

Trabajo completo

Nuevos *Gemini* peptídicos con actividad antimicrobiana: un estudio sobre relación estructura-actividad

RECIBIDO: 17/07/2012

ACEPTADO: 27/09/2012

Garello, CP.¹ • Ingaramo, MC.¹ • Argarañá, MF.² •
Lurá, MC.² • De Zan, MM.³ • Fustero, S.⁴ •
Fanani, ML.⁵ • Murguía, MC.¹ • Müller, DM.^{1,*}

¹ Lab. de Química Aplicada, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Ciudad Universitaria, C.C. 242 Santa Fe, Argentina. ² Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (UNL). Ciudad Universitaria, C.C. 242- Santa Fe, Argentina. ³ Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos, Cátedra de Química Analítica I, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (UNL). Ciudad Universitaria, C.C. 242- Santa Fe, Argentina. ⁴ Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés, s/n 46100 BURJASSOT (Valencia) España. ⁵ Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Haya de la Torre y Medina Allende, Ciudad Universitaria, X5000HUA, Córdoba, Argentina.

* Correspondencia a: Dra. Diana M. Müller, Laboratorio de Química Aplicada, Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas, UNL, C.C 242, C.P. 3000. Ciudad Universitaria, Santa Fe, Argentina. Teléfono 54-342-4575206 int.181, Fax: 54-0342-4575221. E-mail: dmuller@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Se diseñaron y sintetizaron cinco compuestos *gemini* peptídicos denominados 3a-e que difieren estructuralmente en sus regiones polar e hidrofóbica. Los rendimientos obtenidos fueron del 40-65 %. En función de los resultados obtenidos sobre actividad antimicrobiana podemos concluir que estos compuestos presentan máxima actividad cuando su región hidrofóbica esta formada por residuos de triptofano y cadenas insaturadas de 15 carbonos, y la región polar presenta residuos de ornitina adyacentes. Los compuestos de mayor actividad obtenidos (*geminis* 3a y 3b)

son atractivos tecnológicamente por su bajo peso molecular, su forma simple de obtención, favorables propiedades de superficie y elevada actividad biológica, fundamentalmente frente a bacterias causantes de enfermedades de transmisión alimentaria, como algunas especies de *Bacillus* y *Listeria monocytogenes*. En particular el *gemini* 3b tendría además un uso potencial en el campo de la salud humana debido a su actividad frente a *Staphylococcus aureus* y baja toxicidad.

PALABRAS CLAVE: *gemini* peptídico, actividad antimicrobiana, N- δ -alquilación, L-ornitina.

SUMMARY *New Gemini peptides with antimicrobial activity: a study of the structure-activity relationship*

Five Gemini peptide compounds denominated 3a-e were designed and synthesized which differ structurally in their polar and hydrophobic regions. Yields of 40-65% were obtained. Depending on the results of antimicrobial activity, we concluded that these compounds have high activity when the hydrophobic region is formed by tryptophan residues and 15-carbon unsaturated chains and when the polar region contains adja-

cent residues of ornithine. The most active compounds obtained (Gemini 3a and 3b) are technologically attractive due to their low molecular weight, easiness of obtention, favorable surface properties and high biological activity mainly against bacteria causing food-borne diseases such as *Bacillus* species and *Listeria monocytogenes*. In particular, Gemini 3b would also have potential use in the field of human health due to its low toxicity and high activity against pathogenic bacteria. **KEYWORDS:** *peptide gemini, antimicrobial activity, N- δ -alkylation, L-Ornithine.*

Introducción

Los compuestos *gemini* son una clase relativamente nueva de moléculas surfactantes que contienen dos cadenas apolares o hidrofóbicas y dos grupos polares o hidrofílicos unidos por un espaciador rígido o flexible [1]. Los grupos polares pueden presentar carga positiva (amonio) o negativa (fosfato, sulfato, carboxilato), mientras que los grupos polares no iónicos pueden ser poliéteres o azúcares [2]. Estos compuestos, en general, actúan a nivel de la membrana celular de los microorganismos, causando la disrupción de la misma o la inhibición de enzimas que son esenciales para su desarrollo [3]. Por otro lado, los compuestos *gemini* presentan en algunos casos, dependiendo de su estructura química, excelente biodegradabilidad y muy baja toxicidad [4].

Diferentes polioles, hidratos de carbono, alcoholes grasos, alquilglicósidos y aminas han sido usados, entre otros compuestos orgánicos, como materiales de partida para la construcción del grupo espaciador [5].

Recientemente se han desarrollado *gemini* que contienen en su estructura componentes peptídicos y que han demostrado

ser activos como agentes de transfección [6] o antimicrobianos [7]. En la mayoría de estos trabajos utilizan para la hidrofobización del espaciador peptídico, el proceso sintético ampliamente conocido para la obtención de lipopeptidos, el cual consiste en conjugar mediante acilación una cadena peptídica con ácidos grasos de 12 a 18 carbonos de longitud [8].

El diseño básico de los compuestos *gemini* se presta a una gama, casi ilimitada, de estructuras posibles, lo que permite extensos estudios de estructura-actividad a fin de identificar cuales son las características estructurales necesarias para obtener compuestos de máxima actividad biológica.

La molécula espaciadora central puede estar hecha a medida de nuestras necesidades uniendo dos o más moléculas de interés. Para minimizar los problemas potenciales de toxicidad de estos compuestos, la estructura de las moléculas espaciadoras puede estar constituida por α -aminoácidos, carbohidratos, espermina, etc., los cuales además son biodegradables [9].

Se encuentran reportados en la literatura abierta trabajos que estudian la relación

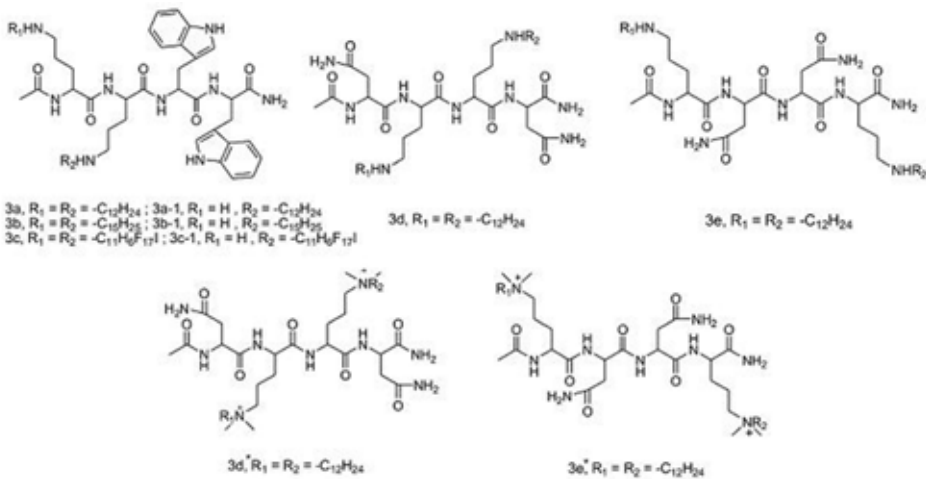
estructura-actividad pero sólo sobre *gemini* peptídicos usados como agentes de transfección [10], los cuales suelen presentar a su vez actividad como antimicrobianos. Por ejemplo, un grupo de tensioactivos *gemini* diseñados sobre la base de espermina como molécula espaciadora y ácido cólico como cadena hidrofóbica han resultado ser muy eficaces como agentes de transfección y como antimicrobianos hacia una amplia gama de bacterias [11].

Nuestro objetivo ha sido diseñar, sintetizar y caracterizar compuestos *gemini* no

iónicos (3a-e) e iónicos (3d* y 3e*) (Figura 1), los cuales varían estructuralmente en sus regiones polares e hidrofóbicas y correlacionar estas variaciones estructurales con la actividad antimicrobiana de estos compuestos, con la finalidad de lograr moléculas con máxima actividad antimicrobiana.

Los compuestos fueron diseñados a partir de espaciadores flexibles derivados de tetrapéptidos (P₁ para los compuestos

Figura 1. Estructura química de compuestos *gemini* en estudio: no iónicos 3a, 3b, 3c, 3d y 3e y catiónicos 3d* y 3e*.



3a-c; P₂ para el compuesto 3d y 3d* y P₃ para el compuesto 3e y 3e*) e hidrofobizados mediante *N*-alquilación de los grupos δ -aminos de las cadenas laterales de ornitina con diferentes cadenas hidrofóbicas saturadas, insaturadas y poli fluoradas de 12 carbonos [12, 5].

Los espaciadores peptídicos fueron sintetizados mediante química en fase sólida, empleando la estrategia del 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc) y funcionalizándose el extremo C-terminal como amida en base a la secuencia reportada por Bisht y col. [13].

Dentro del diseño del espaciador peptídico, se han incorporado estrategias descritas en la literatura, tales como acetilación del extremo *N*-terminal del péptido y la incorporación de aminoácidos no naturales como la ornitina, a fin de incrementar la actividad biológica y la vida media de los compuestos obtenidos [14]. El método de *N*-alquilación empleado y puesto a punto por nuestro grupo de investigación [15] está basado en métodos ampliamente descritos en la literatura [16, 17, 18].

La capacidad de los diferentes compuestos sintetizados para inhibir el desarrollo de diferentes bacterias patógenas (estudios de actividad antimicrobiana), se estudió mediante el método de difusión en agar [12] y determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) [15]. Sobre los compuestos *gemini* que presentaron mayor actividad se realizaron además estudios de tensión superficial mediante isoterms de adsorción de Gibbs y estimación de la concentración micelar crítica (CMC) [19], y estudios de toxicidad midiendo su capacidad hemolítica sobre glóbulos rojos humanos [20].

Materiales y métodos

Síntesis y purificación de los espaciadores peptídicos

Los espaciadores peptídicos (P_1 , P_2 y P_3) fueron sintetizados mediante química en fase sólida [21], empleando la estrategia del 9-fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc) bajo la forma de péptido *C*-terminal carboxamida, y *N*-terminal acetilo. La secuencia de P_1 esta reportada en la bibliografía: AcHN-Orn-Orn-Trp-Trp-CONH₂ [13], mientras que las secuencias pertenecientes a los péptidos P_2 (AcHN-Asn-Orn-Orn-Asn-CONH₂)

y P_3 (AcHN-Orn-Asn-Asn-Orn-CONH₂) fueron diseñadas por nuestro grupo de investigación. Como soporte sólido se utilizó una resina tipo Rink amida 4-metilbencilamina (Sigma) y la síntesis se realizó en forma manual. Los Fmoc aminoácidos (Sigma) se acoplaron al soporte sólido utilizando hexafluorofosfato de 1*H*-benzotriazol-1-iloxi-tris (pirrolidino) fosfonio (PyBOP) en presencia de *N*-metilmorfolina como catalizador. El grupo Fmoc fue eliminado en las etapas de desprotección empleando piperidina al 20 % en *N,N*-dimetilformamida (DMF). Los solventes usados fueron de calidad grado cromatográfico. El monitoreo de las reacciones se realizó por los métodos convencionales para este tipo de síntesis [21]. El péptido fue desprotegido y simultáneamente separado de la resina en un único paso empleando una mezcla de ácido trifluoroacético/agua/triisopropilsilano (TFA/H₂O/TIS) (90:5:5) (v/v). El producto de síntesis fue separado de la mezcla de reacción por precipitación con éter etílico a 4°C, centrifugado y liofilizado.

Los espaciadores peptídicos sintetizados fueron analizados mediante cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR) y espectrometría de masas de alta resolución (EM).

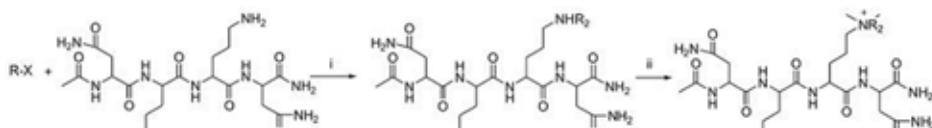
Síntesis y purificación de los compuestos gemini no iónicos

La síntesis de los compuestos *gemini* no iónicos (*geminis* 3a-e) se realizó mediante hidrofobización de las fracciones peptídicas mediante *N*-alquilación directa: sustitución nucleofílica de los grupos amino (pertenecientes a los residuos de ornitina de los espaciadores peptídicos) sobre diferentes agentes alquilantes o colas hidrofóbi-

cas (R-X) (Figura 2). Se empleó una relación molar de reactivos de 1:2.7:2, P₁₋₃ (0.03g, 0.04 mmol), R-X (Sigma-Aldrich) (0.02g, 0.1 mmol), carbonato de potasio (Sigma-Aldrich) (0.01g, 0.06 mmol), [17,18]; se usó DMF como sistema disolvente y se agitó vigorosamente a temperatura ambiente (25°C).

Como agentes alquilantes se emplearon: bromuro de dodecilo (Sigma-Aldrich) para la síntesis de *geminis* con cadenas saturadas (3a, 3d y 3e); bromuro de *trans, trans*-farnesilo (Sigma-Aldrich) para la síntesis del *gemi*ni 3b con cadenas insaturadas y yoduro de 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11 heptadecafluorundecilo para la síntesis del *gemi*ni 3c con cadenas poli fluoradas.

Figura 2. Síntesis del *gemi*ni 3d (*N*- δ -alquilación directa de P₂) y *gemi*ni catiónico 3d*, Reactivos y condiciones: (i) carbonato de cesio, DMF, 40°C, 48 h, R-X: agente alquilante: bromuro de dodecilo; (ii) carbonato de potasio, DMF, 25 °C, 24 h CH₃I: Ioduro de metilo.



Luego de completada la reacción (desaparición de P₁₋₃ mediante CCD), la mezcla reactiva fue liofilizada y conservada a -18°C hasta su purificación.

Esta metodología se síntesis, descrita en la bibliografía como método "a" [15], ha sido modificada para este trabajo a fin de mejorar los rendimientos obtenidos, empleando para la síntesis de los *gemi*ni 3d y 3e, carbonato de cesio en lugar de carbonato de potasio y aumentando la temperatura a 40°C. Todas las reacciones se llevaron a cabo en atmósfera de nitrógeno y fueron monitoreadas mediante CCD sobre placas de sílica gel de 0.2 mm con indicador fluorescente 254 nm (Fluka), empleando como sistemas reveladores: luz UV, yodo, *p*-anisaldehído y ninhidrina. Todos los disolventes usados fueron de calidad grado cromatográfico o destilados antes de ser usados.

Los diferentes *gemi*ni obtenidos fueron purificados usando columnas Sep-Pak C4 (Supelco), equilibradas con dos sistemas solventes: (A) metanol y (B) agua Milli Q. Las muestras en estudio fueron filtradas a través de filtros de 0.45 μ m (Minisart RC 4, Sartorius) y disueltas en DMF. La elución se realizó aplicando un gradiente de 0-100 A % (v/v). Las muestras recolectadas fueron analizadas mediante CCD, CLAR y EM. Las fracciones eluidas que contenían a los *gemi*ni puros fueron concentradas, posteriormente liofilizadas y conservadas a -18°C. Finalmente, se realizó el cálculo de los rendimientos post-purificación de los diferentes compuestos obtenidos.

Síntesis de las sales de amonio cuaternarias de los geminis 3d y 3e

La síntesis de los *geminis* catiónicos 3d* y 3e* se realizó mediante cuaterniza-

ción (obtención de la sal de amonio) de los grupos amino secundarios de los residuos de ornitina de los *gemini* respectivos. Se empleó una relación molar de reactivos de 1:4:8: a 10.2 mg de *gemini* (0.012 mmol) y 6.6 mg de carbonato de potasio (0.0478 mmol) disueltos en 2 mL de DMF, se le añadió gradualmente y con agitación 47.6 μ L (0.0952 mmol) de ioduro de metilo. La mezcla reactiva se agitó durante 24 h a 25 °C, se liofilizó y posteriormente se analizó mediante CCD y EM [22].

Métodos analíticos empleados

Los análisis de pureza de los productos de síntesis, tanto de las fracciones peptídicas como de los compuestos hidrofobizados, se realizaron mediante CLAR, en un equipo analítico-Agilent 1100 con detector de arreglo de diodos (DAD). Condiciones Cromatograficas: se empleó una columna analítica de C₄ (Júpiter Phenomenex, 5m, 300 Å, 4.6 x 150 mm), y un sistema de gradiente de elución utilizando agua ultrapura (A) y acetonitrilo (B) como solventes. Se utilizó el siguiente programa de gradientes: inicial 30 % B, 100 % B en 10 min y 100 % B isocrático hasta los 20 min, para asegurar la limpieza de la columna. La velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min, el volumen de inyección de 10 μ L y la temperatura del horno de columna de 30 °C. La señal de los compuestos se monitoreo recogiendo los cromatogramas a 220 y 240 nm y los espectros UV de los mismos se estudiaron en el rango de 200 – 400 nm, mediante la utilización del DAD.

Los EM se realizaron en un equipo VGmAutospec (VG Analytical, Micromass Instruments) a través del servicio de espectrometría de masas de la Universidad de Valencia (España).

Ensayos de actividad antimicrobiana

Se utilizaron cepas bacterianas pertenecientes a la American Type Culture Collection (ATCC): *Listeria monocytogenes* ATCC 15313; *Bacillus subtilis* ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27857.

La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante el ensayo de difusión en agar en pocillos modificado [12]. Para cada una de las bacterias se prepararon placas sembradas en profundidad, en las que se efectuaron 5 pocillos de 5 mm de diámetro cada uno. Se colocaron 35-50 μ L de cada compuesto a ensayar (1mg/mL) en sendos pocillos. En el quinto pocillo se colocó idéntico volumen de dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado para disolver los compuestos en estudio. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y luego se midieron los diámetros correspondientes a los halos de inhibición. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

Las determinaciones de CIM fueron realizadas usando el método de dilución en caldo modificado para péptidos antimicrobianos catiónicos [23]. Cada uno de los inóculos de las respectivas cepas de referencia, se preparó ajustando la concentración a un valor de 5.10⁷ UFC/mL en caldo Mueller-Hilton (Laboratorios Britania, CABA, Argentina) al 10 % [24].

Se prepararon soluciones stock de los diferentes compuestos ensayados en DMSO, todos los test incluyeron controles de reactivos y de cepas bacterianas indicadoras. Cada ensayo fue realizado por duplicado. Se consideró como CIM la menor concentración de compuesto que redujo el 100 % de crecimiento de la cepa bacte-

riana ensayada en comparación con el cultivo control (CIM₁₀₀).

Ensayos de toxicidad

La actividad hemolítica de los espaciadores peptídicos y *geminis* sintetizados se evaluó frente a eritrocitos humanos, aislados a partir de un pool de sangre fresca, mediante la medición espectrofotométrica de la cantidad de hemoglobina liberada como consecuencia de la lisis de las células [20]. Distintas muestras de sangre entera se lavaron 3 veces con solución fisiológica con el objeto de eliminar el plasma y otras células, separando los eritrocitos por centrifugación a baja velocidad. Las distintas suspensiones de células, una vez aisladas, se mezclaron a fin de obtener un pool lo más representativo posible para llevar adelante los ensayos. El pool obtenido se diluyó 1/50 para obtener aproximadamente 10⁵ células/mL. Alícuotas de 0.5 mL de la suspensión diluida de células, en contacto con 1 mL de las soluciones de los diferentes compuestos en el rango de concentraciones entre 2 µg/mL y 500 µg/mL, se incubaron durante 1 h a 37 °C, con agitación. Para todos los compuestos ensayados se realizó un blanco con solución fisiológica (0% de hemólisis) y un ensayo testigo (100 % de hemólisis) con una solución de Tritón X-100 al 1%. Finalizada la incubación, se centrifugó para separar el sobrenadante libre de eritrocitos y determinar la cantidad de hemoglobina presente en el mismo. Las mediciones se realizaron a 414 nm, empleando un espectrofotómetro UV-Visible Metrolab 1700.

Estudios de medición de la tensión superficial y determinación de la CMC de los surfactantes sintetizados

Los estudios de superficie se realizaron disolviendo los compuestos a ensayar en dimetilsulfóxido DMSO para alcanzar una concentración de 50 mM (solución madre). A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas (1:10 hasta 1:1000) en PBS para obtener concentraciones de: 5, 2.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1 y 0.05 mM. A 0.5 mL de estas diluciones se les evaluó su actividad de superficie registrando los cambios de tensión superficial (en mN/m) en el tiempo (s) hasta alcanzar una tensión de equilibrio mediante las isoterms de adsorción de Gibbs. Para ello se utilizó una balanza de Langmuir KSV minitrough (KSV Helsinki, Finlandia). Todas las diluciones fueron evaluadas dentro de las 8 hs de realizada la dilución; durante ese período las diluciones se conservaron a temperatura ambiente (aprox. 25 °C) y fueron sometidas a agitación cada 30 min. El preparado de las diluciones y las mediciones de tensión superficial se realizaron por duplicado para cada compuesto en experimentos independientes. La mínima tensión superficial que se obtiene en estas curvas es aprox. 40 mN/m. A partir de las curvas obtenidas se realizó la estimación de la CMC.

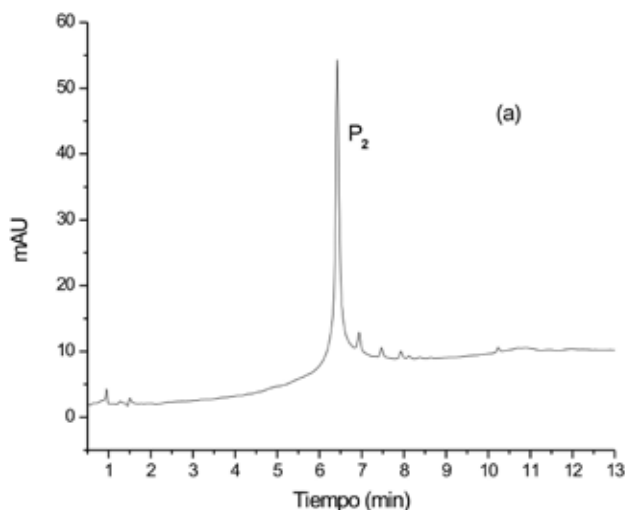
Resultados y discusión

El rendimiento de la síntesis de los espaciadores peptídicos (P₁₋₃) [P.Mol. 659.29 (P₁) y 515.28 (P₂₋₃)] fue del orden del 70% a partir de 300 mg de resina, escala de síntesis 0.22 mmol, obteniéndose 70-100 mg de péptido crudo. El análisis cromatográfico de los productos de síntesis de los espa-

ciadores peptídicos produjeron cromatogramas muy limpios, identificándose claramente el pico principal del péptido (Figura 3a). El alto grado de pureza alcanzado en la síntesis de todos los espaciadores peptídicos (entre 75-90 %), determinó que no hubiera necesidad de purificarlos previo a su uso en la síntesis de los *gemini*. Espectro

de masas [m/z, intensidad relativa]: 660.,36 [(M+H)⁺, P₁, 100]; 537.32 [(M+Na)⁺, P₂₋₃, 100]. Mediante el método de Kaiser [21], se pudo comprobar un 100 % de eficiencia en el acoplamiento de cada uno de los aminoácidos durante la síntesis de los diferentes espaciadores peptídicos, razón por la cual no hubo necesidad de secuenciarlos.

Figura 3.(a) Cromatograma de P₂.



La síntesis de los compuestos *gemini* iónicos 3a, 3b y 3c reportada por nuestro grupo de trabajo se realizó mediante *N*-alquilación directa en presencia de carbonato de potasio a 25 °C y durante 48 h, obteniéndose los siguientes resultados [15]: 1) *gemini* 3a (PMol. 996.58): se obtuvo con un 40 % de rendimiento y 19 % de producto mono alquilado (3a-1) (PMol. 827.58), observándose polialquilación (producto hidrofobizado con tres cadenas (PMol

1163.93): espectro de masas [m/z, intensidad relativa]: 996.74 [(M)⁺ 3a, 43]; 856.54 [(M+6H)⁺ 3a-1, 55]; 1164.93 [(M+H)⁺ producto poli alquilado, 19] y 663.53 [(M+3H)⁺ P₁, 65]; el *gemini* 3b (PMol. 1068.05): se obtuvo con un rendimiento de 38 % y 52 % de producto monoalquilado (3b-1) (PMol. 863.7) (Figura 1) sin poli-alquilación: espectro de masas [m/z, intensidad relativa]: 550.35 [(M/2)⁺ 3b, 10]; 454.43 [(M+3H)/2]⁺ 3b-1, 100]; el *gemini* 3c (PMol. 1579.57):

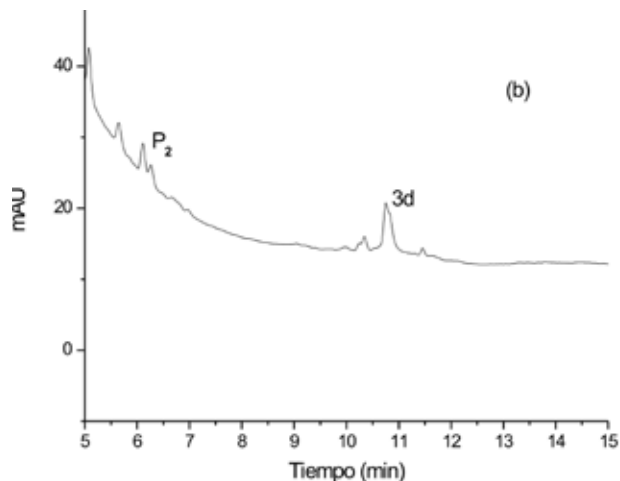
se obtuvo con un rendimiento de 10 % y 20 % de producto mono alquilado (3c-1) (PMol. 1118.43) (Figura 1) sin poli-alquilación: espectro de masas [m/z, intensidad relativa]: 1580,38 [(M/2)⁺ 3c, 10]; 454.43 [(M+3H)/2]⁺ 3c-1, 20].

En el presente trabajo se repitió la síntesis de los *gimini* 3a, 3b y 3c pero a mayor temperatura (40 °C) obteniéndose rendimientos considerablemente mayores en el caso de los compuestos 3b y 3c: 64 % y 30 % respectivamente con disminución del tiempo de reacción de 48 a 24 h y empleo de un 30 % menos de agente alquilante. No se observó aumento en el rendimiento en la obtención del *gimini* 3a, sin embargo al igual que para la obtención de 3b y 3c el producto se obtuvo considerablemente

mas limpio (puro), con menor proporción de productos poli alquilados contaminantes.

Los *gimini* 3d (PMol. 851.65) y 3e (PMol. 851.65) presentaron rendimientos de 40 y 30 % respectivamente: espectro de masas [m/z, intensidad relativa]: 852.66 [(M+H)⁺ 3d, 100]; 803,54 [(M-Ac-Amida+K)⁺ 3e, 100]. Mediante análisis cromatográfico pudo verificarse que el uso de carbonato de cesio producía reactores más limpios, es decir una disminución importante en la producción de productos secundarios mono y poli alquilados. Como puede observarse en el cromatograma del crudo de reacción del *gimini* 3d (Figura 3b), además del pico principal del *gimini* puede observarse algo de péptido residual y sólo pequeños picos de productos secundarios.

Figura 3. (b) Cromatograma del crudo de reacción de 3d. Condiciones: Fase móvil: agua ultrapura (A) y acetonitrilo (B), gradiente aplicado: inicial 30 % B; 100 % B en 10 min y 100 % B isocrático hasta los 20 min, velocidad de flujo: 1.0 mL/min, lecturas a 240 nm y 30 °C .



Los geminis catiónicos 3d* (PMol: 909.65) y 3e* (PMol: 909.65) se obtuvieron con rendimientos mayores al 80%: espectro de masas [m/z, intensidad relativa]: 228.27 [(M/4)⁴⁺ 3d*, 100]; 204.83 [(M/4)⁴⁺ 3e*, 100].

Nuestro grupo ha obtenido rendimientos aceptables mediante *N*-alquilación directa sin usar exceso de amina y en presencia de carbonato de potasio [15]. En esta oportunidad se utilizó carbonato de cesio, para la síntesis de los gemini de cadenas saturadas 3d y 3e ya que este reactivo en comparación con el uso de carbonato de potasio genera reacciones quimioselectivas, donde el producto principal que se obtiene es la amina primaria con menor presencia de contaminantes [17].

Se ha reportado que este tipo de alquilaciones son fuertemente dependientes del número de átomos de carbono presentes en el agente alquilante (R-X). Alquilantes de cadenas largas (≥ 5 carbonos) permiten obtener productos monoalquilamino derivados exclusivamente, por el contrario en presencia de alquilantes de cadenas cortas (≤ 5 carbonos) la selectividad de la reac-

ción cambia notablemente hacia la producción de las *N,N*-dialquilaminas [25]. Es así que teniendo en cuenta por un lado que en función de la estructura de los espaciadores peptídicos diseñados solamente hay dos sitios reactivos para la unión con el agente alquilante (grupos amino de las cadenas laterales de ornitina) y por otro que se ha utilizado en todos los casos agentes alquilantes de ≥ 5 carbonos, existe una elevada probabilidad de que la estructura de los *gemini* iónicos y no iónicos sintetizados sea la esperada (Figura 1). Por lo expuesto y considerando que los productos finales de síntesis no presentaron la pureza requerida para un análisis más exhaustivo de su estructura como RMN (resonancia magnética nuclear), se realizó sobre los mismos solamente la determinación del peso molecular mediante espectrometría de masas.

Actividad antimicrobiana

En la Tabla 1 se presentan los tamaños de los halos de inhibición obtenidos para cada uno de los diferentes compuestos sintetizados.

Tabla 1. Halos de inhibición de los compuestos en estudio, frente a cepas de referencia expresados en mm.

Cepas indicadoras	geminis no iónicos					geminis catiónicos	
	3a	3b	3c	3d	3e	3d*	3e*
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12	18	7	5	6	6	6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10	16	7	6	6	6	8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7	7	5	7	5	5	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27857	5	7	5	8	5	5	5
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	11	16	5	5	6	5	5

5 mm: Diámetro de los pozos, indica ausencia de halo de inhibición.

Bisht y col. [13], han encontrado que P_1 presentó actividad inhibitoria hacia diferentes bacterias patógenas: *P. aeruginosa* (MTCCB, 741), CIM_{80} 256; *E. coli* (MTCCB, 1610), CIM_{80} 512; *S. aureus* (MTCCB, 96), CIM_{80} 128; *B. subtilis* (NCIM, 2063), CIM_{80} 512; *E. coli* (aislado clínico) CIM_{80} de 256. Por el contrario los tres espaciadores peptídicos sintetizados resultaron inactivos frente a las cepas de colección ensayadas al igual que los productos poli alquilados con cadenas saturadas, mientras que todos los compuestos *gemini* sintetizados presentaron actividad.

Los compuestos mono alquilados con cadenas saturadas, insaturadas y poli fluoradas (3a-1, 3b-1 y 3c-1) también presentaron actividad antimicrobiana, con un espectro inhibitorio similar pero con valores de CIM menores en relación a los *gemini* respectivos. De los compuestos *gemini* obtenidos, el 3b fue el de mayor espectro inhibitorio (Tabla 1).

Estos resultados concuerdan con lo reportado por la bibliografía, en relación a que los surfactantes diméricos (*gemini*) presentan en general, una actividad mayor (hasta un aumento de 1000 veces) en relación a su correspondiente homólogo monohidrofobizado (una cadena, un grupo polar). Esto hace que sean de especial interés para aplicaciones biológicas y biomédicas, especialmente, en las que es esencial reducir al mínimo su concentración *in vivo*. Dado que el uso de menor cantidad

de compuesto para lograr el mismo efecto también tiene claras ventajas económicas, en los últimos años se han reportado un creciente número de patentes que describe una amplia gama de aplicaciones de estos compuestos.

Relación actividad antimicrobiana-tipo de cadenas hidrofóbicas

Los *gemini* 3a, 3b y 3c sólo se diferencian estructuralmente en las cadenas hidrofóbicas que forman parte de la región no polar de sus moléculas. De estos, el *gemini* 3b, sintetizado empleando cadenas insaturadas (2-*trans*, 6-*trans*-farnesol) fue el que presentó mayor espectro inhibitorio y menores valores de CIM (Tabla 2). Estos resultados concuerdan con lo esperado ya que se ha reportado por ejemplo que la presencia de cadenas hidrofóbicas derivadas del ácido oleico (18:1 *cis*-9) aumentan la actividad en la mayoría de los compuestos *gemini* ya sea como agentes antimicrobianos o de transfección [9, 26]. Las cadenas poli fluoradas otorgan a los *gemini* una mayor lipofilia y mayor capacidad detergente (afinidad por las membranas bacterianas) [27], sin embargo los valores obtenidos de CIM para el *gemini* 3c fueron altos, debido probablemente a los bajos rendimientos obtenidos (10 %) y a que los *gemini* utilizados no estaban puros a causa de dificultades presentadas al momento de ser purificados.

Tabla 2. Concentración Inhibitoria mínima (CIM) de los *gemini* en estudio ($\mu\text{g/mL}$)

Cepas indicadoras	geminis no iónicos					geminis catiónicos	
	3a	3b	3c	3d	3e	3d*	3e*
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	17.26	7.6	42.36	ND	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	189.6	7.6	169.3	>800	>1000	250	1000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	ND	ND	ND	>800	ND	ND	ND
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27857	ND	ND	462.5	>800	ND	ND	ND
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	12.6	3.83	ND	ND	125	<62.5	<500

ND: No determinado.

Relación actividad antimicrobiana-estructura de espaciador peptídico

A fin de estudiar la relación entre la actividad obtenida y el tipo de secuencia aminoácida empleada para la molécula espaciadora, se tomó como base el *gemini* 3a, y se varió la secuencia aminoácida del espaciador peptídico manteniendo constante la cadena hidrofóbica (cadena saturada de 12 carbonos).

En el espaciador P_1 se incorporó el aminoácido triptofano mientras que en los espaciadores P_2 y P_3 se sustituyeron los residuos de triptofano (W) por asparagina (N) aminoácido más polar. Los resultados sobre actividad muestran que los *geminis* obtenidos a partir del espaciador P_1 son considerablemente más activos, que los obtenidos a partir de P_2 y P_3 , ya que presentaron mayor espectro de inhibición y menores valores de CIM (Tabla 1 y 2). Esto estaría indicando que el aminoácido triptofano tiene un rol fundamental en el mecanismo de acción de este tipo de *geminis*, como ocurre con un péptido antimicrobiano sin hidrofobizar. En la

literatura, se describe que la estructura del tripófano presenta una elevada preferencia por la interfase de las membranas biológicas bacterianas, en comparación con el resto de los aminoácidos hidrofóbicos [28], otorgando de esta manera una mayor actividad antimicrobiana a los péptidos que contienen este aminoácido.

También, a fin de analizar que influencia tiene en la actividad antimicrobiana el tamaño de la molécula espaciadora, es decir la distancia entre los residuos de ornitina, sintetizamos el *gemini* 3e donde la distancia entre estos residuos es máxima y lo comparamos con el *gemini* 3d donde se encuentran adyacentes. Se sabe que muchos surfactantes *gemini* activos y que presentan en su estructura el aminoácido lisina (K), muy parecido a ornitina, experimentan un aumento de su actividad a medida que los residuos de lisina están mas cerca [6]. Los resultados sobre actividad obtenidos para *geminis* 3d y 3e no fueron concluyentes sobre cual es el tamaño del espaciador mas adecuado (Tablas 1

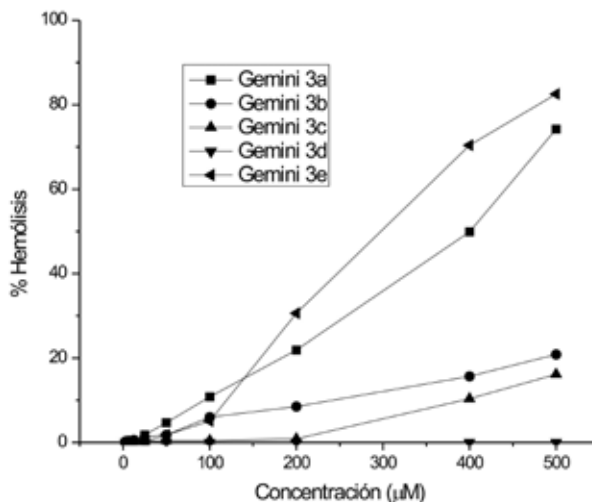
y 2), sin embargo el *gemi*ni 3d presentó un espectro de acción mas amplio, frente a bacterias Gram + y -, mientras que el *gemi*ni 3e solo fue activo y selectivo frente a bacterias Gram +. Con la finalidad de dilucidar esta cuestión se sintetizaron los *gemi*nis catiónicos respectivos (sales de amonio cuaternarias: 3d* y 3e*) ya que al generar una carga positiva neta permanente en dichas moléculas es de esperar que la actividad sea mayor en ambos compuestos, en relación a los *gemi*nis no iónicos. Los resultados obtenidos frente a *Listeria monocytogenes* y *Stahylococcus aureus* demuestran claramente que la cercanía en los residuos de ornitina cargados positivamente favorece la actividad en coincidencia con lo reportado en la literatura para el aminoácido lisina, ya que los valores de CIM obtenidos para el *gemi*ni 3d* son entre 4 y 8 veces menor que para el *gemi*ni 3e*.

Actividad Hemolítica

La toxicidad de los *gemi*ni sintetizados se estudió mediante medición de la actividad hemolítica sobre glóbulos rojos humanos. Los resultados demuestran que los *gemi*nis mas activos: 3a, 3b y 3c presentan escasa toxicidad dentro del rango de concentraciones bajo los cuales ejercen su actividad antimicrobiana ya que los porcentajes de hemólisis correspondientes son inferiores al 10 % para el *gemi*ni 3a y menores al 10 % para los *gemi*ni 3b y 3c. (Figura 4). Este aspecto es importante fundamentalmente para el *gemi*ni 3b, cuya CIM frente a *S. aureus* ATCC 25923 es muy baja: 7.6 μ g/mL, estas características de baja toxicidad y elevada acción antimicrobiana lo convierten en un potencial antibiótico aplicable al campo de la salud humana.

La notable diferencia en la actividad hemolítica de los *gemi*ni 3d y 3e, sumado al

Figura 4. Actividad hemolítica de los compuestos *gemi*ni 3a, 3b, 3c, 3d y 3e.



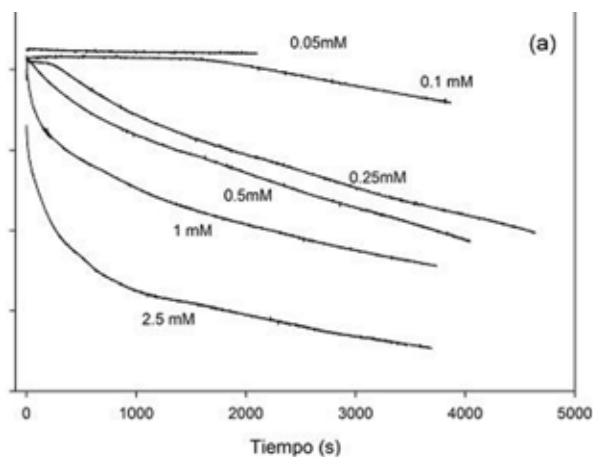
espectro antimicrobiano diferente de estos compuestos sugiere la hipótesis de que ambos compuestos puedan diferir en su mecanismo de acción a nivel de la membrana de las células.

Determinación de la tensión superficial y de la concentración micelar crítica (CMC)

La medición de la tensión interfacial consiste básicamente en disolver el surfactante en la subfase (debajo de la interfase agua-aire) y dejar que su concentración alcance un equilibrio dinámico con las moléculas adsorbidas en la interfase. Los anfífilos, en equilibrio dinámico, se adsorben a la interfase disminuyendo la tensión superficial. Los estudios de superficie se realizaron para los *gemini* más activos, 3a y 3b (Figuras 5a y 5b). El *gemini* 3a fue muy insoluble en agua

y sedimentó a las 24 horas, esto hizo que tardara llegar al equilibrio y que las curvas fueran lentas y poco reproducibles a las distintas concentraciones estudiadas. La estabilización de las moléculas no siguió la curva típica de tipo hiperbólica sino que presentó un descenso continuo de la tensión superficial en forma de una recta a tiempos largos. Esto puede deberse a cambios continuos de la conformación del anfífilo en la interfaz, o bien a una agregación del *gemini* en la interfase en función del tiempo. Esto dificultó el análisis e hizo difícil el cálculo de CMC ya que las curvas no se estabilizaron en un valor de tensión superficial. Sin embargo definitivamente muestra efecto tensioactivo a altas concentraciones, mucho mayores que el *gemini* 3b (Figura 5a).

Figura 5. (a) Variación de la tensión superficial (mN/m) en el tiempo (s) para el compuesto *gemini* 3a.

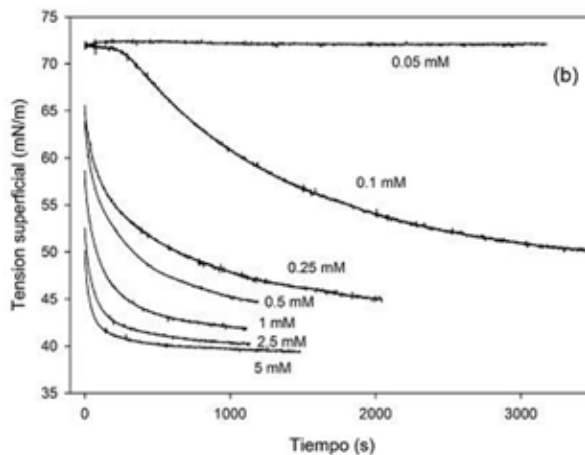


El *gemini* 3b resultó bastante soluble en agua y mostró un efecto tensioactivo importante, se absorbió rápidamente en la interfase (15 min) y llegó a tensiones superficiales estables a concentraciones superiores a 1.0 mM. La mínima tensión superficial que se obtiene en estas curvas es de 39 mN/m. Este descenso de 33 mN/m es bastante bueno para un *gemini* peptídico anfipático (3b) y muestra un efecto tensioactivo importante. Los valores de la concentración micelar crítica (CMC) fueron determinados por el método clásico de quiebre en la curva tensión superficial en función del tiempo. En función de las curvas obtenidas para el *gemini* 3b, su CMC dio un valor de 0.76 mM, y se ubicaría entre las curvas de 1.0 y 0.5 mM (Figura 5b). Estas concentraciones

como es de esperar son muy inferiores a las CIM frente a las diferentes bacterias ensayadas. Esta marcada propiedad detergente del *gemini* 3b es coherente con su elevada actividad antimicrobiana.

Numerosos reportes científicos han demostrado que la actividad de los surfactantes *gemini* depende de la CMC, esto puede explicarse en función del hecho que si se encuentran a una concentración por debajo de la CMC, son solubles y están disponibles para ejercer su acción antimicrobiana u de otro tipo, en cambio si se encuentran por encima de su CMC, comienzan a formar agregados supramoleculares del tipo micelas, bicapas o vesículas y dejan de estar disponibles para actuar como antimicrobianos [29].

Figura 5. (b) Variación de la tensión superficial (mN/m) en el tiempo (s) para el compuesto *gemini* 3b.



Conclusiones

La hidrofobización realizada por nuestro grupo de trabajo sobre los diferentes espaciadores peptídicos aumentó considerablemente su espectro antimicrobiano de acción tanto sobre bacterias Gram (+) como Gram (-), causantes de enfermedades infecciosas o intoxicaciones de origen alimentario tales como *Pseudomonas aeruginosa*, diferentes especies de *Bacillus*, *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*.

Todos estos compuestos pero especialmente los anfifilos peptídicos de mayor actividad obtenidos (*gemini* 3a y 3b), presentan bajos pesos moleculares y pueden ser obtenidos por un método simple de *N*-alquilación, esto los torna atractivos tecnológicamente para ser producidos en mayor escala. La presencia en estas moléculas de análogos *N*- δ -alquilados de ornitina (aminoácido no natural) las hace resistentes a la acción de numerosas enzimas como aminopeptidasas, aumentando la vida media de las mismas, lo cual es un hecho importante en el desarrollo de nuevas drogas con fines terapéuticos. De los compuestos diseñados y sintetizados, hemos seleccionado como los de mejor desempeño como antimicrobianos, aplicables a la conservación de alimentos a los productos hidrofobizados con cadenas insaturadas y saturadas ya que presentaron máxima actividad antimicrobiana frente a bacterias como *Bacillus subtilis* y *Listeria monocytogenes*. Dentro de este grupo el *gemini* 3b presentó además, muy baja actividad hemolítica, ambas características, lo tornan un compuesto aplicable al campo de la salud humana.

Los estudios estructura-función realizados indican en relación a la porción hidrofóbica de estas moléculas que los mejores

resultados de actividad antimicrobiana y de superficie se obtienen mediante el uso de cadenas insaturadas, mientras que a nivel de la molécula espaciadora estos surfactantes *gemini* peptídicos presentan requerimientos estructurales semejantes a los péptidos antimicrobianos sin hidrofobizar. La mayor actividad obtenida para los *geminis* 3a, 3b y 3c en relación a 3d y 3e indica que la presencia del aminoácido triptofano es fundamental para la acción antimicrobiana. Por otro lado los ensayos de actividad antimicrobiana y toxicidad realizados sobre los *gemini* 3d y 3e demostrarían que la distancia entre los residuos de ornitina afecta el espectro de inhibición de estos compuestos probablemente debido a una diferencia en el mecanismo de acción.

Actualmente los resultados aquí presentados sobre estudios de estructura función están siendo aplicados por nuestro grupo de trabajo al diseño de nuevas moléculas *gemini* peptídicas para ser usadas como agentes de transfección.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el marco del Proyecto CAI+D 2009 de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, República Argentina.

Referencias bibliográficas

1. Menger F. M. and J. S. Keiper., 2000. Gemini surfactants. *Angew. Chem. Int. Ed.*: **39**, 1906-1920.
2. Hait, S. K. and S. P. Moulik., 2002. Gemini surfactants: A distinct class of self-assembling molecules. *Current Science*. **82**, 9: 1101-1111.
3. Tewari, NET.; Tiwari, V.K.; Tripathi, Chaturvedi, R.P.;V. Srivastava, A.; Srivastava, Shukla, R.P.K.; Chaturvedi, A.K.; Gaikwad, A.; Sinha, S.; Srivastava, B.S., 2004. Synthesis of galactopyranosyl amino alcohols as new class of antitubercular and antifun-

- gal agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 329-332.
4. Menger F.M, and B.N.A. Mbadugha., 2001. Gemini surfactants with a disaccharide spacer. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 875-885.
5. Murguía, M. C., Machuca, L. M., Lurá, M C. Cabrera, M.I., Grau, R, 2008. Synthesis and Properties of Novel Antifungal Gemini Compounds Derived from N-Acetyl Diethanolamines. *Surfact. Deterg.* **11**, 223-230.
6. Kirby, A. J. Camillero,P.J.; Engberts, B. F. N.; Feiters, M.C.; Nolte, R.J. M.; Soderman, O.; Bergsma, M.; Bell, P.C.; Bielden, M.L.; García Rodríguez, C.L.; Guédat, P; Kremer, A.; McGregor, C.; Perrin, C.; Ronsin, G. and van Eijk, M.C.P, 2003. Gemini Surfactants: New Synthetic Vectors for Gene Transfection. *Angew. Chem. Int. Ed.* **42**, 1448-1457.
7. Accardo, A. D.; Tesauro, A.; Morisco, G.; Mangiapia, M.; Vaccaro, G. E.; Heenan, R.K.; Paduano, L.; and Morelli, G., 2009. Micelles obtained by aggregation of gemini surfactants containing the CCK8 peptide and a gadolinium complex. *J. Biol. Inorg. Chem.* **14**, 587-599.
8. Jerala, R., 2007. Synthetic lipopeptides: a novel class of anti-infectives. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* **16**, 8: 1159-69.
9. Kirby A.J.; McGregor, Caroline; Perrin, Christele; Monck, Myrna; Camillero, Patrick .,2001 Rational Approaches to the Design of Cationic Gemini Surfactants for Gene Delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 26:6215-6220.
10. McGregor C, Perrin C, Monck M, Camilleri P, Kirby AJ., 2001. Rational approaches to the design of cationic gemini surfactants for gene delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6215-6220.
11. Ronsin, G.; Kirby A. J., Rittenhouse, S.; Woodnutt, G.; Camilleri, P, 2002. Structure and antimicrobial activity of new bile acid-based gemini surfactants. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2**, 1302-1306.
12. Müller, D.M.; Carrasco, MS.; Simonetta, AC.; Beltrami, LM.; and Tonarelli, G. G., 2007. A synthetic analog of plantaricin 149 inhibiting food-borne pathogenic bacteria:evidence for α -helical conformation involved in bacteria-membrane interaction. *J. Pept. Sci.* **13**, 3: 171-178.
13. Bisht, G.S.; Rawat, D.S.; Kumar, A.; Kumar,R. and Pasha,S., 2007. Antimicrobial activity of rationally designed amino terminal modified peptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 4343-4346.
14. Adessi, C. and Soto, C., 2002. Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr. Med. Chem.* **9**, 963-978.
15. Müller, D.M.; Ingaramo, M.C.; Argañar, M.F.; Murguía, M.C., 2011. "Síntesis y actividad biológica de nuevos surfactantes peptídicos tipo gemini". *CIT*, **22**, 5. PRINT ISSN 0716-8756. ON LINE ISSN 0718-0764
16. Bowman, W.R. and D.R. Coghlan., 1997. A Facile Method for the N-Alkylation of α -Amino Esters. *Tetrahedron.* **53**, 46: 15787-15798.
17. Salvatore, R.N.; Schmidt, S. E.; Shin, S. I.; Nagle, A. S.; Worrella, J. H. and Junga, K. W., 2000. CsOH-promoted chemoselective mono-N-alkylation of diamines and polyamines. *Tetrahedron Lett.* **41**, 9705-9708.
18. Srivastava, S.K.; Chauhan, P.M.S. and Bharduri A.P., 1999. A novel strategy for N-alkylation of primary amines. *Synth. Commun.* **29**, 2085-2091.
19. Régine Maget-Dana., 1999. The monolayer technique: a potent tool of studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. *Biochim. et Biophysica Acta* **1462**, 109-140.
20. Mor, A. and Nicolas, P., 1994. The NH2 terminal α -helical domain 1-18 of Dermaseptin is responsible for antimicrobial activity. *J.Biol. Chem.* **269**, 3: 1934-1939.
21. Merrifield, R.B, 1995. "Solid- phase peptide synthesis- In Peptides: Synthesis, Structures, and Applications", Academic Press (San Diego, USA), IIIXC, 93-169.

- 22.** Rist, Ø.; Rike, A.; Ljones, L.; and Carlsen, P.H.J. 2001. Synthesis of Novel Diammonium Gemini Surfactants. *Molecules*: **6**, 979-987
- 23.** Wu M, Hancock REW. Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. 1999. *J. Biol. Chem*: **274**, 29-35.
- 24.** Zelezetsky, I.; Pacor, S.; Pag, U.; Papo, N.; Shai, Y.; Sahl, HG. and Tossi, A., 2005. Controlled alteration of the shape and conformational stability of alpha-helical cell-lytic peptide: effect on mode of action and cell specificity. *Biochem. J.* **390**, 177-188.
- 25.** Salvatore, R.N.; Yoon, C.H.; Jung, K.W., 2001. Synthesis of secondary amines. *Tetrahedron*. **57**, 7785-7811.
- 26.** Ladlow, M.; Castro, M., Griffiths, D.; Patel, A.; Patrick, N., and Kitson, C., 2004. Effect of chain length on transfection properties of spermine-based gemini surfactants. *Org. Biomol. Chem.* **2**, 2814- 2820.
- 27.** Fustero, S.; Roman, R.; Sanz Cervera, J.; Simon, A.; Cunat, A.; Villanova, S.; Murguía, M.C., 2008. Improved Regioselectivity in Pyrazole Formation through the Use of Fluorinated Alcohols as Solvents: Synthesis and Biological Activity of Fluorinated Tebufenpyrad Analogs. *J Org Chem.* **73**, 9: 3523-3529, ISSN 0022-3263.
- 28.** Lindblom, G.; Persson, S. J. and Killian, A., 1998. Molecular Ordering of Interfacially Localized Tryptophan Analogs in Ester- and Ether-Lipid Bilayers Studied by 2H-NMR. *Biophys. J.* **75**, 1365-1371.
- 29.** Laatiris, A.; El Achouri, M.; Infante, M.R.; Bensouda, Y., 2008. Antibacterial activity, structure and CMC relationships of alkanediyl α, α -bis (dimethylammoniumbromide) surfactants. *Microbiol. Res.* **163**, 645-650.

Presentaciones a congresos

Este trabajo ha sido aprobado para su presentación y defendido en los siguientes encuentros científicos:

XXVIII Congreso Argentino De Química - Bicentenario De Mayo - 4to. Workshop y 2da. "Reunión Latinoamericana de Química Medicinal, 13-16 de Septiembre, de 2010, Universidad de Lanús, Prov. Bs. As, Argentina.

XIV Encuentro de jóvenes investigadores de la UNL y V Encuentro de jóvenes investigadores de Universidades de Santa Fe, 3-4 de Noviembre de 2010, Santa Fe, Argentina.

XVIII Simposio Argentino de Química Orgánica, Sociedad Argentina de Investigaciones en Química Orgánica, 13 al 16 de noviembre de 2011, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

XX Jornada de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades del grupo Montevideo (AUGM), Octubre de 2012, Curitiba, Paraná, Brasil.