INTEC

UNL CONICET

Instituto de Desarrollo Tecnológico
para la Industria Química

Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

DESARROLLO DE NUEVOS COMPUESTOS GEMINI CON ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA PARA APLICACIONES VETERINARIAS

Tesis presentada por

Lic. en Biotecnología
Victoria Guadalupe Sánchez

Directora: Dra. María Inés Cabrera
Co-Director: Dr. Marcelo César Murguía

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del grado académico de Doctora en Ciencias Biológicas

-2009-

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por estar conmigo siempre dándome todo su apoyo, comprensión y confianza.

A mi directora la Dra. María I. Cabrera y al Dr. Ricardo Grau por su ayuda y el lugar brindado.

A mi co-director el Dr. Marcelo Murguía por su apoyo, aportes y por ser mi compañero y guía en la construcción de esta tesis.

Al INTEC y compañeros del Parque Tecnológico.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por ser mi casa de estudios durante tantos años.

A todos los integrantes del Instituto de Patobiología del INTA Castelar por su predisposición y grata compañía.

A Griselda Caracostantogolo por brindarme su amistad y gran ayuda de manera totalmente desinteresada.

A los integrantes de la Cátedra de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de Rosario y en especial al Dr. Claudio Giudici por sus aportes, colaboración y excelente predisposición.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Fina y muy especialmente a mis amigos Alejandro Cappadoro, Alexis Bock, Luciano Mengatto, Sonia Mancini, Laura Machuca y Andrea Popielarz.

A Antonio Negro y Susana Gervasio que siempre estuvieron ahí para tenderme una mano.

A Nora Pratta y Diana Magni por su ayuda y aportes en materia de estadística.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad Nacional del Litoral (UNL), por el apoyo económico brindado.

Por último, a todos aquellos que me han devuelto una sonrisa, a todos aquellos que me ofrecieron su apoyo en tiempos difíciles, a todos aquellos que han puesto de su parte para que el trabajo diario sea más llevadero. A todos ellos, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Victoria G. Sánchez

RESUMEN

En el presente trabajo, se presenta el diseño sintético para la preparación de nuevas moléculas anfipáticas de la familia gemini con potencial actividad antihelmíntica sobre nematodes gastrointestinales que afectan la sanidad de los animales de producción. El objeto de la tesis es contribuir en el desarrollo de nuevos productos, aportando una solución en materia de manejo de la resistencia antihelmíntica (rotación de principios activos) que representa una nueva problemática a resolver en favor de la producción pecuaria argentina.

El esquema de síntesis de las nuevas moléculas diméricas involucra no menos de tres etapas de síntesis. De esta manera, eligiendo cuidadosamente los materiales de partida, fue posible dirigir estratégicamente la síntesis de surfactante con dos grupos hidrofílicos y dos cadenas hidrofóbicas. El estudio de dichos compuestos constituye un área de investigación y desarrollo en expansión gracias a las excepcionales propiedades que estos compuestos presentan en disolución acuosa. Por ejemplo, concentraciones micelares críticas (CMC) menores a la de los surfactantes convencionales monoméricos, mejor desempeño en la disminución de la tensión superficial del agua y la propiedad de formar agregados con diferentes morfologías, entre otras.

Se presenta además el estudio y desarrollo de diferentes pruebas de actividad biológica de los productos puros sintetizados frente a nematodes gastrointestinales de interés veterinario.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos de los ensayos de actividad biológica *in vitro*, se realizó un ordenamiento jerárquico de los compuestos gemini sintetizados y se proponen aquellos que presentan las mejores propiedades antihelmínticas para la realización de estudios toxicológicos y estudios a nivel bioquímico-molecular más complejos, tales como el estudio de los cambios celulares que afectan la capacidad de la droga para acumularse intracelularmente, la identificación de receptores celulares para la droga, el estudio de las alteraciones de sistemas enzimáticos y/o alteraciones de receptores celulares, entre otros que permitan recomendar los productos de mejor desempeño para ser utilizados en el tratamiento de rumiantes.

En el Capítulo 1, **“Introducción”**, se presentan nociones básicas acerca del problema de la helmintiasis en rumiantes y la resistencia antihelmíntica; como así también el objetivo general y los objetivos específicos de esta tesis.

En el Capítulo 2, **“Síntesis de nuevos compuestos gemini”**, se presentan los aspectos estratégicos para la obtención de nuevos surfactantes de naturaleza no iónica y catiónica con potencial actividad biológica. La ruta sintética para la obtención de los surfactantes comprende no menos de tres etapas de síntesis: (i) la protección regioselectiva de un par de grupos hidroxilos del pentaeritritol (ii) la utilización de la catálisis por transferencia de fases sólido-líquido para la obtención del intermediario reactivo y (iii) la sustitución nucleofílica bimolecular con aminas grasas para la obtención de surfactantes gemini.

En el Capítulo 3, **“Propiedades activas de superficie de los gemini sintetizados”**, se estudiaron diversos parámetros tales como tensión superficial, concentración micelar crítica, concentración en exceso de superficie, entre otros; que definen las excepcionales propiedades de superficie que exhiben los surfactantes gemini en disolución acuosa.

En el Capítulo 4, **“Determinación de las propiedades antihelmínticas de los gemini sintetizados”**, se analizaron, exploraron y estudiaron diversas técnicas propuestas en la bibliografía. Este capítulo, se dividió en dos etapas experimentales diferentes. En la primera etapa se realizaron dos ensayos a modo de *screening* con huevos y larvas de nematodes gastrointestinales de ovejas, mientras que en la segunda etapa se realizó un ensayo estandarizado de manera más rigurosa utilizando una única cepa de nematode gastrointestinal de ratón denomina *Heligmosomoides polygyrus bakeri*.

En el Capítulo 5, **“Conclusiones”**, se presentan las principales consideraciones conclusivas.

INDICE

CAPITULO 1 2

1. INTRODUCCION 2

1.1. PROBLEMATICA DE LA HELMINTIASIS EN RUMIANTES 2

1.2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE NEMATODES GASTROINTESTINALES DE RUMIANTES 3
1.2.1. Clasificación de los principales parásitos de interés veterinario 3
1.2.2. Morfología 4
Huevos de nematodos 4
Nematodos 4
1.2.3. Ciclo biológico de los nematodes gastrointestinales 7

1.3. ANTIHELMINTICOS. PRINCIPALES GRUPOS 8
1.3.1. Bencimidazoles 9
1.3.2. Imidazotiazoles y Tetrahidropirimidinas 10
Imidazotiazoles: Levamisol 10
Tetrahidropirimidinas: Pirantel, Morantel y Oxantel 11
1.3.3. Lactonas macrocíclicas 11
Avermectinas y Milbemicinas 11

1.4. DESARROLLO DE NUEVAS ESTRUCTURAS ANTIHELMINTICAS TIPO GEMINI 14

1.5. RESISTENCIA ANTIHELMINTICA 14
1.5.1. Factores que influencian el desarrollo de resistencia 15
1.5.2. Mecanismos de resistencia a los diferentes grupos antiparasitarios 16
Resistencia a los Bencimidazoles 16
Resistencia al Levamisol 16
Resistencia a las Avermectinas y Milbemicinas 16
1.5.3. Métodos para la detección de resistencia antihelmíntica 17
Pruebas *in vivo* 17
- Test de eficacia controlada 17
- Test de reducción del conteo de huevos 17

Pruebas *in vitro* 18
- Ensayo de eclosión de huevos 18
- Parálisis larval 18
- Unión a tubulina 19
- Prueba de desarrollo larval 19
- Técnicas de biología molecular 19

1.5.4. Estrategias para retardar el desarrollo de resistencia 19

1.6. OBJETIVO GENERAL 21
1.6.1. Objetivos específicos 21

CAPITULO 2 23

2. SINTESIS DE NUEVOS COMPUESTOS GEMINI 23

2.1. SURFACTANTES 23
2.1.1. Tipos de surfactantes 23

2.2. ESTRATEGIA DE SINTESIS UTILIZADA 25
2.2.1. Protección regioselectiva 25
2.2.2. Catálisis por transferencia de fases 26

2.2.3. Síntesis de surfactantes gemini 28

2.3. MATERIALES Y METODOS **28**

2.4. PROCEDIMIENTOS DE SINTESIS **29**
2.4.1. Síntesis de aminas grasas terciarias a partir de aminas primarias 29
2.4.2. Síntesis de *N,N*-dimetilfarnesilamina y *N,N*-dimetil-perfluorooctil-propil amina 30
2.4.3. Síntesis de acetales mediante destilación reactiva 31
2.4.4. Síntesis del éter diglicidílico 31
2.4.5. Síntesis de surfactantes 32
Síntesis de compuestos de *bis*-alquilamina 32
Síntesis de sales de *bis*-alquilamonio 32

2.5. CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS **32**

2.6. RESULTADOS Y DISCUSION **35**

CAPITULO 3 **37**

3. PROPIEDADES ACTIVAS DE SUPERFICIE DE LOS GEMINI SINTETIZADOS **37**

3.1. TENSION SUPERFICIAL **37**

3.2. MATERIALES Y METODOS **38**

3.3. RESULTADOS Y DISCUSION **38**

CAPITULO 4 **43**

4. DETERMINACION DE LAS PROPIEDADES ANTIHELMINTICAS DE LOS GEMINI SINTETIZADOS **43**

4.1. PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL: *SCREENING* **43**

4.2. MATERIALES Y METODOS **43**
4.2.1. Toma de muestra 43
4.2.2. Recuentos de huevos en materia fecal 43
4.2.3. Aislamiento de los huevos 44
4.2.4. Cultivo de larvas de nematodes gastrointestinales. Técnica de Corticelli-Lai 45
4.2.5. Compuestos 45
4.2.6. Huevos y larvas infectantes 45
4.2.7. Prueba de eclosión de huevos con nematodes gastrointestinales de oveja 45
4.2.8. Prueba biológica con L3 de nematodes gastrointestinales 46

4.3. RESULTADOS Y DISCUSION **46**

4.4. SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL **48**

4.5. CARACTERISTICAS GENERALES DEL MODELO EXPERIMENTAL: *Heligmosomoides polygyrus* **48**

4.6. MATERIALES Y METODOS **49**
4.6.1. Animales experimentales 49
4.6.2. Infección experimental y recuperación de los nematodes 49
4.6.3. Compuestos 49

4.6.4. Prueba de movilidad *in vitro* con nematodes adultos 49
4.6.5. Microscopía electrónica 51
4.6.6. Estadística 51

4.7. RESULTADOS Y DISCUSION **51**

CAPITULO 5 **57**

5. CONCLUSIONES **57**

BIBLIOGRAFIA **60**

ANEXO I **65**

AI. DETERMINACION DE LAS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y ANTIFUNGICAS DE LOS GEMINI SINTETIZADOS **65**

AI.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS GEMINI **65**

AI.2. MATERIALES Y METODOS **65**
AI.2.1. Microorganismos 65
AI.2.2. Medios de cultivo 66
AI.2.3. Antiséptico comercial 66
AI.2.4. Método de difusión en disco 66
AI.2.5. Determinación de la concentración inhibitoria mínima 66

AI.3. RESULTADOS Y DISCUSION **67**
AI.3.1. Método de difusión en disco 67
AI.3.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima 68

AI.4. BIBLIOGRAFIA **69**

ANEXO II **71**

AII. MEDIOS DE CULTIVO, BUFFERS Y ANOVA FACTORIAL **71**

AII.1. COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVOS Y BUFFERS **71**

AII.2. ANOVA FACTORIAL **72**

INDICE DE TABLAS

		Página
Tabla 2.1	Proporción molar de reactivos y tiempos de reacción para metilación de aminas primarias	30
Tabla 3.1	Actividad de superficie y datos de agregación de los compuestos catiónicos sintetizados	41
Tabla 4.1	Prueba con huevos de nematodes gastrointestinales de oveja resistentes a Ivermectina	46
Tabla 4.2	Prueba con larvas infectantes de nematodes gastrointestinales de oveja resistentes a Ivermectina	47
Tabla AI.1	Actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* de seis de los surfactantes sintetizados usando el método de difusión en disco	67
Tabla AI.2	Actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* expresada como CIM para los compuestos catiónicos diméricos de C_{12} y C_{18} en dos medios antibióticos	68

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Huevos de nematodes gastrointestinales de rumiantes	4
Figura 1.2	Estructura esquemática de la larva infectante (L3) de nematodes gastrointestinales de los rumiantes	5
Figura 1.3	Sección transversal esquemática de la cutícula de *A. lumbricoides*	6
Figura 1.4	Corte transversal esquemático de un nematodo hembra	7
Figura 1.5	Ciclo de los trichostrongylideos	8
Figura 1.6	Estructura química de algunos Bencimidazoles	9
Figura 1.7	Estructura química del Levamisol (L-Tetramisol)	10
Figura 1.8	Estructura química de las Tetrahidropirimidinas	11
Figura 1.9	Estructura generalizada de las Avermectinas.	12
Figura 1.10	Estructura química de las principales Milbemicinas	13
Figura 1.11	Representación esquemática del mecanismo de acción propuesto para los fármacos endectocidas en nematodes	13
Figura 1.12	Representación esquemática de un tensoactivo gemini	14
Figura 1.13	Representación esquemática del modelo de receptor nicotínico sobre el que actúan Levamisol/Morantel-Pirantel, y posibles mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia	16
Figura 1.14	Control biológico con hongos	21
Figura 2.1	Representación esquemática de los diversos grupos de surfactantes	24
Figura 2.2	Acetales cíclicos del tipo 1,3-dioxolano y 1,3-dioxano	25
Figura 2.3	Sustitución nucleofílica de halogenuros de alquilo con iónes cianuro	26
Figura 2.4	Catálisis por transferencia de fase. El ión de amonio cuaternario (Q^+) es tanto hidrófilo como lipófilo, se mueve entre la fase acuosa y la orgánica transportando un anión: el nucleófilo (Z^-) o el grupo saliente (X^-). En la fase orgánica el nucleófilo no está virtualmente solvatado y reacciona rápidamente con el sustrato (R-X)	27
Figura 2.5	Vías de síntesis de los compuestos diméricos neutros y catiónicos. (**a**) Pentaeritritol (**1**), ciclohexanona, ácido *p*-toluensulfónico monohidrato, benceno/DMF (40:60), 115 ºC, 48 h; (**b**) Diol (**2**), (±)-epiclorhidrina, NaOH, TBAB, 30 ºC, 1,5 h; (**c**) Éter diglicidílico (**3**), alquilamina primaria, TBABr, etanol, 30 ºC, 20 h; (**d**) **3**, *N,N*-dimetilamina, TBABr, etanol, 30 ºC, 20 h	29

Figura 2.6	Equipo de síntesis. Solución de dimetilamina en THF	30
Figura 2.7	Equipo de síntesis. Protección regioselectiva.	31
Figura 2.8	Equipo de síntesis. Éter diglicidílico	31
Figura 2.9	Equipo de síntesis. Surfactantes gemini	32
Figura 3.1	Tensiómetro semiautomático	38
Figura 3.2	Tensión superficial *vs*. logaritmo de la concentración molar de los compuestos catiónicos sintetizados a pH= 7 y 20 ºC. (a) Curvas para los compuestos de diferentes longitudes de cadena C_8, C_{12} y $C_{18.}$ (b) Curvas para los compuestos **5b**, **5e** y **5f** con diferentes regiones hidrofóbicas	39
Figura 3.3	Tensión superficial *vs* logaritmo de la concentración para el compuesto **5e** en ausencia de NaCl y 0,1 M de NaCl	40
Figura 4.1	Toma de muestra de materia fecal para examen coprológico	43
Figura 4.2	Cámara de Mc Master	44
Figura 4.3	Técnica de Corticelli-Lai	45
Figura 4.4	Fotografía. Huevos de nematodes de ovinos	46
Figura 4.5	Fotografía de larva L3 infectante	46
Figura 4.6	Ciclo biológico de vida de *Heligmosomoides polygyrus*	48
Figura 4.7	Necropsia. Extracción de la porción del intestino donde se hallan los nematodes adultos de *Heligmosomoides polygyrus bakeri*	50
Figura 4.8	Pocillos de incubación	51
Figura 4.9	Método de Tukey. Medias e intervalos de confianza del 95% para la movilidad de *H. polygyrus bakeri* en función del sexo del parásito (a) y del tipo de compuesto (b)	52
Figura 4.10	Efecto de los compuestos gemini **5b** (a) **5c** (b) y **5e** (c) sobre la movilidad del nematode adulto *H. polygyrus bakeri in vitro*. Los datos obtenidos de nematodes machos y hembras fueron combinados debido a que el factor sexo sobre la movilidad no resulto significativo ($p > 0,05$). Además, se representa el error estándar para los grupos tratados y el control (0 ppm)	53
Figura 4.11	Método de Tukey. Medias e intervalos de confianza del 95% para la movilidad de *H. polygyrus bakeri* en función de la concentración en ppm (a) y en función del tiempo en minutos (b) para el compuesto **5b**	54
Figura 4.12	Fotografía de una hembra y un macho adultos de *H. p. bakeri* tratados con **5b** a 500 ppm, 30 minutos	54

Figura 4.13 Microscopía electrónica de barrido del nematode adulto *Heligmosomoides polygyrus bakeri* expuesto a los compuestos gemini **5b** y **5e** *in vitro*. Control en buffer Hanks´ (a). Nematode tratado con el compuesto **5b** a 500 ppm a los 30 minutos de incubación (b). Nematode tratado con el compuesto **5e** a 500 ppm a los 30 minutos de incubación (c). En **1** Mag= 1,47 kx; en **2** Mag= 4,00 kx y en **3** Mag= 10 kx 55

ABREVIATURAS

ABM	Abamectina
ABZ	Albendazol
AM	Antibiotic Medium
ATCC	American Type Culture Collection
AVM	Avermectinas
BAC	Cloruro de benzalconio
BZD	Bencimidazoles
CIM	Concentración inhibitoria mínima
CMC	Concentración micelar crítica
CTF	Catálisis por transferencia de fases
DMF	Dimetilformamida
DRM	Doramectina
FBT	Febantel
FBZ	Fenbendazol
Fen	Fenilalanina
GA	Glutaraldehído
GC	Cromafografía gaseosa
GI	Gastrointestinales
Glu	Glutamato
Gp P	Glicoproteína P
HPG	Huevos por gramo
IVM	Ivermectina
LEV	Levamisol
MBM	Milbemicinas
MRT	Morantel
MXD	Moxidectina
NTB	Netobimin
OFZ	Oxfendazol
OXT	Oxantel

PCR	Polimerase chain reaction
PE	Pentaeritritol
pro-BZD	Probencimidazoles
PRT	Pirantel
RT-PCR	Reverse transcriptase polimerase chain reaction
SEM	Scanning electron microscopy (microscopía electrónica de barrido)
TBAB	Bisulfato de tetrabutilamonio
TBABr	Bromuro de tetrabutilamonio
TEC	Test de eficacia controlada
TFT	Tiofanato
THF	Tetrahidrofurano
Tir	Tirosina
TRCH	Test de reducción del conteo de huevos

CAPITULO 1

INTRODUCCION

CAPITULO 1

1. INTRODUCCION

1.1. PROBLEMATICA DE LA HELMINTIASIS EN RUMIANTES

Los nematodes gastrointestinales que afectan a los rumiantes pertenecen a diversas familias y géneros, dentro de los cuales encontramos: Trichostrongylidae (*Haemonchus, Ostertagia, Teladorsagia, Trichostrongylus, Marshallagia, Cooperia*) y Strongylidae (*Chabertia y Oesophagostomum*) (1, 2).

Las parasitosis son enfermedades de verdadera importancia en el mundo entero y afectan tanto al ser humano como a los animales. Estas pueden originar sintomatología muy variada, según la gravedad, desde la pérdida de apetito hasta la muerte del individuo severamente parasitado. Además, debido a que los nematodos gastrointestinales son importantes patógenos del ganado ovino, caprino y bovino son responsables de graves pérdidas en la producción animal a nivel mundial (1, 3-5).

Se ha calculado que en el Reino Unido, las enfermedades causadas por parásitos gastrointestinales constituyen la pérdida económica más importante en relación al ganado ovino con un costo anual estimado en 83 millones de euros. Consecuentemente, el mercado de fármacos antihelmínticos ha crecido enormemente desde la década de los setenta, ocupando actualmente un lugar de notable importancia económica en el contexto de la industria farmacéutica (4, 5).

Actualmente son tres los grupos de antihelmínticos de amplio espectro disponibles en el mercado que actúan sobre los nematodos que se localizan en el tracto gastrointestinal de los animales en pastoreo. En el grupo uno encontramos a los Bencimidazoles, en el grupo dos los Imidazoles (Levamisol) y Tetrahidropirimidinas (Morantel/Pirantel) y en el grupo tres las lactonas macrocíclicas (Avermectinas/Milbemicinas). Dichos productos se han constituido en insumos indispensables para mantener la eficacia productiva de ovinos, caprinos y bovinos. Sin embargo, la aparición de resistencia por parte de los nematodos a estos grupos de fármacos constituye uno de los riesgos más importantes para la producción pastoril de rumiantes al dificultar la reducción de los costos inherentes al parasitismo (3, 5).

La resistencia a los antihelmínticos es un fenómeno generalizado y motivo de preocupación creciente en la producción de ovinos en muchas partes del mundo incluido nuestro país. Además, aunque existen pocos informes sobre la presencia de la misma en bovinos, y la mayoría de los casos se han registrado en Nueva Zelanda, recientemente se han publicado casos en el Reino Unido y en Argentina. En nuestro país, los primeros informes sobre resistencia antihelmíntica a principios activos de Ivermectina y Doramectina en bovinos de las provincias de Corrientes y Buenos Aires, fueron publicados en el segundo semestre del 2000 y se refieren principalmente a miembros del género *Cooperia* (6, 7).

Lamentablemente, otros géneros de nematodes de mayor patogenicidad también están mostrando resistencia a los antihelmínticos en Argentina. En 2003 se informó sobre la presencia de *Haemonchus* y *Ostertagia* resistente a los Bencimidazoles en el sur de Córdoba mientras que en el centro de Santa Fe se detectó un aislamiento del primero de estos géneros con resistencia no sólo a estas drogas sino también a las Avermectinas (8, 9).

Es indiscutible que la mayor magnitud del problema de resistencia se observa en los pequeños rumiantes, en los cuales constituye el problema sanitario-productivo de mayor importancia. Existen numerosos reportes de resistencia antihelmíntica en pequeños rumiantes en comparación con los reportes existentes en bovinos. Esta amplia diferencia probablemente obedece a diferentes razones entre las cuales la de

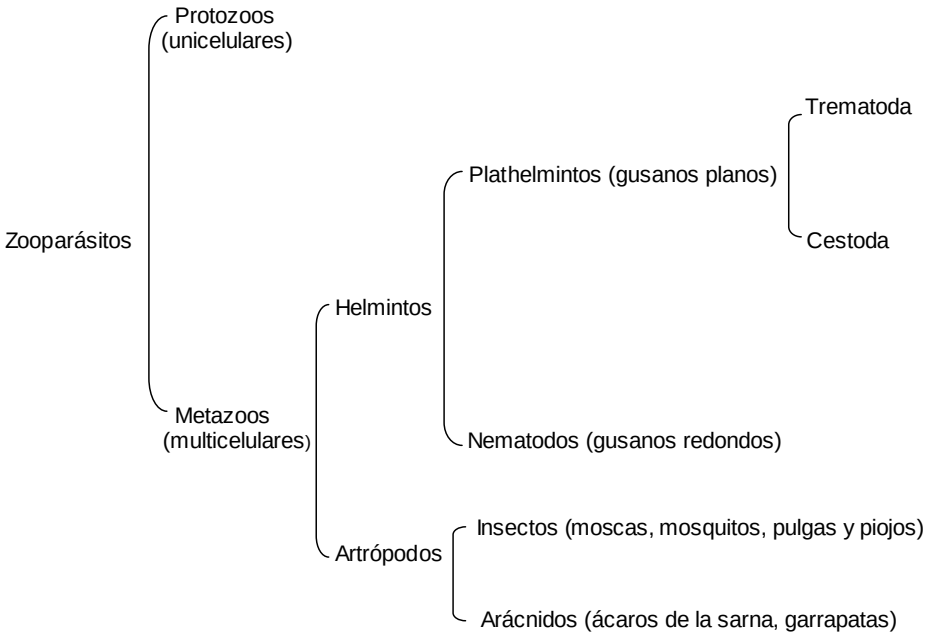
mayor importancia se refiere a las diferencias genético-fisiológicas, pues es sabida la pobre habilidad de los pequeños rumiantes para regular los nematodes gastrointestinales. Así, por ejemplo, las cabras desarrollan menos niveles de inmunidad a los nematodos, requiriendo tanto adultos como jóvenes, tratamientos para el mantenimiento de su salud. Por otra parte, en bovinos la frecuencia de tratamiento es menor y los animales adultos no son tratados. Esta situación permite mantener las pasturas con vermes provenientes de animales no tratados, aumentando con ello la población en refugio. Además existen diferencias en los sistemas de pastoreo entre las dos especies y finalmente el contraste en el tamaño y estructura de los compactos pellets fecales de ovinos y caprinos y las mayores proporciones de los bolos fecales de bovinos, afectan probablemente la dinámica y concentración de larvas infectantes de las poblaciones resistentes y susceptibles a las drogas en las praderas (10, 11).

En los últimos años, se han realizado importantes avances en cuanto a métodos no químicos para el control antiparasitario, como el control biológico, la resistencia genética o el desarrollo de vacunas. Aunque los métodos no quimioterápicos podrían desempeñar un papel relevante en el control antiparasitario del futuro, en la actualidad los sistemas de producción animal dependen del uso de fármacos antiparasitarios como herramientas para el control de endoparásitos y ectoparásitos. Los antiparasitarios deben ser considerados como un recurso no renovable y en este contexto, es imprescindible la aplicación racional de las drogas actualmente en uso para mantener su eficacia y vida útil, integrando la aplicación de las mismas con alternativas no químicas de manejo tendientes al control integrado y a un balance entre productividad y sustentabilidad (3, 4).

1.2. CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE NEMATODES GASTROINTESTINALES DE RUMIANTES

Según la naturaleza del parásito se habla de zooparásitos (reino animal) y fitoparásitos (reino vegetal). Los zooparásitos de interés veterinario se clasifican como se muestra a continuación (1).

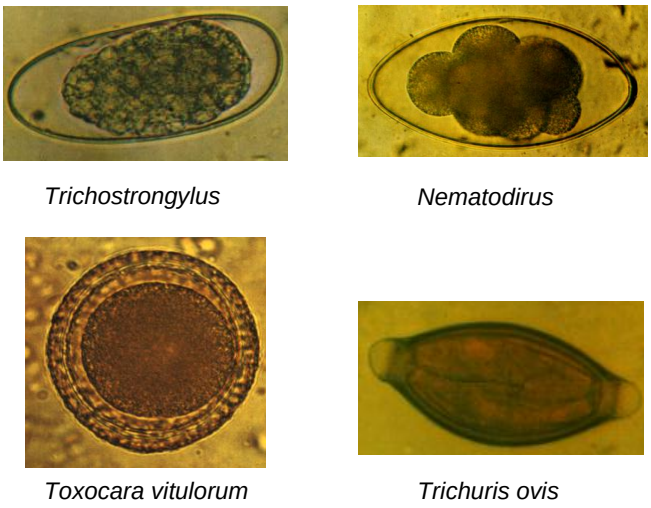
1.2.1. Clasificación de los principales parásitos de interés veterinario



1.2.2. Morfología

Huevos de nematodos

Los huevos de los nematodos son de forma ovoide, incoloros y su tamaño oscila entre 70-100 µm de longitud por 40-60 µm de ancho, excepto *Nematodirus* y *Marshallagia* que miden más de 130 µm de longitud. Los huevos de algunas especies presentan una cubierta muy gruesa (ascáridos y tricúridos) y otros delgada (estrongílidos y ancilostómidos). En los huevos de ciertos nematodos hay uno o dos opérculos, que representan un área especializada para facilitar la salida del embrión (1, 2). Ver Figura 1.1.



Trichostrongylus *Nematodirus*

Toxocara vitulorum *Trichuris ovis*

Figura 1.1. Huevos de nematodes gastrointestinales de rumiantes. Extraída y modificada de (12).

La cubierta del huevo está compuesta por tres capas: una interna, o capa lipídica; una media, también denominada quitinosa; y otra externa, o capa vitelina. Los ascáridos poseen una cuarta capa segregada por el útero, llamada capa uterina constituida por un complejo de proteínas tanificadas y mucopolisacáridos (1).

- ✓ La capa lipídica está constituida mayoritariamente por ascarósidos, y 25% de proteínas. Los ascarósidos son glucolípidos que se encuentran únicamente en los nematodos, compuestos por azúcar y alcohol unidos por enlaces glucosídicos. Estos ascarósidos parecen ser los responsables de la impermeabilidad de los huevos a cualquier sustancia que no sea gas o disolvente lipídico.
- ✓ La capa media está constituida básicamente por quitina y su proporción varía de una especie a otra.
- ✓ La capa vitelina al parecer tendría características comunes a la capa externa de la cutícula de los adultos.

Nematodos

Los nematodos son gusanos redondos, no segmentados y su cuerpo es filiforme, con simetría bilateral. Poseen aparato digestivo, sexos separados y ciclos vitales directos o indirectos.

En la Figura 1.2, podemos observar la estructura de una larva infectante. En ella puede verse el canal alimentario, formado por la boca, cavidad bucal, esófago o faringe, intestino y recto (1).

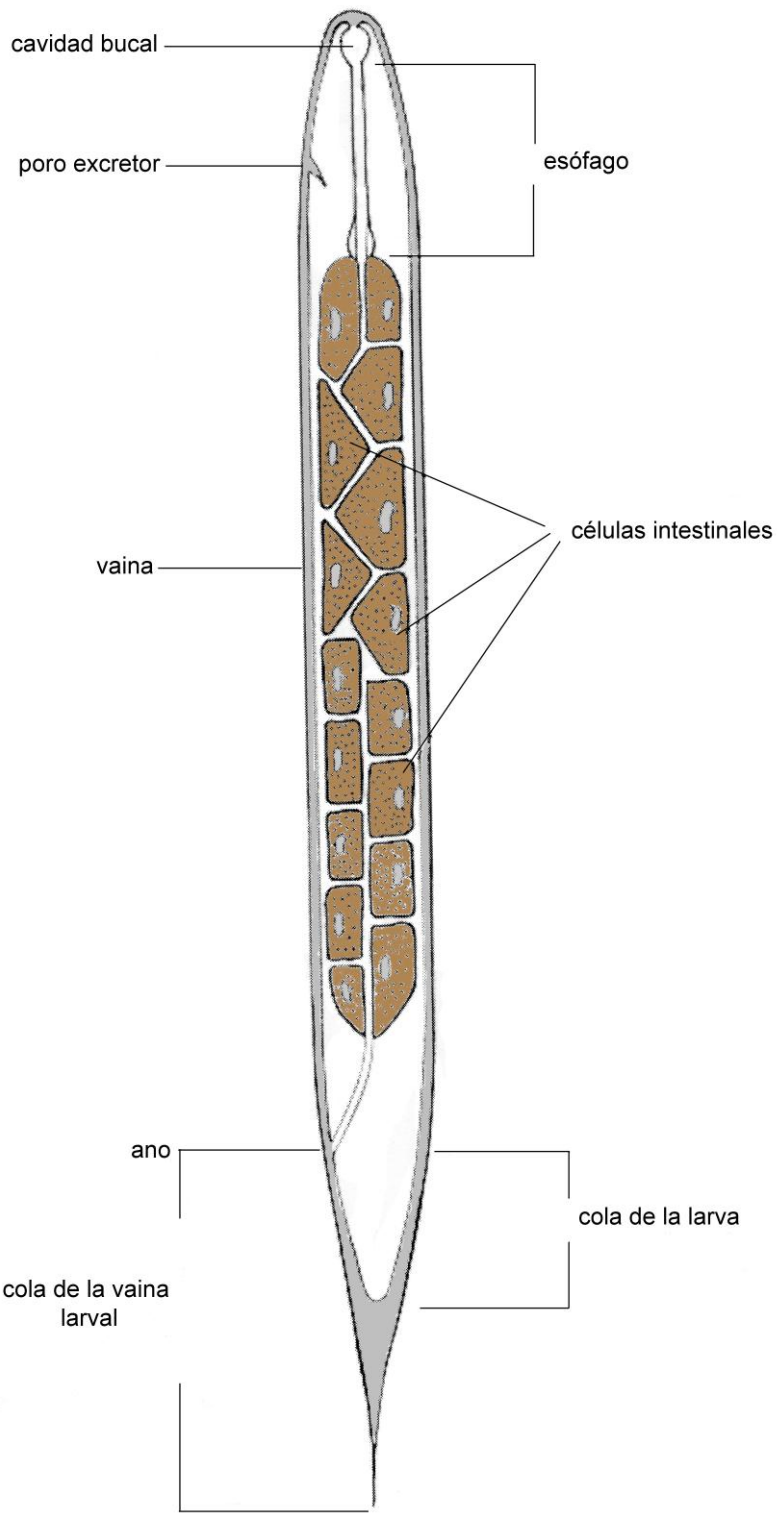


Figura 1.2. Estructura esquemática de la larva infectante (L3) de nematodes gastrointestinales de los rumiantes. Extraída y modificada de (13).

En cuanto a la cubierta corporal de los nematodos; esta consta de dos capas principales: la cutícula y la hipodermis. Cabe aclarar que existen notables diferencias en la composición química, morfología y en el grosor de las capas que constituyen la cutícula de los distintos grupos de nematodos. Algunos de ellos presentan una capa adicional externa segregadas por las glándulas del nematodo y que no se considera

parte integrante de la cutícula denominada capa superficial externa o glucocáliz, la cual es rica en carbohidratos y se supone juega un importante rol en los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria de los hospedadores (1).

La cutícula está compuesta por diversas capas, cada una de ellas con una composición característica; la más externa, la epicutícula (6-40 μm) está formada por dos laminillas separadas por un espacio más claro y a diferencia de las demás no es originada a partir de la hipodermis. Por debajo de la epicutícula se encuentran otras capas, las cuales se pueden agrupar básicamente en las llamadas, cortical, media y basal (1, 14). Ver Figura 1.3.

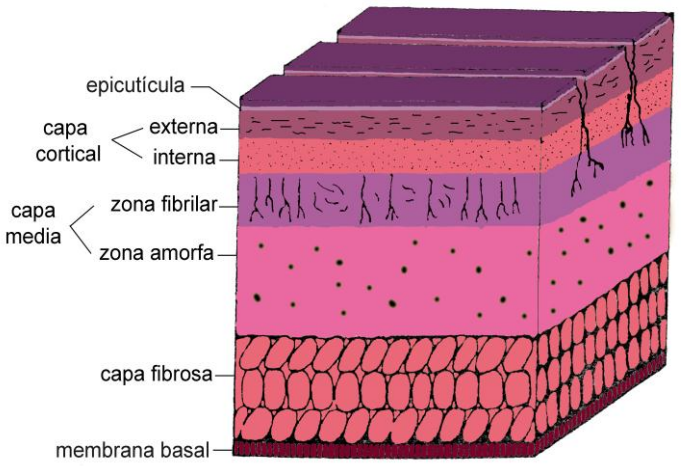


Figura 1.3. Sección transversal esquemática de la cutícula de *A. lumbricoides*. Extraída y modificada de (1).

- ✓ Capa cortical: es amorfa y contiene una proteína relacionada con la queratina, se encuentra interrumpida por un punteado con apariencia de poros que conducen a canales que penetran en la parte interna cortical y llegan hasta la zona fibrilar de la capa media. Estos canales tendrían como función el transporte de sustancias, y el sostén esquelético.
- ✓ Capa media: es homogénea y está constituida por pequeñas fibrillas pero básicamente ofrece escasa estructura.
- ✓ Capa basal o fibrosa: tiene un importante papel en el esqueleto hidrostático de los nematodos, es muy compleja y esta formada principalmente por fibras de colágeno.

Entre la cutícula y los músculos se encuentra la hipodermis, constituída en los adultos por un sincitio[1] asociado de fibrillas, que dan origen a cuatro bandas gruesas denominadas cordones, uno dorsal, otro ventral y dos laterales (Figura 1.4). Estos cordones se hallan en contacto con el pseudocele[2] y con la zona muscular a la que divide en cuatro cuadrantes. En las zonas intercordales, la hipodermis es delgada y está atravesada por fibrillas unidas a las células musculares, que constituyen puentes de unión entre estas células y la cutícula. La hipodermis es rica en colágeno y lípidos y

[1] Sincitio: masa de citoplasma que contiene muchos núcleos rodeada por una sola membrana plasmática. Típicamente es el resultado de la fusión de células o de series de ciclos de división incompletas en las que el núcleo se divide (cariocinesis) pero la célula no (no hay citocinesis).
[2] Pseudocele: también denominado cavidad corporal, es donde se hallan suspendidas todas las vísceras, rodeadas por el líquido corporal o hemolínfa.

se han hallado en ella enzimas, escasas mitocondrias, ribosomas, cuerpos vesiculares y complejos de Golgi (1).

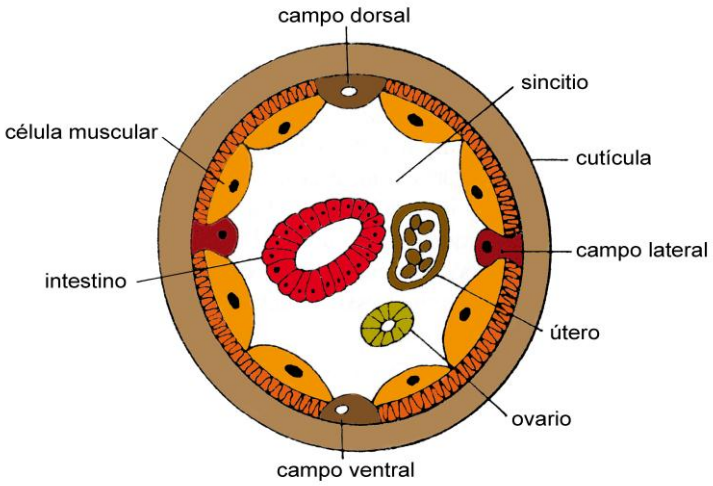


Figura 1.4. Corte transversal esquemático de un nematodo hembra. Extraída y modificada de (1).

1.2.3. Ciclo biológico de los nematodes gastrointestinales

El ciclo biológico de estos nematodos ocurre en dos fases: una parasitaria y otra de vida libre (11). Ver Figura 1.5.

Los huevos de los nematodes son expulsados del organismo del animal parasitado con las heces y de este modo son sembrados sobre el campo. Si bien su capacidad de supervivencia depende de diversos factores, ésta se encuentra directamente relacionada con el grosor de su cubierta. Al ser eliminados del hospedador, los huevos están en proceso de división (embriogénesis) y en condiciones adecuadas de humedad y temperatura su desarrollo avanza pasando por las típicas fases de mórula, blástula y gástrula. Cuando el embrión esta totalmente desarrollado, los núcleos de las células no germinales cesan de dividirse y en ese momento están ya presentes todas las células del adulto. Dependiendo de la especie, los huevos pueden contener o no la larva desarrollada como es el caso de *Strongyloides papillosus* que ya contiene (L1) formadas.

La excreción de huevos es variable y depende del hospedador (edad, estado inmunitario, consistencia fecal) y del parásito (prolificidad de las hembras). En este sentido, algunos parásitos como *Haemonchus* son muy prolíficos (5000-10000 huevo/día), otros como *Ostertagia* y *trichostrongylus* son moderadamente prolíficos (100-200 huevos/días) y otros como *Nematodirus* son poco prolíferos (50 huevos/día). Llegado el momento de la eclosión, la capa interna del huevo se rompe por la acción de enzimas segregadas por la larva, que lisan los lípidos, y por los movimientos de la misma. Posteriormente, la larva, rompe el resto de las capas del huevo y sale al exterior como una larva del primer estado (L1). Estas larvas son muy simples; poseen cavidad bucal y su esófago es bulboso (rabditiforme) y esta provisto de un aparato valvular característico en forma de “Y” al que sigue el intestino y el ano. Se alimentan de sustancias contenidas en la materia fecal como bacterias, esporas de hongos y agua; son bastante móviles pero no poseen aún la facultad de trepar a los pastos. Pasado un tiempo la larva L1 sufre una primera muda y cambia su envoltura, transformándose en una larva del segundo estado (L2) que se alimenta de manera similar a la L1 y que posee características morfológicas muy similares sólo que es mucho más grande y su esófago es menos bulboso (1, 13).

Las larvas L2 sufren luego una nueva transformación convirtiéndose en larvas del tercer estado o infectantes (L3), cuyo esófago es filiforme y sin aparato valvular. Estas larvas conservan la envoltura de la L2 que le sirve de protección contra los factores externos: frío, calor, sequedad, etc. y a diferencia de los estados larvales anteriores, la larva infectante no se alimenta del medio externo, consumiendo en cambio sus propias reservas contenidas en las células intestinales. Por esta razón las larvas jóvenes son más oscuras que las viejas en las que las granulaciones alimenticias han desaparecido (13). Las larvas infectantes son muy activas, pudiendo trepar y subir a los pastos (si hay suficiente intensidad de luz y humedad), donde permanecen hasta ser ingeridas por un hospedador. Estas larvas constituyen la última etapa del ciclo fuera del hospedador definitivo. Tras la ingestión (aproximadamente 30 minutos), las larvas pierden la vaina en el aparato digestivo del animal por diversos estímulos del hospedador y una vez desenvainadas penetran en distintas zonas dentro de la mucosa digestiva (ejemplo: *Trichostrongilus* spp se sitúa en el primer tercio del intestino delgado, *Ostertagia* y *Teladorsagia* spp se sitúan en la zona antropilórica, en la zona de las glándulas gástricas, etc.) donde se convierten en larvas del cuarto estado o L4. Después de la última muda, se transforman en L5 o preadultos que maduran sexualmente y pasan a adultos. Tras la cópula, las hembras comienzan a poner huevos, cerrando de esta manera el ciclo (1).

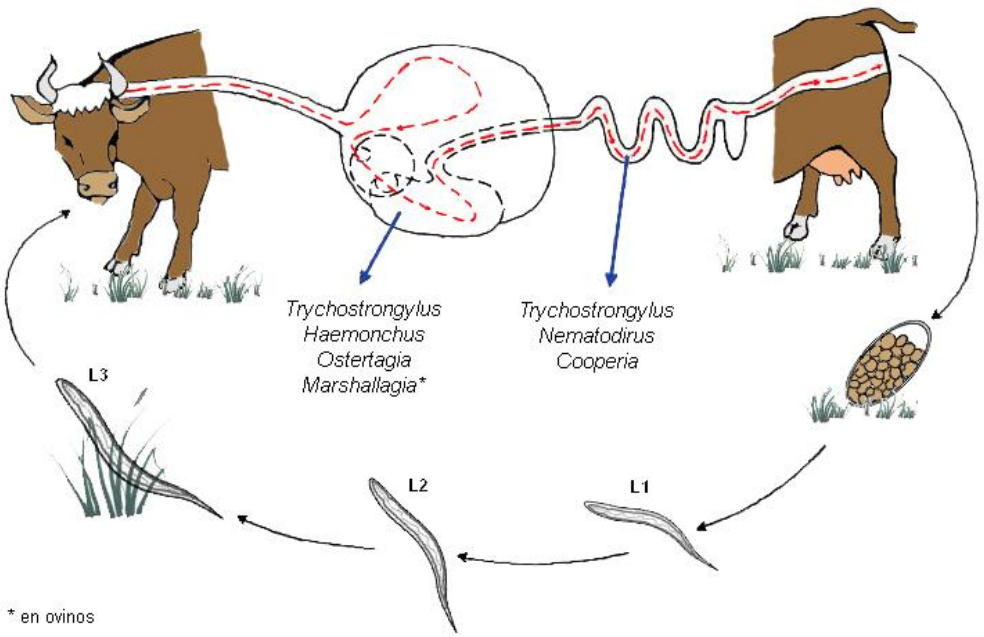


Figura 1.5. Ciclo de los trichostrongylideos. Extraída y modificada de http://cnia.inta.gov.ar/helminto/index.htm.

1.3. ANTIHELMINTICOS. PRINCIPALES GRUPOS

La potencia de los antihelmínticos depende principalmente de las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la droga. La farmacocinética es el evento que ocurre luego de la administración del antiparasitario e incluye el tiempo de absorción de la droga, distribución, metabolismo y eliminación por parte del hospedador. Además, determina la concentración de fármaco activo que llega al lugar de localización del parásito. Sin embargo, la acción antihelmíntica dependerá también de la capacidad de la droga activa de alcanzar su receptor específico dentro del parásito para ejercer su efecto (farmacodinamia).

La superficie externa de los helmintos funciona como barrera protectora del organismo. Esta superficie es vital para la toma de nutrientes, osmoregulación, inmunoprotección y soporte estructural. En gusanos planos, cestodos y trematodos, la superficie externa se denomina tegumento, el cual consiste en una estructura membranosa simple unida al sincitio. En nematodos, como se mencionó anteriormente, la cutícula tiene una estructura mucho más compleja constituída por lípidos y una matriz de colágeno. A pesar de las diferencias estructurales, el mecanismo de entrada de las drogas en ambos helmintos depende principalmente de la lipofilicidad del antihelmíntico y de las características fisicoquímicas del medio que rodea al parásito. Dos cuestiones son esenciales para la comprensión del proceso de acumulación de droga en los nematodes. La vía de entrada, oral versus transcuticular y la identificación del principal mecanismo de transporte de la droga involucrado en el proceso de transferencia (transporte activo versus difusión pasiva). Aunque la vía oral es importante, existen claras evidencias que indican que la vía de difusión transcuticular es la ruta predominante para el acceso de sustancias diferentes de los nutrientes y sustancias no electrolíticas en nematodos (14).

1.3.1. Bencimidazoles

Los Bencimidazoles (BZD) y probencimidazoles (pro-BZD) han alcanzado una notable transcendencia terapéutica gracias a su amplio espectro de acción, baja toxicidad y bajo coste. Son sustancias cristalinas, estables y con alto punto de fusión (223-304 ºC). Son relativamente insolubles en agua pero muy solubles en alcohol y disolventes no polares. El núcleo químico de los BZD comprende un sistema de dos anillos (bicíclicos), en el cual un grupo benceno se fusiona en la posición 4 y 5 del anillo imidazol (heterocíclico) (4).

Los probencimidazoles como el Febantel (FBT), el Tiofanato (TFT) y el Netobimin (NTB) son prodrogas inactivas que se convierten enzimáticamente en Bencimidazoles etil o etil carbamatos una vez que son absorbidos por el huésped (4, 11).

Los BZD más modernos como el Albendazol (ABZ), Fenbendazol (FBZ), Oxfendazol (OFZ), etc. son más lipofílicos que los compuestos más antiguos (Tiabendazol), y permanecen más tiempo en la circulación general (Figura 1.6). En consecuencia, estos fármacos tienen un mayor tiempo para el intercambio entre el plasma y el tracto gastrointestinal, lo cual es muy importante para alcanzar concentraciones adecuadas en el tracto digestivo, y prolongar la exposición de los parásitos localizados en el mismo a niveles de fármacos que le son tóxicos (4).

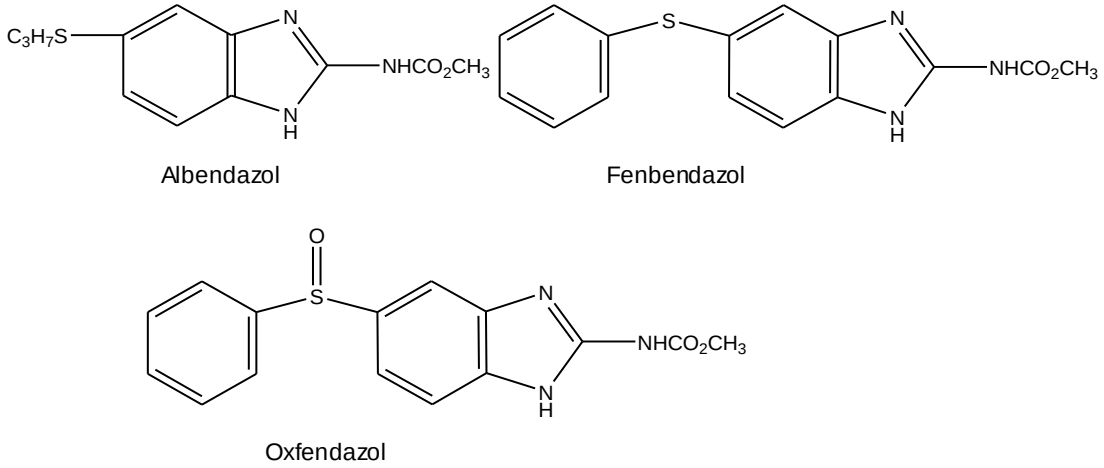


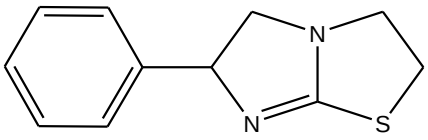
Figura 1.6. Estructura química de algunos Bencimidazoles.

Los BZD actúan ligándose selectivamente a la subunidad β de la proteína tubulina de nematodes y cestodes, modificando el patrón de polimerización para la formación de microtúbulos, lo que origina una pérdida de la homeostasis celular, que si persiste en el tiempo puede resultar letal para el parásito. En todos los organismos eucariotas, la unidad estructural de los microtúbulos, es un dímero formado por dos subunidades de tubulina α y β. Los microtúbulos además de formar parte del citoesqueleto participan en una amplia variedad de funciones celulares, entre ellas el movimiento de cromosomas durante la división celular, soporte estructural de la célula, motilidad, movimiento de partículas intracelulares como metabolitos energéticos, absorción de nutrientes, exocitosis y comunicación célula-célula. El efecto farmacológico de los antihelmínticos BZD requiere de mayor período de latencia, siendo más lento que aquellos que actúan sobre la coordinación neuromuscular del parásito, e incluye déficit energético del verme por disrupción de las células intestinales e inhibición de la producción de huevos. Se requieren concentraciones sostenidas en el tiempo para asegurar la eliminación de los parásitos de su sitio de localización (15).

1.3.2. Imidazotiazoles y Tetrahidropirimidinas

Imidazotiazoles: Levamisol

En un principio este producto se presentó como una mezcla racémica, denominada Tetramisol, compuesta por partes iguales de Tetramisol levógiro y Tetramisol dextrógiro. Posteriormente se demostró que la actividad antihelmíntica de la mezcla recaía casi exclusivamente en el isómero levógiro (L-Tetramisol), que se denominó Levamisol (Figura 1.7). Esto representó una gran ventaja, ya que permitió reducir la dosis para la actividad antihelmíntica a la mitad y aumentar su margen de seguridad.



Levamisol

Figura 1.7. Estructura química del Levamisol (L-Tetramisol).

Este producto no tiene efecto sobre trematodos, cestodos o parásitos externos. Indicado para su uso sobre nematodos de bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, aves, caninos y felinos, actúa principalmente sobre los nematodos adultos y con menor eficacia sobre estados larvarios; carece de acción ovicida y generalmente no tiene efectividad contra los estadios inhibidos de estos parásitos (hipobiosis) (4).

En cuanto a su mecanismo de acción, el Levamisol (LVM) provoca una parálisis del parásito a causa de una contracción muscular permanente (parálisis espástica). No mata al parásito, y éste es expulsado vivo. Este efecto paralizante lo logra actuando de manera rápida y selectiva como agonista colinérgico sobre receptores nicotínicos sinápticos y extrasinápticos de las membranas de las células musculares de los nematodos. El receptor nicotínico es un pentámero de subunidades homólogas α y β dispuestas de modo tal que forman un poro central o canal iónico selectivo permeable a cationes como sodio y potasio. Cuando el LVM se une a estos receptores, los canales iónicos se abren, aumenta la conductancia del sodio y se despolarizan las membranas de las células musculares, resultando en contracción muscular y parálisis espástica (4, 15).

Esta molécula también produciría la inhibición de la enzima fumarato reductasa y la oxidación del ácido succínico en el parásito, bloqueando de esta manera el metabolismo de los hidratos de carbono. Sin embargo esta acción no es importante en su efecto antiparasitario, debido a que las altas concentraciones que se deben lograr en el helminto para que se produzca dicha acción, no se logran con las dosis terapéuticas administradas al hospedador (4).

Tetrahidropirimidinas: Pirantel, Morantel y Oxantel

El primer componente de este grupo que se utilizó como antiparasitario de amplio espectro fue el Pirantel (PRT) en 1966. Luego se desarrollaron el Morantel (MRT) análogo metilado del PRT y por último el denominado Oxantel (OXT) (4). Ver Figura 1.8.

Poseen un modo de acción similar al de los imidazoles y actúan como agentes bloqueadores neuromusculares y despolarizantes. Son altamente efectivos contra las formas adultas de los nematodos intestinales pero no contra las formas larvarias o huevos. Son compuestos bastante seguros desde el punto de vista de la bioseguridad y toxicidad.

Las sales de Morantel exhiben mayor actividad antihelmíntica que el Pirantel por lo que se requieren de dosis más bajas para lograr su efecto y dada su elevada solubilidad es una droga ideal para la liberación lenta en el medio acuoso del rumen (11).

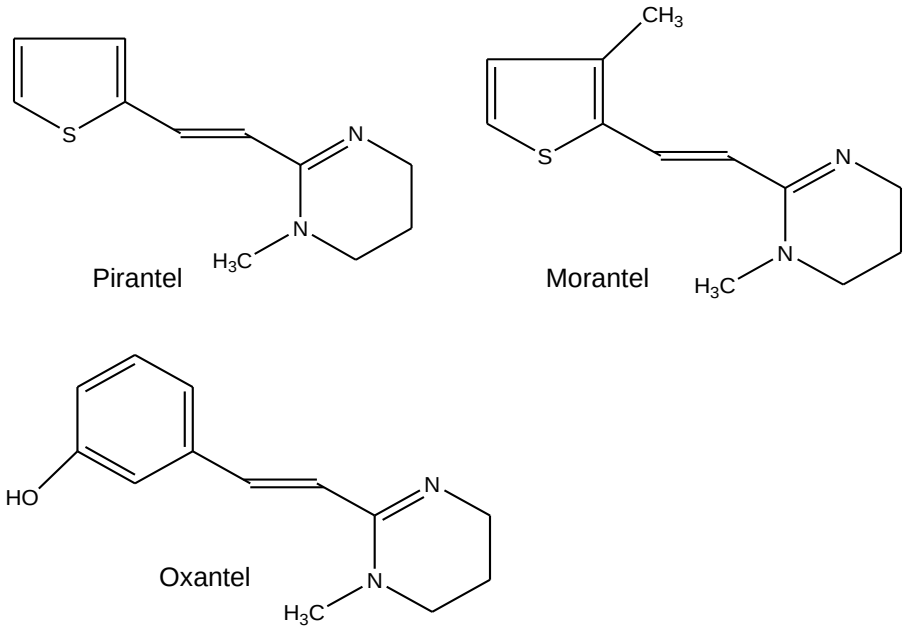


Figura 1.8. Estructura química de las Tetrahidropirimidinas.

1.3.3. Lactonas macrocíclicas

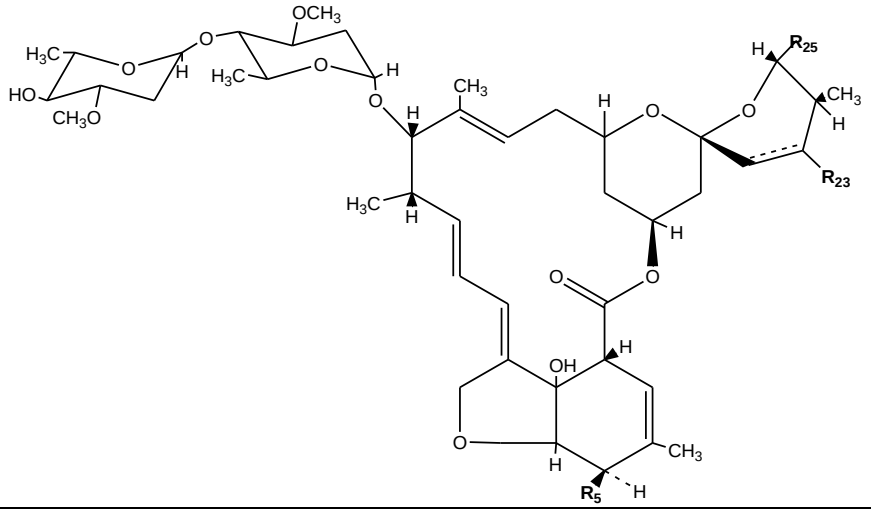
Avermectinas y Milbemicinas

La introducción de las primeras Avermectinas revolucionó el mercado farmacéutico veterinario, principalmente por la elevada potencia farmacológica de estos compuestos dosificados en el orden de los µg Kg^{-1} de peso vivo y por su amplio espectro de acción sobre parásitos internos y externos. La Ivermectina (IVM) fue introducida como antiparasitario en 1981, sucediéndose en años subsiguientes la incorporación de la familia de las Milbemicinas (MBM). Los compuestos de ambas familias poseen actividad sobre endoparásitos y ectoparásitos por lo que se

denominan fármacos endectocidas, lo cual define la combinación de sus efectos nematodicida, insecticida y acaricida (4).

La estructura química de estos fármacos es muy compleja y corresponde a una lactona macrocíclica de 16 miembros similar a la de los antibióticos macrólidos, pero sin efecto antibacteriano, unida a un grupo benzofurano (C_2 a C_8) y a un anillo espiroquetal (C_1 a C_{25}). Son moléculas de gran tamaño con peso molecular entre 600 g mol^{-1} (Milbemicinas) y 800 g mol^{-1} (Avermectinas) (4, 16,).

Las Avermectinas clásicas, Abamectina (ABM), Ivermectina (IVM), Doramectina (DRM), y las más nuevas, Eprinomectina y Selamectina, derivan de la fermentación de *Streptomyces avermitilis*. De la fermentación de la bacteria en la producción de Avermectina se identificaron cuatro pares de homólogos, A_{1a}, A_{2a}, B_{1a}, B_{2a} en mayor proporción y A_{1b}, A_{2b}, B_{1b}, B_{2b} en menor proporción (Figura 1.9); así, la Abamectina es una mezcla de AVM que contiene más de un 80% de B_{1a} y más de un 20% de B_{1b} (4, 11).



Avermectinas	R_5	R_{23}	R_{25}	Tipo de enlace C_{22}-C_{23}
A_{1a}	-OCH_3	-H	Sec-butilo	doble
A_{1b}	-OCH_3	-H	Iso-propilo	doble
A_{2a}	-OCH_3	-OH	Sec-butilo	simple
A_{2b}	-OCH_3	-OH	Iso-propilo	simple
B_{1a}	-OH	-H	Sec-butilo	doble
B_{1b}	-OH	-H	Iso-propilo	doble
B_{2a}	-OH	-OH	Sec-butilo	simple
B_{2b}	-OH	-OH	Iso-propilo	simple

Figura 1.9. Estructura generalizada de las Avermectinas.

Por su parte las Milbemicinas derivan de la fermentación de *Streptomyces cyaneogriseus* y se diferencian de las AVM por no poseer el disacárido como sustituyente en el C_{13} del anillo lactámico. Dentro de esta familia de compuestos encontramos la Nemadectina, Moxidectina (MXD), Milbemicina D y Milbemicina 5-oxima. La MXD se obtiene por modificación química de la Nemadectina que es el

compuesto natural obtenido como producto de la fermentación de *S. cyaneogriseus* (4). Ver Figura 1.10.

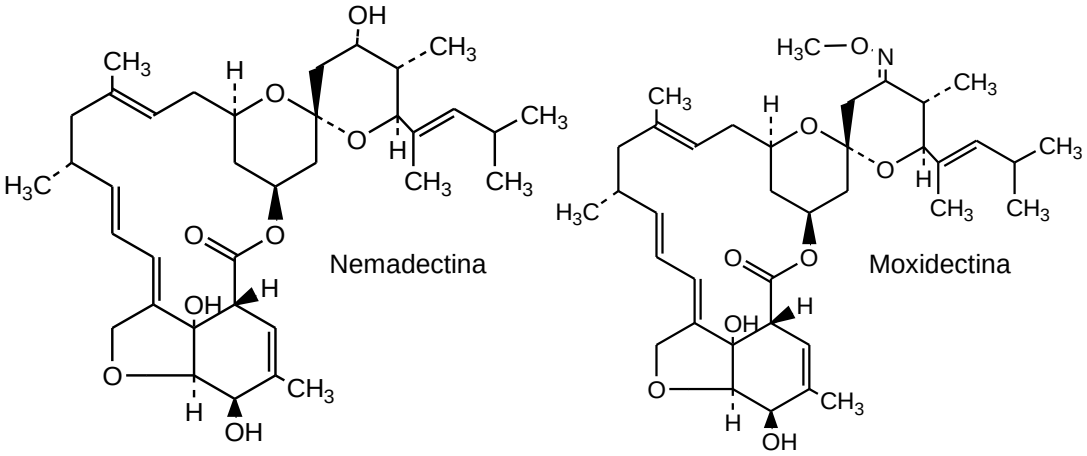


Figura 1.10. Estructura química de las principales Milbemicinas.

En cuanto al mecanismo de acción de estos fármacos, tanto las AVM como las MBM actúan como agonistas (compuesto que produce la misma respuesta máxima que el ligando) de alta afinidad sobre la subunidad α de canales iónicos selectivos a cloro presentes en nematodos y artrópodos (no así en el sistema nervioso del hospedador). Estos canales iónicos están constituídos por cinco subunidades proteicas, de las cuales las subunidades α, β y δ se recombinan para formar el pentámero. El ligando natural de estos canales iónicos es el glutamato (Glu), por lo que estos receptores son denominados GluCl. Estos receptores GluCl están localizados mayoritariamente en células musculares somáticas, de la bomba faríngea y del útero, y en sus respectivas neuronas asociadas, por lo que la exposición del parásito blanco a las AVM/MBM afecta su motilidad, capacidad de alimentación y fecundidad (ver Figura 1.11). Cuando dichos compuestos se unen selectiva e irreversiblemente a estos receptores aumenta la permeabilidad de la membrana al cloro, lo cual origina la hiperpolarización de la membrana de la célula muscular y/o neuronal del parásito blanco. Como consecuencia se produce una parálisis tipo flácida del parásito que no puede mantenerse en su sitio de localización (4, 11, 15).

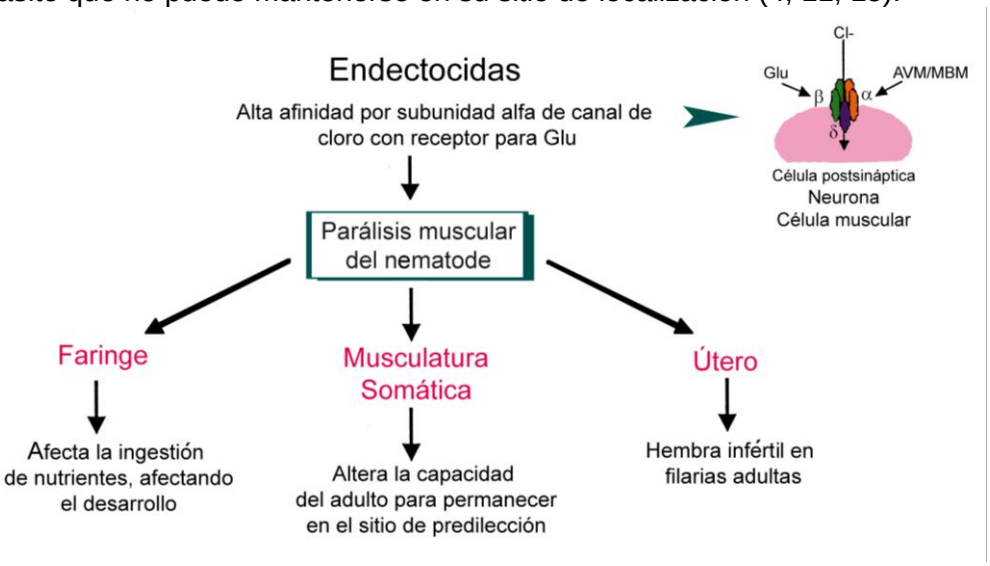


Figura 1.11. Representación esquemática del mecanismo de acción propuesto para los fármacos endectocidas en nematodes. Extraída y modificada de (15).

1.4. DESARROLLO DE NUEVAS ESTRUCTURAS ANTIHELMINTICAS TIPO GEMINI

Alrededor de 19 años atrás se reportó un nuevo tipo de molécula surfactante dimérica con dos colas hidrofóbicas y dos grupos iónicos unidos por un espaciador, denominadas gemini. El intenso interés que ha generado el descubrimiento de este tipo de compuestos radica que, en comparación con los tensoactivos típicos, la presencia de dos cabezas polares y dos colas hidrofóbicas confiere a estas moléculas una variedad única de propiedades activas de superficie y de agregación. Estas nuevas estructuras amfifílicas están siendo estudiadas a nivel académico y tecnológico debido al interés económico que despiertan en distintas áreas de la química. Así, hoy en día sus usos son amplios y variados como por ejemplo: formulaciones para la piel, procesos de solubilización, separaciones analíticas, y tratamientos antibacterianos, entre otros. Más de 100 patentes desarrolladas en diferentes áreas revelan la importancia comercial de estos surfactantes (17, 18).

Figura 1.12. Representación esquemática de un tensoactivo gemini.

Desde hace algunos años, nuestro Grupo de Investigación viene estudiando detenidamente y con excelentes resultados los aspectos sintéticos, teóricos, y mecanísticos de numerosos compuestos gemini; de naturaleza aniónica, catiónica, no iónica y zwitteriónica. Se estudiaron en detalle las propiedades fisicoquímicas de los gemini obtenidos en nuestro laboratorio y se realizaron optimizaciones por métodos de mecánica molecular clásica (Dinámica Molecular) para estudiar los diferentes estados de agregación que adoptan estas estructuras (micelas o vesículas) en sistemas acuosos y no acuosos. Finalmente se realizaron estudios microbiológicos de eficacia y actividad biológica frente a microorganismos de referencia como: bacterias Gram-negativas, Gram-positivas, levaduras y hongos filamentosos de los gemini sintetizados, con excelentes resultados. Como puede verse, nuestra experiencia es muy amplia en lo que respecta a los surfactantes gemini y nos condujo a abordar la síntesis de nuevos compuestos potencialmente bioactivos contra nematodes gastrointestinales que afectan la sanidad de los animales de producción (19-27).

1.5. RESISTENCIA ANTIHELMINTICA

La resistencia antihelmíntica puede ser definida como la disminución o ausencia de eficacia de un fármaco frente a poblaciones parasitarias que son generalmente susceptibles a esta droga (28).

La resistencia no debe ser confundida con tolerancia, que en parasitología se refiere a la falta de respuesta innata de la población parasitaria para cada droga independientemente de la exposición previa, y que en términos prácticos corresponde al valor que queda por fuera de la eficacia[3] declarada para cada género y especie parasitaria (6, 11).

La resistencia puede ser intrínseca ó adquirida. En la primera el parásito es natural o innatamente insensible al efecto de una droga. Este fenómeno puede deberse a la falta del receptor ó a que la droga no puede entrar a la célula y acceder a su sitio de acción. La resistencia adquirida, se da cuando poblaciones que son inicialmente susceptibles a la acción de un fármaco, dejan de serlo tras la ocurrencia de cambios genéticos heredables de generación en generación. Los mecanismos que

[3] Eficacia: capacidad que tiene un compuesto químico determinado para producir un efecto biológico (mortalidad, parálisis, etc.) usado en una dosis determinada. Es característica de la sustancia y básicamente depende de su concentración.

operan estas modificaciones genéticas en resistencia adquirida son mutación, ampliación génica y transferencia génica.

Dependiendo de si la resistencia ocurre para una o más drogas de igual o diferente mecanismo de acción la resistencia puede ser lateral, Levamisol/Morantel-Pirantel que aunque son químicamente diferentes comparte el mecanismo de acción, cruzada o múltiple (15).

Las modificaciones genéticas que confieren resistencia se traducen finalmente en diferentes modificaciones bioquímicas tales como: cambios celulares que afectan la capacidad de la droga para acumularse intracelularmente, alteración de sistemas enzimáticos y/o alteración de receptores celulares (11, 15).

1.5.1. Factores que influencian el desarrollo de resistencia

La clave en la evolución de la resistencia antihelmíntica esta dada por el porcentaje de individuos sobrevivientes al tratamiento que contribuyen con sus genes a la próxima generación parasitaria. Esta contribución está influenciada por la frecuencia y el tiempo de tratamiento, eficacia de la droga, la fecundidad de los parásitos adultos, la tasa de larvas consumidas, la deposición de huevos, el manejo de las pasturas y el clima (3, 11).

A la proporción de parásitos que no se encuentra sujeta a la selección por los tratamientos químicos, se la denomina población en refugio y aparentemente este es el factor más importante en el desarrollo de la resistencia a los antihelmínticos. Considerando a los nematodos GI, cuando mayor es la proporción de la población que se encuentra en las pasturas (refugio), menor es la selección por resistencia. Es por esto que el incremento de la población de nematodos en refugio podría constituir un aspecto fundamental en el manejo de la resistencia y la posibilidad de “diluir” los genes resistentes por la introducción de nematodos susceptibles (3).

La selección para la resistencia también se desarrolla rápidamente cuando el potencial biótico de los nematodos GI es alto, como en el caso de *Haemonchus contortus*, donde pequeñas poblaciones de parásitos resistentes pueden producir grandes poblaciones en corto tiempo gracias a su elevado grado de fecundidad (15).

Por otro lado, la tasa de desarrollo de los procesos de selección puede también estar influenciada por el número de genes involucrados en los mecanismos de resistencia y si ellos son heredados de modo dominante. Se ha postulado que cuando la frecuencia de genes es baja, si la misma es heredada como un carácter dominante y/o determinada por un único gen, responderá a la selección mucho más eficientemente y la resistencia se desarrollará más rápido que aquella que es heredada como un carácter dominante/recesivo incompleto (donde el heterocigota tiene mayor similitud a su progenitor susceptible) y/o determinada por dos ó más genes. Esto ocurre así porque cuando la resistencia es poligénica donde varios genes necesitan trabajar juntos para expresar el carácter, hay más genotipos conteniendo alelos susceptibles que no son completamente removidos por el tratamiento antihelmíntico y pueden contribuir con aquellos alelos susceptibles en futuras generaciones (11, 15).

Además de los factores mencionados, el surgimiento y la velocidad de desarrollo de resistencia se debe a factores externos u operacionales, los cuales tienen que ver con el mecanismo de acción de las drogas, su grado de eficacia, la frecuencia de los tratamientos, las dosis, la rotación de principios activos y las formas de manejo animal (11).

1.5.2. Mecanismos de resistencia a los diferentes grupos antiparasitarios

Resistencia a los Bencimidazoles

En *Haemonchus contortus* la población susceptible posee dos subtipos de β tubulina: una de alta afinidad y otra de baja afinidad. Los nematodos junto con otros helmintos, hongos y algunos protozoos tienen normalmente estos receptores de alta afinidad por los BZD, localizados en el grupo N-terminal de la β tubulina. El mecanismo de resistencia a BZD involucra alteraciones principalmente en el isotipo 1 de β tubulina donde una mutación en la posición 200, que al expresarse representa un cambio aminoacídico (Fen por Tir), causa la pérdida del receptor de alta afinidad por BZD con el consecuente desarrollo de resistencia. Es importante mencionar que debido a que la β tubulina de los mamíferos también tiene tirosina en la posición 200, es muy poco probable que la resistencia a los BZD pueda ser resuelta realizando cambios en la química de la droga, ya que no sería posible diseñar un agente selectivamente tóxico contra los nematodes u hongos, porque las β tubulina de los mismos y del hospedador tendrían una afinidad similar por los BZD, reduciendo de este modo el margen terapéutico requerido (15).

Resistencia al Levamisol

Los genes lev-1, unc-38 y unc-29 están asociados con la resistencia al LEV. Estos genes codifican las subunidades proteicas del canal iónico (sitio blanco de estos antihelmínticos), sugiriendo que la resistencia consistiría en una modificación del sitio blanco de está sustancia. En otras palabras, la resistencia a LEV se debe a la alteración o reducción del número de receptores colinérgicos o en la menor afinidad de estos receptores en los nematodos Levamisol-resistentes (15). Ver Figura 1.13.

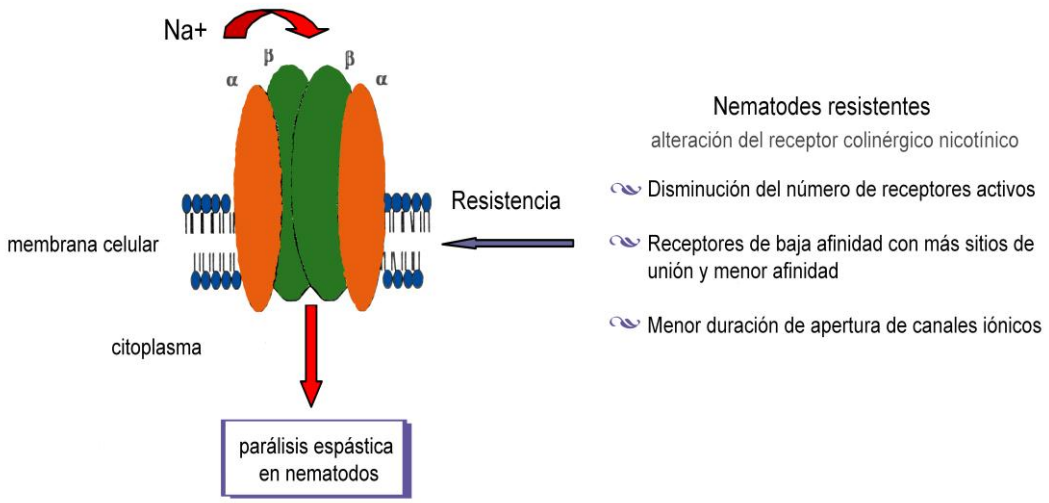


Figura 1.13. Representación esquemática del modelo de receptor nicotínico sobre el que actúan Levamisol/Morantel-Pirantel, y posibles mecanismos involucrados en el desarrollo de resistencia. Extraída y modificada de (15).

Resistencia a las Avermectinas y Milbemicinas

En relación a estos compuestos, la resistencia puede estar asociada a modificaciones en el receptor GLuCl (modificación del sitio blanco, como en el caso de LEV) y/o a la expresión aumentada de una glicoproteína de membrana, glicoproteína P

(Gp P), la cual impediría alcanzar concentraciones activas de la droga en el receptor GLuCl del parásito resistente (4, 15).

En relación a la Ivermectina, por ejemplo, la ausencia de un efecto inhibitorio sobre la actividad de la bomba faríngea sugiere que los parásitos adultos resistentes sortean los efectos de IVM no sólo aumentando el número de sitios de unión a Glu, sino también haciendo estos sitios menos susceptibles a la inhibición por IVM, resultando en un marcado aumento en la capacidad de unión de Glu.

Por otra parte, la resistencia a IVM también ha sido asociada con una disminución en la permeabilidad de la cutícula de los nematodos a esta droga, lo que se traduce en la incapacidad de la droga de alcanzar su receptor, con la consecuente generación de resistencia (15).

1.5.3. Métodos para la detección de resistencia antihelmíntica

La creciente importancia de la resistencia antihelmíntica ha dado lugar a la necesidad de desarrollar métodos de detección estandarizados. Diversas técnicas *in vivo* e *in vitro* han sido publicadas y revisadas. Sin embargo, todos los métodos descriptos hasta el momento presentan inconvenientes ya sea en términos de costo, aplicabilidad, reproducibilidad, tiempo e interpretación de resultados (3, 6, 29, 30).

Pruebas *in vivo*

- Test de eficacia controlada (T.E.C)

Es el método más confiable para detectar la resistencia a los antihelmínticos, ya que compara el número de nematodes adultos obtenidos de la necropsia de animales tratados y controles. Sin embargo debido a su elevado costo (gran número de animales requeridos para ser sacrificados), laboriosidad y demanda de tiempo, este método se encuentra prácticamente restringido a trabajos muy específicos de investigación, limitando seriamente su aplicación en situaciones de campo (3).

- Test de reducción del conteo de huevos (T.R.C.H)

Es el método más utilizado en todo el mundo para detectar resistencia. Compara los valores de huevos por gramo (h.p.g) de heces en los animales antes y después del tratamiento antihelmíntico. Cuando la reducción del conteo de huevos resulta inferior al 90% en un período de 15-20 días (según el grupo químico utilizado para el tratamiento) para la toma de muestra luego del tratamiento se considera la presencia de resistencia (3).

La forma recomendada para calcular la reducción de los conteos de huevos es:

$$R.C.H.(\%) = ((C - T) / C) \times 100$$

donde T es la media aritmética del grupo tratado y C es la media aritmética del grupo control sin tratamiento a los 15-20 días post-tratamiento.

Este test requiere del cultivo de larvas en las muestras pre y post tratamiento, con motivo de determinar la participación relativa de cada género parasitario. Las recomendaciones e información general para su empleo fueron realizadas por la Asociación Mundial para el Desarrollo de la Parasitología Veterinaria o W.A.A.V.P. (29).

El T.R.C.H. posee la gran ventaja de poder ser utilizado con todos los grupos de antihelmínticos en todas las especies de animales domésticos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en rumiantes, los resultados de este test deben ser considerados solo una estimación de la eficacia antihelmíntica, ya que la postura de los huevos por parte de los nematodes no guarda una estrecha correlación con la carga parasitaria.

En este contexto, este ensayo podría mostrar mayor eficiencia con géneros que tienen un alto potencial biótico y/o con buena correlación entre el número de huevos y el de nematodes como por ejemplo *Haemonchus*, pero podría ser menor cuando se considera al género *Ostertagia*. Otra limitante importante de esta técnica es su baja sensibilidad ya que solo permitiría detectar resistencia cuando la frecuencia de genes resistentes en una población excede el 25% y ya se observan fallas clínicas al tratamiento (3).

Pruebas *in vitro*

- Ensayo de eclosión de huevos

Esta prueba fue desarrollada para la detección de resistencia a los Bencimidazoles y se basa en la capacidad de estos compuestos de impedir la embriogénesis y eclosión de los huevos. El test original fue descripto por Le Jambre en 1976 y ha sido utilizado desde entonces con algunas modificaciones por muchos otros investigadores.

El método consiste en incubar huevos no desarrollados de nematodes en concentraciones seriadas de Bencimidazoles por un tiempo prefijado y luego determinar la proporción de ellos que falla a la embrionación y/o eclosión (11, 30). El porcentaje de huevos que desarrollan y/o eclosionan se corrige en base a la mortalidad natural en los controles no tratados. Finalmente los datos se someten a análisis para estimar la LC_{50} que es la concentración necesaria de la droga para inhibir la eclosión del 50% de los huevos.

Una consideración importante es la necesidad de cultivar las larvas hasta el estado L3, lo que permite la identificación del género parasitario que sobrevive.

La principal desventaja de ésta prueba es el requerimiento de huevos frescos, no desarrollados. Esto es porque los BZD sólo actúan sobre la primera parte del desarrollo de los huevos, ya que cuando el huevo se ha desarrollado, predomina el metabolismo aeróbico y aparece un efecto refractario frente a la actividad ovicida de dichos compuestos. Otra desventaja del método es la escasa solubilidad y por lo tanto menor poder ovicida de los últimos BZD comercializados, como por ejemplo el Fenbendazol, ya que esta nueva generación de compuestos es la más utilizada por los productores. Sin embargo, la existencia de resistencia colateral entre los diferentes fármacos de esta familia de antihelmínticos, justifica la utilización de otros Bencimidazoles más solubles como el Tiabendazol.

A pesar de todo, la prueba de eclosión de huevos se utiliza actualmente como método discriminante de resistencia a campo para BZD y si bien presenta dificultades en la interpretación de los resultados cuando están involucradas infecciones mixtas y requiere de huevos fresco, el test, es rápido (1-3 días si la muestra inicial posee una buena cantidad de huevos) y es simple a pesar de que requiere precisión técnica (30).

- Parálisis larval

Fue el primer método desarrollado para detectar resistencia al Levamisol y Morantel y se basa en determinar el porcentaje de parálisis de L3 luego de haber sido expuestas por 24 horas (tiempo óptimo de incubación) a diferentes diluciones del antihelmíntico. Esta prueba tiene la ventaja de utilizar L3, las cuales son fácilmente obtenidas de cultivos fecales. La L3 es un estadío robusto, fuerte en el ciclo de vida y se almacenan bien por largos períodos de tiempo.

En cuanto a las desventajas de esta técnica se destacan la subjetividad en la medición de los resultados para definir si una larva esta paralizada o no y que muchas veces ocurre una dosis-respuesta atípica, por lo que altas concentraciones de LEV son menos efectivas para inmovilizar las larvas que las bajas concentraciones (11, 30).

- Unión a tubulina

Se basa en la unión diferencial de los BZD a la tubulina obtenida de nematodos susceptibles y resistentes. Para este ensayo, se produce un extracto crudo de tubulina de parásitos adultos, larvas infectivas o huevos que es incubado con BZD marcado con tritio hasta alcanzar un equilibrio. La droga libre es entonces removida con carbón vegetal, dejando el complejo bencimidazol tritiado-tubulina para ser estimado con un espectrofotómetro de centelleo líquido. Los extractos de tubulina de parásitos resistentes unen sustancialmente menos droga que los parásitos susceptibles (11, 30).

Este ensayo posee la ventaja de estar basado en cambios bioquímicos y sus resultados se pueden comparar entre laboratorios con más confianza que otras técnicas *in vitro*. Además cuando se cuenta con abundante cantidad de nematodos para estudiar este procedimiento es bastante rápido, sensible y seguro.

Por otra parte presenta la desventaja de necesitar de un costoso aparato de laboratorio y además por trabajar con isótopos radioactivos requiere de personal especialmente entrenado (30).

- Prueba de desarrollo larval

Junto con la prueba de eclosión de huevos, es la técnica *in vitro* más utilizada para diagnosticar resistencia a campo. Consiste en incubar los huevos de nematodos hasta el tercer estado larval en una placa multipocillo conteniendo medio nutritivo y distintas concentraciones de antihelmíntico por siete días a 26 ºC; este es el tiempo en el cual la mayoría de los huevos eclosionan y llegan a larvas infectivas. Pasado este tiempo se adicionan unas gotas de yodo (solución de lugol) y se procede a la lectura comparando el desarrollo alcanzado en el pocillo control (contiene solamente medio de cultivo) y el resto de los pocillos.

La gran ventaja de esta técnica es que permite evaluar distintos grupos de antihelmínticos en forma simultánea: Bencimidazoles, Levamisol, combinación de BZD y LEV y Avermectinas/Milbemicinas.

Como desventaja se menciona el hecho de que requiere un cuidadoso monitoreo de la placa en incubación hasta la culminación de la prueba y además requiere de huevos libres de desechos orgánicos por lo que el aislamiento de los huevos es uno de los puntos más críticos de la prueba (30).

- Técnicas de biología molecular

Actualmente, se está trabajando para desarrollar métodos de detección altamente sensibles basados en biología molecular (11).

Las técnicas de PCR (polimerase chain reaction) y de RT-PCR (reverse transcriptase polimerase chain reaction) son pruebas altamente sensibles que utilizan pequeñas cantidades de ADN y ARN respectivamente, para detectar bajas frecuencias de genes resistentes en poblaciones susceptibles de parásitos (30).

1.5.4. Estrategias para retardar el desarrollo de resistencia

En la actualidad cualquier programa de control que pretenda ser efectivo debe incorporar la utilización de antihelmínticos, pero el uso de estos debe basarse en el conocimiento epidemiológico y las diferentes alternativas de pastoreo en relación con el riesgo parasitario. En este sentido urge abandonar toda práctica que se sustente en el uso excesivo, indiscriminado y oportunista de los antihelmínticos, debido a que esto perjudicará no sólo al producto comercial sino a todo el grupo de antihelmínticos involucrado (6).

Son al menos cinco las recomendaciones para limitar el desarrollo de resistencia:

1-Disminuir la frecuencia de tratamientos antiparasitarios.

2-Utilizar antihelmínticos de espectro reducido (en la medida de lo posible).

3-Ajustar las dosis de manera correcta, evitando subdosificaciones.

4-Rotar los distintos grupos químicos.

5-Utilizar medidas integrales de control que no se basen exclusivamente en la aplicación de antihelmínticos.

La recomendación práctica más difundida para reducir la resistencia se basa en la limitación de los tratamientos. De este modo, se reduce la exposición a la droga y por ende disminuye la presión de selección (6, 11, 15).

Respecto del uso de drogas de espectro reducido, no es tan sencilla su instrumentación; una limitación a esta recomendación es la existencia de infecciones mixtas en bovinos. Sin embargo, un diagnóstico parasitológico previo permitirá evaluar alternativas a la hora de recomendar un antiparasitario.

En el tercer punto se recomienda ser especialmente rigurosos en la elección de productos de calidad asegurada y en la correcta implementación del tratamiento en lo referido a la dosificación, vía de administración y manipulación del producto (6, 15).

En cuanto a la rotación de antihelmínticos, a diferencia de la rotación rápida de principios activos ampliamente criticada como generadora de resistencia múltiple; la rotación lenta (cambios anuales de antiparasitarios con diferente modo de acción) es recomendada debido a que el cambio de principio activo permitirá la eliminación de los especimenes seleccionados como resistentes por la droga anterior.

Considerando el último punto, se puede citar una larga lista de alternativas que apunten a disminuir el número de desparasitaciones, basadas en alternativas de manejo del pastoreo de las diferentes categorías de animales y el conocimiento de la epidemiología parasitaria (6).

Además, es importante mencionar que debido al interés por desarrollar alternativas no químicas para el control de los helmintos y las enfermedades parasitarias del ganado, se ha posibilitado la introducción del control biológico (31). A diferencia del control quimioterapéutico (que atacan la fase parasítica de los nematodes), el control biológico esta dirigido a los estados de vida libre de los parásitos. La actividad científica en este tema ha sido intensa especialmente en Dinamarca, Austria, México y Argentina, donde se explora el potencial atrapador de nematodos que tienen ciertos microhongos como *Duddingtonia flagrans*, un hongo que ha demostrado tener habilidad para reducir las larvas de parásitos trichostrongylideos en las heces de los animales antes de que migren a los pastos. Además de *D. flagrans*, existen 200 especies de hongos que tienen la habilidad de atrapar larvas de nematodos por medio de diferentes estructuras como anillos constrictores, hifas, redes, etcétera (11). Ver Figura 1.14.

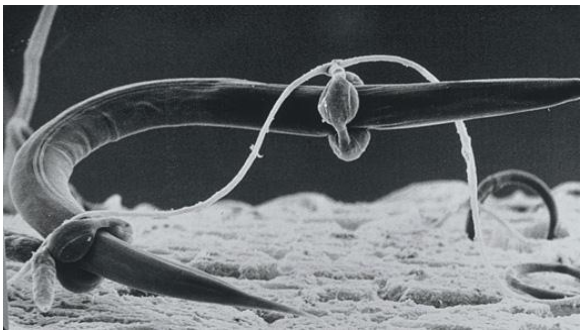


Figura 1.14. Control biológico con hongos. Extraída de http://weblogs.madrimasd.org/images/weblogs_madrimasd_org/universo/163/r_hongois%20depredadores%20de%20nematodos.jpg

A pesar de los avances en materia de control de nematodos en rumiantes por métodos no químicos, no se puede sustituir actualmente el uso de antiparasitarios y si bien el desarrollo de vacunas antihelmínticas y el control biológico aparecen como alternativas promisorias para el futuro, no parece factible que suplanten totalmente el uso de drogas antiparasitarias, y sí que lo complementen. En este contexto, el extendido uso de las Avermectinas como agente antihelmíntico no escapará a la necesidad de su rotación como principio activo. Aquí cobra vital importancia el desarrollo de nuevos agentes antihelmínticos y/o de compuestos sinergizantes de los mismos.

1.6. OBJETIVO GENERAL

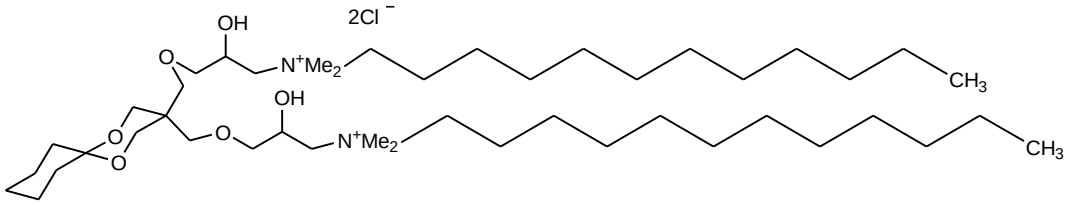
El interés académico y tecnológico de esta tesis es estudiar la síntesis química de nuevas moléculas antihelmínticas de naturaleza anfipática tipo gemini (que constan de dos cabezas polares y de dos cadenas hidrofóbicas de longitud de cadena variable, interconectadas por un espaciador flexible derivado del pentaeritritol) con el propósito de contribuir en el desarrollo de nuevos productos para el control de nematodes que afectan la sanidad de los animales de producción, aportando una solución en materia de manejo de la resistencia antihelmíntica (rotación de principios activos) que representa una nueva problemática a resolver en favor de la producción pecuaria argentina.

1.6.1. Objetivos específicos

- Estudiar y generar mediante síntesis química, nuevas moléculas antihelmínticas tipo gemini y optimizar sus procesos de preparación.
- Desarrollar técnicas analíticas, de separación, filtración y purificación para los compuestos intermedios y los productos finales.
- Caracterizar los compuestos obtenidos y determinar sus propiedades activas de superficie.
- Diseñar protocolos de análisis parasitológicos *in vitro* que permitan evaluar la actividad de las nuevas moléculas sintetizadas.
- Seleccionar los gemini de mejor desempeño.

CAPITULO 2

SINTESIS DE NUEVOS COMPUESTOS GEMINI



CAPITULO 2

2. SINTESIS DE NUEVOS COMPUESTOS GEMINI

2.1. SURFACTANTES

Los surfactantes se encuentran entre las sustancias químicas más versátiles pues tienen un amplio campo de aplicación, tanto en la industria como en el hogar. Están presentes en diversos productos tales como lubricantes, anticorrosivos, acondicionadores textiles, formulaciones de agroquímicos, emulsificantes, detergentes, shampoos, cosméticos y fármacos entre otros. Asimismo, sus aplicaciones en tecnologías emergentes han tenido una rápida expansión, como en biotecnología, bioquímica molecular, nuevos métodos de control de contaminación ambiental y en nuevas técnicas de separación (32-34).

Estos usos tan diversos y a gran escala, y la creciente necesidad de surfactantes "a medida" para nuevas aplicaciones, han desencadenado a lo largo de los últimos años una importante actividad de investigación en el campo de la química orgánica aplicada. A diferencia de antes, esta actividad no tiene como objetivo la producción per se de nuevas moléculas, sino de nuevas e interesantes propiedades. En esta línea no basta con acumular datos de nuevas familias de surfactantes, sino que se trata de dilucidar la relación entre las estructuras moleculares, las propiedades activas de superficie y de agregación, desarrollando métodos específicos de preparación de nuevas moléculas intencionalmente prediseñadas sobre dicha base (18, 35).

Habida cuenta de que los surfactantes poseen una estructura anfipática, grupos apolares o hidrofóbicos conectados a grupos polares o hidrofílicos, han sido usualmente clasificados según la naturaleza de sus grupos polares como aniónicos (grupo iónico con carga negativa, por ejemplo alquilbencenosulfonato), catiónicos (grupo iónico con carga positiva, por ejemplo sales de amonio cuaternarias), zwitteriónicos (grupos iónicos con cargas positivas y negativas, por ejemplo aminoácidos) y no iónicos (grupo polar sin carga iónica, por ejemplo alquilfenoles polioxietilenados). Una clasificación complementaria está surgiendo a la luz del desarrollo de nuevos surfactantes que poseen más de un grupo polar y más de una cola hidrofóbica. Dependiendo de la cantidad de colas hidrofóbicas y de su disposición geométrica, cuatro grupos de surfactantes están siendo reconocidos (35). Ver Figura 2.1.

2.1.1. Tipos de surfactantes

- ✓ Surfactantes convencionales: presentan una estructura clásica compuesta de un grupo iónico o polar y una cola hidrofóbica (35, 36).
- ✓ Surfactantes bolaform: compuestos por dos cabezas hidrofílicas unida por una o varias cadenas hidrofóbicas. Presentan actividad biológica y son promotoras de la formación de membranas monocapa ultrafinas. Debido a esta propiedad estas pueden ser utilizadas como agentes encapsulantes. Por otra parte, poseen la habilidad de intercalarse en la membrana lipídica, dependiendo de su estructura, como un agente estabilizador o disruptor de la membrana (37-39).
- ✓ Surfactantes gemini: en el año 1991 el profesor Fredric Menger reportó un nuevo tipo de molécula surfactante dimérica con dos colas hidrofóbicas y dos grupos iónicos unidos por un espaciador (rígido o flexible), a la que denominó gemini. Puesto que los gemini han mostrado tener una variedad única de propiedades activas de superficie y de agregación, se encuentran entre las sustancias químicas más versátiles. Recientemente se ha mostrado que los compuestos gemini son promisorios como potenciales vehículos para el

transporte de moléculas bioactivas y particularmente como agentes sintéticos activos para la transfección de genes que podrían competir en eficiencia con los peligrosos vectores virales (17, 27, 40-42).

- ✓ Surfactantes multiarmados polivalentes: su estructura no presenta la simetría de los gemini. Poseen múltiples cadenas hidrofóbicas y varios grupos hidrofílicos interconectados por un espaciador múltiple rígido o flexible (35).

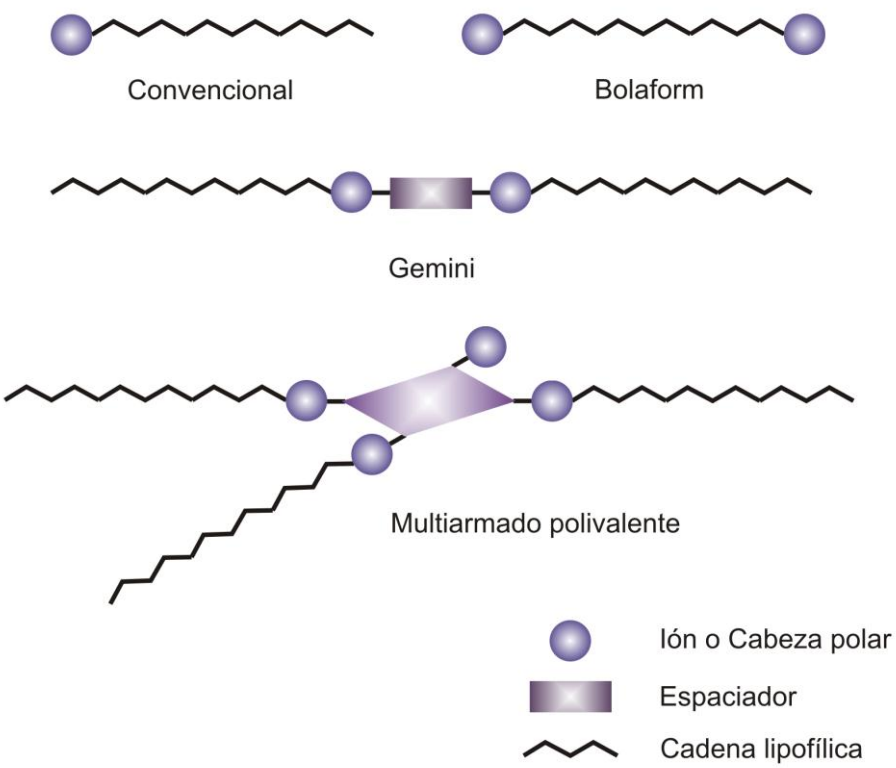


Figura 2.1. Representación esquemática de los diversos grupos de surfactantes.

Actualmente, los surfactantes de los tres últimos grupos presentan la mayor importancia debido a sus notables propiedades de superficie, excelente biodegradabilidad y favorables datos toxicológicos. Los métodos de preparación de estos productos involucran al menos tres etapas sucesivas de síntesis. Polioles, hidratos de carbono, alcoholes grasos, y alquilglicósidos pueden ser usados como materiales de partida para el grupo espaciador. Alcoholes o ácidos grasos de diferentes largos de cadena (C_4-C_{18}) son usualmente usados para proveer de la cadena lipofílica y agentes capaces de generar grupos sulfonatos, sulfatos, fosfatos, carboxilatos o sales de amonio cuaternarias son usados para conferir el carácter iónico (35).

La importante demanda de este tipo de compuestos a nivel mundial justifica las investigaciones para el desarrollo de nuevas estructuras con un mayor desempeño y un reducido impacto sobre el medio ambiente, procesos sintéticos simples, baja toxicidad, y biodegradabilidad, entre otras (33).

2.2. ESTRATEGIA DE SINTESIS UTILIZADA

2.2.1. Protección regioselectiva

Los acetales, son ampliamente empleados en la industria farmacéutica, fitofarmacéutica, de fragancias y de barnices, como valiosos agentes intermediarios o como productos finales de síntesis orgánica. Durante años, las reacciones de acetalización para la protección de 1,2 y 1,3-dioles han sido ampliamente estudiadas. Mediante la protección de *cis* y *trans*-1,3-dioles con aldehídos y cetonas, pueden obtenerse acetales cíclicos.

Los alcoholes polihidroxílicos con aldehídos y cetonas en presencia de catalizadores ácidos conducen a la formación de acetales cíclicos que involucran a dos grupos hidroxilos del poliol por cada grupo carbonilo. La posibilidad de que un par de hidroxilos lleve a la formación de un acetal cíclico es críticamente dependiente de las posiciones relativas y, por lo tanto de la estereoquímica de esos hidroxilos, de la estabilidad conformacional del acetal generado, de la naturaleza del grupo carbonilo y de las condiciones experimentales de reacción. Los catalizadores ácidos más empleados para este tipo de reacciones son: ácido sulfúrico, cloruro de hidrógeno, ácido *p*-toluensulfónico, cloruro de zinc, resinas de intercambio iónico y trifluoruro de boro, entre otros. Es aconsejable que el medio de reacción se mantenga lo más anhidro posible, para lo cual pueden usarse métodos físicos o químicos para eliminar el agua formada durante la reacción. Los acetales derivados de un aldehído se forman más fácilmente que los derivados de las correspondientes cetonas, y los acetales cíclicos se forman más fácilmente que los de cadena abierta. Normalmente, las cetonas tienden a formar acetales cíclicos de cinco miembros (1,3-dioxolanos), más que ciclos de seis miembros (1,3-dioxanos), debido al hecho de que un grupo alquilo debe necesariamente ocupar una posición axial en los anillos de seis miembros (35). Ver Figura 2.2.

1,3-Dioxolano 1,3-Dioxano

Figura 2.2. Acetales cíclicos del tipo 1,3-dioxolano y 1,3-dioxano.

Por otro lado, los aldehídos tienden a formar preferentemente 1,3-dioxanos, en los cuales el sustituyente más grande sobre el carbono del acetal ocupa la posición ecuatorial con el hidrógeno en la posición axial.

La presencia de enlaces conjugados en las cetonas desactiva la función carbonilo hacia la formación de acetales. Obviamente, los alcoholes estéricamente impedidos reaccionan más lentamente. Asimismo, los grupos atraedores de electrones mejoran la formación de acetales y, los grupos dadores de electrones la disminuyen. Una función carbonilo en un anillo de seis miembros es más reactiva en reacciones de adición nucleofílica que en los anillos de cinco miembros (35).

2.2.2. Catálisis por transferencia de fases

La catálisis por transferencia de fases (CTF) es una técnica por la cual se llevan a cabo o se aceleran reacciones entre dos solutos localizados en diferentes fases. Típicamente, uno o más de los reactivos son líquidos orgánicos o sólidos disueltos en solventes no polares y los co-reactivos son sales o hidróxidos metálicos alcalinos en solución acuosa. Sin la presencia de un catalizador, tales reacciones son lentas o directamente no ocurren. Los catalizadores más usados son sales de amonio cuaternario, sales de fosfonio, éteres corona, criptandos y podandos (43).

En comparación con los sistemas homogéneos, la CTF posee las siguientes ventajas: a) no necesita de solventes apróticos caros, b) el *workup* es más simple, c) las condiciones de reacción implican tiempos más cortos y temperaturas más bajas y d) se emplean hidróxidos alcalinos acuosos en lugar de otro tipo de bases más caras y complejas (35).

Para comprender mejor el funcionamiento de este tipo de reacciones, consideramos el siguiente ejemplo: la reacción entre un halogenuro de alquilo con cianuro de sodio. El ión cianuro es fuertemente básico, anión nucleofílico, y desplaza un halogenuro para generar el cianuro de alquilo o nitrilo (Figura 2.3). La forma tradicional de llevar a cabo esta reacción sería utilizar un disolvente prótico o aprótico que disuelva ambos reactivos.

En cambio, supongamos que tenemos una solución de halogenuro de alquilo en un disolvente orgánico no polar y una solución de cianuro de sodio en agua, y que mezclamos ambas. Los disolventes son inmiscibles y se separan en dos fases. Podríamos calentar esta mezcla durante un tiempo muy largo, pero la reacción no se producirá. El sustrato permanecerá en la capa orgánica y el nucleófilo quedará en la fase acuosa, no pudiendo sufrir colisiones. Sin embargo, si añadimos a esta mezcla una pequeña cantidad de una sal de amonio cuaternaria, un compuesto en el que se han reemplazado los hidrógenos del ión amonio por grupos alquilo R (metilo o, mejor aún, grupos *n*-butilo), el halogenuro de alquilo y el cianuro reaccionan rápidamente y en condiciones suaves con un elevado rendimiento (35, 43).

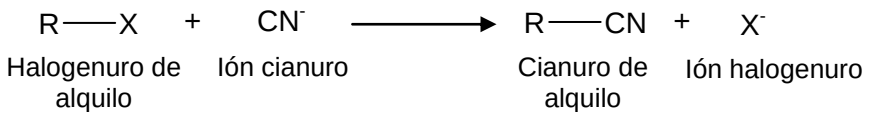


Figura 2.3. Sustitución nucleofílica de halogenuros de alquilo con iónes cianuro.

Este es un ejemplo de los que Charles M. Starks, uno de los pioneros en este campo, ha denominado Catálisis por Transferencia de Fases. Starks ha resumido el ciclo catalítico como se muestra en la Figura 2.4. Todo depende del hecho que los grupos alquilo del ión cuaternario, al que denominaremos Q^+ para simplificar, lo hacen lipofílico y, por tanto, capaz de ser transferido a la fase orgánica. Sin embargo, no puede hacerlo solo: para equiparar su carga positiva debe llevar consigo un anión. Este anión será ocasionalmente su contraión original, o sea, bisulfato; este anión débilmente básico carece virtualmente de poder nucleofílico, de modo que es inerte (43).

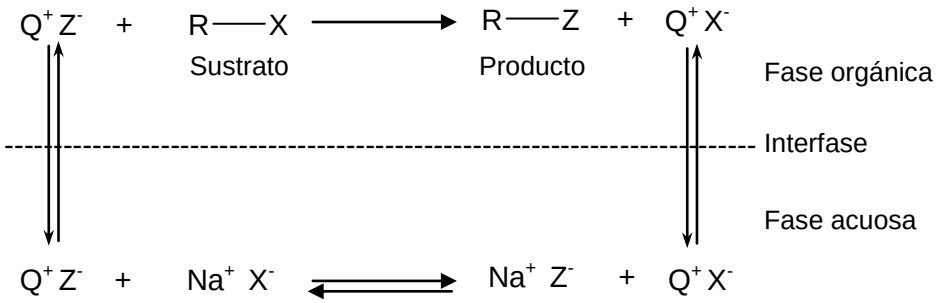


Figura 2.4. Catálisis por transferencia de fase. El ión de amonio cuaternario (Q^+) es tanto hidrófilo como lipófilo, se mueve entre la fase acuosa y la orgánica transportando un anión: el nucleófilo (Z^-) o el grupo saliente (X^-). En la fase orgánica el nucleófilo no está virtualmente solvatado y reacciona rápidamente con el sustrato (R-X).

Sin embargo, la mayoría de los aniones en fase acuosa son iones cianuro (o cualquier otro nucleófilo que se esta empleando), de modo que son los que tienen mayor probabilidad de ser conducidos a la fase orgánica. Tenemos ahora iones cianuro en un medio poco afín: un disolvente no polar. Allí, su concentración puede ser muy baja, pero están virtualmente no solvatados y son muy reactivos. La sustitución es rápida, formándose el nitrilo y liberándose un ión halogenuro. Este ión halogenuro es conducido a la fase acuosa por el ión cuaternario (Q^+) en su migración de regreso.

El ión es transferido sucesivamente entre las dos fases transportando aniones: a veces, el contraión original, otras, uno de los iones halogenuros desplazados, y otras, el nucleófilo, un ión cianuro. Cuando sucede esto último, puede haber reacción. La catálisis se debe así a la transferencia del nucleófilo de una fase a otra.

Hay otro factor adicional involucrado en el proceso. Como se ha mencionado, en la mayoría de los disolventes, las sales existen en cierta medida como pares iónicos. Un ión y su contraión se atraen por tener cargas opuestas. Cuanto menos polar es un disolvente (esto es, cuanto más débil la solvatación), más fuerte es el apareamiento de iones: un tipo de enlace es reemplazado por otro. También, esta atracción electrostática tiende a estabilizar al anión, y ésto desactiva al anión como nucleófilo y como base. Así se podría pensar que al pasar a un disolvente no polar, se esta simplemente intercambiando un tipo de desactivación por otro.

Sin embargo, encontramos aquí otra ventaja del ión cuaternario Q^+ como catalizador de transferencia de fases: los grupos alquilo que lo hacen lipófilo son voluminosos y protegen la carga positiva del nitrógeno, aislándola del anión. El anión es atraído con menor intensidad hacia esta carga sumergida en el ión cuaternario que hacia una carga concentrada sobre un catión metálico. Este par iónico es muy suelto, y el anión es comparativamente libre y muy reactivo (43).

La habilidad de la CTF está entonces basada en el hecho de que minimiza las dos principales fuerzas desactivadotas que actúan sobre un anión: la solvatación y el apareamiento de iones.

Existen muchas variantes del método, por un lado, no es necesaria una fase acuosa ya que el ión cianuro puede transferirse a la fase orgánica directamente desde el cianuro de sodio sólido. Por otra parte, en el caso de contar con un sustrato líquido, tampoco sería necesaria la presencia de un disolvente orgánico debido a que este puede actuar como tal (35).

2.2.3. Síntesis de surfactantes gemini

En las últimas décadas, la preparación de nuevas moléculas anfipáticas, con dos o más cadenas hidrofóbicas y dos o más grupos hidrofílicos, denominados gemini, con excelentes propiedades de superficie han sido reportadas. Descubrimientos científicos recientes, en este tema, han despertado la curiosidad en el desarrollo y la síntesis de esta nueva y poderosa familia de surfactantes. Las nuevas estructuras anfifílicas están siendo estudiadas, desde el punto de vista académico y tecnológico, debido al interés económico que despiertan en distintas áreas de la química. Así, hoy en día sus usos son amplios y variados como por ejemplo: formulaciones para piel, tratamientos antibacterianos, preparación de materiales de alta porosidad, separaciones analíticas etcétera. Alrededor de 100 patentes están siendo desarrolladas en diversas áreas, lo que indica que el desarrollo tecnológico de los gemini está cobrando fuerza por su importancia económica (17, 33, 35, 42).

Los nuevos surfactantes fueron preparados a partir del éter diglicidílico obtenido por CTF a partir del pentaeritritol protegido. La hidrofobización del éter diglicidílico con aminas grasas primarias y terciarias para la obtención de los compuestos gemini, se lleva a cabo mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular en medio básico en la que la ruptura del enlace carbono-oxígeno y el ataque del nucleófilo suceden en una sola etapa. En esta condición, la escinsión del epóxido condujo a la apertura del enlace por el lado menos impedido estéricamente (35, 43).

2.3. MATERIALES Y METODOS

Los espectros NMR ^{1}H, ^{13}C y ^{19}F fueron realizados en un espectrómetro Bruker FT-300, usando $CDCl_3$ como solvente. Todos los espectros están informados en partes por millón (δ), relativos al tetrametilsilano. Los espectros IR se realizaron en espectrómetro Shimadzu 8201 PC. En los análisis de cromatografía se emplearon los siguientes equipos: cromatógrafo gaseoso Shimadzu modelo GC-17AATF; cromatógrafo de gases-espectrómetro de masa Shimadzu modelo GCMS-QP 5000; La cromatografía en columna fue realizada sobre sílica gel (70-230 mesh ASTM). Los puntos de fusión se determinaron con un fusiómetro Büchi B-540.

Se emplearon reactivos y solventes de grado analítico. Las purificaciones de los compuestos se realizaron de acuerdo a los métodos descriptos en la literatura (44). El benceno y la *N,N*-dimetilformamida (Merck) utilizados como solvente en la reacción de protección fueron secados sobre tamices moleculares de 4Å.

El pentaeritritol (Aldrich) 98% fue adquirido comercialmente y la ciclohexanona fue destilada y secada según la metodología descripta (44).

Tanto el ácido *p*-toluensulfónico (Merck), como el bisulfato y el bromuro de tetrabutilamonio de alta pureza (Strem) empleados como catalizadores fueron secados bajo vacío a 100 ºC (44).

La ($\pm$)-epiclorhidrina (Fluka) 98% fue adquirida comercialmente.

Para la síntesis de los surfactantes se utilizaron aminas primarias y terciarias, compuestos no iónicos y catiónicos respectivamente. Las aminas primarias octadecilamina (Aldrich) 98%, dodecilamina (Aldrich) 98%, oleilamina (Aldrich) 97% y octadecilamina (Aldrich) 98% fueron adquiridas comercialmente. Las aminas terciarias fueron preparadas a partir de aminas primarias y halogenuros de alquilo y de perfluoralquilo (23, 45-47).

El clorohidrato de dimetilamina (Aldrich) 99%, el bromuro de *trans, trans*-farnesilo (Aldrich) 95% y el heptadecafluoro-1-iodoctano (Aldrich) 98% fueron adquiridos comercialmente.

2.4. PROCEDIMIENTOS DE SINTESIS

La nueva serie de compuestos diméricos no iónicos y catiónicos fue llevada a cabo en tres etapas de reacción que se presentan en la Figura 2.5.

El primer paso consistió en la protección regioselectiva del pentaeritritol (PE), con ciclohexanona cuyo rendimiento alcanzó el 90%. El acetal formado a partir de aquí, fue adoptado como precursor nucleofílico, en reacciones de sustitución nucleofílica frente a la (±)-epiclorhidrina para la obtención del éter diglicidílico. Esta reacción fue llevada a cabo mediante catálisis por transferencia de fases sólido-líquido y alcanzó un rendimiento del 92%. Finalmente la hidrofobización del éter diglicidílico con aminas grasas primarias y *N,N*-dimetiladas dió lugar a los compuestos no iónicos (**4a-c**) y catiónicos (**5a-f**) respectivamente. Tanto la síntesis de aminas terciarias como las tres etapas de síntesis mencionadas anteriormente, se describen en detalle a continuación.

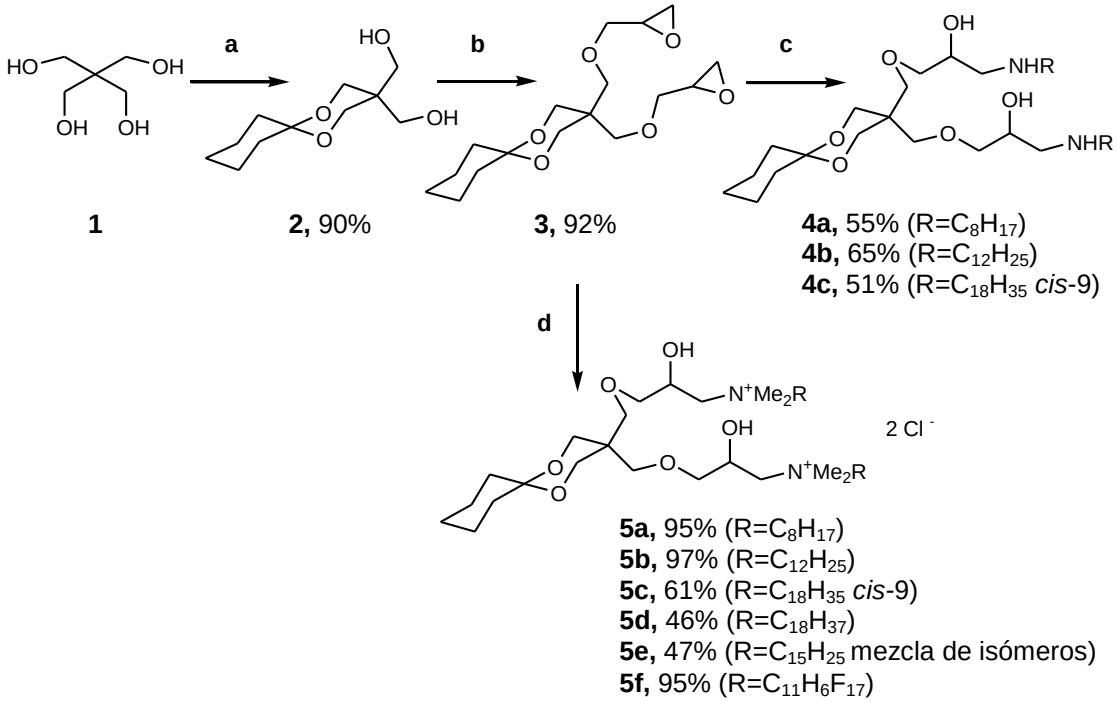


Figura 2.5. Vías de síntesis de los compuestos diméricos neutros y catiónicos. (**a**) Pentaeritritol (**1**), ciclohexanona, ácido *p*-toluensulfónico monohidrato, benceno/DMF (40:60), 115 ºC, 48 h; (**b**) Diol (**2**), (±)-epiclorhidrina, NaOH, TBAB, 30 ºC, 1,5 h; (**c**) Éter diglicidílico (**3**), alquilamina primaria, TBABr, etanol, 30 ºC, 20 h; (**d**) **3**, *N,N*-dimetilamina, TBABr, etanol, 30 ºC, 20 h.

2.4.1. Síntesis de aminas grasas terciarias a partir de aminas primarias

En un balón de una boca conteniendo la amina primaria en 30 mL de metanol, se adicionó el ácido fórmico y el formaldehído muy lentamente bajo agitación constante en las proporciones que figuran en la Tabla 2.1. Finalizada la mezcla de reactivos, el sistema se calentó a reflujo (65,5 ºC) durante el tiempo denominado Tiempo 1. A continuación, los compuestos de bajo punto de ebullición fueron eliminados llevando el crudo de reacción a 50 ºC y desechando el destilado. Posteriormente, la mezcla se alcalinizó (pH= 9) con una solución acuosa de hidróxido de sodio al 25% p/v y se calentó nuevamente a reflujo durante el tiempo denominado

Tiempo 2. Cabe aclarar que los tiempos de reflujo dependen de la amina empleada. Ver Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Proporción molar de reactivos y tiempos de reacción para metilación de aminas primarias.

Alquilamina	Ácido fórmico[a]	Formaldehído[a]	Tiempo 1 (h)	Tiempo 2 (h)
n-octilamina	7	13	12	3
n-dodecilamina	7	13	18	5
n-oleilamina	13	24	24	7
n-octadecilamina	13	24	24	7

[a] Proporción molar de reactivos por mol de amina.

Culminado el tiempo de reacción, se realizaron tres extracciones con cloroformo, y se evaporó el disolvente. Los productos puros (pureza > 98% testeada por cromatografía gaseosa) obtenidos por este procedimiento general se obtuvieron con rendimientos cuantitativos (23, 45).

2.4.2. Síntesis de *N,N*-dimetilfarnesilamina y *N,N*-dimetil-perfluorooctil-propil amina

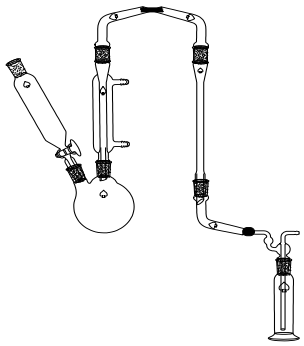


Figura 2.6. Equipo de síntesis. Solución de dimetilamina en THF.

A un balón de dos bocas conteniendo 10 g de KOH y equipado con un refrigerante (Figura 2.6) se le adicionó, gota a gota, a través de una columna de vidrio una solución acuosa de Me_2NH*HCl (18 g; 0,22 mmoles). El gas generado a partir de aquí se hizo pasar a través de una columna de secado conteniendo KOH y fue condensado en un recipiente a -80 ºC (acetona/aire líquido). Finalmente, se adicionaron 40g de THF frío a la amina condensada obteniéndose de este modo una solución de dimetilamina al 20%.

En una segunda etapa de la síntesis se colocó en un balón de reacción de 10 mL el halogenuro de alquilo ó el halogenuro de perfluoroalquilo ($(CH_3)_2C=CH[CH_2CH_2C(CH_3)=CH]_2CH_2Br$ 0,282 g; $R_{f8}(CH_2)_3I$ 0,582 g; 0,99 mmoles) y la solución de dimetilamina al 20% en THF (1,07g; 4,78 mmoles). La mezcla se agitó por 24 horas a temperatura ambiente y el producto de reacción se trató con una solución de NaOH 1M y se extrajo con éter sulfúrico. La fase etérea se lavó con agua y se secó con sulfato de magnesio anhidro. Finalmente el disolvente se evaporó bajo presión reducida y se obtuvo el producto puro. Los rendimientos de *N,N*-dimetilfarnesilamina y *N,N*-dimetil-perfluorooctil-propil amina obtenidos por esta metodología general fueron del 60 y 68% respectivamente (46, 47).

2.4.3. Síntesis de acetales mediante destilación reactiva

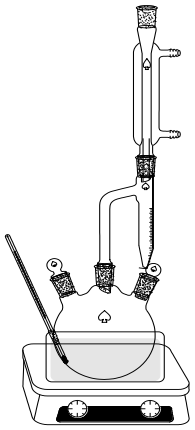


Figura 2.7. Equipo de síntesis. Protección regioselectiva.

En un balón de tres bocas de 100 mL equipado con una trampa de Dean-Stark y un refrigerante, se adicionaron el pentaeritritol **1** (2,995 g; 22 mmoles) a 50 mL de una mezcla benceno-DMF (40:60) y cantidades catalíticas de ácido *p*-toluensulfónico (5% p/p respecto de la ciclohexanona). La mezcla se calentó a 80 ºC hasta disolución total y luego se agregó la ciclohexanona (1,571 g; 15 mmoles) muy lentamente y se aumentó la temperatura hasta alcanzar los 115 ºC, de modo que el agua formada durante la reacción fue removida por destilación reactiva y colectada en la trampa de Dean-Stark.

Cumplidas las 48 horas de reacción, se procedió a destilar el benceno a presión reducida bajo campana y se dejó enfriar la reacción. Luego, se adicionó agua (30 mL), se neutralizó el medio con carbonato de potasio y se realizaron tres extracciones con diclorometano (30 mL). La fase orgánica fue secada con $MgSO_4$ anhidro y el diclorometano fue evaporado a presión reducida. El producto crudo fue obtenido por destilación en Kugelrohr y purificado por cromatografía en columna sobre sílica gel (Et_2O-éter de petróleo 80:20). El compuesto **2** fue obtenido como un sólido blanco con un rendimiento del 90% y una selectividad el 92% (19, 27, 35).

2.4.4. Síntesis del éter diglicidílico

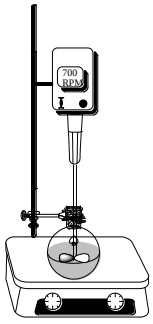


Figura 2.8. Equipo de síntesis. Éter diglicidílico.

A un balón de una boca, equipado con un agitador mecánico (50-2000 rpm), conteniendo una mezcla de 1,5-dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-dimetanol (0,843 g; 3,90 mmoles), hidróxido de sodio (0,936 g; 23,40 mmoles), agua y bisulfato de tetrabutilamonio (0,132 g; 0,39 mmoles) como catalizador de transferencia de fases, se adicionó (±)-epiclorhidrina (3,608 g; 39,0 mmoles) bajo agitación constante a 700 rpm a una temperatura de 30 ºC. Luego de 1,5 horas de reacción (conversión total determinada por GC y TLC), se filtró el crudo por gravedad y se realizó un lavado del sólido con 150 mL de CH_2Cl_2. Se evaporó el disolvente y el residuo fue particionado en éter etílico (2 x 150 mL) y brine (80 mL). La fase orgánica combinada fue secada con $MgSO_4$ anhidro, filtrada y evaporada a sequedad bajo presión reducida. El producto crudo se purificó por cromatografía en columna sobre sílica gel con una mezcla de acetona/hexano (3:7), y el éter diglicidílico **3** puro se obtuvo con un rendimiento del 92% y una selectividad del 98,9% (27, 35).

2.4.5. Síntesis de surfactantes

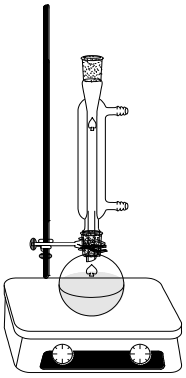


Figura 2.9. Equipo de síntesis. Surfactantes gemini.

Síntesis de compuestos de *bis*-alquilamina (**4a-c**)

En un balón de una boca conteniendo 12 mL de etanol absoluto se adicionó una proporción molar 2,5:1:0,1 de alquilamina (octilamina 0,494 g; dodecilamina 0,708 g; oleilamina 1.022 g; 3,825 mmoles), éter diglicidílico (0,331 g; 1,530 mmoles) y TBABr (0,049 g; 0,153 mmoles). La solución se agitó durante 20 horas a 30 ºC. Culminado el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente a presión reducida y se purificó el crudo por cromatografía en columna sobre sílica gel con una mezcla de CH_2Cl_2/EtOH (1:1). Los productos **4a-c** obtenidos por este procedimiento general dieron un rendimiento de 55, 65 y 51% de rendimiento respectivamente (27).

Síntesis de sales de *bis*-alquilamonio (**5a-f**)

Una proporción molar de 2,5:1:0,1 de *N,N*-dimetilalquilamina (*N,N*-dimetiloctilamina 0,601 g; *N,N*-dimetildodecilamina 0,815 g; *N,N*-dimetiloleilamina 1,129 g; *N,N*-dimetiloctadecilamina 1,138 g; *N,N*-dimetilfarnesilamina 0,954 g; *N,N*-dimetil-perfluorooctil-propil amina 1,932 g; 3,825 mmoles), éter diglicidílico (0,331 g; 1,530 mmoles) y TBABr (0,049 g; 0,153 mmoles) fue adicionada a 12 mL de etanol absoluto y la solución fue agitada por 20 horas a 30 ºC. Terminado el tiempo de reacción, el disolvente fue evaporado a presión reducida y el crudo fue purificado por cromatografía en columna sobre sílica gel en dos etapas. La primera con una mezcla de elución de acetato de etilo/acetona/NH_4OH (4:1:0,5) y la segunda con una mezcla de CH_2Cl_2/EtOH (1:1). El eluído conteniendo el producto deseado fue evaporado a presión reducida. Finalmente, se adicionó al producto una solución de HCl que proporcionó el correspondiente contraión. Los productos **5a-f** obtenidos por este procedimiento general dieron un rendimiento de 95, 97, 61, 46, 47 y 95% respectivamente (27).

2.5. CARACTERIZACION DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS

1,5-Dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-dimetanol (**2**).

Datos físicos del compuesto: sólido blanco. Punto de fusión (PF) 123-124 ºC.
IR (KBr): ν (cm^{-1})= 920,0; 1039,6; 1062,7; 1107,1; 1369,4; 2856,4; 2922,0; 3273,0. ^{1}H-NMR [200 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ= 1,31-1,57 (m, 6H); 1,61-1,78 (m, 4H); 3,27-3,48 (m, 4H); 3,61 (s, 4H); 4,47 (t, 2H, J= 6,5). ^{13}C-NMR [50 MHz, $(CD_3)_2SO$]: δ= 22,11 (CH_2-4´); 25,19 (CH_2-3´ - CH_2-5´); 32,25 (CH_2-2´ - CH_2-6´); 40,36 (C); 60,63; 60,79; 61,19; (CH_2O-CH_2OH); 96,88 (C-1´). MS: m/z (%)= 216 (M^+, 6); 187 (13); 173 (96); 160 (4); 125 (5); 101 (6); 99 (14); 83 (34); 71(40); 55 (100); 41 (72). Microanálisis calculado para $C_{11}H_{20}O_4$ (PM=216,278): C, 61,08; H, 9,32; O, 29,59. Encontrado: C, 61,01; H, 9,61; O, 29,38.

1,5-Dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-dimetildiglicidil éter (**3**).

Datos físicos del compuesto: aceite amarillo claro.
IR (KBr): ν (cm^{-1})= 1100,0; 1460,0; 2980,0. ^{1}H-NMR [200 MHz, ($CDCl_3$)]: δ= 1,44-1,51 (m, 10H); 2,45-2,60 (m, 4H); 2,96 (m, 2H); 3,46-3,64 (m, 4H); 3,80 (s, 4H); 4,13 (m, 2H); 4,23 (m, 2H). ^{13}C-NMR [50 MHz ($CDCl_3$)]: δ= 22,00 (CH_2-4´); 24,26 (CH_2-3´ - CH_2-5´); 33,22 (CH_2-2´ - CH_2-6´); 41,58 (C); 44,73 ($CHCH_2O$); 49,91 (CH); 63,19 (CCH_2O); 86,08 ($CHCH_2O$); 99,28 (C-1´). MS: m/z (%)= 328 (M^+, 3); 299 (4); 285 (12); 113 (10);

83 (42); 55 (95); 31 (100). Microanálisis calculado para $C_{17}H_{28}O_6$ (PM= 328,406): C, 62,17; H, 8,59; O, 29,24. Encontrado: C, 62,28; H, 8,51; O, 29,21.

1,5-Dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-Bis(1-metoxi-3-octilamino-propan-2-ol) (**4a**).

Datos físicos del compuesto: siruposo blanco.
IR (KBr): ν (cm^{-1})= 1100,0; 2950,0; 3640,0. ^{1}H-NMR [200 MHz, ($CDCl_3$)]: δ= 0,88-0,92 (t, 6H J=6,6); 1,27-1,35 (m, 24H); 1,37-1,61 (m, 10H); 2,57-2,72 (m, 8H); 2,76-2,80 (m, 4H); 3,09-3,41 (m, 4H); 3,76-3,85 (m, 4H); 3,87-3,91 (m, 2H); 4,10 (s, 2H); 4,20 (s, 2H). ^{13}C-NMR [50 MHz]: δ= 14,20; 22,00; 23,10; 24,26; 27,41; 29,30; 29,80; 30,35; 32,35; 34,22; 41,11; 48,84; 52,45; 62,88; 63,07; 69,41; 74,04; 98,28. Microanálisis calculado para $C_{33}H_{66}N_2O_6$ (PM= 586,887): C, 67,51; H, 11,36; N, 4,74; O, 16,39. Encontrado: C, 67,53; H, 11,33; N, 4,77; O, 16,37.

1,5-Dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-Bis(1-metoxi-3-dodecilamino-propan-2-ol) (**4b**).

Datos físicos del compuesto: siruposo blanco.
IR (KBr): ν (cm^{-1})= 1110,0; 2955,0; 3640,1. ^{1}H-NMR [200 MHz, ($CDCl_3$)]: δ= 0,80-0,92 (t, 6H J=6,4); 1,22-1,33 (m, 40H); 1,37-1,60 (m, 10H); 2,57-2,72 (m, 8H); 2,76-2,80 (t, 4H J=7,05); 3,08-3,41 (m, 4H); 3,77-3,84 (m, 4H); 3,87-3,90 (m, 2H); 4,10 (s, 2H); 4,20 (s, 2H). ^{13}C-NMR [50 MHz]: δ= 14,10; 22,00; 22,69; 24,26; 27,18; 29,39; 29,59; 29,62; 29,63; 29,65; 29,73; 29,73; 29,76; 31,24; 34,22; 41,11; 48,84; 52,45; 62,88; 63,07; 69,41; 74,04; 98,28. Microanálisis calculado para $C_{41}H_{82}N_2O_6$ (PM= 699,100): C, 70,41; H, 11,83; N, 3,98; O, 13,78. Encontrado: C, 70,44; H, 11,82; N, 4,00; O, 13,74.

1,5-Dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-Bis(1-metoxi-3-octadecilamino-propan-2-ol) (**4c**).

Datos físicos del compuesto: aceite amarillo claro
IR (KBr): ν (cm^{-1})= 1090,3; 2956,0; 3644,1. ^{1}H-NMR [200 MHz, ($CDCl_3$)]: δ= 0,86-0,94 (t, 6H J=6,8); 1,19-1,41 (m, 52H); 1,42-1,59 (m, 10H); 1,94-2,01 (m, 8H); 2,57-2,71(m, 8H); 2,76-2,80 (m, 4H); 3,09-3,41 (m, 4H); 3,77-3,84 (m, 4H); 3,87-3,91 (m, 2H); 4,15 (s, 2H); 4,20 (s, 2H); 5,22-5,28 (m, 4H). ^{13}C-NMR [50 MHz]: δ= 13,95; 22,57; 24,26; 27,18; 29,41; 29,73; 29,76; 31,60; 31,99; 34,22; 41,11; 48,84; 52,45; 63,07; 69,41; 74,04; 98,28; 130,70. Microanálisis calculado para $C_{53}H_{102}N_2O_6$ (PM= 863,387): C, 73,71; H, 11,91; N, 3,22; O, 11,16. Encontrado: C, 73,73; H, 11,90; N, 3,24; O, 11,13.

Dicloruro de 1,5-dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-Bis(1-metoxi-3-octildimetilammonio-propan-2-ol) (**5a**).

Datos físicos del compuesto: siruposo blanco.
IR (KBr): ν (cm^{-1})= 1091,0; 2950,0; 3640,0. ^{1}H-NMR [200 MHz, ($CDCl_3$)]: δ= 0,83-0,93 (m, 10H); 1,27-1,37 (m, 16H); 1,39-1,54 (m, 10H); 1,92-1,99 (m, 4H); 3,12-3,16 (m, 6H); 3,32 (s, 12H); 3,34-3,41 (m, 4H); 3,82-4,05 (m, 6H); 4,13 (s, 2H), 4,23 (s, 2H). ^{13}C-NMR [50 MHz]: δ= 14,07; 22,00; 22,68; 24,13; 26,31; 27,19; 28,46; 31,73; 34,22; 41,11; 59,43; 60,92; 63,07; 66,93; 68,57; 71,20; 98,28. Microanálisis calculado para $C_{37}H_{76}Cl_2N_2O_6$ (PM= 715,915): C, 62,05; H, 10,73; Cl, 9,89; N, 3,89; O, 13,44. Encontrado: C, 62,07; H, 10,70; Cl, 9,90; N, 3,91; O, 13,42.

Dicloruro de 1,5-dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-Bis(1-metoxi-3-dodecildimetillammonio-propan-2-ol) (**5b**).

Datos físicos del compuesto: siruposo blanco.
IR (KBr): ν (cm^{-1})= 1110,0; 2950,0; 3640,1. ^{1}H-NMR [200 MHz, ($CDCl_3$)]: δ= 0,83-0,91 (m, 10H); 1,21-1,40 (m, 32H); 1,37-1,60 (m, 10H); 1,95-2,01 (m, 4H); 3,12-3,16 (m, 6H); 3,32 (s, 12H); 3,33-3,41 (m, 4H); 3,77-4,05 (m, 8H); 4,13 (s, 2H); 4,23 (s, 2H). ^{13}C-NMR [50 MHz]: δ= 14,04; 22,00; 22,62; 23,79; 24,26; 26,08; 26,87; 29,37; 29,45; 29,61; 29,62; 31,68; 34,22; 41,11; 59,43; 60,92; 63,50; 66,93; 68,57; 71,20; 98,27.

Microanálisis calculado para $C_{45}H_{92}Cl_2N_2O_6$ (PM= 828,128): C, 65,27; H, 11,18; Cl, 8,55; N, 3,36; O, 11,64. Encontrado: C, 65,26; H, 11,19; Cl, 8,56; N, 3,38; O, 11,61.

Dicloruro de 1,5-dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-Bis(1-metoxi-3-octadecildimetilammonio-propan-2-ol) (**5c**).

Datos físicos del compuesto: siruposo blanco.
IR (KBr): ν (cm^{-1}) = 1085,9; 2940,0; 3640,0. ^{1}H-NMR [200 MHz, ($CDCl_3$)]: δ= 0,85-0,94 (m, 10H); 1,25-1,32 (m, 40H); 1,39-1,60 (m, 10H); 1,94-1,98 (m, 4H); 3,12-3,16 (m, 6H); 3,32 (s, 12H); 3,34-3,40 (m, 4H); 3,79-4,05 (m, 6H); 4,13 (s, 2H); 4,23 (s, 2H); 5,29-5,32 (m, 4H). ^{13}C-NMR [50 MHz]: δ= 13,95; 22,00; 22,57; 23,79; 26,08; 27,88; 29,42; 29,69; 29,76; 31,60; 31,99; 34,22; 41,11; 59,43; 60,92; 63,07; 66,93; 68,57; 71,20; 98,28; 130,70. Microanálisis calculado para $C_{57}H_{112}Cl_2N_2O_6$ (PM= 992,415): C, 68,95; H, 11,39; Cl, 7,17; N, 2,80; O, 9,69. Encontrado: C, 68,98; H, 11,37; Cl, 7,14; N, 2,82; O, 9,69.

Dicloruro de 1,5-dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-Bis(1-metoxi-3-octadecildimetilammonio-propan-2-ol) (**5d**).

Datos físicos del compuesto: siruposo blanco.
IR (KBr): ν (cm^{-1})= 1085,9; 2940,0; 3640,0. ^{1}H-NMR [200 MHz, ($CDCl_3$)]: δ= 0,85-0,94 (m, 10H); 1,25-1,32 (m, 44H); 1,39-1,60 (m, 10H); 1,94-1,98 (m, 4H); 3,12-3,16 (m, 6H); 3,32 (s, 12H); 3,34-3,40 (m, 4H); 3,79-4,05 (m, 6H); 4,13 (s, 2H); 4,23 (s, 2H); 5,29-5,32 (m, 4H). ^{13}C-NMR [50 MHz]: δ= 13,95; 22,00; 22,57; 23,79; 26,08; 27,88; 29,42; 29,69; 29,76; 31,60; 31,99; 34,22; 41,11; 59,43; 60,92; 63,07; 66,93; 68,57; 71,20; 98,28; 130,70. FAB-HRMS $(M - 2Cl - 2CH_3)^+$ calculado para $C_{57}H_{116}Cl_2N_2O_6$: 895,8442. Encontrado: 895,8421.

Dicloruro de 1,5-dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-Bis[1-metoxi-3-(E,E)-3,7,11-trimetil-2,6, 10-dodecatrien-1-il-dimetilammonio-propan-2-ol] (**5e**)

Datos físicos del compuesto: siruposo rojizo.
IR (KBr): ν (cm^{-1})= 1085,9; 2940,0; 3640,0. ^{1}H-NMR [200 MHz, ($CDCl_3$)]: δ= 1,40-1,57 (m, 10H); 1,63 (s, 12H); 1,69 (s, 6H); 1,94-2,18 (m, 16H); 3,32 (s, 12H); 3,34-3,56 (m, 4H); 3,70-4,25 (m, 8H). ^{13}C-NMR [50 MHz]: δ= 15,23; 17,56; 22,00; 23,22; 24,26; 25,56; 27,03; 34,22; 38,48; 39,95; 41,11; 53,58; 60,92; 62,77; 63,07; 66,95; 68,83; 71,20; 98,28; 124,17; 124,90; 129,89; 135,27; 144,63. FAB-HRMS $(M - 2Cl - 2CH_3)^+$ calculado para $C_{51}H_{92}Cl_2N_2O_6$: 799,6564. Encontrado: 799,6535.

Dicloruro de 1,5-dioxaspiro[5.5]undecano-3,3-Bis[1-metoxi-3-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9, 10,10,11,11,11)-heptadecafluoroundecildimetilammonio-propan-2-ol] (**5f**)

Datos físicos del compuesto: siruposo amarillo pálido.
IR (KBr): ν (cm^{-1})= 1085,9; 2940,0; 3640,0. ^{1}H-NMR [200 MHz, ($CDCl_3$)]: δ= 1,41-1,58 (m, 10H); 2,19-2,37 (m, 8H); 3,25 (dd, 4H), 3,32 (s, 12H); 3,34-3,37 (m, 4H), 3,85 (m, 10H); 4,13 (s, 2H); 4,23 (s, 2H). ^{13}C-NMR [50 MHz, (CDCl3)]: δ=14,00; 22,80; 25,95; 28,93; 29,23; 29,55; 29,60; 29,90; 32,20; 42,24; 62,74; 64,09; 70,11; 71,14; 72,71; 73,77; 98,28; 110,36; 115,24; 126,65; 130;50. ^{19}F-NMR [200 MHz, ($CD_3OD/CFCl_3$)]: δ= -82,0 (m, 6F, $2CF_3$); -115,1 (m, 4F, $2CF_2$); -123,1 (m, 12F, $6CF_2$); -123,3 (m, 4F, $2CF_2$); -124,0 (m, 4F, $2CF_2$); -124,9 (m, 4F, $2CF_2$); -127,5 (m, 4F, $2CF_2$). FAB-HRMS (M - 2Cl) calculado para $C_{43}H_{54}F_{34}Cl_2N_2O_6$: 1340,34389. Encontrado: 1340,3421.

2.6. RESULTADOS Y DISCUSION

La elección del pentaeritritol como grupo espaciador para la síntesis de los compuestos diméricos no ha sido arbitraria. En primer lugar porque se trata de un 1,3 diol simétrico que como grupo conector permite una considerable separación de dos a cuatro cadenas hidrofóbicas, y por ende posibilita dirigir estratégicamente la síntesis de surfactantes con dos o cuatro cadenas hidrofóbicas y con otros tantos grupos hidrofílicos. Segundo, es un tetraol barato y de fácil provisión aún en cantidades industriales.

Debido a la naturaleza altamente polar del pentaeritritol se emplea una mezcla de disolventes compuesta por benceno y dimetilformamida (DMF) con los objetivos de: i) disolver el tetraol y los demás reactivos, ii) eliminar el agua formada durante la reacción mediante destilación reactiva para desplazar el equilibrio hacia la formación de productos. Esta última condición también es crítica en lo que se refiere al rendimiento debido a que los acetales son inestables ante la presencia de agua. La DMF fue empleada como solvente debido a que disuelve ambos reactivos y, además, al no ser volátil favoreció el empleo de altas temperaturas para la operación de destilación reactiva. Por su parte, el benceno, fue empleado como co-solvente de reciclaje para la recuperación de la cetona volátil que corría el riesgo de ser destilada junto con el agua.

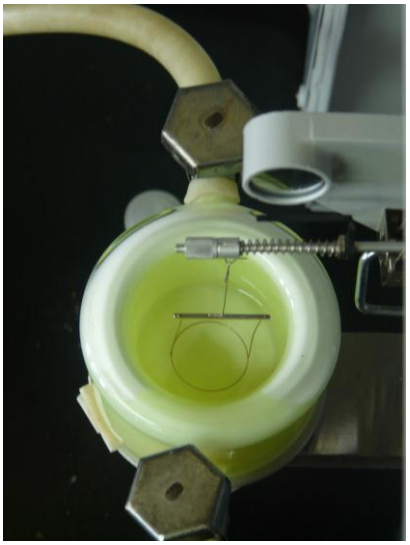
Así, en orden de establecer un mejor control de la síntesis de los intermediarios, se protegió selectivamente el PE con la ciclohexanona en una solución de benceno/DMF (40:60), en presencia de cantidades catalíticas de ácido *p*-toluensulfónico monohidrato durante 48 horas a 115 ºC. Se obtuvo, de este modo, un 90% de rendimiento del producto **2**, con un 99% de conversión y un 92% de selectividad. Esta estrategia de monoprotección permitió controlar las sucesivas etapas de síntesis evitando de esta manera la formación de subproductos difíciles de aislar y la disminución del rendimiento global del proceso de síntesis.

La eterificación del pentaeritritol monoprotegido fue llevada a cabo en un sistema de reacción sólido-líquido mediante catálisis por transferencia de fases. La utilización directa de pellets de hidróxido de sodio con el agregado de sólo 1% de agua condujo a un sistema sólido-líquido, de apariencia semi-pastosa. Bajo estas condiciones, con el agregado de un 10% de TBAB se obtuvo una alta conversión del precursor y una selectividad (98,9%) casi absoluta hacía el éter diglicidílico deseado. Se seleccionó este intermediario dialquilado con dos grupos epóxidos para la obtención de los nuevos surfactantes debido a las posibilidades que brinda la naturaleza de su estructura para el diseño sintético de estructuras complejas. Con su simetría particular y sus dos anillos epóxidos lábiles fue posible construir una nueva familia de compuestos no iónicos (**4a-c**) y catiónicos (**5a-f**).

En conclusión, una nueva familia de surfactantes tipo gemini fueron sintetizados a partir del pentaeritritol protegido con buenos rendimientos (ver Figura 2.5). Estos nuevos surfactantes de naturaleza catiónica y no iónica poseen una doble cadena hidrofóbica con dos cabezas polares y demostraron tener, en su mayoría, excelentes propiedades activas de superficie y potencial actividad biológica contra nematodes gastrointestinales. Todos estos resultados se analizan en los Capítulos 3 y 4 respectivamente.

CAPITULO 3

PROPIEDADES ACTIVAS DE SUPERFICIE DE LOS GEMINI SINTETIZADOS



CAPITULO 3

3. PROPIEDADES ACTIVAS DE SUPERFICIE DE LOS GEMINI SINTETIZADOS

3.1. TENSION SUPERFICIAL

El nombre surfactante es una contracción del término “agente activo de superficie” y es una sustancia capaz de adsorberse en la superficie o interfaz del sistema y de alterar marcadamente la energía libre de interfaz (33).

La energía libre de interfaz se define como la mínima cantidad de trabajo necesaria para crear esa interfaz. Cuando se mide la tensión superficial de un líquido, se determina la energía libre de interfaz por unidad de área del límite entre el líquido y el aire.

El trabajo mínimo ($\mathbf{W_{mín}}$) para expandir una superficie de área ($\boldsymbol{A}$) esta dado por el producto del área por la tensión superficial (γ): $\mathbf{W_{mín}} = \boldsymbol{A} \times \gamma$. Un agente activo de superficie es por ende una sustancia que a bajas concentraciones se adsorbe a una o a todas las interfases del sistema y cambia significativamente la cantidad de trabajo requerida para expandir dichas superficies (35).

Los tensoactivos poseen una característica dual, ya que poseen una cabeza polar la cual es altamente soluble en agua y una cola hidrofóbica cuya tendencia es disminuir el contacto con el agua. La cabeza polar puede ser de naturaleza catiónica (grupos amonio, piridinium), aniónica (grupos sulfato, sulfonatos, fosfatos y carboxilatos), no iónica (carbohidratos) o zwitteriónica (betaína). Las colas consisten en una o más cadenas alquílicas las cuales pueden ser ramificadas o no ramificadas, saturadas o insaturadas.

Cuando un agente tensoactivo se disuelve en un medio acuoso el grupo hidrofóbico distorsiona la estructura del agua (por ruptura de enlaces puente hidrógeno y por reestructuración de las moléculas de agua en la vecindad del grupo hidrofóbico). Como resultado de esta distorsión, algunas de las moléculas del surfactante son expulsadas hacia la interfase del sistema, con sus grupos hidrofóbicos orientados a fin de reducir al mínimo el contacto con las moléculas de agua. Así, la superficie del agua se cubre con una sola capa de tensoactivo con sus grupos hidrofóbicos predominantemente orientados hacia el aire. Todo lo cual se traduce en una disminución de la tensión superficial del agua (33, 48).

3.2. MATERIALES Y METODOS

La tensión superficial de las soluciones acuosas fue determinada por el método de desprendimiento del anillo (27, 33) de Du Nouy a pH=7 a 20 ºC usando un tensiómetro semiautomático Cole-Parmer modelo 21 (Figura 3.1).

Figura 3.1. Tensiómetro semiautomático.

El equipo fue calibrado usando como referencia compuestos puros y/o soluciones estándares cuyas tensiones superficiales cubrieron el rango de 20-70 mN m^{-1} a 20 ºC.

La tensión superficial fue medida tres veces para cada muestra con un intervalo de 40 minutos para cada lectura de manera de alcanzar el equilibrio, debido a que la tensión superficial mostró tener un comportamiento dependiente del tiempo, lo cual se observó por un incremento en los valores experimentales sobre las sucesivas medidas de cada una de las soluciones. Este tipo de comportamiento fue relacionado como una dificultad estructural de los gemini para organizarse en la interfaz aire-líquido.

Los valores de concentración micelar crítica[4] (CMC) se determinaron usando una serie de soluciones acuosas a varias concentraciones y fueron estimados a partir del punto de quiebre de la curva de tensión superficial *vs*. Log de la concentración.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSION

La solubilidad en agua de los compuestos catiónicos excedió ampliamente a la de sus homólogos neutros. Las propiedades tensoactivas y de agregación de los compuestos neutros **4a-c** no pudieron ser determinadas debido a su baja solubilidad y a que fueron incapaces de mantener una emulsión estable. Por otra parte, los compuestos de naturaleza catiónica **5a-f** exhibieron soluciones claras y mostraron un punto de quiebre en la curva de tensión superficial *vs*. concentración (en escala logarítmica) que permitió obtener una CMC bien definida como se muestra en la Figura 3.2.

En la primera gráfica de la Figura 3.2 donde se compararon los compuestos con diferentes largos de cadena alquílica (**5a-d**), puede verse muy claramente que la CMC disminuye con el aumento del largo de la cadena hidrocarbonada, lo que se encuentra en concordancia con lo reportado en la bibliografía. En cuanto a la segunda gráfica presentada en la figura, donde se comparan diferentes tipos de cadenas hidrofóbicas, podemos observar que el compuesto **5f** presenta una CMC mucho más baja que los gemini **5b** y **5e**. Por otra parte, cabe aclarar que la diferencia en el comportamiento de

[4] CMC: Concentración por encima de la cual las moléculas de surfactante se agregan en micelas que pueden presentar diferente morfología dependiendo de la estructura molecular del compuesto.

la curva de tensión superficial que se observa para el compuesto **5e**, puede deberse a que este compuesto presenta varias instauraciones en su estructura lo que causa una pérdida del empaquetamiento de las moléculas en la interfase del sistema y aumenta su solubilidad en agua.

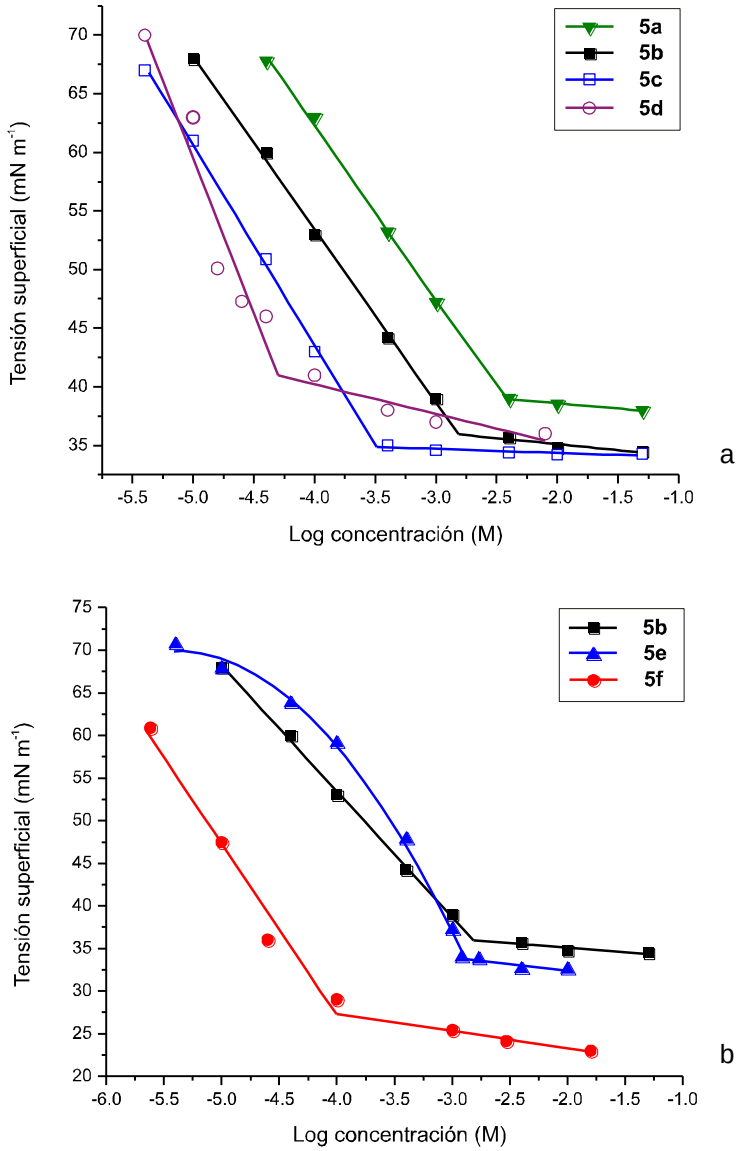


Figura 3.2. Tensión superficial *vs*. logaritmo de la concentración molar de los compuestos catiónicos sintetizados a pH= 7 y 20 ºC. (a) Curvas para los compuestos de diferentes longitudes de cadena C_8, C_{12} y C_{18}. (b) Curvas para los compuestos **5b**, **5e** y **5f** con diferentes regiones hidrofóbicas.

En la Figura 3.3 se muestra la curva de tensión superficial *vs* el log de la concentración para el compuesto **5e** en ausencia de NaCl y en presencia de una solución 0,1 M de NaCl. Como ocurre en la bibliografía (49), se observó que el agregado de una pequeña cantidad de NaCl mejora la tendencia de la curva lo cual se traduce en una mejora de sus propiedades activas de superficie, debida a la fuerte cooperación entre los gemini en presencia de electrolitos (ver Tabla 3.1).

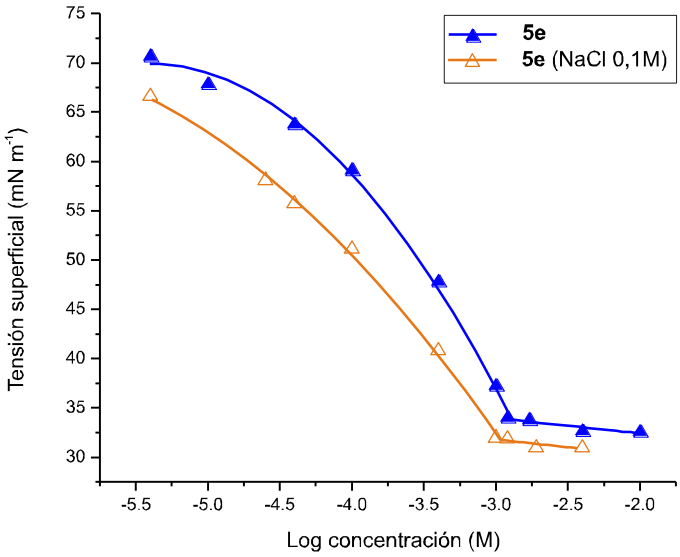


Figura 3.3. Tensión superficial *vs* logaritmo de la concentración para el compuesto **5e** en ausencia de NaCl y 0,1 M de NaCl.

La concentración en exceso de superficie Γ, en la interfaz aire-agua fue calculada aplicando la ecuación de la isoterma de adsorción de Gibbs (50, 51).

$$\Gamma = -\frac{1}{2{,}303RT}\frac{\partial\gamma}{\partial \log c}$$

donde γ es la tensión superficial; c es la concentración de la solución, mol L^{-1}; T es la temperatura absoluta; R la constante de los gases (8,3144 J mol^{-1} K^{-1}). En cuanto al área por molécula, *A*, en la interfaz, esta fue estimada a partir del correspondiente valor de Γ de acuerdo con la siguiente ecuación (50).

$$A = \frac{1}{N_A \Gamma}$$

donde N_A es el número de Avogadro.

En la Tabla 3.1 se resumen los valores de CMC, $C20$[5], γ_{CMC}, pC_{20}[6], CMC/C_{20}[7], Γ y *A*. Los valores de pC_{20} indican que los cinco compuestos gemini catiónicos son buenos surfactantes (**5a-f**). En el caso de **5f** significa que una reducción de la tensión superficial en 20 mN m^{-1} es lograda con un cambio de concentración de 6,0 x10^{-6} M. La superficie en exceso Γ y el área por molécula *A* mostraron variedad de valores para los compuestos de la serie catiónica. Efectivamente, el área por molécula en la interfaz aire/agua de la cabeza polar en los surfactante de la serie catiónica se encontró en un rango de entre 32,74 y 64,17 Å^2, mostrando un área por molécula más pequeña con el incremento del largo de la cola carbonada (**5a-5d**). Esto podría atribuirse a la flexibilidad del grupo espaciador y a las fuerzas intermoleculares de Van der Waals incrementadas con el largo de la cadena. Por otro lado, en concordancia con lo reportado en la bibliografía (33) se observó un incremento en el valor de la relación CMC/C_{20}, para el compuesto **5f** donde la cola hidrocarbonada fue reemplazada por

[5] C_{20} es la concentración de surfactante necesaria para reducir en 20 mN m^{-1} la tensión superficial del agua a 20 ºC.
[6] pC_{20} se define como $pC_{20} = -\log C_{20}$.
[7] CMC/C_{20} es una medida de los efectos de algunos de los factores de carácter estructural o microambiental sobre la formación de micelas y la adsorción en la interfase. Mide la tendencia de los tensoactivos a adsorberse a la interfase con respecto a la tendencia a formar micelas.

una cola fluorada. Este incremento significa que la formación de micelas en el compuesto fluorado está inhibida respecto de la adsorción a la interfase.

Tabla 3.1. Actividad de superficie y datos de agregación de los compuestos catiónicos sintetizados[a].

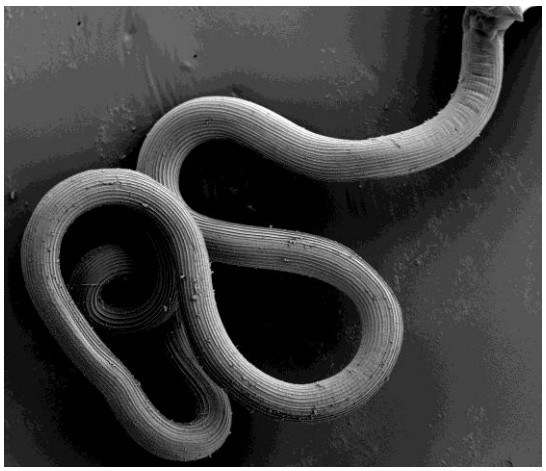
Compuestos	CMC x 10^3 (M)	C_{20} x 10^3 (M)	γ_{CMC} (mN m^{-1})	pC_{20}	CMC/C_{20}	Γ x 10^6 (mol m^{-2})	A x 10^{20} (m^2)
5a	3,61	0,568	38,98	3,24	6,35	2,62	63,27
5b	1,54	0,146	35,93	3,84	10,55	2,59	64,17
5c	0,38	0,038	34,61	4,42	10,00	2,87	57,82
5d	0,05	0,021	40,95	4,68	2,38	4,72	35,18
5e	1,30	0,262	33,78	3,58	4,96	5,07	32,74
5e (NaCl 0,1 M)	1,08	0,093	31,75	4,03	11,61	3,73	44,51
5f	0,10	0,006	27,34	5,18	16,67	3,60	46,12

[a] Condiciones experimentales: Temperatura 20 ± 0,5 ºC. Solución acuosa a pH=7. La incertidumbre experimental estimada sobre los valores de CMC ± 0,03x10^{-3} M y sobre los valores de γ_{CMC} ± 1 mN m^{-1}.

En conclusión podemos decir que dados los valores de CMC, C_{20}, γ_{CMC}, pC_{20}, CMC/C_{20}, Γ y A, la serie de compuestos catiónicos sintetizados presentó buenas propiedades activas de superficie y de agregación. De la serie, se destacan principalmente los gemini **5d** y **5f** que muestran valores de pC_{20} de 4,68 y 5,18 y valores de CMC de 5x10^{-5} M 1x10^{-4} M respectivamente.

CAPITULO 4

DETERMINACION DE LAS PROPIEDADES ANTIHELMINTICAS DE LOS GEMINI SINTETIZADOS



CAPITULO 4

4. DETERMINACION DE LAS PROPIEDADES ANTIHELMINTICAS DE LOS GEMINI SINTETIZADOS

4.1. PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL: *SCREENING*

Se realizaron pruebas *in vitro*, a modo de *screening* en el Instituto de Patobiología de la Estación Experimental del INTA de Castelar, provincia de Buenos Aires, bajo la supervición del Médico Veterinario Jorge Caracostantogolo. Se elaboraron protocolos de análisis para la puesta a punto de pruebas biológicas en parasitología animal para huevos y larvas de parásitos gastrointestinales de ovejas (52). De esta manera, se estudiaron los compuestos sintetizados y purificados en el laboratorio (**4a-c** y **5a-c**). Se realizaron dos tipos de ensayos para los que se utilizaron huevos indiferenciados y larvas de cepas de referencia de nematodes gastrointestinales de ovinos resistentes a Ivermectina como*: Haemonchus* spp, *Ostertagia* spp, *Trichostrongylus* spp y *Oesophagostomum* spp.

4.2. MATERIALES Y METODOS

4.2.1. Toma de muestra

La materia fecal de las ovejas infectadas con nematodes gastrointestinales resistentes a Ivermectina fue colectada del suelo, inmediatamente después de ser emitida, en una bolsa de polietileno que fue refrigerada y luego llevada al laboratorio donde fue procesada inmediatamente (14).

Figura 4.1. Toma de muestra de materia fecal para examen coprológico. Extraída de http://cnia.inta.gov.ar/helminto/index.htm.

4.2.2. Recuentos de huevos en materia fecal

Es un método cuantitativo que permite determinar la cantidad de huevos eliminados con la materia fecal. Para llevar a cabo esta metodología se empleó la cámara de Mc. Master (modificada por Roberts O´ Sullivan) que consta de 4 celdas de 1x2 cm de lado y 2,5 mm de espesor. Cada celda tiene 0,5 mL. La cara inferior de la tapa que cubre la cámara está dividida en franjas, cuyo ancho es abarcado por el campo de un microscopio común cuando se enfoca con el objetivo de 10X (14). Ver Figura 4.2.

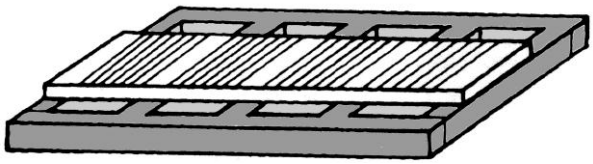


Figura 4.2. Cámara de Mc Master.

Se pesaron 5 gramos de materia fecal y se morterearon en una solución sobresaturada de cloruro de sodio. Luego se procedió a filtrar con un colador común, se llevó todo a un volumen de 100 mL y se agitó por 5 minutos con agitador magnético. Finalmente, con ayuda de una pipeta Pasteur se cargó la cámara de Mc. Master y se procedió a la lectura. Para realizar el cálculo de huevos por gramo (hpg) de materia fecal, se tomaron 2 mL de la suspensión de huevos y se llenaron las cuatro celdas contiguas de la cámara de Mc. Master. El número de huevos contados corresponden a 0,1 gramos de heces.

4.2.3. Aislamiento de los huevos

Una vez determinado el hpg en base al promedio del procesamiento de diez muestras, se procedió al aislamiento de los huevos siguiendo los siguientes pasos (14):

-Se pesaron 2 kg de materia fecal necesarios para obtener 2 x 10^5 huevos en un volumen final de 10 mL.

-Se adicionó abundante agua a la materia fecal para disgregarla y se la filtró a través de un colador común para eliminar la mayor cantidad de materia orgánica posible. Luego el filtrado se paso a través de diferentes tamices:

* 60 mesh (250 μm de apertura entre hilos)

* 80 mesh (177 μm de apertura entre hilos)

* 200 mesh (74 μm de apertura entre hilos)

* 500 mesh (25 μm de apertura entre hilos). Es aquí donde quedan retenidos los huevos.

-Se enjuagó el último tamiz y se colectó el líquido con los huevos en 4 tubos de centrífuga de 50 mL.

-Se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.

-Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 10 mL de una solución sobresaturada de azúcar a cada uno de los tubos y se agitaron de modo de romper el sedimento. Una vez roto el sedimento, se completó el volumen de los tubos con la solución sobresaturada de azúcar y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos.

-Se inyectó luego a cada tubo solución sobresaturada de azúcar de modo de formar un menisco de convexidad y sobre el menisco, se colocaron cubreobjetos que se dejaron reposar durante 15 minutos.

-Se enjuagaron los cubreobjetos y se colectó el líquido conteniendo los huevos en un tubo de centrífuga de 50 mL.

-Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos y se descartó parte del sobrenadante hasta alcanzar un volumen final de 10 mL.

Finalmente se contaron los huevos recolectados en 10 muestras de 40 μL, se calculó el promedio y se obtuvo la cantidad de huevos presentes en los 10 mL.

4.2.4. Cultivo de larvas de nematodes gastrointestinales. Técnica de Corticelli-Lai

El cultivo de larvas permite que los huevos de nematodes gastrointestinales eclosionen y desarrollen hasta larvas infectantes en condiciones adecuadas de humedad, temperatura y oxigenación.

El procedimiento consistió en el uso de dos cajas de Petri, una de ellas de tamaño ordinario (10 cm de diámetro) que contenía el material en cultivo y que fue colocada dentro de la otra de diámetro mayor (15 cm) con agua hasta una altura de 1 cm aproximadamente. A la caja en el interior no se le colocó la tapa y a la otra sí, de modo que se generó una cámara húmeda. El cultivo se colocó en una estufa al resguardo de la luz a una temperatura de entre 24-27 ºC durante 7-8 días. Es importante mencionar, que el cultivo fue destapado diariamente durante 1-2 horas para permitir su aireación. Terminado el tiempo de incubación, la caja conteniendo el cultivo se invirtió y se dejó en esta posición por aproximadamente 12 horas, tiempo en el cual la mayoría de las larvas del cultivo migran al agua. Finalmente se concentraron las larvas por centrifugación (12).

Figura 4.3. Técnica de Corticelli-Lai. Extraída de (13).

4.2.5. Compuestos

Se prepararon diluciones seriadas de cada uno de los compuestos a ensayar. En el caso de los compuestos de naturaleza catiónica (**5a-c**) las soluciones se realizaron en agua destilada, mientras que para los compuestos diméricos no cargados (**4a-c**), las soluciones consistieron en una mezcla de 2-pirrolidona, propilenglicol y agua destilada para lograr su solubilización.

Se utilizaron dos controles, uno realizado con agua destilada y el otro con la mezcla de 2-pirrolidona, propilenglicol y agua destilada.

4.2.6. Huevos y larvas infectantes

Se utilizaron para los ensayos huevos indiferenciados y larvas infectantes de nematodes gastrointestinales de oveja (infección mixta) resistentes a Ivermectina, provistos por el Instituto de Patobiología del INTA de Castelar. Los géneros involucrados en los ensayados fueron*:* *Haemonchus* spp, *Ostertagia* spp, *Trichostrongylus* spp y *Oesophagostomum* spp.

4.2.7. Prueba de eclosión de huevos con nematodes gastrointestinales de oveja

La prueba consistió en incubar una suspensión de huevos indiferenciados con las soluciones seriadas de los compuestos a ensayar durante 48 horas a 26 ºC (ver Tabla 4.1).

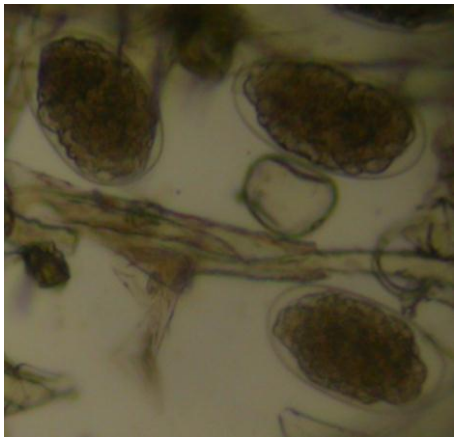


Figura 4.4. Fotografía. Huevos de nematodes de ovinos.

4.2.8. Prueba biológica con L3 de nematodes gastrointestinales

La prueba consistió en poner en contacto las L3 infectantes con las diferentes concentraciones de los gemini durante 24 horas y a la temperatura de 26 ºC (ver Tabla 4.2).

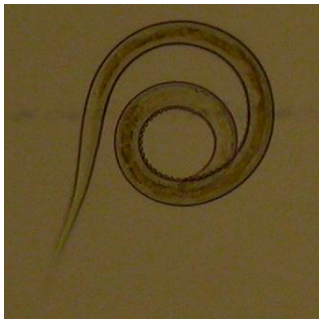


Figura 4.5. Fotografía de larva L3 infectante.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 4.1 se resumen los resultados obtenidos sobre huevos de nematodes gastrointestinales resistentes a Ivermectina.

Tabla 4.1. Prueba con huevos de nematodes gastrointestinales de oveja resistentes a Ivermectina[a]

Compuestos		Concentración en ppm ($\mu g\ mL^{-1}$)										
		100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
Gemini no iónicos	**4a**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	4c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Gemini catiónicos	**5a**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5b	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	5c	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

[a] (+) indica compuesto activo frente a huevos de nematodes y (-) ausencia de actividad.

Los resultados obtenidos fueron alentadores para la mayoría de los compuestos ensayados. Estos datos revelan que todas las moléculas presentaron, a diferentes

concentraciones, acción ovicida. El compuesto **4a** fue activo sólo hasta una concentración de 300 ppm (dato no mostrado), mientras que **4b** y **4c** fueron muchos más efectivos alcanzando concentraciones inhibitorias de hasta 20 ppm.

Los gemini de naturaleza catiónica (**5b-c**) tuvieron también un excelente desempeño donde los mejores resultados se obtuvieron nuevamente con las moléculas que presentaban una longitud de cadena de 12 (**5b**) y 18 (**5c**) átomos de carbono, respectivamente. El compuesto **5c** resulto ser el más efectivo alcanzando una concentración activa de 10 ppm.

La Tabla 4.2 resume los resultados obtenidos sobre larvas infectantes resistentes a Ivermectinas.

Tabla 4.2. Prueba con larvas infectantes de nematodes gastrointestinales de oveja resistentes a Ivermectina[a]

Compuestos		Concentraciones en ppm ($\mu g\ mL^{-1}$)										
		1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0
Gemini no iónicos	**4a**	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	4b	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4c	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Gemini catiónicos	**5a**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[a] (+) indica compuesto activo frente a larvas infectantes de nematodes y (-) ausencia de actividad.

Se observa que todos los compuestos no cargados (**4a-c**) tuvieron efectos larvicidas, siendo **4b** el que presentó mejor desempeño con actividad hasta 500 ppm. Por otro lado, los productos **4a** y **4c** dieron resultados positivos hasta 700 ppm. Finalmente las moléculas con carga positiva no fueron activas frente a las L3 aún a 1000 ppm.

Estos ensayos preliminares, nos permitieron seleccionar los gemini de mejor desempeño y establecer la importancia no sólo de la naturaleza de la molécula (catiónica y no iónica), sino también del largo de la cola hidrocarbonada. En esta dirección los candidatos seleccionados fueron los compuestos **4b**, **4c**, **5b** y **5c**.

4.4. SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL

De manera complementaria con el INTA de Castelar otros ensayos se realizaron en la Facultad de Ciencias Veterinarias de Casilda (Universidad Nacional de Rosario) bajo la supervisión del Dr. Claudio Giudici. En esta segunda etapa, con motivo de mejorar los resultados obtenidos en Castelar, se ajustó el ensayo de movilidad *in vitro* de una manera más rigurosa. Se dispone para las pruebas de una única cepa denominada *Heligmosomoides polygyrus bakeri* un nematode gastrointestinal de ratón utilizado comúnmente como modelo experimental (53-56). Cabe aclarar que para llevar a cabo la prueba de movilidad con nematodes adultos se utilizaron únicamente los compuestos diméricos de naturaleza catiónica **5b-f** debido a que son los únicos solubles en agua y por ende en la solución isotónica necesaria para mantener las larvas activas. Los resultados obtenidos con esta prueba mostraron ser confiables y reproducibles.

4.5. CARACTERISTICAS GENERALES DEL MODELO EXPERIMENTAL: *Heligmosomoides polygyrus*

H. polygyrus es un nematodo gastrointestinal que habita en el intestino delgado de ratones. Son de un color rojo brillante, debido a la pigmentación de sus tejidos y miden entre 5-20 mm de longitud. Por lo general son muy enrollados y las hembras poseen entre 12-15 bobinas y los machos entre 8-12. El macho puede distinguirse fácilmente de la hembra por la presencia de la bolsa copuladora y por dos largas y delgadas espículas en el extremo posterior.

El ciclo de vida es directo (Figura 4.6). Los huevos pasan al medioambiente con las heces de los roedores y luego de 24-36 h eclosionan para formar las L1 que miden aproximadamente 300 µm de longitud. Las larvas mudan días más tarde hasta convertirse en larvas infecciosas ó L3, en ese momento son consumidas por el hospedador y en virtud de días se transforman en adultos que emergen en la luz del duodeno donde se alimentan del contenido intestinal. Tras la cópula, las hembras comienzan a poner huevos cerrando de este modo el ciclo completo que dura un mínimo de 15 días (56).

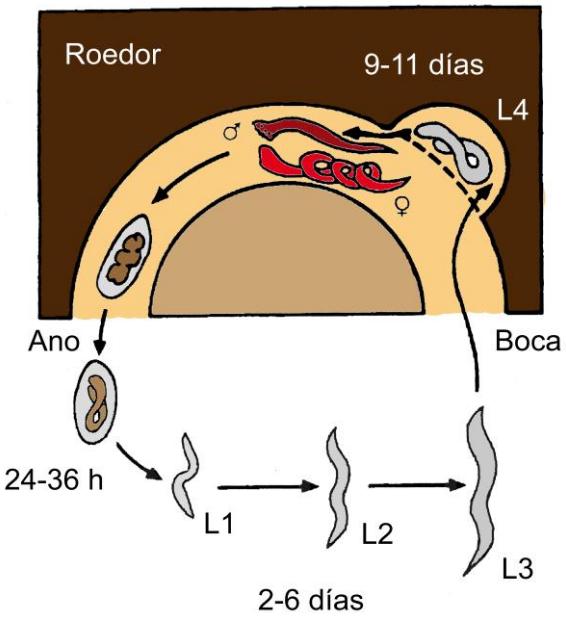


Figura 4.6. Ciclo biológico de vida de *Heligmosomoides polygyrus*. Extraída y modificada de (56).

H. polygyrus fue introducido como un modelo de infección experimental en ratones de laboratorio en 1943 y ahora es ampliamente utilizado para estudios inmunológicos e inmunogenéticos del hospedador, toxicológicos, farmacológicos y de epidemiología del parasitismo gastrointestinal. En este modelo, se encuentran presentes todos los elementos para examinar la susceptibilidad a la infección y la adquisición de resistencia, permitiendo el análisis tanto de los eventos inmunológicos post infección como de los antígenos del parásito involucrados en desencadenar/modular la respuesta inmune del hospedador. Este sistema de laboratorio nematodo/ratón ha sido propuesto como modelo de la anquilostomiasis[8] en humanos e infecciones de nematodes de importancia agrícola y veterinaria (56).

4.6. MATERIALES Y METODOS

4.6.1. Animales experimentales

Se utilizaron 2 ratones (*Mus musculus*) machos de 10 semanas de edad de la cepa C57 Black, los que fueron mantenidos en una jaula estándar, bajo condiciones de temperatura constante, 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Una semana antes de la infección con *H. polygyrus bakeri*, previo a la experiencia, los ratones fueron desparasitados con fenbenzazol en el alimento determinándose, en ambos animales, la ausencia de helmintos por medio de exámenes coproparasitológicos. La dieta de los mismos fue alimento granulado con nivel proteico de mantenimiento. La comida y el agua se administraron ad limitum.

4.6.2. Infección experimental y recuperación de los nematodes

Las larvas utilizadas en la infección experimental, provenían de un cultivo de huevos de *H*. *polygyrus bakeri*, una cepa de laboratorio. Las mismas fueron cultivadas sobre papel de filtro en una placa de Petri de 9 cm de diámetro durante 15 días a una temperatura de entre 20 y 22 ºC. Finalizado este período, se obtuvieron y contaron las larvas infectivas por medio de la técnica de Baerman. Los ratones se infectaron 3 semanas antes de la experiencia, con 150 larvas cada uno de *H*. *polygyrus bakeri* suspendidas en 0,1 mL de agua destilada.

4.6.3. Compuestos

Las soluciones de cada uno de los cinco compuestos a ensayar (**5b-f**) fueron preparadas a partir de la disolución del compuesto dimérico en buffer Hanks´ pH= 7,4 (ver composición en el Anexo II). Cada compuesto fue ensayado a cuatro concentraciones diferentes 500, 100, 50 y 10 ppm.

4.6.4. Prueba de movilidad *in vitro* con nematodes adultos

A los 21 días post infección, los ratones fueron sacrificados mediante anestesia inhalatoria. Luego se procedió a realizar la necropsia parasitológica a partir de la cual se extrajo el intestino delgado desde el cual se recuperaron todos los nematodes presentes en el primer tercio del intestino, en una placa de Petri y solución isotónica de Hanks´ (pH= 7,4) en estufa a 37 ºC durante 15 minutos (Figura 4.7).

[8] Enfermedad producida por el anquilostoma *Acylostoma duodenale* que es un nematodo, parásito de los seres humanos. La misma se caracteriza por la aparición de variados trastornos gastrointestinales y por una gran disminución del número de glóbulos rojos en la sangre del paciente.

Figura 4.7. Necropsia. Extracción de la porción del intestino donde se hallan los nematodes adultos de *Heligmosomoides polygyrus bakeri*.

Una vez obtenidos los gusanos adultos, estos fueron suavemente levantados con pincel, bajo lupa estereomicroscópica, y colocados en pocillos de 2 cm de alto por 1 cm de diámetro conteniendo solución isotónica de Hanks´ para los controles y solución isotónica de Hanks´ más compuesto para los tratados. Se utilizaron dos ejemplares de *H. polygyrus bakeri,* un macho y una hembra, que fueron ensayados por separados y todos los datos fueron tomados por triplicado (Figura 4.8). La evaluación de la movilidad se realizó por observación bajo lupa esteromicroscópica, estableciéndose una escala de movilidad de 0 a 5 donde 0 es ausencia absoluta de movilidad y 5 el máximo de movilidad respectivamente. Los pocillos fueron incubados a 37 ºC y la observación se realizó cada 15 minutos por un período de dos horas.

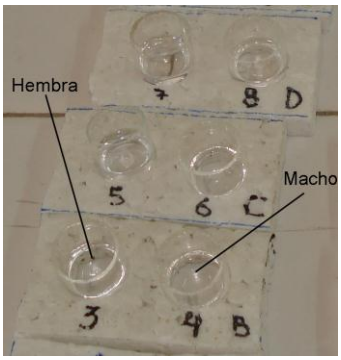


Figura 4.8. Pocillos de incubación.

4.6.5. Microscopía electrónica

Las muestras en glutaraldehído 2,5% (en buffer fosfato de Sorensen 0,1 M; ver Anexo II) de hembras y machos controles y tratados, se lavaron con alcohol al 50% y buffer (GA 2,5%) respectivamente. Luego, se secaron a punto crítico en un equipo Polaron y finalmente, se las recubrió con oro en un sputter coater marca Pelco 91000. Las fotografías se adquirieron en un microscopio de barrido marca LEO modelo EVO40 Vp a 5KV.

4.6.6. Estadística

Los datos obtenidos del ensayo de movilidad *in vitro* fueron analizados utilizando Statgraphics Plus 5.1. Se realizó un análisis ANOVA factorial donde se seteó la movilidad como variable dependiente y la concentración, el tipo de compuesto, el sexo y el tiempo como factores.

4.7. RESULTADOS Y DISCUSION

Del ensayo de movilidad *in vitro*, realizado para los cinco compuestos catiónicos ensayados (**5b-f**), se obtuvieron 1200 datos, los cuales fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1. Se realizó un ANOVA factorial (análisis de variancia) donde la variable respuesta, movilidad, se contrastó contra los factores sexo del parásito, tipo de compuesto y concentración de la solución del mismo utilizada para el tratamiento y tiempo de incubación. Cabe aclarar que todas las pruebas se realizaron con un nivel de confianza del 95%. De este primer análisis se demostró que el sexo del parásito no tiene una influencia estadísticamente significativa sobre la movilidad del nematode (valor p= 0,8696, ver Anexo II). Por otra parte, se demostró que tanto la concentración, el tipo de compuesto y el tiempo de incubación son factores con un efecto estadísticamente significativo sobre la movilidad (valores $p < 0,05$).

Debido a que los compuestos gemini **5d** y **5f** no mostraron actividad frente a *H. polygyrus bakeri* ya que mostraban un comportamiento muy variable, los mismos fueron eliminados del análisis estadístico y este último se continuó con los datos obtenidos para los tres compuestos que si mostraron actividad frente a *H. polygyrus bakeri.*

Para los tres compuestos de la serie catiónica (**5b**, **5c** y **5e**) que mostraron apreciable actividad *in vitro* sobre los nematodes adultos de *H. polygyrus bakeri* (720 datos, ver anexo II) se realizó el análisis de variancia factorial incluyendo además las interacciones entre los factores. Como en el análisis anterior los factores que influyeron significativamente sobre la movilidad del parásito fueron la concentración, el tipo de compuesto y el tiempo de incubación (valores $p < 0,05$). Por otro parte, el factor

sexo no fue significativo como tampoco lo fueron las interacciones que lo involucraban con los demás factores (valores p > 0,05). Ver Anexo II.

Se realizó además para los tres compuestos un método de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. El método de Tukey (HSD) arrojó como resultado un grupo homogéneo en cuanto al sexo del nematode y dos grupos homogéneos teniendo en cuenta los diferentes compuestos, de lo cual se concluyó que el compuesto gemini de 12 carbonos saturado (**5b**) es el que presenta mejor desempeño y que los productos **5c** y **5e** son equivalentes en cuanto a su actividad biológica (Figura 4.9). A raíz de estos hechos cabe destacar que los compuestos activos **5b** y **5c** no son sólo los más económicos y sencillos de sintetizar, sino que también son los que presentan mayores rendimientos. Ver Capítulo 2.

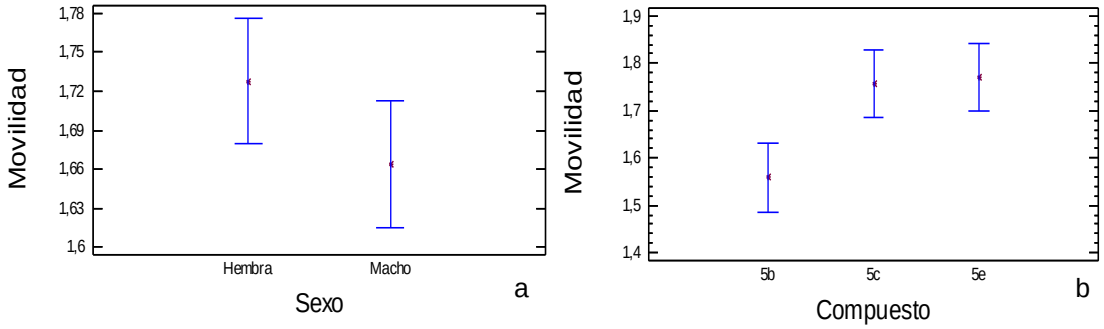


Figura 4.9. Método de Tukey. Medias e intervalos de confianza del 95% para la movilidad de *H. polygyrus bakeri* en función del sexo del parásito (a) y del tipo de compuesto (b).

En la Figura 4.10 se presentan las gráficas de movilidad en función del tiempo para el control y las cuatro concentraciones de los tres compuestos que mostraron actividad (**5b**, **5c** y **5e**). En las gráficas los datos obtenidos de nematodes machos y hembras fueron combinados debido a que como se mencionó anteriormente, el factor sexo sobre la movilidad no resulto significativo (p > 0,05). En las mismas, puede verse claramente que para las concentraciones de 500, 100 y 50 ppm hay un decaimiento apreciable de la movilidad en un corto periodo de tiempo, principalmente en las fracciones más concentradas. En ninguno de los casos se encontró actividad a la concentración de 10 ppm durante el período de incubación, obteniéndose valores de movilidad muy variables. Por su parte, el control se mantuvo siempre con un alto grado de movilidad a lo largo del tiempo.

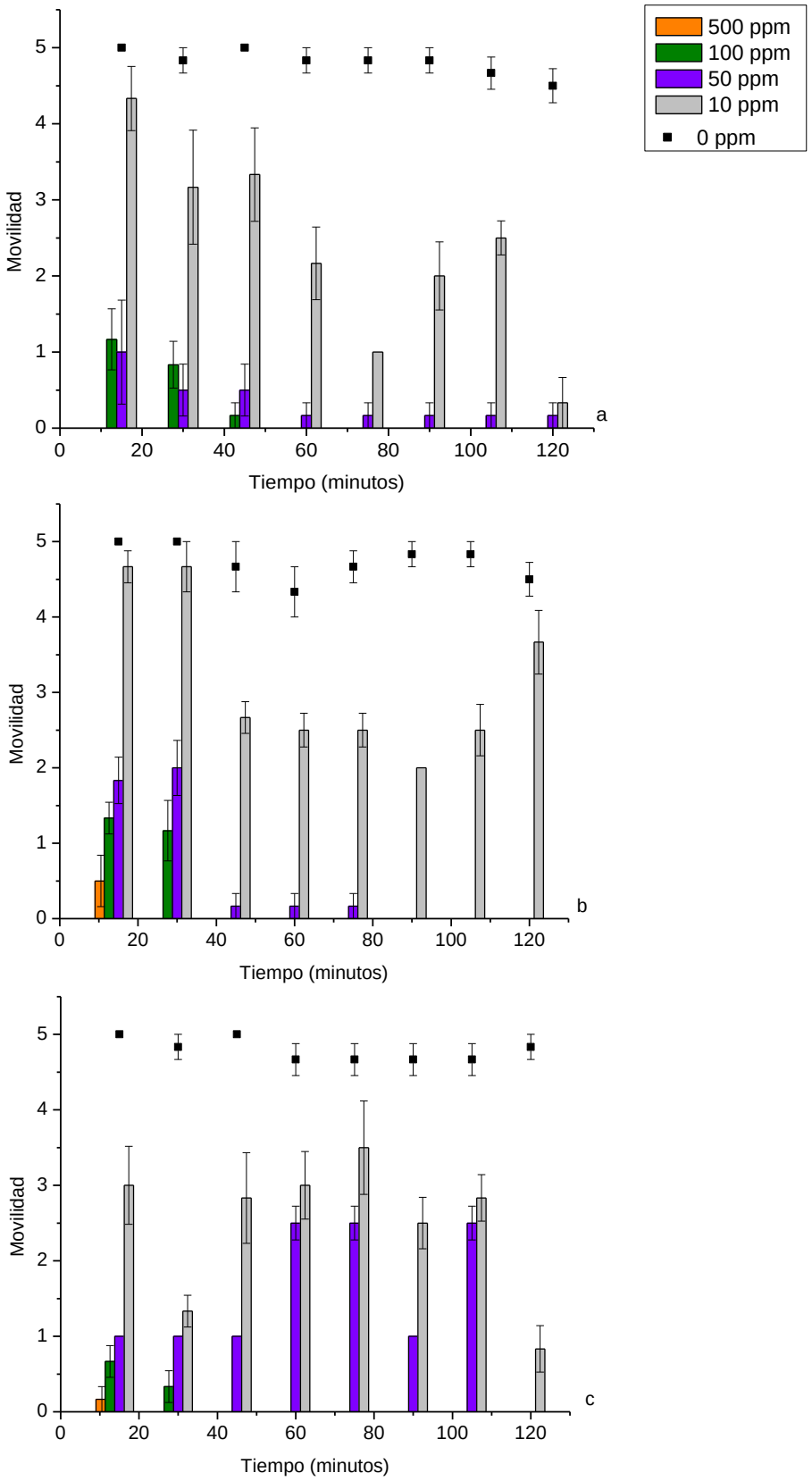


Figura 4.10. Efecto de los compuestos gemini **5b** (a) **5c** (b) y **5e** (c) sobre la movilidad del nematode adulto *H. polygyrus bakeri in vitro*. Los datos obtenidos de nematodes machos y hembras fueron combinados debido a que el factor sexo sobre la movilidad no resulto significativo ($p > 0,05$). Además, se representa el error estándar para los grupos tratados y el control (0 ppm).

Con el fin de determinar la concentración óptima y el tiempo de incubación necesarios para obtener los mejores resultados de actividad biológica, se realizó nuevamente el test de Tukey para cada uno de los gemini activos. De este modo, se determinó que para **5b** las concentraciones de 500, 100 y 50 ppm constituyeron un grupo homogéneo, al igual que los tiempos 60, 75, 90, 105 y 120 minutos (Figura 4.11). Por lo tanto se recomienda la utilización del compuesto **5b** a una concentración de 50 ppm por 60 minutos. Al mismo tiempo se realizó este último análisis para los otros dos compuestos que presentaron actividad biológica. Los valores óptimos de concentración y tiempo de incubación obtenidos fueron de 100 ppm y 45 minutos para el compuesto **5c**, y de 100 ppm y 120 minutos para el compuesto **5e** (ver Anexo II).

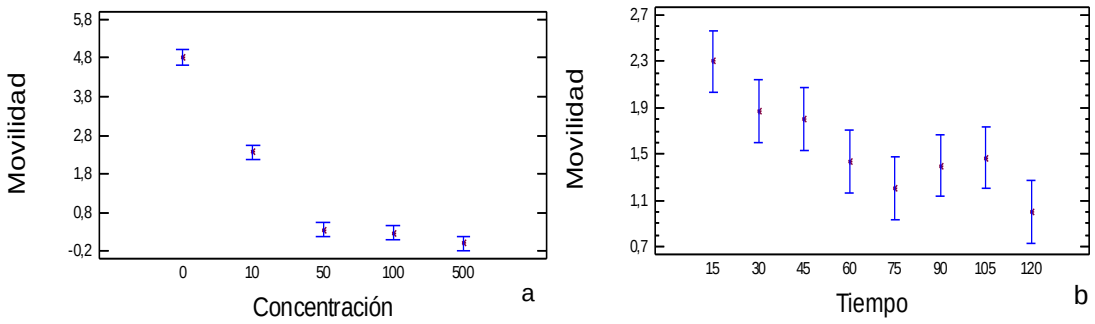


Figura 4.11. Método de Tukey. Medias e intervalos de confianza del 95% para la movilidad de *H. p. bakeri* en función de la concentración en ppm (a) y en función del tiempo en minutos (b) para el compuesto **5b**.

En la Figura 4.12 se muestra una fotografía de una hembra y un macho de *H. polygyrus bakeri* luego del tratamiento con el compuesto **5b** a 500 ppm por 30 minutos. Si bien los nematodes resultaron estar muertos luego del tiempo de exposición al compuesto gemini, no se apreció el daño a nivel externo con la lupa estereomicroscópica.

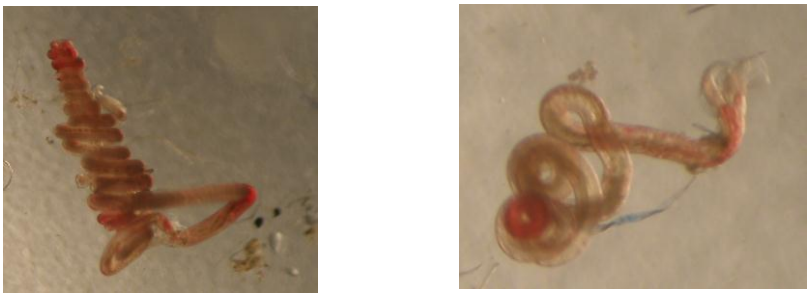


Figura 4.12. Fotografía de una hembra y un macho adultos de *H. polygyrus bakeri* tratados con **5b** a 500 ppm, 30 minutos.

Para determinar si los compuestos gemini ensayados que mostraron tener actividad biológica actuaban a nivel de la cutícula del nematode o a nivel interno, se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para el grupo control y tratado (Figura 4.13).

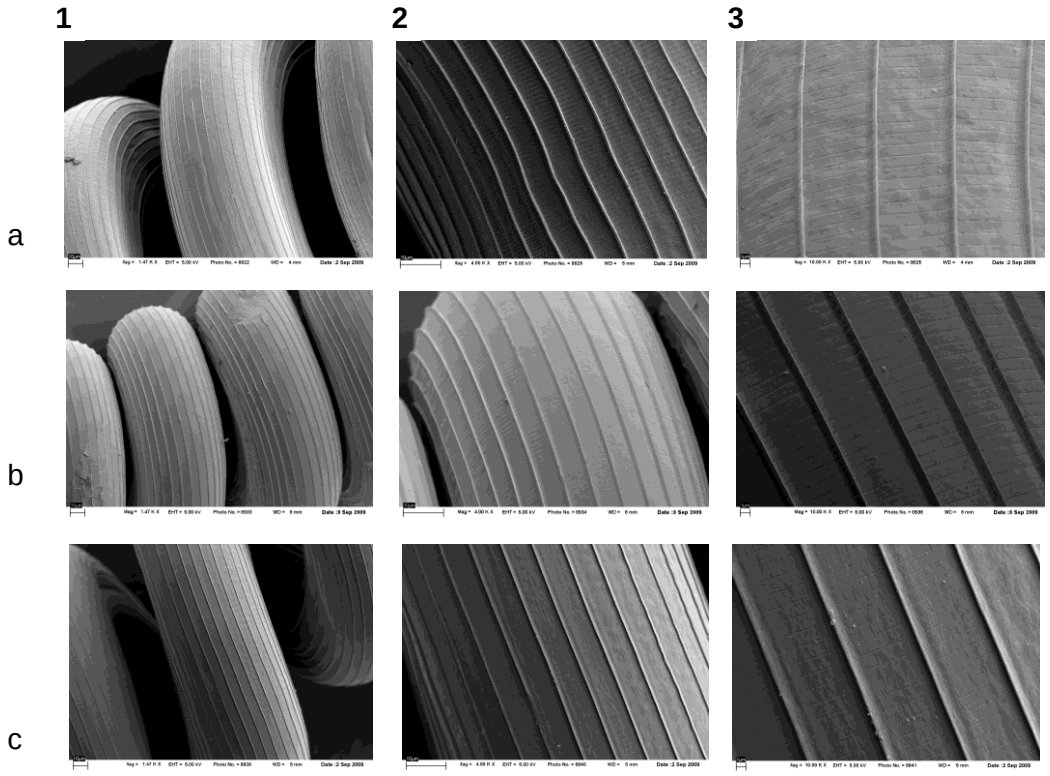


Figura 4.13. Microscopía electrónica de barrido del nematode adulto *Heligmosomoides polygyrus bakeri* expuesto a los compuestos gemini **5b** y **5e** *in vitro*. Control en buffer Hanks´ (a). Nematode tratado con el compuesto **5b** a 500 ppm a los 30 minutos de incubación (b). Nematode tratado con el compuesto **5e** a 500 ppm a los 30 minutos de incubación (c). En **1** Mag= 1,47 kx; en **2** Mag= 4,00 kx y en **3** Mag= 10 kx.

En las micrografías se puede ver fácilmente que no existe daño a nivel de la cutícula del nematode a diferencia de lo reportado en la bibliografía (5, 52, 53) donde se ensayan algunas enzimas proteolícas provenientes de algunas frutas y del látex de algunas plantas. Estos resultados sugieren que el mecanismo de acción de los gemini ensayados no está dado a nivel de superficie en la cutícula del parásito. Aparentemente, las moléculas activas penetrarían la cutícula ejerciendo su acción a nivel interno.

En conclusión, de la serie de 5 compuestos catiónicos ensayados, tres mostraron tener excelente actividad antihelmíntica *in vitro* a diferentes concentraciones. El compuesto **5b** fue el de mejor desempeño optimizándose su utilización a una concentración mínima de 50 ppm y 60 minutos de incubación. En cuanto al mecanismo de acción de los compuestos gemini ensayados, si bien podemos decir feacientemente que no está dado por un daño a nivel de la superficie externa del parásito, se necesitan estudios a nivel bioquímico-molecular mucho más profundos, costosos y complejos para determinarlo. Dichos estudios, incluyen el estudio de los cambios celulares que afectan la capacidad de la droga para acumularse intracelularmente, la identificación de receptores celulares para la droga, el estudio de las alteraciones de sistemas enzimáticos y/o alteraciones de receptores celulares, entre otros. Cabe aclarar que este tipo de estudios escapan a los objetivos planteados en esta tesis.

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

CAPITULO 5

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo están fundamentadas sobre la base de los objetivos planteados y los resultados experimentales obtenidos. De manera particular, en esta tesis se abarcaron estudios en distintos campos como a) la química orgánica, en sus aspectos sintéticos teóricos; b) la fisicoquímica, en lo que respecta a estudios de tensión superficial y concentraciones micelares críticas; y c) biológicos, mediante pruebas de desempeño *in vitro* de los gemini obtenidos por síntesis frente a parásitos gastrointestinales.

Se generaron mediante síntesis química una serie de compuestos anfipáticos tipo gemini de naturaleza no iónica y catiónica en tres pasos de síntesis. El primer paso consistió en la protección regioselectiva del pentaeritritol, un tetraol barato y de fácil provisión, con ciclohexanona cuyo rendimiento alcanzó el 90%. Este procedimiento permitió controlar las sucesivas etapas de síntesis evitando la formación de subproductos difíciles de aislar y la disminución del rendimiento global del proceso de síntesis. En el segundo paso de reacción, la obtención del éter diglicidílico (intermediario de síntesis) mediante catálisis por transferencia de fases (CTF) sólido-líquido a partir del pentaeritritol protegido y (±)-epiclorhidrina alcanzó un rendimiento del 92% y resultó clave para la posterior preparación de los nuevos surfactantes gemini posibilitando el control de la regioquímica de las reacciones. La importancia de la CTF radica en que brinda ventajas tecnológicas tales como tiempos más cortos y temperaturas más bajas de reacción, altos rendimientos, selectividad y purificaciones sencillas consistentes en simples filtraciones cromatográficas. En el último paso de reacción, la hidrofobización del éter diglicidílico con aminas grasas primarias y *N,N*-dimetiladas con diferentes longitudes de cadena, grados de instauración y cadenas fluoradas dió lugar a los compuestos no iónicos (**4a-c**) y catiónicos (**5a-f**) respectivamente con buenos rendimientos. Para los compuestos gemini no iónicos los rendimientos fueron de 55, 65 y 51% respectivamente. En el caso de los compuestos de naturaleza cationica, los rendimientos obtenidos fueron de 95, 97, 61, 46, 47 y 95% respectivamente.

En la serie catiónica de compuestos, los valores de CMC, C_{20}, γ_{CMC}, pC_{20}, CMC/C_{20}, Γ y A, indican que los cinco compuestos gemini evaluados son buenos surfactantes, entre los que se destacan los gemini **5d** y **5f** que muestran valores de pC_{20} de 4,68 y 5,18 y valores de CMC de $5x10^{-5}$ M y $1x10^{-4}$ M respectivamente. Los compuestos neutros **4a-c** presentan baja solubilidad en medio acuoso lo que imposibilita la determinación de sus propiedades tensoactivas y de agregación.

Se desarrolló un método estandarizado *in vitro* para la evaluación de nuevas drogas de naturaleza anfipática potencialmente activas contra helmintos y los resultados obtenidos con esta prueba mostraron ser confiables y reproducibles. De la serie de 5 compuestos catiónicos ensayados (**5b-f**), tres de ellos (**5b**, **5c** y **5e**) mostraron tener excelente actividad antihelmíntica *in vitro* a diferentes concentraciones. El compuesto gemini **5b** es el que presenta el mejor desempeño como agente antihelmíntico, optimizándose su utilización a una concentración mínima de 50 ppm y 60 minutos de incubación. Las observaciones por microscopía electrónica de barrido sugieren que el mecanismo de acción de éste compuesto no estaría dado a nivel de la cutícula del parásito, ya que no se observó daño en la superficie externa de la misma. Aparentemente, el compuesto ingresaría al interior del parásito por un mecanismo no determinado causando allí su efecto.

Finalmente, el compuesto denominado **5b** es el que presenta las mayores ventajas a nivel tecnológico, ya que es un producto económico, de fácil obtención (síntesis en pocos pasos) y con un elevado rendimiento (97%). Desde el punto de vista

biológico, es el gemini con mayor potencial de la serie como agente antibacteriano, antifúngico y antihelmíntico *in vitro* (ver anexo I). En vista de estos resultados se recomienda continuar con los estudios necesarios (pruebas toxicológicas, ensayos *in vivo*, pruebas a campo, etc.) para poder proponer este último compuesto como una alternativa para el control de nematodes que afectan la sanidad de los animales de producción, aportando una solución en materia de manejo de la resistencia antihelmíntica en favor de la producción pecuaria argentina.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1-Cordero del Campillo M, Rojo Vázquez F.A. (1999). *Parasitología Veterinaria*. Editorial Mc Graw-Hill. Interamericana.

2-Soulsby E.J.L. (1986). *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. Editorial Interamericana.

3-Anziani O., Fiel C. (2004). *Resistencia de los nematodes gastrointestinales a los antihelmínticos: un problema emergente y relevante para la producción bovina nacional*. Editorial Universidad Católica de Córdoba. Documento de trabajo 1-19.

4-Botana L. M., London F., Martín-Jiménez T. (2002). *Farmacología y terapéutica veterinaria*. Editorial Mc Graw-Hill. Interamericana**.**

5-Behnke J.M., Buttle D.J., Stepek G., Lowe A., Duce I.R. (2008). *Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases*. Review. Parasites *&* Vectors. Biomed central 1-18.

6-Fiel C., Anziani O., Suárez V., Vázquez R., Eddi C., Romero C., Caracostantógolo J., Saumell C., Mejía M., Costa J., Steffan P. (2001). *Resistencia antihelmíntica en bovinos: causas, diagnóstico y profilaxis*. INTA Rafaela. Producción Animal. http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/anuario2001/a2001_63.htm

7-Anziani O., Zimmermann G., Guglielmone A., Vázquez R., Suárez V. (2000). *Resistencia a las ivermectinas de bovinos parasitados por Cooperia spp*. Comunicación preliminar. Veterinaria Argentina 164: 280-281.

8-Mejia M.E., Fernandez Igartúa B. M, Schmidt E.E., Cabaret J. (2003). *Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodos in a farm in Argentina: the begining of high resistance*. Veterinary Research. 34: 461-467.

9-Anziani O., Fiel C. (2004). *Estado actual de la resistencia antihelmíntica (nematodos gastrointestinales) en bovinos de la Argentina*. Veterinaria Argentina 21: 86-101.

10-Waller P.J. (2003). *Global perspectivas on nematode parasite control in ruminant livestock: the need to adopt alternatives to chemotherapy, with emphasis on biological control*. Animal Health Research. Review 4: 35-43.

11-Lara Márquez D. (2003). *Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control*. Revista Corpoica. Artículo de revisión **4** (1): 55-71.

12-Thienpont D., Rochette F., Vanparijs O.F.J. (1989). *Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico*. Janssen Pharmaceutica.

13-Niec R. (2006). *Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino.* FAO-Red de helmintología para América latina y el Caribe. http://cnia.inta.gov.ar/helminto/niec/niec1.htm

14-Alvarez L., Mottier L., Lanusse C. (2006). *Drug transfer into target helminth parasites*. Trends in Parasitology 23 (3) 97-104.

15-Mottier L., Lanusse C. (2002). *Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos*. ww1.inta.gov.ar/producto/helminto/pdf%20resistencia/mottier2.pdf

16-Gill J.H., Lacey E. (1998). *Avermectin/milbemycin resistente in trichostrongyloid nematodos*. International Journal for Parasitology 28: 863-877.

17-Menger F.M., Littau C.A. (1991). *Gemini surfactants: Syntesis and properties*. Journal of the American Chemical Society 113: 1451-1452.

18-Menger F.M., Keiper J. (2000). *Gemini surfactants*. Angewandte Chemie International Edition 39: 1906-1920.

19-Murguía M.C., Vaillard S., Grau R.J. (2001). *A facile, selective preparation of monoacetals from pentaerythritol and ketones*. Synthesis 7: 1093-1097.

20-Murguía M.C., Grau R.J. (2001). *Synthesis of new pentaerythritol-based gemini surfactants*. Synlett 8: 1229-1232.

21-Murguía M.C., Cabrera M.I., Grau R.J. (2002). *Selective preparation of key intermediates for the synthesis of gemini surfactants by phase-transfer catalysis*. Reaction Kinetics & Catalysis Letters 75 (2), 205-211.

22-Murguía M.C., Cabrera M.I., Grau R.J. (2006). *Método para la preparación de surfactantes polianiónicos multiarmados a partir de monoacetales del pentaeritritol por catálisis de transferencia de fases y posterior hidrofobización seguida de sulfonación*. Patente de Invención, INPI. Acta Nº P 05 01 01059. Boletín de Patentes 350: 46-47.

23-Ricci C.G., Cabrera M.I., Luna J.A., Grau R.J. (2002). *A convenient synthesis of quaternary ammonium gemini surfactants from Long-chain alkyldimethylamines and Epichlorohydrin*. Synlett 11: 1811-1814.

24-Ricci C.G., Cabrera M.I., Luna J.A., Grau R.J. (2004). *Preparación de sales de bis-amonio cuaternarias en medio microemulsión y/o micelar acuoso*. Patente de Invención, INPI. Acta Nº P 02 01 01012. Boletín de patentes 209: 15-16.

25-Ricci C.G., Cabrera M.I., Luna J.A. Grau R.J. (2003). *Micellar-improved synthesis of bis-quaternary ammonium salts by the epichlorohydrin route*. Journal Surfactants and Detergents 6 (3): 231-237.

26-Murguía M.C., Cristaldi M.D., Porto A., Di Conza J. Grau R. (2008). *Synthesis, surface-active properties and antimicrobial activities of new neutral and cationic trimeric surfactants.* Journal of Surfactants and detergents 11 (1): 41-48.

27-Murguía M.C., Vaillard V.A., Sánchez V.G., Di Conza J., Grau R.J. (2008). *Synthesis, surface-active properties, and antimicrobial activities of new double-chain gemini surfactants*. Journal of Oleo Science. 57 (5): 301-308.

28-Sangster N.C., Gill J. (1999). *Pharmacology of anthelmintic resistence*. Parasitology Today 15: 141-146.

29-Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J. (1992). *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodos of veterinary importance*. Veterinary Parasitology 44: 35-44.

30-Cutullé C., Eddi C., Caracostantógolo J., Castaño Zubieta R., Schapiro J. *Métodos in vitro para el diagnóstico de resistencia antihelmíntica*. Veterinaria Argentina. 16 (157): 514-521.

31-Padilha T. (1999). *Biological control*. International Journal for Parasitology 29: 153-154.

32-Menger F.M., Mbadugha B.N.A. (2001). *Gemini surfactants with a disaccharide spacer*. Journal of the American Chemical Society 123: 875-885.

33-Rosen M.J. (2004). *Surfactants and interfacial phenomena*. Editorial. John Wiley & Sons. New York.

34-Zhu Y.P., Masuyama A., Kirito Y., Okahara M., Rosen M.J. (1992). *Preparation and properties of glycerol based double or triple chain surfactants with two hydrophilic ionic groups*. Journal of the American Oil Chemists´Society 69 (7): 626-632.

35-Murguía M.C. (2001). *Empleo de catalizadores de transferencia de fases para la obtención de nuevas moléculas surfactantes*. Tesis doctoral.

36-Pestman M. (1997). *Carbohydrate-derived surfactants containing an N-acylated amine functionality. Fundamental aspects and practical applications*. Langmuir.13. American Chemical Society.

37-Bertho J.N., Coué A., Ewing D., Goodby J.W., Letellier P., Mackenzie G., Plusquellec D. (1997). *Novel sugar bola-amphiphiles with a pseudo macrocyclic structure*. Carbohydrate Research 300: 341-346.

38-Satgé C., Granet R., Verneuil B., Champavier Y., Krausz P. (2004). *Synthesis and properties of new bolaform and macrocyclic galactose-based surfactants obtained by olefin metathesis*. Carbohydrate Research 339: 243-1254.

39-Schuur B., Wagenaar A., Heeres A., Heeres E. (2004). *A synthetic strategy for novel nonsymmetrical bola amphiphiles based on carbohydrates*. Carbohydrate Research 339: 1147-1153.

40-Menger F.M., Littau C.A. (1993). *Gemini surfactants: a new class of self-assembling molecules*. Journal of the American Chemical Society 115 (22): 10083-10090.

41-Bell P.C, Bergsma M., Dolonya I.P., Bras W., Stuart M.C.A. Rowan, A.E.; Feiters, M.C.; Engberts, J.B.F.N. (2002). *Transfection mediated by gemini surfactants: engineered escape from the endosomal comparment*. Journal of the American Chemical Society. 125: 1551-1558.

42-Kirby A., Camilleri P., Engberts J., Feiters M., Nolte R., Söderman O., Bergsma M., Bell P., Fielden M., García Rodríguez C., Guédat P., Kremer A., McGregor C., Perrin C., Ronsin G., van Eijk M. (2003). *Gemini surfctants: new synthetic vectors for gene transfection*. Minireviews. Angewandte Chemie International Edition 42: 1448-1457.

43-Morrison R.T., Boyd R.N. (1996). *Química Orgánica*. 5ta edición. Addison-Wesley Iberoamericana.

44-Perrin D.D, Armarego W.L.F, Perrin D. (1980). *Purification of laboratory chemicals*. 2da edición. Pergamon Press.

45-Kim T., Kida T., Nakatsuji Y., Hirao T., Ikeda I. (1996). *Surface-active properties of novel cationic surfactants with two alkyl chains and two ammonio groups*. Journal of Oleo Science 73 (7): 907-911.

46-Norman S.M., Poling S.M., Maier V.P., Nelson M.D. (1985). *Farnesyl and α-Ionylideneethyl tertiary and quaternary amines: their influence on abscisic acid biosynthesis*. Agricultural and Biological Chemistry 49 (10) 2893-2898.

47-Szlávik Z., Tárkányi G., Gömöry Á., tarczay G., Rábai J. (2001). *Convenient syntheses and characterization of fluorophilic perfluorooctyl-propyl amines and ab initio calculations of proton affinities of related model compounds*. Journal of Fluorine Chemistry 108: 7-14.

48-Menger F., Portnoy C. (1967). *On the chemistry of reactions proceeding inside molecular aggregates*. Journal of the American Chemical Society 89 (18): 4698-4703.

49-Rabinovich Y.I., Kanicky J.R, Pandey S., Oskarsson H., Holmberg K., Moudgil B.M., Shah D.O. (2005). *Self-assembled gemini surfactante film-mediated dispersión stability*. Journal of Colloid and Interface Science 288: 583-590.

50-Han L., Zhang Y., Lei li H. (2009). *The synthesis and surface activity of perfluoro-2,5-dimethyl-3,6-dioxanonanoic acid ester fluorocarbon surfactants*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering. Aspects 334: 176-180.

51-Chlebicki J., Wegrzynska J., Maliszewska I., Oswiecimska M. (2005). *Preparation, surface-active properties, and antimicrobial activities of bis-quaternary ammonium salts from amines and epichlorohydrin*. Journal of Surfactants and Detergents 8 (3): 227-232.

52-Corba J., Vçarady M. (1999). *Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resistente in Haemonchus contortus and Ostertagia circumcincta of sheep*. Veterinary Parasitology 80: 239-249.

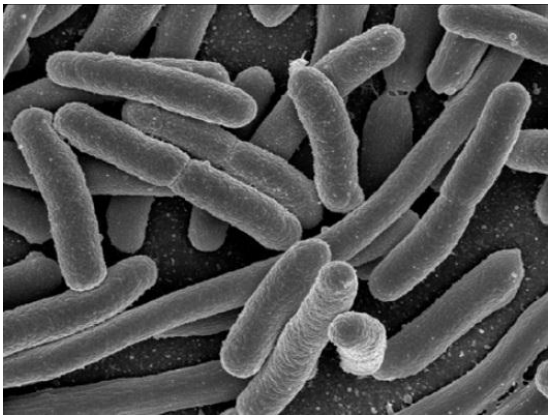
53-Stepek G., Buttle D.J., Duce I.R., Lowe A., Behnke J.M. (2005). *Assessment of the anthelmintic effect of natural plant cysteine proteinases against the gastrointestinal nematode, Heligmosomoides polygyrus, in vitro*. Parasitology 130: 203-211.

54-Stepek G., Lowe A.E., Buttle D.J., Duce I.R., Behnke J.M. (2006). *In vitro and in vivo anthelmintic efficacy of plant cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, Trichuris muris.* Parasitology 1-9. Cambridge University Press.

55-Tadaaki S., Masataka K., Kazuo K., Isao T., Tamotsu N. (2001). *Nematocidal activities of thiabendazole and ivermectina against the larvae of Strongyloides ratti and S. venezuelensis*. Veterinary and Parasitology 99: 311-322.

56-Monroy F.G., Enriquez F. J. (1992). *Heligmosomoides polygyrus: a model for chronic gastrointestinal helminthiasis*. Parasitology Today 8 (2): 49-54.

ANEXO I



ANEXO I

AI. DETERMINACION DE LAS PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS Y ANTIFUNGICAS DE LOS GEMINI SINTETIZADOS

AI.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS GEMINI

La actividad antibacteriana y antifúngica de los gemini (**4a-c** y **5a-c**) sintetizados fue evaluada frente a un amplio espectro de microorganismos de referencia por el método de difusión en disco en dos medios antibióticos y se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) para los compuestos más activos de la serie.

Es sabido que los compuestos de naturaleza anfipática tienen la capacidad de intercalarse, a través de su región hidrofóbica, en el arreglo fosfolipídico de las membranas biológicas provocando un alto grado de desestabilización lo cual se traduce en un colapso de la misma en un proceso conocido como disrupción celular. Se ha propuesto que la acción de los surfactantes sobre las membranas se debe más a una interacción física que química, este hecho haría suponer que la presencia de más de una cola hidrofóbica por molécula aumentaría las probabilidades de interacción y por ende una mayor distorsión. Otro factor adicional en este tipo de compuestos es la presencia de cargas, en el caso de los gemini catiónicos las cargas positiva sobre los átomos de nitrógenos podrían entrar en contacto con los grupos fosfatos negativamente cargados de los fosfolípidos aumentando aún más las posibilidades de interacción entre la membrana biológica y el surfactante.

Por otra parte, se ha reportado la importancia de la funcionalidad β-hidroxi amino en compuestos alquil derivados (como los presentados en esta tesis) en los productos antimicrobianos, debido a que esta funcionalidad inhibiría a las enzimas glicosil transferasas presentes en la superficie de los microorganismos que son las encargadas de mantener la integridad de la pared celular de los microorganismos (1).

En este contexto los gemini catiónicos y no iónicos sintetizados se presentan como potenciales agentes antimicrobianos (2).

AI.2. MATERIALES Y METODOS

AI.2.1. Microorganismos

Las pruebas se realizaron con microorganismos de referencia provenientes de la colección ATCC (American Type Culture Collection):

- ✓ Bacterias Gram (+):

  Bacillus subtilis ATCC 6633
  Micrococcus luteus ATCC 9341
  Staphylococcus aureus ATCC 6538
  Listeria monocytogenes ATCC 15313

- ✓ Bacterias Gram (-):

  Escherichia coli ATCC 11105
  Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

- ✓ Hongos:

  Levaduriforme: *Candida albicans* ATCC 10231
  Filamentoso: *Aspergillus niger* ATCC 16404

AI.2.2. Medios de cultivo

Para las pruebas microbiológicas de difusión en disco y determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), se utilizaron los medios de cultivo:

Antibiotic Medium (AM1) pH= 6,6 (Difco)
Antibiotic Medium (AM11) pH= 7,9 (Difco)

La composición de los medios de cultivo puede verse en el Anexo II

Además, en la técnica de difusión en disco sobre los hongos se ensayó el medio de cultivo Sabouraud glucosado pH= 5,6 (Difco). Sin embargo debido a que los resultados obtenidos utilizando este medio de cultivo no aportaron mayor información respecto a la acción de los compuestos sobre hongos, se decidió dejar de lado este resultado y sólo presentar los datos obtenidos en AM 1 y AM 11 (3, 4).

AI.2.3. Antiséptico comercial

En base a la bibliografía consultada, se seleccionó el Cloruro de Benzalconio (BAC) como patrón de referencia de probada actividad antimicrobiana.

El BAC fue adquirido en forma pura como una solución acuosa al 50% (p/v) (Fluka).

AI.2.4. Método de difusión en disco

Este método se realizó como *screening* inicial para detectar la actividad antibacteriana y antifúngica de los surfactantes (2-5).

Se impregnaron discos de papel estériles de 6 mm de diámetro con 100 μg de cada compuesto diluído en etanol y posteriormente se evaporó el disolvente. Luego, los discos con los diferentes surfactantes se colocaron sobre la superficie de las placas agarizadas y secas, previamente inoculádas con una suspensión de microorganismos de 10^6 ufc mL^{-1}. Finalmente, las placas se incubaron por 24 horas a 37 ºC.

El criterio para la definición de compuesto activo se atribuyó a la inhibición del crecimiento microbiano en la zona alrededor del disco y los resultados fueron expresados con el diámetro (en mm) de la zona de inhibición. El test fue realizado por duplicado. Ver Tabla 1.

El etanol fue adoptado como control negativo y el cloruro de benzalconio (BAC) como control positivo.

AI.2.5. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

Los compuestos gemini más activos de la serie (**5b** y **5c**), según los halos de inhibición obtenidos por el método de difusión en disco, fueron también ensayados sobre bases cuantitativas determinando las CIMs para cada microorganismo y utilizando BAC como control positivo.

Para la determinación de la CIM se tomó como modelo la metodología propuesta en la bibliografía (3-5).

Se prepararon diluciones seriadas al medio de cada compuesto a evaluar con agua destilada estéril. El rango de concentraciones ensayadas fue de 1024 μg mL^{-1} a 0,125 μg mL^{-1}.

Las diluciones seriadas de los productos se incorporaron en los medios de cultivo fundidos AM1 y AM11 y la mezcla homogeneizada fue vertida en placas de Petri de 90 mm. Una vez secas fueron inoculadas con un multi-inoculador de *Steers*.

El inóculo de cada microorganismo fue de aproximadamente 10^4 ufc mL^{-1} y cada microorganismo fue sembrado dos veces en una misma placa. Las placas fueron incubadas por 24 horas a 37 ºC.

Todas las concentraciones de surfactante en los diferentes medios de cultivo se realizaron por duplicado y los controles positivos se realizarón con agua destilada estéril.

La CIM para un compuesto y microorganismo dados, se define como la menor concentración testeada del compuesto a partir de la cual no se observa desarrollo microbiano luego del período de incubación estandarizado. Ver Tabla 2.

AI.3. RESULTADOS Y DISCUSION

AI.3.1. Método de difusión en disco

El método de difusión en disco es ampliamente utilizado como metodología de *screening* para la evaluación de la actividad antimicrobiana de nuevos compuestos. Es una técnica sencilla, económica, rápida y que permite realizar un relevamiento de la actividad biológica sobre una gran cantidad de compuestos en simultáneo (6, 7).

En la Tabla AI.1 se presenta la actividad antimicrobiana obtenida por el método de difusión en disco para los compuestos diméricos **4a-c** y **5a-c** sobre varios microorganismos procariotas y eucariotas a partir de los diámetros de los halos de inhibición.

Tabla AI.1. Actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* de seis de los surfactantes sintetizados usando el método de difusión en disco[a].

Microorganismos	Compuestos[b]													
	Medio AM1							Medio AM11						
	4a	**4b**	**4c**	**5a**	**5b**	**5c**	**BAC**	**4a**	**4b**	**4c**	**5a**	**5b**	**5c**	**BAC**
E. coli	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	+	-	+
P. aeruginosa	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
M. luteus	-	+	+	-	+++	++	++	-	-	++	+	+++	++	++
S. aureus	-	+	-	-	++	+	++	-	-	-	+	++	+	++
B. subtilis	-	+	-	-	+++	+	+++	-	-	+	+	+++	+	+++
L. monocytogenes	-	-	-	-	++	+	++	-	-	-	-	+++	+	++
C. albicans	-	+	-	-	++	+	++	-	-	-	-	++	+	++
A. niger	-	-	+	-	++	+	++	-	-	+	-	+++	+	+++

[a] Zonas de inhibición del crecimiento: -: 0-6 mm; +:7-12 mm; ++: 13-20 mm; +++: > 21mm.
[b] Para ver la estructura de los compuestos, ver Capítulo 2, Figura 2.5.

De la Tabla AI.1, se desprende que los compuestos neutros **4a**-**4c** y el derivado catiónico **5a** no exhibieron apreciable actividad antimicrobiana *in vitro* sobre ninguno de los microorganismos testeados. Sin embargo, los compuestos catiónicos **5b** y **5c** mostraron tener buena actividad sobre las bacterias Gram-positivas *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Listeria monocytogenes* y sobre los hongos *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Por otra parte, la actividad antimicrobiana sobre las bacterias Gram-negativas, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, fue moderada para **5b** y baja para **5c**. Como era de esperarse, las bacterias Gram-negativas fueron menos sensibles que las Gram-positivas debido a que su membrana externa es menos permeable a los compuestos amfifílicos. Además, se observa claramente que por este método, el compuesto **5b** mostró una actividad comparable con BAC y hasta alcanzó diámetros de inhibición mayores para *M. luteus* y *L. monocytogenes*.

Es importante mencionar que la baja actividad biológica de los compuestos neutros en relación a sus homólogos catiónicos, puede atribuirse a la elevada densidad de cargas negativas que le confieren los ácidos teichoicos a las membranas de las bacterias Gram-positivas. Finalmente, la buena performance de los compuestos

diméricos de 12 y 18 carbonos catiónicos se atribuye a su relativamente elevada preferencia de adsorberse a la interfaz (ver valores de CMC/C_{20}, Capítulo 3, Tabla 3.1) y a un óptimo balance entre las regiones hidrofóbicas e hidrofílicas.

AI.3.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima

En la Tabla AI.2 se presentan los valores de CIMs ($\mu g\ mL^{-1}$) para los gemini que exhibieron la mejor performance luego del *screening* (**5b** y **5c**) y para el germicida comercialmente disponible, Cloruro de Benzalconio.

Tabla AI.2. Actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* expresada como CIM para los compuestos catiónicos diméricos de C_{12} y C_{18} en dos medios antibióticos.

Microorganismos	CIM de los compuestos ($\mu g\ mL^{-1}$)					
	Medio AM1			Medio AM11		
	5b	**5c**	**BAC**	**5b**	**5c**	**BAC**
E. coli	32	1024	12	16	1024	12
P. aeruginosa	128	1024	6	128	1024	12
M. luteus	4	16	6	4	64	2
S. aureus	12	128	6	12	64	2
B. subtilis	32	64	6	32	64	12
L. monocytogenes	32	64	6	32	64	12
C. albicans	32	128	12	32	64	6
A. niger	16	128	12	16	128	2

Los valores de CIMs mostrados en la Tabla AI.2 se correlacionan con los diámetros de los halos de inhibición y la actividad antimicrobiana determinada a partir del método de difusión en disco para los dos compuestos diméricos ensayados (**5b** y **5c**).

Ambos compuestos presentaron actividad contra todas las cepas ensayadas en el rango de concentraciones examinado y en ningún caso se superó la concentración 1024 $\mu g\ mL^{-1}$. Por otro lado, se estableció un orden de susceptibilidades, ya que la actividad antimicrobiana dependió claramente del microorganismo blanco, siendo las bacterias Gram-positivas más sensibles que las bacterias Gram-negativas. En los dos medios de cultivo ensayados, las bacterias Gram-negativas *E. coli* (excepto para el compuesto **5b**) y *P. aeruginosa* fueron inhibidas a valores de CIMs mayores o iguales a 128 $\mu g\ mL^{-1}$. En el caso de las bacterias Gram-positivas, el compuesto **5b** exhibió una muy buena actividad sobre *M. luteus* y *S. aureus* con valores de CIM de 4 $\mu g\ mL^{-1}$ y 12 $\mu g\ mL^{-1}$ respectivamente tanto en AM1 como en AM11. Además, **5b** presentó también buena actividad sobre *A. niger* con un valor de CIM de 16 $\mu g\ mL^{-1}$ (AM1 y AM11). Por su parte, el Cloruro de benzalconio presentó excelentes valores de CIM para todos los microorganismos ensayados en ambos medios de cultivo.

A modo de conclusión, podemos decir que la potencia antimicrobiana depende del microorganismo blanco (bacterias Gram-positivas > hongos > bactarias Gram-negativas), de la naturaleza de los compuestos (catiónicos > no iónicos) y del largo de su cadena alquílica (C_{12} > C_{18} > C_8). Además se observa que todos los compuestos neutros **4a-c** y el compuesto catiónico **5a,** con un largo de cadena de 8 carbonos, se mostraron prácticamente inactivos frente a los microorganismos ensayados. Finalmente el compuesto dimérico de 12 carbonos (**5b**) demostró ser el agente antimicrobiano más activo de la serie de compuestos ensayados frente a bacterias Gram-positivas y hongos *in vitro*.

AI.4. BIBLIOGRAFIA

1-Tewari N., Tiwari V.K., Tripathi R.P., Chaturvedi V., Srivastava A., Srivastava R., Shukla P.K., Chaturvedi A.K., Gaikward A., Sinha S., Srivastava B.S. (2004). *Synthesis of galactopyranosyl amino alcohols as a new class of antitubercular and antifungal agents*. Biooganic & Medicinal Chemistry Letters 14 (2): 329-332.

2-Murguía M.C., Vaillard V.A., Sánchez V.G., Di Conza J., Grau R.J. (2008). *Synthesis, surface-active properties, and antimicrobial activities of new double-chain gemini surfactants*. Journal of Oleo Science. 57 (5): 301-308.

3-Cristaldi, M. (2006). *Síntesis y selección de nuevas moléculas surfactantes de carácter catiónico y no iónico con actividad antimicrobiana*. Tesina de Licenciatura.

4-Murguía M.C., Cristaldi M.D., Porto A., Di Conza J. Grau R. (2008). *Synthesis, surface-active properties and antimicrobial activities of new neutral and cationic trimeric surfactants.* Journal of Surfactants and detergents 11 (1): 41-48.

5-Brousse B.N., Massa R., Moglioni A.G., Alho Martins M., D´Accorso N., Gutkind G., Moltrasio G.Y. (2004). *Antibacterial and antifungal activity of some thiosemicarbazones and 1,3,4-thiadiazolines*. Journal of the Chilean Chemical Society 49 (1): 1-7.

6-Pappa H., Segall A., Pizzorno M.T., Radice M., Amoroso A., Gutkind G.O. Radice. (1994). *Antimicrobial Activity of 5,6-Dihydrobenzo-[a]-Carbazoles*. Parte II. Il Fármaco 49 (5): 333-336.

7-Bisceglia J., García M.B., Massa R., Magri M.L., Zani M., Gutkind G., Otelli L.R. (2004). *Synthesis, Characterization and Biological Activity of bis(3-Aryl-1-hexahydropyrimidinyl)methanes. Novel Heterocyclic Polyamine Derivatives*. Journal of Heterocyclic Chemistry 41: 85-90.

ANEXO II

ANEXO II

AII. MEDIOS DE CULTIVO, BUFFERS Y ANOVA FACTORIAL

AII.1. COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVOS Y BUFFERS

Antibiotic Medium (AM)

Extracto de carne	1,5 g
Extracto de levadura	3 g
Digerido pancreático de caseína	4 g
Peptona	6 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Para AM1 se lleva a pH 6.6 con HCl (conc.) y para AM11 se lleva a pH 7.9 con Na(OH) (conc).

Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS) sin rojo fenol

Para 1000 mL de solución

Cloruro de sodio (NaCl)	8000 mg
Cloruro de potasio (KCl)	400 mg
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	60 mg
Glucosa	1000 mg
Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4)	48 mg
Sulfato de magnesio anhidro ($MgSO_4$)	98 mg
Cloruro de Calcio anhidro ($CaCl_2$)	140 mg
Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$)	350 mg

pH= 7,5

Soluciones fijadoras para microscopía electrónica

Solución de glutaraldehído al 2,5% en buffer fosfato de Sorensen 0,1 M pH= 7,2

Buffer fosfato de Sorensen (0,1M)

*Solución A: 0,2 M

Fosfato de sodio dibásico anhidro	Na_2HPO_4	24g/1000mL
ó	$Na_2HPO_4.2H_2O$	5,61g/1000mL

*Solución B: 0,2 M

Fosfato de sodio monobásico anhidro	NaH_2PO_4	28,4g/1000mL
ó	$NaH_2PO_4.2H_2O$	31,21g/1000mL

Para preparar 100 mL del buffer fosfato 1M pH= 7,2. Se mezclan las proporciones que se presentan en la tabla y se lleva a volumen con agua destilada.

pH a 25ºC	Solución A (mL)	Solución B (mL)
6,4	13,25	36,75
6,6	18,75	31,25
6,8	24,5	25,5
7,0	30,5	19,5
7,2	**36,0**	**14,0**
7,4	40,5	9,5
7,6	43,5	6,5
7,8	43,75	4,25
8,0	47,35	2,65

AII.2. ANOVA FACTORIAL

Análisis estadístico para los compuestos ensayados (5b-f)

Resumen del Procedimiento

Variable dependiente: Movilidad
Factores:
Tiempo
Sexo
Compuesto
Concentración

Número de casos completos: 1200

Análisis de la Varianza para Movilidad - Sumas de Cuadrados

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio
EFECTOS PRINCIPALES			
A:Compuesto	757,775	4	189,444
B:Concentración	2236,4	4	559,1
C:Tiempo	144,61	7	20,6586
D:Sexo	0,03	1	0,03
RESIDUOS	1317,1	1183	1,11336
TOTAL (CORREGIDO)	4455,92	1199	

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio

Análisis estadístico para tres de los compuestos ensayados (5b, 5c y 5e)

Resumen del Procedimiento

Variable dependiente: Movilidad
Factores:
Compuesto
Concentración
Sexo
Tiempo

Número de casos completos: 720

Análisis de la Varianza para Movilidad - Sumas de Cuadrados

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio
EFECTOS PRINCIPALES			
A:Compuesto	6,825	2	3,4125
B:Concentración	2330,42	4	582,606
C:Tiempo	64,9542	7	9,27917
D:Sexo	0,734722	1	0,734722
INTERACCIONES			
AB	43,9528	8	5,4941
AC	54,9083	14	3,92202
AD	0,836111	2	0,418056
BC	45,6222	28	1,62937
BD	1,05	4	0,2625
CD	2,03194	7	0,290278
RESIDUOS	285,05	642	0,444003
TOTAL (CORREGIDO)	2836,39	719	

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio

Contraste Múltiple de Rangos para Movilidad según Compuesto

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey				
Compuesto	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos
5b	240	1,55833	0,0430118	X
5c	240	1,75833	0,0430118	X
5e	240	1,77083	0,0430118	X

Contraste	Diferencias
5b - 5c	*-0,2
5b - 5e	*-0,2125
5c - 5e	-0,0125

* indica una diferencia significativa.

Contraste Múltiple de Rangos para Movilidad según Sexo

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey				
Sexo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos
Macho	360	1,66389	0,035119	X
Hembra	360	1,72778	0,035119	X

Contraste	Diferencias
Hembra - Macho	0,0638889

* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico para el compuesto Gemini (5b)

Resumen del Procedimiento

Variable dependiente: Movilidad
Factores:
Concentración
Tiempo
Sexo

Número de casos completos: 240

Análisis de la Varianza para movilidad - Sumas de Cuadrados

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio
EFECTOS PRINCIPALES			
A:concentracion	804,433	4	201,108
B:tiempo	35,7833	7	5,1119
C:sexo	0,0166667	1	0,0166667
INTERACCIONES			
AB	47,9667	28	1,7131
AC	3,23333	4	0,808333
BC	0,716667	7	0,102381
RESIDUOS	87,0333	188	0,462943
TOTAL (CORREGIDO)	979,183	239	

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio

Contraste Múltiple de Rangos para Movilidad según Concentra

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos		
500	48	0,0	0,0982072	X		
100	48	0,270833	0,0982072	X		
50	48	0,354167	0,0982072	X		
10	48	2,35417	0,0982072		X	
0	48	4,8125	0,0982072			X

Contraste	Diferencias
0 - 10	*2,45833
0 - 50	*4,45833
0 - 100	*4,54167
0 - 500	*4,8125
10 - 50	*2,0
10 - 100	*2,08333
10 - 500	*2,35417
50 - 100	0,0833333
50 - 500	0,354167
100 - 500	0,270833

* indica una diferencia significativa.

Contraste Múltiple de Rangos para Movilidad según Tiempo

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Tiempo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos
120	30	1,0	0,124223	X
75	30	1,2	0,124223	X
90	30	1,4	0,124223	XX
60	30	1,43333	0,124223	XX
105	30	1,46667	0,124223	XX
45	30	1,8	0,124223	XX
30	30	1,86667	0,124223	XX
15	30	2,3	0,124223	X

Contraste	Diferencias
15 - 30	0,433333
15 - 45	0,5
15 - 60	*0,866667
15 - 75	*1,1
15 - 90	*0,9
15 - 105	*0,833333
15 - 120	*1,3
30 - 45	0,0666667
30 - 60	0,433333
30 - 75	*0,666667
30 - 90	0,466667
30 - 105	0,4
30 - 120	*0,866667
45 - 60	0,366667
45 - 75	*0,6
45 - 90	0,4
45 - 105	0,333333
45 - 120	*0,8
60 - 75	0,233333
60 - 90	0,0333333
60 - 105	-0,0333333
60 - 120	0,433333
75 - 90	-0,2
75 - 105	-0,266667
75 - 120	0,2
90 - 105	-0,0666667
90 - 120	0,4
105 - 120	0,466667

* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico para el compuesto gemini 5c

Resumen del Procedimiento

Variable dependiente: Movilidad
Factores:
Concentración
Tiempo
Sexo

Número de casos completos: 240

Análisis de la Varianza para movilidad - Sumas de Cuadrados

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio
EFECTOS PRINCIPALES			
A:concentracion	825,483	4	206,371
B:tiempo	60,3833	7	8,62619
C:sexo	1,35	1	1,35
INTERACCIONES			
AB	34,1167	28	1,21845
AC	0,0666667	4	0,0166667
BC	1,31667	7	0,188095
RESIDUOS	45,2667	188	0,24078
TOTAL (CORREGIDO)	967,983	239	

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio

Contraste Múltiple de Rangos para Movilidad según Concentra

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos		
500	48	0,0625	0,0708255	X		
100	48	0,3125	0,0708255	X	X	
50	48	0,541667	0,0708255		X	
10	48	3,14583	0,0708255			X
0	48	4,72917	0,0708255			X

Contraste	Diferencias
0 - 10	*1,58333
0 - 100	*4,41667
0 - 50	*4,1875
0 - 500	*4,66667
10 - 100	*2,83333
10 - 50	*2,60417
10 - 500	*3,08333
100 - 50	-0,229167
100 - 500	0,25
50 - 500	*0,479167

* indica una diferencia significativa.

Contraste Múltiple de Rangos para Movilidad según Tiempo

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Tiempo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos
90	30	1,36667	0,089588	X
60	30	1,4	0,089588	X
105	30	1,46667	0,089588	X
75	30	1,46667	0,089588	X
45	30	1,5	0,089588	X
120	30	1,63333	0,089588	X
30	30	2,56667	0,089588	X
15	30	2,66667	0,089588	X

Contraste	Diferencias
105 - 120	-0,166667
105 - 15	*-1,2
105 - 30	*-1,1
105 - 45	-0,0333333
105 - 60	0,0666667
105 - 75	0,0
105 - 90	0,1
120 - 15	*-1,03333
120 - 30	*-0,933333
120 - 45	0,133333
120 - 60	0,233333
120 - 75	0,166667
120 - 90	0,266667
15 - 30	0,1
15 - 45	*1,16667
15 - 60	*1,26667
15 - 75	*1,2
15 - 90	*1,3
30 - 45	*1,06667
30 - 60	*1,16667
30 - 75	*1,1
30 - 90	*1,2
45 - 60	0,1
45 - 75	0,0333333
45 - 90	0,133333
60 - 75	-0,0666667
60 - 90	0,0333333
75 - 90	0,1

* indica una diferencia significativa.

Análisis estadístico para el compuesto gemini 5e

Resumen del Procedimiento

Variable dependiente: Movilidad
Factores:
Concentración
Tiempo
Sexo

Número de casos completos: 240

Análisis de la Varianza para Movilidad - Sumas de Cuadrados

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio
EFECTOS PRINCIPALES			
A:Concentración	744,458	4	186,115
B:Tiempo	23,6958	7	3,38512
C:Sexo	0,204167	1	0,204167
INTERACCIONES			
AB	52,4083	28	1,87173
AC	0,191667	4	0,0479167
BC	3,5625	7	0,508929
RESIDUOS	57,875	188	0,307846
TOTAL (CORREGIDO)	882,396	239	

Los cocientes F están basados en el error cuadrático medio

Contraste Múltiple de Rangos para Movilidad según Concentra

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Concentración	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos		
500	48	0,0208333	0,080084	X		
100	48	0,125	0,080084	X		
50	48	1,4375	0,080084		X	
10	48	2,47917	0,080084			X
0	48	4,79167	0,080084			X

Contraste	Diferencias
0 - 10	*2,3125
0 - 50	*3,35417
0 - 100	*4,66667
0 - 500	*4,77083
10 - 50	*1,04167
10 - 100	*2,35417
10 - 500	*2,45833
50 - 100	*1,3125
50 - 500	*1,41667
100 - 500	0,104167

* indica una diferencia significativa.

Contraste Múltiple de Rangos para Movilidad según Tiempo

Método: 95,0 porcentaje HSD de Tukey

Tiempo	Recuento	Media LS	Sigma LS	Grupos
120	30	1,13333	0,101299	X
30	30	1,5	0,101299	XX
90	30	1,63333	0,101299	XX
45	30	1,76667	0,101299	XXX
15	30	1,96667	0,101299	XX
105	30	2,0	0,101299	XX
60	30	2,03333	0,101299	XX
75	30	2,13333	0,101299	X

Contraste	Diferencias
15 - 30	*0,466667
15 - 45	0,2
15 - 60	-0,0666667
15 - 75	-0,166667
15 - 90	0,333333
15 - 105	-0,0333333
15 - 120	*0,833333
30 - 45	-0,266667
30 - 60	*-0,533333
30 - 75	*-0,633333
30 - 90	-0,133333
30 - 105	*-0,5
30 - 120	0,366667
45 - 60	-0,266667
45 - 75	-0,366667
45 - 90	0,133333
45 - 105	-0,233333
45 - 120	*0,633333
60 - 75	-0,1
60 - 90	0,4
60 - 105	0,0333333
60 - 120	*0,9
75 - 90	*0,5
75 - 105	0,133333
75 - 120	*1,0
90 - 105	-0,366667
90 - 120	*0,5
105 - 120	*0,866667

* indica una diferencia significativa.