

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

2. Introducció a les Tècniques Experimentals

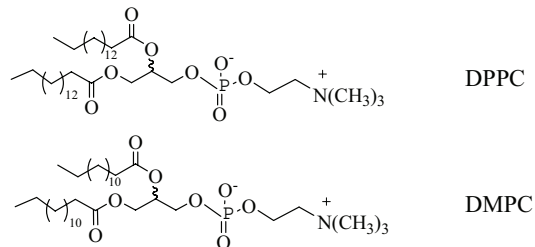
2.1. Preparació de vesícules

Un dels models de membrana cel·lular més emprats són les vesícules de fosfolípids, perquè la bicapa lipídica que les forma és idèntica a la porció lipídica de les membranes cel·lulars (veure *Secció 1.3.*).

Per a l'estudi de les interaccions dels tensioactius catiónics derivats de l'aminoàcid arginina amb membranes cel·lulars s'han utilitzat, com a models, vesícules mixtes formades per tensioactiu catiónic/fosfolípid. En funció de la naturalesa iònica del fosfolípid, les vesícules resultants seran *vesícules catióniques mixtes* (tensioactiu catiónic/fosfolípid amfòter) o *vesícules cataniòniques* (tensioactiu catiónic/fosfolípid aniònic).

➤ *Vesícules catióniques mixtes (tensioactiu catiónic/fosfolípid amfòter)*

S'han preparat vesícules mixtes formades per un tensioactiu catiónic derivat d'arginina i un fosfolípid amfòter (DPPC, DMPC). Les estructures químiques d'aquests fosfolípids es detallen a l'Esquema 2. Les vesícules mixtes resultants presenten càrrega global positiva deguda al caràcter catiónic dels tensioactius. El fosfolípid DPPC s'ha utilitzat per ser el component majoritari dels tensioactius pulmonars, mentre que l'estudi de les interaccions amb DMPC s'ha utilitzat per estudiar les diferents interaccions dels tensioactius en variar la hidrofobicitat del fosfolípid.



Esquema 2. Estructures químiques dels fosfolípids amfòters DPPC i DMPC.

➤ *Vesícules cataniòniques (tensioactiu catiónic/fosfolípid aniònic)*

Els sistemes cataniònics estan formats per mesclades d'un tensioactiu catiónic i un tensioactiu aniònic. Quan la mescla entre tots dos tensioactius de càrrega oposada no és estrictament equimolar, el que s'obté són mesclades cataniòniques estabilitzades per

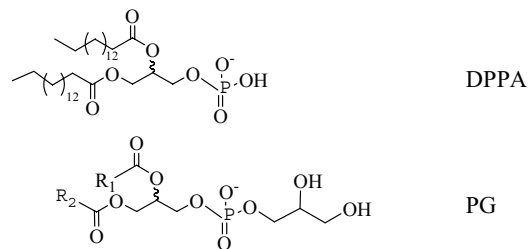
les fortes interaccions entre els caps polars, modulades per les interaccions entre les parts hidrofòbiques, obtenint així una mescla no ideal [Khan A i col., 2000]. Aquestes mescles cataniòniques presenten la següent seqüència d'agregació en incrementar la concentració de tensioactiu minoritari: micel·les, micel·les inflades, micel·les cilíndriques, vesícules, arribant finalment a la neutralització de la càrrega i per tant a la formació de precipitat [Marques EF i col., 1998; 1999]. Aquest precipitat rep el nom de tensioactiu cataniònic i és el resultat de mesclar quantitats equimolars d'un tensioactiu catiònic amb un d'aniònic. Dins d'aquest grup de sistemes cataniònics, i depenent del nombre de cadenes hidrofòbiques de cadascun dels tensioactius involucrats, es poden classificar en:

- *pseudo-di-catenaris*: formats per dos tensioactius monocatenaris [Kamenka N i col., 1992; Silva BFB i col., 2005; Bonincontro A i col., 2006].
- *pseudo-tri-catenaris*: constituïts per un tensioactiu monocatenari i un altre de doble cadena, sent aquest grup de cataniònics àmpliament estudiats a la literatura [Bonincontro A i col., 2008; Burgo P i col., 2007; Marques EF i col., 2000; 2002; 2006; 2008].
- *pseudo-tetra-catenaris*: sistemes formats per dos tensioactius de doble cadena. Aquests sistemes només han estat estudiats prèviament per [Caria A i col., 1996] i [Karukstis KK i col., 2003].

En aquesta tesi s'han preparat vesícules cataniòniques formades per un tensioactiu catiònic, monocatenari o de doble cadena, i un fosfolípid aniònic de doble cadena, DPPA o PG. Les estructures químiques d'aquests fosfolípids es detallen a l'Esquema 3. Els sistemes cataniònics formats són sistemes *pseudo-tri-* i *pseudo-tetra-catenaris*, aquests últims de gran interès degut a la seva novetat. Tots aquests sistemes cataniònics poden presentar tant càrrega global positiva com negativa, en funció de si el component majoritari és el tensioactiu catiònic o bé el fosfolípid aniònic.

El fosfolípid aniònic DPPA, degut a la seva similitud amb el fosfolípid de membrana DPPC, s'ha utilitzat per estudiar la influència de la càrrega global de les vesícules en la interacció amb els tensioactius derivats d'arginina. En canvi, per l'estudi de l'activitat antimicrobiana, s'ha escollit el PG com a fosfolípid aniònic majoritari en els tensioactius pulmonars (veure Figura 9). Les deduccions de l'estudi

de les propietats de les vesícules cataniòniques XXRAc/DPPA s'han fet extensives als sistemes cataniònics XXRAc/PG, degut a la similitud estructural dels dos fosfolípids aniònics.



Esquema 3. Estructures químiques dels fosfolípids aniònics DPPA i PG.

La preparació de vesícules mixtes, tant catiòniques com cataniòniques, s'ha realitzat mitjançant la hidratació dels components purs en estat sòlid. Per tal d'assegurar la completa hidratació de les mostres i reduir la polidispersió de les vesícules formades, aquestes han estat sonicades en un bany d'ultrasons amb termòstat, emprant temperatures superiors a la temperatura de transició (T_t) de cadascun dels components de la mescla. En el cas del sistema tensioactiu/DPPA, no ha estat necessari sonicar les mostres, únicament s'han escalfat a 90 °C, obtenint així vesícules monodisperses i de mida petita.

Un tret comú emprat en la preparació de les *vesícules cataniòniques* consisteix en la hidratació individual dels components purs, a temperatura superior a la de transició, i posterior addició gota a gota del component minoritari sobre el majoritari, afavorint així la formació de les vesícules cataniòniques.

.....

Els procediments experimentals detallats per la preparació de les vesícules mixtes estan descrits en els següents articles:

Article II

Preparació de *vesícules catiòniques mixtes* formades per un tensioactiu catiònic (1414RAc, 1212RAc) i un fosfolípid amfòter (DPPC, DMPC), en solució salina (0.1 M NaCl).

Article III

Preparació de *vesícules catióniques mixtes* formades pel tensioactiu catiònic 1414Rac i el fosfolípid amfòter DPPC, en solució salina (0.1 M NaCl).

Article IV

Preparació de *vesícules cataniòniques* formades per un tensioactiu catiònic (LAM, 140Rac, 1414Rac, 1212Rac) i el fosfolípid aniònic DPPA, en solució aquosa.

Article V (Manuscrit)

Preparació de *vesícules cataniòniques* formades per un tensioactiu catiònic (1414Rac, 1212Rac) i el fosfolípid aniònic PG, en solució aquosa.

.....

2.2. Balança de Langmuir

Per a l'estudi de les membranes biològiques, un dels models més simples són les monocapes de fosfolípids. La caracterització fisicoquímica de monocapes s'ha realitzat a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), utilitzant la balança de Langmuir que es mostra a la Figura 10. La unitat de mesura es troba dins d'una cabina per tal de protegir el sistema tant de la contaminació ambiental com dels possibles corrents d'aire, mantenint alhora constant la humitat relativa. En tots els estudis realitzats s'ha treballat a una temperatura constant de 25 °C.

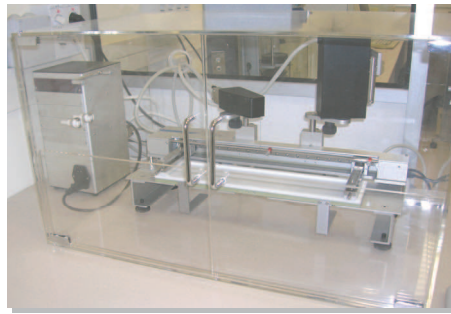


Figura 10. Fotografia de la balança de Langmuir (*KSV Instruments Minitrough, Finland*).

➤ Fonament teòric

Per la mesura de la pressió superficial (π) s'ha utilitzat la placa de Wilhelmy, que és la part de la balança de Langmuir que penja d'una electrobalança encarregada de mesurar la força exercida sobre la placa (F) quan aquesta es troba parcialment submergida en un líquid (veure Figura 11). Degut a la presència de molècules amfífiles adsorbides a la interfase aire/líquid, el menisc format entre la placa i el líquid on està submergida, experimenta una variació del pes, el qual està relacionat amb la variació de la pressió superficial [Gaines GL, 1966].

Per una placa de dimensions l (alçada), w (amplada) i t (gruix), i d'un material amb densitat ρ_p , submergida a una profunditat h en un líquid de densitat ρ_l , la força neta (F) ve donada per l'Equació 3,

$$F = \rho_p g l w t + 2\gamma(t + w) \cos \theta - \rho_l g t w h \quad (3)$$

on γ és la tensió superficial del líquid, θ és l'angle de contacte entre el líquid i la placa i la g és la constant gravitacional.

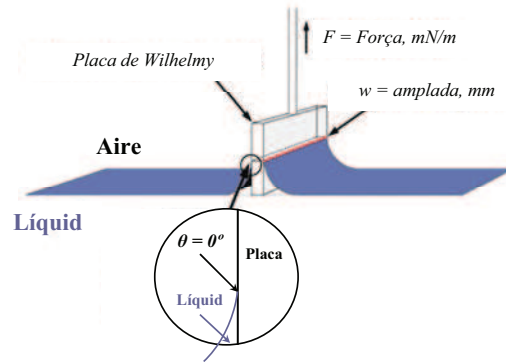


Figura 11. Placa de Wilhelmy parcialment submergida en un líquid.

Imatge adaptada de © KRÜSS GmbH.

La pressió superficial (π) està determinada per la variació entre la força F corresponent a una superfície en absència de tensioactiu (γ_0) i una altra força F en presència de tensioactiu (γ). Si l'angle de contacte entre la placa i la subfase és de 0° ($\cos \theta = 1$), la pressió superficial ve donada per l'Equació 4, considerant el gruix de la placa negligible enfront l'amplada ($t \ll w$).

$$\pi = -\Delta\gamma = \frac{-\Delta F}{2(t+w)} = \frac{-\Delta F}{2w} \quad (4)$$

➤ Propietats estructurals de monocapes

En una monocapa, les molècules tendeixen a adoptar diferents orientacions, fet que està íntimament relacionat amb les interaccions que existeixen entre elles i amb les interaccions entre aquestes i les molècules que es troben a les fases adjacents. Al comprimir una monocapa, l'àrea disponible per cada molècula disminueix i augmenta la densitat superficial (Γ). Al augmentar la densitat superficial s'observen canvis de fase que únicament es produeixen quan totes les molècules estan en alguna de les seves configuracions estables.

Els diferents estats que poden presentar les monocapes estan representats a la Figura 12 i són els següents:

- *Gasós (G)*: estat en el qual no existeixen pràcticament interaccions entre les molècules ja que es troben molt allunyades entre si.

- *Líquid expandit (LE)*: les molècules tensioactives interaccionen entre si però en menor grau que en l'estat condensat i adopten una configuració intermèdia entre l'estat gasós i l'estat de líquid condensat.

- *Condensat*: estat caracteritzat per un fort empaquetament de les molècules tensioactives on les cadenes hidrocarbonades es col·loquen pràcticament en posició vertical respecte a la interfase, amb els caps polars dins de la subfase aquosa. Això explica l'existència de fortes interaccions entre les cadenes. Dins d'aquest grup existeixen dos tipus: *a) líquid condensat (LC)*, zona lineal amb un pendent moderat; *b) l'estat sòlid (S)*, fase que presenta una major condensació de les molècules, ocupant la mínima àrea possible, caracteritzada per un pendent pronunciat a elevades pressions superficials.

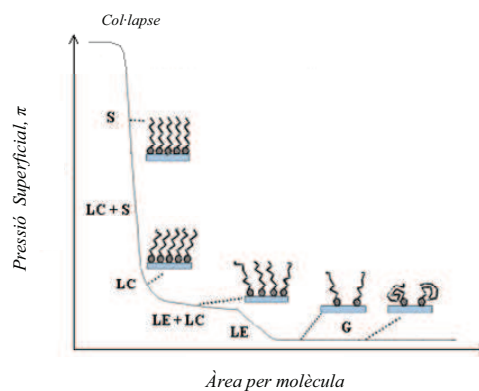


Figura 12. Isoterma de Langmuir característica d'una monocapa a la interfase aire/aigua.

Normalment, a densitats moleculars baixes, les monocapes es troben en una estructura de fase gasosa. En reduir l'àrea per molècula (compressió de la monocapa) s'obtenen els estats LE, LC i S en que s'incrementen progressivament les interaccions entre les molècules, arribant a un màxim que correspon al *col·lapse (C)* on té lloc el trencament de la monocapa.

➤ *Condicions experimentals òptimes*

Per tal de conèixer les condicions experimentals més adequades per l'estudi dels nostres sistemes, i establir així una sistemàtica de treball per l'obtenció de les isotermes de Langmuir, es va realitzar un procés d'optimització del mètode. Es va

utilitzar el fosfolípid amfòter dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) com a patró, ja que forma monocapes insolubles degut a que té una solubilitat molt baixa en aigua.

El material més àmpliament utilitzat per la *placa de Wilhelmy* és el platí. Altres materials utilitzats són el vidre, quars, mica o paper de filtre. Degut a que es va detectar que, en el temps de mesura, hi havia una variació de l'angle de contacte ($\theta \neq 0$) provocada per l'adsorció de tensioactiu sobre el platí, en els estudis realitzats s'ha optat per la utilització d'una placa de paper de filtre (Figura 13). S'ha utilitzat una placa de paper nova per cada mesura experimental. La placa de paper de filtre (Whatman, sense cendres) és de fabricació pròpia, amb un perímetre aproximat de 20 ± 0.05 mm.

La *cubeta* és una superfície rectangular hidròfoba de Tefló (politetrafluoroetilè, material químicament inert) on es col·loca la subfase aquosa. Les diferents cubetes de que disposa la balança de Langmuir estan fotografiades a la Figura 14. En aquesta tesi, totes les mesures experimentals han estat realitzades amb la cubeta A, que presenta un àrea efectiva de 273 cm^2 (365×75 mm) i una capacitat de 150 ml.

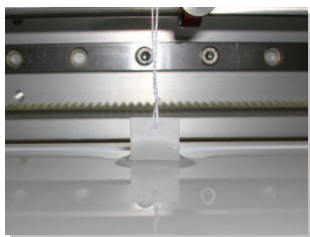


Figura 13. Fotografia de la placa de paper submergida a la subfase.

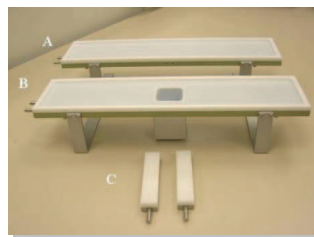


Figura 14. Cubetes per isoterms de (A) Langmuir i (B) Langmuir-Blodgett. Barreres de Tefló (C).

La variació de l'àrea superficial d'una monocapa és produïda per moviments simètrics de compressió/expansió de les *barreres* de Tefló (Figura 14C). Aquesta simetria és la responsable que l'orientació de la placa (en paral·lel o perpendicular) respecte al moviment de les barreres no influeixi en la resposta obtinguda, ja que la monocapa formada al voltant de la placa es pot considerar totalment homogènia [Cicuta P i col., 2005]. Les barreres es poden moure dins d'un rang de velocitats de 0.01-120 mm/min. Per a l'obtenció de les isoterms de Langmuir s'ha escollit una velocitat de compressió de les barreres de 20 mm/min (o $15 \text{ cm}^2/\text{min}$) ja que a aquesta

velocitat les isoterms resultaven reproduïbles. La balança de Langmuir també permet la possibilitat de realitzar cicles sinusoidals de compressió/expansió de la monocapa, on la velocitat de les barreres dependrà dels paràmetres imposats de freqüència d'oscil·lació i d'amplitud de deformació a l'àrea. Aquests moviments oscil·latoris tenen com a objectiu simular les condicions d'inspiració/expiració (veure Figura 15), i així com poder determinar els paràmetres reològics superficials associats a les monocapes.

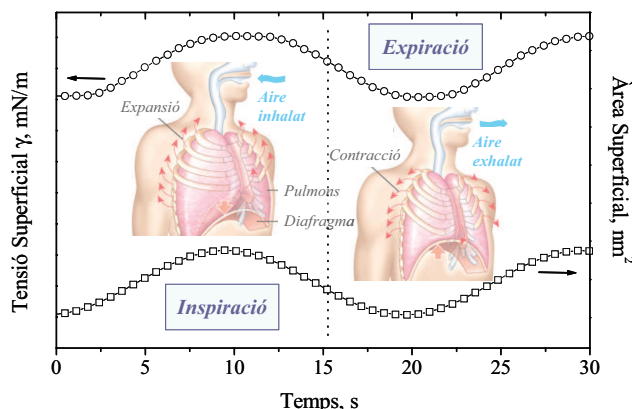


Figura 15. Oscil·lació de la tensió superficial causada per la deformació sinusoidal a l'àrea, on s'indica la similitud amb els cicles d'inspiració/expiració de la respiració pulmonar. *Imatges adaptades de http://kvhs.nbed.nh.ca/gallant/biology/negative_pressure_breathing.html.*

Els **solvents**, o mescla de solvents per mostres no solubles en solvents apolars, emprats per la formació de monocapes d'extensió han de complir els següents requisits [Gaines GL, 1966]: solubilitzar totalment la mostra, ser químicament inerts per tal de no introduir agents contaminants a la monocapa, han de ser solvents apolars i han de ser volàtils per tal de facilitar la seva evaporació de la interfase a temps relativament curts ($40\text{ °C} < T_{\text{eb}} < 80\text{ °C}$). Després de diferents proves, es va optar per la mescla de solvents hexà/etanol en la proporció 9:1 (v/v), ja que complia tots els requisits anteriorment especificats. Es va verificar la no interferència del solvent en l'adsorció a la interfase aire/aigua realitzant experiments en blanc.

Finalment, la deposició uniforme de les gotes de mostra sobre la superfície aquosa, mitjançant una xeringa de precisió (veure la Figura 16), formarà la monocapa d'extensió. Prèviament a la compressió de la monocapa, serà necessari esperar 15 min per l'evaporació total del solvent.

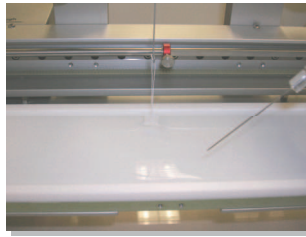


Figura 16. Fotografia del moment de la deposició de la mostra.

.....

La balança de Langmuir s'ha utilitzat per els estudis fisicoquímics de monocapes. El procediment experimental detallat i els resultats obtinguts estan descrits en els següents articles:

Article I

Caracterització fisicoquímica de monocapes de DPPC i DMPC, en presència i en absència dels tensioactius sintètics 1414RAc i 1212RAc. A partir de les isoterms de compressió obtingudes experimentalment dels quatre sistemes binaris, s'ha determinat l'elasticitat estàtica (E_s) que proporciona informació estructural més detallada de les diferents fases de la monocapa. També s'ha avaluat el grau de miscibilitat dels dos components de la mescla a partir de la regla d'addició (\bar{A}) i de l'energia de Gibbs en excés (ΔG_{ex}).

Article III

Estudi de les propietats reològiques superficials (E , E_r , E_i , θ) de la mescla 1414RAc/DPPC mitjançant el mètode oscil·latori dinàmic. Aquest mètode permet aplicar petites deformacions sinusoidals en l'àrea, obtenint una resposta de pressió superficial també sinusoidal.

.....

2.3. Tensiometria de bombolla

La tensiometria de bombolla s'ha emprat en els estudis realitzats sota la direcció del Dr. Elias I. Franses del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat de Purdue (Indiana, EEUU), dins del Programa d'Estades Breus per a becaris/contractats I3P-CSIC, finançat pel Ministeri de Ciència i Innovació.

A la Figura 17 es mostra una fotografia del tensiòmetre de bombolla polsant (PBS, *Pulsating Bubble Surfactometer*) emprat. Aquesta tècnica permet mesurar la variació de la tensió superficial de la interfase que es forma al generar una bombolla d'aire dins d'una solució aquosa de tensioactiu (veure Figura 18), simulant així la interfase aire/líquid en els alvèols pulmonars. Les mesures s'han realitzat en condicions d'àrea constant (el radi de la bombolla es manté constant, R_1) i àrea polsant (el radi de la bombolla varia entre R_1 i R_2 , seguint un moviment sinusoidal) [Chang CH i col., 1994].



Figura 17. Fotografia del tensiòmetre de bombolla polsant (*General Transco, Largo, FL*).

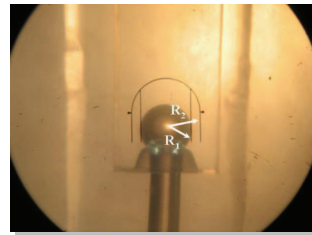


Figura 18. Fotografia d'una bombolla d'aire dins d'una solució aquosa de tensioactiu de radi $R_1=0.40$ mm ($R_2=0.55$ mm).

La tensiometria de bombolla s'ha emprat per la caracterització fisicoquímica de dispersions. El fonament teòric de la tècnica, el procediment experimental i els resultats obtinguts estan descrits en el següent article:

Article II

Caracterització fisicoquímica de dispersions de DPPC i DMPC, en presència i en absència dels tensioactius sintètics 1414RAc i 1212RAc.

2.4. Espectroscòpia d'infraroig

L'espectroscòpia d'infraroig s'ha emprat en els estudis realitzats sota la direcció del Dr. Elias I. Franses de la Universitat de Purdue (Indiana, EEUU).

Per l'obtenció dels espectres de reflexió total atenuada (ATR, *Attenuated Total Reflection*) i d'infraroig d'absorció- reflexió (IRRAS, *Infrared Reflection- Absorption Spectroscopy*) s'ha utilitzat l'espectròmetre d'infraroig, equipat amb els accessoris específics ATR i IRRAS, mostrats a la Figura 19.

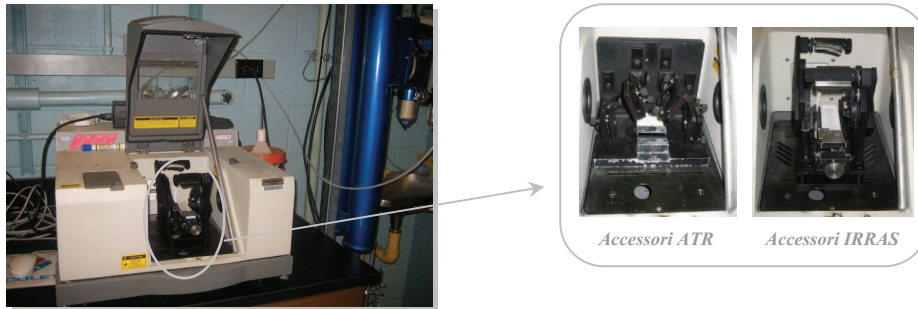


Figura 19. Fotografia de l'espectròmetre d'infraroig Nicolet Protégé 460 Fourier transform amb els accessoris ATR i IRRAS.

A la Figura 20 es mostra de forma esquemàtica la trajectòria de la radiació dels dos experiments realitzats. Els *experiments ATR* detecten la intensitat de radiació IR resultant de les múltiples reflexions internes en angles de 45° dins del cristall de Germani amb forma trapezoïdal. La mostra, dissolta en etanol, és depositada sobre el cristall. Un cop evaporada a sequedat, s'obté un film totalment uniforme. L'anàlisi dels espectres obtinguts amb aquesta tècnica permet l'assignació de cadascuna de les bandes dels diferents grups funcionals de les molècules pures estudiades.

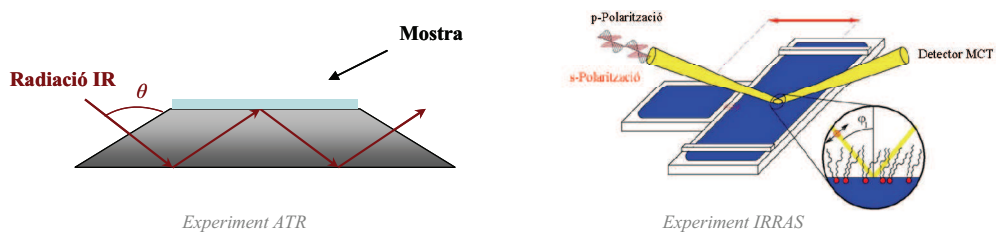


Figura 20. Esquema del funcionament dels experiments ATR i IRRAS.

Imatge de l'experiment IRRAS extreta de <http://phys.chemie.uni-halle.de/groups/blume/kerth/index.html>.

Els *experiments IRRAS* detecten la intensitat reflectida al incidir la radiació IR sobre una monocapa. Degut a que es produeix una única reflexió (Figura 20), les intensitats obtingudes amb aquests experiments seran més febles que les que s'obtenen amb els experiments ATR. Aquesta tècnica ha permès estudiar l'efecte sinèrgic de monocapes mixtes [Prosser AJ i col., 2002].

.....

L'espectroscòpia d'infraroig s'ha utilitzat per la caracterització fisicoquímica de monocapes. El procediment experimental i els resultats obtinguts estan descrits en el següent article:

Article II

Caracterització fisicoquímica de dispersions de DPPC i DMPC, en presència i en absència dels tensioactius sintètics 1414RAc i 1212RAc.

.....

2.5. Tensiometria

La tensiometria s'ha utilitzat per estudiar la variació de la tensió superficial (γ), com a conseqüència de l'adsorció de tensioactiu a la interfase aire/aigua, amb el temps. S'ha emprat el tensiòmetre de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC) que es mostra a la Figura 21.

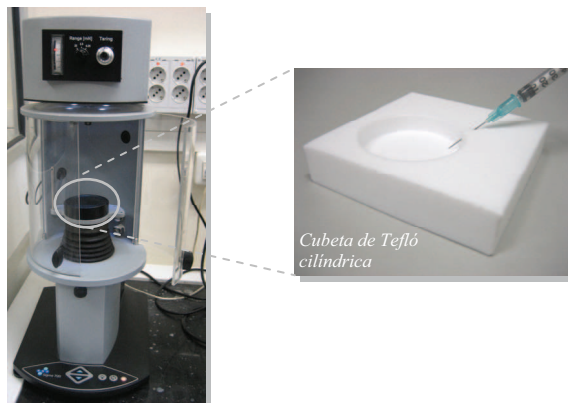


Figura 21. Fotografia del tensiòmetre *KSV Sigma 700* i de la cubeta de Tefló cilíndrica.

El fonament teòric de la tensiometria és el mateix que el de la balança de Langmuir (veure Secció 2.2.). A diferència de la balança de Langmuir, aquesta tècnica no permet modificar l'àrea superficial, però ha permès treballar amb petites quantitats de mostra degut als petits volums de subfase emprats. S'ha utilitzat una cubeta de Tefló de superfície cilíndrica, amb un àrea efectiva de 19.24 cm^2 ($R = 2.475 \text{ cm}$) i una capacitat de 20 ml, que presenta un forat lateral per injectar la mostra a la subfase aquosa, tal i com es pot observar a la Figura 21.

La tensiometria s'ha emprat per l'estudi cinètic de la formació de monocapes. El procediment experimental detallat i els resultats obtinguts estan descrits en el següent article:

Article III

Caracterització fisicoquímica de monocapes de DPPC, en presència i en absència del tensioactiu sintètic 1414RAc.

2.6. Velocimetria Doppler làser

La velocimetria Doppler làser s'ha emprat en els estudis realitzats sota la direcció del Dr. Camillo La Mesa del Departament de Química de la Universitat *La Sapienza*, (Roma, Itàlia), dins del Programa d'Estades Breus per a becaris/contractats I3P-CSIC, finançat pel Ministeri de Ciència i Innovació.

Aquesta tècnica, mitjançant experiments d'electroforesi, permet determinar el potencial- ζ de sistemes col·loïdals. Aquest paràmetre és important per entendre l'estabilitat electrostàtica de les dispersions. L'essència d'un sistema clàssic de micro-electroforesi consisteix en l'aplicació d'un camp elèctric (E) entre dos elèctrodes situats als extrems d'una cel·la capil·lar que conté la mostra, on les partícules carregades són atretes cap a l'elèctrode de càrrega oposada i la seva velocitat és mesurada i expressada en termes de mobilitat electroforètica. Per aquestes mesures electroforètiques s'ha utilitzat el *Zetasizer* que es mostra a la Figura 22.

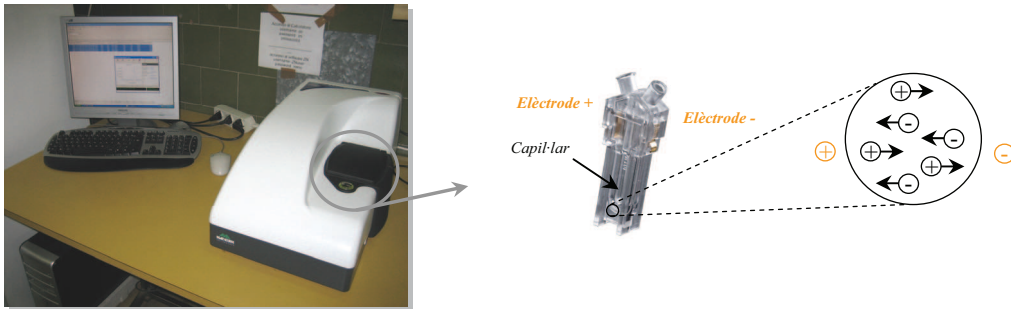


Figura 22. Fotografia del *Malvern Zetasizer Nano ZS* i de la cel·la capil·lar on s'indica el fenomen d'electroforesi que hi té lloc.

El potencial- ζ està relacionat amb la mobilitat electroforètica (μ) mitjançant l'equació de Henry [Adamson A, 1990],

$$\mu = \left[\frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta} f(\kappa a) \right] \quad (5)$$

on ε és la constant dielèctrica del solvent, η és la seva viscositat i $f(\kappa a)$ és la funció de Henry. κ^{-1} és la inversa de la longitud de Debye, i dóna informació del gruix de la doble capa elèctrica (Figura 23). El paràmetre "a" fa referència al radi de la partícula i, per tant, κa és una mesura de la relació entre el radi de la partícula i el gruix de la

doble capa elèctrica. Les mesures electroforètiques del potencial- ζ s'acostumen a realitzar en medi aquós i a una concentració moderada d'electròlit. Per tant, $f(\kappa a)$ en aquest cas és 1.5 ($\kappa a \gg 1$) i es coneix com aproximació de Smoluchowski, aplicable a partícules grans (~ 200 nm). En canvi, per partícules petites i en un medi no aquós, $f(\kappa a)$ és 1.0 ($\kappa a \ll 1$) i rep el nom d'aproximació de Hückel (veure Figura 24).

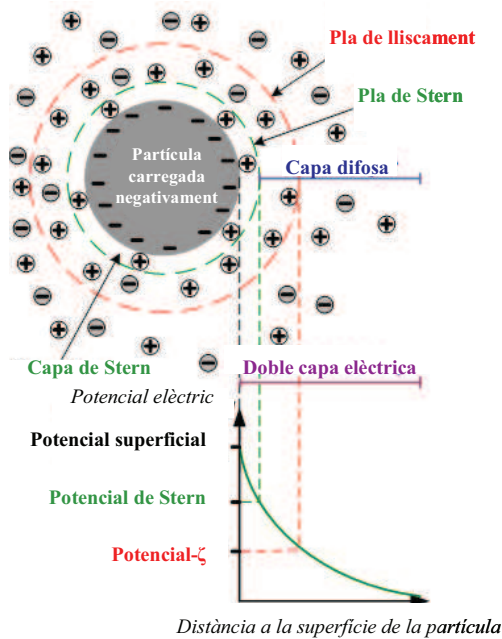


Figura 23. Il·lustració esquemàtica de la doble capa elèctrica i la variació del potencial elèctric en funció de la distància a la superfície de la partícula. Imatge adaptada de <http://www.substech.com>.

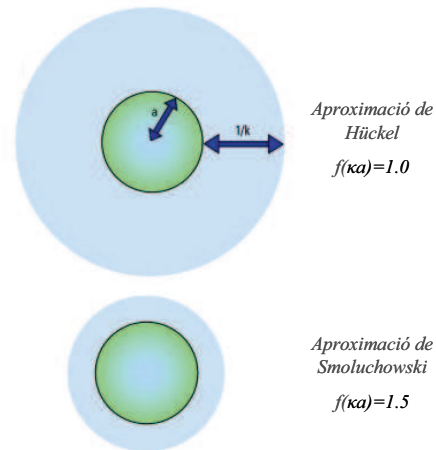


Figura 24. Representació esquemàtica de les aproximacions de Hückel i Smoluchowski. Imatge extreta de © 2001-2005 Silver Colloids.

Per tant, aplicant l'aproximació de Smoluchowski a l'equació de Henry, s'obté l'Equació 6 que relaciona el potencial- ζ amb la mobilitat electroforètica:

$$\zeta = \left[\frac{4\pi\eta\mu}{\varepsilon E} \right] \quad (6)$$

.....

La velocimetria Doppler làser s'ha emprat per l'estudi de la càrrega neta de vesícules catanòniques. El procediment experimental detallat i els resultats obtinguts estan descrits en el següent article:

Article IV

Determinació del potencial- ζ de les mescles catanòniques formades pels tensioactius catònics derivats d'arginina LAM, 140RAc, 1212RAc i 1414RAc amb el fosfolípid aniónic DPPA, en funció de la $\chi_{\text{tensioactiu}}$ i de l'acidesa del medi.

.....

2.7. Dispersió de llum dinàmica

Per la determinació de les dimensions de les vesícules s'ha emprat la tècnica de dispersió de llum dinàmica (DLS, *Dynamic Light Scattering*). Aquesta tècnica es fonamenta en la mesura de la intensitat de llum dispersada per la presència de partícules en solució, en funció del temps. La velocitat de les partícules provoca un canvi de freqüència de la llum dispersada degut a l'efecte Doppler: les partícules grans es mouen a velocitats petites i la intensitat varia lentament amb el temps, mentre que les partícules petites es mouen a grans velocitats i la intensitat canvia ràpidament.

Aquest efecte s'observa a partir de la fluctuació de la intensitat. El temps de mostreig correspon a 0,1 μ s. El correlador és un dispositiu que avalua la fluctuació d'intensitats donant com a resultat la funció d'autocorrelació.

La intensitat es relaciona amb els coeficients de difusió de les partícules i , a partir de l'equació Stokes-Einstein [Pecora R, 1985; Schillen K i col., 1994], amb la seva dimensió. Les següents equacions s'apliquen a partícules monodisperses,

$$g^{(2)}(t) = \beta |g^{(1)}(t)|^2 + 1 \quad (7)$$

$$g^{(1)}(t) = a + b \cdot e^{-Dqt} \quad (8)$$

on $g^{(2)}(t)$ és la funció d'autocorrelació experimental, β el factor de correcció, $g^{(1)}(t)$ la funció d'autocorrelació, D el coeficient de difusió, q el vector de difusió que depèn de l'angle i i de la longitud d'ona λ i t el temps.

Donat els valors del coeficient de difusió (D) i tenint en compte l'equació d'Stokes-Einstein, es pot calcular el radi hidrodinàmic (r_h) de les partícules en la dispersió (suposant que les partícules són esfèriques):

$$D = k_B T / 6\pi\eta r_h \quad (9)$$

on $k_B = 1.3807 \times 10^{-23}$ J/K és la constant de Boltzmann, $T = 298$ K és la temperatura i $\eta = 10^{-3}$ Pa·s és la viscositat de l'aigua.

Per la determinació de la intensitat, s'ha utilitzat l'aproximació de Rayleigh-Debye-Gans (RDG) ja que encara que es tracta de dimensions de partícula

comparables amb la longitud d'ona de la radiació, les vesícules són estructures de baix contrast [Pinazo A i col., 2004].

Els experiments de dispersió s'han realitzat, depenent de l'angle entre el detector i el làser, amb el *Malvern Zetasizer Nano ZS* de la Universitat *La Sapienza* i el *Malvern Autosizer 4700c PS/MV* de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC).

➤ *Malvern Zetasizer Nano ZS* (Figura 22), equipat amb un làser de longitud d'ona (λ) 632.8 nm i amb un angle de lectura de 173° (*retrodispersió*). Aquest mode de detecció presenta una sèrie d'avantatges respecte a la detecció clàssica a 90° . Degut a que el làser no ha de viatjar a través de tota la mostra per obtenir senyal al detector, es redueix considerablement l'efecte de la dispersió múltiple i, per tant, existeix la possibilitat de mesurar mostres altament concentrades. A més, el fet que les partícules grans dispersen principalment a angles petits, la presència de partícules de pols serà pràcticament insignificant en la determinació de la mesura.

La informació del correlador és transferida l'ordinador, on el software Nano s'encarrega d'analitzar les dades dels experiments realitzats, mitjançant el mètode CONTIN. Aquesta anàlisi s'ha comparat amb el mètode dels cumulants, obtenint directament la informació de la mida de partícula, a partir de la funció d'autocorrelació $g^{(1)}(t)$.

.....

La dispersió de llum dinàmica s'ha utilitzat per determinar les dimensions de les vesícules. El procediment experimental detallat i els resultats obtinguts estan descrits en el següent article:

Article IV

Determinació del diàmetre de partícula de les mescles catanòniques formades pels tensioactius catiónics derivats d'arginina LAM, 140RAc, 1212RAc i 1414RAc amb el fosfolípid aniónic DPPA, en funció de la $\chi_{\text{tensioactiu}}$ i de l'acidesa del medi.

.....

➤ *Malvern Autosizer 4700c PS/MV* (Figura 25), equipat amb un làser d'Argó de longitud d'ona (λ) 488 nm i amb un angle de lectura de 90°.

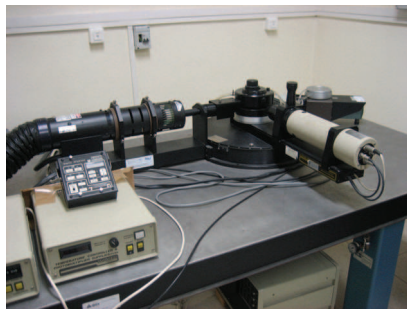


Figura 25. Fotografia de l'espectrofotòmetre de correlació fòtonica *Malvern Autosizer 4700c PS/MV*.

Per l'anàlisi de dades dels experiments obtinguts amb l'espectrofotòmetre de correlació fòtonica s'ha utilitzat el programa interactiu GENDIST [Schillen K i col., 1994]. Es pot obtenir una còpia d'aquest programa contactant amb el Dr. Robert Johnsen de la Universitat de Upsala (Suècia) o a través de l'enllaç <http://www.fki.uu.se/gendist.htm>. Aquest programa permet ajustar tres models diferents utilitzant l'algorisme REPES: un model de forma lliure, un de forma fixa per la distribució de les relaxacions i un de forma lliure per la funció d'autocorrelació de la intensitat. En aquesta tesi s'ha emprat el model de forma lliure que, a diferència del CONTIN, utilitza la funció d'autocorrelació experimental $g^{(2)}(t)$.

La dispersió de llum dinàmica s'ha utilitzat per determinar les dimensions de les vesícules. El procediment experimental detallat i els resultats obtinguts estan descrits en la següent secció:

Secció 5. Efecte de la nebulització

Determinació del diàmetre de partícula de les mesclures catióniques formades pels tensioactius catiónics derivats d'arginina 1414RAC i 1212RAC amb els fosfolípids amfòters DPPC i DMPC, en funció de la $\chi_{\text{tensioactiu}}$.

2.8. Potenciometria

La potenciometria s'ha dut a terme a l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC) per determinar la concentració de protons (H^+) i d'ions sodi (Na^+) en solució. Els elèctrodes selectius d'ions H^+ i Na^+ , així com el multivoltímetre d'alta impedància emprats en aquesta tesi, es mostren a la Figura 26.

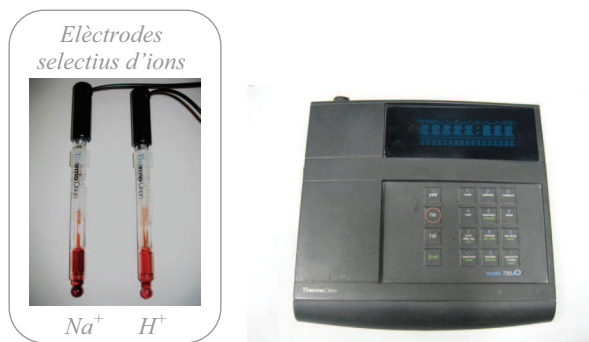


Figura 26. Fotografia de l'elèctrode selectiu de H^+ *Thermo Orion PerpHect ROSS Sure-Flow pH (8272BN)*, de l'elèctrode selectiu de Na^+ *Thermo Orion Sure-Flow ROSS Sodium (8611BN)* i del multivoltímetre *720Aplus Thermo Orion*.

La potenciometria [Cattrall RW, 1997] és una tècnica que permet conèixer l'activitat d'un analit (a_i) en solució aquosa, mitjançant la mesura del potencial (E), seguint l'equació de Nernst,

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln a_i = E_0 + 2.303 \frac{RT}{nF} \log_{10} a_i \quad (10)$$

on E_0 és el potencial de referència, R la constant dels gasos, T la temperatura en Kelvin, n el número d'electrons transferits i F la constant de Faraday. L'activitat iònica (a_i) està directament relacionada amb la concentració (c_i) pel coeficient d'activitat (γ_i):

$$a_i = \gamma_i \cdot c_i \quad (11)$$

Com a sensor químic potenciomètric s'ha utilitzat un elèctrode combinat format per un elèctrode indicador selectiu d'ions (H^+ , Na^+) i d'un elèctrode de referència $Ag/AgCl$. A la Figura 27 es mostra l'esquema detallat d'un elèctrode combinat

selectiu d'ions/referència. L'elèctrode indicador és un sensor químic potenciomètric que consisteix en una membrana que respon de manera selectiva a un ió determinat. Aquesta membrana es troba en contacte, per la cara interna, amb una solució coneguda del ió a mesurar i, per la cara externa, amb la solució problema que conté una concentració d'ió desconeguda. L'elèctrode de referència també és un sensor químic potenciomètric que respon reversiblement als ions clorurs, i que proporciona un potencial constant (E_0). Per tant, qualsevol canvi de potencial detectat serà degut exclusivament a la diferència de potencial generat a la membrana de l'elèctrode indicador (E), provocat per un flux d'ions a través de la mateixa.

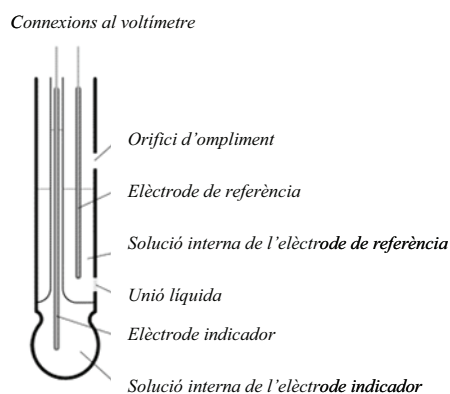


Figura 27. Esquema d'un elèctrode combinat selectiu d'ions/referència.

Imatge adaptada de © 2005 www.ph-meter.info.

La potenciomètria s'ha emprat per la determinació de l'activitat d'ions H^+ i Na^+ en solució. El procediment experimental detallat i els resultats obtinguts estan descrits en el següent article:

Article III

Determinació de la concentració micel·lar crítica (cmc) del tensioactiu sintètic catiònic 1414RAc mitjançant mesures de pH (activitat dels ions H^+).

Article IV

Estudi de la variació d'activitat dels ions Na^+ en addicionar quantitats progressives de tensioactiu catiònic LAM a una dispersió de fosfolípid aniònic DPPA, respecte a una solució estàndard de NaCl i a dispersions de DPPA. Aquest estudi ha proporcionat informació del grau d'associació del contraió sodi a les vesícules cataniòniques LAM/DPPA.

.....

2.9. Criomicroscòpia electrònica de transmissió

La criomicroscòpia electrònica de transmissió (Cryo-TEM, *Cryogenic Transmission Electron Microscopy*) s'ha realitzat als Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona (SCT-UB) situats al Parc Científic de Barcelona, sota l'assistència tècnica de la Dra. Carmen López i la Dra. Elisenda Coll.

Amb la criomicroscòpia electrònica de transmissió [Steinbrecht RA i col., 1987] s'irradia una mostra fina criogenitzada, que es troba en una reixeta de carbó, amb un feix d'electrons de densitat de corrent uniforme. El procés de vitrificació de les mostres, totalment automatitzat, s'ha realitzat amb el *Vitrobot* que es mostra a la Figura 28. El fet de treballar amb mostres criogenitzades evita l'aparició d'artefactes provinents de diferents processos com els de tinció o d'assecat, fent que la mostra es mantingui pràcticament inalterada.

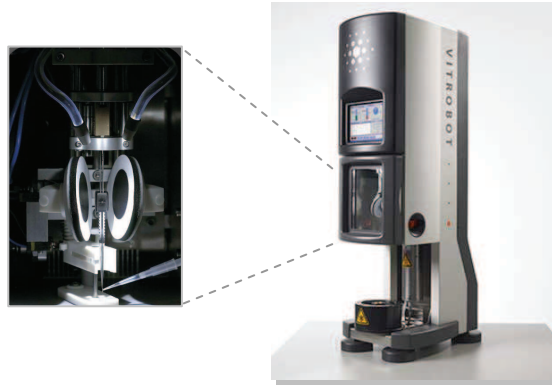


Figura 28. Imatge del FEI Vitrobot Mark III (extreta de © 1996-2009 Ted Pella, Inc.), indicant un detall de la deposició de la mostra a la reixeta (imatge extreta de <http://www.labssoft.pl>), instant previ al “blotting” on s’eliminarà l’excés de mostra mitjançant l’aplicació de pressió amb les dues planxes circulars on hi ha fixat paper de filtre.

Part d’aquests electrons irradiats sobre la mostra són transmesos, altre part són dispersats i d’altres donen lloc a interaccions que provoquen diferents fenòmens com l’emissió de llum, electrons secundaris, raigs X, etc. Totes aquestes senyals es poden utilitzar per obtenir informació sobre la natura de la mostra (morfologia, composició, estructura cristal·lina, estructura electrònica, etc.). Per l’obtenció de les imatges (determinació de la morfologia) s’ha utilitzat la transmissió dels electrons a través de

la mostra fent servir el microscopi electrònic de transmissió que es mostra a la Figura 29.

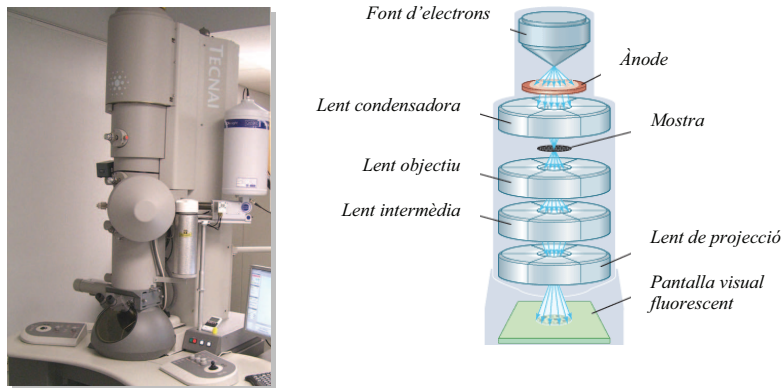


Figura 29. Fotografia del microscopi electrònic *FEI Tecnai F20 FEG* i l'esquema dels seus principals components. *Esquema adaptat de © 2008 Encyclopedia Britannica, Inc.*

.....

La criomicroscòpia electrònica de transmissió s'ha emprat per l'estudi morfològic d'agregats supramoleculars. El procediment experimental detallat i els resultats obtinguts estan descrits en el següent article:

Article IV

Caracterització morfològica de les dispersions de LAM/DPPA ($\chi_{\text{LAM}} = 0.2$), del tensioactiu sintètic 1212RAc i del fosfolípid aniònic DPPA.

.....

2.10. Dispersió de raigs X a angle petit

La dispersió de raigs X a angle petit (SAXS, *Small Angle X-ray Scattering*) s'ha realitzat al Servei SAXS-WAXS de l'Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC) sota l'assistència tècnica d'en Jaume Caelles. S'ha estudiat la morfologia de les dispersions emprant una càmera compacta Kratky d'angle petit que es mostra a la Figura 30, acoblada a un generador *Siemens KF 760 (3KW)*.

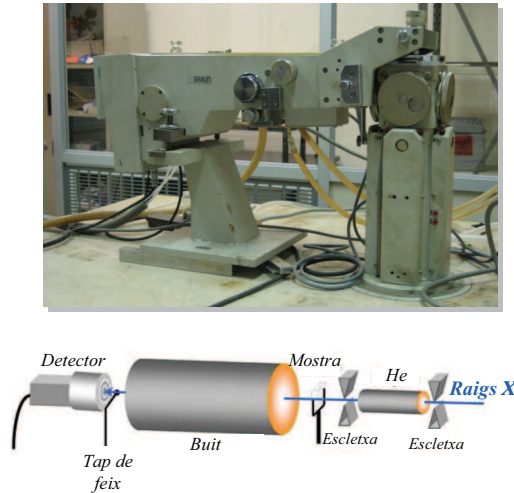


Figura 30. Fotografia de la càmera Kratky *Hecus X-ray Systems* i l'esquema de la seva configuració experimental. *Esquema adaptat de © SAGA-LS.*

La intensitat dispersada per un conjunt finit de bicapes està descrita per [Pabst G i col., 2000],

$$I(q) \propto \frac{\langle |f(q)|^2 s(q) \rangle}{q^2} \quad (12)$$

on q és el valor absolut del vector de dispersió ($q = 4\pi \sin \theta / \lambda$), $f(q)$ és el factor de forma i $s(q)$ és el factor d'estructura. El factor de forma caracteritza la distribució de densitat electrònica i, per una estructura en capes, es pot expressar com la transformada de Fourier unidimensional del perfil de densitat electrònica (ρ) al llarg de l'eix z :

$$f(q) = \int \rho(z) \exp(iqz) dz \quad (13)$$

El factor d'estructura té en compte la natura de la xarxa cristal·lina o quasi cristal·lina de les bicapes en un cristall líquid. Tant el factor de forma com el d'estructura són el promig de les fluctuacions de la bicapa. Assumint que les fluctuacions dins de la bicapa són independents de les fluctuacions dels punts de la xarxa, el factor d'estructura i el de forma poden ser tractats de manera independent:

$$I(q) \propto \frac{1}{q^2} \left[\langle |f(q)|^2 \rangle \langle s(q) \rangle + N \left(\langle |f(q)|^2 \rangle - \langle |f(q)| \rangle^2 \right) \right] \quad (14)$$

El darrer terme de l'Equació 14 dóna lloc a la dispersió difosa i correspon a la dispersió deguda a N bicapes. Habitualment aquest terme és negligible quan la informació estructural prové només dels pics de Bragg.

El procediment estàndard d'anàlisi consisteix en ajustar les reflexions de Bragg amb el factor apropiat d'estructura multiplicat per un factor de forma constant per cada pic individual, hipòtesi raonable com a aproximació als pics deguts exclusivament a la difracció. El perfil de densitat electrònica relatiu a la densitat constant electrònica del solvent es calcula per la síntesi de Fourier,

$$\rho^*(z) = \sum_{h=1}^{h_{\max}} \pm F_h \cos\left(\frac{2\pi h z}{d}\right) \quad (15)$$

on h correspon a l'ordre de reflexió i d a la dimensió de la cel·la unitat. Aquesta transformada resulta indefinida pel que fa al signe de cada factor.

Una alternativa consisteix en establir un model de perfil de densitat electrònica i generar l'espectre mitjançant una transformada de Fourier. Donat que es registren les dades en un rang continu en q , la funció de dispersió $I(q)$ hauria de ser modelada a tot el rang estudiat. El perfil de densitat electrònica, a una resolució donada de quatre ordres de difracció, pot ser modelat per la suma de tres Gaussians, cadascuna representant el cap polar i els metils terminals, respectivament, tal i com s'indica a l'Equació 16,

$$\rho(z) = \rho_{CH_2} + \bar{\rho}_H \left[\exp\left(-\frac{(z - z_H)^2}{2\sigma_H^2}\right) + \exp\left(-\frac{(z + z_H)^2}{2\sigma_H^2}\right) \right] + \bar{\rho}_C \exp\left(-\frac{z^2}{2\sigma_C^2}\right) \quad (16)$$

on les densitats electròniques dels caps polars ($\bar{\rho}_H$) i de les cadenes hidrocarbonades ($\bar{\rho}_C$) es defineixen en funció de la densitat electrònica dels metilens ($\bar{\rho}_{CH_2}$),

$$\bar{\rho}_H \equiv \rho_H - \rho_{CH_2} \quad (17)$$

$$\bar{\rho}_C \equiv \rho_C - \rho_{CH_2} \quad (18)$$

Aquest model d'anàlisi emprà tres funcions Gaussians per definir la densitat electrònica a la bicapa. Degut a la baixa resolució obtinguda en els espectres experimentals, s'ha utilitzat un model d'ajust simplificat que es basa en definir el perfil de densitat electrònica mitjançant tres esglaons, esquematitzat a la Figura 31.

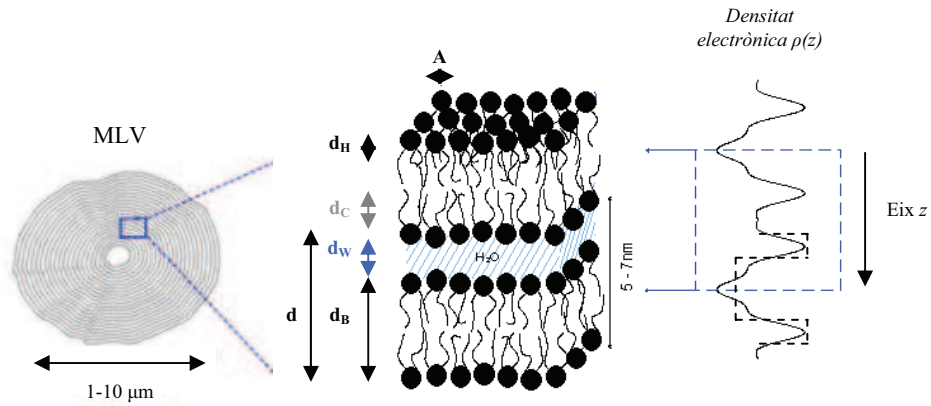


Figura 31. Esquema d'una vesícula multilaminar, on s'indiquen els paràmetres estructurals que es poden determinar amb SAXS, així com el perfil de densitat electrònica $\rho(z)$ en funció de la distància z del model estàndard d'anàlisi, ajustat a tres Gaussians (línia contínua), i del model simplificat de bicapes en tres esglaons (línia discontinua). *Imatge adaptada de <http://www.elettra.trieste.it/science/elettranews/volume29/39.html>.*

En el model de contrast [Cantu L i col., 1998], la intensitat dispersada ve donada per la següent equació,

$$I(q) = \frac{4\pi}{q^2} \cdot cA \left[d_C \Delta\rho_{12} \frac{\sin(qd_C)}{qd_C} + \frac{d_B}{2} \Delta\rho_{23} \frac{\sin(qd_B/2)}{qd_B/2} \right]^2 \quad (19)$$

on $\Delta\rho_{ij}$ representa les diferències de contrast entre el medi i i el j , d_C és el gruix de la cadena hidrocarbonada, d_B el gruix de la bicapa, A és l'àrea per molècula, c la concentració de tensioactiu.

Per una bicapa plana, es defineixen els següents paràmetres geomètrics (Figura 31),

$$d_C = V_L / A \quad (20)$$

$$d_B / 2 = d_C + (V_S + hV_W) / A \quad (21)$$

on la suma de volums moleculars hidrofòbic (V_L) i hidrofílic (V_S) és igual al volum del monòmer, V_W és de 30 \AA^3 . Els dos paràmetres d'ajust seran l'àrea per molècula (A) i la hidratació h .

.....

La dispersió de raigs X a angle petit s'ha emprat per la determinació dels paràmetres geomètrics de sistemes dispersos en medi aquós. El procediment experimental detallat i els resultats obtinguts estan descrits en el següent article:

Article IV

Caracterització estructural dels agregats formats per DPPA i les seves mescles amb els tensioactius LAM, 1212RAC i 1414RAC, a $\chi_{\text{tensioactiu}}$ de 0.2.

.....

2.11. Assaigs microbiològics

Els assaigs microbiològics s'han realitzat sota la direcció del Dr. Luis Rivas del *Centro de Investigaciones Biológicas* (CIB-CSIC) de Madrid i amb la col·laboració de la Dra. María Fernández-Reyes i del Dr. Juan-Román Luque-Ortega. Aquests estudis es van iniciar gràcies a un projecte PIF finançat pel CSIC (PIF-200480F0330).

Aquests assaigs han permès estudiar l'activitat antimicrobiana i la citotoxicitat dels tensioactius derivats d'arginina i d'algunes de les seves mescles catanòniques amb el fosfolípid aniónic PG.

➤ Activitat antimicrobiana

S'ha estudiat l'activitat antimicrobiana en els següents patògens humans:

Leishmania: Protozou, microorganisme unicel·lular eucariòtic, que pot presentar dos estats morfològics en el seu cicle vital (veure Figura 32), el *promastigote*, present de forma extracel·lular (~ 20 µm) i ubicat a l'intestí del mosquit infeccions del gènere *Phlebotomus*, caracteritzat per tenir un cos allargat i un flagel que permet el seu moviment.

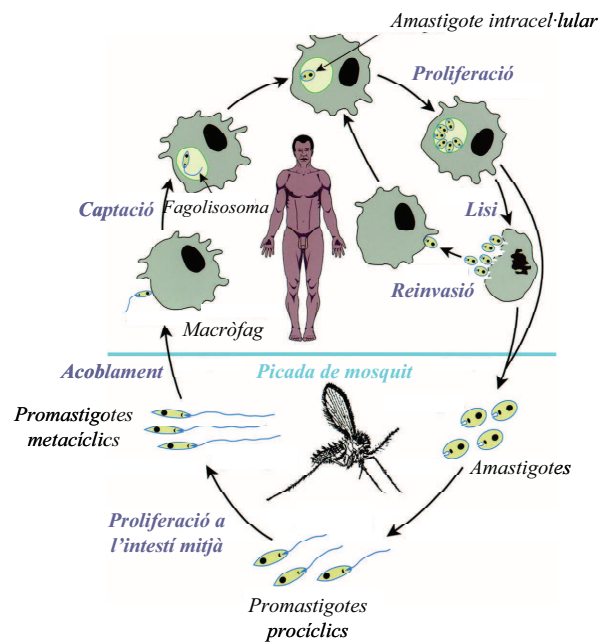


Figura 32. Esquema del cicle vital digenètic de la *Leishmania*.

Esquema adaptat de [Handman E, 2001].

El promastigote, al ser inoculat a l'interior de l'hoste vertebrat, es transforma, dins del macròfag (cèl·lula amb capacitat immunològica), en el seu segon estat morfològic conegut com a *amastigote*. Els amastigotes (~ 4-5 µm) es caracteritzen per ser arrodonits i presentar un flagel molt curt, únicament visible al microscopi electrònic. Aquesta forma és la responsable de la patologia anomenada leishmaniosis.

En aquesta tesi s'ha estudiat l'efecte leishmanicida sobre el promastigote de la *Leishmania donovani* que pertany a l'espècie més letal de la *Leishmania*, causant de la forma visceral de la malaltia. Com a amastigote, forma intracel·lular del paràsit, s'ha assajat l'activitat sobre la *Leishmania pifanoi* que pertany al complex *mexicana*, responsable de la leishmaniosis cutània. En general, els amastigotes requereixen de cèl·lules infectades de macròfag per convertir-se en amastigote, però en aquest cas, l'acció leishmanicida estaria condicionada per la cèl·lula hoste, fent difícil la comparativa de l'acció directa de l'agent antimicrobià sobre les dues formes del paràsit. És per aquest motiu que la *L. pifanoi* s'ha obtingut de forma axènica, és a dir, sense la necessitat d'un macròfag per créixer com a amastigote. La seva identitat ha estat corroborada per mètodes estructurals, de metabolisme, infecció i antígen, amb una correspondència del 99% amb el que s'obtidria mitjançant el macròfag, però molt més estandarditzat i reproduïble [Ueda-Nakamura T i col., 2007; Rainey PM i col., 1991].

Bacteris: Microorganismes unicel·lulars procariotes (0.1-50 µm), mancats de nucli i orgànuls interns, que presenten una morfologia molt diversa. Les malalties bacterianes mortals més comuns són les infeccions respiratòries, amb una mortaldat únicament per la tuberculosi d'uns dos milions de persones a l'any. Els antibiòtics s'utilitzen per tractar les infeccions bacterianes, inhibint la formació de la paret cel·lular o bé impeding altres processos del seu cicle vital. Els bacteris estan formats per una paret cel·lular de peptidoglicà i, en funció de l'absència o presència de membrana externa, es poden dividir en Gram-positius i Gram-negatius, respectivament [Stanier RY i col., 1984]. Degut a que l'embolcall cel·lular dels dos tipus de bacteris presenta diferent estructura i composició, tal i com es pot observar a la Figura 33, la permeabilitat de les seves membranes també serà diferent.

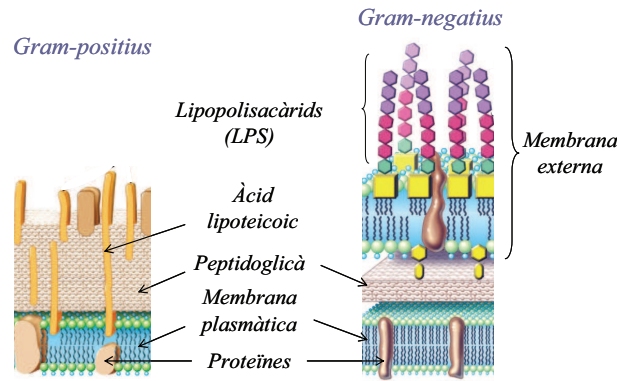


Figura 33. Esquema de l'embolcall cel·lular dels bacteris Gram-positius i Gram-negatius.

Imatges adaptades de [Madigan MT i col., 2006].

En la majoria dels bacteris *Gram-positius*, el peptidoglicà representa entre el 40 i el 90% del pes sec de la paret cel·lular. L'àcid lipoteicoic present a la superfície del bacteri és el responsable de la seva càrrega neta negativa. En canvi, les parets dels bacteris *Gram-negatius* tenen un contingut comparativament baix de peptidoglicà, que no sol ser més del 5 al 10% del pes de la paret. Aquesta membrana de peptidoglicà es troba entre la membrana plasmàtica i la membrana externa, formada bàsicament per una bicapa de fosfolípids amb lipopolisacàrids (LPS). Aquests LPS estan situats a la part externa de la membrana i els seus grups fosfats li confereixen un caràcter hidrofílic amb una càrrega neta també negativa. La membrana externa també conté nombroses proteïnes, alguna de les quals es caracteritzen per la formació de porus, creant canals que possibiliten el transport de molècules relativament hidròfiles de grans dimensions.

Els bacteris Gram-negatius estudiats, d'incidència respiratòria i responsables de la pneumònia, són: *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Els bacteris Gram-positius assajats són: *Staphylococcus aureus* CECT 240, *Bacillus Cereus* LWLI i *Bronchothrix thermosphata* CECT 847.

➤ **Citotoxicitat**

La citotoxicitat dels tensioactius s'ha assajat en les següents cèl·lules de mamífers:

Eritròcits d'ovella: Els eritròcits (o glòbuls vermells) són els elements majoritaris de la sang i contenen hemoglobina, substància transportadora d'oxigen cap als diferents teixits del cos. Aquest assaig consisteix en mesurar la quantitat d'hemoglobina alliberada al medi extern, mitjançant espectrofotometria, després de posar en contacte els eritròcits amb els tensioactius, avaluant així la seva capacitat hemolítica.

Línia tumoral macrofàgica RAW 264.7: Els macròfags, com a cèl·lules hoste de la *Leishmania*, són cèl·lules amb capacitat immunològica present al teixit conjuntiu. Aquest assaig ha permès determinar la inhibició de la viabilitat, induïda pels tensioactius i, per tant, avaluar el seu potencial tòxic sobre les cèl·lules.

Queratinòcits humans HACAT: Els queratinòcits constitueixen aproximadament el 90% de les cèl·lules de l'epidermis, amb un citoesquelet format fonamentalment per filaments de queratina que dona origen al seu nom. Aquest assaig s'ha realitzat per determinar el possible ús dels tensioactius catiónics com a desinfectants tòpics.

.....

Els assaigs microbiològics han permès l'estudi de l'activitat antimicrobiana i de la citotoxicitat dels tensioactius catiónics derivats de l'aminoàcid arginina. El procediment experimental detallat i els resultats obtinguts estan descrits en els següents articles:

Article I

Estudi de l'activitat antimicrobiana (*L. donovani*, *L. pifanoi*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*) i de la citotoxicitat (eritròcits, macròfags, queratinòcits) dels diacilglicerols d'arginina 1212RAc i 1414RAc.

Article V (Manuscrit)

Estudi de l'activitat antimicrobiana (*A. baumannii*, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. thermosphacta*) i hemolítica dels tensioactius N^α-acetilats 1212Rac i 1414Rac i dels seus homòlegs estructurals no N^α-acetilats 1212R i 1414R derivats dels diacilglicerols d'arginina.

Estudi de l'activitat antimicrobiana (*A. baumannii*, *S. aureus*) i hemolítica de les mescles cataniòniques 1212Rac/PG i 1414Rac/PG, en funció de la $\chi_{\text{tensioactiu}}$.

.....