

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

Neus Lozano Valdés

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

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

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



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



Tesi doctoral dirigida per:

Dra. Aurora Pinazo Gassol / Dr. Ramon Pons Pons

Neus Lozano Valdés

Barcelona, Gener 2010

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

Bienni 2005-2007

*4. Síntesi dels
Diacilglicerols d'Arginina XXRAc*

Reproduint la síntesi descrita per [Perez L i col., 2004a], s'han sintetitzat dos tensioactius catiónics d'estructura glicerolípídica derivats de l'aminoàcid arginina, 1212RAc i 1414RAc (XXRAc). Abans de la descripció de la ruta sintètica i del procediment experimental, es descriuen a continuació les tècniques emprades en la síntesi d'aquests diacilglicerols d'arginina.

➤ *Tècniques utilitzades en la síntesi dels diacilglicerols d'arginina XXRAc*

Tècniques cromatogràfiques

Les tècniques cromatogràfiques es basen en les diferents afinitats que tenen les substàncies per la fase mòbil i estacionària, que donen com a resultat diferents velocitats de migració.

▪ *Cromatografia de capa fina (CCF)*

La cromatografia de capa fina és una tècnica analítica utilitzada per a la separació i caracterització dels components d'una mescla. Les seves aplicacions inclouen la determinació de la puresa d'un compost, el seguiment d'una reacció i la determinació de la composició d'una mescla.

La CCF s'ha realitzat en cromatofol·lis de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄, fent servir un indicador de fluorescència. La velocitat de migració (factor de retenció, R_f) depèn tant de la polaritat relativa de les substàncies com de la polaritat de la fase mòbil emprada (o eluent). La fase mòbil que s'ha utilitzat és cloroform/metanol 7:3 (v/v).

Els reveladors de capa fina emprats [Merck E, 1972], en funció dels grups funcionals dels components a caracteritzar, són els següents:

- Cl₂ / *o*-toluidina: revelador d'amides, prèviament transformades en cloramides en una atmosfera de clor.
- Verd de bromocresol: revelador d'àcids.

▪ *Cromatografia d'adsorció en columna (CC)*

La cromatografia d'adsorció en columna té com a finalitat la separació de diferents compostos d'una mescla per diferència de polaritats. La fase estacionària que s'ha utilitzat és el gel de sílice (SiO₂) i ha estat compactada amb cloroform. Com a fase mòbil, s'han emprat gradients de polaritat creixents de la mescla cloroform/metanol.

▪ **Cromatografia líquida d'alta eficàcia analítica (HPLC)**

Per determinar tant l'avanç de la reacció com el grau de puresa dels productes de síntesi, s'ha utilitzat la cromatografia líquida d'alta eficàcia.

S'ha utilitzat com a fase estacionària la columna Lichrospher 100 CN (propilciano) de 5 µm, de dimensions 250×4 mm, obtenint uns temps de retenció (t_R) característics per cada compost, en funció de la polaritat de la fase mòbil emprada.

Les condicions de treball han estat les següents:

- *Fase mòbil:* *fase A:* aigua / 0.1% àcid trifluoroacètic (TFA)
fase B: acetonitril / aigua 4:1 + 0.085% TFA
- *Longitud d'ona de detecció:* 215 nm
- *Gradient de la fase mòbil:* A la Taula 1 es mostren els dos gradients de polaritat decreixent emprats en la cromatografia líquida d'alta eficàcia analítica: el gradient A s'ha utilitzat per controlar l'avanç de la reacció mentre que el gradient B s'ha utilitzat per determinar el grau de puresa dels productes de síntesi.

Taula 1. Gradients de polaritat decreixent emprats com a fase mòbil en la cromatografia líquida d'alta eficàcia analítica.

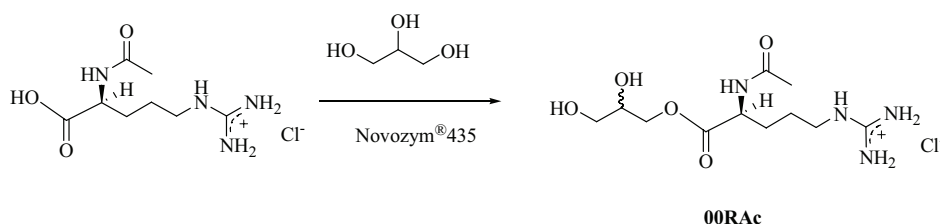
<i>Gradient</i>	<i>temps, min</i>	<i>flux, ml/min</i>	<i>% fase A</i>	<i>% fase B</i>
<i>A</i>	0	1	75	25
	24	1	5	95
	27	1	5	95
<i>B</i>	0	1	50	50
	13	1	5	95
	16	1	5	95

Espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN)

L'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear ha permès tant controlar el progrés de la reacció com caracteritzar estructuralment els productes resultants de la mateixa. En ambdós casos s'han realitzat mesures tant de ressonància de protó (^1H -RMN) com de carboni (^{13}C -RMN). S'ha emprat el senyal del solvent, metanol deuterat, com a senyal de referència.

➤ Ruta sintètica dels diacilglicerols d'arginina XXRAc

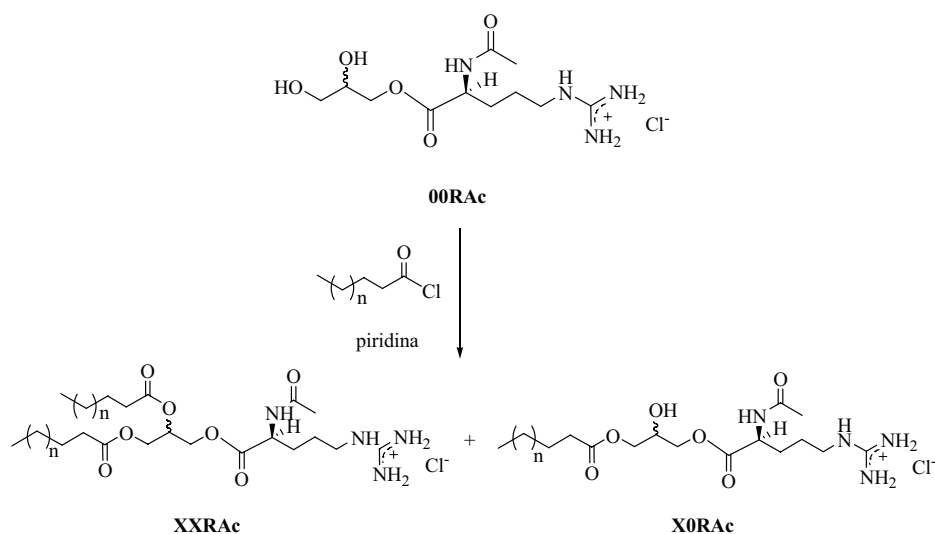
La ruta sintètica per l'obtenció dels tensioactius catiónics derivats dels diacilglicerols d'arginina acetilats (XXRAc) consta de dues etapes. La primera etapa consisteix en la condensació del grup carboxílic del clorhidrat de la N^α -acetil-L-arginina (producte comercial) amb una de les funcions primària del glicerol, formant-se un enllaç èster. Aquesta reacció s'ha dut a terme enzimàticament utilitzant el Novozym[®]435. El producte resultant és el clorhidrat de l'1-O-(N^α -acetil-L-argininil) glicerol* (00RAc) [Moran C i col., 2001], Esquema 4.



Esquema 4. Síntesi enzimàtica del clorhidrat de l'1-O-(N^α -acetil-L-argininil) glicerol (00RAc).

La segona etapa és una acilació dels dos grups hidroxils lliures del 00RAc amb el clorur d'àcid corresponent, donant lloc a la mescla mono- (X0RAc)/diacilglicèrid (XXRAc) derivats d'arginina [Perez L i col., 2004a], Esquema 5.

* Aquest producte va ser sintetitzat al laboratori del Dr. Pere Clapés.



Esquema 5. Esquema general de la síntesi dels tensioactius derivats dels mono- (X0RAc) i diacilglicerols (XXRAc) d'arginina.

La ruta sintètica per l'obtenció dels dos tensioactius 1414RAc i 1212RAc és idèntica, l'única diferència és la longitud de cadena del clorur d'àcid que intervé en la segona etapa de reacció, ja que per a l'obtenció del 1414RAc s'utilitza el clorur d'àcid tetradecanoic (14 àtoms de carboni, $n = 10$) mentre que pel 1212RAc s'utilitza el clorur d'àcid dodecanoic (12 àtoms de carboni, $n = 8$).

➤ *Procediment experimental de la síntesi del diacilglicerol d'arginina 1414RAc*

A continuació es descriu el procediment experimental detallat de la segona etapa de síntesi del diacilglicerol d'arginina 1414RAc. Sobre una solució de 5.5295 g de 00RAc (0.0169 mols) en 100 ml de piridina, s'ha afegit poc a poc i amb agitació 10.6 ml de clorur d'àcid tetradecanoic (0.0391 mols). Després de diferents assaigs (veure Taula 2), la relació molar escollida de 00RAc:clorur d'àcid va ser de 1:2.3. La mescla de reacció s'ha mantingut en agitació durant 90 min. Després d'aquest temps, el percentatge de conversió ha estat satisfactori, obtenint el diacilglicerol com a producte majoritari.

L'evolució de la desaparició del producte de partida 00RAc, s'ha realitzat per CCF ($R_f(00RAc) = 0$) utilitzant el revelador d'amides Cl_2/ o -toluidina, mentre que el seguiment de la formació dels productes 140RAc (1-O-miristoil-*rac*-glicero-3-O-(N^α-acetil-L-arginina) i 1414RAc s'ha controlat per HPLC (gradient B).

Taula 2. Percentatge de formació del 140RAc i del 1414RAc a partir de les àrees integrades dels cromatogrames obtinguts per HPLC.

<i>Relació molar</i>	<i>% 140RAc</i>	<i>% 1414RAc</i>
<i>00RAc : clorur d'àcid</i>	<i>($t_R=17.3$ min)</i>	<i>($t_R=24.0$ min)</i>
1 : 1.0	90	10
1 : 1.9	69	31
1 : 2.3	55	45

La piridina, utilitzada com a solvent de la mescla de reacció, s'ha eliminat al buit, obtenint-se un residu d'aspecte oliós. El residu s'ha dissolt totalment en metanol i s'han realitzat extraccions amb èter de petroli, solubilitzant així l'àcid tetradecanoic residual en la fase etèria. Les extraccions s'han repetit fins que a la fase metanòlica no es detecta la presència d'àcid tetradecanoic. El control qualitatiu d'àcid residual s'ha realitzat per CCF, emprant com a revelador el verd de bromocresol ($R_f(\text{àcid tetradecanoic}) = 0.80$, $R_f(140RAc, 1414RAc) = 0$).

La fase metanòlica s'ha evaporat fins a sequedat, obtenint-se un residu oliós. Aquest residu s'ha dissolt en cloroform i s'ha sotmès a successives extraccions amb aigua per eliminar les impureses solubles en medi aquós, com és el cas de les sals de piridini (precipitat de color blanc). Finalment la fase orgànica, que conté majoritàriament cloroform, s'ha evaporat a sequedat i l'oli resultant s'ha dissolt en aigua, s'ha congelat i s'ha liofilitzat, obtenint així un cru de reacció format per una barreja de 140RAc/**1414RAc**/impureses i traces de piridina detectables a l'olfacte.

La purificació del 1414RAc s'ha dut a terme mitjançant la cromatografia d'adsorció en columna (Figura 34), degut a que els dos tensioactius a separar (140RAc i 1414RAc) presenten una polaritat diferenciada. Els gradients de polaritat creixent

que s'han emprat com a fase mòbil, s'especifiquen a la Taula 3, així com el producte/s eluït/s a cada fracció.

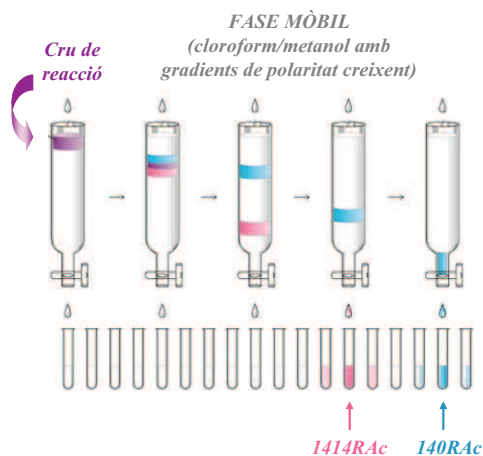


Figura 34. Il·lustració esquemàtica de la separació dels dos tensioactius mitjançant una columna d'adsorció en columna, gràcies a la diferent polaritat d'aquests.

El seguiment dels productes eluïts de la CC s'ha dut a terme mitjançant les següents tècniques:

- CCF (revelador d'amides: Cl_2 / *o*-toluidina)
 $R_f(140\text{RAc}) = 0.31$ / $R_f(1414\text{RAc}) = 0.53$
- HPLC (gradient A): $t_R(140\text{RAc}) = 9.1 \text{ min}$ / $t_R(1414\text{RAc}) = 14.1 \text{ min}$

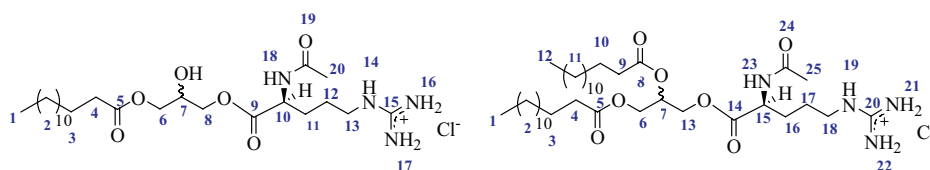
Taula 3. Gradients de polaritat creixents de cloroform/metanol utilitzats com a fase mòbil en la cromatografia d'adsorció en columna.

<i>Volum, l</i>	<i>% cloroform (v/v)</i>	<i>% metanol (v/v)</i>	<i>Producte eluït</i>
0.5	100	0	-
1	95	5	-
2	93	7	1414RAc
1	92	8	1414RAc
1	90	10	1414RAc / 140RAc
1	87	13	140RAc
2.5	85	15	140RAc
0.5	50	50	-

La diferent polaritat entre el tensioactiu mono- (140RAc) i diacilat (1414RAc) es basa únicament en el número de cadenes hidrocarbonades. Per aquest motiu, el 1414RAc ha estat el primer compost en eluir, i ho ha fet amb les fraccions més apolars de la fase mòbil (93:7 i 92:8). Mentre que el 140RAc ha estat l'últim en fer-ho, juntament amb les fraccions de la fase mòbil més polars (90:10 en endavant). Degut a que aquesta diferència de polaritats no és molt gran, s'han obtingut fraccions intermèdies amb mescles de tots dos tensioactius.

La caracterització química dels tensioactius sintètics 140RAc i 1414RAc, es detalla a la Taula 4.

Taula 4. Caracterització química dels tensioactius 140RAc i 1414RAc.



Tècnica	140RAc			1414RAc		
HPLC	Puresa > 99%			Puresa > 99%		
(gradient B)	(t _R =17.3 min)			(t _R =24.0 min)		
Anàlisi elemental	C (%)	H (%)	N (%)	C (%)	H (%)	N (%)
Experimental:	53.50	9.49	9.86	61.32	10.73	7.20
Calculat:	1.5 molec H ₂ O 52.23	9.29	9.93	1 molec H ₂ O 61.19	10.14	7.32
¹ H-RMN	0.89 [tr, 3H (1)]; 1.3 [m, 16H (2)]; 1.5-2 [m, 6H (3,11,12)]; 2.00 [s, 3H (20)]; 2.35 [tr, 2H (4)] 3.21 [m, 2H (13)]; 4.03-4.45 [m, 6H (10,8,6,7)].			0.90 [tr, 6H (1,12)]; 1.29 [m, 30H (2,11)]; 1.5-2 [m, 8H (16,17,3,10)]; 1.99 [s, 3H (25)]; 2.32 [tr, 4H (4,9)]; 3.21 [m, 2H (18)]; 4.15-4.43 [m, 5H (15,13,6)]; 5.29 [m, 1H (7)].		
¹³ C-RMN	14.48 (1); 22.37 (20); 53.43 (10); 65.86 (6) 66.75 (8); 68.27 (7); 158.58 (15); 172.98 (19); 173.45 (9); 175.21 (5).			14.49 (1,12); 22.35 (25); 53.34 (15); 63.29 (6); 64.08 (13); 70.44 (7); 158.60 (20); 172.43 (24); 172.73 (14); 173.46 (8); 174.74 (5).		

En el cromatograma HPLC del tensioactiu 1414RAc s'observen dos pics degut a la presència dels dos regioisòmers (cadenes hidrocarbonades en posició relativa 1,2- i 1,3-) com a conseqüència de la migració dels grups acil [Perez L i col., 2004a]. Mitjançant la relació d'àrees corresponents a cadascun dels productes, es pot calcular que el regioisòmer minoritari és present a la mescla en un 30%. L'espectre de ¹³C-RMN també proporciona aquesta informació gràcies a la possibilitat de poder integrar

els senyals, sent en aquest cas del 25%. Ha estat necessària l'addició d'un agent de relaxació paramagnètic acetilacetonat de crom (III) ($\text{Cr}(\text{acac})_3$) per tal d'igualar els temps de relaxació de totes les espècies. L'espectre s'ha enregistrat en presència d'un 10% en pes respecte a la concentració dels productes, sense que l'addició afectés a l'amplada dels senyals ni a la variació del desplaçament químic. En el cas del tensioactiu sintètic 140RAc, mitjançant HPLC, no es diferencien els tres possibles regioisòmers, mentre que amb la tècnica DEPT RMN sí que es podrien diferenciar [Perez L i col., 2004b].

Els espectres de ^1H -RMN i de ^{13}C -RMN del tensioactiu sintètic monoacilat 140RAc es mostren a la Figura 35 i Figura 36, respectivament.

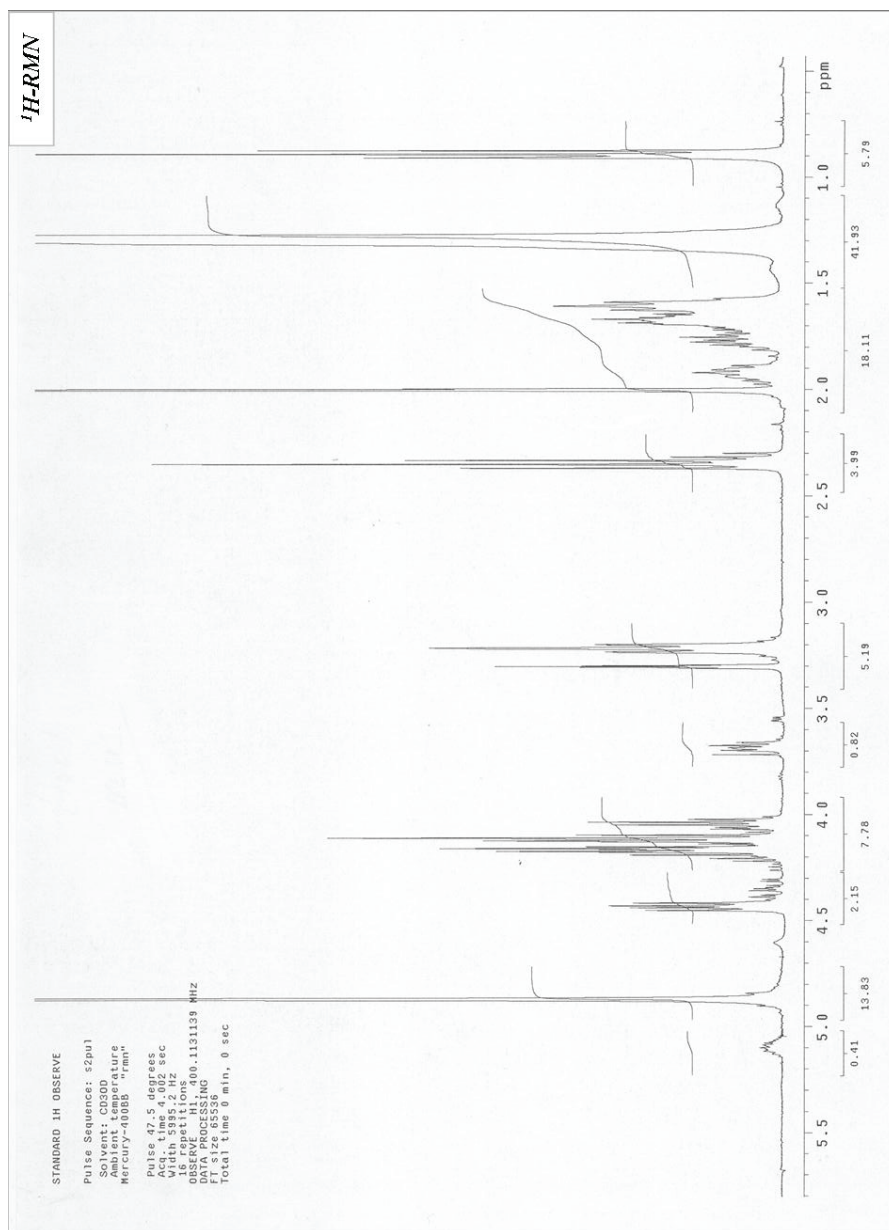


Figura 35. Espectre ^1H -RMN del tensioactiu sintètic monoacilat 140RAc.

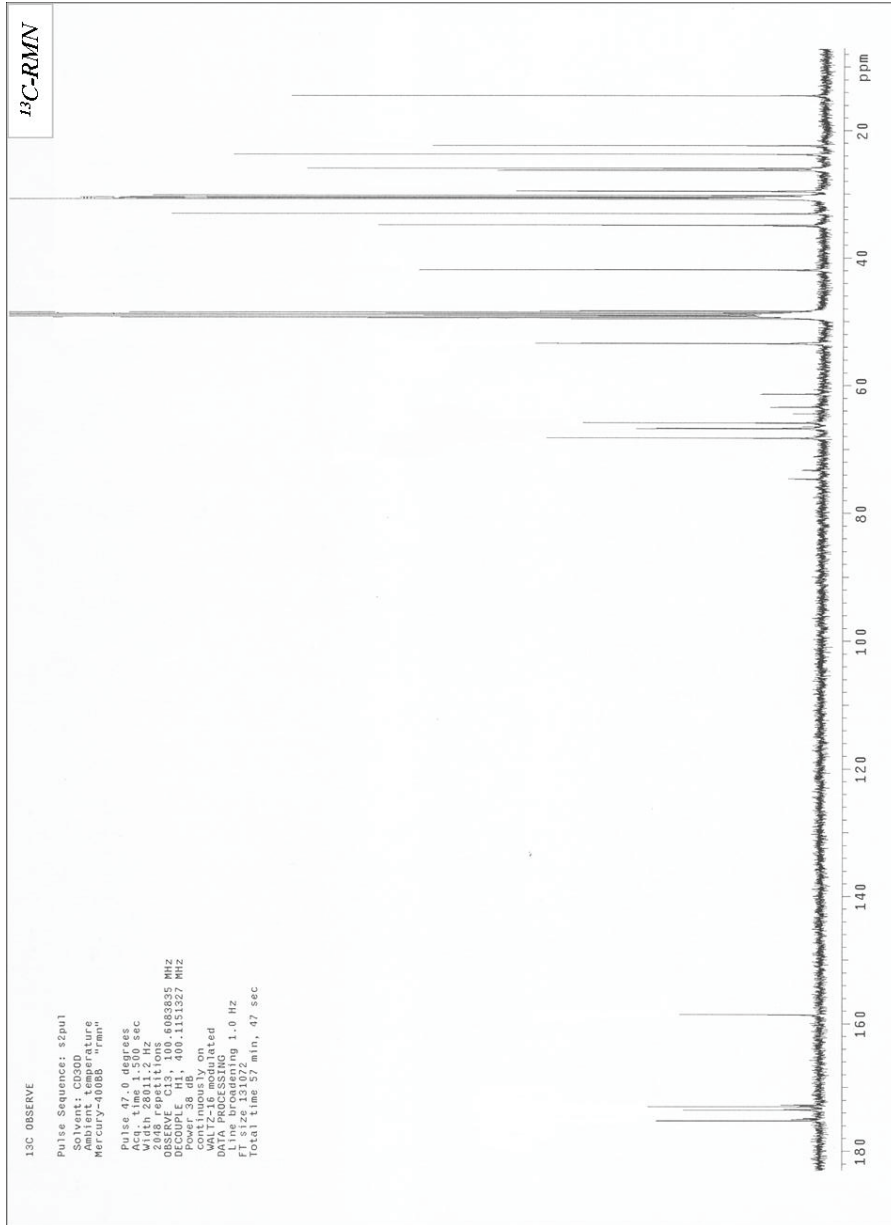


Figura 36. Espectre ¹³C-RMN del tensioactiu sintètic monoacilat 140RAc.

Els espectres de ^1H -RMN i de carboni ^{13}C -RMN del tensioactiu sintètic diacilat 1414RAc es mostren a la Figura 37 i Figura 38, respectivament.

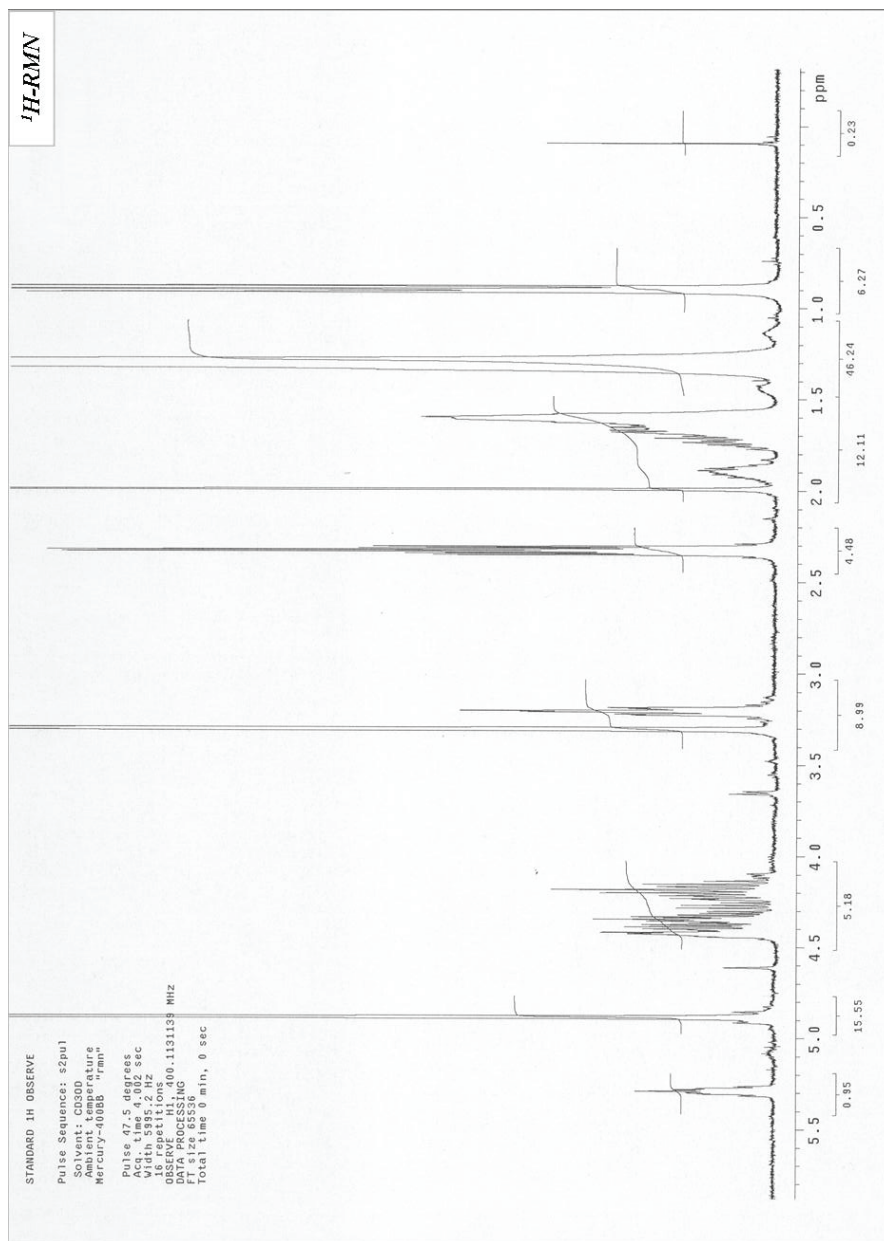


Figura 37. Espectre ^1H -RMN del tensioactiu sintètic diacilat 1414RAc.

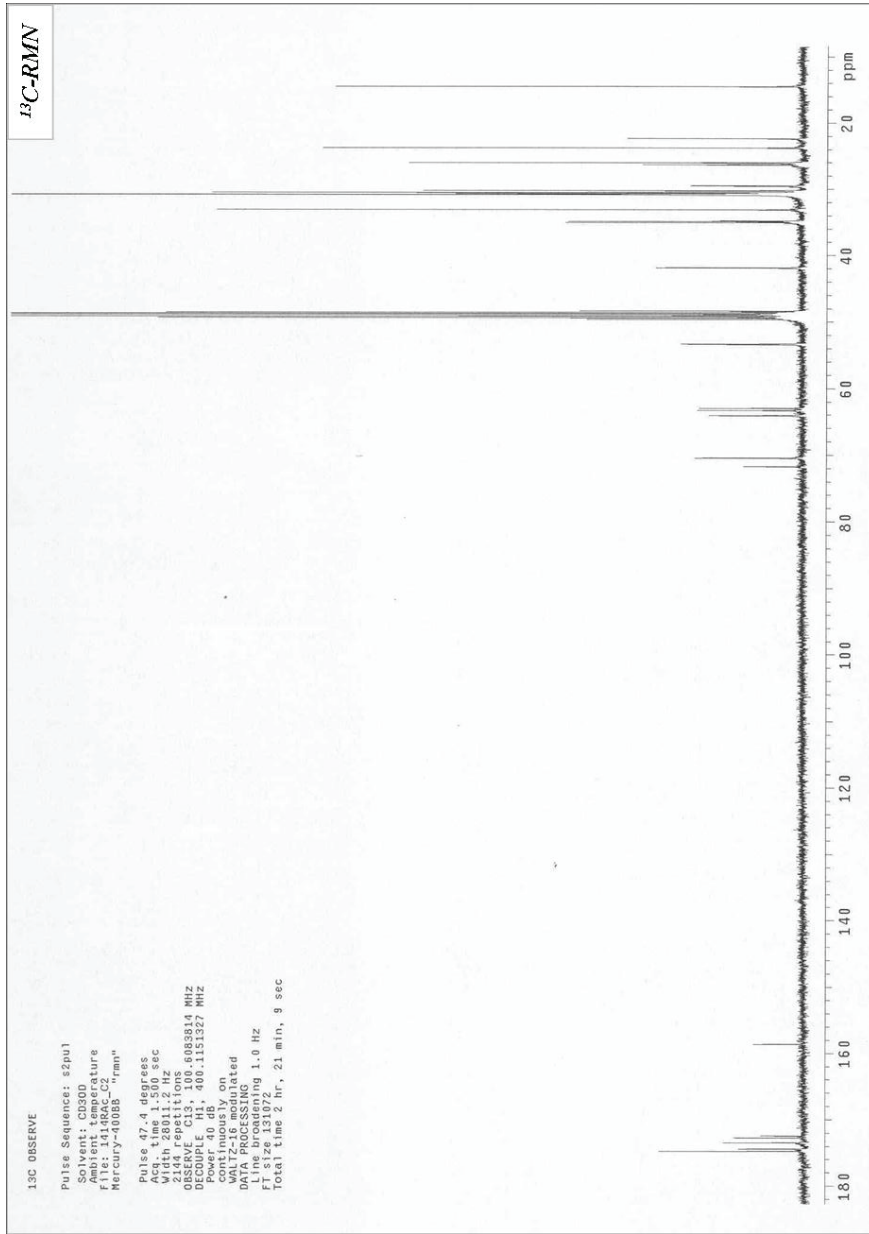
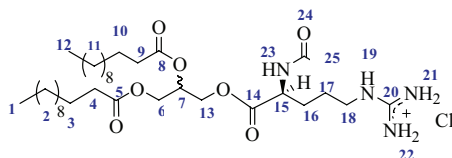


Figura 38. Espectre ¹³C-RMN del tensioactiu sintètic diacilat 1414RAc.

➤ **Caracterització química del diacilglicerol d'arginina 1212RAc**

El compost diacilat 1212RAc ha estat sintetitzat al nostre laboratori d'investigació, seguint el mateix esquema de síntesi descrit anteriorment pel tensioactiu 1414RAc. La caracterització química del tensioactiu sintètic 1212RAc es resumeix a la Taula 5.

Taula 5. Caracterització química del tensioactiu 1212RAc.



Tècnica		1212RAc			
HPLC		Puresa > 99.6%			
(gradient B)		(tr=20.6 min)			
Anàlisi elemental		C (%)	H (%)	N (%)	
Experimental:		59.39	9.70	7.83	
Calculat:		1.5 molec H ₂ O	59.24	9.73	7.90
¹ H-RMN		0.83 [tr, 6H (1,12)]; 1.1-1.7 [m, 32H (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12)]; 1.84 [s, 3H (25)]; 2.26 [tr, 4H (4,9)]; 3.09 [m, 2H (18)]; 4.01-4.3 [m, 5H (15,13,6)]; 5.19 [m, 1H (7)]; 7.17 [m, 4H (21,22)]; 7.86 [tr, 1H (19)]; 8.31 [d, 1H (23)].			
¹³ C-RMN		13.71 (1,12); 21.97 (25); 51.59 (6); 61.69 (15); 62.22 (13); 68.52 (7); 157.02 (20); 169.42 (24); 171.48 (14); 172.02 (8); 172.31 (5).			

➤ *Càlcul aproximat del cost sintètic dels diacilglicerols d'arginina XXRAc*

S'ha calculat de manera aproximada i a escala de laboratori, el cost que implica la síntesi dels diacilglicerols d'arginina XXRAc. La primera etapa de síntesi, via enzimàtica, ha suposat una despesa de 3 dies de treball, mentre que la síntesi de la segona etapa ha requerit de tres mesos de treball, amb un cost només de personal d'uns 3000 €/g XXRAc. Incrementant-li el cost dels dissolvents, productes de síntesi, etc., suposaria un cost global d'uns 5000 €/g XXRAc, o el que és el mateix, d'uns 5 €/mg XXRAc.

Un tensioactiu pulmonar d'origen natural, com per exemple el Curosurf (Chiesi Farmaceutici, Parma-Itàlia), en un vial monodosi de 120 mg/1.5 ml, conté aproximadament un 70% de fosfatidilcolines (84 mg), un 30% de fosfatidilglicerol (36 mg) i un 1% de cadascuna de les proteïnes recombinants SP-B i SP-C (2% de SP, 2.4 mg), en una suspensió del 0.9% de clorur sòdic. Aquest preparat comercial, d'ús hospitalari, té un preu de mercat de 320 €/dosi. A escala de laboratori, i a preu de catàleg de Sigma pels fosfolípids DPPC (100 mg, 41 €) i PG (25 mg, 50 €), la substitució de les SP pels tensioactius sintètics XXRAc, suposaria un cost total de 120 €/dosi, pràcticament un terç del preu del tensioactiu comercial Curosurf. A efectes comparatius, el tensioactiu pulmonar comercial Exosurf (Burroughs Wellcome, Research Triangle Park, NC-USA), d'origen sintètic, està lliure de proteïnes, i constituït per un 80% de DPPC, combinat amb hexadecanol i tiloxapol. El preu de 108 mg/1.5 ml és de 390 €/dosi, similar al del tensioactiu comercial d'origen natural Curosurf.

A més, tenint en compte la important reducció en el cost final que suposaria la síntesi dels diacilglicerols d'arginina XXRAc a nivell industrial, podríem estar parlant d'una reducció del cost final de producte d'uns dos ordres de magnitud. Per tant, a escala de laboratori, i encara més a nivell industrial, la incorporació d'aquests tensioactius derivats dels diacilglicerols d'arginina XXRAc en formulacions sintètiques reduiria considerablement el seu cost de producció respecte al dels tensioactius pulmonars comercials existents a l'actualitat.