

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

*Desarrollo, purificación y caracterización de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* con potenciales aplicaciones agronómicas*

Lic. Ma. Esperanza Mainez

Director: Dr. Marcelo C. Murguía

Laboratorio de Medio Ambiente- Instituto de Desarrollo Tecnológico para la
Industria Química (INTEC-CONICET)

Laboratorio de Química Aplicada (FBCB-UNL)

-2018-

Agradecimientos

Al Dr. Marcelo C. Murguía, por haberme guiado y acompañado en esta etapa de formación, por darme un lugar en su grupo de trabajo, poner a mi disposición los recursos necesarios para hacer este trabajo de tesis y darme la posibilidad de investigar con libertad y compartir conmigo sus conocimientos.

A la Dra. Diana Müller quien me ayudó mucho con sus aportes y colaboro para llevar a cabo este trabajo.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL) por haberme aceptado como tesista para llevar a cabo mis estudios de posgrado y realizar el seguimiento académico de mi doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haberme otorgado la Beca de Posgrado que me permitió desarrollar este trabajo de tesis.

Al CONICET y a Rizobacter SA por haber financiado este trabajo.

A todas las personas que forman parte de Rizobacter SA y más aun a Silvio, Alberto y Eugenia que siempre me recibieron muy bien, confiaron en mí y colaboraron en mi formación.

A los investigadores Dr. Niels Guedens (Unidad de Análisis de Estructura y RMN, Departamento de orgánica y química macromolecular, Universidad de Gante Bélgica, Dr. Daniel Vega (Comisión nacional de Energía Atómica, Argentina) y al Dr. Fernando Herrera, con quienes trabajamos en colaboración y sus aportes fueron fundamentales para este trabajo de investigación.

Quiero agradecer también al Lic. Matias Baldo por su acompañamiento en este trabajo de tesis, por brindarme sus conocimientos y amistad.

A todas las personas que forman parte del Laboratorio de Medio Ambiente/ Laquimap (INTEC UNL CONICET), quienes han contribuido de alguna manera para el desarrollo de este trabajo. Pero un agradecimiento más especial a Silvana y Javier con quienes hemos compartido muchos momentos lindos de amistad, siempre han estado incondicionalmente y han sido mi sostén en todos estos años de trabajo juntos. Siempre me han brindado su ayuda para resolver problemas relacionados con lo experimental en el laboratorio compartiendo su conocimiento, pero también en lo personal. A Emilia con quien hemos logrado construir una amistad muy valiosa, a pesar de que hace muy poquito tiempo se incorporó al grupo. Agradecerte por escucharme siempre apoyarme y en esta última etapa del doctorado que ha sido muy difícil y con muchos cambios. Gracias Silvana, Emilia, Javier y Santiago soy muy afortunada que nos hayamos cruzado y que sean parte de mi vida.

Quiero agradecer a la Dra. Roxana Paez y a todas las personas que forman parte del Laboratorio de Calidad de Leche y Agroindustria (EEA Rafaela) por compartir sus conocimientos, incluirme en su grupo y permitirme realizar una pasantía de formación

A mis amigas de Concordia por entenderme y alentarme en mis decisiones a pesar de que no entiendan mucho lo que hago, gracias por ser parte de mi vida ya hace 17 años.

A mis amigas de Santa fe por acompañarme en esta etapa y más especialmente a Luisina y Celeste con quienes compartimos en este último tiempo muchos momentos lindos.

A jesi, quiero agradecerte por tu compañía por tus consejos, muchas gracias porque a pesar que nos conocemos hace muy poco tiempo logramos formar una muy linda amistad.

Quiero agradecer a mi familia que siempre me ha acompañado en cada una de mis decisiones apoyándome y ayudando a nunca bajar los brazos y cumplir con todos mis objetivos laborales y de vida.

A Nicolás, mi compañero de vida, que me ha acompañado en toda la etapa de mi doctorado, que me ha sostenido en los momentos más difíciles de este camino. Quiero agradecerte por interesarte siempre en lo que hago y hacerme sentir una persona especial. Todo este camino lo hicimos juntos con mucho esfuerzo, pero hoy podemos decir que valió la pena

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	1
RESUMEN.....	4
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN.....	8
1. Surfactantes	8
1.1. Definición y clasificación.....	8
2. Biosurfactante.....	10
2.1. Definición y clasificación.....	10
2.2. Importancia del estudio de biosurfactantes.....	14
3. Ramnolípidos.....	15
4. Lipopéptidos cíclicos	16
4.1. Naturaleza química	16
4.2. Género Pseudomonas productor de lipopéptidos cíclicos.....	17
4.2.1. Estructura y clasificación	17
4.2.2. Grupo Viscosina	21
4.3. Género Bacillus productor de lipopéptidos cíclicos.....	23
4.4. Función biológica.....	24
5. Aplicaciones de los biosurfactantes	25
OBJETIVOS GENERALES	29
CAPÍTULO I: Producción, detección y cuantificación de biosurfactantes	
INTRODUCCIÓN.....	30
OBJETIVOS	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
1. Producción del biosurfactante.....	33
1.2. Producción y control de calidad de los sobrenadantes de cultivo	33
1.2. Procesamiento	33
2. Determinación del valor de CMC	34

3. Extracción del biosurfactante	34
4. Análisis del retenido por MS	34
5. Cuantificación del biosurfactante	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
1. Purificación y procesamiento	35
2. Extracción y Análisis por MS (ESI).....	37
3. Cuantificación	38
4. Obtención de la CMC del producto concentrado.....	40
CONCLUSIONES	42
CAPÍTULO II: Aislamiento, purificación e identificación de los biosurfactantes producido por <i>Pseudomonas</i>	
INTRODUCCIÓN.....	43
OBJETIVOS	44
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
1. Purificación del los biosurfctantes	44
1.1. Purificación por cromatografía de adsorción.....	44
1.2. Purificación mediante extracción en fase sólida y cristalización.....	45
1.2.1. Extracción	45
1.2.2. Purificación por Cristalización	45
2. Identificación de la familia de los biosurfactantes.....	45
2.1. Análisis por Cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplado a un detector de MS (UPLC-MS)	45
2.2. Análisis por Espectrometría de Alta Resolución (HRMS)	46
2.3. Análisis por RMN	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
1. Purificación del e identificación	47
CONCLUSIONES	55
CAPÍTULO III: Caracterización estructural de los compuestos identificados	
INTRODUCCIÓN.....	56
OBJETIVOS	59

MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
1. Análisis de los cristales por Espectrometría de masas en tándem.....	59
1.1. Análisis por MALDI-TOF-TOF.....	59
1.2. Análisis por MS ² (ESI).....	59
2. Estudios de RMN.....	59
3. Análisis de los ácidos grasos.....	60
3.1. Hidrólisis y extracción de los ácidos grasos.....	60
4.2. Derivatización de los aminoácidos.....	61
4.3. Detección de L y D aminoácidos por HPLC-DAD.....	61
5. Cristalografía de Rayos X.....	62
1.1. Modelado Computacional.....	62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
1. Análisis de los cristales por Espectrometría de masas en tándem.....	63
2. Análisis de la estereoquímica de los aminoácidos por la técnica de Marfey.....	65
3. Estudios de los cristales por RMN.....	68
4. Análisis de los ácidos grasos por GC-MS.....	74
5. Cristalografía de rayos X y modelado computacional del cristal.....	77
CONCLUSIONES.....	81
CAPÍTULO IV: Estudio de las propiedades fisicoquímicas y de control biológico del lipopéptidos cíclicos producido por <i>Pseudomonas</i>	
INTRODUCCIÓN.....	82
OBJETIVOS.....	83
MATERIALES Y MÉTODOS.....	83
1. Solubilización de los lipopéptidos cíclicos.....	83
1.1. Disolución con DMSO y 2-propanol.....	84
1.2. Disolución con agregados proteicos.....	84
2. Determinación de la CMC de los compuestos puros.....	84
2.1. Solución con DMSO y 2-propanol.....	84
2.2. Solución con agregados proteicos.....	85

3. Índice de emulsificación (IE)	85
4. Esparcimiento	85
5. Estudio de la actividad antimicrobiana	86
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
1. Solubilidad y determinación de la CMC	87
2. Emulsificación y Humectabilidad.....	94
3. Actividad Antimicrobiana.....	95
CONCLUSIONES	96
CAPÍTULO V: Cuantificación de los lipopéptidos cíclicos por Cromatografía líquida de alta performance acoplado a un detector DAD	
INTRODUCCIÓN.....	96
OBJETIVOS	96
MATERIALES Y MÉTODOS.....	97
1. Barrido espectral	97
2. Análisis por HPLC-DAD	97
3. Curva de calibrado.....	97
3.1. Preparación del estándar	97
3.2. Preparación de muestras a cuantificar.....	98
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
1. Barrido espectral y perfil cromatográfico	98
2. Curva de calibrado y cuantificación del retenido	100
CONCLUSIONES.....	103
CONCLUSIONES.....	104
BIBLIOGRAFÍA.....	¡Error! Marcador no definido.
Anexos	118

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

3-AHD: ácido 3-hidroxidecanoico

3-AHO: ácido 3-hidroxioctanoico

3-AHP: ácido 3-hidroxipentanoico

ACN: Acetonitrilo

AG: ácido graso

Ala: Alanina

Asp: Asparagina

BAP: 1-bromoacetilpirano

B_{Sm}: Biosurfactante

CH₂O₂: Ácido fórmico

CHCA: matriz α-cianohidroxinámica

CMC: Concentración micelar crítica

Dab: ácido 2,4-diaminobutírico

DAD: Detector de arreglo de diodos

Dhb: 2,3-dihidro-2-aminobutírico

Dimetil sulfóxido-d₆: Dimetil sulfóxido deuterado

ESI: ionización por electrospray

GC: Cromatografía gaseosa

Gln: Glutamina

Glu: Ácido glutámico

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

H₃PO₄: Ácido fosfórico

HAA: hidroxidecanoil β-hidroxidecanoico

HCl: Ácido clorhídrico

HPA: Hidrocarburo poliaromático

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta resolución

HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución

Hse: Homoserina

IE: Índice de emulsificación

Ile: isoleucina

Leu: Leucina

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

LPC: lipopéptidos cíclicos

MALDI: desorción/ionización láser asistida por matriz

Metanol-d₄: Metanol deuterado

MS: Espectrometría de masas

Phe: fenilalanina

Pro: Prolina

PSNR: Péptido sintasa no ribosomal

PVDF (di-fluoruro de polivinilideno)

Rf: factor de frente

RL: Ramnolípidos

RMN: Resonancia magnética nuclear

Ser: Serina

TFA: Ácido trifluoroacético

Thr: Treonina

TLC: Cromatografía de capa delgada (TLC)

TMS: tetrametilsilano

TOF: Tiempo de vuelo

Tyr: Tirosina

UPLC: Cromatografía Líquida de Ultra-Alta resolución

Val: Valina

WLIP: *White line induce principle*

γ : Tensión superficial

Φ : ángulo de torsión Phi

Ψ : ángulo de torsión Psi

RESUMEN

Los tensioactivos son compuestos anfifílicos que tienen la propiedad de reducir la tensión superficial (γ) del agua (72 mN/m). Los surfactantes se utilizan en una gran variedad de productos de uso doméstico e industrial. Su producción mundial se estimó en más de cuatro millones de toneladas y en 9-10 billones de dólares por año. A pesar de todas las ventajas, su liberación al medio ambiente puede ser un peligro potencial, ya que son tóxico para el medio ambiente. La mayoría de los tensioactivos sintéticos que se producen son derivados del petróleo y presentan diferentes estructuras complejas no biodegradables. Dicha problemática ha motivado la búsqueda de surfactantes que sean más respetuosos con el medio ambiente, como los producidos por microorganismos, los cuales se denominaron biosurfactante microbiano (BSm). Los BSms son un grupo de moléculas estructuralmente diversas producidas por diferentes microorganismos y liberadas al medio extracelular, los cuales varían en sus propiedades químicas y tamaño molecular. Las características más interesantes de los BSms son la tolerancia a pH extremos, fuerza iónica y temperatura, baja toxicidad, biodegradabilidad y su biocompatibilidad y digestibilidad, esto último permite el uso de estas biomoléculas en diferentes industrias, especialmente la alimentación, farmacéutica y cosmética. El alto costo de producción de los BSms ha sido un obstáculo importante para su comercialización y se han realizado numerosos esfuerzos para reducirlo. En el 2011 el mercado de BSm fue de 2210 millones de dólares y se estima que crecerá hacia el 2018 a una tasa del 3,5 %. Debido a lo expuesto anteriormente el objetivo de este trabajo se centró en la producción, detección y caracterización de BSm producidos por una cepa de *Pseudomonas* de interés agro industrial, provista por la empresa. La producción se llevó a cabo en erlenmeyer a 28 °C durante 72 h utilizando un medio enriquecido. La producción se monitoreo mediante mediciones de la γ al sobrenadante de cultivo, las cuales estaban entre 33 y 34 mN/m (1/3000). Se obtuvo una muestra concentrada, filtrada y liofilizada cuyo valor de γ se encontraba en 31 mN/m (1/1000), que se utilizó para los fines es este trabajo. Se cuantificó BSm total mediante una técnica de precipitación ácida y extracción con disolventes obteniéndose valores de 20 mg/ml. Se aisló el BSm mayoritario mediante extracción en columnas de C18 y se purificó mediante cristalización. Se identificó por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en una dimensión y por Espectrometría de masas (MS) que la cepa de *Pseudomonas* utilizada produce BSms de la familia de los lipopéptidos cíclicos (LPCs). Se determinó por Espectrometría de masas en tándem que estos compuestos pertenecen al grupo Viscosina. Se caracterizaron los analitos

provenientes de la muestra purificada por RMN en dos dimensiones, se determinó la estereoquímica de los aminoácidos por la técnica de Marfey encontrándose que el compuesto podría tratarse de WLIP (*White line induce principle*), lo cual fue confirmado mediante Cristalografía de rayos X. También se analizó la longitud de los ácidos grasos de los LPC por Cromatografía gaseosa acoplado a un detector de masas (GC-MS) y se encontró que *Pseudomonas* produce otros compuestos que varían de WLIP en la longitud de la cadena (C8-C20). Se cuantificaron dichos compuestos por HPLC-DAD y se obtuvo entre 17 y 18 g de LPCs por litro de muestra concentrada. Se determinó el valor de concentración micelar crítica (CMC) y el valor de γ del compuesto puro obteniendo valores de 0,05 g/l y 27,7 mN/m respectivamente. Se estudió la propiedad emulsificante y humectante de los LPC frente a surfactantes químicos como el Eco Rizospray (principio activo: Poli(oxi-1,2-etanodiilo), α -undecil- ω -hidroxi-, ramificado y lineal), el Silwet L Ag (principio activo: Heptametiltrisiloxano modificado con éter metil aliloxipoliétilénglico) y el dodecil sulfato de sodio (SDS). Se encontró mediante el cálculo de esparcimiento que los LPCs podrían cubrir una superficie de 30,5 mm² y emulsionar aceite siliconado en un 52 %, se observó una emulsión con kerosene pero a las 25 h la bicapa desapareció. En conclusión, en el presente trabajo se logró producir un BSm a partir de una cepa no patógena. Se obtuvo valores de CMC que superan a muchos de los surfactantes químicos comerciales, sumado a valores de γ superadores. Los LPCs purificados resultaron tener una alta capacidad humectante a muy baja concentración, lo que posibilitaría su uso como co-adyuvantes en productos de interés agronómico con el objetivo de lograr una mayor eficiencia de los productos que son pulverizados, por ejemplo, herbicidas o fertilizantes. Cabe aclarar, que el uso de este tipo de BSm en el área agroindustrial requiere reducir los costos en la etapa de producción y purificación. Estos compuestos, así como también otros BSms, podrían ser de interés en el área farmacéutica, cosmética y alimenticia convirtiéndose en un producto de alto valor agregado que amerite solventar los altos costos de producción y del *downstream* promoviendo el uso de tecnologías medioambientalmente más limpias.

SUMMARY

The surfactants are amphiphilic compounds that have the property of reducing the surface tension (γ) of water (72 mN/m). Surfactants are used in a wide variety of products for domestic and industrial use. Its production was estimated at more than four million tons and at 9-10 billion dollars per year. Despite the advantages, their release into the environment can be a potential danger, because surfactants are toxic to the environment. Most of the commercial synthetic surfactants that are produced are petroleum derivatives and have different complex non-biodegradable structures. This problem has motivated the search of respectful surfactants with the environment, such as those produced by microorganisms. Microbial biosurfactants (BSms) are a group of structurally diverse molecules produced by different microorganisms and excreted into the extracellular medium. BSms vary in their chemical properties and molecular size. The most interesting properties are the tolerance to extreme pH, ionic strength and temperature, low toxicity, biodegradability and biocompatibility and digestibility. The latter allows the use of these biomolecules in different industries, especially food, pharmaceutical and cosmetics. The high production cost of BSm has been the major obstacle to their commercialization, but numerous efforts have been made to reduce it. In 2011, BSms market was 2210 million dollars and is estimated the BSms market will grow by 2018 at a rate of 3.5 %.

This work focused on the production, detection and characterization of BSms produced by non-pathogenic of agro-industrial interest. An enriched medium was used for production of BSm. The production was monitored by means of γ to the culture supernatant, these values were between 33 and 34 mN/m (1/3000). To finally of process a concentrated, filtered and lyophilized sample was obtained, whose value of γ was 31 mN/m (1/1000). This product was used for the purposes of this work. Total BSm was quantified by an acid precipitation technique and extraction with solvents and was obtained values of 20 mg/ml. The majority BSM was isolated by extraction in C18 columns and purified by crystallization. A family of cyclic lipopeptides (CLP) was identified in purified fraction by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in one dimension and by Mass spectrometry (MS). It was determined by MS² these compounds belong to the Viscosin group. The presence of WLIP (White line induce principle) in the purified sample was determined by NMR in two dimensions, analysis of the stereochemistry of the amino acids and was confirmed by X-ray crystallography. Variants of the WLIP fatty acid (C10) were found by gas

chromatography coupled to a mass detector (GC-MS). It was determined that *Pseudomonas* produces between 17 and 18 g of LPC per liter of concentrated sample by quantification in HPLC-DAD

Values of 0.05 g/l and 27.7 mN/m for critical micelle concentration value (CMC) and γ respectively of pure compound. The emulsifying and wetting property of the LPCs was studied against chemical surfactants EcoRizoSpray (active principle Poly (oxy-1,2-ethanediyl), α -undecyl- ω -hydroxy-, branched and linear), Silwet L Ag (active principle: Heptamethyltrisiloxane modified with methyl allyloxy polyethylene glycol ether) and SDS (sodium dodecyl sulfate). It was found by calculation of spreading the LPCs could cover an area of 30.5 mm² and emulsify siliconized oil by 52 %, the emulsion with kerosene was observed but at 25 h the bi-layer disappeared. In conclusion, in the present work was possible to produce a from a non-pathogenic strain. CMC values were obtained that surpass many of the commercial chemical surfactants, added to values of higher γ . The purified LPCs were found to have a high wetting capacity at very low concentration, which would make possible their use as co-adjuvants in products of agronomic interest. This will permit to achieve greater efficiency of the products that are sprayed, for example, herbicides or fertilizers. It should be noted that the use of this type of BSms in the agro-industrial area requires reducing costs in the production and purification stage. These compounds, as well as other BSms, could be of interest in the pharmaceutical, cosmetic and food areas, becoming a high value-added product that merits high production and downstream costs promoting the use of environmentally cleaner technology.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Surfactantes

1.1. Definición y clasificación

Los surfactantes también llamados tensioactivos son compuestos anfifílicos o anfipáticos (Figura 1) de bajo peso molecular que forman monocapas orientadas en las interfaces y muestran actividad superficial (es decir, tienen la propiedad de disminuir la γ o interfacial del medio en el que están disueltos). Los surfactantes también se definen como moléculas capaces de asociarse para formar micelas [1].

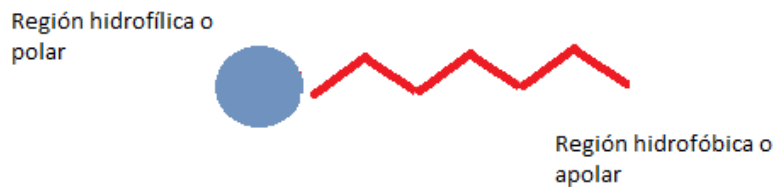


Figura 1. Esquema de un surfactante

La longitud de la cadena hidrocarbonada es importante para que el surfactante cumpla su función tensioactiva. Si su longitud es demasiado corta, las moléculas son demasiado solubles en agua y sus propiedades hidrofóbicas apenas se observan. Esto resulta en una pérdida de la adsorción a la interfaz y por lo tanto la formación de micelas en solución. Cuando la cadena de hidrocarburos es demasiado larga, las moléculas se vuelven insolubles en agua. Para un surfactante es adecuado que la cadena hidrocarbonada sea de 8-18 átomos de carbono. Existen casos en donde el surfactante contiene dos cadenas hidrocarbonadas. esta modificación afecta la formación de agregados en la solución, un agente tensioactivo con una sola cadena forma micelas esféricas mientras que cuando el número de la cadena de hidrocarburos varía de uno a dos, el grupo hidrofóbico se vuelve voluminoso y tienden a formar una vesícula o una estructura laminar en lugar de la micela esférica [2].

Los grupos hidrofílicos se dividen en cuatro tipos en función de sus cargas

Agente tensioactivo catiónico: el grupo hidrofílico del tensioactivo catiónico tiene una carga positiva. El grupo catiónico representativo es el alquilamonio cuyas propiedades están muy influenciadas por un ligero cambio en el grupo hidrofílico debido al grupo metilo. En la figura 2 se muestran ejemplos de grupos hidrofílicos catiónicos.

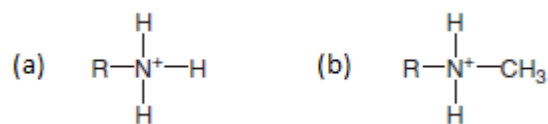


Figura 2. Ejemplos de grupos hidrofílicos catiónicos: (a) alquilamonio; (b) alquilmetilamonio; (R denota grupo hidrofóbico).

Tensioactivo aniónicos: son aquellos que tienen una carga negativa. Hay varios tipos en comparación con los catiónicos, los grupos sulfonatos y fosfatos están incluidos en los grupos hidrofílicos típicos de este tipo de surfactantes. En la figura 3 se muestra ejemplos de grupos hidrofílicos aniónicos.

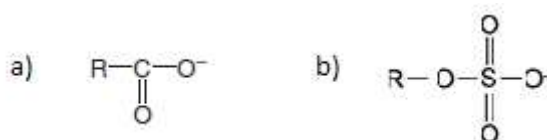


Figura 3. Ejemplo de grupo hidrofílico aniónico: (a) carboxilo; (b) sulfato; (R denota el grupo hidrofóbico).

Tensioactivo zwitteriónico: son aquellos surfactantes que pueden tener dependiendo del pH, cargas positivas y negativas en sus grupos hidrofílicos, al igual que ocurre con los electrolitos anfóteros. En la figura 4 se muestra el compuesto diacilfosfatidilcolina.

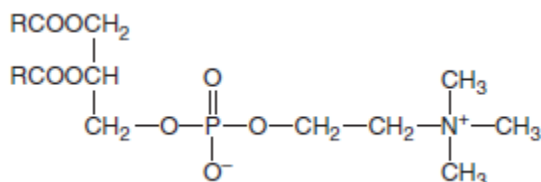


Figura 4. Ejemplo de grupo hidrofílico zwitteriónico: diacilfosfatidilcolina (R indica el grupo hidrofóbico)

Tensioactivo no iónico: dentro de este grupo se encuentran los tensioactivos cuyo grupo hidrofílico no tiene carga. El tensioactivo no iónico polioxietileno alquileter se presenta a menudo como CiEj, donde i y j indican los números de cadena de alquilo y el grupo oxietileno, respectivamente. Tensioactivos a base de polioxietileno alquileter están disponibles para diversos fines comerciales porque es posible ajustar su hidrofobicidad o hidrofiliidad simplemente cambiando el número de átomos de carbono en la cadena de alquilo o en el grupo oxietileno. Además, la solubilidad de los tensioactivos en agua o

aceite puede cambiar con la temperatura. En la figura 5 se muestra el ejemplo de un grupo hidrofílico no iónico.

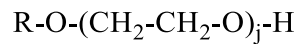


Figura 5. Ejemplo de grupo hidrofílico no iónico, grupo polioxietileno (R denota grupo hidrofóbico).

Son compuestos muy importantes ya que son utilizados en una gran variedad de productos de uso doméstico e industrial. La industria de los surfactantes está dominada por varios tipos de compuestos, a saber: sulfonatos de alquilbenceno, etoxilatos, sulfatos y éteres sulfatos de alcoholes grasos. Las aplicaciones de los surfactantes en el área industrial son bastante diversas y tienen una gran importancia práctica. Los surfactantes pueden aplicarse en la producción y procesamiento de alimentos, agroquímicos, productos farmacéuticos, productos de cuidado personal y lavandería [3].

A pesar de todas las ventajas de los surfactantes, su liberación al medio ambiente puede ser un peligro potencial. La mayoría de los tensioactivos sintéticos son derivados del petróleo y presentan diferentes estructuras complejas no biodegradables. Además, los surfactantes sintéticos pueden bioacumularse y sus procesos de producción y subproductos pueden ser peligrosos para el medio ambiente [4]. Debido a esto, en los últimos años, estos problemas han motivado la búsqueda de tensioactivos que sean más respetuosos con el medio ambiente, como los producidos por microorganismos. Estos compuestos se denominan BSm [5].

2. Biosurfactantes microbianos

2.1. Definición y clasificación

Los surfactantes naturales o BSm son compuestos biológicos anfifílicos, generalmente extracelulares, producidos por una variedad de microorganismos a partir de diversas fuentes de carbono, incluidos los materiales de desecho. Son un grupo de moléculas que varía en sus propiedades químicas y tamaño molecular. Estructuralmente, contienen una región hidrofílica, la cual posee una diversidad química más amplia ya que puede ser un carbohidrato, aminoácido, péptido cíclico, fosfato, ácido carboxílico o un alcohol. La región hidrofóbica de estas moléculas está más conservada y generalmente la forman uno o dos ácidos grasos que pueden ser insaturados, saturados, ácido graso hidroxilados. El número de átomos de carbono de las cadenas alquilo oscila entre 8 y 22 carbonos [6],[7].

Los BSm se dividen en cinco grupos según su estructura glicolípidos, lipopéptidos, BSm poliméricos, BSm particulados y fosfolípidos, ácidos grasos y lípidos naturales [8].

Glicolípidos:

Son los tensioactivos microbianos más estudiados, consisten en carbohidratos que se asocian con ácidos grasos hidroxilados o ácidos grasos de cadena larga conectados a un grupo éster o éter. Dentro de este grupo se encuentran los ramnolípidos (RLs) comúnmente producidos por *Pseudomonas aeruginosa*, los cuales serán descritas posteriormente; trehalolípidos por cepas del género *Actinomycetes* y *Mycobacterium* entre otras y soforolípidos producidos por diferentes especies de levaduras. Generalmente están compuestos por mono- o disacáridos. El azúcar que forma parte de su estructura generalmente puede ser glucosa, galactosa, xilosa o ramnosa. La región apolar está compuesta por moléculas de ácidos grasos saturados, insaturados o ácidos grasos hidroxilados [9].

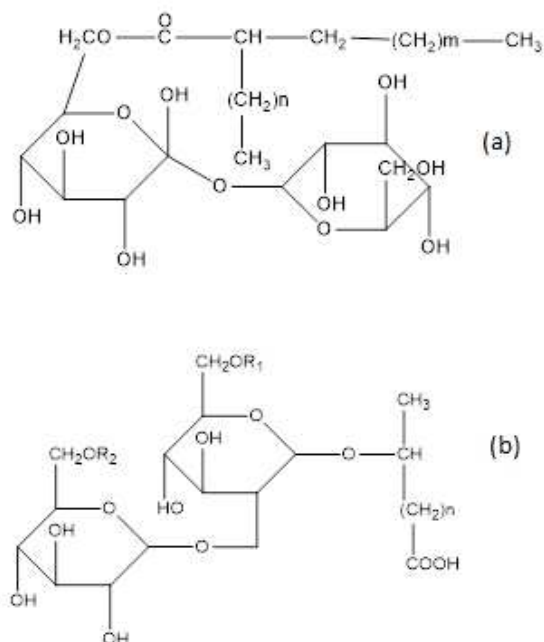


Figura 6. Biosurfactantes de la familia de los glicolípidos, (a) corresponde a un trehalolípido producidos por *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium* y (b) soforolípidos producido generalmente por *Candida bombicola* o *Candida apicola*

Fosfolípidos

Se encuentran naturalmente en las paredes celulares de animales, plantas y microorganismos. En la naturaleza, los fosfolípidos forman membranas semipermeables

que desempeñan un papel importante en la separación, protección y transporte de los componentes celulares, así como en la integridad y señalización celular. Los fosfolípidos consisten en un esqueleto de glicerol con dos ácidos grasos y un resto de ácido fosfórico. Las cadenas de ácidos grasos constituyen la cola lipófila no polar, el resto del ácido fosfórico y cualquier otro grupo forma la cabeza hidrófila polar. Los fosfolípidos más comunes son fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico [10]. Se ha reportado que bacterias y levaduras producen grandes cantidades de ácidos grasos y fosfolípidos durante el crecimiento en n-alcenos [11].

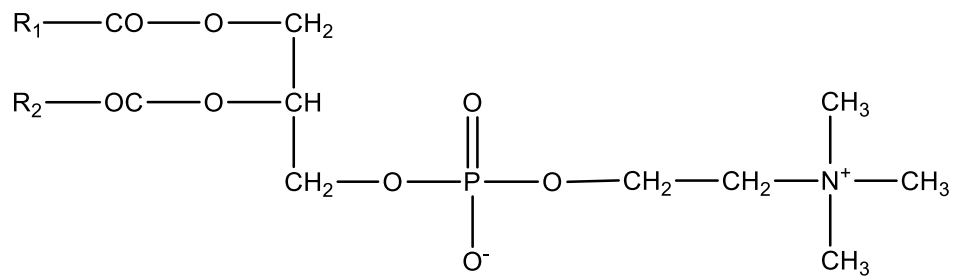


Figura 7. Fosfatidilcolina ejemplo de fosfolípido natural

Lipopéptidos

Consisten en un lípido unido a una cadena polipeptídica. Entre ellos se encuentra lipopéptidos de cadena lineal (Polimixina), lipopéptidos cíclicos (Surfactina) producidos por cepas del género *Pseudomonas* y *Bacillus* entre otras [12].

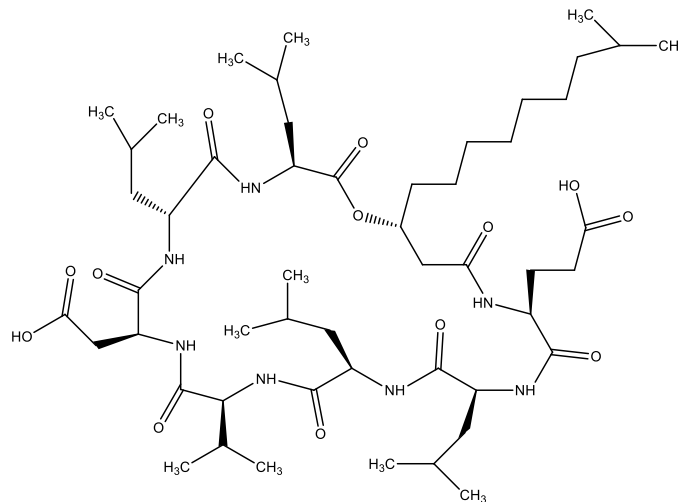


Figura 8. Surfactina producido por *Bacillus subtilis*

BSm poliméricos

Son BSms de alto peso molecular. La mayoría están formados por una cadena principal de tres o cuatro azúcares repetidos unidos a ácidos grasos. Dentro de este grupo se encuentra Emulsan, Alasan, Liposan y complejos polisacárido-proteína. Son producidos principalmente por *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas spp* entre otras.

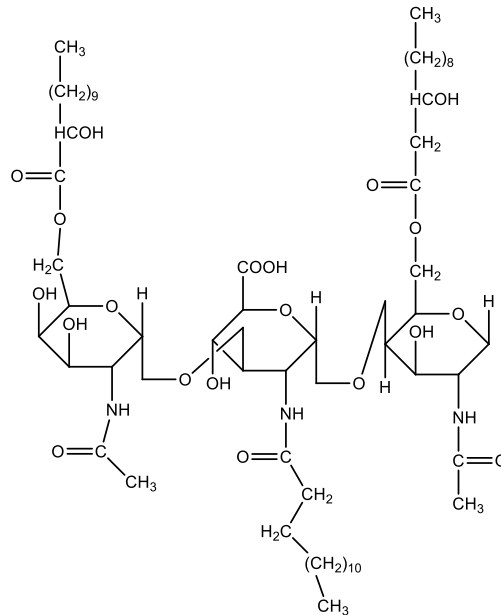


Figura 9. Emulsan producido por bacterias del género *Acinetobacter*.

BSms particulados

Dentro de esta clasificación se encuentran las vesículas extracelulares y células microbianas. Las vesículas de membrana extracelular dividen los hidrocarburos para formar microemulsiones, que permiten la captación de hidrocarburos por las células microbianas [9],[13],[6].

Se ha reportado otra clasificación para los BSms que los agrupa en moléculas de bajo y alto peso molecular. Las moléculas de bajo peso molecular reducen eficazmente la tensión superficial e interfacial, dentro de este grupo se encuentran lipopéptidos, glicolípidos y fosfolípidos. Las moléculas de alto peso (polímeros) son más eficaces como agentes estabilizadores de la emulsión (emulsificadores), pertenecen a este grupo las lipoproteínas, lipopolisacáridos y BSms particulados [14],[15].

2.2. Importancia del estudio de BSms

Los BSms tienen ventajas sobre los tensioactivos convencionales sintetizados por síntesis química, debido a las propiedades que presentan como la baja toxicidad, alta eficacia y biodegradabilidad. En general estas características son comunes a todos los surfactantes de origen microbiano.

Tolerancia a la temperatura, pH y fuerza iónica: muchos surfactantes biológicos pueden usarse a altas temperaturas y valores de pH de 2 a 12. También toleran una concentración de sal de hasta el 10 %, mientras que disoluciones al 2 % de NaCl es suficiente para inactivar a los tensioactivos sintéticos [16].

Baja toxicidad y biodegradabilidad: BSms exhiben generalmente una toxicidad menor que los surfactantes derivados químicamente. Por ejemplo, en las pruebas de solubilización con naftaleno, los glicolípidos producidos a partir de *Rhodococcus* fueron 50 % menos tóxicos que Tween 80 [17]. Debido al origen biológico y estructura química simple, los BSm no persisten en el ambiente y se degradan fácilmente por microorganismos [18].

Biocompatibilidad: esto permiten el uso de biomoléculas en diferentes industrias, especialmente la alimentación, farmacéutica y cosmética.

Actividad surfactante e interfacial: un buen BSm puede reducir la γ de 72 a valores más bajos de 35 mN/m y la tensión interfacial del agua de 40 a 1 mN/m. En general, los BSm son más eficientes y efectivos y su valor de CMC es aproximadamente 10 a 40 veces menor que el de los surfactantes sintetizados químicamente [19].

Disponibilidad de materias primas: los BSms se pueden producir a partir de materias primas relativamente baratas y disponibles en abundancia. Las fuentes de carbono como los hidrocarburos, los carbohidratos o los lípidos se pueden usar individualmente o mezclar entre sí. Además se pueden producir a partir de desechos industriales y subproductos, y esto es una ventaja para la producción a granel [20].

Con respecto a las desventajas de los BSm, uno de los problemas está relacionado con los costos en la producción a gran escala. Otro problema puede encontrarse en la obtención de sustancias puras que es de particular importancia en aplicaciones farmacéuticas, alimenticias y cosméticas. El procesamiento en el *downstream* está involucrado con múltiples pasos consecutivos, por lo que lo que es importante para facilitar su recuperación y purificación que los rendimientos sean elevados [21],[22].

3. Ramnolípidos

Los RLs se encuentran dentro de los BSms más estudiados. Consisten en un dominio hidrofóbico con generalmente dos moléculas de ácidos grasos que forman el ácido β -hidroxidecanoil β -hidroxidecanoico (HAA) y una parte hidrofílica de una o dos moléculas de ramnosa, formando así mono- y di-RL, respectivamente (figura 10). La región lipídica y glicídica están unidas mediante un enlace glicosídico entre una molécula de azúcar y el grupo hidroxilo del primer ácido graso. El segundo ácido graso está unido al primero por una unión éster. *Pseudomonas aeruginosa* es el organismo mejor estudiado para la producción de RL, los cuales se obtienen como una mezcla de homólogos que dependen de la fuente de carbono, la cepa y la edad del inóculo. Los RLs se diferencian por contener una o dos moléculas de ramnosa, así como también, por el número de cadenas alquilo que constituyen la porción lipofílica, su número de átomos de carbono (C8, C10, C12, C18, C22, C24) y el número de insaturaciones [23].

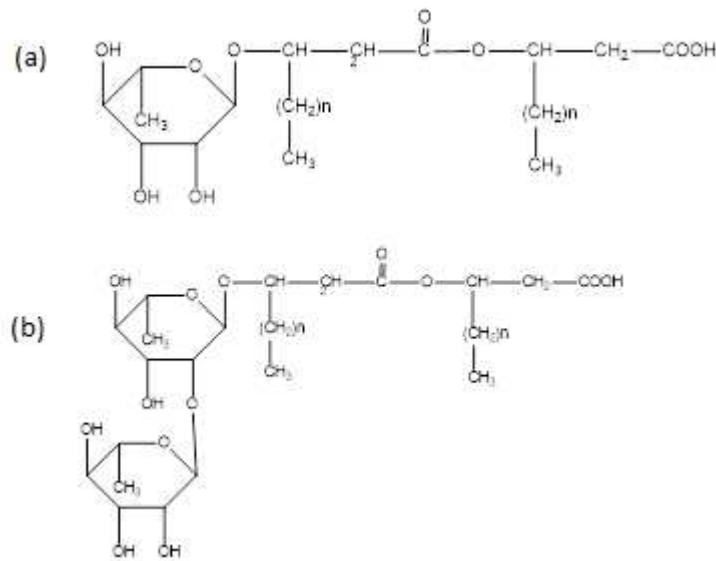


Figura 10. Estructura química de dos tipos de RLs a) corresponde a un monoramnolípido y b) diramnolípido.

4. Lipopéptidos cíclicos (LPC)

4.1. Naturaleza química

Los LPC son metabolitos secundarios producidas por una gran variedad de microorganismos, tales como *Aspergillus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Burkholderia* y *Pseudomonas*. Son moléculas pequeñas que están formados por una cadena de ácido graso (5-20 átomos de carbono) y una cadena de oligopéptidos (7-25 aminoácidos) que se cicla a través de un enlace lactona entre el extremo C-terminal de un aminoácido y un grupo de alcohol de la cadena lateral de otro aminoácido. La diversidad estructural se debe a las diferencias en la longitud y composición del ácido graso y a las variaciones en el número, el tipo y la configuración de los aminoácidos [24].

Los LPC son producidos en complejos multienzimáticos llamados sintasas peptídicas no ribosómicas (SPNR) que se organizan de manera modular [25]. El orden de los módulos es usualmente co-lineal con las secuencias peptídicas del producto. Cada módulo está compuesto por dominios específicos que son responsables de catalizar diferentes actividades enzimáticas. El dominio de adenilación (A) es responsable del reconocimiento y adenilación de aminoácidos a expensas de ATP para formar un intermedio acil-adenilato. A continuación, el aminoácido adenilado se une covalentemente a un portador de fosfopanteteína del dominio de tiolación (T). La formación de enlaces peptídicos de dos aminoácidos enlazados consecutivamente es catalizada por el dominio de condensación (C). Los dominios de modificación, tales como el dominio de epimerización (E), catalizan la conversión de L-aminoácidos en isómeros D, y están típicamente asociados con el módulo que incorpora D-aminoácidos. Por último, la ciclación y la liberación del péptido se llevan a cabo por el dominio de la tioesterasa C-terminal (Te) que está asociado con un módulo de terminación [26]

En contraste con la síntesis ribosomal de péptidos, los SPNR son capaces de sintetizar péptidos que contienen aminoácidos inusuales, incluidos D-aminoácidos, β aminoácido y aminoácidos hidroxilados o N metilados [25].

Se conoce relativamente poco sobre los factores externos (abióticos y bióticos) y las vías de transducción de señales que impulsan la transcripción de los genes biosintéticos de LPCs.

4.2. Género *Pseudomonas* productora de LPC

El género *Pseudomonas* pertenece al grupo de gammaproteobacteria con más de 100 especies que cumplen variadas funciones en una amplia gama de ambientes, incluyendo suelo, agua, superficies de plantas y animales [27]. El género incluye las especies patógenas mejor estudiadas de animales, insectos y plantas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas entomophila* y *Pseudomonas syringae*. Junto a estas especies patógenas, este género bacteriano contiene múltiples especies que pueden tener diversos efectos beneficiosos. *Pseudomonas putida* es una especie de gran interés por sus propiedades de biorremediación que permiten la degradación o desintoxicación de contaminantes ambientales peligrosos [28]. Varias cepas de *Pseudomonas fluorescens* afectan el crecimiento de las plantas e inducen resistencia sistémica contra microorganismos patógenos [29]. Los metabolitos secundarios producidos por *Pseudomonas* spp., desempeñan un papel importante en la supervivencia en los diferentes ambientes, ya que están relacionados con la adquisición de nutrientes, la virulencia y la defensa contra los competidores y depredadores que se encuentran en hábitats naturales. Dentro de este grupo de metabolitos secundarios se encuentran los LPC que se destacan por sus propiedades anfífilas, antimicrobianas y su papel en *swarming* y la formación de *biofilm* [30].

4.2.1. Estructura y clasificación

Los LPC son sintetizados por numerosas y diversas especies de *Pseudomonas*. Estos metabolitos se subdividen comúnmente en grupos según su similitud estructural. Incluyen los grupos Viscosina, Anfisina, Tolasin, Siringopepina, Siringomicina y Putisolvina. [31],[32],[26]. Se encuentran también los recientemente emergentes representados por Orfamida [33], Pseudofactina [34], Entolisina [35] y Xantolisina [35]. En la tabla 11 se muestran algunos ejemplos de LPCs que forman parte de los grupos antes mencionados. En el caso de Viscosina, este grupo será desarrollado en el punto siguiente de esta tesis.

Tabla 1. Ejemplos de LPC producidos por bacterias del género *Pseudomonas*

LPC	AG	
GRUPO SIRINGOMICINA		
Siringomicina SRA	C10(OH)	LSer-DSer-DDab-LDab-LArg-LPhe-ZDhb-LAsp (3-OH)-4CILThr
Siringomicina SRB	C12(OH)	LSer-DSer-DDab-LDab-LArg-LPhe-ZDhb-LAsp (3-OH)-4CILThr
Siringostatina A	C14(OH)	LSer-DDab-LDab-DHse-LOrn-LoThr-ZDhb-LAsp (3-OH)-4CILThr
GRUPO AMFISINA		
Amfisina	C10(OH)	DLeu-DAsp-DAsp-DalloThr-DLeu-DLeu-DSer-LLeu-DGln-LLeu-LIle-LAsp
Tensin	C10(OH)	DLeu-DAsp-DAsp-DalloThr-DLeu-DLeu-DSer-LLeu-DGln-LLeu-LIle-LGlu
GRUPO PUTISOLVINA		
Putisolvina I	C8	Leu-Glu-Leu-Ile-Gln-Ser-Val-Ile-Ser-Leu-Val.-Ser
Putisolvina II	C8	Leu-Glu-Leu-Ile-Gln-Ser-Val-Ile-Ser-Leu-Leu/Ile.-Ser
GRUPO TOLASIN		
Tolasin I	C8(OH)	Dhb-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Gln-Leu-Val-Dhb-aThr-Ile-Hse-DbA-Lys
Tolasin II	C10	Dhb-Pro-Ser-Leu-Val-Ser-Leu-Val-Val-Gln-Leu-Val-Dhb-aThr-Ile-Gly-DbA-Lys
GRUPO SIRINGOPEPTINAS		
SP25A	C10(OH)	Dhb-Pro-Val-Ala-Ala-Ala-Val-Leu-Ala-Dhb-Val-Dhb-Ala-Val-Ala-Ala-Dhb-aThr-Ser-Ala-Val-Ala-Dab-Dab-Tyr
Phe SP25A	C10(OH)	Dhb-Pro-Val-Ala-Ala-Ala-Val-Leu-Ala-Dhb-Val-Dhb-Ala-Val-Ala-Ala-Dhb-aThr-Ser-Ala-Val-Ala-Dab-Dab-Phe

Se indican en azul los aminoácidos que participan en el ciclo

Los LPC pertenecientes al grupo Viscosina y Amfisina están constituidos por un oligopéptido de 9 y 11 aminoácidos respectivamente acoplado a un ácido 3-hidrodecanoico (3-AHD). Para ambos grupos el enlace se forma entre el aminoácido C-terminal y el residuo de la treonina (Thr). La única excepción es arthrofactina, perteneciente al grupo Amfisina que se cicla a la cadena de ácido graso. En comparación con los grupos antes mencionados, el grupo Tolasin es mucho más diverso debido a múltiples variaciones tanto en la composición como en la longitud de la cadena péptida (19 a 25 aminoácidos) y la cola lipídica (3-AHD o ácido 3-hidrooctanoico 3-AHO). La parte peptídica contiene varios aminoácidos inusuales, incluyendo el ácido 2,3-dihidro-2-aminobutírico (Dhb) y la homoserina (Hse). La parte cíclica del resto peptídico contiene de 5 a 8 aminoácidos y el anillo de lactona se forma entre el aminoácido C-terminal y el resto allo-Thr.

El grupo de Siringomycina presenta 9 aminoácidos en su cadena peptídica, pero se diferencia al grupo Viscosina en que Siringomycina contiene aminoácidos inusuales tales como el ácido 2,4-diaminobutírico (Dab), el Dhb y un resto de Thr clorada. Esta última, forma el ciclo con el N-terminal de la serina (Ser). Las cadenas de ácidos grasos pueden consistir en una cadena de ácido graso 3-AHD o 3,4-dihidrodecanoico con una longitud de 10-14 átomos de carbono [32].

Los LPCs del grupo Tolasi se distinguen por cadenas laterales más cortas y porciones peptídicas más largas que otros LPC. Está formado por el ácido 3-hidroxipentanoico (3-AHP), el 3-AHD o 3- 3-AHO y el resto peptídico puede estar compuesto de 19-25 aminoácidos. Algunos aminoácidos suelen ser inusuales (Hse, Dab y Dhb) [36]. Entolisina A y B producido por *Pseudomonas entomophila* contiene 14 aminoácidos, la formación del anillo de lactona tiene lugar entre el C terminal del ácido carboxílico de la Isoleucina (Ile) y el décimo aminoácido Serina (Ser) [37].

El grupo de Putisolvina producido por *Pseudomonas putida* incluye putisolvina A y B. Se caracterizan por contener una cola lipídica hexanoica y, un resto peptídico de 12 aminoácidos [38].

Los LPC del grupo Orfamida presentan un 3-AHD o un ácido mirístico conectado al extremo N terminal de un péptido cíclico que contiene 10 aminoácidos [39].

En la figura 12 se muestra las estructuras de algunos de los LPC producidos por cepas del género *Pseudomonas*.

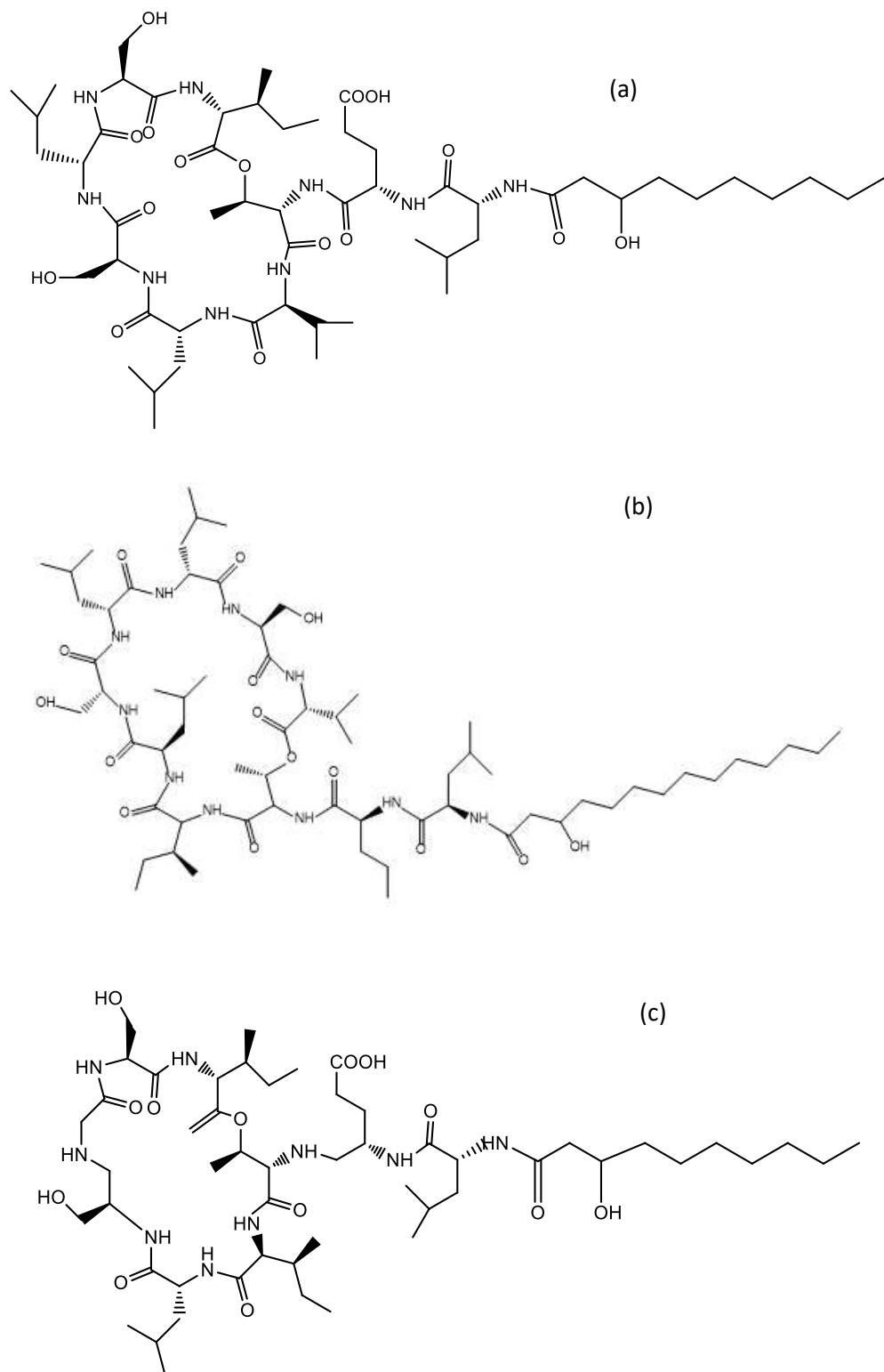


Figura 12. Estructuras de algunos de los LPCs producidos por cepas del género *Pseudomonas*, en la figura (a) visosina, en (b) ofarmida y (c) masetolidas. Las figuras se realizaron con el programa ChemDraw.

4.2.2. Grupo Viscosina

El Grupo Viscosina es uno de los más amplios, está constituido por viscosina [40], massetólidos A-F [41], viscosinamida [42], WLIP [43], pseudofosmina A y B [44] y pseudodesmina A y B [45]. Los LPC del grupo Viscosina comprenden un nonapéptido ciclizado en Thr 3. Dentro de este grupo se pueden distinguir tres tipos de variaciones estructurales: a) diferencias en las características estructurales hidrofóbicas; b) presencia de un residuo glutamina (Gln) o ácido glutámico (Glu) en la posición 2, y c) estereoquímica L o D de la Leu 5. Se observan diferencias en las características estructurales hidrofóbicas de los LPCs del grupo Viscosina, debido a que los residuos en las posiciones 4 y 9 son intercambiables entre Ile, Leu y Valina (Val), y la longitud de ácido graso, también puede variar entre C10 y C12. Esta variación se produce típicamente dentro de la misma cepa bacteriana, aunque el LPC que se produce como compuesto principal varía de cepa a cepa [45],[46]. El segundo tipo de variación es la presencia de un residuo Glu o Gln en la posición 2 lo cual, divide el grupo Viscosina en dos subgrupos E (Glu) y Q (Gln). Estos sólo difieren en este tipo de variación. La sustitución del residuo Glu (único grupo fisiológicamente ionizable en la molécula) por un Gln neutro, probablemente altere la afinidad a la membrana y, por lo tanto, da lugar a la acumulación del LPC en la envoltura celular, ya que esta sustitución reduce significativamente la solubilidad en agua. Se han descrito cepas que pueden producir LPCs tanto de los subgrupos E como Q [30]. Por último, la configuración L o D del Leu 5 conservada, es la variación más característica. Esto permite una división del grupo Viscosina en dos, los subgrupos L y D. Se han reportado que Massetolidas (L-Leu 5) y pseudofosmina (D Leu 5), contienen en la posición 4 una D-Ile que en el caso de massetolidas es una D-allo-Ile⁴. Se desconoce que esta variación este acoplada al interruptor D/L en Leu 5. No se ha informado que, una misma cepa produzca miembros de subgrupos D como L [47]. En esta tabla 2 se resume lo mencionado anteriormente.

Tabla 2. Descripción de la diversidad molecular dentro del grupo de Viscosina y su división en subgrupos

	SUB-GRUPO L					SUB-GRUPO D														
LPC	CONFIGURACIÓN				LPC	CONFIGURACIÓN														
	AG	L	D	D-a	D	L	D	L	D	L	AG	L	D	D-a	D	D	D	L	D	L
SUB-GRUPO E																				
Viscosina	C10(OH)	Leu-Glu-Thr-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile				WLIP	C10(OH)	Leu-Glu-Thr-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile												
Massetolida A	C10(OH)	Leu-Glu-Thr-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile				Pseudofosmina A	C10(OH)	Leu-Glu-Thr-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile												
Massetolida B	C11(OH)	Leu-Glu-Thr-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile				Pseudofosmina B	C12(OH)	Leu-Glu-Thr-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile												
Massetolida C	C12(OH)	Leu-Glu-Thr-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile																		
Massetolida D	C10(OH)	Leu-Glu-Thr-Ile-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu																		
Massetolida E	C10(OH)	Leu-Glu-Thr-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Val																		
Massetolida F	C10(OH)	Lue-Glu-Thr-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu																		
Massetolida G	C11(OH)	Lue-Glu-Thr-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile																		
Massetolida H	C12(OH)	Lue-Glu-Thr-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu																		
Massetolida L	C10(OH)	Leu-Glu-Thr-Ile-Leu-Ser- Leu-Ser-Val																		
SUB-GRUPO Q																				
	CONFIGURACIÓN					CONFIGURACIÓN														
	AG	L	D	D-a	D	L	D	L	D	L		L	D	D-a	D	D	D	L	D	L
Viscosinamida A	C10(OH)	Leu-Gln-Thr-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile				Pseudodesmina A	C10(OH)	Leu- Gln-Thr- Val- Leu- Ser- Leu- Ser-Ile												
Viscosinamida B	C10(OH)	Leu-Gln-Thr-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Val				Pseudodesmina B	C10(OH)	Leu- Gln-Thr- Val- Leu- Ser- Leu- Ser-Val												
Viscosinamida C	C10(OH)	Leu-Gln-Thr-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu																		
Viscosinamida D	C12(OH)	Leu-Gln-Thr-Val-Leu-Ser-Leu-Ser-Ile																		

AG indica la longitud de cadena de carbono, la configuración hace referencia a la estereoquímica del aminoácido, los sub-grupos Glu y Gln indican que poseen en su estructura ácido glutámico o glutamina. Se indica con azul los aminoácidos que participan en el ciclo (Tabla modificada de Geudens y col., 2014)

4.3. Género *Bacillus* productor de LPC

Numerosas especies bacterianas del género *Bacillus* sintetizan LPCs como metabolitos secundarios con actividades específicas contra patógenos de plantas de interés agronómico y farmacéutico. Estos compuestos al igual que en *Pseudomonas* se sintetizan a partir de SPNR, las cuales conducen a una notable heterogeneidad entre los productos en lo que respecta al tipo y secuencia de residuos de aminoácidos, la naturaleza de la ciclación del péptido, la longitud y ramificación de la cadena de ácido graso. Se clasifican en tres grupos en función de su secuencia de aminoácidos: Iturina, Fengycinas, y Surfactinas [48].

Surfactina es uno de los grupos de LPC más prometedoras producidos por *Bacillus subtilis*, dentro de este grupo se encuentra surfactina, lichenisina, esperina y pumilacidina. Estos LPC son lipoheptapéptidos cíclicos que contiene siete residuos de D y L aminoácidos y un residuo de un β -hidroxi ácido graso que varían dentro de sus congéneres entre 14 y 15 átomos de carbono. Los LPCs de este grupo son poderosos BSms, que muestran propiedades antibacterianas, pero no tienen marcada actividad contra hongos [30].

Dentro del grupo Iturina se encuentra iturina A, C, D, y E, bacillomicina D, F y L, bacillopeptina, y micosubtilina. Todos ellos comparten una secuencia común β -hidroxi ácido graso-Asparagina-Tirosina-Asparagina (β -hidroxi.AG-Asn-Tyr-Asn) Están formados por siete aminoácidos y un ácido graso que varía dentro de sus congéneres entre 14 y 17 átomos de carbono. Los LPCs del grupo Iturina son una clase especial de lipopéptidos formadores de poros y son reconocidos por su actividad antifúngica contra una amplia variedad de levaduras y hongos patógenos [49].

Los LPC del grupo Fengycinas se caracterizan por contener 10 aminoácidos y un lípido unido al extremo N-terminal de la molécula. Se diferencian del grupo Iturina y Surfactina por la presencia de aminoácidos inusuales como ornitina y allo-Thr. Dentro de este grupo se encuentra fengicina y plipastatina A y B. Similar a los compuestos de iturina, fengicina muestra una fuerte actividad antifúngica e inhibe el crecimiento de una amplia gama de patógenos de plantas, especialmente los hongos filamentosos [50].

4.4. Función biológica

Los LPC exhiben actividades líticas e inhibitoras del crecimiento contra una amplia gama de microorganismos, como también participan en la motilidad y formación de *biofilm* de los microorganismos [30]. A continuación, se resume brevemente las funciones naturales de LPCs.

Motilidad

El movimiento de las bacterias en las superficies ha sido ampliamente estudiado y fueron reconocidas varias formas distintas, incluyendo *swimming*, *swarming* y *twitching* [51]. El *swimming* les permite a las células bacterianas moverse individualmente, mientras que en grupo lo hacen a través del *swarming*. Las células vegetativas de algunas especies bacterianas pueden diferenciarse en células *swarmer* especializadas que son hiperflageladas y generalmente más largas [52]. Los BSms pueden cambiar la viscosidad de las superficies, influyendo así en la diferenciación celular y la motilidad. Se piensa que los LPCs están implicado también en la agregación de las células en dendritas y en la coordinación de su movimiento. Para estudiar el papel de los LPCs en la motilidad de *Pseudomonas*, han generado mutantes deficientes en LPC. Su motilidad superficial se ensayó in vitro en placas de agar semisólido, en la mayoría de los casos, la motilidad superficial se perdió o redujo en los mutantes deficientes en LPCs [53].

Formación del *biofilm*

Las células bacterianas individuales pueden adherirse a las superficies y, luego de la división celular y la proliferación, forman agregados densos comúnmente denominados *biofilms*. Las células bacterianas segregan polímeros tales como polisacáridos y proteínas que los mantiene unidos [54]. La matriz extracelular del *biofilm* protege a las bacterias contra condiciones ambientales adversas: por ejemplo, las biopelículas son menos susceptibles al tratamiento con antibióticos [55]. Los *biofilms* también proporcionan protección contra la depredación de protozoarios y son un nicho para la transferencia horizontal de genes [56]. Para *Pseudomonas*, los LPCs desempeñan un papel importante en la fijación a las superficies y la formación del *biofilm*, aunque los resultados difieren dependiendo del tipo de LPC [30]. Se ha reportado que mutantes deficientes en los LPCs mesetolidas, viscosina, WLIP y xantolisina formaron significativamente menos *biofilm* [57],[53],[43].

Actividad antimicrobiana

LPCs producidos por varias especies de *Pseudomonas* exhiben actividades líticas e inhibitorias del crecimiento contra una amplia gama de microorganismos, incluyendo micoplasmas (bacterias sin pared celular) y virus. Masetolidas, viscosina, siringopeptinas y siringomicinas mostraron actividad contra bacterias Gram positivas como *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium smegmatis* [46],[58]. Son reducidos los LPC que tienen actividad contra bacterias Gram-negativas. Esto se ha atribuido a la membrana externa que contienen, la cual podría obstaculizar el acceso de LPCs a la membrana plasmática [59]. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de xantolisinas no se limita a este grupo de bacterias, ya que han reportado la inhibición de bacterias Gram negativas incluyendo *Xanthomonas* [60]. El mismo efecto inhibitorio de este género también se demostró para WLIP [43].

Se han descrito actividades antifúngicas para muchos LPCs [32],[48]. Para algunos, se llevaron a cabo investigaciones más detalladas para dilucidar sus efectos sobre la morfología y la fisiología de las células fúngicas. Se observó crecimiento retardado acompañado de una mayor ramificación y formación de roseta, así como hinchazón de las hifas [61]. Estos efectos podrían ser causados por un aumento de Ca^{2+} y H^+ lo que puede estar o no asociado con la capacidad de los LPC de formar porinas en la membrana celular [62]. Viscosina, viscosinamida, masetolida A, putisolvina y orfamida han sido bien caracterizados por su impacto sobre las zoosporas [63],[64].

Protección contra predadores

La predación representa un factor importante de mortalidad para las bacterias en los hábitats naturales [65]. Las defensas pre-ingestionales implican cambios en la morfología celular, las propiedades de superficie y la motilidad; las estrategias post-ingestionales incluyen la producción de metabolitos tóxicos [66]. Andersen y colaboradores demostraron que la cepa *Pseudomonas fluorescens* DR54, que produce viscosinamida, tuvo efectos negativos sobre las amebas, así como sobre los protozoos del suelo [67]. Sin embargo no se observó lo mismo en cepas mutantes que no producen masetolidas y viscosina [68].

5. Aplicaciones de los BSms

Industria alimenticia

Los BSms son compuestos biocompatibles, biodegradables y de baja toxicidad, esta combinación de características particulares exhiben una variedad de propiedades útiles

para la industria alimenticia, especialmente como emulsionantes, espumantes, humectantes y solubilizantes [69]. Los BSm pueden ser utilizados como agentes emulsionantes, ya que su adición tiene un valor especial para los productos bajos en grasa [15] mejorando la textura y cremosidad. Se ha reportado el uso de RLs para mejorar las propiedades emulsionantes de postres congelados [70]. Los surfactantes biológicos se utilizan como agentes estabilizantes en el control de la aglomeración de los glóbulos de grasa, la estabilización de los sistemas aireados, mejorando la vida útil de los productos que contienen almidón y manteniendo su consistencia y la textura. En el procesamiento de alimentos, la adición de RLs mejora la textura y la vida útil de los productos que contienen almidón [71].

Industria cosmética

Los surfactantes biológicos tienen varias aplicaciones cosméticas debido a sus propiedades superficiales excepcionales (detergente, humectante, emulsionante, solubilizante, dispersante y espumante) sumado a los efectos de baja irritación y propiedades hidratantes y compatibilidad con la piel. Los glicolípidos más utilizados en cosméticos son soforolípidos, RLs y lípidos de manosileritritol [72]. Los soforolípidos tienen una buena compatibilidad con la piel y excelentes propiedades hidratantes, los RLs son emulsionantes que pueden reemplazar a los surfactantes basados en productos petroquímicos utilizados en la mayoría de los productos cosméticos. También se han utilizado en pastillas de acné anti-caspa, antiarrugas y antienvjecimiento, desodorantes, productos para el cuidado de las uñas y pastas dentífricas en varias formulaciones diferentes, debido a sus propiedades de superficie y actividades emulsionantes [73].

Industria farmacéutica

Han demostrado que los BSms podrían tener una amplia gama de aplicaciones en campos farmacéuticos.[74],[75], como por ejemplo en la transfección de genes, Kitamoto y colaboradores demostraron que los liposomas basados en BSms, muestran una eficiencia creciente de transfección génica en comparación con el liposoma catiónico comercialmente disponible [21]. Se ha demostrado la acción inmunomoduladora de lipopéptidos bacterianos con antígenos convencionales, los BSms podrían constituir un potente adyuvante inmunológico no tóxico y no pirogénico [76]. Varios BSms tienen una fuerte actividad antimicrobiana, antimicótica y antiviral, su rendimiento está dado por las diversas estructuras de BSms. Se cree que ejercen su toxicidad sobre la permeabilidad de

la membrana celular [77]. Por otro lado, la adhesión de los BSms a las superficies sólidas podría constituir un medio eficaz de combatir la colonización por microorganismos patógenos. Se ha encontrado que los BSms inhiben la adhesión de organismos patógenos al sitio de infección. Rodrigues y colaboradores demostraron que al pasar la solución de surfactina a través del pre-recubrimiento del catéter uretral de vinilo antes de la inoculación con los medios dio como resultado una disminución en la cantidad de *biofilm* formada por *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*, lo que demuestra que estos BSM podrían desempeñar un papel importante como agente terapéutico [78],[79],[80]. Se ha estudiado también la actividad anticancerosa de los BSM. Se ha encontrado que glicolípidos microbianos inducen la diferenciación celular en la línea celular de leucemia promielocítica humana inhibiendo la proliferación celular, también, se observó que la exposición de células PC12 a glicolípidos potencia la actividad de la acetilcolinesterasa e interrumpe el ciclo celular en la fase G1 esto sugiere que estos glicolípidos induce diferenciación neuronal en células PC12 [81].

BSm en bioremediación

Los surfactantes están implicados en la biorremediación de dos maneras: aumentando el área superficial del sustrato hidrófobo insoluble en agua y aumentando la biodisponibilidad de sustancias hidrofóbicas insolubles en agua [82],[83].

Los hidrocarburo poliaromático (HPA), debido a la hidrofobicidad, la baja solubilidad acuosa y la fuerte capacidad de adsorción en el suelo, se vuelven menos disponibles para los microorganismos y por lo tanto su biodegradación es muy limitada [84],[85]. Sólo un número de microorganismos son capaces de degradar los HPA, ya que contienen cuatro o más anillos aromáticos fusionados [86]. Los tensioactivos mejoran la degradación de HPA liberando los hidrocarburos sumergidos en el suelo y/o solubilizan o emulsionan los compuestos hidrófobos en fase acuosa [87]. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 produce un agente emulsionante que aumentaba la solubilidad de hexaclorobifenilo añadido a suspensiones de suelo, resultando en una recuperación del 31% del compuesto en la fase acuosa [88].

Mulligan y colaboradores demostraron el posible uso de surfactina (*Bacillus subtilis*) para tratar el suelo y los sedimentos contaminados con Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , aceite y grasa. Encontraron que los metales pesados estaban asociados con carbonato, óxidos y fracciones orgánicas en el material contaminado y que éstos se podían eliminar usando surfactina [89],[90]. Por otro lado, Tan y colaboradores investigaron el potencial de los

RLs producidos por *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 en la eliminación de metales de suelos contaminados con Cd²⁺ usando una solución 5 mM de RL [91].

BSm en la agricultura

El mantenimiento de la salud del suelo y la protección de los cultivos de diversas enfermedades son dos cuestiones primordiales en la agricultura. Los BSms se han utilizado para tratar estos problemas, la baja toxicidad y biodegradabilidad de los BSms han hecho que estos compuestos sean superiores a sus equivalentes sintéticos. Las preocupaciones acerca de la contaminación por pesticidas han impulsado los esfuerzos globales para encontrar tecnologías alternativas de control biológico. Hay muchos informes que demuestran el uso de BSms como agentes de biocontrol. Los LPCs producidos por *Pseudomonas* spp. tienen propiedades antimicrobianas hacia hongos patógenos radiculares. Surfactantes producidos por cepas del género *Bacillus* desempeñan un rol importante en la permeabilización de la membrana, dando como resultado la formación de poros [92].

Objetivos generales

OBJETIVOS GENERALES

Producir BSm, en las instalaciones de la empresa, a partir de un aislamiento regional de una cepa de *Pseudomonas*, provista por Rizobacter Argentina S.A.

Encontrar una técnica simple de purificación que permita separar el BSm, de interés de forma eficiente de los otros componentes del sobrenadante del cultivo.

Aplicar diferentes técnicas de caracterización que permitan determinar la familia a la que pertenecen los BSm purificados y dilucidar la estructura de estos compuestos.

Estudiar la capacidad surfactante de los sobrenadantes de cultivo y del BSm purificado, así como también su capacidad antimicrobiana y humectante para su eventual aplicación en el sector agrícola.

Adquirir conocimientos y formación calificada en la temática abordada, y promover la relación interinstitucional (CONICET-Empresa) e interacción con los demás integrantes calificados que conforman el equipo de trabajo.

CAPÍTULO 1

Producción, detección y cuantificación de biosurfactantes

INTRODUCCIÓN

Los BSms son compuestos anfífilos producidos por diferentes microorganismos que incluyen hongos, bacterias y levaduras. Dos de sus propiedades más importantes, la baja toxicidad y su carácter biodegradable, los hacen una opción interesante como alternativa a los compuestos obtenidos sintéticamente.

El interés mundial de estos compuestos aumentó significativamente en los últimos años, debido a su capacidad para atenuar la mayoría de los requerimientos de la producción de tensioactivos químicos. Sin embargo, el alto costo de producción de estos BSms ha sido un obstáculo importante para su comercialización y se han realizado numerosos esfuerzos para reducirlo, incluido el aumento de la productividad mediante el uso de cepas mutantes y la simplificación del procesamiento mediante el desarrollo de procesos integradores en el *downstream* [93]. Los surfactantes constituyen una parte integral del inventario de materias primas químicas para muchas industrias y son principalmente sintetizados a partir de productos petroquímicos [5]. Su producción mundial se estimó en más de cuatro millones de toneladas y en 9-10 billones de dólares por año [94]. El mercado de los Bsm fue de 2210 millones de dólares en 2011 y se estima que crecerá hacia el 2018 a una tasa del 3,5 % [7].

La producción de estos compuestos puede ser espontánea o inducida por la presencia de compuestos lipofílicos, variaciones en el pH, la temperatura, la aireación y la velocidad de agitación o cuando el crecimiento celular se mantiene en condiciones de estrés, por ejemplo, en condiciones de baja concentración de nitrógeno [6].

La fuente de carbono juega un papel importante en el crecimiento y la producción de BSm y varía de una especie a otra. Se encontraron bajos rendimiento cuando solo se usó glucosa o aceite vegetal, pero aumentan cuando las fuentes se suministran juntas. Bacterias del género *Pseudomonas* son capaces de utilizar diferentes sustratos, como glicerol, manitol, fructosa, glucosa, n-parafinas y aceites vegetales, para producir BSms. En procesos fermentativos, la relación C/N afecta la acumulación de metabolitos. La alta relación de C/N (es decir, bajos niveles de nitrógeno) limitan el crecimiento bacteriano, favoreciendo al metabolismo celular hacia la producción de metabolitos. En contraste, el nitrógeno excesivo conduce a la síntesis de material celular [95]. Diferentes fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico han sido utilizadas en la producción de BSm. Se ha reportado la importancia del nitrógeno para la producción de un BSm por *Pseudomonas aeruginosa* cultivado en un medio mineral utilizando glicerol como fuente de carbono. Como nitrato de sodio demostró ser más eficaz que sulfato de amonio, las limitaciones

nutricionales guían el metabolismo celular a la formación del producto. Mulligan y Gibbs informaron que *Pseudomonas aeruginosa* utiliza nitratos, amonio y aminoácidos como fuentes de nitrógeno [96]. Ellos reportaron que las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, velocidad de agitación y oxígeno) también influyen en la producción de BSms y que las condiciones de crecimiento varían según la especie [6].

Los sustratos hidrofílicos son utilizados principalmente por los microorganismos para el metabolismo celular y la síntesis del resto polar de un BSm, mientras que los sustratos hidrófobos se usan exclusivamente para la producción de la porción de hidrocarburo del BSM [97],[6]. Diversas vías metabólicas están involucradas en la síntesis de precursores para la producción de BSm y dependen de la naturaleza de las principales fuentes de carbono empleadas en el medio de cultivo

Pseudomonas putida es una bacteria Gram negativa no patogénica, muy versátil en cuanto a todos los ambientes que puede habitar. Produce una gran variedad de metabolitos secundarios entre ellos BSms de la familia de los LPC y RLs [98],[99].

Los BSms tienen la capacidad de reducir la γ , que es la fuerza por unidad de longitud ejercida por un líquido en contacto con un sólido u otro líquido. El agua tiene el valor de γ más alto de 72 mN/m. La reducción de los valores de γ se debe a que parte de los monómeros del surfactante quedan en el seno de la solución, pero otras moléculas se sitúan en la superficie, y las colas lipófilicas quedan expulsadas del agua debido al efecto hidrofóbico [7],[100]. El sistema tiende a reducir la energía libre del sistema alquilo-agua, quedando los monómeros orientados de manera que la región polar esté en contacto con el medio acuoso y la cola hidrofóbica quede en contacto con la fase aérea. A cada cantidad de tensioactivo le corresponde un valor de γ que va disminuyendo al aumentar la concentración. Se establece un equilibrio entre los monómeros disueltos en el seno de la disolución [101]. Si se aumenta la concentración de surfactante el número de monómeros absorbidos comienza a saturarse, a dicha concentración se la denomina concentración micelar crítica (CMC). La CMC es la mínima concentración a la cual los monómeros libres del seno de la disolución comienzan a agregarse para constituir micelas [70]. Lo mencionado anteriormente se esquematiza en la figura 13. Cada surfactante tiene su propio valor de CMC en solución acuosa. El valor de CMC del surfactante es clave para abrir sus perspectivas industriales. Las propiedades de limpieza, detergencia y solubilización están determinadas por sus valores de CMC y estructura molecular. Los valores de CMC de un BSm se encuentra en un rango de 1 a 200 mg/ml. La CMC se obtiene graficando los valores de γ en función de los valores de concentración del

surfactante. El punto de quiebre de la curva determina el valor de CMC (figura 13). Experimentalmente, el valor de CMC se calcula por diversos métodos en donde se mide el cambio de alguna propiedad como: γ , conductividad, fuerza electromotriz, dispersión de luz, presión osmótica, entre otras) con respecto a la variación de concentración del surfactante

La γ se mide siguiendo el método de Du Noüy, el cual consiste en suspender verticalmente sobre la muestra un anillo de platino sumergido por debajo de la superficie y posteriormente hacerlo ascender lentamente. Se mide la fuerza máxima necesaria para desprender el anillo a través de la interfase, y se utilizan los valores de los radios internos y externos del anillo para obtener el valor de la γ . Para ello se utiliza la siguiente ecuación

$$\gamma = \gamma^* F = (K/l_b)F$$

donde γ es la tensión superficial real, γ^* es la tensión superficial medida, F es un factor de corrección, l_b es la longitud total de las circunferencias internas y externa del anillo. F se utiliza debido a que además de la fuerza que resulta de la γ hay otra fuerza debido al peso de la película que rodea directamente al anillo. Para el cálculo influyen todos los factores y toman importancia en la calibración del Tensiómetro que se utiliza para las mediciones de la γ [102] [103]. Otros métodos para medir γ es el de Wilhelmy [104].

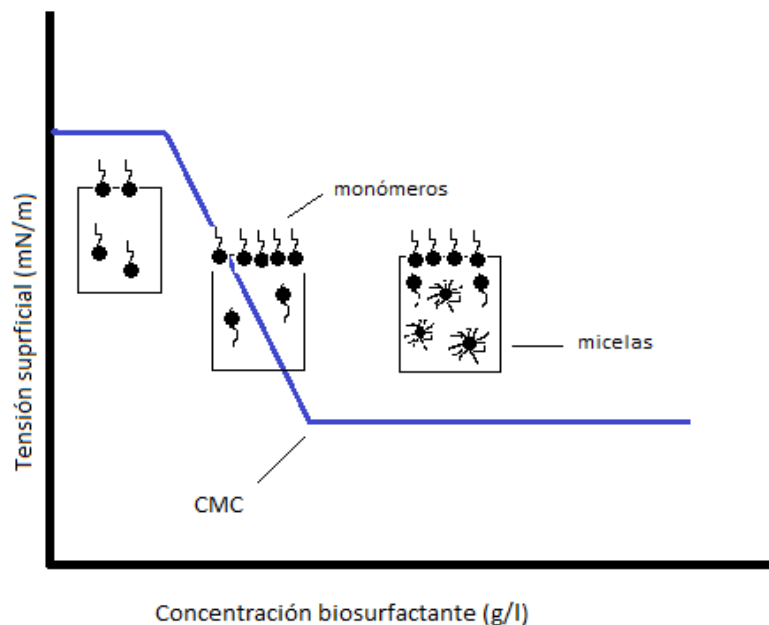


Figura 13. Esquemización de los BSms en solución en los diferentes tramos de la curva de CMC.

OBJETIVOS

Producir BSm utilizando un aislamiento regional no patógeno del género *Pseudomonas*.

Identificar los analitos por MS.

Evaluar las propiedades tensioactivas del BSm crudo mediante la obtención de la CMC.

Cuantificar mediante una técnica simple la producción de BSms en una muestra obtenida a partir de un proceso de ultrafiltración y filtración del sobrenadante del cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Producción del BSm

1.2. Producción y control de calidad de los sobrenadantes de cultivo

Para el presente estudio se utilizó un aislamiento regional de *Pseudomonas*. Esta cepa se seleccionó por su capacidad de producir BSm y por ser no patogénica. La cepa se cultivó en un medio enriquecido similar al publicado por Wenjie y colaboradores [105]. El cultivo *starter* se incubó durante 24 h. La producción se llevó a cabo en 25 erlenmeyer de 2000 ml que contenían 500 ml cada uno (25 % V/V) de medio de cultivo y un 2% V/V del inóculo *starter*. Los erlenmeyer se incubaron a 30 °C a 250 rpm durante 72 h. Los sobrenadantes de cultivo obtenidos de cada erlenmeyer fueron sembrados en placas del mismo medio para verificar la pureza de los mismos. Se realizó a cada uno de los cultivos un recuento de células viables para obtener las UFC/ml y control de pH del medio.

Para confirmar la producción de BSm se midió la γ de una dilución 1:3000 de los 25 sobrenadantes de cultivo. Las mediciones se realizaron en un Tensiómetro K20 (Krüss) utilizando el método del anillo de Du Noüy. Se descartaron los sobrenadantes cuyos valores de γ no estaba en el rango de γ de 31,5 a 37,5 mN/m.

1.2. Procesamiento

Los sobrenadantes de cultivo fueron centrifugados a 5236 xg a 15 °C durante 15 min con una centrifuga SIGMA (Sartorius). El sobrenadante total centrifugado se acondicionó con un *buffer* fosfato (30 % V/V) para llevar a cabo el proceso de ultrafiltración. La muestra se concentró 40 veces utilizando una membrana Pellicon XL Poli Eter Sulfona de 30 KDa (Biomax, Millipore). De la etapa de ultrafiltración se obtuvo una muestra concentrada denominada retenido y los solutos de bajo peso molecular pasan al permeado. Para los controles se tomó una alícuota del permeado. Se midió la γ de las siguientes diluciones del retenido 1:500, 1:1000, 1:3000, 1:4000 y de una alícuota del permeado sin diluir y de una dilución 1:25.

El retenido se centrifugó a 10784 xg a 15 °C durante 20 min para su posterior filtración hasta esterilidad. Se utilizó filtraciones consecutivas de 2 µm, 1 µm, 0,45 µm y 0,22 µm con el objetivo de eliminar la totalidad de las células.

Para su almacenamiento el retenido se congeló a -80 °C y se deshidrató utilizando un liofilizador con Manifold tipo Tambor con 8 bocas (Rificor). El proceso se llevó a cabo a 24 °C y 0,1 mmHg, durante 48 h. La viabilidad del BSm luego del proceso de liofilización se analizó mediante la evaluación de la γ .

2. Determinación del valor de CMC

Se preparó una solución de retenido liofilizado de 2,4 mg/ml a partir de la cual se hicieron diluciones en un rango de concentración de en agua Milli-Q a pH 7,5. La γ se midió a 25 °C y se comparó con el valor del agua Milli-Q utilizada para las diluciones. La γ se determinó por triplicado siguiendo el método del anillo de Du Noüy con un Tensiómetro (CSC Scientific Company).

3. Extracción del BSm

Se llevó a cabo una técnica de precipitación ácida, seguida de extracciones con disolventes. Se acidificó 3 ml del producto liofilizado concentrado reconstituido, con ácido clorhídrico 6N, se centrifugó a 1993 xg utilizando una centrifuga TDL+4 (Arcano). El precipitado se extrajo con un volumen igual de mezcla 3:1 V/V de cloroformo/etanol y se utilizó agua como co-disolvente de la extracción, dicha etapa se repitió tres veces. La fase obtenida se deshidrató con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio. Anteriormente para confirmar que los BSm precipiten, se realizó un ensayo en donde se evaluó el aumento de γ de una solución de γ conocida luego de reducir el pH a 2. Se procedió de la misma forma para cuantificar BSm en el permeado.

4. Análisis del retenido por MS

El análisis del extracto se realizó en un Espectrómetro de masas simple cuadrupolo SQD2 (Waters), mediante ionización por electrospray (ESI). El extracto se disolvió en metanol y se filtró con filtros de jeringa PVDF (di-fluoruro de polivinilideno) de 0,22 µm. De la misma forma se procedió para el permeado.

5. Cuantificación del BSm

Se pesó el extracto obtenido en el apartado 3 del presente capítulo. Con estos datos se calculó el % P/P y % P/V para estimar el rendimiento de la producción de BSm total. Se

cuantifico también el permeado, para lo cual se tomó una alícuota en la última etapa del proceso de ultrafiltración.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Purificación y procesamiento del BSm

Se logró satisfactoriamente producir surfactantes a partir de la cepa no patógena en las condiciones de cultivo utilizadas, esto se determinó principalmente por los análisis de reducción de la γ , luego del tiempo de incubación. Los valores de γ de la dilución 1:3000 de los sobrenadantes de cultivo se ubicaron entre 33 y 34 mN/m (γ_{agua} 72,5 mN/m a 24 °C). El pH entre 7,9 y 8,5 y la concentración celular de 10^9 a 10^{10} UFC/ml. Estos valores resultaron ser muy buenos, sin embargo, otros autores han encontrado valores más bajos de γ con otras fuentes de carbono diferentes al glicerol, tal es el caso de la melaza, la cual permitió reducir los valores de γ de 60 a 30 mN/m, la cepa utilizada por estos autores fue caracterizada y designada como *Pseudomonas* sp.2B. La producción de biosurfactante se llevó a cabo en erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml de un medio de cultivo compuesto por: NH₄Cl 0,02 M, KCl 0,12 M, MgSO₄ 0,0016 M, peptona al 1 % P/V y melaza al 1 % V/V. El medio se inoculó con 2 % del cultivo bacteriano de 18 h cultivado en caldo nutritivo. La incubación se llevó a cabo a 30 °C a 150 rpm durante 96 h [106].

Se seleccionaron los sobrenadantes de cultivo cuya γ se encontraban entre 31,5 a 37,5 mN/m, estos sobrenadantes se concentraron por ultrafiltración. A partir de la ultrafiltración realizada a los sobrenadantes de cultivo que cumplían con los valores estipulados de γ , se obtuvo 500 ml de sobrenadante de cultivo estéril concentrado (retenido) que contenía el BSm total producidos por la cepa. Se ha reportado que en el sobrenadante de cultivo los BSm de la familia de los RLs interaccionan con proteínas producidas por el mismo microorganismo y eso podría explicar que no atraviesen la membrana de filtración y queden retenidos. Por otro lado, Jauregi y colaboradores informaron que la optimización de la separación de BSm mediante un proceso basado en membrana requiere un buen conocimiento de su comportamiento de agregación en el entorno expuesto, en este caso el sobrenadante del cultivo, y que en la ultrafiltración el tamaño y la forma de las moléculas son los parámetros más importantes que afectan la separación. Jauregi y colaboradores trabajaron en la separación de iturina y surfactina realizando dos pasos de ultrafiltración. Para el primer paso utilizaron una membrana de separación de moléculas de 100 KDa de *cut-off* y para la segunda etapa de ultrafiltración membranas de 10 KDa de *cut-off*, con la que se obtuvo la mayor pureza. Esto puede explicarse ya que las micelas

de estos LPCs pueden formar agregados intermicelares a través de enlaces puente de hidrógeno [107].

Cumplida la etapa de ultrafiltración se analizó la γ del retenido puro para corroborar que los BSms hayan quedado retenidos. Las γ del retenido puro y de sus diluciones se muestran en la tabla 3. También se controló el pH, el cual se mantuvo en 7,5.

Tabla 3. Valores medidos de γ del retenido

DILUCIÓN	VALOR DE γ (H ₂ O 72,4Nm/m)*
1:4000	41,7 ± 0,4
1:3000	34,4 ± 0,1
1:1000	31,2 ± 0,0
1:500	28,5 ± 0,4
PURO	26,4 ± 0,4

*Los valores expuestos de γ representan el promedio de cinco mediciones con su correspondiente desviación estándar.

Para confirmar la posible pérdida del principio activo en el permeado se analizó la γ del mismo. Se evaluó la γ del permeado sin diluir, el cual mostró valores de aproximadamente 27,0 mN/m, pero al diluirlo a la mitad este valor aumentó acercándose al valor del agua. Es posible que en el permeado hayan migrado compuestos del medio de cultivo como peptonas y extractos de carne o levadura que reducen la γ cuando están en alta concentración, pero una vez que se diluye disminuye esa capacidad. Sin embargo, no se verificó esta hipótesis

Para su conservación la muestra concentrada por ultrafiltración se liofilizó y de 500 ml se obtuvo 21 g de sólido color marrón posiblemente por la presencia de pigmentos, el cual se muestra en la imagen 1 junto a una alícuota del retenido liofilizado. El liofilizado se almacenó en el freezer a -20°C para realizar los estudios planteados en este trabajo de tesis, previamente una fracción se reconstituyó y se verificó la viabilidad del producto mediante medidas de γ .

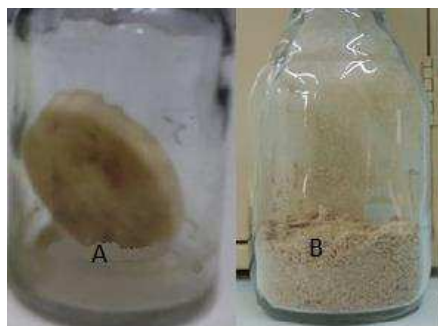


Imagen 1. La figura A corresponde a la pastilla formada luego de la liofilización de una alícuota de retenido y la figura B corresponde al producto liofilizado de un proceso de producción completo.

2. Extracción y Análisis por MS (ESI) de los BSms

Se obtuvo el BSm total mediante una técnica de precipitación ácida y extracción con disolventes con el objetivo de cuantificarlos y detectarlos. Previo a la etapa de acidificación se corroboró que los compuestos con propiedades surfactantes precipiten al acidificar el medio de cultivo. Para ello, se utilizó de control una solución de γ y pH conocido (28,5 mN/m, pH 7,5) se acidificó a pH 3 y al medir γ se confirmó el aumento del valor de γ a 63,0 mN/m.

Se extrajo el BSm total a partir de 130 mg de retenido liofilizado (3 ml aproximadamente). El extracto se analizó por MS (ESI- y ESI+) en búsqueda de los posibles analitos con actividad surfactante.

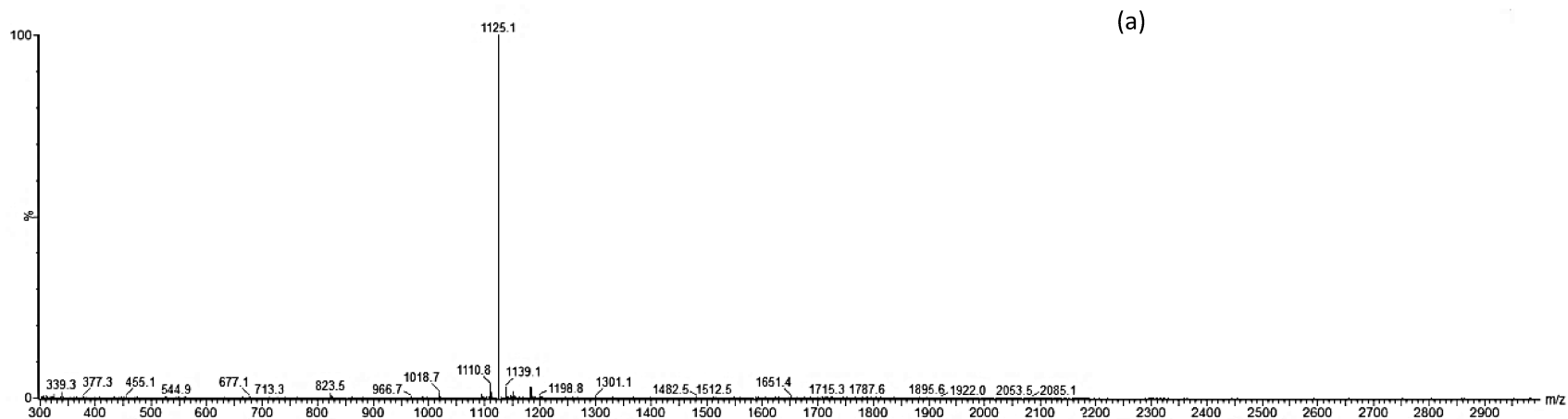
El espectro de iones negativos (Figura 14 a) mostró un ion molecular de 1125,1 m/z de mayor intensidad relativa. En el espectro de iones positivos, ese ion podría estar formando aductos de sodio, $[M+Na]^+$ para el ion de 1148,8 m/z y $[M+2Na]^+$ para el caso del ion 1170,8 m/z. También se observan en el espectro iones de menor intensidad relativa, que poseen pesos moleculares más bajo, los cuales muestran masas de 502, 648 y 702 Da (Figura 2b).

Desde un primer momento este trabajo se direccionó para la producción de RLs. Estos compuestos se encuentran dentro de la familia de los BSm de tipo glicolípidos. Los RLs se clasifican en dos grupos principales, los mono-ramnolípidos, que tienen una unidad de ramnosa unida a una o dos moléculas de ácidos β -hidroxialcanoicos y los di-ramolípidos con dos unidades de ramnosa relacionadas de forma similar con ácidos β -hidroxicarboxílico. Es bien sabido que la producción de RL y su composición química es específica de la cepa y sensible a las condiciones de cultivo [108],[109]. Se ha informado las posibles estructuras y pesos moleculares de los RL. Los pesos moleculares de los mismos varían entre 300 y 900 Da. Los análisis de masas indican que posiblemente la

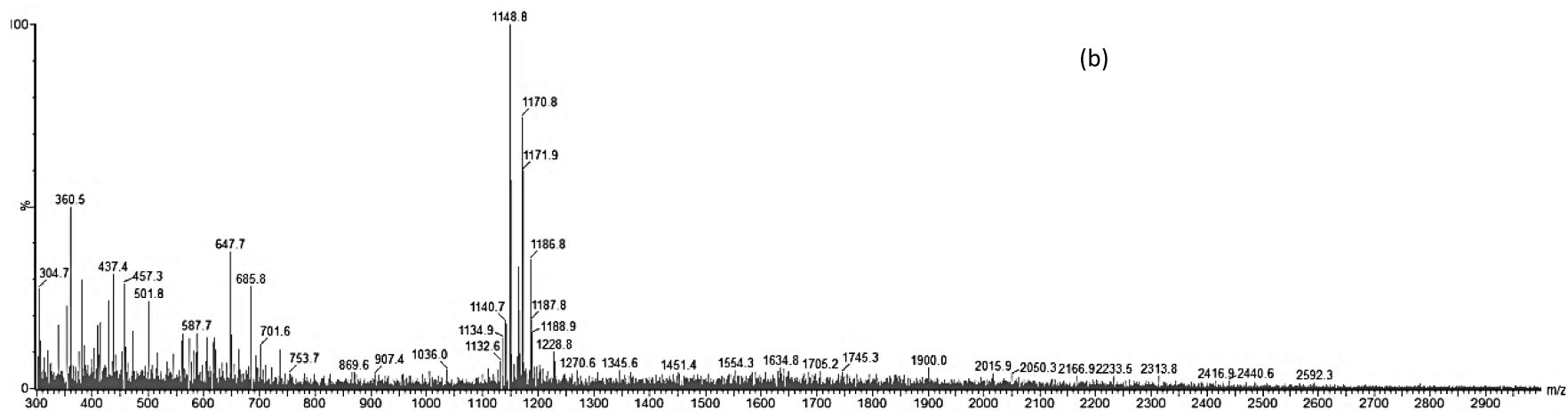
cepa utilizada produzca RLs, ya que se encontraron iones por MS (ESI+) que concuerdan con el rango de masas reportado [23]. Sin embargo, es probable que la cepa produzca también otra familia de BSm. Es claro que para determinar lo dicho anteriormente es necesario purificar los compuestos con actividad surfactante y caracterizarlos. Dichas actividades serán descritas en los capítulos siguientes.

3. Cuantificación del BSm total

Se obtuvo un extracto de 60 mg a partir de la precipitación ácida seguida de extracción con cloroformo y etanol, por lo tanto, el rendimiento de la producción correspondiente al BSm total fue de 2 % P/V y 46 % P/P.



(a)



(b)

Figura 14. Espectro de masas del extracto que contiene el BSm total en la forma ESI⁻ en la figura (a), en donde se observa un ion principal de 1125,1 m/z y en la figura (b) el espectro ESI⁺, en donde se observan dos familias de BSms, una familia con un peso molecular entre 400 y 750 Da y otra entre 1100 y 1200Da

Con respecto al permeado se procedió de la misma forma para determinar cuantitativamente si es posible que se pierda parte del principio activo en el proceso de ultrafiltración, se encontró que para el permeado los valores se ubican en 0,23 % P/V con 13 % P/P, lo que indicaría que posiblemente en el permeado se pierda principio activo, el análisis por MS realizado a la muestra al extracto obtenido para la cuantificación se observa en la figura 15. Sin embargo, la cuantificación se realizó sobre una alícuota tomada al finalizar el proceso, se debería cuantificar sobre la totalidad del permeado.

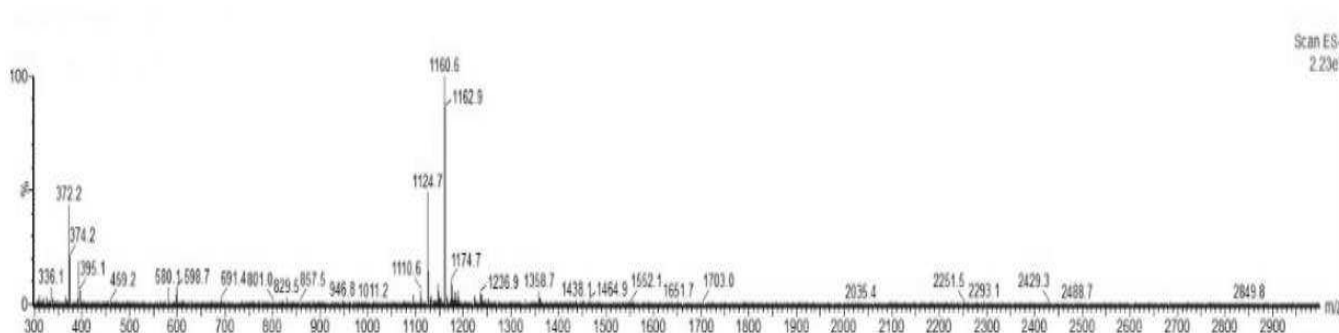


Figura 15. Espectro de masas del extracto obtenido de una alícuota del permeado en la última etapa del proceso de ultrafiltración

En el espectro de masas ESI- del extracto, se observa el ion de interés que corresponde al compuesto de 1124 Da, también se observa otros compuestos de 1110 Da y 1174 Da, este último podría ser un aducto.

4. Obtención de la CMC del producto concentrado

Se evaluó la CMC de una muestra del concentrado, este valor se calculó a partir del punto de inflexión de la curva obtenida al graficar los valores y frente a los de concentración de retenido (mg/ml). La curva de CMC se muestra en la figura 15.

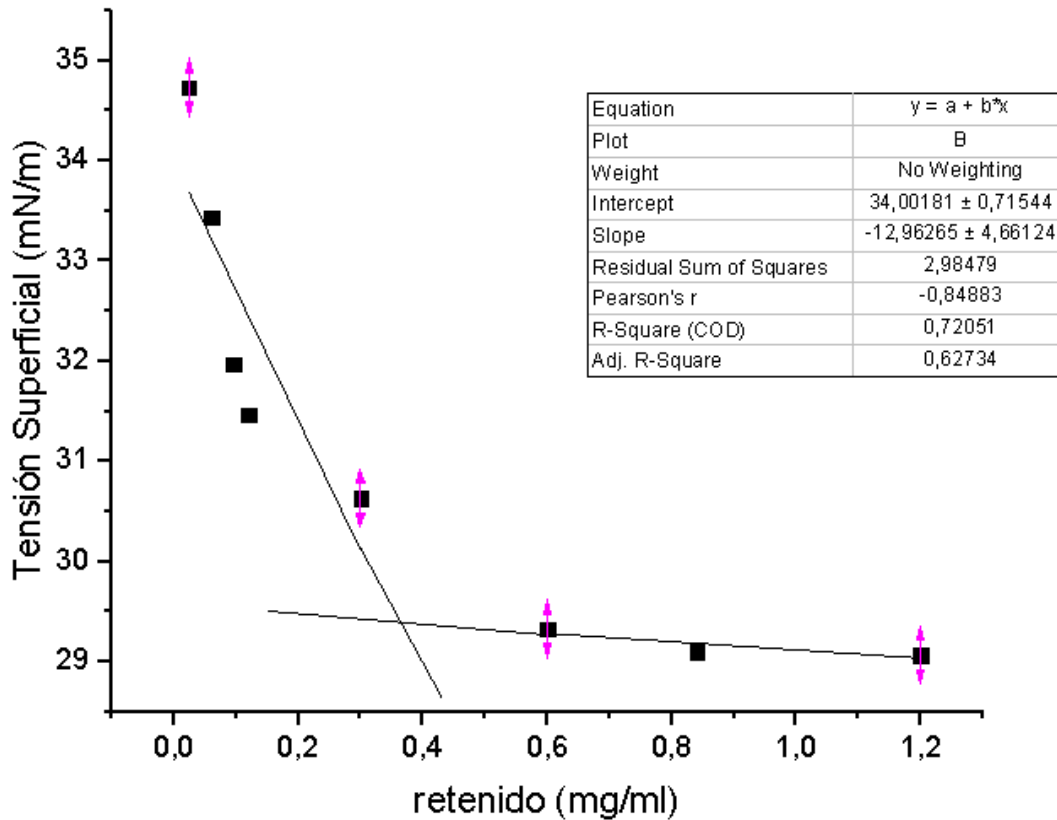


Figura 15. Efecto de la concentración del retenido sobre la tensión superficial. La CMC se calculó de la intersección de las líneas de regresión

Tabla 4. Valores medidos de γ del retenido

Concentración (mg/ml)	Tensión Superficial (mN/m)
0,02	$34,7 \pm 0,3$
0,06	$33,4 \pm 0,3$
0,09	$32,0 \pm 0,1$
0,12	$31,5 \pm 0,1$
0,3	$30,6 \pm 0,2$
0,6	$29,5 \pm 0,2$
0,84	$29,1 \pm 0$
1,2	$29,1 \pm 0,1$

Se obtuvo un valor de CMC del BSm total de 0,38 mg/ml, el cual mostró un valor γ de 29,6 mN/m. Se encontró un valor de 28,0 mN/m para la solución madre (γ_{H_2O} 73,0 mN/m a 25 °C). El rango de CMC de los BSm es muy amplio y se encuentra entre 0,001 y 0,200 mg/ml, teniendo en cuenta que los valores obtenidos para el retenido provienen del

estudio de una muestra no purificada, parecerían ser muy alentadores. Los valores obtenidos a partir de las mediciones de γ pueden variar de los registrados en el punto 1.2 para el retenido sin liofilizar por cuestiones de equipamiento.

CONCLUSIONES

Se concluye a partir de los resultados obtenidos que se logró producir BSm con la cepa del género *Pseudomonas* utilizada en las condiciones experimentales propuestas. Se obtuvieron valores muy bajos de γ en los sobrenadantes de cultivo diluidos y valores aún más superadores en la muestra concentrada (26,4 mN//m). Las etapas de procesamiento utilizadas permitieron reducir el volumen de sobrenadante de cultivo y obtener una muestra sólida.

Dado los resultados de los estudios de MS es posible que la cepa utilizada produzca BSm del tipo RLs, pero también una variedad de otra familia de BSms, los cuales poseen pesos moleculares de alrededor de 1000 y 1200 Da. Cabe destacar los valores de γ logrados superan a los reportados para RLs en sobrenadante de cultivo, lo que amerita su estudio. Se cuantifico el principio activo por una técnica que permitió aislar el BSm total a partir del producto concentrado. El análisis de la fracción del permeado demostró que en el proceso de ultrafiltración se pierde parte del principio activo, esto último debería ser analizado con más profundidad

CAPÍTULO II

Aislamiento, purificación e identificación de los
biosurfactantes producido por *Pseudomonas*

INTRODUCCIÓN

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* producen dos grandes familias de BSm, glicolípidos y LPCs. Se ha informado que *Pseudomonas aeruginosa* en condiciones apropiadas produce principalmente dos tipos de RLs llamados monoramnolípidos, y diramnolípidos. Los RLs producidos por *Pseudomonas aeruginosa* han sido ampliamente estudiados y generalmente se encuentran como una mezcla de las especies homólogas RL₁ (Rha₂C₁₀C₁₀), RL₂ (RhaC₁₀C₁₀), RL₃ (Rha₂C₁₀) y RL₄ (RhaC₁₀) donde la abreviatura Rha proviene de *rhamnosa*. Se identificaron hasta 28 congéneres de RLs diferentes que difieren en la composición de la cadena de ácido graso (C8, C10, C12), que muestran formas incluso insaturadas. Sin embargo, estas variantes siempre se encuentran como componentes menores de las mezclas de RLs [110]. Los LPCs son moléculas de estructuras muy diversas y por lo tanto de pesos moleculares muy variable. Se sintetizan mediante complejos de proteínas macromoleculares conocidos SPNR. La organización modular de estos complejos y la posibilidad de reorganización dentro de los *clusters* genéticos de SPNR permite la producción de una gran variedad de LPC, que varían en el tipo y número de aminoácidos como en la longitud del ácido graso. Se ha descrito en la sección introducción la naturaleza química de los LPCs producidos por *Pseudomonas* spp. y su clasificación en grupos según su estructura en la sección introductoria. La información sobre la estructura y las diferentes variantes que pueden presentarse es muy importante para lograr determinar el compuesto con mayor exactitud. Es necesario para identificar la familia de los BSM producidos por el microorganismo disponer de muestras puras, ya que se trabajan con análisis que son muy sensibles a impurezas como es el análisis por RMN y MS y más aún cuando se requiere dilucidar la estructura final de estos compuestos. Para obtener muestras puras a partir del caldo de cultivo, se requieren técnicas eficaces de aislamiento [111]. En los últimos años se han reportado métodos convencionales y no convencionales para la recuperación de BSM [112],[113]. Generalmente una sola técnica de procesamiento a menudo no es suficiente para la recuperación y purificación. En estos casos, es más eficaz una estrategia de recuperación que utilice una secuencia de etapas de concentración y purificación. Uno de los métodos más comunes es la precipitación con ácido concentrado y extracción con un disolvente adecuado. El ácido neutraliza cargas negativas del BSM, disminuyendo la su solubilidad en la fase acuosa [114]. Otro método es el de adsorción/desorción en resinas, el método de extracción en fase sólida es muy utilizado en el proceso de purificación, ya

que permite obtener en un solo paso altos niveles de pureza [115]. La técnica de extracción en fase sólida se utiliza con el objetivo de aumentar la concentración del analito y reducir o eliminar la presencia de posibles agentes interferentes. Las columnas contienen una resina que según su naturaleza química el mecanismo de extracción se clasifica en intercambio iónico, fase normal o reversa. En este trabajo se utilizó una resina de Octadecil Silano (C18), la cual permite extracción por fase reversa de analitos orgánicos hidrofóbicos o polares de una matriz acuosa. Los pasos principales del procedimiento la extracción en fase sólida son la activación y el acondicionamiento del adsorbente, que es necesario para garantizar la interacción con el analito. Los adsorbentes no polares suelen ser activados por 2-3 volúmenes de columna de un solvente miscible con agua (metanol, tetrahidrofurano, 2-propanol). Para el acondicionamiento se utiliza agua. El tercer paso es la siembra de la muestra, el lavado del adsorbente y la elución.

La cristalización es un método convencional, en donde el BSm obtenido por una técnica de recuperación, se vuelve a disolver en el mínimo volumen de disolvente orgánico. La cristalización se favorece disminuyendo la temperatura, ya que se vuelve menos soluble en el disolvente [116].

OBJETIVOS

Aislar y purificar el compuesto con actividad surfactante.

Identificar a qué familia de Bsm pertenecen los analitos encontrados

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Purificación de los Bsms

1.1. Purificación por cromatografía de adsorción

El proceso de purificación se llevó a cabo en una columna de 30 cm de largo con 2 cm de diámetro interno, se le agregaron 17 g de gel de sílica gel 60 para obtener una altura de aproximadamente 10 cm. Se sembró en la columna 1 g de retenido liofilizado 45 % P/P sin tratamiento previo. Se utilizó en la cromatografía un gradiente de acetato de etilo y etanol. La purificación se monitoreó mediante Cromatografía de capa delgada (TLC), las cuales se corrieron en una mezcla de cloroformo, metanol y agua (65:15:2). Las placas de TLC se revelaron con una solución de ácido sulfúrico al 10 % V/V en etanol y se mantuvieron a 105 °C durante 5 min.

1.2. Purificación mediante extracción en fase sólida y cristalización

1.2.1. Extracción de los BSms

El BSm se aisló utilizando cartuchos de extracción en fase sólida, para ello, 300 mg de retenido liofilizado se hidrató con 30 ml de agua Milli-Q. La solución obtenida se ajustó a pH 2 y se mantuvo overnight a 4 °C para favorecer la precipitación del BSm. El precipitado obtenido se sembró en el cartucho para su extracción.

El cartucho de extracción en fase sólida (C18 *endcapped*, 6 ml/1 g; Sep-Pak) se acondicionó y equilibró con 15 ml de metanol y agua Milli-Q, respectivamente. Para eliminar la mayor cantidad de impurezas se utilizaron dos mezclas de acetonitrilo (ACN) y agua, al 40 % y al 60 % V/V de ACN. La elución del compuesto de interés se logró con una solución de metanol en agua al 90 % V/V. El disolvente del eluato se evaporó en evaporador rotatorio.

Se confirmó la presencia de los compuestos de interés por MS (ESI) en ambos modos positivo y negativo. El extracto se disolvió en metanol y se filtró con un filtro PVDF de 0,22 µm.

1.2.2. Purificación por Cristalización

La etapa de purificación se llevó a cabo mediante cristalización. El extracto obtenido de las columnas de C18 se extrajo con tres volúmenes de 20 ml de etanol. La extracción se realizó en tubos falcon centrifugados a 1993 xg durante 5 min, para dicho propósito se utilizó una centrifuga TDL+4 (Arcano). Se colectaron las fases etanólicas y se redujo su volumen en el evaporador rotatorio. Para favorecer la cristalización se añadieron unas gotas de agua y se mantuvo en la heladera a 4 °C durante 24 h. Una vez cumplido el tiempo, el sobrenadante de los cristales se separó y los cristales se lavaron con dos volúmenes de agua Milli-Q con una temperatura de 2°C. Se eliminó el disolvente remanente en el evaporador rotatorio.

2. Identificación de la familia de los BSms

2.1. Análisis por Cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplado a un detector de MS (UPLC-MS)

El análisis se realizó en un Espectrómetro de masas SQD2 simple cuadrupolo (Waters) acoplado a un sistema HPLC (Waters), equipado con una columna de 2,1 mm de ancho y

5 mm de alto (ACQUITY BEH C18 1,7 μ m, Waters). Previamente se optimizaron los parámetros del espectrómetro de masas para lograr una buena ionización.

Se utilizó un gradiente de ACN y 0,1 % V/V de ácido fórmico (H-COOH) en agua, el cual se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 5. Gradiente utilizado en el análisis de BSm por UPLC-MS

Tiempo (min)	% ACN	% AGUA (0,1 % V/V H-COOH)
0	10	90
5	65	35
15	99	1

Se inyectó un volumen de muestra de 3 μ l, el flujo se mantuvo en 0,3 ml/min y la temperatura de la columna en 27 °C. Se adquirió en el rango de masas de 300 a 3000 Da y se utilizó ESI-. Se estableció en 2 kV y 90 V el voltaje de pulverización y el voltaje del cono respectivamente. La temperatura de desolvatación se elevó a 623 °K y la temperatura de la fuente a 423 ° K. La energía de ionización se estableció en 1 V. Se utilizó el *software* Mass Lynx (ver. 4.1) para el análisis y el procesamiento posterior.

2.2. Análisis por Espectrometría de Alta Resolución (HRMS)

Este análisis se realizó con un Espectrómetro de masas de alta resolución por tándem con Tiempo de vuelo (TOF) y fuente de ionización ESI, modelo MicrOTOFQ.II (Bruker Daltonics). Se analizó la muestra en el rango de masas de 1050 a 1300 Da. Estos estudios se llevaron a cabo en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (ICYTAC-CONICET).

2.3. Análisis por RMN

Los análisis se realizaron en un Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Multinuclear Bruker Avance de 300 Mhz. Los cristales se disolvieron en metanol deuterado (metanol-d₄) para el experimento del RMN-¹H y en dimetil sulfóxido deuterado (dimetil sulfoxido-d₆) para el experimento del RMN-¹³C. Para dichos estudios se utilizó 15 mg de muestra y 0,5 ml del disolvente deuterado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Purificación del e identificación del BSms

Se llevó a cabo dos técnicas de purificación con el objetivo de lograr identificar la familia de BSm producida mayoritariamente por la cepa utilizada. Las fracciones obtenidas con ambas técnicas fueron analizadas por MS.

En un primer lugar se realizó una cromatografía de adsorción en silica gel, esta técnica se ha utilizado para la purificación de RLs [117]. Se purificó a partir de 1 g de retenido liofilizado una fracción mayoritaria de 380 mg. La elución se logró con acetato de etilo al 50 % V/V en etanol. Se encontró para la fracción aislada una relación de frente (R_f) de 0,4 en la TLC, la cual presentó una reacción positiva al reactivo de revelado, ácido sulfúrico, generalmente este reactivo se ha utilizado para revelar azúcares. Sin embargo, esta reportado su uso para detectar compuestos de tipo LPC [118]. La fracción eluída se analizó por HRMS (ESI-), los resultados se muestran en la figura 16. En el espectro de HRMS de la fracción purificada se encontraron iones moleculares de 1094,7009 y 1182,6715 m/z, siendo el de mayor intensidad relativa el ion de 1124,7090 m/z. Este analito de mayor intensidad se observó en los espectros realizados por EM (ESI-) cuando se analizó el extracto conteniendo el BSm total obtenido por la técnica de precipitación ácida seguida de extracción con cloroformo y etanol, el cual se mencionó en el capítulo 1. Cabe destacar, que el peso molecular del ion molecular 1124,7090 varía en 14 Da del ion 1138,7225 y esto mismo se puede observar con otros iones, en el caso del ion 1152,7374 difiere en 28 Da del ion 1182,675. Esa variación en peso molecular podría tratarse de una diferencia estructural de uno o dos grupos metilenos. Con respecto al ion 1160,6879, no se puede relacionar con los otros iones encontrados, por su masa parecería ser un aducto negativo de sodio correspondiente al ion de 1138,7225 m/z, que también es común que se forme cuando se trabaja en ionización en modo negativa.

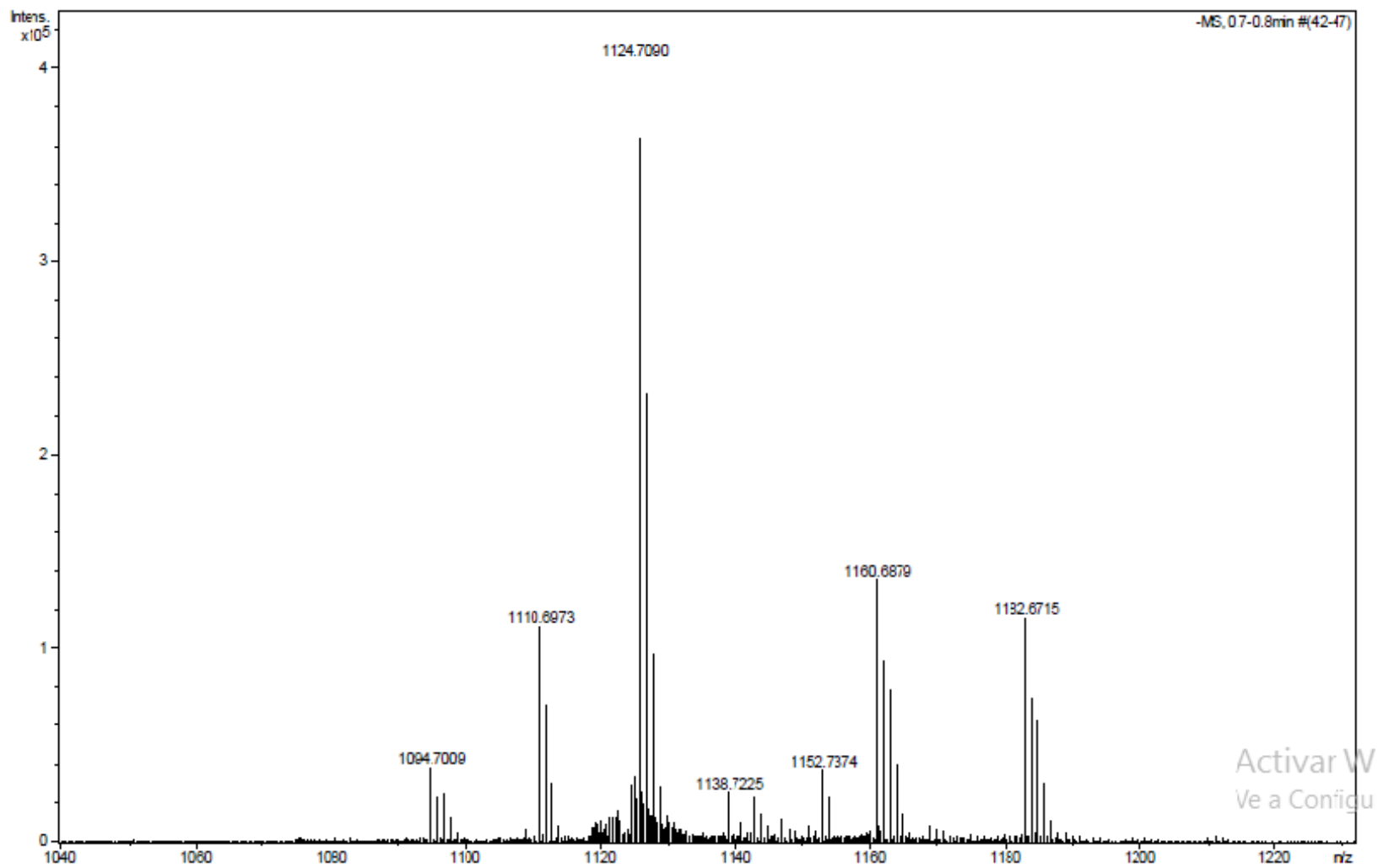


Figura 16. Experimento de HRMS de la fracción mayoritaria obtenida por Cromatografía de absorción en silica gel

Se obtuvo del software la información sobre la composición química y las posibles estructuras condensadas del ion mayoritario. Esta información indicaría que los analitos de la muestra analizada estarían constituidos por carbono, nitrógeno, hidrógeno y oxígeno, lo que no se logró determinar es la estructura condensada posible. La fracción mayoritaria aislada por cromatografía de adsorción se analizó por RMN, se llevó a cabo el experimento de RMN-¹H. El experimento no brindó mucha información, las señales estaban poco definidas, lo cual se sospecha que podría haber interferencias por la presencia de impurezas de la muestra. Es importante tener en cuenta que la purificación se realizó con una muestra del retenido liofilizado, no se hizo con una muestra tratada previamente como lo sugieren otros autores [119],[117].

El otro método de purificación que se llevó a cabo fue la extracción por cartuchos de C18, la cual se realizó a partir de un precipitado obtenido al acidificar 300 mg de liofilizado reconstituido (Imagen 2). Como resultado se obtuvo 110 mg de sólido de color blanco (Imagen 3a). Por EM (ESI +) y (ESI-) se confirmó la presencia de compuestos en un rango de masas de 1100 a 1200 Da, la cual se muestra en la figura 17. En el espectro de masas ESI+ se observan iones de menor peso molecular tal es el caso del ion 589,3 el cual podría provenir de la doble ionización del ion 1177,8. El ion 1177,8 m/z corresponde al aducto de sodio del ion de 1154 m/z. Estos resultados concuerdan con lo observados en los HRMS.

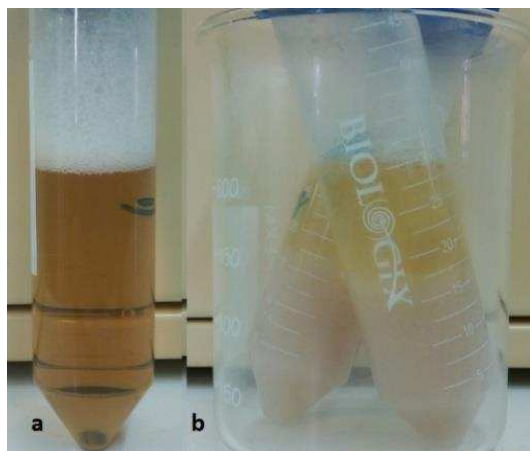


Imagen 2. (a) Retenido liofilizado reconstituido. (b) Precipitado obtenido de la acidificación del retenido reconstituido.

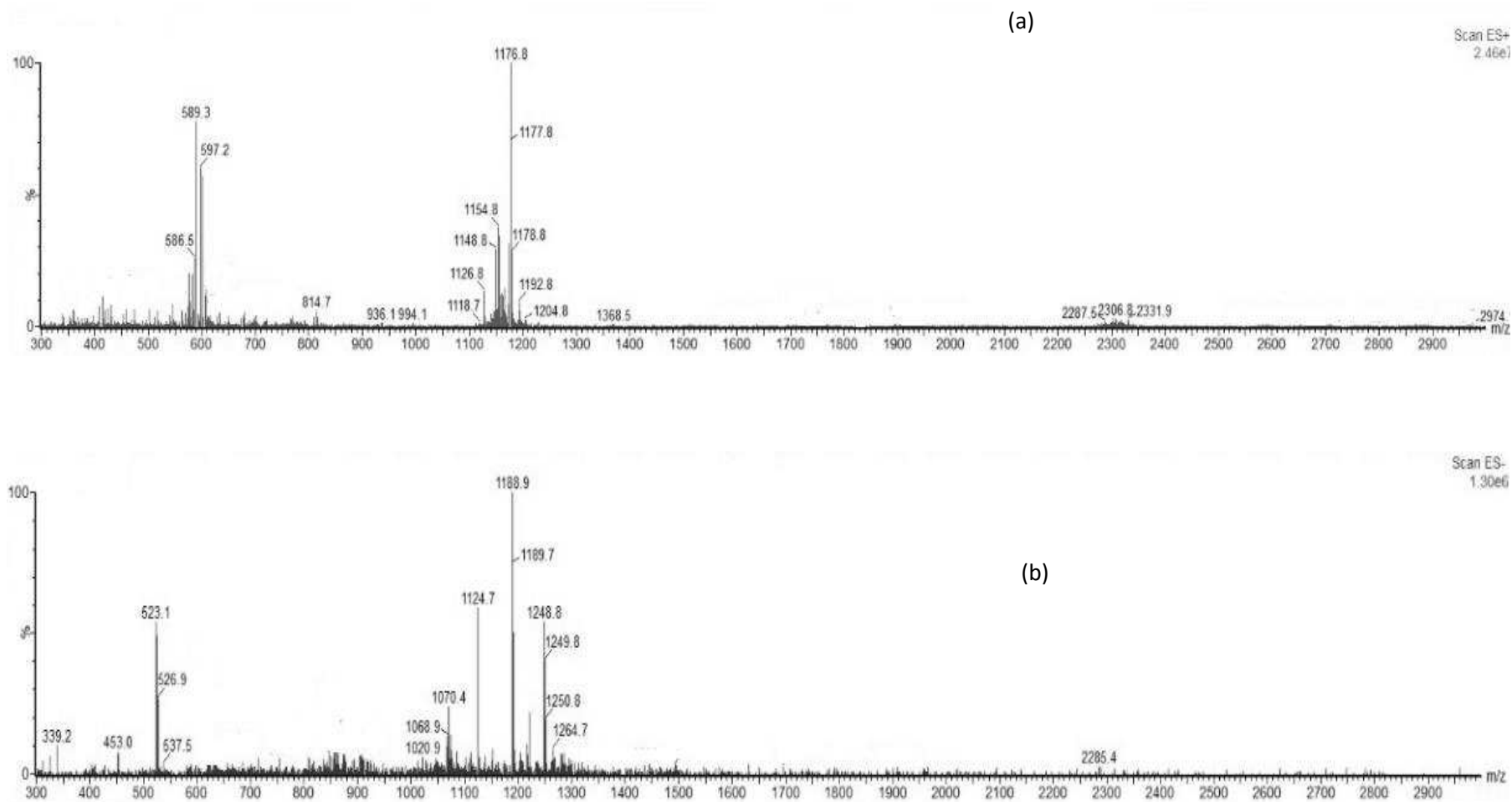


Figura 17. Se muestran los espectros en ESI+ (a) y ESI- (b) correspondientes a la fracción aislada por cartuchos C18. Los espectros confirman la presencia de una familia de iones con pesos moleculares muy similares (1100 a 1200 Da).

La segunda etapa de purificación consistió en un proceso de cristalización con etanol y agua a 4 °C de temperatura para favorecer la formación de cristales. En la etapa de cristalización se obtuvieron 85 mg de cristales (Imagen 3). El sobrenadante de los cristales resultó ser de color amarillo y posiblemente haya contenido las impurezas y restos de cristales que se perdieron, cabe aclarar que esta fracción no fue estudiada.

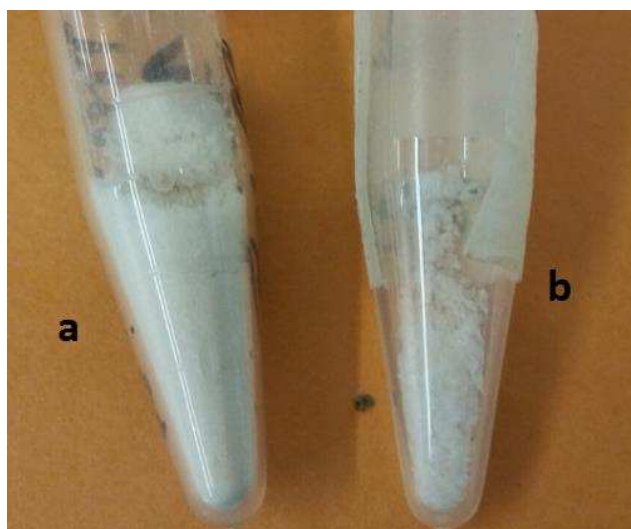


Imagen 3. (a) Sólido obtenido de la extracción por Cartuchos C18 y (b) cristales del BSm obtenidos luego de la etapa de cristalización.

Los cristales se analizaron por UPLC-MS para confirmar los iones obtenidos en los espectros. La elución de los analitos de interés comenzó con 70 % V/V de ACN en agua y finalizó con 75 % V/V de ACN en agua. El cromatograma se muestra en la figura 18, con el cual se confirmó la presencia de los analitos encontrados en los espectros, el ion de 1124 m/z se corresponde con el de mayor intensidad relativa.

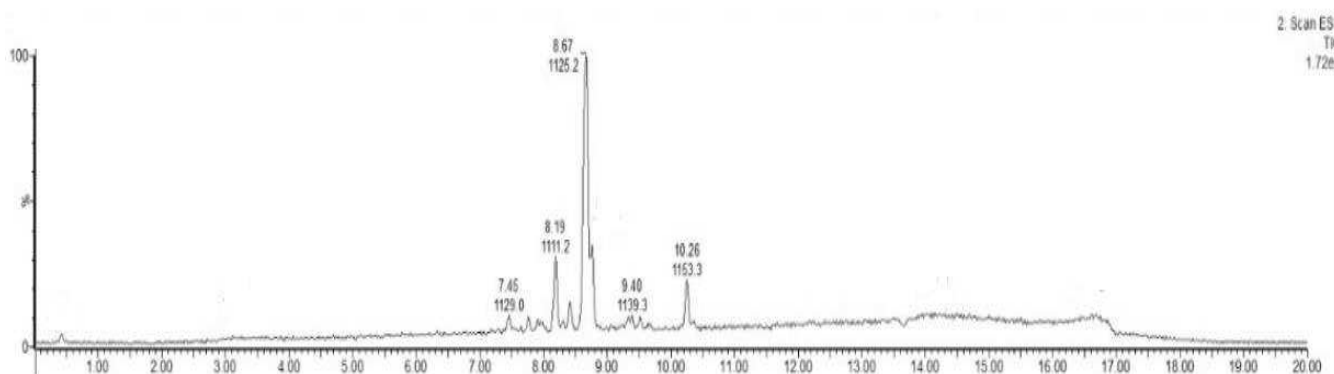


Figura 18. Cromatograma de masas (ESI+) de los cristales obtenidos en el proceso de purificación

Se realizó un análisis de RMN de los cristales obtenidos en búsqueda de identificar los grupos funcionales que no lograron identificarse con la muestra purificada por cromatografía de adsorción.

La muestra se disolvió en metanol-d4 y los resultados del experimento de RMN-¹H se muestran en la figura 18. Dado que se obtuvo señales más definidas se realizó el experimento de RMN-¹³C, el cual se presenta en la figura 19.

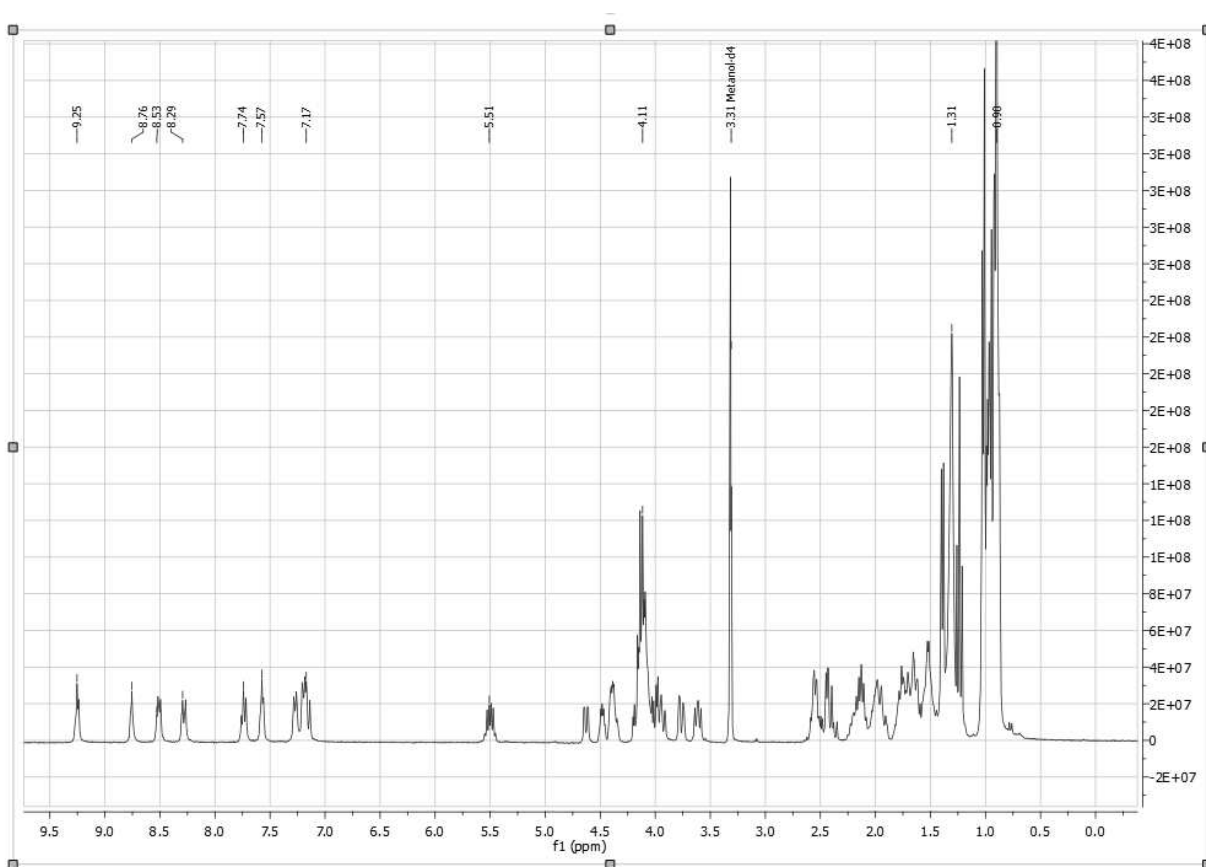


Figura 18. Experimento RMN-¹H de los cristales

Se analizó el experimento de RMN-¹H de los cristales, se observó claramente en el espectro la existencia de grupos amidas cuyos protones se ubican en la región de 7 a 9,5 ppm y protones de grupos metilos provenientes de las colas hidrocarbonadas de los ácidos grasos en la región cercana a 1 ppm.

El experimento de RMN-¹³C se realizó en dimetil sulfóxido-d6 debido a que en metanol la cantidad de muestra requerida no era totalmente soluble en el volumen de metanol

utilizado para el experimento. Para realizar el experimento de ^{13}C se requiere más horas de adquisición y mayor cantidad de muestra.

El experimento de RMN- ^{13}C confirmó la presencia de grupos carbonilos provenientes de aminoácidos ubicados en la región de 169 a 175 ppm y los carbonilos de las colas hidrofóbicas del BSm en la región de 10 a 15 ppm. No se encontraron señales provenientes de azúcares las cuales deberían observarse en 90 y 100 ppm en el espectro del ^{13}C . Esta información junto con la de los pesos moleculares demostraría que la fracción mayoritaria no esté constituida de compuestos del tipo RL, ya que como se indicó anteriormente los pesos moleculares son mucho más bajo (300 y 900 Da) que los observados en el espectro de masas. Sin embargo, es posible que los produzca en menor cantidad, en los espectros de la muestra BSm total se encontraron masas que podrían correlacionarse con estos glicolípidos. Los resultados encontrados a través del análisis de MS y RMN de la fracción mayoritaria purificada por cromatografía de adsorción y los cristales, indicarían que el BSm podría formar parte de la familia de los LPC. Las señales de RMN en las regiones encontradas también fueron reportadas por otros autores para la identificación y caracterización de LPC. La señal encontrada a 5,5 ppm es característica de la Thr [40].

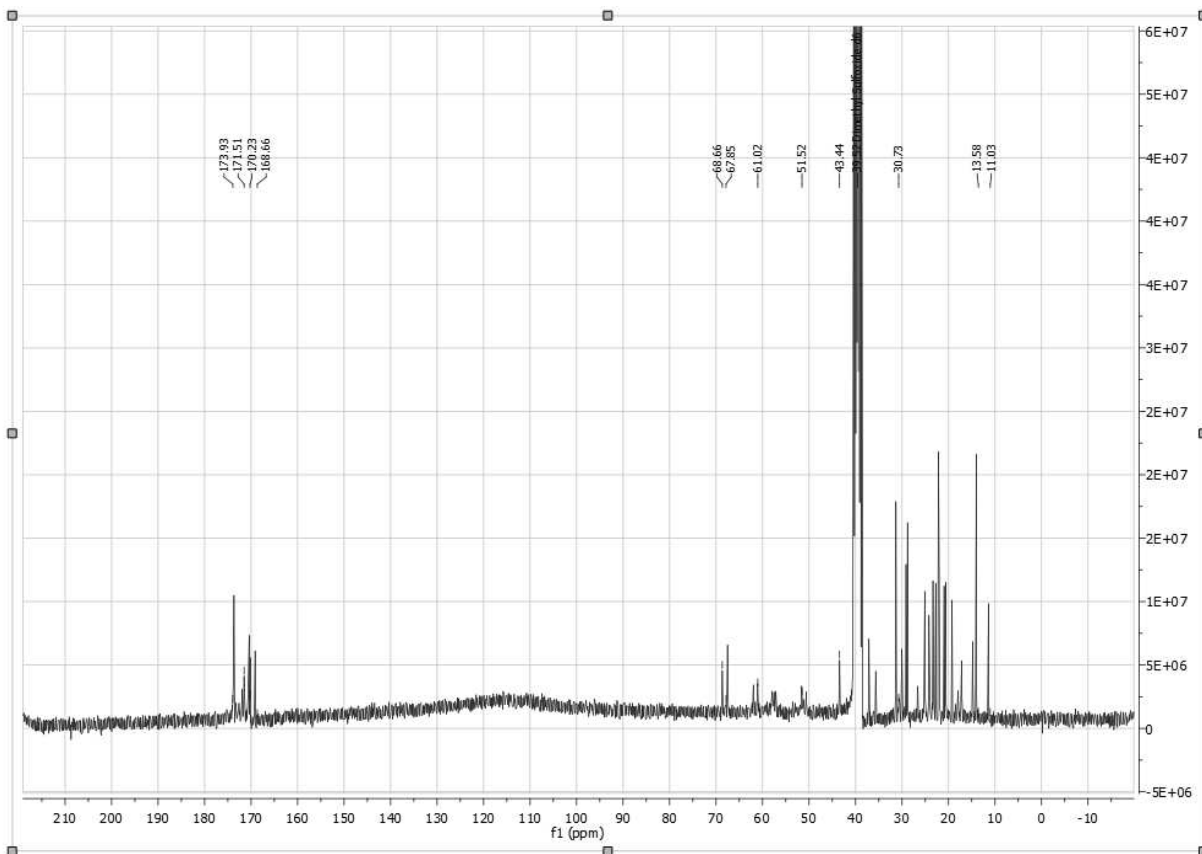


Figura 19. Experimento RMN- ^{13}C de los cristales

Pseudomonas produce LPC de estructuras muy diversas, los cuales fueron diferenciados en distintos grupos según las características en común y la especie que lo produce. Uno de los grupos conocidos de LPC es el grupo Viscosina, los LPC de este grupo están formados por 9 aminoácidos y un ácido graso hidroxilado que varía en 10 a 14 átomos de carbono [31]. Por su peso molecular los compuestos que se encontraron en los cromatogramas y espectros de masas podrían formar parte de este grupo. Viscosina y WLIP (White line induce principle) son dos LPC que forman parte del grupo Viscosina, ambos poseen 9 aminoácidos, un ácido graso hidroxilado de 10 átomos de carbono y un peso molecular de 1124 Da, solo se diferencian en la estereoquímica de un aminoácido [120],[121]. De la misma forma hay LPC en el mismo grupo que solo varían en un aminoácido, es por ello que para lograr caracterizar estos compuestos se requiere del uso de diferentes técnicas que permitan obtener información certera y precisa sobre el tipo de aminoácido, su estereoquímica y la longitud del ácido graso presente. En el capítulo siguiente se desarrollarán las técnicas necesarias para dilucidar la estructura de los LPC.

Con respecto a los métodos de purificación analizados en este capítulo, el método de extracción en cartuchos C18 está reportado como método en una sola etapa para la purificación de LPC, indicaron que se obtiene un producto de alta pureza y en algunos trabajos científicos lo han utilizado para realizar estudios de caracterización de los mismos [43]. Sin embargo, uno de los métodos de purificación de LPC más informados es HPLC semi-preparativo o preparativo, con esta técnica se obtiene compuestos de alta pureza, este método, así como el de los cartuchos C18 son utilizados a nivel industrial y en algunos casos los disolventes pueden ser recuperados [34]. Por otro lado, Layncock y colaboradores reportaron un método de cristalización partiendo del sobrenadante del cultivo [40]. Dicha técnica ha sido llevada a cabo, pero no se encontraron resultados satisfactorios. La técnica de cristalización que se desarrolló es una modificación de la técnica de Layncock, en la cual se partió de una muestra pre-tratada. Los cristales obtenidos luego del aislamiento con los cartuchos de extracción en fase sólida, seguida de la etapa de cristalización, se utilizaron para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo.

CONCLUSIONES

Se logró encontrar una técnica de purificación de LPC en dos etapas: extracción con cartuchos de extracción en fase sólida (C18), seguida de una técnica de cristalización, las cuales permitieron obtener una muestra con alto grado de pureza. Los cristales se analizaron por RMN encontrando grupos funcionales que indicarían que los analitos se tratan de surfactantes de la familia de LPC. Por los espectros de masas encontrados es posible que estos LPCs formen parte del grupo Viscosina, sin embargo, es necesario realizar otros análisis complementarios para determinarlo. Los cristales de los LPCs se utilizarán para caracterizar los compuestos, cuantificarlos y analizar sus propiedades fisicoquímicas y de control biológico.

CAPÍTULO III

Caracterización estructural de los compuestos

identificados

INTRODUCCIÓN

Los LPC del grupo Viscosina están formados por 9 aminoácidos y un ácido graso que varía entre 10 y 12 átomos de carbono. Es uno de los grupos de LPC producidos por *Pseudomonas* más estudiados. El interés en el estudio de estos compuestos radica en sus propiedades surfactantes y antimicrobianas. Se han reportado subdivisiones dentro de este grupo dadas por las pequeñas diferencias en su estructura. Dentro de este grupo existen tres tipos de variaciones estructurales: 1) diferencias en las características estructurales hidrofóbicas, 2) la presencia de un residuo Gln2 o Glu2, y 3) la estereoquímica L o D de la Leu, dicha clasificación fue descrita en el apartado 4.2.2 de la introducción. WLIP (*White line inducing principle*) es un miembro del grupo Viscosina. A las cepas del género *Pseudomonas* productoras de WLIP se los ha clasificado taxonómicamente de forma inválida como *Pseudomonas reactans*, basado en la capacidad de revelar la presencia cercana de *Pseudomonas tolassi*, productora de un LPC denominado tolasin mediante la prueba de la línea blanca en agar (*White-line-in-agar assay*) [120],[122]. Al enfrentarse ambas cepas en un medio agarizado y condiciones adecuadas, la interacción de WLIP y tolasin induce la formación de un precipitado blanco, por ello su denominación "*White line inducing principle*". Esta propiedad la han encontrado como herramienta de diagnóstico para identificar bacterias productoras de tolasin patógenas de hongos [123] [124]. WLIP es miembro del grupo Viscosina ubicado dentro del subgrupo D por contener una D-Leu y dentro del subgrupo E por presentar en su estructura Glu (ver tabla 2). Se ha informado que la D-Leu jugaría un papel importante en la interacción con tolasin, ya que no se observó la misma reacción entre Viscosina y tolasin.

Por otro lado, pseudodesmina A y viscosinamida ambos pertenecientes al grupo Viscosina se diferencia de WLIP en contener Gln en vez de Glu. Estas diferencias, así como también, la estereoquímica de un aminoácido o la diferencia de un solo aminoácido en toda la estructura, justifican la utilización de diferentes técnicas de caracterización que permitan determinar con certeza la estructura de los LPCs. Una de las técnicas reportadas para la identificación de los aminoácidos que forman la región peptídica es MS-MS, para lo cual se utilizan equipo que contienen más de un analizador o cuadrupolos e ionización suave como ESI [43]. Otros equipos utilizan Ionización/desorción láser asistida por una matriz (MALDI) con un analizador Tiempo de vuelo (TOF). Estas técnicas permiten obtener información estructural acerca de un compuesto a través de la formación

de fragmentos específicos y es útil para determinar compuestos en mezclas complejas de acuerdo con su patrón de fragmentación. La técnica de MALDI-TOF no es muy utilizada para la identificación de LPC probablemente porque está destinada al análisis de compuestos de mayor peso molecular. Por otro lado, la cromatografía de gases (GC) acoplado a un detector masas utiliza una ionización más fuerte denominada impacto electrónico (EI), la cual permite la caracterización de compuestos volátiles a partir del estudio de los fragmentos, dicho estudio se ha utilizado en una gran cantidad de trabajos para determinar la longitud de los ácidos grasos de diferentes BSms [125] Los estudios de RMN en una y dos dimensiones (1D y 2D) es una de las herramientas más utilizadas para la identificación y la caracterización completa de LPC [126]. Otra técnica reportada para la identificación de los aminoácidos y su estereoquímica es la técnica de Marfey [127]. Es un método que permite diferenciar entre L y D aminoácido, la cual consiste en derivatizar los aminoácidos con, 1-fluoro-2,4-dinitrofenil-5 alaninaamida para formar derivados *N-arilo* diastereoméricos (Figura 20). Los aminoácidos derivatizados se separan por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando fases estacionarias ordinarias no quirales y se detectan a 340 nm. Los L-diestereómeros son usualmente eluidos antes de los isómeros D, y las cadenas laterales ionizables disminuyen la retención, mientras que las cadenas laterales hidrófobas la aumentan [128],[129].

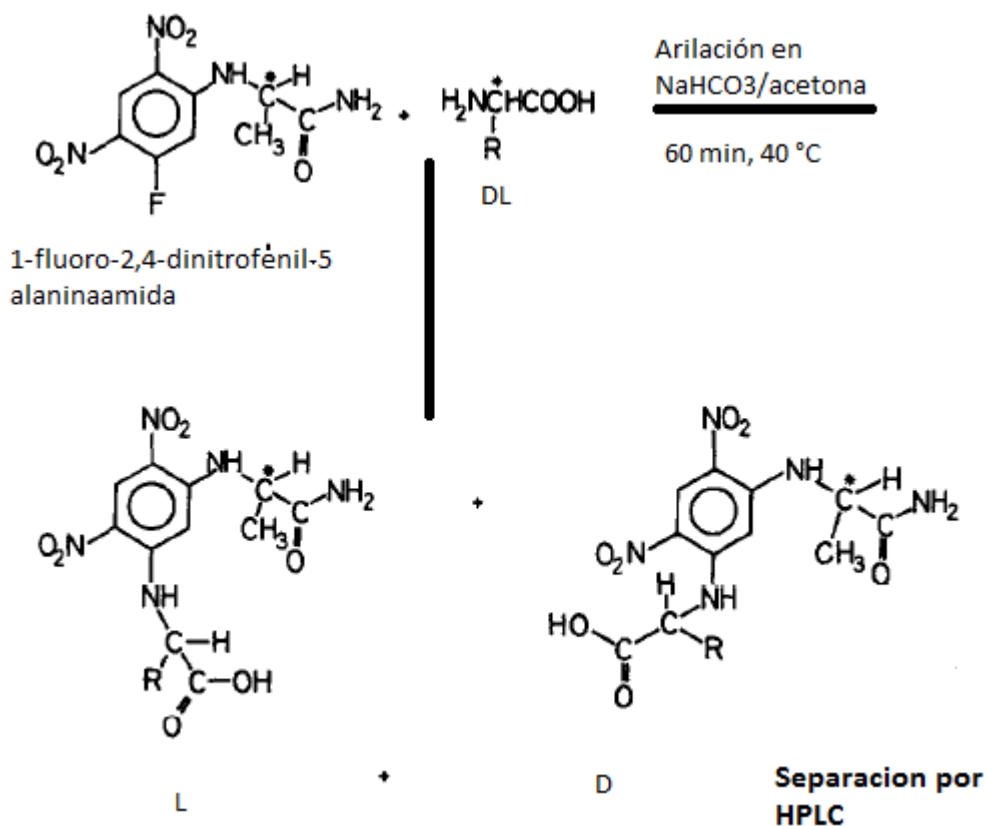


Figura 20. Derivatización de D/L aminoácidos con el reactivo de Marfey (1-fluoro-2,4,- dinitrofenil 5 alaninaamida (Figura modificada de Szokan y col.,1988).

La cristalografía de rayos x es una técnica muy potente para resolver estructuras moleculares. Esta técnica proporciona una imagen tridimensional, a escala atómica del material cristalizado. Se requieren cristales, ya que la difracción procedente de una sola molécula es demasiado débil para que pueda medirse. Un cristal es un sólido con estructura interna ordenada de los elementos que lo componen. Todas sus moléculas muestran idéntica orientación en las tres dimensiones del espacio de manera que, al sumarse la contribución de todas ellas, actúa como amplificador de la señal. El grado de orden interno en el cristal determina el máximo ángulo de difracción de los rayos X y por tanto la máxima resolución que la difracción alcanza. De este estudio se obtiene información de distancias y ángulos de enlace, empaquetamiento cristalino etc. Los ángulos de torsión Φ (Phi) Ψ (Psi) se calculan para construir el diagrama de Ramachandram, en el que se representa Ψ frente Φ . Permite determinar cuántos residuos se encuentran formando parte de un elemento de estructura determinada. Dicha información se ha utilizado para modelar la estructura secundaria de los LPC que han sido caracterizados en esta tesis [45].

OBJETIVOS

Analizar los analitos por EM en tandem

Analizar los analitos por RMN (1D y 2D).

Estudiar la naturaleza química de los ácidos grasos GC-MS.

Analizar la estereoquímica de los aminoácidos por la técnica de Marfey.

Determinar la estructura cristalina utilizando Cristalografía de Rayos x.

Modelar la estructura secundaria del péptido para determinar la conformación del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Análisis de los cristales por EM en tándem

1.1. Análisis por MALDI-TOF-TOF

Los estudios de fragmentación se llevaron a cabo en un EM MALDI TOF TOF 4800 plus (ABSMciex). Modo reflector MS-MS. La muestra se disolvió en metanol. Para la siembra en MALDI se tomaron 0,5 μ l y se mezclaron con 0,5 μ l de matriz α -cianohidroxinámica (CHCA). Se estudió un rango de masas de 1000-3000 Da, en el modo de ionización positiva. Se analizó la fragmentación del ion principal.

1.2. Análisis por MS² (ESI)

Se realizaron estudios de fragmentación en un Espectrómetro de masas triple cuadrupolo VARIAN 1200L. Los espectros se registraron en ambos modos de ionización positivo y negativo. La fragmentación se realizó sobre el ion principal. Para dicho estudio los cristales se disolvieron en metanol. Estos análisis se realizaron en Domínguez Lab (Paraná, Entre Ríos) en conjunto con Lic. Matias Baldo.

2. Estudios de RMN

Las mediciones de RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance II que funciona a frecuencias ¹H y ¹³C de 500,13 y 125,76 MHz, respectivamente, y equipado con una sonda ¹H, ¹³C, ¹⁹F TXO Z. Se utilizó el tetrametilsilano (TMS) como disolvente de referencia. Los espectros registrados en ambas muestras incluyeron RMN-¹H, RMN-¹³C, RMN-COSY¹H-¹H, RMN -TOCSY ¹H-¹H con un bloqueo de spin MLEV de 90ms, RMN-NOESY- ¹H-¹H con un tiempo de mezcla de 250 ms, RMN-gHSQC ¹H- ¹³C} y RMN-

gHMBC ^1H - $\{^{13}\text{C}\}$ con una constante de acoplamiento de largo alcance de 8 Hz. Las muestras se disolvieron en dimetilformamida-deuterada (dimetilformamida-d7).

3. Análisis de los ácidos grasos

3.1. Hidrólisis y extracción de los ácidos grasos

Para este experimento 30 mg de cristales de LPCs se hidrolizaron con 15 ml de ácido sulfúrico 6 M a 110 °C durante 48 h en un tubo sellado. El residuo de ácido graso se obtuvo extrayendo el hidrolizado con éter etílico. La extracción se realizó tres veces y la fase orgánica se lavó dos veces con agua Milli-Q para eliminar el ácido sulfúrico.

3.2. Esterificación del extracto de ácidos grasos

El extracto obtenido se esterificó añadiendo ácido sulfúrico 10 % V/V en metanol y se mantuvo a 50 °C durante 4 h. Luego de cumplido el tiempo de reacción se adicionó agua Milli-Q a la solución de éster en una proporción 3:1. El ácido graso esterificado se obtuvo extrayendo tres veces con éter etílico y se lavó dos veces con agua Milli-Q para eliminar el remanente de ácido sulfúrico.

3.3. Estudios de ácidos grasos esterificados por GC-MS

El éster metílico del ácido graso se disolvió en 1 ml de metanol, de los cuales 1 μl se aplicó en el sistema GC-MS. Se utilizó un CG CLARUS 600 (Perkin Elmer,) acoplado a un detector MS (fotomultiplicador electrónico), simple cuadrupolo con ionización EI. El GC está equipado con una columna Elite-5 de 30 m de largo, 0,25 mm de diámetro y 0,25 μm de tamaño de partícula. Se comenzó con una temperatura de horno de 80 °C que se mantuvo por 2 min, luego se alcanzó una temperatura de 280 °C a un flujo de 10 °C/min, la cual se mantuvo durante 18 min. Las masas se escanearon en un rango de 50 a 500 Da.

4. Determinación de la estereoquímica de los aminoácidos

4.1. Hidrolisis de la fracción peptídica

Para determinar la estereoquímica de los aminoácidos se utilizó la técnica de derivatización de Marfey. Los cristales (5 mg) se hidrolizaron con 4 ml de ácido clorhídrico

6 M a 120 °C y agitación exhaustiva por 48 h. Cumplido el tiempo, se evaporó en evaporador rotatorio hasta sequedad.

4.2. Derivatización de los aminoácidos

Para este análisis se utilizó como agente derivatizante el reactivo de Marfey N-(2,4-Dinitro-5-fluorofenil)-L-alaninamida (Sigma Aldrich CAS: 95713-52-3), estándares de aminoácidos (Sigma Aldrich), L-Leu (CAS: 61-90-5), D-Leu (CAS: 328-38-1), D-Thr (CAS: 72-19-5), D-Val (CAS: 640-68-6), D-Ser (CAS: 56-45-1), L-Ile (CAS: 73-32-5) y D-Glu (CAS: 6893-26-1).

Se prepararon soluciones de cada uno de los aminoácidos con una concentración 50 mM. El reactivo de Marfey se preparó al 1 % P/V en acetona y con carbonato ácido de sodio (NaHCO₃) 1 M. Para llevar a cabo la derivatización se mezcló 100 µl de la solución de agente derivatizante, 50 µl de la solución de cada aminoácido y 20 µl NaHCO₃. De la misma manera se derivatizó un pool de aminoácidos utilizando 10 µl de cada solución.

El producto de la hidrólisis se suspendió en 200 µl de agua Milli-Q, a 100 µl se le adicionó 100 µl de reactivo de Marfey y 20 µl carbonato ácido de sodio. Además, se preparó un blanco de reactivos. Todas las muestras se incubaron a 40 °C por 1 h y se llevaron a sequedad hasta obtener un sólido color amarillo.

4.3. Detección de L y D aminoácidos por HPLC-DAD

Este análisis se realizó en un HPLC acoplado a un detector de Arreglo de Diodos (Water), equipado con una columna de 4,60 mm de ancho y 150 mm de alto (JUPITER C18 5 µm, Waters).

Los residuos obtenidos luego de la derivatización con el reactivo de Marfey se disolvieron en 1 ml de agua y se inyectaron en el HPLC, los aminoácidos se detectaron a 340 nm. Se utilizó un gradiente de ACN y 0,05 % V/V de ácido trifluoroacético (TFA) en agua y un flujo de 1 ml/min.

Tabla 6. Gradiente de disolventes para la separación de aminoácidos por HPLC-DAD

Tiempo (min)	% ACN	% AGUA(0,05 % V/V TFA)
0	50	50
40	50	50
43	90	10
45	90	10

5. Cristalografía de Rayos X

Los datos de difracción de rayos X se colectaron a 190 °K, utilizando un difractómetro modelo Gemini A (Oxford Diffraction), con un detector EOS CCD. La estrategia de colección de datos (ω -scan) y de reducción de datos (integrado y escalado de intensidades) seguido de procedimientos estándares implementados en el programa CrystAlisPro1. Se colectaron 14781 reflexiones en total, de las cuales 10542 reflexiones son independientes, 8488 con $I > 2\sigma(I)$, R_{int} : 0,035. La estructura se resolvió utilizando el programa SHELXS-972 y se refinó utilizando el procedimiento de matriz completa LS con SHELXL-2014/73. Se emplearon parámetros de desplazamiento anisotrópicos para átomos distintos de hidrógeno. Todos los átomos de hidrógeno se localizaron en las posiciones estereoquímicas esperadas y se refinaron utilizando un modelo *riding*. Los átomos de hidrógeno de la molécula de agua fueron refinados restringiendo las distancias y ángulos a los valores esperados estereo-químicamente. La estructura absoluta se determinó refinando el parámetro de Flack (x) usando 2600 *quotients* $[(I^+)-(I^-)]/[(I^+)+(I^-)]$, alcanzando un valor de $x = -0,01(17)$. Para el refinamiento estructural por cuadrados mínimos se emplearon pesos de la forma $w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0,0808P)^2 + 0,8151P]$ donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$. Los valores de acuerdos finales fueron: $R[F_2 > 2\sigma(F_2)] = 0,053$, $wR(F_2) = 0,131$. El análisis y procesamiento de la estructura cristalográfica se realizó mediante el software Mercury.

1.1. Modelado Computacional

Se utilizó software Quimera para realizar el modelado computacional de la estructura cristalográfica. Se analizó la superficie total de la molécula, la conformación que adquieren los residuos, la superficie accesible al solvente (SASA) y el porcentaje que ocupa cada residuo sobre la superficie expuesta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevaron a cabo una serie de diferentes estudios en búsqueda de dilucidar la estructura de la familia de LPCs producidos por la cepa utilizada, los cuales aportaron información para cada región de la molécula, la región polar y apolar de la misma, es decir permitieron determinar la naturaleza química y la estereoquímica de los aminoácidos y la longitud de la cadena del ácido graso.

1. Análisis de los cristales por Espectrometría de masas en tándem

Por estudios de MS mostrados en el capítulo 2 se cree que posiblemente esta familia de LPCs varíen solamente en la longitud del ácido graso, es decir la región polar sea idéntica porque los pesos moleculares de los analitos observados en el cromatograma varían entre sí en 14, 28 Da etc (figura 18), lo que podría corresponderse a uno o dos grupos metilenos provenientes del ácido graso. En el capítulo 2 se informó también que estos LPCs, por sus pesos moleculares, podrían pertenecer a la familia de Viscosina, para confirmar lo dicho anteriormente se realizó un estudio de MS-MS utilizando la técnica de MALDI-TOF-TOF en modo de ionización positiva. La molécula se fragmentó en búsqueda de detectar por análisis de masas los aminoácidos que lo componen. Se analizaron los iones en un rango de masas del espectro de 1000 a 3000 Da, en el que se observó el ion de mayor intensidad relativa de 1126,71 m/z y sus aductos de sodio y potasio, 1148,70 m/z y 1164,68 m/z respectivamente. En la figura 21 se muestra el espectro ampliado en el rango de 1000 a 2000 Da, a partir de 2000 Da no se observaron señales.

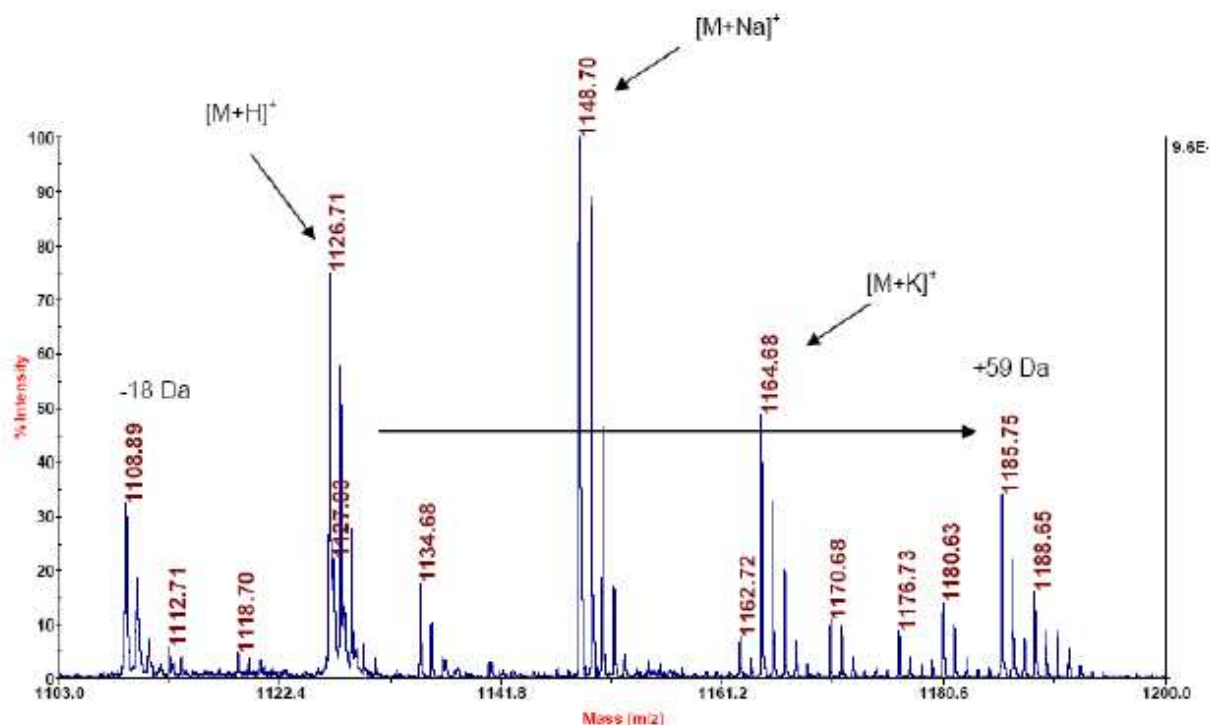


Figura 21. Espectro obtenido por la técnica de MALDI-TOF-TOF en el modo de ionización positiva, en el rango de 1000 a 2000 Da.

La fragmentación MS-MS se realizó sobre el ion de mayor intensidad relativa, ya que los otros iones, dada su baja intensidad, al fragmentarse no se logran detectar. En MALDI se

toma un intervalo del espectro para realizar la fragmentación. La fragmentación del ion 1126,71 m/z se presenta en la figura 22.

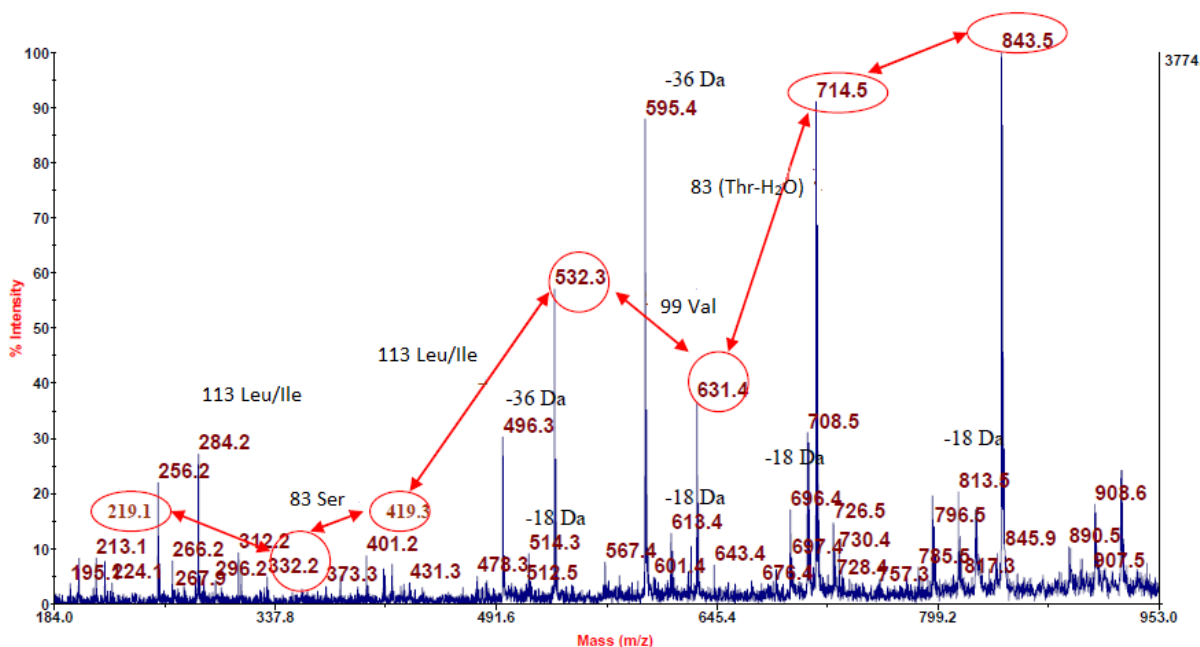


Figura 22. Fragmentación del ion 1126,71 m/z. Se muestra resaltados los iones hijos pertenecientes a la cadena peptídica del LPC. Se indican las diferencias de masas entre los fragmentos y la identidad del residuo correspondiente. Cada fragmento posee asociadas varias señales con -18 y -36 Da por pérdida de agua.

En la introducción general se informó acerca de los diferentes grupos de LPC producidos por el género *Pseudomonas*. Dentro del grupo Viscosina se encuentran dos LPC que por EM en ESI+ muestran una masa de aproximadamente de 1126 Da al igual que el ion encontrado. Estos compuestos están formados por nueve aminoácidos ubicados en la siguiente secuencia:

Leu - Glu - Thr - Ile - Ser - Leu - Ser - Leu - Val

Una de las características de este grupo es la presencia de Thr la cual participa en la formación de la lactona en los LPCs, en el caso de Viscosina y WLIP la lactona se forma entre la Thr y la Val.

En la fragmentación del ion de mayor intensidad relativa se encontró, por diferencia de fragmentos, masas que corresponden a pesos moleculares de aminoácidos luego de la pérdida de una molécula de agua. Se identificaron Leu/Ile (113 Da), Ser (87 Da), Val (99

Da), Glu (129 Da) y Thr (83 Da), esta última está modificada por lo que se estimaría que también en esta estructura está participando en la formación del enlace lactona. La presencia de los aminoácidos encontrados en la fragmentación se confirmó mediante el análisis de los iones imonios. Los iones imonios son un tipo de fragmento de un clivaje interno del que se obtiene la cadena lateral de los aminoácidos más un grupo amino. El espectro de los iones imonios se presenta en la figura 23.

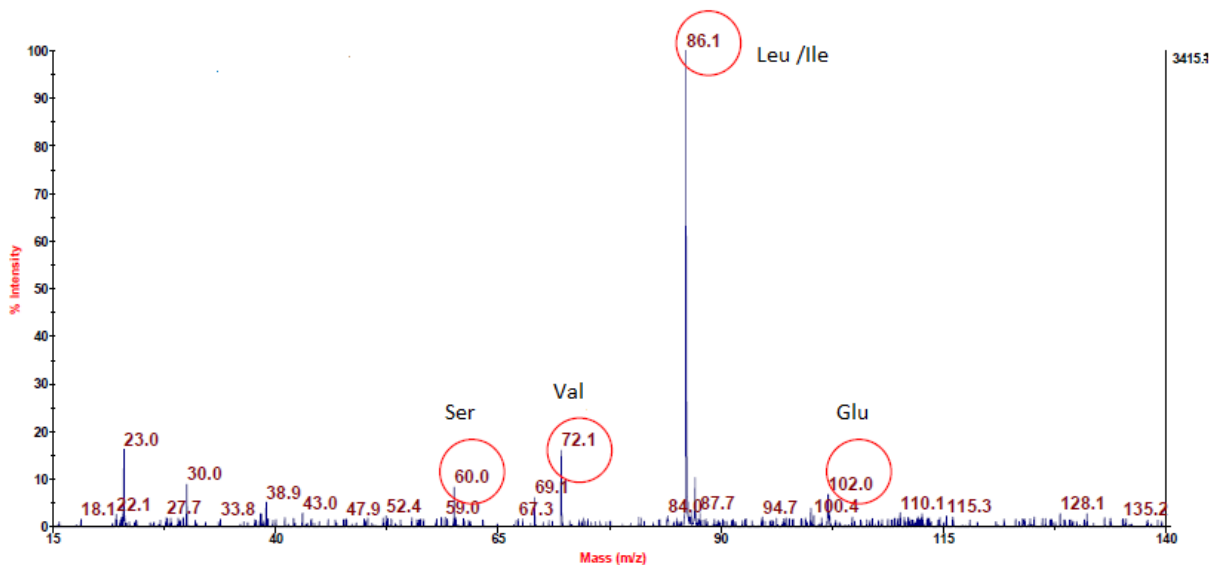


Figura 23. Espectro de masas ampliado de los iones imonios encontrados.

El ion principal también se analizó por MS² (ESI+) y se obtuvieron los mismos fragmentos que los obtenidos por la técnica de MALDI, el cual se muestra en el anexo 1. El perfil de fragmentación del ion principal de 1126,71 m/z resultó ser muy similar al encontrado por y colaboradores para WLIP de referencia. Ellos mostraron los posibles sitios de fragmentación de WLIP los cuales concuerdan por los encontrados para en ion de 1126,71 m/z [43].

Claramente por esta técnica no fue posible diferenciar entre los aminoácidos Ile y Leu, ya que son isómeros, y por lo tanto el peso molecular es el mismo y así como también no es posible determinar la estereoquímica de los aminoácidos, la cual es importante a la hora de diferenciar entre dos compuestos de un mismo grupo.

2. Análisis de la estereoquímica de los aminoácidos por la técnica de Marfey

Para determinar la estereoquímica y la presencia de Leu e Ile se llevó a cabo la técnica de Marfey. Esta técnica permite separar mediante HPLC L y D aminoácidos con columnas

convencionales (C18, no quirales). Teniendo en cuenta la información recolectada en los estudios anteriores de fragmentación y MS, se utilizaron como estándares todos los aminoácidos que posiblemente formarían parte de la región peptídica de viscosina o WLIP. Se utilizaron estándares D aminoácidos para el caso de Glu, Thr, Ser y Leu y de estereoquímica L para Leu e Ile. Se evaluó la presencia de D y L Leu, ya que como se dijo en el capítulo 2 los dos compuestos del grupo Viscosina (Viscosina y WLIP) varían solo en la estereoquímica de la Leu de la posición 5, en el caso de Viscosina poseen un L y WLIP D Leu. Los estándares se inyectaron por separados para detectar los tiempos de retención y luego se realizó un pool para comparar con los aminoácidos derivatizados provenientes de la muestra cristales, la detección se realizó a 340 nm. El perfil cromatográfico del pool de estándar se muestra en la figura 24.

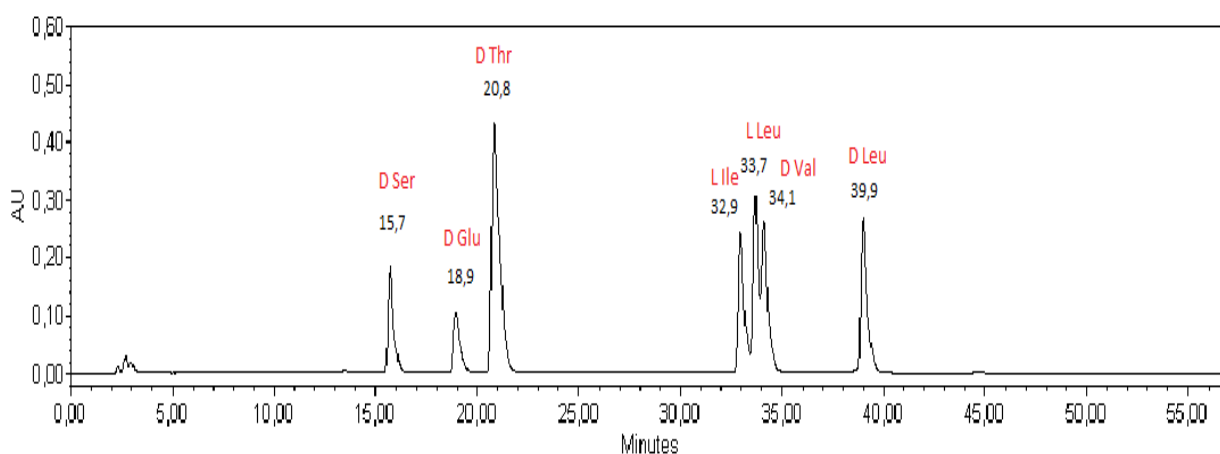


Figura 24. Perfil cromatográfico a 340 nm de los estándares de aminoácidos derivatizados con el reactivo de Marfey.

Se analizaron los aminoácidos de los LPCs por la técnica de Marfey, la cual fue sometida a hidrólisis ácidas en condiciones extremas para romper la unión peptídica, de la cual se encontró un sólido con el que se procedió de la misma forma que con los estándares. El perfil cromatográfico del hidrolizado de LPC derivatizado se muestra en la figura 25.

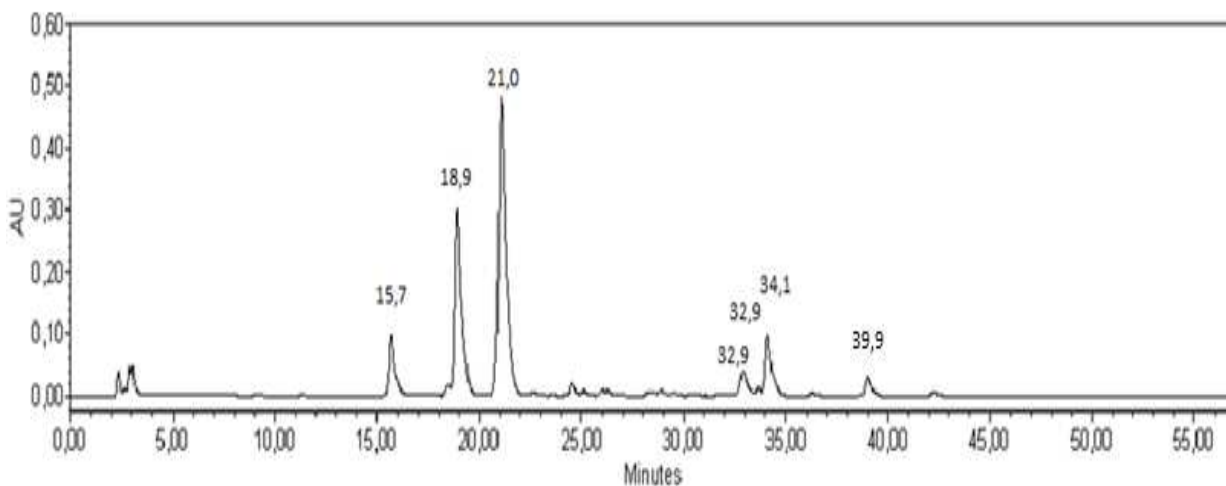


Figura 25. Perfil cromatográfico a 340 nm del hidrolizado de los cristales de LPC derivatizados con el reactivo de Marfey

Se observó en el perfil del hidrolizado de los cristales de LPC la presencia de una señal con un tr de 39,9 min, el cual corresponde a la D-Leu, por otro lado, se logró confirmar la presencia de todos los aminoácidos analizados. La técnica de Marfey se ha utilizado en numerosos trabajos de investigación para la caracterización de LPCs como Surfactina producido por bacterias del género *Bacillus* y pseudoesmina A producido por bacterias de género *Pseudomonas* [127][130]. Pseudoesmina A se diferencia de WLIP que contienen Gln en vez de Glu.

Los estudios de fragmentación MS² y la detección de aminoácidos por Marfey permitió acercarse al compuesto ya reportado nombrado anteriormente denominado WLIP. Se ha reportado que la especie bacteriana utilizada en la producción de BSm es capaz de producir WLIP y otros LPC de estructuras y pesos moleculares muy variables, entre ellos se encuentra xantolisina un compuesto que contiene catorce aminoácidos y un peso molecular de aproximadamente 1600 Da y no contiene Thr [60] ; Putisolvina es un grupo de LPC en el que forman parte putisolvina 1 y 2, estos LPCs están formados por 12 aminoácidos, su peso molecular se encuentra alrededor de 1350 Da y tampoco contiene Thr [131].

Lo mencionado anteriormente, la producción de WLIP por la cepa utilizada en este trabajo, se confirmó mediante otras técnicas de caracterización como RMN y cristalografía de rayos X.

3. Estudios de los cristales por RMN

Los estudios de RMN se realizaron en conjunto con Dr. Niels Geudens, quien forma parte de la Unidad de Análisis de Estructura y RMN de la Universidad de Gante (Bélgica). Niels Geudens trabajó en la producción y caracterización de viscosinamida y sus variantes. Viscosinamida es un LPC que forma parte del grupo Viscosina y de estructura muy similar al compuesto Viscosina, ya que solo se diferencia en un aminoácido, viscosinamida contiene Gln en vez de Glu (ver tabla 1, sección Introducción) [132]. Su grupo desarrollo la síntesis química de WLIP, esto nos permitió comparar las señales del RMN de LPC producido por la cepa utilizada con las señales de WLIP sintetizado químicamente. Se requirió realizar los estudios en colaboración, ya que este grupo cuentan con equipos de RMN que poseen mayor resolución y sensibilidad. Para este estudio los cristales se disolvieron en dimetilformamida-d6, ya que Geudens y colaboradores reportaron que el DMSO desnaturaliza efectivamente los LPCs debido a su alta capacidad de formación de enlaces de hidrógeno.

Para confirmar la producción de WLIP se realizaron varios experimentos de RMN, en primer lugar, RMN-¹H, RMN-¹³C y HSQC. Este último fue comparado con el HSQC del WLIP de referencia [126]. En la figura 26 y 27 se muestran los resultados de los experimentos de RMN-¹H y RMN-¹³C. En ambos experimentos se puede observar una región amida, la región alfa y la región alifática. En RMN-¹H se logran distinguir 9 señales correspondientes a protones de amidas, lo que indicaría la presencia de nueve aminoácidos. Los corrimientos químicos para el RMN-¹³C y RMN-¹H se muestran en el anexo 3. El HSQC comparativo donde se muestran las señales de los cristales de LPC purificados y de un WLIP referente (sintetizado químicamente) se presenta en la figura 28

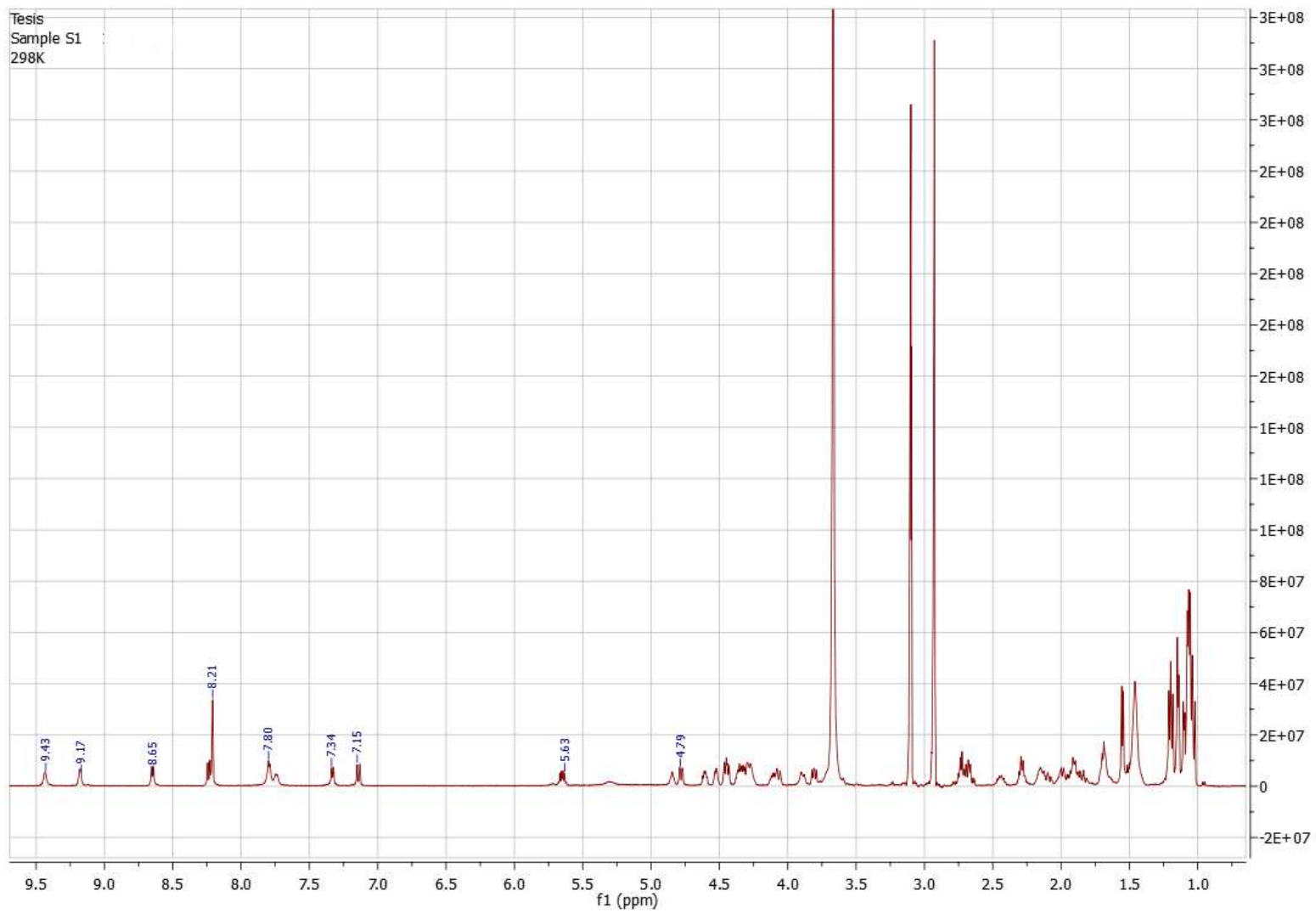


Figura 26. Experimento del RMN- ^1H de los cristales obtenidos en la etapa de purificación

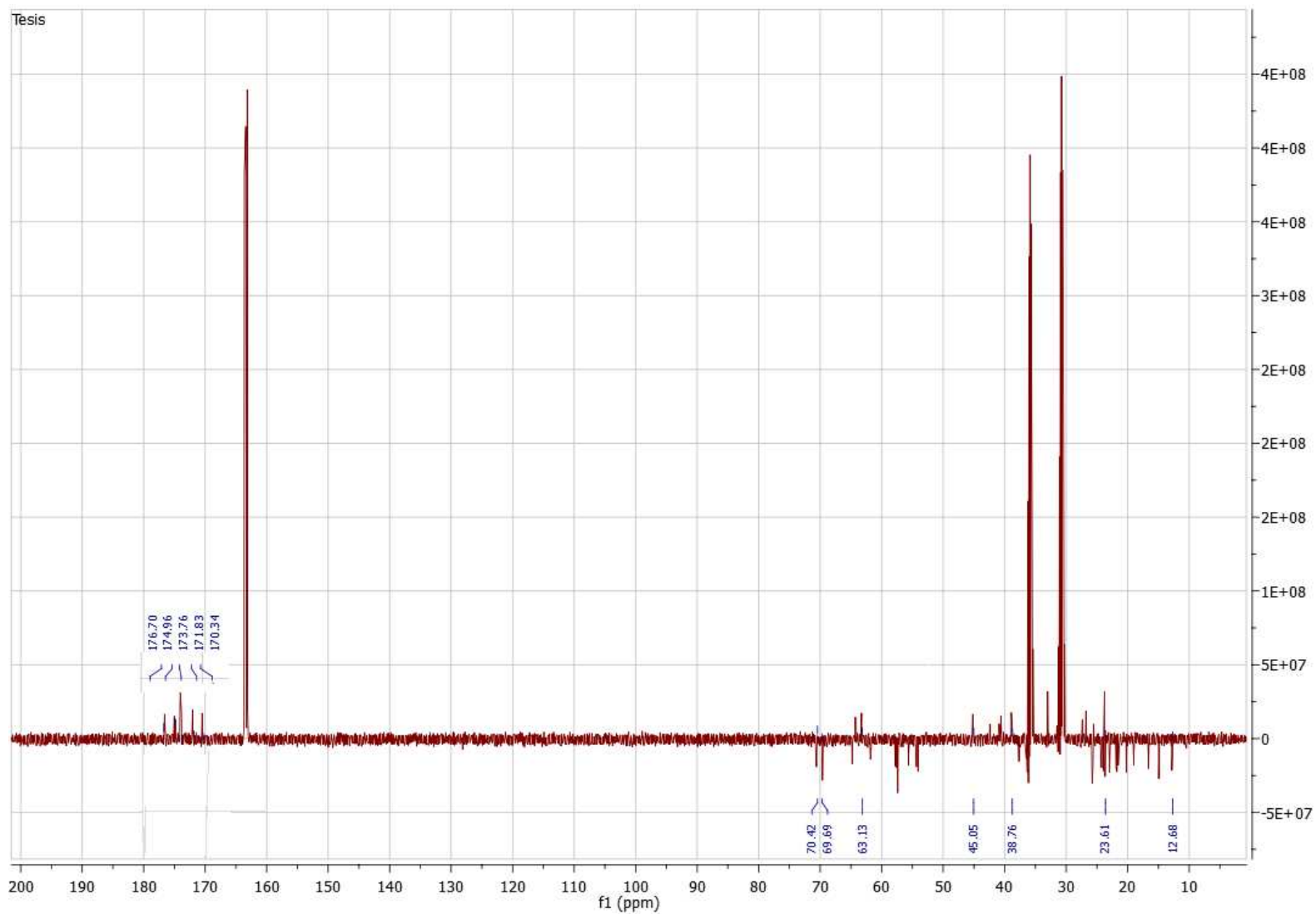


Figura 27. Experimento del RMN-¹³C de los cristales obtenidos en la etapa de purificación

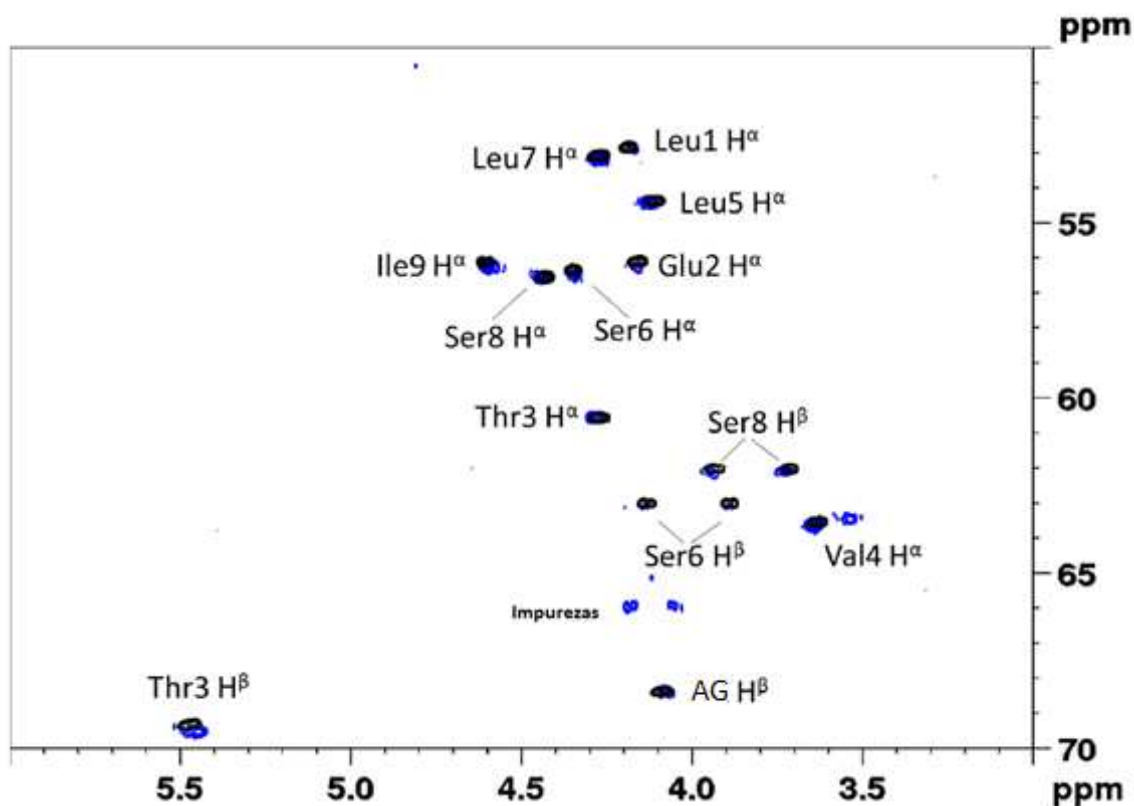


Figura 28. Región alfa del espectro ^1H - ^{13}C gHSQC de C3 (negro) y WLIP sintético (azul) en DMF- d_7 (500 MHz, 298 K). El procesamiento se realizó con el software Topspin.

El experimento en dos dimensiones HSQC demostró que la región peptídica de los LPC es idéntica a la de WLIP, ya que las señales se superponen en su totalidad con las del WLIP referente sintetizado químicamente. Geudens y colaboradores han realizado el experimento de HSQC en donde comparan viscosinamida y pseudodesmina A y demostraron que es muy clara la diferencia entre las señales de CH^α de la L-Leu 5 y CH^α de la D-Leu 5 respectivamente [47].

Se realizaron también otros estudios complementarios de RMN en 2D. El experimento TOCSY (^1H - ^1H) confirmó la presencia de todos los residuos de aminoácidos esperados y el resto de ácido graso hidroxilado en la posición 3; NOESY (^1H - ^1H) confirmó la secuencia primaria y la unión del ácido graso a la L-Leu 1, HMBC (^1H - ^{13}C) confirmó la unión de la cadena lateral de la Thr al residuo de la Ile a través del enlace lactona mediante la observación de picos cruzados $\text{H}\alpha(i) \rightarrow \text{HN}(i+1)$.

Con los experimentos de RMN no se logró confirmar la longitud de los ácidos grasos, ya que se obtuvieron señales superpuestas, por lo tanto, para determinarlo los cristales de LPCs se sometieron a hidrólisis ácida y calentamiento en condiciones extremas. Los ácidos grasos liberados se extrajeron con éter etílico y se esterificaron con metanol para ser detectados por GC-MS. Mediante este análisis se obtuvieron los fragmentos de cada uno de los iones encontrados. Se han reportado estudios de caracterización de ácidos grasos de LPCs producidos por bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus*, los cuales se utilizaron para comparar el perfil de masas obtenidas en los espectros de GC-MS de los ácidos grasos esterificados [40],[125],[133].

El estudio de los fragmentos de los posibles ácidos grasos que forman parte de los LPCs se realizó en conjunto con la información obtenida de los espectros de masas (ver figura 17), la cual se complementó con el estudio en un Espectrómetro de masas triple cuadrupolo utilizando la herramienta *enhanced product-ion* (EPI) que permite mejorar la resolución de las señales. Este espectro (MS² ESI-) se muestra en la figura 29.

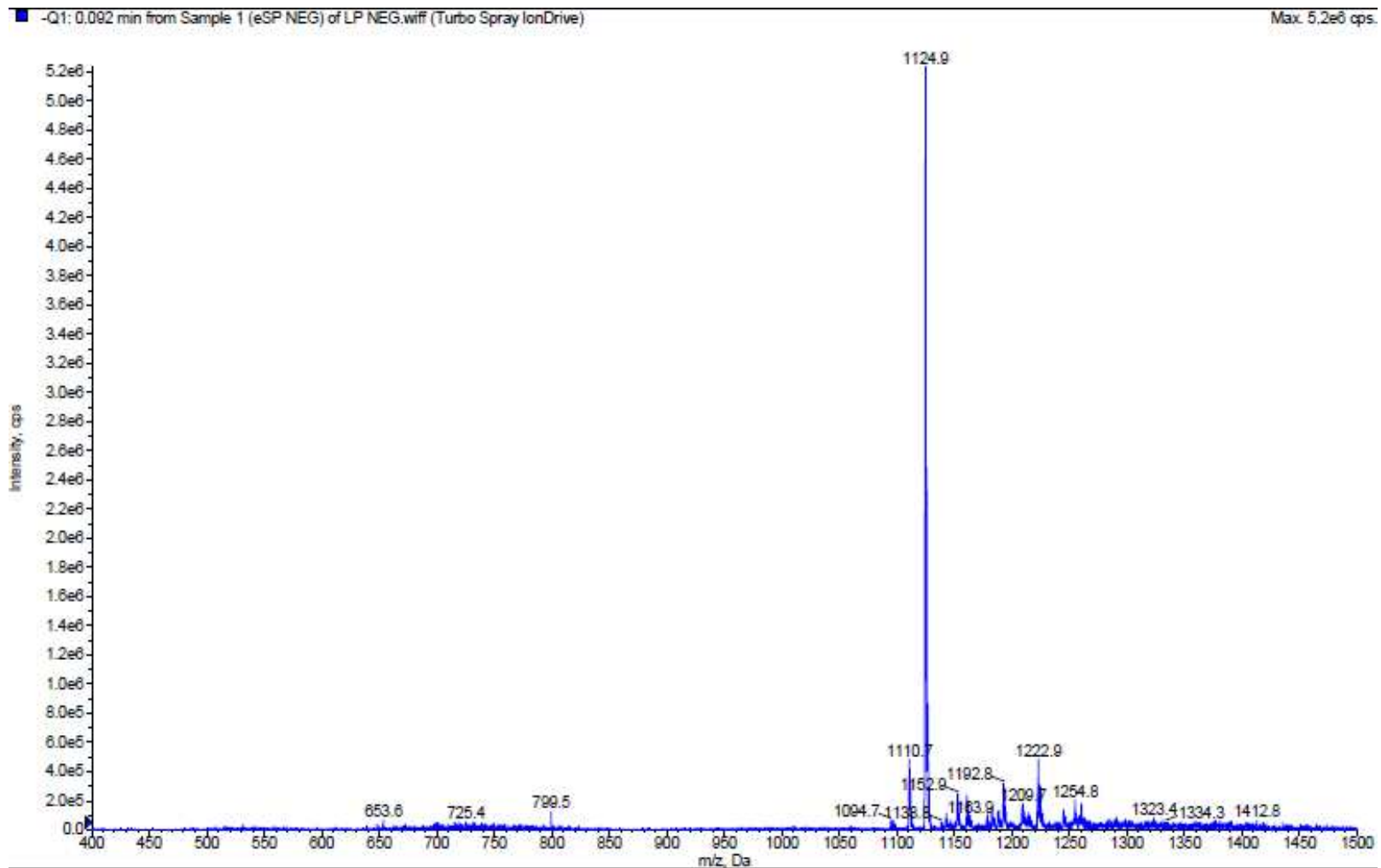


Figura 29. Espectro de masas MS² (ESI-) EPI realizado para los LPCs de las muestras cristales.

En este espectro se muestran todos los iones provenientes de la muestra cristalizada, se determinó que el ion de 1124,9 m/z corresponde a WLIP y los iones restantes a sus variantes naturales o congéneres, que según las masas observadas podrían estar formados en ácidos grasos de 8 a 18 átomos de carbono.

4. Análisis de los ácidos grasos de los LPC por GC-MS

Por GC-MS se confirmó la presencia de ácidos grasos de cadena 12, 14, 15, 16 y 17 átomos de carbono. No se ha reportado aun congéneres de WLIP. El cromatograma con los tr correspondientes a cada ácido graso esterificado encontrado se expone en la figura 30. El pico de mayor intensidad corresponde al ácido graso formado por 12 átomos de carbono. Se puede observar el perfil de fragmentación de este en la figura 31. Los perfiles de fragmentación de los ácidos grasos encontrados se muestran en el anexo 2. Los pesos moleculares de los ácidos grasos encontrados concuerdan con los pesos moleculares de los ácidos grasos encontrados en el espectro de masas de los LPCs, suponiendo que la región peptídica es la misma para cada LPCs. Sin embargo, no fue posible determinar por GC-MS ácidos grasos de C8, C9, C10 y C18, la causa podría ser que la hidrólisis no haya sido total o estos compuestos estén en baja concentración. Los resultados enunciados anteriormente se resumen en la tabla 7.

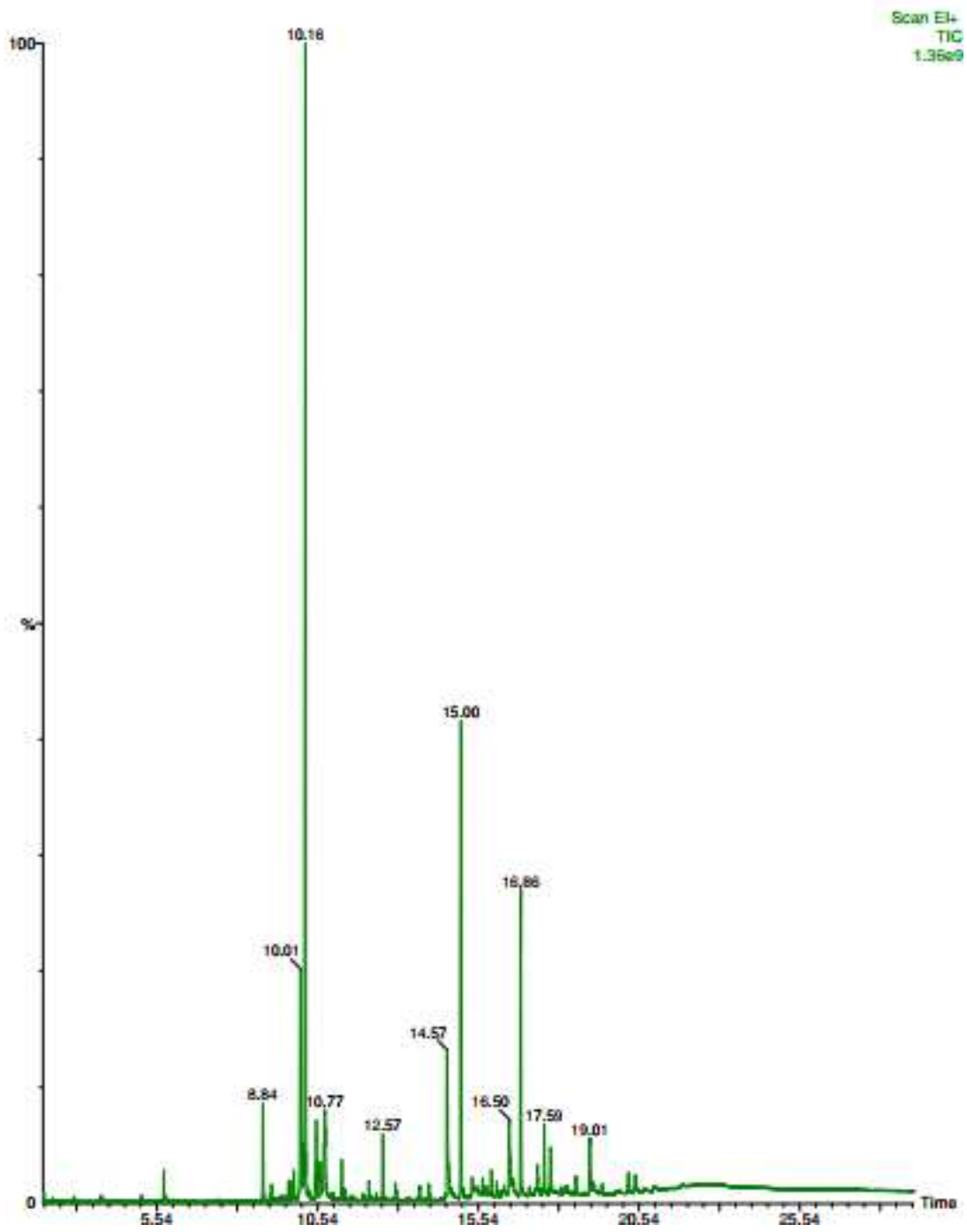


Figura 30. Cromatograma de los ácidos grasos esterificados proveniente de los cristales de LPC

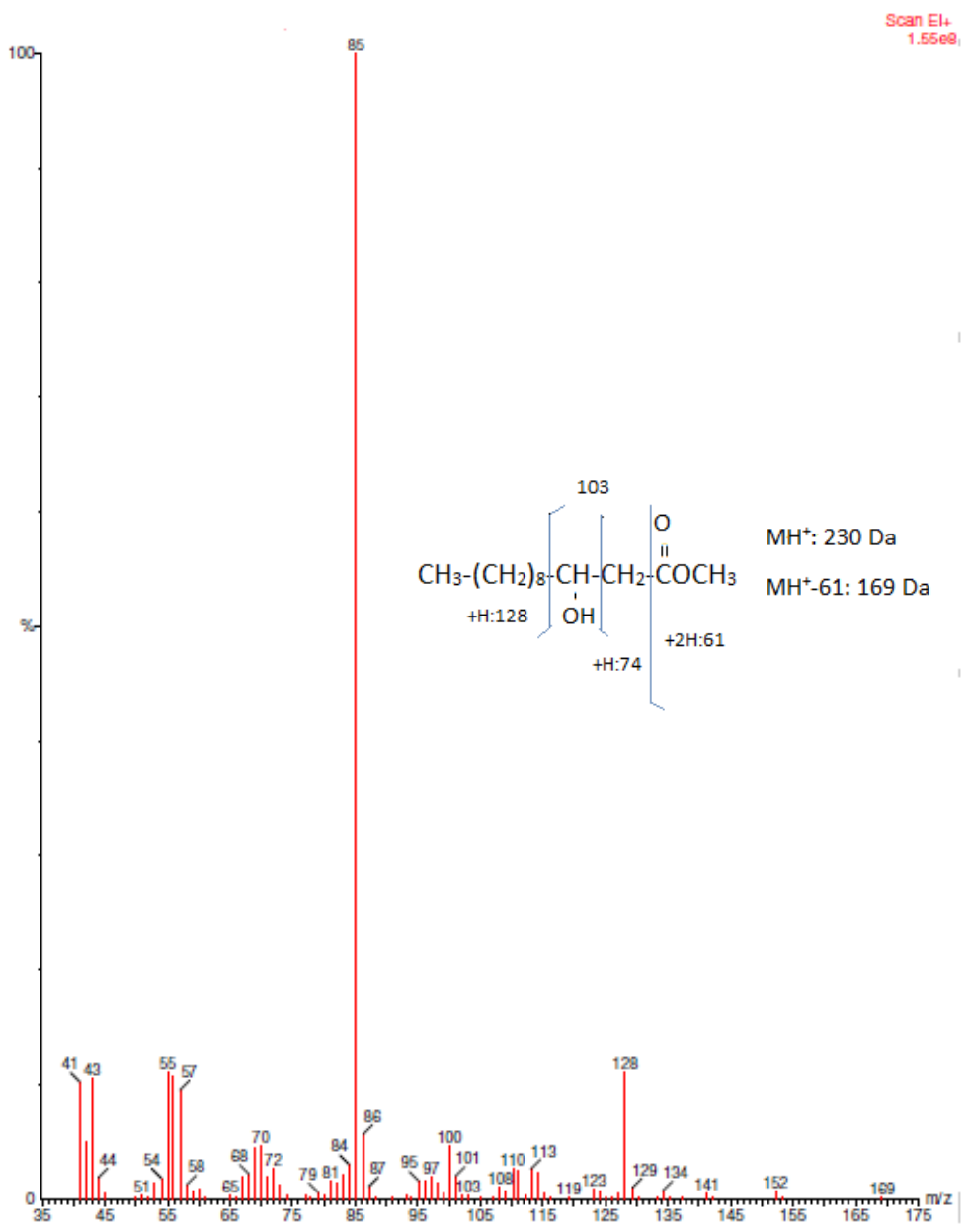


Figura 31. Perfil de fragmentación MS (EI) del ácido graso de doce átomos de carbono esterificado de M+ 230 Da.

Tabla 7. LPCs encontrados por MS con su correspondiente ácido graso y el tiempo de retención al que eluyen por GC-MS.

LPC (MS ESI+) en Da	LONG. AG	TR en min (GC-MS)
1094,7	C8	Nd
1110,7	C9	Nd
1124,9	C10	Nd
1138,8	C11	Nd
1152,9	C12	10,16
1182,0	C14	14,57
1192,8	C15	15,0
1209,7	C16	15,94
1222,9	C17	16,86
1254,8 *	C18	Nd
Nd	C20	19,01

* Es el aducto de sodio del LPC de masa 1236 Da que corresponde al ácido graso de dieciocho átomos de carbono (C18).

nd no se ha podido determinar por GC-MS (EI).

No se logró determinar por GC-MS la presencia del ácido graso de C10, el cual forma parte de la estructura de WLIP (ion principal de 1124,9 m/z Da ESI-). Sin embargo, se logró confirmarlos con los resultados obtenidos en la cristalografía de rayos X. Con los resultados encontrados por estudios de MS, RMN GC-MS, cristalografía de rayos X y el análisis de la estereoquímica de los aminoácidos mediante la técnica de Marfey se logró concluir con el estudio sobre la identificación y caracterización de los LPCs producidos por la cepa de *Pseudomonas* utilizada.

5. Cristalografía de rayos X y modelado computacional del cristal

La cristalografía de rayos X se realizó sobre un cristal con forma de aguja ya que el cristal en forma de roceta no brindó resultados satisfactorios. Este estudio se realizó en conjunto con el Dr. Daniel Vega, quien forma parte Comisión de Energía Atómica de Argentina. La estructura cristalográfica obtenida se presenta en la figura 32. En el anexo 4 se detallan los parámetros encontrado para el cristal estudiado. Mortishire y colaboradores fueron los primeros en obtener la estructura cristalina de WLIP producido a partir de *Pseudomonas reactans*, los cristales los obtuvieron por difusión de agua en una solución saturada de WLIP en metanol [120].

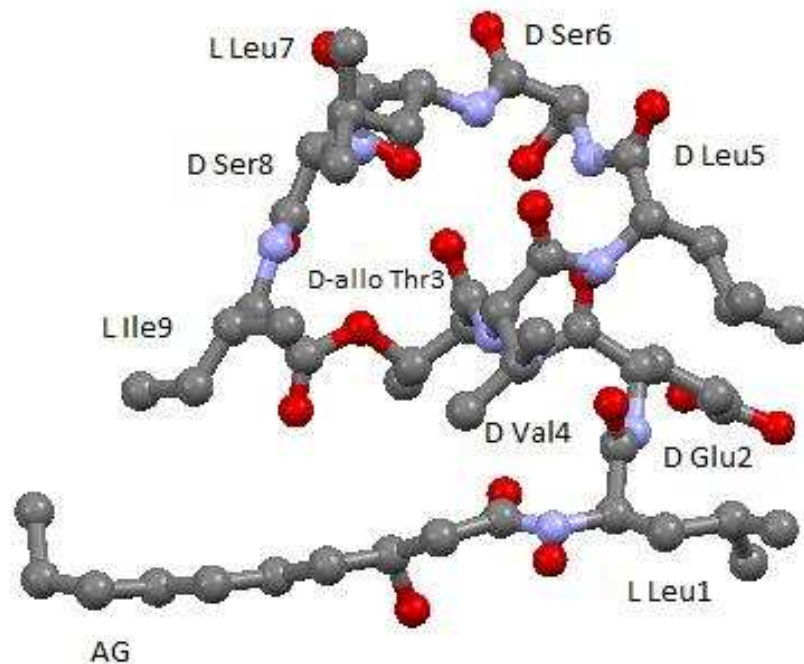


Figura 32. Estructura cristalina de WLIP, la cual se obtuvo a partir de la difracción de rayos X de un cristal en forma de aguja y procesada con el software Mercury.

A partir de la cristalografía de rayos X se modeló la estructura conformacional de WLIP. Se obtuvo el diagrama de Ramachandram con los ángulos de torsión ϕ y ψ encontrados para cada residuo, el cual se muestra en la figura 33. El diagrama permitió determinar que residuos se encuentran formando parte de un elemento de estructura secundaria, en este caso los residuos adoptan en la estructura una conformación de tipo hélice alfa. No se pudo encontrar los ángulos de torsión para la Leu 1 y para la Ile. En la bibliografía abierta se sugirió que la Leu 1 podría mostrar múltiples conformaciones, probablemente debido a que está situado al final del oligopéptido exocíclico, lo que permite una mayor flexibilidad [134]. No se ha informado hasta la fecha un estudio de simulación computacional de la conformación secundaria que puede adoptar la región peptídica de WLIP. Mortishire y colaboradores mediante geometría de distancia y cálculos de dinámica molecular usando restricciones de distancia obtenidas de experimentos de RMN, en dos dimensiones en dimetil sulfóxido-d6, sugirieron que algunos de los residuos adoptan una conformación de tipo giro β pero luego rechazaron la afirmación al analizar esos resultados en conjunto con la estructura cristalina, sugiriendo que el disolvente utilizado es inadecuado para los estudios de RMN. La estructura conformacional simulada obtenida

para WLIP se muestra en la figura 34. La conformación secundaria tipo hélice alfa se ha reportado para otros miembros del grupo Viscosina. Cabe destacar que solo se han determinado las estructuras tridimensionales para los miembros de Viscosina de tipo D-Leu, desafortunadamente aún no se puede evaluar el impacto estructural de la variación de D o L [45],[44]. Se han reportado estructuras helicoidales para otros LPC como Amfisina y Tensin que no forman parte del grupo Viscosina, lo cual se podría pensar que cumple un papel importante en su función. Amfisina y Tensin son muy similares a los LPC del grupo Viscosina, pero tienen una estructura de anillo construida de nueve residuos en lugar de siete. Hay algunas sustituciones de residuos, pero se mantiene el patrón general de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos y quiralidad D y L [135],[136],[45].

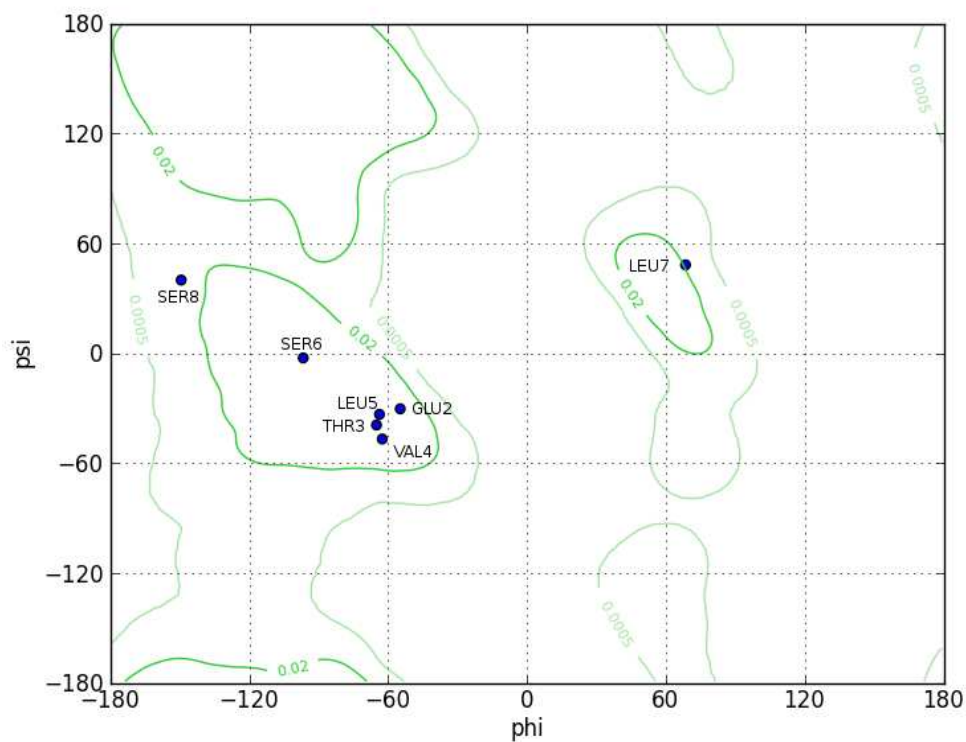


Figura 33. Diagrama de Ramachandram para los residuos de WLIP.

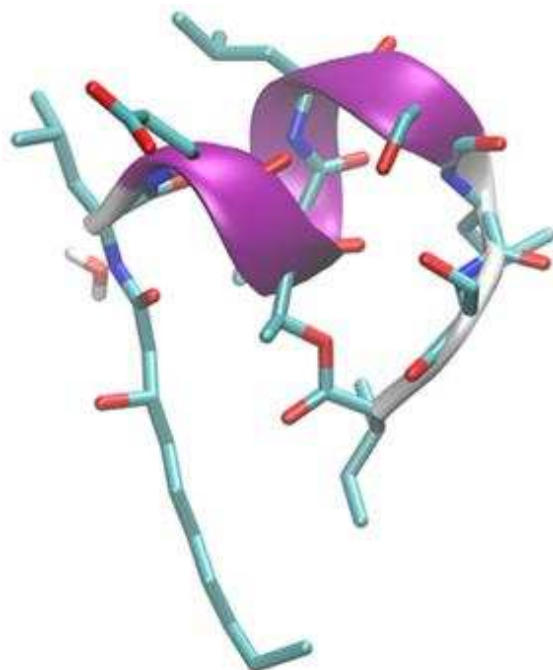


Figura 34. Estructura conformacional simulada de WLIP. Se encontró que los residuos adoptan una conformación de tipo hélice alfa.

Se logró determinar mediante el software Chimera (UCSF) los valores de SASA por residuo en la molécula y el porcentaje que ocupa cada residuo sobre la superficie de la molécula. Los valores se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Valores de SASA y porcentaje que ocupa cada residuo sobre la superficie de la molécula

		SASA por residuo en la molécula (nm ²)	Porcentaje de cada residuo sobre la superficie molecular
	AG	2,906	23,15 %
1	Leu	1,637	13,04 %
2	Glu	1,410	11,23 %
3	Thr	0,330	2,63 %
4	Val	0,889	7,08 %
5	Leu	1,346	10,72 %
6	Ser	0,726	5,78 %
7	Leu	1,541	12,27 %
8	Ser	0,941	7,50 %
9	Ile	0,830	6,61 %

CONCLUSIÓN

Se logró determinar que el BSm producido por la cepa de *Pseudomonas* utilizada es WLIP. La cepa produce otros LPC de cadena peptídica idéntica a WLIP que sólo difiere en la longitud de la cadena del ácido graso. El análisis de los ácidos grasos esterificados permitió determinar que la cepa produce variantes naturales de WLIP (C10), se encontraron ácidos grasos de C12, C14, C15, C16, C17 por GC-MS, sin embargo, los espectros de masas indicaron la posible existencia de C8, C9 y C18.

Cada uno de los estudios realizados resulto fundamental para que se pueda llevar a cabo un análisis más fino de la molécula, ya que las estructuras de los LPCs del mismo grupo son muy similares y muy difíciles de diferenciar. En primer lugar, los análisis de MS-MS permitieron acercarnos al grupo Viscosina, ya que se determinó por esta técnica algunos de los aminoácidos presentes en el LPC, lo cual se corroboró por la técnica de Marfey. Además la técnica de Marfey permitió determinar la presencia de la D-Leu, lo que redujo la búsqueda al sub grupo D. El estudio de RMN en 2D (HSQC) confirmó que la región peptídica de los LPC es idéntica a la de WLIP y finalmente la cristalografía de rayos X confirmó que la cepa utilizada produce WLIP. La cristalografía de rayos X de WLIP permitió modelar la estructura secundaria del péptido determinando que los residuos adoptan una conformación del tipo alfa hélice.

CAPÍTULO IV

Estudio de las propiedades fisicoquímicas y de control biológico del lipopéptidos cíclicos producido por una cepa de *Pseudomonas* provista por la empresa

INTRODUCCIÓN

Se han caracterizado una variedad de LPC que han demostrado tener actividad surfactante antimicrobiana y de citotoxicidad. Las características importantes de los BSms sobre los surfactantes sintetizados químicamente es su biodegradabilidad, biodisponibilidad, menor toxicidad, mayor formación de espuma y actividad específica a pH, temperatura y salinidad extremos [6],[12]. Los géneros bacterianos como *Bacillus* (Gram-positivo) y *Pseudomonas* (Gram-negativo) han recibido la mayor atención porque producen una amplia gama de tensioactivos de la familia LPCs efectivos que son potencialmente útiles para las industrias agrícola, química, alimenticia y farmacéutica.

Los BSms reducen la γ , así como también, la interfacial en solución acuosa y mezclas hidrofóbicas como se explicó en el capítulo 1. Además de su actividad como surfactante, los LPC poseen otras propiedades que lo hacen interesantes en búsqueda de potenciales aplicaciones. Una de ellas es la propiedad emulsificante, la cual se explica como la capacidad dispersar un líquido en otro, lo que conduce a la mezcla de dos líquidos inmiscibles. Esta propiedad es medida por el método de índice de emulsificación (IE) [111]. Por otro lado, la propiedad humectante es el poder de extensión y penetración de una sustancia cuando se añade a un líquido. Reduce las fuerzas atractivas de moléculas similares y aumenta la atracción hacia superficies diferentes. Los tensioactivos actúan como agentes humectantes por entrar en los poros y fisuras. Se considera un humectante fuerte por la capacidad de dispersión de un líquido sobre un área superficial. Esta propiedad se mide a partir del ensayo de esparcimiento [137]. Finalmente, una de las actividades más interesantes de los LPC es su actividad antimicrobiana y antifúngica. Debido a su diversidad estructural, los LPCs exhiben bioactividad frente a un amplio espectro de otros microorganismos. En general, son más activos contra bacterias Gram-positivas que Gram-negativas. Esto podría deberse a que la membrana externa Gram-negativa, impide que los LPC accedan a la membrana plasmática [30]. Se ha formulado la hipótesis de que la función biológica y el mecanismo antibiótico de los LPC están relacionados con la formación de canales iónicos de transporte pasivo en las membranas celulares. Esto desestabilizaría seriamente el metabolismo del microorganismo al alterar las concentraciones de iones en el citoplasma [62]. La naturaleza anfipática de la molécula de LPCs sugiere un modelo para la formación de poros que implica la formación de micelas de tipo inverso dentro de la membrana. Las moléculas se juntan con sus superficies hidrófilas entre sí mientras extienden las superficies hidrófobas hacia afuera

para minimizar los contactos hidrofóbicos-hidrofílicos con el medio ambiente. Independientemente de la estructura supramolecular exacta que se forma, estas micelas inversas podrían atravesar la membrana, permitiendo que los iones se transporten a través del poro hidrófilo creado [138]. Además, algunas investigaciones han demostrado que los lipopéptidos pueden inhibir la formación de paredes celulares de hongos así como también, puede causar apoptosis uniéndose a la ATPasa en la membrana mitocondrial [139],[140]. Es interesante analizar las propiedades de los LPC, las cuales son comunes a otras familias de BSm, ya que pueden conducir a aplicaciones en diversas áreas de la industria. En la industria farmacéutica se podrían aplicar como antibióticos contra bacterias u hongos y esto es muy importante dada las resistencias adquiridas por microorganismos de interés clínico. En la industria cosmética, por sus características surfactantes y humectantes y en la industria alimenticia pueden ser utilizados como agentes emulsionantes en la producción de diversos alimentos. Lo dicho anteriormente es posible debido a que presentan baja citotoxicidad contra las células humanas [78].

OBJETIVOS

Solubilizar los cristales de los LPCs y sus variantes utilizando co-disolventes y estrategias de asociación con proteínas.

Determinar la CMC de los LPC purificados.

Evaluar la capacidad humectante.

Calcular el IE en Kerosene, Aceite siliconado y Hexano

Compara la capacidad humectante y el IE de los LPCs con los obtenidos para surfactantes químicos comerciales, tales como SDS, EcoRizoSpray (principio activo: Poli(oxi-1,2-etanodiilo), α -undecil- ω -hidroxi-, ramificado y lineal) y Silwet (Heptametiltrisiloxano modificado con éter metil aliloxipolietilén glicol)

Realizar un ensayo de inhibición del crecimiento de microorganismos por LPCs.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Solubilización de los cristales de LPC

Se realizaron diferentes pruebas para disolver en agua los cristales de LPC obtenidos en la etapa de purificación. Para ello, se utilizaron co-disolventes como DMSO, 2-propanol y el agregado de albumina y medios proteicos, con el objetivo de estabilizar el compuesto en agua y construir curvas de γ . Se construyeron las curvas de γ contra los valores de

concentración de LPCs para cada disolvente con el objetivo de determinar el valor de CMC.

1.1. Disolución con DMSO y 2-propanol

Se utilizó 0,5 ml de DMSO y 2 ml de 2-propanol para disolver 4 mg del compuesto cristalizado. Se añadió agua Milli-Q para obtener una solución 0,16 mg/ml. Debido a que se formaron agregados sólidos se ajustó el pH a 10,5, pH al cual se obtuvo una solución sin la observación de precipitado en el medio acuoso. La solución de 0,16 mg/ml se utilizó para construir la curva que muestra la variación de la γ en función de la concentración del LPC.

1.2. Disolución con agregados proteicos

Se utilizó 0,5 ml de DMSO para disolver los cristales de LPCs, una vez disuelto los LPCs con el DMSO se añadió 5 ml de una solución denominada MEP, la cual contenía 5 mg de peptona, 25 mg de extracto de carne y 10 mg extracto de levadura. Se adiciono la cantidad de agua Milli-Q suficiente para obtener una solución de concentración 0,16 mg/ml y se ajustó el pH a 8.

De la misma forma, se disolvieron los cristales de LPC con DMSO, a la cual se añadió 5 ml de una solución al 0,08 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA). Se adiciono la cantidad de agua Milli-Q suficiente para obtener una solución de concentración 0,16 mg/ml y se ajustó el pH a 8.

2. Determinación de la CMC de WLIP y sus congéneres.

2.1. Solución con DMSO y 2-propanol

La curva de γ para cada co-disolvente se construyó a partir de diluciones de la solución de LPCs preparada como se describió en el apartado 1.1. de este capítulo (0,16 mg/ml). Se realizaron diluciones en un rango de concentración de 0,022 a 0,128 mg/ml. Las diluciones se realizaron con agua Milli-Q conteniendo DMSO y 2-propanol en las mismas proporciones en las que se prepararon las soluciones de LPCs y se ajustó el pH a 10,5. La γ se midió según el método de Du Noüy. Los valores de γ de cada dilución se compararon con el del valor del agua Milli-Q y con el blanco que contenía el co-disolvente correspondiente.

2.2. Solución con agregados proteicos

Para construir las curvas de γ para las soluciones descritas en el punto 1.2 realizadas con agregados proteicos, las soluciones de 0,16 mg/ml se diluyeron con agua Milli-Q para obtener un rango de concentración de 0,003-0,096 mg/ml. Los valores de γ se compararon con el valor del agua Milli-Q y con un blanco que contenía el agregado proteico en la misma proporción y pH que la solución madre. La γ se midió en todos los casos por triplicado y siguiendo el método de Du Noüy.

3. Índice de emulsificación (IE)

El ensayo IE se realizó utilizando una solución de LPCs preparada de la forma descrita en el apartado 1.2 utilizando la solución MEP. Se compararon los resultados con surfactantes químicos comerciales como el dodecil sulfato de sodio (SDS), Eco Rizo Spray y Silwet Ag, los últimos son comercializados por Rizobacter S.A. Se prepararon soluciones al 0,3 mg/ml de cada uno de los surfactantes químicos comerciales y del BSM en estudio, teniendo en cuenta que el principio activo del Eco Rizo Spray se encuentra en 48 % P/V y el Silwet Ag al 100 % P/V. El principio activo del Eco Rizo Spray es un alcohol graso monoramificado etoxilado (AGE). Siwet L Ag es un coadyuvante 100% organosiliconado, posee una altísima capacidad para reducir la γ de los líquidos aplicados, permitiendo mayor absorción por parte de la planta.

Este ensayo se llevó a cabo añadiendo al aceite siliconado, al Kerosene y hexano una solución de surfactante en la proporción 1:2 V/V. El IE se calculó utilizando la siguiente ecuación [141].

$$IE_{24} = \frac{\text{altura de la capa de emulsión}}{\text{altura de la mezcla total}} \times 100$$

4. Esparcimiento

El ensayo de esparcimiento se realizó utilizando una solución de LPC preparada de la forma descrita en el apartado 1.2 de la misma manera que se preparó para el ensayo de IE, a la misma concentración. Los resultados de esparcimiento obtenidos para los LPCs purificados se compararon con una solución de Silwet Ag, DMSO y Eco Rizo Spray a la misma concentración (0,3 mg/ml). Como control se utilizó una solución de MEP con DMSO en las mismas proporciones que se utilizaron para disolver los LPCs.

Para realizar este ensayo se colocó en una caja de Petri de vidrio una cuadrilla de esparcimiento (imagen 4) y arriba del mismo parafilm. El parafilm se utilizó para simular la

superficie de una hoja. Se sembró en el centro de la cuadrilla una gota de 20 μL de la solución de LPCs, del control y de los surfactantes químicos comerciales, se midió la cantidad de cuadrados cubiertos por la expansión de las gotas luego de 30 seg para cada solución. Teniendo en cuenta que cada cuadrado tiene una superficie de 4 mm^2 , se calculó el esparcimiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Esparcimiento (mm}^2\text{)} = 4 \times \text{n}^\circ \text{ de cuadrados cubiertos por la gota luego de 30 seg}$$

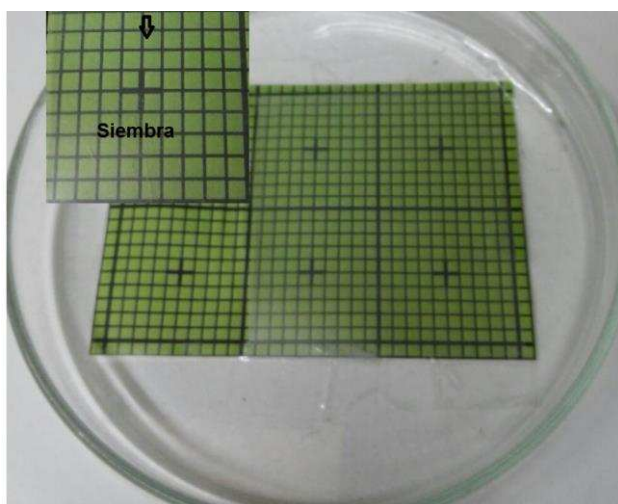


Figura 4. Cuadrilla para evaluar esparcimiento.

5. Estudio de la actividad antimicrobiana de los LPCs

La determinación de la actividad contra microorganismos se realizó mediante el método de difusión en agar. Se realizaron pozos en el agar de 7 mm de diámetro y se sembraron en cada uno de ellos 70 μl de la solución de WLIP y sus congéneres. Se evaluaron dos soluciones de LPCs de 0,8 mg/ml y 2 mg/ml, las mismas se prepararon disolviendo los cristales con MEP utilizando como co-disolvente 10 % de DMSO. El pH de las soluciones se ajustó en 8. Se probó también un blanco de MEP conteniendo DMSO. Las muestras se filtraron con filtros Millipore de 0,22 μm .

Se ensayó la actividad de WLIP y sus congéneres contra un grupo de bacterias Gram positivas y negativas y un grupo de levaduras y hongos filamentosos. Se evaluó la actividad contra bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecalis*; las bacterias Gram negativas que se ensayaron fueron *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, y *Pseudomonas* sp.; las levaduras *Rhodotorula rubra*, *Candida parapsilosis* y *Saccharomyces cerevisiae*; por

último, los hongos filamentosos *Geotrichum candidum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roquefortii*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus* y *Rhizopus oryzae*.

Los hongos filamentosos y las levaduras se cultivaron en medio H y L (Biokar) y se incubaron a 28 °C durante 72 h. Las bacterias se cultivaron en agar nutritivo y se incubaron a 37 °C durante 48 h. Se midieron los halos de inhibición luego del culminado el tiempo de incubación. Estos estudios se realizaron en conjunto con el departamento de Microbiología General de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral bajo la supervisión del Dr. Arturo Simonetta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Solubilidad y determinación de la CMC

Se observó una baja solubilidad de los cristales de LPCs una vez purificados del medio de cultivo, así como también, la fracción eluída de los cartuchos de extracción en fase sólida. Es por ello que para analizar su capacidad surfactante se requirió evaluar la utilización de co-disolventes que rompan la estructura cristalina, así como, la utilización de medios proteicos. En primer lugar, se ensayó disolver los cristales con DMSO y 2-propanol como co-disolventes, es decir utilizando el mínimo volumen del mismo. En ambos casos los cristales se disolvieron, cabe destacar que en DMSO la disolución fue instantánea y probablemente se podría haber utilizado menor volumen de DMSO; mientras que con 2-propanol se requirió calor y sonicado para lograr disolución completa. Una vez disueltos los cristales se preparó la solución madre para realizar la curva de CMC. No se obtuvieron resultados satisfactorios una vez que la solución de cristales en DMSO se llevará a volumen con agua Milli-Q, ya que rápidamente se formaron agregados sólidos. La disolución completa de esos agregados se logró al aumentar el pH a 10,5. Lo mismo ocurrió con el 2-propanol, las soluciones no se estabilizaron, por lo cual también se debió ajustar el pH a 10,5.

Se entiende que WLIP debería disolverse a pH 8 por la presencia del ácido carboxílico de Glu, sin embargo, se hicieron pruebas con buffer a ese pH y no se logró disolver el compuesto. Cabe destacar que WLIP es comercializado por Adipogen para actividades de investigación relacionadas con la detección de *Pseudomonas tolaasi* y en la ficha técnica se indica que solo es soluble en DMSO, etanol y metanol (CAS: 135096-89-8).

Una vez ajustado el pH de las soluciones a 10,5 se obtuvo la gráfica de γ para encontrar el valor de CMC con cada co-disolvente, las gráficas se muestran en la figura 35.

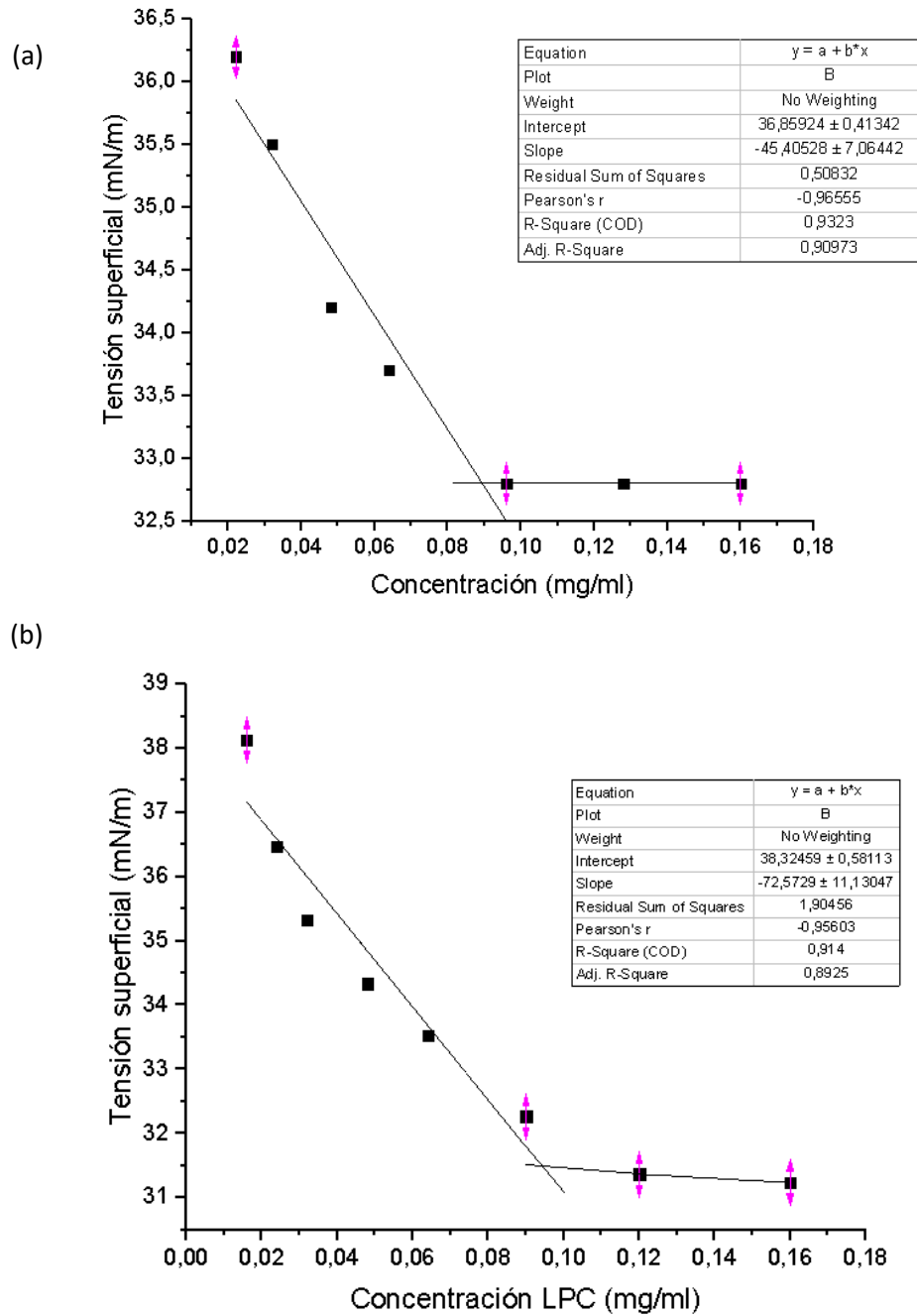


Figura 35. Efecto de la concentración de LPCs sobre la tensión superficial. La CMC se calculó de la intersección de las líneas de regresión. La figura (a) corresponde al co-disolvente 2-propanol y (b) al co-disolvente DMSO a pH 10,5.

Tabla 9. Valores de γ para cada concentración de LPC utilizando (a) 2-propanol como co-disolventes y (b) DMSO+ BSA a pH 10,5.

	Concentración (mg/ml)	Tensión Superficial (mN/m)
(a)	0,016	38,1 \pm 0,4
	0,024	36,5 \pm 0,1
	0,032	35,3 \pm 0,1
	0,048	34,3 \pm 0,4
	0,064	33,5 \pm 0,4
	0,09	32,3 \pm 0,2
	0,12	31,4 \pm 0,1
	0,16	31,2 \pm 0,1
	Concentración (mg/ml)	Tensión Superficial (mN/m)
(b)	0,022	36,3 \pm 0,3
	0,032	35,4 \pm 0,1
	0,048	34,6 \pm 0,5
	0,064	33,7 \pm 0,3
	0,096	32,7 \pm 0,2
	0,128	32,7 \pm 0,2
	0,16	32,6 \pm 0,2

Los valores obtenidos de γ se obtuvieron por triplicado y se muestran en la tabla con su correspondiente desviación estándar.

Se observa en la figura 35 que los valores de CMC son muy similares para ambos co-disolventes, así como también, los valores de γ . Se encontró para las soluciones en las que se utilizó 2-propanol como co-disolvente valores de CMC de 0,09 mg/ml y γ de 32,8 Nm/m ($\gamma_{\text{H}_2\text{O}+2\text{-propanol}}$ 48,0 Nm/m). Para soluciones de LPCs en las que se utilizó DMSO como co-disolvente se encontró un valor de CMC de 0,09 mg/ml y un valor de γ de 31,5 Nm/m ($\gamma_{\text{H}_2\text{O}+\text{DMSO}}$ 70,5 Nm/m). Ambos valores se encuentran en el mismo orden y resultan ser muy interesantes dado los bajos valores de CMC. Sin embargo, los valores de pH son poco manipulables y además se debería analizar la estabilidad del LPC en esas condiciones. Cabe aclarar que, Kanna y colaboradores evaluaron la estabilidad de esta familia de BSm producido por *Pseudomonas putida* ajustando la solución a distintos pH y encontraron que los LPCs producidos por la cepa utilizada eran estable en un rango de pH de 6 a 11 [142].

Los resultados obtenidos con los co-disolventes llevaron a analizar la solubilidad de los LPC con el agregado de excipientes de origen proteico, basándose en el hecho de que cuando la cepa lo produce y libera al medio los LPCs se mantienen solubles. Para este

ensayo, los cristales se disolvieron con DMSO y se agregó un volumen de la solución denominada MEP que logró mantener en solución los LPCs. Lo interesante es que las diluciones de la solución madre se realizaron en agua Milli-Q sin mostrar precipitados. La gráfica de CMC se muestra en figura 36.

Se encontró que el valor de CMC de la solución de WLIP y congéneres se ubica en 0,06 mg/ml y el valor de γ es de 27,7 mN/m ($\gamma_{\text{H}_2\text{O}+\text{DMSO}+\text{MEP}}$: 65,0 mN/m). Estos valores resultan ser más alentadores, se asemejan a los valores reportados para otros LPCs producidos por *Pseudomonas* spp, así como también, el valor de pH con el que se ha trabajado. Cabe destacar que estos valores de γ cercanos a 27,0 mN/m concuerdan con los valores encontrados para el retenido (BSm total). Esto confirmaría que los valores de γ del retenido se atribuyen solamente a la actividad surfactante de WLIP y sus congéneres. Esto llevo a pensar que posiblemente estos compuestos puedan formularse para mejorar su solubilidad mediante agregados proteicos. Lo dicho anteriormente se analizó utilizando una solución de BSA de concentración 0,08 mg/ml en vez de MEP y se trabajó de la misma forma. Los cristales se disolvieron obteniéndose una solución clara al igual que con MEP, esto puede observarse en la imagen 5.

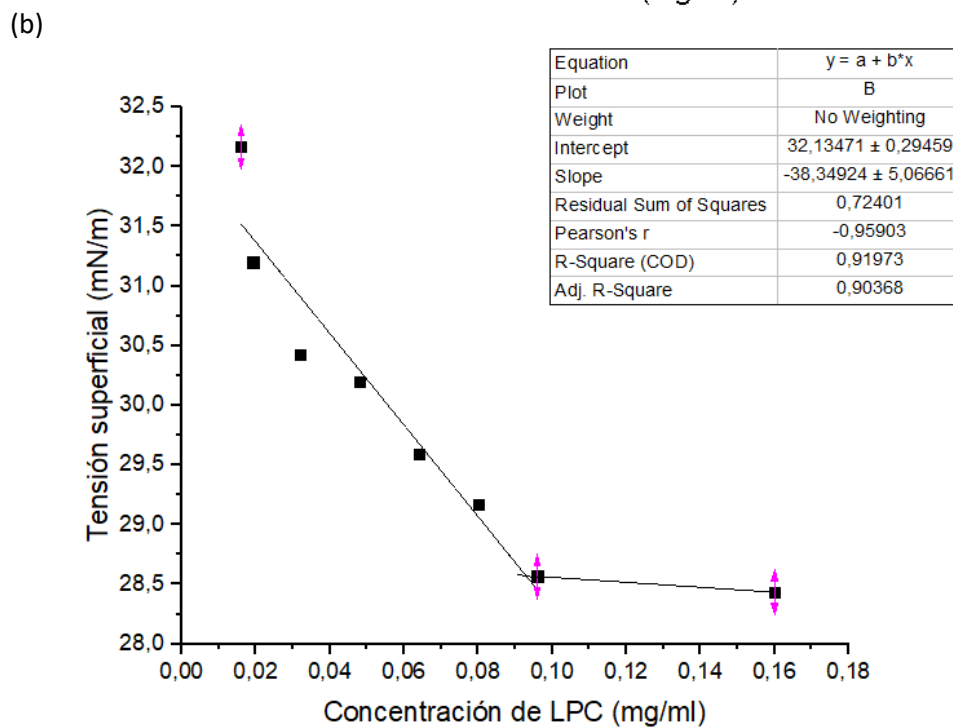
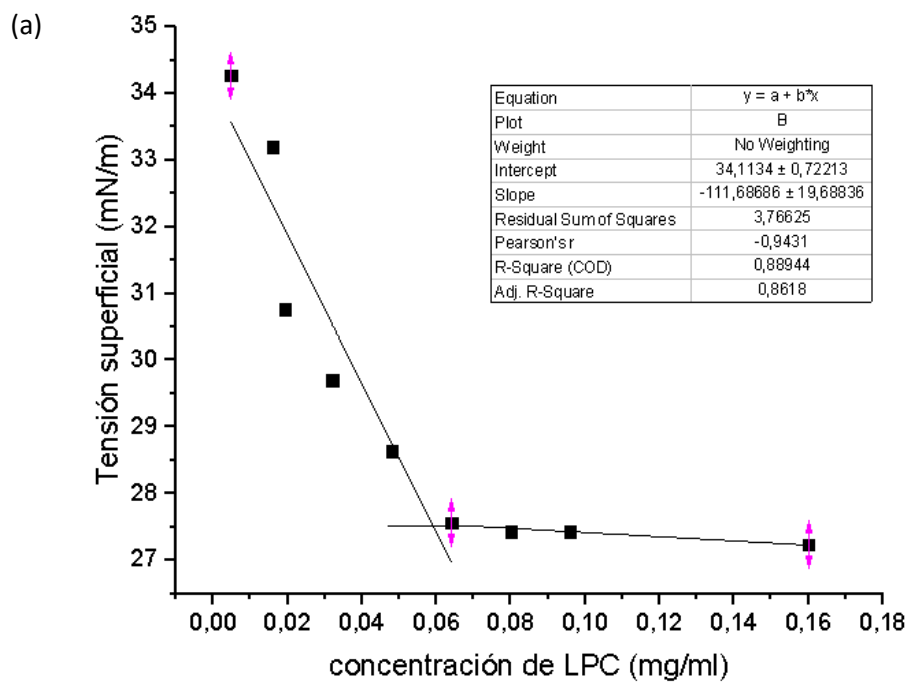


Figura 36. Efecto de la concentración de LPCs sobre la tensión superficial. La CMC se calculó de la intersección de las líneas de regresión. La figura (a) corresponde al co-disolvente DMSO+MEP y (b) corresponde al co-disolvente DMSO+BSA a pH 8.

Tabla 10. Valores de γ para cada concentración de LPC utilizando (a) DMSO+MEP como co-disolventes y (b) DMSO+ BSA a pH 8.

(a)

Concentración (mg/ml)	Tensión superficial (mN/m)
0,005	44,3± 0,2
0,016	34,3 ± 0,2
0,019	33,2 ± 0,2
0,032	30,8± 0,3
0,048	29,7 ± 0,1
0,064	28,6 ± 0,2
0,080	27,6 ± 0,1
0,096	27,4 ± 0,3
0,160	27,2 ± 0,1

(b)

Concentración (mg/ml)	Tensión superficial (mN/m)
0,016	32,1 ± 0,2
0,019	31,2 ± 0,1
0,032	30,4 ± 0,7
0,048	30,2 ± 0,3
0,064	29,6 ± 0,7
0,08	29,1 ± 0,1
0,096	28,6 ± 0,1
0,16	28,4 ± 0,1

Los valores obtenidos de γ se obtuvieron por triplicado y se muestran en la tabla con su correspondiente desviación estándar.

La proteína BSA interacciona con surfactantes catiónicos, [143] aniónicos [144], zwitteriónicos, [145] y surfactantes no iónicos [146], lo cual se debe a que BSA es una proteína con regiones hidrofóbicas, las cuales podrían ser los objetivos en su asociación con los surfactantes. Gelamo y colaboradores informaron las interacciones de BSA con el SDS y otros surfactantes químicos por espectroscopia de fluorescencia [143],[144].

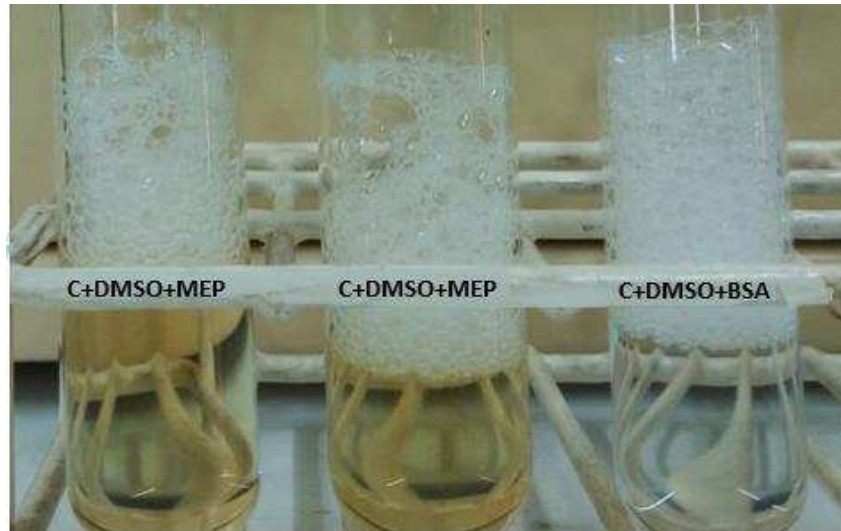


Imagen 5. Cristales disueltos con agregados proteicos.

Se determinó el valor de CMC de la solución de LPCs con el agregado de BSA y se encontraron valores muy similares que con MEP, esto se puede observar en la gráfica de CMC en la figura 37. Se determinó el valor de CMC de 0,09 mg/ml y el valor de γ de 28,6 mN/m ($\gamma_{\text{H}_2\text{O}+\text{DMSO}+\text{BSMA}}$: 65,0 mN/m). Se podría sugerir por los resultados encontrados que WLIP y sus variantes naturales al ser excretados al medio se unen a algún péptido o proteína y de esa forma se estabilizan y se mantienen solubles en el medio de cultivo en el que se excreta [147]. No se ha reportado estudios de interacción de WLIP y BSA y de ningún miembro del grupo Viscosina, pero sí se ha investigado la interacción de surfactina con proteínas. Zou y colaboradores investigaron la interacción de Surfactina con BSA mediante mediciones de γ , fluorescencia, Microscopía electrónica de transmisión criofracturada (FF-TEM) y Dicroísmo circular (CD). Los estudios de γ se realizaron sobre una solución de Surfactina pura y otra con Surfactina/BSA. Se determinó que el valor de CMC es más baja para el surfactante puro y la γ aumenta al aumentar la concentración de BSA, esto último se observó a partir de mediciones de diluciones que contenían la misma cantidad de BSA. Zou y colaboradores determinaron que la agregación micelar impulsada por BSA se produce a una concentración que es más alta que en el sistema de Surfactina pura [148].

Cabe destacar que hasta el momento de esta tesis no se reportaron en la literatura abierta valores de CMC de una solución del WLIP (puro) o asociado a proteínas. Sí se han reportado valores de CMC y γ de otros miembros del grupo Viscosina. Para viscosina se han reportado valores de γ de 25,0 mN/m cuando la solución se ajusta a pH 7 con $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ y un valor de CMC de 0,01 mg/ml en esas condiciones. Sin embargo, sin

el agregado del buffer se encontraron valores más altos de CMC 0,1 mg/ml, por lo que sugirieron que se solubiliza totalmente a pH 7 [149].

En el caso de pseudofactina que a diferencia de los LPCs del grupo Viscosina contiene en su estructura 8 aminoácidos y uno de ellos es Glicina (Gly) unida a un ácido graso de 14 átomos de carbono, es capaz de reducir la γ del agua de 72,0 mN/m a 31,5 mN/m [34]. El valor de CMC encontrado para pseudofactina se ubicó en 0,072 mg/ml, este valor se encuentra en el mismo orden que el encontrado para WLIP y sus variantes naturales pero los valores de γ son más bajos para WLIP. Se informó que arthrofactina (1354,7 Da), otro de los LPC producidos por *Pseudomonas* pero de mayor peso molecular, es uno de los LPC más eficaces producidos por esta cepa, ya que es capaz de reducir la γ del agua a 24 mN/m y el valor de CMC se ubicó alrededor de los 0,01 mg/ml [150].

2. Emulsificación y Humectabilidad

Se analizó la capacidad emulsificante de los LPCs y se la comparó con la de surfactantes comerciales a la misma concentración, entre ellos el SDS, Silwet L Ag y Eco Rizospray comercializados por Rizobacter S.A. El Eco Rizospray es un coadyuvante descrito con una biodegradabilidad total superior al 90 %, amigable con el medio ambiente y la salud humana, que mejora la cobertura y adherencia de los agroquímicos sobre la superficie foliar, incrementando la eficiencia de los productos a pulverizar. Las soluciones se prepararon en función de las capacidades tensioactivas de la muestra de LPC disueltos con DMSO y MEP. Se prepararon soluciones de cada surfactante con una concentración de 0,3 mg/ml, concentración que supera el valor de CMC de WLIP. La capacidad emulsificante se estudió con kerosene, aceite siliconado y hexano. Se encontró que los LPCs y el SDS emulsifican el kerosene pero a las 24 h la capa de emulsión desaparece, sin embargo no se ha encontrado esta actividad con el Silwet L Ag y el Eco Rizospray. Sin embargo, todos los surfactantes estudiados han mostrado emulsionar el aceite siliconado. Se encontró que a la concentración estudiada los LPCs logran emulsificar el aceite siliconado en un 52 % mientras que el Silwet L Ag y el SDS en un 45 % y por último el Eco Rizo Spray en un 29 %. Cabe destacar que el Eco Rizo Spray y SDS fueron los únicos surfactantes que emulsionaron el hexano, ambos en un 28 %. El IE depende de la concentración de surfactante, es probable que si se aumenta la concentración de LPCs aumente el IE. Se han reportado valores de IE para LPCs producidos por *Pseudomonas* identificados como putisolvina, viscosina, amfisina y massetolidas, los cuales fueron evaluados frente a n-hexadecano. Bak y colaboradores encontraron valores de EI de 6 a

24% a 0,02 mg/ml y 20 a 31% a 0,09 mg/ml [151]. Janek y colaboradores evaluaron la actividad emulsificadora de los LPCs producidos por *Pseudomonas* spp denominados Pseudofactins utilizando una concentración 15 veces más que la que se utilizó en este trabajo (0,03 mg/ml) y encontraron que estos compuestos emulsifican el aceite de oliva en un 90 % y hexano en un 50 % a esa concentración [34].

Con respecto a la humectabilidad, la cual se midió con el ensayo de esparcimiento, se encontró que los LPC superan enormemente al SDS y al Eco Rizospray demostrando su posible capacidad humectante, penetración y adherencia de los productos adicionales en conjunto. Se encontró mediante el cálculo de esparcimiento que los LPCs podrían cubrir una superficie de 30,5 mm², mientras el Eco Rizo Spray de 24,5 y el SDS de 13 mm². El Silwet L Ag supera enormemente estos resultados obteniendo valores de 180 mm².

3. Actividad Antimicrobiana

Se determinó la actividad antimicrobiana del blanco (MEP y DMSO) y la muestra de LPCs (0,8 y 2 mg/ml) mediante el método de difusión en agar. No se encontró actividad por parte del blanco contra ningún tipo de microorganismo estudiado, el cual contenía un 10 % de DMSO en MEP, por lo que se confirmó la inocuidad del DMSO en el volumen utilizado. También se observó la aparición de un halo de inhibición de 4 mm de ancho frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*, que resultó inválido antes de finalizar el periodo de incubación. No se encontró actividad contra los otros microorganismos estudiados en esta concentración. Podría ser que los LPCs actuaron como compuestos bacteriostáticos frente a *Staphylococcus aureus*, ya que retrasó su crecimiento. Sin embargo, se debería hacer más pruebas para confirmarlo. Este ensayo se realizó anteriormente utilizando como disolvente DMSO y una concentración de LPCs de 1,25 mg/ml pero no se encontró actividad contra los microorganismos evaluados. Se analizó la posibilidad que los LPCs en DMSO tengan poca difusión en el medio agarizado es por ello que se realizó este ensayo disolviendo los cristales en un medio mayormente acuoso utilizando solo un volumen mínimo de DMSO. Sin embargo, Rokni-Zadeh y colaboradores realizaron el método de difusión en agar según Cantore y colaboradores, en el cual WLIP fue disuelto en DMSO hasta obtener soluciones de WLIP en un rango entre 0,16 y 2,5 mg/ml y se ajustaron a pH 8. Para la siembra de los pozos de agar utilizaron 10 µl. Rokni-Zadeh y colaboradores encontraron que WLIP inhibe bacterias del género *Xantomonas* (diámetros de halo de inhibición entre 1,3 y 6,5 mm según la especie) y bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* (2,5 mm) y *Bacillus megaterium* (15 mm) cuando utilizaron

una MQI(cantidad inhibitoria mínima) de 22,2 μg [122]. Cantore y colaboradores observaron halos de inhibición a valores muy bajos de MQI para bacterias Gram-positivas y varios especies de hongos [124]. Los resultados encontrados con WLIP y sus congéneres no concuerdan con los reportados a pesar de que se utilizó una cantidad de compuesto más alta (56 y 140 μg). Sin embargo, estos resultados concuerdan con los reportados por Sinnaeve y colaboradores, ellos determinaron que pseudodesmina A y B poseen actividades bacteriostáticas sobre bacterias Gram positivas [45].

CONCLUSIONES

Se concluye a partir de los resultados obtenidos que es necesario disolver los cristales con un co-disolvente, se encontró que con DMSO la disolución es instantánea y completa. Posiblemente estos LPC tengan muy baja solubilidad en agua y requieran del agregado de alguna proteína o péptido para que se estabilice y no forme agregados y de tal forma lograr aprovechar su potencial actividad surfactante. El uso de agregados proteicos resulta ser muy interesante en la etapa de formulado del producto.

Se obtuvieron valores de CMC y de γ muy alentadores utilizando o no agregados proteicos, estos valores concuerdan con los encontrados para otros miembros del grupo Viscosina.

Los resultados de los ensayos realizados para evaluar emulsificación y humectabilidad resultaron ser muy prometedores para los LPCs. A baja concentración se logró emulsificar aceite siliconado y kerosene, probablemente si se aumentara la concentración de BSm los valores encontrados mejorarían. A diferencia de los surfactantes químicos el IE del aceite siliconado fue mayor para los LPCs. Con respecto al ensayo de esparcimiento y actividad humectante, a pesar de que no se logró superar al Silwet L Ag, se encontraron muy buenos resultados superando al SDS y al Eco Rizo Spray, esto sumado a su propiedad biodegradable demostraría su posible uso como coadyuvante.

CAPÍTULO V

*Cuantificación de lipopeptidos cíclicos por
Cromatografía líquida de alta performance acoplado a
un detector DAD*

INTRODUCCIÓN

El estudio de los LPCs ha ganado la atención de muchos investigadores, debido a su diversidad estructural, biodegradabilidad y posibilidad de ser aplicados en diferentes áreas de la ciencia. El objetivo es reemplazar o disminuir el uso de los surfactantes químicos, los cuales se ven favorecidos por su disponibilidad en grandes cantidades y bajos costos de producción.

El estudio de las propiedades de LPC, la optimización de la producción y su utilización en la industria requiere el desarrollo de herramientas rápidas y precisas para su cuantificación. Se han reportados varios métodos semi-cuantitativos para cuantificar basados en la medición de cambios en las propiedades superficiales [152] y otros métodos como los colorimétricos que permiten la detección de grupos específicos de las moléculas, tal es el caso del uso del ácido bicincolínico para la cuantificación de LPC [153],[154]. Sin embargo, estos métodos pueden sobreestimar la cantidad del BSM. Por otro lado, se ha reportado un método para determinar la concentración de LPC a partir de la medición del contenido de glutamato disociado en muestras hidrolizada, pero este método conlleva una etapa de hidrólisis, por lo cual la veracidad de la determinación podría estar distorsionada por la disociación del aminoácido. La cromatografía líquida es una herramienta poderosa para la cuantificación rápida y exacta de LPC, no solo se ha utilizado para análisis cuantitativos sino cualitativos de lipopéptidos [155],[156].

Se ha aprovechado la propiedad intrínseca del enlace peptídico de absorber entre 180 y 215 nm para su detección por UV-Visible. Sin embargo, esta reportado el uso del detector de fluorescencia para cuantificar surfactina, utilizando 1-bromoacetilpirano (BAP) como agente derivatizante en solución acuosa. El BAP se une a un grupo carboxilo permitiendo la detección de forma selectiva de muy bajas cantidades de LPC [157]. La cuantificación mediante HPLC es altamente confiable y los análisis se ven favorecidos por una buena resolución.

OBJETIVOS

Obtener el espectro UV-Visible de los cristales de LPC purificados.

Analizar el perfil cromatográfico de los LPC purificados utilizando un detector DAD.

Obtener una curva de calibrado para LPCs.

Cuantificar por HPLC los LPC producidos por *Pseudomonas* a partir del análisis de la fracción concentrada obtenida luego del proceso de ultrafiltración del sobrenadante.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Barrido espectral de los LPC

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible (Perkin Ermer), para analizar el máximo de absorbancia de los cristales de LPC en el UV-Visible. La muestra se disolvió en ACN y el barrido espectral se llevó cabo desde 200 a 800 nm.

2. Análisis por HPLC-DAD de LPC

Se utilizó la fracción de cristales puros como estándar para la cuantificación de LPC, ya que no se observaron impurezas en los análisis de RMN. Para favorecer la disolución total del estándar se agregó un volumen mínimo de DMSO (20 μ l) y se disolvió en metanol.

El análisis de los cristales se realizó en un HPLC-DAD (Waters), equipado con una columna de 4,60 mm de ancho y 150 mm de alto (JUPITER C18 5 μ m, Waters) trabajando a un flujo de 1 ml/min. La fase móvil consistió en ACN y ácido fosfórico (H_2PO_3) al 0,1 % V/V en agua, el gradiente que se utilizó para la corrida se muestra en la tabla. Se inyectó 15 μ l de la muestra, la detección se realizó a 210 nm y la temperatura del horno se seleccionó en 28 °C.

Tabla 11. Gradiente de corrida en el HPLC-DAD de una muestra de LPC

Tiempo (min)	% ACN	% AGUA (0,1 % H_2PO_3)
0	50	50
4	65	35
6	69	31
13	69	31
18	99	1

3. Curva de calibrado

3.1. Preparación del estándar

Se preparó una solución del estándar en metanol con una concentración de 1,60 mg/ml, para lo cual se utilizó 20 μ l de DMSO para asegurar la disolución completa de los cristales. Se realizaron diluciones de la solución de estándar para obtener un rango de concentración de 0,128-0,8 mg/ml.

Se inyectaron en el HPLC-DAD 15 μ l de cada dilución y del blanco de disolventes por duplicado en el HPLC y se corrieron utilizando el gradiente descrito en el apartado 1. Se

trabajó a un flujo de 1 ml/min y 28 °C de temperatura. La detección se llevó a cabo a 210 nm.

Se integraron los picos que corresponden a la muestra de LPC y se obtuvo el área total de los picos. Con estos datos, se construyó la curva de calibrado para la cuantificación de LPC. El área es un promedio de los duplicados. De la curva de calibrado se obtuvo la ecuación de la recta.

Se obtuvieron a partir de la curva los LOQ y LOD, límites de cuantificación y de detección respectivamente. El LOQ se calculó como $3\sigma_r/m$ y LOD como $10\sigma_r/m$, donde σ_r es la desviación de los residuales del ajuste por cuadrados mínimos de la curva de calibración y m es la pendiente de la recta de calibrado. Este método tiene en cuenta todo el rango de trabajo del método analítico.

3.2. Preparación de muestras a cuantificar

Se cuantificó el retenido obtenido de la ultrafiltración (ver capítulo 1, apartado 1.2.) por HPLC-DAD. Para lo cual, se llevó a cabo la precipitación de los LPCs con HCl concentrado y extracción del precipitado obtenido (ver descripción de las técnicas en el capítulo 1 apartado 4). Este procedimiento se realizó por duplicado sobre dos retenidos liofilizados provenientes de dos cultivos de diferentes días. Se prepararon soluciones en metanol de los extractos obtenidos utilizando DMSO como co-disolvente en una concentración de 1,53 mg/ml, la cual se diluyó para inyectar en el HPLC. Se utilizaron las mismas condiciones de corrida que para el estándar. De la misma forma se integraron los picos y se tomó el área bajo la curva. El valor obtenido de la cuantificación corresponde al promedio de los duplicados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Barrido espectral y perfil cromatográfico de los LPC

Se analizó la absorbancia de los LPC en el UV-Visible mediante barrido espectral y se encontró un máximo de absorbancia a una longitud de onda de 213 nm, lo cual permitió la detección y cuantificación de los LPCs mediante HPLC-DAD. El espectro se muestra en la figura 36.

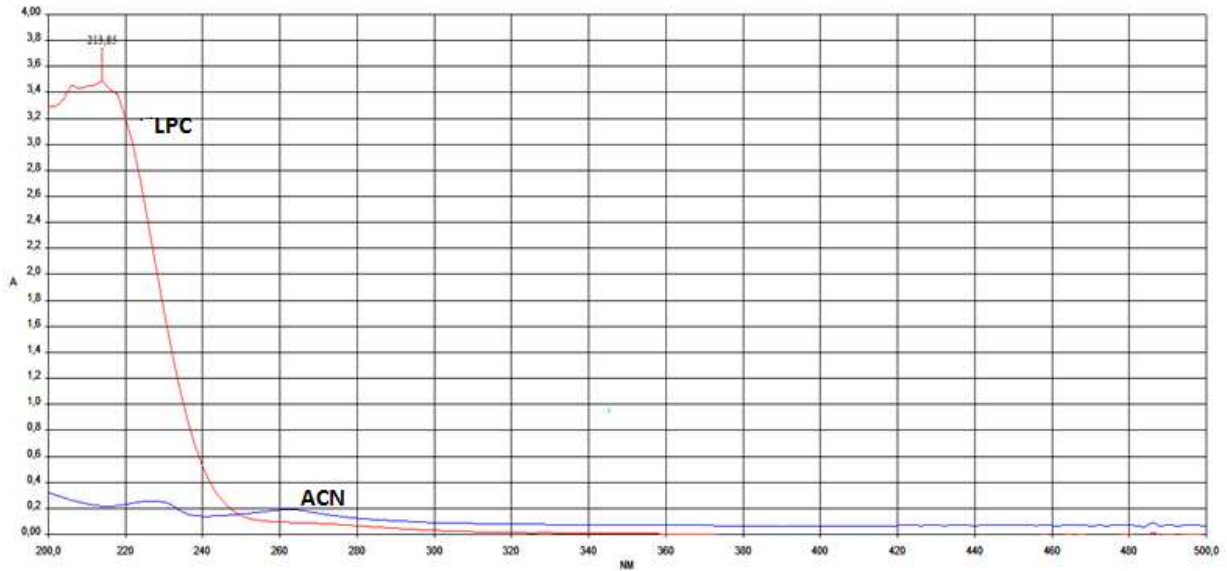


Figura 36. Barrido espectral de LPC en el rango de 200- 800 nm: el espectro de color rojo muestra el perfil de absorbancia de los LPCs disueltos en ACN y el azul el del blanco del ACN.

Dado los resultados anteriores, el análisis por HPLC-DAD se realizó a 210 nm, utilizando un volumen mínimo de DMSO para asegurar la disolución completa de los cristales. La elución de los compuestos comenzó con un porcentaje de ACN del 69 % V/V y finalizó la elución con un 80 % V/V aproximadamente. Estos resultados permitieron plantear una técnica de cuantificación por HPLC utilizando como estándar los cristales de WLIP y sus variantes naturales, ya que los estudios de caracterización demostraron la pureza de los mismos. El perfil cromatográfico se muestra en la figura 37, en el cual se puede observar el pico del DMSO y los picos correspondientes a los LPCs con un tr de 12,070 y 13,525 min.

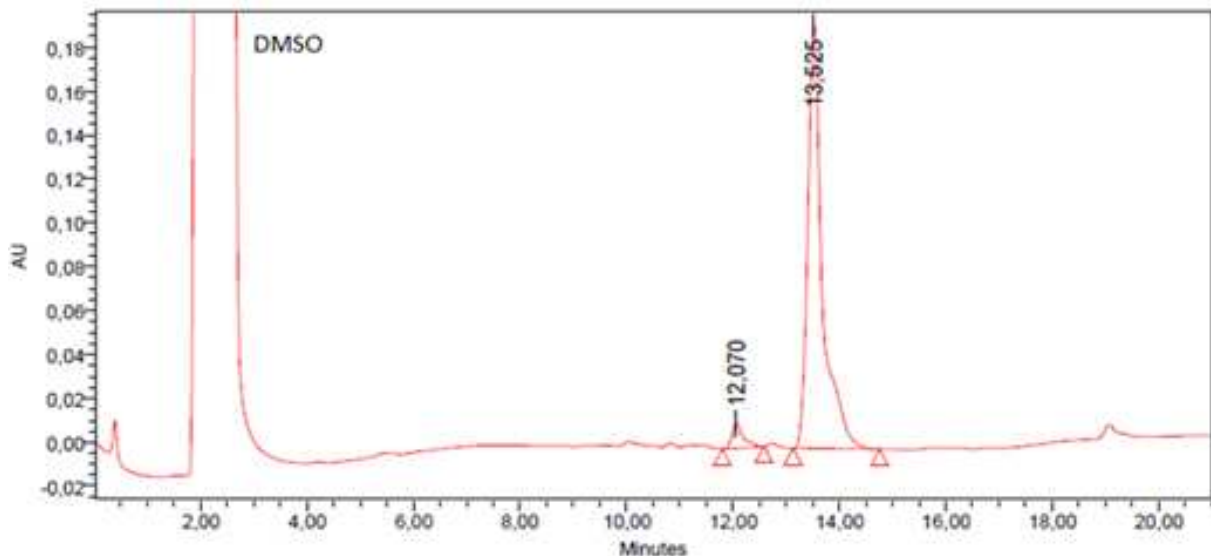


Figura 37. Perfil cromatográfico de los cristales de LPC a 210 nm. Se observa el pico de elución del DMSO que se utilizó como co-disolvente y los picos a tiempos de retención de 12,07 min y 13,53 correspondiente a los LPCs.

2. Curva de calibrado y cuantificación del retenido

Se cuantificaron dos muestras de retenido liofilizado por duplicado de distintos cultivos (lotes), las que se denominaron A y B. Las muestras de retenido A y B a cuantificar fueron tratadas con HCl y extraídas con una mezcla de cloroformo y etanol previo a la inyección como lo recomiendan diferentes autores, en esta etapa los LPCs se concentran y se evita la cuantificación de posibles impurezas [158],[159]. El sólido obtenido se pesó y se calculó el % P/P y % P/V, para tener una idea de la concentración de BSm total en cada uno de los cultivos. Las masas (mg) utilizadas y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Cuantificación del BSm total por el método de precipitación y extracción con solvente.

Muestra	Vol.retenido (ml)	Masa retenido (mg)	Extracto (mg)	% P/V	g/l
A1	3,7	165,0	75,0	2	20
A2	3,5	163,0	68,7	2	20
B1	2,8	157,0	64,0	2	20
B2	3,2	176,0	63,2	2	20

Para construir la curva de calibrado se realizaron diferentes diluciones de la muestra estándar (0,128-0,8 mg/ml), se inyectaron en el HPLC-DAD a 210 nm y se obtuvo el área

bajos los picos (tabla 13). Con los datos se graficó una curva de calibrado de la concentración de LPC (mg/ml), la cual se muestra en la figura 37.

Tabla 13: Mediciones de las diluciones de la muestra estándar para construir la curva de calibrado.

LPC (mg/ml)	Área total (210 nm)
0,128	962222 ± 10023
0,160	1185575 ± 3092
0,288	2211105 ± 11387
0,480	3728088 ± 9437
0,800	6151542 ± 21142

Las mediciones se realizaron por duplicado y se muestran con su correspondiente desviación estándar.

A partir del coeficiente de determinación r^2 obtenido de la regresión simple se calculó el coeficiente de Pearson r :1 el cual demuestra que existe una asociación lineal entre las variables x (concentración de LPC) y de y (área total).

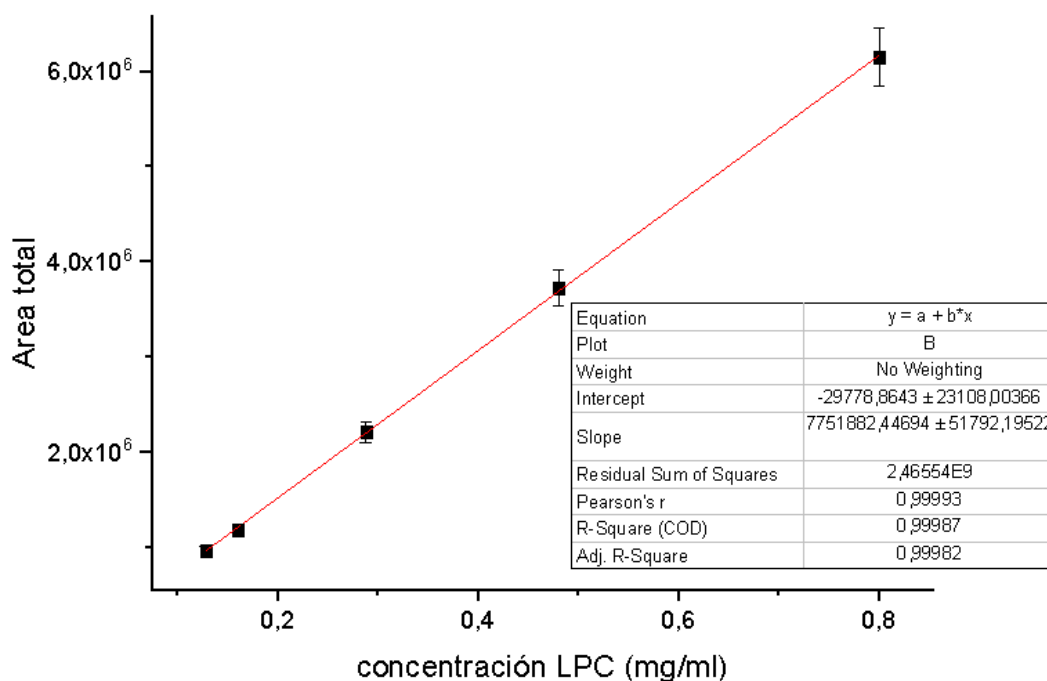


Figura 38. Curva de calibrado de WLIP, la misma se realizó con el programa OriginPro, 2018.

Tabla 14. Cuantificación del LPC por HPLC-DAD

	Área total	Conc. LPC (% P/V)
Lote A		
extracción 1	4336643 ± 32699	1,67 ± 0,02
extracción 2	5111478 ± 2458	1,71 ± 0,01
Lote B		
extracción 1	5283363 ± 116889	1,82 ± 0,05
extracción 2	5267773 ± 17374	1,75 ± 0,02

Las áreas corresponden al promedio de las mediciones por duplicado. La concentración de los LPC se muestra con su correspondiente desviación estándar.

Se obtuvieron las concentraciones de los LPCs de los extractos de cada uno de los retenidos y sus duplicados a partir de los datos de la curva de regresión, el volumen procesado, masa del extracto y diluciones. Se encontró que la cepa utilizada produjo 17 g/l de WLIP y sus variantes estructurales en el lote A y 18 g/l en el B, estos resultados fueron calculados sobre una muestra concentrada (retenido), por lo que la concentración en el sobrenadante de cultivo se reduce a valores cercanos a 0,4 g/l para A 0,5 g/l para B. Estos valores parecerían ser muy alentadores comparándolos con los publicados para LPCs producidos por otros microorganismos como es el caso de *Bacillus subtilis* y cuantificados con técnicas cromatográficas. Se encontró que *Bacillus subtilis* libera al sobrenadante de cultivo concentraciones de surfactina de 0,2 g/l [160] y de iturina 0,8 g/l [158]. No se han publicado hasta la fecha trabajos que informen el rendimiento de la producción basados en estudios por HPLC-DAD de WLIP y de ningún otro LPC producido a partir de cepas del género *Pseudomonas*.

Se muestra en la tabla los resultados de la cuantificación de LPC por HPLC expresadas a modo de comparación obtenido en los extractos (BSm total). Estos resultados podrían indicar que cerca del 80 % del BSm total corresponde a LPC.

Se calculó también a partir de la curva de calibrado el LOQ que es la concentración más baja de un analito que un proceso analítico se puede diferenciar confiablemente de los niveles de ruido, por otro lado, el LOD es la concentración más baja de la curva estándar que puede medirse con precisión, exactitud y variabilidad aceptable. Se encontró un valor de 0,01 g/l para el LOQ y un valor de 0,04 g/l para el LOD.

Se publicaron diferentes trabajos que utilizan técnicas de cuantificación por HPLC, en muchos casos se opta por etapas de pre-tratamiento para pre purificar los LPC, sin embargo se han reportado técnicas de cuantificaciones por HPLC en forma directa [159]. En este trabajo no se comparó la cuantificación con y sin pre-tratamiento, pero se cree

que estas etapas, como precipitación ácida del principio activo y extracción con disolventes, son importantes para evitar sobreestimaciones. A pesar de que se obtuvieron buenos rendimientos se debería estudiar el porcentaje de recuperación luego de las etapas de pre-purificación utilizando una concentración conocida de estándar para evaluar si se está recuperando la totalidad del BSm.

CONCLUSIONES

Se logró desarrollar una técnica de cuantificación por HPLC-DAD a 210 nm utilizando como estándar una muestra de cristales de LPC. La curva de calibrado, resultó tener buena sensibilidad y asociación lineal. Esto resulta interesante ya que evita la necesidad de derivatizar, lo cual muchas veces es una fuente de error ya que la absorción depende de cuánto se derivatizó el compuesto.

Se logró obtener una curva de calibrado de LPCs con un rango de concentración de 0,04 a 0,8 g/l. Con esta técnica se cuantificó la cantidad de LPC presente en un extracto correspondiente al BSm total. Se calculó, a partir de los resultados, el porcentaje de LPC del BSm total, lo que indicó que el 80 % corresponde a LPC. Esto confirma nuevamente lo encontrado en el capítulo 4, que el compuesto que reduce la γ a valores cercanos a 27 mN/m, además es el analito que se encuentra en mayor proporción. Para realizar la curva de calibrado se utilizó el WLIP purificado y caracterizado en este trabajo, se debería haber comparado los valores con un estándar de WLIP comercial.

Conclusiones

CONCLUSIONES

- En conclusión, en el presente trabajo de tesis se logró purificar mediante extracción en fase sólida en cartuchos C18 y cristalización el BSM de interés producido por la empresa que cofinancia este trabajo. Se determinó mediante varios estudios (RMN en 1D y 2D, MS²) que el BSM pertenece a la familia de los LPCs. Estudios más complejos como cristalografía de rayos X permitieron determinar que el LPC producido por *Pseudomonas* es WLIP y a demás produce otros LPC que sólo difieren en la longitud del ácido graso. Estos son variantes naturales de WLIP y se han reportado para otros LPCs.
- Se logró solubilizar el compuesto puro en medio acuoso utilizando una solución proteica, lo que permitió obtener un valor de γ y CMC en esas condiciones, se encontró que estos valores superan a muchas surfactantes químicos.
- Los LPCs purificados resultaron tener una alta capacidad humectante a muy baja concentración, lo que posibilitaría su uso como co-adyuvantes en productos de interés agronómico con el objetivo de lograr una mayor eficiencia de los productos que son pulverizados por ejemplo herbicidas o fertilizantes. Cabe aclarar, que el uso de este tipo de BSms en el área agroindustrial requiere reducir los costos en la etapa de producción y purificación. Estos compuestos, podrían ser de interés en el área cosmética y alimentaria convirtiéndose en un producto de alto valor agregado que amerite solventar los altos costos de producción y del *downstream*.
- No se encontraron resultados alentadores al analizar la capacidad antimicrobiana de WLIP y sus variantes naturales, a pesar de que se han publicado numerosos trabajos que informan la inhibición del crecimiento de géneros bacterianos en su gran mayoría Gram positivas y algunas Gram negativas como *Xantomonas*.
- En este trabajo también se incluyó el desarrollo de una técnica de cuantificación por HPLC aprovechando la posibilidad de detectar los LPC por UV, sin la necesidad de derivatizarlos, esta técnica es una herramienta muy confiable y práctica a la hora de cuantificar el analito de interés al finalizar el proceso de producción.

Bibliografia

BIBLIOGRAFÍA

1. V Singh (2012) Biosurfactant – Isolation, Production, Purification & Significance. *Int J Sci Res Publ* 2:2250–3153.
2. J Israelachvili (2011) Intermolecular and Surface Forces. *Intermol Surf Forces* 3 era edición ,Elseiver 706 .
3. IM Banat, RS Makkar, SS Cameotra (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 53:495–508.
4. Y Takata (2016) Surfactants and biosurfactants. En *Biocolloid Biointerface Sci* (Ed Hiroyuki ohshima), *Willey Song* 2:1051–1055
5. S Vijayakuma, V Saravanan (2015) Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Res J Microbiol* 10:181–192.
6. JD Desai, IM Banat (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:47–64.
7. SK Satpute, GA Plaza, AG Banpurkar (2017) Biosurfactants' Production from Renewable Natural Resources: Example of Innovative and Smart Technology in Circular Bioeconomy. *Manag Syst Prod Eng* 25:46–54.
8. G Bognolo (1999) Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 152:41–52.
9. S Erum, A Faiza, B Uzma, ASI Jameela (2013) Classification and Industrial Applications of Biosurfactants. *Nat Appl Sci* 4:243–252.
10. DKF Santos, RD Rufino, JM Luna, VA.Santos, LA Sarubbo (2016) Biosurfactants: Multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int J Mol Sci* 17:1–31.
11. BSM Saharan, RK Sahu, D Sharma (2012) A review on biosurfactants: Fermentation, current developments and perspectives. *Genet. Eng. Biotechnol. J.* 2011:1–14
12. DJ Mc Clements, CE Gumus (2016) Natural emulsifiers - Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Adv Colloid Interface Sci* 234:3–26 .
13. MC Cirigliano, GM Carman (1984) Isolation of a Bioemulsifier From *Candida-Lipolytica*. *Appl Environ Microbiol* 48:747–750
14. E Rosenberg, EZ Ron (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 52:154–62 .

15. AM Abdel-Mawgoud, F Lépine, E Déziel (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1323–1336.
16. D Kitamoto, H Isoda, T Nakahara (2002) Functions and Potential Applications of Glycolipid Biosurfactants - from Energy-Saving Materials to Gene Delivery Carriers -. *Biosci Bioengineering* 94:187–201
17. KSM Rahman, E Gakpe (2008) Production, characterisation and applications of biosurfactant. *Rev Biotechnol* 7:360–370 .
18. JM Raaijmakers, I De Bruijn, MJD De Kock (2006) Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated *Pseudomonas* spp.: Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation. *Mol Plant-Microbe Interact* 19:699–710.
19. MA Marahiel, T Stachelhaus, HD Mootz (1997) Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev* 97:2651–2674.
20. N Roongsawang, K Washio, M Morikawa (2011) Diversity of Nonribosomal Peptide Synthetases Involved in the Biosynthesis of Lipopeptide Biosurfactants. *Int J Mol Sci* 12:141–172 .
21. C Song, MJ Kropf (2015) Regulation and natural functions of lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas*.
22. Y Hirata, M Ryu, Y Oda, K Igarashi, A Nagatsuka, T Furuta, M Sugiura (2009) Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. *J Biosci Bioeng* 108:142–146 .
23. KC Loh, B Cao (2008) Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*-A review of proteomics studies. *Enzyme Microb Technol* 43:1–12.
24. CN Mulligan (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133:183–198
25. D Haas, G Défago (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat Rev Microbiol* 3:307–19.
26. N Kosaric (2001) Biosurfactants and their applications for soil bioremediation. *Food Technol Biotechnol* 39:295–304
27. JM Raaijmakers, I De Bruijn, O Nybroe, M Ongena (2010) Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: More than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 34:1037–1062.
28. H Gross, JE Loper (2009) Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat Prod Rep* 26:1408–1446.

29. JM Raaijmakers, I De Bruijn, MJD De Kock (2006) Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated *Pseudomonas* spp. Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation. *Am Phytopathol Soc* 19:699–710.
30. H Gross, VO Stockwell, MD Henkels, B Nowak-Thompson, JE Loper., WH Gerwick, (2007) The Genom isotopic Approach: A Systematic Method to Isolate Products of Orphan Biosynthetic Gene Clusters. *Chem Biol* 14:53–63.
31. T Janek, M Lukaszewicz, T Rezanka, A Krasowska (2010) Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresour Technol* 101:6118–6123.
32. HB Bode, D Reimer, SW Fuchs, F Kirchner, C Dauth, C Kegler, W Lorenzen, A O Brachmann, P Grün (2012) Determination of the absolute configuration of peptide natural products by using stable isotope labeling and mass spectrometry. *Chem - A Eur J* 18:2342–2348.
33. C Bassarello, S Lazzaroni, G Bifulco, P Lo Cantore, NS Iacobellis, R Riccio, L Gomez-Paloma, A Evidente (2004) Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *J Nat Prod* 67:811–816.
34. I Vallet-Gely, O Opota, A Boniface, A Novikov, Lemaitre B (2010) A secondary metabolite acting as a signalling molecule controls *Pseudomonas entomophila* virulence. *Cell Microbiol* 12:1666–1679.
35. I Kuiper, EL Lagendijk, R Pickford, JP Derrick, GEM Lamers, JE Thomas-Oates, BJJ Lugtenberg, Bloemberg GV. (2004) Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol* 51:97–113.
36. M Zongwang, N Geudens, NP Kieu, D Sinnaeve, M Ongena, JC Martins, Höfte M (2016) Biosynthesis, chemical structure, and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species. *Front Microbiol* 7:1–16.
37. MV Laycock, PD Hildebrand, P Thibault, JA Walter, Wright, LCJ (1991) Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *J Agric Food Chem* 39:483–489.
38. De Bruijn, MJ De Kock, P De Waard, TA Van Beek, JM Raaijmakers (2008) Massetolide A Biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 190:2777–2789.

39. TH Nielsen, C Christophersen, U Anthoni, J Sorensen (1999) Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties produced by *Pseudomonas fluorescens* DR54. *Appl Microbiol* 87:80–90.
40. H Rokni-Zadeh, W Li, A Sanchez-Rodriguez, D Sinnaeve, J Rozenski, JC Martins R De Mot (2012) Genetic and functional characterization of cyclic lipopeptide white-line-inducing principle (WLIP) production by rice rhizosphere isolate *Pseudomonas putida* RW10S2. *Appl Environ Microbiol* 78:4826–4834.
41. MSC Pedras, N Ismaila, JW Quail, SM Boyetchko (2003) Structure, chemistry, and biological activity of pseudophomins A and B, new cyclic lipodepsipeptides isolated from the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry* 62:1105–1114.
42. D Sinnaeve, C Michaux, J Van hemel, J Vandenkerckhove, E Peys, FAM Borremans, B Sas, J Wouters, JC Martins. (2009) Structure and X-ray conformation of pseudodesmins A and B, two new cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* bacteria. *Tetrahedron* 65:4173–4181.
43. J Gerard, R Lloyd, T Barsby, Haden P, MT Kelly, RJ Andersen (1997) Massetolides A-H, Antimycobacterial Cyclic Depsipeptides Produced by Two Pseudomonads Isolated from Marine Habitats. *J Nat Prod* 3864:223–229
44. N Geudens, De Vleeschouwer M, K Fehør, H Rokni-zadeh (2014) Impact of a Stereocentre Inversion in Cyclic Lipodepsipeptides from the Viscosin Group: A Comparative Study of the Viscosinamide and Pseudodesmin Conformation and Self Assembly. *ChemBioChem* 15:2736–2746.
45. M Ongena, P Jacques (2008) Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 16:115–125.
46. L Volpon, P Tsan, Z Majer, E Vass, M Hollósi, V Noguéra, JM Lancelin, Besson, F (2007) NMR structure determination of a synthetic analogue of bacillomycin Lc reveals the strategic role of l-Asn1 in the natural iturinic antibiotics. *Spectrochim Acta Mol Biomol Spectrosc* 67:1374–1381.
47. KR Meena, SS Kanwar (2015) Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: Applications in food safety and therapeutics. *Biomed Res*.
48. J Henrichsen (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* 36:478–503
49. RM Harshey (2003) Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annu Rev Microbiol* 57:249–273.

50. J D'ae, NP Kieu, V Léclère, Tokarski C, FE Olorunleke, K De Maeyer, P Jacques, MHöfte, Ongena M (2014) To settle or to move? The interplay between two classes of cyclic lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a. *Environ Microbiol* 16:2282–2300.
51. Stewart PS, Franklin MJ (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol* 6:199–210 . doi: 10.1038/nrmicro1838
52. L Hall-Stoodley, JW Costerton, P Stoodley (2004) Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2:95–108.
53. T Danhorn, C Fuqua (2007) Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61:401–422.
54. I De Bruijn, MJD De Kock, M Yang, De Waard, VB Pieter, A Teris. Raaijmakers, JM (2007) Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Mol Microbiol* 63:417–428.
55. E Buber, A Stindl, NL Acan, (2002) Antimycobacterial activity of lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas syringae* pv *syringae* B359. *Nat Prod Lett* 16:419–423 .
56. Nybroe O, Sorensen J, Veterinary R (2004) LIPOPEPTIDES BY FLUORESCENT. *Plenum Publ* 3:147–172
57. Li W, H Rokni-Zadeh, M De Vleeschouwer, MGK Ghequire, D Sinnaeve, GLR Xie, A Jef Madder, JC Martins, R De Mot (2013) The Antimicrobial Compound Xantholysin Defines a New Group of *Pseudomonas* Cyclic Lipopeptides. *PLoS One* 8:1–16 .
58. TH Nielsen, C Thrane, C Christophersen, U Anthoni, J Sørensen (2000) Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin--a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *J Appl Microbiol* 89:992–1001
59. C Thrane, S Olsson, TH Nielsen, J Sørensen (1999) Vital fluorescent stains for detection of stress in *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* challenged with viscosinamide from *Pseudomonas fluorescens* DR54. *FEMS Microbiol Ecol* 30:11–23.
60. C Thrane, TH Nielsen, MN Nielsen, J Sørensen, S Olsson (2000) Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* 33:139–146
61. JE Van De Mortel, H Tran, F Govers, JM Raaijmakers (2009) Cellular responses of the late blight pathogen *Phytophthora infestans* to cyclic lipopeptide surfactants and their dependence on G proteins. *Appl Environ Microbiol* 75:4950–4957.

62. A Jousset, E Lara, LG Wall, C Valverde (2006) Secondary metabolites help biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to escape protozoan grazing. *Appl Environ Microbiol* 72:7083–7090.
63. C Matz, S Kjelleberg (2005) Off the hook - How bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol* 13:302–307.
64. JB Andersen, B Koch, TH Nielsen, D Sørensen, M Hansen, O Nybroe, C Christophersen, J Sørensen, S Molin, M Givskov (2003) Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology* 149:37–46.
65. M Mazzola, I De Bruijn, MF Cohen, JM Raaijmakers (2009) Protozoan-induced regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis is an effective predation defense mechanism for *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* 75:6804–6811 .
66. SS Cameotra, RS Makkar (2004) Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr Opin Microbiol* 7:262–266.
67. JM Campos, LA Sarubbo, JM De Luna, RD Rufino, IM Banat (2013) Microbial Biosurfactants as Additives for Food Industries via Montenegro Stamford. *Biotechnol Prog* 29:1097–1108 .
68. IP Van Haesendonck, ECA Vanzeveren (2004) Rhamnolipids in bakery products. W.O. 2004/040984, International application patent
69. A Varvaresou, K Lakovou (2015) Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. *Lett Appl Microbiol* 61:214–23 .
70. V Piljac, G Piljac (1995) Pharmaceutical Preparation Bases on Rhamnolipid. US Patent 5455232A
71. K Kakugawa, M Tamai, K Imamura, K Miyamoto, S Miyoshi, Y Morinaga, O Suzuki, T Miyakawa, KM Iyamoto (2002) Isolation of Yeast *Kurtzmanomyces* sp . I-11 , Novel Producer of Mannosylerythritol Lipid. *Biosci Biotechnol Biochem* 66:188–191.
72. Mukherjee, P Das, R Sen (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* 24:509–515.
73. E Gharaei-Fathabad (2011) Biosurfactants in Pharmaceutical Industry: A Mini-Review. *Am J Drug Discov Dev* 1:58–69
74. Z Zhao, Q Wang, K Wang, B Kemp, L Changhong, G Yucheng (2010) Bioresource Technology Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresour Technol* 101:292–297.

75. F Rivardo, R J Turner, G Allegrone, H Ceri (2009) Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 83:541–553.
76. P Das, S Mukherjee, R Sen (2009) Antiadhesive action of a marine microbial surfactant. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 71:183–186.
77. Francy DS, Thomas JM, Raymond RL (1991) Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 8:237–245
78. Y Zhang, R M Miller (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl Environ Microbiol* 58:3276–3282
79. J R Mihelcic, D R Lueking, R J Mitzell, J M Stapleton (1993) Bioavailability of sorbed- and separate-phase chemicals. *Biodegradation* 4:141–153
80. F Volkering, A M Breure, G Johan (1995) Influence of Nonionic Surfactants on Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 61:1699–1705
81. Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K (1999) Petroleum Biodegradation in Marine Environments. *J Molec Microbiol Biotechnol* 1:63–70
82. Aronstein BN, Calvillo YM, Alexander M (1991) Effect of Surfactants at Low Concentrations on the Desorption and Biodegradation of Sorbed Aromatic Compounds in Soil. *Environ Sci Technol* 25:1728–1731
83. G Berg, A G Seech, H Lee (1990) Identification and characterization of a soil bacterium with extracellular emulsifying. *J Environ Sci Heal* 7:753–764.
84. C N Mulligan, R N Yong, B F GibBSm (1999) On the Use of Biosurfactants for the Removal of Heavy Metals from O & Contaminated Soil. *Process Saf Prog* 18:50–54
85. Rodrigues, I M Banat, J Teixeira, R Oliveira (2006) Biosurfactants: Potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother* 57:609–618 .
86. Mulligan CN, Yong RN, GibBSm BF, S James, JHP Bennet. (1999) Metal Removal from Contaminated Soil and Sediments by the Biosurfactant Surfactin. *Environ Sci Technol* 33:3812–3820
87. H Tan, J T Champion, J F Artola, M L Brusseau, R M Miller. (1994) Complexation of Cadmium by a Rhamnolipid Biosurfactant. *Environ Sci Technol* 28:2402–2406
88. I Grangemard, J Wallach, R Maget-Dana, F Peypoux (2001) Lichenysin: A more efficient cation chelator than surfactin. *Appl Biochem Biotechnol* 90:199–210.

89. IM Banat (1995) Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: A review. *Bioresour Technol* 51:1–12
90. P Biniarz, M Łukaszewicz, T Janek (2016) Critical Reviews in Biotechnology Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. *Crit. Rev. Biotechnol*
91. R Makkar, S Cameotra (2002) An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 58:428–434.
92. M Robert, ME Mercadé, MP Bosch, JL Parra, MJ Espuny, MA Manresa, J Guinea (1989) Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Biotechnol Lett* 11:871–874 .
93. CN Mulligan, BF Giblin (1989) Correlation of Nitrogen-Metabolism with Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 55:3016–3019
94. L Weber, C Döge, G Haufe, H Rolf, HP Kleber (1992) Oxygenation of hexadecane in the biosynthesis of cyclic glycolipids in *Torulopsis apicola*. *Biocatal Biotransformation* 5:267–272.
95. Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M (2007) Functional analysis of a pyoverdine synthetase from *Pseudomonas* sp. MIS38. *Biosci Biotechnol Biochem* 71:2002–2009.
96. SP Lim, N Roongsawang, K Washio, M Morikawa (2009) Flexible exportation mechanisms of arthrofactin in *Pseudomonas* sp. MIS38. *J Appl Microbiol* 107:157–166.
97. C Tanford (1980) The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. *J. Polym. Sci.* 18:687–690.
98. A Fiechter (1992) Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol* 10:208–217.
99. W Harkins, H Jordan (1930) A Method for the Determination of Surface and Interfacial Tension from the Maximum Pull on a Ring. *J Am Soc* 52:1751–1772.
100. P Jauregi, F Coutte, L Catiau, D Lecouturier, J Philippe (2013) Micelle size characterization of lipopeptides produced by *B. subtilis* and their recovery by the two-step ultrafiltration process. *Sep Purif Technol* 104:175–182.
101. O Pornsunthorntawe, S Chavadej, R Rujiravanit (2009) Solution properties and vesicle formation of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 72:6–15.

102. YH Wei, CLC heng, CC Chien, HM Wan (2008) Enhanced di-rhamnolipid production with an indigenous isolate *Pseudomonas aeruginosa* J16. *Process Biochem* 43:769–774.
103. M Nitschke, SGVAO Costa, J Contiero (2005) Rhamnolipid Surfactants: An Update on the General Aspects of These Remarkable Biomolecules. *Biotechnol Prog* 21:1593–1600.
104. SK Satpute, AG Banpurkar, PK Dhakephalkar, IM Banat, BA Chopade (2010) Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: A review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30:127–144
105. M Inès, G Dhouha (2015) Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. *Peptides* 71:100–112.
106. V Rangarajan, G Dhanarajan, R Sen (2014) Improved performance of cross-flow ultrafiltration for the recovery and purification of Ca²⁺ conditioned lipopeptides in diafiltration mode of operation. *J Memb Sci* 454:436–443.
107. H Yang, X Li, X Li, H Yu, Z Shen (2015) Identification of lipopeptide isoforms by MALDI-TOF-MS/MS based on the simultaneous purification of iturin, fengycin, and surfactin by RP-HPLC. *Anal Bioanal Chem* 407:2529–2542.
108. BH Williams, Y Hathout, C Fenselau (2002) Structural characterization of lipopeptide biomarkers isolated from *Bacillus globigii*. *J Mass Spectrom* 37:259–264.
109. A Manso Pajaron, CG De Koster, W Heerma, M Schmidt, J Haverkamp (1993) Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Glycoconj J* 10:219–226 .
110. ZA Raza, ZM Khalid, IM Banat (2009) Characterization of rhamnolipids produced by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant strain grown on waste oils. *J Environ Sci Heal* 44:1367–1373.
111. PL du Noüy (1919) A new apparatus for measuring surface tension. *J Gen Physiol* 1:521–524 .
112. TJP Smyth, A Perfumo, S McClean, R Marchant, IM Banat. Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants, En *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. (Ed. KN Timmis), Springer 557–561 (2010).
113. TB Lotfabad, H Abassi, R Ahmadkhaniha, R Roostaazad, F Masoomi, HS Zahiri, G Ahmadian, H Vali, KA Noghabi. (2010) Structural characterization of a rhamnolipid-type biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* MR01: Enhancement of di-rhamnolipid proportion using gamma irradiation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 81:397–405.

114. E Rame (1997) Measuring Dynamic Contact Angles by the Wilhelmy Plate method. *Colloid Interface Sci* 251:245–251
115. F Han, RJ Mortishire-Smith, PB Rainey, DH Williams (1992) Structure of the white-line-inducing principle isolated from *Pseudomonas reactans*. *Acta Crystallogr* 48:1965–1968.
116. W Xia, Z Du, Q Cui, Dong, W Hao, H Fuyi, T Panqing, Ch Yong (2014) Biosurfactant produced by novel *Pseudomonas* sp. WJ6 with biodegradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Hazard Mater* 276:489–498
117. HS Saini, BE Barragán-Huerta, A Lebrón-Paler, Pemberton, Jeanne E, RR Vázquez, AM Burns, MT Marron, CJ Seliga, AAL Gunatilaka, RM Maier (2008) Efficient Purification of the Biosurfactant Viscosin from *Pseudomonas libanensis* Strain M9-3 and Its Physicochemical and Biological Properties. *J Nat Prod* 71:1011–1015.
118. H Rokni-Zadeh, W Li, A Sanchez-Rodriguez, D Sinnaeve, J Rozenski, JC Martins, R De Mot (2012) Genetic and Functional Characterization of Cyclic Lipopeptide White-Line-Inducing Principle (WLIP) Production by Rice Rhizosphere Isolate *Pseudomonas putida* RW10S2. *Appl Environ Microbiol* 78:4826–4834.
119. RJ Mottishire-Smith, JC Nutkins, LC Packman, CL Brodey, PB Rainey, K Johnstone, Williams, DH (1991) Determination of the structure of an extracellular peptide produced by the mushroom saprotroph *Pseudomonas reactans*. *Tetrahedron* 41:3645–3654
120. M Coraiola, P Lo Cantore, S Lazzaroni, A Evidente, NS Iacobellis, Dalla Serra, M (2006) WLIP and tolaasin I, lipodepsipeptides from *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas tolaasii*, permeabilise model membranes. *Biochim Biophys Acta* 1758:1713–1722.
121. XY Liu, SZ Yang, BZ Mu (2009) Production and characterization of a C15-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. *Process Biochem* 44:1144–1151.
122. M De Vleeschouwer, JC Martins, A Madder (2016) First total synthesis of WLIP: On the importance of correct protecting group choice. *J Pept Sci* 22:149–155.
123. DZ Zang, RL Li, YG Liu, LM Tao, Tian Li (2010) Two New Antifungal Cyclic Lipopeptides from *Bacillus marinus* B-9987. *Chem Pharm Bull* 58:1630–1634.
124. P Marfey (1984) Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene. *Methods* 49:591–596
125. G Szokan, G Mezo, F Hudecz (1988) Application of marfey's reagent in racemization studies of amino acids and peptides. *J Chromatogr A* 444:115–122 .

126. C Ullrich, B Kluge, Z Palacz, J Vater (1991) Cell-Free Biosynthesis of Surfactin, a Cyclic Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 30:6503–6508.
127. JF Dubern, GV Bloemberg (2006) Influence of environmental conditions on putisolvins I and II production in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *FEMS Microbiol Lett* 263:169–175.
128. N Geudens, M De Vleeschouwer, F Krisztina, H Rokni-Zadeh, MGK Ghequire, A Madder, R De Mot, JC Martins, D Sinnaeve (2014) Impact of a stereocentre inversion in cyclic lipodepsipeptides from the viscosin group: A comparative study of the viscosinamide and pseudodesmin conformation and self-assembly. *ChemBioChem* 15:2736–2746.
129. XY Liu, SZ Yang, BZ Mu (2008) Isolation and characterization of a C12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. *J Pept Sci* 14:1084–1095.
130. A Henriksen, U Anthoni, TH Nielsen, J Sørensen, C Christophersen, M Gajhede (2000) Cyclic lipoundecapeptide tensin from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *Cryst Struct Commun* 56:113–115.
131. D Sørensen, Nielsen TH (2001) Cyclic lipoundecapeptide amphisin. *Cryst Struct* 57:1123–1124
132. EZ Ron, E Rosenberg (2001) Natural roles of biosurfactants. *Environ Microbiol* 3:229–236.
133. S Pastewski, E Hallmann, K Medrzycka (2006) Physicochemical Aspects of the Application of Surfactants and Biosurfactants in Soil Remediation. *Environ Eng Sci* 23:579–588.
134. ML Hutchison, M Tester, DC Gross (1994) Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: a model for the mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *Mol plant-microbe Interact* 8:610–620.
135. Q Lin, W Jianlong (2010) Biodegradation characteristics of quinoline by *Pseudomonas putida*. *Bioresour Technol* 101:7683–7686.
136. T Schneider, HG Sahl (2010) An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *Int J Med Microbiol* 300:161–169.
137. DG Cooper, BG Goldenberg (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol* 53:224–229.
138. K Rajesh, G Sathyanarayana, K Suresh (2014) Production and Characterization of Biosurfactant by *Pseudomonas putida* MTCC 2467. *Biol Sci* 14:436–445

139. EL Gelamo, CHTP Silva, H Imasato, M Tabak (2002) Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: Spectroscopy and modelling. *Biochim Biophys Acta* 1594:84–99.
140. EL Gelamo, M Tabak (2000) Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. 56:2255–2271.
141. E Lissi, E Abuin, ME Lanio, C Alvarez (2002) A new and simple procedure for the evaluation of the association of surfactants to proteins. *J Biochem Biophys Methods* 50:261–268.
142. H Durchschlag, KJ Tiefenbach, S Gebauer, R Jaenicke (2001) Spectroscopic investigations of detergents and protein-detergent complexes. *J Mol Struct* 563:449–455.
143. A Zou, J Liu, Y Jin, F Liu, B Mu, (2014) Interaction Between Surfactin and Bovine Serum Albumin. *J Dispers Sci Technol* 35:48–55 .
144. TR Neu, T Härtner, K Poralla (1990) Surface active properties of viscosin: a peptidolipid antibiotic. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:518–520.
145. M Morikawa, H Daido, T Takao, S Murata, Y Shimonishi, T Imanaka (1993) A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter sp.* strain MIS38. *J Bacteriol* 175:6459–6466.
146. F Bak, L Bonnichsen, NOG Jorgensen, MH Nicolaisen, O Nybroe, (2014) The biosurfactant viscosin transiently stimulates n-hexadecane mineralization by a bacterial consortium. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:1475–1483.
147. S Voss, AJ Ulmer, G Jung, K H Wiesmüller, R Brock (2007) The activity of lipopeptide TLR2 agonists critically depends on the presence of solubilizers. *Eur J Immunol* 37:3489–3498.
148. SJ Joshi, HS uthar, AK Yadav, K Hingurao, A Nerurkar (2013) Occurrence of Biosurfactant Producing *Bacillus* spp. in Diverse Habitats. *ISRN Biotechnol* 2013:652340.
149. R Ramachandran, M Shrivastava, NN Narayanan, RL Thakur, A Chakrabarti, U Roy (2017) Evaluation of Antifungal Efficacy of Three New Cyclic Lipopeptides of the Class Bacillomycin from *Bacillus subtilis* RLID 12.1. *Antimicrob Agents Chemother* 62
150. MHM Isa, RA Frazier, P Jauregi (2008) A further study of the recovery and purification of surfactin from fermentation broth by membrane filtration. *Sep Purif Technol* 64:176–182.
151. SC Lin, YC Chen, YM Lin (1998) General approach for the development of high-performance liquid chromatography methods for biosurfactant analysis and purification. *J Chromatogr A* 825:149–159.

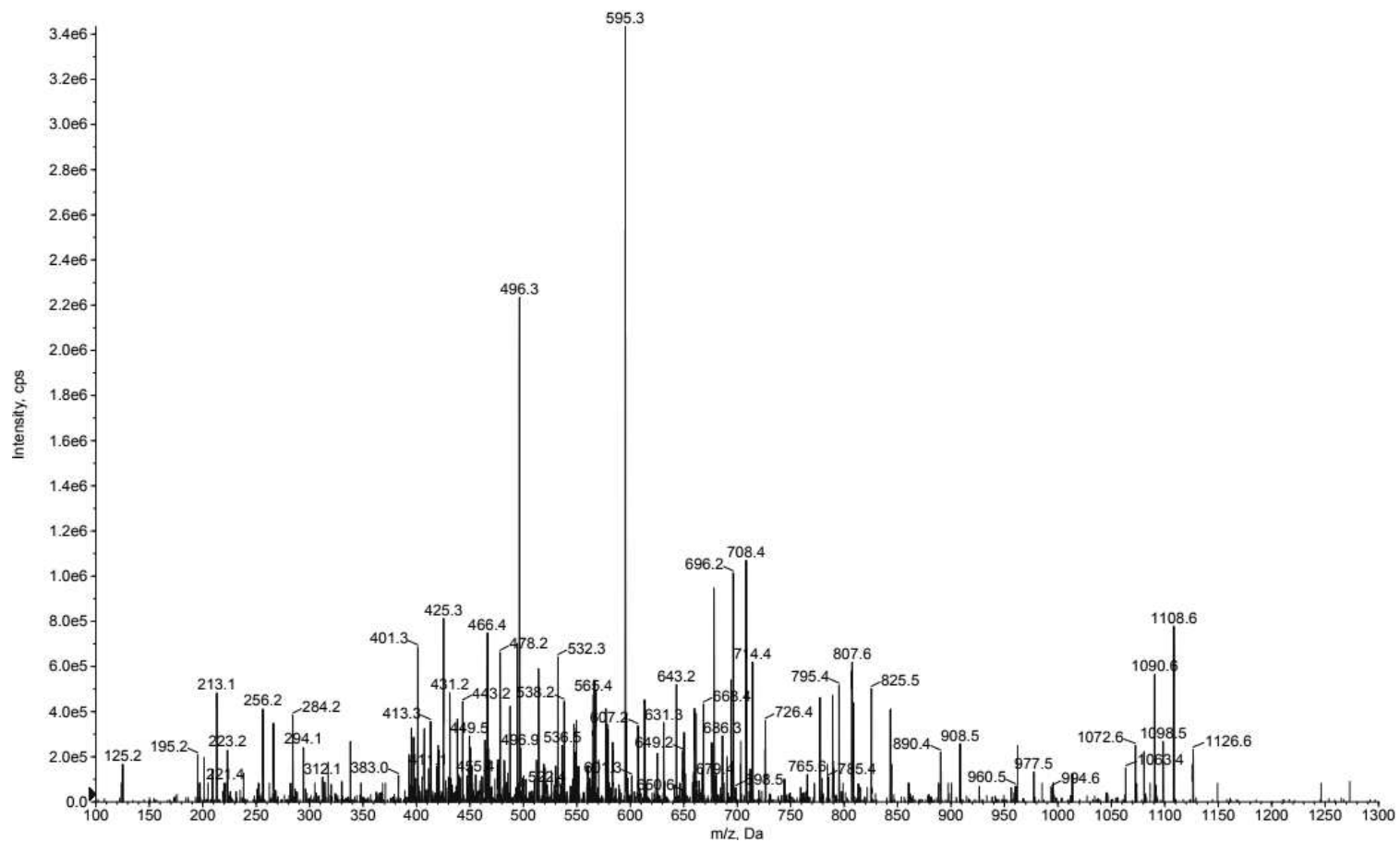
152. S Mukherjee, P Das, C Sivapathasekaran, R Sen (2009) Antimicrobial biosurfactants from marine *Bacillus circulans*: Extracellular synthesis and purification. *Lett Appl Microbiol* 48:281–288.
153. Y Meng, JF Liu, SZ Yang, RQ Ye, BZ Mu (2015) Quantification of Lipopeptides Using High-performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection after Derivatization. *Anal Sci* 31:377–82.
154. K Yokota, M Yatsuda, E Miwa, K Higuchi (2012) Comparative study on sample preparation methods for the HPLC quantification of iturin from culture supernatant of an antagonistic *Bacillus* strain. *J Int Soc Southeast Asian Agric Sci* 18:70–75
155. Biniarz P, Lukaszewicz M (2017) Direct quantification of lipopeptide biosurfactants in biological samples via HPLC and UPLC-MS requires sample modification with an organic solvent. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:4747–4759.
156. Kinsella K, Schulthess CP, Morris TF, Stuart JD (2009) Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biol Biochem* 41:374–379.

Anexo

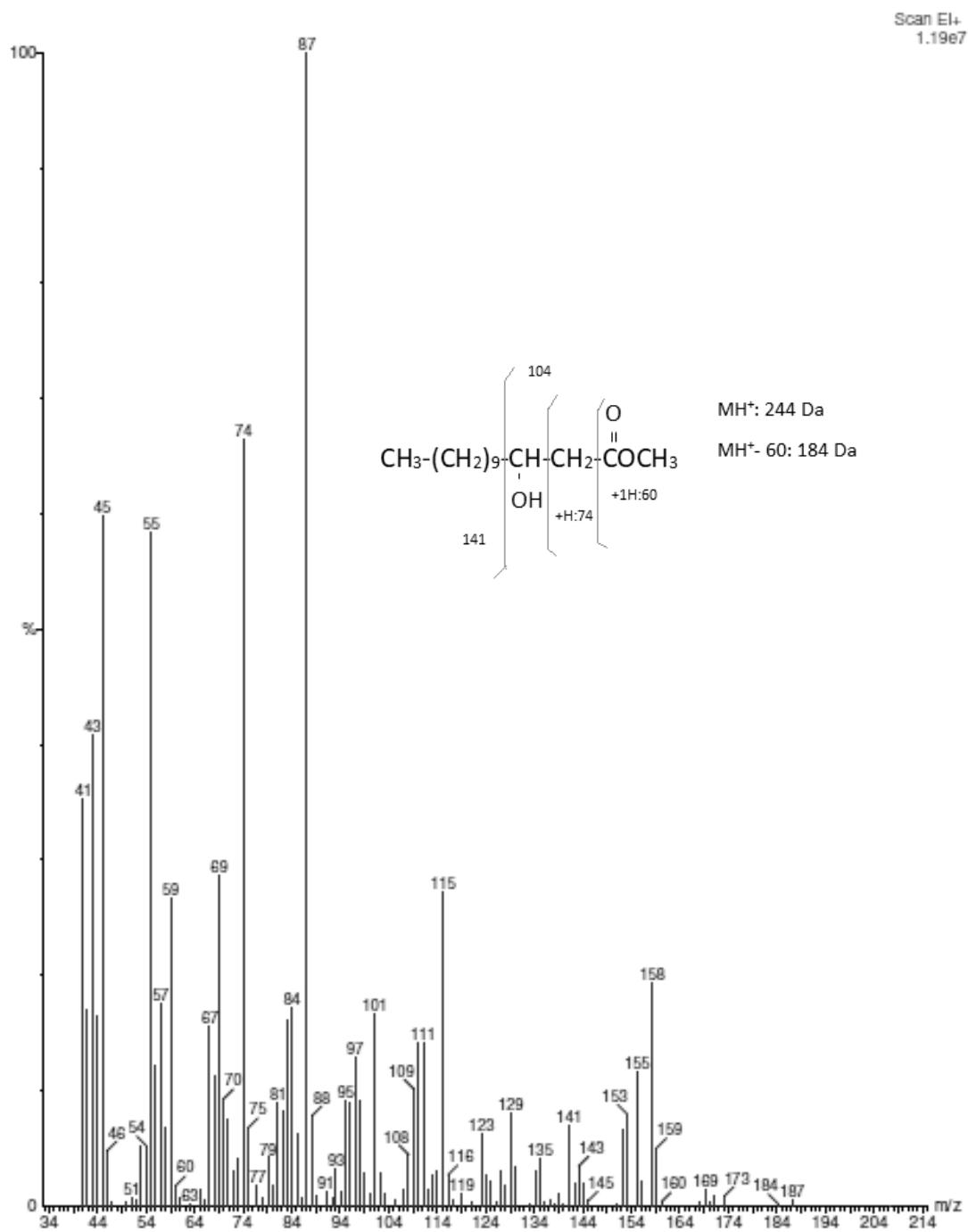
Anexos

Anexo 1. Espectro de MS² del ion de 1126,6 Da.

■ +EPI (1126.90) CE (50) CES (0.2): 7 MCA scans from Sample 1 (Esperanza) of EPI 1126.9.wiff (Turbo Spray IonDrive) Max. 3.4e6 cps.

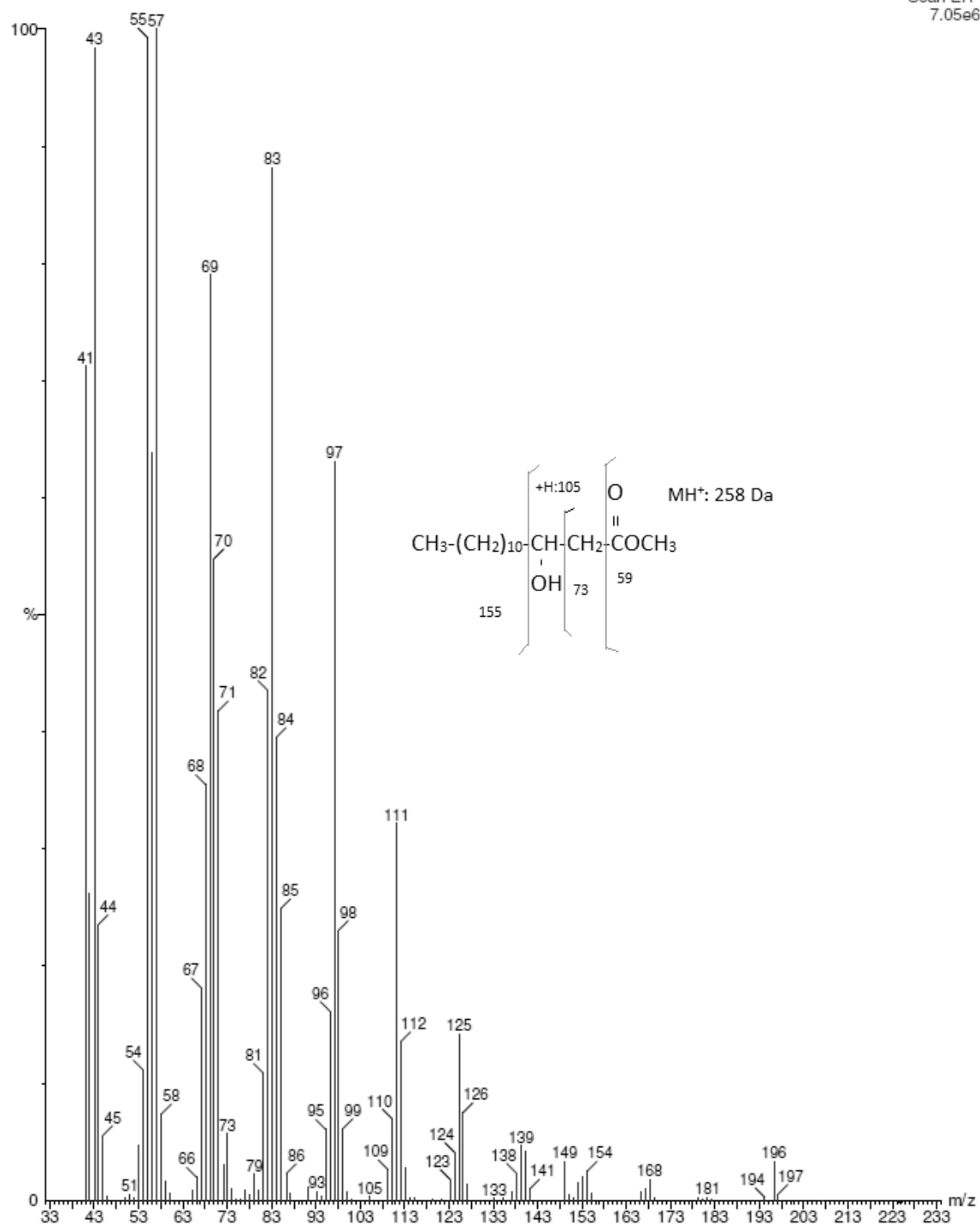


Anexo 2. Análisis de los ácidos grasos esterificados de los LPC por GC-MS

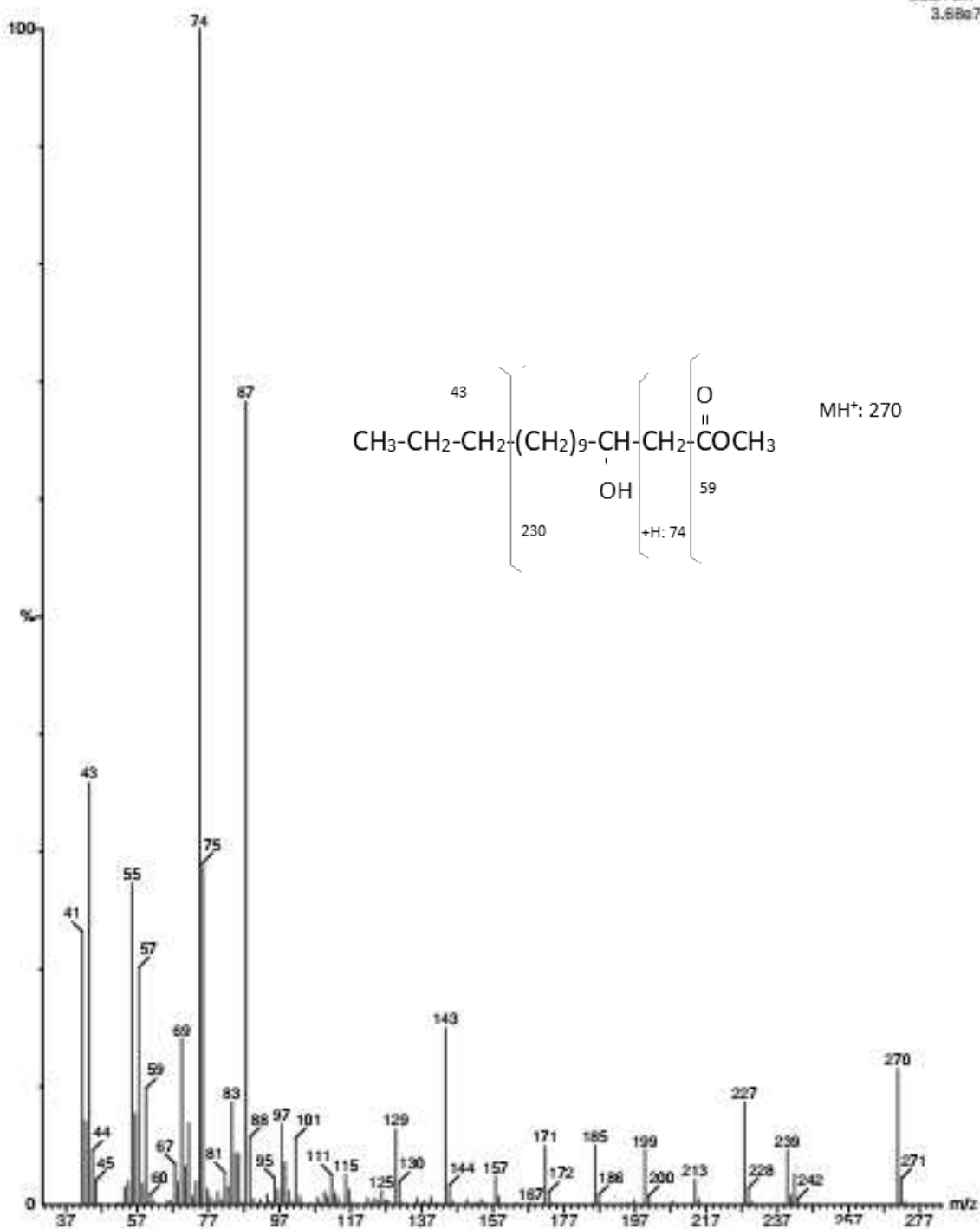


Espectro de GC-MS (EI) correspondiente al ácido graso esterificado C13

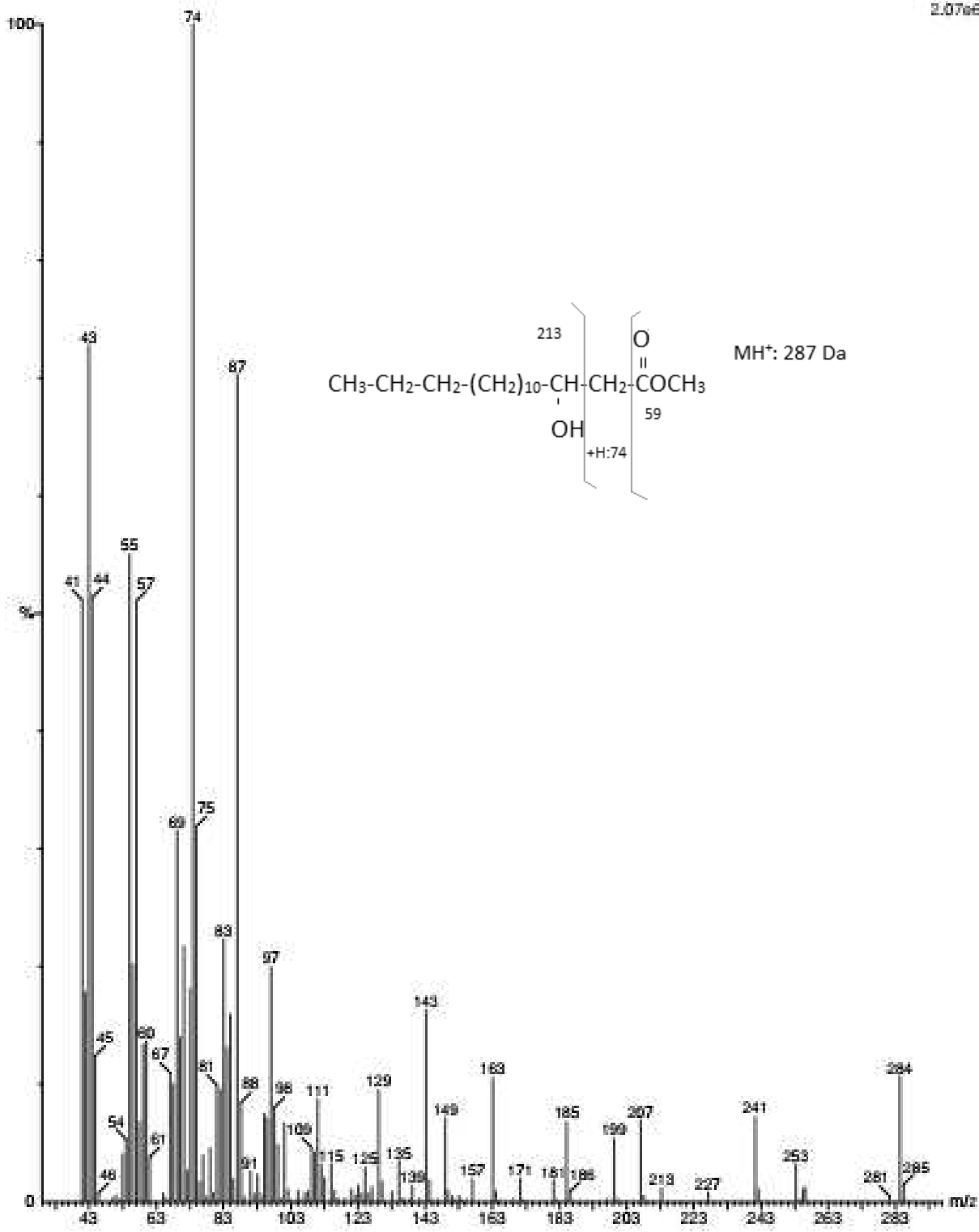
Scan EI+
7.05e6



Espectro de GC-MS (EI) correspondiente al ácido graso esterificado C14

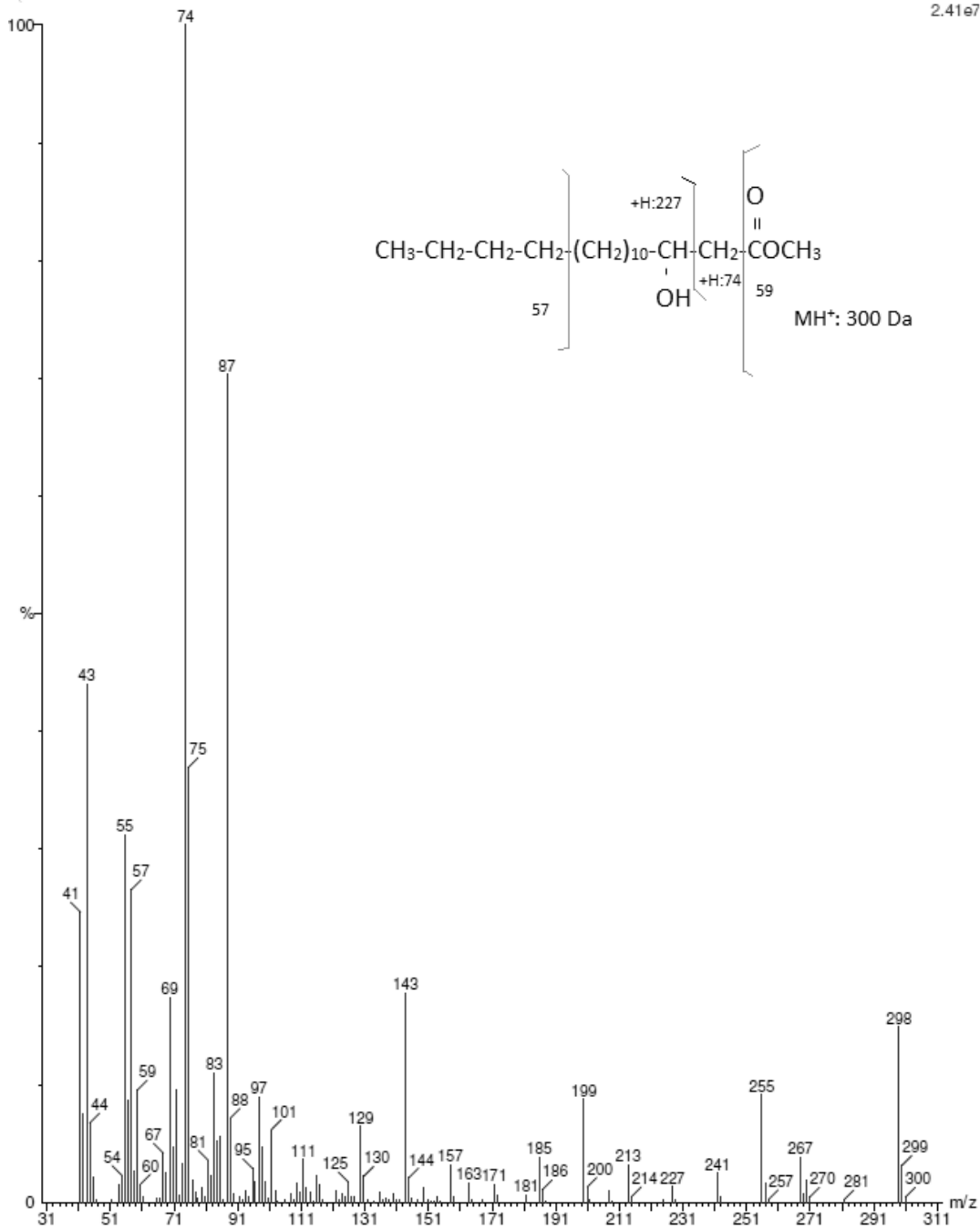


Espectro de GC-MS (EI) correspondiente al ácido graso esterificado C15

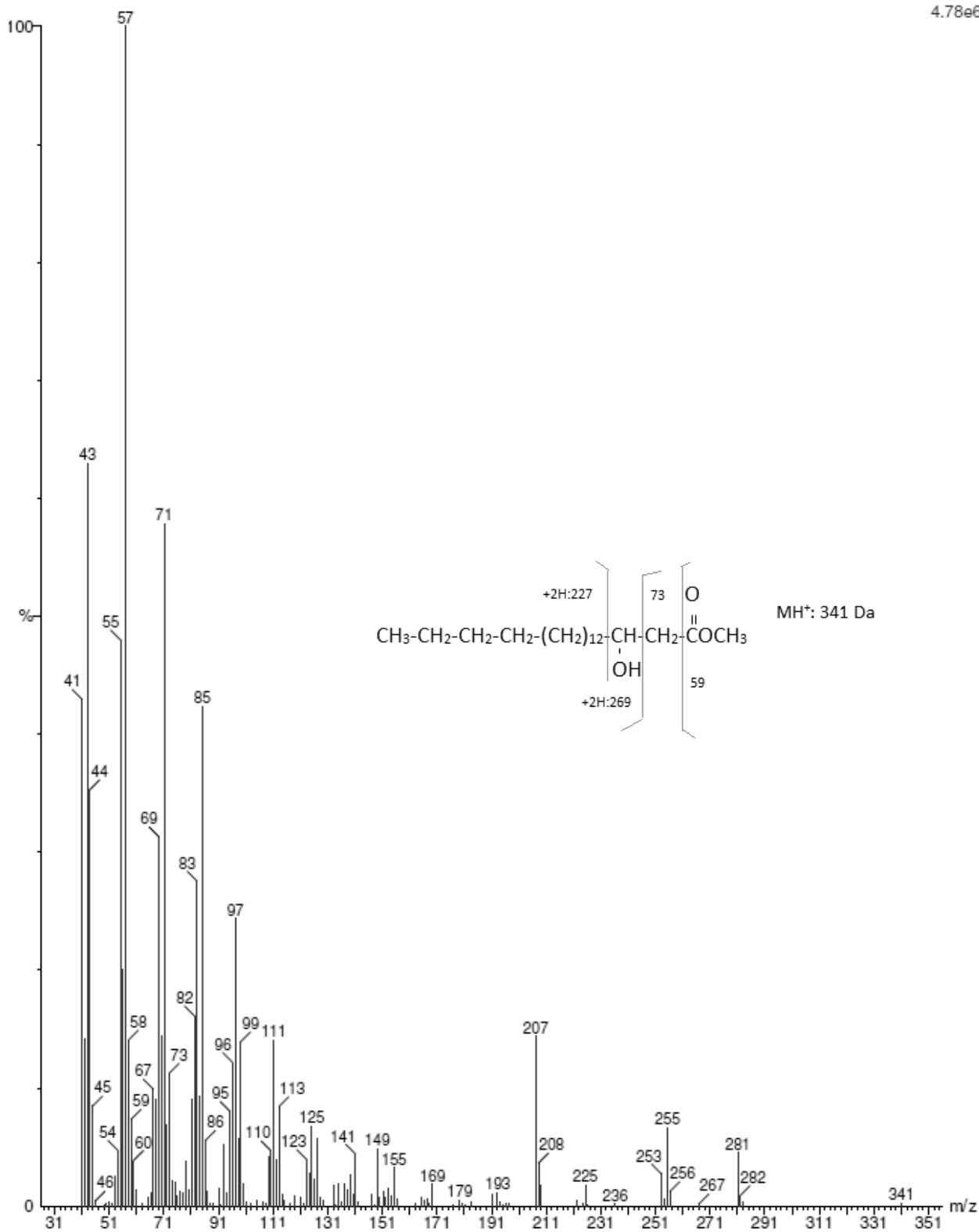


Espectro de GC-MS (EI) correspondiente al ácido graso esterificado C16

Scan EI+
2.41e7



Espectro de GC-MS (EI) correspondiente al ácido graso esterificado C17



Espectro de GC-MS (EI) correspondiente al ácido graso esterificado C20

Anexo 3. Valores de los corrimientos químicos en dimetilformamida

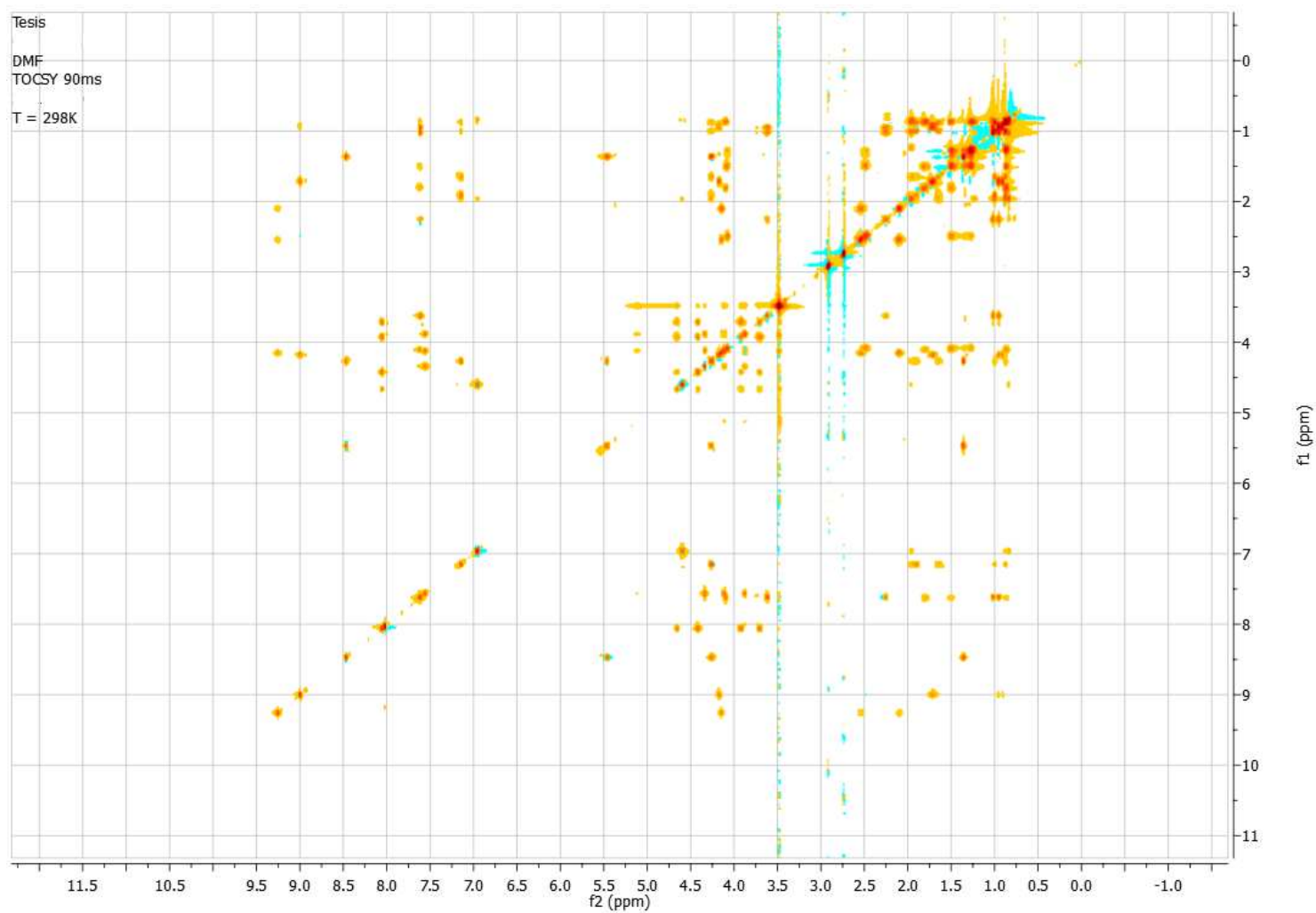
		¹ H δ [ppm]	¹³ C δ [ppm]			¹ H δ [ppm]	¹³ C δ [ppm]		
AHD		CO	-	173.96	D-Leu5 ³ J _{HNHα} n.d.	NH	7.62	-	
		CH ₂ α	2.50	43.92		CHα	4.11	54.37	
		CHβ	4.09	68.36		CO			
		CH ₂ γ	1.51	37.65		CH ₂ β1	1.80	39.65	
		CH ₂ δ1	1.49	25.55		CH ₂ β2	1.51	39.65	
		CH ₂ δ2	1.37	25.55		CHγ	1.83	25.51	
		CH ₂ ε	1.29	29.38		CH ₃ δ1	0.90	22.71	
		CH ₂ ζ	1.29	29.38		CH ₃ δ2	0.87	20.49	
		CH ₂ η	1.29	29.38		D-Ser6 ³ J _{HNHα} 6.8 Hz	NH	7.56	-
		CH ₂ θ	1.29	29.38			CHα	4.35	56.35
		CH ₂ ι	1.27	31.77			CO	-	171.15
		CH ₂ κ	1.29	22.50			CH ₂ β1	4.15	63.03
		CH ₃ λ	0.88	13.70			CH ₂ β2	3.89	63.03
		OH	n.d.	-			OHγ	n.d.	-
L-Leu1 ³ J _{HNHα} 5.0 Hz		NH	9.00	-	L-Leu7 ³ J _{HNHα} 7.2 Hz	NH	7.15	-	
		CHα	4.18	52.83		CHα	4.27	53.09	
		CO	-	n.d.		CO	-	172.82	
		CH ₂ β	1.73	39.35		CH ₂ β1	1.92	41.15	
		CHγ	1.74	25.54		CH ₂ β2	1.66	41.15	
		CH ₃ δ1	0.97	22.44		CHγ	1.98	24.41	
		CH ₃ δ2	0.93	21.71		CH ₃ δ1	1.01	23.03	
			CH ₃ δ2	0.90	20.60				
D-Glu2 ³ J _{HNHα} n.d.		NH	9.26	-	D-Ser8 ³ J _{HNHα} 8.2 Hz	NH	8.06	-	
		CHα	4.16	56.12		CHα	4.43	56.54	
		CO	-	175.56		CO			
		CH ₂ β	2.12	26.11		CH ₂ β1	3.94	62.01	
		CH ₂ γ	2.56	30.24		CH ₂ β2	3.72	62.01	
		COδ	-	175.56		OHγ	4.67	-	
		OH	12.48	-					
D-aThr3 ³ J _{HNHα} 6.7 Hz		NH	8.47	-	L-Ile9 ³ J _{HNHα} 9.8 Hz	NH	6.96	-	
		CHα	4.27	60.56		CHα	4.60	56.12	
		CO	-	173.62		CO	-	169.42	
		CHβ	5.47	69.34		CHβ	1.97	36.44	
		CH ₃ γ	1.38	17.72		CH ₂ γ1	1.26	24.33	
			CH ₂ γ2	1.03	24.31				
D-Val4 ³ J _{HNHα} n.d.		NH	7.62	-	CH ₃ γ1	0.85	15.38		
		CHα	3.63	63.51	CH ₃ δ	0.89	11.55		
		CO	-	n.d.					
		CHβ	2.27	29.02					
		CH ₃ γ1	1.03	20.29					
		CH ₃ γ2	0.97	18.96					

nd: no determinado

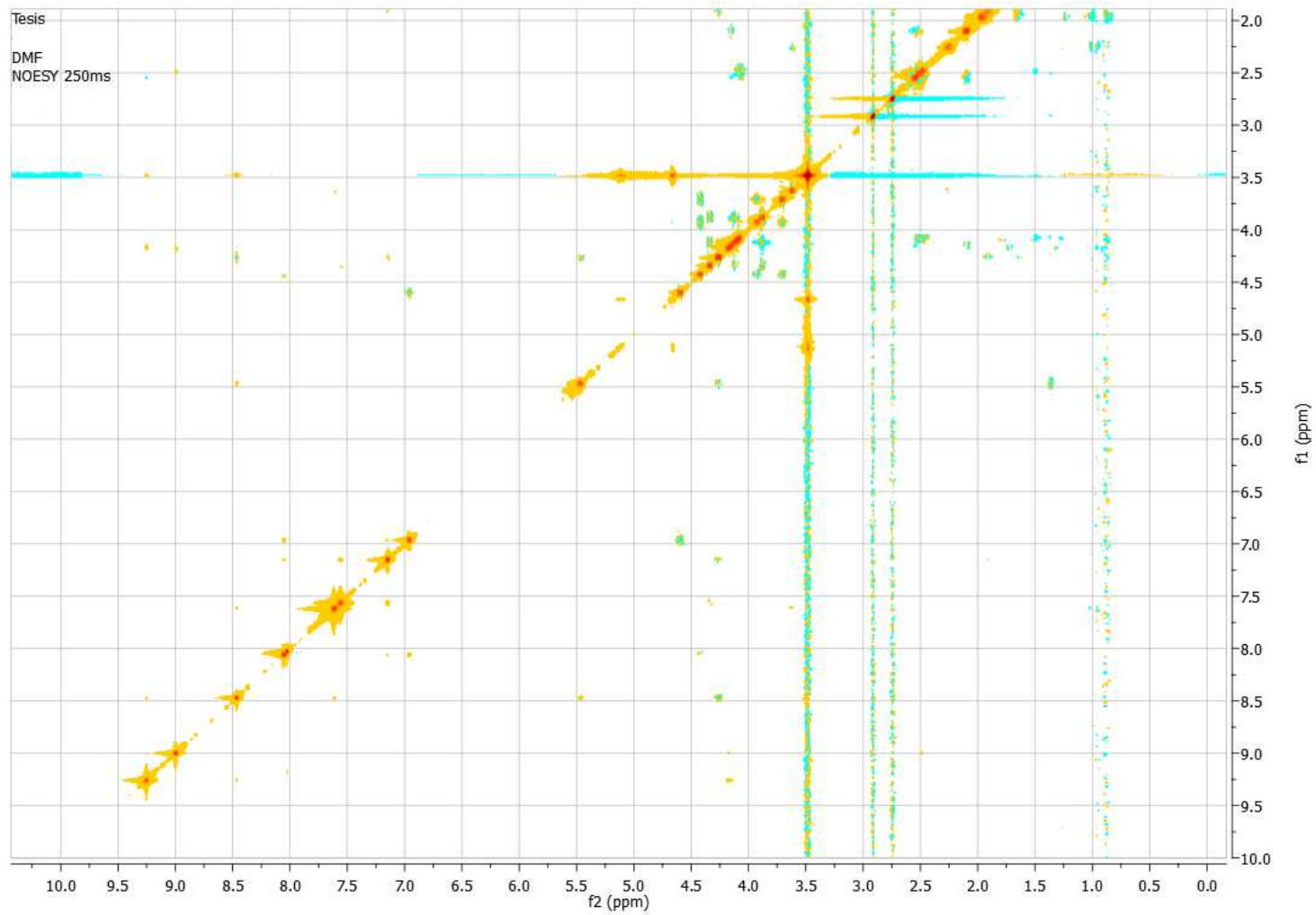
Anexo 4. Parámetros cristalográficos del cristal de WLIP

Datos cristalinicos	
Grupo espacial	Orthorhombic, P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Parámetros de celda unitaria (Å)	a = 14,2803 (14), b = 18,7124 (11), c =24,5716(16)
V (Å ³)	6566.0 (9)
Z	4
μ (mm ⁻¹)	0,709
Tamaño del cristal (mm ³)	0.82x0.10x0.10
Recopilación de datos	
Reflexiones medidas	14781
Reflexiones independientes	0542
Reflexiones con I > 2σ (I)	8488
Rint	0.0349
Refinamiento	
R	0.0534
Reflexiones	0542
Parámetros	748
Δρ _{max}	0.324
Δρ _{min}	-0.204

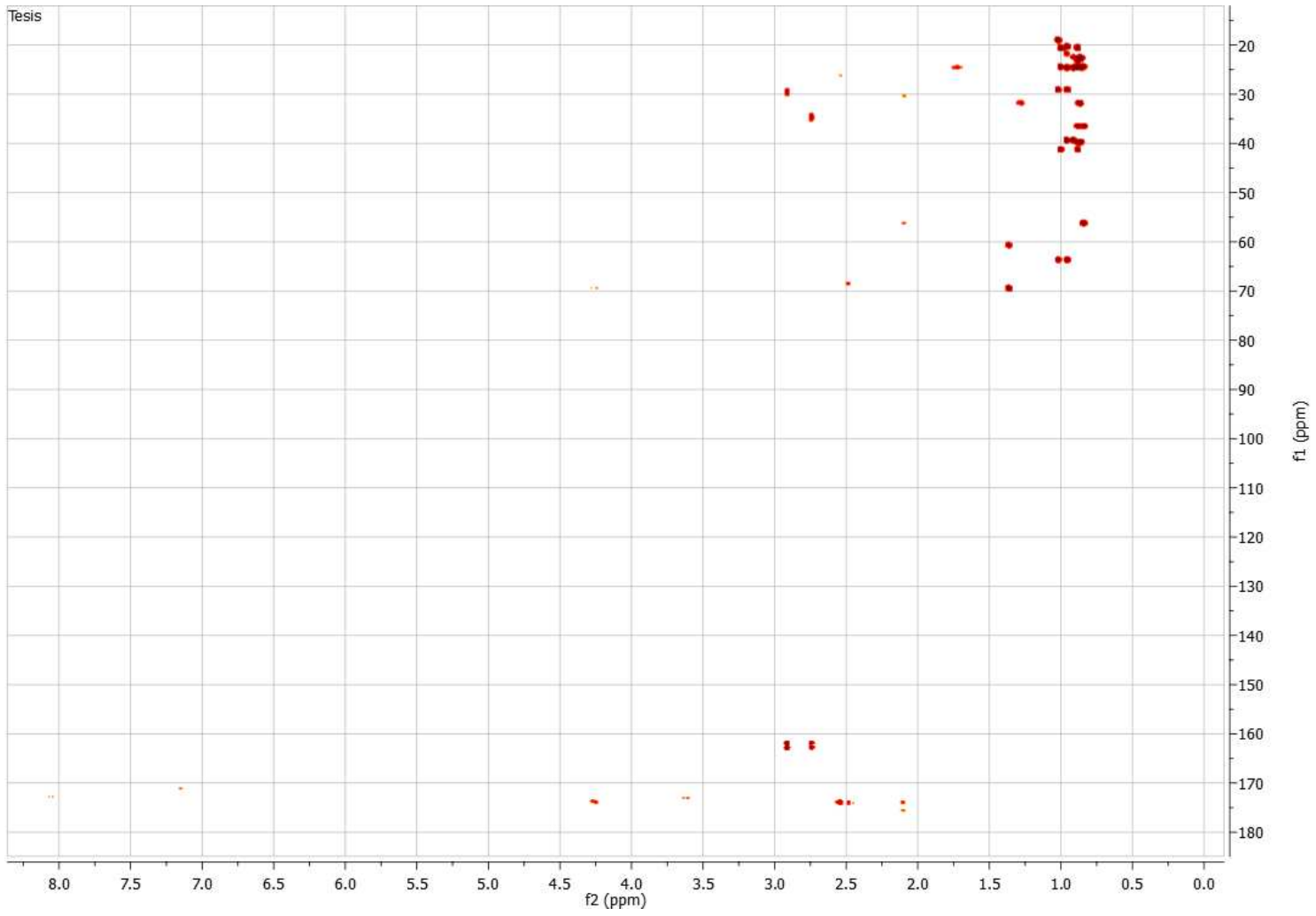
Anexo 5. Experimentos de RMN en 2D de la muestra purificada por cristalización



Experimento de RMN TOCSY (^1H - ^1H)



Experimento de RMN NOESY (^1H - ^1H)



Experimento de RMN HMBC (^1H - ^{13}C)

