







Estrategias catalíticas combinadas en la obtención de tensioactivos derivados de alanina: análisis de los productos obtenidos y evaluación de la actividad biocida

Combined catalytic strategies in obtaining alanine-derived surfactants: Analysis of the products obtained and evaluation of biocidal activity

Grillo, Patricia D.^{1,3,4} , Vetere, Virginia² , Fait, Maria Elisa^{1,5} , Llerena Suster, Carlos R.², Laurella, Sergio^{1,5} , Morcelle, Susana R.^{1,5*} 

¹ Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

² Universidad Nacional de La Plata, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

³ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

⁴ Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación, Argentina

⁵ Universidad Nacional de La Plata, Argentina

* morcelle@biol.unlp.edu.ar

Resumen

Este trabajo presenta el estudio de distintas alternativas para la hidrogenólisis catalítica junto con el análisis de los productos obtenidos en la síntesis de surfactantes derivados de alanina, y la evaluación de su actividad antimicrobiana. La síntesis de dichos compuestos involucra una reacción de condensación entre un derivado N-prottegido de alanina (N^o-carbobenzoxi-Ala) con alquilaminas catalizada por papaína (una endopeptidasa vegetal) y la hidrogenólisis del producto para eliminar el grupo protector de la porción aminoacídica. En las reacciones de hidrogenólisis se ensayaron dos catalizadores a base de Pd soportados sobre carbón.

Los productos observados por cromatografía en capa fina (TLC) mostraron que los mejores resultados se obtuvieron mediante el empleo del catalizador Pd/C 10% (p/p) durante 4 h de reacción a 4 atm de presión de H₂ y a 40 °C. El análisis mediante distintos tipos de espectroscopías bidimensionales de RMN y por UPLC-MS demostraron que los productos formados fueron N^o-isopropil-alanina amidas, debido a que, en las condiciones seleccionadas, el 2-propanol elegido como medio de reacción fue capaz de reaccionar con el grupo α -amino de la porción aminoacídica, desplazando al grupo protector N^o-carbobenzoxi. Los compuestos resultantes demostraron tener actividad bacteriostática y bactericida frente a *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: hidrogenólisis; surfactante derivado de alanina; actividad antimicrobiana.





Abstract

This work presents the study of different alternatives for catalytic hydrogenolysis, along with the analysis of the products obtained in the synthesis of alanine-derived surfactants and the evaluation of their antimicrobial activity. The synthesis of these compounds involves a condensation reaction between an N-protected alanine derivative (N^α-carbobenzyloxy-Ala) and alkylamines, catalyzed by papain (a plant endopeptidase), followed by hydrogenolysis of the product to remove the protecting group from the amino acid moiety. Two Pd-based catalysts supported on activated carbon were tested in the hydrogenolysis reactions.

Thin-layer chromatography (TLC) analysis revealed that the best results were achieved using a 10% (w/w) Pd/C catalyst after 4 h of reaction under 4 atm of H₂ pressure at 40 °C. Analyses by different two-dimensional NMR spectroscopy techniques and UPLC-MS demonstrated that the products formed were N^α-isopropyl-alanine amides. Under the selected conditions, the 2-propanol used as the reaction medium was able to react with the α-amino group of the amino acid moiety, displacing the N^α-carbobenzyloxy protecting group. The resulting compounds exhibited both bacteriostatic and bactericidal activity against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: hydrogenolysis; alanine-derived surfactant; antimicrobial activity.

1. INTRODUCCIÓN

Los tensoactivos se emplean en múltiples aspectos de la vida cotidiana por sus propiedades detergentes y de emulsificación. Históricamente, los surfactantes son productos de la industria petroquímica, pero estos compuestos han resultado ser contaminantes y poco biodegradables. Por ello resulta atractivo desarrollar surfactantes de base biológica a partir de materias primas renovables que conserven o mejoren la actividad superficial y antimicrobiana de compuestos de origen biológico que tengan la capacidad de disminuir la tensión superficial. En particular, los tensoactivos basados en aminoácidos (por ejemplo, derivados de arginina) han demostrado poseer actividad antibacteriana (Pinazo et al., 2019). Estructuralmente, estos compuestos son análogos de los lípidos antimicrobianos naturales, ya que contienen una o dos unidades de aminoácidos unidas a cadenas hidrofóbicas, de modo que actúan como anfífilos capaces de interactuar con membranas celulares, provocando la pérdida del contenido celular y por lo tanto la muerte de los microorganismos.

En investigaciones previas (Grillo et al., 2023) se describió la obtención de surfactantes derivados de alanina mediante una estrategia de dos etapas. En la primera, la condensación enzimática de Z-Ala-OH con alquilaminas (decilamina/dodecilamina) catalizada por una proteasa vegetal (papaína adsorbida sobre poliamida) produjo los derivados Z-Ala-NHC₁₀ y Z-Ala-NHC₁₂. En la segunda etapa, se realizaron reacciones de hidrogenólisis catalítica utilizando como catalizador Pd/C 10% p/p para eliminar el grupo protector carbobenzoil- (Z) y generar el surfactante catiónico correspondiente (Fig. 1). En dicho trabajo se informaron rendimientos cercanos al 100% para la reacción de obtención de Z-Ala-NHC₁₀ usando papaína sobre poliamida como biocatalizador (Fig. 1A) y que el sistema Pd/C fue activo y selectivo en la desprotección del grupo α-amino (Fig. 1B). Sin embargo, en esa instancia la identidad del producto no estaba aún dilucidada.

A fin de mejorar la selectividad y evitar la formación de subproductos, en la presente investigación se evaluó un catalizador alternativo PdFe/C y se realizó una identificación exhaustiva de los productos finales formados. Este tipo de catalizadores bimetálicos han sido empleados exitosamente en la hidrogenación quimioselectiva de derivados de carbohidratos (Rojas et al., 2019). Finalmente, se llevó a cabo un ensayo preliminar de la actividad antimicrobiana de los compuestos obtenidos, mediante la determinación de concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas (CIM y CBM respectivamente) contra dos cepas bacterianas. Estos ensayos permitieron confirmar la actividad biocida de los compuestos obtenidos.

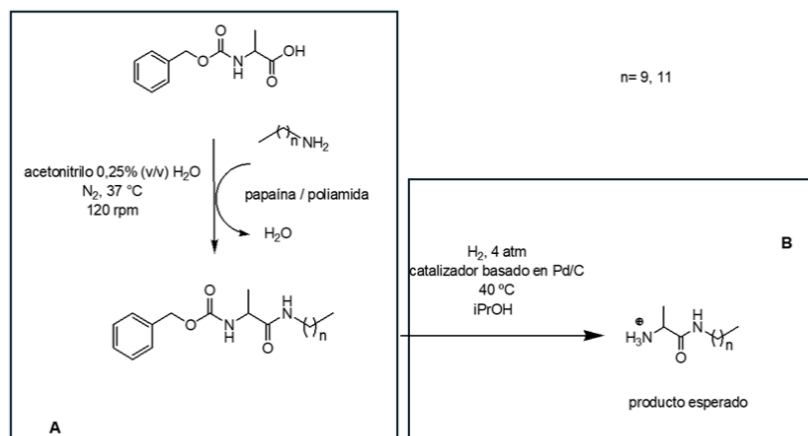


Figura 1. Vía de síntesis propuesta para la obtención de dos surfactantes derivados de alanina. (A) etapa biocatalítica. (B) Reacción de hidrogenólisis.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención de N^α-carboboixi-alanina alquilamidas (Z-Ala-NHC_n)

La síntesis a escala semipreparativa de los Z-Ala-NHC_n se llevó a cabo como se indicó oportunamente (Grillo et al., 2023). El esquema general de la reacción biocatalítica se muestra en la Fig. 1A.

2.1.1 Hidrogenólisis catalítica

El procedimiento seguido fue el esquematizado en la Fig. 1B. Se seleccionó el surfactante Z-Ala-NHC₁₀ para optimizar los ensayos. Se realizaron reacciones de hidrogenólisis catalizadas con dos catalizadores: Pd/C (10% p/p de Pd) y el catalizador bimetálico PdFe/C (10% p/p PdFe, relación Fe/Pd=0,5) preparado por impregnación a humedad, seguido de reducción a 350 °C bajo H₂ durante 2 h. Para cada experimento, en un reactor batch de acero inoxidable se introdujeron distintas masas de Z-Ala-NHC₁₀ disueltos en 2-propanol (50 mL) y 200 mg del catalizador. La reacción fue llevada a cabo a 4 atm de presión de H₂ y 40 °C, en continua agitación, durante 4 o 24 h según corresponda.

Una vez puesta a punto la técnica, el compuesto intermediario obtenido mediante la condensación de Z-Ala-OH con dodecilamina (Z-Ala-NHC₁₂), fue sometido a una reacción de hidrogenólisis únicamente con el catalizador Pd/C 10% p/p. Las condiciones de reacción ensayadas se muestran en la Tabla 1.

Para monitorear el avance de las reacciones, se tomaron muestras a distintos tiempos y se analizaron por cromatografía de sílica gel en capa fina (TLC) utilizando como fase móvil diclorometano/metanol 95:5 y ninhidrina como revelador. El producto se obtuvo tras la filtración para eliminar el catalizador, evaporación del solvente y secado del sólido residual.

Tabla 1. Condiciones de las reacciones de hidrogenólisis.

Sustrato	Z-Ala-NHC ₁₀		Z-Ala-NHC ₁₂
	Pd/C (10% p/p)	PdFe/C (10% p/p)	Pd/C (10% p/p)
Masa sustrato (mmoles)	0,4	0,4	0,4
Masa catalizador (mg)	200	200	200
Solvente (50 ml)	2-propanol	2-propanol	2-propanol



Tiempo reacción (h)	24	4	4	4
----------------------------	----	---	---	---

2.2. Análisis estructural e identificación

2.2.1. Análisis por RMN

Los productos aislados se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se analizaron en un espectrómetro Bruker Avance NEO 500 (frecuencias 500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C) mediante técnicas bidimensionales HSQC, COSY y HMBC.

2.2.2 Análisis por UPLC-MS

Para complementar el análisis de la estructura de los productos obtenidos, estos fueron también analizados mediante un sistema de cromatografía líquida de ultraperformance Waters modelo H-class. Detector de masas Waters Xevo-TQS micro: Sistema de ionización a presión atmosférica (API) por electrospray (ESI) y dos analizadores cuadrupolares.

2.3. Determinación de la actividad antimicrobiana

Se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) y bactericidas mínimas (CBM) de los surfactantes obtenidos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Pseudomonas aeruginosa* (PA01). Los ensayos se realizaron por microdilución en caldo Mueller-Hinton (CLSI), en placas de 96 pocillos. Se prepararon diluciones seriadas de los compuestos (31-500 μM) e inóculos de bacterias (~10⁶ UFC/mL). Tras incubar 24 h a 37 °C, la CIM se determinó como la concentración mínima que inhibió el crecimiento bacteriano (visual y por absorbancia a 600 nm). Para la CBM, se sembraron alícuotas de los pocillos sin crecimiento en agar nutritivo. La misma fue determinada como la concentración mínima a la cual no se recuperaron colonias tras 24 h adicionales de incubación a 37 °C.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Hidrogenólisis con los catalizadores basados en Pd/C

3.1.1. Catalizador Pd/C 10% p/p

Utilizando el catalizador Pd/C y 2-propanol como solvente a 40 °C y 4 atm de H₂ durante 4 h, se observó por TLC la completa desaparición de los sustratos Z-Ala-NHC₁₀ y Z-Ala-NHC₁₂ (Figura no mostrada). Los análisis por RMN (¹H-RMN, ¹³C-RMN, HMBC/COSY) mostraron la ausencia total de señales aromáticas del grupo carbobenzoxi (Z), confirmando la eliminación del protector. A su vez, las señales indicaron la presencia de un grupo isopropilo (-CH(CH₃)₂) unido al nitrógeno α de la alanina. De manera análoga, el MS-ESI del producto final derivado de decilamina mostró un pico en el cromatograma correspondiente a m/z [M+H]⁺≈271, consistente con la fórmula empírica C₁₆H₃₄N₂, mientras que el derivado de dodecilamina exhibió un pico en el cromatograma correspondiente a m/z [M+H]⁺≈299, consistente con la fórmula empírica C₁₈H₃₈N₂.

Los resultados sugieren que tras la eliminación del grupo protector Z, ocurrió una sustitución nucleofílica debida a la presencia de 2-propanol empleado como solvente sobre el nitrógeno recién liberado, dando como resultado la formación de N^α-isopropil-alanina alquilamida (denominado iPr-Ala-NHCn). En fase heterogénea con Pd/C, el 2-propanol puede protonarse (o activarse en la superficie metálica) y formar un intermediario carbocatiónico, que reaccionaría con la base fuerte (nitrógeno de la porción aminoacídica) resultando en la adición de un isopropilo a dicho nitrógeno (Fig. 2). Es decir, en las condiciones ensayadas y utilizando Pd/C como catalizador, se logró la remoción del grupo Z de forma eficaz, pero simultáneamente se produjo la alquilación del nitrógeno con un grupo isopropilo proveniente del solvente.

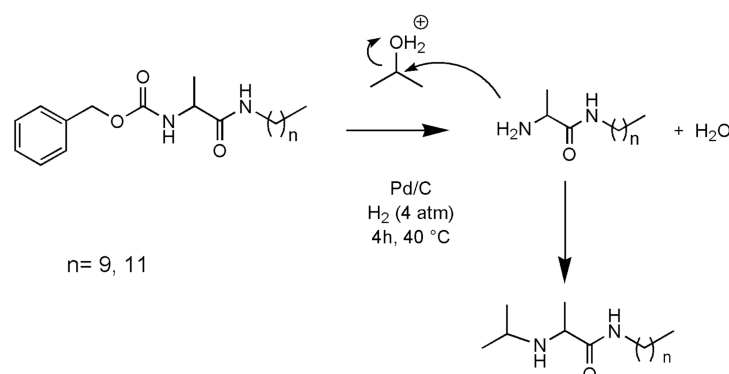


Figura 2. Mecanismo de reacción propuesto para la obtención de N^{α} -isopropil-alanina alquilamidas.

3.1.2. Catalizador PdFe/C 10% p/p

Con el objetivo de evaluar una mejora en la selectividad, se ensayó el catalizador bimetalico PdFe/C bajo condiciones similares sólo para el compuesto Z-Ala-NHC₁₀. De acuerdo con lo que se observó en la TLC correspondiente, no se alcanzó la conversión total en producto: tras 24 h aún se detectó la mayoría del sustrato Z-Ala-NHC₁₀ sin reaccionar. Esto indica una actividad significativamente menor para hidrogenólisis en estas condiciones. Aunque estos sistemas bimetalicos han sido muy eficientes en la hidrogenación selectiva de otros compuestos orgánicos (Rojas et al., 2019), en el presente estudio se observó una notable disminución en la actividad. Estos resultados pueden ser una consecuencia de la disminución en la cantidad de sitios activos para la hidrogenólisis debido al agregado de Fe sobre Pd. En base a los resultados obtenidos, se decidió no ensayar este catalizador con Z-Ala-NHC₁₂.

3.2. Actividad biocida

Se investigó la actividad antimicrobiana de los surfactantes obtenidos mediante la determinación de CIM y CBM. N^{α} -isopropil-alanina decilamida y N^{α} -isopropil-alanina dodecilamida revelaron actividad contra uno de los patógenos testeados a las concentraciones ensayadas (véase Tabla 2). Se observaron CIM moderadas y CBM mayores al doble de la CIM, lo que sugiere que el compuesto es bacteriostático a concentraciones bajas y bactericida al aumentar la dosis. En concreto, con el compuesto iPr-Ala-NHC₁₀ ante *S. aureus* se obtuvo una CIM de 250 μ M y una CBM mayor a 500 μ M. Para el compuesto iPr-Ala-NHC₁₂, se observaron valores de CIM de 125 μ M y CBM de 500 μ M, frente a la misma cepa bacteriana. Sin embargo, en ninguno de los casos se observó una inhibición en el crecimiento de *P. aeruginosa*.

Estos resultados muestran que el surfactante es activo sobre Gram-positivos. La actividad antimicrobiana observada coincide con reportes previos de surfactantes derivados de aminoácidos (Olutas et al., 2022). En particular, su efecto biocida ha resultado ser menor que los de derivados del aminoácido arginina de estructura similar (Fait et al., 2015), lo que podría deberse al menor carácter básico del N sustituido con el grupo isopropilo en relación al del grupo guanidinio de la arginina. No obstante, futuros estudios podrían explorar variaciones en la estructura para optimizar la potencia biocida.

Tabla 2. Valores de CIM y CBM (en μ M) de los surfactantes obtenidos frente a distintas bacterias.

Bacteria	iPr-Ala-NHC ₁₀		iPr-Ala-NHC ₁₂	
	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	250	>500	125	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA01)	-	-	-	-



4. CONCLUSIONES

Se sintetizaron tensioactivos derivados de alanina mediante una estrategia catalítica combinada. La desprotección de la molécula Z-Ala-NHCn vía hidrogenólisis con Pd/C permitió eliminar el grupo protector carbobenzoxi. Sin embargo, se descubrió que se formó como producto N^o-isopropil-alanina decil- o dodecilamida según la reacción correspondiente, en lugar del tensioactivo catiónico esperado (Ala-NHC₁₀ y Ala-NHC₁₂). Esto se atribuye a una sustitución nucleofílica del 2-propanol sobre el nitrógeno de la porción aminoacídica durante la hidrogenólisis, agregando un grupo isopropilo. Por otro lado, el catalizador PdFe/C 10% diseñado para mejorar la selectividad no resultó eficaz bajo las condiciones ensayadas, dado que la conversión del sustrato fue muy baja. Adicionalmente, los productos obtenidos mostraron actividad bactericida contra una cepa gram-positiva. Estos hallazgos indican que, aunque la estrategia combinada es prometedora para generar surfactantes de base biológica con actividad antimicrobiana, el diseño de la reacción de hidrogenólisis puede optimizarse.

Agradecimientos

Agradecemos a la ANPCyT, el CONICET y la UNLP por el financiamiento (PICT 2018-1651; PICT 2020-3223; PIP 1728; X 828 y X 894).

Referencias

- Fait, M. E., Garrote, G. L., Clapés, P., Tanco, S., Lorenzo, J. y Morcelle, S. R. (2015). Biocatalytic synthesis, antimicrobial properties and toxicity studies of arginine derivative surfactants. *Amino Acids*, 47, 1465–1477. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1979-0>
- Grillo, P., Fait, M. E., Llerena Suster, C. R., Vetere, V. y Morcelle, S. R. (2023). Obtención de tensioactivos biodegradables a partir de estrategias catalíticas combinadas. *Jornadas en Ciencias Aplicadas "Dr. Jorge Ronco"*, 4(1).
- Olutas, E. B., Kartal, N. B. y Birinci Yildirim, A. (2022). Self-assembly, surface, antibacterial, and solubilization properties of phenylglycine type amino acid-based cationic surfactants. *Journal of Molecular Liquids*, 367, 120528. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120528>
- Pinazo, A., Pérez, L., Morán, M. de C. y Pons, R. (2019). Arginine-based surfactants: Synthesis, aggregation properties, and applications. En D. G. Hayes, D. K. Solaiman y R. D. Ashby (Eds.), *Biobased surfactants: Synthesis, properties, and applications* (2^a ed., pp. 413–445). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00013-7>
- Rojas, A. H., Zendri, L. G., Lafuente, L., Ponzinibbio, A. y Vetere, V. (2019). Synthesis of potentially bioactive carbohydrate derivatives by chemoselective hydrogenation with PdFe catalyst. *ChemistrySelect*, 4(48), 14228–14232. <https://doi.org/10.1002/slct.201903853>