



CUARTO CONGRESO INTERNACIONAL
CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO
DE LA PROVINCIA DE BUENOS AIRES

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y DEL MECANISMO DE INTERACCIÓN CON MEMBRANAS BIOLÓGICAS DE SURFACTANTES DERIVADOS DE ARGININA

Centro de Investigación de Proteínas Vegetales
(CIProVe-UNLP-CIC)

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y DEL MECANISMO DE INTERACCIÓN CON MEMBRANAS BIOLÓGICAS DE SURFACTANTES DERIVADOS DE ARGININA

M. Hermet, M. E. Fait, S. R. Morcelle y L. S. Bakas*

Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIProVe-UNLP-CIC)
caffini@biol.unlp.edu.ar

RESUMEN

Se caracterizaron algunas propiedades fisicoquímicas de dos surfactantes derivados de arginina, Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂, así como su interacción con membranas biológicas utilizando glóbulos rojos humanos (GRH) como sistema modelo. Dichos compuestos fueron capaces de reducir la tensión superficial del agua a un valor constante, y mostraron además concentraciones micelares críticas (CMC) definidas. La observación de agregados cilíndricos de Bz-Arg-NHC_n a través de microscopía de fuerza atómica corroboró las predicciones basadas en los valores del parámetro de empaquetamiento. Los estudios de la actividad hemolítica evidenciaron que la solubilización de la membrana de GRH es inducida por los agregados de los surfactantes, ya que solo se observó lisis celular a concentraciones mayores que sus respectivas CMC. Los cambios morfológicos observados en los GRH expuestos a los surfactantes demostraron la existencia de dos fenómenos involucrados en el mecanismo hemolítico: la incorporación de monómeros de surfactante en la capa externa de la membrana de los GRH, que provoca su desestabilización con la consiguiente formación de equinocitos y liberación de microvesículas, y la extracción de los componentes de la membrana, resultante de colisiones con los agregados de los surfactantes, lo que provoca una disminución del área relativa de la capa externa y favorece la aparición de estomatocitos.

Palabras clave: Surfactantes, hemólisis, micelas, microvesículas.

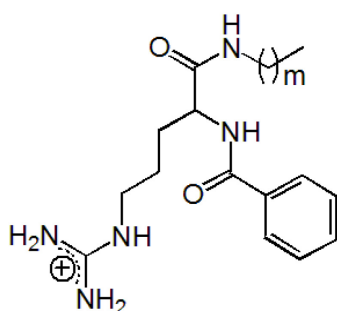
* Centro de Investigación de Proteínas Vegetales (CIProVe-UNLP-CIC), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata. Calle 47 y 115, La Plata, Buenos Aires. meli.hermet@hotmail.com; fait.mariaelisa@biol.unlp.edu.ar; morcelle@biol.unlp.edu.ar; lbakas@biol.unlp.edu.ar.

INTRODUCCIÓN

Los surfactantes derivados de arginina constituyen un grupo interesante entre los surfactantes derivados de aminoácidos, ya que generalmente presentan baja toxicidad, alta biodegradabilidad, propiedades antimicrobianas de amplio espectro y son más fáciles de obtener que los surfactantes comerciales (Pinazo *et al.*, 2016). Esta familia de compuestos ha demostrado eficacia como conservante en formulaciones farmacéuticas y alimentarias, así como principio activo en productos dermatológicos y de cuidado personal (Singh y Tyagi, 2014).

Dos tensioactivos derivados de arginina, *N*^ε-benzoil-L-arginina-decilamida (Bz-Arg-NHC₁₀) y *N*^ε-benzoil-L-arginina-dodecilamida (Bz-Arg-NHC₁₂) (figura 1), fueron sintetizados mediante biocatálisis, empleando papaína (una peptidasa obtenida a partir del látex de frutos de *Carica papaya*) adsorbida sobre poliamida como biocatalizador. El hecho de que estos compuestos hayan demostrado tener actividad antimicrobiana de amplio espectro, baja irritabilidad ocular y baja citotoxicidad (Fait *et al.*, 2015) ha sugerido su uso como aditivo en formulaciones farmacéuticas. Sin embargo, los compuestos capaces de inhibir el crecimiento microbiano también pueden resultar ser tóxicos frente a otros tipos celulares, y causar efectos adversos, como la hemólisis. Pape *et al.* (1987) han descrito un método simple, rápido y efectivo para evaluar la toxicidad de surfactantes, basado en el uso de glóbulos rojos como sistema modelo para analizar la integridad de membrana.

Figura 1. Estructura química de Bz-Arg-NHC_n, con m=9, 11 y n=m+1



MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos. Los glóbulos rojos humanos (GRH) fueron aislados a partir de sangre de voluntarios sanos de nuestro personal de laboratorio (CIProVe-UNLP-CIC, La Plata, Argentina). Seroalbúmina bovina (BSA) fue comprada a Fedesa S.A. Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ fueron sintetizados en nuestro laboratorio según lo descrito por Fait *et al.* (2015). El resto de los reactivos fue de grado analítico.

Declaración ética. La sangre humana fue obtenida de voluntarios sanos pertenecientes a nuestro personal de laboratorio (CIProVe). El estudio ha sido aprobado por el COBIMED (Comité de Bioética y Ética de la Investigación, Facultad de Ciencias Médicas, UNLP), de acuerdo a los requisitos de la Declaración de Helsinki.

Concentración micelar crítica (CMC)

Se realizaron medidas de tensión superficial (γ) de soluciones acuosas de Bz-Arg-NHC_n de distintas concentraciones, utilizando un tensiómetro Krüs K-12 con una placa de Wilhelmy. Todas las soluciones fueron preparadas en agua desionizada y se dejaron equilibrar por 2 h a 25 °C en las celdas correspondientes. La CMC fue determinada a partir de la intersección de las porciones lineales de las curvas de tensión superficial vs. el logaritmo de la concentración de surfactante.

Microscopía de fuerza atómica (AFM)

La forma de los agregados de Bz-Arg-NHC_n fue caracterizada en aire y en celda fluida por AFM en modo de contacto intermitente a 25 °C. La concentración de surfactante empleada en cada ensayo fue 5 veces la CMC correspondiente. En todos los casos, 20 μ l de la solución del tensioactivo fueron colocados sobre mica muscovita recientemente descamada. Para los ensayos en aire, las muestras fueron secadas bajo corriente de N₂ y analizadas utilizando sondas de nitruro de silicio (RTESP, Veeco, radios de punta 8-12 nm, 271-311 kHz, constante de fuerza 40 N/m). En cuanto a las muestras en celda fluida (agua), se emplearon sondas NPS10 (radios de punta 8-12 nm, 2-10 kHz, constante de fuerza 0,06 N/m). Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio MultiMode Scanning Probe (Veeco) equipado con un controlador Nanoscope V (Veeco) a una velocidad de escaneo estándar (1 Hz).

Preparación de la suspensión de GRH

Los GRH fueron aislados mediante centrifugación a 1300×g durante 15 min a temperatura ambiente y lavados tres veces con buffer fosfato salino (PBS; NaCl 123,3 mM, Na₂HPO₄ 22,2 mM y KH₂PO₄ 5,6 mM en agua MilliQ[®] nanopura; pH 7,4; 300 mOsm/l) (Pape *et al.* 1987).

Cinética de hemólisis

Se evaluó el grado de hemólisis inducido por Bz-Arg-NHC_n a diferentes hematocritos (0,075; 0,15; 0,30 y 0,45 % v/v). Para ello, se prepararon diluciones seriadas de soluciones de los surfactantes en PBS en una placa de microtitulación de 96 pocillos. En cada ensayo, se añadieron 100 μ l de la suspensión de GRH a 100 μ l de las diluciones de

Bz-Arg-NHC_n. Las placas fueron incubadas a 37 °C en un detector multimodo DTX 880 (Beckman Coulter), midiéndose la densidad óptica a 595 nm (DO₅₉₅) en intervalos de 1 min por un período total de 1 h, con agitación lineal entre mediciones. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Con los datos obtenidos se construyeron las curvas de cinética de hemólisis, graficando la disminución de la DO₅₉₅ en función del tiempo. El porcentaje de hemólisis para 1 h de incubación fue calculado según la Ec. (1):

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{DO_c - DO_x}{DO_c - DO_{tx}} \times 100 \quad (1)$$

donde DO_c es la DO₅₉₅ de los GRH incubados en PBS, DO_x es la DO₅₉₅ de los GRH tratados con diferentes concentraciones de los surfactantes y DO_{tx} es la DO₅₉₅ de los GRH incubados en presencia de Tritón X-100 1 % v/v (100 % hemólisis). A continuación, se construyeron las curvas dosis-respuesta para cada hematocrito, ajustándose cada conjunto de datos a una función sigmoidea (Boltzmann), utilizando el software OriginPro8[®], y se aplicó el análisis propuesto por Preté *et al.* (2002).

Caracterización morfológica de los GRH

Se estudiaron los cambios morfológicos en GRH tratados con Bz-Arg-NHC_n mediante microscopía óptica con contraste de fase. Para ello, se depositaron alícuotas de GRH (10 µl, hematocrito 0,075 % en PBS adicionado con 1,0 % p/v de BSA) sobre portaobjetos revestidos con poli-L-lisina 0,001 % v/v (Jay, 1975). Los cambios en la morfología celular fueron observados a través de un microscopio óptico con contraste de fases (Nikon Eclipse TS100) luego de la adición de 10 µl de soluciones de distinta concentración de los surfactantes (300 y 1200 µM para Bz-Arg-NHC₁₀; 280 y 1100 µM para Bz-Arg-NHC₁₂). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital Nikon 391CU 3.2M CCD y analizadas utilizando el software Micrometrics SE Premium[®].

Microscopía electrónica de transmisión

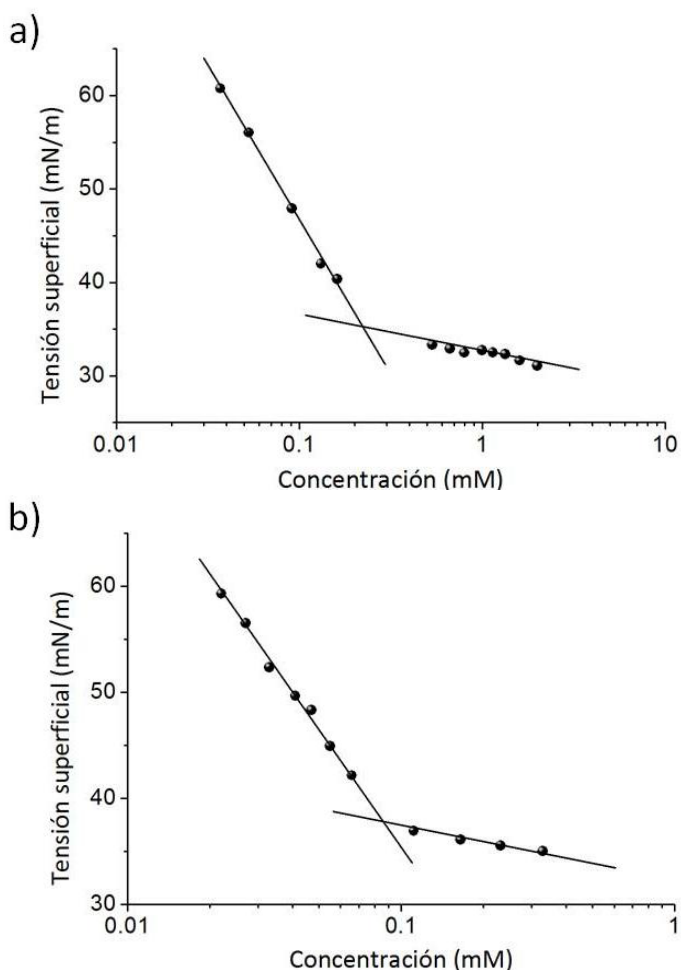
Las microvesículas fueron aisladas mediante el ultracentrifugado (100000×g, 1 h) del sobrenadante de GRH (2 % v/v) tratados con Bz-Arg-NHC₁₀ (300 µM) y Bz-Arg-NHC₁₂ (280µM); y fijadas por la adición de 10 µl de glutaraldehído. Para su observación se utilizó la técnica de tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 1 % p/v como contrastante y un microscopio electrónico de transmisión JEM-1200EX II (Jeol).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración micelar crítica

Se ha sugerido cierto paralelismo entre la CMC de un surfactante y su coeficiente de partición entre la fase acuosa (polar) y la membrana (no polar). También se ha reportado una relación lineal entre el logaritmo de la CMC y el logaritmo de la constante de partición del surfactante en la membrana (K). Por este motivo, el valor de CMC es un parámetro clave para entender el mecanismo involucrado en la solubilización de membranas inducida por surfactantes. Estos valores fueron determinados a partir de la intersección de las porciones lineales de las curvas de tensión superficial (γ) vs. el logaritmo de la concentración de surfactante (figura 2). De acuerdo a los resultados, ambos compuestos fueron capaces de reducir la tensión superficial del agua a un valor constante. Se observó que para Bz-Arg-NHC₁₂ el valor de CMC (0,085 mM) fue menor que para Bz-Arg-NHC₁₀ (0,23 mM), lo que se puede explicar teniendo en cuenta el largo de la cadena hidrocarbonada: a mayor hidrofobicidad de la molécula (mayor longitud de la cola hidrocarbonada), mayor será la tendencia a formar agregados y menor será su CMC.

Figura 2. Tensión superficial vs. concentración de surfactante: (a) Bz-Arg-NHC₁₀ y (b) Bz-Arg-NHC₁₂



Parámetros de empaquetamiento

La forma de los agregados en los que se ensamblan las moléculas de los surfactantes es variable, y puede predecirse según el parámetro de empaquetamiento, definido por la Ec. (2):

$$SPP = v/lA_o \quad (2)$$

donde v es el volumen de la cola no polar, l es el largo de la cadena no polar en configuración *all-trans* y A_o es el área ocupada por la cabeza polar. Valores de SPP entre 0,33 y 0,5 corresponden a una conformación cilíndrica, mientras que para $SPP < 0,33$ los agregados tienden a adoptar formas esféricas. Para Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂ los valores de SPP hallados (0,38 y 0,45, respectivamente) predicen la formación de agregados cilíndricos en ambos casos.

Microscopía de fuerza atómica

Se estudió el comportamiento de agregación de Bz-Arg-NHC_n en aire y celda fluida, mediante AFM (figura 3). En todos los casos, los perfiles obtenidos mostraron la existencia de mono- y bicapas de moléculas de tensioactivo, con alturas promedio de entre 3 y 5 nm respectivamente. La presencia de regiones alternadas de mica sin cubrir y bicapas de surfactante fue evidenciada para Bz-Arg-NHC_n en aire (figura 3a y 3c). También se observó la adsorción de agregados sobre las bicapas inicialmente formadas tanto en aire como en medio líquido. Estos agregados presentaron una amplia variedad de tamaños, con alturas de entre 5 y 90 nm para Bz-Arg-NHC₁₀, y de entre 12 y 40 nm para Bz-Arg-NHC₁₂. Finalmente, en el caso de las imágenes adquiridas en celda fluida para Bz-Arg-NHC_n, se evidenció la presencia de agregados cilíndricos (figuras 3b y 3c), corroborando las predicciones basadas en el SPP.

Cinética de hemólisis

Para obtener más información acerca del mecanismo involucrado en el proceso hemolítico inducido por Bz-Arg-NHC_n se estudiaron las cinéticas de hemólisis de GRH. La figura 4 muestra los cambios en la DO₅₉₅ en función del tiempo para los GRH tratados con 6 concentraciones distintas de Bz-Arg-NHC_n, tanto por debajo como por encima de sus respectivas CMC, para dos hematocritos (0,15 y 0,30 % v/v).

En el caso de las muestras incubadas con Bz-Arg-NHC₁₀, solo se observó la solubilización de las membranas (evidenciada por una disminución en la DO₅₉₅) a concentraciones mayores que su CMC. Al aumentar el hematocrito, para tiempos de incubación mayores a 30 min a las menores concentraciones de surfactante, se notó un aumento en la DO₅₉₅ (figura 4b). Esto podría deberse a una agregación de los GRH mediada por los monómeros del surfactante. Por otro lado, para los GRH tratados con Bz-Arg-NHC₁₂, se observó un comportamiento similar (figuras 4c y 4d). Finalmente, el hecho de que la hemólisis solo fue evidente a concentraciones de surfactante de 2,5 y 3,3 veces los valores de CMC para

Bz-Arg-NHC₁₀ y Bz-Arg-NHC₁₂, respectivamente, sugiere que son los agregados los responsables de este efecto.

Figura 3. Imágenes de AFM obtenidas para: (a, b) Bz-Arg-NHC₁₀ y (c, d) Bz-Arg-NHC₁₂, (a, c) en aire y (b, d) en celda fluida. Las imágenes se muestran en escala z de 30 nm, representada por el brillo del color

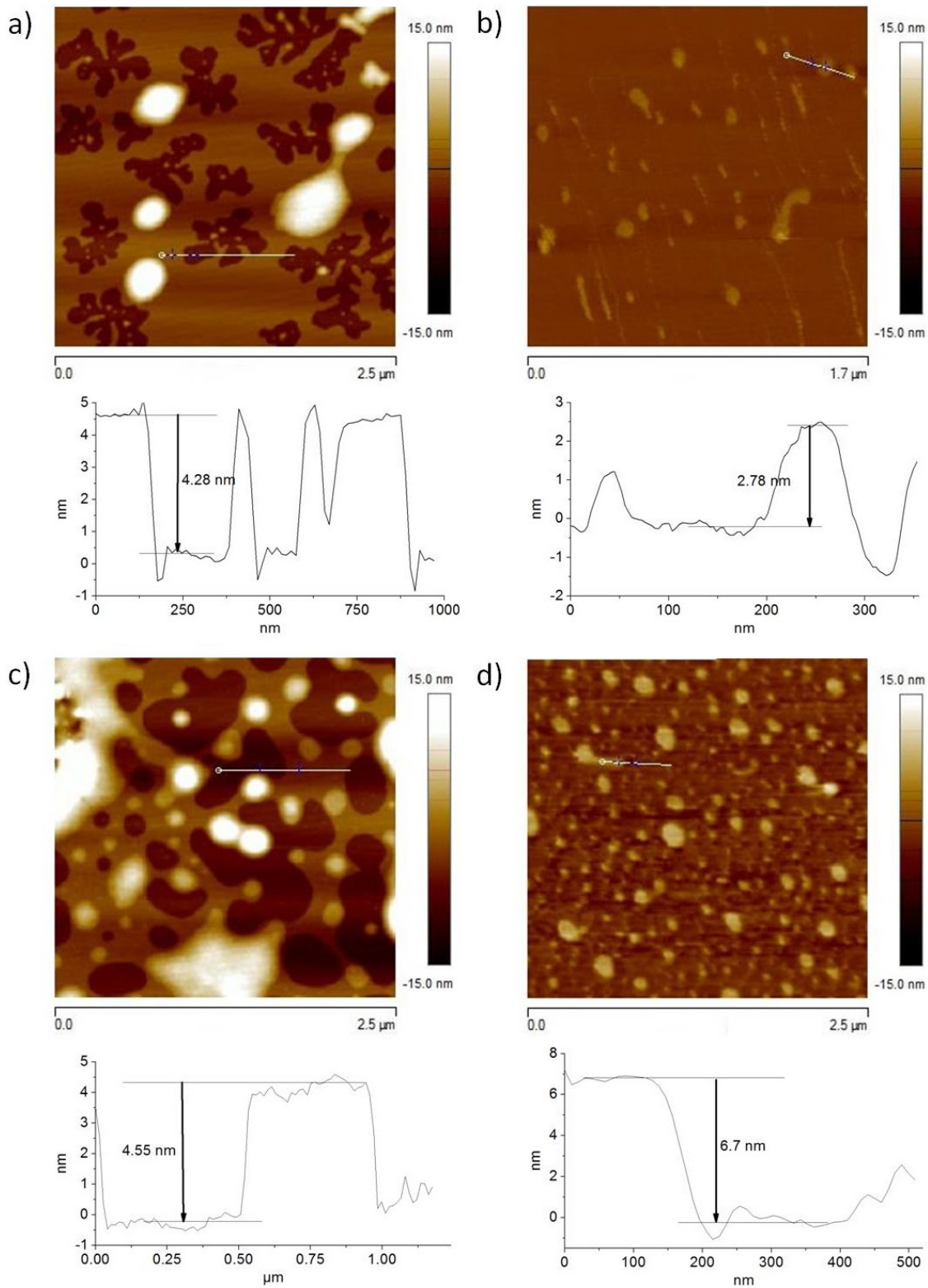
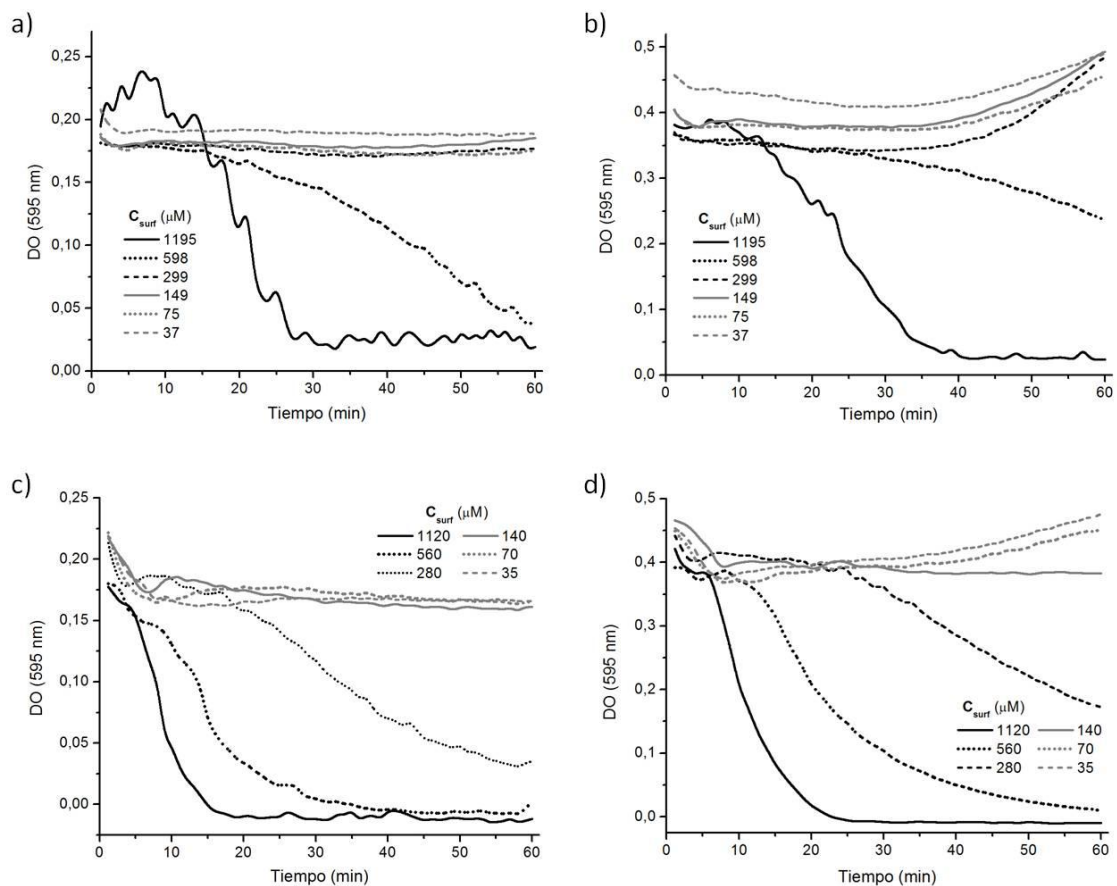


Figura 4. Cinética de hemólisis inducida por (a, b) Bz-Arg-NHC₁₀ y (c, d) Bz-Arg-NHC₁₂, en medio isotónico para hematocritos de 0,15 % (a, c) y 0,30 % (b, d) v/v



Cambios morfológicos en GRH inducidos por Bz-Arg-NHC_n

Se analizaron los cambios en la forma de GRH inducidos por Bz-Arg-NHC_n, utilizando un microscopio óptico con contraste de fases. Las imágenes obtenidas revelaron una serie de cambios morfológicos que dependían no solo del largo de la cadena hidrocarbonada, sino también de la concentración de surfactante empleada (figura 5). Para los GRH tratados con Bz-Arg-NHC₁₀, la secuencia de cambios morfológicos fue discocito → equinocito → esferocito para ambas concentraciones ensayadas (300 o 1200 μM). En el caso de Bz-Arg-NHC₁₂, para la menor concentración empleada (280 μM) la secuencia observada fue discocito → equinocito → esferoequinocito, mientras que para la mayor concentración ensayada (1120 μM), la secuencia fue discocito → estomatocito → esferocito. Solo se observó lisis luego de 6 min de incubación con Bz-Arg-NHC₁₂ a una concentración igual a 1120 μM .

A pesar de que las capas externa e interna de la membrana permanecen acopladas, pueden surgir alteraciones en la forma normal de los GRH, debido a diferencias entre sus áreas relativas (Sheetz y Singer, 1974; Sheetz, *et al.*, 1976). Por lo tanto, cualquier perturbación que provoque un aumento en el área relativa de la capa externa contribuye a la formación de

estructuras que protruyen de la membrana, y prevalecen los equinocitos. Por el contrario, la adición de moléculas en la capa interna lleva a un aumento del área de esta respecto de la externa, lo que provoca la aparición de concavidades en la superficie celular (estomatocitos). Las alteraciones en la forma de los GRH inducidas por surfactantes pueden resultar no solo de una incorporación asimétrica de moléculas anfífilas en la bicapa, sino también como consecuencia de la extracción de los componentes de la membrana (Vives *et al.*, 1999).

En el caso de Bz-Arg-NHC₁₀, el cambio de discocito a equinocito sugiere la incorporación de los monómeros del surfactante (menos hidrofóbicos) en la capa externa de la membrana de los GRH. La transición final a esferocitos (figuras 5b y 5c) puede ser explicada por el desprendimiento de microvesículas mixtas, cuya presencia fue evidenciada por microscopía electrónica de transmisión (figura 6).

Por otro lado, Bz-Arg-NHC₁₂ mostró un comportamiento similar en la menor concentración ensayada (figura 5d). En este caso, al aumentar la concentración del tensioactivo, la morfología predominante observada fueron los estomatocitos (figura 5e), lo cual puede explicarse por un incremento en el número de agregados de surfactante, lo que puede atribuirse al aumento de la tasa de extracción de componentes de la membrana en relación con la observada en el caso de los agregados de Bz-Arg-NHC₁₀. De esta forma, si bien las moléculas de Bz-Arg-NHC₁₂ serían incapaces de traslocar a la capa interna de la membrana, la rápida solubilización de los constituyentes de esta conducirían a una disminución substancial del área de la capa externa, cambiando la forma de los GRH de discocitos a estomatocitos.

Figura 5. Imágenes de microscopía óptica con contraste de fases de GRH tomadas inmediatamente (t_0) y 1, 3, 6 o 10 min después de la adición de: Bz-Arg-NHC₁₀ (b) 300 μ M o (c) 1200 μ M; Bz-Arg-NHC₁₂ (d) 280 μ M o (e) 1100 μ M, todos en medio isotónico (aumento: 400X; barras: 10 μ m). Las imágenes correspondientes a los GRH control (a) evidenciaron la inexistencia de cambios morfológicos en ausencia de los tensioactivos. Los recuadros muestran las imágenes digitalmente ampliadas (1000X) de las células señaladas con flechas

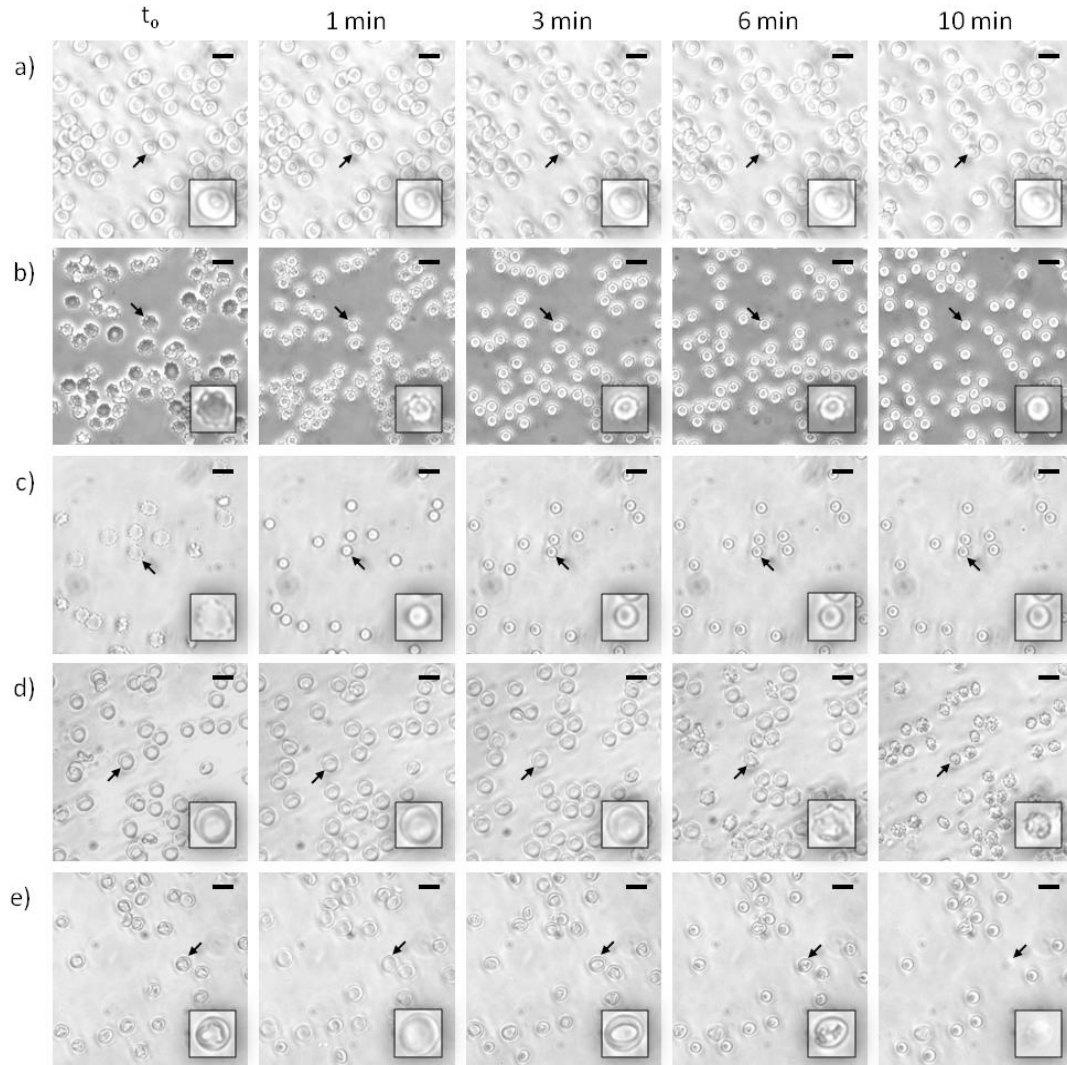
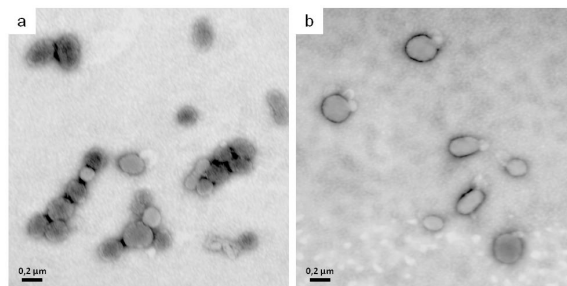


Figura 6. Micrografías electrónicas de las microvesículas liberadas y aisladas por ultracentrifugación luego de la exposición de GRH a (a) Bz-Arg-NHC10 300 μ M y (b) Bz-Arg-NHC12 280 μ M en medio isotónico



CONCLUSIONES

Se determinaron las CMC de Bz-Arg-NHC_n mediante medidas de tensión superficial. El análisis por AFM reveló la formación de agregados cilíndricos para ambos surfactantes, corroborando las predicciones basadas en el parámetro SPP. Mediante el estudio de las cinéticas de hemólisis se verificó la ausencia de lisis celular a concentraciones de por debajo de las respectivas CMC, incluso a tiempos de incubación largos (1 h). El estudio de la interacción de los surfactantes con GRH reveló que el mecanismo hemolítico involucrado depende no solo del largo de la cadena hidrocarbonada sino también de la concentración del tensioactivo.

BIBLIOGRAFÍA

- FAIT, M. E., GARROTE, G. L., CLAPES, P., TANCO, S. E., LORENZO, J. y MORCELLE, S. R. (2015). "Biocatalytic Synthesis, Antimicrobial Properties and Toxicity Studies of Arginine Derivative Surfactants". *Amino Acids*, vol. 47, n.º 7, pp. 1465-1477. doi: 10.1007/s00726-015-1979-0
- JAY, A. W. (1975). "Geometry of the Human Erythrocyte. I. Effect of Albumin on Cell Geometry". *Biophysical Journal*, vol. 15, n.º 3, pp. 205-222. doi: 10.1016/S0006-3495(75)85812-7
- PAPE, W. J. W.; PFANNENBECKER, U. y HOPPE, U. (1987). "Validation of the Red Blood Cell Test System as in Vitro Assay for the Rapid Screening of Irritation Potential of Surfactants". *Molecular Toxicology*, vol. 1, n.º 4, pp. 525-536.
- PINAZO, A.; MANRESA, M. A.; MARQUES, A. M.; BUSTELO, M.; ESPUNY, M. J. y PÉREZ, L. F. (2016). "Amino Acid-Based Surfactants: New Antimicrobial Agentes". *Advances in Colloid and Interface Science*, vol. 228, pp. 17-39. doi: 10.1016/j.cis.2015.11.007
- PRETÉ, P. S. C.; GOMES, K.; MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C. y DE PAULA, E. (2002). "Solubilization of Human Erythrocyte Membranes by Non-Ionic Surfactants of the Polyoxyethylene Alkyl Ethers Series". *Biophysical Chemistry*, vol. 97, n.º 1, pp. 45-54. doi: 10.1016/S0301-4622(02)00042-X
- SHEETZ, M. P. y SINGER, S. J. (1974). "Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions". *PNAS*, vol. 71, n.º 11, pp. 4457-4461.
- SHEETZ, M. P.; PAINTER, R. G. y SINGER, S. J. (1976). "Biological Membranes as Bilayer Couples. III. Compensatory Shape Changes Induced in Membranes". *The Journal of Cell Biology*, vol. 70, n.º 1, pp. 193-203.
- SINGH, A. y TYAGI, V.K. (2014). "Arginine Based Novel Cationic Surfactants: A Review". *Tenside Surfactants Detergents*, vol. 51, n.º 3, pp. 202-214. doi: 10.3139/113.110299

VIVES, M. A., INFANTE, M. R., GARCÍA, E., SELVE, C., MAUGRA, M. y VINARDELL, M. P. (1999). "Erythrocyte Hemolysis and Shape Changes Induced by New Lysine-Derivate Surfactants. *Chemico-Biological Interactions*, vol. 118, n.º 1, pp. 1-18.