

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



Caracterización fisicoquímica de sistemas microheterogéneos en presencia de derivados de manopiranososa y sus aplicaciones.

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctora en Química por:

CATALINA PAZ SANDOVAL ALTAMIRANO

Director de Tesis: Dr. Germán Günther Sapunar.

Co- Director de Tesis: Dra. Susana Sánchez Donoso.

Santiago-CHILE

Junio 2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

CATALINA PAZ SANDOVAL ALTAMIRANO

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Química, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Germán Günther Sapunar

Co-director de Tesis:

Dra. Susana Sánchez Donoso

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Antonio Zanocco

Dra. Maria Victoria Encina

Dr. Marcelo Campos

Dr. Patricio Iturriaga

*A Cristian,
Por su amor y apoyo incondicional.*

Agradecimientos.

Quisiera agradecer a los integrantes del Laboratorio de Cinética y Fotoquímica, por hacer amenas las jornadas de trabajo. A los profesores Antonio y Else.

A las personas que me acompañaron durante estos años; Pato, Gonzalo, mono, Vivi (gorda).

A Julio (v.v.), por su humor.

A Carolina Jullian, por su agradable compañía.

A Eduardo, Javier y Nancy por su grata compañía en los momentos de esparcimiento. A Javier por su trato cariñoso y Nancy por el apoyo.

A los miembros de mi comisión por el interés y la preocupación. Quisiera agradecer a Eduardo Lissi por ayudar con sus conocimientos y experiencia en el desarrollo termodinámico.

A Antonio Vargas Berenguel y el Laboratorio de Carbohidratos y proteínas de las Universidad de Almería quienes me recibieron y ayudaron durante mi pasantía. A Juanma, Giovanna y Ahlam.

A mi co-directora, Susana, por prestar ayuda necesaria para poder resolver los inconvenientes que se presentaron.

A Germán, mi querido director de tesis, quien sufrió las consecuencias del desarrollo de ésta. Quisiera agradecerte por la confianza que tuviste y por aceptar dirigir mi tesis (aunque en un inicio pudo ser difícil). Por aguantar y tolerar las locuras de esta estudiante. Por las “pocas” tardes de esparcimiento necesarias para escarpar del trabajo. Gracias viejito por todo.

A mi familia, donde siempre encontraré amor y apoyo.

Finalmente, quisiera agradecer a Cristian, amor, por la paciencia infinita en este proceso. Por aceptar que el trabajo ocupara las horas de nuestra vida y por el apoyo necesario en los momentos de flaqueza y distancia.

Financiamiento

- Beca de Formación de capital humano avanzado de Conicyt para la realización de estudio de doctorado nacional 21120554
- Becas complementarias (Estadía de investigación y gastos operacionales)
- Becas de Asistencia a eventos y cursos cortos, convocatorias 2013 y 2015.

Índice

<i>Índice de Figuras</i>	<i>iii</i>
<i>Índice de tablas</i>	<i>vi</i>
<i>Resumen</i>	<i>i</i>
<i>Abstract</i>	<i>iv</i>
1. Introducción	1
1.1. Introducción a la química de carbohidratos	2
1.2. Procesos de agregación	6
1.3. Interacción carbohidrato-proteína	15
2. Hipótesis	23
3. Objetivo General	24
3.1. Objetivos específicos	24
4. Materiales	25
4.1. Reactivos	25
4.2. Instrumentación	25
5. Síntesis	28
5.1. Síntesis de DL-1,2- Isopropilidenglicerol	28
5.2. Síntesis de Isopropiliden bencilglicerol	29
5.3. Síntesis de bencilglicerol	30
5.4. Síntesis de alquil bencilglicerol	30
5.5. Síntesis de alquil glicerol	32
5.6. Síntesis de 2-(2-Bromoetoxi)tetrahidropirano	33
5.7. Síntesis de 2-(2-(2,3-bis(alquiloxy)propoxi)etoxi)tetrahidro-2H-pirano	34
5.8. Síntesis de 2-(2,3-bis(alquiloxy)propoxi)etan-1-ol	35
5.9. Síntesis de manopiranososa pentaacetato	36
5.10. Síntesis de alquil aceto manopiranososa (O-glicosilación)	37
5.11. Desprotección de alquil aceto manopiranososa	40
6. Metodología	43
6.1. Preparación de vesículas unilamelares	43
6.1.1. Método de ultrasonificación	43
6.1.2. Método de extrusión.....	44
6.1.3. Método de inyección	44
6.1.4. Preparación de Vesículas Gigantes	45
6.2. Determinación de tamaño promedio de los agregados	46
6.3. Determinación de potencial zeta de los agregados	46

6.4.	Fluorescencia de estado estacionario.....	47
6.4.1.	Polarización generalizada de Laurdan (GP Laurdan).....	47
6.4.2.	Anisotropía de la fluorescencia del Difenilhexatrieno (rDPH)	48
6.5.	Caracterización de procesos de solubilización de vesículas lipídicas sintéticas.....	49
6.6.	Determinación de la temperatura de transición de fase de vesículas. Efecto de la adición de surfactantes.....	52
6.7.	Determinación del coeficiente de partición de monoalquil manopiranososa en vesículas unilamelares grandes	53
6.8.	Ensayos de aglutinación inducidos por la presencia de proteínas	55
6.9.	Calorimetría isoterma de valoración.....	55
6.10.	Fluorescencia y anisotropía resueltas en el tiempo	57
6.11.	Resonancia plasmón superficial (SPR).....	61
7.	Resultados y Discusión.....	66
7.1.	Síntesis.....	66
7.2.	Caracterización de agregados formados por derivados de manopiranososa	70
7.2.1.	Caracterización fisicoquímica de agregados formados por derivados alquil manopiranosidos.....	70
7.2.2.	Propiedades fisicoquímicas de los agregados formados por sistemas mixtos derivados monoalquil manopiranososa (MXM) y colesterol.....	80
7.3.	Incorporación de derivados monoalquil manopiranososa en vesículas sintéticas	84
7.3.1.	Solubilización de vesículas sintéticas por la incorporación de MXM.....	84
7.3.2.	Evaluación de la temperatura de transición de vesículas en presencia de derivados de manopiranososa	95
7.3.3.	Determinación de la constante de reparto de derivados mono-alquilados manopiranosido en vesículas sintéticas.....	99
7.4.	Interacción de glicovesículas de manopiranososa con Concanavalina A.....	103
7.4.1.	Calorimetría de titulación isotérmica	103
7.4.2.	Interacción vesículas con Concanavalina A.....	109
7.4.2.1.	Estudios de Aglutinación	109
7.4.2.2.	Estudio de tiempo de vida y anisotropía resuelta en el tiempo	111
7.4.3.	Interacción de Con A con liposomas de DPPC-derivados de manopiranososa.....	115
7.4.3.1.	Estudio de aglutinación	115
7.4.3.2.	Estudio de tiempo de vida y anisotropía resuelta en el tiempo	118
7.4.3.3.	Efecto de la concentración de DLEM en liposomas de DPPC en la interacción con Concanavalina A	124
7.4.3.4.	Resonancia de plasmón superficial	125
8.	Conclusiones.....	133
	Bibliografía.....	135

Índice de Figuras

Figura 1-. Proyecciones fischer para las dos configuraciones absolutas de manopiranososa.....	3
Figura 2-. Anomerización en solución.....	4
Figura 3-. Mecanismo para la glicosidación de fischer.....	5
Figura 4-. Representación esquemática de los diferentes tipos de moléculas anfífilicas y los agregados relacionados con el parámetro de empaquetamiento crítico.....	8
Figura 5-. Representación de modelo de membrana.....	9
Figura 6-. Estructura química de los fosfolípidos existentes en diferentes tipos de membranas.....	10
Figura 7-. Distribución de los diferentes tipos de fosfolípidos en la bicapa externa e interna de una vesícula.....	11
Figura 8-. Termograma característico para liposomas de DPPC. T_m : temperatura de transición principal, t_p : temperatura de pre-transición, t_s : temperatura de transición subgel.....	14
Figura 9 -. Ilustración de las diferentes interacciones carbohidrato-proteína que ocurren en la superficie celular.....	15
Figura 10- Aminoácidos involucrados en la interacción de con a con carbohidratos (manopiranosapiranososa o glucopiranososa).....	18
Figura 11-. Representación de modos específicos de interacción multivalentes. A) re-interacción entre un receptor monomérico y un ligando tetraivalente. Alta concentración local. B) quelación debido a ligando y receptor divalentes. C) efecto <i>cluster</i> analito trivalente con receptor multivalente. D) interacción entre un analito divalente con dos ligandos diferentes y un receptor con dos sitios de interacción.....	20
Figura 12-. Representación de diferentes modelos multivalentes de carbohidratos.....	21
Figura 13-. Agregados supramoleculares de moléculas anfífilicas utilizados como sistema multivalente para el estudio de la interacción carbohidrato-proteína.....	22
Figura 14-. Celdas de teflón utilizadas para preparar vesículas gigantes.....	46
Figura 15-. Caracterización de mezclas detergente-lípido. (A) descripción esquemática del proceso de solubilización monitoreado por dispersión de luz. (B) dependencia de las concentraciones de detergente necesarias para saturar y solubilizar la mebrana en función de la concentración de lípido.....	50
Figura 16-. Representación de un termograma y del ajuste sigmoideal de los datos obtenidos.....	56
Figura 17-. Decaimiento de anisotropía resuelta en el tiempo de Laurdan incorporado en la membrana de las vesículas de DODAC a 25°C.....	60
Figura 18-. Diagrama de configuración de Kretschmann para SPR.....	62
Figura 19-. Sensograma característico de la interacción molecular.....	63
Figura 20-. Síntesis de 1,2,3,4,6-penta-o-acetil-manopiranososa. A) I_2/Ac_2O	67
Figura 21-. Esquema sintético general para la obtención de los diferentes derivados de manopiranososa propuestos. R cadena hidrocarbonada con largo de 8, 12 y 16 unidades metilénicas.....	68
Figura 22-. Estructuras químicas de los derivados de manopiranososa sintetizados.....	69
Figura 23-. Determinación de las cac de los monoalquil manopiranosidos estudiados, utilizando metodologías físicas y fotofísicas. (○) tensión superficial. (◊) intensidad de fluorescencia de ans.....	71
Figura 24-. Imagen de intensidad de fluorescencia de Laurdan en GUV de MPM.....	75

Figura 25-. Variación en los valores de gp de Laurdan a 25°C para mezclas de monomanopiranosas (MOM, MLM, MPM) con vesícula de DODAC (A), y liposoma de POPC (B). [lípidos]=0,5 mM.	84
Figura 26-. Imagen e histograma de gp para liposomas mixtos de MLM-POPC a composiciones a) [MLM]/[POPC] = 1.8. B) [MLM]/[POPC] = 3.5. C) GP promedio para liposomas de MPM-POPC y MLM-POPC.	87
Figura 27-. Anisotropía de DPH a 25°C para mezclas de monomanopiranosas (MOM, MLM, MPM) con vesícula de DODAC (a), y liposoma de POPC (b). [lípidos]=0,5 mM.	87
Figura 28-. Curva de solubilización de vesículas de DODAC 0,4 mM por MOM.	90
Figura 29-. Ajuste lineal de las concentraciones de saturación y solubilización en función de la concentración de lípido.	91
Figura 30-. Variación de dispersión de luz de vesículas de DODAC a medida que se aumenta la concentración de MLM.	93
Figura 31-. Efecto de la concentración de MLM en la temperatura de transición de DODAC. (●) DODAC (●) [MLM]= $4,98 \times 10^{-2}$ mM (●) [MLM]=0,141 mM (●) [MLM]=0,249 mM. La concentración de DODAC en todas las medidas es 0,7 mM.	96
Figura 32-. Variación en la temperatura de transición de DODAC a diferentes concentraciones de derivados monoalquilados de manopiranososa.	97
Figura 33-. Dependencia de la constante de reparto con la cac de MXM (escala logarítmica). Constantes determinadas utilizando método de separación de fases.	101
Figura 34-. Termograma de la interacción de MOM con Con A en tampón fosfato 10 mM pH 7, NaCl 20 mM, CaCl ₂ 0,1 mM, MnCl ₂ 0,1 mM a 25°C. La parte superior corresponde al termograma de la valoración correspondiente a 27 inyecciones de 7 µl de una solución de MOM 5,81 mM sobre 1,42 mL de con a 155,6 µM. La figura inferior corresponde al calor desprendido por cada inyección frente a la relación de concentraciones totales, y el ajuste no lineal de n sitios iguales e independientes.	104
Figura 35-. Representación esquemática de la interacción multivalente de las vesículas (100 nm) decoradas con derivados de manopiranososa (no a escala) y Con A (10 nm) a pH 7.	109
Figura 36-. Efecto de la presencia de con a en el tamaño de vesículas en ausencia de derivados de manopiranososa.	110
Figura 37-. Tiempo de vida fluorescente promedio A) DPH. B) Laurdan.	113
Figura 38-. Esquema del movimiento de un fluoróforo en una bicapa de acuerdo al modelo “wobbling in cone”	114
Figura 39-. Resultados de anisotropía resuelta en el tiempo para tres posibles lípidos matriz. A) DPH. B) Laurdan.	115
Figura 40-. Valores de diámetro determinados por DLS para los agregados en ausencia y presencia de con a. A) todos los diámetros de los agregados formados en ausencia y presencia de con a en liposomas y glicoliposomas con un 5% de manopiranososa que contribuyen a la dispersión de luz. B) diámetros de los agregados formados en ausencia y presencia de Con a (el de mayor proporción en la dispersión de luz) en liposomas y glicoliposomas con un 5% de manopiranososa C) cambio en el diámetro de los agregados (presencia – ausencia de Con A).	117
Figura 41-. Tiempo de vida de fluorescencia promedio (A) de DPH (superior) y Laurdan (inferior) para agregados formados por DPPC y 5% de derivado de manopiranososa. Razón de los tiempos de vida de fluorescencia promedio en presencia y en ausencia de con a (B) de DPH (superior) y Laurdan (inferior) para agregados formados por DPPC y 5% de derivado de manopiranososa en ausencia y presencia de Con A.	119

Figura 42-. Resultados de anisotropía resuelta en el tiempo para la interacción de con a con liposomas de DPPC y glicoliposomas con 5% de derivado de manopiranososa. A) razón del tiempo de correlación rotación de DPH en presencia y ausencia de con a. B) razón del tiempo de correlación rotación de Laurdan en presencia y ausencia de Con a. C) razón del ángulo de tambaleo de DPH en presencia y ausencia de con a. D) razón del ángulo de tambaleo de Laurdan en presencia y ausencia de Con A.....	121
Figura 43-. Esquema propuesto de las posibilidades de interacción de con a con membranas modificadas con derivados de manopiranososa. La esfera gris corresponde al residuo manopiranósido de los derivados, la figura roja corresponde a la proteína y las esferas azules corresponden al lípido matriz utilizado.....	123
Figura 44-. Cambio de turbidez producto de la interacción con con a. Efecto de la concentración de DPEM en membranas de DPPC.....	125
Figura 45-. Sensogramas de curvas de adsorción de liposomas en monocapa de mercapto-11-undecanol (MUO).	126
Figura 46-. Representación de los dos tipos de adsorción de liposomas sobre monocapa de muo. A) inmovilización de los liposomas manteniendo su forma original. B) fusión de liposomas inmovilizados formando una bicapa.....	127
Figura 47-. Sensogramas de la interacción de liposomas inmovilizados con diferentes concentraciones de con a. A) DPPC. B) 5% en mol de DLEM en liposomas de DPPC. C) 5% en mol de DPEM en liposomas de DPPC.	128
Figura 48-.(A) sensogramas y ajuste monoexponencial de la fase inicial de asociación y final de disociación para los glicoliposomas; 5% of DPEM y 5% of DLEM. (B) dependencia de la constante de velocidad cinética observada con la concentración de con a para la interacción proteína-glicoliposomas; 5% de DPEM y 5% de DLEM.....	130

Índice de tablas

Tabla 1-. Parámetros geométricos de los agregados formados por MXM.	73
Tabla 2-. Tamaño de los agregados formados por MXM en medio acuoso.....	74
Tabla 3-. Caracterización de los agregados formados por derivados de alquil manopiranosidos a 25°C. La preparación fue realizada por el método de ultrasonificación utilizando tampón fosfato 1 mM pH 7,4.	76
Tabla 4-. Valores de GP de Laurdan a 25°C para sistemas microheterogéneos de derivados monoalquilados de manopiranososa en presencia de diferentes cantidades de colesterol.....	81
Tabla 5-. Valores de rDPH a 25°C para sistemas microheterogéneos de derivados monoalquilados de manopiranososa en presencia de diferentes cantidades de colesterol.	81
Tabla 6-. Coeficiente de partición bicapa/agua, $k_{bic/agua}$, para derivados mono alquílicos de manopiranososa en tres vesículas sintéticas.	100
Tabla 7-. Termodinámica de interacción de con a con derivados de manopiranososa.	105
Tabla 8-. Parámetros termodinámicos de la interacción de con a con vesículas decoradas con derivados monoalquilados de manopiranososa.....	106
Tabla 9-. Constantes cinéticas de asociación y disociación de la interacción de liposomas inmovilizados con Con A.....	131

Resumen

La manosa es un monosacárido presente en muchas membranas celulares en forma de glicolípido o glicoproteína. Los glicolípidos son moléculas anfifílicas en las cuales la parte hidrofílica corresponde a un glúcido y la hidrofóbica son ácidos grasos o cadenas hidrocarbonadas.

Debido a la naturaleza anfifílica los glicolípidos, en medio acuoso pueden agregarse de forma espontánea, o no, para formar diversas estructuras supramoleculares, tales como; micelas, vesículas y/o liposomas. Estos sistemas tienen diversas aplicaciones en áreas de solubilización de membranas, liberación controlada de drogas y cristales líquidos, entre otras.

Por otra parte, los glúcidos presentes en la superficie de las membranas celulares son uno de los principales actores en diferentes procesos de interés biológicos. Por ejemplo, están involucrados en el reconocimiento célula-célula, célula-virus/bacteria, célula-toxina, entre otros.

En este trabajo se sintetizaron 9 derivados alquílicos de manopiranososa (con una y dos cadenas hidrocarbonadas), con el objetivo de evaluar la capacidad de solubilizar modelos de membranas y modificar la superficie de vesículas para ser utilizadas como sistema multivalente en el reconocimiento específico de lectinas.

La caracterización de la estructuración de la interfase y de la región hidrofóbica de los agregados formados, en medio acuoso, por estos derivados muestra una dependencia lineal con el aumento de unidades metilénicas de las cadenas hidrocarbonadas. Además,

el derivado hexadecil manopiranosido puede formar vesículas unilamelares gigantes, aunque cálculos teóricos de la topología de este derivado indican que podría formar micelas.

Los derivados monoalquil manopiranosidos con 12 y 16 unidades metilénicas no presentan la capacidad de solubilizar membranas modelo (vesículas), debido a que la curvatura de los agregados formados por estos derivados es similar a la curvatura de los agregados formados por los lípidos comerciales utilizados.

La incorporación de derivados monoalquílicos de manopiranososa en vesículas de DODAC produce una disminución en la temperatura de transición de fase. El mayor efecto es observado por la incorporación del derivado con 12 unidades metilénicas. Un aumento en el largo de la cadena hidrocarbonada (16 unidades) provoca que el glicolípido durante la transición de fase tenga afinidad por la fase gel en lugar a la fase líquido cristalina.

El coeficiente de partición de los derivados monoalquil manopiranosidos en tres vesículas (DODAC, POPC, DPPC), da cuenta que el factor hidrofóbico de los glicolípidos no es el único factor que gobierna esta interacción (vesícula-glicolípido).

Finalmente, es posible caracterizar cómo se encuentran incorporados los glicolípidos en las vesículas a partir de la respuesta de la interacción con Concanavalina A (proteína que interacciona específicamente con manopiranososa). El aumento del largo de cadena hidrocarbonada en derivados monoalquil y dialquil manopiranosido promueve una incorporación más profunda del glicolípido en la interfase, impidiendo la interacción con la Concanavalina A. La incorporación de un extensor oxietilénico en los derivados dialquil

manopiranosido favorece la exposición de la manopiranososa en la superficie y por lo tanto la interacción con Concanavalina A es más favorecida que en el caso de sus análogos sin extensor. El aumento en la hidrofobicidad de los derivados dialquil manopiranosido con un grupo extensor reduce el número de conformaciones que desfavorecen la interacción con la lectina.

Abstract

The monosaccharide mannose is a molecule present in a great number of biological membranes, in both, glycolipids or glycoproteins. The glycolipids are amphiphilic molecules, where the carbohydrate corresponds to the hydrophilic region and hydrocarbon chain to the hydrophobic region. Due to their amphiphilic nature, glycolipids in aqueous media, can self-assemble to form supramolecular aggregates (e.g., micelles, vesicles and liposomes). These aggregates have applications in membrane solubilization, drug delivery and liquid crystals.

The carbohydrates located at the surface of cellular membranes are involved in processes like cell-cell recognition, cell-virus/bacteria interaction and cell-toxin, among others.

In this research, 9 different alkyl derivatives of mannose (with one or two methylene chains) were synthesized. Two are the main goals related to this work: Study the ability to solubilize model membranes and study how the modification of the vesicle surface with these glycolipids modulates the specific interaction with lectins.

For alkyl mannoside aggregates, the length of hydrocarbon chain directly affects structuration of both, interface and hydrocarbon chain region. Additionally, the longest monoalkyl mannoside (hexadecyl chain) is able form giant unilamellar vesicles.

The derivatives with 12 and 16 methylene units do not have the capability to solubilize model vesicles, because their spontaneous curvature, coincides with the one of the matrix lipid.

The incorporation of glycolipids to DODAC vesicles results in a decrease of bilayer phase transition temperature. The highest effect is observed when for the incorporation of the derivative with 12 methylene units. An increase in the hydrophobic balance (derivative with 16 methylene units) yields a glycolipid with increased affinity for the gel phase.

The partition coefficient was evaluated for all monoalkyl mannoside derivatives in three different model vesicles (DODAC, DPPC and POPC). The results obtained indicate that not only the hydrophobic factor drives glycolipid incorporation into vesicles, but also interactions at interface and membrane structuration are involved.

The incorporation of glycolipids to vesicles is expected to increase their specificity toward specific targets such as lectins, particularly in this case Concanavalin A; however, the degree of exposure of the carbohydrate moiety at the liposome surface is a crucial parameter to be considered and characterized for the interaction. Longer hydrocarbon chain in mono and di-alkyl derivatives favor a deeper insertion into the bilayer and hence mannose moiety is less exposed at the surface to interact with Concanavalin A.

1. Introducción

La manosa corresponde a un monosacárido del grupo de las aldosas, se puede encontrar en forma cíclica o abierta.

En las últimas décadas los derivados anfifílicos de carbohidratos han sido utilizados en diferentes áreas de la ciencia y la tecnología, dependiendo de sus propiedades como; surfactantes¹, cristales líquidos², agentes solubilizantes de membranas³, etc.

Los glicolípidos corresponden a una gran familia de compuestos anfifílicos, en los que la parte hidrofílica es un glúcido. Desde el punto de vista de la química de superficies, los glicolípidos son moléculas anfifílicas con una cabeza hidrofílica, que corresponde al glúcido, unida a una cola hidrofóbica, que habitualmente es una o más cadenas hidrocarbonadas. Desde el punto de vista biológico, los glicolípidos junto con los ácidos nucleicos y las proteínas son responsables de la transferencia de información biológica⁴. En el caso de los glicolípidos, su importancia fisiológica involucra al glúcido presente en su estructura, el que es reconocido selectivamente (reconociendo el tipo de carbohidrato) por proteínas que se encuentran en la superficie de virus, bacterias, células, entre otras.

De la selectividad de las interacciones glicolípido – proteína, surge la posibilidad de utilizar los glicolípidos de manopiranososa como biosensores. Consecuentemente surge la necesidad de estudiar el efecto de modificaciones estructurales en las propiedades fisicoquímicas de agregados supramoleculares y su potencial utilización como sensor de lectinas específicas.

1.1. Introducción a la química de carbohidratos

El término hidrato de carbono se originó del hecho que un número importante de estos compuestos presentan la formula general $C_n(H_2O)_n$. Los carbohidratos constituyen un amplio grupo de productos naturales, se pueden encontrar en forma de oligosacáridos, polisacáridos y como monosacáridos; éstos últimos no pueden ser hidrolizados en unidades más pequeñas. Los monosacáridos son moléculas quirales, con varios centros asimétricos, que a menudo se encuentran en forma cíclica de hemiacetal; el estereocentro C-1 involucrado en la ciclación se denomina centro anomérico. Los carbohidratos pueden estar enlazados covalentemente a una gran variedad de biomoléculas, entre las que podemos mencionar lípidos (glicolípidos) y proteínas (glicoproteínas). De especial interés en esta investigación son los monosacáridos enlazados covalentemente a lípidos.

La estereoquímica de los carbohidratos fue establecida en el siglo XIX por Emil Fischer⁵, reconocido como el padre de la química de los carbohidratos. La configuración absoluta D y L se asigna de acuerdo a la configuración del estereocentro que tiene la mayor numeración en la cadena¹. En la representación conocida como proyección de Fischer, la configuración absoluta D corresponde al grupo quiral hidroxilo de mayor numeración orientado hacia la derecha (Figura 1).

¹ Según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog para establecer la configuración de un estereocentro. Configuración R para D-azúcar y S para L- azúcar.

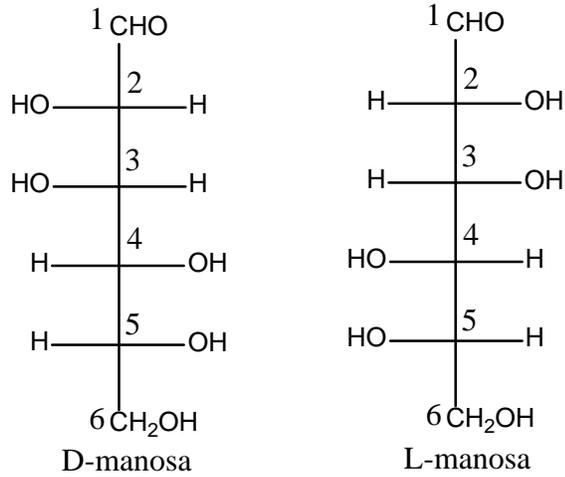


Figura 1-. Proyecciones Fischer para las dos configuraciones absolutas de manosa.

Los monosacáridos en su forma cíclica pueden adoptar dos conformaciones en equilibrio conocidas como formas anoméricas hemiacetálicas α y β , esta isomería tiene su origen en las dos formas diferentes en que puede re-establecer la forma hemiacétalica. (El ataque del grupo hidroxilo al aldehído puede llevarse a cabo por cualquiera de las dos caras, y por lo tanto, se obtiene una mezcla de isómeros Figura 2). Para azúcares con configuración D, el anómero α corresponde al grupo hidroxilo en la posición axial, mientras que para el anómero β , el grupo OH se encuentra en la posición ecuatorial de la conformación silla.

En solución existe un equilibrio de las formas α y β , fenómeno llamado mutarrotación. La Figura 2 muestra el equilibrio de estas dos formas para el carbohidrato manopiranososa, la mutarrotación incluye la hidrólisis del hemiacetal a través de una catálisis ácida o básica y luego un proceso de re-ciclación para formar nuevamente el hemiacetal. El ataque del grupo hidroxilo del carbono 5 al grupo aldehído puede llevarse a cabo por ambas caras, obteniéndose las dos formas anoméricas posibles. Debido a este equilibrio es posible

también la obtención de furanosas (ciclos de 5 miembros) cuando el ataque al aldehído involucra al grupo hidroxilo del carbono 4.

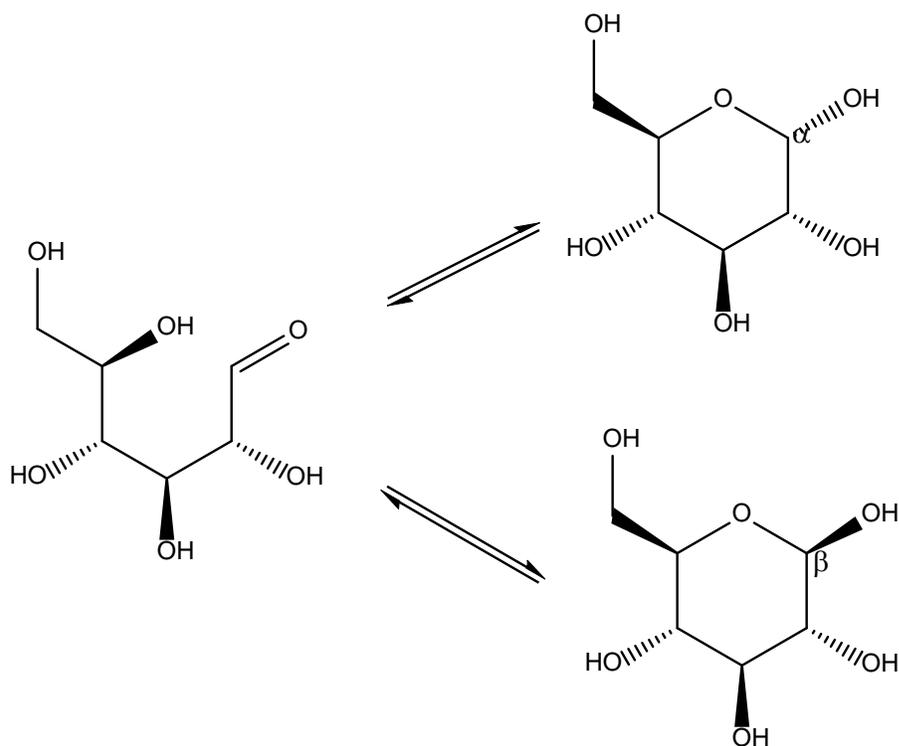


Figura 2-. Anomerización en solución.

La ciclación de carbohidratos involucra la formación de hemiacetales, por lo tanto, la reactividad del carbono anomérico es muy similar a la de cualquier hemiacetal. Los lactoles, como por ejemplo manopiranososa, pueden reaccionar con alcoholes en condiciones ácidas para generar acetales. Estas reacciones transcurren mediante un mecanismo S_N1 , donde inicialmente se forma un intermediario carbocationico cíclico, que luego es atacado por el grupo alcohol; proceso conocido como glicosidación de Fischer. (Figura 3)

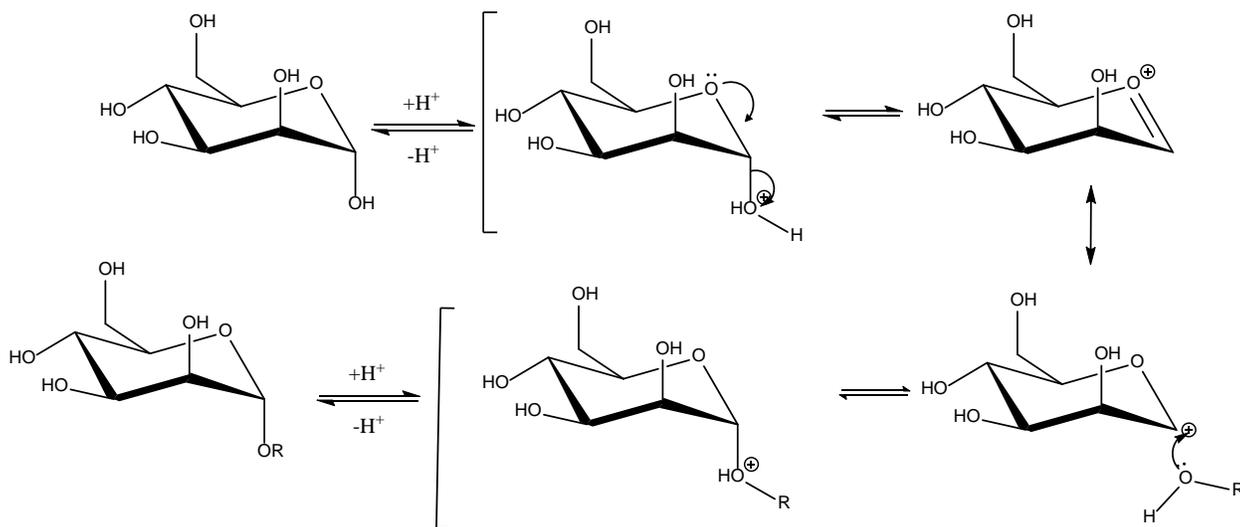


Figura 3-. Mecanismo para la glicosidación de Fischer.

La glicosilación es un proceso con control termodinámico, sin embargo, hay efectos de origen electrónico que pueden ser determinantes en la estereoquímica del centro anomérico. La presencia de sustituyentes electronegativos en el piranósido favorece la posición axial por sobre la posición ecuatorial. El par de electrones libres del oxígeno del anillo tiene posición anti-periplanar respecto al enlace C-O y participa en la estabilización de la estructura, debido a la deslocalización electrónica producto de la interacción $n \rightarrow \sigma^*$.

Un aspecto relevante en la síntesis y modificación de carbohidratos es el control de la estereoquímica, debido a que es posible obtener mezclas de isómeros o estereoisómeros difíciles de separar. Por lo tanto, en la estrategia de síntesis cuando se utilizan carbohidratos es crucial la protección de los grupos hidroxilos. Los grupos protectores utilizados más frecuentemente son los acetatos y los éteres bencílicos. Por otra parte, las diferentes reactividades de los grupos hidroxilos (anoméricos, primarios y secundarios)

pueden favorecer la obtención preferente de ciertas estructuras. De los diferentes grupos hidroxilos presentes en los monosacáridos, el que presenta mayor reactividad es el grupo hidroxilo del centro anomérico. Éste es más ácido comparado con los otros hidroxilos presentes, debido al oxígeno que conforma el ciclo de la hexosa, y por lo tanto, reacciona rápido como nucleófilo.

1.2. Procesos de agregación

Como se mencionó anteriormente, los glicolípidos son moléculas anfífilas y en medio acuoso pueden agregarse espontáneamente o no, para formar estructuras supramoleculares. La agregación de moléculas anfífilas es gobernada por interacciones hidrofóbicas (efecto hidrofóbico)⁶, donde las cadenas hidrocarbonadas tienden a reducir el área de contacto con las moléculas de agua, proceso que es caracterizado termodinámicamente por una ganancia entrópica, debido a la reorganización de las moléculas de agua. Es importante destacar que en el proceso de agregación están involucradas dos fuerzas opuestas; las interacciones hidrofóbicas antes mencionadas y las interacciones repulsivas (iónicas o estéricas) de los grupos polares, que actúan principalmente en la región de la interfase. Las interacciones hidrofóbicas tienden a disminuir el área ocupada por molécula, mientras que el segundo grupo de interacciones (repulsiones iónicas y estéricas) tienden a producir un aumento del área.

En medio acuoso, las moléculas anfífilas pueden formar diversas estructuras; micelas, vesículas, bicapas planas, entre otras, minimizando el área de contacto entre la parte hidrofóbica y las moléculas de agua. El tipo de agregado formado depende de la estructura

de la molécula anfifílica, de su concentración, y de la temperatura y presión⁷. A muy bajas concentraciones, el anfifilo forma una monocapa en la interfase agua-aire. Sobre una cierta concentración, denominada concentración de agregación crítica (cac), se agrega para formar diferentes estructuras. A concentraciones mucho más altas que la cac, los anfifilos pueden formar diversas fases líquido-cristalinas (con sus correspondientes transiciones liotrópicas).

Debido a las fuerzas opuestas determinantes en el proceso de agregación, ya mencionadas, el sistema alcanza el equilibrio a una determinada área interfacial, donde cada molécula presentará un área expuesta a la fase acuosa (a_0). Conociendo el volumen (v) de la porción hidrofóbica de la molécula y su longitud (l_c) es posible predecir la forma del agregado a partir de la evaluación del parámetro crítico de empaquetamiento (C_{pp})^{8,9}. Este parámetro da cuenta de una relación directa entre la geometría de la molécula anfifílica y el tipo de agregado que es capaz de formar en solución (Figura 4), para minimizar la energía libre superficial.

La estabilidad física de las dispersiones formadas por estos agregados, definida como la tendencia a agregarse o a sedimentar debido a la acción de la gravedad, es un factor clave en el estudio de este tipo de sistemas coloidales.

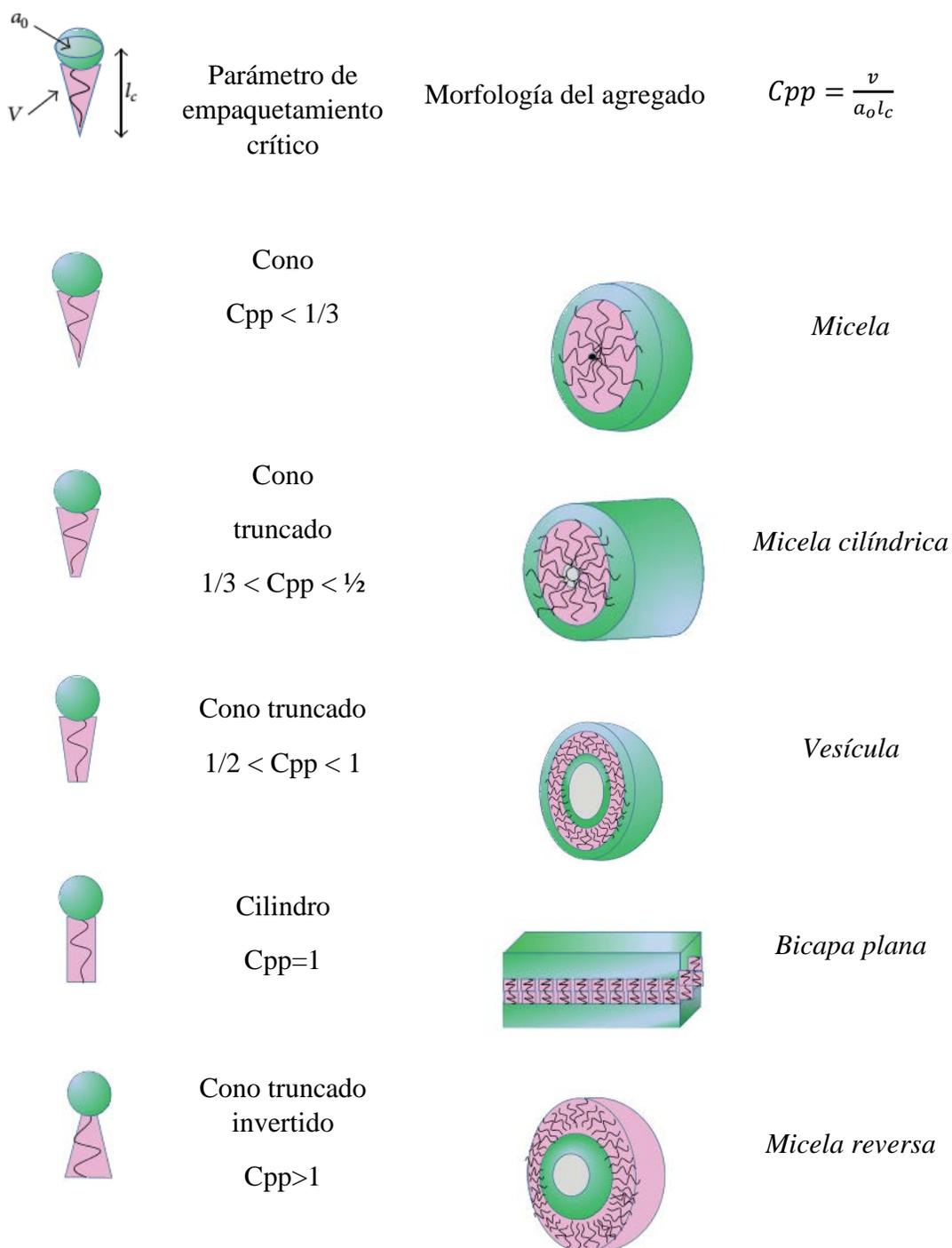


Figura 4-. Representación esquemática de los diferentes tipos de moléculas anfifílicas y los agregados relacionados con el parámetro de empaquetamiento crítico¹⁰.

Entre los diferentes agregados, las vesículas y las bicapas planas sintéticas han sido ampliamente utilizadas como modelos de membrana¹¹. Las membranas biológicas están constituidas principalmente por: lípidos (fosfolípidos, esteroides y glicolípidos) y proteínas (Figura 5). La composición relativa de los diferentes constituyentes en las bio-membranas depende del tipo de célula. Por ejemplo, la membrana plasmática posee en promedio 50% de lípidos, mientras que la membrana interna de la mitocondria posee 25% en masa de lípidos¹².

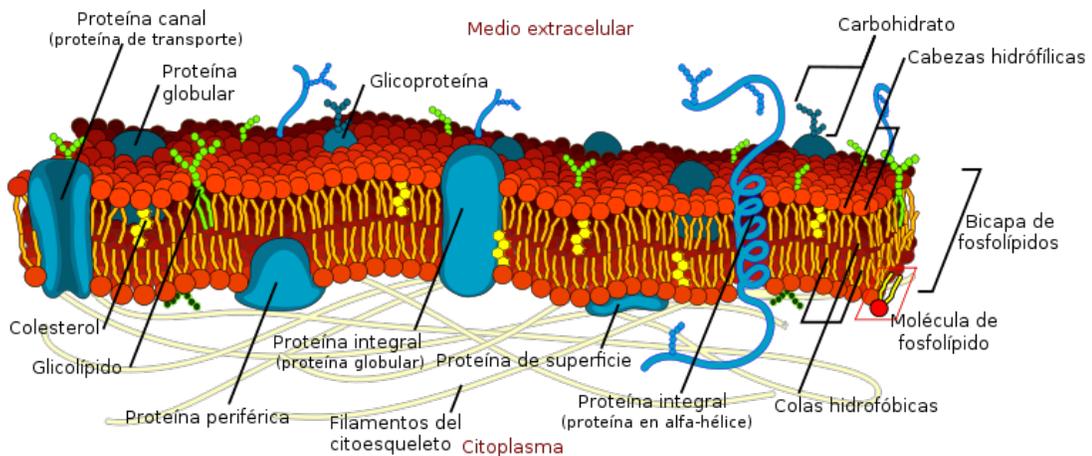


Figura 5-. Representación de modelo de membrana.

Los fosfolípidos corresponden a los lípidos que, en general, se encuentran en mayor proporción en las membranas. Existen 6 familias de fosfolípidos (Figura 6), las cuales son clasificadas de acuerdo al tipo de cabeza hidrofílica que poseen. Los fosfolípidos se encuentran, además, en diferentes proporciones en la capa interna y externa de la bicapa, la Figura 7 muestra la distribución de los diferentes fosfolípidos en membranas de glóbulos rojos humanos. Esta distribución asimétrica de fosfolípidos en las membranas afecta diversas propiedades, tales como carga superficial, permeabilidad, forma y

estabilidad¹³, da cuenta de un estado de no equilibrio y está relacionada con la curvatura espontánea de cada fosfolípido.

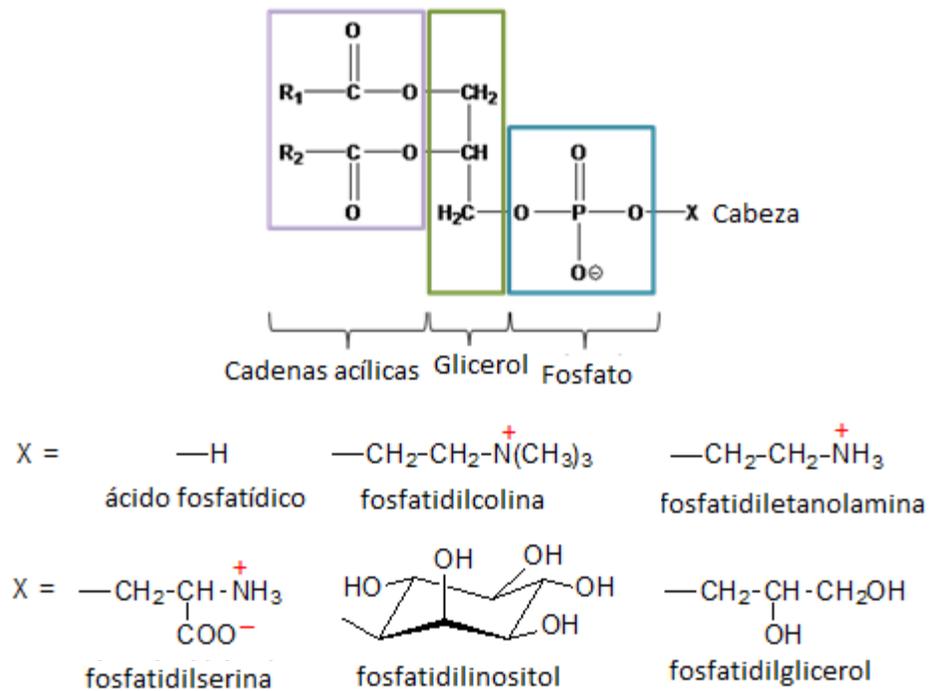


Figura 6-. Estructura química de los fosfolípidos existentes en diferentes tipos de membranas.

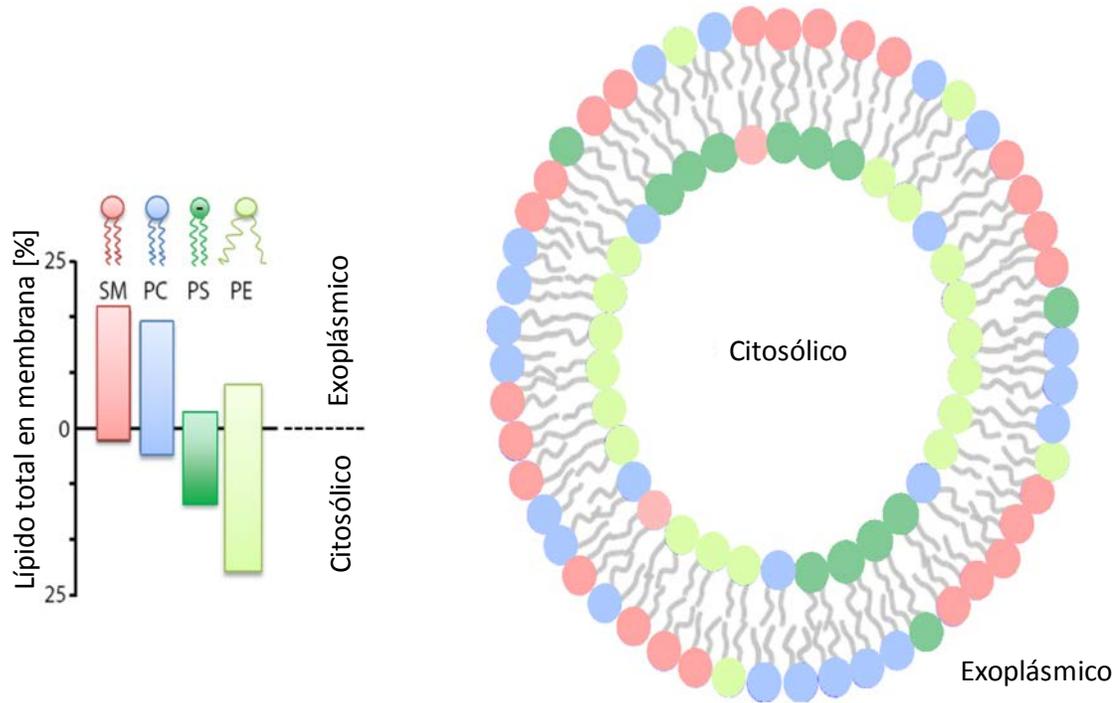


Figura 7-. Distribución de los diferentes tipos de fosfolípidos en la bicapa externa e interna de una vesícula¹³.

Otro tipo de lípido presente en la mayoría de las membranas biológicas son los esteroides. El colesterol es el principal esteroide presente en vertebrados, el ergosterol se encuentra presente en hongos y el sitosterol en plantas. La presencia de esteroides es responsable de la formación de una nueva fase líquida-ordenada (l_o) que se propone juega un rol fundamental en diversos procesos biológicos. Esta fase permite la difusión rápida de moléculas en el plano de la membrana (líquida) y exhibe un alto orden conformacional en las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (ordenada)¹⁴. El colesterol se encuentra en altas concentraciones en células animales, aproximadamente de 20-30%, 50% en células de glóbulos rojos y hasta 70% en membranas oculares¹⁵. La presencia de colesterol puede

modificar propiedades físicas de las membranas, tales como el orden molecular, la permeabilidad y grosor de la bicapa y estructura de los microdominios¹⁶.

Los glicolípidos son los lípidos que se encuentran en menor proporción en las membranas celulares, y como ya se ha mencionado, son derivados glucosídicos de lípidos y forman parte de una familia de compuestos denominados glicoconjugados. Los glicolípidos, en general, se pueden clasificar en dos grupos: alquil glucósidos sintéticos y glicosfingolípidos (de origen biológico)⁴.

Los alquil-glucósidos son glicolípidos con una estructura química más simple en comparación con los glicosfingolípidos y pueden ser sintetizados utilizando un azúcar polifuncional y un alcohol hidrofóbico. Los alquil-glucósidos son detergentes y poseen propiedades destacables, las cuales difieren de otros detergentes no-iónicos, por ejemplo, éstos pueden ser utilizados en aplicaciones relacionadas a la agricultura debido a que son biodegradables y presentan baja eco-toxicidad, en el área de productos cosméticos y de cuidado personal debido a su compatibilidad dermatológica¹⁷. Además, los glicolípidos pueden formar mesofases en estado fundido (cristales líquidos termotrópicos) o en solución (cristales líquidos liotrópicos).

Debido a la presencia de grupos hidroxilos en las moléculas de carbohidratos, los enlaces de tipo puente de hidrógeno son las interacciones predominantes en los agregados de glicolípidos¹⁸. La interacción de los glicolípidos con moléculas de solvente (generalmente agua) a través de puentes de hidrógeno puede, generar redes de puentes de hidrógeno, que proporcionarán estabilidad y rigidez a ciertas conformaciones¹⁹. Diversos estudios

teóricos se han realizado con el fin de elucidar el efecto de la estereoquímica del glúcido en la formación de diferentes agregados^{18, 20-22}. Los α -glucósidos pueden formar un mayor número de puentes de hidrógeno inter-glucósidos que los análogos β -glucósidos¹⁸, en estas interacciones inter-glucósido participan tres grupos hidroxilos (OH-2, OH-3 y OH-4)²³.

Las vesículas y bicapas planas muestran una serie de transiciones termotrópicas. La Figura 8 muestra el termograma característico para liposomas de DPPC²⁴, en la que se observan tres transiciones endotérmicas caracterizadas por tres máximos. La de más baja temperatura corresponde a la transición subgel, bajo esta transición la fase corresponde a una cristalina hidratada (L_c') caracterizada por cadenas hidrocarbonadas empaquetadas estrechamente y con restricción en sus movimientos rotacionales y la cabeza polar contiene unas pocas moléculas de agua. El segundo máximo corresponde a transición de la fase sólido-ordenada² (L_β) a la fase conocida como “*ripple*” (ondulación, P_β), esta transición es conocida como pre-transición. A medida que la temperatura aumenta ocurre la transición de fase principal obteniéndose la fase líquido-desordenada² (L_α). Este perfil es característico de la familia de diacilfosfatidilcolina, sin embargo, la fase *ripple* no es necesariamente observable en otros sistemas lipídicos. La transición de fase principal corresponde a un proceso altamente cooperativo de las cadenas hidrocarbonadas en la región hidrofóbica de la bicapa²⁵. En el estado gel las cadenas hidrocarbonadas se

² El término sólido-líquido de la denominación del tipo de fase de la bicapa está referido al grado de libertad traslacional. Mientras que el término orden-desorden se relaciona al grado de libertad conformacional de las cadenas hidrocarbonadas.

encuentran completamente extendidas (configuración trans) y en general alineadas perpendicularmente al plano de la bicapa.

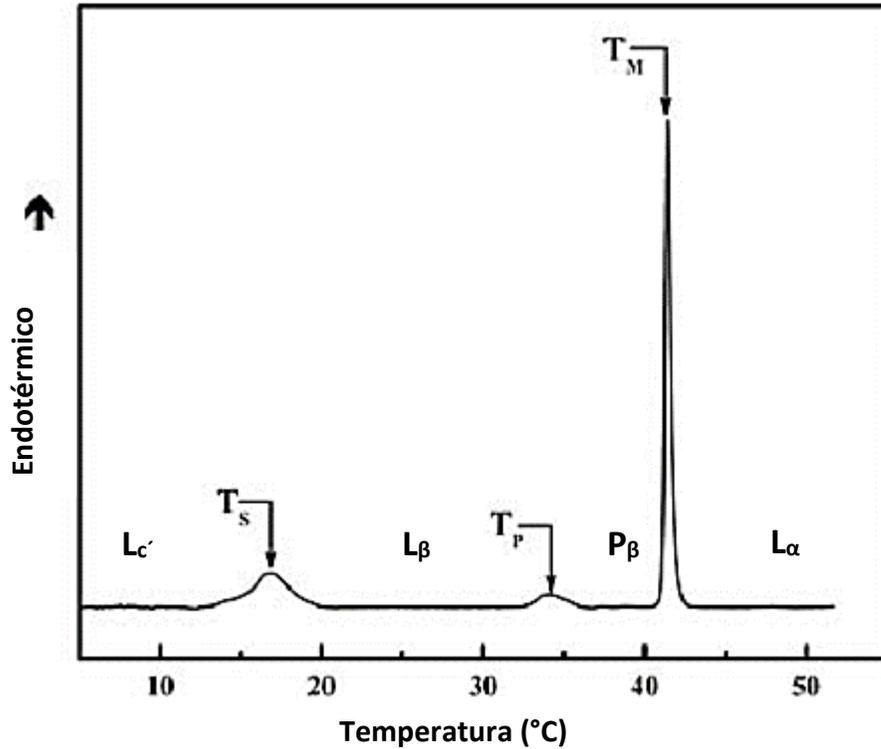


Figura 8-. Termograma característico para liposomas de DPPC. T_m : temperatura de transición principal, T_p : temperatura de pre-transición, T_s : temperatura de transición subgel.²⁴

Cuando una bicapa lipídica contiene una mezcla de lípidos pueden ocurrir procesos de separación de fases; los lípidos se reorganizan en regiones denominadas “rafts”²⁶. En células los rafts están asociados, en general, a dominios ricos en colesterol y esfingolípidos y se ha propuesto que éstos juegan un rol fundamental en diversos procesos biológicos, por ejemplo: vías de transducción de señal, apoptosis, adhesión y migración celular, transmisión sináptica, organización del citoesqueleto²⁷.

1.3. Interacción carbohidrato-proteína

La interacción carbohidrato-proteína es un mecanismo importante para la transferencia de información biológica entre células y célula-substrato (Figura 9)^{28, 29}.

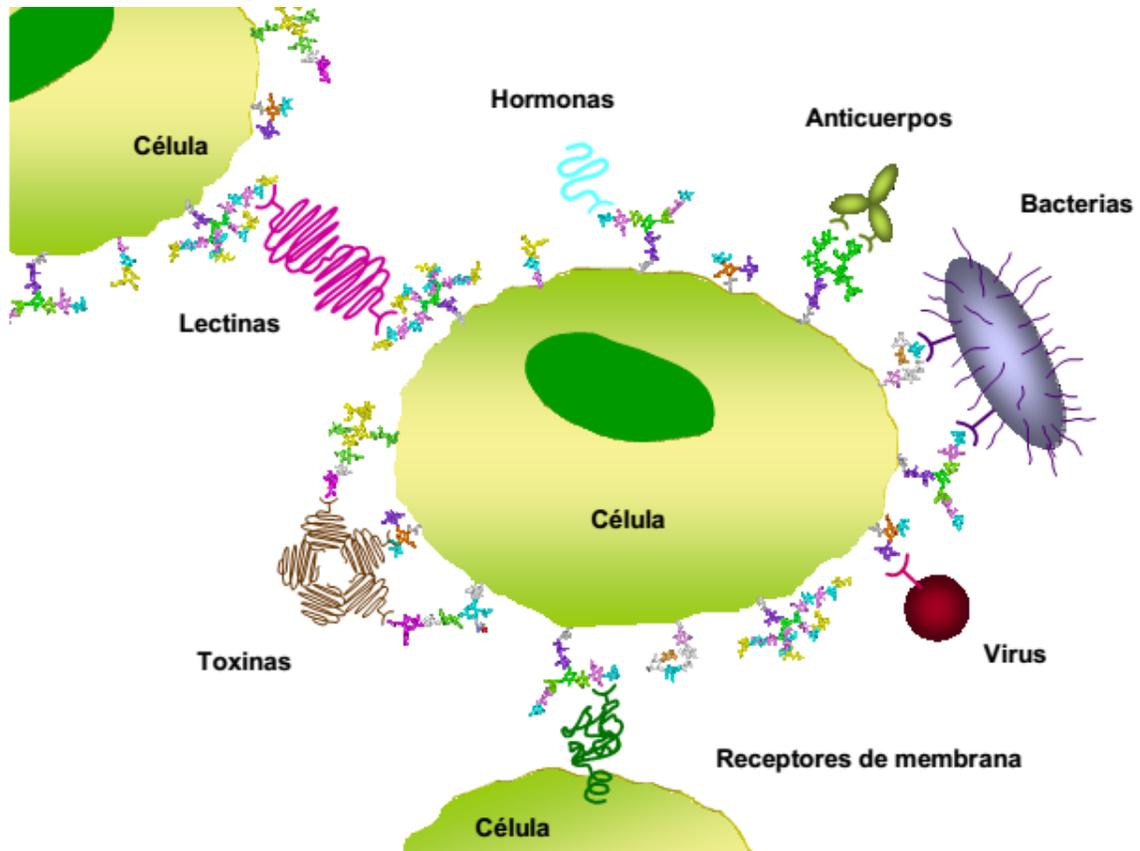


Figura 9 -. Ilustración de las diferentes interacciones carbohidrato-proteína que ocurren en la superficie celular²⁹.

Las proteínas que interactúan específicamente con carbohidratos se denominan Lectinas; éstas pueden agruparse según su estructura y su dominio de reconocimiento de carbohidrato³⁰. Numerosos procesos biológicos están mediados por la unión de carbohidratos con lectinas. En plantas, las lectinas controlan la germinación, el transporte y almacenamiento de azúcares y participan en la protección contra insectos y microorganismos dañinos^{31, 32}.

El reconocimiento de carbohidratos específicos por lectinas es utilizado en numerosas bacterias, virus, toxinas, hongos y protozoos, como mecanismo de fijación inicial del proceso infeccioso³³. Un mecanismo de defensa en nuestro organismo está basado en el reconocimiento específico de la manosa por la proteína MLB (lectina de unión a manosa) que permite que el microorganismo sea atrapado y destruido³⁴. Otros microorganismos, como una variedad de la bacteria *e. coli*, responsable de la mayoría de las infecciones de la vejiga, tiene la capacidad de fijarse a las moléculas de manosa presentes en la pared de la vejiga iniciando el proceso de infección³⁵. En la década de los 50 se demostró por primera vez que el virus de la gripe reconoce carbohidratos específicos en la célula huésped³⁶. Por el contrario, en otros casos, son las lectinas presentes en la célula huésped las que están involucradas en la unión del virus. Por ejemplo, las lectinas de tipo C DC-SIGN, presentes en células dendríticas, pueden facilitar la adhesión del virus VIH-1^{37, 38}, la hepatitis C³⁹ y el Ebola^{40, 41}, a través del reconocimiento de estructuras ricas en manosa presentes en el virus⁴².

La proteína Concanvalina A (Con A) es una lectina del poroto que interacciona específicamente con α -manopiranososa y α -glucopiranososa. Dependiendo del pH, esta proteína se puede encontrar en forma dimérica (pH < 6) o tetramérica (pH > 7). Cada subunidad tiene un único sitio de reconocimiento específico de carbohidrato. A pH fisiológico las cuatro subunidades se encuentran en configuración tetraédrica, y sus sitios de reconocimiento específico se ubican a una distancia de 72 Å⁴³. Esta proteína ha sido ampliamente estudiada para elucidar el mecanismo de interacción con carbohidratos⁴⁴.

También ha sido utilizada como modelo para investigar la relación estructuras y función de las glicoproteína que se encuentran en la superficie de células y organelos⁴⁵.

En el reconocimiento específico carbohidrato-proteína las interacciones involucradas corresponden a puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones alifáticas-aromáticas, CH/ π ⁴⁶. Respondiendo a las características de los carbohidratos, los sitios de unión en las proteínas contienen numerosos aminoácidos polares que participan en la formación de una red muy específica de enlaces de hidrógeno con el azúcar. En general, sólo algunos de los grupos hidroxilo del azúcar están involucrados en la interacción. Los grupos que no participan de la interacción con el sitio de reconocimiento participan en la formación de enlaces más débiles con la proteína o con el solvente. Por otra parte, los sitios de reconocimiento contienen residuos de Triptófano o Tirosina que establecen interacciones CH/ π con la cara hidrofóbica del carbohidrato. En algunos casos hay cationes divalentes (por ejemplo; Ca²⁺ y Mn²⁺) implicados en el reconocimiento, ya sea indirectamente configurando el sitio de unión (por ejemplo; Concanavalina A), o participando directamente en la unión del carbohidrato⁴⁷.

La Figura 10 muestra las interacciones involucradas en el reconocimiento de manopiranososa por la lectina Con A obtenida por difracción de rayos X⁴⁸. La interacción involucra 5 aminoácidos presentes en la proteína que le confieren al centro de reconocimiento de carbohidratos diferentes propiedades fisicoquímicas. El centro de reconocimiento posee una región apolar o hidrofóbica (localizada en el aminoácido Leucina), polar ácida (localizada con dos aminoácidos aniónicos, Tirosina y Ácido

aspártico), polar neutra (localizada en la Asparagina) y polar básica (aminoácido Arginina)⁴⁹.

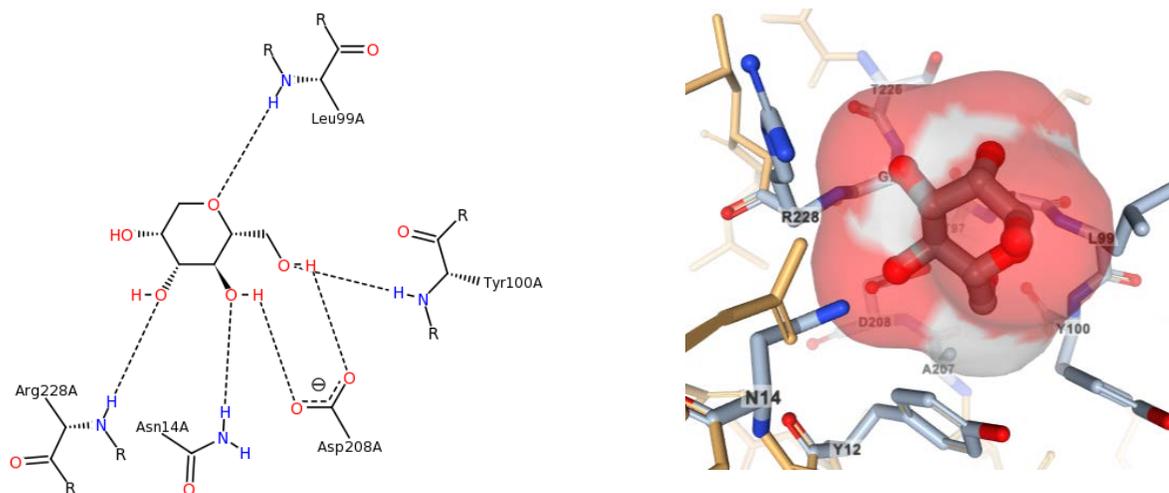


Figura 10- Aminoácidos involucrados en la interacción de Con A con carbohidratos (manopiranososa o glucopiranososa)⁴⁸.

Las moléculas de agua también juegan un papel fundamental en las interacciones carbohidrato-proteína. Al unirse el ligando, se produce una reorganización significativa de las moléculas de solvente a lo largo de la superficie de contacto. En algunos casos, las moléculas de agua estrechamente unidas al sitio de unión, se desplazan para permitir el contacto adecuado y lo mismo ocurre con aquellas moléculas de agua que se encuentran unidas a los grupos hidroxilos del carbohidrato. Esta reorganización del solvente contribuye a la energía libre de Gibbs y, por lo tanto, a la afinidad de la unión. Los cambios de entalpía incluyen, por un lado, la contribución favorable de los contactos específicos proteína-carbohidrato y de los nuevos enlaces de hidrógeno formados entre moléculas de agua tras la desolvatación de la proteína y el carbohidrato y, por otro lado, la contribución desfavorable de la ruptura de las interacciones proteína-agua y carbohidrato-agua. La interacción específica afecta a la entropía debido al cambio de las restricciones

traslacionales y rotacionales del ligando, y a la pérdida de libertad conformacional del carbohidrato y de la proteína debido a la formación del complejo proteína-carbohidrato. Por lo tanto, las interacciones proteína-carbohidrato se caracterizan por una compensación entalpía-entropía⁵⁰.

En general, la constante de afinidad de la interacción carbohidrato-proteína es del orden milimolar²⁹. Debido a la baja afinidad que presentan estas interacciones en la naturaleza ocurren procesos de carácter multivalente, en los cuales un aumento en la afinidad es observada cuando la interacción se lleva a cabo con carbohidratos multivalentes (más de un carbohidrato disponible para la interacción) debido a la presencia de interacciones múltiples. Este efecto es denominado efecto multivalente, y es el predominante en la naturaleza⁴³.

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar el aumento de afinidad debido al efecto de multivalencia: efecto quelato, *clustering*, proximidad/estadístico y sitio de interacción secundario⁵¹. La Figura 11 muestra la representación de los posibles mecanismos de efecto multivalente. El efecto estadístico (Figura 11 A) se relaciona con analitos multivalentes, donde los ligandos se encuentran próximos, aumentando la concentración local efectiva. El efecto quelato da cuenta de la interacción entre analitos y receptores divalentes; la distancia entre los ligandos es la adecuada para enlazar simultáneamente dos sitios del receptor (Figura 11 B). La interacción de analitos y receptores multivalentes, se lleva a cabo a través del enlace conjunto de los ligandos presentes con una distancia adecuada en el analito, con los diferentes sitios presentes en

el receptor; este fenómeno es conocido como *clustering* (Figura 11 C). La interacción de un sitio secundario precedida por el enlace con el sitio primario de un analito multivalente con dos ligandos diferentes en un determinado receptor (Figura 11 D).

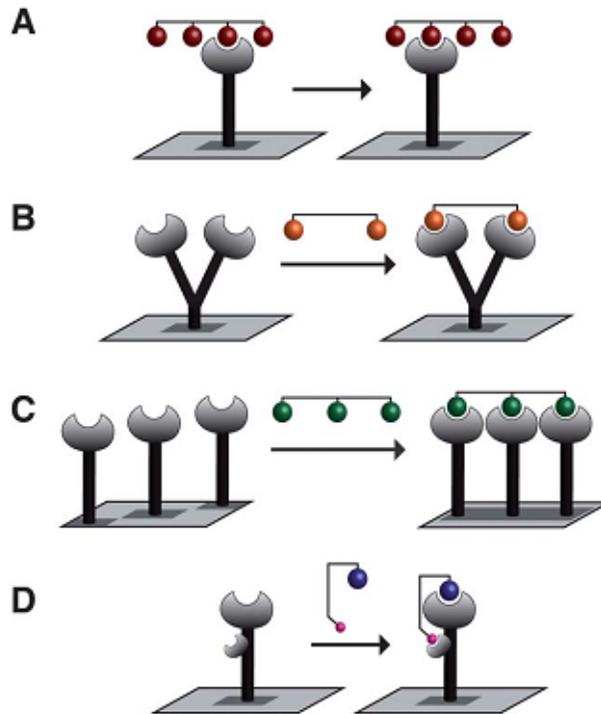


Figura 11-. Representación de modos específicos de interacción multivalentes. A) Re-interacción entre un receptor monomérico y un ligando tetravalente. Alta concentración local. B) Quelación debido a ligando y receptor divalentes. C) Efecto *cluster* analito trivalente con receptor multivalente. D) Interacción entre un analito divalente con dos ligandos diferentes y un receptor con dos sitios de interacción⁵¹.

El estudio de la interacción carbohidrato-proteína requiere del desarrollo de estructuras que permitan una presentación multivalente de los carbohidratos. En la bibliografía se encuentran descritos numerosos modelos de sistemas multivalentes con carbohidratos⁵².

Estos sistemas artificiales consisten fundamentalmente en la preparación de soportes de

muy diversa naturaleza sobre los que se unen varias moléculas del carbohidrato originando una presentación multivalente del mismo. Entre los sistemas multivalentes más usados, cabe destacar los péptidos y proteínas⁵², liposomas⁵³, dendrímeros^{38, 54}, calixarenos⁵⁵, ciclodextrinas⁵⁶, oligómeros y polímeros^{57, 58} y nanopartículas^{59, 60} (Figura 12).

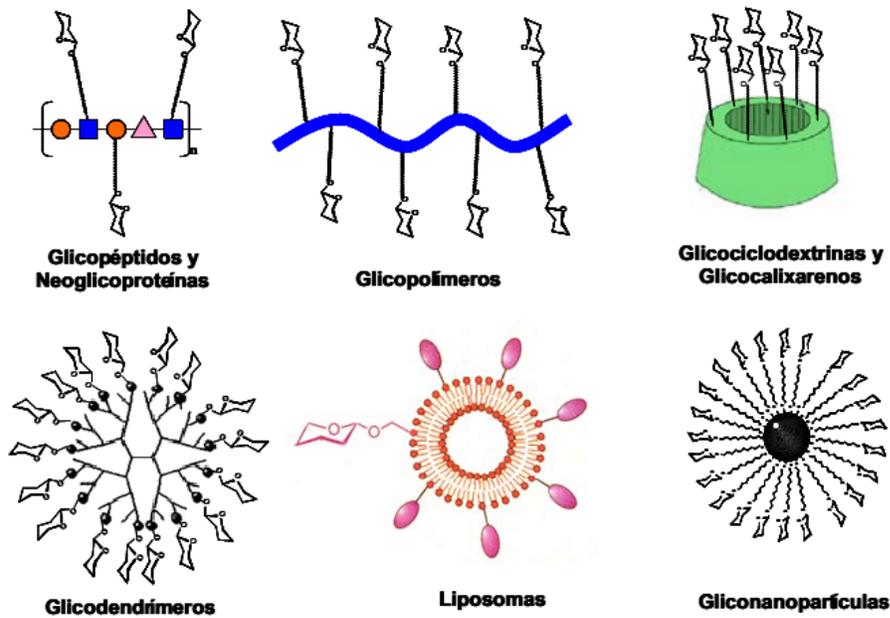


Figura 12-. Representación de diferentes modelos multivalentes de carbohidratos.

La utilización de liposomas y vesículas como soporte de sistemas multivalentes incluye la utilización de glicolípidos o glicoconjugados. Estos derivados de carbohidratos están presentes en la naturaleza y, por lo tanto, son modelos y ejemplos por excelencia para entender el papel de los glicolípidos en la maquinaria celular⁵³. La Figura 13 muestra algunos ejemplos de agregados formados por moléculas anfifílicas que han sido utilizados para el estudio de la interacción carbohidrato-proteína. La disponibilidad del residuo de

carbohidrato para la interacción con la lectina en estos sistemas es afectada por la longitud de la cadena hidrocarbonada del glicolípido, mientras que la orientación del residuo es levemente modificada por este parámetro. La incorporación de un espaciador entre la cabeza hidrofílica y la región hidrofóbica modifica la flexibilidad y orientación del residuo de carbohidrato.

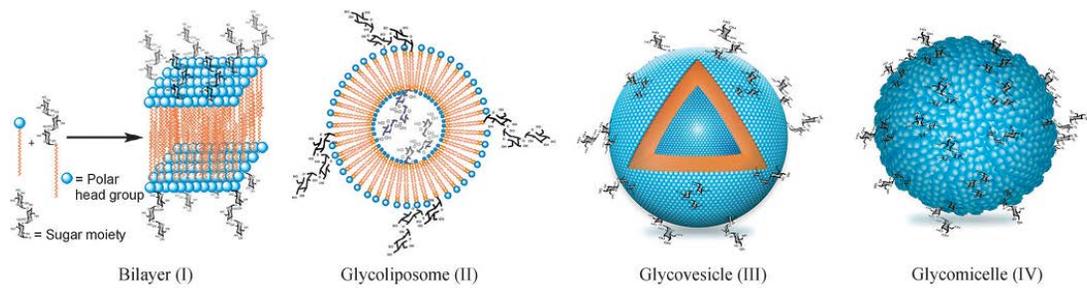


Figura 13-. Agregados supramoleculares de moléculas anfifílicas utilizados como sistema multivalente para el estudio de la interacción carbohidrato-proteína.

2. Hipótesis

La incorporación de derivados de alquil manopiranosos en bicapas sintéticas modificará el empaquetamiento de la bicapa, principalmente en la región de la interfase, debido a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del glúcido y las moléculas de agua.

Las glicovesículas podrán ser utilizadas como sistemas multivalentes en la interacción carbohidrato-proteína. Dicha interacción permitirá predecir la forma en que se encuentran incorporados los glicolípidos en las vesículas. Considerando que el balance hidrofóbico-hidrofílico es un factor clave en la incorporación del glicolípido en la membrana y en la disponibilidad del glúcido para la interacción. A mayor número de unidades metilénicas en la cadena hidrocarbonada, la manopiranososa quedará insertada más profundamente en la interfase y por lo tanto, observaremos una disminución de la afinidad por la lectina. La incorporación de un grupo extensor hidrofílico favorecerá la interacción con la lectina debido a que el glúcido quedará más expuesto en la región de la interfase.

3. Objetivo General

El objetivo de esta investigación es sintetizar estereoselectivamente alquil derivados de manopiranososa. Caracterizar fisicoquímicamente los sistemas microheterogéneos formados por estos surfactantes no iónicos derivados de manopiranososa en medio acuoso. Y además evaluar la interacción entre glicovesículas y una proteína específica de carbohidrato.

3.1. Objetivos específicos

1. Síntesis estereoselectiva de mono y di éteres de manopiranososa con diferente largo de cadena hidrocarbonada, específicamente en la posición anomérica de manopiranososa y su caracterización utilizando técnicas de ^1H RMN, polarimetría y espectrometría de masas.
2. Determinación de la formación de agregados supramoleculares de los derivados di-alquilados de manopiranososa. Caracterización: temperatura de transición, microviscosidad y micro-polaridad.
3. Determinación del efecto de concentraciones subléxicas de surfactante en la permeabilidad y caracterización de la solubilización de membranas.
4. Evaluación de la interacción de lectina específica con los derivados de manopiranososa sintetizados.
5. Análisis del efecto del espaciador etoxilado ubicado entre el residuo azúcar y la cadena hidrocarbonada en la interacción con lectina.

4. Materiales

4.1. Reactivos

Octanol, dodecanol, hexadecanol, 1-bromooctano, 1-bromododecano, 1-bromohexadecano, BF_3OEt_2 , SnCl_4 (1M en CH_2Cl_2), difenil hexatrieno (DPH), glicerol, manopiranososa, POPC (palmitoil-fosfatidil-colina), DPPC (dipalmitil-fosfatidil-colina), Con A (Concanavalin A), BSA (bovine serum albumin), mercapto-11-undecanol y colesterol fueron adquiridos a la empresa Sigma-Aldrich y Laurdan a Molecular Probes. Todos ellos fueron utilizados sin previa purificación.

DODAC producto técnico de Herga Industries fue extraído y recristalizado seis veces desde acetona. Pireno (Sigma Aldrich) fue recristalizado 3 veces desde metanol.

Todos los solventes utilizados fueron secados sobre tamiz molecular de 3Å o 4Å.

4.2. Instrumentación

La obtención de pellets de las vesículas (liposomas) cargadas de monoalquil manopiranososa se realizó por ultracentrifugación, XL-90 Beckmann, rotor sw 55TI, 120000g, 20°C.

Las medidas de fluorescencia en estado estacionario se llevaron a cabo en dos espectrofluorímetros: Fluorolog Tau-2 (SPEX, Jobin Yvon), controlado a través de un computador con software DMF 300 y PC1 (ISS Inc., Champaign, IL), controlado a través de un computador con software Vinci.

Las medidas de fluorescencia resueltas en el tiempo se realizaron en un equipo Fluotime 200 (PicoQuant), que emplea la técnica de conteo de fotón único correlacionado en el

tiempo (TCSPC) empleando una tarjeta multicanal Timeharp 250 (PicoQuant). Como fuente de excitación se emplearon láseres o LEDs de la longitud de onda apropiada.

Las imágenes de intensidad y GP fueron adquiridas en un microscopio de dos fotones (Zeiss Axiovert S100TV) acoplado a una tarjeta Becker and Hick 830 (Becker and Hickl, Berlin). Se usó como fuente de excitación un láser Ti:Sapphire (Spectra-Physics Mai Tai) con una frecuencia de repetición de 80 MHz a 780 nm. La señal de fluorescencia se separa en dos canales con filtros de 440/50 nm y 490/50 nm. Los datos se adquieren y tratan con el software SinFCS desarrollado en el Laboratory for Fluorescence Dynamics (www.lfd.uci.edu).

Todos los experimentos fueron realizados con control de temperatura empleando un baño termorregulado Fisons, HAAKE F3, con control de la décima de grado. El control de la temperatura se realizó directamente en la cubeta con una termocupla OMEGAETTE.

Para la preparación de vesículas unilamelares se utilizaron tres metodologías. Para la obtención de vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) se utilizó un equipo de sonicación de alta frecuencia de 400 Watts (Ultrasonic Homogeneizer, Cole Parmer) o un baño de ultrasonido (Liposomicator, Avanti lipids). En aquellas experiencias donde es necesaria una distribución de tamaños más estrecha, las vesículas preparadas por el método de sonicación fueron extruidas utilizando una membrana de 50 nm y un extrusor termostatzado de 10 ml (Northern Lipids, Thermobarrel extruder). Para la obtención de vesículas unilamelares grandes se utilizó el método de inyección, utilizando una bomba de jeringa (Cole Parmer series 74900).

Las medidas de dispersión dinámica de luz, DLS, fueron realizadas en un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) equipado con una láser verde (532nm). La intensidad de la luz dispersada fue detectada en un ángulo de 173°. El procesamiento de los datos se realizó con el software Zetasizer 6.2 (Malvern).

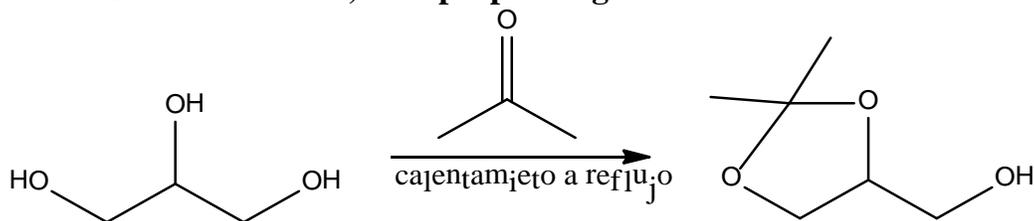
El estudio termodinámico de la interacción de manopiranososa con Concanavalina A fue realizado utilizando calorimetría isotérmica de valoración en un MCS-ITC (Microcalorimetry Systems).

Las mediciones de espectrofotometría de absorción UV-Vis fueron realizadas en un espectrofotómetro 8453 (Agilent).

La determinación de las constantes cinéticas y de equilibrio de interacción entre glicoliposomas y Concanavalina A fueron realizadas utilizando resonancia plasmón superficial en un Two channel-Reichert2SPR 7500DC.

5. Síntesis

5.1. Síntesis de DL-1,2- Isopropilidenglicerol

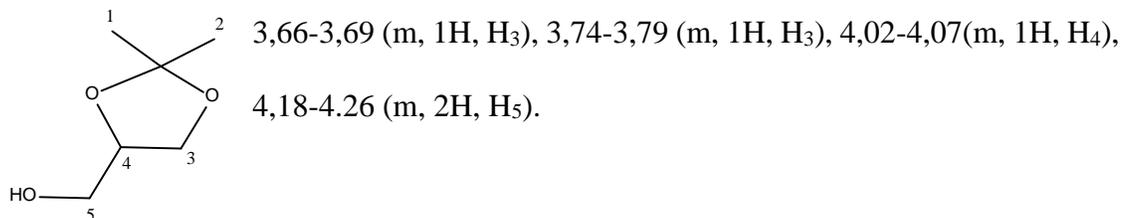


Se calienta a reflujo en un sistema Dean-Stark una solución que contiene 300 ml (240, 4 mol) de acetona, 80 ml (100 g, 1,1 mol) de glicerina, 300 ml de éter de petróleo 40-60 °C y 6 g (0,035 mol) de ácido p-toluensulfónico. La reacción es detenida cuando se han recogido aproximadamente 42 mL de agua.

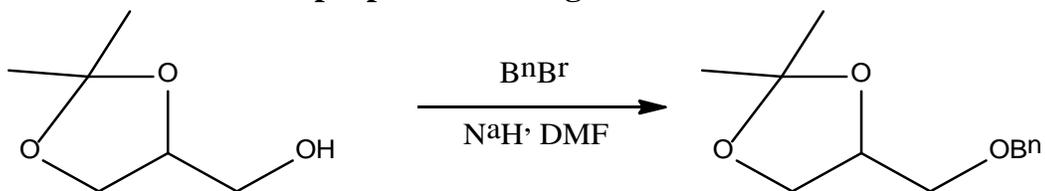
La purificación del isopropilidenglicerol fue realizada por destilación a presión reducida.

El producto fue recogido a los 65 °C a 11 mmHg.

Isopropilidenglicerol: ^1H NMR (300 MHz, MeOH) δ 1,37 (s, 3H, H₁), 1,43 (s, 3H, H₂),

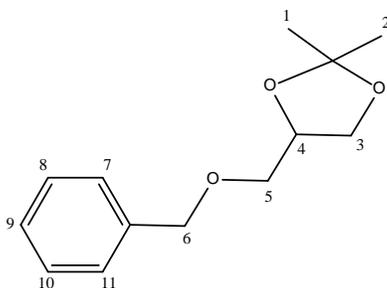


5.2. Síntesis de Isopropiliden bencilglicerol

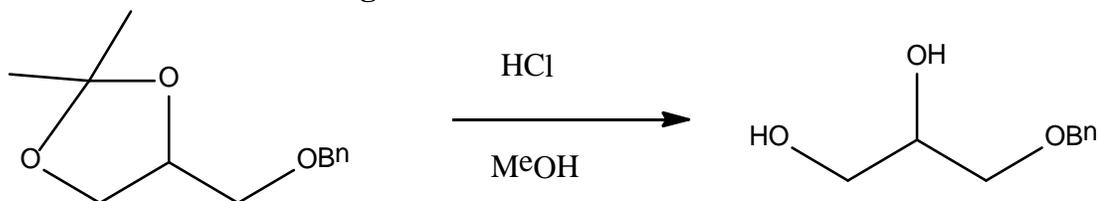


Se disuelven 3 g (0,022 mmol) de isopropilidenglicerol en 250 mL de dimetilformamida, se agregan en porciones 2 g (0,08 mol, 3,5 equivalentes) de hidruro de sodio. Transcurridos 30 min de agitación a temperatura ambiente, se sumerge en un baño de hielo. Se adicionan gota a gota 5,8 g (4 mL, 0,034 mol) de bromuro de bencilo, terminada la adición, la reacción se deja por 12 horas a temperatura ambiente. La reacción se detiene agregando MeOH. El crudo de reacción se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica es secada con Na₂SO₄ anhidro. La purificación se realiza mediante columna cromatográfica utilizando como fase eluyente una mezcla tolueno-acetona 5:1.

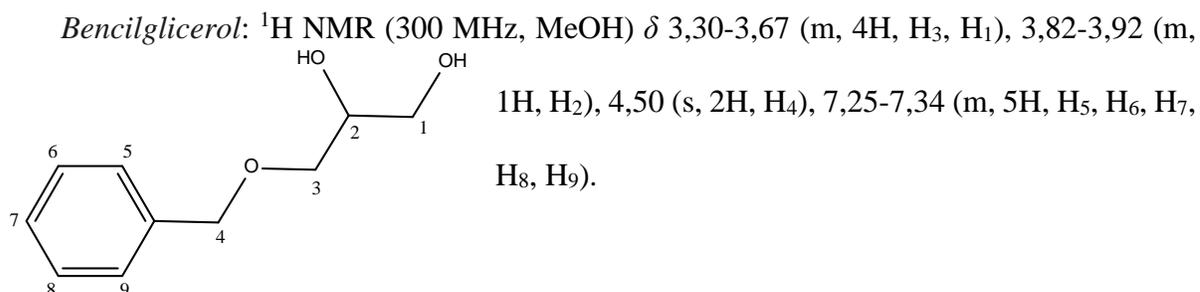
Isopropiliden bencilglicerol: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1,38 (s, 3H, H₁), 1,41 (s, 3H, H₂), 3,41-3,55 (m, 2H, H₅), 3,67-3,74 (m, 1H, H₃), 3,97-4,02 (m, 1H, H₃), 4,24-4,35 (m, 1H, H₄), 4,55 (d, 2H, H₆), 7,29-7,3 (m, 5H, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁).



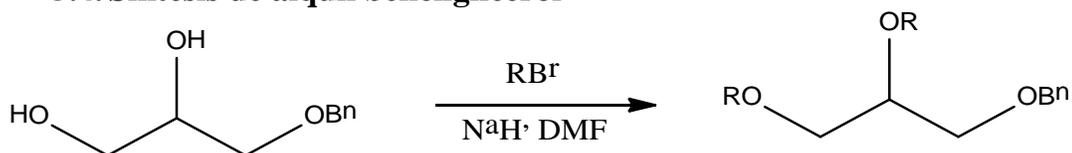
5.3. Síntesis de bencilglicerol



Se disuelven 4,479 g (21,5 mmol) de isopropilidenglicerol en 60 mL de metanol, y se adicionan 10 mL de una solución de ácido clorhídrico 2 M. La reacción es agitada a temperatura ambiente durante 16 horas. El avance de reacción se siguió por t.l.c. con fase móvil ciclohexano-acetato de etilo 5:1. Finalmente se añade NaHCO_3 , se filtra y se evapora a sequedad.



5.4. Síntesis de alquil bencilglicerol

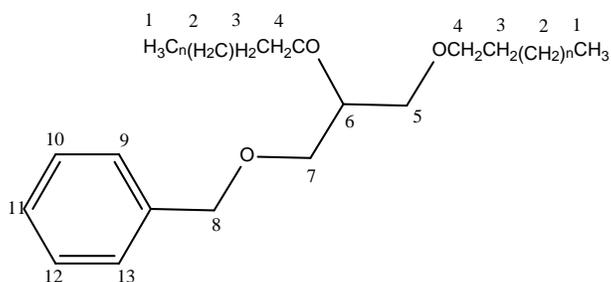


Se disuelven 29,4 g (0,128 mol) de bencilglicerol en 250 mL de DMF, se agrega, en porciones, 9,2 g (0,038 mol, 3,5 equivalentes) de hidruro de sodio. Transcurridos 30 min de agitación a temperatura ambiente, se baja la temperatura con un baño de hielo y se adicionan gota a gota 571 mmol del halogenuro de alquilo correspondiente; terminada la

adición la reacción se deja agitando a temperatura ambiente y se sigue el avance mediante t.l.c utilizando con fase móvil ciclohexano-acetato de etilo 5:1.

Una vez terminada la reacción, se agrega metanol hasta que no se observe desprendimiento de hidrógeno. La reacción se diluye en agua y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica es secada con Na_2SO_4 anhidro.

La purificación se realiza mediante columna cromatográfica con fase eluyente ciclohexano-acetato de etilo 5:1.

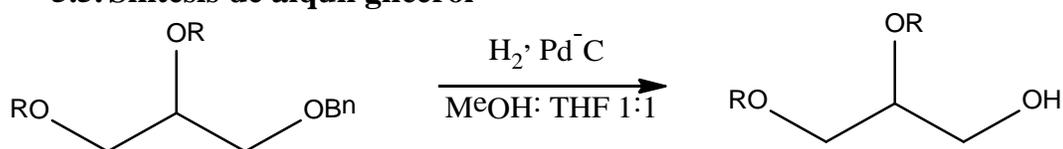


Octil Bencilglicerol (DOBG): ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 0,88 (t, 6H, H_1) 1,27 (s, 20H, H_2), 1,77-1,92 (m, 4H, H_3), 3,33-3,65 (m, 9H, H_4 , H_5 , H_6 , H_7), 4,54 (s, 2H, H_8) 7,24-7,36 (m, 5H, H_9 , H_{10} , H_{11} , H_{12} , H_{13}).

Lauril Bencilglicerol (DLBG): ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 0,88 (t, 6H, H_1) 1,27 (s, 36H, H_2), 1,77-1,92 (m, 4H, H_3), 3,33-3,65 (m, 9H, H_4 , H_5 , H_6 , H_7), 4,54 (s, 2H, H_8) 7,24-7,36 (m, 5H, H_9 , H_{10} , H_{11} , H_{12} , H_{13}).

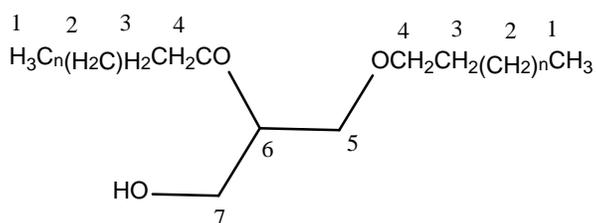
Palmitil Bencilglicerol (DPBG): ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 0,88 (t, 6H, H_1) 1,27 (s, 52H, H_2), 1,77-1,92 (m, 4H, H_3), 3,33-3,65 (m, 9H, H_4 , H_5 , H_6 , H_7), 4,54 (s, 2H, H_8) 7,24-7,36 (m, 5H, H_9 , H_{10} , H_{11} , H_{12} , H_{13}).

5.5. Síntesis de alquil glicerol



Se disuelven 9 gr del alquil glicerol correspondiente en 20 mL de una mezcla THF-MeOH 1:1, se agregan 900 mg de catalizador paladio-carbono. La solución es agitada a temperatura ambiente y en atmósfera de hidrógeno.

El crudo es purificado por cromatografía en columna de gel de sílice, ciclohexano-acetato de etilo 5:1.

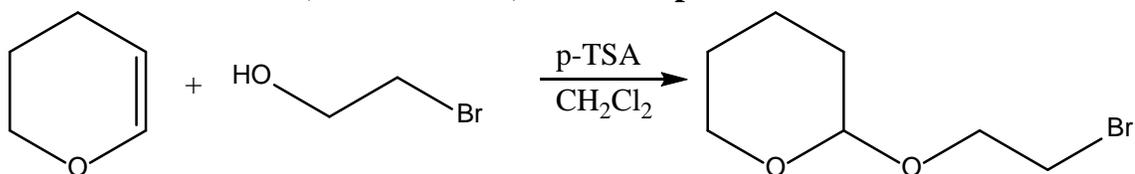


Octil glicerol (DOG): $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 0,88 (t, 6H, H₁) 1,25 (s, 20H, H₂), 1,50-1,65 (m, 4H, H₃), 3,38-3,8 (m, 9H, H₄, H₅, H₆, H₇).

Lauril glicerol (DLG): $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 0,88 (t, 6H, H₁) 1,27 (s, 36H, H₂), 1,50-1,65 (m, 4H, H₃), 3,3-3,8 (m, 9H, H₄, H₅, H₆, H₇).

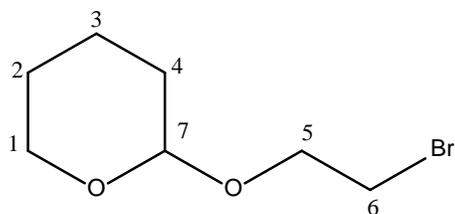
Palmitil glicerol (DPG): $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO) δ 0,88 (t, 6H, H₁) 1,27 (s, 52H, H₂), 1,77-1,92 (m, 4H, H₃), 3,33-3,65 (m, 9H, H₄, H₅, H₆, H₇).

5.6. Síntesis de 2-(2-Bromoetoxi)tetrahidropirano.



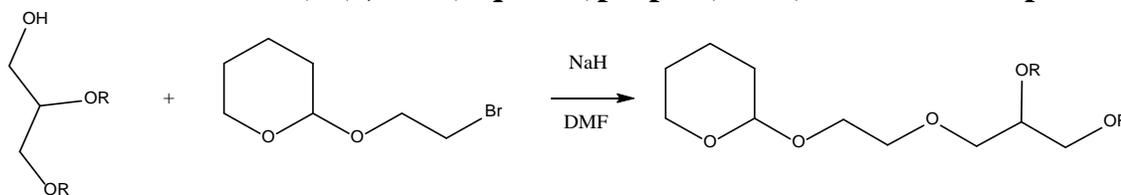
13,4 g (0,159 mol) de 3,4-Dihidro-2H-pirano fueron agregados a una solución de 0,13 g ($7,6 \times 10^{-4}$ mol) de p-TSA en 88 mL de diclorometano bajo atmósfera de nitrógeno. Luego de 10 min se adicionó gota a gota 12,4 g (7 mL, 0,99 mol) de 2-bromoetanol. La solución fue agitada a temperatura ambiente durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se agregaron 5 gr de NaHCO₃ a la reacción y se agitó durante 50 min. El crudo es filtrado, evaporado bajo presión reducida y purificado por cromatografía en columna de gel de sílice, ciclohexano- acetato de etilo 10 :1.

2-(2-Bromoetoxi)tetrahidropirano: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1,53-1,88 (m, 6H, H₄,



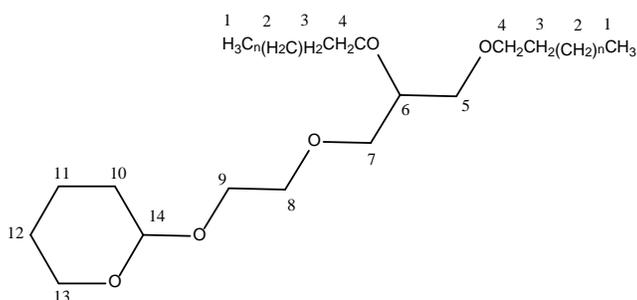
H₂, H₃), 3,47-3,57 (m, 3H, H₁, H₅), 3,71-3,81 (m, 1H, H₅), 3,84-3,92 (m, 1H, H₆), 3,97-4,05 (m, 1H, H₆), 4,66-4,88 (m, 1H, H₇).

5.7. Síntesis de 2-(2-(2,3-bis(alquiloxi)propoxi)etoxi)tetrahidro-2H-pirano.



Se disuelven 5,8 mmol de dialquilglicerol en 12 mL de DMF, se adicionan lentamente 6,5 mmol de NaH. Se deja a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se baja la temperatura con un baño de hielo para posteriormente adicionar gota a gota 2,87 mmol de 2-(2-Bromoetoxi)-tetrahidropirano. Se deja a temperatura ambiente durante 48 horas, transcurrido este tiempo se agrega MeOH para eliminar el exceso de NaH, se lava con agua y se extrae con acetato de etilo. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro.

El crudo es purificado por cromatografía en columna de gel de sílice, ciclohexano-acetato de etilo 5:1.

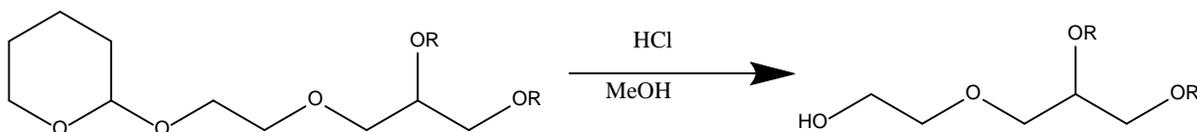


2-(2-(2,3-bis(octiloxi)propoxi)etoxi)tetrahidro-2H-pirano: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0,87 (t, 6H, H₁), 1,25 (s, 20H, H₂), 1,45-1,94 (m, 10H, H₃, H₁₀, H₁₁, H₁₂), 3,41-3,69 (m, 12H, H₄, H₅, H₇, H₈, H₉), 3,81-3,92 (m, 1H, H₆), 4,61-4,66 (m, 1H, H₁₄).

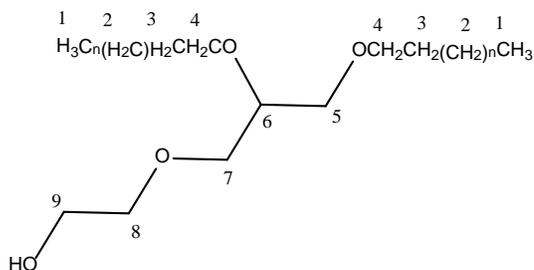
2-(2-(2,3-bis(dodeciloxi)propoxi)etoxi)tetrahidro-2H-pirano: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0,88 (t, 6H, H_1), 1,25 (s, 36H, H_2), 1,53-1,88 (m, 10H, H_3 , H_{10} , H_{11} , H_{12}), 3,47-3,57 (m, 12H, H_4 , H_5 , H_7 , H_8 , H_9), 3,84-3,92 (m, 1H, H_6), 4,66-4,88 (m, 1H, H_{14}).

2-(2-(2,3-bis(hexadeciloxi)propoxi)etoxi)tetrahidro-2H-pirano: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0,88 (t, 6H, H_1), 1,25 (s, 52H, H_2), 1,53-1,88 (m, 10H, H_3 , H_{10} , H_{11} , H_{12}), 3,47-3,57 (m, 12H, H_4 , H_5 , H_7 , H_8 , H_9), 3,84-3,92 (m, 1H, H_6), 3,97-4,05 (m, 1H, OCH_2), 4,66-4,88 (m, 1H, H_{14}).

5.8. Síntesis de 2-(2,3-bis(alquiloxy)propoxi)etan-1-ol.



Se disuelve 2-(2-(2,3-bis(alquiloxy)propoxi)etoxi)tetrahidro-2H-pirano en 20 mL de MeOH y se agregan 5 mL HCl 5N. Se agita a temperatura ambiente y luego se neutraliza con NaHCO_3 . Se disuelve con acetato de etilo y se lava con agua. La fase orgánica es secada con Na_2SO_4 anhidro. La reacción es cuantitativa.

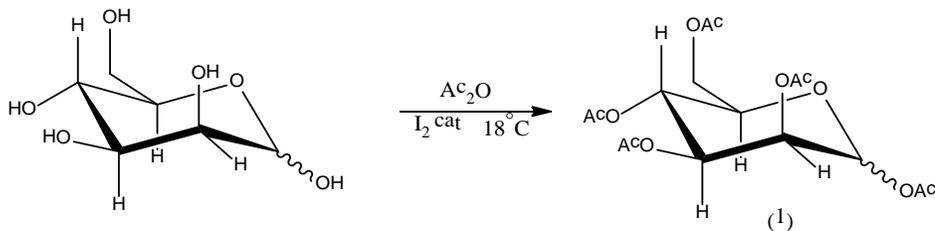


2-(2,3-bis(octiloxi)propoxi)etan-1-ol. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 0,88 (t, 6H, H_1), 1,28 (s, 20H, H_2), 1,45-1,65 (m, 4H, H_3), 3,36-3,78 (m, 13H, H_4 , H_5 , H_6 , H_7 , H_8 , H_9).

2-(2,3-bis(dodeciloxy)propoxi)etan-1-ol. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 0,88 (t, 6H, H_1), 1,26 (s, 36H, H_2), 1,49-1,62 (m, 4H, H_3), 3,40-3,74 (m, 13H, H_4 , H_5 , H_6 , H_7 , H_8 , H_9).

2-(2,3-bis(hexadeciloxy)propoxi)etan-1-ol. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 0,88 (t, 6H, H_1), 1,26 (s, 52H, H_2), 1,49-1,62 (m, 4H, H_3), 3,40-3,74 (m, 13H, H_4 , H_5 , H_6 , H_7 , H_8 , H_9).

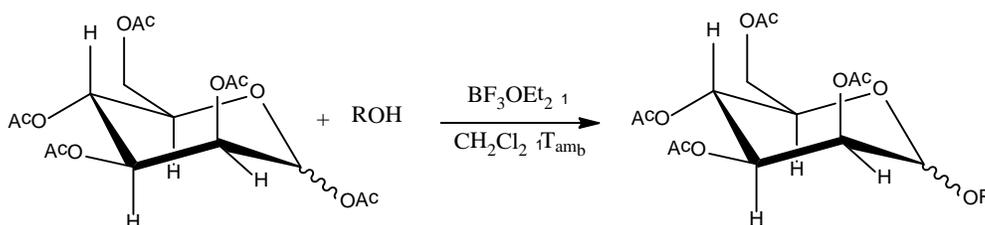
5.9. Síntesis de manopiranosas pentaacetato.



10 g de manopiranosas se suspenden en 50 mL de anhídrido acético a temperatura ambiente. Se adicionan 500 mg de I_2 (50 mg/g de azúcar). Cuando ya no se observa sólido blanco suspendido, se considera que la reacción ha concluido, y se adicionan 100ml de una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ saturada y luego se adiciona con precaución una solución de carbonato de sodio saturada hasta que no se observa desprendimiento de CO_2 . La fase acuosa es lavada con diclorometano y la fase orgánica es secada con Na_2SO_4 anhidro.

Manosa peracetilada: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2,01 (s, 3H, OCOCH_3), 2,1 (s, 3H, OCOCH_3), 2,17 (s, 3H, OCOCH_3), 2,22(s, 6H, OCOCH_3), 4-4,20 (m, 2H, H3, H4), 4,25-4,30 (m, 1H, CH_2), 5,75-5,85 (m, 3H, H2, H5, CH_2), 5,80 (s, 1H, βH1), 6,10(s, 1H, αH1).

5.10. Síntesis de alquil aceto manopiranosas (O-glicosilación).

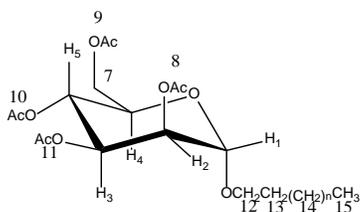


a) Utilizando SnCl_4 como ácido de Lewis.

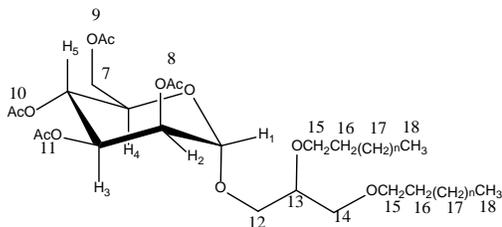
Se disuelven 10 mmol de manopiranosas peracetiladas en 70 ml de diclorometano seco. Se baja la temperatura de la reacción a 0°C , y se adiciona un equivalente de una solución 1 M de SnCl_4 en CH_2Cl_2 . La reacción fue agitada por 10 min y se adicionan gota a gota 1,2 equivalentes del alcohol correspondiente. La mezcla resultante fue agitada durante 16 horas. El crudo de reacción se disuelve en 50 mL de diclorometano y es vertido en 100 mL de una solución fría saturada de NaHCO_3 . La fase orgánica es separada y lavada con agua y secada con NaSO_4 . El crudo se filtra y concentra, la purificación se realiza por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como fase móvil ciclohexano-acetato de etilo 5:1 \rightarrow 2,5:1.

b) Utilizando BF_3OEt_2 como ácido de Lewis.

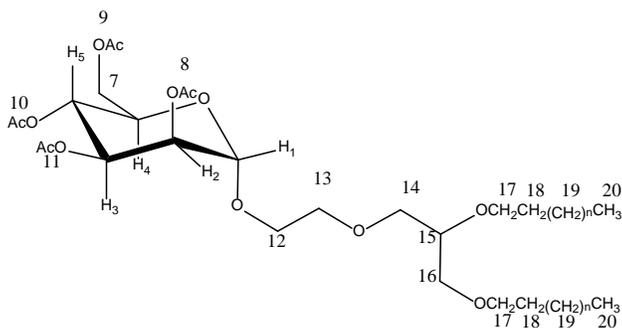
Se disuelven 10 mmol de manopiranososa peracetilada en 70 ml de diclorometano seco, se adicionan 5 equivalentes del alcohol correspondiente. La mezcla resultante se agita durante 20 min y luego se enfría en un baño de hielo. Se adicionan gota a gota 10 equivalentes de BF_3OEt_2 . La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Se adicionan 50 mL de diclorometano y el crudo de reacción se vierte en agua fría. La fase orgánica se separa y lava con una solución saturada de NaHCO_3 , agua y finalmente se seca con NaSO_4 anhidro, se filtra y concentra. La purificación se realiza por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como fase móvil ciclohexano-acetato de etilo 5:1 \rightarrow 2,5:1.



n-Octil-2,3,4,6-tetra-*O*-acetil- α -manopiranososa: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0,90 (t, 3H, H_{15}), 1,30 (s, 10H, H_{14}), 1,50-1,65 (m, 2H, H_{13}), 2,00 (s, 3H, H_9), 2,1 (s, 3H, H_8), 2,17 (s, 3H, H_{11}), 2,22(s, 3H, H_{10}), 3,40-3,50 (m, 1H, H_{12}), 3,60-3,70 (m, 1H, H_{12}), 3,90-4,01 (m, 1H, H_4), 4,05-4,15 (m, 1H, H_7), 4,25-4,35 (m, 1H, H_7), 4,80 (s, 1H, H_1), 5,20-5,40 (m, 3H, H_3 , H_5 , H_2).



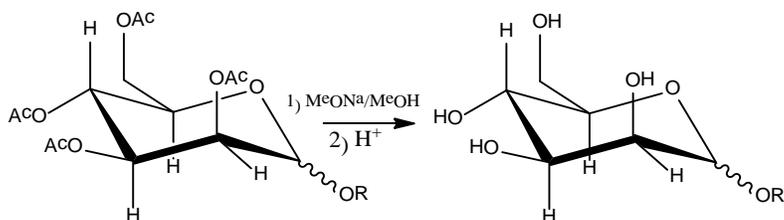
(2,3-bis(Octil)glicero)-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -manopiranososa: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0,89 (t, 6H, H_{18}), 1,28 (s, 20H, H_{17}), 1,48-1,66 (m, 4H, H_{16}), 1,99(s, 3H, H_9), 2,04 (s, 3H, H_8), 2,11 (s, 3H, H_{10}), 2,16(s, 3H, H_{11}), 3,34-3,65 (m, 9H, H_{12} , H_{13} , H_{14} , H_{15}), 3,68-3,87 (m, 1H, H_4), 4,0-4,18 (m, 2H, H_7), 4,23-4,35 (m, 1H, H_5), 4,87 (s, 1H, H_1), 5,21-5,41 (m, 3H, H_3 , H_5 , H_2).



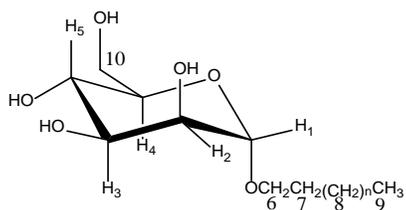
1-(2-(2,3-bis(octil)glicero)etoxi)- α -D-manopiranososa: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0,87 (t, 6H, H_{18}), 1,27 (s, 20H, H_{17}), 1,49-1,64 (m, 4H, H_{16}), 1,99(s, 3H, H_9), 2,04 (s, 3H, H_8), 2,11 (s, 3H, H_{10}), 2,16(s, 3H, H_{11}), 3,35-3,85 (m, 15H, H_7 , H_{12} , H_{13} , H_{14} , H_{15} , H_{16} , H_{17}), 4,02-4,14 (m, 2H, H_5), 4,28-4,35 (m, 1H, H_5), 4,87 (s, 1H, H_1), 5,24-5,40 (m, 3H, H_3 , H_5 , H_2).

Los corrimientos químicos de los otros derivados protegidos de manopiranososa son similares, sólo cambia la integración de la región alquílica.

5.11. Desprotección de alquil aceto manopiranosas.



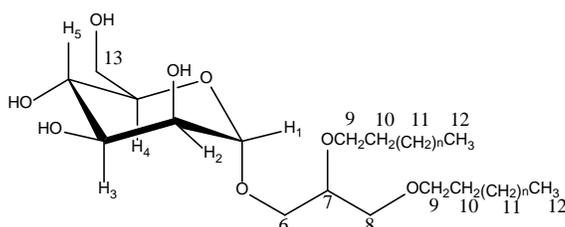
Se disuelven 0,2 gr de alquil aceto manopiranosas en una mezcla MeOH:CH₂Cl₂ (7,5:2), y se adicionan 0,5 mL de una solución 1 M de MeONa. La mezcla resultante se agita durante 24 horas a temperatura ambiente. El crudo se neutraliza con Amberlyst 15 y se concentra. El crudo de reacción se purifica por cromatografía flash (CH₂Cl₂-MeOH 10:1 → 5:1).



1-octil- α -D-manopiranosas (MOM): ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 0,90 (t, 3H, H₉), 1,26 (s, 10H, H₈), 1,50-1,60 (m, 2H, H₇), 3,30-4,05 (m, 8H, (H₂, H₃, H₄, H₅, H₁₀, H₆)), 4,8(s, 1H, H₁). *m/z* calc C₁₄H₂₈O₆Na [M+Na]⁺: 315,2; encontrado: 315,4. [α]_D +55,6 (0,42, MeOH).

1-dodecil- α -D-manopiranosas (MLM): ¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 0,85 (t, 3H, H₉), 1,26 (s, 18H, H₈), 1,40-1,55 (m, 2H, H₇), 3,20-3,65 (m, 8H, (H₂, H₃, H₄, H₅, H₁₀, H₆)), 4,6(s, 1H, H₁). *m/z* calc C₁₈H₃₆O₆Na [M+Na]⁺: 371,2; encontrado: 371,0. [α]_D +49 (0,39, MeOH).

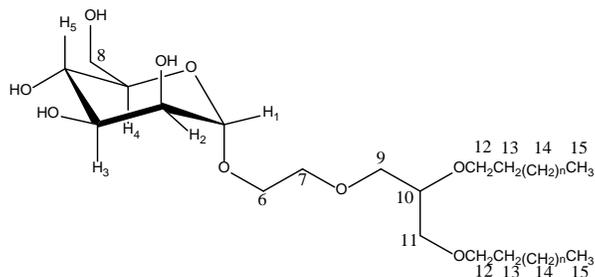
1-hexadecil- α -D-manopiranososa (MPM): ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 0,85 (t, 3H, H₉), 1,26 (s, 26H, H₈), 1,40-1,55 (m, 2H, H₇), 3,22-3,65 (m, 8H, (H₂, H₃, H₄, H₅, H₁₀, H₆)), 4,6(s, 1H, H₁). m/z calc C₂₂H₄₄O₆Na [M+Na]⁺: 427,3; encontrado: 423,5. $[\alpha]_D +42,3$ (0,35, MeOH).



1-(2,3-bis(octil)glicero)- α -D-manopiranososa (DOM): ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 0,9 (t, 6H, H₁₂), 1,30 (s, 20H, H₁₁), 1,50-1,62 (m, 4H, H₁₀), 3,38-4,05 (m, 15H, (H₂, H₃, H₄, H₅, H₁₃, H₉, H₇)), 4,85(s, 1H, H₁). m/z calc C₂₅H₅₀O₈Na [M+Na]⁺: 501,4 encontrado: 501,8. $[\alpha]_D +34,3$ (0,41, CHCl₃).

1-(2,3-bis(dodecil)glicero)- α -D-manopiranososa (DLM): ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 0,9 (t, 6H, H₁₂), 1,30 (s, 36H, H₁₁), 1,50-1,62 (m, 4H, H₁₀), 3,25-4,05 (m, 15H, (H₂, H₃, H₄, H₅, H₁₃, H₉, H₇)), 4,88(s, 1H, H₁). m/z calc C₃₃H₆₆O₈Na [M+Na]⁺: 613,5; encontrado: 614,0. $[\alpha]_D +25,8$ (0,39, CHCl₃).

1-(2,3-bis(hexadecil)glicero)- α -D-manopiranososa (DPM): ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 0,87 (t, 6H, H₁₂), 1,25 (s, 52H, H₁₁), 1,43-1,65 (m, 4H, H₁₀), 3,30-4,04 (m, 15H, (H₂, H₃, H₄, H₅, H₁₃, H₉, H₇)), 5,0 (s, 1H, H₁). m/z calc C₄₁H₈₂O₈K [M+K]⁺: 741,7; encontrado: 742,0. $[\alpha]_D +32,8$ (0,27, CHCl₃).



1-(2-(2,3-bis(octil)glicero)etoxi)-α-D-manopiranosas (DOEM): ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 0,88 (t, 6H, H₁₅), 1,28 (s, 20H, H₁₄), 1,44-1,65 (m, 4H, H₁₃), 3,33-4,03(m, 19H, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂), 4,87(s, 1H, H₁). m/z calc C₂₇H₅₄O₉K [M+K]⁺: 561,82; encontrado: 562,0. $[\alpha]_{\text{D}}$ +19,9 (0,30, CHCl₃).

1-(2-(2,3-bis(dodecil)glicero)etoxi)-α-D-manopiranosas (DLEM): ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 0,88 (t, 6H, H₁₅), 1,25 (s, 36H, H₁₄), 1,42-1,64 (m, 4H, H₁₃), 3,31-4,03(m, 19H, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂), 4,88(s, 1H, H₁). m/z calc C₃₅H₇₀O₉Na [M+Na]⁺: 657,5; encontrado: 657,49. $[\alpha]_{\text{D}}$ +29,3 (0,14, CHCl₃).

1-(2-(2,3-bis(hexadecil)glicero)etoxi)-α-D-manopiranosas (DPEM): ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 0,87 (t, 6H, H₁₅), 1,25 (s, 52H, H₁₄), 1,42-1,60 (m, 4H, H₁₃), 3,22-4,0(m, 19H, H₂, H₃, H₄, H₅, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁, H₁₂), 5,3(s, 1H, H₁). m/z calc C₄₃H₈₆O₉Na [M+Na]⁺: 769,6; encontrado: 770,62. $[\alpha]_{\text{D}}$ +31,3 (0,11, CHCl₃).

6. Metodología

6.1. Preparación de vesículas unilamelares

6.1.1. Método de ultrasonicación

El método de ultrasonicación es ampliamente utilizado en la preparación de vesículas y consiste en someter a una dispersión de lípido, en agua o tampón, a la acción de energía acústica proporcionada por una sonda de tungsteno o un baño ultrasónico adecuado. Las ondas de presión inducidas rompen las vesículas multilamelares grandes inicialmente formadas, para dar lugar a vesículas pequeñas unilamelares (SUV). El tamaño promedio habitual para los microagregados obtenidos por este método se encuentran por debajo de 100 nm de diámetro⁶¹.

Para preparar vesículas mixtas (formadas por más de un constituyente lipídico), la homogeneidad de la mezcla inicial se asegura preparando una solución en un solvente orgánico volátil (cloroformo o metanol) con las cantidades correspondientes de cada componente, que luego se evapora para generar una película homogénea de lípidos, que queda adherida a las paredes del recipiente. La muestra seca de 10 mM de lípidos totales se hidrata, utilizando agua o tampón, dependiendo de los lípidos empleados y se somete al procedimiento de sonicación con una sonda de tungsteno durante 3 ciclos de 120 s o en un baño ultrasónico durante 30 min. En el caso de la utilización de la sonda de tungsteno la suspensión fue centrifugada con el fin de eliminar partículas metálicas.

6.1.2. Método de extrusión

El método de extrusión es una opción ampliamente empleada cuando se requiere obtener vesículas de un tamaño definido. En general, se pueden preparar vesículas con tamaños entre 50 y 400nm, dependiendo éste del diámetro de los poros de la membrana o filtro de policarbonato a través del que se fuerza a pasar una suspensión previamente preparada de vesículas multilamelares o unilamelares de tamaño significativamente mayor al requerido. Además de obtenerse un tamaño específico, al repetir el proceso de extrusión al menos 10 veces, las vesículas preparadas con este método presentan una distribución de tamaño mucho más estrecha que las preparadas por sonicación.

En nuestro caso, el proceso de extrusión se realizó utilizando la dispersión de vesículas obtenidas por el método de sonicación. La extrusión se llevó a cabo empleando filtro de policarbonato con un tamaño de poro nominal de 50 nm y nitrógeno como medio capaz de ejercer la presión necesaria para que se produzca la extrusión, todo ello a una temperatura de 60°C (temperatura por sobre la de transición); el procedimiento fue repetido al menos en 10 oportunidades para lograr una distribución de tamaño uniforme.

6.1.3. Método de inyección

La preparación de vesículas unilamelares grandes (LUV) fue realizada utilizando el método de inyección, que consiste en la inyección de un determinado volumen de una solución concentrada de lípido en un solvente volátil (Cloroformo), en agua o tampón manteniendo la temperatura a 70°C y burbujeo de nitrógeno. La velocidad de inyección es de 0,27 ml/min o de 0,067 ml/min para preparar vesículas de DODAC o de fosfolípidos, respectivamente. Luego de inyectado el volumen de lípido requerido para alcanzar la

concentración requerida de 10 mM, la suspensión se mantiene a 70°C durante 30 min y finalmente a 1 hora a 30°C, antes de enrasar al volumen deseado.

6.1.4. Preparación de Vesículas Gigantes

Para la preparación de vesículas unilamelares con tamaños del orden de micrómetros (GUVs) se empleó el método de electroformación desarrollado por Angelova⁶². Se emplearon dos procedimientos diferentes, a) GUVs asentadas sobre el portaobjeto b) GUVs adheridas a un alambre de platino. En ambos casos se siembra alrededor de cinco microlitros de una solución de lípido (puro o mezcla) en cloroformo, con una concentración de 0,2 mg/ml sobre dos alambres de platino, se permite la evaporación del solvente bajo una corriente suave de nitrógeno. Luego se agrega una solución de sacarosa 100 mM (procedimiento a) o una solución de tampón (procedimiento b) a una temperatura superior a la de transición del lípido empleado. Durante una hora y manteniendo la temperatura constante, se aplica una onda eléctrica sigmoideal de 10 Hz y 1 Volt de amplitud a los alambres de platino. Transcurrido este tiempo, en el procedimiento a, se baja la frecuencia a 1 Hz para desprender las vesículas del alambre, se enfría y se recoge la solución de sacarosa conteniendo las GUVs en un tubo Eppendorf. En el procedimiento b, se cambia la temperatura a la de trabajo y se realizan inmediatamente las medidas con el microscopio. Para la medición de las vesículas preparadas por el método a, 50 microlitros de la solución madre de vesículas en sacarosa, se incorporan cuidadosamente a una solución isotónica de glucosa; las vesículas con sacarosa en su compartimiento acuoso interior, al ser más densas, se hunden hasta asentarse al fondo de la cubeta.



Figura 14-. Celdas de teflón utilizadas para preparar vesículas gigantes.

6.2. Determinación de tamaño promedio de los agregados

La técnica utilizada para determinar el tamaño de los agregados fue la dispersión dinámica de luz (DLS). Esta técnica relaciona los cambios de intensidad de la luz dispersada con el movimiento Browniano de las partículas, que a su vez tiene relación con el tamaño de las mismas. La muestra se irradia con un láser y se analizan las fluctuaciones de intensidad de la luz dispersada. Las partículas de menor tamaño se mueven rápidamente, mientras que las partículas más grandes lo harán más lentamente. La relación entre el tamaño de una partícula y su velocidad de desplazamiento queda definida por la ecuación de Stokes-Einstein.

La determinación se realizó agregando 600 μL de una dispersión 0,5 mM de lípidos totales en una cubeta de plástico de bajo volumen.

6.3. Determinación de potencial zeta de los agregados

El potencial zeta se determina a partir de la movilidad electroforética (estos dos parámetros se relacionan a través de la ecuación de Henry). El potencial zeta corresponde al potencial eléctrico que existe en el punto de corte o cizalla (región de separación de la doble capa de Stern y la capa difusa) de la doble capa eléctrica de las partículas. La

determinación de su magnitud se lleva a cabo en una celda con electrodos, a los cuales se aplica un potencial, las partículas se desplazan hacia el electrodo de carga opuesta y su velocidad es determinada utilizando velocimetría láser Doppler. En esta técnica la dispersión de luz en un ángulo de 17° es comparada con un haz de referencia.

El potencial zeta de los agregados formados por los derivados alquil manopiranosido fue determinado en tampón Hepes pH 7.4 10mM y 10mM NaCl y a una concentración de 0,5 mM de lípido total.

6.4. Fluorescencia de estado estacionario

La incorporación de sondas a las diferentes vesículas se realizó agregando alicuotas de una solución concentrada de la sonda respectiva en dimetilsulfóxido. La suspensión fue calentada por sobre la temperatura de transición de la vesícula durante 1 h y luego se permitió que la suspensión alcanzara temperatura ambiente lentamente.

6.4.1. Polarización generalizada de Laurdan (GP Laurdan)

Diversas sondas fluorescentes derivadas del aminonaftaleno han sido diseñadas y sintetizadas para evaluar la polaridad del medio a través del estudio de su relajación dipolar,⁶³⁻⁶⁵ y pueden ser empleadas para determinar la penetración de las moléculas de agua en una interfase. En 1979 Gregorio Weber diseñó la sonda Prodan (6-propanoil-2-dimetilaminonaftaleno), y para desplazar el reparto en membranas hacia la fase lipídica, la cadena alquílica de tres unidades se extendió a doce. Así el 6-dodecanoil-2-dimetilaminonaftaleno (Laurdan), se ubica primordialmente en la zona hidrofóbica, con

el grupo fluoróforo localizado en la región de los grupos glicerol en membranas fosfolipídicas. Esta sonda no presenta fluorescencia desde el medio acuoso.

El segmento naftalénico del Laurdan posee un momento dipolar debido a la separación de carga parcial entre el grupo amino y el grupo carbonilo. En estado excitado este momento dipolar aumenta, induce la reorientación de los dipolos de las moléculas de solvente que lo rodean. El estado excitado se estabilizará, (disminución de su energía) a medida que las moléculas de solvente se reorientan a su alrededor. Esta disminución de energía se traduce en un corrimiento espectral determinado por el medio (tipo de solvente o accesibilidad de este en medios microheterogéneos) que rodean al residuo naftalénico del Laurdan.⁶⁶

Como consecuencia del comportamiento fotofísico del Laurdan, su emisión fluorescente ha sido ampliamente utilizada para caracterizar la transición gel-fluido en membranas⁶⁷⁻⁷², y para identificar la coexistencia de fases^{67, 73-75}. Los mecanismos de desactivación de la fluorescencia del Laurdan en membranas han sido ampliamente discutidos en términos de la presencia y el efecto de las moléculas de agua en las diferentes fases y de su interacción con el estado excitado⁷⁶.

6.4.2. Anisotropía de la fluorescencia del Difenilhexatrieno (rDPH)

La anisotropía de la fluorescencia, entre otros factores, está relacionada con los movimientos rotacionales del fluoróforo que dan como resultado la depolarización de la emisión tras excitarlo con radiación polarizada. Los movimientos moleculares rotacionales hacen que los momentos dipolares asociados a la excitación y la emisión cambien de orientación durante el tiempo de vida de la sonda excitada, la magnitud del

desplazamiento dependerá del tamaño y de la forma de la especie que emite (o la molécula a la cual está unida la sonda fluorescente), además de la fluidez de su microambiente.

La anisotropía de la fluorescencia ha sido frecuentemente utilizada para estudiar la fluidez de vesículas lipídicas⁷⁷. La fluidez de la región correspondiente a las cadenas hidrocarbonadas en la bicapa ha sido descrita en términos de la microviscosidad aparente, y su magnitud se obtiene con una curva de calibración (obtenida midiendo la anisotropía en un grupo de diferentes medios, generalmente aceites de viscosidad conocida)⁷⁷. El DPH (Difenilhexatrieno) es una de las sondas fluorescentes más utilizada en estudios de anisotropía. Por su naturaleza hidrofóbica se repartirá preferentemente en la bicapa, lo que junto a su bajo rendimiento cuántico de emisión en agua, aseguran que las medidas de fluorescencia y depolarización de la misma, corresponderán a la sonda ubicada en la membrana⁷⁸.

6.5. Caracterización de procesos de solubilización de vesículas lipídicas sintéticas

Los mecanismos involucrados en el proceso de solubilización de vesículas lipídicas por la incorporación de detergentes han sido ampliamente estudiados por Lichtenberg⁷⁹, quien estableció que la solubilización de una bicapa involucra tres etapas (Figura 15 A). Inicialmente y a concentraciones bajas respecto a la concentración de lípido, el detergente se reparte entre la fase acuosa y la fase lipídica produciendo alteraciones en la bicapa, esta condición se denomina habitualmente sublítica. El aumento de la concentración de detergente conducirá a la saturación de la bicapa, con el consiguiente aumento de su concentración en la fase acuosa, hasta alcanzar la cmc y cuando se forman micelas, éstas

removerán lípidos de la membrana, formándose micelas mixtas (detergente – lípido). Esta etapa se denomina solubilización, y en ella se observa la disminución del tamaño de las vesículas/liposomas. La tercera etapa se alcanza cuando ya no quedan vesículas o membranas en la solución, habiendo presentes sólo micelas mixtas.

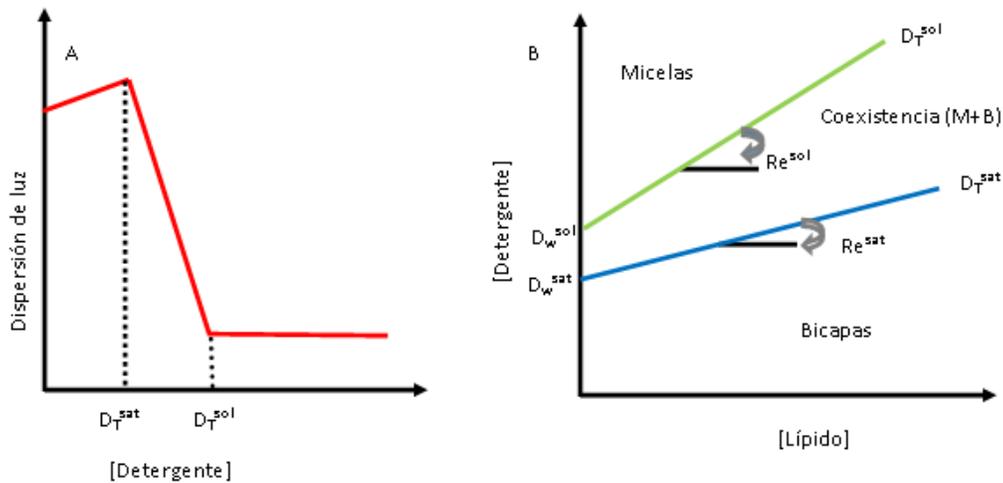


Figura 15-. Caracterización de mezclas detergente-lípido. (a) Descripción esquemática del proceso de solubilización monitoreado por dispersión de luz. (b) Dependencia de las concentraciones de detergente necesarias para saturar y solubilizar la mebrana en función de la concentración de lípido.

El proceso de solubilización de la membrana puede ser caracterizado con dos parámetros críticos, la concentración de saturación y la de solubilización (C_{sat} y C_{sol}), cuando éste se evalúa manteniendo la concentración de lípido (constituyente de las vesículas) constante.

Cuando se cumple el modelo propuesto por Lichtenberg, los parámetros C_{sat} y C_{sol} , dependen linealmente con la concentración de lípido, como se observa en el diagrama de fases de la Figura 15 B. Este comportamiento es descrito por la ecuación 1.

$$C_t^c = C_W^c + C_B^c = C_W^c + R_e^c L \quad (1)$$

donde, C_i es a concentración total de surfactante en cada punto de quiebre y R_e corresponde a la razón surfactante/lípido, C_B y C_w son las concentraciones analíticas de surfactante en la fase lipídica y acuosa, respectivamente. El superíndice c, indica los diferentes puntos críticos observados.

La constante de reparto puede ser definida a partir de las fracciones molares del surfactante en ambas fases, ecuación 2, y es posible determinar su magnitud para las diferentes etapas del proceso de solubilización de vesículas por un detergente.

$$K_{bic/ac} = \frac{\chi_{bic}}{\chi_{ac}} \quad (2)$$

donde, χ_{bic} y χ_{ac} son las fracciones molares del soluto en la fase lipídica y acuosa, respectivamente. La ecuación 2 puede ser reescrita considerando las concentraciones de soluto en ambas fases, como se muestra en la ecuación 3.

$$K_{bic/ac} = \frac{\frac{C_B}{C_B+L}}{\frac{C_W}{C_W+W}} = \frac{C_B(C_W+W)}{(C_B+L)C_W} \quad (3)$$

donde, L y W son las concentraciones de las fases lipídica y acuosa. Considerando que la concentración de detergente en la fase acuosa es muy baja comparada con la concentración del agua, la constante de reparto se puede definir de acuerdo a la ecuación 4.

$$K = \frac{C_B}{[(L+C_B)C_W]} \quad (4)$$

Las concentraciones de la ecuación 4 se despejan de la ecuación 1 y considerando la definición de $R_E=C_b/L$, la ecuación puede ser reescrita obteniéndose la ecuación 5.

$$K = \frac{R_E}{[(1+R_E)C_W]} \quad (5)$$

6.6. Determinación de la temperatura de transición de fase de vesículas. Efecto de la adición de surfactantes

En una membrana, una transición de fase corresponde al cambio conformacional de las cadenas alquílicas desde una fase ordenada (fase gel) a una fase desordenada (fase líquido-cristalina) o viceversa; este cambio de fase ocurre a una determinada temperatura conocida como temperatura de transición que puede ser modificada por la incorporación de aditivos. Dependiendo del tipo de interacción, el aditivo y los lípidos, la temperatura de transición de fase puede aumentar, disminuir o simplemente desaparecer (la transición deja de ocurrir). En general los aditivos pueden corresponder a una amplia variedad de compuestos tales como; polipéptidos, proteínas, detergentes, colesterol, ácidos grasos y drogas⁸⁰.

La disminución de la temperatura de transición de las membranas lipídicas, se puede estudiar tal como se analiza y describe la disminución del punto de congelación para sistemas bifásicos propuesto por Van't Hoff.

Para que el modelo de Van't Hoff sea aplicable, deben cumplirse las siguientes condiciones: i) el surfactante se incorpora en la membrana lipídica estableciéndose el equilibrio de reparto entre la fase acuosa y la membrana. ii) las moléculas de surfactante incorporadas en la membrana en estado líquido cristalino se encuentran homogéneamente distribuidas, mientras que, en estado gel se producirá separación de fase (dominios)⁸¹.

La ecuación 6 describe la disminución de la temperatura de transición de fase de una vesícula por la adición de un aditivo A.

$$-\Delta T = \frac{\left(1 - K_g\right) K_{bic} \frac{RT_0^2}{a_c}}{55,5 \Delta H_t^0} C_A = \frac{K_{obs} RT_0^2}{55,5 \Delta H_t^0} C_A \quad (6)$$

donde, C_A corresponde a la concentración total de aditivo agregada, ΔH_t^0 es el cambio de entalpía estándar de la transición de fase en ausencia de detergente, K_{obs} corresponde a la constante de partición aparente del detergente en la fase lipídica.

6.7. Determinación del coeficiente de partición de monoalquil manopiranososa en vesículas unilamelares grandes

Para la determinación del coeficiente de partición de los derivados MXM en las diferentes vesículas unilamelares grandes (LUVs) es necesario, una vez alcanzada la condición de equilibrio, separar y cuantificar el derivado de manopiranososa que no se incorporó en la membrana y quedó en la fase acuosa. Para este propósito se utilizaron dos metodologías diferentes: columna de filtración en gel (separación por exclusión) y centrifugación.

Para la primera metodología se utilizó una columna de 20 cm longitud y 1 cm de diámetro rellena con Sephadex G-25, el tiempo (o volumen) de retención de las LUVs se determinó utilizando vesículas marcadas con azul de metileno (MB). La segunda metodología, ultracentrifugación a 120.000g (35.300 rpm), permite separar las vesículas de la fase acuosa sedimentándolas. En este procedimiento se debe tener la precaución de que en el sobrenadante no quedan vesículas de menores dimensiones, como verificación, se adiciona rubreno y luego de la centrifugación se evalúa la intensidad de fluorescencia de

rubreno presente en el sobrenadante respecto a la intensidad inicial. El precipitado obtenido se redisuelve y sonica.

Luego de realizados ambos procedimientos se determinó espectroscópicamente la concentración de manopiranososa en la fase lipídica.⁸² Para aplicar este procedimiento de cuantificación se mezclan 0,5 ml de solución de manopiranososa (fracción recolectada de la columna y el precipitado obtenido de la centrifugación) con 1 ml de una solución acuosa de fenol al 5% y finalmente se adicionan 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. El azúcar del detergente se deshidrata obteniéndose un derivado de furfural, que al interaccionar con fenol, forma un compuesto coloreado. Tras una hora a temperatura ambiente se evalúa la absorbancia a 490 nm y la concentración de azúcar se determina empleando una curva de calibración.

La constante de partición está definida como la razón de las fracciones molares de MXM en cada una de las fases, según la ecuación 7.

$$K_{\chi} = \frac{\chi_b}{\chi_{ac}} \quad (7)$$

donde, χ_b y χ_{ac} corresponden a la fracción en moles de MXM en la fase lipídica y acuosa respectivamente. Las fracciones molares pueden ser determinadas a partir de las ecuaciones 8 y 9.

$$\chi_b = \frac{D_b}{D_b+L} \quad (8)$$

$$\chi_{ac} = \frac{D_{ac}}{D_{ac}+W} \quad (9)$$

Donde, L y W corresponden a la concentración de lípido y agua respectivamente.

6.8. Ensayos de aglutinación inducidos por la presencia de proteínas

Los sistemas multivalentes se caracterizan por favorecer la agregación y como consecuencia se observa un aumento de tamaño de los agregados. La determinación del cambio de tamaño producto de la interacción con una proteína se puede relacionar con disponibilidad/accesibilidad del residuo manopiranosido presente en la membrana para interactuar con la proteína que se agrega a la solución, Concanavalina A en este caso.

La determinación del tamaño de los agregados en presencia y ausencia de Con A se realizó utilizando dispersión dinámica de luz (DLS).

Las suspensiones en presencia y ausencia de Concanavalina A fueron agitadas a 25°C durante 48 h, para permitir que se alcance el equilibrio en la interacción entre la proteína y las membranas, para posteriormente realizar la medida de DLS. Se utilizaron suspensiones con una relación molar de Con A/lípido igual a 100 y HEPES salino pH 7,4(10 mM Hepes, 10 mM NaCl, 0,1 mM de CaCl₂ y MnCl₂) como medio dispersante.

6.9. Calorimetría isoterma de valoración

La calorimetría isotérmica de valoración (ITC, isothermal titration calorimetry) es una técnica que mide directamente el calor absorbido o liberado en un proceso particular, que al ocurrir a presión constante corresponde al cambio de entalpía asociado al proceso. Del análisis de la información obtenida con estas medidas, es posible determinar la constante de asociación, K , el cambio de entalpía de unión, ΔH , y la estequiometría de proceso de asociación, n . Y, por ende, es posible determinar la energía libre de Gibbs, ΔG , y la entropía, ΔS , de formación del complejo.

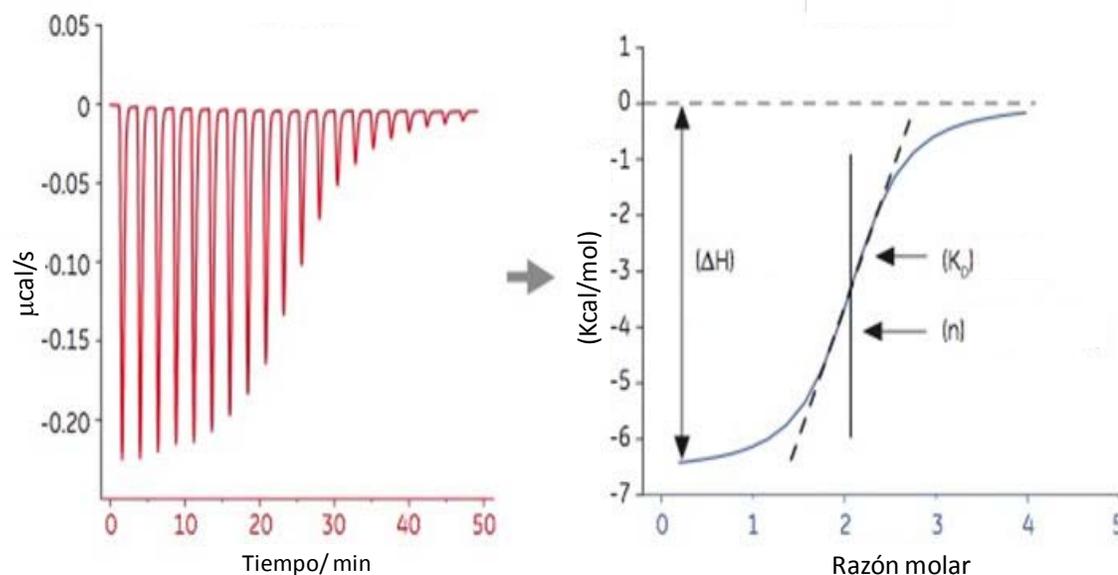


Figura 16-. Representación de un termograma y del ajuste sigmoideal de los datos obtenidos.

En la Figura 16 se muestra un experimento típico de ITC, en el cual se realizaron inyecciones sucesivas de un ligando. A medida que la concentración de ligando aumenta, los sitios de unión de la proteína disponibles para interactuar disminuyen, y como consecuencia el calor medido disminuye hasta que se alcanza el punto de saturación. Mediante un cálculo de mínimos cuadrados es posible obtener los parámetros previamente definidos.

Las constantes de equilibrio obtenidas de la curva sigmoidea experimental expresadas en unidades de concentración⁻¹ (generalmente M⁻¹ o mM⁻¹), se deben normalizar a concentraciones estándar (unitarias) para poder determinar el cambio de energía libre de Gibbs en condiciones estándar utilizando la ecuación 10.

$$\Delta G^0 = -RTL\ln K^0 \quad (10)$$

La determinación del cambio de entropía estándar, ΔS^0 , se realizó utilizando la ecuación 11.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (11)$$

En este trabajo, a una solución de 5 mM de lípidos totales (preparados como vesículas pequeñas, SUVs, por sonicación) en tampón salino pH 7,4 (10 mM Hepes, 10 mM NaCl, 0,1 mM de CaCl_2 y MnCl_2 , fueron adicionadas alícuotas sucesivas de 7 μL de proteína Con A 10^{-2} mM.

6.10. Fluorescencia y anisotropía resueltas en el tiempo

La determinación de los cambios en el ordenamiento de los lípidos que constituyen la bicapa, debido a la interacción con la proteína se realizó empleando medidas de tiempo de vida y anisotropía resuelta en el tiempo con dos sondas fluorescentes, el Laurdan y el DPH. La sonda Laurdan se ubica en la región de la interfase⁶⁶ y DPH se ubica en la región hidrófoba más interna de la bicapa (cadenas hidrocarbonadas)⁷⁸. Ambas sondas fueron incorporadas a las membranas, mantenidas por sobre su temperatura de transición durante 1 hora, desde una solución de DMSO. Una vez incorporada la sonda, se adiciona a la solución una alícuota de proteína necesaria para alcanzar una relación en moles lípidos/proteína igual a 100 y se agita a 25°C durante 48 horas.

Las vesículas (SUVs) empleadas en estas experiencias fueron preparadas utilizando el método de sonicación, para luego ser extruidas con una membrana de 50nm y utilizando tampón HEPES salino pH 7,4(10 mM Hepes, 10 mM NaCl, 0,1 mM de CaCl_2 y MnCl_2) como medio de dispersión.

Las medidas de fluorescencia se realizaron en una celda termostaticada a 25°C, como fuente de excitación se utilizó un láser de 375 nm operando a una frecuencia de 10 MHz.

Para la determinación del tiempo de vida de fluorescencia de ambas sondas, la intensidad de emisión en función del tiempo es medida después del pulso de excitación, esta determinación se realiza utilizando el polarizador orientado en el ángulo mágico (54,7°) con el fin de evitar el efecto de la difusión rotacional sobre la emisión. A partir de un gráfico de la variación de la intensidad en función del tiempo, se obtiene el tiempo de vida del fluoróforo, ajustando las curvas experimentales a una función exponencial.

Cuando el tiempo de vida de las especies que emiten es similar al ancho del pulso de excitación, para el ajuste de los decaimientos es necesario realizar deconvolución. Para ambas sondas empleadas, el decaimiento de la intensidad de emisión se ajusta a un modelo bi-exponencial según la ecuación 12.

$$I(t) = A_1 e^{-t/\tau_1} + A_2 e^{-t/\tau_2} \quad (12)$$

donde, τ_1 y τ_2 corresponden a los dos tiempos de vida de fluorescencia de la sonda.

Una alternativa frecuentemente empleada para evitar la complejidad asociada a decaimientos multiexponenciales, es utilizar tiempos de vida promedio por amplitud (ecuación 13). Esta opción se utilizó para describir el efecto de las interacción con la proteína sobre la fotofísica de las sondas⁸³.

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum a_i \tau_i}{\sum a_i} \quad (13)$$

La anisotropía resuelta en el tiempo se determina fotoseleccionando la muestra con luz polarizada, para luego medir el decaimiento en el tiempo de la intensidad de emisión en sus componentes paralela y perpendicular a la excitación, empleando polarizadores verticales y horizontales. La dependencia temporal de la anisotropía queda descrita por la ecuación 14.

$$r(t) = \frac{I_{VV}(t) - GI_{VH}(t)}{I_{VV}(t) + 2GI_{VH}(t)} \quad (14)$$

donde G corresponde a un factor de corrección definido según la ecuación 15.

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (15)$$

Cuando las sondas fluorescentes están incorporadas en vesículas, el decaimiento de anisotropía a tiempos largos no alcanza el valor cero (depolarización completa) como se muestra en la Figura 17, este comportamiento es debido a que la sonda se encuentra en un entorno en el cual su difusión rotacional está restringida⁸⁴. Este comportamiento, denominado “wobbling in a cone” puede ser descrito de acuerdo a la ecuación 16.

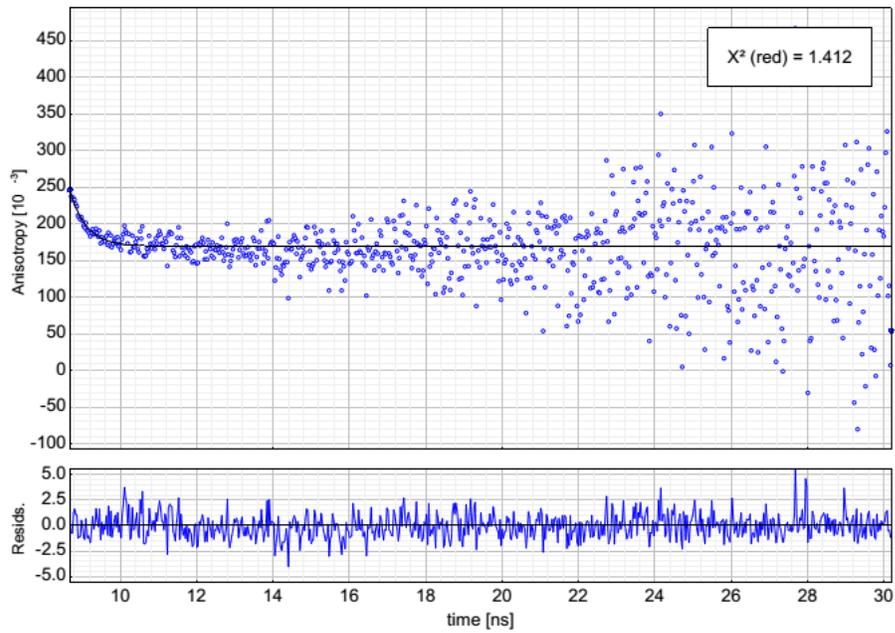


Figura 17-. Decaimiento de anisotropía resuelta en el tiempo de Laurdan incorporado en la membrana de las vesículas de DODAC a 25°C.

$$r(t) = (r_0 - r_\infty)e^{-\frac{t}{\tau_r}} + r_\infty \quad (16)$$

donde: r_∞ corresponde a anisotropía residual, r_0 anisotropía a $t=0$ y τ_r queda definido como tiempo de correlación rotacional relacionado con el movimiento del fluoróforo.

Considerando el modelo de “*wobbling in a cone*” desarrollado por Kinosita, K. et. al.⁸⁴, en el cual, se describe el movimiento del fluoróforo oscilando dentro de un cono en la bicapa. El cono puede ser caracterizado por un ángulo, relacionado con la amplitud del movimiento de oscilación del fluoróforo. La ecuación 17 muestra la relación matemática entre los parámetros de anisotropía de la fluorescencia y el ángulo del cono de tambaleo de la sonda.

$$\frac{r_{\infty}}{r_0} = \left\langle \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \right\rangle^2 \quad (17)$$

6.11. Resonancia plasmón superficial (SPR)

La técnica de SPR permite la detección y monitoreo en el tiempo de interacciones producidas en una superficie.

La resonancia de plasmón superficial es un proceso físico que ocurre cuando el plano de luz polarizada choca con un delgado film metálico bajo condiciones de reflexión interna total. Esto ocurre cuando la luz incidente pasa de un medio con mayor índice de refracción (prisma) a uno con menor (tampón), y se produce cuando el haz de luz incide con cierto ángulo crítico.

La Figura 18 muestra el esquema de configuración de Kretschmann⁸⁵ empleado para realizar las medidas de SPR. Un haz de una longitud de onda definida se hace pasar a través de un prisma con un ángulo θ , este haz alcanza la lámina de oro soportada en el prisma, produciendo la excitación de los plasmones superficiales. La excitación de los plasmones genera un campo que se expande hacia el medio sobre la lámina de oro. Este campo se denomina onda evanescente debido a que la amplitud de la onda disminuye exponencialmente con el incremento de la distancia de la superficie.

La interacción de las moléculas en la superficie del sensor produce cambios en el índice de refracción, que son proporcionales al número de moléculas enlazada a la superficie de dicho sensor.

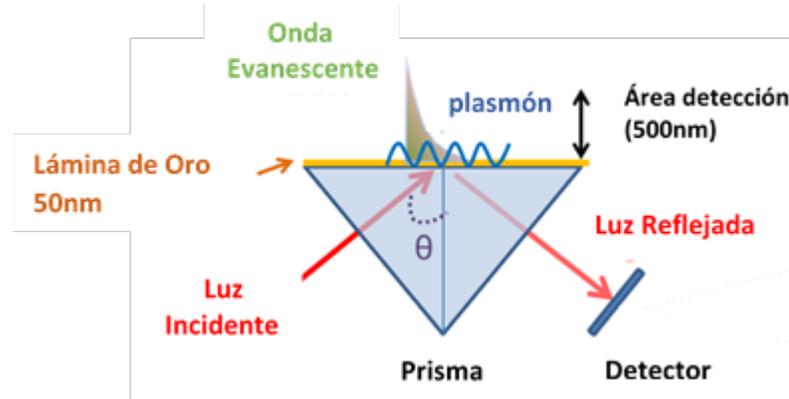


Figura 18-. Diagrama de configuración de Kretschmann para SPR.

En la Figura 19 se muestra un modelo de sensograma característico de una interacción molecular, y las fases experimentales que ocurren durante el proceso de interacción. La primera etapa corresponde a la fase de asociación en la cual se realizan inyecciones del analito de interés. Luego continúa la fase de disociación, donde se hace circular la solución de tampón de corrida, lo que produce la disociación de la interacción analito-ligando. Con el fin de remover todo el analito de la superficie, la última etapa experimental contempla la regeneración de la superficie, usando como fase móvil tampón HEPES salino con BSA.

A partir de las respuestas obtenidas en cada una de las fases es posible determinar las constantes cinéticas de los procesos de asociación y de disociación, para la interacción molecular estudiada.

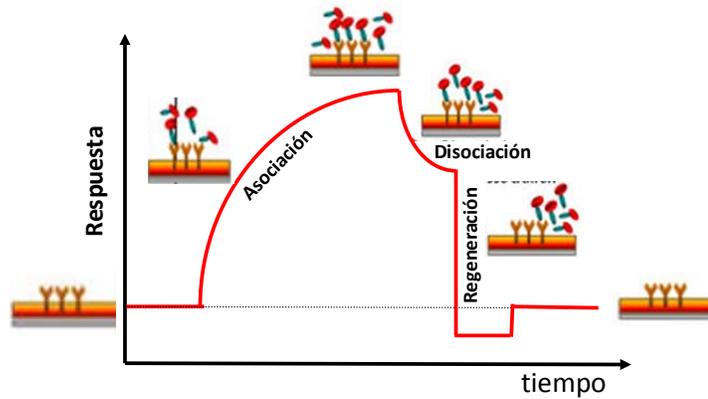


Figura 19-. Sensograma característico de la interacción molecular.

Los datos cinéticos son obtenidos a partir de los sensogramas considerando que la concentración de analito (Con A) se encuentra en exceso respecto a la concentración del ligando inmovilizado (bicapa). Bajo condiciones de pseudoprimer orden las fases de asociación y disociación pueden ser descritas según las ecuaciones 18 y 19 respectivamente.

$$R_t = R_{eq}[1 - e^{-k_{obs}t}] \quad (18)$$

$$R_t = R_0[e^{-k_{dis}(t-t_0)}] \quad (19)$$

donde, $k_{obs} = k_{aso}[Con A] + k_{dis}$, R_t , R_{eq} y R_0 corresponden a las respuestas instrumentales a tiempo t , en el equilibrio y del comienzo de la fase de asociación respectivamente. k_{aso} y k_{dis} corresponden a las constantes cinéticas del proceso de asociación y disociación de la interacción.

Las constantes de equilibrio de asociación pueden ser evaluadas a partir de la relación de las constantes cinéticas de asociación y disociación del proceso, de acuerdo a la ecuación 20.

$$K_A = \frac{k_{aso}}{k_{dis}} (M^{-1}) \quad (20)$$

La determinación de la interacción de la proteína, Con A, con diferentes vesículas y glicovesículas fue realizada inmovilizando estas últimas sobre el sensor. En primer lugar, el sensor de oro fue modificado con una monocapa de mercapto-11-undecanol sumergiéndolo en una solución etanólica 1 M de este compuesto. Luego, el sensor se lava varias veces con etanol y agua y se seca bajo una corriente de nitrógeno. El experimento se inicia haciendo pasar una solución de tampón HEPES 10 mM pH 7,4 (el mismo utilizado para preparar las vesículas), hasta la estabilización de la línea base, luego se hace circular la solución de vesículas 3 mM (lípidos totales) sólo por el canal de trabajo a 5 μ L/min durante 50 min. Una vez finalizado este tiempo, el flujo es incrementado a 250 μ L/min durante 10 min con el fin de eliminar las vesículas que se encuentran débilmente adsorbidas. Finalmente se comprueba la resistencia de la superficie a la solución regeneradora (solución acuosa de ácido fosfórico 100 mM). Una vez corroborada la estabilidad de los liposomas adsorbidos (observado en la respuesta en el canal de trabajo), el tampón de corrida se cambia a tampón HEPES salino pH 7,4 (10 mM Hepes, 10 mM NaCl, 0,1 mM de CaCl₂ y MnCl₂ y 0,5 mg/ml de BSA). Con el fin de disminuir interacciones inespecíficas entre la proteína y la monocapa del tiol, MUO, se adicionó BSA al tampón de corrida y el flujo fue modificado a 50 μ L/min. Una vez estabilizadas las respuestas del canal de trabajo y de referencia se realizan inyecciones de proteína (manteniendo un flujo de 50 μ L/min) siguiendo el siguiente protocolo experimental; fase de asociación, inyección de Con A de concentración conocida durante 90seg, luego, fase

de disociación con tampón de corrida durante 150 seg y finalmente inyección de solución de regeneración (H_3PO_4 100 mM) durante 60 seg.

Los parámetros experimentales óptimos, tales como; flujo de corrida en la interacción, concentración de BSA y concentración de Con A fueron previamente establecidos. Por ejemplo, el flujo del sistema se debe optimizar con el fin de eliminar de las ecuaciones cinéticas el componente difusional del analito.

7. Resultados y Discusión

7.1. Síntesis

Debido a la baja solubilidad que presentan los carbohidratos en los solventes comúnmente utilizados en síntesis orgánica y para aumentar la regioselectividad, la primera etapa en una síntesis que involucra carbohidratos, en general, corresponde a la protección de los numerosos grupos hidroxilo presentes.

Los alcoholes reaccionan rápidamente con ácidos carboxílicos activados tales como anhídridos de ácidos o cloruros de ácido bajo condiciones apropiadas para producir los correspondientes ésteres. Existen tres procedimientos descritos para acetilar azúcares, empleando: anhídrido acético/piridina, anhídrido acético/acetato de sodio o anhídrido acético/ácido de Lewis. Cada uno de estos métodos da como resultado productos con distinta estereoquímica en la posición anomérica. La acetilación utilizando piridina, genera como productos una mezcla de los dos anómeros, manteniéndose la relación de la mezcla inicial. En el caso de la acetilación con acetato de sodio la formación del anómero β se ve favorecida (este procedimiento requiere calentamiento a reflujo y la mutarrotación es más rápida que la reacción de acetilación, debido a que el anómero β es más nucleofílico éste reaccionará preferentemente). Por último, la acetilación usando un ácido de Lewis como catalizador conduce mayoritariamente a la formación del anómero favorecido termodinámicamente (efecto anomérico).

La síntesis de manopiranososa peracetilada fue realizada utilizando yodo como catalizador (Figura 20)⁸⁶. El producto obtenido presenta una razón anomérica α/β igual a 5/1,

(concordante con el predominio del anómero más estable termodinámicamente), y el rendimiento de la reacción es cercano al 100%.

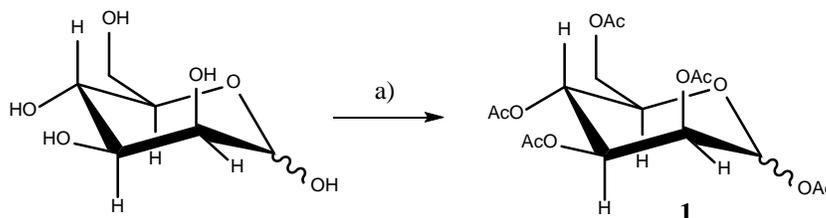


Figura 20-. Síntesis de 1,2,3,4,6-penta-O-acetil-manopiranoside. a) I₂/Ac₂O.

El paso siguiente es la alquilación del sacárido protegido. Se han reportados diversos métodos para la obtención de O-glucósidos, entre los que destacan el método de Fischer⁸⁷, el método de Koenings-Knorr⁸⁷ y el de Schmidt⁸⁷. En este trabajo, la obtención de O-glucósidos derivados de la manopiranoside, se realizó empleando el procedimiento propuesto por Fischer (Figura 20). La O-glicosilación se realizó en presencia de un alcohol y se usó como catalizador un ácido de Lewis. Entre los ácidos de Lewis más utilizados se encuentran las sales mercuríicas^{88, 89}, el SnCl₄⁹⁰, el BF₃Et₂O⁹¹, y el triflato de trimetilsililo (TMSOTf)⁹². En nuestro caso, se utilizaron los ácidos SnCl₄ y BF₃Et₂O. Los rendimientos obtenidos experimentalmente fueron variables, dependiendo tanto del tipo de ácido de Lewis como del alcohol utilizado.

En la Figura 21 se muestra el esquema de la estrategia sintética que fue utilizada para la obtención de los diferentes derivados de manopiranoside. La ruta sintética A (Figura 21) consideró el uso de un alcohol lineal comercial. En la preparación de derivados de manopiranoside con dos cadenas hidrocarbonadas es necesario sintetizar previamente el alcohol requerido (ruta B y C), mediante eterificación y protección de los grupos hidroxilo

presentes en la molécula de glicerol y un grupo extensor. La desprotección final de los grupos acetales de la manopiranososa, para obtener el manopiranosido puro, se llevó a cabo utilizando metóxido de sodio en metanol, con posterior neutralización utilizando una resina de intercambio de protones (Amberlyst 15, Merck).

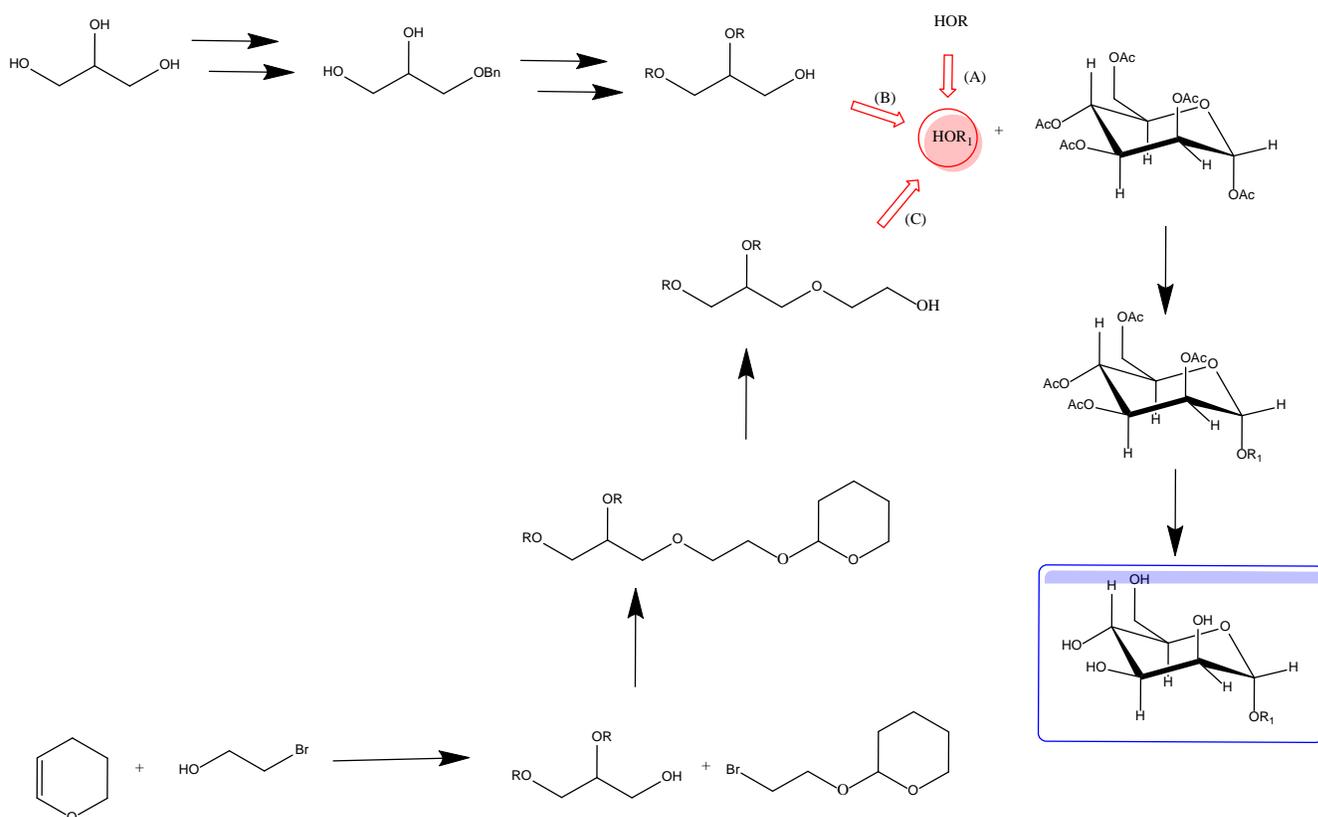


Figura 21-. Esquema sintético general para la obtención de los diferentes derivados de manopiranososa propuestos. R cadena hidrocarbonada con largo de 8, 12 y 16 unidades metilénicas.

La Figura 22 muestra las estructuras químicas de todos los derivados de manopiranososa sintetizados, incluyendo la nomenclatura y las abreviaciones utilizadas para nombrarlos.

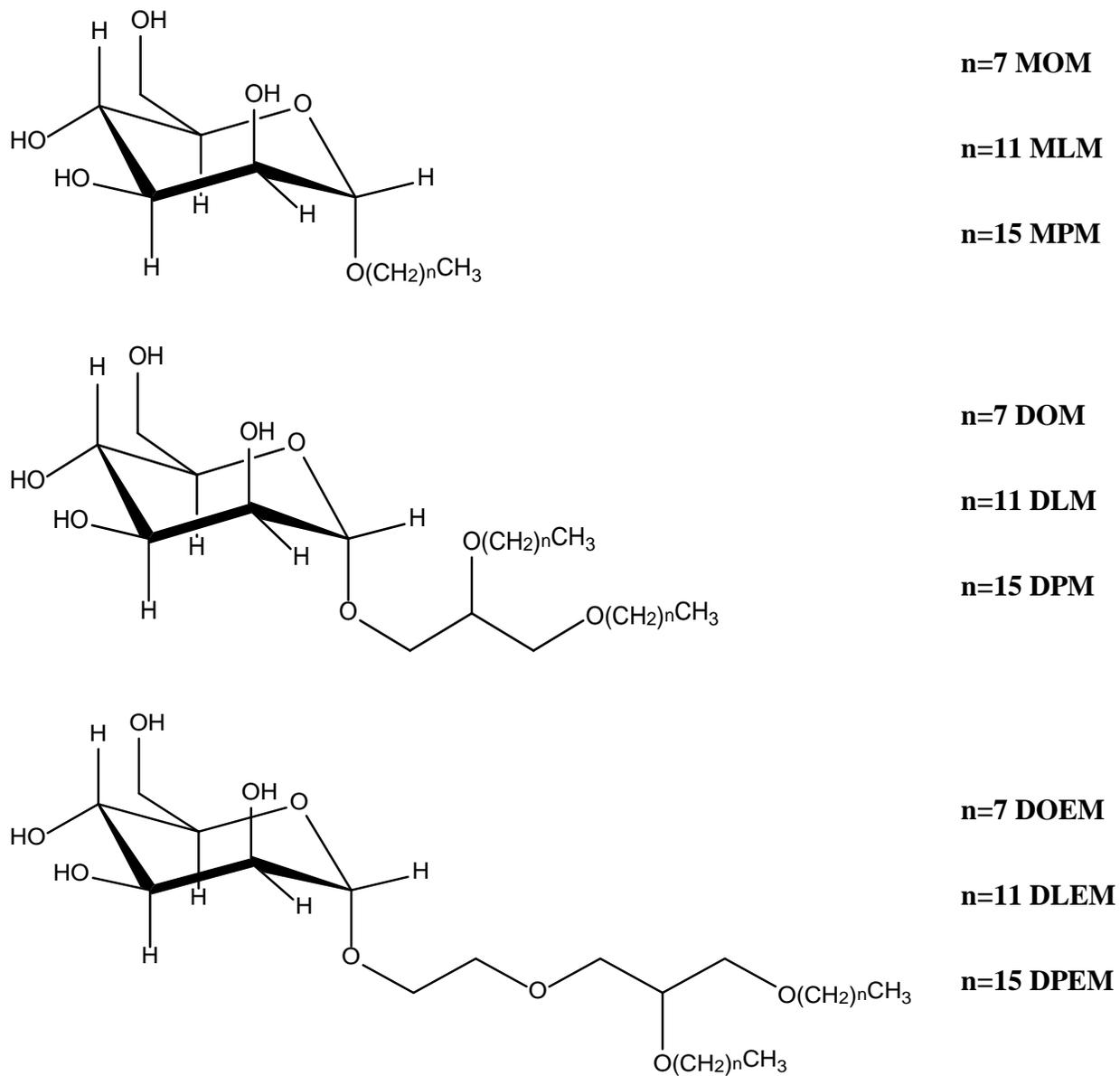


Figura 22-. Estructuras químicas de los derivados de manopiranosina sintetizados.

7.2. Caracterización de agregados formados por derivados de manopiranososa

7.2.1. Caracterización fisicoquímica de agregados formados por derivados alquil manopiranosidos

Debido a la naturaleza anfifílica de los derivados de manopiranososa sintetizados, en fase acuosa, éstos pueden agruparse para formar diferentes agregados, tales como; micelas, vesículas, bicapas, etc. Los agregados formados espontáneamente por derivados monoalquil manopiranososa (MXM) fueron caracterizados evaluando parámetros tales como; concentración de agregación crítica (cac), temperatura de transición, polaridad, viscosidad, tamaño y potencial zeta. Para estos compuestos la concentración necesaria para la formación de agregados corresponderá a la concentración de agregación crítica (cac), debido a que no se puede tener certeza de que éstos formen micelas.

La determinación de la concentración de agregación crítica de los tres derivados monoalquilados, MXM, se realizó empleando dos técnicas diferentes: medidas de tensión superficial y medidas de fluorescencia (empleando como sonda el ácido 8-Anilinaftalen-1-sulfónico, ANS). El quiebre en la tendencia de la propiedad medida (tensión superficial o intensidad de la fluorescencia) como consecuencia del aumento en la concentración del derivado de manopiranososa corresponderá a la concentración de agregación crítica para el derivado.

La concentración de agregación crítica (cac), es fuertemente influenciada por la estereoquímica del centro anomérico y del carbono 4, C4. La cmc de los α derivados es menor que la cmc que para sus análogos β^{93} , y este comportamiento es atribuido a la

interacción o “protección” del grupo OH del carbono 6, C6, con el primer grupo metilénico de la cadena hidrocarbonada en el anómero β , que resulta en la reducción de la hidrofobicidad de la molécula⁸⁷. Los valores de cmc reportados para α octil derivados de tres diferentes monosacáridos (manopiranososa, glucopiranososa, galactopiranososa) dan cuenta del efecto de la estereoquímica del carbono C4 en la agregación^{93,94}, la cmc para esta serie corresponde a $C_8\alpha\text{Man} \approx C_8\alpha\text{Glc} < C_8\alpha\text{Gal}$.

Los valores de cac obtenidos para los derivados MOM, MLM, MPM por medidas de tensión superficial fueron 10; 0,03 y 0,008 mM, respectivamente (Figura 23), mientras que, los valores determinados por la variación de la intensidad de la emisión fluorescente

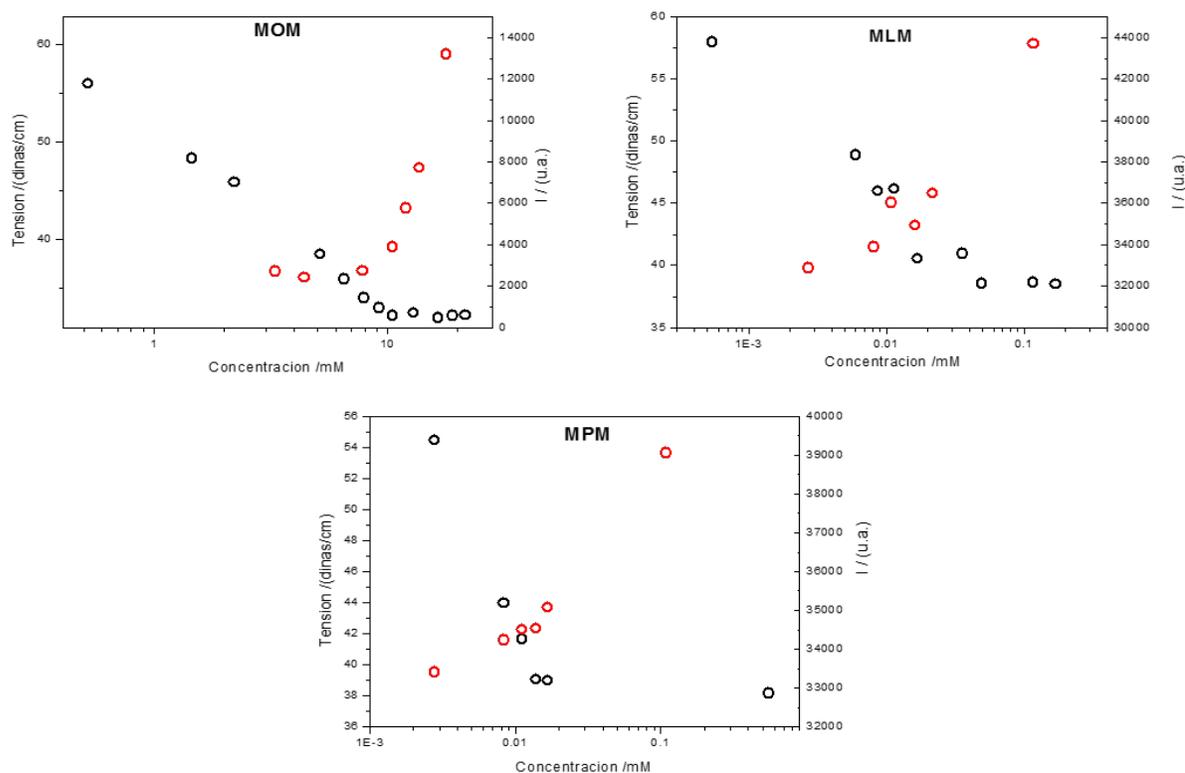


Figura 23-. Determinación de las cac de los monoalquil manopiranosidos estudiados, utilizando metodologías físicas y fotofísicas. (○) Tensión superficial. (○) Intensidad de fluorescencia de ANS.

del ANS, fueron de 10; 0,01 y 0,004 mM, respectivamente. En los resultados, se puede observar claramente el efecto del largo de la cadena sobre la magnitud de la cac, los valores obtenidos disminuyen con el aumento del largo de cadena hidrocarbonada, de acuerdo a lo esperado. Los valores obtenidos para cac de MOM y MLM coinciden con los valores reportados^{93, 94}.

A partir de las medidas de tensión superficial en función de la concentración de surfactante es posible estimar el área o sección que ocupa una molécula en la interfase (ecuación 21) utilizando la isoterma de adsorción de Gibbs (ecuación 22).

$$A = \frac{1}{N_A \Gamma} \quad (21)$$

Donde el exceso superficial, Γ , está relacionado con la velocidad de variación de la tensión superficial (γ) respecto al logaritmo de la concentración.

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \left(\frac{\delta \gamma}{\delta \ln C} \right)_{T,P} \quad (22)$$

Es posible estimar la geometría de los agregados formados a partir del parámetro de empaquetamiento crítico (C_{pp} , ecuación 23), cuya magnitud se relaciona con la geometría del agregado.⁹

$$C_{pp} = \frac{v}{a_0 l_c} \quad (23)$$

donde, v y l_c corresponden al volumen y al largo promedio de la cadena hidrocarbonada, respectivamente y a_0 el área o sección del grupo polar.

Tanford⁹⁵ ha mostrado que existe una dependencia lineal entre el volumen y el largo de las cadenas hidrocarbonadas saturadas (número de unidades metilénicas presentes), de acuerdo a las ecuaciones 24 y 25:

$$v = 27,4 + 26,9n \quad (\text{Å}^3) \quad (24)$$

$$l_c \leq l_{max} = 1,5 + 1,265n \quad (\text{Å}) \quad (25)$$

donde n es el número de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada.

Si consideramos que el área o sección del grupo polar en el agregado es comparable con al área ocupada por molécula en la interfase, es posible determinar los valores de Cpp para los diferentes derivados de manopiranos. Los valores obtenidos para dicho parámetro predicen que la formación de micelas cilíndricas es la favorecida para estos tres derivados.

Los valores correspondientes al área por molécula que MOM y MLM ocupan en la interfase (Tabla 1) son similares a los previamente reportados en la literatura.⁹⁴ El derivado MPM ocupa un área menor que los otros dos derivados. Es posible que los agregados formados por éste presenten interacciones intermoleculares más intensas que los agregados formados por MOM y MLM.

Tabla 1-. Parámetros geométricos de los agregados formados por MXM.

	$v/\text{Å}^3$	$l_c/\text{Å}$	$A/(\text{Å}^2/\text{molécula})$	Cpp
MOM	242,6	11,62	51,7	0,40
MLM	350,2	16,68	55,1	0,38
MPM	457,8	21,74	43,5	0,48

En la Tabla 2 se resumen los resultados obtenidos para las medidas de tamaño de los agregados formados en fase acuosa utilizando DLS. Es importante destacar la gran magnitud del radio hidrodinámico, especialmente para los derivados MLM y MPM. El radio hidrodinámico reportado para los agregados formados por el derivado MOM evaluado por NMR y utilizando la ecuación de Stokes-Einstein es de alrededor de 6 nm⁹³.

Tabla 2-. Tamaño de los agregados formados por MXM en medio acuoso.

	R _h /nm	P.I.
MOM	8,36±3,63	0,20±0,074
MLM	99,87±1,09	0,11±0,019
MPM	84,87±0,89	0,26±0,023

La determinación de tamaño utilizando DLS involucra ajustes matemáticos que consideran los agregados esféricos. En el caso de que éste no tenga forma esférica, el tamaño obtenido resultará de la estimación del radio de una esfera con coeficiente de difusión similar al de los agregados. En el caso de partículas con forma cilíndrica (de acuerdo a los valores de Cpp) el tamaño obtenido por DLS estará sobreestimado debido al componente longitudinal de la estructura cilíndrica.

La conformación axial del derivado α permite a los monómeros agruparse en estructuras extendidas (por ejemplo; del tipo laminar)⁹⁶. El gran tamaño de los agregados obtenidos para los derivados MLM y MPM hace pensar en la posibilidad de que estos compuestos formen vesículas esféricas. Esta posibilidad se confirmó al poder preparar vesículas unilamelares gigantes (GUVs), que fueron visualizadas utilizando microscopía bifotónica

y Laurdan como sonda fluorescente (Figura 24). La baja solubilidad en agua, una cadena hidrocarbonada lo suficientemente larga y un mayor valor de C_{pp} , son consistentes con la posibilidad que el MPM forme bicapas y vesículas^{97, 98}.

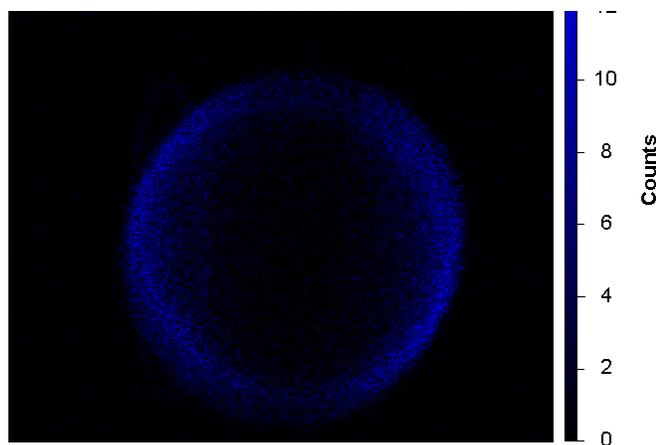


Figura 24-. Imagen de intensidad de fluorescencia de Laurdan en GUV de MPM.

La Tabla 3 muestra los resultados obtenidos para la caracterización de agregados formados por los diferentes alquil manopiranosidos (MXM, DXM, DXEM), utilizando dos parámetros adimensionales asociados a las propiedades físicas del agregado (GP de Laurdan y rDPH), el potencial zeta y la temperatura de transición.

Para todos los agregados formados por alquil manopiranosidos se obtuvieron valores negativos de potencial zeta (ζ). La teoría DLVO relaciona el parámetro ζ con la estabilidad de una suspensión coloidal: una mayor carga superficial hace que los procesos de coagulación o aglomeración sean menos probables, mediante estabilización electrostática.

Tabla 3-. Caracterización de los agregados formados por derivados de alquil manopiranosidos a 25°C. La preparación fue realizada por el método de ultrasonificación utilizando tampón fosfato 1 mM pH 7,4.

	GP de Laurdan	rDPH	T _m / °C	ζ/mV
MOM	-0,388±0,007	0,049±0,015	n,d,	-19,4±1,1
MLM	-0,245±0,027	0,146±0,023	10,0±1,0	-43,2±3,0
MPM	0,525±0,040	0,364±0,027	46,4±0,2	-50,7±1,1
DOM	-0.026±0.016	0,088±0,002	n.d.	-39,6±0,7
DLM	0,280±0,009	0,383±0,019	27,4±0,1	-48,3±0,7
DPM	0.551±0.012	0,342±0,010	53,8±1,3	-33,2±4,3
DOEM	-0,180±0.006	0,073±0,005	n.d.	-38,9±2,3
DLEM	0,133±0,028	0,308±0,025	22,4±0,8	-46,0±2,2
DPEM	0,446±0,057	0,247±0,048	59,5±0,5	-44,0±1,5

En general, los valores de ζ para todos los agregados son menores a -30 mV, con excepción de los formados por MOM que tienen ζ igual a -19,4 mV. El potencial negativo observado para estos agregados, formados por moléculas neutras, puede ser atribuido a la adsorción de aniones en la superficie⁹⁹ o a la carga electrostática originada por el desplazamiento de las partículas; la fase con constante dieléctrica mayor (el agua) se carga positivamente, mientras que las partículas, fase dispersa, se cargan negativamente (regla de Cohen). Considerando esta regla, la constante dieléctrica de los agregados es función tanto de la longitud de la cadena hidrocarbonada como del tipo de derivado. Los agregados formados por MOM presentan una mayor constante dieléctrica que los formados por los otros derivados con grupos hidrofílicos análogos.

Los valores de GP de Laurdan y de anisotropía de DPH (rDPH), se muestran en la Tabla 3. El valor de GP de Laurdan, da cuenta de la accesibilidad de moléculas de agua a la interfase, (región donde se encuentra la sonda) y por consiguiente de la estructuración de ésta. El rango de valores experimentales que puede tomar este parámetro en fases lipídicas varía desde 0,6 a -0,3⁶⁶. Mientras más alto sea el valor determinado para el GP de Laurdan, menor es la accesibilidad de moléculas de agua a la interfase o más estructurada se encuentra ésta.

Por otra parte, la anisotropía, rDPH, da cuenta de la estructuración de las cadenas hidrocarbonadas (región en la que se ubica la sonda DPH), y el rango de valores de anisotropía es de 0,0 a 0,4. Cuanto más alto es su valor, mayor es la estructuración de las cadenas alrededor de la sonda.

Tanto los valores de rDPH como de GP Laurdan, mostraron un aumento con el incremento del número de unidades metilénicas de la cadena hidrocarbonada (para una misma familia de derivados), excepto en el caso del rDPH para los agregados formados por DXM y DXEM, en los que se observó un valor máximo para el derivado con 12 unidades metilénicas. Este resultado nos indica que, en general, el incremento de la hidrofobicidad del surfactante favorece la estructuración tanto de la interfase como de la región hidrocarbonada del agregado.

Los agregados formados por los derivados dialquil manopiranosidos (DXM, DXEM) presentaron una mayor estructuración en la interfase y en la región hidrofóbica cuando se comparan con los agregados formados por los derivados monoalquilados MXM. Además,

la presencia del grupo oxietileno (OE) incorporado entre la manopiranososa y la cadena hidrocarbonada produce una disminución en los valores de GP, indicando que la presencia del extensor hidrofílico facilita el acceso de moléculas de agua a la interfase; la incorporación de este grupo aumenta la hidrofiliidad de la cabeza polar y, por lo tanto, se espera una mayor facilidad para el acceso de moléculas del solvente al entorno de la sonda. Además, la presencia del grupo OE modifica la fluidez de la membrana, como lo muestran los valores de rDPH, esta alteración es más significativa para derivados con 8 unidades metílicas.

La temperatura de transición de fase (T_m) de los agregados formados por los derivados de alquil manopiranosido (Tabla 3) fue determinada monitoreando el cambio del GP de Laurdan con la temperatura¹⁰⁰. La existencia de una temperatura de transición puede estar asociada a diferentes fenómenos que involucran coexistencia de dos fases. Si los agregados formados corresponden a vesículas, la transición observada corresponderá al cambio de fase de $L_\beta \rightarrow L_\alpha$ (ó fase gel a la fase líquida). La temperatura de transición también puede asociarse también con cambios topológicos de los agregados, por ejemplo, transición desde micelas cilíndricas a estructuras con geometría cúbica¹⁰¹.

Para los derivados con 8 unidades metilénicas en la cadena hidrocarbonada, la temperatura de transición no fue determinada, pues la mínima temperatura que se puede alcanzar con el equipamiento disponible es 5°C, y de acuerdo a la tendencia de los datos determinados el valor de este parámetro para estos derivados sería menor. Las temperaturas de transición determinadas, muestran una dependencia directa con el largo de la cadena hidrofóbica, coincidiendo con el comportamiento observado para otros lípidos¹⁰². Para los derivados

de 12 y 16 unidades metilénicas las temperaturas de transición se encuentran en los rangos de 10-30°C y de 46-60°C respectivamente. De acuerdo a la literatura, la temperatura de transición del Dihexadecilglucósido es 60°C¹⁰³, valor de una magnitud similar al determinado para el DPEM y levemente mayor que el obtenido para el derivado DPM. Se sabe que la temperatura a la que ocurre la transición de fase de los lípidos es modulada por factores tales como la longitud de la cadena hidrocarbonada, la presencia de insaturaciones, la carga, y la naturaleza de la cabeza polar¹⁰⁴. Un aumento en el largo de la cadena hidrocarbonada es acompañado por un aumento de interacciones de Van der Waals^{43, 46} y un consiguiente aumento en la energía requerida para desorganizar el empaquetamiento.

La presencia del grupo OE no afecta de igual forma la temperatura de transición de los agregados formados por 12 y 16 unidades metilénicas. Un punto a considerar en el análisis de la estructura de los agregados formados por moléculas anfifílicas es la temperatura de trabajo en relación a la temperatura de transición de fase del agregado. En el caso de los derivados con 12 unidades metilénicas, las determinaciones de GP de Laurdan y rDPH se realizaron sobre o alrededor de la temperatura de transición (temperatura experimental 25°C). La dependencia de estos valores con el largo de la cadena hidrocarbonada sólo es comparable con la de los derivados con 8 y 12 unidades metilénicas (donde se observa el comportamiento ya descrito). Sin embargo, estos resultados no son comparables con los obtenidos para el derivado con 16 unidades cuya temperatura de transición es mayor que 25°C y donde se espera que los agregados estén en una fase o estado diferente, en comparación con los derivados de cadena hidrocarbonadas más cortas.

7.2.2. Propiedades fisicoquímicas de los agregados formados por sistemas mixtos derivados monoalquil manopiranososa (MXM) y colesterol

El colesterol es uno de los principales componentes de las membranas celulares, cuya composición es variable y dependiente del tipo celular. El colesterol se encuentra en proporciones que varían desde 20 a 70%. La presencia de colesterol en membranas biológicas tiene como función la regulación de su fluidez, la reducción de la permeabilidad a moléculas pequeñas y el incremento de la fuerza mecánica, entre otras^{15, 105}. Además, se ha reportado que el cambio en la fluidez de la membrana por la incorporación de colesterol es dependiente de la relación entre la temperatura de trabajo y la de transición¹⁰⁶⁻¹¹⁰.

Los sistemas constituidos por surfactantes no iónicos y colesterol en diferentes proporciones, denominados niosomas, han despertado mucho interés, pues se consideran una alternativa tecnológicamente viable a los sistemas de liberación controlada de drogas constituidos por fosfolípidos⁹⁷.

En general, los surfactantes con una sola cadena hidrocarbonada y el balance hidrofílico lipofílico apropiado, se agregan en medio acuoso sólo para formar micelas. Sin embargo, en el caso de compuestos anfifílicos con una región hidrofóbica relativamente grande y por tanto baja solubilidad en agua, la presencia de una proporción adecuada de colesterol permite que la mezcla de lípidos pueda formar vesículas⁹⁷.

El efecto que produce la presencia de diferentes proporciones de colesterol en agregados formados por MXM, fue evaluada a través del análisis de los parámetros GP de Laurdan y anisotropía de DPH (Tablas 4 y 5, respectivamente).

Tabla 4-. Valores de GP de Laurdan a 25°C para sistemas microheterogéneos de derivados monoalquilados de manopiranososa en presencia de diferentes cantidades de colesterol.

%Chol	0	25	50	75
Manosa	GP			
MOM	-0,388	0,261	-	0,187
MLM	-0,245	0,369	0,439	0,465
MPM	0,525	0,382	0,396	0,407

Tabla 5-. Valores de rDPH a 25°C para sistemas microheterogéneos de derivados monoalquilados de manopiranososa en presencia de diferentes cantidades de colesterol.

%Chol	0	25	50	75
Manosa	rDPH			
MOM	0,049	0,200	0,310	0,245
MLM	0,146	0,231	0,237	0,248
MPM	0,364	0,242	0,253	0,244

El incremento del porcentaje de colesterol en los agregados de MOM y MLM produjo un aumento significativo en los valores de GP y rDPH hasta alcanzar un valor constante (Tablas 4 y 5). De acuerdo a estos resultados, la presencia de cantidades crecientes de colesterol en los agregados aumenta la estructuración tanto en la interfase como en la región de las cadenas hidrocarbonadas.

Para los agregados formados por el derivado MPM con un 25% de colesterol, los valores de rDPH y GP de Laurdan fueron menores, indicando que la presencia de colesterol aumenta la fluidez de ambas regiones en estos agregados. Una mayor proporción de

colesterol, 50-75%, no produjo modificación apreciable en la estructuración de la interfase y de la región hidrofóbica (Tablas 4 y 5).

Para un mismo porcentaje de colesterol, se observaron valores similares para rDPH en los agregados formados por MXM, es decir estos agregados presentan una estructuración similar en la región hidrofóbica. Mientras que para los agregados formados por MLM y MPM con colesterol, la región de la interfase muestra un comportamiento similar entre ellos, por lo que la incorporación de colesterol promueve la existencia de estados similares en ambos agregados. Considerando que la incorporación de colesterol en membranas de fosfolípidos induce la formación de estados líquidos ordenados¹⁴, es razonable suponer que es este estado es el que se está dando en nuestro sistema.

El estudio del efecto del porcentaje de colesterol en los agregados formados por MXM se realizó a 25°C. Es decir, en estas condiciones, los agregados formados por MPM se encuentran por debajo de su temperatura de transición (en estado gel) y los formados por MLM por encima de la misma (en líquido cristalino).

La presencia de colesterol hace más estable el estado líquido ordenado, L_o , más fluido que la fase gel (L_β) y más rígido que la fase líquida cristalina (L_α). Se ha descrito que la incorporación de colesterol a bicapas fosfolipídicas induce la formación de dominios o separación de fases. La coexistencia de fases dependerá de la temperatura de transición de fase. Por debajo de la temperatura de transición de fase, coexistirán L_o y L_β , en tanto, que sobre la temperatura de transición de fase, estarán presentes L_o y L_α ¹¹¹.

Considerando el efecto de la incorporación en membranas y liposomas de fosfolípidos reportado en literatura y los valores obtenidos para la anisotropía de DPH y Laurdan de GP. Podemos decir que la incorporación de colesterol a agregados de MPM, resulta en una fluidización, coexistiendo fases L_{β} de MPM pura con alta estructuración y una fase L_o que contiene colesterol. En cambio, para los derivados MOM y MLM, en los agregados con colesterol coexistirán las fases L_o y L_{α} , donde la primera está más estructurada.

7.3. Incorporación de derivados monoalquil manopiranososa en vesículas sintéticas

7.3.1. Solubilización de vesículas sintéticas por la incorporación de MXM

La interacción de vesículas con detergentes, tanto iónicos como no iónicos, ha sido un tópico de interés durante los últimos años, y el conocimiento detallado del mecanismo involucrado en esta interacción es muy importante, como consecuencia de la necesidad de solubilizar biomembranas para aislar, purificar, reconstituir y recristalizar proteínas de membrana o simplemente para incorporar agentes farmacológicos de interés en sistemas microheterogéneos de liberación controlada de droga^{98, 112}.

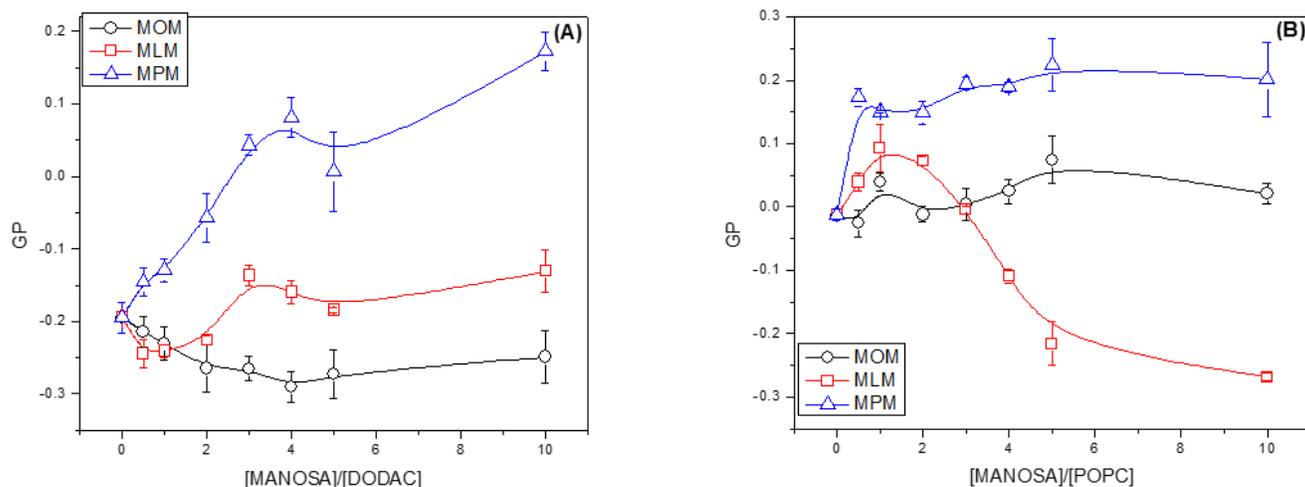


Figura 25-. Variación en los valores de GP de Laurdan a 25°C para mezclas de monomanopiranosas (MOM, MLM, MPM) con vesícula de DODAC (A), y liposoma de POPC (B). [Lípido]=0,5 mM.

La Figura 25 muestra la variación de los valores de GP de Laurdan a medida que se incorporan cantidades crecientes de cada uno de los derivados de manopiranososa a vesículas de DODAC o POPC (SUVs). En el gráfico, la abscisa corresponde a la razón en moles de surfactante a lípido que forma la bicapa (DODAC o POPC).

Es importante destacar que la temperatura de trabajo es de 25°C, los liposomas de POPC se encuentran por sobre su temperatura de transición mientras que las vesículas de DODAC están por debajo.

Se puede observar que la incorporación de MPM para ambos tipos de bicapa (DODAC o POPC) produce un aumento de los valores de GP, resultado que indica que la presencia de manopiranosas en la interfase reduce la accesibilidad de las moléculas de agua, observación que se interpreta como una mayor estructuración de la interfase producida por la presencia de MPM.

En el caso de los derivados MOM y MLM, el efecto observado depende de la naturaleza de los lípidos que constituyen la bicapa (lípidos zwitteriónicos, POPC o catiónicos, DODAC). La incorporación de MOM a liposomas de POPC no provocó una variación significativa en los valores de GP. Sin embargo, cuando este derivado se incorpora a vesículas de DODAC, el valor de GP disminuyó, es decir, la incorporación de un derivado de manopiranosas con cadena hidrocarbonada corta, perturba la interfase de manera tal, que el acceso de moléculas de agua a esta se ve facilitado. Por otra parte, al estudiar el efecto de la incorporación de cantidades crecientes del derivado MLM se observó que para ambos sistemas el comportamiento presenta un punto de inflexión o un comportamiento no monotónico. En el caso de las vesículas de DODAC, los valores de GP disminuyeron inicialmente y luego aumentaron, para los liposomas de POPC la situación es inversa (Figura 25). Este comportamiento es el habitualmente observado en el proceso de solubilización de vesículas, por ejemplo, utilizando ésteres de sacarosa¹¹³. La Figura 26 muestra imágenes de GP en liposomas gigantes obtenidas por microscopía

de fluorescencia para dos relaciones molares de [MLM]/[POPC] de 1,8 (Figura A) y 3,5 (Figura B). En la Figura 26 A se observa la presencia de macrodominios (las áreas con diferentes colores, corresponden a estados físicos y composiciones diferentes) con un elevado valor de GP, alrededor de 0,45 y cuando se aumenta la proporción de MLM en la bicapa (Figura 26 B) los dominios desaparecen. Estos resultados permiten explicar que el incremento de GP observado en las mediciones realizadas en cubeta a bajas relaciones molares MLM/POPC, tiene su origen en la contribución del alto GP de los dominios formados, promediado con el valor de GP del resto de la membrana, (el GP observado corresponde al promedio ponderado del GP de cada región por su proporción relativa). Al aumentar la proporción de MLM (sobre la relación [MLM]/[POPC] = 1,8) el valor de GP disminuyó, no se observan dominios a mayores proporciones. En consecuencia, la disminución del valor de GP a partir de una determinada relación molar de surfactante, en este caso, no se debe a la solubilización de las vesículas. De similar forma, en el caso de la incorporación de MLM a vesículas de DODAC la formación de dominios podría originar la existencia de un punto de inflexión en el perfil de variación del valor de GP con la proporción de surfactante.

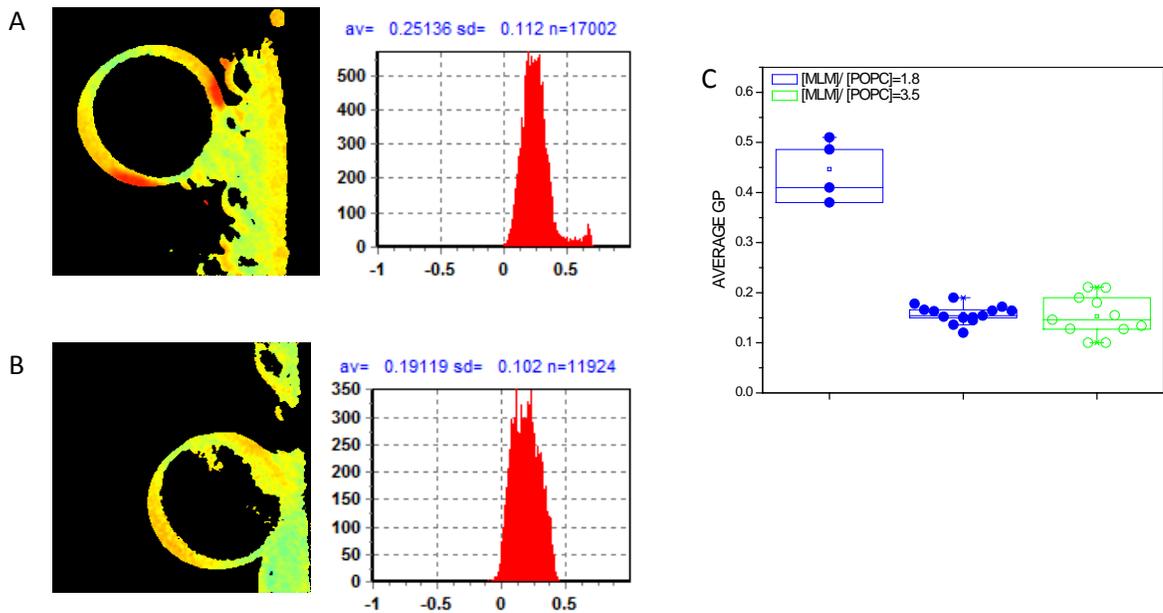


Figura 26-. Imagen e histograma de GP para liposomas mixtos de MLM-POPC a composiciones A) $[MLM]/[POPC] = 1.8$. B) $[MLM]/[POPC] = 3.5$. C) GP promedio para liposomas de MPM-POPC y MLM-POPC.

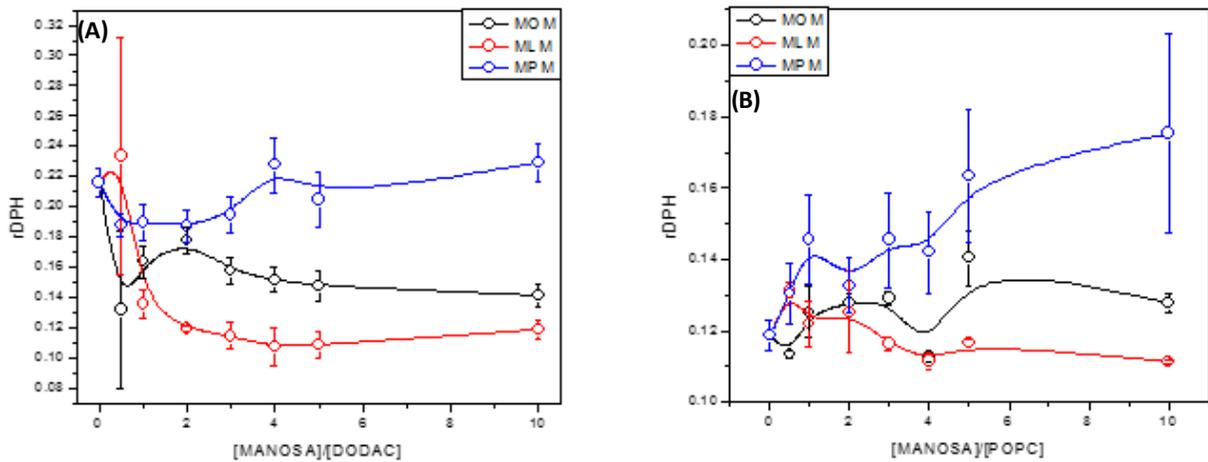


Figura 27-. Anisotropía de DPH a 25°C para mezclas de monomanopiranosas (MOM, MLM, MPM) con vesícula de DODAC (A), y liposoma de POPC (B). $[Lípido]=0,5$ mM.

La anisotropía de la fluorescencia de DPH es una medida utilizada para caracterizar la fluidez de la región correspondiente a las cadenas hidrocarbonadas en vesículas

lipídicas⁷⁸. Valores cercanos a cero, depolarización completa de la fluorescencia, dan cuenta de una fluidez elevada en la región examinada. Valores mayores que cero, son interpretados como una menor fluidez de la región correspondiente a las cadenas hidrocarbonadas, junto con una difusión rotacional de la sonda más lenta

La Figura 27 muestra la dependencia de la anisotropía del DPH con el aumento de la concentración de los diferentes derivados MXM en las vesículas de DODAC y POPC.

No se observaron cambios importantes en el valor de rDPH con la incorporación de los derivados de manopiranososa en ambos sistemas lipídicos (DODAC o POPC). Y el efecto de la incorporación de estos derivados es dependiente del tipo de lípido que conforma la vesícula. Para vesículas de DODAC la mayor alteración se obtuvo para el derivado MLM en donde se observa una disminución en el valor de rDPH, mientras que la incorporación de MOM y MPM no modifica de manera considerable el ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas. Por otra parte, para liposomas de POPC la incorporación de MPM produce una estructuración de las cadenas hidrocarbonadas, reflejado en un aumento del valor de rDPH, sin embargo, la incorporación de MOM y MLM en este liposoma no perturba la estructuración de la región hidrofóbica del agregado.

Estos resultados de incorporación de derivados MXM a vesículas sintéticas de DODAC y POPC utilizando sondas fluorescentes (Laurdan y DPH) muestran, en principio, que la incorporación de estos derivados no ocurre de acuerdo al modelo propuesto por Lichtenberg (en una primera etapa de saturación en la bicapa por detergente, seguida por la ruptura de la fase lamelar). Para comprobar la ocurrencia del proceso de solubilización

se utilizó la técnica de dispersión de luz que permite monitorear directamente el cambio de tamaño de los agregados.

Durante el proceso de solubilización, la transición desde una vesícula a una micela conlleva una disminución significativa de tamaño, por lo que las medidas relacionadas con dispersión de luz permiten establecer sin lugar a dudas si éste proceso está ocurriendo efectivamente. En la Figura 28 se muestra el cambio en el porcentaje de dispersión (como referencia se utilizó la dispersión de vesículas de DODAC intactas, asignándole un valor de 100%).

La Figura 28 muestra el perfil característico de un proceso de solubilización para vesículas, que, en este caso particular, corresponde a SUVs de DODAC 0,4 mM solubilizadas por la incorporación de concentraciones crecientes de MOM. A concentraciones bajas de MOM (sublíticas), éste se incorpora en la bicapa, su presencia altera el índice de refracción y/o aumenta el tamaño de la vesícula y por ende la dispersión de luz, hasta alcanzar el punto donde la membrana se satura con el surfactante, y se inicia el proceso de solubilización. La primera región del gráfico como ya se mencionó corresponde a la incorporación del surfactante, y el primer punto de quiebre la saturación de la membrana por el surfactante. A partir de este punto comienza el proceso de solubilización; en esta región coexisten membranas saturadas y micelas mixtas (constituidas por el lípido y el surfactante empleado para solubilizar). Finalmente, el segundo quiebre indica que el proceso de solubilización ha finalizado, y en el sistema quedan sólo micelas mixtas.

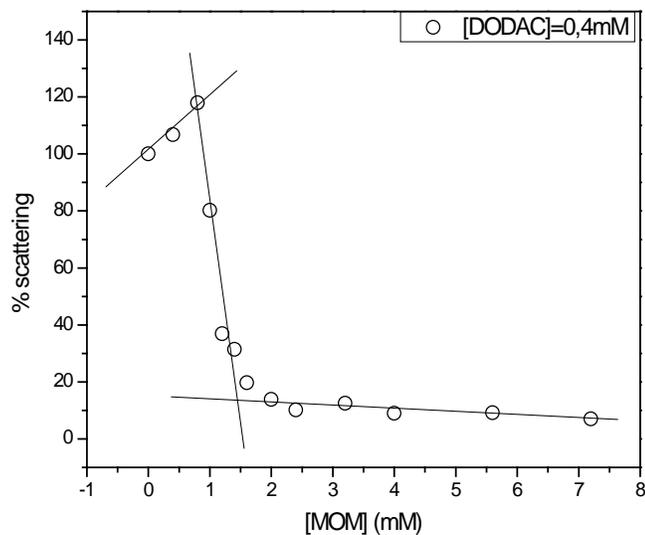
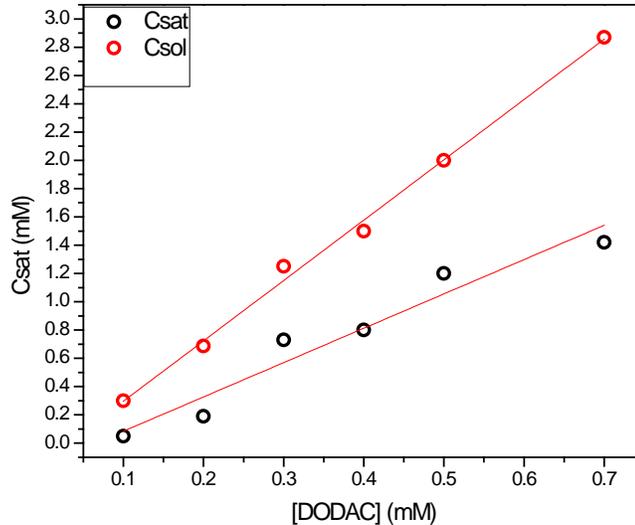


Figura 28-. Curva de solubilización de vesículas de DODAC 0,4 mM por MOM.

Así, para caracterizar el proceso de solubilización es necesario determinar las concentraciones críticas de saturación y de solubilización a diferentes concentraciones de DODAC. De acuerdo al modelo, ambas concentraciones críticas son linealmente dependientes con la concentración de lípido, en la Figura 29 se observa que los resultados experimentales se ajustan satisfactoriamente; el diagrama construido corresponde a un diagrama de fases típico para procesos de solubilización de membranas.



$$C_{sat} = -0,15829 + 2,42714[DODAC] \quad R^2 = 0,95112$$

$$C_{sol} = -0,12989 + 4,26643[DODAC] \quad R^2 = 0,98554$$

Figura 29-. Ajuste lineal de las concentraciones de saturación y solubilización en función de la concentración de lípido.

Del ajuste lineal de los datos de la Figura 29 se extraen dos datos que caracterizan el proceso de solubilización. El valor de la pendiente corresponde a la razón surfactante/lípido en la vesícula en la situación de solubilización (curva C_{sol} vs [DODAC]) y en la situación de saturación (curva C_{sat} vs [DODAC]) de la vesícula; el valor del intercepto corresponde a la concentración de surfactante en el medio acuoso en los puntos críticos antes mencionados. En la Figura 29 se muestran los resultados obtenidos para el ajuste lineal del proceso de solubilización de membranas de DODAC por MOM. El intercepto de esta regresión para ambas rectas arrojó un resultado menor que cero, valor sin sentido físico que no correspondería a la concentración de MOM en el medio acuoso (debería ser cercano a la cmc del surfactante). Una posible explicación para este resultado

podría encontrarse en la reportada dependencia de la concentración del surfactante necesaria para solubilizar vesículas y la fase (gel-líquido cristalino)¹¹⁴. La cantidad de surfactante requerida para solubilizar la vesícula en estado gel sería menor que la requerida cuando se encuentra en estado líquido. En el caso de vesículas de DODAC ($T_m = 40^\circ\text{C}$) que se encuentran en estado gel, la cantidad de MOM necesario para solubilizar sería menor. Otra posibilidad para la desviación en el valor del intercepto, es la formación de micelas o premicelas de MOM que puede estar favorecida en presencia de vesículas de DODAC, lo que se traduciría en una reducción de la cmc medida experimentalmente¹¹⁵.

La Figura 30 muestra la variación de la dispersión de luz para vesículas de DODAC en presencia de concentraciones crecientes de MLM. Se observa un aumento en la dispersión a medida que aumenta la concentración de MLM, indicando que las vesículas aumentan de tamaño. Al incrementar la concentración del derivado MLM no se observa disminución de la dispersión, lo que permite inferir que este surfactante no es capaz de solubilizar las vesículas de DODAC en el rango de concentraciones estudiado. Las experiencias de solubilización se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20°C), temperatura a la cual las vesículas de DODAC se encuentran en estado gel; el equilibrio del sistema lípido-surfactante en este estado de la membrana puede tomar largos periodos de tiempo formando agregados metaestables y por lo tanto el proceso de solubilización puede tomar más tiempo que el observado^{116, 117}.

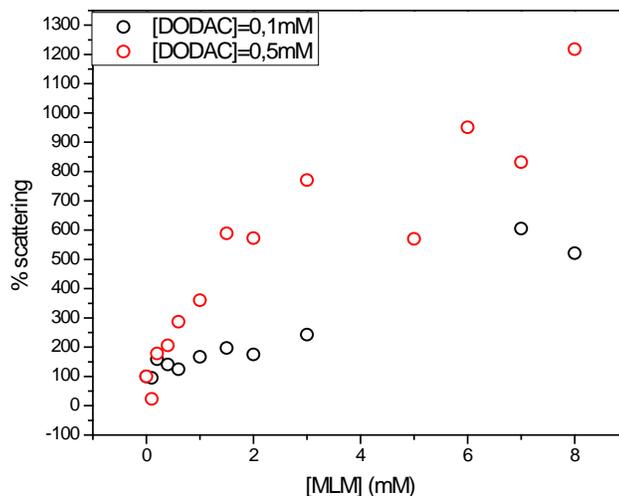


Figura 30-. Variación de dispersión de luz de vesículas de DODAC a medida que se aumenta la concentración de MLM.

Las experiencias de solubilización de vesículas de DODAC con MPM no se realizaron pues, aun a bajas concentraciones de este derivado, se produjo un aumento considerable de la dispersión de luz. Es posible que este aumento de tamaño de las vesículas se deba a que la presencia del derivado de manopiranososa favorece y facilita la ocurrencia de fenómenos de coalescencia y fusión de las vesículas.

Existen numerosos reportes de distintos alquil glucósidos empleados para el estudio y caracterización del proceso de solubilización de diferentes vesículas sintéticas y naturales (utilizando en todos ellos el modelo de tres etapas descrito en la sección de metodología), por ejemplo; alquil glucósidos^{115, 118, 119}, dodecil maltósido¹²⁰ y ésteres de sacarosa^{100, 113, 121, 122}. Como ya se ha mencionado, el proceso de solubilización de DODAC y POPC por α alquil manopiranosido (sólo MOM) no procede a través del mismo mecanismo que en el caso de los alquil glucósidos antes mencionados. El estado de agregación de las mezclas

lípidos-detergentes depende de la proporción y consecuentemente del balance de las topologías más favorecidas de cada uno de sus componentes. Cuando el detergente está en baja proporción se encuentra forzado a permanecer en una superficie con una curvatura diferente a su curvatura natural o espontánea. A medida que la proporción de detergente aumenta, es el lípido el que se encuentra en un agregado con una curvatura diferente a la propia, originándose centros de inestabilidad local. La solubilización ocurre debido al aumento de potencial químico del lípido en una vesícula con la curvatura diferente a la propia^{20, 114}.

El volumen del grupo manopiranosido es menor que el de los glucósidos utilizados en estudios de solubilización reportados en literatura¹²³, los surfactantes con una cabeza polar pequeña y una cadena hidrocarbonada lo suficientemente larga presentan una estructura geométrica cilíndrica, y la curvatura de los agregados que forman este tipo de surfactantes es menor a la observada cuando están constituidos por surfactantes con topología cónica. La incorporación de derivados MLM y MPM a vesículas de POPC y DODAC no produce la ruptura de la fase lamelar debido a que las curvaturas de los derivados manopiranosidos y el lípido que constituye la membrana son similares, en definitiva, estos derivados se comportan como un co-lípido y como resultado no son capaces de solubilizar estas membranas.

7.3.2. Evaluación de la temperatura de transición de vesículas en presencia de derivados de manopiranososa

Se ha reportado que la incorporación de diferentes sustratos a vesículas, entre ellos los surfactantes, produce una disminución en su temperatura de transición. A partir de los valores del descenso en la temperatura de cambio de fase (ΔT_m) es posible evaluar la constante de reparto entre las fases acuosa y lipídica de la molécula que induce esta disminución^{81, 124}. La Figura 20 muestra los cambios de turbidez con la temperatura en vesículas de DODAC con diferentes concentraciones de MLM. De estas curvas es posible obtener los valores de T_m .

La variación de la turbidez durante el cambio de fase está asociado a los diferentes índices de refracción de los dos estados involucrados, pues esta propiedad depende directamente de la densidad u ordenamiento molecular¹²⁵.

El ancho de la transición (rango de temperatura en la cual ocurre la transición de fase) es una medida directa de la cooperatividad que se da en el proceso. Un incremento en el ancho de la transición indica una menor cooperatividad producto de la adición del surfactante, y se explica porque la incorporación de moléculas ajenas supone un impedimento a las interacciones entre las moléculas de lípido, responsables de la cooperatividad de la transición⁸¹. En la Figura 31, se observa claramente que el aumento en la concentración de MLM además de modificar la temperatura de transición, produce un aumento en el ancho de la transición de fase.

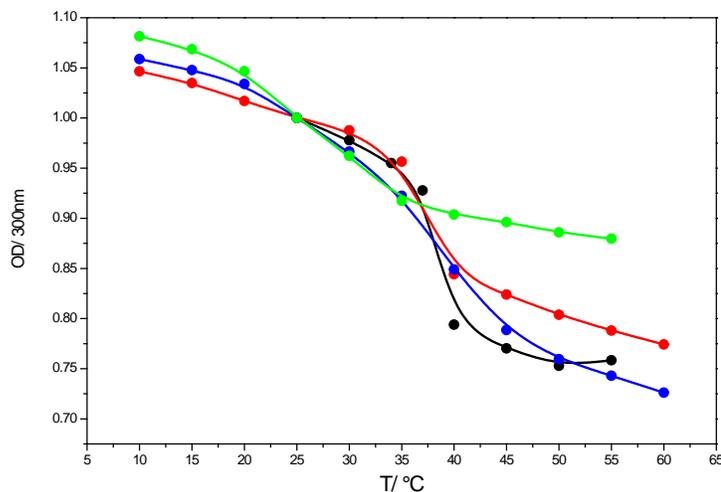


Figura 31-. Efecto de la concentración de MLM en la temperatura de transición de DODAC. (●) DODAC (●) [MLM]= $4,98 \times 10^{-2}$ mM (●) [MLM]=0,141 mM (●) [MLM]=0,249 mM. La concentración de DODAC en todas las medidas es 0,7 mM.

La Figura 32 muestra que la diferencia de temperatura de transición (ΔT_m respecto a la temperatura de transición de DODAC puro) presenta una dependencia lineal con la concentración de monoalquil manopiranosido incorporado. Se puede observar además que las variaciones en la temperatura de transición al incorporar los derivados MOM y MPM son similares en el rango de concentraciones estudiadas, mientras que la presencia del derivado MLM produce un cambio mayor en la temperatura de transición.

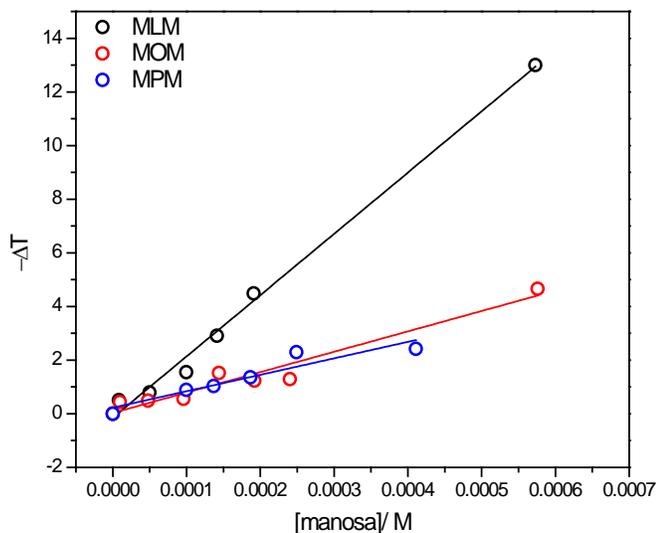


Figura 32-. Variación en la temperatura de transición de DODAC a diferentes concentraciones de derivados monoalquilados de manopiranosos.

El modelo de Van 't Hoff permite describir la disminución del punto de congelación, y se ha utilizado para obtener la constante de reparto de diversos solutos entre las fases acuosa y lipídica⁸¹. Durante la transición de fase hay presencia de dominios, (regiones en estado líquido cristalino coexistiendo con regiones en estado gel) el modelo propuesto por Van 't Hoff sólo será aplicable si durante el cambio de fase el soluto sólo se incorpora en la región líquido cristalina.

De acuerdo a este modelo y a los resultados de disminución de la temperatura de transición de fase con el aumento de la concentración de MXM, la constante de reparto para el MPM es menor que para el derivado MLM. Sin embargo, se ha observado que un incremento en el largo de la cadena hidrocarbonada, se traduce en un aumento en la hidrofobicidad de la

molécula, disminuyendo la cac y aumentando el coeficiente de reparto (mayor afinidad a la fase lipídica)¹²⁶.

La ecuación 13 (sección de metodología) describe la disminución de la temperatura de transición de fase de una vesícula por la presencia de un aditivo. La pendiente de la recta de esta ecuación es proporcional a la constante de partición involucrada. Ésta, es función de dos constantes de partición; el reparto del surfactante entre la fase gel y líquido cristalina de la vesícula y el reparto entre la fase acuosa y lipídica. Según esta ecuación, un incremento en la afinidad del surfactante por la fase gel de la membrana produce una disminución en la constante observada¹²⁷. Por lo tanto, durante la transición de fase el reparto de MPM hacia la fase gel de la vesícula se ve favorecida en comparación con los otros dos derivados. Y no es posible determinar su constante de reparto de MPM con este modelo.

Asumiendo que el reparto hacia la fase gel de los derivados MOM y MLM es depreciable, se determinó el valor de las constantes de partición. Los valores obtenidos fueron de $2,1 \times 10^4$ y $6,5 \times 10^4$ para MOM y MLM, respectivamente.

7.3.3. Determinación de la constante de reparto de derivados mono- alquilados manopiranosido en vesículas sintéticas

Los coeficientes de partición bicapa/agua determinados para los derivados MXM estudiados se muestran en la Tabla 6. En este estudio se utilizaron tres modelos de membrana (vesículas, específicamente SUVs), dos zwitteriónicos (DPPC y POPC) y uno catiónico (DODAC). Para la determinación del coeficiente de partición es necesario determinar la concentración del derivado de manopiranosida en la fase acuosa y lipídica en equilibrio, con este fin, se utilizaron dos métodos para separar las fases. En el método que denominaremos A, se utilizó una columna de Sephadex G-25 con el fin de separar el derivado de manopiranosida que no se incorporó a la bicapa, y se procedió a cuantificar el derivado de manopiranosida incorporado en la fase lipídica. En el método B se separaron los liposomas de la fase acuosa por ultracentrifugación, para luego determinar la concentración de alquil manopiranosido en ambas fases. La cuantificación de manopiranosida en las respectivas fases se realizó utilizando el método fenol/H₂SO₄, ya descrito en la sección Metodología. En el caso de la utilización de DODAC como medio lipídico, la determinación de las constantes mediante el método de centrifugación (método B) no se pudo emplear, debido a que la densidad de estas vesículas es menor que la del agua; por lo tanto, al momento de centrifugar no se obtienen pellets que permitan aislar la fase lipídica.

Los valores de los coeficientes de partición obtenidos para los derivados MOM y MLM utilizando ambos métodos coinciden con los obtenidos monitoreando la disminución de la temperatura de transición.

Los resultados (Tabla 5) muestran una relación directa entre el coeficiente de partición y el largo de la cadena hidrocarbonada para los tres tipos de vesículas estudiados. De acuerdo a lo esperado, el incremento en el largo de cadena aumenta la hidrofobicidad de la molécula y por lo tanto la afinidad por la fase lipídica (vesícula). Además, se observa una dependencia entre el tipo de lípido que conforma la vesícula y el coeficiente de partición.

Los valores de $K_{bic/agua}$ para MOM y MLM en vesículas de DODAC determinados por el método de disminución de la temperatura de transición son similares a los obtenidos utilizando el método A.

Tabla 6-. Coeficiente de partición bicapa/agua, $K_{bic/agua}$, para derivados mono alquílicos de manopiranosos en tres vesículas sintéticas.

	$K_{bic/agua}/10^4$					
	MOM		MLM		MPM	
	Método A	Método B	Método A	Método B	Método A	Método B
DODAC	1,79±0,21	n.e.	4,43±0,28	n.e.	7,31±0,08	n.e.
POPC	2,02±0,07	1,84±0,05	3,80±0,06	3,19±2,49	4,86±0,20	3,40±0,01
DPPC	0,83±0,03	0,61±0,006	3,28±0,20	2,52±0,12	12,2±1,04	8,21±0,08

Método A: columna, Método B: centrifuga, n.e. no evaluado

La incorporación de surfactantes a vesículas puede ser modulado por tres efectos; efecto hidrofóbico, temperatura (referida principalmente a la fase o estado físico de las vesículas) y estructurales (relacionados con las interacciones que se establecen o rompen al incorporar el sustrato, principalmente puentes de hidrógeno)¹²⁸.

Se observa una tendencia similar del coeficiente de partición para los derivados MOM y MLM en los diferentes lípidos ($\text{DODAC} \approx \text{POPC} > \text{DPPC}$). Sin embargo, los coeficientes de partición del derivado MLM en las tres vesículas son muy similares a diferencia del MOM. Por otra parte, el derivado MPM tiene una mayor afinidad por el liposoma de DPPC y menor afinidad por el liposoma de POPC. Esto nos indica que las interacciones involucradas en el proceso de partición de los tres alquil manopiranosidos estudiados son diferentes.

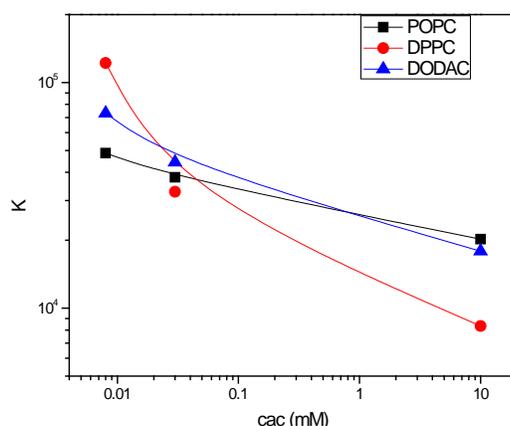


Figura 33-. Dependencia de la constante de reparto con la cac de MXM (escala logarítmica). Constantes determinadas utilizando método A de separación de fases.

Para los liposomas de POPC existe una buena correlación lineal del logaritmo del coeficiente de partición con el logaritmo de su cac (Figura 33), indicándonos que la partición en este liposoma catiónico es controlada por efecto hidrofóbico. Mientras que para DODAC y DPPC la dependencia muestra una curvatura, resultado que indica que la partición de MXM en estas dos vesículas no sólo es gobernada por el factor hidrofóbico.

En general, se ha descrito que los surfactantes presentan una mayor afinidad por la fase fluida de las vesículas, pues la mayor estructuración de la interfase, descrita en términos

de una mayor densidad superficial¹²⁹ de la vesícula en fase gel¹³⁰ no favorece el reparto. A la temperatura de trabajo (20°C) las vesículas de DODAC ($T_m=40^\circ\text{C}$) y DPPC ($T_m=40^\circ\text{C}$) se encuentran en estado gel y los liposomas de POPC ($T_m=-2^\circ\text{C}$) se encuentran en estado líquido cristalino. Este efecto se observa claramente para el derivado MOM en DPPC, cuyo coeficiente de partición es un 50 % menor respecto al de los otros dos tipos de vesícula. Para el derivado MPM se observa el efecto contrario, como ya se mencionó en el estudio de la disminución de la temperatura de transición para vesículas de DODAC en presencia de MXM, durante la transición de fase el derivado MPM presenta afinidad por la fase gel de la vesícula.

El reparto de moléculas neutras en bicapas cargadas se ve favorecida por la estabilización de la repulsión electrostática. En nuestro caso, las vesículas de DODAC están formadas por lípidos catiónicos (sal de amonio cuaternario), la incorporación de los alquil manopiranosido permite estabilizar las repulsiones coulombicas de las cabezas polares de la molécula de DODAC.

7.4. Interacción de glicovesículas de manopiranososa con Concanavalina A

7.4.1. Calorimetría de titulación isotérmica

En el proceso de reconocimiento carbohidrato-proteína se postula que las interacciones específicas predominantes corresponden a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del azúcar y algunos residuos peptídicos específicos del centro activo. Además, ocurren interacciones de tipo Van der Waals entre las regiones hidrofóbicas de ambas moléculas. Todo ello acompañado del reordenamiento de las moléculas de agua durante la interacción, que se traduce en la ‘deshidratación’ de algunos entornos particulares durante el proceso de interacción¹³¹⁻¹³³.

La Figura 34 muestra el termograma obtenido para la inyección de alícuotas de 7 μL consecutivas de una solución acuosa de MOM en una celda que contiene una solución acuosa de Concanavalina A (Con A). Es posible observar que el calor liberado por la interacción de Con A-MOM disminuye a medida que la concentración de MOM en la celda aumenta, esto se debe a la saturación de los sitios de unión específicos de la proteína.

En la Tabla 7 se resumen los datos termodinámicos evaluados para la interacción de la Con A con MOM y con metil- α -manopiranososa (Me α Man) medido como referencia o control. Las experiencias para estudiar la interacción del derivado MOM se realizaron a concentraciones menores que las cac, con el fin de evaluar cuál es el efecto del largo de la cadena hidrocarbonada en la interacción.

La afinidad de Con A por MOM ($23,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) resultó ser 3,5 veces superior a la determinada para el metil manopiranosido ($6,52 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$); este resultado es consecuencia

de la presencia de una cadena hidrocarbonada más larga y por tanto más hidrofóbica, que interactuará favorablemente con una región adyacente al sitio de reconocimiento del carbohidrato, de carácter hidrofóbico, descrita para la Con A.¹³⁴ Este resultado da cuenta de que la incorporación de sustituyentes hidrofóbicos cercanos a la manopiranososa produce un aumento en la afinidad con Con A, debido a la existencia de una interacción secundaria adicional.

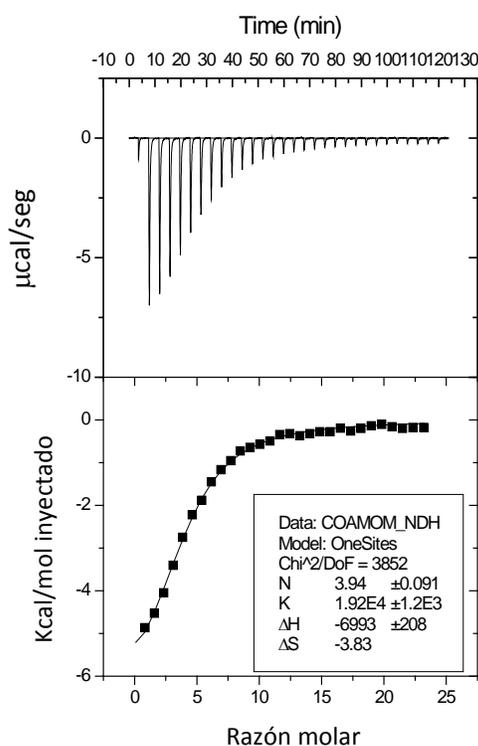


Figura 34-. Termograma de la interacción de MOM con Con A en tampón fosfato 10 mM pH 7, NaCl 20 mM, CaCl₂ 0,1 mM, MnCl₂ 0,1 mM a 25°C. La parte superior corresponde al termograma de la valoración correspondiente a 27 inyecciones de 7 µL de una solución de MOM 5,81 mM sobre 1,42 mL de Con A 155,6 µM. La Figura inferior corresponde al calor desprendido por cada inyección frente a la relación de concentraciones totales, y el ajuste no lineal de n sitios iguales e independientes.

De acuerdo al valor determinado para el cambio de entalpía, la interacción de MOM-Con A corresponde a un proceso exotérmico, por la formación de enlaces más fuertes y el

incremento de las interacciones de tipo Van der Waals, debido al contacto entre las superficies hidrofóbicas, que se ve entonces parcialmente compensado por la disminución de la entropía debida a las limitaciones configuracionales que provocan las interacciones involucradas.¹³² Del análisis de los datos termodinámicos, la interacción de ambos derivados alquilados es gobernada por la contribución entálpica y el incremento en el largo de la cadena hidrocarbonada induce a una disminución en el cambio de entropía, siguiendo el perfil termodinámico antes descrito.

Tabla 7-. Termodinámica de interacción de Con A con derivados de manopiranososa.

	$K/ 10^3M^{-1}$	$-\Delta H^\circ/ (Kcal/mol)$	$T\Delta S^\circ/ (Kcal/mol)$	$-\Delta G^\circ/ (Kcal/mol)$	n
Me-Man	6,52	5,88	-0,67	5,24	1
MOM	23,6	6,99	-1,01	6,00	1

La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos para los estudios de la interacción glicovesículas de manopiranososa y Con A, la concentración de ligando utilizada para hacer los cálculos corresponde a la de lípidos totales (DODAC + alquil manopiranosido). La incorporación de los derivados de manopiranososa en las vesículas conlleva la presencia de varias unidades de manopiranososa en la superficie de la vesícula y por lo tanto, el análisis de la interacción se debe realizar considerando el efecto multivalente (efecto también conocido como glicocluster).²⁸ Este efecto es el responsable, por ejemplo, de la ocurrencia de los fenómenos de aglomeración celular, habitualmente observados, pues la baja

magnitud de las constantes de afinidad para las interacciones carbohidrato-proteína individuales, no permiten explicar la ocurrencia este fenómeno⁵⁹.

Tabla 8-. Parámetros termodinámicos de la interacción de Con A con vesículas decoradas con derivados monoalquilados de manopiranososa.

Sistema		$K/10^3 M^{-1}$	$-\Delta H^\circ/$ (Kcal/mol)	$T\Delta S^\circ/$ (Kcal/mol)	$-\Delta G^\circ/$ (Kcal/mol)	n
DODAC:MOM	1:1	23,5	2,1	6,0	3,9	4,41
	3:1	38,6	1,2	6,3	5,1	10,7
DODAC:MLM	1:1	95,5	-3,9	6,8	10,7	0,55
	3:1	144	-5,5	7,1	12,6	0,12
DODAC:MPM	3:1	326	-1,4	7,6	9,0	0,30
	4:1	54,1	-3,9	6,5	10,4	0,13

De la Tabla 8 se deduce que los valores de la constante de afinidad por la proteína Con A de sistemas manopiranososa-vesícula de DODAC aumentan a medida que aumenta el número de unidades metilénicas de la cadena hidrocarbonada del derivado de manopiranososa. De acuerdo a nuestros resultados, la constante de afinidad para MPM-vesícula es alrededor de 50 veces mayor que la del metil manopiranosido aislado. En cambio, para el derivado MOM, con una cadena hidrocarbonada más corta, incorporado en la bicapa, no se observa un aumento significativo de la afinidad. Es importante destacar que la constante evaluada corresponde a una constante aparente; en otros términos, son el resultado neto macroscópico de la suma de todos los procesos microscópicos

correspondientes a cada una de las interacciones ligando-proteína monovalentes que tienen lugar. Como consecuencia, la magnitud del reparto del derivado de manopiranososa entre la fase acuosa y lipídica tendrá una influencia directa en la magnitud del valor de la constante de afinidad obtenido. A medida que el largo de la cadena hidrocarbonada aumenta, el menor reparto hacia la fase acuosa hará que este efecto sea menos importante. Se ha descrito que las interacciones multivalentes carbohidrato-proteína provocan un aumento de la afinidad y de la especificidad de las interacciones monovalentes. Existen dos tipos de interacciones entre lectinas y carbohidratos multivalentes, que presentan arreglos moleculares diferentes. Cuando tanto la lectina como el carbohidrato son divalentes, la interacción originará arreglos monodimensionales (lineales). Por otra parte, si la valencia tanto de la lectina como del carbohidrato son mayores que dos, el agregado resultante de la interacción será bidimensional y/o tridimensional (planar o tubular)¹³⁵. Este último tipo de agregados por lo general se aglutina o precipita. En nuestro caso, la interacción de Con A con las glico-vesículas estudiadas forman agregados tridimensionales.

Los parámetros termodinámicos obtenidos muestran que en la interacción Con A-glicovesículas la componente entrópica es la que gobierna el proceso, para todos los sistemas estudiados, indicándonos que el factor predominante en estos procesos corresponde al reordenamiento de las moléculas de agua tras la interacción. El cambio de entalpía de la interacción depende del tipo de sistema. Para glicovesículas con MOM la interacción es exotérmica, mientras que, la interacción de Con A con glicovesículas que contienen MLM o MPM es endotérmica. La diferencia está relacionada con el balance

energético de los diversos procesos microscópicos relacionados con la formación y ruptura de enlaces de tipo puente de hidrógeno. Los valores de energía libre de Gibbs no muestran variaciones significativas al comparar las diferentes glicovesículas,

El parámetro n (Tabla 8) corresponde a la estequiometría de la interacción carbohidrato-proteína (número de lípidos enlazados por proteína). Este parámetro presenta una fuerte dependencia con el tipo y concentración de derivado de manopiranosido incorporado en la bicapa lipídica.

En el caso de las vesículas de DODAC con MOM (en relación 1:1) el valor obtenido para n , mayor que uno, indicaría que interaccionan 4 moléculas de lípido por cada subunidad de Con A. En otras palabras, una subunidad de Con A emplea 4 sitios de posible interacción para el sistema DODAC-MOM con composición 1:1. Cuando la concentración de MOM disminuye en la vesícula, el valor de n aumenta a aproximadamente 11 (DODAC:MOM 3:1), indicándonos que hay 11 lípidos interaccionando con cada monómero de Con A. El aumento del número de moléculas de lípido involucradas en la interacción debido al aumento en la razón DODAC/MOM se debe, a interacciones inespecíficas existentes entre la proteína y DODAC.

Para vesículas de DODAC con MLM o MPM incorporados, los valores obtenidos para el parámetro n resultaron ser menores que 1. Debido a que el ajuste se realizó utilizando la concentración de lípidos totales el valor mínimo de n esperado es igual a 1. Como ya se mencionó, la interacción de carbohidratos y proteínas multivalentes produce redes

tridimensionales que pueden precipitar; esta situación puede llevar a errores en la estimación de la estequiometría de la interacción¹³⁶.

7.4.2. Interacción vesículas con Concanavalina A

7.4.2.1. Estudios de Aglutinación

Se ha reportado que la presencia de Con A favorece la fusión de vesículas con derivados de glicolípidos presentes en la bicapa¹³⁷⁻¹⁴⁰, es decir, facilita una agregación inicial y posterior ‘coalescencia’. En la Figura 35 se muestra una representación esquemática (a escala) de la posible red que generaría la interacción de la proteína con glicovesículas. El fenómeno de agregación (aglutinación) tras la interacción de vesículas con glicolípidos en presencia de lectinas puede ser monitoreado observando el incremento de la densidad óptica (UV-Vis) y/o de los tamaños de partícula en la solución vesicular (DLS).

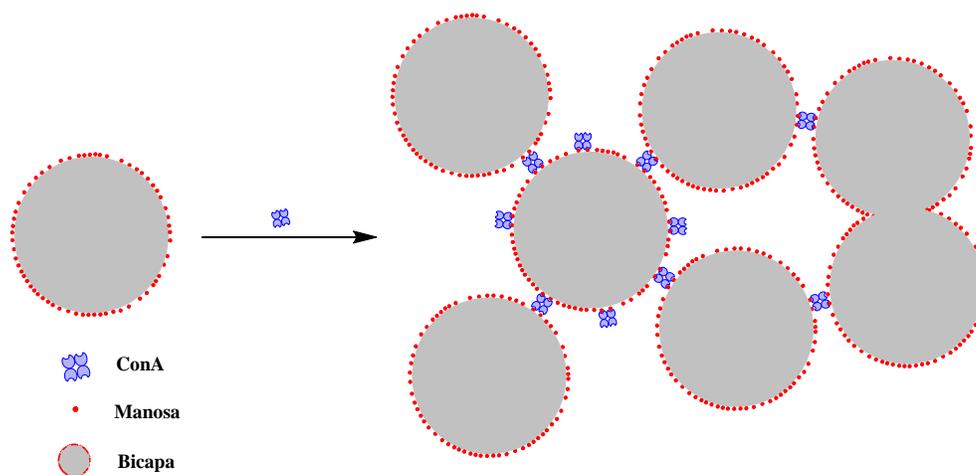


Figura 35-. Representación esquemática de la interacción multivalente de las vesículas (100 nm) decoradas con derivados de manopiranosos (no a escala) y Con A (10 nm) a pH 7.

Con el objetivo de evaluar el incremento en el tamaño de los agregados debido a la formación de redes producto de la interacción de glicovesículas con Con A, se realizaron

medidas de dispersión dinámica de luz (DLS) y de turbidez. El efecto de las interacciones inespecíficas en el proceso de aglomeración se evaluó para vesículas sin derivados de manopiranososa y la proteína, la Figura 36 muestra los diámetros obtenidos para las vesículas en ausencia y presencia de Con A. El tamaño de los agregados de DODAC (sin glicolípidos) en presencia de Con A aumenta más de 12 veces en comparación con el tamaño de este sistema en ausencia de la proteína. Este aumento de tamaño se debe a la existencia de interacciones electrostáticas atractivas entre la superficie de la bicapa y la proteína, el potencial z medido de la bicapa de DODAC es de 88 mV y la proteína Con A a pH 7,4 posee grupos cargados negativamente, con un potencial zeta de -10 mV.

Por otra parte, en el caso de los liposomas (vesículas de POPC y DPPC), no se observan cambios de tamaño en presencia de la proteína. El potencial zeta de los liposomas es negativo por lo que las interacciones electrostáticas, que favorecerían la aglutinación, no se dan en el caso de sistemas fosfolipídicos.

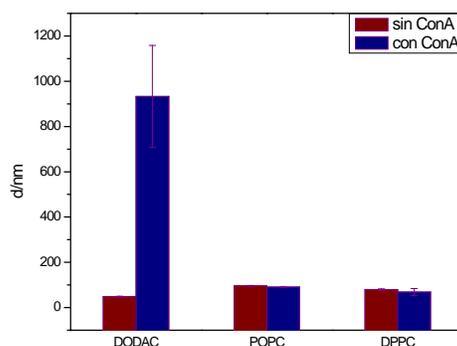


Figura 36-. Efecto de la presencia de Con A en el tamaño de vesículas en ausencia de derivados de manopiranososa.

7.4.2.2. *Estudio de tiempo de vida y anisotropía resuelta en el tiempo*

Con el fin de evaluar si el ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas de la bicapa se ve afectado por la interacción con la proteína, se realizaron medidas de fluorescencia y de anisotropía resueltas en el tiempo, usando como sondas fluorescentes el DPH y el Laurdan. Estas sondas entregan información relacionada con el ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas y con la estructuración o accesibilidad de moléculas de agua a la interfase, respectivamente. En la Figura 37 se muestran los valores determinados para el tiempo de vida promedio del DPH (A) y del Laurdan (B) en presencia y en ausencia de la proteína para las tres matrices lipídicas ya mencionadas, DODAC, DPPC y POPC. El tiempo de vida de DPH puede relacionarse con el estado en que se encuentra la bicapa (gel o líquido cristalino). En estado gel el tiempo de vida de DPH es aproximadamente de 10-11 ns, mientras que para líquido cristalino el tiempo de vida puede variar entre 6 y 9 ns^{78, 141}. La variación en el tiempo de vida debido al estado físico de la membrana se asocia a la mayor penetración de moléculas de agua cuando la membrana se encuentra en estado líquido cristalino y por lo tanto un cambio en la constante dieléctrica en el entorno en que se encuentra la sonda¹⁴¹. Se ha descrito que la emisión fluorescente del Laurdan depende principalmente de dos factores: la polaridad del entorno y la velocidad de la relajación dipolar consecuencia de la reorientación de las moléculas de agua durante el tiempo de vida del estado excitado de este fluoróforo. El efecto de estos dos factores se observa en dos regiones diferentes de su espectro de emisión. El primero predomina a 440 nm y el segundo a 490 nm. En este estudio se evaluó cómo la interacción con la proteína afecta el tiempo de vida de Laurdan (localizado en la membrana) a 440 nm. Estos resultados arrojan

información sobre la accesibilidad de moléculas al entorno de Laurdan, a mayor accesibilidad menor será su tiempo de vida¹⁴².

El tiempo de vida de fluorescencia de ambas sondas en ausencia de proteína es mayor para los liposomas de DPPC (Figura 37). Considerando que la temperatura de transición para DPPC es 40°C, a la temperatura de trabajo (25°C) estos liposomas se encuentran en estado gel, los resultados obtenidos son concordantes con los reportado para el DPH¹⁴¹. Además, el tiempo de vida de alrededor de 5 ns determinado para el del Laurdan, nos indica que la accesibilidad de las moléculas de agua es menor en comparación con los liposomas de POPC y las vesículas DODAC. El tiempo de vida de fluorescencia de DPH en vesículas de POPC y DODAC es similar, dando cuenta que la constante dieléctrica de la región hidrofóbica de la membrana es similar en ambos casos. Sin embargo, el tiempo de vida de Laurdan es ligeramente mayor para liposomas de POPC. Estos liposomas presentan una interfase con menor accesibilidad para las moléculas de agua que las vesículas de DODAC (resultados concordantes con los valores de GP determinados por medidas de fluorescencia en estado estacionario).

La interacción en presencia de Con A en la superficie de la vesícula, induce a una disminución en el tiempo de vida de DPH. Este efecto es más importante en el caso de las vesículas de DODAC que en el de liposomas de DPPC, mientras que en el caso del Laurdan, su tiempo de vida, no varía al agregar Con A a vesículas de DODAC y que éste aumenta para los liposomas de POPC y DPPC. Estos resultados indican que se dan interacciones inespecíficas entre la proteína y las vesículas y que estas producen alteraciones detectables en ambas regiones de la bicapa (interfase y región hidrofóbica).

La proteína, Con A, localizada en la superficie de liposomas de POPC y DPPC actúa como una barrera o altera la bicapa reduciendo la accesibilidad de moléculas de agua a la interfase, (incremento del tiempo de vida fluorescente de Laurdan). Además, algunas moléculas de agua de la interfase localizadas bajo la Con A, se desplazan hacia el interior de la membrana (región hidrofóbica), y su presencia provocaría un aumento en el tiempo de vida de Laurdan y una disminución del tiempo de vida de DPH.

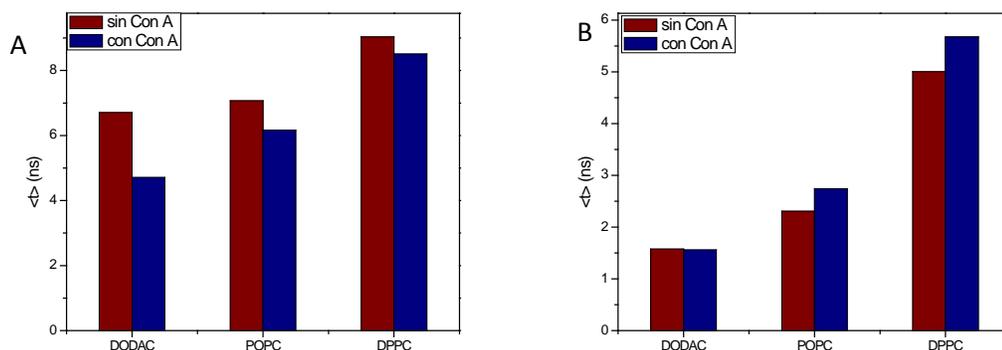


Figura 37-. Tiempo de vida fluorescente promedio A) DPH. B) Laurdan.

En la Figura 38 se muestra un diagrama del movimiento de un fluoróforo incorporado en una membrana, caracterizado por el modelo de “*wobbling in a cone*” y el significado de los parámetros asociados a este modelo.

El ángulo de tambaleo (θ) está relacionado con el orden molecular de la bicapa, mientras que, el tiempo de correlación rotacional (τ_r) está relacionado con movimientos dinámicos de la sonda en la vesícula (por ejemplo; difusión lateral, rotacional, isomerización, entre otros, lo que hace que este parámetro sea difícil de interpretar).

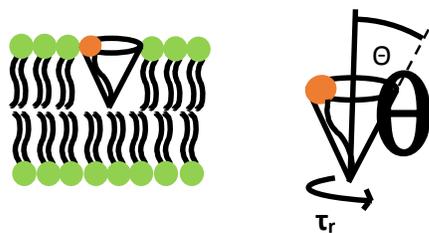


Figura 38-. Esquema del movimiento de un fluoróforo en una bicapa de acuerdo al modelo “wobbling in cone”.

En la Figura 39 se muestran los resultados obtenidos para el ángulo de tambaleo y el tiempo de correlación rotacional de DPH y Laurdan incorporados en vesículas y cómo se ven afectados estos parámetros por la interacción con Con A. Se observa que para los liposomas la interacción con Con A produce una disminución del ángulo de tambaleo de ambas sondas, mientras que en las vesículas de DODAC sólo se ve aumentado el ángulo del Laurdan. La disminución del ángulo de tambaleo de la sonda indicaría que tiene un menor volumen accesible, es decir, las moléculas de lípidos se encuentran más cercanas. Por otra parte, el cambio en el tiempo de correlación rotacional producto de la interacción con Con A es dependiente del tipo de vesículas (liposomas o DODAC), al igual que el ángulo de tambaleo. En el caso de vesículas de DODAC el tiempo de correlación rotacional disminuye para ambas sondas en presencia de Con A en la suspensión, indicando una disminución en la viscosidad del entorno de las sondas. En cambio, para los liposomas se observa un incremento en el tiempo de correlación rotacional del DPH y una disminución para Laurdan.

A partir de los resultados obtenidos para la interacción de Con A con vesículas se decidió utilizar como lípido matriz el DPPC para la obtención de glicovesículas. La selección de

DPPC se basó en los siguientes resultados para este sistema; el tamaño de partícula no varió significativamente, y a las que las medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo mostraron cambios menores. Es decir, de darse interacciones inespecíficas de la proteína con vesículas de DPPC, éstas no inducen procesos de aglomeración ni promueven cambios significativos en la estructuración de la membrana.

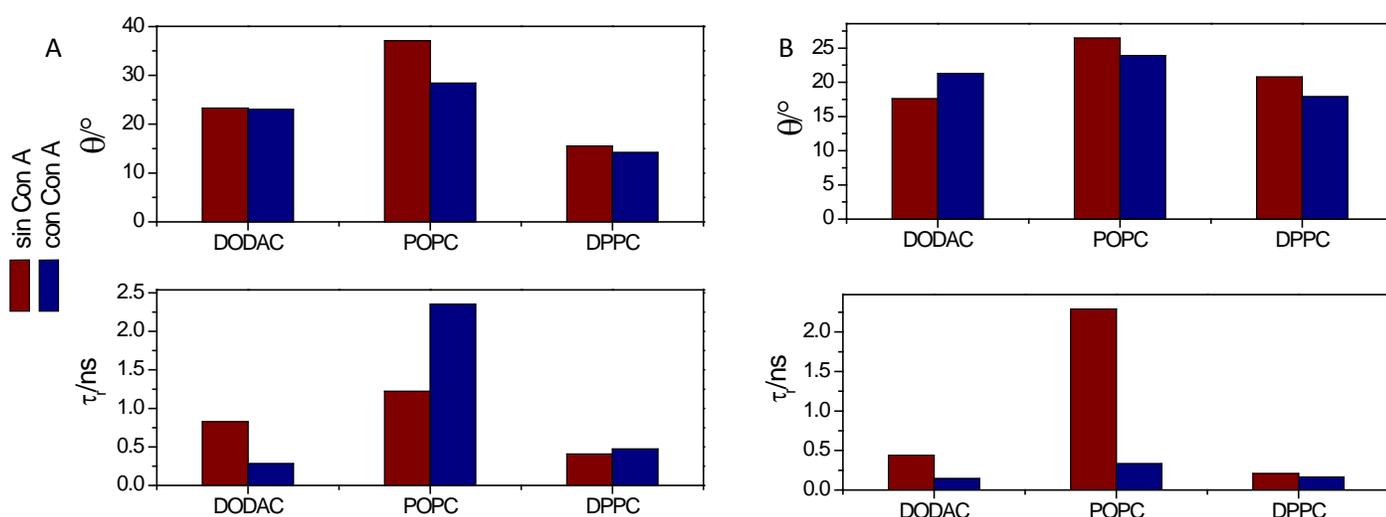


Figura 39-. Resultados de anisotropía resuelta en el tiempo para tres posibles lípidos matriz. A) DPH. B) Laurdan.

7.4.3. Interacción de Con A con liposomas de DPPC-derivados de manopiranososa

7.4.3.1. Estudio de aglutinación

Se evaluó la interacción de la proteína Con A con vesículas de DPPC modificadas con 5% en moles de los diferentes derivados de manopiranososa sintetizados. El objetivo es estudiar el efecto de la presencia de derivados de manopiranososa en la interfase (monitoreando el proceso de aglomeración y la fluorescencia resuelta en el tiempo de sondas específicas) y establecer cómo el largo de la cadena hidrocarbonada y la disponibilidad/accesibilidad al residuo manopiranosido afecta la interacción con la proteína.

Los tamaños obtenidos al incorporar Con A a la suspensión de liposomas de DPPC modificados con los derivados de manopiranososa se muestran en la Figura 40. En la Figura A se incluyen todos los resultados obtenidos. Se puede observar que la presencia de Con A provoca la aparición de agregados con varios tamaños, por ejemplo, los liposomas DPPC-DOEM en ausencia de Con A tienen diámetro promedio de 65nm, y al adicionar Con A se forman agregados con diámetros promedio de 65, 150, 1400, 5000 nm (tamaños obtenidos en la modalidad de Intensidad). El análisis del tamaño obtenido utilizando dispersión dinámica de luz evaluado por intensidad es muy sensible a la formación de agregados de gran tamaño. Con el fin de poder comparar el efecto de la proteína en las diferentes vesículas se utilizó el tamaño que predomina, es decir, el tamaño con mayor porcentaje de dispersión de luz (Figura B). En la Figura C se muestran las diferencias de tamaño provocadas por la presencia de Con A.

Los datos obtenidos indican que en aquellos sistemas donde se han incorporado derivados MXM, el aumento del largo de la cadena hidrocarbonada limita la aglomeración, debido a que un mayor número de unidades metilénicas provoca una incorporación más profunda del derivado (mayor carácter hidrofóbico) y, por lo tanto, el residuo manopiranósido queda menos expuesto para la interacción con Con A. Similar efecto puede observarse en el caso de los derivados con dos cadenas hidrocarbonadas, DXM; sin embargo, los derivados DXM muestran un mayor efecto en el aumento de tamaño debido a la interacción con Con A cuando son comparados con los MXM análogos. Este comportamiento indica que el residuo manopiranósido de estos derivados con dos cadenas (DXM) de 12 y 16 unidades metilénicas queda más expuesto que en el caso de sus análogos correspondientes

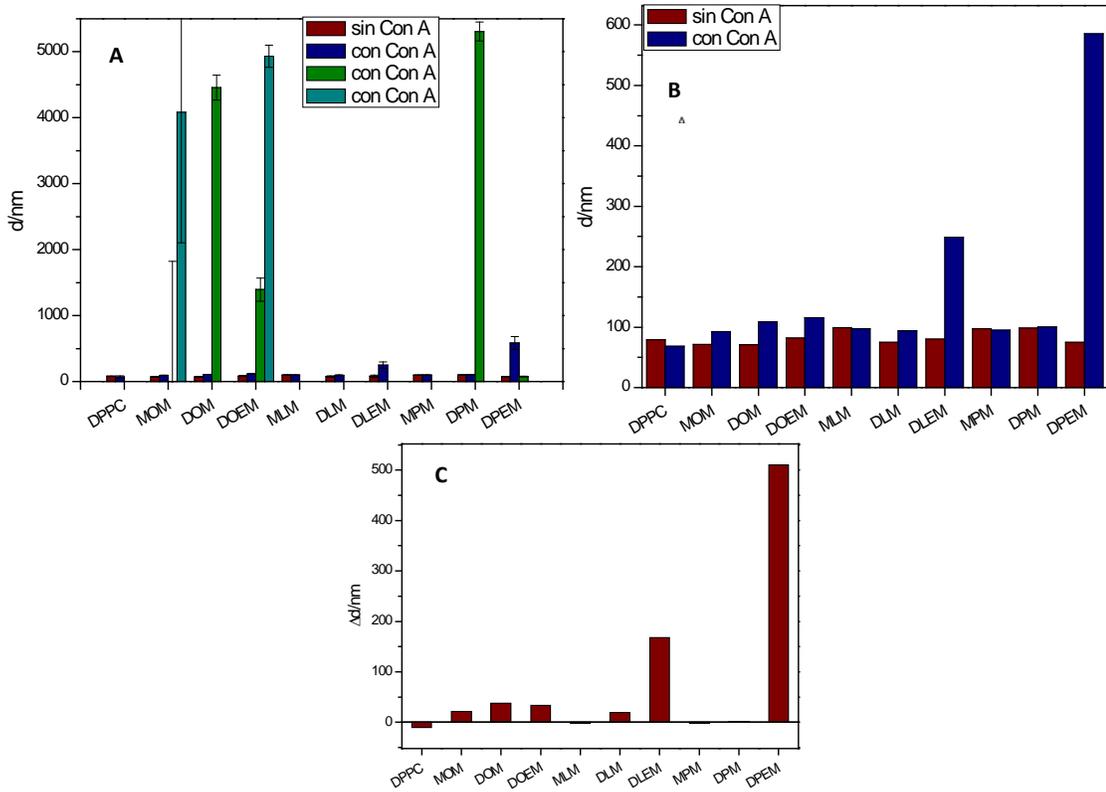


Figura 40-. Valores de diámetro determinados por DLS para los agregados en ausencia y presencia de Con A. A) Todos los diámetros de los agregados formados en ausencia y presencia de Con A en liposomas y glicoliposomas con un 5% de manopiranososa que contribuyen a la dispersión de luz. B) Diámetros de los agregados formados en ausencia y presencia de Con A (el de mayor proporción en la dispersión de luz) en liposomas y glicoliposomas con un 5% de manopiranososa C) Cambio en el diámetro de los agregados (presencia – ausencia de Con A).

monoalquilados (MXM). En el caso de la familia con extensor, DXEM, el comportamiento observado es diferente al descrito previamente, al aumentar el largo de la cadena hidrocarbonada se observa un mayor efecto sobre el tamaño en presencia de Con A. La incorporación del espaciador OE modifica la flexibilidad de la cabeza hidrofílica aumentando el número de conformaciones posibles en la bicapa en las que el residuo manopiranósido no queda expuesto de la forma adecuada para el reconocimiento

por la proteína. A medida que, aumenta la hidrofobicidad del derivado este efecto se compensa, quedando la manopiranososa en mejor disposición, o con una mejor orientación, para ser reconocida por la Con A.

Los estudios de Engel, A. et. al.¹⁴³ dan cuenta que para derivados hexadecil manopiranososa incorporados en vesículas, existe una longitud óptima del espaciador etilenglicol para que se dé una interacción adecuada con Con A. Al aumentar la longitud por encima de su valor óptimo (OE=6) crece el número de arreglos y de modos de plegado a lo largo de la misma cadena del espaciador que evitan la interacción con la proteína.

7.4.3.2. Estudio de tiempo de vida y anisotropía resuelta en el tiempo

En la Figura 41 se muestran los resultados obtenidos para las determinaciones de tiempo de vida de fluorescencia del DPH y del Laurdan incorporados en glicovesículas, en ausencia y presencia de Con A.

El tiempo de vida de fluorescencia del DPH se reduce en presencia de derivados de manopiranososa en liposomas de DPPC (Figura 41 A superior). Se observa que para los derivados pertenecientes a la familia MXM y DXM, con el aumento del largo de la cadena hidrocarbonada disminuye el tiempo de vida del DPH, mientras que para los derivados de DXEM, el tiempo de vida aumenta cuando la cadena hidrocarbonada aumenta de 8 a 12 unidades metilénicas y permanece casi sin variación cuando la cadena hidrocarbonada pasa de C12 a C16. Cuando se emplea Laurdan como sonda, el efecto de la presencia de los derivados de manopiranososa en los liposomas de DPPC con manopiranososa no sigue un patrón simple (Figura 41 A inferior). Se observa que a mayor largo de cadena

hidrocarbonada el tiempo de vida aumenta, indicando una menor accesibilidad de moléculas de agua a la región sensada por el Laurdan debido a la incorporación de los derivados. Además, se observa que el efecto de la modificación del tipo de cadena hidrocarbonada es más importante en derivados con cadena hidrocarbonada corta (C8), donde, la incorporación de una doble cadena hidrocarbonada y del grupo OE producen una disminución de tiempo de vida, indicando que la interfase de membranas de DPPC sufren modificación con la presencia de derivados DOM y DOEM, que permiten una mayor accesibilidad de moléculas de agua que las membranas sin modificar. Además, se observa que el tiempo de vida fluorescente del Laurdan aumenta debido a la incorporación de derivados con 12 y 16 unidades metilénicas, indicando en este caso una disminución en la accesibilidad de moléculas de agua en la interfase.

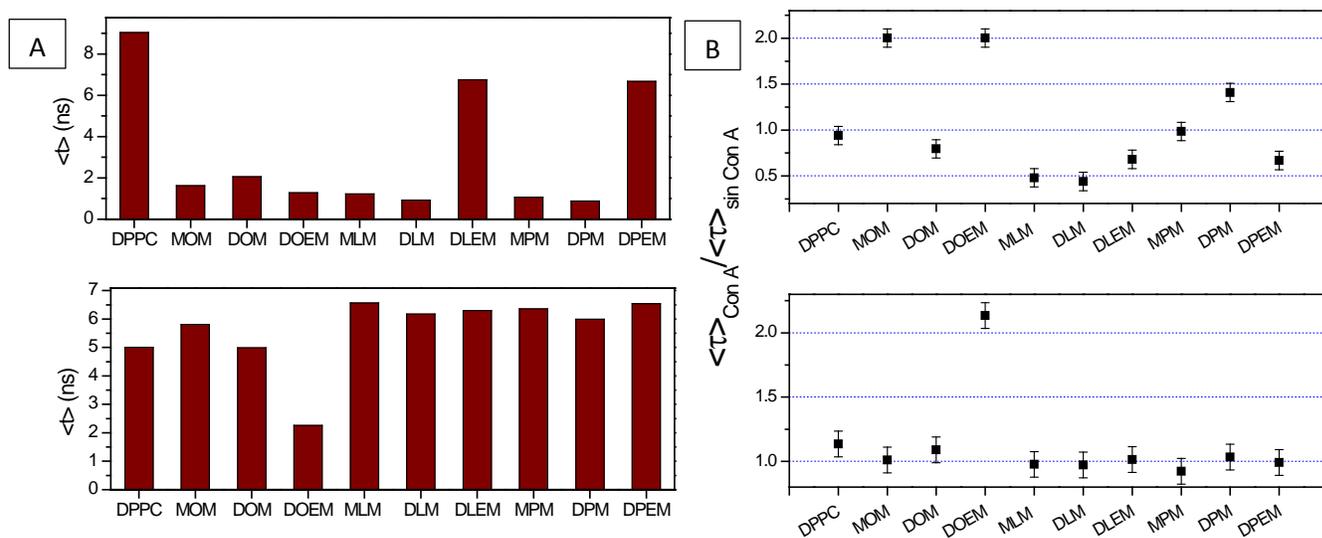


Figura 41-. Tiempo de vida de fluorescencia promedio (A) de DPH (superior) y Laurdan (inferior) para agregados formados por DPPC y 5% de derivado de manopiranosina. Razón de los tiempos de vida de fluorescencia promedio en presencia y en ausencia de Con A (B) de DPH (superior) y Laurdan (inferior) para agregados formados por DPPC y 5% de derivado de manopiranosina en ausencia y presencia de Con A

La interacción de Con A con membranas de DPPC en ausencia y presencia de derivados de manopiranososa induce modificaciones en el tiempo de vida de fluorescencia de DPH (Figura 41 B superior), mientras que para Laurdan el tiempo de vida de fluorescencia no se ve modificado (Figura 41 B inferior). Un aumento en el tiempo de vida de ambas sondas es observado debido a la interacción de Con A con liposomas de DOEM-DPPC, indicándonos que la presencia de Con A reduce la accesibilidad de moléculas de agua a la bicapa de la vesícula. Por otra parte, para liposomas en los cuales se incorporaron derivados DOM, MLM, DLM, DLEM y DPEM se observó una disminución en el tiempo de vida de DPH, debido a la interacción con Con A, la presencia de Con A podría desplazar moléculas de agua a la región hidrofóbica de la bicapa.

La Figura 42 muestra los parámetros obtenidos del análisis de medidas de anisotropía resuelta en el tiempo, utilizando el modelo de “*wobbling in a cone*” para el ajuste de los decaimientos experimentales de la anisotropía del DPH y del Laurdan. En general, se observa un aumento en el ángulo de tambaleo de DPH en presencia de la proteína (Figura 42 C), con excepción de membranas de DPPC y DPPC-MOM. Por otra parte, el ángulo de tambaleo para el Laurdan disminuye con la excepción de membranas de DPPC-DOM (Figura 42 D). Estos resultados nos indican que la interacción de las membranas con Con A produce una reducción en el empaquetamiento de la interfase y un aumento de éste en la región de las cadenas hidrocarbonadas.

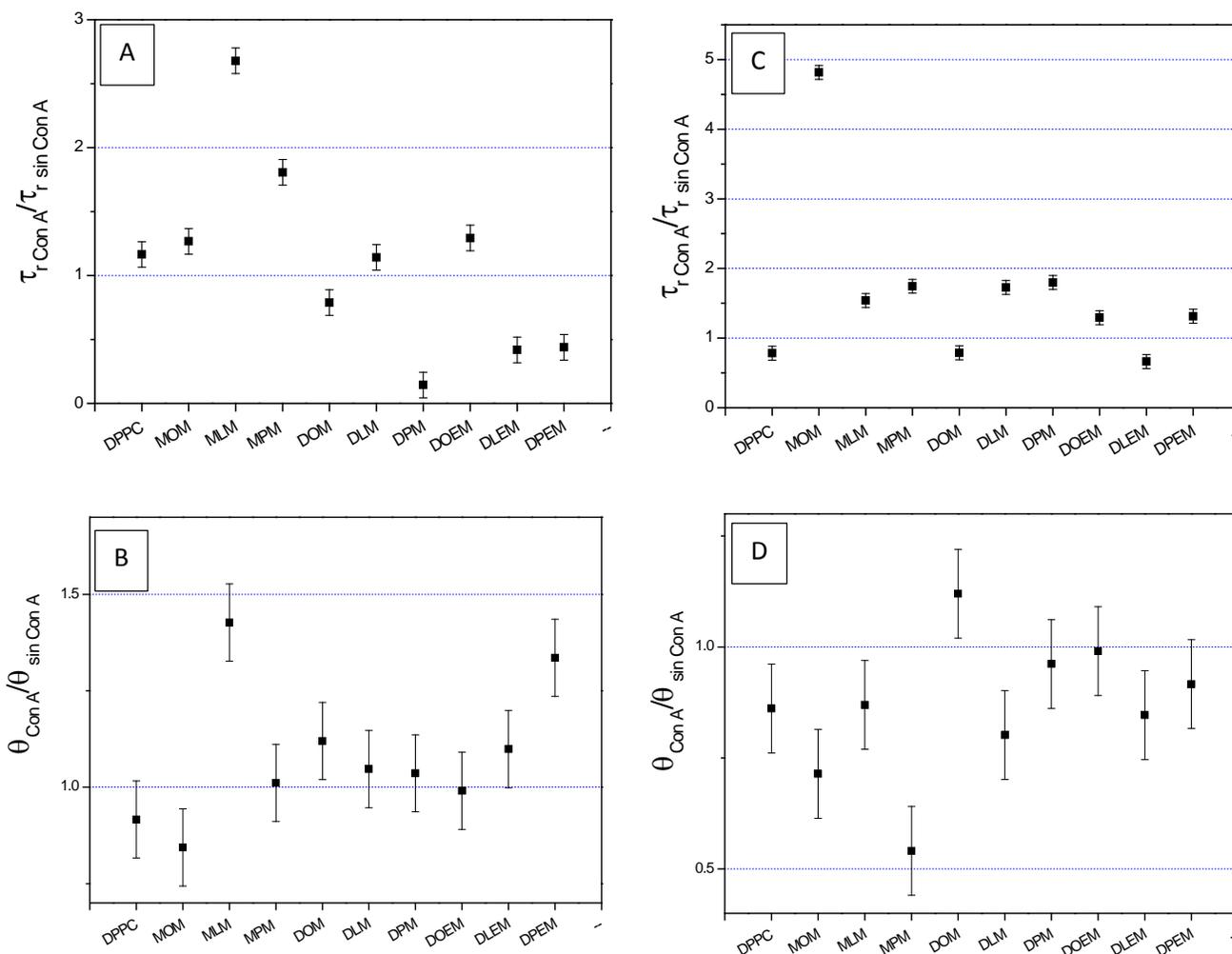


Figura 42-. Resultados de anisotropía resuelta en el tiempo para la interacción de Con A con liposomas de DPPC y glicoliposomas con 5% de derivado de manopiranososa. A) Razón del tiempo de correlación rotación de DPH en presencia y ausencia de Con A. B) razón del tiempo de correlación rotación de Laurdan en presencia y ausencia de Con A. D) razón del ángulo de tambaleo de DPH en presencia y ausencia de Con A. B) razón del ángulo de tambaleo de Laurdan en presencia y ausencia de Con A.

En el caso del tiempo de correlación rotacional (τ_r), se observa un comportamiento inverso de las dos sondas utilizadas, debido a la interacción con Con A (Figura 42 A y B). Por ejemplo, en el caso de vesículas de DPPC-DLEM se observa que el tiempo de correlación rotacional del DPH aumenta, mientras que para el Laurdan disminuye, es decir, si

consideramos que el tiempo de correlación rotacional está directamente relacionado con la viscosidad del medio la interacción con Con A en esta membrana produce una disminución de la viscosidad en la zona de los grupos glicerol de la bicapa y un aumento de ésta en la región hidrofóbica.

Los resultados obtenidos pueden ser explicados en el diagrama de la Figura 43 que muestra un esquema de las posibles formas de la interacción de la proteína, Con A, con las membranas sintéticas modificadas con derivados de manopiranososa. La perturbación de la membrana producto de la interacción con la proteína dependerá de la profundidad y como esté localizado el derivado de manopiranososa en la membrana. En el primer esquema el residuo manopiranosido se encuentra inserto en la interfase, en este caso la proteína, debido a la interacción con la manopiranososa, se inserta en la región de la interfase; reduciendo el área ocupada por la cabeza hidrofílica y aumentando el área ocupada por las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. En el caso donde la inserción de la proteína sea más profunda el área ocupada por las cadenas hidrocarbonadas disminuye y el ángulo de tambaleo de DPH es menor. La segunda alternativa mostrada en el esquema, muestra el derivado de manopiranososa más expuesto por sobre los lípidos de matriz; en este caso, la interacción con la proteína no produciría grandes cambios estructurales en la membrana.

Por lo tanto, la interacción de proteína con membranas modificadas con glicolípidos es influenciada en la forma en que el glicolípido se incorpora y localiza en la membrana, puntos en que el balance hidrofílico-hidrofóbico es un factor clave. No existe una correlación clara entre el aumento de tamaño producto de la interacción entre la proteína y la bicapa con los cambios en el tiempo de vida y ángulo de tambaleo de las sondas

estudiadas. Esto nos indicaría que la interacción con la proteína no conduciría siempre a procesos de aglutinación.

La variación en el ángulo de tambaleo debido a la interacción de Con A con glicovesículas, específicamente, con alquil manopiranosidos con 12 y 16 unidades metilénicas en su cola hidrocarbonada tiene la misma tendencia, un aumento en el ángulo para el DPH y una disminución para Laurdan. La interacción entre la proteína y estas glicovesículas se produciría con incorporación de parte de la proteína a la interfase de la vesícula (Figura 43 panel superior). En el caso de vesículas de DPPC-DOEM, la variación en el ángulo de tambaleo de ambas sondas es pequeño, por lo que el derivado DOEM se encuentra más expuesto en la interfase y la parte hidrofóbica de la proteína no se incorporará a la interfase de la glicovesículas DPPC-DOEM (Figura 43 panel inferior).

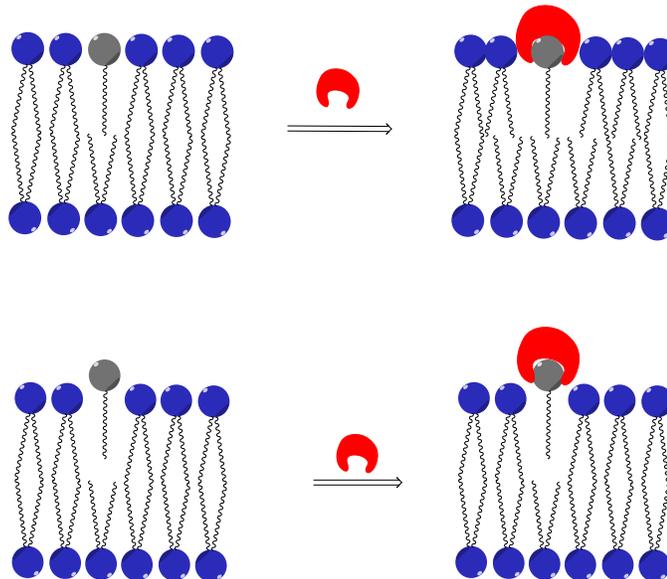


Figura 43-. Esquema propuesto de las posibilidades de interacción de Con A con membranas modificadas con derivados de manopiranososa. La esfera gris corresponde al residuo manopiranosídico de los derivados, la figura roja corresponde a la proteína y las esferas azules corresponden al lípido matriz utilizado.

7.4.3.3. Efecto de la concentración de DLEM en liposomas de DPPC en la interacción con Concanavalina A

Con el fin de evaluar el efecto, en la interacción con Con A, de la concentración de manopiranososa en la vesícula se realizaron medidas de turbidez utilizando tres diferentes concentraciones de DPEM (1, 5 y 10% en liposomas de DPPC) y adicionando Con A a la suspensión. En este caso, se estudió el efecto de la concentración de DPEM en membranas de DPPC. Se decidió utilizar DPEM debido a que es el derivado que mostró un mayor aumento en el tamaño de los agregados cuando la proteína fue incorporada. La Figura 44 muestra como la composición de la membrana afecta la interacción con la proteína. Como ya se ha mencionado, un aumento en la turbidez o el tamaño de los agregados debería observarse producto de la interacción con Con A. Se puede destacar que para las composiciones estudiadas, el mayor aumento en la turbidez fue observado para sistemas con 5% en moles de DPEM. El cambio de turbidez observado en membranas modificadas con 1% de DPEM fue muy similar al observado en membranas de DPPC sin aditivos. Por otra parte, cuando la cantidad de DPEM en la membrana se aumentó en 10%, el incremento observado en la turbidez fue menor. Es posible que un aumento en la concentración del derivado de manopiranososa provoque segregación de lípidos (*formación de dominios*), y por lo tanto, un menor número de funcionalidades manopiranososa estén disponibles para interaccionar con la proteína. Adicionalmente, la incorporación de estos derivados de manopiranososa en membranas de DPPC provoca una disminución en el potencial zeta de los liposomas, por lo que existe una mayor repulsión electrostática entre la superficie de la membrana y la proteína lo que también desfavorece el proceso de aglutinación.

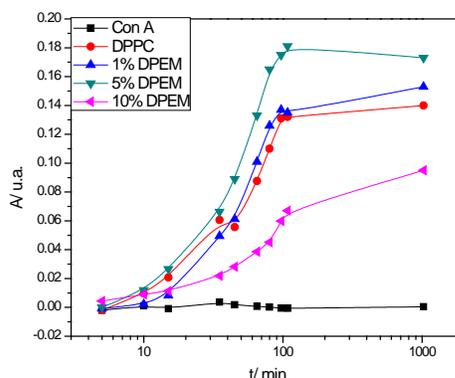


Figura 44-. Cambio de turbidez producto de la interacción con Con A. Efecto de la concentración de DPEM en membranas de DPPC.

7.4.3.4. *Resonancia de plasmón superficial*

Con el fin de evaluar constantes cinéticas y de equilibrio de la interacción de la proteína con las vesículas modificadas con derivados de manopiranososa se realizaron experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR). Los liposomas de interés fueron inmovilizados en una monocapa de Mercapto-11-undecanol (MUO) fijada sobre una lámina de oro y luego se evaluó el efecto de la presencia de diferentes concentraciones de proteína, Con A, sobre el índice de refracción de la interfase. Para realizar estos estudios se utilizaron liposomas modificados con los derivados extendidos, DXEM, debido a que éstos fueron los que presentaron los mejores resultados en los experimentos de aglutinación.

La Figura 45 muestra las curvas de adsorción de los diferentes liposomas estudiados sobre la monocapa de MUO. En los sensogramas se pueden observar tres etapas en el proceso de adsorción (A, B, C). En el punto A la solución de liposomas se hace circular sobre la monocapa de MUO, (los diámetros hidrodinámicos de los liposomas inmovilizados fueron evaluados utilizando dispersión dinámica de luz, todos los liposomas poseen diámetro

promedio de 70 nm, fueron preparados por extrusión), luego se hace circular el tampón de corrida (punto B) y finalmente, a partir del punto C se hace circular una solución regeneradora (solución acuosa de H_3PO_4). Se observa una disminución en la respuesta al hacer circular solución regeneradora por la superficie (punto C), como consecuencia de la eliminación de los liposomas débilmente adsorbidos. Al realizar más adiciones de esta solución, no se observa una disminución importante en la respuesta.

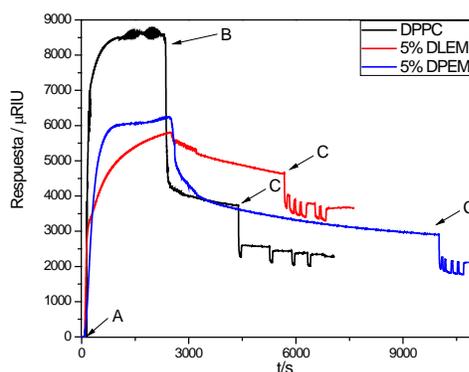


Figura 45-. Sensogramas de curvas de adsorción de liposomas en monocapa de Mercapto-11-undecanol (MUO).

Es posible que la adsorción de liposomas en monocapas autoensambladas, (SAMs *self-assembled monolayer*) resulte en dos tipos diferentes de superficie (Figura 46).^{144, 145} Una de las posibilidades es que el liposoma se adsorba manteniendo su forma original, bicapa cerrada (A). La segunda alternativa es, debido a la proximidad de los liposomas inmovilizados, que el aumento de las interacciones favorezca la fusión y se genere como resultado una bicapa plana (B). Se ha propuesto que la densidad de la SAM formada por MUO es un factor determinante en cuál de los dos tipos de inmovilización se verá favorecida. Para una baja densidad de MUO se ha propuesto que la opción A es la más

favorecida, mientras que, altas densidades de modificación de la lámina de oro por MUO, favorecen el proceso de fusión de vesículas (B)¹⁴⁶. Debido al prolongado tiempo de modificación de la superficie de oro por la solución de MUO, 48 horas, es esperable una alta densidad y por lo tanto los liposomas inmovilizados se encuentran como una bicapa plana, alternativa (B).

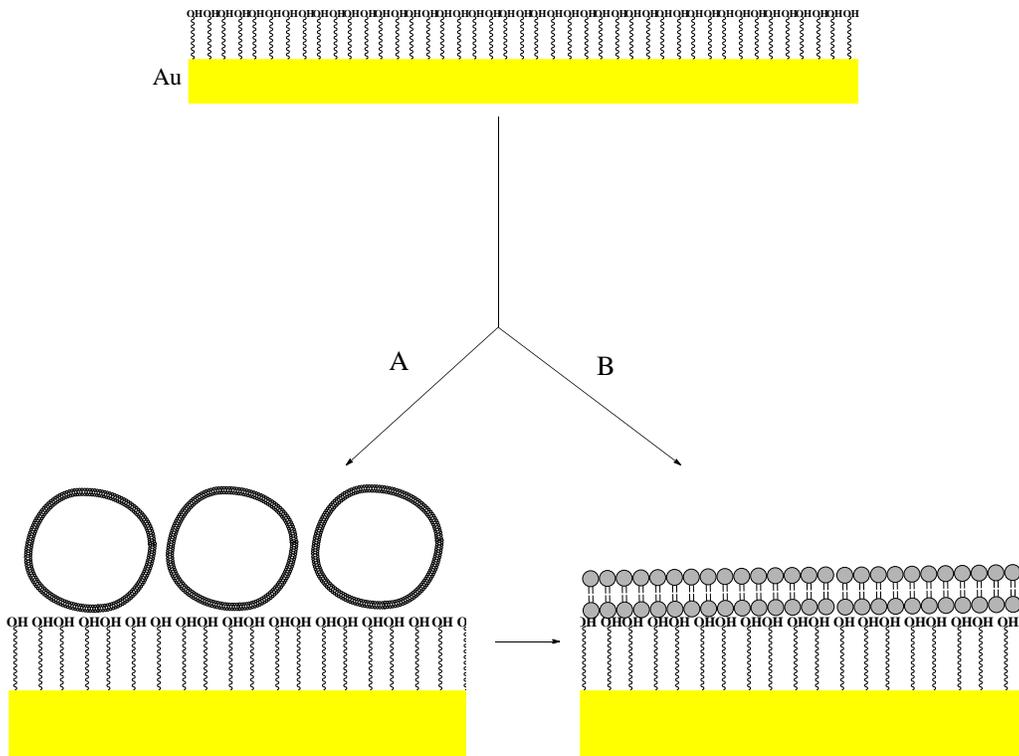


Figura 46-. Representación de los dos tipos de adsorción de liposomas sobre monocapa de MUO. A) Inmovilización de los liposomas manteniendo su forma original. B) Fusión de liposomas inmovilizados formando una bicapa.

En la Figura 47 se muestran los sensogramas obtenidos para la interacción de Con A con los diferentes liposomas inmovilizados. La interacción de Con A con liposomas de DPPC muestra una baja respuesta con una baja relación señal/ruido (Figura 47 A). La presencia de manopiranosido en la superficie produce un notorio aumento en la señal de SPR (Figura

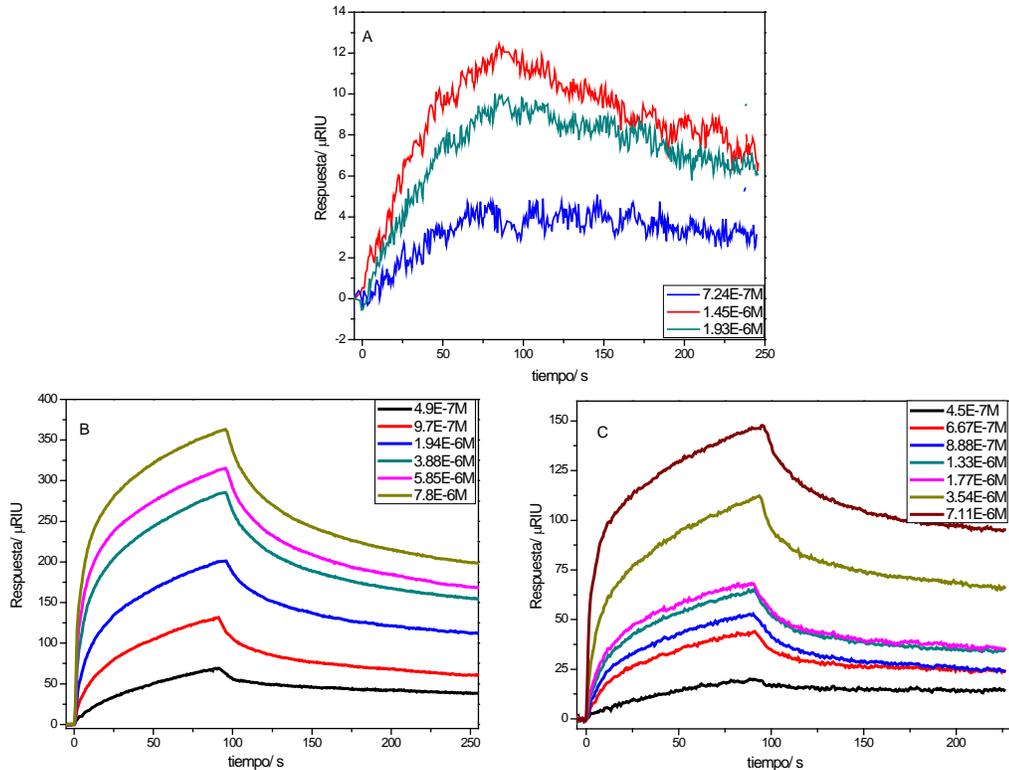


Figura 47-. Sensogramas de la interacción de liposomas inmovilizados con diferentes concentraciones de Con A. A) DPPC. B) 5% en mol de DLEM en liposomas de DPPC. C) 5% en mol de DPEM en liposomas de DPPC.

47 B y C), sin alcanzar la saturación de la superficie con las concentraciones de Con A estudiadas ($7,8 \cdot 10^{-6}$ M). A partir del ajuste de estas curvas, es posible obtener los valores de las constantes cinéticas de asociación y de disociación para los diferentes sistemas estudiados. La interacción con la bicapa de DPPC se ajusta a una curva monoexponencial tanto en la asociación como en la disociación, mientras que, para la interacción con glicoliposomas las curvas no muestran un ajuste adecuado a los modelos convencionalmente utilizados en SPR, la fase de asociación muestra una pronunciada pendiente inicial, indicándonos la existencia de una interacción rápida. Para evaluar las constantes de velocidad cinéticas de la interacción de Con A con glicoliposomas se

realizaron ajustes monoexponenciales. Para la fase de asociación se aplicó la ecuación 37, considerando los primeros 25 s (para bajas concentraciones de Con A) y los primeros 14 s (para concentraciones altas). En el caso de la fase de disociación (ecuación 38) el ajuste se aplicó a los datos con $t > 170$ seg.

La Figura 48 muestra el ajuste monoexponencial para los glicoliposomas en los primeros segundos de la fase de asociación y en los últimos segundos de la fase de disociación (Figura 48 A) y la dependencia de la constante cinética observada con la concentración de Con A (Figura 48 B). La Figura 48 B muestra que la dependencia de las constantes cinéticas observadas con la concentración de Con A presenta desviaciones del modelo de pseudo primer orden (dos pendientes). Existen reportes previos que muestran desviaciones del modelo de pseudo primer orden con la concentración de ligando, debido a heterogeneidad de la superficie¹⁴⁷. En nuestro caso, la heterogeneidad de la superficie puede tener su origen en la formación de dominios o micro-dominios (distribución no homogénea de lípidos y glicolípidos en la superficie).

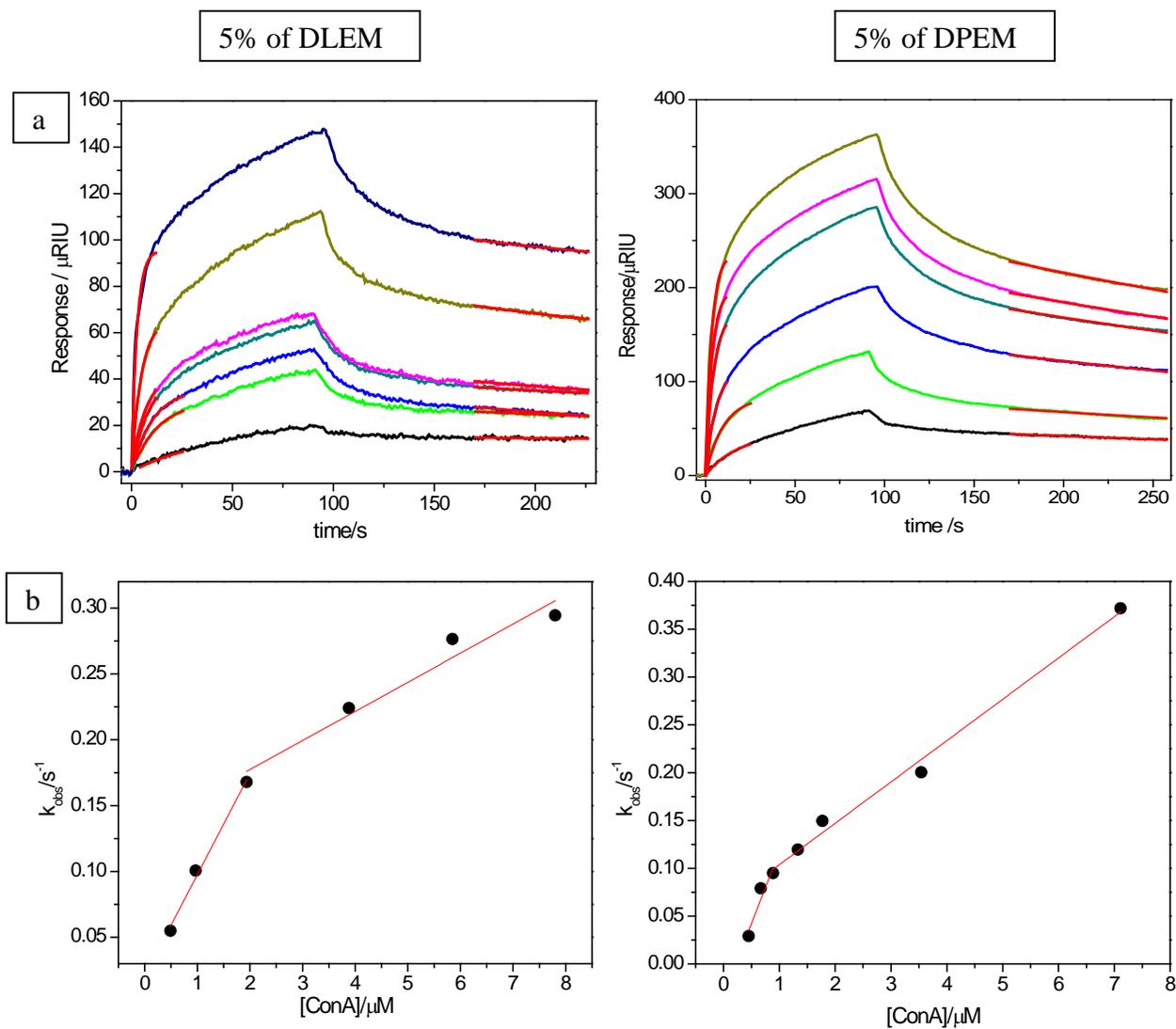


Figura 48-.(A) Sensogramas y ajuste monoexponencial de la fase inicial de asociación y final de disociación para los glicoliposomas; 5% of DPEM y 5% of DLEM. (B) Dependencia de la constante de velocidad cinética observada con la concentración de Con A para la interacción proteína-glicoliposomas; 5% de DPEM y 5% de DLEM.

En la Tabla 9 se muestran las constantes cinéticas y de equilibrio de la interacción de Con A con liposomas y glicoliposomas a 25°C. La constante cinética de la fase de asociación para DPPC es un orden de magnitud menor que las constante cinéticas obtenidas para

glicoliposomas, indicándonos que la interacción de Con A con los residuos manopiranósidos predomina en los primeros segundos de la interacción.

Tabla 9-. Constantes cinéticas de asociación y disociación de la interacción de liposomas inmovilizados con Con A.

	$k_{a1}/10^4 M^{-1} s^{-1}$	$k_{a2}/10^4 M^{-1} s^{-1}$	$k_{off}/10^{-3} s^{-1}$	$K_a/10^6 M^{-1}$ baja [Con A]
DPPC	1		3	3
5% DLEM	10	2	3	33
5% DPEM	15	4	1,5	100

Lüscher-Mattli, M.¹⁴⁸ ha reportado que la interacción de Con A con liposomas en ausencia de glicolípidos es gobernada por factores entrópicos, comportamiento característico de las interacciones hidrofóbicas. Las constantes de velocidad reportadas por estos autores para la interacción de Con A con liposomas son del orden de 10^5 - $10^6 M^{-1}$ a $30^\circ C$, valor concordante con la constante de afinidad obtenida para liposomas de DPPC utilizando SPR.

Se ha reportado que las constantes de velocidad de asociación y disociación para la interacción entre Con A y metil- α -manopiranósido presentan valores de 3 - $6 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ y 3 - $6 s^{-1}$ respectivamente¹⁴⁹. Valores muy similares a los obtenidos a concentraciones mayores de Con A (k_{a2}), a bajas concentraciones las constantes de velocidad son mayores (k_{a1}). Estos resultados cinéticos nos indican que a altas concentraciones de Con A el mecanismo de interacción es muy similar al de las interacciones monovalentes. Sabiendo que el efecto multivalente aumenta la cinética de la interacción¹⁵⁰, a bajas concentraciones

de Con A la interacción con la superficie de glicoliposoma involucra mecanismos multivalentes, mientras que, a concentraciones altas el mecanismo corresponde a interacciones monovalentes.

Para la disociación de la interacción de Con A se obtienen resultados similares con los dos glicoliposomas estudiados. Sin embargo, la constante cinética de la fase de asociación depende del tipo de glicolípido utilizado, aumentando 1,5 veces para los liposomas que contienen DPEM. Por consiguiente, la constante de afinidad de la lectina Con A con liposomas de DPPC-5% DPEM es mayor.

El efecto multivalente puede ser atribuido a varios procesos (principalmente, efecto quelato y re-enlace)⁴³. El proceso de re-enlace se debe a la proximidad entre ligandos, en nuestro caso la proximidad de grupos manósidos en la superficie, la interacción de Con A con un manósido puede ocurrir inmediatamente después de la disociación de la interacción de Con A con un grupo manopiranosido próximo. Si este proceso ocurre con la interacción de Con A y glicoliposomas, nos indica que las moléculas de DPEM están más próximas o agrupadas que las moléculas de DLEM en la superficie.

Un importante aumento en la afinidad de Con A por glicoliposomas es observado en comparación a liposomas de DPPC. Por lo tanto, en los primeros segundos de la fase de asociación, las moléculas de DPPC no participan en la interacción con Con A.

8. Conclusiones

Para los agregados formados directamente por los derivados de manopiranosido sintetizados, propiedades tales como fluidez de la región de las cadenas hidrocarbonada, accesibilidad de moléculas de agua en la interfase y temperatura de transición muestran una dependencia directa con el largo de la cadena hidrocarbonada.

El MPM, a pesar de que su topología no es la apropiada, puede formar vesículas unilamelares.

Los derivados MLM y MPM no son capaces de solubilizar bicapas sintéticas, resultado que indica que corresponden a compuestos curvofóbicos.

En presencia de vesículas de DODAC y POPC, los derivados MXM son capaces de actuar como co-surfactantes en lugar de hacerlo como agentes solubilizantes de membranas.

La afinidad de los derivados sintetizados de manopiranosido a membranas sintéticas de DODAC, POPC y DPPC, en términos de su capacidad para incorporarse a ellas, no queda sólo determinada por la hidrofobicidad de los derivados, sino que también el tipo de lípido utilizado tiene gran relevancia.

La incorporación de derivados de manopiranosido a vesículas de DODAC induce la disminución de su temperatura de transición. El efecto de la disminución de la temperatura de transición es menor para MPM en comparación con los otros dos derivados, indicando que este compuesto presentaría una mayor afinidad por la fase gel durante la transición de fase.

Como consecuencia de su comportamiento frente a Con A, los liposomas de DPPC fueron seleccionados como lípido de matriz más adecuado para realizar los estudios de la interacción de Carbohidrato-lectina.

EL aumento de largo de cadena hidrocarbonada en derivados MXM y DXM produce una incorporación más profunda en la bicapa lipídica, provocando una menor disponibilidad para la interacción con la Concanavalina A. Para los derivados con extensor, DXEM, se observa el efecto contrario.

La presencia del espaciador OE favorece la disponibilidad del glúcido para la interacción con Concanavalina A.

Los resultados de anisotropía resuelta en el tiempo nos indican que, en general, parte de la proteína (Concanavalina A) es incorporada a la membrana o al menos se encuentra tan próxima que altera la región de la interfase de la bicapa.

Del estudio de resonancia de plasmón superficial se concluye que existe interacción inespecífica entre Concanavalina A y liposomas de DPPC en ausencia de glicolípidos. Y que la interacción con glicoliposomas involucra la participación de mecanismos complejos.

Para los derivados con extensor, se observa un aumento de la afinidad de Con A por glicoliposomas que contienen DPEM comparado con DLEM.

La constante de equilibrio para los glicoliposomas estudiados son 3000-10000 veces mayores que la obtenida para el glicolípido aislado Me- α -Man ($\approx 10^3 \text{ M}^{-1}$).

Bibliografía

1. L. Coppola, A. Gordano, A. Procopio and G. Sindona, *Colloids Surf., A*, 2002, **196**, 175-187.
2. G. Jeffrey, A. L. Wingert and M, *Liq Cryst*, 1992, **12**, 179-202.
3. F. Caussanel, C. Andre-Barres, S. Lesieur and I. Rico-Lattes, *Colloids Surf., B*, 2001, **22**, 193-203.
4. P. Thiesen, H. H. Rosenfeld, P. Konidala, V. Garamus, M. L. He, A. Prange and B. Niemeyer, *J Biotechnol*, 2006, **124**, 284-301.
5. E. Fischer, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1891, **24**, 1836-1845.
6. L. Maibaum, A. Dinner, R and D. Chandler, *J Phys Chem B*, 2004, **108**, 6778-6781.
7. J. N. Israelachvili, in *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*, Academic Press, Boston, 2011, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-391927-4.10020-9>, pp. 535-576.
8. D. Mitchell, John and B. W. Ninham, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics*, 1981, **77**, 601-629.
9. J. Israelachvili, D. Mitchel, J, B. Ninham and W, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, 1976, **72**, 1525-1568.
10. D. Lombardo, M. A. Kiselev, Magaz, #xf9, S. and P. Calandra, *Advances in Condensed Matter Physics*, 2015, **2015**, 22.
11. D. Papahadjopoulos and H. K. Kimelberg, *Progress in Surface Science*, 1974, **4**, 141-232.
12. G. Guidotti, *Archives of Internal Medicine*, 1972, **129**, 194-201.
13. D. Marquardt, B. Geier and G. Pabst, *Membranes*, 2015, **5**, 180.
14. E. J. Dufourc, *Journal of Chemical Biology*, 2008, **1**, 63-77.
15. T. Rog, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen and M. Karttunen, *BBA-Biomembranes*, 2009, **1788**, 97-121.
16. E. Williams, E, J. Cooper, A, W. Stillwell, L. Janski and J, *Molec. Memb. Biol.*, 2000, **17**, 157-164.
17. K. Hill and O. Rhode, *Fett-Lipid*, 1999, **101**, 25-33.
18. T. T. Chong, T. Heidelberg, R. Hashim and S. Gary**, *Liq Cryst*, 2007, **34**, 267-281.
19. P. Carcabal, R. Jockusch, A, I. Hunig, L. Snoek, C, R. Kroemer, T, B. Davis, G, D. Gamblin, P, I. Compagnon, J. Oomens, J. Simons and P, *J Am Chem Soc*, 2005, **127**, 11414-11425.
20. P. Sakya, J. Seddon and M, *Liq Cryst*, 1997, **23**, 409-424.
21. S. Ahmadi, V. Manickam Achari, H. Nguan and R. Hashim, *J Mol Model*, 2014, **20**, 2165.
22. V. Vill and R. Hashim, *Curr Opin Colloid In*, 2002, **7**, 395-409.
23. R. Hashim, S. M. Mirzadeh, T. Heidelberg, H. Minamikawa, T. Yoshiaki and A. Sugimura, *Carbohydr. Res.*, 2011, **346**, 2948-2956.
24. R. N. Lewis, A, H, D. A. Mannock, R. N. McElhaney and T. P. Begley, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 2007, DOI: 10.1002/9780470048672.wecb049.
25. M. O. Eze, *Biochemical Education*, 1991, **19**, 204-208.
26. S. L. Veatch and S. L. Keller, *Phys. Rev. Lett.*, 2002, **89**.
27. S. Munro, *Cell*, 2003, **115**, 377-388.
28. Y. Lee, C, R. Lee and T, *Acc. Chem. Res.*, 1995, **28**, 321-327.
29. J. Holgersson, A. Gustafsson and M. E. Breimer, *Immunol Cell Biol*, 2005, **83**, 694-708.
30. Y. Ni and I. Tizard, *Vet Immunol Immunop*, 1996, **55**, 205-223.

31. D. Janzen, H. Juster and I. Liener, *Science*, 1976, **192**, 795-796.
32. R. Barkai-Golan, D. Mirelman and N. Sharon, *Archives of Microbiology*, 1978, **116**, 119-124.
33. G. R. Vasta, *Nat Rev Micro*, 2009, **7**, 424-438.
34. L. H. Bouwman, B. O. Roep and A. Roos, *Hum Immunol*, 2006, **67**, 247-256.
35. E. Blumenstock and K. Jann, *Infect. Immun.*, 1982, **35**, 264-269.
36. W. Weis, J. Brown, H. S. Cusack, J. Paulson, C. J. Skehel, J. D. Wiley and C. Nature, 1988, **333**, 426-431.
37. E. Schaeffer, L. Dehuysen, D. Sigwalt, V. Flacher, S. Bernacchi, O. Chaloin, J. Remy, S. C. Mueller, G. R. Baati and A. Wagner, *Bioconjugate Chem.*, 2013, **24**, 1813-1823.
38. S. Wang, K. P. Liang, H. R. Astronomo, D. T. Hsu, L. S. Hsieh, L. D. Burton, R. C. Wong and H. P. Natl Acad Sci USA, 2008, **105**, 3690-3695.
39. K. A. Sasaki, T. N. W. K. O. Y. S. Y. W. N. N. T and Koike, *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2000, **35**, 960-965.
40. S. Vidal, *Nat Chem*, 2016, **8**, 4-6.
41. A. Muñoz, D. Sigwalt, B. M. Illescas, J. Luczkowiak, L. Rodríguez-Pérez, I. Nierengarten, M. Holler, J.-S. Remy, K. Buffet, S. P. Vincent, J. Rojo, R. Delgado, J.-F. Nierengarten and N. Martín, *Nat Chem*, 2016, **8**, 50-57.
42. J. C. Paulson, O. Blixt and B. E. Collins, *Nat Chem Biol*, 2006, **2**, 238-248.
43. R. J. Pieters, *Org Biomol Chem*, 2009, **7**, 2013-2025.
44. T. Sanji, K. Shiraishi, M. Nakamura and M. Tanaka, *Chem-Asian J*, 2010, **5**, 817-824.
45. R. D. Gray and R. H. Glew, *J. Biol. Chem.*, 1973, **248**, 7547-7551.
46. H.-J. Gabius, S. André, J. Jiménez-Barbero, A. Romero and D. Solís, *Trends Biochem. Sci.*, **36**, 298-313.
47. A. R. Dolores Solís, Margarita Menéndez, Jesús Jiménez-Barbero, in *The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences*, ed. H.-J. Gabius, Wiley, 2009, ch. 13, pp. 233-245
48. R. Kadirvelraj, B. Foley, Lachele, J. D. Dyekjær and R. J. Woods, *J Am Chem Soc*, 2008, **130**, 16933-16942.
49. J. Kruh, *Bioquímica, estudios médicos y biológicos*, Ediciones Omega, Barcelona, 1978.
50. T. K. Dam, C. Brewer and Fred, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 387-430.
51. P. M. Levine, T. P. Carberry, J. M. Holub and K. Kirshenbaum, *Medchemcomm*, 2013, **4**, 493-509.
52. B. T. Houseman and M. Mrksich, in *Host-Guest Chemistry: Mimetic Approaches to Study Carbohydrate Recognition*, ed. S. Penadés, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2002, DOI: 10.1007/3-540-45010-6_1, pp. 1-44.
53. N. Jayaraman, K. Maiti and K. Naresh, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 4640-4656.
54. A. Michel, K. P. Nangia-Makker, A. Raz, M. Cloninger and J. ChemBioChem, 2014, **15**, 2106-2112.
55. S. Cecioni, S. Matthews, E. H. Blanchard, J. Praly, P. A. Imberty and S. Vidal, *Carbohydr. Res.*, 2012, **356**, 132-141.
56. R. Vico, V. J. Voskuhl, B. Ravoo and J. Langmuir, 2011, **27**, 1391-1397.
57. M. Disney, D. J. Zheng, T. Swager, M. P. Seeberger and H. J. Am Chem Soc, 2004, **126**, 13343-13346.
58. C. Chen, H. Xu, Y. Qian, C. X. Huang and J. Rsc Adv, 2015, **5**, 15909-15915.
59. C. Goodman, K. M. Wolfenden, L. P. Nangia-Makker, A. Michel, K. A. Raz, M. Cloninger and J. Beilstein J Org Chem, 2014, **10**, 1570-1577.
60. C. Huang, C. C. Chen, T. Y. Shiang, C. Z. Lin, H. H. Chang and T. Anal. Chem., 2009, **81**, 875-882.

61. M. Lapinski, M. A. Castro-Forero, A. Greiner, J. R. Ofoli, Y. G. Blanchard and J. *Langmuir*, 2007, **23**, 11677-11683.
62. M. I. Angelova, D. S. Dimitrov and *Faraday Discussion. Chem. Soc.*, 1986, **81**, 303-311.
63. G. Weber and F. J. Farris, *Biochem.*, 1979, **18**, 3075-3078.
64. M. Viard, J. Gallay, M. Vincent, O. Meyer, B. Robert and M. Paternostre, *Biophys. J.*, 1997, **73**, 2221-2234.
65. T. Parasassi, E. K. Krasnowska, L. Bagatolli and E. Gratton, *J Fluoresc*, 1998, **8**, 365-373.
66. S. A. Sanchez, M. A. Tricerri, G. Gunther and E. Gratton, in *Modern Research and Educational Topics in Microscopy.*, eds. A. M.-V. a. J. D. (Eds and), ©FORMATEX, 2007, vol. 3, pp. 1007-1014.
67. L. A. Bagatolli and E. Gratton, *Biophys. J.*, 1999, **77**, 2090-2101.
68. L. A. Bagatolli, E. Gratton and G. D. Fidelio, *Biophys. J.*, 1998, **75**, 331-341.
69. L. A. Bagatolli, B. Maggio, F. Aguilar, C. P. Sotomayor and G. D. Fidelio, *BBA-Biomembranes*, 1997, **1325**, 80-90.
70. F. Harris, M. K. Best, B. J. Bell and D. *BBA-Biomembranes*, 2002, **1565**, 123-128.
71. T. Parasassi, G. De Stasio, A. d'Ubaldo and E. Gratton, *Biophys. J.*, 1990, **57**, 1179-1186.
72. M. Viard, J. Gallay, M. Vincent and M. Paternostre, *Biophys. J.*, 2001, **80**, 347-359.
73. L. A. Bagatolli and E. Gratton, *Biophys. J.*, 2000, **79**, 434-447.
74. G. Bonaventura, M. Barcellona, L. O. Golfetto, J. Nourse, L. L. Flanagan, A and E. Gratton, *Cell biochemistry and biophysics*, 2014, DOI: 10.1007/s12013-014-9982-8.
75. T. Parasassi, G. De Stasio, G. Ravagnan, R. Rusch, M and E. Gratton, *Biophys. J.*, 1991, **60**, 179-189.
76. C. De Vequi-Suplicy, C. C. Benatti, R. M. Lamy and T, *J Fluoresc*, 2006, **16**, 431-439.
77. L. Davenport, J. Knutson, R and L. Brand, *Biochem.*, 1986, **25**, 1811-1816.
78. D. Barrow, B. Lentz and R, *Biophys. J.*, 1985, **48**, 221-234.
79. D. Lichtenberg, *BBA*, 1985, **821**, 470-478.
80. A. Alonso and F. M. Goñi, *The Journal of Membrane Biology*, 1983, **71**, 183-187.
81. T. Inoue, K. Miyakawa and R. Shimosawa, *Chem. Phys. Lipids*, 1986, **42**, 261-270.
82. M. DuBois, K. Gilles, A, J. Hamilton, K, P. Rebers, A and F. Smith, *Anal. Chem.*, 1956, **28**, 350-356.
83. A. Sillen and Y. Engelborghs, *Photochemistry and Photobiology*, 1998, **67**, 475-486.
84. K. Kinoshita, S. Kawato and A. Ikegami, *Biophys. J.*, 1977, **20**, 289-305.
85. E. Kretschmann, *Opt. Commun.*, 1972, **6**, 185-187.
86. K. Kartha, P, Ravindranathan and R. A. Field, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 11753-11766.
87. C. C. Ruiz, *Sugar-Based Surfactants. Fundamentals and applications*, 2009.
88. R. Mestres, A. Gonzales and C. Santamaria, *Carbohydr. Res.*, 1972, **22**, 457-459.
89. M. Horisberger, B. Lewis, A and F. Smith, *Carbohydr. Res.*, 1972, **23**, 144-147.
90. R. J. Kaufman and R. S. Sidhu, *J. Org. Chem.*, 1982, **47**, 4941-4947.
91. H. B. Mereyala and S. R. Gurralla, *Carbohydr. Res.*, 1998, **307**, 351-354.
92. G. B. Giovenzana, L. Lay, D. Monti, G. Palmisano and L. Panza, *Tetrahedron*, 1999, **55**, 14123-14136.
93. J. Schmidt-Lassen, T. Lindhorst and K, *Medchemcomm*, 2014, **5**, 1218-1226.
94. S. Matsumura, K. Imai, S. Yoshikawa, K. Kawada and T. Uchibori, *J Am Oil Chem Soc*, 1990, **67**, 996-1001.
95. C. Tanford, *The hydrophobic effect : formation of micelles and biological membranes*, John Wiley & Sons, New York, 1973.

96. B. Focher, G. Savelli, G. Torri, G. Vecchio, D. McKenzie, C. D. Nicoli, F. C. Bunton and A, *Chem. Phys. Lett.*, 1989, **158**, 491-494.
97. A. Manosroi, P. Wongtrakul, J. Manosroi, H. Sakai, F. Sugawara, M. Yuasa and M. Abe, *Colloids Surf., B*, 2003, **30**, 129-138.
98. H. Vandoren, A. S. Galema, A. J. Engberts, B. F and N, *Langmuir*, 1995, **11**, 687-688.
99. E. Chibowski and A. Szcześ, *Adsorption*, 2016, **22**, 755-765.
100. E. Lemp, A. L. Zanocco and G. Gunther, *Colloids Surf., A*, 2003, **229**, 63-73.
101. N. Zahid, Idayu, O. K. Abou-Zied, R. Hashim and T. Heidelberg, *Langmuir*, 2012, **28**, 4989-4995.
102. E. Feitosa, J. Jansson and B. Lindman, *Chem. Phys. Lipids*, 2006, **142**, 128-132.
103. A. Schöppe, H. Hinz, J. R. Gerdes, H. Redlich and G. Rapp, *Chem. Phys. Lipids*, 1999, **103**, 95-115.
104. Z. Leonenko, V. E. Finot, H. Ma, T. Dahms, E. S. D. Cramb and T, *Biophys. J.*, 2004, **86**, 3783-3793.
105. A. Kuo, T. C. Chang and H, *Langmuir*, 2014, **30**, 55-62.
106. L. Terminassiansaraga and G. Madelmont, *FEBS Lett.*, 1982, **137**, 137-140.
107. M. Cortijo and D. Chapman, *FEBS Lett.*, 1981, **131**, 245-248.
108. L. Coderch, J. Fonollosa, M. De Pera, J. Estelrich, A. De La Maza, J. Parra and L, *J Control Release*, 2000, **68**, 85-95.
109. H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki and J. Peter Slotte, *Prog. Lipid Res.*, 2002, **41**, 66-97.
110. M. Vist, R. J. Davis and H, *Biochem.*, 1990, **29**, 451-464.
111. T. P. McMullen, W and R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, **1234**, 90-98.
112. V. Pata, F. Ahmed, D. Discher, E and N. Dan, *Langmuir*, 2004, **20**, 3888-3893.
113. N. Becerra, L. R. de la Nuez, A. L. Zanocco, E. Lemp and G. Gunther, *Colloids Surf., A*, 2006, **272**, 2-7.
114. D. Lichtenberg, H. Ahyayauch, A. Alonso and F. M. Goni, *Trends Biochem. Sci.*, 2013, **38**, 85-93.
115. A. de la Maza, L. Coderch, P. Gonzalez, J. Parra and L, *J Control Release*, 1998, **52**, 159-168.
116. D. Lichtenberg, H. Ahyayauch, F. Goni and M, *Biophys. J.*, 2013, **105**, 289-299.
117. A. Alonso, M.-A. Urbaneja, F. M. Goñi, F. G. Carmona, F. G. Cánovas and J. C. Gómez-Fernández, *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **902**, 237-246.
118. O. Lopez, M. Cocera, J. Parra, L and A. de la Maza, *Colloid Polym. Sci.*, 2001, **279**, 909-915.
119. O. Lopez, M. Cocera, J. Parra, L and A. de la Maza, *Colloids Surf., A*, 2001, **193**, 221-229.
120. O. Lopez, M. Cocera, L. Coderch, J. Parra, L and A. de la Maza, *Colloid Polym. Sci.*, 2002, **280**, 352-357.
121. E. Berrios, A. L. Zanocco, E. Lemp and G. Gunther, *J Chil Chem Soc*, 2008, **53**, 1728-1731.
122. C. Toro, S. A. Sanchez, A. Zanocco, E. Lemp, E. Gratton and G. Gunther, *Chem. Phys. Lipids*, 2009, **157**, 104-112.
123. S. A. Galema and H. Hoeliland, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 5321-5326.
124. T. Inoue, K. Fukushima and R. Shimosawa, *Chem. Phys. Lipids*, 1990, **52**, 157-161.
125. T. Inoue, *Vesicles*, Marcel Dekker, New York, 1996.
126. H. Heerklotz and J. Seelig, *Biophys. J.*, 2000, **78**, 2435-2440.
127. Y. Kaminoh, C. Tashiro, H. Kamaya and I. Ueda, *BBA*, 1988, **946**, 215-220.

128. C. Arnulphi, J. Sot, M. Garcia-Pacios, J. Arrondo, L, R, A. Alonso, F. Goni and M, *Biophys. J.*, 2007, **93**, 3504-3514.
129. L. Deyoung, R, K. Dill and A, *Biochem.*, 1988, **27**, 5281-5289.
130. H. Heerklotz, *Q Rev Biophys*, 2008, **41**, 205-264.
131. G. Zolotnitsky, U. Cogan, N. Adir, V. Solomon, G. Shoham and Y. Shoham, *P Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**, 11275-11280.
132. M. Chervenak, C, E. Toone and J, *Biochem.*, 1995, **34**, 5685-5695.
133. A. Cooper, *Curr Opin Chem Biol*, 1999, **3**, 557-563.
134. D. Loganathan, S. Osborne, E, G. Glick, D, I. Goldstein and J, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **299**, 268-274.
135. T. K. Dam, R. Roy, S. K. Das, S. Oscarson, C. Brewer and Fred, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 14223-14230.
136. T. K. Dam, M. L. Talaga, N. Fan and C. F. Brewer, in *Methods in Enzymology*, eds. L. Andrew and Feig, Academic Press, 2016, vol. Volume 567, pp. 71-95.
137. D. Hoekstra, N. Duzgunes and J. Wilschut, *Biochem.*, 1985, **24**, 565-572.
138. M. a. del Carmen Luzardo, M. a. E. Lanio, C. Alvarez, I. Pazos, Fabiola, S. Figueroa, V. Vérez, E. Disalvo and Aníbal, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2002, **26**, 281-289.
139. J. van der Bosch and M. McConnell, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1975, **72**, 4409-4413.
140. R. Sundler, *FEBS Lett.*, 1982, **141**, 11-13.
141. E. Gratton and T. Parasassi, *J Fluoresc*, 1995, **5**, 51-57.
142. O. Golfetto, E. Hinde and E. Gratton, *Biophys J*, 2013, **104**, 1238-1247.
143. A. Engel, S. K. Chatterjee, A. Al-Arifi and P. Nuhn, *J. Pharm. Sci.*, **92**, 2229-2235.
144. R. P. Richter, R. Bérat and A. R. Brisson, *Langmuir*, 2006, **22**, 3497-3505.
145. R. P. Richter, J. L. K. Him and A. Brisson, *Materials Today*, 2003, **6**, 32-37.
146. K. Melzak, E. Ralph and E. Gizeli, *Langmuir*, 2001, **17**, 1594-1598.
147. D. J. O'Shannessy and D. J. Winzor, *Anal. Biochem.*, 1996, **236**, 275-283.
148. M. Luschemattli, *Biopolym.*, 1987, **26**, 1509-1526.
149. S. D. Lewis, J. A. Shafer and I. J. Goldstein, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1976, **172**, 689-695.
150. E. M. Munoz, J. Correa, R. Riguera and E. Fernandez-Megia, *J Am Chem Soc*, 2013, **135**, 5966-5969.