

Estudis d'interacció de tensioactius sintètics biocompatibles amb models de membrana. Potencial aplicació en medicina pulmonar

Neus Lozano Valdés

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



*Estudis d'Interacció de Tensioactius Sintètics
Biocompatibles amb Models de Membrana.
Potencial Aplicació en Medicina Pulmonar.*



Tesi doctoral dirigida per:

Dra. Aurora Pinazo Gassol / Dr. Ramon Pons Pons

Neus Lozano Valdés

Barcelona, Gener 2010

Programa de Doctorat “Ciència i Tecnologia de Col·loides i Interfases”

Bienni 2005-2007

Resum de la Memòria

Resum de la Memòria

Els pulmons dels mamífers són funcionals gràcies a la presència dels tensioactius pulmonars. Aquesta substància d'extraordinàries propietats d'adsorció, reducció de la tensió superficial i protecció davant d'atacs bacterians està formada per una barreja en la que els components majoritaris són fosfolípids i proteïnes. L'absència d'aquests tensioactius provoca nombroses patologies greus com la síndrome de dificultat respiratòria neonatal (*SDR*) i la deficiència respiratòria aguda en adults (*ARDS*), aquesta última provocada principalment per infeccions bacterianes a les vies respiratòries, amb el resultat d'una elevada mortalitat. Actualment, aquestes patologies es combaten amb compostos naturals d'origen boví i porcí o amb derivats sintètics. En ambdós casos tenen un cost molt elevat. En el primer cas, per la necessitat de controls d'innocuitat rigorosos i, en el segon, pel baix rendiment de les complexes tècniques de síntesi que hi intervenen. En aquesta tesi es proposa una aproximació al desenvolupament i formulació mitjançant una metodologia diferent i innovadora de nous tensioactius pulmonars d'origen sintètic. La hipòtesi en què s'ha basat aquesta tesi ha estat que els nous tensioactius sintètics actuarien com a factors d'optimització de tensioactius pulmonars sintètics mitjançant una doble funcionalitat incorporada en una mateixa molècula. Els nous tensioactius actuarien 1) mimetitzant l'estructura dels fosfolípids per tal que la seva adsorció a la interfase produeixi una distorsió mínima de les característiques fisicoquímiques del tensioactiu pulmonar i 2) presentant capacitat antimicrobiana basada en la naturalesa catiònica de l'aminoàcid. La simplicitat dels nous tensioactius pulmonars permetria la seva producció a gran escala i baix cost.

➤ *Síntesi dels diacilglicerols d'arginina XXRAc*

S'han sintetitzat els tensioactius catiònics derivats dels diacilglicerols d'arginina XXRAc (1414RAc i 1212RAc) obtenint resultats satisfactoris, amb rendiments propers al 70%. La caracterització estructural de les noves molècules s'ha realitzat a partir de la ressonància magnètica nuclear de protó (^1H -RMN) i de carboni (^{13}C -RMN). Emprant cromatografia líquida d'alta eficàcia (HPLC) i anàlisi elemental s'ha determinat la puresa d'aquests tensioactius sintètics, que ha estat del 99%.

➤ *Efecte de la nebulització*

S'ha estudiat el procés de nebulització per ser aquesta tècnica la més emprada en l'administració dels tensioactius pulmonars per via respiratòria. Per realitzar aquest estudi s'ha emprat un nebulitzador mèdic convencional. S'ha determinat la mida de les partícules de les dispersions aquoses formades per un fosfolípid amfòter (DPPC, DMPC) en presència i en absència dels tensioactius sintètics (1414RAc, 1212RAc), abans i després de nebulitzar (condensant l'aerosol), així com el del romanent al dipòsit del nebulitzador, mitjançant la tècnica de dispersió de llum dinàmica. Els resultats obtinguts han demostrat que l'efecte de la nebulització no afecta en les dimensions de les partícules dispersades.

➤ *Caracterització fisicoquímica de monocapes d'extensió i adsorbides*

Per tal de conèixer la capacitat d'adsorció/incorporació en preparats sintètics de tensioactius pulmonars, s'ha realitzat la caracterització fisicoquímica de monocapes, tant d'extensió com adsorbides, dels fosfolípids DPPC i DMPC, en presència i en absència dels tensioactius sintètics XXRAc. El fosfolípid DPPC s'ha emprat com a component majoritari dels tensioactius pulmonars, mentre que el fosfolípid DMPC s'ha estudiat per ser un homòleg estructural de cadena més curta. A partir de la caracterització fisicoquímica de monocapes, s'ha demostrat l'existència d'un fort sinergisme entre els dos components de la mescla i, en condicions polsants, s'ha evidenciat la no desorció dels components tensioactius cap a la subfase, estabilitzant així la interfase aire/aigua que simula la interfase present al pulmó. Petites addicions del tensioactiu 1414RAc acceleren el procés d'adsorció del fosfolípid DPPC, això pot ajudar a resoldre un dels principals problemes en els preparats sintètics de tensioactius pulmonars.

➤ *Activitat microbiològica dels diacilglicerols d'arginina XXRAc*

S'ha iniciat una aproximació de l'activitat microbiològica dels nous tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina emprant un medi de cultiu senzill. S'ha estudiat l'activitat antimicrobiana en protozous de *Leishmania* (promastigote i amastigote) i en bacteris Gram-negatius per ser els causants de les malalties infeccioses al pulmó. La citotoxicitat s'ha assajat en eritròcits, macròfags i queratinòcits. Els resultats obtinguts

demostren una elevada activitat leishmanicida i una activitat antimicrobiana i hemolítica moderada. S'ha aprofundit en els assaigs microbiològics emprant un medi de cultiu complet i estudiant l'activitat antimicrobiana en un bacteri Gram-negatiu i tres de Gram-positius, així com l'activitat hemolítica, dels tensioactius XXRAc i, a efectes comparatius, dels seus homòlegs no N^α-acetilats (XXR). Aquests resultats evidencien una activitat antimicrobiana dels diacilglicerols d'arginina XXRAc moderada i una activitat hemolítica elevada el que suposa un obstacle pel seu ús com a substituïts dels tensioactius pulmonars. També s'ha demostrat una forta dependència entre l'activitat microbiològica i la hidrofobicitat del cap polar del tensioactiu.

➤ *Propietats de vesícules cataniòniques*

S'ha estudiat una estratègia de formulació com a vesícules cataniòniques per tal de reduir la citotoxicitat dels tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina XXRAc. Inicialment, s'han estudiat les propietats d'aquestes vesícules determinant el potencial- ζ i de les dimensions de les partícules, així com la seva caracterització morfològica mitjançant les tècniques de Cryo-TEM i SAXS. S'ha evidenciat la formació de vesícules cataniòniques carregades tant negativament com positivament, en funció de la proporció dels components iònics que formen la mescla, amb una zona de precipitació corresponent a la neutralització de càrrega a fraccions properes a la relació equimolar. S'ha observat un comportament insòlit ja que a petites addicions de tensioactiu s'observa un increment en el valor absolut del potencial- ζ respecte a les vesícules del fosfolípid aniònic que s'atribueix a una disminució del grau d'associació del contraió sodi a les vesícules. Les vesícules cataniòniques carregades negativament mantenen l'activitat antimicrobiana en bacteris Gram-positius, però al mateix temps redueixen tant l'activitat antimicrobiana en bacteris Gram-negatius com l'activitat hemolítica. Independentment de la seva actuació al pulmó, la qual en aquest estadi de la investigació no és del tot esperançadora, els resultats obtinguts constitueixen una base sòlida per, mitjançant la formulació de sistemes cataniònics, reduir la citotoxicitat dels tensioactius, obrint així possibles aplicacions clíniques per tractaments de malalties infeccioses.