



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

**SURFACTANTES DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS COMO
POTENCIALES BIOCIDAS Y POTENCIADORES DE PENETRACIÓN DE
MOLÉCULAS TERAPÉUTICAS A TRAVÉS DE LA PIEL.
CARACTERIZACIÓN DE LA INTERACCIÓN CON MEMBRANAS
MODELO**

Tesista: Lic. Melisa Hermet

Director/a: Dra. Laura Bakás

Codirector/a: Dra. Susana Morcelle del Valle

Año: 2022

Junio 2022 – La Plata, Buenos Aires

El presente trabajo, para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas, se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CiProVe-CICPBA-UNLP) perteneciente al Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Laura Bakás y la codirección de la Dra. Susana R. Morcelle del Valle.

Los resultados que se muestran en este trabajo forman parte de las siguientes publicaciones en revistas científicas periódicas:

Hermet, M. *et al.* (2019) "Bromide counterion as a spectroscopic sensor at the interface of cetyltrimethylammonium micelles," *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 223. doi:10.1016/j.saa.2019.117266.

Hermet, M. *et al.* (2021) "Interaction of cationic surfactants with DPPC membranes: effect of a novel N α - benzoylated arginine - based compound," *Amino Acids* [Preprint], (0123456789). doi:10.1007/s00726-021-02964-2.

Hermet, M. *et al.* (2022) "Arginine based surfactants interaction with stratum corneum model membranes" (enviado para su publicación).

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a los organismos que hicieron posible el presente trabajo de investigación: a la Universidad Nacional de La Plata, y a la Facultad de Ciencias Exactas en particular, por la formación, gratuita y de excelencia, y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca para la realización del presente Trabajo de Tesis Doctoral.

A las personas, que directa o indirectamente me formaron y acompañaron durante el desarrollo de este trabajo, especialmente a mi directora, Dra. Laura Bakás, y a mi codirectora, Dra. Susana R. Morcelle del Valle, por su empeño en mi instrucción, tanto científica como personal, desde que era una estudiante de grado y luego durante mi doctorado, por su dedicación y consejos.

A los todos mis compañeros de laboratorio con los que tuve el placer de compartir el trabajo diario durante todo este tiempo, por su ayuda y sus enseñanzas, por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

A todos los laboratorios y grupos de trabajo que nos abrieron sus puertas y permitieron enriquecer este proyecto de tesis con los trabajos realizados en colaboración:

- A la Dra. Sabina Maté y la Dra. Romina Vázquez por su ayuda con los ensayos con lípidos y monocapas.
- A la Dra. M. Antonieta Daza Millone y Dra. M. Elena Vela por su colaboración en los análisis por AFM y SPR.
- Al Dr. Ariel Álvarez por su participación en el desarrollo de los estudios de simulación.
- A la Dra. Ayelen Caimi por su colaboración en los en los ensayos de citotoxicidad.
- A la Dra. M. Laura Fanani por recibirme amablemente en su laboratorio y asistirme con los ensayos de caracterización empleando monocapas. Por su tiempo, dedicación, paciencia e invaluable ayuda.

Y, por último, a mi familia y amigos por el soporte y su apoyo incondicional, a los que están y los que estuvieron, pero que siempre estarán presentes en mi corazón, y que directa o indirectamente contribuyeron a que esto sea posible.

Índice general

| | |
|---|-----|
| ABREVIATURAS | 9 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 11 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 14 |
| CAPÍTULO I – INTRODUCCION Y OBJETIVOS | 15 |
| CAPÍTULO II – DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE AGREGACIÓN DE SURFACTANTES DERIVADOS DE ARGININA | 57 |
| CAPÍTULO III – INTERACCIÓN DE Bz-Arg-NHC ₁₀ CON SISTEMAS MODELO DE MEMBRANA: DPPC | 89 |
| CAPÍTULO IV – INTERACCIÓN DE Bz-Arg-NHC _n CON SISTEMAS MODELO DE MEMBRANA: MODELO DE ESTRATO CÓRNEO | 135 |
| CAPÍTULO V – OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS DEFORMABLES: Bz-Arg-NHC _n COMO ACTIVADORES DE BORDE..... | 205 |
| CAPÍTULO VI – CONCLUSIONES GENERALES..... | 245 |
| APÉNDICE – PUBLICACIONES..... | 259 |

Abreviaturas

| | | | |
|--------------------------|--|--------------------------------|--|
| -S _{CD} | parámetro de orden carbono-deuterio | CAM | N ^α -caproil-L-arginina-metil éster |
| -S _{CH} | parámetro de orden carbono-hidrógeno | CBM | Concentración bactericida mínima |
| τ | Constante de acoplamiento | Cer24 | Ceramida[NS]24:0 |
| γ | Tensión superficial | Cer24-18 | cadena corta de Cer24 |
| ΔΘ _{bicapa} | Cambio en la señal en el ángulo de la máxima derivada | Cer24-24 | cadena larga de Cer24 |
| ΔΘ _{SPR} | Ángulo de SPR | Cho | Colesterol |
| γ ₀ | Tensión superficial del líquido puro | ChoS | Sulfato de colesterol |
| γ _{CMC} | Tensión superficial a la CMC | CIM | Concentración inhibitoria mínima |
| % Inh | Porcentaje de inhibición | CL | Cardiolipina |
| ΔT _{1/2} | Ancho a mitad de altura del pico del termograma | CMC | Concentración micelar crítica |
| Δπ | Variación en la presión superficial | Cs ⁻¹ | Módulo de compresibilidad |
| ACA | arginina-N-caproil amida | CTAB | Bromuro de hexadecil-trimetilamonio |
| ACN | Acetonitrilo | D | Elasticidad de la vesícula |
| AEA | Exceso de área promedio | DLS | Dispersión dinámica de la luz |
| AFM | Microscopía de Fuerza Atómica | DM | Dinámica molecular |
| A _{min} | Área por molécula | DMSO | Dimetilsulfóxido |
| A _{min} | Área por molécula | DO ₆₀₀ | Densidad óptica a 600 nm |
| BAM | Microscopía de ángulo de Brewster | DPPC | dipalmitoilfosfatidilcolina |
| Buffer A | Buffer bórico-borato 0,01 M 50% v/v etanol | DSC | Calorimetría Diferencial de Barrido |
| Buffer B | Buffer bórico-borato 0,01 M 50% v/v etanol NaCl 1 M | DSPC | diestearoil fosfatidilcolina |
| Bz-Arg-NHC ₁₀ | N ^α -benzoil-L-arginina decilamida | DTT | 1,4-ditio-D,L-treitol |
| Bz-Arg-NHC ₁₂ | N ^α -benzoil-L-arginina dodecilamida | EA | Activador de borde |
| Bz-Arg-NHC _n | N ^α -benzoil-arginina alquilamida | EDTA | Ácido etilendiaminotetra-acético |
| Bz-Arg-OEt o BAEE | N ^α -benzoil-L-arginina etil éster | GP | Polarización generalizada |
| | | GR | Glóbulos rojos |
| | | GUV | Vesículas unilamelares gigantes |
| | | HEPES | Ácido N-(2-hidroxietil) piperazin-N'-(2-etanosulfónico) |
| | | I ₃ /I ₁ | Relación de intensidades entre los picos de la tercera y primera banda vibratoria del pireno |

| | | | |
|--------------------------------|---|------------------|--|
| I ₄₄₀ | Intensidad de emisión de fluorescencia a 440 nm | RPMI | Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute |
| I ₄₉₀ | Intensidad de emisión de fluorescencia a 490 nm | r _v | Tamaño de liposomas luego de la extrusión |
| I _e /I _m | Relación de intensidades excímero y monómero de pireno | SA | Ácido esteárico |
| IUPAC | Unión Internacional de Química Pura y Aplicada | SC | Estrato córneo |
| J | Tasa de penetración de las vesículas | SCM | Mimético al estrato córneo |
| LA | Ácido lignocérico | SD | Desviación estándar |
| LAM | N ^α -lauril-L-arginina-metil éster | SFB | Suero fetal bovino |
| Laurdan | 6-dodecanoil-2-dimetil-aminonaftaleno | SLB | Bicapas lipídicas soportadas |
| LB | Luria-Bertani | So | Fase gel o fase ordenada |
| Lc | Fase líquido-condensada | SPC | Fosfatidilcolina de soja |
| Ld | Fase fluída o líquido-desordenada | SPC20C10 | SPC LUV conteniendo un 20 mol% de Bz-Arg-NHC ₁₀ |
| Le | Fase líquido expandido | SPC20C12 | SPC LUV conteniendo un 20 mol% de Bz-Arg-NHC ₁₂ |
| LPS | Lipopolisacárido | SPP | Parámetro de empaquetamiento superficial |
| LUD | Liposomas ultradeformables | SPR | Resonancia superficial de plasmones |
| LUV | Vesículas unilamelares grandes | SUV | Vesículas unilamelares pequeñas |
| MEM | Medio de cultivo Modified Eagle's | TBS | Buffer Tris salino |
| MLV | Vesículas multilamelares | TDD | Suministro transdérmico de drogas |
| MMA | Área molecular media | Tm | Temperatura de transición |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro | Tris | tris(hidroximetil)aminometano |
| OA | Ácido oleico | UD | Ultradeformables |
| PALS | Dispersión de luz para análisis de fase | VC | volumen de columna |
| PBS | Buffer fosfato salino | Γ _{max} | Máxima concentración de surfactante adsorbida en la interfase aire/líquido |
| PC | Fosfatidilcolina | π | Presión superficial |
| PDI | Índice de polidispersidad | π _c | Presión superficial crítica |
| PE | Fosfatidiletanolamina | π _{eq} | Presión superficial de equilibrio |
| PG | Fosfatidilglicerol | π _{máx} | Presión superficial máxima |
| PP | Potenciadores de penetración | π _o | Presión superficial inicial |
| r _p | Tamaño de poro de la membrana | | |

Índice de Figuras

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO I | 15 |
| FIGURA 1.1 <i>Principales tipos de unión entre la porción hidrofóbica y la aminoacídica de los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple</i> | 23 |
| FIGURA 1.2 <i>Clasificación de los surfactantes derivados de aminoácido según su estructura</i> | 25 |
| FIGURA 1.3 <i>Estructura de surfactantes derivados de arginina de cadena simple</i> | 29 |
| FIGURA 1.4 <i>Estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram positivas</i> | 33 |
| FIGURA 1.5 <i>Estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas</i> | 34 |
| FIGURA 1.6 <i>Ilustración de monocapas lipídicas adsorbidas en interfase aire/agua</i> | 40 |
| FIGURA 1.7 <i>Representaciones esquemáticas de las diferentes estructuras liposomales comúnmente utilizadas</i> | 41 |
| FIGURA 1.8 <i>Representación esquemática de bicapas lipídicas soportadas</i> | 42 |
| | |
| CAPÍTULO II | 57 |
| FIGURA 2.1 <i>Representación esquemática de los tres posibles estados de moléculas de surfactantes en solución acuosa</i> | 62 |
| FIGURA 2.2 <i>Parámetro de empaquetamiento superficial</i> | 63 |
| FIGURA 2.3 <i>Representación esquemática de la determinación de la CMC mediante medidas de tensión superficial</i> | 65 |
| FIGURA 2.4 <i>Estructura química de los compuestos Bz-Arg-NHC_n-HX</i> | 68 |
| FIGURA 2.5 <i>Determinación de la CMC de CTAB en PBS mediante las relaciones de intensidad de fluorescencia I₃/I₁ o I_e/I_m</i> | 76 |
| FIGURA 2.6 <i>Espectro de absorción del bromuro en soluciones de CTAB en H₂O o PBS</i> | 77 |
| FIGURA 2.7 <i>Espectro de absorción de soluciones de concentraciones crecientes de CTAB</i> | 79 |
| FIGURA 2.8 <i>Variación de la tensión superficial en función de la concentración de surfactante en PBS</i> | 81 |
| | |
| CAPÍTULO III | 89 |
| FIGURA 3.1 <i>Estructura 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina, DPPC</i> | 95 |

| | |
|--|------------|
| FIGURA 3.2 Representación esquemática de una balanza de Lagmuir y los gráficos obtenidos en la evaluación del poder de penetración de un compuesto bioactivo en una monocapa lipídica..... | 102 |
| FIGURA 3.3 Representación esquemática de la transformación de un liposoma a una bicapa soportada | 105 |
| FIGURA 3.4 Porcentaje de inhibición de crecimiento en presencia de distintas concentraciones de Bz-Arg-NHC ₁₀ | 111 |
| FIGURA 3.5 Transiciones de fase en bicapas compuestas por DPPC | 114 |
| FIGURA 3.6 Curvas de DSC para MLV de DPPC en presencia de Bz-Arg-NHC ₁₀ | 116 |
| FIGURA 3.7 Cinética de inserción de Bz-Arg-NHC ₁₀ 30 μM en monocapas de DPPC | 118 |
| FIGURA 3.8 $\Delta\pi_{m\acute{a}x}$ y $\Delta\pi_{eq}$ en función de π_o obtenidas para la interacción de Bz-Arg-NHC ₁₀ con monocapas de DPPC | 120 |
| FIGURA 3.9 Imágenes de AFM de la interacción de Bz-Arg-NHC ₁₀ 50 μM con bicapas soportadas de DPPC a distintos tiempos | 121 |
| FIGURA 3.10 Imágenes de AFM antes y después del agregado de Bz-Arg-NHC ₁₀ 50 μM a bicapas soportadas de DPPC | 122 |
| FIGURA 3.11 Imágenes de AFM de la interacción de Bz-Arg-NHC ₁₀ 100 μM con bicapas soportadas de DPPC a distintos tiempos | 123 |
| FIGURA 3.12 Medidas de SPR de la interacción de Bz-Arg-NHC ₁₀ con bicapas soportadas de DPPC | 125 |
| CAPÍTULO IV | 135 |
| FIGURA 4.1 Representación esquemática de la anatomía de la piel..... | 141 |
| FIGURA 4.2 Posibles vías de transporte a través del estrato córneo | 142 |
| FIGURA 4.3 Estructura química del ácido oleico, ácido esteárico, ácido lignocérico, Cer24, colesterol y sulfato de colesterol..... | 147 |
| FIGURA 4.4 Configuración inicial para los sistemas simulados mediante DM reportados en la Tabla S4.2 | 156 |
| FIGURA 4.5 Efecto de los anfifilos sobre las propiedades elásticas de monocapas modelo del estrato córneo | 162 |
| FIGURA 4.6 Adsorción sobre interfase aire/agua | 164 |
| FIGURA 4.7 Inserción de anfifilos en monocapas SCM..... | 167 |
| FIGURA 4.8 Imágenes de BAM de monocapas de SCM en presencia de un 35 mol% de los anfifilos | 172 |

| | | |
|-------------------|--|------------|
| FIGURA 4.9 | <i>Imágenes de AFM de monocapas de SCM transferidas a un soporte sólido en presencia de 35 mol% de los anfifilos</i> | 175 |
| FIGURA 4.10 | <i>Distribución de densidades para los sistemas con Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ inicialmente en solución acuosa de la membrana SCM</i> | 178 |
| FIGURA 4.11 | <i>Distribución de densidades para los sistemas con los anfifilos insertados en la membrana SCM</i> | 181 |
| FIGURA 4.12 | <i>Parámetro de orden carbono-hidrógeno (-S_{CH}) para los componentes de la membrana SCM</i> | 183 |
| FIGURA 4.13 | <i>Exceso de área promedio por anfifilo incorporado en la membrana en las simulaciones MD</i> | 185 |
| FIGURA 4.14 | <i>Compresibilidad normalizada con respecto al control para las simulaciones MD de los sistemas con los anfifilos insertos en la membrana</i> | 186 |
| FIGURA S4.1 | <i>Distribución de densidades para los sistemas con los anfifilos inicialmente en la fase acuosa</i> | 200 |
| FIGURA S4.2 | <i>Distribución de densidades para los sistemas con los anfifilos inicialmente insertos en la membrana SCM</i> | 201 |
| FIGURA S4.3 | <i>Átomos seleccionados para el cálculo de -S_{CH} para los componentes de la membrana SCM</i> | 202 |
| CAPÍTULO V | | 205 |
| FIGURA 5.1 | <i>Ilustración esquemática de la bicapa de liposomas ultradeformables y sus componentes</i> | 211 |
| FIGURA 5.2 | <i>Mecanismo de penetración de liposomas ultradeformables</i> | 213 |
| FIGURA 5.3 | <i>Evaluación de la deformabilidad de las formulaciones liposomales SPC20C10 y SPC20C12</i> | 226 |
| FIGURA 5.4 | <i>Evaluación de la citotoxicidad en HaCat de SPC20C10 y SPC luego de 24 y 48 h de incubación</i> | 232 |
| FIGURA 5.5 | <i>Evaluación de la citotoxicidad en J77A.1 de SPC20C10 y SPC luego de 24 y 48 h de incubación</i> | 233 |
| FIGURA 5.6 | <i>Estructura, esquema de localización y espectro de emisión del Laurdan en membranas en fase gel y en fase fluida</i> | 235 |
| FIGURA 5.7 | <i>Valores de GP para la liposomas de SPC en ausencia y presencia de un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀</i> | 236 |

Índice de Tablas

| | |
|---|-----|
| Tabla 2.1. <i>Parámetros fisicoquímicos determinados para Bz-Arg-NHCn-HCl en buffer PBS.....</i> | 82 |
| Tabla 3.1. <i>Concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas</i> | 112 |
| Tabla 4.1. <i>Distancia entre los valores máximos de densidad para los componentes de la membrana en las simulaciones con los anfifilos insertados en ella</i> | 180 |
| Tabla S4.1. <i>Parámetros de optimización de la membrana SCM</i> | 199 |
| Tabla S4.2. <i>Condiciones iniciales de las simulaciones de DM</i> | 199 |
| Tabla 5.1. <i>Composición y características estructurales de formulaciones liposómicas</i> | 224 |
| Tabla 5.2. <i>Parámetros característicos de la evaluación de la ultradeformabilidad de las formulaciones liposomales</i> | 228 |
| Tabla 5.3. <i>Estabilidad coloidal de las formulaciones en función del tiempo de almacenamiento en oscuridad a 4°C.....</i> | 230 |

Capítulo I

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Índice Capítulo I

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 19 |
| 1.1 | Surfactantes | 19 |
| 1.1.1 | <i>Surfactantes derivados de aminoácidos</i> | <i>22</i> |
| 1.1.2 | <i>Propiedades fisicoquímicas</i> | <i>25</i> |
| 1.1.3 | <i>Propiedades biológicas.....</i> | <i>28</i> |
| 1.1.4 | <i>Surfactantes derivados de arginina</i> | <i>28</i> |
| 1.1.5 | <i>Surfactantes como agentes antibacterianos.....</i> | <i>32</i> |
| 1.1.6 | <i>Surfactantes como potenciadores de penetración en aplicación tópica y transdérmica de fármacos</i> | <i>36</i> |
| 1.1.7 | <i>Surfactantes como activadores de borde en liposomas ultradeformables ..</i> | <i>38</i> |
| 1.2 | Sistemas modelo de membranas | 39 |
| 1.2.1 | <i>Monocapas lipídicas como sistema modelo de membrana</i> | <i>39</i> |
| 1.2.2 | <i>Liposomas como sistema modelo de membrana</i> | <i>40</i> |
| 1.2.3 | <i>Bicapas soportadas como sistema modelo</i> | <i>41</i> |
| 1.2.4 | <i>Membranas modelo de bacterias</i> | <i>43</i> |
| 1.2.5 | <i>Modelos de membrana para estudios de piel</i> | <i>43</i> |
| 2 | HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 46 |
| 2.1 | Hipótesis | 46 |
| 2.2 | Objetivos..... | 47 |
| 2.2.1 | <i>Objetivos generales.....</i> | <i>47</i> |

2.2.2 *Objetivos específicos:*..... 48

3 REFERENCIAS.....49

1 Introducción

1.1 Surfactantes

El término surfactante es un anglicismo de la palabra *surfactant*, que a su vez proviene de la contracción de *surface-active agent* (Reznik et al., 2010). La IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) los define como compuestos anfifílicos capaces de disminuir la tensión superficial del medio en el que se encuentran solubilizados, así como también la tensión interfacial en la interfase de fluidos inmiscibles (IUPAC, 2001).

Los surfactantes están compuestos por un grupo polar y una o más cadenas hidrofóbicas, usualmente hidrocarbonadas o fluorocarbonadas. Esta dualidad es la que les confiere una gama única de propiedades, que son utilizadas en una gran variedad de procesos. La región hidrofílica, y por lo tanto la molécula, puede ser no iónica, iónica o zwitteriónica, y está acompañada por contraiones en los dos últimos casos (Pinazo et al., 2011). La cadena hidrocarbonada interactúa débilmente con las moléculas de agua en medios acuosos, mientras que el grupo de la cabeza polar lo hace fuertemente a través de interacciones dipolo o ión-dipolo, lo que les permite ser completa o parcialmente solubles en agua (Tharwat, 2005). Es en este contexto que la forma más simple y comúnmente utilizada para clasificar estos compuestos está basada en la naturaleza del grupo hidrofílico. De esta manera, se pueden distinguir tres grandes clases de surfactantes: aniónicos, catiónicos y zwitteriónicos.

Los surfactantes se caracterizan por aumentar la solubilidad, movilidad, biodisponibilidad y subsecuente biodegradación de compuestos orgánicos insolubles en agua (Singh et al., 2007). Su estructura anfifílica permite que sus regiones hidrofílica e hidrofóbica se orienten en las interfaces entre fluidos con diferentes polaridades, reduciendo así las tensiones superficiales e interfaciales. Como consecuencia, estos compuestos facilitan la formación de emulsiones, dispersiones y espuma, haciéndolos esenciales en aplicaciones que requieren la emulsificación, lubricación y espumado, así como la solubilización de compuestos no miscibles o dispersión de fases. Su capacidad de interactuar con membranas y macromoléculas les otorga, en varios casos, propiedades antimicrobianas, antivirales, hemolítica, insecticida, entre otras. Es así que estos compuestos poseen un amplio rango de aplicaciones, que van desde la limpieza en el hogar, la industria textil, uso en agroquímicos, hasta ingredientes activos en productos de cuidado personal (Clapés & Infante, 2002; Vatta & Kaur, 2017). Debido a las razones expuestas, los surfactantes representan un conjunto de productos consumidos diariamente en grandes cantidades a escala mundial (Pinazo et al., 2011).

La mayoría de los surfactantes disponibles hoy en día provienen de la industria petroquímica, ya que son derivados de los combustibles fósiles. El consumo de recursos no renovables y la contribución a la contaminación ambiental debido a la baja biodegradabilidad de dichos derivados los ha convertido en blanco de diversas polémicas (Morán et al., 2004). Es así como, durante las últimas décadas, la presión ejercida por las legislaciones y los consumidores para generar productos químicos más benignos con el medio ambiente ha logrado que aquellos que presentaran mayor toxicidad fueran reemplazados completamente por tensioactivos menos dañinos y/o

más biodegradables (Bordes & Holmberg, 2015). En este contexto, aquellos compuestos basados en estructuras anfifílicas naturales han despertado un gran interés (Morán et al., 2004; Pinazo et al., 2016).

Como alternativas a los surfactantes derivados del petróleo, pueden mencionarse a los biosurfactantes y los surfactantes de base biológica. Los biosurfactantes son aquellos compuestos obtenidos de fuentes biológicas, como pueden ser microorganismos, plantas o animales. Por lo general, la fuente más sustentable y comercialmente prometedora son los microorganismos, entre los cuales encontramos a bacterias, levaduras y arqueas, debido a su gran diversidad genómica (Nikolova & Gutierrez, 2021). Los biosurfactantes pueden formar parte de la pared celular del microorganismo o ser excretados extracelularmente, e incluyen compuestos tales como péptidos, fosfolípidos, glicolípidos, lipopéptidos y ácidos grasos (Shahaliyan et al., 2015).

Los surfactantes de base biológica son estructuras anfifílicas sintéticas basadas en estructuras naturales de biosurfactantes (Clapés & Infante, 2002). Estos compuestos presentan ciertas propiedades como una alta biodegradabilidad y biocompatibilidad, baja toxicidad, alta actividad superficial, estabilidad bajo extremas condiciones de temperatura, pH y salinidad, diversidad de estructuras y actividad biológica, entre otras. Todas estas características, sumadas a la utilización de recursos renovables para su obtención, les confieren potenciales ventajas sobre los tensioactivos sintéticos convencionales, constituyendo así las principales razones para el creciente interés sobre estas moléculas (Gudiña et al., 2016).

1.1.1 Surfactantes derivados de aminoácidos

Entre los tensioactivos de base biológica, aquellos derivados de aminoácidos representan una interesante familia de surfactantes con excelentes propiedades de adsorción y agregación, alta biodegradabilidad, baja toxicidad, bajo impacto ambiental y amplia actividad antimicrobiana. La multifuncionalidad de estos compuestos los convierte en aditivos promisorios para diversas preparaciones cosméticas y farmacéuticas, ayudando a la eliminación de ingredientes innecesarios y permitiendo el desarrollo de formulaciones más simples con una reducción en los costos.

La combinación entre aminoácidos o péptidos polares y compuestos hidrocarbonados de cadena larga resulta en la obtención de moléculas anfifílicas con alta actividad superficial. Existe una amplia gama de este tipo de estructuras con distintas propiedades fisicoquímicas y biológicas. Esta variabilidad se encuentra determinada no solo por la diversidad de aminoácidos o péptidos que conforman la porción hidrofílica de la molécula, sino que también por la naturaleza, estructura, largo y número de cadenas hidrocarbonadas de la porción hidrofóbica. Varios de los aminoácidos estándares (es decir, aquellos codificados) han sido probados como materia prima para la elaboración de surfactantes y, aunque algunos de ellos ya se han establecido en el mercado, todavía el volumen de producción de estos productos es relativamente pequeño (Bordes & Holmberg, 2015).

Los aminoácidos tienen al menos dos grupos funcionales: el grupo α -carboxílico y el grupo α -amino. La cadena hidrofóbica puede introducirse en la estructura del aminoácido a través de enlaces amida o éster (Figura 1.1).

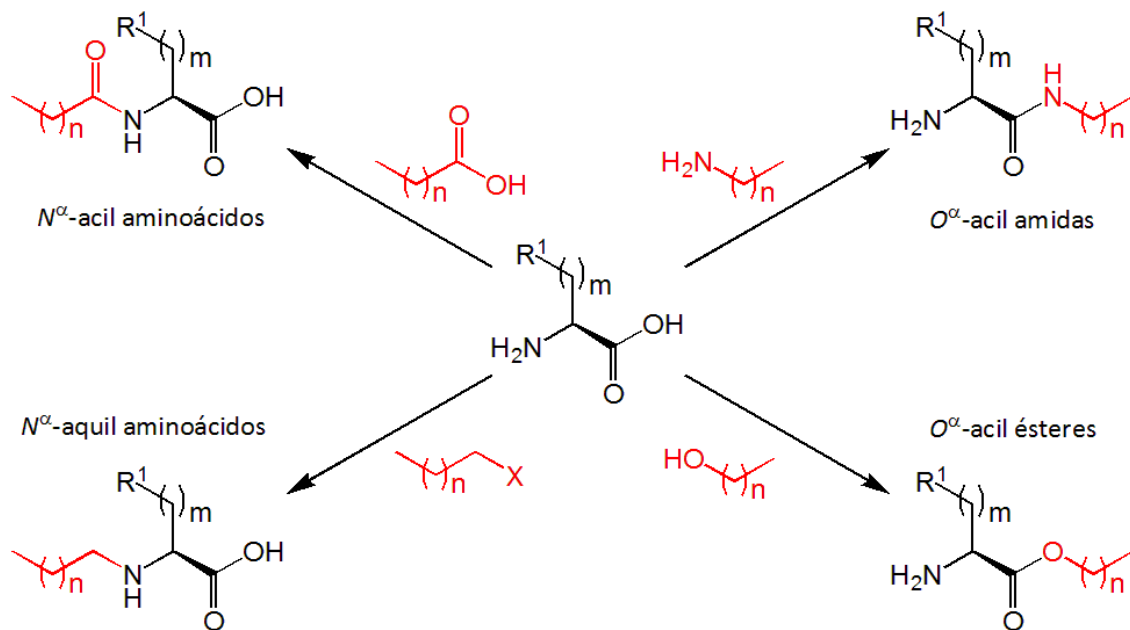


Figura 1.1 Principales tipos de unión entre la porción hidrofóbica y la aminoacídica de los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple. X: Cl, Br o I; R^1 : cadena lateral del aminoácido.

Entre los surfactantes derivados de aminoácidos, la porción correspondiente al péptido o aminoácido será la que determine sus principales diferencias de adsorción, agregación y actividad biológica. Por lo tanto, se pueden obtener surfactantes catiónicos, aniónicos, no iónicos y zwitteriónicos, dependiendo de los grupos funcionales libres. Una modificación adicional en estos grupos, así como también en la

cadena hidrocarbonada, permite un ajuste más fino de sus propiedades según cada aplicación particular (Perinelli et al., 2019).

Además de los surfactantes derivados de aminoácidos de cadena simple, las cadenas alifáticas y los aminoácidos pueden combinarse entre sí para generar nuevas estructuras diméricas o géminis, del tipo glicerolípidos y anfifilos tipo bola (Figura 1.2). Los surfactantes géminis son estructuras formadas por dos moléculas anfifílicas idénticas (constituidas cada una por una cabeza polar y una cola hidrofóbica) unidas covalentemente entre sí mediante un espaciador. En el caso de los surfactantes con estructura tipo glicerolípidos pueden ser considerados análogos de fosfolípidos o de mono- y diglicéridos. Estos consisten en una cabeza polar y una o dos colas hidrofóbicas unidas entre sí a través de un esqueleto de glicerol. Por último, los anfifilos tipo bola poseen dos cabezas polares unidas en cada extremo de una cadena hidrocarbonada.

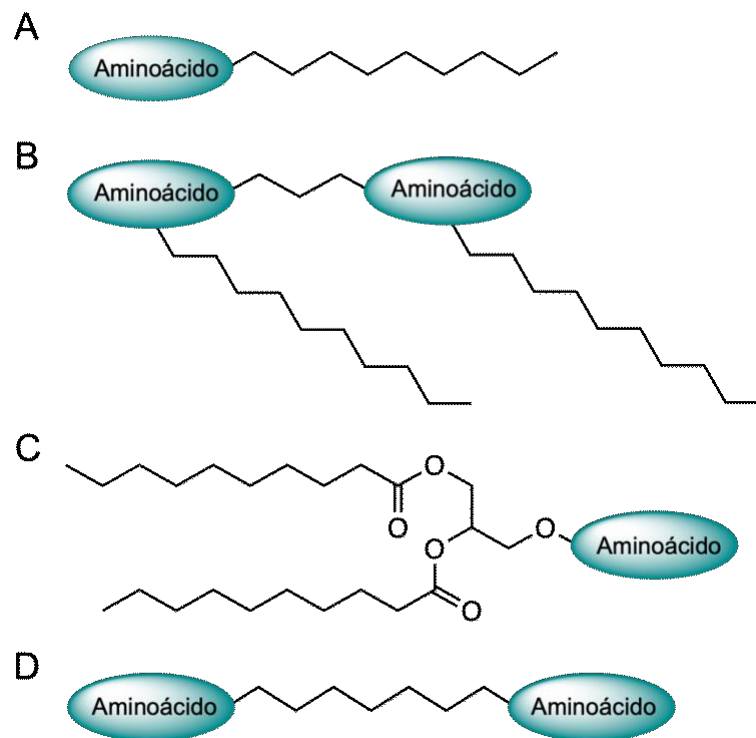


Figura 1.2 Clasificación de los surfactantes derivados de aminoácido según su estructura: A) de cadena simple, B) diméricos o géminis, C) del tipo glicerolípidos y D) anfífilos tipo bola. El aminoácido constituye la cabeza polar del surfactante, mientras que la cadena alquilo hidrocarbonada constituye la región hidrofóbica de la molécula.

1.1.2 Propiedades fisicoquímicas

En general, cuando los surfactantes están presentes en solución a bajas concentraciones, son adsorbidos en la superficie o interfase de una manera orientada con una consecuente disminución en la tensión superficial o interfacial del sistema. En el seno de la solución, estos compuestos forman agregados de diferentes tamaños y formas (esferas, elipsoides, cilindros), comúnmente conocidos como micelas. La concentración a la cual comienza a observarse la formación de agregados es

característica de cada surfactante y se la conoce como concentración micelar crítica (CMC) (Clapés & Infante, 2002). Esta concentración depende no solo de la estructura del surfactante, sino también de otros factores como la temperatura, la naturaleza del contraión, la presencia de electrolitos, y la presencia de otros compuestos orgánicos en solución (Ghosh et al., 2020). La CMC de estos compuestos se rige principalmente por el largo de la cadena alquílica: a mayor cantidad de grupos metilenos en la porción hidrofóbica, menor valor de CMC, debido al aumento del carácter hidrofóbico de la molécula (Pinazo et al., 2016).

La actividad superficial de estas moléculas depende tanto del largo de la cadena hidrocarbonada como de la naturaleza del grupo que conforma la porción hidrofílica. Aquellos anfifilos con mayor largo de cadena hidrocarbonada tienden a tener más actividad de superficie comparados con aquellos que tengan cola hidrocarbonada más corta (Rosen & Kunjappu, 2012).

En términos generales, se ha observado que los surfactantes derivados de aminoácidos tienen el mismo comportamiento fisicoquímico que los surfactantes tradicionales. En este sentido, se ha comprobado que la actividad superficial aumenta al aumentar la longitud de cadena de alquilo y la hidrofobicidad del residuo aminoacídico.

En estudios realizados con surfactantes catiónicos, se encontró que el proceso de micelización está gobernado principalmente por el número de cargas de la cabeza polar, sin que afecte significativamente la posición y/o el tipo de carga, así como también por el largo de la cadena hidrocarbonada (Colomer et al., 2011). Un aumento

en el número de aminoácidos en la estructura del surfactante lleva a un aumento en la hidrofiliidad de la molécula y consecuentemente mejora su solubilidad. Esto disminuye la tendencia de las moléculas a formar micelas, aumentando así el valor de su CMC.

Con respecto a surfactantes géminis, se sabe que su estructura incrementa las interacciones hidrofóbicas dando lugar a compuestos con valores de CMC muy bajos y alta eficiencia en la reducción de la tensión superficial del agua (Zana & Xia, 2003). Por lo general, estos compuestos presentan valores de CMC un orden de magnitud menores que los surfactantes monocatenarios correspondientes.

Se ha reportado que el enlace amida que conecta la cabeza y la cola hidrocarbonada de los tensioactivos de la familia de los N^α -acil aminoácidos participa en la autoagregación de las moléculas (Bordes & Holmberg, 2015). Este enlace puede contribuir en la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares, lo que conduce a un empaquetamiento muy apretado, tanto en el caso en que los anfifilos se alinean en una monocapa en la interfase de dos fluidos inmiscibles, como cuando se agrupan en forma de micelas en solución acuosa (Bordes, Tropsch & Holmberg, 2010). La presencia del enlace amida en los N^α -acil aminoácidos de cadena larga les otorga a estos compuestos una excelente solubilidad acuosa, a diferencia de lo que ocurre con las sales de ácidos grasos tales como el laurato de sodio (Clapés & Infante, 2002).

1.1.3 Propiedades biológicas

Muchos surfactantes catiónicos son extremadamente tóxicos frente a organismos acuáticos como algas, peces y moluscos, a concentraciones de miligramos por litro o incluso menores. Por el contrario, debido a que en los surfactantes derivados de aminoácidos los principales tipos de enlaces entre el residuo aminoacídico y la cola hidrofóbica suelen ser amida y/o éster, estos compuestos son fácilmente degradados por la acción de enzimas hidrolíticas, tales como lipasas y peptidasas. Por lo tanto, la mayoría de estos surfactantes son biodegradables y no tóxicos para los organismos marinos (Clapés & Infante, 2002; Colomer et al., 2011; Infante et al., 2004). Es de particular interés señalar que la presencia de un enlace éster en esta unión hace que la biodegradación se acelere considerablemente.

Por otro lado, la familia de los N^{α} -acil aminoácidos ha sido ampliamente estudiada, demostrando baja capacidad de irritación y sensibilización de la piel (Bordes & Holmberg, 2015). En cuanto a la actividad hemolítica, parámetro comúnmente empleado para evaluar la potencial toxicidad de los surfactantes, la mayoría de estos compuestos son considerados como agentes no hemolizantes en comparación con otros surfactantes catiónicos comerciales, como el Cetrimide (Clapés & Infante, 2002).

1.1.4 Surfactantes derivados de arginina

Entre los surfactantes derivados de aminoácidos, aquellos derivados de arginina conforman una clase de compuestos catiónicos con excelentes propiedades de agregación y adsorción, actividad antimicrobiana de amplio espectro, buena

biodegradabilidad, baja toxicidad y bajo impacto ambiental (Pinazo et al., 2016). Se han descrito en la literatura diversos surfactantes derivados de arginina, tales como monocatenarios, gémis y del tipo glicerolípido (Pérez et al., 2002, 2014; Pinazo et al., 2019). En particular, el presente trabajo de tesis se referirá a surfactantes derivados de arginina monocatenarios. Estos compuestos pueden clasificarse en función de su estructura en tres series: A) N^α -acil arginina metil ésteres, B) arginina- N -alquilamidas y C) arginina- O -alquil ésteres (Figura 1.3).

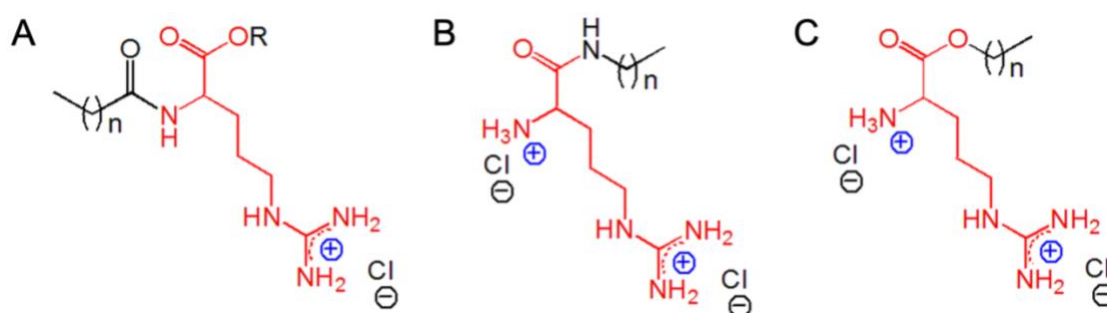


Figura 1.3 Estructura de surfactantes derivados de arginina de cadena simple: A) N^α -acil arginina alquil ésteres (R=CH₃ y n=8 CAM, n=10 LAM, n=12 MAM), B) arginina- N -alquilamidas (n=9 ACA, n=11 ALA, n=13 AMA), y C) arginina- O -alquil ésteres (n=7 AOE, n=9 ACE, n=11 ALE) (Pinazo et al., 2016).

Las principales diferencias entre estas tres series son: el tipo de enlace a través del cual se une la cadena hidrocarbonada a la porción aminoacídica, la posición del mismo respecto al carbono α de la arginina (unión a través del grupo α -amino o α -

carboxilo) y la cantidad de cargas positivas presentes en la porción hidrofílica de la molécula (Morán et al., 2004).

Hasta hace pocos años la síntesis de surfactantes era llevada a cabo mediante metodologías relacionadas con la química orgánica tradicional. Sin embargo, el rápido avance de la biotecnología ha despertado el interés en los surfactantes obtenidos mediante el empleo de catalizadores biológicos (Valivety et al., 1997). Si bien la mayor parte de las aplicaciones de las enzimas hidrolíticas se refiere a reacciones en medio acuoso para la degradación de moléculas complejas a moléculas más simples, el uso de proteasas y lipasas para la síntesis de enlaces éster y amida ha despertado un creciente interés. Este aspecto ha sido ampliamente estudiado para diversas aplicaciones en el área de la química fina, dentro de las cuales cabe mencionar la obtención de los surfactantes derivados de aminoácidos (Castillo Expósito, 2006; Clapés et al., 1999; Morcelle et al., 2009; Valivety et al., 1997). La síntesis y los métodos de purificación tradicionales de esta clase de compuestos involucran numerosos pasos con reacciones de protección y desprotección, así como el uso de solventes orgánicos peligrosos y otros químicos de elevada toxicidad. Estas desventajas pueden ser evitadas empleando enzimas como biocatalizadores, las cuales son altamente específicas y pueden utilizarse bajo condiciones de reacción suaves. Los surfactantes derivados de aminoácidos, al tratarse de derivados no naturales que pueden considerarse análogos estructurales de los lipopéptidos, poseen una estructura muy simple por lo cual son relativamente fáciles de diseñar y sintetizar. Los sintones para la producción de este tipo de compuestos son aminoácidos y aminos o alcoholes grasos, que consisten en las partes hidrofílica e

hidrofóbica de la molécula respectivamente. Dichos sintones pueden unirse mediante una reacción de condensación catalizada por lipasas y/o proteasas.

La papaína es una de las peptidasas más utilizadas industrialmente. Esta enzima es una endopeptidasa cisteínica vegetal obtenida a partir del látex de frutos de *Carica papaya*, que tiene múltiples aplicaciones en industrias tales como alimenticia, cervecera, farmacéutica, cosmética, del cuero y textil. Además, es menos costosa que enzimas microbianas y tiene una buena estabilidad térmica comparada con otras proteasas. La papaína inmovilizada por adsorción sobre poliamida y celite demostró ser un biocatalizador eficiente para la formación de enlaces amida y éster en la síntesis de *N*-alquil amidas y *O*-alquil ésteres de arginina (Castillo Expósito, 2006; Clapés et al., 1999; Morán et al., 2004).

Empleando esta metodología se han sintetizado dos surfactantes derivados de arginina: *N*^α-benzoil-L-arginina decilamida (Bz-Arg-NHC₁₀) y *N*^α-benzoil-L-arginina dodecilamida (Bz-Arg-NHC₁₂) (Fait et al., 2015). Se ha evaluado la actividad hemolítica de estos compuestos, encontrándose que son menos irritantes y hemolíticos que el surfactante catiónico comercial Cetrimide. Además, se ha estudiado el mecanismo de interacción de ambos surfactantes con glóbulos rojos (GR) humanos; se observó que son los agregados los responsables de la solubilización de las membranas de GR, ya que la lisis celular se evidenció a concentraciones mayores que sus respectivas CMC (Fait et al., 2017). Por otra parte, se encontró un comportamiento bifásico para Bz-Arg-NHC₁₂: a altas concentraciones fue capaz de inducir la lisis en GR, mientras que a bajas concentraciones puede protegerlos frente a la hemólisis hipotónica (Fait et al., 2018).

Teniendo en cuenta todas las propiedades de estos compuestos, los surfactantes derivados de arginina presentan muchas de las características requeridas para los tensioactivos que se quieran incorporar en productos de consumo masivo. Sin embargo, estas propiedades deben ser revisadas cada vez que se desarrolla un nuevo surfactante.

1.1.5 Surfactantes como agentes antibacterianos

El uso de agentes antimicrobianos para prevenir y controlar infecciones es de suma importancia. La resistencia, por parte de los microorganismos, a estos compuestos representa una amenaza creciente a la salud pública mundial (Levy & Marshall, 2004; Russell, 2003). Actualmente, las bacterias clínicamente relevantes se caracterizan no solo por la resistencia a drogas individuales sino también por la resistencia a múltiples antibióticos, lo cual se debe al uso y abuso de agentes antimicrobianos durante décadas. Es por esta razón que ha surgido la necesidad de diseñar nuevos compuestos antimicrobianos que impidan el desarrollo de resistencia adquirida. Una estrategia posible es la preparación de compuestos con nuevos modos de acción y blancos distintos a los de los antibióticos que existen hoy en día (Pinazo et al., 2016).

Desde hace varios años se emplean antimicrobianos catiónicos tanto para el control de infecciones como en muchos productos de cuidado personal y, a menudo, se ha asumido que poseen un mecanismo de acción único y genérico dirigido a las membranas biológicas. En las células bacterianas su superficie exterior posee una carga negativa neta, la cual a menudo está estabilizada por la presencia de cationes divalentes como el Mg^{+2} y Ca^{+2} (Gilbert & Moore, 2005). En el caso de las bacterias Gram positivas,

los principales componentes externos de la pared celular son los ácidos teicoico y lipoteicoico, los cuales contribuyen a la carga negativa neta de la misma (Figura 1.4). En el caso de las bacterias Gram negativas, esta carga está asociada a la presencia de lipopolisacáridos que forman parte de la membrana externa de estas bacterias (Figura 1.5). Además, en ambos tipos de bacterias, el predominio de fosfolípidos zwitteriónicos (fosfatidiletanolamina) y lípidos cargados negativamente (fosfatidilglicerol y cardiolipina) en la membrana citoplasmática también contribuyen a la carga negativa neta que presentan. Por lo tanto, no es sorprendente que muchos agentes antimicrobianos catiónicos tengan una alta afinidad de unión por las células bacterianas.

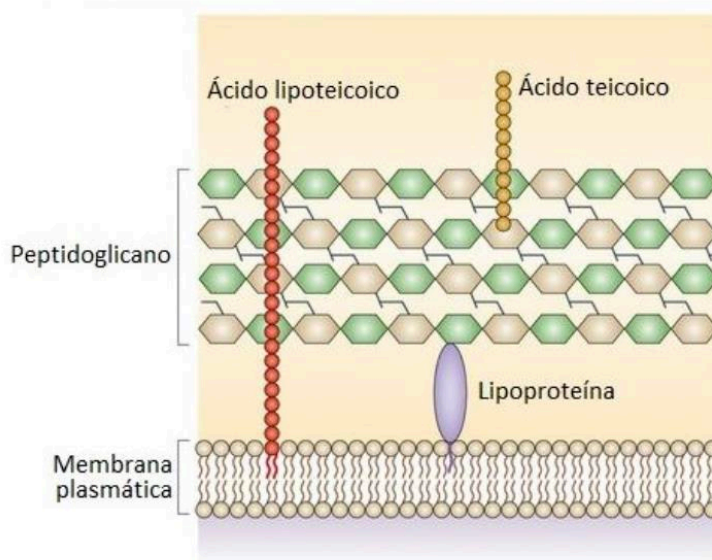


Figura 1.4 Estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram positivas: la membrana plasmática se encuentra rodeada por una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano y ácido lipoteicoico, el cual se encuentra anclado a la membrana a través del esqueleto de diacilglicerol de los fosfolípidos (Imagen tomada de Brown et al., 2015).

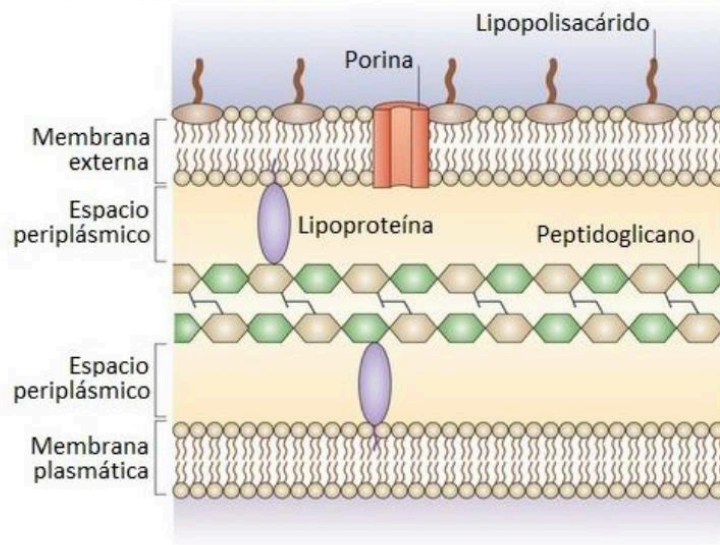


Figura 1.5 Estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas: en el espacio periplásmico entre las membranas citoplasmática y externa se encuentra una fina capa de peptidoglicano; la membrana externa además contiene lipopolisacáridos (LPS) en su cara exterior y facilita el transporte no vesicular a través de canales como porinas y transportadores especializados (Imagen tomada de Brown et al., 2015).

Por lo general, el modo de acción de antimicrobianos catiónicos involucra su integración en la membrana citoplasmática bacteriana. Por lo tanto, a menudo, estos compuestos solo requieren la presencia de una fuerte carga positiva junto con una región hidrofóbica para interactuar con la superficie celular e integrarse en la membrana citoplasmática (Gilbert & Moore, 2005). La región hidrofóbica de los mismos se ubica en el interior de la bicapa lipídica, quedando la cabeza polar alineada con la región hidrofílica de los fosfolípidos de la membrana. Tal integración es suficiente para perturbar el crecimiento y desarrollo normal del microorganismo (efecto bacteriostático)

y, en formulaciones antisépticas es suficiente para hacer que la membrana pierda fluidez y la célula muera (efecto bactericida).

Numerosos trabajos han mostrado que los surfactantes poseen efecto bacteriostático e incluso, efecto bactericida. Se ha encontrado que los surfactantes derivados de aminoácidos, sobre todo de arginina y lisina, son activos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas (Castillo Expósito, 2006; Pinazo et al., 2016). En general, el poder antimicrobiano de los surfactantes catiónicos es el resultado de la combinación de la actividad interfacial de los mismos y su estructura molecular. En el caso particular de los surfactantes derivados de arginina, es un factor clave la longitud de la cadena hidrocarbonada y la presencia del grupo básico guanidinio protonado de la cabeza polar aminoacídica (Castillo Expósito, 2006).

Los surfactantes del tipo arginina-*N*-alquilamidas (compuestos de la serie 2, Figura 1.3) son agentes muy efectivos contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Es bien conocida la tolerancia de las bacterias Gram negativas a los biocidas, siendo la membrana externa la responsable de obstruir la entrada a estos compuestos. Al cambiar el enlace amida por uno éster (compuestos de la serie 3, Figura 1.3), la actividad decrece de forma drástica. El enlace éster puede ser hidrolizado más fácilmente, provocando la eliminación de la actividad antimicrobiana de estos compuestos.

1.1.6 Surfactantes como potenciadores de penetración en aplicación tópica y transdérmica de fármacos

La piel es una de las vías más ventajosas para la administración de fármacos. Esto se debe a su extensión, su fácil acceso y a que es posible evitar el primer paso de la degradación metabólica de los mismos, la que usualmente tiene lugar en el hígado. Más importante aún, se puede garantizar un nivel en sangre estable de las drogas por un largo período de tiempo, evitando así la fluctuación de su concentración; además, podría conllevar al empleo de dosis menores del mismo, resultando en una reducción de los efectos secundarios. Sin embargo, esta vía está restringida por la función de barrera del estrato córneo (SC), siendo pocos los fármacos que pueden naturalmente atravesar dicha barrera.

Los potenciadores de penetración (PP) son sustancias que disminuyen de manera temporal las características de barrera de la piel. Entre los más utilizados se incluyen: agua, hidrocarburos, sulfóxidos, ácidos grasos, ésteres y alcoholes, dexametazona y sus derivados, amidas (incluyendo urea y sus derivados), polioles, aceites esenciales, terpenos, enzimas epidérmicas, polímeros, inhibidores de la síntesis de lípidos y tensioactivos (aniónicos, catiónicos y no iónicos) (Vasyuchenko et al., 2021). Una desventaja importante de muchos PP potentes es que producen irritación de la piel, ya que también interfieren con las membranas de células vivas.

En los últimos años, los surfactantes han sido empleados como PP para mejorar las tasas de permeación de diversos fármacos por vía transdérmica. Como ya se ha mencionado, los surfactantes tienen efectos sobre la permeabilidad de las membranas

biológicas. Esta característica puede hacerse extensiva a la piel, ya que la penetración de la molécula de surfactante en las capas de lípidos del SC depende en gran medida de su comportamiento de partición y su solubilidad. El uso de surfactantes debe ser monitoreado cuidadosamente ya que puede producir irritación de la piel dependiendo de la naturaleza del mismo y la concentración empleada (Teixeira et al., 2015). Se ha evaluado el potencial uso de diferentes surfactantes sintéticos, tanto catiónicos como aniónicos, géminis y monocatenarios, como PP de numerosas drogas, centrándose en la influencia del largo de la cadena en la eficacia de permeación (Pereira et al., 2021; Teixeira et al., 2015).

Actualmente, se busca que los surfactantes que se empleen en la industria farmacéutica como PP sean productos de base biológica que mimeticen los compuestos naturales. Como ya se describió previamente, los surfactantes derivados de aminoácidos cumplirían con estas condiciones. En particular, aquellos surfactantes derivados de arginina, debido a la interacción de este aminoácido con membranas biológicas, constituirían alternativas prometedoras. Se ha sugerido que la arginina es capaz de formar múltiples interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno tanto con las cabezas polares de los lípidos como con el agua, lo que produce como consecuencia deformaciones en la estructura de la bicapa (Hristova & Wimley, 2011). Teniendo esto en cuenta, los surfactantes derivados de arginina podrían penetrar en el SC a través de interacciones hidrofóbicas, arrastrando grupos polares de lípidos y moléculas de agua con ellos hacia el seno de las membranas lipídicas presentes en el SC. Dicho efecto produciría una interrupción de la estructura de la bicapa y favorecería movimientos de más grupos polares de lípidos, moléculas de agua y péptidos hacia el

núcleo hidrofóbico del SC, lo que consiste en una característica muy favorable para su función como PP en aplicaciones tópicas.

1.1.7 Surfactantes como activadores de borde en liposomas ultradeformables

Los liposomas han sido incorporados a las formulaciones farmacéuticas y/o cosméticas para mejorar la administración tópica de los compuestos (Siler-Marinkovic, 2016). Estos son vesículas artificiales que consisten en un núcleo acuoso encerrado en una o más capas de fosfolípidos, donde compuestos solubles en agua pueden ser encapsulados en el núcleo acuoso, mientras que los compuestos liposolubles pueden incorporarse en la bicapa lipídica del liposoma.

Recientemente, estos sistemas de liberación se han modificado con el fin de mejorar la penetración en la piel del liposoma mediante la incorporación de ciertos compuestos que aumentan su deformabilidad, denominándose así activadores de borde. En consecuencia, el liposoma es capaz de incrementar su poder de penetración en la piel. Los liposomas así modificados se denominan liposomas ultradeformables, y tienen la característica de poder atravesar el SC sin perder su estructura. Dentro de los compuestos empleados como activadores de borde, se ha reportado el uso de surfactantes tanto neutros como cargados. Es por esta razón que se ha propuesto el uso de potenciadores de penetración para la formulación de liposomas ultradeformables (Benson, 2016; el Maghraby et al., 2004).

1.2 Sistemas modelo de membranas

Debido a la complejidad que presentan las membranas biológicas, así como también la dificultad para aislarlas y mantenerlas en sus condiciones fisiológicas nativas durante el tiempo que tardan en llevarse a cabo los experimentos, se han desarrollado diferentes modelos de membranas artificiales que permiten el estudio de sus propiedades y su estructura, al igual que el efecto de agentes externos sobre ellas (Eeman & Deleu, 2010).

Entre los sistemas más conocidos y comúnmente utilizados como modelo de membranas biológicas se encuentran: las monocapas, vesículas y bicapas lipídicas soportadas. A pesar de que cada sistema presenta ventajas y desventajas, todos mimetizan la estructura lipídica de las membranas celulares naturales.

1.2.1 Monocapas lipídicas como sistema modelo de membrana

Ciertas moléculas orgánicas cuando se encuentran en una interfase líquido-gaseosa o líquido-líquido tienden a organizarse con el fin de minimizar su energía libre. El *film* resultante tiene el espesor de una molécula, una capa monomolecular comúnmente llamada monocapa (Figura 1.6) (Petty, 1996). Las monocapas lipídicas pueden ser consideradas como la mitad de la bicapa que compone las membranas biológicas. Este sistema bidimensional constituye un modelo simple que permite simular membranas biológicas y evaluar la inserción de compuestos anfipáticos en la misma (Brockman, 1999; Maget-Dana, 1999). Además, presenta varias ventajas en comparación con los otros modelos de membrana. Parámetros como la naturaleza y el

empaquetamiento de las moléculas esparcidas, la composición de la subfase (pH, fuerza iónica) y la temperatura pueden ser modificados de forma controlada (Eeman & Deleu, 2010).

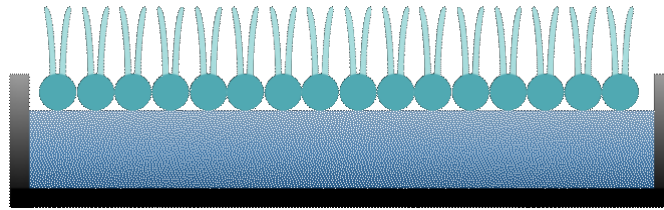


Figura 1.6 Ilustración de monocapas lipídicas adsorbidas en interfase aire/agua.

1.2.2 Liposomas como sistema modelo de membrana

Otro sistema modelo de membrana ampliamente utilizado son los liposomas. Como se mencionó previamente en la Sección 1.1.7, los liposomas se asemejan a las membranas biológicas, con la ventaja de constituir un sistema simplificado y de composición controlada. Además, representan un modelo de membrana versátil, utilizado comúnmente para el estudio del comportamiento de fase de las membranas y procesos como fusión de membranas, reconocimiento molecular y adhesión celular, entre otros.

Según el método que se utilice para la preparación de los liposomas se obtienen vesículas de distintos tamaños, las cuales se pueden clasificar en: vesículas unilamelares pequeñas (SUV, del inglés *Small Unilamellar Vesicles*), con un tamaño entre 30 y 50 nm; vesículas unilamelares grandes (LUV, del inglés *Large Unilamellar Vesicles*), con un tamaño de entre 100 a 500 nm; vesículas unilamelares gigantes (GUV, del inglés *Giant*

Unilamellar Vesicles), con diámetros entre 10 y 100 μm ; y vesículas multilamelares (MLV, del inglés *Multilamellar Lipid Vesicles*), con tamaños mayores a 1 μm (Figura 1.7).

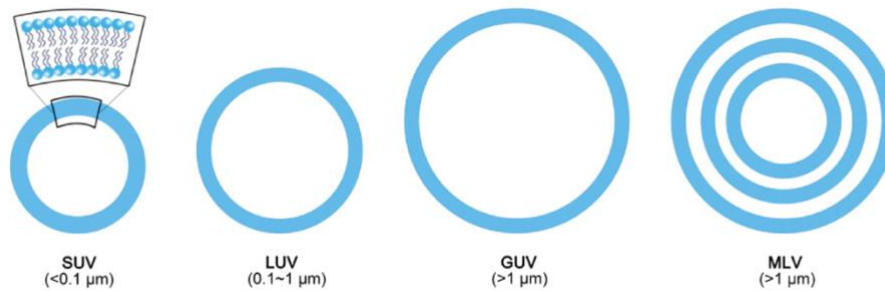


Figura 1.7 Representaciones esquemáticas de las diferentes estructuras liposomales comúnmente utilizadas. Vesículas unilamelares pequeñas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares gigantes (GUV) y vesículas multilamelares (MLV). (Imagen tomada de Li et al., 2018)

1.2.3 Bicapas soportadas como sistema modelo

Las bicapas soportadas (SLB, del inglés *Supported Lipid Bilayers*) son sistemas modelo de membrana que consisten en una bicapa lipídica plana adherida a una superficie sólida como la mica o vidrio (Eeman & Deleu, 2010). En este tipo de modelo las cabezas polares de la monocapa inferior están en contacto con la superficie donde se deposita la bicapa, mientras que las cadenas hidrocarbonadas de la misma están en contacto con las cadenas hidrocarbonadas de la segunda bicapa como se puede observar en la Figura 1.8.

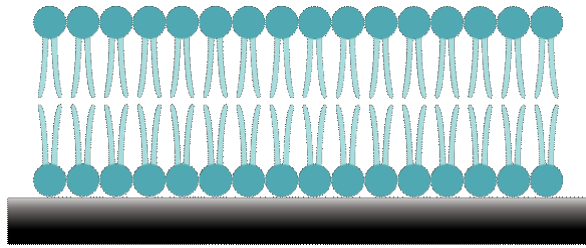


Figura 1.8 Representación esquemática de bicapas lipídicas soportadas (SLB).

Las SLB ofrecen varias ventajas con respecto a las vesículas lipídicas (Loose & Schwille, 2009). Estos sistemas son fáciles de preparar y bastante más estables que los liposomas; asimismo, tanto la composición lipídica general como la asimetría lipídica de la bicapa pueden ser controladas. Además, como en este modelo las bicapas están confinadas a la superficie de un soporte sólido, pueden ser caracterizadas con más facilidad que las vesículas libres en suspensión, permitiendo el uso de una gran variedad de técnicas como microscopía de fuerza atómica, microscopía de fluorescencia, microscopía electrónica de transmisión, entre otras (Eeman & Deleu, 2010).

Desde su desarrollo como sistema modelo de membrana, las bicapas soportadas han sido utilizadas ampliamente para predecir el comportamiento de fase y la organización molecular de membranas biológicas. Además, han demostrado ser un modelo relevante para el estudio de interacciones moleculares de compuestos con membranas celulares (Peetla et al., 2009).

1.2.4 Membranas modelo de bacterias

Las membranas biológicas contienen una gran variedad de lípidos, por lo que la mayor parte de nuestro conocimiento sobre las funciones de las propiedades específicas de los lípidos en membranas proviene de estudios de membranas modelo. Los modelos más comunes utilizados para imitar las propiedades de las membranas bacterianas consisten en mezclas de varios fosfolípidos aniónicos y zwitteriónicos. Estos funcionan razonablemente bien para las bacterias Gram positivas. Sin embargo, dado que las membranas de las bacterias Gram negativas contienen lipopolisacáridos, así como fosfolípidos aniónicos y zwitterionicos, se requiere un modelo más complejo para simular la membrana externa de este tipo de bacterias.

1.2.5 Modelos de membrana para estudios de piel

Los estudios de penetración en la piel juegan un rol esencial en la selección de drogas para aplicación dérmica o transdérmica. Los experimentos *in vivo* en humanos suelen no ser posibles debido a razones éticas, prácticas o económicas, especialmente en las primeras etapas del desarrollo de una droga. Es por esta razón que la elección de un modelo predictivo de penetración *in vitro* es de gran importancia (Alonso et al., 2020; Netzlaff et al., 2005).

Se han propuesto numerosos modelos animales como alternativa a la piel humana. Se han observado características comparables entre la piel de oreja de porcino y la de la piel humana con respecto al SC y espesor de la epidermis, así como la

estructura folicular y la densidad del pelo (Jacobi et al., 2007). Sin embargo, la relevancia de las conclusiones obtenidas utilizando animales como modelo para la piel humana ha sido siempre cuestionable. El principal inconveniente en el uso de membranas biológicas naturales, tanto animales como humanas, es la alta variabilidad inter- e intraindividual (Alonso et al., 2020). Además, los problemas éticos que surgen del uso de la piel de animales con fines de testeo conducen a regulaciones, donde en algunos países se prohíbe el uso de animales para recopilar datos toxicológicos para ingredientes cosméticos (Netzlaff et al., 2005).

En los últimos años se ha estimulado el desarrollo de membranas artificiales para obtener modelos capaces de reproducir distintas propiedades de la piel como la penetración e irritabilidad, entre otras. SkinEthic® (SkinEthic, France), EpiSkin® (LÓreal, France), y EpiDerm® (MatTek, USA) están definidos como pieles sintéticas obtenidas a partir de cultivos de queratinocitos humanos normales. Estas demuestran gran similitud con la piel humana en términos de estructura, composición lipídica y marcadores biológicos. Por esta razón son considerados alternativas útiles para llevar a cabo pruebas de corrosividad, irritabilidad y fototoxicidad de los ingredientes en la industria cosmética. Sin embargo, no son utilizados frecuentemente para ensayos de penetración de drogas, ya que la epidermis y el estrato córneo no están completamente formados. Por lo tanto, estos sistemas son más permeables que la piel humana, debido a que estas capas (epidermis y SC) son las que ofrecen la mayor resistencia a la aplicación tópica (Alonso et al., 2020).

Aceptando que los dominios de lípidos intercelulares son responsables de la naturaleza de barrera del SC, es posible realizar los estudios con sistemas modelo de membranas más simples como los previamente mencionados. Los liposomas compuestos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) fueron utilizados inicialmente en estudios del efecto de potenciadores de penetración empleando calorimetría diferencial de barrido (DSC) (el Maghraby et al., 2004). Estas investigaciones revelaron resultados comparables con los obtenidos en estudios que emplean SC humano.

Sin embargo, la importancia de emplear sistemas modelo compuestos por mezclas más complejas se basa en investigaciones que demuestran que el alto contenido de ceramidas es esencial para mantener la función de barrera de la piel, como surge de estudios asociados a enfermedades como dermatitis atópica y psoriasis, en las que se encontró que los niveles de ceramidas estaban muy disminuidos (Knox & O'Boyle, 2021; van Smeden et al., 2013). En cuanto al colesterol, es un componente indispensable de la matriz lipídica del SC y es de fundamental importancia para la organización adecuada de los lípidos, contribuyendo a un empaquetamiento ortorrómbico y, por lo tanto, esencial para la función de barrera cutánea.

2 Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

El uso de compuestos con actividad antimicrobiana como preservantes y antisépticos en la industria farmacéutica, alimenticia y dermatológica es de importancia capital. Debido al comportamiento adaptativo de los microorganismos y su tendencia a adquirir resistencia, el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos presenta un constante desafío. Por otro lado, la naturaleza de barrera de la piel causa dificultades para la administración transdérmica de drogas; por lo tanto, el desarrollo de surfactantes que aumenten la penetración de estas barreras podría sortear este inconveniente.

Los lipoaminoácidos combinan las propiedades estructurales de los lípidos con los de los α -aminoácidos, y representan una clase relativamente inexplorada de agentes que mejorarían la adsorción y/o difusión de drogas.

Los surfactantes derivados de aminoácidos, en particular de arginina, son compuestos que mimetizan los lipoaminoácidos naturales y han demostrado poseer baja irritabilidad y toxicidad, y además son biodegradables. Estos compuestos han sido exitosamente obtenidos mediante catálisis enzimática empleando peptidasas, combinando así no sólo la generación de compuestos biodegradables sino también la utilización de tecnologías de producción de bajo impacto ambiental.

En este contexto, la hipótesis planteada en el presente plan de Trabajo Doctoral sostiene que estos surfactantes derivados de arginina constituirían una alternativa

novedosa y prometedora a los surfactantes convencionales para su uso como biocidas y/o como potenciadores de penetración de moléculas terapéuticas a través de la piel.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivos generales

El mecanismo de acción como biocidas y potenciadores de penetración (PP) de sustancias a través del estrato corneo (SC) de estos compuestos aún no ha sido investigado en detalle. Debido a que las perturbaciones de la membrana celular por los surfactantes están directamente gobernadas por procesos fisicoquímicos, los sistemas modelo de membrana pueden proveer información valiosa para entender el mecanismo de acción biocida de estas moléculas. A su vez, estructuralmente el SC es una delgada capa heterogénea, que comprende capas de células epidérmicas diferenciadas y queratinizadas separadas por un dominio lipídico intercelular. Estos lípidos tienen una organización de múltiples bicapas con una organización que se asemeja a la de los liposomas. En este contexto, esta situación podría ser parcialmente representada por liposomas con una composición de lípidos similar al SC.

El presente plan propone caracterizar la interacción de estos nuevos surfactantes derivados de arginina con sistemas modelo de membrana bacteriana y de piel. Se espera que, mediante la mayor comprensión de la interacción de estos surfactantes con las membranas, la elección de biocidas y PP deje de ser empírica, aumentando así significativamente el número de medicamentos disponibles para la administración tópica y transdérmica.

2.2.2 Objetivos específicos:

1. Obtener surfactantes derivados de arginina a través de técnicas biocatalíticas, empleando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador.
2. Determinar su concentración micelar crítica (CMC).
3. Caracterizar la interacción de los surfactantes con diferentes sistemas modelo de membrana (liposomas, monocapas y bicapas soportadas) compuestas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y de una mezcla de lípidos que mimetice el estrato córneo (mezcla equimolar de ceramida, colesterol y ácido lignocérico, con la adición de un 5% de sulfato de colesterol). La caracterización se realizará con técnicas biofísicas tales como calorimetría diferencial de barrido (DSC), isothermas de compresión de monocapas, microscopía de ángulo Brewster (BAM), microscopía de fuerza atómica (AFM) y resonancia superficial de plasmones (SPR).
4. Evaluar la posible aplicación de los surfactantes como activadores de borde para la formación de liposomas ultradeformables.

3 Referencias

- Alonso, C., Collini, I., Carrer, V., Barba, C., Martí, M., & Coderch, L. (2020). Permeation kinetics of active drugs through lanolin-based artificial membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 192. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111024>
- Benson, H. A. E. (2016). Vesicles for transdermal delivery of peptides and proteins. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers* (pp. 297–307). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47862-2_19
- Bordes, R., & Holmberg, K. (2015). Amino acid-based surfactants - do they deserve more attention? *Advances in Colloid and Interface Science*, 222, 79–91. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.013>
- Brockman, H. (1999). Lipid monolayers: Why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Current Opinion in Structural Biology*, 9(4), 438–443. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)80061-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)80061-X)
- Brown, L., Wolf, J. M., Prados-Rosales, R., & Casadevall, A. (2015). Through the wall: Extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 10, pp. 620–630). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3480>
- Castillo Expósito, J. A. (2006). *Studies on Antimicrobial Activity of Arginine-Based Surfactants and Chemo-Enzymatic Synthesis of Novel Amphiphiles Based on L-Arginine and D-Fagomine*.
- Clapés, P., & Infante, M. R. (2002). Amino Acid-based Surfactants: Enzymatic Synthesis, Properties and Potential Applications. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(4), 215–233. <https://doi.org/10.1080/10242420290004947>

- Clapés, P., Morán, C., & Infante, M. R. (1999). Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*, 63(3), 333–343. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19990505\)63:3<333::AID-BIT10>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19990505)63:3<333::AID-BIT10>3.0.CO;2-G)
- Colomer, A., Pinazo, A., Manresa, M. A., Vinardell, M. P., Mitjans, M., Infante, M. R., & Pérez, L. (2011). Cationic Surfactants Derived from Lysine: Effects of Their Structure and Charge Type on Antimicrobial and Hemolytic Activities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(4), 989–1002. <https://doi.org/10.1021/jm101315k>
- Eeman, M., & Deleu, M. (2010). From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(4), 719–736.
- el Maghraby, G. M. M., Williams, A. C., & Barry, B. W. (2004). Interactions of surfactants (edge activators) and skin penetration enhancers with liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 276(1–2), 143–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.02.024>
- Fait, M. E., Garrote, G. L., Clapés, P., Tanco, S., Lorenzo, J., & Morcelle, S. R. (2015). Biocatalytic synthesis, antimicrobial properties and toxicity studies of arginine derivative surfactants. *Amino Acids*, 47(7), 1465–1477. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1979-0>
- Fait, M. E., Hermet, M., Comelles, F., Clapés, P., Alvarez, H. A., Prieto, E., Herlax, V., Morcelle, S. R., & Bakás, L. (2017). Microvesicle release and micellar attack as the alternative mechanisms involved in the red-blood-cell-membrane solubilization induced by arginine-based surfactants. *RSC Adv.*, 7(60), 37549–37558. <https://doi.org/10.1039/C7RA03640J>
- Fait, M. E., Hermet, M., Vazquez, R., Mate, S., Daza Millone, M. A., Vela, M. E., Morcelle, S. R., & Bakás, L. (2018). Volume expansion of erythrocytes is not the only mechanism responsible for the protection by arginine-based surfactants against

- hypotonic hemolysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 171. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.005>
- Ghosh, S., Ray, A., & Pramanik, N. (2020). Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. *Biophysical Chemistry*, 265(July), 106429. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106429>
- Gilbert, P., & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 703–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>
- Gudiña, E. J., Rodrigues, A. I., de Freitas, V., Azevedo, Z., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2016). Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresource Technology*, 212, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.027>
- Hristova, K., & Wimley, W. C. (2011). A look at arginine in membranes. In *Journal of Membrane Biology* (Vol. 239, Issues 1–2, pp. 49–56). Springer Science and Business Media, LLC. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9323-9>
- Infante, M. R., Pérez, L., Pinazo, A., Clapés, P., Morán, C., Angelet, M., García, M. T., & Vinardell, M. P. (2004). Amino acid-based surfactants. *Comptes Rendus Chimie*, 7(6–7), 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2004.02.009>
- IUPAC. (2001). *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Pure and Applied Chemistry. <https://doi.org/10.1351/pac199062112139>
- Jacobi, U., Kaiser, M., Toll, R., Mangelsdorf, S., Audring, H., Otberg, N., Sterry, W., & Lademann, J. (2007). Porcine ear skin: An in vitro model for human skin. *Skin Research and Technology*, 13(1), 19–24. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0846.2006.00179.x>

- Knox, S., & O'Boyle, N. M. (2021). Skin lipids in health and disease: A review. In *Chemistry and Physics of Lipids* (Vol. 236). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2021.105055>
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. In *Nature Medicine* (Vol. 10, Issue 12S, pp. S122–S129). <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Li, H., Zhao, T., & Sun, Z. (2018). Analytical techniques and methods for study of drug-lipid membrane interactions. *Reviews in Analytical Chemistry*, 37(1). <https://doi.org/10.1515/revac-2017-0012>
- Loose, M., & Schwille, P. (2009). Biomimetic membrane systems to study cellular organization. *Journal of Structural Biology*, 168(1), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.03.016>
- Maget-Dana, R. (1999). The monolayer technique: A potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1462, Issues 1–2). [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00203-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00203-5)
- Morán, C., Pinazo, A., Pérez, L., Clapés, P., & Angelet, M. (2004). “Green” amino acid-based surfactants. 6(3), 233–240.
- Morcelle, S. R., Liggieri, C. S., Bruno, M. A., Priolo, N., & Clapés, P. (2009). Screening of plant peptidases for the synthesis of arginine-based surfactants. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1–4), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.08.013>
- Netzlaff, F., Lehr, C. M., Wertz, P. W., & Schaefer, U. F. (2005). The human epidermis models EpiSkin®, SkinEthic® and EpiDerm®: An evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport.

- In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Vol. 60, Issue 2, pp. 167–178). <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.03.004>
- Nikolova, C., & Gutierrez, T. (2021). Biosurfactants and Their Applications in the Oil and Gas Industry: Current State of Knowledge and Future Perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(February). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.626639>
- Peetla, C., Stine, A., & Labhasetwar, V. (2009). Biophysical interactions with model lipid membranes: Applications in drug discovery and drug delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 6(5), 1264–1276. <https://doi.org/10.1021/mp9000662>
- Pereira, R., Silva, S. G., Pinheiro, M., Reis, S., & Luísa Do Vale, M. (2021). Current status of amino acid-based permeation enhancers in transdermal drug delivery. In *Membranes* (Vol. 11, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/membranes11050343>
- Pérez, L., Pinazo, A., Pons, R., & Infante, M. R. (2014). Gemini surfactants from natural amino acids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 205, 134–155. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.10.020>
- Pérez, L., Pinazo, A., Vinardell, P., Clapés, P., Angelet, M., & Infante, M. R. (2002). Synthesis and biological properties of dicationic arginine–diglycerides. *New J. Chem.*, 26(9), 1221–1227. <https://doi.org/10.1039/B203896J>
- Perinelli, D. R., Petrelli, D., Vllasaliu, D., Vitali, L. A., Bonacucina, G., Cespi, M., Giorgioni, G., & Palmieri, G. F. (2019). Quaternary ammonium leucine-based surfactants: The effect of a benzyl group on physicochemical properties and antimicrobial activity. *Pharmaceutics*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060287>
- Petty, M. C. (1996). *Langmuir-Blodgett Films: An Introduction*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511622519>

- Pinazo, A., Manresa, M. A., Marques, A. M., Bustelo, M., Espuny, M. J., & Pérez, L. (2016). Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. *Advances in Colloid and Interface Science*, 228, 17–39. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.11.007>
- Pinazo, A., Pérez, L., Morán, C., & Pons, R. (2019). Arginine-Based Surfactants: Synthesis, Aggregation Properties, and Applications. In *Biobased Surfactants* (Second Edition, pp. 413–445). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00013-7>
- Pinazo, A., Pons, R., Pérez, L., & Infante, M. R. (2011). Amino acids as raw material for biocompatible surfactants. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 50(9), 4805–4817. <https://doi.org/10.1021/ie1014348>
- Reznik, G. O., Vishwanath, P., Pynn, M. A., Sitnik, J. M., Todd, J. J., Wu, J., Jiang, Y., Keenan, B. G., Castle, A. B., Haskell, R. F., Smith, T. F., Somasundaran, P., & Jarrell, K. A. (2010). Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(5), 1387–1397. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2431-8>
- Rosen, M. J., & Kunjappu, J. T. (2012). *Surfactants and Interfacial Phenomena* (4th ed.). John Wiley & Sons, Inc.
- Russell, A. D. (2003). Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The Lancet Infectious Diseases*, 3, 794–803. <http://infection.thelancet.com794>
- Shahaliyan, F., Safahieh, A., & Abyar, H. (2015). Evaluation of Emulsification Index in Marine Bacteria *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(7), 1849–1854. <https://doi.org/10.1007/s13369-015-1663-4>
- Siler-Marinkovic, S. (2016). Liposomes as drug delivery systems in dermal and transdermal drug delivery. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers* (pp. 15–38). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47862-2_2

- Singh, A., Van Hamme, J. D., & Ward, O. P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, 25(1), 99–121. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.10.004>
- Teixeira, R. S., Cova, T. F. G. G., Silva, S. M. C., Oliveira, R., do Vale, M. L. C., Marques, E. F., Pais, A. A. C. C., & Veiga, F. J. B. (2015). Novel serine-based gemini surfactants as chemical permeation enhancers of local anesthetics: A comprehensive study on structure-activity relationships, molecular dynamics and dermal delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 93, 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.02.024>
- Tharwat, F. T. (2005). Introduction. In *Applied Surfactants* (pp. 1–17). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/3527604812.ch1>
- Valivety, R., Jauregi, P., Gill, I., & Vulfson, E. (1997). Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 74(7), 879–886. <https://doi.org/10.1007/s11746-997-0232-8>
- van Smeden, J., Janssens, M., Lavrijsen, A. P., Kezic, S., Vreeken, R. J., & Bouwstr, J. A. (2013). Skin barrier dysfunction in non-lesional atopic eczema: the role of stratum corneum lipids. *European Journal of Dermatology*.
- Vasyuchenko, E. P., Orekhov, P. S., Armeev, G. A., & Bozdaganyan, M. E. (2021). Cpe-db: An open database of chemical penetration enhancers. *Pharmaceutics*, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13010066>
- Vatta, P., & Kaur, R. (2017). Influence of NaCl on the Micellar Behaviour of Some Cationic Surfactans. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 10(05), 01–04. <https://doi.org/10.9790/5736-1005020104>
- Zana, R., & Xia, J. (2003). *Gemini Surfactants : Synthesis, Interfacial and Solution-Phase Behavior, and Applications* (R. Zana & J. Xia, Eds.; 1st Edition). CRC Press.

Capítulo II

DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES
DE AGREGACIÓN DE SURFACTANTES
DERIVADOS DE ARGININA

Índice Capítulo II

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 61 |
| 1.1 | Métodos de determinación de la concentración micelar crítica | 64 |
| 2 | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 67 |
| 2.1 | Materiales | 67 |
| 2.2 | Síntesis y purificación de surfactantes derivados de arginina | 67 |
| 2.2.1 | <i>Inmovilización del extracto enzimático de papaína por adsorción en poliamida.....</i> | <i>67</i> |
| 2.2.2 | <i>Síntesis semipreparativa de Bz-Arg-NHC_n.....</i> | <i>68</i> |
| 2.2.3 | <i>Purificación de Bz-Arg-NHC_n·HCl por cromatografía de intercambio iónico</i> | <i>69</i> |
| 2.2.4 | <i>Obtención y purificación de Bz-Arg-NHC_n·HBr.....</i> | <i>70</i> |
| 2.3 | Determinación de la concentración micelar crítica..... | 70 |
| 2.3.1 | <i>Optimización de la determinación de la CMC mediante la absorción de bromuros</i> | <i>70</i> |
| 2.3.2 | <i>Determinación de la CMC mediante medidas de tensión superficial.....</i> | <i>71</i> |
| 3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 73 |
| 3.1 | Optimización de un método de determinación de CMC empleando absorción UV del contraión bromuro..... | 74 |
| 3.2 | Determinación de la CMC de CTAB empleando pireno..... | 75 |
| 3.3 | El contraión bromuro como sensor de otros iones en solución | 76 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4 | El bromuro como sensor de agregación..... | 78 |
| 3.5 | Determinación de la CMC de Bz-Arg-NHC _n mediante medidas de tensión superficial..... | 80 |
| 4 | CONCLUSIÓN..... | 83 |
| 5 | REFERENCIAS..... | 85 |

1 Introducción

Como se mencionó previamente, cuando los surfactantes se encuentran en solución acuosa sus moléculas son adsorbidas en la superficie, es decir que difunden preferencialmente desde el seno de la solución hacia una interfase. Este es un proceso gobernado entrópicamente: debido a la afinidad que presentan estas moléculas anfifílicas tanto por fases polares como no polares, el equilibrio se alcanza cuando las mismas se adsorben en la interfase polar-no polar. El proceso de adsorción ocurre a cualquier concentración de surfactante, pero si gradualmente esta se incrementa, la concentración superficial del compuesto también aumenta alcanzando un nivel máximo a una determinada concentración de surfactante en el seno de la solución. Por encima de esta concentración los monómeros de surfactante comienzan a agregarse con el fin de minimizar la energía libre del sistema. En general, se cree que alrededor de las porciones no polares de las moléculas de surfactante en solución hay un aumento en el orden de las moléculas de agua como resultado del incremento en el establecimiento de puentes de hidrógeno; al formarse los agregados de surfactante, debido a interacciones hidrofóbicas, el orden de las moléculas de agua disminuye dando lugar a un cambio positivo en la entropía del sistema (Alawi, 2010). La concentración a la cual este proceso de agregación ocurre se denomina, como ya se definió en la Introducción, concentración micelar crítica (CMC). Los agregados son denominados micelas, y se encuentran en equilibrio con los monómeros libres en solución (Figura 2.1). Esta propiedad de los surfactantes hace que las soluciones acuosas donde se encuentren

sean medios micro-heterogéneos, es decir, son heterogéneos a escala microscópica aunque a menudo son homogéneos macroscópicamente (Domínguez et al., 1997).

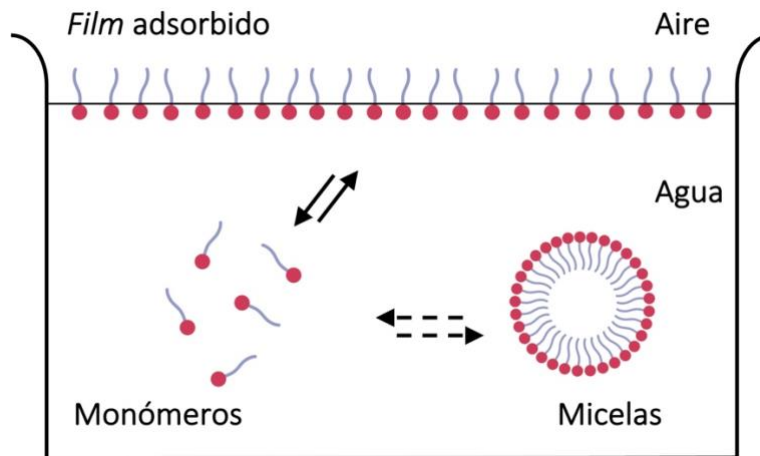


Figura 2.1 Representación esquemática de los tres posibles estados de moléculas de surfactantes en solución acuosa, monómeros, micelas y *film* adsorbido (monocapa de Gibbs), a concentraciones mayores a su CMC.

La forma que adoptan dichos agregados depende principalmente de la estructura molecular del surfactante y, para predecir dicha forma hay ciertas reglas empíricas basadas en parámetros geométricos de la molécula (Luisi, 2016). En particular, como se puede observar en la Figura 2.2, el volumen (V) ocupado por el surfactante, el área (a) de la cabeza polar, y el largo (l) de la cola hidrocabonada son los factores determinantes de la forma del agregado. Cuando el parámetro de empaquetamiento de superficie (SPP), definido por la Ecuación 2.1, es cercano a la unidad tienden a formarse bicapas; mientras que, si es menor o mayor a 1, se formarán micelas acuosas esféricas o micelas reversas, respectivamente. Sin embargo, no siempre

es posible determinar la forma del agregado en base a este parámetro ya que hay factores del entorno, como la temperatura y el pH, que van a afectar la forma del mismo (Luisi, 2016).

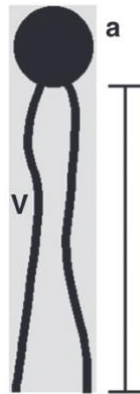


Figura 2.2 Parámetro de empaquetamiento superficial, SPP, basado en los parámetros geométricos de la molécula de surfactante, que determina en cierta medida la forma del agregado.

$$SPP = \frac{V}{a \times l} \quad \text{Ecuación 2.1}$$

No obstante, el valor de la CMC para un determinado compuesto no es una constante ya que puede ser afectado por diferentes variables, a saber: el balance hidrofóbico-hidrofílico del monómero y las condiciones fisicoquímicas del entorno. El balance hidrofóbico-hidrofílico depende del largo de la cadena hidrocarbonada: a mayor longitud de la misma, menor el valor de la CMC. El pH y la temperatura, y particularmente para el caso de los surfactantes iónicos, la naturaleza y la concentración

de los contraiones presentes en la solución, son los factores fisicoquímicos del entorno que tienen mayor efecto sobre el valor de la CMC. Adicionalmente, la presencia de electrolitos produce un descenso de dicho valor, y este efecto incrementa al disminuir la densidad de carga del contraión (Yu & Xu, 2011).

1.1 Métodos de determinación de la concentración micelar crítica

A partir de concentraciones mayores a la CMC los surfactantes muestran cambios marcados en sus propiedades físicas, tales como conductividad eléctrica, presión osmótica, densidad, dispersión de la luz o índice de refracción (Pérez-Rodríguez et al., 1998); por lo tanto, es de sumo interés la investigación sobre métodos simples y prácticos para su determinación. Con este fin, numerosas metodologías han sido desarrolladas, las cuales, generalmente, hacen uso de los cambios en las propiedades físicas previamente mencionadas en función de la concentración. Básicamente, el valor de la CMC es calculado a partir de la intersección de las dos líneas rectas de la gráfica de la propiedad medida en función de la concentración de surfactante, en la cual se observa un cambio abrupto en la pendiente. Debido a que el cambio de pendiente se produce en un rango más o menos estrecho de concentraciones, el valor de la CMC determinado puede ser ambiguo y su magnitud dependerá de la propiedad que se mida. En la Figura 2.3 se puede observar una representación esquemática de la determinación del valor de la CMC mediante medidas de tensión superficial. En esta figura se ve como disminuye la tensión superficial al aumentar la concentración de surfactante hasta que

llega a un determinado punto en el cual este valor se hace constante. Dicho valor es el correspondiente a la CMC.

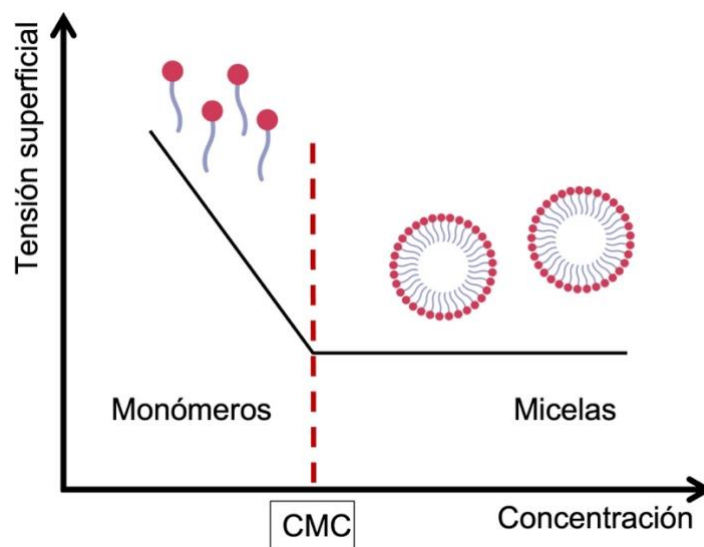


Figura 2.3 Representación esquemática de la determinación de la CMC mediante medidas de tensión superficial.

Otra forma de determinar esta concentración es midiendo el cambio en las características espectrales de alguna sonda añadida cuando se alcanza la CMC del compuesto de interés. Entre los métodos comúnmente utilizados, las sondas fluorescentes son de gran utilidad. Esto se debe a sus numerosas ventajas, entre las cuales se encuentran su simplicidad, sensibilidad, y bajo costo (Cai et al., 2015). Dentro de las sondas fluorescentes que generalmente se emplean, podemos encontrar al pireno, el cual ha sido utilizado como sonda por excelencia para sistemas microheterogéneos como micelas, polímeros, proteínas, péptidos y membranas

biológicas (Piñeiro et al., 2015). La sensibilidad de la intensidad de fluorescencia del pireno a la polaridad del solvente se utiliza para la determinación de la CMC de estos sistemas micelares. En la ausencia de micelas, por debajo de la CMC, las moléculas de pireno detectan un entorno polar debido a las moléculas de agua; mientras que, por encima de la CMC, cuando hay micelas presentes, y debido a la alta hidrofobicidad de las moléculas de pireno, estas se solubilizan en la fase micelar por lo que el entorno detectado es menos polar. Esta sonda, además, presenta un espectro de absorción característico, con picos intensos en la región del UV, el cual puede ser de utilidad a la hora de determinar la CMC de un compuesto.

Cuando se emplean sondas para la determinación espectroscópica de la CMC, se debe asegurar que la presencia de la misma no afecte al valor de la CMC del compuesto de interés (Rosen, 2004). Una alternativa es la de tener un sensor espectroscópico que no sea ajeno al sistema. El bromuro es un contraión común de varios tensioactivos, el cual presenta una fuerte banda de absorción cerca de los 200 nm en soluciones acuosas. Dependiendo de la composición de la solución en la que se encuentre, el máximo de absorción de bromuro puede desplazarse, actuando como un sensor de agregación e interacción con otros iones, moléculas unidas o insertadas en la región interfacial, detectando interactivamente su microambiente.

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

Para la síntesis de los surfactantes se emplearon papaína y tamices moleculares (4 Å) de Fluka; decil- y dodecilamina, y *N*^α-benzoil-L-arginina etil éster (Bz-Arg-OEt o BAEE) comprados a Sigma-Aldrich (USA). 1,4-ditio-D,L-treitol (DTT) fue adquirido a Invitrogen. Acetonitrilo (ACN) y CH₃OH de Baker, y ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA, Anedra). Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) fue comprado a Ciccarelli, y la sonda pireno fue provista por Sigma-Aldrich (pureza 99,0 %).

El buffer fosfato salino (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*) empleado contenía NaCl 123,3 mM, Na₂HPO₄ 22,2 mM y KH₂PO₄ 5,6 mM, pH 7,4; y una osmolaridad de 300 mOsmol/l. El agua utilizada para la preparación de todas las soluciones fue purificada por un sistema Milli-Q (Millipore, USA) para obtener un producto con resistividad de 18.2 MΩ.cm.

El resto de los reactivos y solventes empleados fueron de calidad analítica o superior.

2.2 Síntesis y purificación de surfactantes derivados de arginina

2.2.1 Inmovilización del extracto enzimático de papaína por adsorción en poliamida

Para la preparación del inmovilizado enzimático se disolvieron 300 mg del extracto enzimático (papaína) junto con 150 mg DTT en 3 ml de buffer bórico-borato pH 8,5 conteniendo 1 mM de EDTA. Se le agregaron 3 g de soporte sólido (poliamida) y se

homogeneizó agitando vigorosamente en vórtex. Finalmente, el biocatalizador fue secado por liofilización y almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.2 Síntesis semipreparativa de Bz-Arg-NHC_n

Para la preparación de la mezcla de reacción, BAEE (20 mM) y decil- o dodecilamina (30 mM) fueron disueltos en ACN anhidro conteniendo 0,25% v/v de agua. Se incubó 1 g del biocatalizador con 10 ml de la mezcla de reactivos bajo atmósfera de nitrógeno, en un Erlenmeyer cerrado herméticamente, con agitación constante (250 rpm) a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas.

Luego de la incubación se separó el biocatalizador del medio de reacción por filtración a través de papel, realizándose a continuación lavados del mismo con ACN (3x10 ml) y éter sulfúrico (3x10 ml) de manera de eliminar el exceso de amina. Finalmente, se extrajo el producto de reacción adsorbido en la superficie del biocatalizador mediante lavados con una mezcla $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ 4:1 (3x10 ml).

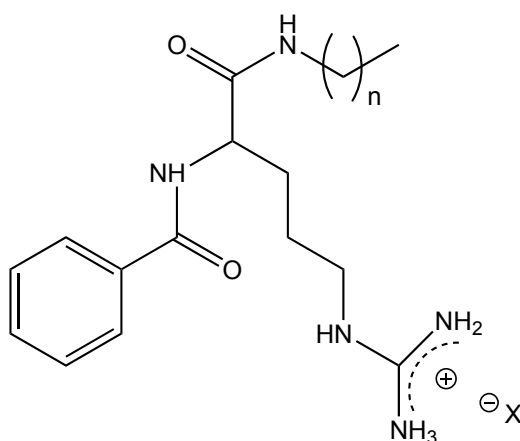


Figura 2.4 Estructura química de los compuestos Bz-Arg-NHC_n·HX, (donde n=9 o 11; X: Cl o Br).

2.2.3 Purificación de Bz-Arg-NHC_n·HCl por cromatografía de intercambio iónico

Los surfactantes *N*^α-benzoil-L-arginina-decilamida (Bz-Arg-NHC₁₀) y *N*^α-benzoil-L-arginina-dodecilamida (Bz-Arg-NHC₁₂) (Figura 2.4) fueron purificados mediante cromatografía de intercambio catiónico empleando una columna SP Sepharose Fast Flow (GE Healthcare) en un equipo de purificación Äkta Purifier 10 (GE Healthcare) según lo descrito por Fait et al. (2015), previa filtración de la mezcla de síntesis a través de una membrana de nylon de 0,22 μm (Osmonics). Las fases móviles empleadas para la purificación fueron buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5 con 50 % v/v de etanol (buffer A) y para la elución buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5 con 50 % v/v de etanol y NaCl 1 M (buffer B). El material no retenido fue eluido mediante el lavado con dos volúmenes de columna (VC) de buffer A. La elución del producto deseado se logró aumentando la concentración de buffer B al 31 %. Finalmente se lavó la columna con 2 VC de buffer B, eliminando así todo el resto que pudiera haber quedado contenido en la columna. El flujo se mantuvo a 1 ml/min a lo largo de todo el proceso, y la detección se realizó espectrofotométricamente a 215 y 254 nm.

Las fracciones recolectadas de cada surfactante purificado fueron concentradas mediante evaporación del solvente en rotavapor (Heidolph), y posteriormente desaladas por precipitaciones sucesivas con etanol absoluto (3x10 ml), centrifugación (13500 rpm, 15 min) y evaporación del solvente.

2.2.4 Obtención y purificación de Bz-Arg-NHC_n-HBr

Los surfactantes derivados de arginina conteniendo bromuro como contraión (Bz-Arg-NHC_n-HBr, Figura 2.4) fueron obtenidos de la misma manera que se describió previamente (Sección 2.2.2), empleando el mismo equipamiento y procedimiento descrito en la Sección 2.2.3, salvo que en la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico el buffer de elución B fue bórico-borato 0,01 M pH 8,5 con 50 % v/v de etanol y KBr 1 M.

Las fracciones recolectadas de cada surfactante purificado fueron concentradas mediante evaporación del solvente en rotavapor, y posteriormente desaladas por precipitaciones sucesivas con acetona (3x10 ml) en frío, centrifugación (13500 rpm, 15 min) y evaporación del solvente.

2.3 Determinación de la concentración micelar crítica

2.3.1 Optimización de la determinación de la CMC mediante la absorción de bromuros

2.3.1.1 Ensayos de fluorescencia empleando pireno

Para la determinación de la CMC por fluorescencia se preparó un stock de pireno disolviendo una pequeña cantidad del mismo en etanol absoluto, corroborando su concentración por absorbancia utilizando su coeficiente de absorción molar (ϵ , 54000 M⁻¹cm⁻¹ a 335 nm). Previo a la medición de absorbancia y fluorescencia de las muestras, se añadieron a las soluciones de surfactante pequeñas cantidades del stock concentrado de pireno. La concentración final de etanol en las muestras fue siempre menor al 1 % v/v.

Todas las soluciones de surfactante fueron preparadas en material volumétrico de plástico (polipropileno), con el fin de disminuir la adsorción tanto de los surfactantes como de pireno a las paredes de los mismos.

Las medidas de fluorescencia fueron realizadas en un espectrofluorómetro Shimadzu RF1501, empleando 335 nm como longitud de onda de excitación, y 10 nm de ancho de rendija tanto para la emisión como excitación. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente.

2.3.1.2 Ensayos de absorbancia en el UV

Para la determinación de la CMC empleando bromuro como sensor de la agregación, se midió el espectro de absorción de soluciones de concentraciones crecientes de surfactante desde los 190 hasta los 230 nm. Luego se calculó el área debajo de cada curva, en el rango de los 210 a 220 nm (región donde el valor de la absorbancia es menor a la unidad). El valor de la CMC se calculó a partir de la intersección de las líneas rectas de las gráficas de área bajo la curva vs concentración de surfactante. Los espectros de absorbancia fueron registrados en un espectrofotómetro PGT60, utilizando cubetas de cuarzo y suprasil. Todos los experimentos fueron llevados a cabo a temperatura ambiente.

2.3.2 Determinación de la CMC mediante medidas de tensión superficial

Se realizaron medidas de tensión superficial (γ) de soluciones acuosas de distintas concentraciones de los productos sintetizados (Bz-Arg-NHC_n·HCl) utilizando un tensiómetro Krüss K-12 con una placa de Wilhelmy. Las soluciones fueron preparadas

en buffer PBS, y se dejaron equilibrar durante 15-20 min a 25 °C en las celdas correspondientes. La efectividad de adsorción (pC_{20} , el logaritmo negativo de la concentración molar del surfactante necesaria para reducir la tensión superficial del agua en 20 mN/m), la CMC, la tensión superficial a la CMC (γ_{CMC}), la máxima concentración del surfactante adsorbida en la interfase aire/líquido (Γ_{max}) y el área por molécula (A_{min}) fueron calculadas a partir de las curvas γ vs $\log C$ en el equilibrio, utilizando la ecuación de adsorción de Gibbs (Ecuación 2.2):

$$\Gamma_{max} = -\frac{(\partial\gamma/\partial \log C)}{2,303nRT} \quad \text{Ecuación 2.2}$$

donde $\partial\gamma/\partial \log C$ es la pendiente de la porción recta de la curva γ vs $\log C$, n es el número de especies en la solución (para surfactantes iónicos, $n = 2$), T es la temperatura absoluta en grados kelvin (K) y R es la constante de los gases ideales ($R = 8.314 \text{ J/mol.K}$). El área mínima ocupada por molécula de surfactante adsorbida en la interfase aire/líquido (A_{min}), expresada en Å^2 , fue calculada según la Ecuación 2.3:

$$A_{min} = \frac{10^{16}}{N_A \times \Gamma_{max}} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

donde 10^{16} es el factor de conversión de cm^2 a Å^2 , N_A es el número de Avogadro, y Γ_{max} la máxima adsorción de surfactante expresada en mol.cm^{-2} .

3 Resultados y Discusión

En biociencias, la síntesis de nuevos tensioactivos biocompatibles diseñados para diversos fines es un tema de gran interés actualmente. Es sabido que la obtención de tensioactivos bioactivos listos para usar puede ser costosa y debe gestionarse minimizando el uso de insumos y la generación de residuos. La eficacia de una determinada molécula de surfactante en la tarea para la cual ha sido diseñada depende de una serie de factores entre los cuales la concentración micelar crítica (CMC) es crucial. Este parámetro evalúa la eficacia de un tensioactivo dado, ya que indica la cantidad mínima del mismo necesaria para lograr una reducción máxima de la tensión superficial, y es un parámetro esencial para vincular las características fisicoquímicas del compuesto en cuestión con su actividad biológica. Es por esto, y por la amplia aplicación que los mismos presentan en diversas áreas tecnológicas y científicas, que el conocimiento de su comportamiento de agregación en diferentes medios, en los cuales los surfactantes vayan a ser empleados, es indispensable. Por tanto, la necesidad de utilizar pequeñas cantidades de muestra exige el uso de equipos y metodologías mejorados para tales tareas.

El objetivo de este capítulo, en primer lugar, fue la puesta a punto de un método para la determinación de la CMC empleando pequeñas cantidades de muestra, haciendo uso de la absorción del contraión bromuro presente en los surfactantes. Asimismo, la determinación de este parámetro en medio acuoso salino resulta de suma relevancia, ya que numerosos ensayos son realizados empleando buffer con el fin de simular las condiciones fisiológicas.

3.1 Optimización de un método de determinación de CMC empleando absorción UV del contraión bromuro

Como se mencionó previamente, existen numerosos métodos para la determinación de la CMC. Idealmente se prefieren aquellos que posean un sensor espectroscópico interno no ajeno al sistema, para evitar tanto la alteración como la interferencia en la organización molecular que pueda ocasionar la presencia de una sonda. El bromuro es un contraión frecuente de varios surfactantes y ha mostrado poseer características particulares desde el punto de vista estructural, impartiendo propiedades de adsorción y agregación concretas (In et al., 2000; Vivek & Burgess, 2012). Los espectros de absorción de moléculas no disociadas de haluros alcalinos se han determinado en la fase de vapor, donde el bromuro muestra una fuerte banda de absorción cercana a los 200 nm (Daminelli et al., 1999).

Dependiendo de la composición de la solución, el bromuro puede presentar un corrimiento en el máximo de absorción hacia longitudes de onda mayores. En los casos en los que este sea contraión de moléculas que presenten autoagregación, como el caso de los surfactantes, los cambios en su espectro de absorción podrían actuar como un sensor de la agregación y de la interacción con otros iones o moléculas unidas o insertadas en la región interfacial, detectando interactivamente su microambiente.

Con el objetivo de conocer la sensibilidad de los espectros de bromuro y así poner a punto un método para determinar la CMC, se empleó el surfactante comercial CTAB. Este compuesto es representativo de los tensioactivos de amonio cuaternario, una extensa familia de tensioactivos catiónicos con una amplia aplicación en campos como la transfección génica, en técnicas de separación analítica y como agentes

antimicrobianos, entre otras (Asavov et al., 2018; Fuguet et al., 2005; Gilbert & Moore, 2005). Para corroborar este método de determinación de la CMC, se empleó la sonda fluorescente pireno, sobre la cual hay un amplio conocimiento en bibliografía.

3.2 Determinación de la CMC de CTAB empleando pireno

Uno de los métodos de determinación de la CMC mediante fluorescencia ampliamente conocido es aquel en el que emplea la sonda pireno. El espectro de fluorescencia de este compuesto muestra bandas características en el rango de los 370-400 nm, cuyas intensidades absolutas y relativas, ancho y posición, dependen de la polaridad del entorno (Piñeiro et al., 2015). Generalmente se utiliza la relación de intensidades entre los picos de la tercera y primera banda vibratoria (relación I_3/I_1) para la determinación de la CMC. Esto se debe a que esta relación I_3/I_1 varía de forma característica frente a un cambio en la polaridad del entorno donde se encuentra la sonda como, por ejemplo, el que experimenta cuando de una solución acuosa se incorpora a una micela.

Por otro lado, la variación de la relación entre la intensidad de fluorescencia del excímero y del monómero (I_e/I_m) también puede ser utilizada de la misma forma que la relación I_3/I_1 para la determinación de CMC (Turro & Kuo, 1986). Debido a la baja solubilidad del pireno en agua pura, a bajas concentraciones de surfactante (por debajo de la CMC) la eficiencia de formación de excímeros es baja. Lo mismo ocurre con concentraciones altas de tensioactivo donde hay una probabilidad muy baja de encontrar más de una molécula de sonda en una micela. Sin embargo, a valores cercanos a la CMC, las moléculas de pireno se acumulan en las primeras micelas de modo que se

favorece la formación de excímeros y conduce a un pico relativamente fuerte en la intensidad de fluorescencia de esta sonda.

En la Figura 2.5 se pueden observar tanto la curva I_3/I_1 como I_e/I_m obtenidas para la determinación de la CMC de CTAB en buffer PBS. La superposición de estas curvas muestra resultados consistentes. El valor de la CMC obtenido de la relación I_3/I_1 para CTAB en este buffer fue de 0,5 mM, el cual coincide con el máximo de la curva I_e/I_m . El cambio observado en la CMC de este compuesto entre H₂O pura (0,9 mM) y PBS se le atribuye a la fuerza iónica introducida por la presencia de sales en el buffer, y no al cambio de pH (Mukerjee & Banerjee, 1964; Patel et al., 2014).

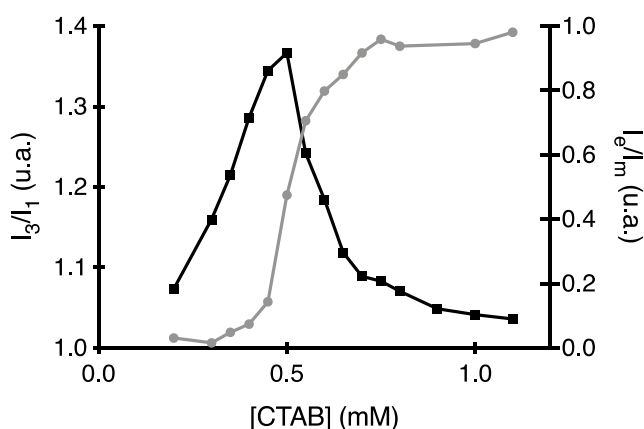


Figura 2.5 Determinación de la CMC de CTAB en PBS mediante las relaciones de intensidad de fluorescencia I_3/I_1 (línea gris) o I_e/I_m (línea negra).

3.3 El contraión bromuro como sensor de otros iones en solución

Al ser un surfactante con bromuro como contraión, el espectro de absorción de una solución de CTAB en agua ultrapura produce una banda ancha centrada en

aproximadamente 193-194 nm (Figura 2.6). Los espectros que se muestran en esta figura se registraron en dos medios con diferencias tanto en el pH como en el contenido de sales, empleando una solución de concentración de CTAB igual al valor de su CMC en H₂O (0,9 mM) y en buffer PBS (0,5 mM).

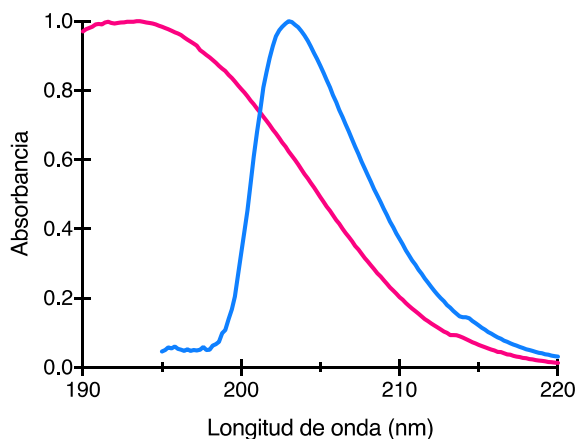


Figura 2.6 Espectro de absorción del bromuro en soluciones de CTAB en H₂O (línea rosada) o PBS (línea celeste), a sus respectivas CMC (0,9 mM en H₂O y 0,5 mM en PBS).

En primer lugar, se procedió a definir si las diferencias observadas en los espectros (Figura 2.6) eran debidas a la diferencia de pH entre el H₂O y el PBS o la distinta concentración de sales en las soluciones. En este sentido, se verificó que el corrimiento de longitud de onda registrado en el máximo del espectro de absorción se debía a la presencia de sales. Esto se realizó midiendo la absorbancia de una solución de CTAB frente a concentraciones crecientes de NaCl (ya que es el componente más abundante del buffer PBS), observándose un pronunciado corrimiento batocrómico de unos 10 nm

y, además, una disminución significativa de la absorbancia con el aumento de la concentración de sal.

3.4 El bromuro como sensor de agregación

La sensibilidad del bromuro a su entorno no solo se limita a la presencia de sales en la solución, ya que se observaron cambios en los espectros de CTAB simplemente aumentando su concentración. En la Figura 2.7 se muestra cómo, al aumentar la concentración de surfactante, cambia progresivamente el máximo de absorción a mayores longitudes de onda. Sin embargo, dada la alta absorptividad, los valores exactos en los máximos de absorbancia deben confirmarse con trayectorias ópticas más cortas.

Al integrar el área bajo la curva de cada espectro en la región donde los valores de absorbancia son menores a la unidad, esto es, entre 210 y 230 nm, se obtuvo el gráfico que se muestra en el recuadro de la Figura 2.7. Este gráfico, de área en función de la concentración de CTAB, muestra un cambio en la pendiente cuando la concentración de CTAB es 0,46 mM (estimado a partir de la intersección de dos líneas rectas). Este valor es muy similar al encontrado mediante la determinación de la CMC por fluorescencia (descrito en la Sección 3.2), con lo cual resulta ser una evidencia convincente de que los espectros de absorción de bromuro son capaces de detectar la agregación de moléculas de CTAB.

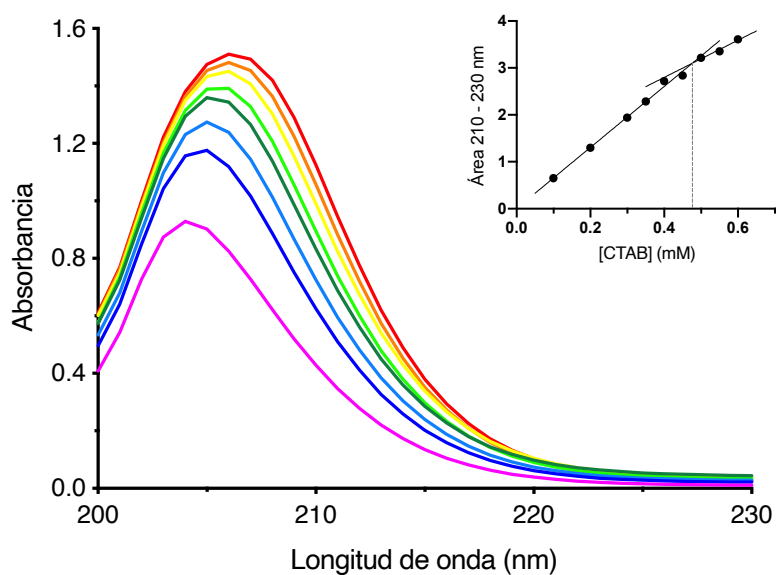


Figura 2.7 Espectro de absorción de soluciones de concentraciones crecientes de CTAB. Recuadro: Área bajo la curva en función de la concentración de CTAB.

El desarrollo de esta metodología para determinar la CMC tenía como objetivo contar con un método alternativo que permitiera la medida de dicha propiedad empleando equipamiento disponible en nuestro lugar de trabajo. Asimismo, mediante la metodología propuesta se podrían utilizar menores cantidades de los compuestos sintetizados, debido a que no es necesario el empleo de volúmenes de muestra muy grandes para realizar las medidas pertinentes. Cabe destacar que el método desarrollado permite la medición de la CMC en volúmenes de muestra menores a 1 ml, lo que supone una ventaja destacable cuando se cuentan con cantidades pequeñas de compuestos experimentales. Por otro lado, el empleo del contraión bromuro como sensor interno evita el agregado de agentes externos que puedan interferir con el proceso de micelización. Finalmente, y no menos importante, la determinación de la

CMC en PBS consistió en otro objetivo particular, debido a que, como se mencionó previamente, la mayoría de los ensayos son llevados a cabo en condiciones fisiológicas. No obstante, los bromuros de Bz-Arg-NHC_n resultaron tener muy baja solubilidad en PBS, motivo por el cual dicha determinación no se pudo llevar a cabo. A pesar de esto, como conclusión de los ensayos realizados en este capítulo, se puede afirmar que se logró poner a punto un método sencillo y confiable para la determinación de la CMC.

3.5 Determinación de la CMC de Bz-Arg-NHC_n mediante medidas de tensión superficial

Cuando se mide la tensión superficial (γ) de las soluciones de concentraciones creciente de surfactante, los gráficos de tensión superficial vs concentración de tensioactivo muestran dos líneas rectas, una con una pendiente negativa pronunciada y la otra con una pendiente levemente decreciente. La recta que presenta una disminución lineal pronunciada corresponde al rango de concentración por debajo de la CMC donde solo existen monómeros de tensioactivo en la superficie de la solución. A concentraciones más altas, la superficie de la solución se satura de moléculas de surfactante, con lo cual las que se sigan adicionando deben disponerse como micelas. Este fenómeno hace que no se detecte ningún otro cambio en la tensión superficial. Por este motivo, la intersección de la recta de pendiente negativa y la línea de base de la tensión superficial mínima se toma como el valor de CMC del surfactante.

Se realizaron medidas de tensión superficial de soluciones de distintas concentraciones de los productos sintetizados en PBS. En la Figura 2.8 podemos

encontrar los gráficos de tensión superficial en función de la concentración de surfactante obtenidos para Bz-Arg-NHC_n·HCl.

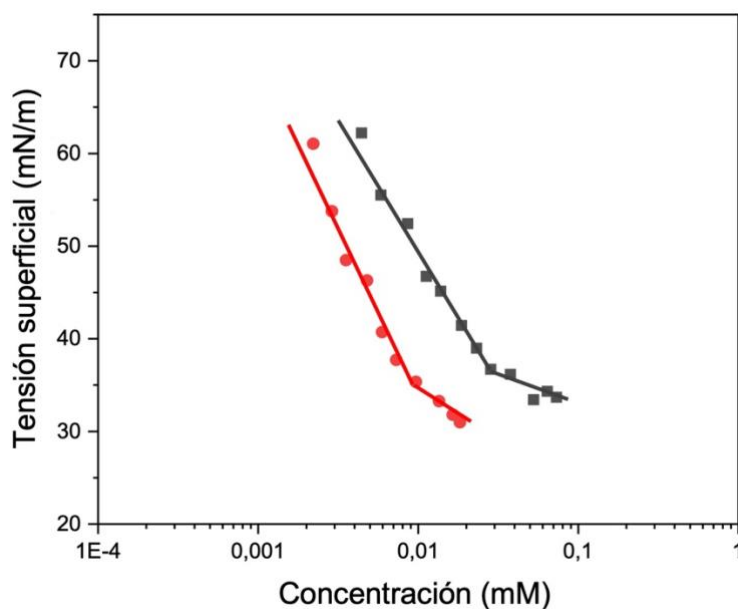


Figura 2.8 Variación de la tensión superficial en función de la concentración de surfactante: Bz-Arg-NHC₁₀·HCl (negro) y Bz-Arg-NHC₁₂·HCl (rojo) en buffer PBS.

Ambos compuestos derivados de arginina fueron capaces de reducir la tensión superficial del agua, y los valores de sus respectivas CMC se encuentran en la **Tabla 2.1**. Además, se calcularon otros parámetros fisicoquímicos básicos, como la tensión superficial a la CMC (γ_{CMC}), la máxima concentración del surfactante adsorbida en la interfase aire/líquido (Γ_{max}), la efectividad en la reducción de γ (Π_{CMC}), la efectividad de adsorción (pC_{20}), y el área por molécula (A_{min}). Este último parámetro mide el área mínima por molécula de surfactante en la interfase aire-agua. Todos estos parámetros se resumen en la **Tabla 2.1**.

Tabla 2.1 Parámetros fisicoquímicos determinados para Bz-Arg-NHC_n·HCl en buffer PBS a 25 °C.

| Surfactante | CMC (mM) | γ_{CMC} (mN/m) | Π_{CMC} (mN/m) | ρ_{C20} | Γ_{max} (mol.cm ⁻² x 10 ¹⁰) | A _{min} (Å ²) |
|-------------------------------|-------------|--------------------------|-----------------------|--------------|--|---------------------------------------|
| Bz-Arg-NHC ₁₀ ·HCl | 0,028 | 36,7 | 35,3 | 4,6 | 2,5 | 67 |
| Bz-Arg-NHC ₁₂ ·HCl | 0,012 | 37,6 | 34,4 | 5,5 | 4,0 | 42 |

Si comparamos los valores de la CMC obtenidos para Bz-Arg-NHC_n·HCl en buffer PBS con los valores ya reportados de CMC en H₂O (Bz-Arg-NHC₁₀·HCl: 0,23 mM, Bz-Arg-NHC₁₂·HCl: 0,085 mM) (Fait et al., 2017) vemos que, como era de esperar la CMC obtenida en medio salino fue mucho menor que aquella obtenida en agua. Como se mencionó previamente, el proceso de micelización de los surfactantes se ve afectado por la presencia de sales: por lo general, los valores de CMC disminuyen a medida que aumenta la concentración de iones en el medio. La magnitud de este fenómeno depende de varios factores, como la fuerza iónica del medio y la naturaleza del contraión del surfactante. La disminución en los valores de CMC sería una consecuencia de la disminución de la fuerza de repulsión electrostática entre los grupos de cabeza polar, debido a un efecto de blindaje electrostático ejercido por los iones presentes en el buffer, y al aumento de las interacciones entre las colas hidrofóbicas. Como consecuencia, se produce un incremento en el número de monómeros tensioactivos por micela (Helenius et al., 1979).

4 Conclusión

En este capítulo se describe la obtención de distintos surfactantes derivados de arginina, tanto cloruros como bromuros de Bz-Arg-NHC_n, mediante el empleo de técnicas biocatalíticas. Además, se pudo poner a punto un método sencillo para la determinación de la CMC en base a la absorción en el espectro UV del contraión bromuro, empleando CTAB como surfactante modelo. Este método fue corroborado con medidas de fluorescencia utilizando la sonda pireno, metodología ampliamente utilizada en bibliografía para la determinación de este parámetro (Piñeiro et al., 2015).

Con respecto a los surfactantes derivados de arginina sintetizados que presentaban bromuro como contraión, Bz-Arg-NHC_n-HBr, no se continuó trabajando con ellos en los siguientes capítulos debido a la baja solubilidad que presentaron en buffer.

Por último, se caracterizaron los surfactantes en función a sus propiedades de agregación mediante medidas de tensión superficial. Se comprobó que los valores de CMC de Bz-Arg-NHC_n disminuyen a medida que aumenta la concentración de sales del medio. Esto se evidenció cuando se determinaron los valores de CMC para los cloruros de Bz-Arg-NHC_n en medio salino, obteniéndose valores de 0,028 y 0,012 mM para Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ respectivamente, los que resultaron menores a los valores de CMC en H₂O ya reportados (Fait et al., 2017). En el primer caso, la disminución en este valor es una consecuencia de la reducción de las fuerzas electrostáticas de repulsión entre los grupos de la cabeza, debido a un efecto protector electrostático ejercido por los iones presentes en el medio, así como el aumento de las interacciones entre las colas

hidrofóbicas. En consecuencia, se produce un incremento en el número de monómeros de surfactante por micela (Helenius et al., 1979).

Si se comparan los valores de CMC obtenidos con aquellos que tienen otros surfactantes análogos derivados de arginina, se puede observar que Bz-Arg-NHC_n presenta valores de CMC bastante menores (Pinazo et al., 2019). Esto se debe a que el balance hidrofílico/hidrofóbico debido a la presencia del grupo benzoilo que poseen los surfactantes Bz-Arg-NHC_n incrementa la tendencia a agregarse, disminuyendo así su CMC.

5 Referencias

- Alawi, S. M. (2010). Thermodynamics studies of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) in N, N-dimethyl acetamide-water mixtures. *Oriental Journal of Chemistry*, 26(4), 1235–1240.
- Asavov, Z. H., Ahmadova, G. A., Rahimov, R. A., Abilova, A. Z., Zaegarova, S. H., & Zubkov, F. I. (2018). Synthesis and Properties of Quaternary Ammonium Surfactants Based on Alkylamine, Propylene Oxide, and 2-Chloroethanol. *J Surfact Deterg*.
- Cai, X., Yang, W., Huang, L., Zhu, Q., & Liu, S. (2015). A series of sensitive and visible fluorescence-turn-on probes for CMC of ionic surfactants: Design, synthesis, structure influence on CMC and sensitivity, and fast detection via a plate reader and a UV light. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 219, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.04.126>
- Daminelli, G., Katskov, D. A., Mofolo, R. M., & Tittarelli, P. (1999). Atomic and molecular spectra of vapours evolved in a graphite furnace. Part 1. Alkali halides. In *Spectrochimica Acta Part B* (Vol. 54).
- Domínguez, A., Fernández, A., González, N., Iglesias, E., & Montenegro, L. (1997). Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education*, 74(10), 1227–1231. <https://doi.org/10.1021/ed074p1227>
- Fait, M. E., Garrote, G. L., Clapés, P., Tanco, S., Lorenzo, J., & Morcelle, S. R. (2015). Biocatalytic synthesis, antimicrobial properties and toxicity studies of arginine derivative surfactants. *Amino Acids*, 47(7), 1465–1477. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1979-0>
- Fait, M. E., Hermet, M., Comelles, F., Clapés, P., Alvarez, H. A., Prieto, E., Herlax, V., Morcelle, S. R., & Bakás, L. (2017). Microvesicle release and micellar attack as

the alternative mechanisms involved in the red-blood-cell-membrane solubilization induced by arginine-based surfactants. *RSC Advances*, 7(60). <https://doi.org/10.1039/c7ra03640j>

Fuguet, E., Ràfols, C., Rosés, M., & Bosch, E. (2005). Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems. *Analytica Chimica Acta*, 548(1–2), 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.05.069>

Gilbert, P., & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. In *Journal of Applied Microbiology* (Vol. 99, Issue 4, pp. 703–715). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>

Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E., & Tanford, C. (1979a). Properties of detergents. *Methods in Enzymology*, 56(C), 734–749. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)56066-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)56066-2)

Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E., & Tanford, C. (1979b). Properties of Detergents. *Methods in Enzymology*, 56(C), 734–749. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)56066-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)56066-2)

In, M., Bec, V., Aguerre-Chariol, O., & Zana, R. (2000). Quaternary ammonium bromide surfactant oligomers in aqueous solution: Self-association and microstructure. *Langmuir*, 16(1), 141–148. <https://doi.org/10.1021/la990645g>

Luisi, P. L. (2016). The various types of surfactant aggregates. In *The Emergence of Life* (pp. 265–296). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/cbo9781316135990.012>

Mukerjee, P., & Banerjee, K. (1964). A Study of the Surface pH of Micelles Using Solubilized Indicator Dyes. *The Journal of Physical Chemistry*, 68(12), 3567–3574.

- Patel, V., Dharaiya, N., Ray, D., Aswal, V. K., & Bahadur, P. (2014). PH controlled size/shape in CTAB micelles with solubilized polar additives: A viscometry, scattering and spectral evaluation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 455(1), 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.04.025>
- Pérez-Rodríguez, M., Prieto, G., & Rega, C. (1998). A Comparative Study of the Determination of the Critical Micelle Concentration by Conductivity and Dielectric Constant Measurements. *Langmuir*, 7463(11), 4422–4426. <https://doi.org/10.1021/la980296a>
- Pinazo, A., Pérez, L., Morán, C., & Pons, R. (2019). Arginine-Based Surfactants: Synthesis, Aggregation Properties, and Applications. In *Biobased Surfactants* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812705-6.00013-7>
- Piñeiro, L., Novo, M., & Al-Soufi, W. (2015). Fluorescence emission of pyrene in surfactant solutions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 215, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.010>
- Rosen, M. J. (2004). Micelle Formation by Surfactants. In *Surfactants and Interfacial Phenomena* (Third, pp. 105–177). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0471670561.ch3>
- Turro, N. J., & Kuo, P.-L. (1986). Pyrene Excimer Formation in Micelles of Nonionic Detergents and of Water-Soluble Polymers. In *Langmuir* (Vol. 2).
- Vivek, J. P., & Burgess, I. J. (2012). Quaternary ammonium bromide surfactant adsorption on low-index surfaces of gold. 2. Au(100) and the role of crystallographic-dependent adsorption in the formation of anisotropic nanoparticles. *Langmuir*, 28(11), 5040–5047. <https://doi.org/10.1021/la300036y>

Yu, D., & Xu, H. (2011). Determination of Critical Concentrations by Synchronous Fluorescence Spectrometry. *The Royal Society of Chemistry*.

Capítulo III

INTERACCIÓN DE Bz-Arg-NHC₁₀ CON
SISTEMAS MODELO DE MEMBRANA: DPPC

Índice Capítulo III

| | | |
|----------|--|------------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 93 |
| 1.1 | Sistemas modelo de membrana | 94 |
| 2 | MATERIALES Y MÉTODOS | 97 |
| 2.1 | Materiales | 97 |
| 2.2 | Determinación de la actividad antimicrobiana | 98 |
| 2.3 | Preparación de liposomas | 99 |
| 2.4 | Utilización de liposomas multilamelares como modelo de membrana..... | 100 |
| 2.4.1 | <i>Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre la transición de fase de liposomas multilamelares de DPPC por calorimetría diferencial de barrido</i> | <i>100</i> |
| 2.5 | Empleo de monocapas lipídicas como sistema modelo de membrana | 101 |
| 2.5.1 | <i>Cinética de inserción de Bz-Arg-NHC₁₀ en monocapas de DPPC.....</i> | <i>103</i> |
| 2.6 | Utilización de bicapas soportadas como modelo de membrana | 104 |
| 2.6.1 | <i>Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre la topografía de bicapas soportadas por Microscopía de Fuerza Atómica</i> | <i>104</i> |
| 2.6.2 | <i>Estudio de la adsorción de Bz-Arg-NHC₁₀ a bicapas mediante resonancia de plasmones de superficie</i> | <i>107</i> |
| 3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 110 |
| 3.1 | Determinación de las concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas | 110 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.2 | Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC ₁₀ sobre la transición de fase de MLV de DPPC por calorimetría diferencial de barrido | 112 |
| 3.3 | Inserción de Bz-Arg-NHC ₁₀ en monocapas de DPPC..... | 117 |
| 3.4 | Visualización de la interacción de Bz-Arg-NHC ₁₀ con bicapas de DPPC por AFM 120 | |
| 3.5 | Análisis de la interacción de Bz-Arg-NHC ₁₀ con bicapas mediante SPR | 124 |
| 4 | CONCLUSIÓN..... | 127 |
| 5 | REFERENCIAS..... | 130 |

1 Introducción

Debido al comportamiento adaptativo de los microorganismos y su tendencia a adquirir resistencia, el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos presenta un constante desafío (Singh & Tyagi, 2014). Es en este contexto que el hallazgo, la obtención y aplicación de compuestos novedosos con actividad antimicrobiana como preservantes y antisépticos en la industria farmacéutica, alimenticia y cosmética, entre otras, adquiere una relevancia altamente significativa.

Como se mencionó previamente en la Introducción general (Capítulo I), los lipoaminoácidos derivados de arginina son una clase de compuestos que poseen excelentes propiedades de superficie, baja toxicidad, alta biodegradabilidad y una actividad antimicrobiana de amplio espectro (Morán et al., 2004). Estas características hacen de los surfactantes derivados de arginina una mejor opción frente a otros compuestos antimicrobianos comúnmente utilizados. Se ha demostrado que los factores estructurales esenciales para su actividad antimicrobiana incluyen tanto el largo del residuo hidrofóbico alquílico como la presencia del grupo guanidinio del residuo de arginina (Infante et al., 1986, 1997; Piera et al., 1998). Es sabido que los surfactantes catiónicos ejercen su acción antimicrobiana debido a su capacidad de disrumpir la membrana plasmática de los microorganismos. Este fenómeno se debe a la combinación entre la naturaleza iónica de la porción hidrofílica de este tipo de surfactantes y su actividad superficial.

Los surfactantes derivados de arginina sintetizados en nuestro laboratorio han demostrado tener actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como contra hongos, revelando su potencial uso como un efectivo desinfectante. Además, han demostrado poseer una baja actividad hemolítica y menor irritabilidad ocular que el surfactante catiónico comercial Cetrimide. Una tendencia similar fue observada cuando se evaluó la citotoxicidad en cultivos celulares de hepatocitos y fibroblastos (Fait et al., 2015, 2019). Todas estas propiedades hacen que estos compuestos constituyan una prometedora alternativa a los surfactantes catiónicos comerciales, especialmente en su uso como aditivo en formulaciones tópicas.

Debido a que las perturbaciones de la membrana celular producidas por estos compuestos están directamente gobernadas por procesos fisicoquímicos, los sistemas modelo de membrana pueden proveer información valiosa para entender el mecanismo de acción de estas moléculas.

1.1 Sistemas modelo de membrana

La composición lipídica de las membranas citoplasmáticas bacterianas presenta una gran diversidad. Para la mayoría de las bacterias el fosfolípido zwitteriónico predominante es fosfatidiletanolamina (PE). En general, las bacterias Gram negativas tienen un contenido mayor de PE que las Gram positivas. En cuanto a los lípidos aniónicos, los predominantes son fosfatidilglicerol (PG) y cardiolipina (CL). Todas las bacterias tienen por lo menos un 15 % de lípidos aniónicos, independientemente de ser Gram positiva o Gram negativa (Epanand & Epanand, 2009). Debido a las complicaciones que

se encuentran al armar modelos de membrana conteniendo solo PE y PG, normalmente se utilizan mezclas de estos lípidos con fosfatidilcolina (PC) para mimetizar las membranas bacterianas. Sin embargo, en algunos casos, membranas compuestas exclusivamente de PC son empleadas para determinar el mecanismo de acción antimicrobiana (Lind et al., 2019). Esta elección se debe principalmente al hecho de que representa un modelo simple y fácil de trabajar frente a mezclas de lípidos complejos; aunque este tipo de mezclas son necesarias para poder identificar interacciones específicas entre el surfactante y algún componente particular de la membrana bacteriana.

Como el estudio realizado en este capítulo constituye un acercamiento inicial para elucidar el mecanismo de interacción entre uno de los surfactantes derivado de arginina sintetizados en nuestro laboratorio, Bz-Arg-NHC₁₀, y la membrana bacteriana, se empleó 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC, Figura 3.1) como lípido modelo. Este es un modelo simple y bien caracterizado, lo que facilita la comparación de los resultados que pudieran obtenerse con ensayos relevantes de la literatura (Almeida et al., 2010).

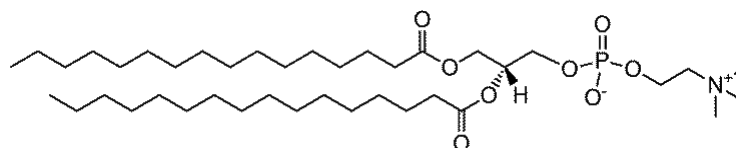


Figura 3.1 Estructura de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina, DPPC.

En este capítulo se describe la realización de ensayos de actividad antimicrobiana de Bz-Arg-NHC₁₀ frente a distintas bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas. Además, con el objetivo de indagar sobre el mecanismo de acción antimicrobiano se estudiaron los procesos fisicoquímicos involucrados en la perturbación de la membrana lipídica inducidos por el surfactante. Para esto, se evaluó la interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ con los diferentes modelos de membranas descritos previamente (Capítulo I).

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

El lípido utilizado para la preparación de los sistemas modelo de membrana fue 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfolina (DPPC), al igual que el compuesto DTT, el ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES) y otros reactivos, fueron comprados a Sigma-Aldrich (USA). El metanol (calidad HPLC) y tris(hidroximetil)aminometano (Tris) fueron provistos por Baker (USA).

El surfactante derivado de arginina, Bz-Arg-NHC₁₀, fue sintetizado en nuestro laboratorio tal como se describió anteriormente en la Sección 2.2.2 del Capítulo II, utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador (Fait et al., 2015).

El agua utilizada para la preparación de todas las soluciones fue purificada por un sistema Milli-Q (Millipore, USA) para obtener un producto con resistividad de 18.2 MΩ.cm.

Los sustratos de oro evaporado sobre vidrio para SPR fueron obtenidos de Bionavis (Finlandia). La mica moscovita empleada fue de grado V-1 (calidad más alta disponible), comprada a SPI Supplies (USA).

El resto de los reactivos y solventes empleados fueron de calidad analítica o superior.

2.2 Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antibacteriana de Bz-Arg-NHC₁₀ fue estudiada frente a las siguientes cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 11229, *Bacillus subtilis* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella sp.* y *Micrococcus sp.* Todos los microorganismos fueron mantenidos en agar LB (Luria-Bertani) a 37°C hasta la realización de los ensayos.

La actividad antibacteriana del surfactante fue evaluada según el ensayo de microdilución, utilizando microplacas estériles de 96 pocillos con fondo plano (Falcon, USA). Durante los ensayos, 125 µl de las soluciones de distinta concentración de los surfactantes preparadas en medio LB estéril fueron inoculados con 2,5 µl de la suspensión bacteriana de interés ajustada al 0,5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml; $DO_{600} = 0,1$) en buffer PBS estéril. Se incluyeron cultivos en presencia de medio LB y gentamicina (20 y 10 µg/ml) como controles negativo y positivo para la inhibición del crecimiento respectivamente, así como también controles negativos de todas las soluciones empleadas. Las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 24 h. A tiempo 0 y 24 h se determinó la densidad óptica de los pocillos a 600 nm (DO_{600}) utilizando un lector de placas (Perkin Elmer Victor3 V). La actividad antimicrobiana fue expresada como porcentaje de inhibición del crecimiento (% Inh) comparado con los pocillos control. En este contexto, el cambio en la DO_{600} media de las células crecidas en LB y ausencia de los surfactantes fue considerada como 100 % de viabilidad. Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado. Los resultados fueron contrastados utilizando el análisis de varianza (ANOVA, *one-way analysis of variance*) y

el *test* de Tukey utilizando el software GraphPad Prism®. P-values <0,05 fueron considerados como significativos.

Para cada cepa se definió la concentración inhibitoria mínima (CIM) como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento visible ($DO_{600} = 0$ y % Inh > 95 %). De aquellos pocillos que no presentaron crecimiento visible se tomaron muestras y realizaron estrías en placas conteniendo agar LB libre de los surfactantes. Se analizó la presencia de colonias luego de 24 h de incubación a 37°C. La concentración bactericida mínima (CBM) se definió como la mínima concentración del surfactante que inhibe completamente el crecimiento bacteriano (ausencia de colonias).

2.3 Preparación de liposomas

Para la preparación de liposomas, primero se resuspendió la cantidad necesaria de DPPC en $CHCl_3/CH_3OH$ 2:1. Se evaporó el solvente bajo una corriente de N_2 o en rotavapor y luego se colocó por lo menos 2 h en bomba de vacío para eliminar los restos de solvente remanente. Posteriormente se agregó la solución acuosa correspondiente con agitación energética para formar los liposomas. Este paso se realizó a una temperatura mayor a la temperatura de transición (T_m) del lípido empleado; en este caso se realizó a 60 °C. De esta manera se obtienen vesículas multilamelares (MLV).

Para obtener los liposomas unilamelares grandes (LUV) se procedió a extruir la suspensión de MLV empleando un extrusor de mesada (LiposoFast, Avestin) y un

sándwich de filtros de policarbonato de 100 nm de diámetro de poro. Se extruyeron las muestras un total de 19 veces con el fin de homogeneizar el tamaño de los liposomas. Al igual que para obtener los MLV, el paso de extrusión se realizó a 60 °C.

2.4 Utilización de liposomas multilamelares como modelo de membrana

2.4.1 Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre la transición de fase de liposomas multilamelares de DPPC por calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, del inglés *Differential Scanning Calorimetry*) es una buena herramienta, tanto rápida como económica, para el estudio termodinámico del comportamiento de fase de lípidos en modelos de membranas biológicas sin el añadido de exógenos (Mcelhaney, 1982). Las técnicas calorimétricas miden el calor consumido o liberado por una muestra al reequilibrarse luego de una perturbación. En el caso de DSC las perturbaciones son ocasionadas por cambios en la temperatura (Raudino et al., 2013).

Utilizando esta técnica se estudió la influencia de Bz-Arg-NHC₁₀ en las propiedades de membrana de liposomas multilamelares de DPPC, en particular en la transferencia de fase gel-líquido cristalino. Las medidas se llevaron a cabo en un calorímetro DSC Q100 (TA Instruments, USA) a una velocidad de escaneo de 5 °C/min. Se emplearon MLV de DPPC y concentraciones variables de surfactante, entre 0 y 4 mol%. Las muestras fueron cargadas en cápsulas de aluminio (0,2 mg de DPPC), las cuales se sellaron y sometieron a ciclos de enfriamiento/calentamiento entre 0 y 60 °C.

Se realizaron por lo menos dos ciclos en cada muestra, descartándose siempre los datos del primer ciclo para el análisis. Estos experimentos fueron realizados por duplicado y analizados utilizando el software TA Universal Analysis.

2.5 Empleo de monocapas lipídicas como sistema modelo de membrana

La presencia de una monocapa en la superficie de un líquido afecta a la tensión superficial del mismo. En experimentos con monocapas es normal referirse a medidas de presión superficial (π). Esta presión es igual a la reducción de la tensión superficial de un líquido puro por la presencia de la monocapa, representado en la siguiente ecuación (Brockman, 1999):

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{Ecuación 3.1}$$

donde γ_0 es la tensión superficial del líquido puro y γ es la tensión superficial de la superficie cubierta por la monocapa. Los valores de π son generalmente del orden de mN/m, siendo el valor máximo de 72,8 mN/m a 20 °C, correspondiente al valor de la tensión superficial del agua pura (Petty, 1996).

Como se mencionó previamente, las monocapas lipídicas constituyen buenos modelos para evaluar la inserción de compuestos en membranas biológicas. Para este propósito en particular, se forma la monocapa lipídica correspondiente sobre una interfase aire/agua en una balanza de Langmuir (Figura 3.2 A). Una vez que la monocapa se estabiliza en la presión superficial inicial (π_0) deseada, se inyecta en la subfase acuosa

el compuesto de interés disuelto en un solvente apropiado. A partir de este momento, cualquier cambio en la presión superficial será consecuencia de la interacción del compuesto con la monocapa (Figura 3.2 B). Si se grafica la variación máxima de π ($\Delta\pi$) en función de la presión inicial de la monocapa, se puede determinar la presión superficial crítica (π_c) (Figura 3.2 C). Este parámetro corresponde a la presión inicial de la monocapa por encima de la cual no puede penetrar más compuesto e incrementar π . En otras palabras, este parámetro refleja el poder de penetración del compuesto de interés en un modelo de membrana definido de dos dimensiones.

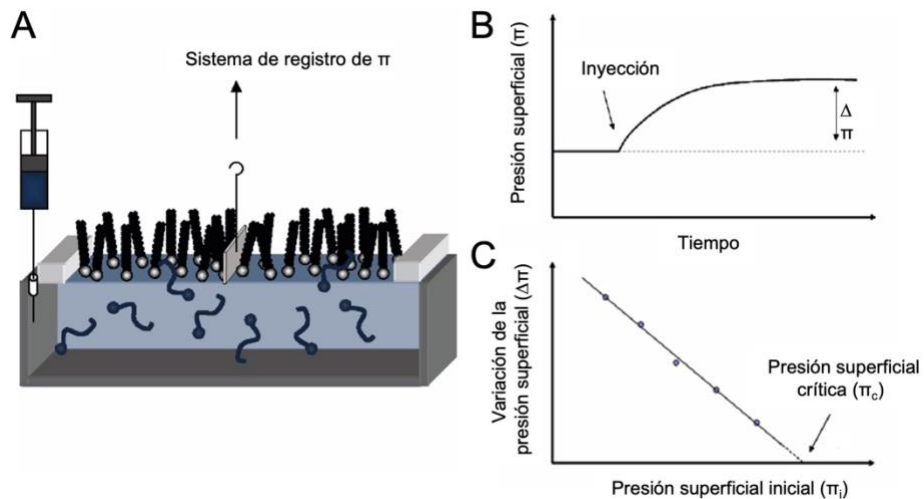


Figura 3.2 A) Representación esquemática de una balanza de Langmuir utilizada para evaluar el poder de penetración de un compuesto bioactivo en una monocapa lipídica; B) Cinética de penetración luego de la inyección del compuesto en la subfase; C) Gráfico de la variación en la presión superficial vs la presión superficial inicial utilizado para la determinación de la presión de exclusión de la monocapa lipídica. Imagen adaptada de *Eeman & Deleu, 2010*.

2.5.1 Cinética de inserción de Bz-Arg-NHC₁₀ en monocapas de DPPC

Para el estudio de la cinética de inserción de Bz-Arg-NHC₁₀ en monocapas lipídicas se empleó un tensiómetro de Langmuir NIMA Modelo 102A (NIMA Technology, UK), equipado con una placa de Wilhelmy de platino como sensor de π . Sobre la subfase acuosa, constituida por 350 μ l de buffer PBS, se formó la monocapa lipídica mediante el agregado de pequeñas cantidades del stock de DPPC en cloroformo (1 mM) hasta alcanzar la π_o deseada. Luego de esperar 15 min para la completa evaporación del solvente y estabilización de π_o , se comenzaron a realizar las medidas, registrándose la presión superficial de la monocapa neta de lípidos. Posteriormente, utilizándose una jeringa Hamilton, se inyectó una alícuota de la solución de surfactante en PBS en la subfase hasta alcanzar una concentración final de 30 μ M. El incremento en π fue medido en función del tiempo hasta que se obtuvo una señal estable. Todas las medidas fueron realizadas a 23 ± 1 °C, y las soluciones fueron preparadas con agua MilliQ ultrapura.

El proceso de inserción del surfactante en las monocapas se caracterizó analizando el máximo incremento de la presión superficial ($\Delta\pi$) mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta\pi = \pi_f - \pi_o \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde π_f es la presión superficial una vez alcanzado el equilibrio luego de la inyección del surfactante, y π_o es la presión superficial de la monocapa antes de añadir el surfactante, expresadas en mN/m.

Los ensayos de adsorción para cada surfactante fueron llevados a cabo de manera similar, pero en ausencia de lípidos.

2.6 Utilización de bicapas soportadas como modelo de membrana

2.6.1 Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre la topografía de bicapas soportadas por Microscopía de Fuerza Atómica

Dentro de las microscopías de barrido por sonda, la técnica de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM, del inglés *Atomic Force Microscopy*) es la más comúnmente utilizada. Además, constituye una herramienta muy útil para la observación de muestras de origen biológico, ya que permite obtener imágenes de alta resolución en condiciones cercanas a las fisiológicas. Esta microscopía se basa en la medida de la fuerza de interacción entre una punta delgada (sonda o *cantilever*) y la superficie de la muestra a distancias muy cortas. El tipo de interacción dependerá del modo de operación del equipo de AFM, los cuales pueden ser: modo contacto o repulsivo, modo no contacto o atractivo, y modo contacto intermitente o *tapping*. Cada uno presenta ventajas y desventajas, las cuales deben considerarse para su elección en función del tipo de muestra y resultados que se desean obtener.

2.6.1.1 Preparación de bicapas soportadas sobre mica

Para la preparación de las bicapas (SLB) se empleó el método de fusión de vesículas sobre un soporte de mica (Jass et al., 2000). Este método es relativamente simple y puede ser realizado en poco tiempo. Brevemente, la fusión es obtenida calentando una suspensión de SUV en contacto con el soporte sólido a una temperatura superior a la T_m del lípido. El proceso de fusión involucra la adsorción de la vesícula lipídica a la superficie del soporte, seguido de su deformación, achatamiento y finalmente su ruptura. La fusión de los bordes de los parches de bicapa, gracias a las interacciones hidrofóbicas, dan lugar a una bicapa lipídica continua (Figura 3.3).

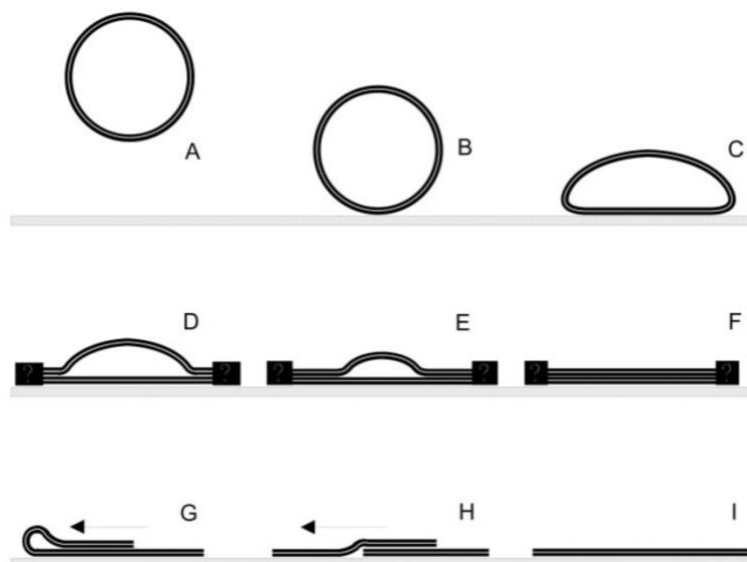


Figura 3.3 Representación esquemática de la transformación de un liposoma a una bicapa soportada. El liposoma se acerca (A), adsorbe (B) y adhiere (C) a una superficie. Comienza a aplanarse desde los bordes (D). Las áreas externas aplanadas se expanden y esparcen (E), dando como resultado un liposoma parcialmente aplanado (D y E). El liposoma se colapsa para formar dos bicapas (F) apiladas una encima de la otra. La bicapa superior se mueve desde la inferior hacia áreas desocupadas en la superficie (G y H), dando lugar a una sola bicapa en la superficie del soporte (I). Imagen tomada de Jass et al., 2000.

Para preparar las SLB, se partió de un stock de MLV de DPPC (2mM) en buffer HEPES, el cual fue sonicado empleando un sonicador de baño (TestLab TB04, Argentina) durante 2 ciclos de 30 min a 60 °C para obtener de esta manera SUV. Previo a inmovilizar los SUV sobre el soporte de mica, el mismo fue exfoliado e incubado durante 15 min con 5 μ l de CaCl₂ 1 mM. Luego de enjuagar la superficie del soporte con abundante agua MilliQ, 100 μ l de la suspensión de SUV de DPPC fueron depositados sobre la mica y se los dejó interactuar durante 1 h a 60 °C en un baño húmedo para evitar la evaporación de la muestra. Se enjuagó el exceso de las vesículas lipídicas, es decir aquellas que no fueron adsorbidas, con lavados abundantes de buffer HEPES. Durante todo el procedimiento se dejó una pequeña cantidad de buffer sobre la superficie de la muestra, de manera de mantener hidratadas las bicapas soportadas hasta el momento de su uso.

2.6.1.2 Visualización de la interacción mediante AFM

Una vez preparadas las muestras se colocaron directamente, sin ser secadas, en una celda de líquido de AFM la cual se llenó con 50 μ l de buffer HEPES. Se realizó un escaneo inicial de la superficie de la muestra y luego de añadir una alícuota (30 μ l) de solución de Bz-Arg-NHC₁₀, de concentraciones entre 0,5 a 1 mM, se observaron los cambios inducidos por el mismo lo largo del tiempo (10 a 20 min).

Todas las medidas de AFM fueron realizadas en un equipo MultiMode Scanning Probe Microscope controlado por una unidad Nanoscope-V (Veeco, USA) utilizando una

punta de Si_3N_4 en forma de V (Veeco, USA) con una constante elástica de 0,08-0,15 N/m. Todos los experimentos se llevaron a cabo en modo contacto a una temperatura de 24 °C. Se obtuvieron imágenes de resolución 512×512 píxeles a una velocidad de escaneo de 1 Hz. Las imágenes fueron tomadas tanto en ausencia como en presencia del surfactante de manera de registrar el efecto del mismo.

2.6.2 Estudio de la adsorción de Bz-Arg-NHC₁₀ a bicapas mediante resonancia de plasmones de superficie

La resonancia de plasmones superficiales (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*) constituye una interesante herramienta para el estudio de interacciones entre macromoléculas. Esta técnica permite la determinación de forma rápida y directa de las velocidades de asociación y disociación en procesos de unión sin la necesidad del uso de sondas específicas, y presenta una alta sensibilidad de detección, razón por la cual se puede trabajar con bajas concentraciones de muestra.

Utilizando esta técnica se estudió la interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ con bicapas de DPPC. Para las medidas se utilizó el equipo MP-SPR Navi™ 200 (BioNavis, Finlandia), el cual está compuesto por un sistema de detección de doble canal que permite medidas simultáneas en dos celdas, a través de dos láseres independientes (670 y 785 nm). Las mediciones se realizaron en un rango de exploración angular de 58-72 grados, empleando flujos típicos de 10 a 500 $\mu\text{l}/\text{min}$.

2.6.2.1 Preparación de la superficie de los sensores

Los sustratos de oro comerciales (SPR102-AU, BioNavis™) que se emplearon para realizar las medidas fueron tratados previamente a su uso. En primer lugar, se lavaron con una solución de $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ 1:1:2 a 90 °C durante 10 min, se enjuagaron con agua y etanol y se secaron bajo corriente de N_2 . Luego se los incubó con una solución etanólica de DTT 50 μM por 30 min a temperatura ambiente, con el objetivo de recubrir toda su superficie. Los sustratos oro-DTT (Au-DTT) fueron inmediatamente enjuagados con etanol y secados con N_2 .

2.6.2.2 Formación de la bicapa lipídica sobre el sustrato

Para la formación de las bicapas lipídicas *in situ* sobre la superficie del sustrato Au-DTT se utilizó una suspensión de SUV de DPPC. Como se mencionó anteriormente, para poder obtener los SUV primero se prepararon los MLV. Brevemente, se partió de un stock 1 mg/ml de DPPC en $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1 de los cuales se tomaron 1200 μl para obtener el *film* lipídico, que fue resuspendido con 3 ml de buffer TBS (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) a 60 °C. Finalmente, la suspensión de MLV fue sonicada durante 1 h a 60 °C en un sonicador de baño, obteniéndose así las vesículas unilamelares pequeñas.

Los sustratos Au-DTT se colocaron dentro del equipo de SPR y se obtuvieron curvas (de 52 a 78 grados) cada 3 segundos. El buffer de corrida empleado fue TBS con Ca^{+2} 3 mM a un flujo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$, el cual se mantuvo a lo largo de los experimentos. Luego de estabilizar la línea de base durante 10 min, se inyectó la suspensión de

liposomas (0,2 mg/ml) a un flujo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 15 min en sólo una de las dos celdas de flujo. La segunda celda se mantuvo sin lípidos para utilizarla como control. En función del porcentaje de recubrimiento deseado se repitió este paso de inyección de SUV tantas veces como fuera necesario. Luego de 10 min de estabilización de la señal, se le hizo pasar un pulso rápido (500 $\mu\text{l}/\text{min}$) de buffer para remover todo material adsorbido débilmente. La cantidad de lípido unido fue calculada a partir del cambio en la señal en el ángulo de la máxima derivada ($\Delta\Theta_{\text{bicapa}}$) entre la línea de base inicial y la línea de base final. Los resultados fueron expresados como porcentaje del $\Delta\Theta_{\text{bicapa}}$ teórico esperado para un recubrimiento total de la superficie por parte de la bicapa (Daza Millone et al., 2018).

2.6.2.3 Medidas de afinidad del surfactante

Una vez lista la bicapa, se procedió a evaluar la afinidad del surfactante con la misma. Para esto, se inyectó una solución de surfactante en buffer TBS a un flujo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 30 min. Las medidas fueron realizadas por duplicado, utilizándose bicapas soportadas frescas para cada ensayo.

3 Resultados y Discusión

3.1 Determinación de las concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas

Para estudiar el efecto del surfactante Bz-Arg-NHC₁₀ sobre el crecimiento microbiano, se emplearon bacterias Gram positivas y Gram negativas como indicadores. El crecimiento de las bacterias en medio LB adicionado con diferentes concentraciones de los surfactantes fue monitoreado a través de lecturas de densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) luego de 24 h de incubación. Con estos datos se calcularon los porcentajes de inhibición del crecimiento según lo descrito en la Sección 2.2 de Materiales y Métodos. Los cultivos en presencia de caldo LB adicionado con DMSO al 1 y 2 % permitieron confirmar que el crecimiento de las bacterias no se vio afectado por la presencia de este solvente en el medio. La Figura 3.4 muestra los gráficos de dosis-respuesta para cada microorganismo. A partir de estos datos se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM). Estos resultados, junto con las concentraciones bactericidas mínimas (CBM), se resumen en la Tabla 3.1.

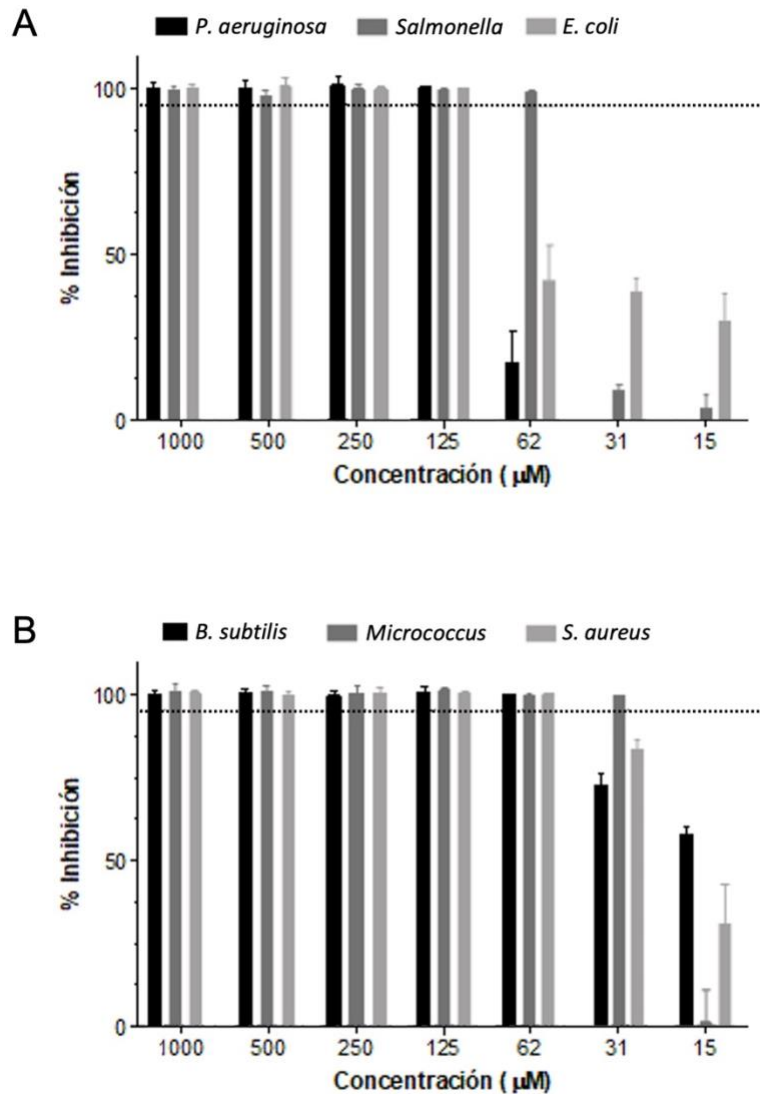


Figura 3.4 Porcentaje de inhibición de crecimiento en presencia de distintas concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₀ para: A) bacterias Gram negativas: *P. aeruginosa* (negro), *Salmonella* (gris oscuro) y *E. coli* (gris claro), y B) bacterias Gram positivas: *B. subtilis* (negro), *Micrococcus* (gris oscuro) y *S. aureus* (gris claro). El porcentaje de inhibición del crecimiento se grafica como la media \pm SD.

En base a los resultados obtenidos, se puede observar que Bz-Arg-NHC₁₀ demostró tener capacidad inhibitoria del crecimiento de las cepas bacterianas tanto

Gram positivas como Gram negativas. Este efecto fue dependiente de la concentración del surfactante en solución. Asimismo, se evidenció actividad bactericida en la mayoría de los casos.

Tabla 3.1 Concentraciones inhibitorias y bactericidas mínimas (CIM y CBM) expresadas en μM .

| Microorganismo | | Bz-Arg-NHC ₁₀ | |
|----------------|----------------------|--------------------------|-----------------------|
| | | CIM (μM) | CBM (μM) |
| Gram positivo | <i>Micrococcus</i> | 31 | 62 |
| | <i>B. subtilis</i> | 62 | 62 |
| | <i>S. aureus</i> | 62 | 62 |
| Gram negativo | <i>Salmonella</i> | 62 | 125 |
| | <i>P. aeruginosa</i> | 125 | 250 |
| | <i>E. coli</i> | 125 | 125 |

3.2 Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre la transición de fase de MLV de DPPC por calorimetría diferencial de barrido

Los lípidos experimentan un número de transiciones de fase internas sin cambiar la morfología del agregado. Estas fases se caracterizan por su organización lateral, el orden molecular y la movilidad de los lípidos que la constituyen. Hay al menos dos fases presentes en las membranas biológicas: fase gel y fase fluida. La denominación de estas

fases requiere de dos términos: el primero hace referencia al grado de libertad traslacional (sólido o líquido), mientras que el segundo se refiere al grado de libertad conformacional (interno) de las cadenas hidrocarbonadas (orden o desorden) (Bagatolli & Mouritsen, 2017). En la fase gel, o fase ordenada (So), las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se disponen en configuración *all-trans* y están en su máxima elongación, generando una red compacta. Como consecuencia, la difusión lateral de los lípidos se encuentra fuertemente reducida. En la fase fluida, también llamada fase líquido-desordenada (Ld), ocurren isomerizaciones *trans-gauche* lo que genera que las cadenas hidrocarbonadas se encuentren menos extendidas y tanto la difusión lateral como rotacional de los lípidos se ve favorecida en estas bicapas (McElhaney, 1982; Vazquez, 2015). En algunos lípidos la fase gel exhibe una característica adicional en determinados rangos de temperatura debida a la aparición de una fase llamada fase *ripple* (Figura 3.5). La transición entre la fase So y la fase *ripple* se denomina genéricamente pre-transición.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) permite evaluar las propiedades termodinámicas de un sistema, específicamente su transición de fase. Esta transición ocurre como resultado de una transición cooperativa de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos de una configuración *all-trans* a *gauche* en donde se conserva la estructura lamelar del sistema y los lípidos pasan de fase gel a fase fluida. Esta propiedad puede ser medida haciendo uso de los perfiles de capacidad calorífica en función de la temperatura a presión constante, en donde la presencia de picos señala transiciones de fase (Figura 3.5). Debido a la naturaleza anfílica de los surfactantes, estos podrían ser incorporados en las membranas lipídicas alterando su arreglo compacto y, por lo tanto, induciendo transiciones de fase.

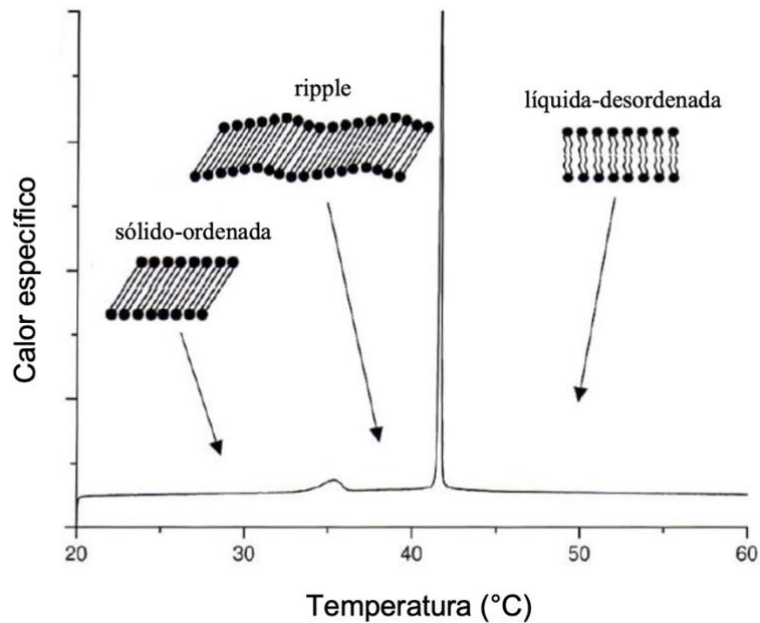


Figura 3.5 Transiciones de fase en bicapas compuestas por DPPC. Los insertos ilustran esquemáticamente la estructura transversal de la bicapa en cada una de las fases, separadas por los máximos en el perfil de calor específico. El máximo menos intenso de calor específico, en la región correspondiente a las estructuras sólidas, indica la transición entre las fases sólido ordenada \rightarrow *ripple*, (pre-transición. Mientras que el máximo más intenso corresponde a la transición principal de fases, que en este caso indica la transición entre las fases *ripple* \rightarrow líquido desordenado. Imagen tomada de (Bagatolli & Mouritsen, 2017).

Mediante el empleo de esta técnica se estudió el efecto de Bz-Arg-NHC₁₀ en vesículas de DPPC, y se analizaron dos parámetros asociados con la transición de fase. Por un lado, se estudió la temperatura de transición de fase gel-líquido desordenado (T_m) y por el otro, el ancho a mitad de altura del pico del termograma ($\Delta T_{1/2}$), que da un indicio de la cooperatividad del proceso de transición.

En la Figura 3.6 A se puede observar el termograma obtenido para MLV de DPPC en presencia de 0-4 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀. En la curva control, sin adición de surfactante, (línea negra) se puede observar que la transición ocurre a 41,2 °C, valor que está dentro del rango reportado por la literatura (Inoue et al., 1986). Se debe tener en cuenta que los valores de entalpía correspondientes a cada curva no pueden ser directamente comparados desde el gráfico, ya que la cantidad de muestra contenida en cada cápsula no fue la misma.

Cuando un compuesto se intercala entre los lípidos de una membrana, y sus cadenas hidrocarbonadas poseen una longitud igual o menor a 10 átomos de carbonos, se genera un desarreglo hidrofóbico. Es decir, se forma un vacío en el centro de las cadenas hidrocarbonadas que aumenta la proporción de conformeros *trans* a *gauche*, disminuyendo la estabilidad de la membrana en fase gel, y por lo tanto disminuye el valor de T_m (Castillo et al., 2004). Como se mencionó anteriormente, el ancho del pico del termograma ($\Delta T_{1/2}$) muestra la cooperatividad en la transición de fase. Por lo tanto, un ensanchamiento en el pico de transición (mayor $\Delta T_{1/2}$) indicaría que disminuye la cooperatividad por la adición del surfactante. Esto puede interpretarse como que, al incorporarse las moléculas de surfactante en la membrana, se altera la correlación entre las moléculas de lípidos responsables de la cooperatividad de la transición (Inoue et al., 1986).

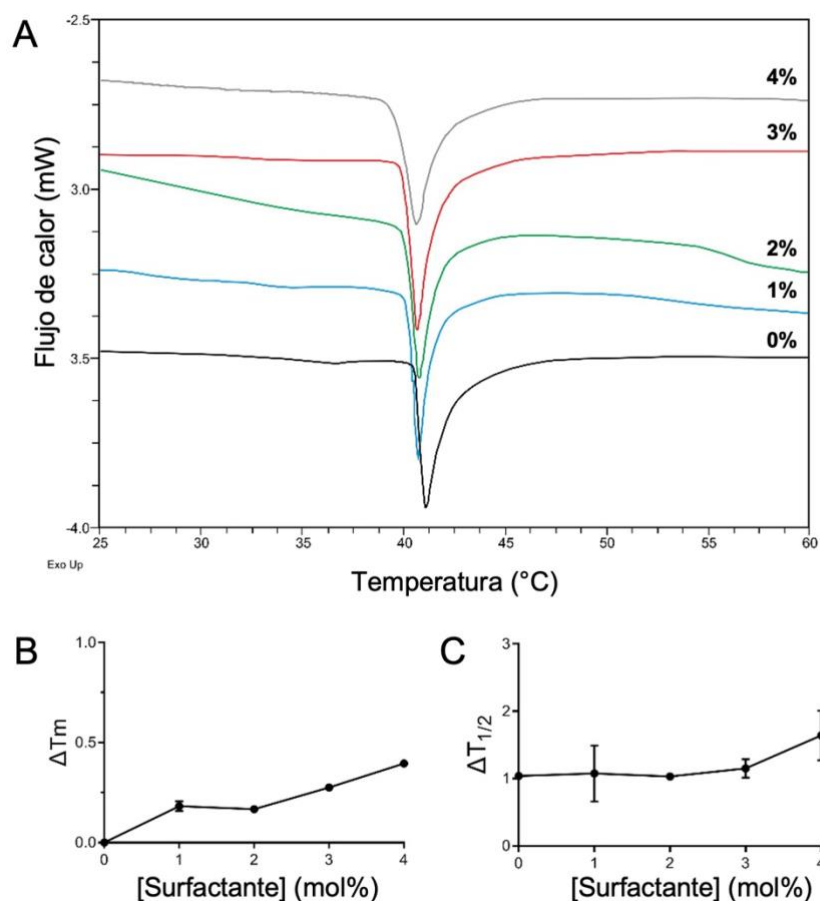


Figura 3.6 A) Curvas de DSC obtenidas para MLV de DPPC en presencia de Bz-Arg-NHC₁₀: 0 (DPPC puro), 1, 2, 3 y 4 mol%. La velocidad de calentamiento fue de 5 °C/min. B) y C) representan la variación en la temperatura de transición ($\Delta T_m = T_m - T_{m_0}$) y el ancho a mitad de altura de la transición ($\Delta T_{1/2}$), respectivamente, de los MLV en función del porcentaje molar de surfactante.

En la Figura 3.6 B y C se puede observar la variación en la temperatura de transición (ΔT_m) y la variación en el ancho a mitad de altura ($\Delta T_{1/2}$) de la transición para los MLV en función del porcentaje molar de Bz-Arg-NHC₁₀. El primer parámetro se calcula de la diferencia entre la T_m de los lípidos puros y la T_m de los liposomas conteniendo el surfactante ($\Delta T_m = T_m - T_{m_0}$). Estos resultados muestran que,

efectivamente Bz-Arg-NHC₁₀ fue capaz de incorporarse a la membrana de los liposomas de DPPC, lo que concuerda con los resultados anteriores, aunque el efecto en la fluidificación de esta fue pequeño. En experimentos de DSC llevados a cabo para otros surfactantes derivados de arginina, tales como LAM, también se ha encontrado un bajo efecto para concentraciones de hasta 5 mol%, pero aumenta notablemente entre 5 y 30 mol% (Castillo et al., 2004). Concentraciones mayores de nuestros surfactantes no fueron ensayadas, debido a la baja solubilidad que presentan.

3.3 Inserción de Bz-Arg-NHC₁₀ en monocapas de DPPC

Con el objetivo de determinar la concentración de surfactante a utilizar, antes de los ensayos de inserción se realizaron medidas de adsorción de Bz-Arg-NHC₁₀ a superficies limpias aire/buffer. Para el estudio de la interacción del surfactante con monocapas de DPPC se inyectó una alícuota de la solución del mismo en la subfase, de manera de obtener la concentración final deseada (30 μM) y se registraron las variaciones en la presión superficial ($\Delta\pi$) a lo largo del tiempo.

En la Figura 3.7 se muestran las curvas de $\Delta\pi$ en función del tiempo obtenidas luego del agregado del surfactante para presiones iniciales de lípido (π_0) desde los 5 hasta los 25 mN/m.

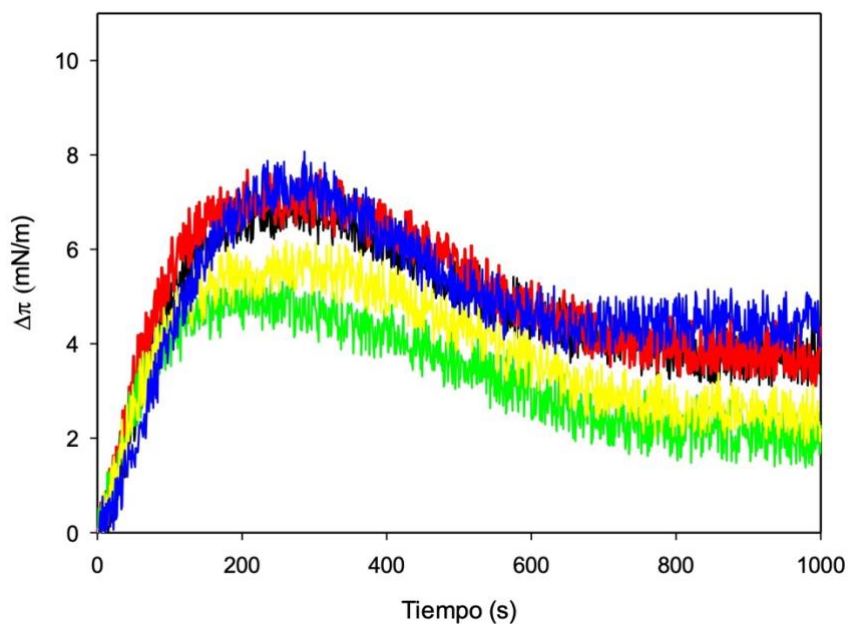


Figura 3.7 Cinética de inserción de Bz-Arg-NHC₁₀ 30 μ M en monocapas de DPPC. Los ensayos se realizaron para una presión inicial de lípidos de: 5 (línea verde), 10 (línea negra), 15 (línea roja), 20 (línea amarilla), 25 (línea azul). Las medidas fueron realizadas a 23 ± 1 °C.

Como se puede observar en el gráfico, se registró un aumento en la presión superficial del sistema como resultado de la interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ con la monocapa. En los primeros 5 min posteriores a la inyección hubo un rápido incremento en π , independientemente de la π_0 de la monocapa lipídica. Luego de este aumento inicial se produjo una disminución progresiva de π , lo que estaría reflejando una reorganización de la monocapa luego de la adsorción/incorporación de las moléculas de surfactante. Esto podría deberse a la actividad tensioactiva del compuesto el cual, luego de incorporarse a la monocapa lipídica alcanzaría una concentración lo suficientemente alta como para provocar la remoción de lípidos de la membrana mediante la formación de micelas mixtas (Nitenberg et al., 2018).

Finalmente, con el tiempo las monocapas se estabilizaron alcanzando una presión superficial de equilibrio (π_{eq}). La disminución neta desde la presión máxima alcanzada ($\pi_{m\acute{a}x}$) a la π_{eq} fue de aproximadamente de 4 mN/m para todas las π_0 ensayadas. A pesar de que las cinéticas observadas para este surfactante fueron similares en los distintos ensayos, la variación total de π , tanto de $\Delta\pi_{eq}$ como $\Delta\pi_{m\acute{a}x}$, dependió de los valores de π_0 de la monocapa lipídica (Figura 3.7). A medida que se aumentó el valor de π_0 , se registraron menores valores de $\Delta\pi$, es decir que disminuyó la habilidad del compuesto de insertarse en la membrana debido al empaquetamiento más compacto que presentan los lípidos a una mayor π_0 .

Con el objetivo de analizar la influencia de la densidad de empaquetamiento lipídico en las propiedades de inserción de los surfactantes, se determinó la presión superficial crítica (π_c). Este parámetro corresponde al valor de la extrapolación lineal de π_0 a partir del cual no hay más incorporación de moléculas de surfactante en la monocapa, es decir $\Delta\pi_{m\acute{a}x} = 0$ luego de la inyección, y refleja la capacidad de penetración del compuesto. En la Figura 3.7 se puede observar la gráfica de $\Delta\pi_{m\acute{a}x}$ en función de π_0 utilizadas para el cálculo de π_c . Debido a que el valor obtenido (59,6 mN/m) fue mayor a 30 mN/m, valor que se considera representativo del empaquetamiento lipídico de la membrana celular (Marsh, 1996), indicaría que este compuesto tiene la capacidad de penetrar en las membranas biológicas aún a altas densidades de empaquetamiento lipídico.

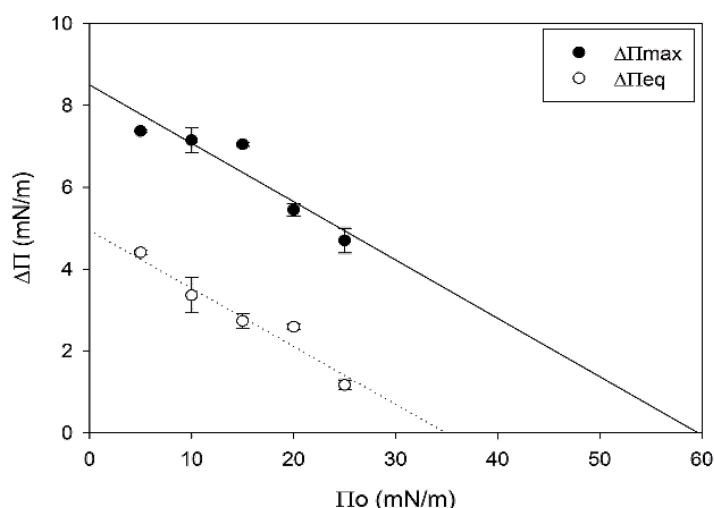


Figura 3.8 $\Delta\pi_{\text{máx}}$ y $\Delta\pi_{\text{eq}}$ en función de π_0 obtenidas para la interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ con monocapas de DPPC. La presión superficial crítica (π_c) fue obtenida de la extrapolación a $\Delta\pi_{\text{máx}} = 0$. Las medidas fueron realizadas a 23 ± 1 °C.

3.4 Visualización de la interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ con bicapas de DPPC por AFM

Una de las principales aplicaciones del AFM es el estudio de la topografía a nano- y microescala, permitiendo la visualización de procesos como la fusión, difusión, adsorción y asociaciones moleculares. Las muestras biológicas pueden ser observadas a alta resolución en condiciones cercanas a su estado natural (Müller et al., 2002). En este caso, se estudió el efecto ocasionado por Bz-Arg-NHC₁₀ sobre bicapas soportadas de DPPC.

Las medidas fueron realizadas en modo contacto como se describió en la sección Materiales y Métodos 2.6.1. Por esta razón, y para asegurar que las observaciones no se debían a una interacción invasiva de la punta del AFM con la membrana, se registraron

numerosos escaneos consecutivos en la misma área de la muestra sin surfactante. La Figura 3.9 muestra la bicapa de DPPC a distintos tiempos de incubación con Bz-Arg-NHC₁₀. El gráfico inferior en cada imagen muestra la distribución de alturas correspondientes a la sección transversal de la línea azul señalada en cada caso. En la Figura 3.9 A se muestra la bicapa inicial de DPPC con un espesor de $4,3 \pm 0,3$ nm. Esta diferencia de altura se encuentra dentro del rango de valores generalmente admitidos para bicapas soportadas de fosfolípidos.

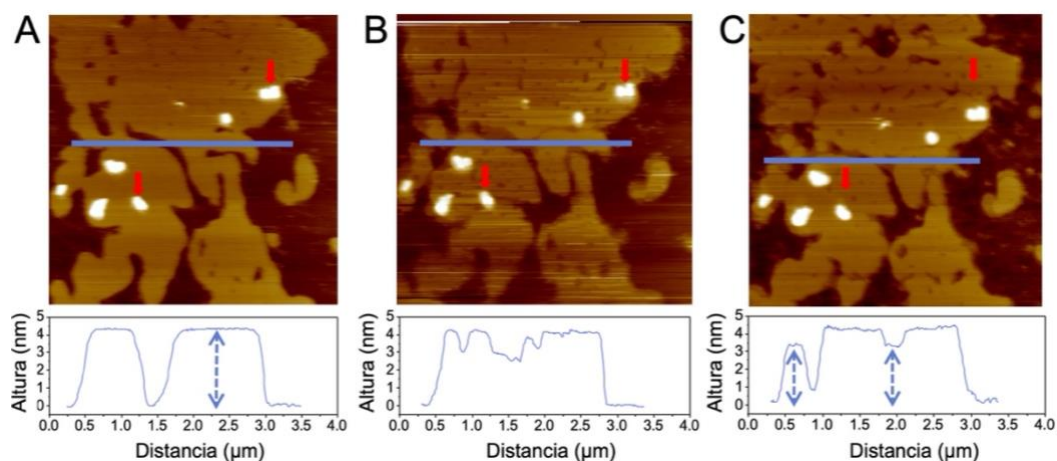


Figura 3.9 Imágenes de AFM de la interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ 50 μM con bicapas soportadas de DPPC a distintos tiempos: A) imagen 4 x 4 μm de la bicapa previo al agregado de surfactante; B) inmediatamente luego del agregado de Bz-Arg-NHC₁₀; y C) imagen tomada a los 16 min posteriores a la inyección. Los gráficos inferiores corresponden a las secciones transversales de las líneas azules dibujadas en las imágenes. Los puntos más brillantes están asociados a vesículas no fusionadas (flechas rojas). Las medidas fueron realizadas en modo contacto, a 23 ± 1 °C.

Luego del agregado de Bz-Arg-NHC₁₀ 50 μM (Figura 3.9 B) se tomaron sucesivas imágenes de la misma área de la bicapa tratada a lo largo del tiempo, a fin de observar

los cambios inducidos en ella (Figura 3.9 B-C). La altura de la bicapa permaneció sin alteraciones ($4,4 \pm 0,3$ nm) a lo largo del experimento, aunque se evidenció la presencia de agujeros dentro de la misma. Además, la región de los bordes de la bicapa exhibió alturas de $3,5 \pm 0,3$ nm. No está del todo claro a qué se deben estas regiones más bajas, pero se ha reportado en literatura que los surfactantes tienden a intercalarse preferentemente en regiones donde el empaquetamiento molecular es menos denso, es decir, el borde de la bicapa (Lima et al., 2013). La intercalación de este compuesto podría alterar las interacciones entre las cabezas y las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, induciendo así desorden en la bicapa. En base a las diferencias en el espesor de la muestra medida, se puede suponer que los dominios de mayor altura corresponden a dominios ricos en DPPC, mientras que los de menos altura corresponderían a dominios ricos en Bz-Arg-NHC₁₀.

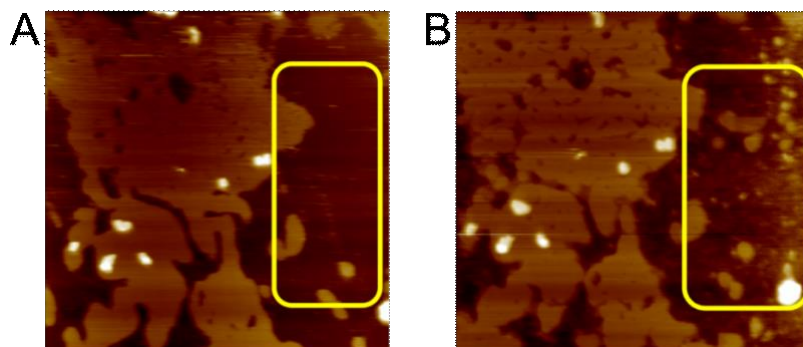


Figura 3.10 Imágenes de AFM A) antes ($t = 0$) y B) luego del agregado de Bz-Arg-NHC₁₀ 50 μ M ($t = 16$ min) a bicapas de DPPC. Los recuadros muestran la re-deposición de material.

En todas las muestras también se encontraron vesículas que no fueron afectadas por la adición del surfactante, las cuales se señalan con flechas rojas en la Figura 3.9.

Además, como muestran los recuadros de la Figura 3.10, se observó re-adsorción de material sobre la superficie de la mica, lo que podría deberse a la formación de vesículas mixtas de lípido/surfactante (Morandat & el Kirat, 2007).

Cuando se incubaron las bicapas con concentraciones mayores de Bz-Arg-NHC₁₀ (100 μ M) se vieron cambios más drásticos. Como se puede observar en la Figura 3.11, la bicapa de DPPC fue removida por completo luego de la adición del surfactante, dejando solamente restos de material adsorbido de 1,2–2,5 nm de altura (Figura 3.11 C).

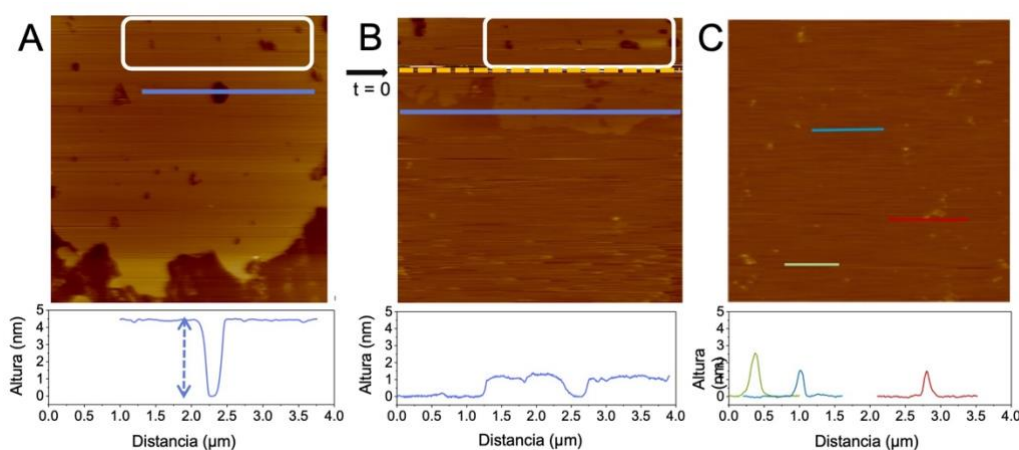


Figura 3.11 Imágenes de AFM de la interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ 100 μ M con bicapas soportadas de DPPC a distintos tiempos: A) imagen 4 \times 4 μ m de la bicapa previo al agregado de surfactante; B) inmediatamente luego del agregado de Bz-Arg-NHC₁₀ (señalado por la flecha negra y la línea punteada); y C) imagen tomada a los 6 min posteriores a la inyección. Los gráficos inferiores corresponden a las secciones transversales de las líneas azules dibujadas en las imágenes. Los rectángulos de línea blanca en A) y B) muestran las áreas conservadas entre los escaneos sucesivos. Las medidas fueron realizadas en modo contacto, a 23 ± 1 °C.

3.5 Análisis de la interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ con bicapas mediante SPR

La resonancia de plasmones superficiales constituye una herramienta poderosa para el monitoreo de interacciones biomoleculares en tiempo real, sin el requerimiento del marcado de moléculas. Los experimentos de SPR implican la inmovilización de uno de los reactivos en un soporte y el monitoreo de la interacción con el segundo componente en solución. Esta técnica mide los cambios en el índice de refracción del solvente cercano a la superficie que ocurren durante la interacción (Rich & Myszk, 2000).

A través del uso de SPR se estudió la capacidad de unión y solubilización del surfactante Bz-Arg-NHC₁₀ a bicapas de DPPC inmovilizadas en la superficie del sensor. Para la formación de la bicapa se realizaron inyecciones sucesivas de una suspensión de SUV de DPPC. En función del porcentaje de cobertura de la superficie que se quería obtener, fue la cantidad de inyecciones de la solución de SUV que se hicieron. En cuanto al surfactante, se utilizaron concentraciones de 50, 100 y 500 μM .

En la Figura 3.12 A se puede observar un gráfico representativo del ensayo de SPR en donde en el punto (1) se comienza la inyección de las vesículas de DPPC, en (2) se finaliza la inyección y se enjuaga con buffer (3) para eliminar material no adsorbido. Una vez estabilizada la línea de base, se realiza la inyección del surfactante (4) seguido de un paso de lavado (5), y estabilización y lectura de la señal final de SPR (6) mostrando un incremento neto en la misma.

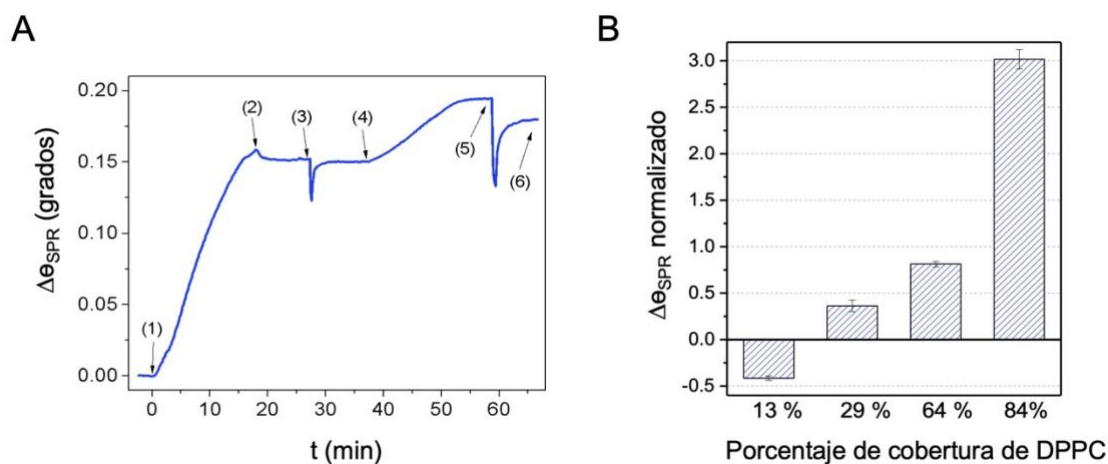


Figura 3.12 Medidas de SPR de la interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ con bicapas soportadas de DPPC. A) Interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ 100 μM con una superficie cubierta con $\sim 40\%$ de DPPC: (1) inyección de vesículas lipídicas, (2) fin de inyección, (3) lavado con buffer, (4) inyección del surfactante, (5) lavado con buffer y (6) señal final de SPR mostrando un incremento neto. B) Cambios normalizados en el ángulo de SPR ($\Delta\theta_{\text{SPR}}$) para la interacción de Bz-Arg-NHC₁₀ 500 μM con superficies con distinto porcentaje de cobertura de DPPC.

Como se muestra en la Figura 3.12 B, cuando la solución de Bz-Arg-NHC₁₀ (500 μM) se inyectó sobre una superficie con un porcentaje de cobertura lipídica mayor al 29 % se produjo un incremento neto en la señal de SPR, indicando un aumento en la unión de surfactante a la bicapa. Resultados similares fueron encontrados cuando se ensayaron concentraciones menores de surfactante (50 y 100 μM).

Por el contrario, cuando se utilizaron superficies con una cobertura lipídica del 13 %, se encontró un comportamiento distinto. En este caso, luego de la inyección de Bz-Arg-NHC₁₀ 500 μM , se observó una disminución en la señal con respecto a la línea de base, lo que da indicios de la remoción de lípidos de la bicapa. Estos resultados se

correlacionan con lo observado en las imágenes de AFM, en donde para una concentración de Bz-Arg-NHC₁₀ 100 μ M se alcanza la solubilización de la membrana.

En resumen, los ensayos de SPR se corresponden a varios efectos. En primer lugar, a una desorganización de la bicapa de DPPC, provocada por la adsorción del surfactante. Luego, al saturarse la bicapa de DPPC con Bz-Arg-NHC₁₀, ocurriría la liberación de micelas mixtas de lípido-surfactante. Estas micelas podrían luego depositarse en la superficie del soporte, tal como se observó en las imágenes de AFM (Figura 3.10).

4 Conclusión

En este capítulo se estudió la interacción entre Bz-Arg-NHC₁₀ con distintos sistemas de membrana modelo de DPPC con el fin de elucidar el mecanismo de disrupción de la organización de la membrana.

A través de los ensayos de DSC, se pudo ver que este compuesto tuvo un leve efecto en la fluidez de los liposomas de DPPC en el rango de concentraciones evaluado. Un comportamiento similar ha sido encontrado para otro surfactante derivado de arginina, LAM (*N*^α-lauril-L-arginina-metil éster), el cual demostró tener poco efecto sobre ΔT_m y $\Delta T_{1/2}$ a bajas concentraciones, aunque su efecto aumenta significativamente al aumentar su concentración (Castillo et al., 2004). Sin embargo, Bz-Arg-NHC₁₀ demostró ser capaz de insertarse en monocapas lipídicas de DPPC. Además, luego de su inserción se observó una disminución en la señal que correspondería a la remoción de lípidos de la monocapa. Según los cálculos de la presión superficial crítica, Bz-Arg-NHC₁₀ podría insertarse en membranas biológicas ya que su π_c fue 59,6 mN/m, valor que excede ampliamente a la presión característica de las membranas biológicas (30 mN/m) (Marsh, 1996). Estos datos indicarían que el surfactante sería capaz de insertarse en membranas biológicas altamente empaquetadas.

La variación neta del valor máximo de π (π_{max}) observada luego de la inserción de las moléculas de Bz-Arg-NHC₁₀ podría deberse a la actividad tensioactiva que presenta este compuesto. Luego de incorporarse a la monocapa lipídica se alcanzaría

una concentración lo suficientemente alta como para provocar la remoción de lípidos de la membrana mediante la formación de micelas mixtas (Nitenberg et al., 2018).

En los ensayos de AFM se pudo ver un efecto sobre la bicapa distinto en función de la concentración de surfactante empleada. A las concentraciones de Bz-Arg-NHC₁₀ más bajas se observó una remoción gradual de los lípidos de la bicapa. La misma comenzó por los bordes y/o defectos que esta presentaba. Además, se observó re-deposición de material a tiempos largos de ensayo, lo que podría deberse a la formación de micelas mixtas de DPPC-Bz-Arg-NHC₁₀ y su posterior adsorción sobre la superficie. Cuando la concentración de surfactante se duplicó, la remoción de la bicapa se dio de forma instantánea.

Al igual que en AFM, con SPR se pudo ver un efecto dependiente de la concentración. Cuando el ensayo se realizó con un bajo porcentaje de cobertura del sensor, se evidenció la remoción de lípidos de la bicapa, mientras que al aumentar la cantidad de lípidos que componían la bicapa, el surfactante se adsorbía a la misma.

Los resultados obtenidos en este capítulo corresponden tanto a la inserción del surfactante, lo que produce una desorganización de la bicapa de DPPC, como a la liberación de micelas mixtas de surfactante-lípido cuando la bicapa se satura de moléculas de surfactante. Estas micelas pueden ser re-depositadas en la superficie de la muestra, tal como se observó en las imágenes de AFM.

En todos los experimentos realizados, la concentración de surfactante responsable del efecto observado estuvo por encima de la CMC. Como los efectos en la

bicapa fueron mayores al aumentar la concentración de surfactante, esto sugeriría que no solo los monómeros, sino también los agregados de surfactante son los responsables de la ruptura de la membrana. El efecto de los monómeros se produciría a través de la inserción y saturación de la membrana con consecuente liberación de micelas mixtas. Asimismo, el efecto de los agregados de surfactante se produciría a través de colisiones con la membrana y extracción de los lípidos.

Estos resultados permitirían explicar la actividad antimicrobiana observada para Bz-Arg-NHC₁₀. Se encontró que este compuesto es eficiente contra distintas cepas bacterianas, a diferencia de otros surfactantes análogos derivados de arginina tales como ACA y CAM (arginina-*N*-caproil amida y *N*^α-caproil-L-arginina-metil éster, respectivamente), los que han demostrado no ser efectivos contra microorganismos Gram negativos como *E. coli*. Esto podría explicarse en base a las diferencias estructurales entre estos surfactantes análogos y Bz-Arg-NHC₁₀, lo cual resultaría en las distintas interacciones de estos compuestos con la superficie celular y la membrana bacteriana. Además, estas interacciones podrían no solo estar influenciadas por la estructura química del surfactante, sino también por la composición de la envoltura celular bacteriana. Bz-Arg-NHC₁₀ probó tener actividad antimicrobiana frente a bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas casi en la misma medida, a diferencia de lo que generalmente se ha observado para otros surfactantes derivados de arginina, los cuales son más efectivos contra bacterias Gram positivas. Este comportamiento podría atribuirse a la presencia del grupo benzoilo, el cual incrementa el carácter hidrofóbico del surfactante, mejorando su habilidad para penetrar en la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

5 Referencias

- Almeida, J. A. S., Marques, E. F., Jurado, A. S., & Pais, A. A. C. C. (2010). The effect of cationic gemini surfactants upon lipid membranes. An experimental and molecular dynamics simulation study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *12*(43), 14462–14476. <https://doi.org/10.1039/c0cp00950d>
- Bagatolli, L. A., & Mouritsen, O. G. (2017). *Vida ¿Una cuestión de grasas?* (L. Bagatolli & O. Mouritsen, Eds.; 2da ed.). Springer.
- Brockman, H. (1999). Lipid monolayers: Why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? *Current Opinion in Structural Biology*, *9*(4), 438–443. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)80061-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)80061-X)
- Castillo, J. A., Pinazo, A., Carilla, J., Infante, M. R., Alsina, M. A., Haro, I., & Clapés, P. (2004). Interaction of Antimicrobial Arginine-Based Cationic Surfactants with Liposomes and Lipid Monolayers. *Langmuir*, *20*(8), 3379–3387. <https://doi.org/10.1021/la036452h>
- Daza Millone, M. A., Vázquez, R. F., Maté, S. M., & Vela, M. E. (2018). Phase-segregated membrane model assessed by a combined SPR-AFM approach. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *172*(August), 423–429. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.066>
- Eeman, M., & Deleu, M. (2010). From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, *14*(4), 719–736.
- Epanand, R. M., & Epanand, R. F. (2009). Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, *1788*(1), 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.023>
- Fait, M. E., Bakás, L., Garrote, G. L., Morcelle, S. R., & Saparrat, M. C. N. (2019). Cationic surfactants as antifungal agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(1), 97–112. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9467-6>

- Fait, M. E., Garrote, G. L., Clapés, P., Tanco, S., Lorenzo, J., & Morcelle, S. R. (2015). Biocatalytic synthesis, antimicrobial properties and toxicity studies of arginine derivative surfactants. *Amino Acids*, 47(7), 1465–1477. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1979-0>
- Infante, M. R., Molinero, J., Erra, P., Juliá, M. R., Garcia Dominguez, J. J., & Robert, M. (1986). The Influence of Steric Configuration of some N α -Lauroyl Amino-Acid Derivatives on their Antimicrobial Activity. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 88(3), 108–110. <https://doi.org/10.1002/lipi.19860880311>
- Infante, M. R., Pinazo, A., & Seguer, J. (1997). Non-conventional surfactants from amino acids and glycolipids: Structure, preparation and properties. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 123–124, 49–70. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(96\)03793-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(96)03793-4)
- Inoue, T., Muraoka, Y., Fukushima, K., & Shimosawa, R. (1986). Interaction of surfactants with vesicle membrane of dipalmitoylphosphatidylcholine: fluorescence depolarization study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 42(2), 261–270. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(88\)90120-X](https://doi.org/10.1016/0009-3084(88)90120-X)
- Jass, J., Tjärnhage, T., & Puu, G. (2000). From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: An atomic force microscopy study. *Biophysical Journal*, 79(6), 3153–3163. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76549-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76549-0)
- Lima, L. M. C. C., Giannotti, M. I., Redondo-Morata, L., Vale, M. L. C., Marques, E. F., & Sanz, F. (2013). Morphological and nanomechanical behavior of supported lipid bilayers on addition of cationic surfactants. *Langmuir*, 29(30), 9352–9361. <https://doi.org/10.1021/la400067n>
- Lind, T. K., Skoda, M. W. A., & Cárdenas, M. (2019). Formation and Characterization of Supported Lipid Bilayers Composed of Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylglycerol by Vesicle Fusion, a Simple but Relevant Model for Bacterial Membranes. *ACS Omega*, 4(6), 10687–10694. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01075>

- Marsh, D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 1286(3), 183–223. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3)
- McElhane, R. N. (1982). The use of differential scanning calorimetry and thermal analysis in studies of model and biological membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 30, 229–259.
- Morán, C., Pinazo, A., Pérez, L., Clapés, P., Angelet, M., García, M. T., Vinardell, M. P., & Infante, M. R. (2004). “Green” amino acid-based surfactants. In *Green Chemistry* (Vol. 6, Issue 5, pp. 233–240). <https://doi.org/10.1039/b400293h>
- Morandat, S., & el Kirat, K. (2007). Solubilization of supported lipid membranes by octyl glucoside observed by time-lapse atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 55(2), 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.11.039>
- Müller, D. J., Janovjak, H., Lehto, T., Kuerschner, L., & Anderson, K. (2002). Observing structure, function and assembly of single proteins by AFM. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 79, 1–43.
- Nitenberg, M., Bénarouche, A., Maniti, O., Marion, E., Marsollier, L., Géan, J., Dufourc, E. J., Cavalier, J. F., Canaan, S., & Girard-Egrot, A. P. (2018). The potent effect of mycolactone on lipid membranes. *PLOS Pathogens*, 14(1), e1006814. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006814>
- Petty, M. C. (1996). *Langmuir-Blodgett Films: An Introduction*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511622519>
- Piera, E., Comelles, F., Erra, P., & Infante, M. R. (1998). New alquil amide type cationic surfactants from arginine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 2, 335–342. <https://doi.org/10.1039/a705565j>
- Raudino, A., Sarpietro, M. G., & Pannuzzo, M. (2013). 4 - Differential scanning calorimetry (DSC): theoretical fundamentals. In R. Pignatello (Ed.), *Drug-Biomembrane Interaction Studies* (pp. 127–168). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781908818348.127>

- Rich, R. L., & Myszka, D. G. (2000). Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(1), 54–61. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00054-3)
- Singh, A., & Tyagi, V. K. (2014). *Arginine Based Novel Cationic Surfactants : A Review*. 51, 202–214.
- Vazquez, R. (2015). *Mecanismo de acción de la toxina alfa hemolisina de E. coli*. Universidad Nacional De La Plata.

Capítulo IV

INTERACCIÓN DE Bz-Arg-NHC_n CON
SISTEMAS MODELO DE MEMBRANA:
MODELO DE ESTRATO CÓRNEO

Índice Capítulo IV

| | | |
|----------|---|------------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 139 |
| 1.1 | Sistema modelo de membrana mimético del estrato córneo | 145 |
| 2 | MATERIALES Y MÉTODOS | 148 |
| 2.1 | Materiales | 148 |
| 2.2 | Caracterización de las monocapas lipídicas mediante isothermas de compresión | 149 |
| 2.3 | Adsorción de Bz-Arg-NHC _n en interfase aire/agua e inserción en monocapas lipídicas | 150 |
| 2.4 | Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC _n sobre monocapas mediante Microscopía de Ángulo de Brewster | 151 |
| 2.5 | Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC _n sobre monocapas por Microscopía de Fuerza Atómica | 152 |
| 2.5.1 | <i>Transferencia de monocapas de Langmuir a un soporte sólido</i> | <i>152</i> |
| 2.5.2 | <i>Observación de las monocapas por AFM</i> | <i>153</i> |
| 2.6 | Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC _n empleando modelos <i>in silico</i> | 154 |
| 2.6.1 | <i>Detalles de la simulación</i> | <i>157</i> |
| 3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 159 |
| 3.1 | Caracterización de las monocapas lipídicas mediante isothermas de compresión | 160 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.2 | Adsorción de Bz-Arg-NHC _n en interfase aire/agua e inserción en monocapas lipídicas | 163 |
| 3.3 | Observación de la estructura lateral de monocapas SCM por BAM | 169 |
| 3.4 | Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC _n sobre monocapas por AFM | 173 |
| 3.5 | Análisis de la interacción de Bz-Arg-NHC _n con membranas SCM mediante ensayos <i>in silico</i> | 177 |
| 3.5.1 | <i>Cálculo de la distribución de densidad normalizada</i> | 177 |
| 3.5.2 | <i>Parámetro de orden de enlace carbono-deuterio</i> | 182 |
| 3.5.3 | <i>Cálculo del área extra por anfifilo incorporado</i> | 184 |
| 3.5.4 | <i>Compresibilidad</i> | 185 |
| 4 | CONCLUSIÓN | 187 |
| 5 | REFERENCIAS | 191 |
| 6 | ANEXO | 199 |
| 6.1 | Detalles de simulación | 199 |
| 6.2 | Imágenes suplementarias | 200 |
| 6.3 | Videos suplementarios | 203 |

1 Introducción

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, y la mayor interfase entre este y el medio externo. Su función principal es la de establecer una barrera protectora compleja frente a agentes externos, incluyendo amenazas biológicas, físicas y químicas. Además, previene la pérdida de agua y el ingreso de otras sustancias exógenas (Abla et al., 2016; Lemos et al., 2018). A pesar de esto, se ha convertido en una reconocida ruta para la liberación de drogas, ya que es un sitio ideal para la aplicación de principios activos que necesiten ejercer un efecto local (tópico) o sistémico (transdérmico). Es en este contexto que el suministro transdérmico de drogas (TDD, del inglés *transdermal drug delivery*) ofrece varias ventajas con respecto a las rutas tradicionales de liberación de principios activos. Entre ellas se encuentran su fácil acceso, un mejor control de los niveles en sangre del fármaco, una reducción en la incidencia de la toxicidad sistémica, y la ausencia de metabolismo primario hepático (Nokhodchi et al., 2003), razón por la cual la piel ha adquirido gran interés como sitio de aplicación de diversos compuestos medicinales.

La piel está compuesta de tres capas: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 4.1). La primera capa, la más externa, es la epidermis, cuyo espesor varía entre 50 y 150 μm y cumple principalmente un propósito de defensa. La epidermis puede dividirse en dos subcapas: el estrato córneo (SC) y la epidermis viable, la cual a su vez está compuesta por cuatro capas (estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato germinativo o basal). Las células epidérmicas están en continua renovación y se organizan jerárquicamente, diferenciándose desde las capas más profundas hasta el SC.

Por debajo de la epidermis se encuentra la dermis, cuyo tipo celular mayoritario son fibroblastos, e incluye una red de capilares sanguíneos, vasos linfáticos y terminales nerviosas. Es principalmente tejido conectivo de naturaleza hidrofílica y proporciona nutrientes y oxígeno a la piel, además de proveerle fuerza, resistencia mecánica y flexibilidad. Dependiendo de la ubicación en el cuerpo, el espesor de la dermis varía entre 0,3 a 5 mm. El transporte de sustancias a través de esta zona es rápido, y se puede alcanzar la circulación sistémica mediante los vasos sanguíneos. La capa más interna se denomina hipodermis o tejido subcutáneo. Esta capa tiene entre 2 a 7 mm de espesor, y está constituida principalmente por adipocitos y fibroblastos. Tiene funciones importantes como almacenar lípidos, aislar el cuerpo y regular la temperatura.

A pesar de que la piel está conformada por las múltiples capas nombradas anteriormente, su función de barrera está asegurada principalmente por el estrato córneo. Esta capa es de naturaleza lipofílica, tiene un espesor aproximado entre 10 y 20 μm y está compuesta por una matriz lipídica y de 15 a 20 capas de células epidérmicas muertas, deshidratadas, enriquecidas en proteínas y altamente especializadas, denominadas corneocitos. Estas células tienen una forma poligonal, y están embebidas en la matriz lipídica formando estructuras muy organizadas. La organización de dicha estructura se conoce como el modelo comúnmente denominado de "ladrillo y mortero" ("*brick and mortar*") (Abla et al., 2016; Lemos et al., 2018).

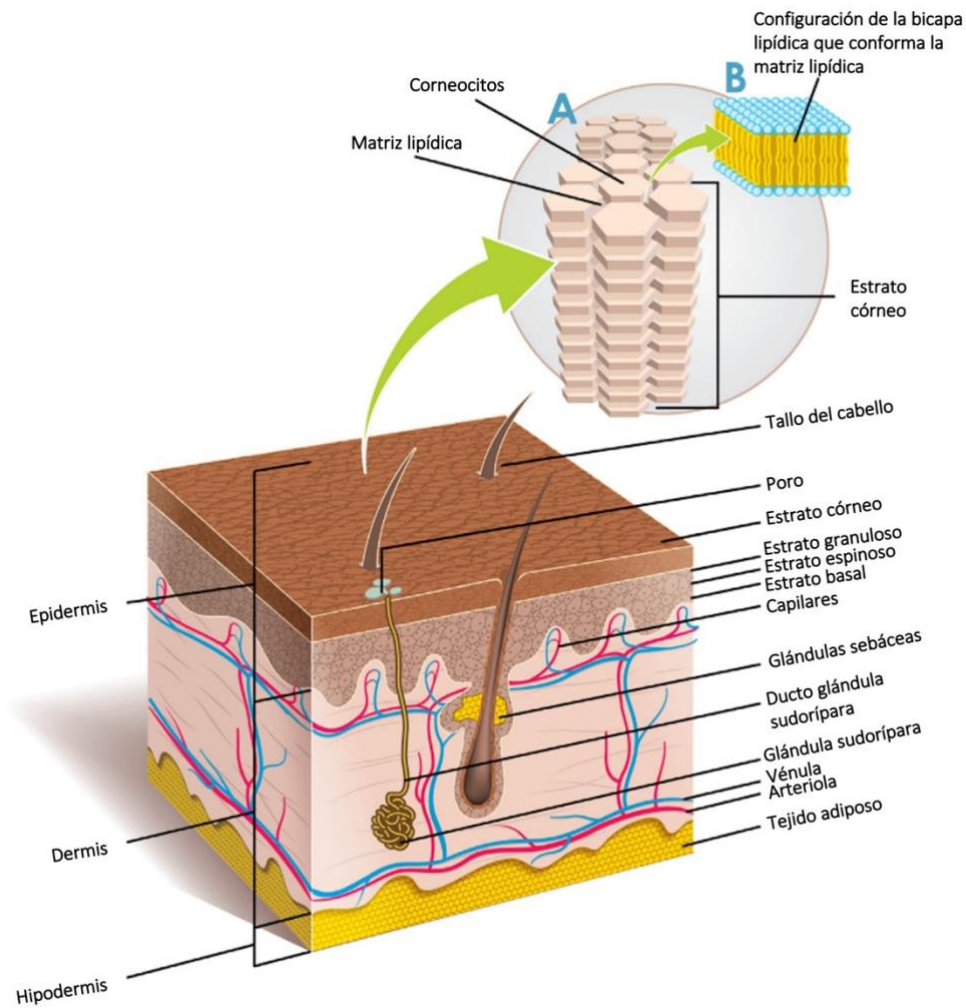


Figura 4.1 Representación esquemática de la anatomía de la piel. A) Organización estructural de los corneocitos según el modelo de “*brick and mortar*”, muestra su forma hexagonal, organizados en grupos. B) Representación simplificada de la matriz lipídica, compuesta por fosfolípidos autoensamblados en bicapas. Imagen tomada de (Lemos et al., 2018).

La composición lipídica del SC difiere bastante de otras membranas biológicas ya que básicamente no incluye fosfolípidos. Sus componentes principales son ácidos

grasos, colesterol y ceramidas de cadena larga (Kahraman et al., 2019; Pham et al., 2016). Esta matriz intercelular lipídica del SC es esencial para mantener la función de barrera de la piel y prevenir la pérdida de agua transepidermica. Es por esta razón que el SC representa el principal impedimento para la penetración de fármacos a través de la piel.

Para que una molécula sea capaz de permear a través de la piel debe poseer determinadas características fisicoquímicas, tales como un tamaño menor a 500 Da, no tener carga neta, ser moderadamente lipofílica, entre otras. Hay distintas rutas por las cuales una molécula puede atravesar el SC (Figura 4.2): intercelular, transcelular o por apéndices. El pasaje de compuestos a través de los queratinocitos se denomina ruta transcelular, mientras que si ocurre a través de la matriz lipídica se llama ruta intercelular. El transporte vía apéndices es el que ocurre a través de los folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas (Banga, 2011).

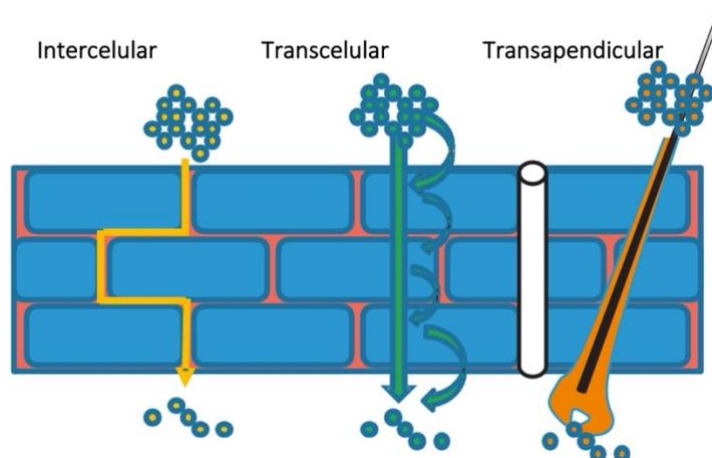


Figura 4.2 Posibles vías de transporte a través del estrato córneo: intercelular, transcelular o por apéndices. Imagen adaptada de Lane, 2013.

Se han desarrollado varias estrategias para superar la impermeabilidad del SC y mejorar así la penetración de los compuestos terapéuticos. Una de las más comúnmente utilizada es el empleo de potenciadores de penetración (PP). Estos compuestos idealmente pueden alterar de forma temporal y reversible la organización de la capa de lípidos del SC, aumentando su permeabilidad sin modificar otras funciones de la piel (Zhang et al., 2015).

Diferentes clases de compuestos han sido propuestos como potenciadores de penetración, entre los que se encuentran pequeños compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos, surfactantes, lípidos y solventes. Al tener diferencias en sus propiedades físicas y químicas, se espera que afecten las propiedades del estrato córneo en diferentes maneras.

Un PP efectivo podría favorecer la TDD mediante alguna de las siguientes maneras (Williams & Barry, 2004):

- Incrementando el coeficiente de difusión de la droga en el SC (disrumpiendo la barrera natural del SC),
- Incrementando la concentración efectiva de la droga en el vehículo (por ej. actuando como cosolvente),
- Mejorando la partición entre la formulación y el SC,
- Disminuyendo el grosor de la piel, el cual es el efecto menos deseado.

Barry y colaboradores (Barry, 1991) postularon el concepto de partición lípido-proteína con el fin de categorizar y describir cómo los PP alteran la permeabilidad de la piel. Según esta teoría existen tres formas posibles en las que se puede ajustar la permeabilidad de la piel para permitir un mejor transporte de las drogas. La primera es la modificación lipídica, en la cual los PP actuarían alterando la organización de la bicapa lipídica del SC y, como resultado, la barrera del SC se volvería más permeable incrementándose el coeficiente de difusión de la droga. La segunda es la modificación de proteínas, en donde los PP interactúan y se unen a las proteínas de los corneocitos ocasionando un cambio conformacional en las mismas que altera el orden en los corneocitos y aumenta la difusión de la droga a través del SC. Finalmente, la tercera manera en que pueden actuar los PP es promoviendo la partición. Esto quiere decir que algunos solventes pueden penetrar en el SC y cambiar sus propiedades químicas, permitiendo el aumento de la partición de un fármaco, co-potenciador y co-disolvente en el SC y su mayor solubilidad dentro del SC (Dragicevic & Maibach, 2015). Los PP actúan por uno, o usualmente más de uno, de estos mecanismos de acción.

Una de las grandes desventajas de los PP es la toxicidad que presentan la mayoría de ellos, razón por la cual se ha estimulado la búsqueda de compuestos más seguros. Diferentes estudios han propuesto el uso de surfactantes en sistemas de TDD, los cuales demostraron que son efectivos como PP. Sin embargo, debido a la alta irritabilidad de la piel frente a los surfactantes, así como la toxicidad de este tipo de compuestos su empleo como PP se ve limitado (Som et al., 2012).

Como se ha mencionado anteriormente, los surfactantes derivados de arginina han demostrado ser poco tóxicos e irritantes al ser probados en organismos vivos, además de presentar buena biodegradabilidad. En particular, se ha verificado la baja actividad hemolítica, irritabilidad ocular y citotoxicidad de nuestros compuestos (Fait et al., 2015). Todas estas propiedades podrían hacer de Bz-Arg-NHC_n una prometedora alternativa para su uso como aditivos en formulaciones tópicas.

En este capítulo se describe el estudio de los procesos fisicoquímicos involucrados en la perturbación de sistema modelos de membrana producidos por la interacción con Bz-Arg-NHC_n, para evaluar su potencial aplicación como PP.

1.1 Sistema modelo de membrana mimético del estrato córneo

A lo largo del tiempo se han hecho numerosos esfuerzos para identificar un modelo simple que pudiera representar la compleja estructura enriquecida en lípidos del SC (Ochalek, 2012; Školová et al., 2013; Sparr et al., 2001). Un modelo de membrana compuesto por colesterol (Cho), ceramidas de cadenas largas no hidroxiladas, saturadas y ligadas a esfingosina (Cer[NS]), y ácidos grasos (Figura 4.3), con o sin la incorporación de sulfato de colesterol (ChoS), ha demostrado mimetizar la estructura del estrato córneo y su capacidad de barrera (Y. M. Zulueta Díaz et al., 2020). Estos lípidos forman un estado sólido, líquido condensado (Lc) o fase ordenada, con un alto módulo de compresibilidad.

Este sistema lipídico se autoorganiza en arreglos lamelares impermeables muy compactos, formando nanoestructuras con distancias repetidas de 6 y 13 nm, lo cual se

asemeja a la organización estructural general del SC (Flach et al., 2000; Schmitt & Neubert, 2018; Školová et al., 2013). Se cree que estas lamelas están organizadas en dominios segregados lateralmente, que pueden ser relevantes para la penetración de componentes químicos a través de la estructura del SC (Del Regno & Notman, 2018; Školová et al., 2013).

En los ensayos realizados en este capítulo se utilizó una mezcla lipídica que mimetiza al estrato córneo (SCM) obtenida a partir de la mezcla equimolar de Cer[NS] 24:0 (Cer24), Chol y ácido lignocérico (LA), con la adición de un 5% p/p de CholS (Figura 4.3) para estudiar el efecto producido por Bz-Arg-NHC_n. En los experimentos se incluyeron un control negativo y un control positivo. Como control negativo se utilizó ácido esteárico (SA) debido a su nula actividad como potenciador de penetración (Pham et al., 2016), además de ser un compuesto que promueve la preservación de la barrera de la piel (Ananthapadmanabhan et al., 2013). Como control positivo, se empleó ácido oleico (OA), ya que se trata de un potenciador de penetración típico.

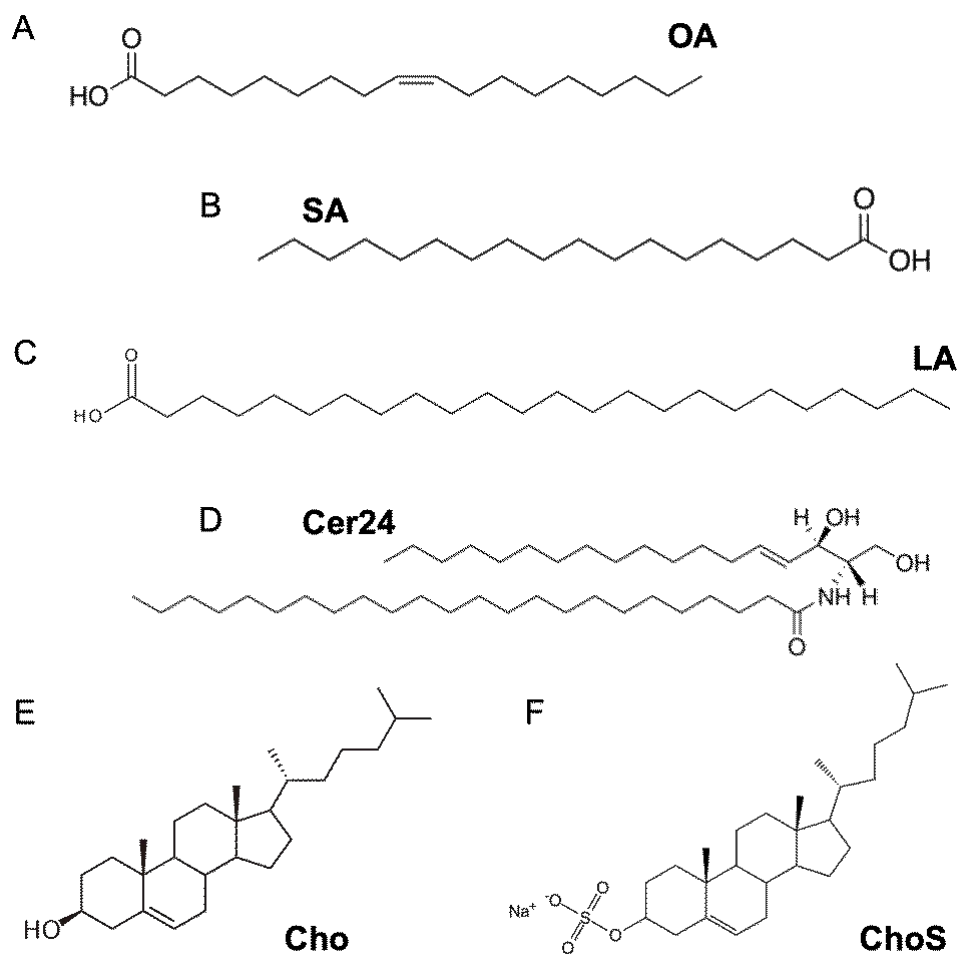


Figura 4.3 Estructura química de A) ácido oleico (OA), B) ácido esteárico (SA) y de los componentes del sistema modelo de estrato córneo C) ácido lignocérico (LA), D) Cer[NS]24:0 (Cer24), E) colesterol (Chol) y F) sulfato de colesterol (ChoS).

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

Para la preparación de las monocapas se utilizaron colesterol (Cho) y (d18:1/24:0) *N*-lignoceroil-D-eritro-esfingosina (Cer[NS]24:0 o Cer24) adquiridos a Avanti Polar Lipids (USA); ácido lignocérico (LA), ácido oleico (OA), ácido esteárico (SA), y colesterol-3-sulfato (ChoS) fueron provistos por Sigma-Aldrich (USA).

Para obtener una membrana que mimetizara al estrato córneo (SCM), se empleó una mezcla de lípidos compuesta por Cer24/LA/Cho 33:33:33 a la cual se le adicionó un 5% p/p de ChoS. La misma fue preparada en Cl₃CH/CH₃OH 2:1 v/v para obtener una concentración total de 1 nmol/μl. Todos los solventes empleados fueron de la máxima pureza comercial disponible.

Para la realización de todos los ensayos se empleó buffer citrato 10 mM pH 4,5. El agua utilizada fue purificada por un sistema Milli-Q (Millipore, USA) para obtener un producto con resistividad de ~18,5 MΩ. En todos los casos la temperatura de trabajo fue de 24 °C.

Los cubreobjetos de vidrio (12 mm de diámetro) utilizados para soportar las membranas fueron comprados a Marienfeld GmbH & Co. KG (Alemania).

2.2 Caracterización de las monocapas lipídicas mediante isotermas de compresión

Las monocapas lipídicas fueron preparadas y caracterizadas empleando una balanza de Langmuir KSV-NIMA (BiolinScientific-Espoo, Finlandia), sobre una subfase de buffer citrato 10 mM pH 4,5 a 24 ± 1 °C. La presión superficial fue determinada usando el método de Wilhemy con una platina de Pt según la ecuación:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{Ecuación 4.1}$$

donde γ_0 es la tensión superficial del líquido puro y γ es la tensión superficial de la superficie cubierta por la monocapa. Luego de sembrar la monocapa y asegurarse una completa evaporación del solvente (2 min), la misma fue comprimida uniaxialmente a una velocidad aproximada de $1 \text{ \AA}^2/\text{molécula}\cdot\text{min}$ hasta alcanzar la presión de colapso, empleando dos barreras de Delrin™. El movimiento lateral sobre la superficie de la balanza fue monitoreado y registrado por una unidad electrónica. El área molecular media (MMA) fue considerada como el área total de la monocapa dividida por el número total de moléculas sembradas en la superficie. La elasticidad en el plano frente a la compresión fue evaluada mediante el módulo de compresibilidad, calculado directamente de los datos de las isotermas como se indicó previamente:

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T \quad \text{Ecuación 4.2}$$

El análisis de los datos de las isotermas de presión superficial en función del área fue realizado empleando el software OriginPro®8.

2.3 Adsorción de Bz-Arg-NHC_n en interfase aire/agua e inserción en monocapas lipídicas

La adsorción de los compuestos (Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂, OA y SA) desde la subfase acuosa a la interfase limpia aire/agua lleva a la formación de monocapas de Gibbs. Para realizar estos experimentos se prepararon soluciones etanólicas de Bz-Arg-NHC₁₀ (8 mg/ml), Bz-Arg-NHC₁₂ (8 mg/ml), OA (9 mg/ml) y SA (5,42 mg/ml). Estas fueron inyectadas, utilizando un volumen menor a 100 µl, en la subfase bajo una constante agitación (volumen de cuba 16 ml) para llegar a una concentración final de 100 µM. Se realizaron controles inyectando 100 µl de etanol en la subfase, los cuales no demostraron aumento en la presión superficial (π). La concentración final de los surfactantes en la subfase se eligió para que estuviera por encima de sus respectivas CMC en buffer, 28 µM para Bz-Arg-NHC₁₀ y 12 µM para Bz-Arg-NHC₁₂ (valores obtenidos en el Capítulo II).

Se registraron los cambios en la presión superficial, manteniendo el área constante, a lo largo del tiempo mientras la monocapa de Gibbs se establecía en la

interfase aire/agua. Se consideró que luego de la adsorción del surfactante a la superficie, su concentración en la subfase pudo haber disminuido menos de un 4%.

Para los experimentos de inserción, se formó una monocapa SCM por deposición de la mezcla de lípidos (Cer24/LA/Cho 33:33:33, ChoS 5% p/p) en la interfase aire/agua hasta alcanzar la presión inicial de lípidos deseada antes de la inyección de los surfactantes (π_0). Con el objetivo de evaluar cómo la inserción de estos compuestos altera las propiedades de la monocapa cuando se incorporan a la membrana SCM, se calcularon los módulos de compresibilidad (C_s^{-1}). Para esto, luego de que la monocapa alcanzara el equilibrio, se la comprimió y expandió varias veces, se calculó la pendiente del gráfico de presión superficial en función de área durante la compresión y, aplicando la Ecuación 4.2, se obtuvo el valor de este parámetro.

2.4 Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC_n sobre monocapas mediante Microscopía de Ángulo de Brewster

Las monocapas de Langmuir pueden ser caracterizadas *in situ*, en la interfase aire/agua, a través de distintas técnicas experimentales tales como la Microscopía de Ángulo de Brewster (del inglés *Brewster Angle Microscope*). Esta microscopía permite la observación de la monocapa sin la necesidad de incorporar sondas que podrían alterar sus características.

El análisis de la organización de fase de los lípidos en la monocapa, así como el comportamiento de la misma debido a la presencia de los surfactantes, se efectuó mediante un ensayo de compresión de las monocapas empleando el equipo KSV-VIMA

Langmuir minitrough (BiolinScientific-Espoo, Finlandia), montado sobre un elipsómetro de imágenes Nanofilm EP3 (Accurion, Alemania) en el modo BAM. La reflexión se fijó a cero al hacer incidir un láser polarizado ($\lambda = 532 \text{ nm}$) sobre la interfase limpia aire/agua (sin monocapa), lo que permitió determinar el ángulo de Brewster experimental ($\approx 53,1^\circ$). Luego de la formación de la monocapa y durante la compresión, la luz reflejada en la interfase se colectó con un objetivo de 20X. Las imágenes fueron adquiridas con una cámara CCD.

El nivel de gris de cada píxel de las imágenes de BAM es proporcional al valor de reflectividad. La reflectividad está a su vez relacionada con el grosor y con el índice de refracción de la monocapa (Vollhardt, 2014). El análisis de las imágenes de BAM se realizó utilizando el software ImageJ.

2.5 Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC_n sobre monocapas por Microscopía de Fuerza Atómica

2.5.1 Transferencia de monocapas de Langmuir a un soporte sólido

Para poder observar las monocapas por AFM es necesario transferirlas a un soporte sólido. A tal fin, la técnica comúnmente utilizada es la de Langmuir-Blodgett. Para esto, se formaron las monocapas de la misma manera que se describió anteriormente, y se las comprimieron hasta alcanzar una presión superficial de 30 mN/m, a una velocidad de 0,85 Å²/molécula·min en una balanza de Langmuir KSV-NIMA (BiolinScientific-Espoo, Finlandia) provista de un *dipper* motorizado.

Las bicapas soportadas se formaron al transferir las monocapas (velocidad del *dipper* 2 mm/min) a un cubreobjeto hidrofílico (de 12 mm de diámetro) previamente lavado con una solución de H₂O₂/H₂SO₄ 1:3 a 80 °C por 30 min. El proceso de transferencia de una monocapa en suspensión a un soporte sólido se realiza a una presión superficial constante y puede ser monitoreado por la *relación de transferencia*. Dicha relación se define como la relación entre la disminución en el área superficial de la monocapa y el área del soporte sólido a dónde se transfirió la monocapa. Una relación de transferencia cercana a 1 señala que el proceso de deposición de la monocapa se ha realizado satisfactoriamente (Eeman & Deleu, 2010). Con el objetivo de mantener una presión superficial constante durante el proceso de transferencia, la monocapa lipídica es comprimida constantemente mientras el *dipper* se levanta, resultando en una disminución en el área de la monocapa.

2.5.2 Observación de las monocapas por AFM

Las medidas de AFM fueron realizadas en aire en modo contacto a temperatura ambiente, utilizando un microscopio Agilent 5500 (Agilent Technology, USA) y puntas triangulares de silicón cubiertas con un *film* de W/Al (constante elástica 0,35 N/m). La topografía fue determinada mediante la deflexión vertical del cantiléver. Se tomaron imágenes de 512 × 512 píxeles de resolución (11 × 11 μm) a una velocidad de escaneo de 1 Hz. Los datos recolectados fueron analizados empleando el software Gwyddion 2.50.

2.6 Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC_n empleando modelos *in silico*

Para entender la interacción de Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂, OA y SA con bicapas que mimeticen al SC, se construyó un modelo a escala atómica simulado mediante Dinámica Molecular (DM). Las simulaciones de DM fueron realizadas con el paquete GROMACS 2018 (Kutzner et al., 2019). Los sistemas fueron parametrizados según el campo de fuerza *all-atom* CHARMM36 (Klauda et al., 2010) y el modelo de agua TIP3P (Jorgensen et al., 1983). Las coordenadas para la membrana SCM fueron diseñadas utilizando el constructor de bicapas CHARMM-GUI (Jo et al., 2008) y el software PACKMOL (Martinez et al., 2009).

La membrana SCM construida contaba con 66 moléculas de cada componente de la mezcla lipídica (Cer24/LA/Cho), constituyendo un total de 198 moléculas lipídicas. Inicialmente, la membrana fue optimizada según un proceso de minimización de energía empleando el método *Steepest Descent* durante 5000 pasos, o hasta alcanzar un gradiente de energía potencial $\Delta E \leq 1000$ kJ/mol. Durante el proceso de minimización de energía, la posición z de uno de los átomos de la región hidrofílica de cada componente de la membrana SCM (Nitrógeno para Cer24 y Oxígeno para LA y Cho) fue restringida aplicando un potencial armónico con una constante de fuerza de 1000 kJ/mol-nm². Posteriormente, las restricciones en las posiciones de los átomos en cada molécula de lípido fueron secuencialmente relajadas hasta cero en un proceso de estabilización de 6 pasos (ver Tabla S4.1 del Anexo). Finalmente, la membrana SCM se estabilizó durante un tiempo de simulación de 100 ns.

A continuación, se crearon ocho sistemas nuevos en donde cuatro de ellos contenían 30 moléculas de Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂, OA o SA, respectivamente, en la solución acuosa de la membrana. En los otros cuatro sistemas restantes, estas moléculas fueron añadidas dentro de la membrana SCM (Tabla S4.2). En todos los sistemas los anfifilos fueron añadidos en una distribución espacial al azar (Figura 4.4), y además se incluyeron contraiones Na⁺ y Cl⁻ para neutralizar la carga de los sistemas. La membrana SCM sin anfifilos fue utilizada como sistema control.

Una vez establecidas las condiciones iniciales para los sistemas de membrana de SCM con los respectivos anfifilos (Tabla S4.2), se minimizó nuevamente la energía empleando el algoritmo *Steepest Descent*, en donde las posiciones atómicas de los anfifilos fueron restringidas a sus posiciones iniciales utilizando un potencial armónico con una constante de fuerza de 1000 kJ/mol·nm² en todas las direcciones cartesianas. Posteriormente, todos los sistemas fueron equilibrados por 1 ns en el ensamble NPT a 303,15 K, aplicando las mismas restricciones de posición. Por último, se removieron estas restricciones y los sistemas fueron simulados durante 500 ns.

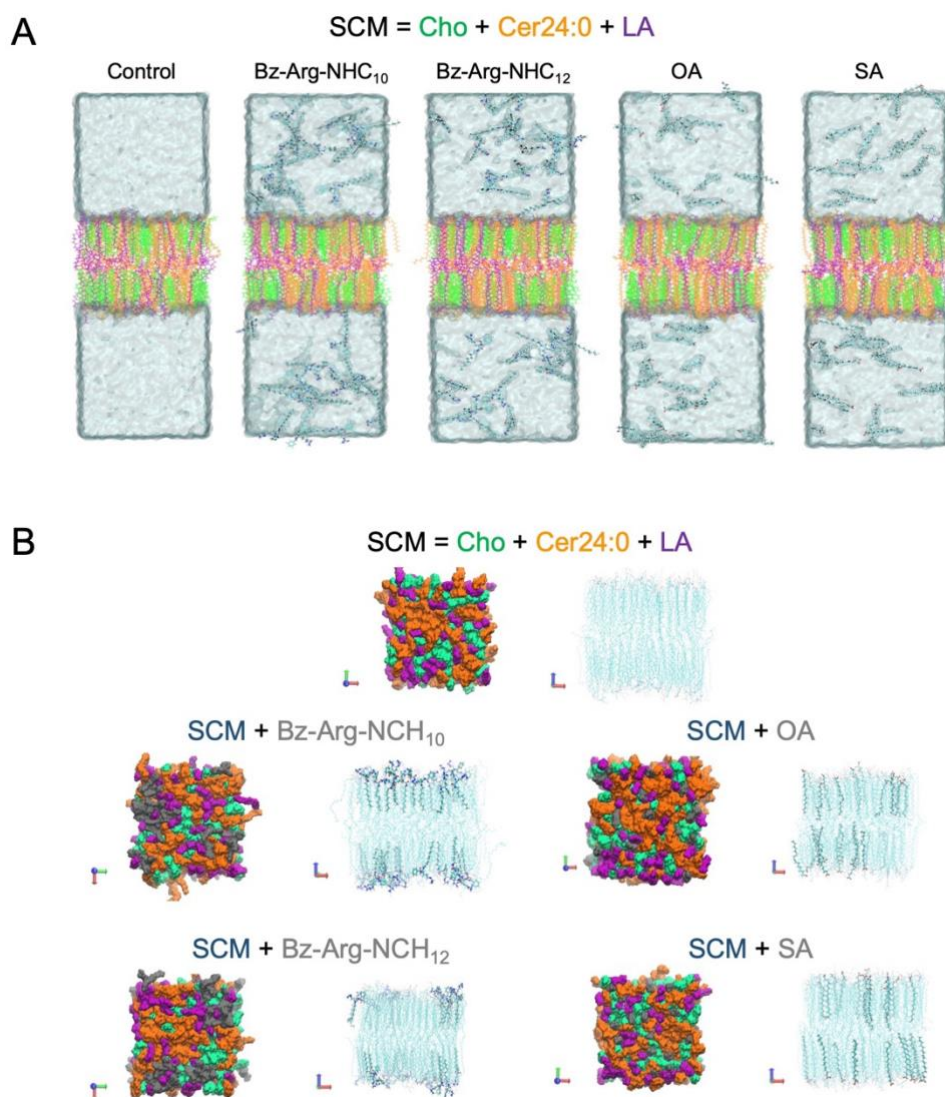


Figura 4.4 Configuración inicial para los sistemas reportados en la Tabla S4.2 para membranas SCM en ausencia (control) y en presencia de Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂, OA o SA: A) insertos en la solución acuosa y B) insertos en la membrana (gris oscuro). La membrana SCM compuesta por moléculas de Cho (verde), Cer24 (naranja) y LA (violeta); y en celeste moléculas de agua TIP3P. En B) las moléculas de agua fueron removidas de la representación para una mejor visualización de la distribución de los anfifilos en la membrana.

2.6.1 Detalles de la simulación

Los sistemas fueron simulados en un baño de acoplamiento de presión semi-isotrópico a 1 bar utilizando un baróstato Parrinello-Rahman (constante de acoplamiento $\tau = 5,0$ ps) (Parrinello & Rahman, 1981), y un termostato Nosé-Hoover (Evans & Holian, 1985) a 303,15 K (constante de acoplamiento $\tau = 1,0$ ps). La compresibilidad se ajustó a $4,5 \times 10^{-5} \text{ bar}^{-1}$, permitiendo que el eje z de la monocapa fluctúe independientemente, en relación a la presión en los planos x-y (Dignon et al., 2017). Durante las simulaciones las longitudes de los enlaces se restringieron empleando el algoritmo de LINCS (Hess et al., 1997). Las interacciones electrostáticas fueron calculadas utilizando el *esquema Particle Mesh Ewald* (PME) (Abraham & Gready, 2011), y se aplicó un radio de corte de 1,2 nm tanto para las interacciones de van der Waals como para las de Coulomb con un esquema de corte de Verlet (Páll & Hess, 2013). Todas las simulaciones fueron realizadas aplicando condiciones de contorno periódicas, y el paso de integración (*integration time step*) de DM fue de 2 fs. Las simulaciones fueron llevadas a cabo en un servidor Linux con un procesador Intel Core i7-6700 3.40 GHz eight Core, y una unidad de procesamiento gráfico NVIDIA GeForce GTX 1080.

La compresibilidad de la membrana se define como el cambio relativo de la tensión superficial de la membrana con respecto a su área, y puede ser calculada a partir de la DM empleando la siguiente ecuación (Loschwitz et al., 2020):

$$C_s^{-1} = A \left(\frac{\partial \gamma}{\partial A} \right)_T = \frac{A k_B T}{\sigma_A^2} = \frac{A_L k_B T}{N_l \sigma_A^2} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

donde γ es la tensión superficial, A es el promedio del área total de la membrana, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura, A_L es el área por lípido, N_l es el número de moléculas lipídicas, y σ_A^2 es la fluctuación cuadrática media de la de A_L .

3 Resultados y Discusión

Se han propuesto dos grandes teorías sobre cómo los potenciadores de penetración (PP) pueden influenciar la disposición intercelular de los lípidos del estrato córneo (SC). Se cree que los PP hidrofílicos pequeños interactúan con los grupos de la cabeza polar de los lípidos del SC, desorganizando la región compacta intermembrana entre los grupos de las cabezas adyacentes. Por otro lado, se supone que la actividad de los PP lipofílicos se basa en el desorden y fluidificación de las cadenas lipídicas, causando eventualmente una separación de fases en los lípidos. Debido a las características fisicoquímicas que presentan los surfactantes, estos podrían ocasionar ambos efectos.

Como se describió anteriormente, las membranas que mimetizan al estrato córneo (SCM) muestran isothermas de compresión tipo sólido con bajas propiedades de difusión y compresibilidad, compatibles con una fase compacta líquida-condensada (Lc). La incorporación a la membrana de diferentes anfifilos con actividad de potenciador de penetración, como OA o surfactantes no iónicos, ha reportado disminuir el valor del módulo de compresibilidad (C_s^{-1}) en este tipo de monocapas (Zulueta Díaz et al., 2016; Zulueta Díaz & Fanani, 2017). Este parámetro refleja las propiedades reológicas de la monocapa y es proporcional a la pendiente de las isothermas de compresión. Un incremento en la elasticidad de la membrana lipídica (es decir, menor valor de C_s^{-1}) se correlaciona con una mayor capacidad de los anfifilos de incorporarse en las membranas lipídicas.

Dado a que los ensayos realizados en esta sección tienen como objetivo analizar el comportamiento de Bz-Arg-NHC_n como agentes potenciadores de penetración de la piel, se empleó en todos los casos buffer de pH ácido para emular las condiciones de la piel.

3.1 Caracterización de las monocapas lipídicas mediante isotermas de compresión

Con el objetivo de evaluar el efecto inducido por Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂, se estudió el comportamiento elástico de monocapas compuestas por una mezcla lipídica que mimetiza el estrato córneo (SCM) mediante el empleo de una balanza de Langmuir. A su vez, estos resultados fueron comparados con aquellos obtenidos con un potenciador de penetración utilizado comúnmente (ácido oleico, OA), y con un ácido graso que ha demostrado no tener actividad como PP, sino que favorece la función de barrera de la piel (ácido esteárico, SA) (Ananthapadmanabhan et al., 2013; Pham et al., 2016).

En la Figura 4.5 se pueden observar las isotermas de compresión para monocapas en ausencia de anfifilos (en la gráfica, SCM) y en presencia de A) 15 mol% o B) 35 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂, OA o SA. El área molecular media (MMA) fue considerada como el área total de la monocapa dividida por el número total de moléculas sembradas en la superficie. Para cada caso se calculó el módulo de compresibilidad empleando la Ecuación 4.2, y se compararon los valores de Cs⁻¹ obtenidos a 30 mN/m, ya que esta presión es cercana a la presión de las membranas

celulares. Estos resultados se muestran en la Figura 4.5 C y D para un 15 o un 35 mol% de compuesto, respectivamente. Las letras mayúsculas señalan las discrepancias estadísticas entre las distintas condiciones de acuerdo con el *test* de Tuckey ($p < 0,05$).

Como se puede observar en las isotermas de compresión para las muestras que contenían los surfactantes derivados de arginina, una reducción en el área disponible produjo un menor incremento en la presión superficial (π) en comparación a la curva control (SCM) y, consecuentemente, un menor valor en el módulo de compresibilidad. Se registró una reducción en este valor de aproximadamente hasta un 30 y 20% del valor original para la adición de 15 y 35 mol% de surfactante, respectivamente (Figura 4.5 C y D). Esto quiere decir que la incorporación de los surfactantes dio como resultado monocapas más compresibles. Consecuentemente, se registró un comportamiento dosis-dependiente: a mayor concentración de surfactante, mayor intensidad del efecto observado. Asimismo, se encontró que tanto Bz-Arg-NHC₁₀ como Bz-Arg-NHC₁₂ son modificadores más fuertes de las propiedades reológicas de la monocapa SCM que el clásico potenciador de penetración OA, y muchísimo mayor que el SA. Este comportamiento se correlaciona con hallazgos previos para otros PP como Span 20 y miristato de isopropilo, así como también para los ésteres de alquilo del ácido L-ascórbico propuestos recientemente como PP (Zulueta Díaz et al., 2020). Estos resultados correlacionan un comportamiento físico para estos surfactantes derivados de arginina con la función farmacológica de mejorar la permeabilidad de la piel. Asimismo, como se puede observar en la Figura 4.5 A y B, en las monocapas que contenían a los surfactantes se evidenció un quiebre en las isotermas a presiones de ~ 40 mN/m, el cual fue más evidente al aumentar la proporción de surfactante. Este

comportamiento sugeriría una expulsión de dichos anfifilos de la compacta monocapa SCM a altas π . Un comportamiento similar fue encontrado para las monocapas conteniendo un 35 mol% de OA.

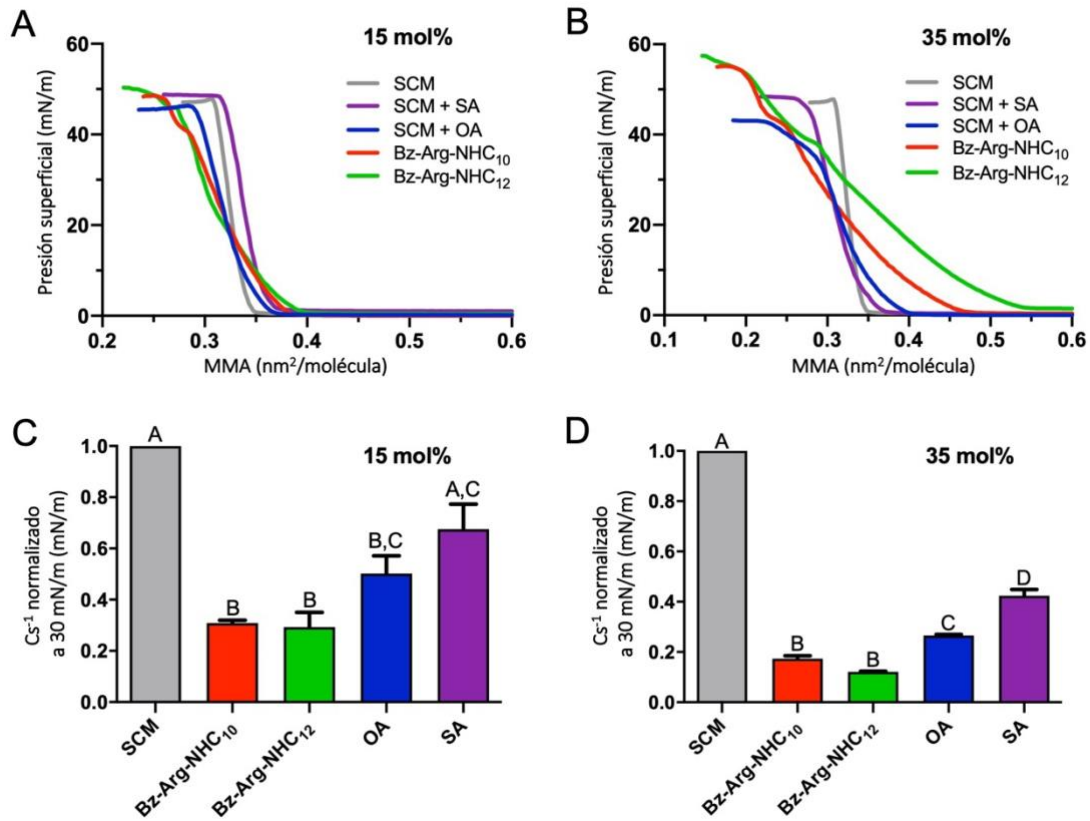


Figura 4.5 Efecto de los anfifilos sobre las propiedades elásticas de monocapas modelo del estrato córneo. A) y B) Presión superficial en función del área molecular media (MMA) en la presencia de A) 15 y B) 35 mol% de OA (línea azul), SA (línea violeta), Bz-Arg-NHC₁₀ (línea roja) o Bz-Arg-NHC₁₂ (línea verde). En gris se representa el comportamiento de monocapas SCM en ausencia de anfifilos. Las curvas son representativas de triplicados, las cuales no difieren más de 0,1 nm²/molécula. C) y D) Módulo de compresibilidad (Cs^{-1}) normalizado en ausencia o presencia de C) 15 y D) 35 mol% de los anfifilos. Los datos son promedios de tres medidas independientes; las barras señalan la SD. Las distintas letras indican las discrepancias estadísticas entre las diferentes condiciones de acuerdo con el *test* de Tuckey ($p < 0,05$).

3.2 Adsorción de Bz-Arg-NHC_n en interfase aire/agua e inserción en monocapas lipídicas

Cuando se inyectan moléculas anfifílicas a una concentración mayor a su CMC en la subfase de una solución acuosa, parte de las moléculas se autoorganizan formando agregados y parte son adsorbidas rápidamente en la interfase limpia aire/agua formando monocapas de Gibbs. En una balanza de Langmuir esto es evidenciado por una disminución en la tensión superficial, es decir, un incremento en π .

Se estudió la adsorción de Bz-Arg-NHC_n, OA y SA a la interfase aire/buffer empleando buffer citrato 10 mM pH 4,5 y una concentración de compuestos superior a la CMC de los surfactantes. Luego de la inyección de cada tensioactivo en la subfase acuosa, la adsorción de los compuestos en la interfase produjo un rápido incremento en la presión superficial (Figura 4.6 A) alcanzando una presión de equilibrio distinta para cada compuesto representada como $\Delta\pi$ en la Figura 4.6 B.

Como se puede observar, ambos surfactantes fueron capaces de aumentar π hasta valores de ~ 40 mN/m (disminución en la tensión superficial hasta ~ 33 mN/m). Este efecto fue mayor que el registrado para el clásico potenciador de penetración OA (~ 8 mN/m mayor). Por el contrario, el SA mostró una actividad superficial más baja alcanzando valores de π menores a 20 mN/m.

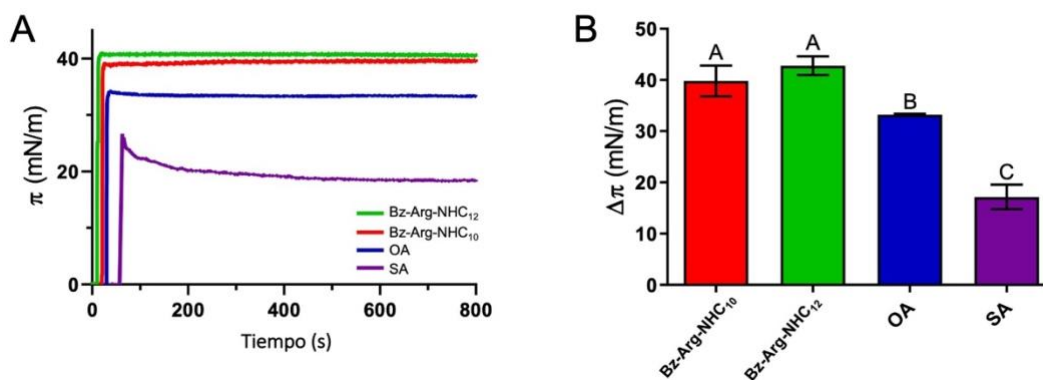


Figura 4.6 Adsorción sobre interfase aire/agua: A) Presión superficial (π) en función del tiempo y B) $\Delta\pi$ para 100 μM de Bz-Arg-NHC₁₀ (rojo), Bz-Arg-NHC₁₂ (verde), OA (azul) y SA (violeta). Los datos son promedios de tres medidas independientes, las barras muestran la SD. Las diferentes letras mayúsculas indican las diferencias estadísticas significativas según el *test* de Tukey ($p < 0,05$). Las medidas fueron realizadas a 24 ± 1 °C.

Posteriormente se estudió la interacción de Bz-Arg-NHC_n en monocapas de SCM preformadas, para lo cual se realizaron ensayos de inserción empleando varias presiones superficiales iniciales (π_0). Estos ensayos se realizaron de la misma manera que los de adsorción, sólo que esta vez en presencia de una monocapa lipídica previamente formada a la inyección de surfactante en la subfase.

El incremento en π que se observa luego de la adición de un anfifilo en la subfase depende no solo de la capacidad de la monocapa para incorporar a dicho anfifilo, sino también de la respuesta de la misma frente a un estrés de dilatación. La compresión lateral de los componentes lipídicos, un proceso mecánico relacionado con su elasticidad, es un requisito para que pueda darse un espacio vacante que permita la penetración de un nuevo anfifilo en la membrana (Zulueta Díaz et al., 2016). Por lo tanto,

la inserción de una molécula y el incremento en π que este proceso induce en la membrana típicamente decrece con un incremento en la presión superficial inicial.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.7. En la parte A de la misma se encuentra graficada la variación en la presión superficial ($\Delta\pi$) en función de las distintas presiones iniciales de lípido ensayadas (π_0). Como puede observarse en el gráfico, ambos surfactantes fueron capaces de incorporarse en monocapas de hasta ~ 39 mN/m (máxima π_0 ensayada). Notablemente, los valores de $\Delta\pi$ alcanzados luego de la inserción de Bz-Arg-NHC_n fueron mayores a aquellos obtenidos con OA o SA, lo que se correspondería con una mayor inserción de los surfactantes.

El valor máximo de π al cual cada anfifilo sería capaz de penetrar una monocapa se denomina presión superficial crítica (π_c). Dicho valor se obtiene de la extrapolación de $\Delta\pi = 0$, y tradicionalmente ha sido considerado como una medida indirecta de la afinidad de los anfifilos por la monocapa lipídica (Maget-Dana, 1999). Nuestros resultados (Figura 4.7 B), indican que ambos compuestos podrían penetrar en monocapas que presenten una presión superficial bastante alta, 43 y 45 mN/m para Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ respectivamente. Estos datos se correlacionan con la expulsión de dichos anfifilos a altas presiones de las monocapas lipídicas pre-formadas observada en la Figura 4.5 B. Por el contrario, con OA se obtuvieron los valores más bajos de π_c mientras que SA mostró un comportamiento intermedio. Vale la pena señalar que estos valores son mucho mayores que los valores promedios asignados a las membranas biológicas, similares a las de una monocapa de 30 - 35 mN/m, lo que indicaría que tanto

Bz-Arg-NHC₁₀ como Bz-Arg-NHC₁₂ serían capaces de interactuar con las membranas biológicas (Marsh, 1996).

Con el fin de evaluar cómo la inserción de estos compuestos puede alterar las propiedades reológicas de la monocapa SCM, se compararon los módulos de compresibilidad (C_s^{-1}) en cada uno de los casos. A diferencia de los ensayos realizados en la Sección 3.1, en este caso, la cantidad de surfactante presente en la interfase depende de la capacidad del anfifilo para penetrar en la membrana e integrarse en ella. Por lo tanto, el efecto encontrado variará en función del grado de inserción y de la capacidad del anfifilo para modificar las propiedades de la membrana.

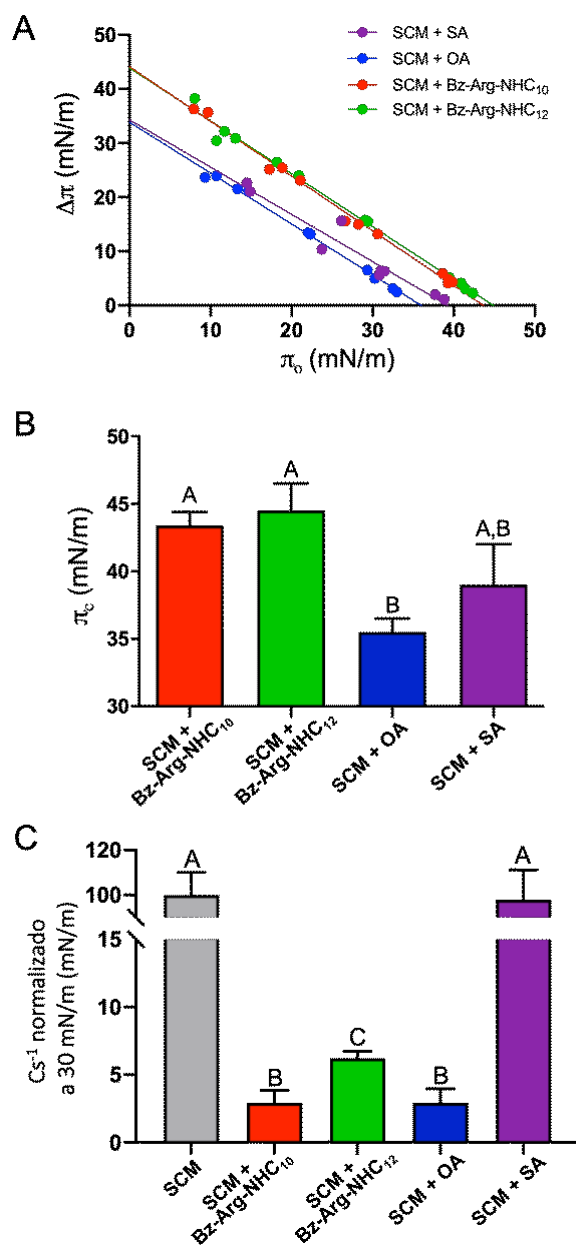


Figura 4.7 Inserción de anfifilos en monocapas SCM: A) variación en la presión superficial ($\Delta\pi$) en función de la presión superficial inicial (π_0) luego de la interacción con Bz-Arg-NHC₁₀ (rojo), Bz-Arg-NHC₁₂ (verde), OA (azul) o SA (violeta). B) valores de presión superficial crítica (π_c) obtenidos a partir de la regresión lineal de las curvas mostradas en A) para cada compuesto. C) Módulo de compresibilidad (C_s^{-1}) normalizado luego de la inserción de los anfifilos ($\pi_0 = 30$ mN/m). Los datos son promedios de tres medidas independientes, las barras muestran la SD. Las diferentes letras indican las diferencias estadísticas entre las distintas condiciones según el test de Tukey ($p < 0,05$). Las medidas fueron realizadas a 24 ± 1 °C.

Para obtener los valores de Cs^{-1} luego de que la monocapa en presencia de los surfactantes alcanzara el equilibrio, se la comprimió y expandió varias veces. El módulo de compresibilidad se calculó de la pendiente de la curva π vs área durante cada compresión, empleando la Ecuación 4.2. El gráfico de la Figura 4.7 C muestra los valores de Cs^{-1} normalizados para una presión inicial de 30 mN/m. En este gráfico se puede apreciar cómo la inserción de los surfactantes, Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂, reduce el valor de Cs^{-1} obteniéndose valores de hasta un 3 y 6%, respectivamente, respecto del valor original (ausencia de anfifilos, SCM). Un resultado similar fue encontrado en las monocapas tratadas con OA, donde se observó una reducción del Cs^{-1} hasta un 3% del valor inicial. Sin embargo, el efecto fue completamente diferente cuando se insertó SA, que produjo una reducción del 2%, es decir que el Cs^{-1} en este caso es un 98% del valor de Cs^{-1} original. Esto indica que, a pesar de que SA puede penetrar en las monocapas de SCM, no tiene la capacidad de alterar la elasticidad de la membrana como sí lo haría un potenciador de penetración.

Estos resultados reflejan el hecho de que la capacidad para incrementar la elasticidad de las monocapas es un indicador característico de un potenciador de permeabilidad de la piel.

3.3 Observación de la estructura lateral de monocapas SCM por BAM

Con el objetivo de visualizar la organización interfacial de los componentes lipídicos de la monocapa y/o los cambios en el comportamiento como consecuencia de la inserción de los compuestos de interés en ella, se combinó la técnica de la balanza de Langmuir con la de BAM. Esta metodología tiene la ventaja de no requerir el uso de sondas fluorescentes, las que podrían dar lugar a inestabilidades de los dominios en monocapas altamente comprimidas (McConlogue & Vanderlick, 1997).

Como los resultados encontrados previamente indicaron que el efecto inducido por los surfactantes fue mayor a mayores concentraciones, se esperaba observar el mismo comportamiento dependiente de la dosis en la estructura lateral de las monocapas. Por lo tanto, se eligió continuar los ensayos utilizando la mayor proporción de compuestos empleada en los ensayos anteriores (35 mol%), asumiendo que a una concentración menor el efecto inducido sería similar pero en menor grado.

Mediante el uso de BAM se ha evidenciado que algunos potenciadores de permeación de la piel, como ésteres de sacarosa, OA y ésteres de alquilo del ácido L-ascórbico, alteran el comportamiento de fase de monocapas SCM (Garofalakis et al., 2000; Mao et al., 2013; Oliveira et al., 2017; Zulueta Díaz et al., 2016). Esta metodología permite evaluar la microestructura de las monocapas. Debido a que el nivel de gris en las imágenes de BAM depende tanto del índice de refracción como del grosor de la monocapa, las fases líquido expandido (Le) aparecen como regiones más oscuras en comparación con las fases líquido condensado (Lc), que muestran una naturaleza de mayor grosor y/o más compacta (Vollhardt, 2014).

En la Figura 4.8 se muestran las imágenes de BAM resultantes del estudio de las monocapas control A) SCM y en presencia de un 35 mol% de B) Bz-Arg-NHC₁₀, C) Bz-Arg-NHC₁₂, D) OA y E) SA. Sobre cada imagen se encuentra indicada la presión superficial (mN/m) a la cual fue tomada. En la monocapa sin agregado de anfifilos se encontró que hubo coexistencia de fase líquido expandido-líquido condensada (Le-Lc) hasta una presión aproximada de 5 mN/m. Por encima de esa presión superficial, y hasta 30 mN/m, la monocapa muestra una apariencia homogénea. Esto se puede observar por la constante y pequeña desviación estándar en el nivel de gris de las imágenes (panel derecho de la Figura 4.8 A), el cual corresponde a la fase Lc. A presiones superiores a 30 mN/m se puede apreciar la aparición de puntos brillantes aislados, lo cual denota estructuras 3D que protruyen de la superficie de la monocapa, liberando el estrés producido por el alto grado de compactación molecular.

Con la incorporación de un 35 mol% de Bz-Arg-NHC_n a la monocapa lipídica, se observa que a bajas π se estabiliza la separación de fase líquido-líquido, evidenciado por la presencia de dominios redondeados (Figura 4.8 B y C) los cuales persisten hasta presiones de 9 y 11 mN/m para Bz-Arg-NHC₁₂ y Bz-Arg-NHC₁₀, respectivamente. Estos resultados podrían reflejar una inmiscibilidad de los surfactantes con los componentes de la membrana más largos y, por lo tanto, más hidrofóbicos, como la ceramida, la cual contiene una cadena acilo saturada de 24 átomos de carbono de largo.

Notablemente, estos resultados no se encontraron en las monocapas que contenían OA, en donde se muestra una superficie uniforme a bajas π (Figura 4.8 D). Por el contrario, a bajas π la presencia de SA induce un cambio en la apariencia de la

monocapa lipídica, mostrando una fase condensada con bordes irregulares (Figura 4.8 E). Esto se asemeja a la coexistencia de fases sólido-gas observadas para monocapas de diesteoril fosfatidilcolina (DSPC) pura (Zulueta Díaz et al., 2016). Este comportamiento es consistente con los altos valores de Cs^{-1} encontrados anteriormente (Sección 3.1.).

A presiones superficiales altas, la presencia de los anfifilos induce la aparición de una fase con alta reflectividad que aparece en los bordes de los dominios, en el caso de Bz-Arg-NHC₁₀ (Figura 4.8 B), o como puntos distribuidos uniformemente (Figura 4.8 C-E), siendo más pronunciado este efecto en la muestra que contiene SA. Esta falta de homogeneidad también se puede evidenciar en el análisis de la desviación estándar en el nivel de gris de las imágenes tomadas (gráficos en el panel derecho en la Figura 4.8). Esta observación sugiere una desestabilización de la organización en el plano de la monocapa y la formación de estructuras 3D las cuales, si se extrapola al entorno de la piel, podría alterar localmente la estructura laminar del estrato córneo.

Para una presión superficial de 30 mN/m, en las imágenes de BAM se puede apreciar una alta reflectividad, nivel de gris, lo cual indicaría que no hay presencia de la fase Le en ninguna de las condiciones ensayadas. Sin embargo, la fase condensada observada muestra irregularidades en la textura, diferente a lo que se encuentra en las monocapas de SCM solo. Esto podría reflejar la coexistencia de fase condensada/sólida a una escala menor al límite de resolución de equipo (0,22 μm /píxel).

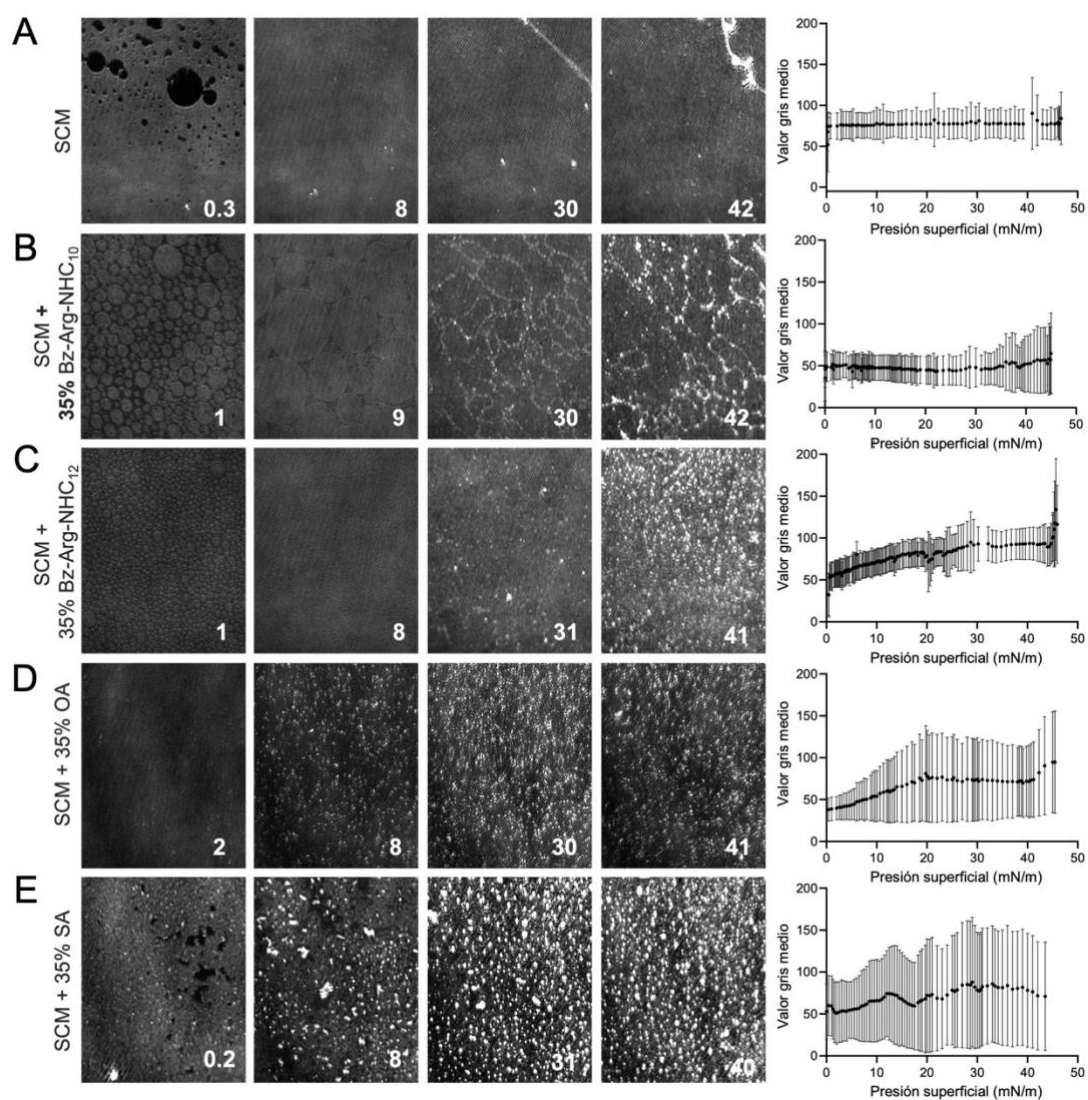


Figura 4.8 Imágenes de BAM de monocapas de SCM en A) ausencia (control, SCM) o presencia de 35 mol%, de: A) Bz-Arg-NHC₁₀, B) Bz-Arg-NHC₁₂, C) de OA o D) SA. Los números en las imágenes indican la presión superficial a la que fueron tomadas. Tamaño de imagen 250 × 190 m. Los gráficos de la derecha muestran el valor medio de gris y su SD en función de π para cada condición experimental. Las curvas son representativas de ensayos realizados por triplicado. Las medidas fueron realizadas a 24 ± 1 °C.

3.4 Estudio del efecto de Bz-Arg-NHC_n sobre monocapas por AFM

La separación de fase y formación de dominios es un hecho relevante para la interpretación del mecanismo de acción de los potenciadores de penetración. Se ha propuesto que la formación de una fase con mayor fluidez y capacidad de incorporar a una droga es esencial para que se generen canales entre las capas del SC, en los cuales la difusión-partición-solubilidad del compuesto de interés puede ser más eficiente (Bouwstra et al., 2003; Lane, 2013; Zulueta Díaz et al., 2020).

La técnica de BAM ofrece una resolución lateral en el rango de los micrómetros, lo cual no la hace el tipo de microscopía adecuado para visualizar con alta resolución las propiedades de las fases de una monocapa. Para este propósito, AFM es una excelente alternativa ya que permite la visualización de los dominios lipídicos con una resolución en la escala nanométrica. Sin embargo, para poder utilizar esta metodología es necesario transferir la monocapa lipídica a un soporte sólido. Teniendo esto en cuenta, se formaron las monocapas en la balanza de Langmuir, de la misma forma que en los ensayos previos, se comprimieron hasta una presión de 30 mN/m, y se transfirieron a un soporte sólido de vidrio utilizando la técnica de Langmuir-Blodgett, tal como se describió en la sección Materiales y Métodos.

Mediante ensayos de rayos X y AFM se han reportado y confirmado, respectivamente, la coexistencia de dos fases lamelares en el SC (Bouwstra et al., 1998; Školová et al., 2013; Sparr et al., 2001; ten Grotenhuis et al., 1996). En monocapas SCM transferidas a un soporte sólido, se ha reportado la coexistencia de una fase más alta, L_c, enriquecida en ceramidas y conteniendo ácidos grasos insaturados de cadena larga;

y una fase más delgada enriquecida en colesterol (Eeman et al., 2009). En la Figura 4.9 podemos observar las imágenes AFM resultantes para las monocapas SCM: A) control, monocapa sin tratar, o B-E) con el agregado de un 35 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂, OA o SA, respectivamente. En todas las imágenes se puede ver una fase más alta, la cual aparece de un color más brillante, y otra más baja, de color más oscuro.

Si se observa la monocapa control (SCM, Figura 4.9 A), se ve que la fase de menor grosor es la fase continua, mientras que la fase más alta se organiza en estructuras largas y delgadas con forma tipo gusano o cinta, ocupando aproximadamente un 32% de la superficie total (Figura 4.9 F). La incorporación de un 35 mol% de los anfifilos altera la forma de los dominios, obteniéndose en estos casos estructuras de bordes redondeados (Figura 4.9 B-E). La aparición de dominios de tamaño finito distribuidos regularmente en la membrana es el resultado de la competencia entre la tensión lineal y fuerzas repulsivas de largo alcance (Fanani & Wilke, 2018). Las membranas enriquecidas en ceramidas presentan altas repulsiones intradominio debido al alto momento dipolar de las ceramidas, en particular aquellas con una cadena larga de *N*-acilo (Dupuy et al., 2011). Esta propiedad favorece la formación de los dominios alargados por sobre los redondeados. La presencia de un nuevo componente dentro de esta fase puede disminuir la repulsión intradominio al compensar los dipolos moleculares, favoreciendo de esta manera a los dominios redondeados (Fanani & Wilke, 2018).

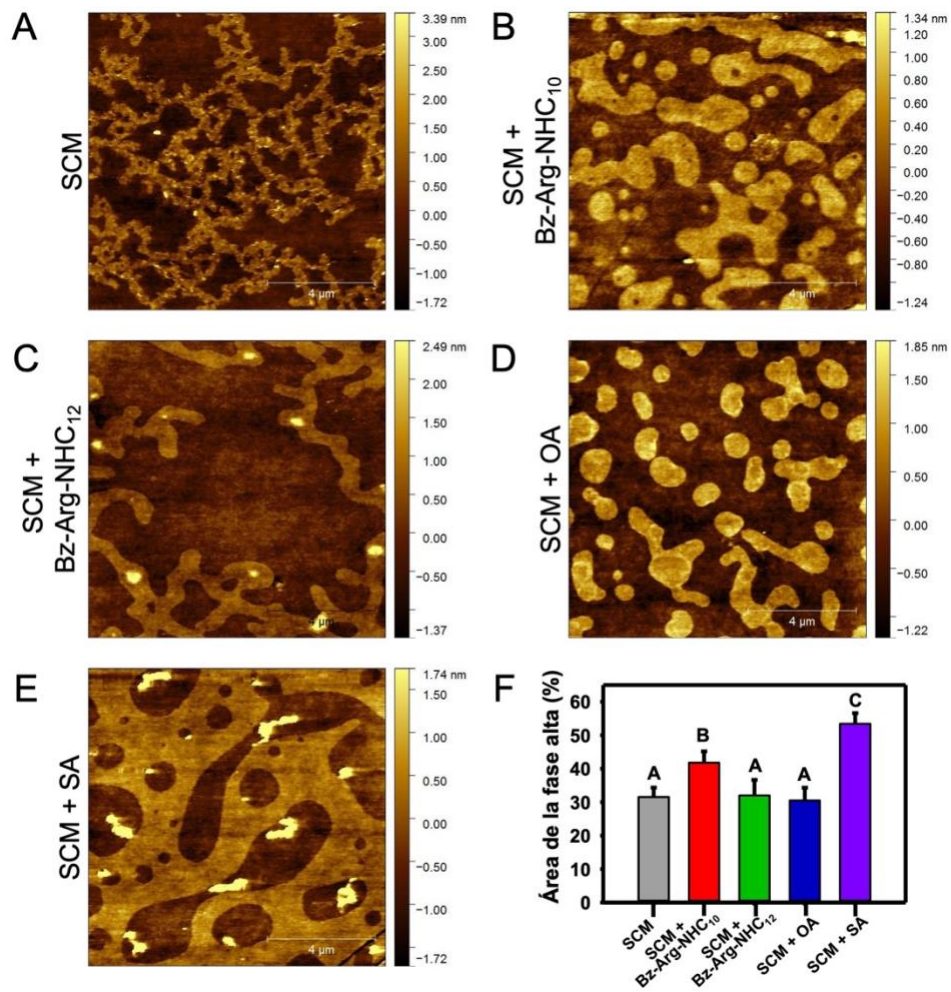


Figura 4.9 Imágenes de AFM de monocapas de SCM transferidas a un soporte sólido en A) ausencia (control, SCM) o en presencia de 35 mol% de: B) Bz-Arg-NHC₁₀, C) Bz-Arg-NHC₁₂, D) OA o E) SA. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes. Tamaño de imagen 11 × 11 μm. F) Análisis del efecto de la incorporación de los surfactantes y ácidos grasos en la distribución del área de la fase más alta. Las letras indican las discrepancias estadísticas entre las distintas condiciones según el test de Tukey ($p < 0,05$).

Con el objetivo de resaltar las diferencias entre las fases observadas en las imágenes de AFM se calculó el porcentaje de área ocupada por cada una de ellas. La Figura 4.9 F muestra el porcentaje de área cubierto por la fase más alta para cada condición estudiada. La presencia tanto de Bz-Arg-NHC₁₂ como de OA no alteró el equilibrio de fases, manteniéndose un valor similar en el porcentaje de cobertura del área de la fase alta. Por el contrario, con la adición de Bz-Arg-NHC₁₀ o SA se incrementó el porcentaje de área ocupado por la fase alta, a un 42 y 59%, respectivamente (Figura 4.9 F). Vale la pena notar que solo en presencia de SA la fase más alta es la que presenta continuidad, formándose dominios aislados de la fase más delgada (Figura 4.9 E). Este comportamiento es consistente con reportes previos, en donde el porcentaje de área ocupado por la fase de mayor altura de las monocapas SCM en presencia de SA experimentó un aumento significativo (Zulueta Díaz et al., 2020).

Cuando se añade un nuevo componente a una membrana lipídica, como los compuestos que se estudiaron en este capítulo, es posible que estos presenten una capacidad de partición desigual en las diferentes fases de una membrana heterogénea (Fanani & Wilke, 2018). El aumento en el porcentaje de área de la fase más alta de las membranas SCM a expensas de la fase más baja, luego de la adición de SA, indicaría una partición preferencial de este compuesto en la fase más alta enriquecida en ceramida y una exclusión de la fase más fluida, rica en colesterol. Este resultado está en concordancia con reportes previos, en donde se encontró que SA se incorporaba en estructuras más rígidas y ordenadas cuando el modelo de membrana presentaba ceramidas (Engelbrecht et al., 2012). Teniendo en cuenta que el mecanismo de difusión-partición propuesto para para los potenciadores de penetración ha sido relacionado con

la fase enriquecida en colesterol (Zulueta Díaz et al., 2020), la poca capacidad potenciadora del SA, el cual en realidad promueve preservación de la barrera cutánea (Ananthapadmanabhan et al., 2013), puede ser una consecuencia de la disminución en el porcentaje de esta fase “activa”.

3.5 Análisis de la interacción de Bz-Arg-NHC_n con membranas SCM mediante ensayos *in silico*

3.5.1 Cálculo de la distribución de densidad normalizada

Con el objetivo de profundizar el estudio del efecto de los surfactantes derivados de arginina sobre membranas SCM y su comportamiento como PP, se desarrollaron simulaciones de Dinámica Molecular (DM) de los mismos (Figura 4.4; Tabla S4.2 del Anexo). Al igual que en los ensayos anteriores, se utilizaron OA y SA como controles.

En primer lugar, se calculó la distribución de densidades normalizada para las configuraciones (*setups*) de simulación donde los anfifilos estaban inicialmente en la fase acuosa (Figura S4.1). Estos *setups* simulaban las condiciones experimentales de los ensayos de la Sección 3.2. Se pudo observar que ambos surfactantes interactuaban superficialmente con la membrana, y luego se insertaban en ella (Figura S4.1 A y B, Videos S4.1 A y B). Por el contrario, las moléculas de OA y SA no interactuaron con la membrana en el tiempo que duró la simulación (500 ns), y formaron agregados (Figura S4.1 C, Videos S4.1 C y D). Posteriormente se extendieron los tiempos de simulación hasta 500 ns más, y se observó un incremento en la inserción de Bz-Arg-NHC_n en la membrana (Figura 4.10).

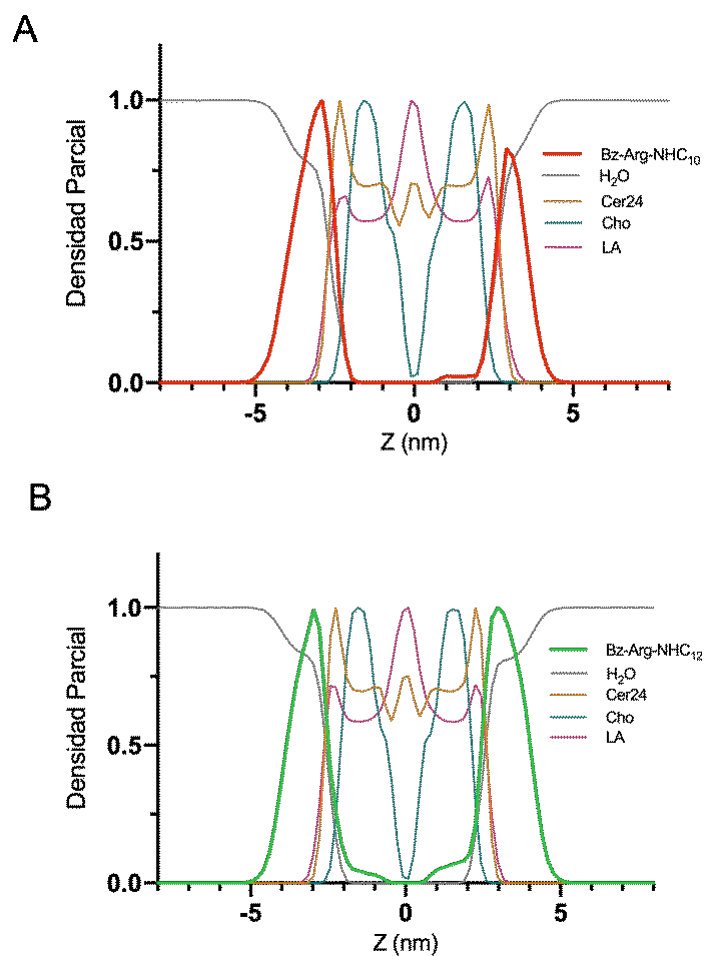


Figura 4.10 Distribución de densidades para los sistemas con A) Bz-Arg-NHC₁₀ y B) Bz-Arg-NHC₁₂, inicialmente insertados en solución acuosa de la membrana SCM, durante los últimos 500 ns de la simulación DM. Las líneas grises representan las moléculas de H₂O. Los componentes de la membrana SCM son los siguientes: Cer24 (línea naranja), LA (línea rosada) y Cho (línea turquesa). Los surfactantes Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Agr-NHC₁₂ se encuentran representados con líneas gruesas rojas y verdes, respectivamente. Los cálculos fueron realizados teniendo en cuenta el centro de la bicapa como punto de referencia y la posición relativa del centro del sistema $Z = 0$ nm.

Como la interacción entre los anfifilos y la membrana SCM aparentaba ocurrir en un período de tiempo mayor al de las simulaciones realizadas, se procedió a simular sistemas en donde los compuestos ya estuvieran insertados en la membrana y así poder evaluar su comportamiento. Estos *setups* simulaban las condiciones ensayadas en la Sección 2.2. En la Figura 4.11 se muestra la distribución de densidades para estos sistemas, los cuales también fueron simulados durante 500 ns. El comportamiento de estos sistemas puede ser visualizado en los Video S4.2 A-D del Anexo. Como puede observarse, en este caso las moléculas de Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ también se localizan en la proximidad de la interfase con el agua, mientras que OA y SA se insertan con más profundidad en la membrana. Esto genera, en aquellos casos en donde los surfactantes están presentes, una reducción en el grosor de los componentes de la membrana. En la Tabla 4.1 se muestran los resultados de los cálculos de la distancia entre los máximos de densidad para los componentes de la membrana en las simulaciones control (SCM) o en presencia de los anfifilos (Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂, OA y SA). La primera columna (Membrana) muestra los valores para los componentes de la membrana SCM sin considerar a los anfifilos, mientras que la segunda columna (Membrana + anfifilo) muestra los valores totales de la medida del grosor de la membrana considerando a todos los componentes. Los resultados mostrados en esta tabla indican que la distancia entre los valores máximos de densidad de la membrana no sufre variaciones en los sistemas en presencia de SA, mientras que para el resto de los casos sí se observa una reducción. Si se compara el espesor total de la membrana y el espesor de cada componente de la misma, también se podría concluir que Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ se posicionan preferentemente en la superficie de la

membrana, mientras que OA lo hace en el interior de la membrana SCM. Adicionalmente, se puede observar en la Figura S4.2, que ambos surfactantes derivados de arginina inducen una densidad normalizada de los componentes SCM mayor en el centro de la membrana, específicamente para Chol y Cer24 (Figura S4.2 B y C, respectivamente).

Tabla 4.1 Distancia entre los valores máximos de densidad para los componentes de la membrana en las simulaciones con los anfifilos insertos en ella. La primera columna (Membrana) muestra los valores para los componentes de la membrana SCM. La segunda columna (Membrana + anfifilo) muestra los valores totales de la medida del grosor de la membrana para todos los componentes.

| Simulación | Distancia entre máximos de densidad (nm) | |
|--------------------------|--|------------------------|
| | Membrana sin anfifilos | Membrana con anfifilos |
| SCM | 3,3 | - |
| Bz-Arg-NHC ₁₀ | 2,9 | 3,1 |
| Bz-Arg-NHC ₁₂ | 2,8 | 3,0 |
| OA | 3,0 | 2,9 |
| SA | 3,3 | 3,3 |

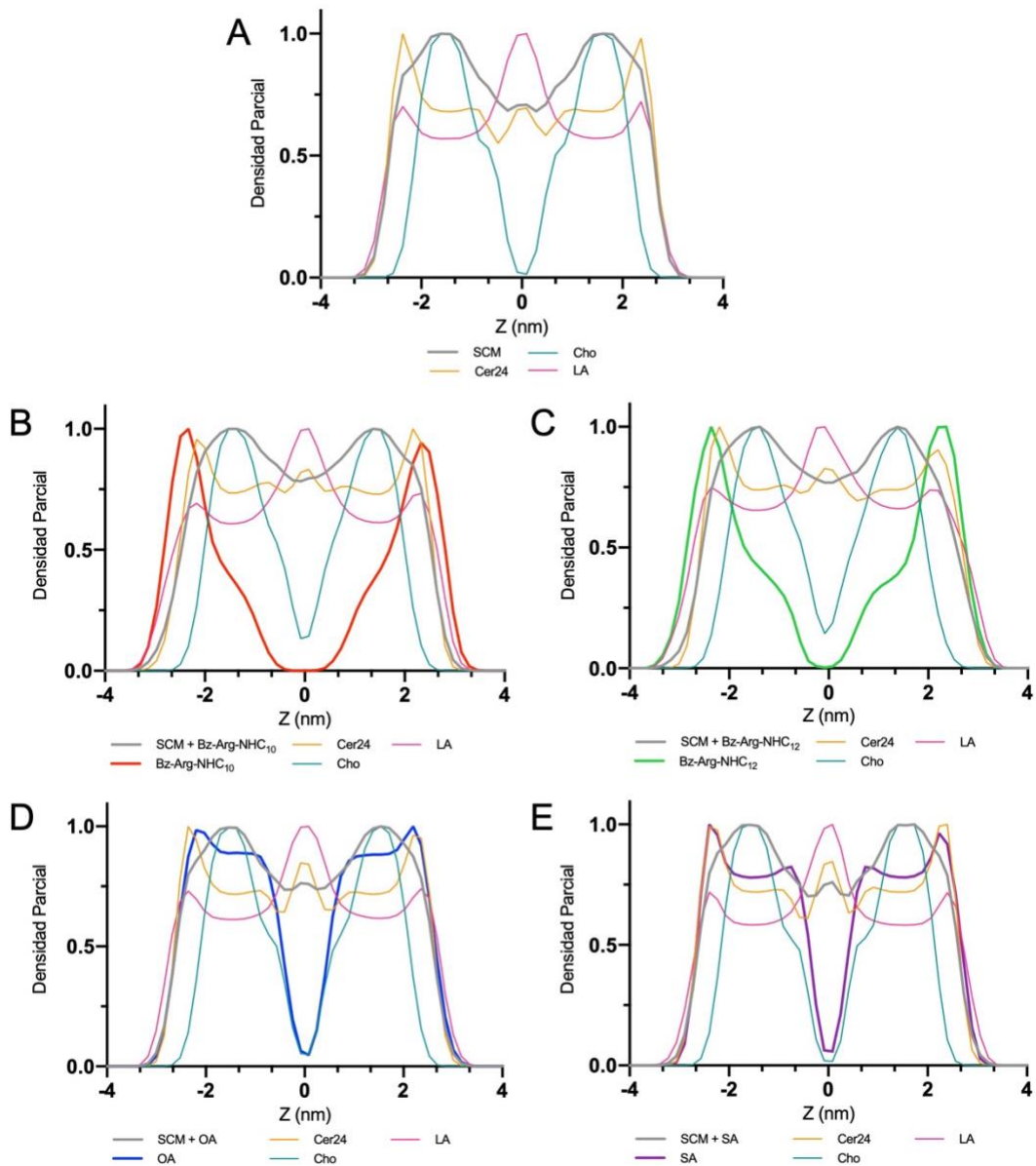


Figura 4.11 Distribución de densidades para los sistemas con los anfífilos insertos en la membrana SCM. La línea gruesa gris corresponde a la membrana: A) control o con B) Bz-Arg-NHC₁₀ (SCM + Bz-Arg-NHC₁₀), C) Bz-Arg-NHC₁₂ (SCM + Bz-Arg-NHC₁₂), D) OA (SCM + OA) o E) SA (SCM + SA). Las líneas delgadas representan a los componentes de la membrana SCM: Cer24 (línea naranja), LA (línea rosada), Cho (línea verde). Los cálculos fueron realizados teniendo en cuenta el centro de la bicapa como punto de referencia y la posición relativa del centro del sistema $Z = 0$ nm.

3.5.2 Parámetro de orden de enlace carbono-deuterio

El parámetro de orden de enlace carbono-deuterio (o hidrógeno en simulaciones), $-S_{CD}$ (o $-S_{CH}$), mide el movimiento de los enlaces C-H en las moléculas de lípidos y puede ser obtenida mediante espectroscopia RMN utilizando 2H (deuterio) o lípidos marcados $^1H-^{13}C$ (Seelig, 1977; Tieleman et al., 1997; Vermeer et al., 2007). Generalmente, el orden decrece desde la región de la interfase al centro de la bicapa. Se calcularon los valores de $-S_{CH}$ para los componentes de la membrana SCM usando DM. En la Figura S4.3 se describen las secuencias de átomos de carbono seleccionados para cada componente de la membrana SCM. Los valores de $-S_{CH}$ obtenidos se encuentran graficados en la Figura 4.12: los paneles A y B, representan a la cadena corta de la ceramida (Cer24-18); los paneles C y D, la a cadena larga de la ceramida (Cer24-24); los paneles E y F, al ácido lignocérico (LA); y los paneles G y H, al colesterol (Cho). Para los *setups* donde los anfifilos inicialmente se encuentran en fase acuosa, no se observó perturbación alguna en los valores de este parámetro con respecto al control (paneles A, C, E y G). Por otro lado, los *setups* donde los anfifilos están inicialmente insertados en la membrana se muestran en los paneles B, D, F y H de la Figura 4.12. En estos casos se observa una clara reducción en el valor del parámetro para Cer24 y LA, especialmente para los *setups* que contenían Bz-Arg-NHC_n. Particularmente la porción media de la cadena de Cer24, entre los carbonos 8 y 16, resultó ser más afectada por la presencia de ambos surfactantes derivados de arginina; mientras que para las moléculas de LA la reducción en el valor de $-S_{CH}$ fue más pronunciada en la región de la cadena cercana a la interfase. Esta reducción en el parámetro $-S_{CH}$ registrada en los modelos simulados, podría explicar parcialmente el aumento en la elasticidad observada en las

monocapas SCM luego de la inserción de Bz-Arg-NHC_n. La presencia de estos compuestos no modificó el orden de Cho, el cual es intrínsecamente más estructurado.

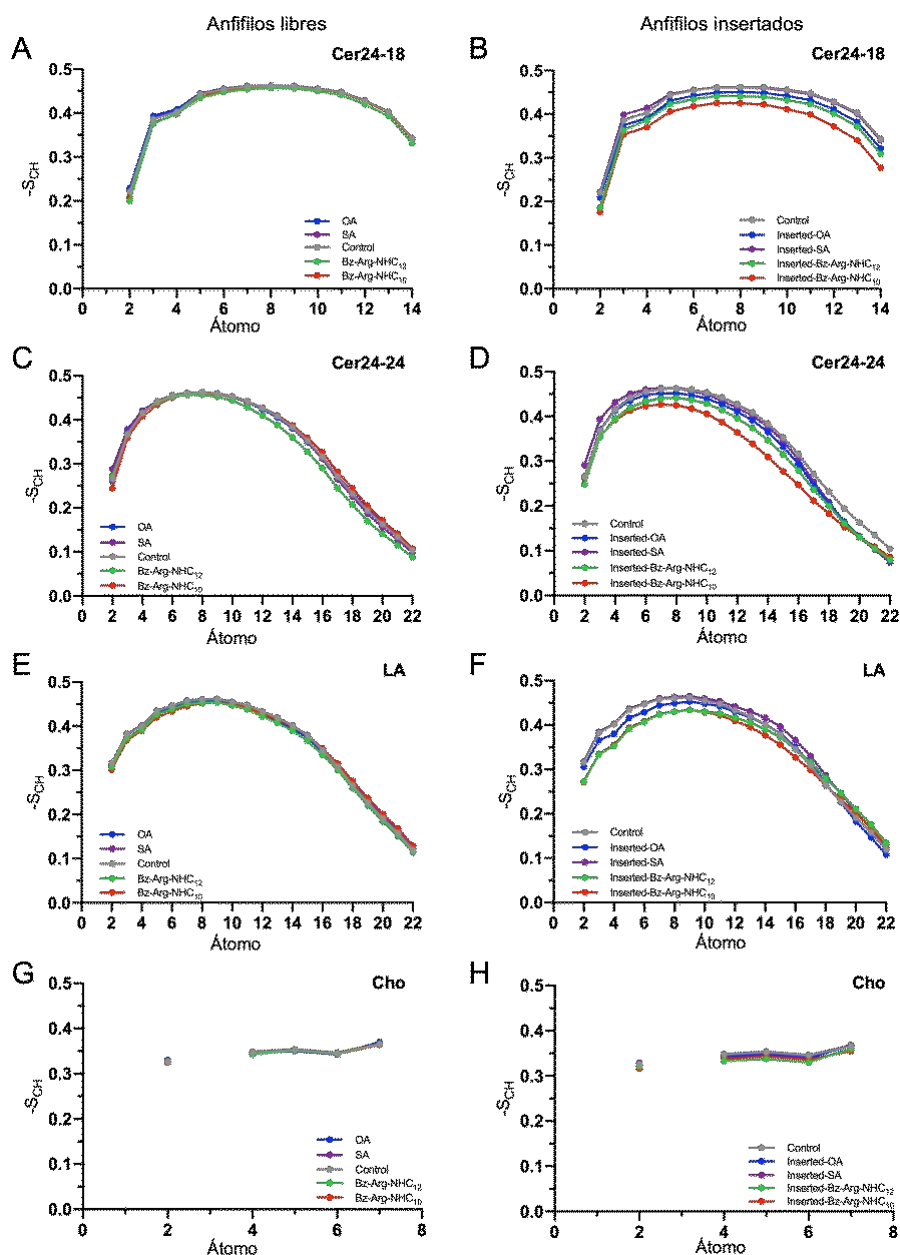


Figura 4.12 Parámetro de orden del enlace carbono-hidrógeno ($-S_{CH}$) para los componentes de la membrana SCM: A) y B) cadena corta de la ceramida (Cer24-18); C) y D) cadena larga de la ceramida (Cer24-24); E) y F) LA; y G) y H) Cho. Los paneles en la derecha (A,C,E y G) muestran los parámetros de las simulaciones con los anfifilos inicialmente libres en la fase acuosa, mientras que los paneles en la izquierda (B, D, F y H) muestran los parámetros para las simulaciones con los anfifilos inicialmente insertados en la membrana.

3.5.3 Cálculo del área extra por anfifilo incorporado

El área por lípido también es un indicador de cuán comprimidas se encuentran estas moléculas en la membrana. Como no se observó perturbación alguna para los arreglos iniciales de la membrana en presencia de los anfifilos en la fase acuosa y la interacción de los mismos con la membrana no estaba estabilizada, se calculó el exceso de área promedio por anfifilo insertado (AEA, del inglés *average excess area*). Este parámetro señala la diferencia entre el área promedio de la membrana en presencia del respectivo anfifilo y el área promedio de la membrana SCM, normalizados por el número total de anfifilos incorporados (Ecuación 4.4). Este parámetro se calculó para los *setups* con Bz-Arg-NHC₁₀, Bz-Arg-NHC₁₂, OA o SA insertados en la membrana.

$$AEA = \frac{A_{SCM+anfifilo} - A_{SCM}}{N_{anfifilo}} \quad \text{Ecuación 4.4}$$

donde $A_{SCM+anfifilo}$ es el área promedio de la membrana con el anfifilo incorporado, A_{SCM} es el área promedio de la membrana sin anfifilo, y $N_{anfifilo}$ es el número total de anfifilos insertos en la membrana.

En la Figura 4.13 se muestran los valores de este parámetro calculado para los últimos 200 ns de las simulaciones. Como se puede observar, el exceso de área fue mayor en aquellas membranas que contenían Bz-Arg-NHC₁₀, mientras que para las que contenían SA fue considerablemente más bajo. Estos resultados concuerdan con los

parámetros de orden observados para las monocapas en presencia de los surfactantes derivados de arginina (Figura 4.12), y respalda los datos experimentales obtenidos usando las monocapas de Langmuir, los cuales mostraron que la presencia de estos compuestos provoca una mayor perturbación en la estructura y organización de la membrana (Figura 4.5).

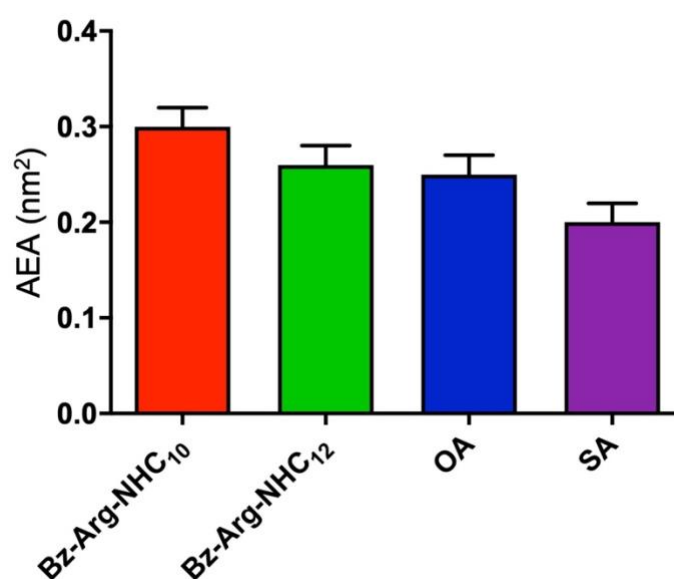


Figura 4.13 Exceso de área promedio (AEA) por anfifilo insertado en los últimos 200 ns de las simulaciones de DM de los sistemas con los anfifilos insertados en la membrana. Membrana SCM en presencia de: Bz-Arg-NHC₁₀ (rojo), Bz-Arg-NHC₁₂ (verde), OA (azul) o SA (violeta).

3.5.4 Compresibilidad

Como se mencionó previamente, la compresibilidad de una membrana está definida por los cambios relativos en la tensión superficial de la misma con respecto a su área. Este parámetro se calculó a partir de simulaciones de DM empleando la

Ecuación 4.3 y los resultados se muestran en la Figura 4.14. Se puede observar que el comportamiento general de estos sistemas concuerda con aquel observado en los resultados experimentales (Sección 3.1, Figura 4.5 D), en donde los mayores cambios en la compresibilidad se encontraron para aquellas membranas que poseían Bz-Arg-NHC₁₀, mientras que el SA no alteró significativamente este valor.

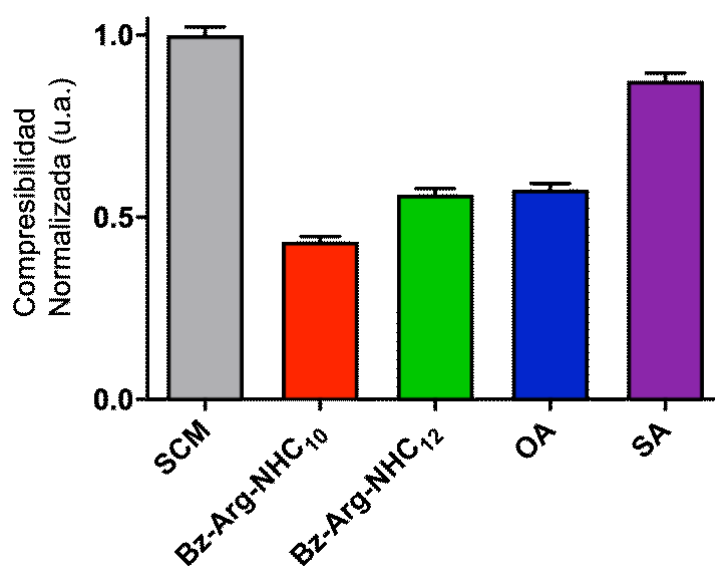


Figura 4.14 Compresibilidad normalizada con respecto al control (SCM) para las simulaciones de DM de los sistemas en ausencia, SCM (gris), o en presencia de: Bz-Arg-NHC₁₀ (rojo), Bz-Arg-NHC₁₂ (verde), OA (azul) o SA (violeta).

4 Conclusión

En este capítulo se estudió el efecto de Bz-Arg-NHC_n sobre monocapas de composición lipídica similar al estrato córneo (SCM). Estos resultados fueron comparados con un potenciador de penetración normalmente utilizado, ácido oleico (OA) y un no potenciador de penetración, ácido esteárico (SA). Estos estudios se llevaron a cabo haciendo uso de dos perspectivas complementarias.

En primer lugar, se emplearon monocapas lipídicas como modelo las cuales permiten el estudio de una parte unitaria de las múltiples capas que componen al estrato córneo (SC). A pesar de ser un sistema estructural y químicamente simplificado, este modelo ha sido utilizado ampliamente en literatura y permite obtener información valiosa de su estudio (Engelbrecht et al., 2012; Školová et al., 2013; Sparr et al., 2001). Del análisis de las isothermas de compresión, se pudo observar que la presencia de los surfactantes en las monocapas SCM aumenta su compresibilidad (menor valor de C_s^{-1}), siendo mayor el efecto a mayor concentración de surfactante. Un resultado similar se encontró para OA, mientras que SA, como era de esperar, fue el que menor efecto mostró. Adicionalmente, se pudo ver que ambos surfactantes fueron capaces de adsorberse en la interfase aire/agua, y a su vez también lograron insertarse en monocapas SCM. Los valores de π_c indican que tanto Bz-Arg-NHC₁₀ como Bz-Arg-NHC₁₂ serían capaces de insertarse en las membranas biológicas, incluso a altas presiones. Además, luego de la incorporación de los surfactantes la monocapa se volvió más compresible, siendo levemente mayor el efecto inducido por Bz-Arg-NHC₁₀.

Mediante las técnicas microscópicas empleadas, BAM y AFM, se pudo ver cómo estos compuestos alteraban la organización lateral de las monocapas SCM a micro- y nano-escala, respectivamente. A través de BAM se vio que la presencia de los surfactantes estabilizaba la separación de fases líquido-líquido, lo cual podría indicar una inmiscibilidad de estos compuestos frente a los componentes más hidrofóbicos de la membrana. En las imágenes tomadas por AFM se observó cómo la incorporación de los anfifilos altera la forma de los dominios presentes en la monocapa. Adicionalmente, en el caso de SA se vio afectado el equilibrio de fases, lo cual se refleja por el aumento en el porcentaje de cobertura de la fase de mayor grosor, más compacta y enriquecida en ceramidas, la cual se cree que es menos activa en el proceso de permeación. Este resultado podría explicar el efecto de SA como preservante de la función de barrera de la piel.

En segundo lugar, estos estudios fueron complementados mediante el uso de modelos *in silico*. Se construyeron modelos a escala atómica que se estudiaron por DM, los cuales permitieron no solo corroborar algunas de las observaciones realizadas mediante las monocapas de Langmuir, sino también investigar el comportamiento molecular de cada componente, en los distintos sistemas anfifilo-SCM, y extraer información relevante la cual no es accesible mediante técnicas experimentales. Los resultados de DM señalan una reducción en los parámetros de orden del enlace carbono-hidrógeno ($-S_{CH}$) para los componentes de la membrana SCM luego de la incorporación de Bz-Arg-NHC₁₀ o Bz-Arg-NHC₁₂. Este efecto fue incluso más pronunciado que el ocasionado cuando el potenciador de penetración OA estaba presente. Teniendo en cuenta que en la literatura se relaciona la actividad de los potenciadores de

penetración lipofílicos con un efecto desorganizador o fluidificante de estos compuestos activos sobre las cadenas lipídicas del SC como mecanismo de acción (Barry, 1987; Engelbrecht et al., 2012; Ochalek, 2012; Williams & Barry, 2012), los resultados obtenidos en estos ensayos que indican un fuerte efecto de los surfactantes derivados de arginina, son de gran relevancia para destacar su potencial función como PP. La disminución de los valores de $-S_{CH}$ ocasionada por la presencia de estos compuestos fue más pronunciada en la porción central de las cadenas de acilo de las ceramidas y en la porción superficial de las moléculas de LA, lo que indicaría que los surfactantes podrían estar interactuando de manera diferente con ambas moléculas. Este resultado sugiere una posible interacción diferencial de Bz-Arg-NHC_n con fases lipídicas lateralmente separadas.

Por otro lado, Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ pueden cambiar los equilibrios de fase de SCM favoreciendo la fase más expandida y delgada, como sugiere el análisis de imágenes BAM. Los resultados de DM muestran que estos tensioactivos ocupan la superficie de la membrana e inducen el adelgazamiento de las membranas SCM. En estudios recientes (Zulueta Díaz et al., 2020) se ha propuesto que los PP se concentran en la fase lipídica más delgada de las membranas SCM ejerciendo un efecto adelgazante y aumentando la deformabilidad de la membrana, reflejado por una disminución en el valor de C_s^{-1} . Esas alteraciones físicas favorecerían la inserción de compuestos activos en las membranas lipídicas del SC, las cuales experimentarían un mecanismo de partición-difusión a través de las múltiples capas del SC, favoreciéndose de esta manera la permeación cutánea de los fármacos.

En conclusión, los resultados encontrados en este capítulo señalan que ambos surfactantes fueron capaces de incorporarse en las membranas SCM y alterar sus propiedades estructurales y reológicas al desordenar las cadenas lipídicas, aumentar en gran medida su elasticidad y reducir su grosor. Asimismo, estos anfifilos alteran la estructura lateral heterogénea de las membranas SCM en la nano-escala, al relajar y redondear los bordes de los dominios lipídicos. Este comportamiento concuerda con los efectos inducidos por agentes potenciadores de penetración anfifílicos (Schroeter et al., 2015; Todosijević et al., 2017; Williams & Barry, 2012; Zulueta Díaz et al., 2020), lo que incentiva futuros ensayos en los que Bz-Arg-NHC_n se empleen como potenciadores de penetración de compuestos a través de la piel.

Finalmente, estos resultados señalan a la alteración de las propiedades reológicas y estructurales de las membranas SCM como un comportamiento característico de varios potenciadores de penetración. Además, estos efectos pueden conducir a la desestabilización de la estructura lamelar del SC en la microescala, así como a la alteración de la nanoestructura lateral en el plano y la promoción de capas más delgadas, interconectadas y permeables, que podrían ser de fundamental importancia en el mecanismo de mejora de la permeación.

5 Referencias

- Abla, M. J., Singh, N. D., & Banga, A. K. (2016). Role of nanotechnology in skin delivery of drugs. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers* (pp. 1–13). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47862-2_1
- Abraham, M. J., & Gready, J. E. (2011). Optimization of parameters for molecular dynamics simulation using smooth particle-mesh Ewald in GROMACS 4.5. *Journal of Computational Chemistry*, 32(9), 2031–2040. <https://doi.org/10.1002/jcc.21773>
- Ananthapadmanabhan, K. P., Mukherjee, S., & Chandar, P. (2013). Stratum corneum fatty acids: Their critical role in preserving barrier integrity during cleansing. *International Journal of Cosmetic Science*, 35(4), 337–345. <https://doi.org/10.1111/ics.12042>
- Banga, A. K. (2011). *Transdermal and intradermal delivery of therapeutic agents: application of physical technologies*. CRC press.
- Barry, B. W. (1987). Mode of action of Penetration Enhancers in Human Skin. *Journal of Controlled Release*, 6, 85–97.
- Barry, B. W. (1991). Lipid–Protein–Partitioning Theory of Skin Penetration Enhancement. *Journal of Controlled Release*, 15, 237–248. <https://doi.org/10.1023/A:1015813803205>
- Bouwstra, J. A., Gooris, G. S., Dubbelaar, F. E. R., Weerheim, A. M., & Ponc, M. (1998). pH, cholesterol sulfate, and fatty acids affect the stratum corneum lipid organization. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 3(2), 69–74.
- Bouwstra, J. A., Honeywell-nguyen, P. L., & Gooris, G. S. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*, 42, 1–36.

- Del Regno, A., & Notman, R. (2018). Permeation pathways through lateral domains in model membranes of skin lipids. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 20(4), 2162–2174. <https://doi.org/10.1039/c7cp03258g>
- Dignon, G. L., Zerze, G. H., & Mittal, J. (2017). Interplay between Membrane Composition and Structural Stability of Membrane-Bound hIAPP. *Journal of Physical Chemistry B*, 121(37), 8661–8668. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b05689>
- Dragicevic, N., & Maibach, H. I. (2015). Percutaneous penetration enhancers chemical methods in penetration enhancement: Modification of the stratum corneum. *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum*, 1–411. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47039-8>
- Dupuy, F., Fanani, M. L., & Maggio, B. (2011). Ceramide N-acyl chain length: A determinant of bidimensional transitions, condensed domain morphology, and interfacial thickness. *Langmuir*, 27(7), 3783–3791. <https://doi.org/10.1021/la105011x>
- Eeman, M., & Deleu, M. (2010). From biological membranes to biomimetic model membranes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 14(4), 719–736.
- Eeman, M., Francius, G., Dufrêne, Y. F., Nott, K., Paquot, M., & Deleu, M. (2009). Effect of cholesterol and fatty acids on the molecular interactions of fengycin with Stratum Corneum mimicking lipid monolayers. *Langmuir*, 25(5), 3029–3039. <https://doi.org/10.1021/la803439n>
- Engelbrecht, T. N., Schroeter, A., Hauß, T., Demé, B., Scheidt, H. A., Huster, D., & Neubert, R. H. H. (2012). The impact of ceramides NP and AP on the nanostructure of stratum corneum lipid bilayer. Part I: Neutron diffraction and 2H NMR studies on multilamellar models based on ceramides with symmetric alkyl chain length distribution. *Soft Matter*, 8(24), 6599–6607. <https://doi.org/10.1039/c2sm25420d>
- Evans, D. J., & Holian, B. L. (1985). The Nose-Hoover thermostat. *The Journal of Chemical Physics*, 83(8), 4069–4074. <https://doi.org/10.1063/1.449071>

- Fait, M. E., Garrote, G. L., Clapés, P., Tanco, S., Lorenzo, J., & Morcelle, S. R. (2015). Biocatalytic synthesis, antimicrobial properties and toxicity studies of arginine derivative surfactants. *Amino Acids*, 47(7), 1465–1477. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1979-0>
- Fanani, M. L., & Wilke, N. (2018). Regulation of phase boundaries and phase-segregated patterns in model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1860(10), 1972–1984. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.02.023>
- Flach, C. R., Mendelsohn, R., Rerek, M. E., & Moore, D. J. (2000). Biophysical Studies of Model Stratum Corneum Lipid Monolayers by Infrared Reflection - Absorption Spectroscopy and Brewster Angle Microscopy. *Journal of Physical Chemistry B*, 104(9), 2159–2165. <https://doi.org/10.1021/jp9936805>
- Garofalakis, G., Murray, B. S., & Sarney, D. B. (2000). Surface activity and critical aggregation concentration of pure sugar esters with different sugar headgroups. *Journal of Colloid and Interface Science*, 229(2), 391–398. <https://doi.org/10.1006/jcis.2000.7035>
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H. J. C., & Fraaije, J. G. E. M. (1997). LINCS: A Linear Constraint Solver for Molecular Simulations. In *J Comput Chem* (Vol. 18). John Wiley & Sons, Inc.
- Jo, S., Kim, T., Iyer, V. G., & Im, W. (2008). CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*, 29(11), 1859–1865. <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>
- Kahraman, E., Kaykın, M., Şahin Bektay, H., & Güngör, S. (2019). Recent Advances on Topical Application of Ceramides to Restore Barrier Function of Skin. *Cosmetics*, 6(3), 52. <https://doi.org/10.3390/cosmetics6030052>
- Klauda, J. B., Venable, R. M., Freites, J. A., O'Connor, J. W., Tobias, D. J., Mondragon-Ramirez, C., Vorobyov, I., MacKerell, A. D., & Pastor, R. W. (2010). Update of the

- CHARMM All-Atom Additive Force Field for Lipids: Validation on Six Lipid Types. *Journal of Physical Chemistry B*, 114(23), 7830–7843. <https://doi.org/10.1021/jp101759q>
- Kutzner, C., Páll, S., Fechner, M., Esztermann, A., de Groot, B. L., & Grubmüller, H. (2019). More bang for your buck: Improved use of GPU nodes for GROMACS 2018. *Journal of Computational Chemistry*, 40(27), 2418–2431. <https://doi.org/10.1002/jcc.26011>
- Lane, M. E. (2013). Skin penetration enhancers. *International Journal of Pharmaceutics*, 447(1–2), 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.040>
- Lemos, C. N., Pereira, F., Dalmolin, L. F., Cubayachi, C., Ramos, D. N., & Lopez, R. F. V. (2018). Chapter 6 - Nanoparticles influence in skin penetration of drugs: In vitro and in vivo characterization. In A. M. Grumezescu (Ed.), *Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs* (pp. 187–248). William Andrew Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813665-2.00006-5>
- Loschwitz, J., Olubiyi, O. O., Hub, J. S., Strodel, B., & Poojari, C. S. (2020). Computer simulations of protein–membrane systems. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 170, pp. 273–403). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.01.001>
- Maget-Dana, R. (1999). The monolayer technique: A potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1462, Issues 1–2). [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00203-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00203-5)
- Mao, G., Vanwyck, D., Xiao, X., MacK Correa, M. C., Gunn, E., Flach, C. R., Mendelsohn, R., & Walters, R. M. (2013). Oleic acid disorders stratum corneum lipids in langmuir monolayers. *Langmuir*, 29(15), 4857–4865. <https://doi.org/10.1021/la4002384>
- Marsh, D. (1996). Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1286(3), 183–223. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3)

- Martinez, L., Andrade, R., Birgin, E. G., & Martínez, J. M. (2009). PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, *30*(13), 2157–2164. <https://doi.org/10.1002/jcc.21224>
- McConlogue, C. ., & Vanderlick, T. K. (1997). A close look at domain formation in DPPC monolayers. *Langmuir*, *13*(26), 7158–7164. <https://doi.org/10.1021/la970898e>
- Nokhodchi, A., Shokri, J., Dashbolaghi, A., & Hassan-zadeh, D. (2003). *Nokhodchi-2003-The enhancement effe.pdf*. 250, 359–369.
- Ochalek, M. (2012). *Barrier properties of stratum corneum lipid model membranes based on ceramide [AP] and [EOS]* [Doctoral thesis, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg]. <https://opendata.uni-halle.de//handle/1981185920/7650>
- Oliveira, J. S. L., Lange, S., Dobner, B., & Brezesinski, G. (2017). The effect of non-deuterated and deuterated isopropyl myristate on the thermodynamical and structural behavior of a 2D Stratum Corneum model with Ceramide [AP]. *Chemistry and Physics of Lipids*, *204*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.02.002>
- Páll, S., & Hess, B. (2013). A flexible algorithm for calculating pair interactions on SIMD architectures. *Computer Physics Communications*, *184*(12), 2641–2650. <https://doi.org/10.1016/j.cpc.2013.06.003>
- Parrinello, M., & Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, *52*(12), 7182–7190. <https://doi.org/10.1063/1.328693>
- Pham, Q. D., Björklund, S., Engblom, J., Topgaard, D., & Sparr, E. (2016). Chemical penetration enhancers in stratum corneum - Relation between molecular effects and barrier function. *Journal of Controlled Release*, *232*, 175–187. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.04.030>
- Schmitt, T., & Neubert, R. H. H. (2018). State of the art in Stratum Corneum research: The biophysical properties of ceramides. *Chemistry and Physics of Lipids*, *216*, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.09.017>

- Schroeter, A., Eichner, A., Mueller, J., & Neubert, R. H. H. (2015). Penetration Enhancers and Their Mechanism Studied on a Molecular Level. In N. Dragicevic & H. I. Maibach (Eds.), *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Modification of the Stratum Corneum* (pp. 1–411). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47039-8>
- Seelig, J. (1977). Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes. In *Quarterly Reviews of Biophysics* (Vol. 10).
- Školová, B., Januššová, B., Zbytovská, J., Gooris, G., Bouwstra, J., Slepíčka, P., Berka, P., Roh, J., Palát, K., Hrabálek, Al., & Vávrová, K. (2013). Ceramides in the skin lipid membranes: Length matters. *Langmuir*, *29*(50), 15624–15633. <https://doi.org/10.1021/la4037474>
- Som, I., Bhatia, K., & Yasir, M. (2012). Status of surfactants as penetration enhancers in transdermal drug delivery. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, *4*(1), 2–9. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.92724>
- Sparr, E., Eriksson, L., Bouwstra, J. A., & Ekelund, K. (2001). AFM study of lipid monolayers: III. Phase behavior of ceramides, cholesterol and fatty acids. *Langmuir*, *17*(1), 164–172. <https://doi.org/10.1021/la000271n>
- ten Grotenhuis, E., Demel, R. A., Ponec, M., Boer, D. R., van Miltenburg, J. C., & Bouwstra, J. A. (1996). Phase behavior of stratum corneum lipids in mixed Langmuir-Blodgett monolayers. *Biophysical Journal*, *71*(3), 1389–1399. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79341-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79341-4)
- Tieleman, D. P., Marrink, S. J., & Berendsen, H. J. C. (1997). A computer perspective of membranes: molecular dynamics studies of lipid bilayer systems. In *Biochimica et Biophysica Acta* (Vol. 1331).
- Todosijević, M. N., Brezesinski, G., Savić, S. D., & Neubert, R. H. H. (2017). Sucrose esters as biocompatible surfactants for penetration enhancement: An insight into the mechanism of penetration enhancement studied using stratum corneum model lipids and Langmuir monolayers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *99*, 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.12.002>

- Vermeer, L. S., de Groot, B. L., Réat, V., Milon, A., & Czaplicki, J. (2007). Acyl chain order parameter profiles in phospholipid bilayers: Computation from molecular dynamics simulations and comparison with ²H NMR experiments. In *European Biophysics Journal* (Vol. 36, Issue 8, pp. 919–931). <https://doi.org/10.1007/s00249-007-0192-9>
- Vollhardt, D. (2014). Brewster angle microscopy: A preferential method for mesoscopic characterization of monolayers at the air/water interface. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 19(3), 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2014.02.001>
- Williams, A. C., & Barry, B. W. (2004). Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(5), 603–618. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.025>
- Williams, A. C., & Barry, B. W. (2012). Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.032>
- Zhang, H., Zhai, Y., Yang, X., & Zhai, G. (2015). Breaking the Skin Barrier: Achievements and Future Directions. *Current Pharmaceutical Design*, 21(20), 2713–2724. <https://doi.org/10.2174/1381612821666150428124406>
- Zulueta Díaz, Y. de las M., Menghi, K., Guerrero, M. L., Nocelli, N., & Fanani, M. L. (2020). L-Ascorbic acid alkyl esters action on stratum corneum model membranes: An insight into the mechanism for enhanced skin permeation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110621>
- Zulueta Díaz, Y. M., & Fanani, M. L. (2017). Crossregulation between the insertion of Hexadecylphosphocholine (miltefosine) into lipid membranes and their rheology and lateral structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1859(10), 1891–1899. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.06.008>
- Zulueta Díaz, Y. M., Mottola, M., Vico, R. V., Wilke, N., & Fanani, M. L. (2016). The Rheological Properties of Lipid Monolayers Modulate the Incorporation of L-Ascorbic Acid Alkyl Esters. *Langmuir*, 32(2), 587–595. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04175>

6 Anexo

6.1 Detalles de simulación

Tabla S4.1 Parámetros de optimización de la membrana SCM

| Steep | Ensemble | Time steps | Equilibration times | Force constant of the harmonic restraint |
|-------|----------|------------|---------------------|--|
| | | fs | ps | $\text{kJ mol}^{-1}\text{nm}^2$ |
| 1 | NVT | 1 | 25 | 1000 |
| 2 | NVT | 1 | 25 | 800 |
| 3 | NpT | 1 | 25 | 600 |
| 4 | NpT | 2 | 100 | 400 |
| 5 | NpT | 2 | 100 | 200 |
| 6 | NpT | 2 | 100 | 0 |

Tabla S4.2 Condiciones iniciales de las simulaciones de DM

| Systems | Stratum corneum membrane (SCM) | | | Surfactants | | Fatty acids | | Ions | | Waters |
|--|--------------------------------|-------------|----|-------------|-----|-------------|----|-----------------|-----------------|--------|
| | Cho | Cer[NS]24:0 | LA | C10 | C12 | OA | SA | Na ⁺ | Cl ⁻ | |
| SCM (Control) | 66 | 66 | 66 | -- | -- | -- | -- | 66 | -- | 14,924 |
| Surfactants and fatty acids inserted into the aqueous solution | | | | | | | | | | |
| SCM + C10 | 66 | 66 | 66 | 30 | -- | -- | -- | 66 | 30 | 14,027 |
| SCM + C12 | 66 | 66 | 66 | -- | 30 | -- | -- | 66 | 30 | 13,776 |
| SCM + OA | 66 | 66 | 66 | -- | -- | 30 | -- | 96 | -- | 14,281 |
| SCM + SA | 66 | 66 | 66 | -- | -- | -- | 30 | 96 | -- | 14,251 |
| Surfactants and fatty acids inserted into the SCM | | | | | | | | | | |
| SCM + C10 | 66 | 66 | 66 | 30 | -- | -- | -- | 66 | 30 | 13,404 |
| SCM + C12 | 66 | 66 | 66 | -- | 30 | -- | -- | 66 | 30 | 13,404 |
| SCM + OA | 66 | 66 | 66 | -- | -- | 30 | -- | 96 | -- | 13,493 |
| SCM + SA | 66 | 66 | 66 | -- | -- | -- | 30 | 96 | -- | 13,529 |

6.2 Imágenes suplementarias

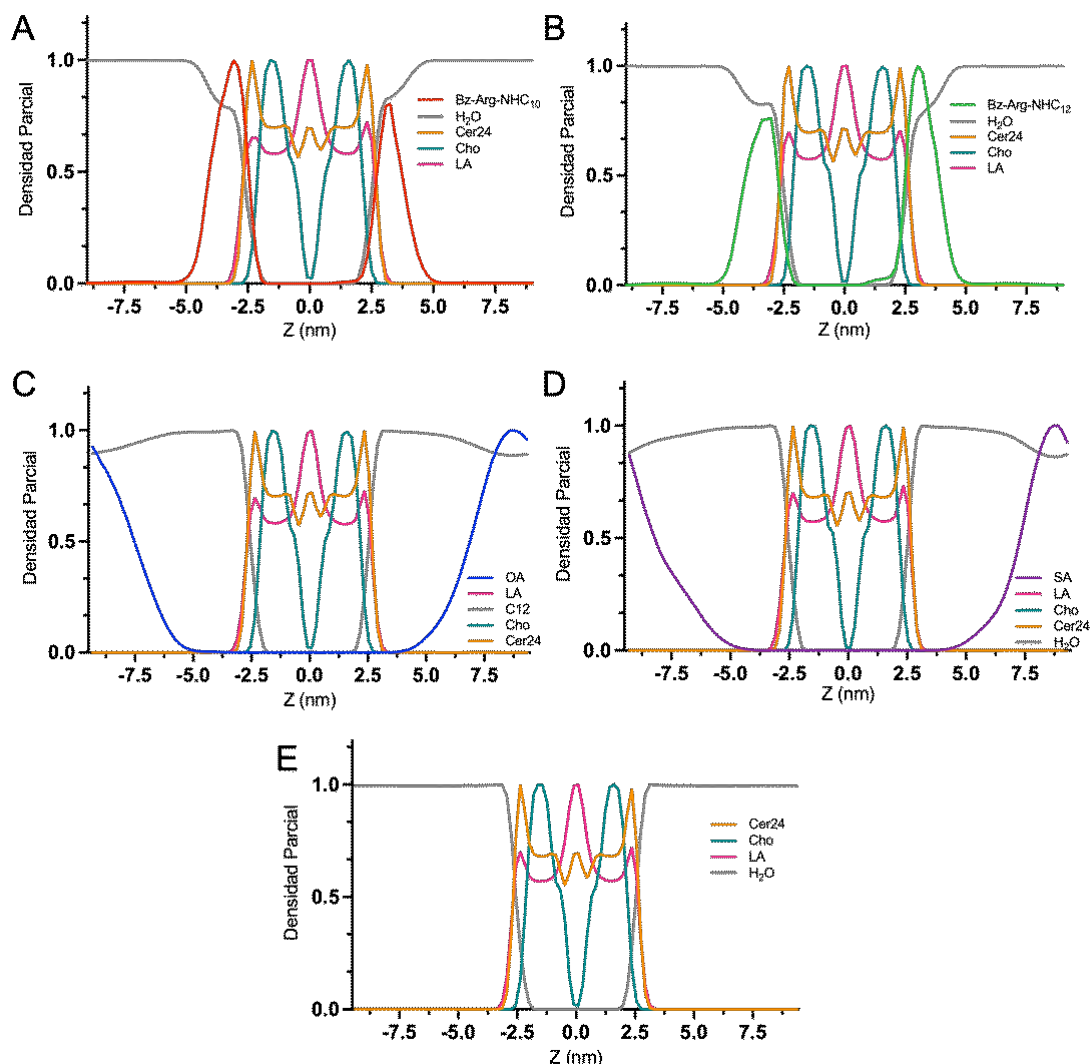


Figura S4.1 Distribución de densidades para los sistemas con los anfifilos inicialmente en la fase acuosa. Las líneas gruesas señalan a los anfifilos añadidos: A) Bz-Arg-NHC₁₀ (línea roja), B), Bz-Arg-NHC₁₂ (línea verde), C) OA (línea azul), y D) SA (línea violeta). En E) se muestra el sistema control (SCM), compuesto por: Cho (línea verde), Cer (línea naranja) y LA (línea rosada). Los cálculos fueron realizados teniendo en cuenta el centro de la bicapa lipídica como punto de referencia y posición relativa del centro del sistema, $Z = 0$ nm.

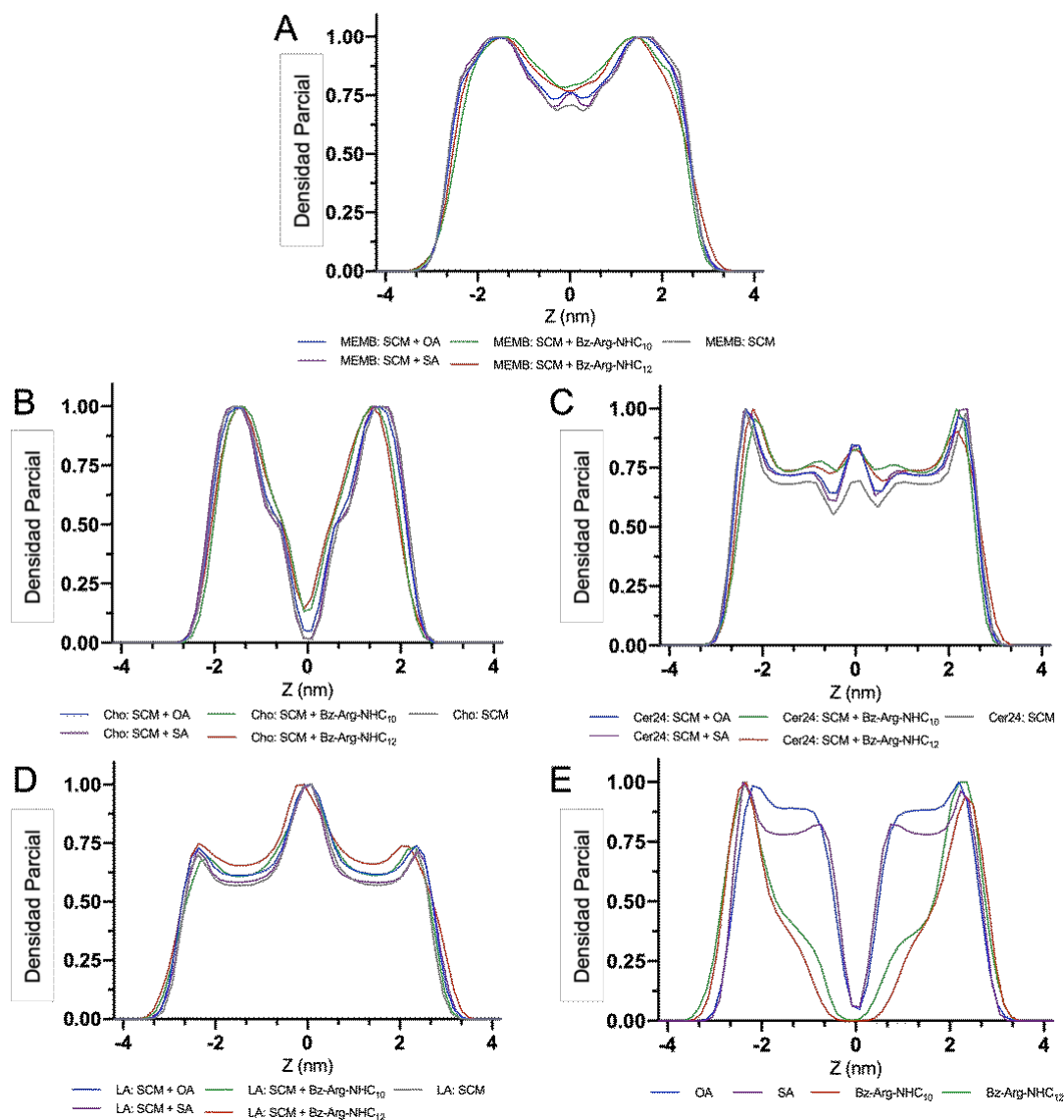


Figura S4.2 Distribución de densidades para los sistemas con los anfifilos inicialmente insertos en la membrana SCM. Se muestra la membrana control (SCM, línea gris), y en presencia de: Bz-Arg-NHC₁₀ (línea roja), Bz-Arg-NHC₁₂ (línea verde), OA (línea azul) o SA (línea violeta). Se muestran los cálculos para la densidad de A) la membrana completa (MEMB), B) Cho, C) Cer24 y D) LA. En E) se muestran las densidades para las moléculas de Bz-Arg-NHC₁₀ (línea roja), Bz-Arg-NHC₁₂ (línea verde), OA (línea azul), y SA (línea violeta).

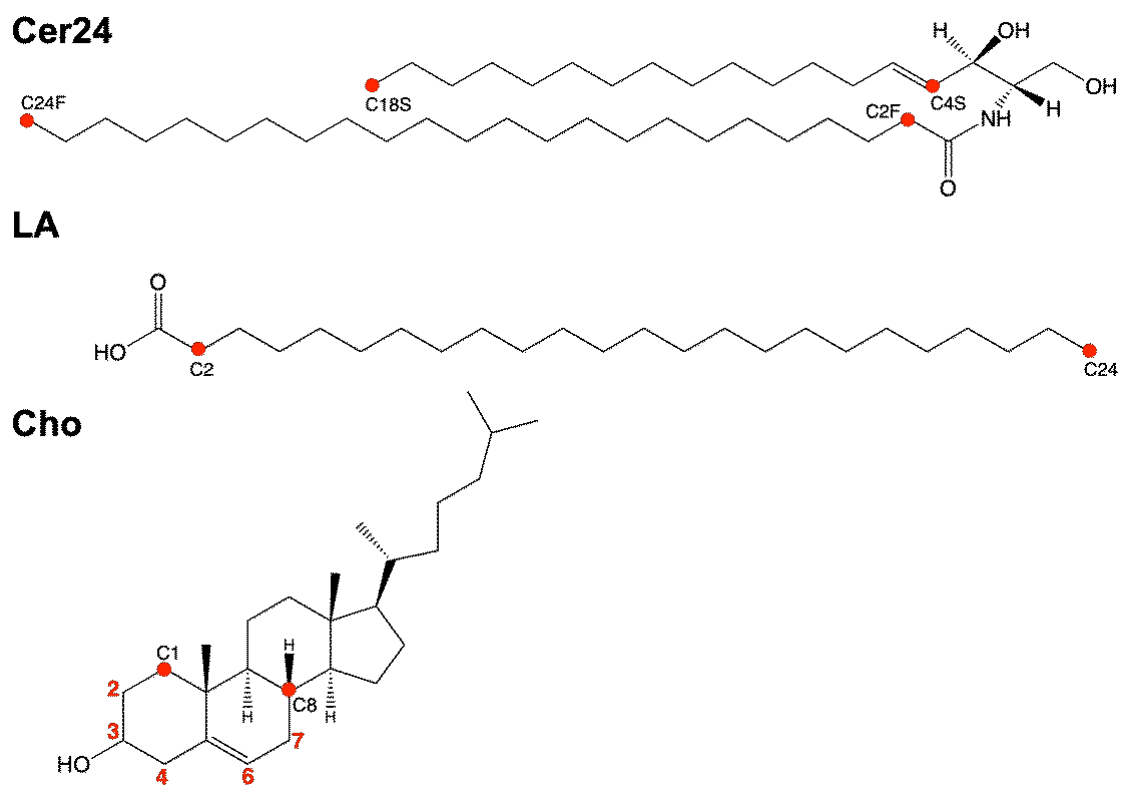


Figura S4.3 Átomos seleccionados (marcados con un punto rojo) para el cálculo del parámetro de orden de los enlaces carbono-hidrógeno para los componentes de la membrana SCM.

6.3 Videos suplementarios

- A. Bz-Arg-NHC₁₀: [Video 1](#)
- B. Bz-Arg-NHC₁₂: [Video 2](#)
- C. OA: [Video 3](#)
- D. SA: [Video 4](#)

Videos S4.1 Representaciones gráficas de las trayectorias de DM de los sistemas con los anfifilos inicialmente libres en fase acuosa en contacto con la membrana SCM: A) Bz-Arg-NHC₁₀, B) Bz-Arg-NHC₁₂, C) OA y D) SA. Los componentes de la membrana SCM se muestran en una representación de superficie (Cho en verde, Cer24 en naranja y LA en violeta). Los anfifilos se muestran como representaciones de van der Waals, coloreados según los nombres de los átomos. Las moléculas de H₂O no se muestran para una mejor visualización.

- A. Bz-Arg-NHC₁₀: [Video 5](#)
- B. Bz-Arg-NHC₁₂: [Video 6](#)
- C. OA: [Video 7](#)
- D. SA: [Video 8](#)

Videos S4.2 Representaciones gráficas de las trayectorias de DM de los sistemas con los anfifilos inicialmente insertados en la membrana SCM: A) Bz-Arg-NHC₁₀, B) Bz-Arg-NHC₁₂, C) OA y D) SA. Los componentes de la membrana SCM se muestran en una representación de superficie (Cho en verde, Cer24 en naranja y LA en violeta). Los anfifilos se muestran como representaciones de van der Waals, coloreados según los nombres de los átomos. Las moléculas de H₂O y los átomos de hidrógeno no se muestran para una mejor visualización.

Capítulo V

OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS
DEFORMABLES: Bz-Arg-NHC_n
COMO ACTIVADORES DE BORDE

Índice Capítulo V

| | | |
|----------|---|------------|
| 1 | INTRODUCCIÓN | 209 |
| 2 | MATERIALES Y MÉTODOS | 215 |
| 2.1 | Materiales | 215 |
| 2.2 | Preparación de los liposomas | 215 |
| 2.3 | Caracterización de los liposomas obtenidos | 216 |
| 2.3.1 | <i>Cuantificación de fosfolípidos.....</i> | <i>216</i> |
| 2.3.2 | <i>Determinación del tamaño y potencial Zeta</i> | <i>217</i> |
| 2.3.3 | <i>Evaluación de la deformabilidad de las preparaciones liposomales.....</i> | <i>217</i> |
| 2.3.4 | <i>Estabilidad frente al almacenamiento</i> | <i>218</i> |
| 2.3.5 | <i>Evaluación de la citotoxicidad de las formulaciones liposomales</i> | <i>218</i> |
| 2.3.6 | <i>Medida de polarización generalizada del Laurdan</i> | <i>219</i> |
| 2.3.7 | <i>Análisis estadístico.....</i> | <i>220</i> |
| 3 | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 222 |
| 3.1 | Caracterización de los liposomas | 222 |
| 3.2 | Evaluación de ultradeformabilidad de las formulaciones obtenidas | 225 |
| 3.3 | Análisis de la estabilidad coloidal de las formulaciones liposomales | 228 |
| 3.4 | Evaluación de la citotoxicidad de las formulaciones liposomales..... | 230 |
| 3.5 | Efecto de Bz-Arg-NHC ₁₀ en los valores de polarización generalizada del Laurdan | 234 |

| | | |
|----------|-------------------------|------------|
| 4 | CONCLUSIÓN | 237 |
| 5 | REFERENCIAS..... | 239 |

1 Introducción

Como se mencionó en el Capítulo IV, la piel se ha convertido en un sitio de preferencia para la aplicación de principios activos que necesiten ejercer un efecto tópico o transdérmico. Debido a las características propias del estrato córneo (SC) la entrada de agentes terapéuticos hidrofílicos o de gran tamaño a través de la piel se ve restringida. Por este motivo, se han llevado a cabo numerosas investigaciones para mejorar la administración transdérmica de fármacos (TDD), lo que contribuyó al desarrollo de diferentes metodologías tales como el uso de potenciadores de penetración y las técnicas activas de permeación, como la electroporación, microporación, ionoforesis y fonoforesis (Dragicevic & Maibach, 2016). Otra alternativa para mejorar la TDD es realizar cambios en las técnicas pasivas de permeación, lo que permite el transporte de una amplia gama de fármacos. La nanotecnología es una de estas metodologías, la cual ha sido empleada para mejorar distintas rutas del *drug delivery* tales como la vía oral, parenteral y nasal. Esta metodología hace referencia al uso de partículas en el rango de la nanoescala, generalmente entre menos de 100 a 1000 nm (Baroli, 2010; Escobar-Chávez et al., 2012; Mishra et al., 2010; Müller-Goymann, 2004).

Los nanotransportadores ofrecen numerosas ventajas frente a los medios pasivos de administración de drogas convencionales, tales como mayor área superficial, mayor solubilidad, transporte a un sitio específico (*site-targeted delivery*), estabilidad mejorada, liberación controlada del ingrediente activo y baja irritabilidad cutánea, entre otros (Abramovits et al., 2010; Escobar-Chávez et al., 2012; Mihranyan et al., 2012). En

el área de los cosméticos y tratamientos antienvjecimiento en particular, la nanotecnología ha jugado un papel importante en la liberación de los ingredientes activos en la piel, lo cual se evidencia por el gran número de invenciones y patentes registradas, y por la creciente lista de dichos productos en el mercado (Izquierdo et al., 2020).

Se han investigado y desarrollado una amplia gama de sistemas coloidales para la administración tópica, las cuales incluyen nanopartículas lipídicas sólidas, nanocápsulas, liposomas y vesículas, y nano- y microemulsiones (Latter et al., 2019). El encapsulamiento de ingredientes activos en liposomas es utilizado en numerosos productos cosméticos, dentro de los cuales podemos encontrar humectantes como glicerol y urea, protectores solares y bronceadores, enzimas, compuestos antiedad o para el acné como el retinol, agentes antimicrobianos, esteroides, ácido hialurónico y productos naturales (Benson, 2016). Estos pueden facilitar el suministro intracelular a través de la fusión con los lípidos de la membrana plasmática, endocitosis mediada por receptor y/o fagocitosis. Además, la facilidad de su preparación, el aumento de la absorción de ingredientes activos por la piel y el continuo suministro de agentes en las células durante un prolongado período de tiempo, los hacen adecuados para aplicaciones cosméticas.

El tamaño de los liposomas juega un rol muy importante en su penetración a través de la piel. Se ha reportado que estas vesículas penetran y se acumulan en las capas superiores del SC pero no pueden penetrar en las capas más profundas de la epidermis (el Maghraby et al., 2006; Schäfer-Korting et al., 2007; Schaller & Korting,

1996). Asimismo, la elasticidad de la membrana de estas vesículas es otro de los factores determinantes en el proceso de partición en la piel, lo que está directamente relacionado con la eficacia de este sistema para la TDD. En este sentido, la composición de las vesículas constituye un factor clave en el éxito de esta estrategia. Para superar las limitaciones que presentan los liposomas convencionales, tales como estabilidad y rigidez, se diseñaron los liposomas ultradeformables (LUD). Estos son sistemas vesiculares de bicapas biocompatibles que pueden transportar numerosas drogas con fines terapéuticos, bioquímicos y cosméticos. Son conocidos con diversos nombres, tales como liposomas elásticos, deformables, flexibles y transferosomas® (originalmente descritos por Cevc 1992). Estos liposomas pueden sortear los inconvenientes que enfrentan los vehículos tradicionales para la TDD debido a sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas mejoradas (Hussain et al., 2017).

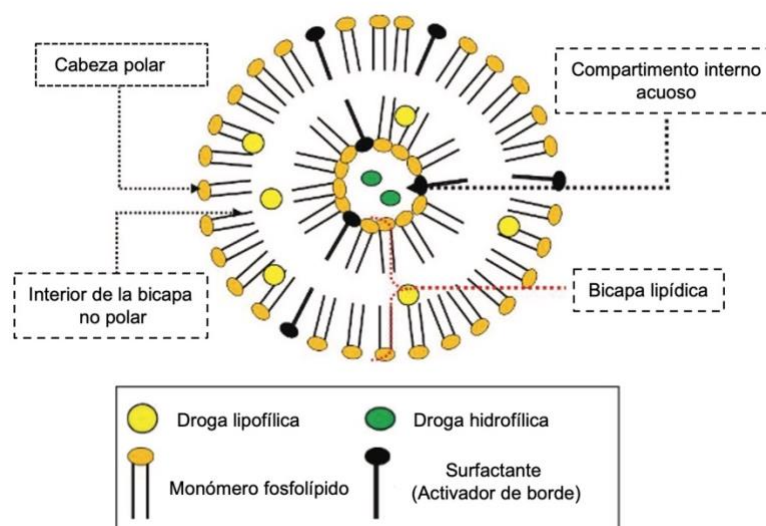


Figura 5.1 Ilustración esquemática de la bicapa de liposomas ultradeformables y sus componentes. Imagen tomada de (Hussain et al., 2017).

Como se ilustra en la Figura 5.1, los LUD consisten en fosfolípidos, un activador de borde (EA, del inglés *edge activator*) y un compartimento interno acuoso encerrado entre una bicapa lipídica capaz de encapsular moléculas hidrofílicas (en dicho compartimento acuoso) y moléculas lipofílicas (en la bicapa) (Benson, 2016; Santos et al., 2019). Los activadores de borde son moléculas anfifílicas (generalmente surfactantes, como el Tween 20, Tween 60, Span 65, Span 80 y el colato de sodio) capaces de intercalarse entre los fosfolípidos de las membranas de las vesículas lipídicas (Carita et al., 2018). Por lo general, estos surfactantes poseen una única cadena hidrocarbonada y le confieren a la membrana una mayor curvatura, desestabilizando las bicapas de fosfolípidos y contribuyendo a la reorganización de las moléculas anfifílicas, lo que provoca un aumento en la flexibilidad y capacidad de deformación de las membranas de los liposomas (Souto et al., 2021). Por esta razón, Cevc argumentó que los mismos son capaces de atravesar canales entre los queratinocitos de un décimo de su diámetro y penetrar intactos a través de las capas de la piel como se muestra en la Figura 5.2 (Benson, 2016; Dragicevic & Maibach, 2016; Hussain et al., 2017). Como respuesta a un estrés mecánico, los EA se relocalizan de la bicapa lipídica en las zonas de mayor curvatura (o estrés), mientras que los fosfolípidos enriquecen las regiones de la bicapa de menor curvatura. Estos reordenamientos son los que permiten que los LUD pasen a través de pequeños poros sin desarmarse.

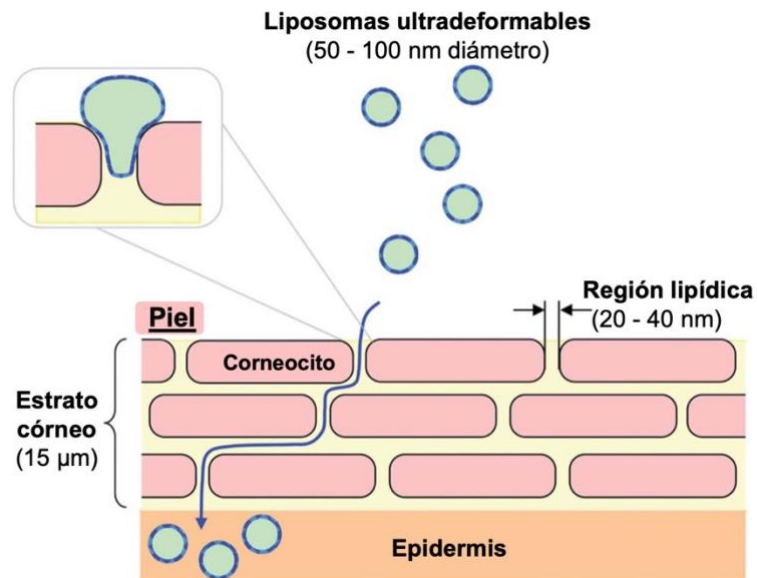


Figura 5.2 Mecanismo de penetración de liposomas ultradeformables (LUD). Se cree que realizan un camino tortuoso a través de las regiones lipídicas (poros) entre los corneocitos hasta llegar a la epidermis. Nótese que los LUD tienen un diámetro mayor al tamaño de los poros, sin embargo pueden deformarse para atravesar estos poros como se señala en el recuadro de la imagen. Imagen adaptada de (Ogunsola et al., 2012).

Aunque el mecanismo de penetración de los LUD a través del SC no se conoce en detalle, está aceptado que la fuerza que dirige la penetración es la diferencia en el contenido de agua entre la superficie de la piel relativamente deshidratada y la epidermis rica en agua. Es decir que se da a favor del gradiente de hidratación ocasionado por la circulación sanguínea debajo de la epidermis (Cevc & Gebauer, 2003). Por el contrario, los liposomas convencionales permanecen y se acumulan próximos a la superficie del SC (Gupta et al., 2012).

En general, los fosfolípidos preferidos para la preparación de LUD son la fosfatidilcolina (PC) insaturada de soja y la PC de huevo. Con el objetivo de lograr un eficiente potencial de penetración y almacenamiento a largo tiempo, la relación entre la cantidad de lípido y EA debe ser la óptima para una buena elasticidad y estabilidad de las preparaciones.

En este contexto, los surfactantes derivados de aminoácidos son candidatos de sumo interés para ser ensayados como activadores de borde en la formación de liposomas ultradeformables, y evaluar la posibilidad de emplearlos así en el transporte de agentes terapéuticos. Esta idea se ve reforzada por las notables características fisicoquímicas y propiedades biológicas que dichos compuestos poseen (ya descritas en los capítulos previos). Por esta razón, el objetivo de este capítulo es evaluar la potencial aplicación de Bz-Arg-NHC_n como EA en liposomas de PC de soja (SPC).

2 Materiales y métodos

2.1 Materiales

El lípido utilizado para la preparación de los liposomas fue fosfatidilcolina de soja (SPC, del inglés *soy phosphatidylcholine*), donado por Phospholipid/Natterman, Alemania. El metanol HPLC fue provisto por Baker (USA), y el cloroformo, el ácido clorhídrico y el perclórico por Anedra. La sonda fluorescente 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno (Laurdan) y el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT) fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (USA). Los medios de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) y Modified Eagle's (MEM) fueron de Gibco (Argentina).

Los macrófagos murinos J774A.1 A.1 (ATCC® TIB-67TM) fueron suministrados por la Dra. Erina Petrera, de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Buenos Aires, Argentina. Los queratinocitos humanos (células HaCaT) fueron suministrados por el Dr. Salvatierra de la Fundación Instituto Leloir (Buenos Aires, Argentina).

Para todos los ensayos se empleó buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,4 conteniendo NaCl 0,9 % p/v filtrado con membrana de nylon de 0,2 μm .

El resto de los reactivos y solventes empleados fueron de calidad analítica o superior.

2.2 Preparación de los liposomas

Las formulaciones de liposomas (liposomas multilamelares o MLV) fueron preparadas empleando SPC como fosfolípido y un 20 mol% de surfactante, Bz-Arg-NHC₁₀

(*formulación SPC20C10*) o Bz-Arg-NHC₁₂ (*formulación SPC20C12*), como activador de borde a través del método de hidratación de la película lipídica. Brevemente, las mezclas de lípidos y surfactante se disolvieron en CHCl₃/MeOH 1:1 v/v. Luego los solventes se evaporaron en rotavapor (Heidolph, Alemania) a temperatura ambiente. Las películas lipídicas resultantes fueron colocadas en desecador al vacío para eliminar restos de solvente por al menos 2 h. Finalmente, las muestras fueron rehidratadas con el buffer previamente mencionado hasta una concentración final de 10 mg/ml de lípido. Las suspensiones de MLV obtenidas fueron sonicadas empleando un sonicador de baño (80 W, 40 KHz) durante 1 h a temperatura ambiente, y se sometieron a extrusión a través de un sándwich de filtros de policarbonato con tamaños de poro de 0,2 y 0,1 μm utilizando un extrusor Thermobarrel (Northern Lipids, Canadá). Este proceso se repitió diez veces, a fin de generar los liposomas unilamelares (LUV).

Los liposomas de SPC sin surfactante fueron preparados de forma análoga y utilizados como control para los experimentos que se detallan a continuación.

2.3 Caracterización de los liposomas obtenidos

2.3.1 Cuantificación de fosfolípidos

Los fosfolípidos se cuantificaron mediante un microensayo colorimétrico de fosfato (Böttcher et al., 1961). Durante el ensayo, alícuotas de la solución de liposomas fueron tratadas con ácido perclórico e incubadas a 180 °C durante 30 min. En este paso de digestión, el fósforo orgánico de los fosfolípidos es convertido en ortofosfato. La adición de molibdato de amonio en presencia de ácido sulfúrico y ácido ascórbico

convierte el ortofosfato en ácido fosfomolibdico, el cual es reducido a un complejo coloreado azul durante el calentamiento. Este último puede ser cuantificado espectrofotométricamente a 818 nm. La absorción de cada muestra fue comparada con una curva control, realizada con un stock de fosfatos de concentración conocida ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 32 $\mu\text{mol/ml}$). Todas las determinaciones fueron realizadas al menos por triplicado.

2.3.2 Determinación del tamaño y potencial Zeta

El tamaño medio de las vesículas, el índice de polidispersidad (PDI, del inglés *polydispersity index*) y el potencial Zeta de las suspensiones de liposomas se determinaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS, del inglés *dispersion light scattering*) y por dispersión de luz para análisis de fase (PALS, del inglés *phase analysis light scattering*), respectivamente, empleando un equipo Zetasizer nano (Malvern Instruments, Reino Unido). Para esto las muestras se diluyeron 1/20 con el mismo buffer de las formulaciones.

2.3.3 Evaluación de la deformabilidad de las preparaciones liposomales

El grado de deformabilidad de las vesículas se determinó de acuerdo con lo descrito por van den Bergh et al. utilizando la siguiente ecuación:

$$D = J \times \left(\frac{r_v}{r_p} \right)^2 \quad \text{Ecuación 5.1}$$

donde D es la elasticidad de la vesícula, J es la tasa de penetración de las vesículas a través de una barrera semipermeable (calculado como el área bajo la curva de porcentaje de fosfolípidos vs tiempo), r_v es el tamaño de los liposomas luego de la extrusión (medido por DLS) y r_p es el tamaño de poro de la membrana.

Para determinar J , se midió el flujo de penetración de 2 ml de la suspensión de liposomas a través de una barrera de permeabilidad (sándwich de membranas de nitrocelulosa de 50 nm de tamaño de poro) a una presión externa de 0,8 MPa ejercida por una corriente de N_2 en extrusor. El volumen extruido fue recolectado cada 1 min durante 15 min y se determinó la cantidad de fosfolípidos en cada fracción. Los resultados obtenidos para la formulación conteniendo los surfactantes fueron contrastados con aquellos obtenidos para liposomas control de SPC.

2.3.4 Estabilidad frente al almacenamiento

La estabilidad coloidal de las suspensiones liposomales se determinó a través de medidas en su tamaño, PDI y potencial Zeta a intervalos entre 15 y 30 días, durante un período total de 90 días de almacenamiento en oscuridad a 4 °C. Los resultados fueron expresados como la media \pm SD de tres medidas independientes.

2.3.5 Evaluación de la citotoxicidad de las formulaciones liposomales

Se emplearon macrófagos murinos J774A.1 (ATCC® TIB-67TM) y queratinocitos humanos (células HaCaT) para evaluar la citotoxicidad de liposomas SPC y SPC20C10.

Ambas líneas celulares se cultivaron en RPMI o MEM, respectivamente, suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1% de antibiótico-antimicótico y 2 mM de glutamina a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad.

La viabilidad celular tras la incubación con las formulaciones se determinó utilizando el ensayo de MTT. Brevemente, las células J774A.1 A.1 y HaCaT se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 5,5 x10⁴ y 4 x10⁴ células por pocillo, respectivamente. Luego de 24 h de crecimiento, las células se incubaron con 100 µl de diferentes concentraciones de las formulaciones diluidas en medio fresco con 5% de SFB. Las concentraciones de las formulaciones empleadas fueron 25, 50, 75, 100 y 250 µg/ml de fosfolípido. Después de 24 o 48 h de incubación, las células se lavaron con PBS y se añadieron 100 µl de MTT 5 mg/ml a cada pocillo. Tras de 3 h de incubación a 37 °C, se eliminó la solución de MTT, los cristales de formazán insolubles se disolvieron en DMSO y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas (Cytation 5 BioTeck, USA). La viabilidad celular se expresó como porcentaje respecto a las células control crecidas en medio de cultivo sin las formulaciones liposomales.

2.3.6 Medida de polarización generalizada del Laurdan

El efecto del Bz-Arg-NHC₁₀ sobre la interfase hidrofílica-hidrofóbica de la membrana se determinó por medidas de polarización generalizada (GP) de la sonda Laurdan. Esta sonda pertenece a la familia de sondas fluorescentes sensibles a la polaridad del entorno, por lo tanto, puede ser utilizada para detectar cambios en las propiedades de fase de las membranas. Además, se la emplea para distinguir diferencias

en el orden de los fosfolípidos a partir de cambios en la fluidez de la membrana por su sensibilidad a los efectos de relajación del solvente.

Se prepararon suspensiones de SPC20C10 y SPC (0,2 mM) en buffer, y se incubaron con Laurdan (1 μ M) en oscuridad a 25 °C durante 1 h. La intensidad de fluorescencia del Laurdan se registró mediante un espectrofluorómetro Shimadzu RF1501, empleando un ancho de rendija de 10 nm tanto para la emisión como para la excitación. La longitud de onda de excitación utilizada fue 350 nm. Los valores de GP fueron calculados a partir de las intensidades de emisión utilizando la siguiente ecuación adaptada del trabajo de Parasassi (Parasassi et al., 1991):

$$GP = \frac{(I_{440} - I_{490})}{(I_{440} + I_{490})} \quad \text{Ecuación 5.2}$$

donde I_{440} e I_{490} se refieren al promedio de intensidades de emisión a la longitud de onda correspondiente. La relación molar sonda-lípidos utilizada fue 1,5:1000. LUV sin sonda fueron utilizados para corregir el *scattering* de las muestras, el que nunca excedió el 1%. Los valores de GP obtenidos para la formulación de SPC20C10 fueron contrastados con aquellos calculados para los liposomas control, de SPC.

2.3.7 Análisis estadístico

En los ensayos de citotoxicidad los resultados se analizaron usando t-test independiente de dos muestras, análisis de varianza de 2 factores (ANOVA) seguido del

test de Sidak, o análisis de varianza de un factor seguido de Dunnet, usando el software GraphPad Prism 4.01. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de $*p < 0.05$; $**p < 0.001$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$; n.s.: no significativo.

Los valores de GP fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA, *one-way analysis of variance*) y el *test* de Tukey, utilizando el software InfoStat. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados como significativos.

3 Resultados y Discusión

Se ha demostrado que la elasticidad de la bicapa lipídica de los liposomas es un factor clave para conseguir que un determinado activo penetre a través de la piel en concentraciones suficientes. Con este fin, se han desarrollado sistemas de encapsulación liposomales llamados liposomas ultradeformables (LUD). Estos sistemas están constituidos por fosfolípidos y un activador de borde (EA), que generalmente es una molécula anfifílica con propiedades tensioactivas capaz de intercalarse en la bicapa lipídica. Al formarse el liposoma, su estructura dependerá de la relación molar entre los lípidos y el tensioactivo, pudiendo conservarse la bicapa liposomal a bajas concentraciones del activador de borde. Asimismo, al incluir ambos tipos de moléculas en una misma vesícula, se desestabiliza la bicapa lipídica y aumenta su capacidad de deformación debido a la disminución en la tensión interfacial (Hua, 2015). Gracias a esta propiedad, los LUD son capaces de deformarse para pasar entre las células del SC y penetrar intactos a través de la piel, alcanzando así estratos más profundos y permitiendo la administración de los principios activos.

3.1 Caracterización de los liposomas

Luego de obtener liposomas unilamelares conteniendo un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀ (SPC20C10) o Bz-Arg-NHC₁₂ (SPC20C12), los mismos fueron caracterizados en cuanto a su tamaño, potencial Zeta y deformabilidad. El tamaño hidrodinámico se determinó mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). Esta técnica analiza la

intensidad de la luz dispersada por el movimiento browniano de las partículas en suspensión, y se utiliza para medir su tamaño y distribución en la región submicrométrica. El índice de polidispersidad (PDI) indica el grado de variación de los valores de tamaños de los liposomas obtenidos y, por lo tanto, de la homogeneidad de la población liposomal. Valores de PDI cercanos a 0 indican una población monodispersa, mientras que valores más cercanos a 1 indican una población altamente polidispersa.

En la Tabla 5.1 se muestran los resultados obtenidos para las formulaciones en las distintas etapas de tratamiento. Los liposomas sin tratar (MLV), luego de 1 h de sonicación y, por último, luego de ser extruidas por membranas 0,2-0,1 nm de diámetro de poro. Los tamaños promedios y PDI obtenidos para las formulaciones fueron los esperados para cada paso de preparación de los liposomas. Inicialmente, el tamaño promedio de las vesículas multilamelares fue de 3683 o 1266 nm para SPC20C10 y SPC20C12, respectivamente, con un valor alto de PDI, lo que refleja una población de vesículas de gran tamaño y además heterogénea. Al sonicar las formulaciones se observó una disminución tanto en el tamaño promedio de las vesículas como en su PDI. Finalmente, luego de extruir los MLV para obtener los liposomas unilamelares, se registró un tamaño promedio de 140,9 y 145,5 nm, con un PDI de 0,13 y 2,30, para los liposomas conteniendo Bz-Arg-NHC₁₀ o Bz-Arg-NHC₁₂, respectivamente. Estos valores sugieren la obtención de una población monodispersa con tamaños típicos para este tipo de preparación (Subba Reddy et al., 2022).

Tabla 5.1 Composición y características estructurales de formulaciones liposomales. Los valores informados son promedios de 2 ensayos independientes con sus respectivas desviaciones estándar.

| Formulación | Tratamiento | Caracterización | |
|-------------|------------------|----------------------|--------------|
| | | Tamaño promedio (nm) | PDI |
| SPC20C10 | MLV (sin tratar) | 3683,0 ± 184,3 | 0,913 ± 0,05 |
| | Sonicación | 1582,0 ± 79,1 | 0,282 ± 0,01 |
| | Extrusión | 140,9 ± 5,6 | 0,130 ± 0,01 |
| SPC20C12 | MLV (sin tratar) | 1266,0 ± 98,67 | 0,891 ± 0,08 |
| | Sonicación | 881,7 ± 51,19 | 0,741 ± 0,15 |
| | Extrusión | 145,5 ± 1,18 | 0,230 ± 0,02 |
| SPC | Extrusión | 138,2 ± 4,3 | 0,120 ± 0,03 |

Por otro lado, el potencial Zeta de una suspensión es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática entre las partículas suspendidas, resultando un parámetro relevante para evaluar y predecir la estabilidad de una preparación liposomal. Este parámetro se ve influenciado tanto por la composición de las partículas como por el medio en el que se dispersa. Si las nanopartículas tienen un potencial Zeta de módulo mayor a 30 mV, sus cargas superficiales generarán repulsión entre ellas y no se observará una tendencia a su agregación (Mohanraj & Chen, 2006). Sin embargo, en aquellas partículas con un potencial Zeta entre -30 y +30 mV la repulsión no será suficiente para evitar su agregación, y su estabilidad en suspensión se verá

comprometida. Para todos los liposomas obtenidos, tanto en presencia como en ausencia de Bz-Arg-NHC_n, registraron valores de potencial Zeta negativos, con módulos cercanos a los 5 mV, lo que sugeriría una baja estabilidad de las preparaciones.

3.2 Evaluación de ultradeformabilidad de las formulaciones obtenidas

Existen dos factores determinantes que afectan la profundidad de penetración de una nanovesícula a través del SC intacto: su elasticidad o ultradeformabilidad y su tamaño. La ultradeformabilidad resulta del módulo de Young reducido de las bicapas lipídicas de los liposomas; este es un parámetro que caracteriza el comportamiento elástico de las membranas y que se reduce en aproximadamente un orden de magnitud respecto de aquel para las vesículas no deformables (Higa et al., 2016). Esta propiedad se logra al incluir una alta proporción de activadores de borde en la bicapa de fosfolípidos (Cevc & Blume, 1992).

Se estudió la deformabilidad de las nanovesículas de SPC20C10 y SPC20C12 con una concentración teórica de fosfolípidos igual a 10 mg/ml. Los resultados fueron comparados con los obtenidos para liposomas control, SPC, sin surfactante. La deformabilidad de los liposomas fue evaluada calculando el valor de D (elasticidad de la vesícula), mediante la medida del flujo de fosfolípidos a través de membranas de 50 nm en función del tiempo, empleando la Ecuación 5.1.

En la Figura 5.3 se muestran las curvas de flujo de las soluciones liposomales a través de un sándwich de membranas de 50 nm de diámetro de poro en función del

tiempo. Se encuentran representados tanto el porcentaje de fosfolípidos como el porcentaje de volumen de solución recuperado luego del ensayo de extrusión para A) SPC20C10 y B) SPC20C12. En el primer caso, se puede observar que la mayor parte de los liposomas atraviesan la membrana en los primeros 3 min, y se logra recuperar la totalidad de la muestra. Por el contrario, en los liposomas conteniendo Bz-Arg-NHC₁₂ solo se logra recuperar un 50 % del volumen total luego de los 15 min que dura el ensayo, y el porcentaje de fosfolípidos contenido en ese volumen es menor al 10 % del total.

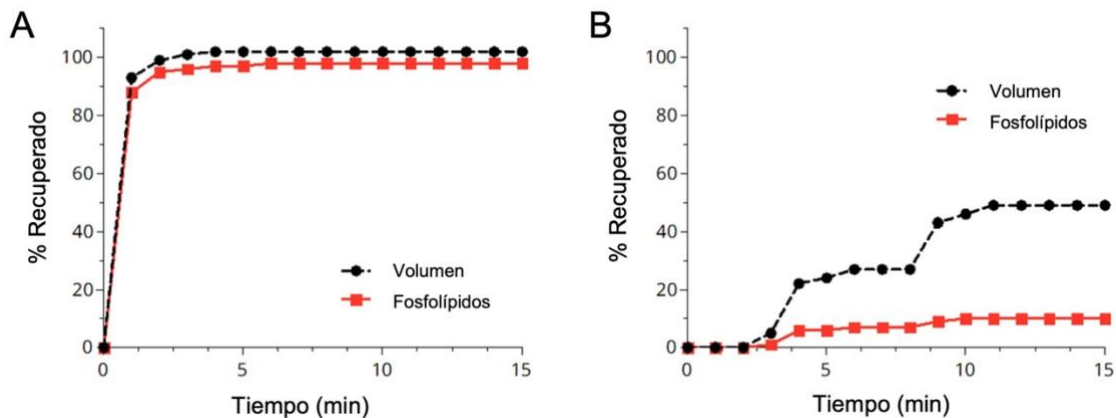


Figura 5.3 Evaluación de la deformabilidad de las formulaciones extruidas a través de un sándwich de membranas de 50 nm a 0,8 MPa. En rojo se representa el porcentaje de recuperación de fosfolípidos y en negro el porcentaje de volumen de solución recuperados para: A) liposomas conteniendo un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀ (SPC20C10) y B) liposomas conteniendo un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₂ (SPC20C12). Las curvas son representativas de dos ensayos independientes.

En la **Tabla 5.2** se muestran los resultados de la caracterización de las formulaciones antes y luego del ensayo de ultradeformabilidad (UD). En particular, el

valor de D hallado para los liposomas de SPC coincide con el previamente reportado para una formulación equivalente y se corresponde al de liposomas no deformables (Perez et al., 2016). Al observar los valores obtenidos para los liposomas SPC20C12, se encuentra que su comportamiento es similar a los liposomas control de SPC: presentaron un bajo valor de D , bajos porcentajes de recuperación de fosfolípidos y de volumen luego del ensayo. Estos resultados indicarían que los liposomas de SPC conteniendo un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₂ no podrían categorizarse como ultradeformables.

Por el contrario, los resultados obtenidos para las formulaciones SPC20C10 indicarían que los mismos sí serían ultradeformables. Este hecho se ve reflejado en el valor de D obtenido, que resultó 10 veces mayor en comparación con las otras formulaciones probadas. Se ha encontrado que, independientemente de EA utilizado, el valor D en estos casos es 5 veces mayor que en los liposomas no ultradeformables (Perez et al., 2016).

Tabla 5.2 Parámetros característicos de la evaluación de la ultraformabilidad de las formulaciones liposomales.

| Parámetro | Formulación | | |
|----------------------------|-------------|----------|-------|
| | SPC20C10 | SPC20C12 | SPC |
| J (% PL/min) | 1404 | 98 | 90 |
| r_v (nm) | 128,9 | 111,4 | 135,1 |
| r_p (nm) | 50 | 50 | 50 |
| D (% PL/min) | 6358 | 486 | 657 |
| Reducción en el tamaño (%) | 1,07 | 1,31 | 1,07 |

D : elasticidad de la vesícula, J : flujo de penetración a través de la barrera de permeabilidad, r_v : diámetro de la vesícula luego de realizar el ensayo, r_p : tamaño de poro de la membrana (50 nm); PL: fosfolípido.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, que sugieren que solo Bz-Arg-NHC₁₀ (y no Bz-Arg-NHC₁₂) funcionaría como activador de borde modificando el empaquetamiento de los fosfolípidos en la bicapa de la membrana de los liposomas y aumentando así su elasticidad, el resto de los ensayos de caracterización fueron realizados solamente empleando Bz-Arg-NHC₁₀ como EA.

3.3 Análisis de la estabilidad coloidal de las formulaciones liposomales

Como se mencionó previamente, los LUD se caracterizan por su capacidad de atravesar poros con radios más pequeños que su propio tamaño (hasta 1/10 de su

diámetro), sin que la estructura de su bicapa se vea afectada (Cevc & Chopra, 2016; Hussain et al., 2017). Teniendo esto en cuenta y, considerando que el diámetro de los “poros” presentes en la matriz lipídica del SC (espacio intercelular entre los corneocitos) tiene un tamaño que varía entre los 20 y 40 nm (Ogunsola et al., 2012), solo aquellos LUD con un tamaño máximo cercano a los 200-400 nm tendrían posibilidad de atravesar al SC. Por lo tanto, resulta importante que el tamaño de los liposomas diseñados se mantenga constante y/o no supere los valores máximos durante su almacenamiento.

En este contexto, la estabilidad de los liposomas durante el almacenamiento a 4 °C en oscuridad fue determinada en un período total de 90 días mediante la medición de la variación en el tamaño o diámetro hidrodinámico y del potencial Zeta (Tabla 5.3). De acuerdo con los resultados obtenidos, los liposomas de SPC serían estables durante al menos 60 días almacenados en las condiciones ensayadas, lo cual se evidencia por la conservación en sus propiedades coloidales (tamaño y potencial Zeta) durante dicho período. En el caso de la formulación conteniendo el surfactante derivado de arginina, para el mismo tiempo de almacenamiento, se observó un aumento tanto del tamaño de las vesículas como de su PDI, lo que podría deberse a la fusión de los liposomas. Esto sugeriría una menor estabilidad coloidal de esta formulación. Los parámetros evaluados evidenciaron que esta formulación sería estable durante solo 30 días de almacenamiento, registrándose en este tiempo un leve aumento del tamaño de los liposomas, pero manteniendo los valores en la escala de tamaños de referencia para este tipo de vesículas.

Tabla 5.3 Estabilidad coloidal de las formulaciones liposomales en función del tiempo de almacenamiento en oscuridad a 4 °C.

| Tiempo (días) | SPC | | | SPC20C10 | | |
|---------------|--------------|-------------|------------------|---------------|-------------|------------------|
| | Tamaño (nm) | PDI | Potencial Z (mV) | Tamaño (nm) | PDI | Potencial Z (mV) |
| 0 | 138,2 ± 4,3 | 0,12 ± 0,03 | -5,3 ± 0,1 | 140,9 ± 5,6 | 0,13±0,01 | -5 ± 0,3 |
| 15 | 132,4 ± 6,6 | 0,11 ± 0,01 | -5,1 ± 0,3 | 156,3 ± 7,8 | 0,13 ± 0,01 | -5,1 ± 0,3 |
| 30 | 141,9 ± 10,3 | 0,13 ± 0,03 | -5,7 ± 0,3 | 165,8 ± 15,3 | 0,17 ± 0,03 | -5,3 ± 0,3 |
| 60 | 140,3 ± 5,5 | 0,25 ± 0,02 | -5,0 ± 0,5 | 621,3 ± 123,5 | 0,56 ± 0,13 | -5,3 ± 0,01 |
| 90 | 355,2 ± 17,8 | 0,45 ± 0,02 | ND | 856,4 ± 42,8 | 0,67 ± 0,03 | -5,0 ± 0,3 |

ND: no determinado

3.4 Evaluación de la citotoxicidad de las formulaciones liposomales

Con el objetivo de realizar una evaluación de la potencial citotoxicidad de la formulación SPC20C10, se utilizaron diferentes líneas celulares para los ensayos: HaCat, una línea celular de queratinocitos humanos y J774A.1, una línea celular de macrófagos murinos. Los resultados obtenidos fueron comparados con los liposomas en ausencia de surfactante, SPC (formulación control). A tal fin, se empleó el método de MTT, el cual permite medir la proliferación y actividad metabólica celular de manera general. En este ensayo el MTT es reducido a formazán, y la cantidad de señal generada depende de distintos parámetros entre los cuales se encuentran el período de incubación, el número

de células viables y la actividad metabólica. La cantidad de formazán generado es proporcional al número de células metabólicamente viables (van Meerloo et al., 2011).

Durante los ensayos, las líneas celulares mencionadas fueron expuestas a las formulaciones durante 24 y 48 h. Pasado ese tiempo, se evaluó la viabilidad celular. El porcentaje de viabilidad por encima del cual las formulaciones se consideraron no citotóxicas fue del 70 %. Los gráficos del porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración de formulación se muestran en la Figura 5.4 para células HaCat, y en la Figura 5.5 para las células J774.A1. En todos los casos se observó un efecto sobre las células dependiente de la concentración.

En el caso de los ensayos realizados con la línea de queratinocitos humanos, la máxima concentración no citotóxica tras 24 h de incubación fue de 100 $\mu\text{g/ml}$ para liposomas compuestos solo por SPC, mientras que para la formulación SPC20C10 fue de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 5.4). Luego de 48 h de incubación con las mismas muestras, los efectos de SPC permanecen invariables, mientras que en las muestras tratadas con SPC20C10 se produjo una disminución significativa de viabilidad celular en todas las concentraciones estudiadas (Figura 5.4).

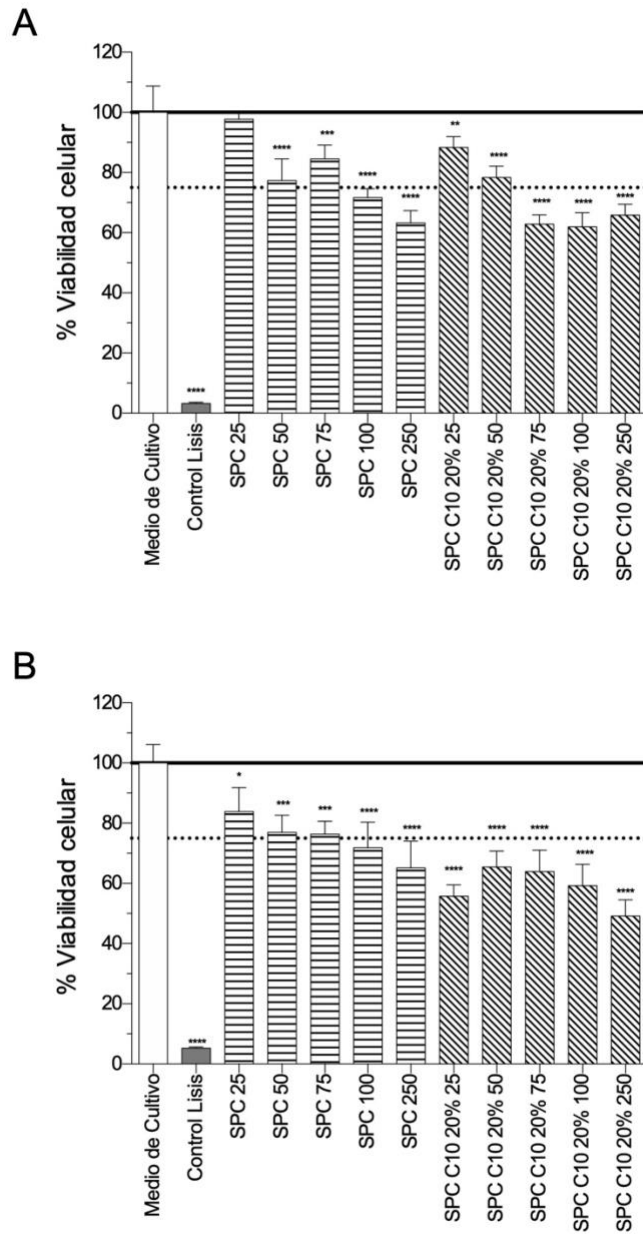


Figura 5.4 Evaluación de la citotoxicidad en HaCat de SPC20C10 y SPC luego de A) 24 h y B) 48 h de incubación. La línea punteada corresponde al porcentaje de viabilidad del 70 %, valor por encima del cual las formulaciones se consideraron no tóxicas.

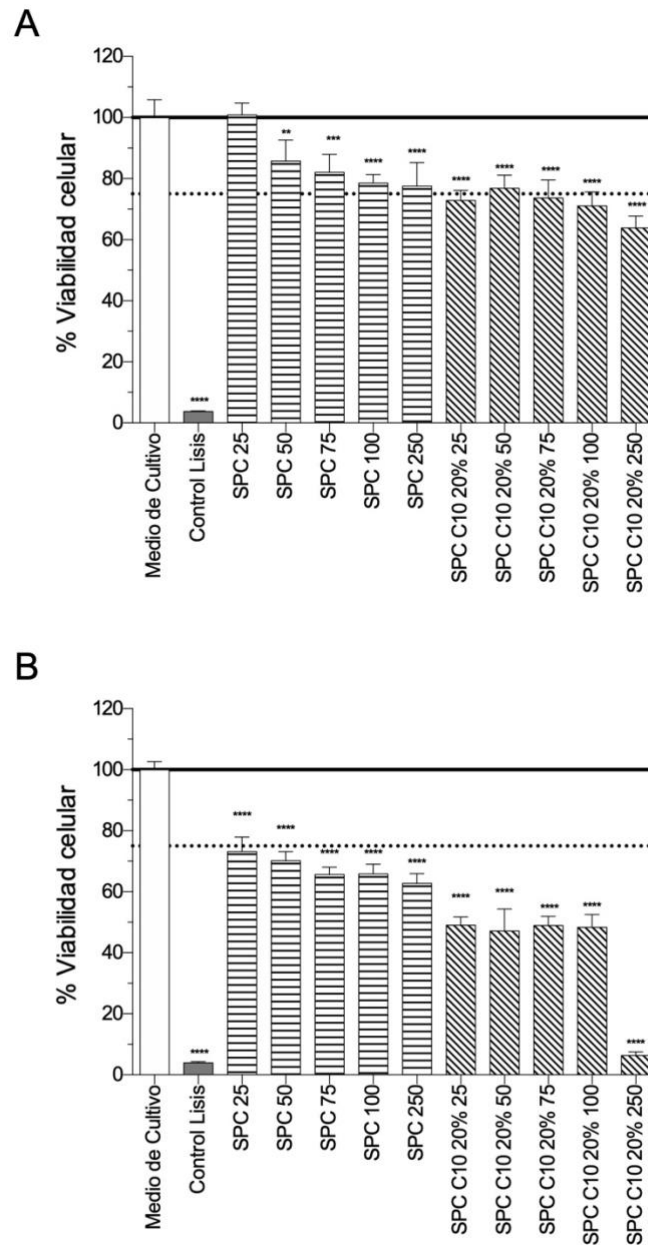


Figura 5.5 Evaluación de la citotoxicidad en J77A.1 de SPC20C10 y SPC luego de A) 24 h y B) 48 h de incubación. La línea punteada corresponde al porcentaje de viabilidad del 70 %, valor por encima del cual las formulaciones se consideraron no tóxicas.

En el caso de los macrófagos murinos, la formulación de SPC no resultó citotóxica en ninguna de las concentraciones estudiada tras 24 h de incubación. Por el contrario,

para la formulación SPC20C10, pudo comprobarse la citotoxicidad a partir de 100 µg/ml (Figura 5.5). Luego de 48 h, todas las formulaciones fueron citotóxicas en todas las concentraciones ensayadas, siendo mayor el daño causado por SPC20C10 (Figura 5.5).

En general, se pudo observar que sobre ambas líneas celulares la presencia de Bz-Arg-NHC₁₀ en los liposomas conlleva a un aumento en la toxicidad de la formulación, evidenciado por una disminución en la viabilidad celular.

3.5 Efecto de Bz-Arg-NHC₁₀ sobre los valores de polarización generalizada del Laurdan

El Laurdan (Figura 5.6) es una molécula perteneciente a la familia de las sondas fluorescentes sensibles a la polaridad del entorno, y es comúnmente utilizada para detectar cambios en las propiedades de fase de las membranas y diferencias en el orden de los fosfolípidos. La evaluación en los cambios en la fluidez de estas membranas es posible debido a la sensibilidad de la sonda a los efectos de relajación dipolar del solvente. El Laurdan se localiza en la interfase de la bicapa con la porción ácido láurico alineada en paralelo con las cadenas acilo de los fosfolípidos, en tanto que el residuo naftaleno, responsable de la fluorescencia, se localiza a nivel del esqueleto glicerol (Figura 5.6). Cuando se inserta en membranas lipídicas, la distribución de las moléculas de Laurdan es homogénea, acomodándose de forma indistinta tanto en la fase gel (más ordenada y con un entorno más rígido) como en la fase líquido-cristalina (más fluida). Debido a que las propiedades fluorescentes de la sonda varían en función de su entorno, de acuerdo con cuál de las fases sea la predominante en una determinada membrana,

se observará un corrimiento en el máximo del espectro de emisión de la sonda. Cuando las moléculas se ubican en fase gel se observará un corrimiento hacia el azul (máximo de intensidad cercano a 440 nm), mientras que el corrimiento será hacia el rojo (máximo de intensidad cercano a 490 nm) cuando se encuentran en fase líquido-cristalina (Figura 5.6). Este efecto es atribuido a un proceso de relajación dipolar, es decir, a la reorientación y cambio en la cantidad y/o movilidad de las moléculas de agua presentes en la interfase lipídica cerca del Laurdan (proceso de relajación dipolar) (Bagatolli & Gratton, 1999; Chong & Wong, 1993; Parasassi et al., 1990, 1991).

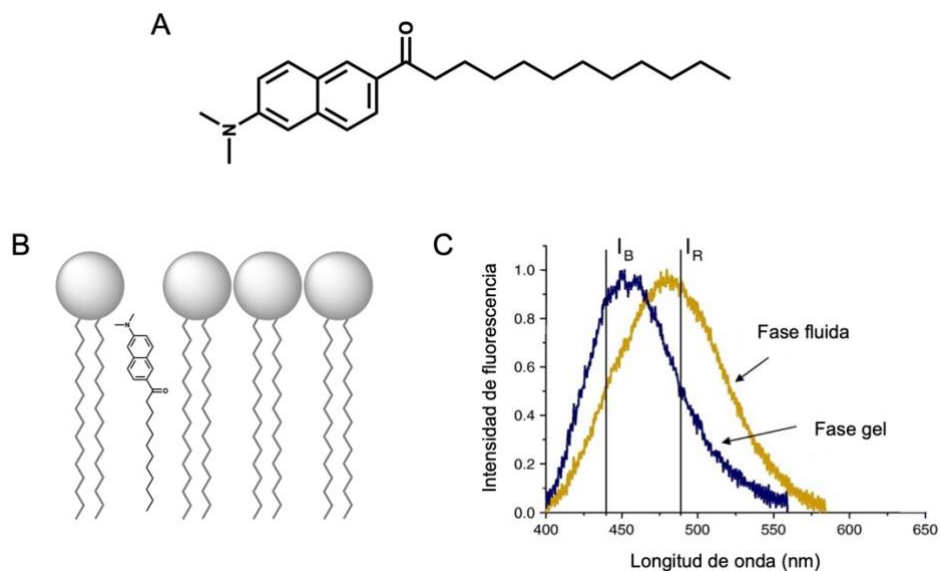


Figura 5.6 A) Estructura del Laurdan. B) Esquema de localización del Laurdan en la membrana lipídica. C) Espectro de emisión del Laurdan en membranas en fase gel (línea azul) y en fase fluida (amarilla), gráfico adaptado de Bagatolli (2006).

Los cambios en el espectro de emisión de fluorescencia del Laurdan pueden ser cuantificados mediante el cálculo de la polarización generalizada o GP (Parasassi et al., 1991). Este valor de GP puede variar entre -1 (exposición total al solvente) y +1 (sin

efecto del solvente), siendo mayor cuando se observa una menor relajación dipolar, lo que indica un entorno más rígido (Sanchez et al., 2012). En este sentido, se han demostrado valores característicos de GP tanto para la fase gel (GP = 0,6) como para la fase líquido-cristalina (GP = -0,2) (Parasassi et al., 1991).

En este contexto se calcularon los valores de GP para las formulaciones SPC20C10 y SPC, cuyos resultados se muestran en la Figura 5.7. Para la muestra control el valor de GP encontrado fue de $0,23 \pm 0,02$, en tanto que para la formulación que contenía Bz-Arg-NHC₁₀ el mismo fue de $0,179 \pm 0,009$. La disminución del GP observada en este último caso puede relacionarse con una mayor movilidad y/o penetración de las moléculas de agua en la región polar de la bicapa lipídica de los liposomas, sugiriendo que el Laurdan se ubicaría en un entorno menos ordenado. Estos resultados indicarían que Bz-Arg-NHC₁₀ contribuye a la desorganización de la membrana de los liposomas, alterando el empaquetamiento de los fosfolípidos.

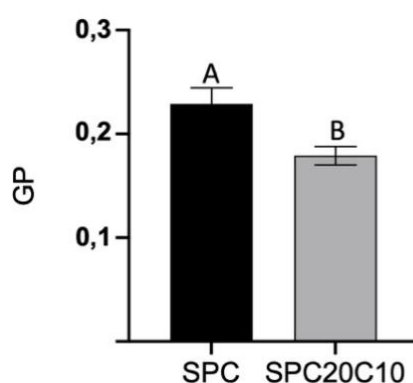


Figura 5.7 Valores de GP para los liposomas de SPC en ausencia (SPC) y presencia de un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀. Los valores se expresan como la media \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Las letras mayúsculas indican muestras con diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el *test* de Tukey ($p < 0.05$).

4 Conclusión

En este capítulo se evaluó el potencial uso de los surfactantes Bz-Arg-NHC_n, como activadores de borde para la formación de liposomas ultradeformables. Se obtuvieron y caracterizaron liposomas conteniendo SPC y 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀ (SPC20C10) o de Bz-Arg-NHC₁₂ (SPC20C12).

De los ensayos de ultradeformabilidad realizados se pudo ver que la formulación SPC20C12 presentó valores bajos de D (elasticidad del liposoma), similar al obtenido para liposomas no deformables, cuya composición fue únicamente de SPC. Este parámetro indicaría que Bz-Arg-NHC₁₂ no actúa como activador de borde para la formación de liposomas ultradeformables. Por el contrario, aquellas formulaciones conteniendo Bz-Arg-NHC₁₀ sí podrían ser clasificados como liposomas deformables, evidenciado por un elevado valor de D, lo que implica que los liposomas resultantes luego de añadir un 20 mol% de Bz-Arg-NHC₁₀ son capaces de atravesar poros de tamaño mucho menor que su propio diámetro. Esta característica sugiere que Bz-Arg-NHC₁₀ sería una potencial herramienta para la administración transdérmica de fármacos. Los cambios inducidos por el surfactante se verían reflejados en el aumento de la fluidez de las membranas de los liposomas, lo cual fue corroborado mediante la determinación del valor GP para el Laurdan.

Además, se evaluó la estabilidad de las formulaciones y se encontró que en aquellas que contenían Bz-Arg-NHC₁₀ fue menor que la hallada para los liposomas control, SPC. Luego de los 30 días de almacenamiento se observó un gran aumento tanto

en su tamaño como en el PDI, lo cual podría deberse a la fusión de los liposomas favorecida por la presencia del surfactante. Por el contrario, los liposomas sin surfactantes fueron estables durante 60 días, aunque también se evidenció un aumento de su tamaño pasado ese tiempo.

Adicionalmente, se estudió la citotoxicidad de la formulación SPC20C10 con dos líneas celulares: una de queratinocitos humanos (HaCat) y otra línea de macrófagos murinos (J774A.1). El porcentaje de viabilidad celular fue evaluado luego de 24 y 48 h de incubación con las formulaciones. En general, se pudo observar que la presencia de Bz-Arg-NHC₁₀ en los liposomas conlleva a un aumento en la toxicidad de la formulación, evidenciado por una disminución en la viabilidad celular.

En resumen, la evidencia recopilada en este capítulo sugiere que el surfactante Bz-Arg-NHC₁₀ podría emplearse en el desarrollo de nuevos sistemas de administración transdérmica, específicamente a través de su empleo como activador de borde en liposomas ultradeformables. Sin embargo, debido a la citotoxicidad encontrada en las líneas celulares ensayadas su aplicación se vería limitada.

5 Referencias

- Abramovits, W., Granowski, P., & Arrazola, P. (2010). Applications of nanomedicine in dermatology: use of nanoparticles in various therapies and imaging. *Journal of Cosmetic Dermatology*, *9*, 154–159.
- Bagatolli, L. A. (2006). To see or not to see: Lateral organization of biological membranes and fluorescence microscopy. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1758, Issue 10, pp. 1541–1556). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.05.019>
- Bagatolli, L. A., & Gratton, E. (1999). Two-photon fluorescence microscopy observation of shape changes at the phase transition in phospholipid giant unilamellar vesicles. *Biophysical Journal*, *77*(4), 2090–2101. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77050-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77050-5)
- Baroli, B. (2010). Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? In *Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 99, Issue 1, pp. 21–50). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jps.21817>
- Benson, H. A. E. (2016). Vesicles for transdermal delivery of peptides and proteins. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers* (pp. 297–307). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47862-2_19
- Böttcher, C. J. F., van gent, C. M., & Pries, C. (1961). A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Analytica Chimica Acta*, *24*(C), 203–204. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(61\)80041-X](https://doi.org/10.1016/0003-2670(61)80041-X)
- Carita, A. C., Eloy, J. O., Chorilli, M., Lee, R. J., & Leonardi, G. R. (2018). Recent Advances and Perspectives in Liposomes for Cutaneous Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry*, *25*(5), 606–635. <https://doi.org/10.2174/0929867324666171009120154>

- Cevc, G., & Blume, G. (1992). Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *BBA - Biomembranes*, *1104*(1), 226–232.
- Cevc, G., & Chopra, A. (2016). Deformable (Transfersome®) vesicles for improved drug delivery into and through the skin. In *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement: Nanocarriers* (pp. 39–59). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-47862-2_3
- Cevc, G., & Gebauer, D. (2003). Hydration-driven transport of deformable lipid vesicles through fine pores and the skin barrier. *Biophysical Journal*, *84*(2 1), 1010–1024. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74917-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74917-0)
- Chong, P. L.-G., & Wong, P. T. T. (1993). Interactions of Laurdan with phosphatidylcholine liposomes: a high pressure FTIR study. In *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Dragicevic, N., & Maibach, H. I. (2016). *Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement* (N. Dragicevic & H. I. Maibach, Eds.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-47862-2>
- el Maghraby, G. M. M., Williams, A. C., & Barry, B. W. (2006). Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *58*(4), 415–429. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.4.0001>
- Escobar-Chávez, J. J., Rodríguez-Cruz, I. M., Domínguez-Delgado, C. L., Torres, R. D.-, Revilla-Vázquez, A. L., & Aléncaster, N. C. (2012). Nanocarrier Systems for Transdermal Drug Delivery. In A. D. Sezer (Ed.), *Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/50314>
- Gupta, M., Agrawal, U., & Vyas, S. P. (2012). Nanocarrier-based topical drug delivery for the treatment of skin diseases. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 9, Issue 7, pp. 783–804). <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.686490>
- Higa, L. H., Arnal, L., Vermeulen, M., Perez, A. P., Schilrreff, P., Mundiña-Weilenmann, C., Yantorno, O., Vela, M. E., Morilla, M. J., & Romero, E. L. (2016). Ultradeformable

- archaeosomes for needle free nanovaccination with leishmania braziliensis antigens. *PLoS ONE*, 11(3), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150185>
- Hua, S. (2015). Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Frontiers in Pharmacology*, 6(SEP), 2011–2015. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00219>
- Hussain, A., Singh, S., Sharma, D., Webster, T. J., Shafaat, K., & Faruk, A. (2017). Elastic liposomes as novel carriers: Recent advances in drug delivery. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 12, pp. 5087–5108). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S138267>
- Izquierdo, M. C., Lillo, C. R., Bucci, P., Gómez, G. E., Martínez, L., Alonso, S. del V., Calienni, M. N., & Montanari, J. (2020). Comparative skin penetration profiles of formulations including ultradeformable liposomes as potential nanocosmeceutical carriers. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(11), 3127–3137. <https://doi.org/10.1111/jocd.13410>
- Latter, G., Grice, J. E., Mohammed, Y., Roberts, M. S., & Benson, H. A. E. (2019). Targeted topical delivery of retinoids in the management of acne vulgaris: Current formulations and novel delivery systems. In *Pharmaceutics* (Vol. 11, Issue 10). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100490>
- Mihrianyan, A., Ferraz, N., & Strømme, M. (2012). Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. In *Progress in Materials Science* (Vol. 57, Issue 5, pp. 875–910). <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2011.10.001>
- Mishra, B., Patel, B. B., & Tiwari, S. (2010). Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. In *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (Vol. 6, Issue 1, pp. 9–24). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.008>
- Mohanraj, V. J., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles-A Review. In *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* (Vol. 5, Issue 1). <http://www.tjpr.freehosting.net>
- Müller-Goymann, C. C. (2004). Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles

- for topical administration. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Vol. 58, Issue 2, pp. 343–356).
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.028>
- Ogunsola, O. A., Kraeling, M. E., Zhong, S., Pochan, D. J., Bronaugh, R. L., & Raghavan, S. R. (2012). Structural analysis of “flexible” liposome formulations: New insights into the skin-penetrating ability of soft nanostructures. *Soft Matter*, 8(40), 10226–10232. <https://doi.org/10.1039/c2sm26614h>
- Parasassi, T., de Stasio, G., d’Ubaldo, A., & Gratton, E. (1990). Phase fluctuation in phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 57(6), 1179–1186. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(90\)82637-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(90)82637-0)
- Parasassi, T., de Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M., & Gratton, E. (1991). Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 60(1), 179–189. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82041-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82041-0)
- Parasassi, T., De Stasio, G., Ravagnan, G., Rusch, R. M., & Gratton, E. (1991). Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophysical Journal*, 60(1), 179–189. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82041-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82041-0)
- Perez, A. P., Altube, M. J., Schilrreff, P., Apezteguia, G., Celes, F. S., Zacchino, S., de Oliveira, C. I., Romero, E. L., & Morilla, M. J. (2016). Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: Formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 139, 190–198. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.12.003>
- Sanchez, S. A., Tricerri, M. A., & Gratton, E. (2012). Laurdan generalized polarization fluctuations measures membrane packing micro-heterogeneity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(19), 7314–7319. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118288109>
- Santos, A. C., Morais, F., Simões, A., Pereira, I., Sequeira, J. A. D., Pereira-Silva, M., Veiga, F., & Ribeiro, A. (2019). Nanotechnology for the development of new cosmetic

- formulations. In *Expert Opinion on Drug Delivery* (Vol. 16, Issue 4, pp. 313–330). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17425247.2019.1585426>
- Schäfer-Korting, M., Mehnert, W., & Korting, H. C. (2007). Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 59, Issue 6, pp. 427–443). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.006>
- Schaller, M., & Korting, H. C. (1996). Interaction of liposomes with human stratum corneum skin: the role of the. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 18).
- Souto, E. B., Macedo, A. S., Dias-Ferreira, J., Cano, A., Zielińska, A., & Matos, C. M. (2021). Elastic and Ultradeformable Liposomes for Transdermal Delivery of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9743. <https://doi.org/10.3390/ijms22189743>
- Subba Reddy, K., Durga Srinivasa Rao, M., & Venkatesh, P. (2022). A review on: liposomes. *International Journal of Indigenous Herbs and Drugs*, 7(1), 8–11. <https://doi.org/https://doi.org/10.46956/ijihd.v7i1.271>
- van den Bergh, B. A. I., Wertz, P. W., Junginger, H. E., & Bouwstra, J. A. (2001). B.A.I. 6an den Bergh et al. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 217). www.elsevier.com/locate/ijpharm
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In Cree I. (eds) *Cancer Cell Culture. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* (Vol. 731, pp. 237–245). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20

Capítulo VI

CONCLUSIONES GENERALES

1. Conclusiones Generales

El desarrollo y producción de surfactantes de base biológica ha despertado un gran interés en los últimos años. Esto se debe principalmente a las propiedades que poseen este tipo de compuestos, entre las cuales se encuentran su alta biodegradabilidad y biocompatibilidad, baja toxicidad, alta actividad superficial, estabilidad bajo extremas condiciones de temperatura, pH y salinidad, diversidad en su estructura y actividad biológica, entre otras. Además, dadas sus características estructurales, pueden emplearse para su obtención recursos renovables. Todas estas propiedades hacen que los surfactantes de base biológica sean de preferencia frente a los surfactantes tradicionales derivados del petróleo (Gudiña et al., 2016; Morán et al., 2004). Entre los tensioactivos de base biológica, aquellos derivados de aminoácidos constituyen una prometedora familia de surfactantes ya que poseen todas las propiedades mencionadas previamente, incluyendo un bajo impacto ambiental y amplia actividad antimicrobiana. La multifuncionalidad de estos compuestos los convierte en aditivos atractivos para diversas formulaciones cosméticas y farmacéuticas. (Clapés & Infante 2002).

Los surfactantes catiónicos han sido ampliamente utilizados como agentes antimicrobianos en diversos campos, como por ejemplo en la industria alimenticia y farmacéutica. A diferencia de los antibióticos tradicionales, estos compuestos ejercen su actividad antimicrobiana principalmente al desintegrar la membrana bacteriana mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Hoque et al., 2012, 2015). Aunque es difícil para las bacterias eludir este mecanismo inespecífico de alteración de

la membrana, el enorme consumo de surfactantes en todo el mundo ha provocado su acumulación en el medio ambiente, lo que ejerce una presión selectiva sobre las bacterias y desencadena la aparición de resistencia a los agentes antimicrobianos (Jennings et al., 2016). Durante las últimas décadas, con la creciente conciencia ambiental ejercida sobre el sector industrial, se han dedicado grandes esfuerzos al desarrollo de tensioactivos antimicrobianos altamente eficientes para minimizar sus dosis, y que además sean biodegradables y considerablemente menos tóxicos.

En el presente trabajo se obtuvieron alquilamidas derivadas de arginina (N^α -benzoil arginina alquilamidas, Bz-Arg-NHC_n) mediante el empleo de estrategias biocatalíticas, las cuales fueron estudiadas y caracterizadas a lo largo del mismo. En el Capítulo II, dichos surfactantes fueron caracterizados fisicoquímicamente mediante la determinación de su concentración micelar crítica (CMC) a través de medidas de tensión superficial. Se halló que estos compuestos poseen valores de CMC mucho menores que otros surfactantes derivados de arginina (Pinazo et al., 2019). Esto podría deberse a que el balance hidrofílico-hidrofóbico de Bz-Arg-NHC_n, debido a la presencia del grupo benzoílo, produce el incremento en la tendencia del surfactante a autoagregarse en solución. Además, el proceso de micelización de este tipo de compuestos se ve afectado por la presencia de sales en el medio; por lo general, el valor de la CMC de surfactantes iónicos disminuye al aumentar la concentración de sales. La magnitud de este fenómeno depende de diferentes factores, como lo son la fuerza iónica del medio y la naturaleza del contraión del surfactante. Esto se evidenció al determinar el valor de CMC de los surfactantes en buffer PBS, los cuales fueron menores a los valores ya reportados de CMC en H₂O (Fait et al., 2017). Asimismo, al cambiar el contraión del surfactante, de

cloruro a bromuro, también se observó una disminución en su CMC. En el primer caso, la disminución en este valor es una consecuencia de la reducción de las fuerzas electrostáticas de repulsión entre los grupos de la cabeza del anfifilo, debido a un efecto protector electrostático ejercido por los iones presentes en el medio, y el aumento de las interacciones entre las colas hidrofóbicas. Como consecuencia, se produce un incremento en el número de monómeros de surfactante por micela (Helenius et al., 1979).

Por otra parte, se comprobó la actividad antimicrobiana de Bz-Arg-NHC₁₀ frente a diversas cepas bacterianas y, con el objetivo de elucidar su mecanismo de acción, se evaluó su interacción con un sistema modelo de membrana compuesto por DPPC. Los resultados obtenidos en el Capítulo III indican que Bz-Arg-NHC₁₀ sería capaz de penetrar en la membrana de las células bacterianas, provocando su desorganización y consecuentemente ejerciendo así su efecto biocida. Además, a concentraciones mayores de surfactante, al saturarse la membrana con los monómeros, se removerían lípidos de la misma, liberándose micelas mixtas lípido-surfactante. En resumen, tanto la liberación de micelas mixtas como la desorganización de la membrana serían los procesos responsables del efecto antimicrobiano mostrado por este compuesto.

A diferencia de los resultados reportados para otros surfactantes derivados de arginina análogos a Bz-Arg-NHC₁₀, como se mencionó en el Capítulo III, este compuesto mostró una actividad antimicrobiana de amplio espectro, siendo efectivo incluso frente a microorganismos resistentes a los surfactantes análogos. Este resultado podría explicarse en base a las diferencias estructurales entre estos tensioactivos y

Bz-Arg-NHC₁₀, lo cual resultaría en distintas interacciones de estos compuestos con la superficie celular y la membrana bacteriana. Este comportamiento podría atribuirse a la presencia del grupo benzoílo el cual, como se mencionó previamente, incrementa el carácter hidrofóbico del surfactante mejorando así su habilidad para penetrar en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Un efecto similar fue observado por Perinelli y colaboradores, quienes reportaron que la presencia de un grupo *N*-benzoílo en surfactantes derivados de aminoácidos aumentaba su efecto antimicrobiano. Este comportamiento fue atribuido al aumento de la hidrofobicidad de la molécula (Perinelli et al., 2019).

En base a los resultados obtenidos en estos capítulos, se comprobaría la primera parte de la hipótesis de este plan de Tesis Doctoral, la cual establecía el potencial uso de Bz-Arg-NHC₁₀ como agente biocida. En cuanto al mecanismo de acción, para poder extrapolar los resultados obtenidos en este trabajo con el modelo de membrana compuesto solamente por DPPC a la membrana bacteriana, se considera necesario realizar estudios adicionales empleando otros lípidos que abunden en membranas bacterianas, como la fosfatidiletanolamina.

Por otro lado, en los Capítulos IV y V se evaluó la potencial aplicación de Bz-Arg-NHC_n para mejorar la administración transdérmica de moléculas terapéuticas a través de la piel (TDD). A pesar de que la principal función de la piel es la de establecer una barrera protectora frente a agentes externos, esta se ha convertido en un sitio de preferencia para la liberación de drogas que necesiten ejercer tanto un efecto local (tópico) como sistémico (transdérmico). Esto se debe a las numerosas ventajas que esta

vía presenta, entre las cuales se pueden mencionar su fácil acceso, amplia superficie de aplicación, un mejor control de los niveles en sangre del fármaco y reducción de la toxicidad sistémica, entre otras (Nokhodchi et al., 2003). Como se mencionó en los capítulos previos, la principal desventaja que presenta la TDD se debe a la función de barrera que posee la piel, en particular la ejercida por el estrato córneo (SC). Existen distintas estrategias que pueden llevarse a cabo para superar estos inconvenientes, entre las cuales se puede mencionar el uso de potenciadores de penetración (PP) o la realización de cambios en las técnicas pasivas de permeación. En este sentido, el uso de activadores de borde para la obtención de liposomas ultradeformables tiene este objetivo.

En primer lugar, en el Capítulo IV se abordó el estudio de Bz-Arg-NHC_n como posibles potenciadores de penetración de moléculas terapéuticas a través de la piel, así como de su mecanismo de acción. Para esto se evaluó su interacción con sistemas modelo de membrana compuestos por una mezcla lipídica que mimetizaban tanto la composición como la función de barrera del estrato córneo (SCM), y se contrastaron los resultados obtenidos frente a aquellos inducidos por un potenciador de penetración conocido, el ácido oleico (OA), y un no potenciador, el ácido esteárico (SA). Se tomó como modelo las monocapas lipídicas, las cuales representan un sistema estructural y químicamente simplificado. Aunque este modelo difiere en varias propiedades del estrato córneo, ha sido ampliamente utilizado en la literatura y de su estudio se puede extraer información valiosa sobre las propiedades del SC de la piel (Bouwstra et al., 2003; Janůšová et al., 2011; Školová et al., 2013). Además, estos estudios fueron complementados con la construcción de un modelo de dinámica molecular (DM) a

escala atómica. Este sistema permitió no solo reforzar las observaciones experimentales, sino también investigar el comportamiento molecular de cada componente en cada uno de los sistemas y extraer información relevante la cual no es accesible frente a otras técnicas experimentales.

Los resultados obtenidos en el Capítulo IV, tanto mediante las técnicas experimentales como las de simulación, evidenciaron que ambos surfactantes alteran las propiedades reológicas de las membranas modelo del SC al reducir el parámetro del módulo de compresibilidad, lo que indica un aumento en la elasticidad de la membrana. Este efecto se encuentra regularmente en la literatura para diferentes PP de naturaleza anfifílica. Por el contrario, el compuesto no PP muestra una alta tendencia a incorporarse a las monocapas SCM, pero carece de la capacidad de aumentar la elasticidad de la película. Adicionalmente, los resultados de DM indicaron una reducción de los parámetros de orden de enlace carbono-hidrógeno para los componentes de la membrana SCM en presencia de Bz-Arg-NHC_n, la cual fue incluso más pronunciada que la obtenida en presencia de OA. Teniendo en cuenta que en la literatura se propone como mecanismo de acción que los PP lipofílicos tienen un efecto de desorden o fluidificante sobre las cadenas lipídicas del SC, el hallazgo de un fuerte efecto fluidificante por parte de Bz-Arg-NHC_n constituye una característica relevante para su función como PP. En reportes iniciales se propuso que el OA ejerce su función farmacológica al inducir la separación de fases de los lípidos del SC, lo cual fue confirmado además por estudios de la estructura lateral de la membrana lipídica del SC a escala nanométrica. Este mismo efecto fue observado para Bz-Arg-NHC_n mediante los experimentos con AFM, mostrando un comportamiento similar al OA. Por otro lado,

también se encontró que tanto Bz-Arg-NHC₁₀ como Bz-Arg-NHC₁₂ pueden alterar el equilibrio de fase de SCM favoreciendo la fase expandida y delgada. Un resultado similar fue encontrado mediante DM.

Recientemente se ha propuesto un mecanismo de acción de los PP (Zulueta Díaz et al., 2020), en el cual los mismos se concentrarían en la fase lipídica de menor espesor de las membranas SCM, ejerciendo un efecto adelgazante e incrementando la deformabilidad de la membrana, lo cual se traduce en un aumento de la elasticidad de la misma. Estas alteraciones físicas favorecerían la inserción de compuestos activos en el SC, que a su vez experimentarían un mecanismo de partición-difusión a través de las capas del SC, contribuyendo así a la permeación cutánea de los fármacos.

En resumen, los resultados obtenidos en este Capítulo concuerdan con el mecanismo de potenciación de la penetración propuesto en la literatura, basado en un efecto desordenador o fluidificante sobre las cadenas lipídicas y/o la inducción de la separación de dichas fases. Se relaciona un aumento en la elasticidad de las membranas SCM con la presencia de los potenciadores de permeación anfifílicos. La desestabilización de la fase lamelar a microescala, así como la alteración de la nanoestructura lateral en el plano, podrían tener una importancia fundamental en el mecanismo de mejora de la permeación.

Finalmente, en el Capítulo V se estudió el uso de Bz-Arg-NHC_n para la obtención de liposomas ultradeformables (UD). Estos son sistemas vesiculares de bicapas biocompatibles que pueden transportar numerosas drogas con fines terapéuticos, bioquímicos y cosméticos, y poseen la ventaja de que pueden sortear los inconvenientes

que enfrentan los vehículos tradicionales para *drug delivery* debido a sus propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas mejoradas. Para la formación de liposomas UD es necesario la presencia de un activador de borde, el cual desestabiliza la bicapa lipídica aumentando la deformabilidad del liposoma. Por lo tanto, en este Capítulo se evaluó la posible aplicación de los surfactantes derivados de arginina como activadores de borde (EA) de liposomas compuestos por fosfatidilcolina de soja (SPC). Los resultados obtenidos indican que solo uno de ellos, Bz-Arg-NHC₁₀, fue capaz de actuar como EA dando lugar a liposomas UD. Este resultado distinto entre ambos surfactantes podría deberse a la diferencia estructural que presentan. Debido a que Bz-Arg-NHC₁₀ posee una cadena hidrocarbonada más corta, se produciría una mayor desestabilización de los lípidos de la membrana, otorgándole deformabilidad al liposoma. Por el contrario, el surfactante Bz-Arg-NHC₁₂ al poseer una cadena hidrocarbonada más larga, la diferencia con el largo de las cadenas hidrocarbonadas de SPC no es suficiente como para desestabilizar la interacción entre los lípidos y permitirle al liposoma adoptar la característica de ultradeformabilidad. No obstante, al evaluar la citotoxicidad de la formulación de liposomas conteniendo Bz-Arg-NHC₁₀, se encontró que la presencia del surfactante conlleva a un aumento en la toxicidad de la formulación, lo cual se evidenció por una disminución en la viabilidad celular. Esto podría verificarse a través de estudios futuros, modificando la formulación propuesta en este trabajo mediante el empleo de menores concentraciones de surfactante para evaluar si aún se conserva la característica de ultradeformabilidad y si se reduce la citotoxicidad de dicha formulación.

Los estudios abordados en los dos últimos capítulos previos permitieron comprobar la segunda parte de la hipótesis planteada originalmente en este trabajo de tesis. En este sentido, queda demostrado que se podría considerar la implementación de ambos surfactantes como herramientas para mejorar la penetración de moléculas terapéuticas a través de la piel, ya sea directamente como potenciadores de penetración o, en el caso de Bz-Arg-NHC₁₀, a través del empleo liposomas ultradeformables, generando expectativas interesantes para futuros estudios relacionados con esta temática.

2. Bibliografía

- Bouwstra, J. A., Honeywell-nguyen, P. L., & Gooris, G. S. (2003). Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*, *42*, 1–36.
- Fait, M. E., Hermet, M., Comelles, F., Clapés, P., Alvarez, H. A., Prieto, E., Herlax, V., Morcelle, S. R., & Bakás, L. (2017). Microvesicle release and micellar attack as the alternative mechanisms involved in the red-blood-cell-membrane solubilization induced by arginine-based surfactants. *RSC Advances*, *7*(60). <https://doi.org/10.1039/c7ra03640j>
- Gudiña, E. J., Rodrigues, A. I., de Freitas, V., Azevedo, Z., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2016). Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresource Technology*, *212*, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.027>
- Helenius, A., McCaslin, D. R., Fries, E., & Tanford, C. (1979). Properties of Detergents. *Methods in Enzymology*, *56*(C), 734–749. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)56066-2](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)56066-2)
- Hoque, J., Akkapeddi, P., Yarlagadda, V., Uppu, D. S. S. M., Kumar, P., & Haldar, J. (2012). Cleavable cationic antibacterial amphiphiles: Synthesis, mechanism of action, and cytotoxicities. *Langmuir*, *28*(33), 12225–12234. <https://doi.org/10.1021/la302303d>
- Hoque, J., Konai, M. M., Samaddar, S., Gonuguntala, S., Manjunath, G. B., Ghosh, C., & Haldar, J. (2015). Selective and broad spectrum amphiphilic small molecules to combat bacterial resistance and eradicate biofilms. *Chemical Communications*, *51*(71), 13670–13673. <https://doi.org/10.1039/c5cc05159b>
- Janůšová, B., Zbytovská, J., Lorenc, P., Vavrysová, H., Palát, K., Hrabálek, A., & Vávrová, K. (2011). Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes.

- Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(3), 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2010.12.003>
- Jennings, M. C., Minbiole, K. P. C., & Wuest, W. M. (2016). Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. In *ACS Infectious Diseases* (Vol. 1, Issue 7, pp. 288–303). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00047>
- Morán, C., Pinazo, A., Pérez, L., Clapés, P., Angelet, M., García, M. T., Vinardell, M. P., & Infante, M. R. (2004). “Green” amino acid-based surfactants. In *Green Chemistry* (Vol. 6, Issue 5, pp. 233–240). <https://doi.org/10.1039/b400293h>
- Nokhodchi, A., Shokri, J., Dashbolaghi, A., & Hassan-zadeh, D. (2003). *Nokhodchi-2003-The enhancement effe.pdf*. 250, 359–369.
- Perinelli, D. R., Petrelli, D., Vllasaliu, D., Vitali, L. A., Bonacucina, G., Cespi, M., Giorgioni, G., & Palmieri, G. F. (2019). Quaternary ammonium leucine-based surfactants: The effect of a benzyl group on physicochemical properties and antimicrobial activity. *Pharmaceutics*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060287>
- Pinazo, A., Pérez, L., Morán, C., & Pons, R. (2019). Arginine-Based Surfactants: Synthesis, Aggregation Properties, and Applications. In *Biobased Surfactants* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812705-6.00013-7>
- Školová, B., Januššová, B., Zbytovská, J., Gooris, G., Bouwstra, J., Slepíčka, P., Berka, P., Roh, J., Palát, K., Hrabálek, Al., & Vávrová, K. (2013). Ceramides in the skin lipid membranes: Length matters. *Langmuir*, 29(50), 15624–15633. <https://doi.org/10.1021/la4037474>
- Zulueta Díaz, Y. M., Menghi, K., Guerrero, M. L., Nocelli, N., & Fanani, M. L. (2020). L-Ascorbic acid alkyl esters action on stratum corneum model membranes: An insight into the mechanism for enhanced skin permeation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 185(April 2019), 110621. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110621>

Apéndice

PUBLICACIONES



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

Bromide counterion as a spectroscopic sensor at the interface of cetyltrimethylammonium micelles

Melisa Hermet, Laura Bakás, Susana R. Morcelle, Delia L. Bernik*

Plant Proteins Research Center (CIProVe), National University of La Plata, Calles 47 y 115, CP1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 February 2019

Received in revised form 31 May 2019

Accepted 9 June 2019

Keywords:

Bromide absorption

UV spectra

Cetyltrimethylammoniumbromide

Micelles

Pyrene excimer

Interface

CTAB

ABSTRACT

The strong UV absorption of the bromide in aqueous solution undergoes a remarkable red shift of more than 10 nm induced by the addition of the salts that constitute a saline buffer. The maximum absorption wavelength of the bromide is displaced from approximately 194 nm in ultrapure water to wavelengths above 200 nm, depending on the composition of the solution. The bromide spectrum as counterion of the cetyltrimethylammonium in the surfactant CTAB also shows sensitivity to the aggregation behavior of the tensioactive, being able to detect intermolecular interactions even at concentrations lower than the critical micelle concentration. And, when the micelles are assembled, the bromide absorption detects the interfacial rearrangements caused by the incorporation of ions. To know more about those interfacial features, the pyrene molecular probe was used, taking advantage of the extensive knowledge of its spectroscopy. Pyrene verifies the existence of changes in the interfacial organization which confirm that the sensitivity of the bromide spectrum is based on the ability of the ion to detect its microenvironment, and therefore reaffirms that its absorption spectrum can be used as a local sensor. The present work encourages the use of bromide as a sensor ion in the UV region between 190 and 210 nm, which would avoid the introduction of external molecular probes that could disturb the system.

© 2019 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Interfaces in biological systems are the gateway for molecules and ions, an unavoidable path for communication. The use of model systems of interfaces and their study by means of molecular probes always offers new information that is worth analyzing to build the puzzle, the global picture. As simple models, micelles are a preferred study system, since parameters such as composition, charge, size, among others, can be widely and simply modulated.

For structural studies it would be ideal to have a spectroscopic sensor not foreign to the system, to gather information without altering the molecular organization by introducing a probe. Here we show that bromide can be that sought constituent. This halide, a regular counterion of several tensioactives, has already shown to have particular characteristics from the structural point of view, imparting concrete adsorption and aggregation properties [1,2]. The absorption spectra of undissociated molecules of alkali halides have been determined in the vapor phase, where the bromide shows a strong absorption band near 200 nm [3]. More recently, the absorption of calcium bromide was suggested as analytical methodology for the determination of bromide in samples [4,5].

The results reported here show another aspect that takes advantage of the strong UV absorption of the bromide ions in aqueous solutions. Using simple spectrophotometers the remarkable changes in the bromide absorption spectrum can be used to study the relationship of the halide ion with its counterion and other molecules in solution. In many cases these absorption of bromide in solution have been ignored or disregarded. This could have been because the wavelengths of bromide absorption in ultrapure water, centered at about 193 nm, are far from the range of absorption of many chromophoric groups. This work shows that, depending on the solution composition, bromide absorption can displace at 205 nm or even to longer wavelengths, and with a high molar absorptivity. Moreover, in particular cases where bromide is the counterion of molecules experiencing self-aggregation, such as surfactants, the changes in its absorption spectrum acts as a sensor of aggregation and interaction with other ions or molecules bound or inserted at the interfacial region, interactively detecting its microenvironment.

With this purpose we use CTAB, cetyltrimethylammonium bromide, to find out about the sensitivity of the bromide spectra. CTAB is, in turn, representative of the quaternary ammonium surfactants, known as QAS, an extensive family of cationic tensioactives with wide application in fields such as gene transfection, in analytical separation techniques, and as antimicrobial agents [6–8]. Whatever the process faced by a QAS surfactant, the action involves unarguably an interaction at the

* Corresponding author.

E-mail address: dbernik@biol.unlp.edu.ar (D.L. Bernik).

interface level with a leading role of the quaternary ammonium, where the counterion also plays a significant part in the overall process. As a witness to these phenomena, the pyrene (Py) molecular probe was used, taking advantage of the extensive knowledge of its spectroscopy. Throughout the work we present the parallel results obtained with both molecules in order to better interpret the changes observed.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Hexadecyltrimethylammonium bromide was purchased from Ciccarelli. Pyrene (Py) was provided by Sigma-Aldrich (99.0% pure). Ultrapure water was MilliQ® grade. All the other reagents were of analytical grade.

2.2. Sample preparation

CTAB solutions were prepared by weighing the appropriate amount of surfactant and dissolving it in the corresponding water solution with gentle mixing. Pyrene stock solution was prepared by dissolving a small amount of solid in ethanol checking its concentration by absorbance using the molar absorption coefficient (ϵ) $54,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 335 nm [9]. Small aliquots of this concentrated stock were added to the surfactants samples just prior to the absorbance and fluorescence measurements in a way that the ethanol final ratio to water was always below 1% v/v. All surfactant solutions and samples were prepared in plastic (PP) volumetric materials in order to diminish both pyrene and surfactant adsorption to the glass walls. PBS was prepared such that the osmolarity results isotonic with biological material (300 mOsm/L); 123.3 mM NaCl, 22.2 mM Na_2HPO_4 , 5.6 mM KH_2PO_4 in ultrapure water (milliQ®), final pH 7.4 [10].

2.3. Absorbance and fluorescence measurements

Absorbance spectra were recorded with an Agilent 8453 and PGT60 spectrophotometers, using quartz and suprasil cuvettes with a path length of 1 cm. A Shimadzu RF1501 spectrofluorometer was used to record the pyrene fluorescence spectra, with excitation and emission fluorescence slits of 10 nm. The excitation wavelength was 335 nm and the emission wavelengths are indicated in the legends of the Figures. All the experiments were carried out at 22–25 °C.

3. Results and discussion

3.1. Bromide counterion and pyrene: two probes for the polar head region in micelles

Fig. 1a) shows the drastic change of bromide (CTAB) absorption spectra when changing from ultrapure deionized water to a biologically

isoosmotic saline buffer (PBS), reflected in a ten nanometers shift with a sharp reduction of bandwidth.

Simultaneously, the part b) in the Figure shows how the fluorescent probe Py senses the change at the interface: the black curve is the fluorescence spectrum when pyrene is associated to CTAB incipient micelles in pure water, CTAB- H_2O , whereas the blue curve is the one obtained in phosphate buffer saline, CTAB-PBS. Determination of the CMC in each media is detailed in the Supplementary material.

Impelled by these contrasts, we first studied changes in the absorption spectrum of bromide (i.e. CTAB) in different media. A parallel analysis of the information provided by the pyrene molecular probe allows us to propose an explanation of the structural changes that give rise to these remarkable differences. Being bromide herein the counterion of a surfactant molecule, we must also analyze the system below and above the critical micelle concentration of CTAB in the respective solutions.

3.2. Bromide counterion as sensor of other ions in solution

The strong absorption of halide ions in the far UV has been described earlier [11–13]. As a surfactant with bromide as counterion, the spectrum of a CTAB solution in ultrapure water gives a broad band centered at about 193–194 nm (Fig. 1a, black curve). The broadness of the band is due to an unresolved splitting of the bromide absorption, being the wavelengths of each component 191 ± 1 and 198 ± 2 nm [14,15].

The spectra shown in Fig. 1 were recorded in two media with differences in pH and in the content of salts. First it is necessary to find out if the pH difference between the one of water and that of PBS (7.4) influences the spectra. The pH of pure water is around 6, depending on temperature and pressure, due to dissolved carbon dioxide and its corresponding hydration and dissociation equilibrium [16]. We verified that the absorption spectrum of CTAB obtained in pure water and in 1.5 mM phosphate buffer pH 7.4 remained invariant. Hence, we tested the absorption of CTAB in aqueous solutions at increasing concentrations of sodium chloride (Fig. 2), since this salt is the most abundant component of the PBS buffer.

The spectra show a pronounced bathochromic shift of about ten nanometers and, in addition, a significant decrease in absorbance with the increase in salt concentration. At concentrations in the range of 10^{-5} M in PBS, that is, well below the CMC, CTAB spectra show a linear relationship between the maximum absorption value and the concentration. This allows calculating the molar absorption coefficient to be $5.65 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 202.5 nm (the maximum absorption wavelength at those surfactant concentrations). This is almost half the absorption coefficient previously reported for CTAB in ultrapure water at 194 nm ($\approx 1.15 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [14].

In the inset the spectra are shown normalized in order to compare with the spectra of CTAB in water and PBS previously shown in Fig. 1a; the similarity with that obtained in a 0.12 M NaCl solution

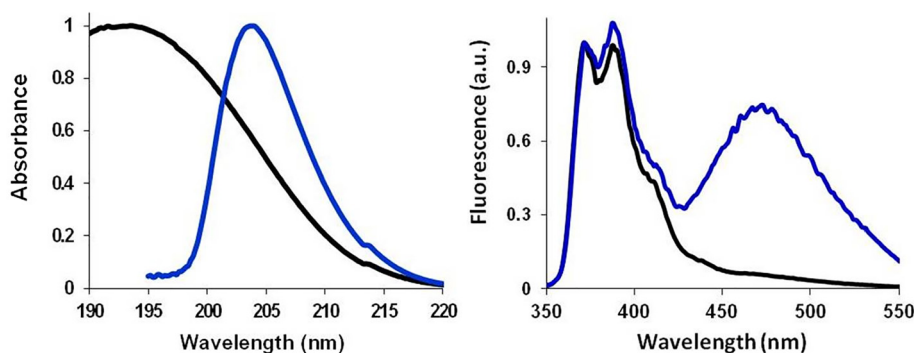


Fig. 1. a) Absorption spectra of bromide and b) fluorescence emission spectra of Py, in CTAB- H_2O (black curve) and CTAB-PBS (blue curve), at their respective CMC concentrations in each media (0.9 mM in ultrapure water and 0.5 mM in PBS). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

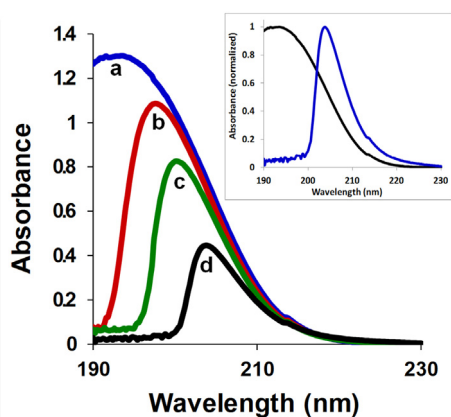


Fig. 2. Absorption spectra of a CTAB solution in: a-in ultrapure water (0.12 mM, upper curve), and after successive additions of aliquots of a NaCl solution to get in b, c and d NaCl concentrations of 0.052, 0.09 and 0.12 M, respectively. Inset: the spectra in pure water and in 0.12 M NaCl solution are normalized to show the similarity with the spectra in Fig. 1a.

suggests that the sodium chloride content in the PBS is the main source of the change.

It has been proposed that the sensitivity of the halide spectra originates in the influence of the dipole layers of the solvent molecules oriented around the ion. For example, in the case of iodide, previous studies showed that the low frequency peak of the first electronic absorption band changes markedly when the solvent or the temperature change. However, the absorption spectra of iodide do not change with the addition of sodium chloride, unlike the noticeable changes we obtained here with bromide [17].

3.3. Bromide as a sensor of aggregation

The sensitivity of the bromide to its microenvironment is not limited to the presence of salts in the solution. Even leaving the medium invariant, we observed changes in CTAB spectra simply by increasing its concentration, at a constant temperature. First, the CMC of CTAB in PBS was found to be 0.5 mM, using the Py fluorescent probe by a procedure detailed in the Supplementary material. Fig. 3 depicts the evolution of bromide absorption spectra in PBS at increasing CTAB concentrations. The progressive shift to wavelengths above 203 nm is noticeable; however,

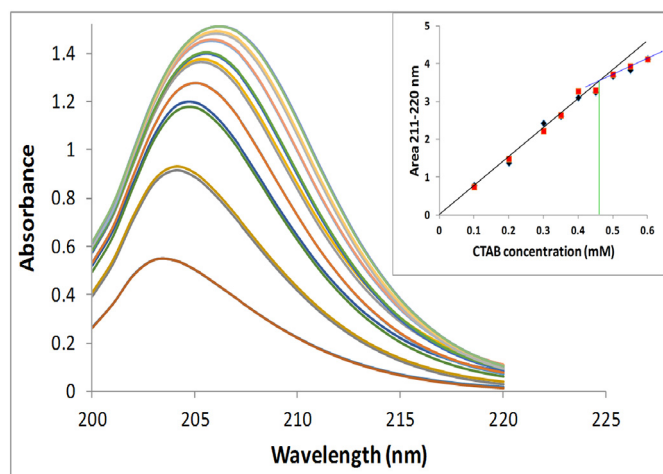


Fig. 3. Absorbance spectra of CTAB in PBS. From bottom to top CTAB concentrations are: 0.1, 0.2, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45, 0.5, 0.55 and 0.6 mM. The curves are shown in duplicate of different samples, to highlight the reproducibility. Inset: plot of the area under the curves between 210 and 230 nm, (region where the absorbance is less than 1) vs CTAB concentration. The two straight lines intercept at a value of 0.46 mM of CTAB.

given the high absorptivity, the exact values at the maxima of absorbance should be confirmed with shorter optical paths.

By integrating the area under the curve of each spectrum between 210 and 230 nm (a region where the absorbance is less than 1) we can construct the graph displayed in the inset. The plot of the areas as a function of CTAB concentration shows a change in the slope at about 0.46 mM CTAB, estimated from the intersection of two straight lines. This value is very similar to that found by means of Py fluorescence. Therefore, Fig. 3 is convincing evidence that the bromide absorption spectra are capable of detecting the aggregation of CTAB molecules to form micelles. Later in Section 3.6 we will return to this topic with additional studies in this regard.

3.4. Parallel spectroscopic studies with pyrene at the CTAB interface

Given the vast knowledge of pyrene spectroscopy, this molecular probe was used under conditions equivalent to those studied with bromide, in order to elucidate the structural features that give rise to the observed spectroscopic changes.

Fig. 1b shows that the fluorescent probe pyrene, when interacting with CTAB, also evidences a striking difference between the spectra displayed in pure water and in PBS. Given that Py interacts at the interface level, its absorption and fluorescence spectra were analyzed in similar conditions to those assayed with bromide, to gain more information on the system.

One distinctive characteristic of Py, an electron-rich polyaromatic hydrocarbon, is its excimer fluorescence in the cyano-green region of the spectrum (470–500 nm), which has been documented to be maximum at the CMC of a surfactant [18,19]. Indeed, the excimer signal at 480 nm is prominent at the CMC in CTAB-PBS samples, whereas it can hardly be observed in CTAB-H₂O. Taking into account that the excimer formation is directly related to the number of probe molecules in the micelle (called occupation number, N_{occ}), the assay was repeated for a wide range of Py concentrations, as shown in the Fig. 4.

From the spectra of Fig. 4, the characteristic I₃/I₁ ratio for the analysis of the information given by the Py is calculated as described in the Supplementary material. Also, the absorption spectra of same samples were analyzed simultaneously, to obtain as much information as possible; the results are shown in Fig. 5. The values of I₃/I₁ proved to be independent of the concentration of Py, either in PBS or in water and for concentrations of CTAB below, at or above the CMC in both media.

Below the CMC the I₃/I₁ ratio has the same value both in CTAB-H₂O and CTAB-PBS. Along increasing CTAB concentration in pure water the I₃/I₁ increases in total only 2%, whereas in CTAB-PBS the changes are noticeable, with increases of 10% and 23% at and above the CMC, respectively, in comparison with the average value obtained below the CMC. Hence, the magnitude of the change in the I₃/I₁ ratio is another noticeable difference between CTAB-H₂O and CTAB-PBS.

The absorption spectra of the samples whose fluorescence spectra are shown in Fig. 4 were recorded and analyzed. Some aspects worth to be highlighted are plotted in Fig. 5b. The absorption of Py in CTAB-PBS is much higher than in CTAB-H₂O at and above the CMC, as shown in the graph of absorption maxima versus the concentration of Py. The maximum absorption wavelength, initially at 335 nm below CMC in both media, remains unchanged in CTAB-H₂O but shifts to 337–338 nm in CTAB-PBS at and above the CMC. The invariance of Py spectra for concentrations at and above the CMC in CTAB-H₂O is remarkable, and appears to come from samples in the absence of micelles. The inset highlights the differences of pyrene absorption bands in CTAB-H₂O and CTAB-PBS above the CMC. The information given by these studies suggest, taking also into account the previously described I₃/I₁ ratios, that Py remains in the outermost region of the interface in the samples of CTAB-H₂O, without being able to enter the region of the palisade, experiencing a greater aggregation due to its restricted location.

A more extensive and detailed analysis is developed in the Supplementary material.

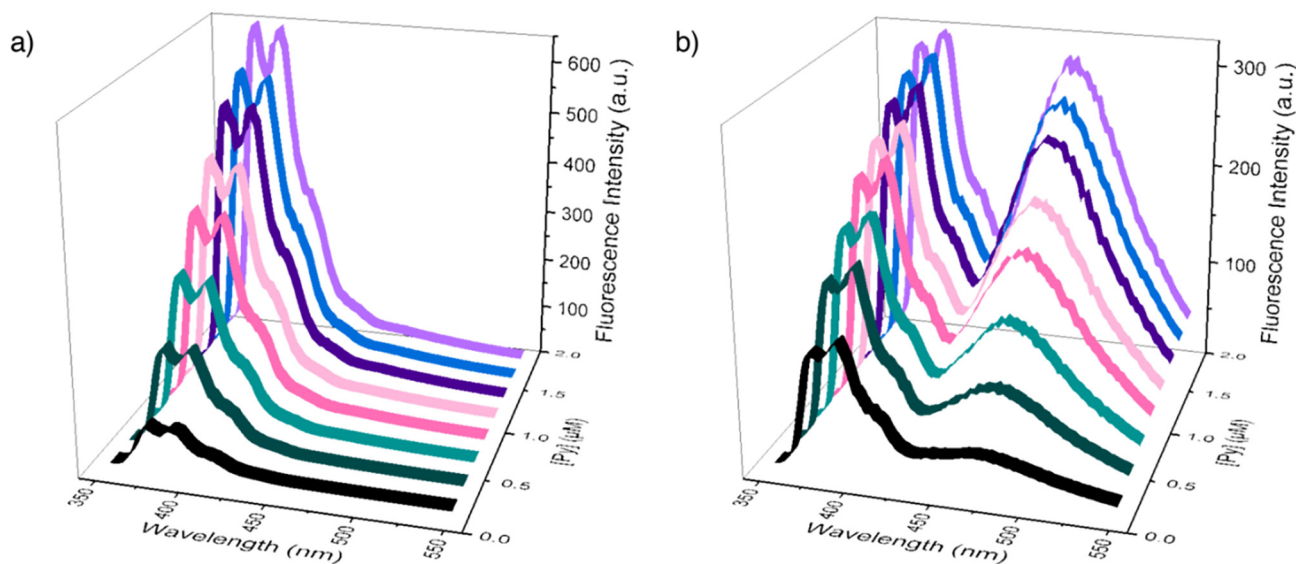


Fig. 4. Fluorescence emission spectra of increasing Py concentrations from 0.24 to 1.96 μM in a) CTAB-H₂O and b) CTAB-PBS at their respective CMC concentrations in each media (0.9 mM in water and 0.5 mM in PBS).

3.5. Relationship between bromide and pyrene spectra

In CTAB solutions in the absence of salts an intimate interaction between bromide and CTA⁺ is likely. According to preceding studies, some extent of ionic association as a solvent-shared ion pairs can be expected in pure water [20,21]. The addition of salt would weaken this ion-association and, by modifying the solvation layer of bromide, induces the shift from the broadband centered at 194 nm to a narrower band above 200 nm.

The formation of micelles undoubtedly generates an additional change in the microenvironment of the bromide. Some bromides may remain closely associated with their CTA⁺ counterion, but given the steric hindrance, there must be a redistribution of bromides between the Stern and diffuse layers. This would induce the changes in the absorption which allows the determination of the CMC by integrating the area under the spectra through the transition.

This analysis about the origin of the observed changes in bromide spectra is coherent with the information given by the molecular probe pyrene. It has been reported that the electron-deficient cetyltrimethylammonium ion (CTA⁺) selectively deactivates the

fluorescence of the Py excimer by dynamic quenching [22]. This quenching was early mentioned by Almgren et al. and Lianos et al., who found that quaternary ammonium compounds interact with a certain affinity with Py, inhibiting the fluorescence of its excimer [20,21]. Moreover, in the particular case of CTAB in water, it was proposed that CTA⁺ and pyrene form a weak complex, to which bromide is attached, forming an ion-pair [23]. A sign of this close CTA⁺-Py interaction in pure water is the almost invariant I₃/I₁ ratio in CTAB-H₂O shown in Fig. 2. Recently, studies with other QAS also reported similar trends of anomalous I₃/I₁ ratios [24].

The change in the interfacial arrangement introduced by the PBS is what the scheme in Fig. 6 is intended to describe: when introducing the buffer salts, the bromide counterions and the pyrene are partially released from their close association with CTA⁺. The bromide redistributes (the binding changes), the pyrene moves to a less polar microenvironment in the palisade region, and the excimer recovers fluorescence intensity.

Another test supporting the interpretation of pyrene excimer dequenching by the addition of salts is described in the Supplementary material.

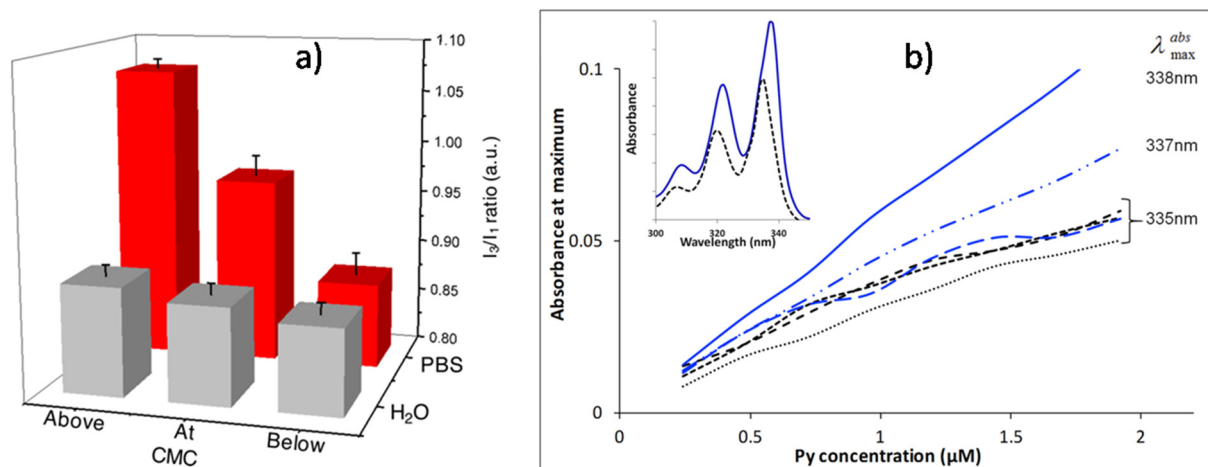


Fig. 5. a) Comparison of the I₃/I₁ ratios of Py in CTAB-H₂O and CTAB-PBS samples for surfactant concentrations below, at and above the CMC in each medium. Ratios are expressed as the mean \pm SD of the eight Py concentrations assayed for each surfactant concentration. b) Graphs of the absorption at the maximum absorption wavelength as a function of Py concentrations of same samples. Inset: comparison of the lowest energy band of the absorption spectra of pyrene in CTAB-H₂O (black dashed line) and in CTAB-PBS (blue full line). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

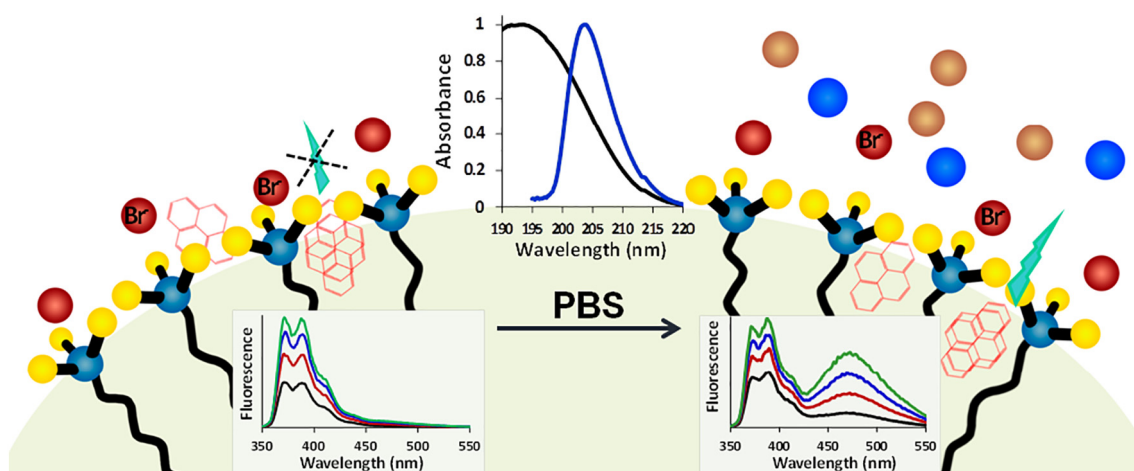


Fig. 6. Scheme of the interfacial arrangement of the polar head region of the CTAB and its bromide counterion before and after the addition of the buffer. The red spheres represent Br^- , blue Na^+ , brown Cl^- . Above, in the center, the bromide absorption spectra in pure water (black line) and in PBS (blue line) are shown. Below, the fluorescence spectra of different concentrations of pyrene in CTAB at the CMC in pure water (left) and in PBS (right), and the proposed location of pyrene in each medium is drawn. In water, Py remains in the outer region of the interface, while relocates in the region of the palisade after the addition of buffer. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.6. Additional information given by bromide absorption spectra

Regarding the change in the bromide spectra observed for increasing concentrations of CTAB in PBS (see Fig. 3), it is worth drawing attention to the information given by these bathochromic shifts. Well below the CMC the spectrum is centered at about 202 nm and progressively moves above 205 nm as the concentration approaches and exceeds the value of the CMC. Given the high bromide absorbance in PBS, we alternatively studied CTAB's CMC in more concentrated saline solutions (NaCl 0.5 and 1 M). As previously shown in Fig. 2, increasing salt concentrations significantly decrease the absorbance, thus allowing the analysis of the spectral shifts in more detail.

Fig. 7 shows the progressive shift of CTAB absorption spectra in a 0.5 M NaCl solution. The plot of the spectral areas vs CTAB concentrations tracks down the CMC at around 0.13 mM. An analogous procedure but in a 1 M NaCl solution locates the CMC at CTAB 0.04 mM.

The inset shows how evolves the value of the maximum absorption wavelength ($\lambda_{\text{max}}^{\text{Abs}}$) during the monomer-micelle transition. Both for the

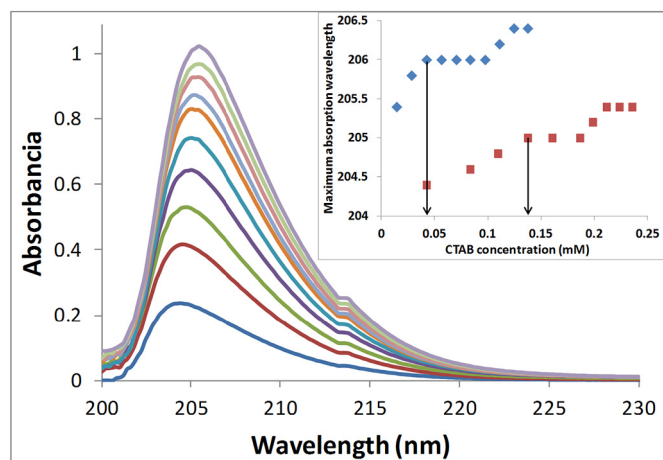


Fig. 7. Absorption spectra of CTAB increasing concentrations in aqueous 0.5 M NaCl solution. Increasing CTAB concentrations in NaCl 0.5 M are: 0.043, 0.082, 0.135, 0.16, 0.186, 0.198, 0.211, 0.223 and 0.235. Inset: graph of the maximum absorption wavelength ($\lambda_{\text{max}}^{\text{Abs}}$) as a function of CTAB concentration in NaCl solutions 0.5 M (red squares) and 1 M (blue diamonds). The arrows points the CTAB CMC determined in each medium. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

CTAB in 0.5 M NaCl solution and for the 1 M solution of the salt, the $\lambda_{\text{max}}^{\text{Abs}}$ shifts to the red with increasing surfactant concentration, remaining invariant in a narrow range before returning to move further to the red. The onset of that first plateau coincides in both cases with the value of the CMC in the respective media. The pattern observed for CTAB in PBS is similar.

Our interpretation is that the sensitivity of bromide absorption is such that the spectrum begins to detect other surfactant molecules even below the CMC, which is not unexpected given the high concentration of salt, which can promote that the long hydrocarbon chains of the CTAB aggregate at a certain pre-CMC concentration. Once the micelles began to assemble, the microenvironment of the bromide remains invariant until a given additional increase in the concentration of CTAB affects the packing of surfactant in the micelle, which alters the interaction of the bromide with neighboring molecules and probably also its degree of binding to its CTA^+ counterion. This is an additional aspect of the bromide spectrum to be exploited in different situations.

3.7. Perspectives

A wide range of applications arises from the high sensitivity of the absorption spectrum of bromide. The studies may be extended to other surfactants or biomolecules containing bromide as counterion. Given the high absorptivity of the bromide, its spectra can be detected well at very low concentrations; therefore it can sense aggregation phenomena at the micromolar level. The binding of bromide as a counterion could be sensitive to the insertion of foreign molecules in its microenvironment or to the changes induced by chemical reactions, either in a micelle or in other biologically relevant interfaces.

4. Conclusions

The remarkable sensitivity to the absorption spectra of bromide in aqueous is shown here for the first time. Spectral shifts that can reach 10–15 nm can be achieved at different concentrations and solution compositions; the microenvironment also modifies the molar extinction coefficient. The spectra can, in addition, be affected by aggregation processes of the molecules carrying bromide as counterion. These properties can be largely exploited in future research both in homogeneous and heterogeneous systems.

Acknowledgements

MH is recipient of a doctoral fellowship of CONICET. LB belongs to the CICIPBA researcher career. DLB and SRM belong to the CONICET researcher career. Financial support of MINCYT (PICT 2013-00647) and UNLP (X11-682 and X11-828) are acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117266>.

References

- [1] M. In, V. Bec, O. Aguerre-Chariol, R. Zana, Quaternary ammonium bromide surfactant oligomers in aqueous solution: self-association and microstructure, *Langmuir* 16 (2000) 141–148, <https://doi.org/10.1021/la990645g>.
- [2] J.P. Vivek, I.J. Burgess, Quaternary ammonium bromide surfactant adsorption on low index surfaces of gold. 2. Au(100) and the role of crystallographic dependent adsorption in the formation of anisotropic nanoparticles, *Langmuir* 28 (2012) 5040–5047, <https://doi.org/10.1021/la300036y>.
- [3] G. Daminelli, D.A. Katskov, R.M. Mofolo, P. Tittarelli, Atomic and molecular spectra of vapours evolved in a graphite furnace. Part 1. Alkali halides, *Spectrochim. Acta B* 54 (1999) 669–682, [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(98\)00248-1](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(98)00248-1).
- [4] M.R. Flórez, M. Resano, Direct determination of bromine in plastic materials by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta B* 88 (2013) 32–39, <https://doi.org/10.1016/j.sab.2013.07.013>.
- [5] E.R. Pereira, I.N.B. Castilho, B. Welz, J.S. Gois, D.L.G. Borges, E. Carasek, J.B. de Andrade, Method development for the determination of bromine in coal using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis, *Spectrochim. Acta B* 96 (2014) 33–39, <https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.04.001>.
- [6] P. Gilbert, L.E. Moore, Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet, *J. Appl. Microbiol.* 99 (2005) 703–715, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>.
- [7] Z.H. Asadov, G.A. Ahmadova, R.A. Rahimov, A.Z. Abilova, S.H. Zargarova, F.I. Zubkov, Synthesis and properties of quaternary ammonium surfactants based on alkylamine, propylene oxide, and 2-chloroethanol, *J. Surfactant Deterg.* 21 (2018) 247–254, <https://doi.org/10.1002/jsde.12008>.
- [8] E. Fuguet, C.M. Rafols, M. Roses, E. Bosch, Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems, *Anal. Chim. Acta* 548 (2005) 95–100, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.05.069>.
- [9] I.B. Beriman, *Handbook of Fluorescence Spectra of Aromatic Molecules*, Academic Press, New York, 1971.
- [10] M.E. Fait, M. Hermet, F. Comelles, P. Clapes, H.A. Alvarez, E. Prieto, V. Herlax, S.R. Morcelle, L. Bakas, Microvesicle release and micellar attack as the alternative mechanisms involved in the red-blood cell-membrane solubilization induced by arginine based surfactants, *RSC Adv.* 7 (2017) 37549–37558, <https://doi.org/10.1039/C7RA03640J>.
- [11] O. Zielinski, D. Voß, B. Saworski, B. Fiedler, A. Körtzinger, Computation of nitrate concentrations in turbid coastal waters using an in situ ultraviolet spectrophotometer, *J. Sea Res.* 65 (2011) 456–460, <https://doi.org/10.1016/j.seares.2011.04.002>.
- [12] E.A. Guenther, K.S. Johnson, K.H. Coale, Direct ultraviolet spectrophotometric determination of total sulfide and iodide in natural waters, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3481–3487, <https://doi.org/10.1021/ac0013812>.
- [13] J. Mertens, D.L. Massart, Determination of nitrate ion in marine biotopes with high nitrate content by ultraviolet spectrophotometry, *Bull. Soc. Chim. Belg.* 80 (1971) 151–158, <https://doi.org/10.1002/bscb.19710800116>.
- [14] T.G. Movchan, E.V. Plotnikova, O.G. Us'yarov, Light absorption in solutions of cetyltrimethylammonium and cetylpyridinium bromides, *Colloid J.* 75 (2013) 319–325, <https://doi.org/10.1134/S1061933X13030137>.
- [15] J. Jortner, A. Treinin, Intensities of the absorption bands of halides ions in solution, *Trans. Faraday Soc.* 58 (1962) 1503–1510, <https://doi.org/10.1039/TF9625801503>.
- [16] Z. Duan, R.S. Sun, An improved model calculating CO₂ solubility in pure water and aqueous NaCl solutions from 273 to 533 K and from 0 to 2000 bar, *Chem. Geol.* 193 (2003) 257–271, [https://doi.org/10.1016/S0009-2541\(02\)00263-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2541(02)00263-2).
- [17] M. Smith, C.R. Symons, Solvation spectra. Part I. – the effect of environmental changes upon the ultra-violet absorption of solvated iodide ions, *Trans. Faraday Soc.* 54 (1958) 338–345, <https://doi.org/10.1039/TF9585400338>.
- [18] N.J. Turro, P. Kuo, Pyrene excimer formation in micelles of nonionic detergents and of water-soluble polymers, *Langmuir* 2 (1986) 438–442, <https://doi.org/10.1021/la00070a011>.
- [19] L. Piñeiro, M. Novo, W. Al-Soufi, Fluorescence emission of pyrene in surfactant solutions, *Adv. Colloid Interf. Sci.* 215 (2015) 1–12, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.10.010>.
- [20] P. Lianos, M.L. Viriot, R. Zana, Study of the solubilization of aromatic hydrocarbons by aqueous micellar solutions, *J. Phys. Chem.* 88 (1984) 1098–1101, <https://doi.org/10.1021/j150650a014>.
- [21] M. Almgren, B. Medhage, E. Mulchtar, Fluorescence study of the weak interaction between pyrene and quaternary ammonium groups, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 59 (1991) 323–334, [https://doi.org/10.1016/1010-6030\(91\)87084-9](https://doi.org/10.1016/1010-6030(91)87084-9).
- [22] K.S. Focsaneanu, J.C. Scaiano, Potential analytical applications of differential fluorescence quenching: pyrene monomer and excimer emissions as sensors for electron deficient molecules, *Photochem. Photobiol. Sci.* 4 (2005) 817–821, <https://doi.org/10.1039/b505249a>.
- [23] M. Almgren, F. Grieser, J.K. Thomas, Dynamic and static aspects of solubilization of neutral arenes in ionic micellar solutions, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 279–291, <https://doi.org/10.1021/ja00496a001>.
- [24] H. Xing, P. Yanb, J. Xiao, Unusual location of the pyrene probe solubilized in the micellar solutions of tetraalkylammonium perfluorooctanoates, *Soft Matter* 9 (2013) 1164–1171, <https://doi.org/10.1021/j150650a014>.



Interaction of cationic surfactants with DPPC membranes: effect of a novel N^α -benzoylated arginine-based compound

Melisa Hermet^{1,5} · M. Elisa Fait^{1,5} · Romina F. Vazquez^{2,5,6} · Sabina Mate^{2,5} · M. Antonieta Daza Millone^{3,5} · M. Elena Vela³ · María Teresa García⁴ · Susana R. Morcelle^{1,5} · Laura Bakas¹

Received: 2 December 2020 / Accepted: 19 February 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, AT part of Springer Nature 2021

Abstract

Cationic amino acid-based surfactants are known to interact with the lipid bilayer of microorganism resulting in cell death through a disruption of the membrane topology. To elucidate the interaction of a cationic surfactant synthesized in our lab, investigations involving N^α -benzoyl-arginine decyl amide (Bz-Arg-NHC₁₀), and model membranes composed by 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) were done. Bz-Arg-NHC₁₀ was able to penetrate into DPPC monolayers up to a critical pressure of 59.6 mN m⁻¹. Differential scanning calorimetry revealed that as the concentration of Bz-Arg-NHC₁₀ increased, the main transition temperature of DPPC slightly decreased. Atomic force microscopy (AFM) in situ experiments performed on supported DPPC bilayers on mica allowed monitoring the changes induced by Bz-Arg-NHC₁₀. DPPC bilayer patches were partially removed, mainly in borders and bilayer defects for 50 μM Bz-Arg-NHC₁₀ solution. Increasing the concentration to 100 μM resulted in a complete depletion of the supported bilayers. Surface plasmon resonance (SPR) experiments, carried out with fully DPPC bilayers covered chips, showed a net increase of the SPR signal, which can be explained by Bz-Arg-NHC₁₀ adsorption. When patchy DPPC bilayers were formed on the substrate, a SPR signal net decrease was obtained, which is consistent with the phospholipids' removal observed in the AFM images. The results obtained suggest that the presence of the benzoyl group attached to the polar head of our compound would be the responsible of the increased antimicrobial activity against gram-negative bacteria when compared with other arginine-based surfactants.

Keywords Arginine-based surfactants · Model biological membranes · DPPC bilayer · Antibacterial activity

Introduction

The use of surfactants is widely spread in everyday life, since they are ingredients of many formulations, ranging from cleansing agents for household and personal care to

emulsifiers and preservatives in food and pharmaceutical preparations. The reason for this is based on their biological and physicochemical properties, which are given by their amphiphilic nature. Due to the paramount importance of these compounds, which are manufactured and consumed at worldwide scale, the development of new products with low

Handling editor: J. G. López.

✉ Susana R. Morcelle
morcelle@biol.unlp.edu.ar

✉ Laura Bakas
lbakas@biol.unlp.edu.ar

¹ Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIProVe), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Centro Asociado CICPBA, La Plata, Buenos Aires, Argentina

² Instituto de Investigaciones Bioquímicas La Plata (INIBIOLP), CCT-La Plata, CONICET, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

³ Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CCT-La Plata, CONICET, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina

⁴ Departamento de Tensioactivos y Nanotecnología, IQAC-CSIC, Barcelona, Spain

⁵ Centro Científico Tecnológico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICET, CCT-La Plata), La Plata, Argentina

⁶ Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina

environmental impact and minimal toxicity is mandatory. Within this context, amino acid-based surfactants represent an attractive alternative to the more conventional ones, since they resemble natural amphiphilic molecules and can be obtained from renewable raw materials (Pinazo et al. 2011). Furthermore, the chemical groups that amino acids possess allow the possibility of attaching different acyl/alkyl chains by amide, ester or alkyl linkage, generating a great variety of structures with diverse properties (Tripathy et al. 2018). These compounds have some characteristics in common, such as minimal toxicity and low irritancy, high biodegradability and good antimicrobial activity, being the most studied those arginine-based ones (Pinazo et al. 2019). Arginine-based surfactants can be obtained by sustainable methods such as biocatalytic strategies, and have low toxicity profile, high biodegradability and exceptional antimicrobial properties due to the presence of both the guanidine group of the arginine residue and the alkyl chain length (Infante et al. 1985, 1997; Morán et al. 2004).

The antimicrobial action of cationic surfactants is supposed to be based on their ability to disrupt the microbial membrane through a combined adsorption and hydrophobic phenomenon at the membrane/water interface followed by membrane disorganization (Castillo et al. 2006). In this regard, the cationic surfactants are strongly adsorbed on the bacterial cell surface due to the presence of ionic charges in the molecule, triggering membrane disruption. Morán et al. (2001) published results showing that arginine *O*-alkyl amides (C₁₀–C₁₄) and arginine *O*-alkyl esters (C₈–C₁₂) with two positive charges per head group showed the lowest MIC values (Morán et al. 2001). On the other hand, Colomer and coworkers proved that the addition of a lysine residue as a second amino acid in the polar portion of the molecule reduced biocidal activity due to the presence of two cationic charges, which increased the hydrophilic character of the molecule and, consequently, reduced the surface activity (Colomer et al. 2011).

Regarding the length of the hydrophobic chain, for the three monocatenary surfactant series, *N*^α-alkyl amides, *O*^α-alkyl amides, and *O*^α-alkyl esters, the highest antimicrobial effect was observed for those compounds with 12-carbon alkyl chains (Morán et al. 2001). This fact was attributed to the combination of several physicochemical properties, such as hydrophobicity, adsorption strength, CMC, and solubility in aqueous media. However, it is important to point out that the optimum alkyl chain length depends on the surfactant structure.

Our group has previously synthesized and characterized some arginine-based surfactants using an endopeptidase from *Carica papaya* latex—papain—as biocatalyst and a purification methodology based on ecofriendly techniques (Fait et al. 2015). Among the compounds synthesized within this family of surfactants, *N*^α-benzoyl-arginine

decylamidehydrochloride (Bz-Arg-NHC₁₀) demonstrated an interesting potential for its use as a disinfectant, due to the antimicrobial activity showed against both gram-positive and gram-negative bacteria and fungi. Besides, it proved to have lower toxicity and irritancy when compared with other commercial tensioactives of cationic nature. These properties turn Bz-Arg-NHC₁₀ into a promising candidate for its application in topical formulations as a preservative agent or as an antiseptic itself.

The present work examines the physicochemical process involved in the perturbation of the lipid membrane induced by Bz-Arg-NHC₁₀, schematically represented in Fig. 1. To this end, the interaction of this surfactant with different biomembrane models, namely, 1,2-dipalmitoyl *sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC) multilamellar lipid vesicles (MLVs), monolayers and supported bilayers was evaluated using different experimental approaches, including Langmuir monolayer, differential scanning calorimetry analysis (DSC), atomic force microscopy (AFM) and surface plasmon resonance (SPR).

Materials and methods

Chemicals

1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), DL-dithiothreitol (DTT), *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) and other reagents, all analytical-grade, were purchased from Sigma Aldrich (USA) and Tris base and methanol HPLC-grade from J. T. Baker (USA). The arginine-based cationic surfactant Bz-Arg-NHC₁₀·HCl was synthesized as previously described using papain adsorbed onto polyamide as biocatalyst (Fait et al. 2015). For all the solutions and experiments ultrapure MilliQ (Merck Millipore, USA) water was used, and had a resistivity of 18.2 MΩ cm⁻¹. Gold evaporated (~50 nm) on glass substrates (SPR102-AU) were obtained from Bionavis (Finland). Muscovite mica grade V-1 was

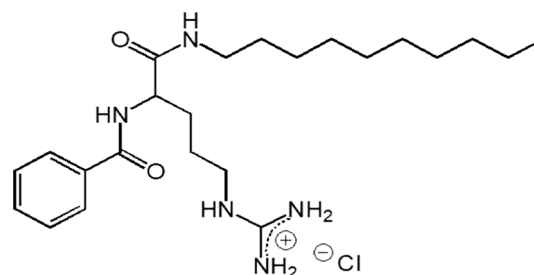


Fig. 1 *N*^α-Benzoyl-arginine decylamide (Bz-Arg-NHC₁₀) chemical formula

purchased from SPI Supplies (USA). The rest of the chemicals used in this work were of analytical grade.

Critical micelle concentration (CMC)

The surface tension measurements at equilibrium were performed with a Krüss K12 tensiometer (Hamburg, Germany) by means of the Wilhelmy plate method. A stock solution of the surfactant (0.335 mM) was prepared in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 (6.78 g L⁻¹ NaCl, 1.42 g L⁻¹ Na₂HPO₄ and 0.4 g L⁻¹ KH₂PO₄ in MilliQ water). The experiment was performed in an appropriate glass cell containing PBS at the beginning of the assay. For the CMC estimation, the surface tension of a solution of increasing concentration of Bz-Arg-NHC₁₀-HCl was measured after each addition of a small volume of the stock solution and the subsequent 15–20 min equilibration at 25 °C. The CMC was estimated from the intersection between the two linear portions of the γ vs. $\log C$ plot.

Preparation of DPPC MLVs and SUVs suspensions

Multilamellar vesicles (MLVs) of DPPC used for the DSC assays were obtained as follows. A standard solution of DPPC (3.33 mg mL⁻¹) in CHCl₃/MeOH 1:1 v v⁻¹ was prepared and aliquoted (100 μ L) in glass test tubes. The solvent was removed under a nitrogen stream while rotating the tube to form a thin film of lipid and left under reduced pressure for at least 2 h to eliminate all traces of solvent. MLVs were obtained by hydrating the lipid film with 100 μ L of PBS, containing the corresponding amount of surfactant (from 0 to 4 mol%), followed by five alternative cycles of vortex and heating at 60 °C (2 min). To assure a significant interaction between the surfactant and the liposomal structures, the final solutions were left overnight.

For AFM and SPR measurements, DPPC MLVs were prepared by addition of buffer HEPES (25 mM HEPES, 150 mM NaCl pH 7.4) or TBS (20 mM Tris base, 150 mM NaCl pH 7.4), respectively, to the thin lipid film, followed by vigorous vortexing at 60 °C. In both cases, the MLVs suspensions were sonicated at 60 °C for 1 h using a TestLab TB04 bath-type sonicator (Buenos Aires, Argentina). Hence, small unilamellar vesicles (SUV) were generated.

SUVs were characterized by means of DLS with a Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instruments, UK) equipped with a laser (633 nm) set at angle of 173°. Measurements made in PBS buffer at 25 °C gave a mean size of 85 \pm 6 nm (PDI = 0.18 \pm 0.02).

Differential scanning calorimetry (DSC)

Differential scanning calorimetry measurements of DPPC MLVs were carried out in a DSC Q100 TA Instruments

(USA) calorimeter at a scanning rate of 5 °C min⁻¹. Aluminum pans were loaded with MLV suspension (0.2 mg of DPPC) and submitted to heating/cooling cycles between 0 and 60 °C. At least two runs were performed for each sample. The data from the first run were always discarded. Experiments were carried out in duplicate. Data analysis was done using the TA Universal Analysis software.

Monolayer penetration experiments

Surface-pressure (π) measurements were carried out with a Langmuir trough by a NIMA Model 102A instrument (NIMA Technology, Coventry, UK) with a Wilhelmy plate as the π sensor. The aqueous subphase consisted of PBS buffer prepared in ultrapure Milli-Q water. For monolayer penetration assays, DPPC monolayers were formed by spreading the lipids from a stock solution prepared in chloroform (1 mM) over the subphase surface until the desired initial surface pressure (π_0) of the lipid film was attained. After waiting 15 min for complete solvent evaporation and π_0 stabilization, the measurement was started, and the surface pressure of the neat lipid monolayer was recorded. Then, Bz-Arg-NHC₁₀ from a stock solution prepared in PBS was injected into the subphase bulk with a Hamilton microsyringe to reach a final concentration of 30 μ M and the increment in π ($\Delta\pi$) was recorded over time until a stable signal was obtained. Measurements were performed at 23 \pm 1 °C.

Atomic-force microscopy (AFM)

Ex-situ lipid samples were prepared in freshly cleaved plachets of mica. First, a 5 μ L drop of 1 mM CaCl₂ was added to the mica and after 15 min, the surface was washed with MilliQ water. Then, 100 μ L of DPPC SUVs were dropped on the Ca²⁺ modified mica and allowed to interact for 1 h at 60 °C. The unbounded lipid vesicles were washed with buffer solution. Samples were placed without drying in the AFM fluid chamber, and then filled with 50 μ L of HEPES buffer. After scanning the surface, an aliquot (30 μ L) of surfactant solution was added and the changes induced by the addition of Bz-Arg-NHC₁₀ were followed during time (10–20 min). To assess that these observations were not due to invasive AFM tip interaction with the membrane, consecutive scans of the same area without surfactant were also recorded.

AFM measurements were performed on a MultiMode Scanning Probe Microscope controlled by a Nanoscope-V unit (Veeco Instruments Inc., USA) using V-shaped Si₃N₄ probes (Veeco Instruments Inc., USA) with 0.08–0.15 N m⁻¹ spring constants. All the experiments

were carried out at 24 °C in a fluid cell. Images were obtained in contact mode with a scanning rate of 1 Hz.

Surface plasmon resonance (SPR) measurements

SPR measurements were performed in MP-SPR Navi™200 (BioNavis, Finland) equipped with two independent lasers (670 and 785 nm) in a dual-channel detection system. Measurements were made in an angular-scan range of 58–72 degrees and typical flows employed were 10–500 $\mu\text{L min}^{-1}$.

Preparation of the sensor surfaces

Commercial gold substrates (SPR102-AU, Bionavis) were washed with $\text{NH}_3:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:2) at 90 °C during 10 min, rinsed with water and ethanol and dried with N_2 . Immediately, the substrates were incubated in the presence of a 50 μM DTT ethanolic solution for 30 min at room temperature. The DTT-gold substrates were thoroughly rinsed with ethanol and dried with N_2 .

Liposome binding

DPPC SUVs were employed for the in situ generation of lipid bilayers on the surface of the SPR sensor chip. DTT-gold substrates were placed in the SPR device and the SPR curves (from 58 to 72 degrees) were registered each 3 s. The running buffer was TBS with 3 mM Ca^{2+} kept at a flow of 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ for all the experiments. After 10 min of baseline stabilization, the 0.2 mg mL^{-1} liposome suspension was injected at 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ during 15 min, with one or more steps for different surface coverages, in both flow cells. After 10 min of stabilization, a quick pulse of running buffer at 500 $\mu\text{L min}^{-1}$ was performed to remove weakly adsorbed material. The amount of bound lipid was calculated from the change in the signal registered at the angle of maximum derivative ($\Delta\Theta_{\text{bilayer}}$) from the initial baseline and the signal after the washing step. Results were expressed as the percentage of the theoretical $\Delta\Theta_{\text{bilayer}}$ expected for a full bilayer coverage (Daza Millone et al. 2018).

Surfactant affinity measurements

After supported bilayer preparation, surfactant solutions prepared in TBS buffer were injected at 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ during 30 min through the main channel, while buffer (TBS) was injected in the control channel. Duplicate measurements were performed for each sample using freshly prepared supported

bilayers. Also, control experiments were made injecting the surfactant solutions on DTT surfaces, i.e., without the DPPC bilayer.

Results

Cationic lipoamino acids constitute an important class of natural surface-active biomolecules of great interest to organic and physical chemists and to biologists with an unpredictable number of basic and industrial applications (Pinazo et al. 2019). Among others, antimicrobial activity is one of the most remarkable biological properties of this kind of compounds (Fait et al. 2019). This fact is attributed to the combination of several physicochemical parameters—such as the CMC, the surfactant's hydrophobicity, the adsorption strength, and water solubility, among others—which results in an optimal hydrophobic/hydrophilic balance that enhance the interaction and penetration of the surfactant into the microorganism's membrane. In all instances, both the alkyl chain length and the chemistry of the polar head group affect the biocidal activity. Within this context, the physicochemical parameters of Bz-Arg-NHC₁₀ and its interaction with model membranes were studied.

Physicochemical characterization

Basic physicochemical parameters that characterize a surface-active compound are CMC, surface tension at the CMC (γ_{CMC}), the maximum surface excess concentration at the air/aqueous solution interface (Γ_{max}), and the area per molecule (A_{min})—which measures the minimum area per surfactant molecule at air/aqueous solution interface. The CMC and γ_{CMC} can be determined from the break point of the surface tension (γ) vs. the logarithm of the surfactant concentration curves. And using the Gibbs adsorption equation, we can also obtain both Γ_{max} and A_{min} (Rosen 2004). All parameters are summarized in Table 1.

Several studies have reported adsorption and self-aggregation in aqueous media at a range of concentrations and in either the presence or the absence of other components for single chain arginine-based surfactants (Pinazo et al. 2011). We previously demonstrated the surfactant character of Bz-Arg-NHC₁₀ in aqueous media, proving its ability to reduce the surface tension of water (Fait et al. 2017). Within this context, self-aggregation was also evidenced, showing a defined CMC value of 0.230 mM at 25 °C. Since the presence of salts in the medium (buffer solution) used in the experiments modifies

Table 1 Bz-Arg-NHC₁₀ surface parameters in PBS

| Medium | CMC (mM) | γ_{CMC} (mN m^{-1}) | Π_{CMC} (mN m^{-1}) | Γ_{max} (10^{10} mol cm^{-2}) | A_{min} (\AA^2) |
|--------|----------|---|--|--|-------------------------------------|
| PBS | 0.028 | 36.7 | 35.3 | 2.47 | 67 |

the aggregation properties of the surfactant, the determination of the CMC of Bz-Arg-NHC₁₀ in PBS was performed. The selection of PBS was based on the fact that a stock solution of the surfactant in this medium was used for both the monolayers penetration assays and the preparation of DPPC MLVs for the DSC studies (see “Materials and Methods” section). As expected, the CMC obtained in this saline medium was lower than in deionized water (0.028 and 0.230 mM, respectively, Fait et al. 2017). The effect of salts on the micellization of this kind of compounds reveals that in general the CMC values become lower as the concentration of salts in the medium increases.

Critical micelle concentration (CMC), surface tension at CMC (γ_{CMC}), effectiveness of surface tension reduction (Π_{CMC}), maximum adsorption at the interface liquid–air (Γ_{max}) and minimum area occupied by adsorbed molecule at the interface liquid–air (A_{min}).

Interaction of Bz-Arg-NHC₁₀ with model membranes

Even though for most bacteria the main zwitterionic phospholipid is phosphatidylethanolamine (PE), we used monolayers, liposomes and supported bilayers composed of DPPC as lipid models to elucidate the antimicrobial mechanism of Bz-Arg-NHC₁₀. This choice was made on the basis of the advantages these systems offer over more complex lipid mixtures (Epanand and Epanand 2009; Lind et al. 2019), although these will be necessary in order to identify specific interactions between the surfactant and a particular component of the bacterial membrane (Castillo et al. 2004; Colomer et al. 2013). Within this context, differential scanning calorimetry (DSC), Langmuir monolayers, atomic force microscopy (AFM), and surface plasmon resonance (SPR) studies will serve as an initial approach to give an insight into the interaction of this kind of compounds and bacterial membranes.

Differential scanning calorimetry (DSC)

DSC is a tool for assessing the thermodynamic properties of a system, specifically allowing the inspection of a phase transition phenomenon. Heat capacity profiles measure this property as function of the temperature at constant pressure. The presence of peaks in these profiles indicates phase transitions. Surfactants, due to their amphiphilic structure, can be incorporated into the lipid barrier and thus disrupt the tight arrangement of the membrane lipids, inducing a phase transition that can be registered using this technique.

In this work, DSC allowed us to study the effect of Bz-Arg-NHC₁₀ on DPPC bilayers. By these means, two parameters were studied. On one hand, we analyzed the main phase transition temperature (T_m), which corresponds to

the gel–liquid crystalline transition and is related to *gauche* isomerization of the acyl chains. On the other hand, the width at half-height of the heat absorption peak ($\Delta T_{1/2}$) was also determined, which is a measure of the cooperativity of the transition process.

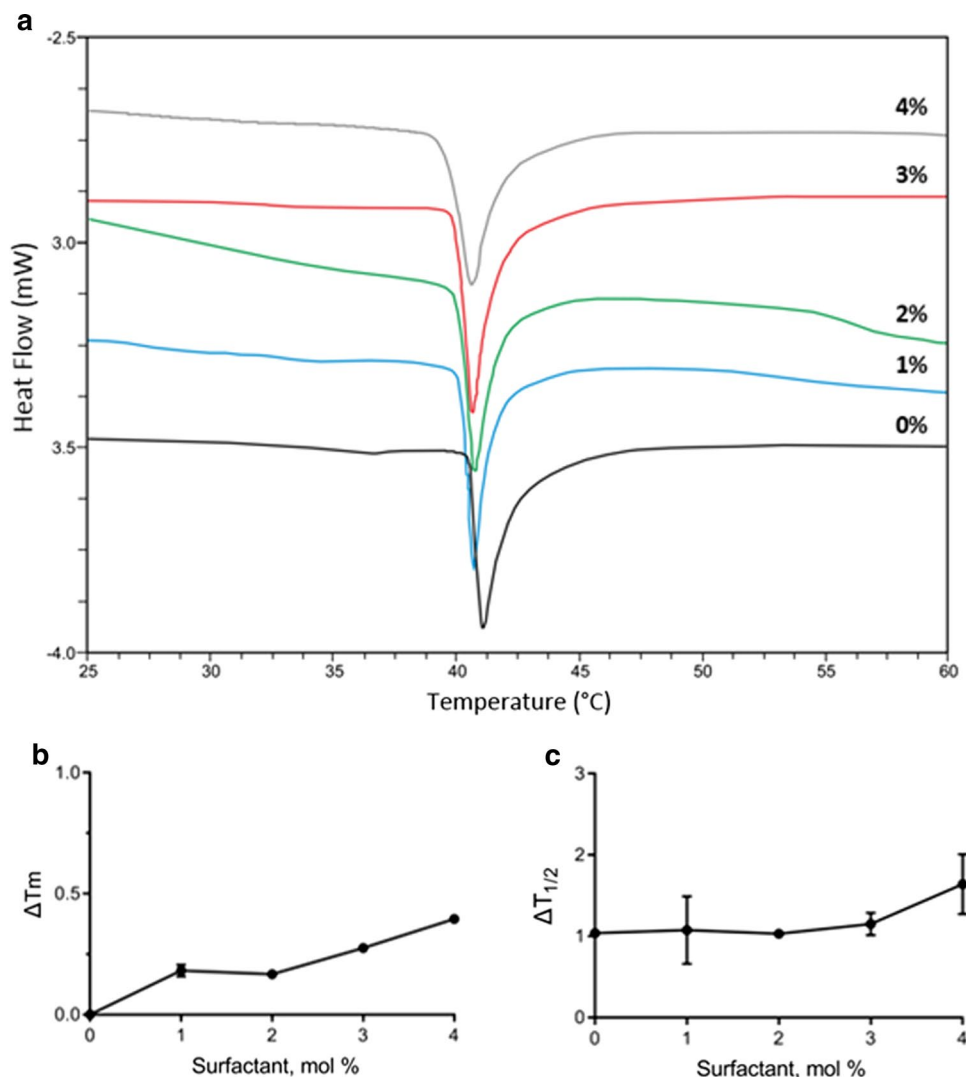
The effect of Bz-Arg-NHC₁₀ in a range of concentrations comprised between 0 and 4 mol% on DPPC MLVs is presented by the thermograms depicted in Fig. 2a. In the absence of the surfactant (control curve), the main transition took place at 41.2 °C. Since the amount of compound enclosed in the DSC capsules was not the same for each determination, the enthalpy values could not be directly recovered from the thermograms. A decrease in the lipidic bilayer fluidity due to the incorporation of Bz-Arg-NHC₁₀ can be attributed to hydrophobic mismatch (Inoue et al. 1988). Within this context, compounds bearing ten or less carbon alkyl chains would penetrate into the hydrophobic core of the lipid bilayer in such a fashion that avoid near the acyl hydrocarbon core is created, reducing the stability of the lamellar gel phase and lowering T_m . As can be inferred by the broadening of the endothermic peak, the correlation between the lipid molecules in the phase transition, or cooperativity, was disrupted by the presence of Bz-Arg-NHC₁₀. This fact allows us to infer that the compound was incorporated into the DPPC MLVs.

The parameters obtained from Fig. 2b, c were $\Delta T_m = 0.395$ and $\Delta T_{1/2} = 1.64$. From this experiment, it can be concluded that Bz-Arg-NHC₁₀ has a slight efficiency in the fluidification of DPPC bilayers in the assayed conditions; higher concentrations of the compound could not be tested since its low aqueous solubility.

Monolayer penetration experiments

The interaction of Bz-Arg-NHC₁₀ with DPPC monolayers was investigated by injecting the surfactant solution into the aqueous subphase (30 μM final concentration), beneath the monolayers compressed at different initial surface pressures (π_0) and analyzing the increment in π ($\Delta\pi$) over time. Figure 3a shows representative curves obtained for DPPC monolayers at π_0 of 5 and 20 mN m^{-1} . Upon injection, regardless the π_0 of the lipid films, the interaction of Bz-Arg-NHC₁₀ with the monolayers resulted in a rapid increase in π within the first 5 min. After this initial increment, a progressive decrease in π was detected within the next 5 min, suggesting a reorganization of the monolayer after adsorption/incorporation of Bz-Arg-NHC₁₀ molecules. The monolayers finally became stabilized reaching an equilibrium π (π_{eq}). Interestingly, the net decrease from the maximum π (π_{max}) was $\sim 4 \text{ mN m}^{-1}$ for all the π_0 tested, which could arise from the detergent-like behavior of this compound that once incorporated into the lipid film may reach a surface concentration high enough to induce the removal of lipid molecules

Fig. 2 **a** DSC heating thermograms of DPPC MLVs in the presence of increasing concentrations of Bz-Arg-NHC₁₀ (from 0 up to 4 mol%). The heating rate was 5 °C min⁻¹. **b** Depression of the transition temperature ($\Delta T = T_m - T_{m0}$) and **c** the transition width ($\Delta T_{1/2}$) of DPPC MLVs as a function of the molar percentage of surfactant concentrations



from the monolayer to the subphase and the resulting formation of mixed micelles (Nitenberg et al. 2018). For the different π_0 assayed, similar kinetics were observed, though the total $\Delta\pi$ (both $\Delta\pi_{\max}$ and $\Delta\pi_{\text{eq}}$) achieved depended on the π_0 value of the lipid film (Fig. 3b)—as the π_0 of the monolayer increased, the incorporation of Bz-Arg-NHC₁₀ decreased (i.e., a lower $\Delta\pi$ registered) due to the closer packing of the lipids at a higher π_0 . From the plot of $\Delta\pi_{\max}$ values observed as a function of π_0 , the critical surface pressure (π_c) was calculated. This π_c corresponds to the extrapolated value of π_0 beyond which no further incorporation of the surfactant into the monolayer would occur (i.e., $\Delta\pi_{\max} = 0$ after injection) and reflects the influence of the lipid packing density on the ability of the molecule to penetrate into the monolayer, and hence, its penetration capacity. By these means, the value of π_c obtained was 59.6 mN m⁻¹ for Bz-Arg-NHC₁₀ in DPPC monolayers.

Atomic force microscopy (AFM)

Biological samples can be observed at the highest resolution under conditions close to their natural state by means of atomic force microscopy (AFM) (Müller et al. 2002). Using this technique, we characterized the interaction of Bz-Arg-NHC₁₀ with supported lipid membranes. The AFM image (Fig. 4a) showed DPPC bilayers in gel phase, with a thickness of 4.3 ± 0.3 nm as shown in the corresponding cross-section. This difference in the step height with the level of the mica can be considered in the range of values generally observed for supported phospholipid bilayers.

After surfactant's injection in the fluid chamber (50 μM , $t=0$, Fig. 4b), sequential AFM images of the same area were recorded (Fig. 4b, c). The DPPC supported bilayer height remained unaltered (4.4 ± 0.3 nm) but some holes appeared within it. Besides, most of the bilayer border regions exhibit typical heights of 3.5 ± 0.3 nm. It is not clear what these lower regions are due to, but it has been reported that

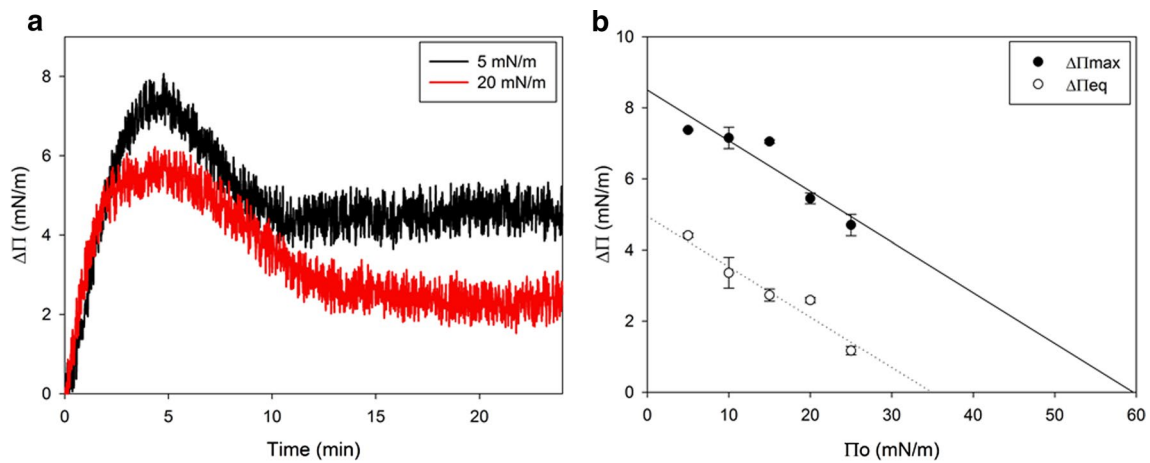


Fig. 3 Bz-Arg-NHC₁₀ interaction with DPPC monolayers. **a** Insertion kinetics of Bz-Arg-NHC₁₀ into lipid monolayers of DPPC. The lipids were spread over the subphase (PBS buffer) to achieve the initial surface pressures (π_0) indicated in the figure. Bz-Arg-NHC₁₀ was then injected from a stock solution in PBS to give a final concentration of 30 μ M and the increase in surface pressure ($\Delta\pi$) was registered over

time. **b** Maximum and equilibrium $\Delta\pi$ ($\Delta\pi_{\max}$ and $\Delta\pi_{\text{eq}}$) obtained for the interaction of Bz-Arg-NHC₁₀ with DPPC monolayers at different π_0 . The critical surface pressure (π_c) was obtained by extrapolating the curve of $\Delta\pi_{\max}$ vs. π_0 to $\Delta\pi=0$. The values represent the mean \pm SEM, $n=3$. Measurements were performed at 23 ± 1 °C

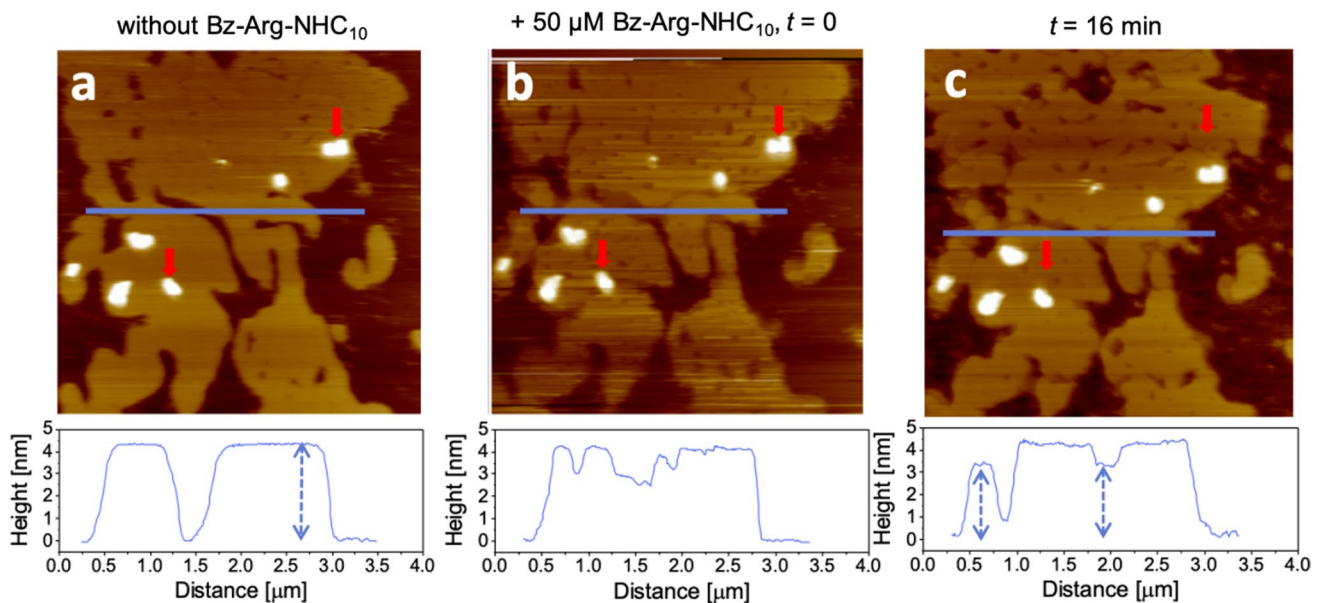


Fig. 4 AFM images of Bz-Arg-NHC₁₀ interaction (50 μ M) with DPPC supported bilayers. **a** 4 μ m \times 4 μ m image taken before the interaction, **b** immediately after the injection of 50 μ M Bz-Arg-

NHC₁₀, and **c** at $t=16$ min (subsequent scans). Cross-sections shown below correspond to the blue lines drawn in the images. Brighter spots are associated to vesicles (red arrows)

surfactants intercalate preferentially in regions where the molecular packing is less dense, i.e., the border of the bilayer (Lima et al. 2013). This intercalation would induce disorder in the DPPC gel phase causing a phase transition from gel to a liquid-crystalline state. Based on different heights measured, it can be presumed that the higher domains are essentially DPPC-rich domains while the lower ones are Bz-Arg-NHC₁₀-rich domains.

For all samples, vesicles that were not removed by surfactant's addition were also observed (red arrows in Fig. 4).

The AFM image (Fig. 5a) showed DPPC bilayers in the gel phase, with a thickness of 4.3 ± 0.3 nm. Furthermore, 16 min after the injection of Bz-Arg-NHC₁₀, re-adsorption of material on the mica surface was observed (Fig. 5b). This could be due to the formation of lipid-surfactant mixed micelles (Morandat and El Kirat 2007).

Fig. 5 Interaction of Bz-Arg-NHC₁₀ with DPPC supported bilayers. AFM images (5 μm × 5 μm) taken **a** before the interaction and **b** 16 min after the injection of 50 μM Bz-Arg-NHC₁₀. Deposited material can be observed from the changes in the dashed zone

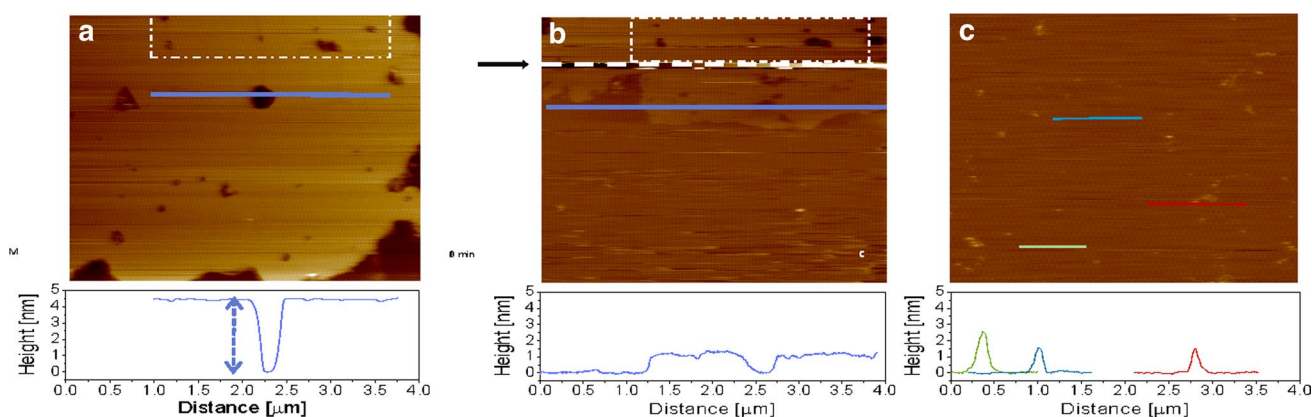
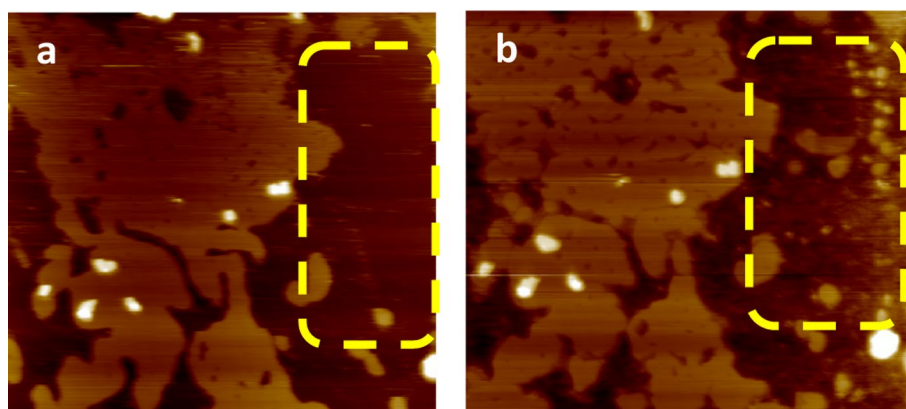


Fig. 6 AFM images of 100 μM Bz-Arg-NHC₁₀ interaction with DPPC supported bilayers. **a** 4 μm × 4 μm image taken before the interaction with Bz-Arg-NHC₁₀, **b** injection of 100 μM Bz-Arg-NHC₁₀ (arrow and black dotted line) and **c** subsequent scan at

$t=6$ min. Cross-sections shown below correspond to the full blue lines in the images. The white dotted rectangles in **a**, **b** show the conserved area between scans

The incubation of DPPC bilayers with the surfactant at a concentration two times greater than that used for the previous observations induced dramatic alterations of the bilayer (Fig. 6a, b). Indeed, after the addition of 100 μM Bz-Arg-NHC₁₀, the DPPC bilayer was completely removed leaving only patches of adsorbed material ranging 1.1–2.5 nm in mean height (Fig. 6c).

Surface plasmon resonance (SPR)

SPR constitutes a powerful biosensing technique for monitoring biomolecular interactions in real-time without labeling requirements. Biosensor experiments involve immobilizing one reactant on a surface and monitoring its interaction with a second component in solution through changes in the reflectivity of the Au sensor platform (Rich and Myszka 2000). Using SPR spectroscopy, we tested the binding and lipid solubilization capacity of Bz-Arg-NHC₁₀ on DPPC supported lipid bilayers onto the surface of a sensor chip (Daza Millone et al. 2018). DPPC vesicles were

injected in a step-way manner in order to reach different surface coverage and the surfactant was injected at concentrations 50, 100 and 500 μM (Fig. 7a).

When 500 μM of the surfactant was injected on sensors with a surface coverage higher than 29%, a net binding increase was detected, evidenced as an increment in the SPR signal, as shown in Fig. 7b. Similar results were obtained with lower (50 and 100 μM) surfactant concentrations. In contrast, a different profile was observed when 500 μM Bz-Arg-NHC₁₀ was injected on sensor chips with 13% of lipid coverage. In this case, after surfactant injection, a drop of the signal below the baseline was observed, revealing the lipid removal from the bilayer. These results can be correlated with the AFM experiments performed at a surfactant concentration of 100 μM, in which the solubilization of the model biomembrane is observed (Fig. 6b).

In summary, the SPR response corresponds to both the adsorption of the surfactant which produces a disorganization of the DPPC bilayer and the release of lipid-detergent mixed micelles when the bilayers are saturated

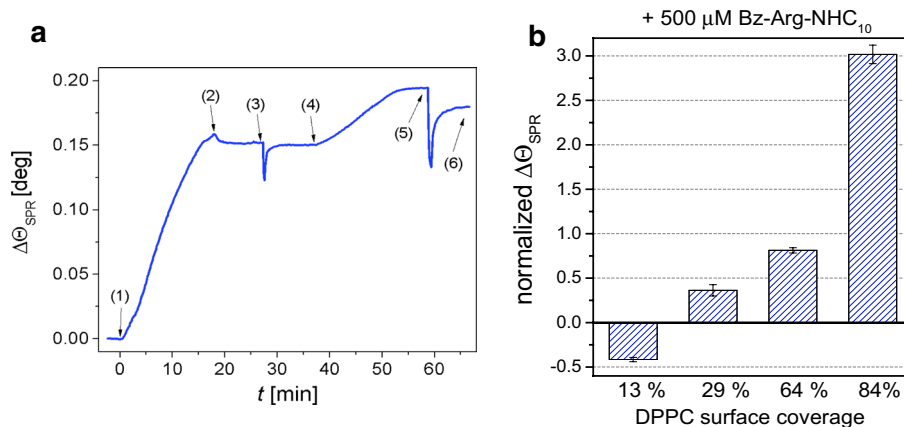


Fig. 7 SPR measurements of Bz-Arg-NHC₁₀ binding to DPPC supported bilayers. **a** Interaction of 100 μM surfactant with $\sim 40\%$ DPPC surface coverage: (1) DPPC vesicle injection, (2) end of injection, (3) buffer washing step, (4) surfactant injection, (5) buffer washing

by surfactant. These micelles can be re-deposited on the surface as shown in AFM images (Fig. 5b).

Discussion

A great effort has been made to design and synthesize a large variety of arginine-based surfactants with differences in the number of the cationic charges, the chemical structure of the head group, the number, length, and bonding positions of hydrophobic chains and the molecule's symmetry. In this paper, the interaction between Bz-Arg-NHC₁₀ and lipid monolayers, liposomes and supported lipid bilayers has been studied with the aim of assessing the relationship between the chemical structure of the head group, in particular the presence of the benzoyl moiety, and the perturbation of membranes. Finally, these results were correlated with the antimicrobial activity of this surfactant.

The hydrophilic/hydrophobic balance of Bz-Arg-NHC₁₀ due to the presence of benzoyl moiety attached to the head group lead to an effective insertion of the surfactant into the lipid bilayer. This property not only allowed the interaction of the surfactant with the membrane, but also increased the tendency to self-aggregate in solution, which is reflected in the low CMC value.

It was observed among different families of monocaternary arginine-based surfactants that the CMC values have a strong reliance on the alkyl chain length: the more hydrophobic the molecule (i.e., longer alkyl chain), the lower the CMC value. On the contrary, it is not clear whether the nature of the head group has an influence in the CMC and γ_{CMC} (Pinazo et al. 2019). Indeed, in terms of adsorption and surface-active properties, Bz-Arg-NHC₁₀ has a much lower CMC value (from 5 to 150 times) than other

step, and (6) final SPR signal showing a net increment. **b** Normalized changes in SPR angle—difference in values between (4) and (6) referred to lipid amount between (1) and (3)—for the interaction of 500 μM Bz-Arg-NHC₁₀ with increasing DPPC surface coverage

arginine-based compounds—such as N^α -decyl-Arg-methyl ester (CAM) or Arg- N -decylamide (ACA)—(Pinazo et al. 2019). This could be attributed to the molecule's higher hydrophobicity due to the presence of the benzoyl group, which increases its tendency to self-aggregate. In this concern, Perinelli and coworkers reported the effect of the addition of a benzyl group on the CMC of quaternary ammonium leucine-based surfactants with the same alkyl chain length that Bz-Arg-NHC₁₀ (Perinelli et al. 2019). They found that the substitution of the methyl group with a benzyl one exerts a double effect by increasing the hydrophobicity and the steric hindrance of the ammonium quaternary polar head, thereby reducing the CMC values.

Surfactants' micellization is influenced by the presence of salts in the medium: in general, CMC values of ionic surfactants become lower as the concentration of salts in the medium increases. The magnitude of this phenomenon depends on several factors, such as the ionic strength of the medium and the nature of the surfactant's counterion. The decrease of the CMC values would be a consequence of the reduction of the electrostatic repulsion forces among the head groups, due to an electrostatic shielding effect exerted by the ions present in the medium, and the increase of the interactions among the hydrophobic tails. Hence, an increment in the number of surfactant monomers per micelle is also observed (Helenius et al. 1979).

It is known that a change in the molecule's polarity has a direct influence in its ability to adsorb onto the surface as well as its insertion within a lipid membrane. To elucidate the disruption mechanism of the membrane organization, different approaches were adopted in this paper. Within this context, DSC experiments proved that Bz-Arg-NHC₁₀ is slightly efficient in fluidizing DPPC bilayers within the concentration range tested. A similar trend was observed

for other arginine-based surfactants as N^α -lauroyl-Arg-methyl ester (LAM), which showed a small effect in the ΔT_m and $\Delta T_{1/2}$ values up to a 5 mol% concentration, but it became significant as the surfactant proportion increased (Castillo et al. 2004).

Moreover, Bz-Arg-NHC₁₀ molecules demonstrated to be able to insert themselves within the membrane, as it arises from the monolayer insertion experiments. By these means, the value of π_c obtained was 59.6 mN m⁻¹ for Bz-Arg-NHC₁₀ in DPPC monolayers. This value by far exceeds the average π assigned to the lipid packing in cell membranes (30 mN m⁻¹), suggesting that Bz-Arg-NHC₁₀ has the ability to penetrate into biological membranes even at high lipid packing densities (Marsh 1996). Interestingly, the net variation of the maximum π (π_{max}), can arise from the detergent-like behavior of this compound that once incorporated into the lipid film may reach a surface concentration high enough to induce the lipid removal from the monolayer to the aqueous subphase by the formation of mixed micelles (Nitenberg et al. 2018). Supporting this hypothesis, SPR responses and AFM images showed a similar trend, suggesting both the adsorption of the surfactant's molecules—which produces a disorganization of the DPPC bilayer—and the release of lipid-detergent mixed micelles once the bilayers become saturated with the surfactant's monomers. These micelles can be re-deposited on the surface, as shown in AFM images.

In all the experiments detailed in this paper, the surfactant concentration responsible for the effects observed was above its CMC value. The fact that the effects on the lipid bilayers were proportional to the surfactant concentration suggests that not only the monomers triggered membrane disruption through their insertion and mixed micelles releasing after saturation, but that also the surfactant aggregates can extract lipids via collision with the membrane.

Remarkably, all the results presented here are in concordance with the proposed hemolytic mechanism for Bz-Arg-NHC₁₀ (Fait et al. 2017). In this regard, surfactants often exhibit a dual behavior: besides the hemolytic effect, they can also protect erythrocytes against hypotonic lysis. This protective effect is often observed at surfactant concentrations below the corresponding CMC value. However, our previous published work demonstrated that Bz-Arg-NHC_n display both hemolytic and protective activity above this parameter (Fait et al. 2018). Moreover, Joondan and coworkers proved a similar trend for the hemolytic activity of aromatic amino acid-based surfactants, evidencing the crucial role of the surfactants' aggregates in the disruption of the membrane structure (Joondan et al. 2016, 2017; Fait et al. 2018).

The discussion presented up to this point allows us to explain the results obtained in regard to the antimicrobial activity observed for Bz-Arg-NHC₁₀. As opposed to the results obtained for other arginine-based surfactants

analogous to our compound, Bz-Arg-NHC₁₀ showed a broad-spectrum antimicrobial activity: e.g., its MIC value for *E. coli* is 0.45 mM, whereas ACA and CAM proved to be ineffective against this microorganism. This can be explained based on the structural differences between these two compounds and Bz-Arg-NHC₁₀, which could result in different interactions with the bacterial cell surface and the microbial membrane. Furthermore, these interactions could be influenced not only by the chemical structure of the surfactant molecule, but also by the composition of bacterial cell envelopes themselves. It is also remarkable that Bz-Arg-NHC₁₀ showed antimicrobial activity against both gram-positive and gram-negative bacterial strains in almost the same extent, a fact that is opposed to the behavior observed for other arginine-based surfactants, which were more effective against gram-positive bacteria (Fait et al. 2015). This behavior can be attributed to the presence of the benzoyl group, which increases the hydrophobic character of the surfactant, improving the surfactant molecules' ability to penetrate through the outer membrane of the gram-negative bacteria. Interestingly, this trend was also noticed by Perinelli and coworkers, who found that the *N*-benzyl group present in the cationic amino acid-based surfactants they studied enhanced the antimicrobial effect of this kind of compounds (Perinelli et al. 2019). The underlying principle for this behavior was addressed to the increase of the hydrophobicity of the molecule, especially for the derivative with a ten-carbon alkyl moiety.

Another feature of relevance concerns to MIC values reported in the literature for other amino acid derived surfactants, which are generally below the corresponding CMC value in water. This may lead to the assumption that the surfactant monomers and not its aggregates are the entities responsible for the antimicrobial activity. However, this was not observed for Bz-Arg-NHC₁₀, since the MIC values registered for this compound are above its CMC.

Finally, we consider that further studies using lipid membranes containing anionic lipids and PE are necessary to confirm whether the proposed mechanisms of interaction with red blood cells and DPPC membranes can be extrapolated to the bacterial membrane, explaining the antimicrobial mechanism of our surfactants.

Acknowledgements Financial support of MINCYT (PICT 2013-00647, PICT 2018-1651 and PICT 2016-0679), CONICET (PUE 22920170100100CO, PIP 2015-2017 1120201501 00671CO) and UNLP (11X-828 and 11/X861) is acknowledged. MH was awarded CONICET fellowship. MEF, RFV, SM, MADM and SRM are members of the CONICET Researcher Career. MEV and LB belong to the CICPBA Researcher Career.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest. This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by the any of the authors.

References

- Castillo JA, Pinazo A, Carilla J et al (2004) Interaction of antimicrobial arginine-based cationic surfactants with liposomes and lipid monolayers. *Langmuir* 20:3379–3387. <https://doi.org/10.1021/la036452h>
- Castillo JA, Infante MR, Manresa À et al (2006) Chemoenzymatic synthesis and antimicrobial and haemolytic activities of amphiphilic bis(phenylacetylarginine) derivatives. *ChemMedChem* 1:1091–1098. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600148>
- Colomer A, Pinazo A, Manresa MA et al (2011) Cationic surfactants derived from lysine: effects of their structure and charge type on antimicrobial and hemolytic activities. *J Med Chem* 54:989–1002. <https://doi.org/10.1021/jm101315k>
- Colomer A, Perez L, Pons R et al (2013) Mixed monolayer of DPPC and lysine-based cationic surfactants: an investigation into the antimicrobial activity. *Langmuir* 29:7912–7921. <https://doi.org/10.1021/la401092j>
- Daza Millone MA, Vázquez RF, Maté SM, Vela ME (2018) Phase-segregated membrane model assessed by a combined SPR-AFM Approach. *Colloids Surf B Biointerfaces* 172:423–429. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.066>
- Epand R, Epand R (2009) Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1788:289–294. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2008.08.023>
- Fait ME, Garrote GL, Clapés P et al (2015) Biocatalytic synthesis, antimicrobial properties and toxicity studies of arginine derivative surfactants. *Amino Acids* 47:1465–1477. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1979-0>
- Fait ME, Hermet M, Comelles F et al (2017) Microvesicle release and micellar attack as the alternative mechanisms involved in the red-blood-cell-membrane solubilization induced by arginine-based surfactants. *RSC Adv*. <https://doi.org/10.1039/c7ra03640j>
- Fait ME, Hermet M, Vazquez R et al (2018) Volume expansion of erythrocytes is not the only mechanism responsible for the protection by arginine-based surfactants against hypotonic hemolysis. *Colloids Surf B Biointerfaces*. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.07.005>
- Fait M, Bakas L, Garrote G et al (2019) Cationic surfactants as anti-fungal agents. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:97–112. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9467-6>
- Helenius A, McCaslin DR, Fries E, Tanford C (1979) Properties of detergents. *Methods in enzymology*. Academic Press, New York, pp 734–749
- Infante MR, Molinero J, Erra P et al (1985) A comparative study on surface active and antimicrobial properties of some N^{α} -lauroyl- L^{α} , ω Dibasic aminoacids derivatives. *Fette Seifen Anstrichm* 87:309–313. <https://doi.org/10.1002/lipi.19850870805>
- Infante M, Pinazo A, Seguer J (1997) Non-conventional surfactants from amino acids and glycolipids: structure, preparation and properties. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 123–124:49–70. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(96\)03793-4](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(96)03793-4)
- Inoue T, Iwanaga T, Fukushima K, Shimozawa R (1988) Biphasic effect of alkyltrimethylammonium bromides on gel-to-liquid-crystalline phase transition temperature of dilaurylphosphatidic acid (DLPA) vesicle membrane. *Chem Lett* 17:277–280. <https://doi.org/10.1246/cl.1988.277>
- Joondan N, Jhaumeer Laullo S, Caumul P et al (2016) Synthesis, physicochemical properties and membrane interaction of novel quaternary ammonium surfactants derived from L-tyrosine and L-DOPA in relation to their antimicrobial, hemolytic activities and in vitro cytotoxicity. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 511:120–134. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.09.050>
- Joondan N, Jhaumeer Laullo S, Caumul P (2017) Amino acids: building blocks for the synthesis of greener amphiphiles. *J Dispers Sci Technol* 39:1550–1564. <https://doi.org/10.1080/01932691.2017.1421085>
- Lima L, Giannotti M, Redondo-Morata L et al (2013) Morphological and nanomechanical behavior of supported lipid bilayers on addition of cationic surfactants. *Langmuir* 29:9352–9361. <https://doi.org/10.1021/la400067n>
- Lind T, Skoda M, Cárdenas M (2019) Formation and characterization of supported lipid bilayers composed of phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol by vesicle fusion, a simple but relevant model for bacterial membranes. *ACS Omega* 4:10687–10694. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01075>
- Marsh D (1996) Lateral pressure in membranes. *Biochim Biophys Acta Rev Biomembr* 1286:183–223. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(96\)00009-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(96)00009-3)
- Morán C, Clapés P, Comelles F et al (2001) Chemical structure/property relationship in single-chain arginine surfactants. *Langmuir* 17:5071–5075. <https://doi.org/10.1021/la010375d>
- Morán MC, Pinazo A, Pérez L et al (2004) “Green” amino acid-based surfactants. *Green Chem* 6:233–240. <https://doi.org/10.1039/b400293h>
- Morandat S, El Kirat K (2007) Solubilization of supported lipid membranes by octyl glucoside observed by time-lapse atomic force microscopy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 55:179–184. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2006.11.039>
- Müller D, Janovjak H, Lehto T et al (2002) Observing structure, function and assembly of single proteins by AFM. *Prog Biophys Mol Biol* 79:1–43
- Nitenberg M, Bénarouche A, Maniti O et al (2018) The potent effect of mycolactone on lipid membranes. *PLoS Pathog* 14:1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006814>
- Perinelli DR, Petrelli D, Vitali LA et al (2019) Quaternary ammonium leucine-based surfactants: the effect of a benzyl group on physicochemical properties and antimicrobial activity. *Pharmaceutics* 11:287. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11060287>
- Pinazo A, Pons R, Pérez L, Infante MR (2011) Amino acids as raw material for biocompatible surfactants. *Ind Eng Chem Res* 50:4805–4817. <https://doi.org/10.1021/ie1014348>
- Pinazo A, Pérez L, Morán M, Pons R (2019) Arginine-based surfactants: synthesis, aggregation properties, and applications, 2nd edn. Elsevier Inc., Amsterdam
- Rich R, Myszkka D (2000) Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. *Curr Opin Biotechnol* 11:54–61. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)00054-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)00054-3)
- Rosen M (2004) Surfactants and interfacial phenomena. Wiley, Hoboken
- Tripathy DB, Mishra A, Clark J, Farmer T (2018) Synthesis, chemistry, physicochemical properties and industrial applications of amino acid surfactants: a review. *Comptes Rendus Chim* 21:112–130. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2017.11.005>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.