

## 15. Biofísica

### **Surfactantes derivados de arginina: propiedades fisicoquímicas y mecanismo de interacción con membranas biológicas.**

Hermet, Melisa; Fait, M. Elisa\*; Bakas, Laura S.\*

hermet.melisa@biol.unlp.edu.ar; fait.marielisa@biol.unlp.edu.ar; bakas@biol.unlp.edu.ar.

\*Orientadores

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

---

### **Resumen**

Se caracterizaron algunas de las propiedades fisicoquímicas de dos surfactantes derivados de arginina, Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, así como su interacción con membranas biológicas utilizando glóbulos rojos humanos (GRH) como sistema modelo. Las medidas de tensión superficial de soluciones de distinta concentración de los surfactantes evidenciaron la capacidad de los mismos de reducir la tensión superficial del agua a un valor constante, mostrando además concentraciones micelares críticas (CMC) definidas. La observación de agregados cilíndricos de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> a través de microscopía de fuerza atómica, corroboró las predicciones basadas en los valores del parámetro de empaquetamiento. Los estudios de la actividad hemolítica evidenciaron que la solubilización de la membrana de GRH es inducida por los agregados de los surfactantes, ya que sólo se observó lisis celular a concentraciones mayores que sus respectivas CMC. Los cambios morfológicos observados en los GRH expuestos a los surfactantes permitieron apreciar la combinación de dos fenómenos involucrados en el mecanismo hemolítico. Por un lado, la incorporación de monómeros de surfactante en la capa externa de la membrana de los GRH provoca la desestabilización de la misma con la consiguiente formación de equinocitos y liberación de microvesículas. Por el otro, la extracción de los componentes de la membrana, resultante de colisiones con los agregados de los surfactantes, provoca una disminución del área relativa de la capa externa, favoreciendo la aparición de estomatocitos.

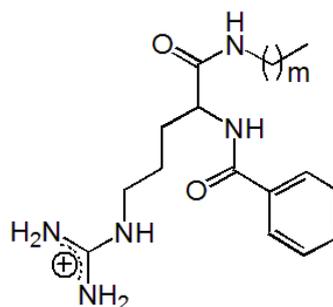
**Palabras clave:** Surfactantes derivados de arginina, glóbulos rojos humanos, actividad hemolítica, solubilización de membranas, morfología de eritrocitos.

## Introducción

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

Dos surfactantes derivados de arginina, *N*α-benzoil-L-arginina-decilamida (Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>) y *N*α-benzoil-L-arginina-dodecilamida (Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>) (Fig. 1), fueron sintetizados mediante biocatálisis empleando papaína (una peptidasa obtenida a partir del látex de frutos de *Carica papaya*) adsorbida sobre poliamida como biocatalizador. El hecho de que estos compuestos hayan demostrado tener actividad antimicrobiana de amplio espectro, baja irritabilidad ocular y baja citotoxicidad (Fait *et al.*, 2015) ha sugerido su uso como aditivo en formulaciones farmacéuticas. Sin embargo, los compuestos capaces de inhibir el crecimiento microbiano también pueden resultar tóxicos frente a otros tipos celulares causando efectos adversos,

como la hemólisis. Pape *et al.* (1987) han descrito un método simple, rápido y efectivo para evaluar la toxicidad de surfactantes, basado en el uso de glóbulos rojos como sistema modelo para el análisis de la integridad de membrana.



**Fig. 1** Estructura química de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>, con m=9, 11 y n=m+1.

## Objetivos

1. Obtener los valores de concentración micelar crítica de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> mediante medidas de tensión superficial y caracterizar la forma de los agregados mediante microscopía de fuerza atómica.
2. Estudiar el mecanismo hemolítico de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> utilizando glóbulos rojos humanos como sistema modelo.

## Materiales y Métodos

### Reactivos

Los glóbulos rojos humanos (GRH) fueron aislados a partir de sangre de voluntarios sanos de nuestro personal de laboratorio (CIPROVE, La Plata, Argentina). Seroalbúmina bovina (BSA) fue comprada a Fedesa S.A..

Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> fueron sintetizados en nuestro laboratorio según lo descrito por Fait *et al.* (2015). El resto de los reactivos fue de grado analítico.

**Declaración ética.** La sangre humana fue obtenida de voluntarios sanos pertenecientes a nuestro personal de laboratorio (Centro de Investigación de Proteínas Vegetales, CIPROVE-CIC-UNLP, La Plata, Argentina).

### **Concentración micelar crítica (CMC)**

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

### **Microscopía de fuerza atómica (AFM)**

La forma de los agregados de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> fue caracterizada en aire y en celda fluida por AFM en modo de contacto intermitente a 25°C. La concentración de surfactante empleada en cada ensayo fue 5 veces la CMC. En todos los casos, 20  $\mu$ l de la solución del tensioactivo fueron colocados sobre mica muscovita recientemente descamada. Para los ensayos en aire, las muestras

fueron secadas bajo corriente de N<sub>2</sub> y analizadas utilizando sondas de nitruro de silicio (RTESP, Veeco, radios de punta 8-12 nm, 271-311 kHz, constante de fuerza 40 N/m). En cuanto a las muestras en celda fluida (agua), se emplearon sondas NPS10 (radios de punta 8-12 nm, 2-10 kHz, constante de fuerza 0,06 N/m). Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio MultiMode Scanning Probe (Veeco) equipado con un controlador Nanoscope V (Veeco) a una velocidad de escaneo estándar (1Hz).

### **Preparación de la suspensión de GRH**

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

### **Cinética de hemólisis**

Se evaluó el grado de hemólisis inducido por Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> a distintos hematocritos (0,075; 0,15; 0,30 y 0,45% v/v). Para ello, se prepararon diluciones seriadas de soluciones de los surfactantes en PBS en una placa de microtitulación de 96 pocillos. En cada ensayo, se añadieron 100  $\mu$ l de la suspensión de GRH a 100  $\mu$ l de las diluciones de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>. Las placas fueron incubadas a 37°C en un detector multimodo DTX 880 (Beckman

Coulter), midiéndose la densidad óptica a 595 nm ( $DO_{595}$ ) en intervalos de 1 min por un período total de 1 h, con agitación lineal entre mediciones. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. Con los datos obtenidos se construyeron las curvas de cinética de hemólisis, graficando la disminución de la  $DO_{595}$  en función del tiempo. El porcentaje de hemólisis para 1 h de incubación fue calculado según la Ec. (1):

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

donde  $DO_c$  es la  $DO_{595}$  de los GRH incubados en PBS,  $DO_x$  es la  $DO_{595}$  de los GRH tratados con diferentes concentraciones de los surfactantes y  $DO_{tx}$  es la  $DO_{595}$  de los GRH incubados en presencia de Tritón X-100 1% v/v (100% hemólisis). A continuación, se construyeron las curvas dosis-respuesta para cada hematocrito, ajustándose cada conjunto de datos a una función sigmoidea (Boltzmann) utilizando el software OriginPro8®, y se aplicó el análisis propuesto por Preté *et al.* (2002).

### Caracterización morfológica de los GRH

Se estudiaron los cambios morfológicos en GRH tratados con Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> mediante microscopía óptica. Para ello, se depositaron alícuotas de GRH (10  $\mu$ l, hematocrito 0,075% en PBS adicionado con 1,0% p/v de BSA)

sobre portaobjetos revestidos con poli-L-lisina 0,001% v/v (Jay, 1975). Los cambios en la morfología celular fueron observados a través de un microscopio óptico con contraste de fases (NIKON Eclipse TS100) luego de la adición de 10  $\mu$ l de soluciones de distinta concentración de los surfactantes (300 y 1200  $\mu$ M para Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>; 280 y 1100  $\mu$ M para Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital NIKON 391CU 3.2M CCD y analizadas utilizando el software Micrometrics SE Premium®.

### Microscopía electrónica de transmisión

Las microvesículas fueron aisladas mediante el ultracentrifugado (100000 $\times$ g, 1 h) del sobrenadante de GRH (2% v/v) tratados con Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> (300  $\mu$ M) y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> (280 $\mu$ M); y fijadas por la adición de 10  $\mu$ l de glutaraldehído. Para su observación se utilizó la técnica de tinción negativa con ácido fosfotúngstico al 1% p/v como contrastante y un microscopio electrónico de transmisión JEM-1200EX II (Jeol).

### Resultados y Discusión

#### Concentración micelar crítica

Se ha sugerido cierto paralelismo entre la CMC de un surfactante y su coeficiente de partición entre la fase acuosa (polar) y la membrana (no polar). Heerklotz & Seelig (1974) han reportado una relación lineal entre el logaritmo de la

CMC y el logaritmo de la constante de partición del surfactante en la membrana ( $K$ ). Por este motivo el valor de CMC es un parámetro clave para entender el mecanismo involucrado en la solubilización de membranas inducida por surfactantes. Estos valores fueron determinados a partir de la intersección de las porciones lineales de las curvas de tensión superficial ( $\gamma$ ) vs el logaritmo de la concentración de surfactante (Fig. 2). De acuerdo a los resultados obtenidos, ambos compuestos fueron capaces de reducir la tensión superficial del agua a un valor constante. Se observó que para Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> el valor de CMC (0,085 mM) fue menor que para Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> (0,23 mM), lo que se puede explicar teniendo en cuenta el largo de la cadena hidrocarbonada: a mayor hidrofobicidad de la molécula (mayor longitud de la cola hidrocarbonada), mayor tendencia a formar agregados y menor será su CMC.

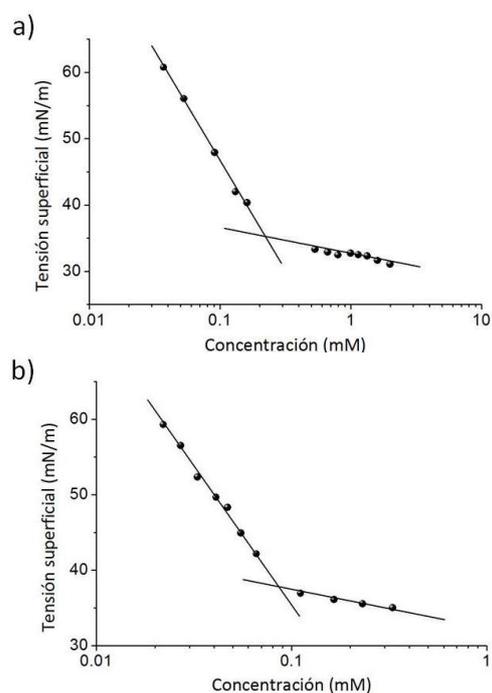
### Parámetros de empaquetamiento

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

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

donde  $v$  es el volumen de la cola no polar,  $l$  es el largo de la cadena no polar en configuración all-trans y  $A_o$  es el área ocupada por la cabeza polar. Valores de

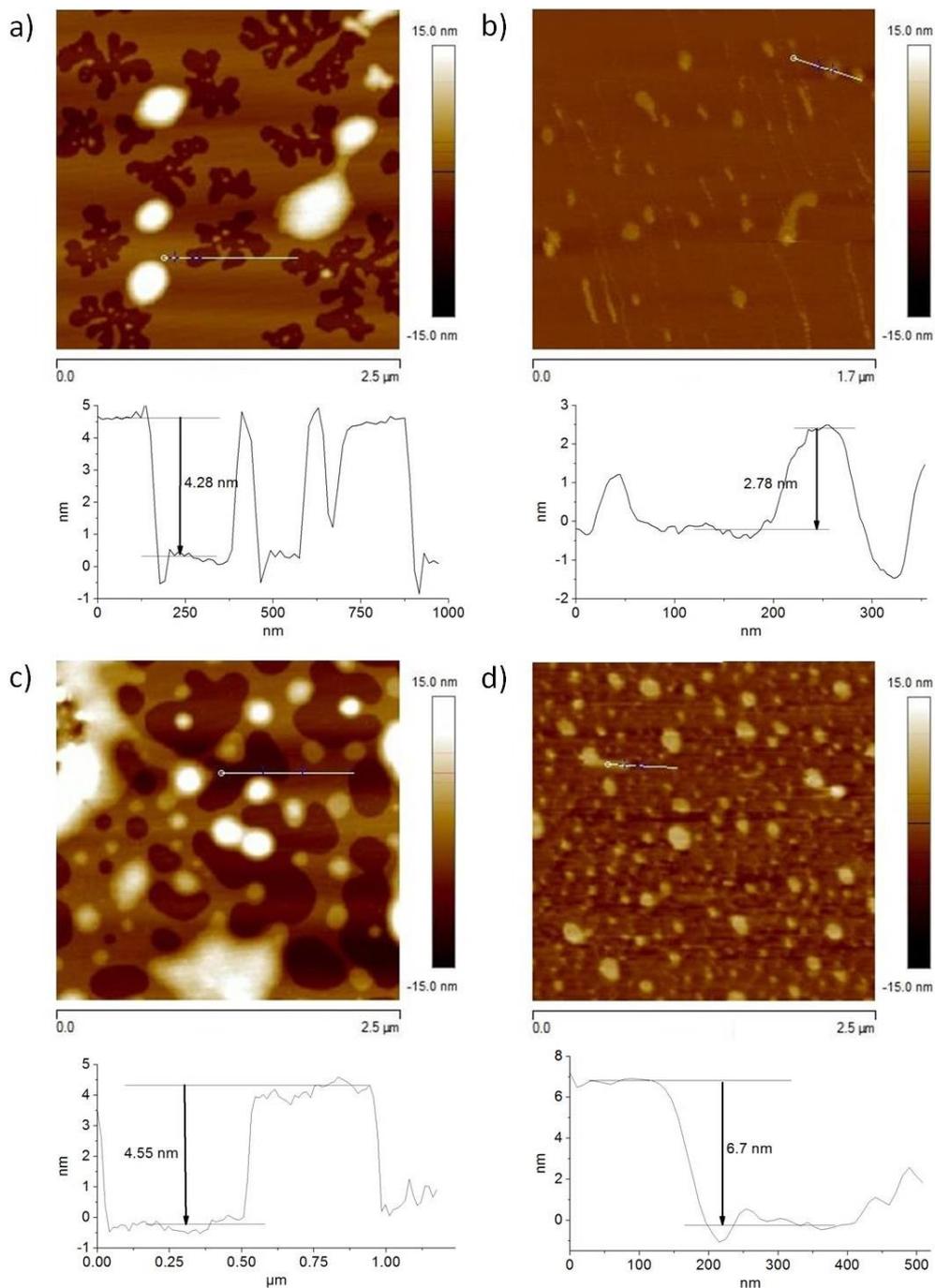
SPP entre 0,33 y 0,5 corresponden a una conformación cilíndrica, mientras que para  $SPP < 0,33$  los agregados tienden a adoptar formas esféricas. Tanto para Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> como para Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> los valores de SPP hallados (0,38 y 0,45, respectivamente) predicen la formación de agregados cilíndricos en ambos casos.



**Fig. 2** Tensión superficial vs concentración de surfactante: (a) Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y (b) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>.

### Microscopía de fuerza atómica

Se estudió el comportamiento de agregación de Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> en aire y celda fluida, mediante AFM (Fig. 3). En todos los casos, los perfiles obtenidos mostraron la existencia de mono- y bicapas de moléculas de tensioactivo, con alturas promedio entre 3 y 5 nm



**Fig. 3** Imágenes de AFM obtenidas para: (a, b) Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y (c, d) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, (a, c) en aire y (b, d) en celda fluída. Las imágenes se muestran en escala z de 30 nm representada por el brillo del color.

respectivamente. La presencia de regiones alternadas de mica sin cubrir y bicapas de surfactante fue evidenciada para Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> en aire (Fig. 3a y 3c). También se observó la adsorción de

agregados sobre las bicapas inicialmente formadas tanto en aire como en medio líquido. Estos agregados presentaron una amplia variedad de tamaños, con alturas entre 5 y 90 nm para Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>, y

entre 12 y 40 nm para Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>. Finalmente, en el caso de las imágenes adquiridas en celda fluida para ambos surfactantes, se evidenció la presencia de agregados cilíndricos (Fig 3b y 3c), corroborando las predicciones basadas en el SPP.

### **Cinética de hemólisis**

Para obtener más información acerca del mecanismo involucrado en el proceso hemolítico inducido por Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> se estudiaron las cinéticas de hemólisis de GRH. La Fig. 4 muestra los cambios en la DO<sub>595</sub> en función del tiempo para los GRH tratados con 6 concentraciones distintas de cada surfactante, tanto por debajo como por encima de sus respectivas CMC, para dos hematocritos (0,15 y 0,30% v/v).

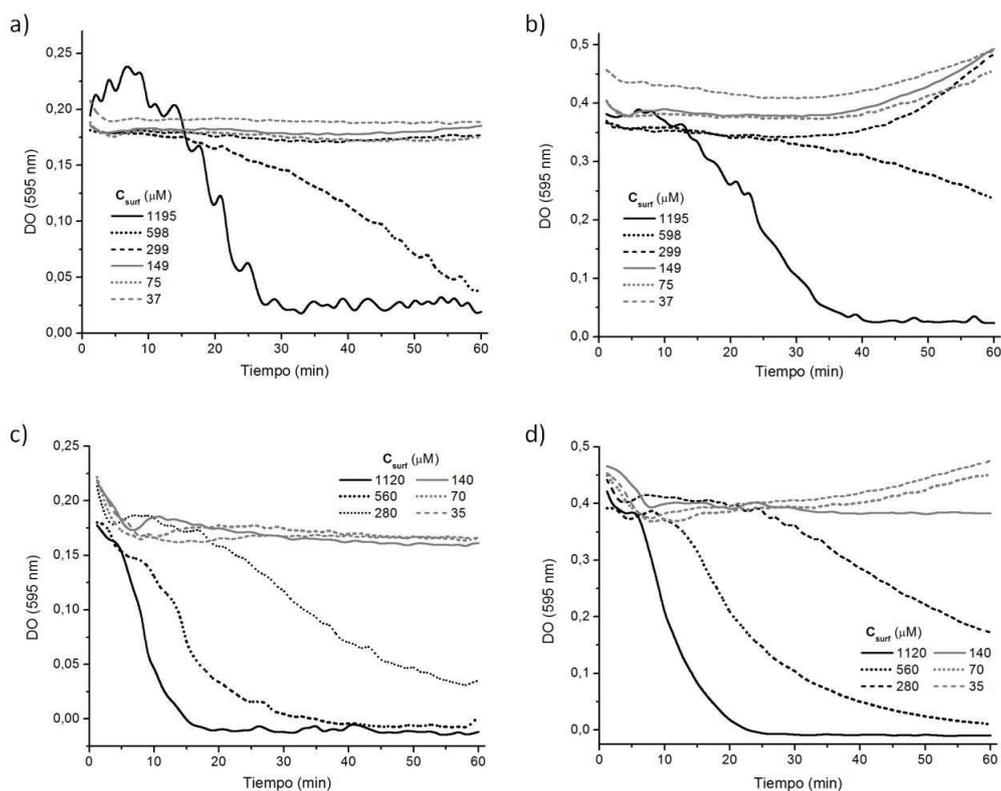
En el caso de las muestras incubadas con Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> sólo se observó la solubilización de las membranas (evidenciada por una disminución en la DO<sub>595</sub>) a concentraciones mayores que su CMC. Al aumentar el hematocrito, para tiempos de incubación mayores a 30 min a las menores concentraciones de surfactante, se notó un aumento en la DO<sub>595</sub> (Fig. 4b). Esto podría deberse a una agregación de los GRH mediada por los monómeros del surfactante. Por otro lado, para los GRH tratados con Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> se observó un comportamiento similar (Fig. 4c y 4d). Finalmente, el hecho de que la hemólisis solo fue evidente a concentraciones de

surfactante de 2,5 y 3,3 veces los valores de CMC para Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> respectivamente, sugiere que son los agregados los responsables de este efecto.

### **Cambios morfológicos en GRH inducidos por Bz-Arg-NHC<sub>n</sub>**

Se analizaron los cambios en la forma de GRH inducidos por Bz-Arg-NHC<sub>n</sub> utilizando un microscopio óptico con contraste de fases.

Las imágenes obtenidas revelaron una serie de cambios morfológicos que dependían no solo del largo de la cadena hidrocarbonada, sino también de la concentración de surfactante empleada (Fig. 5). Para los GRH tratados con Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> la secuencia de cambios morfológicos fue discocito → equinocito → esferocito para ambas concentraciones ensayadas (300 o 1200 μM). En el caso de Bz-Arg-NHC<sub>12</sub>, para la menor concentración empleada (280 μM) la secuencia observada fue discocito → equinocito → esferoequinocito, mientras que para la mayor concentración ensayada (1120 μM), la secuencia fue discocito → estomatocito → esferocito. Sólo se observó lisis luego de 6 min de incubación con Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> a una concentración igual a 1120 μM.

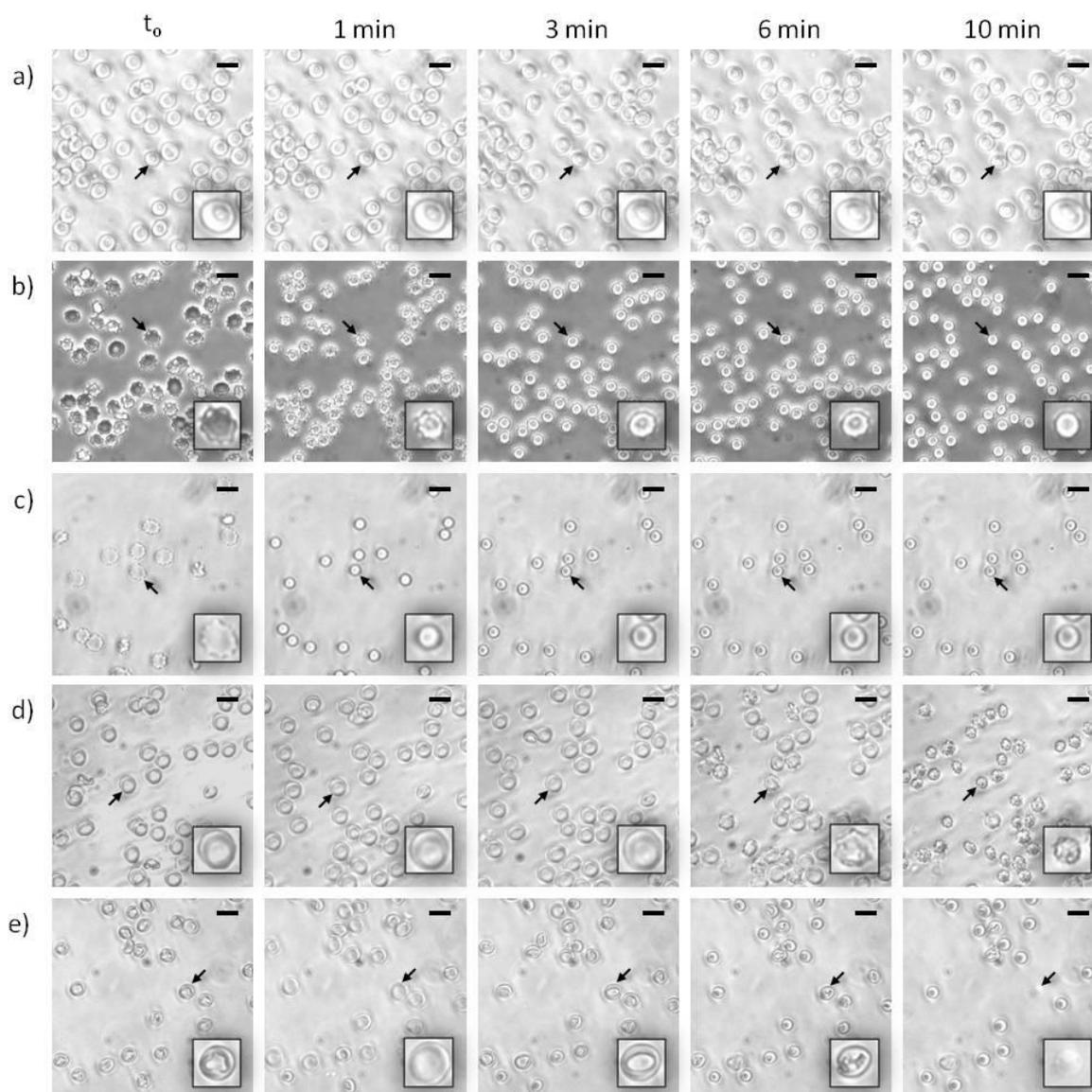


**Fig. 4** Cinética de hemólisis inducidas por (a, b) Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> y (c, d) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> en medio isotónico para hematocritos de 0,15% (a, c) y 0,30% (b, d) v/v.

A pesar de que las capas externa e interna de la membrana permanecen acopladas, alteraciones en la forma normal de los GRH pueden surgir debido a diferencias entre las áreas relativas de las mismas (Sheetz & Singer, 1974) (Sheetz, R.G. et al., 1976). Por lo tanto, cualquier perturbación que provoque un aumento en el área relativa de la capa externa contribuye a la formación de estructuras que protruyen de la membrana y prevalecen los equinocitos. Por el contrario, la adición de moléculas en la capa interna lleva a un aumento del área de la misma respecto de la externa, provocando la aparición de concavidades en la superficie celular (estomatocitos). Las alteraciones en la forma de los GRH

inducidas por surfactantes puede resultar no solo de una incorporación asimétrica de moléculas anfifílicas en la bicapa, sino también como consecuencia de la extracción de los componentes de la membrana (Vives et al., 1999).

En el caso de Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>, el cambio de discocito a equinocito sugiere la incorporación de los monómeros del surfactante (menos hidrofóbicos) en la capa externa de la membrana de los GR. La transición final a esferocitos (Fig. 5b y 5c) puede ser explicada por el desprendimiento de microvesículas mixtas, cuya presencia fue evidenciada por microscopía electrónica de transmisión (Fig. 6).

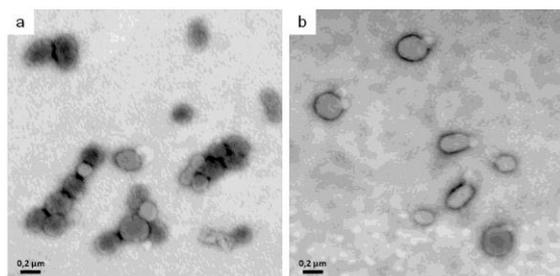


**Fig. 5** Imágenes de microscopía óptica con contraste de fases de GRH tomadas inmediatamente ( $t_0$ ) y 1, 3, 6 o 10 min después de la adición de: Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> (b) 300  $\mu$ M o (c) 1200  $\mu$ M; Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> (d) 280  $\mu$ M o (e) 1100  $\mu$ M, todos en medio isotónico (Aumento: 400X; barras: 10  $\mu$ m). Las imágenes correspondientes a los GRH control (a) evidenciaron la inexistencia de cambios morfológicos en ausencia de los tensioactivos. Los recuadros muestran las imágenes digitalmente ampliadas (1000X) de las células señaladas con flechas.

Por otro lado, Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> mostró un comportamiento similar en la menor concentración ensayada (Fig 5d). En este caso, al aumentar la concentración del tensioactivo, la morfología predominante observada fueron los estomatocitos (Fig. 5e), lo cual puede explicarse por un

incremento en el número de agregados de surfactante, lo que puede atribuirse al aumento de la tasa de extracción de componentes de la membrana en relación a la observada en el caso de los agregados de Bz-Arg-NHC<sub>10</sub>. De esta forma, si bien las moléculas de

Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> serían incapaces de trasladar a la capa interna de la membrana, la rápida solubilización de los constituyentes de la misma conducirían a una disminución substancial del área de la capa externa, cambiando la forma de los GRH de discocitos a estomatocitos.



**Fig. 6** Micrografías electrónicas de las microvesículas liberadas y aisladas por ultracentrifugación luego de la exposición de GRH a (a) Bz-Arg-NHC<sub>10</sub> 300 µM y (b) Bz-Arg-NHC<sub>12</sub> 280 µM en medio isotónico.

## Conclusiones

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

hidrocarbonada sino también de la concentración del tensioactivo.

## Bibliografía

- Fait, M.E., Garrote, G.L., Clapés, P., Tanco, S.E., Lorenzo, J. y Morcelle, S.R. 2015. Biocatalytic synthesis, antimicrobial properties and toxicity studies of arginine derivative surfactants. *Amino Acids*, 47(7), 1465-1477. doi:10.1007/s00726-015-1979-0.
- Jay, A.W. 1975. Geometry of the human erythrocyte. I. Effect of albumin on cell geometry. *Biophys. J.*, 15(3), 205-222. doi:10.1016/S0006-3495(75)85812-7.
- Pape, W.J.W., Pfannenbecker, U., y Hoppe, U. 1987. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Mol. Toxicol.*, 1(4), 525-536.
- Pinazo, A., Manresa, M.A., Marques, A.M., Bustelo, M., Espuny, M.J. y Pérez, L.F. (2016). Amino acid-based surfactants: New antimicrobial agents. *Adv. Colloid. Interface Sci.*, 228, 17-39. doi:10.1016/j.cis.2015.11.007
- Preté, P.S.C., Gomes, K., Malheiros, S.V.P., Meirelles, N.C., y De Paula, E. 2002. Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ethers series.

- Biophys Chem.*, 97(1), 45-54. doi:  
10.1016/S0301-4622(02)00042-X.
- Sheetz, M.P. y Singer, S.J. 1974.  
Biological membranes as bilayer  
couples. A molecular mechanism  
of drug-erythrocyte interactions.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71(11),  
4457-61.
- Sheetz, M.P., Painter, R.G. y Singer, S.J.  
1976. Biological membranes as  
bilayer couples. III. Compensatory  
shape changes induced in  
membranes. *J. Cell. Biol.*, 70(1),  
193-203.
- Singh, A. y Tyagi, V.K. 2014. Arginine  
Based Novel Cationic Surfactants:  
A Review. *Tens. Surf. Det.*, 51,  
202–214. doi:10.3139/113.110299.
- Vives, M.A., Infante, M.R., Garcia, E.,  
Selve, C., Maugra, M. y Vinardell,  
M.P. 1999. Erythrocyte hemolysis  
and shape changes induced by  
new lysine-derivate surfactants.  
*Chemico-Biological Interactions*  
118(1), 1-18.