

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

7. Resultats i Discussió

La descripció, interpretació i discussió dels resultats globals obtinguts en aquesta tesi s'ha estructurat tal i com s'especifica a la Taula 7, on s'ha indicat la tècnica experimental emprada, les propietats estudiades, l'*Article* corresponent on s'han publicat els resultats, així com els sistemes estudiats en cada cas. L'objectiu d'aquesta taula és facilitar tant el seguiment dels resultats com la localització d'aquests en els *Articles* corresponents.

Inicialment, s'ha estudiat la capacitat d'adsorció dels tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina XXRAc (1414RAc, 1212RAc) en possibles preparats sintètics de tensioactius pulmonars. Per aquest estudi s'han caracteritzat fisicoquímicament tant les monocapes d'extensió (*Secció 7.1.*), formades a partir de la deposició de les substàncies amfífiles a la interfase, com la formació de la monocapa adsorbida (*Secció 7.2.*) a partir de dispersions de les substàncies amfífiles. A continuació s'ha estudiat l'activitat microbiològica dels diacilglicerols d'arginina XXRAc (*Secció 7.3.*) que ha motivat l'estudi de les propietats microbiològiques de les mescles catanòniques i ha promogut alhora un estudi de les propietats d'aquests sistemes catanònics (*Secció 7.4.*).

Taula 7. Estructura de la descripció, interpretació i discussió dels resultats.

<i>Secció</i>	<i>Tècnica Experimental</i>	<i>Propietats</i>	<i>Article</i>	<i>Sistemes estudiats*</i>
7.1. Caracterització fisicoquímica de les monocapes d'extensió XXRAc/DPPC i XXRAc/DMPC	Balança de Langmuir	Isotermes de compressió (E_s , \bar{A} , ΔG_{ex}) Mètode oscil·latori (E_s , E_p , E_i , $\tan\theta$)	I III	XXRAc/DPPC XXRAc/DMPC 1414RAc/DPPC
7.2. Caracterització fisicoquímica de les monocapes adsorbides XXRAc/DPPC i XXRAc/DMPC	Tensiometria de bombolla IRRAS	En condicions d'àrea constant (γ_{ss}) En condicions d'àrea polsant (γ_{min}) RA: $v_i(\text{CH}_3)$, $v_i(\text{CH}_2)$, $v_i(\text{CH}_2)$	II	XXRAc/DPPC XXRAc/DMPC
7.3. Activitat microbiològica dels diacilglicerols d'arginina XXRAc	Tensiometria Assaig microbiològic	En condicions d'àrea constant (γ_{ss}) Activitat antimicrobiana i citotoxicitat	III I / V	1414RAc/DPPC XXRAc XXR
7.4. Propietats de vesícules catióniques	Velocimetria Doppler làser DLS Cryo-TEM / SAXS Potenciometria Assaig microbiològic	Potencial- ζ Dimensió de partícula Morfologia Grau d'associació de i contraió sodi Activitat antimicrobiana i citotoxicitat	IV V	140RAc/DPPA LAM/DPPA XXRAc/DPPA XXRAc/PG

* Tensioactius derivats de diacilglicerols d'arginina N^ω-acetilats XXRAc (1414RAc i 1212RAc) i els seus homòlegs no N^ω-acetilats XXR (1414R i 1212R).

7.1. Caracterització fisicoquímica de les monocapes d'extensió XXRAc/DPPC i XXRAc/DMPC

En aquesta Secció es presenten alguns dels resultats clau dels Articles I i III.

Les monocapes d'extensió, formades a partir de la deposició d'una substància amfífila sobre una subfase aquosa, han permès l'estudi estructural de les isoterms de compressió, així com les seves propietats viscoelàstiques mitjançant el mètode oscil·latori de la balança de Langmuir. Per aquests estudis, s'ha escollit el fosfolípid DPPC, com a component majoritari dels tensioactius pulmonars, i el fosfolípid DMPC, com un homòleg estructural de cadena més curta.

La capacitat d'adsorció/incorporació dels diacilglicerols d'arginina XXRAc en possibles preparats sintètics de tensioactius pulmonars s'ha avaluat mitjançant la caracterització fisicoquímica de monocapes d'extensió dels fosfolípids amfòters DPPC i DMPC, en presència i en absència dels tensioactius sintètics 1414RAc i 1212RAc. Les isoterms de compressió utilitzades per aquests estudis s'han obtingut en aplicar una deformació de compressió a l'àrea de la monocapa a una velocitat constant.

En primer lloc, s'han caracteritzat les **isoterms de compressió** de cadascun dels components purs (veure *Article I – Figura 1*). Les isoterms del fosfolípid DPPC i del diacilglicerol d'arginina 1414RAc presenten tots els possibles estats característics d'una monocapa insoluble: gas (G), líquid expandit (LE), líquid condensat (LC) i sòlid (S), amb una pressió superficial (π) al col·lapse (C) de 70 mN/m. La transició entre els estats LE i LC, associada a una estabilització de la π , té lloc a 10 i 40 mN/m, respectivament. En el cas del fosfolípid DMPC i del diacilglicerol d'arginina 1212RAc, les isoterms presenten perfils propis de l'estat fluid, en el que només es detecten els estats G i LE abans del col·lapse, que té lloc a 50 mN/m. Aquesta tendència a formar fases expandides és pròpia dels compostos de cadena alquímica curta i s'atribueix a la disminució de les interaccions hidrofòbiques entre les cadenes alifàtiques. La fluïdesa del fosfolípid està d'acord amb els resultats obtinguts amb l'estudi de l'efecte de la nebulització de les vesícules que s'han descrit en la *Secció 5*. La transició entre els estats G i LE dels tensioactius catiónics derivats dels diacilglicerols d'arginina té lloc a àrees per molècula superiors a la dels fosfolípids, amb valors d'1.3 i 1.0 nm²/molècula, respectivament. Aquest comportament pot estar

relacionat amb la càrrega neta del cap polar de l'arginina comparat amb el caràcter amfòter dels fosfolípids.

En segon lloc, s'ha estudiat la capacitat d'adsorció dels tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina en preparats sintètics de tensioactius pulmonars, a partir de l'estudi de les monocapes d'extensió mixtes XXRAc/DPPC (veure *Article I – Figura 2*), considerant el fosfolípid DPPC com a component majoritari dels tensioactius pulmonars. La comparació entre les isoterms de compressió dels components purs i la de les mescles pot donar indicacions referents al grau en el que el compost tensioactiu és forçat a retornar a la subfase. Per tant, les isoterms de compressió d'aquests sistemes binaris donaran una idea del grau d'adsorció dels tensioactius, ja que si aquests es desorbeixen completament en comprimir la monocapa, la isoterma resultant serà idèntica a la del fosfolípid DPPC. A pressions superficials properes al col·lapse, les monocapes mixtes 1414RAc/DPPC mostren una reducció de l'àrea per molècula ocupada en incrementar la fracció molar del tensioactiu* 1414RAc ($\chi_{1414RAc}$). Aquestes isoterms mixtes, de la mateixa forma que les dels seus components purs, presenten tots els estats característics d'una monocapa insoluble. S'ha de destacar que la pressió a la que té lloc la transició entre els estats LE i LC depèn de la $\chi_{1414RAc}$, i per tant queda descartada la possibilitat de la desorció del tensioactiu de la monocapa cap a la subfase. També s'observa un comportament característic de monocapa insoluble per la mescla 1212RAc/DPPC a $\chi_{1212RAc}$ inferiors o iguals a la relació equimolar. Quan el component majoritari és el tensioactiu 1212RAc, el comportament de la isoterma mixta és el propi de l'estat fluid, igual que en el cas del tensioactiu pur.

A efectes comparatius, s'han estudiat les isoterms mixtes XXRAc/DMPC, emprant el fosfolípid DMPC com un homòleg estructural del fosfolípid DPPC, amb una longitud de cadena hidròfoba de 14 àtoms de carboni. Les isoterms mixtes 1414RAc/DMPC presenten un comportament característic tant de monocapa insoluble com de l'estat fluid, en funció de la $\chi_{1414RAc}$. Aquesta tendència és la mateixa que s'ha observat per la mescla 1212RAc/DPPC, i sembla ser un comportament coincident en sistemes binaris formats per un component amb comportament de monocapa insoluble

* S'han interpretat els resultats en funció de la $\chi_{\text{tensioactiu}}$ i no en funció de la $\chi_{\text{fosfolípid}}$, tal i com s'ha fet a l'*Article I*, per tal d'unificar la terminologia d'aquests resultats amb la dels que es discutiran a continuació.

i un altre amb comportament característic de l'estat fluid. Les isoterms mixtes de la mescla 1212Rac/DMPC, només presenten l'estat fluid, igual que els seus components purs. Les isoterms mixtes estan situades entre les isoterms dels dos components purs que formen la mescla i properes a aquestes.

Les isoterms dels sistemes binaris formats per XXRac/DPPC i XXRac/DMPC, a pressions superficials baixes i moderades, mostren una expansió de la monocapa en incrementar la $\chi_{\text{tensioactiu}}$. Aquest fet s'atribueix al caràcter catiónic del cap polar dels tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina. A més, a $\chi_{\text{tensioactiu}}$ inferiors a 0.7, les isoterms mixtes presenten un comportament característic de monocapa insoluble sempre i quan la isoterma d'un dels dos components purs també presenti aquest comportament. La presència de l'estat sòlid (S) indica que el sistema és capaç de reduir la tensió superficial de l'aigua com a mínim a valors propers a 10 mN/m.

A partir dels pendents de les isoterms de compressió, s'ha determinat l'**elasticitat estàtica (E_s)** de les monocapes mixtes (veure *Article 1 – Figura 3*). El valor d' E_s a l'estat G és virtualment zero. La transició cap a l'estat LE està marcada per un increment sobtat de l' E_s , mentre que en la fase LE, augmenta lleugerament el seu valor. En la transició LE-LC, l' E_s cau repentinament i posteriorment adopta valors superiors als observats per l'estat LE. De la mateixa manera, la transició LC-S ve marcada per una reducció i un posterior augment de l' E_s , però aquest cop menys accentuat, degut a que les dades d'elasticitat dels dos estats condensats, LC i S, mostren molt de soroll. Les monocapes mixtes XXRac/DPPC a pressions superficials moderades, experimenten una lleugera reducció de l' E_s en augmentar la $\chi_{\text{tensioactiu}}$, mentre que a pressions elevades, les isoterms presenten un comportament fortament elàstic. S'ha de destacar l'elevada elasticitat de les monocapes mixtes formades per 1414Rac/DMPC a l'estat S, quan el component majoritari és el tensioactiu, ja que és superior a les elasticitats d'ambdós components purs. Per les monocapes mixtes 1212Rac/DMPC, amb un comportament característic de l'estat fluid, només s'observen els estats G i LE, amb diferències d'elasticitats molt poc significatives. Un tret comú, a pressions superficials moderades, de les elasticitats de les monocapes mixtes XXRac/DPPC i XXRac/DMPC és la seva reducció en augmentar la $\chi_{\text{tensioactiu}}$.

A partir de les isoterms de compressió dels sistemes binaris, s'ha obtingut informació addicional respecte al **grau de miscibilitat** dels dos components de la

mescla, a partir de la regla d'addició i de l'energia de Gibbs en excés. La **regla d'addició** ha ajudat a interpretar les isoterms en termes de desviacions d'àrees per molècula experimentals respecte a la calculada per un sistema de mescla ideal (\bar{A}) (veure *Article I i Correccions – Figura 4*). La mescla formada per 1414RAc/DPPC presenta un comportament pràcticament ideal per totes les π estudiades, excepte en la relació equimolar que s'observa una desviació negativa respecte a la idealitat, fent-se més evident a baixes pressions superficials. Aquesta desviació de la idealitat indica una miscibilitat parcial dels dos components de la mescla. En canvi, el comportament ideal observat a fraccions no equimolars pot ser degut tant a una miscibilitat ideal dels dos components de la mescla o bé tractar-se d'una mescla totalment immiscible. És per aquest motiu que ha estat necessari realitzar una anàlisi termodinàmica a partir del càlcul de l'energia de Gibbs en excés (ΔG_{ex}), per tal de discernir entre aquestes dues possibles situacions. Les mescles 1212RAc/DPPC i 1414RAc/DMPC, a totes les fraccions molars estudiades, presenten una desviació negativa respecte al comportament ideal i per tant, els dos components que intervenen en aquestes mescles són parcialment miscibles. En canvi, la mescla formada per 1212RAc/DMPC mostra una desviació negativa respecte a la idealitat en la relació equimolar i desviacions positives a les fraccions no equimolars. Aquestes desviacions tant positives com negatives respecte al comportament ideal també indiquen una miscibilitat parcial entre els dos components de la mescla.

L'avaluació del grau de miscibilitat dels components de la mescla a partir del càlcul de **l'energia de Gibbs en excés** (ΔG_{ex}) ha permès interpretar les isoterms dels sistemes binaris en termes d'energia, determinant així l'estabilitat termodinàmica de les monocapes mixtes (veure *Correccions de l'Article I – Figura 5*). Els valors negatius de ΔG_{ex} , calculats a partir de les isoterms de compressió dels sistemes binaris XXRAc/DPPC i 1414RAc/DMPC, indiquen que les monocapes estan afavorides termodinàmicament i per tant, que les forces existents entre els dos components a la monocapa són atractives. En canvi, els valors positius de ΔG_{ex} de la mescla 1212RAc/DMPC suggereixen una interacció més feble entre els dos components respecte a les interaccions entre les mateixes molècules dels components purs. Per tant, almenys un dels dos components tindrà una tendència a l'autoagregació, formant agregats bidimensionals. Aquest resultat és sorprenent ja que, en reduir la

longitud de cadena hidròfoba del tensioactiu, no s'observa aquesta tendència en les mescles amb DPPC. Per tant, no trobem arguments per explicar aquests resultats en termes d'interaccions hidròfobes/hidròfiles.

Fins ara s'han analitzat les propietats estructurals de les monocapes d'extensió a partir de les isoterms de compressió. Amb aquests resultats es conclou que els tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina XXRAc tenen la capacitat d'adsorbir-se en possibles preparats sintètics de tensioactius pulmonars, formant monocapes mixtes miscibles i afavorides termodinàmicament, en presència del fosfolípid DPPC. A més, aquestes monocapes mixtes tenen la capacitat de reduir la tensió superficial a valors suficientment baixos com per poder evitar el col·lapse als alvèols pulmonars.

A continuació, i donant un pas més enllà en els estudis de les monocapes d'extensió, s'han simulat les condicions d'inspiració/expiració de la respiració pulmonar, mitjançant el mètode oscil·latori de la balança de Langmuir. Amb aquest mètode, la monocapa és sotmesa a una deformació sinusoidal de l'àrea que ve definida per una freqüència d'oscil·lació i una amplitud de deformació, limitades alhora per la restricció de la velocitat màxima de les barreres de l'equip emprat. Aquests estudis han permès estudiar en profunditat les *propietats viscoelàstiques* de les monocapes mixtes formades per 1414RAc/DPPC. S'ha considerat aquest sistema binari, ja que els dos components purs que formen la mescla presenten isoterms amb un comportament característic de monocapes insolubles, així com les seves mescles. S'ha treballat a una pressió superficial (π) de 26 mN/m (tensió superficial (γ) de 47 mN/m) ja que correspon a la densitat d'empaquetament de les membranes biològiques.

En primer lloc, ha estat necessari delimitar els rangs d'amplitud de deformació i de freqüència d'oscil·lació, dins dels quals el comportament viscoelàstic és lineal. Per estudiar els límits d'*amplitud* lineal, s'han determinat les propietats reològiques dilatacionals (E , mòdul superficial dilatacional; E_r , elasticitat dilatacional; E_v , viscositat dilatacional; $\tan \theta$, tangent de l'angle de pèrdua) de les monocapes d'extensió dels components purs 1414RAc i DPPC, en el rang d'amplituds de deformació compreses entre l'1 i el 10% de deformació en l'àrea, a les freqüències d'oscil·lació de 50, 100 i 166 mHz (veure *Article III – Figura S2*). Els valors de E i E_r augmenten en el mateix sentit que l'amplitud de deformació, assolint un màxim de

deformació al 5%, al mateix temps que la $\tan \theta$ decreix fins arribar a un mínim. A amplituds de deformació superiors al 5%, les propietats reològiques dilatacionals de les monocapes dels components purs depenen exclusivament de la freqüència d'oscil·lació i no de l'amplitud de deformació. És per aquest motiu que, els límits del comportament viscoelàstic lineal es defineixen dins del rang comprès entre el 5 i el 10%. S'ha de destacar que la no linealitat obtinguda a amplituds de deformació petites pot ser atribuïda als límits de detecció en les mesures de la tensió superficial de la balança de Langmuir emprada. De la mateixa manera s'ha observat un augment de $\tan \theta$ amb la freqüència, que pot estar relacionat amb les condicions experimentals de no idealitat, ja que a freqüències grans, la longitud d'ona de la deformació és propera a la longitud de la cubeta de la balança de Langmuir.

Respecte als límits de **freqüència** lineal, s'ha de tenir en compte que el rang de freqüència que es pot assolir amb el mètode d'oscil·lació de la balança de Langmuir és des d'un fins uns quants centenars de mHz. A freqüències petites, la variació de la γ induïda pel moviment de les barreres queda fàcilment obscurit per fluctuacions i canvis graduals de tensió. En canvi, les freqüències grans no són permeses degut a les restriccions del moviment del dispositiu mecànic i a la commensurabilitat de la cubeta amb l'ona superficial generada. S'ha treballat amb l'amplitud de deformació del 5% per ser el mínim de deformació dins de la regió viscoelàstica lineal. S'han determinat els paràmetres reològics dilatacionals de la mescla 1414RAc/DPPC en el rang de freqüències compreses entre 50 i 250 mHz, a diferents $\chi_{1414RAc}$ (veure *Article III – Figura S3*). L'elasticitat intrínseca de les monocapes dels components purs exhibeix clarament valors més alts per DPPC que pel tensioactiu 1414RAc. La principal diferència estructural entre les dues molècules és la càrrega del cap polar (neutre i catiònic, respectivament), fet que implica diferències en les interaccions intermoleculares i en la cohesió de la monocapa degut a la gran solubilitat en aigua del cap polar del tensioactiu catiònic (major possibilitat de formació de ponts d'hidrogen amb la fase aquosa) en comparació amb el fosfolípid DPPC. Aquest comportament està d'acord amb les isoterms de compressió on les interaccions electrostàtiques entre els grups ionitzats del 1414RAc són més efectives a distàncies grans ($1.3 \text{ nm}^2/\text{molècula}$) mentre que les interaccions de DPPC tenen efecte a distàncies més curtes ($1.0 \text{ nm}^2/\text{molècula}$). Aquestes interaccions a llarga distància, atribuïdes a una

disminució de la tendència a la formació de dominis condensats en la fase G, també s'han observat per sistemes binaris formats per una proteïna tensioactiva (SP) i el fosfolípid DPPC. Per tant, aquestes interaccions estan d'acord amb una petita disminució de la pressió superficial en funció de l'àrea per molècula i, com a conseqüència, l' E disminueix. Els valors d' E són independents de la freqüència d'oscil·lació. Els valors de E i E_r són pràcticament els mateixos a 50 mHz degut als petits valors de $\tan \theta$ dins d'aquest rang. A aquesta baixa freqüència, $\tan \theta$ presenta valors propers a zero encara que experimenta un increment significatiu a freqüències elevades. Aquest increment és degut principalment a la disminució d' E en incrementar la freqüència. En resum, les monocapes mixtes de 1414RAc/DPPC presenten un comportament reològic dilatacional essencialment elàstic a baixes freqüències (50 mHz) i viscoelàstic a freqüències superiors a 50 mHz. És necessari destacar que l' E és més gran per la monocapa de DPPC que per la del 1414RAc i és independent de la freqüència d'oscil·lació a totes les $\chi_{1414RAc}$ estudiades.

Després de definir els rangs d'amplitud i de freqüència lineals, s'han determinat els paràmetres reològics dilatacionals de les monocapes mixtes de 1414RAc/DPPC en funció de la $\chi_{1414RAc}$, a una amplitud de deformació del 5% i a una freqüència d'oscil·lació de 50 mHz (veure *Article III – Figura 6*). S'ha de tenir en compte que aquesta freqüència d'oscil·lació emprada és molt inferior a la freqüència real de respiració en adults, compresa entre 250 i 400 mHz (15 i 25 cicles/min) [Banner MJ i col., 1995]. Els valors de les elasticitats obtinguts per a les monocapes mixtes són inferiors als esperats per a una mescla ideal, essent màxima aquesta desviació per la relació equimolar. S'ha de destacar que els valors d' E són molt similars als valors calculats de les elasticitats estàtiques (E_s) a partir dels pendents de les isoterms de compressió. Aquest fet pot també estar relacionat amb l'energia de Gibbs. D'una manera estricta, la monocapa del tensioactiu 1414RAc no és completament insoluble ja que presenta una cmc propera a 2 μ M, encara que, a la velocitat de compressió experimental emprada, la monocapa pot considerar-se com a insoluble. En un principi, el valor d'elasticitat d'una monocapa soluble hauria de ser zero. Comparant l' E_s (elasticitat *quasi*-estàtica) amb l' E (elasticitat dinàmica) es verifica que la velocitat de solubilització de la monocapa de tensioactiu és molt lenta. Quan el component majoritari és el fosfolípid DPPC, el valor d' E és pràcticament idèntic al predit per una

mescla ideal, mentre que a fraccions igual o superiors a la relació equimolar, el valor d' E és lleugerament inferior al del tensioactiu pur. Degut a que l'elasticitat dilatacional d'una monocapa insoluble és una mesura de les interaccions moleculars a la interfase, aquesta observació es pot interpretar dins del marc de la termodinàmica estadística. En aquest context, el comportament observat correspon a una desviació negativa de la llei de Raoult i per tant, les interaccions A-A i B-B són menys favorables que les A-B. Això suposa un major potencial d'interacció entre 1414RAc-DPPC, comparat amb el potencial entre DPPC-DPPC i 1414RAc-1414RAc. El component viscos E_i presenta valors petits per totes les $\chi_{1414RAc}$, amb un subtil mínim en la relació equimolar.

L'aplicació de successius cicles sinusoidals a la monocapa mixta 1414RAc/DPPC, no induïx deriva en la resposta de la pressió superficial (veure *Article III – Figura 1*), posant de manifest la no desorció de les molècules tensioactives a la monocapa cap a la subfase, en condicions simulades d'inspiració/expiració de la respiració pulmonar.

7.2. Caracterització fisicoquímica de les monocapes adsorbides XXRAc/DPPC i XXRAc/DMPC

En aquesta Secció es presenten alguns dels resultats clau dels Articles II i III.

Fins ara s'han interpretat els resultats obtinguts a partir de les monocapes d'extensió (Secció 7.1.). Per tal d'extrapolar-los a sistemes més complexos, s'ha caracteritzat la formació de monocapes adsorbides a la interfase aire/aigua, a partir de dispersions aquoses de XXRAc/fosfolípid. Aquests sistemes s'aproximen més a les condicions reals d'adsorció dels preparats sintètics de tensioactius pulmonars. La tensiometria de bombolla i l'espectroscòpia d'infraroig IRRAS han estat les tècniques emprades per a la caracterització fisicoquímica de les monocapes adsorbides a la interfase aire/aigua, de dispersions dels fosfolípids DPPC i DMPC, en presència i en absència dels tensioactius catiónics derivats dels diacilglicerols d'arginina 1414RAc i 1212RAc.

Amb la **tensiometria de bombolla**, la interfase aire/aigua es genera mitjançant la formació d'una bombolla d'aire dins d'una dispersió aquosa, simulant així la interfase existent als alvèols pulmonars. En **condicions d'àrea constant**, s'ha estudiat la variació de la tensió superficial (γ) en el temps, obtenint així els valors de tensió a l'estat "estacionari" (γ_{ss}) de les mescles XXRAc/DPPC i XXRAc/DMPC. L'estat d'"equilibri" és complex de determinar per compostos insolubles o parcialment solubles, és per això que s'han definit els valors de tensió a l'estat "estacionari", on les tensions es mantenen estables durant períodes suficientment llargs, depenent de la mida de les partícules dispersades i del protocol de preparació. L'evolució de la γ en el temps per les dispersions dels diacilglicerols d'arginina XXRAc (veure *Article II – Figura 1*) mostren una dependència evident amb la concentració, en augmentar la concentració es redueix el temps de formació de la monocapa i també es redueix de manera important la γ_{ss} , assolint tots dos tensioactius valors propers a 20 mN/m. A concentracions elevades, la γ disminueix ràpidament durant els primers 100 s, a partir dels quals disminueix més lentament, fins assolir l'estat estacionari. Això suggereix que l'augment de la densitat superficial provoca un increment tant de la densitat de càrrega com del potencial elèctric superficial, disminuint considerablement el procés d'adsorció. En canvi, l'evolució de la γ en el temps per les dispersions dels fosfolípids no varia significativament i els valors de la γ disminueixen com a màxim fins a 60

mN/m. Aquests resultats no estan d'acord amb alguns resultats trobats a la literatura on els mateixos fosfolípids, però sonicats durant hores, són capaços d'assolir valors de γ molt inferiors en menys temps. Aquestes diferències en les velocitats d'adsorció s'atribueixen a la reducció en la mida de les vesícules ja que depenen del protocol de preparació emprat.

S'ha estudiat la variació de la γ_{ss} en funció de la $\chi_{\text{tensioactiu}}$ de les dispersions mixtes formades per XXRAc/DPPC i XXRAc/DMPC, a una concentració total de 500 μM (veure *Article II – Figura 2*). Les mescles formades per 1414RAc/DPPC presenten desviacions negatives respecte al comportament ideal, excepte quan el tensioactiu 1414RAc és el component majoritari, que presenta un comportament pràcticament ideal. En canvi, per les mescles 1414RAc/DMPC, les desviacions respecte a la idealitat són positives, indicant repulsions entre els dos components adsorbts a la monocapa, exceptuant el cas en que el fosfolípid DMPC és el component majoritari, que es comporta com una mescla ideal. Per les mescles formades amb el tensioactiu 1212RAc, tant amb DPPC com amb DMPC, s'observen desviacions negatives respecte al comportament ideal, indicant atraccions entre els dos components de la mescla, i els valors de γ_{ss} de les mescles són idèntics i coincidents amb el valor assolit pel tensioactiu 1212RAc pur, proper als 20 mN/m. Aquesta coincidència pot suggerir tant la presència exclusiva del tensioactiu 1212RAc a la interfase aire/aigua com un afavoriment, per part del tensioactiu, de l'adsorció dels fosfolípids provocat per una sinergia entre tots dos components. Per conèixer aquesta informació respecte a les espècies presents a la monocapa, serà necessari un estudi complementari dels espectres IRRAS, el qual s'analitzarà a continuació. Els resultats obtinguts per tensiometria de bombolla en condicions d'àrea constant, difereixen dels obtinguts a partir de les isoterms de compressió, on la dinàmica d'adsorció no hi juga cap paper.

Un cop assolida la γ_{ss} , després de 1800 s, s'ha estudiat la γ en **condicions d'àrea polsant**, aplicant una deformació sinusoidal de l'àrea de la bombolla, a una freqüència de 20 cicles/min (20 rpm, 333 mHz), corresponent a la freqüència normal de respiració en adults. A diferència del mètode oscil·latori de la balança de Langmuir, aquesta tècnica només permet variar la freqüència d'oscil·lació, sense la possibilitat de modificar l'amplitud de deformació, amb un valor constant del 2%. Durant l'expansió, la γ augmenta degut a la disminució de la densitat superficial, mentre que durant la

compressió, la γ disminueix. En general, al voltant del catorzè cicle, la γ assoleix un estat estacionari d'oscil·lació. Per tant, s'ha determinat la tensió superficial mínima (γ_{\min}) assolida al catorzè cicle de les dispersions mixtes (veure *Article II – Figura 3*). Per tots els sistemes binaris estudiats, excepte per les dispersions mixtes de 1414RAc/DMPC, els valors de γ_{\min} són inferiors als valors corresponents a un comportament ideal, degut a la histèresi existent en tots els processos d'adsorció, en els quals estan involucrats la difusió a la superfície, adsorció, desorció i difusió a través de la superfície. Per tant, aquests resultats posen de manifest un sinergisme important en la tensió superficial. S'ha de destacar el mínim de tensió assolit pel sistema binari 1212RAc/DMPC en la relació equimolar, corresponent a 2 mN/m. Experimentalment s'ha observat una deformació en la bombolla induïda per la gravetat, tret característic per valors de γ inferiors a 5 mN/m. A efectes comparatius, la monocapa d'extensió d'aquest mateix sistema binari mostra un comportament pràcticament ideal.

L'efecte sinèrgic en la tensió superficial de les dispersions de DPPC i DMPC en presència dels diacilglicerols d'arginina, s'ha complementat amb estudis d'intensitats d'absorbància reflectides (RA), mitjançant l'*espectroscòpia d'infraroig IRRAS*, per tal d'obtenir informació addicional respecte les espècies presents a la monocapa. Prèviament a aquests estudis, s'han realitzat una sèrie d'estudis preliminars: a) experiments ATR, proporcionant informació respecte a la posició de cadascuna de les bandes de vibració a l'espectre (veure *Article II – Figura 4*) i b) experiments IRRAS de les monocapes d'extensió dels diacilglicerols d'arginina, a densitats superficials conegudes (veure *Article II – Figures 5 i 6*). Els resultats d'aquests estudis s'han utilitzat per interpretar els resultats amb les monocapes adsorbides. En les monocapes d'extensió s'observa la presència de conformacions trans de la cadena hidrocarbonada i un major grau d'ordenament de les molècules del 1414RAc que per les molècules del 1212RAc, a la mateixa densitat molar superficial. D'altra banda, la intensitat RA de la monocapa d'extensió del 1414RAc pràcticament correspon al doble de la del 1212RAc. Aquesta diferència és atribuïda en part, a la diferència del número d'unitats $-\text{CH}_2-$ de les cadenes hidrocarbonades (13 vs. 11, respectivament) i, fonamentalment a les diferents orientacions que adopten les cadenes a la monocapa. Els valors d'intensitats RA de les monocapes d'extensió són superiors als de les monocapes

adsorbides ja que presenten densitats superficials superiors. Això és consistent amb els valors de tensió superficial.

Amb les mesures d'ATR, s'han identificat totes les bandes a l'espectre IRRAS, excepte les del carbonil i l'amida, característiques dels diacilglicerols d'arginina, ja que en aquests espectres es troben solapades amb el senyal intens de l'aigua. És per aquest motiu que únicament s'ha estudiat la zona de l'espectre infraroig on apareixen les bandes dels modes vibracionals de tensió de la regió hidrocarbonada compresa entre 3000 i 2800 cm^{-1} . De les tres bandes observades en aquesta regió (1: $\nu_a(\text{CH}_3)$, mode vibracional de tensió asimètrica del metil; 2: $\nu_a(\text{CH}_2)$, mode vibracional de tensió asimètrica del metilè; 3: $\nu_s(\text{CH}_2)$, mode vibracional de tensió simètrica del metilè), només s'ha interpretat la banda $\nu_a(\text{CH}_2)$ per ser la més intensa. L'estudi de les monocapes d'extensió dels diacilglicerols a diferents densitats superficials, ha confirmat la completa saturació de les monocapes adsorbides a la concentració de treball. Els resultats experimentals dels espectres IRRAS de les dispersions mixtes XXRAc/DPPC i XXRAc/DMPC (veure *Article II – Figura 7*) mostren un augment de les seves intensitats RA respecte a les dels components purs. Aquest comportament implica un efecte sinèrgic en l'adsorció, confirmant així la presència de tots dos components a la monocapa. S'ha de destacar l'augment de les intensitats RA en mescles XXRAc/DPPC respecte a les mescles amb DMPC (veure *Article II – Figura 8*). El sinergisme en l'adsorció suggereix interaccions atractives netes entre els dos components, tal i com era d'esperar per tractar-se de monocapes miscibles.

Fins ara, la caracterització fisicoquímica de les monocapes tant d'extensió com d'adsorció han proporcionat uns resultats molt optimistes pel que fa a la possible aplicació dels diacilglicerols d'arginina XXRAc en preparats sintètics de tensioactius pulmonars. Arribats a aquest punt, s'ha plantejat resoldre un problema important existent en els preparats sintètics de tensioactius pulmonars com és la lenta adsorció a la interfase aire/aigua del seu component majoritari, el fosfolípid DPPC. En els preparats sintètics, l'hexadecanol i les proteïnes recombinants (SP-B i SP-C) semblen ser els responsables de promoure la ràpida adsorció del fosfolípid DPPC. Per tant, seria molt interessant que els diacilglicerols d'arginina fossin capaços d'accelerar per sí mateixos la velocitat d'adsorció del fosfolípid DPPC, per tal de ser uns bons candidats a possibles substituïts sintètics. És per aquest motiu que s'ha tingut en

compte el reduït percentatge present en els tensioactius pulmonars naturals de cadascuna de les proteïnes recombinants (1% SP-B, 1% SP-C), amb una capacitat de reduir la γ a valors propers a 20 mN/m. Per conèixer si els diacilglicerols d'arginina són bons candidats a ser els substituïts sintètics de les SP, s'ha estudiat el procés d'adsorció de les dispersions del fosfolípid DPPC en presència de petites quantitats del tensioactiu 1414RAc (1.4-20%) mitjançant *tensiometria*. Aquest tensioactiu sintètic presenta un comportament característic de monocapa insoluble, minimitzant així els possibles problemes de solubilització a la subfase.

Prèviament, s'ha estudiat la formació de la monocapa a partir de les dispersions dels components purs, seguint les variacions de la γ en el temps, a diferents concentracions. Les dispersions del fosfolípid DPPC (veure *Article III – Figura 2*) a concentracions inferiors a 55 μ M, mostren una γ pràcticament constant durant el temps de mesura. En augmentar lleugerament la concentració, la γ comença a disminuir significativament fins valors mínims de 32 mN/m, assolits en només 22 minuts a concentracions superiors a 74 μ M. Aquesta estabilització de la γ a la interfase aire/aigua no implica un equilibri termodinàmic, el qual hauria de donar una reducció molt petita de la γ , ja que s'està treballant per sota de la seva temperatura de transició (T_i). Les mesures experimentals s'han realitzat amb agitació constant i, per tant, la reducció de la γ pot donar-se tant per sota com per sobre de la seva T_i , mentre que els resultats obtinguts amb la tensiometria de bombolla sí que coincideixen amb una estabilització termodinàmica de les dispersions de DPPC. Els resultats experimentals no mostren una dependència clara de la velocitat d'adsorció interfacial en funció de la concentració de fosfolípid a la subfase. Aquests experiments d'adsorció depenen de les dimensions de les partícules dispersades, i per tant, del protocol de preparació emprat. A partir del seguiment de la formació de la monocapa de DPPC mitjançant la variació de la γ , s'ha seleccionat una concentració de fosfolípid de 55 μ M per portar a terme l'estudi de la formació de la monocapa mixta 1414RAc/DPPC, a fraccions de tensioactiu sintètic petites. A aquesta concentració, el fosfolípid no s'adsorbeix significativament durant el temps experimental. Aconseguim simular així la lenta adsorció dels substituïts sintètics dels tensioactius pulmonars. Aquesta situació maximitzarà els efectes de l'addició del tensioactiu sintètic en l'adsorció del fosfolípid. Respecte a la formació de la monocapa de les dispersions del tensioactiu

1414RAc (veure *Article III – Figura 3*), a concentracions diluïdes (inferiors a 1.1 μM) la γ no varia significativament respecte a la de l'aigua (en un temps experimental de 90 min). En canvi, a concentracions superiors a 2.2 μM , la γ disminueix fins a valors propers a 20 mN/m. A diferència del fosfolípid DPPC, la velocitat de l'adsorció interfacial augmenta amb la concentració de tensioactiu a la subfase.

A continuació s'ha estudiat la velocitat d'adsorció de les dispersions del fosfolípid DPPC en presència de petites quantitats del diacilglicerol d'arginina 1414RAc compreses entre 0.8 i 8.4 μM , corresponent a uns percentatges en pes de l'1.4 i del 20%, a una concentració total de 55 μM (veure *Article III – Figura 3*). S'observa un augment de la velocitat d'adsorció de totes les mescles estudiades respecte a la del fosfolípid DPPC, que sol no s'adsorbeix significativament a aquesta concentració. Aquest comportament indica una forta activitat superficial del tensioactiu 1414RAc, accelerant la velocitat d'adsorció del fosfolípid DPPC i reduint considerablement la γ fins a valors mínims propers a 20 mN/m. Per determinar si aquesta activitat és deguda simplement a la presència del tensioactiu o bé a un sinergisme entre els dos components de la mescla, ha estat necessari comparar cadascuna de les adsorcions de les mescles amb la del 1414RAc pur a la mateixa concentració que en la mescla (veure *Article III – Figura 4*). L'addició de quantitats petites de tensioactiu 1414RAc (inferiors o igual a 1.4 μM) al fosfolípid DPPC, millora i accelera la reducció de la γ respecte a l'adsorció tant del fosfolípid com la del tensioactiu pur. Aquest comportament evidencia un fort sinergisme entre els dos components de la mescla a concentracions petites de tensioactiu. En canvi, per les mescles 1414RAc/DPPC a concentracions de tensioactiu igual o superiors a 2.7 μM , aquest sinergisme no s'observa respecte a l'adsorció del tensioactiu, encara que sí respecte a l'adsorció del fosfolípid, tal i com s'ha detallat anteriorment. Aquest mateix comportament sinèrgic ha estat observat per d'altres autors, els quals ho han atribuït a la formació d'estructures mielíniques tubulars induïdes pel tensioactiu. En el nostre cas, no s'han observat aquest tipus d'estructures per les dispersions del 1414RAc pur, però no s'exclou la inducció d'aquestes estructures en presència del fosfolípid DPPC. Una altra raó del sinergisme observat seria la possibilitat de la reducció de la mida de les partícules de DPPC ja que acceleraria la reducció de la γ en addicionar un tensioactiu soluble com és el 1414RAc. Però, les distribucions en les dimensions de les mescles i

del fosfolípid DPPC no mostren cap diferència significativa. Una explicació alternativa als resultats obtinguts seria la reducció de la temperatura de transició (T_t) del fosfolípid DPPC induïda per petites quantitats de tensioactiu. El fosfolípid DPPC i el tensioactiu 1414RAc presenten uns valors de T_t de 41 i 39 °C, respectivament. Degut a la similitud d'aquests valors, no s'espera un efecte important en la T_t de les mescles, encara que no es pot descartar aquesta possibilitat amb les dades actuals. Caldria nous experiments per tal d'aclarir aquest punt.

L'evolució de la γ en funció del temps per totes les dispersions estudiades mostra un temps de retard comú (veure *Article III – Figura S1*), el qual s'atribueix al temps necessari per adsorbir les molècules des del si de la solució fins a la interfase aire/aigua. L'origen d'aquest temps de retard pot estar relacionat amb una barrera d'adsorció originada per repulsions iòniques. Aquesta interpretació és raonable si es té en compte que els temps de retard són més grans pel tensioactiu catiónic 1414RAc que per les mescles amb DPPC. Aquest temps mostra la mateixa tendència que la γ , en augmentar la concentració de 1414RAc.

L'acceleració de l'adsorció de les mescles 1414RAc/DPPC en presència de petites quantitats de tensioactiu (inferiors o igual a 1.4 μM), va plantejar una possible relació entre el sinergisme observat entre els dos components de la mescla i el comportament d'agregació del tensioactiu. És per aquest motiu que s'ha determinat la concentració micel·lar crítica (cmc) del 1414RAc, mitjançant mesures de pH a 25 °C (veure *Article III – Figura 5*). A concentracions de tensioactiu inferiors a 2 μM , s'observa una activitat constant dels protons, atribuïda a la presència del monòmer en solució. A partir d'aquesta concentració, l'activitat dels protons comença a augmentar, degut a que l'agregació indueix un canvi de pK_a , seguint un comportament d'àcid fort fins a una concentració de 15 μM . Aquests canvis en els pH poden ser atribuïts a la incorporació del tensioactiu en bicapes o bé a la formació d'agregats discoidals. En seguir augmentant la concentració del tensioactiu, l'activitat dels protons continua augmentant amb un pendent més moderat fins a una concentració de 200 μM , on probablement les bicapes s'han carregat progressivament o bé s'han tancat per formar vesícules. Finalment, a concentracions superiors a 200 μM , un creixement de les vesícules podria justificar el tercer canvi de pendent. Aquestes interpretacions són

especulatives i, per caracteritzar tots aquests canvis estructurals, caldria realitzar experiments addicionals.

En resum, les mescles formades per 1414Rac/DPPC presenten un efecte sinèrgic entre els dos components de la mescla respecte a l'adsorció del tensioactiu, i sembla fortament relacionat amb la cmc del 1414Rac. A concentracions de tensioactiu inferiors a la cmc, on el tensioactiu es troba en forma de monòmer, s'indueix sinergisme entre el 1414Rac i el fosfolípid DPPC. En canvi, a concentracions superiors a la cmc, on el tensioactiu es troba en forma d'agregats, la γ no experimenta variacions respecte a la del tensioactiu pur. S'ha de destacar que, independentment de la concentració de tensioactiu emprada, l'addició d'aquest sobre el fosfolípid DPPC provoca sempre un augment de la velocitat d'adsorció. Aquesta acceleració en el procés d'adsorció és rellevant per aplicacions en formulacions de tensioactius pulmonars, ja que un dels principals problemes dels substituïts sintètics és la lenta velocitat d'adsorció del fosfolípid DPPC.

Les propietats d'adsorció a la interfase aire/aigua dels tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina XXRac en presència del fosfolípid DPPC han satisfet els requisits necessaris per ser els possibles substituïts a les proteïnes recombinants SP-B i SP-C, les quals s'encarreguen d'estabilitzar la interfase aire/líquid de l'alvèol pulmonar. Tenint en compte que la síndrome de dificultat respiratòria en nounats (SDR) és produïda bàsicament per la deficiència de tensioactiu pulmonar, es podria pensar, en una primera aproximació, en la incorporació d'aquests diacilglicerols d'arginina XXRac en formulacions sintètiques, com a possible tractament d'aquesta malaltia.

7.3. Activitat microbiològica dels diacilglicerols d'arginina XXRAc

En aquesta Secció es presenten alguns dels resultats clau dels Articles I i V (Manuscrit).

Una de les possibles aplicacions dels tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina XXRAc és el seu ús com a agents antimicrobians, degut a les propietats que li confereix el grup guanidino clorhidratat.

Inicialment, s'ha estudiat l'activitat microbiològica dels tensioactius sintètics XXRAc utilitzant un *medi de cultiu senzill* (sèrum) per tal de fer una primera avaluació de l'activitat (veure Article I). En aquest estudi s'ha determinat l'activitat antimicrobiana en els protozous de *Leishmania donovani* (promastigote) i *pifanoi* (amastigote), i en els bacteris Gram-negatius *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa*, responsables de malalties infeccioses al pulmó. Els protozous de *Leishmania* són microorganismes unicel·lulars eucariotes i, com a tals, presenten un nucli ben diferenciat. En canvi, els bacteris són microorganismes unicel·lulars procariotes, mancats de nucli i òrgans interns. També s'ha assajat la citotoxicitat en les següents cèl·lules eucariotes de mamífers: eritròcits d'ovella, línia tumoral macrofàgica RAW 264.7 i queratinòcits HACAT.

Els resultats obtinguts de l'activitat microbiològica (veure Article I – Taula I), mostren una gran resistència dels bacteris Gram-negatius als tensioactius 1414RAc i 1212RAc. Un comportament molt interessant és la gran susceptibilitat a la lisi provocada pels tensioactius en els protozous de *Leishmania*, en comparació en les cèl·lules de mamífers. Aquesta especificitat en els protozous de *Leishmania* dona peu a una possible aplicació dels XXRAc com a agents leishmanicides. Aquests estudis, juntament amb d'altres resultats, han donat lloc a la sol·licitud d'una patent amb **Ref.: ES1641.261BIS**, registrada el 15 de desembre de 2009 pel CSIC (veure l'Apèndix II).

A partir del comportament microbiològic observat, la resistència dels bacteris Gram-negatius als XXRAc s'atribueix a la incapacitat dels propis tensioactius sintètics de pertorbar la membrana externa, característica d'aquests bacteris, que actua com a barrera permeable i selectiva a un ampli rang de soluts. Per poder presentar activitat antimicrobiana, és necessari que els tensioactius siguin capaços de pertorbar la membrana externa del bacteri per tal de poder permeabilitzar la membrana interna de fosfolípid, la integritat de la qual és essencial per a la seva viabilitat biològica. Aquests

arguments estan d'acord amb la gran permeabilitat aconseguida pels XXRAc en cèl·lules eucariotes, tant les de *Leishmania* com les de mamífers, degut a la manca de membrana externa. Un comportament similar va ser observat per Jenssen H i col., 2006, amb pèptids antimicrobians eucariotes fortament catiònics. Els autors van argumentar que aquesta selectivitat dels pèptids antimicrobians en bacteris respecte a les cèl·lules eucariotes era deguda a la forta interacció electrostàtica amb els fosfolípids aniònics situats a la superfície dels bacteris (l'àcid lipoteicoic pels bacteris Gram-positius i els grups fosfats dels lipopolisacàrids pels bacteris Gram-negatius), a diferència de les cèl·lules eucariotes on hi predominen els lípids neutres. Pels XXRAc, també s'ha observat una distinció entre els petits i els grans eucariotes, ja que existeix una major susceptibilitat en la línia tumoral macrofàgica que en la dels eritròcits i queratinòcits.

D'acord amb els resultats que es detallen a continuació, l'origen de la disminució de la viabilitat és la pèrdua de la funció com a barrera, de la membrana plasmàtica. S'ha arribat a aquesta conclusió basant-nos en els resultats obtinguts amb els assaigs en *L. donovani* (veure *Article I – Figura 6*). Un augment de la sonda fluorescent SYTOXTM introduïda en el citoplasma està directament associada amb un augment de la permeabilitat de la membrana plasmàtica. A més, s'observa en paral·lel una pèrdua de viabilitat. Les concentracions de tensioactiu requerides per l'alliberament de l'hemoglobina (64 kDa) dels eritròcits, estan dins del rang que també permet l'entrada de SYTOXTM ($M_w=600$ g/mol) en el protozou de *Leishmania*. És per aquest motiu que s'ha descartat la possibilitat de la formació de porus discrets a les membranes com a justificació del guany de permeabilitat induït pels XXRAc. La possibilitat de que els tensioactius dispersats, en forma de micel·les o vesícules, puguin solubilitzar alguns dels components lipídics de la membrana (efecte detergent) no es pot descartar, però sembla ser poc favorable degut a la baixa solubilitat, de l'ordre del micromolar, dels XXRAc emprats.

A partir dels resultats obtinguts per espectroscòpia d'infraroig IRRAS de les monocapes adsorbides XXRAc/DPPC (veure l'*Article II*), considerant en aquest cas el fosfolípid DPPC com a component majoritari de les membranes biològiques, s'ha proposat una hipòtesi que podria explicar el mecanisme de l'activitat antimicrobiana dels diacilglicerols d'arginina. Aquesta hipòtesi està relacionada amb l'adsorció del

tensioactiu a les membranes lipídiques que donaria lloc a la formació de regions fluides. Aquesta fluïdesa seria la responsable de la pertorbació de l'estructura de la membrana, causant canvis en la seva hidrofobicitat i en les seves propietats de difusió lateral.

S'ha observat una gran correlació entre l'activitat microbiològica dels XXRAc i la longitud de cadena alifàtica. Un increment en la longitud de cadena de dos àtoms de carboni, i per tant un increment en la hidrofobicitat, indueix una disminució important en l'activitat, especialment en els protozous de *Leishmania*.

A continuació, s'han ampliat els estudis microbiològics dels XXRAc (veure *Article V*), on s'ha emprat un **medi de cultiu complet** (sèrum, proteïnes, vitamines, ...) per simular millor les condicions reals fisiològiques. Per obtenir més informació respecte a la lisi inespecífica de les cèl·lules hoste eucariotes observada en el medi de cultiu senzill, s'ha determinat l'activitat hemolítica dels tensioactius monocatiònics XXRAc (1414RAc i 1212RAc) i la dels seus homòlegs no N^α-acetilats (N^α-lliures) XXR (1414R i 1212R), les estructures dels quals es troben representades a l'*Article V – Esquema 1*. Al pH de treball, proper a 7, el grup α-amino dels tensioactius XXR es troba desprotonat i, per tant, tant els XXRAc com els XXR actuaran amb una única càrrega neta positiva. Però l'acetilació de l'amina primària dels XXRAc suposa la introducció d'un punt d'hidrofobicitat en el cap polar en comparació amb els tensioactius N^α-lliures XXR.

En aquestes condicions experimentals, els diacilglicerols d'arginina XXRAc (veure *Article V – Figura 1*) presenten una activitat hemolítica lleugerament superior a l'observada en un medi de cultiu senzill. Comparant l'activitat hemolítica dels diacilglicerols d'arginina N^α-acetilats XXRAc amb la dels seus homòlegs N^α-lliures XXR, s'observa una reducció significativa en la lisi dels eritròcits. També, en reduir de 14 a 12 àtoms de carboni la longitud de les cadenes hidrocarbonades dels tensioactius XXR, disminueix considerablement l'activitat hemolítica. Mentre que aquesta mateixa disminució en la hidrofobicitat de les cadenes hidrocarbonades no provoca efectes significatius en l'activitat hemolítica dels tensioactius XXRAc. Per tant, l'activitat dels diacilglicerols d'arginina en cèl·lules eucariotes sembla modulada en gran part per l'acetilació del cap polar del tensioactiu.

La concentració de tensioactiu XXRAc necessària per lisar el 50% dels eritròcits en el medi de cultiu complet, és inferior a la requerida en els experiments d'hemòlisi en un medi senzill. Això implica que els tensioactius 1414RAc i 1212RAc, en condicions properes a les fisiològiques, presenten una gran activitat hemolítica i, per tant, una possible elevada toxicitat en les cèl·lules eucariotes. Basant-nos en la forta dependència observada entre l'activitat en cèl·lules eucariotes i l'acetilació del cap polar del tensioactiu, una possibilitat per reduir aquesta citotoxicitat seria la formulació d'aquests diacilglicerols d'arginina XXRAc amb un fosfolípid aniònic, per tal de modular la càrrega global de les vesícules cataniòniques resultants. Aquests estudis es descriuran a la *Secció 7.4*.

Un cop estudiat el diferent comportament dels diacilglicerols d'arginina en les cèl·lules eucariotes mitjançant l'assaig d'hemòlisi, s'ha estudiat l'efecte de l'acetilació del cap polar i de la longitud de cadena dels diacilglicerols d'arginina en bacteris com a exemple de microorganismes procariotes. S'ha assajat l'activitat antimicrobiana dels tensioactius N^o-acetilats, 1414RAc i 1212RAc, i la dels seus homòlegs estructurals N^o-lliures, 1414R i 1212R, en el bacteri Gram-negatiu *Acinetobacter baumannii* i en tres bacteris Gram-positius *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Bronchothrix thermosphacta* (veure *Article V – Taula 2*). L'activitat antimicrobiana dels tensioactius XXRAc i XXR mostra una activitat pràcticament nul·la en els tres bacteris Gram-positius assajats. En canvi, els tensioactius 1414RAc i 1212RAc, presenten una activitat antimicrobiana en el bacteri Gram-negatiu *A. baumannii* molt superior a l'observada en un medi de cultiu senzill, essent uns resultats molt prometedors respecte a la seva possible aplicació com a tensioactius pulmonars, ja que aquest bacteri és el responsable de malalties infeccioses al pulmó. També s'observa un increment de l'activitat antimicrobiana dels tensioactius XXRAc en reduir la longitud de la cadena hidrocarbonada, mentre que la no acetilació del cap polar del tensioactiu, provoca una important reducció de l'activitat antimicrobiana. Aquests resultats posen de manifest la complexa relació existent entre l'activitat antimicrobiana i l'estructura del cap polar dels tensioactius. La hipòtesi que justificaria la lisi privilegiada de la membrana dels eritròcits respecte a la del bacteri Gram-negatiu es basa en la presència de la membrana externa específica dels bacteris que evita l'accés dels tensioactius a la membrana citoplasmàtica. Per confirmar aquesta hipòtesi s'han realitzat experiments

combinant la polimixina E (PXE) amb els dos diacilglicerols d'arginina, 1414RAc i 1212RAc, que presenten activitat. Les polimixines són uns pèptids catiònics antibiòtics i actius en bacteris Gram-negatius. El seu mecanisme d'acció consisteix en la unió i permeabilització de la membrana externa del bacteri, interaccionant amb el lipopolisacàrid aniònic que és el component majoritari de la membrana externa. El pèptid PXE, a concentracions superiors a 0.5 μM , sensibilitza al bacteri i el fa vulnerable a l'acció del tensioactiu (veure *Article V – Figura 2*). A aquesta concentració de PXE, tant el pèptid com el tensioactiu són pràcticament inactius per ells mateixos, amb el que es produeix un sinergisme entre els dos components. S'ha avaluat aquesta sinergia entre PXE i els dos tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina 1414RAc i 1212RAc, a partir de la fracció de concentració inhibidòria (FIC), obtenint valors de 0.49 i 0.37, respectivament, que corroboren el fort sinergisme positiu entre els dos components. Aquest sinergisme s'atribueix a la formació d'agregats mixtes amb una estequiometria indeterminada. En un futur serà necessari realitzar experiments addicionals que puguin aclarir aquest punt.

Degut a la gran influència de la hidrofobicitat del cap polar dels tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina en l'activitat hemolítica, s'ha decidit assajar una estratègia de formulació com a vesícules cataniòniques amb l'objectiu de reduir la seva citotoxicitat.

7.4. Propietats de vesícules catanioniques

En aquesta Secció es presenten alguns dels resultats clau dels Articles IV i V (Manuscrit).

Els assaigs microbiològics realitzats fins ara dels tensioactius sintètics derivats dels diacilglicerols d'arginina XXRAc, han manifestat una activitat antimicrobiana satisfactòria en els bacteris Gram-negatius, però al mateix temps han evidenciat una activitat hemolítica important que impediria el seu ús com a agents antimicrobians en preparats farmacèutics pels éssers vius. Per reduir la citotoxicitat d'aquests tensioactius, s'ha proposat una estratègia de formulació com a vesícules catanioniques formades per un diacilglicerol d'arginina i un fosfolípid aniònic. Les vesícules catanioniques permeten modular la càrrega global del sistema, donant lloc a vesícules carregades tant positivament com negativament, depenent de la proporció dels compostos iònics que formen la mescla.

L'interès per l'estudi d'aquest tipus de vesícules catanioniques (tensioactiu catiònic/fosfolípid aniònic), ha promogut un estudi de les seves propietats mitjançant la determinació del potencial- ζ i de les dimensions de les vesícules catanioniques, en funció de la fracció molar del tensioactiu ($\chi_{\text{tensioactiu}}$) i de l'acidesa del medi, en aigua i en 10^{-3} M HCl. Com a tensioactius catiònics, s'han estudiat els diacilglicerols d'arginina 1414RAc i 1212RAc, donant lloc a mescles catanioniques *pseudo-tetra-catenàries*. A efectes comparatius, s'han inclòs en l'estudi dos tensioactius monoacilats derivats de l'aminoàcid arginina, LAM i 140RAc, els quals també han estat sintetitzats al nostre grup d'investigació i les estructures dels quals es mostren a l'Article IV – Esquema 1. La inclusió d'aquests dos nous tensioactius ha permès l'estudi complementari de les propietats de les mescles catanioniques *pseudo-tri-catenàries*. Com a fosfolípid aniònic s'ha optat per la sal monosòdica de l'àcid 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatídic (DPPA) per presentar una estructura química molt similar a la del fosfolípid DPPC.

El **potencial- ζ i les dimensions de partícula** de les mescles catanioniques s'han estudiat mitjançant les tècniques de velocimetria Doppler làser i de dispersió de llum dinàmica, respectivament. Per totes les mescles catanioniques estudiades (veure Article IV – Figures 1, 2, S1 i S2), els valors experimentals del potencial- ζ mostren una variació des de valors negatius, corresponents a les vesícules del fosfolípid DPPA,

fins a valors positius per les mescles on el tensioactiu és el component majoritari. El diàmetre de partícula s'incrementa en el mateix sentit de la $\chi_{\text{tensioactiu}}$ fins arribar a la relació equimolar, on es produeix la precipitació dels agregats. Els límits d'aquesta zona de precipitació no s'han determinat en detall. En termes generals, s'observa una correlació inversa entre la densitat de càrrega superficial i el diàmetre de les vesícules. És per això que, a fraccions properes a la neutralització de la càrrega, les dimensions de les partícules creixen de manera brusca, donant lloc a la separació de fases amb una càrrega global pràcticament nul·la. El potencial- ζ és proporcional al moment elèctric per unitat d'àrea, és a dir, que els canvis en la composició donaran lloc a modificacions del potencial- ζ . Per tant, a densitats de càrrega properes a zero tindrà lloc la disminució del gruix de la doble capa, provocant una reducció de l'estabilització de les vesícules cataniòniques les quals presentaran una solubilitat mínima i com a conseqüència precipitaran.

Les vesícules pures de DPPA experimenten un augment en les seves dimensions en acidificar el medi. En aquestes condicions d'acidesa, el cap polar del fosfolípid DPPA constituït pel grup fosfat ($-PO_4^-$; $pK_a \sim 3.5$), està parcialment neutralitzat degut a la captació de protons.

Sorprenentment, en medi aquós, petites addicions de tensioactiu provoquen un increment del valor absolut del potencial- ζ respecte a les vesícules pures de DPPA, sent més significatiu aquest increment per les mescles formades per LAM i 1212RAC. En canvi, en medi àcid, que podria induir variacions de càrrega en les molècules, el potencial- ζ pràcticament es manté constant. Respecte al diàmetre de les partícules, l'addició de petites quantitats de tensioactiu a DPPA provoca un increment tant en medi aquós com en medi àcid.

A continuació, es descriuen els resultats obtinguts pels dos sistemes cataniònics *pseudo-tri-catenaris*, formats per un tensioactiu monoacilat (LAM i 140RAC) i el fosfolípid aniònic DPPA (veure *Article IV – Figura 1 i S1*, respectivament). La principal diferència observada entres aquestes mescles és l'amplada de la zona de precipitació, essent aquesta molt més estreta per les mescles formades pel tensioactiu 140RAC que pel LAM. Com que no es disposa de suficient informació respecte a aquesta zona de precipitació, els límits tindran només un significat qualitatiu. En augmentar la $\chi_{\text{tensioactiu}}$ per sobre de la zona de precipitació, s'evidencia una disminució

progressiva de la mida de les partícules fins donar lloc a estructures micel·lars per sobre de la $\chi_{\text{tensioactiu}}$ de 0.8 per el LAM i de 0.6 per el 140RAc. Aquests tensioactius monoacilats formen micel·les a concentracions superiors al seu valor de cmc (LAM, 4 ± 1 mM fins a 100 mM; 140RAc, 1 mM). Per tant, a la concentració de treball de 0.2 mM, el tensioactiu només serà present com a monòmer, ja sigui en el si de la solució o entre les vesícules o ambdós. A χ_{LAM} lleugerament superiors a la relació equimolar, s'observen grans diferències en les dimensions de partícula, dependent de l'acidesa del medi. En medi aquós, a pH pràcticament neutres, s'observen vesícules molt grans mentre que en medi àcid són estructures relativament petites. També s'han observat grans diferències en les seves intensitats dispersades a partir de DLS. Les raons d'aquestes diferències radica en la captació del protó i en la neutralització parcial de DPPA, mentre que el tensioactiu incrementa la seva càrrega degut a que el seu pK_a està al voltant de 9.

Un cop analitzats els dos sistemes cataniònics *pseudo-tri-catenaris*, s'interpretaran en detall els dos sistemes cataniònics *pseudo-tetra-catenaris*, formats per un diacilglicerol d'arginina 1414RAc i 1212RAc, i el fosfolípid aniónic DPPA (veure *Article IV – Figures S2 i 2*, respectivament). A fraccions properes a la relació equimolar, no s'han obtingut diferències significatives respecte als sistemes cataniònics estudiats fins ara. La zona de precipitació de les vesícules cataniòniques formades pels diacilglicerols d'arginina està compresa entre les fraccions molars de 0.4 i 0.6, i presenta una amplada superior a l'obtinguda amb el tensioactiu 140RAc. El potencial- ζ mostra una forta dependència amb l'acidesa del medi. Per les mescles cataniòniques 1414RAc/DPPA, tant el tensioactiu com el fosfolípid formen vesícules en les condicions experimentals assajades. Quan el fosfolípid DPPA és el component majoritari, les vesícules cataniòniques resultants presenten càrrega global negativa, mentre que quan és el minoritari, la càrrega és positiva, arribant a valors de potencial- ζ propers a 60 mV. Per vesícules enriquides en DPPA, l'addició d'àcid redueix els valors absoluts del potencial- ζ en el mateix sentit que en els monoacilats (disminució del grau d'ionització del grup fosfat). Per mescles enriquides en 1414RAc, l'àcid fa disminuir el diàmetre de partícula i incrementa el potencial- ζ . Aquest efecte s'atribueix a l'augment de la ionització dels grups guanidini, que a una concentració de 0.2 mM en medi aquós presenta una ionització del 90% pel 1212RAc i del 96% pel

1414RAc. Mentre que el grau d'ionització en medi àcid (10^{-3} M HCl) és pràcticament del 100% pels dos diacilglicerols d'arginina.

Les petites diferències observades en les mescles catanioniques 1212RAc/DPPA respecte a les del 1414RAc/DPPA, poden ser atribuïdes a la menor partició del 1212RAc en forma de vesícules en comparació amb el 1414RAc, degut a la major solubilitat d'aquest tensioactiu i per tant a la major possibilitat de formar micel·les. En mescles enriquides en 1212RAc, és d'esperar que la càrrega de les vesícules augmenti en disminuir el pH, degut a la ionització del grup guanidini. Aquest comportament no s'observa en els components purs. A fraccions properes a la relació equimolar, les dimensions de partícula divergeixen més significativament en mescles que contenen diacilglicerols en comparació amb els tensioactius monoacilats, degut a la incipient precipitació, a partir de la qual, en augmentar la $\chi_{1212RAc}$, es recupera el rang original de les dimensions.

Basant-nos en els resultats de la caracterització de les vesícules catanioniques formades per un tensioactiu derivat de l'aminoàcid arginina (LAM, 140RAc, 1414RAc, 1212RAc) i el fosfolípid aniónic DPPA, cal destacar un comportament repetitiu observat en addicionar petites quantitats de qualsevol dels tensioactius estudiats a les vesícules de DPPA. L'augment del valor absolut del potencial- ζ podria ser degut a un increment en la densitat de càrrega superficial de les partícules i/o a una disminució en les seves dimensions.

L'increment en la mobilitat electroforètica podria ser degut a una transformació de vesícules mixtes a micel·les allargades com també a un trencament o perforació de les vesícules. Aquestes dues hipòtesis es donarien més probablement en sistemes catanionics formats per un tensioactiu monoacilat que pels formats per diacilglicerols d'arginina. És per això que s'ha realitzat la *caracterització morfològica* de les vesícules catanioniques LAM/DPPA a una χ_{LAM} de 0.2, mitjançant la tècnica de criomicroscòpia electrònica de transmissió (Cryo-TEM) (veure *Article IV – Figura 3*). Aquesta tècnica no ha permès treballar a la concentració emprada fins ara de 2 mM, ja que a aquesta concentració, i degut al reduït volum de mostra emprat, el nombre de vesícules és baix i la localització de les mateixes al microscopi és difícil. És per aquest motiu que l'observació s'ha fet amb una mostra de concentració total de 20 mM. La visualització de les imatges del sistema catanionic LAM/DPPA, no evidencia ni la

transformació a micel·les allargades ni la perforació de les vesícules mixtes. L'observació d'aquest sistema cataniònic mostra vesícules, similars a les del fosfolípid DPPA (veure *Article IV – Figura S3-A*), a més d'una gran quantitat tant de vesícules bilaminars com de vesícules no esfèriques. En la imatge del tensioactiu pur 1212RAC (veure *Article IV – Figura S3-B*), l'observació de vesícules petites no descarta la presència de micel·les.

S'ha obtingut informació addicional respecte a la morfologia dels agregats formats pel fosfolípid DPPA, i les seves mesclades amb LAM, 1212RAC i 1414RAC ($\chi_{\text{tensioactiu}}$ de 0.2) mitjançant la tècnica de dispersió de raigs X a angle petit (SAXS) (veure *Article IV – Figura 4*). Les corbes d'intensitat en funció del vector de dispersió de les vesícules cataniòniques no mostren diferències significatives amb la corba corresponent a les vesícules pures de DPPA, posant de manifest l'estructura laminar de les vesícules cataniòniques mixtes, tal i com ja s'havia observat amb la criomicroscòpia. Només s'observa una lleugera tendència en la reducció del gruix hidrofòbic en reduir la cadena alquílica dels tensioactius. Per tant, el fet que no hi hagi cap evidència d'una transformació de vesícules cap a micel·les, fa que l'augment en el valor absolut del potencial- ζ sigui una qüestió encara oberta i a la que ha calgut buscar-hi resposta.

Un altre aspecte que podria justificar l'increment en el valor absolut del potencial- ζ seria una disminució en el **grau d'associació del contraió sodi** a les vesícules, és a dir, un alliberament d'ions sodi com a conseqüència de la interacció entre el tensioactiu catiònic i el fosfolípid aniònic DPPA. Per relacionar l'activitat d'aquests ions sodi amb la càrrega neta de les vesícules, s'ha utilitzat la tècnica de la potenciomètria mitjançant un elèctrode selectiu d'ions sodi. Prèviament s'ha demostrat que, a les condicions de pH experimentals, els protons no interfereixen en les mesures dels ions sodi. S'ha mesurat la força electromotriu (*fem*) de l'estàndard de clorur sòdic i de les dispersions de DPPA, en funció de la concentració total de sodi (veure *Article IV – Figura 5*). Per la dispersió del fosfolípid DPPA, l'activitat de l'ió sodi correspon a l'abscissa de la corba de clorur sòdic a la mateixa ordenada. Experimentalment s'ha mesurat amb l'elèctrode selectiu una activitat dels ions sodi lliures independent de la concentració i corresponent a 0.15 càrregues netes/molècula (veure *Article IV – Figura 6*). Per tant caldria esperar un grau d'associació dels ions sodi a les vesícules

de DPPA corresponent a 0.85. Però, s'ha de tenir en compte que el sistema està format per vesícules i que només la meitat del sodi lliure és accessible a la sonda de l'elèctrode selectiu, ja que l'altre meitat es troba a l'interior de les vesícules. Per tant, el grau d'associació dels ions sodi a les vesícules formades pel fosfolípid aniònic DPPA correspon a 0.7. També s'ha estudiat l'activitat dels ions sodi en afegir progressivament quantitats de LAM al fosfolípid DPPA. El bruscat increment observat dels valors de f_{em} suggereix una forta activitat dels ions sodi. Per tal d'interpretar aquests resultats, s'ha representat la càrrega neta/molècula en funció de la χ_{LAM} (veure *Article IV – Figura 6*). Encara que les barres d'error són considerables, s'observa una tendència definida en afegir petites quantitats de LAM, que induïx un fort augment de la càrrega neta/molècula, estabilitzant-se a χ_{LAM} superiors a 0.1, i essent independent de la concentració total de tensioactiu. Kamenka N i col. van estudiar el grau d'associació del contraió mitjançant mesures de difusió de mesclures cataniòniques. En afegir un tensioactiu catiònic (ió bromur com a contraió) a un d'aniònic (ió sodi com a contraió) van observar un increment en el coeficient de difusió del sodi, per l'alliberament del mateix, mentre que la difusió del bromur es va mantenir constant. A l'inici de la formació de les vesícules, es va obtenir una forta reducció en tots dos coeficients de difusió. Aquest efecte va ser atribuït a l'increment dels contraions associats amb les vesícules. Aquestes observacions són considerablement diferents a les observades en aquesta tesi, ja que inicialment s'ha partit de sistemes vesiculars que ni es transformen en micel·les ni són perforats en presència de petites quantitats de tensioactiu. Aquest augment de la càrrega neta està d'acord amb el comportament observat del potencial- ζ . Probablement, el motiu del fort alliberament dels ions sodi associats a la vesícula sigui la deslocalització iònica degut a l'estabilització de la càrrega gràcies a la interacció amb els caps polars del LAM.

Tal i com s'ha introduït a l'inici d'aquesta secció, l'estratègia de formulació com a vesícules cataniòniques dels diacilglicerols d'arginina té com a objectiu principal la millora de les propietats terapèutiques dels tensioactius purs, mitjançant la reducció de la seva citotoxicitat, per així fer viable la seva inclusió en formulacions de tensioactius pulmonars. Per tant, s'ha estudiat l'*activitat microbiològica* de les vesícules cataniòniques XXRAc/PG, formades per un tensioactiu catiònic derivat dels

diacilglicerols d'arginina i el fosfatidilglicerol (fosfolípid aniònic majoritari en els tensioactius pulmonars), a $\chi_{\text{tensioactiu}}$ de 0.2 i 0.8 per estudiar l'efecte de la càrrega neta. També s'ha estudiat l'activitat microbiològica de les vesícules catióniques formades per un diacilglicerol d'arginina XXRAc i el fosfolípid amfòter DPPC, sense manifestar diferències significatives respecte a l'activitat antimicrobiana i hemolítica dels tensioactius purs, tal i com era d'esperar.

Les conclusions 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 emprats. Per tant, els tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina formaran vesícules carregades negativament quan el fosfolípid PG sigui el component majoritari, i vesícules carregades positivament a fraccions enriquides amb el tensioactiu XXRAc. A una $\chi_{\text{tensioactiu}}$ de 0.2, caldria esperar un valor absolut del potencial- ζ més gran pel tensioactiu 1212RAc que pel 1414RAc, degut a la seva diferent cmc. I pel que fa a la zona de precipitació, aquesta estarà centrada en la relació equimolar i compresa entre les fraccions de 0.4 i 0.6.

En les mescles cataniòniques formades per XXRAc/PG (veure *Article V – Taula 3*), quan el fosfolípid PG és el component majoritari (vesícules carregades negativament), l'activitat en el bacteri Gram-negatiu *A. baumannii* disminueix lleugerament, mentre que l'activitat es manté pràcticament constant per les vesícules carregades positivament. En el bacteri Gram-positiu *S. Aureus*, les vesícules cataniòniques carregades negativament mostren una important millora de la seva activitat antimicrobiana i, paral·lelament, una important disminució de l'activitat hemolítica. Per tant, es conclou que l'activitat hemolítica i l'activitat antimicrobiana en bacteris Gram-positius segueixen una mateixa tendència, la qual va en sentit contrari a l'activitat antimicrobiana en bacteris Gram-negatius. Aquestes diferències en l'activitat microbiològica s'atribueixen a l'efecte de blindatge de les formulacions. Les vesícules cataniòniques carregades negativament tindran una major afinitat per les superfícies carregades positivament o les neutres. Encara que la càrrega superficial dels bacteris sigui negativa, l'entrada del tensioactiu a través de la membrana de peptidoglicà serà molt probablement en forma de parells iònics neutres (afavorit per la formulació). Un cop el tensioactiu accedeix a la membrana plasmàtica, la inserció del

fosfolípid negatiu probablement serà més complexa. Amb l'objectiu de proposar un possible mecanisme d'actuació de les vesícules cataniòniques XXRAc/PG amb el fosfolípid DPPC com a model de membrana, s'estudiarà en un futur la caracterització fisicoquímica de monocapes mixtes formades per XXRAc/PG/DPPC.

Independentment de la seva actuació al pulmó, la qual en aquest estadi de la investigació no és del tot prometedora, 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. Aquesta estratègia de formulació ha donat lloc a la sol·licitud d'una patent amb **Ref.: ES1641.261**, registrada el 13 de novembre de 2009 pel CSIC (veure l'*Apèndix I*).