

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

**Determinación de la estructura laminar en cerebrosidos
mediante análisis de difracción de rayos X a bajo ángulo**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Víctor Luis Cruz Cañas

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322346355

544

CRU

DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA LAMINAR
EN CEREBROSIDOS MEDIANTE ANALISIS DE DIFRACCION
DE RAYOS X A BAJO ANGULO

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS QUIMICAS

DIRECTOR: DR. D. SALVADOR FERNANDEZ BERMUDEZ
COLABORADOR CIENTIFICO
INSTITUTO DE ESTRUCTURA DE LA MATERIA
C.S.I.C.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro32828.....

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
DEPARTAMENTO DE QUIMICA-FISICA

AÑO 1985

INDICE

PROLOGO	1
1. INTRODUCCION	5
2. FUNDAMENTOS TEORICOS	13
2.1 Análisis de los diagramas de difracción de Rayos-X de bicapas lipídicas	14
2.1.1. Descripción del objeto difractante	16
2.1.2. Amplitud de la onda difractada	19
2.1.3. Formalismo de la función de Patterson	23
2.1.4. Separación de la función $Q_0(X)$	31
2.1.5. Deconvolución de $Q_0(X)$	36
2.1.6. Influencia del termino de orden cero de I(b) en la función $Q_0(X)$	46
2.2. Distorsiones en el objeto difractante	50
2.2.1. Distorsiones en el empaquetamiento	50
2.2.2. Distorsiones dentro de la celdilla unidad	59
3. EXPERIMENTAL	63
3.1 Preparación de muestras orientadas	64
3.2 Geometria de la cámara de difracción a bajo ángulo	77
3.3. Análisis de los perfiles de difracción	84
3.3.1. Determinación de la posición de las reflexiones	87
3.3.2. Medida de la intensidad difractada	87
3.3.3. Corrección de la intensidad difractada	89

4.1. Métodos de orientación	94
4.2. Distorsiones paracrystalinas	100
4.3. Perfil de densidad electrónica de cerebrósido natural	108
4.3.1. Intensidad difractada	109
4.3.2. Función $Q(X)$	109
4.3.3. Extracción de $Q_0(X)$	119
4.3.4. Cálculo del perfil de densidad electrónica $\rho_0(X)$	119
5. DISCUSION	148
5.1. Métodos de orientación	149
5.2. Distorsiones paracrystalinas	153
5.3. Perfil de densidad electrónica	155
6. CONCLUSIONES	166

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis ha sido realizada en el laboratorio de Física Macromolecular del Instituto de Estructura de la Materia del C.S.I.C., bajo la dirección del Dr. D. Salvador Fernández Bermúdez al que expreso mi agradecimiento por la dirección de la misma.

Tambien deseo extender mi agradecimiento al Dr. D. Francisco J. Baltá Calleja por su interés en el desarrollo del presente trabajo.

A los Dres. D. Armando Albert y D. J. Saiz las facilidades dadas para poder usar determinados instrumentos necesarios para la realización de la parte experimental.

Al Dr. D. Mario Suwalsky por las valiosas sugerencias aportadas a dicha tesis.

A la Srta. Pilar Escribano por el cuidadoso mecanografiado realizado.

Al profesor D. Mateo Díaz Peña por haber aceptado ser el ponente de esta tesis.

A todos mis compañeros de laboratorio que con tanta disponibilidad han prestado su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

P R O L O G O .

El éxito espectacular del análisis de difracción de rayos X en estudios estructurales de alta resolución de proteínas no ha sido repetido cuando se aplica a sistemas de membranas. La combinación del largo período de tiempo necesario para obtener un diagrama de difracción y el alto grado de movilidad de los componentes de las biomembranas conduce a un diagrama correspondiente a una estructura promediada tanto en el tiempo como en el espacio. La mayoría de estos estudios han sido confinados o bien a sistemas naturales compuestos por conjuntos de membranas o bien empaquetamientos artificiales contruidos por sedimentación y deshidratación parcial (1), dado que poseen la ventaja de concentrar la radiación difractada en forma de un típico espectro de Bragg (2). En este caso la celdilla unidad que se repite a lo largo del empaquetamiento estaría constituida por una membrana cuya anchura es, por término medio, superior a los 30 Å, siendo necesario emplear técnicas de difracción de rayos X a ángulos bajos.

La región en el espacio recíproco asociada con difracción de rayos X a ángulos bajos es la correspondiente a espaciados mayores de 30 Å, aunque no existe un dato claro para esta limitación entre los dos tipos de ángulos (3). Las técnicas de difracción de rayos X a ángulos altos dan información acerca de la disposición atómica dentro de la celdilla unidad. Esta información se obtiene a partir de reflexiones con espaciados menores que unos pocos angstroms. Aunque la difracción a bajo ángulo no puede resolver átomos, pueden alcanzarse resultados útiles acerca de la estructura de membranas biológicas o bicapas lipídicas. Es preciso comentar que, debido a su longitud de onda, la difracción de rayos X

es una técnica superior a difracción de luz visible para investigar en torno al tamaño y forma de moléculas biológicas. Existe un buen número de publicaciones que desarrollan tanto la naturaleza teórica como experimental de la difracción de rayos X a ángulos bajos y su aplicación a estudios biológicos. (4-7).

El presente trabajo forma parte de un proyecto de investigación financiado por la CAICYT del Ministerio de Educación y Ciencia y cuyo objetivo es estudiar la estructura de varios tipos de membrana por dicha técnica. En particular el sistema objeto de este trabajo es la bicapa de cerebrósido, lípido presente en algunas membranas citoplasmáticas (8).

En esta Memoria se desarrollan los pasos dados para elucidar la estructura de dichos lípidos. En el capítulo 2 se explican los fundamentos y procedimientos teóricos empleados a tal fin. En el capítulo siguiente se exponen las técnicas experimentales usadas para obtener los diagramas de difracción correspondientes, haciendo especial hincapié en los métodos de orientación empleados para conseguir muestras de características apropiadas. Los resultados obtenidos así como la discusión de los mismos se muestran en los capítulos 4 y 5, de los cuales se extraen las conclusiones mencionadas en el capítulo 6.

BIBLIOGRAFIA

1. Levine, Y.K., Prog. Biophys. Mol. 24, 3 (1972).
2. Wilkins, M. et al., Nature 220, 577 (1968).
3. Akers, C.K., Methods Enzymol. 211 (1974).
4. Guinier, A., Fournet, G., "Small-Angle Scattering of X-Rays", Wiley, New York (1955).
5. Kratky, O., Prog. Biophys. Mol. Biol. 13, 105 (1963).
6. Brumberger, H., "Small-Angle X-Ray Scattering", Gordon and Breach, New York (1967).
7. Glatter, O. et al. "Small-Angle X-Ray Scattering", Academic Press (1983).
8. O'Brian, J., Fillerup, D.L., Head, J.F., J. Lipid Research, 5, 109 (1964).

1. INTRODUCCION

El modelo generalmente admitido para explicar la estructura de la membrana celular fue propuesto por Dawson y Danielli en 1935(1). Dicho modelo consiste en un esqueleto formado por una bicapa lipídica en el cual se insertan las distintas proteínas que dan características especiales a cada biomembrana. Gracias al carácter anfifílico de las moléculas de lípido, la membrana celular constituye una barrera muy eficaz de separación entre dos medios distintos, permitiéndose sin embargo, el paso de ciertas sustancias de un medio a otro a través de ella. En la figura 1.1 se presenta la estructura anteriormente expuesta.

Este modelo hipotético, que teóricamente explica multitud de fenómenos a nivel celular y molecular de los cuales es responsable la membrana, ha sido verificado experimentalmente empleando técnicas de microscopía electrónica y difracción de Rayos X(2-4). Sin embargo un estudio más profundo de la estructura íntima de las membranas se hace necesario para conocer con mayor precisión aquellos procesos. Las membranas no son estructuras estáticas sino, por el contrario, sus moléculas presentan una cierta movilidad y aparecen generalmente en disposiciones que no están totalmente ordenadas, distantes de lo que se entiende por cristal perfecto. Por ello se presenta sumamente complicado abordar directamente el estudio estructural de estos complejos lipoprotéicos mediante difracción de Rayos X.

Esta situación puede verse simplificada notablemente tratando por separado la cuestión concerniente a la estructura del esqueleto lipídico y, en un paso posterior, completar la información insertando las distintas proteínas en dicha estructura. Un

buen número de investigaciones han sido llevadas a cabo respecto al primer proceso, centrándose dichos estudios en la estructura que presentan bicapas de fosfolípidos, componente lipídico mayoritario en biomembranas. Para ello ha sido necesario formar un pseudo-cristal constituido por empaquetamiento de bicapas lipídicas, el cual difracta coherentemente la radiación X(5-7). Sin embargo, dado que la celdilla unidad tiene en estos casos una dimensión superior a 30 Å, considerado en difracción de rayos X como límite entre ángulos altos y ángulos bajos, se hace preciso emplear técnicas de difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS). Aunque la precisión con la que se pueden obtener datos por dichas técnicas es incapaz de resolver átomos, un adecuado tratamiento teórico puede proporcionar resultados útiles, tal como se explicará en la siguiente sección. Una visión esquemática de un empaquetamiento frente a la difracción de rayos X es mostrada en la figura 2.1 de la siguiente sección.

Esta misma idea de formar un pseudocristal en la forma descrita fue aplicada por diversos autores a ciertos tipos de membranas: mielina del nervio (8), fibra de colágeno (9), membrana de eritrocito (10) y otras, alcanzándose resultados bastante incompletos dada la poca cantidad de reflexiones obtenidas.

Aparte del énfasis con el que se ha profundizado en el estudio estructural de fosfolípidos en bicapas, es necesario mencionar la poca atención dedicada a otros lípidos componentes de membranas que, aunque minoritarios, confieren propiedades importantes a aquellas. En particular es interesante el caso de los cerebrosidos, presentes en membranas de células de cerebro (11,12) y

frecuentemente relacionados con propiedades antigénicas (13). Los cerebrósidos son un tipo especial de glicoesfingolípido con un componente lipofílico conocido como ceramida, el cual es un ácido graso de cadena larga unido a través de un enlace amido con una molécula de una base de cadena larga denominada esfingosina, completado con un residuo carbohidratado (galactosa) (14). Su constitución química se ilustra en la figura 1.2. En el buey así como en el cerebro humano la longitud de la cadena de ácido graso de la molécula de cerebrósido puede variar entre 14 y 27 átomos de carbono (11, 12). Los estudios que se han realizado sobre cerebrósidos mediante difracción de rayos X se han limitado hasta ahora al análisis de largos espaciados de fases cristalinas para muestras naturales con sólo una cadena de tipo parafínico (15) y para productos sintéticos (16) en los cuales se presentan dos cadenas pero de igual longitud. Cabe destacar, sin embargo, los trabajos realizados para elucidar mediante análisis de SAXS la estructura de Frenosina y Cerasina, dos constituyentes principales del cerebrósido natural (17, 18). En sendos estudios no se pudieron conseguir muestras orientadas por lo que los resultados obtenidos son algo incompletos. Así pues, el objetivo principal del presente trabajo es extraer información estructural lo mas completa posible mediante SAXS, siendo necesaria la preparación previa de muestras orientadas de dichos compuestos. Dicha información está constituida por el perfil de densidad electrónica de la bicapa lipídica o proyección de densidad electrónica según el eje de empaquetamiento, ya que este empaquetamiento de bicapas puede ser considerado frente a la difracción de rayos X como un cristal

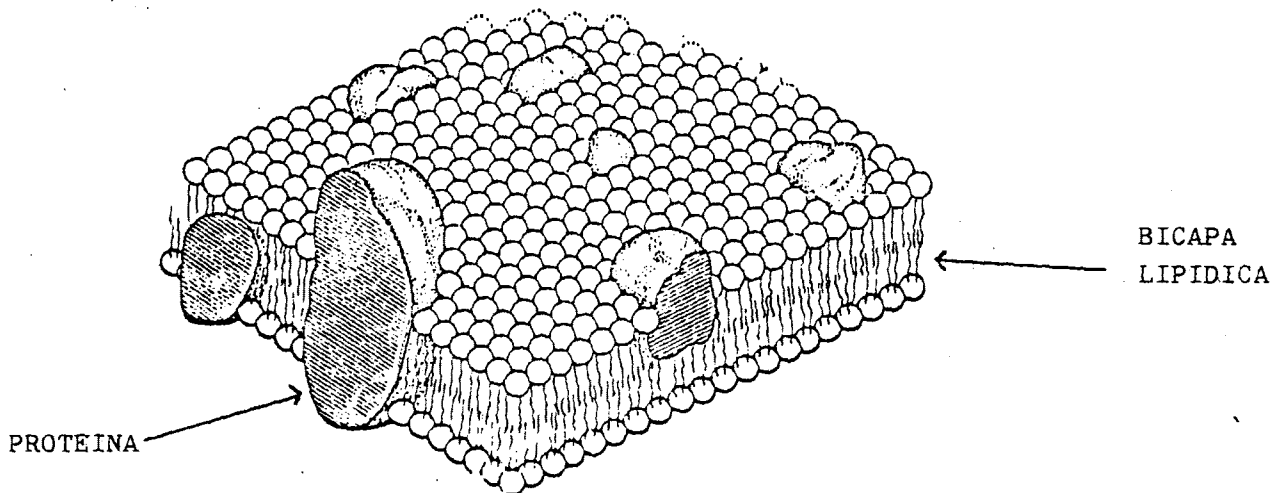


FIG. 1.1

MODELO DE BIOMEMBRANA

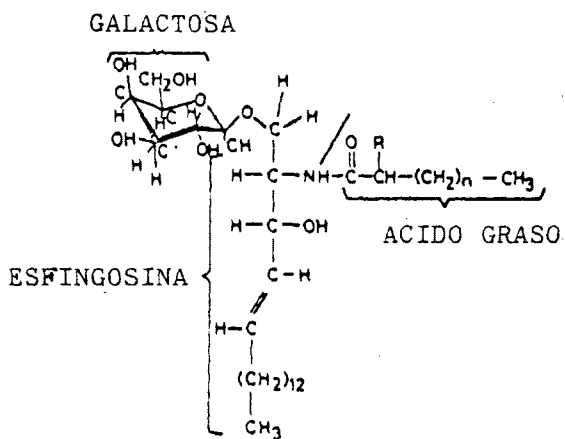


FIG. 1.2

FORMULA GENERAL DE CEREBROSIDOS

unidimensional cuya celdilla unidad es, precisamente, la bicapa lipídica.

Dado que dicho empaquetamiento no forma un cristal perfecto, es necesario tener en cuenta las distorsiones presentes en el mismo para un adecuado tratamiento del problema. En este sentido, Hosemann y Bagchi (19) ofrecen una descripción exhaustiva de estos estados de la materia de orden intermedio a los cuales denominaron "paracristales". Definen dos clases de desorden: desorden de primera especie referido a sistemas en los cuales se mantiene el orden a largo alcance como en el caso de vibraciones térmicas en un cristal, y desorden de segunda especie o paracristales, en los cuales se pierde el orden a largo alcance quedando sólo orden a corto alcance. El concepto de desorden laminar de segunda especie asociado al empaquetamiento parece el tratamiento adecuado para describir el apilamiento de membranas. Las fluctuaciones paracristalinas que ocurren en la membrana y en los apilamientos de membranas ofrecen una explicación satisfactoria de observaciones realizadas en el diagrama de difracción como son la disminución de la intensidad y aumento de la anchura integral de las reflexiones a medida que aumenta el espaciado.

BIBLIOGRAFIA

1. Danielli, J. F., Davson, H., J. Cell. Physiol. 5, 495 (1935).
2. Hodge, A.J., Rev. Mod. Phys., 31, 331 (1959).
3. Skoulios, A.E., Acta Cryst., 14, 419 (1961).
4. Fineau, J.B., J. Biophysic. and Biochem. Cytol., 8, 13 (1960).
5. Mateu, L. et al., J. Mol. Biol., 75, 697 (1973).
6. Luzzati, V., Tardieu, A., Taupin, D., J. Mol. Biol., 64, 269 (1972)
7. Gaffney-McFarland, B., McConnell, H., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 68,
1274 (1971).
8. Blaurock, A.E., Nelander, J.C., J. Mol. Biol., 39, 417 (1976).
9. Hosemann, R., Dseissig, W., J. Mol. Biol., 83, 275 (1974)
10. Pape, E.H., Klott, K., Kreutz, W., Biophys. J., 19, 141 (1977).
11. O'Brian, J., Rouser, G., J. Lipid Res. 5, 339 (1964).
12. O'Brian, J., Fillerup, D., J. Lipid Res. 5, 109 (1964).
13. Rapport, M., Graff, L., Prog. Allergy, 13, 273 (1969).
14. Martin-Lomas, M. Chapman, D., Chem. Phys. Lipids, 10, 152. (1973)
15. Reiss-Husson, E., J. Mol. Biol. 25, 363 (1967).
16. Abrahamsson, S. et al., chem. Phys. Lipids, 8, 152 (1972).

17. Fdez- Bermudez, S. et al., Z. Naturforsch. 32c, 362 (1977).
18. Hosemann, R. et al., Z. Naturforsch. 34c, 1121 (1979).
19. Hosemann, R., Bagchi, S.N., "Direct Analysis of Diffraction by Matter",
Amsterdam, North Holland (1962).

2. FUNDAMENTOS TEORICOS

2.1. ANALISIS DE LOS DIAGRAMAS DE DIFRACCION DE RAYOS X DE BICAPAS LIPIDICAS

El empaquetamiento de bicapas lipídicas puede ser considerado un cristal unidimensional en la dirección de apilamiento, cuya celdilla unidad correspondería, generalmente, a una bicapa (fig. 2.1).

Este sistema es susceptible de ser estudiado mediante técnicas de difracción de Rayos X. La distribución periódica de densidad electrónica a lo largo del eje de apilamiento, conocida con el nombre de perfil de densidad electrónica, es la responsable de la difracción de Rayos X. Dado que las dimensiones de la celdilla unidad son típicamente 40-70 Å, es más aconsejable considerar, en este caso, radiación difractada a bajos ángulos, para los cuales se pueden resolver estas dimensiones. La información estructural obtenida con estas técnicas es más completa si el empaquetamiento de membranas posee un alto grado de orientación.

El análisis de estructuras mediante difracción a bajos ángulos de este tipo de objetos difractados comporta dificultades adicionales sobre técnicas de difracción de Rayos X convencionales, pues la información experimental obtenida suele ser pequeña, en circunstancias muy favorables puede obtener un máximo de diez órdenes de difracción. Sin embargo, los resultados obtenidos con estos métodos concuerdan satisfactoriamente con los procedentes de otras técnicas.

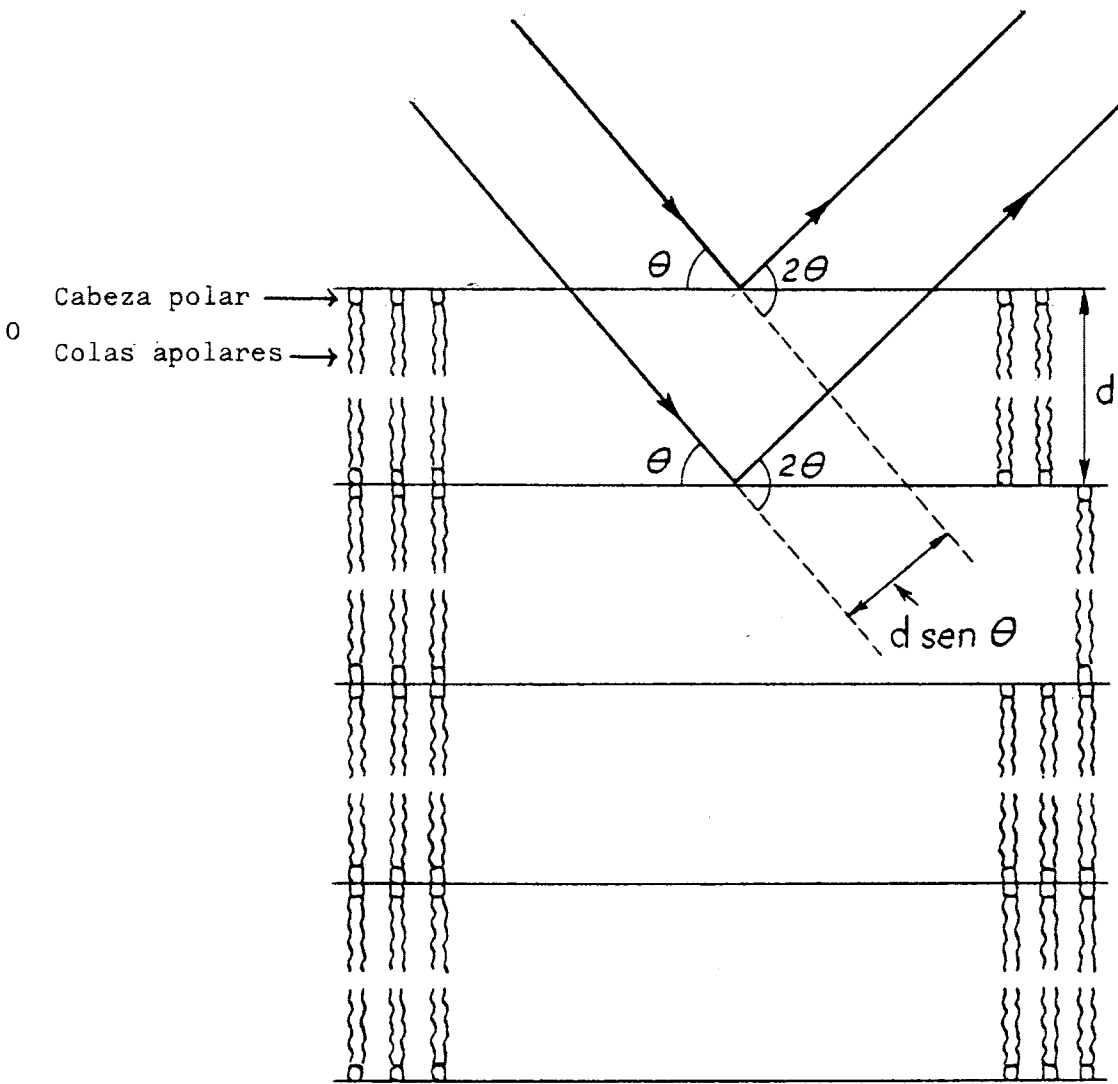


FIG. 2.1

2.1.1. Descripción del objeto difractante

El sistema difractante puede ser fácilmente definido en términos matemáticos. Tres funciones matemáticas bastan para describir las características esenciales del sistema: "motivo", "tamaño" y "forma"⁽¹⁾, tal como se muestra en la figura 2.2.

La función que determina la secuencia del motivo en el empaquetamiento $Z(x)$, puede ser definida como una secuencia de funciones puntuales:

$$Z(x) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} \delta(x - nL) \quad |1|$$

donde $\delta(x) \neq 0$ para $x \neq 0$ y $\int_{-\infty}^{\infty} \delta(x) dx = 1$ siendo L la constante de red.

La función que limita el tamaño del empaquetamiento o la extensión de la proyección de la densidad electrónica, $S(x)$, se define como:

$$S(x) = \begin{cases} 1 & (x) \leq D/2 \\ 0 & \text{resto} \end{cases} \quad |2|$$

Por último la función que describe el perfil de densidad electrónica del motivo individual ρ_0 puede ser deducida de la siguiente forma:

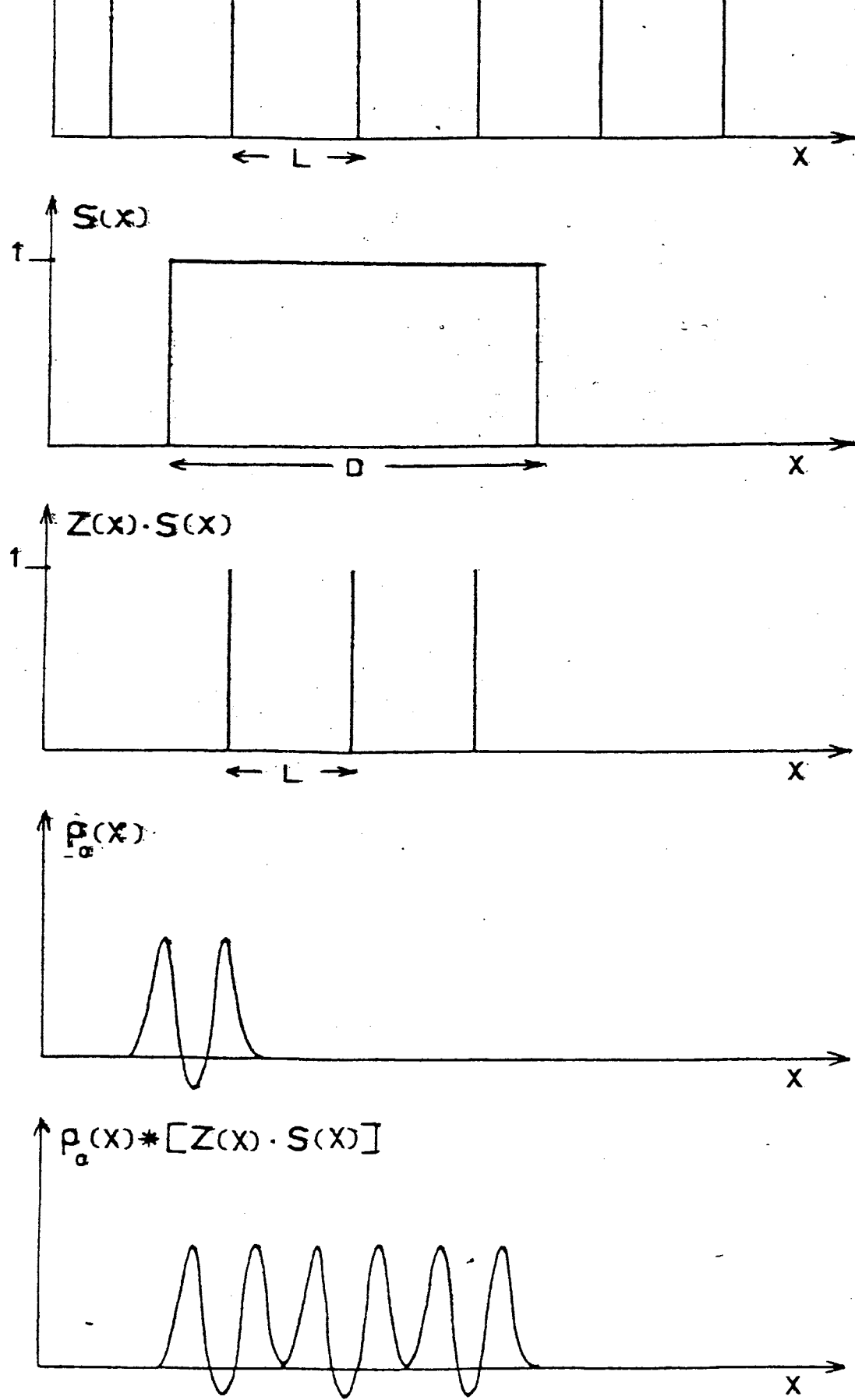


FIG. 2.2

$$\begin{aligned}
&= \ell_0(x) \text{ para } (-L_0/2) \leq x \leq (+L_0/2) \\
\ell_0(x) & \\
&= 0 \text{ resto}
\end{aligned}
\tag{3}$$

donde L_0 es el espesor del motivo y $\ell_0(x)$ función centrosimétrica.

Partiendo de estas consideraciones, se puede construir el perfil de densidad electrónica del elemento difractante $\ell(x)$ con el procedimiento que se describe a continuación y que también se muestra gráficamente en la figura 2.2.

El primer paso consiste en limitar la secuencia infinita de puntos, red infinita, a una secuencia finita delimitada por el tamaño del cristal monodimensional. Esto representa matemáticamente el producto $Z(x) \cdot S(x)$ (fig.2.2).

En el siguiente punto se obtiene el perfil de densidad electrónica del empaquetamiento de bicapas mediante la convolución del perfil motivo representado por ℓ_0 con la secuencia finita de puntos de la red definida por el producto $Z(x) \cdot S(x)$ reproduciéndose el motivo ℓ_0 alrededor de cada uno de estos puntos. Así pues,

$$\ell(x) = \ell_0(x) * (Z(x) \cdot S(x))
\tag{4}$$

El símbolo $*$ representa la operación de convolución que, teniendo en cuenta una sola dimensión queda definida de la siguiente forma:

$$f(x) * g(x) = \int f(x') g(x-x') dx'
\tag{5}$$

donde $f(x)$ y $g(x)$ son dos funciones unidimensionales.

2.1.2. Amplitud de la onda difractada

En el proceso de difracción cada punto másico se comporta como una fuente de ondas difractadas. Estas ondas procedentes de los distintos elementos difractantes interfieren entre sí con lo cual la amplitud total está dada por la suma de las amplitudes individuales procedentes de cada punto. En el caso de N centros de scattering se tiene:

$$A(b) = \sum_{n=1}^N \rho(x_n) \exp(-2\pi i b x_n) \quad |6|$$

Si la distribución de densidad electrónica es continua entonces el sumatorio se transforma en la integral sobre el volumen del objeto difractante:

$$A(b) = \int_{V(x)} \rho(\bar{x}) \exp(-2\pi i b x) dV_x \quad |7|$$

Esta integral es conocida como la transformada de Fourier de la distribución de densidad electrónica. En adelante se empleará el símbolo \mathcal{F} para describir la operación transformada de Fourier. Por tanto:

$$A(b) = \mathcal{F} \rho(x) \quad |8|$$

El vector \vec{b} se define del siguiente modo: en la figura 2.3 el vector \vec{k}_0 determina la dirección del haz de rayos X incidente. \vec{K} es el vector unidad determinante de la dirección de los rayos X

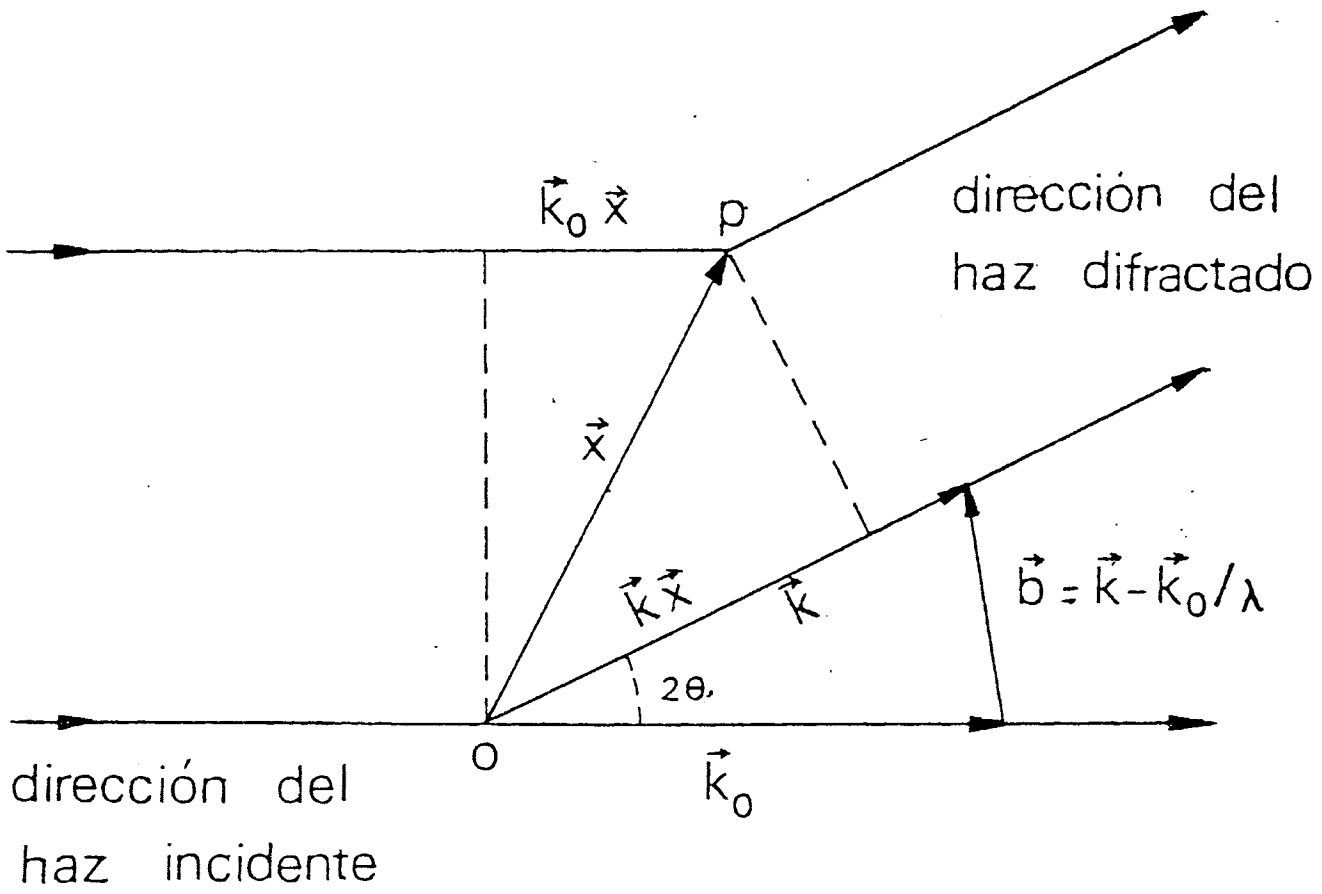


Fig. 2.3

difractados. El vector \vec{x} define la posición de los puntos de scattering O y P. La diferencia de camino entre los haces difractados en O y P será $(\vec{K} \cdot \vec{x} - \vec{K}_0 \cdot \vec{x})$ siendo la diferencia de fases entre ambas $(2\pi/x)\vec{x}(\vec{K}-\vec{K}_0)$ (en el caso de fenómenos de difracción coherente solo son consideradas diferencias de fase según el camino recorrido). El vector \vec{b} viene entonces dado por:

$$\vec{b} = (\vec{K} - \vec{K}_0) / \lambda \quad |9|$$

La diferencia de fase será pues $2\pi\vec{b} \cdot \vec{x}$.

Por otro lado el modulo del vector \vec{b} es $|\vec{b}| = 2 \sin\theta / \lambda$ que, para el caso en el que se considera difracción a bajos ángulos, se simplifica resultando $|\vec{b}| = 2\theta / \lambda$, donde 2θ es el ángulo de difracción y λ la longitud de onda de la radiación x empleada.

La amplitud de la onda difractada por un empaquetamiento de bicapas puede ser ahora definido sobre la base de las tres funciones que describen la distribución de densidad electrónica en el objeto. Reemplazando $\ell(x)$ en [8] por su valor dado en [4] obtenemos:

$$A(\vec{b}) = \mathcal{F} \{ \ell_0(x) * (Z(x) \cdot S(x)) \} \quad |10|$$

Teniendo en cuenta los teoremas de convolución de la transformada de Fourier siguientes:

$$\mathcal{F} \{ f(x) * g(x) \} = \mathcal{F} f(x) \cdot \mathcal{F} g(x) \quad |11|$$

$$\{f(x) \cdot g(x)\} = \tilde{F} f(x) * \tilde{F} g(x) \quad |12|$$

La integral |10| se puede evaluar:

$$A(b) = \tilde{F} \ell_0(x) \cdot \tilde{F} S(x) * \tilde{F} Z(x) \quad |13|$$

obteniéndose finalmente una expresión para la amplitud de la onda difractada en función de las transformadas de Fourier de las tres funciones $\ell_0(x)$, $S(x)$, $Z(x)$; que pueden ser denominadas del siguiente modo:

$$\tilde{F} \ell_0(x) = F(b): \text{ amplitud de una celdilla unidad}$$

$$\tilde{F} S(x) = S(b): \text{ amplitud de forma}$$

$$\tilde{F} Z(x) = Z(b): \text{ amplitud de red}$$

resultando finalmente:

$$A(b) = F(b) \{ S(b) * Z(b) \} \quad |14|$$

Así pues, hemos obtenido una representación de la amplitud total de difracción que es ilustrativa a la hora de elucidar dos puntos esenciales: (a) la difracción por una celdilla unidad interviene en la amplitud total como un factor, esto es, define la intensidad relativa de las reflexiones, y (b) la contribución del tamaño del cristal y la periodicidad en el mismo, a la amplitud total viene dado por el producto de convolución de sus respectivas transformada de Fourier, en otras palabras, el tamaño del cristal determina la anchura de las reflexiones y la periodicidad el espaciado entre ellas.

La intensidad de la onda difractada esta directamente relacionada con el cuadrado del modulo de la amplitud y por tanto:

$$I(b) = |A(b)|^2 = |F(b)|^2 |S(b) * Z(b)|^2 \quad |15|$$

En la figura 2.4 se muestra gráficamente el anterior desarrollo aplicado al caso de un empaquetamiento de tres láminas, modelo primitivo de empaquetamiento de bicapas lipídicas.

La proyección de la densidad electrónica, en este caso especial es representado por una secuencia de tres funciones-caja caracterizadas por los parámetros L_0 , tamaño de una lámina; L , tamaño de la celdilla unidad y D , grosor del paquete de láminas. Esta distribución produce un diagrama de difracción de rayos-X que es registrado en el film como $|A(b)|^2$.

Es preciso resaltar que la periodicidad dentro del empaquetamiento puede ser determinada directamente por el espaciado de las reflexiones de acuerdo con la expresión $n/L = 2 \text{ sen}\theta/\lambda$, donde n es el orden de la reflexión.

2.1.3. Formalismo de la función de Patterson

El resultado final que se pretende alcanzar cuando se emplean técnicas de difracción de rayos-X es el perfil de densidad electrónica del elemento difractante. Esta información puede ser obtenida mediante la transformada de Fourier inversa de la amplitud de la onda difractada $A(b)$ según [8]:

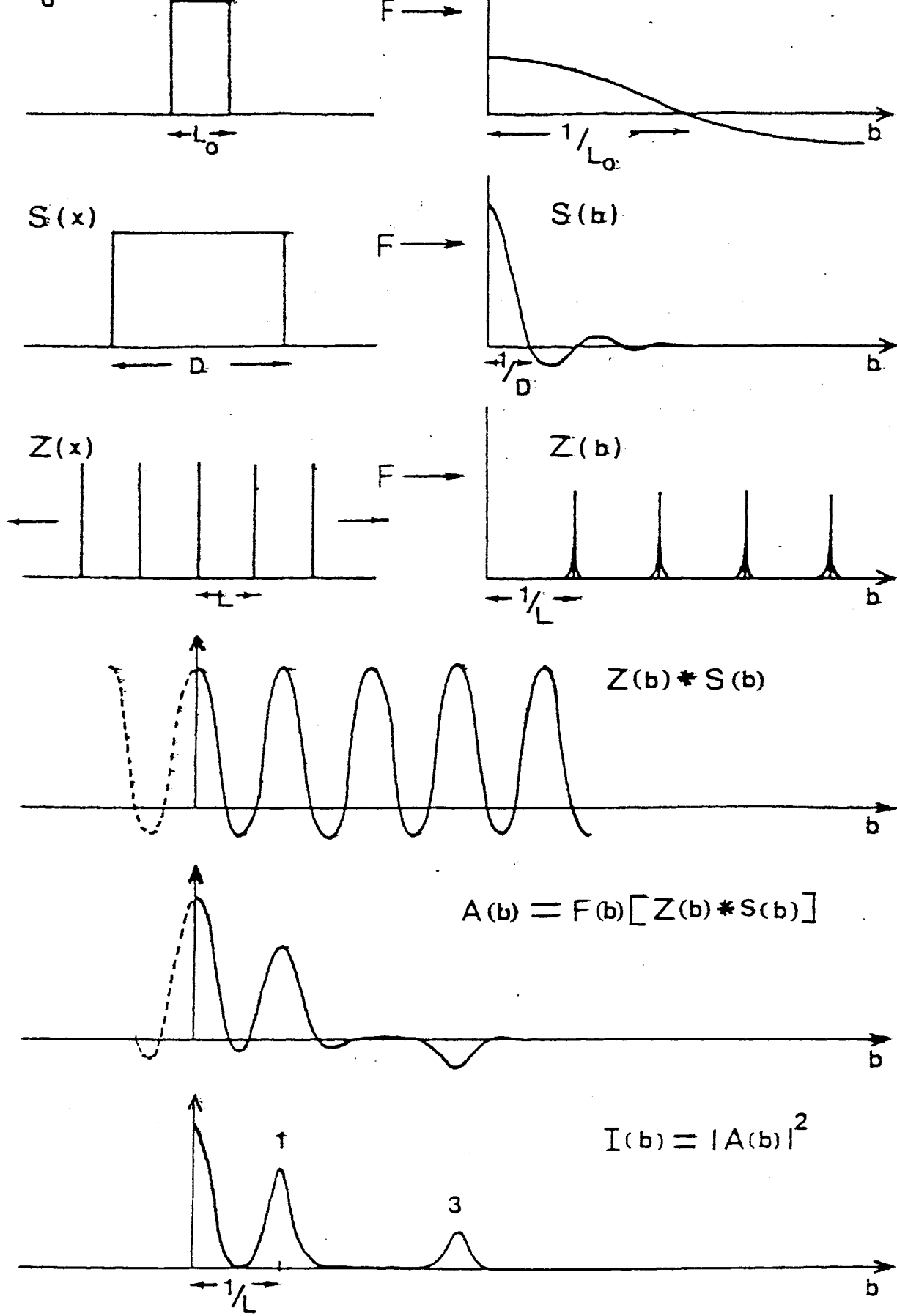


FIG. 2.4

$$\ell(x) = \mathcal{F}^{-1}A(b)$$

|16|

En la práctica este procedimiento es muy complicado puesto que experimentalmente solo se pueden registrar intensidades y no amplitudes:

$$I(b) = |A(b)|^2 = A(b)A^*(b) = |A(b)|e^{i\phi}|A(b)|e^{-i\phi} \quad |17|$$

Esto significa que la información acerca de la fase $e^{i\phi}$ se pierda ya que únicamente se registra el módulo $|A(b)|$.

Existen dos formas de solucionar este problema: a) reencontrar las fases mediante alguna técnica adicional (hinchamiento de la celdilla unidad, marcado con átomos pesados, ...) ó b) calculando la distribución de densidad electrónica a través de la función de Patterson, $Q(x)$.

El primer punto puede ser atacado en algunos casos especiales, si bien en el campo de biomembranas no muestra ser muy apropiado por las dificultades experimentales que conlleva, además de causar una posible alteración de la estructura a estudiar.

En el segundo sistema se evita el problema de la fase via una transformación de Fourier directa sobre la misma distribución de intensidad. Esta transformada de Fourier se denomina función de Patterson y se define del siguiente modo:

$$Q(x) = \mathcal{F}^{-1}I(b) = \mathcal{F}^{-1}|A(b) \cdot A^*(b)| \quad |18|$$

Teniendo en cuenta [8] y aplicando los teoremas de convolu-

ción de la transformada de Fourier, obtenemos:

$$\begin{aligned}
 Q(x) &= \{ \mathcal{F}^{-1} A(b) \} * \{ \mathcal{F}^{-1} A^*(b) \} \\
 &= \{ \mathcal{F}^{-1} \ell(x) \} * \{ \mathcal{F}^{-1} \ell(x) \} = \ell(x) * \ell(-x) \quad |19|
 \end{aligned}$$

Este producto de convolución de una función con su imagen especular, se denomina cuadrado de convolución:

$$Q(x) = \ell(x) * \ell(-x) = \widetilde{\ell(x)} \quad |20|$$

Se puede sustituir $\ell(x)$ por su valor en |4| obteniéndose:

$$Q(x) = | \ell_0(x) * |Z(x) \cdot S(x)| | * | \ell_0(-x) * |Z(-x) \cdot S(-x)| | \quad |21|$$

En un producto de convolución de varios miembros la secuencia de operaciones puede ser intercambiada:

$$\begin{aligned}
 Q(x) &= | \ell_0(x) * \ell_0(-x) | * \{ Z(x) S(x) \} * \{ Z(x) S(-x) \} \\
 &= \widetilde{\ell_0(x)} * \{ S(x) \cdot Z(x) \} \quad |22|
 \end{aligned}$$

Designando por $Q_0(x)$ a la convolución cuadrado del motivo $\ell_0(x)$:

$$Q_0(x) = \widetilde{\ell_0(x)} \quad |23|$$

se obtiene finalmente:

$$Q(x) = Q_0(x) * \overbrace{\{S(x) \cdot Z(x)\}}^2 \quad |24|$$

En la figura 2.5 se puede apreciar de forma gráfica el proceso de obtención de $Q(x)$ a partir de las tres funciones características del objeto difractante que en el ejemplo expuesto en dicha figura consiste en un empaquetamiento de láminas.

Atendiendo a la definición de producto de convolución |5| la relación |23| puede escribirse como:

$$Q_0(x') = \int_0^a l_0(x) \cdot l_0(x+x') dx \quad |25|$$

siendo a la dimensión de la celdilla unidad.

Esta expresión presenta el balance del producto de densidades electrónicas en los dos extremos de una línea de longitud fraccionada x' . Evidentemente tendrá un valor alto la función |25| si dentro del periodo a aparecen valores grandes de la densidad electrónica separados por una distancia x' . Recíprocamente, si $Q_0(x)$ alcanza un máximo para una separación particular, x' , es debido a que, dentro del período a sobre el cual se realiza el balance, existen un par de máximos en la densidad electrónica cuyas localizaciones están separadas por este intervalo x' .

Esta relación entre la variación de la densidad electrónica y la función |25| es ilustrada por la figura 2.6. La variación de la densidad electrónica en una celdilla de dimensión a viene representada en la parte 6A. Esta función posee tres máximos nume-

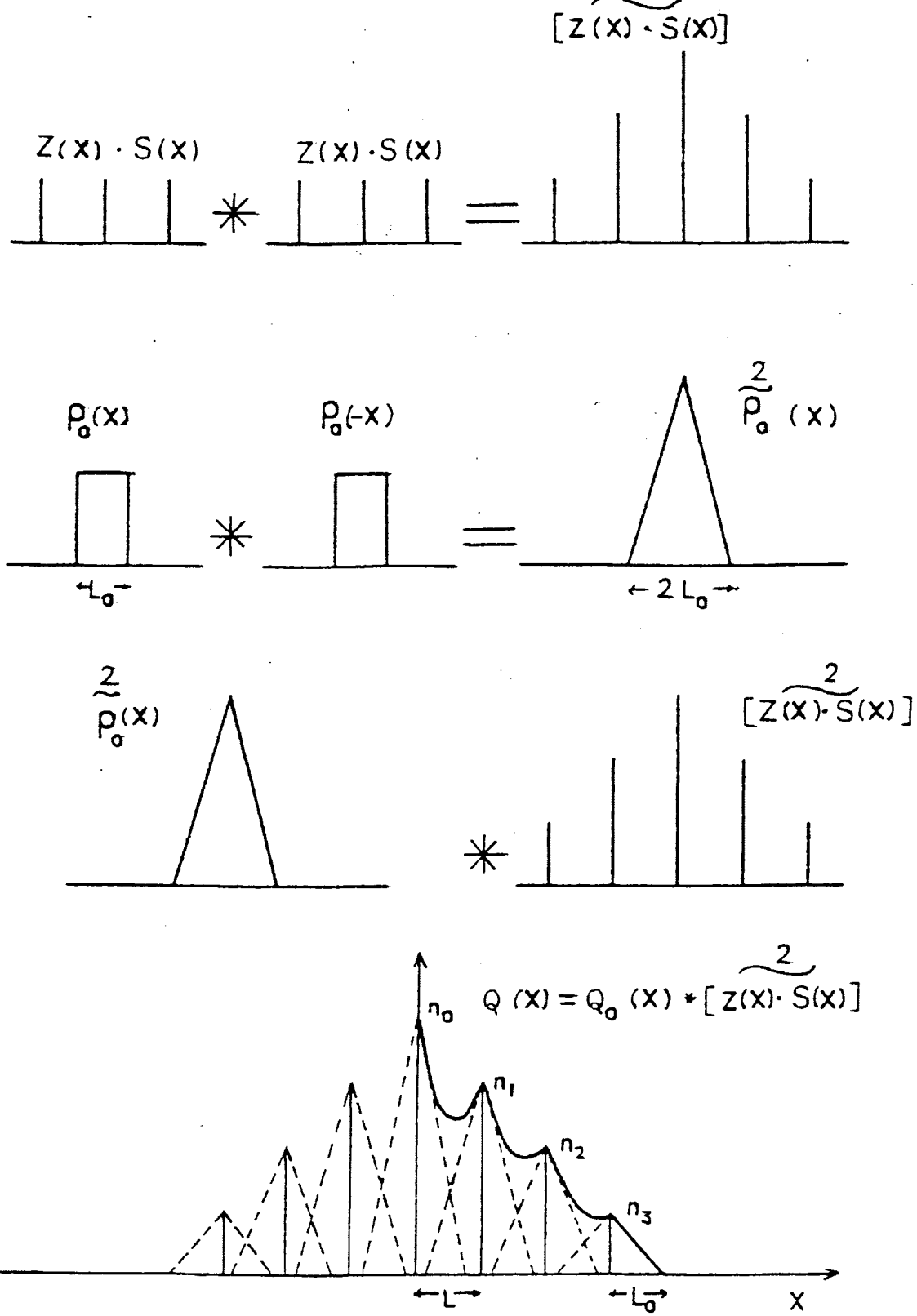
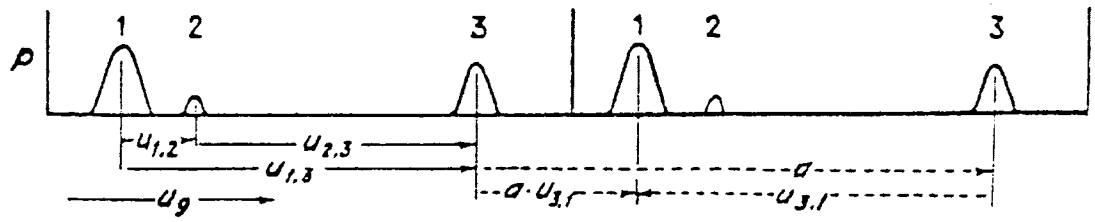
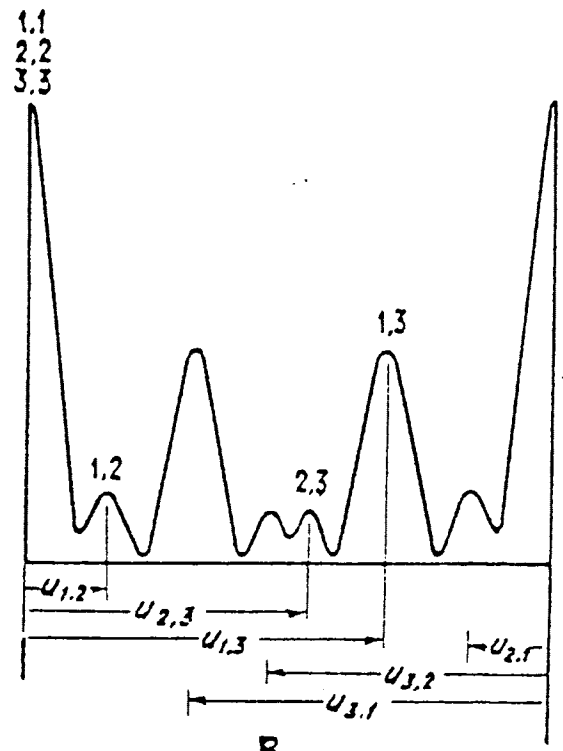


FIG. 2.5



A



B

FIG. 2.6

rados 1, 2 y 3. Entre máximos la densidad electrónica posee valores despreciables y están separados uno de otro por tres vectores de longitud $x_{1,2}$, $x_{2,3}$ y $x_{1,3}$, así como sus opuestos $x_{2,1}$, $x_{3,2}$ y $x_{3,1}$. Para cada una de estas separaciones el producto de las densidades electrónicas es grande. Así la función |25| posee valores altos en 3 puntos, fig. 6B, situados a distancias $x' = x_{1,2}$, $x_{2,3}$ y $x_{1,3}$. Para cualquier otra combinación de valores de x , x_{ij} , para los cuales no existe un máximo en la densidad electrónica, el producto $\rho_o(x_i) \cdot \rho_o(x_j)$ nunca será grande y no dará lugar a máximo en $Q_o(x_{ij})$.

Si en la celdilla cristalina existen n átomos es posible formar n^2 parejas que darían lugar a otros tantos máximos en la función de Patterson. Las n combinaciones tipo i,i constituyen una serie de picos que se funden en uno solo centrado en el origen. Un fenómeno similar ocurre con las combinaciones i,j y j,i que dan lugar a picos únicos en posiciones x'_{ij} . Por tanto el número total de máximos esperables en la función de Patterson será $n^2 - n/2$ más uno centrado en el origen.

Este resultado no es normalmente alcanzable debido a diversos factores, entre ellos cabe destacar el siguiente: si un vector $\vec{x}_{i \rightarrow j}$ que une a los átomos i,j en el espacio cristalino, es aproximadamente igual a uno \vec{x}_{hk} entre átomos hk ; entonces cuando dichos vectores son transferidos al origen común en el espacio de Patterson, resultan prácticamente coincidentes y, por tanto, no pueden ser resueltos.

A pesar de esta circunstancia se puede extraer información acerca del perfil de densidad electrónica via función de Patterson

según el siguiente esquema:

$$I(b) \xrightleftharpoons[\mathcal{F}]{\mathcal{F}^{-1}} Q(x) \xrightleftharpoons[\Delta+]{\overset{2}{*ZS}} Q_0(x) \xrightleftharpoons[\sqrt{\quad}]{\overset{2}{\quad}} \rho_0(x)$$

A la intensidad recogida por el detector, una vez corregida con los factores necesarios (polarización, Lorentz,...) se le aplica la transformada de Fourier para obtener la función de Patterson del sistema difractante. El siguiente paso consiste, en extraer el valor de Q_0 , función de Patterson del motivo difractante, de la función $Q(x)$ obtenida mediante la transformada de Fourier anterior. Esta operación puede ser realizada siguiendo varios métodos que serán descritos en el siguiente epígrafe.

Finalmente el resultado $\rho_0(x)$, perfil de densidad electrónica de la bicapa ó motivo difractante, puede alcanzarse empleando algunos métodos de deconvolución apropiados y que serán descritos en la correspondiente sección de esta Memoria.

2.1.4. Separación de la función $Q_0(x)$

Con objeto de obtener el perfil de densidad electrónica de la celdilla unidad ρ_0 , es preciso tener en cuenta, solamente, valores correspondientes a la mitad derecha de $Q_0(x)$, dado que dicha función es centrosimétrica.

El cálculo de la función $Q_0(x)$ a partir de valores de $Q(x)$ puede realizarse empleando alguno de los métodos que se describen a continuación:

i) Último máximo en $Q(x)$. Según puede apreciarse en la figura 5d en torno a cada punto del cristal n_0, n_1, n_2 y $Q_0(x)$ están simétricamente convolucionados y que cada período de $x=0$ hasta $x=\pm n_1$ consiste en la suma de $Q_0(x \geq 0)$ y la imagen especular $Q_0(x \leq 0)$ de $Q_0(x)$; además para $x \geq n_2, Q_0(x)$ es obtenida directamente de $Q(x)$.

En la práctica, sin embargo, este rango de la función $Q(x)$ es el más inapropiado puesto que los valores de la misma son muy pequeños estando afectados por un gran error.

ii) Sustracción por imagen especular⁽²⁾. En este procedimiento el rango $x \geq n_2$ de la función $Q(x)$ es dibujado especularmente en torno al punto n_2 y luego sustraído de la función Q en el intervalo $n_1 \leq x \leq n_2$. Como puede ser visto en la figura 5d, se produce la función $Q_0(x)$ pura en ese intervalo. Continuando este procedimiento, se puede realizar nuevamente dicho tipo de sustracción entre los puntos n_0 y n_1 dibujando por simetría especular $Q_0(x \geq n_1)$ alrededor de n_1 en el rango $x \leq n_1$ y restando de $Q(x)$. Usando este método se puede obtener una función $Q_0(x)$ con más precisión, suponiendo que el empaquetamiento forma un cristal unidimensional perfecto, es decir, la autoconvolución $|Z(x) \cdot S(x)|^2$ viene representado por una serie de deltas de Dirac separadas por una distancia periódica L . Sin embargo, los sistemas formados por empaquetamiento de bicapas lipídicas suelen presentar diversos tipos y grados de distorsiones, los cuales, serán analizados posteriormente, y que es preciso tener en cuenta a la hora de construir la función de red $Z(x)$ o la función de motivo $l_0(x)$ pues afectan tanto a la longitud de la celdilla unidad como a la propia dimensión de la bicapa. En estos casos el procedimiento descrito anteriormente es inapropia-

do puesto que los puntos n_i sobre los cuales se realiza el dibujo especular se encuentran desplazados de sus posiciones ideales en el cristal afectando al proceso de sustracción. Esta situación se agrava a medida que en el empaquetamiento aumenta el número de elementos difractantes.

iii) Hinchamiento de la celdilla unidad. Este método puesto a punto por Worthington(3) consiste en aumentar la dimensión de la celdilla unidad L sin afectar apreciablemente la estructura y el tamaño de la bicapa lipídica. Esta situación se consigue aumentando la cantidad de agua en la muestra, elevando convenientemente la humedad relativa del ambiente en el cual está inmersa la muestra.

En estas circunstancias las moléculas de agua interaccionan con los grupos polares constituyentes de las moléculas de lípido insertándose en el espacio interlamelar provocando, por tanto, una separación gradual entre bicapas y un aumento de tamaño de la celdilla unidad. El objetivo de este método consiste en alcanzar un valor L para la celdilla unidad que sea superior al doble del tamaño de la bicapa $L > 2L_0$ quedando aislada, por tanto, la función $Q_0(x)$ en cada punto n_i .

iv) Separación de Q_0 en el intervalo $n_0 \leq x \leq n_1$ (4).

En el intervalo $(0, L)$, la función $Q(x)$ viene definida por:

$$Q(x) = A Q_0(x) + B Q_0(L-x) \quad [26]$$

siendo $A = Q_0(0)$ y $B = Q_0(L)$.

Cualquier función puede representarse como la suma de una

función simétrica y otra antisimétrica:

$$Q_0(x) = Q_0^S(x) + Q_0^A(x) \quad |27|$$

Los superíndices S y A indican función simétrica o antisimétrica respectivamente.

De la misma forma también puede escribirse:

$$Q_0(L-x) = Q_0^S(L-x) + Q_0^A(L-x) \quad |28|$$

Debido a la centrosimetría de la función $Q_0(x)$ se deduce que:

$$Q_0^S(x) = Q_0^S(D-x) \quad |29|$$

$$Q_0^A(x) = -Q_0^A(D-x) \quad |30|$$

Sustituyendo en |30| estas dos últimas expresiones:

$$Q_0(L-x) = Q_0^S(x) - Q_0^A(x) \quad |31|$$

También es posible formular $Q_0^S(x)$ y $Q_0^A(x)$ en términos de $Q(x)$ y de $Q(L-x)$ que son los datos de partida.

Para ello efectuamos la suma de $Q(x)$ con $Q(L-x)$. Teniendo en cuenta |26|:

$$Q(x) + Q(L-x) = AQ_0(x) + BQ_0(L-x) + AQ_0(L-x) + BQ_0(x) \quad |32|$$

y agrupando

$$Q(x) + Q(L-x) = (A+B)Q_0(x) + (A+B)Q_0(L-x) \quad |33|$$

Con las relaciones |27| y |31|, |33| se puede reescribir:

$$Q(x) + Q(L-x) = 2(A+B)Q_0^S(x) + (A+B)(Q_0^A(x) - Q_0^A(x))$$

Entonces

$$Q_0^S(x) = \frac{Q(x) + Q(L-x)}{2(A+B)} \quad |34|$$

Analogamente se puede calcular $Q_0^A(x)$ en función de $Q(x)$ y $Q(L-x)$:

$$\begin{aligned} Q(x) - Q(L-x) &= AQ_0(x) + BQ_0(L-x) - AQ_0(L-x) - BQ_0(x) \\ &= (A-B)Q_0(x) - (A-B)Q_0(L-x) \end{aligned} \quad |35|$$

Empleando las relaciones |27| y |31| dadas para $Q_0(x)$ y $Q_0(L-x)$:

$$Q(x) - Q(L-x) = Q_0^S(x)(A-B-A+B) + 2(A-B)Q_0^A(x) \quad |36|$$

$$Q_0^A(x) = \frac{Q(x) - Q(L-x)}{2(A-B)} \quad |37|$$

Finalmente se puede obtener $Q_0(x)$ en función de los valores

de $Q(x)$ en el intervalo $(0,L)$ sustituyendo las expresiones |37| y |34| en |27|:

$$Q_0(x) = \frac{AQ(x) - BQ(L-x)}{A^2 - B^2} \quad |38|$$

Esta relación toma valores 1 y 0 en los extremos $x=0$ y $x=L$ respectivamente. Esta afirmación se puede demostrar calculando $Q_0(x)$ dado en |38| para estos dos valores y teniendo en cuenta el significado de A y B.

$$Q_0(0) = \frac{Q(0)Q(0) - Q(L)Q(L)}{Q(L)^2 - Q(L)^2} ; \quad Q_0(0) = 1$$

$$Q_0(L) = \frac{Q(0)Q(L) - Q(L)Q(0)}{Q(0)^2 - Q(L)^2} ; \quad Q_0(L) = 0$$

Este sistema de aislar $Q_0(x)$ de $Q(x)$ muestra ser el más adecuado de los descritos anteriormente. En primer lugar no interviene la presencia de distorsiones de empaquetamiento dado que solo se consideran valores de $Q(x)$ en el intervalo $(0,L)$.

Por otro lado, se evita la posibilidad de un cambio estructural en la bicapa lipídica pues no es necesario manipular experimentalmente las muestras con objeto de aislar $Q_0(x)$.

2.1.5. Deconvolución de $Q_0(x)$

El paso final en la consecución del perfil de densidad elec-

trónica de la bicapa lipídica consiste en la deconvolución de la función $Q_0(x)$.

En la bibliografía (4.-6.) aparecen descritos distintos métodos de deconvolución aplicados a casos de empaquetamiento de membranas biológicas, bicapas lipídicas o láminas; siendo los dos últimos los más apropiados en la resolución del presente problema. A continuación se exponen dichos métodos:

i) Deconvolución analítica de Fourier.

Este método desarrollado por Pape (5) está basado en la importante propiedad de centrosimetría que posee $l_0(x)$. A causa de esta cualidad $l_0(x)$ puede ser representada por una serie limitada de cosenos:

$$l_0(x) = a_0 + \sum_{k=1}^N a_k \cos kx ; \quad -\pi \leq x \leq +\pi \quad |39|$$

Siempre es posible transformar la longitud L_0 de la celdilla unidad en el intervalo $(-M, M)$ por la transformación sencilla: $x = \hat{x} \cdot 2M/L_0$. El correspondiente cuadrado de convolución $Q_0(x)$ (también centrosimétrico) o, mas exactamente, su mitad derecha, está definida por:

$$Q_0(x) = \int_{-\pi+x}^{+\pi} l_0(x') l_0(x'-x) dx' ; \quad 0 \leq x \leq 2\pi \quad |40|$$

Esta integral puede ser facilmente calculada insertando $l_0(x)$ dado en [39] en el valor de Q_0 dado en [40]. El resultado es:

$$Q_0(x) = a_0^2(2M-x) + \sum_{k=1}^N (a_k^2/2) \{ (2M-x) \cos kx - (\sin kx/k) \} +$$

$$+ \sum_{k=1}^N 2ka_k \sin kx \sum_{\substack{n=0 \\ n \neq k}}^N | (-1)^{k+n} a_n / (n^2 - k^2) | \quad |41|$$

Esta $Q_0(x)$ también puede ser representada por una serie de Fourier:

$$Q_0(x) = C_0 + \sum_{k=1}^N (C_k \cos Kx + d_k \sin Kx) \quad |42|$$

El problema de resolver la ecuación integral |40| para $l_0(x)$ queda ahora transformado en la cuestión de calcular los coeficientes coseno de Fourier a_k de $l_0(x)$ deseados a partir de los coeficientes de Fourier C_k, d_k de $Q_0(x)$ dados experimentalmente.

Este nuevo problema puede ser tratado en la forma siguiente: Los coeficientes coseno de Fourier C_k de $Q_0(x)$ vienen definidos por:

$$C_k = 1/\pi \int_0^{2\pi} Q_0(x) \cos Kx \, dx \quad ; \quad k = 0, 1, 2, \dots, N \quad |43|$$

En un primer paso se obtienen los valores absolutos de los coeficientes coseno de Fourier a_k de $l_0(x)$, sustituyendo la $Q_0(x)$ calculada como una función de los a_k (ecuación |41|) en la ecuación |43| e integrando:

$$C_0 = 2\pi a_0^2$$

$$C_k = 1/2\pi a_k^2 \quad ; \quad k = 1, 2, \dots, N \quad |44|$$

De esta forma los valores absolutos de los (N+1) coeficientes a_k de $\ell_0(x)$.

El segundo paso consiste en la determinación de los signos de dichos coeficientes a_k mediante un sistema de ecuaciones lineales generados a través de los coeficientes seno de Fourier d_k ; los cuales pueden calcularse según la siguiente expresión:

$$d_k = 1/\pi \int_0^{2\pi} Q_0(x) \operatorname{sen}Kx \, dx \quad |45|$$

Insertando |41| en |45| obtenemos:

$$d_k = (2a_0^2/k) - (a_k^2/4k) - \sum_{\substack{n=1 \\ n \neq k}}^N |ka_n^2/(n^2-k^2)| + \\ + \sum_{\substack{n=0 \\ n \neq k}}^N |2ka_k a_n (-1)^{k+n}/(n^2-k^2)| \quad |46|$$

Si introducimos los signos S_k de los coeficientes a_k de $\ell_0(x)$ por:

$$a_k = S_k |a_k|.$$

Podemos transformar la ecuación |46| en un sistema de ecuaciones lineales para la determinación de N signos.

El signo de coeficiente (N+1), sea por ejemplo a_0 , siempre puede ser escogido independientemente ya que un cambio completo de todos los signos no altera la función Q_0 . La razón para ello es que tanto $\ell_0(x)$ como $-\ell_0(x)$ tienen la misma función Q_0 .

El sistema de ecuaciones lineales quedaría formado por:

$$a_0/k^2 = \sum_{\substack{n=1 \\ n \neq k}}^N |(-1)^n| a_n |S_n / (n^2 - k^2)| - \hat{d}_k |a_k |S_k; \quad K=1, 2, \dots, N \quad |47|$$

donde \hat{d}_k está relacionado con d_k en la siguiente forma:

$$\hat{d}_k = |d_k / 2k - a_0^2 / k^2 + a_k^2 / 8k^2 - \sum_{\substack{n=1 \\ n \neq k}}^N a_n^2 / 2(k^2 - n^2)| (-1)^k / a_k^2 \quad |48|$$

El resultado, la solución $l_0(x)$ deseada, es generada en la forma:

$$l_0(x) = |a_0| + \sum_{k=1}^N |a_k |S_k \cos kx; \quad -\pi \leq x \leq +\pi \quad |49|$$

que en el intervalo $\{-L_0/2 \leq x \leq +L_0/2\}$ se transforma en:

$$l_0(x) = |a_0| + \sum_{k=1}^N |a_k |S_k \cos 2\pi kx / L_0 \quad |50|$$

Como puede desprenderse del anterior tratamiento este método determina, de una forma directa y sin iteraciones, el perfil de la densidad electrónico de una bicapa lipídica a partir de unos valores experimentales de $Q_0(x)$.

Sin embargo, la presencia de distorsiones dentro de la celdilla unidad modifica en cierta cuantía la estructura de la bicapa lipídica, rompiendo parcialmente la centrosimetría de $l_0(x)$, condición por lo demás indispensable para la aplicación adecuada de este método. La existencia de este tipo de distorsiones queda de manifiesto en la representación gráfica de $Q_0(x)$ por una sua-

vización en la parte más externa del perfil de dicha función.

Esta cuestión será abordada posteriormente.

ii) Deconvolución por mínimos cuadrados (6).

Este método consiste en un proceso de optimización de un modelo propuesto para la $l_0(x)$ mediante un ajuste por mínimos cuadrados no lineales con datos de $Q_0(x)$.

El perfil de densidad electrónica de una bicapa $l_0(x)$ puede descomponerse en el perfil de una monocapa $l_m(x)$ y su imagen especular $l_m(-x) = l_{-m}(x)$ (fig.2.7).

De acuerdo con la figura 2.7, se puede distinguir entre L_1 , distancia al vecino mas cercano dentro de la celdilla unidad y L_2 , distancia al vecino más próximo entre dos bicapas. Ambas magnitudes pueden venir afectadas por distorsiones de distinto tipo que provocan desviaciones del valor medio del espaciado. Además se supone que estas variaciones pueden ser gobernadas por funciones de distribución estadística $H_1(x)$ y $H_2(x)$ respectivamente.

Por tanto, teniendo en cuenta dichas distorsiones, se puede descomponer la distribución de densidad $l_0(x)$ de la siguiente forma:

$$l_0(x) = l_m(x) + l_{-m}(x) * H_1(x - L_1) \quad |51|$$

El símbolo * representa la operación de convolución definida anteriormente [5].

Dado que, $Q_0(x)$ es el cuadrado de convolución de $l_0(x)$ [23] cuyo valor está dado en [51], resulta:

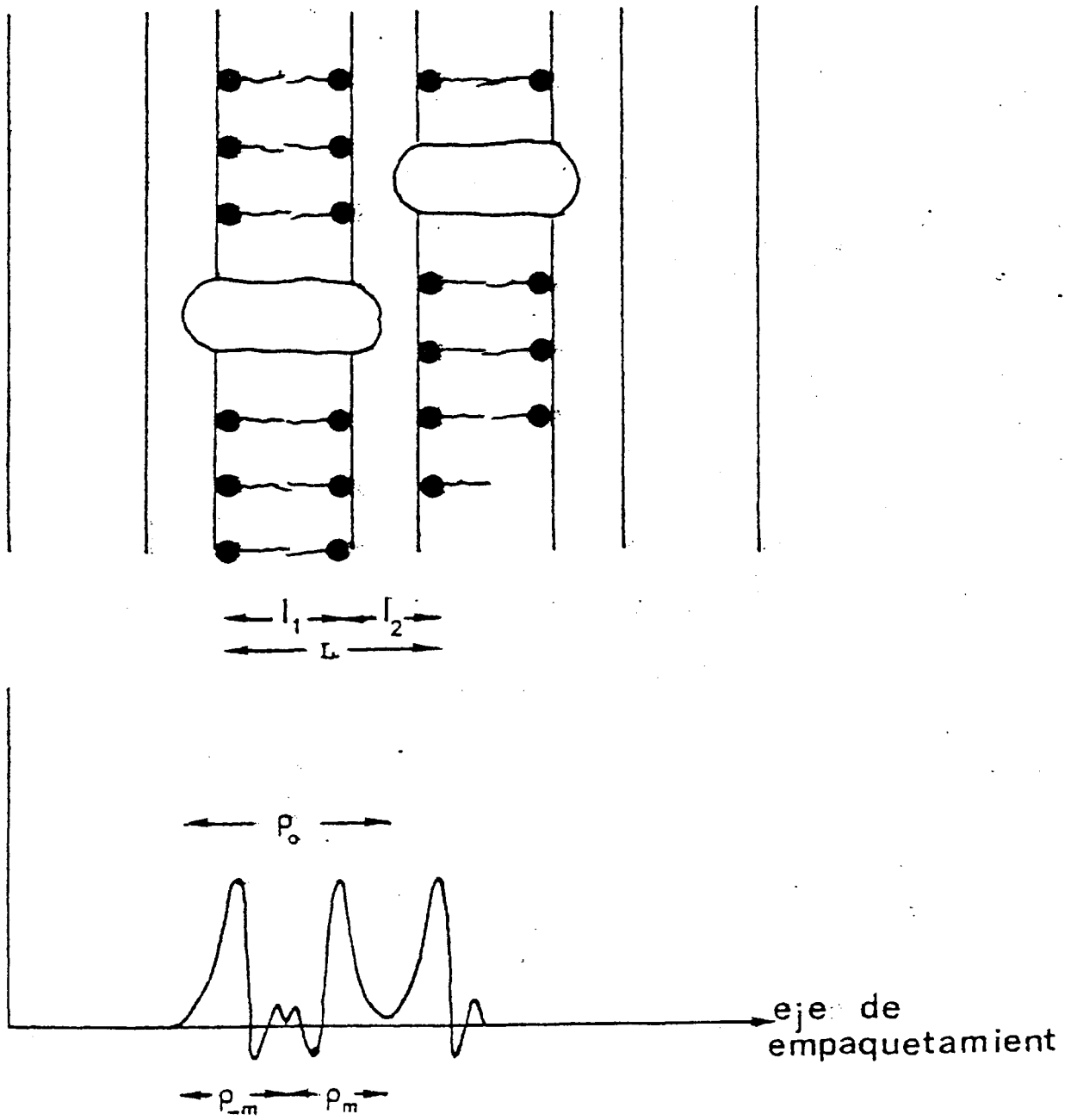


FIG. 2.7

$$Q_0(x) = \left| l_m(x) + l_{-m}(x) * H_1(x-L_1) \right| * \left| l_m(x) + l_{-m}(x) * H_1(x-L_1) \right| \quad |52|$$

Atendiendo a las propiedades asociativa y distributiva del producto de convolución y teniendo en cuenta las siguientes definiciones:

$$Q_m = l_m * l_{-m}$$

$$Q_{m1} = l_m * l_m$$

$$Q_{m2} = l_{-m} * l_{-m}$$

Se puede escribir la expresión |52| en función de Q_m , Q_{m1} y Q_{m2} :

$$Q_0(x) = 2Q_m(x) + Q_{m1}(x) * H_1(x-L_1) + Q_{m2}(x) * H_1(x-L_1) \quad |53|$$

En esta expresión la función $H_1(x-L_1)$ da cuenta de las distorsiones que se producen en el interior de la celdilla unidad que como ya se expuso anteriormente, modifican en cierto grado la forma de la función $Q_0(x)$.

En el caso menos general en el cual no se presentan distorsiones de esta especie se puede sustituir la función de distribución estadística $H_1(x-L_1)$ por una función delta de Dirac $\delta(x-L_1)$ con lo cual la expresión |53| resultaría:

$$Q_0(x) = 2Q_m(x) + Q_{m1}(x) * \delta(x-L_1) + Q_{m2}(x) * \delta(x-L_1) \quad |54|$$

El objetivo pues, queda reducido a calcular el perfil de densidad electrónica de una monocapa $\rho_m(x)$. Este método consiste en elaborar un modelo inicial para $\rho_m(x)$ evaluando posteriormente $Q_0(x)$ según la expresión [53]. Este resultado se compara con los valores $Q_0(x)$ obtenidos experimentalmente empleando un método de mínimos cuadrados no lineales que refina el conjunto de parámetros inicialmente utilizados en la elaboración de $\rho_m(x)$.

En este modelo de $\rho_m(x)$ se representa como una suma de N_0 gaussianas de la misma anchura:

$$\rho_m(x) = \sum_{k=1}^{N_0} A_k \exp\{-c(x-x_k)^2\} \quad [55]$$

donde A_k , amplitud; c , anchura y x_k , centro de la gaussiana.

También se puede generar la función de distribución de distancia $H_1(x)$ por una gaussiana:

$$H_1(x) = (c_1/\pi)^{0.5} \exp\{-c_1(x-L_1)^2\} \quad [56]$$

El motivo de escoger funciones gaussianas para describir ambas funciones está en la propiedad que poseen dichas funciones de transformarse en otras gaussianas cuando se aplica entre ellas la operación de convolución.

Así pues, todos los términos en ecuaciones [53] y [54] se calculan fácilmente como polinomios de convolución de funciones gaussianas:

$$Q_m(x) = W_a \sum_{i=1}^{N_0} \sum_{k=1}^{N_0} A_i A_k \exp\{-0.5c|x-(x_i-x_k)|^2\} \quad [57]$$

$$Q_{m1}(x) = W_a \sum_{i=1}^{N_0} \sum_{k=1}^{N_0} A_i A_k \exp\{-0.5c|x+(x_i+x_k)|^2\} \quad |58|$$

donde $W_a = (M/2c)^{0.5}$. El segundo término en la ecuación |53| puede calcularse por la convolución adicional de |58| con $H_1(x)$.

$$Q_{m1}(x) * H_1(x) = W_a W_{HQ} \sum_{i=1}^{N_0} \sum_{k=1}^{N_0} A_i A_k \exp\{-|cc_1/(c+2c_1)| |x+(x_i+x_k)-L_1|^2\} \quad |59|$$

donde $W_{HQ} = |c_1/(c_1+0.5c)|^{0.5}$.

Es idénticamente con el término $Q_{m2}(x) * H_2(x)$.

El uso de gaussianas de anchuras diferentes en ℓ_m no tiene efecto significativo en el grado de acuerdo entre las funciones experimentalmente observadas y las sintetizadas (6). Por tanto, es conveniente usar solamente gaussianas de la misma anchura con objeto de reducir el número de parámetros.

Con un conjunto inicial de parámetros A_i, X_i, c, c_1, L_1 se calculan las cantidades Q_m, H_1, Q_{m1} y Q_{m2} y la expresión completa para $Q_o(x)$ de acuerdo con |53|. El resultado es comparado con la función $Q_o(x)$ obtenida experimentalmente. En un subsiguiente proceso de refinamiento por mínimos cuadrados (7) son variados los parámetros que describen las gaussianas $\ell_m(x)$ y $H_1(x)$ hasta que las diferencias entre $Q_o, \exp(Q_o(x) \text{ experimental})$ y $Q_o(x)$ recalculado sean mínimas. La solución ℓ_m que da el mejor acuerdo entre $Q_{o,exp}$ y $Q_{o,recalc.}$ será considerada la correcta.

Para cuantificar la extensión de esta concordancia, diver-

Los autores (6, 8) definen los siguientes parámetros:

$$R_Q = \sum_{m=1}^N \frac{|Q_{\text{exp}}(x_m) - Q_{\text{mod}}(x_m)|^2}{|Q_{\text{exp}}(x_m)|^2} \quad |60|$$

$$G_Q = \frac{\sum_{m=1}^N |Q_{\text{exp}}(x_m) - Q_{\text{mod}}(x_m)|^2}{N} \quad |61|$$

donde N representa el número de valores de la función $Q_0(x)$ tomados en un conjunto discreto de puntos equidistantes a lo largo del eje X.

La principal ventaja que posee este método es, como ya se mencionó anteriormente, la consideración de distorsiones en el empaquetamiento, que reproduce con mayor verosimilitud la situación real en dicho empaquetamiento. Sin embargo, los valores finales de $l_m(x)$ dependen notablemente de la forma que posea la función $Q_0(x)$ experimental. Esto es, si la $Q_0(x)$ de entrada no tiene buena resolución, entonces existe más de un posible conjunto de valores para $l_m(x)$ que puede ajustar bastante bien $Q_{0,\text{recalc}}$ a $Q_{0,\text{teor}}$. Este punto se volverá a tratar más extensamente a la hora de analizar los resultados obtenidos con dicho método para los compuestos estudiados en este trabajo.

2.1.6. Influencia del término de orden cero de $I(b)$ en la función $Q_0(x)$.

La distribución de intensidad $I(b)$ no puede ser registrada

a ángulo cero y su vecindad debido al grosor finito del haz de rayos X y a la difracción intrínseca del sistema de colimación (fig. 2.8a). Solamente la parte externa del pico de orden cero es accesible. Para Cálculos de la función $Q(x)$ por transformada de Fourier de la distribución de intensidad, la intensidad perdida del pico de onda cero tiene que ser cancelada completamente o bien evaluada por extrapolación. En el primer proceso la distribución real de densidad electrónica con respecto a sus alrededores puede ser encontrada en principio; en el segundo tratamiento, sin embargo, solamente resulta la modulación de la densidad electrónica dentro del cristal. Estas relaciones pueden ser explicadas del siguiente modo:

Solamente las regiones de densidad electrónica que difieren en dicho valor del entorno en el que se encuentran embebidas contribuyen a la difracción. Por tanto, las funciones $\ell_0(x)$ y $\ell(x)$ deberíamos designarlas como $\Delta\ell(x)$ y $\Delta\ell_0(x)$.

La función $\Delta\ell_0(x)$ describe pues la diferencia en la distribución de densidad electrónica del sistema lamelar y su entorno. Este incremento puede descomponerse en dos partes: la media de la diferencia de densidad electrónica entre el sistema lamelar y sus alrededores ($\ell = \text{constante}$) por un lado y la modulación de dicha densidad electrónica con respecto a esa media (fig. 2.8b).

$$\Delta\ell(x) = \Delta\bar{\ell} + \Delta\ell'(x) \quad [62]$$

Simplificando la nomenclatura, podemos escribir nuevamente:

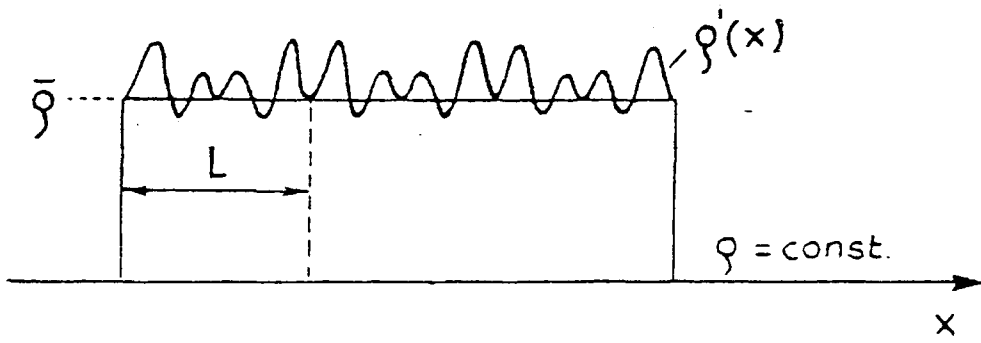
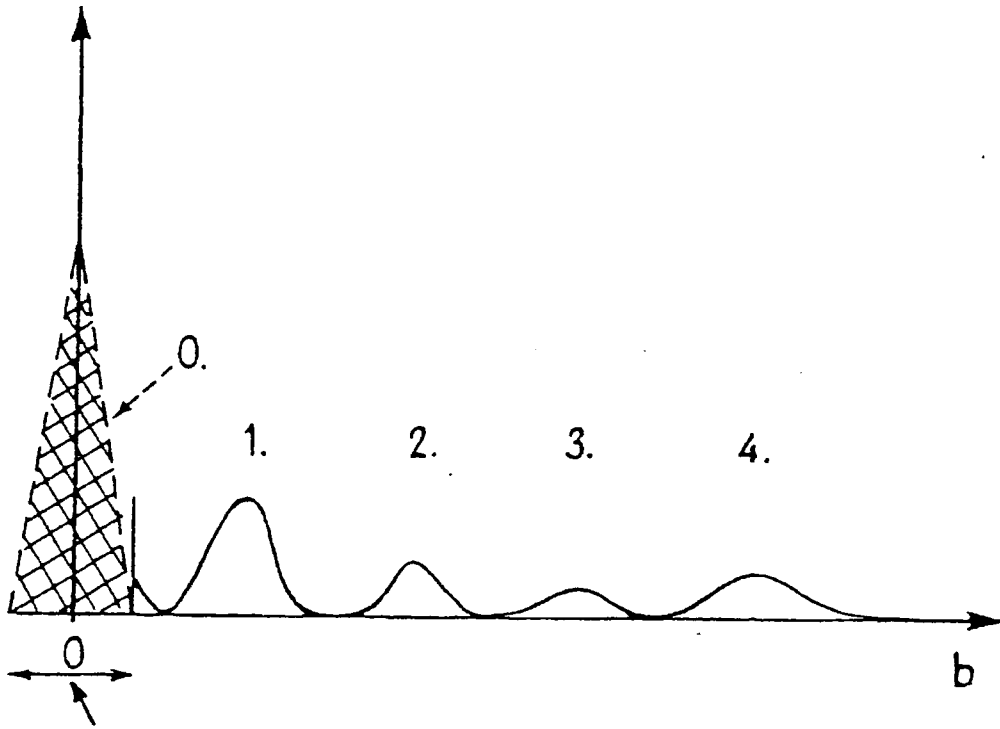


FIG. 2.8

$$l(x) = \bar{l} + l'(x) \quad |63|$$

En este caso la amplitud de la onda difractada sería:

$$A(b) = \mathcal{F}\{l(x)\} = \mathcal{F}\{\bar{l} + l'(x)\} \quad |64|$$

En esta expresión \bar{l} es, salvo un factor constante, idéntico a $S(x)$:

$$\bar{l} = c \cdot S(x) \quad |65|$$

Por otro lado:

$$l'(x) = l'_0(x) * [Z(x) \cdot S(x)] \quad |66|$$

Sustituyendo |65| y |66| en |64|:

$$A(b) = \mathcal{F}\{c \cdot S(x) + l'_0(x) * [Z(x) \cdot S(x)]\} \quad |67|$$

$$A(b) = S_c(b)_0 + F'(b) [Z(b) * S(b)] \quad |68|$$

En esta expresión $F'(b) = 0$ para $b = 0$, es decir, en las proximidades de $\theta = 0$ la amplitud es igual a $S_c(b)_0$ ó, en otras palabras, a la difracción debida a la densidad electrónica media \bar{l} .

Si se precisa incluir el pico de orden cero en el problema,

la distribución de intensidad para la reflexión de orden cero debe ser extrapolada a ángulo cero. En este caso se obtiene la distribución total de densidad electrónica $\rho(x)$, resultando una pequeña incertidumbre concerniente al valor de $\bar{\rho}$ que en muchos casos carece de importancia.

2.2. DISTORSIONES EN EL OBJETO DIFRACTANTE

Dado que el empaquetamiento de bicapas no forma un cristal perfecto, es preciso considerar los distintos tipos de distorsiones que aparecen en dicho sistema. Por un lado existen perturbaciones debidas al propio empaquetamiento de bicapas, y por otra parte, tenemos distorsiones producidas en la misma bicapa o en la propia celdilla unidad. Ambos tipos son descritos a continuación.

2.2.1. Distorsiones en el empaquetamiento

Se discuten principalmente dos clases de distorsiones (9). En sistemas con distorsiones de primera clase, se mantiene un orden de largo alcance de la celdilla unidad a lo largo del empaquetamiento. Los puntos de la red sufren desviaciones estadísticas en torno a las posiciones de equilibrio. En sistemas con distorsiones de segunda especie solo se encuentra un orden a corto alcance para los puntos de la red. La probabilidad de encontrar

un punto vecino de la red viene dado en este caso por una función de distribución para las distancias. Las funciones $Q(x)$ para los dos tipos de sistemas son bastante distintas.

i) Distorsiones de primera especie.

Las oscilaciones térmicas de los átomos alrededor de sus posiciones en el cristal son consideradas distorsiones de este tipo. Por simplicidad, tomemos la probabilidad de encontrar una celdilla unidad en un cierto entorno de su verdadera posición por una gaussiana:

$$H(x) = k \exp\left[-\frac{c}{2\Delta^2}(x - n\bar{L})^2\right] \quad [69]$$

donde

$$k = (2M\Delta^2)^{-\frac{1}{2}}, \quad \bar{L} = \int xH(x) dx, \quad c = \frac{1}{2}\Delta^2$$

y Δ es la desviación standard definida por $\Delta^2 = \int (x - n\bar{L})^2 H(x) dx$. Esta función de distribución es, en el caso de distorsiones de primera clase, idéntica para todos los vecinos independientemente del orden.

La función $Q(x)$ completa se puede escribir pues:

$$Q(x) = Q_0(x) * \delta(x-0) + Q_0(x) * H(x \pm \bar{L}) + Q_0(x) * H(x \pm 2\bar{L}) + \dots \quad [70]$$

o expresada en la forma del producto de convolución de $Q_0(x)$ y el producto de convolución de la red:

$$Q(x) = Q_0(x) * Z^I(x)$$

donde

$$Z^I(x) = N\delta(x-0) + \sum_{n=1}^{N-1} (N-n)H(x \pm n\bar{L}) \quad |71|$$

El efecto de distorsiones de primera especie en la función $Q(x)$ se traduce como una convolución de las funciones $Q_0(x)$, centradas en puntos $x = \pm n\bar{L}$ ($n=1, 2, \dots, N$) con la función de distribución $H(x)$. Solamente la función $Q_0(x)$ centrada en el origen permanece inalterada (fig.9).

Como puede observarse en la figura 2.9, la altura de los picos de orden $n=1, 2, \dots, N$ está reducida por un factor determinado por la anchura estadística existente en el sistema. Dicha anchura es, además, idéntica para todos los picos. Dado que los picos son también simétricos en cada punto de la red en la función $Q(x)$, se puede aislar cuantitativamente la función $Q_0(x)$ convolucionada en torno a $\delta(x-0)$ por sustracción por imagen especular (2.), como ya se explicó en un punto anterior.

ii) Distorsiones de segunda especie.

Para entender bien este tipo de distorsiones es necesario realizar previamente algunas consideraciones sobre el estado paracrystalino.

La mayoría de los polímeros biológicos y artificiales presentan un comportamiento intermedio entre un ordenamiento tridimensional presente en los cristales y un desorden total como el que poseen los sistemas amorfos. Este estado intermedio que deno-

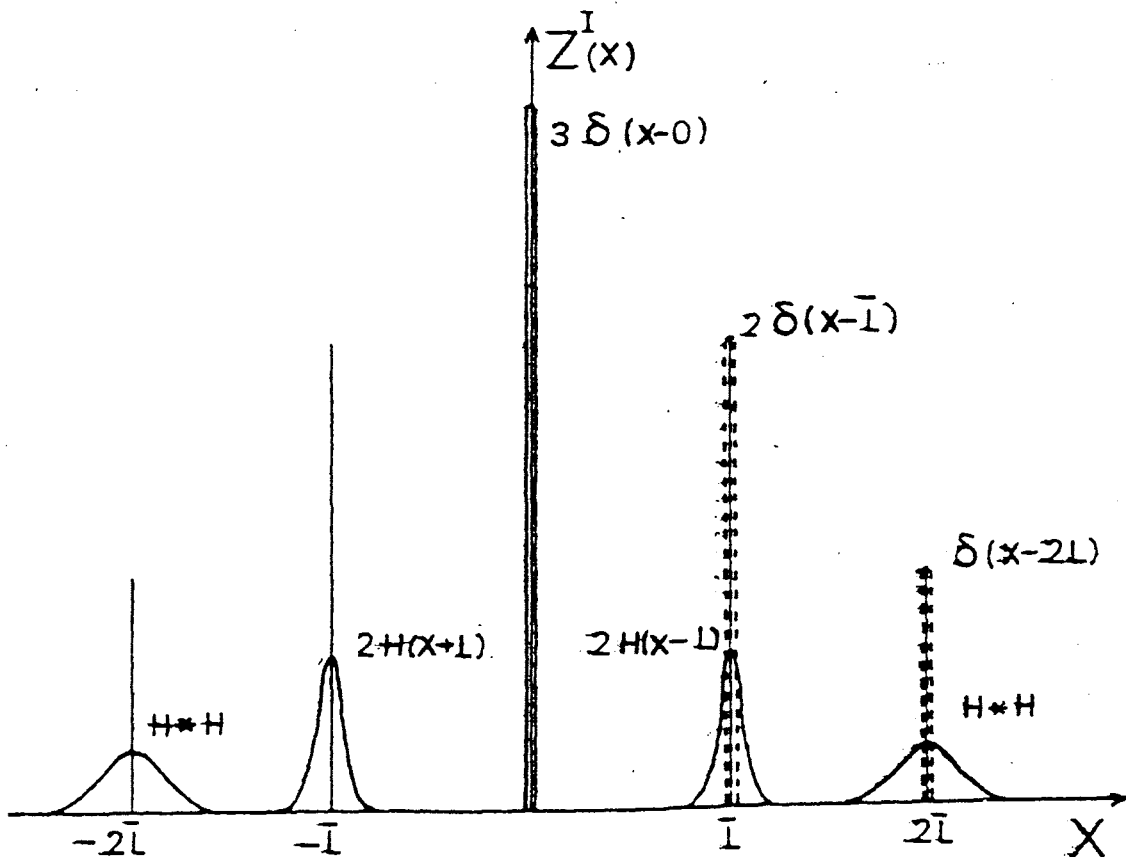


FIG. 2.9

minado "paracristalinidad" por primera vez por Hosemann (10) en 1950.

En este caso se mantiene el concepto de red pero no existe orden a largo alcance. Las dimensiones de la celdilla unidad varían estadísticamente de una celdilla a otra como puede observarse en la figura 2.10, para el caso de redes monodimensionales, bidimensionales y tridimensionales.

Definiendo $\Delta_{nk\ell} = (\bar{d}_{nk\ell}^2 - \bar{d}_{nk\ell}^2)^{\frac{1}{2}}$ como la fluctuación que representa la separación paracristalina de una familia de planos caracterizada por una distancia promedio, $\bar{d}_{nk\ell}$, la fluctuación entre el primer plano y el plano $n+1$ viene definida por:

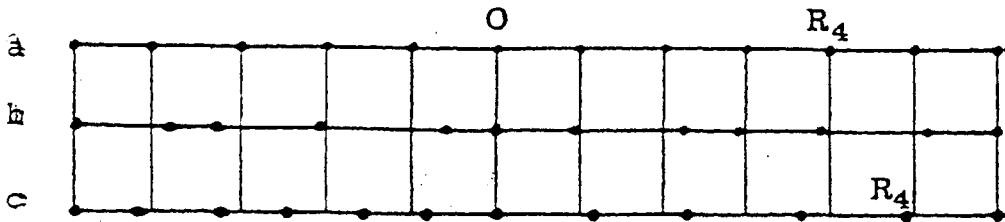
$$(\Delta_{hk\ell})_n = \Delta_{hk\ell}(n)^{\frac{1}{2}} \quad |72|$$

Las fluctuaciones estadísticas entre planos reticulares aumentan con la raíz cuadrada del número de planos, perdiéndose el orden de largo alcance. Estas distorsiones de la red cristalina provocan, un ensanchamiento de las reflexiones en los diagramas de difracción, efecto que se suma a la amplitud debida al propio tamaño de los cristales.

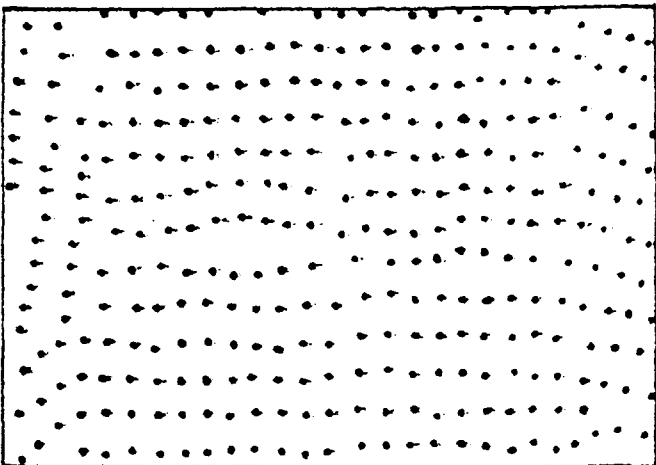
Según la teoría del paracristal el ensanchamiento de las reflexiones $(\delta\beta_{hk\ell})_{PC}$ debido a la fluctuación entre planos vecinos $hk\ell$ viene dado por

$$(\delta\beta_{hk\ell})_{PC} = \frac{(\pi g_{hk} m)^2}{\bar{d}_{hk\ell}} \quad |73|$$

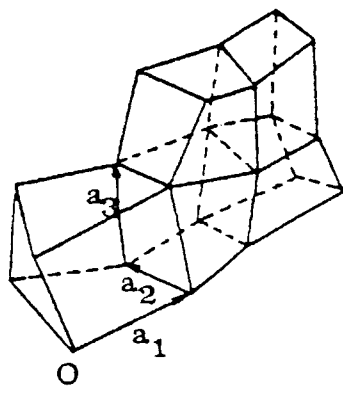
donde g_{hk} es el denominado grado de paracristalinidad y m es el



- (a) Red monodimensional ideal
- (b) Red monodimensional con perturbaciones de primera especie. La amplitud de las fluctuaciones es independiente de la posición
- (c) Red monodimensional con perturbaciones de segunda especie. La amplitud de las fluctuaciones aumenta con la distancia



Red bidimensional paracristalina



Red tridimensional paracristalina

orden de la reflexión hkl .

$$g_{hkl} = \frac{(\Delta_{hkl}^2)^{\frac{1}{2}}}{d_{hkl}} \quad |74|$$

tomando valores característicos para estructura cristalina $g_{hkl}=0$ y $g_{hkl}>0.1$ para estructura amorfa. Así pues de la pendiente de la variación de $\delta\beta_{hkl}$ en función de m se puede deducir la contribución del tamaño de cristal y la del tipo de distorsión. En el caso de distorsiones paracrystalinas, por extrapolación de $\delta\beta_{hkl}$ para $m=0$ se puede separar la contribución de las distorsiones paracrystalinas de la contribución del tamaño de cristal utilizando la ecuación:

$$\delta\beta_{hkl} = \frac{1}{D_{hkl}} + \frac{(\pi gm)^2}{d_{hkl}} \quad |75|$$

donde $\delta\beta_{hkl}$ es la anchura de la reflexión y D_{hkl} el tamaño del cristal en la dirección hkl . Esta separación puede realizarse siempre que se conozca la aditividad de estas contribuciones a la anchura integral.

El número de planos cristalinos que un paracristal real es limitado y sólo puede alcanzar un valor máximo, N_{hkl} . Como resultado de múltiples medidas experimentales se ha llegado a la conclusión de que este valor viene definido por (11-13).

$$N_{hkl} = \left(\frac{\alpha^*}{g_{hkl}}\right)^2 \quad |76|$$

siendo α^* un valor empírico adimensional que varía entre 0.1 y

0.2, dependiendo del tipo de interacción molecular.

Como ya se ha mencionado anteriormente los empaquetamientos de bicapas lipídicas no pueden tratarse enteramente como cristales unidimensionales perfectos y es preciso tener en cuenta la presencia de distorsiones en el empaquetamiento. En este sentido las fluctuaciones de segundo orden o paracristalinidad reflejan con mayor precisión lo que realmente ocurre en dicho empaquetamiento. Según se describió anteriormente solo se mantiene un orden de corto alcance en distorsiones de este tipo. Se destruye la periodicidad exacta de las posiciones de equilibrio de los puntos de la red. Si la función de distribución para los vecinos más próximos viene dada por $H(x)$, entonces la distribución de distancia para los vecinos segundos será la convolución de $H(x)$ con $H(x)$, como muestra Hosemann (14). En general, para el vecino n -ésimo obtendremos:

$$H_n(x) = H * H * H * \dots * H, \quad (n-1) \text{ veces} \quad [77]$$

La función $H(x)$ no es simétrica. Posee una inclinación más acusada en la parte que mira al origen, esto es, en la dirección de acercamiento entre las celdillas unidad empaquetadas. Sin embargo, en una primera aproximación se puede evitar esta asimetría y considerar $H(x)$ de nuevo como una gaussiana:

$$H(x) = k \exp\left[-c(x-\bar{L})^2\right] \quad [78]$$

donde $\int H(x) dx = 1$; $k = (2\pi\Delta^2)^{-\frac{1}{2}}$; $c = \frac{1}{2}\Delta^2$ y Δ es la desviación

standard definida por $\Delta^2 = (x-\bar{L})^2$.

La distancia media entre dos miembros adyacentes se puede definir por la siguiente integral:

$$\bar{L} = \int_{-\infty}^{+\infty} xH(x) dx \quad |79|$$

Si $H(x)$ está definida como una gaussiana, las consiguientes convoluciones de $H(x)$ resultarán:

$$H_n(x) = k \cdot n^{-\frac{1}{2}} \exp\left[-c/n(x-n\bar{L})^2\right] \quad |80|$$

Con un aumento progresivo de las desviaciones standard dado por $\Delta_n^2 = n\Delta^2$.

La distancia media al vecino enésimo es n veces la distancia media al primer vecino:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} xH_n(x) dx = n\bar{L} \quad |81|$$

La correspondiente función $Q(x)$ puede ser representada, nuevamente, como un producto de convolución de la función $Q_0(x)$ no distorsionada con una función de distribución de distancia $Z^{II}(x)$ que contabiliza distorsiones de segunda clase:

$$Q(x) = Q_0(x) * Z^{II}(x) \quad |82|$$

donde

$$Z^{II}(x) = N(x-0) + \sum_{n=1}^{N-1} (N-n)H_n(x \pm n\bar{L}) \quad |83|$$

En la fig. 2.11, se representa la función $Z^{II}(x)$ para un empaquetamiento consistente de un empaquetamiento de tres celdillas unidad.

El efecto de las fluctuaciones en la red sobre la función $Q(x)$ es un aumento en la anchura de los picos de la función $Z^{II}(x)$, que para el caso de funciones de distribución gaussianas el ensanchamiento es proporcional a \sqrt{n} . Sin embargo, la función $Q_0(x)$ centrada en el origen $Q_0(x)$ permanece inalterada.

2.2.2. Distorsiones dentro de la celdilla unidad.

Este tipo de distorsiones ya se trató en el punto referido a la deconvolución de la función $Q_0(x)$ usando el método de mínimos cuadrados (ver 2.1.5). En la figura 2.12 se representan los dos tipos de distancias sometidas a perturbaciones.

La ecuación [53] relaciona valores de la función $Q_0(x)$ con la función de distribución $H_1(x)$ responsable de las fluctuaciones dentro de la celdilla unidad.

Sustituyendo este valor de $Q_0(x)$ dado por la relación [53] en [82] obtendríamos la función $Q(x)$ de un sistema de empaquetamiento de celdillas en el que se consideran dos tipos de distorsiones gobernadas por funciones estadísticas $H_1(x)$, para distancias intraceldilla unidad, L_1 ; y $H_2(x)$ para espaciados inter-cel-

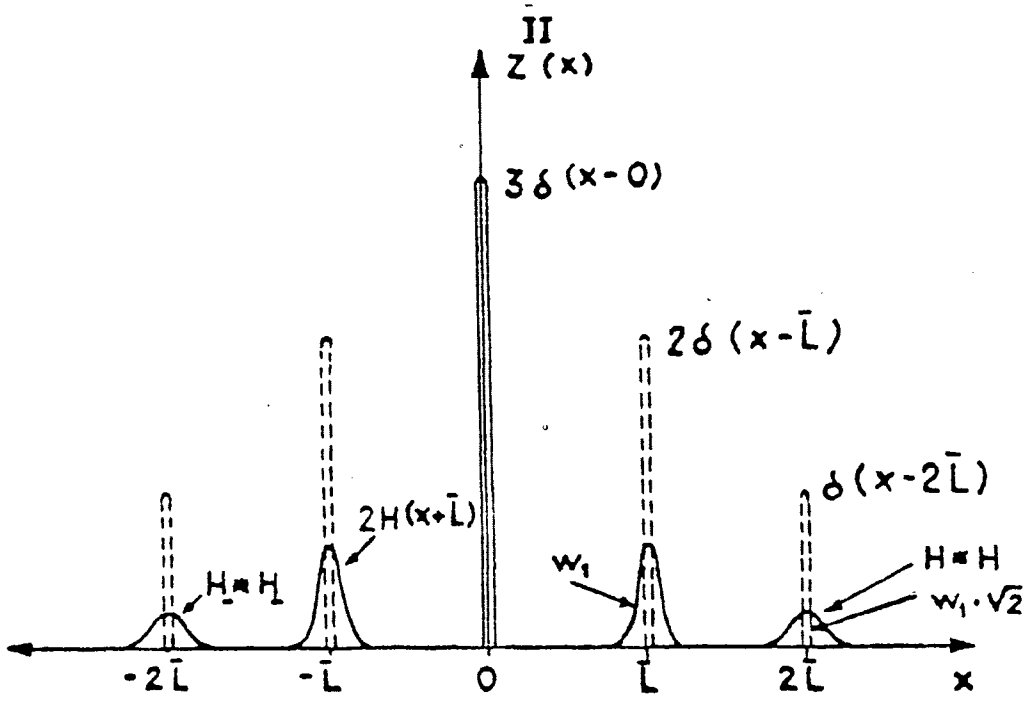


FIG. 2.11

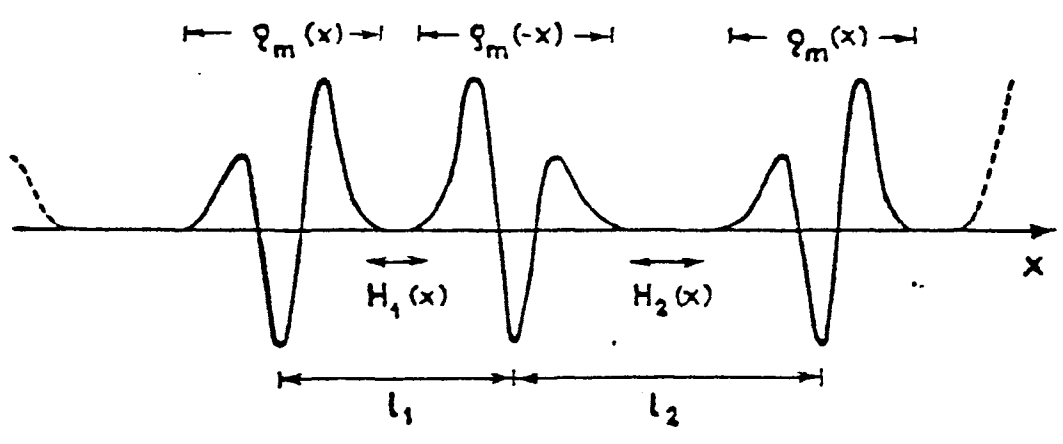


FIG. 2.12

dillas unidad (fig. 2.12).

Suponiendo que $H_1(x)$ y $H_2(x)$ sean distintas:

$$\begin{aligned}
 Q(x) = & NQ_m * \delta(x-0) + (N-1) \frac{1}{2} \left| Q_{m2} * H_1(x-L_1) + Q_{m1} * H_2(x-L_2) \right| \\
 & + (N-2) Q_m * H_1(x-L_1) * H_2(x-L_2) + \dots \\
 & + (N-(2k+1)) \frac{1}{2} \left| Q_{m2} * H_{1,k} * H_{2,k}(x-L_1) + Q_{m1} * H_{1,k} * H_{2,k}(x-L_2) \right| \\
 & + (N-2k) Q_m * H_{1,k} * H_{2,k} + \dots
 \end{aligned}$$

| 84 |

donde N = número de celdillas unidad

$H_{1,k} = H_1$, $(k-1)$ veces autoconvolucionada.

El número de términos de la ecuación anterior que tienen relevancia para la evaluación pueden ser directamente tomados del descenso gradual de la función $Q(x)$ experimentalmente determinada. En el caso de fuertes distorsiones el primer término de la función $Q(x)$ ($Q_m(x)$) convolucionado en torno al pico de orden cero, que es el único término no ensanchado, es tan predominante, que en una primera aproximación solo este $Q_m(x)$ necesita ser deconvolucionado.

BIBLIOGRAFIA

1. Kreutz, W., Pape, E.H., Summer Institute on the Physics of Biological Membranes (Colbow, K., Ed.), Vancouver B.C., Canada (1978).
2. Kreutz, W., Advances in Botanical Research, Academic Press Inc., New York.
3. Worthington, C.R., Khore, R.S., Biophys. J., 23, 407 (1978).
4. Kreutz, W., Habilitationsschrift D 83, Technische Universität Berlin (1968).
5. Pape, E.H., Biophys. J. 14, 284 (1974).
6. Pape, E.H., Kreutz, W., J. Appl. Cryst. 11, 421 (1978).
7. Marquardt, D.W., J. Soc. Ind. Appl. Math. 11, 431 (1963).
8. Gbordzoe, M.K., Kreutz, W., J. Appl. Cryst. 11, 489 (1978).
9. Vainshtein, B.K., Diffraction of X-Rays by Chain Molecules, Elsevier Publishing Co. (1966).
10. Hosemann, R., Z. Phys. 1, 128 (1950).
11. Hosemann, R., Makromolekular Chem. Sppl. 1, 559 (1975).
12. Hosemann, R., Baltá Calleja, F.J., Ber. Bunsenges Phys. Chem. 84, 91 (1984).
13. Baltá Calleja, F.J., Hosemann, R., J. Appl. Cryst. 13, 521 (1980).
14. Hosemann, R., Baychi, S.N., Direct Analysis of Diffraction by Matter, North-Holland Publishing Co., Amsterdam (1962).

3. EXPERIMENTAL

3.1. PREPARACION DE MUESTRAS ORIENTADAS

La originalidad del trabajo descrito en la presente Memoria consiste en realizar el análisis sobre muestras de cerebrósidos orientadas. Como ya se expuso en la sección anterior la información que se puede extraer con este tipo de muestras es mucho más completa.

Sin embargo, la preparación de empaquetamientos de bicapas lipídicas orientadas en una dirección determinada es sumamente compleja dado que estos sistemas son altamente sensibles a cambios en la humedad relativa y temperatura, que pueden ocasionar cambios estructurales destacados en bicapas de dichos compuestos.

Entre los numerosos procedimientos de orientación descritos en la bibliografía (1.-10) tanto para bicapas lipídicas como para biomembranas, se han aplicado en este trabajo aquellos que por su economía de medios y bondad en sus resultados se juzgaron los más adecuados para alcanzar los objetivos previstos.

Todos los métodos analizados se basan, principalmente, en el uso de un material cuya superficie sea inductora de orientación. Esta se consigue mediante la interacción de tipo electrostático que se presenta entre la superficie del material soporte y las moléculas anfifílicas de lípido. Dicha superficie atrae al grupo molecular de características eléctricas similares y repele el resto provocando de esta forma una orientación sobre una primera monocapa que es susceptible de extenderse a toda la muestra (fig. 3.1). Tales métodos se describen a continuación:

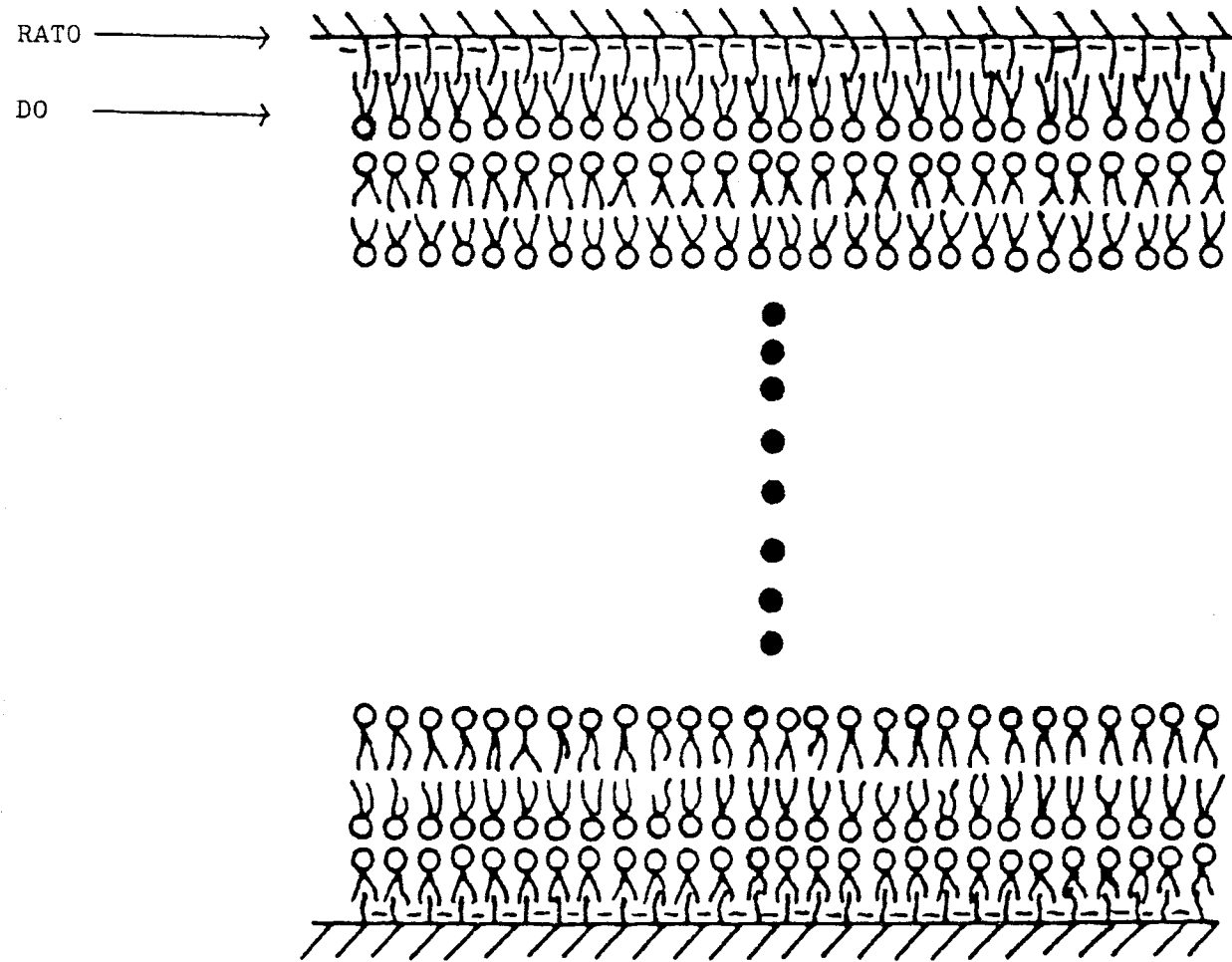


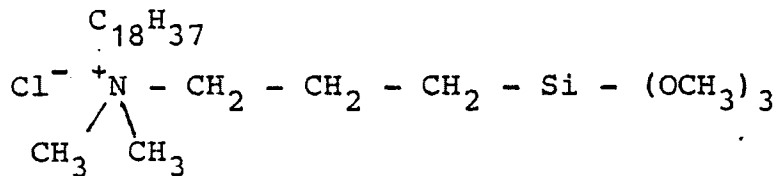
FIG. 3.1

i) Construcción de "multisandwich".

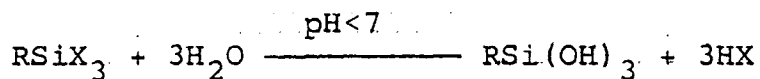
Este método fue elaborado por Hentschel y colaboradores (11), siendo aplicado en primera instancia al fosfolípido dipalmitoil lecitina. Originariamente este procedimiento consiste en la preparación de un "multisandwich" compuesto por cien películas de un material comercial cuya superficie es altamente hidrofílica, conocido por Mylar, alternando con multicapas de fosfolípido. El espesor de cada lípido así como el de cada película de Mylar es de unas 5 micras. Este "multisandwich" se construye depositando alternativamente una película de Mylar de dicho grosor y una pequeña cantidad del compuesto a estudiar que puede contener una cierta proporción de agua. A continuación se calienta hasta una temperatura de unos 60°C y se comprime.

A temperatura ambiente la muestra cuya altura será de, aproximadamente, 1 milímetro se corta en tiras de 1 x 10 milímetros. Finalmente el conjunto de tiras con las dimensiones indicadas se monta en un tubo capilar transparente a la radiación X, el cual se sella por fusión del extremo abierto.

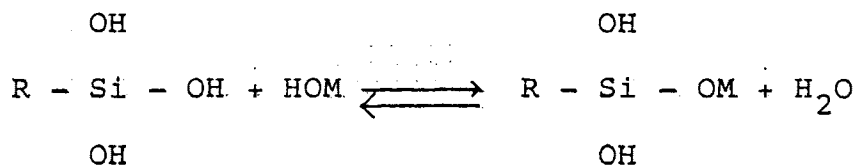
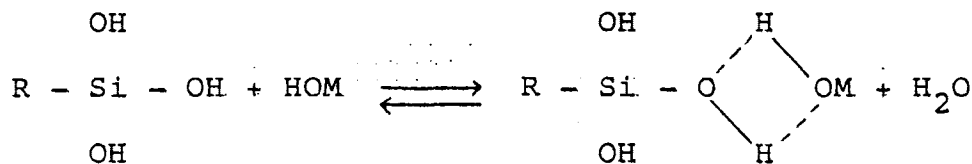
Este método puede presentar otras variaciones. Una de ellas consiste en cambiar la naturaleza eléctrica de la superficie del soporte. Para invertir este comportamiento hidrofílico se puede utilizar superficies tratadas con agente silanizante siguiendo el método de Kahn (12). Este sistema consiste en introducir el sustrato en una disolución diluída de silanizante. Se utilizó como agente silanizante el DMOAP, octadecil-dimetil-13-(trimetoxisilil)-propil cloruro de amonio, al 50 % en metanol. Su fórmula es la siguiente:



El DMOAP es un alcoxisilano, RSiX_3 . R es un grupo hidrofóbico y X son grupos alcoxi hidrolizables. Los alcoxisilanos no reaccionan directamente con la superficie; antes han de hidrolizarse:



Una vez sufrida la hidrolisis ya están en condiciones de adsorberse sobre la superficie hidrofílica de dos formas:



donde HOM representa a los grupos OH polares en la superficie del sustrato.

Posteriormente se realizan varios lavados con objeto de eliminar el DMOAP en exceso.

En ambos casos existe la posibilidad de una nueva hidroli-

sis del complejo silanizante-sustrato que originaría un desplazamiento de las anteriores reacciones hacia la izquierda desprendiéndose el silanizante de la superficie. Este proceso se puede evitar tratando el sustrato a 110°C durante una hora.

En la figura 3.2, se presenta el aspecto que ofrece el sustrato limpio y cubierto con silanizante y la influencia de los dos en el proceso orientador de las multicapas de lípido. En el caso de tratamiento de la superficie con silanizante las cadenas hidrocarbonadas del DMOAP se orientan perpendicularmente a la superficie del mylar y por lo tanto, serán las colas hidrocarbonadas de las moléculas de lípido las que presentarán una tendencia mayor hacia el sustrato.

Este método presenta el inconveniente de que la muestra que será posteriormente analizada incorpora el soporte que ha sido utilizado para su preparación, lo que, en algunos casos, puede dificultar el estudio que se va a realizar sobre la misma.

ii) Método de Langmuir-Blodgett.

Este método propuesto por Levine y Wilkins (13) consiste en formar multicapas de lípido utilizando el sistema de "pesca" de la monocapa ideado por Langmuir-Blodgett (14, 15). En primer término, es preciso construir una monocapa estable del lípido a estudiar sobre una superficie líquida que normalmente es agua. Esta monocapa se obtiene por dispersión de una disolución del lípido sobre agua en una balanza de superficie. Para dicha disolución se emplea un disolvente orgánico que actúa como extendedor, es decir, se encarga de esparcir las moléculas de lípido sobre la superficie acuosa. Además, los disolventes empleados han de ser voláti-

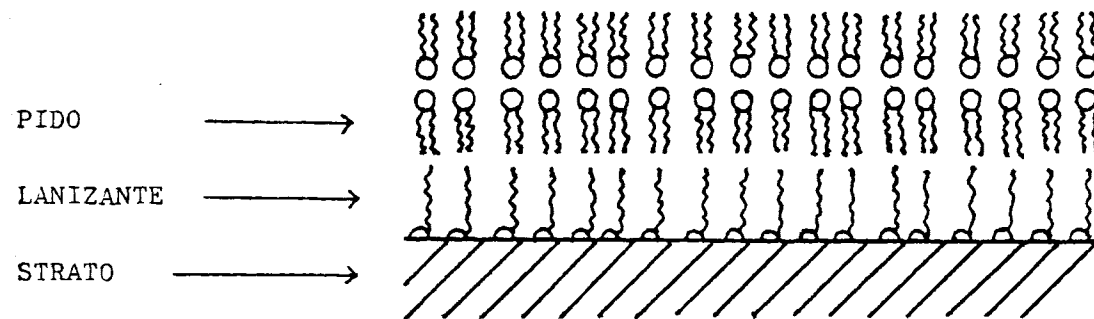
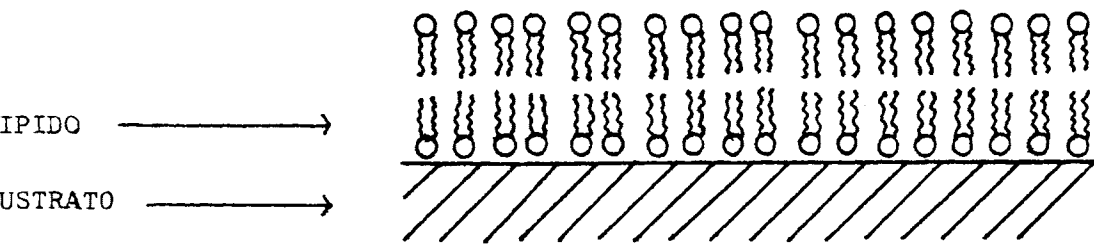


FIG. 3.2

les con objeto de no interferir en la construcción de la monocapa. Unos pocos microlitros de esta disolución se inyectan a través de una microjeringuilla sobre la superficie acuosa de una balanza de superficie. Un esquema de esta balanza se ofrece en la figura 3.3. El puente móvil se desplaza sobre la superficie acuosa presionando sobre los elementos que se encuentran en la misma en tanto que sobre el puente fijo el sistema acoplado al mismo registra el aumento de presión que se está ejerciendo en dicha superficie, correspondiendo a una ordenación de máximo empaquetamiento monomolecular del lípido.

El proceso de compresión finaliza justamente a una presión inmediatamente por debajo de la presión de colapso (en la cual las moléculas rompen la estructura en monocapa) con objeto de obtener una monocapa lipídica lo más compacta posible. La figura 3.4, representa gráficamente el proceso de formación de dicha monocapa.

El siguiente paso es propiamente el procedimiento de "pesca" sucesiva de la monocapa sobre un soporte adecuado. Dicho soporte debe presentar la mayor homogeneidad posible en su superficie y como en el caso anterior poseer características electrostáticas bien definidas. Así, por ejemplo, es utilizado como soporte, en algunos trabajos, cubreobjetos de vidrio (13, 14). Otros autores (16, 17) prefieren utilizar soportes con superficies hidrofóbicas como resina epoxi fabricada a partir del producto comercial Epon 812 (Shell Oil Co.), siendo curado entre dos portaobjetos cubiertos con tetrafluoretileno separados por cubreobjetos de vidrio. El soporte finalmente se obtiene como una fina lámina altamente

- A -Amplificador diferencial
- M₁ -Moto-reductor que acciona el hilo de torsión
- P₁¹ -Potenciometro
- M₂¹ -Motor que acciona la barrera movíl
- P₂² -Potenciometro
- R² - Registro gráfico X-Y

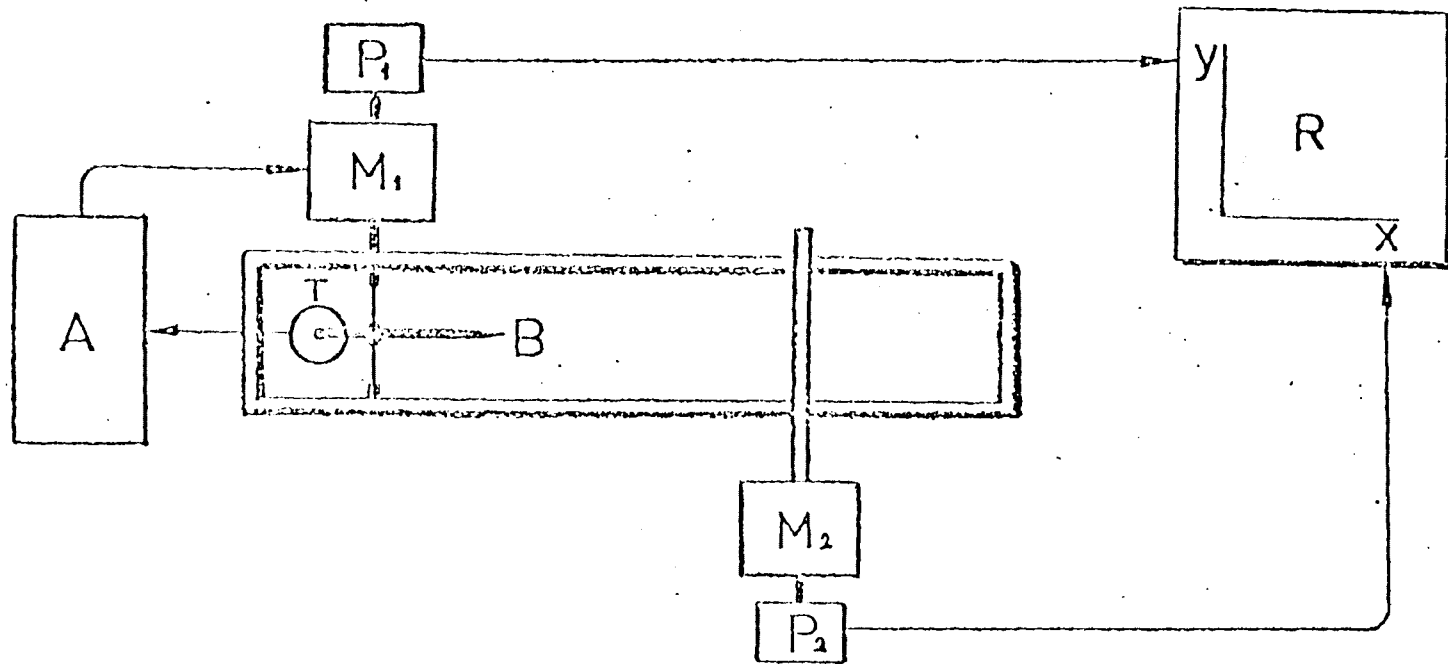
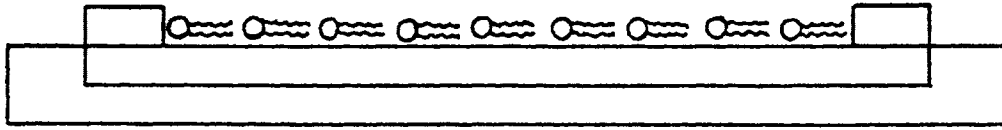
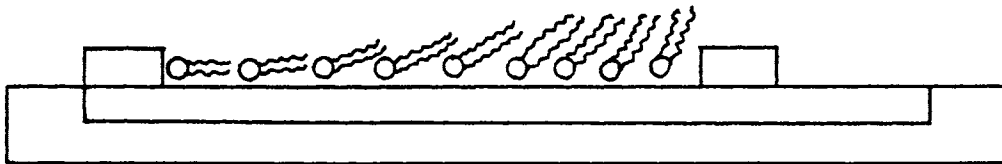


FIG. 3.3

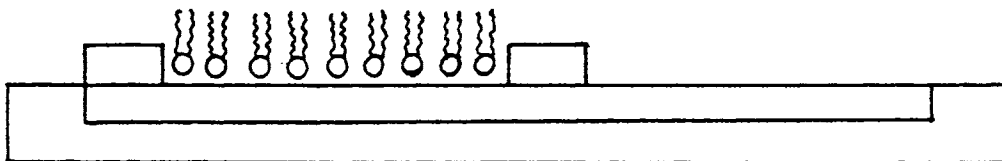
DESCRIPCION DE LA BALANZA DE SUPERFICIE



a) Extensión del Lipido en la superficie acuosa



b) Compresión de la capa superficial



c) Obtención de la monocapa

FIG. 3.4

hidrofóbica.

Dicho soporte se coloca perpendicularmente a la monocapa y mediante un equipo mecánico apropiado se hace pasar sucesivamente la laminilla a través de la monocapa capturando cada vez una monocapa (fig. 3.5). Este procedimiento va acompañado con una compresión automática de tal forma que la presión superficial se mantenga constante. Es necesario precisar que si la superficie del soporte es hidrofílica entonces será necesario previamente sumergir el mismo para que en el momento en el cual atraviese la monocapa ésta pueda ser atrapada en su superficie. Para ello normalmente se sumerge el soporte antes de formar la monocapa.

Con este procedimiento se han conseguido pescar, en algunos casos, hasta cincuenta monocapas (16). En este caso los resultados fueron realmente espectaculares, obteniendo cristales unidimensionales casi perfectos correspondientes a empaquetamientos de bicapas formadas por ácidos grasos asociados a iones alcalinos.

iii) Orientación por compresión mecánica.

Este método fue elaborado en primera instancia por Powers y colaboradores (18) cuyo objetivo era construir grandes conjuntos de bicapas de fosfolípidos mediante un procedimiento combinado de compresión mecánica y calefacción controlada de la muestra hasta una temperatura cercana a la correspondiente a la fase líquida-cristalina.

Este procedimiento presentaba, a priori, unos buenos resultados. Sin embargo, Asher y colaboradores (19) estimaron que un calentamiento de la muestra podría en algunas circunstancias llegar a desnaturalizar el compuesto a estudiar. Por otro lado, al

tratar con muestras que contenían agua, ésta podría originar defectos en el alineamiento si, como es corriente, la temperatura que se desea alcanzar es relativamente alta (150°C para dipalmitoilfosfatidilcolina con un 7% de agua en peso). Por todas las razones arriba indicadas estos autores propusieron un proceso en el cual se evita la calefacción.

El fundamento del método es el mismo que el descrito por Hentschel (11) para la construcción del multisandwich, pero en este caso la muestra se coloca solamente entre dos superficies que posean características adecuadas para inducir orientación. El lípido que va a ser orientado se coloca entre dos soportes, que usualmente son dos portaobjetos de microscopio, separados por dos espaciadores elásticos (goma, plástico,...) cuya anchura dará el grosor final de la muestra. Este conjunto se monta en una prensa apropiada como la mostrada en el figura 3.6. En esta prensa la tensión dentro de la muestra puede ser controlada por los tornillos que comprimen los portaobjetos. El proceso de prensado es realizado lentamente alternando compresión y descompresión en cada tornillo. Los autores aseguran que con este procedimiento se eliminan algunos defectos de origen cinético dentro del empaquetamiento. Esta afirmación queda corroborada por experimentos combinados de microscopía polarizada y de campo oscuro sobre fosfolípidos. El soporte sobre el cual se va a realizar el proceso de alineamiento debe ser lo mas homogéneo posible puesto que la orientación se lleva a cabo sobre una muestra de unas 50 micras de grosor, en tanto que el método de Hentschel el espesor del material biológico a tratar era de 5 micras. Esto obliga a extremar

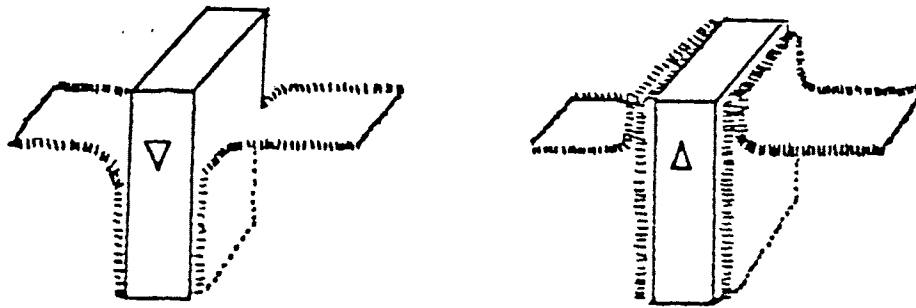


FIG. 3.5

ESQUEMA DEL METODO DE LANGMUIR - BLODGETT

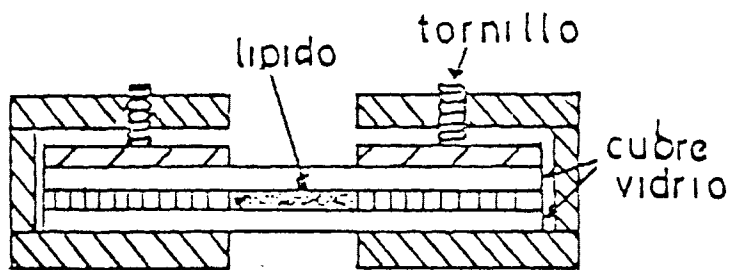


FIG. 3.6

SISTEMA DE COMPRESION MECANICA

el cuidado en la preparación del soporte evitando, en lo posible, contaminación por impurezas ambientales. En este sentido los portaobjetos tratados con agente surfactante, por ejemplo el DMOAP ya descrito, son más aconsejables puesto que son menos proclives a ser contaminados por elementos ambientales. Estos soportes una vez tratados con el silanizante son guardados en atmósfera de nitrógeno.

El lípido que va a ser tratado se disuelve en compuestos orgánicos, en el caso de cerebrósidos se encontró como mejor disolvente una mezcla de metanol/cloroformo 2/1. A continuación se deposita esta disolución sobre una superficie de 1 cm^2 aproximadamente del portaobjeto, dejando evaporar lentamente el disolvente en suave corriente de nitrógeno. Una vez terminado el proceso de evaporación se colocan los espaciadores de cinta de teflón de unas 50 micras y se introduce el conjunto en la prensa procediéndose como ya se mencionó más arriba.

Este método presenta una ventaja sobre el resto en el sentido de que el soporte no está incluido dentro de la muestra y, por tanto, se tiene la garantía de que ésta se compone totalmente por el sistema que se va a estudiar. Sin embargo, el proceso de orientación está menos favorecido porque a igualdad de materiales el espesor de la muestra es mucho mayor en este último caso, existiendo una más alta probabilidad de presencia de distorsiones.

Una vez finalizado el proceso de prensado se corta la muestra en tiras de 1×10 milímetros y se introducen en un capilar Mark de vidrio de dos milímetros de diámetro en cual se monta en un portamuestras para la realización del diagrama de difracción a ángulos bajos.

3.2. GEOMETRIA DE LA CAMARA DE DIFRACCION A BAJO ANGULO

La distinción entre ángulos altos y ángulos bajos en difracción de rayos X reside en el ángulo al cual la radiación es refractada y que viene definido por la ley de Bragg. No existe un límite claro para el cual se pueda decir que una reflexión corresponda a ángulos altos o bajos, pero, en general, ángulos que correspondan a espaciados mayores de 30 \AA son considerados pequeños (20). Así, los sistemas de biomembranas y bicapas lipídicas son estudiados por técnicas de difracción a ángulos bajos dado que la unidad repetitiva en estos sistemas presenta espaciados que oscilan entre unas decenas y varios centenares de \AA .

La técnica de difracción de rayos X a ángulos bajos requiere un especial cuidado, ya que al operar por transmisión se debe centrar el sistema de colimación con una gran precisión y buscar la resolución adecuada al efecto de difracción que se desea medir. En este sentido es preciso comentar que la fuente de alto voltaje del tubo de rayos X debe ser convenientemente regulada dado que la posible inestabilidad en el alto voltaje causaría un cambio de posición en el punto de enfoque situado en el ánodo del tubo. Esto destruiría el alineamiento de la cámara con el haz primario de rayos X.

La colimación de rayos X puede realizarse usando diversos sistemas: rendijas (21), colimadores puntuales (22), cámara de Kratky (23), focalización por reflexión (24) y focalización por difracción (25). En el presente trabajo hemos utilizado una cámara de difracción de rayos X diseñada por Kiessig (26) con colima-

ción puntual. Al equipo inicial de colimadores que poseía la cámara se añadió uno de 0.2 milímetros de diámetro construida y diseñada en nuestro taller con objeto de obtener una mayor resolución. La cámara se acopló a un generador de rayos X de ánodo rotatorio de 12 Kw de potencia fabricado por la casa Rigaku-Denki usándose foco normal de tamaño $0.5 \times 1 \text{ mm}^2$ en la superficie del ánodo. La radiación empleada es la correspondiente a la $k\alpha$ del Cu filtrada con níquel. La cámara de Kiessig consta de una serie de cuatro colimadores puntuales. En todos los experimentos realizados con esta cámara se ha usado la combinación 0.3/0.5/0.3/0.2/∅ milímetros. La figura 3.7, representa esquemáticamente el principio básico de la cámara de colimación puntual empleada, donde por simplicidad solo se representan los colimadores primero y cuarto que definen la divergencia del haz. Las letras representadas en esta figura tienen el siguiente significado; s, placa interceptora del haz, P, película fotográfica, D, espesor de la muestra (en los experimentos realizados era aproximadamente de 1 mm), ℓ , distancia entre colimadores, A, distancia muestra-film, F, distancia del foco a la placa fotográfica y r, radio del anillo de difracción. En orden a conocer la resolución angular de la cámara se puede calcular, en primer lugar, la divergencia angular del haz incidente ϵ , que viene dada por los diámetros de los colimadores c_1 y c_4 y la distancia que los separa, la cual está fijada para esta cámara siendo de 200 milímetros.

$\epsilon = c_1 + c_2 / \ell$, sustituyendo los valores c_1 , c_2 y ℓ empleados en este trabajo $\epsilon = 0.3 + 0.2 / 200 = 0.0025 \text{ rad}$.

No es conveniente emplear colimadores de menor diámetro, más aún si se pretende analizar la intensidad difractada, puesto que dicha intensidad disminuye rápidamente sobre todo si se consideran ángulos pequeños, como es el caso.

La anchura del haz primario en el plano del film, suponiendo la aproximación de ángulos bajos $\sin \theta \approx \theta$ viene dada por:

$$S = \epsilon \cdot A + D$$

El diámetro de la placa interceptora, ϕ_s , obviamente debe ser mayor que s .

La distancia muestra-film empleada en este trabajo con la cámara Kiessig fue de 200 mm. Así pues:

$$s = 0.0025 \times 200 + 1 = 1.5 \text{ mm}$$

La placa interceptora posee un diámetro de 3 mm.

La resolución alcanzada depende del diámetro de los colimadores c_1 y c_4 así como de las distancias muestra-film y entre colimadores:

$$\theta = \frac{s/2}{F} = \frac{s/2}{A+1(c_2/c_1+c_2)}$$

En este caso:

$$\theta = \frac{1.5/2}{200+200(0.2/0.3+0.2)} = 0.00268 \text{ rad}$$

El espaciado mayor registrado se puede obtener con la ecuación:

$$d = \frac{2\lambda A}{s+D+A \cdot \epsilon}$$

que para la radiación k_2 del ánodo de Cu utilizado, cuya longitud de onda es $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, toma el valor $d = 205 \text{ \AA}$.

Para otras distancias muestra-film empleadas se obtienen los siguientes valores de resolución y mayor espaciado:

<u>A (mm)</u>	<u>θ (rad)</u>	<u>d (\AA)</u>
100	6.9×10^{-3}	100
500	3.9×10^{-3}	375

En algunos experimentos también se ha empleado la cámara de ángulos bajos construída por Rigaku. Esta cámara también utiliza un sistema de colimación puntual tal como se representa esquemáticamente en la figura 3.8. Las condiciones de trabajo fueron en este caso: c_1 ($\phi = 0.3 \text{ mm}$), c_2 ($\phi = 0.2 \text{ mm}$), $s = 1.5 \text{ mm}$, $c_P = 250 \text{ mm}$, $c_L = 250 \text{ mm}$.

El diámetro del haz primario en el plano de la película se calcula mediante la siguiente relación:

$$s = c_2 + \frac{c_P}{c_C} (c_1 + c_2) = 0.7 \text{ mm}.$$

La resolución viene entonces expresada como:

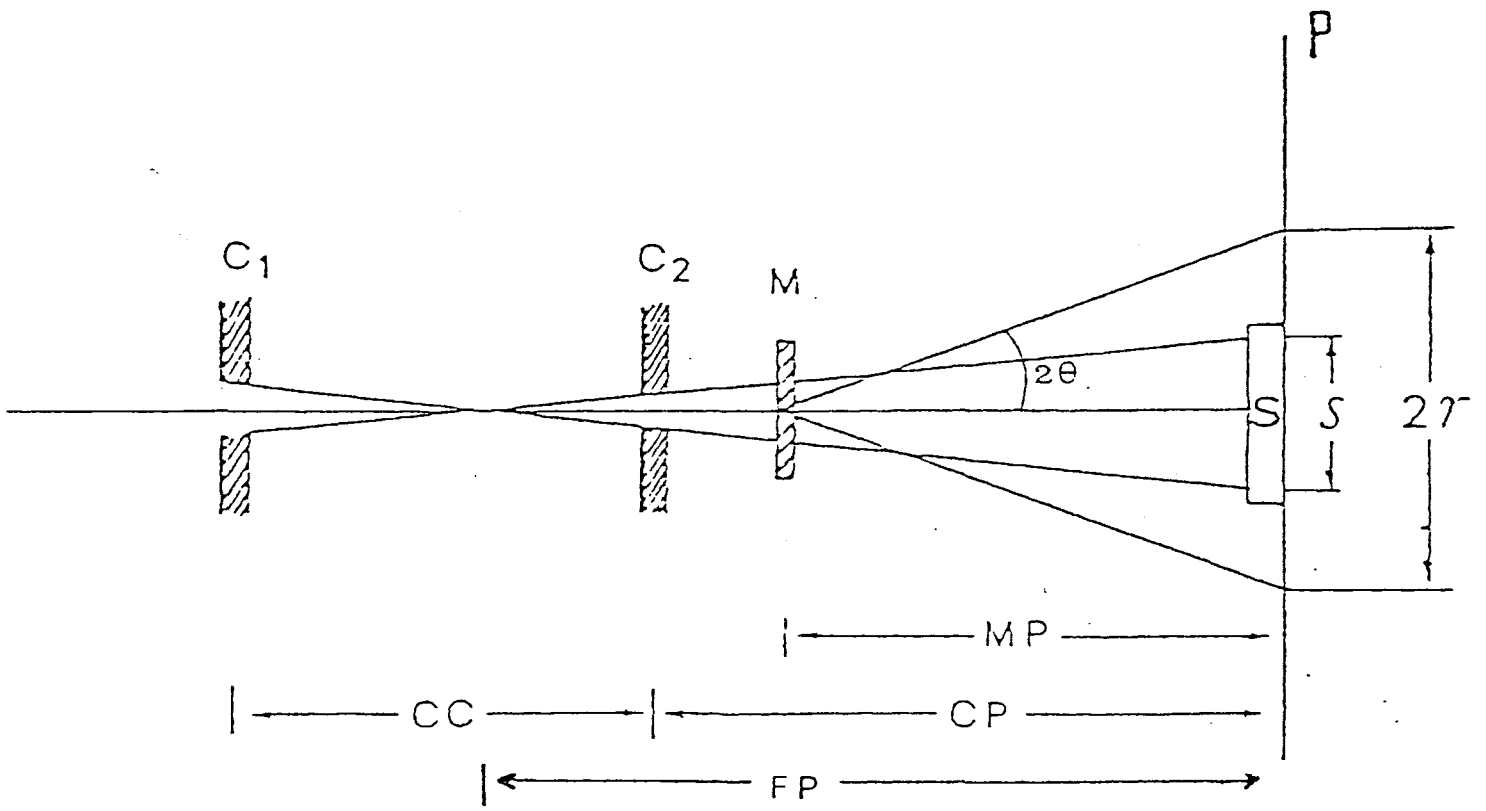


FIG. 3.8

$$\theta = \frac{s/2}{FP} = \frac{s/2}{cP + cc(c_2/c_1 + c_2)}$$

que para los valores dados anteriormente:

$$\theta = \frac{0.7/2}{250 + 250(0.2/0.5)} = 0.001 \text{ rad}$$

Para obtener el valor real de la resolución es preciso considerar el diámetro de la placa interceptora ($s = 1.5 \text{ mm}$) en lugar del diámetro del haz primario, $s = 0.7 \text{ mm}$

$$\theta_{\text{real}} = \frac{s/2}{FP} = 0.0021$$

La ley de Bragg para ángulos pequeños relaciona el espaciado con el ángulo de difracción. Considerando los datos ya mencionados, el espaciado máximo observable será:

$$d_{\text{max}} = \lambda_{\text{Cu}}/2\theta = 366 \text{ \AA}$$

Como ya se mencionó anteriormente el espesor de las muestras fue de aproximadamente 1 mm. El tiempo de exposición de aquellas estaba comprendido entre 30 minutos para registrar el primer orden de difracción, que coincidía con la reflexión más intensa, y 40 horas para las más débiles.

La potencia del generador se operó a 8 Kw (200 mA/40 Kv). Dentro de la cámara se realizó vacío proporcionado por una bomba rotatoria entre la muestra y la película con objeto de eliminar

el scattering producido por las partículas de aire, que oscurecerían la película.

Los difractogramas fueron registrados en películas Kodirex de la casa Kodak cuyas características son: granulidad 11×10^3 , densidad de ennegrecimiento media, velocidad del film para el Cu 38, factor del film 2.65 %. Las películas fueron sometidas a un proceso de revelado en revelador G-150 de Agfa-Gevaert siendo el tiempo del tratamiento 5 minutos a una temperatura de 22°C.

Los registros fotográficos de difracción se fotometraron, previo calibrado del aparato, con un microdensitómetro Joyce-Loebl MKIII-C5. Las condiciones empleadas en los registros fueron: anchura de rendija, 90-100 μm , brazos de ampliación 1/20 y 1/50, cuñas (atenuadores ópticos) F-960, D-951, B-784, A-770 y A-757 de densidades ópticas 2.34, 1.67, 0.90, 0.43, 0.40 respectivamente.

En la figura 3.9, se muestra una fotografía obtenida con una de las cámaras de difracción y el perfil densitométrico correspondiente.

3.3. ANÁLISIS DE LOS PERFILES DE DIFRACCIÓN

Antes de comenzar los cálculos con los datos recogidos en los diagramas de difracción, es preciso realizar un refinamiento de los datos experimentales con objeto de obtener los datos fidedignos sobre el sistema en estudio.

El análisis del diagrama obtenido consta de los siguientes

FIG. 3.9

pasos:

- 1.- Separación del fondo o "background" debido a la difracción no coherente.
- 2.- La resolución del solapamiento de las reflexiones separando la contribución de cada máximo.
- 3.- Cálculo de las posiciones de los máximos.
- 4.- Evaluación de las intensidades normalizadas y anchuras integrales corregidas de los picos.

La radiación de fondo recogida en el difractograma procede de varios factores ajenos al sistema lamelar en estudio, por ejemplo, la difracción procedente de las partículas de aire o la influencia del proceso de revelado sobre la fotografía obtenida. Este fondo puede ser separado tomando una fotografía sin muestra en las mismas condiciones de tiempo de exposición, potencia de trabajo, y período de revelado que las empleadas para la obtención de la fotografía correspondiente al sistema lamelar de cerebrósidos.

Los distintos máximos de difracción correspondientes, en nuestro caso, a los diferentes órdenes de la reflexión producida por el orden lamelar, fueron separados utilizando un analizador de curvas Dupont aplicado sobre la lectura microdensitométrica de la placa fotográfica de cerebrósidos.

En la figura 9 se ilustra el resultado obtenido con este método de separación de las distintas reflexiones.

3.3.1. Determinación de la posición de la reflexiones.

La posición de las reflexiones puede ser determinada de dos formas distintas: por la situación de su centro de gravedad (media de la distribución) o por la posición del máximo (moda de la distribución). La diferencia entre estas dos medidas depende fundamentalmente de las condiciones de registro empleadas (27).

Sin embargo, dado que en nuestros casos el parámetro de asimetría es cero los dos valores son aproximadamente iguales.

Atendiendo a la formulación de Bragg, la posición en grados (θ) viene expresada por

$$\theta = \frac{1}{2} \text{ arc tg } \frac{r/D}{\ell} \quad |6|$$

donde r es la posición del máximo según el registro densitométrico, D el brazo de ampliación utilizado en dicho registro y ℓ la distancia muestra-film que en los experimentos realizados fueron: 100, 200 y 500 mm.

3.3.2. Medida de la intensidad difractada.

Como ya se expuso en el capítulo anterior según se considere la intensidad difractada en torno a ángulo cero ó no, así se obtendrá un perfil de densidad electrónico en escala absoluta o relativa respectivamente. En el estudio de bicapas lipídicas es suficiente con tener en cuenta el perfil de densidad electrónica

relativa. Además, el cálculo de la intensidad en torno al origen plantea numerosas dificultades. Todos estos hechos nos han decidido a trabajar en una escala relativa, referida al pico más alto que aparece en el diagrama de difracción.

La expresión para la intensidad total difractada $I_c(b)$ restringida para difracción de Fraunhofer a una distancia r_0 de la muestra viene dado por

$$I_c(b) = f_e^2 f_\theta^2 (I_p/r_0^2) I(b) \quad |7|$$

donde f_e^2 es el conocido factor de Thomson de difracción del electrón:

$$f_e^2 = (e^2/m_0c^2)^2 \approx 1 \times 10^{-25} \text{ cm}^2$$

$$f_\theta^2 = \text{factor de polarización} = \frac{1}{2}(1 + \cos^2 2\theta)$$

I_p = intensidad del haz primario

$I(b)$ = distribución de intensidad dependiente de la estructura.

r_0 = distancia de la muestra al plano de registro.

El término $I(b)$ es el único dependiente de la estructura, los demás valores son constantes para unas determinadas condiciones experimentales. Sin embargo, en la mayoría de los casos la intensidad registrada que depende de la estructura debe ser corregida eliminando las aportaciones a dicha intensidad producidas por el equipo experimental (nominado con índice s en $I(b)$) y

la geometría de la muestra (índice L en $I(b)$). En el siguiente epígrafe se describen los procedimientos de correlación (corrección) entre los valores no corregidos de la intensidad $I_{S,L}(b)$ y los reales $I(b)$.

3.3.3. Corrección de la intensidad difractada.

Una de las razones por las que no es posible registrar $I(b)$ es que en la mayoría de los casos no podemos usar un haz primario con sección puntual sino con una sección de determinada forma geométrica según el sistema de colimación empleado. Este hecho da lugar a un error de colimación que "difumina" los valores de $I(b)$ resultando la curva $I_S(b)$. El grado de "difusión" depende de la razón entre la estructura fina de la curva de difracción y las dimensiones de la sección del haz primario. Existen varios métodos que extraen la curva real de scattering $I_L(b)$ de los datos medidos $I_{S,L}(b)$ (28-31).

La segunda corrección viene motivada por la extensión lateral del sistema lamelar. Este factor de corrección se conoce por factor de Lorentz. El origen de este factor reside en el hecho de que las estructuras reales no son idealmente monodimensionales y que también las dimensiones de los planos promediadas en el espacio, contribuyen a la distribución de masa en la dirección de empaquetamiento.

Después de la corrección por el error de colimación, la intensidad viene dada por:

$$I_L(b) = f_L I(b)$$

|8|

donde f_L es el factor de Lorentz.

El factor de Lorentz para sistemas lamelares fue calculado por Porod (32) para capas extendidas infinitamente. En la práctica $1/b^2$ es una aproximación suficientemente buena para el caso de extensión finita en cada capa. Así pues, el valor real de la intensidad difractada por una estructura lamelar unidimensional se obtiene multiplicando $I_L(b)$ por b^2 :

$$I_L(b) \cdot b^2 = I(b) = |A(b)|^2$$

|9|

BIBLIOGRAFIA

1. Lesslaner, W., Cain, J.E., Blasie, J.K., Proc. Natt. Acad. Sci., USA 64, 1499 (1972).
2. Blaurock, A.E., Stoeckenius, W., Nat. New Biol. 233, 152 (1971).
3. Blasie, J.K., Biophys. J. 12, 191 (1972).
4. Worchester, D.L., Franks, N.P., J. Mol. Biol. 100, 345 (1976).
5. Saxena, A.M., Schoenborn, B.P., Biophys. J. 17, 47 (1977).
6. Libertini, L.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 64, 13 (1969).
7. Bangham, A.D., Horne, R.W., J. Mol. Biol. 8, 660 (1964).
8. Bogomolni, R.S. et al., Biophys. J. 21, 183 (1978).
9. Herbette, L., Marquardt, J., Biophys. J. 20, 245 (1977).
10. Herbette, L. et al., Biophys. J. 21, 205 (1978).
11. Hentschel, M., Hosemann, R., Helfrich, W., Z. Naturforsch. 35a, 643 (1980).
12. Kahn, F.J., Appl. Phys. Lett. 22, 386 (1973).
13. Levine, Y.K., Wilkins, M.H.F., Nature New Biol. 230 69 (1971).
14. Langmuir, I., Trans. Faraday Soc. 15, 62 (1920).
15. Blodgett, K.B., J. Am. Chem. Soc. 57, 1007 (1935).
16. McIntosh, T.J., Waldbillig, R.C., Robertson, J.D., Biochim. Biophys. Acta 448, 1 (1976).
17. Waldbillig, R.C., Robertson, J.D., McIntosh, T.J., Biochim. Biophys. Acta, 448, 15 (1976).
18. Powers, L., Pershan, P.S., Biophys. J. 20, 137 (1977).
19. Asher, S., Pershan, P.S., Biophys. J., 27, 393 (1979).

20. Worthington, C.R., J. Biol. Phys. 2, 1 (1974).
21. Worthington, C.R., J. Sci. Instr. 33, 66 (1956).
22. Kiessig, H., Kolloid Z. 98, 213 (1942).
23. Kratky, O., Z. Elektrochem. 58, 49 (1956).
24. Franks, A., Proc. Phys. Soc. 688, 1054 (1958).
25. Beereman, D.W., Rev. Sci. Instr. 26, 1048 (1955).
26. Kiessig, H., Sci. 11, 433 (1953).
27. Klug, H.P., Alexander, L.E., "X-Ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials", 2ª edición, J. Wiley, New York (1974).
28. Glatter, O., J. Appl. Cryst. 7, 147 (1974).
29. Kratky, O., Porod, G., Skala, Z., Acta Phys. Austriaca 13, 76 (1955).
30. Strobl, G.R., Acta Cryst. A26, 367 (1970).
31. Schelten, J., Hossfeld, F., J. Appl. Cryst. 4, 210 (1971).
32. Porod, G., Kolloid Z., 124, 83 (1951).

4. RESULTADOS

4.1.- MÉTODOS DE ORIENTACION

Los métodos de orientación empleados fueron ya referidos en la parte experimental. A continuación se describen los resultados en cada caso.

i) Método de Henstchel de construcción de multisandwich.

Como ya se mencionó anteriormente este método supone la formación de un "multisandwich" constituido por láminas de mylar y sistemas multilamelares de cerebrósidos (1). En principio fueron usadas láminas de mylar de 1 cm^2 previamente lavadas en etanol y secadas en acetona sobre las cuales se depositaba directamente una pequeña cantidad de material lipídico; colocando encima otra lámina de mylar y presionando el conjunto. Este procedimiento se repitió varias veces hasta obtener un "multisandwich" de 0.2 mm. de grosor aproximadamente. Posteriormente se cortó en tiras de 1.5 mm. y se montó en un capilar de 2 mm. de diámetro que fue colocado en el portamuestras de una cámara de ángulos bajos Kiessig de tal forma que el haz de rayos X incidiera perpendicularmente al eje de empaquetamiento. El diagrama de difracción resultante para una muestra de cerebrósido natural se presenta en la figura 4.1.

En dicho diagrama se puede observar un cierto grado de orientación, apareciendo un primer orden de difracción bastante fuerte y otros cuatro más débiles. Además se puede observar una reflexión en la dirección perpendicular situada a unos 170 \AA y un scattering continuo a ángulos más altos del correspondiente al quinto orden de difracción. Estos últimos detalles que no corres-

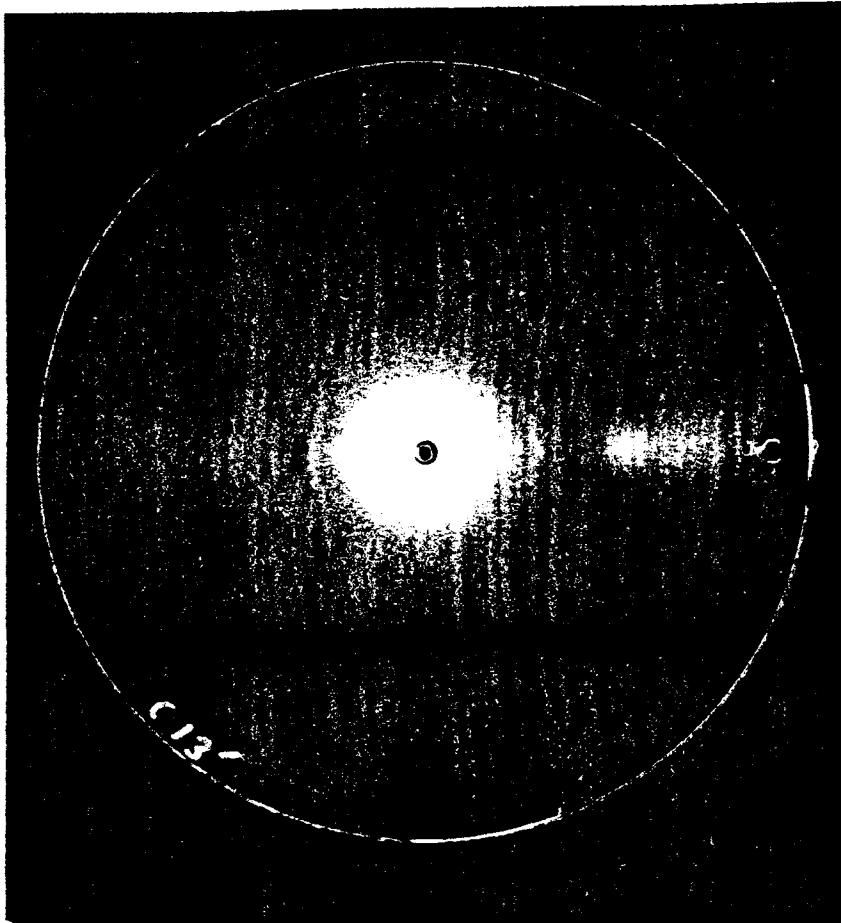


FIG. 4.1

DISTANCIA MUESTRA-FILM: 200 mm.

TIEMPO DE EXPOSICION: 24 h.

POTENCIA DE GENERADOR: 7.2 Kw

ponden a la difracción característica de un sistema multilamelar se asocian con la presencia en la muestra del soporte mylar. Efectivamente, en la figura 4.2 se presenta un diagrama de difracción de un empaquetamiento constituido solamente por mylar y tratado de forma similar al incorporado en las muestras de lípido. En dicha figura puede observarse con mayor nitidez la reflexión ecuatorial a 170 \AA así como el scattering meridional a ángulos más altos.

Posteriormente, con objeto de homogeneizar y rebajar el espesor entre las capas de lípido, se dejó evaporar lentamente una disolución de cerebrósido sobre un cuadrado de mylar de 50 cm^2 . Una vez finalizada la evaporación se corta en trozos de 1 cm^2 se apila y se continúa el tratamiento tal como se ha descrito anteriormente. En la figura 4.3 se presenta el resultado obtenido introduciendo esta modificación. Como puede apreciarse, el grado de orientación aumenta notablemente. Sin embargo la presencia, sobre todo, del scattering continuo oscurece el diagrama no permitiendo observar mas allá de la quinta reflexión.

El tratamiento del soporte mylar con silanizante, no parece tener una influencia apreciable sobre el grado de orientación, obteniéndose, en todos los casos, resultados similares a los alcanzados sin dicho procedimiento.

ii) Procedimiento de Langmuir-Blodgett.

Para obtener la monocapa de cerebrósido se disolvieron 5 miligramos de cerebrósido en 10 ml. de una mezcla 9:1 hexano : etanol con una concentración final de 0.56 mg/ml . Posteriormente se inyectan, a través de una microjeringuilla, doscientos microlitros

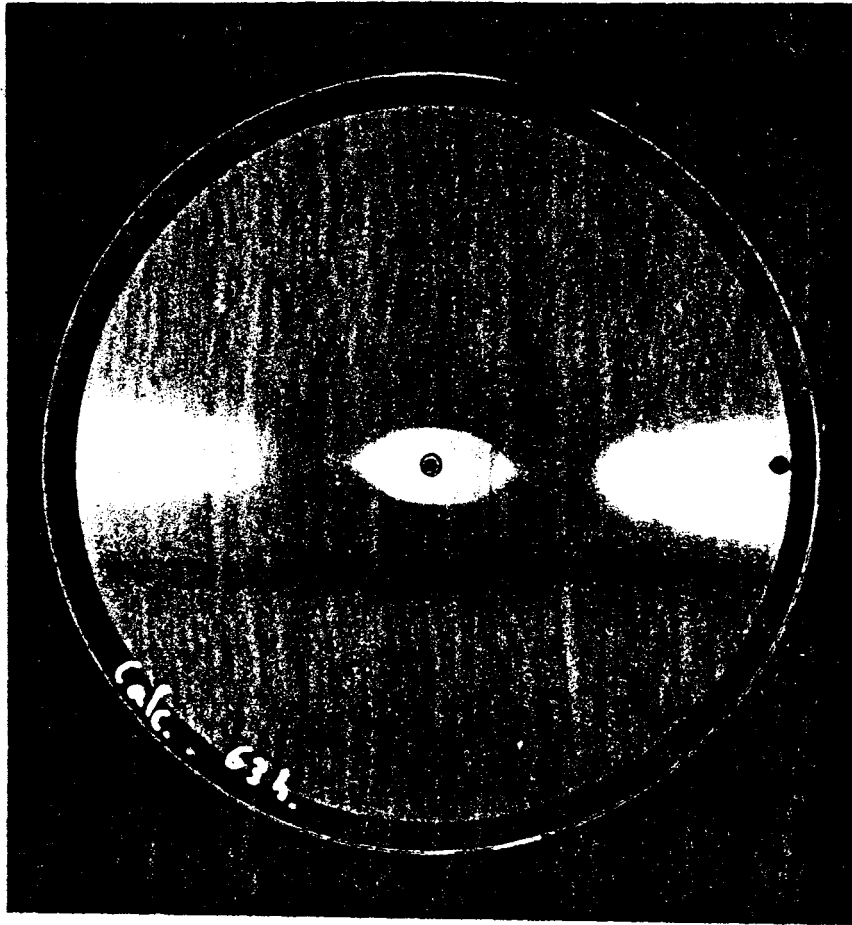


FIG. 4:2

DISTANCIA MUESTRA-FILM: 200 mm.

TIEMPO DE EXPOSICION: 63 h.

POTENCIA DE GENERADOR: 4 Kw.

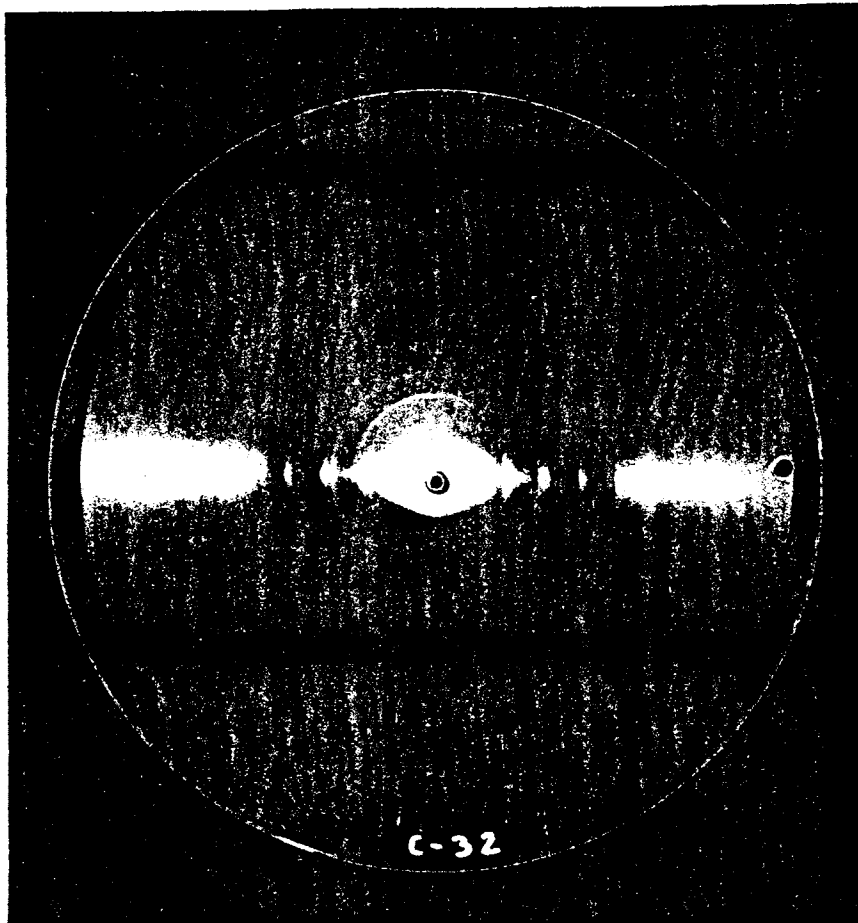


FIG. 4.3

DISTANCIA MUESTRA-FILM: 200 mm.

TIEMPO DE EXPOSICION: 24 h.

POTENCIA DE GENERADOR: 7.2 Kw.

de disolución sobre una superficie de agua tamponada a pH = 6.5 y a 25°C de temperatura. Seguidamente se procedió a comprimir la superficie lipídica desplazando lentamente el puente móvil. Una vez alcanzada una presión próxima a la del colapso se procedió a "pescar" la monocapa utilizando un soporte de 1 cm² de superficie por ambas caras constituido por una resina epoxi (epon 812, shell oilco.) curada entre dos portaobjetos fabricados con tetrafluoretileno (2).

A pesar de haber conseguido un soporte altamente hidrofóbico y con una superficie bastante homogénea no se pudo recoger más de una monocapa sobre la misma. Este punto se pudo comprobar midiendo la longitud que se había desplazado el puente móvil para mantener la presión constante. Esta cantidad se multiplica por la anchura del marco empleado cuyo valor es constante, resultando la superficie extraída en el procedimiento de "pesca", aproximadamente 2 cm².

También se ha intentado aplicar este método usando otros soportes: cubreobjetos de vidrio para microscopio y mylar, ambos sin alterar o sometidos a un tratamiento con silanizante. El resultado en todos los casos fue similar al mencionado anteriormente, reteniéndose únicamente una monocapa sobre la superficie del soporte en cuestión.

iii) Métodos de compresión mecánica.

Este método ha sido aplicado usando, en primer término, cerebrostido natural en polvo finamente dividido. Unos pocos miligramos se depositaban entre dos portaobjetos de vidrio convenientemente lavados y el conjunto era comprimido en una prensa como la

descrita en la figura 3.6. El tamaño de la película obtenida finalmente era de 0.7 mm. En la figura 4.4 se presenta el diagrama de difracción correspondiente a una muestra de cerebrósido natural preparada de la manera descrita anteriormente. La posterior modificación del tipo de soporte, por ejemplo: portaobjetos tratados con silanizante o papel aluminio comercial, no introducía ninguna mejora en el grado de orientación de la muestra. Con objeto de aumentar la eficacia de este proceso de orientación, que depende inversamente del espesor de la muestra comprimida (3), se disminuyó el grosor de la misma dejando evaporar lentamente, en corriente de nitrógeno, sobre una zona de 1 cm^2 de soporte, una disolución de cerebrósido natural en cloroformo: metanol 1:2. Una vez evaporado el disolvente se continuó con el proceso de compresión como en el caso anterior. El diagrama de difracción obtenido se presenta en la figura 4.5. En esta fotografía se puede apreciar un grado de orientación bastante aceptable, apareciendo hasta siete órdenes de difracción.

4.2.- DISTORSIONES PARACRISTALINAS

La presencia de distorsiones de primera o segunda especie en el empaquetamiento puede ponerse de manifiesto estudiando la relación existente entre la anchura integral de las distintas reflexiones y la posición de las mismas (4).

El cálculo de la anchura integral se realizó a partir del registro de densidad óptica obtenido empleando un microdensitóme-

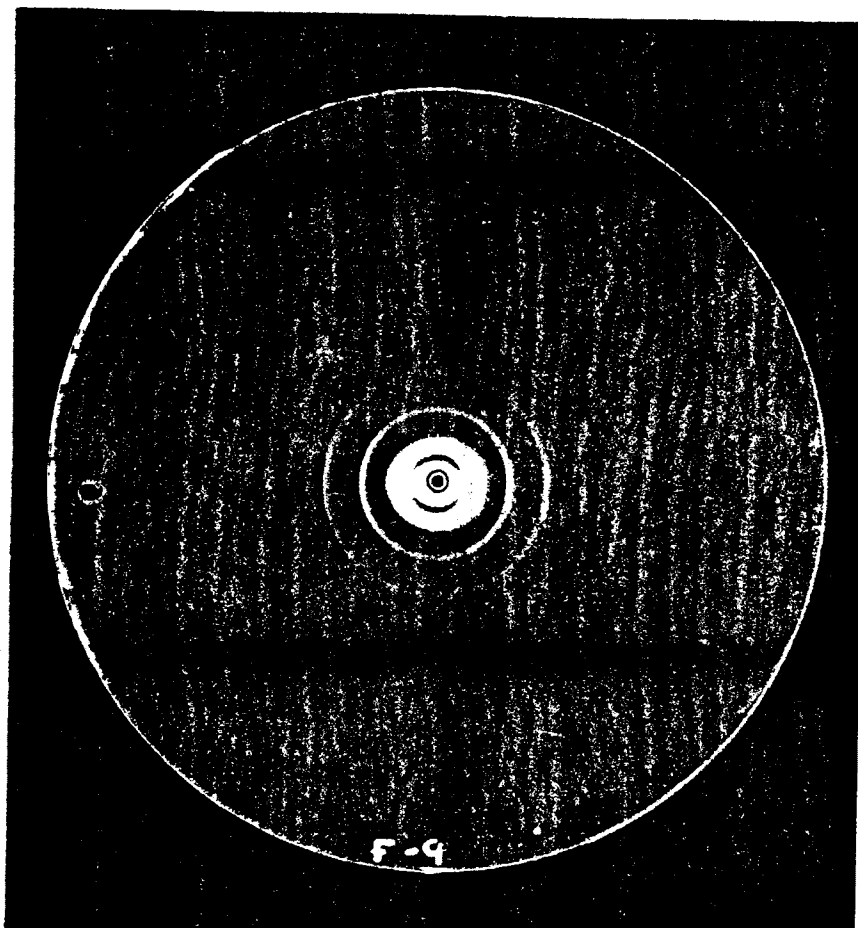


FIG. 4.4

DISTANCIA MUESTRA-FILM: 200 mm.

TIEMPO DE EXPOSICION: 24 h.

POTENCIA DE GENERADOR: 7.2 Kw.

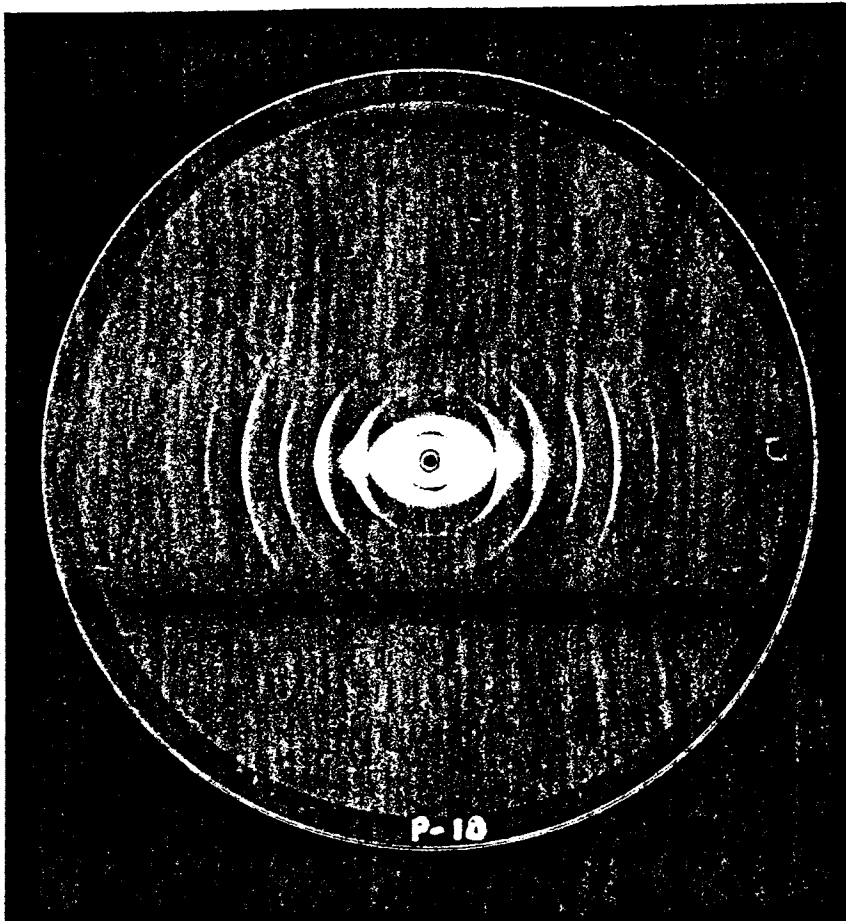


FIG. 4.5a

DISTANCIA MUESTRA-FILM: 200 mm.

TIEMPO DE EXPOSICION: 30 h.

POTENCIA GENERADOR: 7.2 Kw.

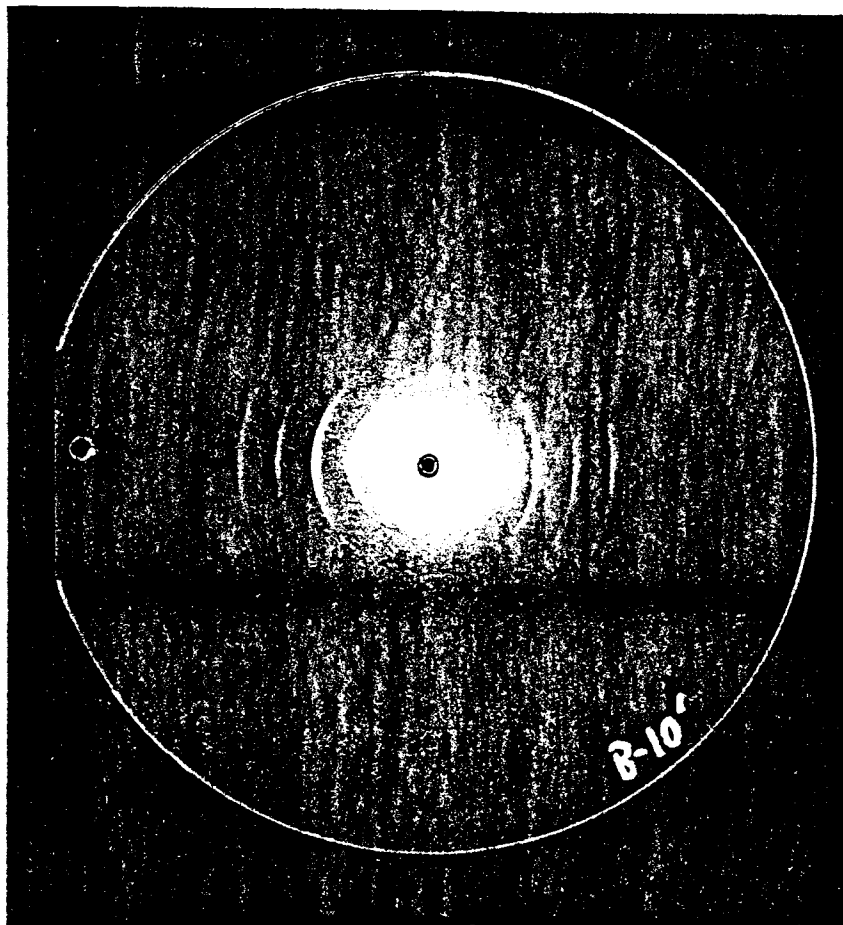


FIG. 4.5b

DISTANCIA MUESTRA-FILM: 200 mm.

TIEMPO DE EXPOSICION: 30 h.

POTENCIA DE GENERADOR: 7.2 Kw.

tro Joyce-Loebl. Los perfiles correspondientes a las distintas reflexiones fueron resueltos posteriormente mediante un analizador de curvas Dupont. En las Tablas I y II se presentan los valores de anchura integral $\delta\beta$, y posición del máximo de difracción, b , de las distintas reflexiones en la dirección meridional obtenidas para cerebrósido natural y Frenosina respectivamente.

En las figuras 4.6 y 4.7 se muestran las representaciones gráficas de anchura integral frente a posición del máximo de difracción correspondientes a los dos lípidos estudiados. Como puede apreciarse en dichas gráficas, existe una relación cuasiparabólica entre $\delta\beta$ y b lo que sugiere que la contribución de defectos de primera especie a la anchura observada es prácticamente despreciable.

Trabajos recientes, realizados con diferentes membranas (5-7), muestran que los apilamientos presentan considerables distorsiones de red de tipo paracristalino, debido a ondulaciones en las superficies de las membranas y a la naturaleza del empaquetamiento. El tratamiento, considerando distorsiones de segunda especie en la red, parece el más apropiado para estudiar estos sistemas (8).

De acuerdo con la teoría del paracristal se puede obtener la ecuación |75|, que presenta una relación lineal entre $\delta\beta$ y b^2 .

De esta misma expresión se pueden deducir los valores para el tamaño de los dominios que difractan coherentemente, D , el número de bicapas promedio por paquete, N y el grado de fluctuación paracristalina, g (9). Las figuras 4.8 y 4.9 muestran la linealidad de los valores de $\delta\beta$ frente a b^2 apoyando la presencia de dis-

TABLA I

Planos reticulares	$b \cdot 10^2 (\text{\AA}^{-1})$	I(b) corregida y normalizada	$\delta\beta \cdot 10^3 (\text{\AA}^{-1})$
(001)	1.564±0.002	100	1.1±0.1
(002)	3.111±0.002	44.7	1.4±0.1
(003)	4.662±0.002	30.3	1.9±0.2
(004)	6.207±0.003	9.5	2.9±0.3
(005)	7.746±0.003	15.3	4.1±0.3
(006)	9.276±0.004	6.1	4.9±0.4
(007)	10.796±0.005	7.1	6.6±0.5

TABLA II

Planos reticulares	$b \cdot 10^2 (\text{\AA}^{-1})$	I(b) corregida y normalizada	$\delta\beta \cdot 10^3 (\text{\AA}^{-1})$
(001)	1.540±0.002	100.0	1.0±0.1
(002)	3.080±0.002	33.4	1.5±0.1
(003)	4.613±0.002	25.2	2.3±0.3
(004)	6.143±0.003	22.3	2.9±0.3
(005)	7.666±0.003	29.6	4.0±0.5

$\delta\beta \times 10^{-3} (\text{\AA}^{-1})$

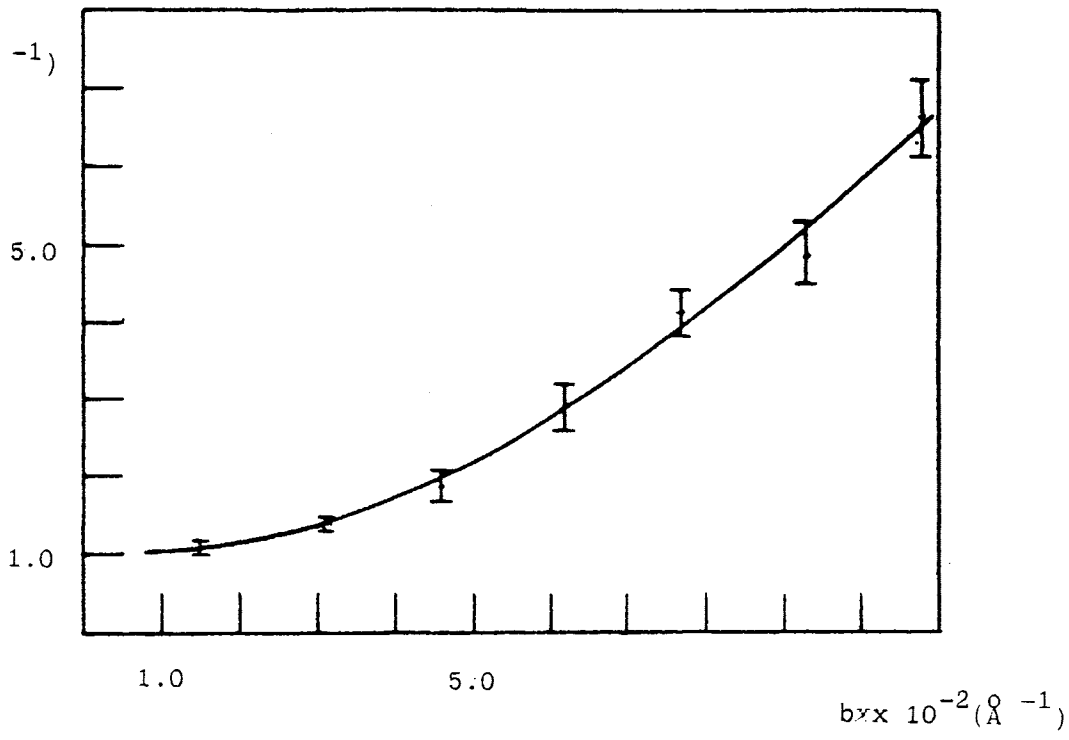


FIG. 4.6

$\delta\beta \times 10^{-3} (\text{\AA}^{-1})$

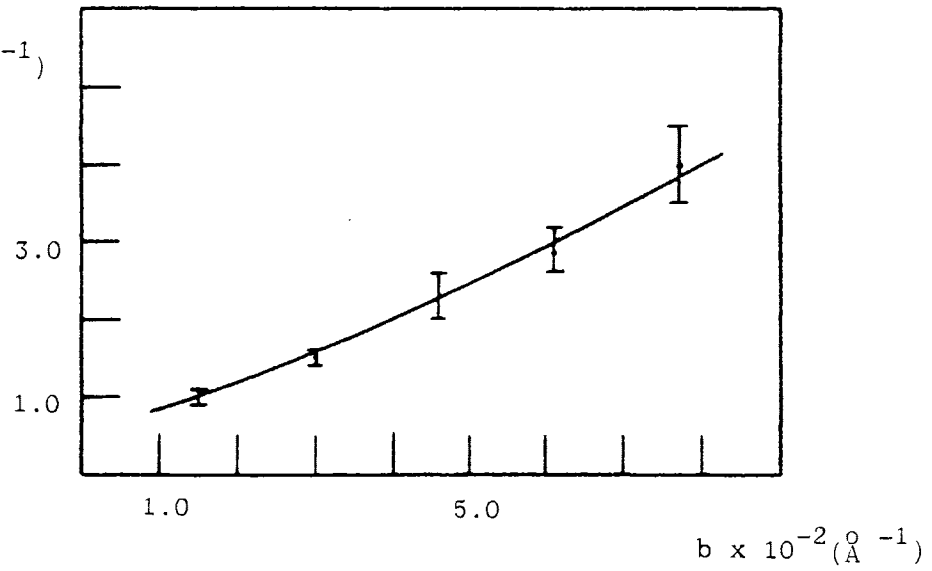


FIG. 4.7

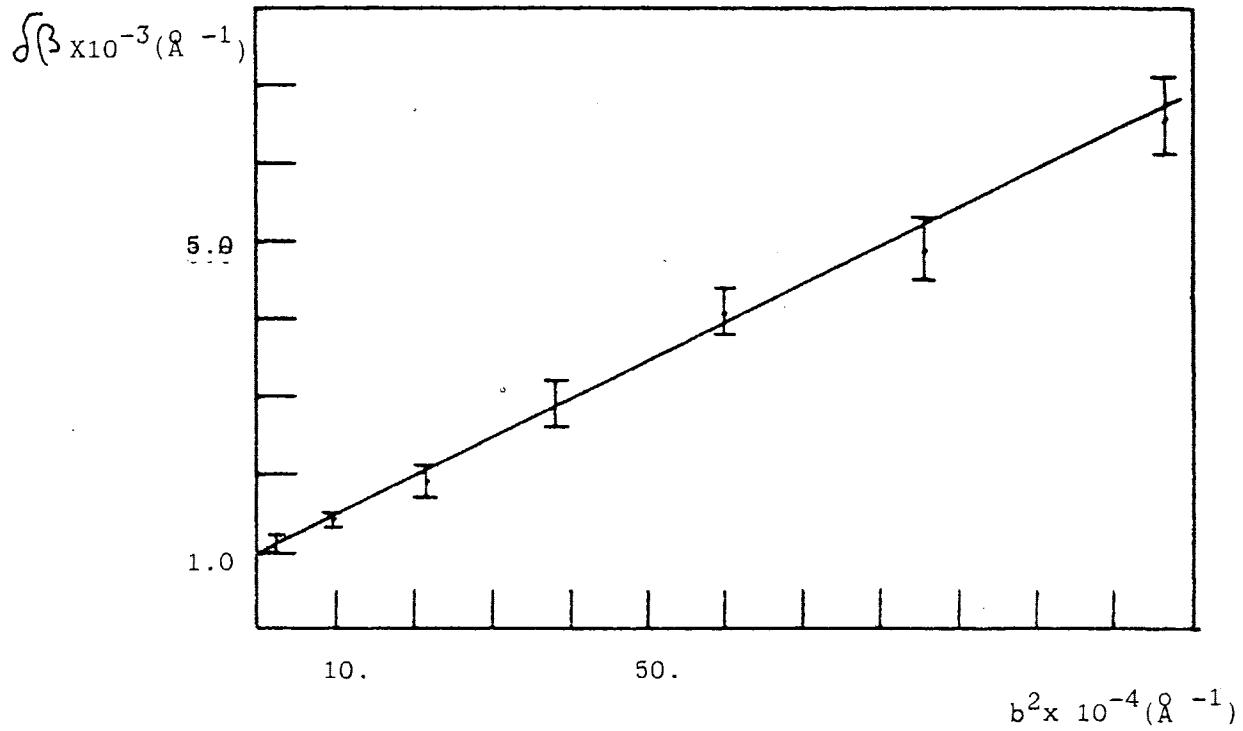


FIG. 4.8

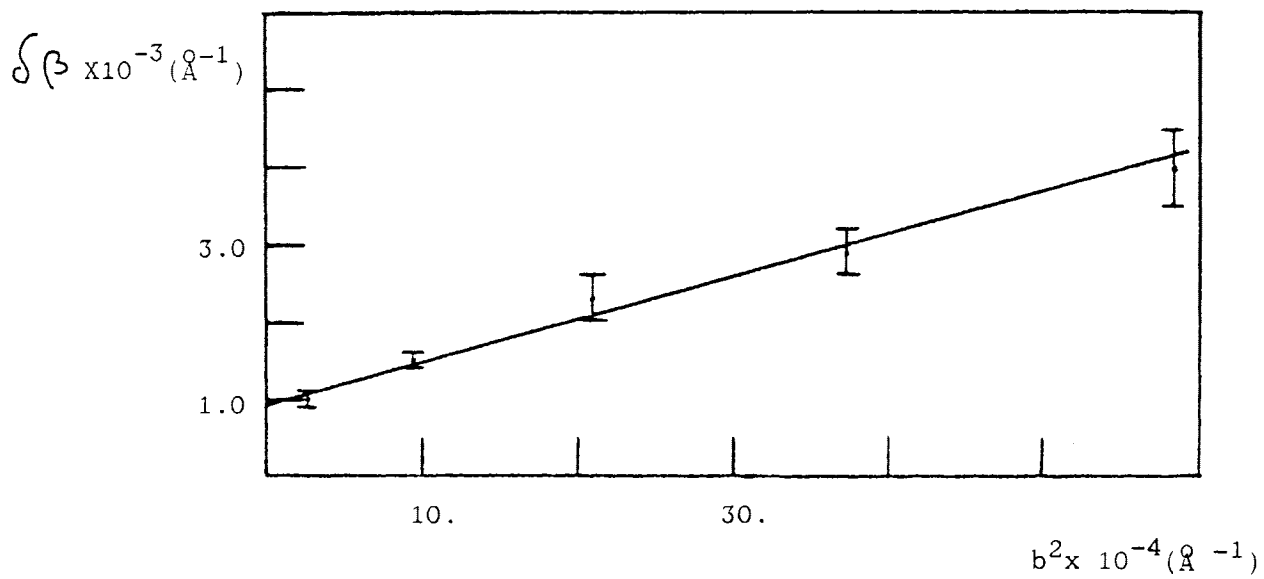


FIG. 4.9

torsiones de segunda especie en el empaquetamiento de bicapas constituídas por cerebrósido natural y frenosina respectivamente. En la Tabla III se presentan los valores de N, g, D y dimensión del motivo difractante, P, para los lípidos estudiados.

TABLA III

Lípido	P (Å)	D (Å)	N	g (%)
Cerebrósido natural	64.3 ± 0.5	1050 ± 120	16	1.8 ± 0.2
Frenosina	65.6 ± 0.2	1010 ± 110	15	1.9 ± 0.2

4.3.- PERFIL DE DENSIDAD ELECTRONICA DE CEREBROSIDO NATURAL

El procedimiento de obtención del perfil de densidad electrónica de una bicapa lipídica mediante el cálculo de la función de Patterson consta de los siguientes pasos: 1) obtención de la intensidad difractada por el sistema lamelar corregida por los diversos factores implicados, $I(b)$, 2) cálculo de la función de Patterson de este sistema, $Q(x)$; extracción de la función de Patterson correspondiente al motivo difractante, $Q_0(x)$ y deconvolución de $Q_0(x)$ para obtener finalmente el perfil de densidad electrónica de dicho motivo, $\rho_0(x)$. Estos pasos se detallan a continuación.

4.3.1.- Intensidad difractada

En un capítulo anterior (4.1) se describieron los resultados obtenidos con distintos métodos de orientación. Los estudios estructurales realizados con los glicosfingolípidos objeto de este trabajo fueron realizados sobre muestras orientadas obtenidas por el procedimiento de compresión mecánica, dado que los diagramas así conseguidos presentan un buen grado de orientación además de ausencia de "scattering" procedente del soporte orientador.

Los registros fotográficos obtenidos operando con las características ya mencionadas en la parte experimental fueron microdensitometrados en la dirección ecuatorial obteniéndose los diagramas de intensidad mostrados en las figuras 4.10 y 4.11 para cerebrósido natural y frenosina respectivamente. Las Tablas I y II presentan los valores de intensidad relativa de las distintas reflexiones obtenidas en cada caso. Estas intensidades están ya corregidas por el factor de Lorentz (10).

4.3.2.- Función $Q(x)$

El registro densitométrico del diagrama de difracción es digitalizado con objeto de calcular la transformada de Fourier $|16|$ mediante métodos numéricos de integración (1 1). Las figuras 4.12 y 4.13 muestran las representaciones gráficas de la mitad derecha de las funciones $Q(x)$ obtenidas para cerebrósido natural y frenosina respectivamente. Ambas gráficas muestran funciones cuasiperiódicas con máximos espaciados equidistantemente. Esta

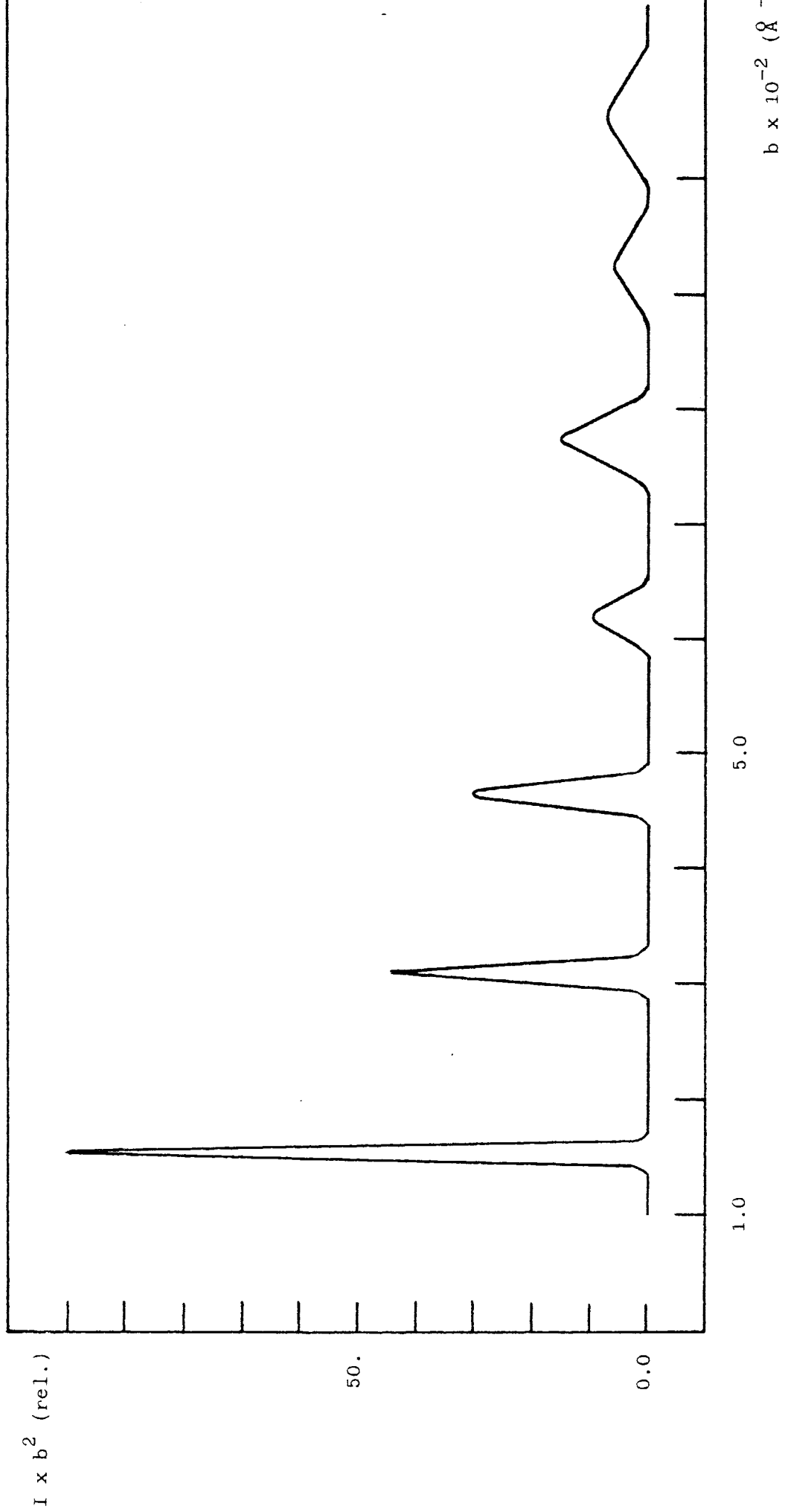
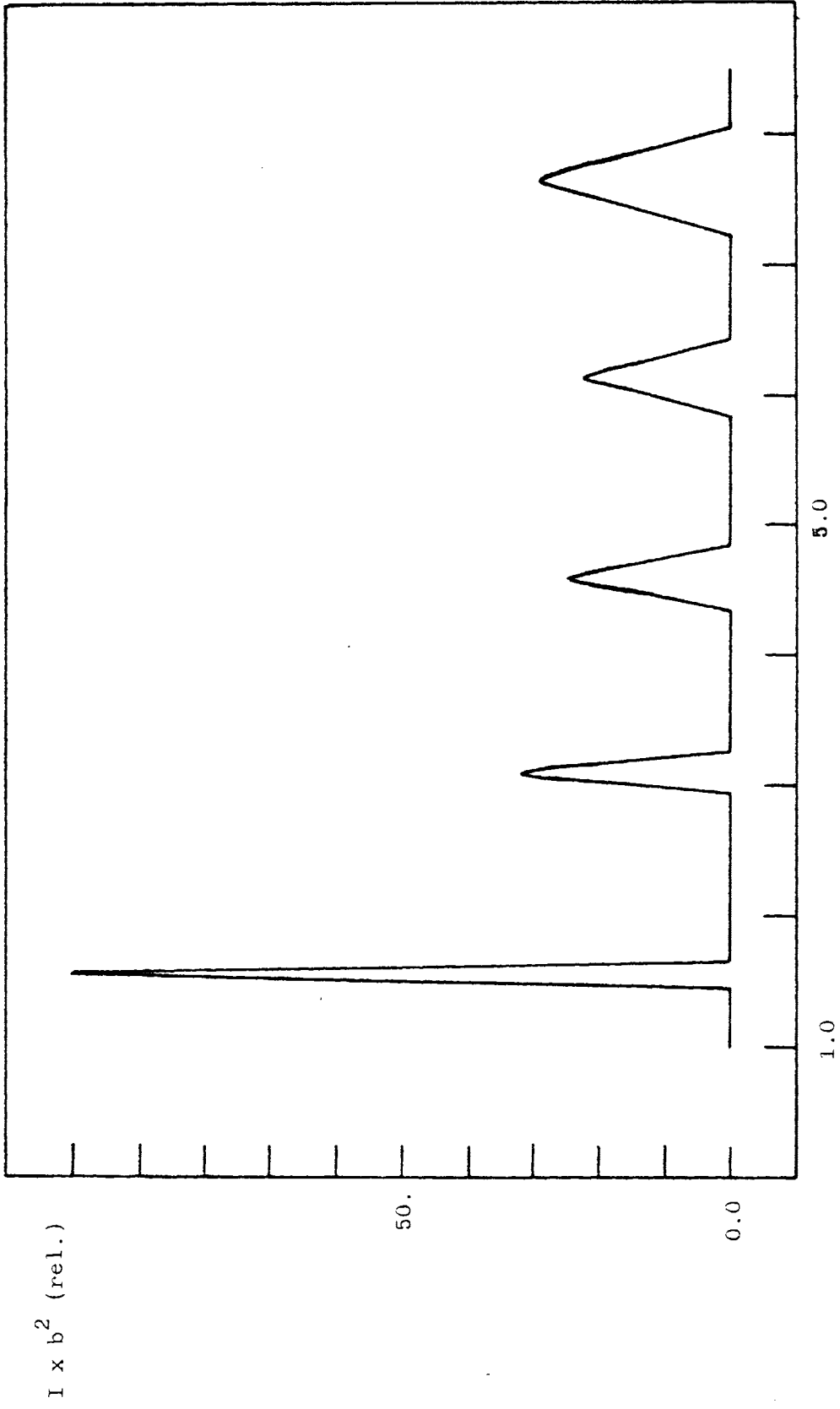


FIG. 4.10



$b \times 10^{-2} (\text{\AA}^{-1})$

FIG. 4.11

distancia da cuenta del tamaño de la celdilla unidad que a su vez está relacionada con la inversa del espaciado al que aparece el primer orden de difracción. Por otro lado, el número de máximos que resultan en la función $Q(x)$ se puede relacionar con el número de celdillas unidad que difractan coherentemente, según se mencionó en el capítulo 2.1.3. Este resultado se puede comparar con el obtenido en el análisis paracrystalino del sistema (12). En la Tabla VI se presentan todos estos datos conjuntamente para cerebrósido natural y frenosina.

TABLA VI

Lípido	N	N*	P (Å)	P _b (Å)
Cerebrósido natural	15	16	64 ± 1	64.3 ± 0.5
Frenosina	14	15	66 ± 1	65.6 ± 0.2

N: número de motivos que difractan coherentemente, extraído de $Q(x)$

N*: Idem. extraído del estudio paracrystalino

P: tamaño del motivo. Calculado a partir de $Q(x)$

P_b: Idem. a partir del primer orden de difracción.

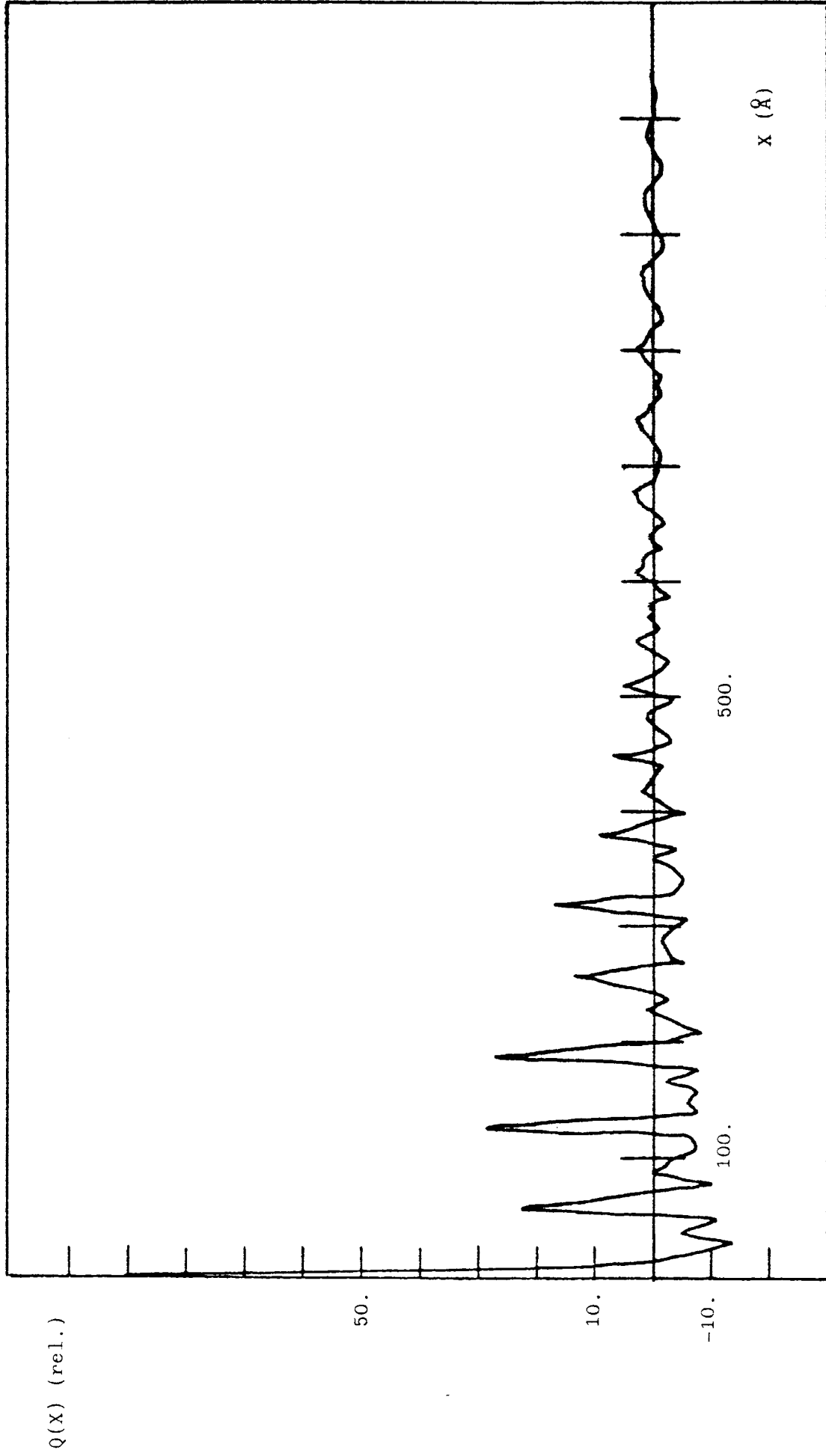


FIG. 4.12

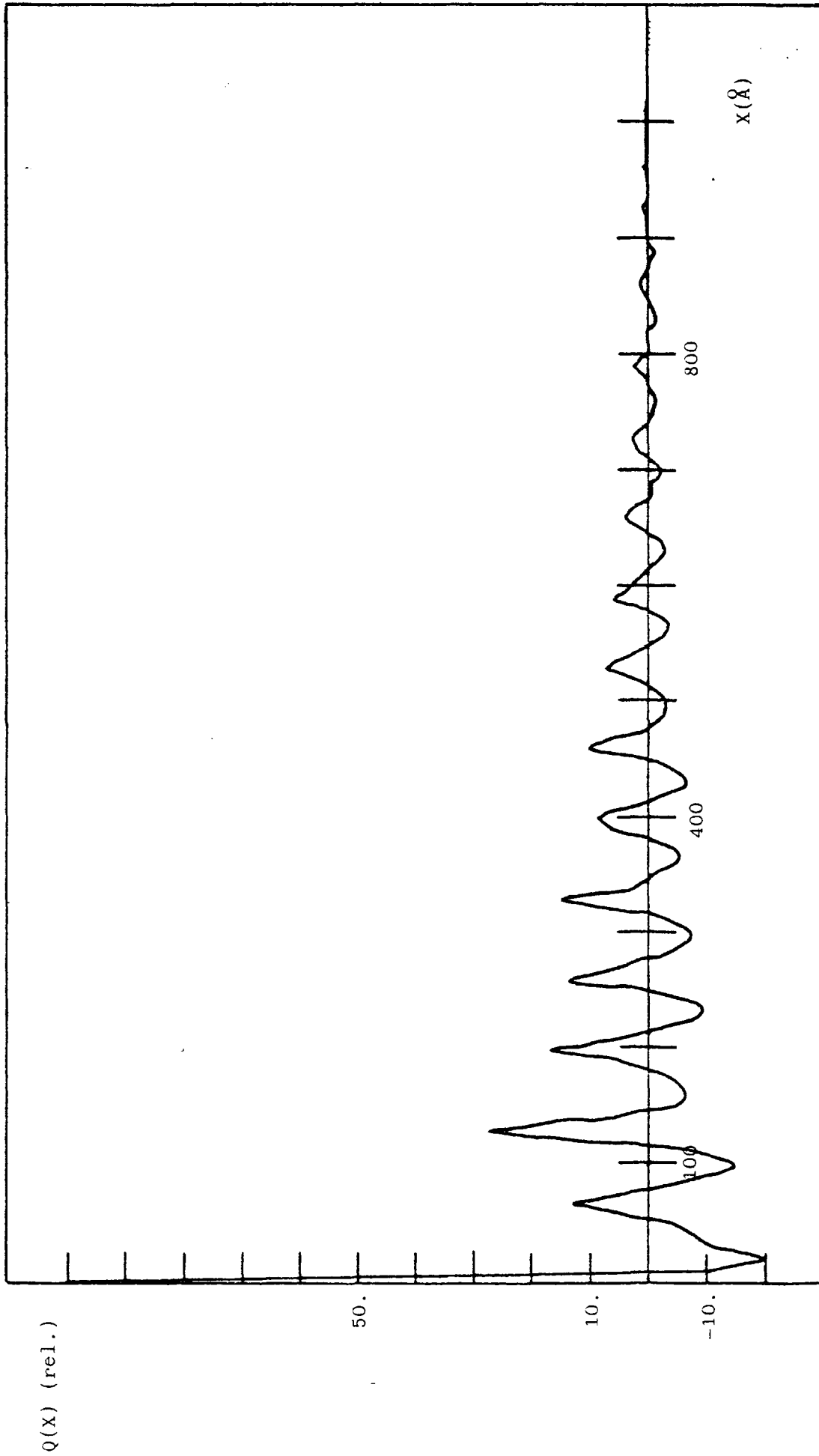


FIG. 4.13

TABLA IV

Valores de $Q(X)$ para Cerebrosido Natural. El espacio X está tomado en \AA

X	Q(X)	X	Q(X)	X	Q(X)	X	Q(X)	X	Q(X)
1	100.0	11	6.4	21	-6.5	31	-14.3	41	-5.1
51	-11.1	61	23.4	71	6.9	81	-11.3	91	.1
101	-3.3	111	-8.4	121	-7.3	131	29.6	141	-8.0
151	-5.7	161	-7.8	171	-2.1	181	-7.9	191	27.0
201	-.3	211	-9.7	221	-4.7	231	1.1	241	-3.6
251	6.2	261	12.7	271	-6.4	281	-2.7	291	-2.1
301	-2.4	311	-6.5	321	17.1	331	-3.0	341	-5.5
351	-3.7	361	.7	371	-4.3	381	9.4	391	2.5
401	-6.0	411	-1.7	421	2.2	431	-.3	441	-1.0
451	6.6	461	-3.3	471	-2.0	481	.9	491	1.1
501	-3.8	511	4.8	521	-.7	531	-3.2	541	.0
551	2.7	561	-1.0	571	.3	581	.2	591	-2.7
601	-.1	611	2.9	621	1.4	631	-1.6	641	-.2
651	-1.8	661	-.7	671	1.8	681	2.6	691	-.7
701	-1.2	711	-1.5	721	-.9	731	1.0	741	2.5
751	.5	761	-1.2	771	-1.9	781	-1.0	791	.6
801	2.0	811	1.2	821	-.3	831	-2.1	841	-1.0
851	.4	861	1.5	871	1.4	881	.1	891	-1.7
901	-1.4	911	.2	921	1.1	931	1.2	941	-.1

X	Q(X)	X	Q(X)	X	Q(X)	X	Q(X)	X	Q(X)
951	-.8	961	-1.7	971	.2	981	1.0	991	1.0
1001	-.0	1011	-.1	1021	-1.3	1031	-.1	1041	.8
1051	.7	1061	-.0	1071	-.2	1081	-.8	1091	-.4
1101	.5	1111	.6	1121	-.2	1131	-.7	1141	-.1
1151	.1	1161	.8	1171	.3	1181	-.2	1191	-1.2
1201	-.1	1211	.4	1221	1.3	1231	.4	1241	-.4
1251	-1.4	1261	-.9	1271	.5	1281	1.6	1291	1.3
1301	-.6	1311	-1.3	1321	-1.6	1331	-.0	1341	1.7
1351	2.2	1361	.0	1371	-1.5	1381	-2.2	1391	-1.0
1401	1.2	1411	2.7	1421	1.2	1431	-1.2	1441	-2.2
1451	-1.6	1461	.4	1471	2.6	1481	2.2	1491	-.5
1501	-2.1	1511	-2.0	1521	-.6	1531	1.8	1541	2.7
1551	.5	1561	-1.8	1571	-2.2	1581	-1.1	1591	1.0
1601	2.8	1611	1.5	1621	-1.1	1631	-2.3	1641	-1.4
1651	.2	1661	2.2	1671	2.1	1681	-.2	1691	-2.2
1701	-1.9	1711	-.4	1721	1.5	1731	2.4	1741	.7
1751	-1.5	1761	-2.0	1771	-.7	1781	.8	1791	2.0
1801	1.3	1811	-.7	1821	-1.9	1831	-1.2	1841	.1
1851	1.4	1861	1.5	1871	.0	1881	-1.4	1891	-1.3
1901	-.2	1911	.9	1921	1.3	1931	.5	1941	-.9
1951	-1.0	1961	-.4	1971	.3	1981	.8	1991	.6

Valores de $Q(X)$ para Fenosina. El espacio X está tomado en \AA

X	$Q(X)$	X	$Q(X)$	X	$Q(X)$	X	$Q(X)$	X	$Q(X)$
1	100.0	11	-11.3	21	-20.5	31	-11.9	41	-8.1
51	-6.0	61	4.5	71	13.5	81	.7	91	-8.1
101	-15.5	111	-10.7	121	4.4	131	27.6	141	5.1
151	-5.0	161	-7.3	171	-6.4	181	-2.7	191	2.1
201	16.6	211	3.2	221	-4.1	231	-10.3	241	-10.1
251	-2.1	261	14.3	271	7.2	281	-2.0	291	-6.1
301	-7.9	311	-4.4	321	1.2	331	15.4	341	3.1
351	-2.4	361	-5.0	371	-6.1	381	-2.5	391	6.1
401	8.6	411	1.7	421	-2.7	431	-6.8	441	-5.1
451	-.7	461	10.2	471	2.4	481	-2.0	491	-3.1
501	-4.1	511	-2.6	521	1.3	531	6.8	541	2.1
551	-.3	561	-3.7	571	-4.2	581	-.9	591	6.1
601	3.2	611	-.2	621	-1.6	631	-2.8	641	-1.1
651	-.5	661	3.8	671	.9	681	-.1	691	-1.1
701	-2.8	711	-1.3	721	2.1	731	2.4	741	-.1
751	-.4	761	-1.5	771	-.7	781	.1	791	2.1
801	.3	811	.0	821	-.1	831	-1.0	841	-.1
851	-.1	861	.9	871	.3	881	-.1	891	-1.1
901	-.8	911	-.1	921	1.2	931	-.2	941	-.1

X	Q(X)	X	Q(X)	X	Q(X)	X	Q(X)	X	Q(X)
951	.2	961	.3	971	.3	981	-.2	991	.4
1001	.0	1011	.5	1021	.1	1031	-.4	1041	-.1
1051	.3	1061	-.3	1071	-.7	1081	-.2	1091	-.0
1101	.3	1111	.0	1121	-.2	1131	-.7	1141	.0
1151	.6	1161	.5	1171	.1	1181	-.1	1191	.0
1201	-.2	1211	.2	1221	-.0	1231	.3	1241	.4
1251	.0	1261	-.9	1271	-.7	1281	.3	1291	.6
1301	.2	1311	-.5	1321	-.4	1331	-.3	1341	.2
1351	.1	1361	.3	1371	.4	1381	.4	1391	-.3
1401	-.6	1411	.1	1421	.6	1431	.7	1441	-.1
1451	-.5	1461	-.5	1471	-.0	1481	.1	1491	.0
1501	.1	1511	.0	1521	-.2	1531	-.6	1541	-.3
1551	.2	1561	.8	1571	.5	1581	-.1	1591	-.5
1601	-.2	1611	.3	1621	.5	1631	.3	1641	-.1
1651	-.2	1661	-.3	1671	-.3	1681	-.3	1691	.3
1701	.4	1711	.1	1721	-.6	1731	-.7	1741	-.2
1751	.6	1761	.7	1771	-.0	1781	-.3	1791	-.1
1801	.1	1811	-.0	1821	.2	1831	.3	1841	.4
1851	-.2	1861	-.5	1871	-.5	1881	.2	1891	.6
1901	.1	1911	-.5	1921	-.5	1931	-.1	1941	-.0
1951	.2	1961	.1	1971	.2	1981	.0	1991	-.1

4.3.3.- Extracción de $Q_0(x)$

Como ya se mencionó en el epígrafe 2.1.4 el método más aconsejable para extraer $Q_0(x)$ de $Q(x)$ en el caso de presencia de distorsiones de segunda especie, es el cálculo de dicha $Q_0(x)$ en torno al origen. En las Tablas VII y VIII se presentan los valores de $Q_0(x)$ obtenidos por este método para cerebrósido natural y frenosina respectivamente, cuyas representaciones gráficas están recogidas en las figuras 4.14 y 4.15.

4.3.4.- Cálculo del perfil de densidad electrónica $l_0(x)$

En esta Memoria se han descrito con anterioridad (2.1.5) dos procedimientos de deconvolución $Q_0(x)$ para obtener el perfil de densidad electrónica $l_0(x)$. El método de deconvolución analítica de Fourier calcula, sin iteraciones, los valores de $l_0(x)$ a partir de los datos de entrada $Q_0(x)$ ya obtenidos (13). Este procedimiento se ha llevado a cabo poniendo a punto un programa de cálculo escrito en lenguaje Fortran IV y ejecutado en un ordenador UNIVAC de la serie 1100 propiedad del Centro de Cálculo y Proceso de Datos del Ministerio de Educación y Ciencia. Este mismo programa recalcula $Q_0(x)$ por convolución cuadrada de la $l_0(x)$ obtenida. En las Tablas IX y X se recogen para los dos casos estudiados los valores de los coeficientes a_k que definen $l_0(x)$ como serie de cosenos. Estas funciones $l_0(x)$ y los correspondientes productos de autoconvolución $Q_0(x)$ están representados en las figuras 4.16, 4.17, 4.18 y 4.19.

TABLA VII

$x(\text{Å})$	$Q_o(x)$	$x(\text{Å})$	$Q_o(x)$
1	100.00	25	-18.52
2	90.70	26	-17.68
3	68.32	27	-14.76
4	39.64	28	-11.40
5	12.84	29	-9.39
6	-5.42	30	-9.80
7	-12.05	31	-12.58
8	-8.28	32	-16.58
9	1.28	33	-20.08
10	10.73	34	-21.52
11	15.21	35	-20.13
12	12.62	36	-18.18
13	4.04	37	-10.85
14	-7.07	38	-5.73
15	-16.60	39	-2.23
16	-21.51	40	-1.10
17	-20.94	41	-2.22
18	-16.31	42	-4.71
19	-10.44	43	-7.29
20	-6.23	44	-8.76
21	-5.42	45	-8.42
22	-8.01	46	-6.23
23	-12.46	47	-2.86
24	-16.57	48	0.57

TABLA VII (Cont.)

$x(\text{\AA})$	$Q_o(x)$	$x(\text{\AA})$	$Q_o(x)$
49	2.90	58	8.57
50	3.29	59	10.67
51	1.57	60	13.45
52	-1.59	61	11.74
53	-4.91	62	9.19
54	-6.78	63	5.83
55	-5.87	64	3.03
56	-1.62	65	1.15
57	5.40	66	0.00

TABLA VIII

$x(\text{\AA})$	$Q_O(x)$	$x(\text{\AA})$	$Q_O(x)$
1	100.00	25	-20.66
2	96.13	26	-13.97
3	83.58	27	-7.21
4	64.36	28	-2.04
5	41.48	29	0.39
6	18.44	30	-0.44
7	-1.38	31	-4.25
8	-15.33	32	-10.13
9	-21.96	33	-16.72
10	-21.15	34	-22.56
11	-14.12	35	-26.40
12	-3.14	36	-27.46
13	9.00	37	-25.58
14	19.52	38	-21.23
15	26.52	39	-15.40
16	27.60	40	-9.34
17	23.66	41	-4.28
18	15.25	42	-1.22
19	4.11	43	-0.64
20	-7.58	44	-2.49
21	-17.67	45	-6.17
22	-24.48	46	-10.72
23	-27.09	47	-15.00
24	-25.53	48	-17.96

TABLA VIII (Cont.)

$x(\text{\AA})$	$Q_0(x)$	$x(\text{\AA})$	$Q_0(x)$
49	-18.84	56	9.84
50	-17.33	57	10.22
51	-13.64	58	8.73
52	-8.38	59	5.89
53	-2.47	60	2.44
54	3.08	61	0.83
55	7.38	62	0.00

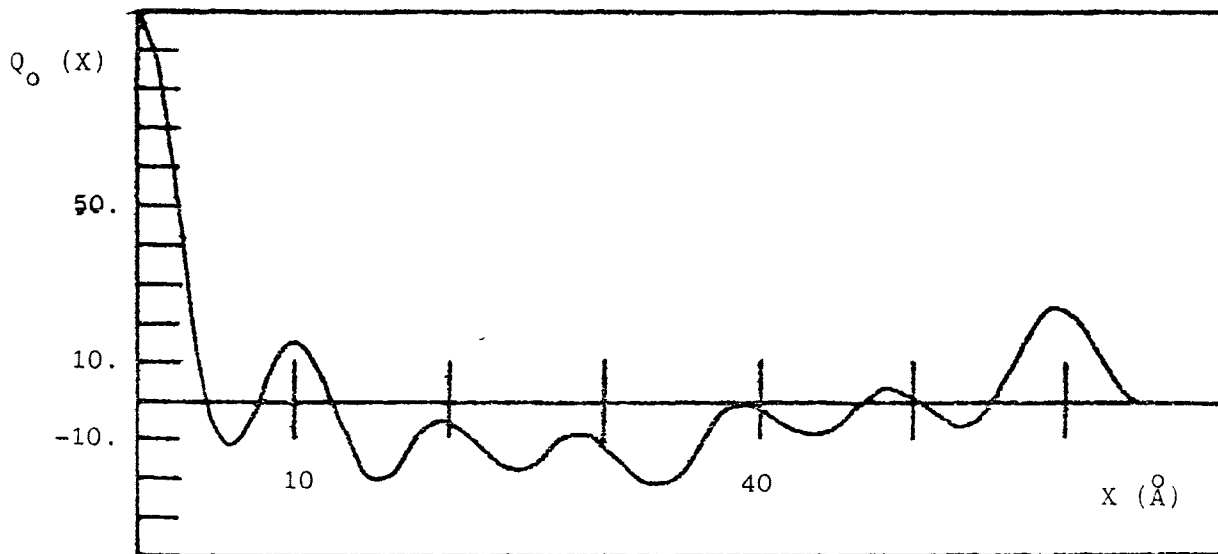


FIG. 4.14

FIG. 4.15

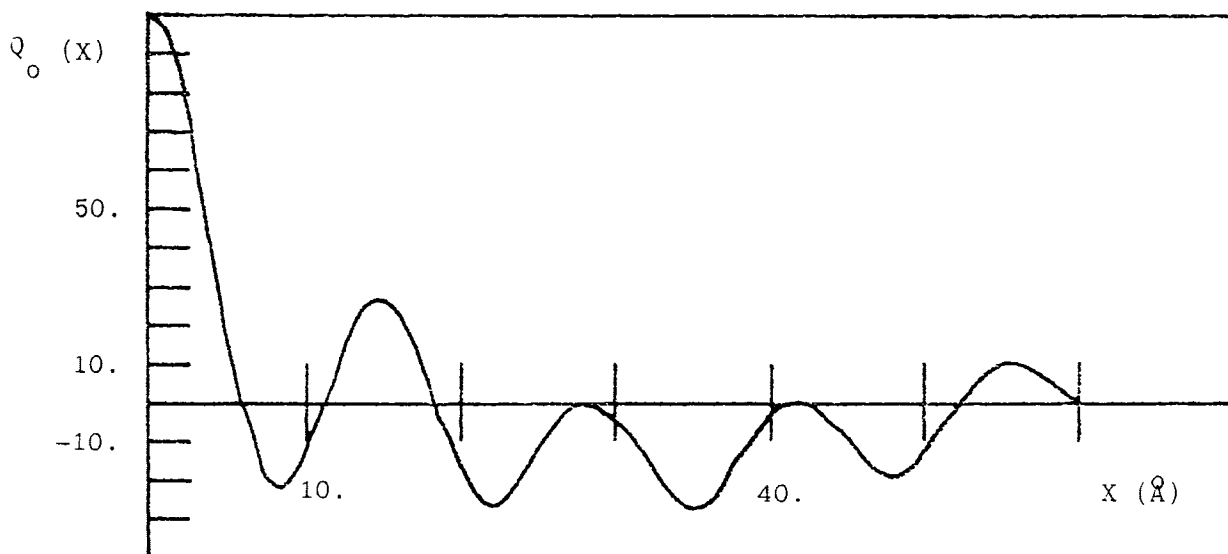


TABLA IX

Coeficientes a_K en el desarrollo de $\varrho_0(x)$ en serie de cosenos para cerebrósido natural

<u>K</u>	<u>a_K</u>	<u>K</u>	<u>a_K</u>
1	-0.001	13	-0.001
2	3.196	14	-0.001
3	1.567	15	0.001
4	-1.990	16	-0.232
5	0.708	17	0.001
6	-1.583	18	-0.278
7	2.012	19	0.096
8	-2.615	20	0.001
9	-1.182	21	-0.259
10	0.001	22	-1.713
11	-0.001	23	0.100
12	0.001		

TABLA X

Coefficientes a_K para Frenosina

K	a_K	K	a_K
1	0.001	12	0.001
2	3.355	13	-0.001
3	1.734	14	0.001
4	1.717	15	0.074
5	2.308	16	-0.139
6	3.308	17	0.165
7	-0.001	18	-0.177
8	0.001	19	0.172
9	-0.001	20	-0.157
10	0.001	21	0.127
11	-0.001		

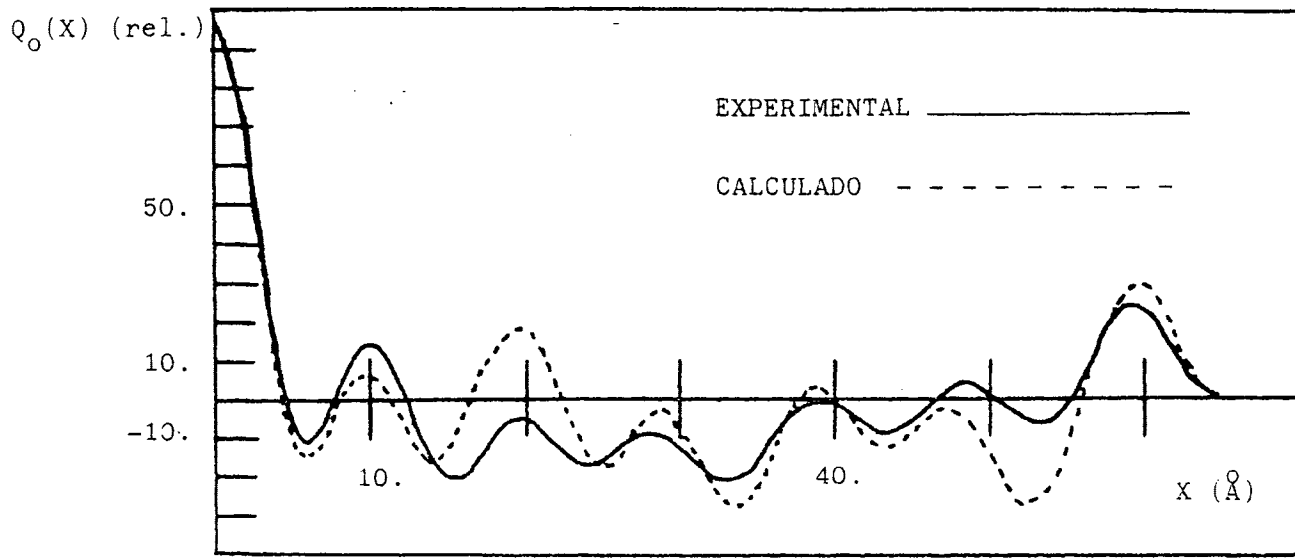


FIG. 4.16

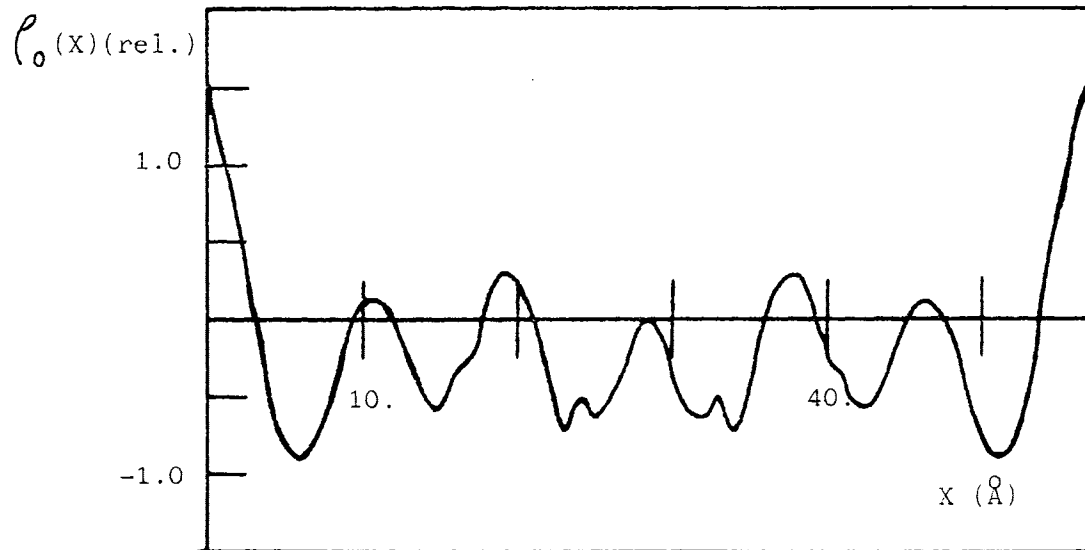


FIG. 4.17

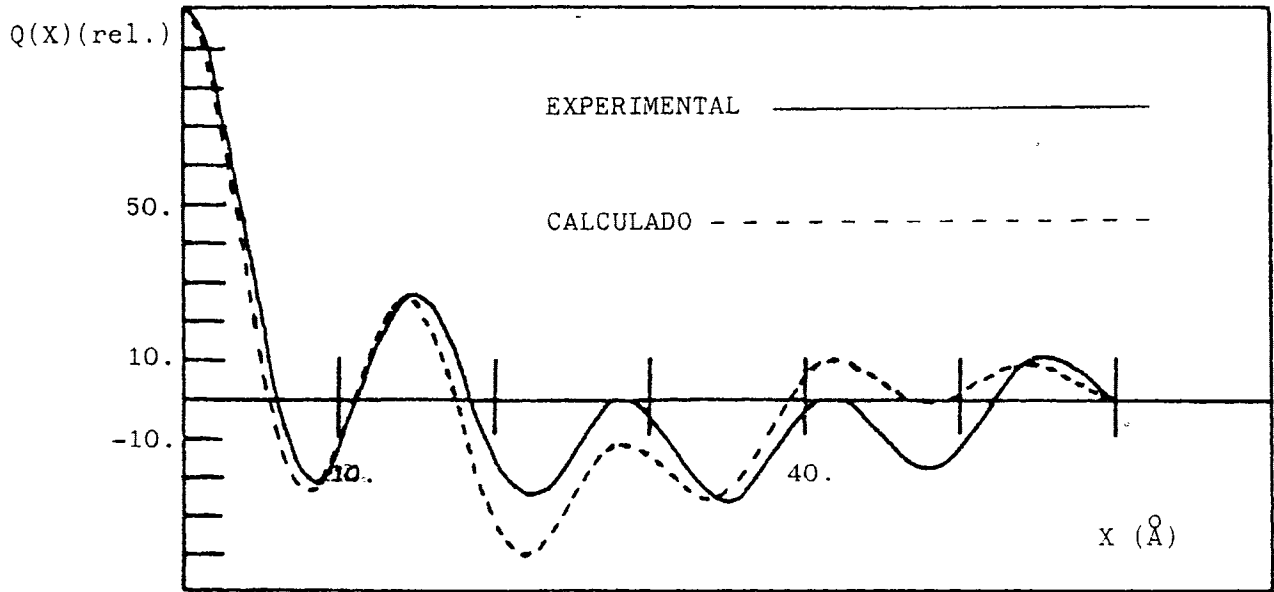


FIG. 4.18

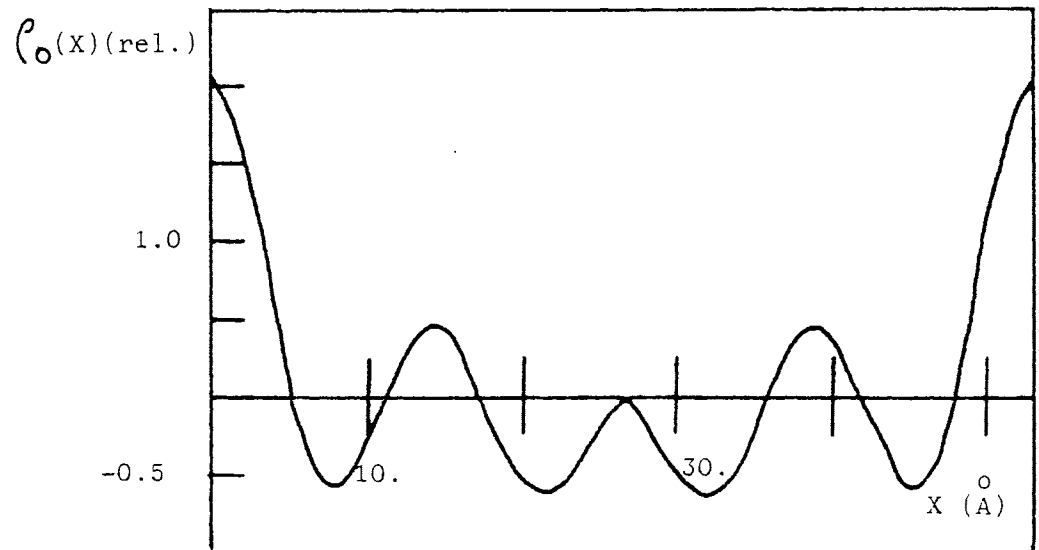


FIG. 4.19

El otro procedimiento de deconvolución usado (14) consiste en plantear un modelo de $l_0(x)$ basado en una suma de gaussianas de la misma anchura, calcular el producto de autoconvolución, $Q_0(x)$, y ajustar las diferencias entre estos valores de $Q_0(x)$ y los experimentales usando un procedimiento de mínimos cuadrados no lineales (15).

Los parámetros de las gaussianas que describen el modelo $l_0(x)$ están relacionados con la forma de la función $Q_0(x)$ según el formulismo descrito por Buerger (16).

En el caso de cerebrósido natural un número de cuatro gaussianas es en principio suficiente para interpretar la forma de la función $Q_0(x)$. Los puntos sobresalientes en esta función, máximos y mínimos, se encuentran separados por una distancia media de 5 \AA , siendo múltiplos de esta cantidad las posiciones elegidas para los centros de las gaussianas. Por otro lado, los signos de dichas gaussianas pueden ser elegidos teniendo en cuenta las posiciones de los máximos y mínimos en $Q_0(x)$, según está descrito en 2.1.5. Con estos datos iniciales se aplicó el procedimiento de deconvolución ya mencionado obteniéndose los parámetros del modelo ya refinados que se muestran en la Tabla XI. En la Tabla XII se comparan los valores de Q_0 experimental y Q_0 calculado en el último ciclo del ajuste para este caso. En este mismo sentido, es también posible una solución consistente en cinco gaussianas, igualmente centradas en posiciones que sean múltiplos de 5 \AA . Los parámetros que definen este nuevo modelo están expresados en la Tabla XIII y, en la Tabla XIV aparecen las diferencias finales entre Q_0 experimental y calculado. También fue intentado un conjunto

de seis gaussianas que en principio asimismo servían para describir la forma de $Q_0(x)$ pero una vez operado el ajuste por mínimos cuadrados se encontró que una de las posiciones de dichas gaussianas era redundante. Conjuntamente con los datos referidos propiamente a la estructura del perfil de densidad electrónica también se presentan los valores correspondientes a los coeficientes de las gaussianas que representan la presencia de distorsiones dentro de la celdilla unidad. Dichos valores se adjuntan en las respectivas Tablas. Las figuras 4.20 y 4.21 muestran los perfiles de densidad electrónica obtenidos con los modelos de cuatro y cinco gaussianas respectivamente.

En el estudio de la frenosina el proceso anteriormente expuesto fue elaborado de la misma manera. En este caso un modelo compuesto por tres gaussianas es suficiente, en principio, para interpretar la forma de la función $Q_0(x)$, menos resuelta que en el caso anterior. Las posiciones de los centros de cada gaussiana se escogieron como múltiplos de 7 \AA que es el intervalo entre los distintos máximos y mínimos en $Q_0(x)$. Los parámetros finales resultantes del ajuste se encuentran recogidos en la Tabla XV, y en la Tabla XVI se muestra el ajuste entre los valores de $Q_0(x)$ experimental y $Q_0(x)$ recalculados. Un modelo compuesto por suma de cuatro gaussianas centradas en posiciones múltiplos de 7 \AA también es capaz de explicar la forma de $Q_0(x)$. En la Tabla XVII se recogen los parámetros refinados de este modelo. La diferencia entre $Q_0(x)$ experimental y $Q_0(x)$ evaluado con esta suma de gaussianas es mostrado en la Tabla XVIII. Los perfiles de densidad electrónica para cada uno de estos modelos están representados en las figuras 4.22 y 4.23

TABLA XI

Parámetros para $\ell_0(x)$ de Cerebrósido Natural como suma de 4 Gaussianas

A_i	x_i (Å)	c, c_1	L_1 (Å), R_Q
2.3	0.0	$c=0.18$	$L_1=58.5$
-0.3	4.56	$c_1=0.14$	$R_Q=0.004$
-0.4	15.84		
-0.7	25.14		

TABLA XIII

Parámetros para $\ell_0(x)$ de Cerebrósido Natural como suma de 5 Gaussianas

A_i	x_i (Å)	c, c_1	L_1 (Å), R_Q
2.2	0.0	$c=0.13$	$L_1=58.3$
-0.25	4.41	$c_1=0.13$	$R_Q=0.008$
+0.20	11.64		
-0.31	13.91		
-0.60	24.99		

TABLA XII

$x(\text{\AA})$	$Q_o(x)$ EXP	$Q_o(x)$ CAL	DIFERENCIA
1	100.00	99.78	0.22
2	90.70	90.85	-0.15
3	68.32	68.25	0.07
4	39.64	39.66	-0.02
5	12.84	12.80	0.04
6	-5.42	-5.42	0.00
7	-12.05	-12.10	0.05
8	-8.28	-8.25	-0.03
9	1.28	1.28	0.00
10	10.73	10.70	0.03
11	15.21	15.25	-0.04
12	12.62	12.63	-0.01
13	4.04	4.00	0.04
14	-7.07	-7.05	-0.02
15	-16.60	-16.65	0.05
16	-21.51	-21.49	-0.02
17	-20.94	-20.88	-0.06
18	-16.31	-16.30	-0.01
19	-10.44	-10.48	0.04
20	-6.23	-6.25	0.02
21	-5.42	-5.42	0.00
22	-8.01	-8.08	0.07
23	-12.46	-12.44	-0.02
24	-16.57	-16.55	-0.02

TABLA XII (Cont.)

$x(\text{\AA})$	$Q_o(x)$ EXP	$Q_o(x)$ CAL	DIFERENCIA
25	-18.52	-18.48	-0.04
26	-17.68	-17.65	-0.03
27	-14.76	-14.78	0.02
28	-11.40	-11.38	-0.02
29	-9.39	-9.41	0.02
30	-9.80	-9.81	0.01
31	-12.58	-12.55	-0.03
32	-16.58	-16.53	-0.05
33	-20.08	-20.11	0.03
34	-21.52	-21.55	0.03
35	-20.13	-20.11	-0.02
36	-18.18	-18.20	0.02
37	-10.85	-10.88	0.03
38	-5.73	-5.72	-0.01
39	-2.23	-2.23	0.00
40	-1.10	-1.12	0.02
41	-2.22	-2.20	-0.02
42	-4.71	-4.69	-0.02
43	-7.29	-7.25	-0.04
44	-8.76	-8.73	-0.03
45	-8.42	-8.41	-0.01
46	-6.23	-6.21	-0.02
47	-2.86	-2.84	-0.02
48	0.57	0.57	0.00

TABLA XII (Cont.)

$x(\text{\AA})$	$Q_0(x)$ EXP	$Q_0(x)$ CAL	DIFERENCIA
49	2.90	2.91	-0.01
50	3.29	3.30	-0.01
51	1.57	1.55	0.02
52	-1.59	-1.60	0.01
53	-4.91	-4.92	0.01
54	-6.78	-6.81	0.03
55	-5.87	-5.85	-0.02
56	-1.62	-1.60	-0.02
57	5.40	5.37	0.03
58	8.57	8.55	0.02
59	10.67	10.65	0.02
60	13.45	13.44	0.01
61	11.74	11.71	0.03
62	9.19	9.21	-0.02
63	5.83	5.85	-0.02
64	3.03	3.03	0.00
65	1.15	1.14	0.01

TABLA XIV

$x(\text{\AA})$	$Q_o(x)$ EXP	$Q_o(x)$ CAL	DIFERENCIA
1	100.00	99.70	0.30
2	90.70	90.62	0.08
3	68.32	68.44	-0.12
4	39.64	39.68	-0.04
5	12.84	12.79	0.05
6	-5.42	-5.38	0.04
7	-12.05	-12.10	-0.05
8	-8.28	-8.23	-0.05
9	1.28	1.29	-0.01
10	10.73	10.77	-0.04
11	15.21	15.25	-0.04
12	12.62	12.58	0.04
13	4.04	4.04	0.00
14	-7.07	-7.05	-0.02
15	-16.60	-16.55	-0.05
16	-21.51	-21.48	-0.03
17	-20.94	-20.90	-0.04
18	-16.31	-16.28	-0.03
19	-10.44	-10.41	-0.03
20	-6.23	-6.21	-0.02
21	-5.42	-5.44	0.02
22	-8.01	-8.03	0.02
23	-12.46	-12.47	0.01
24	-16.57	-16.59	0.02

TABLA XIV (Cont.)

$x(\text{\AA})$	$Q_o(x)$ EXP	$Q_o(x)$ CAL	DIFERENCIA
25	-18.52	-18.55	0.03
26	-17.68	-17.71	0.03
27	-14.76	-14.73	-0.03
28	-11.40	-11.36	-0.04
29	-9.39	-9.36	-0.03
30	-9.80	-9.78	-0.02
31	-12.58	-12.55	-0.03
32	-16.58	-16.59	0.01
33	-20.08	-20.11	0.03
34	-21.52	-21.47	-0.05
35	-20.13	-20.09	-0.04
36	-18.18	-18.15	-0.03
37	-10.85	-10.85	0.00
38	-5.73	-5.71	-0.02
39	-2.23	-2.21	-0.02
40	-1.10	-1.11	0.01
41	-2.22	-2.23	0.01
42	-4.71	-4.73	0.02
43	-7.29	-7.27	-0.02
44	-8.76	-8.73	-0.03
45	-8.42	-8.40	-0.02
46	-6.23	-6.20	-0.03
47	-2.86	-2.89	0.03
48	0.57	0.57	0.00

TABLA XIV (Cont.)

$x(\text{\AA})$	$Q_o(x)$ EXP	$Q_o(x)$ CAL.	DIFERENCIA
49	2.90	2.92	-0.02
50	3.29	3.26	0.03
51	1.57	1.53	0.04
52	-1.59	-1.59	0.00
53	-4.91	-4.89	-0.02
54	-6.78	-6.75	-0.03
55	-5.87	-5.83	-0.04
56	-1.62	-1.64	0.02
57	5.40	5.37	0.03
58	8.57	8.54	0.03
59	10.67	10.63	0.04
60	13.45	13.44	0.01
61	11.74	11.78	-0.04
62	9.19	9.22	-0.03
63	5.83	5.84	-0.01
64	3.03	3.05	-0.02
65	1.15	1.17	-0.02

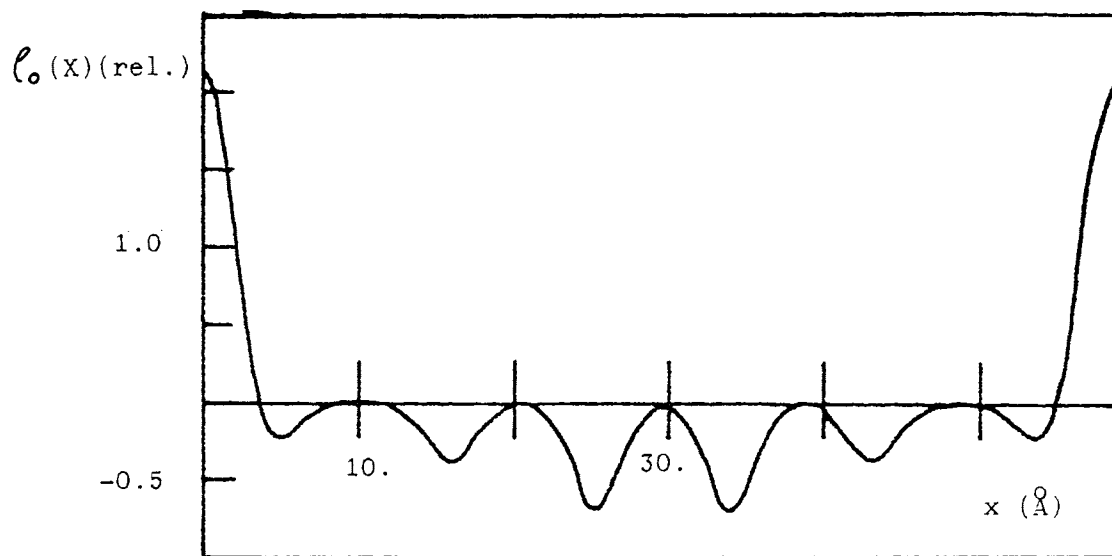


FIG. 4.20

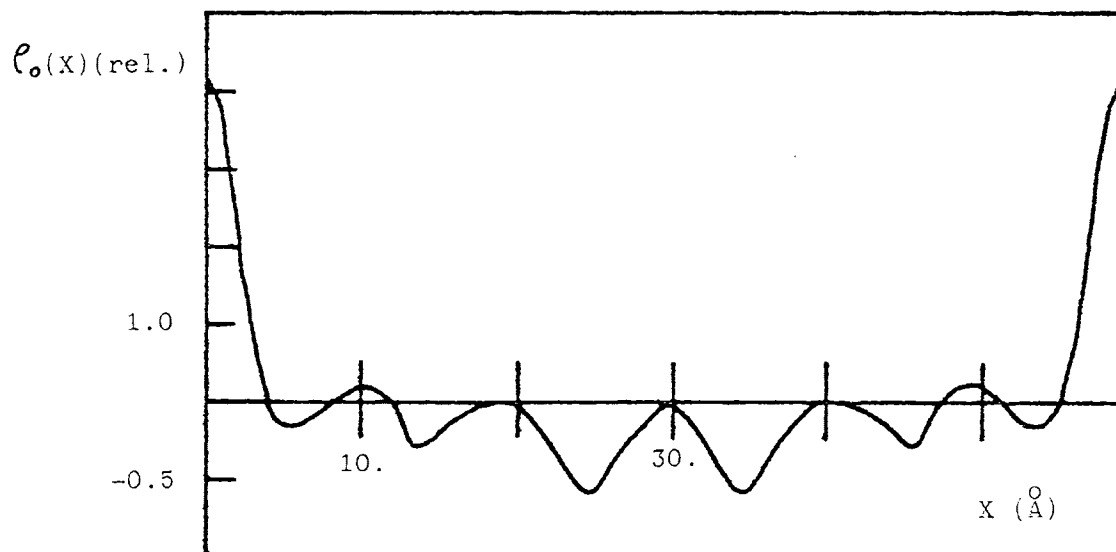


FIG. 4.21

TABLA XV

Parámetros para $\ell_0(x)$ de Frenosina como suma de 3 Gaussianas

A_i	x_i (Å)	c, c_1	L_1 (Å), R_Q
2.3	0.0	$c=0.11$	$L_1=56.90$
-0.3	8.42	$c_1=0.05$	$R_Q=0.022$
-0.5	22.56		

TABLA XVI

Parámetros para $\ell_0(x)$ de Frenosina como suma de 4 Gaussianas

A_i	x_i (Å)	c, c_1	L_1 (Å), R_Q
2.5	0.0	$c=0.098$	$L_1=57.16$
-0.3	8.87	$c_1=0.052$	$R_Q=0.015$
+0.1	14.58		
-0.6	22.53		

TABLA XVI

$x(\text{\AA})$	$Q_o(x)$ EXP	$Q_o(x)$ CAL	DIFERENCIA
1	100.00	99.55	0.45
2	96.13	96.33	-0.20
3	83.58	83.43	0.15
4	64.36	64.25	0.11
5	41.48	41.38	0.10
6	18.44	18.34	0.10
7	-1.38	-1.35	-0.03
8	-15.33	-15.42	0.09
9	-21.96	-22.08	0.12
10	-21.15	-21.23	0.08
11	-14.12	-14.20	0.08
12	-3.14	-3.18	0.04
13	9.00	9.11	-0.11
14	19.52	19.62	-0.10
15	26.52	26.63	-0.11
16	27.60	27.80	-0.20
17	23.66	23.57	0.09
18	15.25	15.15	0.10
19	4.11	4.09	-0.02
20	-7.58	-7.50	-0.08
21	-17.67	-17.55	-0.12
22	-24.48	-24.38	-0.10
23	-27.09	-26.95	-0.14
24	-25.53	-25.43	-0.10

TABLA XVI (Cont.)

$x(\text{\AA})$	$Q_o(x)$ EXP	$Q_o(x)$ CAL	DIFERENCIA
25	-20.66	-20.72	0.06
26	-13.97	-14.07	0.10
27	-7.21	-7.28	0.07
28	-2.04	-2.09	0.05
29	0.39	0.35	0.04
30	-0.44	-0.42	-0.02
31	-4.25	-4.21	-0.04
32	-10.13	-10.03	-0.10
33	-16.72	-16.59	-0.13
34	-22.56	-22.46	-0.10
35	-26.40	-26.26	-0.14
36	-27.46	-27.29	-0.17
37	-25.58	-25.38	-0.20
38	-21.23	-21.35	0.12
39	-15.40	-15.52	0.12
40	-9.34	-9.42	0.08
41	-4.28	-4.35	0.07
42	-1.22	-1.26	0.04
43	-0.64	-0.68	0.04
44	-2.49	-2.40	0.09
45	-6.17	-6.10	-0.07
46	-10.72	-10.64	-0.08
47	-15.00	-14.89	-0.11
48	-17.96	-17.85	-0.11

TABLA XVI (Cont.)

$x(\text{Å})$	$Q_0(x)$ EXP	$Q_0(x)$ CALC	DIFERENCIA
49	-18.84	-18.97	0.13
50	-17.33	-17.45	0.12
51	-13.64	-13.78	0.14
52	-8.38	-8.48	0.10
53	-2.47	-2.39	-0.08
54	3.08	3.15	-0.07
55	7.38	7.49	-0.11
56	9.84	9.94	-0.10
57	10.22	10.14	0.08
58	8.73	8.77	-0.04
59	5.89	5.80	0.09
60	2.44	2.39	0.05
61	0.83	0.81	0.02

TABLA XVIII

$x(\text{\AA})$	$Q_o(x)$ EXP	$Q_o(x)$ CAL	DIFERENCIA
1	100.00	99.60	0.40
2	96.13	96.02	0.12
3	83.58	83.50	0.08
4	64.36	64.26	0.10
5	41.48	41.55	-0.07
6	18.44	18.54	-0.10
7	-1.38	-1.30	-0.08
8	-15.33	-15.22	-0.11
9	-21.96	-21.88	-0.08
10	-21.15	-21.05	-0.10
11	-14.12	-14.18	0.06
12	-3.14	-3.18	0.04
13	9.00	9.11	-0.11
14	19.52	19.60	-0.08
15	26.52	26.62	-0.10
16	27.60	27.71	-0.11
17	23.66	23.49	0.17
18	15.25	15.16	0.09
19	4.11	4.05	0.06
20	-7.58	-7.66	0.08
21	-17.67	-17.77	0.10
22	-24.48	-24.55	0.07
23	-27.09	-26.95	-0.14
24	-25.53	-25.48	-0.05

TABLA XVIII (Cont.)

$x(\text{\AA})$	$Q_o(x)$ EXP	$Q_o(x)$ CAL	DIFERENCIA
25	-20.66	-20.55	-0.11
26	-13.97	-13.87	-0.10
27	-7.21	-7.15	-0.06
28	-2.04	-2.00	-0.04
29	0.39	0.39	0.00
30	-0.44	-0.41	-0.03
31	-4.25	-4.30	-0.05
32	-10.13	-10.13	0.00
33	-16.72	-16.66	-0.06
34	-22.56	-22.45	-0.11
35	-26.40	-26.50	0.10
36	-27.46	-27.55	0.09
37	-25.58	-25.68	0.10
38	-21.23	-21.31	0.08
39	-15.40	-15.50	0.10
40	-9.34	-9.44	0.10
41	-4.28	-4.20	-0.08
42	-1.22	-1.19	-0.03
43	-0.64	-0.62	-0.02
44	-2.49	-2.40	-0.09
45	-6.17	-6.13	-0.04
46	-10.72	-10.63	-0.09
47	-15.00	-14.91	-0.09
48	-17.96	-18.09	0.13

TABLA XVIII (Cont.)

$x(\text{\AA})$	$Q_0(x)$ EXP	$Q_0(x)$ CAL.	DIFERENCIA
49	-18.84	-18.94	0.10
50	-17.33	-17.40	0.07
51	-13.64	-13.74	0.10
52	-8.38	-8.30	-0.08
53	-2.47	-2.44	-0.03
54	3.08	3.03	0.05
55	7.38	7.30	0.08
56	9.84	9.81	0.03
57	10.22	10.10	0.12
58	8.73	8.82	-0.09
59	5.89	5.95	-0.06
60	2.44	2.47	-0.03
61	0.83	0.82	0.01

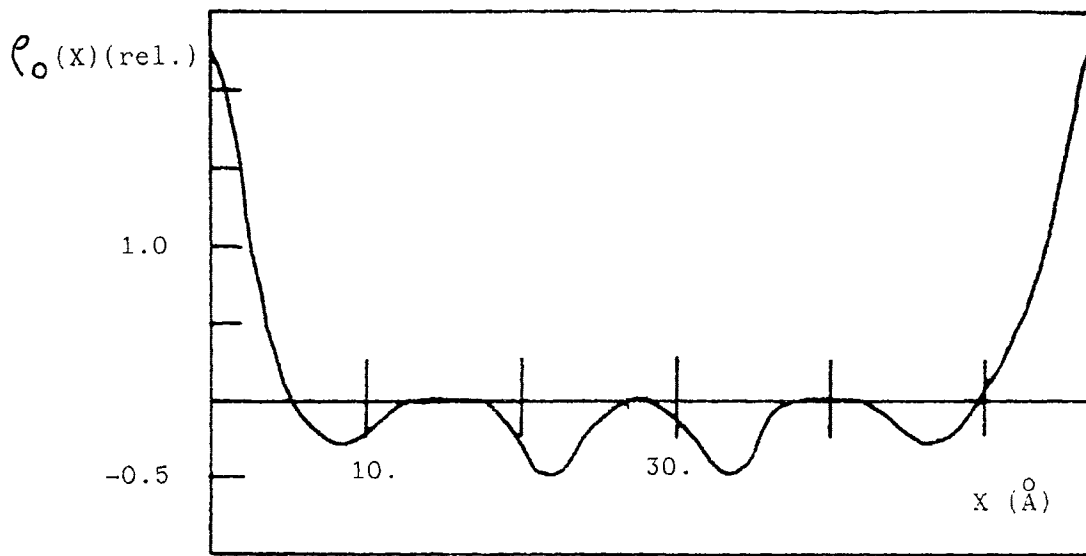


FIG. 4.22

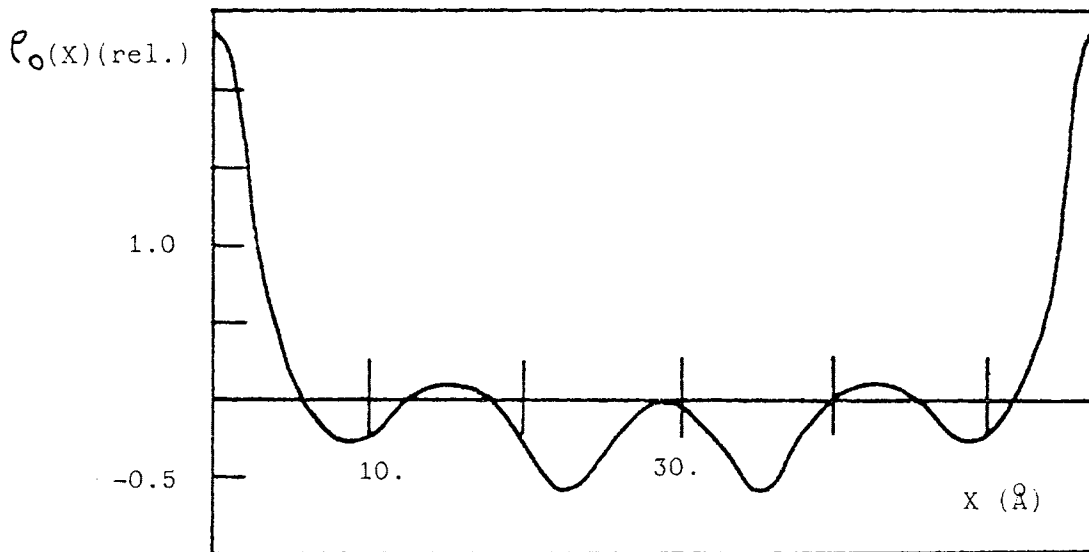


FIG. 4.23

BIBLIOGRAFIA

1. Heutschel, M., Hosemann, R., Helfrich, W., Z. Naturforsch. 35a, 643 (1980).
2. McIntosh, T., et al., Biochim. Biophys. Acta, 448, 15 (1976).
3. Asher, S.A., Pershan, P.S., Biophys. J. 27, 393 (1979).
4. Oesterhelt, D., Stoeckenius, W., Nature New Biology, 233, 149 (1971).
5. Hybl, A., J. Appl. Cryst. 10, 141 (1977).
6. Blaurock, A.E., Nelander, J.C., J. Mol. Biol. 103, 421 (1976).
7. Gbordzoe, M.K., Kreutz, W., Z. Naturforsch. 33c, 184 (1978).
8. Hosemann, R., bagchi, S.N., "Direct Analysis of Diffraction by Matter", Amsterdam, North Holland (1962).
9. Hosemann, R., Wilke, W., Makromol. Chem. 118, 230 (1968).
10. Blaursck, A.E., Worthington, C.R., Biophys. J. 6, 305 (1966).
11. Ralston, A., Wilf, H.S., "Mathematical Methods for Digital Computers", John Wiley, New York (1967).
12. Baltá Calleja, F.J., Hosemann, R., J. Appl. Cryst. 13, 521 (1980).
13. Pape, E.M., Biophys. J. 14, 284 (1974).
14. Pape, E.M., Kreutz, W., J. Appl. Cryst. 11, 421 (1978).
15. Marquardt, D.W., Bennet, R.G., Burrell, E.J., J. Molec. Spectroscopy 7, 269 (1961).
16. Buerger, M.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 34, 277 (1948).

5. DISCUSSION

5.1.- MÉTODOS DE ORIENTACION

Como ya se expuso anteriormente, los métodos de orientación empleados pueden ser considerados como los más adecuados en la preparación de muestras orientadas de bicapas de cerebrósidos. Dichos métodos han sido ensayados con éxito en numerosos casos, como por ejemplo el método de "pesca" de la monocapa con ciertos estearatos (1, 2) o la compresión mecánica en algunas lecitinas (3, 4).

Sin embargo, en el caso especial de los cerebrósidos estudiados en este trabajo, algunos de los métodos descritos para obtener orientación de lípidos en bicapas no son eficaces en este sentido. Se hacía, pues, necesario un análisis comparativo de algunos de estos procedimientos con objeto de encontrar cual era el más adecuado en orientar dichos cerebrósidos.

Así, en primer término el método de Langmuir-Blodgett (5) de pesca de la monocapa ha mostrado no ser útil en este caso, pues en todos los ensayos realizados no ha sido posible capturar más de una sola monocapa de lípido sobre la superficie del soporte, como ya se mencionó en el capítulo 4.1. Fueron empleados diversos tipos de soportes: por un lado se fabricaron pequeñas láminas de resina epoxi que, convenientemente curadas, presentaban una superficie bastante homogénea y de carácter hidrofóbico, también fueron probadas otras superficies hidrofóbicas tratando cubreobjetos de vidrio con un surfactante adecuado, según se describe en 3.1; por otro lado se probaron soportes con superficies hidrofílicas tales como mylar y cubreobjetos de vidrio no silanizados. Este

último tipo de soporte presenta una dificultad adicional debido al hecho de que son más fácilmente contaminables con partículas de polvo ambiental, destruyendo la homogeneidad de la superficie. En cualquier caso, el resultado fue idéntico, no pudiendo recogerse más de una monocapa de lípido cuando se hacía pasar el soporte a través de la interfase lipídica en la balanza. Dado que los tipos de superficies empleados en estos experimentos son similares a los utilizados en diversos trabajos descritos en la bibliografía (6), cabe atribuir la ineficacia del método a la naturaleza del lípido tratado. La principal diferencia entre los cerebrósidos y los otros lípidos que han sido orientados por este sistema radica en el grado de polaridad de la zona polar de dichos compuestos. En el caso de cerebrósidos dicha zona está constituida por dipolos eléctricos tipo O-H, en tanto que en compuestos como por ejemplo lecitinas, poseen pares iónicos (fig. 5.1). Evidentemente, es más fuerte una interacción entre cabezas polares en lecitinas que en cerebrósidos. Este hecho puede explicar la estabilidad de multicapas de lecitinas frente a las de cerebrósidos construidas con este procedimiento, en el cual uno de los factores más influyentes es la interacción que presentan las moléculas entre sí una vez orientadas.

Otro método que ha sido utilizado para preparar sistemas multilamelares de estos lípidos es el desarrollado por Hentschel y colaboradores (7). Al final del proceso experimental se obtiene una muestra compuesta por una serie de láminas del soporte utilizado para inducir orientación, intercaladas con sistemas multilamelares supuestamente orientados de lípidos. Efectivamente, con

dicho procedimiento se obtienen unos diagramas de difracción que muestran un alto grado de orientación del objeto difractante, en este caso, el conjunto de bicapas lipídicas (fig. 4.3). Este resultado no se ve modificado si en lugar de utilizar un soporte con superficie de tipo hidrofílico, como es el caso del sustrato mylar empleado en la muestra cuyo diagrama de difracción corresponde a la figura 4.3, se emplease otro tipo de soporte con superficie hidrofóbica. El hecho de usar un tipo de soporte y otro no afecta, en principio, al proceso de orientación, pues la única modificación que se introduce es el sentido de las moléculas en la primera monocapa, siendo idéntica la orientación de las moléculas en el resto del cristal. Sin embargo, a pesar del buen grado de orientación conseguido con este método, tuvo que ser eliminado pues el soporte mylar, incorporado en las muestras, presentaba difracción.

Como puede apreciarse en las figuras 4.2 y 4.3 esta difracción oscurece el registro fotográfico. Así, no es posible resolver mas allá de la quinta reflexión en ninguno de los casos. En principio cabría esperar que el soporte fuera transparente a la radiación tal como ocurre en el trabajo de Hentschel (7), que utilizaba láminas de mylar de 5 μm de espesor.

Ante la imposibilidad de conseguir mylar de este espesor, en este trabajo se empleó mylar de 10 μm que no parece ofrecer las mismas características respecto a su transparencia frente a la radiación X.

Finalmente se analizó el método de compresión mecánica propuesto por Asher y Pershan (8). Este procedimiento es similar al anterior excepto que el soporte usado para inducir orientación en

la muestra no queda incorporado a ésta. Naturalmente se elimina el problema causado por la difracción procedente del soporte pero se pierde calidad en la orientación (fig. 4.5). A pesar de este último inconveniente fue elegido este método para la preparación de las muestras orientadas de cerebrósidos de las cuales se obtuvieron los diagramas de difracción apropiados para el estudio estructural de las mismas. Así en el caso del cerebrósido natural se obtuvieron siete órdenes de difracción correspondientes al empaquetamiento lamelar de bicapas de este compuesto (ver capítulo 2.1). Para el caso de la Frenosina se han conseguido hasta cinco órdenes de difracción empleando el mismo sistema de compresión mecánica que el utilizado con el Cerebrósido Natural.

5.2.- DISTORSIONES PARACRISTALINAS

La presencia de solo unos pocos órdenes de difracción y el aumento de su anchura integral al aumentar el orden, en cada uno de los casos estudiados, sugiere la existencia de un empaquetamiento imperfecto de lamelas que puede ser descrito satisfactoriamente usando el concepto de paracristal. Estudios de este tipo se han realizado en otras membranas biológicas, tales como membrana de eritrocito humano (9), membrana de mielina del nervio (10, 11) y membrana de mitocondria (12) mostrando la ventaja de este tipo de tratamiento al permitir separar la información concerniente a la celdilla unidad de la referente a la red.

Para el cerebrósido natural se obtuvieron siete órdenes de

difracción espaciados 64.3 \AA entre sí. Representando gráficamente la anchura integral de cada una de estas reflexiones, $\delta\beta$, frente al cuadrado de la posición del máximo en el espacio recíproco, b^2 , para cada una de ellas (fig. 4.8); resulta una relación casi lineal de la cual se pueden extraer el número de motivos que difractan coherentemente ($N = 16$) y el grado de paracristalinidad ($g = 1.8 \%$). Estos dos valores se encuentran relacionados entre si a través de la ley empírica de α^* :

$$\alpha^* = \sqrt{N} g$$

donde α^* es una constante que varía entre 0.1 y 0.2 para diversos materiales. En el caso de Cerebrósido Natural se obtiene un valor de $\alpha^* = 0.072$.

En cuanto a la Frenosina, como ya se mencionó anteriormente, se han conseguido cinco órdenes de difracción a 65.6 \AA en la dirección meridional. Igual que ocurre con el Cerebrósido Natural la anchura integral aumenta con el orden de la reflexión, con lo cual es aplicable la teoría del paracristal. De la representación gráfica de $\delta\beta$ frente a b^2 resultan los siguientes parámetros: $N = 15$ y $g = 1.9 \%$, calculándose $\alpha^* = 0.074$.

Según puede apreciarse, a la vista de los anteriores resultados los valores obtenidos para el grado de paracristalinidad son relativamente bajos comparados con los obtenidos en muestras no orientadas para estos mismos compuestos (13, 14). Este valor está ligado con el número de celdillas unidad que difractan coherentemente, que son superiores al valor normalmente conseguido en expe-

rimentos con membranas biológicas (15, 16).

Por otro lado, como cabría esperar, los parámetros paracrystalinos obtenidos son parecidos en los dos casos estudiados al ser compuestos de estructuras similares.

5.3.- PERFIL DE DENSIDAD ELECTRONICA

Los detalles más finos que pueden observarse en la determinación de características estructurales de membranas biológicas y bicapas lipídicas dependen del valor máximo de b para el cual se anula la intensidad difractada. La resolución viene dada por $\Delta X = 1/2b_{\text{máx}}$ y suele estar entre 5 y 25 Å según el espaciado al que aparezcan las últimas reflexiones. En el caso de cerebrósido natural se consigue una resolución de 5 Å y para la Frenosina de 7 Å. No puede esperarse pues, de este procedimiento que sirva para determinar posiciones atómicas, tan sólo detalles tales como espesor de las membranas, estratos de proteína o grupos de cabezas polares de la bicapa lipídica, es decir, sólo se puede resolver el perfil de densidad electrónica de regiones características de la membrana.

Por otro lado, estas resoluciones obtenidas coinciden con los intervalos de separación entre los distintos máximos y mínimos en las funciones $Q_0(x)$ (fig. 4.14 y fig. 4.15), que se toma como base para asignar las posiciones de las gaussianas del modelo de perfil de densidad electrónica que se usa en el método de ajuste por mínimos cuadrados.

Estas condiciones restrictivas que se imponen a los modelos de partida respecto a las posiciones que deben ocupar las gaussianas, motivan que la solución pueda considerarse única, objetivo difícil de conseguir cuando se usa este método de deconvolución por mínimos cuadrados ya que son varios los parámetros que deben ser ajustados, alcanzándose normalmente otras soluciones alternativas que dan un ajuste de idéntica magnitud.

En este sentido el método de deconvolución analítica de Fourier, ya desarrollado en el capítulo correspondiente, ofrece la posibilidad de obtener una solución única partiendo de unos datos experimentales de $Q_0(x)$. Sin embargo la presencia de distorsiones en el interior de la celdilla unidad provoca perturbaciones en los valores de $Q_0(x)$ experimental de partida y en consecuencia los datos últimos obtenidos para la densidad electrónica $\rho_0(x)$ van afectados de error. En las figuras 4.17 y 4.19 se presentan los resultados obtenidos con este método para los perfiles de densidad electrónica de los dos compuestos estudiados en este trabajo. Se puede apreciar, en ambos casos, que la zona correspondiente a las cadenas hidrocarbonadas presenta una serie de oscilaciones muy pronunciadas que no están de acorde con la uniformidad que, en principio, debe presentar esta región. Sin embargo, el posicionamiento de los valores máximos de densidad electrónica correspondientes a las cabezas polares es similar al obtenido según el otro método de deconvolución empleado. Por otro lado, en las figuras 4.16 y 4.18 se comparan los valores experimentales de $Q_0(x)$ con los recalculados por convolución cuadrado de los perfiles de densidad electrónica $\rho_0(x)$ obtenidos por el método de Fourier. Se

puede apreciar, en ambos casos, diferencias significativas entre los valores experimentales y recalculados que se hace mayor para valores de x más alejados del centro.

Este problema de falta de concordancia entre datos experimentales y calculados no se presenta cuando se emplea el método de ajuste por mínimos cuadrados para deconvolucionar $Q_0(x)$, pues en este caso se puede introducir una función que de cuenta de las distorsiones que se producen en las bicapas lipídicas, y que en todos los casos se elige una distribución tipo gaussiana en torno a la dimensión de la celdilla unidad.

Como ya se trató en la sección 4.3.4, existen dos posibles combinaciones de funciones gaussianas, en cada caso, que ajustan con la misma bondad los datos experimentales de $Q_0(x)$ y que cumplen las restricciones impuestas en cuanto a posicionamiento de las mismas. En las figuras 5.2 y 5.3 se presentan, comparativamente, los perfiles de densidad electrónica obtenidos con las diferentes combinaciones de gaussianas válidas para Cerebrósido Natural y Frenosina respectivamente.

A la vista de dichas figuras, y teniendo en cuenta los datos de las tablas XI, XIII, XV y XVII, se pueden considerar las siguientes observaciones:

- 1) Las dimensiones de la bicapa lipídica resultan ser similares independientemente del número de gaussianas que se tome en el ajuste.

- 2) El hecho de introducir una gaussiana más en el modelo conduce a un perfil de densidad electrónica complementario al correspondiente obtenido con el modelo constituido por el número

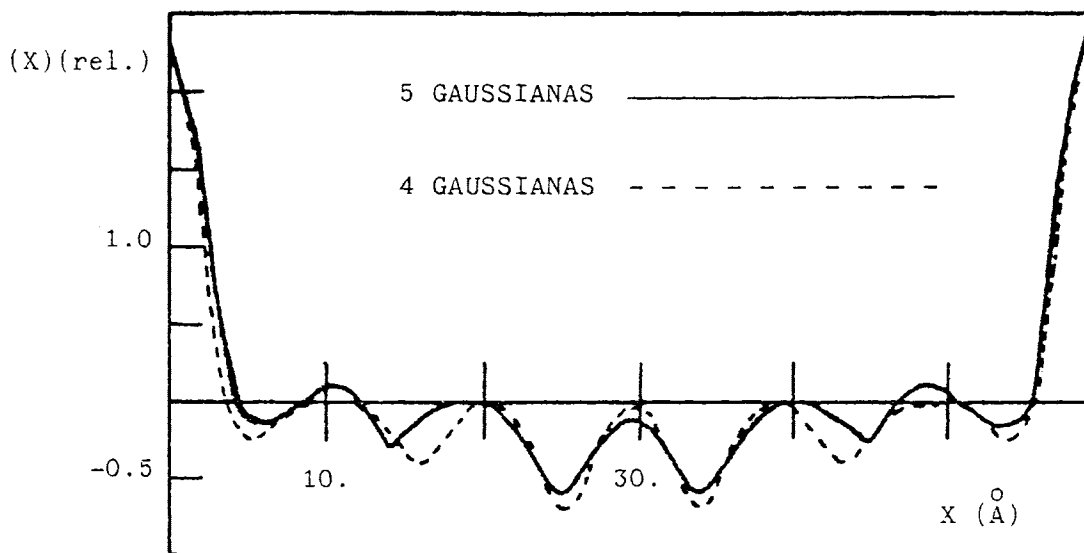


FIG. 5.2

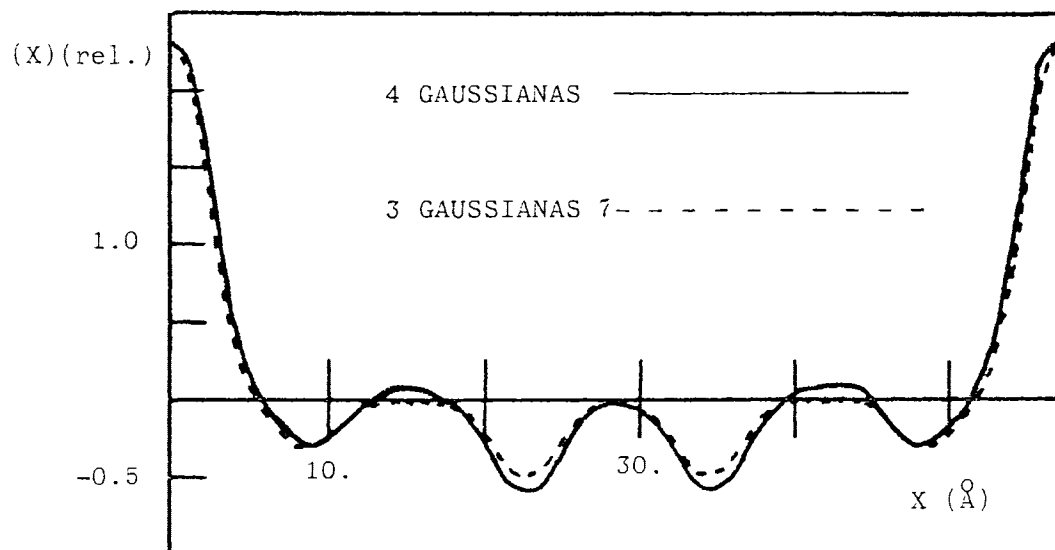


FIG. 5.3

mínimo de gaussianas. Obsérvese la similitud en cuanto a los valores de $\rho_0(x)$ así como en las posiciones de los centros de las gaussianas. Dado que la consideración de una nueva gaussiana en el modelo da lugar a que una de éstas resulte redundante tras el ajuste, se puede concluir que existe un número máximo de gaussianas cuya suma da cuenta del perfil de densidad electrónica, siendo este número 5 en el caso de cerebrósido natural y 4 en la frenosina.

3) El grado de acuerdo entre los valores de $Q_0(x)$ experimentales y calculados para el modelo, definido por R_Q (17, 18), no muestra diferencias drásticas entre modelos constituidos con distinto número de gaussianas. Sin embargo, sí cabe destacar el mejor ajuste que se alcanza en el caso de Cerebrósido Natural (menor valor de R_Q) motivado, en gran medida, por la posibilidad de utilizar una gaussiana más en el modelo, así como por la buena definición de la función de Patterson $Q_0(x)$.

4) Las magnitudes correspondientes a las distorsiones producidas en el interior de la celdilla unidad, medidas por los valores c_1 que dan la anchura de las gaussianas $H_1(x)$, también son equivalentes en los dos modelos planteados en cada caso.

Dado que el Cerebrósido Natural y la Frenosina aislada de aquel poseen estructuras similares, se puede realizar un análisis comparativo entre los perfiles de densidad electrónica obtenidos cuando ambos compuestos se disponen en estructura de bicapas. En la figura 5.4 se representan los modelos, $\rho_0(x)$, resultantes en los dos casos y constituidos por el número máximo de gaussianas. A la vista de esta gráfica y de las tablas mencionadas anterior-

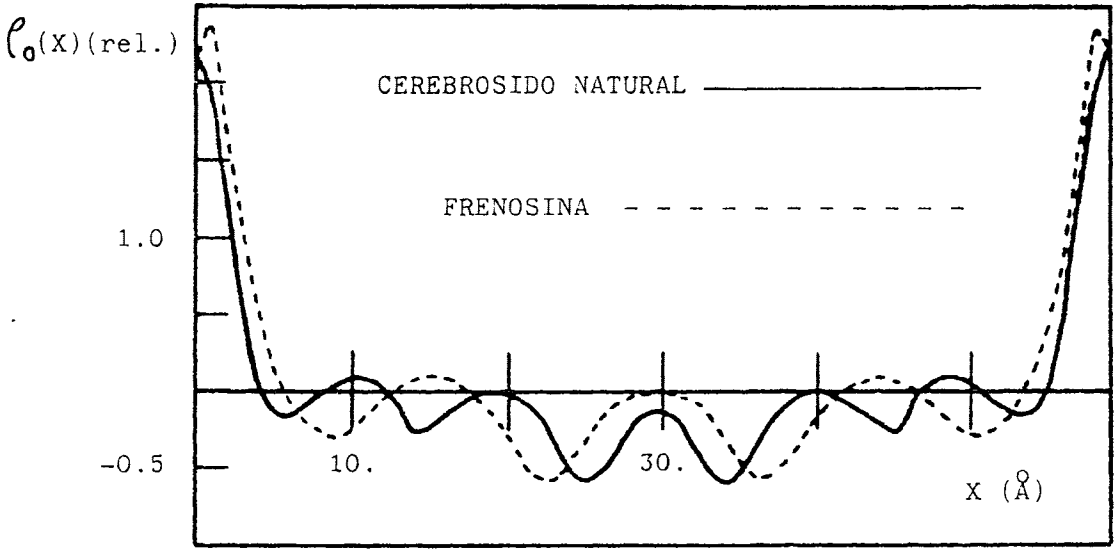


FIG. 5.4

mente, se pueden extraer las siguientes observaciones:

1) La anchura de la bicapa es similar para ambos compuestos. Este valor es concordante con los datos existentes en la bibliografía (19, 20, 21) sobre cerebrósidos de estructura molecular similar.

2) Los valores de densidad electrónica relativa son también muy parecidos tanto en las regiones correspondientes a las cabezas polares como a la zona central constituida por las cadenas hidrocarbonadas, si bien existen ligeras oscilaciones en cuanto al posicionamiento de los máximos y mínimos en esta última región, debido, probablemente, a la presencia de impurezas durante los procesos de aislamiento y orientación. Es preciso señalar aquí la ausencia de un "pozo" en el centro del perfil de densidad electrónica, tal como se observa en otros compuestos (22, 25). Dicho "pozo" se interpreta como una ausencia de moléculas en el centro de la bicapa lo que implica que las zonas hidrocarbonadas de las dos monocapas constituyentes están ligeramente separadas (ver fig. 5.5). Así pues, en nuestro caso se puede deducir que, dada la ausencia de dicho "pozo", los extremos de las cadenas hidrocarbonadas se encuentran interpenetrados tal y como se muestra en la figura 5.6. Así pues, teniendo en cuenta las dimensiones obtenidas para la anchura de la bicapa así como las dimensiones aproximadas tanto de la cabeza polar como de las colas hidrocarbonadas en estos compuestos, se propone como modelo estructural de la bicapa el señalado en la figura 5.6, en el cual se puede apreciar que las cadenas hidrocarbonadas están completamente extendidas, tal como cabría esperar al tratarse de medidas realizadas a temperatura

ambiente.

3) El grado de distorsión en el interior de la bicapa es mayor para la frenosina, tal como puede deducirse de los valores de la anchura c_1 que corresponde, como ya se mencionó anteriormente en esta misma sección, a la gaussiana $H_1(x)$ que da cuenta de este tipo de fluctuaciones. Este mayor grado de distorsión en la Frenosina es consecuencia de la menor definición de la función $l_0(x)$ obtenida a partir de los datos experimentales.

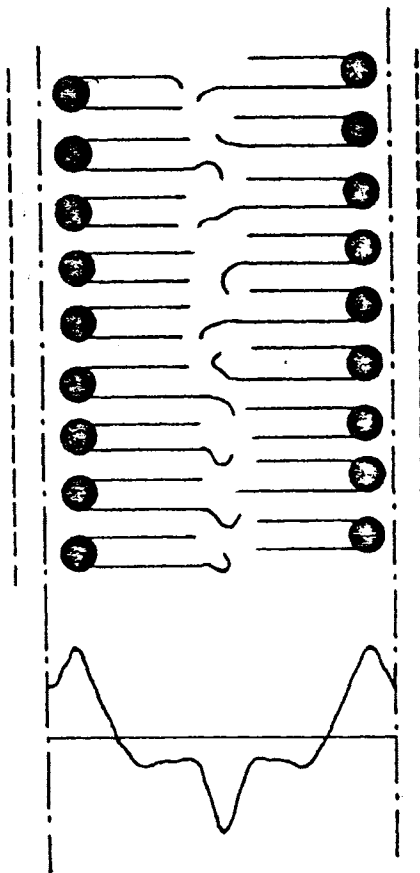


FIG. 5.5

BICAPA LIPIDICA Y SU PERFIL ELECTRONICO

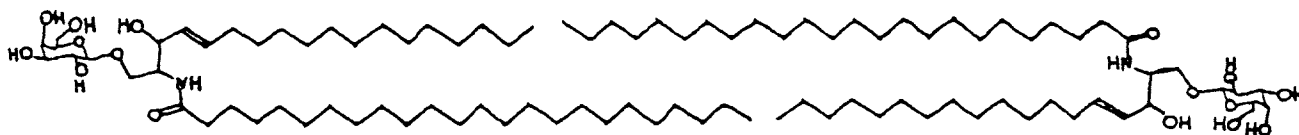


FIG. 5.6

MODELO DE BICAPA DE CEREBROSIDO PROPUESTA

BIBLIOGRAFIA

1. Waldbillig, R., Robertson, J., McIntosh, T., *Biochimica et Biophysica Acta* 448, 1 (1976).
2. McIntosh, T., Waldbillig, R., Robertson, J., *Biochim. et Biophys. Acta* 448, 15 (1976).
3. Powers, L., Clark, N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 840 (1975).
4. Asher, S.A., Pershan, P.S., *Biophys. J.* 27, 393 (1979).
5. Blodgett, K.B., Langmuir, J., *Phys. Rev.* 51, 964 (1937).
6. Levine, Y.K., Bailey, A., Wilkins, M.H., *Nature* 220, 577 (1968).
7. Hentschel, M. et al., *Z. Naturforsch.* 35a, 643 (1980).
8. Asher, S.A., Pershan, P.S., *J. Phys.* 40, 161 (1979).
9. Pape, E.H., Klott, K., Kreutz, W., *Biophys. J.* 19, 141 (1977).
10. Gbordzoe, M.K., Kreutz, W., *Z. Naturforsch.* 33c, 184 (1978).
11. Blaurock, A.E., Nelander, J.C., *J. Mol. Biol.* 103, 421 (1976).
12. Müller-Klieser, W., Kreutz, W., *Z. Naturforsch.* 13c, 612 (1976).
13. Hosemann, R., Laboda-Cackovic, J., Cackovic, H., Fdez-Bermudez, S., Baltá Calleja, F.J., *Z. Naturforsch.* 34c, 1121 (1979).
14. Fdez-Bermudez, S., Laboda-Cackovic, J., Cackovic, H., Hosemann, R., 32c, 362 (1977).
15. Corless, J.M., *Nature (London)* 237, 229 (1972).
16. Levine, Y.K., *Prog. Surf.* 3(4), 299 (1973).
17. Pape, E.H., Kreutz, W., *J. Appl. Cryst.* 11, 421 (1978).
18. Gbordzoe, M.K., Kreutz, W., *J. Appl. Cryst.* 11, 489 (1978).

19. Pascher, I. et al., Chem. Phys. Lipids 20, 175 (1977).
20. Hakamori, S.J., Chem. Phys. Lipids, 5, 96 (1970).
21. Ruocco, J.P. et al., Biochem. J. 21, 5957 (1981).
22. Luzzatti, V., Husson, F., J. Cell. Biol. 12, 208 (1962).
23. Suwalski, M., Tapia, J., Z. Naturforsch., 36c, 875 (1981).
24. Wilkins, M.H.F. et al., Nature New Biol. 230, 72 (1971).
25. Luzzatti, V., Tardieu, A., Ann. Rev. Phys. 79 (1974).

6. CONCLUSIONES

- El procedimiento de compresión mecánica ha mostrado ser el más efectivo para preparar muestras orientadas de cerebrósidos. La utilización de agente silanizante como inductor de orientación no mejora los resultados obtenidos.
- El empaquetamiento de bicapas de cerebrósidos se comporta como un paracrystal. El parámetro de fluctuación entre planos cristalográficos, g , en Cerebrósido Natural y Frenosina es 1.8 % y 1.9 % respectivamente.
- El número de planos cristalográficos que difractan coherentemente obtenido a partir del análisis de máximos en la función de Patterson generalizada, cuyos valores son 15 para Cerebrósido Natural y 14 para Frenosina, presenta una buena concordancia con los mismos datos resultantes del estudio paracrystalino del sistema, 16 y 15 respectivamente.
- Las anchuras de las bicapas de Cerebrósido Natural y Frenosina alcanzan valores muy parecidos de 64.5 Å y 65.6 Å respectivamente, siendo la separación entre grupos polares de 58.3 Å y 57.2 Å.
- Dada la presencia de distorsiones dentro de la celdilla unidad, el método de deconvolución analítica de Fourier no es capaz de aproximar una buena solución para el perfil de densidad electrónica $\rho_0(x)$. En estos casos es preciso realizar la deconvolución ajustando, por mínimos cuadrados, un modelo propuesto al perfil experimental.
- La resolución alcanzada en el diagrama de difracción (5 Å para Cerebrósido Natural y 7 Å para Frenosina) permite obtener una función de Patterson para el motivo difractante, $Q_0(x)$, con un alto grado de definición, con lo que se pueden imponer varias res-

tricciones en el modelo de perfil de densidad electrónica, para el cual se obtiene una solución única.

- Un modelo para el perfil de densidad electrónica formado por suma de gaussianas muestra ser bastante adecuado para describir dicho perfil. En cada caso existen distintas combinaciones de dichas gaussianas que presentan un buen ajuste con los datos experimentales. Las distintas soluciones son complementarias entre si, existiendo un número máximo de gaussianas que definen mejor el perfil de densidad electrónica. Dicho número toma valores de 5 gaussianas para Cerebrósido Natural y 4 para Frenosina.

- Tanto en Cerebrósido Natural como en Frenosina el perfil de densidad electrónica muestra la existencia de una interpenetración entre extremos de cadenas hidrocarbonadas en el centro de la bicapa.