

Las publicaciones pertenecientes a los trabajos de investigación incluidos en esta Tesis son las siguientes:

Zaragoza A, Aranda FJ, Espuny MJ, Teruel JA, Marqués A, Manresa A, Ortiz A (2009). Mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp. *Langmuir*. 25: 7892-7898. (Índice de impacto: 4,347).

Zaragoza A, Aranda FJ, Espuny MJ, Teruel JA, Marqués A, Manresa A, Ortiz A (2010). Hemolytic activity of a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp.: Evidence for a colloid-osmotic mechanism. *Langmuir*. 26: 8567-8572. (Índice de impacto: 4,347).

Zaragoza A, Aranda FJ, Espuny MJ, Teruel JA, Marqués A, Manresa A, Ortiz A (2012). Interaction of a *Rhodococcus* sp. trehalose lipid biosurfactant with model proteins: thermodynamic and structural changes. *Langmuir*. 28: 1381-1390. (Índice de impacto: 4,269).

Zaragoza A, Teruel JA, Aranda FJ, Ortiz A (2012). Interaction of a trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7 with a secretory phospholipase A₂. (Enviado).

“La cosa más bella que podemos experimentar es lo misterioso. Es la fuente de toda verdad y ciencia. Aquel para quien esa emoción es ajena, aquel que ya no puede maravillarse y extasiarse ante el miedo, vale tanto como un muerto: sus ojos están cerrados...”

“Si tu intención es descubrir la verdad, hazlo con sencillez, la elegancia déjasela al sastre”.

Albert einstein

A mis padres
y hermano

AGRADECIMIENTOS

Al término de esta etapa de mi vida, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me han alentado a lograr mi meta:

A mi director de tesis Dr. Antonio Ortiz que me acogió en su grupo de trabajo y me abrió las puertas al mundo de la investigación. Le agradezco toda su ayuda, consejos y apoyo así como la confianza que ha depositado en mí para realizar este trabajo.

Gracias al Dr. Francisco J. Aranda y al Dr. José Antonio Teruel por sus aportaciones al desarrollo de esta tesis y por su ayuda en la resolución de las dudas puntuales del día a día.

A María J. Espuny, Ana Marqués y Ángeles Manresa del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Barcelona, que nos han proporcionado el biotensioactivo crudo y sin las cuales no se habría podido realizar esta tesis.

A César Flores y Alejandro Torrecillas del Servicio de Biología Molecular del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Murcia, por su ayuda y el buen trato recibido.

A todos mis compañeros del Ala D del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A, en especial a Ángel Pérez, Marina Sánchez y Schecherezade García, por todos los buenos momentos, las risas y de vez en cuando los llantos que hemos pasado juntos, por su ayuda cuando no encontraba la salida, y por supuesto por llevarme no sólo una experiencia profesional sino también humana, no sólo compañeros de trabajo sino verdaderos amigos. Gracias.

A todos mis amigos y amigas, por ayudarme a desconectar cuando lo he necesitado, por escucharme aún cuando no me entendían y por no dejar que me perdiera en el camino recordándome quien soy y lo que quiero ser. A Raquel y Guille, por su apoyo y ayuda y muy especialmente a Ana, M^a José y Eva a quienes jamás encontraré la forma de agradecer que hayan estado junto a mí tras cada derrota y logro de mi vida, haciendo de este triunfo tanto suyo como mío (vosotras sois mi faro en la oscuridad).

Finalmente, quiero expresar mi agradecimiento a mi familia. Sin ellos no habría podido alcanzar este sueño. Gracias a mis padres quienes no han escatimado esfuerzo alguno, sacrificando gran parte de su vida para educarme. Por enseñarme a luchar por lo que quiero y a levantarme tras cada tropiezo. A mi hermano por poner a prueba mi paciencia y mi capacidad de superación, por enseñarme de esa forma tan peculiar la importancia de las palabras y el conocimiento. Cada uno de mis ideales y esfuerzos han sido inspirados en vosotros.

Gracias a todos por lo que hemos logrado.

ÍNDICE Y ABREVIATURAS

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 1 |
| 1. TENSIOACTIVOS | 3 |
| 1.1. Definición y clasificación de tensioactivo | 4 |
| 1.2. Propiedades fisicoquímicas de las disoluciones de tensioactivos | 7 |
| 2. TENSIOACTIVOS BIOLÓGICOS | 15 |
| 2.1. Definición y clasificación de los biotensioactivos. | 15 |
| 2.2. Papel fisiológico de los biotensioactivos | 18 |
| 2.3. Aplicaciones potenciales de los biotensioactivos | 20 |
| 2.4. Biotensioactivos frente a tensioactivos químicos | 22 |
| 3. TREALOSALÍPIDOS. | 25 |
| 3.1. Estructura química de los trealosalípidos | 25 |
| 3.2. Biosíntesis de trealosalípidos | 27 |
| 3.3. Producción microbiana | 29 |
| 3.4. Aplicaciones potenciales de los trealosalípidos | 31 |
| 4. MEMBRANAS BIOLÓGICAS Y MEMBRANAS MODELO | 33 |
| 4.1. Estructura de la membrana plasmática | 33 |
| 4.2. Lípidos de membrana | 36 |
| 4.3. Polimorfismo lipídico | 40 |
| 4.4. Membranas Modelo | 45 |
| 4.5. Permeabilización y solubilización de membranas | 48 |
| 5. BIBLIOGRAFÍA | 51 |
| | |
| OBJETIVOS | 61 |
| | |
| TÉCNICAS GENERALES | 65 |
| 1. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS | 67 |
| 1.1. Espectroscopía de absorción | 68 |
| 1.2. Espectroscopía de fluorescencia | 77 |
| 2. TÉCNICAS CALORIMÉTRICAS | 80 |
| 2.1. Calorimetría diferencial de barrido | 80 |
| 2.2. Calorimetría isotérmica de titulación | 82 |
| 3. MEDIDAS DE TENSIÓN SUPERFICIAL | 86 |
| 4. BIBLIOGRAFÍA | 88 |

CAPÍTULO I

Mecanismo de la permeabilización de membranas por acción de un trealosalípido biotensioactivo bacteriano producido por *Rhodococcus* sp 91

| | |
|--|------------|
| 1. RESUMEN | 93 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 94 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 96 |
| 3.1. Materiales | 96 |
| 3.2. Producción y purificación de trealosalípido | 97 |
| 3.3. Preparación de vesículaas | 97 |
| 3.4. Medidas de turbidez | 99 |
| 3.5. Medida de fluorescencia | 99 |
| 3.6. Medida de la tensión superficial | 99 |
| 3.7. Calorimetría isotérmica de titulación | 100 |
| 4. RESULTADOS | 101 |
| 4.1. Concentración micelar crítica de trealosalípido | 101 |
| 4.2. Reparto de trealosalípido en membranas de POPC | 102 |
| 4.3. El trealosalípido induce salida del contenido de vesículas fosfolipídicas y cambios de turbidez | 104 |
| 4.4. Velocidad de unión y <i>flip-flop</i> de trealosalípido en membranas de POPC | 107 |
| 4.5. Efecto de la composición de la membrana lipídica en la permeabilización inducida por trealosalípido | 110 |
| 5. CONCLUSIONES | 113 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 115 |

CAPÍTULO II

Actividad hemolítica de un trealosalípido biotensioactivo bacteriano producido por *Rhodococcus* sp.: Evidencias para un mecanismo coloide-osmótico 119

| | |
|---|------------|
| 1. RESUMEN | 121 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 122 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 124 |
| 3.1. Materiales | 124 |
| 3.2. Hemólisis | 125 |
| 3.3. Experimentos de protección osmótica | 125 |
| 3.4. Microscopía electrónica de barrido | 126 |
| 4. RESULTADOS | 126 |
| 4.1. Inducción de hemólisis por el trealosalípido | 126 |
| 4.2. Salida de K ⁺ de eritrocitos humanos | 129 |
| 4.3. Protección osmótica de la hemólisis | 132 |
| 4.4. Cambios morfológicos en los eritrocitos humanos inducidos por trealosalípido | 134 |
| 5. CONCLUSIONES | 136 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 137 |

CAPÍTULO III

Interacción de un trealosalípido biotensioactivo de *Rhodococcus* sp. con proteínas modelo: cambios estructurales y termodinámicos 141

| | |
|--|------------|
| 1. RESUMEN | 143 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 145 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 146 |
| 3.1. Materiales | 146 |
| 3.2. Preparación de la muestra | 146 |
| 3.3. Calorimetría diferencial de barrido de alta sensibilidad | 147 |
| 3.4. Calorimetría isotérmica de titulación | 148 |
| 3.5. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier | 148 |
| 3.5. Espectroscopía de fluorescencia | 149 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 150 |
| 4.1. Efecto de la interacción de trealosalípido sobre la desnaturalización térmica de BSA y Cit-c | 150 |
| 4.2. Unión de trealosalípido a BSA y Cit-c..... | 153 |
| 4.3. Determinación de los cambios estructurales en BSA y Cit-c inducido por trealosalípido mediante FTIR | 155 |
| 4.4. Efecto del trealosalípido en la fluorescencia intrínseca del Trp | 161 |
| 5. CONCLUSIONES | 167 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 168 |

CAPÍTULO IV

Interacción de un biotensioactivo trealosalípido segregado por *Rhodococcus erythropolis* 51T7 con una fosfolipasa A₂ de secreción 173

| | |
|--|------------|
| 1. RESUMEN | 175 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 176 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 177 |
| 3.1. Materiales | 177 |
| 3.2. Preparación de la muestra de trealosalípido | 178 |
| 3.3. Preparación de los liposomas con sondas fluorescentes | 178 |
| 3.4. Ensayo fluorescente continuo de la actividad de sPLA ₂ pancreática | 179 |
| 3.5. Atenuación de fluorescencia por acrilamida | 179 |
| 3.6. Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier | 180 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 181 |
| 4.1. La preincubación con trealosalípido inhibe la actividad de sPLA ₂ | 182 |
| 4.2. La preincubación de la sPLA ₂ con trealosalípido altera la estructura de sPLA ₂ | 185 |
| 4.3. Inhibición de sPLA ₂ por modificación de la estructura del sustrato | 189 |
| 5. CONCLUSIONES | 192 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 194 |

CONCLUSIONES GENERALES 197

ANEXO 201

Índice de Figuras y Tablas

ABREVIATURAS

| | |
|-----------|--|
| BODIPY-PC | 1,2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4bora-3a,4diazas-indacena-3-undecanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina |
| BSA | Albúmina de suero bovino ('Bovine Serum Albumin') |
| CF | 5(6)-Carboxifluoresceína |
| CMC | Concentración micelar crítica |
| DOPC | 1,2-Dioleoilfosfatidilcolina |
| DSC | Calorimetría diferencial de barrido ('Differential Scanning Calorimetry') |
| EE | Error estándar |
| FD4 | FITC-Dextranos PM: 4000 |
| FD10 | FITC-Dextranos PM: 9400 |
| FPE | N-(Fluoresceína-5-thiocarbamil)-1,2-dihexadecanil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina |
| FTIR | Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier ('Fourier Transform Infrared Spectroscopy') |
| GC/MS | Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas. |
| HEPES | Ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2'-etanosulfónico |
| ITC | Calorimetría isotérmica de titulación ('Isothermal Titration Calorimetry') |
| lisoPC | 1-Palmitil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina |
| LUV | Vesículas unilamelares grandes ('Large Unilamellar Vesicles') |
| MES | Ácido 2-morfolinoetanosulfónico monohidrato |
| MLV | Vesículas multilamelares ('Multilamellar Vesicles') |
| monoRL | Monorramnolípido |
| PEGs | Polietilenglicoles |
| POPC | 1-Palmitil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfocolina |
| POPE | 1-Palmitil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina |
| RBC | Glóbulos rojos ('Red Blood Cells') |
| Rf | Factor de retención |

| | |
|-------------------|--|
| sPLA ₂ | Fosfolipasa A ₂ de secreción |
| SUV | Vesículas unilamelares pequeñas ('Small Unilamellar Vesicles') |
| TL | Trealosárido |
| T _m | Temperatura de transición |
| γ_{TS} | Tensión superficial |

INTRODUCCIÓN

1-TENSIOACTIVOS

El detergente más antiguo conocido es el jabón, el cual se lleva utilizando desde el año 3000 A.C. En la segunda mitad del siglo VIII el jabón se convirtió en un producto más barato pudiendo ser utilizado por todas las clases sociales, lo que llevó a un notable aumento de la población debido a una mejora de la higiene y la concomitante disminución de la tasa de mortalidad. Durante los siglos XVIII y XIX se desarrolló esta industria considerablemente, fabricándose diferentes productos: jabones duros, blandos, perfumados... Henckel introdujo en 1907 el primer detergente en polvo para lavadoras automáticas bajo la marca "Persil".

La demanda de detergente se fue haciendo cada vez más exigente, solicitándose detergentes con propiedades especiales y menos sensibles a la dureza del agua. Harkins y Langmuir descubrieron en 1917 una clase de sustancias sintéticas capaces de acumularse preferentemente en las superficies de las disoluciones acuosas. A estas sustancias se les llamó más tarde "tensioactivos". Fue así como empezó el desarrollo de formulaciones más elaboradas hacia los años 30 y 40 con la aparición de nuevos detergentes sintéticos y desplazando casi totalmente al jabón en los años cincuenta.

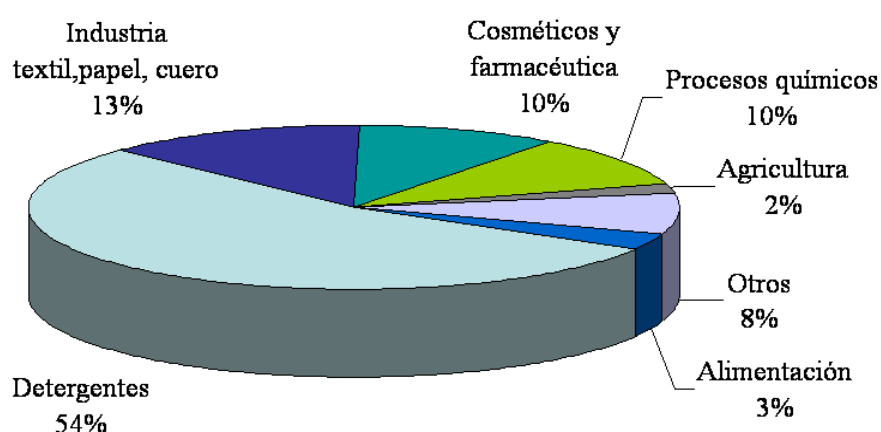


Figura 1. Consumo mundial de tensioactivos en las áreas de mayor aplicación (Rhaman y Gakpe, 2008).

En los últimos años del siglo XX la mejor situación económica llevó a un aumento en la demanda de productos que contenían tensioactivos. En el año 2003 el mercado global de tensioactivos tenía un valor estimado de 14.3 billones de dólares y se producían unos 11 millones de toneladas de tensioactivos al año. En el presente se producen unos 12 millones de toneladas de tensioactivos al año y se prevé un incremento de la producción mundial de alrededor de un 3% anual (Edser, 2008), alcanzándose una demanda estimada en 16 billones de dólares (*reportaje de Global Industry Analysts, Inc.* <http://www.ibtimes.com/prnews/20081022/.htm>).

Hoy en día, la demanda total mundial de tensioactivos es cubierta por un grupo reducido de productos, siendo los alquilbenceno sulfonatos (LAS), alquil etoxisulfatos (AES), alquil sulfatos (AS), alquilfenoles etoxilados (APE), alcoholes etoxilados (AE), y las sales de amonio cuaternario (QAC) los que ocupan las principales posiciones. Las principales materias primas para la producción de tensioactivos son aceites y grasas, tanto animales como vegetales y el petróleo.

Su capacidad para adsorberse a superficies e interfases, confiere a los tensioactivos una serie de características que les permiten ser utilizados en casi todos los sectores (Figura 1). Debido a sus propiedades de solubilidad, detergencia, resistencia a la dureza del agua, así como su capacidad emulsionante, dispersante y humectante, estos compuestos encuentran aplicación en numerosos campos tecnológicos como formulación de detergentes, productos de higiene corporal, cosméticos, aplicaciones alimentarias, pinturas y barnices, aplicaciones agrícolas, farmacéuticas, emulsiones de asfalto, tratamiento de cueros y/o flotación de minerales, etc. (Ying, 2006).

1.1 Definición y clasificación de tensioactivos

Los tensioactivos son compuestos anfifílicos, es decir, que presentan en la misma molécula una porción hidrófoba (o apolar), la cual se encuentra unida covalentemente a una región hidrófila (o polar), que tiene afinidad por disolventes polares (Figura 2). La región apolar tiene afinidad por disolventes orgánicos o

apolares y corresponde frecuentemente a una cadena hidrocarbonada, de tipo alquilo o alquil benceno, de longitud variable. Los diferentes tipos de tensioactivos según su estructura molecular, incluyendo varios ejemplos, se enumeran en la Tabla 1.

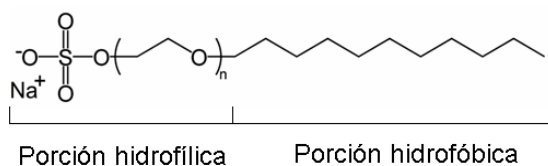





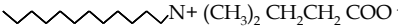
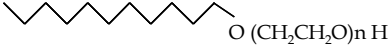
Figura 2. Representación esquemática de un tensioactivo donde se muestra la cabeza polar y la cola hidrofóbica.

Tabla 1. Estructura molecular de los tensioactivos

| Estructura Molecular | Esquema | Ejemplos |
|---|---------|--|
| Cabeza hidrofílica y cola hidrofóbica | | <ul style="list-style-type: none"> •Jabón (sal sódica o ácidos grasos) •Sal alquiltrimetilamonio |
| Una cabeza hidrofílica y dos colas hidrofóbicas | | <ul style="list-style-type: none"> •Alquilbenceno sulfonato •Fosfolípidos(fosfatidilcolina) |
| Una cola hidrofóbica que termina en ambos extremos con grupos hidrofílicos: α , ω tensioactivos | | <ul style="list-style-type: none"> •Bolaform cuaternarios |
| Las cabezas hidrofílicas de dos tensioactivos se combinan con un espaciador rígido, el cual es lineal o un anillo orgánico: tensioactivos géminis | | <ul style="list-style-type: none"> •Esteres de fosfato géminis |
| Más de dos grupos hidrofílicos e hidrofóbicos: tensioactivos poliméricos | | <ul style="list-style-type: none"> •Tensioactivo poliéster •Tensioactivo polimérico silicona |

La clasificación de los tensioactivos más aceptada se basa en su capacidad de disociación en agua. Así, según la naturaleza de su grupo polar se pueden encontrar tensioactivos iónicos (catiónicos o aniónicos), zwitteriónicos (anfóteros), y no iónicos (Salager, 2002) (Tabla 2).

Tabla 2. Tipos de tensioactivo según la naturaleza de su grupo polar.

| Tipo de Tensioactivo | Características | Ejemplos |
|--|---|---|
| Tensioactivos aniónicos | <ul style="list-style-type: none"> • La parte hidrófila posee átomos con alta electronegatividad, haciendo que sean moléculas muy polares. • El contraión es generalmente un catión pequeño como el sodio, aunque en ocasiones es mayor como en el caso del amonio o las aminas. • Usados como emulsionantes, solubilizantes, humectantes y detergentes. |  <p>Dodecilsulfato de Sodio (SDS)</p>  <p>Jabón</p> |
| Tensioactivos catiónicos | <ul style="list-style-type: none"> • La parte lipofílica suele ser una cadena hidrocarbonada larga con una amina cuaternaria como hidrófilo. • El contraión suele ser un haluro. • Se adsorben a superficies cargadas negativamente como tela, pelo o membranas celulares usándose como suavizante, acondicionador o agente antimicrobianos. |  <p>Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB)</p> |
| Tensioactivos anfotéricos o zwitteriónicos | <ul style="list-style-type: none"> • La parte lipofílica suele ser una cadena hidrocarbonada larga y la parte hidrofílica contiene cargas negativas y positivas, por tanto se comportan como catión o anión dependiendo del pH. • Pueden poseer las propiedades solubilizantes de los aniónicos y las desinfectantes de los catiónicos. |  <p>Dodecil-N-betaina</p> |
| Tensioactivos no-iónicos | <ul style="list-style-type: none"> • Cabeza polar no cargada, con varios grupos como polioxietileno (etoxilatos) o polirol. • Se usan en farmacia, cosmetica, así como solubilizantes y emulsificantes en alimentos. |  <p>Alcohol de polioxietileno</p> |

1.2 Propiedades fisicoquímicas de las disoluciones de tensioactivos

En el seno de un líquido cada molécula está sometida a fuerzas de atracción iguales en todas direcciones de manera que quedan anuladas, sin embargo en la superficie del líquido hay una fuerza neta hacia el interior. Esto supone que habría que realizar un trabajo para llevar las moléculas hacia la superficie en contra de esa fuerza. Dicho trabajo es proporcional a la tensión superficial (γ_{TS}). Todos los tensioactivos tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial cuando se añaden al agua en pequeñas cantidades. En un sistema acuoso, las moléculas de tensioactivo se distribuyen de manera que tienden a minimizar la superficie de contacto agua-hidrocarburo.

La adsorción de las moléculas de tensioactivo en las interfases o en las superficies que las contienen se debe a la débil interacción de la porción hidrófoba del tensioactivo con las moléculas de agua, y a la fuerte interacción (fuerzas de dispersión y puentes de hidrógeno) que existe entre las moléculas de agua. Así la parte hidrofóbica del tensioactivo queda fuera del seno de la disolución acuosa, mientras que la porción hidrófila interacciona fuertemente con el agua a través de interacciones dipolo-dipolo o ión-dipolo, quedando solvatada y localizándose así el tensioactivo en la interfase aire/agua.

La adsorción progresiva de las moléculas de tensioactivo en la superficie de la solución provoca un cambio en las fuerzas de interacción de las moléculas de agua de la superficie. Como consecuencia, el tensioactivo es capaz de disminuir la energía de los enlaces entre las moléculas de agua, es decir, reduce la tensión superficial del agua, expresada como:

$$\gamma_{TS} = dW_{rev} / dA \quad (N m^{-1})$$

o cantidad de trabajo necesaria para llevar una molécula de agua a la superficie. Siendo dW_{rev} el trabajo realizado y dA el aumento del área superficial. A medida que aumenta la concentración de tensioactivo, aumenta el número de moléculas de tensioactivo en la superficie, hasta que la superficie queda totalmente saturada por

éstas. A partir de este punto, si la concentración de tensioactivo sigue aumentando, este se disuelve en la fase acuosa en una forma molecularmente dispersa. La tensión superficial sigue disminuyendo hasta alcanzar un valor crítico, llamado concentración micelar crítica (CMC), a partir de la cual, la tensión superficial se mantiene constante y se empiezan a formar estructuras en las que las cabezas polares se orientan hacia la disolución y las cadenas apolares hacia el interior. Dicha formación es cooperativa, espontánea y reversible. Los agregados que se forman, denominados micelas, están en equilibrio con los monómeros de tensioactivo, son termodinámicamente estables y pueden adoptar varias formas y tamaños en función de la concentración y naturaleza del tensioactivo. A partir de la CMC cualquier cantidad de tensioactivo que se añada a la solución se incorpora en forma de agregado y no de monómero (Figura 3) (Chevalier y Zemb, 1990).

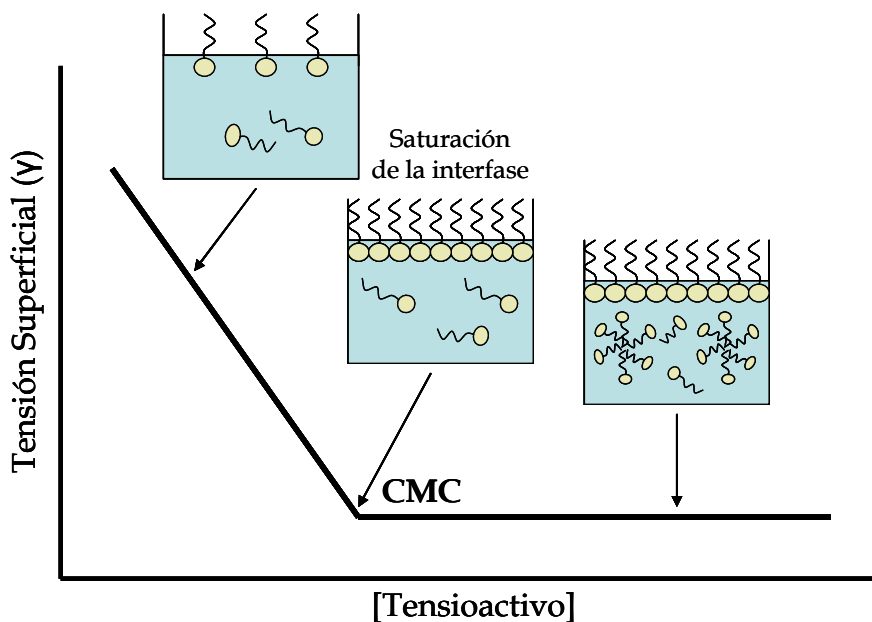


Figura 3. Representación esquemática del comportamiento de un tensioactivo en disolución acuosa.

Los dos parámetros fundamentales que definen a un tensioactivo son: *eficacia*, que corresponde a la máxima disminución de la tensión superficial o tensión de interfase que produce, y *eficiencia*, que equivale a la CMC y es la cantidad de tensioactivo que produce ese descenso máximo. El valor de la CMC viene determinado por la naturaleza del tensioactivo y por la longitud de sus cadenas hidrocarbonadas. La CMC disminuye logarítmicamente con el número de carbonos de la cadena, n .

Conforme aumenta la CMC, aumenta la capacidad de formar micelas y cuanto menor es el valor de ésta, mejor detergente será el tensioactivo (Zana, 2005; Myers, 2006). La determinación de la CMC, se puede llevar a cabo utilizando cualquier propiedad que presente un cambio más o menos brusco frente a la concentración de tensioactivo. Algunas de las propiedades más utilizadas son: la tensión superficial, la conductividad, y las propiedades ópticas y espectroscópicas tales como medidas de dispersión de la luz e índice de refracción o absorción (Tadros, 2005).

La naturaleza dual de los tensioactivos, en particular el equilibrio entre las porciones hidrófoba e hidrófila de la molécula, se conoce como balance hidrófilo-lipófilo (HBL), el cual es responsable de los fenómenos de actividad superficial y de agregación supramolecular de los tensioactivos (micelas, cristales líquidos, liposomas, vesículas y geles), y de él dependen fenómenos como la solubilización y la emulsión (Rosen, 2004) (Tabla 3).

Tabla 3. Aplicaciones generales de los tensioactivos en base a su HLB.

| HLB | APLICACIÓN |
|-------|---------------------------------------|
| 4-6 | Emulgentes para sistemas agua-aceite. |
| 7-9 | Agentes humectantes. |
| 8-18 | Emulgentes para sistemas aceite-agua. |
| 13-15 | Detergentes. |
| 10-18 | Solubilizantes. |

Griffin ideó una escala arbitraria de valores que sirviese como medida del HLB de los tensioactivos (Griffin, 1949). Así, por medio de un sistema numérico de índices HLB, es posible establecer un intervalo de la máxima eficacia para cada tipo de tensioactivo, deduciéndose de esta escala que cuanto más alto es el HLB de un tensioactivo, mayor es su carácter hidrófilo y por tanto mayor su solubilidad en disoluciones acuosas.

1.2.1 Micelas

El término micela se utilizó por primera vez en la descripción de agregados de jabones y detergentes en disoluciones acuosas (McBain, 1913). La formación de micelas es una característica importante de los tensioactivos, de manera que, al igual que sólo los tensioactivos en forma de monómeros contribuyen a los fenómenos dinámicos como la actividad espumógena o la de humectabilidad, otros procesos que se dan en las interfases, como la interacción de los tensioactivos con membranas biológicas, detergencia o solubilización, dependen de las micelas o agregados presentes en la disolución (Holmberg y *col.*, 2003). La forma de las micelas producidas en medio acuoso es importante para determinar diferentes propiedades de las disoluciones de tensioactivos, tales como la viscosidad, su capacidad de solubilizar material insoluble en agua o su punto de nube (temperatura a partir del cual una disolución isotrópica de tensioactivo se vuelve turbia).

Los cambios en la temperatura, pH, concentración del tensioactivo, aditivos en la fase líquida y grupos estructurales en el tensioactivo pueden causar cambios en el tamaño, forma y número de agregación de las micelas (Rosen, 2004). La formación de estos agregados no sólo tiene lugar en medio acuoso sino también en otros disolventes polares y no polares (Lattes y Rico, 1989). Las micelas comienzan a formarse en disoluciones acuosas de tensioactivo a concentraciones mayores de la CMC. Esta CMC no es una concentración única, sino un rango de concentraciones. También es necesario que se alcance una Temperatura Micelar Crítica, TMC, la cual coincide con la temperatura de fusión de las cadenas hidrocarbonadas (McBain y Hutchinson, 1955).

Por otra parte, la solubilidad de un tensioactivo muestra un fuerte aumento a cierta temperatura, denominada punto o temperatura de Krafft. Generalmente la TMC y el punto de Krafft coinciden. En este punto las moléculas de tensioactivo coexisten como monómeros, micelas y sólidos hidratados y la solubilidad del tensioactivo es igual a la CMC. Por debajo del punto de Krafft el tensioactivo existe en forma molecular con una solubilidad limitada, mientras que por encima, los cristales están en equilibrio con micelas y monómeros (Schramm y Marangoni, 2000;

Xia y Nnanna, 2001) (Figura 4). En general un tensioactivo puede mostrar actividad superficial cuando se usa a una temperatura por encima de su punto de Krafft.

El punto de Krafft puede variar por pequeños cambios en la estructura química del tensioactivo. En general, aumenta con la longitud de las cadenas alquilo y depende del grupo de cabeza y de los contraiones. La adición de sal aumenta el punto de Krafft mientras que otros cosolutos lo disminuyen (Holmberg y Jönsson, 2003; Tadros, 2005).

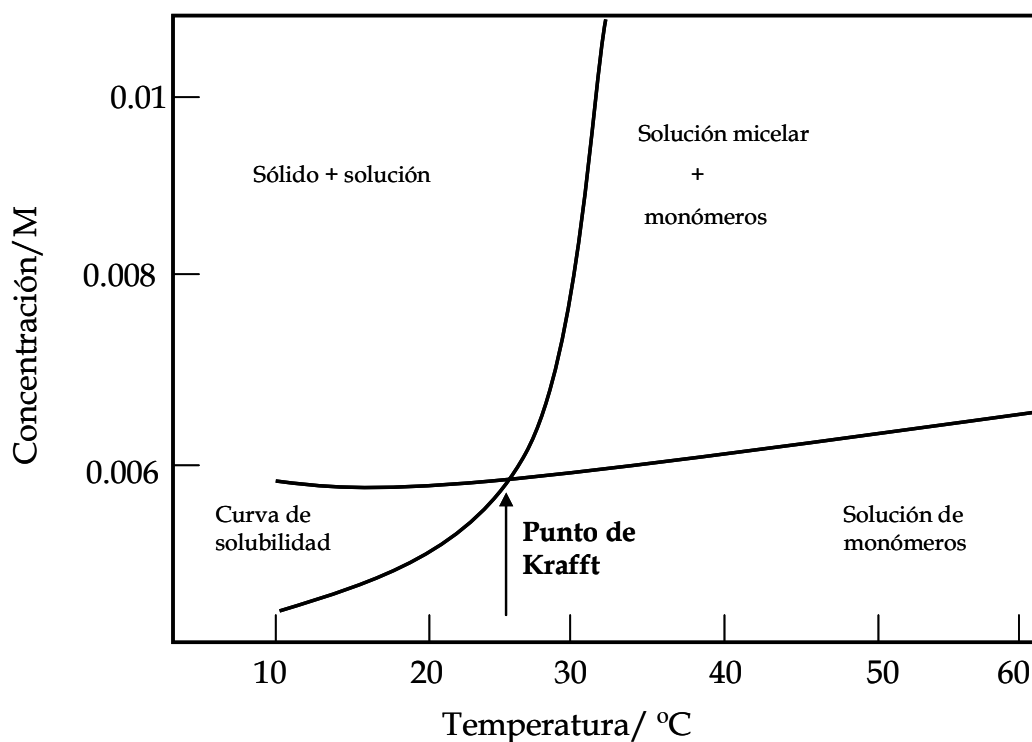


Figura 4. Diagrama de fase Temperatura-Concentración.

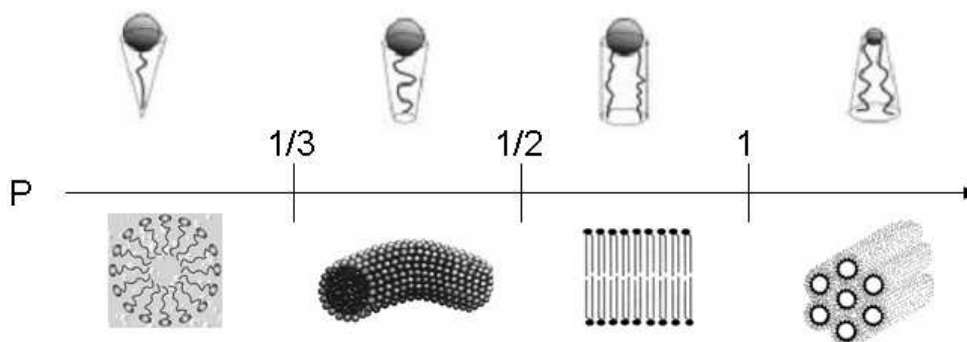
Los tensioactivos no iónicos no tienen punto de Krafft, de forma que su solubilidad puede disminuir con la temperatura y pueden perder sus propiedades de actividad superficial alrededor de una temperatura dada denominada punto de nube, debido a que aumentan las interacciones entre las micelas formando superagregados. A temperaturas por encima del punto de nube la solución puede separarse en dos fases: una rica en tensioactivo y otra rica en agua (Schramm y Gerrard, 2000).

La teoría de la estructura micelar está basada en la geometría de diferentes formas micelares y el espacio ocupado por los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de las moléculas de tensioactivos. Según esta teoría la forma micelar está determinada por el valor del parámetro de empaquetamiento (P) (Israelachvili, 1976):

$$P = v/a_0l$$

donde v y l son el volumen y longitud de la molécula hidrofóbica, y a_0 es el área de superficie óptima (área de sección transversal) ocupada por el grupo hidrofílico de un tensioactivo en la interfase micela/agua (Zana, 2005). La forma del tensioactivo y de las estructuras micelares que se puede formar en una disolución según el parámetro de empaquetamiento se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Agregados de tensioactivo dependiendo del parámetro de empaquetamiento crítico.



1.2.2. Propiedades solubilizantes

El poder solubilizante de los tensioactivos está directamente relacionado con su capacidad de formar micelas. La solubilización es un proceso dinámico y depende tanto de la naturaleza del soluto como del tensioactivo empleado. La solubilización de un compuesto también se ve afectada por la presencia de electrolitos, el efecto de compuestos orgánicos tanto monoméricos como poliméricos, y la temperatura. En general la cantidad de soluto solubilizado es directamente proporcional a la

concentración de tensioactivo utilizado, una vez que la formación de las micelas ha tenido lugar.

Si el compuesto a solubilizar es hidrofóbico o muy poco soluble en agua (grasas, moléculas aromáticas y fármacos), su solubilidad aumenta cuando el tensioactivo se encuentra por encima de su CMC. Dicho compuesto es solubilizado en el núcleo hidrofóbico de las micelas, constituyendo los llamados sistemas solubilizados. Por otro lado, si el compuesto es de tipo anfifílico (alcoholes) puede dar lugar a micelas mixtas, mientras que si el compuesto es de tipo hidrofílico la solubilización tendrá lugar en la interfase micela-medio acuoso (Figura 5) (Rosen, 1978). En perfumería, esta propiedad es fundamental para que los perfumes (aceites) se estabilicen en diferentes productos comerciales como cosméticos, detergente, plásticos, etc.

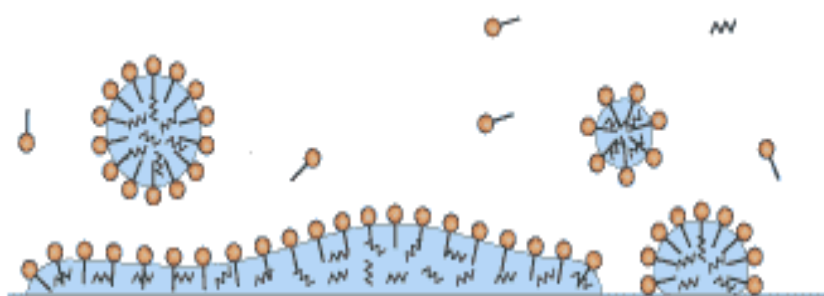


Figura 5. Representación de la acción de detergencia de los tensioactivos.

1.2.3. Otras propiedades

Además de las características enunciadas anteriormente los tensioactivos pueden actuar como dispersantes situándose en la superficie de partículas sólidas en suspensión y previniendo su agregación al producirse una repulsión entre las cabezas polares. Cuando los monómeros de tensioactivo se adsorben en la interfase sólido-aire o sólido-líquido crean una película de agua sobre las superficies sólidas hidrofóbicas actuando como humectantes. Por otra parte, los tensioactivos también pueden actuar como espumantes. La espuma es la dispersión de un gas en un líquido, generalmente aire en agua, donde hay un pequeño volumen de líquido en

comparación con el gas. Cada espacio ocupado por aire está recubierto por moléculas de tensioactivo adsorbidas a una delgada capa de agua (Figura 6).

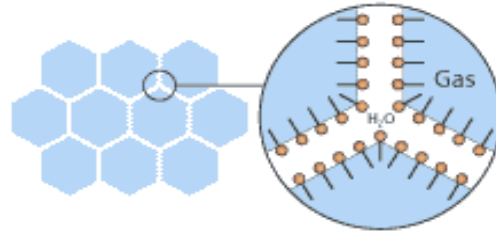


Figura 6. Estabilización de sistemas espumógenos por acción de tensioactivos.

Los tensioactivos son también capaces de actuar como emulsionantes, ya que se sitúan en la interfase aceite-agua dando lugar a microemulsiones (Hoar y Shulman, 1943). La incorporación de un tensioactivo aumenta la estabilidad del estado disperso (Figura 7). En ocasiones se requiere la adición de un co-tensioactivo (suelen ser alcoholes de cadena corta) y de electrolitos. Al ir variando el contenido de los componentes los sistemas se pueden convertir en bifásicos o trifásicos, en los cuales pueden aparecer estructuras lamelares, hexagonales, cúbicas o desordenadas tipo cristalinas. Uno de los campos más importantes de aplicación de las microemulsiones es como vehículos para la liberación de fármacos ya que poseen un alto poder de solubilización de compuestos activos insolubles en agua y protección de fármacos sensibles (Lawrence y Rees, 2000).

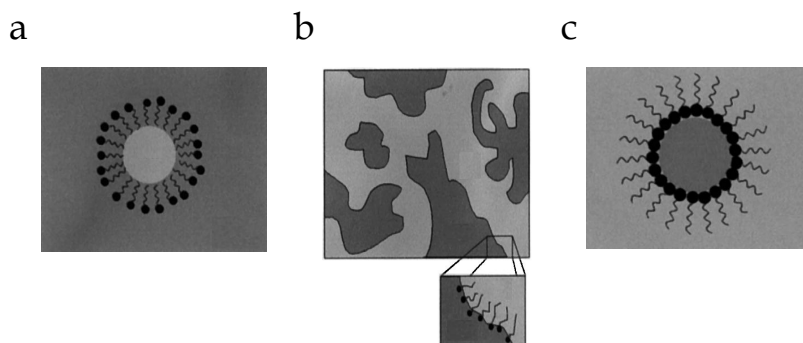


Figura 7. Representación esquemática de las microestructuras más comunes de microemulsiones.
(a) aceite en agua, (b) bicontinua, y (c) agua en aceite.

2- TENSIOACTIVOS BIOLÓGICOS

Hoy en día el uso de tensioactivos es prácticamente indispensable debido a sus múltiples propiedades y aplicaciones. A pesar del gran número de aplicaciones y de las numerosas ventajas que presentan los tensioactivos tanto en el ámbito industrial como económico y sanitario, uno de los problemas de estos compuestos es que generalmente son tóxicos en mayor o menor medida. En muchos casos los productos que contienen tensioactivos entran en contacto con la piel, ojos y mucosas pudiendo provocar diferentes tipos de reacciones adversas. Además, muchos de estos compuestos proceden del petróleo lo que hace que sean poco biodegradables y perjudiciales para el medioambiente. Los procesos de manufacturación y algunos productos laterales que se forman en estos procesos también pueden ser peligrosos desde el punto de vista ecológico, lo cual es muy importante, ya que muchos de ellos acabarán formando parte del ecosistema una vez son desechados (Makkar y Cameotra, 2002). Todo esto ha hecho necesario aplicar de forma rigurosa una serie de regulaciones medioambientales, e incrementar la conciencia de la necesidad de proteger el ecosistema buscando alternativas menos tóxicas y más respetuosas con el medio ambiente (Banat y *col.*, 2000; Benincasa, 2007). Los tensioactivos biológicos constituyen tal vez la más interesante de estas alternativas.

2.1. Definición y clasificación de los biotensioactivos

Los tensioactivos biológicos (biotensioactivos) son moléculas anfifílicas de origen microbiano, generalmente procedentes de bacterias, hongos y levaduras. Estas sustancias son sintetizadas principalmente en fase exponencial y los microorganismos que las producen se dividen en tres categorías según el sustrato que utilicen: los que usan alcanos exclusivamente como fuente de carbono, tales como *Corynebacterium sp.* o *Arthrobacter sp.*; los que sólo usan sustratos solubles en agua como fuente de carbono, como es el caso de *Bacillus sp.*; y los que usan tanto alcanos como sustratos solubles en agua como fuente de carbono como *Pseudomonas*

sp. Debido a interesantes propiedades como su diversidad estructural, baja toxicidad y biodegradabilidad se están convirtiendo en una excelente alternativa a los tensioactivos de origen químico.

Tabla 5. Clasificación de los biotensioactivos según su grupo polar y microorganismos productores más representativos.

| TENSIOACTIVO | MICROORGANISMO |
|--------------------------------------|---|
| GLUCOLÍPIDOS | |
| • Ramrólpidos. | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Serratia rubidea</i> |
| • Trealosalípidos. | <i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia</i> sp. |
| • Soforosalípidos. | <i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i> , <i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i> |
| • Manosileritolípidos. | <i>Candida antartica</i> . |
| LIPOPÉPTIDOS Y LIPOPROTEÍNAS | |
| • Surfactina. | <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> |
| • Iturina. | <i>Bacillus subtilis</i> |
| • Viscosina. | <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| • Liquenisina. | <i>Bacillus licheniformis</i> |
| FOSFOLÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS | |
| • Ácidos corynomicólicos. | <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Corynebacterium lepus</i> |
| BIOTENSIOACTIVOS POLIMÉRICOS | |
| • Emulsan. | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| • Alasan. | <i>Acinetobacter radioresistens</i> |
| • Liposan. | <i>Candida lipolytica</i> |
| BIOTENSIOACTIVOS PARTICULADOS | |
| • Vesículas. | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> |
| • Células microbianas | <i>Cyanobacteria</i> |

Además son capaces de disminuir la tensión superficial e interfacial usando los mismos mecanismos que los tensioactivos químicos. Estos biotensioactivos se pueden encontrar tanto intracelularmente, como adheridos a la pared celular, o siendo excretados al medio externo.

Los biotensioactivos se clasifican principalmente por su composición química y origen microbiano. Dependiendo de su grupo polar se pueden clasificar en cinco grupos diferentes (Desai y Banat, 1997): glicolípidos, lipopéptidos y lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos, tensioactivos poliméricos y tensioactivos particulados (Tabla 5).

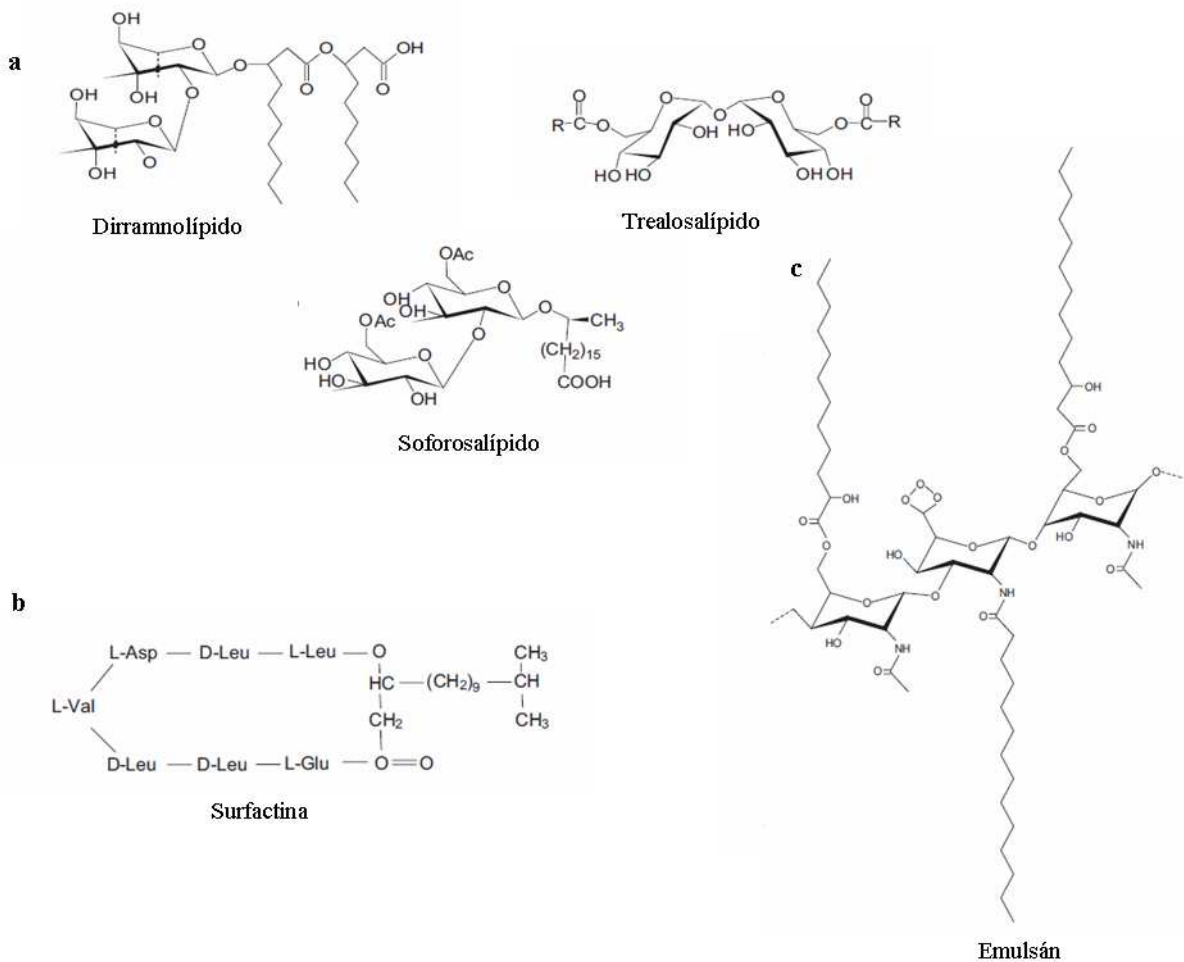


Figura 8. Ejemplos de diferentes estructuras de biotensioactivos. a) Glicolípidos; b) Lipopéptidos; c) Biotensioactivos poliméricos.

Por otro lado, los biotensioactivos también se pueden clasificar según su peso molecular (Ron y Rosenberg, 2001). Así, los glicolípidos, lipopéptidos y fosfolípidos se consideran compuestos de bajo peso molecular con actividad superficial, siendo capaces de reducir la tensión superficial del agua hasta 25-30 mN/m. Los glicolípidos están constituidos por mono-, di-, tri- y tetrasacáridos de azúcares como glucosa, manosa, trealosa, soforosa, celobiosa, manosileritritol, y ramnosa, más el componente apolar. Dentro de este grupo cabe destacar los ramnolípidos, producidos por diferentes especies de *Pseudomonas*, los soforosalípidos producidos por especies de *Candida* y *Torulopsis*, y los trealosalípidos que son sintetizados por *Rhodococcus* y otros actinomicetos (Figura 8a). En el caso de los lipopéptidos cabe destacar los producidos por varias especies de *Bacillus*, en particular *B. subtilis* que sintetiza surfactina, un lipopéptido cíclico y uno de los biotensioactivos conocidos más potentes (Figura 8b).

Por otro lado los biotensioactivos de elevado peso molecular se caracterizan por tener CMC más altas que los de bajo peso molecular siendo incapaces de reducir la tensión superficial del agua por debajo de 35-40 mN/m. La propiedad principal de estos compuestos es su capacidad de estabilizar emulsiones aceite/agua actuando como bioemulsionantes. Las diferentes especies de *Acinetobacter* producen bioemulsionantes de elevado peso molecular como el emulsan, el cual es una mezcla compleja de un heteropolisacárido y proteínas y es un efectivo agente emulsionante de hidrocarburos en agua (Figura 8c).

2.2. Papel fisiológico de los biotensioactivos

No se ha podido determinar con claridad el papel fisiológico que estas moléculas desempeñan para los microorganismos que las producen. Debido a la amplia variedad estructural y de especies que los sintetizan, las cuales pueden ocupar hábitats muy distintos, lo más acertado sería adjudicarles diversas funciones, aunque todas ellas estarían en relación directa con su carácter anfifílico.

Diferentes investigadores han revisado el papel fisiológico de los biotensioactivos (Neu, 1996; Ron y Rosenberg, 2001; Van Hamme y *col.*, 2006). Alguno de los papeles que se atribuyen a estas sustancias son movilidad (volar, nadar y desadherirse de superficies), interacción célula/célula para la formación de biofilms, mantenimiento y maduración, *quorum sensing*, amensalismo y patogenicidad. Cuando los microorganismos patogénicos infectan plantas o animales podrían producir biotensioactivos, que actuarían como agentes dispersantes para el microorganismo y como agentes humectantes para la célula hospedadora. También podrían estar implicados en la diferenciación celular, accesibilidad a sustratos y resistencia a compuestos tóxicos. Muchos de ellos han demostrado su acción antimicrobiana, en general con efectos más marcados sobre microorganismos grampositivos que sobre gramnegativos, debido a diferencias en la estructura de su pared celular. Así mismo, también se han encontrado propiedades antifúngicas y antivirales en algunos de ellos, principalmente en lipopéptidos y glicolípidos.

Otro posible papel de los biotensioactivos sería el de almacén de fuente de carbono y energía (Kitamoto y *col.*, 2002). La interacción entre microorganismos y sustratos insolubles como hidrocarburos, permitiendo el acceso a los nutrientes gracias a su acción emulsionante y solubilizante podría ser el papel principal de los biotensioactivos. Los microorganismos usan una gran variedad de compuestos orgánicos como fuentes de carbono y energía. Cuando la fuente de carbono es un sustrato insoluble como hidrocarburos, los microorganismos facilitan su difusión al interior celular mediante la producción de biotensioactivos. Algunas bacterias y levaduras excretan al medio biotensioactivos iónicos que emulsionan los carbohidratos, mientras que otras son capaces de cambiar la estructura de su pared celular por la síntesis de lipopolisacáridos o biotensioactivos no iónicos (Karanth y *col.*, 1999). La mayoría de las funciones citadas de los biotensioactivos tienen lugar extracelularmente, siendo posible que todavía estén por descubrir nuevas actividades intracelulares.

2.3. Aplicaciones potenciales de biotensioactivos

El uso de biotensioactivos se ha propuesto para un gran número de aplicaciones comerciales (Tabla 6). Actualmente, la principal aplicación de los biotensioactivos se encuentra en la biorremediación de contaminaciones por hidrocarburos, y en la industria del petróleo y el aceite, en particular la mejora de la recuperación microbiana de petróleo (MEOR) y la limpieza de tanques de almacenaje. Un ejemplo de esta actividad son los productos utilizados por la empresa Rhamnolipids Co., que utiliza rhamnolípidos Biorem 80, Esludger 60 y Biorem 70 ® para remediación. Otro campo emergente de aplicación, es la industria biomédica y de cuidado de la salud. Algunos biotensioactivos han demostrado ser buenas alternativas a productos sintéticos como agentes antimicrobianos y terapéuticos, debido a diferentes propiedades biológicas como antimicrobianos, antivirales, antiadherentes, anticancerígenos o como inmunomoduladores. Además, los biotensioactivos se consideran generalmente más seguros que los tensioactivos sintéticos debido a su origen biológico, aunque se han llevado a cabo pocos estudios aún para confirmar su falta de toxicidad (Muthusamy y col., 2008).

En agricultura se aplican por su actividad insecticida y herbicida. Se han utilizado bioemulsionantes en formulaciones de herbicidas y pesticidas (Rosenberg y Ron, 1999), y biotensioactivos producidos por bacterias del género *Bacillus* para emulsionar y dispersar en fase acuosa pesticidas de solubilidades bajas como son los de tipo órganofosforados (Patel y Gopinathan, 1986), rhamnolípidos producidos por *Pseudomonas syringae* en el biocontrol de *Candida thistle*, y rhamnolípidos junto con el hongo *Mytothecium verrucaria* como herbicidas en el control de *Pueraria lobata* (Singh y col., 2007). Stanghellini y Miller (1997) demostraron que los rhamnolípidos son efectivos contra tres géneros de patógenos zoospóricos de plantas.

Estos compuestos también tienen aplicaciones potenciales en cosméticos y productos de higiene personal, detergentes, industria alimentaria, procesos de manufacturación y minería, provisiones de lavandería, tratamiento y procesamiento del metal, procesamiento del papel e industria de la pintura. A nivel industrial, los

heteropolisacáridos de *Macrocystis pirifra* y *Azobacter vinelandii* se han usado como dispersantes en la producción de cerámica (Pellerin y col., 1991)

Tabla 6. Aplicaciones potenciales de los biotensioactivos.

| CAMPO DE APLICACIÓN | FUNCIÓN | BIBLIOGRAFÍA |
|---|--|--|
| Petróleo | | |
| Recuperación y de-emulsión | <ul style="list-style-type: none"> • Mejora del drenaje de petróleo en pozos. • Liberación de crudo atrapado en los capilares de las rocas. • Humidificación de superficies sólidas. • Reducción de la tensión superficial. • Desemulsión de emulsiones oleosas. • Solubilización de aceites. • Reducción de la viscosidad. • Agentes humectantes. | (Kanga y col, 1997; Raiger y López, 2009; Schramm y Gerrad 2000; Bognolo, 1999) |
| Industria farmacéutica | | |
| Agente Terapéutico | <ul style="list-style-type: none"> • Antimicrobiano, antifúngico y antivírico. • Agente adhesivo, moléculas inmunomoduladores, vacunas, terapia génica. | (Singh y Cameotra, 2004; Rodrigues y col, 2006; Seydlová y Svobodová, 2008; Falagas y Makris, 2009; Cameotra y Makkar, 2004) |
| Medioambiente | | |
| Biorremediación y lavado de suelos | <ul style="list-style-type: none"> • Emulsión de hidrocarburos. • Reducción de la tensión superficial. • Secuestro de metales. • Dispersión. • Agentes espumantes. • Detergente. | (Wang y Mulligan, 2004; Mulligan, 2005; Finnerty, 1994) |
| Agricultura | | |
| Control biológico | <ul style="list-style-type: none"> • Acción directa o facilitando la acción de otros microorganismos. • Adyuvante en pesticidas y herbicidas. | (Haferburg y col., 1987 ; Kim y col., 2004; Wang y col., 2005) |
| Industria Cosmética. | | |
| Productos de belleza y cuidado personal | <ul style="list-style-type: none"> • Emulsionantes, espumantes, solubilizantes, humectantes, agentes antimicrobianos, mediadores de acción enzimática. | (Brown, 1990; Williams, 2009) |
| Alimentación | | |
| Emulsionante y de-emulsionante | <ul style="list-style-type: none"> • Emulsionante, solubilizante, de-emulsificador, humectante, espumante, desespumante, lubricante. | (Shepherd, 1995; Nitschke y Costa, 2007) |
| Ingrediente funcional | <ul style="list-style-type: none"> • Interacción con lípidos, proteínas y carbohidratos, agente protector. | |
| Bioprocesamiento | | |
| Procesamiento: | <ul style="list-style-type: none"> • Biocatálisis en sistemas binarios acuosos y microemulsiones. • Biotransformación. • Recuperación de productos intracelulares. • Mejora de la producción de enzimas extracelulares y productos de fermentación. | (Singh y col, 2007) |

2.4. Biotensioactivos frente a tensioactivos químicos

Se ha demostrado que los biotensioactivos presentan múltiples ventajas sobre los tensioactivos sintetizados químicamente (Kosaric, 1992; Kitamoto y *col.*, 2002; Rahman y Gakpe, 2008; Muthusamy, 2008). Entre ellas podemos citar:

- Biodegradabilidad y baja toxicidad. Son fácilmente degradados por bacterias y otros microorganismos de manera que no quedan en el medio ambiente, mientras que los tensioactivos químicos presentan una alta toxicidad, y debido a una gran resistencia a la degradación terminan acumulándose en el medio ambiente.
- Biocompatibilidad y digestibilidad. Esto permite su aplicación en cosmética, farmacéutica y como aditivos alimentarios.
- Producción a partir de materias primas renovables. Generalmente, éstas están disponibles en grandes cantidades y a precios competitivos.
- Uso en el control medioambiental, en la manipulación de emulsiones industriales, control de vertidos de petróleo, biodegradación y detoxificación de efluentes industriales y biorremediación de suelos contaminados.
- Son moléculas orgánicas complejas con grupos funcionales específicos los cuales suelen tener una acción específica. Esto sería de particular interés en la detoxificación de contaminantes específicos, desemulsificación de emulsiones industriales, cosméticos específicos, farmacéutica y aplicaciones alimentarias.
- Son efectivos a temperaturas, pH y salinidad extremos.
- La mayoría poseen una baja CMC y son capaces de reducir la tensión superficial e interfacial entre interfases líquidas, sólidas y gaseosas, lo que les permite mezclarse o dispersarse como emulsión en agua u otros líquidos.
- Poseen una gran capacidad para formar ensamblajes moleculares (vesículas, micelas, cristales líquidos, etc.).
- Presentan una gran actividad biológica variada (acción antimicrobiana, antivírica, antitumoral, etc.) que les faculta para poder ser usados como agentes terapéuticos.

A pesar de todas las ventajas citadas anteriormente, los biotensioactivos siguen sin poder competir con los tensioactivos de origen químico debido a varios inconvenientes (Kosaric, 1992). El principal de ellos es que la producción de biotensioactivos a gran escala suele ser aún cara, y en aplicaciones medioambientales y la industria del petróleo se necesitan grandes cantidades. Este problema se está intentando solventar utilizando materias primas cada vez más baratas, como sustancias de desecho de otras industrias, con lo que al mismo tiempo se combate su efecto contaminante y se equilibran los costes.

Otro problema se encuentra en la obtención de biotensioactivos puros para determinadas aplicaciones, ya que los costes de aislamiento y purificación de los biotensioactivos generalmente son elevados. En algunas aplicaciones como la biorremediación *in situ* no se requiere una elevada pureza pero esta es de particular importancia en aplicaciones farmacéuticas, cosméticas y alimentarias.

Las cepas productoras de biotensioactivos son raras y generalmente tienen una baja productividad. Además necesitan medios complejos. Finalmente otro gran inconveniente en la producción de biotensioactivos es el control de la formación de espuma en los procesos a escala industrial.

Teniendo en cuenta todo lo anterior existen tres aspectos principales que deberían de mejorar en su producción: el coste, la funcionalidad y la capacidad de producción. Para que los biotensioactivos fueran competitivos económicamente (Mukherjee y *col.*, 2006) debería usarse sustratos baratos o de desecho que disminuyan los costes del proceso, desarrollarse bioprocesos eficientes, incluida la optimización de las condiciones de cultivo y procesos de separación rentables para la máxima producción y recuperación de biotensioactivos, y desarrollarse cepas superproductoras, mutantes o recombinantes, para aumentar los rendimientos. Para cualquiera de estas tres mejoras es necesario un mayor conocimiento de los mecanismos de regulación y de las cinéticas de producción en base al microorganismo y sustrato elegidos.

Los biotensioactivos pueden sintetizarse a partir de diversos sustratos y se está dando una gran importancia a los provenientes de recursos renovables (aceites vegetales, lecherías, destilerías, etc.) (Makkar y Cameotra, 2002). Normalmente, la

limitación de nitrógeno conduce a un incremento en la producción del biotensioactivo, y los iones y elementos traza también inciden en la biosíntesis. Concentraciones altas de iones en la fase acuosa inhiben la producción de biotensioactivos al afectar sus propiedades de interfase. Así por ejemplo, altas concentraciones de cloruro sódico inactivan a los glicolípidos de *Torulopsis apicola* (Georgiou y *col.*, 1992).

La calidad y cantidad de la producción de biotensioactivos dependen de modo importante de la fuente de carbono, de manera que sustratos inmiscibles en agua promueven la síntesis de biotensioactivos mientras que compuestos como glucosa, acetato y ácidos tricarbónicos conducen a la represión catabólica de la síntesis de biotensioactivos (Nitschke y *col.*, 2005).

Finalmente, el pH, la temperatura, la agitación y la disponibilidad de oxígeno también deben ser controlados para la producción de biotensioactivos (Desai y Banat, 1997; Cameotra y Makkar, 1998). Tarek y *col.*, (2006) han optimizado la producción de biotensioactivo a partir de *Nocardia amarae* usando aceite de oliva como fuente de carbono, y han descrito que los cultivos agitados tienen un mayor rendimiento que los estáticos, alcanzando el mayor rendimiento a 150 rpm, en su caso.

3. TREALOSALÍPIDOS

3.1. Estructura química de los trealosalípidos

Dentro de los biotensioactivos, los glicolípidos son los más estudiados debido a su alta tasa de producción, y a la utilización de materias primas renovables como fuente de carbono en su producción. Microorganismos del grupo de los micolatos, como son, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardia* y *Gordonia*, producen trealosalípidos con actividad superficial cuando crecen con hidrocarburos como fuente de carbono, incluyendo mono-, di- y tetraésteres, donde los restos lipídicos son cadenas largas de ácidos o hidroxiácidos grasos.

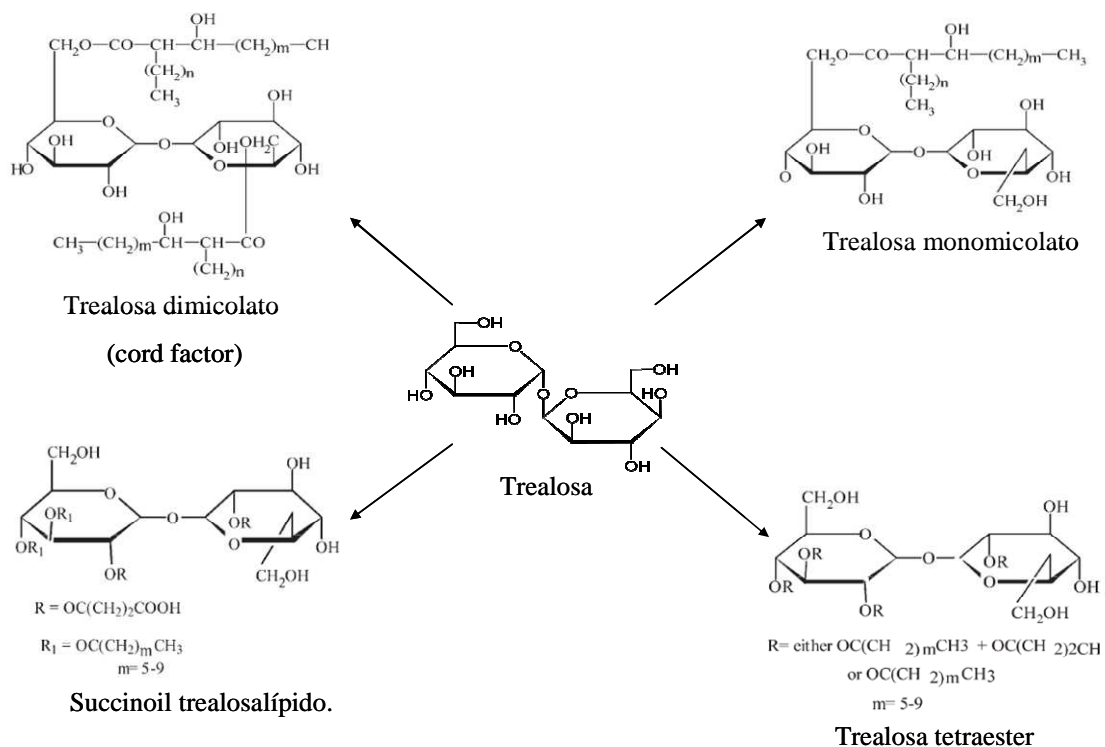


Figura 9. Estructura química de algunos trealosalípidos.

La trealosa es el componente básico de los glicolípidos de la pared celular de micobacterias y corinobacterias. Es un disacárido no reductor en el que dos moléculas de glucosa están unidas por un enlace α, α -1,1-glicosídico. Los

tensioactivos trealosalipídicos de diferentes microorganismos difieren en el tamaño y estructura de su ácido micólico, el número de átomos de carbono y el grado de insaturación (Asselineau y Asselineau, 1978) (Figura 9).

Tabla 7. Propiedades de diferentes biotensioactivos producidos por el género *Rhodococcus*.

| MICROORGANISMO | PRODUCTO | TENSIÓN SUPERFICIAL (mN m ⁻¹) | TENSIÓN INTERFACIAL (mN m ⁻¹) | CMC | REFERENCIAS |
|----------------------------------|-------------------------------|---|---|------|--------------------------|
| <i>R. erythropolis</i> DSM 43215 | Trealosa dicorinomicolato | 36 | 17 | 4 | Kim y col., 1990 |
| | Trealosa monocorinomicolato | 32 | 14 | 4 | |
| | Trehalosa-2,2',3,4-tetraester | 26 | <1 | 15 | |
| <i>R. erythropolis</i> SD-74 | Succinoil trealosalípido | 26 | 8 | 200 | Ishigami y col., 1987 |
| <i>R. rubropertinctus</i> 60003 | Todo el cultivo | 31 | 2.0 | n.d. | Ramsay y col., 1983 |
| <i>R. aurantiacus</i> 80001 | Todo el cultivo | 28 | 0.35 | n.d. | |
| <i>R. terrae</i> 70006 | Todo el cultivo | 30 | 3.0 | n.d. | |
| <i>Rhodococcus</i> strain 51T7 | Sobrenadante libre de células | 30 | n.d. | n.d. | Espuny y col., 1996 |
| <i>Rhodococcus</i> strain H13-A | Octaacil-trealosa | n.d. | 0.02 | 1.5 | Singer y Finnerty., 1990 |

El interés en los trealosalípidos como biotensioactivos se puede remontar al descubrimiento de dimicolatos de trealosa en la capa de emulsión de caldos de cultivo de *Athrobacter paraffineus* cuando se cultivaban las células sobre sustratos hidrofóbicos (Martin y col., 1991). El trealosalípido más conocido, es el llamado factor cuerda (cord factor). Es un componente de la pared celular de micobacterias. Tiene una cadena de ácido micólico unido por un enlace α -éster al C₆ de cada glucosa dando lugar a trealosa 6,6'-dimicolato (Figura 9) (Franzetti y col., 2010). Este

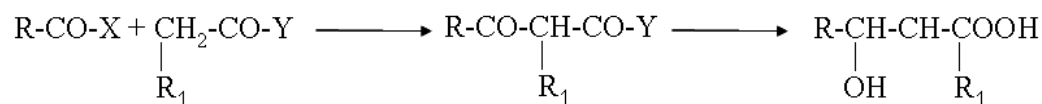
glicolípido es inmunogénico por lo que se ha intentado usar en la prevención de enfermedades como la tuberculosis (Besre y Chatterjee, 1994; Warwick *y col.*, 1994; Vergne y Dafne, 1998; Brennan y Nikaido, 1995).

Estos compuestos son capaces de reducir la tensión superficial del agua de 72 a 26-36 mN m⁻¹ y la tensión interfacial entre el agua y una fase hidrofóbica de 43 mN m⁻¹ a valores de 17 mN m⁻¹ y hasta por debajo de 1 mN m⁻¹.

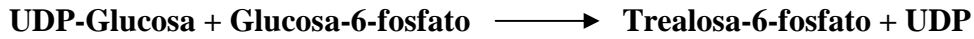
Se han elucidado varios tipos de trealosalípidos en respuesta a la presencia de n-alcanos en el medio de cultivo de bacterias del género *Rhodococcus*. Estos glucolípidos varían en el número y longitud de la cadena (C₂₀-C₉₀) de los ácidos grasos esterificados, así como en sus propiedades (Tabla 7). La mayoría de los trealosalípidos sintetizados por *Rhodococcus* y géneros relacionados están unidos a la envuelta celular y son producidos principalmente cuando los microorganismos crecen en hidrocarburos. Estas características tienen significantes consecuencias negativas en el nivel de producción y su recuperación para aplicaciones industriales (Lang y Philp, 1998).

3.2. Biosíntesis de trealosalípidos

La formación de los residuos micólicos se debe a una condensación tipo Claisen entre dos ácidos grasos, probablemente activados ambos como tioletéster:



donde X e Y se consideran los grupos activos. La trealosa-6-fosfato sintetasa (TPS) cataliza la reacción clave para la síntesis del residuo de azúcar final, trealosa-6-fosfato, uniendo dos unidades de α-D-glucopiranosil en C₁ y C_{1'}. UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato actúan probablemente como los precursores inmediatos:



En *Rhodococci* alcanotrópicos, TPS es inducida por los n-alcanos. Las reacciones con mayor implicación en la síntesis de trealosalípidos se han dilucidado para trealosa dimicolatos en *M. tuberculosis* donde la producción ocurre en las etapas finales de la síntesis de la pared celular. En esta fase, los ácidos micólicos sintetizados son transportados y unidos al complejo arabinogalactano peptidoglicano de la pared, seguido por la formación de trealosa dimicolato, la cual ocurre en cuatro reacciones (Figura 10). Las dos primeras se dan en el interior de la célula, después se transfiere el trealosa monomicolato al exterior de la célula gracias a un transportador donde ocurre la última reacción (Franzetti y *col.*, 2010; Lang y Philp, 1998).

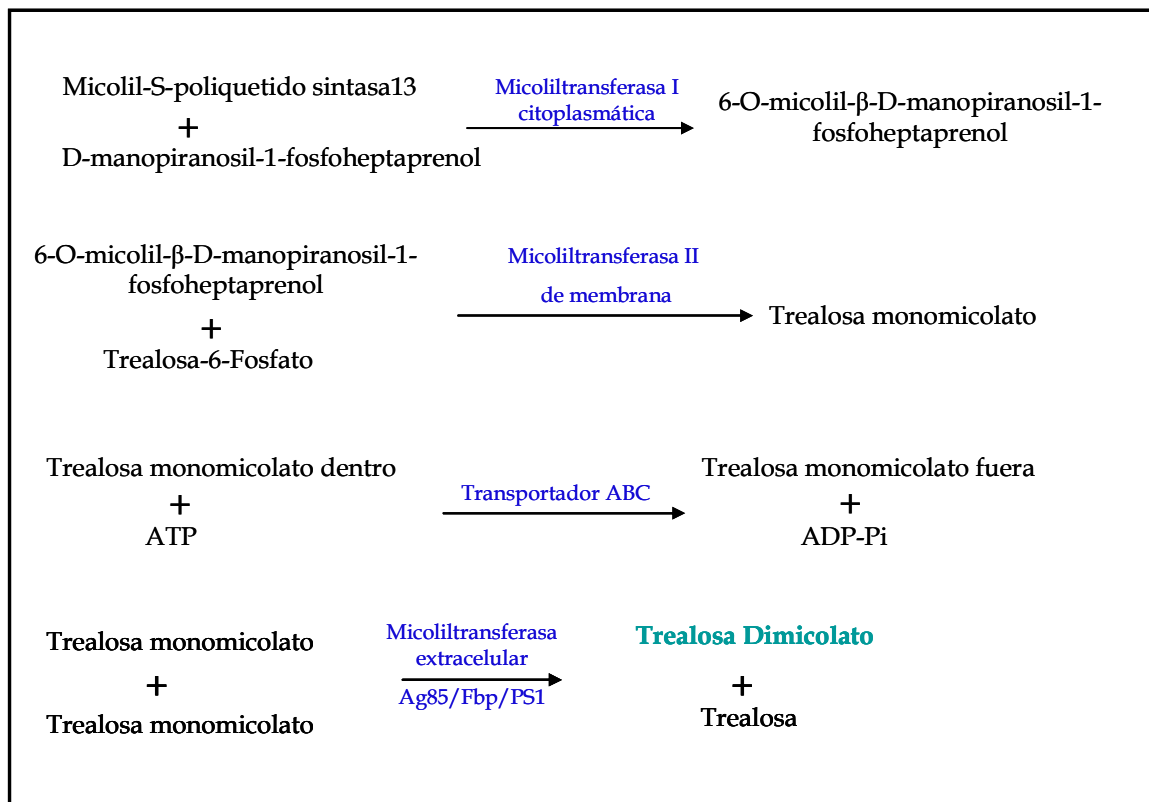


Figura 10. Vía biosintética de trealosa dimicolato.

3.3. Producción microbiana

Actualmente el principal obstáculo para la aplicación a gran escala de biotensioactivos es el elevado coste de producción. El tipo y cantidad de trealosalípido que se produce depende de las condiciones de crecimiento. Se ha descrito la producción de biotensioactivos unidos a la pared celular, capaces de reducir la tensión superficial, los cuales sólo se producen en presencia de hidrocarburos como fuente de carbono, así como la producción de bioemulsionantes extracelulares que se sintetizan sólo con sustratos solubles (Pirog y *col.*, 2004; Franzetti y *col.*, 2008).

Las condiciones de cultivo y el uso de sustratos de bajo coste pueden reducir el coste de producción (Ruggeri y *col.*, 2009; Uchida y *col.*, 1989; Abu-Ruwaida y *col.*, 1991; Espuny y *col.*, 1995). Por ejemplo, la producción de biotensioactivos suele estar asociada con la limitación de nitrógeno, de modo que la sobrefertilización, práctica común para la remediación *in situ*, podría tener un efecto negativo. La eficiencia y éxito comercial del proceso biotecnológico entero es un punto clave para la explotación de trealosalípidos, los cuales suelen encontrarse unidos a la superficie celular, incrementando el coste aguas abajo y disminuyendo el campo de producción. En las etapas de extracción de trealosalípido se han usado diferentes disolventes. El más utilizado es cloroformo:metanol (2:1) aunque también puede utilizarse el t-butilmetil éter o una mezcla de acetato de etilo:metanol (8:1). Otras técnicas utilizadas son la precipitación ácida, similar a la usada para ramnolípidos y surfactina, o diafiltración y precipitación con isopropanol.

Para determinar el contenido de trealosalípido en un medio de cultivo o un extracto se utiliza el método de la antrona (Hodge y Hofreiter, 1962). Este ensayo colorimétrico se basa en la reacción de antrona con el azúcar trealosa formando un complejo coloreado, el cual se puede cuantificar usando un espectrofotómetro. Otra opción sería el método del ácido sulfúrico-fenol (Dubois y *col.*, 1956). Finalmente se procede a la purificación del trealosalípido. Se lleva a cabo generalmente usando TLC o cromatografía en columna. Mediante TLC puede detectarse trealosalípido en un extracto a la vez que se obtiene información sobre la composición estructural. La fase

móvil que más se utiliza es cloroformo:metanol:agua (65:15:2 o 65:25:4). La purificación a gran escala usando columnas cromatográficas es más laboriosa ya que los biotensioactivos se producen a bajas concentraciones. Además la presencia de diferentes tipos estructurales de trealosalípidos y un gran número de otros tipos de lípidos con n-alcenos (sustrato en el proceso de producción), complica el proceso de purificación. Debido a esto se hace necesario un paso preliminar para eliminar el hidrocarburo usando diferentes mezclas de cloroformo: metanol.

La caracterización estructural del trealosalípido purificado se puede llevar a cabo trabajando con la molécula intacta o rompiendo la estructura entre el carbohidrato y el ácido graso. La espectroscopía de masas (MS) es el mejor método y se puede usar para identificar todas las estructuras individuales de la mezcla glucolipídica. Para la caracterización de los componentes ácidos graso o carbohidrato del trealosalípido se utiliza la cromatografía de gases acoplada a la MS (GC-MS). Para ello es necesaria la hidrólisis alcalina de la mezcla glucolipídica que da lugar a la conversión de la porción lipídica a éster metílico del ácido graso (Kretschmer y *col.*, 1982; Kuyukina y *col.*, 2001). La caracterización del ácido graso aporta una información esencial para la identificación de la estructura. El análisis del componente trealosa usando GC o GC-MS después de la conversión a derivados trimetilsililados aporta información sobre el enlace éster del ácido graso a la trealosa. Otras técnicas utilizadas para la caracterización del trealosalípido son el bombardeo atómico rápido-MS (FAB-MS) y más recientemente desorción matriz-asistida/ionización de láser (MALDI). También se ha utilizado el método de ionización electrospray-MS (ESI-MS) (Niescher y *col.*, 2006), aunque este estudio usa ionización positiva y puede ser muy complejo debido a la presencia de iones protonados con aducto de Na⁺. La ESI-MS en modo ión negativo usando HPLC-MS, podría ser una alternativa mejor (Marqués y *col.*, 2009).

3.4. Aplicaciones potenciales de los trealosalípidos

El potencial comercial de distintas especies de *Rhodococcus* es cada vez más atractivo (Tabla 8), fundamentalmente debido a su capacidad metabólica para degradar un amplio rango de contaminantes medioambientales y transformarlos en compuestos útiles. Esta propiedad hace que puedan ser utilizados en medio ambiente y en la industria biotecnológica. Un punto clave en la aplicación en biorremediación medioambiental es su especificidad, debido al hecho de que diferentes cepas microbianas producen diferentes tipos de moléculas. La aplicación de trealosalípidos muestra buenos resultados en experimentos de solubilización y biodegradación de diferentes compuestos orgánicos hidrofóbicos.

Se han observado actividades y propiedades en estos trealosalípidos que indican que podrían ser utilizados en aplicaciones industriales así como en el campo de la medicina debido a propiedades biológicas como antimicrobiana, antiviral, antiadhesiva, anticancerígeno, o propiedades inmunomoduladoras. Debido a su origen biológico son considerados más seguros que los tensioactivos sintéticos aunque se han realizado muy pocos estudios para confirmar su falta de toxicidad. En el sector farmacéutico y biomédico el elevado coste de producción y procesamiento aguas abajo se podría compensar debido a las pequeñas cantidades de producto que se requerirían.

La naturaleza dual de los biotensioactivos puede ayudar a los microorganismos a desplazar otros compuestos emulsionantes de las interfases aceite/agua. Tal propiedad de desemulsión se puede usar para romper emulsiones que forman varios pasos de la extracción y procesamiento del petróleo, obteniendo una mejor recuperación del producto.

Tabla 8. Posibles aplicaciones de trealosalípidos en diferentes campos.

| CAMPO DE APLICACIÓN | ACTIVIDAD | BIBLIOGRAFÍA |
|-----------------------|---|---|
| Medio ambiente | Biodegradación de hidrocarburos | Oberbremer y <i>col.</i> , 1990; Christofi e Ivshina, 2002 |
| | Aumento de la solubilidad de hidrocarburos | Park y <i>col.</i> , 1998; Page y <i>col.</i> , 1999; Peng y <i>col.</i> , 2007 |
| | Biorremediación | Noordman y Jansen., 2002; Kurane y <i>col.</i> , 1995. |
| | Menor toxicidad | Ivshina y <i>col.</i> , 1998; Chang y <i>col.</i> , 2004; Kanga y <i>col.</i> , 1997 |
| | Descontaminación de aguas contaminadas. Producto comercial: "EKOIL". | Ermolenko y <i>col.</i> , 1997 |
| Industria | Recuperación de petróleo de rocas y esquistos aceitosos | Finnerty y Singer, 1984; Ivshina y <i>col.</i> , 1998; Rapp y <i>col.</i> , 1979 |
| | Aumento de la biodegradabilidad de hidrocarburos | Kuyukina y <i>col.</i> , 2005 |
| | Extracción de hidrocarburos | Haddadin y <i>col.</i> , 2009 |
| Medicina | Menor irritación para la piel que tensioactivos químicos: aplicaciones cosméticas. | Marques y <i>col.</i> , 2009 |
| | Actividad antitumoral. Inducción de la diferenciación celular a monocitos e inhibición de la proliferación celular en líneas celulares HL60 de leucemia promioleocítica humana. | Isoda y <i>col.</i> , 1997; Natsuhara y <i>col.</i> , 1990; Orbach- arbouys y <i>col.</i> , 1983. |
| | Actividad antiviral: contra HSV e influenzavirus. | Azuma y <i>col.</i> , 1987 |
| | Actividad antibacteriana: contra grampositivos. | Vollbrecht y <i>col.</i> , 1999. |
| | Aumento de inmunidad no específica, inmunomodulación. | Parant y <i>col.</i> , 1977; Bekierkunst y <i>col.</i> , 1969; Yano y <i>col.</i> , 1984 |

4. MEMBRANAS BIOLÓGICAS Y MEMBRANAS MODELO

Las membranas biológicas constituyen un elemento esencial en la vida de los seres vivos, puesto que no sólo confieren a las células individualidad, sino que al mismo tiempo cumplen una serie de funciones biológicas esenciales. Actúan como barreras selectivamente permeables, permiten el mantenimiento de un gradiente iónico a ambos lados de la membrana (por lo tanto el potencial de membrana) y el paso o transporte de solutos de un lado a otro de la célula siguiendo un gradiente de concentración. Intervienen en respuestas a señales externas a las células, mediante receptores que son capaces de reconocer y responder de manera específica a señales del medio extracelular (inhibiendo o estimulando actividades internas como el inicio de la división celular, procesos de inmunidad, la elaboración de más glucógeno, movimiento celular, liberación de calcio de las reservas internas, etc.), y pueden llevar a cabo procesos de fusión o de fisión sin necesidad de crear grandes roturas en las superficies celulares.

4.1. Estructura de la membrana plasmática

Mientras que en las células procariotas existe un único compartimento generado por la membrana plasmática, en las células eucariotas además existen una serie de membranas intracelulares que componen compartimentos cerrados u orgánulos, cada uno de los cuales presenta una especialización funcional.

Los componentes principales de las membranas son lípidos, proteínas y glúcidos (en forma de glicolípidos o glicoproteínas). Los lípidos proporcionan una barrera flexible y semipermeable, mientras que las proteínas conforman receptores y canales que median la transducción de información y regulan el transporte de moléculas. Dependiendo del tipo de célula, y de si se trata de la membrana plasmática o de un orgánulo subcelular, los porcentajes de cada uno de los

componentes puede variar, poniendo de manifiesto la gran variedad de funciones y procesos en los que pueden estar implicadas.

Todas las membranas presentan una unidad estructural básica llamada bicapa lipídica. En 1972, Singer y Nicholson propusieron el conocido modelo de mosaico fluido (Singer y Nicholson, 1972) (Figura 11A). Este modelo propone que los lípidos se disponen formando una bicapa donde se distribuyen las proteínas. La distribución de los lípidos y proteínas es asimétrica generando diferencias en ambas hemicapas. Las proteínas integrales están embebidas en la bicapa lipídica a través de uno o varios dominios, los cuales presentan residuos con cadenas laterales hidrofóbicas con las que interaccionan con los grupos acilo de los fosfolípidos, anclando las proteínas a la membrana. Estas proteínas pueden atravesar totalmente la membrana dejando dominios extramembranosos a ambos lados de la bicapa o sólo parcialmente. Los dominios o fragmentos transmembrana generalmente adoptan una estructura en hélice α aunque también se pueden encontrar en forma de hoja β . Las proteínas periféricas sin embargo están unidas a las superficies de las membranas por medio de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno con grupos lipídicos o grupos hidrocarbonados de cadena larga unidos covalentemente a la membrana.

Este modelo postula que tanto lípidos como proteínas pueden difundir libremente en la membrana, pero hoy en día se sabe que los lípidos no tienen libertad total de difundir lateralmente ya que la distribución lateral de los lípidos y proteínas es heterogénea y muy compleja (Ohvo-Rekila y *col.*, 2002). Numerosas observaciones experimentales han revelado la presencia de grupos de receptores de membrana y la existencia de dominios lipídicos diferentes, denominados "rafts" o balsas lipídicas (Hwang y *col.*, 1998; Simons y Vaz, 2004). Estas balsas están formadas principalmente por esfingolípidos y colesterol (Figura 11B), que se asocian espontáneamente entre sí haciendo que su movilidad disminuya, convirtiéndose en una región membranosa más densa que el resto. Se cree que estas asociaciones son muy abundantes y dinámicas, y hacen que las membranas celulares sean en realidad un mosaico de dominios más densos que viajan entre los glicerofosfolípidos más fluidos. Hay experimentos que apoyan la idea de que ciertas proteínas tendrían mayor apetencia por estas balsas y por tanto viajarían en el interior de ellas. Las fuerzas cohesivas que

mantendrían estas agrupaciones vendrían de interacciones lípido-lípido, proteína-proteína y proteína-lípido, así como de efectores supramoleculares (citoesqueleto, matriz extracelular, otras células). Comparado con el modelo del mosaico fluido, este nuevo modelo, denominado “mosaico fluido estructurado dinámicamente”, nos da una descripción más real de la estructura y propiedades funcionales de las biomembranas (Vereb y *col.*, 2003).

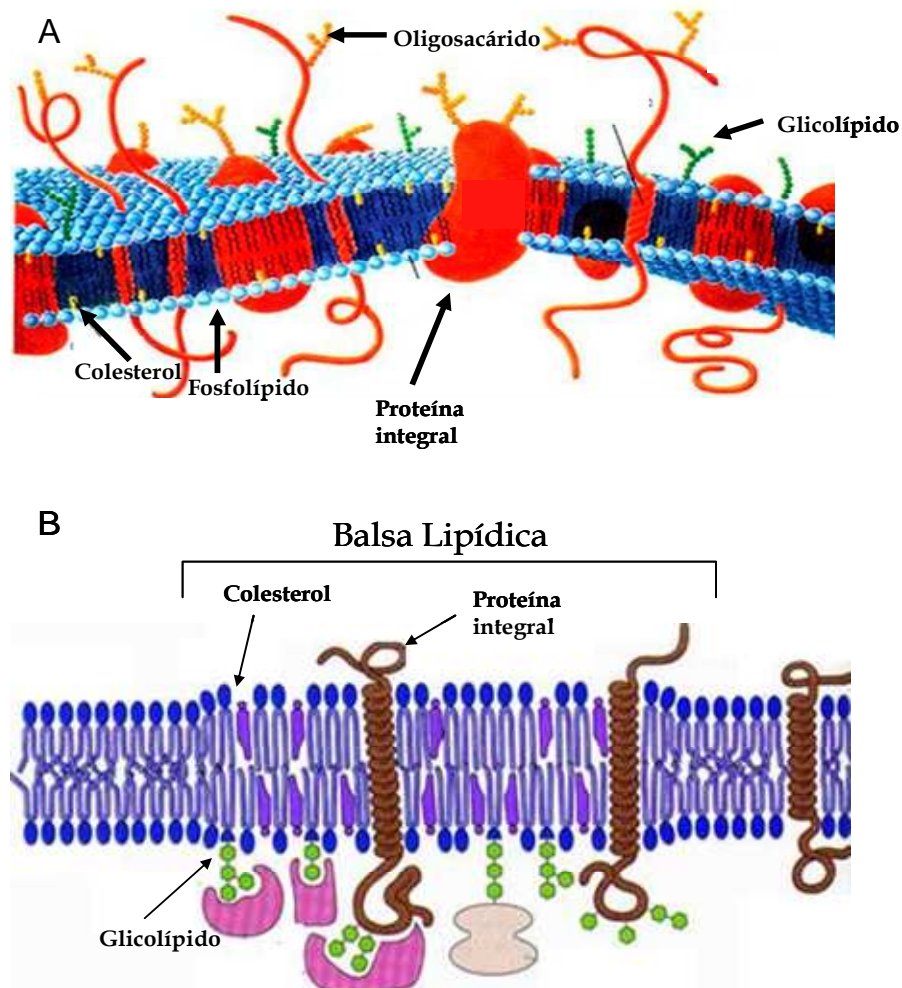


Figura 11. A) Modelo de mosaico fluido. B) Balsas lipídicas.

En general se han descrito cuatro tipos de movimientos para un lípido: “*flip-flop*” o movimiento de un lado a otro de la membrana, movimiento transversal donde los lípidos intercambian sus posiciones con sus vecinos en la misma monocapa, movimiento rotacional de los lípidos a lo largo de su eje longitudinal, y movimientos entrópicos de las cadenas hidrocarbonadas que llevan a un desorden local. Los saltos

entre monocapas son muy infrecuentes debido a que las cabezas polares de los lípidos se encuentran con la barrera de las cadenas de ácidos grasos. El colesterol posee sin embargo la capacidad de hacer movimientos “*flip-flop*” con relativa facilidad. El movimiento de los lípidos garantiza la fluidez de la bicapa así como procesos como el transporte o la actividad enzimática. Las proteínas, siempre que no presenten interacciones especiales, pueden difundir lateralmente, pero no son capaces de pasar de un lado a otro de la membrana.

4.2 Lípidos de membrana

Los lípidos constituyen alrededor de un 50% de la masa de las membranas en una célula animal. Dentro de la célula, los diferentes compartimentos de las membranas presentan diferentes composiciones lipídicas. Los tres tipos principales de lípidos de membrana son los fosfolípidos, glicolípidos y el colesterol.

4.2.1. Fosfolípidos

Son los lípidos más importantes de las membranas. Una molécula de fosfolípido está formada por cuatro componentes: ácido graso, un esqueleto al que se unen los ácidos grasos, un fosfato y un alcohol unido al fosfato. Los ácidos grasos que más comúnmente forman parte de los fosfolípidos de la membrana de células eucariotas son los que cuentan con un número de átomos de carbono comprendido generalmente entre 16 y 20, tanto saturados como insaturados (cuyos dobles enlaces *cis* producen un acodamiento en la estructura). Los ácidos grasos más abundantes son el ácido esteárico, palmítico y mirístico dentro de los saturados, y el ácido oleico como insaturado. El esqueleto al que se unen los ácidos grasos puede ser el glicerol o la esfingosina, dando lugar a los glicerofosfolípidos o esfingofosfolípidos respectivamente.

En los **glicerofosfolípidos** el grupo hidroxilo de la posición sn-3 del glicerol se une a un grupo polar que contiene fosfato y los otros dos grupos hidroxilo se unen a

dos ácidos grasos de cadena larga generalmente uno saturado y otro insaturado (Figura 12). Los alcoholes más comunes de los glicerofosfolípidos son la colina, etanolamina, serina, glicerol e inositol, dando lugar a los glicerofosfolípidos principales de las membranas: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG) y fosfatidilinositol (PI) (Figura 13).

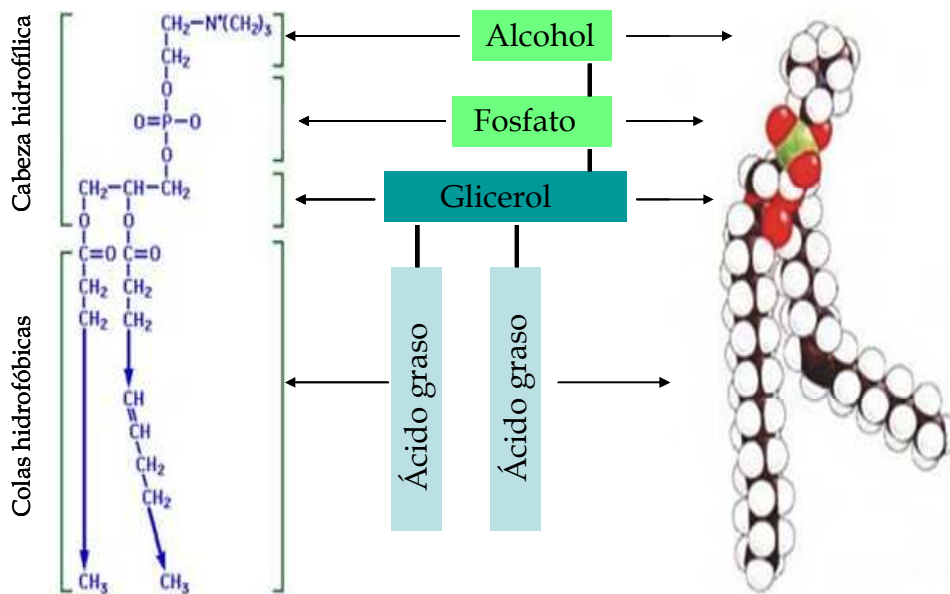


Figura 12. Estructura de un fosfoglicérido.

Las principales clases de fosfolípidos presentes en células animales son las PCs y PEs, que se diferencian específicamente por sus cabezas polares y por la presencia de dobles enlaces en una o en ambas cadenas hidrocarbonadas.

La PC o lecitina es el fosfolípido más común en las membranas biológicas. Se encuentra fundamentalmente en la monocapa externa de la membrana. Las cabezas polares son zwitteriónicas, y debido a la ausencia de donadores de enlaces de hidrógeno no son capaces de formar enlaces de hidrógeno entre sí. Además proporciona superficies de membrana hidratadas o cargadas, permitiendo al agua e iones unirse a sus cabezas polares.

La PE, al igual que la PC, posee una cabeza polar zwitteriónica pero ésta sí que puede formar enlaces de hidrógeno con otras cabezas polares de PE. Se encuentran preferentemente en la monocapa interna. Las superficies ricas en PE son hidrofóbicas

y poco hidratadas lo que promueve la formación de estructuras de tipo no lamelar para compensar el efecto hidrofóbico. La inestabilidad de este fosfolípido es necesaria en funciones como la fusión de membranas.

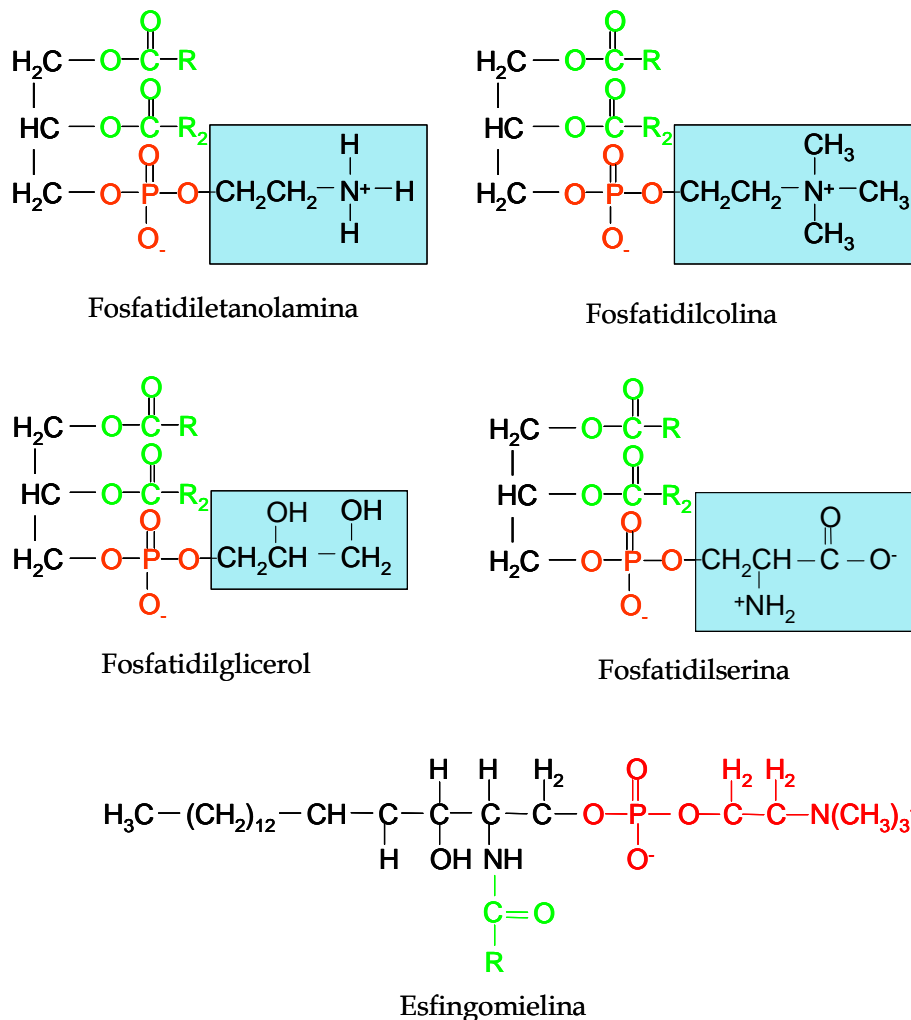


Figura 13. Ejemplos de fosfolípidos presentes en la membrana.

La PS y el PG tienen carga negativa. La PS se encuentra en la mayoría de membranas de mamíferos, siendo el fosfolípido cargado negativamente más abundante. Las cabezas polares tienen tanto donadores como aceptores de enlaces de hidrógeno, pudiendo así formar enlaces de hidrógeno entre ellas, lo que hace que el fosfolípido presente temperaturas de transición de fase de gel a líquido-cristalino altas. Se encuentra normalmente en la cara interna de la membrana y al igual que la PC proporciona superficies de membrana hidratadas o cargadas. Por otro lado, el PG no

se estabiliza por la formación de enlaces de hidrógeno y su temperatura de transición es similar a la de PCs de peso molecular similar.

En el caso de los **esfingofosfolípidos**, la esfingomielina (SM) es el único tipo que se encuentra en la membrana. Tiene como unidad estructural la ceramida y su esqueleto no es el glicerol sino la esfingosina. El grupo amino de esta esfingosina está ligado a un ácido graso mediante un enlace amida y el grupo hidroxilo primario de la esfingosina está esterificado a la fosforilcolina. La SM es un componente fundamental de la membrana plasmática de las células eucariotas. Los esfingolípidos contienen cadenas acílicas largas y muy saturadas que les permite empaquetarse fácilmente juntos, una propiedad que da a estos compuestos temperaturas de transición de fase mucho mayores que las del resto de fosfolípidos de la membrana. La diferente capacidad de empaquetamiento de esfingolípidos y fosfolípidos es uno de los factores que contribuyen a la formación de dominios en la membrana (Ramstedt y Slotte, 2002; Brown y London, 2000).

4.2.2. Colesterol

El colesterol es un esteroide formado por la unión de cuatro anillos hidrocarbonados. A un extremo se le une una cola hidrocarbonada y al otro un grupo hidroxilo. En las membranas se orienta paralelo a las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos vecinos. La cabeza polar del colesterol se alinea con las cabezas polares de los fosfolípidos e inmoviliza los primeros carbonos de las cadenas hidrocarbonadas estabilizando la membrana (Figura 14).

El colesterol previene el compactamiento de las cadenas hidrocarbonadas a bajas temperaturas, así como el aumento de las interacciones débiles entre las mismas, evitando que cristalicen. Su presencia afecta principalmente al orden y la estructuración de las cadenas hidrocarbonadas, generando una fase lipídica ordenada donde las cadenas se encuentran relativamente rígidas, similar al estado gel, pero permitiendo una importante difusión en el plano de la membrana, como sucede en la fase líquido-cristalina. Se ha observado que el efecto de la presencia del

colesterol no es lineal con su concentración, de manera que bajas cantidades de colesterol incrementan la permeabilidad de la membrana y a concentraciones mayores puede llegar a suprimir la transición de fase y disminuir la permeabilidad. La presencia de colesterol afecta a las propiedades físicas de la bicapa y su ubicación en la membrana depende principalmente de las posibles interacciones con las distintas zonas de la misma.

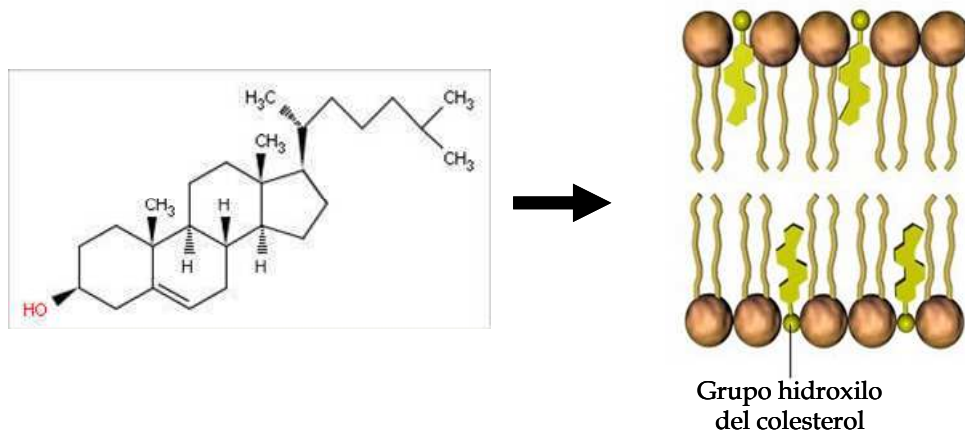


Figura 14. Estructura del colesterol.

4.3. Polimorfismo lipídico

La gran variedad de lípidos que contienen las membranas biológicas, sugiere que éstos juegan un papel muy importante dentro de las células. Estos lípidos adoptan diferentes tipos de fases además de la fase bicapa característica de la membrana. Estas estructuras no bicapa están relacionadas con la función y estructura de las biomembranas. Así, la importancia biológica del polimorfismo lipídico se pone de manifiesto en procesos tan diversos como la fusión de membranas, el tráfico de proteínas mediado por vesículas, el movimiento transversal de moléculas a través de la membrana, o la estabilización de complejos de proteínas de membrana (Cullis y De Kruijff, 1979).

Las fases lipídicas pueden clasificarse según el tipo de red u organización de largo rango, el orden de las cadenas acílicas (fluidas o extendidas), la curvatura de la

fase (normal o inversa), la forma molecular dinámica, o el parámetro de empaquetamiento P (ver Introducción, sección 1.3.1).

El sistema de nomenclatura para las diferentes mesofases liotrópicas (conformaciones que pueden adoptar los lípidos debido al cambio en el contenido de agua) más ampliamente utilizado es el propuesto por Luzzati (Luzzati, 1968). El tipo de red se denota por medio de una letra mayúscula. Las estructuras periódicas en una dimensión son bicapas o fases lamelares (L). Las cadenas hidrocarbonadas se pueden encontrar en un estado desordenado o fluido todo-*gauche* (subíndice α), como cadenas elongadas todo-*trans* (subíndice β) con una conformación ordenada tipo gel o como cadenas con enrollamiento helicoidal o mixtas (subíndice δ). Las fases hexagonales (H), así como las oblicuas y las rectangulares, son estructuras periódicas en dos dimensiones. Finalmente, como estructuras periódicas en tres dimensiones cabe destacar las estructuras cúbicas (Q). Las fases no lamelares pueden ser fases de tipo I o fases normales (aceite en agua), cuando una matriz polar rodea a las cadenas hidrocarbonadas, o fases tipo II o invertidas (agua en aceite), cuando el disolvente acuoso y las cabezas polares están rodeados por una matriz hidrofóbica (Seddon, 1990).

Los lípidos puros dispersos en estado líquido-cristalino generalmente adoptan, además de la fase micelar a bajas concentraciones, fases lamelares (bicapas lipídicas) y fase hexagonal invertida- H_{II} , la fase no lamelar más común en sistemas biológicos. Proteínas y péptidos (péptidos ionofóricos, citotóxicos, péptidos de fusión viral) pueden hacer que los lípidos de membrana adopten fases no lamelares y por otro lado, los cambios conformacionales de las proteínas como los asociados a la unión de ligandos pueden requerir de fosfolípidos que adopten dichas fases (Epanand, 1998).

Las fases lamelares (L) o bicapas se pueden dividir en función de la temperatura en dos estados o fases diferentes: fase gel o fase líquido-cristalina (Figura 15). En fase gel, las colas hidrocarbonadas se encuentran en un estado parcialmente rígido, altamente ordenado, los dobles enlaces adoptan una configuración *trans* y se empaquetan en redes bidimensionales cuasi-hexagonales, que se pueden disponer de tres formas diferentes: paralelas a la normal de la bicapa

(L_β), inclinadas (L_β'), o interdigitadas (L_β^i) (Marsh, 1980). La fase lamelar fluida (L_α) o líquido-cristalina se caracteriza por el desorden de las cadenas acílicas. Esto se debe a la rotación en torno a enlaces C-C, con la aparición de una disposición *gauche*, generalmente cerca del extremo metilo terminal de la cadena, lo que produce desviaciones de 60° . Estos acodamientos provocan una disminución en la anchura de la bicapa y además aumentan el área superficial por molécula de lípido.

La temperatura es un factor determinante de la fase en la que se encuentra el lípido. Los cambios en el estado físico de la membrana, en función de la temperatura y la composición se definen en un diagrama de fases. La temperatura a la cual coexisten los dos tipos de fase se denomina temperatura de transición (T_m) y su valor depende del tamaño de las cadenas hidrocarbonadas así como de su grado de saturación.

Por encima de la T_m los lípidos se encuentran en un estado líquido-cristalino (L_α), mientras que por debajo están en fase gel (L_β). Antes de llegar al estado líquido-cristalino, es decir, a una temperatura menor y con una entalpía también menor se ha observado en algunos fosfolípidos la existencia de otra fase, P_β , donde la superficie de la membrana presenta leves ondulaciones y se conoce como pretransición de fase. En el estado P_β existe cierto grado de isomerización *trans/gauche* intermedio entre las fases L_α y L_β .

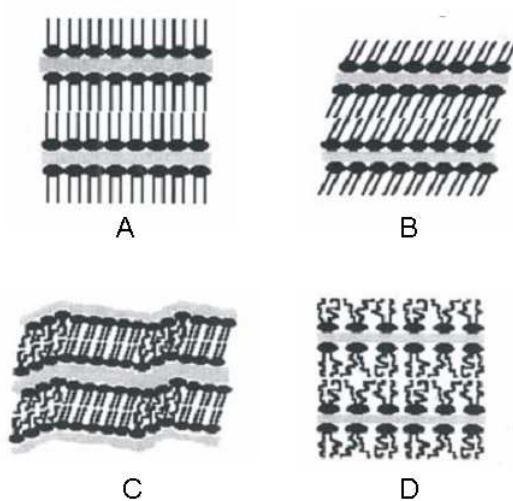


Figura 15. Disposición molecular para las diferentes fases lamelares. (A) Fase gel L_β ; (B) Fase gel inclinada, L_β' ; (C) Fase ondulada, P_β ; (D) Fase líquido-cristalina, L_α .

La T_m de los fosfolípidos puros está bien definida y la transición se produce de forma cooperativa, sin embargo en sistemas biológicos donde existen mezclas lipídicas complejas, formadas por más de un tipo de lípido, la transición se produce en un intervalo de temperaturas y suele existir una cooperatividad más baja. La presencia de fosfolípidos de cadena corta o con insaturaciones en sus cadenas produce un descenso de la T_m , debido a que una menor longitud de las cadenas reduce la tendencia de las colas hidrocarbonadas a interactuar entre ellas, y la presencia de dobles enlaces producen torsiones en las colas apolares que pueden facilitar su movilidad. Por otra parte la presencia de fosfolípidos saturados en la bicapa aumenta la T_m debido a que estos fosfolípidos presentan una elevada capacidad de agrupación y baja movilidad.

Existen diferentes métodos para determinar la T_m como son la resonancia magnética nuclear, resonancia de spin electrónico, fluorescencia o técnicas microcalorimétricas, siendo estas últimas el método de elección, pudiendo determinarse no sólo la T_m sino también los parámetros termodinámicos asociados al cambio de fase.

La preferencia de una especie lipídica para dar una estructura característica depende de su forma molecular dinámica, así como del parámetro de empaquetamiento (P). Además, un parámetro que también controla el polimorfismo de fase es la curvatura de Gruner (Gruner, 1985), la cual postula que las restricciones impuestas por el empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas y de las fuerzas que actúan a nivel de las cabezas polares de los lípidos determinan la curvatura que adopta una monocapa.


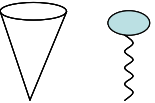

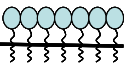
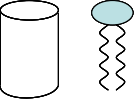
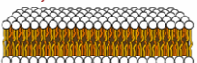
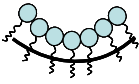
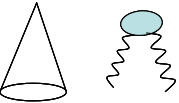

Como se puede observar en la Tabla 9, los lípidos cuya cabeza polar ocupa un área menor que la de sus cadenas acíclicas (tipo cono, como las fosfatidiletanolaminas) tenderán a formar fases invertidas como las fases hexagonales invertidas o micelas invertidas con curvatura negativa. Aquellos fosfolípidos que tienen un área de cabeza polar proporcionalmente mayor al área de sus cadenas hidrocarbonadas tendrán una geometría tipo cono invertido y su tendencia natural será a formar micelas y estructuras con curvatura positiva. Este es el caso de los lisofosfolípidos. Finalmente los lípidos con un área de cabeza polar similar a la de su región

hidrocarbonada como la fosfatidilcolina, tendrán una geometría cilíndrica y se acomodarán formando fases en bicapa.

Mezclas complementarias de lípidos con diferente tendencia a formar estructuras con curvatura negativa y positiva pueden adoptar estructuras de tipo bicapa (Hafez y Cullis, 2001; Janes, 1996).

Además de la forma del lípido, el tipo de estructura que éste adopta está modulada por otros factores como son el grado de insaturación de la región hidrofóbica, el tamaño de la cabeza polar, así como su grado de ionización. Propiedades extrínsecas como el pH, el grado de hidratación e ionización, la presencia de otros lípidos o de cationes divalentes en la mezcla, o la temperatura, también afectan al tipo de fase (Cullis y *col.*, 1986).

Tabla 9. Tendencia de los lípidos a adoptar una determinada fase en relación a la forma molecular dinámica y la curvatura.

| Curvatura | Forma molecular | Fase | Ejemplos |
|--|---|--|---|
|  $R_o > 0$ |  Cono Invertido |  Micelas | Lisofosfolípidos Detergentes Fosfolípidos con gran repulsión entre grupos polares. |
|  $R_o = 0$ |  Cilindro |  Bicapas planas | Fosfatidilcolina Esfingomielina Fosfatidilserina Fosfatidilglicerol Fosfatidilinositol |
|  $R_o < 0$ |  Cono |  H_{II} Micelas invertidas | Fosfatidiletanolamina insaturada Cardiolipina Colesterol Ácido fosfatídico (pH < 6, Ca^{2+}) Ácido fosfatídico (pH < 3-4) Fosfatidilserina (pH < 3-4) |

4.4. Membranas modelo

Los liposomas o vesículas fosfolipídicas son agregados coloidales formados por una o más bicapas cerradas. Poseen la habilidad de reproducir la organización y las funciones principales de las células y presentan una similitud con las bicapas biológicas. Desde su descubrimiento en la década de los 60, y debido a sus características morfológicas y estructurales, han tenido una gran importancia en numerosas áreas de investigación siendo utilizados como modelos de membranas biológicas para llevar a cabo estudios en diferentes campos tales como la biofísica, fisicoquímica, farmacología, cosmetología, alimentos, y bioquímica.

Estos agregados se pueden preparar con lípidos obtenidos de fuentes naturales o de origen sintético, cuya estructura química confiere características específicas a la bicapa, determinando su interacción con el medio. Su utilización en el estudio de mecanismos biológicos se debe principalmente a propiedades tales como estructura, composición química y tamaño, las cuales derivan fundamentalmente de las propiedades de las moléculas que los conforman, en este caso los fosfolípidos. Las propiedades de la superficie del liposoma y, en consecuencia, el tipo de interacciones que se darán con el medio, quedarán definidas por las características de la cabeza polar del fosfolípido.

El hecho de que las moléculas fosfolipídicas en presencia de un medio acuoso se conformen en bicapas, depende de la proporción lípido-agua, así como del parámetro de empaquetamiento. Cuando los fosfolípidos se dispersan en medio acuoso ocasionan una reorganización de las moléculas de agua, que conlleva un aumento de la energía libre. Para minimizar este coste energético, las partes hidrófobas de los fosfolípidos se agrupan de tal manera que el número de moléculas de agua afectadas sea mínimo. Por esta razón, los fosfolípidos se alinean exponiendo sus cabezas polares al medio acuoso y las cadenas hidrocarbonadas hacia el interior formando una bicapa fosfolipídica. Esta estructura sigue siendo energéticamente desfavorable por lo que la bicapa lipídica tenderá a cerrarse sobre sí misma evitando que la parte hidrófoba entre en contacto con el disolvente polar dando lugar a liposomas (Figura 16).

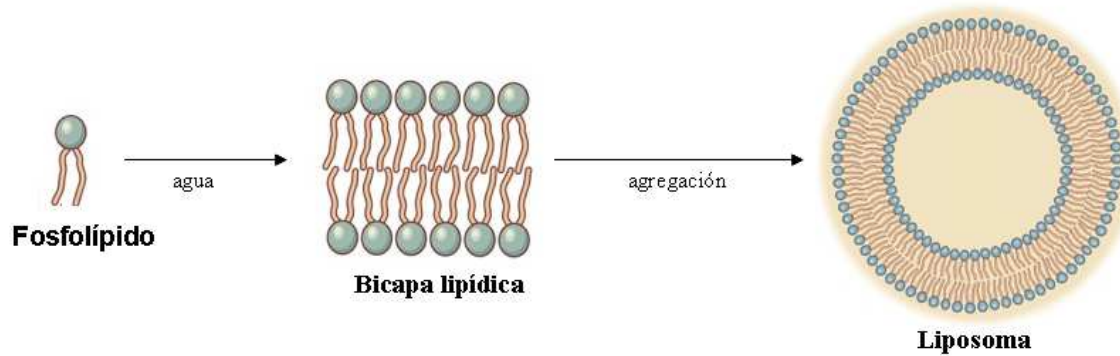


Figura 16. Formación de liposomas en un medio acuoso.

Los liposomas se clasifican fundamentalmente atendiendo a dos propiedades: la lamellaridad (número de bicapas concéntricas) y el tamaño. Una de las grandes ventajas de los liposomas es que la obtención de diferentes tamaños y lamellaridades depende exclusivamente del método de preparación.

En cuanto a las vesículas multilamelares, también se utilizan los términos vesículas oligolamelares OLV (Oligolamellar Vesicles) cuando contienen varias bicapas pero en menor número que las multilamelares, y vesículas multivesiculares o MVV (Multivesicular Vesicles) constituidas por bicapas que no son concéntricas.

Para la preparación de MLV se elimina el disolvente orgánico de la mezcla de lípidos de la composición deseada hasta obtener una fina película en el fondo de un tubo. A continuación se añade el tampón acuoso adecuado y se agita vigorosamente hasta obtener una muestra homogénea, manteniendo la temperatura por encima de la temperatura de transición de gel a líquido-cristalino del lípido que las forme (Bangham y *col.*, 1965). Es un procedimiento de preparación muy rápido y sencillo y aplicable a una gran variedad de mezclas lipídicas. La vida media de los liposomas depende del tamaño de las partículas, la carga superficial y la permeabilidad de la bicapa. Por lo tanto, la naturaleza y densidad de carga superficial de los liposomas afectan a su estabilidad, difusión, distribución e interacciones con células diana. Las MLV son las estructuras adecuadas para el estudio de las propiedades biofísicas de las membranas y aportan valiosa información sobre la dinámica y estructura de sus componentes.

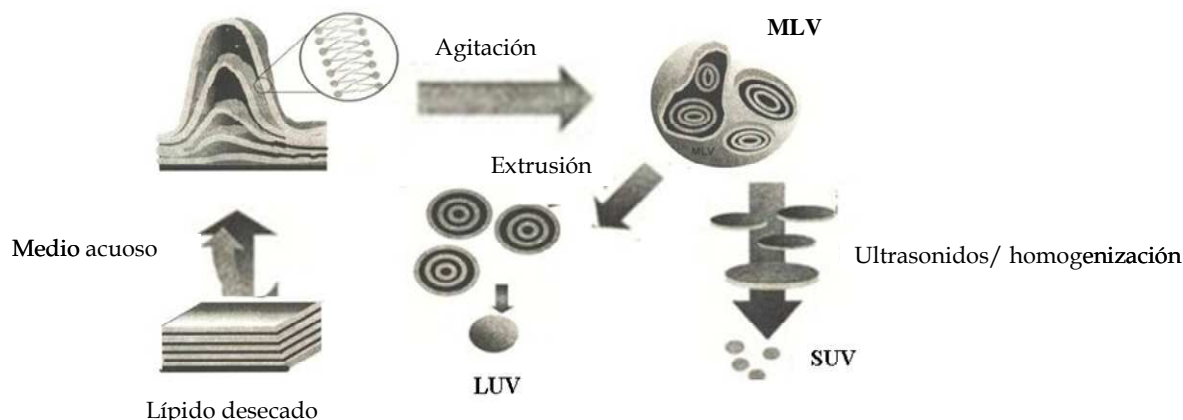


Figura 17. Representación esquemática de la formación de vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares grandes (LUV) y vesículas unilamelares pequeñas (SUV).

Para la formación de vesículas unilamelares es necesario el aporte de energía al sistema. Uno de los métodos más extendidos de preparación de las vesículas unilamelares pequeñas (SUV) es por tratamiento con ultrasonidos de vesículas multilamelares (Saunders y *col.*, 1962). Por otra parte, para conseguir que tengan un tamaño homogéneo se puede llevar a cabo una selección por filtración en gel (Huang, 1969). Las vesículas unilamelares pequeñas presentan un radio de curvatura muy alto, habiendo restricciones en el empaquetamiento de los fosfolípidos que las forman, lo que hace que se perturben sus propiedades físicas en comparación con las MLV y se restrinja su uso como membrana modelo.

Las vesículas unilamelares grandes, o LUV, también se forman a partir de vesículas multilamelares por extrusión a través de filtros de policarbonato de tamaño de poro definido (Hope y *col.*, 1985; MacDonald y *col.*, 1991) (Figura 17). Existen otros procedimientos para la obtención de LUVs como el que se basa en la solubilización del lípido con detergentes y su posterior diálisis (Mimms y *col.*, 1981), o la utilización de disolventes orgánicos en el denominado método de evaporación en fase reversa (Szoka y Papahadjopoulos, 1978) (Figura 17). La presencia de numerosos compartimentos interlamelares en las MLV hace que sea más adecuada la utilización de LUV en estudios de permeabilización o fusión de membranas.

4.5. Permeabilización y solubilización de membranas

La mayoría de los componentes de las membranas biológicas, son moléculas anfifílicas, las cuales forman cristales o precipitados insolubles en medio acuoso. Los tensioactivos, por su naturaleza anfifílica, se han venido utilizando para la liberación de metabolitos en cultivos microbianos (Miozzari y *col.*, 1978), para realizar estudios estructurales de membranas celulares (Lichtenberg y *col.*, 2000), para la incorporación de macromoléculas en el citoplasma (Meiners y *col.*, 1991; Le Maire y *col.*, 2000) y en procesos de permeabilización celular (Le Maire y *col.*, 2000; Schreier y *col.*, 2000). No obstante, ciertos aspectos de su interacción con las membranas no están totalmente claros aún. En consecuencia, el estudio de las propiedades fisicoquímicas de los sistemas constituidos por tensioactivos y membranas fosfolipídicas se ha desarrollado extensamente, especialmente en lo concerniente a los cambios en su permeabilidad y su solubilización.

La solubilización se define como la formación de disoluciones isotrópicas con estabilidad termodinámica, de sustancias normalmente insolubles o débilmente insolubles en un disolvente dado, por la introducción de un componente o componentes anfifílicos solubles o detergentes (Elworthy y *col.*, 1968). Esta propiedad de los tensioactivos se utiliza para aislar y purificar proteínas de membrana (Helenius y Simons, 1975).

El detergente puede atacar a la bicapa lipídica en forma monomérica (**Mecanismo transbicapa de solubilización**) (Figura 18A). Los monómeros de detergente se insertan en la membrana de una manera no cooperativa y mediante movimientos de *flip-flop* similares a los que ocurren con los fosfolípidos se distribuyen en ambas monocapas, formando un agregado mixto (Le Maire y *col.*, 1987). Como resultado se puede producir la formación de microcanales o microporos con moléculas de detergente en los extremos (Mazer y *col.*, 1980; Smart, 1971), o se forman micelas cilíndricas alargadas (Edwards y *col.*, 1989). A través de estas brechas y posiblemente mediante procesos difusivos los metabolitos almacenados intracelularmente son excretados o liberados al medio de cultivo (Brodelius, 1988). La formación de estos canales son temporales y no deberían dañar la estructura de las

membranas celulares, conservándose las células viables para continuar realizando los procesos metabólicos conducentes a crecimiento y biosíntesis (Thimmaraju *y col.*, 2003).

Si el detergente ataca la bicapa en forma micelar (**Mecanismo micelar de solubilización**), los lípidos de membrana se extraen de la monocapa externa por la interacción con estas micelas. Hay una redistribución de los fosfolípidos desde la monocapa interna a la externa que provoca que lentamente la membrana se fragmente y finalmente se solubilize (Kragh-Hansen *y col.*, 1998) (Figura 18B).

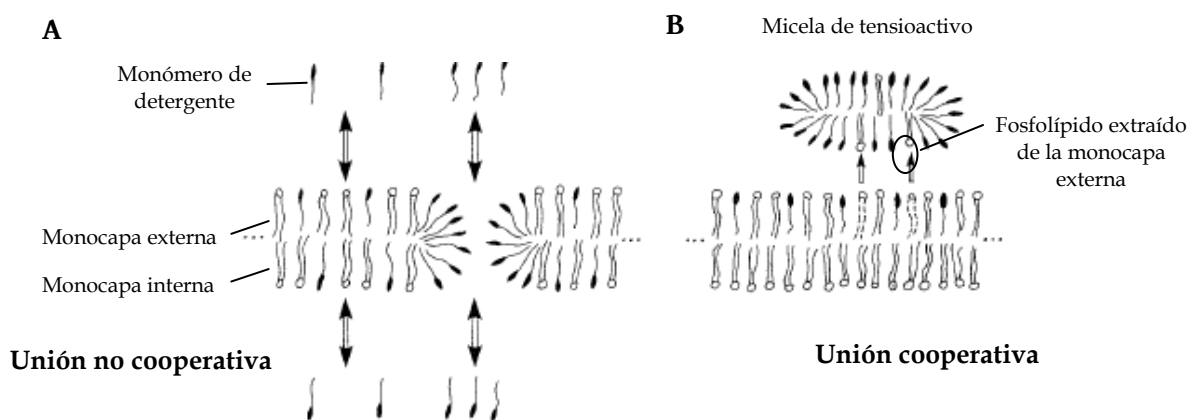


Figura 18. Representación de los mecanismos de solubilización. (A) Mecanismo Transbicapa, (B) Mecanismo Micelar (adaptado de Kragh-Hansen *y col.*, 1998).

En los procesos de permeabilización y solubilización pueden distinguirse cuatro etapas:

- A)** A bajas concentraciones de tensioactivo, éste comienza a interactuar con los fosfolípidos; pero aún es mayor el número de regiones no ocupadas por las moléculas del detergente. Esta interacción provoca cambios en las propiedades físicas de la membrana como la fluidez o la temperatura de transición de fase.
- B)** Conforme aumenta la concentración del detergente, comienzan a saturarse las posibles regiones de unión (punto de la concentración de saturación, C_{Sat}). Se producen cambios en la estructura de la bicapa que se traducen en cambios en

la permeabilidad de la misma sin que esto produzca su disgregación (Lichtenberg *y col.*, 1979). Para ello la concentración de tensioactivo deberá estar por debajo del punto de saturación lo que permitiría mantener la viabilidad celular (Schreier *y col.*, 2000). Parte del tensioactivo permanece como monómero en el seno de la disolución (Ribeiro *y Dennis*, 1973).

- C) Concentración crítica de saturación (CCS). Se produce la saturación de la bicapa por el tensioactivo. En este momento, un aumento de tensioactivo producirá la formación de micelas mixtas que coexisten con las bicapas (transición de fase lamelar a micelar) (Helenius *y Simons*, 1975).
- D) Cuando la cantidad de tensioactivo es suficiente, sólo existen micelas mixtas detergente/lípido debido a que la concentración de detergente enlazado es tal, que solubiliza a los fosfolípidos e interactúa con las porciones hidrofóbicas de las proteínas, reemplazando a los lípidos que están unidos a dichas proteínas (Goñi *y Alonso*, 2000; Le Maire *y col.*, 2000).

5. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Ruwaida A.S., Banat I.M., Haditirto S., Khamis A. (1991). Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus* bacterium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7: 53-81.
- Asselineau C., Asselineau J. (1978). Trehalose containing glycolipids. *Prog. Chem. fats Lipids.* 16: 59-99.
- Azuma M., Suzutani T., Sasaki K., Yoshida I., Sakuma T., Yoshida T (1987) Role on interferon in the augmented resistance of trehalose-6-6'-dimycolate treated mice to influenza virus infection. *F. Gen. Virol.* 68: 835-843.
- Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S. (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53:495-508.
- Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13:238-252.
- Beckierkunst A., Levij I. S., Yarkoni E., Vilkas E., Adam A., Lederer E. (1969). Granuloma formation induced in mice by chemically defined mycobacterial fractions. *J. Bacteriol.* 100: 95-102.
- Benincasa M. (2007). Rhamnolipid produces from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. *Curr. Microbiol.* 54: 445-449.
- Besra G. S., Chatterjee D. (1994). Lipids and carbohydrates of mycobacterium tuberculosis. En: *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Barry R.B. (ed). American Society for Microbiology: Washington, DC.
- Brennan P. J., Nikaido H. (1995). The envelope of mycobacterial. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 29-63.
- Bognolo G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids surf.* 152: 41-52.
- Brown M.J. (1991). Biosurfactants for cosmetic applications. *Int. J. Cosmet. Sci.* 13: 61-64.
- Brown D.A., London E. (2002) Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275: 17221-17224.
- Brodelius P. (1988). Permeabilization of plant cells for release of intracellular stored products: viability studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 561-566.
- Cameotra S.S., Makkar R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 520-529.
- Cameotra S.S., Makkar R.S. (2004) Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Curr. Opin. Microbiol.* 7:262-266.
- Chang J.S., Radosevich M., Jin Y., Cha D.K. (2004). Enhancement of phenanthrene solubilization and biodegradation by trehalose lipid biosurfactants. *Environ. Toxicol. Chem.* 23: 2816-2822.
- Chevalier Y., Zemb T. (1990). The structure of micelles and microemulsions. *Rep. Prog. Phys.* 53, 279-371.
- Christofi N., Ivshina I. B. (2002). Microbial surfactant and their use in field studies of soil remediation. *F. Appl. Microbiol.* 93: 915-929.

- Cullis P.R., de Kruijff B. (1979) Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 559:399-420.
- Cullis P.R., Hope M.J., Tilcock C.P.S. (1986). Lipid polymorphism and the roles of lipids in membranes. *Chem. Phys. Lipid.* 40: 127-144.
- Desai J.D., Banat I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 47-64.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.
- Edser C. (2008). Status of global surfactant markets. Focus on surfactants . 2008: 1-2.
- Epand R.M. (1998) Lipid polymorphism and protein-lipid interactions. *Biochim. Biophys. Acta* 1376:353-368.
- Edwards K., Almgren M., Bellare J., Brown W. (1989) Effects on Triton X-100 on sonicated lecithin vesicles. *Langmuir* 5:473-478.
- Elworthy P.H., Florence A.T., Macfarlane C.B. (1968) *Solubilization by surface-active agents*. Chapman y Hall: Londres.
- Ermolenko Z.M., Kholodenko V.P., Chugunov V.A., Zhirkova N.A., Raulova G.E. (1997). A mycobacterial strain isolated from the oil of the Ukhtinskoe oil field: Identification and degradativ properties. *Microbiology.* 66: 542-545.
- Espuny M.J., Egido S., Mercade M.E., Manresa A. (1995). Characterization of trehalose tetraester produced by a waste lubricant oil degrader *Rhodococcus* sp. 51T7. *Toxicol. Environ. Chem.* 48: 83-88.
- Espuny M.J., Egido S., Rodon I., Manresa A., Mercade M.E.(1996). Nutritional requeriment of a biosurfactant producing strain *Rhodococcus* sp. 51T7. *biotechnol. Tech.* 7: 745-748.
- Falagas M.E., Makris G.C. (2009) Probiotic bacteria and biosurfactants for nosocomial infection control: a hypothesis. *J. Hosp. Infect.* 71: 301-306.
- Finnerty W.R., Singer M.E.V. (1984). A microbial biosurfactant- Physiology, biochemistry and applications. *Dev. Ind. Microbiol.* 25: 31-40.
- Finnerty W.R. (1994). Biosurfactants in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5: 291-295.
- Franzetti A., Bestetti G., Caredda P., La Colla P., Tamburini E. (2008). Surface-active compounds and their role in bacterial access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. *Fems microbial. Ecol.* 63: 238-248.
- Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Smyth T.J.P., Banat I.M (2010). Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112, 617-627.
- Georgiu G., Lin S., Sharma M.M. (1992) Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology.* 10: 60-65.
- Griffin W.C. (1949) Classification of surface-active agents by HLB. *Soc. Cosm. Chem.* 1: 311.
- Gruner S.M. (1985) Intrinsic curvature hypothesis for biomembrane lipid composition: a role for nonbilayer lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 82:3665-3669.

- Goñi F.M., Alonso A. (2000). Spectroscopic techniques in the study of membrane solubilization, reconstitution and permeabilization by detergents. *Biochim. Biophys. Acta.* 1508: 51-68.
- Haddadin M.S.Y., Arqoub A.A.A., Reesh I. ., Haddadin J. (2009). Kinetics of hydrocarbon extraction from oil shale using biosurfactant producing bacteria. *Energy Convers Manage.* 50: 983-990.
- Hafez I.M., Cullis P.R. (2001). Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47: 139-148.
- Haferburg D., Hommel R., Kleber H-P., Kluge S., Schuster G., Zschiegner H-J. (1987) Antiphytovirale Aktivität von Rhamnolipid aus *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Biotechnol.* 7:353-356.
- Helenius A., Simons K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415:29-79.
- Hoar T.P., Shulman J.H. (1943) Transparent water-in-oil dispersion: the oleopathic hydro-micelle. *Nature* 152:102-103.
- Hodge J.E., Hofreiter B.T. (1962). Determination of reducing sugar and carbohydrates. *Methods Carbohydr. Chem.* 1: 380-394.
- Holmberg K., Jönsson B., Kronberg B., Lindman B. (2003). *Surfactants and polymers in aqueous solution*. Wiley. Inglaterra.
- Hope M.J., Bally M.B., Webb G., Cullis P.R. (1985) Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* 812:55-65.
- Huang C. (1969). Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochem.* 8: 344-352.
- Hwang J., Gheber L.A., Margolis L., Edidin M. (1998). Domains in cell plasma membranes investigated by near-field scanning optical microscopy. *Biophys. J.* 74: 2184-2190.
- Ishigami Y., Suzuki S., Funada T., Chino M., Uchida Y., Tabuchi T. (1987). Surface-active properties of succinoyl trehalose lipids as microbial biosurfactants. *J. JPN. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU).* 36: 847-851.
- Isoda H., Kitamoto D., Shinmoto H., Matsumura M., Nakahara T. (1997). Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of protein kinase C activity of human promyelocytic leukaemia cell line HL-60. *biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 609-614.
- Israelachvili J.N., Mitchell D.J., Ninham B.W. (1976) Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Farad. Trans.* 272:1525-1568.
- Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Philip J.C., Christofi N. (1998). Oil desorption from mineral and organic materials using biosurfactant complexes produced by *Rhodococcus* species. *World J. Microb. Biotechnol.* 14: 711-717.
- Janes N. (1996) Curvature stress and polymorphism in membranes. *Chem. Phys. Lipids.* 81:133-150.

- Kanga S.A., Bonner J.S., Page C.A., Mills M.A., Autenrieth R.L. (1997). Solubilization of naphthalene and methyl substituted naphthalenes from crude oil using biosurfactant environ. Sci. Technol. 31: 556-561.
- Karant N.G.K., Deo P.G., Veenanadig N.K. (1999). Microbial production of biosurfactants and their importance. Current Science. 77: 116-126.
- Kim J.S., Powalla M., Lang S., Wagner F., Lünsdorf H., Wray V. (1990). Microbial glycolipid production under nitrogen limitation and resting cell conditions. J. Biotechnol. 13: 257-266.
- Kim P.I., Bai H., Bai D., Chae H., Chung S., Kim Y., Park R., Chi Y-T (2004). Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. J. Appl. Microbiol. 97: 942-949.
- Kitamoto D., Isoda H., Nakahara T. (2002) Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants: from energy-saving materials to gene delivery carriers. J. Biosci. Bioeng. 94:187-201.
- Kosaric N. (1992). Biosurfactant in industry. Pure. Appl. Chem.. 64: 1731-1737.
- Kragh-Hansen U., Le Maire M., Moller J.V. (1998) The mechanism of detergent solubilization of liposomes and protein-containing membranes. Biophys. J. 75:2932-2946.
- Kretschmer A., Bock H., Wagner F. (1982). Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. Appl. Environ. Microbiol. 44: 864-870.
- Kurane R., Hatamochi K., Kakuno T., Kiyohara M., Tajima T., Hirano M., Taniguchi Y. (1995). Chemical structure of lipid dioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. Biosci. Biotech. Biochem. 59: 1652-1656.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Philip J.C., Christofi N., Dunbar S.A., Ritchkova M.I. (2001). Recovery of *Rhodococcus* biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. J. Microbiol. Methods. 46: 149-156.
- Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Makarov S.O., Litvinenko L.V. (2005). Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. Environ. Int. 31: 155-161.
- Lang S., Philip J.C. (1998). Surface-active lipids in *Rhodococci*. Ant. Van Leewenhoek. 74: 59-70.
- Lattes A., Rico I. (1989). Aggregation in formamide solution: reactivity and structure of non-aqueous microemulsions. Colloids and Surfaces 35: 221-235.
- Lawrence M.J., Rees G.D (2000). Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Adv. Drug Deliv. Rev. 45: 89-121.
- Le Maire M., Champeil P., Møller J.V. (2000). Interaction of membrana proteins and lipids with solubilizing detergents. Biochim. Biophys. Acta. 1508: 86-111.
- Le Maire M., Møller J.V., Champeil P. (1987). Binding of a noionic detergent to membranes: Flip-flop rate and location on the bilayer. Biochem. 26: 4803-4810.
- Lichtenberg D., Zilberman Y., Greenzaid P., Zamir S. (1979) Structural and kinetic studies on the solubilization of lecithin by sodium deoxycholate. Biochemistry 18:3517-3525.

- Lichtenberg D., Opatowski E., Kozlov M.M. (2000). Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1508: 1-19.
- Luzzati V. (1968) X-ray diffraction studies of lipid-water systems. En: *Biological Membranes*. Chapman D. (ed). Academic Press: Londres.
- MacDonald R.C., MacDonald R.I., Menco B.P., Takeshita K., Subbarao N.K., Hu L.R. (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1061:297-303.
- Makkar R.S., Cameotra S.S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 428-434.
- Marsh D., Watts A. (1980). Molecular motion in phospholipids bilayer in the gel phase: spin label saturation transfer esr studies. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 94: 130-137.
- Martin M., Bosch P., Parra J.L. (1991) Structure and bioconversion of trehalose lipids. *Carbohydr. Res.* 220: 93-100.
- Marques A.M., Pinazo A., Farfan M., Aranda F.J., Teruel J.A., Ortiz A., Manresa A., Espuny M.J. (2009). The physicochemical properties and chemical composition of trehalose lipids produced by *Rhodococcus erythropolis* 51T7. *Chem. Phys. Lipids.* 158: 110-117.
- Mazer N.A., Benedek G.B., Carey M.C. (1980) Quasielastic light-scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions. *Biochemistry.* 19:601-615.
- McBain J.W. (1913) *Trans. Far. Soc.* 9: 99-101.
- McBain M.E.L., Hutchinson E. (1955) *Solubilization and related phenomena*. Academic Press: Nueva York.
- Meiners S., Gharyal P.K., Schindler M. (1991). Permeabilization of the plasmalemma and wall of soybean root cells to macromolecules. *Planta.* 184: 443-447.
- Mimms L.T., Zampighi G., Nozaki Y., Tanford C., Reynolds J. (1981). Phospholipids vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside. *Biochemistry.* 20: 833-840.
- Miozzari G.F., Niederberger P., Hütter R. (1978). Permeabilization of microorganism by triton X-100. *Anal. Biochem.* 90: 220-233.
- Myers D. (2006). *Surfactant science and technology*. Jonh W (ed) Wiley-Interscience: United States.
- Mukherjee S., Das P., Sen R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactant. *Trends. Biotechnol.* 24:509-515.
- Mulligan C.N. (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133:183-198.
- Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Ravi T.K., Sivachidambaram P. (2008). Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Curr. Sci.* 94: 736-747.
- Natsuhara Y., Oka S., Kaneda K., Kadto Y., Yano I. (1990). Parallel antitumor, granuloma-forming and tumor-necrosis-factor-priming activities of mycoloyl glycolipids from *Nocardia rubra* that differ in carbohydrate moiety: structure-activity relationships. *Cancer immunol. Immunother.* 31: 99-106.
- Neu T.R. (1996). Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.* 60: 151-166.

- Niescher S., Wray V., Lang S., Kaschabek S.R., Schlomann M. (2006). Identification and structural characterisation of novel trehalosa dinocardiomycolates from n-alkane-grown *Rhodococcus opacus* 1CP. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 70: 605-611.
- Nitschke M., Costa S.G.V.A.O., Contiero J. (2005). Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol.* 21: 1593-1600.
- Nitschke M., Costa S.G.V.A.O. (2007) Biosurfactants in food industry. *Trends Food Sc. Technol.* 18:252-259.
- Noordman W.H., Janssen D.B.(2002). Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbial.* 68: 4502-4508.
- Oberbremer A., Müller-Hurtig R., Wagner F. (1990). Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbide degradation in a soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 32: 485-489.
- Ohvo-rekilä H., Ramstedt B., Leppimäki P., Slotte J.P. (2002). Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.* 41: 66-97.
- Orbach-Arbouys S., Tenu J. P., Petit J. F., (1983). Enhancement of in vitro and in vivo antitumor activity by cord factor (6-6'-dimycolate of trehalose) administered suspended in saline. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 71: 67-73.
- Page C.A., Bonner J.S., Kanga S.A., Mills M.A., Autenrieth R.L. (1999). Biosurfactant solubilization of PAHs. *Environ. Eng. Sci.* 16: 465-474.
- Parant M., Parant F., Chedid L., Drapier J. C., Petit J. F., Wietzerbin J., Lederer E. (1997). Enhancement of non-specific immunity to bacterial infection by cord factor (6-6'-trehalose dimycolate). *F. Infect. Dis.* 135: 771-777.
- Park A.J., Cha D.K., Holsen T.M. (1998). Enhancing solubilization of sparingly soluble organic compounds by biosurfactants produce by *Nocardia erythropolis*. *Water Environ. Res.* 70: 351-355.
- Patel M.N., Gopinathan K.P. (1986). Lysozyme-sensitive bioemulsifier for immiscible organophosphorus pesticides. *Appl. Environ. Microbial.* 52: 1224-1226.
- Pellerin N., Staley J.T., Ren T., Graff G.L., Treadwell D.R., Aksay I.A. (1991) Acidic biopolymers as dispersants for ceramic processing. *Mater. Res. Soc. Sym. Proc.* 218: 123-128.
- Peng F., Liu Z., Wang L., Shao Z. (2007). An oil-degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C-9 and its biosurfactants. *J. Appl. Microbiol.* 102: 1603-1611.
- Pirog T. P., Shevchuk T. A., Voloshina I. N., Karpenko E. V. (2004). Production of surfactants by *Rhodococcus erythropolis* strain EK-1, grown on hydrophilic and hydrophobic substrates. *Appl. Biochem. Microbial.* 40: 470-475.
- Rahman P.K.S.M., Gakpe E. (2008) Production, characterization and applications of biosurfactant. *Biothechnology* 7:360-370.
- Raiger L.J., Lopez N.L. (2009). Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Químicas Viva.* 3: 146-161.
- Ramstedt B., Slotte J.P. (2002). Membranes properties of sphingomyelins. *FEBS Lett.* 531: 33-37.

- Rapp P., Bock H., Wray V., Wagner F. (1979) Formation, isolation and characterisation of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *F. Gen. Microbiol.* 115: 491-503.
- Ramsay B. A., Cooper D. G., Margaritis A., Zajic J. E. (1983). *Rhodochorous* bacteria: biosurfactant production and demulsifying ability. *Microb. Enh. Oil. Recov.* 61-65.
- Ribeiro A.A., Dennis E.A. (1973). Effect of thermotropic phase transitions of dipalmitoylphosphatidylcholine on the formation of mixed micelles with Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta* 332:26-35.
- Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. (2006) Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 57:609-618.
- Ron E.Z., Rosenberg E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbiol.* 3: 229-236.
- Rosen M. J. (1978). Surfactants and interfacial phenomena. 178-207.
- Rosen M.J. (2004). *Surfactants and interfacial phenomena*. 3rd edition, Wiley-Interscience, New Jersey.
- Rosenberg E., Ron E.Z. (1999) High- and low-molecular-mass microbial. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52: 154-162.
- Ruggeri C., Franzatti A., Bestetti G., Caredda P. (2009). Isolation and characterisation of surface active compound producing bacteria from Hydrocarbon-contaminated environments. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63: 936-942.
- Salager J.L. (2002). Surfactantes tipos y usos. Cuaderno FIRP 300.
- Saunders L., Perrin J., Gammack D. (1962) Ultrasonic irradiation of some phospholipid sols. *J. Pharm. Pharmacol.* 14:567-572.
- Schramm LL, Marangoni DG. (2000). Surfactants and their solutions: Basic principles. En: *Surfactants: fundamentals and applications in the petroleum industry*. Cambridge university press. Reino Unido.
- Schreier S., Malheiros S.V.P., Paula E. (2000). Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. *Biochim. Biophys. Acta.* 1508: 210-234.
- Seddon J.M. (1990) Structure of the inverted hexagonal (H_{II}) phase and non-lamellar phase transitions of lipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1031:1-69.
- Seydlová G., Svobodová J. (2008). Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications. *Cent. Eur. J. Med.* 3: 123-133.
- Shepherd R., Rockey J., Sutherland I.W., Roller S. (1995). Novel bioemulsifiers from microorganism for use in foods. *J. Biotechnol.* 40: 207-217.
- Simons K., Vaz W.L.C. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. biophys. Biomol. Struct.* 33: 269-295.
- Singer S.J., Nicolson G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
- Singer M.E.V., Finnerty W.R. (1990). Physiology of biosurfactant synthesis by *Rhodococcus* species H13-A. *Can. J. Microbiol.* 36: 741-745.

- Singh P., Cameotra S.S. (2004) Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol.* 22:142-146.
- Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol. Adv.* 25:99-121.
- Smart D.M. (1971). En: *The Bile Acids: Chemistry, Physiology and metabolism*. Nair P.P., Kritchevsky D. (eds). Plenum press: Nueva York.
- Stanghellini M.E., Miller R.M. (1997) Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic pathogens. *Plant Disease* 81:4-12.
- Szoka F., Papahadjopoulos D. (1978). Procedure for reparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75: 4194-4198.
- Tadros Th. F (2005). *Applied Surfactant: Principles and Applications*. Wiley VCH
- Tarek A.A.M., Gaber M.A., Shereen M.S.A (2006). Optimization of cultural conditions for biosurfactant production from *Nocardia amarae*. *J. Appl. Sci. Res.* 2: 844-850.
- Thimmaraju R., Bhagyalakshmi N., Narayan M.S., Ravishankar (2003). Food-grade chemical and biological agents permeabilized red beet hairy roots, assisting the release of betalaines. *Biotechnol. Prog.* 19: 1274-1282.
- Uchida Y., Tsuchiya R., Chino M., Hirano J., Tabuchi T. (1989). Extracellular accumulation of mono- and di-succinoyl trehalose lipids by a strain of *Rhodococcus erythropolis* grown n-alkanes. *Agric. Boil. Chem.* 53: 757-763.
- Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. (2006). Physiological aspects. Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 24: 604-620.
- Vereb G., Sköllösi J., Matkó J., Farkas T., Vigh L., Mátyus L., Waldmann T.A., Damjanovich S. (2003). Dynamic, yet structured: the cell membrane three decades after the Singer-Nicolson model. *PNAS.* 100: 8053-8058.
- Vergne I., Daffe M. (1998). Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells. *Front. Biosci.* 3: 865-876.
- Vollbrecht E., Rau U., Lang S. (1999). Microbial conversion of vegetable oils into surface-active di-, tri-, and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *Tsukamurella* spec. *Fett Lipid*, 101: 389-394.
- Wang S., Mulligan C.N. (2004) An evaluation of surfactant foam technology in remediation of contaminated soil. *Chemosphere.* 57: 1079-1089.
- Wang X., Gong L., Liang S., Han X., Zhu C., Li Y. (2005) Algicidal activity of rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Harmf. algae* 4:433-443.
- Warwick J. B., Paul W., Winter N. (1994). Mechanism of persistence of mycobacteria. *Trends Microbiol.* 2: 284-288.
- Williams K. (2009). Biosurfactants for cosmetic application: Overcoming production challenges. *Basic. Biotechnol.* 5: 78-83.

-
- Xia J., Nnanna I.A. (2001). An overview of the basis, technology and surface phenomena of protein-based surfactants. En: *Protein-based surfactants: synthesis, physicochemical properties and applications*. Nnanna IA., Xia J (Eds). Marcel dekker inc. New York.
- Yano L., Tomiyasu I., Kitabatake S., Kaneda K. (1984). Granuloma-forming activity of mycolic acid-containing glycolipids in *Nocardia* and related taxa. *Acta Leprol.* 2: 341-349.
- Ying G.G. (2006). Fate, behaviour and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environ Int.* 32: 417-431.
- Zana R. (2005). *Dynamics of Surfactant Self-Assemblies, Micelles, Microemulsions, Vesicles and Lyotropic Phases*. Zana R (Ed). CRC Press. Boca Raton.

OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo general la caracterización bioquímica y biofísica del biotensioactivo succinil trealosalípido bacteriano producido por *Rhodococcus sp.*. El conocimiento detallado de las actividades biológicas que posee cada especie purificada de un biotensioactivo crudo es clave para la introducción de estas moléculas en productos industriales de elevado valor añadido. Aunque el mecanismo de acción de la mayoría de tales compuestos no se ha aclarado en detalle hasta la fecha, es obvio que sus propiedades superficiales y su acción sobre las membranas juegan un importante papel en la expresión de sus actividades. Por ello, los objetivos iniciales a partir de los cuales se planteó este trabajo de investigación fueron los siguientes:

- Caracterizar el mecanismo de permeabilización y solubilización de membranas fosfolipídicas inducido por el trealosalípido en sistemas modelo, incidiendo en el efecto modulador de la composición lipídica de la membrana.
- Estudiar el proceso de permeabilización y solubilización de membranas biológicas inducido por el trealosalípido, utilizando eritrocitos humanos como sistema experimental.
- Caracterizar detalladamente a escala molecular la interacción del trealosalípido con diversas proteínas modelo que difieren en su estructura secundaria, para extender su aplicabilidad en estudios de proteínas.
- Estudiar a nivel molecular los mecanismos de inhibición de la actividad enzimática por el trealosalípido succinoil bacteriano producido por *Rhodococcus erythropolis* 51T7 usando la sPLA₂ pancreática como modelo, con el fin de establecer futuras nuevas aplicaciones para este compuesto.

Las técnicas que se han empleado para la consecución de estos objetivos son:

Medidas de tensión superficial, que permite caracterizar las propiedades superficiales del biotensioactivo.

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, que proporciona información acerca de los cambios en la estructura secundaria de la proteína debido a la interacción de esta con el biotensioactivo.

Espectroscopía de fluorescencia, que permite el estudio de los procesos de unión entre proteína-biotensioactivo y biotensioactivo-membrana.

Calorimetría diferencial de barrido, aporta información sobre la desnaturalización térmica de proteínas, y como se afectan por la presencia del trealosalípido.

Calorimetría isotérmica de titulación, que refleja los procesos de unión proteína-ligando (biotensioactivo).

Microscopía electrónica de barrido, para la caracterización del efecto del trealosalípido en la superficie celular eritrocitaria.

TÉCNICAS GENERALES

1. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de las moléculas para absorber radiación. Este término se aplica tanto al estudio de la luz visible en las longitudes de onda que la componen, como a cualquier tipo de radiación electromagnética e incluso técnicas que no suponen radiación electromagnética como es la espectroscopía de masas o la electrónica.

La radiación electromagnética puede describirse como una onda, definida por un campo eléctrico y otro magnético que oscilan en direcciones mutuamente perpendiculares y perpendiculares a su vez a la dirección en que se propaga la onda. Estas ondas se caracterizan por su velocidad (v), frecuencia (ν), longitud de onda (λ) y amplitud (A) (Figura 19).

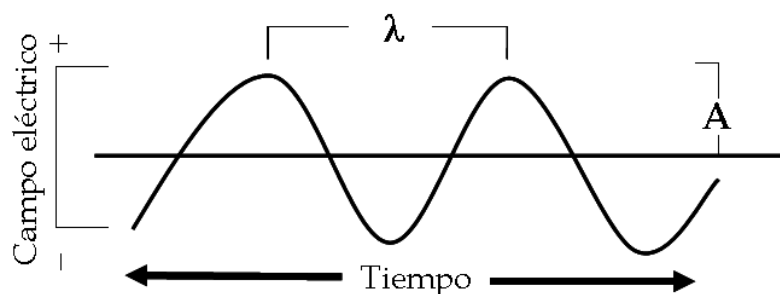


Figura 19. Representación esquemática de un haz monocromático.

El conjunto de ondas electromagnéticas se denomina espectro electromagnético, el cual comprende un intervalo enorme de longitudes de onda y energía (Figura 19). Dependiendo de la región del espectro en la que se trabaje, y por tanto de la energía de la radiación utilizada, la interacción molecular será de diferente naturaleza: excitación de electrones, vibraciones moleculares y rotaciones moleculares. Al cambio entre niveles de energía se le denomina transición.

Por otro lado, Planck y Einstein demostraron que toda radiación electromagnética se comporta como si estuviese compuesta de pequeños paquetes de energía, llamados fotones. Cada fotón tiene una energía que es proporcional a la frecuencia de la luz:

$$E_{\text{fotón}} = h \nu, \quad \text{y si } \nu = c/\lambda \quad \text{entonces} \quad E = h c/\lambda$$

Donde h es la constante de Planck, ν la frecuencia, c la velocidad de propagación de la radiación en el vacío y λ la longitud de onda.

1.1 Espectroscopía de absorción

Según la teoría cuántica, cada átomo, ión o molécula tiene un conjunto irreplicable de estados de energía de los que el de mínima energía es el estado fundamental, S_0 . Cuando un fotón de radiación incide sobre una de estas partículas, ésta puede absorber energía y sus electrones pasan a niveles energéticos más altos. Se dice que se encuentra en un estado excitado, S_1 (Figura 20).

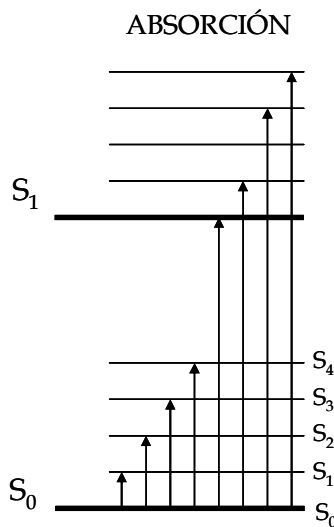


Figura 20. Diagrama de niveles de energía de un átomo o molécula. Muestra los cambios producidos cuando la partícula absorbe energía.

La parte de la partícula que se excita se denomina cromóforo. Para un electrón dado la diferencia entre esas energías es la cantidad de energía perdida por el electrón y es igual a la energía electromagnética que se transmite:

$$E_e - E_o = E_{\text{fotón}} = h c/\lambda \longrightarrow T = I_e/I_o \longrightarrow \%T = I_e/I_o \times 100$$

Siendo E_e la energía del fotón en el primer nivel energético excitado, E_o la energía del fotón en el estado fundamental, I_e el haz de luz transmitida, I_o el haz de luz incidente y T la transmitancia.

Además de la atenuación de la intensidad del haz debido a la absorción, también se produce esta disminución por reflexión en las interfases aire-pared y pared-disolución, así como por motivo de la dispersión de moléculas grandes y a veces por absorción de las paredes del recipiente (Figura 21). Para compensar estos efectos, la potencia del haz transmitida a través de la celda que contiene el analito es comparada generalmente con la de un haz que pasa a través de una celda idéntica que contiene sólo disolvente. Así la absorbancia experimental se aproxima mucho a la verdadera mediante la ecuación:

$$A = \log I_{\text{solvente}}/I_{\text{disolución}} = -\log T$$

La absorbancia experimental obedece a la ley de Lambert-Beer que describe la relación existente entre la concentración y la absorbancia.

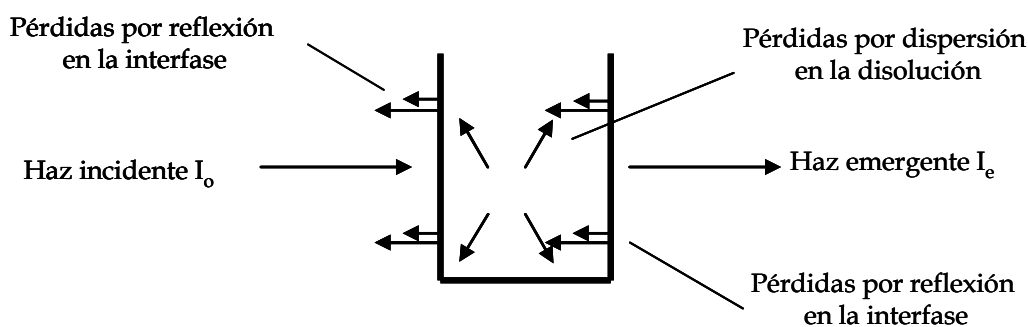


Figura 21. Atenuación de la intensidad del haz por pérdidas de dispersión y reflexión.

La ley de Lambert-Beer se cumple para cualquier proceso de absorción en cualquier zona del espectro y se basa en que cada unidad de longitud a través de la cual pasa la radiación absorbe la misma fracción de radiación. La absorción de la radiación por parte de la muestra es proporcional a la anchura del camino óptico (anchura de la celda) (cm), a la concentración de la disolución (mol/L) y a una constante

proporcional específica de cada muestra, ϵ , denominada absorptividad molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) o coeficiente de extinción molar:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Esta ley lineal se cumple únicamente para disoluciones diluidas ($c \leq 0.1\text{M}$), pudiéndose producir desviaciones de la linealidad a concentraciones más elevadas, al variar ϵ como consecuencia de cambios en el índice de refracción de la disolución. Otras desviaciones de la linealidad tienen su origen en la propia instrumentación: presencia de luz reflejada y dispersada, luz no estrictamente monocromática o detectores de respuesta no lineal (Harris y Bashford, 1987).

Para verificar el cumplimiento de la ley se debe realizar una curva de calibración: absorbancia en función de la concentración; para lo cual se preparan disoluciones de la sustancia de concentraciones conocidas y se mide A a la longitud de onda elegida. Si es válida la ley para esa sustancia a esas concentraciones la relación debe ser una recta que pase por el origen de coordenadas.

1.1.1 Espectroscopía Ultravioleta-Visible

La porción de la región ultravioleta del espectro electromagnético se extiende desde 200 a 400 nm, mientras que la región visible se extiende hasta cerca de 800 nm. La excitación con radiación UV-vis determina la promoción de un electrón de un orbital molecular o atómico de baja energía a un orbital de mayor energía. Este salto se llama transición electrónica y el proceso de absorción, absorción electrónica. La absorción molecular en las regiones UV-vis consiste en bandas de absorción.

Las medidas llevadas a cabo usando espectrofotómetros nos proporcionan datos de absorbancia en función de la longitud de onda. Estos equipos se componen de una fuente estable de energía radiante que emite luz policromática entre 350-900 nm. Las lámparas que más comúnmente se usan son de tungsteno-halógeno y de deuterio. El haz de luz pasa a través de un monocromador que separa todas las

longitudes de onda de ese haz de la longitud de onda deseada. Finalmente, proyecta este haz de luz monocromática a través de la muestra y mide la cantidad de luz que es absorbida por la misma. Esto permite al experimentador obtener información sobre la naturaleza de la sustancia e indicar indirectamente qué cantidad de sustancia está presente en la muestra (Figura 22).

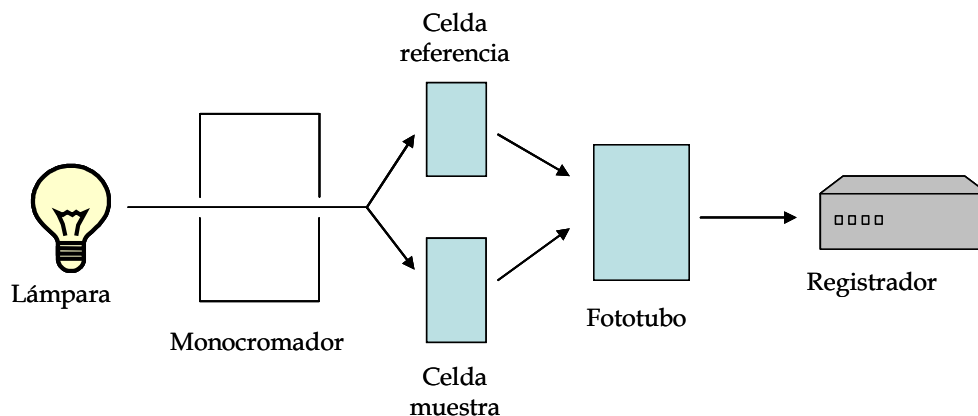


Figura 22. Esquema de un espectrofotómetro.

1.1.2 Espectroscopía de Infrarrojo

La radiación electromagnética infrarroja tiene una energía que no es suficiente para producir transiciones electrónicas; sin embargo, su energía es similar a las pequeñas diferencias energéticas entre los distintos estados vibracionales y rotacionales existentes en la mayoría de las moléculas. La molécula, al absorber la radiación infrarroja, cambia su estado de energía vibracional y rotacional.

Los modos de vibración se clasifican en dos tipos: vibraciones de tensión ("stretching") por cambios en la distancia de enlace (pueden ser simétricas o asimétricas), y vibraciones de torsión ("bending"), por cambios en el ángulo de enlace, las cuales pueden ser en el plano como tijereteo ("scissoring") y balanceo ("rocking"), o fuera del plano como el "wagging" (Figura 23). Otros tipos de vibraciones son las vibraciones del esqueleto o vibraciones combinadas. Estos movimientos se dan en los diferentes enlaces químicos presentes en los grupos funcionales de una molécula. La escala de tiempos de dichas vibraciones moleculares es muy corta (cerca de 10^{-13} s).

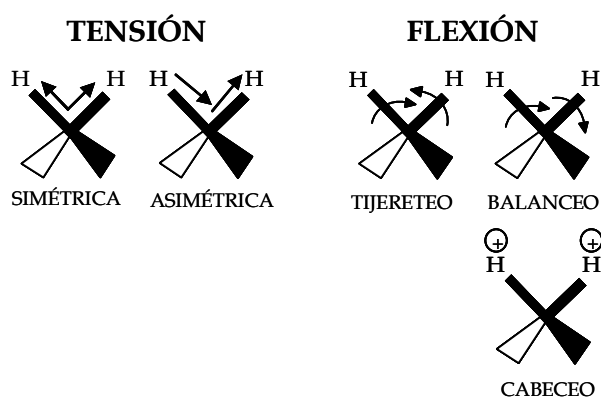


Figura 23. Diferentes tipos de modos vibracionales teniendo en cuenta cambios en la longitud del enlace y en el ángulo de enlace.

La espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), ha supuesto un avance sustancial en la aplicabilidad de esta técnica a los sistemas biológicos. Un espectrofotómetro de FTIR está compuesto por una fuente de radiación infrarroja. Esta radiación pasa a través de un interferómetro de Michelson (elemento seleccionador de frecuencias) antes de incidir en la muestra, el cual está constituido por un divisor de haz y dos espejos, uno fijo y uno móvil. Así, el haz incidente se divide en dos haces perpendiculares de igual energía, uno incide sobre el espejo móvil y el otro sobre el espejo fijo. Se generan por tanto, dos ondas que viajan en fase en direcciones distintas hacia los espejos y una vez reflejadas las dos ondas se recombinan produciéndose una interferencia entre ambas. Este haz resultante es el que atravesará la muestra (Figura 24). El desarrollo del interferómetro de Michelson junto con la aplicación del algoritmo de la transformada de Fourier ha mejorado la relación señal/ruido respecto a anteriores espectrofotómetros de infrarrojo basados en la dispersión.

El interferograma es una representación de la intensidad respecto al movimiento del espejo. Una vez que se ha recogido un interferograma, es necesario convertirlo en un espectro. Esto se consigue a través del algoritmo de la transformada de Fourier rápida (Fast Fourier Transform o FFT). Tras la aplicación de la transformada de Fourier, la apodización, y la corrección de la fase de los datos, se obtiene un único espectro de la muestra, que dividido por el fondo (un espectro

tomado en ausencia de muestra), da lugar a una representación del espectro de absorción como una medida de intensidad (absorbancia infrarroja) frente a frecuencia (o número de onda).

Cada agrupamiento de enlaces da lugar a una banda en el infrarrojo siempre en la misma posición. La intensidad de la banda va a depender del número de agrupamientos que exista. La posición exacta de las bandas en el espectro aporta información sobre las interacciones de los grupos funcionales con el ambiente (interacciones polares en sistemas biológicos), y el acoplamiento de vibraciones (conformación de macromoléculas biológicas).

Para muestras acuosas, estas se disponen formando una película muy fina entre ventanas fabricadas con los materiales adecuados en función de la naturaleza de la muestra (CaF_2 , BaF_2 , ZnS , etc.), teniendo cada tipo de ventana un rango de transmitancia que ha de ser tenido en cuenta según las bandas que se desee estudiar.

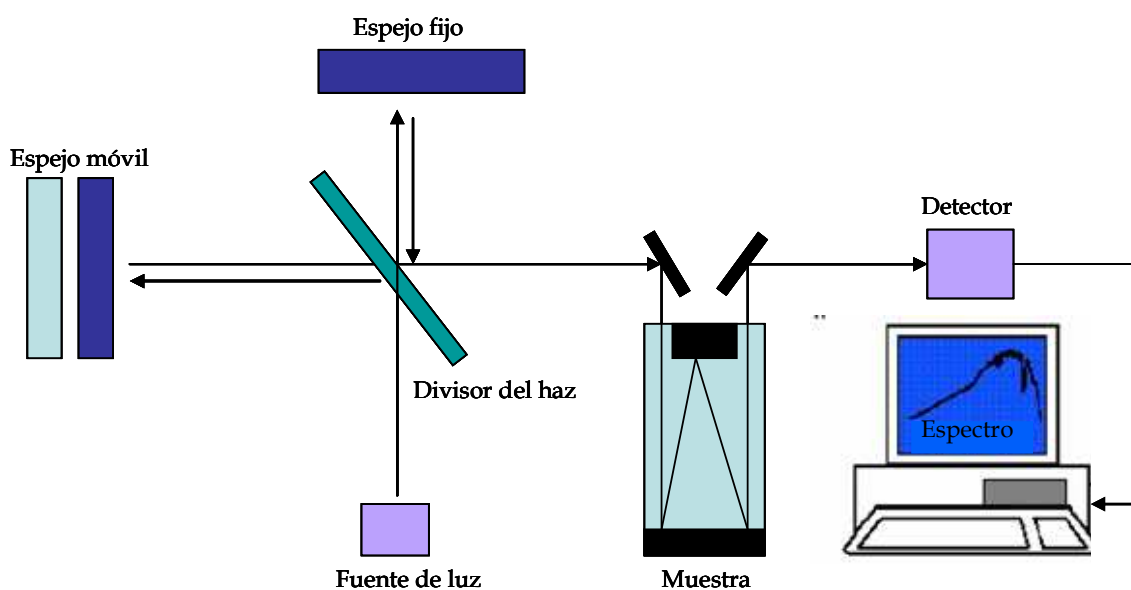


Figura 24. Representación de los componentes de un Espectrómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier.

Con frecuencia se obtienen bandas complejas de absorción, resultado del solapamiento de varias bandas. Para extraer la mayor información posible se han desarrollado técnicas matemáticas de aumento de resolución como la diferenciación

y la deconvolución (“Fourier self-deconvolution”). La primera derivada de un pico de absorción aumenta la resolución. Se calcula restando las absorbancias a longitudes de onda adyacentes (en el caso de longitudes de onda equidistantes). La segunda derivada se obtiene aplicando de nuevo este proceso y da lugar a mínimos correspondientes con los picos de absorción del espectro original, y un hombro para cada banda facilitando en gran medida la resolución de los picos solapados. Además, también elimina problemas en la línea base. Sus principales desventajas son que disminuye la relación señal/ruido y aumenta la complejidad del espectro. Debido a que la diferenciación es una operación lineal, la ley de Lambert-Beer sigue siendo válida en el espectro derivada, por lo que éste puede ser utilizado para determinaciones cuantitativas. Con la deconvolución pueden resolverse bandas separadas. Se hace la inversa de la transformada de Fourier del espectro y después se multiplica por una función suavizante (“smoothing”) y por una función Gausiana-Lorentziana. Finalmente se aplica la transformada de Fourier al interferograma modificado, repitiendo todo el proceso de manera iterativa.

1.1.2.1. Conformación de macromoléculas

Dentro del espectro infrarrojo se pueden diferenciar tres zonas: IR lejano, donde se producen las absorciones debidas a cambios rotacionales; IR medio (MIR o simplemente, IR), donde tienen lugar las vibraciones fundamentales; e IR cercano (NIR), donde se producen absorciones debidas a sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales.

En las moléculas orgánicas y biológicas, donde el esqueleto es alifático, los grupos funcionales suelen tener una o varias vibraciones altamente localizadas. Esto permite la rápida identificación de grupos funcionales de una molécula y que los cambios de frecuencia sean más fácilmente correlacionables con un cambio en la constante de fuerza de los enlaces del grupo funcional. Los modos de vibración más localizados implican un menor desplazamiento de masa y suelen tener una frecuencia entre $4000-1000\text{ cm}^{-1}$, que pertenece a la zona del infrarrojo medio.

Los grupos funcionales permiten el estudio de moléculas por infrarrojo al simplificar la asignación de bandas y la interpretación de sus cambios. En las proteínas se pueden encontrar numerosos grupos funcionales. Entre ellos el más característico y numeroso es el grupo amida, el grupo que forma el enlace peptídico. Este grupo de vibraciones incluye nueve bandas de absorción características de las cuales cabe destacar la banda amida I (vibraciones de tensión del enlace C=O principalmente, acoplados a la vibración de flexión del N-H y tensión del enlace C-N), la banda amida II (tensión C-N y flexión en el plano de N-H), la amida III (tensión C-N, flexión N-H, flexión en el plano CO), y la amida A (tensión N-H) (Kong y Yu, 2007) (Figura 25).

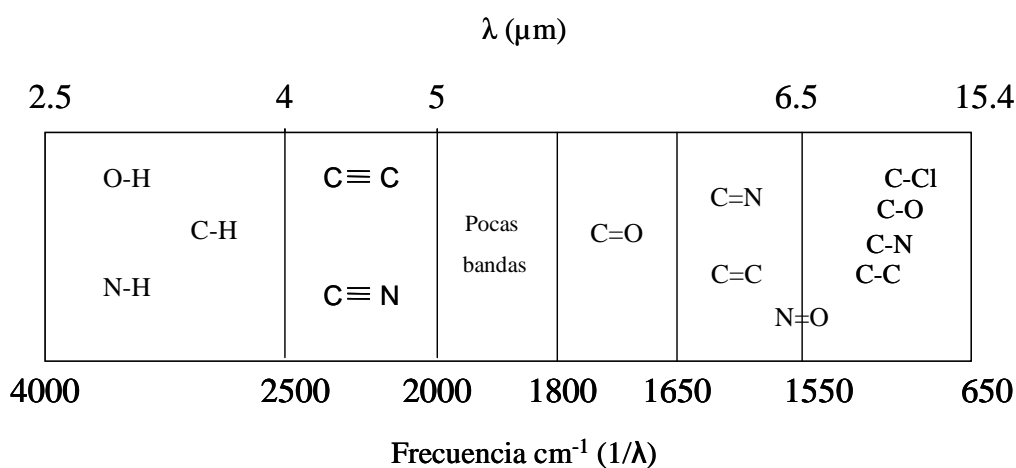


Figura 25. Localización de las bandas de absorción más importantes dentro del infrarrojo medio.

La banda amida I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) es la más utilizada ya que da información acerca del tipo y estructura secundaria, y no está influida fuertemente por cadenas laterales (Ganim, 2007). Además, el acoplamiento bipolar entre las vibraciones amida I de grupos contiguos hace que la frecuencia amida I de un enlace peptídico sea directamente sensible a la conformación que adopta y por lo tanto a la estructura secundaria en la que se halla (Krimm y Bandekar, 1986).

Como dificultades experimentales para obtener el espectro, se encuentra principalmente la absorción del agua, la cual absorbe fuertemente en una región espectral muy importante, aproximadamente a 1640 cm^{-1} . La utilización de D_2O en vez de H_2O como disolvente lleva a un desplazamiento isotópico ya que se induce el cambio del N-H del grupo amida a N-D. Debido al cambio de puentes de hidrogeno

a puentes de deuterio, la frecuencia de vibración del C=O disminuye aproximadamente 10 cm^{-1} . La causa es que la sustitución de hidrógenos por deuterios hace aumentar las masas desplazadas en las oscilaciones. La banda amida I pasa a llamarse amida I' (Krimm y Bandekar, 1986) que en principio posee la misma información estructural.

Tabla 10. Asignación de bandas a diferentes estructuras secundarias.

| FRECUENCIA (cm^{-1}) | VALORES DE LA LITERATURA | ESTRUCTURA SECUNDARIA | REFERENCIAS |
|------------------------------------|-----------------------------|--|---|
| 1684 | 1684-----1686 | Hojas β intermoleculares (agregados) | Torrent y <i>col.</i> , 2001 Ganim, 2007 |
| 1674 | 1674-----1675 | Giros β^* | Holzbaur y <i>col.</i> , 1996 Ye y <i>col.</i> , 2007 |
| 1654 | 1650-----1656 | Hélice α | Olinger y <i>col.</i> , 1986 Surewicz y <i>col.</i> , 1993 |
| 1644 | 1640-----1652 | Estructuras desordenadas y hélices α | Murayama y Tomida, 2004 Fabian y Mantsch., 1995 |
| 1634 | 1630-----1640 | Hojas β^{**} | Panuszko y <i>col.</i> , 2009 Smeller y <i>col.</i> , 1999 |
| 1615 | 1615-----1618 | Hojas β intermoleculares (agregados) | Sánchez y <i>col.</i> , 2008 Meersman y <i>col.</i> , 2002 |

* Para algunos autores estas banda se corresponden con estructuras secundarias tipo hélice $\alpha_{3,10}$ (Panuszko y *col.*, 2009, Sánchez y *col.*, 2008).

** En el caso de la albúmina se ha comprobado que no tiene estructuras hojas β y que esta banda se corresponde con estructuras desordenadas (Murayama y Tomida., 2004, Takeda y *col.*, 1987).

Existe una correlación entre las frecuencias amida del enlace peptídico y la estructura de la molécula. Esta correlación se utiliza para obtener información estructural de proteínas, principalmente una estimación de los porcentajes de estructura secundaria (Ganim y *col.*, 2007).

Los porcentajes de estructuras secundarias determinados varían entre la estructura tridimensional refinada y la que no lo está, entre estructuras tridimensionales de fuentes diferentes y entre diferentes usuarios que utilizan el método (Levitt y Greer, 1977; Kabsch y Sander, 1983). No todos los autores coinciden a la hora de definir el intervalo de aparición de una estructura, y cuando lo hacen estos intervalos no son exactamente iguales. Estas discrepancias ilustran la dificultad que puede existir, en algunos casos, a la hora de asignar una banda a una estructura concreta.

En la Tabla 10 se muestran unos rangos de número de onda propuestos y/o utilizados por diversos autores para asignar las bandas que se resuelven en la banda amida I a ciertas estructuras secundarias de proteínas, cuando el disolvente utilizado es D₂O. Con estos rangos, una vez localizada la posición de una banda componente en la banda amida I, se puede realizar una asignación estructural y finalmente obtener una estimación de la estructura secundaria de una proteína.

1.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Si una molécula en su estado fundamental absorbe más energía de la necesaria para alcanzar S₁ entonces el exceso de energía puede absorberse como energía vibracional. Esta energía se disipa rápidamente y la partícula baja a los niveles más bajos de S₁. Esta partícula excitada al regresar a S₀ puede hacerlo de diferentes formas: puede ocurrir sin emitir radiación electromagnética, o de forma radiativa (emitiendo un fotón). A estas últimas sustancias se les conoce como luminiscentes (fluorescencia y fosforescencia) (Figura 26).

La energía disipada por el fotón es exactamente igual a la diferencia de energía entre los niveles vibracionales involucrados. Como consecuencia, aunque todas las moléculas se exciten a la misma longitud de onda, los fotones emitidos pueden tener distintas longitudes de onda de emisión, originando el espectro de emisión fluorescencia (Lakowicz, 2006). Los tiempos de vida del estado excitado son del orden de 10⁻⁸ segundos. Por otra parte, debido a la energía que se pierde al bajar a niveles menores de S₁ (conversiones internas y relajaciones vibratorias) la luz emitida

es de menor energía (mayor λ) que la absorbida. Así la luz de fluorescencia de emisión es siempre de λ mayor que la de excitación.

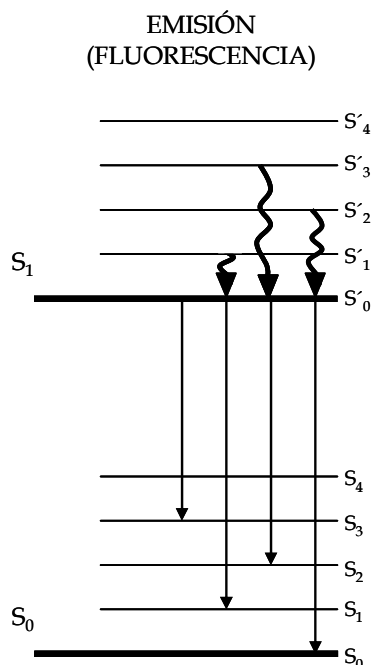


Figura 26. Diagrama de niveles de energía de un átomo o molécula. Muestra los cambios producidos cuando la partícula emite energía.

Un espectrofluorímetro está compuesto por una lámpara que emite luz de alta intensidad. Esta luz pasa a través de un monocromador que selecciona la λ de excitación. La luz de excitación pasa a través de una celda que contiene la muestra.

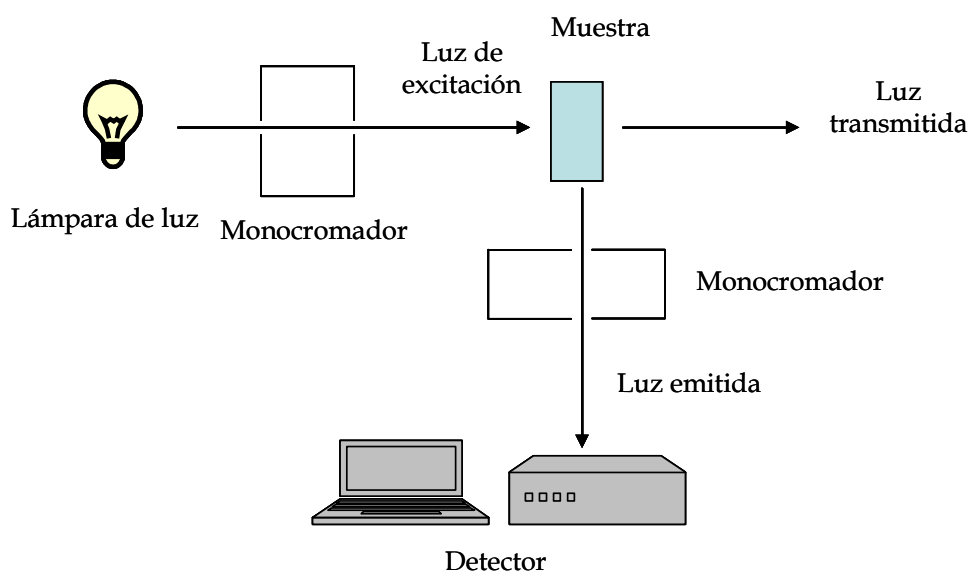


Figura 27. Esquema de un espectrofluorímetro.

La fluorescencia se propaga desde la muestra en todas direcciones pero debe observarse en ángulo recto respecto al haz de excitación. El haz entonces pasa por un segundo filtro o monocromador que aísla un pico fluorescente para medirlo. La radiación emitida llega a un detector fotoeléctrico. Desde los tubos fotomultiplicadores de los detectores de la muestra y de la referencia, las señales son conducidas a un amplificador de diferencia cuya salida se lee en un ordenador o un registrador potenciométrico (Figura 27).

1.2.1. Aplicación al estudio de proteínas

Los fluoróforos presentes en las proteínas son los aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina). La emisión de fluorescencia de las proteínas suele estar dominada por los residuos de triptófano, ya que tanto su coeficiente de extinción a la longitud de onda habitual de excitación como su rendimiento cuántico intrínseco (número de fotones emitidos dividido por el número de fotones absorbidos) son considerablemente mayores que los de tirosina y fenilalanina. Además, los fotones absorbidos por la tirosina son normalmente transmitidos a los triptófanos a través de un fenómeno cuántico denominado transferencia de energía por resonancia.

La espectroscopía de fluorescencia permite el estudio de los procesos de unión entre biomoléculas, tales como la asociación proteína-proteína, ya que la emisión de fluorescencia de los fluoróforos, principalmente del triptófano, depende fuertemente de su entorno local y este cambia cuando se produce la asociación, bien porque los fluoróforos se localizan en el sitio de unión entre ambas moléculas o bien porque aún situándose fuera del sitio de unión, la interacción provoca un cambio conformacional global que altera el microentorno de los fluoróforos. Al producirse la interacción, el espectro de fluorescencia de las moléculas implicadas puede cambiar, originándose variaciones en la longitud de onda máxima de emisión y/o en la intensidad de fluorescencia, que pueden utilizarse para el seguimiento del proceso de unión. Además, para este tipo de estudios también se pueden aplicar otras técnicas basadas

en la fluorescencia, como la atenuación de la fluorescencia o la anisotropía de fluorescencia.

La atenuación de la fluorescencia consiste en la disminución de la intensidad de la emisión fluorescente de los fluoróforos como consecuencia de su interacción con una molécula ajena denominada atenuador (“quencher”). Estos factores ambientales normalmente se deben al disolvente, a solutos presentes en la disolución, temperatura, pH, grupos químicos vecinos o a la concentración del fluoróforo. La atenuación de la fluorescencia puede ser dinámica, cuando el atenuador colisiona con el fluoróforo durante el tiempo de vida media del estado excitado, sin producirse alteraciones químicas en las moléculas; o estática, si el atenuador se asocia al fluoróforo formando un complejo estable que impide la emisión de fluorescencia. La atenuación será mayor cuanto más accesible sea el fluoróforo (que depende de la conformación de la proteína) y más atenuador haya en el medio. Los datos de atenuación de fluorescencia se manejan usando las herramientas matemáticas que aportan la llamada ecuación de Stern-Volmer.

2. TÉCNICAS CALORIMÉTRICAS

2.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

En general, con esta técnica se estudian los cambios conformacionales inducidos por la temperatura y/o cambios de fase al calentar o enfriar en un intervalo de temperatura, que para proteínas, ácidos nucleicos y biomembranas suele estar comprendido entre -20 y 130°C. La DSC mide la capacidad calorífica aparente de un sistema, en función de la temperatura, dando acceso al mecanismo que gobierna el equilibrio conformacional. Su posterior análisis permite la determinación de los parámetros termodinámicos asociados a la transición inducida por la temperatura.

Los microcalorímetros miden la diferencia de la capacidad calorífica de dos celdas idénticas, una para la muestra y otra para la referencia (diseño “twin” o de celdas gemelas). Estas celdas no son desmontables para una mayor reproducibilidad de los datos y poseen un sistema de presurización para evitar la formación de

burbujas. Ambas celdas se encuentran situadas dentro de una cámara adiabática y están conectadas a una termopila de gran sensibilidad que mide la diferencia de temperatura entre las dos celdas. Estos aparatos carecen de agitación mecánica para evitar aportar calor al sistema.

En el experimento, las celdas con la muestra y la referencia se calientan simultáneamente a una velocidad constante. Cuando se produce una transición inducida por la temperatura (por ejemplo la desnaturalización de una proteína o una transición termotrópica de fase en una bicapa fosfolipídica), la muestra absorbe parte del calor que se le está suministrando a la celda si la transición es endotérmica. Como resultado, la celda de la muestra tendría una temperatura algo inferior a la de la celda de referencia. Este efecto termodinámico es detectado por un sensor de temperatura y el sistema de control del equipo suministra una potencia calorífica adicional para que ambas celdas mantengan la misma temperatura. Esta potencia en exceso es proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas entre las dos celdas y sus contenidos. De esta manera se obtiene la capacidad calorífica del soluto en función de la temperatura.

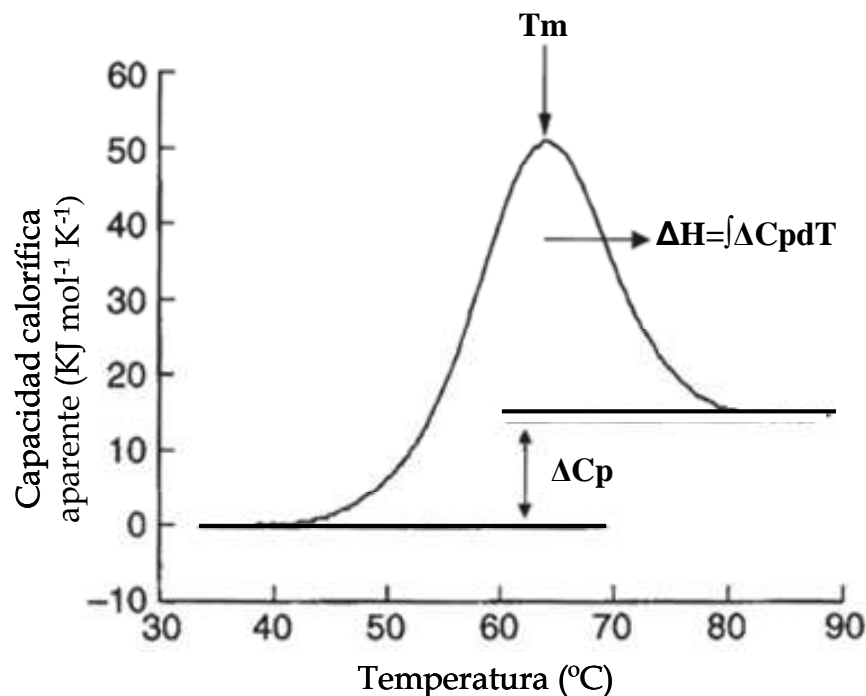


Figura 28. Representación de un pico endotérmico.

Por lo general se realizan varios barridos de la muestra para comprobar si el proceso es reversible. Esto resulta importante para el posterior análisis de datos que se basa en la termodinámica de equilibrio que requiere un proceso reversible. También es necesario restar al termograma de la muestra el termograma de la línea base instrumental para el correcto análisis de los datos.

Tanto en el estudio de proteínas como de lípidos por DSC, el perfil típico obtenido se corresponde con uno o varios picos endotérmicos, que se corresponden con el proceso de desplegamiento en el caso de proteínas, o con transiciones entre diferentes fases para los lípidos (Figura 28).

Este tipo de experimentos permite hacer un análisis termodinámico completo, obteniendo los distintos parámetros termodinámicos asociados a la transición, siempre que tenga lugar en condiciones de equilibrio (Privalov, 1979). Al punto máximo de la endoterma se le denomina temperatura de desnaturalización, T_m , en el caso de las proteínas, y temperatura media de transición de fase, T_m , en el caso de los lípidos. La integral del área bajo el pico de la transición representa la entalpía calorimétrica (ΔH) (Kcal mol^{-1}), es decir, la cantidad de energía absorbida necesaria para que tenga lugar la transición. La entropía (ΔS) se calcula a partir de: $\Delta S = \Delta H / T_m$.

La anchura del pico a media altura, $\Delta T_{1/2}$, está relacionada con la cooperatividad o tamaño de la unidad cooperativa ($N = \Delta H_{vh} / \Delta H$), siendo ΔH_{vh} la entalpía de van't Hoff (determinada a través del ajuste de la endoterma a un modelo de dos estados), el calor necesario para que cada unidad cooperativa lleve a cabo la transición de fase. Cuanto más estrecho es el pico mayor cooperatividad presenta la transición. Si $\Delta H = \Delta H_{vh}$ se trata de una transición de primer orden entre dos estados (inicial y final), mientras que si $\Delta H > \Delta H_{vh}$, es una transición que implica más de dos estados.

2.2. Calorimetría isotérmica de titulación (ITC)

Esta técnica mide el calor absorbido o liberado en una reacción química a temperatura constante (Wiseman y col., 1989). Es la técnica experimental más directa

para determinar los parámetros termodinámicos asociados a la formación de un complejo macromolécula/ligando.

Como en el caso de la DSC, el calorímetro funciona por compensación del efecto térmico en un entorno adiabático y cuenta con una celda de referencia que, en este caso, no participa en el proceso de valoración y se llena normalmente con agua o tampón. Existe otra celda denominada celda de reacción que contiene una disolución de la macromolécula en el mismo tampón, y lleva un sistema acoplado de inyección-agitación a través del cual se añade el ligando (Figura 29). Tras cada inyección de ligando se forma una cierta cantidad de complejo macromolécula/ligando. La formación de este complejo está acompañada por la liberación (reacción exotérmica) o absorción (reacción endotérmica) de calor, que genera una diferencia de temperatura entre ambas celdas, la cual es compensada automáticamente mediante un sistema de retroalimentación. La energía eléctrica necesaria para mantener la igualdad de temperaturas entre ambas celdas tras cada inyección, se registra en forma de picos característicos en la línea base y reciben el nombre de isothermas de unión. La integral del área bajo los picos corresponde al calor asociado a la reacción, entalpía de unión (ΔH) en el caso de macromoléculas-ligando.

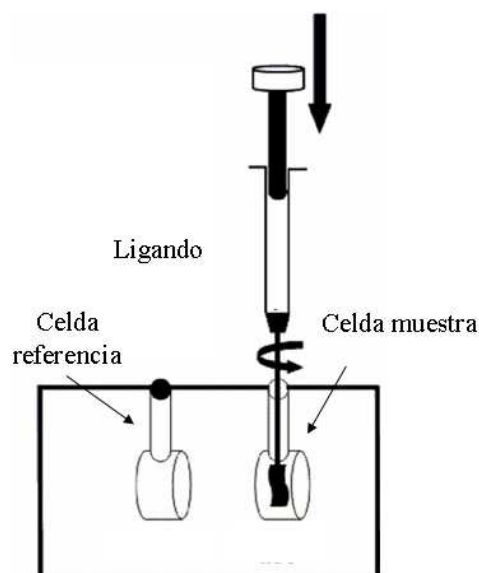


Figura 29. Representación esquemática de la situación de las celdas y la inyección de valorante en un calorímetro isotérmico de titulación.

En las inyecciones iniciales todo el ligando se unirá a la proteína, dando lugar a grandes picos. A medida que aumenta el grado de saturación, la intensidad de los picos disminuye hasta alcanzar un valor constante que corresponde al calor de dilución del ligando. Este efecto debe ser descontado del calor medido en cada inyección y se determina realizando una curva de dilución del ligando en el tampón bajo las mismas condiciones experimentales. Las isotermas de unión observadas generalmente se normalizan convirtiendo los datos en kilocalorías por mol de ligando inyectado, y se representan frente a la relación molar entre ligando y macromolécula (Figura 30).

El análisis de la isoterma de valoración generada a partir de la dependencia de el calor medido en cada inyección (q_i) con la relación molar ligando/proteína en términos de un modelo de unión adecuado, permite calcular la constante de unión (K_b), la estequiometría de la interacción ligando/proteína (n) y la entalpía de unión (ΔH). Conocidos K_b y ΔH es posible determinar la energía libre ($\Delta G = -RT \ln K_b = \Delta H - T \Delta S$) y la entropía de unión (ΔS) (Wiseman y col., 1989). La magnitud y el signo de ΔH y ΔS están relacionados con el tipo de fuerzas (hidrofóbicas, electrostáticas, puentes de hidrógeno, van der Waals) implicadas en la estabilización del complejo formado y se pueden correlacionar con la estructura de la moléculas interaccionantes (Leavitt y Freire, 2001).

Si partimos del hecho de que q_i tras sustraer la dilución del ligando es proporcional a la fracción de ligando unido a la proteína y a la entalpía de unión (ΔH):

$$q_i = v \Delta L_i \Delta H$$

Siendo v el volumen de la celda de reacción y ΔL_i la variación en la concentración de ligando libre tras la inyección i .

El calor total Q acumulado tras N inyecciones vendrá expresado por: $Q = \sum q_i = V_C [M]_t \Delta H_b K_a / (1 + K_a [L])$, donde V_C es el volumen de la celda, $[M]_t$ la concentración total de macromolécula total, ΔH_b la entalpía de unión por mol de

ligando ($K_{cal}/mol L_B$), K_a la constante de unión y $[L]$ concentración de ligando libre (Jelesarov y Bosshard, 1999).

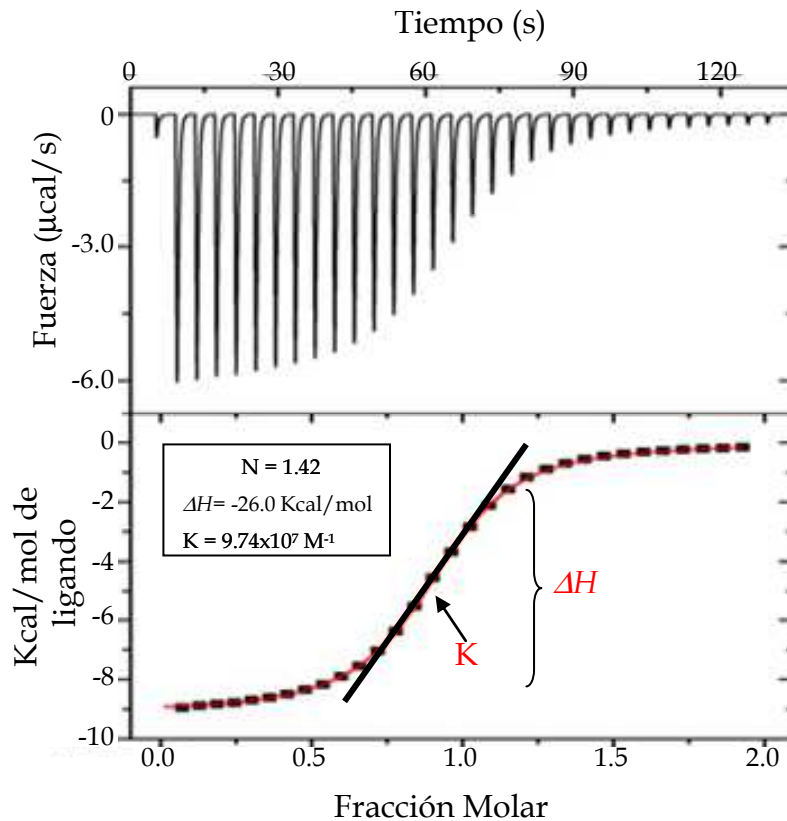


Figura 30. Ejemplo de gráficos correspondientes a las isotermas de unión macromolécula-ligando (arriba) y curva normalizada de entalpía de unión frente fracción molar de ligando unido a la proteína (debajo).

Wiseman y *col.*, (Wiseman y *col.*, 1989) demostró que la forma de la curva de unión está determinada por el producto del número de sitios de unión del ligando a la macromolécula (n) por la constante de unión (K) y por la concentración total de la macromolécula ($[M]_T$). A este valor se le denomina parámetro de Wiseman ($c = [M]_T K_b n$) y debe estar comprendido entre 1 y 1000 para que los parámetros termodinámicos puedan ser determinados con fiabilidad mediante ITC. Si el proceso de unión da un valor de c aproximado a 1 la curva obtenida será hiperbólica mientras que con valores de c más altos la curva se va volviendo sigmoideal.

3. MEDIDAS DE TENSIÓN SUPERFICIAL.

La tensión superficial se expresa en unidades de fuerza por unidad de longitud (N m^{-1}) y depende de las fuerzas cohesivas intermoleculares, las cuales son diferentes en el seno y en la superficie de un líquido. Existen diferentes métodos de medida de la tensión superficial. En esta tesis se ha utilizado el método del anillo de Du Noüy (Du Noüy, 1919) basado en el ángulo de contacto que el líquido establece con una superficie sólida.

El método de Du Noüy es una medida dinámica que consiste en suspender verticalmente sobre la muestra un anillo de platino, sumergirlo por debajo de la superficie y posteriormente se le hace ascender (Figura 31).

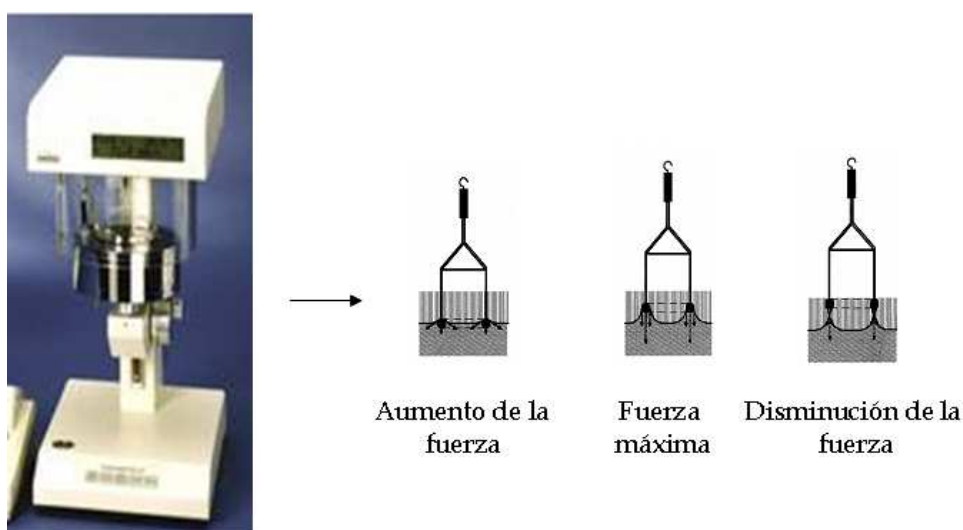


Figura 31. Diagramas de fuerzas al ir elevando el anillo de la muestra en medidas de tensión superficial mediante el método de Du Noüy.

Se mide la fuerza máxima necesaria para sacar el anillo a través de la interfase, y se utilizan los valores de los radios internos y externos del anillo para obtener el valor de tensión superficial. Para ello se utiliza la ecuación,

$$\gamma = \gamma^* F = (K / l_b) F$$

donde γ , es la tensión superficial real, γ^* la tensión superficial medida, F es un factor de corrección, K es la fuerza máxima medida y l_b es la longitud total de las circunferencias interna y externa del anillo. El factor de corrección se utiliza debido a que además de la fuerza que resulta de la tensión superficial hay otra fuerza debida al peso de la película que rodea directamente al anillo. Para su cálculo influyen sobre todo la fracción de líquido hidrostáticamente efectivo y la diferencia de densidad entre las dos fases (Harkins y Jordan, 1930).

4. BIBLIOGRAFÍA

- Du Noüy P.L. (1919) A new apparatus for measuring surface tension. *J. Gen. Physiol.* 1:521-524.
- Fabian H., Mantsch H. H. (1995) Ribonuclease A revisited: Infrared spectroscopic evidence for lack of native-like secondary structures in the thermally denatured state. *Biochemistry.* 34: 13651-13655.
- Ganim Z. (2007) Amide I Two-Dimensional Infrared Spectroscopy of proteins. *Acc. Chem Res.* 41: 432-441.
- Harkins W.D., Jordan H.F. (1930) A method for determination of surface and interfacial tension from the maximum pull on a ring. *J. Am. Soc.* 52:1751-1772.
- Harris D.A., Bashford C.L. (1987). *Spectrophotometry and spectrofluorimetry. A practical approach.* IRL Press.
- Holzbaur I.E., English A.M., Ismail A.A. (1996). FTIR study of the thermal denaturation of horseradish and cytochrome c peroxidases in D₂O. *Biochemistry.* 35: 5488-5494.
- Jelesarov I., Bosshard H.R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary Tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* 12: 3-18.
- Kabsch W., Sander C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers.* 22: 2577-637.
- Krimm S., Bandekar J. (1986) Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins. *Adv. Protein. Chem.* 38: 181-364.
- Kong J., Yu S. (2007) Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39: 549-559.
- Lakowicz J.C. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy.* Springer Science.
- Leavitt S., Freire E (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 560-566.
- Levitt M., Greer J. (1977). Automatic identification of secondary structure in globular proteins. *J. Mol. Biol.* 114: 181-293.
- Meersman F., Smeller L., Heremans K. (2002). Comparative fourier transform infrared spectroscopy study of cold-, pressure-, and heat-induced unfolding and aggregation of myoglobin. *Biophys. J.* 82: 2635-2644.
- Murayama K., Tomida M. (2004). Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry.* 43: 11526-11532.
- Olinger J.M., Hill D.M., Jakobsen R.J., Brody R.S. (1986). Fourier transform infrared studies of ribonuclease in H₂O and ²H₂O solutions. *Biochim. Biophys. Acta.* 869: 89-98.

- Panuszko A., Bruzdziak P., Zielkiewicz J., Wyrzykowski D., Stangret J. (2009). Effects of urea and trimethylamine-N-oxide on the properties of water and the secondary structure of hen egg white lysozyme. *J. Phys. Chem.* 113: 14797-14809.
- Privalov P.L. (1979). Stability of proteins. I. Small globular proteins. *Advan. Protein Chem.* 33: 167-241.
- Smeller L., Rubens P., Heremans K. (1999). Pressure effect on the temperature-induced unfolding and tendency to aggregate of myoglobin. *Biochemistry.* 38: 3816-3820.
- Sánchez M., Aranda F.J., Espuny M.J., Marqués A., Teruel J.A., Manresa A., Ortiz A. (2008). Thermodynamic and structural changes associated with the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant with bovine serum albumin. *Langmuir.* 24: 6487-95.
- Surewicz W.K., Mantsch H.H., Chapman D. (1993) Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: a critical assessment. *Biochemistry* 32:389-394.
- Takeda K., Shigeta M., Aoki K. (1987). Secondary structures of bovine serum albumin in anionic and cationic surfactant solutions. *J. Colloid Interface Sci.* 117: 120-126.
- Torrent J., Rubens P., Ribó M., Heremans K., Vilanova M. (2001). Pressure versus temperature unfolding of ribonuclease A: An FTIR spectroscopic characterization of 10 variants at the carboxy-terminal site. *Protein Science.* 10: 725-734.
- Wiseman T., Williston S., Brandts J.F., Lin L.N. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* 179:131-137.
- Ye M., Zhang Q-L., Li H., Weng Y-X., Wang W-C., Qiu X-G. (2007). Infrared spectroscopic discrimination between the loop and α -helices and determination of the loop diffusion kinetics by temperature-jump time-resolved infrared spectroscopy for cytochrome c. *Biophys. J.* 93: 2756-2766.

CAPÍTULO I.

Mecanismo de la permeabilización de membranas por acción de un trealosalípido biotensioactivo bacteriano producido por *Rhodococcus sp.*

Zaragoza A, Aranda FJ, Espuny MJ, Teruel JA, Marqués A, Manresa A, Ortiz A (2009). Mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus sp.* Langmuir. 25: 7892-7898.

1. RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado mediante técnicas de espectroscopía de absorción, espectroscopía de fluorescencia y calorimetría, la interacción de un succinil trealosárido biotensioactivo bacteriano producido por *Rhodococcus sp.* con vesículas fosfolipídicas, la cual conduce a la permeabilización de la membrana, en busca de un modelo molecular.

La concentración micelar crítica (CMC) del trealosárido se ha determinado mediante medidas de tensión superficial obteniendo un valor de 300 μM . La unión del trealosárido a membranas de POPC se ha estudiado mediante ITC. La constante de unión junto con la CMC, indican que el trealosárido funciona como un detergente débil, el cual prefiere incorporarse a la membrana a producir la micelización de la misma. Además, la adición de trealosárido a LUV de POPC produce la salida selectiva al medio externo de solutos atrapados en su interior, la cual es dependiente de su tamaño. Se demuestra que se requiere de una etapa de *flip-flop* previa a la permeabilización. La velocidad de este *flip-flop* se ha medido usando diferentes sondas fluorescentes, y se ha visto que la composición de la membrana modula el proceso de salida en gran medida. Esto nos ha llevado a proponer la incorporación y segregación del trealosárido en membranas de fosfatidilcolina creando dominios laterales, los cuales forman defectos o “poros” a través de los cuales tiene lugar la salida de solutos con un tamaño determinado. Los resultados presentados contribuyen al conocimiento de los mecanismos moleculares de la acción de trealosáridos biotensioactivos bacterianos relacionada con las membranas biológicas.

2. INTRODUCCIÓN

Los compuestos anfifílicos con actividad superficial y de origen biológico se conocen como biotensioactivos, y se han descrito nuevas propiedades químicas y biológicas que hacen que tengan aplicaciones muy interesantes (Desai y Banat, 1997; Cameotra y Makkar, 1998; Banat y *col.*, 2000; Lang, 2002; Sing y Cameotra, 2004; Rodrigues y *col.*, 2006). En general, los biotensioactivos se prefieren sobre los tensioactivos de origen químico debido a que son más biodegradables y menos lesivos para el medio ambiente. Además, algunos biotensioactivos juegan un papel interesante por sus actividades biológicas, como antifúngicos o en general como antimicrobianos (Lang y *col.*, 1989; Lang y Wagner, 1993; Stanghellini y Miller, 1997). Por otro lado algunos de estos compuestos pueden producirse a través de procesos biotecnológicos usando materiales de desecho como fuente de carbono, lo que tiene un valor añadido no sólo desde el punto de vista económico sino también por razones ecológicas (Makkar y Cameotra, 2002). Además se ha dirigido una gran actividad de investigación hacia la identificación de nuevos biotensioactivos y la caracterización de sus propiedades biológicas y químicas (Singh y Cameotra, 2004; Rodrigues y *col.*, 2006; Singh y *col.*, 2007).

La naturaleza química de los biotensioactivos es diversa, los ejemplos más interesantes incluyen lipopéptidos, glicolípidos, polímeros y otros (Lang, 2002). Debido a la naturaleza anfifílica de los biotensioactivos, estos se intercalan en las membranas biológicas alterando su función y propiedades fisicoquímicas (Ortiz y *col.*, 2009a). Recientemente se han dirigido varios trabajos al estudio de la acción de diferentes biotensioactivos sobre las membranas, incluyendo lipopéptidos como surfactina, iturina A (Grau y *col.*, 1999, 2000; Carrillo y *col.*, 2003; Aranda y *col.*, 2005) y fengicina, o glicolípidos como ramnolípidos (Sánchez y *col.*, 2006; Ortiz y *col.*, 2006; Aranda y *col.*, 2007a). Todos estos compuestos alteran las propiedades fisicoquímicas del núcleo hidrofóbico de la bicapa y perturban el estado de hidratación de la interfase agua/lípido (Sánchez y *col.*, 2006; Ortiz y *col.*, 2006; Ortiz y *col.*, 2008), además algunos de ellos inducen la permeabilización en sistemas de liposomas (Carrillo y *col.*, 2003), y/o hemólisis (Aranda y *col.*, 2005). La inducción de

permeabilización de membranas por tensioactivos puede ocurrir a concentraciones por encima o por debajo de su CMC dependiendo de la naturaleza química del tensioactivo. La permeabilización puede tener lugar concomitantemente con la solubilización de las vesículas o sin alteración de la integridad de las mismas.

Los biotensioactivos que contienen trealosa constituyen un grupo interesante de compuestos anfifílicos de origen natural (Asselineau y Asselineau, 1978). Estos trealosalípidos son producidos principalmente por *Rhodococci* y presentan propiedades fisicoquímicas y biológicas muy relevantes (Lang y Philp, 1998). Los trealosalípidos (TL) reducen significativamente la tensión superficial del agua (Ramsay y col., 1983), y forman microemulsiones (Singer y col., 1990). De este modo se ha propuesto un gran número de aplicaciones para estos compuestos (Lang y Philp, 1998). Además se ha visto que los succinil trealosalípidos inducen la diferenciación de líneas celulares de leucemia (Sudo y col., 2000) e inhiben la actividad de la proteína quinasa (Isoda y col., 1997). La mayoría de las acciones biológicas de estos trealosalípidos biotensioactivos se relacionan con su capacidad de perturbar la bicapa fosfolipídica.

El conocimiento detallado de las propiedades biológicas de un tensioactivo determinado es importante, ya que permitirá la selección de compuestos para usos específicos en función de las propiedades deseadas. En este capítulo se realiza un estudio detallado de los mecanismos moleculares y cinéticos de cada acción en particular con relación a su capacidad de permeabilizar la membrana lipídica. Se han usado técnicas de calorimetría, fluorescencia y espectroscopía de absorción para estudiar la interacción de succinil trealosalípidos biotensioactivos bacterianos producidos por *Rhodococcus sp.* con vesículas fosfolipídicas, que conduce a la permeabilización de la membrana. La cinética de los procesos se caracteriza detalladamente. Se encuentran diferencias significativas en función de la composición de la bicapa, lo cual ayuda a explicar los mecanismos que emplea este TL para perturbar la membrana.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materiales

1-Palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1-palmitil-2-hidroxi-*sn*-glicero-3-fosfocolina (lisoPC), y colesterol fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids Inc. (Birmingham, AL). 5(6)-Carboxifluoresceína (CF) (99% por HPLC) y FITC-dextranos (FD4: PM 4000; y FD10: PM 9400) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). N-(Fluoresceína-5-thiocarbamil)-1,2-dihexadecanil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (FPE) se adquirió de Molecular Probes (Eugene, OR). El resto de reactivos se obtuvieron con la mayor pureza disponible. Los tampones y sales inorgánicas fueron de grado analítico. El agua purificada fue desionizada en un equipo milli-Q de millipore (Millipore, Redford, MA) y mostró una resistividad de aproximadamente 18 M Ω .

La disoluciones stock de los distintos fosfolípidos y del trealosárido se prepararon en cloroformo/metanol (2:1) y se almacenaron a -80°C. La concentración de fosfolípido se determinó mediante el método de Böttcher (Böttcher y *col.*, 1961) en el que la concentración de fosfolípidos o de sus derivados hidrolíticos se puede cuantificar mediante la detección de fósforo inorgánico. En primer lugar se llevó a cabo una digestión química en medio ácido (ácido perclórico 70%) a 190°C durante 30 min. para liberar el grupo fosfato de la estructura del fosfolípido. Tras la adición de un 22% p/v de una disolución de reactivo molibdato (heptamolibdato amónico/ácido sulfúrico 1:6.5 p/v) los oxoaniones metálicos de molibdato amónico en este medio fuertemente ácido encierran a los aniones fosfato en estructuras llamadas polianiones. La reacción colorimétrica se desarrolló incorporando ácido ascórbico al 10% p/v e incubando las muestras a 100°C en un baño durante 15 min. La medida de la densidad óptica se realizó en un colorímetro a una longitud de onda de 812 nm. El tampón usado fue 150 mM NaCl, 5 mM Hepes pH 7.4 a no ser que se indique otro distinto. El agua y todos los tampones mencionados se filtraron a través de filtros de 0.2 μ m antes de su uso. La osmolaridad de todos los tampones y

disoluciones se comprobó y ajustó usando un osmómetro Osmomat 030 (Gonotec, Berlín, Alemania).

3.2. Producción y purificación de trealosalípido

La cepa 51T7 se aisló de muestras de suelo contaminado con aceite después de un cultivo enriquecido con queroseno y se identificó como *Rhodococcus sp.* (Espuny y col., 1995). Esta cepa se mantuvo en diferentes cultivos de TSA (Pronadisa, España) y se conservó en crioviales a -20°C. Los biotensioactivos se produjeron, purificaron y caracterizaron como se ha descrito anteriormente (Aranda y col., 2007b). Brevemente, los cultivos se incubaron a 27°C y se airearon mediante agitación (100 rpm). El inóculo se preparó por incubación de la cepa en un medio mineral con 10 g L⁻¹ de C₁₃ parafina durante 36 h. Un 2% v/v de este cultivo se utilizó como inóculo en un matraz de 500 mL con 50 mL de medio. Los compuestos con actividad superficial se aislaron por extracción líquido-líquido. El producto aislado se analizó por cromatografía en capa fina en silicagel G60 usando como fase móvil cloroformo/metanol/agua (65:25:4) y revelando con vapor de yodo. La GS/MS llevó a la determinación de los residuos de succinilo, heptanoilo, decanoilo, nonanoilo y undecanoilo. La principal fracción con actividad superficial se identificó con ¹H-NMR y ¹³C-NMR como un 2,3,4,2'-trealosa tetraéster.

3.3. Preparación de vesículas

Para los experimentos de salida de CF las vesículas fosfolipídicas se prepararon mezclando en cloroformo las cantidades apropiadas de los distintos fosfolípidos como se indica en cada caso. El disolvente se evaporó bajo un flujo de N₂ (g) obteniendo una fina película en el fondo de un pequeño tubo de vidrio. Las últimas trazas del disolvente se eliminaron desecando durante 2-3 horas en una bomba de vacío. A las muestras secas se les añadió 1 mL de tampón que contenía 75 mM de CF, 5 mM Hepes pH 7.4 y se formaron vesículas multilamelares (MLV) mediante

agitación mecánica de la muestra. Las vesículas unilamelares grandes (LUV) se prepararon mediante extrusión repetitiva de las MLV a través de un filtro de policarbonato de 0.1 μm (Nuclepore, Pleasanton, CA). Las vesículas se separaron del material no encapsulado por filtración en gel de Sephadex G-75. Inmediatamente después de ser preparada, la suspensión de vesículas se depositó cuidadosamente en la parte superior de una columna y la elución se realizó utilizando 150 mM NaCl, 5 mM Hepes, pH 7.4 como tampón de elución. Bajo estas condiciones las LUV eluyeron con el volumen muerto, mientras que la CF libre quedó retenida. Las LUV se recogieron en un tubo y la concentración de lípido se determinó como se menciona con anterioridad mediante el método de Böttcher.

Para la encapsulación de FITC-dextrano de peso molecular 4.000 y 10.000, las LUV se prepararon esencialmente como se describe arriba en un medio que contenía 20 mM FD4 o 10 mM FD10, 5 mM Hepes, pH 7.4 respectivamente. Se ajustó la osmolaridad con NaCl a la del tampón de elución descrito arriba. Las LUV se separaron del material no encapsulado mediante filtración en gel en una columna de Sephacryl S-300 en el mismo tampón descrito más arriba.

Las vesículas que contenían FPE se prepararon mezclando las cantidades apropiadas de la sonda fluorescente FPE (normalmente 1 mol%) en cloroformo junto con el fosfolípido, y se prepararon LUV esencialmente como se describe para vesículas con CF, en un tampón que contenía 150 mM NaCl, 5 mM Hepes pH 7.4.

Las SUV de POPC se prepararon por sonicación de MLV en 150 mM NaCl, 5 mM Hepes pH 7.4. La suspensión se sometió a ultrasonidos en un equipo Cole-Parmer (Cole-Parmer, Chicago, IL) usando una sonda de titanio durante 10 min en modo pulsado. La muestra se mantuvo en un baño de agua a 4°C para evitar el calentamiento. Finalmente la suspensión de SUV se centrifugó durante 30 min en una ultracentrífuga de sobremesa para eliminar las vesículas grandes y partículas de titanio de la sonda. El diámetro medio de las vesículas fue de unos 36 nm, según se determinó por dispersión de luz dinámica.

3.4. Medidas de turbidez

Se prepararon LUV de POPC como se describe con anterioridad en tampón 150 mM NaCl, 5 mM Hepes pH 7.4. Las medidas de turbidez se realizaron en un espectrofotómetro Uvikon XL (Bio Tek, Winooski, VT), en una celda termostatzada a 25°C con agitación magnética.

3.5. Medidas de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro PTI Quantamaster (Photon Technology, New Jersey, USA). Se usaron cubetas de cuarzo con un paso óptico de 1 cm. La salida de CF de las LUV se midió en el mismo tampón que se indicó antes y se usaron como longitudes de onda de excitación y emisión 430 y 520 nm respectivamente. Para calibrar la escala de fluorescencia, la liberación máxima se indujo por rotura de las vesículas con 1% (v/v) de Tritón X-100 y este valor se tomó como el 100% de liberación de CF.

El TL se añadió desde una disolución stock 5 mM en el mismo tampón en el que estaban dispersas las LUV. El volumen que se añadió fue siempre menor al 10% del volumen total del tampón en la cubeta, y en cualquier caso, se corrigió la intensidad de fluorescencia para esa dilución en cada caso. Las longitudes de onda utilizadas en LUV con FD4 y FD10 fueron 490 y 520 nm, excitación y emisión respectivamente. Todas las medidas se realizaron en celdas termostatzadas a 25°C y con agitación magnética.

3.6. Medidas de tensión superficial

La tensión superficial en equilibrio (γ_{TS}) se midió a 25°C con un tensiómetro digital Krüss K9 (Krüss, Helsinki, Finlandia) mediante el método del anillo. El instrumento se calibró con agua ultrapura (72 mN m⁻¹), etanol puro (22.7 mN m⁻¹) y etanol/agua al 30.5% (34.4 mN m⁻¹) para garantizar la precisión en el rango completo de tensión

superficial. Antes de cada medida, el anillo de platino y todo el material de vidrio se lavó con ácido crómico, agua desionizada, acetona y finalmente, en el caso del anillo, se flameó con un mechero Bunsen. La solución acuosa de TL se preparó por pesada en un tampón que contenía 150 mM NaCl, 5 mM Hepes pH 7.4 y se dejó equilibrar a 25°C antes de las medidas.

3.7. Calorimetría isotérmica de titulación

Los experimentos de calorimetría isotérmica de titulación (ITC) se llevaron a cabo en un calorímetro VP-ITC (MicroCal, Northampton, MA), equipado con una celda de 1.442 mL de volumen. Los datos se procesaron con el software Origin proporcionado con el equipo.

El reparto de TL en membranas fosfolipídicas se determinó por ITC. En este experimento la celda del calorímetro se llenó con TL 50 μM , es decir, por debajo de su CMC. La jeringa se llenó con SUV de POPC, normalmente a una concentración 2 mM. Las inyecciones secuenciales de lípido (5-10 μL) en la solución de TL condujeron al reparto de TL libre en la membrana con la concomitante evolución de calor. La disminución progresiva del TL libre hace que la evolución de calor sea progresivamente menor. Para la evaluación de los datos experimentales seguimos el modelo descrito para otros tensioactivos (Heertklotz y Seelig, 2000a, 2001). De acuerdo con este modelo, los datos de ITC se ajustaron a la ecuación:

$$\frac{\delta h_i}{\delta n_L^0} = \frac{K C_{TL}^0}{(1 + K C_L^0)^2} \Delta H_{TL}^m + q_{dil} \quad \text{(Ecuación. I.1)}$$

Donde $\delta h_i / \delta n_L^0$ es el calor de reacción después de cada inyección de lípido, C_{TL}^0 y C_L^0 son las concentraciones correspondientes al TL y vesículas de POPC, K es el coeficiente de reparto, ΔH_{TL}^m es el calor estándar de reacción para la transferencia de TL desde la fase acuosa a la membrana, m , y q_{dil} es el calor de dilución de la inyección de la suspensión de SUV. El coeficiente de reparto K se define como R_b / C_{TL}^f , siendo

R_b la relación TL/lípido en la membrana y C_{TL}^f la concentración de TL libre. Ajustando los datos de unión experimentales a la **Ecuación.I.1** es posible determinar K , ΔH_{TL}^m y q_{dil} para la unión de TL a membranas de POPC.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Concentración micelar crítica de trealosalípido

El TL producido por la cepa 51T7 de *Rhodococcus sp.* posee una cola formada por tres ácidos grasos de diferente longitud (C_7 , C_9 y C_{11}), y un grupo polar que contiene la molécula de trealosa y un residuo succinilo (Figura I.1). Este succinilo proporciona un grupo carboxilo libre a la molécula de trealosalípido, que dependiendo del pH puede estar protonado (neutro) o disociado (negativo). El pKa del TL se determinó por titulación con NaOH de una disolución 2 mM en NaCl 150 mM (resultados no mostrados).

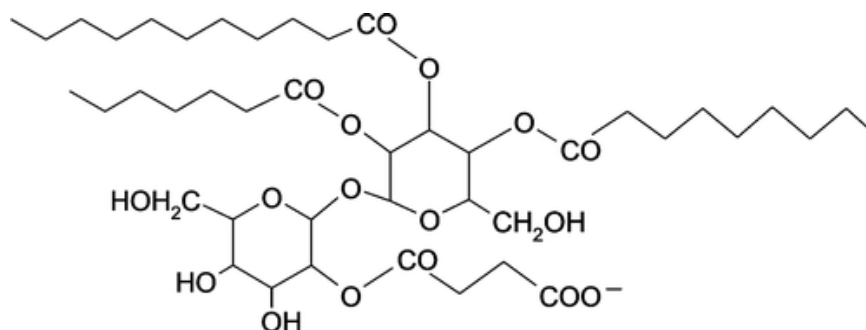


Figura I.1. Estructura química del trealosalípido de *Rhodococcus sp.*

Se obtuvo un pKa 6.1 que indicaba el carácter ácido del grupo carboxilo, y que a pH 7.4 sólo una pequeña proporción (aprox. 5%) de las moléculas estaban en forma protonada, es decir, la mayoría de las moléculas de TL portaban una carga negativa. Así a pH y fuerza iónica fisiológica, el TL se considera con carga negativa (tensioactivo aniónico).

La CMC del TL se determinó por medidas de tensión superficial. La Figura I.2 muestra la γ_{ST} en función de la concentración de TL (escala logarítmica). Una

disolución diluida del biotensioactivo presentaba un valor de γ_{TS} próximo al del agua pura (70 mN m^{-1}). Al ir aumentando la concentración de TL, la γ_{TS} disminuyó hasta alcanzar un valor de 26 mN m^{-1} para TL 10 mM . El valor de CMC obtenido a partir de estas medidas fue aproximadamente $300 \mu\text{M}$. Este valor es del mismo orden que el descrito para otros biotensioactivos glicolípidicos como el ramnolípido (Aranda y *col.*, 2007).

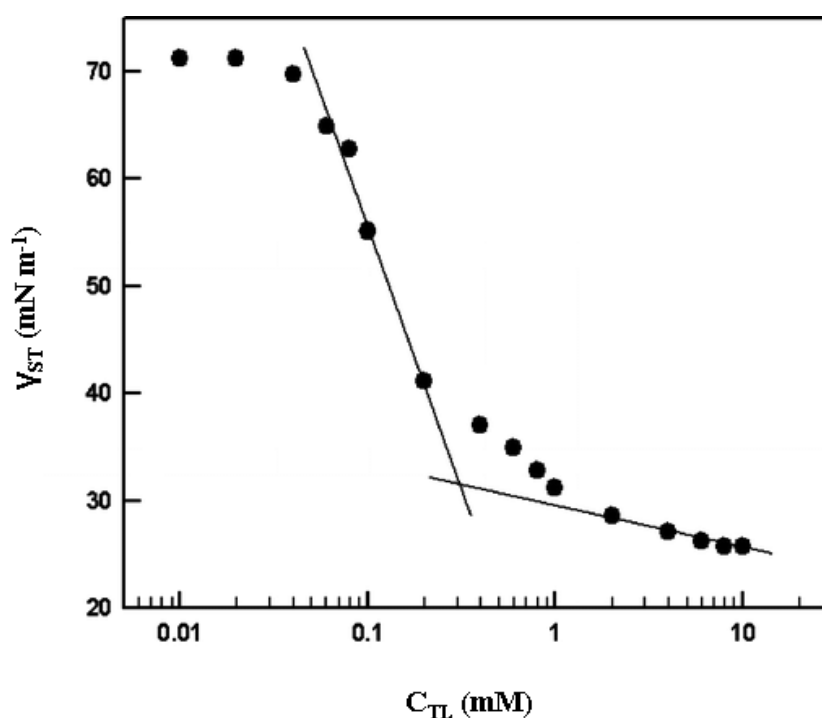


Figura I.2. Determinación de la CMC del trealosalípido por medidas de tensión superficial. La tensión superficial (γ_{ST}) se representa en función de la concentración total de trealosalípido (C_{TL}) para una serie de disoluciones a 25°C .

4.2. Reparto de trealosalípido en membranas de POPC

La termodinámica de unión de TL a membranas de POPC se determinó mediante experimentos de ITC en los que una dispersión del lípido se tituló con una disolución de biotensioactivo a una concentración por debajo de su CMC, es decir, en estado monomérico. Todos los experimentos se llevaron a cabo a 25°C , y a un pH y fuerza iónica fisiológicos. En estos experimentos, tras inyectar SUV de POPC a una

disolución de TL, se produjo el reparto del biotensioactivo en la membrana. El reparto del tensioactivo en la membrana fue exotérmico, así como el calor de dilución. La integración de los picos de titulación proporcionó los calores de reacción, los cuales se dividieron por la cantidad de lípido inyectado. La representación de $\delta h_i / \delta n_L^0$ frente a la concentración total de lípido (C_{POPC}) se muestra en la Figura I.3. La línea sólida corresponde al mejor ajuste de los datos conforme al modelo de reparto descrito en la sección experimental 3.7 de este capítulo. (**Ecuación I.1**).

$$\frac{\delta h_i}{\delta n_L^0} = \frac{K C_{TL}^0}{(1 + K C_L^0)^2} \Delta H_{TL}^m + q_{dil} \quad (\text{Ecuación.I.1})$$

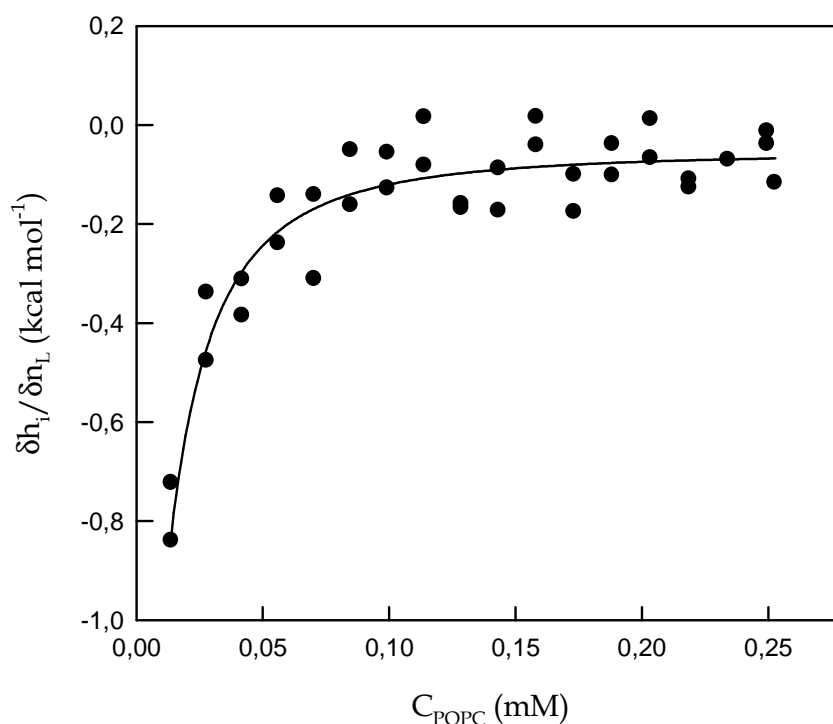


Figura I.3. Determinación por ITC del reparto del trealosalípido en vesículas unilamelares de POPC. El calor de inyección por mol de lípido inyectado ($\delta h_i / \delta n_L^0$) se representa en función de la concentración total de lípido (C_{POPC}). Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C. Los datos mostrados corresponden a dos experimentos diferentes. La línea sólida es el ajuste teórico de acuerdo con la **Ecuación.I.1**.

Este procedimiento de ajuste permitió la determinación simultánea del coeficiente de reparto, K ; la entalpía de reparto en la membrana $\Delta H^{m_{TL}}$ y el calor de dilución, q_{dil} . Los parámetros obtenidos fueron: $K = 46.2 \text{ mM}^{-1}$, $\Delta H^{m_{TL}} = -0.89 \text{ Kcal mol}^{-1}$, y $q_{dil} = -0.054 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Así, el calor de dilución fue pequeño, suponiendo menos del 10% del calor de reacción.

Para los detergentes no iónicos existe una relación entre la CMC y el reparto en la membrana (Heerklotz y Seelig, 2000b). A pesar de la naturaleza aniónica del TL bajo nuestras condiciones experimentales, es interesante resaltar que nuestros resultados de CMC ($300 \mu\text{M}$) y K (46.2 mM^{-1}) se ajustan bien con parámetros similares a detergentes no iónicos como C_{12}EO_6 y C_{12}EO_7 .

4.3. El trealosalípido induce la salida del contenido de vesículas fosfolipídicas y cambios de la turbidez

La salida de contenidos de vesículas al medio externo se monitorizó mediante sondas fluorescentes encapsuladas en el interior de vesículas de POPC. La Figura I.4, panel A, muestra las curvas de salida de CF de LUV de POPC en función del tiempo, obtenidas tras la adición de concentraciones crecientes de TL (manteniendo un rango de concentración por debajo de la CMC de TL). Como observación general, la salida fue un proceso lento y tuvo un período de retardo inicial de 1-2 minutos para todas las concentraciones de TL. La duración del período de retardo fue independiente de la concentración de TL, pero conforme aumentaba la concentración del glicolípido, iba aumentando la velocidad inicial de salida. La salida de contenidos se completó en unas 2-3 horas dependiendo de la concentración de TL. Se obtuvieron resultados similares a concentraciones menores y mayores de LUV de POPC.

La Figura I.4, panel B, muestra el cambio de la absorbancia a 400 nm (turbidez) en función del tiempo para suspensiones de LUV de POPC $25 \mu\text{M}$, al añadir diferentes concentraciones de TL por debajo de su CMC. Se observó que la adición del biotensioactivo disminuyó la turbidez dependiente del tiempo. Se observó un pequeño descenso de la turbidez a todas las concentraciones estudiadas (0.02-0.03 A).

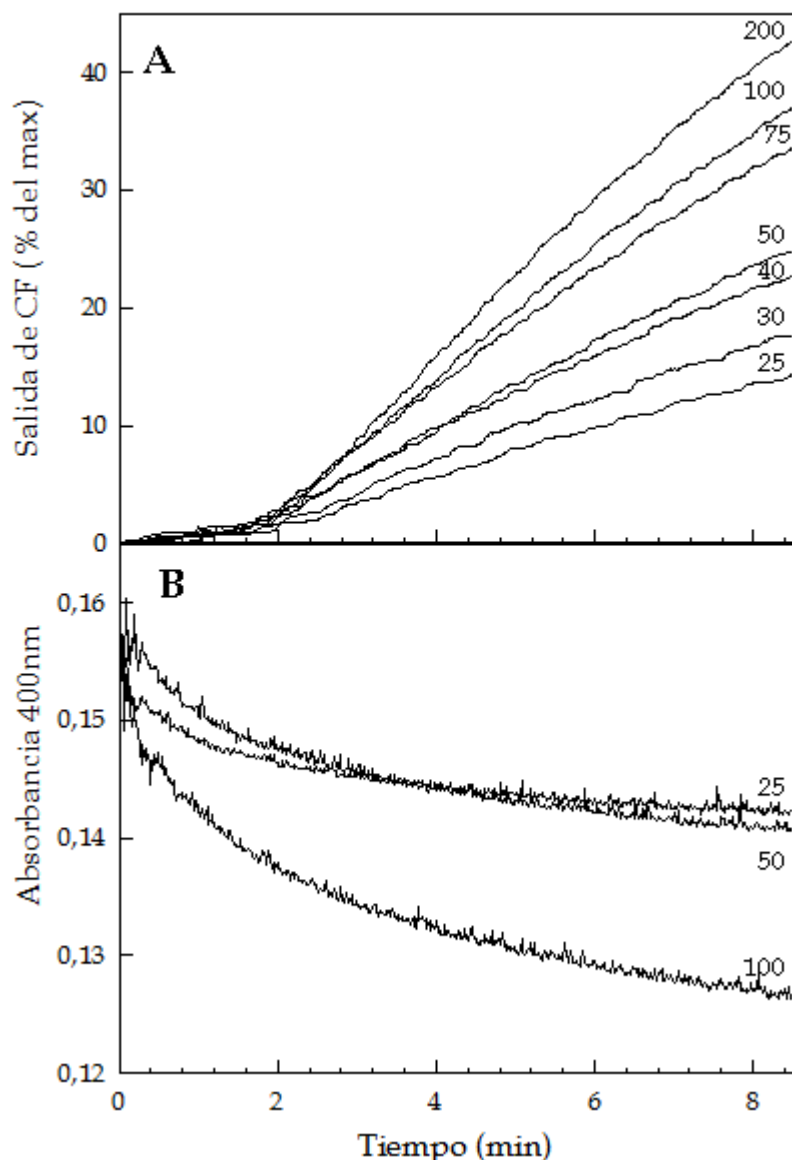


Figura I.4. (A) Salida de CF en función del tiempo (aumento de la intensidad de fluorescencia) en LUVs de POPC a varias concentraciones de TL. (B) Cambios en la turbidez (absorbancia a 400 nm) en función del tiempo a varias concentraciones de TL. Las concentraciones de TL (μM) se muestran a la derecha de las curvas. La concentración de POPC fue de $25 \mu\text{M}$, y la temperatura se mantuvo constante a 25°C .

Estos resultados sugieren en principio la solubilización de la membrana. Si este fuera el caso entonces los solutos de elevado peso molecular atrapados en el interior de las vesículas se liberarían al medio externo. Para comprobar esta posibilidad, se usaron fluoresceína-dextranos de diferentes pesos moleculares. Mediante un método similar al usado para CF, estos compuestos se encapsularon en el interior de vesículas de

POPC a una concentración relativamente alta, a la cual se producía autoextinción de la fluorescencia, de manera que se observa un aumento de fluorescencia al diluirse conforme se produce la salida de los mismos al medio externo (Tournois y *col.*, 1990). La Figura I.5 muestra el efecto de la adición de TL a LUV de POPC conteniendo FD4. Se observó una lenta atenuación de la fluorescencia de FD4 por efecto de la adición de TL, la cual se estabilizó después de unos 2-3 minutos, indicando que la sonda no se liberaba al medio externo. La subsiguiente adición de Tritón X-100 llevó al incremento de la fluorescencia, como consecuencia de la salida de FD4 al medio externo. Se obtuvieron resultados similares al utilizar FD10 (resultados no mostrados).

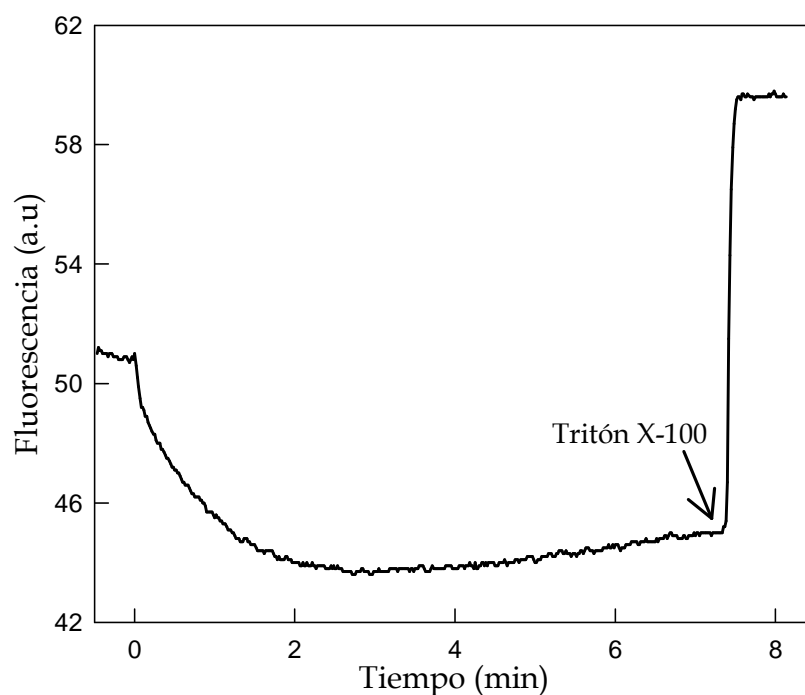


Figura I.5. Efecto de la adición de TL sobre la fluorescencia de FD4 atrapado en LUVs de POPC. La concentración de POPC fue de 25 μM . El TL se añadió a una concentración final de 25 μM , a tiempo cero. Cuando se indica (flecha), se añadió un 1% de Triton X-100 para romper las vesículas. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C.

La relación tensioactivo/lípido en la membrana limitante, que inicia la solubilización de ésta, $R_b \text{ sat}$, se puede simplificar como el producto de $K^* \text{CMC}$ (Heerklotz y Seelig, 2000b). En el caso del TL el producto $K^* \text{CMC} = 13.8$, sugiriendo que el TL se

comporta como un detergente bastante débil el cual prefiere insertarse en la membrana a producir la micelización de los lípidos. Los detergentes débiles requieren relaciones detergente/lípido > 1 para provocar la desintegración de la membrana, lo que está en concordancia con nuestros resultados que muestran que el TL induce la salida de solutos de bajo peso molecular, como la CF, pero no de los de alto peso molecular como FD4 o FD10. Estos resultados dejan fuera la posibilidad de que el TL a esas proporciones tensioactivo/lípido induzca la desintegración o solubilización de la membrana. Así, el leve descenso de la turbidez observado al añadir el TL tendría que deberse por lo tanto a otras razones. Probablemente, la incorporación del TL en dominios laterales en las membranas de POPC, da lugar a bicapas mixtas con un menor efecto sobre la dispersión de luz.

4.4 Velocidades de unión y *flip-flop* de trealosalípido en membranas de POPC

El panel A de la Figura I.6 muestra los primeros tres minutos del efecto inducido por TL a una concentración 25 μM en la salida de CF de vesículas de POPC (25 μM), mostrado anteriormente en la Figura I.4. Se observó un período de retardo de unos 90 s, anterior a la salida de CF. La existencia de este período de retardo previo a la liberación de CF inducida por el TL a diferentes concentraciones, sugiere que son necesarias una o más etapas previas para la inserción adecuada del glicolípido en la membrana, antes de que se produzca la permeabilización de la misma. Para comprobar esta hipótesis se realizaron una serie de experimentos usando sondas fluorescentes sensibles a la presencia del TL, concretamente FD4 y FPE.

La fluorescencia de FPE incorporada en las membranas fosfolipídicas se atenúa por ácidos grasos aniónicos, usándose para monitorizar la unión y transporte de esos compuestos en la bicapa lipídica (Brunaldi y *col.*, 2007; Simard y *col.*, 2008). Puesto que el TL lleva un residuo succinilo cargado negativamente es factible que este glucolípido pueda atenuar la fluorescencia de FPE detectando así la llegada del TL a la cara externa de la membrana. El panel B de la Figura I.6, muestra el efecto de

la adición de TL bajo las mismas condiciones que en el panel A, sobre la fluorescencia de FPE incorporada a membranas de LUV de POPC. Se observó que el TL producía atenuación de la fluorescencia de FPE. Las curvas en función del tiempo eran claramente bifásicas, de forma que primero tenía lugar un atenuación rápida de aproximadamente el 50% del total, seguido de una atenuación lenta que se estabilizaba pasados unos 90 s.

Estos resultados condujeron a la idea de que son necesarias dos etapas antes de que se produzca la salida de los solutos del interior de las vesículas: la unión de TL (adsorción) a la monocapa externa de la membrana (paso a), y el *flip-flop* desde la monocapa externa a la interna (paso b). Nuestra propuesta es que estos dos pasos ocurren en los primeros 90s, es decir, el tiempo correspondiente al período de retardo en las curvas de la salida de CF (Figura I.6, panel A, paso a+b). Sólo entonces el TL bien organizado en la bicapa provocaría la salida de CF (Figura I.6, panel A, paso c). El resultado obtenido usando LUV de POPC que contienen FPE en ambas caras (Figura I.6, panel B) indica que la absorción de TL a la cara externa de la membrana es muy rápido (Figura I.6, panel B, paso a), como se ve por la prácticamente instantánea atenuación del 50% de la fluorescencia de FPE por la adición de TL (FPE en la cara externa), mientras que el *flip-flop* del glicolípido hacia el interior de la membrana es más lento, requiriendo de unos 90s para completar la atenuación de la fluorescencia de FPE (FPE en el interior de la membrana) (Figura I.6, panel B, paso b).

Para corroborar este mecanismo se realizó un tercer experimento (Figura I.6, panel C). Se añadió TL a LUV de POPC que contenían FD4 encapsulado dentro de su volumen acuoso interno, como se explica arriba. El glicolípido atenuó la fluorescencia de FD4 de forma lenta y dependiente del tiempo sin observarse el paso rápido inicial, nivelándose la fluorescencia después de 90-120 s. En este caso la atenuación de la sonda atrapada en el interior ocurre después de que el TL llegue a la parte interna de la membrana y su difusión al espacio acuoso. Al ser la adsorción a la cara externa muy rápida, la atenuación de la fluorescencia debería reflejar la velocidad del *flip-flop*. Como se muestra en la Figura I.6, panel C, la atenuación de la fluorescencia de FD4 fue lenta, llevando unos 90 s para completarse, permaneciendo la sonda atrapada en las vesículas.

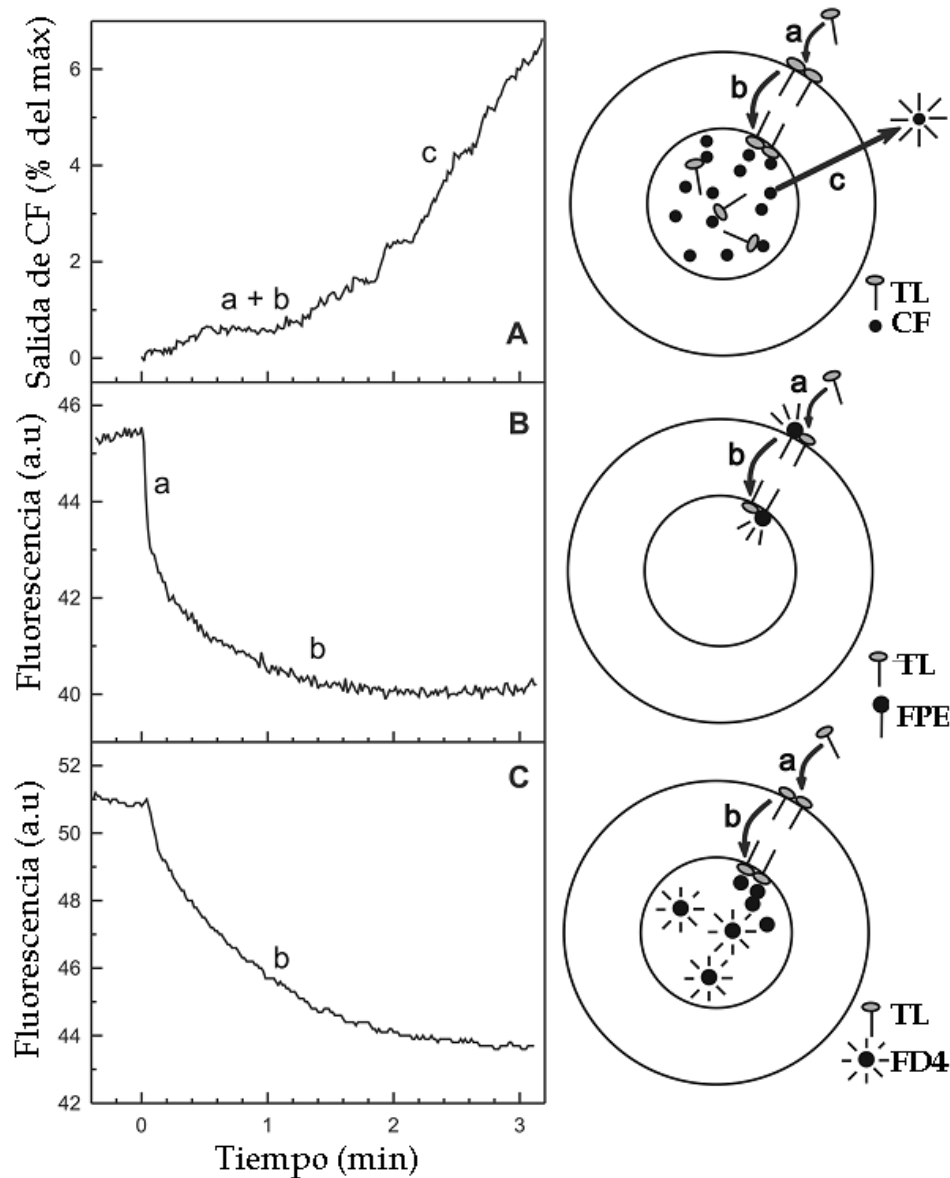


Figura I.6. Experimentos con sondas fluorescentes para observar las etapas de interacción del trealosalípido con LUVs de POPC. En todos los casos, se añadió TL (concentración final $25 \mu\text{M}$) a una suspensión de LUV de POPC $25 \mu\text{M}$ a 25°C . (A) Curva de salida de CF. (B) Efecto en la fluorescencia de FPE incorporado a la membrana de LUV de POPC. (C) Efecto en la fluorescencia de FD4 atrapado en el interior de LUVs de POPC. Los estados indicados corresponden a (a) difusión rápida del TL y unión a la monocapa externa de la membrana, (b) *flip-flop* de la monocapa externa a la interna, y (c) salida de CF al medio externo.

La velocidad de *flip-flop* del TL que medimos fue lenta en comparación con la de ácidos grasos libres que muestran un *flip-flop* muy rápido a través de bicapas fosfolipídicas (Simard y *col.*, 2008), mientras que fue rápida en comparación con el

flip-flop de fosfolípidos que puede durar varias horas (Kol y col., 2003), siendo de la misma magnitud que la publicada para ceramidas (López-Montero y col., 2005).

4.5. Efecto de la composición de la membrana lipídica en la permeabilización inducida por trealosalípido

Como se explicó en la sección 3.3 de este capítulo, el TL induce la salida completa de CF para todas las proporciones TL/POPC ensayadas, después de un período de 2-3 horas. Así, para tener medidas cuantitativas de la velocidad de salida de CF para diferentes concentraciones de biotensioactivo, se determinó la velocidad inicial de salida a partir de la tangente a las curvas al comienzo de la liberación de CF, y se expresó como el porcentaje máximo de salida (determinado por desintegración de las vesículas con TX-100) por minuto. La dependencia de esa velocidad inicial de salida de CF en función de la concentración de TL se muestra en la Figura I.7, para LUV de diferentes composiciones lipídicas. En todos los casos la velocidad inicial de salida aumentó con la concentración de TL alcanzando un máximo alrededor de una concentración 200 μM (valor cercano a la CMC del TL).

Examinando la influencia de la composición lipídica de la bicapa en la salida de CF se puede elaborar el mecanismo molecular subyacente. Los resultados mostraron que la composición lipídica afecta en gran medida a la velocidad de liberación de CF. Para todas las concentraciones de TL estudiadas, la inclusión de colesterol o POPE en la membrana redujo considerablemente la velocidad inicial de salida, sugiriendo un efecto opuesto al del TL. El efecto del colesterol es particularmente importante ya que sólo se observó el 20% de salida después de dos horas de incubación para muestras que contenían 50% (no mostrado). Por otro lado la presencia de concentraciones sublépticas de lisoPC estimulaba la salida de CF inducida por TL a todas las concentraciones del biotensioactivo ensayadas.

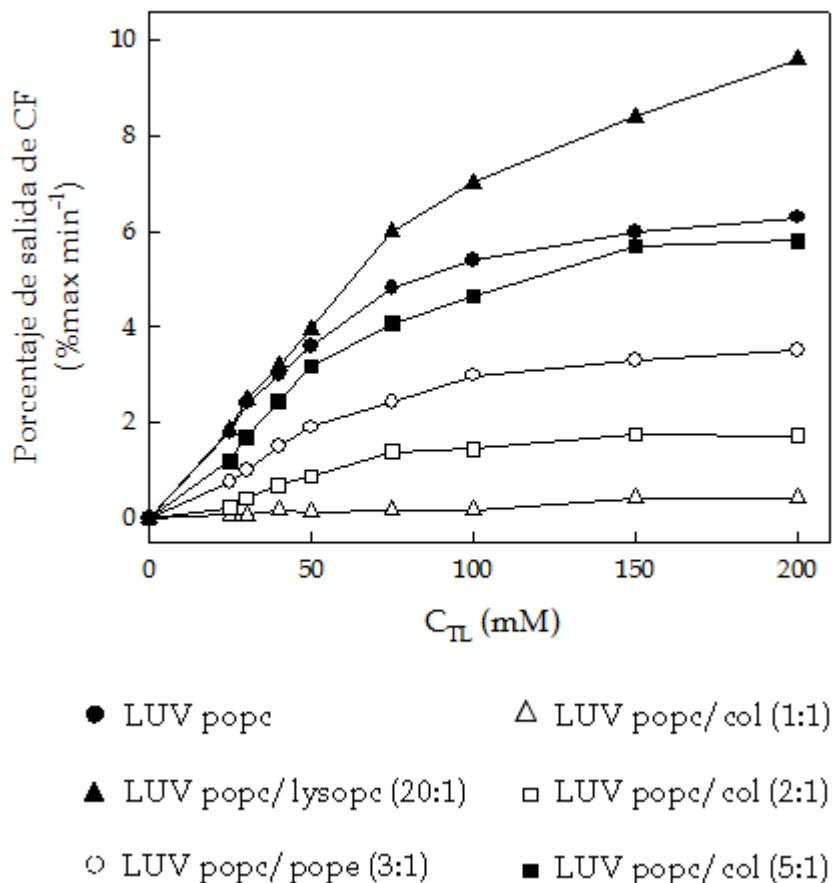


Figura I.7. Efecto de la composición de la membrana sobre la velocidad inicial de salida de CF de LUVs inducida por TL. La velocidad inicial de la salida de CF se muestra en función de la concentración de trealosápidido (C_{TL}) para LUV de diferentes composiciones tal y como se indica en la leyenda.

La molécula de TL tiene una cabeza polar grande formada por la unidad de trealosa que contiene un residuo succinilo, y una porción hidrofóbica comparativamente menor formada por tres cadenas acílicas de longitud media, considerándose como una molécula con forma molecular de cono invertido, y confiriendo por tanto curvatura positiva a las membranas en las que se incorpora (Cullis y De Kruijff, 1979). Esta teoría podría explicar porqué la presencia de cantidades sublétricas de lisoPC, la cual es una molécula también con forma de cono invertido, facilita la permeabilización inducida por el TL, debido a la suma de los efectos de ambas moléculas sobre la curvatura de la membrana. Por otro lado, en trabajos anteriores se describió que el TL facilita la formación de fases hexagonales invertidas en

dielaidilfosfatidiletanolamina (Ortiz y *col.*, 2008) mediante la deshidratación de la región interfacial, lo cual acentúa la forma de cono de POPE, siendo por tanto complementaria a la de TL y contrarrestando su efecto sobre la curvatura de la bicapa. Además POPE es un lípido no bicapa y se ha mostrado que causa un incremento en la presión lateral de la región hidrocarbonada de la bicapa (De Kruijff, 1997) y en el orden de las cadenas acílicas (Lafleur y *col.*, 1996), lo que podría contribuir a explicar el efecto protector de POPE en la permeabilización inducida por TL. Probablemente esta explicación podría tener también alguna relación con el efecto del colesterol. Se ha descrito que la inclusión de 40-50% de colesterol en membranas de fosfatidilcolina evita casi completamente la permeabilización pasiva de CF e iones (Bhattacharya y Saubhik, 2000), la salida de tóxicos medioambientales (Ortiz y *col.*, 2005) y la salida de contenidos inducida por tensioactivos (Apel-Paz y *col.*, 2000). Se sabe que en la bicapa el colesterol afecta al orden de las cadenas acílicas de los fosfolípidos, así como influye en las propiedades mecánicas de la membrana (Miao y *col.*, 2002; Henriksen y *col.*, 2006). El efecto protector del colesterol frente a la permeabilización inducida por TL podría ser el resultado del incremento en el movimiento de las cadenas acílicas de los fosfolípidos por este esteroide (Stockton y Smith, 1976; Miao y *col.*, 2002; Henriksen y *col.*, 2006), dando lugar a un empaquetamiento lipídico más compacto (Urbina y *col.*, 1995), haciendo por ello más difícil la inserción del tensioactivo e impidiendo o disminuyendo así la formación de poros. El efecto del colesterol podría ser de particular interés cuando se considera el caso de membranas bacterianas que no contienen colesterol, mientras que las membranas de células eucariotas contienen sobre un 50% (Miao y *col.*, 2002). Esto abre la posibilidad de aplicaciones del TL como un compuesto activo de membrana que podría distinguir entre bacterias y por ejemplo membranas celulares de mamífero. Con respecto a esto se ha sugerido que este hallazgo podría ser útil para la aplicación de este tipo de tensioactivos en enfermedades de transmisión sexual (Apel-Paz y *col.*, 2005). Considerados en su conjunto, los efectos de POPE y colesterol reflejan presumiblemente una influencia general sobre las propiedades físicas de bicapas de POPC.

5. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha abordado el estudio del mecanismo de interacción de un trealosalípido biotensioactivo bacteriano con membranas fosfolipídicas modelo, el cual conduce a la permeabilización de la membrana. Se eligió POPC como especie de fosfatidilcolina representativa para preparar vesículas de membrana. En resumen, se ha mostrado que el trealosalípido producido por *Rhodococcus sp.* actúa como un detergente débil el cual prefiere insertarse a la membrana a producir la micelización de la misma. Un resultado importante es que el TL induce la salida de CF pero no de otros solutos de mayor peso molecular como algunos dextranos. En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación se ha demostrado por DSC y microscopía de fuerza atómica que el TL se incorpora en membranas POPC y se segrega en dominios laterales, los cuales están constituidos por glicolípido puro (Aranda y col., 2007). Nuestra propuesta es que esos dominios podrían constituir defectos en la membrana, actuando como poros selectivos al tamaño los cuales permiten la salida de CF pero no de solutos mayores. La formación de esos poros podría también estar vinculada al proceso de *flip-flop* del TL, existiendo indicios de que la traslocación a través de la membrana lipídica es un proceso mediado por poros (Gurtovenko y Vattulainen., 2007). Además, los resultados de permeabilización de membranas de POPC por TL para solutos de tamaño pequeño como la CF indican que ocurre sin la solubilización de la membrana.

La capacidad de una molécula de atravesar la membrana lipídica es importante para algunas aplicaciones como la administración externa de drogas o compuestos biológicamente activos. Con respecto a esto, nosotros hemos mostrado que el TL puede realizar *flip-flop* en las membranas de fosfolípidos en una escala de tiempo de minutos, y este *flip-flop* se requiere para la adecuada inserción del biotensioactivo en la bicapa antes de la formación de poros de permeabilización. Por otra parte, nuestros resultados han mostrado claramente que la adsorción del TL a la monocapa externa de membranas de POPC es un proceso muy rápido mientras que el *flip-flop* del glicolípido es más lento.

Finalmente, la composición lipídica de la membrana modula el efecto del TL, el cual actúa como una molécula con forma molecular de cono invertido. El colesterol inhibe fuertemente la salida de contenidos vesiculares inducida por TL, lo que puede tener una gran relevancia dado las grandes diferencias en los contenidos de colesterol entre membranas bacterianas y de mamíferos. Los resultados obtenidos en este capítulo suponen una contribución para explicar el mecanismo molecular de la acción biológica del TL relacionado con las membranas biológicas.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Apel-Paz M., Doncel G.F., Vanderlick T.K. (2005). Impact of membrane cholesterol content on the resistance of vesicles to surfactant attack. *Langmuir* 21: 9843-9849.
- Aranda F.J., Teruel J.A., Ortiz A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochim. Biophys. Acta* 1713: 51 - 56.
- Aranda F.J., Espuny M.J., Marqués A., Teruel J.A., Manresa A., Ortiz A. (2007a). Thermodynamics of the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with phospholipid membranes. *Langmuir* 23: 2700-2705.
- Aranda F.J., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Palacios-Lidón E., Ortiz A. (2007b). Domain formation by a *Rhodococcus* sp. biosurfactant trehalose lipid incorporated into phosphatidylcholine membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 2596-2604.
- Asselineau C., Asselineau J. (1978). Trehalose-containing glycolipids. *Prog. Chem. Fats other Lipids* 16: 59-99.
- Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 495-508.
- Bhattacharya S., Saubhik H. (2000). Interactions between cholesterol and lipids in bilayer membranes. Role of lipid headgroup and hydrocarbon chain-backbone linkage. *Biochim. Biophys. Acta* 1467: 39-53.
- Böttcher C.J.F., Van Gent C.M., Pries C. (1961). A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Anal. Chim. Acta* 24: 203-204.
- Brunaldi K., Simard J.R., Kamp F., Rewal C., Asawakarn T., O'Shea P., Hamilton J.A. (2007). Fluorescence assays for measuring fatty acid binding and transport through membranes. *Methods Mol. Biol.* 400: 237-55.
- Cameotra S.S., Makkar R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 520-529.
- Carrillo C., Teruel J.A., Aranda F.J., Ortiz A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim. Biophys. Acta* 1611: 91-97.
- Cullis P.R., De Kruijff B. (1979). Lipid polymorphism and the functional roles of lipids in biological membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 559: 399-420.
- De Kruijff B. (1997). Lipid polymorphism and biomembrane function, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1: 564-569.
- Desai J.D., Banat I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 47-64.
- Espuny M.J., Egido S., Mercadé M.E., Manresa A. (1995). Characterization of trehalose tetraester produced by a waste Lube oil degrader *Rhodococcus* sp. 51T7. *Toxicol Environ Chem* 48:83-88.

- Grau A., Gómez-Fernández J.C., Peypoux F., Ortiz A. (1999). A study of the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 1418: 307-319.
- Grau A., Ortiz A., De Godos A., Gómez-Fernández J.C. (2000). A biophysical study of the interaction of the lipopeptide antibiotic iturin A with aqueous phospholipid bilayers. *Arch. Biochem. Biophys.* 377: 315-323.
- Gurtovenko A.A., Vattulainen I. (2007). Molecular Mechanism for Lipid Flip-Flop, *J. Phys. Chem. B* 11: 13554-13559.
- Heerklotz H., Seelig J. (2000a). Titration calorimetry of surfactant-membrane partitioning and membrane solubilization. *Biochim. Biophys. Acta* 1508: 69-85.
- Heerklotz H., Seelig J. (2000b). Correlation of membrane/water partition coefficients of detergents with the critical micelle concentration. *Biophys. J.* 78: 2435-2440.
- Heerklotz H., Seelig J. (2001) Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. *Biophys. J.* 81: 1547-1554.
- Henriksen J., Rowat A.C., Brief E., Hsueh Y.W., Thewalt J.L., Zuckermann M.J., Ipsen J.H. (2006). Universal Behavior of Membranes with Sterols. *Biophys. J.* 90: 1639-1649.
- Isoda H., Kitamoto D., Shinmoto H., Matsumura M., Nakahara T. (1997). Microbiol estracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of the proteína kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60. *Biosci. Biotechnol. Biochem* 61: 609-614.
- Keller S., Heerklotz H., Blume A. (2006). Monitoring lipid membrane translocation of sodium dodecyl sulphate by isothermal titration calorimetry. *J. Am. Chem. Soc.* 128: 1279-1286.
- Kol M.A., Van Laak A.N.C., Rijkers D.T.S., Killian J.A., de Kroon A.I.P.M., de Kruijff B. (2003). Phospholipid flop induced by transmembrane peptides in model membranes is modulated by lipid composition. *Biochemistry* 42: 231-237.
- Makkar R.S., Cameotra S.S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 428-434.
- Miao L., Nielsen M., Thewalt J., Ipsen J.H., Bloom M., Zuckermann M.J., Mouritsen O.G. (2002). From lanosterol to cholesterol: structural evolution and differential effects on lipid bilayers. *Biophys J.* 82:1429-1444.
- Lafleur M., Bloom M., Eikenberry E., Gruner S., Han Y, Cullis P. (1996). Correlation between lipid plane curvature and lipid chain order. *Biophys. J.* 70: 2747-2757.
- Lang S., Katsiwela E., Wagner F. (1989). Antimicrobial effects of biosurfactants, *Fat Sci. Technol.* 91: 363-366.
- Lang S., Wagner F. (1993). Biological activities of biosurfactants, in: N. Kosaric, (Ed.), *Biosurfactants*, vol. 48, Dekker, New York, pp. 251-258.
- Lang S., Philp J.C. (1998). Surface-active compounds in *Rhodococci*. *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 59-70.

- Lang S. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 7: 12-20.
- Lopez-Montero I., Rodriguez N., Cribier S., Pohl A., Velez M., Devaux P.F. (2005). Rapid transbilayer movement of ceramides in phospholipid vesicles and in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 27: 25811-25819.
- Ortiz A., Teruel J.A., Aranda F.J. (2005). Effect of triorganotin compounds on membrane permeability. *Biochim. Biophys. Acta* 1720: 137-142.
- Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Aranda F.J. (2006). Effects of dirhamnolipid on the structural properties of phosphatidylcholine membranes, *Int. J. Pharm.* 325: 99-107.
- Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Aranda F.J. (2008). Interactions of a *Rhodococcus* sp. biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylethanolamine membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 2806-2813.
- Ortiz A., Aranda F.J., Teruel J.A. (2009a). Interaction of dirhamnolipid biosurfactants with phospholipid membranes: a molecular level study, in: R. Sen, (Ed.) *Biosurfactants*, Landes Bioscience, Austin.
- Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Aranda F.J. (2009b) Interactions of a bacterial biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylserine membranes. *Chem. Phys. Lipids.* 158: 46-53.
- Ramsay B.A., Cooper D.G., Margaritis A., Zajic J.E. (1983). Rodochrous bacteria: biosurfactant production and demulsifying ability. J.E. Zajic, D.G. Cooper, T.R. Jack, N. Kosaric (Eds.), *Microb. Enh. Oil. Recov.* 61-65.
- Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 609-618.
- Sánchez M., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Aranda F.J., Manresa A., Ortiz A. (2006) Modulation of the physical properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine membranes by a dirhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Phys. Lipids.* 142: 118-127.
- Singer M.E.V., Finnerty W.R., Tunelid A. (1990). Physical and chemical properties of a biosurfactant synthesized by *Rhodococcus* species H13-A. *Can. J. Microbiol.* 36: 746-750.
- Singh P., Cameotra S.S. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol.* 22: 142-146.
- Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. (2007). Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects, *Biotech. Adv.* 25: 99-121.
- Simard J.R., Pillai B.K., Hamilton J.A. (2008). Fatty acid flip-flop in a model membrane is faster than desorption into the aqueous phase. *Biochemistry.* 47: 9081-9089.

- Stanghellini M.E., Miller R.M. (1997). Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Dis.* 81: 4-12.
- Stockton G.W., Smith I.C.P. (1976). A deuterium nuclear magnetic resonance study of the condensing effect of cholesterol on egg phosphatidylcholine bilayer membranes. I. Perdeuterated fatty acid probes. *Chem. Phys. Lipids.* 17: 251-263.
- Sudo T., Zhao X., Wakamatsu Y., Shibahara M., Nomura N., Nakahara T., Suzuki A., Kobayashi Y., Jin C., Murata T., Yokoyama K.K. (2000). Induction of the differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cell line by succinoyl trehalose lipids. *Cytotechnology.* 33: 259-264.
- Tournois H., Fabrie C.H.J.P., Burger K.N.J., Mandersloot J., Hilgers P., van Dalen H., de Gier J., de Kruijff B. (1990). Gramicidin A Induced Fusion of Large Unilamellar Dioleoylphosphatidylcholine Vesicles and Its Relation to the Induction of Type II Nonbilayer Structures. *Biochemistry.* 29: 8297-8307.
- Urbina J.A., Pekerar S., Le H.B., Patterson J., Montez B., Oldfield E. (1995). Molecular order and dynamics of phosphatidylcholine bilayer membranes in the presence of cholesterol, ergosterol and lanosterol: a comparative study using ^2H -, ^{13}C - and ^{31}P -NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta.* 13: 163-176.

CAPÍTULO II.

Actividad hemolítica de un trealosalípido biotensioactivo bacteriano producido por *Rhodococcus* sp.: Evidencias para un mecanismo coloide-osmótico

Zaragoza A, Aranda FJ, Espuny MJ, Teruel JA, Marqués A, Manresa A, Ortiz A (2010). Hemolytic activity of a bacterial trehalose lípido biosurfactant produces by *Rhodococcus* sp.: Evidence for a colloid-osmotic mechanism. *Langmuir* 26: 8567-8572.

1. RESUMEN

Una cepa de la bacteria *Rhodococcus sp.*, cultivada bajo condiciones adecuadas produce un succinil trealosalípido que se comporta como biotensioactivo, y muestra diferentes actividades biológicas interesantes. El TL ha mostrado tener una gran tendencia a repartirse en la membrana, por lo que la caracterización de su interacción con membranas modelo y membranas biológicas es de crucial importancia. En este trabajo, se han usado eritrocitos humanos como modelo de experimentación. El TL produce la hinchazón de los glóbulos rojos seguida de hemólisis, a concentraciones por debajo de su concentración micelar crítica. Las medidas cinéticas muestran que, con la adición de TL, la salida de K^+ precede a la de la hemoglobina. La adición de protectores osmóticos de tamaño apropiado al medio externo hace posible disminuir y hasta evitar la hemólisis. Los resultados indican que el TL causa hemólisis de eritrocitos humanos por un proceso coloide-osmótico, muy probablemente mediante la formación de dominios de permeabilización, o “poros”, ricos en el biotensioactivo, en la membrana de los eritrocitos. Por otra parte, mediante microscopía electrónica de barrido se muestra que el TL induce esferocitosis y equinocitosis de los glóbulos rojos, lo que encaja perfectamente dentro del marco de la teoría de acoplamiento de bicapas. Estos resultados contribuyen a establecer la base molecular de las propiedades biológicas del biotensioactivo.

2. INTRODUCCIÓN

Existe una amplia variedad de microorganismos que lleva a cabo la producción de compuestos anfifílicos con actividad superficial. Así, el término biotensioactivo se usa comúnmente para definir compuestos anfifílicos con actividad superficial de origen biológico. La intensa investigación en este campo en las últimas décadas ha supuesto la descripción de nuevas propiedades biológicas, lo que deriva en interesantes aplicaciones potenciales (Desai y Banat, 1997; Cameotra y Makkar, 1998; Banat y *col.*, 2000; Lang, 2002; Singh y Cameotra, 2004; Rodrigues y *col.*, 2006). Los biotensioactivos presentan varias ventajas frente a los tensioactivos de origen químico, particularmente en relación a su biodegradabilidad y compatibilidad medioambiental. Otras características de algunos biotensioactivos están relacionadas con algunas de sus actividades biológicas, por ejemplo, como antifúngicos o, en general, como agentes antimicrobianos, lo que extiende su uso a otros campos (Lang y *col.*, 1989; Lang y Wagner, 1993; Stanghellini y Miller, 1997). Algunos de estos compuestos pueden producirse a través de procesos biotecnológicos en los cuales la fuente de carbono proviene de materiales de desecho o diferentes productos industriales, lo que supone un valor añadido no sólo desde el punto de vista económico sino también desde el punto de vista ecológico (Makkar y Cameotra, 2002). Así, la identificación de nuevos biotensioactivos y la caracterización de sus propiedades biológicas y químicas es objeto de una intensa actividad investigadora (Singh y Cameotra, 2004; Rodrigues y *col.*, 2006; Singh y *col.*, 2007).

Las estructuras químicas más frecuentes entre los biotensioactivos incluyen lipopéptidos, glicolípidos, polímeros, y otros (Lang, 2002). Debido a su naturaleza anfifílica, cuando se incorporan biotensioactivos a sistemas biológicos, aquéllos se reparten preferiblemente en la membrana, alterando sus propiedades fisicoquímicas y, por lo tanto, su funcionalidad (Ortiz y *col.*, 2006; Aranda y *col.*, 2007a; Ortiz y *col.*, 2009). Muchos trabajos recientes se han dirigido al estudio de la acción de distintos biotensioactivos sobre las membranas, incluyendo lipopéptidos como la surfactina o la iturina A (Grau y *col.*, 1999; Grau y *col.*, 2000; Carrillo y *col.*, 2003; Aranda y *col.*, 2005), o glicolípidos como los ramnolípidos (Ortiz y *col.*, 2006; Aranda y *col.*, 2007a;

Sánchez y col., 2006; Sánchez y col., 2010), y los trealosalípidos (Aranda y col., 2007b; Ortiz y col., 2008; Ortiz y col., 2010; Zaragoza y col., 2009). Se ha demostrado que estos compuestos alteran las propiedades fisicoquímicas del núcleo hidrofóbico de la bicapa y perturban el estado de hidratación de la interfase lípido/agua (Ortiz y col., 2006; Sánchez y col., 2006; Ortiz y col., 2008). Algunos de ellos inducen permeabilización de membranas fosfolípídicas modelo (Carrillo y col., 2003; Sánchez y col., 2010; Ortiz y col., 2008), y/o hemólisis de eritrocitos humanos (Aranda y col., 2005; Sanchez y col., 2010; Latoud y col., 1986; Haussler y col., 1998; Kracht y col., 1999; Dufour y col., 2005). La permeabilización de membranas fosfolípídicas, membranas modelo o membranas biológicas como las de los eritrocitos inducida por tensioactivos, puede ocurrir a concentraciones por debajo o por encima de la concentración micelar crítica (CMC), cuyo valor depende fundamentalmente de la naturaleza química del tensioactivo. Sin embargo, la permeabilización de membranas puede tener lugar concomitantemente con la solubilización de las mismas, o sin alteración de su integridad física, dependiendo del mecanismo molecular del proceso.

Los biotensioactivos glicolípidicos que contienen trealosa, aunque identificados hace algunas décadas (Asselineau y Asselineau, 1978), constituyen un grupo emergente de compuestos. Estos biotensioactivos son producidos principalmente por *Rhodococci* y presentan propiedades fisicoquímicas y biológicas muy interesantes (Lang y Philip, 1998). Los trealosalípidos reducen la tensión superficial del agua (Ramsay y col., 1983) y forman microemulsiones (Singer y col., 1990). Se han propuesto diferentes potenciales aplicaciones para estos compuestos (Lang y Philip, 1998). Los succinil trealosalípidos inducen la diferenciación celular de líneas celulares de leucemia (Sudo y col., 2000), e inhiben la actividad de la proteína quinasa (Isoda y col., 1997). Dada su naturaleza tensioactiva, con un marcado carácter anfifílico, lo más común es que la mayoría de sus acciones biológicas estén relacionadas con su interacción con las bicapas de fosfolípidos. Así, es de gran interés caracterizar la cinética y los mecanismos moleculares de sus acciones, en particular, las relacionadas con su capacidad de permeabilizar la membrana. En este trabajo, se ha caracterizado la actividad hemolítica de un succinil trealosalípido bacteriano

producido por *Rhodococcus sp.* Los experimentos de cinética y protección osmótica aportan evidencias de un mecanismo coloide-osmótico para la hemólisis. Estos resultados junto al trabajo sobre la permeabilización de membranas modelo por acción del trealosárido (Zaragoza y *col.*, 2009) ayudan a explicar el mecanismo por el cual este biotensioactivo puede ejercer su acción perturbadora de la integridad y funcionalidad de la membrana.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

La sacarosa y los diferentes polietilenglicoles (PEGs) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Las sales inorgánicas y los tampones fueron de grado analítico, y el resto de reactivos fue de la máxima pureza disponible. El agua purificada se desionizó en un equipo Milli-Q de Millipore (Millipore, Bedford, M.A., USA), hasta una resistividad de aprox. 18 M Ω . Las disoluciones stock de TL se prepararon en cloroformo/metanol (2:1) y se almacenaron a -80°C.

En este estudio se utilizó normalmente un tampón conteniendo 150 mM NaCl, 5 mM Hepes, pH 7.4, a no ser que se indique otro. El agua y todas las disoluciones tampón mencionadas se filtraron a través de filtros de 0.2 μ m antes de su uso. La osmolaridad de todas las disoluciones y tampones se comprobó usando un osmómetro Osmomat 030 (Gonotec, Berlín, Alemania).

La producción del biotensioactivo a partir de la cepa 51T7 (NCIB) de *Rhodococcus sp.*, así como la purificación del componente TL se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Capítulo I, sección 3.2).

3.2. Hemólisis

Los eritrocitos humanos se prepararon justo antes de los experimentos a partir de concentrados de glóbulos rojos (RBC) obtenidos de un banco de sangre local. Las células se lavaron dos veces con el tampón 150 mM NaCl, 5 mM Hepes, pH 7.4, y finalmente se resuspendieron en el mismo tampón antes de su uso. Todas estas operaciones se realizaron a 4°C.

Para las medidas de liberación de K⁺ y de hemoglobina, el concentrado de eritrocitos anterior se diluyó con el mismo tampón hasta obtener una suspensión con una A₅₄₀ = 1. La liberación de hemoglobina se determinó después de la incubación de los eritrocitos con TL bajo las diferentes condiciones, y midiendo la absorbancia a 540 nm después de sedimentar las membranas por centrifugación durante 2 min en una microfuga de mesa. La temperatura se mantuvo a 37°C y la cantidad total de hemoglobina se estableció lisando los eritrocitos con agua destilada, tomando este valor como el 100% de liberación de hemoglobina.

La liberación de K⁺ desde el interior de los eritrocitos se midió utilizando un electrodo selectivo de K⁺ (Jenway, Reino Unido) como se detalla a continuación. Se añadió TL desde una disolución stock 5 mM en tampón y la salida de K⁺ se monitorizó de modo continuo usando un registrador. Las medidas se realizaron bajo agitación magnética continua en una cubeta provista con una camisa de termostatación que permitía mantener la temperatura constante a 37°C mediante un baño de agua circulante. El total de K⁺ liberado se determinó lisando las células con 100 µl de colato sódico al 10%.

3.3. Experimentos de protección osmótica

Los eritrocitos se prepararon como se ha descrito en el apartado anterior en un tampón que contenía 135 mM NaCl, 5 mM Hepes, pH 7.4, más 30 mM de una de las siguientes sustancias: sacarosa, PEGs 400, 600, 1000, 3350, 6000 y 10000, usadas como protectores osmóticos. El TL se añadió desde una disolución 5 mM en tampón a las

diferentes concentraciones que se indican en cada experimento, y la hemólisis se determinó después de incubar durante 1 h a 37°C. Para los cálculos se utilizaron los siguientes diámetros moleculares (Kuga, 1981): sacarosa, 9.8 Å; PEG 400, 11.2 Å; PEG 600, 13.8 Å; PEG 1000, 17.8 Å; PEG 3350, 32 Å; PEG 6000, 54 Å; PEG 10000, 72 Å.

3.4. Microscopía electrónica de barrido

Las muestras para microscopía electrónica de barrido se prepararon como se describe a continuación. A las muestras de sangre (1.5 ml) se añadieron 150 µl de glutaraldehído al 3% en tampón fosfato y se incubaron durante toda la noche. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se descartó. Al precipitado se le añadió glutaraldehído al 2.5% y se incubó durante 4 h. El fijador se extrajo después de una centrifugación como la anterior, y las células se lavaron 3 veces con agua destilada. El precipitado final se resuspendió en un volumen mínimo de agua destilada y se situó una gota sobre una rejilla de latón para microscopía electrónica de barrido, dejándose secar en una estufa a 37°C durante 1 h. Las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol JSM-6100 (Tokio, Japón).

4. RESULTADOS

4.1. Inducción de hemólisis por el trealosalípido

Dada la importancia de las posibles aplicaciones potenciales de los biotensioactivos, por ejemplo en cosmética o como transporte de drogas, se ha estudiado la actividad hemolítica de varios ejemplos representativos. Esto ha incluido a lipopéptidos como la surfactina (Kracht y *col.*, 1999; Dufour y *col.*, 2005) y la iturina A (Aranda y *col.*, 2005; Latoud y *col.*, 1986), y a glicolípidos como los ramnolípidos producidos por *Burkholderia pseudomallei* (Haussler y *col.*, 1998) o *Pseudomonas aeruginosa* (Sánchez y *col.*, 2010).

La actividad hemolítica de los tensioactivos y consecuentemente de los biotensioactivos, puede ocurrir a través de dos mecanismos diferentes (Bielawski, 1990). La hemólisis puede estar causada por rotura directa de la membrana a través de su solubilización, lo cual ocurre a relaciones altas tensioactivo/membrana, o puede deberse a la permeabilización de la membrana para solutos de bajo peso molecular, lo que ocurre normalmente a concentraciones bajas y conduce a la lisis osmótica.

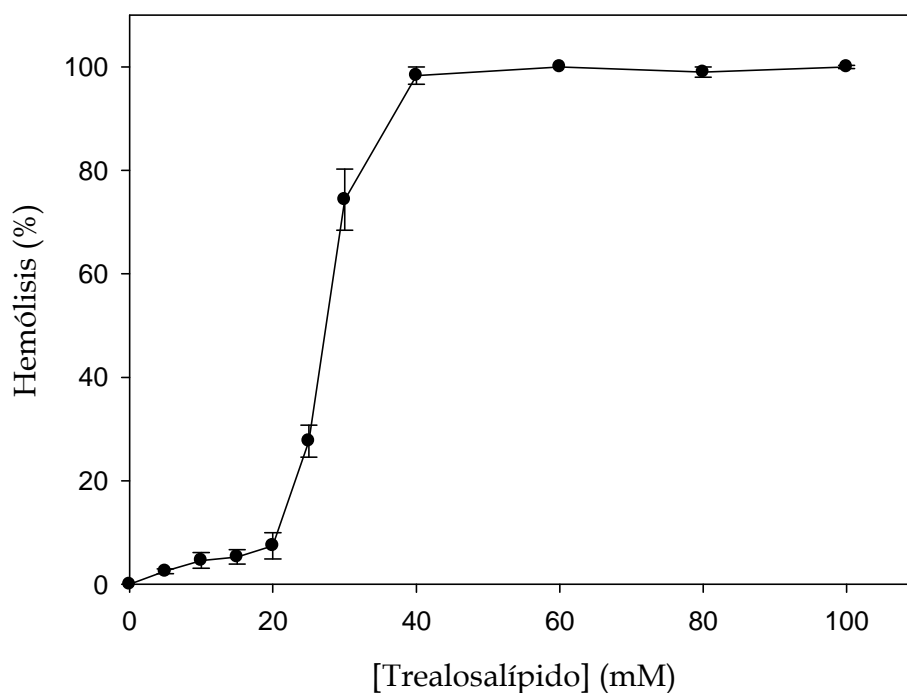


Figura II.1. Dependencia de la hemólisis eritrocitaria con la concentración de TL. Los eritrocitos se incubaron durante 1 h a 37°C a diferentes concentraciones de TL, y se determinó la cantidad de hemoglobina liberada. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm error estándar (barras de error).

La dependencia de la hemólisis con la concentración de TL se muestra en la Figura II.1. En este experimento, la hemólisis se determinó a un tiempo fijo, después de una hora de incubación en presencia de diferentes concentraciones de TL. Se observó una variación sigmoide de la hemólisis con la concentración de TL. A concentraciones por debajo de 20 μ M, el porcentaje de hemólisis no fue significativo, sin embargo un

aumento de la concentración tan sólo de 20 a 40 μM , supuso alcanzar un valor de hemólisis del 100%.

El comportamiento sigmoidal de la hemólisis inducida por el TL es indicativo de un proceso complejo en el cual es necesario que se acumule suficiente biotensioactivo para inducir la lisis osmótica de los eritrocitos. Esto ocurre a concentraciones relativamente bajas, en el rango de 20 μM (por debajo de la CMC que es 300 μM), en buena correlación con resultados previos que muestran que el TL es un detergente débil que en presencia de membranas prefiere repartirse en la membrana a llevar a cabo la micelización de la misma (Zaragoza y *col.*, 2009).

La Figura II.2 muestra la inducción de hemólisis de los eritrocitos humanos por el TL en función del tiempo para diferentes concentraciones de biotensioactivo. Todas las concentraciones utilizadas se mantuvieron por debajo de 300 μM , valor que corresponde a la CMC del TL determinada anteriormente (Zaragoza y *col.*, 2009). Se observó que la hemólisis era un proceso relativamente lento, incluyendo la presencia de un período de retardo inicial en todas las curvas. Después del período de retardo inicial, la hemólisis aumentaba linealmente con el tiempo. Esta velocidad constante fue esencialmente la misma para todas las concentraciones ensayadas; sin embargo, el período de retardo, así como el tiempo requerido para obtener el 100% de la hemólisis fue considerablemente más corto conforme aumentaba la concentración de TL. Una observación general fue que la hemólisis era un proceso notablemente lento, en una escala de minutos a horas dependiendo de la concentración del biotensioactivo.

La presencia de un período de retardo, en el rango de minutos, en las curvas de salida de hemoglobina indica que se requieren uno o más pasos previos antes de que la membrana eritrocitaria se vuelva permeable a la hemoglobina. Uno de esos pasos es la formación de un "poro", en el sentido más amplio del término, y la salida de solutos de bajo peso molecular como se muestra más abajo. De esta manera, nuestros hallazgos soportan la idea de que la hemólisis no ocurre simplemente por rotura directa de la organización molecular de la membrana, sino a través de un mecanismo más complejo.

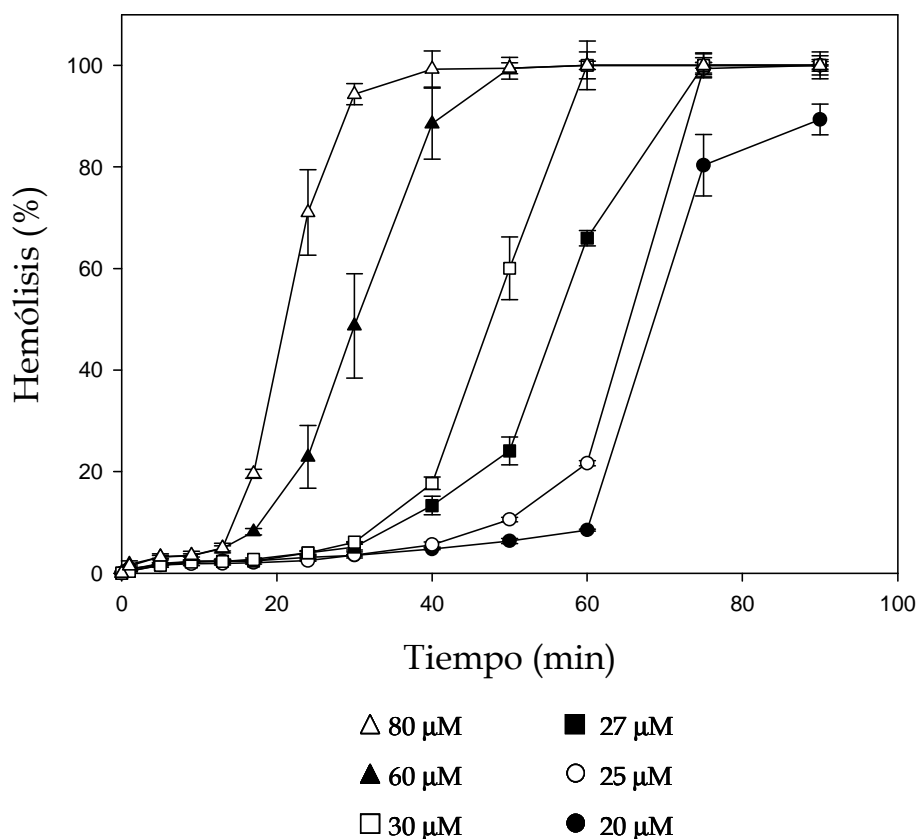


Figura II.2. Salida de hemoglobina desde eritrocitos humanos, inducida por el trealosalípido en función del tiempo. El TL se añadió a tiempo cero desde una disolución stock 1 mM a las concentraciones finales indicadas en la leyenda. La salida de hemoglobina se determinó mediante el ensayo discontinuo a 37°C. El 100% de salida de hemoglobina se determinó mediante la lisis de las células con agua destilada. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm error estándar (barras de error).

4.2. Salida de K^+ de eritrocitos humanos

La cinética de salida de K^+ de los glóbulos rojos, y su comparación con la de hemoglobina, normalmente arroja luz sobre el mecanismo de hemólisis. La salida de K^+ inducida por TL en los eritrocitos humanos se monitorizó continuamente en un ensayo distinto (Figura II.3, panel A), bajo las mismas condiciones que se han descrito para la hemólisis. Se pudo observar que los iones de K^+ comienzan a salir también después de un período inicial de retardo de 2 a 3 min. En este caso el

período de retardo pareció que era independiente de la concentración de TL, de forma diferente a la observada en las curvas de salida de hemoglobina, mientras que la velocidad de salida sí era dependiente de la concentración de glicolípido. Es interesante que el período de retardo de 2 o 3 min observado en las curvas de salida de K^+ sea del mismo rango que el período de retardo de 2 min previamente descrito para la salida de carboxifluoresceína inducida por TL en vesículas unilamelares de fosfatidilcolina (Zaragoza y col., 2009), siendo en ambos casos independiente de la concentración de trealosalípido. En este trabajo, se observó que eran necesarias dos etapas previas a la inserción del TL en la membrana diana antes de que comenzara la salida de solutos: primero, la adsorción del biotensioactivo a la cara externa de la membrana, y segundo, el *flip-flop* a la monocapa interna, siendo este último el paso limitante. La concordancia entre los datos experimentales en las membranas modelo y las de eritrocito, sugiere que estos mismos pasos podrían ser necesarios para que se produzca la salida de K^+ .

La Figura II.3, panel B presenta las cinéticas relativas de salida de K^+ y hemoglobina obtenidas por la adición de 30 μM de TL a eritrocitos humanos. Se observó claramente que la salida de K^+ era un proceso más rápido y que precedía a la hemólisis. De esta manera, no se apreció salida de hemoglobina hasta que la salida de K^+ alcanzó valores de aproximadamente el 70% del máximo.

Estos datos sugieren que las regiones de permeabilización formadas primariamente en la membrana de los eritrocitos inducidas por TL llevan a una salida de K^+ comparativamente rápida, dando lugar a cambios osmóticos a través de la membrana con hemólisis por un mecanismo coloide-osmótico. Después de la salida rápida de K^+ , el agua entra debido al gradiente osmótico creado por la hemoglobina atrapada en el interior, los eritrocitos se hinchan, ocurren daños, y finalmente sale la hemoglobina.

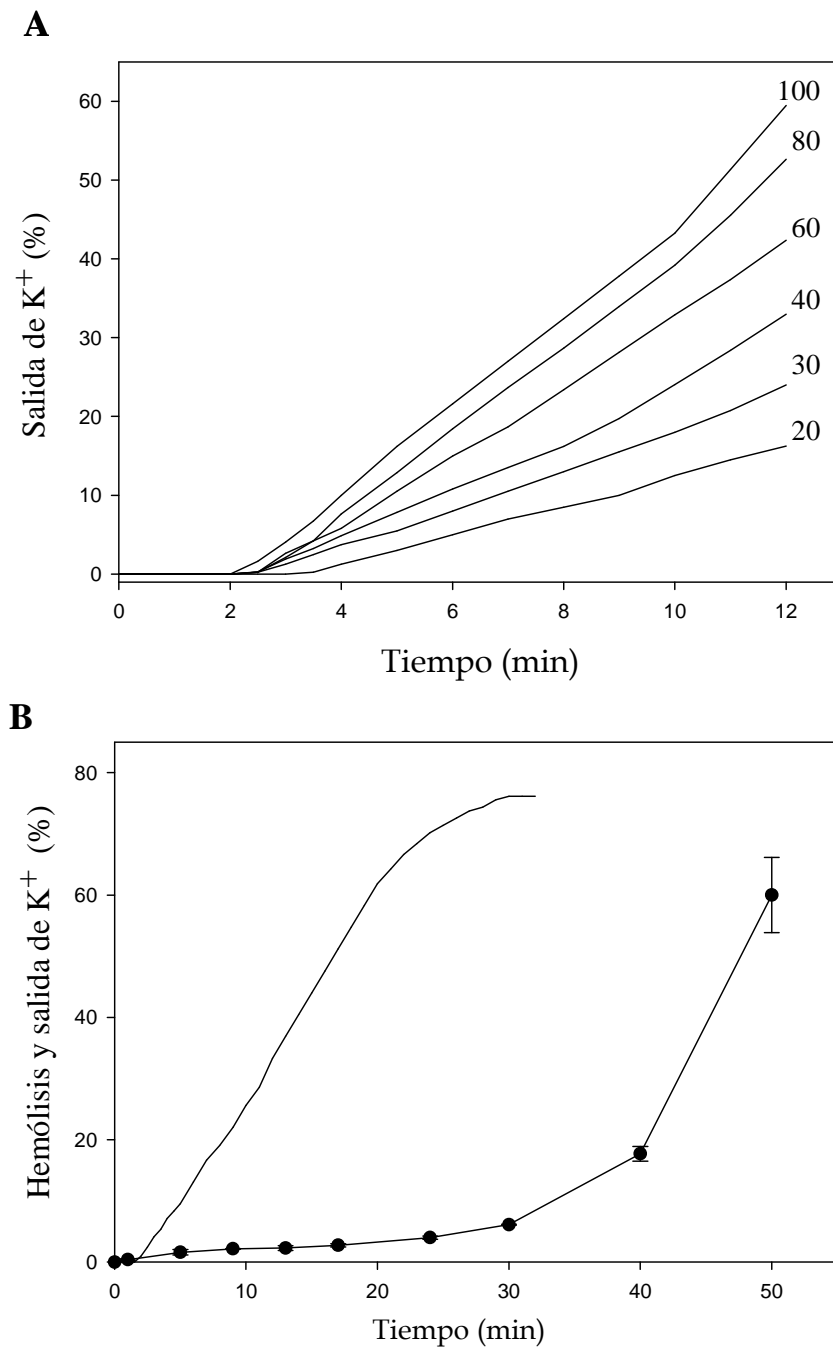


Figura II.3. Panel A: salida de K⁺ de eritrocitos humanos inducida por trealosalipido. El trealosalipido se añadió a tiempo 0 a la concentración final indicada en las curvas (μM) desde una disolución stock 1 mM. La salida de K⁺ se monitorizó usando un electrodo selectivo de K⁺ a 37°C. El 100% de la salida de K⁺ se determinó después de romper las células con colato sódico. Panel B: cinética relativa de la salida de hemoglobina y K⁺ inducidas por trealosalipido. Las medidas se realizaron a 37°C en presencia de 30 μM trealosalipido. Los datos corresponden a un experimento representativo.

4.3. Protección osmótica de la hemólisis

El diferente comportamiento cinético de la salida de K^+ y de hemoglobina se podría explicar mediante un mecanismo coloide-osmótico. Si la hemólisis tiene lugar a través de un proceso coloide-osmótico, entonces la hemólisis de los eritrocitos se debería evitar al añadir un soluto de tamaño adecuado a la disolución acuosa externa. La razón de esta consideración esta basada en el hecho de que si la presión osmótica de la hemoglobina intracelular se equilibra con otro soluto añadido al tampón externo, el cual no puede pasar a través del poro de membrana, entonces no ocurrirá la hemólisis. Los experimentos de protección osmótica mostrados en la Figura II.4 confirmaron el mecanismo coloide-osmótico sugerido. Se realizó un experimento de protección osmótica (Figura II.4) para determinar el tamaño del poro de membrana usando protectores de diferentes tamaños. Se representó el porcentaje de hemólisis frente al diámetro del protector osmótico presente en cada caso. La hemólisis se pudo evitar con compuestos de un diámetro mayor al del PEG 3350 (34 Å) independientemente de la concentración de TL utilizada, lo que nos indicó que el poro tenía un diámetro próximo al del PEG 3350, o sea en torno a 34 Å. Así, un tamaño de poro de 34 Å sería suficiente para dar lugar al flujo libre de solutos de bajo peso molecular como K^+ que tiene un radio iónico de 1.33 Å, pero no permite el paso de la hemoglobina.

Debemos considerar la posibilidad de que si se produjese una unión fuerte e inespecífica del TL al PEG, debería reducir la concentración efectiva del biotensioactivo, actuando de la misma forma que los protectores osmóticos. Sin embargo, resultados previos mostraron que un biotensioactivo glicolípido relacionado, el dirramnolípido de *P. aeruginosa*, causaba la hemólisis a través de un mecanismo lítico directo en lugar de por un proceso coloide-osmótico, indicando la ausencia de unión del glicolípido al PEG (Sánchez y col., 2010). Es razonable esperar un comportamiento similar para el succinil trealosalípido bajo estudio.

No tenemos datos experimentales que nos den detalles sobre la estructura de esas regiones de permeabilización, o poros, en las membranas celulares sanguíneas. Deberían consistir en un número determinado de moléculas de TL interactuando

fuertemente unas con otras o, debido a su naturaleza anfifílica, con fosfolípidos vecinos. Esto se sostiene por la gran tendencia de estos biotensioactivos glicolipídicos a autoagregarse en la membrana formando dominios lo que ya fue visualizado por microscopia de fuerza atómica, en membranas fluidas de fosfatidilcolina (Aranda y *col.*, 2007b). Esta acumulación de moléculas de glicolípido en una región definida de la membrana del eritrocito podría llevar a la permeabilización localizada para pequeños solutos (K^+ en este caso), del mismo modo que se induce la salida de carboxifluoresceína en vesículas de fosfatidilcolina (Zaragoza y *col.*, 2009), resultando en un comportamiento tipo “poro”.

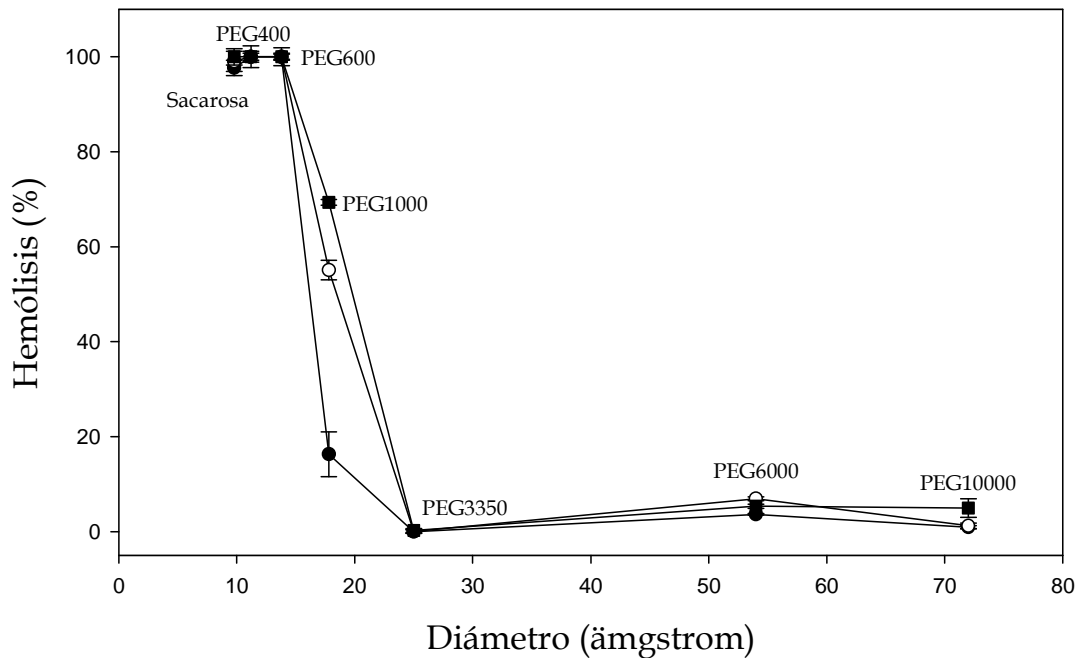


Figura II.4. Hemólisis de eritrocitos humanos inducida por trealosalípido en presencia de protectores osmóticos. El trealosalípido se añadió a la suspensión de eritrocitos humanos a diferentes concentraciones finales: 40 (●), 60 (○), y 80 (■) μM . las medidas se realizaron a 37°C. El diámetro de los protectores y el detalle de la determinación de la hemólisis se han explicado en la sección experimental 2.4. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes \pm error estándar (barras de error).

4.4. Cambios morfológicos en los eritrocitos humanos inducidos por trealosalípido

Los cambios morfológicos producidos en eritrocitos humanos tras su incubación con TL se observaron mediante microscopía electrónica de barrido. La Figura II.5 muestra imágenes de eritrocitos humanos antes y después de incubarlos con TL a una concentración de 60 μM , así como el efecto de la incorporación del protector osmótico PEG 3350. Los eritrocitos normales presentaron una morfología típica con forma de disco deprimido en el centro, y con un tamaño promedio de 5 μm (Figura II.5, panel A). Al incubar con TL 60 μM (Figura II.5, panel B), los eritrocitos se transformaron en esferocitos (células hinchadas) con presencia de crenaciones en la superficie celular (equinocitos); el tamaño celular se mantuvo sin cambios. El mismo experimento se llevó a cabo en presencia de PEG 3350, un protector osmótico frente a la hemólisis inducida por TL, como se ha descrito más arriba. El PEG apenas tuvo efecto en la morfología de los eritrocitos, y además éstos mantuvieron su forma discoidal normal y su tamaño (Figura II.5, panel C). En correlación con los resultados de la hemólisis presentados arriba, la adición de TL en presencia de PEG no condujo a la formación de esferocitos (Figura II.5, panel D), es decir se evitó el hinchamiento osmótico. No obstante, aunque en la mayoría de las células la forma de disco era todavía patente, estas eran más irregulares y la superficie celular no era suave sino que contenía protrusiones de diferentes tamaños. Comparando las células tratadas con TL en ausencia de PEG, el número de protuberancias fue menor mientras que su tamaño era en general mayor.

Así, el efecto del TL en la morfología del eritrocito se resume en la formación de células hinchadas (esferocitos) y células crenadas (equinocitos). Debido a que el TL es un anfífilo cargado negativamente a pH neutro, este escenario se ajusta a la hipótesis del acoplamiento de bicapas (Sheetz y Singer, 1974), la cual propone que las drogas aniónicas se intercalan preferentemente entre los lípidos presentes en la monocapa externa de la membrana ampliando esta monocapa en relación a la monocapa interna y formando así células crenadas. De hecho se ha observado que otros anfífilos aniónicos, tales como los alquilsulfatos de sodio, son potentes agentes

equinocitogénicos (Isomaa y *col.*, 1987). En presencia de PEG 3350, no se observa la formación de esferocitos inducida por TL, confirmando el papel protector de esos PEG frente a la lisis osmótica; sin embargo, la equinocitosis todavía ocurre. Es de esperar que para un volumen relativo celular dado, el número de espículas de equinocitos aumente mientras su tamaño disminuya cuando el número de moléculas anfifílicas intercaladas en la bicapa externa de la membrana celular aumente (Iglíc y *col.*, 1998).

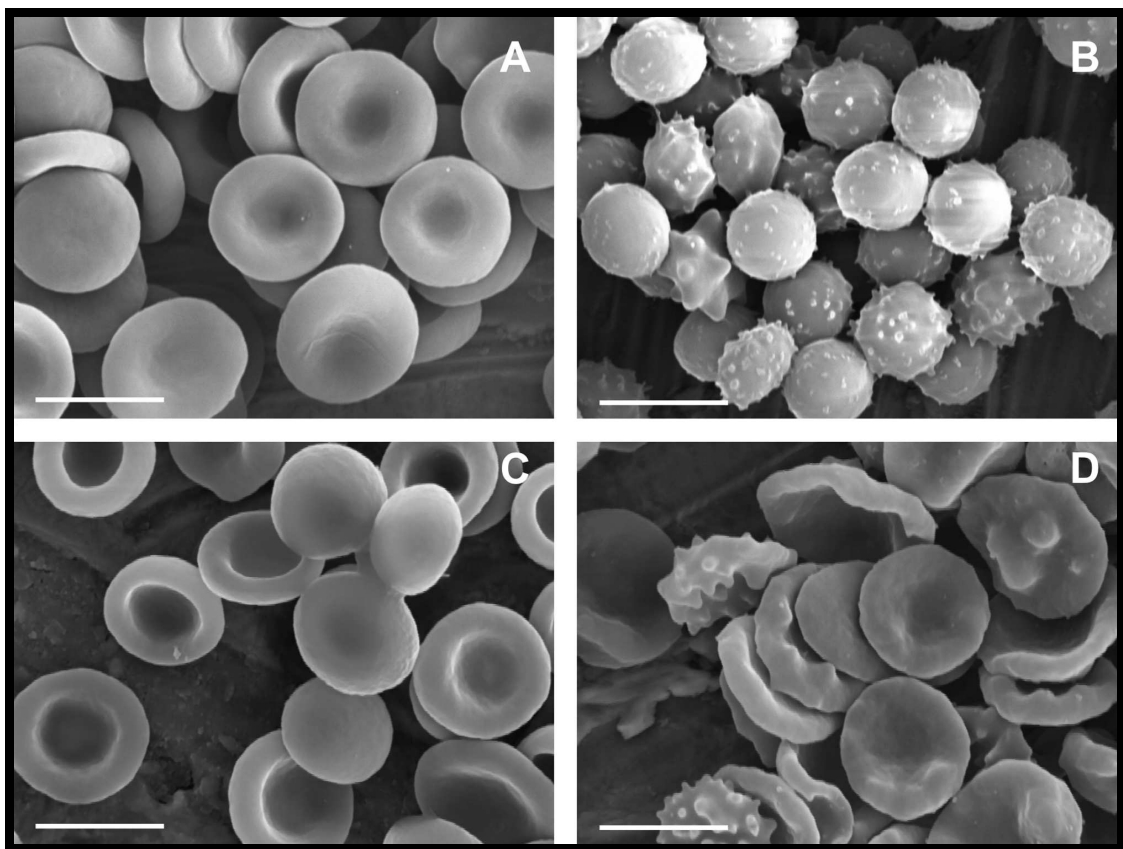


Figura II.5. Efecto del trealosalípido en la morfología de los eritrocitos humanos. Se observaron micrografías electrónicas de barrido de eritrocitos control en ausencia y presencia de PEG 3350 (paneles A y C respectivamente) y de eritrocitos incubados con trealosalípido 60 μM en ausencia y presencia de PEG 3350 (paneles B y D respectivamente). La barra de escala corresponde a 5 μm .

Nuestra observación es que en presencia de PEG el número de espículas es más pequeño y el tamaño es mayor que en su ausencia. Esto debería significar un menor reparto del trealosalípido en la monocapa externa o un mayor porcentaje de biotensioactivo en la monocapa interna frente a la externa, comparado con el control. Finalmente, se ha sugerido que el citoesqueleto de los eritrocitos es el responsable de la formación de las formas equinocíticas presumiblemente debido a la deformación de corte del esqueleto (Iglíc, 1997). Hemos observado sustanciales diferencias morfológicas entre las células tratadas con TL en ausencia y presencia de PEG 3350, y el efecto del TL relacionado con el citoesqueleto no se puede descartar de nuestro sistema.

La formación de células crenadas como se discute arriba indica que hay un reparto preferencial del TL en la monocapa externa frente a la monocapa interna de la membrana. Estos resultados enfatizan el papel del lípido constituyente de la membrana del eritrocito en la hemólisis inducida por el TL, el cual puede ser también el caso para otros biotensioactivos.

5. CONCLUSIONES

El succinil trealosalípido biotensioactivo producido por *Rhodococcus* sp. causa la hemólisis de eritrocitos humanos a través de un mecanismo coloide-osmótico. Este comportamiento tipo poro se puede explicar por la formación de dominios de permeabilidad en la membrana eritrocitaria, como se observa en membranas modelo. Las medidas de las cinéticas de salida de hemoglobina y K^+ se correlacionan bien con los resultados previos de la permeabilización de membranas modelo inducida por TL, sugiriendo un mecanismo similar y enfatizando el papel central de los lípidos constituyentes de la membrana en el mecanismo de hemólisis. Los cambios morfológicos en las células sanguíneas después de la incubación con TL incluyen esferocitosis y equinocitosis, y pueden ser explicados por la hipótesis del acoplamiento de bicapas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aranda F.J., Teruel J.A., Ortiz A. (2005) Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochim Biophys Acta* 1713: 51-56.
- Aranda F.J., Espuny M.J., Marqués A., Teruel J.A., Manresa A., Ortiz A. (2007a) Thermodynamics of the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant secreted by *Pseudomonas aeruginosa* with phospholipid membranes. *Langmuir* 23: 2700-2705.
- Aranda F.J., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Palacios-Lidón Elisa, Ortiz A. (2007b). Domain formation by a *Rhodococcus* sp. biosurfactant trehalose lípido incorporated into phosphatidylcholine membranas. *Biochim Biophys Acta* 1768: 2596-2604.
- Asselineau C., Asselineau J. (1978). Trehalose-containing glycolipids. *J. Prog. Chem. Fats Other Lipids* 16: 59-99.
- Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S. (2000) Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 495-508.
- Bielawski J. (1990) Two types of haemolytic activity of detergents. *Biochim Biophys Acta* 1035: 214-217.
- Cameotra S.S., Makkar R.S. (1998) Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 50 :520-529.
- Carrillo C., Teruel J.A., Aranda F.J., Ortiz A. (2003) Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim Biophys Acta* 1611: 91-97.
- Desai J.D., Banat I.M. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 47-64.
- Dufour S., Deleu M., Nott K., Wathélet B., Thonart P., Paquot M. (2005) Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. *Biochim Biophys Acta* 1726: 87-95.
- Grau A., Gomez Fernandez J.C., Peypoux F., Ortiz A. (1999) A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1418: 307-319.
- Grau A., Ortiz A., de Godos A., Gomez-Fernandez J.C. (2000) A biophysical study of the interaction of the lipopeptide antibiotic iturin A with aqueous phospholipid bilayers. *Arch Biochem Biophys* 377: 315-323.
- Haussler S., Nimtz M., Domke T., Wray V., Steinmetz I. (1988) Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*, *Infection and Immunity*. *Infect Immun* 66: 1588-1593.

- Iglic A. (1997). A possible mechanism determining the stability of speculated red cells. *J Biomechanics* 30:35-40.
- Iglic A., Kralj-Iglic V., Hägerstrand H. (1998). Amphiphile induced echinocyte-spherocytocyte transformation of red blood cell shape. *Eur Biophys J* 27: 335-339.
- Isoda H., Kitamoto D., Shinmoto H., Matsumura M., Nakahara T. (1997). Microbiol extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of the proteína kinase C activity of human promyelocytic leukemia cell line HL60. *Biosci Biotech Biochem* 61: 609-614.
- Isomaa B., Hägerstrand H., Paatero G. (1987). Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 899: 93-103.
- Kracht M., Rokos H., Ozel M., Kowall M., Pauli G., Vater J. (1999). Antiviral and haemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. *J Antibiot (Tokyo)* 52: 613-9.
- Kuga S. (1981) Pore size distribution analysis of gel substances by size exclusion chromatography. *J Chromatogr* 206: 449-461.
- Lang S. (2002) Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Curr Opin Colloid Interface Sci* 7: 12-20.
- Lang S., Katsiwela E., Wagner F. (1989) Antimicrobial effects of biosurfactants. *Fat Sci Technol* 91: 363-366.
- Lang S, Wagner F (1993) Biological activities of biosurfactants. En: *Biosurfactants Production, Properties, Applications*. Kosaric N (ed). Marcel Dekker: New York.
- Lang S., Philp J.C. (1998). Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 59-70.
- Latoud C., Peypoux F., Michel G., Genet R., Morgat J.L. (1986). Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 856: 526-35.
- Makkar R.S., Cameotra S.S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 428-434.
- Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Aranda F.J. (2006) Effects of dirhamnolipid on the structural properties of phosphatidylcholine membranes. *Int J Pharm* 325: 99-107.
- Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Aranda F.J. (2008) Interactions of a *Rhodococcus* sp. biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylethanolamine membranes. *Biochim Biophys Acta* 1778: 2806-2813.
- Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Aranda F.J. (2009) Interactions of a bacterial biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylserine membranes. *Chem Phys Lipids* 158: 46-53.

- Ortiz A., Aranda F.J., Teruel J.A. (2010). Interaction of dirhamnolipid biosurfactants with phospholipid membranes: A molecular level study. *Adv. Exp. Med. Biol.* 672: 42-53.
- Ramsay B.A., Cooper D.G., Margaritis A., Zajic J.E. (1983). *Rhodochrous* bacteria: biosurfactant production and demulsifying ability. J.E. Zajic, D.G. Cooper, T.R. Jack, N. Kosaric (Eds.), *Microb. Enh. Oil. Recov.* 61-65.
- Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. (2006) Biosurfactants: potential applications in medicine. *J Antimicrob Chemother* 57: 609-618.
- Sánchez M., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Aranda F.J., Manresa A., Ortiz A. (2006) Modulation of the physical properties of dielaidoylphosphatidylethanolamine membranes by a dirhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Phys Lipids* 142: 118-127.
- Sánchez M., Aranda F.J., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Ortiz A. (2010) Permeabilization of biological and artificial membranes by a bacterial dirhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Colloid Interface Sci* 341: 240-247.
- Sheetz M.P., Singer S.J. (1974). Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 4457-4461.
- Singer M.E.V., Finnerty W.R., Tunelid A. (1990). Physical and chemical properties of a biosurfactant by *Rhodococcus* species H13-A. *Can. J. Microbiol* 36: 746-750.
- Singh A., Van Hamme J.D., Ward O.P. (2007) Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnol Adv* 25: 99-121.
- Singh P., Cameotra S.S. (2004) Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol* 22: 142-146.
- Stanghellini M.E., Miller R.M. (1997) Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoospore pathogens. *Plant Disease* 81: 4-12.
- Sudo T., Zhao X., Wakamatsu Y., Shibahara M., Nomura N., Nakahara T., Suzuki A., Kobayashi Y., Jin C., Murata T., Yokoyama K.K. (2000). Induction of the differentiation of human HL-60 promyelocytic leukemia cell line by succinoyl trehalose lipids. *Cytotechnology* 33: 259-264.
- Zaragoza A., Aranda F.J., Espuny M.J., Teruel J.A., Marqués A., Manresa A., Ortiz A. (2009). Mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp. *Langmuir* 25: 7892-7898.

CAPÍTULO III.

Interacción de un trealosalípido biotensioactivo de *Rhodococcus sp.* con proteínas modelo: cambios estructurales y termodinámicos.

Zaragoza A, Aranda FJ, Espuny MJ, Teruel JA, Marqués A, Manresa A, Ortiz A (2009). Interaction of a *Rhodococcus sp.* trehalosa lipid biosurfactant with model proteins: thermodynamic and structural changes. *Langmuir* 28: 1381-1390.

1. RESUMEN

Una de las mayores aplicaciones de los tensioactivos es prevenir la agregación de proteínas durante su manipulación. En este trabajo, se ha identificado y purificado un trealosáido bacteriano (TL) con actividad biotensioactiva, secretado por *Rhodococcus sp.*, y se ha estudiado la interacción de este glicolípido con proteínas modelo usando calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR), calorimetría isotérmica de titulación (ITC) y espectroscopía de fluorescencia. Se seleccionaron la Albúmina sérica bovina (BSA) y el Citocromo c (Cit-c) debido a sus notables diferencias en estructura secundaria: BSA prácticamente no contiene hoja- β y posee un 66% de α -hélice, mientras que Cit-c posee alrededor de un 25% de hoja- β y 45% de α -hélice.

La calorimetría diferencial de barrido muestra que la adición de TL a BSA a concentraciones menores de su CMC, desplaza la temperatura de desnaturalización térmica de la proteína a valores más altos. Por FTIR se observa que el TL no altera la estructura secundaria de la BSA nativa pero que la presencia de TL protege la proteína frente a la desnaturalización térmica, principalmente evitando la formación de agregados β . Los estudios de fluorescencia intrínseca de triptófano (Trp) de BSA muestran que la adición de TL a la proteína nativa conduce a cambios conformacionales. BSA, por encima de su temperatura de desnaturalización, en ausencia de TL hace que los residuos de Trp se encuentren menos accesibles al atenuador, como se muestra por el descenso del valor de la constante de atenuación de Stern-Volmer, mientras se previene la desnaturalización en presencia del biotensioactivo, en concordancia con los resultados de FTIR. En el caso de Cit-c, la interacción con TL da lugar a una nueva transición de desnaturalización térmica, como se observó con DSC, a temperaturas menores de la temperatura de desnaturalización de la proteína nativa, es decir se facilita la desnaturalización térmica. La unión de TL a BSA y Cit-c nativos, como se determinó por ITC, sugiere una interacción no específica del biotensioactivo con la proteína. FTIR indica que el TL modifica la estructura secundaria del Cit-c. La desnaturalización de la proteína en presencia de TL conduce a una mayor proporción de agregados β que en ausencia de

éste (20% frente a 3.9%). El estudio de la fluorescencia de Trp tras la adición de TL a Cit-c resulta un escenario completamente opuesto al descrito para BSA. En este caso, la adición de TL aumenta considerablemente el valor de la constante de atenuación dinámica, tanto en la proteína nativa como en la desnaturalizada, así la interacción con el glicolípido induce cambios conformacionales que facilitan la exposición de los residuos de Trp al atenuador. Considerando la estructura de ambas proteínas podríamos decir que las características de la interacción de TL, promoviendo o evitando la desnaturalización térmica, son dependientes de la estructura secundaria de la proteína. Además, nuestros resultados sugieren que la naturaleza de estas interacciones es inespecífica. Esto podría involucrar dominios hidrofóbicos de las proteínas los cuales se encuentran tapados en la proteína nativa exponiéndose tras la desnaturalización térmica.

2. INTRODUCCIÓN

La albúmina sérica es una molécula extraordinaria debido a sus propiedades y aplicaciones, la cual se ha usado como modelo general para el estudio de interacciones de tensioactivos con proteínas globulares (Vasilescu y *col.*, 1999; Valstar y *col.*, 2000; Moriyama y Takeda, 2005; Singh y Kishore, 2006; Orión y *col.*, 2006). La albúmina, como transportador, puede unir un gran número de compuestos orgánicos de tamaño medio, incluyendo ácidos grasos, aminoácidos, esteroides o tensioactivos. Es una proteína de cadena simple con 581 aminoácidos y un peso molecular de 66,300 y su estructura y propiedades fisicoquímicas se han descrito detalladamente (Vijai y Foster, 1967; Carter y He, 1990; He y Carter, 1992; Carter y Ho, 1994; Carter y *col.*, 1989). Las propiedades y eficacia de algunas drogas farmacéuticas se pueden modificar en base a su interacción con BSA.

El Citocromo c (Cit-c) es una proteína globular pequeña que consiste en 104 aminoácidos (peso molecular 12,327) en una única cadena polipeptídica (N-terminal acetilado), la cual está unida a un grupo prostético hemo protoporfirina IX mediante dos enlaces tioéter. De los 104 residuos, 24 son lisinas, argininas e histidinas. Es una proteína que se encuentra en las mitocondrias de todas las células eucariotas así como en células procariotas, funcionando como un transportador de electrones en la cadena respiratoria (Margoliash y Schejter, 1966; Bushnell y *col.*, 1990; Naeem y Hasan 2004; Stevens, 2011). Recientemente se ha identificado el Cit-c como un importante mediador en la vía apoptótica (Liu y *col.*, 1996; Cai y *col.*, 1998) y se ha usado como modelo para estudios de cinética y termodinámica de la proteína nativa.

Los tensioactivos son compuestos esenciales para el estudio de la estructura y función de proteínas de membrana (Ananthapadmanabhan, 1993). Los estudios de las interacciones específicas y no específicas de los tensioactivos y las proteínas son muy importantes debido a su posible aplicación industrial y en investigación de sistemas tensioactivo/proteína. Algunos ejemplos de estas aplicaciones los encontramos en el campo de la cosmética y detergencia, así como en diferentes métodos bioquímicos de laboratorio (Lindman y Karlström, 1990), y tienen gran interés en el desarrollo de nuevas aplicaciones para los biotensioactivos (Singh y

Cameotra, 2004). El objetivo de este trabajo es presentar un estudio detallado a nivel molecular de la interacción de un succinil trealosárido biotensioactivo bacteriano producido por *Rhodococcus sp.* (Ver capítulo 1, Figura 1.I), con proteínas modelo, BSA y Cit-c, para definir las características básicas de estos compuestos y extenderlo a su aplicabilidad en estudios de proteínas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Todos los reactivos usados fueron de la mayor pureza posible. El agua purificada fue desionizada en un equipo milli-Q de Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA) y mostró una resistividad de 18 M Ω . BSA (esencialmente libre de ácidos grasos y globulina; min. 99%; PM: 66,300) y Citocromo c de corazón bovino (pureza 103% basada en un contenido en agua 3.6%; PM: 12,327) fueron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

El tampón usado para este trabajo fue 150 mM NaCl, 5 mM HEPES pH 7.4. El agua y todas las soluciones utilizadas se filtraron a través de filtros de 2 μ m antes de su uso.

La producción del biotensioactivo a partir de la cepa 51T7 (NCIB) de *Rhodococcus sp.*, así como la purificación del componente TL se llevó a cabo como se detalla con anterioridad (Capítulo I, sección 3.2).

3.2. Preparación de la muestra

Las muestras acuosas se prepararon por dispersión de la cantidad requerida del biotensioactivo en el tampón apropiado. Se disolvió la cantidad deseada de TL en CHCl₃/MeOH (2:1) y después el disolvente se evaporó bajo un flujo de N₂ (g) para obtener una delgada capa en el fondo de un tubo de vidrio. Las últimas trazas de disolvente se eliminaron desecando a vacío durante un mínimo de 3 h. Se añadió la

disolución tampón a las muestras desecadas y se agitó a temperatura ambiente hasta obtener una suspensión homogénea.

Las disoluciones de proteínas se prepararon justo antes de los experimentos, a una concentración de 1.5 mM en el tampón apropiado, por agitación a 25°C. La concentración se comprobó mediante absorción ultravioleta usando $\epsilon = 44,720 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para BSA y $\epsilon = 106,100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para Cit-c. La disolución stock se diluyó a la concentración deseada en el mismo tampón antes de los experimentos.

3.3. Calorimetría diferencial de barrido de alta sensibilidad

La desnaturalización térmica de BSA y Cit-c se monitorizó mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un calorímetro VP-DSC de alta sensibilidad de MicroCal (Northampton, MA, USA). Los termogramas se recogieron entre 40 y 90°C para BSA y entre 40 y 110°C para el Cit-c, a una velocidad de calentamiento de 30 °C h⁻¹. Se sabe que existe una dependencia entre la velocidad de barrido y la temperatura de transición, por lo se utilizó la misma velocidad de barrido tanto para las proteínas puras como para las proteínas en presencia de TL, pudiéndose así realizar las comparaciones oportunas. Además, la velocidad de barrido utilizada ya ha sido usada en este tipo de estudios con esas y otras proteínas (Giancola y col., 1997; Deep y Ahluwalia, 2001; Grasso y col., 1995). La concentración usada para todas las proteínas fue de 0.05 mM (con pesos moleculares de 66,300 y 12,327 para BSA y Cit-c respectivamente), a menos que se indique otra distinta. Los datos calorimétricos se analizaron usando el software Origin proporcionado con el equipo para obtener los valores de ΔH y T_m . El procedimiento de ajuste de la curva se llevó a cabo con algunos termogramas transformados con un software usando una función gaussiana.

3.4. Calorimetría isotérmica de titulación

Los experimentos de ITC se llevaron a cabo en un calorímetro de titulación VP-ITC de MicroCal (Northampton, MA, USA), provisto con una celda de mezcla de 1.442 ml. Los datos se analizaron con el Software de Origin proporcionado con el equipo.

Los experimentos se llevaron a cabo como sigue. La jeringa del calorímetro se llenó con una disolución de TL 2 mM (unas 20 veces mayor que la CMC). Se realizó la inyección de alícuotas de 10 μ l de esta disolución sobre una disolución 0.1 mM de las proteínas en el mismo tampón, contenida en la celda del calorímetro. La inyección de esta disolución en la disolución de proteína da lugar a la liberación de calor debido a la unión del TL a la proteína. Los experimentos se realizaron a 25°C. La celda del calorímetro se agitó de manera continua a una velocidad de 260 rpm. Los datos se corrigieron con los valores de los calores de dilución del TL, que se determinaron en experimentos separados.

3.5. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

Las muestras para los experimentos de FTIR se prepararon usando un tampón de D₂O que contenía 100 mM NaCl, 100 mM fosfato, pD 7.4 (pH 7.0). La concentración de NaCl se ajustó a 100 mM para tener una osmolaridad similar a la utilizada en otros experimentos. Se evitó el uso de Hepes para estos experimentos porque este compuesto presenta bandas en el infrarrojo que podrían interferir con las de la proteína, mientras que el uso de tampón fosfato disminuye la posibilidad de la presencia de bandas de infrarrojo que pudieran interferir en la determinación estructural de BSA o Cit-c. Una alícuota de la muestra (aprox. 30 μ l de una solución de 0.2 mM) se situó entre dos ventanas de CaF₂ usando espaciadores de teflón de 50 μ m, y el conjunto se montó en un soporte termostaticado.

Los espectros de infrarrojo se adquirieron en un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Nicolet 6700 (FTIR) (Madison, WI) equipado con un ordenador para la recolección de datos. Cada espectro se obtuvo por la acumulación

de 256 interferogramas con una resolución nominal de 2 cm^{-1} . El equipo se purgó continuamente con aire seco para minimizar la contribución de los picos del vapor de agua atmosférica. La celda donde estaba la muestra se mantuvo termostatzada a 25°C usando un Peltier (sistema Proteus para Nicolet).

Se tomaron espectros para las proteínas en estado nativo en presencia y ausencia de TL. Los espectros se tomaron a intervalos de 2°C , dejando un tiempo de equilibrado entre temperaturas de 5 min. El espectro del tampón en D_2O tomado a las mismas temperaturas se restó interactivamente usando el software Omnic o GRAMS/32 (Galactic Industries, Salem, NH). Se construyó un espectro sintético para la contribución de las cadenas laterales de Gln y Asn usando los datos publicados (Chirgadze y *col.*, 1975) para espectro en D_2O , teniendo en cuenta las secuencias de aminoácidos de BSA (Hirayama y *col.*, 1990) y Cit-c (Bushnell y *col.*, 1990). Este espectro se sustrajo al espectro de las proteínas, considerando la concentración de proteína (0.2 mM) y el espaciador (50 μM). Se aplicaron la derivación y auto-deconvolución de Fourier para resolver las bandas componentes de la región amida I' del espectro (Kauppinen y *col.*, 1981; Cameron y Moffatt, 1984). La estructura secundaria de la proteína se cuantificó por un análisis de ajuste de curva de las bandas componentes de la región amida I' usando el software Grams. Durante el proceso de ajuste del máximo de las bandas determinado por la deconvolución se permitió un error de $\pm 2\text{ cm}^{-1}$.

3.6. Espectroscopía de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro PTI Quantamaster (Photon Technology, New Jersey, USA). En los experimentos de atenuación de acrilamida, se añadieron alícuotas de una disolución de acrilamida 10 M a la disolución de proteína para alcanzar la concentración de acrilamida deseada. La concentración final de proteína fue 0.02 mM y la de TL 0.2 mM. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm y se obtuvo el espectro de emisión entre 300 y 400 nm. La anchura de rendijas fue de 2 nm para BSA y de 5 nm para Cit-c.

Todas las medidas se realizaron en celdas termostatzadas a 25°C, y se usaron cubetas de cuarzo de 1 cm.

Los datos experimentales de atenuación de fluorescencia de triptófano se analizaron mediante métodos convencionales para distinguir entre fluorescencia estática, la cual es debida a la formación de un complejo estable no fluorescente entre el atenuador y el fluoróforo, y la atenuación dinámica, debida a la colisión dinámica entre el atenuador y el fluoróforo. La fluorescencia en la mayoría de las proteínas es heterogénea. Una forma conveniente de representar los datos de atenuación de fluorescencia es mediante la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{f_i}{(1 + K_i[Q])e^{V_i[Q]}} \right)^{-1} \quad \text{Ecuación (III.1)}$$

donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del atenuador, K_i y V_i son las constantes de atenuación dinámica y estática para el componente i de fluorescencia (puede representar diferentes residuos Trp de la proteína), f_i es la contribución fraccional del componente i al total de fluorescencia, y $[Q]$ es la concentración molar del atenuador (Eftink y Ghiron, 1981). K_i , V_i , y f_i se determinaron mediante un ajuste no linear de los datos experimentales con la Ecuación III.1.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la interacción de TL sobre la desnaturalización térmica de BSA y Cit-c

En estos experimentos se utilizaron disoluciones diluidas tanto de BSA como de Cit-c para minimizar los efectos que pudieran darse debidos a la agregación de la proteína.

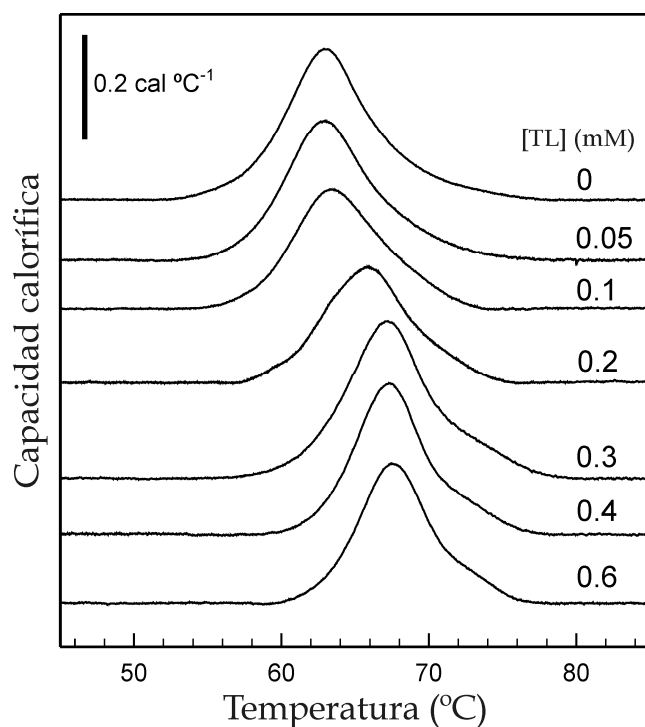


Figura III.1. Termogramas de DSC para la desnaturalización térmica de BSA en ausencia y presencia de TL. Los experimentos se llevaron a cabo bajo las condiciones explicadas en Materiales y Métodos. La concentración de BSA fue de 0.05mM. Los números sobre las curvas corresponden a la concentración de TL (mM). La velocidad de barrido fue de 30°C h⁻¹.

La Figura III.1 muestra los termogramas de DSC para BSA en presencia de concentraciones crecientes de TL. BSA pura presenta un desplegamiento endotérmico inducido térmicamente, con una temperatura media (T_m) centrada a 62.9°C y una entalpía media de desnaturalización $\Delta H = 187 \pm 1$ Kcal mol⁻¹. Esta transición, así como la nueva transición que se observa en presencia de TL mostrada en la Figura III.1, fueron totalmente irreversibles, como se comprobó por sucesivos barridos después de enfriar la muestra. Estos datos coinciden en lo esencial con otros publicados con anterioridad (Almeida y *col.*, 2004; Giancola y *col.*, 1997; Singh y Kishore, 2006; Sánchez y *col.*, 2008), teniendo en cuenta las diferencias en las condiciones experimentales. Concentraciones de TL por debajo de 0.1 mM (relación molar TL/proteína 2:1) no alteran esta transición. Sin embargo, después de la adición de TL en una proporción molar de 4:1 (0.2 mM TL), comenzó a aparecer una segunda transición endotérmica centrada a 65.9°C, la cual fue la única presente a una

proporción molar de 6:1 (0.3 mM) y a concentraciones mayores de TL, sugiriendo que corresponde a la desnaturalización térmica de BSA rica en interacciones con TL.

Además, el incremento de la concentración de TL por encima de una proporción molar 4:1 desplaza la transición a 67°C. Nosotros proponemos que esta transición endotérmica que tiene lugar a una mayor temperatura (66-67°C) corresponde a la desnaturalización de BSA que interacciona con TL, lo que se hace más evidente conforme aumenta la concentración del biotensioactivo.

La Figura III.2 muestra los termogramas de DSC del Cit-c en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de TL. El Cit-c puro presenta un desplegamiento endotérmico inducido térmicamente con una temperatura media (T_m) centrada en 80.1°C y una entalpía media de desnaturalización $\Delta H = 123.8 \pm 1$ Kcal mol⁻¹. Estos datos están de acuerdo con otros publicados con anterioridad (Privalov y Khechinashvili, 1974; Zhang y Rowe, 1994; Makhatadze y Privalov, 1995).

Esta transición, así como las nuevas transiciones observadas en presencia de TL, fueron totalmente irreversibles, como se comprobó por sucesivos barridos después de enfriar la muestra. Tras la adición de TL en una proporción molar de 2:1 (0.1 mM TL), comenzó a aparecer una segunda transición endotérmica centrada a 63.3°C. Al incrementar la concentración de TL a una proporción molar 4:1 (0.2 mM TL) la endoterma a temperatura menor prevalece sobre la endoterma de mayor temperatura. Así como la endoterma de mayor temperatura corresponde a la desnaturalización de moléculas de Cit-c puro, la transición endotérmica que tiene lugar a una menor temperatura correspondería a la desnaturalización de Cit-c rico en interacciones con TL. El aumento de ruido observado en presencia de TL podría deberse al incremento de complejos proteína-biotensioactivo involucrados en la desnaturalización de la proteína, como se ha descrito para mezclas con otros biotensioactivos (Turro y Lei, 1995; Andersen y *col.*, 2008).

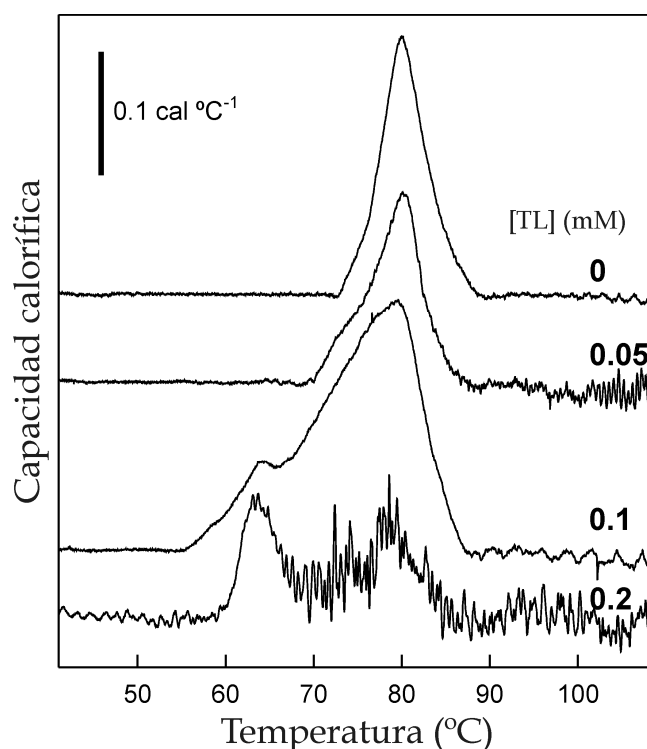


Figura III.2. Termogramas de DSC para la desnaturalización térmica de Cit-c en ausencia y presencia de TL. Los experimentos se llevaron a cabo bajo las condiciones explicadas en Materiales y Métodos. La concentración de Cit-c fue de 0.05 mM. Los números de las curvas dan la concentración de TL (mM). La velocidad de barrido fue de 30°C h⁻¹

4.2. Unión de TL a BSA y Cit-c

Mediante calorimetría isotérmica de titulación se estudió cuantitativamente la unión de TL a BSA y Cit-c. Los datos se ajustan a un modelo con un sitio de unión para ambas proteínas, obteniéndose los parámetros n (número de moléculas de TL unidas por mol de proteína), K (constante de unión), y ΔH (entalpía de unión).

La Figura III.3 muestra los datos de unión de TL a BSA en un experimento típico de ITC. Estos datos indican que BSA se satura con una molécula de TL monomérico ($n = 0.72 \pm 0.41$) unida por molécula de BSA, de una forma esencialmente no cooperativa. Se obtuvo un valor de ΔH de -2.94 ± 2.43 Kcal mol⁻¹, $\Delta S = 12.7$ Kcal mol⁻¹ K⁻¹ y la constante de afinidad $K = 1.5 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^4$ M⁻¹. Esta baja unión podría deberse a la carga negativa que tiene la BSA a pH 7

(Peters, 1985), produciendo repulsiones electrostáticas con las cargas negativas de las moléculas de TL. La unión de tensioactivos a BSA se produce principalmente por interacciones electrostáticas o hidrofóbicas, y el resultado anterior sugiere que la unión de TL se produce por interacciones hidrofóbicas. Esto se apoya por el hecho de que la entropía de unión fue positiva ($\Delta S > 0$), estando aceptado que una reacción con una entropía positiva principalmente involucra interacciones hidrofóbicas. El consenso general actual es que la albúmina posee hasta seis zonas de unión a ligandos que pueden alojar diferentes tipos de moléculas anfipáticas (Carter y He, 1990; Carter y Ho, 1994; De y col., 2005) y que puede unir decenas de pequeños tensioactivos aniónicos como n-decilsulfato (Jones y col., 1975) o dodecilsulfato de sodio (Deep y Ahluwalia, 2001). Además la ΔH de la interacción de estos tensioactivos aniónicos es de 70 Kcal mol⁻¹, que comparada con los valores en el rango de -3 Kcal mol⁻¹ que se han obtenido para el TL, y la baja constante de afinidad, sugiere que la unión de TL es mucho más débil, indicando probablemente una interacción inespecífica. Por otro lado, los parámetros de unión de TL fueron muy parecidos a los obtenidos para un biotensioactivo ramnolípido bacteriano (Sánchez M y col., 2008), lo que significa que este tipo de tensioactivos, que poseen cabezas polares voluminosas en comparación por ejemplo con el dodecilsulfato de sodio, no presentan interacciones específicas con BSA, sino más bien interacciones inespecíficas con dominios hidrofóbicos de la proteína.

No se pudo obtener curvas de unión de ITC reproducibles para Cit-c (resultados no mostrados), indicando que no había unión o que ésta se producía sin intercambio de calor neto. Es posible que la interacción TL/proteína nativa sea de naturaleza inespecífica de forma que no pudiera obtenerse una curva de unión de saturación apropiada.

El Cit-c tiene un dominio catiónico con siete residuos de Lys localizados alrededor del grupo hemo, donde interaccionan micelas de SDS (Oellerich y col., 2003) y, como proteína globular soluble, no posee dominios hidrofóbicos expuestos en la superficie, aunque hay un segmento hidrofóbico en el centro del anillo de lisinas que está localizado en la vecindad inmediata del grupo hemo y que se ha sugerido como una diana potencial para la unión de monómeros de SDS (Oellerich y

col., 2003). Nuestros resultados sugieren que los monómeros de TL deberían interactuar con las porciones hidrofóbicas de la proteína de forma inespecífica.

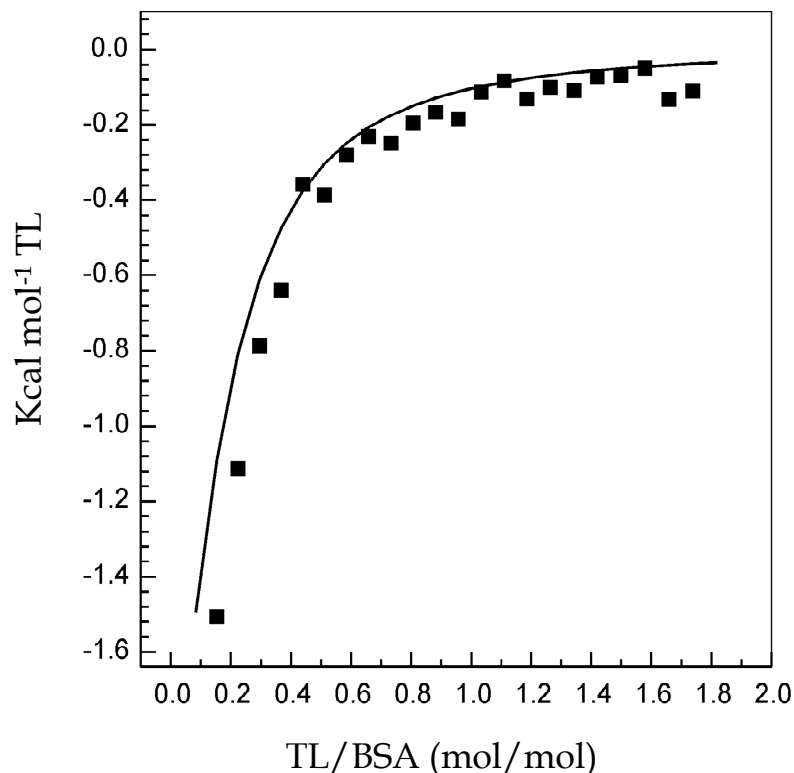


Figura III.3. Determinación por ITC de la unión de TL a BSA. Se muestra el calor de inyección por mol de TL inyectado en función de la relación molar TL/BSA en la celda del calorímetro. Los datos corresponden a una concentración de BSA de 0.1 mM. Se muestran los datos de un experimento representativo. La línea sólida es el ajuste teórico.

4.3. Determinación de los cambios estructurales en BSA y Cit-c inducidos por TL mediante FTIR

Los cambios estructurales producidos en ambas proteínas como consecuencia de las interacciones con TL se estudiaron mediante la evaluación de la banda amida I' del espectro de FTIR. La banda amida I' es una banda compleja de absorción en el infrarrojo formada por varios componentes. Algunas estructuras raras o minoritarias podrían interferir con la asignación de bandas. Por ejemplo, la absorción de giros- β

aproximadamente a 1665 cm^{-1} está cerca de una banda característica de infrarrojo que representa hélice- 3_{10} . Por otra parte, la vibración de algunas cadenas laterales de aminoácidos podría tener pequeñas contribuciones en la intensidad de la banda amida característica de la proteína. Finalmente, un procedimiento experimental incorrecto podría también dar lugar a un espectro erróneo. Todas estas complicaciones indican que no existe una correlación simple entre el espectro de infrarrojo y los componentes estructurales secundarios, y es necesario ser cauteloso en la interpretación del espectro de infrarrojo de las proteínas (Ye y *col.*, 2007; Kong y Yu, 2007). En nuestros experimentos, la banda amida I' está formada por componentes centrados aproximadamente a 1684 , 1674 , 1654 , 1645 , 1634 , y 1615 cm^{-1} como se determinó por derivación y autodeconvolución (ver Sección 3.5 de este capítulo). Estos máximos están en concordancia con los descritos en la literatura (Le Gal y Manfait, 1990; Jackson y Mantsch, 1995; Murayama y Tomida, 2004; Zhang y Yan, 2005, Panuszko y *col.*, 2009). La correlación entre las posiciones de la banda amida I' y la estructura secundaria de las proteínas muestra que la banda centrada aproximadamente a 1654 cm^{-1} corresponde a hélices- α , la de 1674 cm^{-1} corresponde a giros, el componente de 1645 cm^{-1} a estructuras desordenadas y el componente centrado en 1634 cm^{-1} corresponde a hojas- β . Las bandas centradas a 1615 y 1684 cm^{-1} podrían asignarse a la formación de hojas- β antiparalelas intermoleculares resultantes de la agregación de la proteína debido al tratamiento térmico. Una excepción es BSA. La estructura de BSA nativa totalmente hidratada posee aproximadamente un 66% de hélice- α , un 31% de estructuras desordenadas (cadenas extendidas) y muy baja proporción de hojas- β ; estos resultados pueden variar considerablemente dependiendo de la concentración de la proteína, pH, temperatura, etc (Carter y He, 1990; He y Carter, 1992; Carter y Ho, 1994; Carter y *col.*, 1989). Existe una cierta contradicción en la literatura concerniente a la estructura de BSA, particularmente en relación a la asignación de las estructuras β y estructuras extendidas o desordenadas. Mientras algunos autores han mostrado que BSA no contiene esencialmente estructuras β y que posee una proporción de un 23% de estructuras desordenadas (Carter y He, 1990; Carter y Ho, 1994; Murayama y Tomida, 2004), otros han descrito que posee entre un 8 y un 15% de hojas β con una

menor proporción de estructuras desordenadas (Sjoholm y Ljungstedt, 1973; Imamura y *col.*, 2009; Charbonneau y Tajmir-Riahi, 2010). De acuerdo con estos datos y la asignación de bandas descrita en la literatura (Murayama y Tomida, 2004; Wetzel y *col.*, 1980; Takeda y *col.*, 1987) nosotros asignamos la banda de 1674 cm^{-1} a estructuras helicoidales (quizá una hélice- 3_{10}) (Jackson y Mantsch, 1995) y las bandas de 1645 y 1634 cm^{-1} a estructuras desordenadas (cadenas extendidas), las cuales estaban más de acuerdo con nuestros datos experimentales.

Por otro lado, se debe saber que las cadenas de Gln y Asn absorben en la región de la banda amida I' (Chigadze y *col.*, 1975; Venyaminov y Kalnin, 1990). Tal y como se explicó en la sección de métodos experimentales, se corrigió el espectro de FTIR para la contribución de esas cadenas por sustracción del correspondiente espectro sintético. Se ha sugerido que la banda de 1645 cm^{-1} podría deberse a la deuteración de residuos de Asn, sin embargo, como esta banda sigue presente después de la deconvolución del espectro corregido para la contribución de las cadenas laterales de Asn, concluimos que esta es debida a estructuras desordenadas en BSA, las cuales están de acuerdo con los datos de la literatura (Ye y *col.*, 2007; Murayama y Tomida, 2004).

La Figura III.4 muestra el efecto del TL en la estructura secundaria de BSA totalmente hidratada, determinada por ajuste de la banda amida I' como se explica arriba. El ajuste del espectro de BSA nativa a 25°C (Figura IV.4A) dio un 67.2% de estructura hélice- α , 32.2% de estructura extendida o desordenada, y solo un 0.6% de agregados β (Tabla 1), de acuerdo a los datos publicados (Peters, 1985; Wetzel y *col.*, 1980; Takeda y *col.*, 1987). Después de calentar e incubar a 70°C , aparecen claramente dos bandas a 1684 y 1615 cm^{-1} (Figura III.4B) indicando un incremento de estructuras β agregadas (9.2%) a expensas de hélice- α , la cual disminuye a 58.6%. Estos resultados están de acuerdo con datos publicados que muestran que la agregación está acompañada del desarrollo de hojas β (Clark y *col.*, 1981).

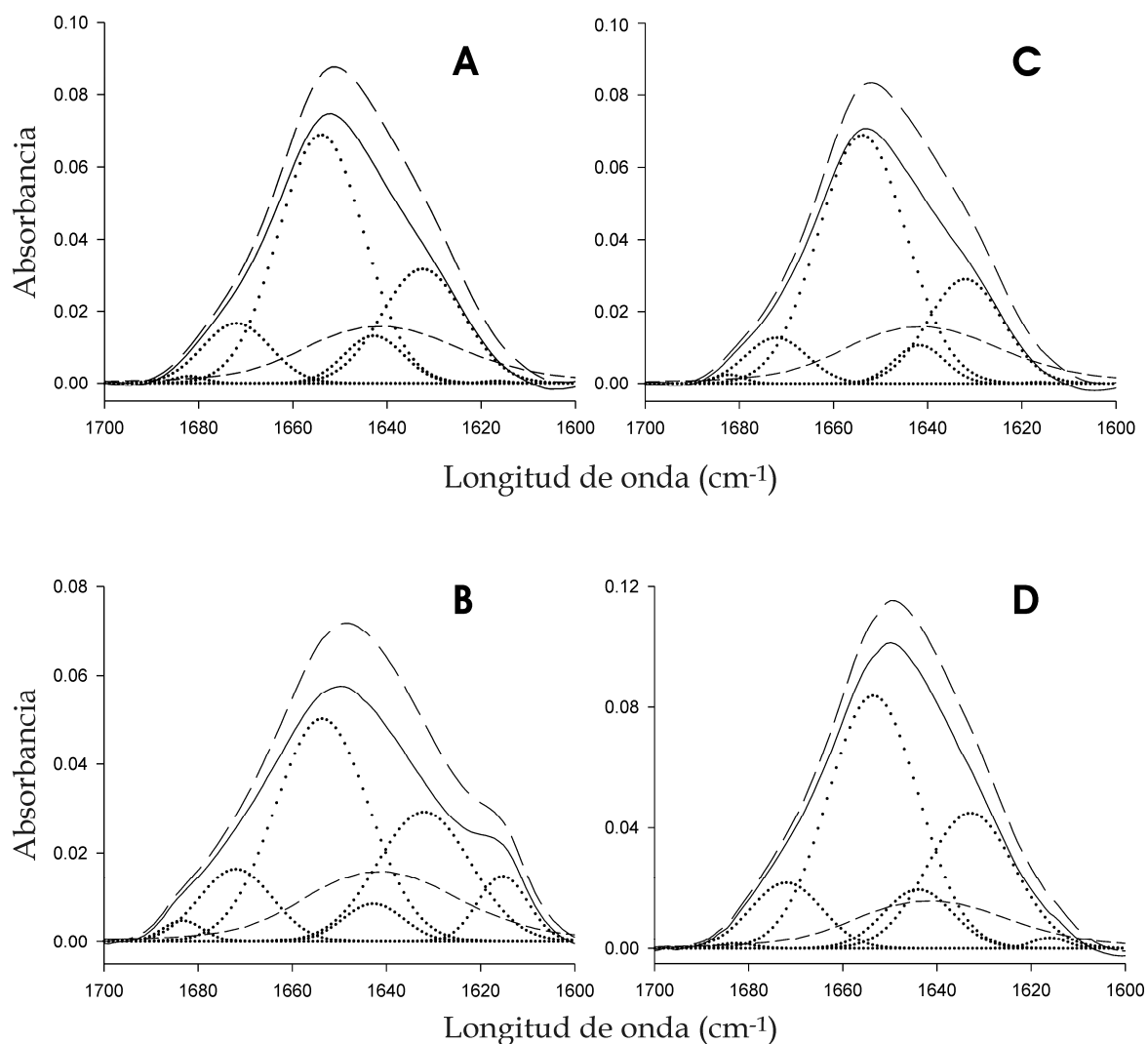


Figura III.4. Banda amida I' de BSA nativa a 25°C en ausencia (A) y presencia de TL (C); y BSA incubada a 70°C en ausencia (B) y presencia de TL (D). La concentración final de la proteína y el TL fueron 0.2 y 0.5 mM, respectivamente. Las medidas se llevaron a cabo en un tampón en D₂O que contenía 100 mM NaCl, 100 mM fosfato pD 7.4. Se muestra el espectro original de BSA (línea discontinua larga), el espectro de las cadenas de Gln y Asn (línea discontinua corta), y el espectro de BSA al que se le ha sustraído el espectro de los aminoácidos (línea continua). Las líneas de puntos corresponden a las bandas componentes obtenidos después de ajustar como se explica en el texto.

La proporción de hélice- α después de la desnaturalización térmica es bastante elevada, indicando que la conformación hélice- α de BSA es bastante resistente a la desnaturalización (Harmsen y Braam, 1969). La adición de una concentración 5 mM de TL a BSA nativa a 25 °C (Figura III.4C) no afecta esencialmente a la estructura de la proteína, reteniendo un 71.1% de estructura helicoidal, 28.0% de cadenas desordenadas y 0.9% de agregados β . Sin embargo, después de incubar a 70°C

(Figura III.4D) la proporción de estructuras β agregadas fue menor en presencia de biotensioactivo (1.2%) que en ausencia (9.2%). Puede verse que después de calentar, la disminución de estructuras helicoidales fue concomitante con el incremento de estructuras desordenadas y estructuras β . Estos resultados muestran claramente que existe un efecto protector de TL contra la desnaturalización térmica.

Tabla III.1. Estructura secundaria de BSA y Cit-c nativos y desnaturalizados (0.2mM) en ausencia y presencia de TL (0.5mM) determinada por FTIR.

| ESTRUCTURA SECUNDARIA (%) | | | | | |
|----------------------------|------------------|---------------|--------------|----------------|--------------------|
| | Hélice- α | Hoja- β | Desordenadas | Giros- β | Agregados- β |
| BSA nativa | 67.2 | 0.0 | 32.2 | 0.0 | 0.6 |
| BSA + TL | 71.1 | 0.0 | 28.0 | 0.0 | 0.9 |
| BSA desnaturalizada | 58.6 | 0.0 | 32.2 | 0.0 | 9.2 |
| BSA desnaturalizada + TL | 62.7 | 0.0 | 36.1 | 0.0 | 1.2 |
| Cit-c nativo | 39.2 | 24.5 | 23.1 | 12.4 | 0.8 |
| Cit-c nativo + TL | 40.5 | 29.8 | 20.8 | 8.9 | 0.0 |
| Cit-c desnaturalizado | 17.11 | 46.0 | 14.2 | 18.7 | 3.9 |
| Cit-c desnaturalizado + TL | 26.6 | 33.2 | 7.0 | 13.2 | 20.0 |

Varios tensioactivos catiónicos, aniónicos y no iónicos, incluidos SDS y TX-100, inducen cambios sustanciales en el contenido helicoidal de BSA (Singh y Kishore, 2006; Takeda y *col.*, 1987), indicando un efecto desnaturalizante. La interacción de dirramnolípido secretado por *Pseudomonas aeruginosa* con BSA causa un efecto similar

en la desnaturalización térmica, disminuyendo la proporción de la agregación β por desnaturalización (Sánchez y *col.*, 2008), sugiriendo que este tipo de glicolípidos, incluido nuestro TL, probablemente interactuarían con las mismas regiones de la proteína. El hecho de que la interacción de TL con BSA resulte en un efecto protector abre la posibilidad de utilizar este biotensioactivo en estudios de proteínas.

Según la literatura, Cit-c posee una media de 35-45% de hélice- α , 12-39% de estructuras desordenadas, 10-25% de hoja- β y 14-25% giros (Ye y *col.*, 2007; Dousseau y Pézolet, 1990; Dong y *col.*, 1992; Bushnell y *col.*, 1990). La figura 6 muestra el efecto de TL en la estructura secundaria de Cit-c. Puede verse que la adición de TL a Cit-c nativo no altera esencialmente la forma de la banda amida I' (Figura III.5 A y C).

Después de la desnaturalización la forma de la banda cambia considerablemente (Figura III.5 B), y esta modificación es mucho más pronunciada en presencia de TL (Figura III.5 D). Ajustando el espectro de Cit-c nativo a 25°C (Figura III.5 A) obtuvimos un 39.2% de hélices α , 24.5% de estructura β , 23.1% desordenadas, 12.4% de giros β y solo 0.8% de agregados β (Tabla 1), en concordancia con resultados publicados con anterioridad como se comentó arriba. Después de incubar a 90°C (Figura III.5 B) se observó un incremento en hojas- β (46.0%) y agregados β (3.9%) a expensas de hélice- α , la cual disminuyó a 17.1%, y estructuras desordenadas, las cuales disminuyeron a 14.2%. Al añadir TL a una concentración 5 mM a Cit-c nativo a 25°C (Figura III.5 C) no se ve afectada esencialmente la estructura de la proteína, la cual tiene un 40.5% de estructuras hélice, 20.8% cadenas desordenadas, 29.8% de hojas- β y 8.9% de giros. Sin embargo después de incubar a 90°C en presencia de TL (Figura III.5 D), la proporción de agregados β fue mayor (20%), mientras que la proporción de hojas- β y giros fue menor. Estos resultados indican que la presencia de TL desestabiliza la proteína, un efecto contrario mostrado para BSA, sugiriéndose que la interacción de TL con Cit-c involucra motivos estructurales de diferente naturaleza a los involucrados en la interacción TL/BSA.

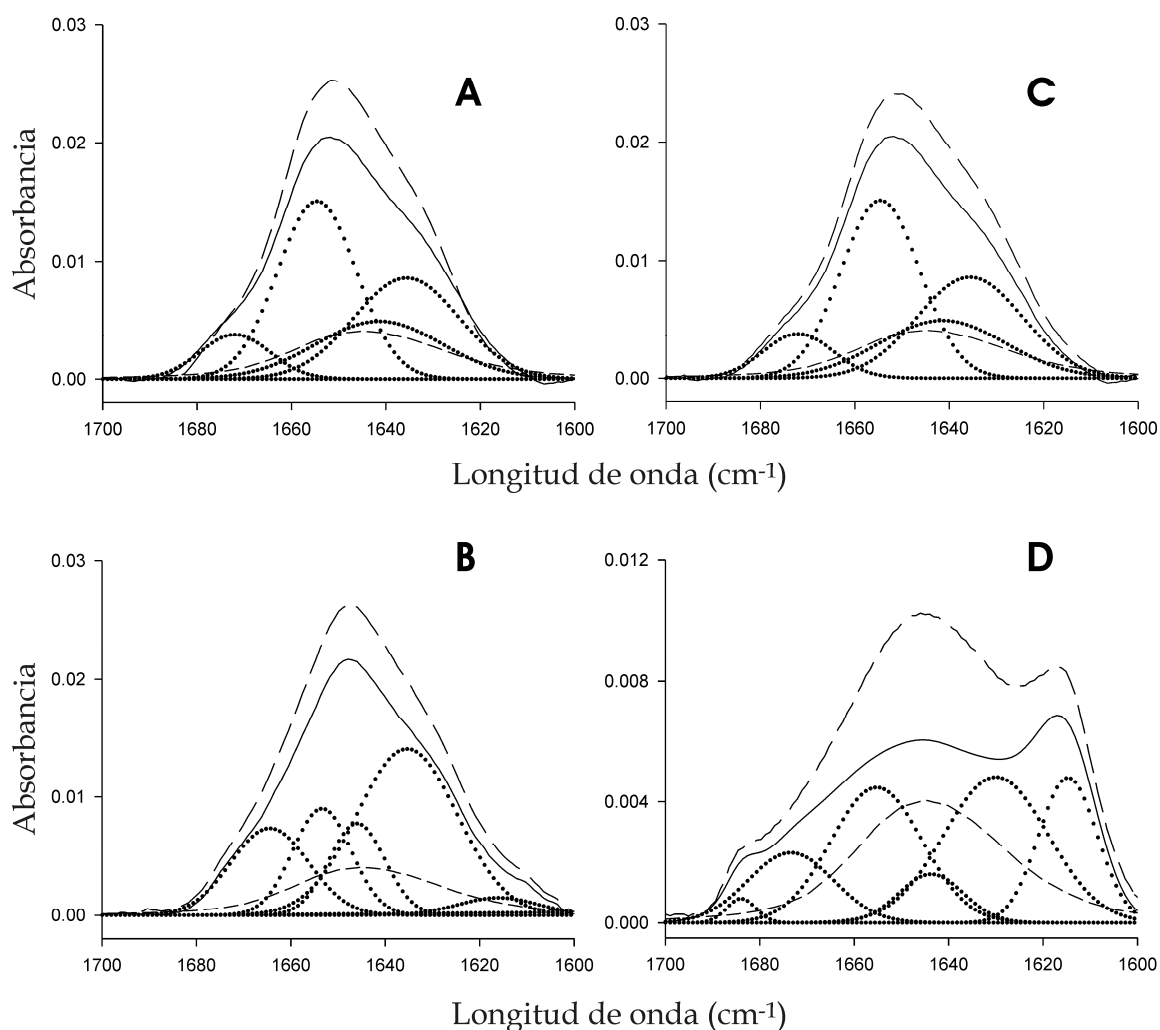


Figura III.5. Banda amida I' de Cit-c nativo a 25°C en ausencia (A) y presencia de TL (C); y Cit-c incubado a 90°C en ausencia (B) y presencia de TL (D). La concentración final de la proteína y el TL fueron 0.2 y 0.5 mM, respectivamente. Las medidas se llevaron a cabo en un tampón en D₂O que contenía 100 mM NaCl, 100 mM fosfato pD 7.4. Se muestra el espectro original de Cit-c (línea discontinua larga), el espectro de las cadenas de Gln y Asn (línea discontinua corta), y el espectro de Cit-c al que se le ha sustraído el espectro de los aminoácidos (línea continua). Las líneas de puntos corresponden a las bandas componentes obtenidos después de ajustar como se explica en el texto.

4.4. Efecto del TL en la fluorescencia intrínseca del Trp

El efecto de TL en la estructura de BSA y Cyt-c se determinó también a través del estudio del efecto de la interacción de TL en la fluorescencia intrínseca del Trp de las

proteínas. La Figura III.6A muestra el efecto de TL en el espectro de emisión del Trp de BSA nativa. La proteína pura muestra un espectro de emisión centrado en 342 nm. Al añadir concentraciones crecientes de TL la atenuación de la fluorescencia del Trp disminuye progresivamente. Así el TL no puede actuar directamente como un atenuador de la fluorescencia del Trp, sino que esta atenuación debe ser consecuencia indirecta del cambio conformacional que induce el TL en la proteína como se describe por FTIR. Un comportamiento similar se ha observado en la interacción de Tween 80 y Tween 20 con BSA (Gelamo y Tabak, 2000). Además, conforme la concentración de TL se incrementa de 0 a 500 μM , el máximo de emisión tiene un cambio moderado de 342 a 338 nm, compatible con el movimiento de los residuos de Trp a un ambiente más hidrofóbico, como consecuencia del cambio conformacional o por interacción directa con porciones hidrofóbicas del biotensioactivo.

En una segunda serie de experimentos se utilizó acrilamida como atenuador, que es un atenuador que no perturba y que normalmente no se une a la proteína. En este caso la atenuación de la fluorescencia se debe normalmente al contacto físico entre atenuador y fluoróforo, y por lo tanto depende directamente de la medida en que el atenuador puede acercarse al fluoróforo. Así la accesibilidad de los residuos Trp a los sitios de unión del ligando en la proteína se puede comprobar con estudios de atenuación. La Figura III.6B muestra la gráfica de Stern-Volmer para la atenuación de la fluorescencia intrínseca del Trp de BSA por acrilamida en diferentes condiciones.

Los datos experimentales se ajustaron a la **Ecuación III.1**, y en todos los casos la contribución de la atenuación estática fue esencialmente despreciable al igual que para los datos de Cit-c mostrados abajo. La gráfica para BSA nativa en ausencia y presencia de TL fue esencialmente lineal, mientras que para BSA desnaturalizada se observó una gráfica ligeramente curvada. Primero debería observarse que la gráfica correspondiente a BSA desnaturalizada en ausencia de TL presenta una pendiente algo diferente del resto. Los datos ajustados a la **Ecuación III.1**, permitieron determinar la constante de atenuación dinámica de Stern-Volmer, así como las fracciones de fluoróforos accesibles en el caso de fluorescencia heterogénea (Tabla 2).

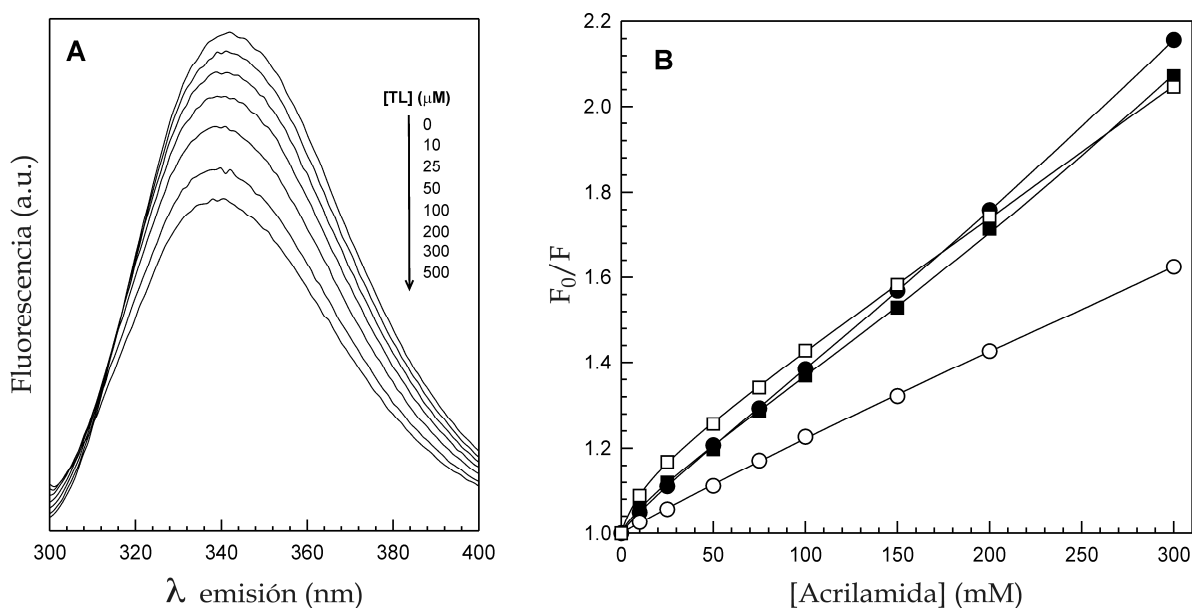


Figura III.6. Efecto de TL en la fluorescencia intrínseca del Trp de BSA. (A) Espectro de emisión de BSA nativa en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de TL. Concentración de BSA 20 μM . (B) Gráfica de Stern-Volmer para la atenuación de la fluorescencia de BSA nativa por acrilamida (25°C) y BSA incubada a 70°C (desnaturalizada), en ausencia y presencia de TL. (●) BSA nativa, (○) BSA desnaturalizada, (■) BSA en presencia de TL, y (□) BSA desnaturalizada en presencia de TL. Las concentraciones de proteína y TL fueron 20 y 200 μM , respectivamente.

Se observó que BSA nativa presenta una población simple de fluoróforos de Trp con una constante de atenuación dinámica de 3.7 M^{-1} . La adición de TL a BSA nativa no afecta esencialmente a los parámetros de atenuación ($K_1 = 3.30 \text{ M}^{-1}$), es decir, la accesibilidad de Trp no se vio afectada, indicando que el biotensioactivo no modifica esencialmente la estructura de la proteína, como puede observarse por FTIR. La desnaturalización de la proteína en ausencia de TL lleva a la conversión de una mayor proporción de fluoróforos de Trp (82%) en una fracción con una menor constante de atenuación (1.60 M^{-1}), consistente en un incremento de agregados β observados por FTIR (Tabla III.1), la cual disminuye la accesibilidad de Trp al atenuador. Es muy interesante la observación de que la desnaturalización en presencia de TL mantiene una elevada proporción de residuos de Trp (87%) con una constante de atenuación bastante mayor (2.70 M^{-1}), confirmando el efecto protector

de TL en el proceso de desnaturalización mostrado arriba, el cual disminuye la formación de agregados β . BSA contiene 580 aminoácidos y se caracteriza por un bajo contenido de triptófano. Los triptófanos se localizan en las posiciones 134 y 212. El Trp-134 parece localizarse cerca de la superficie de BSA en la segunda hélice del primer dominio, estando más expuesto que el Trp-212 (Ruiz-Peña y *col.*, 2010; Samson y *col.*, 2005). Según esto, nuestros resultados sugieren que los cambios conformacionales que ocurren durante la agregación de la proteína en la desnaturalización dan lugar a una menor exposición del Trp-134, proceso que disminuye por la unión de TL a motivos apropiados de la proteína.

Se llevaron a cabo experimentos similares de fluorescencia para el Cit-c. De acuerdo con la literatura, el Cit-c contiene un único residuo de triptófano (Trp-59) el cual se localiza en la depresión de una cresta donde se localiza el grupo hemo. El Trp-59 forma un puente de hidrógeno con uno de los grupos propiónicos del hemo (Fisher y *col.*, 1973; Stellwagen y *col.*, 1972; Myer y *col.*, 1980) por lo que la señal de fluorescencia es débil debido a la proximidad del Trp-59 al grupo hemo (Schlamadinger y *col.*, 2010). Se observó (Figura III.7 A) que al añadir concentraciones crecientes de TL al Cit-c nativo se produjo un aumento progresivo de la fluorescencia. Estos resultados sugieren que la interacción de TL induce la desnaturalización de Cit-c, dando lugar a un cambio conformacional que incrementa la distancia entre el grupo hemo y el triptófano, disminuyendo así la eficiencia de transferencia de energía por resonancia e incrementando la intensidad de fluorescencia del Trp dador. Un incremento de fluorescencia similar se describió recientemente por la adición de SDS a Cit-c, y se sugirió el mismo tipo de explicación (Ahluwalia y *col.*, 2011).

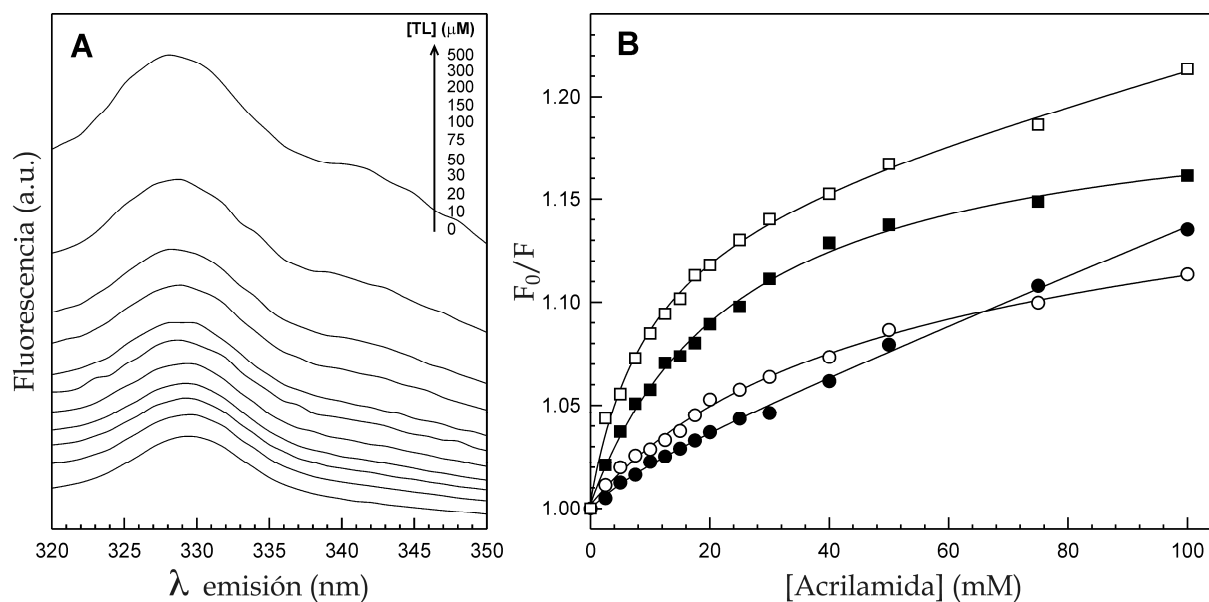


Figura III.7. Efecto de TL en la fluorescencia intrínseca del Trp de Cit-c. (A) Espectro de emisión de Cit-c nativo en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de TL. Concentración de Cit-c 20 μ M. (B) Gráfica de Stern-Volmer para la atenuación de la fluorescencia de Cit-c nativo por acrilamida (25°C) y Cit-c incubada a 90°C (desnaturalizada), en ausencia y presencia de TL. (●) Cit-c nativa, (○) Cit-c desnaturalizada, (■) Cit-c en presencia de TL, y (□) Cit-c desnaturalizada en presencia de TL. Las concentraciones de proteína y TL fueron 20 y 200 μ M, respectivamente.

Los resultados de atenuación por acrilamida se muestran en la Figura III.7B. La gráfica de Stern-Volmer para el Cit-c nativo fue prácticamente lineal, indicando claramente que existe una población homogénea de fluoróforos. De hecho, los datos que se muestran en la Tabla III.2 indican la presencia de una única fracción con $K_1 = 1.1 \text{ M}^{-1}$, lo que se corresponde con una accesibilidad intermedia. La desnaturalización de la proteína en ausencia de TL da lugar a una curva en la gráfica de Stern-Volmer (Figura III.7 B), con una fracción mayor (88%) menos accesible ($K_2 = 0.10 \text{ M}^{-1}$), debido a la formación de agregados β (Tabla III.1).

Tabla III.2. Constantes de fluorescencia dinámica (K_1 , K_2) y contribución fraccional de los correspondientes componentes (f_1 , f_2) para la atenuación de la fluorescencia por acrilamida de BSA y Cyt-c bajo diferentes condiciones. Las concentraciones finales de las proteínas y TL fueron 0.02 y 0.2 mM respectivamente. Datos de un experimento representativo.

| | f_1 | K_1 (M^{-1}) | f_2 | K_2 (M^{-1}) |
|-----------------------------------|-------|--------------------|-------|------------------------|
| BSA nativa | 1 | 3.70 | 0 | - |
| BSA desnaturalizada | 0.18 | 5.80 | 0.82 | 1.6 |
| BSA nativa + TL | 1 | 3.30 | 0 | - |
| BSA desnaturalizada + TL | 0.87 | 2.70 | 0.13 | 89.50 |
| Cit-c nativo | 1 | 1.10 | 0 | - |
| Cit-c desnaturalizado | 0.12 | 27.40 | 0.88 | 0.10 |
| Cit-c nativo + TL | 0.16 | 47.30 | 0.84 | 2.76×10^{-10} |
| Cit-c desnaturalizado + TL | 0.13 | 119.50 | 0.87 | 0.60 |

De acuerdo con los resultados de DSC, FTIR y fluorescencia, la adición de TL a Cit-c nativo da lugar a un cambio conformacional dando como resultado una población predominante de proteína (84%) con residuos de Trp prácticamente inaccesibles ($K_2 = 2.76 \times 10^{-10} M^{-1}$), sin embargo queda todavía una pequeña proporción de fluoróforos con una mayor accesibilidad (16%). La desnaturalización en presencia de TL no muestra el efecto protector que se observa en el caso de BSA. Sin embargo, nuestros resultados indican que el TL se une o interactúa con el Cit-c, aumentando la proporción de estructuras desordenadas a expensas de hélice- α , facilitando la agregación β (Tabla III.1) y dando lugar a un efecto desnaturalizante como se observó por la disminución de la accesibilidad de Trp (Tabla III.2).

5. CONCLUSIONES

La relevancia de los estudios de interacción proteína-tensioactivo se deriva de las múltiples aplicaciones de los sistemas proteína-tensioactivo: por ejemplo, para las industrias alimentarias o farmacéuticas, y en bioquímica analítica. BSA es rica en estructuras α hélice y contiene una baja proporción de estructuras β , mientras que el Cit-c posee entre un 10 y un 25% de estructura β , y ambas proteínas se han usado como proteínas modelo. Nuestros datos muestran que, en el caso de BSA, no hay efecto desnaturizante y por el contrario la proteína se estabiliza frente a la desnaturización térmica al interaccionar con TL. La interacción es bastante inespecífica como muestran los datos de ITC, pero lo suficientemente intensa como para producir una estabilización importante de la proteína frente a la desnaturización térmica. Probablemente la localización de BSA en un ambiente más hidrofóbico por la incorporación por ejemplo de micelas de TL contribuya a esta estabilización. Por otro lado la interacción TL-Cit-c es muy inespecífica, pero lo bastante fuerte como para promover la desnaturización de la proteína, justo el efecto contrario al observado para BSA. Teniendo en cuenta la estructura de ambas proteínas, se puede derivar de nuestros resultados que la interacción de TL con BSA, una proteína rica en α -hélice, protege de la desnaturización térmica, mientras que la interacción con Cit-c, con un mayor contenido en hojas- β , facilita la desnaturización térmica. El hecho de que el TL afecte más fuertemente a proteínas desnaturizadas que a las nativas puede sugerir que existe una interacción diferente con dominios hidrofóbicos, los cuales se encuentran enterrados en la estructura nativa y se exponen tras la desnaturización. En cualquier caso la diferente naturaleza de los dominios involucrados en la interacción con BSA o Cit-c parece clara. Algunos tensioactivos se suelen añadir para prevenir y/o minimizar la agregación de la proteína durante diferentes procesos, y el distinto efecto de TL en BSA y Cit-c nos indica que el efecto del biotensioactivo depende en gran medida de las características estructurales de la proteína en cuestión, por lo que estudios de este tipo deberían llevarse a cabo antes de su aplicación práctica en casos particulares.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahluwalia U., Nayeem S. M., Deep S. (2011). The non-native conformations of cytochrome c in sodium dodecyl sulphate and their modulation by ATP. *Eur. Biophys. J.* 40: 259-271.
- Andersen K. K., Westh P., Otzen D. E. (2008) Global study of myoglobin-surfactant interactions. *Langmuir.* 24: 399-407.
- Almeida N. L., Oliveira C. L.P., Torriani I. L., Loh W. (2004) Calorimetric and structural investigation of the interaction of lysozyme and bovine serum albumin with poly(ethylene oxide) and its copolymers. *Colloids Surf.* 38: 67-76.
- Ananthapadmanabhan, K. P. (1993). *Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins.* CRC Press: London.
- Bushnell G. W., Louie G. V., Brayer G. D. (1990). High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *J. Mol. Biol.* 214: 585-595.
- Cai J., Yang J., Jones D.P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Act.* 1366: 139-149.
- Cameron D. G., Moffatt D. J. (1984) Deconvolution, derivation, and smoothing of spectra using fourier transforms. *J. Test. Eval.* 12: 78-85.
- Carter D. C., He X. M. (1990) Structure of human serum albumin. *Science.* 249: 302-303.
- Carter D. C., Ho J. X. (1994) Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 45: 153-203.
- Carter D. C., He X. M., Munson S. H., Twigg P. D., Gernert K. M., Broom M. B., Miller T. Y. (1989) Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science.* 244: 1195-1198.
- Charbonneau D. M., Tajmir-Riahi H. A. (2010). Study on the interaction of cationic lipids with bovine serum albumin. *J. Phys. Chem. B.* 114: 1148-1155.
- Chirgadze Y. N., Fedorov O. V., Trushina N. P. (1975) Estimation of amino acid residue side-chain absorption in the infrared spectra of protein solutions in heavy water. *Biopolymers.* 14: 679-694.
- Clark A. H, Saunderson D. H. P., Suggett A. (1981). Infrared and laser-raman spectroscopic studies of thermally-induced globular protein gels. *Int. J. Pept. Protein.* 17: 353-364.
- Deep S., Ahluwalia J. C. (2001). Interaction of bovine serum albumin with anionic surfactants. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 3: 4583-4591.
- De S., Girigoswami A., Das S. (2005). Fluorescence probing of albumin-surfactant interaction. *J. Colloid Interface Sci.* 285: 562-573.
- Dong A., Huang P., Caughey W. S. (1992). Redox-Dependent Changes in β -extended chain and turn structures of Cytochrome c in water solution determined by second derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry.* 31: 182-189.

- Dousseau F., Pézolet M. (1990). Determination of the secondary structure content of proteins in aqueous solutions from their amide I and amide II infrared bands. Comparison between classical and partial least-squares methods. *Biochemistry* 29: 8771-8779
- Eftink M. R., Ghiron C. A. (1981) Fluorescence quenching studies with proteins. *Anal. Biochem.* 114: 199-227.
- Fisher W. R., Taniuchi H., Anfinsen C. B. (1973). On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome c. *Journal of Biological Chemistry.* 248: 3188-3195.
- Gelamo E. L., Tabak M. (2000). Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectrochim. Acta part A* 56: 2255-2271.
- Giancola C., De Sena C., Fessas D., Graziano G., Barone G. (1997) DSC studies on bovine serum albumin denaturation effects of ionic strength and SDS concentration. *Int. J. Biol. Macromol.* 20: 193-204.
- Grasso D., La Rosa C., Milardi D., Fasone S. (1995) The effects of scan rate and protein concentration on DSC thermograms of bovine superoxide dismutase. *Thermochim. Acta.* 14: 679-694.
- Harmsen B. J. M, Braam W. J. M. (1969). On the conformation of bovine serum albumin after alkaline or thermal denaturation. *Int. J. Protein.* 1: 225-233.
- Hirayama K., Akashi S., Furuya M., Fukuhara K. (1990). Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by esims and FRIT-FAB LC/MS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173: 639-646.
- He X. M., Carter D. C. (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature.* 358: 209-215.
- Imamura K., Ohyama K., Yokoyama T., Maruyama Y., Kazuhiro N. (2009). Temperature scanning FTIR analysis of secondary structures of proteins embedded in amorphous sugar matrix. *J. Pharm. Sci.* 98: 3088-3098.
- Jackson M., Mantsch H.H. (1995) The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein setructure. *Crit. Rev. biochem. Mol. Boil.* 30: 95-120.
- Jones M.N., Skinner H. A., Tipping E. (1975). The interaction between bovine serum albumin and surfactants. *Biochem. J.* 147: 229-234.
- Kauppinen J. K., Moffatt D. J., Mantsch H. H., Cameron D. G. (1981). Fourier transforms in the computation of self-deconvoluted and first-order derivative spectra of overlapped band contours. *Anal. Chem.* 53: 1454- 1457.
- Kong J., Yu S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Biochim. Biophys. Acta.* 39: 549-559.
- Makhatadze G. I., Privalov P. L. (1995) Energetics of protein structure. *Adv. Protein Chem.* 47: 307-425.
- Margoliash E., Schejter A. (1966). Cytochrome c. *Advan. Protein Chem.* 21: 113-286.

- Moriyama Y., Takeda K. (2005) Protective effects of small amounts of bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinate on the helical structures of human and bovine serum albumins in their thermal denaturations. *Langmuir*. 21: 5524-5528.
- Murayama K., Tomida M. (2004). Heat-Induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*. 43: 11526-11532.
- Myer Y. P., MacDonald L. H., Verma B. C., Pande A. (1980). Urea denaturation of horse heart ferricytochrome c. Equilibrium studies and characterization of intermediate forms. *Biochemistry*. 19: 199-207.
- Naeem A., Hasan R. (2004). Characterization of molten globule state of cytochrome c at alkaline, native and acidic pH induced by butanol and SDS. *Science*. 36: 2281-2292.
- Le Gal J. M., Manfait M. (1990). Conformational changes of human serum albumin in vivo induced by free fatty acids as studied by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*. 1041: 257-263.
- Lindman B., Karlström G. (1990) Polymer Surfactant Systems. En: *The Structure, Dynamics and Equilibrium Properties of Colloidal Systems*. Bloor D.M., Wyn-jones E. (eds). Kluwer Academic: Dordrecht.
- Liu X., Naekyung K., Yang J., Jemmerson R., Wang X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 86: 147-157.
- Oellerich S., Wackerbarth H., Hildebrandt P. (2003) Conformational equilibria and dynamics of cytochrome c induced by binding of sodium dodecyl sulphate monomers and micelles. *Eur. J. Biophys.* 32: 599-613.
- Orioni B., Roversi M., La Mesa C., Asaro F., Pellicer G., D'Errico G. (2006) Polymorphic behavior in protein-surfactant mixtures: the water-bovine serum albumin-sodium turodeoxycholate system. *J. phys. Chem. B*. 110: 12129-12140.
- Panuszko A., Bruzdziak P., Zielkiewicz J., Wyrzykowski D., Stangret, J. (2009) Effects of urea and trimethylamine-N-oxide on the properties of water and the secondary structure of hen egg white lysozyme. *J. Phys. Chem.* 113: 14797-14809.
- Peters T. (1985) Serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 37: 161-245.
- Privalov P. L., Khechinashvili N. N. (1974). A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure : a calorimetric study. *J. Mol. Biol.* 86: 665-684.
- Ruiz-Peña M., Oropesa-Nuñez R., Pons T., Louro S. R. W., Pérez-Gramatges A.(2010). Physico-chemical studies of molecular interactions between non-ionic surfactants and bovine serum albumin. *Colloids Surf., B*. 75: 282-289.
- Samson N. Q., Bugante R. V., Galagalac M. N., Amador J. V. (2005). Interaction of bovine serum albumin and metallothionein. *J. Helth Sci.* 51: 8-15.

- Sánchez M., Aranda F. J., Espuny M. J., Marqués A., Teruel J.A., Manresa A. Ortiz A. (2008) Thermodynamic and structural changes associated with the interaction of a dirhamnolipid biosurfactant with bovine serum albumin. *Langmuir*. 24: 6487-6495.
- Singh P., Cameotra SS. (2004). Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol.* 22: 142-146.
- Singh S. K., Kishore N. (2006). Thermodynamic insights into the binding of triton X-100 to globular proteins: A calorimetric and spectroscopic investigation. *J. Phys. Chem. B* 110: 9728-9737.
- Sjoholm I., Ljungstedt I. (1973) Studies on the tryptophan and drug-binding properties of human serum albumin fragments by affinity chromatography and circular dichroism measurements. *J. Biol. Chem.* 248: 8434-844.
- Schlamadinger D. E., Kats D. I., Kim J. E. (2010). Quenching of tryptophan fluorescence in unfolded cytochrome c: A biophysics experiment for physical chemistry students. *Journal of chemical Education*. 87: 961-964.
- Stellwagen E., Rysavy R., Babul G. (1972). The conformation of horse heart apocytochrome c. *The Journal of Biological Chemistry*. 247: 8074-8077.
- Stevens, J. M. (2011) Cytochrome c as an experimental model protein. *Metallomics*. 3: 319-322.
- Takeda K., Shigeta M., Aoki K. (1987). Secondary structures of bovine serum albumin in anionic and cationic surfactant solutions. *J. Coll. Int. Sci.* 117: 120-126.
- Turro N. J., Lei X. (1995) Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions: The BSA/SDS system. *Langmuir*. 11: 2525-2533.
- Valstar A., Almgren M., Brown W., Vasilescu M. (2000). The interaction of bovine serum albumin with surfactants studied by light scattering. *Langmuir*. 16: 922-927.
- Vasilescu M., Angelescu D., Alegren M., Valstar A. (1999) Interactions of globular proteins with surfactants studied with fluorescent probe methods. *Langmuir* 1999. 15: 2635-2643.
- Venyaminov S. Y., Kalnin N. N. (1990). Quantitative IR spectrophotometry of peptide compounds in water (H₂O) solutions. II. Amide absorption bands of polypeptides and fibrous proteins in α -, β -, and random coil conformations. *Biopolymers*. 30: 1259-1271.
- Vijai K., Foster J.F. (1967) The amphoteric behaviour of bovine plasma albumin. Evidence for masked carboxylate groups in the native protein. *J. Biochemistry*. 6: 1152-1159.
- Wetzel R., Becker M., Behlke J., Billwitz H., Böhm S., Ebert B., Hamann H., Krumbiegel J., Lassmann G. (1980). Temperature behaviour of human serum albumin. *Eur. J. Biochem.* 104: 469-478.
- Ye M., Zhang Q.L., Weng Y.X., Wang W.C., Qiu X.G. (2007). Infrared spectroscopic discrimination between the loop and α -helices and determination of the loop diffusion kinetics by temperature-jump time-resolved infrared spectroscopy for cytochrome c. *Biophysical Journal*. 93: 2756-2766.

Zhang F., Rowe E. (1994). Calorimetric studies of the interactions of cytochrome c with dioleoylphosphatidylglycerol estruded vesicles: ionic strength effects. *Biochim. Biophys. Acta.*1193: 219-225.

Zhang J., Yan Y. B. (2005). Probing conformational changes of proteins by quantitative second-derivative infrared spectroscopy. *Anal. Biochem.* 340: 89-98.

CAPÍTULO IV

Interacción de un biotensioactivo trealosalípido segregado por *Rhodococcus erythropolis* 51T7 con una fosfolipasa A₂ de secreción.

1. RESUMEN

Los trealosalípidos producidos por *Rhodococci* presentan actividades biológicas únicas y propiedades fisicoquímicas muy interesantes. Estos compuestos alteran la estructura y propiedades de los fosfolípidos de membrana e interactúan con las proteínas. Las fosfolipasas A₂ constituyen una clase de enzimas que hidrolizan el enlace ester *sn*-2 de los glicerofosfolípidos, liberando un ácido graso libre y un lisofosfolípido. La familia de la fosfolipasa A₂ se compone de fosfolipasas A₂ de secreción (sPLA₂) y fosfolipasas A₂ intracelulares. En este trabajo se muestra como el succinil trealosalípido aislado de *Rhodococcus erythropolis* 51T7 actúa como un inhibidor de la sPLA₂ porcina pancreática. Se observaron dos modos de inhibición esencialmente distintos. En primer lugar se estudió la inhibición lenta de la actividad de sPLA₂ por preincubación de la enzima con el trealosalípido en ausencia de sustrato. Esto significa que se produce una interacción directa del trealosalípido con la enzima induciendo cambios estructurales en la misma, como se demuestra mediante espectroscopía de fluorescencia del triptófano y FTIR. Por otra parte, la incorporación de trealosalípido en el interior de la membrana fosfolipídica diana dio lugar a una inhibición enzimática rápida. Las medidas cinéticas indican una inhibición competitiva por modificación del sustrato. Estos resultados se discuten a la luz de datos previos de otros inhibidores de sPLA₂, y se añaden a la lista de actividades biológicas interesantes descritas para estos trealosalípidos de *Rhodococcus erythropolis*.

2. INTRODUCCIÓN

Los lípidos microbianos se han convertido en un campo de estudio interesante debido a la posibilidad de obtener lípidos específicos a partir de materiales de desecho de bajo coste y renovables (Subramaniam *y col*, 2010). Algunos de estos compuestos tienen actividad superficial, y debido a su baja toxicidad, carácter biodegradable, eficacia a temperaturas y pH extremos y propiedades biológicas únicas hay un creciente interés en considerar estos lípidos naturales como una alternativa potencial a sus equivalentes sintetizados químicamente (Desai y Banat, 1997; Cameotra y Makkar, 1998; Singh y Cameotra, 2004). Los glicolípidos que contienen trealosa constituyen un grupo emergente de compuestos interesantes (Asselineau y Asselineau, 1978) y se han propuesto un gran número de posibles aplicaciones de estos compuestos en diferentes campos (Lang y Philp, 1998), debido a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.

Las PLA₂ constituyen un grupo diverso de enzimas con respecto a su secuencia, función, localización y dependencia de cationes divalentes (Schaloske y Dennis, 1976; Lambeau y Gelb, 2008). Juegan un papel muy importante en varios procesos celulares, como el metabolismo fosfolipídico y la digestión, así como en la producción de precursores de reacciones inflamatorias. Estas últimas enzimas catalizan la hidrólisis del enlace éster de la posición *sn*-2 de los fosfoglicéridos de la membrana celular para liberar ácido araquidónico, un precursor de eicosanoides incluyendo prostaglandinas y leucotrienos. La misma reacción produce lisofosfolípidos que representan otra clase de mediadores lipídicos. La familia de PLA₂ de secreción (sPLA₂), consiste en enzimas de bajo peso molecular que requieren Ca²⁺, siendo enzimas de secreción que están implicadas en un gran número de procesos biológicos, tales como modificación de la generación de eicosanoides, inflamación, defensa del hospedador y aterosclerosis. Las enzimas del tipo sPLA₂ abundan en el jugo pancreático. Éstas tienen una extensión característica de 5 aminoácidos, denominada lazo pancreático, en el centro de la molécula, y un grupo I específico con un puente disulfuro entre la cys11 y la cys77. La fosfolipasa A₂ pancreática bovina es una enzima lipolítica de peso molecular 14000. Cataliza la

hidrólisis del enlace éster de la posición C₂ de los *sn*-3-fosfoglicéridos. El Ca²⁺ es un cofactor esencial para la reacción. La enzima activada es capaz de digerir de manera muy eficiente estructuras ordenadas de fosfolípidos como micelas (Dijkstra y *col*, 1981; Murakami y Kudo, 2002; García-García y Serruys, 2009).

El aumento del número de inhibidores de fosfolipasas A₂ lipolíticas conocidos debería ayudar a elucidar las funciones fisiológicas y actividades metabólicas de estas enzimas, y esos inhibidores podrían convertirse en nuevos agentes potenciales para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias (Magrioti y Kokotos, 2010). En la investigación de nuevos inhibidores de la fosfolipasa A₂ se han descrito compuestos naturales de diversos orígenes (Oliver y *col*, 1996; Carrier y *col*, 1998; Grau y Ortiz, 1998). Este trabajo presenta en detalle un estudio a nivel molecular de los mecanismos de inhibición de la actividad de la sPLA₂ pancreática por el succinil trealosalípido bacteriano producido por *Rhodococcus erythropolis* 51T7, con el fin de establecer futuras nuevas aplicaciones para este compuesto.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Materiales

Todos los reactivos usados fueron de la mayor pureza disponible. El agua purificada fue desionizada en un equipo milli-Q de Millipore (Millipore, Redford, MA) y mostró una resistividad de aproximadamente 18 MΩ. La sPLA₂ porcina pancreática (suspensión en sulfato amónico) fue de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). BODIPY-PC (1,2-bis-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4bora-3a,4a-diaza-s-indacena-3-undecanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina) fue de Molecular Probes (Eugene, OR). 1,2-Dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) fue de Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL). El tampón usado en este trabajo fue 150 mM NaCl, 5 mM Hepes pH 7.4, si no se indica otra cosa. El agua y todas las disoluciones usadas en este trabajo se filtraron a través de filtros de 0.2 μm antes de usarse. La producción del biotensioactivo a partir de la cepa 51T7 (NCIB) de *Rhodococcus* sp., así como la purificación del componente

trealosalípido (TL) se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Capítulo I, sección 3.2).

3.2. Preparación de la muestra de trealosalípido

Las muestras acuosas se prepararon por dispersión de la cantidad requerida del biotensioactivo en el tampón apropiado. Se disolvió la cantidad deseada de trealosalípido en $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2:1) y después el disolvente se evaporó bajo un flujo de N_2 (g) hasta obtener una delgada capa en el fondo de un tubo de vidrio. Las últimas trazas de disolvente se eliminaron desecando a vacío durante un mínimo de 3 h. Se añadió la disolución tampón a las muestras desecadas y se agitó a temperatura ambiente hasta obtener una suspensión homogénea.

3.3. Preparación de liposomas

Los liposomas se prepararon mezclando 2 mg de DOPC y 0.014 mg de BODIPY-PC en aproximadamente 1 mL de cloroformo en un tubo de vidrio. El disolvente se evaporó bajo un flujo de N_2 (g) obteniendo una fina película en el fondo de un pequeño tubo de vidrio. Las últimas trazas del disolvente se eliminaron desecando durante 2-3 h en una bomba de vacío. A las muestras secas se les añadió 1 mL de tampón que contenía 50 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 2 mM HEPES pH 7.4 y se formaron vesículas multilamelares (MLV) mediante agitación mecánica de la muestra. Esta suspensión se sometió a ultrasonidos con un equipo Bandelin Electronic Sonoplus (Berlin, Alemania), provisto de una microsonda de titanio, durante 10 min en modo pulsado al 50% de potencia. La muestra se mantuvo en un baño de hielo para evitar el calentamiento. Finalmente la suspensión de vesículas unilamelares pequeñas (SUV) se centrifugó durante 10 min en una microfuga de sobremesa para eliminar las vesículas grandes y las partículas de titanio liberadas de la sonda (Barenholz y *col*, 1977).

Los liposomas que contenían distintos porcentajes de TL mezclados con DOPC se prepararon de una forma similar, mezclando las cantidades adecuadas de las disoluciones stock de TL y DOPC en cloroformo antes de la evaporación del disolvente. La concentración de lípido se determinó como se menciona con anterioridad mediante el método de Böttcher (Böttcher y *col*, 1961).

3.4. Ensayo fluorescente continuo de la actividad sPLA₂ pancreática

La enzima se obtuvo como una suspensión en sulfato amónico, con una actividad específica de ca. 800 U/mg. La disolución stock se preparó después de centrifugar la enzima en una microfuga de sobremesa, eliminar cuidadosamente el sobrenadante y disolver el pellet en una disolución tamponada que contenía 50 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 2 mM Hepes pH 7.4, a una concentración final de 0.5 mg/mL. Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro Quantamaster PTI (Photon Technology, NJ). Se usaron cubetas de cuarzo de 1 cm. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 488 y 530 nm respectivamente. La anchura de las rendijas fue de 2 nm. La sPLA₂ se añadió a partir de la disolución stock de 0.5 mg/mL comentada anteriormente. Tanto para la enzima nativa como para la preincubada con TL, la concentración final de sPLA₂ fue 5 µg/mL, si no se indica otra cosa. Todas las medidas se realizaron en una celda termostaticada a 25°C.

3.5. Atenuación de fluorescencia con acrilamida

Las medidas de fluorescencia se llevaron a cabo en el espectrofluorímetro PTI Quantamaster (Photon Technology, New Jersey, USA) citado anteriormente. En los experimentos de atenuación por acrilamida, se añadieron alícuotas de una disolución 5 M de acrilamida a la disolución de proteína hasta alcanzar la concentración de acrilamida deseada. La concentración final de proteína fue 25 µg/mL y la

concentración final de TL cuando estaba presente fue de 200 μM . Se utilizó una longitud de onda de excitación de 295 nm y se obtuvo el espectro de emisión entre 300 y 400 nm. La anchura de rendijas fue de 5 nm tanto para el monocromador de excitación como para el de emisión. Todas las medidas se realizaron en celdas termostatazadas a 25°C, y se usaron cubetas de cuarzo de 1 cm.

Los datos experimentales de atenuación de fluorescencia de triptófano se analizaron mediante métodos convencionales para distinguir entre fluorescencia estática, la cual se debe a la formación de un complejo estable no fluorescente entre el atenuador y el fluoróforo, y atenuación dinámica, debida a la colisión dinámica entre el atenuador y el fluoróforo. En general, la fluorescencia en la mayoría de las proteínas es heterogénea. Una forma conveniente de representar los datos de atenuación de fluorescencia es mediante la ecuación de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{f_i}{(1 + K_i[Q])e^{V_i[Q]}} \right)^{-1} \quad \text{Ecuación (IV.1)}$$

donde F_0 y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia del atenuador, K_i y V_i son las constantes de atenuación dinámica y estática para el componente i de fluorescencia (puede representar diferentes residuos Trp de la proteína), f_i es la contribución fraccional del componente i al total de fluorescencia, y $[Q]$ es la concentración molar del atenuador (Gelamo y Tabak, 2000; Schlamadinger y col, 2010; Lange y col, 1994). K_i , V_i , y f_i se determinaron mediante un ajuste no lineal de los datos experimentales a la **Ecuación IV.1**.

3.6. Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

Las muestras para los experimentos de FTIR se prepararon usando un tampón en D_2O que contenía 50 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 2 mM MES pD 7.4 (pH 7.0). Se situó una alícuota de la muestra (aprox. 30 μl de una solución de 0.2 mM) entre dos ventanas

de CaF₂ usando espaciadores de teflón de 50 µm, y el conjunto se montó en un soporte termostatzado Symta.

Los espectros de infrarrojo se adquirieron en un espectrómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Nicolet 6700 (FTIR) (Madison, WI) equipado con un ordenador para la recolección de datos. Cada espectro se obtuvo por acumulación de 256 interferogramas con una resolución nominal de 2 cm⁻¹. El equipo se purgó continuamente con aire seco para minimizar la contribución de los picos del vapor de agua atmosférica. La celda donde estaba la muestra se mantuvo termostatzada a 25°C usando un Peltier (sistema Proteus para Nicolet).

Se tomaron espectros para las proteínas en estado nativo en presencia y ausencia de TL. Los espectros se adquirieron a intervalos de 2°C, dejando un tiempo de equilibrado entre temperaturas de 5 min. El espectro del tampón en D₂O tomado a las mismas temperaturas se restó interactivamente usando el software Omnic o GRAMS/32 (Galactic Industries, Salem, NH). Se aplicó la derivación y la auto-deconvolución de Fourier para resolver las bandas componentes de la región amida I' del espectro (Kauppinen y *col.*, 1981; Camero y Moffatt, 1984). La estructura secundaria de la enzima se cuantificó por un análisis de ajuste de curva de las bandas componentes de la región amida I' usando el software GRAMS/32. Durante el proceso de ajuste del máximo de las bandas determinado por deconvolución se permitió un error de ±2 cm⁻¹. Se construyó un espectro sintético para la contribución de las cadenas laterales de Gln y Asn usando los datos publicados (Chirgadze y *col.*, 1975) para espectros en D₂O, teniendo en cuenta la secuencia de aminoácidos de la sPLA₂. Este espectro se sustrajo al espectro de las proteínas, teniendo en cuenta la concentración de proteína y el espaciador.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El TL producido por la cepa 51T7 de *Rhodococcus* sp. posee una cola formada por tres ácidos grasos de diferente longitud (C₇, C₉ y C₁₁), y un grupo polar que contiene la molécula de trealosa y un residuo succinilo (Ver capítulo 1, Figura 1.I). Este succinilo

proporciona un grupo carboxilo libre confiriendo una carga negativa a pH neutro. Esta estructura se corresponde con la de un compuesto típicamente anfifílico y así, conforme a su naturaleza, el TL ha mostrado que altera la estructura de membranas fosfolipídicas modelo de diferentes composiciones (Aranda y *col*, 2007; Ortiz y *col*, 2008; Ortiz y *col*, 2009; Ortiz y *col*, 2011), permeabiliza membranas modelo y membranas biológicas (Zaragoza y *col*, 2009; Zaragoza y *col*, 2010), y modula la estructura secundaria de proteínas (Zaragoza y *col*, 2012). En este trabajo mostramos los resultados obtenidos sobre la inhibición de la actividad de sPLA₂ por acción del TL, en un esfuerzo por conseguir conocer la modulación de la actividad enzimática por este glicolípido bacteriano. Nuestros estudios se realizaron con vesículas de DOPC a 25°C, es decir en estado líquido-cristalino, para eliminar complicaciones debidas a cambios en la fase lipídica que podrían influir en la actividad de la sPLA₂.

4.1. La preincubación con trealosalípido inhibe la actividad de sPLA₂

La actividad de sPLA₂ pancreática se midió usando un ensayo de fluorescencia descrito más arriba con el que se obtuvieron las curvas continuas de actividad. La Figura IV.1 muestra las curvas de actividad de sPLA₂ sobre SUV de DOPC obtenidas antes y después de la preincubación de la enzima con concentraciones crecientes de TL. La preincubación de la enzima con el glicolípido llevó a una disminución progresiva de la velocidad inicial de sPLA₂, así como de la extensión total de formación de producto.

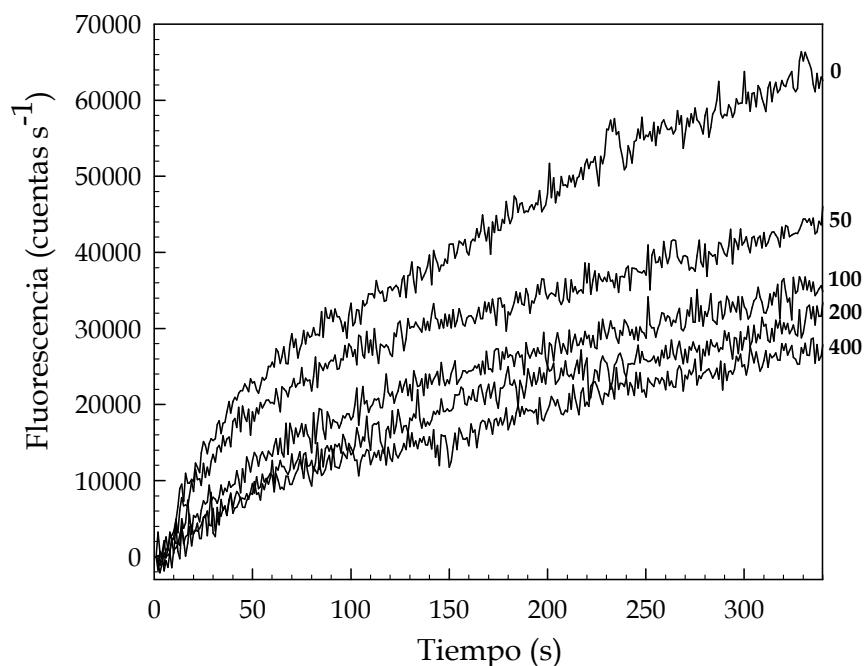


Figura IV.1. Efecto de la preincubación con trealosalípido en la actividad de sPLA₂ (0.5 mg/ml). sPLA₂ se preincubó en presencia de 0, 50, 100, 200 y 400 μM de trealosalípido (números de la derecha) durante 40 min a 25°C, y se inyectaron las alícuotas correspondientes en un cubeta termostatzada (concentración final de sPLA₂ 5 μg/ml) con 40 μM de SUV de DOPC que contenía la sonda fluorescente BODIPY-PC, y el aumento de fluorescencia, siguiendo la actividad de sPLA₂, se monitorizó de modo continuo.

El hecho de que la actividad de sPLA₂ no se recupere en el tiempo de ensayo podría indicar que se trata de un proceso irreversible. Se observó que la preincubación con TL inhibía a la enzima a concentraciones tanto por debajo como por encima de la CMC del glicolípido, pero a la concentración máxima ensayada, 400 μM, la actividad enzimática era todavía bastante significativa.

El efecto del tiempo de preincubación en la actividad de sPLA₂ se muestra en la Figura IV.2A. Se observó que la inhibición fue un proceso lento, en la escala de minutos, para todas las concentraciones de TL ensayadas. Este hallazgo sugería, muy probablemente, modificaciones estructurales de la proteína en este proceso de inhibición, tal como se muestra a continuación. La Figura IV.2B muestra la actividad de sPLA₂ en función de la concentración de TL a dos tiempos de preincubación distintos. En primer lugar se debe señalar que no se observaron diferencias a partir

de los 25 min de preincubación, lo que confirma que esta inhibición es un proceso lento que requiere de 15-30 minutos para completarse.

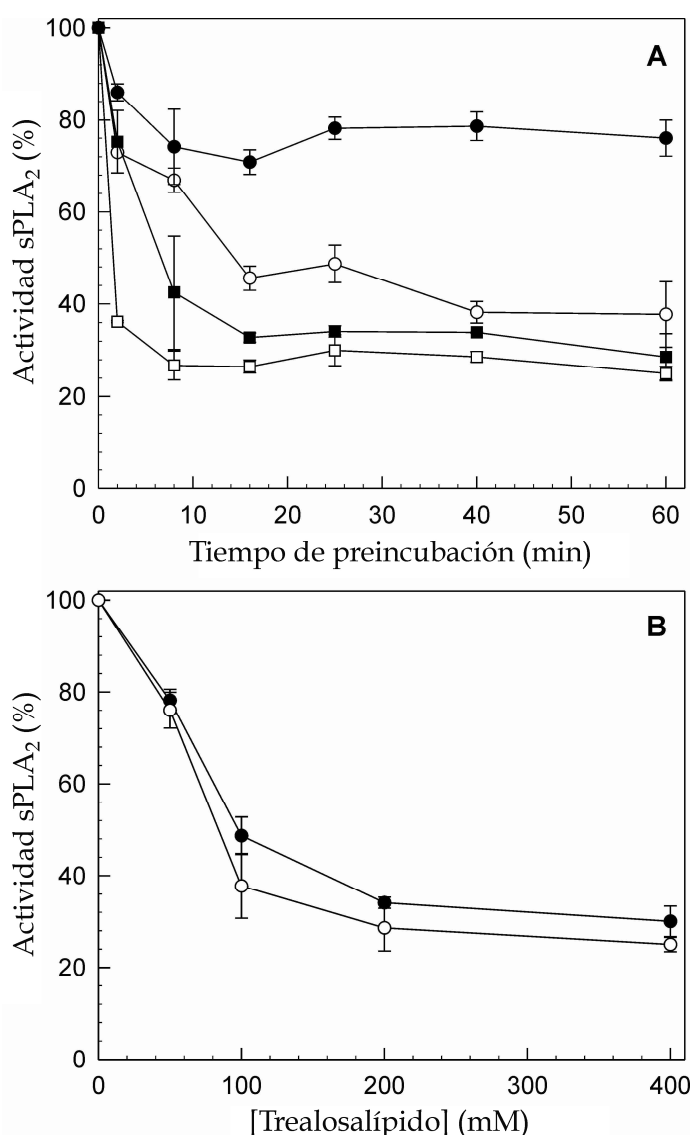


Figura IV.2. Efecto de la concentración de trealosalípido y el tiempo de preincubación en la actividad de sPLA₂. (A) Velocidad inicial relativa de la actividad de sPLA₂ (%) en función del tiempo de preincubación para SUV de DOPC. sPLA₂ (0.5 mg/ml) se preincubó en un medio que contenía 50 (●), 100 (○), 200 (■) y 400 (□) μM de trealosalípido, durante varios tiempos a 25°C. Se inyectó una alícuota en una cubeta que contenía 40 μM de SUV de DOPC (con BODIPY-PC) para empezar la reacción (concentración final de sPLA₂ 5 μg/ml). (B) Porcentaje de la actividad de sPLA₂ en función de la concentración de trealosalípido en el medio de preincubación, a dos tiempos de preincubación diferentes: 25 min (●) y 60 min (○). La velocidad inicial se determinó a partir de curvas similares a las mostradas en la Figura IV.1. Las barras de error, correspondientes al error estándar, se muestran cuando son mayores que los símbolos.

Por otro lado, el aumento de la concentración de TL por encima de 200 μM , un valor cercano a la CMC de 300 μM previamente determinada (Zaragoza y col, 2009), no dio lugar a una reducción significativa de la actividad enzimática. Esto indica que sólo el TL monomérico se une a la enzima dando lugar a la inhibición de ésta, descartando en este caso interacciones proteína-micela.

4.2. La preincubación de sPLA₂ con trealosalípido altera la estructura de sPLA₂

Los resultados mostrados arriba sugerían que la preincubación de sPLA₂ con TL en ausencia de sustrato inducía cambios estructurales lentos en la proteína que conducían a la inhibición de la enzima. Estos cambios estructurales se comprobaron primero por atenuación de la fluorescencia intrínseca del triptófano.

La Figura IV.3 muestra la representación de Stern-Volmer para la atenuación de la fluorescencia del triptófano de la sPLA₂ por acrilamida antes y después de preincubar con TL. Los datos se analizaron de acuerdo a la **Ecuación IV.1** obteniéndose un valor de $3.9 \times 10^{-3} \pm 3.1 \times 10^{-4}$ para la constante de atenuación dinámica de Stern-Volmer para la proteína nativa, K_{SV} , mientras que después de preincubar, K_{SV} disminuyó a $2.8 \times 10^{-3} \pm 2.0 \times 10^{-4}$. Este descenso en la constante de Stern-Volmer indicaba cambios conformacionales en sPLA₂ que llevaban a una menor accesibilidad del residuo de triptófano al atenuador.

Para obtener una mayor comprensión de estos cambios conformacionales se utilizó FTIR. La banda amida I' es una banda compleja de absorción en el infrarrojo formada por varios componentes. Algunas estructuras raras o minoritarias podrían interferir con la asignación de bandas, y la vibración de algunas cadenas laterales de aminoácidos podría tener pequeñas contribuciones en la intensidad de la banda amida característica de la proteína, las cuales se han corregido de forma apropiada en nuestro caso (ver Material y Métodos). Todas estas complicaciones indican que no existe una correlación simple entre el espectro de infrarrojo y los componentes estructurales secundarios, y es necesario ser cauteloso en la interpretación del

espectro de infrarrojo de las proteínas para evitar un espectro erróneo y poder eliminar artefactos (Ye y *col.*, 2007; Kong y Yu, 2007).

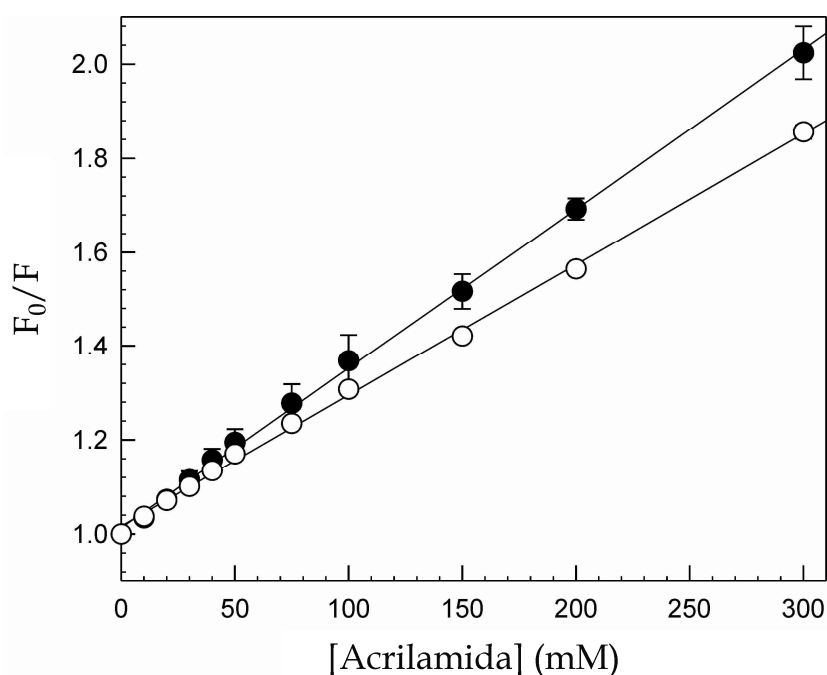


Figura IV.3. Representación de Stern-Volmer para la atenuación de fluorescencia de sPLA₂ por acrilamida en ausencia y presencia de trealosalípido. 25 μg/ml sPLA₂ (●), 25 μg/ml sPLA₂ incubada con 200 μM de trealosalípido durante 30 min (○). Se añadieron secuencialmente alícuotas de una disolución de concentrada acrilamida a la disolución de proteína bajo agitación continua a 25°C, como se explica en el texto. Los datos corresponden a la media de tres experimentos diferentes. Las barras de error, correspondientes al error estándar, se muestran cuando son mayores que los símbolos.

En nuestros experimentos, la banda amida I' estaba formada por componentes centrados aproximadamente a 1684, 1674, 1654, 1645, 1634, y 1615 cm⁻¹ como se determinó por derivación y autodeconvolución. Estos máximos están en concordancia con los descritos en la literatura. La correlación entre las posiciones de la banda amida I' y la estructura secundaria de las proteínas muestra que la banda centrada aproximadamente a 1654 cm⁻¹ corresponde a hélice-α, la de 1674 cm⁻¹ corresponde a giros, el componente de 1645 cm⁻¹ a estructuras desordenadas y el componente centrado en 1634 cm⁻¹ corresponde a hoja-β (Jackson y Mantsch, 1995). Las bandas centradas a 1615 y 1684 cm⁻¹ podrían asignarse a la formación de hojas-β antiparalelas intermoleculares resultantes de la agregación de la proteína al

desnaturalizarse (Jackson y Mantsch, 1995; Le Gal y Manfait, 1990; Murayama y Tomida, 2004; Zhang y Yan, 2005; Panuszko y *col*, 2009).

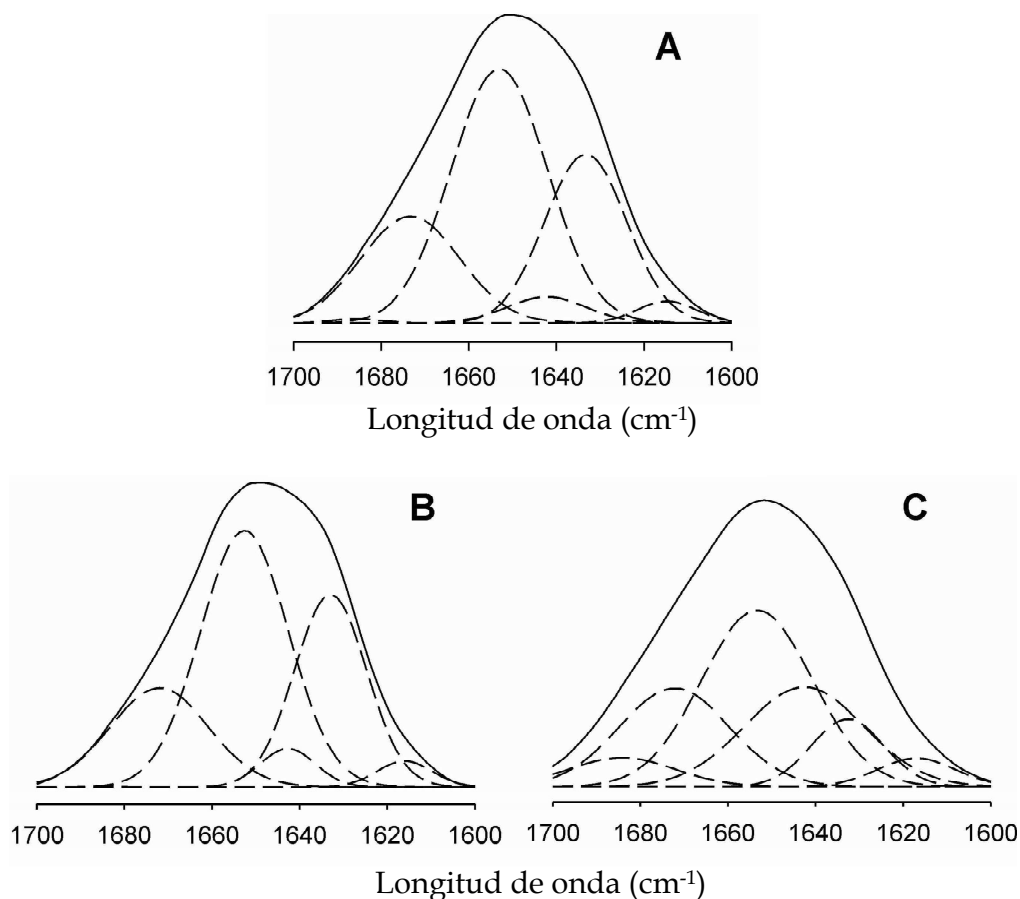


Figura IV.4. Banda amida I' de sPLA₂ antes y después de la preincubación con trealosalípido. (A) sPLA₂ nativa (5 mg/ml), (B) sPLA₂ (5 mg/ml) inmediatamente tras la adición de trealosalípido 200 μM; (C) sPLA₂ (5 mg/ml) tras 30 min de incubación con trealosalípido 200 μM. La línea discontinua se corresponde con las bandas componentes como se explica en el texto.

La banda amida I' de la sPLA₂ se examinó en la enzima nativa, así como después de la preincubación con TL durante varios períodos de tiempo (Figura IV.4). Lo primero que se observó fue que después de la adición del glicolípido la forma de la banda amida I' no se alteró esencialmente en comparación con la proteína nativa. Después de la preincubación durante 30 min la banda amida I' se amplió considerablemente hacia longitudes de onda mayores y la proporción de las bandas componentes cambió claramente. La integración de estas bandas componentes dio lugar a los

resultados que se muestran en la Tabla IV.1. Así, la sPLA₂ nativa contenía un promedio de 44.5% de α -hélice y un 29.0 % de hoja- β , con una baja proporción de estructuras desordenadas y sin agregados de hojas- β , de acuerdo a los datos publicados (Kennedy y *col*, 1990).

Tabla IV.1. Estructura secundaria de la sPLA₂ nativa y después de su preincubación con trealosalípido 200 μ M a diferentes tiempos determinada por FTIR. Los datos corresponden a tres experimentos independientes \pm error estándar.

| ESTRUCTURA SECUNDARIA (%) | | | | | |
|---------------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|--------------------|
| | Hélice- α | Hoja- β | Desordenadas | Giros- β | Agregados- β |
| sPLA ₂ nativa | 44.5 \pm 0.5 | 29.0 \pm 1.0 | 5.0 \pm 1.0 | 19.5 \pm 0.5 | 2.0 \pm 1.0 |
| TL 200 μ M (0 min) | 45.5 \pm 1.5 | 28.0 \pm 2.0 | 2.5 \pm 1.5 | 21.5 \pm 1.5 | 2.5 \pm 0.5 |
| TL 200 μ M (30 min) | 38.5 \pm 1.5 | 7.5 \pm 1.5 | 24.0 \pm 1.0 | 21.0 \pm 0.2 | 9.0 \pm 1.0 |

Tras la incubación con TL durante 30 min la proporción de estructuras desordenadas y agregados aumentó considerablemente a expensas de α -hélice, y particularmente de hojas- β que disminuyó a 7.5%, indicando que la desnaturalización de la proteína es la responsable de la inhibición de la actividad enzimática que se mostró anteriormente. El incremento de la proporción de agregados explicaría la reducción de la atenuación de la fluorescencia por acrilamida (Figura IV.3), indicando que las regiones de agregados menos expuestas corresponderían a las que contienen el residuo de triptófano, el cual se encuentra cerca del extremo N-terminal, en la posición 3 de la enzima porcina (Puijk y *col*, 1979).

4.3. Inhibición de sPLA₂ por modificación de la estructura del sustrato

Los resultados mostrados antes indican que el TL interactúa con la sPLA₂, modificando su estructura secundaria y como resultado inhibiendo la actividad de la enzima. También se ha demostrado que los TL pueden alterar la estructura de una serie de membranas fosfolípídicas de diversas composiciones (Aranda y *col*, 2007; Ortiz y *col*, 2008; Ortiz y *col*, 2009; Ortiz y *col*, 2011), siendo posible que la modificación de la estructura de la membrana diana por el TL lleve a la inhibición de la actividad de la sPLA₂. Así, en un segundo conjunto de experimentos se verificó el efecto de la adición de TL en el sustrato de la membrana diana sobre la actividad de sPLA₂.

La Figura IV.5 muestra las curvas de actividad de sPLA₂ nativa sobre SUV de DOPC y SUV de DOPC que contenían proporciones crecientes de TL. La concentración de TL se mantuvo a una proporción por debajo del 10% para asegurar que la estructura de la bicapa se mantuviera intacta (Aranda y *col*, 2007). Se observó que el aumento de la proporción de TL en la membrana diana daba lugar a una disminución progresiva de la velocidad inicial de la actividad sPLA₂ y de la extensión de formación de producto. En este caso, a diferencia de los resultados anteriores de preincubación, la inhibición fue rápida, indicando por lo tanto que no se debía a un efecto sobre la estructura de la proteína, sino muy probablemente a una alteración del sustrato.

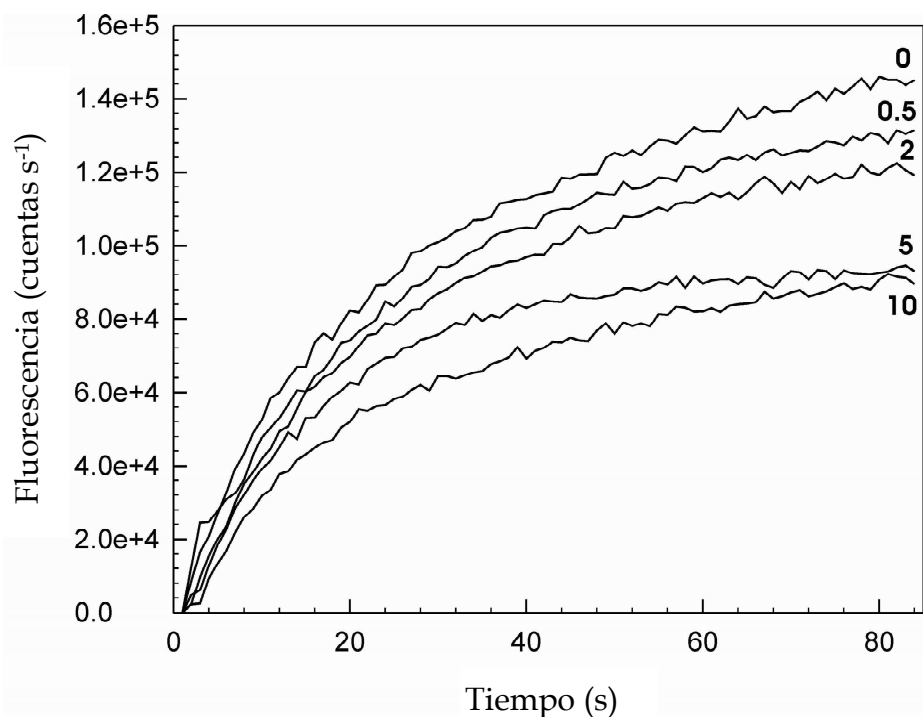


Figura IV.5. Actividad de sPLA₂ sobre membranas de DOPC que contienen trealosalípido. sPLA₂ se añadió a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a una cubeta que contenía SUV de DOPC y SUV de DOPC con 0.5, 2, 5, y 10 moles% de trealosalípido (números a la derecha de las curvas), a una concentración fosfolipídica total de 40 μM . Los experimentos se llevaron a cabo a 25°C bajo agitación continua.

La Figura IV.6A muestra las curvas michaelianas de la velocidad inicial frente a la concentración de DOPC, tanto para DOPC puro como para DOPC que contenía de 0.5 a 10 moles% de TL, alcanzando la saturación en todos los casos a una concentración de DOPC alrededor de 40 μM . La naturaleza competitiva de la inhibición por TL de la sPLA₂ pancreática se puso de manifiesto a partir de las gráficas de dobles recíprocos (Figura IV.6B), en los que la V_m no cambió con el aumento de concentración de TL mientras que K_m aparente fue aumentando, lo que indicaba una disminución de la afinidad de sPLA₂ hacia las membranas lipídicas que contenían TL.

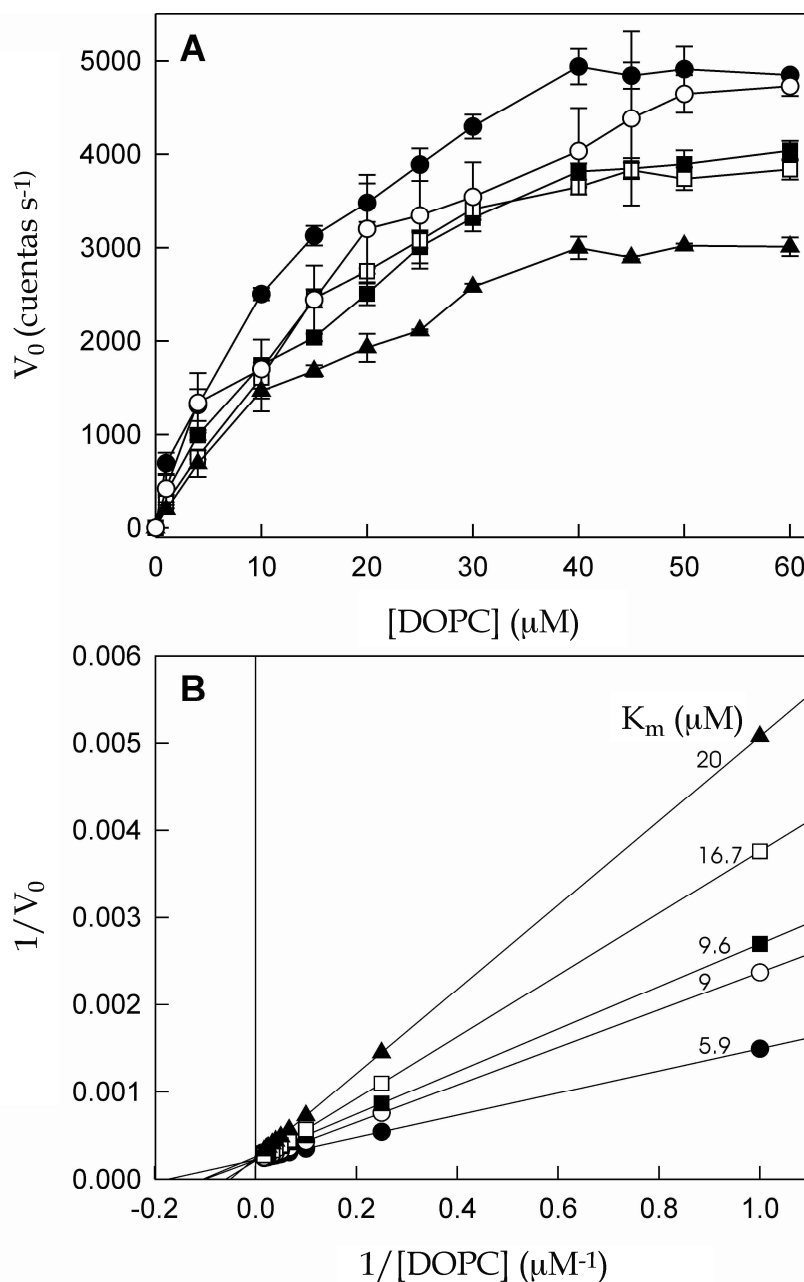


Figura IV.6. Efecto del trehalolípido incorporado en la membrana sobre la actividad de sPLA₂. (A) Dependencia de la velocidad inicial de la actividad de sPLA₂ con la concentración de sustrato (DOPC) para SUV compuestas de DOPC puro (\bullet), y DOPC que contiene 0.5 (\circ), 2 (\blacksquare), 5 (\square), y 10 (\blacktriangle) moles% de trehalolípido. Todas las muestras contienen la sonda BODIPY-PC como se explica en el texto. (B) Gráficas de dobles recíprocos para los datos que se muestran en el panel A. La concentración de sPLA₂ fue 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y la temperatura de 25°C. Los valores de la K_m (μM) se dan en las curvas. Los datos corresponden a tres experimentos independientes. Las barras de error, correspondientes al error estándar, se muestran cuando son mayores que los símbolos.

5. CONCLUSIONES

En este capítulo se han mostrado dos modelos de inhibición de la actividad de la sPLA₂ pancreática por el TL de *Rhodococcus erythropolis*: i) una interacción directa del TL con la enzima, la cual induce cambios conformacionales en la misma que conducen a la inhibición de la actividad enzimática, como se ha mostrado tanto por fluorescencia como por FTIR; y ii) una inhibición competitiva por modificación del sustrato.

La inhibición de la actividad de la sPLA₂ por TL se produce por debajo de la CMC del TL indicando claramente que es el monómero del glicolípido el que interactúa con la proteína, y que no son las propiedades detergentes de las micelas las que modifican la actividad de la sPLA₂. Recientemente hemos demostrado que las interacciones TL/proteína son altamente dependientes de la estructura secundaria de las proteínas, presentando un efecto de desnaturalización solamente en proteínas con alto contenido en hojas- β , como Citocromo-c (Zaragoza y col, 2012). Los resultados del efecto de TL sobre la estructura secundaria de sPLA₂ están de acuerdo con estos datos. De este modo, el Citocromo-c nativo, que tiene un mayor contenido de estructura β (39.2%) (Zaragoza y col, 2012) que la sPLA₂ pancreática (26.4%), se ve más afectado por la interacción con TL que la sPLA₂. Según los datos de FTIR, los cambios conformacionales observados pueden ser asociados principalmente con la porción de hoja- β de la molécula de sPLA₂. Como el Citocromo-c es una proteína no enzimática, los resultados presentados ahora sobre la inhibición de la actividad de sPLA₂ permiten establecer que los cambios conformacionales en proteínas inducidos por el TL pueden dar lugar a la inhibición de la actividad enzimática.

Se manejan dos ideas generales sobre cómo influye el estado físico de la membrana diana sobre la actividad de las fosfolipasas A₂. Por un lado, es un hecho que la fosfolipasa A₂ prefiere bicapas segregadas lateralmente y heterogeneidad lipídica en lugar de bicapas fluidas y homogéneas (Carrier y col, 1998; Burack y. Biltonen, 1994); y por otro, es bien sabido que la calidad de la interfase es crítica para la catálisis interfacial, como la llevada a cabo por la fosfolipasa A₂ (Raghupathi y Franson, 1992). Nuestros resultados han demostrado que los TLs llevan a cabo ambas

acciones: disminuyen la temperatura de transición de fase de gel a líquido-cristalino de las membranas de DOPC, e inducen la formación de dominios, y también dan lugar a una fuerte deshidratación de la interfase lípido/agua (Aranda y *col*, 2007). Por tanto, parece que debe ser la alteración de la interfase de la membrana la que prevalece para la inhibición de la actividad sPLA₂ que hemos descrito aquí, mientras que la formación de dominios ricos en TL debería ser menos relevante. Una inhibición similar de la fosfolipasa A₂ fue demostrada anteriormente para ácidos grasos *cis*-insaturados (Raghupathi y Franson, 1992) y la hidroquinona glicosilada arbutina (Oliver y *col*, 1996).

Los TLs se han descrito como inhibidores de la actividad de la proteína quinasa C *in vivo*, una enzima que requiere de la interacción con la membrana para su activación. Se sugirió que es la interacción del biotensioactivo con la membrana diana la que regula la actividad enzimática disminuyéndola (Isoda y *col*, 1997). Aquí hemos demostrado que el TL también regula la actividad de la sPLA₂ pancreática, disminuyéndola a través de la modulación de las propiedades físicas de la membrana fosfolipídica diana. Debemos mencionar que nuestro grupo ha obtenido también datos experimentales que indican que el TL inhibe la bomba de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico, una proteína integral de membrana (no mostrado). Todos estos resultados proporcionan una fuerte evidencia de la importancia de los cambios estructurales y funcionales inducidos tras la incorporación de TLs en bicapas fosfolipídicas, lo que constituye la base molecular de las interesantes actividades biológicas descritas para este compuesto.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aranda F.J., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Palacios-Lidón E., Ortiz A. (2007). Domain formation by a *Rhodococcus* sp. biosurfactant trehalose lipid incorporated into phosphatidylcholine membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1768: 2596-2604.
- Asselineau C., Asselineau J. (1978). Trehalose-containing glycolipids, *Prog. Chem. Fats other Lipids* 16: 59-99.
- Barenholz Y., Gibbes D., Litman B.J., Goll J., Thompson T.E., Carlson F.D. (1977), A simple method for the preparation of homogeneous phospholipid vesicles, *Biochemistry* 16: 2806-2810.
- Böttcher C.J.F., Van Gent C.M., Pries C. (1961). A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination, *Anal. Chim. Acta* 24: 203-204.
- Burack W.R., Biltonen R.L. (1994), Lipid bilayer heterogeneities and modulation of phospholipase A₂ activity, *Chem. Phys. Lipids* 73: 209-222.
- Cameotra S.S., Makkar R.S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 520-529.
- Cameron D.G., Moffatt D.J. (1984). Deconvolution, derivation, and smoothing of spectra using fourier transforms, *J. Test. Eval.* 12: 78-85.
- Carrier D, Khalil M.B., Kealey A. (1998). Modulation of phospholipase A₂ activity by aminoglycosides and daptomycin: a Fourier transform infrared spectroscopic study, *Biochemistry* 37: 7589-7597.
- Chirgadze Y.N., Fedorov O.V., Trushina N.P. (1975). Estimation of amino acid residue side-chain absorption in the infrared spectra of protein solutions in heavy water, *Biopolymers* 14: 679-694.
- Desai J.D., Banat I.M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiol. Mol. Biol.* 61: 47-64.
- Dijkstra B.W., Kalk K.H., Hol W.G.J., Drenth J. (1981) Structure of bovine pancreatic phospholipase A₂ at 1.7 Å resolution, *J. Mol. Biol.* 147: 97-123.
- García-García H.M., Serruys W.P. (2009). Phospholipase A₂ inhibitors, *Curr. Opin. Lipidology* 20: 327-332.
- Gelamo E.L., Tabak M. (2000). Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants, *Spectrochim. Acta part A* 56: 2255-2271.
- Grau A., Ortiz A. (1998), Dissimilar protection of tocopherol isomers against membrane hydrolysis by phospholipase A₂, *Chem. Phys. Lipids* 91: 109-118.
- Isoda H., Kitamoto D., Shinmoto H., Matsumura M., Nakahara T. (1997). Microbial extracellular glycolipid induction of differentiation and inhibition of protein kinase C activity of human promyelocytic leukaemia cell line HL-60, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 609-614.

- Kauppinen J.K., Moffatt D., Mantsch H.H., Cameron D.G. (1981). Fourier transforms in the computation of self-deconvoluted and first-order derivative spectra of overlapped band contours, *Anal. Chem.* 53: 1454-1457
- Kennedy D.F., Slotboom A.J., de Haas J.H., Chapman D. (1990). A Fourier transform infrared spectroscopic (FTIR) study of porcine and bovine pancreatic phospholipase A₂ and their interaction with substrate analogues and a transition-state inhibitor, *Biochim. Biophys. Acta*, 1040: 317-326.
- Kong J., Yu S. (2007). Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures, *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)* 39: 549-559.
- Jackson M., Mantsch H.H. (1995). The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 95-120.
- Lambeau G., Gelb M.H. (2008) Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A₂, *Annu. Rev. Biochem.* 77: 495-520.
- Lang S., Philp J.C. (1998). Surface-active compounds in *Rhodococci*, *Antonie van Leeuwenhoek* 74: 59-70.
- Lange R., Anzenbacher P., Müller S., Maurin L., Balny C. (1994). Interaction of tryptophan residues in cytochrome P450_{sc} with a fluorescence quencher, *Eur. J. Biochem.* 226: 963-970.
- Le Gal J.M., Manfait M. (1990). Conformational changes of human serum albumin in vivo induced by free fatty acids as studied by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* 1041: 257-263.
- Magrioti V., Kokotos G. (2010), Phospholipase A₂ inhibitors as potential therapeutic agents for the treatment of inflammatory disease, *Expert Opin. Ther. Patents* 20: 1-18.
- Murakami M., Kudo I. (2002). Phospholipase A₂, *J. Biochem.* 185: 263-270.
- Murayama K., Tomida M. (2004), Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry* 43: 11526-11532.
- Oliver A.E., Crowe L.M., de Araujo P.S., Fisk E., Crowe J.H. (1996), Arbutin inhibits PLA₂ in partially hydrated model systems, *Biochim. Biophys. Acta* 1302: 69-78.
- Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Aranda F.J. (2008). Interactions of a *Rhodococcus* sp. biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylethanolamine membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1778: 2806-2813.
- Ortiz A., Teruel J.A., Espuny M.J., Marqués A., Manresa A., Aranda F.J. (2009). Interactions of a bacterial biosurfactant trehalose lipid with phosphatidylserine membranes, *Chem. Phys. Lipids* 158: 46-53.
- Ortiz A., Teruel J.A., Manresa A., Espuny M.J., Marqués A., Aranda F.J. (2011), Effects of a bacterial trehalose lipid on phosphatidylglycerol membranes, *Biochim. Biophys. Acta* 1808: 2067-2072.

- Panuszko A., Bruzdziak P., Zielkiewicz J., Wyrzykowski D., Stangret J. (2009), Effects of urea and trimethylamine-N-oxide on the properties of water and the secondary structure of hen egg white lysozyme, *J. Phys. Chem. B* 113: 14797-14809.
- Puijk W.C., Verheij H.M., Wietzes P., de Haas G.H. (1979). The amino acid sequence of the phospholipase A₂ isoenzyme from porcine pancreas, *Biochim. Biophys. Acta* 580: 411-415.
- Raghupathi R., Franson R.C. (1992). Inhibition of phospholipase A₂ by *cis*-unsaturated fatty acids: evidence for the binding of fatty acid to the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta* 1126: 206-214.
- Schaloske R.H., Dennis E.A. (2006). The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system, *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 1246-1259.
- Schlamadinger D.E., Kats D.I., Kim J.E. (2010). Quenching of tryptophan fluorescence in unfolded cytochrome c: A biophysics experiment for physical chemistry students, *J. Chem. Educ.* 87: 961-964.
- Singh P., Cameotra S.S. (2004) Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences, *Trends Biotechnol.* 22: 142-146.
- Subramaniam R., Dufreche S., Zappi M., Bajpai R. (2010.) Microbial lipids from renewable resources: production and characterization, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37: 1271-1287.
- Ye M., Zhang Q.L., Li H., Weng Y.X., Wang W.C., Qiu X. (2007). Infrared spectroscopic discrimination between the loop and α -helices and determination of the loop diffusion kinetics by temperature-jump time-resolved infrared spectroscopy for cytochrome c, *Biophys. J.* 93: 2756-2766.
- Zaragoza A., Aranda F.J., Espuny M.J., Teruel J.A., Marqués A., Manresa A., Ortiz A. (2009). Mechanism of membrane permeabilization by a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp., *Langmuir* 25: 7892-7898.
- Zaragoza A., Aranda F.J., Espuny M.J., Teruel J.A., Marqués A., Manresa A., Ortiz A. (2010). Hemolytic activity of a bacterial trehalose lipid biosurfactant produced by *Rhodococcus* sp.: evidence for a colloid-osmotic mechanism, *Langmuir* 26: 8567-8572.
- Zaragoza A., Aranda F.J., Espuny M.J., Teruel J.A., Marqués A., Manresa A., Ortiz A. (2012). Interaction of a *Rhodococcus* sp. trehalose lipid biosurfactant with model proteins: thermodynamic and structural changes, *Langmuir* 28: 1381-1390.
- Zhang J., Yan Y. (2005). Probing conformational changes of proteins by quantitative second-derivative infrared spectroscopy, *Anal. Biochem.* 340: 89-98.

CONCLUSIONES GENERALES

- 1) El trealosalípido producido por *Rhodococcus sp.* actúa como un detergente débil, prevaleciendo su inserción en la membrana sobre la micelización de la misma, lo cual conduce a la permeabilización de la bicapa sin su solubilización. El trealosalípido induce la formación de dominios que podrían constituir defectos en la membrana, actuando como poros selectivos al tamaño.
- 2) Se requieren movimientos de *flip-flop* del trealosalípido para la adecuada inserción del biotensioactivo en la bicapa antes de la formación de los poros de permeabilización.
- 3) La composición lipídica de la membrana modula el efecto del trealosalípido, el cual actúa como una molécula con forma molecular de cono invertido. Así, el colesterol inhibe fuertemente la salida de contenidos vesiculares inducida por trealosalípido, lo que puede tener una gran relevancia dado las grandes diferencias en los contenidos de colesterol entre membranas bacterianas y de mamíferos.
- 4) El succinil trealosalípido biotensioactivo producido por *Rhodococcus sp.* causa la hemólisis de eritrocitos humanos a través de un mecanismo coloid-osmótico. Este comportamiento tipo poro se puede explicar por la formación de dominios de permeabilidad en la membrana eritrocitaria, como se ha observado en membranas modelo.
- 5) Los cambios morfológicos en las células sanguíneas después de la incubación con trealosalípido incluyen esferocitosis y equinocitosis, y pueden ser explicados por la hipótesis del acoplamiento de bicapas.
- 6) Se puede derivar de nuestros resultados que la interacción de trealosalípido con proteínas ricas en α -hélice (como BSA) protege frente a la desnaturalización térmica, mientras que la interacción con proteínas con un mayor contenido en hojas- β (como Cit-c) facilita la desnaturalización térmica. El hecho de que el trealosalípido afecte más fuertemente a proteínas desnaturalizadas que a las nativas puede sugerir que existe una interacción preferente con dominios hidrofóbicos, los cuales se encuentran enterrados en la estructura nativa y se exponen tras la desnaturalización.

- 7) Se han demostrado dos modelos de inhibición de la actividad enzimática de la sPLA₂ pancreática por el trealosalípido de *Rhodococcus erythropolis*: i) una interacción directa del trealosalípido con la enzima la cual induce cambios conformacionales en la misma que conducen a la inhibición de la actividad enzimática, como se muestra por fluorescencia y FTIR; y ii) una inhibición competitiva por modificación del sustrato.
- 8) La inhibición de la actividad de la sPLA₂ por trealosalípido se produce por debajo de la CMC del biotensioactivo indicando que es el monómero de glicolípido el que interactúa con la proteína.

ANEXO (Indice de figuras y tablas)

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1. | Consumo mundial de tensioactivos en las áreas de mayor aplicación. | 3 |
| Figura 2. | Representación esquemática de un tensioactivo donde se muestra la cabeza polar y la cola hidrofóbica. | 4 |
| Figura 3. | Representación esquemática del comportamiento de un tensioactivo en disolución acuosa. | 8 |
| Figura 4. | Diagrama de fase Temperatura-Concentración. | 11 |
| Figura 5. | Representación de la acción de detergencia de los tensioactivos. | 13 |
| Figura 6. | Estabilización de sistemas espumógenos por acción de tensioactivos. | 14 |
| Figura 7. | Representación esquemática de las microestructuras más comunes de microemulsiones. | 14 |
| Figura 8. | Ejemplos de diferentes estructuras de biotensioactivos. | 17 |
| Figura 9. | Estructura química de algunos trealosalípidos. | 25 |
| Figura 10. | Vía biosintética del trealosa dimicolato. | 28 |
| Figura 11. | A) Modelo de mosaico fluido. B) Balsas lipídicas. | 35 |
| Figura 12. | Estructura de un fosfoglicérido. | 37 |
| Figura 13. | Ejemplos de fosfolípidos presentes en la membrana. | 38 |
| Figura 14. | Estructura del colesterol. | 40 |
| Figura 15. | Disposición molecular para las diferentes fases lamelares. | 42 |
| Figura 16. | Formación de liposomas en un medio acuoso. | 46 |
| Figura 17. | Representación esquemática de la formación de vesículas multilamelares (MLV); vesículas unilamelares grandes (LUV) y vesículas unilamelares pequeñas (SUV). | 47 |
| Figura 18. | Representación de los mecanismos de solubilización. | 49 |

TÉCNICAS GENERALES

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 19. | Representación esquemática de un haz monocromático. | 67 |
| Figura 20. | Diagrama de niveles de energía de un átomo o molécula. Muestra los cambios producidos cuando la partícula absorbe energía. | 68 |
| Figura 21. | Atenuación de la intensidad del haz por pérdidas de dispersión y reflexión. | 69 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 22. | Esquema de un espectrofotómetro | 71 |
| Figura 23. | Diferentes tipos de modos vibracionales teniendo en cuenta cambios en la longitud del enlace y en el ángulo de enlace. | 72 |
| Figura 24. | Representación de los componentes de un Espectrómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier. | 73 |
| Figura 25. | Localización de las bandas de absorción más importantes dentro del infrarrojo medio. | 75 |
| Figura 26. | Diagrama de niveles de energía de un átomo o molécula. Muestra los cambios producidos cuando la partícula emite energía. | 78 |
| Figura 27. | Esquema de un espectrofluorímetro. | 78 |
| Figura 28. | Representación de un pico endotérmico. | 81 |
| Figura 29. | Representación esquemática de la situación de las celdas y la inyección de valorante en un calorímetro isotérmico de titulación. | 83 |
| Figura 30. | Gráficos correspondientes a las isotermas de unión macromolécula-ligando (arriba) y curva normalizada de entalpía de unión frente fracción molar de ligando unido a la proteína (debajo). | 85 |
| Figura 31. | Diagramas de fuerzas al ir elevando el anillo de la muestra en medidas de tensión superficial mediante el método de Du Noüy. | 86 |

CAPÍTULO I

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Figura I.1. | Estructura química del trealosalípido de <i>Rhodococcus</i> sp. | 101 |
| Figura I.2. | Determinación de la CMC del trealosalípido por medidas de tensión superficial. | 102 |
| Figura I.3. | Determinación por ITC del reparto del trealosalípido en vesículas unilamelares de POPC. | 103 |
| Figura I.4. | (A) Salida de CF en función del tiempo (aumento de la intensidad de fluorescencia) en LUVs de POPC a varias concentraciones de TL. (B) Cambios en la turbidez (absorbancia a 400nm) en función del tiempo a varias concentraciones de TL. | 105 |
| Figura I.5. | Efecto de la adición de TL sobre la fluorescencia de FD4 atrapado en LUVs de POPC. | 106 |
| Figura I.6. | Experimentos con sondas fluorescentes para observar las etapas de interacción del trealosalípido con LUVs de POPC. | 109 |
| Figura I.7. | Efecto de la composición de la membrana sobre la velocidad inicial de salida de CF de LUVs inducida por TL. | 111 |

CAPÍTULO II

| | | |
|---------------------|---|-----|
| Figura II.1. | Dependencia de la hemólisis eritrocitaria con la concentración de TL. | 127 |
| Figura II.2. | Salida de hemoglobina desde eritrocitos humanos, inducida por el trealosalípido en función del tiempo. | 129 |
| Figura II.3. | Panel A: salida de K ⁺ de eritrocitos humanos inducida por trealosalípido. Panel B: cinética relativa de la salida de hemoglobina y K ⁺ inducidas por trealosalípido. | 131 |
| Figura II.4. | Hemólisis de eritrocitos humanos inducida por trealosalípido en presencia de protectores osmóticos. | 133 |
| Figura II.5. | Efecto del trealosalípido en la morfología de los eritrocitos humanos. | 135 |

CAPÍTULO III

| | | |
|----------------------|---|-----|
| Figura III.1. | Termogramas de DSC para la desnaturalización térmica de BSA en ausencia y presencia de TL. | 151 |
| Figura III.2. | Termogramas de DSC para la desnaturalización térmica de Cit-c en ausencia y presencia de TL. | 153 |
| Figura III.3. | Determinación por ITC de la unión de TL a BSA. Se muestra el calor de inyección por mol de TL inyectado en función de la relación molar TL/BSA en la celda del calorímetro. | 155 |
| Figura III.4. | Banda amida I' de la BSA nativa a 25°C en ausencia (A) y presencia de TL (C); y BSA incubada a 70°C en ausencia (B) y presencia de TL (D). | 158 |
| Figura III.5. | Banda amida I' de Cit-c nativo a 25°C en ausencia (A) y presencia de TL (C); y Cit-c incubado a 90°C en ausencia (B) y presencia de TL (D) | 161 |
| Figura III.6. | Efecto del TL en la fluorescencia intrínseca del Trp de BSA. | 163 |
| Figura III.7. | Efecto del TL en la fluorescencia intrínseca del Trp de Cit-c. | 165 |

CAPÍTULO IV

| | | |
|---------------------|--|-----|
| Figura IV.1. | Efecto de preincubación con trealosalípido en la actividad de sPLA ₂ . | 183 |
| Figura IV.2. | Efecto de la concentración de trealosalípido y tiempo de preincubación en la actividad de sPLA ₂ . | 184 |
| Figura IV.3. | Gráfica de Stern-Volmer para la atenuación de fluorescencia de sPLA ₂ por acrilamida en ausencia y presencia de trealosalípido. | 186 |
| Figura IV.4. | Banda amida I' de sPLA ₂ antes y después de la preincubación con trealosalípido. | 187 |

| | | |
|---------------------|---|-----|
| Figura IV.5. | Actividad de sPLA2 en membranas de DOPC que contienen trealosalípido. | 190 |
| Figura IV.6. | Efecto del trealosalípido de membrana en la actividad de sPLA2. | 191 |

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

| | | |
|-----------------|---|----|
| Tabla 1. | Estructura molecular de los tensioactivos. | 4 |
| Tabla 2. | Tipos de tensioactivo según la naturaleza de su grupo polar. | 5 |
| Tabla 3. | Aplicaciones generales de los tensioactivos en base a su HLB. | 9 |
| Tabla 4. | Agregados de tensioactivo dependiendo del parámetro de empaquetamiento crítico. | 12 |
| Tabla 5. | Clasificación de los biotensioactivos según su grupo polar y microorganismos productores más representativos. | 16 |
| Tabla 6. | Aplicaciones potenciales de los biotensioactivos. | 21 |
| Tabla 7. | Propiedades de diferentes biotensioactivos producidos por el género <i>Rhodococcus</i> . | 26 |
| Tabla 8. | Posibles aplicaciones de trealosalípidos en diferentes campos. | 32 |
| Tabla 9. | Tendencia de los lípidos a adoptar una determinada fase en relación a la forma molecular dinámica y la curvatura. | 44 |

TÉCNICAS GENERALES.

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabla 10. | Asignación de bandas a diferentes estructuras secundarias. | 76 |
|------------------|--|----|

CAPÍTULO III.

| | | |
|---------------------|--|-----|
| Tabla III.1. | Estructura secundaria de BSA y Cit-c nativos y desnaturalizados (0.2mM) en ausencia y presencia de TL (0.5mM) determinada por FTIR. | 159 |
| Tabla III.1. | Constantes de fluorescencia dinámica (K_1 , K_2) y contribución fraccional de los correspondientes componentes (f_1 , f_2) para la atenuación de la fluorescencia por acrilamida de BSA y Cyt-c bajo diferentes condiciones. | 166 |

CAPÍTULO V.

Tabla V.1. Estructura secundaria de la sPLA2 nativa y despues de su preincubación con trealosalípido 200 μM a diferentes tiempos determinada por FTIR.

188