo que hace que me sienta en casa. Moltes gràcies!!!!

A mi nueva familia catalana que gané al conocer el amor de mi vida. Muchas gracias amor por toda la paciencia y apoyo. Eres una verdadera pareja. T´estimo molt molt!!

A todos mis mejores amigos de Brasil que quiero tanto y que a pesar de la distancia, supieron enviarme buenas energías, apoyo y amor.

A los buenos amigos que hice en Barcelona y que compartimos momentos felices y de desconexión. Muchas gracias a todos por la sincera amistad.

*Si una persona es perseverante, aunque sea dura de entendimiento,
se hará inteligente; y aunque sea débil, se transformará en fuerte.*

Leonardo da Vinci

Nunca aceites ser comparado com outro alguém.

Você é único! Capaz de alcançar todos os seus sonhos.

O sol tem a capacidade de brilhar para todos, então a desfrutar!

Anderson Ramos

ÍNDICE

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Aspectos generales de los tensioactivos	3
1.2.	Propiedades fisicoquímicas de los tensioactivos	5
1.3.	Ramnolípidos: el desafío para nuevas estrategias	7
1.4.	Tensioactivos catiónicos	11
1.4.1.	Tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos	12
1.4.2.	Tensioactivos catiónicos derivados de lisina	14
1.4.3.	Tensioactivos catiónicos derivados de arginina	15
1.5.	Resistencia antimicrobiana	16
1.6.	Microorganismos	18
1.6.1.	Bacterias y la resistencia a los antibióticos	18
1.6.2.	Levaduras y las infecciones oportunistas	21
1.6.3.	Biofilms de las especies de <i>Candida</i>	24
1.6.4.	Nuevas estrategias para reducir el problema de la resistencia antimicrobiana	28
1.6.5.	Infecciones parasitarias – <i>Leishmania infantum</i>	32
1.6.6.	Infecciones parasitarias – <i>Acanthamoeba castellanii</i>	34
1.7.	Actividad antitumoral y Citotoxicidad	36

2.	OBJETIVOS	41
3.	EXPERIMENTAL	47
3.1.	Materiales	49
3.2.	Obtención de los ramnolípidos	50
3.2.1.	Microorganismo utilizado para producción de ramnolípidos	50
3.2.2.	Medio de cultivo y inóculo	50
3.2.3.	Recuperación de los ramnolípidos	51
3.2.4.	Determinación cuantitativa de los RLs	52
3.3.	Síntesis de los ramnolípidos derivados de aminoácidos	53
3.3.1.	Ramnolípidos derivados de lisina	53
3.3.2.	Ramnolípidos derivados de arginina	54
3.4.	Técnicas cromatográficas	55
3.4.1.	Cromatografía de adsorción en columna	55
3.4.2.	Cromatografía de capa fina	56
3.4.3.	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC analítico)	57
3.4.4.	Cromatografía líquida de alta eficacia preparativa	57
3.5.	Espectroscopia de masas	58
3.6.	Espectrofotometría de resonancia magnética nuclear	58
3.7.	Tensión Superficial	59
3.7.1.	Preparación de muestras	61

3.7.2.	Medida de las muestras	61
3.8.	Espectrofluorescencia	62
3.8.1.	Preparación de la solución de pireno	62
3.9.	Caracterización de tamaño	63
3.10.	Biodegradación	64
3.11.	Actividad antimicrobiana de los RLs	65
3.11.1.	Evaluación de la actividad antibacteriana	66
3.11.2.	Evaluación de la actividad antifúngica	68
3.11.3.	Mecanismos de acción	70
3.11.4.	Evaluación de la viabilidad de biofilms maduro de <i>Candida</i> spp. tratadas con los derivados de arginina	77
3.11.5.	Evaluación de actividad antiprotozoaria	78
3.12.	Encapsulación de ADN	82
3.12.1.	Preparación de soluciones	82
3.12.2.	Medida de las muestras	82
3.12.3.	Electroforesis en gel de agarosa	84
3.13.	Modelos celulares	85
3.13.1.	Actividad Hemolítica	85
3.13.2.	Actividad antitumoral y Citotoxicidad	87
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	93

4.1. Producción de Ramnolípidos mediante <i>Pseudomonas aeruginosa</i> _____	96
4.2. Preparación de ramnolípidos catiónicos basados en aminoácidos _____	100
4.3. Propiedades Físicoquímicas _____	126
4.4. Distribución de tamaños de agregados _____	138
4.5. Biodegradación _____	146
4.6. Actividad antibacteriana _____	151
4.7. Actividad antifúngica y antibiofilm frente a cepas de <i>Candida</i> spp. _____	156
4.7.1. CMI de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos contra cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes al fluconazol _____	157
4.7.2. Mecanismo de acción de los RLs catiónicos derivados de arginina ____	164
4.7.3. Biofilms de cepas de <i>Candida</i> spp. resistentes al fluconazol _____	179
4.8. Ramnolípidos aniónicos y catiónicos como agentes antiprotozoario _____	186
4.8.1. Actividad de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos frente a <i>Acanthamoeba castellanii</i> _____	187
4.8.2. Actividad anti- <i>Leishmania</i> de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos _	195
4.9. Ramnolípidos catiónicos como agentes para terapia genética _____	200
4.10. Modelos Celulares _____	209
4.10.1. Actividad antitumoral y Citotoxicidad _____	210
4.10.2. Hemocompatibilidad _____	230
5. CONCLUSIONES _____	239

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	243
7. APÉNDICE	277
8.PUBLICACIONES	283

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aspectos generales de los tensioactivos

Los tensioactivos son compuestos que poseen una estructura con dos partes bien diferenciadas (Fig. 1.); una parte polar que presenta afinidad al agua (hidrofílica) y otra apolar que presenta afinidad por medios no polares (lipofílica) (Daltin, 2011). Debido a esta naturaleza dual estos compuestos se adsorben en las superficies reduciendo la tensión superficial o interfacial de las mismas y son capaces de formar agregados moleculares en solución (Khoshsima et al., 2016; Tadros, 2015).

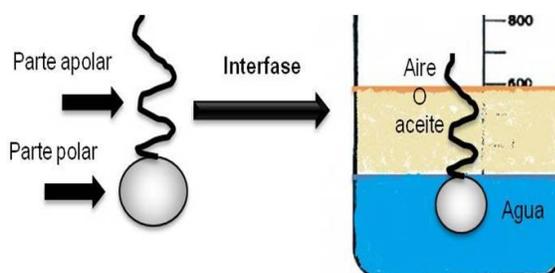


Fig.1. Ubicación de la molécula de tensioactivo en la interfase

La clasificación más utilizada de este tipo de compuestos tiene en cuenta la naturaleza de la parte hidrofílica. Atendiendo a este criterio, los tensioactivos se clasifican en cuatro tipos: no iónico, iónico (aniónico o catiónico) o anfótero (Liang et al., 2016; Daltin et al., 2011):

Tensioactivos no iónicos: en solución acuosa no poseen ningún tipo de carga en su estructura molecular ya que su parte hidrofílica está formada por grupos polares no ionizados como alcohol, tiol, éter o éster.

Tensioactivos aniónicos: presentan carga negativa en la parte hidrofílica de su estructura molecular. En agua se disocian en un anión anfífilo (responsable de la actividad superficial) y en un contraión catiónico que suelen ser metales alcalinos. Los ejemplos más comunes son el sulfonato de alquilo lineal y el sulfato de alquil benceno.

Tensioactivos catiónicos: presentan una carga positiva en la parte hidrofílica de su estructura molecular y se disocian dando lugar a un catión anfífilo y un contraión aniónico, que suelen ser un halogenuro. Entre los más utilizados se encuentran las sales de amonio cuaternario, conocidas por presentar actividad antimicrobiana.

Tensioactivos anfóteros: son tensioactivos que pueden contener cargas positivas y/o negativas en la misma molécula, dependiendo del pH del medio en que se disocien pueden dar lugar a compuestos con carga positiva, negativa o neutra.

Según la metodología utilizada para su preparación los tensioactivos se dividen en dos grandes grupos: a) tensioactivos químicos (sintéticos) derivados principalmente de fuentes petroquímicas como benceno o de fuentes oleoquímicas, como aceites vegetales o de origen animal y b) los tensioactivos naturales o biotensioactivos que se son producidos por organismos eucariotas o procariotas (Parra et al., 1989).

Los tensioactivos sintéticos son ampliamente usados en diversas industrias químicas para la manipulación de hidrocarburos, como productos de limpieza y en formulaciones destinadas a cuidados personales. El uso de algunos de estos tensioactivos está cuestionado debido a que en algunos casos presentan niveles de biodegradación bajos lo que da lugar a una larga permanencia de estos compuestos en el medio ambiente, con los riesgos de toxicidad que esto puede acarrear ([Rebello et al.](#),

2014). Además la producción de este tipo de tensioactivos implica la expulsión de grandes volúmenes de gases invernadero (Rebello et al., 2014).

Los biotensioactivos representan una alternativa más aceptable y sostenible con el medio ambiente. Los biotensioactivos son moléculas complejas que cubren un amplio rango de estructuras químicas incluyendo péptidos, ácidos grasos, fosfolípidos, glicolípidos, lipopéptidos etc. (Uzoigwe et al., 2015). Esas características hacen que puedan ser aplicados en diversas áreas: en la industria petroquímica, alimenticia, cosmética y farmacéutica. En general, los biotensioactivos presentan menor toxicidad y mayor biodegradabilidad que los tensioactivos sintéticos. Actualmente ha crecido el interés en evaluar la potencial utilidad de los este tipo de compuestos en el ámbito médico y veterinario ya que se ha observado que estos productos pueden presentar propiedades antibacterianas (Abalos et al., 2001; Benincasa et al., 2004; Haba et al., 2014), antimicóticas (Zhao et al., 2017), antivirales (Borsanyiova et al., 2016) y antitumorales (Wu et al., 2017). Además, existen estudios que demuestran que también tienen la capacidad en inhibir la adhesión y formación de biofilms de microorganismos patógenos (Raque et al., 2016, Fakruddin, 2012).

1.2. Propiedades fisicoquímicas de los tensioactivos

Los tensioactivos en soluciones acuosas, a bajas concentraciones, se adsorben en las interfases aire/agua orientando los grupos polares hacia la fase polar y los grupos hidrófobos alejados de la misma. Esta adsorción en la interfase da lugar a una reducción de la tensión superficial del agua. Al ir aumentando la concentración de tensioactivo, llega a momento en el cual la interfase agua/aire está saturada de

moléculas y si se sigue añadiendo tensioactivo ya no se sitúa en la interfase sino que comienzan a formar agregados moleculares dentro del seno de la disolución. A la concentración a la cual comienzan a aparecer estos agregados se la denomina concentración micelar crítica (CMC) (Stoyanov et al., 2003; Mukerjee et al., 1958; Bair et al., 1951 Cline et al., 1984), y a partir de este punto, un aumento de concentración de tensioactivo no conlleva una disminución de la tensión superficial del sistema.

La micela es el agregado molecular más sencillo que forman los tensioactivos y su formación se debe principalmente a tres tipos de fuerzas: 1) repulsión entre las cadenas hidrocarbonadas y el medio acuoso, 2) repulsión electrostática de las cabezas polares (en el caso de tensioactivos no iónicos, repulsiones estéricas) y 3) atracciones de van der Waals entre cadenas hidrocarbonadas. En solución acuosa, la micela se caracteriza por la formación de una microfase en la que las cadenas hidrocarbonadas del tensioactivo se sitúan hacia el interior de la micela, mientras que las cabezas polares se orientan hacia el exterior en contacto con la fase acuosa. La forma de la micela depende de la longitud de la cadena alquílica, del volumen de la parte hidrófila y de la concentración. Las micelas esféricas descritas anteriormente son los agregados más sencillos que forman los tensioactivos en solución. Sin embargo dependiendo de la estructura estos compuestos también pueden formar vesículas. Las vesículas son agregados que presentan forma esférica y están formados por bicapas de tensioactivo, de forma que poseen en el interior regiones hidrófilas y regiones lipófilas. Estas características les permiten solubilizar todo tipo de compuestos por lo que son agregados que pueden utilizarse en un amplio abanico de aplicaciones.

A concentraciones superiores, pueden ocurrir transiciones de fase de solución micelar a cristales líquidos ([Hartley, 1936](#)). Los cristales líquidos pueden definirse como un estado de agregación intermedio entre el estado sólido cristalino y el estado amorfo líquido.

La capacidad de formar agregados supramoleculares es una de las propiedades fundamentales de los tensioactivos y estos agregados son los responsables de las aplicaciones que tienen este tipo de compuestos.

Muchas propiedades físicas de las soluciones de tensioactivo (conductividad, tensión superficial, densidad, etc.) cambian de manera notable en la CMC. Utilizando estas técnicas el valor de la CMC se obtiene por la intersección de dos curvas que representan una propiedad física determinada de la solución: una curva representa la propiedad física a concentraciones inferiores a la CMC y la otra representa la propiedad física a concentraciones superiores. En realidad no existe un valor único de la CMC, sino más bien un pequeño intervalo de concentraciones. Algunos métodos son más sensibles que otros para detectar la presencia de micelas, por lo que la CMC depende de la sensibilidad del método utilizado ([Adair et al., 1983](#)).

1.3. Ramnolípidos: el desafío para nuevas estrategias

Los ramnolípidos fueron caracterizados por primera vez en 1949 ([Jarvis e Johnson, 1949](#)) y hasta el momento son los biotensioactivos más patentados tanto desde el punto de vista de su producción como de sus posibles aplicaciones. Hasta 2012, se registraron más de 200 patentes de biotensioactivos y el 50% de ellas estaban

relacionados con ramnolípidos (Muller et al., 2012). A fines de 2017, el número de publicaciones sobre ramnolípidos y biotensioactivos alcanzó las 2100 y 4500, respectivamente (Kourmentza et al., 2018). De todos los géneros de microorganismos productores de ramnolípidos la *Pseudomona aeruginosa* es el que tiene mayor potencial (Irfan-Maqsood et al., 2014). Tal como indica su nombre, los ramnolípidos están formados por una o dos moléculas de L-ramnosa y dos cadenas de β -hidroxi ácidos grasos (Fig. 2.) (Kiran et al., 2016).

Estos biotensioactivos difieren en el número moléculas de ramnosa, en la longitud de cadenas y en el número de insaturaciones presentes en las cadenas grasas (Lovaglio et al., 2015). Hasta el año 2018 se habían descrito en la literatura más de 90 congéneres y homólogos de ramnolípidos (Kourmentza et al., 2018). Los monoramnolípidos (monoRL) (Rha-C₁₀-C₁₀) y diramnolípidos (diRL) (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) (Fig. 2.) son las principales estructuras que se encuentran en la mezcla producidas por las bacterias y la proporción de esas moléculas depende de varios factores como: la cepa bacteriana, la composición del medio de cultivo y las condiciones operativas (Liu et al., 2017). Estos biotensioactivos contienen grupos carboxílicos libres en su estructura y actúan como aniónicos cuando el pH es superior a 4.0, presentando buena solubilidad en metanol, cloroformo y éter etílico (Finnerty, 1994). A valores de pH superiores a 7 estos compuestos generalmente no se encuentran cargados.

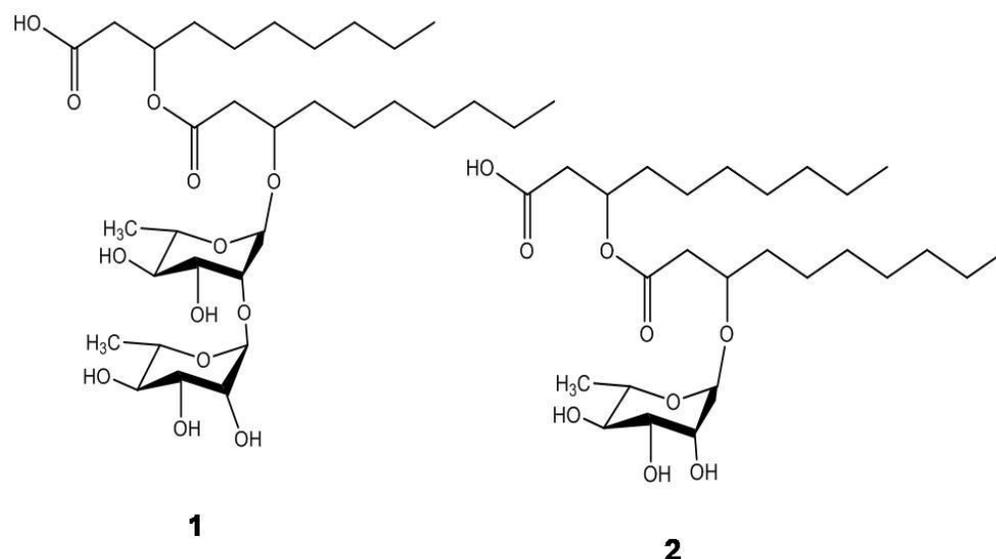


Fig. 2. Estructuras de los dos principales homólogos encontrados en la mezcla de ramnolípidos. Diramnlípido compuesto por dos moléculas de L-ramnosas (**1**) y monoramnlípido compuesta por una molécula de L-ramnosa (**2**).

Una de las claras ventajas que presentan este tipo de compuestos es que pueden ser preparados utilizando cultivos de bacterias a partir de numerosos y diversos sustratos renovables. Los sustratos o fuentes de carbono van desde azúcares hasta hidrocarburos que pueden incluir compuestos como, piruvatos, citratos, fructosa, aceites vegetales, glicerol o aceites vegetales reciclados (Robert et al, 1989; Abalos et al., 2001; Abalos et al., 2014; Benincasa et al., 2004; Haba et al., 2014). La posibilidad de utilizar material de desecho como son los aceites ya utilizados puede contribuir en gran manera a la reducción de los costes de producción (Mukherjee et al, 2006; Li et al., 2016).

La especial atención que han suscitado los ramnolípidos se debe a su amplia gama de propiedades y aplicaciones potenciales así como a las rutas de producción basadas en microorganismos y materiales renovables (Li et al., 2016). Las aplicaciones ambientales descritas hasta el momento son amplias tanto en el ámbito de la

bioremediación como la descomposición y eliminación de derrames de petróleo (Perfumo et al., 2013). También se observó que nuevos nanocompuestos de cobre basados en ramnolípidos fueron eficientes para adsorber simultáneamente contaminantes orgánicos p-cresol (un contaminante fenólico importante que se usa ampliamente en la fabricación de antioxidantes, resinas sintéticas etc.) y Cu^{2+} (metal pesado ampliamente utilizado en la fabricación de pintura, ingeniería eléctrica, fabricación y pigmentos) (Li et al., 2016).

Algunos de estos compuestos también presentan propiedades biológicas (actividad antimicrobiana, antifúngica) (Banat et al., 2014, Banat et al., 2010; Aleksic et al., 2017; Singh et al., 2018) que les hacen potencialmente aptos para ser utilizados en aplicaciones médicas, farmacéuticas y agrícolas. A pesar de estas ventajas y del uso extensivo de estos biotensioactivos aniónicos, su aplicabilidad en biomedicina aún es muy escasa. En este contexto, se están desarrollando enfoques innovadores que permitan mejorar la multifuncionalidad de los ramnolípidos de cara a ampliar el campo de aplicaciones (Lazarkevich et al., 2015; Li et al., 2016; Rodrigues et al., 2017; Aleksic et al., 2017).

El desarrollo de nuevas estrategias que tienen como base los ramnolípidos, ofrece la oportunidad de ampliar aún más las áreas de aplicación. De particular interés, es su utilización en combinación con antibióticos con el objetivo de obtener efectos sinérgicos en la actividad contra varios microorganismos patógenos (Magalhães et al., 2013; Ruiz et al, 2019; Coronel-León et al ,2019). La combinación de la nisina, un péptido antimicrobiano disponible comercialmente y ampliamente aplicado para el control de patógenos en productos alimenticios, con RLs dio lugar a una mejora

significativa de su eficacia antimicrobiana ([Magalhães et al., 2013](#)). También se observó un aumento del efecto inhibitor del crecimiento de *Staphylococcus aureus* Metilina Resistente (MRSA) y *Candida albicans*, al combinar en una formulación RLs con aceites esenciales ([Haba et al., 2014](#)).

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los ramnolípidos y de la importancia biológica y limitaciones de los mismos revelan la posibilidad de obtener nuevos productos a partir de ellos que mejoren y amplíen su aplicabilidad en diversos campos sobre todo, en biomedicina.

1.4. Tensioactivos catiónicos

Los tensioactivos catiónicos son muy utilizados en el sector industrial y doméstico como detergentes, preservativos o antisépticos. Debido a su estructura dual, carga positiva y grupo hidrófobo, estos compuestos tienden a adherirse a las superficies sólidas (normalmente con carga negativa) modificando sus propiedades y son capaces de interacciones con las membranas de los microorganismos, muchas de las cuales también presentan una carga neta negativa. Debido a estas propiedades, estos compuestos también pueden ser utilizados en diferentes aplicaciones médicas avanzadas: en terapia génica, pues las vesículas catiónicas preparadas con tensioactivos catiónicos tienen la capacidad de encapsular ARN o ADN para transferencia de células ([Heyeset al., 2002](#); [Ilies et al., 2006](#)), como vehículos para ciertas drogas ([Stephenson et al., 2006](#)) y como modificadores fisicoquímicos y biológicos de los biomateriales utilizados en medicina ([Wang et al., 2008](#)). Además,

algunos tensioactivos catiónicos muestran propiedades antimicrobianas ([Pinazo et al., 2016](#), [Pinazo et al., 2016](#); [Tripathy et al., 2018](#)).

1.4.1. Tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos

Los tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos son productos cuyo grupo polar contiene uno o más aminoácidos con una o más cargas positivas. La parte hidrófila se obtiene por síntesis enzimática ([Utagawa, 2004](#)) o a partir de un hidrolizado de proteínas ([Lee, 2004](#)) y la parte hidrofóbica a partir de aceites naturales ([Williams, 1997](#)). El interés en los tensioactivos basados en aminoácidos se remonta a 1909, cuando Bondi, por primera vez publicó la unión de un grupo hidrófobo a los aminoácidos glicina y alanina para obtener N-acilglicina y N-acilalanina ([Bondi, 1909](#)). Desde entonces, estos tensioactivos derivados de aminoácidos ha sido objeto de numerosos estudios, debido a sus posibles aplicaciones en formulaciones farmacéuticas, cosméticas, domésticas y alimenticias ([Pinheiro et al., 2017](#)). También se ha observado que este tipo de compuestos tienen excelentes propiedades emulsionantes y fuertes propiedades antimicrobianas ([Hayes et al., 2009](#); [Pinazo et al., 2016](#)).

Los aminoácidos tienen al menos dos grupos funcionales, el grupo carboxílico y el grupo amino. Estos compuestos pueden convertirse fácilmente en tensioactivos mediante la unión de una cadena grasa al aminoácido por alguno de sus grupos reactivos ([Pinheiro et al., 2017](#)). La cadena hidrófoba se puede introducir en la estructura de aminoácidos a través de enlaces éster alquilo o amida. La porción

aminoacídica o peptídica de la molécula será la que determine las mayores diferencias de adsorción, agregación y actividad biológica de estos compuestos (Morán et al., 2004a).

Desde el punto de vista económico y ambiental, los tensioactivos con solo un aminoácido en la cabeza polar y una sola cadena alquílica (Fig. 3a.) son compuestos altamente atractivos por tener una vía sintética más simple (Pinazo et al., 2016). Sin embargo las cadenas alifáticas y los aminoácidos pueden combinarse entre sí para generar otros tipos de estructuras que pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de estos compuestos: a) tensioactivos dicatenarios (Fig. 3b.) formados por un aminoácido unido a dos cadenas hidrocarbonadas, b) tensioactivos geminales que son estructuras formadas por dos restos anfífilos iguales (constituidas cada uno por una cabeza polar y una cola hidrofóbica) unidos covalentemente entre sí mediante un espaciador (Fig. 3c.) y c) estructuras del tipo glicerolípidos que consisten en una cabeza polar unida a una o dos colas hidrofóbicas a través de un esqueleto de glicerol (Fig. 3d.) (Morán et al., 2004a).

Los tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos están generalmente compuestos por tres dominios básicos: un grupo polar positivo, una fracción hidrofóbica y un enlazador entre estas dos regiones (Colomer et al., 2012). Los aminoácidos con grupos básicos en la cadena lateral como la lisina y la arginina constituyen una materia prima excepcional para preparar tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos con diferentes estructuras (Fig. 3.).

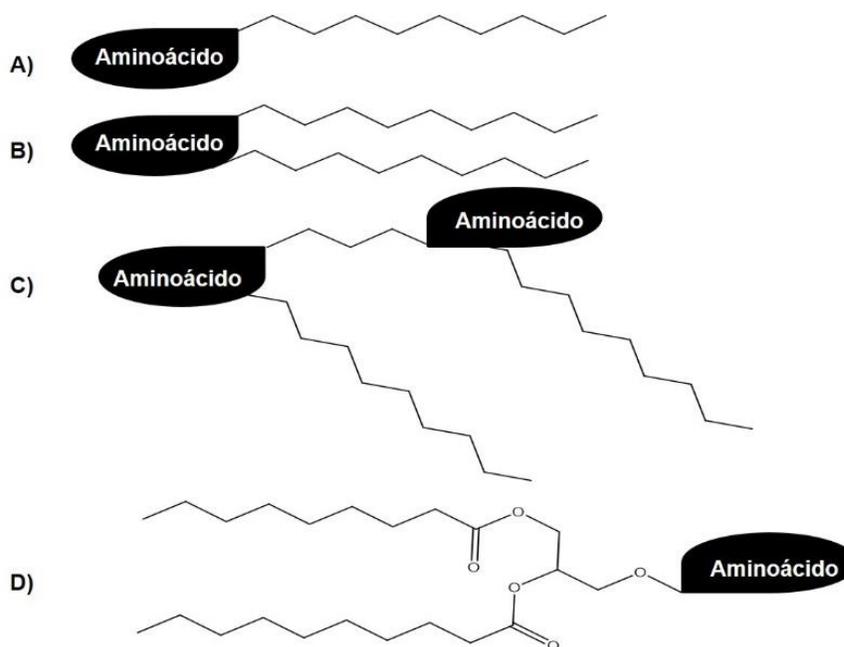


Fig. 3. Clasificación de los tensioactivos derivados de aminoácidos según su estructura. Cadena simple o lineal **(A)**; doble cadena **(B)**; diméricos o géminis **(C)**; glicerolípidos **(D)**.

1.4.2. Tensioactivos catiónicos derivados de lisina

La lisina es un aminoácido básico esencial que posee un grupo carboxilo (aniónico, $pK_a = 2.2$) y dos grupos amino, con diferente carácter básico (los grupos α -amino y ϵ -amino con $pK_a = 8,9$ y $10,5$, respectivamente) (Maugras et al., 2001). La presencia de estos tres sitios reactivos permite el desarrollo de diferentes estructuras de tensioactivos catiónicos con este aminoácido en el grupo polar (Colomer et al., 2011; Colomer et al., 2012).

Estudios realizados por Perez et al., (2009) y Colomer et al., (2011) mostraron que la vía sintética para la obtención de derivados de lisina puede ser simple y sostenible y que con una buena estrategia se puede generar productos con actividad

antimicrobiana. También se observó que la actividad antimicrobiana, la citotoxicidad y el potencial hemolítico de estos tensioactivos estaban directamente relacionados con su carácter hidrófobo, así como con el número y posición de las cargas catiónicas. Además, las diferentes estructuras de tensioactivos derivados de lisina preparados presentaban un elevado índice de biodegradación y baja toxicidad acuática en comparación a los tensioactivos catiónicos sintéticos tradicionales (Colomer et al., 2012).

1.4.3. Tensioactivos catiónicos derivados de arginina

Los tensioactivos monocatenarios catiónicos derivados de arginina pueden ser de diferente tipo: a) *N*^α-acil arginina alquil ésteres, en los cuales la cadena va unida al grupo amino de la arginina mediante un enlace amida, b) arginina-*N*-alquilamidas que poseen la cadena alquílica unida al grupo carboxilo de la arginina mediante un enlace amida y c) arginina-*O*-alquil ésteres, en los cuales la cadena está unida al grupo Carboxilo mediante un enlace éster. Por otro lado, también se han descrito en la literatura tensioactivos catiónicos geminales derivados de arginina y tensioactivos con una arginina y dos cadenas alquílicas (estructuras glicerolípídicas).

La presencia del grupo guanidino en estas estructuras anfífilas proporciona una amplia variedad de compuestos con buenas propiedades biológicas (Morán et al., 2001a).

Las principales diferencias entre las familias de compuestos derivados de arginina incluyen el tipo de enlace que participa en la unión de la cola hidrocarbonada

al residuo de arginina, la posición del mismo respecto del carbono α de la arginina (unión a través del grupo α -amino o del α -carboxilo) y la cantidad de cargas positivas presentes en la porción hidrofílica de la molécula (Morán et al. 2004). Los tensioactivos monocatenarios presentan generalmente buena solubilidad acuosa y propiedades tensioactivas, siendo capaces de disminuir la tensión superficial del agua y de formar agregados en medio acuosos. Los tensioactivos geminales y glicerolipídicos son mucho más activos superficialmente y se agregan a concentraciones mucho más bajas. En el caso de los tensioactivos geminales, se observó que optimizando la longitud de la cadena espaciadora y la cadena alquílica se conseguían compuestos con mayor actividad antimicrobiana que los monocatenarios. Por otro lado los compuestos con estructura glicerolipídica presentaban propiedades fisicoquímicas similares a los fosfolípidos pero con mayor solubilidad y con propiedades antimicrobianas (Pinazo et al., 2016).

1.5. Resistencia antimicrobiana

Los antibióticos han revolucionado la práctica de la Medicina lo que ha permitido avances en todo el espectro de la medicina clínica (Podolsky, 2018). El uso indiscriminado de antibióticos y desinfectantes ha dado lugar en los últimos años a un enorme incremento de microorganismos resistentes, lo que representa una seria amenaza para la salud pública a nivel mundial. Aunque el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural, algunas actividades humanas han acelerado su aparición y propagación. El uso excesivo y con frecuencia empírico de los

compuestos antimicrobianos (antibacterianos, antivirales, antiparasitarios y fungicidas) para el tratamiento de diferentes situaciones clínicas provoca modificaciones de la ecología microbiana y el surgimiento de microorganismos resistentes a estos compuestos ([Machado y Murillo, 2012](#)). En los últimos años el sector de la ganadería también ha utilizado antibióticos en grandes cantidades para lograr la cría industrial de diferentes animales. Todo esto junto con la pobre biodegradación de los antibióticos ha contribuido al desarrollo de microorganismos resistentes. Por otro lado, la puesta en el mercado de nuevos fármacos antimicrobianos es muy cara debido a numerosos y rigurosos controles por los que los compuestos deben pasar. Debido a esto en las últimas décadas las grandes compañías farmacéuticas han dedicado pocos esfuerzos al desarrollo de nuevos antibióticos, prefieren dedicar sus inversiones a medicamentos de mayor uso que resultan mucho más rentables.

La rapidez con la que actualmente están apareciendo cepas microbianas resistentes a los agentes antimicrobianos (RAM) amenaza con obstaculizar e incluso revertir algunos de los avances conseguidos ([Podolsky, 2018](#)). El efecto de la RAM en muchos países puede ser estimado aunque su efecto global es difícil de cuantificar, ya que los datos epidemiológicos son escasos en muchas áreas del mundo, A pesar de ello, los datos presentados exhiben una preocupación considerable ([Lobanovska et al., 2017](#)).

La dimensión del problema de la resistencia ha provocado la movilización de muchas de las Instituciones sanitarias de todo el mundo. De acuerdo con la comisión europea ([CE, 2011](#)), la resistencia a los antimicrobianos causa más de 25000 muertes por año, resultando en pérdidas económicas estimadas del orden de € 1500 millones

de euros debido a costos adicionales en la atención médica y pérdidas de productividad. Debido a este problema la comunidad europea publicó en 2011 un plan de acción para abordar las crecientes amenazas que representa esta situación (CE, 2011), este documento fue reforzado con un segundo plan de acción publicado en 2017 (CE, 2017). La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) publicó sus directrices para ensayos clínicos de antibióticos, y la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas propuso la Iniciativa 10x20, que requiere el desarrollo de diez nuevos antibióticos sistémicos seguros y efectivos hasta 2020 (IDSA, 2010). Además, en la Asamblea de la Organización Mundial de la Salud (OMS) llevada a cabo en 2015, se consensuó la necesidad de un plan de acción global para combatir la resistencia a antimicrobianos que involucre a países en todas las regiones. Este plan pretende concientizar y educar sobre la resistencia antimicrobiana, optimizar el uso de los antimicrobianos, reducir la incidencia de las infecciones hospitalarias y la diseminación de los microorganismos resistentes y asegurar una inversión sostenible para la lucha contra la resistencia antimicrobiana (WHO, 2015).

1.6. Microorganismos

1.6.1. Bacterias y la resistencia a los antibióticos

Los casos de RAM más difundidos y los más graves en términos de morbilidad y mortalidad, están relacionados con las bacterias (Podolsky, 2018). Diversos mecanismos genéticos, bioquímicos y fisiológicos pueden ser responsables del

desarrollo de la RAM. Las especies de bacterias que son tolerantes a diversas clases de antimicrobianos han conseguido esa resistencia desarrollando diversos mecanismos de defensa: a) las Bombas de eflujo o de excreción (BE) que expulsan el antibiótico del interior de la célula bacteriana, b) la modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas, c) el bloqueo de la penetración del compuesto antibacteriano mediante la modificación del sitio activo (modificación de PBP (penicilin-binding-protein en inglés) y modificación ribosomal), d) la alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana y e) la capacidad de formación de biofilms entre otros mecanismos de defensa ([Becerra et al., 2009](#); [Calderón et al., 2016](#)).

Las cepas bacterianas multirresistentes (han creado resistencia frente a varios tipos de antibacterianos) se están haciendo cada vez más frecuentes, particularmente en el ámbito hospitalario ([Espinosa et al., 2011](#)). Esto obliga a recurrir a antibióticos considerados como de “última línea” o de “reserva” que en general son más tóxicos; pero ni siquiera esto garantiza que una infección bacteriana pueda ser curada ([Medina-Morales et al., 2015](#)). Además, se ha observado recientemente que las cepas bacterianas también están creando resistencia frente a estos antibióticos de “reserva”, impidiendo el tratamiento de las infecciones y como consecuencia haciéndolas potencialmente mortales ([Medina-Morales et al., 2015](#); [Renwick et al., 2016](#)). Se estima que la tasa de mortalidad en pacientes afectados por este tipo de infecciones oscila entre un 26% y un 44% ([Medina-Morales et al., 2015](#)). Otro punto importante es que la falta de disponibilidad de antibióticos eficaces puede llegar a limitar notablemente la realización de otras intervenciones terapéuticas, como el tratamiento del cáncer o los

trasplantes de órganos o de médula ósea, que condicionan situaciones de inmunosupresión ([Espinosa et al., 2011](#)).

Durante las últimas dos décadas, la bacteria *S. aureus* Resistente a Meticilina (MRSA) ha sido una de las principales preocupaciones para la salud pública. Sin embargo, en un comunicado de prensa del 27 de febrero de 2017, difundido mundialmente desde Ginebra, la OMS publicó una lista de bacterias multirresistentes que actualmente también constituyen un serio peligro en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos médicos implantados ([WHO, 2017](#)). Las bacterias que se presentan en esta lista (*Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacterias como *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Serratia*, y *Proteus*) pueden provocar infecciones graves que a menudo pueden llegar a ser letales ([WHO, 2017](#)). Estas bacterias también han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera y cuarta generaciones que son considerados antibióticos de “reserva” disponibles para tratar las bacterias multirresistentes ([Souli, 2010](#); [González et al., 2015](#)). Otras especies que aparecen en la lista de bacterias multirresistentes con prioridades medianas publicada por la OMS son bacterias que exhiben una fármaco-resistencia creciente como el *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, el *Helicobacter pylori* resistente a la claritromicina, *Campylobacter* spp. resistente a las fluorquinolonas, *Salmonella* resistente a las fluorquinolonas, la *Neisseria gonorrhoeae* resistente a la cefalosporina y a las fluoroquinolonas, *Streptococcus pneumoniae* sin sensibilidad a la penicilina, el *Haemophilus influenzae* resistente a la ampicilina y la *Shigella* spp. resistente a las fluorquinolonas ([WHO, 2017](#);

Souli et al., 2011; Espinosa et al., 2011; Medina-Morales et al., 2015; Marston et al., 2017).

1.6.2. Levaduras y las infecciones oportunistas

En las últimas décadas la incidencia de infecciones causadas por hongos y levaduras también ha aumentado de forma considerable. Las especies del género *Candida* son responsables del 70-90% de los casos de las infecciones fúngicas invasivas que están asociadas a alta tasa de mortalidad (Kaur et al., 2016; Kolaczowska et al., 2016). La *Candida* spp. ocupa el cuarto lugar entre los microorganismos más frecuentemente aislados en la sepsis hospitalaria (Kumar et al., 2015) y causan la muerte de 12 a 60% de los pacientes que desarrollan candidiasis (infecciones sistémicas) (Storti et al., 2012). En general, esas infecciones son difíciles de diagnosticar, prevenir y tratar. Los cultivos de sangre son positivos en sólo el 50% de los pacientes con candidiasis invasiva y el diagnóstico se confirma en apenas 15 a 40% de los casos (Hinrichsen et al., 2009; Wille et al., 2013).

El género *Candida* posee más de 150 especies en la naturaleza, pero sólo 15 de ellas tienen algunos representantes que pueden ser patógenas para el hombre (Yapar, 2014). Esas son: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa* y *Candida norvegensis*. De acuerdo con la literatura, de las 15 especies patógenas, el 95% de todas las infecciones registradas

son causadas por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. krusei* (Katragkou et al., 2015). Esas infecciones pueden ser tanto superficiales (afectando la piel, pelo, uñas o mucosas) como sistémicas (afectando los principales órganos del cuerpo) (Sifuentes- Osornio et al., 2012).

Las especies del género *Candida* colonizan normalmente las membranas poco después del nacimiento, formando parte de la microbiota normal del sistema gastrointestinal (Kazak et al., 2014). También colonizan la piel, cavidad oral, orofaringe, tracto respiratorio inferior, genitourinario y vulvovaginal. Se pueden encontrar en un 25 a 75% de individuos sanos como microorganismo comensal, sin causar ningún daño o inflamación del tejido (Bonhomme et al., 2013; Yapar, 2014). Para que la levadura pase de microorganismo comensal inofensivo a ser patógena y potencialmente mortal (Silva et al., 2012) son necesarios cambios o alteraciones en el huésped. Cuando hay deficiencias en el sistema inmune del huésped debido principalmente a procedimientos médicos invasivos, el número de *Candida* puede aumentar en el tracto gastrointestinal y las levaduras pueden entrar en el torrente sanguíneo causando candidemia (Colombo et al., 2013, Kazak et al., 2014). En el ambiente hospitalario, las infecciones fúngicas pueden originarse debido a cepas endógenas (oriundas del propio paciente) o exógenas (adquiridas por soluciones contaminadas, dispositivos biomédicos o manos de profesionales de salud) (Storti et al., 2012).

La candidemia es la enfermedad más grave que puede causar estas levaduras y representa un gran desafío para la salud pública por registrar altos índices de morbilidad y mortalidad (Neves- Júnior et al., 2015). Durante largo tiempo, la especie líder en candidemia era *Candida albicans*, sin embargo, las especies conocidas como

Candida no *albicans* (*C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*) vienen emergiendo como importantes agentes patógenos que también pueden dar lugar a esta enfermedad (Matátková et al., 2017, Hinrichsen et al., 2009). El aumento de la candidemia por especies no *albicans* es muy preocupante, ya que en esos casos el tratamiento que se ha de utilizar es más caro y menos efectivo. Además, muchos países sólo pueden prescribir derivados azólicos como tratamiento para las candidiasis, lo cual resulta de escasa efectividad ya que las especies *C. glabrata* y *C. krusei* son intrínsecamente resistentes al fluconazol (Storti et al., 2012, Yapar, 2014, Katragkou et al., 2015).

La patogenicidad de las especies de *Candida* se caracteriza por la presencia de algunos factores de virulencia, entre los que destacan la adhesión, la producción de enzimas hidrolíticas (proteasas, fosfolipasas y hemolisinas), la formación de biofilm en el hospedador y en dispositivos médicos y el cambio de morfología (Beardsley et al., 2018). La adhesión es una etapa necesaria para la colonización inicial y se lleva a cabo mediante la utilización de adhesinas (Panariello et al., 2018). La adherencia permite la permanencia del microorganismo en el huésped y se considera esencial para el establecimiento de la enfermedad (Panariello et al., 2018). La destrucción de tejidos es facilitada por la producción de enzimas hidrolíticas, tales como: aspartil proteinasas, fosfolipas, lipasas y hemolisinas (Marcos-Zambrano et al., 2016). La invasión y colonización dan lugar a la ruptura de membranas y degradación de proteínas del sistema de defensa del huésped (Silva et al., 2012). Otro factor relevante que muchas especies de *Candida* posee es su capacidad de cambiar su morfología de levadura para hifa. Este proceso es importante en la invasión tisular ya que las hifas pueden

promover daño tisular por acción mecánica (Marcos-Zambrano et al., 2016). La *Candida* en la forma filamentosa posee mayor resistencia a fagocitosis comparado a la forma de levadura. Además, la combinación de estos factores de virulencia producidos por el microorganismo con fallos en el sistema inmunológico del huésped conduce al establecimiento de la enfermedad (Silva et al., 2012; Mayer et al., 2013, Lim et al., 2012).

Los problemas de resistencia antimicrobiana son generalmente asociados a cepas bacterianas. Sin embargo, se está observando que muchas de las cepas de *Candida* spp. aisladas en hospitales presentan resistencia a los fármacos antifúngicos convencionales como son los azoles. Este tipo de resistencia también constituye un problema serio sobre todo teniendo en cuenta que en la actualidad existe un número escaso de compuestos comerciales que puedan actuar como antifúngicos. El desarrollo de cepas de *Candida* spp. resistentes es probablemente la causa de que las infecciones causadas por este microorganismo estén aumentando considerablemente a pesar de la implantación de nuevas estrategias dedicadas a erradicar esta levadura y del desarrollo de nuevas herramientas que permiten un diagnóstico más rápido y seguro.

1.6.3. Biofilms de las especies de *Candida*

Actualmente, otro problema grave de virulencia al que se enfrenta la comunidad científica está relacionado con la capacidad que algunos microorganismos tienen en formar biofilms (Beardsley et al., 2018). Se estima que casi un 80% de todos los casos

de infección hospitalarias son causadas por biofilms y que en muchos casos este tipo de organizaciones microbianas da lugar a enfermedades crónicas con una alta tasa de mortalidad (Valentín et al., 2012; Bonhomme et al., 2013).

El número de publicaciones científicas referidas a enfermedades ocasionadas por infecciones de biofilms por especies de *Candida* (Mukherjee et al., 2005; Banat et al., 2014; Nagy et al., 2018) ha crecido enormemente en las últimas dos décadas. La mayoría de esas especies tienen la capacidad de formar biofilms sea en el tejido del huésped inmunodeprimido y o en dispositivos médicos implantados, tales como válvulas cardíacas protéticas, catéteres venosos, prótesis articulares y catéter urinarios, entre otros (Valentín et al., 2012, Kazak et al., 2014; Zavrel et al., 2015; Tabbene et al., 2016). La formación de biofilms fúngicos en superficies abióticas se convierte en un problema grave, ya que a menudo se tiene que retirar del implante para controlar la infección (Rane et al., 2014).

El género *Candida* en forma de biofilm posee una multiplicidad de factores que no se expresan cuando se encuentra en la forma planctónica (Martins et al., 2016). La formación del biofilm es un importante factor de virulencia, pues permite a los microorganismos vivir en ambientes hostiles, otorgando mayor resistencia a la terapia antifúngica y protegiendo las células fúngicas del sistema inmune del huésped (Yu et al., 2016). En los Estados Unidos, más de cinco millones de catéteres venosos centrales son utilizados en hospitales cada año y, a pesar de las mejoras clínicas, las infecciones y la formación de biofilm ocurren en más del 50% de estos catéteres. Con eso, se estima que hay más de 100.000 muertes y una pérdida de 6,5 billones de

dólares al año, lo que representa graves consecuencias para la salud pública y una significativa pérdida económica (Gulati et al., 2016).

El proceso de formación del biofilm es un proceso complejo basado en algunas etapas: I) la adhesión, II y III) formación de colonias y maduración, IV) biofilm maduro y V) dispersión (Fig. 4.) (Gulati et al., 2016; Bonhomme et al., 2013; Chamdra et al., 2001).

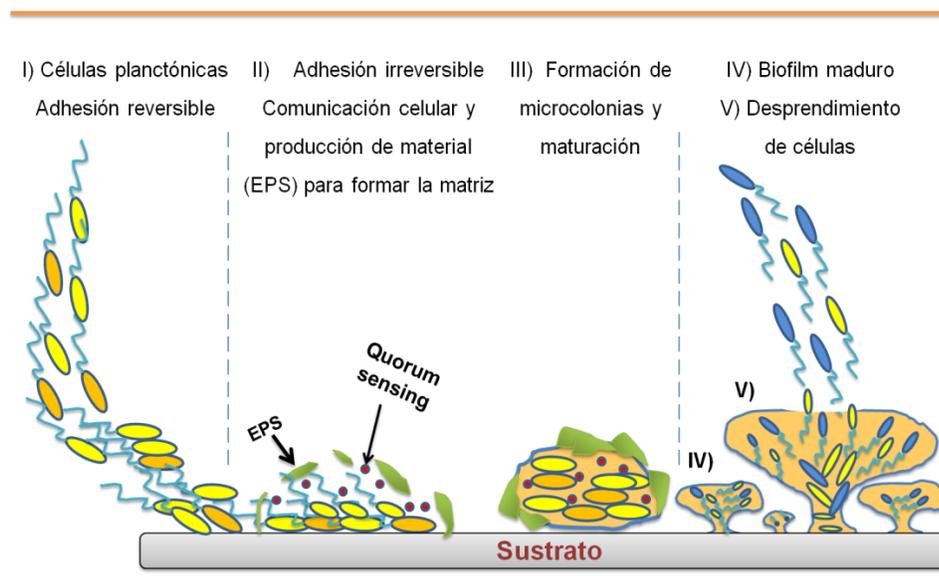


Fig. 4. Esquema representativo de las etapas para el desarrollo de un biofilm sobre un sustrato (Adaptado de Simões et al., 2010)

Etapa I: En la fase inicial, la célula planctónica de levadura se adhiere en la superficie del sustrato. Esta aproximación de las levaduras en el sustrato puede ser aleatoria o atraída por una quimiotaxis.

Etapas II y III: En la fase intermedia, después de la aproximación de las células, existe una interacción hidrofóbica electrostática de estas con la superficie. La producción de adhesinas por la levadura y la adherencia de plaquetas y fibrinas del hospedador en el sustrato ayudan aún más en la adhesión primaria. Las células

adheridas irreversiblemente proliferan y empiezan a formar las microcolonias. El sello distintivo que diferencia a los biofilms de los hongos simplemente adheridos a una superficie es que los biofilms tienen la capacidad de producir sustancias poliméricas extracelulares (EPS sigla en inglés) para formar la matriz extracelular. El EPS microbiano consiste en una mezcla de polímeros biosintéticos que pueden variar su composición química, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos. En este momento existe también la aparición de mecanismos de comunicación intercelulares (quorum sensing) que conduce a una expresión diferencial de genes. Estos genes son responsables por el cambio de morfología, el paso a la formación del micelio y la formación de hifas.

Etapa IV y V: Cuando las células empiezan a confluirse, la red formada comienza a constituirse de una transición de células diferenciadas en pseudohifas, hifas y levaduras, todo envuelto por la matriz extracelular polimérica que posibilita una mayor facilidad de captación de nutrientes. Además, estas estructuras favorecen un crecimiento más ordenado de la comunidad y una mayor protección contra las radiaciones UV, fagocitosis, deshidratación y agentes antimicrobianos. Después de esta fase en que el biofilm se encuentra maduro, se inicia la última etapa, que consiste en la dispersión de células levaduriformes no adherentes, con capacidad para iniciar otro ciclo.

En general, los biofilms son difíciles de erradicar y presentan focos continuos de infección. Los biofilms formados por hongos suelen presentar una alta tolerancia a los antifúngicos y este proceso es multifactorial ([Barros et al., 2016](#)). Algunos estudios sugieren que la matriz extracelular juega un importante papel en ese proceso ([Yu et al.,](#)

2016). La matriz ayuda a preservar la integridad de la arquitectura del biofilm y actúa secuestrando fármacos, impidiendo así el acceso de éstos a las células del biofilm y evitando el desencadenamiento de respuestas celulares (Yu et al., 2016). Sin embargo, existen estudios que indican que la resistencia a los antifúngicos se inicia rápidamente después de la adhesión (Mukherjee et al., 2005). Existen otros factores que también merecen destacarse porque colaboran en la resistencia de este tipo de organizaciones: a) el crecimiento celular es lento dentro del biofilm, b) contribuyen a la activación de genes de bombas de eflujo (CDR, MDR), c) se dan cambios en la concentración de esterol, d) la densidad celular dentro del biofilm es alta y e) existen células persistentes y diferentes patrones de expresión génica (Simões et al., 2010; Valentín et al., 2012, Barros et al., 2016, Yu et al., 2016).

1.6.4. Nuevas estrategias para reducir el problema de la resistencia antimicrobiana

Una de las estrategias propuestas para conseguir reducir el número de infecciones provocadas por bacteria y hongos es desarrollar nuevos compuestos con actividad antimicrobiana que actúen frente a estos microorganismos mediante un mecanismo que no facilite la aparición de cepas resistentes.

Los péptidos antimicrobianos presentan gran interés en este sentido ya que exhiben buena actividad antimicrobiana frente a un amplio rango de bacterias, hongos y levaduras (Zhang et al., 2006, Kang et al. 2014, Sierra et al, 2017). Estos compuestos consisten en 12-50 aminoácidos que poseen una carga neta catiónica al pH fisiológico y presentan también un cierto contenido hidrófobo en la molécula. En

este tipo de compuestos un balance hidrófilo/lipófilo óptimo es necesario de cara a obtener moléculas activas. A diferencia de los antibióticos estos péptidos no actúan sobre una diana celular concreta. Debido a su carácter hidrófobo, estas moléculas se internan en las bicapas lipídicas de las membranas celulares dando lugar a una despolarización de las mismas y como consecuencia a la muerte celular. Este tipo de mecanismo dificulta la aparición de cepas resistentes porque la reorganización de las membranas celulares es muy difícil. Sin embargo estos compuestos también presentan ciertos inconvenientes; su preparación requiere del uso de muchos pasos de síntesis lo cual encarece mucho el producto y generalmente presentan una alta toxicidad celular, no son capaces de atacar selectivamente las membranas bacterianas.

Los compuestos de amonio cuaternario (QACs) convencionales son moléculas anfífilas sencillas que también presentan actividad antimicrobiana ([Jennings et al., 2015](#)) y son los más utilizados para este tipo de aplicaciones. Aunque la actividad de estos compuestos es inferior a la de los antibióticos, su utilización como antisépticos en hilos de sutura, catéteres y gasas ha permitido reducir las infecciones hospitalarias y, como consecuencia, disminuir la cantidad de antibióticos suministrados. Los QACs son tensioactivos catiónicos que debido a su naturaleza anfipática actúan preferentemente sobre la membrana citoplasmática de las bacterias ([Buffet-bataillon et al., 2012](#)). El mecanismo de acción de estos compuestos es similar al de los péptidos antimicrobianos y hasta el momento no se ha observado una reducción significativa en su eficacia antimicrobiana. Sin embargo, debido a su relativamente elevado poder hemolítico y toxicidad, son poco adecuados para ciertas aplicaciones biomédicas ([Salick et al., 2007](#)). Además, desde el punto de vista medioambiental están

fuertemente cuestionados ya que presentan una baja biodegradación ([Naleccz-Jawecki et al., 2003](#), [García et al., 2003](#)). De hecho, un informe reciente de la FDA (Food and Drug Administration, 2015) cuestiona la inocuidad de muchos de los agentes antisépticos utilizados hasta la fecha, entre los que se encuentran las sales de amonio cuaternario convencionales como el cloruro de benzalconio. La posición vulnerable de este tipo de compuestos exige el desarrollo de nuevas moléculas que cumplan los requerimientos de seguridad y eficacia para su uso como antimicrobianos en formulaciones antisépticas y en el desarrollo de material biomédico con propiedades antimicrobianas.

Los tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos pueden constituir una alternativa muy interesante para reemplazar a los antisépticos clásicos. Como se ha comentado, estos compuestos están formados por un aminoácido como parte hidrófila y una parte hidrófoba, que se obtiene de forma muy sencilla y económica a partir de materias primas renovables como son los aceites naturales y los aminoácidos. Debido a los constituyentes naturales que dan lugar a su estructura, estos compuestos presentan normalmente altos niveles de biodegradación. La gran variedad de aminoácidos constituye una excelente herramienta para llevar a cabo modificaciones estructurales que permitan modular las propiedades fisicoquímicas de cara a obtener compuestos con elevada actividad antimicrobiana y antibiofilm. Además, ajustando su balance hidrófilo-lipófilo es probablemente posible obtener tensioactivos que lisen selectivamente las membranas bacterianas y que, sin embargo, no interaccionen con las membranas de las células eucariotas ([Pinazo et al., 2016](#)). Los tensioactivos que poseen en la molécula dos cadenas alquílicas como los compuestos geminales parece

que presentan mayor actividad antimicrobiana de los tensioactivos monocatenarios (Pinazo et al., 2016).

Los estudios llevados a cabo hasta el momento indican que los (bio) tensioactivos también interaccionan con las membranas celulares de las bacterias en dos etapas: a) el tensioactivo se une a la membrana bacteriana debido a interacciones electrostáticas entre los grupos polares del tensioactivo cargado positivamente y las cargas negativas de algunas de las moléculas que forman las membranas bacterianas (Lipopolisacáridos en las Gram-negativas y el Ácido lipoteico en las Gram-positivas), y b) a continuación las cadenas alquílicas de los tensioactivos interaccionan con la bicapa lipídica de la membrana a través de interacciones hidrófobas codificando la arquitectura de la membrana y provocando el transporte e constituyentes intracelulares a través de la membrana (Ortiz et al., 2006; Aranda et al., 2007; Ortiz et al., 2009; Sánchez et al., 2010). Este mecanismo es similar al de los péptidos antimicrobianos por lo que es de esperar que la eficacia antimicrobiana de estos compuestos no se vea reducida por la aparición de resistencias. Los tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos presentan en teoría las propiedades demandadas a un agente antimicrobiano ideal: poseen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, se podría optimizar la síntesis de cara a conseguir compuestos con una baja toxicidad frente a células eucariotas y, además, no generan mecanismos de resistencia.

1.6.5. Infecciones parasitarias – *Leishmania infantum*

Las enfermedades parasitarias son un conjunto de enfermedades que se caracteriza por poder presentar desde lesiones cutáneas asintomáticas hasta su forma visceral, la cual es mortal en ausencia de tratamiento (WHO, 2013). Actualmente, la leishmaniosis está considerada como la segunda enfermedad en importancia dentro de las enfermedades parasitarias. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de la leishmaniosis se ha incrementado más de 40 veces en las últimas dos décadas.

La leishmaniosis, causada por el protozoo parásito *Leishmania*, está asociada a la malnutrición, debilidad del sistema inmunitario, las malas condiciones de vivienda y la falta de recursos económicos, (Tabbabi et al., 2019). La vía de transmisión se produce principalmente a través de la picadura por insectos dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomya*. Se estima que aproximadamente 350 millones de personas en el mundo se encuentran en riesgo de padecer la enfermedad, con 12 millones de casos clínicos entre la población mundial, entre 20.000 y 30.000 defunciones, así como 0,9-1,3 millones de casos nuevos al año, entre los que se distinguen 0,7-1,3 millones de casos de Leishmaniosis Cutánea (CL) y 0,2-0,4 millones de casos de Leishmaniosis Visceral (VL) (WHO, 2016).

La *Leishmania* es un protozoo parásito intracelular monoflagelado que durante su ciclo de vida pasa por dos huéspedes: como parásito extracelular (promastigota) en el aparato digestivo del insecto vector y como parásito intracelular (amastigota) en los macrófagos de vertebrados mamíferos (Fig. 5.) (Bates et al., 2004).

En la Unión Europea, las especies endémicas causantes de leishmaniosis son *L. Infantum* y *L. trópica*, que causa leishmaniosis cutánea antroponótica (Dantas-Torres et al., 2012). La leishmaniosis (especialmente canina) en animales domésticos es una preocupación constante y actual. Los animales infectados constituyen reservorios potenciales para que se produzca la infección en humanos. En concreto, los perros están considerados como el principal reservorio de *Leishmania infantum* (Dantas-Torres et al., 2012). Se estima que al menos 2,5 millones de perros están infectados por *L. Infantum* solamente en el suroeste de Europa (Pennisi, 2015). Además, la leishmaniosis puede considerarse como una enfermedad oportunista en individuos inmunodeprimidos como los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), individuos que hayan sufrido un trasplante de órganos, o pacientes sometidos a quimioterapia para la eliminación de tumores o que presenten enfermedades del sistema inmunitario (Alvar et al., 2008; Leite de Sousa-Gomes et al., 2017).

Desde 1940 se usan fármacos tales como antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) y diamidinas (Pentamidina) para combatir la enfermedad (WHO, 2013). Posteriormente, se han introducido: los antifúngicos como anfotericina B (tanto en forma de desoxicolato como en forma liposomal) y ketoconazol; antibacterianos como paromomicina y dapsona, y más recientemente el antitumoral miltefosina, el primer fármaco oral aprobado frente a la leishmaniosis (Croft et al., 2006). Sin embargo, todos estos compuestos actualmente en uso presentan una serie de inconvenientes como: a) toxicidad elevada, b) variabilidad de acción en diferentes especies de *Leishmania*, c) aparición de resistencias a algunos de estos fármacos

(antimoniales) y d) precio elevado (Croft et al., 2003; Croft et al., 2006). Por lo tanto, muchas vías de investigación actuales se centran en la búsqueda de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas frente a la leishmaniosis.

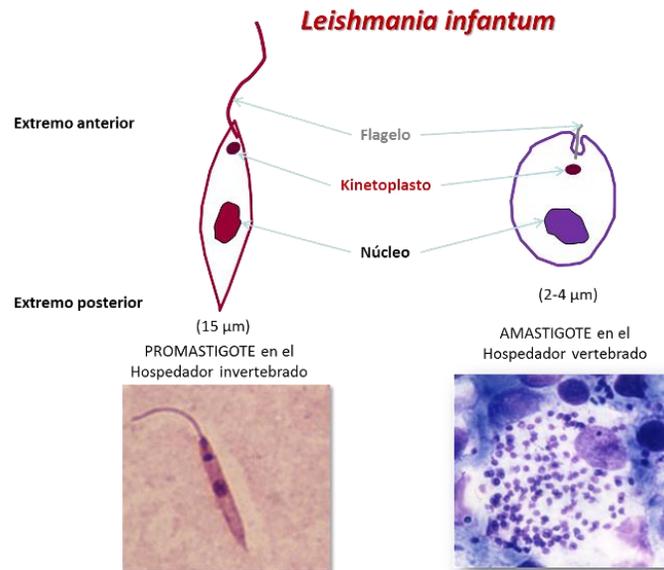


Fig. 5. Formas promastigota (lado izquierdo) y amastigota (lado derecho) de *Leishmania infantum*. (Consultado el 20 / Octubre / 2018, a Parasitología Interactiva (<http://www.ingenius-learning.com/saluvet/pages/leishmaniaafd.html>)).

1.6.6. Infecciones parasitarias – *Acanthamoeba castellanii*

Las amebas de vida libre que pertenecen al género *Acanthamoeba* son otro grupo de protozoos oportunistas que viven en diversos hábitats y que pueden ser encontrado en entornos naturales o artificiales, como suelo, polvo, ríos o piscinas, torres de enfriamiento de centrales nucleares o redes de distribución de agua potable (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Schuster et al., 2004; Niyiyati et al., 2016). Estas amebas

presentan dos formas principales en su ciclo de vida: la forma vegetativa y móvil, llamada trofozoíto y la forma latente y no móvil, llamada quiste, esta última responsable por su diseminación en la naturaleza debido a su gran capacidad de resistencia y tolerancia a condiciones ambientales extremas (Khan et al., 2009).

De todas las especies de amebas oportunistas, la *A. castellanii* es responsable por causar Queratitis por *Acanthamoeba* (QA), una enfermedad producida por la invasión de la especie en la córnea (Lamb et al., 2015). Como consecuencia se produce una inflamación de la córnea (queratitis) que puede originar déficit de la capacidad visual (Fernández-Ferreiro et al., 2017). La QA es cada vez más reconocida como una infección ocular grave y la falta de tratamiento de forma adecuada y agresiva, puede conducir a la pérdida de visión (Fernández-Ferreiro et al., 2017). Además, la *A. castellanii* también es capaz de desarrollar otras enfermedades más graves como la Encefalitis Amebiana Granulomatosa (GAE, sigla en inglés) (Illingworth et al., 1998; Khan, 2006). A pesar de la importancia médica de este parásito, pocos agentes están disponibles para su tratamiento (Marciano-Cabral et al., 2003; Niyati et al., 2016).

Actualmente, el tratamiento de Queratitis por *Acanthamoeba* involucra agentes que actúan sobre la membrana, como clorhexidina o polihexametileno biguanida, en combinación con una diamidina (propamidina o hexamidina) por un período de hasta un año, con recurrencia de infección en el 10% de los casos (Siddiqui et al., 2016; Carrijo-Carvalho et al., 2017). Sin embargo, la encefalitis amebiana granulomatosa sigue siendo letal en más del 90% de los casos, incluso después del tratamiento con varias combinaciones de fármacos que incluyen anfotericina B, rifampicina, cotrimoxazol,

miltefosina, pentamidina, flucitosina, pirimetamina y cotrimoxazol, así como agentes de esterol como vocicazol, voriconazol o clotrimazol (Schuster et al., 2004; Siddiqui et al., 2016; Ong et al., 2017). Entre estos fármacos, la anfotericina B es una de las más utilizadas para el tratamiento de las infecciones por GAE (Siddiqui et al., 2016; Ong et al., 2017). Otra herramienta utilizada para el tratamiento de las infecciones por *Acanthamoeba castellanii* es la quimioterapia, pero la mayoría de los tratamientos terminan con resistencia y son muy tóxicos, causando reacciones no deseadas (Weaver et al., 1993; Siddiqui et al., 2016). Ante esta situación la búsqueda de nuevos agentes anti-*Acanthamoeba* más seguros como alternativas para el tratamiento y recuperación de esos pacientes resulta de gran interés.

1.7. Actividad antitumoral y Citotoxicidad

El cáncer es una enfermedad que puede originarse en cualquier tejido del cuerpo humano cuando las células muestran un comportamiento inusual y comienzan a dividirse sin control, viéndose truncado su mecanismo de muerte celular programada o apoptosis. Además, a medida que el tumor va creciendo, algunas células cancerígenas pueden separarse de la masa tumoral y viajar a través de la circulación sanguínea o linfática extendiéndose a otras partes del cuerpo desarrollando allí nuevos tumores, proceso denominado metástasis (American Cancer Society, 2015; Heitz et al., 2017; Ellison et al., 2017).

Actualmente el cáncer representa uno de los problemas más graves contra la salud humana y se cuentan por millares los casos diagnosticados cada día a nivel

mundial. A pesar del gran avance en la comprensión de su biología y farmacología, los métodos terapéuticos habituales para el tratamiento del cáncer son limitados y útiles solamente para algunas situaciones particulares (Faten et al., 2018). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2012, hubo un total de 14,1 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, de los cuales 8,2 millones de personas fallecieron a causa de esta enfermedad. En Europa, con un total de 3,7 millones de nuevos casos se produjeron 1,9 millones de muertes (GLOBOCAN, 2012). Más concretamente, en España, el número de nuevos casos de cáncer en el año 2012 fue de 215.534 y el número de muertes de 102.762. Se estima que el número de nuevos casos de cáncer a nivel global aumente de forma significativa y pueda llegar alrededor de 23,6 millones de nuevos casos para el año de 2030 (GLOBOCAN, 2012; IARC, 2014; Plummer et al., 2016). Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de seguir investigando para encontrar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren el pronóstico de los pacientes afectados por el cáncer, disminuyendo en lo posible su tasa de mortalidad.

Los avances en las estrategias para tratar la amplia variedad de enfermedades cancerígenas requieren la entrega eficiente del compuesto activo al citosol o núcleo de las células tumorales (Hu et al., 2007). La quimioterapia es un método importante para combatir esta enfermedad devastadora. Hasta el presente, se han desarrollado numerosos productos naturales y compuestos sintéticos como medicamentos anticancerosos entre los que se encuentran la camptotecina, paclitaxel, doxorubicina y compuestos de platino (Bansalet et al., 2014; Wilson et al., 2014; Skwarczynski et al., 2006). Sin embargo, los medicamentos anticancerosos dan lugar a efectos secundarios

graves en los tejidos y producen toxicidad frente a células sanas, haciendo con que la relación riesgo/beneficio al paciente sea a veces desfavorable (Sak, 2012; Dy et al., 2013). El desarrollo de nuevas terapias para el cáncer debe de tener en cuenta que se dé una reducción de la toxicidad en células sanas y una mayor selectividad frente a células cancerígenas (Gudiña et al., 2016). En este contexto, la evaluación de seguridad de los nuevos productos o formulaciones es crucial antes de la exposición (Gudiña et al., 2013). Por lo tanto, se requieren bioensayos rápidos, sensibles y confiables para examinar la toxicidad de estas sustancias.

Las líneas celulares establecidas son sistemas de prueba alternativos útiles para estudios toxicológicos (Crespi, 1995). Los ensayos de citotoxicidad se encuentran entre los puntos finales in vitro más comunes utilizados para predecir la toxicidad potencial de una sustancia en un cultivo celular (Martínez et al., 2006). Por ejemplo, cuando un compuesto o formulación que se evalúa va a ser administrado por vía tópica, interesará determinar su potencial efecto tóxico en modelos representativos de la piel como (fibroblastos y queratinocitos) y modelos tridimensionales equivalentes de piel que permiten realizar experimentos a nivel molecular, celular y tisular (Faller et al., 2002). De hecho, estos dos modelos de células no tumorales se utilizan mucho para evaluar la citotoxicidad de tensioactivos en productos farmacéuticos tópicos y, más recientemente, en dispositivos de administración de fármacos (en terapia contra el cáncer) (Digman et al., 2007; Enache et al., 2018). Por otro lado, la administración de formulaciones por vía sistémica también requiere una valoración de sus efectos tóxicos en células representativas de los más diversos órganos y sistemas. Como un modelo bastante genérico, también se utilizan los fibroblastos, que son células representativas

de los tejidos conectivos y, por lo tanto, se utilizan ampliamente en estudios toxicológicos de sustancias o formulaciones destinados a las más diversas aplicaciones (Li et al., 2013; Browne et al., 2012; Colomer et al., 2012; Pramod et al., 2012).

2. OBJETIVOS

Los ramnolípidos son un grupo de biotensioactivos que presentan gran interés debido a sus excelentes propiedades: se preparan a partir de materiales de desecho utilizando bacterias y presentan alta biodegradabilidad y baja toxicidad. Una de las desventajas que presentan es que el coste de producción y aislamiento puede resultar excesivo para las posibles aplicaciones de estos compuestos.

Los tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos también son un grupo de compuestos que poseen propiedades muy interesantes: se pueden sintetizar a partir de materias primas renovables y presentan buena actividad antimicrobiana y antifúngica. Además, este tipo de compuestos pueden ser efectivos en la solución de uno de los graves problemas sanitarios a los que nos enfrentamos en la actualidad, la rápida aparición de bacterias y levaduras resistentes a los agentes antibacterianos. Parece ser que debido al mecanismo de interacción, a las bacterias les resulta muy complicado crear resistencias frente a estos compuestos.

Ante estos antecedentes nuestra hipótesis de trabajo es que mediante la derivatización de ramnolípidos con aminoácidos básicos se pueden obtener nuevos ramnolípidos biocompatibles con propiedades fisicoquímicas y biológicas mejoradas que permitan ampliar los campos de aplicación de los ramnolípidos clásicos de cara a poder rentabilizar los costes de producción.

Por lo tanto el objetivo principal de esta memoria de tesis es la modificación estructural de ramnolípidos con el fin de conseguir nuevos tensioactivos medioambientalmente aceptables con un bajo perfil de citotoxicidad que posean unas propiedades fisicoquímicas y biológicas adecuadas para que este tipo de compuestos pueda ser utilizado en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas. Las nuevas

estructuras propuestas (Fig. 6.) son tensioactivos catiónicos que poseen una zona hidrófoba proveniente del ramnolípido precursor y un aminoácido como parte hidrófila. Una de las principales características de los nuevos compuestos es su carácter catiónico lo cual las diferencia de los ramnolípidos naturales que poseen carácter aniónico o no iónico dependiendo del pH; Es de esperar que la introducción de la carga catiónica en la estructura ramnolípida de lugar a tensioactivos con propiedades biológicas sustancialmente diferentes a las de los precursores.

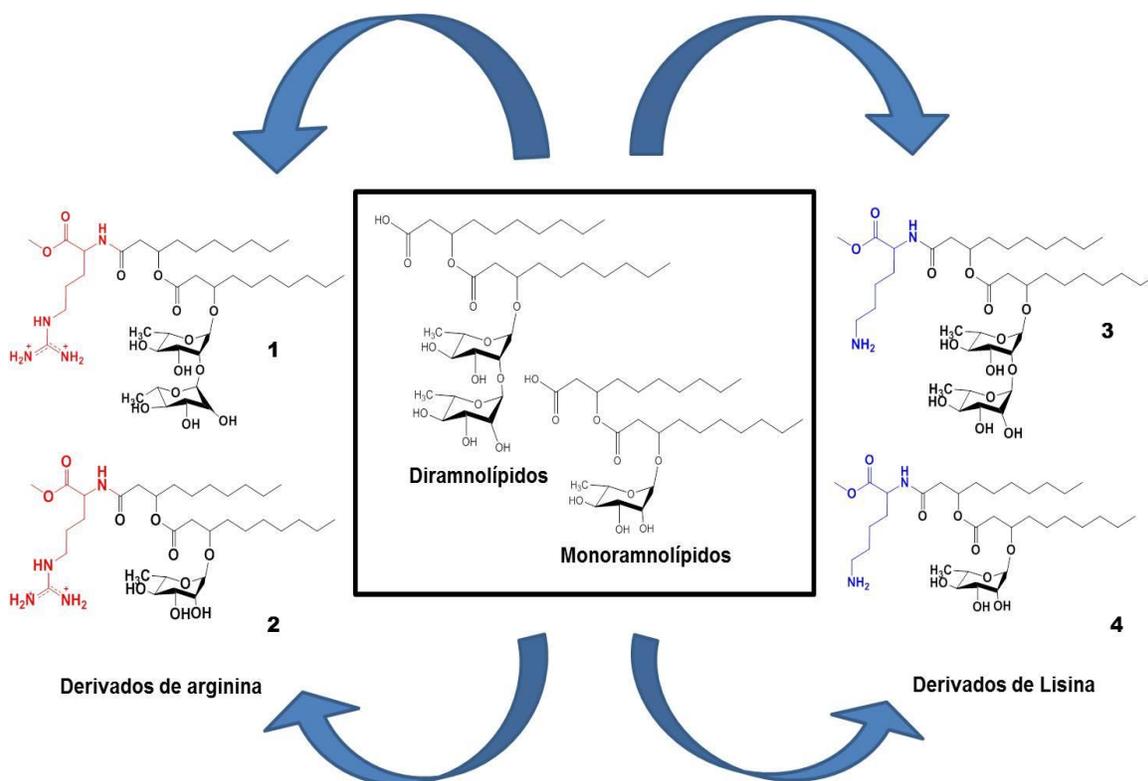


Fig. 6. Estructuras químicas de los ramnolípidos catiónicos basados en aminoácidos: diRL_arginina (1), monoRL_arginina (2), diRL_lisina (3), monoRL_lisina (4).

Con estos planteamientos y consideraciones generales, los objetivos específicos del presente trabajo se resumen en los siguientes puntos:

- 1. Puesta a punto de un método de producción de ramnolípidos mediante el uso de *Pseudomonas aeruginosa* MB y aceites de deshecho que permita obtener estos productos a escala multigramo en tiempos cortos.** Se trata de obtener dos muestras diferentes de ramnolípidos en cantidad suficiente para que puedan ser funcionalizadas con aminoácidos
- 2. Desarrollo de una metodología química que permita la obtención y purificación de los ramnolípidos funcionalizados con aminoácidos a escala de laboratorio.** Se pretende conseguir la cantidad suficiente de cada uno de los derivados de cara a que puedan ser caracterizados y que se puedan estudiar las propiedades de los mismos.
- 3. Estudio de las propiedades fisicoquímicas de los ramnolípidos precursores y de los derivados de aminoácidos.** Se utilizarán las técnicas adecuadas que permitan conocer la actividad superficial de estos compuestos así como el proceso de agregación. También se estudiarán las interacciones ramnolípidos/ADN con el fin de saber si este tipo de productos es potencialmente útil para formular vectores no virales en terapia génica.
- 4. Evaluación de las propiedades antibacterianas, antifúngicas y antibiofilm de los ramnolípidos sintetizados.** Se trata de estudiar la actividad de estos compuestos frente a diferentes tipos de bacterias y hongos. Se pretende llevar a cabo los ensayos necesarios que permitan dilucidar el modo de acción de estos

compuestos frente a los microorganismos así como identificar el mecanismo de muerte celular.

5. Estudio de la actividad de estos ramnolípidos frente a protozoos. Se pretende conocer la actividad frente a este tipo de microorganismos de cara a poder definir sus posibles campos de aplicación.

6. Evaluación de la actividad in vitro de estos compuestos frente a células. Selección de líneas celulares apropiadas para el estudio de la actividad antitumoral de estos compuestos y de la selectividad que presentan frente a las células tumorales.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materiales

1,4-diazabicyclo [2.2.2] octane (Dabco), N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC), triethylamine, dry dichloromethane, 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt), el medio de cultivo RPMI 1640 caldo, MOPS (morpholinepropanesulfonic acid), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), neutral Red (NRU), menadiona, resazurina y los fármacos comerciales utilizados como control en esta memoria fueron comprados de Sigma (EUA). Diclorometano, Acetato de etilo, Metanol, Ácido hidrociorídrico (HCl), Dimetilsulfóxido (DMSO), 1H-Benzotriazol-1-yloxy-tris (dimethylamino) phosphonium hexafluorophosphate (BOP), H-Arg-OMe·2HCl, H-Lys (Cbz)-OMe·HCl, palladium on activated charcoal (Pd/C,10%) y silica gel 60 fueron suministrados por Merck (Alemania). N,N-Dimethylformamide fue comprado en Scharlau (España). Sulfato de sódio de Panreac (España). Trypticase Soy Agar (TSA) de Pronadisa (España) y Tryptone Soya Broth (TSB) de Oxoid (UK). Los matraces de 75 cm² y las placas de 96 pozos fueron compradas de TPP (Suiza). El Caldo Mueller-Hintonde Difco Laboratories (USA). Para la preparación de las soluciones acuosas se utilizó agua del equipo aMilli-Q Millipore system. Los medios de cultivo Sabouraud dextrose agar and CHROMagar fueron comprados de Himedia (India). El medio ATCC® Medium 712: PYG w/ Additives de Manassas (EUA), El Zymolyase 20T de Seikagaku (Japó).El paquete FITC annexin V apoptosis detection Kit de Guava Nexin kit / Guava Technologies (EUA). El medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Phosphate Buffered Saline (PBS), L glutamine solution (200 mM), trypsin-EDTA solution (170,000 U/l trypsin y 0.2 g/l

EDTA) y penicillin–streptomycin solution (10,000 U/ml penicillin y 10 mg/ml streptomycin) fueron suministrados por Lonza (Suiza).

3.2. Obtención de los ramnolípidos

3.2.1. Microorganismo utilizado para producción de ramnolípidos

La producción de ramnolípidos se llevó acabo utilizando la cepa Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa* MB almacenadas a -20 ° C en tubos criogénicos (con 30% de glicerol en TSB). Estas bacterias se hicieron crecer en TSB a 30 °C, se mantuvieron mediante un cultivo quincenal en TSA y se conservaron a 4 °C.

3.2.2. Medio de cultivo y inóculo

Con el fin de estimular a producción de RLs en cultivos de *P. aeruginosa* MB se utilizaron matraces de Erlenmeyer de 2 L que contenían 400 mL de un medio mineral con la siguiente composición (g/L): NaNO₃ 4.5; KH₂PO₄ 1.0; K₂HPO₄ 1.4; KCl 0.1; MgSO₄·7H₂O 0.5; CaCl₂ 0.007; FeSO₄·7H₂O 0.007 y 0.05 mL de una solución de oligoelementos que contiene (g/L): H₃BO₃ 0.26; CuSO₄·5H₂O 0.5; MnSO₄·H₂O 0.5; MoNa₂O₄·2H₂O 0.06; ZnSO₄·7H₂O 0.7. Por último, como fuente de carbono se utilizó una mezcla de aceite de freír oliva/soja (40 g/L 50:50 v/v). Todos los componentes del medio de cultivo se esterilizaron por separado a 121 °C y 1 atm durante 20 minutos en una autoclave. El pH inicial del medio se ajustó a 7,0.

Como inóculo se utilizó una suspensión celular al 2% (*P. aeruginosa*) en un medio salino estéril (NaCl 0.9%) de cloruro sódico. Las células provenían de un cultivo de bacterias en placas de agar de TSA durante la noche. Se utilizó una suspensión bacteriana de aproximadamente 2.0 unidades de absorbancia, medida a una longitud de onda de 540 nm. Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo en un espectrofotómetro PharmaSpec UV-1700 (Shimadzu, Japó). Finalmente, los cultivos se incubaron a 30 °C durante 72 h en un agitador rotatorio recíproco a 150 rpm.

3.2.3. Recuperación de los ramnolípidos

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en las condiciones apropiadas ya mencionadas anteriormente producen ramnolípidos (monoRL y diRL) y los secreta al medio extracelular. Pasadas 72 horas de incubación se recupera el sobrenadante mediante centrifugación durante 20 minutos a 20 °C a 10.000 xg en una centrífuga Kontron (Kontron, Milano, Italia). A continuación, este sobrenadante se llevó a pH 2,0 con una solución de HCl al 37% y se dejó toda la noche a 4 °C y después 24 horas más a 100 °C (Mixich et al., 1992). Después de este tiempo aparece un precipitado constituido principalmente por ramnolípidos que se separó mediante centrifugación (10.000 g, 20 min a 20°C). Este precipitado fue sometido a tres extracciones con medio volumen de acetato de etilo. La fase orgánica se secó sobre un filtro de sulfato de sodio anhidro, y el disolvente se eliminó al vacío (evaporador rotativo, Bücchi, Postfach, Suiza) obteniendo una mezcla de ramnolípidos (monoRL y diRL) que fue

identificado utilizando los métodos de capa fina y HPLC descritos en el apartado de cromatografías.

La purificación de la mezcla de RLs para la obtención del compuesto monoRL se describe en el apartado de cromatografía de adsorción en columna.

3.2.4. Determinación cuantitativa de los RLs

La cuantificación de RLs fue realizada indirectamente mediante espectroscopia de adsorción molecular que permite determinar la cantidad de ramnosa presente en el sobrenadante del medio de cultivo después de 72 h de incubación. Para determinar la cantidad de ramnosa se utilizó como procedimiento de cálculo el método espectrofotométrico de desarrollo de color. En primer lugar se hizo una recta de calibrado utilizando un banco de diluciones con concentraciones que iban de 0 a 40 µg/mL de ramnosa comercial ([Chamdrasekaran et al., 1980](#)).

Para conocer la concentración de ramnosa en los cultivos celulares se tomó una muestra del sobrenadante y se centrifugó a 10.000 g, 20 °C durante 20 min. El método para la cuantificación de la ramnosa en las muestras fue el siguiente: se mezcló 1 mL de sobrenadante con 4,5 mL de la disolución A (6 mL de ácido sulfúrico y 1 mL de agua destilada). Posteriormente, se dejó esa mezcla durante 10 min en un baño de agua a 100 °C, se enfrió en agua fría y se le añadió 0,1 mL de la disolución B (0,1 mL de ácido tioglicólico en 2,9 mL de agua destilada). Esta mezcla se mantuvo durante 3 h a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación se determinó la absorbancia a 400 y 430 nm y se calculó la diferencia entre esas dos longitudes de onda. Se utilizó un blanco como referencia. Las dos medidas son necesarias ya que la 6-desoxi-L-

manosa (ramnosa) presenta una absorbancia baja comparada con la L-hexosa, que es valorada a 430 nm. Con la lectura a 400 nm es posible hacer la corrección para la presencia de otros azúcares. Los valores obtenidos en el espectrofotómetro se substituyen en la recta patrón y se obtiene la concentración de ramnosa de cada muestra. El contenido en ramnolípidos se calcula multiplicando el contenido de ramnosa por el factor 3, factor que representa la correlación ramnolípidos/ramnosa (Itoh et al., 1971).

Mediante este proceso se consiguió una mezcla de ramnolípidos (RLmez) compuesta por monoramnolípidos (monoRLs) y diramnolípidos (diRLs). Una porción de esta mezcla se sometió a cromatografía de adsorción en columna de cara a obtener una muestra que contuviera mayoritariamente monoRLs. A continuación la muestra de RLmez y la de monoRL se utilizaron para llevar a cabo la funcionalización de estos compuestos.

3.3. Síntesis de los ramnolípidos derivados de aminoácidos

3.3.1. Ramnolípidos derivados de lisina

La síntesis de los ramnolípidos derivados de lisina se llevó a cabo en dos etapas:

- 1) Ramnolípidos derivados de Z-lisina: Se preparó una disolución de 0.5 g de la muestra de RL (RLmez o monoRL) y 0.26 g de DABCO en 10 mL de DCM y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente hasta obtenerse una solución transparente. A continuación se añadieron 0.39 g de H-Lys (Cbz)-OMe y 0.46 g

de BOP. Se mantuvo la agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. Se comprobó mediante HPLC que los productos iniciales han reaccionado y se guardó la mezcla de reacción durante la noche a 4 °C. Se lavó esta mezcla con agua 3 veces y se elimina el DCM al vacío. El producto se purificó mediante HPLC preparativa empleando las condiciones descritas en el apartado de Cromatografía líquida de alta eficacia preparativa. Se reunieron las fracciones en las que aparece el producto deseado y se eliminó el disolvente con un rotavapor.

2) Ramnolípidos derivados de lisina: Los ramnolípidos derivados de lisina se obtuvieron mediante la eliminación del grupo protector Z de los compuestos anteriores. Para ello se llevó a cabo una hidrogenación catalítica. Se disolvieron 300 mg del correspondiente producto protegido en 30 mL de metanol y se añadió un 10% en peso de catalizador (Pd/C). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente con agitación constante y a presión atmosférica. Una vez finalizada la reacción (aproximadamente 1 hora), se añadió una solución de metanol (5 mL) que contenga aproximadamente los mismos moles de HCL que de ramnolípidos con el fin de obtener el producto final como una sal clorhidratada. A continuación se filtró la solución sobre un lecho de celite para eliminar el catalizador y el disolvente se evaporó a baja presión en un rotavapor.

3.3.2. Ramnolípidos derivados de arginina

Se disolvieron 380 mg de H-Arg-OMe y 192 mg de trietilamina en 2.5 mL de dimetilformamida. Se agitó la disolución hasta que se vuelve transparente. A

continuación se añadió 500 mg de RLmez o monoRL, 300 mg de DCC y 180 mg de HOBt disueltos en 15 mL de DCM. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente y atmósfera de N₂. Se analiza por HPLC el avance de la reacción. A las 24 horas se guardó la mezcla en frío durante toda la noche. Se eliminó al vacío la DMF y el DCM y se lava con agua tres veces la mezcla de reacción. Finalmente se aíslan los ramnolípidos derivados de arginina mediante HPLC preparativo.

3.4. Técnicas cromatográficas

Las técnicas cromatográficas permiten separar los diferentes componentes de una mezcla. Estas técnicas se basan en a la diferente afinidad que muestran los componentes de la mezcla por la fase estacionaria (introducida en una columna) y el desplazamiento de los mismos en una determinada fase móvil. Las diferentes afinidades por estas dos fases dan lugar a velocidades diferentes de migración lo cual permite la separación de los diferentes componentes.

3.4.1. Cromatografía de adsorción en columna

Esta técnica se utilizó para aislar la muestra de monoRL de la mezcla de RL (constituida de monoRLs y diRLs como homólogos mayoritarios) producida por la *Pseudomonas aeruginosa*. Como fase estacionaria se utilizó Silica gel compactada en una columna de vidrio (50 cm de largo y 3 cm de diámetro interno) según el método

propuesto por [Relling et al., \(1986\)](#). La mezcla de RL se sembró en cloroformo y como fase móvil se utilizaron cinco fracciones de mezclas de polaridad creciente de CHCl_3 : CH_3OH (v/v): primera fracción (250:0); segunda (250:7,5); tercera (250:15); cuarta (250:25); quinta fracción (0:250). De esta forma se consiguieron fracciones que contenían monoRLs como compuestos mayoritarios.

3.4.2. Cromatografía de capa fina

Esta técnica cromatográfica se utilizó para controlar el proceso de producción de la mezcla de RLs por *Pseudomonas aeruginosa*, así como para inspeccionar el aislamiento de los compuestos de monoRL después de su aislamiento mediante cromatografía. Se utilizó una mezcla de ramnolípidos ya caracterizado como control. El método utilizado fue el mismo descrito por [Robert et al., \(1989\)](#) para la detección de azúcares. Se emplearon placas de gel de sílica (SiO_2) y como eluyentes se utilizó una mezcla de $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}$ en una proporción de 32,5//7,5/1,0 mL (v:v), respectivamente. Se utilizó la reacción Molish (tiñe cualquier azúcar presente en la disolución) para revelar las ramnosas presentes en los compuestos de interés ([Parra et al., 1989](#)). El reactivo de Molish se obtuvo diluyendo α -naftol en etanol al 15% y mezclándolo inmediatamente con 13 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y 81 mL de etanol absoluto. El uso de este reactivo en las capas finas dio lugar a la aparición de manchas de color marrón rosado correspondientes a las ramnosas presentes en los compuestos objeto de estudio ([Nicky et al., 2005](#)).

3.4.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC analítico)

Mediante esta técnica se controló el progreso de todas las reacciones llevadas a cabo en este trabajo así como el control de la composición de las fracciones obtenidas mediante HPLC preparativo. Se ha utilizado un equipo de HPLC marca Hitachi modelo Elite que consta de tres módulos: bomba que impulsa la fase móvil del sistema, inyector automático que permite introducir el producto a analizar en el sistema sin interrumpir la fase móvil, detector de UV-VIS de longitud de onda variable y ordenador que controla los anteriores módulos. En este trabajo como fase estacionaria se utilizó una columna de fase reversa funcionalizada con grupos ciano (Lichrospher 100 CN propylciano 5 μ m, 250 x4 mm). Se utilizaron dos fases móviles: fase A (0.1% TFA) y fase B (80% ACN /20% H₂O con 0.085% TFA). El gradiente de fases utilizado para cada uno de los análisis dependió de las características de la mezcla a analizar. El volumen de inyección empleado fue de 20 μ L, la longitud de onda de detección de 215 nm y el flujo de fase móvil de 1 mL/min.

3.4.4. Cromatografía líquida de alta eficacia preparativa

Esta técnica (HPLC preparativo) se utilizó para la purificación de los ramnolípidos derivados de arginina y lisina. Esta técnica permite trabajar con flujos de 100 mL/min con considerables cargas en columna (hasta 1 gramo). Es una técnica muy empleada en la actualidad a nivel industrial especialmente en la industria cosmética y farmacéutica ya que permite llevar a cabo de forma rápida y repetitiva separaciones

que no se pueden realizar a base de cristalizaciones o extracciones líquido/líquido. Se empleó una columna Kromasil 100 C8 5 μm 25x2.12. Las fases móviles fueron las mismas que las utilizadas para el HPLC analítico, el flujo de 20 mL/min y la longitud de onda del detector fue de 215 nm. El gradiente de elución fue programado en función de las características del producto a aislar.

3.5. Espectroscopia de masas

Los espectros de masas se obtuvieron mediante un equipo UPLC acoplado a un espectrómetro con interfase electro spray y un analizador de tiempo de vuelo. Se trabajó con un flujo de 0.276 mL/min y a una $\lambda=215$ nm. Los gradientes empleados para la detección dependieron de las mezclas a analizar y como fases móviles se utilizaron las siguientes mezclas: Fase A (80% ACN/ 20% H₂O + 0.085% HCOOH) y Fase B (100% H₂O + 0.1% HCOOH).

3.6. Espectrofotometría de resonancia magnética nuclear

La resonancia magnética nuclear se utilizó para llevar a cabo la caracterización estructural de los productos preparados en este trabajo. Se utilizó un equipo Mercury de 400 MHz de la casa Varian. Las muestras se prepararon disolviendo el compuesto que se va a analizar en 0.8 mL de disolvente deuterado. Se llevaron a cabo diferentes experimentos de RMN con el fin de poder caracterizar adecuadamente las muestras: 1) experimento monodimensional de ¹HNMR que permite obtener los desplazamientos

químicos así como la integral de las señales de todos los protones de un determinado compuesto, 2) experimento monodimensional de ^{13}C NMR que permite conocer el desplazamiento químico de los carbonos presentes en una molécula, 3) dept que da información de los desplazamientos químicos de los carbonos presentes y permite además discernir entre grupos CH, CH₂ y CH₃, 4) experimento bidimensional de correlación ^1H - ^1H (gCpsy) cuyas señales indican interacciones de acoplamiento escalar (spín-spín) entre hidrógenos de carbonos adyacentes y 5) experimento bidimensional de correlación ^1H - ^{13}C (gHSQC) cuyas señales de correlación dan información sobre el acoplamiento ^{13}C - ^1H .

3.7. Tensión Superficial

La tensiometría es una de las técnicas más empleadas para estudiar las propiedades de adsorción en las interfaces y de agregación de los tensioactivos. Las medidas de tensión superficial en el equilibrio permiten obtener las isothermas de tensión superficial frente a concentración. A partir de estas curvas se obtienen los valores de CMC así como de la efectividad y la eficacia de los tensioactivos tal como se ha descrito en la introducción.

La tensión superficial del agua es de 72 mN/m. Cuando se añade tensioactivos a una disolución acuosa, las moléculas se adsorben en la interfase provocando una disminución de la tensión superficial (γ).

Las medidas de tensiometría se llevaron a cabo utilizando el método de la placa de Wilhelmy, que consiste en poner en contacto con la disolución de tensioactivo una

plata microrugosa de platino. La placa está conectada a una electrobalanza que registra la fuerza que ejerce el menisco del líquido sobre la placa (Fig. 7.).

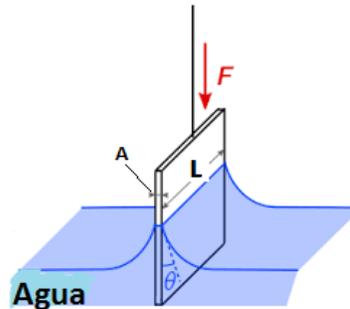


Fig. 7. Representación esquemática del método de la placa de Wilhelmy

La tensión superficial puede ser calculada aplicando la siguiente ecuación:

$$\gamma = \frac{F}{2(L + A)\cos\theta}$$

Donde F representa el peso de la placa (fuerza registrada por la electrobalanza), L es la longitud de la placa, A es la anchura de la placa y θ el ángulo de contacto. Si se considera que el mojado es perfecto $\theta=0$ y por lo tanto $\cos\theta=1$ y el ancho de placa puede ser despreciado frente a la longitud por lo que la ecuación queda como:

$$\gamma = \frac{F}{2L}$$

3.7.1. Preparación de muestras

En primer lugar se comprueba que la tensión superficial del agua miliQ que se va a utilizar para preparar las diferentes soluciones de tensioactivo tenga una tensión superficial de 72 mN/m. A continuación se prepara una disolución concentrada del tensioactivo a estudiar en agua miliQ. A partir de esta disolución concentrada se prepara, mediante sucesivas diluciones, soluciones de tensioactivo inferiores. Se deposita cada una de las soluciones en cápsulas apropiadas para el ensayo y se dejan reposar unas horas para permitir que la interfase a medir alcance el equilibrio.

3.7.2. Medida de las muestras

Las medidas de tensión superficial se llevaron a cabo en un tensiómetro marca Krüss utilizando la técnica de la placa de Wilhelmy usando como cuerpo medidor una placa de platino de dimensiones conocidas. La medida de la tensión superficial se basa en la medida electrónica de la fuerza que es producida por el líquido en el cuerpo medidor. En principio la placa de platino se sumerge en la disolución de tensioactivo a medir, a continuación, se le aplica una fuerza tal que hace que la placa arrastre una fina lámina de disolución hasta la posición inicial.

Es muy importante que todo el material utilizado para la preparación de las muestras esté perfectamente limpio. Antes comenzar a medir las diferentes disoluciones de tensioactivo se comprueba que la tensión superficial del agua bidestilada sea 72 mN/m. Además, para asegurar la fiabilidad de las medidas, cada

cierto tiempo se midió de nuevo la tensión superficial del agua bidestilada. Para cada una de las concentraciones se midió la tensión superficial cada 60 segundos, una vez se obtienen 3 medidas con una desviación igual o inferior a 0.1 mN/m se toma esa medida como la tensión superficial de la muestra. A continuación, antes de llevar a cabo una nueva medida, se limpia a la llama la placa de platino para asegurarnos que no queda ningún material adherido en ella.

3.8. Espectrofluorescencia

Otra de las técnicas que permite determinar el valor de la CMC de los tensioactivos es la espectrofluorescencia. La molécula fluorescente que se empleó fue el pireno. El pireno es una molécula hidrófoba que a concentraciones premicelares de tensioactivo se encuentra disuelto en el medio acuoso, sin embargo, a partir de la CMC el pireno se localiza en el interior de la micela. Esta variación de polaridad del medio donde se localizan las moléculas de pireno al llegar a la CMC induce un importante cambio en el espectro de fluorescencia de pireno, en concreto en la relación de las intensidades del pico I (375 nm) y el pico III (386 nm). Cuando se representa gráficamente la relación I_I/I_{III} frente a la concentración de tensioactivo se obtiene una curva que posee una brusca variación de esa relación a la CMC del tensioactivo.

3.8.1. Preparación de la solución de pireno

En un matraz aforado de 100 mL, se pesan 0.0101 g de pireno y se enrasa con metanol. Se toman 2 mL de esa disolución y se pasan a un matraz de fondo redondo de 250 mL y se elimina el metanol al vacío. Se añade al residuo obtenido 200 mL de

agua miliQ y se sónica a 40 °C durante media hora. A continuación se pasa esa disolución a un matraz de 1L y se enrasa con agua miliQ.

3.8.2. Preparación de las muestras

En primer lugar se comprueba que la relación I_I/I_{III} en el espectro de fluorescencia de la disolución de pireno sea igual a 1.60 o un valor muy aproximado. A continuación, se prepara una solución concentrada del ramnolípido a estudiar utilizando como disolvente la solución de pireno. A partir de esta disolución concentrada se prepara, mediante sucesivas diluciones, siempre con la disolución de pireno, una batería de concentraciones diferentes del compuesto a estudiar y para cada una de ellas y se mide el espectro de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{exc}=332$, $\lambda_{emi}=340-450$. Para cada una de las diferentes concentraciones estudiadas se determina la relación I_I/I_{III} en el espectro de emisión obtenido.

3.9. Caracterización de tamaño

Las medidas del tamaño de los agregados formados por los ramnolípidos en solución acuosa se determinaron utilizando la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (sigla en inglés, DLS). Utilizando un equipo Malvern Zeta, que trabaja a 632.8 nm y 25 °C. Las mediciones de DLS se iniciaron después de 5-10 minutos de preparar las disoluciones con el fin de permitir que las muestras hayan alcanzado el equilibrio. La intensidad de dispersión se midió en un ángulo de 173° con respecto al haz incidente.

Esto se conoce como detección de retrodispersión y permite mediciones en dispersiones turbias, minimizando los múltiples efectos de dispersión. Dependiendo de la turbidez del sistema, la unidad determina automáticamente el espesor de la muestra bajo investigación y enfoca el haz en una posición dada desde las paredes de la celda. Se realizaron al menos 10 repeticiones para cada muestra. El valor de viscosidad (0,8872 mPa.s.) y el índice de refracción (1,33) del agua se utilizaron para todas las mediciones. La función de correlación obtenida para las distribuciones monomodales es diferente de la obtenida para la distribución multimodal. La distribución de tamaños es calculada directamente por el equipo a partir de las funciones de correlación, (Tavano et al., 2013).

3.10. Biodegradación

Para llevar a cabo el análisis de biodegradabilidad de los RLs en condiciones aeróbicas, se aplicó la prueba de espacio de cabeza de CO₂ (OECD, 2014). Este método permite la evaluación de la biodegradación aeróbica última (mineralización en dióxido de carbono) de un compuesto orgánico en medio acuoso. El porcentaje de biodegradación se determina a partir de las medidas del carbón inorgánico total a intervalos de tiempo definidos, comparando los valores con los de un blanco que no contienen ningún compuesto. En este método se utilizan los tensioactivos, 20 mgC/L, como única fuente de carbono en un medio que contiene nutrientes inorgánicos, y que se inocula con lodos activado recogidos de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales (Manresa, Barcelona). Las muestras se incubaron en la oscuridad a 20±1 °C en recipientes sellados (250 LI) en los que la relación aire en

espacio de cabeza/volumen es de 1:2 Se utilizó n-dodecil sulfato de sodio (SDS) (20 mgC/L) como producto control. Se prepararon dos réplicas de tensioactivo, blanco y producto control para cada día de muestreo, excepto para el último día, que se prepararon cuatro réplicas. Las pruebas duraron 28 días. Las muestras se mantienen en la oscuridad y se miden cada 8 días. El día que se lleva a cabo las medidas se toman los frascos correspondientes a ese día de muestreo, se les inyecta Na (OH), se agitan durante 1 hora y se dejan en reposo. A continuación se coge con una jeringa un determinado volumen de la fase líquida y se pasa a un tubo cerrado herméticamente con el fin de evitar el intercambio de CO₂ con el aire. Finalmente se mide la concentración de carbono inorgánico en esa muestra utilizando un analizador de carbono (Shimadzu TOC-5050). El grado de biodegradación se expresó como un porcentaje de la cantidad teórica de carbono inorgánico basado en la cantidad inicial del compuesto probado.

3.11. Actividad antimicrobiana de los RLs

La actividad antimicrobiana de los tensioactivos objeto de estudio en este trabajo fue evaluada mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada uno de los compuestos frente a una serie de microorganismos (bacterias, levaduras, biofilm de levaduras y protozoos). Todos los ensayos fueron realizados en placas de 96 pozos utilizando el método adecuado para cada uno de los microorganismos.

3.11.1. Evaluación de la actividad antibacteriana

En este apartado, se eligieron una serie de bacterias representativas Gram positivas y Gram negativas. A continuación se detallan los microorganismos utilizados:

- Bacterias Gram positivas

Bacillus subtilis: Es una bacteria que normalmente se encuentra en el suelo. No es considerado un microorganismos patógeno para el ser humano, sin embargo puede contaminar alimentos y causar intoxicaciones alimentarias.

Staphylococcus epidermis: Es integrante de la flora normal de piel pero produce y puede causar infecciones como cistitis, septicemia y endocarditis.

Staphylococcus aureus: Se destaca como un importante patógeno humano que produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. Las infecciones por *S. aureus* suelen ser agudas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis o neumonía. Esta bacteria es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, de prótesis y otras. Además, la cepa de *S. aureus* es la causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada.

Staphylococcus aureus Resistente a Meticilina (MRSA): MRSA es una cepa de *S.aureus* que ha desarrollado resistencia a la acción de la meticilina y de diversos antibióticos de tipo beta-lactámicos. Es la bacteria resistente más común en la actualidad y es responsable de diversas infecciones en humanos de difícil tratamiento.

Supone un serio problema para la salud pública y un importante coste económico para los sistemas sanitarios.

Listeria monocytogenes: esta bacteria se encuentra en animales salvajes y domésticos, al igual que en el agua o los suelos. Es uno de los patógenos causante de infecciones alimentarias más violentos, con una tasa de mortalidad entre un 20 a 30%.

- Bacterias Gram negativas

Pseudomonas aeruginosa: están presentes en el suelo y el agua en todo el planeta. Estas bacterias crecen en áreas húmedas, tales como fregaderos, lavabos, piscinas inadecuadamente cloradas y jacuzzis. En ocasiones, estas bacterias están presentes en las axilas y área genital de las personas sanas. Es un patógeno oportunista en humanos y las infecciones varían desde infecciones externas leves hasta enfermedades graves potencialmente mortales.

Klebsiella pneumoniae ATCC 4352: son bacterias que residen en el intestino de muchas personas sanas, causando raras veces infección. Las infecciones con dichas bacterias suelen adquirirse en hospitales y centros de atención a largo plazo. Por lo general se producen en personas cuya resistencia a la infección está debilitada y/o llevan un dispositivo médico (como catéteres, drenajes y tubos de las vías respiratorias) en su cuerpo. Causa alrededor del 1% de las neumonías bacterianas y puede causar condensación hemorrágica extensa del pulmón.

Escherichia coli: Por lo general, esas bacterias viven en los intestinos de las personas y de los animales sanos. La mayoría de las variedades de *Escherichia coli* son

inofensivas o causan diarrea breve en términos relativos. Sin embargo, algunas cepas pueden ser particularmente peligrosas.

3.11.1.1. Actividad antibacteriana

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los RLs estudiados en este trabajo frente a cada una de las bacterias estudiadas se determinó utilizando la técnica de microdilución en caldo Mueller-Hinton (NCCLS, 1997; 2000). Esta técnica consiste en inocular diferentes concentraciones de tensioactivo con una concentración fija de bacterias. Los tensioactivos fueron estudiados en un rango de concentración de 250 -1 µg/mL. Los inóculos se prepararon en medio Mueller-Hinton con una turbidez igual a una disolución de 0,5 de la escala de McFarland ($\times 10^8$). La concentración final de trabajo en cada uno de los pocillos de la placa fue de 5×10^5 UFC/mL. Una vez inoculadas con los microorganismos, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Los ensayos se hicieron por triplicado y la CMI fue determinada como la menor concentración de tensioactivo que no daba lugar a un crecimiento visible de bacterias.

3.11.2. Evaluación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los RLs aniónicos y catiónicos se evaluó utilizando diferentes cepas de *Candida* spp. resistentes al fluconazol.

3.11.2.1. Microorganismos y medios de cultivo

Se utilizaron cepas de *Candida* spp. resistentes al fluconazol (dos *C. albicans*, tres *C. tropicalis* y dos *C. parapsilosis*). Los microorganismos corresponden a la colección de levaduras del Laboratorio de Bioprospección en Moléculas Antimicrobianas (LABIMAN), Facultad de Farmacia de la Universidad Federal do Ceará (Fortaleza–CE, Brasil). La *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (intrínsecamente sensible al fluconazol) y la *Candida krusei* ATCC 6258 (intrínsecamente resistente al fluconazol) fueron utilizadas como control para evaluar la resistencia al fluconazol de las siete cepas en estudio de acuerdo con el método CLSI (en inglés, The Clinical & Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2008). Las cepas fueron inoculadas en Agar Dextrosa Sabourauda 37 °C durante 24h. Posteriormente, las cepas fueron cultivadas en CHROMagar para evaluar la pureza de cada especie.

3.11.2.2. Actividad antifúngica

La determinación de la actividad antifúngica se llevó a cabo mediante la determinación de la CMI, concentración de compuesto que inhibe el crecimiento de los hongos en un 50%. Para llevar a cabo estas determinaciones se utilizó el método de Microdilución en Caldo de acuerdo con el protocolo M27-A3 del CLSI (CLSI, 2018), utilizando el medio de cultivo RPMI 1640 (pH 7.0) tamponado con MOPS 0,165 M (ácido morfolino propanosulfónico).

El fluconazol se disolvió en agua destilada mientras que las diferentes muestras de RLs estudiadas (RLmez, monoRL, RLmez_Arg, monoRL_Arg, RLmez_Lys y monoRL_Lys)

se prepararon en tampón fosfato salino (PBS) con 2% de dimetilsulfóxido. La actividad antifúngica se evaluó en un rango de concentraciones comprendido entre 0.48 y 0.250 µg/mL. El rango de concentración utilizado para los dos controles fue de 0.03-16 µg/mL para anfotericina B (AMPHO B) y 0.03-16 µg/mL para fluconazol. La incubación de las levaduras en contacto con las diferentes concentraciones de cada uno de los RLs así como de los controles se llevó a cabo en placas de cultivo de 96 pocillos a 35 °C durante 24 h. Se trabajó con una concentración final (inóculo) de $\times 10^5$ UFC/mL por pocillo. Los resultados fueron determinados visualmente siguiendo el método recomendado por el CLSI (CLSI, 2008). La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada compuesto fue determinada como la concentración que inhibía el 50% del crecimiento de los hongos. La resistencia de las levaduras fue evaluada de acuerdo con los puntos de corte del documento M27-S4 del CLSI. Las cepas tratadas con fluconazol con $CMI \geq 8$ µg/mL fueron consideradas resistentes al fluconazol (CLSI, 2008). Los experimentos de susceptibilidad in vitro fueron realizados en triplicado en días alternos utilizando el cálculo de las medias geométricas para obtener los valores de las CMIs.

3.11.3. Mecanismos de acción

El mecanismo de interacción de estos ramnolípidos con levaduras se determinó utilizando las siguientes técnicas: evaluación del daño en el ADN, determinación de la pérdida de viabilidad celular, estudio de los cambios en el $\Delta\psi_m$ y evaluación de la producción intracelular de EROs. El tipo de muerte celular se evaluó mediante el

método de la anexina V. Todos estos test se llevaron a cabo utilizando tres cepas representativas de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*), todas ellas resistentes al fluconazol.

3.11.3.1. Preparación de las células

Para llevar a cabo todos estos experimentos se utilizó una suspensión de levaduras preparadas a partir del medio de cultivo de esas cepas en crecimiento exponencial. Las suspensiones fueron centrifugadas (1600 g) durante 10 min a 4 °C y posteriormente se lavaron dos veces con una solución salina 0.85 % (200 g por 5 min a 4 °C). Finalmente, los microorganismos se resuspendieron ($\times 10^6$ UFC/mL) en tampón HEPES (pH 7.2) suplementado con 2 % de glucosa ([Andrade Neto et al., 2015](#)). Posteriormente, se estudiaron las muestras de ramnolípidos derivados de arginina (RLmez_Arg y monoRL_Arg) expuestas a esas células. Estos compuestos fueron evaluados a tres concentraciones distintas: CMI (7,8 $\mu\text{g/mL}$), 2xCMI (15,6 $\mu\text{g/mL}$) y 4xCMI (31,2 $\mu\text{g/mL}$). Como control se utilizó el FLC (64 $\mu\text{g/mL}$) y AMPHO B (4 $\mu\text{g/mL}$). Todas las pruebas fueron conducidas en triplicado en tres experimentos independientes.

3.11.3.2. Daño en el ADN

El denominado ensayo de cometa es una técnica rápida y relativa/sencilla que permite detectar daños en las moléculas de ADN cromosomal en las células. Este método permite diferenciar entre diferentes daños. Existen dos variantes, el ensayo de

cometa neutro y el ensayo de cometa alcalino. La variante alcalina del método utilizado en este trabajo permite evaluar al mismo tiempo las simples y dobles rupturas de ADN, así como las partes alcalinas. Debido a esto se considera que esta variante del método es más sensible.

El ensayo del cometa alcalino fue evaluado esencialmente como lo describe (Andrade Neto et al., 2015). Las capas de soporte de agarosa se secaron al aire antes de la aplicación de la suspensión celular. Posteriormente, se centrifugaron durante 5 min las suspensiones de las cepas de *Candida* tratadas en las condiciones descritas en el apartado anterior (3.11.3.1.). Se lavaron con agua estéril y se resuspendieron en tampón S (1M sorbitol, 25 mM de KH_2PO_4 , pH 6,5). Se tomó una alícuota de las suspensiones que contenía aproximadamente 5×10^4 células y se mezcló con una solución de agarosa (0.7% de agarosa a bajo punto de fusión) que contenía 2 mg/mL de Zymolyase 20T. A continuación se extendió esta alícuota de células en los portaláminas, se taparon con cubreobjetos y se incubaron durante 20 min a 30 °C. Todos los procedimientos se llevaron a cabo a una temperatura de 8-10 °C con el fin de minimizar la actividad celular de enzimas endógenas. Pasados los 20 min se retiraron los cubreobjetos y se incubaron los portaláminas en NaOH 30 mM, NaCl 1M, 0,1% laurilsarcosina y EDTA 50 mM (pH 12,3) durante 1 h. A continuación, se desenrollaron la ADN, para ello se lavaron los portaláminas 3 veces con Na (OH) 30 mM y EDTA 10 mM (pH= 12.4) durante 20 minutos. Finalmente, los portaminas se sometieron a electroforesis (0,5 V/cm y 24 mA) durante 20 minutos en el mismo tampón. Una vez acabada la electroforesis se sumergieron los portaláminas en tampón Tris-HCl 10 Mm (pH= 7.5) para neutralizarlas e inmediatamente se incubaron en etanol (76%) y etanol

(96%). Se secaron y se tiñeron con bromuro de etídio (1 mg/mL) para poder ser visualizadas posteriormente en el microscopio fluorescencia. Por cada experimento se analizan 100 células tomadas aleatoriamente (50 células de cada una de las dos láminas idénticas). Las células fueron inspeccionadas visualmente y clasificadas en cinco clases (0-4) de acuerdo con los respectivos tamaños de las colas (desde células sin ningún daño a células muy dañadas) y se calculó para cada muestra un valor de índice de daño. Así, el índice de daño varió de 0 (muestras completamente intactas: 100 células x 0) a 400 (muestras con daño máximo: 100 células x 4) ([Da Silva et al., 2013](#)).

3.11.3.3. Evaluación de la densidad celular

La viabilidad celular de las suspensiones de *Candida* spp. se evaluó utilizando el método de exclusión de Yoduro de propidio (2 µg/mL). Se incubaron durante 24 h alícuotas de las tres levaduras previamente tratadas con los RLs derivados de arginina (en las diferentes concentraciones), FLC y AMPHO B. A continuación se determinó la fluorescencia celular a mediante citometría de flujo (citómetro Guava EasyCyte (Guava Technologies Inc., Hayward, CA, EE. UU.)). Los resultados se analizaron utilizando el software CytoSoft (versión 4.1). Se evaluaron un total de 10,000 eventos por experimento (n = 3) y los residuos celulares del análisis fueron omitidos ([Andrade Neto et al., 2015](#)).

3.11.3.4. Potencial mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en cepas de *Candida* spp. tratadas con derivados de arginina

El cambio en el potencial de la membrana mitocondrial puede ser uno de los primeros procesos que da lugar a la apoptosis celular. El potencial de transmembrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) se determina generalmente utilizando un marcador fluorescente que se acumula en la matriz mitocondrial con carga negativa; cuanto más negativo es el $\Delta\psi_m$, más marcador se acumula.

En este trabajo el marcador fluorescente utilizado para determinar el $\Delta\psi_m$ fue rodamina 123. En primer lugar se incubaron las tres cepas representativas de *Candida* spp. con las concentraciones de RLs derivados de arginina y los controles durante 24h a 37 °C. A continuación se lavaron los cultivos con PBS y se incubaron a 37 °C con rodamina 123 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 30 minutos en la oscuridad. Se hizo otro lavado con PBS (2x) y se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo, utilizando un citómetro de minisistema Guava EasyCyte (Guava Technologies Inc., Hayward, CA, EE. UU.). Los resultados fueron analizados utilizando el software CytoSoft (versión 4.1). Se evaluaron un total de 10,000 eventos por experimento ($n = 3$) y los residuos celulares del análisis fueron omitidos (Da Silva et al., 2013).

3.11.3.5. Acumulación de EROs intracelular en cepas de *Candida* spp. tratadas con derivados de arginina

La producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) intracelular se evaluó mediante determinación de la acumulación de radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$). En primer lugar

se incubaron durante 24h (35 °C) las cepas de estudio tratadas con los RLs derivados de arginina y los controles. Posteriormente, se incubaron durante 30 min en la oscuridad en presencia de CM-H2DCFDA (20 Mm). Pasado ese tiempo, se centrifugó la suspensión celular de levaduras y se lavó dos veces con PBS. Finalmente, se resuspendieron las células en PBS y se determinó la producción de EROs por citometría de flujo (Guava EasyCyte ((Guava Technologies Inc., Hayward, CA, EE. UU.)). La intensidad de fluorescencia de DCF es proporcional a la cantidad de EROs formados en la célula.

El indicador CM-H2DCFDA se utilizó para determinar la concentración de estos radicales a nivel celular (levaduras). Este indicador difunde fácilmente a través de la membrana celular, es hidrolizado por esterasas intracelulares y dar lugar a DCFH (2', 7'-diclorodi-hidrofluoresceína), compuesto no fluorescente. Cuando las células están sometidas a un amplio estrés oxidativo distinto de H₂O₂, el DCFH se oxida rápidamente dando lugar a una molécula muy fluorescente, el DCF (2', 7'-diclorofluoresceína). La cantidad de EROs formada es proporcional a la intensidad de fluorescencia de DCF intracelular.

3.11.3.6. Determinación de la externalización de fosfatidilserina en células de *Candida* spp. tratadas con derivados de arginina

Con el fin de saber si la muerte celular se debía a apoptosis se determinó la externalización de la fosfatidilserina (PS). La PS es un fosfolípido que usualmente se mantiene en la monocapa lipídica interior, en el lado citosólico, de las membranas

celulares gracias a una enzima llamada flipasa. Cuando una célula sufre apoptosis, la flipasa deja de actuar y la presencia de la fosfatidilserina ya no se limita a la hemicapa interna (parte citosólica) de la membrana plasmática, sino también, y por desplazamientos espontáneos de flip-flop, queda expuesta en la superficie de la hemicapa externa de la membrana plasmática. La externalización de Fosfatidilserina inicia la activación del programa de muerte celular por factores apoptóticos. Estos factores activan un proceso de señalización que permite que el marcador anexina V reconozca las células apoptóticas.

Las suspensiones de las tres cepas representativas tratadas con los derivados de arginina y los controles, fueron centrifugadas y puestas en contacto con 2 mg/mL de Zymolyase 20T en solución tampón fosfato de potasio (PPB) con sorbitol 1M (pH 6.0) e incubadas a 30°C durante 2 h. Posteriormente, las cepas en estudio fueron teñidas con anexina V y Ioduro de Propidio (PI) y expuestas al marcador Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) del kit de detección de apoptosis con anexina V de FITC (Guava Nexin kit; Guava Technologies. Se hizo un lavado con PPB y en seguida se incubó las células en un tampón conteniendo una mezcla del marcador anexina V FITC y PI en una proporción de 5:5 µl/mL (v:v) durante 20 min. Los resultados fueron analizados mediante citometría de flujo (Guava EasyCyte minisystem). Fue evaluado un total de 10,000 eventos por experimento (n = 3) y los residuos celulares del análisis fueron omitidos ([Andrade Neto et al., 2015](#)).

3.11.4. Evaluación de la viabilidad de biofilms maduro de *Candida* spp. tratadas con los derivados de arginina

Con el fin de evaluar la actividad antibiofilm de los RLs derivados de arginina se utilizaron tres cepas representativas de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. Parapsilosis*). En primer lugar se incuban las levaduras durante 24 h en placas de 96 pocillos (10^6 células / pocillo). La continuación se lavaron cuidadosamente los pocillos tres veces para no romper el biofilm. Se añadió 200 μ L de una solución de RLs derivados de arginina y se incubó a 35 °C, 24 h. Para ese ensayo se utilizó cinco concentraciones de los compuestos de interés basadas en los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) encontradas para las cepas de *Candida* en estado planctónico: MIC/4 (1,95 μ g/mL); MIC/2 (3,9 μ g/mL); MIC (7,8 μ g/mL); MICx2 (15,6 μ g/mL) y MICx10 (78 μ g/mL). Después de la incubación con las diferentes concentraciones de RLmez_Arg y monoRL_Arg, se eliminó la solución mediante aspiración con micropipeta y se lavaron tres veces con tampón PBS. Para determinar la viabilidad celular, se añadió en cada pocillo 200 μ L de una solución de MTT (1 mg / mL Diluida en PBS)/menadiona (1 mM diluida en acetona) en una proporción de 75:6 (v/v), y se incubaron las placas a 35 °C durante 20 h en la oscuridad. Pasado este tiempo, se aspiró la solución, se lavaron tres veces con PBS y se añadió en cada pocillo 200 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO). Pasados 20 min se transfirieron 100 μ L de cada uno de los pocillos a otra placa de 96 pozos y se llevó a cabo la lectura a 540 nm en el lector de microplacas Biochrom Asys UVM 340. La concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada compuesto fue determinada como la menor concentración del tensioactivo que eliminó el 50 % del biofilm maduro de cada cepa de acuerdo con el procedimiento

descripto por (Pierce et al., 2008, Da Silva et al., 2016). Los ensayos fueron realizados en triplicado, tres veces en semanas consecutivas.

3.11.5. Evaluación de actividad antiprotozoaria

Con el fin de estudiar la actividad antiprotozoaria de los nuevos ramnolípidos se eligieron dos microorganismos diferentes, una ameba del genero *Acanthamoeba* y la *Leishmania infantum*.

3.11.5.1. *Acanthamoeba castellanii* y medio de cultivo

La *Acanthamoeba castellanii* fue obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC ® 30010; Manassas, VA, USA). El protozoo fue cultivado en medio de cultivo compuesto por Peptona-Extracto de levadura-Glucosa (PYG) (20 g/L de peptona proteosa, 1g/L de Extracto de Levadura, 0.1 g/L de glucosa) con aditivos (0.4 M MgSO₄ x 7 H₂O, 0.05 M CaCl₂, 0.25 M Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 0.25 M KH₂PO₄, 0.005 M Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ x 6 H₂O y 1.0 g/L de Citrato de sodio x 2H₂O). El cultivo se llevó a cabo a 25° C durante 6-7 días en la oscuridad. El pH final del medio se ajustó a 6,5.

3.11.5.2. Actividad anti-*Acanthamoeba* de los RLs aniónicos y catiónicos

La actividad frente a este protozoo fue evaluada de acuerdo con el método descrito por Taravaud et al., (2017). Los compuestos RLmezcla, monoRL, RLmez_Arg, monoRL_Arg, RLmez_Lys y monoRL_Lys fueron diluidos en solución de Tampón fosfato salino (PBS) con 2% de DMSO. Para llevar a cabo el test se preparó una

dilución (100 µL) seriada de concentraciones (rango 250-1 µg/mL) del compuesto a ensayar en el medio de cultivo (ATCC® Medium 712: PYG con aditivos) A continuación se añadieron 100 µL de inóculo; el volumen final de cada pocillo fue de 200 µL con una concentración de microorganismos de 5×10^4 UFC/mL por pocillo. Por último, para poder evaluar la viabilidad celular se añadió 20 µL de una solución de resazurina, (Adaptado de [McBride et al., 2005](#)). La placa fue incubada a 25 °C, en la oscuridad sin agitación, durante 6-7 días. La conversión de resazurina en resorufina se monitorizó midiendo la densidad óptica (DO 570nm) en un lector de placas TECAN Infinite M200. Se determinó la CMI como la menor concentración capaz de inhibir el 50% del crecimiento del protozoo *A. castellanii*. Los experimentos fueron hechos en triplicado y los resultados se presentaron con la media \pm desviación estándar.

3.11.5.3. *Leishmania infantum* y medio de cultivo

El segundo microorganismo utilizado para determinar la actividad antiprotozoaria de estos compuestos fue la *Leishmania infantum*. La actividad anti-*Leishmania* se evaluó mediante la determinación de CMI, concentración mínima de compuesto capaz de inhibir el 50% del crecimiento de este protozoo.

Se utilizó la forma promastigota de *L. infantum* MHOM/ES/2016/BCN-877. Las células fueron descongeladas (de una cámara a -80°C) y cultivadas a 26 °C, pH 7.0 en medio NNN (*Novy-MacNeal-Nicole medium*) para una mejor aportación de nutrientes. Después de 72 h en el medio NNN, se sembraron las células de *L. infantum* en medio Schneider enriquecido con 20% de suero bovino fetal y 1% de solución de gentamicina

a 24 °C durante 72 h. En seguida, se hizo el recuento de células viables en una cámara FuchsRosenthal.

3.11.5.4. Recuento de promastigotas de *L. Infantum*

Partiendo de una concentración inicial mínima de 10^6 promastigotes/mL, se hicieron dos diluciones en formol. La primera de 1:10 (A), (10µL de la solución madre con 90 µL de formol (10%)) y la segunda dilución 1:100 (B) (10 µL de la dilución A con 90 µL de formol). Seguidamente, se adicionaron 10 µL de la solución A y B en el primero y segundo cuadrante de la cámara FuchsRosenthal, respectivamente. Se puso el cubreobjetos para el posterior recuento en microscopio (objetivo x 40).

Las cámaras de recuento se utilizan para determinar el número de partículas por unidad de volumen de un líquido. La cámara de FuchsRosenthal diferente de otras cámaras tiene una gran superficie de 16 mm². La cuadrícula de recuento muestra 16 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm². Cada cuadrado grande está subdividido en 16 cuadrados pequeños con 0,25 mm de aristas y una superficie de 0,0625 mm². Dicho esto, para el recuento de células de *L. infantum* se hizo una media del número de células presentes en los 16 cuadrados grandes a partir de una lectura de 5 cuadrados y en seguida se aplicó un cálculo para saber el número de parásito/mL con la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/mL} = N \cdot K \cdot D$$

Donde, N (media de las células contabilizadas); K (constante de la cámara FuchsRosenthal = 80.000) y D (dilución realizada).

3.11.5.5. Actividad anti-*Leishmania*

El test que permitió evaluar la actividad anti-*Leishmania* de los RLs estudiados en este trabajo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos de acuerdo con el método descrito por Carrió et al. (2000). Los ramnolípidos aniónicos (RLmez y monoRL) y catiónicos (RLmez_Arg, monoRL_Arg y RLmez_Lys, monoRL_Lys) fueron diluidos en una solución de Tampón fosfato salino (PBS) con 2% de DMSO. Para este estudio se preparó una dilución seriada (100 µL) de los compuestos con sus diferentes concentraciones. Se utilizó un rango de concentración que varió de 250 – 1 µg/mL. . Posteriormente, se añadieron 100 µL de inóculo, de forma que al final cada pocillo contenía 200 µL con una concentración de 1×10^5 células promastigotes en su fase de crecimiento logarítmico. Por último, para evaluar la viabilidad celular se añadió 10 µL de una solución de resazurina (1 mM). La placa fue cultivada a 24°C durante 72 h. La conversión de resazurina en resorufina se monitorizó midiendo la densidad óptica (DO 570nm) en el lector de placas TECAN Infinite M200. Se determinó la CMI como la menor concentración capaz de inhibir 50% del crecimiento del protozoo *L. infantum*. Los experimentos fueron hechos en triplicado y los resultados se presentaron con la media ± desviación estándar.

3.12. Encapsulación de ADN

La capacidad que poseen los ramnolípidos para interactuar con ADN se estudió mediante dos técnicas: estudio de la fluorescencia en presencia de bromuro de etidio (BE) y electroforesis.

En primer lugar se estudió como variaba el espectro de fluorescencia del complejo BE/ADN en función de la concentración de ramnolípidos. La fluorescencia del bromuro de etidio libre es muy inferior a la que posee cuando está intercalado entre las bases de ADN formando el complejo BE/ADN. Debido a esto, cuando se tiene una solución acuosa que contiene el complejo BE/ADN se observa una determinada intensidad en el espectro de fluorescencia. Al añadir tensioactivo a la solución, si éste es capaz de interactuar con el ADN desplazando el BE, se observa una clara disminución de intensidad de fluorescencia en el espectro.

3.12.1. Preparación de soluciones

Solución A: 30 mL de una disolución de EB (0.16 μM) en agua milliQ.

Solución B: solución de 10 mg de ADN de salmón (average MW 1.3×10^6 ca. y 2000 bp) en 50 mL de agua milliQ

Solución C: Solución de tensioactivo 50 μM en agua milliQ.

3.12.2. Medida de las muestras

Los espectros de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro PTI Fluorescence Master System. Los espectros fueron realizados con una λ_{exc} de 490 nm y un intervalo de emisión que iba desde 530 a 700 nm. En primer lugar se mide el espectro de la solución A (BE en agua). A continuación se añade 100 μ L de la solución B a 30 mL de la solución A (solución AB). Se toman 3 mL de la solución AB y se hace de nuevo el espectro, este espectro es el de la solución acuosa conteniendo BE/ADN. Se añaden 15 μ L de la solución C y se hace el espectro. Se repite la adicción de 15 μ L de la solución C 12-15 veces, llevando a cabo la adquisición del espectro de fluorescencia por cada adicción de solución C.

El porcentaje de EB desplazado y el complejo EB/ADN debido a la interacción del ADN con los tensioactivos objeto de estudio fue calculado a partir de las gráficas de fluorescencia mediante la siguiente ecuación:

$$\%EB = (I_0 - I / I_0 - I_{EB}) \times 100$$

Donde I_0 y I_{EB} corresponde a la intensidad máxima de fluorescencia obtenidas para la solución de EB y la de EB/ADN respectivamente y I es el máximo de intensidad obtenido para las diferentes concentraciones de ramnolípido estudiadas.

Finalmente el porcentaje de EB desplazado se representa en función N/P:

$$N/P = \text{Moles de tensioactivo} \times n^{\circ} \text{ de cargas} / \text{moles ADN} \times n^{\circ} \text{ de cargas}$$

El número de cargas catiónicas de los ramnolípidos utilizados en este trabajo es igual a 1 mientras que el número de cargas de ADN es igual al doble del número de pares de bases.

3.12.3. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica utilizada para separar y caracterizar ácidos nucleicos basándose en la migración de moléculas con carga neta. En el caso del ADN de doble cadena, la carga neta viene dada por los grupos fosfato. Para poder caracterizar los ácidos nucleicos, es necesario utilizar una sonda fluorescente inmersa en el soporte electroforético junto con el gel, para que su emisión a una determinada longitud de onda permita analizar, con la ayuda de una lámpara UV, las bandas correspondientes a los diferentes fragmentos de ADN. Habitualmente se utiliza bromuro de etidio o GelRed como sondas, puesto que su emisión experimenta un aumento apreciable cuando se intercalan entre los pares de bases del DNA, que les proporcionan un entorno hidrofóbico protector.

En esta memoria la electroforesis en gel de agarosa se ha utilizado con el objetivo de evaluar la capacidad que los nuevos ramnolípidos catiónicos tienen de compactar el ADN y protegerlo de degradaciones. Para llevar a cabo el experimento se preparó una serie de soluciones (mezclas ADN / RLs) con distintas concentraciones de tensioactivos. Se mezcló 50 μ L de una solución de ADN (1,6 mg / ml) con 5mL de una solución de tensioactivo en diferentes concentraciones (12,5; 25; 50; 100; 200 μ M). Se preparó los complejos de ADN/tensioactivos (25 μ L) en presencia de gel de carga (2,5

μL). Todas las muestras se analizaron por electroforesis utilizando 0,7% de gel de agarosa y 5 μL de una solución de gelstar de 10.000x. La electroforesis se llevo a cabo a 90 V durante 35 min en tampón Tris-acético (TAE) (base de tris (hidroximetil) aminometano 40 Mm, ácido acético 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8,0). La banda de ADN se visualizó utilizando un transiluminador (Shimadzu-UV-160A).

3.13. Modelos celulares

3.13.1. Actividad Hemolítica

Los eritrocitos fueron unas de las células utilizadas en este trabajo para evaluar la toxicidad celular de los RL aniónicos y catiónicos sintetizados. El ensayo de hemólisis consiste en determinar la cantidad de hemoglobina que se libera al medio cuando se produce la lisis de las membranas de eritrocitos. Mediante este ensayo se determinó la concentración de compuesto capaz de producir un 50% de lisis de los eritrocitos (HC_{50}). El método utilizado para llevar a cabo estos estudios se encuentra descrito en el protocolo n° 37 de INVITTOX ([ECVAM, 1992](#)).

3.13.1.1. Preparación de una solución salina de tampón fosfato (PBS)

El tampón fosfato salino es una solución acuosa y sales minerales de composición muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos que presenta la siguiente composición (g/L): 3,15 g de Na_2HPO_4 , 0,762 g de KH_2PO_4 y 7,056 g de NaCl en 1 litro de agua Milli-Q. Finalmente, se ajusta, si es necesario, a pH 7.4 con Na(OH) o HCl.

3.13.1.2. Preparación de la suspensión de eritrocitos

Se utiliza sangre de conejo que es recogida en tubos con EDTA como anticoagulante. En primer lugar se separa el suero mediante centrifugación (3000 rpm, Megafuge 2.0 R, Heraeus Instruments) a 25 °C durante 10 minutos. Los glóbulos rojos se lavaron por triplicado con la solución PBS para eliminar el plasma y los leucocitos. Después del último lavado, los eritrocitos se redispersan en PBS a una densidad celular de 8×10^9 células/mL.

3.13.1.3. Ensayo de hemólisis

En primer lugar se prepararon las dos soluciones que se van a utilizar como control: el control negativo (0% hemólisis, 25 μ L de la sangre diluida en 975 μ L de PBS) y el control positivo (100% hemólisis, 25 μ L de la sangre diluida en 975 μ L de agua Mili-Q).

Se prepara una solución madre de los tensioactivos que se va a ensayar. Las soluciones madres de cada compuesto (diluidas en PBS) fueron diferentes, depende del carácter hemolítico de cada compuesto, y llegaron hasta 2500 μ g / mL.

Se añadieron volúmenes (desde 10 – 80 μ L a partir de la solución madre) de cada compuesto en tubos de Eppendorf, posteriormente se añadió una alícuota de 25 μ L de la suspensión de eritrocitos y se completó con PBS para obtener un volumen final de 1 mL. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente en un homogenizador durante 10 minutos para asegurar el contacto de eritrocitos con la solución del

compuesto. Pasados los 10 minutos, los tubos fueron centrifugados durante 5 minutos a 10.000 rpm (Eppendorf centrifuge 5415.) y el grado de hemolisis se determinó comparando la absorbancia del sobrenadante de las muestras ($\lambda=540$, Shimadzu UV-160) con la absorbancia del control positivo y la del control negativo. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.13.2. Actividad antitumoral y Citotoxicidad

3.13.2.1. Células utilizadas en el ensayo

Tabla 1. Células utilizadas en el ensayo y sus respectivas características

	Descripción	Origen	Condiciones de cultivo
3T3	Fibroblastos	ratas albinas (murinos)	Todas las células fueron mantenidas a 37 °C en: medio DMEM sin glutamina 4,5 g/l de glucosa, suplementado con 10 % de FBS, Glutamina (2 mM), Estreptomicina (100 µg/ml), Penicilina (100 U/ml), Hepes(10 mM) y 5 % de CO ₂ .
HaCaT	Queratinocitos	Piel humana	
HeLa	Carcinoma epitelial	Epitelio cervical (humano)	
MCF-7	Adenocarcinoma de mama	Mama (humano)	
A431	Carcinoma escamoso	Piel humana	

Los ensayos de actividad antitumoral se llevaron a cabo utilizando tres líneas celulares tumorales (carcinoma epitelial de útero (HeLa), adenocarcinoma de mama

(MCF7), carcinoma escamoso de piel (A431) y el estudio de la citotoxicidad celular se llevó a cabo utilizando dos líneas celulares sanas (fibroblastos (3T3) y queranocitos (HaCat)). Las principales características de esas líneas celulares están especificadas en la [tabla 1](#). Todas las células fueron obtenidas de la Eucellbank de la Universidad de Barcelona, España.

3.13.2.2. Tratamiento de las células

Las alícuotas de las distintas líneas celulares estaban congeladas en suspensión en un medio DMEM con un 10 % de FBS y un 10 % de DMSO. Las células fueron descongeladas y centrifugadas a 1200g. Se retiró el sobrenadante para eliminar, así, los restos de DMSO. La fracción celular se resuspendió en 20 mL del medio de cultivo apropiado en matraces de 75 cm². Cuando las células alcanzaron aproximadamente 80% de confluencia, se procede a la tripsinizaron.

Las células tienden a adherirse entre ellas y a su vez a la superficie del soporte que las contiene formando una matriz. La tripsinización, o tratamiento con tripsina, permite la disgregación enzimática de estas uniones dando lugar a una suspensión celular. La presencia de EDTA optimiza el proceso de tripsinación ya que actúa como quelante de metales.

El cultivo celular se lavó por triplicado con PBS, se añadió 2.5 mL de tripsina con EDTA y se incubó a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación (2 -5 minutos dependiendo de la línea celular), se comprobó que las células se hubieran desprendido de la superficie de crecimiento. Se desactivó la tripsina mediante la adición de medio

de cultivo (3 veces el volumen de tripsina utilizado). A continuación se realizó un recuento celular en una cámara de Burker® para determinar el número de células viables por mL de suspensión celular.

3.13.2.3. Ensayos de citotoxicidad y actividad antitumoral

Siembra en la placa. A partir del número de células viables por μL de la suspensión celular inicial se mezcla un volumen determinado de esta suspensión inicial con medio de cultivo de cara a obtener una densidad celular de 1×10^5 células /mL para las líneas celulares 3T3, HaCat, MCF-7 y 1×10^4 células / mL para las líneas HeLa y A-431. Se emplearon placas de 96 pocillos con superficie e poliestireno. Se siembran los 60 pocillos centrales con la densidad celular antes comentada y se mantienen a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 horas. Cuando se alcanza la confluencia se exponen las placas a concentraciones crecientes de RLs disueltos en medio DMEM con un 5 % de FBS, 2 mM de L-glutamina y un 1 % de la solución de antibiótico. En cada una de las placas se incluyeron controles, control negativo (el medio de cultivo) y control positivo (pocillos a los que se les añadió la suspensión celular sin tensioactivo).

Control de viabilidad celular. El control de la viabilidad celular se llevó a cabo utilizando dos métodos, captación del colorante rojo neutro (NRU, neutral red uptake) y ensayo de reducción de la sal de formazán (MTT). El colorante rojo neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina) es un colorante catiónico débil que atraviesa la membrana celular pasivamente por un proceso de difusión no iónica y se une a la matriz intracelular de los lisosomas. Las células muertas o dañadas no pueden retener

el colorante después de los procesos de lavado y fijación. Una vez acabado el cultivo de las células con los RLs se añadieron 100 µL por pocillo de la solución del colorante rojo neutro. Las células se incubaron durante 3 h con dicho colorante a 37 °C y 5% de CO₂. Se eliminó el colorante por aspiración, se lavaron los pocillos dos veces con PBS y se añadieron 100 µL de una solución al 50% de etanol absoluto y el 1% de ácido acético glacial en agua destilada, con el objetivo de extraer el colorante del interior de las células. Después de 10 minutos de agitación suave, se realizó la lectura de absorbancia de las placas a 550 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad 550).

El ensayo colorimétrico del MTT se basa en la incubación de las células con 3-[4,5 dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), una sal soluble de color amarillo. Las células captan el MTT por endocitosis y lo reducen a un formazán insoluble de color azul. En general se considera que la reducción del MTT a formazán tiene lugar a nivel mitocondrial. El ensayo de reducción del MTT se realizó siguiendo el método descrito por [Mosmann \(1983\)](#). Tras el tratamiento de las células con los distintos tensioactivos, se aspiró el medio de cada uno de los pocillos y se añadieron 100 µL por pocillo de la solución de MTT. Después de incubar las células con dicho colorante durante 3 h a 37 °C y 5% de CO₂, se eliminó el colorante por aspiración y se lavaron los pocillos dos veces con PBS. Se añadieron 100 µL de DMSO para extraer el colorante del interior de las células. Después de 10 min de agitación suave, se realizó la lectura de absorbancia de las placas a 550 nm en un lector de microplacas (Bio-Rad 550).

3.13.2.4. Cálculo de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀)

A partir de los datos de absorbancia de cada una de las concentraciones ensayadas se obtuvieron las gráficas porcentaje de viabilidad celular/concentración. En el caso del ensayo de captación del colorante rojo neutro, la viabilidad se expresó como el porcentaje de captación de colorante por los lisosomas respecto a las células control que no habían sido tratadas. En el ensayo MTT, la viabilidad también se expresó como el % de reducción del colorante respecto a las células control. Las curvas obtenidas se ajustaron a una función exponencial y se calcularon los índices de citotoxicidad o concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), que es la concentración de tensioactivo que provocó la muerte del 50 % de células (Fig. 8.).

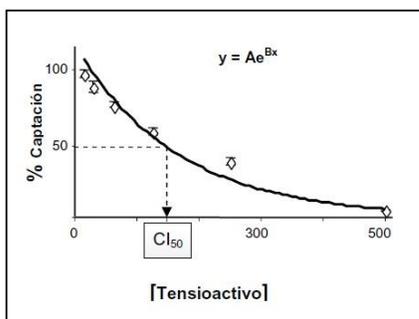


Fig. 8. Cálculo de la concentración inhibitoria 50% de los tensioactivos a partir de la concentración-respuesta (Ocaña, 2007).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la actualidad las sociedades occidentales han tomado conciencia de los graves riesgos que conllevan el consumo descontrolado de recursos naturales así como la gran generación de residuos contaminantes derivados de este consumo. Debido a esto el diseño de las nuevas moléculas se ha llevado a cabo teniendo en cuenta varios de los principios de la química verde. Las materias primas necesarias para la síntesis de estos compuestos están basadas en recursos naturales renovables como son los ramnolípidos y los aminoácidos. La producción de estos compuestos ayudará a minimizar la reducción de residuos ya que los ramnolípidos de partida proceden de aceites de fritura. Las moléculas que se proponen poseen una estructura química sencilla que permite llevar a cabo la síntesis en pocas etapas lo cual reduce el uso de reactivos y la generación de residuos. Dada la estructura, es de esperar que estas moléculas sean seguras desde el punto de vista de toxicidad ya que es conocido que los tensioactivos derivados de amino ácidos presentan un perfil toxicológico inferior al de los tensioactivos clásicos. A priori es de esperar que la estructura química propuesta se degrade rápidamente ya que los enlaces químicos que posee (enlaces éster y amida) son normalmente degradados en el medio ambiente. Además, la degradación de estos compuestos permitirá que una vez llevada a cabo la función para la cual se han utilizado se rompan en moléculas inocuas más pequeñas que no persistan durante demasiado tiempo en el medio ambiente.

4.1. Producción de Ramnolípidos mediante *Pseudomonas aeruginosa*

El primer trabajo llevado a cabo fue la síntesis de los ramnolípidos que iban a ser derivatizados mediante la introducción de aminoácidos. La producción de estos biotensioactivos se llevó a cabo utilizando *Pseudomonas aeruginosa* MB, esta bacteria fue incubada en un medio de cultivo que contenía como fuente de carbono 40 g/L de aceites de fritura. El uso de este medio permite reutilizar un residuo tan abundante como es el aceite de fritura, reduce el coste de producción de los biotensioactivos y a la vez también se reduce el riesgo medio ambiental que supone el almacenamiento de residuos.

La síntesis de RLs se llevó a cabo mediante la optimización de un método ya utilizado por el grupo de investigación para la producción de ramnolípidos a partir de este tipo de sustrato ([Abalos et al., 2001](#); [Benincasa et al., 2004](#); [Haba et al., 2014](#)). El control del proceso de síntesis se llevó a cabo mediante CCF utilizando el método descrito por Robert et al., ([1989](#)). El análisis mediante esta técnica reveló dos manchas de color púrpura lo cual indicaba la presencia de dos tipos de compuestos monoRLs y diRLs. Se utilizó un método consistente en cuatro fases de cultivo que permitió obtener una producción de 19.17 g/L, lo cual corresponde a un rendimiento total de 0.479 g/g con una productividad volumétrica de 266.2 mg/L.h.

La habilidad que posee el género *Pseudomonas* para producir biotensioactivos a partir de aceites residuales de fritura está ampliamente documentada. El grupo de investigación en el que se ha realizado este trabajo llevó a cabo un estudio en el cual se ensayaron 36 cepas de diferentes géneros. De todas las cepas ensayadas, el

género *Pseudomonas* resultó ser el que mejor se adaptó a una fuente de carbono formada por aceites de fritura (Haba et al., 2000). Nitschke et al., (2005) también llevó a cabo un estudio en el que utilizó una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* con diferentes sustratos de carbono, este autor observó que utilizando con esta cepa un sustrato derivado de soja podía obtener una producción de 11.7 g/L de ramnolípidos. Sin embargo, utilizando la misma cepa, Benincasa et al. (2008) solamente consiguieron una producción de 7.3 g/L cuando la producción se llevaba a cabo utilizando aceite de girasol como fuente de carbono. Utilizando una nueva cepa de *Pseudomonas* identificada como SWP-4, Lan et al. (2015) consiguieron obtener un rendimiento mucho mayor en la producción de ramnolípidos (13.9 g/L) utilizando como sustrato aceites residuales de fritura. Con el método utilizado en este trabajo se logró obtener una producción de 19.17g/L, superior a las descritas en la bibliografía.

Las cepas de *Pseudomonas* producen principalmente dos tipos de ramnolípidos, L- α -ramnopyranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (monoRLs con 2 cadenas de 10C, (Rha-C₁₀-C₁₀) y 2-O- α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopyranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (diRLs con dos cadenas de 10C, Rha-Rha-C₁₀-C₁₀). Junto con estos componentes mayoritarios en las mezclas de ramnolípidos también se encuentran otros homólogos con diferentes cadenas alquílicas. Normalmente estas bacterias producen mezclas que contienen mayoritariamente diRLs (Mata-Sandoval et al., 1999; Haba et al., 2003). Sin embargo, también se pueden encontrar trabajos en los que el producto mayoritario son los monoRLs (Monteiro et al., 2007). El tipo de compuestos así como en la proporción relativa de los mismos depende fundamentalmente del tipo de cepa utilizada (Kaskatepe et al., 2016; Irorere et al., 2017), de la composición del sustrato y

de las condiciones específicas de cultivo que se emplean para la producción (Costa et al., 2006). Utilizando *P. aeruginosa* LBI y glicerol y glucosa como sustrato Nitschke et al., (2005) obtuvo Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ como compuesto predominante. Sin embargo cuando cambiaron el sustrato por otro más hidrófobo el producto predominante fue el monoramnolípido Rha-C₁₀-C₁₀. Por otro lado, utilizando un sustrato hidrófobo diferente (soapsstock) como fuente de carbono, Benincasa et al., (2004) obtuvieron el diramnolípido como producto predominante.

Con el fin de conocer el tipo de mezcla obtenido en nuestro cultivo se llevó a cabo un análisis ES_MS de una muestra disuelta en metanol. Tal como era de esperar, el espectro mostró dos picos mayoritarios, uno de m/z 503 compatible con el monoramnolípido Rha-C₁₀-C₁₀ y otro de m/z 649 compatible con el diramnolípido Rha-Rha-C₁₀-C₁₀. El estudio también permitió identificar la presencia de otros homólogos minoritarios: Rha-C₁₀-C₈ (m/z=313), Rha-C_{12:2} (m/z=357), Rha-C₁₀-C₈ (m/z=475), Rha-C₁₀-C_{12:1} (m/z=529), Rha-Rha-C₈-C₁₀ (m/z=621), Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ (m/z=677) (Fig. 9.).

Una vez conocida la composición de la mezcla de ramnolípidos obtenida en el cultivo con *Pseudomonas* se procedió a purificar una parte de la misma con el fin de obtener una muestra compuesta mayoritariamente por monoramnolípidos. La separación se llevó a cabo mediante cromatografía de adsorción en columna. Mediante este proceso de separación se logró obtener una muestra en la cual el pico más relevante correspondía a Rha-C₁₀-C₁₀ (m/z=503). En esta muestra también se observó la presencia de homólogos minoritarios: Rha-C₁₀-C₈ (m/z=313), Rha-C_{12:2} (m/z=337) y Rha-C₁₀-C_{12:1} (m/z=529) (Fig. 10.).

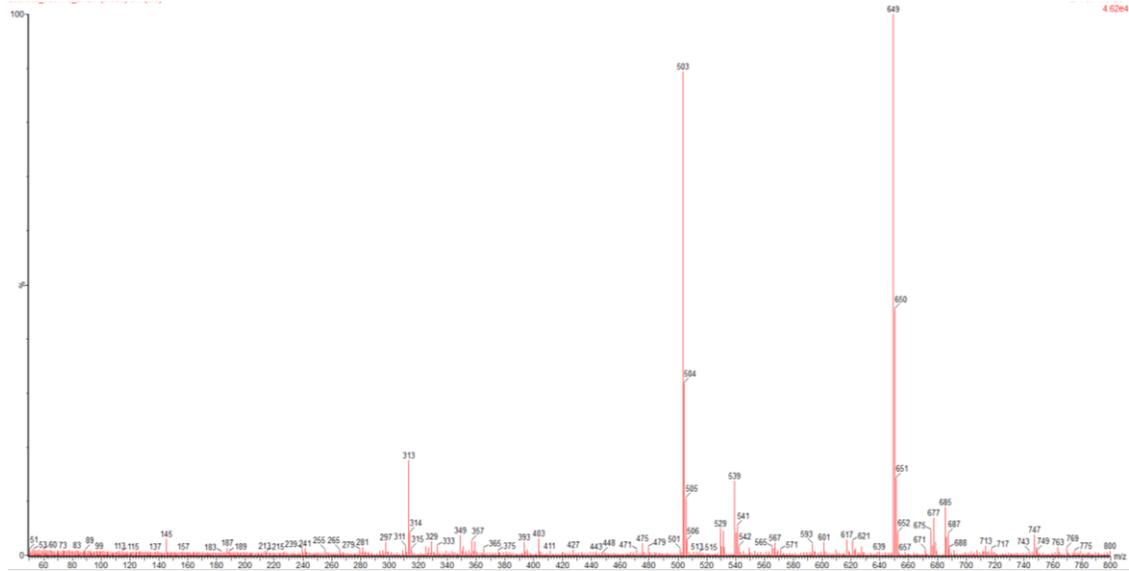


Fig. 9. ES-MS espectro de la mezcla inicial de ramnolípidos (RLmez)

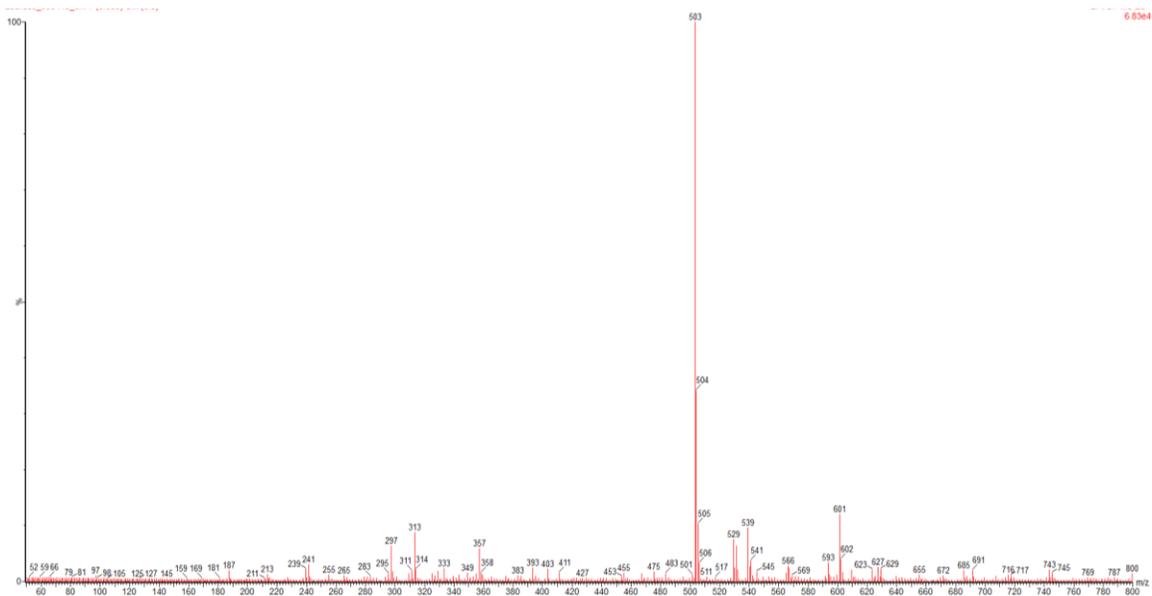


Fig. 10. ES-MS espectro del homólogo monoramnolípidos (monoRL)

Con los trabajos llevados a cabo hasta este momento se obtuvieron 2 muestras diferentes de ramnolípidos, la mezcla obtenida del cultivo bacteriano que contiene mono y diramnolípidos y que la designaremos con el acrónimo **RLmez** y la muestra que contiene mayoritariamente monoramnolípidos, **monoRL**. Estas dos muestras fueron las utilizadas para la síntesis de ramnolípidos catiónicos basados en aminoácidos. Se eligieron estas muestras teniendo en cuenta las siguientes premisas: a) la muestra de RLmez es la que se obtiene directamente del cultivo microbiano, no se la sometió a ningún tratamiento posterior por lo que su obtención requiere menor consumo de tiempo y de disolventes y b) el uso de la muestra de monoramnolípido (monoRL) permite determinar si las propiedades biológicas y fisicoquímicas de sus derivados cambiaban sustancialmente al variar el número de ramnosas en la molécula y por lo tanto ayuda a decidir si la separación de homólogos merece la pena.

4.2. Preparación de ramnolípidos catiónicos basados en aminoácidos

Los tensioactivos catiónicos han sido ampliamente utilizados como agentes antimicrobianos y antisépticos ([Jennings et al., 2015](#)). Debido a la presencia de una cadena hidrófoba y una carga catiónica estos compuestos actúan a nivel de membrana mediante interacciones electrostáticas e hidrófobas ([Salick et al., 2007](#)). Teniendo en cuenta estos estudios, es de esperar que la introducción de una carga catiónica en la estructura ramnolípídica mejore las interacciones de estos compuestos con membranas biológicas y por lo tanto aumente la actividad frente a diferentes microorganismos como las bacterias, los hongos y los protozoos.

La derivatización de las dos muestras de RL se ha llevado a cabo teniendo en cuenta las siguientes hipótesis de partida: a) La introducción de una carga catiónica en la estructura ramnolípídica puede mejorar considerablemente la actividad antimicrobiana de los precursores, b) la unión química de una molécula de ramnolípido con un amino ácido puede llevarse a cabo de forma sencilla y c) los tensioactivos derivados de amino ácidos presentan normalmente menor toxicidad celular y mayor biodegradación que los tensioactivos catiónicos clásicos derivados de amonio cuaternario (Pinazo et al., 2016; Moran et al., 2001a).

Como se ha comentado en la introducción de esta memoria, dentro del amplio grupo de tensioactivos catiónicos, en la literatura se pueden encontrar numerosos ejemplos de tensioactivos derivados de arginina y lisina que también presentan buena actividad antimicrobiana (Moran et al., 2001a; Colomer et al., 2011). De hecho un importante número de compuestos antimicrobianos presentan un motivo común en su estructura química, el grupo guanidino unido a un grupo hidrófobo (Pinazo et al., 2016). La lisina y la arginina son dos amino ácidos que poseen dos grupos básicos con diferente pKa: un grupo amino (pKa=8.9) y un grupo guanidino (pKa=12.4) la arginina y dos grupos amino (pKa=9.0 y 10.5) la lisina. Las moléculas de ramnolípidos poseen un grupo carboxílico libre. Teniendo en cuenta estas características estructurales, estos dos amino ácidos han sido los elegidos para preparar de forma sencilla tensioactivos catiónicos derivados de ramnolípidos, ya que es posible la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo del RL y una de los grupos amino del aminoácido

Los derivados ramnolípídicos de arginina se han preparado en un solo paso utilizando como materia de partida arginato de metilo diclorhidratado comercial y los

RLs preparadas previamente. Como se ha comentado en la sección anterior se van a utilizar 2 muestras diferentes de ramnolípidos; una que mayoritariamente contiene monoramnolípidos (monoRL) y otra que está formada por una mezcla de monoRL y diRL (RLmez). Las reacciones químicas se han llevado a cabo teniendo en cuenta un peso molecular ponderado para las muestras de RL calculado considerando los productos predominantes en las dos fracciones utilizadas. La reacción entre los RL y el arginato de metilo diclorhidratado se llevó a cabo directamente, sin utilizar ningún grupo protector en el aminoácido. El diferente valor del pKa del grupo guanidino (12.5) y el grupo amino (8.9) de la arginina permite que se puedan llevar a cabo reacciones selectivas sobre uno de sus grupos nucleófilos, ya que en el arginato de metilo el grupo guanidino permanece protegido por protonación hasta valores de pH superiores a 9.

La formación del enlace amida entre un grupo carboxilo y una amina primaria requiere la activación del grupo carbonilo dado que los ácidos carboxílicos y las aminas no producen este tipo de enlace de forma espontánea. Es necesario por lo tanto activar el grupo carboxílico para que sea susceptible de reaccionar con un agente nucleófilo, en nuestro caso el grupo α -amino de la arginina. Se probaron diferentes agentes de condensación (BOP, DCC, EDC, DCC/HOBt) para llevar a cabo esta reacción. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando DCC con HOBt (Fig. 11a.). Como disolvente se utilizó una mezcla de DCM/DMF en la cual todos los reactantes eran solubles.

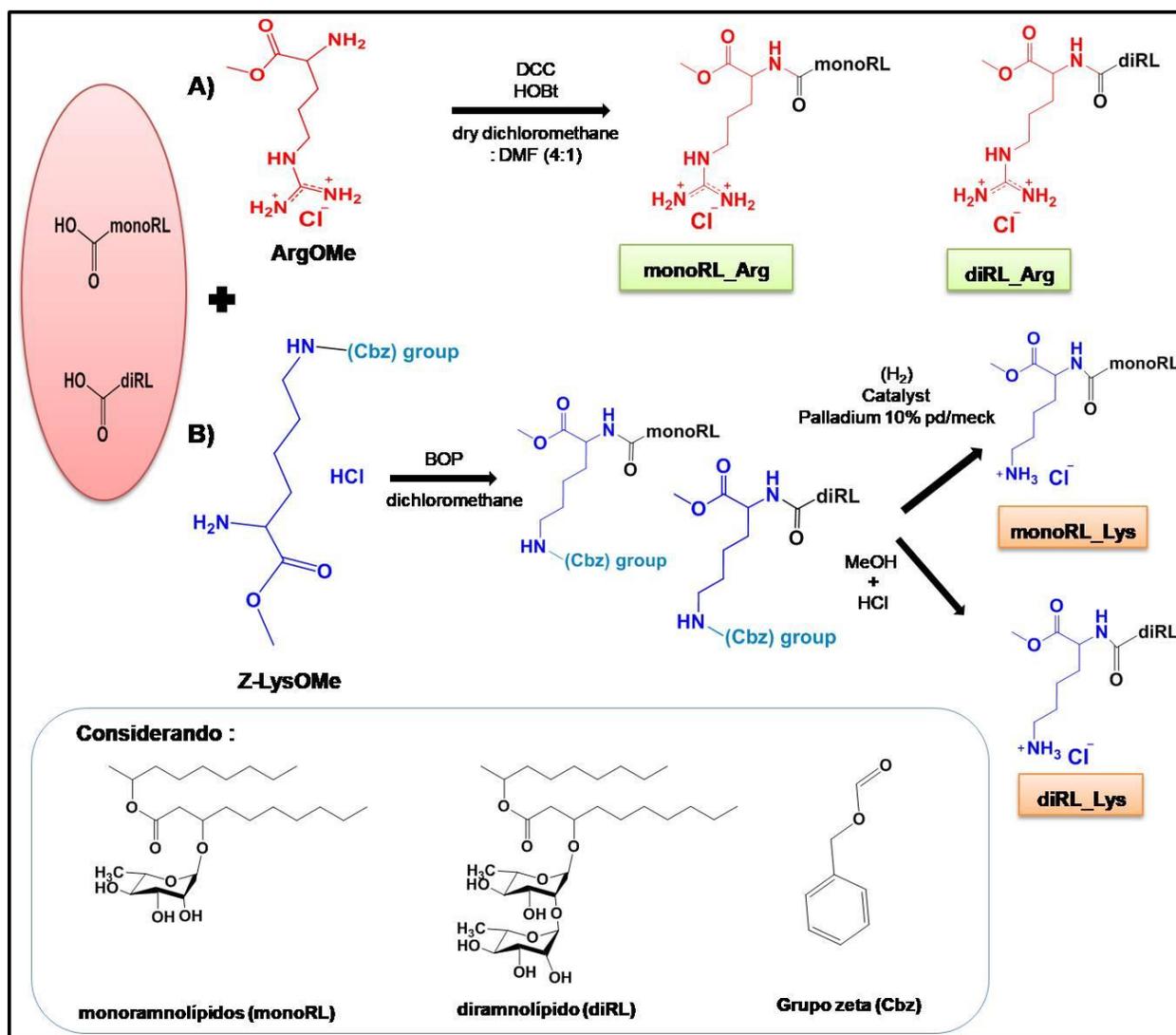


Fig. 11. Ruta sintética para obtener los derivados de ramnolípidos basados en los dos homólogos principales de la mezcla de ramnolípidos (monoRL y diRL). A) Reacciones químicas para obtener derivados de arginina y B) Reacciones químicas para obtener derivados de lisina.

La DCC es un agente de condensación muy utilizado en síntesis de péptidos (Sheehan et al., 1955). Normalmente, la combinación de la DCC con aditivos como el HOBT mejora los rendimientos de la reacción y evita la formación de determinados subproductos. La función de estos aditivos es formar in situ un éster más activo en el grupo carboxilo del aminoácido (Fig. 11a.)

La reacción de formación del ramnolípido derivado de arginina es rápida (4 horas) y el proceso de la reacción fue controlado por HPLC. A las 4 horas, en el cromatograma se observan una serie de picos que parecen corresponder a los ramnolípidos basados en arginina. El tiempo de retención de los derivados obtenidos con la muestra de monoRL y RLmez es similar lo cual significa que no hay mucha diferencia en la hidrofobicidad de los diferentes compuestos mayoritarios. Es de destacar que una vez obtenidas las condiciones óptimas para llevar a cabo la reacción, se hicieron varias reacciones, unas con la misma cantidad de reactante y otras con cantidad superiores. En todos los casos el perfil del cromatograma obtenido fue muy similar, lo cual significa que se obtenía una mezcla de derivados muy similar en todos los casos.

Una vez finalizada la reacción, se elimina el disolvente orgánico al vacío y los productos se purificaron mediante HPLC preparativo. Esta técnica permite eliminar de forma rápida los subproductos de la reacción (agente de condensación y base) y aislar los ramnolípidos catiónicos derivados de arginina. La separación de los diferentes homólogos presentes en cada una de las dos muestras no se llevó a cabo porque requeriría diversas fases de purificación usando diferentes métodos cromatográficos con el consiguiente gasto de un gran volumen de disolventes.

Mediante estas reacciones se obtuvieron dos muestras. La mezcla obtenida a partir de la muestra de monoRL es denominada **monoRL_Arg** mientras que la obtenida a partir de la muestra RLmez se denomina **RLmez_Arg**. La composición de las mezclas obtenidas a partir de las dos muestras de ramnolípidos se analizó mediante ESI-MS (Fig. 12.). Como puede observarse en la figura 12 las dos especies

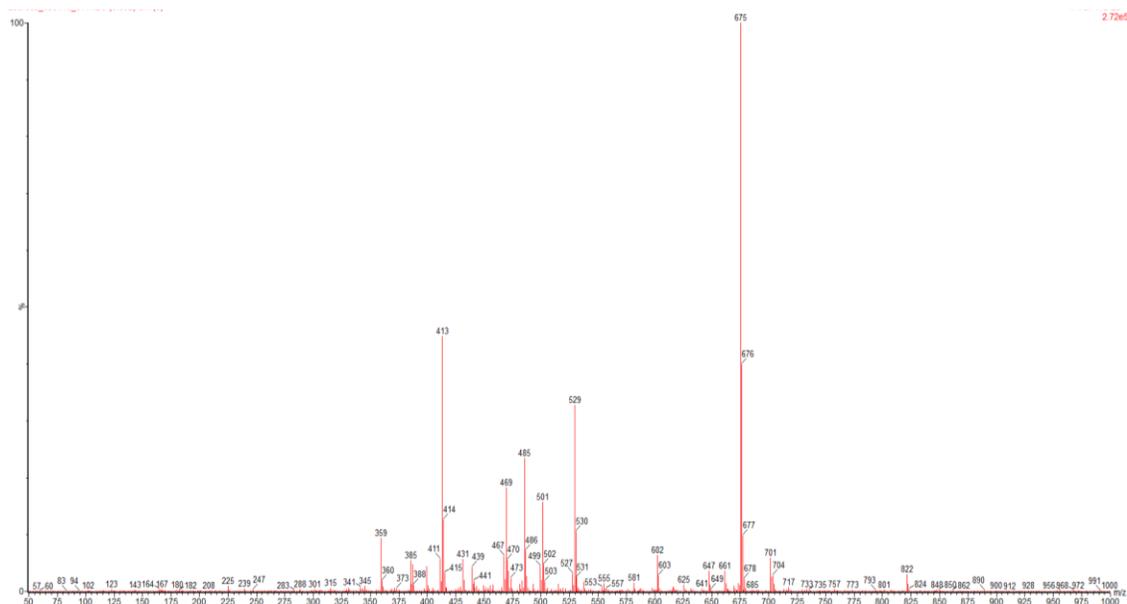
predominantes en la muestra RLmez_Arg son Rha-Rha-C₁₀-C₁₀-Arg (m/z 822) y Rha-C₁₀-C₁₀-Arg (m/z 675) y mientras que en el producto monoRL_Arg solamente se observaron picos correspondientes a derivados del monoramnolípido con el Rha-C₁₀-C₁₀-Arg como compuesto mayoritario. El espectro de masas también presenta picos minoritarios correspondientes a otros homólogos.

La síntesis de los derivados ramnolipídicos de lisina se llevó a cabo en dos etapas (Fig. 11b.). Se utilizó como producto de partida la lisina metilada con el grupo ϵ -amino protegido con el grupo protector carbobenziloxi (N ^{ϵ} -Z-Lisina metil éster). El pKa del grupo ϵ -amino de la lisina es de 10.5, muy inferior al del grupo guanidino de la arginina, por lo cual se requiere la protección de este grupo para que la reacción se dé selectivamente en el grupo α -amino. La primera etapa consistió en la condensación del grupo carbonilo del ramnolípido con el grupo amino libre de la N ^{ϵ} -Z-Lisina metil éster. Los mejores resultados para esta reacción se obtuvieron utilizando el BOP como agente condensante y DCM como disolvente. La condensación se lleva a cabo a partir de la formación in situ del éster activo del grupo carboxilo del aminoácido y el posterior ataque del nucleófilo por parte del grupo amino libre de la lisina al éster activo. Este agente de condensación es muy utilizado en síntesis peptídica dado que produce excelentes resultados en muy poco tiempo y además los subproductos que se generan en la reacción suelen ser fácilmente eliminables. El control de reacción se llevó a cabo mediante HPLC y la formación de los derivados se constató utilizando espectroscopia de masas. Una vez finalizada la reacción de condensación los derivados ramnolipídicos de lisina se separaron de los subproductos mediante HPLC preparativo.

La segunda etapa de esta síntesis consiste en la eliminación del grupo protector Z de forma que el grupo ϵ -amino de la lisina quede libre y pueda ser clorhidratado con el fin de obtener tensioactivos catiónicos. Esta reacción es una hidrogenación catalítica muy rápida (30 minutos). Se llevó a cabo en metanol, a temperatura ambiente y a presión atmosférica. A la mezcla de reacción se añadió una cantidad equimolecular de HCl, al añadir el ácido se evita que aumente el pH durante la reacción evitando así la hidrólisis de los enlaces éster de los ramnolípidos y además, el producto se obtiene como una sal clorhidratada. La composición de las dos mezclas de derivados de lisina se analizó mediante ESI-MS (Fig. 13.)

Se obtuvieron dos productos derivados de lisina. La mezcla obtenida a partir de la muestra de monoRL es denominada **monoRL_Lys** mientras que la obtenida a partir de la muestra RLmez se denomina **RLmez_Lys**. Como puede verse en la figura 13 los resultados son similares a los obtenidos para los compuestos derivados de arginina. La muestra monoRL_Lys contiene principalmente el monoramnolípido Rha-C₁₀-C₁₀-Lys (m/z 647) mientras que la muestra de RLmez_Lys es una mezcla del diramnolípido Rha-Rha-C₁₀-C₁₀_Lys (m/z 793) y el monoramnolípido Rha-C₁₀-C₁₀_Lys (m/z 647).

A)



B)

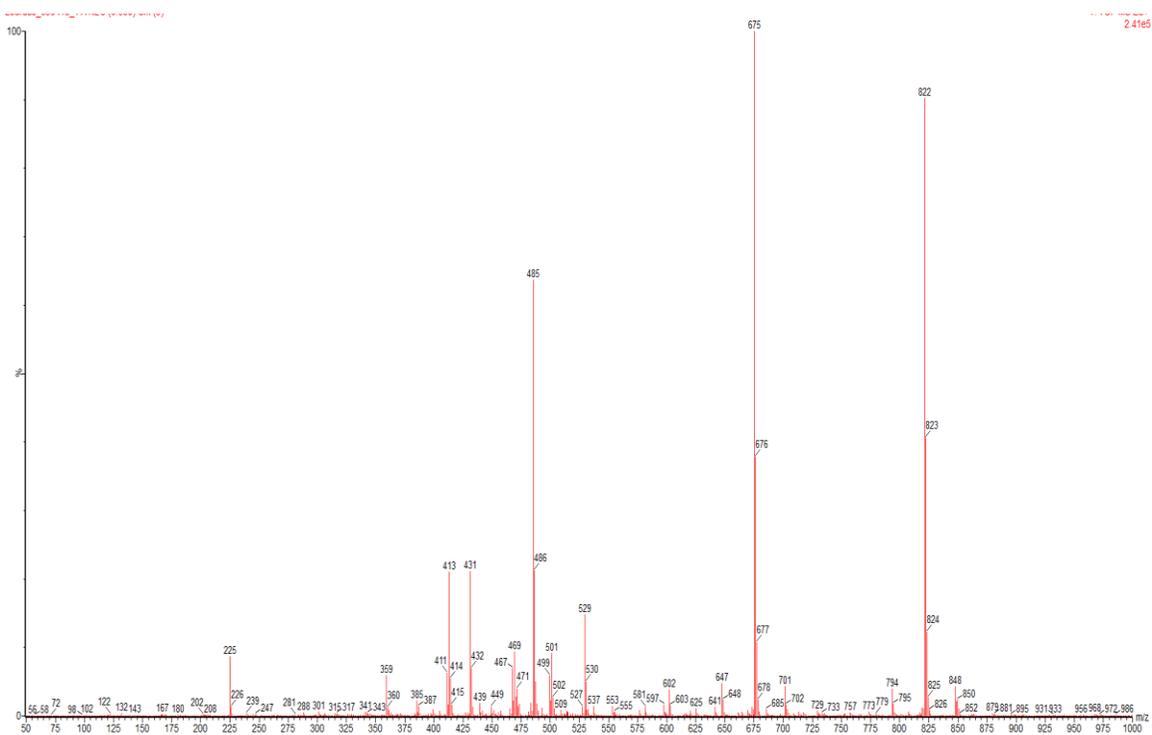


Fig. 12. ES-MS espectro de la de los ramnolípidos derivados de arginina obtenidos a partir de las muestras monoRL (A) y RLmez (B)

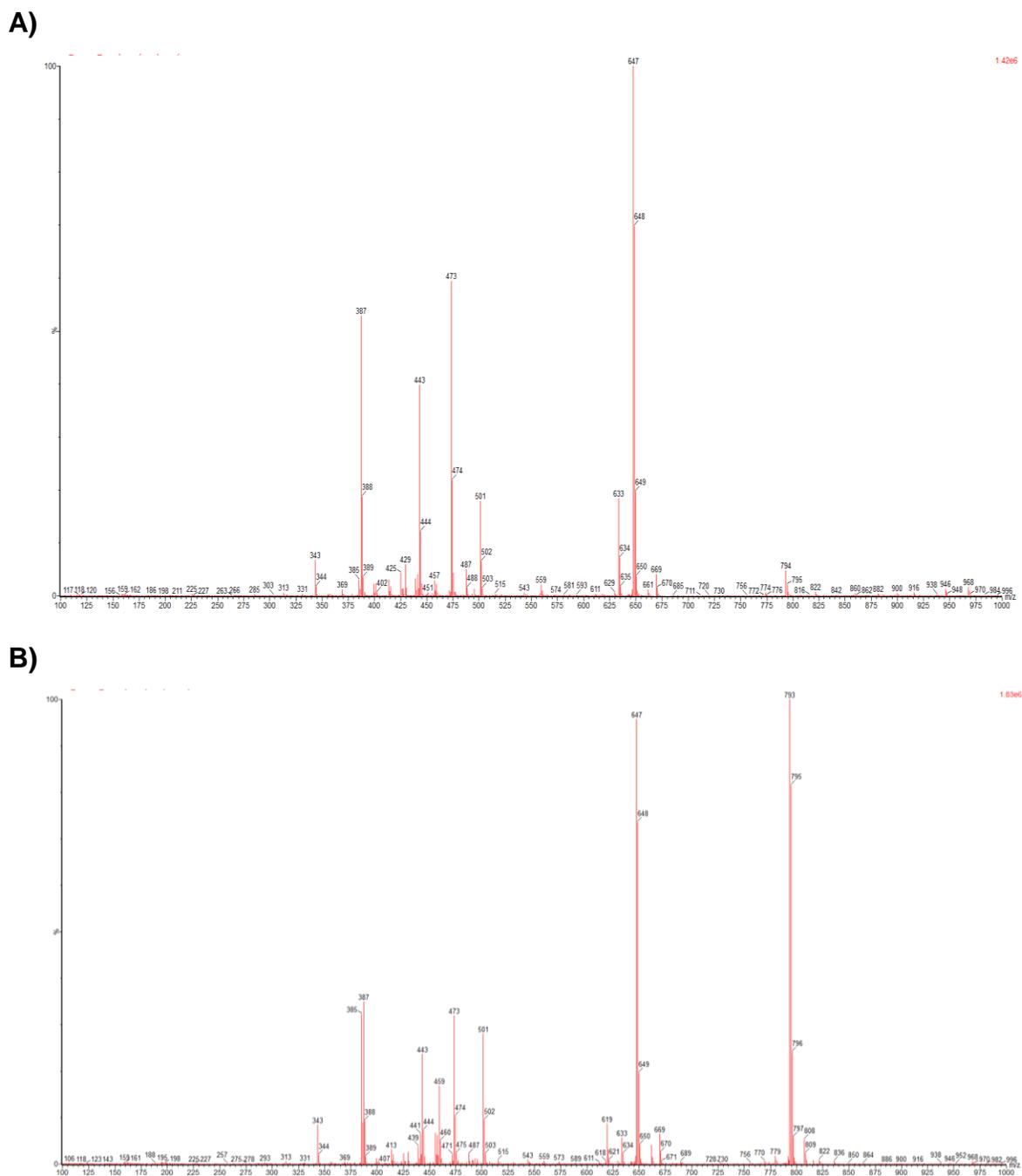


Fig. 13. ES-MS espectro de la de los ramnolípidos derivados de lisina obtenidos a partir de las muestras monoRL (A) y RLmez (B)

Todos los trabajos de síntesis descritos permitieron obtener e identificar 6 muestras de ramnolípidos que se utilizarán en todos los estudios posteriores: **monoRL** compuesto por homólogos de monoramnolípidos, **RLmez** compuesta por mezclas de monoRL y diRL, **monoRL_Arg** compuesta mayoritariamente por homólogos de monoramnolípidos derivados de arginina, **RLmez_Arg** formada por mezclas de mono y diramnolípidos derivados de arginina, **monoRL_Lys** formada principalmente por monoRL derivados de lisina y **RLmez_Lys** compuesta por una mezcla de mono y diramnolípidos derivados de lisina

La resonancia magnética nuclear se utilizó para confirmar la estructura química de todos los ramnolípidos utilizados en este trabajo: los derivados con aminoácidos y sus precursores. El espectro de protón del monoRL (Fig. 14.) muestra claramente las señales correspondientes a las dos partes de esta molécula; las cadenas alquílicas y la ramnosa. Los picos a 0.90, 1.2 y 1.4 ppm indican la presencia del grupo CH₃ y los grupos CH₂ de las dos cadenas alquílicas mientras que las señales que aparecen entre 3.5 y 4.7 ppm son los hidrógenos que corresponden a un anillo de piranosa. Finalmente el pico correspondiente al CH₃ unido al anillo de piranosa se observa a 1.2 ppm. El espectro de ¹³CNMR también indica que los homólogos presentes en esta mezcla contienen una ramnosa y dos cadenas alquílicas; los picos a 172.4 y 174.2 ppm demuestran la presencia de los dos grupos carbonilo, los picos a 14.4 y 23.0-33.0 indican la presencia de las dos cadenas alquílicas y las señales a δ =69.3-100.6 confirman la presencia de una ramnosa en la estructura química. Los espectros monodimensionales de ¹H y ¹³C contienen muchas señales solapadas que no permiten la adecuada asignación de los desplazamientos químicos de todos los protones y todos

los carbonos de la molécula. Por esta razón se utilizaron dos tipos de espectros bidimensionales: el gCOSY espectro en el cual las señales fuera de la diagonal indican acoplamiento entre protones y el gHSQC experimento que relaciona el desplazamiento químico de un protón con el del carbono adyacente (Fig. 15.). A partir de estos dos espectros bidimensionales se ha podido determinar el desplazamiento químico de los protones y los carbonos en la muestra de monoRL (Tabla 2.). En el espectro de ^{13}C de la muestra RLmez, la región correspondiente a las señales de ramnosa contiene más señales de carbono que el espectro correspondiente al monoRL lo cual indica que esta muestra contiene moléculas que poseen dos grupos ramnosa. El gHSQC muestra tres señales correspondientes a carbonos anoméricos de la ramnosa (4.92/99.1, 4.78/104.2, 4.78/100.5) lo cual indica claramente la presencia de monoramnolípidos y diramnolípidos en la muestra. Mediante los espectros mono y bidimensionales y teniendo en cuenta los desplazamientos químicos correspondientes a los monoRL fue posible asignar los desplazamientos químicos de los protones y carbonos de la muestra RLmez (Tabla 2.).

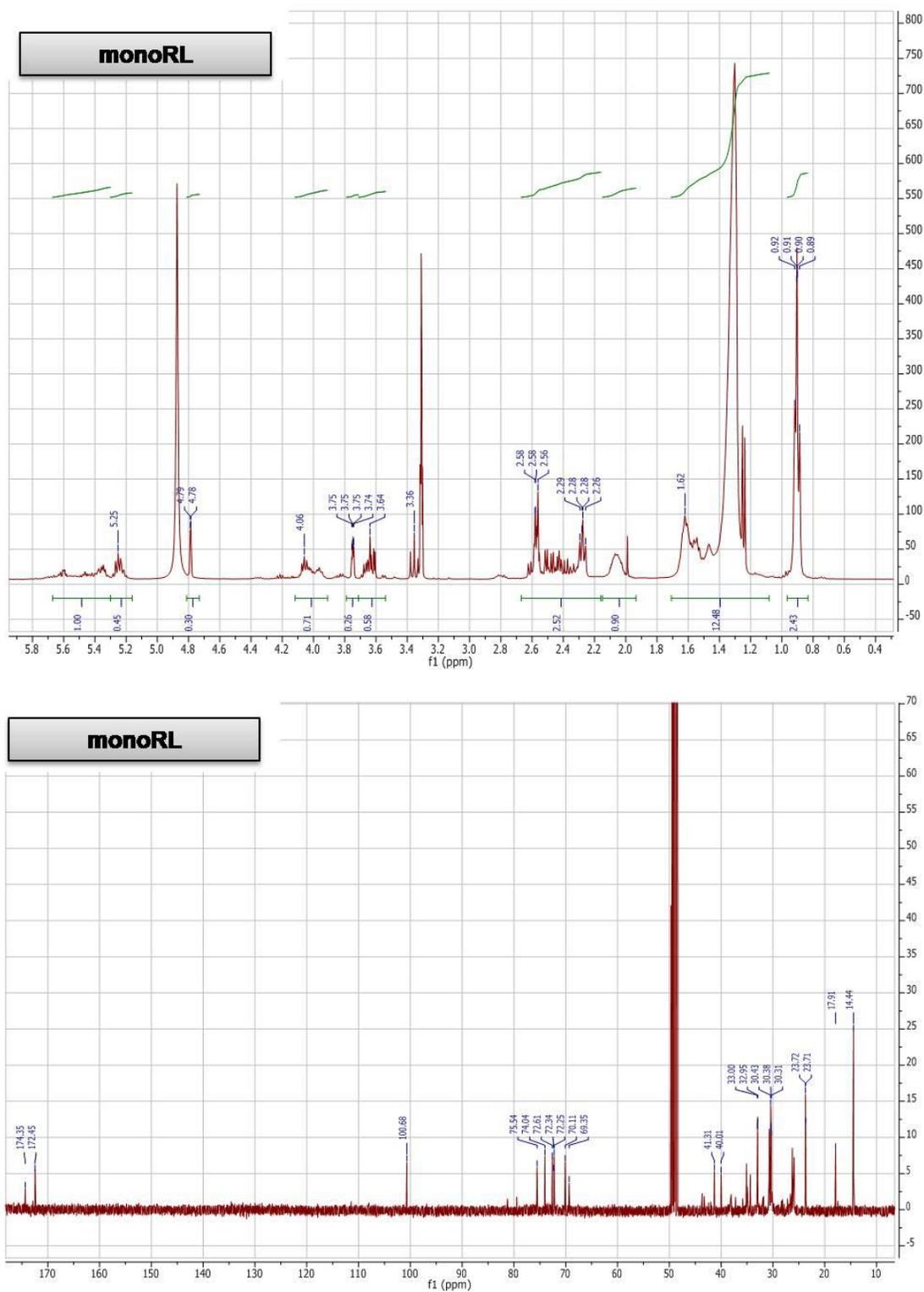


Fig. 14. ¹HNMR, ¹³CNMR de la muestra monoRL

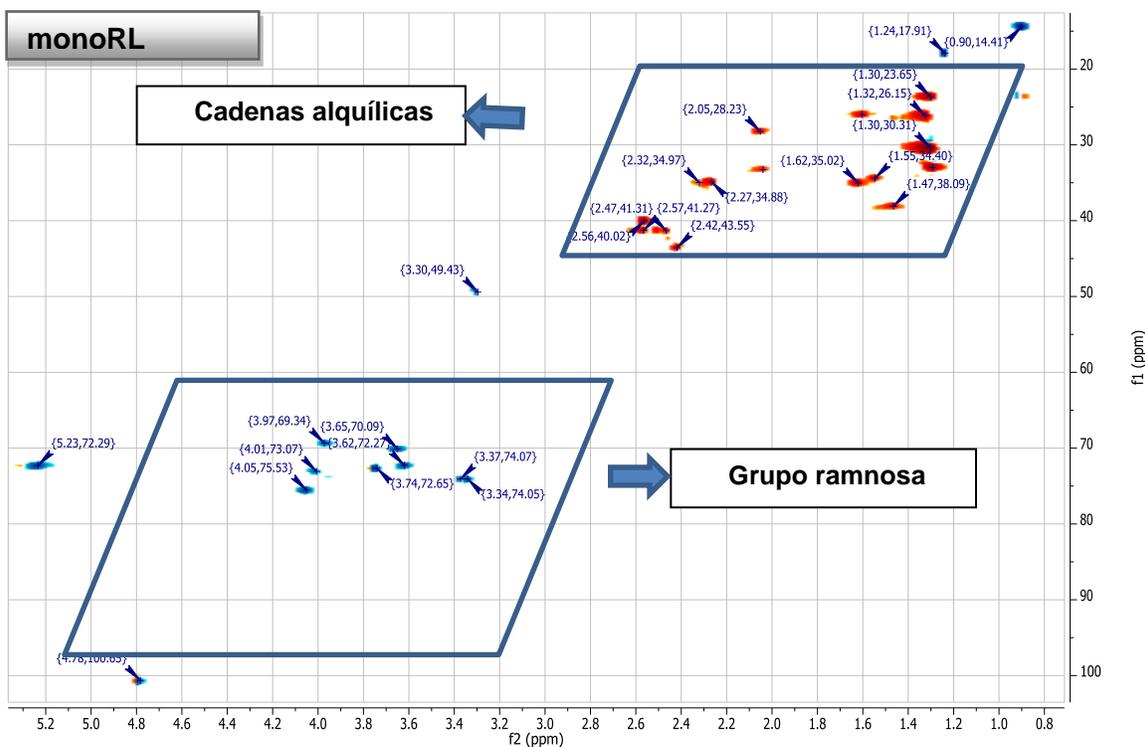
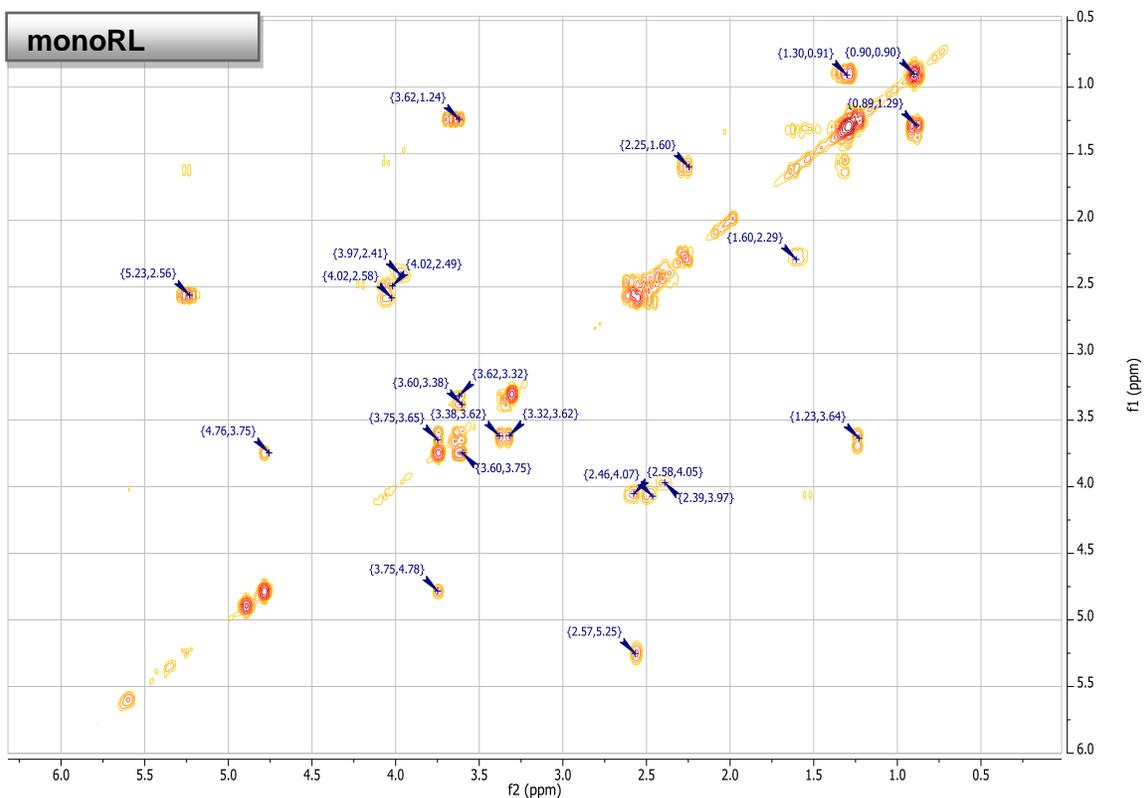


Fig. 15. gCOSOY y gHSQC de la muestra monoRL

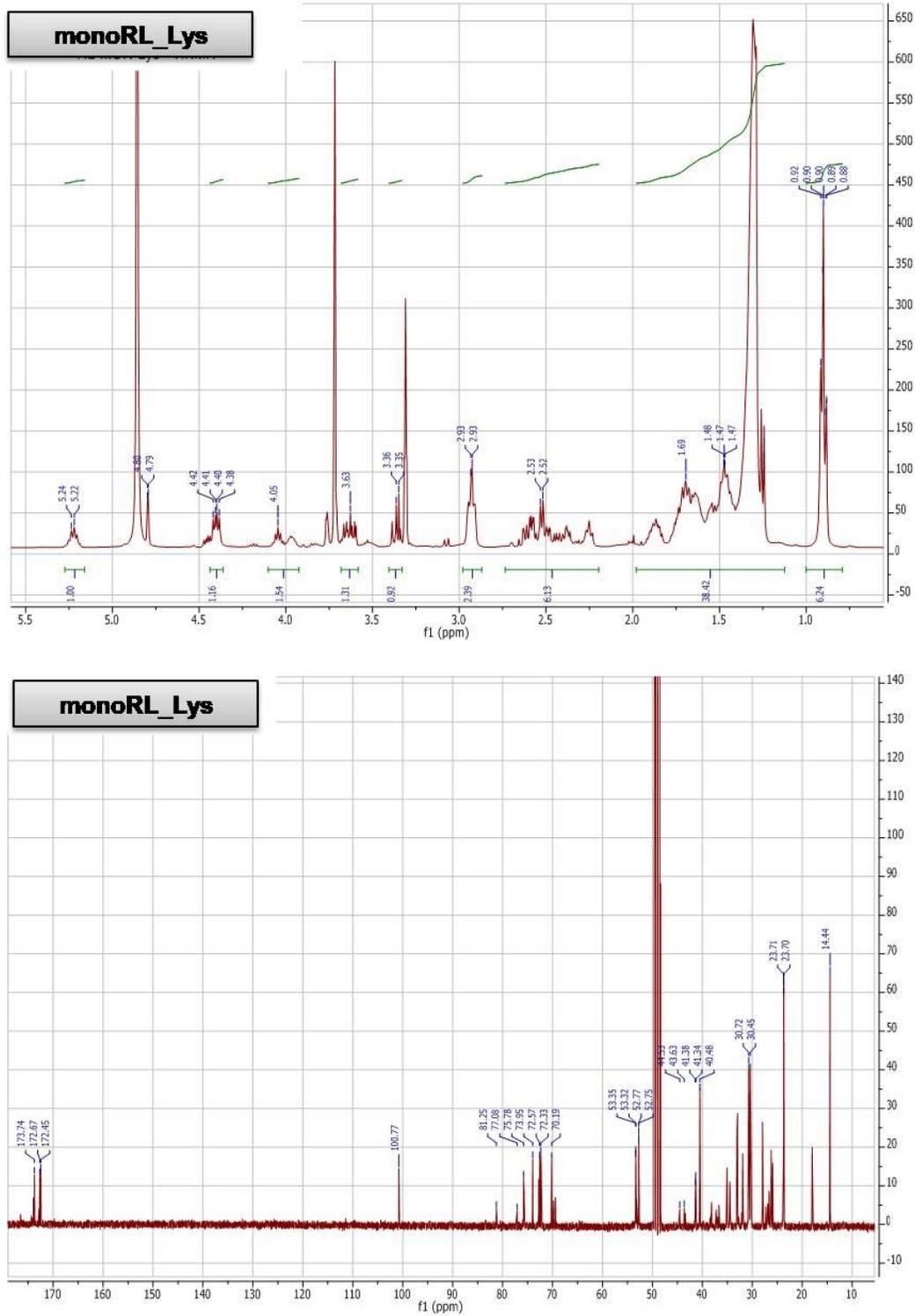


Fig. 16. ¹H NMR, ¹³C NMR de la muestra monoRL_Lys

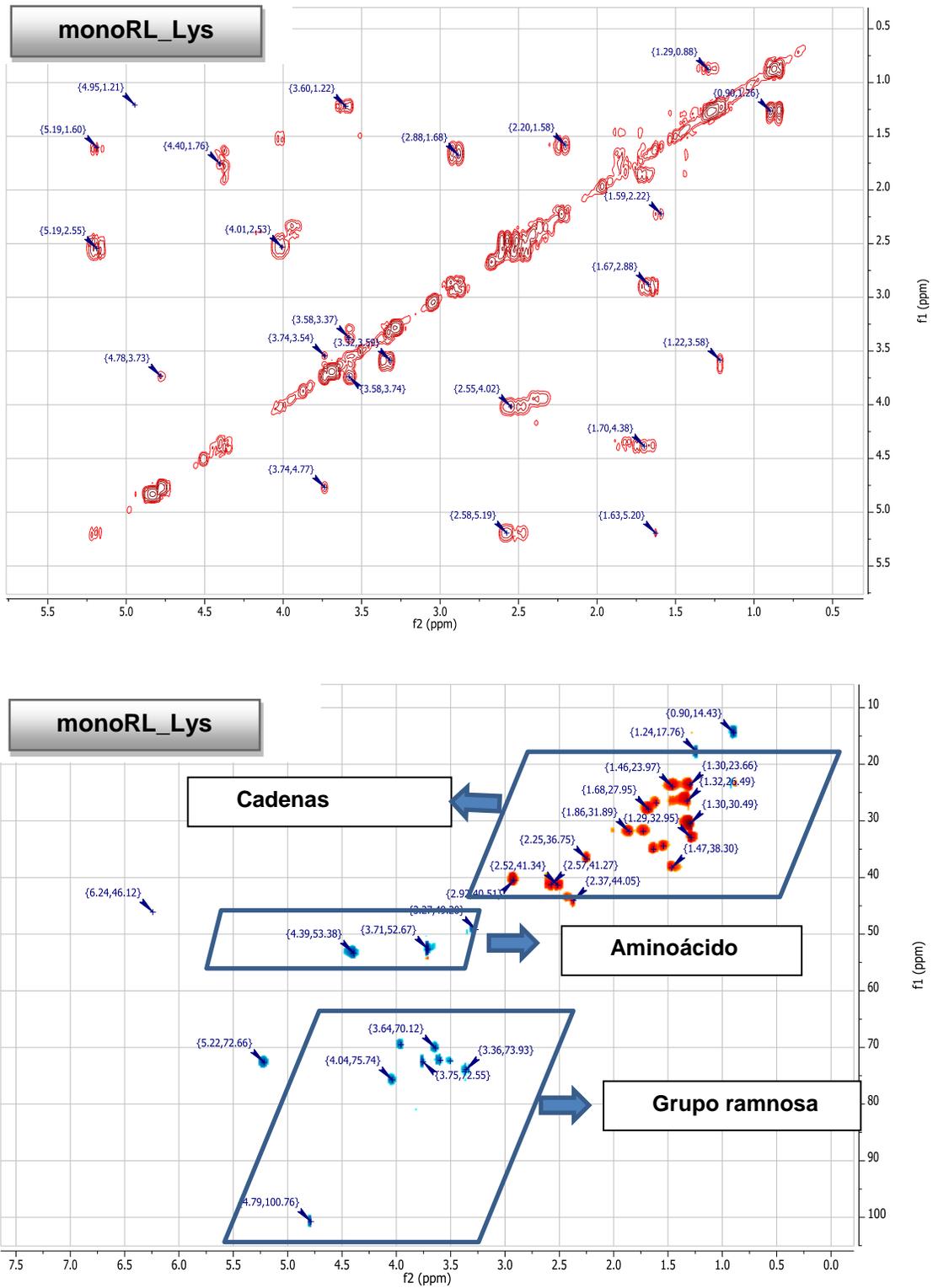


Fig. 17. gCosy y gHSQC de la muestra monoRL_Lys

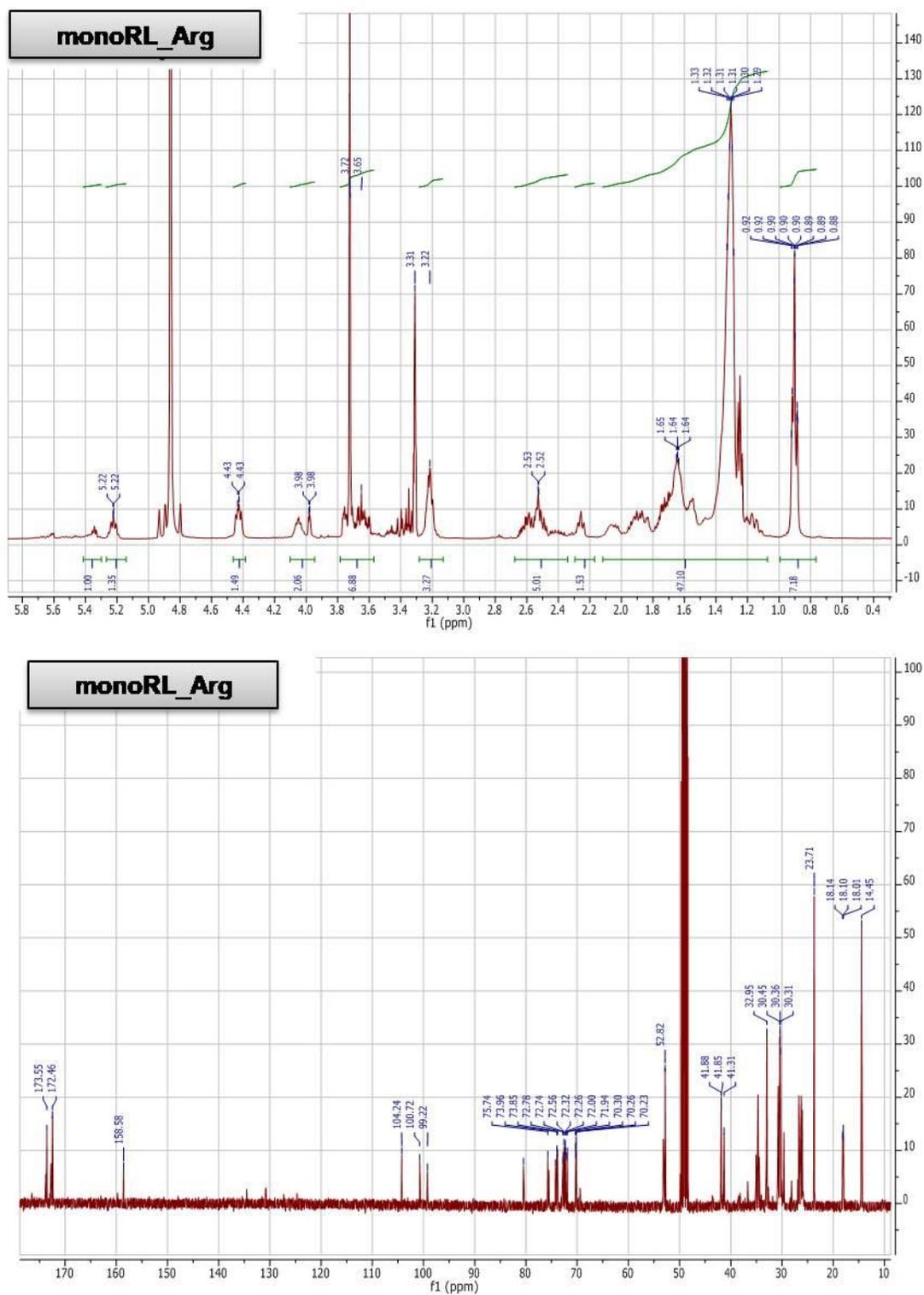


Fig. 18. ¹HNMR, ¹³CNMR de la muestra monoRL_Arg

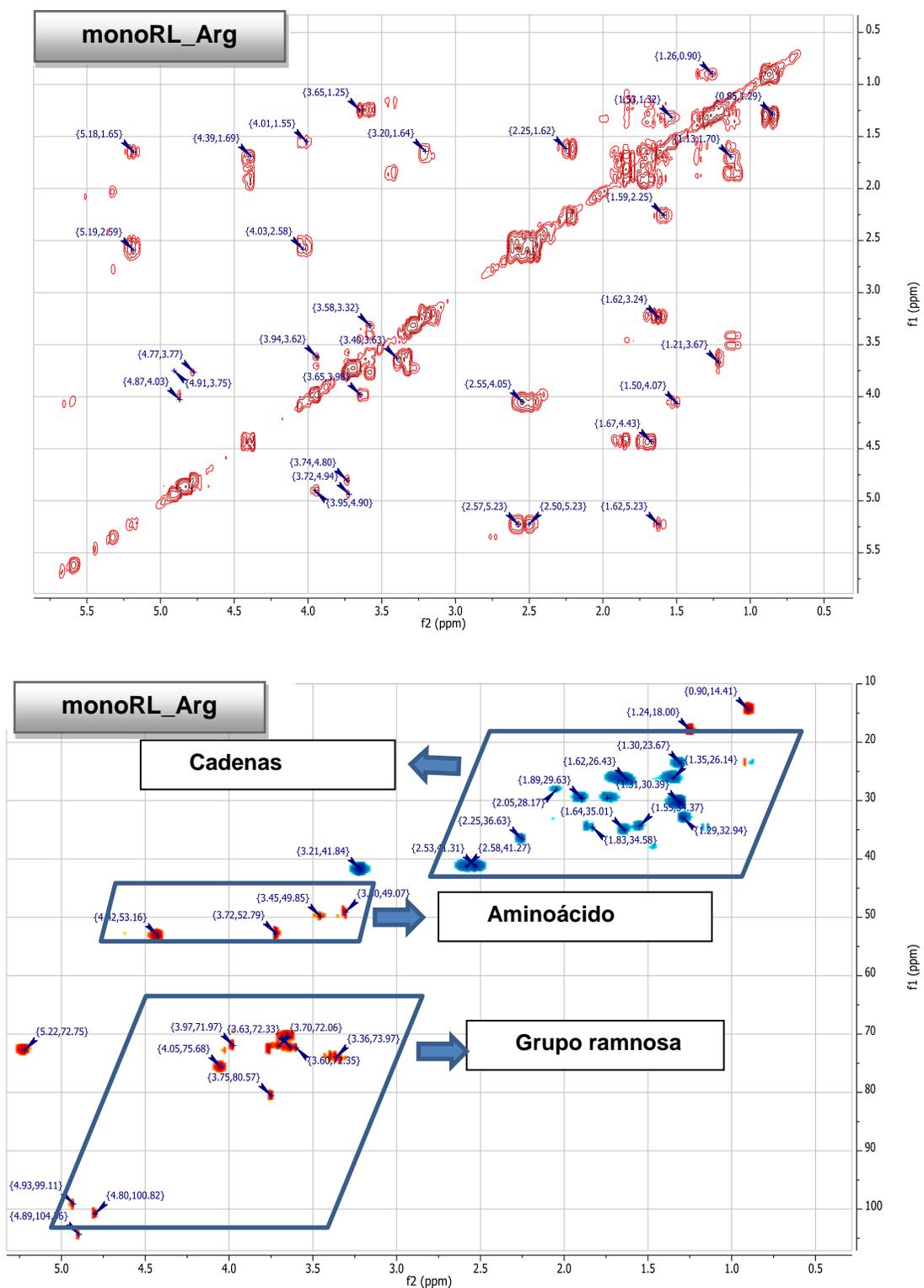


Fig. 19. gCoty y gHSQC de la muestra monoRL_Arg

Tabla 2. Datos espectroscópicos (^1H NMR and ^{13}C NMR) de los monoramnolípidos y sus derivados (arginina y lisina)

	MonoRL		MonoRL_Arg		MonoRL_Lys	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
a	4.78	100.6	4.80	100.8	4.79	100.7
b	3.74	72.6	3.70	72.6	3.75	72.5
c	3.62	72.2			3.76	72.5
d	3.34	74.0	3.36	73.9	3.36	73.9
e	3.65	70.0	3.64	70.1	3.64	70.1
f	1.2	17.9	1.24	18.0	1.24	17.7
1	4.05	75.5	4.05	75.7	4.04	75.7
2	2.57	41.2	2.51	41.3	2.5	41.3
3	---	172.4	---	172.4	----	172.4
4	5.23	72.2	5.22	72.7	5.22	72.6
5	2.56	40.0	2.58	41.3	2.57	41.3
6	---	174.2	----	172.7	----	172.6
7			4.42	53.1	4.39	53.2
8			---	173.5	----	173.4
9			3.72	52.8	3.71	52.3
10			3.21	41.6	2.92	40.4
11			---	158.6		

Los espectros de resonancia de los derivados de lisina y arginina obtenidos con la muestra de monoRL también confirman la estructura propuesta (Figs. 16 y 18). El

espectro de protón muestra un multiplete a aproximadamente 4 ppm y un singulete a 3.7 ppm que corresponden al carbono anomérico CH y al grupo CH₃ del aminoácido respectivamente. El espectro de protón se ha llevado a cabo con un tiempo de relajación de 25 s, suficiente para permitir que todos los protones de la molécula relajen completamente antes de cada pulso, por lo cual se pueden comparar correctamente las integraciones obtenidas en el espectro. La relación de las integrales de la señal de CH₃ o CH de la arginina o lisina con la señal de CH₃ correspondiente a las cadenas alquílicas indica que prácticamente todos los ramnolípidos han sido derivatizados. Esto concuerda con el espectro de masas, en el cual no se observaba señales significativas correspondientes a los ramnolípidos precursores. Los espectros de carbono también contienen las señales que indican la presencia de los aminoácidos en la estructura química de estos compuestos; el carbono anomérico a 53.1 ppm, el éster metílico CH₃ a 52.8 ppm y el carbono del grupo guanidino de la arginina a 158.6 ppm (Figs. 17 y 19).

Los resultados obtenidos para los derivados de aminoácidos preparados con la muestra RLmez son similares y también confirman que el producto contiene los monoramnolípidos y diramnolípidos derivados de lisina y arginina propuestos (Figs. 20, 21, 22, 23, 24, y 25).

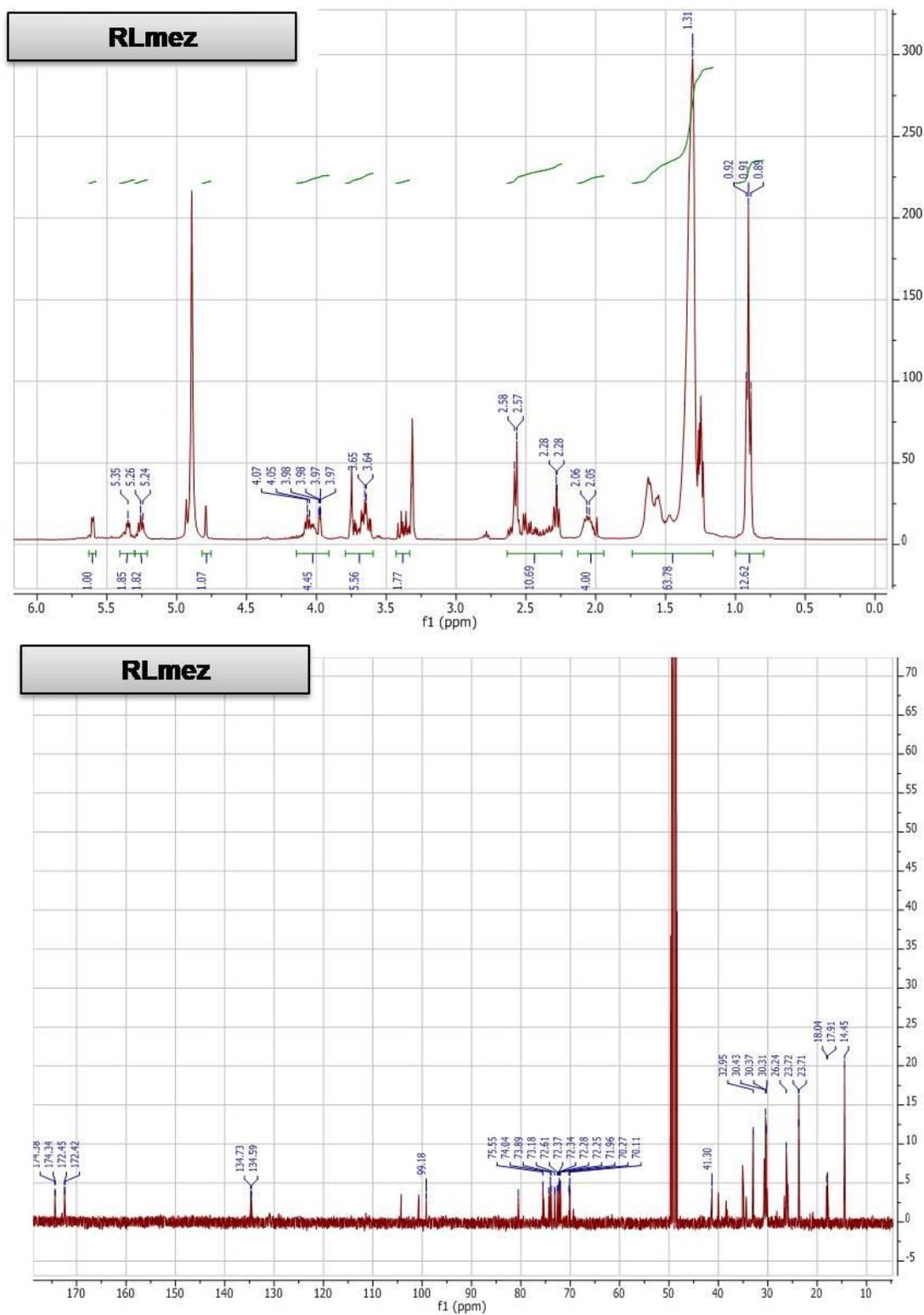


Fig. 20. ¹H NMR y ¹³C NMR, de la muestra RLmez

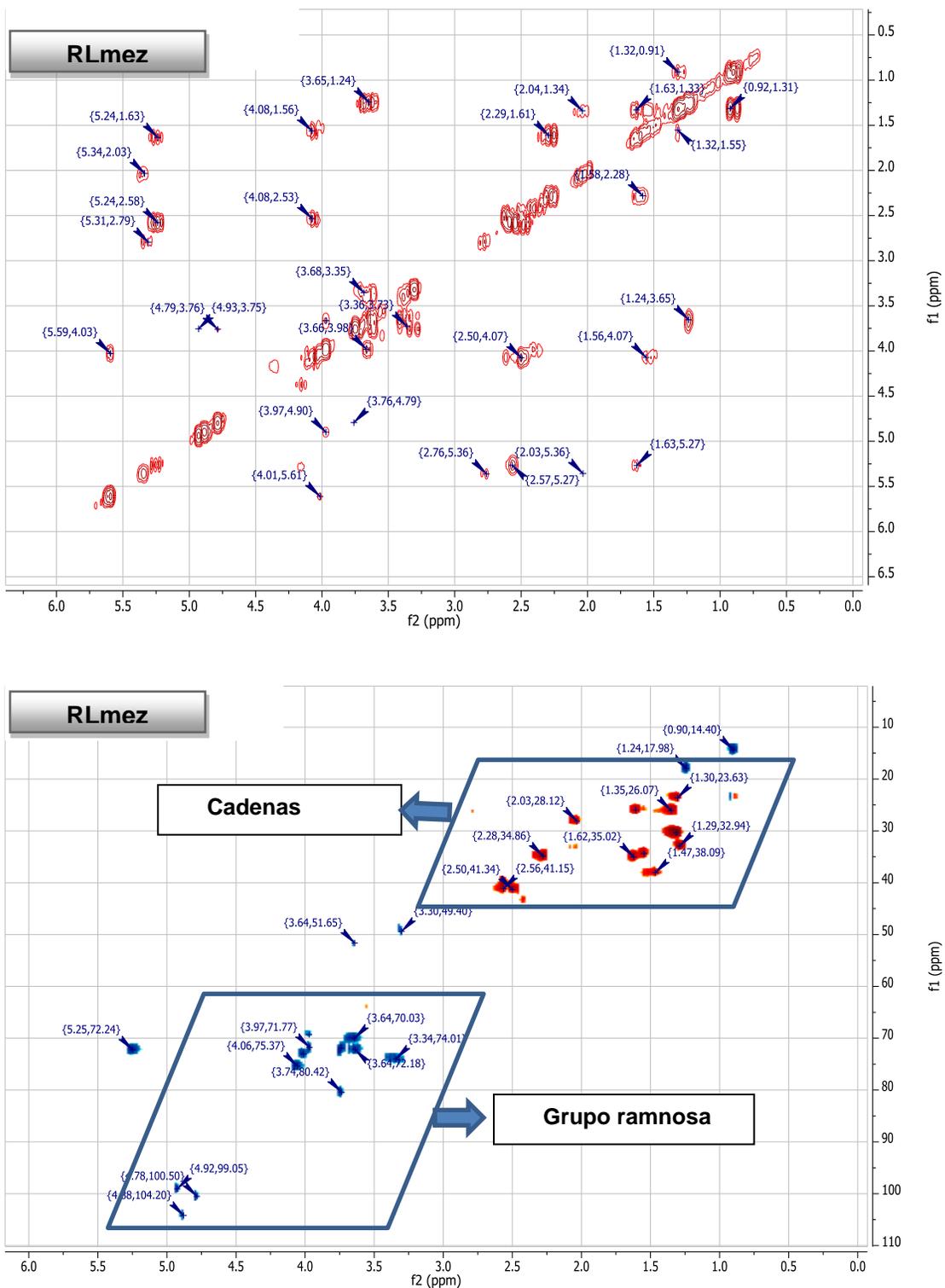


Fig. 21. gCoty y gHSQC de la muestra RLmez

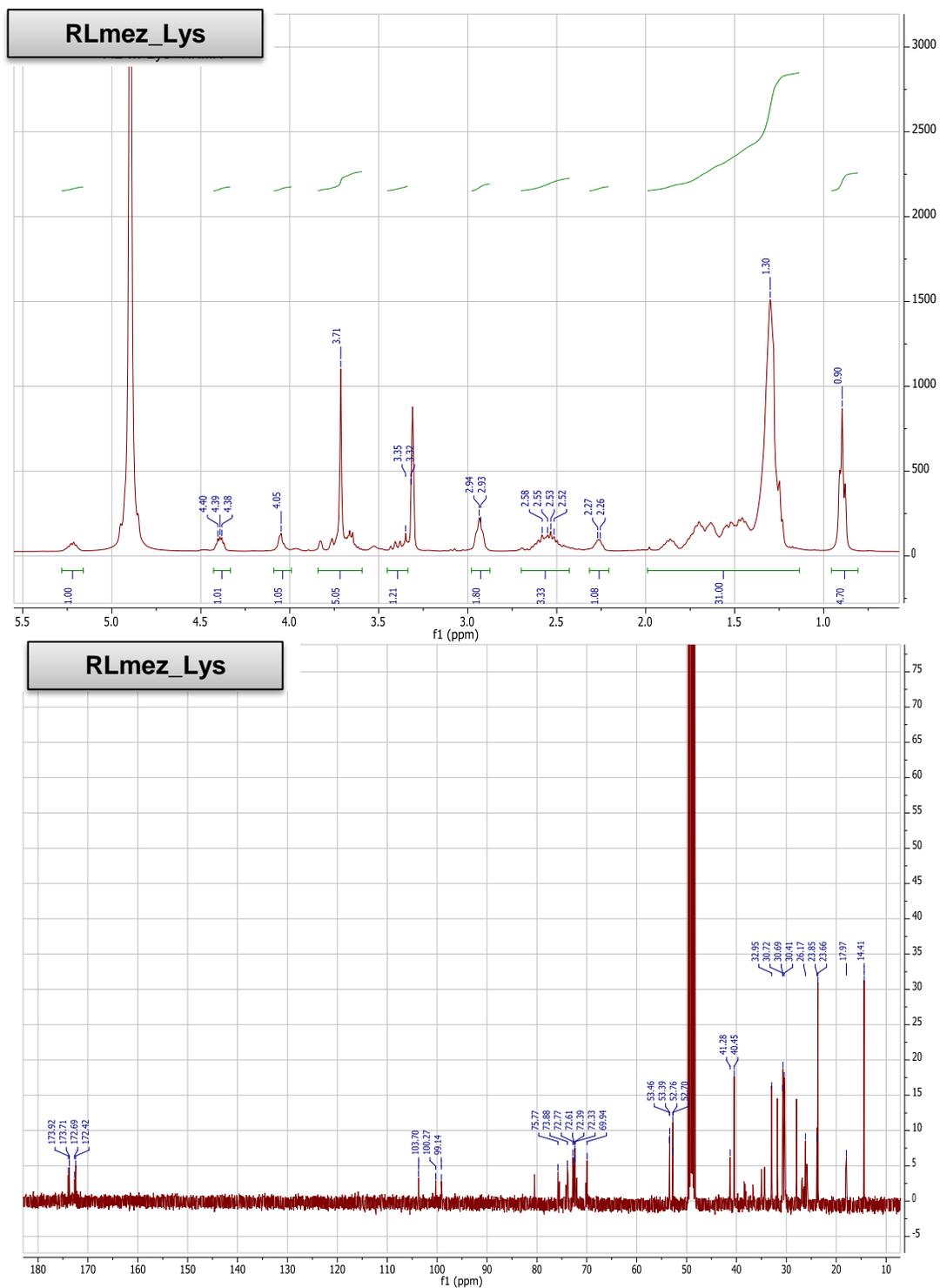


Fig. 22. ^1H NMR y ^{13}C NMR, de la muestra RLmez_Lys

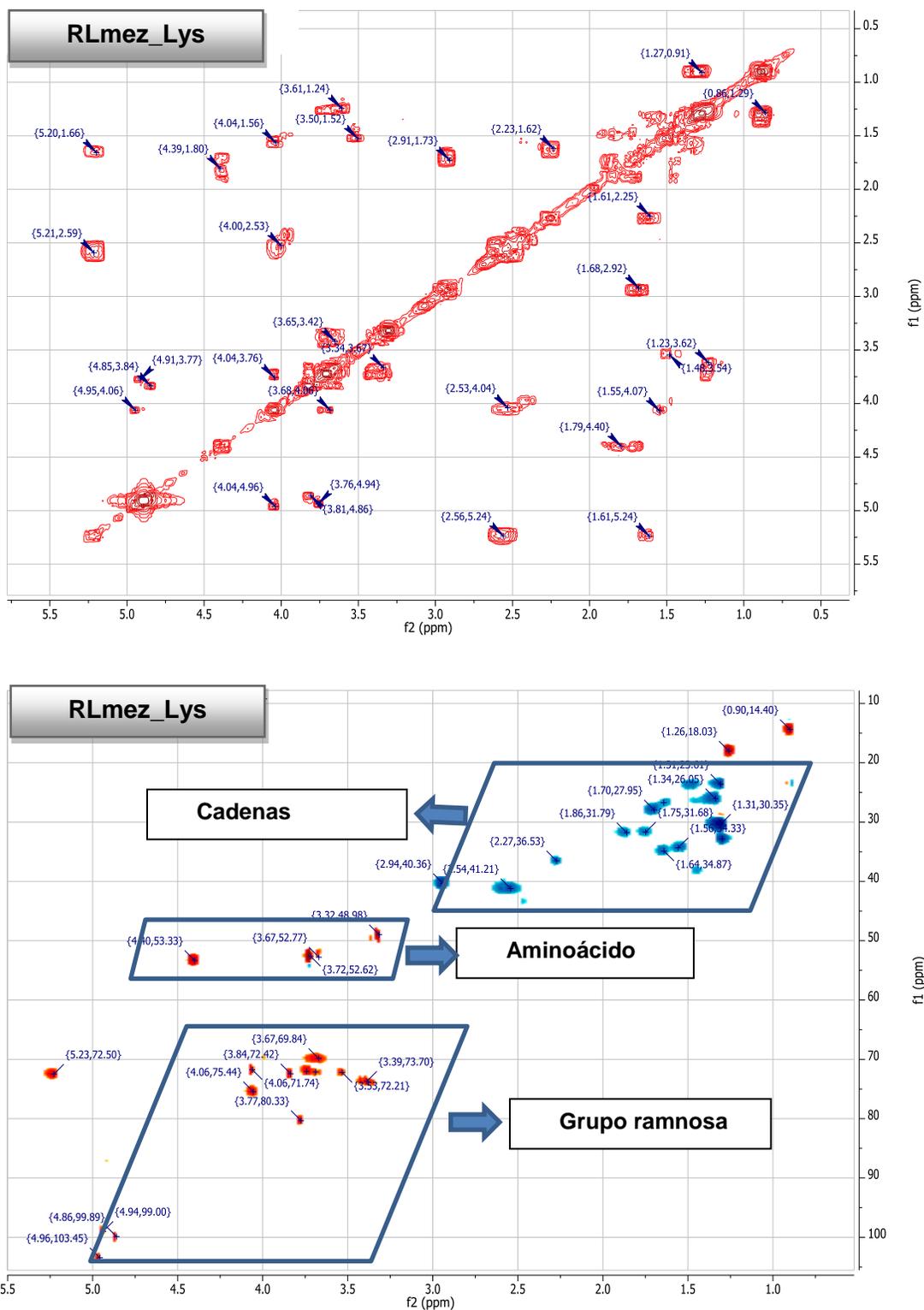


Fig. 23. gCOSY y gHSQC de la muestra RLmez_Lys

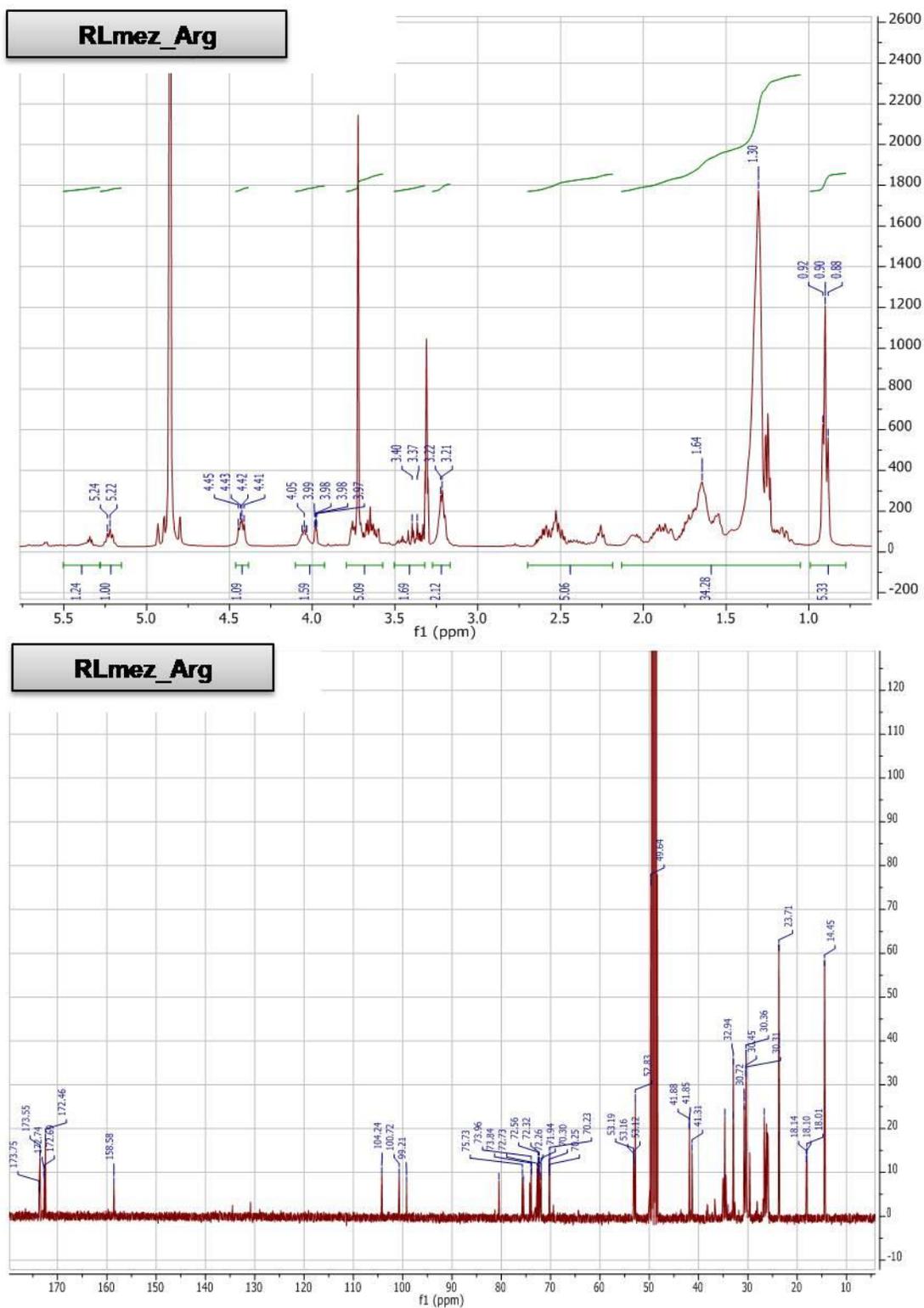


Fig. 24. ¹H NMR y ¹³C NMR, de la muestra RLmez_Arg

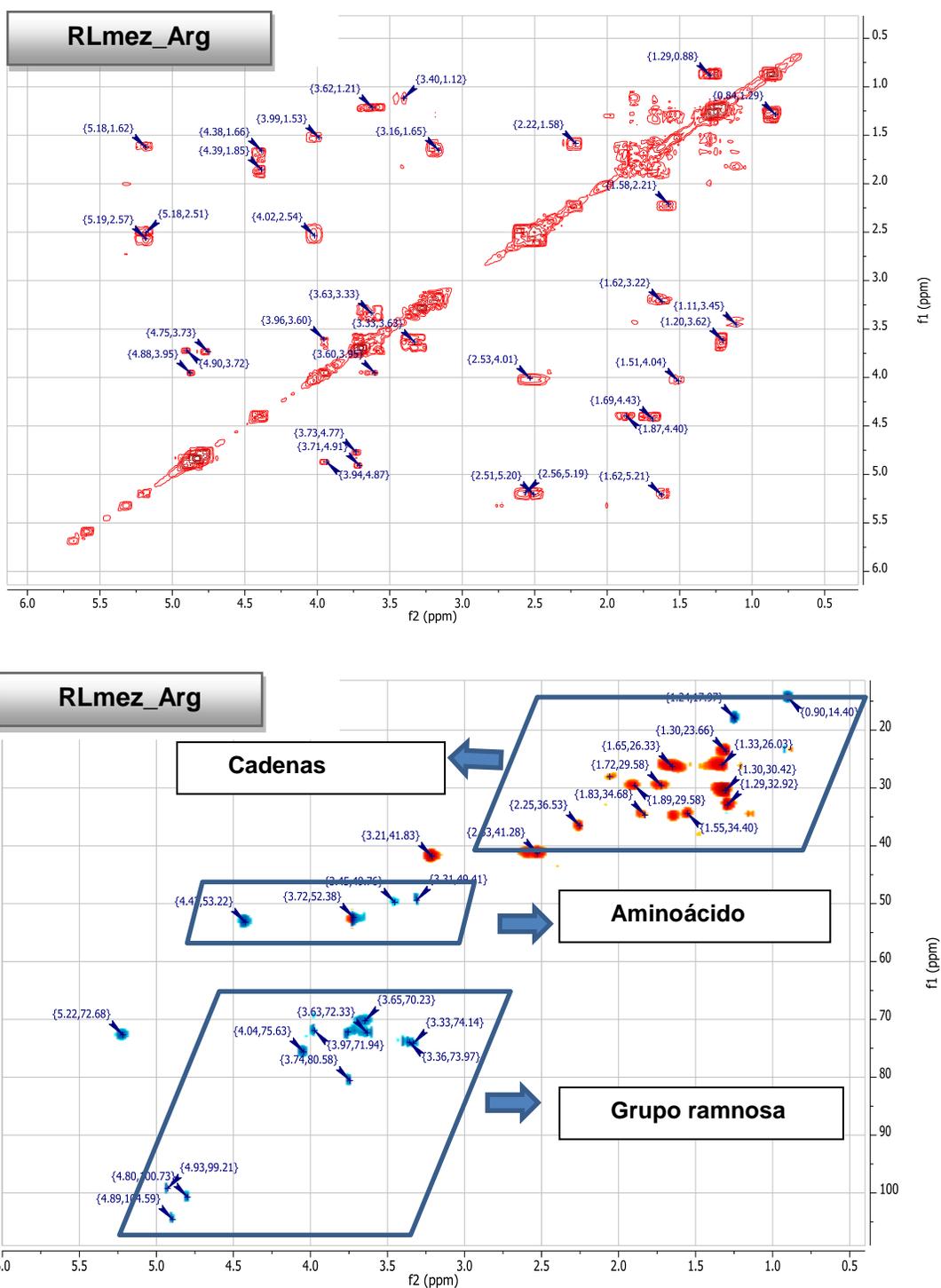


Fig. 25. gCosy y gHSQC de la muestra RLmez_Arg

Tabla 3. Datos espectroscópicos (^1H NMR and ^{13}C NMR) de los diramnolípidos y sus derivados (arginina y lisina)

	diRL		diRL_Arg		diRL_Lys	
	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$
a	4.92	99.1	4.93	99.2	4.97	99.1
b	3.74	80.5	3.72	80.5	3.77	80.5
c	3.36		3.58			
d			3.33	74.1	3.34	73.7
e	3.65	70.1	3.62	70.2	3.63	69.9
f	1.24	18.0	1.24	17.9	1.26	18.1
a'	4.88	104.2	4.89	104.5	4.96	103.7
b'	3.97	69.3	3.97	71.9	4.04	71.7
c'	3.65	70.03	3.60	72.3	3.76	72.2
d'	3.34	74.0	3.33	73.9	3.42	73.7
e'	3.65	70.2	3.62	70.2	3.61	69.8
f'	1.24	18.0	1.24	17.9	1.26	18.1
1	4.06	75.3	4.04	75.36	4.06	75.4
2	2.50	41.2	2.54	41.2	2.5	41.2
3	---	172.4	----		---	172.4
4	5.2	72.4	5.22	72.6	5.2	72.5
5	2.57	41.3	2.57	41.2	2.50	41.2
6	----	174.3	----		----	172.6
7			4.42	53.2	4.04	53.4
8			----		----	173.9
9			3.72	52.8	3.72	52.8
10			3.21	41.8	2.94	40.3

4.3. Propiedades Fisicoquímicas

Una de las propiedades más importantes de los tensioactivos es su tendencia a adsorberse en las interfaces modificando la tensión superficial o interfacial de las mismas en función de las características de la monocapa formada. Otra de las características de los tensioactivos, alternativa a la adsorción para separar grupos hidrófobos del contacto con agua, es su capacidad de formación de agregados moleculares. Se produce en el seno de la disolución cuando la interfase está saturada de monómeros de tensioactivo a una concentración denominada Concentración Micelar Crítica (CMC) (Rosen et al., 2004). La CMC constituye un parámetro característico de cada tensioactivo.

El tipo de agregados que forman los tensioactivos depende del parámetro crítico de empaquetamiento cuyo valor está determinado por el cociente entre el volumen, la zona hidrófoba del tensioactivo (v) y el producto de la longitud de la cadena alquílica (l) por el área del grupo polar (a): $(v/a \times l)$ (Israelachvili et al., 1976). Generalmente, el valor de este parámetro para tensioactivos con un grupo polar y dos cadenas hidrófobas está entre 0.5 y 1, por lo que los compuestos anfífilos con estas características estructurales forman normalmente vesículas en vez de micelas.

Teniendo en cuenta la estructura química de los compuestos estudiados en este trabajo, es de esperar que formen vesículas en vez de micelas, por lo que a la concentración a la que aparecen agregados en solución se la denominará Concentración de Agregación Crítica (CAC) en lugar de CMC. Algunas propiedades de los tensioactivos como son la tensión superficial, la conductividad, el pH o la

fluorescencia experimentan cambios bruscos en la tendencia de su comportamiento a valores de concentración superiores a la CAC. La primera técnica utilizada en este trabajo para determinar la CAC de los ramnolípidos y sus derivados fue la fluorescencia. Esta técnica es muy utilizada para estudiar las propiedades de sistemas micelares ya que permite obtener información acerca de la polaridad del entorno que rodea a las moléculas fluorescentes. Como sonda fluorescente se utilizó el pireno. Esta sonda es muy útil para este tipo de sistemas porque presenta un alto rendimiento cuántico de fluorescencia y larga vida media en el estado singlete excitado. Además, el espectro de pireno es muy sensible a la polaridad del medio que rodea la sonda. La relación de dos de las bandas del espectro de emisión I_1/I_{III} cambia bruscamente cuando cambia la polaridad del medio por lo que es una sonda muy adecuada para este tipo de estudios (García et al., 2013).

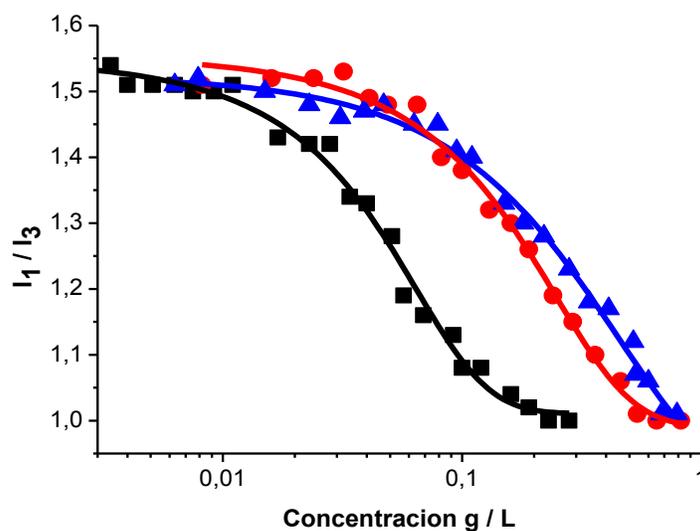


Fig. 26. Variación de I_1/I_{III} en función de la concentración para las muestras de RLmez (■), RLmez_Lys (▲) y RLmez_Arg (●)

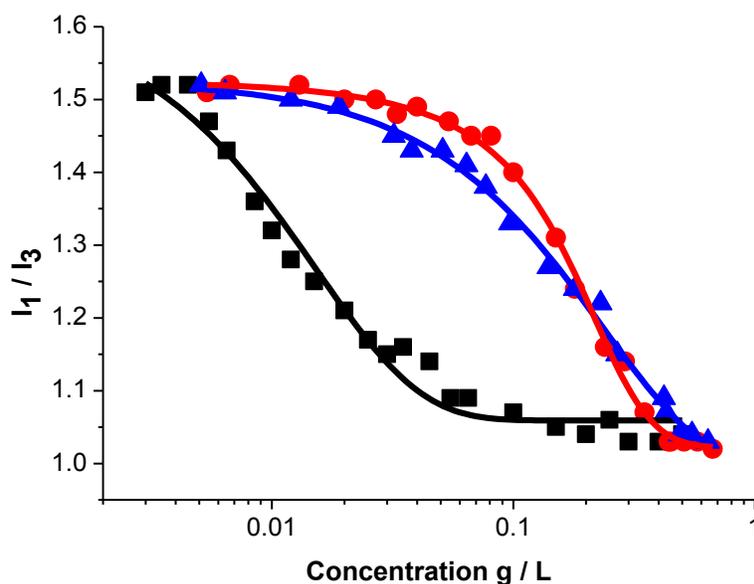


Fig. 27. Variación de I_1/I_3 en función de la concentración para las muestras de monoRL (■), monoRL_Lys (▲) y monoRL_Arg (●)

En las [figuras 26 y 27](#) se muestran las curvas obtenidas al representar la relación I_1/I_3 frente a la concentración de las muestras de ramnolípidos en solución acuosa. A concentraciones muy diluidas la relación I_1/I_3 es aproximadamente 1.6, el valor que presenta cuando el pireno está disuelto en agua. A partir de una determinada concentración se observa una brusca disminución de la relación I_1/I_3 , esto indica que en el seno de la disolución han aparecido agregados moleculares capaces de solubilizar en su interior la molécula de pireno. El cambio de polaridad que sufren las moléculas de la sonda de pireno hace que la relación I_1/I_3 disminuya, lo cual permite determinar el valor de la CAC. Los datos obtenidos se han ajustado utilizando una curva sigmoideal de tipo Boltzmann y el valor de la CAC se ha tomado en el punto medio de transición ([Tabla 4](#)).

Tabla 4. Valores de CAC y relación I_1/I_3 para los ramnolípidos y sus derivados de arginina y lisina

Biotensioactivo	CAC (g / L)	I_1 / I_3
RLmez	0.05	1.26
RLmez_Arginina	0.18	1.26
RLmez_Lisina	0.23	1.26
monoRL	0.02	1.26
monoRL_Arginina	0.17	1.26
monoRL_Lisina	0.14	1.26

Como puede observarse en la [tabla 4](#) las muestras de monoRL y RLmez forman agregados a concentraciones muy bajas. La CAC de la muestra de monoRL es inferior a la de RLmez probablemente debido a que el carácter hidrófobo de los RLmez es menor como consecuencia de los dos grupos ramnosa presentes en su grupo polar. La CAC de los ramnolípidos precursores utilizados en este trabajo entra dentro del amplio rango de valores de CAC (1-400 mg/L) que pueden encontrarse publicados en la literatura ([Zhang et al., 1992](#), [Dubeau et al., 2009](#)). La gran variabilidad de la CAC de este tipo de biotensioactivos se debe a que este parámetro está afectado por diferentes factores que pueden variar en este tipo de compuestos: la composición de la muestra, el pH, la fuerza iónica del medio, el número de homólogos y la relación entre ellos y la presencia de compuestos con cadenas alquílicas insaturadas. Un ejemplo de esta

variabilidad se encuentra en las siguientes referencias: para diferentes mezclas de monoRL y diRL Benicasa et al., encontró un valor de CAC de 120 mg/L, (Benincasa et al., 2004) Mata-Sandoval et al., de 53 mg/L (Mata-Sandoval et al., 1999) y Abalos et al., publicó valores de CAC de 230, 106, 150 y 234 mg/L para muestras de ramnolípidos obtenidos a partir de residuos de aceite de soja (Abalos et al., 2001).

Como se ha comentado anteriormente el pH es otro de los factores que afecta a la CAC de este tipo de biotensioactivos; la CAC de diRL a pH=7.4 en un medio 100 mM de NaCl resultó ser de 0.110 mM (Sanchez et al., 2007). En el caso de monoRL en la literatura se encontró un valor de CAC de 0.070 mM a pH=7.4, 0.050 mM a pH=4 (Abbasi et al., 2013), 0.15 a pH=6.5 (Peker et al., 2003) y 0.1 mM a pH=6.8 (Ozdemir et al., 2004). Chen et al. también estudiaron como afecta el pH a los valores de CAC de los ramnolípidos; mediante medidas de tensión superficial calcularon la CAC de muestras de RL en diferentes condiciones (Chen et al., 2010). Para monoRL y diRL en agua pura encontró un valor de CAC de 0.04 y 0.07 mM respectivamente mientras que para la fracción de monoRL la CAC aumentaba al aumentar el pH, 0.18 mM a pH=7 y 0.36 mM a pH=9. También se ha observado en la literatura que incluso utilizando el mismo ramnólípido comercial de Jeneil se encontraron valores discrepantes de CAC: Zhong et al., publicó un valor de CAC de 0.12 mM a pH=6.8 para la fracción de monoRL y 0.07 mM para la de diRL (Zhong et al., 2008). Sin embargo Chen et al., encontró un valor de 0.18 mM a pH=7 para el monoRL y 0.11 para el diRL (Chen et al., 2010). La desviación de valores de CAC encontrada puede ser debida a la pureza de las muestras; los ramnolípidos producidos por *Pseudomonas* contienen numerosos homólogos por lo que conseguir aislar un solo componente es muy difícil. Debido a

esto, diferentes lotes comerciales del mismo producto pueden no ser exactamente igual en composición lo cual da lugar a estas ciertas diferencias en el proceso de agregación.

Los RLs derivados de arginina y lisina también son capaces de formar agregados en solución acuosa a concentraciones muy bajas. Los valores de CAC de estos RLs catiónicos son superiores a los de sus precursores. Esta diferencia es debida al diferente carácter iónico de estos compuestos. Tanto los RLs precursores como sus derivados catiónicos son tensioactivos cuya carga depende del pH. Sin embargo, en las condiciones de trabajo los RLs aniónicos prácticamente no presentan carga mientras que los derivados de arginina y lisina poseen carga positiva. Los ramnolípidos son biotensioactivos formados por dos cadenas alquílicas, una o dos ramnosas y un grupo carbonilo. Dada su estructura química el carácter iónico de estos compuestos depende del pH del medio y del valor de su pKa. Según la bibliografía, el pKa de monoRL es 5.9 mientras que el de diRL es 5.6 ([Ishigami et al., 1987](#)). Esto significa que a valores de pH inferiores a 4.6 más del 97% de las moléculas están en forma no-iónica mientras que a pH superiores a 6.6 más del 97% de las moléculas presentes en el medio están negativamente cargadas. A pH entre 4.6 y 6.6 existen en solución moléculas de biotensioactivo que poseen carga y moléculas no iónicas. El bajo carácter iónico de los ramnolípidos fue confirmado por Chen et al., ([Chen et al., 2010](#)). Estos autores vieron que la CAC de los RL no cambiaba al añadir NaCl. Los derivados de ramnolípidos sintetizados en este trabajo poseen carácter catiónico, la arginina está cargada positivamente en el grupo guanidino mientras que en la lisina la carga positiva está situada en el grupo ϵ -amino. El pKa del grupo guanidino es de 12.5 y el del grupo

amino de la lisina de 10.5. Teniendo en cuenta que el pKa de los aminoácidos disminuye de 1 a 2 unidades al introducir un grupo hidrófobo (Colomer et al., 2012) es de esperar que el pKa de estos nuevos compuestos no sea inferior a 8. La [tabla 5](#) muestra los valores de pH de las soluciones acuosas de los RLs catiónicos. Dado el valor de pKa previsto, a estos valores de pH prácticamente todas las moléculas de RL se encuentran cargadas positivamente.

Los valores de CAC de los derivados basados en arginina y lisina son similares lo que sugiere que el balance hidrófilo/lipófilo de todos estos compuestos es similar; parece ser que la presencia de las dos cadenas alquílicas y una carga positiva, factor estructural común a todos los derivados, son los parámetros que gobiernan el proceso de agregación de estos compuestos. La relación I1/I3 también indica la polaridad del medio donde está situada la sonda fluorescente. Como puede verse en la [tabla 4](#), para concentraciones superiores a la CAC esta relación es similar para todos los compuestos, lo cual indica que la polaridad de los dominios hidrófobos de los agregados formados por los diferentes compuestos es similar.

Tabla 5. pH a 25 °C de soluciones acuosas de ramnolípidos y sus derivados de arginina y lisina

RLmez		RLmez_arginina		RLmez_lisina	
mg / mL	pH	mg / mL	pH	mg / mL	pH
0,0057	5,4	0,0074	6,1	0,0072	5,7
0,011	5,3	0,022	5,5	0,016	5,7
0,1	5,0	0,1	5,3	0,1	5,5
0,2	4,9	0,2	4,9	0,2	5,2
monoRL		monoRL_arginina		monoRL_lisina	
mg / mL	pH	mg / mL	pH	mg / mL	pH
0,005	5,3	0,0067	6,1	0,0097	6,1
0,01	5,2	0,02	5,9	0,019	5,6
0,1	4,7	0,1	4,8	0,1	5,3
0,2	4,6	0,2	4,4	0,2	4,9

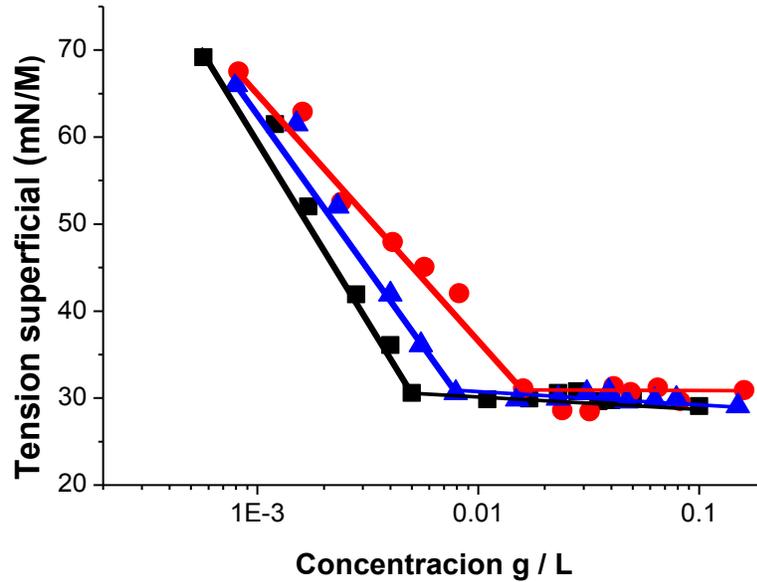


Fig. 28. Isotermas de adsorción superficial frente a logaritmo de concentración a 25 °C para la muestra de RLmez (■),RLmez_Lys (▲) y RLmez_Arg (●)

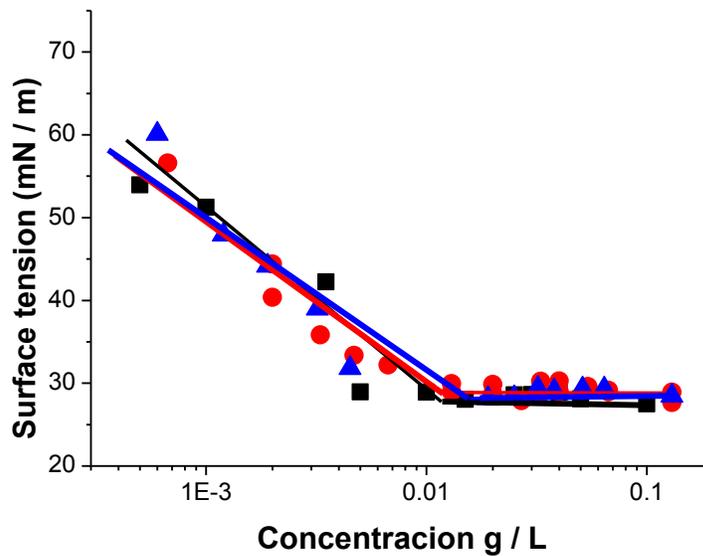


Fig. 29. Isotermas de adsorción superficial frente a logaritmo de concentración para la muestra de monoRL (■), monoRL_Lys (▲) y monoRL_Arg (●)

La determinación de la CMC se llevó también a cabo mediante medidas de tensión superficial. Esta técnica permite, además, estudiar el proceso de adsorción de estos biotensioactivos en la interfase agua/ aire. Como puede apreciarse, [figuras 28 y 29](#), las curvas de tensión superficial frente a concentración muestran el comportamiento típico de los tensioactivos: a concentraciones muy diluidas la tensión superficial disminuye a medida que aumente la concentración dando lugar a una recta de pendiente negativa, a partir de una determinada concentración la tensión superficial permanece constante dando lugar a una recta de pendiente aproximada de cero. La zona de corte de estas rectas se ha tomado como la CAC ([Tabla 6.](#))

Como puede verse en las [Tablas 4 y 6](#) los valores de CAC calculados mediante tensiometría son inferiores a los calculados a partir de medidas de fluorescencia, especialmente en el caso de los tensioactivos derivados de aminoácidos.

Este comportamiento es similar al encontrado para tensioactivos catiónicos derivados de arginina con estructura glicerolípídica o geminal ([Pinazo et al., 2016](#)), para tensioactivos catiónicos geminales con grupos polares formados por piridinium ([Bhadani et al., 2009](#)), y para tensioactivos triméricos ([Yoshimura et al., 2003](#)). En todos los casos se trata de compuestos con dos o más cadenas alquílicas. Este comportamiento parece ser debido a la formación de agregados premicelares que no pueden solubilizar en su interior la sonda de pireno. De hecho, mediante un estudio llevado a cabo con medidas de conductividad en soluciones de tensioactivos geminales basados en piridinium, se pudo poner de manifiesto la formación de agregados premicelares en este tipo de sistemas ([Bhadani et al., 2009](#)). Tsubone et al., también encontraron que tensioactivos geminales con cadenas espaciadoras cortas formaban

agregados premicelares y que debido a esto, la CAC obtenida mediante medidas de tensión superficial era muy diferente a la obtenida mediante conductividad (Tsubone et al., 2003).

Tabla 6. Valores de CAC, tensión superficial a la CAC (Y_{CMC}), eficiencia de adsorción (pC_{20}) y efectividad (π) para los ramnolípidos y sus derivados de arginina y lisina

Biotensioactivo	CAC (Tensión superficial)			
	CAC (g/ L)	Y_{cac} (mN/m)	Π_{cac}	pC_{20} (g/ L)
RLmez	0,005	30.6	41.4	2.8
RLmez_Arginina	0.016	31.1	40.9	2.5
RLmez_Lisina	0.008	30.6	41.4	2.7
monoRL	0.010	28.8	43.2	3.0
monoRL_Arginina	0.013	28.9	43.1	3.14
monoRL_Lisina	0.015	28.3	43.7	3.11

A partir de las curvas de tensión superficial frente a concentración es posible determinar la efectividad y la eficacia de los tensioactivos. La máxima disminución de tensión superficial del agua que puede conseguirse con un tensioactivo se denomina efectividad (π_{cmc}) y corresponde a la diferencia entre la tensión superficial del agua pura y la tensión superficial del sistema en la cmc ($\pi_{cmc} = 70 - Y_{CMC}$). La eficiencia que

tiene un tensioactivo para adsorberse en las interfaces se mide con el parámetro pC_{20} que se define como el logaritmo negativo de C_{20} , concentración de tensioactivo necesaria para conseguir una reducción de 20 mN/ en el agua pura.

Como puede verse en la [tabla 6](#) los valores de Π_{cac} muestran diferencias de solo 1 o 2 mN/m, estas variaciones caen dentro del error experimental de método, por lo que puede considerarse que la efectividad de todos los compuestos es similar. Los valores de Π_{cac} obtenidos indican que tanto los RL precursores como sus derivados catiónicos son compuestos muy efectivos reduciendo la tensión superficial del agua. Los valores de efectividad encontrados para estos compuestos son similares a los descritos en la bibliografía para otros RL ([Chen et al., 2010](#)) o para tensioactivos derivados de aminoácidos con dos cadenas alquílicas ([Pinazo et al., 2016](#)). La presencia de dos cadenas alquílicas en la estructura da lugar a interacciones hidrofóbicas intramoleculares que promueve un mejor empaquetamiento en la monocapa formada en la interfase y consecuentemente una reducción de γ_{cac} .

Los valores de pC_{20} indican que es necesario muy poca cantidad de tensioactivo para reducir la tensión superficial del agua en 20 mN/m, esto significa que estos productos son muy eficaces. La eficacia de los monoRL no cambia al introducir un aminoácido sin embargo en el caso de la muestra de RLmez la eficacia la eficacia disminuye ligeramente cuando se introduce una arginina o una lisina.

4.4. Distribución de tamaños de agregados

Una vez conocida la Concentración de Agregación Crítica se procedió a estudiar el tamaño de los agregados moleculares que forman estos ramnolípidos en disolución acuosa. Para llevar a cabo este estudio se hicieron medidas de dispersión de luz mediante las cuales se obtuvieron las distribuciones de tamaño en estos sistemas. La [figura 30](#) muestra la distribución de tamaños obtenidos mediante DLS para algunas de las concentraciones correspondientes a la muestra de RLmez y monoRL, respectivamente.

Las medidas se llevaron a cabo para concentraciones por debajo y por encima de la CAC. La [figura 31](#) muestra los tamaños de agregados observados en función de la concentración. Como puede observarse para todas las concentraciones estudiadas, incluso las que están por debajo de la CAC, se observa una distribución bimodal con agregados de tamaño pequeño (50-100 nm) y agregados de tamaño mediano (200-400 nm) que muestran mayor intensidad. El tamaño de los agregados pequeños permanece casi constante para las dos muestras de RL. En el caso de los agregados grandes el tamaño también permanece constante al aumentar la concentración para la muestra de RLmez, sin embargo se observa un ligero incremento de tamaño para la muestra de monoRL ([Fig. 31.](#)).

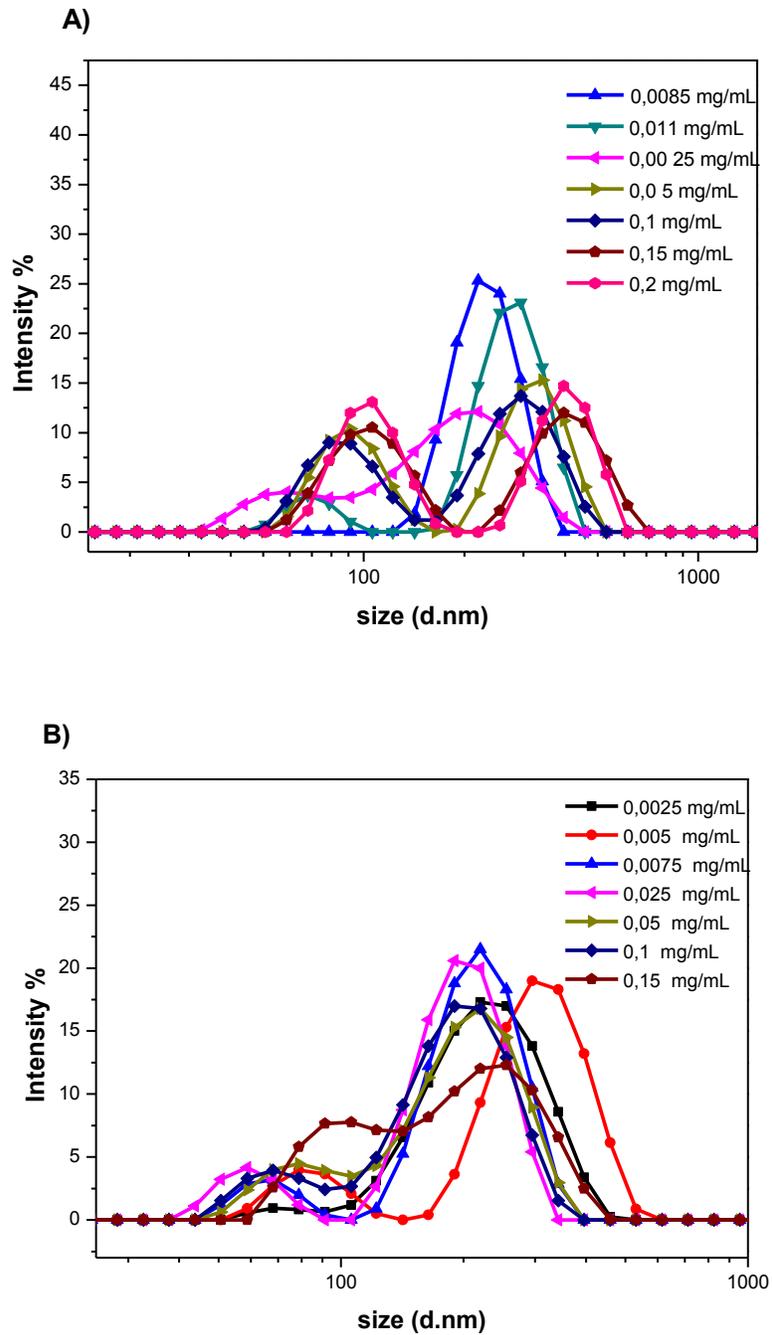


Fig. 30. Distribución de tamaños para diferentes concentraciones del compuesto RLmez (A) y monoRL (B)

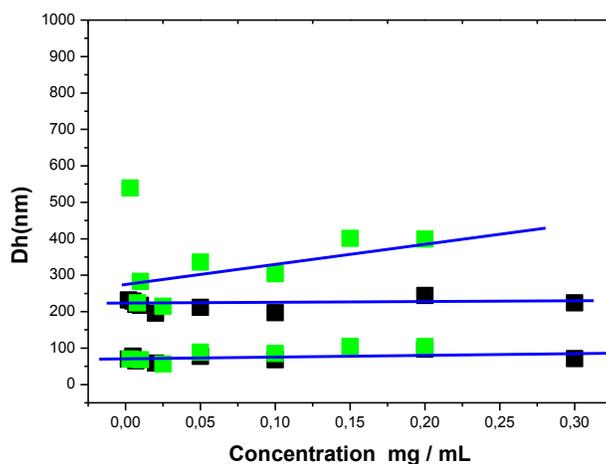


Fig. 31. Distribución de tamaños en función de la concentración para una muestra de RLmez (■) y una de monoRL (■)

La distribución de tamaños encontrada para estas dos muestras de ramnolípidos es similar a la hallada por Haba et al., (2014) para una muestra de mezcla de ramnolípidos producida por la misma cepa bacteriana utilizando aceites vegetales como fuente de carbono. Pornsunthorntawee et al., (2009) también estudiaron mediante DLS el proceso de agregación de una muestra de RLs compuesta mayoritariamente de monoRLs; observaron que a bajas concentraciones (40 mg/L) se formaban micelas, estos agregados desaparecían al aumentar la concentración y daban lugar a vesículas de diferentes tamaños, posteriormente a concentraciones elevadas (>200 mg/L) se observaba la presencia de vesículas de gran tamaño. La formación de diferentes tipos de agregados moleculares a concentraciones muy bajas, incluso inferiores a la CAC, se ha observado para bastantes familias de RLs. Ikilier et al., (2017) investigaron el comportamiento de monoRLs, diRL y mezclas de ambos y observaron que los monoRL y diRL formaban agregados premicelares a concentraciones diez veces inferiores a la CMC. El mismo comportamiento se observó

para las mezclas pero con tamaños de agregados considerablemente mayores. Zhong et al., detectaron la formación de vesículas de tamaño medio (50-60 nm) a una concentración diez veces por debajo de la CMC y la disminución del tamaño de agregados a partir de la CMC (Zhong et al., 2015). En el caso de una fracción rica en diRLs, Guo et al., descubrieron una distribución bimodal de vesículas de tamaño pequeño y mediano, en este caso se observó que el tamaño de los agregados aumentaba al aumentar la concentración (Guo et al., 2009). Pornsunthorntaweew et al., (2009) también detectó la formación de pequeños agregados a concentraciones 5 veces inferiores a la CMC y una población bimodal de vesículas de 50-250 nm por encima de la CMC. El mismo tipo de agregación fue observada por Sánchez et al., (2007); formación de micelas de 43-46 nm antes de la CMC, una distribución bimodal de agregados grandes después de la CMC (350-550 nm) y agregados de tamaño muy grande a altas concentraciones de RL (1500 nm). Todos estos resultados encontrados en la bibliografía ponen de manifiesto los diferentes tipos de agregados que pueden formar este tipo de biotensioactivos. Estas discrepancias pueden ser debidas a la diferente composición de las muestras estudiadas, al pH del medio y también al método de preparación de las disoluciones acuosas que se ha utilizado.

La presencia de agregados a concentraciones muy inferiores a la CAC también se observó en el caso de disoluciones acuosas de los ramnolípidos derivados de lisina y arginina (Figs. 32 y 33.). La distribución de tamaños obtenida para la muestra de monoRL_Lys es similar a la de los RLs aniónicos, una distribución bimodal con agregados de talla pequeña y mediana que permanece más o menos constante al aumentar la concentración. En el caso de la muestra de RLmez_Lys también se

observó una distribución bimodal, pero en este caso el tamaño de los agregados más grandes aumentaba al aumentar la concentración de tensioactivo (Figs. 32 y 34).

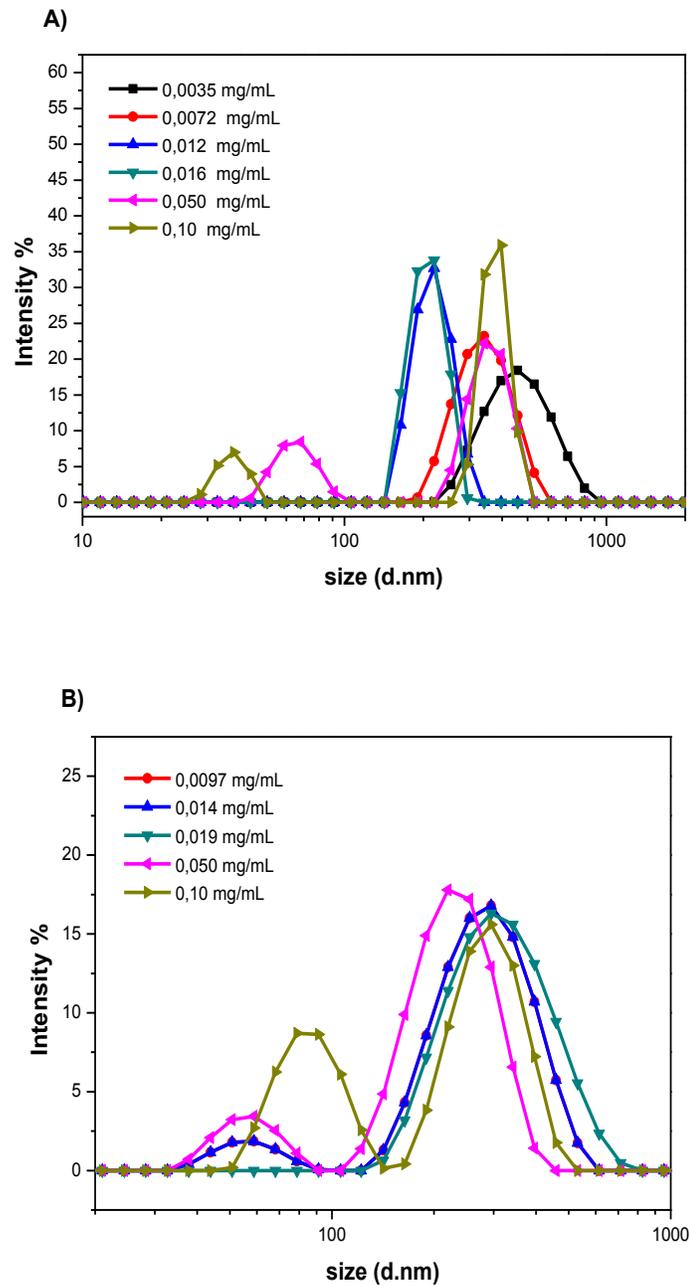


Fig. 32. Distribución de tamaños para diferentes concentraciones del compuesto RLmez_Lys (A) y monoRL_Lys (B)

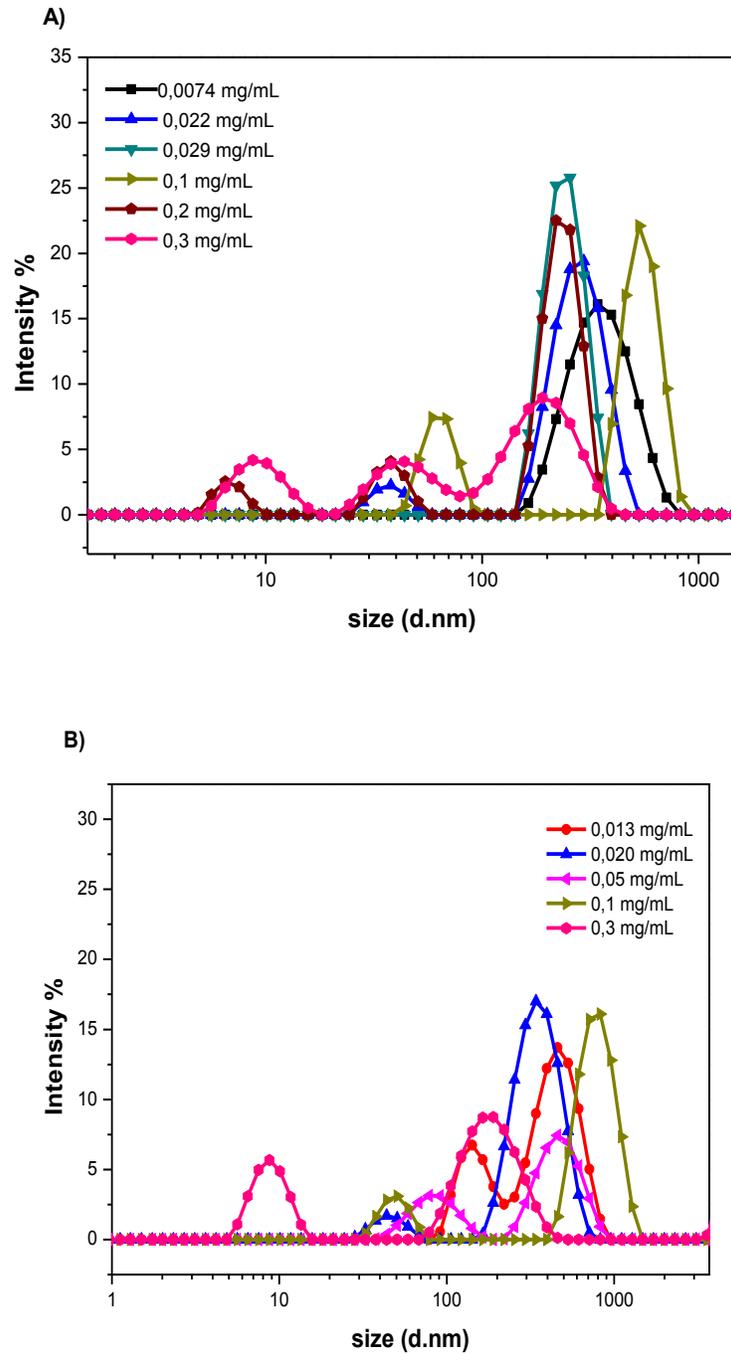


Fig. 33. Distribución de tamaños para diferentes concentraciones de las muestras RLmez_Arg (A) y monoRL_Arg (B)

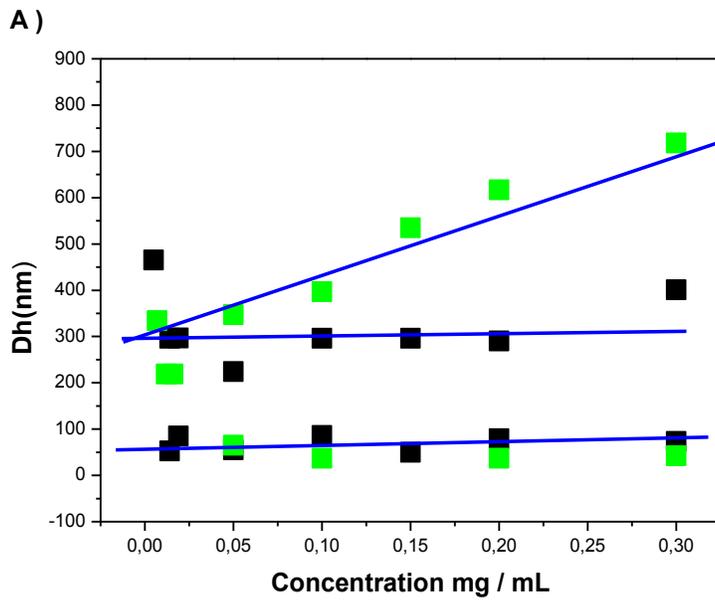


Fig. 34. Distribución de tamaños en función de la concentración para las muestras de RLmez_Lys (■) y monoRL_Lys (■)

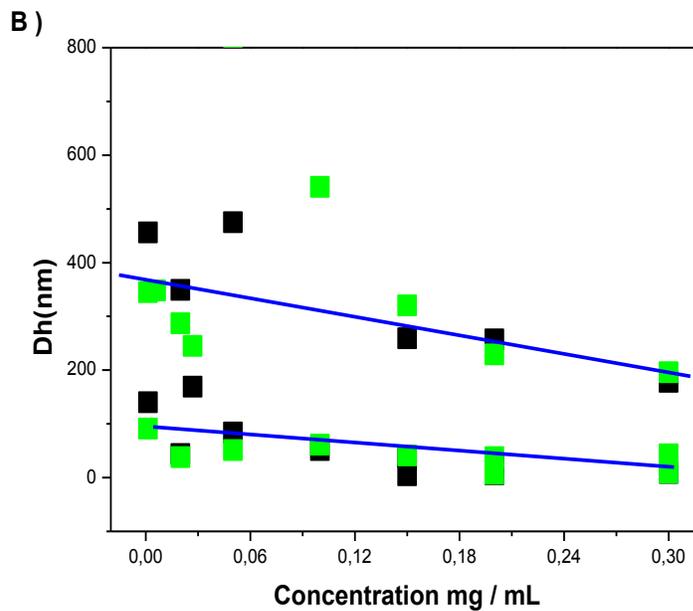


Fig. 35. Distribución de tamaños en función de la concentración para las muestras RLmez_Arg (■) y monoRL_Arg (■)

Los derivados de arginina mostraron un comportamiento diferente (Figs. 33, 35). A concentraciones muy bajas, hasta aproximadamente 0.15 mg/mL (valor de la CAC observada por fluorescencia), también se observó la presencia de agregados moleculares de dos tamaños, una población de tamaño medio y la otra formada por vesículas grandes con un diámetro hidrodinámico muy superior al observado en las vesículas formadas por los RLs precursores. Sin embargo, en las concentraciones más altas estudiadas (0.150-0.3 mg/mL) se observó la presencia de tres poblaciones: agregados muy pequeños de un tamaño de 4-9 nm que podrían corresponder a micelas, agregados de tamaño pequeño (30-40 nm) que podrían corresponder a micelas grandes o a vesículas pequeñas y vesículas de tamaño mediano (250 nm). La intensidad de los picos correspondientes a los agregados más pequeños (menos de 10 nm) es muy pequeña comparada con la intensidad observada para las otras poblaciones. Sin embargo, se tiene que tener en cuenta que cuando se utiliza la técnica de DLS la intensidad de los agregados de mayor tamaño se intensifica considerablemente.

Después de estos estudios se puede concluir que todos los ramnolípidos preparados en este trabajo son capaces de formar agregados moleculares a concentraciones muy bajas. La formación de vesículas a bajas concentraciones también ha sido descrita para tensioactivos catiónicos con dos cadenas alquílicas derivados de arginina, de lisina y de amonio cuaternario (Pinazo et al., 2016; Grillo et al., 2009). El Parámetro de Empaquetamiento Crítico (CCP) (Israelachvili et al., 1976) es un parámetro estructural que tiene en cuenta la geometría de los tensioactivos y que

permite predecir el tipo de agregados que pueden formar en solución acuosa. Como se ha comentado anteriormente, el valor de este parámetro está determinado por el cociente entre el volumen del grupo hidrófobo (v) y el producto de la longitud de la cadena alquílica (l) por el área del grupo polar (a): $(v/a.l)$. Generalmente los tensioactivos con dos cadenas presentan forma cilíndrica lo que da lugar a que el valor del parámetro de empaquetamiento esté entre 0.5 y 1. Estas estructuras fomentan las interacciones de Van der Waals intra e inter moleculares entre las cadenas alquílicas y la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidrófilos dando lugar a la aparición de bicapas o vesículas.

4.5. Biodegradación

La persistencia de los tensioactivos en el medio ambiente una vez han cumplida la aplicación deseada puede acarrear serios problemas en los ecosistemas ya que se prolongan durante mucho tiempo los posibles efectos tóxicos de este tipo de compuestos. Por esta razón, la evaluación de la biodegradación de los tensioactivos de nuevo desarrollo es de vital importancia debido a que es el principal mecanismo por el que se eliminan estos productos químicos en el medio ambiente acuático y terrestre. Una prueba de la importancia actual de este tema es el hecho de que uno de los 12 principios de la química verde sea “Diseño de productos biodegradables” ([Anastas et al., 1998](#)). Las normativas europeas actuales exigen que todos los tensioactivos que se usen en el campo de los detergentes tienen que ser fácilmente biodegradables, o sea que se llegue a una total mineralización del compuesto. Solamente en algunos casos

de tensioactivos para usos especiales se admite que presenten solamente una biodegradación primaria (no última), siempre y cuando se pueda establecer que los beneficios que comporta el uso de un determinado tensioactivo son muy superiores al riesgo medioambiental que supone el hecho de no presentar una biodegradación total (CE, 2004).

El ensayo de biodegradación utilizado para el estudio de la biodegradabilidad aeróbica de los RLs y sus derivados ha sido el test de formación de CO₂ en espacio de cabeza ISO 14593-CO₂ (OECD 2014) que mide la concentración de CO₂ inicialmente y a intervalos regulares de tiempo durante 28 días. Mediante este ensayo se evalúa la biodegradación última o mineralización de los tensioactivos que es la transformación de estos compuestos orgánicos en productos inorgánicos y biomasa por la acción directa de los microorganismos. Los compuestos que alcanzan un porcentaje de biodegradación igual o superior al 60% pueden ser considerados fácilmente biodegradables.

La figura 36 muestra las curvas de biodegradación obtenidas para los RLs objeto de estudio en este trabajo así como para el compuesto usado como referencia (SDS - Dodecil sulfato sódico). La tabla 7 indica el porcentaje de biodegradación obtenido para cada uno de los compuestos a los 28 días. Como puede verse en la tabla 7, después de 28 días, tanto los RLs aniónicos como los RLs derivados de amino ácidos presentan porcentajes de biodegradación superiores al 60% lo que significa que estos compuestos pueden calificarse como fácilmente biodegradables. Se ha de tener en cuenta que este ensayo presenta unas características muy restrictivas ya que el compuesto a estudiar es la única fuente de carbono orgánico presente, el medio se

inocula con poca cantidad de bacterias que además no han sido preadaptadas a estos compuestos y la duración del ensayo es limitada. Esto significa que los compuestos que pasen este test con valores de biodegradación superiores al 60% son compuestos que se van a degradar rápidamente en el medio ambiente acuático.

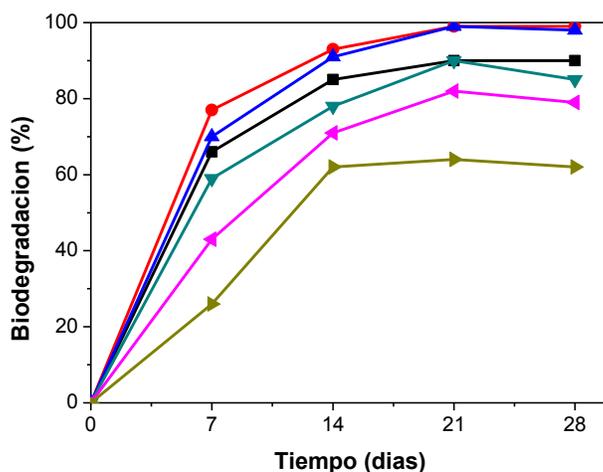


Fig. 36. Curvas de biodegradación de los RL aniónicos y catiónicos a una concentración de 20 mg/L. SDS (■), RLmez (●), monoRL (▲), RLmez_Arg (▼), monoRL_Arg (◄) and RLmez_Lys (◄).

Como era de esperar los RLs aniónicos son degradados muy fácilmente por microorganismos aeróbicos, de hecho, a los 7 días estos compuestos ya han pasado la barrera del 60% y en dos semanas alcanzan un porcentaje del 90%. Estos resultados son similares a los descritos en la literatura para este tipo de compuestos. Según Mohan et al., (2005) los RLs son fácilmente biodegradados en condiciones aeróbicas y además muestran cierto porcentaje de degradación en condiciones anaeróbicas. También se ha observado que este tipo de compuestos puede mejorar la biodegradación de otros contaminantes debido a que aumentan la biodisponibilidad de

los mismos (Zeng et al., 2018). La excelente biodegradación que muestran los RLs es consistente con la estructura química de los mismos. Uno de los principales mecanismos que usan las bacterias para degradar los tensioactivos es el denominado ataque hidrofílico, que consiste en separar los dos grupos que contiene un tensioactivo (grupo polar y grupo hidrófobo). El enlace éster que une las dos cadenas alquílicas de los RLs así como el enlace entre la ramnosa y las cadenas pueden ser fácilmente hidrolizados por las bacterias dando lugar a la formación de dos ácidos grasos y una ramnosa, estructuras que pueden ser fácilmente degradadas por los microorganismos.

Tabla 7. Porcentajes de biodegradación de la sustancia de referencia (SDS), ramnolípidos aniónicos (RLmezcla y monoRL) y catiónicos (RLmez_Arg, monoRL_Arg y RLmez_Lys) determinados por la prueba de espacio de cabeza ISO 14593-CO₂. (Resultados de 28 días calculados a partir de 4 repeticiones).

Compuestos	Biodegradation (%)			
	7días	14 días	21 días	28 días
SDS*	66	85	90	90±1.5
RLmez	77	93	99	99±1.7
MonoRL	70	91	99	98±1.6
RLmez_Arg	59	78	90	85±3.6
MonoRL_Arg	43	71	82	79±3.9
RLmez_Lys	26	62	64	62±2.7

*SDS (Dodecil sulfato sódico) – producto control

Los RLs catiónicos derivados de amino ácidos también muestran un perfil de biodegradación estupendo. La funcionalización de los RLs origina una ligera

ralentización, sin embargo, a los 14 días ya han sobrepasado el nivel de corte del 60% y los derivados de arginina alcanzan porcentajes superiores al 80%. En estos compuestos el amino ácido se une a la estructura ramnolípida mediante un enlace amida que también puede ser atacado por los microorganismos. El tipo de enlaces presentes en los compuestos tensioactivos es esencial de cara a la degradación de los mismos. Los compuestos en los que la cadena alquílica se une al grupo polar mediante enlaces del tipo C-N (tensioactivos catiónicos tipo QACs) presentan niveles de biodegradación muy bajos debido a que ese enlace no puede ser eliminado por las bacterias y no se puede llevar a cabo el ataque hidrófilo. Cuando los tensioactivos derivados de amonio cuaternario llevan un enlace éster o amida entre la cabeza polar y la cadena alquílica (éster QACs) la biodegradación aumenta considerablemente (Brycki et al., 2014). También se ha observado que los tensioactivos derivados de aminoácidos con enlaces éster o amida entre el grupo polar y la cadena alquílica presentan elevados porcentajes de biodegradación (Colomer et al., 2012) y que la biodegradación de líquidos iónicos basados en el grupo imidazolium aumentaba considerablemente cuando se introducía un amino ácido en su grupo catiónico (Coleman et al., 2012). Otro importante aspecto a tener en cuenta a la hora de diseñar compuestos biodegradables es la toxicidad. Está descrito que los tensioactivos catiónicos derivados de amonio cuaternario presentan elevada toxicidad lo que significa que pueden matar a los microorganismos encargados de su eliminación y reducir sus porcentajes de biodegradación (Nalecz-Jawecki et al., 2003). La toxicidad de los tensioactivos catiónicos se reduce cuando la carga está situada en un grupo guanidino o en un heterociclo, (Zhang et al., 2015). Además, en el caso de los RLs derivados de

aminoácidos el ataque hidrófilo originará compuestos intermedios no tóxicos y fácilmente degradables como son los ácidos grasos, las ramnosas y los aminoácidos. Como puede verse, el diseño de estos nuevos tensioactivos catiónicos se ha llevado a cabo teniendo en cuenta los requerimientos estructurales que dan lugar a compuestos fácilmente biodegradables.

4.6. Actividad antibacteriana

Como ya se ha comentado en la introducción el uso indiscriminado de antibióticos y desinfectantes ha dado lugar en los últimos años a un enorme incremento de microorganismos resistentes, lo que representa una seria amenaza para la salud pública a nivel mundial ([WHO, 2015](#)).

Los compuestos de amonio cuaternario (QACs) convencionales son muy utilizados actualmente como agentes antimicrobianos. Sin embargo, estos compuestos no son adecuados para determinadas aplicaciones debido a su alta toxicidad y baja biodegradabilidad. Debido a su relativamente elevado poder hemolítico y toxicidad, estos compuestos son poco adecuados para ciertas aplicaciones biomédicas ([Salick et al., 2007](#)). La posición vulnerable de este tipo de compuestos exige el desarrollo de nuevas moléculas que cumplan los requerimientos de seguridad y eficacia para su uso como antimicrobianos en formulaciones antisépticas. Los tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos pueden ser una alternativa interesante a los QATs ([Pinazo et al., 2016](#)).

Los tensioactivos desarrollados en esta memoria poseen estructura ramnolipídica y son también tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos por lo cual es de esperar que presenten actividad antimicrobiana. Con el fin de confirmar esta premisa se determinó para todos los ramnolípidos la mínima concentración de compuestos que inhibía el crecimiento bacteriano. Se utilizaron una serie representativa de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La [tabla 8](#) muestra los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) obtenidos para los ramnolípidos objeto de estudio en esta memoria. Las concentraciones ensayadas estaban en un rango comprendido entre 0.97-256 µg/mL. Como puede observarse en la tabla, los ramnolípidos no modificados no presentaban actividad frente a ninguna de las bacterias ensayadas. La interacción de los tensioactivos con las bacterias conlleva una primera etapa de interacciones electrostáticas entre los tensioactivos y la membrana bacteriana. Dado que la membrana está cargada negativamente las interacciones electrostáticas con los RLs no modificados también cargados negativamente son repulsivas. Esto explicaría la falta de actividad de estos compuestos frente a las bacterias ensayadas. En cuanto a la actividad antimicrobiana de los RLs en la bibliografía se pueden encontrar resultados muy diversos. Abalos et al., (2001) y Benincasa et al., (2004) determinaron la actividad antimicrobiana de RLs frente a una amplia gama de bacterias y hongos; estos autores encontraron que estos compuestos mostraban actividad frente a los microorganismos ensayados con valores de CMI en el rango de 4-128 µg/mL. Los RLs estudiados por Lotfabad et al., (2010) mostraron moderada actividad solo frente a bacterias Gram-positivas. Por otro lado, también se ha publicado que los RLs hasta concentraciones de

500 µg/mL no muestran actividad frente a bacterias Gram-positivas ni Gram-negativas (Aleksic et al., 2017). La diferencia en los valores de CMI encontrados en la literatura se puede atribuir a la diferente composición, en cuanto a homólogos se refiere, de las diferentes muestras ensayadas. Como ya se ha comentado anteriormente en esta memoria, estas discrepancias también se han descrito para los valores de CMC o el tamaño de los agregados de este tipo de compuestos.

Los resultados de la [Tabla 8](#) muestran que los RLs derivados de arginina presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas, con valores de CMI comprendidos entre 4 y 32 µg/mL. Estos compuestos poseen una carga positiva en su grupo polar por lo cual presentarán interacciones electrostáticas atractivas con las membranas de las bacterias, lo cual facilitará la lisis de los microorganismos. Este comportamiento es similar al descrito en la bibliografía para diversos tensioactivos catiónicos (Haldar et al., 2005) y para compuestos anfífilos que poseen el grupo guanidino (Morán et al., 2004; Song et al., 2014). Especialmente interesante es el hecho de que estos compuestos sean activos frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y los antibióticos beta-lactámicos (MRSA) y frente a la *L. monocytogenes*. La MRSA es la bacteria resistente más común en Europa y causa numerosos problemas en la salud pública así como un enorme coste económico para la sociedad. Por esta razón, existe en la actualidad un gran interés en desarrollar compuestos activos frente a esta bacteria que presenten un modo de acción diferente a los antibióticos para que la bacteria no pueda desarrollar resistencias con facilidad. Por otro lado la *L. monocytogenes* es una bacteria difícil de eliminar que puede provocar graves infecciones alimentarias como ha ocurrido este último verano en Andalucía.

Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria de los ramnolípidos aniónicos (RLmez, monoRL) y catiónicos (RLmez_Arg, monoRL_Arg y RLmez_Lys, monoRL_Lys) frente a cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas

CMI (0,97 – 250 µg / mL)						
	RLmez	MonoRL	RLmez _Lys	MonoRL _Lys	RLmez _Arg	MonoRL _Arg
Gram Positivas						
<i>B. subtilis</i>	>250	>250	>250	>250	16	16
<i>S. epidermidis</i>	>250	>250	>250	>250	4	4
<i>S. aureus</i>	>250	>250	>250	>250	8	8
<i>S. aureus*</i>	>250	>250	>250	>250	32	16
<i>L. onocytogeneses</i>	>250	>250	>250	>250	16	16
Gram Negativas						
<i>P. aeruginosa</i>	>250	>250	>250	>250	>250	>250
<i>K. pneumoniae</i>	>250	>250	>250	>250	>250	>250
<i>E. coli</i>	>250	>250	>250	>250	>250	>250

**S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA)

Rango de concentración de estudio (0,97 – 250 µg/mL)

Como puede observarse en la [Tabla 8](#) la efectividad frente a las bacterias es similar para las dos muestras de derivados de arginina, RLmez_Arg y monoRL_Arg, lo que significa que el número de ramnosas en la molécula no afecta la actividad de estos compuestos frente a bacterias. Este resultado es muy interesante ya que significa que

se puede trabajar con los RLs producidos por las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* MB sin la necesidad de la etapa de purificación, simplificando el proceso y los costes de producción de estos nuevos compuestos. Los derivados de arginina no presentan actividad frente a las bacterias Gram-negativas ensayadas. Este comportamiento ya había sido observado para muchos tensioactivos catiónicos antimicrobianos. Estructuralmente las bacterias Gram-positivas son más simples que las Gram-negativas. En concreto estas últimas poseen una membrana exterior cargada con lipopolisacáridos que funciona como una excelente barrera impidiendo la interacción de los tensioactivos con la membrana bacteriana ([Ortega et al., 2013](#)).

Los RLs derivados de lisina no presentaron actividad frente a ninguna de las bacterias estudiadas. En general, la actividad antimicrobiana de los tensioactivos derivados de lisina es inferior a la de los derivados de arginina lo cual podría ser debido a la diferente naturaleza de la carga catiónica que poseen este tipo de compuestos ([Chen et al., 2016](#); [Moran et al., 2001](#); [Pinazo et al., 2016](#)). El pKa de los derivados de lisina es menor que el de los derivados de arginina lo que significa que los RLs derivados de arginina se mantendrán protonados hasta valores de pH superiores. En un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación años atrás, se observó que la actividad antimicrobiana de tensioactivos sensibles al pH disminuía al disminuir el pKa de este tipo de compuestos ([Colomer et al., 2011](#)).

Es de resaltar que esta es la primera vez que se han sintetizado derivados catiónicos de los ramnolípidos basados en amino ácidos básicos. En la bibliografía sí que se han encontrado derivados aromáticos de RLs ([Aleksic et al., 2017](#)) que mostraban mejor actividad antimicrobiana y antibiofilm que sus precursores no

modificados. Los soforolípidos, otra importante clase de biotensioactivos, sí que fueron modificados químicamente con amino ácidos neutros y ácidos por Azim et al., (2016). Para este tipo de biotensioactivos se encontró que la mejor actividad antimicrobiana se obtenía con los derivados de leucina, que presentaban valores muy bajos de CMI (1-2 µg/mL) frente a *Moraxella sp.* y *S. sanguinis*. Por otro lado, recientemente se ha publicado la preparación de soforolípidos catiónicos basados en amonio cuaternario que también presentan actividad antimicrobiana (Delbeke et al., 2015).

4.7. Actividad antifúngica y antibiofilm frente a cepas de *Candida* spp.

Dentro del género *Candida*, la especie de *C. albicans* continua siendo la que más problemas asociados conlleva ya que puede causar un amplio espectro de enfermedades que van desde infecciones superficiales en la piel hasta graves infecciones sistémicas (Lim et al., 2012). También se ha observado en los últimos años un importante aumento de infecciones causadas por otras especies de *Candida* como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. Parapsilosis* y *C. Krusei* (Beardsley et al., 2018). La formación de cepas de hongos resistentes no es tan común como en el caso de las bacterias, sin embargo el rápido surgimiento de infecciones oportunistas asociadas a las especies de *Candida* resistentes a los azoles representa una amenaza considerable al ser humano, sobretodo, a los pacientes inmunodeprimidos (Beardsley et al., 2018). A pesar de estos problemas el número de fármacos comerciales para el tratamiento de las infecciones provocadas por hongos es limitado y alguno de los más activos como la amphotericin B tienen un nivel de toxicidad elevado (Mayer et al., 2013). El fluconazol es otro fármaco antifúngico muy utilizado, sin embargo en los últimos años se ha

descrito la aparición de numerosas especies de *Candida* resistentes a este fármaco (Pfaller et al., 2012a). Ante todas estas problemáticas el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos para combatir la resistencia fúngica es extremadamente urgente.

4.7.1. CMI de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos contra cepas de *Candida* spp. resistentes al fluconazol

La actividad antifúngica de los RLs objeto de estudio en este trabajo se estudió mediante la determinación de la CMI, concentración mínima de compuestos que causa una disminución del 50% de crecimiento de los cultivos de estas levaduras. Los valores de CMI se evaluaron utilizando el método de microdilución. Se utilizaron como referencia dos fármacos antifúngicos, Anfotericina B (AMPHO B) y fluconazol (FLC). El fluconazol, al igual que todos los azoles, inhibe la biosíntesis de ergosterol, uno de los lípidos fundamentales que forman parte de la membrana plasmática. La anfotericina es una molécula anfífila que se intercala en la membrana plasmática creando canales por los que pueden salir algunos componentes celulares y se desestabiliza el gradiente de protones. Dada la problemática de las cepas de hongos resistentes a antifúngicos, en este trabajo se han empleado cepas clínicas de *Candida* spp. resistentes al FLC y una cepa sensible a este fármaco. En primer lugar se comprobó que las cepas utilizadas eran efectivamente resistentes a este fármaco. Para ello se utilizó el protocolo M27-S4 (CLSI, 2012). La [tabla 9](#) muestra los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) que presentan las cepas estudiadas frente al FLC. La CMI se definió como la concentración más baja que fue capaz de reducir 50% del crecimiento de las células

fúngicas. Según el protocolo utilizado se pueden considerar cepas resistentes al FLC aquellas cuyo valor de CMI sea igual o superior a 8 µg/mL mientras que se consideran cepas sensibles cuando el valor de CMI es igual o inferior a 2 µg/mL. La microdilución en caldo se realizó de acuerdo con el protocolo CLSI M27-A3. Dados los valores de CMI obtenidos puede considerarse que todas las cepas utilizadas en este estudio son resistentes al FLC.

La [tabla 9](#) también contiene los valores de CMI de los ramnolípidos aniónicos (RLmez y monoRL) y sus derivados catiónicos (RLmez_Arg, monoRL_Arg y RLmez_Lys, monoRL_Lys) frente a las diferentes cepas de *Candida* spp. resistentes al fluconazol. Las cepas planctónicas de las diferentes especies de *Candida* se mostraron resistentes a los compuestos de ramnolípidos aniónicos (RLmezcla y monoRL) presentando en todos los casos CMIs superiores a las concentraciones de estudio (>250 µg/mL). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el apartado de actividad antibacteriana. La literatura contiene escasos trabajos acerca de la actividad antifúngica de los ramnolípidos. Esta actividad depende de varios factores entre los que destacan la composición de los homólogos presente en la mezcla de RLs así como el microorganismo ensayado. Algunos estudios indican que la actividad antifúngica es debida principalmente a los diramnolípidos. Rodrigues et al., (2017) estudiaron la actividad de mono y diramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* frente a *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius*. Estos autores encontraron que los diRLs presentaban buena actividad frente a las especies ensayadas mientras que los monoRLs exhibían una actividad moderada incluso a concentraciones elevadas (1.5 mg/mL). Similares resultados fueron obtenidos por Sha et al., (2012) que también

observaron que los diRLs presentaban mejor actividad que los monoRLs frente a diferentes hongos patógenos. Según estos autores el grupo polar de los diRLs, de mayor tamaño que el de los monoRLs, confiere a la molécula una forma de cono invertido que provoca una disrupción mayor en las membranas de los microorganismos. Sin embargo existen estudios que indican que la actividad antimicrobiana de los monoRLs es superior a la de los diRLs, lo cual contradice las teorías anteriormente expuestas (Yang et al., 2014).

En cuanto a la actividad de los RLs frente a levaduras del género *Candida*, también se pueden encontrar resultados discrepantes en la literatura. Algunos autores encontraron que la especie de *C. albicans* era insensible a mezclas de RLs (Abalos et al., 2001). Sin embargo, Singh et al., (2013) encontró CMI de aproximadamente 3.12 µg/mL cuando cepas de *Candida albicans* fueron tratadas con diRLs mientras que Turbhekar et al., (2015) observó valores de CMI de 50 µg/mL cuando la cepa de *Candida albicans* fue expuesta a una mezcla de ramnolípido (RLmezcla). No se ha encontrado en la bibliografía estudios de la actividad antifúngica de los ramnolípidos clásicos (aniónicos) frente a las especies de *Candida* resistentes al fluconazol.

La tabla 9 también contiene los valores de CMIs encontrados para los nuevos ramnolípidos catiónicos derivados de aminoácidos. Como puede observarse los compuestos derivados de arginina resultaron ser muy activos frente a todas las cepas ensayadas mientras que los derivados de lisina no presentaron actividad frente a ninguna de ellas en el rango de concentraciones estudiado. Este comportamiento es similar al observado frente a las bacterias Gram positivas, y como se comentó en ese apartado puede ser debido al diferente pKa de los grupos protonados en los que se

encuentra la carga positiva de estos compuestos (Da Silva et al., 2019). En estudios previos llevados a cabo por el grupo de investigación en el que se ha realizado esta tesis también se observó que compuestos tensioactivos derivados de lisina presentaban menor actividad antifúngica que los derivados de arginina (Pinazo et al., 2016). De hecho los resultados mostraban que la actividad antifúngica mejoraba considerablemente cuando el grupo amino de la lisina estaba quaternizado en vez de clorhidratado (Perez et al., 2009).

Estos resultados sugieren que la densidad de carga catiónica de los derivados de lisina no es lo suficientemente elevada para interaccionar con las membranas de estas levaduras. Resultados similares fueron publicados por Greber et al., (2014), estos autores prepararon tensioactivos que contenían 4 lisinas en el grupo polar; estos compuestos resultaron ser muy activos frente a bacterias pero la actividad frente a hongos resultó ser escasa. Este comportamiento podría deberse a que uno de los componentes de la pared celular de los hongos o levaduras es la quitina que posee carga positiva y podría disminuir la carga negativa neta de la pared celular, provocando así una disminución de las interacciones electrostáticas que ocasionan la actividad antimicrobiana de los tensioactivos catiónicos (Bowman et al., 2006).

Tabla 9. Actividad antifúngica de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos frente a cepas de *Candida spp.* resistentes al fluconazol.

Cepas	Rango de estudio 250 – 1 µg / mL						
	CMI _s (µg/mL)						
	FLC	RLmez	monoRL	RLmez _Lys	monoRL _Lys	RLmez _Arg	monoRL _Arg
<i>C. albicans</i> 1*	64	> 250	> 250	> 250	> 250	6.5	7.8
<i>C. albicans</i> 2**	16	> 250	> 250	> 250	> 250	20.7	15.6
<i>C. tropicalis</i> 1	32	> 250	> 250	> 250	> 250	20.7	15.6
<i>C. tropicalis</i> 2***		> 250	> 250	> 250	> 250	7.8	7.8
<i>C. tropicalis</i> 3	32	> 250	> 250	> 250	> 250	20.7	20.7
<i>C. parapsilosis</i> 1*	32	> 250	> 250	> 250	> 250	15.6	7.8
<i>C. parapsilosis</i> 2**	128	> 250	> 250	> 250	> 250	7.8	7.8
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1	> 250	> 250	> 250	> 250	7.8	7.8
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	16	> 250	> 250	> 250	> 250	10.4	13

*Cepas usadas para los ensayos del biofilm.

** Cepas utilizadas para evaluar el mecanismo de acción de los derivados de arginina

CMI_s calculados a partir de tres repeticiones en días alternados

Los resultados obtenidos indican que los dos productos derivados de arginina presentan buena actividad frente a todas las cepas resistentes ensayadas con valores de CMI que van desde 7.8 µg/mL hasta 20.7 µg/mL. Dada la similar estructura que

poseen todos los ramnolípidos estudiados, la actividad antifúngica de los derivados de arginina parece ser debida a la carga catiónica del grupo guanidino de estos compuestos. Una de las propiedades más interesantes de los tensioactivos catiónicos es que estos compuestos presentan actividad antimicrobiana frente a un amplio rango de microorganismos entre los que se incluyen bacterias, hongos y levaduras. De hecho las sales de amonio cuaternario, QACs, se utilizan en formulaciones desinfectantes desde hace más de 50 años. El bromuro de cetyl trimetil amonio es activo frente a un amplio rango de hongos (Sandle et al., 2014). Sin embargo Gupta et al., (2002) encontró que este compuesto no presentaba actividad frente a *C. albicans* FR-00806 y Carmona-Ribeiro et al., (2006) encontraron que el CTAB solamente inhibía el 50% de la viabilidad de *C. albicans* ATCC 90028 a concentraciones elevadas, de 300 μ M.

La actividad que presentan los ramnolípidos derivados de arginina es similar a la descrita en la bibliografía para tensioactivos geminales basados en amonio cuaternario (Oblak et al., 2013; Machuca et al., 2015) y a la que poseen tensioactivos geminales derivados de arginina (Pinazo et al., 2016). Este tipo de compuestos se han desarrollado en las últimas décadas con el fin de buscar nuevos tensioactivos que mejoraran las propiedades superficiales y biológicas de los tensioactivos monocatenarios clásicos. Los tensioactivos geminales poseen dos grupos polares, dos cadenas hidrófobas y una cadena espaciadora que une los dos grupos polares (Perez et al., 2002). Este tipo de estructuras ha despertado gran interés porque muestran una actividad superficial extraordinaria y su actividad antimicrobiana y antifúngica es superior a la de los tensioactivos monocatenarios homólogos (Oblak et al., 2013). Además los tensioactivos geminales catiónicos pueden presentar efectos sinérgicos en

combinación con azoles, aumentando significativamente la sensibilidad de los hongos frente a estos fármacos (Oblak et al., 2015).

Los resultados obtenidos muestran que la actividad de los dos compuestos derivados de arginina es similar, lo que significa que no es necesaria la separación de los dos homólogos para obtener compuestos antifúngicos. También se observó que los valores de CMI eran similares para todas las especies de *Candida* estudiadas; estos resultados concuerdan con los obtenidos por Paluch et al., (2018) para tensioactivos catiónicos. Estos autores encontraron que tensioactivos catiónicos con dos grupos polares derivados de amonio cuaternario presentaban una actividad antifúngica similar frente a las diferentes especies de *Candidas* ensayadas (*Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida albicans* y *Candida krusei*) y que la mayor actividad se daba en los compuestos con una cadena alquílica de 16 átomos de carbono (valores de CMI entre 10-16 μ M).

Es remarcable el hecho de que los nuevos RLs presenten actividad frente a todas las cepas resistentes al FLC dada la problemática actual que representa el hecho de que las infecciones asociadas a estas cepas están creciendo considerablemente en los últimos años. De hecho no existe en la bibliografía ningún trabajo que muestre la actividad de tensioactivos catiónicos frente a cepas resistentes a este fármaco. Una de las causas de esta marcada actividad podría ser el hecho de que la carga catiónica este situada en el grupo guanidino. La Guazatina es un producto comercial muy utilizado como antifúngico en agricultura. Este producto está compuesto por mezclas de aminas, diaminas y compuestos con grupos guanidino y es activo frente a varias cepas de *Candida* resistentes al fluconazol. El aislamiento de los compuestos que forman este

producto puso de manifiesto que la mejor actividad se obtuvo con muestras que llevan varios grupos guanidinos (Dreassi et al., 2007). Parece ser que los grupos guanidino pueden formar complejos con los grupos polares de los fosfolípidos presentes en las membranas celulares a través de puentes de hidrógeno. Esta afinidad por los fosfolípidos podría mejorar la interacción de los compuestos con grupos guanidino con las membranas celulares con el consiguiente aumento de la actividad.

La actividad antifúngica de estos compuestos frente a cepas resistentes sugiere que el modo de acción que presentan estos compuestos es diferente al de los azoles. Parece ser que la resistencia de los hongos a estos fármacos ocurre a través de diferentes mecanismos entre los que se encuentra un mecanismo muy común de resistencia bacteriana, la producción de bombas de transporte activo sintetizadas a partir de una proteínas presentes en todas las células (bacterianas, hongos, células cancerígenas) (Beardsley et al., 2018). Las bombas de transporte activo se encargan de exportar al espacio extracelular las moléculas extrañas.

4.7.2. Mecanismo de acción de los RLs catiónicos derivados de arginina

Una vez determinada la actividad antifúngica de los derivados de arginina se procedió a investigar el modo en que estos compuestos interaccionan con tres de las levaduras resistentes utilizadas para determinar la actividad antifúngica. En concreto, se utilizaron la *C. albicans* 2, la *C. tropicalis* 2 y la *C. parapsilosis* 2, todas ellas resistentes al fluconazol. Para evaluar el modo de acción de estos ramnolípidos catiónicos se utilizaron las siguientes técnicas experimentales: evaluación del daño en

el ADN, determinación de la pérdida de viabilidad celular, estudio de los cambios en el $\Delta\psi$ y evaluación de la producción intracelular de EROs. Este tipo de estudio puede ayudar a identificar las posibles dianas del compuesto antifúngico lo que puede resultar de gran ayuda de cara al diseño de nuevos compuestos que mejoren la actividad antifúngica de los ya descritos.

4.7.2.1. Evaluación de daño en el ADN de especies de *Candida* spp. resistentes al fluconazol

La evaluación de la naturaleza genotóxica de los nuevos ramnolípidos derivados de arginina se evaluó mediante la técnica del ensayo de cometa en su versión alcalina. Este ensayo consiste en la electroforesis de células de las cepas ensayadas una vez tratadas con los ramnolípidos objeto de estudio. Es una prueba de alta sensibilidad que detecta y cuantifica el daño ocasionado por un agente en el ADN, mediante el número de rupturas o fragmentos que incluyen las cadenas simples y dobles. Posteriormente a un corrido electroforético, el ADN de la célula dañada asume la apariencia de un cometa, con regiones de la cabeza y la cola. El software de análisis de imágenes CASP lleva a cabo el análisis de una variedad de parámetros geométricos y densitométricos que permite estimar la cantidad de ADN en las regiones de la cabeza (ADN intacto) y de la cola (ADN con rupturas) y la extensión de la migración de ADN (Kumar et al., 2009).

Las pruebas del ensayo en cometa fueron realizadas frente a las cepas de levaduras tratadas con los compuestos RLmez_Arg y monoRL_Arg. Como control negativo se utilizaron cepas no tratadas (con ningún compuesto). Como control positivo

se utilizó un agente con actividad antifúngica frente a estas cepas como es la AMPHO B. También se ensayó el efecto del fluconazol para comprobar el efecto de un compuesto no activo.

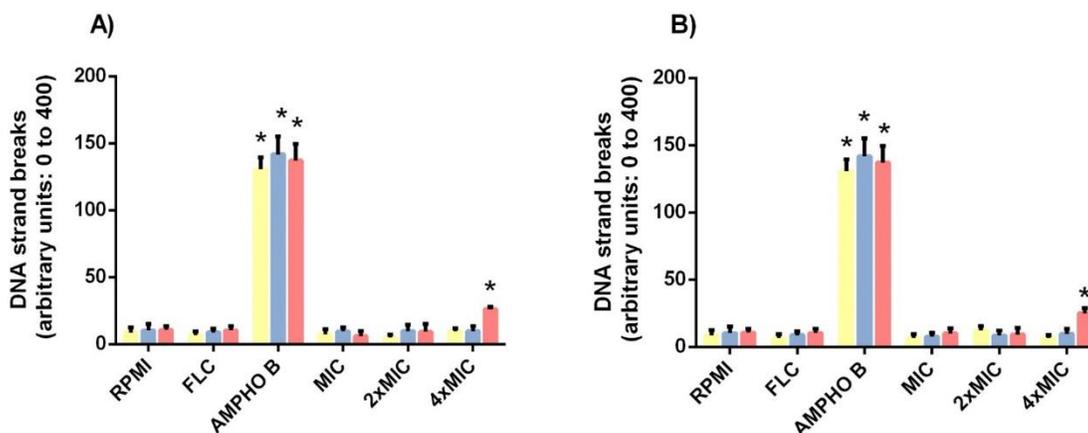


Fig. 37. Evaluación del índice de daño al ADN por ensayo en cometa alcalino en cepas de *C. albicans* (■), *C. tropicalis* (■) y *C. parapsilosis* (■) resistentes al fluconazol. Cepas incubada por 24h en RPMI (Control del medio nutritivo) y expuesta al FLC (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), AMPHO B (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y los derivados de arginina: A) RLmez_Arg y B) monoRL_Arg en las concentraciones: CMI (7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2xCMI (15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4xCMI (31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). $P < 0.05$ comparado con el control de acuerdo con ANOVA seguido por Newman-Keuls test.

La figura 37 muestra el daño en el ADN de las cepas de *Candida* expuestas durante 24 horas a los diferentes compuestos. Como puede verse las células no tratadas con ningún agente no muestran ningún daño. Asimismo, las células tratadas con fluconazol a una concentración elevada, 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$, presentan un comportamiento similar. Como era de esperar, el control positivo, cepas tratadas con AMPHO B, mostraban un importante daño en el ADN celular. Sin embargo las cepas tratadas con diferentes concentraciones de ramnolípidos catiónicos (CMI (7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2xCIM (15,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 4xCMI (31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) no mostraban ningún tipo de ruptura en las cadenas de ADN. El daño en el ADN así como las modificaciones estructurales de las bases de

nucleótidos pueden ser debidas a estrés oxidativo dentro de la célula debido a la generación de ROS intracelular (Da silva et al., 2013). Los resultados obtenidos sugieren que los ramnolípidos catiónicos derivados de arginina no presentan efecto genotóxico como principal mecanismo de acción frente a estos microorganismos y que parece ser que en las células no se producen especies ROS.

4.7.2.2. Pérdida de Viabilidad Celular en *Candida* spp. resistentes al fluconazol

Según la literatura el efecto tóxico que muestran los tensioactivos frente a microorganismos está relacionado con el daño que estos compuestos producen en la membrana plasmática de los microorganismos (Ortiz et al., 2007 y 2009; Otzen et al., 2017). Los estudios llevados a cabo hasta el momento indican que la interacción de tensioactivos catiónicos con microorganismos se lleva a cabo a través de dos etapas como ya se ha mencionado anteriormente. En primer lugar el tensioactivo se une a la membrana debido a interacciones electrostáticas entre las cargas positivas del tensioactivo catiónico y las cargas negativas de algunas de las moléculas presentes en las membrana de los microbios (Lipopolisacárido en el caso de las bacterias Gram-negativas y ácido teicoico en las Gram positivas) (Salick et al., 2007). A continuación la cadena hidrófoba de los tensioactivos interacciona con la bicapa lipídica de las membranas, modificando su estructura y dando lugar al transporte de material intracelular al exterior de la célula (Castillo et al., 2006). En esta segunda etapa, una relación óptima entre la hidrofobicidad y la polaridad de la molécula es esencial de cara a facilitar la difusión del tensioactivo en la bicapa lipídica.

Este tipo de mecanismo explica que muchos de los tensioactivos catiónicos presenten menor actividad frente a hongos ya que la densidad de carga negativa en estos microorganismos en la membrana celular es menor que en las bacterias (Makovitzki et al., 2005).

Con objetivo de evaluar los posibles daños que estos productos producen en la membrana celular de diferentes cepas de *Candida*, se ha evaluado mediante citometría de flujo la viabilidad celular de poblaciones de las cepas estudiadas una vez sometidas a RLs derivados de arginina. Se eligió el PI como compuesto fluorocromo debido a que este producto confiere fluorescencia a las células cuya membrana ha perdido su integridad. De acuerdo con Alvarez-Barrientos et al., (2000), cuando las células, después de algún tratamiento con agentes antifúngicos, mantienen sus membranas intactas, el PI es excluido no pudiendo ser detectada su fluorescencia. Sin embargo, cuando hay daño en las membranas, y las células están muertas ese marcador consigue penetrar y unirse al ADN y al ARN, produciendo fluorescencia (Veal et al., 2000). Por lo tanto, cuanto mayor es la reducción de células viables detectadas mediante este marcador mayor es la probabilidad de que los productos estén afectando la membrana celular.

La figura 38 muestra pérdida de viabilidad de las tres cepas de *Candida* estudiadas después de que fueran tratadas con los derivados de arginina. Como control negativo del estudio se incluyeron los microorganismos no tratados y como control positivo la Ampho B. Dado que las células eran resistentes al fluconazol también se incluyó este compuesto con el objeto de ver su comportamiento.

Los resultados muestran que no hubo una reducción de las células viables cuando estas cepas fueron tratadas con fluconazol en comparación con las células no tratadas (RPMI). Sin embargo, al ser expuestas a diferentes concentraciones de los compuestos RLmez_Arg y monoRL_Arg, el número de células viables disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en todas las concentraciones estudiadas. La reducción de células viables depende de la concentración de compuesto utilizada. Cuando las levaduras son tratadas con la concentración CMI la reducción de la viabilidad celular es inferior a la de la Ampho B. Sin embargo para valores de 2xCMI la reducción en la viabilidad es similar a la que se observa con el control positivo. Al aumentar la concentración (4xCMI) se obtienen valores superiores a los de la Ampho B. Estos resultados indican que el tratamiento de estas cepas con los derivados de arginina da lugar a daños en la membrana citoplasmática de estos microorganismos. La disminución de la viabilidad celular es similar para las tres cepas ensayadas. Además el comportamiento del compuesto monoRL_Arg es similar al del RLmez_Arg. Estos resultados concuerdan con el hecho de que la actividad antifúngica de estos compuestos es similar para todas las especies de *Candida* ensayadas y que los valores de CMI no se vean afectados por el número de ramnosas en la molécula.

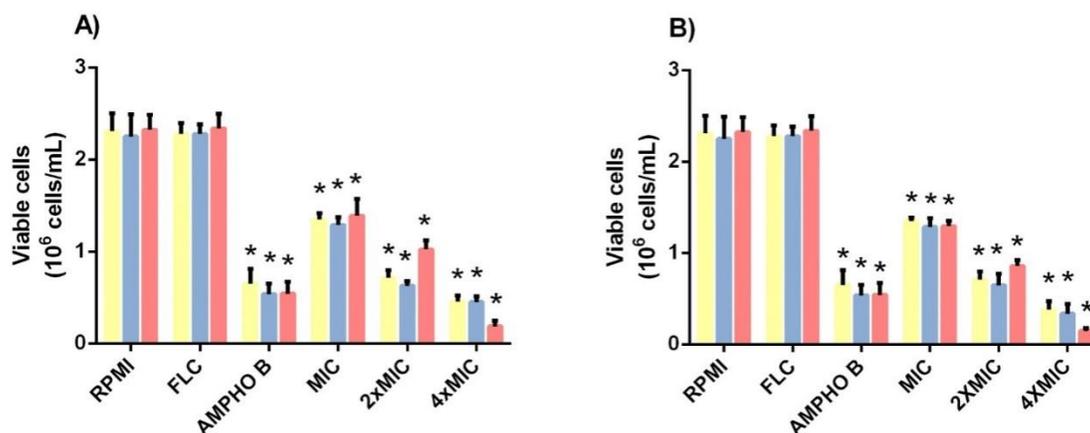


Fig. 38. Evaluación del índice de células viables de *C. albicans* (■), *C. tropicalis* (■) y *C. Parapsilosis* (■) resistentes al fluconazol. Cepas incubada por 24h en RPMI (Control del medio nutritivo) y expuesta al FLC (64 µg/mL), AMPHO B (4 µg/mL) y los derivados de arginina A) RLmez_Arg y B) monoRL_Arg en las concentraciones: CMI (7.8 µg/mL), 2xCMI (15.6 µg/mL), 4xCMI (31.2 µg/mL). P<0.05 comparado con el control de acuerdo con ANOVA seguido por Newman-Keuls test.

4.7.2.3. Cambios en el $\Delta\psi_m$ y producción intracelular de EROs

Según la literatura las funciones que lleva a cabo la mitocondria en las células tienen un papel fundamental en procesos biológicos tales como la programación de la muerte celular (Mazzoni et al., 2013). En concreto, el potencial mitocondrial de membrana es crucial para mantener la función respiratoria necesaria para generar ATP. La formación de poros en la membrana citoplasmática da lugar al colapso del Potencial de Membrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$), lo cual origina una liberación de factores pro-apoptósicos en el citosol (Hwang et al., 2012). Una vez que esto ocurre, la apoptosis pasa a un punto sin retorno que da lugar a la muerte celular.

Dado que este es uno de los mecanismos que puede dar lugar a la muerte celular, se evaluó el efecto de los ramnolípidos catiónicos derivados de arginina en el potencial de membrana mitocondrial de las tres especies de *Candida* spp. estudiadas. Para ello, estas tres levaduras se trataron con los tensioactivos catiónicos, a continuación se incubaron con rodamina 123 y finalmente se mide su fluorescencia mediante citometría. La [figura 39](#) muestra los resultados obtenidos para las tres concentraciones de tensioactivo ensayadas (CMI, 2xCMI y 4xCMI). Las gráficas también incluyen los resultados para el control positivo de AMPHO B así como para el fluconazol. Los resultados indican que estos compuestos son capaces de despolarizar la membrana mitocondrial y que el porcentaje de despolarización aumenta al aumentar la concentración de tensioactivo ([Fig.A.1.](#)).

Los resultados mostraron ([Fig. 39.](#) y [Fig. A.1.](#)) que, a la máxima concentración estudiada, los dos derivados catiónicos causaron un grave colapso en el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de las tres levaduras representativas. Sin embargo, el tratamiento de las mismas en la concentración CMI no afectó en nada la respiración mitocondrial de las especies de *Candida*. Estos resultados indican que estos compuestos son capaces de alterar la membrana mitocondrial de estas levaduras pero que ese no es el mecanismo que usan estos tensioactivos para eliminar las tres especies de *Candida* estudiadas.

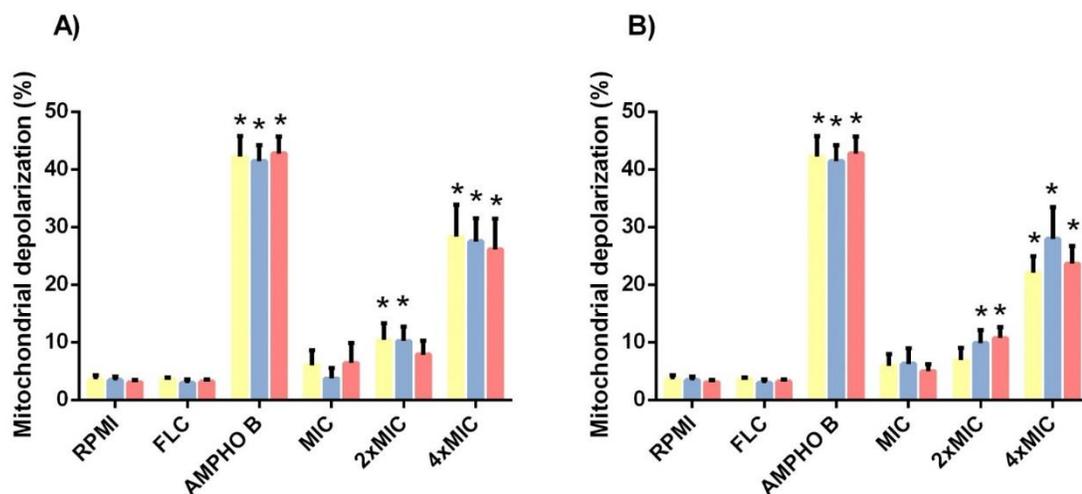


Fig. 39. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en *C. albicans* (■), *C. tropicalis* (■) y *C. Parapsilosis* (■) resistentes al fluconazol. Cepas incubada por 24h en RPMI (Control del medio nutritivo) y expuesta al FLC (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), AMPHO B (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y los derivados de arginina A) RLmez_Arg y B) monoRL_Arg en las concentraciones: CMI (7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2xCMI (15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4xCMI (31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). $P < 0.05$ comparado con el control de acuerdo con ANOVA seguido por Newman-Keuls test.

De acuerdo con algunos autores la despolarización mitocondrial está íntimamente relacionada con la acumulación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) intracelular (Scherz-Shouval et al., 2007; Ito et al., 2009; Chen et al., 2016b). Shirai et al. (2012) también observó que la actividad antimicrobiana de tensioactivos geminales basados en el grupo piridinium frente a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* estaba íntimamente relacionada con la producción de especies reactivas de oxígeno. Los estudios llevados a cabo por estos autores sugerían que la actividad de los compuestos estudiados se debía a dos mecanismos: a) la disrupción de las membranas de los orgánulos de dentro de la célula y b) el estrés oxidativo provocado por la producción de ROS.

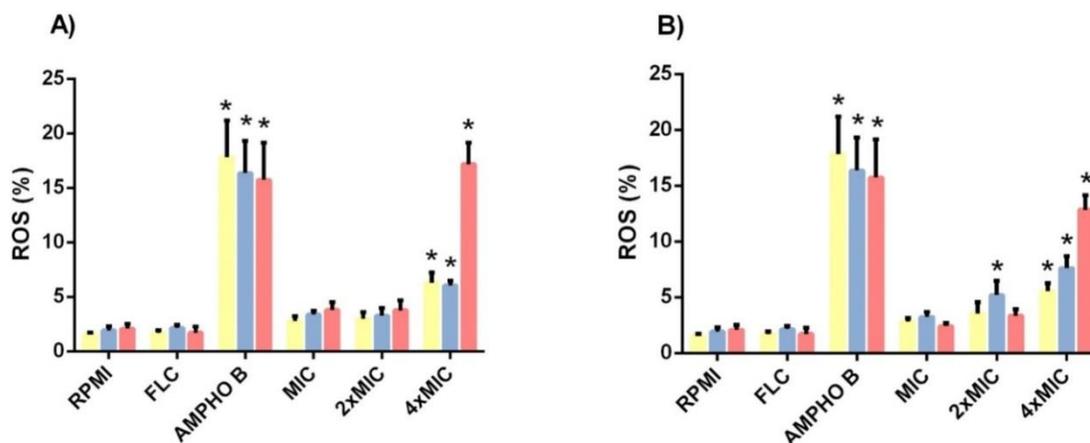


Fig. 40. Evaluación de la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) en *C. albicans* (■), *C. tropicalis* (■) y *C. Parapsilosis* (■) resistentes al fluconazol. Cepas incubada por 24h en RPMI (Control del medio nutritivo) y expuesta al FLC (64 µg/mL), AMPHO B (4 µg/mL) y los derivados de arginina A) RLmez_Arg y B) monoRL_Arg en las concentraciones: CMI (7.8 µg/mL), 2xCMI (15.6 µg/mL), 4xCMI (31.2 µg/mL). $P < 0.05$ comparado con el control de acuerdo con ANOVA seguido por Newman-Keuls test.

La figura 40 muestra la evaluación de la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) en cepas de *Candida* spp. Los resultados obtenidos siguen la misma tendencia que en el caso de la despolarización de la membrana mitocondrial. Las células tratadas (FLC) y no tratadas (RPMI) así como la primera concentración de estudio (CMI) de los derivados de arginina, no presentaron aumento significativo ($p < 0.05$) en la producción de ROS intracelular en cepas de *Candida* spp. resistentes al fluconazol (Fig. 40. y Fig. A.2.). La producción de ROS aumenta con la concentración de tensioactivo catiónico. Se encontró un aumento de EROs significativo ($p < 0.05$) para las tres cepas representativas expuestas a la mayor concentración de estudio (4xCMI) en comparación al grupo control (AMPHO B). La producción de ROS es similar para los dos productos ensayados y para las tres especies de *Candida* spp. Estudiadas.

Los resultados obtenidos sugieren que estos compuestos son capaces de despolarizar la membrana mitocondrial y producir estrés oxidativo a altas concentraciones pero que el mecanismo causante de la muerte celular es principalmente la disrupción de la membrana citoplasmática. La membrana citoplasmática es esencial para la viabilidad de todo tipo de células, debido a eso es una diana atractiva para el desarrollo de compuestos antifúngicos. Además, este modo de acción es muy interesante ya que el hecho de que el tensioactivo no actúe frente a una diana muy concreta del microorganismo puede dificultar considerablemente el desarrollo de resistencia frente a estos compuestos.

Daños en la membrana citoplasmática de bacterias también han sido descritos para otros tensioactivos derivados de aminoácidos (Pinazo et al., 2016). Mediante experimentos de citometría de flujo se observó que cuando *S. typhimurium* y *S. aureus* eran tratados con un compuesto derivado de arginina (Lauroil arginina etil éster) se producía una despolarización de la membrana celular que daba lugar al colapso de la cadena respiratoria y ocasionaba un importante disminución de la viabilidad celular (Rodríguez et al., 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los obtenidos por Mimee et al., (2009) para un biotensioactivo producido por *Pseudozyma flocculosa*, el flocculosin. Este compuesto es un glicolípido con estructura anfipática. Los estudios llevados a cabo por estos autores pusieron de manifiesto que cuando cepas de *C. albicans* eran tratadas con este compuesto se producía una pérdida rápida del contenido intracelular de potasio (un 25% en menos de 5 minutos) debido a un daño directo en la membrana celular (Mimee et al., 2009). También se observó que el flocculosin, un biotensioactivo aniónico, actuaba frente a la *Candida albicans*

desorganizando la membrana celular así como la mitocondrial (Mimee et al., 2009). Estudios muy recientes muestran que la permeabilización de la membrana plasmática de los hongos es el primer evento que ocurre cuando interaccionan tensioactivos catiónicos con estos microorganismos. Después de esto el compuesto da lugar a una serie de procesos en el interior de la célula que conllevan el desensamble de macromoléculas así como la disrupción de las membranas de los orgánulos internos de la célula (Jaber et al., 2018).

Sin embargo no siempre la interacción de tensioactivos con bacterias u hongos se da a nivel de membrana. Cuando *S. aureus* fue tratada con un tensioactivo geminal derivado de arginina la membrana se vio poco afectada, en este caso lo que observó es la formación de mesosomas y zonas claras en el citoplasma (Castillo et al., 2006). Recientemente, Yu et al., (2015) evaluaron el efecto de dos tensioactivos convencionales, uno catiónico (CTAB) y otro aniónico (SDS), en la integridad de la membrana plasmática de las cepas *C. albicans* en crecimiento. Estos autores no detectaron índices de daños en la membrana en su concentración máxima de estudio (8 µg/mL). El tipo de mecanismo que ejercen los QACs fue estudiado mediante isotermas de adsorción, viabilidad celular y movilidad electroforética; los resultados mostraron que el mecanismo que ejercían estos compuestos sobre los hongos se debía fundamentalmente a que la carga de la superficie celular cambiaba de negativa a positiva (Vieira et al., 2006). En el caso de tensioactivos geminales catiónicos, medidas de inhibición respiratoria y observaciones mediante microscopia electrónica indicaban que el efecto fungicida de estos compuestos frente a *S. cerevisiae* no era debido a la lisis derivada de la desorganización de la membrana citoplasmática sino que lo que se

producía era la destrucción o alteración de las membranas de los orgánulos internos de la célula que da lugar a la inhibición de los enzimas respiratorios localizados en la mitocondria (Shirai et al., 2009). El tratamiento de células de *Candida albicans* con tensioactivos catiónicos con dos grupos polares catiónicos daba lugar a una disrupción de la membrana mitocondrial y un proceso de estrés oxidativo debido a la formación de ROS; sin embargo cuando estos tensioactivos tenían una cadena alquílica larga no se observaba la producción de ROS lo cual sugería que estos compuestos debido a su alto contenido hidrófobo eran capaces de incorporarse en la membrana plasmática sin penetrar en el interior de la célula (Paluch et al., 2018).

Según la bibliografía el modo de acción de antibióticos como niphimycin que posee un grupo guanidino y AMPHO B conlleva la liberación de iones de potasio y material intracelular así como la producción de ROS (Usuki et al., 2006).

También han propuesto que el mecanismo de interacción con levaduras está relacionado con el desarrollo de hifas. Las levaduras tipo *Candida* necesitan desarrollar hifas para invadir los tejidos y generar infección en el huésped (Gow et al., 2011). Parece ser que la organización del esqueleto de actina es esencial para el transporte de factores relacionados con el desarrollo de hifas (Sudbery, 2011). Según algunos autores los tensioactivos tienen la capacidad de desestructurar la membrana plasmática de la *C. albicans*, desplazando marcadores citoplasmáticos, seguido por una desorganización polarizada del esqueleto de actina, lo cual lleva a la levadura a la muerte (Yu et al., 2015). En este contexto, la interacción de estos derivados de arginina con la membrana plasmática de las especies de *Candida* spp. podría dar lugar a la

interrupción del desarrollo de esas hifas. Esta interrupción es muy interesante ya que reduciría la capacidad que tienen estas levaduras de invadir los tejidos.

Todos estos resultados ponen de manifiesto que la interacción de los tensioactivos con los hongos puede conllevar diversos mecanismos de acción y que es difícil determinar con precisión que acción es la que gobierna el proceso de la muerte celular. La estructura de los compuestos influye decisivamente en el tipo de mecanismo que ejercen. Por esta razón, y dado el interés de conocer estos mecanismos de cara a optimizar el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos es de gran utilidad determinar datos que ayuden a establecer relaciones estructura actividad.

4.7.2.4. Externalización de la Fosfatidilserina (PS) en especies de *Candida* spp. resistentes al fluconazol

La apoptosis o muerte celular programada, es el proceso por el cual las células se autodestruyen bajo el impulso de una señal. Mediante este proceso las células mueren a través de un mecanismo refinado que no produce inflamación (Lee et al., 2018).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la reducción de la viabilidad celular ocasionada por los ramnolípidos derivados de arginina es debida al daño que estos compuestos producen en la membrana plasmática de las cepas de *Candida* spp. resistentes al fluconazol. Esa sería la principal vía citotóxica inducida por los compuestos RLmez_Arg y monoRL_Arg, ya que un colapso en la membrana plasmática de *C. albicans* causa una fuga de componentes intracelulares importantes, como potasio, calcio y azúcar (Lee et al., 2018). Además, el calcio desempeña un papel

directo en la regulación de la expresión de las cascadas de señalización, factores importantes para la sobrevivencia celular (Liu et al., 2015).

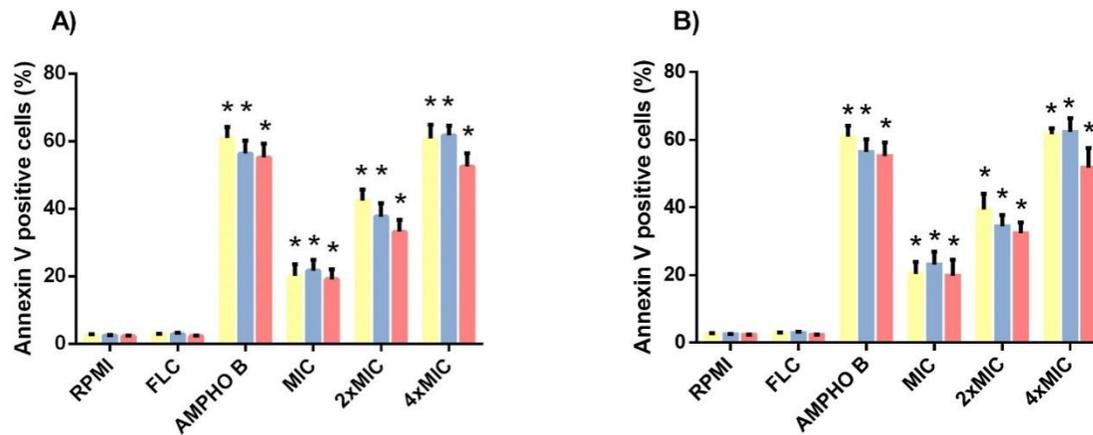


Fig. 41. Intensidad de fluorescencia de la anexina V en cepas de *C. albicans* (■), *C. tropicalis* (■) y *C. Parapsilosis* (■) resistentes al fluconazol. Cepas incubada por 24h en RPMI (Control del medio nutritivo) y expuesta al FLC (64 µg/mL), AMPHO B (4 µg/mL) y los derivados de arginina A) RLmez_Arg y B) monoRL_Arg en las concentraciones: CMI (7.8 µg/mL), 2xCMI (15.6 µg/mL), 4xCMI (31.2 µg/mL). P<0.05 comparado con el control de acuerdo con ANOVA seguido por Newman-Keuls test.

Con el fin de determinar si la muerte de las células de *Candida* ssp. se produce debido a un proceso apoptótico se ha determinado la presencia de fosfatidilserina en la membrana celular externa de células tratadas con los RLs. En este contexto, la detección de la apoptosis en una fase inicial puede ser determinada utilizando la Anexina V, una proteína con una alta afinidad por el fosfolípido fosfatidilserina. La Anexina V en presencia del ion Ca^{2+} (que debido al bloqueo de la bomba de calcio estará en gran cantidad en el citosol) se liga con elevada afinidad a la fosfatidilserina, presente en las membranas de las células apoptóticas (Hwang et al., 2012).

Los resultados obtenidos indican que después de 24 horas de exposición a FLC el porcentaje de células con fosfatidilserina en la membrana externa (suma de las dos

etapas apoptósicas: precoz y tardía) es similar al porcentaje que muestran las células no tratadas (Fig. 41.). Cuando las cepas fueron expuestas a los compuestos RLmez_Arg y monoRL_Arg en las tres concentraciones ensayadas (CMI, 2xCMI y 4xCMI), se observaron elevados niveles de fosfatidilserina externalizada ($p < 0.05$). Se observó que el porcentaje de externalización de PS era similar para las tres especies de *Candida* spp. estudiadas y que la cascada de señalización proteolítica que induce la apoptosis fue activada en las tres concentraciones de los ramnolípidos catiónicos en el estudio (Fig. 41. y Fig. A.3.).

Los resultados indican que el tratamiento de las especies de *Candida* spp. resistentes al fluconazol con los derivados de arginina induce la muerte celular por eventos apoptósicos con un mecanismo de acción similar al que ocurre en células tratadas con Anfotericina B (4 $\mu\text{g/mL}$).

4.7.3. Biofilms de cepas de *Candida* spp. resistentes al fluconazol

En la actualidad uno de las principales causas de infecciones microbianas y del desarrollo de resistencias es la presencia de biofilms. Cuando un microorganismo se deposita sobre una determinada superficie se forma una comunidad biológica estructurada denominada biopelícula bacteriana. Esta biopelícula se autorregula mediante moléculas de *quorum sensing* y crece envuelta en una matriz extracelular que la protege del medio e impide el ataque de agentes antimicrobianos lo cual dificulta enormemente su eliminación. Estudios recientes han puesto de manifiesto que aproximadamente el 80% de las infecciones microbianas están producidas por biofilms

(Nobile et al., 2015) y que en muchos casos estos biofilms están depositados en dispositivos médicos. Normalmente los biofilms están formados por bacterias, sin embargo en los últimos años el uso de antibióticos de amplio espectro así como el mayor número de pacientes inmunodeprimidos ha dado lugar a un importante aumento de las infecciones causadas por hongos, especialmente por levaduras del género *Candida* spp. Esta levadura también es capaz de formar biofilms sobre diferentes superficies. Los biofilms se depositan de forma similar a las bacterias salvo que en este caso en estas estructuras coexisten las diferentes formas de desarrollo del hongo: blastosporas, pseudohifas e hifas verdaderas (Nobile et al., 2015).

El desarrollo de hifas está relacionado con la formación de biofilms (Panariello et al., 2018). Estos biofilms son los principales causantes de la candidiasis invasiva, proceso infeccioso grave cuya incidencia ha aumentado de forma extraordinaria en los últimos años.

Dada la problemática que presentan este tipo de organizaciones microbianas y el hecho de que se ha observado que los azoles presentaban muy poca actividad frente a biofilms de *Candida* spp. (Marcos-Zambrano et al., 2016; Nagy et al., 2018) es importante el desarrollo de compuestos que sean activos frente a estas biopelículas.

En la bibliografía existen numerosos estudios que muestran que los biotensioactivos pueden reducir y dispersar la formación de biofilms bacterianos (Rivardo et al., 2009; Dusane et al., 2010). Sin embargo no existen muchas referencias acerca de la inhibición de biofilms de *Candida* spp. y en general los trabajos publicados utilizan una alta concentración de ramnolípidos para interactuar con biofilms de *C. albicans*. Por ejemplo, Turbhekar et al. (2015) encontraron que la adhesión de biofilms a placas de

microtiter se reducía hasta un 50% si estas placas eran tratadas con una solución de ramnolípidos al 5% en peso. También observaron que a concentraciones similares la disolución de ramnolípidos era capaz de eliminar los biofilms que ya se habían formado, los resultados obtenidos con estos ramnolípidos eran mejores que los obtenidos con CTAB. Sing et al. encontraron que a concentraciones elevadas de una muestra de diramnolípido se podía eliminar un biofilm de *C. albicans* hasta en un 90%, sin embargo a concentraciones inferiores a 310 µg/mL no se observa ningún efecto (Singh et al., 2013). También se observó que a una concentración de 50 mg/mL los RLs disminuían en un 50% la formación de biofilm de *Y. Lipolytica* mientras que con CTAB a la misma concentración solamente se obtenía una reducción del 30% (Dusane et al., 2012). La mayor efectividad del RL puede ser asociada a su alto carácter hidrófobo que podría compensar la falta de carga catiónica.

Dados los resultados descritos en la bibliografía así como la actividad antifúngica obtenida se llevó a cabo el estudio de la actividad antibiofilm de los derivados de arginina, ya que presentaban una actividad muy superior a los de lisina así como a los ramnolípidos precursores. También se evaluó el efecto del FLC así como de la Ampho B.

En este trabajo se evaluó si estos compuestos eran capaces de destruir biofilms maduros de tres especies de *Candida* spp. *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida parapsilosis*. (Fig. 42.). La actividad antibiofilm de estos compuestos depende de la concentración. El tratamiento de los biofilms de *C. albicans* y *C. parapsilosis* con los compuestos RLmez_Arg y monoRL_Arg a una concentración igual a 2xCMI (15.6 µg / mL) da lugar a una reducción aproximada del 50% de la viabilidad (CMI₅₀). Cuando

se aumenta la concentración a un valor de 10xCMI se llegan a obtener reducciones del 75%.

La actividad de estos compuestos frente a *C. tropicalis* es ligeramente superior, en este caso se observa que para una concentración igual a la CMI se obtiene una reducción de prácticamente el 50% mientras que para valores de 2xCMI, en el caso de la muestra de monoRL_Arg se obtiene una reducción de la viabilidad cercana al 75%. La actividad de estos compuestos frente a esta *Candida* resulta de interés dado que esta especie es especialmente activa en las zonas subtropicales donde vive más de la mitad de la población del planeta (Chai et al., 2010). Los resultados obtenidos con la AMPHO B muestran que este fármaco es un buen disgregador de biofilms formados por estas tres especies. Los valores de disrupción obtenidos indican que estos compuestos presentan actividad antibiofilm a concentraciones similares a las de la CMI. Este resultado presenta gran interés teniendo en cuenta que los biofilms de *Candida* son normalmente de 30-2000 veces más resistentes que las células plactónicas a los agentes antifungicos (Hawser et al., 1995). Esta resistencia está asociada a la alta densidad celular y la baja actividad metabólica de los biofilms. Estas características causan una difusión lenta del agente antifúngico en la matriz extracelular lo cual inhibe el acceso a las células de los hongos de dentro del biofilm (Nett et al., 2007).

La actividad que muestran estos derivados frente a los biofilms de *Candida* podría estar asociada a la hidrofobicidad de la molécula, la estructura ramnolípida así como a la presencia de una carga positiva. Está descrito que el revestimiento de determinadas superficies con biotensioactivos afecta seriamente la adhesión del biofilm (Banat et al., 2014). En el caso de los ramnolípidos parece ser que la inhibición de los

biofilms de *Candida* spp. está relacionado con la inhibición de las interacciones célula-célula, así como la célula al sustrato (Davey et al., 2003). Otros autores sugieren que el mecanismo de los (bio) tensioactivos frente a los biofilms de las especies de *Candida* pueden estar atribuidos a la acción desestabilizadora (interacciones entre fosfolípidos y surfactantes) que los tensioactivos son capaces de causar en las levaduras (Carrillo et al., 2003) o que estos últimos lleven a una ruptura de la arquitectura y del diseño del biofilm maduro en especies de *Candida* (Singh et al., 2013). También se ha observado que las bacterias tienen mecanismos para separarse de los biofilms y que en estos mecanismos pueden intervenir los ramnolípidos. La dispersión de los biofilms es un proceso complejo que conlleva numerosas etapas entre las que se incluyen la separación de la matriz y la activación de los cambios fisiológicos necesarios para que la bacteria viva en condiciones fuera del biofilm. Parece ser que los ramnolípidos dada su estructura pueden actuar en este proceso de dispersión socavando pozos en la estructura del biofilm, dispersando las bacterias y haciendo que vuelvan a ser sensibles a los compuestos antifúngicos (Boles et al., 2005) que en este caso es el mismo ramnolípidos derivado de arginina.

Por otro lado también se ha descrito que la carga catiónica puede favorecer la actividad antibiofilm. Los tensioactivos catiónicos pueden interferir en la membrana plasmática de las levaduras dando lugar a la pérdida de constituyentes celulares. Las estructuras amfífilas con carga catiónica permiten una mejor penetración y movilidad del compuesto en los biofilms de *Candida* pudiendo atravesar la rígida estructura formada por las capas de células. De hecho se ha observado que la actividad antibiofilm de un compuesto tensioactivo catiónico derivado de imidazolio frente a

biofilms de *Candida tropicalis* era muy superior a la del fluconazol, que no posee ni carácter tensioactivo ni carga catiónica. Tensioactivos catiónicos geminales así como derivados de amonio cuaternario con 2 cargas positivas poseen una marcada actividad antibiofilm (*C. albicans*) similar a la descrita para los RL derivados de arginina; a concentraciones entre 10-50 µg/mL eliminan un 50 % de los biofilms (Paluch et al., 2018; Oblak et al., 2013).

Nuestros resultados mostraron que los compuestos RLmez_Arg y monoRL_Arg poseen importantes propiedades antifúngicas frente a células planctónicas y habilidad efectiva de dispersar o desestructurar la arquitectura de biofilms maduros de *Candida* spp.. En este trabajo no se ha estudiado la capacidad que estos compuestos tienen de inhibir la adhesión de estas levaduras en la superficie. Este es el primer paso en la formación de los biofilms y por lo tanto su control es de especial relevancia en la lucha contra estas formaciones. Dada el carácter hidrofóbico de estos derivados RL de arginina así como su carga catiónica es de esperar que estos compuestos se absorban en diferentes tipos de superficie y puedan evitar la deposición de los biofilms. De Araújo et al., (2011) observaron que los cambios en las características hidrófobas de las superficies eran una de las claves en la disminución de la adhesión de bacterias en estas superficies (De Araújo et al., 2011). Además Paluch et al., (2018) observaron que tensioactivos catiónicos inhiben la formación de biofilms y que la eficacia depende de la superficie a estudiar y generalmente aumenta al aumentar la hidrofobicidad del compuesto (Paluch et al., 2018).

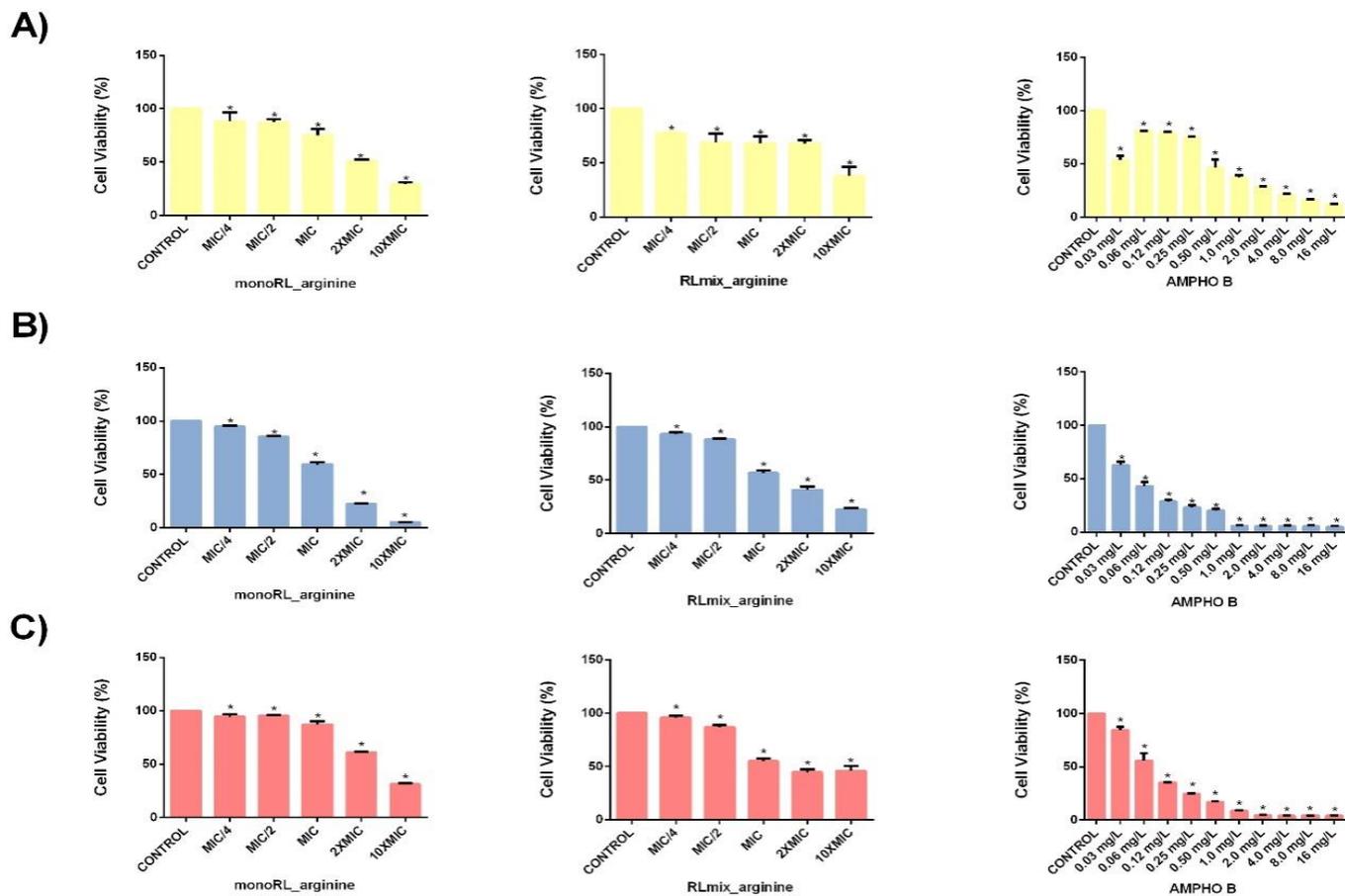


Fig. 42. Actividad antibiofilm de los compuestos RLmez_Arg, monoRL_Arg y el control anfotericina B contra biofilms de A) *Candida albicans*, B) *Candida parapsilosis* y C) *Candida tropicalis* incubados por 24h. Las células de biofilm fueron tratadas con los derivados de arginina en las concentraciones: CMI/4 (1.95 µg/mL), CMI/2 (3.9 µg/mL), CMI (7.8 µg/mL), 2xCMI (15.6 µg/mL) y 10XCMI (78 µg/mL).

4.8. Ramnolípidos aniónicos y catiónicos como agentes antiprotozoario

Las infecciones producidas por protozoos patógenos representan una amenaza importante para la salud pública y para la vida de miles de personas en todo el mundo. Estas infecciones están asociadas con una importante mortalidad y un gran impacto económico (WHO, 2016). En la actualidad el alcance de todo tipo de infecciones suele ser global, sin embargo, la mayor concentración de las enfermedades producidas por protozoos se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Leite deSousa-Gomes et al., 2017). Los protozoos son muy diferentes entre ellos por lo que producen enfermedades que requieren tratamientos muy distintos como la malaria, la amebiasis, la leishmaniosis o la toxoplasmosis. Dada la diferente naturaleza de los protozoos el hecho de que un determinado fármaco sea activo frente a uno de ellos no significa que vaya a tener actividad frente al resto. Esto dificulta el desarrollo de nuevos medicamentos para estas enfermedades (Hefnawy et al., 2017). Además, son pocas las instituciones interesadas en financiar nuevos antiparasitarios y las pocas que existen son organizaciones privadas tales como *Medicines for Malaria Venture (MMV)*, *Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNDi)*, *Unidad de Desarrollo de Medicamentos de la Universidad de Dundee* y la *Fundación Bill y Melinda Gates en colaboración con el Consorcio para el Desarrollo de Medicamentos Parasíticos (CPDD)*. Esas organizaciones disponen de recursos limitados y bajos presupuestos. Sin embargo están intentando encontrar una solución para las enfermedades infecciones parasitarias mediante el desarrollo de nuevos antiparasitarios o formulaciones para ensayos clínicos.

Ante esta situación. Parece evidente que sea un desafío el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos efectivos frente a los protozoos parásitos en los seres humanos. Dadas las interesantes propiedades biológicas que presentan los ramnolípidos estudiados en este trabajo, se pensó que también podían ser activos frente a este tipo de microorganismo. Para comprobar si esta premisa era cierta se evaluó la actividad de los RLs aniónicos así como los derivados de arginina y lisina frente a dos protozoos: *Acanthamoeba castellanii* y *Leishmania infantum*.

4.8.1. Actividad de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos frente a *Acanthamoeba castellanii*

Acanthamoeba es una de las amebas más comunes que pueden encontrarse en hábitats muy diversos como agua de mar, agua dulce, en el polvo o en residuos. Este patógeno oportunista puede colonizar tejidos humanos dando lugar a lesiones muy serias: lesiones cutáneas (ulceraciones), una meningitis denominada Encefalitis Amebiana Granulomatosa (GAE, sigla en inglés) y la queratitis amebiana de la córnea (AK, sigla en inglés) que se produce por penetración de la ameba a través de la mucosa ocular o por traumatismos o lesiones corneales. La AK puede afectar a individuos sanos y normalmente está asociada al uso de lentes de contacto contaminadas (Khan et al., 2006). En general, las infecciones sistémicas y las que afectan al sistema nervioso central están más relacionadas con pacientes que presentan inmunodepresión generalizada, mientras que, los caso de infecciones corneales están más favorecidas por una depresión local (Lorenzo-Morales et al., 2015). Algunas especies como *A. polyphaga* (Tomita et al., 2017) y *A. triangularis*

([Xuan et al., 2008](#)) pueden estar relacionadas con esas patologías. Sin embargo, de todas las especies de *Acanthamoeba*, la más estudiada es la *Acanthamoeba castellanii* ([Marciano-Cabral et al., 2003](#); [Lamb et al., 2015](#)).

La AK por *Acanthamoeba* es una infección invasiva de la córnea, que se caracteriza por una pérdida gradual de agudeza visual, llegando en algunos casos, a provocar ceguera. Con frecuencia la queratitis amebiana por *Acanthamoeba* (AK) es diagnosticada incorrectamente ya que los síntomas son comunes a otras enfermedades oculares y están relacionadas al uso y mantenimiento incorrecto de lentes de contacto, en particular de lentes de contacto blandas ([Fernández-Ferreiro et al., 2017](#); [Niyati et al., 2016](#)).

La incidencia de la AK en el mundo ha aumentado significativamente en los últimos años debido al uso masivo de lentes de contacto ([Lorenzo-Morales et al., 2015](#)). La erradicación de las infecciones producidas por *Acanthamoeba* es difícil debido a que en condiciones adversas este microorganismo se enquistas y las terapias resultan mucho menos efectivas. Actualmente las infecciones de tipo AK se tratan con una combinación de antisépticos catiónicos de tipo biguanidinas que actúan a nivel de membrana y de diamininas que inhiben la síntesis del ADN ([Lorenzo-Morales et al., 2015](#)). Sin embargo estos tratamientos son muy arduos; inicialmente se requieren aplicaciones cada hora y el tratamiento se ha de mantener durante 6-12 meses. Todo esto genera problemas secundarios debido a la toxicidad del fármaco y además da lugar a la aparición de resistencias. Ante esta situación el desarrollo de compuestos activos frente a *Acanthamoeba* que sean más naturales, con menor toxicidad frente a células humanas y que puedan ser sintetizados de forma simple y con bajo coste

puede mejorar sensiblemente los tratamientos de las enfermedades causadas por este microorganismo.

Los tensioactivos son utilizados en la actualidad para limpiar las lentes de contacto. La principal función de estos compuestos es eliminar los depósitos que se acumulan en la superficie de las lentes (Isomaa et al., 1979). Las formulaciones más frecuentemente utilizadas están compuestas por Poloxamer o Pluronic®, compuestos hidrofílicos y no iónicos, entre los que destacan el Poloxamer 407 (Pluronic® F127) y Poloxamer 237 (Pluronic® F87) en una solución única; Éstos compuestos son copolímeros lineales formados por bloques de óxido de etileno y óxido de propileno (Chiappetta et al., 2008; Chiappetta et al., 2010). En este contexto, se consideró de interés el estudio del efecto de los ramnolípidos (aniónicos y catiónicos) sobre el trofozoítoameboide o forma vegetativa infectante de la *Acanthamoeba castellanii*.

La figura 43 muestra la actividad de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos frente a el trofocito de *A. castellanii*. Como puede verse los RLs aniónicos muestran actividad frente a este protozoo y la actividad depende de la concentración. El IC₅₀ para los compuestos RLmezcla y monoRL fue de 42.8 y 48.1 µg/mL, respectivamente. Los resultados indican que el número de ramnosas en la molécula no afecta la actividad frente a esta *Acanthamoeba*.

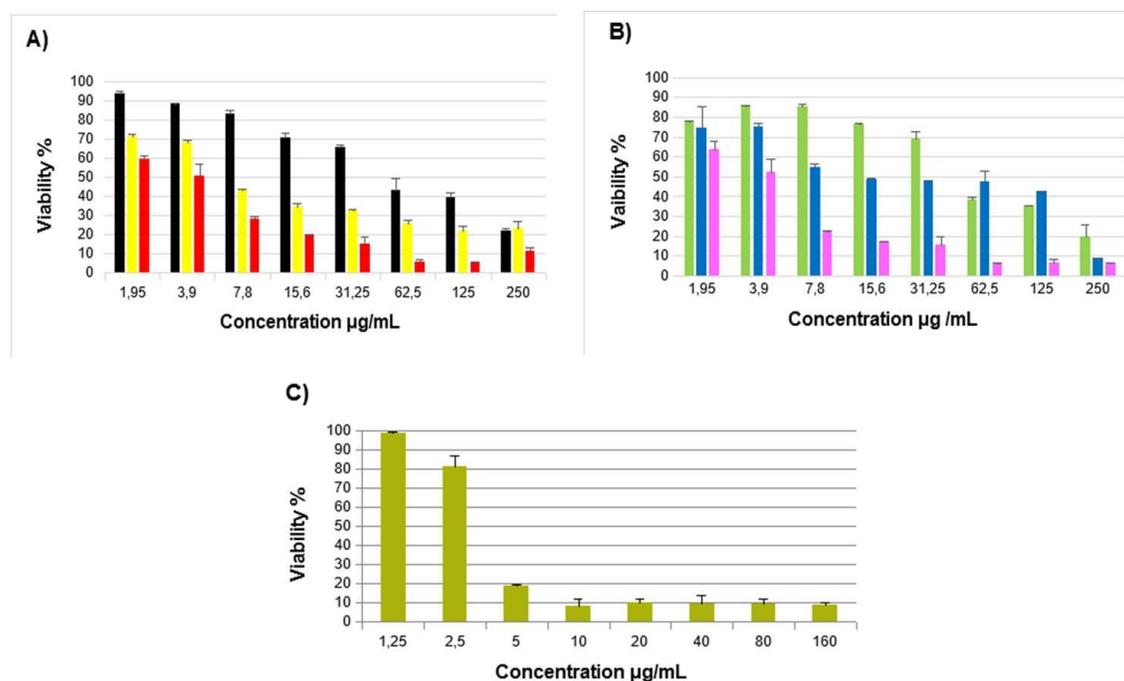


Fig. 43. Actividad amebicida de los compuestos ramnolipídicos y sus derivados y el control AMPHO B frente *Acanthamoeba castellanii*. **A)** monoRL (■), monoRL-Lys (■), monoRL-Arg (■); **B)** RLmez (■), RLmez-Lys (■), RLmez_Arg (■) y **C)** control AMPHO B (■).

En la [figura 43](#) se observa que la actividad de los derivados de aminoácidos es muy superior a la de los RLs precursores. Los valores de IC_{50} para las muestras de RLmez_Arg y monoRL_Arg fueron 4,21 y 4,05, $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Los resultados para los derivados de lisina también se mostraron prometedores con valores de IC_{50} para las muestras RLmez_Lys y monoRL_Lys de 13,2 y 6,7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La presencia de la carga catiónica en la molécula parece favorecer la interacción de este tipo de compuestos con las células de *Acanthamoeba*.

Hasta el momento existen escasos estudios que muestren si los tensioactivos catiónicos pueden ser una alternativa interesante para el tratamiento antiparasitario. Los compuestos derivados de amonio cuaternario (CTAB o CPB) se utilizan para la desinfección de lentes de contacto ([Zanetti et al., 1995](#)). Estos compuestos presentan

una actividad algo inferior a la obtenida para los derivados de arginina, sin embargo la toxicidad celular de estos derivados es muy alta (Lukáč et al., 2013). La introducción de un grupo fosfato en la estructura de los derivados de amonio cuaternario da lugar a compuestos cuya actividad en algunos casos es similar a la del CTAB y que presentan menor toxicidad celular (Lukáč et al., 2013). Se ha descrito que tensioactivos organofosforados geminales también presentan actividad frente al protozoo oportunista *Acanthamoeba*, en este caso se observó que los compuestos con valores de CMC muy bajos o muy altos no presentaban actividad (Lukáč et al., 2014). En otro estudio fue descrito que algunos compuestos de alquifosfocolinas con cadenas de alquilo ramificadas (Isophol-PC) inhibían el crecimiento del trofozoíto de dos especies de *Acanthamoeba*; la actividad amebicida aumentaba con la longitud de las cadenas de alquilo hasta un valor de 16 en el que se observaba el fenómeno de cut-off, a partir de este valor un aumento en la hidrofobicidad de la molécula daba lugar a una disminución de la actividad biológica (Lukáč et al., 2012). El mecanismo de actuación de estos tensioactivos catiónicos no está aún estudiado, sin embargo estos autores han propuesto que este tipo de compuestos actúan como solubilizantes de la membrana citoplasmática. Este tipo de mecanismo concuerda con el que se ha obtenido para el caso de las levaduras así como para el descrito para tensioactivos antimicrobianos (Pinazo et al., 2016). La propuesta de que los tensioactivos actúan como solubilizantes de la membrana también explicaría el hecho de que los compuestos con carga positiva poseen una actividad muy superior a los de carga negativa.

Los seis productos ensayados (ramnolípidos aniónicos y catiónicos) presentaron actividad antiparasitaria en el rango de estudio (250 -1 µg/mL). Los derivados de

arginina presentaron mayor actividad amebicida con una IC_{50} menor de 5 $\mu\text{g/mL}$, así como los derivados de lisina con valores de IC_{50} por debajo de 10 $\mu\text{g/mL}$. En ambos casos los ramnolípidos catiónicos son más efectivos que los correspondientes productos de partida. Esos resultados muestran que la modificación estructural de los ramnolípidos aniónicos en derivados de carga positiva (derivados de aminoácidos – ramnolípidos catiónicos), fue eficiente. Una de las posibles aplicaciones de este tipo de compuestos podría ser la mejora de la actividad anti-*Acanthamoeba* de los fármacos que actualmente existen en el mercado. De hecho, recientemente se ha publicado un estudio que muestra que dentrímeros catiónicos con la carga positiva en grupos guanidino aumentan significativamente la actividad anti-*Acanthamoeba* de la clorhexidina glucamato, uno de los agentes que normalmente se utiliza en los tratamientos médicos ([Herederro-Bermejo et al., 2019](#)).

Dados los prometedores resultados obtenidos en cuanto a la actividad amebicida de estos compuestos y teniendo en cuenta que la forma más común de las infecciones por *A. castellanii* ocurre por lesiones cutáneas, se procedió al estudio de la citotoxicidad frente a línea celular de queratinocitos (HaCaT), originaria de piel humana. El método de viabilidad utilizado fue la captación del colorante rojo neutro (NRU) que evalúa el efecto de los compuestos a nivel de membrana plasmática. En la [tabla 10](#) se muestran los valores de IC_{50} , de los seis tensioactivos estudiados, frente a la *A. castellanii* y la línea celular de queratinocitos (HaCaT). Como puede verse los valores de IC_{50} frente a la *Acanthamoeba* son muy inferiores a los que se obtuvieron frente a línea celular HaCaT. La mayor toxicidad frente a esta línea celular se obtuvo con los derivados de

arginina, lo cual está en concordancia con la mayor actividad que estos compuestos han mostrado en los estudios biológicos llevados a cabo en esta memoria.

Tabla 10. IC₅₀ de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos sobre *A. castellanii* y los queratinocitos (HaCaT) con su respectivo método (NRU) de citotoxicidad.

IC ₅₀ Media (µg / mL) ± Desvío Estándar (n=3)						
	RL_mez	monoRL	RLmez _Arg	MonoRL _Arg	RLmez _Lys	MonoRL _Lys
<i>A. castellanii</i>	42.78±0.05	48.10±0.01	4.21±0.52	4.05±0.27	13.2±0.30	6.70±0.38
Células (HaCaT) Método NRU	111.4±0.01	97.3±3.09	57.2±2.18	53.8±0.03	144±2.31	129±1.44

A partir de los valores que se muestran en la [tabla 10](#) se determinó el Índice de Selectividad (IS) de estos compuestos ([Fig. 44.](#)).

$$IS = \frac{(IC_{50} \text{ de la línea célula HaCat})}{(IC_{50} \text{ de la } A. \text{ castellanii})}$$

Este índice es una relación entre la toxicidad frente a la HaCat y la toxicidad frente a la *A. castellanii*, relación entre la citotoxicidad y la actividad amebicida, y nos indican si estos compuestos atacan selectivamente a las células de acanthamoeba ([Adaptado de Nunes et al., 2016](#)).

Valores de IS mayores de 1 indican que el compuesto actúa selectivamente frente al protozoo, esto es, a los valores que es activo frente al protozoo no muestra toxicidad frente a la línea celular estudiada. Sin embargo, los valores por debajo de uno indican una mayor toxicidad para los queratinocitos (células de piel) y baja selectividad frente a la *A. castellanii*.

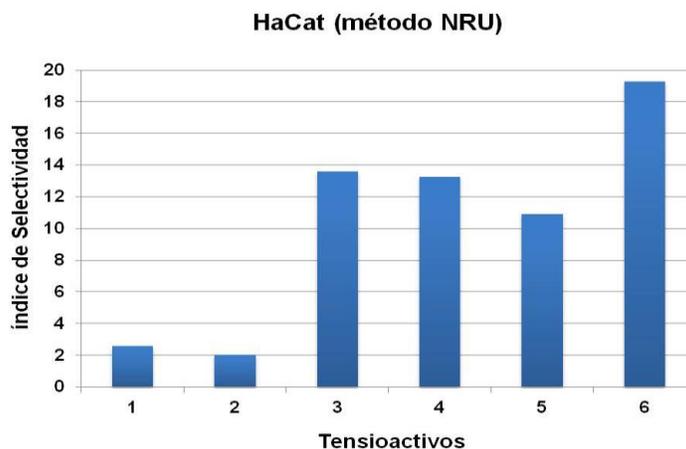


Fig. 44. Índice de Selectividad (SI) de los diferentes tensioactivos: (1) RLmez; (2) monoRL; (3) RLmez_Arg; (4) monoRL_Arg; (5) RLmez_Lys; (6) monoRL_Lys. Considerando el método de viabilidad NRU para la línea celular HaCaT.

Como se observa en la [figura 44](#), todos los ramnolípidos poseen un valor de IS mayor de 1 lo cual significa que todos estos compuestos presentan selectividad frente a la *Acanthamoeba*. Los compuestos de partida RLmez y monoRL muestran selectividad moderada. Los compuestos derivados de arginina (RLmez_Arg y monoRL_Arg) así como los derivados de lisina (RLmez_Lys y monoRL_Lys) muestran índices de selectividad mayores que diez lo que significan que son compuestos que muestran una selectividad alta frente a estos protozoos. Estos resultados son muy interesantes ya que indican que estos productos pueden ser potencialmente utilizados como agentes anti-*Acanthamoeba*, con un amplio margen de seguridad ya que presentan un amplio

margen de actuación frente a la *acanthamoeba* en el cual no muestran toxicidad celular frente a los queratinocitos.

Hasta el momento no hay ningún estudio de Índice de Selectividad que evalúe la especificidad amebicida de los tensioactivos en relación a la citotoxicidad de los mismos en células de piel. Este tipo de estudios comparativos entre células de microorganismos patógenos y líneas celulares sanas puede ser un enfoque adecuado para la selección toxicológica de nuevos compuestos químicos con aplicaciones farmacéuticas.

4.8.2. Actividad anti-*Leishmania* de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos

La *Leishmania* es el otro protozoo que se utilizó para evaluar la actividad de estos compuestos frente a este tipo de microorganismos. La leishmaniosis es un grupo de enfermedades causadas por varias especies de *Leishmania*. Este parásito constituye un serio problema para la salud debido al aumento de su incidencia así como al incremento de la resistencia de estos parásitos a los medicamentos que se utilizan para su erradicación. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud ([WHO, 2016](#)), las infecciones causadas por estos parásitos son enfermedades peligrosas debido al creciente número de casos donde el virus de la inmunodeficiencia humana y *Leishmania* simultáneamente infectan al paciente. Los Tratamientos que se utilizan en la actualidad no resultan satisfactorios ya que utilizan medicamentos con una elevada toxicidad (stibogluconato sódico, anfotericina B, pentamidina, miltefosina) lo que hace que muchas veces el paciente tenga que abandonar la terapia debido a los efectos

secundarios. Además normalmente se requiere de largos periodos de tratamiento que encarece mucho los costes (Hefnawy et al., 2017).

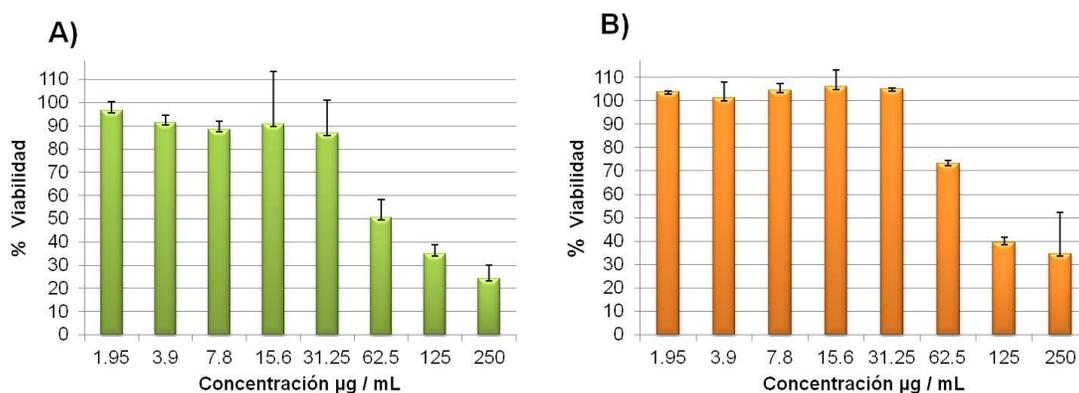


Fig. 45. Actividad anti-*Leishmania* de los ramnolípidos aniónicos: A) RLmezcla y B) monoRL

Por todo esto también hace falta desarrollar nuevos agentes activos frente a estos microorganismos. Por esta razón se evaluó la actividad frente a este tipo de protozoos de los RLs desarrollados en este trabajo. En concreto se estudió la actividad *in vitro* de estos compuestos frente la forma extracelular promastigota de *L. infantum*. Para cada uno de los compuestos, se calcularon los valores de IC_{50} , concentración mínima de RLs necesaria para reducir la viabilidad celular de estos microorganismos en un 50%.

La figura 45 muestra el porcentaje de células viables promastigota de *L. infantum* después de ser tratadas con diferentes concentraciones de los ramnolípidos aniónicos. Los valores de IC_{50} para las muestras de RLmez y MonoRL fueron de 58,74 y 90.33 µg / mL respectivamente. Considerando la IC_{50} de los productos comerciales utilizados para combatir este parásito, 5 µg / mL para la Amphotericin B (Ponte-Sucre et al., 2009)

y 8 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para la glucantime (Alptuzun et al., 2013), se puede considerar que estos compuestos poseen una actividad moderada frente a la *Leishmania*.

La actividad anti-*leishmania* de los derivados de arginina mejoró significativamente (Fig. 46.) ($P < 0.05$). Los valores de IC_{50} obtenidos para RLmez_Arg, monoRL_Arg fueron de 27.23, 21.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Los derivados de lisina también mostraron mejor actividad frente a *Leishmania* que los RL precursores con valores de IC_{50} de 36.92 y 29.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para, RLmez_Lys y monoRL_Lys, respectivamente (Fig. 46.). La mejor actividad de los derivados de aminoácidos podría ser debida a la carga catiónica de los compuestos. Algunas investigaciones llevadas a cabo con compuestos catiónicos indican que una carga N^+ en un nitrógeno cuaternario se requiere para unirse a los fragmentos de ADN de cara a poseer actividad antiinfectiva (Zhu et al., 2007). De hecho se han descrito mono y bisquaternarios derivados de piridinium con actividad antileishmania (Bharate et al., 2010). La importancia de la carga catiónica también queda reflejada en los resultados obtenidos en este trabajo, los derivados de arginina con una carga situada en el grupo guanidino con un pK_a mayor mostraron mejor actividad frente a este protozoo.

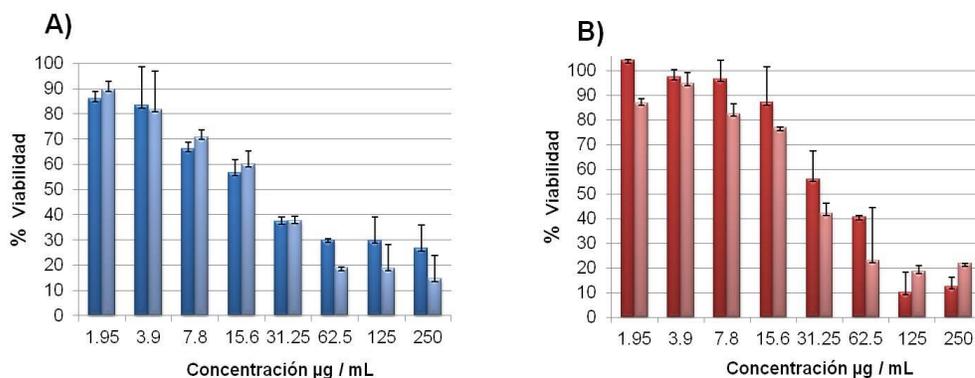


Fig. 46. Actividad anti-*Leishmania* de los ramnolípidos catiónicos: **A)** RLmez_Arg (■) monoRL_Arg (□) y **B)** RLmez_Lys (■) monoRL_Lys (□).

Es sabido que la *L. infantum* en su forma amastigota se torna un parásito intracelular que en mamíferos, se aloja en macrófagos y o células dendríticas (Bates et al., 2004). Por lo tanto los compuestos viables para el tratamiento deben presentar actividad frente a los parásitos a concentraciones a las cuales no son tóxicos frente a los macrófagos. Con el fin de evaluar la viabilidad de estos compuestos en el tratamiento de este tipo de infecciones se determinó la citotoxicidad de los mismos frente a la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Los valores de IC₅₀ frente a esta línea celular se muestran en la tabla 11. En esta tabla también se incluye el Índice de Selectividad.

Tabla 11. La Concentración Inhibitoria de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos frente a células promastigotas de *L. Infantum* y la Concentración citotóxica frente a línea celular RAW 264.7 y el Índice de Selectividad

Compuestos	IC50 (µg / mL) <i>L. infantum</i>	CC50 (µg / mL) Células RAW 264.7	IS
RLmez	58.74 ± 1.65	35.38 ± 1.003	0.60
monoRL	90.33 ± 1.02	26.62 ± 1.03	0.29
RLmez_Arg	27.03 ± 1.14	9.86 ± 1.49	0.36
MonoRL_Arg	21.09 ± 1.78	11.62 ± 1.05	0.55
RLmez_Lys	36.92 ± 1.11	13.01 ± 1.01	0.35
MonoRL_Lys	29.50 ± 1.44	11.91 ± 1.18	0.40

Los resultados indican que tanto los tensioactivos aniónicos como los catiónicos presentaron índices de selectividad inferiores a 1. Esto significa que estos compuestos presentan actividad frente a este parásito pero que no actúan selectivamente sobre él ya que los valores de IC_{50} frente a las células huésped son inferiores a los encontrados frente a las células promastigotas de *L. infantum*. La bibliografía sobre este tema indica que la forma promastigota de las especies de *Leishmania* son agresivamente resistentes (Leprohon et al., 2009) y que uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia a fármacos en *Leishmania* consiste en la disminución intracelular del fármaco mediante un incremento en el eflujo del mismo al medio extracelular o una reducción de su entrada (Uzcategui NL et al. 2008).

Los resultados obtenidos sugieren que este tipo de compuestos podrían ser un interesante punto de partida para el desarrollo de nuevos sistemas activos frente a la Leishmaniosis. Se podría llevar a cabo alguna modificación estructural que haga más selectiva su actividad. Por otro lado también se podría estudiar la actividad de formulaciones liposomiales preparadas con estos compuestos, está descrito que este tipo de formulaciones puede rebajar la citotoxicidad de tensioactivos catiónicos. Otra sugerencia sería hacer pruebas con estos nuevos tensioactivos en combinación con medicamentos antiparasitarios ya existentes para evaluar posibles sinergias y extender su utilidad para la generación de nuevas formulaciones con diferentes fortalezas/combinaciones/regímenes de dosificación para el descubrimiento de nuevos medicamentos.

4.9. Ramnolípidos catiónicos como agentes para terapia genética

Los tensioactivos catiónicos dicatenarios son compuestos que presentan un gran potencial en el transporte de moléculas bioactivas o terapia genética ([Bhattacharya et al., 2016](#)). La terapia genética consiste en introducir en las células vivas genes sanos que sustituyan a aquellos defectuosos que causan enfermedades. Actualmente los virus constituyen la forma más efectiva de incorporar ADN en las células, ya que poseen la ventaja de atravesar fácilmente las membranas celulares y llegar al núcleo ([Vannucci et al., 2013](#)). Sin embargo, este método presenta ciertas desventajas, su capacidad de transportar ADN es limitada y la respuesta inmunológica del ser vivo es impredecible ([Mintzer et al., 2008](#)).

Algunos lípidos catiónicos con dos cadenas alquílicas como el DOTAP son eficaces agentes de transfección cuando se combinan con lípidos neutros ([Ciani et al., 2004](#)). El problema que presentan estos compuestos es la baja biodegradación y alta toxicidad asociada a compuestos derivados de amonio cuaternario y el alto coste que conlleva su preparación.

Las vesículas o liposomas formados por tensioactivos catiónicos también son capaces de transportar ADN a las células ([Zheng et al., 2016](#)). Este tipo de vesículas condensa rápidamente el ADN debido a las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas de las vesículas y las negativas de los grupos fosfato del esqueleto de ADN. Además, parece ser que las cargas positivas de los complejos formados por ADN/tensioactivo facilitan la interacción de estos agregados con las membranas celulares, facilitando la internalización del material genético por endocitosis.

Los tensioactivos con estructura ramnolípida preparados en esta tesis son biodegradables, muestran niveles de toxicidad moderados y pueden ser preparados de forma sencilla y económica. Por esta razón podrían ser un interesante punto de partida para desarrollar nuevos vectores de terapia génica. Con el fin de constatar si los compuestos objeto de este estudio podrían ser potencialmente utilizados en este tipo de aplicaciones se han llevado a cabo estudios encaminados a conocer si estos compuestos son capaces de interaccionar eficazmente con macromoléculas de ADN.

El primer estudio consistió en determinar la capacidad que estos tensioactivos tienen de desplazar moléculas de bromuro de etidio (BE) de los complejos BE/ADN. El bromuro de etidio es una molécula que contiene 4 anillos aromáticos y una carga positiva. Esta molécula puede interaccionar con las bases de ADN situándose en el interior de la hélice. La fluorescencia que emite el bromuro de etidio libre es muy inferior que la que produce cuando forma parte del complejo BE/ADN.

Las [figuras 47 y 48](#) muestran los experimentos llevados a cabo con los dos ramnolípidos (RLmez y monoRL). Como puede verse la fluorescencia del BE aumenta drásticamente cuando se forma el complejo ADN/BE, el BE en este complejo está rodeado de un ambiente hidrofóbico que le protege del agua y del oxígeno molecular que neutralizan la emisión de fluorescencia. La adición de RLmez y monoRL no afecta la estabilidad del complejo, como se ve en las [figuras 47 y 48](#) la emisión de fluorescencia del complejo no cambia al ir añadiendo cantidades crecientes de ramnolípido lo que significa que las moléculas de la sonda se mantienen unidas al ADN. Las muestras de RLmez y monoRL poseen carácter aniónico o no iónico y debido

a la carga negativa no son capaces de interactuar con el ADN que también está cargado negativamente.

Las figuras 49, 50, 51 y 52 indican que la adición de los RL derivados de aminoácidos muestra un comportamiento muy diferente. La emisión de fluorescencia de la sonda disminuye gradualmente a medida que se añaden concentraciones crecientes de los RL catiónicos (RLmez_Arg, monoRL_Arg y RLmez_Lys, monoRL_Lys).

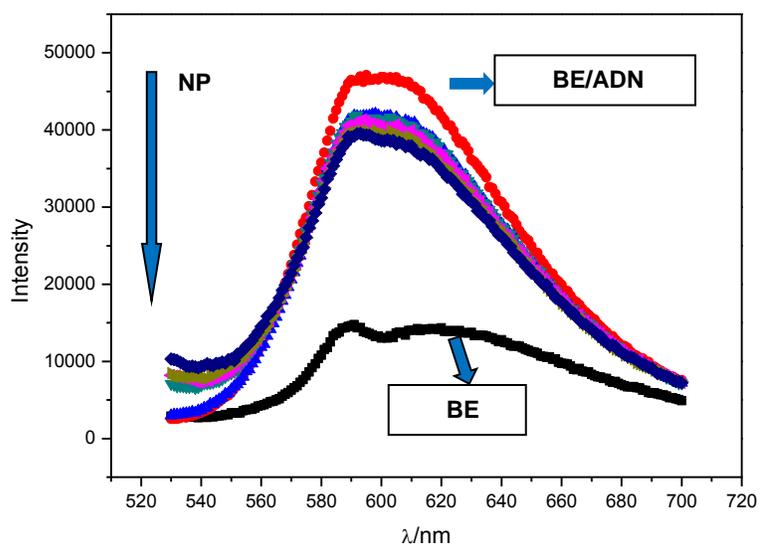


Fig. 47. Exclusión de la sonda de BE mediante diferentes concentraciones de la muestra de RLmez

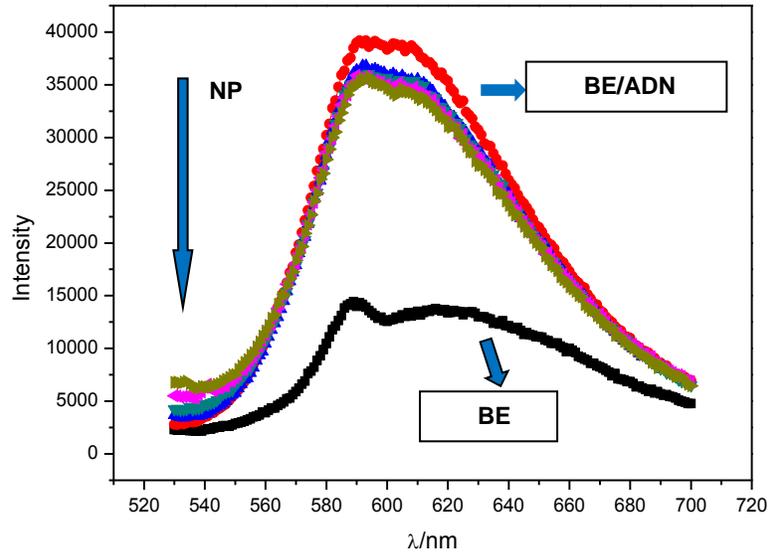


Fig. 48. Exclusión de la sonda de BE mediante diferentes concentraciones de la muestra de monoRL

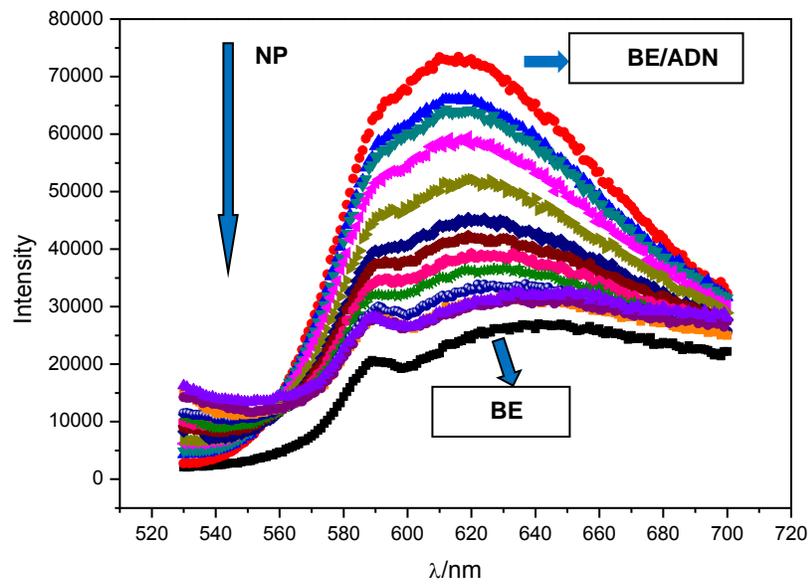


Fig. 49. Exclusión de la sonda de BE mediante diferentes concentraciones de la muestra de RLmez_Arg

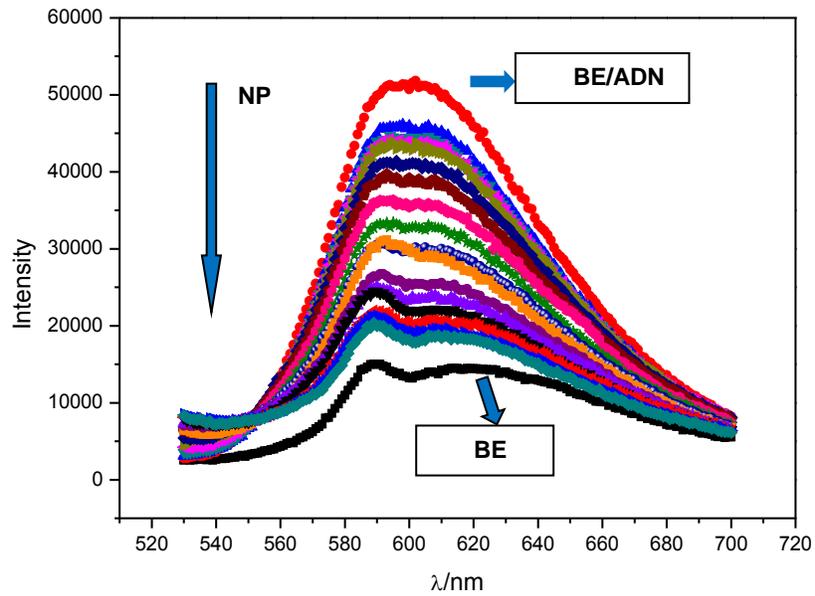


Fig. 50. Exclusión de la sonda de BE mediante diferentes concentraciones de la muestra de monoRL_Arg

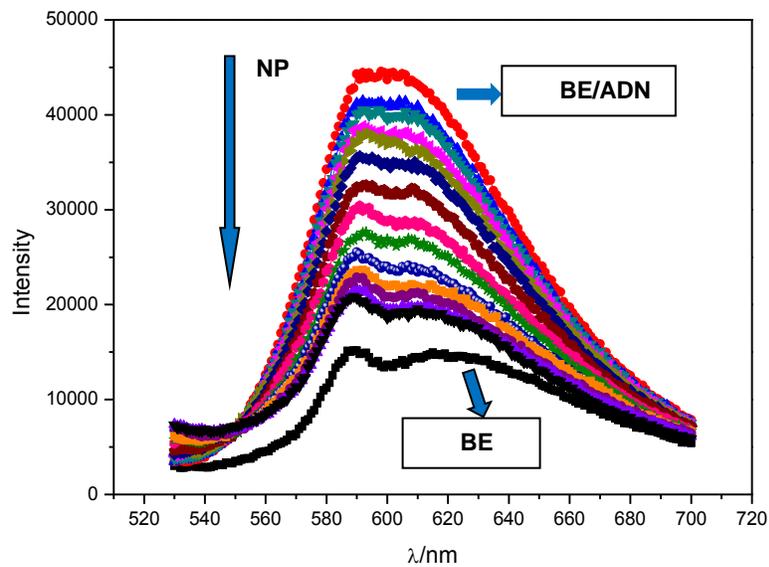


Fig. 51. Exclusión de la sonda de BE mediante diferentes concentraciones de la muestra de RLmez_Lys

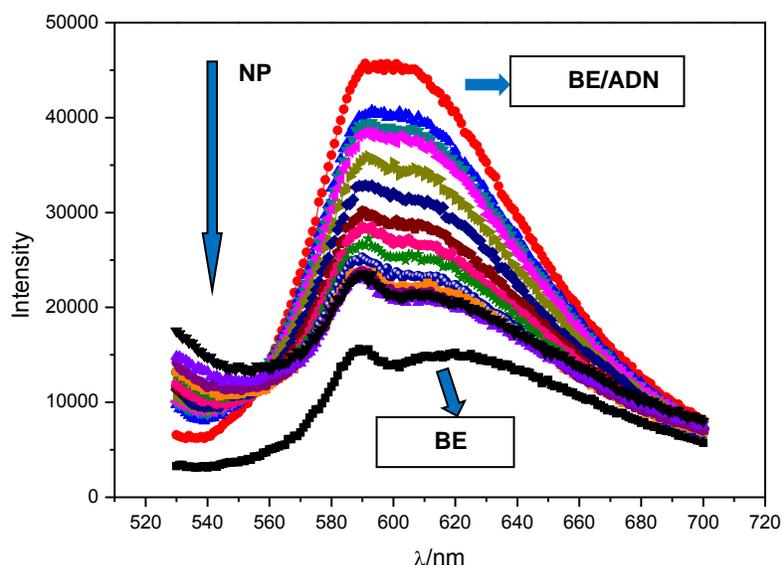


Fig. 52. Exclusión de la sonda de BE mediante diferentes concentraciones de la muestra de monoRL_Lys

Esto indica que el ADN es compactado por los agregados formados por los RL derivados de lisina y arginina y como consecuencia el bromuro de etidio es expulsado al seno de la disolución (Fig. 53.). Los resultados muestran que las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas entre el ADN y los RL catiónicos son muy fuertes, más que las que se unen el EB con el nucleótido.

A partir de las figuras 49, 50, 51 y 52 es posible calcular el porcentaje de bromuro de etidio que permanece unido al ADN en función de la relación tensioactivo catiónico/ carga ADN (N/P) (Fig. 54.). La figura 54 indica que los derivados catiónicos de los ramnolípidos muestran buena afinidad por el ADN y que los más efectivos son los basados en arginina. De hecho, para N/P=6 los derivados de arginina liberan aproximadamente el 85% mientras que los derivados de lisina provocan un menor desplazamiento del BE; 75% la muestra de monoRL_Lys y 60% la de RLmez_Lys. La

mayor afinidad por el ADN que muestran los derivados de arginina puede estar relacionada con el tipo de carga catiónica que poseen estos compuestos. El pKa del grupo amino protonado de la lisina es menor que el pKa del grupo guanidino de la arginina lo cual puede derivar en que la carga neta positiva de los derivados de lisina sea menor de 1. La mayor efectividad de los derivados de arginina también podría ser debida a la mayor facilidad que tienen estos compuestos de formar puentes de hidrógeno a través del grupo guanidino. Otro factor que también puede afectar la afinidad de los derivados de lisina es la forma de los agregados. Se ha observado que los tensioactivos que forman agregados con mayor curvatura dan lugar a interacciones menos eficientes con el ADN (Dasgupta et al., 2007).

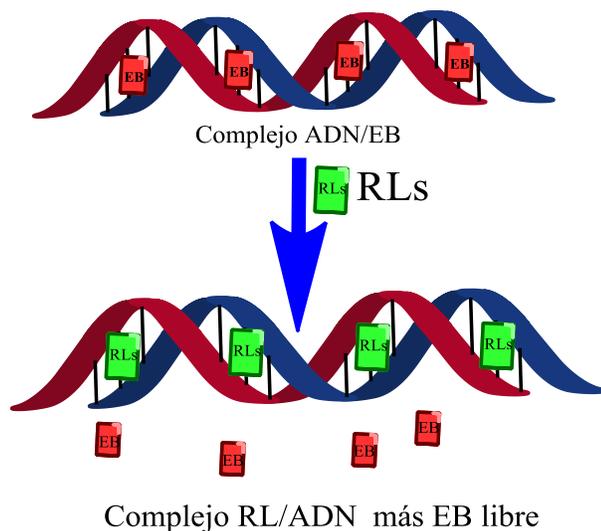


Fig. 53. Dibujo ilustrativo de las interacciones electrostáticas entre el ADN y los nuevos RLs catiónicos

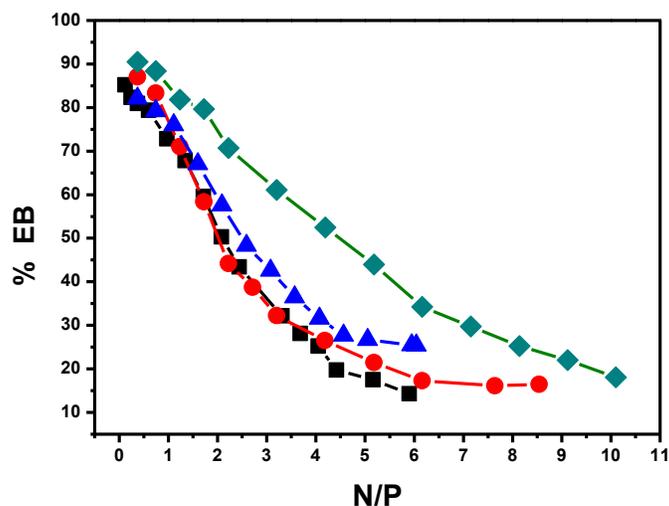


Fig. 54. Porcentaje de BE que queda sin desplazar a diferentes relaciones N/P de tensioactivo. monoRL_Arg (■), RLmez_Arg (●), monoRL_Lys (▲), RLmez_Lys (◆).

La afinidad que presentan estos RL catiónicos es similar a la encontrada para tensioactivos monocatenarios con largas cadenas alquílicas (Izumrudov et al., 2002; Jadhav et al., 2008). Los resultados obtenidos para los RL vienen determinados por el balance hidrófilo/lipófilo de estas moléculas, ya que poseen dos cadenas alquílicas cortas y un grupo hidrófilo voluminoso. Está descrito que la capacidad de formar agregados con el ADN depende principalmente de la hidrofobicidad de las moléculas, normalmente la cantidad de tensioactivo que se requiere para saturar el oligonucleótido aumenta al disminuir el carácter hidrofóbico de las moléculas (Sotirova et al., 2008; Bhadani et al., 2009).

La interacción de los nuevos tensioactivos con ADN también se estudió mediante electroforesis en gel de agarosa. Cuando se coloca ADN en gel de agarosa y se aplica un campo eléctrico, el oligonucleótido se replica a través del gel siguiendo el campo eléctrico. Cuando las cargas del ADN están parcial o totalmente neutralizadas

debido a la interacción de éste con otras moléculas, la migración del ADN es retardada o eliminada totalmente. La [figura 55](#) muestra las imágenes correspondientes a un experimento de electroforesis de ADN en agar en presencia de los RLs objeto de estudio en este trabajo.

Los resultados obtenidos indican que los RLs aniónicos no interaccionan con el ADN, como puede observarse en la [figura 55](#) la fluorescencia del patrón de ADN es similar a la observada en las muestras de ADN/RLs para todas las concentraciones ensayadas. La electroforesis de los sistemas de ADN con los ramnolípidos catiónicos muestra que estos compuestos forman complejos estables con el ADN que retardan la migración del oligonucleótido. A concentraciones bajas, menores de 50 μM , no se aprecia retardo en la migración del ADN. A concentraciones superiores se observa la pérdida de fluorescencia debido a la complejación y neutralización del ADN. Los derivados de arginina muestran una mayor pérdida de fluorescencia, de hecho en el caso del RLmez_Lys solamente se observa interacción con el ADN para la muestra más concentrada (200 μM). Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante medidas de fluorescencia con el bromuro de etidio y confirman que los ramnolípidos catiónicos derivados de aminoácidos son capaces de compactar el ADN. Este comportamiento puede ser muy interesante de cara a las posibles aplicaciones de estos compuestos.

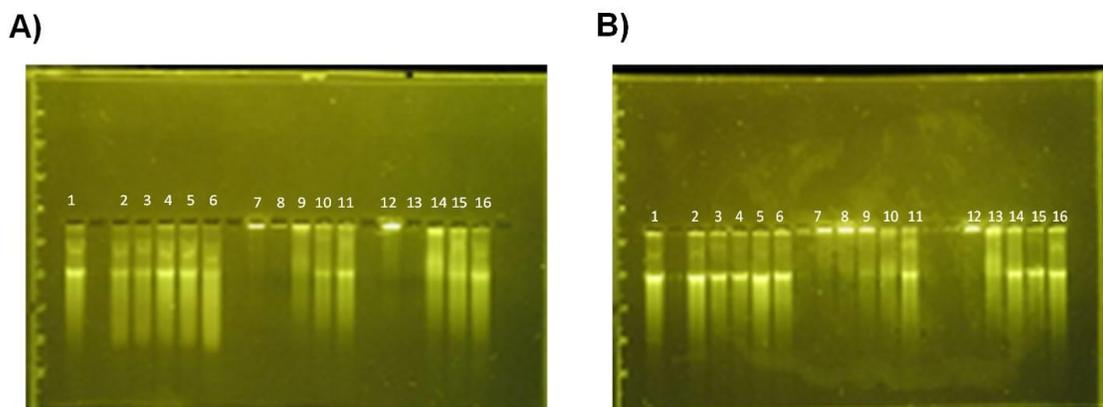


Fig. 55. Estudio de la interacción de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos con ADN mediante electroforesis en gel de agarosa. Unión del ADN con monoRL y sus derivados **(A)** y ADN con RLmez y sus derivados **(B)**. Control ADN libre (línea 1); monoRL y RLmez (líneas 2,3,4,5,6 en las concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 12,5 μM); MonoRL_Arg y RLmez_Arg (líneas 7,8,9,10,11 en las concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 12,5 μM); monoRL_Lys y RLmez_Lys (líneas 12,13,14,15,16 en las concentraciones de 200, 100, 50, 25 y 12,5 μM)

4.10. Modelos Celulares

En la actualidad, lo más adecuado para llevar a cabo el cribado y la evaluación de los riesgos potenciales para la salud humana de nuevas formulaciones cosméticas y farmacéuticas es el uso de métodos *in vitro* que sean rápidos y fiables. De esta forma se consigue reducir la utilización de animales que resulta excesivamente caro y está muy cuestionada desde un punto de vista ético.

Los ensayos *in vitro* son herramientas valiosas en la industria farmacéutica dado que suelen ser técnicas rápidas y de bajo coste para realizar estudios preliminares de toxicidad. Los estudios toxicológicos *in vitro* se llevan a cabo normalmente utilizando cultivos celulares. Una de las mayores ventajas de este tipo de cultivo es la posibilidad

de obtener células de un órgano diana determinado e incluso, en muchos casos, de origen humano. Los cultivos celulares se pueden desarrollar con líneas celulares establecidas o con células derivadas de cultivos primarios. La ventaja principal de las líneas celulares respecto a los cultivos primarios es que evitan las diferencias en los resultados debidas a la variación de los donantes y proporcionan resultados reproducibles (Draize et al., 1994).

La actividad antimicrobiana, antifúngica y antiprotozoaria que presentan los (bio) tensioactivos estudiados en este trabajo hace que estos compuestos sean potencialmente aptos para ser utilizados en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. Sin embargo, debido a su estructura anfífila y a la carga aniónica o catiónica que presentan estos compuestos, también pueden presentar toxicidad celular. Por esta razón el estudio de la citotoxicidad de estos nuevos ramnolípidos es esencial para delimitar el tipo de aplicaciones en las que pueden ser utilizados.

La propuesta de este apartado fue evaluar la sensibilidad de los RLs catiónicos y aniónicos en diferentes líneas celulares. En primer lugar se eligieron 3 líneas tumorales con el fin de evaluarla actividad anticancerígena de estos compuestos: Carcinoma epitelial de útero (HeLa), Adenocarcinoma de mama (MCF7) y Carcinoma escamoso de piel (A431). En segundo lugar se eligieron 2 líneas no tumorales con el fin de determinar si los nuevos productos podían actuar selectivamente frente a las líneas tumorales: fibroblastos (3T3) y queratinocitos (HaCaT).

4.10.1. Actividad antitumoral y Citotoxicidad

La actividad antitumoral fue la última propiedad biológica que se evaluó para los RLs objeto de estudio es este trabajo. Como se ha comentado anteriormente se utilizaron tres tipos de líneas celulares tumorales: Carcinoma epitelial de útero (HeLa), Adenocarcinoma de mama (MCF7) y Carcinoma escamoso de piel (A431).

Como es bien sabido, el cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, casi una de cada seis defunciones se debe a esta enfermedad. Los cánceres de mama y de cuello uterino se encuentran entre las primeras causa de muerte por tumores en la población del sexo femenino (OMS, 2015). Por otro lado, la incidencia de cáncer de piel ha aumentado en casi todos los países, debido a la mayor exposición a la luz solar, cambios climáticos y otros factores (Smoller, 2006). El Carcinoma de Células Escamosas es el segundo cáncer de piel más frecuente, se supone el 20-25% de los tumores malignos cutáneos (Rogers et al., 2015). En este contexto, se consideró interesante evaluar la actividad antitumoral de los RLs frente a las líneas celulares comentadas anteriormente.

La viabilidad de los diferentes cultivos celulares se determinó mediante dos métodos: la captación del colorante rojo neutro (NRU) y el ensayo de reducción de la sal MTT (MTT). Mediante el test del NRU se pueden evaluar los daños producidos a nivel de membrana plasmática de las células. La captación del colorante rojo neutro (NRU) por parte de la célula depende de su capacidad para mantener los gradientes de pH gracias a la producción continua de ATP. Este colorante, a pH fisiológico (pH 7,4), presenta una carga neta próxima a cero, por tanto, es capaz de atravesar las membranas plasmáticas. En el interior de los lisosomas el pH es inferior al citoplasmático. Una vez que el colorante ha llegado al citoplasma puede atravesar la

membrana lisosomal pero como el interior del orgánulo es más ácido, la molécula queda cargada y entonces ya no es capaz de difundir libremente al citoplasma. La pérdida del gradiente de pH existente entre el citoplasma y los lisosomas, ya sea por la muerte de la célula o por un aumento de la permeabilidad de las membranas, puede provocar la liberación del colorante o evitar su acumulación (Filman et al., 1975). De ese modo, se considera que la cantidad de colorante retenido es proporcional al número de células viables.

El ensayo del MTT informa de la actividad metabólica celular dentro del compartimento mitocondrial. El MTT es una sal de tetrazolio que puede reducirse dando lugar a un formazán insoluble de color azul. Desde su descubrimiento en 1894, este producto se ha utilizado ampliamente como indicador de los sistemas redox y de la viabilidad de sistemas biológicos. La reducción de MTT, está catalizada por la succinato deshidrogenasa mitocondrial (Mosmann, 1983). En este ensayo el número de células viables es proporcional a la cantidad de MTT reducida.

El estudio de la actividad anticancerígena se llevó a cabo mediante la determinación de la pérdida de viabilidad celular para las poblaciones tratadas con diferentes concentraciones de cada uno de los RLs con los dos métodos propuestos (Figura 56, 57 y 58). A partir de estos resultados se calcularon los valores de IC₅₀ de cada muestra para cada una de las líneas celulares estudiadas (tabla 12)

En primer lugar nos centraremos en los RLs no modificados. Como puede verse en la figura 56 estos compuestos presentan actividad frente a las tres líneas estudiadas y como era de esperar la actividad aumenta al aumentar la concentración de tensioactivo. Los resultados obtenidos para ambas muestras (monoRL y RLmez) son

similares, lo que significa que el número de ramnosas no influye en la actividad frente a estas células. Este tipo de comportamiento ya había sido observado para las propiedades biológicas estudiadas con anterioridad en este trabajo. La respuesta de las células a este tipo de compuestos depende de la línea celular así como del método utilizado para evaluar la viabilidad celular. En el caso de las líneas A431 y HeLa se observa que los valores de HC_{50} son similares para los dos métodos utilizados, esto indica que estos productos son capaces de interactuar con la membrana celular de estas dos líneas así como de interferir en los procesos metabólicos mitocondriales. Para la línea A431 se observó que, a partir de una determinada concentración, la actividad (NRU) no aumentaba al aumentar la concentración. La línea Adenocarcinoma de mama (MCF-7) dio lugar a diferentes resultados, se observó que los valores de IC_{50} obtenidos mediante el ensayo de MTT eran el doble que los obtenidos a nivel de membrana lo cual indica que, frente a estas células, estos compuestos presentan un menor efecto citotóxico a nivel de mitocondria.

A partir de esos resultados, es difícil establecer una relación clara entre el efecto citotóxico y el tipo de RLs. Se podría decir que en general, estos compuestos actúan tanto a nivel mitocondrial como lisosomal causando la pérdida del gradiente de pH existente entre el citoplasma y los lisosomas de las células y en consecuencia afectando la integridad de la membrana.

Dada su naturaleza anfífila, los RLs son capaces de producir diferentes efectos en las células. El estudio de las aplicaciones de los ramnolípidos en el área biomédica como antitumorales es reciente ([Gudina et al., 2013](#); [Irorere et al., 2017](#)) por lo que la literatura contiene pocas referencias acerca del tema. Además, como ya ocurría con el

resto de propiedades estudiadas en este trabajo, se pueden encontrar resultados muy diferentes y a veces contradictorios. Thanomsub et al., (2006) encontraron que los diRLs, Rha₂-C₁₀-C₁₀ y Rha₂-C₁₀-C₁₂, producidos por *P. aeruginosa* B189 inhibieron significativamente el crecimiento de la línea tumoral de mama (MCF-7). Sin embargo, estos autores no observaron ningún efecto de inhibición con el extracto crudo de ramnolípidos que contenía monoRLs y diRLs (Thanomsub et al., 2006). Similares resultados fueron publicados por Yang et al., (2013), estos autores observaron que tanto el compuesto monoRL como extracto crudo de RLs no presentaran ninguna actividad frente a las líneas tumorales MCF-7 y H460, sin embargo, observaron resultados prometedores para el compuesto diRL (Yang et al., 2013). Los resultados obtenidos por estos autores parecen indicar que son los diRLs los responsables de la actividad antitumoral de este tipo de compuestos. Sin embargo Christova et al. (2013) observaron lo contrario. Estos autores estudiaron la actividad antitumoral de monoRL y diRL puros frente a cuatro líneas tumorales, utilizando como método de viabilidad el MTT. Observaron que los monoRLs ejercieron una actividad citotóxica más alta con un valor de IC₅₀ alrededor de 30 µg/mL, mientras el diRL necesitó de concentraciones más elevadas para inhibir el 50% del crecimiento de las células tumorales (Christova et al., 2013).

En cuanto a la actividad de los RLs frente a células tumorales de cuello uterino, se han encontrado muy pocas referencias en la literatura y con respecto a la línea tumoral de piel A431 no se ha encontrado ninguna publicación, por lo que este trabajo contiene los primeros datos acerca de la actividad antitumoral de RLs en este tipo de células. Recientemente se ha observado que un RL extraído de la cepa *Pseudomonas*

aeruginosa PB3A inhibió el 50% del crecimiento de las células tumorales HeLa con un valor de $IC_{50}=125 \mu\text{g/mL}$, llegando a una inhibición máxima (30,5% de viabilidad) con la mayor concentración estudiada (1000 $\mu\text{g/mL}$) (Vijayakumar et al., 2015). También se observó que el compuesto RLmezcla conteniendo como producto mayoritario el diRL (77,2% de su composición) extraído de una cepa mutante de *Pseudomonas aeruginosa* (MR01), fue capaz de inhibir la viabilidad de células HeLa con el valor de $IC_{50}=5 \mu\text{g/mL}$ (Lotfabad et al., 2010).

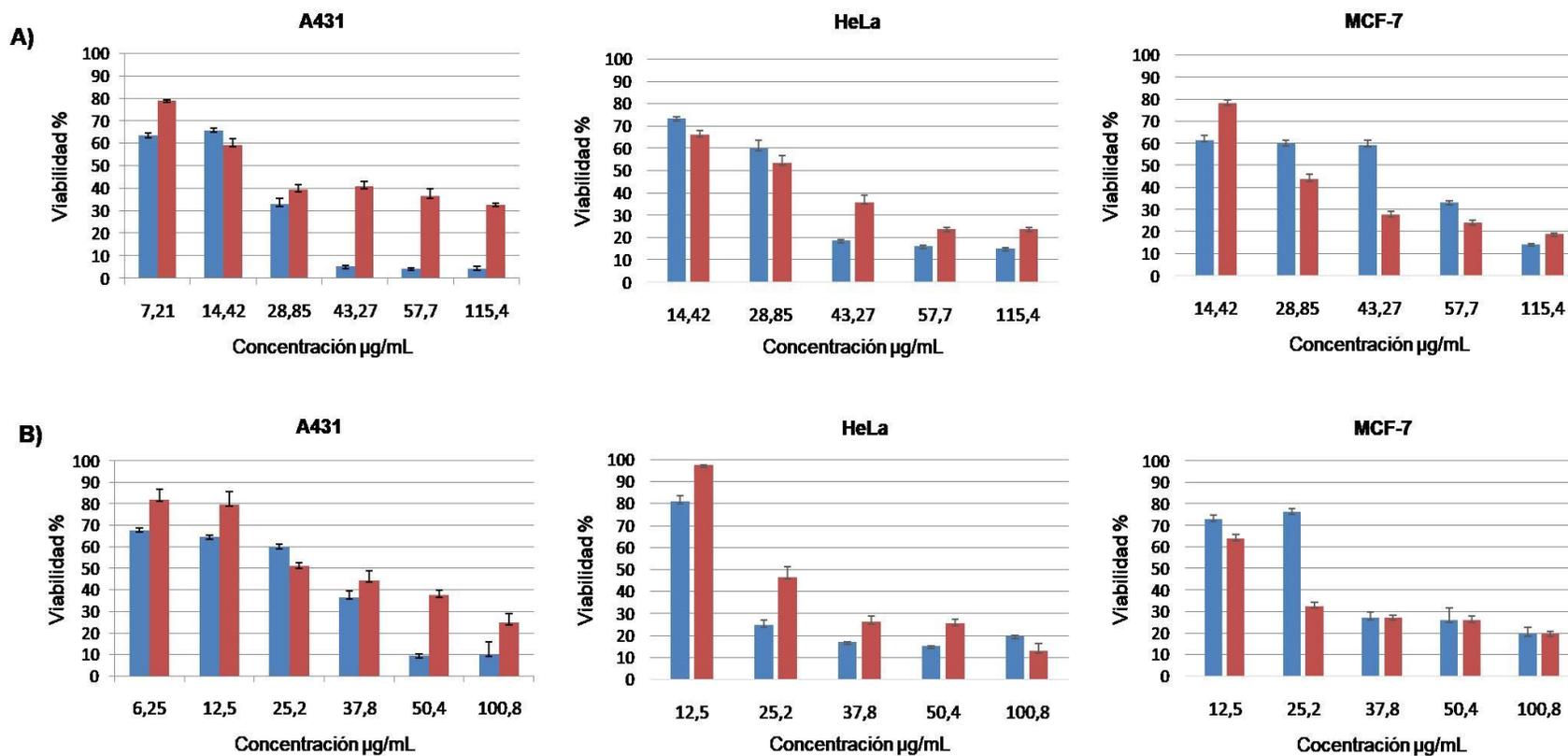


Fig. 56. Citotoxicidad de los ramnolípidos aniónicos, A) RLmezcla y B) monoRL, frente a líneas tumorales de piel (A431), cuello uterino (HeLa) y mama (MCF-7), utilizando como métodos de viabilidad: NRU (■) y MTT (■).

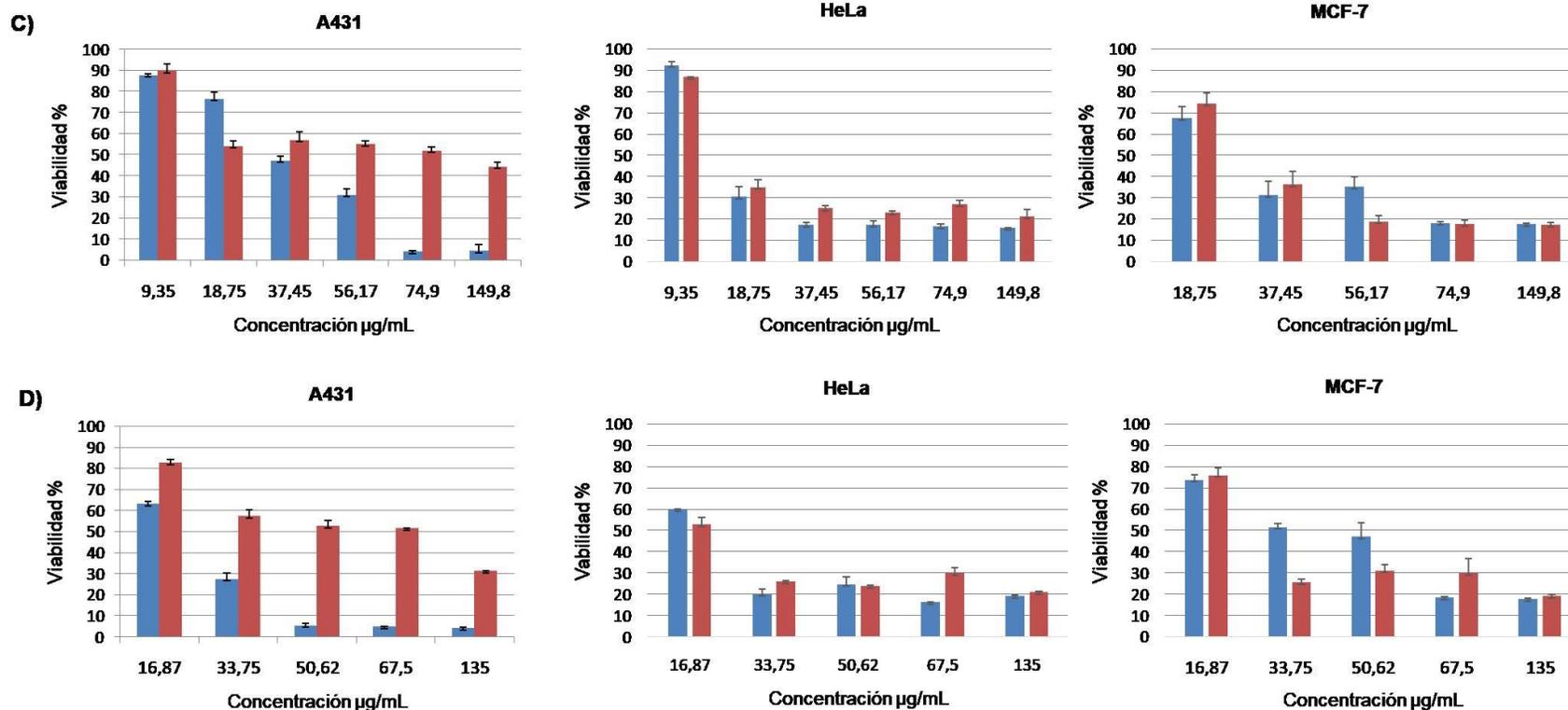


Fig. 57. Citotoxicidad de los ramnolípidos catiónicos derivados de arginina: C) RLmez_Arg y D) monoRL_Arg, frente a líneas tumorales de piel (A431), cuello uterino (HeLa) y mama (MCF-7), utilizando como métodos de viabilidad: NRU (■) y MTT (■).

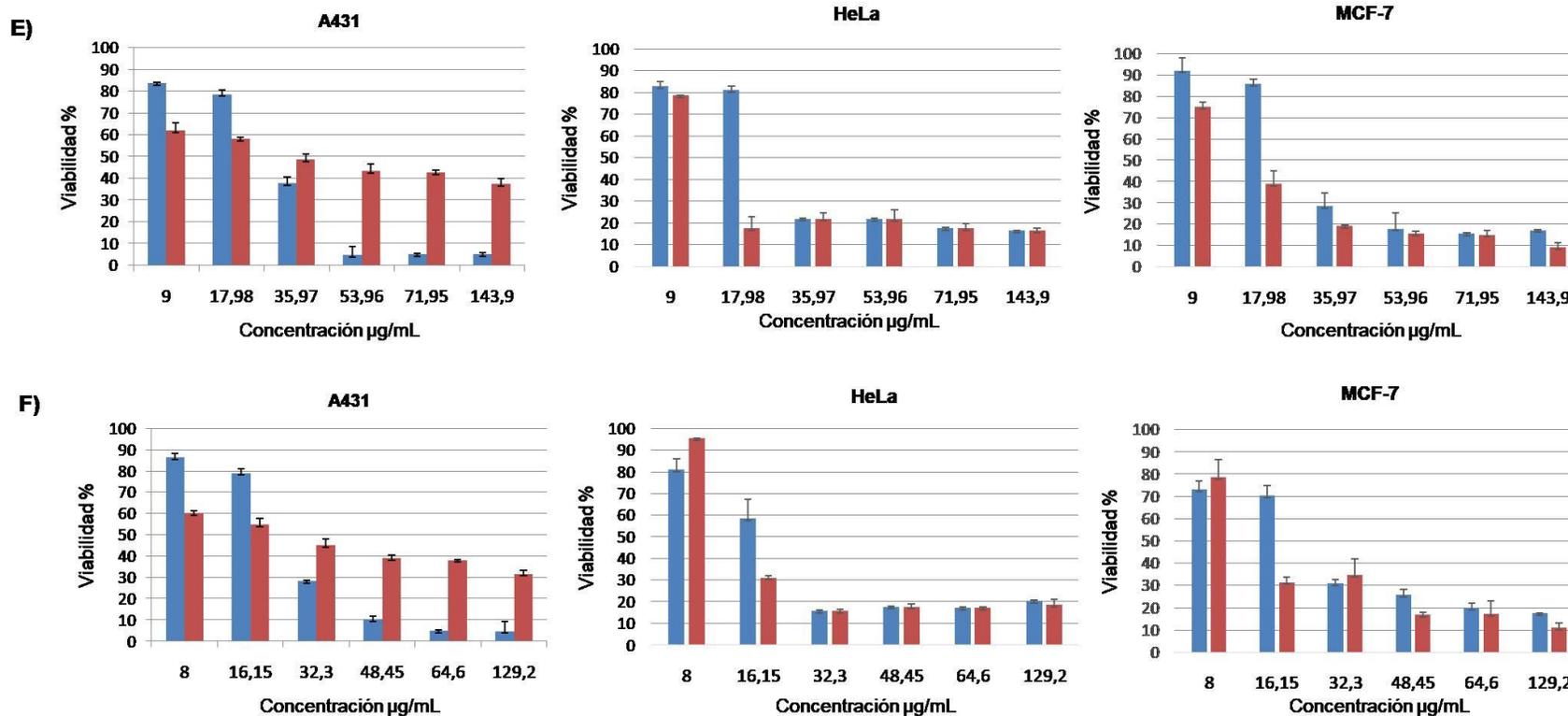


Fig. 58. Citotoxicidad de los ramnolípidos catiónicos derivados de lisina: E) RImez_Lys y F) monoRL_Lys, frente a líneas tumorales de piel (A431), cuello uterino (HeLa) y mama (MCF-7), utilizando como métodos de viabilidad: NRU (■) y MTT (■)

Los resultados encontrados en nuestro trabajo son similares a los publicados por Jiang et al., (2014). Estos autores también hicieron un estudio comparativo entre el monoRL y diRL utilizando las células tumorales MCF-7 y HeLa. Observaron que el efecto citotóxico de estos compuestos era similares frente a las dos líneas de células tumorales, IC_{50} de 100 y 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para monoRL y diRL, respectivamente (Jiang et al., 2014). Además también se observó que el número de ramnosas en la molécula no afecta la actividad antitumoral.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el principal objetivo de esta memoria fue hacer una sencilla modificación en las moléculas de ramnolípidos de cara a conseguir compuestos con diferentes propiedades biológicas. Las figuras 57 y 58 se presentan los resultados de la actividad antiproliferativa de células tumorales de los nuevos RLs derivados de arginina y lisina.

En general, a tenor de los resultados obtenidos, parece que la presencia de una carga catiónica en las moléculas con estructura ramnolípídica no afecta en gran manera la actividad antiproliferativa de células tumorales ya que, excepto en algunos casos concretos, los valores de IC_{50} obtenidos para los derivados de arginina y lisina son del mismo orden que los obtenidos para los RLs precursores. En el caso de los conjugados RL-Arg, la actividad antitumoral frente a las células MCF-7 y HeLa es similar y no depende del método utilizado (MTT o NRU). Sin embargo, para la línea A431 los valores de IC_{50} obtenidos mediante el ensayo de NRU son más altos que los encontrados con la sal de MTT. Además utilizando el método NRU se observó que la viabilidad celular disminuye hasta aproximadamente un 50%, después un aumento de concentración no conllevaba una disminución de la proliferación celular. Estos

resultados indican que, frente a esta línea celular, los derivados de arginina actúan principalmente en el metabolismo celular.

Las curvas de viabilidad celular frente a concentración también muestran que los derivados de lisina pueden inhibir la proliferación celular de líneas tumorales y que esta inhibición depende de la concentración ensayada. El comportamiento de las células frente a estos compuestos es diferente al observado con los derivados de arginina; utilizando el método de NRU se observa una marcada actividad, mayor que utilizando el MTT, frente a las células MCF-7 y Hela con valores de IC_{50} en el rango de 9-13 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo para las células A431 los valores de IC_{50} son similares para ambos métodos.

En general, los resultados obtenidos fueron similares para los seis productos evaluados frente a las células A431, HeLa y MCF-7 cuando los ensayos de citotoxicidad se llevaron a cabo utilizando el método de viabilidad MTT ([Tabla 12](#)).

Los derivados catiónicos presentaban mayor actividad frente a las células HeLa y MCF-7 cuando la viabilidad se determinó mediante el test NRU. Este comportamiento podría ser debido a que la carga catiónica de estos derivados actúa mejor con las membranas debido a interacciones electrostáticas. Teniendo en cuenta que el ensayo MTT es una medida de la actividad metabólica celular dentro del compartimento mitocondrial ([Berridge et al., 2005](#)), los resultados obtenidos para las líneas HeLa y MCF-7 sugirieron que los derivados de lisina presentan una pobre interacción con el compartimento mitocondrial de estas células. De acuerdo con [Leporatti et al., \(2009\)](#), una de las razones que podría explicar los resultados observados de estas dos líneas celulares son que sus características fenotípicas son similares.

La actividad antitumoral de los tensioactivos catiónicos de tipo RL derivados de lisina es superior a la descrita por Nogueira et al. (2011) para tensioactivos aniónicos derivados de lisina. Estos autores observaron una reducción en la proliferación de las líneas tumorales MCF7 y HeLA cuando estas células eran tratadas con tensioactivos aniónicos derivados de lisina. Utilizando el ensayo de MTT observaron valores de IC_{50} en un rango de 31,2-125 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo utilizando el ensayo NRU no se observó actividad antiproliferativa en todo el rango de concentraciones ensayado. Estos resultados sugieren que, como ya se ha comentado, los derivados de lisina interaccionan con las membranas celulares gracias fundamentalmente a la carga positiva que posee la molécula.

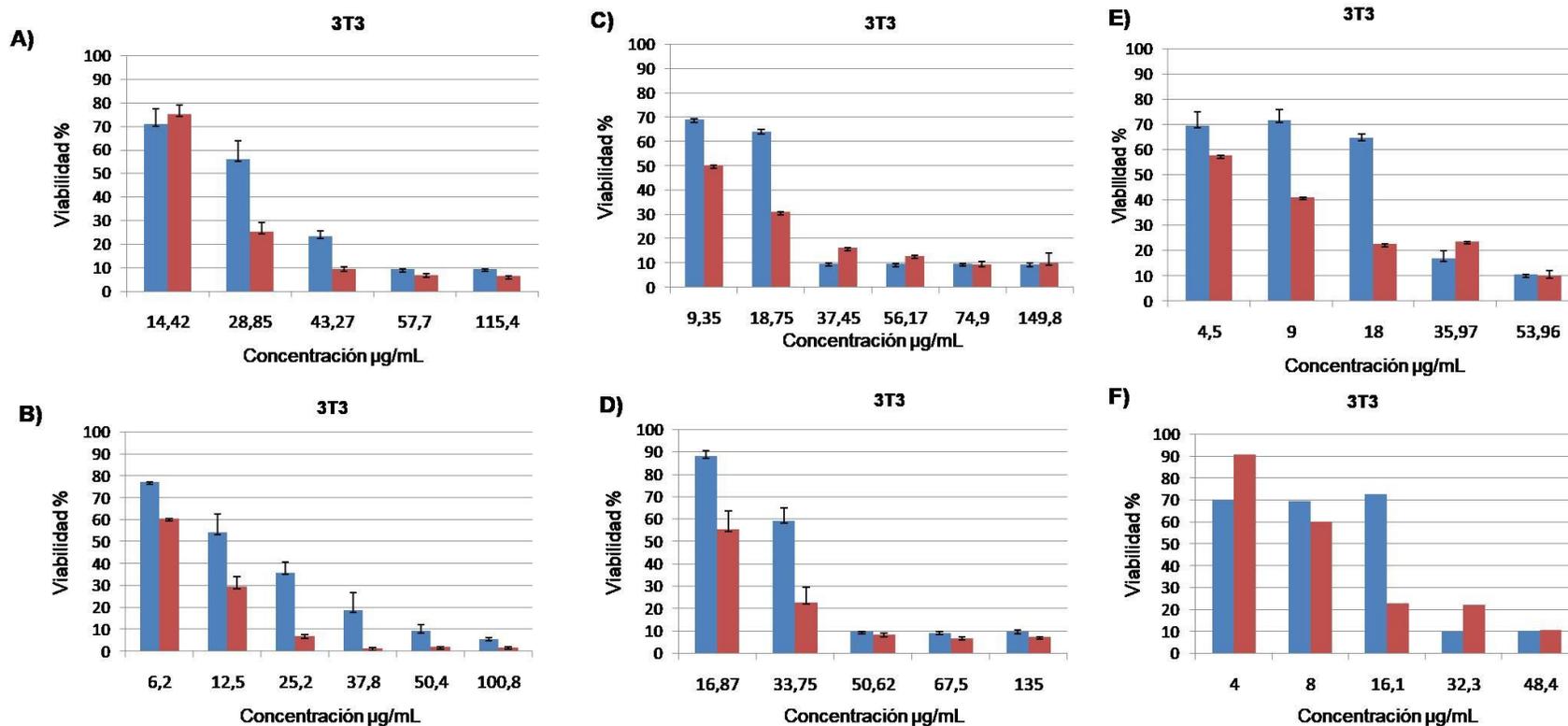


Fig. 59. Citotoxicidad de los ramnolípidos aniónicos y catiónicos: RLmezcla A); monoRL B); RLmez_Arg C); monoRL_Arg D); RLmez_Lys E); monoRL_Lys F) frente la línea no tumoral, fibroblastos (3T3). Métodos de viabilidad: NRU (■) y MTT (■)

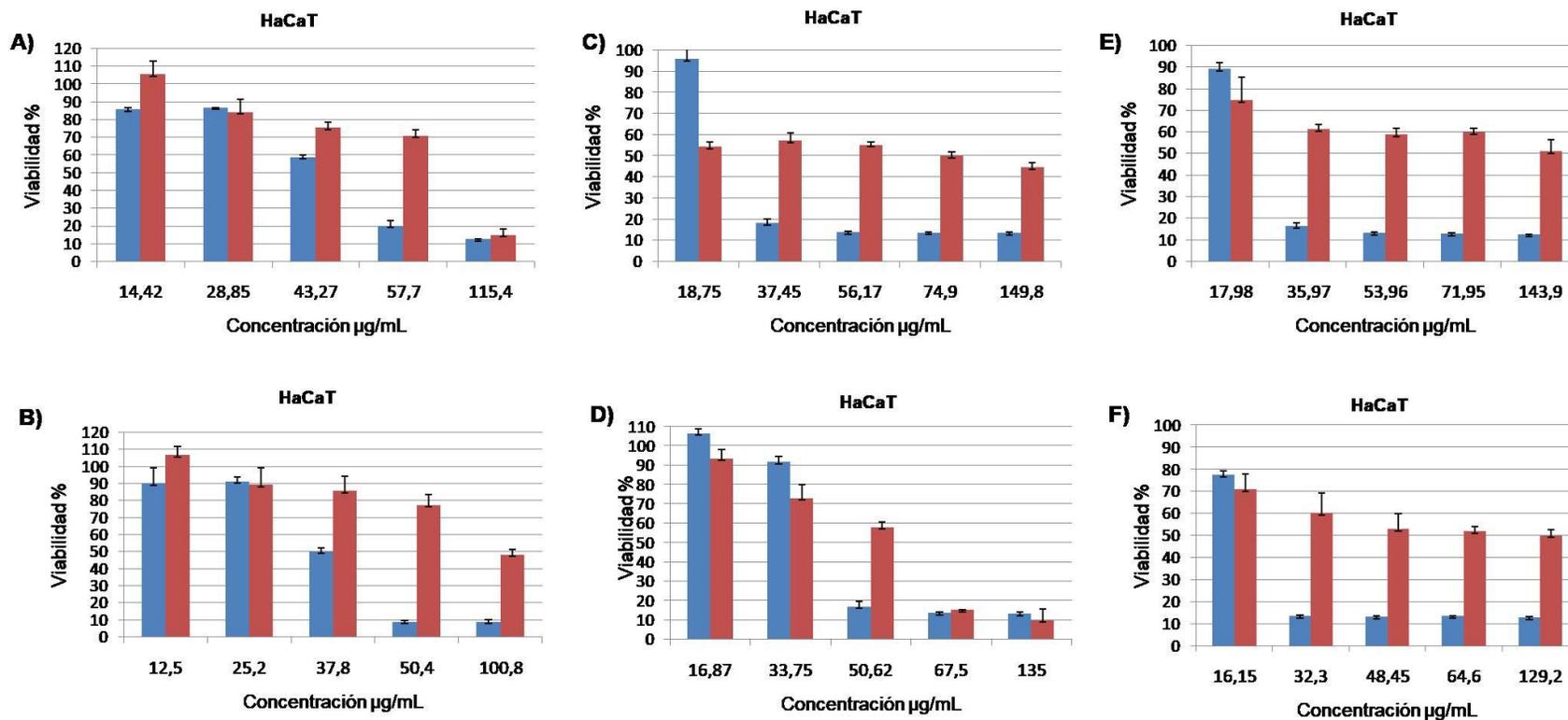


Fig. 60. Citotoxicidad de los ramnolípidos aniónicos y catínicos: RLmezcla A); monoRL B); RLmez_Arg C); monoRL_Arg D); RLmez_Lys E); monoRL_Lys F) frente la línea no tumoral, queratinocitos (HaCaT). Métodos de viabilidad: NRU (■) y MTT (■)

Tabla 12. Comparación de las actividades citotóxicas de los RLs y sus derivados catiónicos frente las cinco líneas celulares.

Tensioactivos	3T3	3T3	HacaT	HacaT	A431	A431	HeLa	HeLa	MCF-7	MCF-7
	MTT	NRU								
RLmez	32.82	21.37	46.62	111.4	18.51	21.01	34.50	31.61	48.40	26.32
MonoRL	12.5	10.22	37.54	97.3	35.75	26.18	19.46	19.51	36.59	18.25
RLmez_Arg	23.4	8.93	29.21	57.19	24.00	74.9	28.51	14.93	27.35	20.54
MonoRL_Arg	38.02	19.72	43.12	53.75	22.97	67.5	21.09	18.74	35.95	24.4
RLmez_Lys	24.63	6.57	27.58	143.9	21.22	33.73	27.48	13.24	29.55	10.15
MonoRL_Lys	22.11	10.22	23.08	129.2	19.64	24.14	19.36	13.65	24.46	9.63

Se ha determinado la concentración requerida para inhibir el 50% del crecimiento en comparación al control no tratado (IC_{50}), 24h.

Valores de IC_{50} presentados en $\mu\text{g/mL}$ para los métodos de viabilidad MTT y NRU.

Una vez comprobado que los RLs estudiados en este trabajo presentaban actividad antitumoral, se procedió a evaluar la citotoxicidad de estos productos frente a dos líneas celulares no tumorales con el fin de saber si estos productos son capaces de actuar selectivamente sobre células tumorales. En concreto se eligió el uso de una línea celular de fibroblastos (3T3) y una de queranocitos (HaCaT). Los queranocitos son células de epidermis por lo cual se pensó que eran las más adecuadas para compararlas con las células tumorales de piel (A431).

Por otro lado, como un modelo genérico se utilizan los fibroblastos, que son células representativas de los tejidos conectivos y, se utilizan ampliamente en estudios toxicológicos de sustancias o formulaciones destinados a las más diversas aplicaciones (Li et al., 2013; Browne et al., 2012; Colomer et al., 2012; Pramod et al., 2012).

El efecto citotóxico de los diferentes RLs frente las líneas celulares 3T3 y HaCaT se muestran en las Figuras 59 y 60, respectivamente. A partir de las curvas de viabilidad frente a concentración se determinaron los valores de IC_{50} para los 6 ramnolípidos estudiados (Tabla 12).

En primer lugar se observa que estos compuestos también son capaces de inhibir la proliferación de células no tumorales. El comportamiento es similar al observado para células tumorales, la actividad aumenta al aumentar la concentración. Como ocurría con los anteriores estudios, las células no muestran los mismos valores de IC_{50} para los dos ensayos utilizados, NRU y MTT, lo que confirma el hecho de que el uso de diferentes criterios de valoración puede dar lugar a diferentes resultados.

Se observó que para estas dos líneas no tumorales los valores de IC_{50} eran similares cuando se determinaban mediante el ensayo de MTT. Sin embargo los

queratinocitos se mostraron menos sensibles a estos tensioactivos cuando la toxicidad se evaluó mediante NRU (Tabla 12). Los queratinocitos, debido a su localización en la epidermis, suelen ser más resistentes que los fibroblastos ya que están constantemente expuestos a los agentes externos. Las líneas celulares también pueden presentar diferente sensibilidad debido a su origen ya que los queratinocitos son de origen epidérmico (Ree et al., 1981; Boukamp et al., 1988) mientras que los fibroblastos proceden de células embrionarias de ratón (Todaro et al., 1963). Eso puede explicar la mayor resistencia de las células HaCaT.

Los resultados obtenidos sugieren que frente a las células 3T3 los RLs interaccionan a nivel de membrana mientras que para las HaCaT los efectos tóxicos son debidos a la desestabilización del metabolismo mitocondrial.

La citotoxicidad de los ramnolípidos derivados de arginina y lisina es similar a la descrita para tensioactivos catiónicos geminales derivados de estos mismos aminoácidos que también poseen dos cadenas hidrófobas. Los estudios llevados a cabo con este tipo de tensioactivos geminales pusieron de manifiesto que la citotoxicidad frente a estas células no tumorales dependía principalmente del carácter hidrófobo de los compuestos, de hecho se observó que los valores de IC_{50} disminuían drásticamente, en un orden de magnitud, al aumentar la longitud de cadena alquílica (Pinazo et al., 2011). En el caso de los tensioactivos estudiados en este trabajo la longitud de cadena alquílica es siempre la misma, esto podría explicar el hecho de que no se observen cambios drásticos en la toxicidad celular de los mismos. Cabe resaltar que la toxicidad que presentan los RLs catiónicos derivados de aminoácidos es inferior a la descrita para un tensioactivo catiónico comercial como el HTAB a pesar de que

estos RLs presentan un carácter hidrófobo muy superior al de los compuestos comerciales.

A partir de todos los resultados obtenidos se puede confirmar que el tipo de actuación de estos RLs frente a las células depende de la línea utilizada. En algunos casos se observó que estos compuestos actuaban principalmente a nivel de membrana tal como se observó en el caso de las diferentes cepas *Candidas* estudiadas. Para algunas de las líneas ensayadas, HaCaT y A431 el mecanismo prioritario son los daños a nivel de metabolismo mitocondrial mientras que en otros casos parecen darse simultáneamente los dos tipos de actuaciones. Este tipo de comportamiento está en parte de acuerdo con los resultados encontrados por Jiang et al., (2014). Estos autores investigaron la toxicidad de RLs utilizando dos métodos diferentes: la reducción de MTT y la liberación de fosfatidilserina (LDH). Observaron que aparentemente no había diferencia significativa de estos dos marcadores de muerte en células tumorales y no tumorales (Jiang et al., 2014). La fuga de LDH es un indicador de muerte celular irreversible debido al daño de la membrana, mientras que la reducción de MTT refleja las actividades mitocondriales intracelulares. Los índices de viabilidad obtenidos indicaban que el daño de la membrana ocurrió simultáneamente con la lesión mitocondrial (Inacio et al. 2011). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo también indican que en muchos casos se da simultáneamente daño a nivel mitocondrial (MTT) y de membrana (NRU) (Tabla 12).

Una vez conocida la actividad de estos compuestos frente a células tumorales y no tumorales se puede establecer si estos productos son capaces de atacar selectivamente las células cancerígenas. Los resultados más prometedores se

obtuvieron para las células tumorales de piel ya que los valores de IC_{50} ponen de manifiesto que estos RLs son más activos frente a la línea de carcinoma de piel (A431) que frente a los queratinocitos de epidermis (HaCaT).

La [figura 61](#) muestra los valores del índice de selectividad de estos compuestos para las células A431 tomando como referencia las HaCaT. Los valores del IS para los RLs y RL derivados de lisina son superiores a 1 para los dos métodos de ensayo utilizados (MTT y NRU). Esto significa que estos compuestos actúan selectivamente sobre las células tumorales de piel, es capaz de neutralizarlas a concentraciones muy inferiores a las que se precisan para atacar las células sanas. La mayor selectividad se dio para los conjugados de lisina con el método NRU, en este caso los valores del IS llegan a 5, lo cual indica que estos compuestos son capaces de desestabilizar las membranas de células cancerígenas a una concentración 5 veces inferior a la que necesitan para atacar las membranas de los queratinocitos sanos. La peor selectividad se dio para los derivados de arginina, en este caso utilizando el método MTT sí que se obtienen valores de IS ligeramente superiores a 1, lo cual no ocurre cuando se tiene en cuenta el método NRU.

Cabe destacar que el desarrollo de compuestos que ataquen selectivamente a células tumorales constituye un gran hallazgo dado que la mayoría de los fármacos utilizados en quimioterapia son muy citotóxicos y atacan a las células tumorales de forma no específica ([Sak, 2012](#), [By y Adjei 2013](#)). Además se ha de tener en cuenta que la incidencia de cáncer de piel aumenta cada vez más en países donde tales tumores son prevalentes ([Siegel et al., 2019](#)). Entre 1970 y 2007, entre todos los cánceres documentados en Canadá, el melanoma tuvo el segundo aumento más alto

en la tasa de mortalidad (Kachuri et al., 2013) y se estima que el cáncer de piel es la forma más común de cáncer en los Estados Unidos de América (EE. UU.) (Siegel et al., 2019).

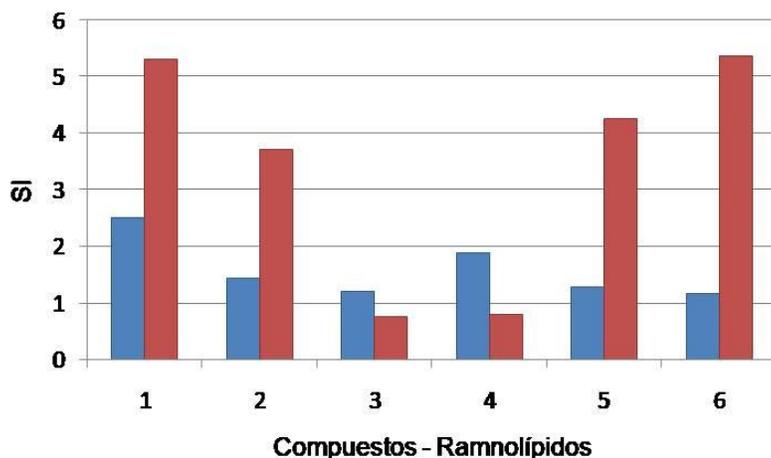


Fig. 61. Índice de Selectividad (SI) de los diferentes tensioactivos utilizando la relación de citotoxicidad entre las células HaCaT y A431: RLmez (1); monoRL (2); RLmez_Arg(3); monoRL_Arg (4); RLmez_Lys (5); monoRL_Lys (6), Métodos de viabilidad: NRU (■) y MTT (■).

Para calcular los IS de las líneas HeLa y MCF-7 se podría tomar como referencia las células 3T3 dado que son células representativas de Tejidos conjuntivos. En este caso los valores de IC_{50} son siempre menores frente a la célula no tumoral lo que significa que estos compuestos no actúan selectivamente sobre este tipo de células (si la referencia es 3T3). Dada su actividad antitumoral estos compuestos también podrían representar un buen punto de partida para ser utilizados en formulaciones anticancerígenas, siempre que se logre disminuir la toxicidad que ejercen en células sanas. Una posible estrategia sería preparar formulaciones que logren vehiculizar el fármaco hacia el tumor para no dañar demasiado el resto de células. En este sentido cabe destacar que estos compuestos pueden formar agregados vesiculares que

pueden funcionar como vehículo y como fármaco. Además estos tensioactivos son sensibles al pH por lo que resultaría más fácil encontrar un estímulo a nivel celular que ayude a la vehiculización de los mismos hacia las células cancerígenas, dado que éstas poseen valores de pH diferentes a los de las células normales.

Finalmente, es muy importante destacar que los valores de IC_{50} obtenidos con los dos tipos de células sanas, 3T3 y HaCat, para los RLs derivados de arginina son superiores a los valores de CMI que estos compuestos presentan frente a bacterias, levaduras y protozoos. Estos resultados indican que los derivados catiónicos de RLs basados en arginina podrían ser utilizados con un amplio margen de seguridad en un amplio abanico de aplicaciones biomédicas y farmacéuticas.

4.10.2. Hemocompatibilidad

El test de hemólisis ha sido el último ensayo utilizado para evaluar la citotoxicidad de los RL estudiados en esta memoria. El ensayo de hemólisis es un método sencillo, barato, no se necesita un equipamiento sofisticado y requiere poco tiempo por producto. Además está bien caracterizado ya que los criterios principales de valoración están bien definidos. El ensayo se basa en el potencial de una sustancia química para perturbar las membranas celulares, valorando espectrofotométricamente la liberación de hemoglobina de una suspensión de eritrocitos incubada con la sustancia a ensayar y bajo condiciones estándar ([Chen et al., 2005](#)).

El término hemólisis se refiere al fenómeno de ruptura o lisis de la membrana del eritrocito que provoca la liberación de la hemoglobina ([Hernández, 2006](#)). Los

eritrocitos han sido ampliamente estudiados como células modelos por tener dos características esenciales: son abundantes y tienen un modelo de membrana plasmática bastante simplificado debido a la ausencia de núcleos y orgánulos (Manaargadoo-Catin et al., 2016). Además, se pueden utilizar una amplia variedad de técnicas físicas y químicas para simular los procesos moleculares implicados en la lisis de la membrana celular inducida por los tensioactivos (Manaargadoo-Catin et al., 2016). El estudio del potencial hemolítico de los tensioactivos es de gran interés para comprender la forma en la que estos compuestos interactúan con las membranas celulares. De acuerdo con la literatura esas interacciones pueden ocurrir por dos mecanismos diferentes. La hemólisis puede ser causada por rotura directa de la membrana a través de su solubilización, lo cual ocurre a altas relaciones tensioactivo/membrana, o puede deberse a la permeabilización de la membrana por solutos de bajo peso molecular, lo que ocurre normalmente a concentraciones bajas (Bielawski, 1990).

En este trabajo el ensayo de hemólisis se ha llevado a cabo siguiendo el protocolo INVITOX número 37 con algunas modificaciones (ECVAM, 1992). En dicho protocolo se establece el uso de sangre de vaca, sin embargo en este trabajo se ha utilizado sangre de conejo. Las Figuras 62 y 63 muestran las curvas de porcentaje de hemólisis frente a concentración para los RL aniónicos así como para los RL derivados de aminoácidos.

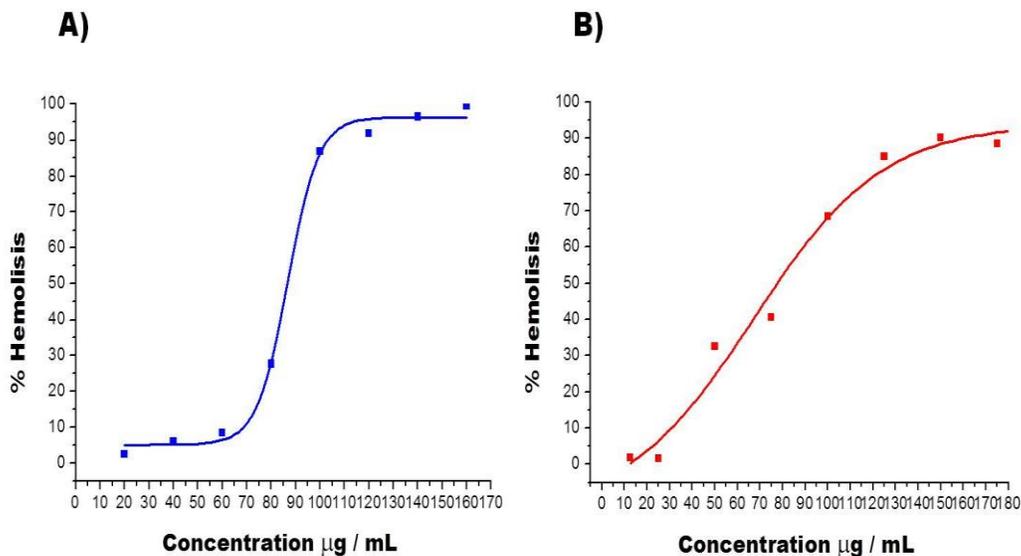


Fig. 62. Porcentaje de hemólisis frente a concentración: A) RLmez y B) monoRL

Después de un tiempo de incubación (10 minutos) en presencia de diferentes concentraciones de ramnolípidos aniónicos y catiónicos se observó una variación sigmoideal del porcentaje de hemólisis en relación a la concentración de los compuestos (Figs. 62 y 63). El comportamiento sigmoideal de la hemólisis inducida por los ramnolípidos aniónicos y catiónicos es indicativo de un proceso complejo en el cual es necesario que se acumule suficiente (bio) tensioactivo para inducir la lisis osmótica de los eritrocitos.

A partir de las curvas de porcentaje de hemólisis frente a concentración se determinó para cada compuesto la concentración de tensioactivo requerida para producir un 50 % de lisis en los eritrocitos (HC_{50}). Los valores de HC_{50} para las muestras de monoRL y RLmez, 75 y 80 $\mu\text{g/mL}$, son similares. La toxicidad de estos compuestos frente a los eritrocitos no depende del número de ramnosas en el grupo polar. Esto mismo se había observado previamente en el caso de la interacción de

estos compuestos con bacterias y levaduras. Los valores de HC_{50} obtenidos indican que estos productos presentan una actividad hemolítica moderada, inferior a la que presenta un tensioactivo aniónico convencional como el dodecil sulfato sódico (tensioactivo aniónico comercial ampliamente utilizado como control en diversos ensayos clínicos) o un tensioactivo anfótero como la tergotetina. La menor toxicidad de estos compuestos puede ser debida a que al pH de trabajo en este ensayo (7.2) los RL se comportan principalmente como tensioactivos no iónicos, pierden la carga negativa debido a los valores de pKa. Las curvas obtenidas indican que a valores de concentración inferiores a 30 $\mu\text{g/mL}$ no se observa prácticamente nada de hemólisis.

El efecto hemolítico de los RLs fue descrito por primera vez en 1960. Los primeros resultados indicaban que estos glicolípidos presentaban una pronunciada actividad hemolítica (Sierra, 1960; Jhonson et al., 1980). Mas tarde (Ishigami et al., 1993), se encontró que utilizando eritrocitos de conejo los ramnolípidos aniónicos presentaban un efecto hemolítico leve, similar al dodecil sulfato sódico (SDS). A partir de estos primeros estudios, se han llevado a cabo numerosos trabajos enfocados al estudio de la acción de los RLs sobre las membranas (Ortiz et al., 2006; Aranda et al., 2007a; Sanchez et al., 2006; Sanchez et al., 2010). Algunos autores sugieren que la naturaleza anfifílica de los RLs facilita la incorporación de estos en los sistemas biológicos, sobre todo en las membranas alterando sus propiedades fisicoquímicas y por lo tanto, su funcionalidad (Ortiz et al., 2006; Ortiz et al., 2009). Según estudios recientes la interacción de los RLs con los fosfolípidos de las membranas de eritrocitos lleva a la desestabilización celular debido a dos efectos: el aumento del desorden de

las cadenas de acilo de los fosfolípidos y la deshidratación de la interfaz acuosa (Ortiz et al., 2009).

La Figura 63 muestra el porcentaje de hemólisis frente a concentración para los compuestos monoRL_Arg, RLmez_Arg, monoRL_Lys y RLmez_Lys. Los valores de HC_{50} obtenidos a partir de estas curvas figuran en la tabla 13. Estos valores indican que los tensioactivos catiónicos derivados de RL presentan mayor actividad hemolítica que sus precursores. Según la literatura la carga iónica del tensioactivo determina su posible mecanismo de acción en células biológicas, de modo que los tensioactivos aniónicos tendrían un mayor efecto sobre las proteínas y los catiónicos sobre las membranas (Zaragoza et al., 2009; Zaragoza et al., 2010). Debido a esto los RL catiónicos presentan una actividad lítica superior a los aniónicos pero su efecto desnaturizante es inferior (Tripathy et al., 2018).

Los resultados indican que los RLs derivados de arginina son los que presentan mayor interacción con las membranas de los eritrocitos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente, los derivados de arginina presentan mayor actividad antimicrobiana, mayor actividad antifúngica y mayor actividad frente a protozoos como la Acanthamoeba y la Leishmania. Esto sugiere que la carga positiva en el grupo guanidino facilita las interacciones entre estos compuestos y las membranas biológicas (Song et al., 2014; Tavano et al., 2013).

El mecanismo de interacción entre tensioactivos y membranas de eritrocitos aún no se conoce con exactitud. De hecho los estudios que relacionan como afectan los parámetros estructurales en la capacidad hemolítica de estos compuestos son

ambiguos; el efecto de un determinado parámetro puede ser diferente para diferentes familias de tensioactivos (Colomer et al., 2011).

Los tensioactivos son estructuralmente semejantes a lípidos de la membrana celular. Esos lípidos son moléculas anfifílicas insolubles en agua, autoorganizadas en una bicapa de cristal líquido continuo que delimita el compartimento celular (Singer et al., 1972). Los tensioactivos también son moléculas anfifílicas que tienen la capacidad de interactuar y alterar las membranas celulares, algunos de estos compuestos, cuando interaccionan con esas membranas pueden modificar la organización de los lípidos, la disposición de proteínas integrales y más generalmente, el equilibrio celular. Todas esas alteraciones celulares pueden conducir a la ruptura de la membrana, provocando la lisis celular (Manaargadoo-Catin et al., 2016). Casi todos los estudios llevados a cabo hasta el momento (Zeng et al., 2018; Manaargadoo-Catin et al., 2016; Inés et al., 2015; Perez et al., 2002) indican que los compuestos anfífilos interaccionan con los microorganismos a través de interacciones a nivel de membrana, además parece ser que las interacciones electrostáticas mejoran la actividad frente a estas membranas (Colomer et al., 2012). Por esta razón los tensioactivos catiónicos, con grupos polares cargados positivamente, interaccionan mejor con las membranas de eritrocitos las cuales tienen el ácido siálico, un señalizador intercelular responsable por la carga negativa de la membrana eritrocitaria (Foresto et al., 2002). El estudio llevado a cabo con levaduras de *Candida* spp. utilizando el marcador yoduro de propídio también puso de manifiesto que frente a las levaduras estos compuestos también actúan a nivel de membrana.

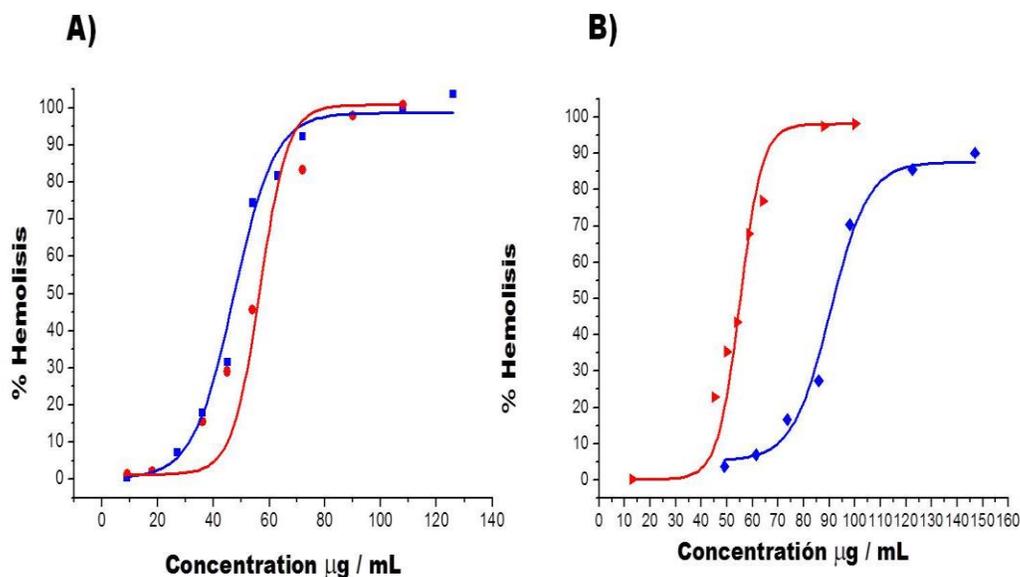


Fig. 63. Porcentaje de hemólisis frente a concentración para los RL catiónicos derivados de arginina, A) RLmez_Arg (●), monoRL_Arg (■) y lisina, B) RLmez_Lys (◆), monoRL_Lys (◄).

Tabla 13. Valores de HC_{50} de los RLs aniónicos y catiónicos.

Tensioactivo	valores de HC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
RLmez	$80,0 \pm 1,1$
monoRL	$75,0 \pm 0,9$
RLmez_Arg	$40,0 \pm 0,9$
MonoRL_Arg	$45,0 \pm 0,7$
RLmez_Lys	$80,0 \pm 0,2$
MonoRL_Lys	$50,0 \pm 0,8$

El mecanismo involucrado en la interacción de compuestos bioactivos con las membranas celulares es un proceso muy complejo que todavía no es totalmente

conocido ([Martínez et al., 2007](#); [Sánchez et al., 2006a](#); [Sánchez et al., 2007a](#); [Otzen, 2017](#), [Shalel et al., 2002](#); [Otzen, 2017](#)). Por lo tanto, son necesarios estudios más específicos para alcanzar un conocimiento profundo de estos mecanismos.

5. CONCLUSIONES

- 1) Se han preparado y caracterizado tensioactivos catiónicos basados en ramnolípidos y aminoácidos a partir de materias primas renovables: ramnolípidos preparados a partir de aceites de desecho y aminoácidos.
- 2) Tanto los ramnolípidos precursores como los derivados catiónicos son muy eficaces reduciendo la tensión superficial del agua, además son capaces de formar agregados tipo vesícula a concentraciones muy bajas.
- 3) Los RLs derivados de arginina presentan buena actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas incluyendo una cepa multirresistente como la especie *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA). Estos compuestos también son muy activos frente a un amplio abanico de cepas de *Candida* spp. resistentes al fluconazol. Los RLs aniónicos y los derivados de lisina no presentaron actividad antibacteriana ni antifúngica en el rango de concentración estudiada.
- 4) Utilizando diferentes técnicas experimentales se ha puesto de manifiesto que los RLs derivados de arginina actúan frente a las cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* desestabilizando las membranas celulares, llevandolas a la muerte por un proceso apoptósico.
- 5) Los derivados de arginina son capaces de desintegrar biofilms maduros de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*.

- 6) Los RLs catiónicos, en especial, los derivados de arginina son muy eficaces para el tratamiento de diferentes protozoos como *Acanthamoeba castellanii* y *Leishmania infantum*. Estos compuestos son capaces de atacar selectivamente en muy bajas concentraciones las células de *A. castellanii*.
- 7) Los seis ramnolípidos estudiados muestran actividad frente a líneas de células tumorales. Además son capaces de atacar selectivamente a células tumorales de piel dejando intactas las células no tumorales de la epidermis.
- 8) Los estudios de citotoxicidad utilizando como modelo eritrocitos mostraron que estos compuestos no presentan actividad hemolítica a las Concentraciones Mínimas Inhibitorias obtenidas frente a bacterias, hongos y protozoos.
- 9) Los RLs aniónicos y catiónicos son muy fácilmente biodegradables, lo cual significa que no constituyen ningún riesgo de cara al medio ambiente.
- 10) Todos los estudios realizados ponen de manifiesto que las propiedades fisicoquímicas y biológicas de monoRL y sus derivados son similares a RLmez y sus derivados. Esto significa que no hace falta la etapa de separación de homólogos lo cual reduce considerablemente los costes de producción.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M., Casals, M., García, F., & Manresa, A. (2001). Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*, 17, 1367-1371.

Abbasi, H., Akbari, K., Manoochehr, M., & Shahbani, H. (2013). Biointerfaces Physicochemical characterization of a monorhamnolipid secreted by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 in aqueous media . An experimental and molecular dynamics study. *Colloids and Surfaces B*, 101, 256–265.

Aleksic, I., Petkovic, M. I., Jovanovic, M., Milivojevic, D., Vasiljevic, B., Nikodinovic-Runic, J., & Senerovic, L. (2017). Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. *Front. Microbiol.*, 8, 1–16.

Alptuzun, V., Cakiroglu, G., Limoncu, M.E., et al. (2013). Synthesis and antileishmanial activity of novel pyridiniumhydrazone derivatives. *J. of Enzyme Inhibition and Med. Chem.*, 28 (5), 960-967.

Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J. P., et al. (2008).The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin.Microbiol. Rev.*, 21, 334-359.

Alvarez-Barrientos, A., Arroyo, J., Canton, R., Nombela, C., & Sanchez-Perez, M. (2000). Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 13, 167-95.

AmericanCancer Society (ACS). (2015). *What Is Cancer ?*. Consultado el 12 / Diciembre / 2018, a American Cancer Society: <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>

Anastas, Paul; & Warner, J. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. New York: Oxford Uni..

Andrade Neto J. B., Silva, C. R., Campos, R. S., et al. (2015). Effects of piperonal nitro derivatives on *Candida* species: antifungal activity against fluconazole-resistants trains is associated with oxidative DNA damage. *Int. J. Curr. Microbiol.Appl. Sci.*, 4,777–792.

Aranda, F. J., Espuny, M. J., Marques, A., Teruel, J. A., Manresa, A., & Ortiz, A. (2007a). Thermodynamics of the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with phospholipid membranes. *Langmuir*, 23, 2700-2705.

Azim, A., Shah, V., Doncel, G. F., Peterson, N., Gao, W., & Gross, R. (2006). Amino acid conjugated sophorolipids: A new family of biologically active functionalized glycolipids. *Bioconjugate Chemistry*, 17 (6), 1523–1529.

B

Bair, E. J., & Kraus, C. A. (1951). Properties of Electrolytic Solutions. XLVIII. Conductance of Some Long Chain Salts in Water at 25°1. *Am. Chem. Soc.*, 73 (3), 1129-1131.

Banat, I. M., Díaz De Rienzo, M. A., & Quinn, G. A. (2014). Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 9915–9929.

Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., & Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87 (2), 427–44.

Barros, P. P., Ribeiro, F. C., Rossoni, R. D., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. (2016). Influence of *Candida krusei* and *Candida glabrata* on *Candida albicans* gene expression *in vitro* biofilms. *Archives of Oral Biology*, 64, 92– 101.

Bates, P. A., & Rogers, M. E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of Leishmania. *Curr. Mol. Med.*, 4, 601-609.

Beardsley, J., Halliday, C. L., Chen, S. C-A., & Sorrell, T. C. (2018). Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. *Future Microbiol.*, 13, 1175–1191.

Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M., & Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enf. Inf. Microbiol.*, 29 (2), 70-76.

Benincasa, M., & Accorsini, F. B. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *Bioresour. Technol.*, 99,3843–3849.

Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., & Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85, 1-8.

Bernabé, K. J., Langendorf, C., Ford, N., Ronat, J. B., & Murphy, R. A. (2017). Antimicrobial resistance in West Africa: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 50 (5), 629-639.

Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insight into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 11, 127–152.

Bhadani, A., & Singh, S. (2009). Novel gemini pyridinium surfactants: Synthesis and study of their surface activity, DNA binding, and cytotoxicity. *Langmuir*, 25 (19), 11703–11712.

Bharate, S. B., & Thompson, C. M. (2010). Antimicrobial, antimalarial, and antileishmanial activities of mono- and bis-quaternary pyridinium compounds. *Chem. Biol. Drug Des.*, 76, 546-551.

Bhattacharya, M., Sharma, A. R., Patra, B. C., Sharma, G. et al. (2016). DNA barcoding to fishes: current status and future directions. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq. Anal.*, 27 (4), 2744-52.

Bielawski, J. (1990). Two types of haemolytic activity of detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 1035, 214-217.

Boles, B. R., Thoendel, M., & Singh, P. K. (2005). Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol. Microbiol.*, 57 (5), 1210-23.

Bondi, S. (1909). Lipoprotein and the analysis of degenerative adiposis lipopeptides, their meaning, synthesis and characteristics (laurylglycin and laurylalanin). *Z. Biochem.*, 17, 543.

Bonhomme, J., & D'enfert, C. (2013). *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. *Current Opinion in Microbiology*, 16 (4), 398-403.

Bordes, R., & Holmberg, K. (2015). Amino acid-based surfactants - Do they deserve more attention?. *Adv. Colloid. Interface Sci*, 222, 79–91.

Bordes, R., Tropsch, J., & Holmberg, K. (2010). Role of an amide bond for self-assembly of surfactants 3077–3083.

Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.*, 24, 119–24.

Borsanyiova, M., Patil, A., Prabhune, A., & Bopegamage, S. (2016). Biological activity of sophorolipids and their possible use as antiviral agents. *Folia Microbiol.*, 61, 85-89.

Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, NE. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell. Biol.*, 106, 761-771.

Bowman, S. M., & Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28, 799–808.

Brycki, B., Waligórska, M., & Szulc, A. (2014). The biodegradation of monomeric and dimeric alkylammonium surfactants. *Journal of hazardous materials*, 280, 797-815.

C

Calderón Rojas, G., & Aguilar Ulate, L. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Rev. Méd. de Costa Rica*, 73 (621), 757-763.

Carrijo-Carvalho, L. C., Santana, V. P., Foronda, A. S., De Freitas, D., & De Sousa Carvalho, F. R. (2017). Therapeutic agents and biocides for ocular infections by free-living amoebae of *Acanthamoeba* genus. *Surv. Ophthalmol.*, 62, 203-218.

Carrillo, C., Teruel, J., Aranda, F., & Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Bioch. Biophys. Acta*, 1611, 91–97.

Carrió, J., De Colmenares, M., Riera, C., Gállego, M., Arboix, M., & Portús, M. (2000). *Leishmania infantum*: stage-specific activity of pentavalent antimony related with the assay conditions. *Exp. Parasitol.*, 95, 209–214.

Castillo, J. A., Clapés, P., Infante, M. R., Comas, J., & Manresa, A. (2006). Comparative study of the antimicrobial activity of bis(Nalpha-caproyl-L-arginine)-1,3-propanediamine dihydrochloride and chlorhexidine dihydrochloride against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Antimicrob Chemother.*, 57 (4), 691-8.

Chai, Y., Norman, T., Kolter, R., & Losick, R. (2010). An epigenetic switch governing daughter cell separation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.*, 24, 754–765.

Chandra, J., Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Faddoul, F. F., et al. (2001). Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J. of Dental Research*, 80 (3), 903-908.

Chandrasekaran, J. N., & Bemiller, E. V. (1980). Constituent analysis of glucosamoglu-cans. A M. L. Whiste, *Methods Carbohydr. Chem.* (p. 89-96). Londres: Wolfram.

Chen, H. L., Su, P. Y., & Shih, C. (2016). Improvement of in vivo antimicrobial activity of HBcARD peptides by D-arginine replacement. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (21), 9125–9132.

Chen, M. L., Penfold, J., Thomas, R. K., Smyth, T. J. P., Perfumo, A., Marchant, R., & Grillo, I. (2010). Solution self-assembly and adsorption at the air-water interface of the monorhamnose and dirhamnose rhamnolipids and their mixtures. *Langmuir*, 26(23), 18281–18292.

Chen, R., Yue, Z., Eccleston, M. E., Williams, S., & Slater, N. K. H. (2005). Modulation of cell membrane disruption by pH-responsive pseudo-peptides through grafting with hydrophilic side chains. *J. Control Release*, 108, 63-72.

Chen, Y., Yu, Q., Wang, H., Dong, Y., Jia, C., Zhang, B., Xiao, C., Zhang, B., Xing, L., & Li, M. (2016). The malfunction of peroxisome has an impact on the oxidative stress sensitivity in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, 95, 1–12.

Chiappetta, D. A., Alvarez-Lorenzo, C., Rey-Rico, A., Taboada, P., Concheiro, A., & Sosnik, A. (2010). N-alkylation of poloxamines modulates micellar encapsulation and release of the antiretroviral efavirenz. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 76, 24-37.

Chiappetta, D. A., Degrossi, J., Teves, S., D'Aquino, M., Bregni, C., & Sosnik, A. (2008). Triclosan-loaded poloxamine micelles for enhanced topical antibacterial activity against biofilm. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 69, 535-45.

Christova, N., Tuleva, B., Kril, A., et al. (2013). Chemical structure and in vitro antitumor activity of rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* BN10. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 170 (3), 676–689.

Ciani, L., Ristori, S., Salvati, A., Calamai, L., & Martini, G. (2004). DOTAP/DOPE and DC-Chol/DOPE lipoplexes for gene delivery: zeta potential measurements and electron spin resonance spectra. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1664, 70–79.

Cline Love, L., & Dorsey, J. (1984). The Micelle-Analytical Chemistry Interface. *Anal. Chem.*, 56 (11), 1132A-1148A.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Approved Standard M27-A3. CLSI: Wayne, PA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2012). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 4th informational supplement*. CLSI document M27-S4. CLSI: Wayne, PA.

Clothier, R., Willshaw, A., Cox, H., Garle, M., Bowler, H., & Combes, R. (1999). The use of human keratinocytes in the EU/COLIPA international in vitro phototoxicity test validation study and the ECVAM/COLIPA study on UV filterchemicals. *ATLA*, *27*, 247–259.

Coleman, D., Marcel, Š., Teresa, M., & Gathergood, N. (2012). Green Chemistry Antimicrobial toxicity studies of ionic liquids leading to a 'hit' MRSA selective antibacterial imidazolium salt. *The Royal Society of Chemistry*, *14*, 1350–1356.

Colombo, A. L., Guimarães, T., Camargo, L. F., & Richtmann, R. (2013). Brazilian guidelines for the management of candidiasis – a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz. J. of infec. Diseases*, *17* (3), 283-312.

Colomer, A., Pinazo, A., García, M. T., Mitjans, M., Vinardell, M. P., Infante, M. R., Martínez, V., & Pérez, L. (2012). pH-Sensitive surfactants from lysine: assessment of their cytotoxicity and environmental behavior. *Langmuir*, *28*, 5900-5912.

Colomer, A., Pinazo, A., Manresa, M. A., Vinardell, M. P., Mitjans, M., Infante, M. R., & 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* (4), 989–1002.

Colomer, A., Pinazo, A., Mitjans, M., Vinardell, P., Manresa, A., & Pérez, L. (2011). Cationic surfactants derived from lysine: effects of their structure and charge type on antimicrobial and hemolytic activities. *J Med Chem*, *54*, 989-1002.

Coronel-León, J., Pinazo, A., Pérez, L., Espunya, M. J., Marqués, A. M., & Manresa, A. (2017). Lichenysin-geminal amino acid-based surfactants: Synergistic action of an unconventional antimicrobial mixture. *Colloids and Surfaces B: Biointerf.*, *149*, 38–47.

Costa, S. G. V. A. O., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M. N., & Contiero, J. (2006). Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process. Biochem.*, *41*, 483-488.

Crespi, C.L. (1995). Xenobiotic-metabolizing human cells as tools for pharmacological and toxicological research. *Adv. Drug Res.*, *26*, 179–235.

Croft, S. L., Sundar, S., & Fairlamb, A. H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 19, 111-126.

Cross, J., & Singer, E. J. (1994). *Cationic Surfactants: Analytical and Biological Evaluation*. New York: Marcel Dekker.

D

Da Silva, A. R., Andrade Neto, J. B., Da Silva, C. R., et al. (2016). Berberine antifungal activity in fluconazole-resistant pathogenic yeasts: action mechanism evaluated by flow cytometry and biofilm growth inhibition in *Candida* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60, 3551-3557.

Da Silva, A. R., Manresa, M. A., Pinazo, A., Garcia, M. T., & Pérez, L. (2019). Rhamnolipids functionalized with basic amino acids: Synthesis, aggregation behavior, antibacterial activity and biodegradation studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 181, 234–243.

Da silva, C.R., et al. (2013). Synergistic Effects of Amiodarone and Fluconazole on *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 57, 1691-1700.

Daltin, D. (2011). *Tensoativos: química, propriedades e aplicações*. Sao Paulo: Edgard Blucher.

Dantas-Torres, F., Solano-Gallego, L., Baneth, G., Ribeiro, V.M., De Paiva- Cavalcanti, M., & Otranto, D. (2012). Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.*, 28,531-538.

Dasgupta, A., Das, P. K., Dias, R. S. , et al. (2007). Effect of headgroup on DNA-cationic surfactant interactions. *J. Phys. Chem. B*, 11, 8502-8508.

Davey, M. E., Caiazza, N. C., & OToole, G. A. (2003). Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology*, 85, 1027–1036.

De Araujo, L. V., Abreu, F., Lins, U., et al. (2011). Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. *Food Research International*, 44, 481–488.

Delbeke, E. I. P., Roman, B. I., Marin, G. B., Van Geem, K. M., & Stevens, C. V. (2015). A new class of antimicrobial biosurfactants: Quaternary ammonium sophorolipids. *Green Chemistry*, 17 (6), 3373–3377.

Desbenoit, N., Schmitz-afonso, I., Baudouin, C., Laprévote, O., Touboul, D., & Brignole-baudouin, F. A. (2013). Brunelle, Localisation and quantification of benzalkonium chloride in eye tissue by TOF-SIMS imaging and liquid chromatography mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, *405*, 4039–4049.

Draize, J.H., Woodard, G., & Calvery, H.O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharm. Exptl. Ther.*, *82*, 377–390.

Dreassi, E., Zizzari, A. T., D'Arezzo S., Visca, P., & Botta, M. (2006). Analysis of guazatine mixture by LC and LC–MS and antimycotic activity determination of principal components. *J. of Pharmaceutical and Bio. Analysis*, *43*, 1499–1506.

Dubeau, D., Déziel, E., Woods, D. E., & Lépine, F. (2009). *Burkholderia thailandensis* harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *B. M. C. Microbiology*, *9*, 1–12.

Durão, P., Balbontín, R., & Gordo, I. (2018). Evolutionary mechanisms shaping the maintenance of antibiotic resistance. *Trends Microbiol.*, *26* (8), 677-691.

Dusane, D. H., Nancharaiah, Y. V., Zinjarde, S. S., & Venugopalan, V. P. (2010). Rhamnolipid mediated disruption of marine *Bacillus pumilus* biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *81*, 242–248.

Dusane, D. H., Dam, S., Nancharaiah, Y. V., et al. (2012). Disruption of *Yarrowia lipolytica* biofilms by rhamnolipid biosurfactant. *Aquatic Biosystems*, *17* (8).

Dy, G. K., & Adjei, A. A. (2013). Understanding, recognizing, and managing toxicities of targeted anticancer therapies. *CA Cancer J. Clin.*, *63*, 249–279.

E

ECVAM. European Center for the Validation of Alternative Methods. (1992). *INVITOX Protocol N° 37 Red blood cells test system*.

Espinosa, C. J., Cortés, J. A., Castillo, J. S., & Leal, A. L. (2011). Revisión sistemática de la resistencia antimicrobiana en cocos Gram positivos intrahospitalarios en Colombia. *Rev. Biomédica*, *31* (1), 27-34.

European Commission (CE). (2017). *Action Plan against antimicrobial resistance*. Consultado el 20 / Nov. / 2018, a European Commission: https://ec.europa.eu/health/amr/sites/amr/files/amr_action_plan_2017_en.pdf

European Commission (CE). (2004). *Biodegradable surfactants*. Consultado el 20 / Fev. / 2018, a European Commission: https://ec.europa.eu/growth/sectors/chemicals/specific-chemicals_en

European Commission (CE). (2011). *Action Plan against antimicrobial resistance: Commission unveils 12 concrete actions for the next five years*. Consultado el 20 / Nov. / 2018, a European Commission: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-11-1359_en.htm, document number 1359

F

Fakruddin, M. (2012). Biosurfactant: Production and Application. *J. Pet. Environ Biotechnol.*, 3 (124).

Faller, C., Bracher, M., Dami, N., & Roguet, R. (2002). Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. *Toxicol in vitro*, 16, 557-572.

Faten, Z., Mustafa, H., & Muayad, A. L. D. (2018). Synthesis of Nano Sulfur Particles and their Antitumor Activity. *J. Microb. Biochem. Technol.*, 10, 56-68.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., et al. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer*, 49 (6), 1374-403.

Fernández-Ferreiro, A., Santiago-Varela, M., Gil-Martínez, M., González-Barcia, M., et al. (2017). *In Vitro* Evaluation of the Ophthalmic Toxicity Profile of Chlorhexidine and Propamidinsethionate Eye Drops. *J. of ocular pharmacol. and therapeutics*, 33 (3), 202-209.

Filman, D.J., Brawn, R.J., Dandliker, & W. B. (1975). Intracellular supravital stain delocalization as an assay for antibody-dependent complement-mediated cell damage. *J. Immunol. Meth.*, 6 (3), 189-207.

Finnerty, W. R. (1994). Biosurfactants in environmental biotechnology, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5 (3), 291–295.

Foresto, P. G., D'Arrigo, M., Filipini, F., Gallo, R., Rasia, R., & Valverde, J. R. (2002). Estudio de parámetros hemorreológicos en hipertensión esencial. *Rev. Fed. ArgCardiol.*, 31, 69-73.

G

García, M. T., Ribosa, I., Pérez, L., Manresa, A., & Comelles, F. (2013). Aggregation Behavior and Antimicrobial Activity of Ester-Functionalized Imidazolium- and Pyridinium-Based Ionic Liquids in Aqueous Solution. *Langmuir*, 29 (8), 2536-2545.

GLOBOCAN. (2012). *Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012*. ARCI: OMS. . Consultado el 12 / Diciembre / 2018, a GLOBOCAN: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>

González Mesa, L., Morffi Figueroa, J., Nadal Becerra, L., Vallín Plous, C., Contreras, R., & Roura, G. (2005). *Frecuencia de aislamiento de Staphylococcus spp. meticilina resistentes y Enterococcus spp. vancomicina resistentes en hospitales de Cuba*. Consultado el 29 / Julio / 2018, a *Rev Cub. Farm.*, 39 (3): http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-751520050003000003

Gow, N. A. R., Van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J., & Netea, M. G. (2011). *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat. Rev. Microbiol.*, 10, 112–122.

Greber, K. E., Dawgul, M., Kamysz, W. et al. (2014). Biological and surface-active properties of double-chain cationic amino acid-based surfactants. *Amino Acids*, 46, 1893-1898.

Grillo, I., Penfold, J., Tucker, I., & Cousin, F. (2009). Spontaneous Formation of Nanovesicles in Mixtures of Nonionic and Dialkyl Chain Cationic Surfactants Studied by Surface Tension and SANS. *Langmuir*, 25 (7), 3932–3943.

Gudina, E. J., Rangarajan, V., Sen, R., & Rodrigues, L. R. (2013). Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends Pharmacol.Sci.*, 34 (12), 667–675.

Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2016). Biosurfactants produced by marine microorganisms with therapeutic applications. *Mar. Drugs*, 14 (2), E38.

Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infection*, 18 (5), 310-21.

Guo, Y., Hu, Y., Gu, R. R., & Lin, H. (2009). Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146. *Journal of Colloid and Interface Science*, 331 (2), 356–363.

Gupta, A. K., Ahmad, I., & Summerbell, R. C. (2002). Fungicidal activities of commonly used disinfectants and antifungal pharmaceutical spray preparations against clinical strains of *Aspergillus* and *Candida* species. *Med. Mycol.*, *40*, 201–208.

H

Haba E., Espuny, M. J., Busquets M., & Manresa, A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.*, *88*, 379-387.

Haba, E., Bouhdid, S., Torrego-Solana, N., Marqués, A., Espuny, M., Garcia-Celma, M., et al. (2014). Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: Antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Pharmaceutics* , *476*, 134-141.

Haba, E., Pinazo, A., Jauregui, O., Espuny, M. J., Infante M. R., & Manresa, A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044. *Biotechnol. Bioeng.*, *81*, 316-322.

Haldar, J., Kondaiah, P., & Bhattacharya, S. (2005). Synthesis and Antibacterial Properties of Novel Hydrolyzable Cationic Amphiphiles. Incorporation of Multiple Head Groups Leads to Impressive Antibacterial Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 3823–3831.

Haque, F., Alfatah, M., Ganesan, K., & Bhattacharyya, M. (2016). Inhibitory Effect of Sophorolipid on *Candida albicans* Biofilm Formation and Hyphal Growth. *Scientific reports*, *6*, 23575.

Hartley, G. (1938). Negative Thixotropy. *Nature*, *142* (161).

Hawser, S. P., & Douglas, L. J. (1995). Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Antifungal Agents In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39* (9), 2128–2131.

Hayes, D., Dai Kitamoto, D., Solaiman, D., & Ashby R. (2009). *Biobased Surfactants and Detergents: Synthesis, Properties, and Applications*. London: AOCS Publishing.

Hefnawy, A., Berg, M., Dujardin, J-C., & Muylder, G. (2017). Exploiting Knowledge on *Leishmania* Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. *Trends in Parasitology*, *33* (3), 162-174.

Henkel, M., Geissler, M., Weggenmann, F., & Hausmann, R. (2017). Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. *Biotechnol Journal*, 12, 1-10.

Henkel, M., Muller, M. M., Kugler, J. H., Lovaglio, R. B., Contiero, J., Syltatk, C., et al. (2012). Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. *Process biochemistry*, 47 (8), 1207-1219.

Herederro-Bermejo, I., Sanchez-Nieves, J., Soliveri, J., Gomez, R., et al. (2016). In vitro anti*Acanthamoeba* synergistic effect of chlorhexidine and cationic carbosilane dendrimers against both trophozoite and cyst forms. *Int. J. Pharm.*, 509 (1–2), 1-7.

Hernández, Y. (2006). Estudio de la actividad hemolítica de los posibles taninos extraídos a partir de la *Boldoa purpurascens* Cav. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 2 (10), 1-5.

Heyes, J. A., Niculescu-Duvaz, D., Cooper, R. G., & Springer, C. J. (2002). Synthesis of novel cationic lipids: Effect of structural modification on the efficiency of gene transfer. *J. Med. Chem.*, 45, 99–114.

Hinrichsen, S. L., Falcão, E., Santos, T. A., et al. (2009). *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. *Braz. J. of Microb.*, 40, 325-328.

Hu, Y., Litwin, T., Nagaraja, A. R., Kwong, B., Katz, J., Watson, N., & Irvine, D. J. (2007). Cytosolic delivery of membrane-impermeable molecules in dendritic cells using pH-responsive core-shell nanoparticles. *Nano Lett.*, 7, 3056–3064.

Hwang, I., Lee, J., Jin, H. G., Woo, E. R., & Lee, D. G. (2012). Amentoflavone Stimulates Mitochondrial Dysfunction and Induces Apoptotic Cell Death in *Candida albicans*. *Mycopathologia*, 173, 207–218.

I

İkizler, B., Arslan, G., Kipcak, E., Dirik, C., Çelenk, D., Aktuğlu, T., & Peker, S. (2017). Surface adsorption and spontaneous aggregation of rhamnolipid mixtures in aqueous solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 519, 125–136.

Ilies, M. A., Seitz, W. A., Johnson, B. H., Ezell, E. L., Miller, A. L., Thompson, E. B., & Balaban, A. T. (2006). Lipophilic pyrylium salts in the synthesis of efficient pyridinium-based cationic lipids, gemini surfactants, and lipophilic oligomers for gene delivery. *J. Med. Chem.*, 49, 3872–3887.

Illingworth, C. D. & Cook, S. D. (1998). *Acanthamoeba keratitis*. *Surv. Ophthalmol.*, 42, 493–508.

Inacio, A. S., Mesquita, K. A., Baptista, M., Ramalho-Santos, J., Vaz, W. L., & Vieira, O. V. (2011). In vitro surfactant structure-toxicity relationships: implications for surfactant use in sexually transmitted infection prophylaxis and contraception. *PLoS One*, 6 (5), e19850.

Infectious Diseases Society of America (IDSA). (2010). The 10 x '20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. *Clinical Infectious Diseases*, 50, 1081–1083.

Internacional Agency for Research on Cancer (IARC). (2014). *World cancer report 2014*. Consultado el 12 / Diciembre / 2018, a International Agency for Research on Cancer: <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>

Irfan-Maqsood, M., & Seddiq-Shams, M. (2014). Rhamnolipids: Well-Characterized Glycolipids with Potential Broad Applicability as Biosurfactants. *Industrial biotechnology*, 10, 285-291.

Irorere, V. U., Tripathi, L., Marchant, R., McClean, S., & Banat, I. M. (2017). Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101 (10), 3941–3951.

Ishigami, Y., Gama, Y., Ishii, F., & Choi, Y. K. (1993). Colloid chemical effect of polar head moieties of a rhamnolipid-type biosurfactant. *Langmuir*, 9 (7), 1634-1636.

Ishigami, Y., Gama, Y., Nagahora, H., Yamaguchi, M., Nakahara, H., & Kamata, T. (1987). The pH-sensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. *Chemistry Letters*, 16 (5), 763–766.

Isomaa, B. (1979). Interactions of surface-active alkyltrimethyl ammonium salts with the erythrocyte membrane. *Biochemical Pharmacology*, 28, 975-980.

Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J., & Ninham, B. W. (1976). Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 72, 1525–1568.

Ito, E., Yip, K. W., Katz, D., Fonseca, S. B., et al. (2009). Potential use of cetrimonium bromide as an apoptosis-promoting anticancer agent for head and neck cancer. *Mol. Pharmacol.*, 76, 969–983.

Itoh, S., Honda, H., Tomita, F., & Suzuki, T. (1971). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. *J. Antibiot.*, 24, 855–859.

J

Jaber, Q. Z., Benhamou, R. I., Herzog, I. M., Baruch, B. B., & Fridman, M. (2018). Cationic amphiphiles induce macromolecule denaturation and organelle decomposition in pathogenic yeast. *Angew. Chem.*, 57(50), 16391–16395.

Jadhav, V. M., Valaske, R., & Maiti, S. (2008). Interaction between 14mer DNA oligonucleotide and cationic surfactants of various chain lengths. *J. Phys. Chem. B*, 112, 8824–8831.

Jarvis, F., & Johnson, M. (1949). Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Ame. Chem. Society*, 71(12), 4124-4126.

Jennings, M. C., Minbiole, K. P. C., & Wuest, W. M. (2015). Quaternary ammonium compounds: An antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance. *ACS Infectious Disease*, 1, 289–303.

Jiang, L., Shen, C., Long, X., Zhang, G., & Qin, Meng. (2014). Rhamnolipids elicit the same cytotoxic sensitivity between cancer cell and normal cell by reducing surface tension of culture medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98, 10187–10196.

K

Kachuri, L., De, P., Ellison, L. F., & Semenciw, R. (2013). Advisory Committee on Canadian Cancer Statistics. Cancer incidence, mortality and survival trends in Canada, 1970–2007. *Chronic Dis. Inj. Can.*, 33, 69–80.

Kaskatepe, B., & Yildiz, S. (2016). Rhamnolipid biosurfactants produced by pseudomonas Species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, 1–16.

Katragkou, A., Walsh, T. J., & Roilides, E. (2015). Invasive fungal infections in pediatric solid organ transplant patients: epidemiology and management. *Current Fungal Infection Reports*, 9(2), 57-64.

Kaur, R., Dhakad, M. S., Goyal, R., & Kumar, R. (2016). “Emergence of non-*albicans* *Candida* species and antifungal resistance in intensive care unit patients”. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(5), 455–460.

Kazak, E., Akın, H., Ener, B., Sığırlı, D., et al. (2014). An investigation of *Candida* species isolated from blood cultures during 17 years in a university hospital. *Mycoses*, 57(10), 623-9.

Khan, N. A. (2006). *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.*, 30 (4), 564-595.

Khan, N. A., & Siddiqui, R. (2009). *Acanthamoeba* affects the integrity of human brain microvascular endothelial cells and degrades the tight junction proteins. *Int. J. Parasitol.*, 39, 1611-1616.

Khoshsima, A., & Dehghani, M. (2016). Phase behavior of glycol ether surfactant systems in the presence of brine and hydrocarbon: Experiment and modeling. *Fluid Phase Equilibria.*, 414, 101-110.

Kiran, G. S., Ninawe, A. S., Lipton, A. N., Pandian, V., & Selvin, J. (2016). Rhamnolipid biosurfactants: evolutionary implications, applications and future prospects from untapped marine resource. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 36, 399–415.

Kołaczkowska, A., & Kołaczkowski, M. (2016). “Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans Candida* species”. *J. of Antimicrob. Chem.*, 71 (6), 1438–1450.

Koumentza, C., Costa, J., Azevedo, Z., Servin, Z., Grandfils, C., De Freitas, V., et al. (2018). *Burkholderia thailandensis* as a microbial cell factory for the bioconversion of used cooking oil to polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids. *Bioresour. Technol.*, 247, 829-837.

Kumar, D., Kumar, A., Singh, S., & Tilak, R. (2015). Candidemia-induced pediatric sepsis and its association with free radicals, nitric oxide, and cytokine level in host. *Journal of Critical Care*, 30 (2), 296-303.

Kumar, R. S., Arunachalam, S., Periasamy, V. S., Preethy, C. P., Riyasdeen, A., & Akbarsha, M. A. (2009). Micellization Behaviour, DNA Binding, Antimicrobial, and Cytotoxicity Studies of Surfactant–Cobalt(III) Complexes Containing Di- and Tetramine Ligands. *Aust. J. Chem.*, 62, 165–175.

L

Lamb, D. C., Warrilow, A. G. S., Rolley, N. J., Parker, J. E., Nes, W. D., Smith, S. N., Kelly, D. E., & Kelly, S. L. (2015). Azole antifungal agents to treat the human pathogens *Acanthamoeba castellanii* and *Acanthamoeba polyphaga* rough inhibition of sterol 14_{demethylase} (CYP51). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59, 4707–4713.

Lan, G., Fan, Q., Liu, Y., Chen, C., Li, G., Liu, Y., & Yin, X. (2015). Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 44–54.

Lazarkevich, I., Sotirova, A., Avramova, T., & Galabova, D. (2015). Comparative study on antibacterial activity of synthetic analogues of biologically active compounds and their combination with rhamnolipid-biosurfactant. *J. Biosci. Biotechnol.*, 55–62.

Lee, C. (2004). The role of biotechnology in modern food production. *J. Food Sci.*, 69 (3), 92-95.

Lee, W., & Lee, D.G. (2018). Reactive oxygen species modulate itraconazole-induced apoptosis via mitochondrial disruption in *Candida albicans*. *Free Radic. Res.*, 52 (1), 39-50.

Leite de Sousa-Gomes, M., Romero, G. A. S., Werneck, G. L. (2017). Visceral leishmaniasis and HIV/AIDS in Brazil: Are we aware enough?. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 11 (9), e0005772.

Leporatti, S., Vergara, D., Zacheo, A., Vergaro, V., Maruccio, G., Cingolani, R., & Rinaldi, R. (2009). Cytomechanical and topological investigation of MCF-7 cells by scanning force microscope. *Nanotechnology*, 20, 1–6.

Leprohon, P., Legare, D., & Ouellette, M. (2009). Intracellular localization of the ABCC proteins of *Leishmania* and their role in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 2646-2649.

Li, M., Neoh, K-G., Wang, R., Zong, B-Y., Tan, J. Y., & Kang, E-T. (2013). Methotrexate-conjugated and hyperbranched polyglycerol-grafted Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for targeted anticancer effects. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 48, 111-120.

Li, Y., Bi, H., & Jin, Y. (2016). Facile preparation of rhamnolipid-layered double hydroxide nanocomposite for simultaneous adsorption of p-cresol and copper ions from water. *Chem. Eng. J.*, 308, 78–88.

Liang, C., Wang, X., & Peng, X. (2016). Arsenic retention and transport behavior in the presence of typical anionic and nonionic surfactants. *Journal of Environmental Sciences*, 39, 249-258.

Lim, C. S., Rosli, R., Seow, H. F., & Chong, P. P. (2012). *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Euro. J. of Clin. Microbiol. Infec. Diseases*, 31 (1), 21-31.

Liu, S., Hou, Y., Liu, W., Lu, C., Wang, W., & Sun, S. (2015). Components of the calcium calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. *Eukaryot Cell*, 14 (4), 324-334.

Liu, Y., Zeng, G. M., Zhong, H., Wang, Z. Q., Liu, Z. F., Cheng, M., Liu, G. S., Yang, X., & Liu, S. H. (2017). Effect of rhamnolipid solubilization on hexadecane bioavailability: enhancement or reduction?. *J. Hazard. Mater.*, 322 (Part B), 394–401.

Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Penicillin's Discovery and Antibiotic Resistance: Lessons for the Future?. *Yale J. Biol. Med.*, 90 (1), 135–145.

Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A., & Walochnik, J. (2015). An update on *Acanthamoeba keratitis*: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasit.*, 22 (10), 25687209.

Loffabad, T. B., Abassi, H., Ahmadkhaniha, R., Roostaazad, R., Masoomi, F., Zahiri, H. S., & Noghabi, K. A. (2010). Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 81 (2), 397–405.

Lovaglio, R. B., Silva, V. L., Ferreira, H., Hausmann, R., & Contiero, J. (2015). Rhamnolipids know-how: looking for strategies for its industrial dissemination. *Biotechnol. Adv.*, 33, 1715–1726.

Lukáč M., Garajová, M., Mrva, M., Devínsky, F., Ondriska, F., & Kubincová, J. (2014). Novel fluorinated dialkylphosphonocholines: Synthesis, physicochemical properties and antiprotozoal activities against *Acanthamoeba* spp.. *J. of Fluorine Chem.*, 164, 10–17.

Lukáč, M., Garajová, M., Mrva, M., Bukovský, M., Ondriska, F., et al. (2012). Relationship between aggregation properties and antimicrobial activities of alkylphosphocholines with branched alkyl chains. *International J. of Pharmaceutics*, 423, 247– 256.

Lukáč, M., Mrva, M., Garajova, M., et al. (2013). Synthesis, self-aggregation and biological properties of alkylphosphocholine and alkylphosphohomocholine derivatives of cetyltrimethylammonium bromide, cetylpyridinium bromide, benzalkonium bromide (C16) and benzethonium chloride. *Eur. J. of Med. Chem.*, 66, 46-55.

M

Machado, J. E., & Murillo M. M. (2012). Evaluación de sensibilidad antibiótica en urocultivos de pacientes en primer nivel de atención en salud de Pereira. *Rev. Salud pública*, 14 (4), 710-719.

Machuca, L. M., Reno, U., Plem, S. C., Gagnetten, A. M. & Murguía, M. C. (2015). N-Acetylated Gemini Surfactants: Synthesis, Surface-Active Properties, Antifungal Activity, and Ecotoxicity Bioassays. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 5, 215-224.

Magalhães, L., & Nitschke, M. (2013). Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control.*, 29 (1), 138–142.

Makovitzki, A., & Shai, Y. (2005). pH-Dependent Antifungal Lipopeptides and Their Plausible Mode of Action. *Biochemistry*, 44 (28), 9775-9784.

Manaargadoo-Catin, M., Ali-Cherif, A., Pougna, J-L., & Perrin, C. (2016). Hemolysis by surfactants — A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 228, 1–16.

Marciano-Cabral, F., & Cabral, G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Micro. Rev.*, 16, 273-307.

Marcos-Zambrano, L. J., Escribano, P., Bouza, E., & Guinea, J. (2016). Susceptibility of *Candida albicans* biofilms to caspofungin and anidulafungin is not affected by metabolic activity or biomass production. *Med Mycol.*, 54, 155–161.

Marston, H. D., Dixon, D. M., Knisely, J. M., Palmore, T. N., & Fauci, A. S. (2016). Antimicrobial resistance. *J. Ame. Med. Ass.*, 316 (11), 1193-1204.

Martinez, V., Corsini, E., Mitjans, M., Pinazo, A., & Vinardell, M. P. (2006). Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different in vitro endpoints as alternatives to the in vivo assays. *Toxicol. Lett.*, 164, 259–267.

Martínez, V., Sánchez, L., Busquets, M. A., Infante, M. R., Vinardell, M. P., & Mitjans, M. (2007). Disturbance of erythrocyte lipid bilayer by amino acid-based surfactants. *Amino Acids*, 33, 459-462.

Martins, N., Ferreira, I., Mariana Henriques, M., & Silva, S. (2016). *In vitro* anti-*Candida* activity of *Glycyrrhizaglabra*L. *Industrial Crops and Products*, 83, 81-85.

Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., & Torrents, A. (1999). High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *Journal of Chromatography A*, 864 (2), 211–220.

Maugras, M., Infante, M. R., Gerardin, C., Selve, C., & Vinardell, M. P. (2001). Possible effects of counterions on biological activities of anionic surfactants. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 128, 541-545.

Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4 (2), 119-28.

Mazzoni, C., Giannattasio, S., Winderickx, J., & Ludovico, P. (2013). Yeast stress, aging, and death. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 684395.

- McBride, J., Ingram, P. R., Henriquez, F. L., & Roberts, C. W. (2005). Development of colorimetric microtiter plate assay for assessment of antimicrobials against *Acanthamoeba*. *J.Clin.Microbiol.*, *43*, 629-634.
- Medina-Morales, D. A., Machado-Duque, M. E., & Machado-Alba, J. E. (2015) Resistencia a antibióticos, una crisis global. *Rev. Méd. Risaralda*, *21* (1), 74.
- Meredith, A., & Mintzer, E. E. S. (2009). Nonviral Vectors for Gene Delivery, *Chem. Rev.*, *109* (2), 259-302.
- Mimee, B., Pelletier, R., & Bélanger, R. R. (2009). "In vitro antibacterial activity and antifungal mode of action of flocculosin, a membrane-active cellobiose lipid." *Journal of Applied Microbiology*, *107* (3), 989-996.
- Mixich, J. M., Knut R. M., & Voguel, M. (1992). Process for producing rhamnose from rhamnolipids, W092/05182.
- Mohan, P. K., Ā, G. N., & Yanful, E. K. (2006). Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic , anoxic and anaerobic conditions. *Water Research*, *40*, 533–540.
- Monteiro, S. A., Sasaki, G. L., De Souza L. M., Meira, J. A., Araujo, J. M., & Mitchell, D. A. (2007). Molecular and structural characterization of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. *Chem. Phys. Lipids*, *147*, 1-13.
- Morán, C., Clapés, P., Comelles, F., García, T., Pérez, L., Vinardell, P., Mitjans, M., & Infante, M. R. (2001a). Chemical structure/property relationship in single-chain arginine surfactants. *Langmuir*, *17*, 5071-5075.
- Morán, M. C., Pinazo, A., Pérez, L., Clapés, P., Angelet, M., García, M. T., Vinardell, M. P., & Infante, M. R. (2004). "Green" amino acid-based surfactants. *Green Chem.*, *6*, 233-240.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay to cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, *5* (1/2), 55–63.
- Muir, C. K., Flower, C., & Abb, N. J. 1983. A novel approach to the search for *in vitro* alternatives to *in vivo* eye irritancy testing. *Toxicology Letters*, *18*, 1-5.
- Mukerjee, P. (1958). Dilute Solutions of Amphipathic Ions. IV. Some General Effects of Dimerization. *J. Phys. Chem.*, *62* (11), 1404-1408.

Mukherjee, P. K., Zhou, G., Munyon, R., & Ghannoum, M. A. (2005). *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. *Medical Mycology*, *43*, 191- 208.

Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol.*, *24*, 509–515.

N

Nagy, F., Tóth, Z., Bozó, A., Czeglédi, A., Rebenku, I., Majoros, L., & Kovács, R. (2018). Fluconazole is not inferior than caspofungin, micafungin or amphotericin B in the presence of 50% human serum against *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* biofilms. *Medical Mycology*, *0*, 1–9.

Nałęcz-Jawecki, G., Grabińska-Sota, E., & Narkiewicz, P. (2003). The Toxicity of Cationic Surfactants in Four Bioassays. *Ecotoxicology and environmental safety*, *54*, 87-91.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCL). (1997). *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria*. Approved Standard M11- A4. NCCLS: Wayne, PA.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCL). (2000). *MIC testing supplemental tables*. Document M100-S10. NCCLS: Wayne, PA.

Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., Massey, R., Holoyda, K., Hoff, B., VanHandel, M., & Andes, D. (2007). Putative role of beta-1,3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance, *Antimicrob. Agents Chemother.*, *51* (2), 510-20.

Neves-Junior, A., Cartágenes-Pinto, A. C., Rocha, D. A., et al. (2015). Prevalence and fluconazole susceptibility profile of *Candida* spp. clinical isolates in a brazilian tertiary hospital in minas gerais, Brazil. *Anais da Acadêmia Brasileira de Ciências*, *87* (2), 1349-59.

Nicky, C. C., Robert, M. Q. S., & O'Toole G. A. (2005). Rhamnolipids Modulate Swarming Motility Patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. of Bacteriology*, *187*, (21), 7351-7361.

Nitschke, M., Paulista, U. E., Nitschke, M., Costa, S. G. V. A. O., Haddad, R., Gonc, L. A. G., & Contiero, J. (2005). Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnol. Prog.*, *21* (5), 1562–1566.

Niyyati, M., Saberi, R., Latifi, A., & Zohreh, Lasjerdi. (2016). Distribution of *Acanthamoeba* Genotypes Isolated from Recreational and Therapeutic Geothermal Water Sources in Southwestern Iran. *Environmental Health Insights*, *10*, 69–74.

Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu. Rev. Microbiol.*, 69, 71-92.

Nogueira, D. R., Mitjans, M., Morán, M. C., Pérez, L., & Vinardell, M. P. (2011). Membrane destabilizing activity of pH-responsive cationic lysine-based surfactants: role of charge position and alkyl chain length. *Amino Acids*, 43 (3), 1203-15.

Nunes, B. C., Martins, M. M., Chang, R., et al. (2016). Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates leaves. *Ind. Crop. Prod.*, 92, 277-289.

O

Oblak, E., Piecuch, A., Krasowska, A., & Łuczynski, J. (2013). Antifungal activity of Gemini quaternary ammonium salts. *Microbiological Research*, 168, 630–638.

Oblak, E., Piecuch, A., Dworniczek, E., & Olejniczak, T. (2015). The influence of biodegradable geminisurfactants, *N,N'*-bis(1-decyloxy-1-oxopronan-2-yl)-*N,N,N',N'* tetramethyl-propane-1,3 diammoniumdibromide and *N,N'*-bis(1-dodecyloxy-1-oxopronan-2-yl) *N,N,N',N'*-tetramethylethane-1,2-diammonium dibromide, on fungal biofilm and adhesion. *J. Oleo Sci.*, 64, 527– 537.

OECD. (2014). OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Ready Biodegradability - CO₂ in sealed vessels (Headspace Test), 310.

Ong, T. Y. Y., Khan, N. A., & Siddiqui, R. (2017). Brain-eating amoebae: predilection sites in the brain and disease outcome. *J. Clin. Microbiol.*, 55, 1989-1997.

Ortega Morente, E., Fernández-Fuentes, M. A., Grande Burgos, M. J., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., & Gálvez, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 162 (1), 13–25.

Ortiz, A., Teruel, J. A., Espuny, M. J., Márques, A., Manresa, A., & Aranda F. J. (2006). Effects of dirhamnolipid on the structural properties of phosphatidylcholine membranes. *Int. J. Pharm.*, 325, 99-107.

Ortiz, A., Teruel, J. A., Espuny, M. J., Márques, A., Manresa, A., & Aranda, F. J. (2009). Interactions of a bacterial biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylserine membranes. *Chem. Phys. Lipids*, 158, 46-53.

Otzem, D. E. (2017). Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different ?. *Biochi. Biophys. Acta Biomembr.*, 1859, 639–649.

Özdemir, G.; Peker, S.; & Helvac, S. S. (2004). Effect of electrolytes on the surface behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 35 (3–4), 225–233.

P

Paluch, E., Piecuch, A., Oblak, E., Lamch, Ł., & Wilk, K. A. (2018). Antifungal activity of newly synthesized chemodegradable dicephalic-type cationic surfactants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 164, 34–41.

Panariello, B. H. D., Klein, M. I., De Oliveira, E. G., & Pavarina, A. C. (2018). Fluconazole impacts the extracellular matrix of fluconazole-susceptible and-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *J. of Oral Microbiol.*, 10 (1), 1476644.

Pape, W. J., & Hoppe, U. (1991). *In vitro* methods for the assessment of primary local effects of topically applied preparations. *Skin Pharmacol.*, 4, 205-212.

Parra, J. L., Guinea, J., Manresa, M. A., Robert, M., Mercade, M. E., Comelles, F., et al. (1989). Chemical characterization and physicochemical behaviour of biosurfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 66, 141–145.

Peker, S., Helvacı, Ş., & Özdemir, G. (2003). Interface-subphase interactions of rhamnolipids in aqueous rhamnose solutions. *Langmuir*, 19 (14), 5838–5845.

Pennisi, M. G. (2015). Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. *Vet. Parasitol.*, 208, 35-47.

Perez, L., Garcia, T., Ribosa, I., Vinardell, M. P., Manresa, A., & Infante, M. R. (2002). Biological properties of arginine-based gemini cationic surfactants, *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 1279–1285.

Pérez, L., Pinazo, A., García, M. T., Lozano, M., Manresa, A., Angelet, M., Vinardell, M. P., Mitjans, M., Pons, R., & Infante, M. R. (2009). Cationic surfactants from lysine: Synthesis, micellization and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.*, 44, 1884-1892.

Perfumo, A., Rudden, M., Smyth, T. J., et al., (2013). Rhamnolipids are conserved biosurfactants molecules: Implications for their biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 97 (16), 7297–7306.

Pfaller, M. A. (2012a). Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, 125, 3–13.

Pierce, C.G., Uppuluri, P., Tristan, A.R., Jr, F. L. W., Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2008). A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat. Protoc.*, 3 (9), 1494–1500.

Pinazo, A., Manresa, M. A., Marques, A. M., Bustelo, M., Espuny, M. J., & Perez, L. (2016) Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. *Advances in Colloid and Interface Science*, 228, 17–39.

Pinheiro, L., & Faustino, C. (2017). *Application and Characterization of Surfactants*. London: InTech.

Plummer, M., De Martel, C., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Franceschi, S. (2016). Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. *Lancet.Glob.Health*, 4 (9), 609-16.

Podolsky, S. H. (2018). The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). *Palgrave Communications*, 4 (1), 124.

Ponte-Sucre, A., Gulder, T., Wegehaupt, A., et al. (2009). Structure-Activity Relationship and Studies on the Molecular Mechanism of Leishmanicidal N,C-Coupled Arylisoquinolinium Salts. *Journal of medicinal chemistry*, 52, 626-36.

Pornsunthorntawe, O., Chavadej, S., & Rujiravanit, R. (2009). Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 72 (1), 6–15.

R

Rane, H. S., Bernardo, S. M., Howell, A. B., & Lee, S. A. (2014). Cranberry-derived proanthocyanidins prevent formation of *Candida albicans* biofilms in artificial urine through biofilm- and adherence-specific mechanisms. *J. of Antimicrob.Chem.*, 69 (2), 428-36.

Rebello, S., & et al. (2014). Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environmental Chemistry Letters*, 12, 275-287.

Renwick, M. J., Brogan, D. M., & Mossialos, E. A. (2016). Systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 69 (2), 73-88.

Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., et al. (2009). Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83 (3), 541-553.

Robert, M., Mercadé, M. E., Bosch, M. P., Parra, J. L., Espuny, M. J., Manresa, M. A., & Guinea, J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnology Letters*, 11, 871–874.

Rodrigues, A. I., Gudiña, E. J., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2017). Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity. *Sci. Rep.* 1–9.

Rodriguez, E., Seguer, J., Rocabayera, X., & Manresa, A. (2004). Cellular effects of monohydrochloride of L-arginine, Na-lauroylethylester (LAE) on exposure to *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.*, 96, 903-912.

Rodriguez-Zaragoza, S. (1994). Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.*, 20, 225-241.

Rogers, H. W., Weinstock, M. A., Feldman, S. R., & Coldiron, B. M. (2015). Incidence estimate of nonmelanoma skin cancer (keratinocyte carcinomas) in the US population. *J. A. M. A. Dermatol.*, 151 (10), 1081-6.

Rosen, M. (2004). *Surfactants And Interfacial Phenomena*. A J. M. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomena* (p. 464). German: Wiley-VCH.

Ruiz, A., Pinazo, A., Pérez, L., Manresa, A., & Marqués, A. M. (2017). Green Catanionic Gemini Surfactant–Lichenysin Mixture: Improved Surface, Antimicrobial, and Physiological Properties. *Applied mat. Interfaces*, 9 (27), 22121-22131.

S

Sak, K. (2012). Chemotherapy and dietary phytochemical agents. *Chemother. Res. Pract.*, 2012, 282570.

Salick, D. A., Kretsinger, J. K., Pochan, D. J., & Schneider, J. P. (2007). Inherent Antibacterial Activity of a Peptide-Based β -Hairpin Hydrogel. *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (47), 14793-14799.

Sánchez, L., Martínez, V., Infante, M. R., Mitjans, M., & Vinardell, M. P. (2007a). Hemolysis and antihemolysis induced by amino acid-based surfactants. *Toxicol Lett*, 169, 177-184.

Sánchez, L., Mitjans, M., Infante, M. R., & Vinardell, M. P. (2006a). Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability. *Toxicol Lett*, 161, 53-60.

Sánchez, M., Aranda, F. J., Espuny, M. J., Marqués, A., Teruel, J. A., Manresa, Á., & Ortiz, A. (2007). Aggregation behaviour of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* in aqueous media. *Journal of Colloid and Interface Science*, 307 (1), 246–253.

Sánchez, M., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Espuny, M. J., Marques, A., Manresa, A., & Ortiz A. (2010). Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Colloid Interface Sci.*, 341, 240-247.

Sánchez, M., Teruel, J. A., Espuny, M. J., Marques, A., Aranda, F. J., Manresa, A., & Ortiz, A. (2006). Modulation of the physical properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine membranes by a dirhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Phys. Lipids*, 142, 118-127.

Sandle, T., Leavy, C., Jindal, H., & Rhodes, R. (2014). Application of rapid microbiological methods for the risk assessment of controlled biopharmaceutical environments. *Journal of Applied Microbiology*, 116, 1495-1505.

Scherz-Shouval, R., & Elazar, Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.*, 17, 422–427.

Schuster, F. L., & Visvesvara, G. S. (2004). Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug resist. updat.*, 7, 41-51.

Sha, R., Jiang, L., Meng, Q., Zhang, G., & Song, Z. (2012). Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens. *J. Basic Microbiol.*, 52 (4), 458–466.

Sheehan, J. C., & Hess, G. P. (1995). A new method of forming peptide bonds. *J. of the Ame. Chem. Society*, 77, 1067-8.

Shirai, A., Ueta, S., Maseda, H., Kourai, H., & Omasa, T. (2012). Action of reactive oxygen species in the antifungal mechanism of gemini-pyridinium salts against yeast. *Biocontrol. Sci.*, 17 (2), 77-82.

Siddiqui, R., Aqeel, Y., & Khan, N. A. (2016). The development of drugs against *Acanthamoeba* infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60, 6441-6450.

Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer Statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.*, 69, 7–34.

- Sierra, G. (1960). Hemolytic effect of a glycolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 26, 189-192.
- Sifuentes-Osornio, J., Corzo-León, D., & Ponce-de-León L. A. (2012). Epidemiology of invasive fungal infections in latinamerica current management of fungal infections. *Current Fungal Infection Reports*, 6 (1), 23–34.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D. W., & Azeredo, J. (2012). *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 36 (2), 288– 305.
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 573–583.
- Singer, S. J., & Nicolson, G. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175, 720-731.
- Singh, N., Pemmaraju, S. C., Pruthi, P. A., & Pruthi, V. (2013). *Candida* Biofilm Disrupting Ability of D-rihamnolipid (RL-2) Produced from *Pseudomonas aeruginosa* DSVP20. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 169, 2374–2391.
- Skwarczynski, M., Hayashi, Y., & Kiso, Y. (2006). Paclitaxel Prodrugs: Toward Smarter Delivery of Anticancer Agents. *J. Med. Chem.*, 49, 7253–7269.
- Smoller, B. R. (2006). Squamous cell carcinoma: From precursor lesions to high-risk variants. *Mod. Pathol.*, 19 (2), 88–92.
- Song, Y., Li, Q., & Li, Y. (2014). Biological Behaviors of Guanidine-Based Cationic Surfactants. *J. Surfact. Deterg.*, 17 (3), 459-464.
- Sotirova, A. V., Spasova, D. I., Galabova, D. N., Karpenko, E., & Shulga, A. (2008). Rhamnolipid-biosurfactant permeabilizing effects on gram-positive and gram-negative bacterial strains. *Curr. Microbiol.*, 56, 639–644.
- Souli, M. (2010). An Outbreak of Infection due to b-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2–Producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: Molecular Characterization, Epidemiology and Outcomes. *CID*, 50, 364-73.

Souli, M., Galani, I., Boukovalas, S., Gourgoulis, M., Chryssouli, Z., Kanellakopoulou, K., Panagea, T., & Giamarellou, H. (2011). In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomicin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antim. Age. Chem.*, 55 (5), 2395-7.

Stephenson, B. C., Rangel-Yagui, C. O., Pessoa, A., Tavares, L. C., Beers, K., & Blankschtein, D. (2006). Experimental and theoretical investigation of the micellar-assisted solubilization of ibuprofen in aqueous media. *Langmuir*, 22, 1514–1525.

Storti, L., Pasquale, G., Scomparim, R., Galastri, A. L., Alterthum, F., Gambale, W., & Paula, C. R. (2012). *Candida* spp. isolated from inpatients, the environment, and health practitioners in the Pediatric Unit at the University Hospital of the Jundiaí Medical College, State of São Paulo, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical*, 45 (2), 225- 231.

Sudbery, P. E. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat. Rev. Microbiol.*, 9, 737–748.

T

Tabbabi, A. (2019). Review of Leishmaniasis in the Middle East and North Africa. *Afr. Health Sci.*, 19 (1):1329-1337.

Tabbene, O., Azaiez, S., Di Grazia, A., & Karkouch, I. (2016). Bacillomycin D and its combination with amphotericin B: promising antifungal compounds with powerful antibiofilm activity and wound-healing potency. *J. of Applied Microbiol.*, 120 (2), 289-300.

Taravaud, A., Loiseau, P. M., & Pomel, S. (2017). In vitro evaluation of antimicrobial agents on *Acanthamoeba* sp. and evidence of a natural resilience to amphotericin B, *International Journal for Parasitology Drugs and Drug Resistance*, 7, 328-336.

Tavano, L., Infante, M. R., Riya, M. A., Pinazo, A., et al. (2013). Role of aggregate size in the hemolytic and antimicrobial activity of colloidal solutions based on single and gemini surfactants from arginine. *Soft Matter*, 9, 306–319.

Thanomsub, B., Pumeechockchai, W., Limtrakul, A., Arunrattiyakorn, P., Petchleelaha, W., & Nitoda, T. (2006). Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. *Bioresource Technology*, 9, 2457–2461.

Todaro, G. J., & Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J. Cell Biol.*, 17, 299-313.

Tomita, S., Suzuki, C., Wada, H., Nomachi, M., Imayasu, M., & Araki-Sasaki, K. (2017). Effects of lactoferrin on the viability and the encystment of *Acanthamoeba trophozoites*. *Biochem.Cell. Biol.*, 95 (1), 48-52.

Trados, T. (2005). *Applied surfactants: principles and applications*. New York: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA.

Tripathy, D. B., Mishra, A., Clark, J., & Farmer, T. (2018). Synthesis, chemistry, physicochemical properties and industrial applications of amino acid surfactants: A review. *C. R. Chimie*, 21, 112-130.

Tsubone, K., Arakawa, Y., & Rosen, M. J. (2003). Structural effects on surface and micellar properties of alkanediyl- α,ω -bis(sodium N -acyl- β -alaninate) gemini surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 262 (2), 516–524.

Turbhekar, K., Malik, N., Dey, D., & Thakare, D. (2015). Disruption of *Candida albicans* Biofilms by Rhamnolipid Obtained from *Pseudomonas aeruginosa* RT. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 3, 73-78.

U

Usuki, Y., Matsumoto, K., Inoue, T., Yoshioka, K., Iio, H., Tanaka, & T. (2006). Structure–activity relationship studies on niphimycin, aguanidylpolyol macrolide antibiotic. Part 1: The role of the N-methyl-N00-alkylguanidinium moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 1553-1556.

Utagawa, T. (2004). Production of arginine by fermentation. *J. Nutr.*, 134, 28545.

Uzcategui, N. L., Zhou, Y., Figarella, K., Ye, J., Mukhopadhyay, R., & Bhattacharjee, H. (2008). Alteration in glycerol and metalloid permeability by a single mutation in the extracellular C-loop of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1. *Mol. Microbiol.*, 70, 1477-1486.

Uzoigwe, C., & Ennis, C. (2015). Production of biosurfactants using eco-friendly microorganisms. A P. Rahman, *Environmental Sustainability: Role of Green Technologies* (p. 185-204). Switzerland: Springer nature.

V

Valentín, A., Cantón, E., Pemán, J., & Martínez, J. P. (2012). Voriconazole inhibits biofilm formation in different species of the genus *Candida*. *J. of Antimicrob. Chem.*, 67 (10), 2418-23.

Vannucci, L., Lai, M., Chiuppesi, F., Ceccherini-Nelli, L., & Pistello, M. (2013). Viral vectors: A look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiologica*, 36 (1), 1–22.

Veal, D. A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J., & Attfield, P. V. (2000). Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J. Immunol. Methods*, 243, 191-210.

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.

Vijayakumar, S., & Saravanan, V. (2015). In vitro Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Strain PB3A. *Asian J. Sci. Res.*, 8 (4), 510-518.

W

Wang, W., Lu, W., & Jiang, L. (2008). Influence of pH on the aggregation morphology of a novel surfactant with single hydrocarbon chain and multi-amine headgroups. *J. Phys. Chem. B.*, 112, 1409–1413.

Weaver, J. L., Szabo, J. G., Pine, P. S., et al. (1993). The effect of ion channel blockers, immunosuppressive agents, and other drugs on the activity of the multi-drug transporter. *Int. J. Cancer*, 54, 456-461.

WHO. (2013). *Worldwide distribution of leishmaniasis*. Consultado el 20 / Octubre / 2018, a World Health Organization:<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

WHO. (2015). *Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance*. . Consultado el 02 / Nov. / 2018, a World Health Organization: <http://www.who.int/drugresistance/>

WHO. (2015b). *Cáncer: Datos y cifras*. Consultado el 12 / Mayo / 2019, a World Health Organization: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

WHO. (2016). *Epidemiological situation*. Consultado el 20 / Octubre / 2018, a World Health Organization: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

WHO. (2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan emergentemente nuevos antibióticos*. Consultado el 29 / Julio / 2018, a Organización Mundial de Salud: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>

Wille, M. P., Guimarães, T., Furtado, G. H., & Colombo, A. L. (2013). Historical trends in the epidemiology of candidemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz*, 108 (3), 288-292.

Williams, M. A. (1997). Extraction of lipids from natural sources. A F. D. Gunstone, & F. Padley, *In Lipid Technologies and Application* (p. 113-135). New York: Marcel Dekker.

Wilson, J. J., & Lippard, S. J. (2014). Synthetic Methods for the Preparation of Platinum Anticancer complexes. *Chem. Rev.*, 114, 4470–4495.

Wu, Y.-S., Ngai, S.-C., Goh, B.-H., Lee, L.-H., & Chuah, L.-H. (2017). Anticancer Activities of Surfactin and Potential Application of Nanotechnology Assisted Surfactin Delivery. *Front. Pharmacol.*, 8, 761.

X

Xuan, Y. H., Chung, B. S., Hong, Y. C., Kong, H. H., Hahn, T. W., & Chung, D. I. (2008). Keratitis by *Acanthamoeba triangularis*: report of cases and characterization of isolates. *Korean J. Parasitol.*, 46 (3), 157-64.

Y

Yang, M. M., Wen, S. S., Mavrodi, D. V., Mavrodi, O. V., Wettstein, D., Thomashow, L. S., Guo, J. H., & Weller, D. M. (2014). Biological control of wheat root diseases by the CLP-producing strain *Pseudomonas fluorescens* HC1-07. *Phytopathology*, 104 (3), 248–256.

Yang, S., Zhao, J., Wu, Y., Alfred, A. T., & Xin, X. (2013). Chemical structures and biological activities of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* M148008. *J. Chem. Pharm. Res.*, 5 (12), 177-182.

Yapar, N. (2014). Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 10, 95-105.

Yoshimura, T., Yoshida, H., Ohno, A., & Esumi, K. (2003). Physicochemical properties of quaternary ammonium bromide-type trimeric surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 267 (1), 167–172.

Yu, H., Liu, X., Wang, C., Qiao, X., et al. (2016). Assessing the potential of four cathelicidins for the management of mouse candidiasis and *Candida albicans* biofilms. *Biochimie*, 121, 268- 77.

Yu, Q., Zhang, B., Ma, F., Jia, C., Xiao, C., Zhang, B., Xing, L., & Li, M. (2015). Novel mechanisms of surfactants against *Candida albicans* growth and morphogenesis, *Chemico-Biological Interactions*, 227, 1-6.

Z

Zanetti, S., Fiori, P. L., Pinna, A., Usai, S., Carta, F., & Fadda, G. (1995). Susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to Contact Lens Disinfecting Solutions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39, 1596–1598.

Zaragoza, A., Aranda, F. J., Espuny, M. J., Teruel, J. A., Marques, A., Manresa, A., & Ortiz, A. (2009). Mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp. *Langmuir*, 25, 7892-7898.

Zaragoza, A., Aranda, F. J., Espuny, M. J., Teruel, J. A., Marqués, A., Manresa, A., & Ortiz, A. (2010). Hemolytic activity of a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp.: evidence for a colloid-osmotic mechanism. *Langmuir*, 26 (11), 8567-72.

Zavrel, M., & White, T. C. (2015). Medically important fungi respond to azole drugs: an update. *Future Microbiology*, 10 (8), 1355-73.

Zeng, Z., Liu, Y., Zhong, H., Xiao, R., Zeng, G., Liu, Z., & Qin, L. (2018). Science of the Total Environment Mechanisms for rhamnolipids-mediated biodegradation of hydrophobic organic compounds. *Science of the Total Environment*, 634, 1–11.

Zhang, C., Cui, F., Zeng, G., Jiang, M., Yang, Z., Yu, Z., et al. (2015). Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Science of the Total Environment*, 518–519, 352–362.

Zhang, Y., & Miller, R. (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (10), 2101–2106.

Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., et al. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 101, 5951-5960.

Zheng, G. X., Lau, B. T., Schnall-Levin, M., et al. (2016). Haplotyping germline and cancer genomes with high-throughput linked-read sequencing. *Nature biotechnology*, 34 (3), 303–311.

Zhong, H., Yang, L., Yang, X., Zeng, G., Liu, Z., Liu, Y., & Yuan, X. (2015). Aggregation of low-concentration dirhamnolipid biosurfactant in electrolyte solution. *RSC Advances*, 5 (108), 88578–88582.

Zhong, H., Zeng, G. M., Liu, J. X., Xu, X. M., Yuan, X. Z., Fu, H. Y., & Ding, Y. (2008). Adsorption of monorhamnolipid and dirhamnolipid on two *Pseudomonas aeruginosa* strains and the effect on cell surface hydrophobicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79 (4), 671–677.

Zhu X. Y., Mardenborough G., et al. (2007). Synthesis and Evaluation of Isosteres of N-Methyl Indolo[3, 2-b]-quinoline (Cryptolepine) as New Antiinfective Agents. *Bioorg. Med. Chem.*, 15, 686-695.

7. APÉNDICE

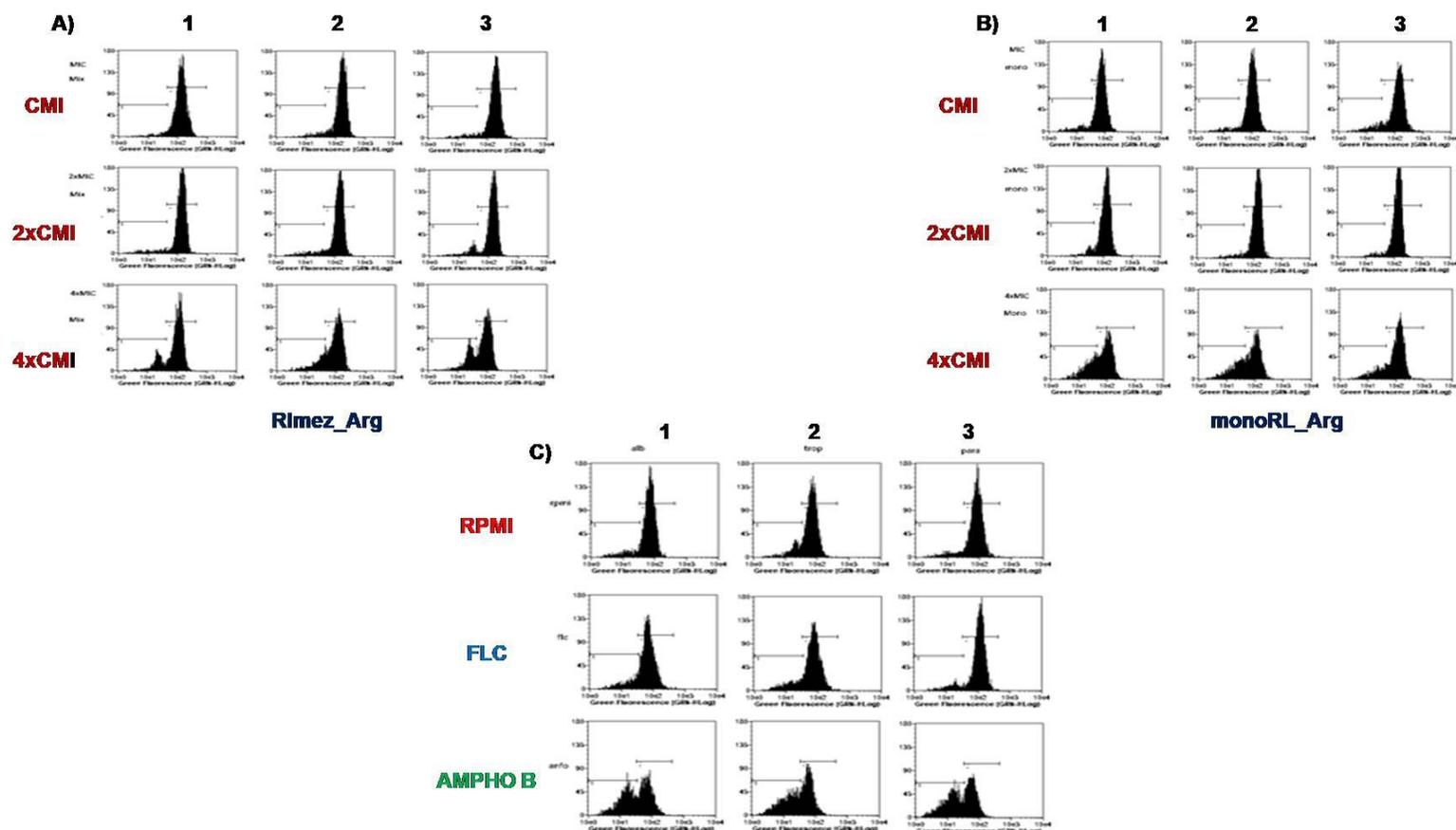


Fig. A1. Histogramas obtenidos por análisis de citometría de flujo. Evaluación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en cepas de *C. albicans* (1), *C. tropicalis* (2) y *C. parapsilosis* (3) resistentes al fluconazol incubadas por 24h con el compuesto *Rlmez_Arg* (A) y *monoRL_Arg* (B) en las concentraciones: CMI (7.8 $\mu\text{g/mL}$), 2xCMI (15.6 $\mu\text{g/mL}$), 4xCMI (31.2 $\mu\text{g/mL}$). Controles: RPMI (Control del medio nutritivo), fluconazol (64 $\mu\text{g/mL}$) y anfotericina B (4 $\mu\text{g/mL}$) (C)

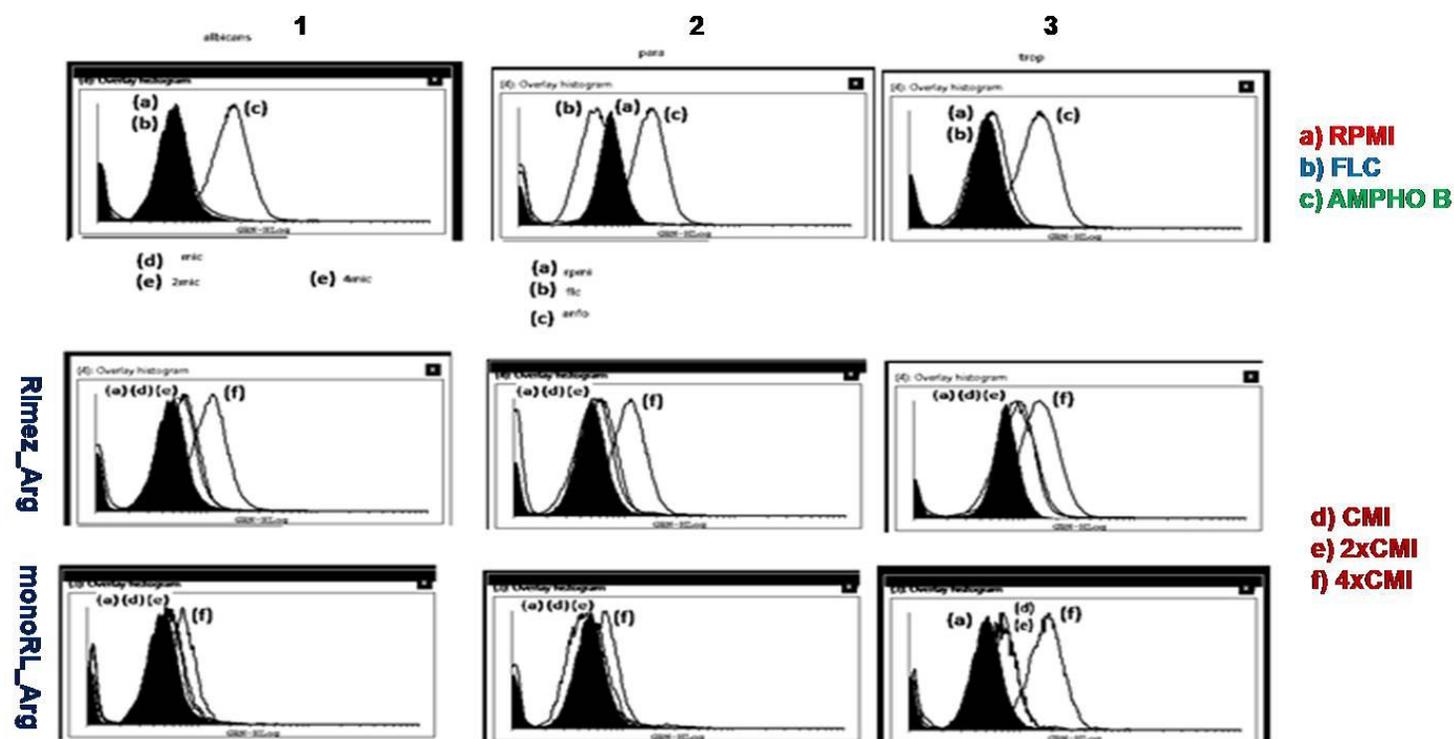


Fig. A2. Histogramas obtenidos por análisis de citometría de flujo. Evaluación de la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) en cepas de *C. albicans* (1), *C. tropicalis* (2) y *C. parapsilosis* (3) resistentes al fluconazol incubadas por 24h con los Controles: **a)** RPMI (Control del medio nutritivo), **b)** fluconazol (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$), **c)** anfotericina B (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y expuesta a los compuestos: Rlmez_Arg y monoRL_Arg en las concentraciones: **d)** CMI (7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), **e)** 2xCMI (15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y **f)** 4xCMI (31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

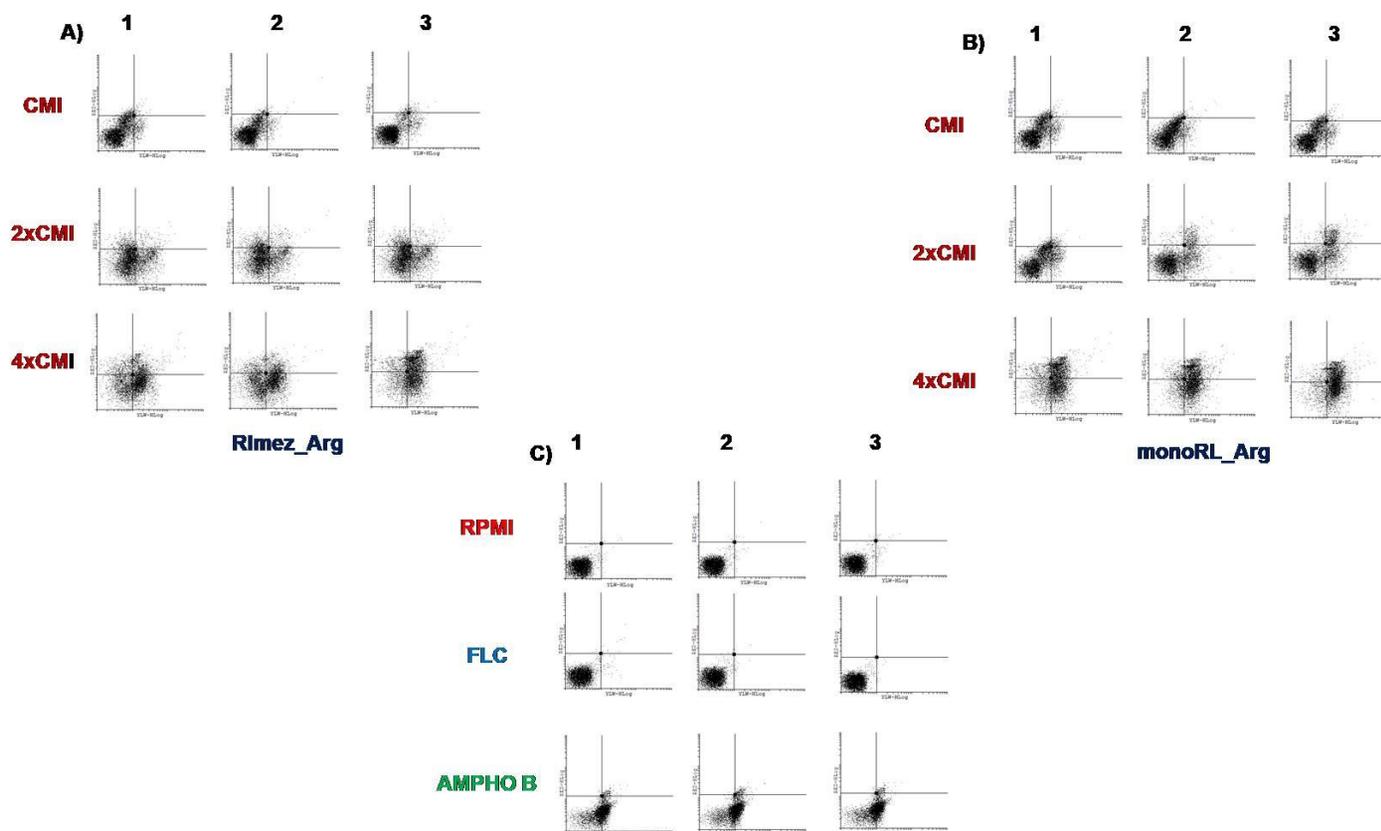
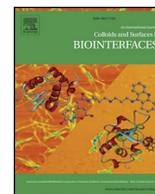


Fig. A3. Histogramas obtenidos por análisis de citometría de flujo. Intensidad de la fluorescencia de la anexina V en cepas de *C. albicans* (1), *C. tropicalis* (2) y *C. parapsilosis* (3) resistentes al fluconazol incubadas por 24h con el compuesto Rlmez_Arg (A) y monoRL_Arg (B) en las concentraciones: CMI (7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 2xCMI (15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4xCMI (31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Controles: RPMI (Control del medio nutritivo), fluconazol (64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y anfotericina B (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (C)

8.PUBLICACIONES



Rhamnolipids functionalized with basic amino acids: Synthesis, aggregation behavior, antibacterial activity and biodegradation studies

Anderson Ramos da Silva^a, M. Ángeles Manresa^a, Aurora Pinazo^b, M. Teresa García^b,
 Lourdes Pérez^{b,*}

^a Department of Biology, Healthcare and the Environment, Section Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

^b Department of Surfactant and Nanobiotechnology, IQAC-CSIC, c/ Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Rhamnolipid production
 Used cooking oil
 Arginine and lysine derivatives
 Physico-chemical properties
 Antibacterial activity
 Biodegradation

ABSTRACT

Rhamnolipids have been intensively studied due to their remarkable properties; however, the biosynthesis of RLs cannot compete commercially with the production of synthetic surfactants. Here, novel cationic rhamnolipids (RLs) derivatives containing arginine and lysine were prepared for the first time using a straightforward synthetic procedure. The RLs used to prepare these new cationic derivatives were produced by *Pseudomonas aeruginosa* using waste frying oil as carbon source. It was found that the amino acid-based RLs form aggregates at very low concentrations, even below the CMC. Biodegradation studies indicate that these cationic RLs can be classified as readily biodegradable. Interestingly, the RL arginine conjugates exhibited notable DNA binding affinity and good antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, which increases the potential applications of these compounds. Consequently, the use of low-cost substrates and the added value of the final product constitute a more cost-effective rhamnolipid production.

1. Introduction

In the last decades, increasing environmental concerns have led to new protocols designed to reduce chemical pollution. With the needs of future generations in mind, the goal of green chemistry is to develop products that will reduce or eliminate the generation of substances harmful to health and the environment. In synthesis, the selection of a starting material may be one of the most significant factors in determining environmental impacts [1].

The growing prominence of biosurfactants is based on their wide range of functional properties and renewable production routes based on microbes [2]. Of all the varieties of microorganisms that produce these substances, those with the greatest potential are the species of the genus *Pseudomonas*, which typically produce a class of glycolipid known as rhamnolipids (RLs) [3].

These biosurfactants have been intensively studied due to their remarkable properties: they are environmentally friendly compounds with excellent surface activity and low toxicity. Moreover, they can be prepared using low-cost renewables substrates [4,5]. The biosynthesis of RLs cannot compete commercially with the production of synthetic surfactants, which has inspired innovative approaches to enhance their

multifunctionality and find novel applications [6,7,8]. In this context, the use of low-cost substrates can be an effective strategy to reduce the production cost and the preparation of cationic RLs offers an opportunity to extend the potential usage of these biosurfactants.

The combination of a positively charged head group and one or more hydrophobic alkyl chains gives cationic surfactants greater multifunctionality compared to anionics [9]. They have been used in advanced medical applications: in gene therapy, because vesicles made of cationic surfactants have the ability to encapsulate RNA or DNA for cell transfer [10]; as vehicles for certain drugs [11], and as physicochemical and biological modifiers of biomaterials used in medicine [12]. Moreover, some cationic surfactants show antimicrobial properties, which may contribute to resolving the acute problem of rapidly growing bacterial resistance to commonly used antibiotics. The interaction of cationic surfactants with the cell membranes of microorganisms has been harnessed in new therapeutic antimicrobial and antifungal applications [13], with a mode of action that hampers the development of antimicrobial resistance.

In this study new cationic RL derivatives containing arginine and lysine (Scheme 1) were prepared by linking the free α -NH₂ group of these amino acids to the terminal carboxyl of the RL. The primary aim

* Corresponding author.

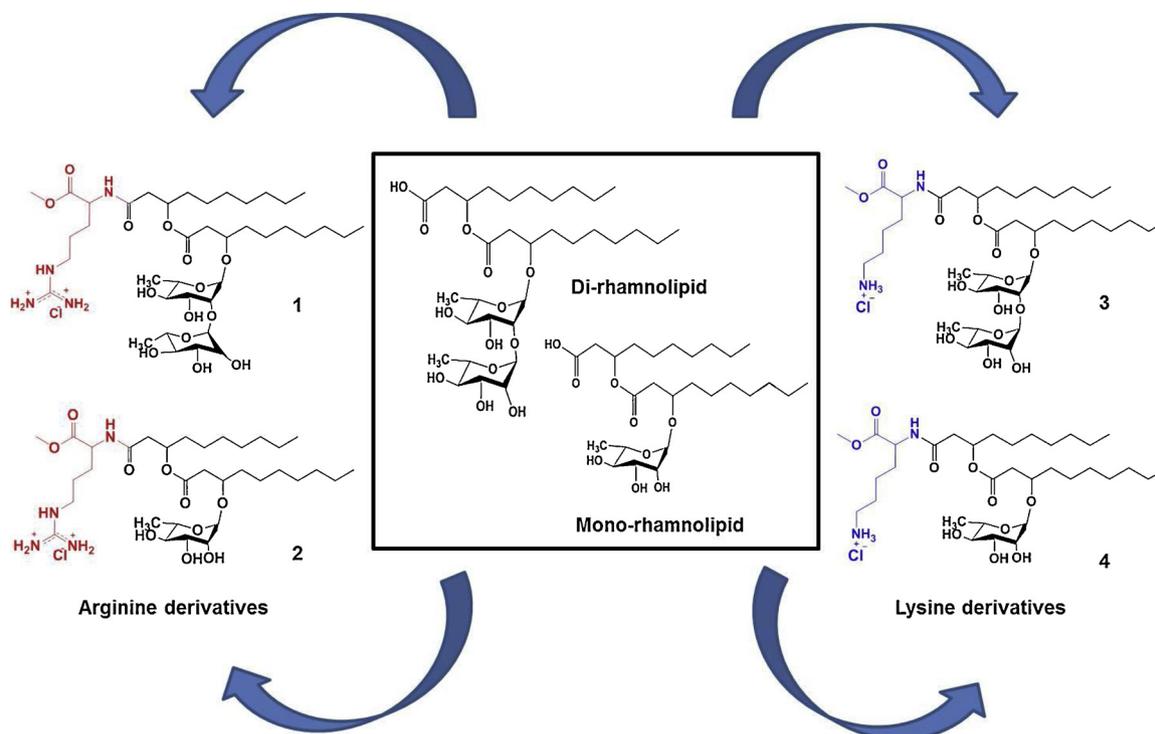
E-mail address: Lourdes.perez@iqac.csic.es (L. Pérez).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.037>

Received 21 February 2019; Received in revised form 13 May 2019; Accepted 15 May 2019

Available online 18 May 2019

0927-7765/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.



Scheme 1. Chemical structures of new semi-synthetic surfactants based on rhamnolipids and amino acids: diRL-Arg (1), monoRL-Arg (2) and lysine derivatives: diRL-Lys (3), monoRL-Lys (4).

of this modification was to increase the antimicrobial activity of RLs by introducing cationic charged head groups. The modified RLs were assayed to ascertain their surface activity, aggregation behavior, antibacterial activity, DNA binding properties and biodegradability. The novelty of this paper is the development of a new route for the transformation of anionic RLs in “green high-added value products”.

2. Experimental

This section briefly explains the methods used in this work. Details of materials and experimental procedures are reported in the Supplementary Information.

2.1. Production and purification of rhamnolipids

The microorganisms used for RLs production were strains of *Pseudomonas aeruginosa* MB and the carbon source was waste frying oil. Using the procedure showed in the supporting information two different RL samples were obtained: the **RLmix** (mixture of monoRL and diRL) and the **monoRL** (isolated fraction containing mainly monoRL).

2.2. Synthesis of amino acid rhamnolipid conjugates

The synthesis of the Arginine-based rhamnolipids was carried out in one step using H-Arg-OME and RLmix or monoRL as starting materials and Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) with Hydroxybenzotriazole (HOBT) as the activating agent. The Lysine-based rhamnolipids were prepared by means of a two-step procedure: the first step consisted of the preparation of RL-Cbz-Lys derivatives using Cbz-Lys-OME and RLmix or monoRL as starting materials. After that, the target compounds were obtained by removing the Cbz-group under a H_2 atmosphere. All the synthesized compounds were characterized by 1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) analyses and Mass Spectrometry (MS). The supporting information contains the detailed description of the procedures used to carry out these syntheses as well as the NMR and MS spectra.

2.3. Surface tension measurements

Surface tension measurements were measured by the Wilhelmy plate technique using a Krüss tensiometer.

2.4. Fluorescence measurements

The CMC was also determined by fluorescence measurements (Shidmadzu RF 540 spectrofluorometer). The fluorescence emission spectrum of pyrene in the 370–400 nm region depends on the polarity of the environment. The ratio of the first to the third vibronic peaks (I_I/I_{III}) in the fluorescence spectra was used to obtain the CMC.

2.5. Size distribution analysis

The size distribution profile of all RL formulations was determined by Dynamic Light Scattering (DLS) measurements using a Malvern Zeta Nanosizer. The size distribution profile was calculated using the correlation function. The Zetasizer (V6.20) software automatically determines the optimum parameters for the algorithm for monomodal and multimodal profiles.

2.6. Etidium bromide (EB) fluorescence

The percentage of EB displaced from the DNA/EB complex due to the interaction of the nucleotide with the RL surfactants was calculated according to the following equation:

$$\%EB = (I_0 - I / I_0 - I_{EB}) \times 100$$

where I_0 and I_{EB} are the maximum fluorescence intensities obtained for the EB and EB/DNA solutions, and I is the maximum fluorescence intensity obtained at different RL surfactant concentrations.

The results are represented based on the N/P ratios:

$$N/P = (\text{mols of surfactants} \times N^{\circ} \text{ of charges}) / (\text{mols of DNA} \times N^{\circ} \text{ of charges})$$

2.7. Agarose gel electrophoresis

Electrophoresis was carried out at 90 V in Tris-acetic buffer (pH 8.0) for 35 min. The DNA band was visualized under a transilluminator (Shimadzu-UV-160A).

2.8. Antimicrobial activity

Antimicrobial activity was studied by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) [14], defined as the lowest concentration of antimicrobial agent that inhibits the development of visible growth after 24 h of incubation at 37 °C.

2.9. Biodegradability

The CO₂ headspace test [15] was applied to evaluate the biodegradability of the surfactants under aerobic conditions. This method allows the evaluation of the ultimate aerobic biodegradation (mineralization to carbon dioxide) of an organic compound in aqueous medium by measuring the net increase in total inorganic carbon over time.

3. Results and discussion

3.1. Rhamnolipid production

In order to reduce the cost of producing biosurfactants and use renewable materials, *Pseudomonas aeruginosa* MB was incubated in a culture medium containing waste frying oils as a carbon source. To increase the productivity, a 2% inoculum was used and four-phase culture was run. At the end of the fourth phase, a production of 19.17 g/L was achieved. In this work, two different RL samples were prepared: **RLmix** and **monoRLs**. The **RLmix** is the mixture of monoRLs and diRLs produced by the microorganisms. The **monoRL** sample, containing mainly monoRLs with alkyl chains of 10 carbon atoms, was obtained by purifying a sample of **RLmix** using silica gel column chromatography.

The composition of the two RL samples was evaluated by ESI-MS analysis (Figure S1). The **RLmix** showed two dominant peaks of m/z 503 and 649 (ratio 60/40), which are compatible with Rha-C₁₀-C₁₀ and Rha-Rha-C₁₀-C₁₀. Minor peaks corresponding to other homologues of mono- and di-rhamnolipids were also identified: Rha-C_{8:2} (m/z : 301), Rha-C_{12:2} (m/z : 357), Rha-C₁₀-C₈ (m/z : 475), Rha-C₁₀-C_{12:1} (m/z : 529), Rha-Rha-C₈-C₁₀ (m/z : 621), Rha-Rha-C₁₀-C₁₂ (m/z : 677). The monoRL Rha-C₁₀-C₁₀ appeared as a predominant peak of m/z 503 in the purified **monoRL** sample. This sample also contained minor peaks corresponding to other homologues such as Rha-C_{12:2} (m/z 357) and Rha-C₁₀-C_{12:1} (m/z 529).

The ability of *Pseudomonas* species to produce biosurfactants has been extensively documented [16]. Nitschke et al. [7] carried out a study with *P. aeruginosa* LBI using several substrates as the carbon source and reported a significant RL yield of 11.7 g/L when using soy soapstock. Lan et al. [18] obtained 13.97 g/L when using 20 g/L of waste cooking oil. According to the literature, the nature of the homologue mixture depends on variables such as the strain type, carbon source, as well as the production strategy [19]. Using glycerol and glucose, *P. aeruginosa* LBI mainly produced the diRL Rha-Rha-C₁₀-C₁₀, whereas when hydrophobic sources were used, the monoRL Rha-C₁₀-C₁₀ was predominant [17]. In contrast, using soapstock (a hydrophobic substrate) as the carbon source, a predominance of Rha-Rha-C₁₀-C₁₀ was found [20].

3.2. Rhamnolipid amino acid conjugates

RL derivatization was carried out using the two RL samples previously prepared. Firstly we used the mixture of mono and dirhamnolipids (**RLmix**) produced by the microorganism. This sample was not

purified because the aim of the work was to modify the rhamnolipid structure as little as possible using renewable raw materials. The second sample, **monoRL**, was purified to ascertain if the biological and physicochemical properties of the resulting surfactants changed meaningfully if the number of rhamnose moieties in the molecule varied.

The cationic derivatization of RLs was carried out by the preparation of arginine and lysine conjugates (Scheme S1). The design of these new amino acid-based RLs was based on the results of previous structure-activity relationship studies [13,21]: 1) the introduction of cationic charges to the RL structures can enhance the antimicrobial activity of the precursors 2) compounds containing basic groups of the guanidine type attached to hydrophobic chains have excellent antimicrobial and antifungal properties 3) lysine and arginine RL derivatives can be prepared using simple and rapid chemical procedures, and 4) amino acid-based surfactants usually show high biodegradability and low ecotoxicity.

The two arginine derivatives were synthesized using **RLmix** or **monoRL** (Scheme S1). The guanidine group of arginine is an extremely strong base (pKa = 12.5) that remains protonated under standard conditions for α -acylations, making it possible to work with an un-protected arginine side chain. The formation of an amide bond between the RLs and the amino group of arginine was achieved with different solvents and condensating agents, the best results being obtained using DCC with HOBt as the activating agent. Two RL samples functionalized with arginine were obtained: **RLmix-Arg** (from **RLmix**) and **monoRL-Arg** (from **monoRL**).

The procedure used to prepare lysine derivatives was performed in two steps (Scheme S1). The pKa of the lysine ϵ -amino group was lower than that of the guanidine group; therefore, for the lysine derivatives it was necessary to work with the ϵ -protected amino acid. The best results for this reaction were obtained using BOP (benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate) as the coupling agent. Two RL samples functionalized with lysine were also obtained: **RLmix-Lys** (from **RLmix**) and **monoRL-Lys** (from **monoRL**).

ESI-MS studies confirmed the formation of the amino acid conjugates (Fig. S1). Both Rha-Rha-C₁₀-C₀-Arg (m/z 822) and Rha-C₁₀-C₁₀-Arg (m/z 675) gave the predominant molecular ion peaks in the **RLmix-Arg** sample, whereas only the peak corresponding to Rha-C₁₀-C₁₀-Arg (m/z 675) was observed for **monoRL-Arg**. ESI-MS also showed minor peaks corresponding to other RL derivatives. Similar results were obtained for the lysine derivatives; the predominant homologues in the **RLmix-Lys** were Rha-Rha-C₁₀-C₁₀-Lys (m/z 793) and Rha-C₁₀-C₁₀-Lys (m/z 647), whereas Rha-C₁₀-C₁₀-Lys (m/z 647) was predominant in the **monoRL-Lys** sample.

The results indicate that it is possible to obtain the amino acid conjugates using a straightforward and highly efficient procedure. It should be emphasized that each reaction was performed with three replicates and the chromatograms obtained in the different reproductions always presented the same profile.

3.3. NMR spectroscopy

NMR spectra were used to confirm the chemical structure of all compounds (Figures S2-S7). The ¹H NMR spectrum of the **monoRL** clearly shows the signals corresponding to the two main moieties of this molecule. The peaks at $\delta = 0.90$ ppm, $\delta = 1.2$ ppm and around $\delta = 1.4$ ppm indicate the presence of the terminal -CH₃ group and the -CH₂- of a straight-chain fatty acid. The ¹H NMR spectrum also contains the typical signals of the rhamnose moiety; chemical shifts of $\delta = 3.5$ –4.7 ppm correspond to the hydrogen atoms of the pyranose ring, and the peak of the -CH₃ of pyranose was observed as a singlet at $\delta = 1.2$ ppm. The ¹³C NMR spectrum also shows the presence of two alkyl chains and the rhamnose group: signals at $\delta = 172.4$ ppm and $\delta = 174.2$ ppm correspond to two carbonyl groups, signals at $\delta = 14.4$ ppm and $\delta = 23.0$ –33.0 ppm to two alkyl chains, and signals at $\delta = 69.3$ –100.6 ppm confirm the presence of the rhamnose moiety. The

^1H NMR and ^{13}C NMR spectra did not identify the chemical shifts of all the protons and carbons of the sample, so 2D NMR spectra were also acquired. Table S1 contains the ^1H NMR and ^{13}C NMR data obtained from these experiments. The NMR spectra of the RLmix also support the proposed mixture. The region corresponding to the rhamnose carbons in the ^{13}C NMR contains more signals than the spectra of the monoRL. The gHSQC shows three cross peaks corresponding to anomeric carbons of rhamnose (4.92/99.05, 4.78/100.5, 4.88/104.2); these signals clearly indicate the presence of the mono- and diRLs in the mixture. Using the mono- and bi-dimensional NMR experiments, the NMR data corresponding to the diRLs was determined (Table S2).

The ^1H NMR of the lysine and arginine derivatives also identified the target structures. The multiplet at around 4 ppm and the singlet at 3.7 ppm confirm the anomeric $-\text{CH}-$ and the methyl ester group of the amino acid moiety. The ^1H NMR was carried out using a delay of 25 s, which allows the integration of the proton signals to be compared accurately. Comparing the integrals corresponding to the $-\text{CH}-$ and $-\text{CH}_3$ of lysine or arginine with those of the $-\text{CH}_3$ of the alkyl chains, it can be assumed that almost all RLs were amino acid derivatives. The ^{13}C NMR of these derivatives also contain signals corresponding to the amino acid moieties: the anomeric $-\text{CH}-$, the $-\text{CH}_3$ of the methyl ester group and the carbon atom of the guanidine group in the arginine derivatives. The 2D NMR spectra were also used for the complete assignment of all NMR data of these derivatives (Table S1 and S2).

3.4. Surface properties and self-aggregation

The critical micellar concentration (CMC) of RLs and their amino acid conjugates in water solution was investigated by steady-state fluorescence measurements using pyrene as a solvatochromic probe.

The I_1/I_3 ratio obtained at the diluted concentrations is about 1.6, which is comparable to that of pyrene in water (Fig. 1A, B); a subsequent abrupt decrease in I_1/I_3 indicates that the pyrene is moving into the formed micelles. The data were fitted to sigmoidal Boltzmann-type curves, and the CMC values were taken as the middle point of transitions (Table 1). The CMC value of the monoRL samples is lower than that of the RLmix which can be ascribed to their hydrophobic nature. Although monoRL and RLmix contain the same hydrophobic group, monoRL can be considered a more hydrophobic as it contains only one rhamnose moiety.

Wide-ranging CMC values (1–400 mg/L) [22,23] have been reported for mono- and diRLs and mixtures of both biosurfactants. For example, the CMC for mixtures of mono- and diRLs include 120 mg/L reported by Benicasa [20], 53 mg/L by Mata-Sandoval [24], and 230, 106, 150 and 234 mg/L for RLs produced using soybean oil refinery wastes [25]. Regarding the influence of the pH, the CMC of monoRLs was found to be 0.070 mM at pH = 7.4 and 0.050 mM at pH = 4 [26], Chen [27] found that for monoRL, the CMC increased as the pH decreased, from 0.18 mM at pH 7 to 0.36 mM at pH 9. Even when the same RL is used, discrepancies in CMC values can arise: using the same commercial RL of Jeneil, Zhong [28] reported a CMC value of 0.12 mM for the monoRL fraction and 0.07 mM for the diRL fraction, whereas Chen et al. found a CMC of 0.18 mM for monoRLs and 0.11 mM for diRLs [27]. These different values can be attributed to the numerous factors that can affect the CMC: levels of sample purity, pH, ionic strength and the presence of unsaturated bonds. Moreover, given the possible coexistence of a variety of RL homologues, separating one can be challenging, and small quantities of other homologues can produce changes in the aggregation behavior.

The CMC of the arginine and lysine RL conjugates are of the same order. These results indicate that the hydrophilic/lipophilic balance of these surfactants is similar. Previous studies reported similar CMC values for arginine and lysine surfactants with the same alkyl chain length [13]. The CMC of the amino acid derivatives is higher than that of their RL precursors, which may be explained by their different ionic character. RLs can be neutral or negatively charged. The pKa values of

purified mono- and diRLs were 5.9 and 5.6, respectively [29]. This means that at a pH of 6.6 or higher, more than 97% of molecules are negatively charged, whereas at a pH of 4.6 or less, more than 97% of molecules will be non-ionic. At a pH between 4.6 and 6.6 water solutions of these compounds contains anionic and non-ionic species. Chen [27] found that the CMC of monoRLs did not change after the addition of NaCl, which confirms the low ionic character of these biosurfactants in water. The arginine RL conjugates have the cationic charge in the protonated guanidine group (pKa = 12.5), while in the lysine derivatives the cationic charge is located in the ϵ -protonated amino group (pKa = 10.5). The pKa of the basic amino group of amino acid is reported to decrease from 1 to 3 units when hydrophobic groups are linked to the amino acid [30]. Taking into account these considerations and the pH of water solutions of RL and amino acid RL conjugates (pH values between 4.3–6.1), it can be assumed that the RL water solutions contain a high percentage of non-ionic molecules, whereas almost all the molecules in the water solution of the arginine and lysine derivatives are cationic. The high percentage of non-charged molecules in the RL water solution explains their lower CMC compared to the amino acid conjugates.

The surface activity of these biosurfactants was examined by surface tension measurements (Fig. 1C and D). The surface tension decreased gradually with increasing RL concentration up to a certain value, the CMC, beyond which it remained almost constant. The CMC values obtained by surface tension did not agree with those determined by fluorescence (Table 1), especially for the amino acid RL conjugates. Similar results have been reported for cationic surfactants with two or more hydrophobic alkyl chains, including gemini and glycerolipid arginine-based [31] and gemini pyridinium [32] surfactants. This behavior has been ascribed to the formation of pre-micellar aggregates. Bhadani [32] used conductivity measurements to confirm the presence of pre-micellar aggregates in aqueous solutions of gemini pyridinium surfactants and Rosen also found an important difference between the CMC values achieved by conductivity or surface tension due to the existence of pre-micellar aggregates in gemini surfactants [33].

The surface tension value at the CMC (γ_{cmc}) indicates how effectively the surfactant can reduce the solvent surface tension. The γ_{cmc} values obtained show that the studied RLs reduced the surface tension of water very effectively, the results being similar for all samples. The presence of two hydrophobic chains gives rise to hydrophobic interaction, which promotes a tightly packed monolayer of surfactants at the interface. Previously reported RLs [34] and arginine-based surfactants with one arginine and two alkyl chains [13] also had low γ_{CMC} values. Moreover, all the RLs showed very good adsorption efficiency ($\text{pC}_{20} = -\log C_{20}$) and very small quantities were required to reduce the surface tension of water.

3.5. Sizes of aggregates

Dynamic light scattering (DLS) measurements were carried out to determine the hydrodynamic diameters of the aggregates formed by the RLs (Figure S8). Fig. 2A shows the size distribution as a function of concentration for the monoRL and RLmix samples, which was similar for both products. For all concentrations tested, even below the CMC, scattering detected a bimodal distribution of sizes corresponding to small- (50–100 nm) and medium-sized vesicles (200–400 nm). The sizes remained roughly within the same range for all concentrations.

Formation of aggregates at very low concentrations, even below the CMC has also been described for other RLs. Haba et al. [35] found a similar size distribution for RLmix produced by the same *P. aeruginosa* strain. Small aggregates were detected by Pornsunthorntawe at about one fifth the CMC and a bimodal population of vesicles of 50–250 nm above the CMC [36]. Ikilier et al. [37] reported that pure mono- and diRLs aggregated at a concentration one tenth of the CMC: aggregate size decreased up to the CMC and then increased up to 10 mM. The minimum concentration at which aggregation occurred was attributed

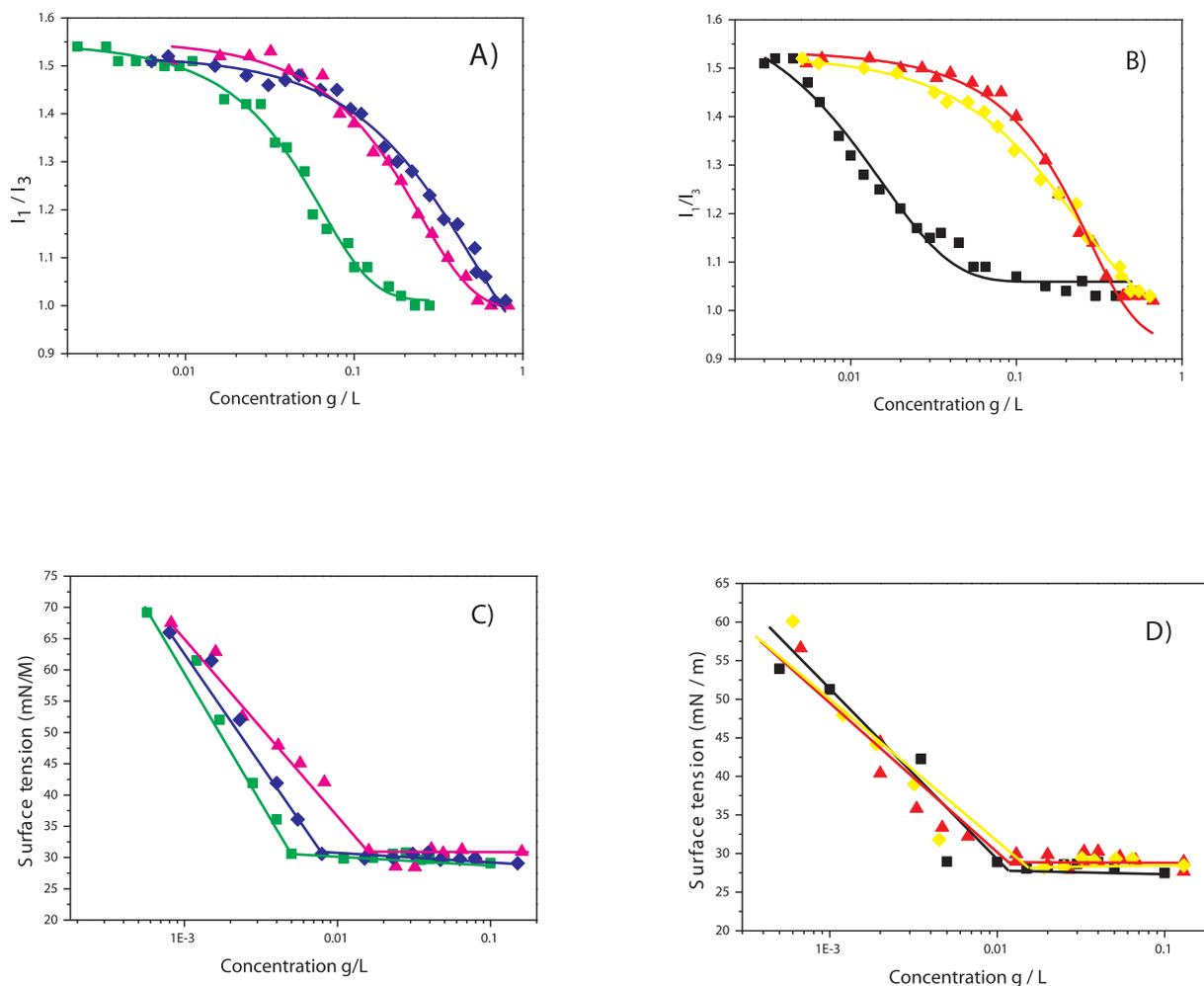


Fig. 1. Determination of the cmc. A and B) Variation of I_1/I_3 ratio of pyrene fluorescence as a function of RL concentration: A) RLMix and its derivatives, B) monoRL and its derivatives. C and D) Variation of surface tension as a function of RL concentration: C) RLMix and its derivatives, D) monoRL and its derivatives. RLMix (■) and monoRL (■), RLMix_arg (▲) and monoRL_arg (▲), RLMix_lys (◆) and monoRL_lys (◆).

Table 1

Surface active properties of RLs and their arginine and lysine derivatives at 25 °C. Critical micellar concentration (CMC), Surface tension at the CMC (γ_{CMC}) and pC_{20} ($-\log C_{20}$, Concentration required to reduce the surface tension of water by 20 mN/m).

Rhamnolipids and their derivatives	Surface tension			Fluorescence	
	CMC (g/l)	γ_{CMC} (mN/m)	pC_{20}	CMC (g/l)	I_1 / I_{II}
RLmix	0,005	30.6	2.8	0.05	1.26
RLmix-Arg	0.016	31.1	2.5	0.18	1.26
RLmix-Lys	0.008	30.6	2.7	0.23	1.26
monoRL	0.010	28.8	3.0	0.014	1.26
monoRL-Arg	0.013	28.9	3.14	0.17	1.26
monoRL-Lys	0.015	28.3	3.11	0.14	1.26

to the transition from the liquid-solid coexistence in the monolayer to the ordered solid range. Zhong et al. [38] also observed the formation of vesicles (50–60 nm) at one tenth the CMC, and a decrease in aggregate size beyond the CMC. Guo et al. [39] reported a bimodal distribution of small and medium vesicles for a diRL-rich fraction; in this case, the vesicle diameter increased with the concentration. The discrepancies in aggregate sizes and trends are similar to the variability of reported CMC values and likewise can be attributed to differences in RL composition, the pH and sample preparation procedures.

Aggregates were also observed at concentrations below the CMC

with the lysine and arginine conjugates (Fig. 2B and C). The size distribution profiles of the monoRL-lys derivatives are similar to those of their RL precursors; a bimodal distribution of small and medium aggregates that remained fairly constant as the concentration increased. The RLMix-lys sample also showed a bimodal distribution and the size of the smallest aggregates did not change when the concentration increased, unlike that of the large aggregates.

Arginine RL conjugates showed different behavior. At low concentrations, medium-sized as well as large vesicles with hydrodynamic diameters higher than those found in the RL samples (between 350 and 750 nm) were observed. At the highest concentrations tested (0.150–0.3), three different size ranges of aggregates were found. The smallest had an average size of 4–9 nm and were most likely micellar structures; those of medium-sized were of 30–40 nm and large of 250 nm. Although the intensity of the peaks corresponding to the micelles (4–9 nm) is very low compared to those of the large aggregates, it should be taken into account that the latter are considerably amplified by the size distribution in terms of intensity.

The DLS studies indicate that all RLs formed vesicles at low concentrations. Vesicle formation has already been described for several cationic surfactants, including arginine- or lysine-based surfactants with two alkyl chains [13] and didodecyl dimethyl ammonium bromide, a cationic surfactant that also contains two hydrophobic chains [40]. The type of aggregates formed by surfactants in aqueous solution can be predicted by the geometry of the molecule. Double chain surfactants have a cylindrical shape and tend to form bilayers through

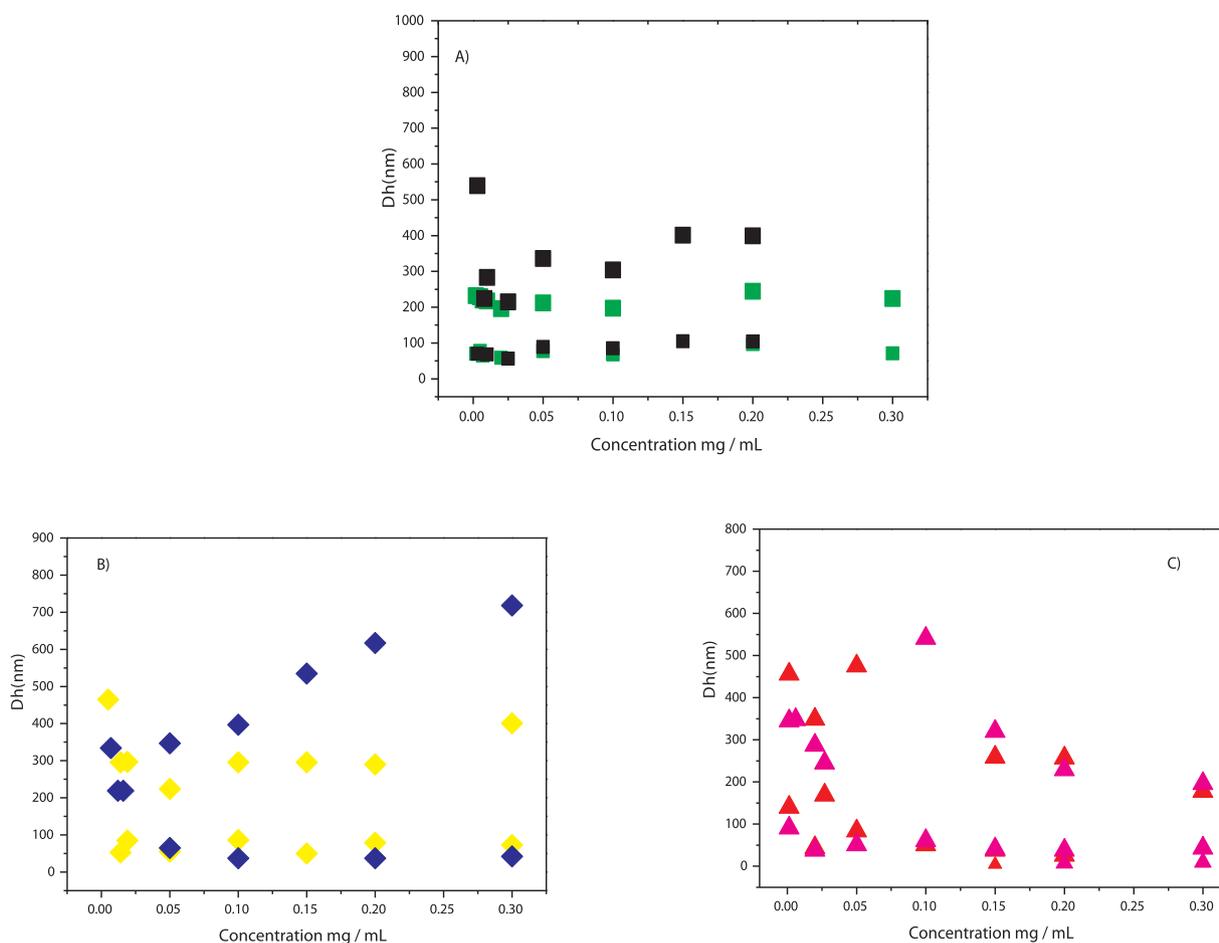


Fig. 2. Size distribution profiles as a function RL concentration: A) RLmix (■) and monoRL (■) B) RLmix_lys (◆) and monoRL_lys (◆) and C) RLmix_arg (▲) and monoRL_arg (▲).

lateral van der Waals interactions of the alkyl chains and hydrogen bonds between the hydrophilic groups.

3.6. DNA binding properties

An important application of cationic lipids in modern biology is the transport of DNA or other genetic material through the cell. To determine if the new cationic amino acid-based RLs are suitable candidates for biomedical applications, their interactions with DNA were studied. The DNA binding affinity was evaluated with ethidium bromide intercalation and agarose gel electrophoresis assays.

The fluorescence intensity of EB, an aromatic cationic dye, increased drastically when the ethidium ion intercalated between the DNA base pairs (Figure S9). The addition of monoRL and RLmix to the EB-DNA complex (Fig. S9A and S9B) did not affect the stability of the DNA-EB complex, indicating that anionic aggregates do not interact with polyanionic DNA. The addition of cationic RLs (Fig. S9(C–F)) resulted in a quenching of the fluorescence emission intensity. The DNA was compacted by the cationic aggregates formed by the arginine- and lysine-based RLs, producing a gradual release of EB from the EB-DNA complex (Fig. 3).

The results indicate that these cationic RLs possess good DNA binding capacity and that the most efficient quenching was produced by the arginine homologues. The higher DNA affinity shown by the arginine-based RLs could be ascribed to the nature of their cationic charge; it has been reported that arginine-based lipids also exhibit significant DNA-binding properties through the hydrogen bonds of the guanidinium group [41]. The DNA affinity of the new RLs is similar to that displayed by monocatenary surfactants with long alkyl chains [42–44].

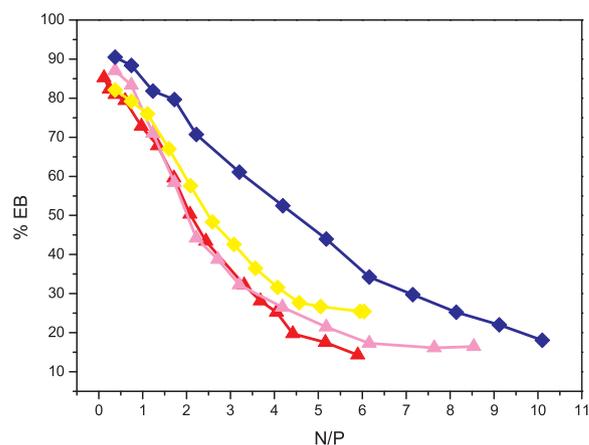


Fig. 3. Release of EB from the EB / DNA complex due to the addition of cationic rhamnolipids: RLmix_lys (◆), monoRL_lys (◆), and C) RLmix_arg (▲) and monoRL_arg (▲).

Agarose gel electrophoresis was also used to study the interactions of the new RL derivatives with DNA (Fig. 4). When an electric field is applied to DNA placed in agarose gel, the oligonucleotide replicates throughout the gel. As negative charges in DNA become partially or totally neutralized due to the interaction with other compounds, the migration of DNA through the gel is retarded or completely hindered.

No evident modifications in DNA mobility were observed in the presence of varying concentrations of monoRL and RLmix. As expected, anionic lipids did not interact with DNA, whereas it was confirmed by

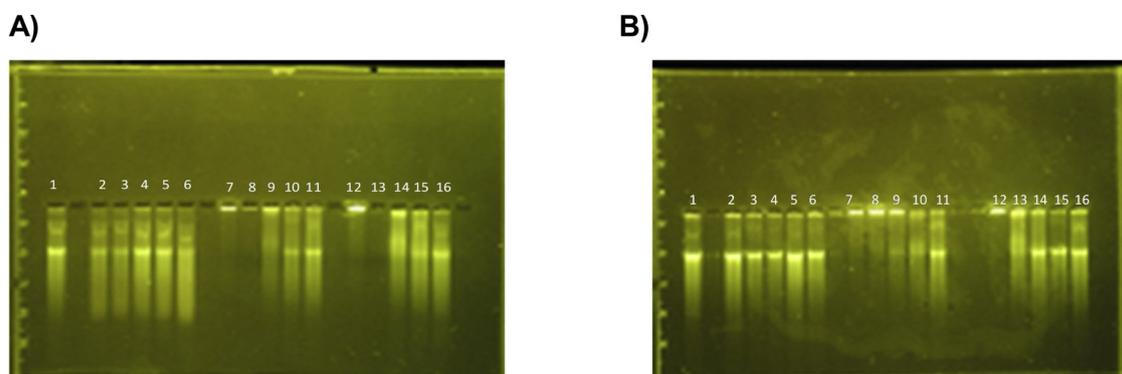


Fig. 4. Gel retardation assay for monitoring DNA binding in monoRL/DNA (A) and RLmix/DNA (B) mixtures at different concentrations, compared with naked DNA. Free DNA (Line 1); RLs (Line 2,3,4,5,6 at 200, 100, 50, 25 and 12.5 μM); RLs_Arg (Line 7,8,9,10,11 at 200, 100, 50, 25 and 12.5 μM); RLs_Lys (Line 12,13,14,15,16 at 200, 100, 50, 25 and 12.5 μM).

agarose gel electrophoresis that DNA forms significantly stable complexes with amino acid-based RLs. At low concentrations of amino acid derivatives migration of oligonucleotides was not clearly modified. However, at higher concentrations, the loss of the fluorescence bands along the lines clearly indicates the complete complexation and neutralization of DNA by the tested compounds. The RLmix-Lys derivatives showed the lowest affinity to DNA, which agrees with the results of the EB fluorescence studies.

3.7. Antibacterial activity

The design and synthesis of new antimicrobial surfactants is of great interest in the fight against growing antimicrobial resistance. The MIC values of each compound against representative bacterial strains are presented in Table 2. Anionic RLs did not show antimicrobial activity at the concentration range tested. The results published in the literature concerning RL antimicrobial activity indicate that different bioactivity profiles can be obtained by changing the growth substrate, growth conditions or bacterial strain. Abalos [25] and Benicasa [20] reported MICs in the range of 4–128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against a variety of bacteria. Lotfabad [29] found that RLs exhibited activity only against some Gram-positive strains. On the other hand, different activity against bacterial and fungal species was described for two RL mixtures produced by two distinct *Pseudomonas* strains [45,46]. In contrast, Aleksic et al. found no direct activity of natural RLs at concentrations of up to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against Gram-positive and Gram-negative strains [47] whereas synthetic RL amide derivatives were active against the Gram-positive bacteria tested.

The different levels of antimicrobial activity can be attributed to the variable homologue composition of RL mixtures and may also be seriously affected by pH. Ferreira et al. evaluated the effects of a RL on food pathogens under different pH conditions and observed activity only against Gram-positive bacteria, which decreased considerably at

pH ≥ 7 [48].

It is assumed that the breakage of the bacterial cell envelope requires an electrostatic interaction between the negative cell envelope and the RLs, but as RLs are often negatively charged, the chances of successful interaction are low. Therefore, it was expected that the introduction of the basic amino acids lysine or arginine could influence the permeability of the bacterial membrane, resulting in an antimicrobial effect. The obtained results show that arginine RL conjugates exhibited good antimicrobial activity against Gram-positive bacteria, with MICs ranging from 4 to 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. It is noteworthy that these compounds were also active against the Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), the most common single multi-drug-resistant bacterium in Europe. These surfactants, with a positive charge in the guanidine group, showed an enhanced tendency to disturb bacterial membranes, as described for numerous cationic surfactants [13,49–51]. The arginine derivatives did not show activity against any of the Gram-negative bacteria studied. Gram-negative bacteria have a single outer membrane charged with lipopolysaccharides that functions as an efficient permeability barrier [52]. Anti-bacterial activity was similar for the two arginine RL conjugates, indicating that it was not affected by the number of rhamnose moieties in the molecule. This result shows it is not necessary to purify the RL mixture, given the similar effectiveness of the two arginine derivatives.

In contrast, the lysine derivatives did not show any activity, in accordance with the generally lower antimicrobial effects reported for lysine versus arginine derivatives [13,53], which is attributed to the differences in the cationic charge. Arginine derivatives have a positive charge in the strongly basic guanidine group (pKa = 12.5) whereas lysine derivatives have the positive charge in the ϵ -protonated amino group (pKa = 10.5). The introduction of hydrophobic groups in the amino acid drastically reduces the apparent pKa; it has been described for lysine-derived surfactants that the pKa of the protonated amine group can be reduced by 2/3 units [30]. Assuming a reduction of 3

Table 2

Minimal inhibitory concentration (MIC) of RLmix and monoRLs, and their amino acid derivatives against selected Gram-positive and Gram-negative bacterial strains.

Bacteria	MIC ($\mu\text{g} / \text{mL}$)					
	RLmix	MonoRL	RLmix-Lys	MonoRL-Lys	RLmix-Arg	MonoRL-Arg
<i>B. subtilis</i>	> 250	> 250	> 250	> 250	16	16
<i>S. epidermidis</i>	> 250	> 250	> 250	> 250	4	4
<i>S. aureus</i>	> 250	> 250	> 250	> 250	8	8
<i>S. aureus</i> (MRSA) *	> 250	> 250	> 250	> 250	32	16
<i>L. monocytogenes</i>	> 250	> 250	> 250	> 250	16	16
<i>P. aeruginosa</i>	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
<i>K. pneumoniae</i>	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
<i>E. coli</i>	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250

Table 3

Biodegradation percentages of reference substance (SDS), anionic (RLmixture and monoRL) and cationic (RLmix_arg, monoRL_arg and RLmix_lys) rhamnolipids determined by the CO₂ headspace test (95%CI of 28 –day results calculated from 4 replicates).

Compounds of study	Biodegradation (%)			
	7 days	14 days	21 days	28 days
SDS*	66	85	90	90 ± 1.5
RLmix	77	93	99	99 ± 1.7
MonoRL	70	91	99	98 ± 1.6
RLmix_arg	59	78	90	85 ± 3.6
MonoRL_arg	43	71	82	79 ± 3.9
RLmix_lys	26	62	64	62 ± 2.7
MonoRL_Lys	20	56	61	61 ± 0.2

*SDS (Sodium n-dodecyl sulfate) – Reference product.

units, the pKa of the arginine RLs would be 9.5 while the pKa of the lysine RLs would be 7.5. Thus, at the pH of the antimicrobial assays (pH = 7.4) the lysine derivatives were only partially protonated in comparison with the 100% protonation of the arginine derivatives. Therefore, the arginine based surfactants showed an enhanced tendency to disturb bacterial membranes, as described for numerous antimicrobial surfactants that feature strongly basic groups of the guanidine type attached to a fairly large lipophilic molecule [49,51]. These results also agree with the greater interaction of the arginine RLs with the DNA.

This is the first report of chemically derivatized amino acid-based RLs with antimicrobial activities. Aromatic derivatives of RL [47], with antimicrobial and antibiofilm activity have also been described. Sphorolipids, another class of biosurfactants, have also been modified with amino acids. The best antimicrobial activity was obtained with the leucine conjugate, which had MIC values of about 1–2 µg/mL against *Moraxella sp.* and *S. sanguinis* [54]. Quaternary ammonium sphorolipids with antimicrobial activity have also been prepared recently [55].

3.8. Biodegradation

Biodegradation is an essential parameter to investigate, given that it is the best mechanism for the irreversible elimination of chemical products from aquatic and terrestrial environments. Indeed, “*Design for Degradation*” has been selected as the 10th Principle of Green Chemistry. European regulation requires that all surfactants used for domestic detergents are ultimately biodegradable. Only surfactants for special purposes can be simply primarily biodegradable, after having obtained a derogation based on risk assessment and benefit estimations. Biodegradability was evaluated by applying the ISO 14593–CO₂ headspace test [15]. The stringent conditions of the test impose a low density of non pre-adapted bacteria, short duration, and absence of other sources of organic carbon. Compounds that exceed 60% biodegradation under these conditions within 28 days can be classified as readily biodegradable surfactants.

After 28 days, biodegradation percentages of RLs and amino acid-based RLs were higher than the 60% (Table 3). RL precursors were very easily degraded by aerobic microorganisms; 70% of biodegradation had occurred in only 7 days (Table 3). These good results match others reported in the literature. Mohan et al. [56] found that RLs were biodegradable under aerobic conditions and also showed certain biodegradability under anaerobic conditions. Moreover, RLs may increase the biodegradation of many contaminants by influencing their bioavailability [57]. The excellent RL biodegradation is consistent with what is expected from their chemical structure. The ester bond linking the two alkyl chains of RLs, as well as the chemical bond between the rhamnose moieties and the alkyl chains, can be easily broken, giving rise to the formation of three structural motifs, one rhamnose moiety

and two carboxylic acids, which can be readily degraded by the microorganisms.

Amino acid RL conjugates also showed high biodegradation levels. The amino acid functionalization slightly decreased the percentage of biodegradation, probably due to the presence of an extra amide bond for microorganisms to break down. Nevertheless, the biodegradation levels achieved were > 60% for all three derivatives and > 80% for the arginine derivative. In these RLs the amino acid was introduced through an easily broken peptide-like amide bond. The structural features of these amino acid derivatives were planned taking into account the guidelines for designing biodegradable surfactants: the use of natural building blocks, unbranched alkyl chains and the presence of hydrolysable groups (amide and ester groups). Moreover, given the assumed surfactant biodegradation mechanism, a safe biodegradable process is expected, as neither the initial products nor the intermediate metabolites (carboxylic acids, rhamnose, lysine or arginine) are toxic compounds. Similarly good levels of biodegradation have been obtained for arginine-based glycerolipic [58] and *N*-acyl-lysine cationic surfactants [30]; both surfactant families also have ester or amide bonds linking the hydrophobic part with the polar heads. It has also been reported that the biodegradation of imidazolium-based ionic liquids increased significantly when an amino acid was introduced in their cationic moiety [59].

4. Conclusions

Novel cationic biosurfactant conjugates were prepared from renewable starting materials (waste frying oil and amino acids) using a straightforward synthetic approach. The spectral characterization of the cationic derivatives confirmed that arginine and lysine amino acids were successfully introduced into the terminal carboxyl of the rhamnolipids. The amino acid RL conjugates as well as the precursors (RLmix and monoRL) showed very small CMC values, indicating that these surfactants form aggregates at very low concentrations. Moreover, they were highly efficient in reducing the surface tension of water. The arginine-based RLs exhibited good DNA binding ability, providing a basis for developing novel DNA-based materials. The arginine derivatives also exhibited considerably improved antibacterial activity compared to the precursors. The lysine derivatives did not exhibit antimicrobial activity, probably due to the different nature of their cationic charge. Interestingly, all RLs studied in this work showed high biodegradability levels and can be classified as readily biodegradable compounds.

The work confirms that a straightforward methodology can be used to transform waste materials into “high-added value products”.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the MINECO of Spain (CTQ2017-88948-P). Authors also thank AGAUR 2017 SGR 670.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.05.037>.

References

- [1] P. Tundo, P. Anastas, D.S. Black, J. Breen, T. Collins, S. Memoli, J. Miyamoto, W. Tumas, Synthetic pathways and processes in green chemistry Introductory overview, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1207–1228, <https://doi.org/10.1351/pac200072071207>.
- [2] B.C. Neves, Leticia Dobler, Leonardo F. Viela, R.V. Almeida, Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting, *N. Biotechnol.* 33 (2016) 123–135, <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.09.005>.
- [3] G. Zhang, Q. Wu, Yue-ting, Xin-ping Qian, Meng, Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of rhamnolipids, *J. Zhejiang Univ. Sci.* (2005) 725–730, <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0725>.

- [4] M.H. Mondal, A. Sarkar, T.K. Maiti, B. Saha, Microbial assisted (*Pseudomonas* sp.) production of novel bio-surfactant rhamnolipids and its characterisation by different spectral studies, *J. Mol. Liq.* 242 (2017) 873–878, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.089>.
- [5] Y. Li, H. Bi, Y. Jin, Facile preparation of rhamnolipid-layered double hydroxide nanocomposite for simultaneous adsorption of p-cresol and copper ions from water, *Chem. Eng. J.* 308 (2016) 78–88, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.09.030>.
- [6] D. Lazarkevih, A. Sotirova, T. Avramova, D. Galabova, Comparative study on antibacterial activity of synthetic analogues of biologically active compounds and their combination with rhamnolipid biosurfactants, *J. Biosci. Biotechnol. Discov.* (2015) 55–62.
- [7] R.P. Pacheco, R.J. Eismín, S. Coss, H. Wang, R.M. Maier, R. Polt, J.E. Pemberton, Synthesis and characterization of four diastereomers of monorhamnolipids, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 5125–5132, <https://doi.org/10.1021/jacs.7b00427>.
- [8] A.I. Rodrigues, E.J. Gudiña, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues, Sodium chloride effect on the aggregation behaviour of rhamnolipids and their antifungal activity, *Sci. Rep.* (2017) 1–9, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13424-x>.
- [9] A.H. Tantawy, M. Abo-Riya, S.M. Abdallah, W. El-Dougoud, Novel cationic surfactants based on waste frying oil for cleaning water surface from petroleum films: synthesis, antimicrobial and surface properties, *J. Mol. Liq.* 253 (2018) 36–44, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.009>.
- [10] J.A. Heyes, D. Niculescu-Duvaz, R.G. Cooper, C.J. Springer, Synthesis of novel cationic lipids: effect of structural modification on the efficiency of gene transfer, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 99–114, <https://doi.org/10.1021/jm010918g>.
- [11] B.C. Stephenson, C.O. Rangel-Yagui, A. Pessoa, L.C. Tavares, K. Beers, D. Blankschtein, Experimental and theoretical investigation of the micellar-assisted solubilization of ibuprofen in aqueous media, *Langmuir* 22 (2006) 1514–1525, <https://doi.org/10.1021/la052530k>.
- [12] W. Wang, W. Lu, L. Jiang, Influence of pH on the aggregation morphology of a novel surfactant with single hydrocarbon chain and multi-amine headgroups, *J. Phys. Chem. B.* 112 (2008) 1409–1413, <https://doi.org/10.1021/jp075535u>.
- [13] A. Pinazo, M.A. Manresa, A.M. Marques, M. Bustelo, M.J. Espuny, L. Pérez, Amino acid-based surfactants: new antimicrobial agents, *Adv. Colloid Interface Sci.* 228 (2016) 17–39, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.11.007>.
- [14] J. Jorgensen James, Turnidge, Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods, in: R. Murray Patrick, James Jorgensen, Michael Pfaller, Ellen Baron, Yolken (Eds.), *Man. Clin. Microbiol.* 8th ed., 2004, pp. 1108–1127 Washington, D. C.
- [15] OECD, OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Ready Biodegradability - CO₂ in Sealed Vessels (Headspace Test) No 310, (2014).
- [16] E.J. Gudiña, A.I. Rodrigues, E. Alves, M.R. Domingues, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues, Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation, *Bioresour. Technol.* 177 (2015) 87–93, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.069>.
- [17] M. Nitschke, U.E. Paulista, M. Nitschke, S.G.V.A.O. Costa, R. Haddad, L.A.G. Gonc, M.N. Eberlin, J. Contiero, Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI 3 (2005), pp. 1562–1566, <https://doi.org/10.1021/bp050198x>.
- [18] G. Lan, Q. Fan, Y. Liu, C. Chen, G. Li, Y. Liu, X. Yin, Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4, *Biochem. Eng. J.* 101 (2015) 44–54, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.05.001>.
- [19] V.U. Irorerer, L. Tripathi, R. Marchant, S. McClean, I.M. Banat, Microbial rhamnolipid production: a critical re-evaluation of published data and suggested future publication criteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 3941–3951, <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8262-0>.
- [20] M. Benincasa, A. Abalos, I. Oliveira, A. Manresa, Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock, *Antonie Van Leeuwenhoek* 85 (2004) 1–8, <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020148.45523.41>.
- [21] A. Colomer, A. Pinazo, M.A. Manresa, M.P. Vinardell, M. Mitjans, M.R. Infante, L. Pérez, Cationic surfactants derived from lysine: effects of their structure and charge type on antimicrobial and hemolytic activities, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 989–1002, <https://doi.org/10.1021/jm101315k>.
- [22] O. Pornsunthorntawe, P. Wongpanit, S. Chavadej, M. Abe, R. Rujiravanit, Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 1589–1595, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.020>.
- [23] E.J. Gudiña, A.I. Rodrigues, V. de Freitas, J. Azevedo, J.A. Teixeira, L.R. Rodrigues, Valorization of agro-industrial waste towards the production of rhamnolipids, *Bioresour. Technol.* 212 (2016) 144–150, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.027>.
- [24] J.C. Mata-Sandoval, J. Karns, a. Torrents, High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil, *J. Chromatogr. A* 864 (1999) 211–220, [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00979-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00979-6).
- [25] A. Abalos, A. Pinazo, M.R. Infante, M. Casals, F. García, A. Manresa, Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes, *Langmuir* 17 (2001) 1367–1371, <https://doi.org/10.1021/la0011735>.
- [26] H. Abbasi, K. Akbari, M. Manoochehr, H. Shahbani, Physicochemical characterization of a monorhamnolipid secreted by *Pseudomonas aeruginosa* MA01 in aqueous media. An experimental and molecular dynamics study, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 101 (2013) 256–265, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.06.035>.
- [27] M.L. Chen, J. Penfold, R.K. Thomas, T.J.P. Smyth, A. Perfumo, R. Marchant, I.M. Banat, P. Stevenson, A. Parry, I. Tucker, I. Grillo, Solution self-assembly and adsorption at the air-water interface of the monorhamnolipid and dirhamnolipid rhamnolipids and their mixtures, *Langmuir* 26 (2010) 18281–18292, <https://doi.org/10.1021/la1031812>.
- [28] H. Zhong, G.M. Zeng, J.X. Liu, X.M. Xu, X.Z. Yuan, H.Y. Fu, G.H. Huang, Z.F. Liu, Y. Ding, Adsorption of monorhamnolipid and dirhamnolipid on two *Pseudomonas aeruginosa* strains and the effect on cell surface hydrophobicity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79 (2008) 671–677, <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1461-y>.
- [29] T.B. Lotfabad, H. Abassi, R. Ahmadvani, R. Roostaazad, F. Masoomi, H.S. Zahiri, G. Ahmadian, H. Vali, K.A. Noghabi, Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 81 (2010) 397–405, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.026>.
- [30] A. Colomer, A. Pinazo, M.T. García, M. Mitjans, M.P. Vinardell, M.R. Infante, V. Martínez, L. Pérez, PH-sensitive surfactants from lysine: assessment of their cytotoxicity and environmental behavior, *Langmuir* 28 (2012) 5900–5912, <https://doi.org/10.1021/la203974f>.
- [31] M.C. Morán, A. Pinazo, L. Pérez, P. Clapés, M. Angelet, “Green” amino acid-based surfactants, *Green Chem.* 5 (2004) 233–240, <https://doi.org/10.1039/B400293H>.
- [32] A. Bhadani, S. Singh, Novel gemini pyridinium surfactants: synthesis and study of their surface activity, DNA binding, and cytotoxicity, *Langmuir* 25 (2009) 11703–11712, <https://doi.org/10.1021/la901641f>.
- [33] K. Tsubone, Y. Arakawa, M.J. Rosen, Structural effects on surface and micellar properties of alkanediyl- α,ω -bis(sodium N-acyl- β -alaninate) gemini surfactants, *J. Colloid Interface Sci.* 262 (2003) 516–524, [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00078-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00078-X).
- [34] D. Mariko, A. Zdzienicka, B. Janczuk, Thermodynamic properties of rhamnolipid micellization and adsorption, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 119 (2014) 22–29, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.04.020>.
- [35] E. Habu, S. Bouhdid, N. Torrego-Solana, A.M. Marqués, M.J. Espuny, M.J. García-Celma, A. Manresa, Rhamnolipids as emulsifying agents for essential oil formulations: antimicrobial effect against *Candida albicans* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Pharm.* 476 (2014) 134–141, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.039>.
- [36] O. Pornsunthorntawe, S. Chavadej, R. Rujiravanit, Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 72 (2009) 6–15, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.03.006>.
- [37] B. İkizler, G. Arslan, E. Kıpçak, C. Dirik, D. Çelenk, T. Aktuğlu, Ş. Helvacı, S. Peker, Surface adsorption and spontaneous aggregation of rhamnolipid mixtures in aqueous solutions, *Colloids Surf. Physicochem. Int. J. Pavement Eng. Asph. Technol.* 519 (2017) 125–136, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.06.056>.
- [38] H. Zhong, L. Yang, X. Yang, G. Zeng, Z. Liu, Y. Liu, X. Yuan, Aggregation of low-concentration dirhamnolipid biosurfactant in electrolyte solution, *RSC Adv.* 5 (2015) 88578–88582, <https://doi.org/10.1039/c5ra16817a>.
- [39] Y. Guo, Y. Hu, R.R. Gu, H. Lin, Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146, *J. Colloid Interface Sci.* 331 (2009) 356–363, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.11.039>.
- [40] I. Grillo, J. Penfold, I. Tucker, F. Cousin, Spontaneous formation of nanovesicles in mixtures of nonionic and dialkyl chain cationic surfactants studied by surface tension, *Langmuir* 25 (2009) 3932–3943, <https://doi.org/10.1021/la802435h>.
- [41] T. Kim, J. Baek, C.Z. Bai, J. Park, Arginine-conjugated polypropyleneimine dendrimer as a non-toxic and efficient gene delivery carrier, *Biomaterials* 28 (2007) 2061–2067, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.12.013>.
- [42] A. Dasgupta, P.K. Das, R.S. Dias, M.G. Miguel, B. Lindman, Effect of headgroup on DNA - Cationic surfactant interactions, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 8502–8508, <https://doi.org/10.1021/jp068571m>.
- [43] V.A. Izumrudov, M.V. Zhiryakova, A.A. Goulko, Ethidium bromide as a promising probe for studying DNA interaction with cationic amphiphiles and stability of the resulting complexes, *Langmuir* 18 (2002) 10348–10356, <https://doi.org/10.1021/la020592u>.
- [44] V.M. Jadhav, R. Valaske, S. Maiti, Interaction between 14mer DNA oligonucleotide and cationic surfactants of various chain lengths, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 8824–8831, <https://doi.org/10.1021/jp8017452>.
- [45] E. Habu, A. Abalos, O. Jauregui, M.J. Espuny, A. Manresa, Use of liquid chromatography-mass spectroscopy for studying the composition and properties of rhamnolipids produced by different strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Surf. Detergent* 6 (2003) 155–161.
- [46] V. Kristoffersen, T. Rämä, J. Isaksson, J. Hammer, A. William, H. Gerwick, E. Hansen, Characterization of rhamnolipids produced by an arctic marine bacterium from the *Pseudomonas* fluorescence group, *Mar. Drugs* 16 (2018) 163, <https://doi.org/10.3390/md16050163>.
- [47] I. Aleksic, M. Petkovic, M. Jovanovic, D. Milivojevic, B. Vasiljevic, J. Nikodinovic-Runic, L. Senerovic, Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1–16, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02454>.
- [48] J. de Freitas Ferreira, E.A. Vieira, M. Nitschke, The antibacterial activity of rhamnolipid surfactant is pH dependent, *Food Res. Int.* 116 (2019) 737–744, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.005>.
- [49] J. Haldar, P. Kondaiah, S. Bhattacharya, Synthesis and antibacterial properties of novel hydrolyzable cationic amphiphiles. Incorporation of multiple head groups leads to impressive antibacterial activity, *J. Med. Chem.* (2005) 3823–3831, <https://doi.org/10.1021/jm049106l>.

- [50] Y. Song, Q. Li, Y. Li, Biological behaviors of guanidine-based cationic surfactants, *J. Surfact. Deterg.* 17 (2014) 459–464, <https://doi.org/10.1007/s11743-013-1560-3>.
- [51] S. Bera, G.G. Zhanel, F. Schweizer, Antibacterial activity of guanidinylated neomycin B- and kanamycin A-derived amphiphilic lipid conjugates, *J. Antimicrob. Chemother.* 65 (2010) 1224–1227, <https://doi.org/10.1093/jac/dkq083>.
- [52] E. Ortega Morente, M.A. Fernández-Fuentes, M.J. Grande Burgos, H. Abriouel, R. Pérez Pulido, A. Gálvez, Biocide tolerance in bacteria, *Int. J. Food Microbiol.* 162 (2013) 13–25, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028>.
- [53] H.L. Chen, P.Y. Su, C. Shih, Improvement of in vivo antimicrobial activity of HBcARD peptides by D-arginine replacement, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (2016) 9125–9132, <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7621-6>.
- [54] A. Azim, V. Shah, G.F. Doncel, N. Peterson, W. Gao, R. Gross, Amino acid conjugated sophorolipids: a new family of biologically active functionalized glycolipids, *Bioconjug. Chem.* 17 (2006) 1523–1529, <https://doi.org/10.1021/bc060094n>.
- [55] E.I.P. Delbeke, B.I. Roman, G.B. Marin, K.M. Van Geem, C.V. Stevens, A new class of antimicrobial biosurfactants: quaternary ammonium sophorolipids, *Green Chem.* 17 (2015) 3373–3377, <https://doi.org/10.1039/C5GC00120J>.
- [56] P.K. Mohan, G.N. Á, E.K. Yanful, Biokinetics of biodegradation of surfactants under aerobic, anoxic and anaerobic conditions, *Water Res.* 40 (2006) 533–540, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.11.030>.
- [57] Z. Zeng, Y. Liu, H. Zhong, R. Xiao, G. Zeng, Z. Liu, M. Cheng, C. Lai, C. Zhang, G. Liu, L. Qin, Mechanisms for rhamnolipids-mediated biodegradation of hydrophobic organic compounds, *Sci. Total Environ.* 634 (2018) 1–11, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.349>.
- [58] N. Perez, L. Perez, M.R. Infante, M.T. Garcia, Biological properties of arginine-based glycerolipidic cationic surfactants, *Green Chem.* (2005) 540–546, <https://doi.org/10.1039/B419204D>.
- [59] D. Coleman, Š. Marcel, M. Teresa, N. Gathergood, Antimicrobial toxicity studies of ionic liquids leading to a 'hit' MRSA selective antibacterial imidazolium salt, *Green Chem.* 14 (2012) 1350–1356, <https://doi.org/10.1039/C2GC16090K>.