

# OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE SURFACTANTES DERIVADOS DE ARGININA OBTENIDOS POR BIOCATÁLISIS.

Caracterización del mecanismo  
de interacción con eritrocitos.

Marzo 2016 – La Plata, Buenos Aires, Argentina

El presente trabajo para optar al título de Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CiProVe), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Laura Bakás y tutoría de la Lic. María Elisa Fait.

# AGRADECIMIENTOS

## **Agradecimientos**

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por la formación académica brindada.

Al Centro de Investigación de Proteínas Vegetales por haber brindado el lugar y equipo para desarrollar este trabajo.

A mi directora, Dra. Laura Bakás, a la Dra. Susana R. Morcelle del Valle y a M. Elisa Fait por su dedicación, estímulo, confianza y enseñanzas.

A todos los laboratorios de la Universidad que nos abrieron sus puertas y prestaron sus equipos para hacer este trabajo posible.

A mi familia, en especial a mi mamá, mi novio, mis amigas de colegio y de la facultad.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

## Índice de Contenidos

Índice de Figuras .....	8
Índice de Tablas .....	10
Abreviaturas .....	11
<b>Capítulo 1. Introducción y Objetivos .....</b>	<b>12</b>
1.1. Surfactantes .....	13
1.1.1. Generalidades .....	13
1.1.1.1. Concentración micelar crítica .....	13
1.1.2. Surfactantes derivados de aminoácidos .....	14
1.1.2.1. Surfactantes catiónicos derivados de arginina .....	15
1.1.2.2. Aplicación de las proteasas en la síntesis biocatalítica de péptidos y otros derivados peptídicos .....	16
1.1.2.3. Formación de enlaces amida bajo control termodinámico .....	17
1.1.2.4. Formación de enlaces amida bajo control cinético.....	18
1.2. Interacción membrana-surfactante .....	19
1.2.1. Sistemas de membrana modelo .....	20
1.2.1.1. Eritrocitos de mamífero .....	20
1.3. Objetivos generales del plan de trabajo .....	22
1.4. Objetivos específicos del plan de trabajo .....	23
<b>Capítulo 2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>24</b>

2.1. Preparación del biocatalizador. Inmovilización del extracto enzimático de papaína por adsorción en poliamida.....	25
2.2. Síntesis y purificación de surfactantes catiónicos derivados de arginina .....	25
2.2.1. Síntesis semipreparativa de $N^\alpha$ -benzoil-L-arginina-decilamida y $N^\alpha$ -benzoil-L-arginina-dodecilamida (Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> ) .....	25
2.2.2. Purificación de Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> por cromatografía de intercambio iónico.....	26
2.3. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) de Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> .....	26
2.3.1. Determinación por conductimetría .....	26
2.4. Caracterización del mecanismo de interacción de los surfactantes con eritrocitos .....	27
2.4.1. Preparación de las suspensiones de eritrocitos humanos y de carnero .....	27
2.4.2. Determinación de la actividad hemolítica de Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> .....	28
2.4.3. Efecto de los surfactantes sobre la resistencia de los eritrocitos a la lisis hipotónica .....	28
2.4.3.1. Protección contra la hemólisis hipotónica .....	28
2.4.3.2. Cálculo del porcentaje de expansión del volumen celular .....	29
2.4.4. Efecto de los surfactantes sobre la morfología de los eritrocitos .....	30
2.5. Análisis estadístico .....	30
<b>Capítulo 3. Resultados y Discusión .....</b>	<b>31</b>
3.1. Síntesis y purificación de Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> .....	32

3.2. Determinación por conductimetría de la CMC de Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> .....	33
3.3. Caracterización del mecanismo de interacción de los surfactantes con eritrocitos .....	38
3.3.1. Actividad hemolítica de Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> .....	38
3.3.2. Efecto de los surfactantes sobre la resistencia de los eritrocitos a la lisis hipotónica .....	41
3.3.3 Efecto de los surfactantes sobre la morfología de los eritrocitos .....	50
<b>Capítulo 4. Conclusiones y Perspectivas .....</b>	<b>53</b>
4.1. Conclusiones generales .....	54
4.2. Perspectivas .....	57
<b>Anexo.....</b>	<b>58</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>60</b>

## Índice de Figuras

Figura 1.1 Clasificación de surfactantes según su estructura .....	15
Figura 1.2 Estructura de surfactantes derivados de arginina de cadena simple .....	16
Figura 1.3 Síntesis catalizada por proteasas bajo control termodinámico.....	18
Figura 1.4 Síntesis catalizada por proteasas bajo control cinético. ....	18
Figura 1.5 Modelo de membrana Singer-Nicolson: versión modificada y actualizada según Engelman .....	19
Figura 3.1 Esquema de reacción de síntesis para BzArgNHC <sub>n</sub> , utilizando papaína adsorbida en poliamida (pap/pol) como biocatalizador.....	32
Figura 3.2 Cromatograma correspondiente a la purificación de Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> por cromatografía de intercambio catiónico. ....	33
Figura 3.3 Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) en función de la concentración (mM) de Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> .....	34
Figura 3.4 Comparación de las estructuras de las series de surfactantes derivados de arginina.....	36
Figura 3.5 Estructura química de los surfactantes gemini $N^\alpha, N^\omega$ -bis( $N^\alpha$ -lauroil-arginina) $\alpha, \omega$ -dialquilamida .....	37
Figura 3.6 Hemólisis inducida por Bz-Arg-NHC12, Bz-Arg-NHC10 y cetrimide en eritrocitos humanos y de carnero .....	39
Figura 3.7 Dependencia del grado de hemólisis hipotónica en función de la concentración ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> y cetrimide sobre eritrocitos humanos y de carnero .....	42
Figura 3.8 Estructura del surfactante catiónico derivado de lisina $N^\alpha$ -miristoil lisina metil éster (MLM) .....	44

Figura 3.9 Dependencia del grado de hemólisis hipotónica en función de la concentración (en veces de CMC) de Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> y cetrimide sobre eritrocitos humanos y de carnero .....	46
Figura 3.10 Lisis osmótica de eritrocitos humanos y de carnero en PBS adicionando Bz-Arg-NHC10, Bz-Arg-NHC12 y cetrimide.....	48
Figura 3.11 Morfología de los glóbulos rojos humanos.....	50
Figura 3.12 Cambios morfológicos de GRH incubados en presencia de Bz-Arg-NHC <sub>n</sub> .....	51

## Índice de Tablas

Tabla 1.1 Porcentaje molar de composición lipídica de fantasmas de eritrocitos humanos y de carnero .....	21
Tabla 3.1 Concentración micelar crítica de los surfactantes derivados de arginina obtenida por medidas de conductividad y tensión superficial .....	35
Tabla 3.2. Propiedades fisicoquímicas de los surfactantes derivados de arginina.....	37
Tabla 3.3. Valores de HC <sub>50</sub> para cada surfactante expresados en µg/ml .....	40
Tabla 3.4 Actividad hemolítica de los surfactantes derivados de arginina de la serie II y III .....	41
Tabla 3.5 Valores de cAH <sub>máx</sub> y pAH para eritrocitos humanos y de carnero .....	43
Tabla 3.6 Porcentaje de expansión de volumen inducido por los surfactantes en eritrocitos de carnero y humanos .....	47
Tabla A1. CMC, actividad hemolítica, protección frente a la lisis hipotónica y porcentaje de expansión del volumen celular inducida por los surfactantes en eritrocitos de carnero y humanos .....	59
Tabla A2. Propiedades de surfactantes derivados de arginina .....	59

## Abreviaturas

ACN = acetonitrilo

ACA o Arg-NHC<sub>10</sub> = arginina-*N*-caproil amida diclorhidrato

ALA o Arg-NHC<sub>12</sub> = arginina-*N*-lauril amida diclorhidrato

BAEE o Bz-Arg-OEt = *N*<sup>α</sup>-benzoil-L-arginina etil éster

Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> = *N*<sup>α</sup>-benzoil-L-arginina-decilamida

Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> = *N*<sup>α</sup>-benzoil-L-arginina-dodecilamida

Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> = Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>

C<sub>50</sub> = concentración osmótica que produce el 50% de hemólisis

cAH<sub>máx</sub> = concentración antihemolítica máxima

CAM = *N*<sup>α</sup>-caproil-L-arginina-metil éster clorhidrato

CHO = colesterol

C<sub>iso</sub> = concentración isoosmótica

CMC = concentración micelar crítica

DTT = 1,4-ditiotreitol

EDTA = ácido etilendiaminotetra-acético

GR = glóbulos rojos

GRC = glóbulos rojos de carnero

GRH = glóbulos rojos humanos

HC<sub>50</sub> = concentración de surfactante que induce el 50% de hemólisis

LAM = *N*<sup>α</sup>-lauril-L-arginina-metil éster clorhidrato

MLM = *N*<sup>α</sup>-miristoil lisina metil éster

pAH = potencia antihemolítica

PBS = Buffer fosfato salino (del inglés *phosphate buffered saline*)

PC = fosfatidilcolina

PE = fosfatidiletanolamina

PI/PS = fosfatidilinositol/fosfatidilserina

rpm = revoluciones por minuto

SM = esfingomiélin

V<sub>a</sub> = volumen osmóticamente activo

VC = volúmenes de columna

V<sub>h</sub> = volumen hemolítico crítico

V<sub>na</sub> = volumen osmóticamente no activo

# CAPÍTULO 1

Introducción y Objetivos

## **1.1. Surfactantes**

### **1.1.1. Generalidades**

El término surfactante es una contracción de *surface-active agent* (Reznik *et al.* 2010). Estos son compuestos anfifílicos que, al acumularse en la interfase, pueden reducir la tensión superficial del medio donde se encuentren solubilizados, y la tensión interfacial de fluidos inmiscibles. A su vez, pueden aumentar la solubilidad, movilidad, biodisponibilidad y subsecuente degradación de compuestos insolubles en medio acuoso (Singh *et al.*, 2007).

Los surfactantes representan un conjunto de productos químicos consumidos en grandes cantidades a escala mundial diariamente. Como se sabe que pueden afectar de forma adversa a ecosistemas acuáticos, es importante que sean compuestos biodegradables y biocompatibles. Teniendo esto en cuenta, se han desarrollado moléculas que mimetizan estructuras naturales anfifílicas como lipoaminoácidos, glicolípidos y fosfolípidos, las cuales han demostrado tener baja toxicidad y buena biodegradabilidad (Pérez *et al.*, 2002).

#### **1.1.1.1. Concentración micelar crítica**

Una de las características esenciales de los compuestos anfifílicos es que, en medio acuoso, son capaces de organizarse formando distintos tipos de agregados (micelas, monocapas, bicapas, etc.) dependiendo de su tamaño y estructura molecular.

La formación de micelas es, en general, un proceso cooperativo y la concentración micelar crítica (CMC) representa la concentración límite de moléculas individuales (monómeros) que pueden existir en solución. La magnitud de la CMC depende del balance hidrofóbico-hidrofílico del monómero, así como también de la temperatura y, para surfactantes iónicos, de la fuerza iónica de la solución. (Jones 1992).

### 1.1.2. Surfactantes derivados de aminoácidos

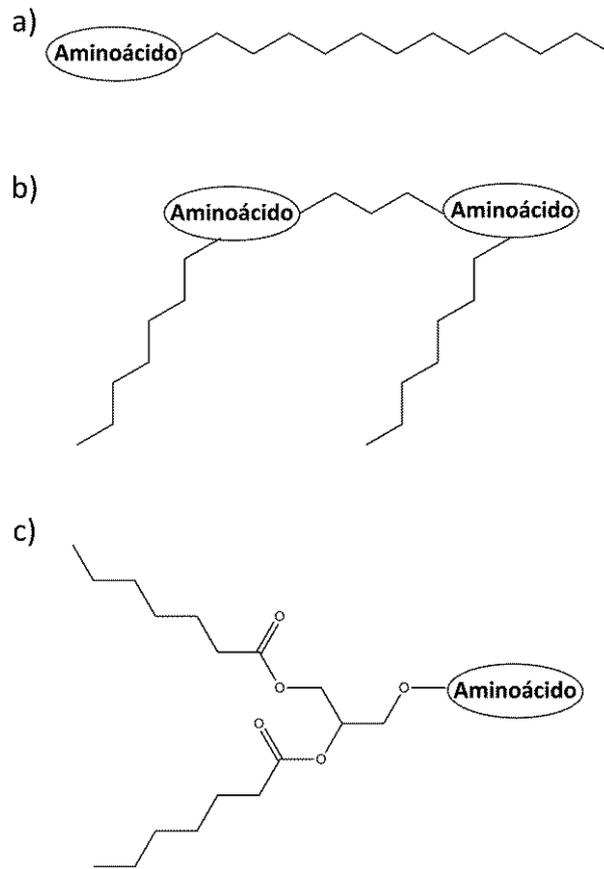
Surfactantes obtenidos a partir de materias primas renovables que mimeticen lipoaminoácidos naturales son una de las opciones más utilizadas para aplicaciones en alimentación, farmacéutica y cosmética. Inicialmente fueron utilizados como conservantes en aplicaciones médicas y cosméticas, luego se encontró que tenían actividad contra varias bacterias, virus e incluso células tumorales. (Morán *et al.*, 2004)

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 sólo 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.

La porción correspondiente al péptido o aminoácido determina las principales diferencias de adsorción, agregación y actividad biológica entre los surfactantes basados en aminoácidos. Por lo tanto, se pueden obtener surfactantes catiónicos, aniónicos, no iónicos y anfóteros dependiendo de los grupos funcionales libres. Una modificación adicional de estos grupos permite un ajuste más fino de sus propiedades según cada aplicación particular.

Según Morán *et al.* (2004), los surfactantes derivados de aminoácidos pueden clasificarse según su estructura en tres principales grupos:

- Lineales o de cadena simple (Figura 1.1 a), consiste en un aminoácido unido a una cola hidrofóbica;
- Diméricos o *gemi* (Figura 1.1 b), 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;
- Estructura tipo glicerolípidos (Figura 1.1 c), pueden ser considerados análogos de fosfolípidos o de mono- y diglicéridos. Consisten en una cabeza polar y una o dos colas hidrofóbicas unidas entre sí a través de un esqueleto de glicerol.

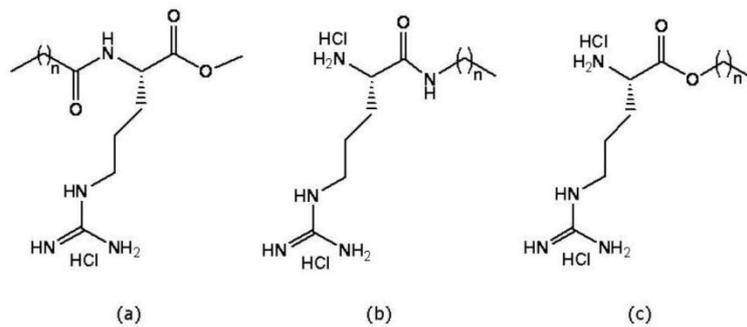


**Figura 1.1** Clasificación de surfactantes según su estructura.

#### 1.1.2.1. Surfactantes catiónicos derivados de arginina

Los lipoaminoácidos derivados de arginina fueron descritos como una familia de surfactantes catiónicos no tóxicos y biodegradables con excelentes propiedades de agregación, buena actividad superficial y actividad antimicrobiana de amplio espectro (Pérez *et al.*, 2002). Estas propiedades convierten a estos compuestos en una alternativa conveniente frente a otros surfactantes antimicrobianos con alta toxicidad intrínseca y cuestionable biodegradabilidad (Castillo *et al.*, 2004). En este aspecto, son particularmente interesantes como conservantes para alimentos y formulaciones farmacéuticas, así como también como ingredientes activos en preparaciones dermatológicas y productos de cuidado personal.

Los surfactantes derivados de arginina de cadena simple pueden agruparse según el tipo de enlace a través del cual se une la cadena hidrocarbonada a la porción aminoacídica en tres series de compuestos: (a)  $N^\alpha$ -acil arginina metil ésteres, (b) arginina- $N$ -alquilamidas y (c) arginina- $O$ -alquil ésteres (figura 1.2).



**Figura 1.2** Estructura de surfactantes derivados de arginina de cadena simple

### 1.1.2.2. Aplicación de las proteasas en la síntesis biocatalítica de péptidos y otros derivados peptídicos

Hasta hace pocos años, la síntesis de surfactantes era sólo considerada dentro de las capacidades de la química orgánica. Sin embargo, el rápido avance de la biotecnología ha despertado el interés en los “biosurfactantes”, es decir, tensioactivos obtenidos mediante el empleo de catalizadores biológicos tanto en forma de microorganismos como de enzimas aisladas (Valivety *et al.*, 1997). Este proceso de obtención, denominado biocatálisis, difiere de la de catálisis química convencional principalmente debido a las características propias del biocatalizador como su estabilidad en las condiciones del proceso y la cinética enzimática (Schmid *et al.*, 2001). Además, esta metodología ofrece una perspectiva de diseño de procesos industriales limpios, con numerosas aplicaciones, fundamentalmente porque conlleva al desarrollo de alternativas más benignas para el medio ambiente como el diseño de productos y procesos factibles y económicos basados en materias primas renovables, que reduzcan la generación de la contaminación en sus propios orígenes y minimicen el consumo de energía (Bommarius & Riebel, 2007).

Las proteasas son las enzimas de mayor relevancia tecnológica, representando cerca del 60% de las ventas del mercado de enzimas de uso industrial (Chellappan *et al.*, 2006). Las proteasas de origen vegetal representan aproximadamente un 5% del mercado mundial de las enzimas industriales. Si bien la mayor parte de las aplicaciones de las proteasas se refiere a reacciones hidrolíticas en medio acuoso para la degradación de moléculas complejas a moléculas más simples, su empleo en reacciones reversas, es decir de síntesis, ha despertado un creciente interés. Las

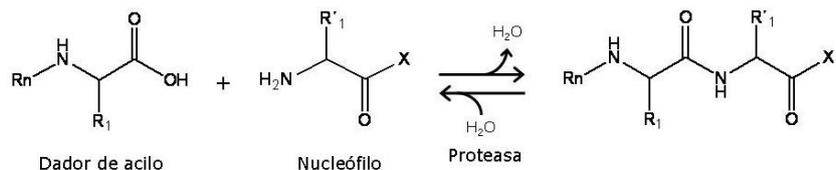
proteasas han sido empleadas de forma eficiente para la síntesis de diversos péptidos empleados en la industria alimentaria y farmacéutica, como el aspartato (Nakaoka *et al.*, 1998), el alitamo (Kim & Shin, 2001) y la kiotorfina (Lee *et al.*, 1993), y diversos derivados de hormonas como la insulina (Moriyama, 1987) y las encefalinas (Clapés *et al.*, 1995).

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 alimenticias, cerveceras, farmacéuticas, cosméticas, de cuero y textiles. Es menos costosa que enzimas microbianas y tiene una buena estabilidad térmica, comparada con otras proteasas. Como biocatalizador en química orgánica, es una de las peptidasas más usadas para la síntesis de diversos péptidos y derivados peptídicos, incluyendo polímeros de un solo aminoácido, edulcorantes peptídicos, hormonas peptídicas e isosteros peptídicos, debido a su amplia especificidad y robustez (Fait *et al.*, 2012). Se ha reportado la síntesis de numerosos surfactantes derivados de aminoácidos utilizando papaína como biocatalizador. (Castillo *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2014; Fait *et al.*, 2015).

Para que las peptidasas puedan actuar como biocatalizadores en la formación de enlaces peptídicos debe manipularse el equilibrio de la reacción. Dichas manipulaciones consisten en dos estrategias básicas: la síntesis bajo control termodinámico y la síntesis bajo control cinético.

### **1.1.2.3. Formación de enlaces amida bajo control termodinámico**

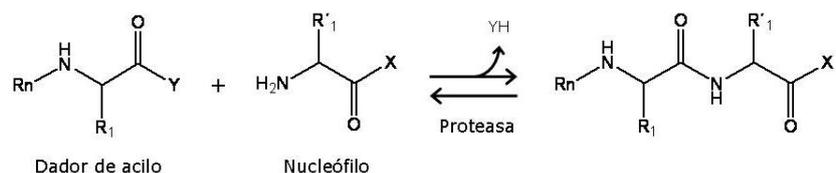
La síntesis catalizada por peptidasas bajo control termodinámico representa la reacción inversa directa de la proteólisis (Figura 1.3). En este caso se emplean solventes orgánicos y sustratos dadores de acilo cuya función carboxilato está libre. Esto permite que cualquier proteasa pueda emplearse como biocatalizador, independientemente de su mecanismo catalítico. Las mayores desventajas de esta estrategia consisten en las bajas velocidades de conversión, la gran cantidad de biocatalizador requerida y la necesidad de desplazar el equilibrio hacia la reacción espontáneamente desfavorable. La precipitación o extracción del producto favorece aún más este tipo de reacciones (Bordusa 2002).



**Figura 1.3** Síntesis catalizada por proteasas bajo control termodinámico.

#### 1.1.2.4. Formación de enlaces amida bajo control cinético

La síntesis catalizada por peptidasas bajo control cinético requiere del empleo de proteasas capaces de formar un intermediario reactivo acil-enzima, como es el caso de las proteasas serínicas o cisteínicas. El factor clave de esta estrategia consiste en el uso de moléculas dadoras de acilo levemente activadas como ésteres o amidas, lo que acelera la velocidad de reacción y minimiza el requerimiento de enzima. El intermediario acil-enzima puede luego ser atacado por un nucleófilo (agua, en el caso de hidrólisis, u otro nucleófilo como una amina, un alcohol, un tiol, etc.) para formar el compuesto deseado (Bordusa 2002).

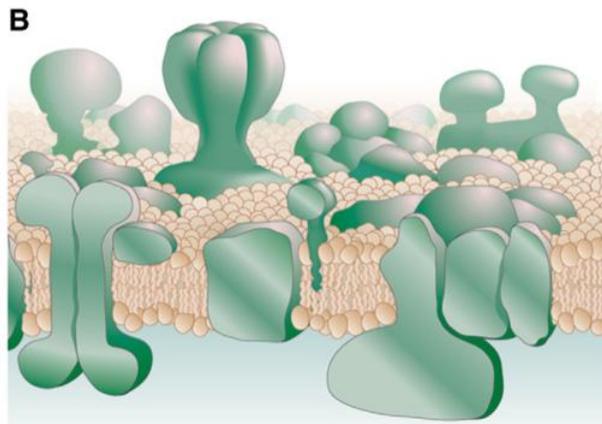


**Figura 1.4** Síntesis catalizada por proteasas bajo control cinético.

Todas estas propiedades, incluyendo la fácil obtención a partir de la fuente natural, convierten a la papaína en una herramienta biocatalítica versátil para reacciones de condensación que involucren la síntesis de enlaces amida y éster entre un amplio rango de aminoácidos y una gran cantidad de nucleófilos simples conteniendo restos amina o alcohol. (Fait *et al.*, 2015). Estos compuestos así obtenidos, por el tipo de estructura que presentan, tienen propiedades tensoactivas.

## 1.2. Interacción membrana-surfactante

Las membranas biológicas consisten en una matriz hidrofóbica, formada por una doble capa de fosfolípidos distribuidos asimétricamente, a la que las proteínas se asocian de diversas formas (integrales, periféricas o por uniones transitorias). Poseen un papel importante en la vida celular, el cual excede el sólo ser la envoltura para los componentes celulares. Regulan el transporte de entrada y salida de iones y metabolitos, gobiernan las comunicaciones intercelulares (Selim *et al.*, 2009) y juegan un rol central en la mayoría de los procesos celulares, ya que una parte muy importante de los procesos bioquímicos que son esenciales para la célula ocurren dentro de las mismas (Brannigan *et al.*, 2006; Goñi, 2014).



**Figura 1.5** Modelo de membrana Singer-Nicolson: versión modificada y actualizada según Engelman (2005). Figura tomada de Goñi, 2014.

Las interacciones entre moléculas anfipáticas y las membranas son de gran interés tanto en la fisiología como en la bioquímica. La forma en que los surfactantes interactúan con las biomembranas todavía no está bien definido, aunque se sabe que depende de ciertos factores tales como el tipo de surfactante, su estructura y concentración, la composición de la membrana en estudio y la relación lípido/surfactante, entre otros (Maher and Singer 1984; Preté *et al.* 2011; Selim *et al.* 2009). La hipótesis más aceptada es que los surfactantes se intercalan en la bicapa lipídica de tal forma que la porción hidrofílica queda localizada en la interfase hidrofílica/hidrofóbica de la membrana y la porción hidrofóbica en el centro de la

bicapa ocupado por las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos (Sánchez *et al.*, 2007).

Experimental y teóricamente se mostró que hay varios pasos involucrados durante la interacción bicapa-detergente hasta la ruptura de la membrana. Se han propuesto diferentes modelos que explican los pasos involucrados en la solubilización de las membranas (Preté *et al.*, 2011). Según el modelo de Lichtenberg *et al.* (2000), pueden observarse tres etapas principales al ir aumentando la concentración de surfactante:

- a) A bajas concentraciones de detergente y baja relación molar detergente/lípido, las moléculas de surfactante se insertan en la bicapa lipídica hasta que se alcanza una concentración límite de saturación;
- b) Pasando esta concentración, los lípidos son extraídos de la membrana por micelas de detergente previamente formadas, dando lugar a la coexistencia de bicapas que contienen detergente y micelas que contienen lípidos;
- c) Finalmente ocurre la solubilización total de la membrana, y una adición extra de surfactante lleva a la formación de micelas con una relación molar detergente/lípido mayor.

Dado que la perturbación de la membrana celular por estos compuestos es dirigida principalmente por procesos fisicoquímicos, los sistemas modelo de membrana pueden aportar información valiosa para comprender el mecanismo de acción de estas moléculas (Castillo *et al.*, 2004).

### **1.2.1 Sistemas de membrana modelo**

#### **1.2.1.1 Eritrocitos de mamíferos**

Los eritrocitos de mamíferos son el sistema modelo de membrana más popular por diversos motivos. Poseen una estructura única comparada con la de otros tipos celulares: son enucleados, lo que los convierte en el modelo más sencillo y útil para medir propiedades de membrana al no contener organelas internas que puedan interferir en las determinaciones. Los glóbulos rojos tienen forma de disco con una sección transversal bicóncava, lo que les provee un área superficial máxima para el mismo volumen celular. Su contenido fundamental es la hemoglobina, lo que facilita el

estudio de su lisis mediante la cuantificación de hemoglobina liberada. Además de ser fáciles de obtener en cantidad, tienen suficientes funciones comunes con otras células especializadas, por lo que los resultados obtenidos pueden ser buenos indicadores de la actividad biológica en condiciones fisiológicas (Nogueira *et al.*, 2012; Selim *et al.*, 2009; Svetina *et al.*, 2004; Vives *et al.*, 1999).

Para realizar este trabajo se eligieron eritrocitos humanos (GRH) y de carnero (GBC), cuya composición lipídica es conocida y se detalla en la tabla 1.1.

**Tabla 1.1** Porcentaje molar de composición lipídica de fantasmas de eritrocitos humanos y de carnero.

Lípidos principales	Fantasmas Humanos <sup>(a)</sup>	Fantasmas de carnero <sup>(b)</sup>
<b>CHO</b>	54,0 ± 3,4	39,2 ± 4,4
<b>SM</b>	12,1 ± 2,1	41,5 ± 3,2
<b>PC</b>	17,7 ± 1,6	0,0 ± 0,1
<b>PE</b>	11,7 ± 0,9	14,0 ± 1,7
<b>PI/PS</b>	6,4 ± 0,5	5,1 ± 0,4

<sup>(b)</sup> Koumanov *et al.* 2005; <sup>(c)</sup> Mate *et al.* 2014. CHO: colesterol; SM: esfingomielina; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; PI/PS: fosfatidilinositol/fosfatidilserina.

Como se puede apreciar, la composición lipídica de los eritrocitos de las especies utilizadas difiere entre sí. Si bien el contenido de colesterol es similar para ambas especies, existen diferencias en la cantidad relativa de fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM). En el caso de los GRC, se observa una alta proporción de SM y ausencia de PC, mientras que en los GRH se aprecia una menor proporción de SM respecto de los GRC y presencia de PC.

La hemólisis ocasionada por surfactantes es un proceso de gran importancia teórica y práctica ya que pueden evaluarse de esta forma diversas propiedades de los mismos, como su citotoxicidad, y potencial irritación ocular. Estos compuestos interactúan con la membrana de los eritrocitos en una forma bifásica, protegiéndolos de la hemólisis hipotónica a bajas concentraciones e induciendo la hemólisis a concentraciones mayores (Sánchez *et al.*, 2007).

### 1.3 Objetivos generales del plan de trabajo

1. Llevar a cabo una búsqueda bibliográfica sobre el mecanismo de catálisis enzimática, en particular del uso de proteasas como biocatalizadores en reacciones de condensación de aminoácidos, y específicamente, de su uso para la síntesis de surfactantes derivados de aminoácidos, la purificación de los mismos y caracterización de los distintos mecanismos de interacción de surfactantes con membrana.

2. Obtener adiestramiento en el manejo de procedimientos básicos de laboratorio:

- a) preparación de soluciones buffer y otros reactivos de uso común,
- b) cuantificación de proteínas,
- c) preparación de los biocatalizadores,
- d) desarrollo de distintas técnicas cromatográficas para hacer seguimientos de la cinética de las reacciones y la purificación de los productos,
- e) desarrollo de criterios para determinar la pureza y la identidad de los productos obtenidos,
- f) determinación de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los productos obtenidos,

3. Desarrollo de criterios para analizar y discutir resultados experimentales,

4. Integrarse adecuadamente a un grupo de trabajo.

#### **1.4 Objetivos específicos del plan de trabajo**

1. Obtención y purificación de surfactantes derivados de aminoácidos obtenidos por biocatálisis,
2. Caracterización de la CMC de los dos surfactantes obtenidos,
3. Determinación de la actividad hemolítica y protección contra la hemólisis hipotónica de los surfactantes empleando eritrocitos humanos y de carnero,
4. Análisis de los resultados y redacción del trabajo final.

# CAPÍTULO 2

Materiales y Métodos

## **2.1. Preparación del biocatalizador: inmovilización del extracto enzimático de papaína por adsorción en poliamida**

Para la preparación del inmovilizado enzimático se disolvieron 300 mg del extracto enzimático (papaína, Fluka) junto con 150 mg de 1,4-ditiotreitol (DTT, Invitrogen) 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 vortex. Finalmente, el biocatalizador fue secado por liofilización y almacenado a -20°C.

## **2.2. Síntesis y purificación de surfactantes catiónicos derivados de arginina**

### **2.2.1. Síntesis semipreparativa de $N^\alpha$ -benzoil-L-arginina-decilamida y $N^\alpha$ -benzoil-L-arginina-dodecilamida (Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>)**

Para la preparación de la mezcla de reacción,  $N^\alpha$ -benzoil-L-arginina etil éster (Bz-Arg-OEt o BAEE, 20 mM) y decil- o dodecilamina (30 mM) fueron disueltos en acetonitrilo (ACN) anhidro conteniendo 0,25% v/v de agua. Se incubó 1 g del biocatalizador con 10 ml de la mezcla de reactivos bajo atmosfera de nitrógeno, en un Erlenmeyer cerrado herméticamente, con agitación constante (250 rpm) a 37°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 acetonitrilo (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 MeOH:H<sub>2</sub>O 4:1 (3x10 ml).

### **2.2.2. Purificación de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> por cromatografía de intercambio iónico**

Para la purificación de los surfactantes, Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, se realizaron cromatografías de intercambio catiónico en un equipo Äkta Purifier 10 (GE Healthcare), utilizando una columna SP Sepharose Fast Flow (12 ml volumen de lecho, GE Healthcare) según lo descrito por Fait *et al.*, (2015). Las mezclas de extracción conteniendo los productos fueron filtradas con una membrana de nylon de 0,22 µm (Osmonics). Las fases móviles empleadas fueron buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5 con 50% v/v de etanol (buffer A) y buffer bórico-borato 0,01 M pH 8,5 con 50% v/v de etanol y NaCl 1 M (buffer B). Se inyectó 1 ml de muestra. El material no retenido fue eluído 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. 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 minutos) y evaporación del solvente.

## **2.3. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>**

### **2.3.1. Determinación por conductimetría**

Se determinó la concentración micelar crítica (CMC) de los surfactantes conductimétricamente. En cada caso, se prepararon soluciones concentradas de los surfactantes en agua nanopura MilliQ®, las cuales fueron diluídas progresivamente. Para cada medida, las soluciones se equilibraron a 25°C durante 10 minutos, registrándose a continuación su conductividad utilizando un conductímetro (WTW - Modelo LF 530, celda WTW LTA 01,

K = 0,104). Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado. Los valores de CMC para cada compuesto se obtuvieron a partir de las gráficas de conductividad en función de la concentración del surfactante.

## **2.4. Caracterización del mecanismo de interacción de los surfactantes con eritrocitos**

### **2.4.1. Preparación de las suspensiones de eritrocitos humanos y de carnero**

Para la preparación de la suspensión de eritrocitos humanos (GRH) se utilizó el protocolo descrito por Pape *et al.* (1987). Los glóbulos rojos fueron obtenidos a partir de sangre de voluntarios sanos del personal de nuestro laboratorio (CIPROVE, La Plata, Argentina) utilizándose EDTA para prevenir su coagulación. Los eritrocitos fueron aislados por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, y lavados tres veces con una solución isotónica de buffer fosfato salino (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*) conteniendo NaCl 123,3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 22,2 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,6 mM en agua nanopura MilliQ® (pH 7,4; 300 mOsmol/l). Finalmente, las células se resuspendieron en PBS a una densidad de 8x10<sup>9</sup> células/ml.

Los glóbulos rojos de carnero (GRC) fueron obtenidos a partir de sangre de especímenes sanos pertenecientes a la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina) utilizándose EDTA para prevenir su coagulación. Para su conservación, los eritrocitos fueron aislados por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente, y resuspendidos en una solución de Alsever conteniendo dextrosa 113,79 mM, Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O 27,2 mM y NaCl 71,87 mM en agua nanopura MilliQ® (pH 6,1). Para los ensayos, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en el mismo buffer a una densidad de 1x10<sup>10</sup> células/ml.

#### **2.4.2. Determinación de la actividad hemolítica de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>**

La actividad hemolítica de los surfactantes BzArgNHC<sub>10</sub> y BzArgNHC<sub>12</sub> fue comparada con la de cetrimide, un surfactante catiónico comercial, de acuerdo a Sánchez *et al.* (2006). Se prepararon soluciones de surfactantes a distintas concentraciones, entre 1,6 y 2000 µg/ml para BzArgNHC<sub>n</sub> y entre 1,9 y 1000 µg/ml para cetrimide, en PBS isotónico (300 mOsm/l). Alícuotas de las suspensiones de eritrocitos (25 µl) humanos o de carnero fueron expuestas a 1 ml de las soluciones de los surfactantes e incubados a 37°C por 10 min. Se realizaron controles con agua nanopura MilliQ® (100% de hemólisis) y PBS isotónico. Posteriormente se recuperó el sobrenadante de cada muestra mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 min. La cuantificación de la hemoglobina liberada en el sobrenadante se midió espectrofotométricamente a 540 nm, y se determinó el porcentaje de hemólisis por comparación con el control tratado con agua nanopura MilliQ® (100% de hemólisis). Todas las determinaciones se realizaron al menos por triplicado.

Con los datos obtenidos se construyeron curvas dosis-respuesta para cada uno de los compuestos, a partir de las cuales se estableció la concentración que induce el 50% de hemólisis (HC<sub>50</sub>).

#### **2.4.3. Efecto de los surfactantes sobre la resistencia de los eritrocitos a la lisis hipotónica**

##### **2.4.3.1. Protección contra la hemólisis hipotónica**

La actividad antihemolítica de BzArgNHC<sub>10</sub> y BzArgNHC<sub>12</sub> fue comparada con la de cetrimide de acuerdo con Nogueira *et al.* (2012). Se prepararon soluciones de distintas concentraciones de los surfactantes por debajo de sus respectivas HC<sub>50</sub> (entre 0,8 y 200 µg/ml para BzArgNHC<sub>10</sub>; 1,2 y 300 µg/ml para BzArgNHC<sub>12</sub> y entre 0,2 y 50 µg/ml para cetrimide) en PBS hipotónico. Éste último fue preparado por dilución de PBS 300 mOsm/l de manera tal que ocasionara el 80-90% de hemólisis de las muestras sin tratar (ausencia de los surfactantes). Alícuotas (25 µl) de la suspensión de eritrocitos humanos o de carnero fueron añadidas a 1 ml de las soluciones de los

surfactantes e incubadas a 37°C durante 10 min, incluyéndose además controles en presencia de agua nanopura MilliQ® y PBS hipotónico. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 15 min para separar las células intactas. El grado de hemólisis fue determinado según el procedimiento descrito en el punto 2.4.2. Todas las medidas fueron realizadas al menos por triplicado.

Con los datos obtenidos se construyeron curvas dosis-respuesta para cada uno de los compuestos, estableciéndose en cada caso la concentración antihemolítica máxima ( $cAH_{m\acute{a}x}$ ), definida como la concentración de cada surfactante responsable de la máxima protección contra la hemólisis hipotónica. Asimismo, la potencia antihemolítica (pAH) de los surfactantes fue expresada como el porcentaje de reducción de hemólisis alcanzado a la  $cAH_{m\acute{a}x}$  respecto del valor obtenido en las muestras sin tratar.

#### **2.4.3.2. Cálculo del porcentaje de expansión de volumen celular**

Se determinó el porcentaje de expansión del volumen celular inducido por los surfactantes sobre GRH y GRC. Para ello se prepararon soluciones de los surfactantes a sus respectivas  $cAH_{m\acute{a}x}$  en PBS de osmolaridades entre 85 y 205 mOsm/l para los GRH y entre 115 y 235 mOsm/l para los GRC. Durante el ensayo, alícuotas (25  $\mu$ l) de las suspensiones de eritrocitos fueron incubadas con 1 ml de las soluciones de los surfactantes. Asimismo, se realizaron controles de los eritrocitos incubados en PBS de las osmolaridades antes detalladas sin la adición de los surfactantes. El grado de hemólisis en cada caso fue determinado por el procedimiento descrito en el punto 2.4.2. Todas las medidas fueron realizadas al menos por triplicado.

Con los resultados obtenidos se construyeron curvas dosis-respuesta y se determinó en cada caso la osmolaridad capaz de provocar el 50% de hemólisis ( $C_{50}$ ). Los cálculos de la expansión de volumen inducido por los surfactantes se llevaron a cabo según Ponder (1948), quien propone que la asociación entre el volumen hemolítico crítico ( $V_h$ ) y la concentración osmótica que produce el 50% de hemólisis ( $C_{50}$ ) es descripta por la siguiente ecuación:

$$V_h = V_{na} + V_a (C_{iso}/C_{50})$$

Donde  $V_{na}$  es el volumen osmóticamente no activo del GR, representado por el 30% del volumen normal del eritrocito ( $V_o$ );  $V_a$  es la parte osmóticamente activa del volumen del eritrocito, representado por el 70% de  $V_o$  ( $V_o = 98$  fl;  $V_{na} = 29,4$  fl;  $V_a = 68,6$  fl para los GRH y  $V_o = 34$  fl;  $V_{na} = 10,2$  fl;  $V_a = 23,8$  fl para los GRC); y  $C_{iso}$  es la concentración isoosmótica (300 mOsm/l). Para cada compuesto, se calculó el aumento porcentual del  $V_h$  de las células tratadas respecto del  $V_h$  control (ausencia de los surfactantes).

#### **2.4.4. Efecto de los surfactantes sobre la morfología de los eritrocitos**

Se estudió el efecto de los surfactantes sobre la morfología de eritrocitos humanos a través de su observación al microscopio óptico. Se prepararon soluciones stock 1 mg/ml de los surfactantes en PBS isotónico (300 mOsm/l). Durante cada ensayo, 2  $\mu$ l de la solución del surfactante fueron colocados sobre un portaobjetos, adicionándole 3  $\mu$ l de una solución de albúmina 0,5% en PBS 300 mOsm/l (Jay 1975). Luego de agregar 0,5  $\mu$ l de la suspensión de eritrocitos ( $8 \times 10^9$  células/ml) las muestras fueron cubiertas con un cubreobjetos y observadas al microscopio óptico (Olympus) bajo un aumento de 1000 X, tomándose fotografías a distintos tiempos.

#### **2.5. Análisis estadístico**

Los valores de CMC fueron calculados a partir de la intersección lineal de las curvas de conductividad vs concentración. Dichas curvas fueron obtenidas mediante un análisis de regresión lineal utilizando el programa OriginPro 8<sup>®</sup>.

Los resultados de hemólisis (isotónica e hipotónica) fueron expresados como porcentaje de hemólisis respecto del control completamente hemolizado. Los valores de  $HC_{50}$  y  $C_{50}$  se calcularon a partir de las curvas dosis-respuesta correspondientes ajustadas a la distribución de Boltzmann utilizando el programa OriginPro 8<sup>®</sup>.

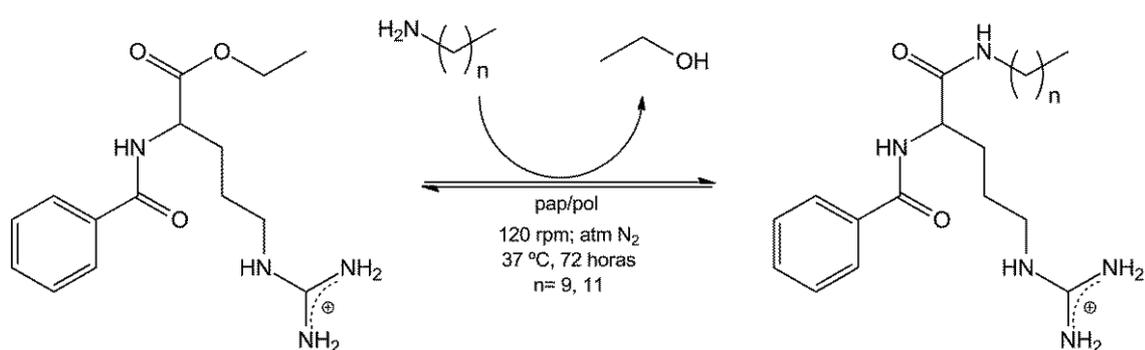
Para los ensayos de protección contra la hemólisis hipotónica se evaluaron diferencias significativas entre las medias de los distintos grupos de datos mediante el *test one-way ANOVA (analysis of variance)* utilizando el programa GraphPad Prism<sup>®</sup>, seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples (*P-value* < 0,05).

# CAPÍTULO 3

Resultados y Discusión

### 3.1. Síntesis y purificación de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>

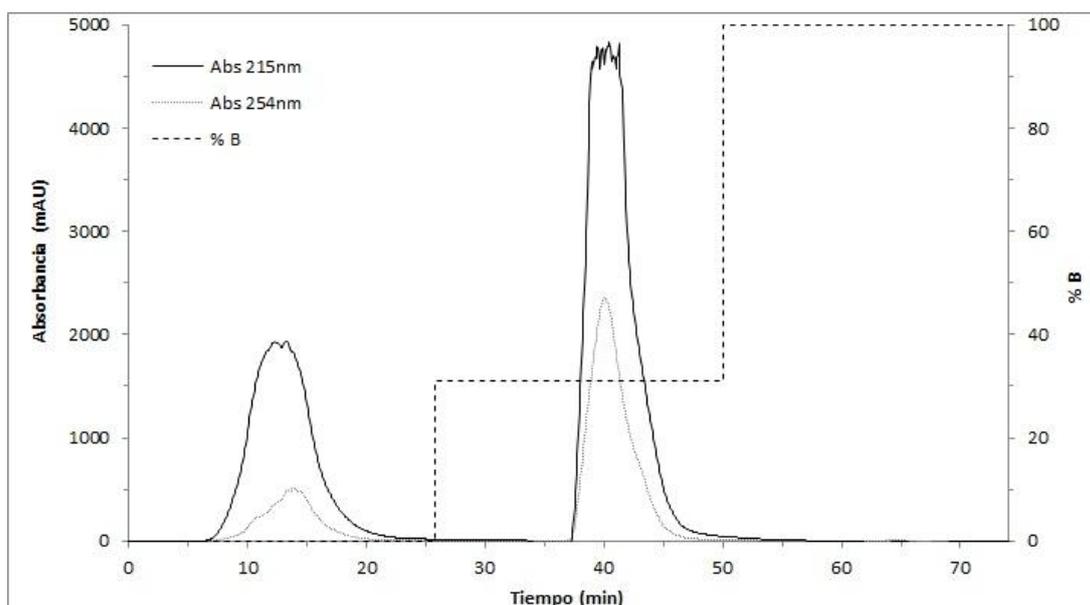
La síntesis de los surfactantes derivados de arginina, Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, fue llevada a cabo por condensación enzimática del reactivo comercial Bz-Arg-OEt (BAEE) y decil- o dodecilamina, respectivamente, utilizando papaína adsorbida sobre poliamida (pap/pol) como biocatalizador (figura 3.1). Los rendimientos alcanzados para estas síntesis (>86%) permitieron la obtención de los surfactantes en cantidades semipreparativas (Fait *et al.*, 2015).



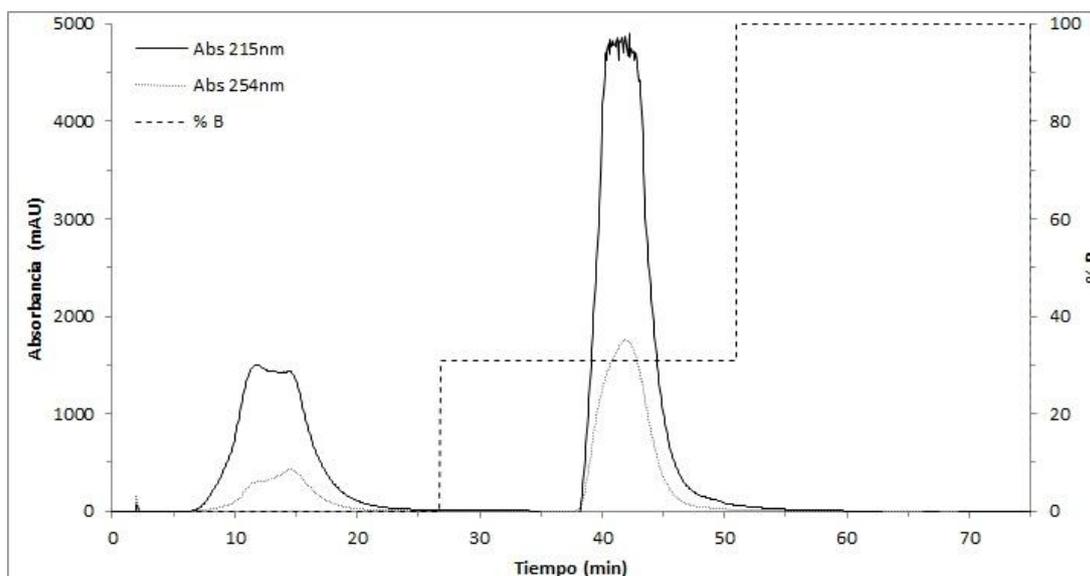
**Figura 3.1** Esquema de reacción de síntesis para BzArgNHC<sub>n</sub>, utilizando papaína adsorbida en poliamida (pap/pol) como biocatalizador.

La purificación de los compuestos sintetizados se realizó por cromatografía de intercambio catiónico colectándose el pico correspondiente al producto en cada caso (Figura 3.2), cuyo tiempo de retención fue aproximadamente de 37 minutos. Se reunieron las fracciones de cada producto por separado, y fueron desaladas según lo descrito en la sección de materiales y métodos.

a)



b)



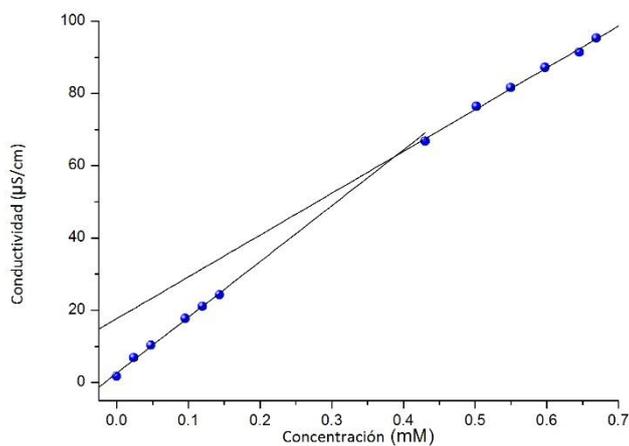
**Figura 3.2** Cromatograma correspondiente a la purificación de a) Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y b) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> por cromatografía de intercambio catiónico. El pico señalado corresponde al producto de síntesis Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> (tiempo de retención: 37 minutos, B: 31%). Se muestran las absorbancias a 215 y 254 nm. En el eje secundario (%B) se muestra el gradiente de elución con buffer bórico-borato 0,01M pH 8,5, etanol 50%, NaCl 1M.

### 3.2. Determinación de la CMC de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> por conductimetría

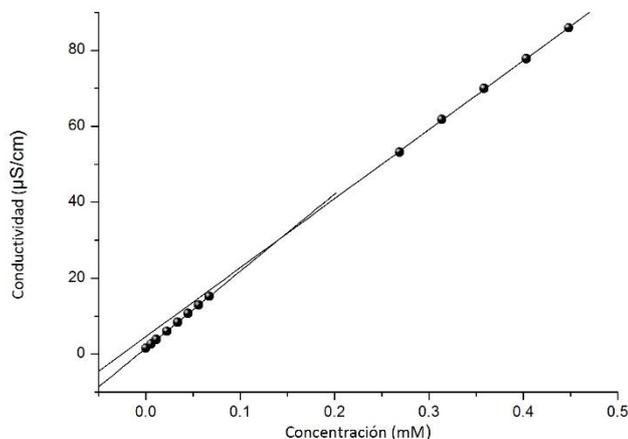
Para cada compuesto se realizaron las medidas conductimétricas como se describió en la sección de materiales y métodos, graficándose a continuación los datos

de conductividad en función de la concentración de tensioactivo (figura 3.3). Los valores de CMC fueron calculados a partir de la intersección lineal de los gráficos de conductividad vs concentración. La CMC calculada para Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> fue de  $0,4 \pm 0,3$  mM, mientras que para Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> de  $0,13 \pm 0,10$  mM.

a)



b)



**Figura 3.3** Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) en función de la concentración (mM) de a) Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y b) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>.

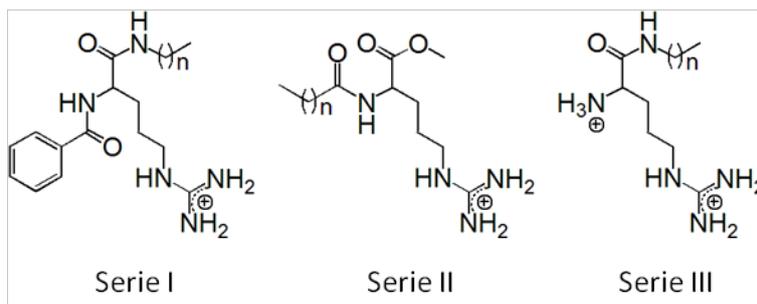
Los resultados obtenidos por conductimetría fueron contrastados con los determinados por medidas de tensión superficial. Como se puede observar en la tabla 3.1, por las distintas metodologías se obtuvieron valores diferentes de CMC. En ambos casos Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> mostró una CMC menor que la de Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>, lo que se explica

por el largo de la cadena hidrocarbonada: a mayor hidrofobicidad de la molécula, mayor tendencia a formar agregados, por lo que menor será su CMC.

**Tabla 3.1** Concentración micelar crítica de los surfactantes derivados de arginina obtenida por medidas de conductividad y tensión superficial.

Compuesto	CMC	
	Conductimetría (mM)	Tensión superficial (mM)
Bz-Arg-NHC <sub>10</sub>	0,4 ± 0,3	0,19 ± 0,04
Bz-Arg-NHC <sub>12</sub>	0,13 ± 0,10	0,08 ± 0,01

Se ha reportado la síntesis de surfactantes derivados de arginina con estructura similar a la de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> (Morán *et al.*, 2001; Infante *et al.* 2004). Los mismo pueden agruparse en dos series de compuestos: N<sup>α</sup>-acil-L-arginina-metil ésteres (figura 3.4, Serie II) y arginina-N-alquilamidas (figura 3.4, serie III). Entre los compuestos de estructura similar a Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> pueden mencionarse arginina-N-lauril amida diclorhidrato (Arg-NHC<sub>12</sub>, ALA) y N<sup>α</sup>-lauril-L-arginina-metil éster clorhidrato (LAM), mientras que arginina-N-caproil amida diclorhidrato (Arg-NHC<sub>10</sub>, ACA) y N<sup>α</sup>-caproil-L-arginina-metil éster clorhidrato (CAM) serían los análogos a Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>. Puede observarse una gran similitud estructural entre los compuestos de la serie III y Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, siendo la única diferencia la desprotección del grupo amino del carbono α perteneciente a la arginina, lo que le otorga a los surfactantes de la serie III una doble carga positiva. En el caso de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, el grupo α-amino del residuo de arginina se encuentra unido a grupo benzoilo altamente hidrofóbico. Con respecto a la serie II, la diferencia estructural con Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> es más notoria, ya que es el grupo amino unido al carbono α de la arginina el que participa en el enlace amida que une el núcleo polar a la cadena alifática hidrocarbonada. Asimismo, en esta serie de compuestos el grupo carboxilo de la arginina forma un enlace éster con un metilo. La principal similitud de los surfactantes pertenecientes a la serie II con Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> radica en la presencia de una única carga positiva en el núcleo polar.



**Figura 3.4.** Comparación de las estructuras de las series de surfactantes derivados de arginina. Serie I:  $N^\alpha$ -benzoil-L-arginina-acilamidas; Serie II:  $N^\alpha$ -acil-L-arginina-metil ésteres; Serie III: arginina- $N$ -alquilamidas.

Se ha llevado a cabo el estudio de las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos (Morán *et al.*, 2001; Infante *et al.* 2004; Piera *et al.* 1998; Pinazo *et al.* 2011). La tabla 3.2 resume algunas de ellas. En el caso de la CMC, para todas las series pudo observarse el mismo comportamiento que en el caso de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>: los derivados con una cola hidrofóbica de 12 carbonos de largo presentaron valores de CMC menores que las contrapartes de 10 carbonos. Por otro lado, comparando las CMC obtenidas para las tres series de compuestos se pudo establecer el siguiente orden: serie I < serie II < serie III. Este hecho podría explicarse por las diferencias estructurales de los mismos, en particular la presencia del grupo aromático benzoilo en nuestros compuestos, lo que resulta en una importante disminución en la solubilidad en medio acuoso. La solubilidad acuosa de los surfactantes derivados de arginina fue determinada previamente por nuestro grupo de trabajo, siendo de 0,8 mg/ml (1,91 mM) para Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y 0,2 mg/ml (0,45 mM) para Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>.

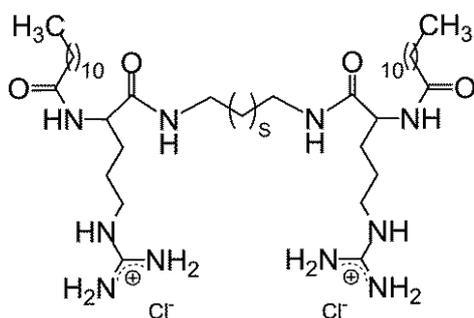
Por otro lado, Pérez *et al.* (1996) ha informado la síntesis de surfactantes *gemini* derivados de arginina con estructura similar a LAM,  $N^\alpha, N^\omega$ -bis( $N^\alpha$ -lauroilarginina)  $\alpha, \omega$ -dialquilamidas ó C<sub>n</sub>(LA)<sub>2</sub> (figura 3.5). Del estudio mediante diferentes metodologías de la CMC de esta familia de compuestos se infirió la existencia de dos CMCs, sugiriendo así la formación de diferentes tipos de agregados (Pinazo *et al.*, 2011). La menor CMC o CMC<sub>1</sub>, registrada entre 0,002 y 0,005 mM, fue detectada por medidas de tensión superficial. Las determinaciones conductimétricas evidenciaron un segundo valor de CMC o CMC<sub>2</sub> entre 0,3 y 0,6 mM, la cual es aproximadamente 2 órdenes de magnitud mayor que la CMC<sub>1</sub>. El menor

valor de CMC puede corresponderse con la formación de agregados no globulares de pequeño número de agregación (número de moléculas por agregado), mientras que a concentraciones mayores que la  $CMC_2$  existe una fuerte evidencia de la formación de estructuras globulares tipo micela (Pinazo *et al.*, 2011). A modo de ejemplo, en la tabla 3.2 se resumen las propiedades fisicoquímicas de  $N^\alpha, N^\omega$ -bis( $N^\alpha$ -lauroilarginina)  $\alpha, \omega$ -dipropilamida ó  $C_3(LA)_2$ . Los valores de CMC registrados para los surfactantes gemini  $C_n(LA)_2$  fueron del orden de los observados para Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, y ambos menores que los registrados para LAM. Asimismo, las diferencias encontradas en los valores de CMC de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> determinados por las distintas metodologías podrían atribuirse a la formación de diversos tipos de agregados.

**Tabla 3.2.** Propiedades fisicoquímicas de distintos surfactantes derivados de arginina.

Surfactante	Serie II		Serie III		$C_3(LA)_2$
	LAM	CAM	ALA	ACA	
N° de carbonos <sup>(a)</sup>	12	10	12	10	12
PM	406,6	378,6	414,46	386,41	822,6
Solubilidad (mg/ml)	92	ND	322,2	343,7	90
CMC (mM)	6,0	16	$1,8 \times 10^6$	$26 \times 10^6$	$0,005^{(b)}$ $0,5^{(c)}$

<sup>(a)</sup>Número de carbonos de la cadena hidrofóbica unida a la arginina. <sup>(b)</sup>  $cmc_1$ , determinada por medidas de tensión superficial. <sup>(c)</sup>  $cmc_2$ , determinada por medidas de conductividad. Datos informados por Pinazo *et al.* 2011.



**Figura 3.5.** Estructura química de los surfactantes gemini  $N^\alpha, N^\omega$ -bis( $N^\alpha$ -lauroilarginina)  $\alpha, \omega$ -dialquilamida ó  $C_n(LA)_2$ , donde n es el número de átomos de carbono de la cadena espaciadora ( $n = s + 2$ ).

### **3.3. Caracterización del mecanismo de interacción de los surfactantes con eritrocitos**

#### **3.3.1. Actividad hemolítica de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>**

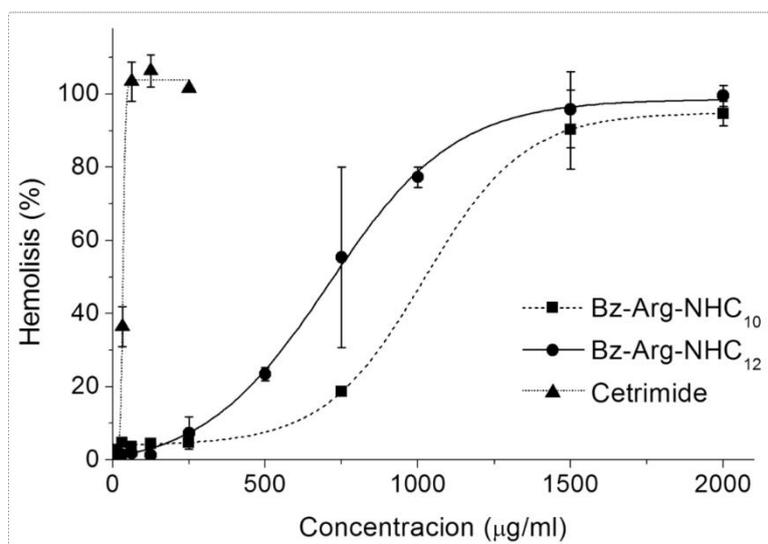
La evaluación de la actividad hemolítica de los surfactantes es un indicador de la citotoxicidad de los mismos. Con el fin de profundizar acerca de la interacción de los surfactantes con las membranas biológicas se analizó la susceptibilidad de eritrocitos de dos especies distintas con Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, y se la comparó con la del tensioactivo comercial cetrimide. Como se dijo en la sección 1.2, se utilizaron glóbulos rojos humanos y de carnero, debido a sus diferencias en la composición lipídica y proteica de membrana.

Para determinar la actividad hemolítica, se incubaron eritrocitos de cada especie en presencia de soluciones de los surfactantes a distintas concentraciones en medio isotónico. A partir de las medidas realizadas se calcularon los porcentajes de hemólisis obtenidos en cada caso, graficándose a continuación las curvas de hemólisis en función de la concentración del surfactante (Figura 3.6).

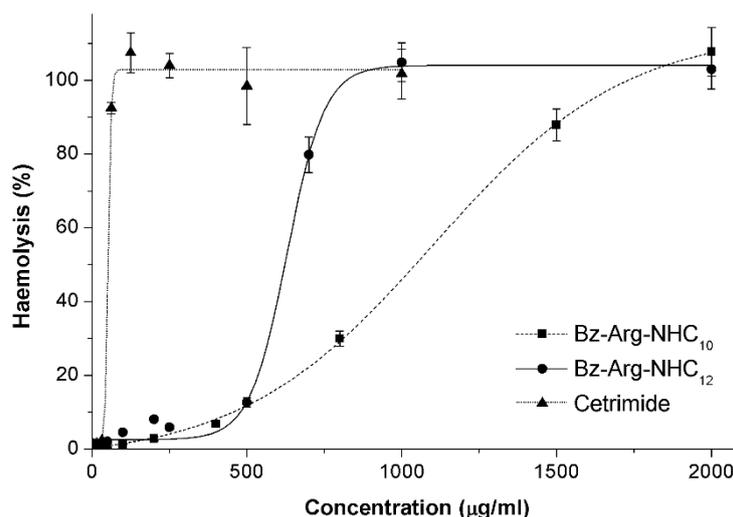
Para la hemólisis de los eritrocitos de carnero (figura 3.6a) se pudo apreciar un comportamiento sigmoideal en el caso del tratamiento con los compuestos derivados de arginina, mientras que para cetrimide, fue hiperbólico. Por otro lado, para la lisis de los GRH inducida por Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y cetrimide (figura 3.6b) los comportamientos fueron similares a los observados para los GRC, mientras que para los tratados con Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> se evidenció un comportamiento hiperbólico en lugar de sigmoideal. La forma hiperbólica de la curva indicaría la presencia de un efecto de cooperatividad en la interacción surfactante-membrana.

A partir del ajuste de los datos a una distribución de Boltzmann, pudieron obtenerse los valores de HC<sub>50</sub> para cada surfactante, es decir, la concentración del mismo responsable del 50% de hemólisis. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.3. Como puede apreciarse, a pesar de las diferencias en la composición de las membranas de los GR estudiados, los surfactantes demostraron tener valores de HC<sub>50</sub> comparables en ambos sistemas. Para los surfactantes derivados de arginina sintetizados, se observó una menor HC<sub>50</sub> cuanto mayor fuese la longitud de la cola hidrocarbonada, lo cual se relaciona con una mayor hidrofobicidad de la molécula.

a)



b)



**Figura 3.6** Hemólisis inducida por Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y cetrimide en (a) eritrocitos de carnero y (b) eritrocitos humanos.

Estos resultados ponen en evidencia que el mecanismo hemolítico depende no solo de la naturaleza del surfactante en cuestión, sino también de las propiedades biofísicas de la membrana. Es sabido que la membrana de los GRC, por su mayor contenido de SM, presenta un estado de mayor orden o “menor fluidez”. De allí que ambos surfactantes, Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, muestran un comportamiento sigmoide. En el caso de GRH, este comportamiento solo se observa para el derivado de menor carácter hidrofóbico (Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>).

En el caso de los GR tratados con cetrimide las HC<sub>50</sub> encontradas fueron menores que la CMC del surfactante, sugiriendo que sería el monómero el responsable

de la actividad lítica. Tanto en el caso de Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> como en el de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, los valores de HC<sub>50</sub> calculados fueron mayores que las correspondientes CMC de los compuestos, lo que podría explicarse mediante dos posibles mecanismos:

- 1) Los agregados serían los que interactuarían con la membrana del eritrocito, y removerían lípidos de la misma, produciendo finalmente la hemólisis.
- 2) Los monómeros serían responsables del efecto hemolítico pero debido a la baja CMC del surfactante, la cantidad de monómeros a esta concentración no sería suficiente para producir la lisis, requiriendo mayores concentraciones del surfactante para lograrlo.

Los resultados obtenidos mediante estos ensayos no permitieron discernir el mecanismo implicado.

Los valores de HC<sub>50</sub> pueden relacionarse con el poder hemolítico de los compuestos: cuanto mayor es su poder hemolítico, menor es su HC<sub>50</sub>. A partir de los resultados obtenidos se puede establecer el siguiente orden de poder hemolítico: Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> < Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> < cetrimide, tanto para GRH como para GRC. Este orden sugeriría que Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> perturba la membrana del eritrocito en menor medida en comparación a cetrimide.

**Tabla3.3** Valores de HC<sub>50</sub> para cada surfactante expresados en µg/ml

Surfactante	HC <sub>50</sub> µg/ml (mM)	
	GRH	GRC
Bz-Arg-NHC <sub>12</sub>	630,58 ± 7,04 (1,41 ± 0,02)	707,6 ± 12,0 (1,59 ± 0,03)
Bz-Arg-NHC <sub>10</sub>	1100,40 ± 24,20 (2,63 ± 0,06)	1019,9 ± 11,8 (2,44 ± 0,03)
Cetrimide	52,21 ± 4,67 (0,16 ± 0,01)	33,8 ± 1,5 (0,101 ± 0,004)

Se ha reportado la actividad hemolítica sobre GRH de los surfactantes derivados de arginina pertenecientes a las series descritas en el punto 3.2 (Morán *et al.*, 2001; Infante *et al.*, 2004; Piera *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2002). Los valores de HC<sub>50</sub>

informados en bibliografía para los mismos se resumen en la tabla 3.4. Como puede observarse, todos los compuestos derivados de arginina revelaron actividad hemolítica. Cada una de estas series mostró un comportamiento similar al observado en el caso de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>: los derivados con una cola hidrofóbica de 10 carbonos de largo presentaron menor poder hemolítico que sus análogos de 12 carbonos.

Teniendo en cuenta los valores de HC<sub>50</sub> reportados para los compuestos pertenecientes a las series II y III, y comparándolos con los obtenidos para Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> (serie I), se puede establecer el siguiente orden de poder hemolítico: serie III < serie I < serie II. Es posible proponer que la interacción del surfactante con la membrana tenga lugar en al menos dos etapas: la primera, vinculada con la adsorción del mismo a la membrana del eritrocito y favorecida por interacciones electrostáticas, y la segunda relacionada su inserción en la matriz hidrofóbica de la membrana. La presencia de dos cargas positivas en la porción polar de los compuestos de la serie III favorecería la primera etapa, sin embargo, los surfactantes de la serie I y II presentan mayor poder hemolítico evidenciando la importancia de las interacciones hidrofóbicas en el proceso. Por otro lado, al comparar la CMC de los compuestos de la serie I y II, vemos que el mayor valor de CMC se correlaciona con el mayor poder hemolítico, lo que estaría indicando que los monómeros y no los agregados serían responsables de la actividad hemolítica de los surfactantes ensayados en este trabajo.

**Tabla 3.4.** Actividad hemolítica de los surfactantes derivados de arginina de la serie II y III.

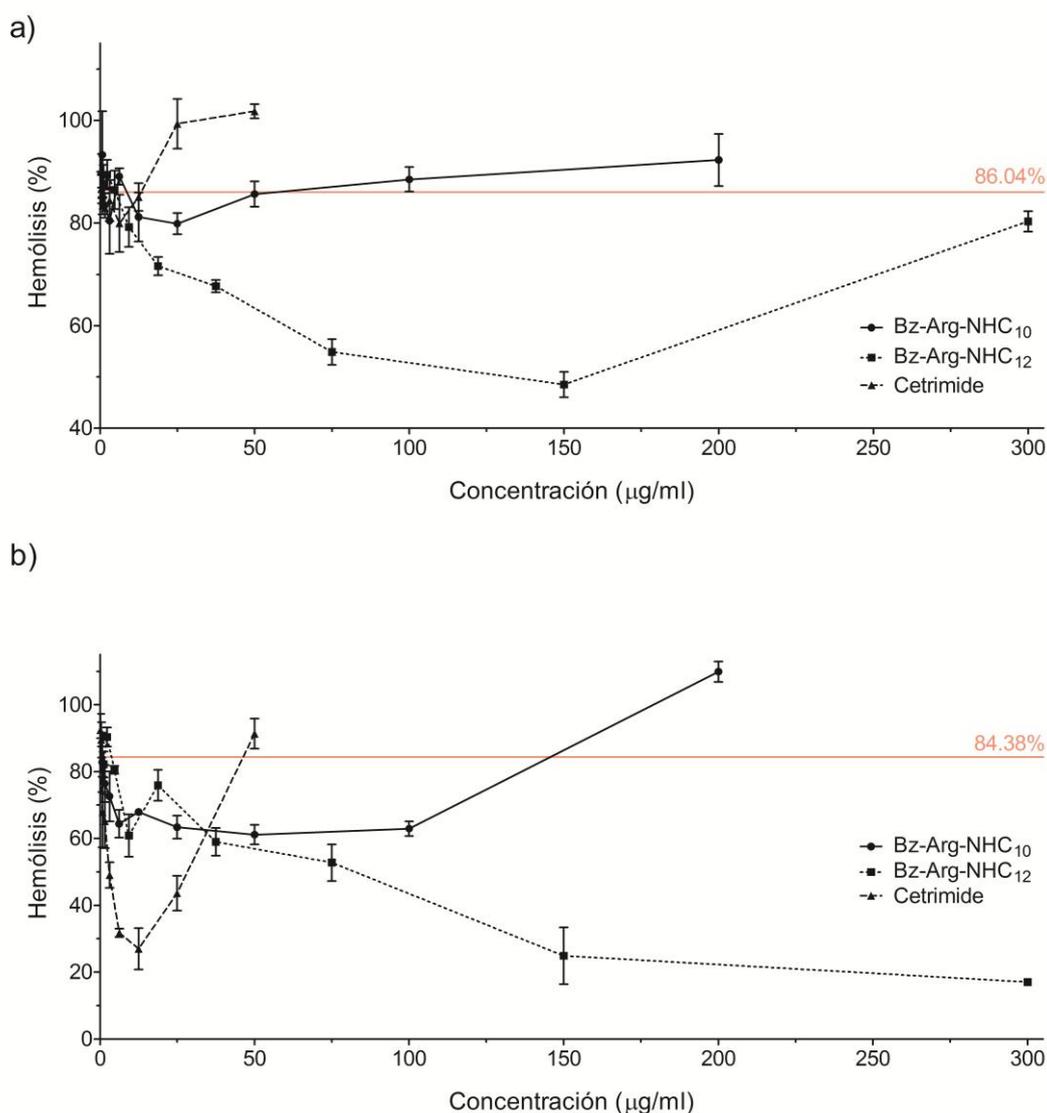
Surfactante	Serie II		Serie III	
	LAM	CAM	ALA	ACA
HC <sub>50</sub> (μM)	51,25	117,92	>2400	>2600

### 3.3.2. Efecto de los surfactantes sobre la resistencia de los eritrocitos a la lisis hipotónica

El efecto hemolítico de los surfactantes depende de su concentración: si bien a altas concentraciones son capaces de producir la lisis de los GR, a bajas concentraciones en medio hipotónico pueden presentar un efecto protector

(comportamiento bifásico). Teniendo esto en cuenta, se estudió la capacidad protectora de los surfactantes contra la hemólisis hipotónica de eritrocitos humanos y de carnero, comparándola con la observada para cetrímid.

La figura 3.7 muestra el porcentaje de hemólisis en función de la concentración de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> o cetrímid para a) GRC y b) GRH. La línea roja horizontal muestra el porcentaje de hemólisis alcanzado en ausencia de los surfactantes (86,04% para GRC y 84,38% para GRH). Todos los surfactantes evidenciaron el comportamiento bifásico antes descrito.



**Figura 3.7** Dependencia del grado de hemólisis hipotónica en función de la concentración (µg/ml) de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y cetrímid sobre (a) eritrocitos de carnero y (b) eritrocitos humanos.

Observando los gráficos obtenidos para cada especie de eritrocitos, se puede ver que en el caso de los GRH los tres surfactantes mostraron un mayor efecto protector que en caso de los GRC, para los que sólo se observó un efecto significativo en el caso de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>.

A partir de estos gráficos se determinó para cada compuesto la concentración antihemolítica máxima (cAH<sub>máx</sub>) que representa la mayor concentración de surfactante responsable de la máxima protección contra la hemólisis hipotónica (menor porcentaje de hemólisis). Para esta concentración se calculó la potencia antihemolítica máxima (pAH), expresada como el porcentaje de reducción del grado de hemólisis respecto del valor obtenido de las muestras sin tratar. Los resultados se resumen en la tabla 3.5.

**Tabla 3.5** Valores de cAH<sub>máx</sub> y pAH para eritrocitos humanos y de carnero

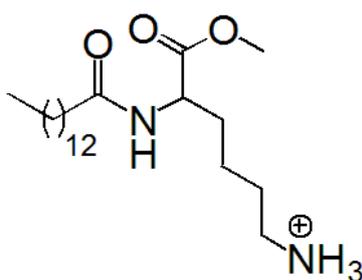
Surfactante	Eritrocitos Humanos		Eritrocitos de Carnero	
	cAH <sub>máx</sub> μg/ml (μM)	pAH %	cAH <sub>máx</sub> μg/ml (μM)	pAH %
<b>Bz-ArgNHC<sub>12</sub></b>	300,0 (672,1)	67,32	150,0 (336,1)	37,54
<b>Bz-ArgNHC<sub>10</sub></b>	50,0 (119,5)	23,22	25,0 (59,8)	6,16
<b>Cetrimide</b>	12,5 (37,2)	57,38	6,3 (18,7)	6,11

Si bien las cAH<sub>max</sub> obtenidas para los GRH fueron el doble de las cAH<sub>max</sub> registradas para los GRC en todos los casos, las pAH presentaron una alta variabilidad dependiendo tanto de la naturaleza del eritrocito como del surfactante estudiado. En el caso de los GRH se observó una mayor protección frente a la lisis hipotónica, ya que no sólo los surfactantes demostraron un efecto protector a mayores concentraciones, sino que la reducción en el porcentaje de hemólisis fue mayor para los tres compuestos.

A partir de los resultados obtenidos pueden establecerse los siguientes órdenes de poder protector o antihemolítico: Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> < cetrimide < Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> para los GRH, y cetrimide ≈ Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> < Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> para GRC. Para las dos especies de GR se observó una mayor protección contra la hemólisis hipotónica en presencia de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, con una pAH de 67,32% para GRH y 37,54% para GRC. Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>

sería el compuesto menos protector, con una pAH de 23,22% para GRH y 6,16%, casi cuatro veces menos, para los GRC.

Si bien en la bibliografía no se ha reportado el estudio de las propiedades protectoras contra la lisis osmótica de otros surfactantes derivados de arginina, sí se lo ha hecho para derivados de otros aminoácidos catiónicos como la lisina. Nogueira *et al.* (2012) ha descrito la síntesis y el estudio de las propiedades antihemolíticas de *N*<sup>α</sup>-miristoil lisina metil éster (MLM), cuya estructura se muestra en la figura 3.8. En el caso de MLM el grupo α-amino de la lisina participa en un enlace amida que une el núcleo polar a una cadena alifática hidrocarbonada de 14 carbonos. Al igual que para los derivados de arginina de la serie II, el grupo carboxilo del aminoácido se encuentra unido a través de un enlace éster a un metilo. Como en el caso de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, MLM presenta un núcleo polar con una única carga positiva.



**Figura 3.8** Estructura del surfactante catiónico derivado de lisina *N*<sup>α</sup>-miristoil lisina metil éster (MLM). PM: 406,66 g/mol.

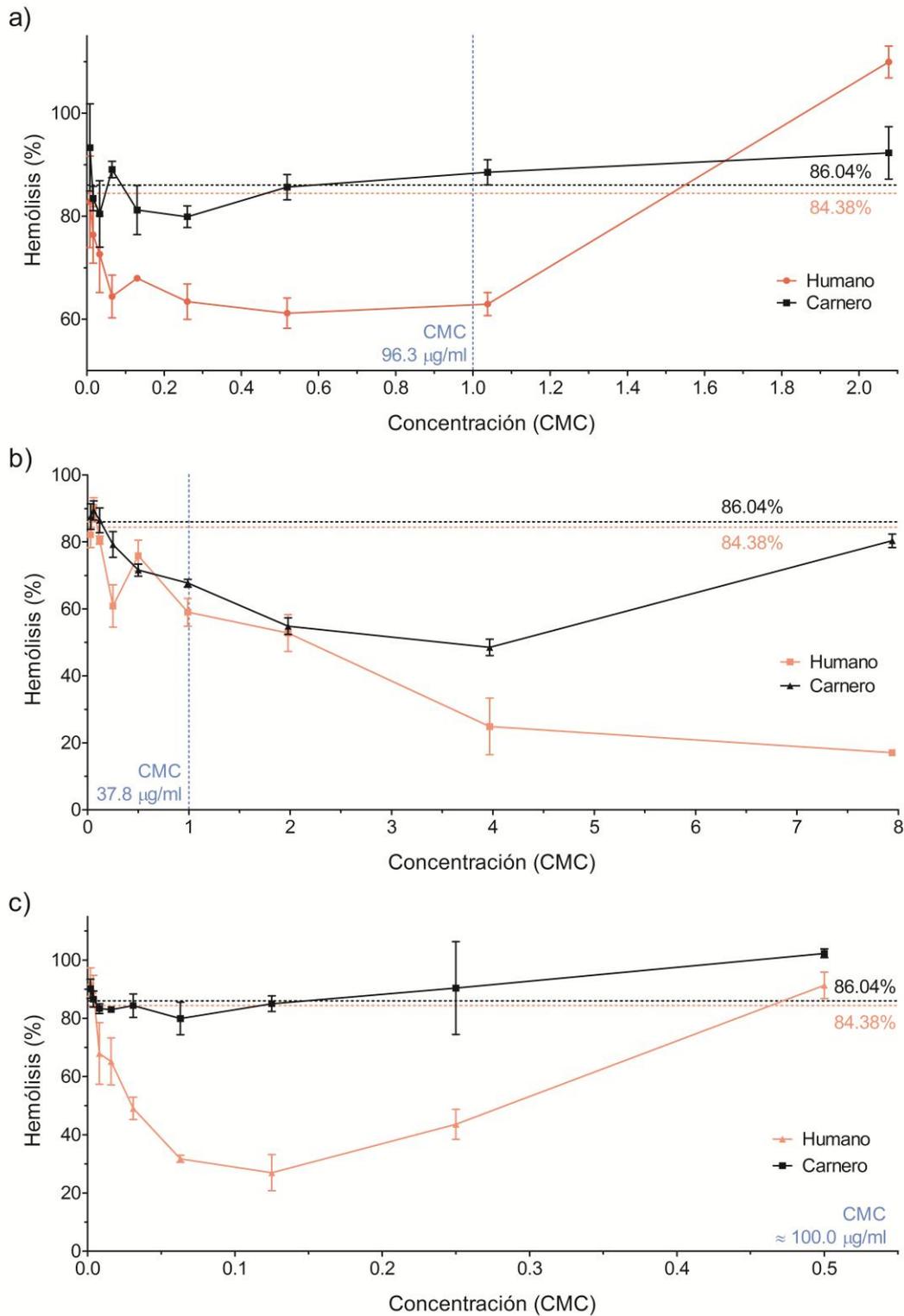
Al tratar GRH con MLM, al igual que con Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, también se ha observado un comportamiento bifásico. En medio isótonico, y a pH < 8,1 (es decir, por debajo de su pK<sub>a</sub>), MLM presentó actividad hemolítica, siendo su HC<sub>50</sub> igual a 71,89 µg/ml. Si bien este valor de HC<sub>50</sub> revela un mayor poder hemolítico respecto del observado para Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, a concentraciones menores que este valor se observó una considerable capacidad protectora. La cAH<sub>max</sub> registrada para MLM fue de 20 µg/ml, similar a la encontrada para Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>. Sin embargo, MLM presentó una mayor potencia antihemolítica, ya que se evidenció una disminución del 58,27% respecto de la hemólisis observada en medio hipotónico en ausencia del surfactante.

Para relacionar el efecto protector frente a la hemólisis hipotónica de los surfactantes derivados de arginina sintetizados con la especie molecular (monómero o agregado) responsable del mismo, en los gráficos de protección contra la hemólisis hipotónica las concentraciones fueron expresadas en unidades de CMC (Figura 3.9).

En el caso de los GR tratados con Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> (figura 3.9a) el efecto protector contra la hemólisis hipotónica se observó en un rango de concentraciones por debajo de su CMC (96,3 µg/ml). Por encima de esta concentración, se registró una drástica disminución en el efecto protector, lo que sugeriría que es el monómero la especie molecular responsable del efecto protector frente a la hemólisis hipotónica.

Por su parte, Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> (figura 3.9b) demostró un comportamiento protector contra la lisis osmótica para la mayoría de las concentraciones ensayadas. Si bien se observó protección para concentraciones menores a la CMC, este efecto fue mayor por encima de la misma, encontrándose una  $c_{AH_{m\acute{a}x}}$  de aproximadamente 8 veces su CMC. Al igual que la hemólisis en medio isotónico, (sección 3.3.1), el resultado observado podría deberse a la baja concentración de monómeros en solución como consecuencia de su baja CMC.

Cetrimide (figura 3.9 c) sólo mostró un efecto protector en el caso de los GRH, ya que para los GRC no se observó una reducción del grado de hemólisis significativa.



**Figura 3.9** Dependencia del grado de hemólisis hipotónica en función de la concentración (veces de CMC) de (a) Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>, (b) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> y (c) cetrimide sobre eritrocitos de carnero y eritrocitos humanos.

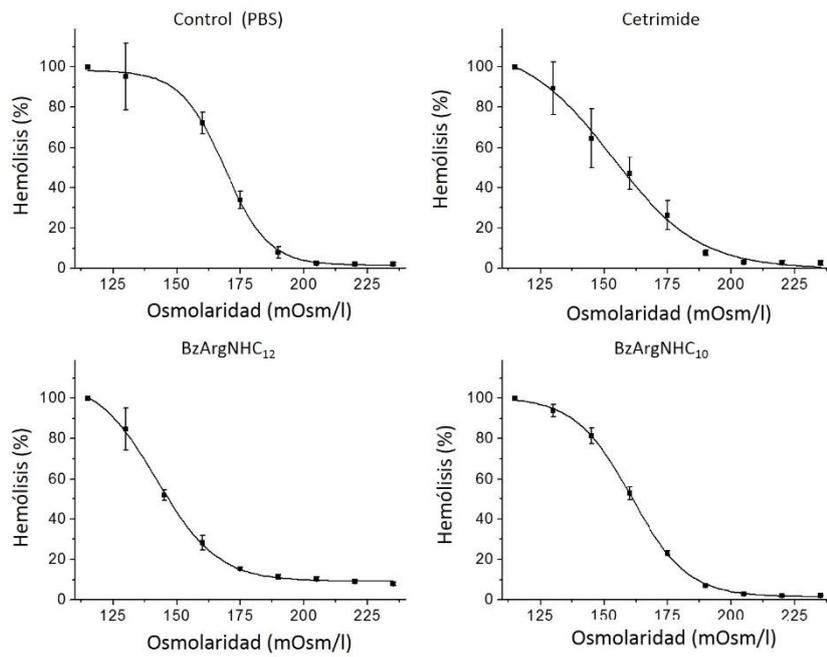
El mecanismo por el cual los compuestos anfifílicos protegen contra la hemólisis hipotónica todavía no ha sido totalmente dilucidado. Una de las principales teorías propuestas para explicar este efecto protector es que al intercalarse la molécula anfifílica en la membrana aumentaría la relación “área de membrana/volumen celular” o la capacidad de la membrana de expandirse, permitiendo al eritrocito alcanzar un mayor volumen hemolítico crítico,  $V_h$  (Sánchez *et al.*, 2007).

Para ver el efecto de los compuestos sobre el volumen de los eritrocitos, los mismos fueron expuestos a medios de distinta osmolaridad en presencia de los surfactantes a sus respectivas  $cAH_{m\acute{a}x}$ . Con los datos registrados en cada caso se construyeron curvas de porcentaje de hemólisis en función de la osmolaridad del medio (Figura 3.10). A partir del ajuste de los datos a una distribución de Boltzmann, pudieron obtenerse los valores de  $C_{50}$  para cada condición, es decir, la osmolaridad del medio responsable del 50% de hemólisis. Con estos datos se calcularon los  $V_h$  teóricos para cada surfactante y en ausencia de los mismos (control) según la ecuación descrita en la sección de materiales y métodos. Para las muestras tratadas con surfactante se calculó además la expansión de volumen respecto del control ( $V_{exp}$ ). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 3.6. Como puede apreciarse, los valores de  $C_{50}$  encontrados para los GRC son aproximadamente un 10 % mayores que los registrados para GRH, lo que indicaría que los GRH soportan una mayor hipotonicidad. Sin embargo, esto no se correlacionaría con los  $V_{exp}$  calculados.

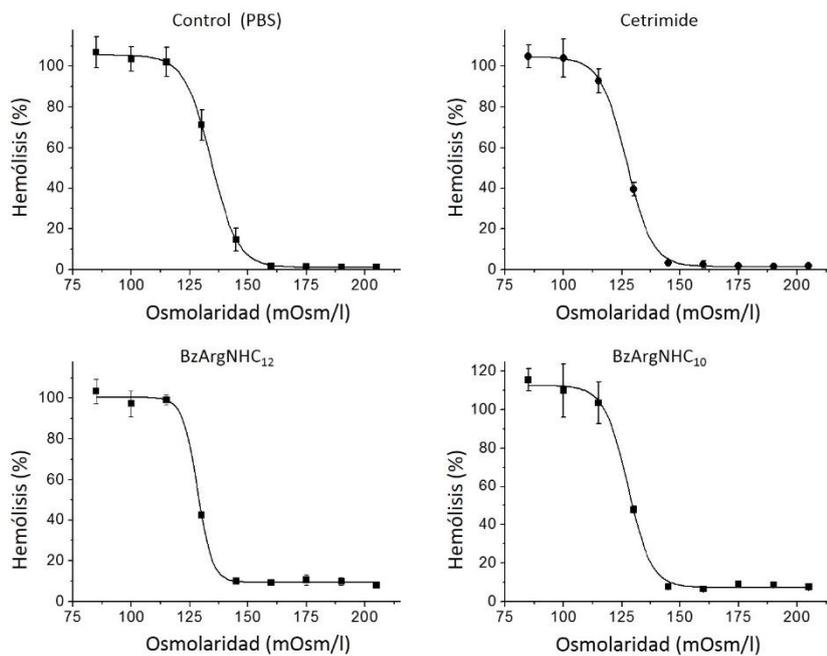
**Tabla 3.6** Volumen de expansión inducido por los surfactantes en eritrocitos humanos y de carnero.

Tratamiento	$C_{50}$ (mOsm/l)		$V_h$ (fl)		$V_{exp}$ (%)	
	GRH	GRC	GRH	GRC	GRH	GRC
Bz-Arg-NHC <sub>12</sub>	128,2 ± 0,8	142 ± 1	190 ± 1	60,5 ± 0,4	3,8 ± 0,6	15,15 ± 0,7
Bz-Arg-NHC <sub>10</sub>	127,5 ± 0,6	160,6 ± 0,4	190,8 ± 0,7	54,6 ± 0,1	4,3 ± 0,4	4,07 ± 0,2
Cetrimide	126,8 ± 0,3	153 ± 3	191,7 ± 0,4	56,8 ± 0,9	4,8 ± 0,2	8,26 ± 1,8
Control	134,1 ± 0,1	168,8 ± 0,6	182,9 ± 0,4	52,5 ± 0,2	-	-

a)



b)



**Figura 3.10** Lisis osmótica de (a) eritrocitos de carnero y (b) eritrocitos humanos en PBS (control) y PBS adicionado con Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>, Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> y cetrimide.

Como puede apreciarse, se observó un aumento en el volumen hemolítico crítico para los GR de ambas especies tratados con los surfactantes respecto del control. Sin embargo, en la mayoría de los casos este aumento no representó una expansión del volumen significativa. Sólo se registraron cambios relevantes en los

casos de los GRC tratados con Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> y cetrimide, donde se encontraron aumentos del volumen del 15,15 y 8,26% respectivamente. Estos resultados sugieren que no existiría una relación entre el efecto protector contra la lisis osmótica de cada compuesto y cambios en el volumen de los GRH, aunque sí en el caso de los GRC.

Se ha reportado el estudio de los cambios en el volumen hemolítico crítico para GRH y de rata tratados con MLM (Nogueira *et al.* 2012). En el caso de los GRH se registró un aumento en el volumen celular del 13,90%. En este trabajo, aunque no consiguieron establecer una correlación directa entre la potencia antihemolítica y  $V_{exp}$ , los autores concluyeron que el mecanismo de protección dependería tanto de la naturaleza química del compuesto como de la composición de la membrana estudiada en cada caso.

### **3.3.3. Efecto de los surfactantes sobre la morfología de los eritrocitos**

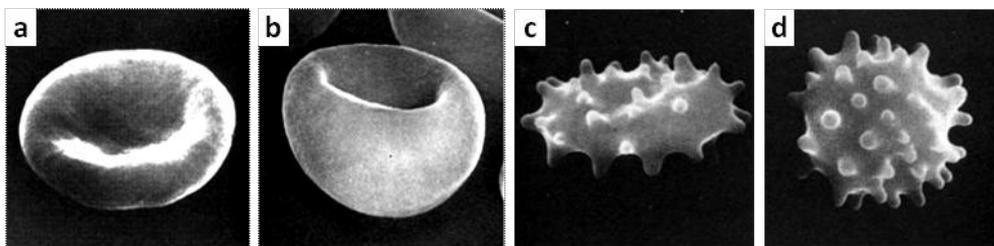
Una de las teorías propuestas para explicar el efecto antihemolítico de los surfactantes es que la protección inducida por los mismos estaría relacionada con rearreglos en la membrana del eritrocito, desencadenados por la intercalación de los compuestos anfifílicos en la misma. Se ha demostrado que estos compuestos a concentraciones subléxicas pueden ejercer profundas reorganizaciones en la membrana de los glóbulos rojos, incluyendo la liberación de componentes celulares y la formación de vesículas (Hägerstrand & Isomaa, 1991).

Las reorganizaciones en la membrana del eritrocito pueden derivar en importantes cambios morfológicos. Se pueden distinguir distintos estadios en la transformación del GR normal a GR esférico prelítico (Bessis, 1973):

1. *Discocito* normal (figura 3.11a), célula con forma de disco bicóncavo.
2. *Estomatocito* (figura 3.11b), célula unicóncava con una depresión central elongada y apariencia de copa o estoma.
3. *Equinocito* (figura 3.11c y d), célula con múltiples protrusiones redondeadas distribuidas de manera uniforme en su membrana.

4. *Esferocito*, en el estadio previo a la lisis del GR se observa una transformación a la forma esférica debido a la pérdida de porciones de la membrana con la consiguiente disminución del volumen celular.

Las transformaciones en la morfología del eritrocito pueden ser interpretadas en términos de modificaciones en la relación entre las áreas de la monocapa interna y externa de la membrana (Vives *et al.*, 1999; Svetina *et al.*, 2004). Esto ocasiona la liberación de vesículas: exovesículas en el caso de los equinocitos o endovesículas para los estomatocitos (Hägerstrand & Isomaa, 1994).



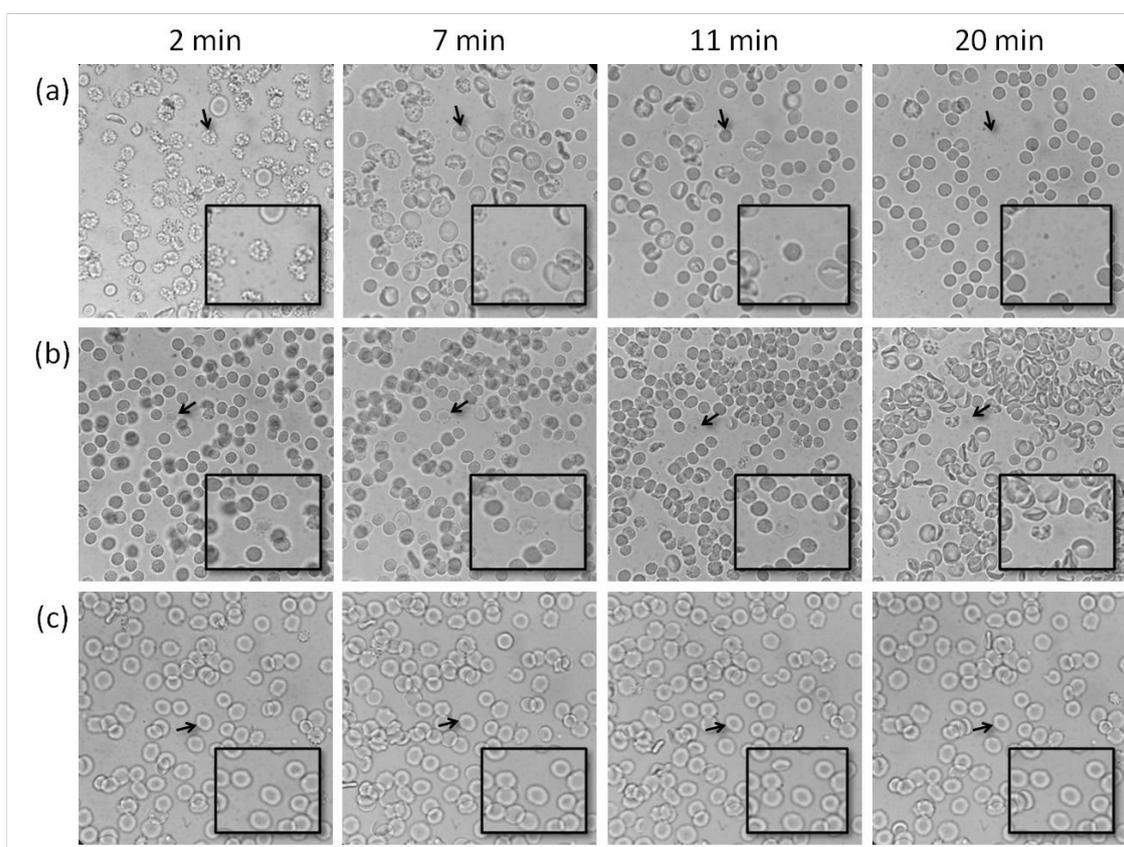
**Figura 3.11** Morfología de los GRH: (a) discocito (GR normal), (b) estomatocito I, (c) equinocito II (plano), (d) equinocito III (esférico). Imagen tomada de Bessis 1973.

Se estudió el efecto de los surfactantes Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> sobre la morfología de eritrocitos humanos a través de su observación al microscopio óptico, con la adición de albúmina 0,5% de manera de evitar la crenación de los mismos por contacto con el vidrio (Jay 1975). La concentración de cada surfactante utilizada en el ensayo fue definida teniendo en cuenta que no ocasionara un porcentaje de hemólisis mayor al 10%.

La figura 3.12 muestra fotografías a distintos tiempos de incubación de los eritrocitos tratados con Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, y en ausencia de los mismos. En los dos primeros casos, se apreciaron cambios notables en la morfología normal de los GR.

Para los GR tratados con Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> (figura 3.12a) se observó inicialmente la formación de equinocitos ( $t < 2$  min), seguida de la transformación a estomatocitos ( $t = 7$  min). Luego de 20 minutos, se observó predominio de esferocitos o

esferoestomatocitos. Por el contrario, en las muestras tratadas con Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> (figura 3.12b) predominaron los equinocitos durante la mayor parte del ensayo, iniciándose la transformación a estomatocitos luego de 11 minutos de incubación. A los 20 minutos de iniciado el ensayo se observó predominio de estomatocitos. En ambos casos se pudo apreciar la lisis de los GR después de 11 minutos de incubación. En el ensayo control llevado a cabo en ausencia de los surfactantes los GR no mostraron cambios en su morfología (figura 3.12c).



**Figura 3.12** Cambios morfológicos de GRH incubados en presencia de (a) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> 363,6 µg/ml, (b) Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> 363,6 µg/ml y (c) PBS<sub>300</sub> observados por microscopía óptica.

La transformación de discocitos a equinocitos sugeriría que las moléculas de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> se intercalarían inicialmente en la monocapa externa de la membrana del GR. El pasaje de equinocito a estomatocito posterior sería indicador de una posible traslocación o redistribución de las mismas o de los lípidos hacia la monocapa interna de la membrana. Sin embargo, los resultados obtenidos en este ensayo son

insuficientes para dilucidar el mecanismo de solubilización de la membrana de los GR por acción de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>.

# CAPÍTULO 4

Conclusiones y Perspectivas

## 4.1. Conclusiones generales

A partir del análisis de los resultados obtenidos se llegaron a las siguientes conclusiones:

- Dos surfactantes derivados de arginina (Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>) fueron obtenidos por catálisis enzimática utilizando papaína adsorbida sobre poliamida como biocatalizador, los cuales fueron purificados mediante cromatografía de intercambio catiónico.
- La CMC de cada compuesto determinada mediante medidas de conductividad, fueron de 0,4 y 0,13 mM para Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> respectivamente.
- Se evidenció un comportamiento bifásico (hemolítico y protector contra la lisis hipotónica) para ambos surfactantes sintetizados sobre eritrocitos humanos y de carnero.
- Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> demostró una mayor actividad hemolítica respecto de la observada para Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> tanto para GRH como para GRC.
- Ambos compuestos resultaron ser menos hemolíticos que el surfactante comercial cetrimide, ya que presentaron mayores valores de HC<sub>50</sub>.
- Tanto para Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> como para Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, los valores de HC<sub>50</sub> calculados fueron mayores que las correspondientes CMC.
- Se observó protección contra la lisis hipotónica en GRH y GRC tratados con Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, siendo mayor el efecto observado frente a eritrocitos humanos.

- El poder antihemolítico registrado para Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> fue mayor que el de Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> para ambos sistemas ensayados, mientras que cetrimide presentó valores intermedios en los dos casos.
- Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> evidenció protección contra la hemólisis hipotónica en un rango de concentraciones por debajo de su CMC, mientras que por encima de esta concentración, se registró una drástica disminución en el efecto protector. Esto sugeriría que es el monómero el que estaría interactuando con la membrana e impidiendo que se produzca la hemólisis.
- Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> demostró un mayor efecto antihemolítico a concentraciones mayores que su CMC.
- Los ensayos realizados no permitieron discernir la especie molecular responsable del efecto hemolítico en el caso de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> y protector frente a la lisis hipotónica para ambos surfactantes derivados de arginina.
- Sólo se observó un aumento significativo en el volumen de los GRC tratados con Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> y cetrimide, aunque fue menor en el último caso.
- En general, para Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> se observó que a > largo de cadena hidrocarbonada, < CMC, < HC<sub>50</sub>, > cAH<sub>máx</sub> y > pAH. Es decir que a mayor hidrofobicidad del compuesto, aumenta su poder hemolítico y antihemolítico.
- Se apreciaron cambios notables en la morfología normal de los GRH tratados con Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, observándose predominio de esferocitos y estomatocitos luego de 20 minutos de incubación con Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> respectivamente.

- La lisis inducida por ambos surfactantes es dependiente de la concentración y del tiempo de incubación

## 4.2. Perspectivas

La administración de moléculas terapéuticas a través de la piel ofrece importantes ventajas sobre la administración convencional en forma de cápsulas o inyectable. Sin embargo es necesario la aplicación de diversos métodos físicos o químicos que permitan a la droga atravesar la barrera más externa de la piel o estrato córneo.

Los potenciadores de penetración son sustancias que pueden alterar de forma reversible la organización de la capa de lípidos del estrato córneo, aumentando así su permeabilidad. No obstante, la toxicidad asociada con la mayoría de ellos ha estimulado la búsqueda de compuestos más seguros.

Los surfactantes derivados de aminoácidos, en particular arginina, son compuestos que mimetizan los lipoaminoácidos naturales que han demostrado poseer baja irritabilidad y toxicidad y son, además, biodegradables.

Los resultados obtenidos en este trabajo final sobre la síntesis, purificación y caracterización de la interacción surfactantes derivados de arginina con GRH y GRC servirán como punto de partida para mi trabajo de tesis doctoral, en el que me propongo estudiar la interacción de estos nuevos surfactantes derivados de arginina con sistemas modelo de membrana que pueden ser empleados como un modelo de piel.

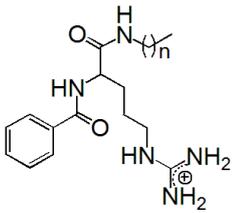
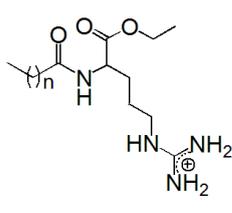
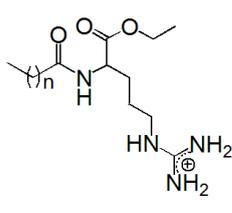
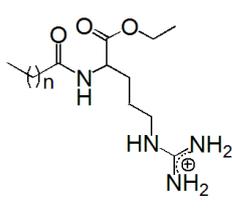
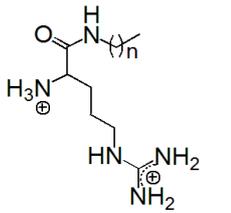
Se espera que mediante la mayor comprensión de la interacción de estos surfactantes con las membranas, la elección de los potenciadores de penetración deje de ser empírica, aumentando así significativamente el número de medicamentos disponibles para la administración tópica y transdérmica

ANEXO

**Tabla A1.** CMC, actividad hemolítica, protección frente a la lisis hipotónica y porcentaje de expansión del volumen celular inducida por los surfactantes en eritrocitos humanos y de carnero

GR	Surfactante	CMC μg/ml (mM)	HC <sub>50</sub> μg/ml (μM)	CAH <sub>máx</sub> μg/ml (μM)	pAH (%)	Vol Exp (%)
Humano	Bz-Arg-NHC <sub>12</sub>	37,8 (0,08)	630,58 ± 7,04 (1412,8 ± 15,8)	300,0 (672,1)	67,32	3,8 ± 0,6
	Bz-Arg-NHC <sub>10</sub>	96,3 (0,19)	1100,40 ± 24,20 (2630,5 ± 57,8)	50,0 (119,5)	23,22	4,3 ± 0,4
	Cetrimide	100,0 (297,25)	52,21 ± 4,67 (155,2 ± 13,9)	12,5 (37,2)	57,38	4,8 ± 0,2
Carnero	Bz-Arg-NHC <sub>12</sub>	37,8 (0,08)	707,6 ± 12,0 (1585,3 ± 26,9)	150,0 (336,1)	37,54	15,15 ± 0,7
	Bz-Arg-NHC <sub>10</sub>	96,3 (0,19)	1019,9 ± 11,8 (2438,1 ± 28,2)	25,0 (59,8)	6,16	4,07 ± 0,2
	Cetrimide	100,0 (297,25)	33,8 ± 1,5 (100,5 ± 4,4)	6,3 (18,7)	6,11	8,26 ± 1,8

**Tabla A2.** Propiedades de surfactantes derivados de arginina.

Surfactante	Bz-Arg-NHC <sub>12</sub>	Bz-Arg-NHC <sub>10</sub>	LAM(*)	CAM(*)	ALA(*)	ACA(*)
Estructura						
PM	446,34	418,32	406,6	378,6	414,46	386,41
Solubilidad acuosa (mg/ml)	0,2	0,8	92	ND	322,2	343,7
CMC (mM)	0,08 <sup>(ts)</sup> 0,13 <sup>(c)</sup>	0,19 <sup>(ts)</sup> 0,40 <sup>(c)</sup>	6,0	16	1,8×10 <sup>6</sup>	26×10 <sup>6</sup>
HC <sub>50</sub> (μM)	1412,8	2630,5	51,25	117,92	>2400	>2600

<sup>(ts)</sup>determinación por medidas de tensión superficial, <sup>(c)</sup>determinación por medidas de conductividad.

(\*) Pinazo *et al.* 2011.

# BIBLIOGRAFÍA

## Bibliografía

- Bessis, M. 1972. Red Cell Shapes. An Illustrated Classification and Its Rationale. *Nouvelle revue française d'hématologie* 12(6): 721–45.
- Bommarius, A. S., & Riebel, B. R. (2007). *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH, Germany.
- Bordusa, F. (2002). Proteases in organic synthesis. *Chemical Reviews*, 102(12):4817–4867.
- Brannigan, G.; Lin, L. C. L.; Brown, F. L. H. (2006). Implicit solvent simulation models for biomembranes. *European Biophysics Journal*, 35(2):104–124.
- 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 : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 20(8):3379–3387.
- Castillo, J. A.; Infante, M. R.; Manresa, À.; Vinardell, M. P.; Mitjans, M.; Clapés, P. (2006). Chemoenzymatic synthesis and antimicrobial and haemolytic activities of amphiphilic bis(phenylacetylarginine) derivatives. *ChemMedChem*, 1(10): 1091-1098.
- Chellappan, S.; Jasmin, C.; Basheer, S. M.; Elyas, K. K.; Bhat, S. G.; Chandrasekaran, M. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41(4):956–961.
- Clapés, P.; Torres, J.L.; Adlercreutz, P. (1995). Enzymatic peptide synthesis in low water content systems: preparative enzymatic synthesis of [Leu]- and [Met]-enkephalin derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 3(3):245-55.
- Engelman, D. M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, 438(7068): 578–580.
- Fait, M. E.; Garrote, G. L.; Clapés, P.; Morcelle, S. R. (2012). Producción de un agente antimicrobiano con potencial actividad tensioactiva mediante el empleo de tecnologías amigables con el medio ambiente. *AUGMDOMUS*, 4:49-61.
- 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.
- Goñi, F. M. (2014). The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer–Nicolson model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*,

1838(6):1467–1476.

- Hägerstrand H. & Isomaa B. (1994). Lipid and protein composition of exovesicles released from human erythrocytes following treatment with amphiphiles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1190(2): 409-415.
- Infante, M. R.; Pérez, L.; Pinazo, A.; Clapés, P.; Morán, M. C.; Angelet, M.; García, M. T.; Vinardell, M. P. (2004). Amino acid-based surfactants. *Comptes Rendus Chimie*, 7(6-7):583-592.
- Jay, A. W. (1975). Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on cell geometry. *Biophysical Journal*, 15(3):205–222.
- Jones, M. (1992). Surfactant interactions with biomembranes and proteins. *Chemical Society Reviews*, 21(2):127-136.
- Kim, C. & Shin, C. S. (2001). Solvent-free enzymatic synthesis of alitame precursor using eutetic substrate mixtures. *Enzyme Microbiol. Technol.* 28:611-6.
- Koumanov K.S.; Tessier C.; Quinn P.J. (2005). Comparative lipid analysis and structure of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys*, 434:150–158.
- Lee, H.-H.; Fukushi, K.; Oyama, K.; Aso, K. (1993). PEG-papain catalyzed synthesis of a kyotorphin derivative in aqueous organic media. *Biotech. Lett.* 15:833-6.
- Lichtenberg, D.; Opatowski, E.; Kozlov, M. M. (2000). Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1508(1-2):1–19.
- Maher, P., & Singer, S. J. (1984). Structural changes in membranes produced by the binding of small amphipathic molecules. *Biochemistry*, 23(1982):230–232.
- Maté, S.; Busto, J. V.; García-Arribas, A. B.; Sot, J.; Vazquez, R.; Herlax, V.; Wolf, C.; Bakás, L.; Goñi, F. M. (2014). N-Nervonoylsphingomyelin (C24:1) Prevents Lateral Heterogeneity in Cholesterol-Containing Membranes. *Biophysical Journal*, 106(12):2606-2616.
- Morán, C.; Clapés, P.; Comelles, F.; García, T.; Pérez, L.; Vinardell, P.; Mitjans, M.; Infante, M.R. (2001). Chemical structure/property relationship in single-chain arginine surfactants. *Langmuir*, 17(16):5071-5075.
- Morán, M. C.; Pinazo, A.; Pérez, L.; Clapés, P.; Angelet, M. (2004). “Green” amino acid-based

surfactants, 6(3):233–240.

Moriyama, K. (1987). Using proteases in peptide synthesis. *Trends Biotech.* 5:164-170.

Nakaoka, H.; Miyajima Y.; Moriyama, K. (1998). Papain-catalyzed synthesis of aspartame precursor: a comparison with thermolysin. *J. Ferm. Bioeng.* 85:43-7.

Nogueira, D. R.; Mitjans, M.; Busquets, M. A.; Pérez, L.; Vinardell, M. P. (2012). Phospholipid bilayer-perturbing properties underlying lysis induced by pH-sensitive cationic lysine-based surfactants in biomembranes. *Langmuir*, 28(32): 11687–11698.

Pape W. J. W.; Pfannenbecker U.; Hoppe U. (1987). Validation of the red blood cell test system as an in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Molecular Toxicology*, 1(4): 525-536.

Pérez, L.; Torres, J. L.; Manresa, A.; Solans, C.; Infante, M. R. (1996). Synthesis, Aggregation, and Biological Properties of a New Class of Gemini Cationic Amphiphilic Compounds from Arginine, bis(Arg) †. *Langmuir*, 12(22): 5296-5301.

Pérez, L.; García, M. T.; Ribosa, I.; Vinardell, M. P.; Manresa, A.; Infante, M. R. (2002). Biological properties of arginine-based gemini cationic surfactants. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 21(6):1279–1285.

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.

Piera, E.; Comelles, F.; Erra, P.; Infante, M. R. (1998). New alkyl amide type cationic surfactants from arginine. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (2):335–342.

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.

Ponder, E. (1948). Hemolysis and related phenomena. New York: Grune & Stratton.

Preté, P. S. C.; Domingues, C. C.; Meirelles, N. C.; Malheiros, S. V. P.; Goñi, F. M.; De Paula, E.; Schreier, S. (2011). Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction-A spin label study. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(1):164–170.

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.
- Sánchez, L.; Mitjans, M.; Infante, M. R.; Vinardell, M. P. (2006). Potential irritation of lysine derivative surfactants by hemolysis and HaCaT cell viability. *Toxicology Letters*. 161(1):53–60.
- Sánchez, L.; Martínez, V.; Infante, M. R.; Mitjans, M.; Vinardell, M. P. (2007). Hemolysis and antihemolysis induced by amino acid-based surfactants. *Toxicology Letters*, 169(2):177–184.
- Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. (2001). Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature*, 409(6817):258–268.
- Selim, N. S.; Desouky, O. S.; Ali, S. M.; Ibrahim, I. H.; Ashry, H. A. (2009). Effect of Gamma Radiation on Some Biophysical Properties of Red Blood Cell Membrane, *Romanian J. Biophys*, 19(3):171–185.
- 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.
- Svetina, S.; Kuzman, D.; Waugh, R. E.; Zihlerl, P.; Zeks, B. (2004). The cooperative role of membrane skeleton and bilayer in the mechanical behaviour of red blood cells. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, 62(2):107–13.
- Valivety, R.; Jauregi, P.; Gill, I.; Vulfson, E. (1997). Chemo-enzymatic synthesis of amino acid-based surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Societ*, 74(7): 879-886.
- Vives, M. A.; Infante, M. R.; Garcia, E.; Selve, C.; Maugras, M.; Vinardell, M. P. (1999). Erythrocyte hemolysis and shape changes induced by new lysine-derivate surfactants. *Chemico-Biological Interactions*, 118(1):1–18.