

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
Departamento de Físico-Químico



TESIS DOCTORAL

**Estudio por capas monomoleculares de poli-l-metionina y  
poli- $\gamma$ -metil-l-glutamato con fosfolípidos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Julia Córdoba Gallardo**

Madrid, 2015

TP  
1983  
153

Julia Córdoba Gallardo



x-53-0211012-9

**ESTUDIO POR CAPAS MONOMOLECULARES DE POLI-L-METIONINA  
Y POLI-Y-METIL-L-GLUTAMATO CON FOSFOLIPIDOS**

Departamento de Físico-Química  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Complutense de Madrid  
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

153/83

© Julia Córdoba Gallardo  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1983  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-19624-1983

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

**ESTUDIO POR CAPAS MONOMOLECULARES DE POLI-L-METIONINA**

**Y POLI-Y-METIL-L-GLUTAMATO CON FOSFOLIPIDOS**

**MEMORIA que presenta;**  
**Julia CORDOBA GALLARDO**  
**para aspirar al GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS**

**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Madrid, Diciembre 1981**





UNIVERSIDAD DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
CATEDRA DE FISICO QUIMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA  
TEL. 244 04 61

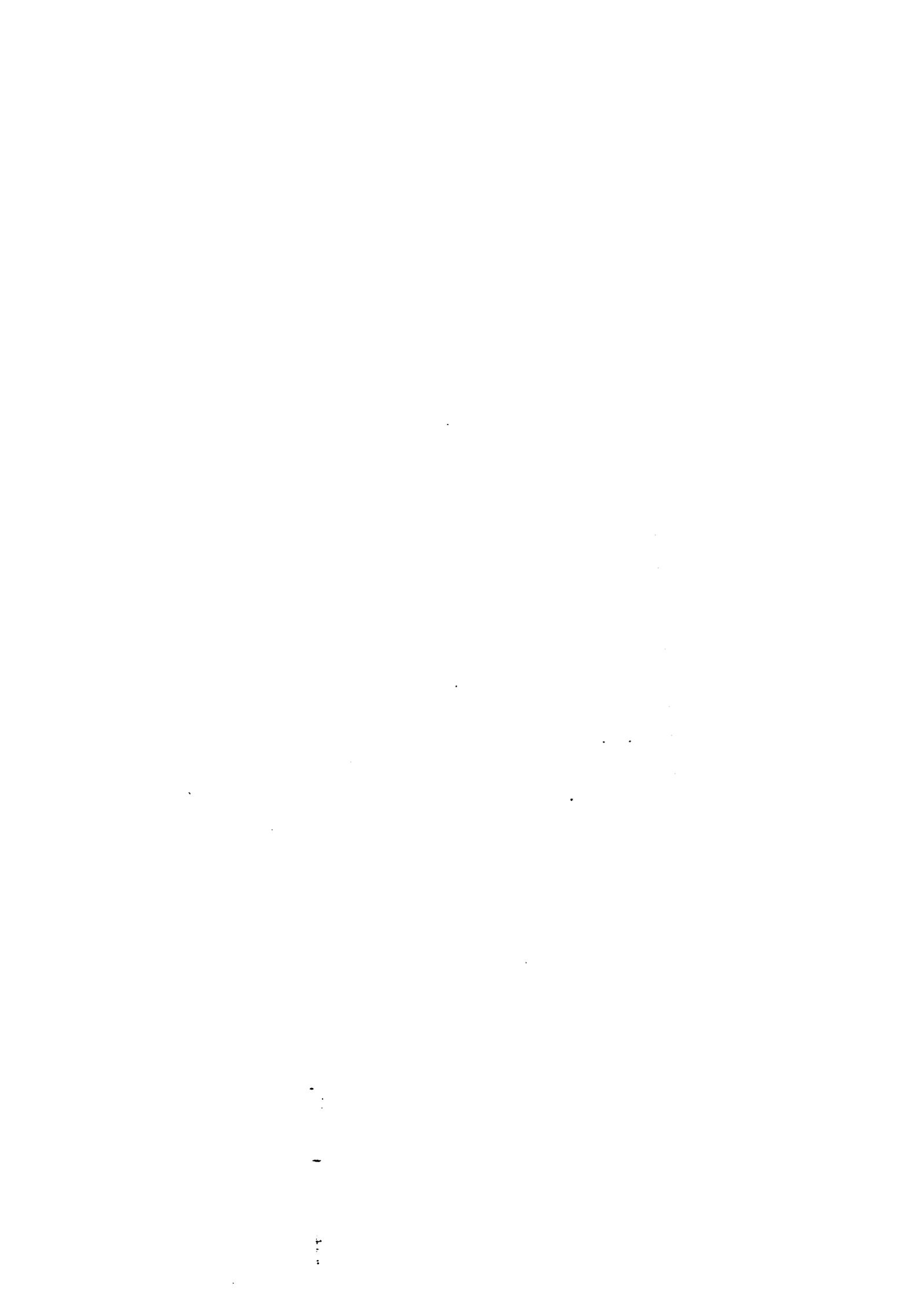
**DON ENRIQUE OTERO AENLLE, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR  
DEL DEPARTAMENTO DE FISICO-QUIMICA Y TECNICAS  
INSTRUMENTALES DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.**

**CERTIFICA:** Que al presente trabajo titulado "Estudio por capas monomoleculares de poli-L-metionina y poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato con fosfolípidos", ha sido realizado por la licenciada Doña Julia Cordoba Gallardo, en el laboratorio del citado Departamento bajo mi dirección, constituyendo la tesis doctoral de la interesada, cuya presentación autorizo.

Para que conste firmo el presente certificado en Madrid, a veintisiete de noviembre de mil novecientos ochenta y uno.



Fdo: D. Enrique Otero Aenlle



El presente trabajo ha sido realizado en el Laboratorio de Fisico-Química de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Prof. Dr. D. Enrique Otero Aenlle, a quien expreso mi agradecimiento por su orientación y consejo.

Asimismo, quiero hacer constar mi gratitud al Dr. D. Albert Martínez, Profesor de Investigación de la Sección de Química-Física de Coloides del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, por su labor de asesoramiento y crítica, así como su constante ayuda en la realización de este trabajo.

Igualmente mi agradecimiento y cariño a todos -- mis compañeros del Laboratorio.

Madrid, Noviembre 1981



## INDICE

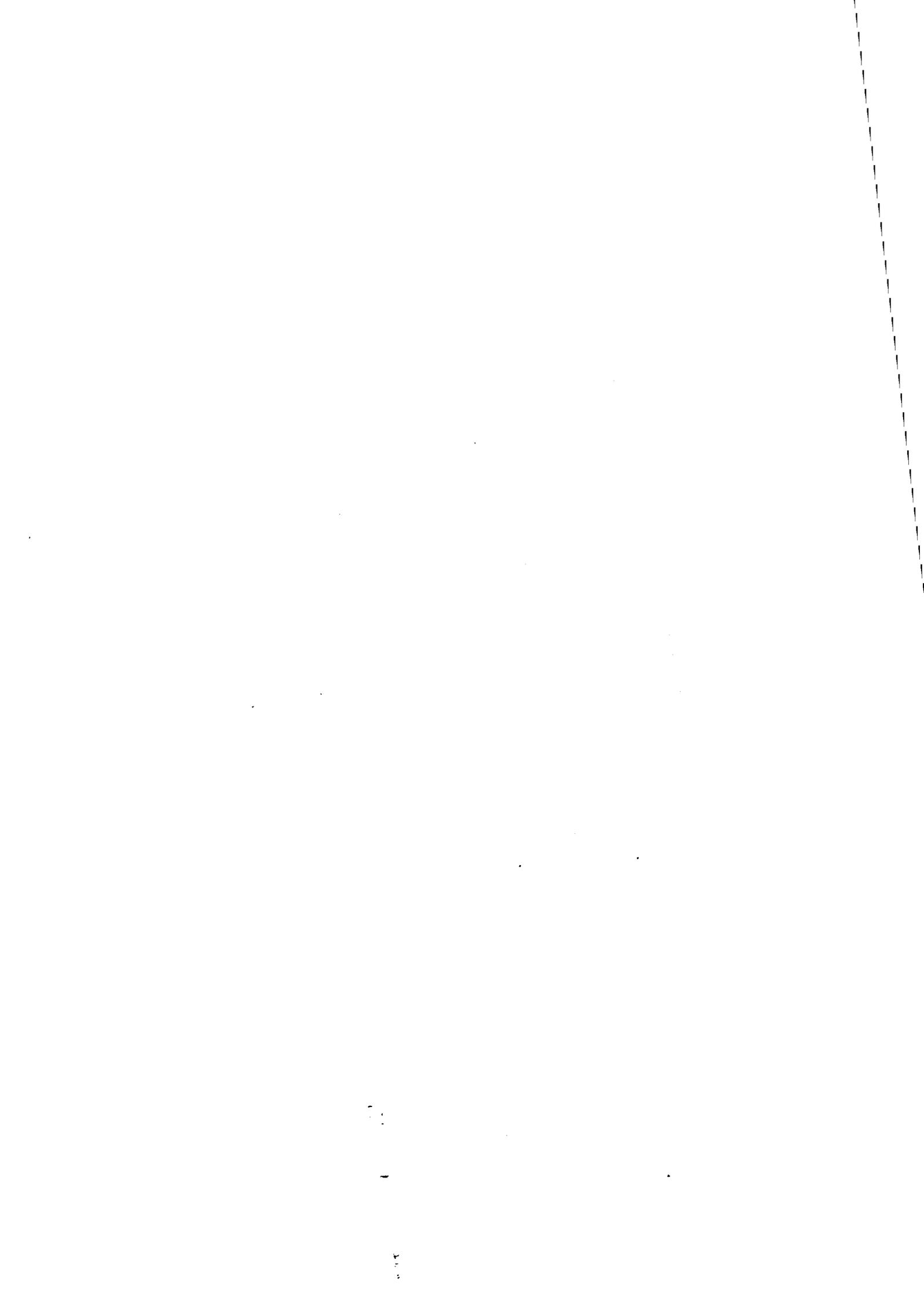
	<u>pág.</u>
I - INTRODUCCION . . . . .	1
II - PARTE EXPERIMENTAL	
2.1. MEDIDA DE PRESIONES SUPERFICIALES EN MONO- CAPAS . . . . .	34
2.1.1. Descripción del aparato . . . . .	34
2.1.2. Calibrado del aparato . . . . .	37
2.2. MATERIALES UTILIZADOS . . . . .	42
2.2.1. Polipéptidos. . . . .	42
2.2.2. Fosfolípidos. . . . .	42
2.2.2.1. Control de pureza . . . . .	44
2.2.2.2. Control de oxidación. . . . .	44
2.2.2.3. Análisis cuantitativo . . . . .	45
2.3. TECNICA OPERATORIA. . . . .	48
2.3.1. Preparación de soluciones . . . . .	48
2.3.2. Técnica de siembra. . . . .	49
2.3.3. Modo de compresión de la monocapa . . . . .	50
2.3.4. Isotermas de compresión $\pi$ -A . . . . .	51
2.3.5. Formación de monocapas mixtas . . . . .	51
III - RESULTADOS . . . . .	
3.1. FORMACION DE MONOCAPAS PURAS DE FOSFOLIPI- DOS. ISOTERMAS DE COMPRESION DE FOSFATIDIL COLINA NATURAL Y 1,2 DIOLEIL-L- $\alpha$ -FOSFATI- DILCOLINA . . . . .	53
3.2. FORMACION DE MONOCAPAS PURAS DE POLIPEPTI- DOS. POLI-L-METIONINA Y POLI-P-METIL-L-GLU- TAMATO. . . . .	57

	<u>pág.</u>
3.2.1. Monocapas de poli-L-metionina. Isotermas de compresión.Efecto del disolvente. .	57
3.2.2. Estudio de la reversibilidad de la monocapa de PM obtenida con un disolvente no polar . . . . .	60
3.2.3. Monocapas de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato. Isotermas de compresión.Efecto del disolvente . . . . .	62
3.2.4. Estudio de la reversibilidad de la monocapa de PHG obtenida con disolvente no polar . . . . .	64
3.3. MONOCAPAS MIXTAS DE POLIPEPTIDOS Y FOSFOLIPIDOS . . . . .	66
3.3.1. Monocapas mixtas de poli-L-metionina y fosfatidilcolina de yema de huevo. Red de isotermas de compresión . . . . .	66
3.3.2. Monocapas mixtas de poli-L-metionina y 1,2 dioleilfosfatidilcolina. Red de isotermas de compresión. . . . .	68
3.3.3. Monocapas mixtas de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato y fosfatidilcolina de yema de huevo. Red de isotermas de compresión . . . . .	70
3.3.4. Monocapas mixtas de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato y 1,2 dioleilfosfatidilcolina. Red de isotermas de compresión . . . . .	70
IV - DISCUSION . . . . .	

	<u>pág.</u>
4.1. MONOCAPAS DE FOSFOLIPIDOS . . . . .	74
4.2. MONOCAPAS DE POLIPEPTIDOS . . . . .	77
4.3. MONOCAPAS MIXTAS . . . . .	96
V - CONCLUSIONES . . . . .	134
VI - BIBLIOGRAFIA . . . . .	138



## **INTRODUCCION**



GENERALIDADES SOBRE MODELOS DE MEMBRANA

La formulación de un modelo de membrana, debe plantearse dentro de unos márgenes lo suficientemente amplios que permitan diseñar una estructura capaz de explicar funciones de muy diversa índole y especificidad, ya que si bien debe existir un cierto grado de similitud entre las diferentes membranas, cada una de ellas en particular puede diferir en detalle, dependiendo de su composición molecular y modo de la interacción de los componentes, lo que, en definitiva, determinará su especificidad.

El modelo de membrana que ha tenido una vigencia más prolongada es el de DANIELLI-DAVSON(1), que incluía la proteína en la bicapa propuesta por GORTER y GREDEL en el año 1925 (2). La confirmación definitiva pareció alcanzarse con los estudios de microscopía electrónica de ROBERTSON (3) y la formulación de la teoría de unidad de membrana.

Este modelo proponía la existencia de una capa lipídica continua de espesor bimolecular, de forma que las cadenas de ácido graso ocupaban el núcleo central de la membrana. La proteína quedaría extendida sobre ambas superficies de la bicapa..

A partir de las ideas de SINGER, BENSON propuso en 1966 un nuevo modelo (4) que postula la existencia de proteínas fundamentalmente globulares dispuestas en el interior de la membrana, maximizando las interacciones hidrofóbicas. Las moléculas lipídicas, sin embargo, no se presentan en bicapa.

## 2

Las cadenas de ácidos grasos están individualmente intercaladas entre las cadenas de proteína, con las cabezas polares de los lípidos hacia la superficie exterior de la membrana en contacto con el agua. Esta estructura da lugar a un complejo de lipoproteína más o menos uniforme por lo que se propone que dichos complejos puedan existir como subunidades morfológicas que se mantendrían por medio de interacciones hidrofóbicas en el plano de la misma.

Dado que esta estructura satisfacía los requisitos para explicar las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas y parecía tener una energía libre más baja que la del modelo de DANIELLI-DAVSON, se consideró su esquema como más probable.

No obstante, parece que tiene un estado de energía demasiado alto para constituir el modelo general de organización para lípidos y proteínas en la mayoría de las membranas. El intercalar las cadenas de ácidos grasos no polares con las cadenas polipeptídicas en el interior de la membrana podría, en virtud de la separación de éstas, evitar la formación del máximo número de puentes de hidrógeno interpeptídico y esto, desde el punto de vista termodinámico, no es satisfactorio.

Naturalmente el concepto de estructura de membrana difiere profundamente de la primera idea de barrera inerte debido fundamentalmente al mayor conocimiento que se posee sobre el microentorno molecular de la membrana. Se conciben las membranas como estructuras integradas por una serie de

moléculas que presentan una elevada movilidad en constante interacción entre ellas y las del medio externo que las rodean.

Esta concepción, fue recogida y expresada en el modelo propuesto por SINGER (5) (6) en 1972, en donde lípidos y proteínas exhiben una serie de peculiaridades de tipo dinámico y estructural, que las diferencian de las propuestas en modelos anteriores. Sobre esta base se realizaron posteriores experimentos referidos a la naturaleza de las interacciones lipido-proteína, lo que ha permitido que este modelo fuera más claramente delimitado, designándose como modelo de mosaico fluido.

En el mismo los lípidos y las proteínas integrales-globulares están dispuestos alternativamente en forma de mosaico por toda la membrana. Las porciones hidrofóbicas de los lípidos y una gran parte de residuos de aminoácidos no polares de las proteínas están fuera del contacto del agua, principalmente en el interior hidrofóbico de la membrana; los grupos iónicos de los lípidos, así como los de las proteínas, están en contacto directo con el agua, predominantemente sobre las superficies exteriores de la membrana.

Los fosfolípidos en este modelo son, en principio, presentados en una forma similar a la bicapa propuesta por DANIELLI-DAVSON (1952); con la diferencia significativa de que en el modelo de mosaico fluido los grupos iónicos de estos están expuestos en la fase acuosa y la bicapa no es continua. La naturaleza de la bicapa no es simple, ya que existe un elevado grado de heterogeneidad entre las cadenas de los ácidos grasos en los lípidos en relación con su longitud y grado de saturación.

Las proteínas globulares en el mencionado modelo pueden sobresalir en la fase acuosa más allá del límite de la bicapa lipídica y así, el espesor medio de la membrana puede ser superior al que corresponde a la propia bicapa.

Una de las mayores diferencias entre este modelo y el de ROBERTSON-DANIELLI-DAVSON concierne a las proteínas de membrana. En el primero, las proteínas son consideradas en su mayoría como globulares, estando intercaladas en el interior de la membrana, e implicadas íntegramente en el mantenimiento de la estructura de éste. La característica globular fue apoyada al encontrarse que la conformación media de las proteínas en membranas intactas es parcialmente  $\alpha$ -hélice y cadena estadística. Por tanto la intercalación de proteínas globulares en la membrana es fundamentalmente una cuestión termodinámica, y se supone que el mantenimiento de lípidos y proteínas juntos es más debido a interacciones hidrofóbicas que a electrostáticas. El grado de penetración de las proteínas globulares en el interior de la membrana dependerá tanto de su tamaño como de sus propiedades estructurales.

Por ello, como las proteínas constituyen fracciones importantes de bastantes membranas y muchas son responsables de su permeabilidad específica y características enzimáticas, ambos modelos no son sólo estructuralmente diferentes, sino que también conducen a características funcionales totalmente distintas.

En lo que respecta a la diferencia entre el modelo de BENSON y el del mosaico fluido, es que, en el último, el volumen de los lípidos existe como una fase de bicapa físicamente

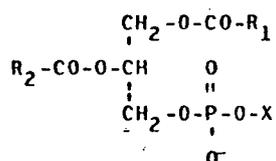
diferenciado con el volumen de la proteína globular en el plano de la membrana, mientras en el primero , los volúmenes de lípido y proteína, están integrados en una fase única. En el modelo tipo mosaico las cadenas de las proteínas sólo están plegadas hacia arriba, en general en orden a maximizar sus interacciones hidrofóbicas internas y los enlaces de hidrógeno no están interferidos por la intercalación de un gran número de cadenas de ácidos grasos.

LIPIDOS

En las estructuras de membrana, los lípidos poseen dentro de su misma molécula, regiones con carácter hidrofóbico y otras con carácter hidrofílico. Este carácter anfipático es muy apropiado para la formación de interfases entre un medio polar y otro que no lo es, además de facilitar la mutua interacción de estas moléculas entre sí.

En base a su estructura química, los lípidos que integran normalmente las membranas de células eucarióticas, son fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos y esteroides, estando tan sólo presentes los dos primeros grupos en el caso de células procarióticas.

Los fosfolípidos pueden considerarse derivados del ácido 3-sn-glicerofosfórico. Su estructura básica es un diglicérido con un ácido fosfórico esterificando el grupo hidroxilo primario del resto glicerol. Normalmente el fosfato se combina, en unión diéster, con un aminoalcohol dando lugar a diferentes tipos de fosfolípidos, de los que los más importantes quedan resumidos a continuación:



X =  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-}\overset{1}{\text{N}}\text{H}_3$  : 1,2 diacil-3-sn-glicerofosforiletalonamina.



dicas separadas por un cierto espaciado acuoso. Una propiedad de estas estructuras, es su capacidad para sufrir una transición termotrópica de un estado gel a otro tipo cristal-líquido, que procede de una fusión cooperativa de las cadenas hidrocarbonadas en el interior de la bicapa. En estos casos y a diferencia de las transiciones entre las distintas mesofases de los fosfolípidos, la fusión selectiva de las cadenas hidrocarbonadas no conlleva cambios espectaculares de la disposición molecular, de forma que la estructura de bicapa se mantiene tanto por debajo como por encima de la temperatura de transición. Esta temperatura de transición gel  $\rightarrow$  cristal-líquido depende fundamentalmente de la estructura y longitud de la cadena de los ácidos grasos constituyentes de las moléculas de fosfolípido. El valor de la temperatura de transición,  $T_c$ , aumenta con la longitud de las cadenas hidrocarbonadas y disminuye al elevarse el contenido de agua del sistema, que depende, a su vez, de la naturaleza química de los grupos polares de los lípidos. La adición de agua al material lipídico anhidrido hace que la temperatura de transición descienda bruscamente, lo que pone de manifiesto que la interacción lípido-agua desestabiliza la estructura cristalina correspondiente. El valor límite de  $T_c$ , denominado punto de Krafft, se alcanza para contenidos superiores al 30%.

La estructura de las cadenas hidrocarbonadas de dipalmitoil lecitina en fase gel está bien determinada. Los estudios de difracción de rayos X demuestran que para la máxima hidratación, las cadenas hidrocarbonadas están agrupadas en

una red hexagonal altamente ordenada, con el eje longitudinal de las cadenas inclinado  $58^\circ$  aproximadamente con respecto al plano normal de la bicapa según unos autores (10) (11), y casi perpendicularmente según otros (12). Este empaquetamiento exige que todos los enlaces carbono-carbono de las cadenas adopten una conformación próxima a la trans.

La naturaleza de la fase cristal-líquido es menos conocida, aunque parece claro que las cadenas hidrocarbonadas se encuentran más desordenadas que en la fase gel, como consecuencia de una considerable movilidad molecular debida a la aparición de rotaciones intramoleculares sobre enlaces carbono-carbono a la temperatura de transición de fases (13). Es evidente que, en este caso, deben aparecer fluctuaciones térmicas simétricas en la longitud de los dobles enlaces carbono-carbono y variaciones en los ángulos torsionales carbono-carbono-carbono de las cadenas de forma que se puede adoptar una configuración a izquierda. La interconversión entre diferentes conformaciones sería el resultado de rápidas isomerizaciones y colisiones de las cadenas.

### LA BICAPA LIPIDICA

En los últimos años se han desarrollado dos tipos fundamentales de sistemas modelo, en relación con los componentes lipídicos de las membranas naturales, y con dimensiones transversales similares a las de los sistemas biológicos. Las propiedades físicas de cada uno de estos modelos; vesículas constituidas por una bicapa de fosfolípidos separada por dos fases acuosas (14), o bien dispersiones acuosas de fosfolípido o liposomas (15), han demostrado ser muy similares a las que presentan las membranas naturales, siendo particularmente útiles para el estudio de interacciones lipido-proteína en sistemas acuosos.

La cuestión básica a la que se orientan los estudios de las propiedades físicas de estos modelos es el poder establecer la relación entre la estructura del componente lipídico en las membranas naturales y las funciones que presentan estos sistemas biológicos.

En el caso de los liposomas, aunque la composición de la fase laminar puede estar perfectamente determinada, y su estructura es conocida, resulta difícil relacionar las propiedades biológicas de este modelo con el área superficial de las láminas lipídicas. Esto se debe al hecho de que en los sistemas de este tipo, las dispersiones son un conjunto heterogéneo de estructuras laminares multiconcéntricas, que varían ampliamente en tamaño, forma y contenido en agua.

Por el contrario, con el otro modelo, es posible disponer de vesículas esféricas de tamaño relativamente homogéneo, consistentes en una simple lámina con dimensiones de bicapa. Siendo la organización molecular y empaquetamiento semejante al que se produce en los liposomas multilamelares.

Aunque las moléculas lipídicas ocupan áreas iguales en las superficies interior y exterior de la bicapa, se ha sugerido que las cadenas de los ácidos grasos en vesículas podrían estar más desordenadas que en liposomas, lo cual llevaría a propiedades de membrana diferentes para los dos modelos. Existe cierta controversia en este punto, pues si bien determinados autores han demostrado que la anchura y entalpía de la transición de fase gel  $\rightarrow$  cristal-líquido de dipalmitoil y dimiristoil lecitina no se afectan por la sonicación del sistema (16), también se defiende la posibilidad contraria en el sentido de que la sonicación introduce considerables alteraciones sobre diversos parámetros físicos de la estructura modelo (17).

Aunque la presencia de proteína y otros componentes de membrana deben inevitablemente alterar la estructura de la bicapa lipídica en mayor o menor grado, es evidente que el estado físico de los lípidos en una bicapa modelo, está íntimamente relacionado con la estructuración de dichas moléculas en membranas intactas, lo cual confirma la validez e interés de cada uno de los modelos utilizados (18) (19) (20) (21).

### CAPAS MONOMOLECULARES

La opinión actual acerca de las membranas biológicas es que la mayoría de las moléculas de éstas están estructuradas en el seno de una bicapa lipídica (22). Aunque existen dudas de que el modelo de bicapa describa correctamente la organización de fosfolípidos en dispersiones de lípidos aislados - bajo las mismas condiciones, estudios por diversas técnicas, (23) (24) (25) son consistentes con dicha organización dentro de las membranas.

Una simplificación de los modelos de membrana mencionados, lo constituyen las monocapas o capas monomoleculares obtenidas por extensión en interfases agua/aire o aceite/agua de los principales componentes de las membranas biológicas - (lípidos y proteínas).

Es posible criticar la elección de una monocapa como modelo de membrana, por ser un sistema cuyo estado energético es claramente diferente al que posee una bicapa o una membrana. Sin embargo existen suficientes evidencias que indican que una monocapa constituye una buena aproximación a media bicapa (26), y que la bicapa lipídica es un factor estructural importante en la mayoría, si no todas las membranas.

Aún teniendo en cuenta las limitaciones que, como modelo de membrana tiene una monocapa, su estado de organización, orientación, y empaquetamiento moleculares, ha de ser muy semejante al existente en los sistemas biológicos naturales, y

los estudios realizados sobre ellas pueden suministrar valiosa información sobre la estructura y naturaleza de las interacciones entre sus componentes.

Las técnicas para el estudio de monocapas se centran especialmente en la obtención de isothermas de compresión, medidas de potenciales de superficie y la medida de propiedades viscoelásticas, que pueden dar información acerca del espaciado molecular en condiciones distintas de empaquetamiento, orientación de las moléculas, distribución de las cargas, etc.

Estos métodos estándar de química superficial son valiosos pero la información obtenida es restringida y en algunos casos la interpretación de los datos es bastante especulativa. Para salvar este vacío entre la química superficial clásica y los métodos usuales de investigación estructural, en orden a obtener más información, se está utilizando en los últimos años técnicas espectroscópicas y más recientemente de difracción de rayos-X pudiéndose seguir el estado de la superficie a medida que se comprime la monocapa. El traslado de la monocapa fuera de la superficie y la consiguiente formación de multicapas se realiza por el método de LANGMUIR-BLODGETT (27) también se pueden formar multicapas orientadas por depósito de solución del material bajo investigación sobre un soporte con posterior evaporación del solvente.

MONOCAPAS DE FOSFOLIPIDOS

Cuando una molécula de cadena anfipática se extiende en una interfase aire/agua los grupos polares se introducen en la fase acuosa, mientras las cadenas hidrocarbonadas se orientan hacia la fase no polar, con lo que se obtiene el mínimo de energía potencial para el sistema interfacial, quedando constituida una capa del espesor de una molécula.

GAINES Y GERSHFELD han estudiado con detalle los diferentes estados físicos de monocapas insolubles (28) (29).

Los estudios de monocapas de lípidos de interés biológico comenzaron con los trabajos de GORTER Y GREDEL en 1925 (30), aunque al ser realizados con sustancias mal definidas extraídas de fuentes naturales, se hizo difícil la interpretación de sus resultados. ANDERSON y PETHICA (31) hicieron el primer estudio de una lecitina sintética.

En los últimos años, los estudios sobre monocapas de fosfolípidos puros ha ido en aumento, haciendo posible explicar el comportamiento en interfases de mezclas de fosfolípidos naturales conocida su composición, siendo éste el primer paso hacia el estudio de mezclas de lípidos que darán información acerca de las interacciones lipido-lipido, para así, finalmente, estudiar mezclas de lípidos y proteínas que se aproximan más a la verdadera situación biológica.

Los trabajos correspondientes a monocapas de fosfolípidos puros fueron recientemente revisados por PETHICA y CANDEN HEAD (32) (33).

VAN DEENEN y col. han hecho un estudio bastante completo de una serie de fosfolípidos naturales y sintéticos (34) - observando que el área ocupada por las moléculas de fosfolípido, es mayor a medida que se acortan las cadenas hidrocarbonadas, o aumenta el número de dobles enlaces en las mismas. Según este autor, el área por molécula a partir de presiones moderadamente altas, disminuye en el siguiente orden:

Fosfatidil colina > fosfatidilserina > ácido fosfatídico > fosfatidil etanolamina.

Suponiendo las mismas condiciones de longitud de cadena hidrocarbonada y grado de insaturación, esto indica que también el grupo polar es responsable de una diferencia de área entre las moléculas de los distintos fosfolípidos.

PHILLIPS y CHAPMAN (35) estudiaron las características de algunos homologos de 1,2 diacil-L-fosfatidilcolinas y etanolaminas extendidas en interfase aire/agua (ClNa 0.1 M) a 22° C, mostrando que la conducta es paralela a la de la serie homóloga de los ácidos grasos saturados. De todos los fosfolípidos estudiados en estas condiciones sólo algunos presentan una transición de fase, en el caso de las lecitinas corresponde al homologo de dipalmitoil (C<sub>16</sub>) y en el caso de las etanolaminas a de dimiristoil (C<sub>14</sub>).

SHATH y SCHULMAN, trabajando con lecitinas sintéticas y naturales (36) (37), estudiaron el efecto de la insaturación de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos en

las monocapas. Como lecitinas sintéticas utilizaron dipalmitoil lecitina y dioleil lecitina, como naturales lecitina de soja y de huevo. Las cadenas hidrocarbonadas de la lecitina de soja son ambas insaturadas en el mismo grado, mientras que la lecitina de huevo tienen una cadena insaturada y otra saturada. Se observó que cuanto mayor era el grado de insaturación, más expandidas resultaban las monocapas. El área por moléculas de estas lecitinas sigue el orden:

dipalmitoil < yema de huevo < dioleil lecitina.

Un dato importante es el conocimiento de la temperatura de transición para una lecitina en exceso de agua, ello condujo a la predicción del estado físico de una monocapa a cualquier temperatura de forma que, cuando la temperatura experimental es superior a la temperatura de transición, la monocapa está completamente expandida y la isoterma  $\Pi$ -A no muestra una región intermedia y cuando aquella sea inferior a dicha temperatura de transición será condensada.

PHILLIPS y CHAPMAN (35) estudiaron las monocapas de dipalmitoil lecitina sobre sustrato Cl N<sub>a</sub> 0.1 M a diferentes temperaturas por debajo de su temperatura de transición, observando una transición de fase para el intervalo 12.4 -29.5°C; a temperaturas superiores o inferiores o a las citadas, desaparece la transición haciéndose más expandidas o más condensadas.

STANDISH y PETHICA (38) estudiaron asimismo el efecto del pH sobre la compresión de fosfolípidos sintéticos obser-

vando que, para la dipalmitoil fosfatidil etanolamina extendida sobre  $\text{ClNa}$  0.01 y 0.1 M a  $23^\circ \text{C}$ , las isoterms aparecen más expandidas a medida que aumenta el pH. Concluyeron que era debido a que la carga neta del grupo polar del fosfolípido es mayor al aumentar aquel, lo que ocasionaría un mayor efecto de repulsión entre sus moléculas.

Los éxitos obtenidos durante los últimos años al utilizar medidas de fluorescencia para la investigación del aspecto dinámico de la conducta de fosfolípidos en biomembranas, hizo que TEISSIE (39) aplicase dicha técnica a monocapas de fosfolípidos extendidas en interfase aire-agua, observando que la región glicerol de un fosfolípido, independientemente de la naturaleza de la parte polar, no es afectada estructuralmente por un estado de ionización o por el estado físico de las cadenas hidrocarbonadas.

CORRELACION DE MONOCAPAS Y BICAPAS

Ya se mencionó anteriormente la importancia del estudio de monocapas de lípidos en biofísica y su posible comparación con la mitad de una bicapa lipídica. Esta conexión se hizo al observar que la similitud de sus estructuras implica que una bicapa puede compararse con una monocapa a presión lateral constante; para algunos autores (40) (41) (42) este valor es 50 din/cm, mientras que para otros es 12,5 din/cm (43). La analogía no es completa, sin embargo, la transición principal de la monocapa, estado líquido expandido  $\rightarrow$  estado líquido condensado, corresponde a una similar en bicapas lipídicas y biomembranas. Esto justifica la conclusión de que el estudio de monocapas de lípido puede conducir a un mejor conocimiento de la estructura y función de las membranas biológicas.

### MONOCAPAS DE POLIPEPTIDOS

Si se extiende de modo apropiado una pequeña cantidad de una disolución de proteína en una interfase aire/agua, la mayor parte de la proteína sufrirá un cambio conformacional más o menos importante o una desnaturalización superficial y se obtiene una monocapa insoluble antes de que la proteína pueda disolverse.

El estudio de polipeptidos sintéticos permite la clasificación de muchos aspectos de los fenómenos observados primeramente con proteínas más complejas, ya que debido a la síntesis de estos en 1955, se pudieron llevar a cabo estudios con sistemas mucho más sencillos y mejor definidos que las proteínas naturales.

Las conformaciones estudiadas para polipéptidos en la interfase son muy relevantes para resolver problemas referentes a la estructura de la membrana y a la actividad y desnaturalización superficial de proteínas.

La idea tradicional de la estructura de proteínas en la interfase aire/agua describe el esqueleto de estas como formado por una cadena extendida con cada uno de los monómeros de aminoácido localizados en la interfase. Los estudios espectrales de membranas han mostrado, sin embargo, conformaciones  $\alpha$ -hélice o de tipo cadena estadística mejor que cadenas  $\beta$ -extendidas (44). Estas configuraciones han sido confirmadas por estudios espectrales en films superficiales de proteínas y polipeptidos, así como en monocapas colapsadas.

Los modelos de cadena extendida fueron aceptados principalmente para monocapas que ocupan grandes áreas de proteínas y polipeptidos que eran coherentes con las calculadas a partir de modelos de cadenas de polipeptidos extendidas bien empaquetadas; sin embargo recientemente los cálculos han mostrado que las conformaciones helicoidales dan lugar también a áreas moleculares altas (45).

Actualmente la investigación se ha orientado a encontrar una correlación precisa de la conformación polipeptídica con las características de sus monocapas, por medio del uso de métodos combinados de espectroscopia y química superficial.

En 1960 BLOUT, FASMAN y col. (46) postulan dos tipos de L-aminoácidos.

- a) Formadores de  $\alpha$ -helice
- b) Formadores de  $\beta$ -estructura, o de cadena-estadística

En estos últimos, la no formación de  $\alpha$ -helice puede deberse a impedimentos estéricos, como en el caso de L-valina, o bien a la presencia de un heteroátomo unido al carbono  $\beta$  como en el caso de la poli-L-cistina y derivados. Todo ello está confirmado por los trabajos de FRASER (47),

Sin embargo, últimamente se ha observado que existe una mayor complejidad en el estudio de la conformación de polipéptidos en interfases mediante la aplicación de modernas técnicas espectroscópicas; llegándose a las siguientes conclusiones:

- a) - Se conocen diversas estructuras- $\beta$ , cada una de las cuales tiene propiedades diferentes.

- b) - No hay un tipo de estructura puro para un determinado polipéptido, sino que generalmente se presenta más de una forma.
- c) - Hay una marcada influencia de la composición del disolvente extensor empleado para formar la monocapa.

En general para disolventes no polares, no rompedores de puentes de hidrógeno, tales como 1,2 dicloroetano (DCE) y cloroformo (CF) las sustancias formadoras de  $\alpha$ -hélice presentan dicha estructura prácticamente en un 100%. Sin embargo, cuando se adiciona un disolvente rompedor de puentes de hidrógeno como los ácidos dicloroacético y trifluoroacético, desaparece la conformación  $\alpha$ -hélice a medida que se aumenta la proporción del disolvente polar y la molécula adquiere forma de cadena estadística o estructura- $\beta$ . Estos hechos fueron comprobados por LOEB y BAIER (48) estudiando monocapas de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato extendidas en diferentes disolventes y utilizando técnicas espectroscópicas para el análisis de las conformaciones presentes en las monocapas. Posteriormente, estos resultados fueron confirmados, para el mismo polipéptido, por GOUPIL y GOODRICH en 1976 (49) y CORNELL en 1979 (50).

MALCOLM en 1968 realizó un estudio de la estructura y propiedades de monocapas de polipéptidos sintéticos (ésteres del ácido poli-L-glutámico y polímeros con cadenas laterales hidrocarbonadas) extendidas en la interfase aire/agua. Complementados los métodos directos de química superficial con técnicas de espectroscopia infrarroja y difracción de electrones sobre films colapsados trasladados desde la superficie (51).

Observó que en todos los casos las propiedades de las monocapas son consistentes con una estructura formada por  $\alpha$ -helices en un estado condensado y empaquetadas en grupos paralelos, y muestra como las cadenas laterales hidrofóbicas y la accesibilidad de los grupos péptidos al agua influyen en el cambio de esta conformación a otra.

Siguiendo esta línea de investigación, combinación de técnicas superficiales y espectroscópicas, han sido muchos los autores que han estudiado la conformación de polipéptidos en la interfase aire/agua. LLOPIS y col. (52) estudiaron monocapas de polipéptidos que contienen azufre.

GABRIELLI, G. y col. (53) estudiaron para varios polipéptidos sintéticos (poli- $\beta$ -benzil-L-aspartato y esteres del ácido poli-L-glutámico) el efecto del solvente de extensión y de la conformación en solución sobre la conformación polimérica en una interfase aire/agua y caracterizaron las monocapas con ecuaciones de estado bidimensionales.

MONOCAPAS MIXTAS

El estudio de monocapas formadas por mezclas de distintos tipos de lípidos o de lípidos y proteínas, se aproxima más estrechamente a lo que sucede en los sistemas naturales y puede dar información sobre los efectos de interacción entre lípido-lípido y lípido-proteína.

El método de estudio en monocapas mixtas es similar al seguido para monocapas de un sólo componente puro, la interpretación de los datos de presión superficial para un sistema binario en una interfase sigue líneas análogas al estudio de sistemas binarios en el seno de una disolución, en el sentido de que las desviaciones de la situación ideal son utilizadas para indagar la naturaleza de las interacciones.

En general, cualquier desviación del comportamiento ideal indica que los componentes de la monocapa mixta son miscibles, pudiendo ser esta desviación: positiva cuando existe una expansión de la monocapa debida a repulsiones o a un grado de desorden mayor, negativa si existe una condensación de la monocapa debida bien a interacciones atractivas o a un efecto de cavidad intermolecular.

Por el contrario, el que se cumpla la regla de aditividad puede deberse a la ausencia de cualquier tipo de interacción o a la no miscibilidad de los componentes en la monocapa.

La miscibilidad puede detectarse, si las moléculas forman agrupaciones suficientemente extensas, por medidas de potenciales de superficie que muestran fluctuaciones en su va-

lor según se mida sobre un componente u otro. Aunque puede suceder que las agrupaciones de moléculas de una misma clase no sean muy extensas debido a las condiciones de extensión.

CRISP demostró que cuando las monocapas de los componentes puros son coherentes y ambos componentes son miscibles en dos dimensiones, las monocapas mixtas muestran un aumento en la estabilidad de la presión superficial (54).

Siguiendo este razonamiento GAINES en 1965 (55) y posteriormente JOOS (56) (57) llegaron a la conclusión de que en una monocapa insoluble mixta con componentes inmiscibles se observan dos presiones de colapso (máxima presión superficial a la que la monocapa es estable respecto al sustrato). En el caso de una monocapa con componentes miscibles solamente se observa un punto de colapso.

Cuando el colapso de la monocapa pura se puede detectar fácilmente, a la presión de expansión de equilibrio, es posible determinar la miscibilidad de los componentes midiendo la presión de colapso del componente que lo hace a presión más baja, para distintas fracciones molares del mismo.

PHILLIPS y col. (58) han estudiado monocapas mixtas de fosfolípidos con diferentes longitudes de sus cadenas hidrocarbonadas y grado de insaturación. Encontrando que cuando la diferencia de longitud de las cadenas hidrocarbonadas es mayor de dos átomos de carbono o tienen diferente grado de insaturación pueden ocurrir desviaciones de la situación ideal. Si la diferencia de longitud de las cadenas hidrocarbonadas es muy grande las monocapas mixtas tienen un comportamiento ideal

porque los dos componentes son inmiscibles.

Debido a la presencia de colesterol en la mayoría de membranas celulares se ha considerado de gran importancia biológica el estudio de la interacción de este con fosfolípidos. Es conocido que el colesterol puede condensar o reducir el área aparente ocupada por moléculas de fosfolípidos en la interfase aire/agua. Muchos autores han estudiado con detalle este fenómeno (59) (60).

La complejidad de las interacciones lípido-proteína en las estructuras de membrana naturales ha llevado a realizar grandes esfuerzos para conocer su naturaleza mediante investigaciones sobre modelos más sencillos. Como ya se ha expuesto en apartados anteriores, los lípidos y proteínas, principales constituyentes de la membrana, forman monocapas estables en la interfase aire/agua. Por esta razón la técnica de monocapas puede proporcionar un buen sistema para estudiar las interacciones lípido-proteína en interfases.

Uno de los métodos utilizados para estudiar esta interacción en monocapas, consiste en obtener la monocapa de lípido e inyectar la proteína bajo la misma, en la fase acuosa que la soporta, pudiéndose observar los efectos siguientes: a) si no hay asociación entre la proteína inyectada y la monocapa de lípido, tanto la presión superficial como el potencial superficial no cambian; b) si la proteína inyectada se absorbe en la capa inferior a la monocapa sin que exista realmente penetración, el potencial superficial variará apreciablemente, pero la presión superficial no variará mucho; c) en el caso de que

exista penetración, es decir, cuando hay interacción entre las partes polares y no polares de la proteína inyectada y las del lípido que constituye la monocapa original, el valor de la presión superficial cambiará notablemente y el potencial superficial tomará un valor intermedio entre el que tenía la monocapa inicial y el de una monocapa de la proteína inyectada. La penetración es menos probable si la monocapa está fuertemente empaquetada.

Muchos autores han relacionado el cambio medido en la presión superficial  $\Delta\Pi$ , al grado de penetración de la molécula de proteína en el film del lípido. A partir de estos estudios se concluyó que  $\Delta\Pi$  es una función de los siguientes factores: presión superficial inicial de la monocapa de lípido, estructura del lípido, concentración de la proteína en la superficie, carga sobre la proteína y la fuerza iónica del sustrato.

A pesar de que han sido numerosas las investigaciones realizadas por el método de monocapa, debido a la complejidad de la estructura y función de la membrana, son necesarios muchos estudios sistemáticos para poder describir satisfactoriamente el complejo lípido-proteína. En esta perspectiva BIRDI (61) ha estudiado la interacción entre la molécula de insulina y varios lípidos observando que la penetración de la molécula de insulina está determinada por las fuerzas de van der WAALS presentes en la monocapa de lípido, y que el grado de interacción de la proteína con la monocapa de lípido está relacionado con el carácter polar-apolar de dicha molécula de proteína. En relación al lípido mostró que el valor de presión superficial

límite( $\Delta H=0$ ) es superior en el colesterol que en los otros lípidos.

Tanto la penetración como la absorción de la proteína puede ser debida a fuerzas electrostáticas o hidrofóbicas, y es probable que un número determinado de aminoácidos en una proteína nativa compleja dé lugar a la formación equilibrada de enlaces múltiples con las monocapas de lípido, tales interacciones simultáneas pueden dar lugar a confusiones en la determinación de contribuciones individuales de aminoácidos diferentes. Este problema se puede evitar utilizando poliaminoácidos aislados como componentes del sistema protéico.

La poli-L-lisina es un polipéptido comunmente estudiado a causa de su alta solubilidad en agua. DEMEL y col. (62) adicionaron poli-L-lisina en el sustrato de monocapas de sulfato de cerebrosideo y de fosfatidilserina, hallando que la presión superficial decrecía ligeramente y después aumentaba lentamente hasta el valor inicial. De ello concluyeron que no existía penetración y que la poli-L-lisina era simplemente adsorbida por acciones electrostáticas.

CHATELAIN y col. (63) estudiaron también la interacción de lípidos y polipéptidos. El lípido fue extendido en la interfase aire/agua, los polipéptidos marcados se inyectaron en la subfase acuosa. Las medidas de presión y radioactividad superficial mostraron que: a) la conformación del polipéptido no sufre variación en la interfase aire/agua ni en la lípido/agua, b) la conformación del polipéptido adsorbido no es diferente de la que tiene este en solución, c) el número de molé-

culas de polipéptido adsorbido por la monocapa de lípido depende de la interacción electrostática, sin embargo, la naturaleza de la interacción entre las moléculas de polipéptido y lípido en el plano de la interfase es esencialmente hidrofóbica.

MILLER y BACH (64) han estudiado la interacción de polipéptidos básicos con monocapas de fosfolípidos midiendo la radiactividad superficial de los polipéptidos marcados adheridos a la monocapa de fosfolípido, encontrando que la capacidad de adsorción de las monocapas de fosfolípido aumenta con su carga negativa.

Sobre la dependencia de la adsorción respecto de la fuerza iónica, concluye que está determinada por tres tipos de interacción: a) atracción electrostática hacia la carga negativa superficial, b) repulsión electrostática entre las polibases adsorbidas, c) interacciones hidrofóbicas que implican ordenamientos estructurales específicos.

SHAFER (65) también abordó este problema llegando a la conclusión de que los cambios de presión superficial se producen solamente cuando interaccionan polipéptidos básicos con monocapas de lípidos cargados negativamente. Aunque la poli-L-lisina puede unirse a monocapas de fosfatidilcolina, esto le hace suponer que en la interacción intervienen únicamente los grupos polares del lípido y del poliaminoácido, sin que haya penetración, lo que ocasionaría cambios de presión en la monocapa.

En general, la posible interacción lípido-proteína por

el método de inyección de la proteína en la subfase acuosa transcurre a través de tres fases sucesivas: difusión de la proteína en dicha subfase, adsorción e interacción. En estas condiciones los cambios de presión superficial a área constante, suceden, inicialmente de una forma relativamente rápida, para después transcurrir lentamente, hasta llegar a alcanzar una situación de equilibrio. Por otra parte, la interpretación de estos fenómenos se centra en la interacción del lípido con algunos grupos específicos de la molécula de proteína.

VILALLONGA ha sugerido estudiar la interacción lípido-proteína mediante la técnica de TRURNIT (66), para la extensión directa de las proteínas en el mismo plano de la monocapa de lípido.

Desde este punto de vista, la obtención de monocapas mixtas puede hacerse partiendo de disoluciones que contienen los componentes mezclados en distintas proporciones, o extendiendo en la interfase cada uno de ellos por separado.

El primer método sólo es posible cuando existe un disolvente común pudiendo estudiarse el efecto de las interacciones en disolución que persisten en la interfase. En el segundo caso sólo son detectables las interacciones en situación bidimensional. Aquí es necesario tener en cuenta el importante papel que ha de jugar la difusión de las moléculas en la interfase.

GABRIELLI y col. ha estudiado las monocapas mixtas de polipéptidos y ácidos grasos, utilizando un disolvente común

para su extensión y muestra la influencia de la orientación bidimensional en la miscibilidad de ambos componentes en la interfase aire/agua (67) (68) (69).

BIRDI (70) utilizando igual método de extensión que el autor anterior, ha estudiado las monocapas mixtas de poli-L-alanina y lípidos en la interfase aire/agua, estimando el efecto de las fuerzas de van der WAALS sobre las interacciones, cuando otras fuerzas, tales como interacciones electrostáticas, están ausentes bajo las condiciones de experimentación.

OBJETO DE ESTA MEMORIA

El estudio de las interacciones lípido-proteína determinantes en gran medida del comportamiento de la membrana celular en procesos del tipo de permeabilidad y transporte de sustancias necesarias para la vida de la célula, está enormemente limitado, por la complejidad de las estructuras naturales y la dificultad de aislar proteínas intrínsecas de membrana en condiciones nativas.

La síntesis de poliaminoácidos ha permitido la preparación de sistemas modelo en los que se puede estudiar interacciones polipéptido-lípido en condiciones físicas equiparables a las de las membranas, mediante la técnica de obtención de monocapas mixtas fosfolípidos-poliaminoácidos. Esta técnica permite el estudio de la influencia de la conformación del polipéptido y la naturaleza química del residuo aminoácido, en la interacción con fosfolípidos de distinto grupo polar y grado de insaturación de las cadenas hidrocarbonadas.

En el presente trabajo se ha abordado el estudio por la técnica de capas monomoleculares, de mezclas de poliaminoácidos y fosfolípidos, con el objeto de ver la influencia de éstos últimos sobre el comportamiento del polipéptido cuando es extendido en una interfase aire-agua en condiciones tales que se mantenga una conformación ordenada del mismo, para

ello se ha partido de la observación realizada por varios autores acerca de que es posible obtener y caracterizar diferentes conformaciones macromoleculares de polipéptidos en la interfase dependiendo del disolvente utilizado en la extensión, ya que se ha demostrado que la conformación presentada en solución se mantiene en la interfase después de formada la monocapa.

Como polipéptidos hemos elegido: la poli-L-metionina y el poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato, ya que a pesar de las claras diferencias en sus cadenas laterales, ambos presentan una conformación ordenada  $\alpha$ -hélice cuando son extendidos en una interfase aire-agua, con un disolvente no polar; y como fosfolípidos: fosfatidilcolina natural de yema de huevo, mezcla de fosfatidilcolinas saturadas e insaturadas y 1,2 dioleil-L- $\alpha$ -fosfatidilcolina sintética totalmente insaturada.

Debido a que los componentes polipeptídicos estudiados no son solubles en soluciones acuosas, ha sido posible obtener las correspondientes monocapas mixtas en la interfase aire/agua por siembra de las mezclas polipéptido-lípido conjuntamente; es decir, se ha sembrado una solución en un disolvente común de ambos componentes en las proporciones deseadas.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que ambos fosfolípidos influyen en igual medida en el comportamiento de las monocapas del polipéptido, poli-L-metionina, y no afecta

a las del poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato, de donde se deduce que, la posible compatibilidad superficial fosfolípido-polipéptido está estrechamente relacionada con la cadena lateral del residuo aminoácido que constituye la cadena polipeptídica - más que el grado de insaturación del fosfolípido.



33<sup>2</sup>

PARTE EXPERIMENTAL

## 2.1. MEDIDA DE PRESIONES SUPERFICIALES EN MONOCAPAS

La determinación directa de la presión superficial en monocapas se lleva a cabo utilizando una balanza superficial de empuje horizontal, basada en el aparato ideado por Langmuir (71) y modificado posteriormente por diversos autores.

### 2.1.1. Descripción del aparato

La balanza superficial o "manómetro superficial" -- que se ha utilizado en el presente trabajo ha sido construido en el Instituto Pasteur de Paris; el dispositivo torsional de medida es de suspensión bifilar, basado en el modelo Dervichian (72) con diferentes velocidades de desplazamiento del pistón compresor y registro automático.

El aparato de medida se halla dentro de una vitrina metálica termostatzada que mantiene en el interior una temperatura ambiente constante ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). La base de la vitrina descansa sobre una poyata fija a una pared maestra, con objeto de evitar las vibraciones del sistema.

Este está formado por una cubeta rectangular de material plástico de 78.5 cm de longitud por 22 cm de anchura y 3 cm de profundidad, destinada a contener el líquido soporte sobre el cual se ha de extender el material de estudio. Colocado en el fondo de la cubeta se halla un serpentín de vidrio que permite mantener la temperatura del líquido soporte

o sustrato a una temperatura constante de  $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ , con ayuda de un sistema apropiado de regulación.

La superficie líquida se limita mediante un rectángulo de plástico parafinado de 0.03 cm de espesor, 16.5 cm de anchura y 68.5 cm de longitud. Este área puede variarse mediante una barrera móvil, del mismo material que el cuadro que se desliza apoyada sobre sus lados más largos comprimiendo o descomprimiendo la monocapa.

Esta barrera es movida por un dispositivo accionado por un motor que mediante un sistema de engranajes permite su desplazamiento en uno u otro sentido a velocidad constante, o bien realizar una compresión discontinua.

El área ocupada por la monocapa queda delimitada por esta barrera móvil, los lados longitudinales del cuadro y una segunda barrera de longitud un poco inferior a la distancia entre estos dos lados y unida a ellos por hilos vaselinados, que flotan sobre el líquido soporte e impiden el paso de material que forma la monocapa, permitiendo sin embargo pequeños desplazamientos de la barrera, como consecuencia de la presión ejercida por la monocapa durante la compresión. Estos desplazamientos provocan a su vez la torsión del péndulo de suspensión bifilar, debido a la pieza de plástico que pende del mismo y que se introduce en la ranura que posee la barrera descrita anteriormente.

En un péndulo de torsión de suspensión bifilar, el par es proporcional a la masa del sistema, y la modificación de este, por medio de masas adicionales permite operar a di-

36



Detalle del sistema de torsión

ferentes sensibilidades.

Las oscilaciones del péndulo de torsión son amortiguadas por medio de una lámina metálica, unida mediante una pequeña varilla perpendicular al mismo, sumergida en aceite de vaselina contenido en un recipiente lateral.

El ángulo de torsión, proporcional a la presión superficial de la monocapa, se detecta por medio de un sistema óptico, que concentra un haz luminoso sobre un pequeño espejo situado en la cruz de la balanza, el cual lo proyecta, - tras sufrir una nueva reflexión, sobre una célula fotoeléctrica móvil o seguidor de "spot", que forma parte de un - equipo registrador "Photodyne-Sefran". La velocidad de desplazamiento del papel en el que registran los valores de desviación torsional, está sincronizada con el movimiento de - la barrera móvil, obteniéndose así directamente sobre el - mismo la isoterma, presión superficial-área ( -A).

#### 2.1.2. Calibrado del aparato

La torsión medida se convierte en unidades de presión superficial mediante un calibrado previo de la balanza.

Para efectuar este calibrado se llena la cubeta de agua bidestilada. En el vástago metálico situado en el centro del cuadro que forma el sistema de torsión se dispone, en posición perpendicular, una varilla metálica provista de - cinco orificios, de los cuales, el central sirve para que di

cha varilla entre con exactitud en el vástago citado de acuerdo con la fig. 1. En los agujeros a y b de dicha varilla, situados a 5 cm del orificio central, según la fig. 2, se disponen dos pesas de forma circular y cuyo radio es, en cada una de 1 cm.

Encendido el dispositivo de iluminación, se hace oscilar el sistema, determinando el tiempo empleado por el spot luminoso en efectuar un recorrido completo a lo largo del papel de registro.

$T_1$  es el tiempo o periodo de oscilación del sistema cuando la distancia entre las pesas es de 5 cm, y  $T_2$  el que corresponde a una segunda medida, realizada de forma análoga a la ya descrita, en la que las pesas están situadas a una distancia de 10 cm.

Las determinaciones citadas se vuelven a repetir colocando en el vástago central del péndulo de torsión, sobrecargas diversas, y volviendo a medir, en cada caso, los periodos  $T_1$  y  $T_2$ .

Conocidos estos datos así como la longitud de los hilos de torsión del sistema pendular y el camino óptico recorrido por el rayo luminoso, se calcula la sensibilidad de la balanza en cada caso, expresada en  $\text{din} \times \text{cm}^{-1}$  a partir de la ecuación (73)

$$P = \frac{4 \cdot n^2 \cdot M(d_2^2 - d_1^2) r}{D \cdot l_1 \cdot l_2} \cdot \frac{1}{T_2^2 - T_1^2}$$

donde:

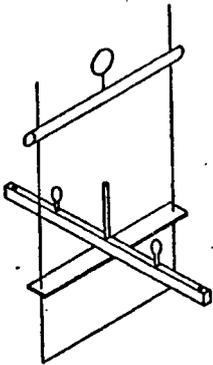


Fig. 1.- Detalle del sistema de torsión con varilla metálica colocada en posición perpendicular para la realización del calibrado de la balanza superficial.

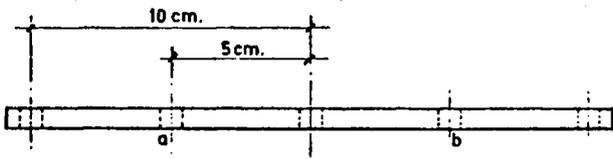


Fig. 2.- Detalle de la varilla metálica

$p$  = sensibilidad en  $\text{din} \cdot \text{cm}^{-1}$

$M$  = suma de las masas de las dos pesas colocadas en la varilla perpendicular al cuadro, en cada caso, expresada en gramos.

$d_2$  = distancia del orificio central de la varilla, al situado en el extremo, 10 cm

$d_1$  = distancia del orificio central de la varilla, a los agujeros situados más cercanos al mismo, 5 cm

$r$  = radio de las pesas circulares, 1 cm

$D$  = camino óptico recorrido por el rayo luminoso, 174,4 cm

$l_1$  y  $l_2$  = longitud de los hilos de torsión del sistema pendular.

Realizadas las determinaciones correspondientes, con la combinación de las sobrecargas que hemos considerado más adecuadas, el calibrado de la sensibilidad de nuestro aparato es el siguiente:

<u>Sobrecargas</u>	<u>Sensibilidad (<math>\text{din} \cdot \text{cm}^{-1}</math>)</u>
0	0,939
98,97 g	1,806
198,89 g	2,629
296,86 g	3,509

Una balanza de empuje horizontal como la descrita ofrece las siguientes posibilidades:

1.- Las grandes dimensiones de la cubeta permiten disponer --

de una gran superficie para extender las monocapas y evitar la influencia del área inicial en las isotermas de compresión ( $\pi-A$ ).

2.- El desplazamiento de la barrera móvil, que actúa a modo de pistón, de forma continua en los dos sentidos y a velocidades constantes.

3.- La variación de la sensibilidad de medida de la presión superficial ejercida por la monocapa, al cambiar el momento de inercia del conjunto.

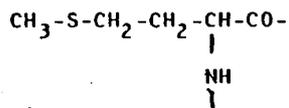
4.- El registrar gráficamente la variación de la presión superficial con el área, de modo continuo o discontinuo, según convenga.

## 2.2. MATERIALES UTILIZADOS

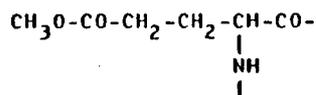
### 2.2.1. Polipéptidos

Los polipéptidos estudiados han sido suministrados por la casa Miles Yeda Ltd. (Israel); son del mayor grado de pureza y tienen la constitución química siguiente:

Poli-L-metionina.- Es un polímero de L-metionina con una masa molecular de 40.800 estimada por ultracentrifugación en cloroformo más el 2% de ácido dicloroacético. Grado de polimerización 311. La fórmula química del residuo de metionina es



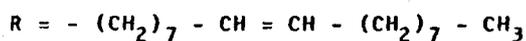
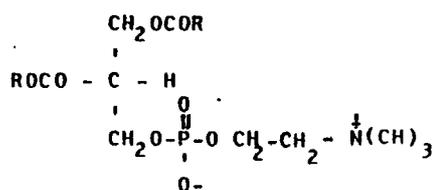
Poli--metil-L-glutamato.- Es un polímero del ester del ácido L-glutámico con una masa molecular de 5300, determinada por valoración del grupo final, en ácido acético, con perclorico 0.1N. Grado de polimerización 37. La fórmula química del residuo es



### 2.2.2. Fosfolípidos

Los fosfolípidos utilizados para nuestros estudios son los siguientes:

1,2-dioleil-3sn-fosfatidilcolina o lecitina sintética insaturada de masa molecular del producto anhidro 787,1; ha sido suministrada por la casa Sigma Chem. Co. en solución clorofórmica con una pureza del 98%. Su fórmula química es:



Fosfatidilcolina o lecitina natural; se ha preparado en nuestro laboratorio a partir de yema de huevo de la que se extrajo, siguiendo el método descrito por Folch y col. (74). El residuo obtenido que contiene lecitina fundamentalmente, pero también otros fosfolípidos, se aplicó a una columna cromatográfica de alumina neutra (Merck) para su purificación; la elución se llevó a cabo con cloroformo: metanol (2:1, v/v) y metanol sucesivamente, recogiendo la fracción cloroformo-metanólica en la que se encuentra la lecitina.

Con el fin de evitar en lo posible los fenómenos de degradación oxidativa durante el proceso de purificación, todos los eluyentes cromatográficos contenían B.H.T (Sigma Chem Co), en la proporción del 0.05% del peso de la muestra empleada en la columna (75).

Si en los controles por cromatografía en capa fina

realizados posteriormente se detectaba la presencia de liso-  
lecitina junto con la lecitina, se procedía a una repurifica-  
ción mediante columna de alumina neutra, activada a 110° C -  
durante una hora; el sistema de elución, en este caso, esta-  
ba formado por una mezcla de cloroformo:metanol (9: 1; v/v).

Como composición química de la lecitina de yema de  
huevo, se tomó la determinada por Papahadjoupoulos (76). Su  
masa molecular media es de 750.

#### 2.2.2.1. Control de pureza

La comprobación del estado de pureza de nuestros -  
fosfolípidos, se realizó mediante la técnica de cromatogra-  
fía en capa fina; se escogió como soporte el silica gel H, y  
como eluyente el sistema cloroformo:metanol:ácido acético:a-  
gua (25:15:4:2; v/v/v/v'). El revelado del cromatograma se -  
llevó a cabo de la siguiente forma: con vapor de iodo para  
distinguir fosfolípidos con cadenas insaturadas; mezcla de -  
molibdato amonico y ácido perclórico (77) para los grupos -  
fosfato; reactivo de Dragendorff para detectar grupos colina  
y finalmente para determinar la materia orgánica total, se  
trató con ácido sulfúrico al 50% seguido de calentamiento a  
110° C durante diez minutos.

#### 2.2.2.2. Control de oxidación

Dada la gran susceptibilidad que presentan los fos-  
folípidos a la oxidación de sus cadenas hidrocarbonadas, re-

sulta absolutamente necesario este control. De lo contrario, la aparición de nuevas especies moleculares por aumento de la conjugación dienica y subsiguiente ruptura de las cadenas, alteraría las propiedades físico-químicas del fosfolípido, conduciendo a modificaciones en el sistema en estudio no controlables.

Este proceso degradativo, puede seguirse a través del espectro de absorción, característico de cada compuesto observándose un incremento de la absorbancia en la región comprendida entre 230-280 nm, conforme aumenta la conjugación de los dobles enlaces en las cadenas (78).

Para prevenir este proceso oxidativo, el almacenamiento de estos productos se realiza en forma de soluciones clorofórmicas concentradas (78), en recipientes perfectamente cerrados en atmósfera de nitrógeno y a temperaturas inferiores a 0° C.

#### 2.2.2.3. Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo de los fosfolípidos se efectuó mediante la determinación del fósforo presente. Previa digestión con ácido perclórico y según el método de Bartlett (79), el complejo formado con el fósforo inorgánico fue valorado frente a un standar de fósforo por espectrofotometría U.V. (Shimadzu. mod QV-50).

### 2.3. TECNICA OPERATORIA

Todo el material, así como los instrumentos utilizados en este estudio, se han limpiado y manejado cuidadosamente para no introducir contaminaciones por sustancias tensoactivas ajenas al experimento, capaces de variar la presión superficial, dando lugar a unos resultados falsos. Los reactivos empleados han sido del más alto grado de pureza; el agua utilizada para la limpieza del material de vidrio, así como para la preparación del líquido soporte fue bidestilada en aparato de vidrio con mezcla de permanganato potásico y sosa y tratada con carbón activado.

La limpieza de la cubeta destinada a contener el líquido soporte, se realiza con tierra de diatomeas, calcinada a 1000° C durante cuatro horas, que se elimina después con sucesivos lavados con agua bidestilada.

El cuadro de plástico que ha de delimitar la superficie de experimentación y las dos barreras fija y móvil, se recubren con una delgada capa de parafina mediante inmersión en esta sustancia fundida contenida en un baño apropiado. La parafina empleada es muy pura (Merck) y de punto de reblandecimiento elevado (60° C). Los hilos utilizados para unir la barrera flotante a los lados del cuadro parafinado han sido de algodón puro o de nylon de distintas calidades, y suavemente vaselinados.

La colocación y disposición de los hilos se realiza

según el esquema de la fig. 3 que se considera como el más eficaz para impedir la fuga de las sustancias que constituyen las monocapas en el rango de presiones que se trabaja. Antes de iniciar cualquier experimento, se comprueba la correcta disposición de los hilos y su adaptación a la superficie del sustrato.

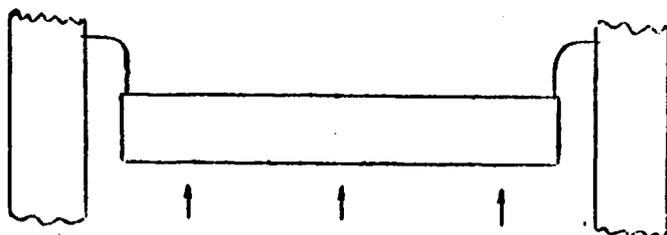


Fig. 3

El líquido soporte o sustrato utilizado en todos los experimentos ha sido una solución salina de  $\text{ClNa}$   $0.2\text{M}/\text{ClH}$   $0.001\text{M}$   $\text{pH} = 2.9 \pm 0.1$ .

La superficie del líquido soporte se limpia antes de realizar cada experimento. Para facilitar la limpieza, se extiende talco calcinado de modo que si la superficie está limpia, es decir, no contiene sustancias tensioactivas, se observa que las partículas de talco se agrupan fácilmente en un ts lote con gran libertad de movimiento al dirigirles una corriente de aire. Cualquier traza de suciedad dispersa las partícu-

las de talco por toda la superficie e impide su agrupación. Por tanto, la limpieza de la superficie se ha realizado mediante barrido y acumulación hacia una esquina de la cubeta del talco espolvoreado sobre la misma y succión simultánea del líquido superficial con ayuda de un capilar unido a una trompa de vacío. Una vez que la superficie está perfectamente limpia, por haberse comprobado que existe el correspondiente vacío superficial, se lleva la imagen luminosa a cero, procediéndose a continuación a la siembra de la sustancia a estudiar; se cierra la vitrina y no se abre durante todo el experimento para evitar así posibles contaminaciones.

#### 2.3.1. Preparación de las soluciones

Fosfolípidos.- Las disoluciones de ambas lecitinas, por encontrarse almacenadas en solución de cloroformo en atmósfera de nitrógeno a 0°C, se prepararon del modo siguiente: Se toma un volumen de disolución madre, de concentración previamente conocida por determinación de fósforo, que contiene la cantidad de lecitina deseada; se lleva a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno y el residuo se extrae con alcohol isopropílico; una vez disuelto se adiciona 1,2 dicloroetano hasta completar el volumen deseado. La concentración final estuvo en todos los casos comprendida en un intervalo de 0.4-0.6 mgrs/ml.

Polipéptidos.— Las disoluciones de ambos se prepararon por pesada directa de las muestras, secadas a vacío, con una precisión de  $\pm 10^{-5}$  grs y posterior disolución en la mínima cantidad posible de ácido dicloroacético; a continuación se adiciona el disolvente correspondiente en cada caso en las proporciones deseadas. Estas disoluciones se prepararon al menos 24 horas antes de su utilización. La concentración final estuvo dentro del intervalo 0.4 - 0.6 mgrs/ml con un error máximo del 0.1%.

### 2.3.2. Técnica de siembra

Conocida la concentración de la disolución, se calcula la cantidad de sustancia extendida a partir del volumen utilizado. Para la medida de este volumen con exactitud, la extensión de las muestras se realiza por medio de una microjeringa "Aglá" con aguja de vidrio, que permite hacer lecturas con una precisión de  $\pm 2 \cdot 10^{-4}$  ml.

La extensión de la muestra sobre la superficie del líquido soporte se hace de forma muy lenta, depositando gotas por contacto con dicha superficie y repartidas por toda ella, evitando así que tanto los disolventes como las sustancias fácilmente solubles en el sustrato, puedan pasar al seno de éste. Para facilitar la extensión se adiciona a las disoluciones una pequeña cantidad (1%) de un agente extensor como el alcohol isopropílico, el cual previamente se ha comprobado que no influye en las propiedades de las monocapas,

así como los distintos disolventes empleados.

Una vez sembrada la muestra se espera un cierto tiempo, llamado "tiempo de extensión", para la total evaporación o disolución del disolvente o mezcla utilizados. En nuestro trabajo experimental este tiempo ha sido de cinco minutos para los fosfolípidos y de treinta minutos para los polipéptidos y la mezcla de ambos, ya que a partir de estos tiempos no se observa influencia alguna del disolvente en los resultados experimentales.

### 2.3.3. Modo de compresión de la monocapa

Realizada la operación de siembra de la muestra, se procede a comprimir la monocapa formada; en todos los casos se ha partido de una distancia entre las barreras fija y móvil de  $56.5 \text{ cm} \pm 0.1 \text{ cm}$ ; el desplazamiento de la barrera móvil se efectúa del modo siguiente:

- a.- De una forma continua: velocidad constante de 2.7 cm/min para fosfolípidos.
- b.- De una forma discontinua a intervalos de un minuto por cada mm que avanza la barrera móvil para polipéptidos y mezclas.

El método de compresión discontinua nos asegura que el equilibrio superficial ha sido alcanzado; se ha mantenido rigurosamente constante para los componentes puros y mezclas, ya que es conocido que la constancia de las condiciones de compresión es particularmente importante para las mezclas por

la necesidad de comparar sus zonas de transición, que pueden depender en gran medida de la velocidad y método de compresión (68).

#### 2.3.4. Isotermas de compresión $\Pi$ -A

Las curvas obtenidas representan presiones superficiales ( $\Pi$ ) frente a áreas ocupadas por la monocapa (A); estas curvas vendrán referidas a:

1) - Componentes puros

$$\Pi = \text{dín} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$A = \text{Å}^2/\text{molécula}$  para fosfolípidos y en  $\text{Å}^2/\text{residuo}$  para polipéptidos

2) - Mezclas de ambos componentes

$$\Pi = \text{dín} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$A = \text{Å}^2/\text{residuo medio}$

Las áreas por molécula o residuos se obtienen dividiendo el área superficial total utilizada, por el número de moléculas o residuos de muestra sembrada, respectivamente.

El área por residuo medio se obtiene dividiendo el área superficial total utilizada, por la suma del número de residuos y moléculas sembrados.

#### 2.3.5. Formación de monocapas mixtas

La extensión de los componentes que constituyen la monocapa se ha realizado en la forma de extensión conjunta,-

es decir, extendiendo sobre el sustrato una disolución que contiene ambos componentes mezclados en las proporciones - deseadas. Una vez extendida la mezcla se espera el "tiempo de extensión" correspondiente, procediéndose a continuación a la compresión de la monocapa formada.



3.1. FORMACION DE MONOCAPAS PURAS DE FOSFOLIPIDOS-ISOTERMAS  
DE COMPRESION DE FOSFATIDILCOLINA NATURAL Y 1,2 DIOLEIL  
-L- $\alpha$ -FOSFATIDILCOLINA.

La formación y estudio de las monocapas puras de fosfatidilcolina de yema de huevo (PC) y 1,2 dioleilfosfatidilcolina (DOPC), se ha llevado a cabo en las siguientes condiciones de trabajo:

- disolvente de extensión: DCE: IP; 90: 10
- concentración final de la solución de extensión: comprendida en el intervalo 0.4 - 0.6 mgrs/ml
- líquido soporte: ClH  $10^{-3}$  M-ClNa 0.2M, pH = 2,9
- volumen de siembra:  $250 \times 2 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-4}$  ml
- superficie total de extensión: 932,25 cm<sup>2</sup>
- temperatura  $20 \pm 0.2^\circ$  C
- velocidad de la barrera de compresión: 2.7 cm/min
- sensibilidad de la balanza:  $\pm 0.26$  din . cm<sup>-1</sup>/mm en el registro gráfico para presiones superficiales y  $\pm 3$  Å<sup>2</sup> /molécula/mm en el registro gráfico para áreas superficiales.

Las monocapas de ambos fosfolipidos se extendieron con áreas iniciales superiores a 300 Å<sup>2</sup>/molécula, para las que las isotermas de compresión son independientes de la cantidad de sustancia sembrada. Las curvas  $\pi$ -A se muestran en las fig. 4 y 5; son el resultado promedio de cuatro a seis medidas experimentales.

54

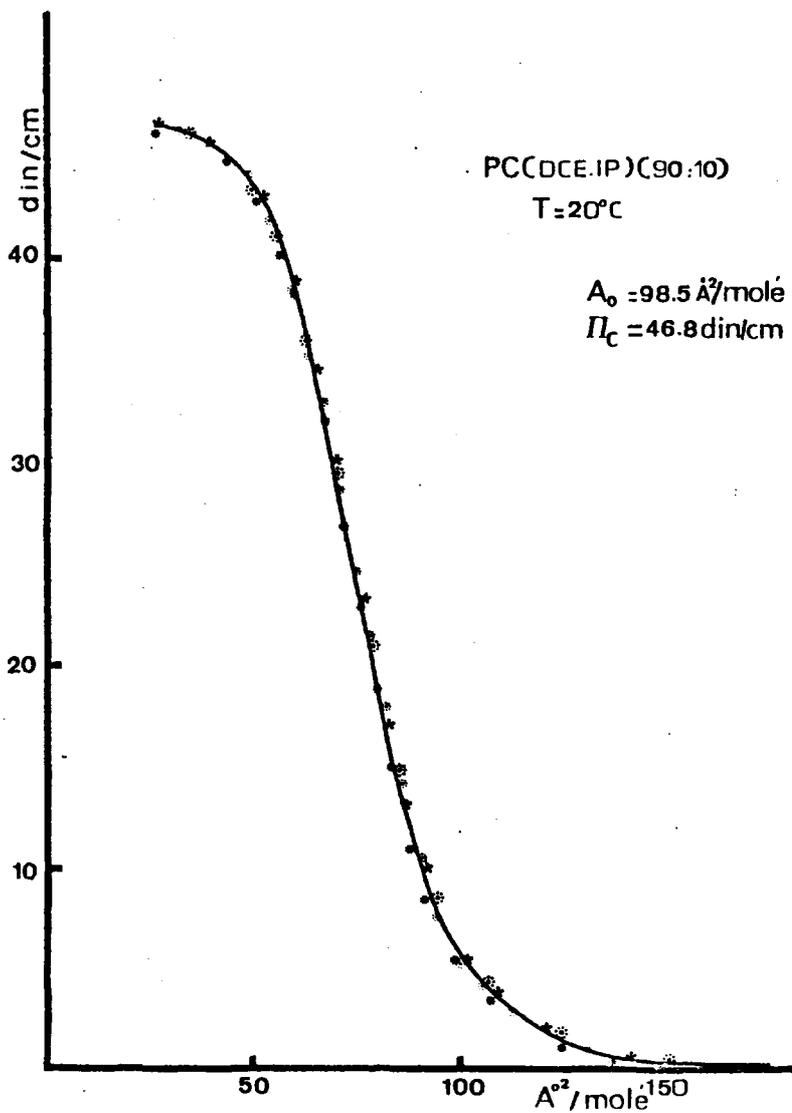


Fig. 4.- Isoterma de compresión  $\pi$ -A de lecitina natural de huevo purificada (PC).

55

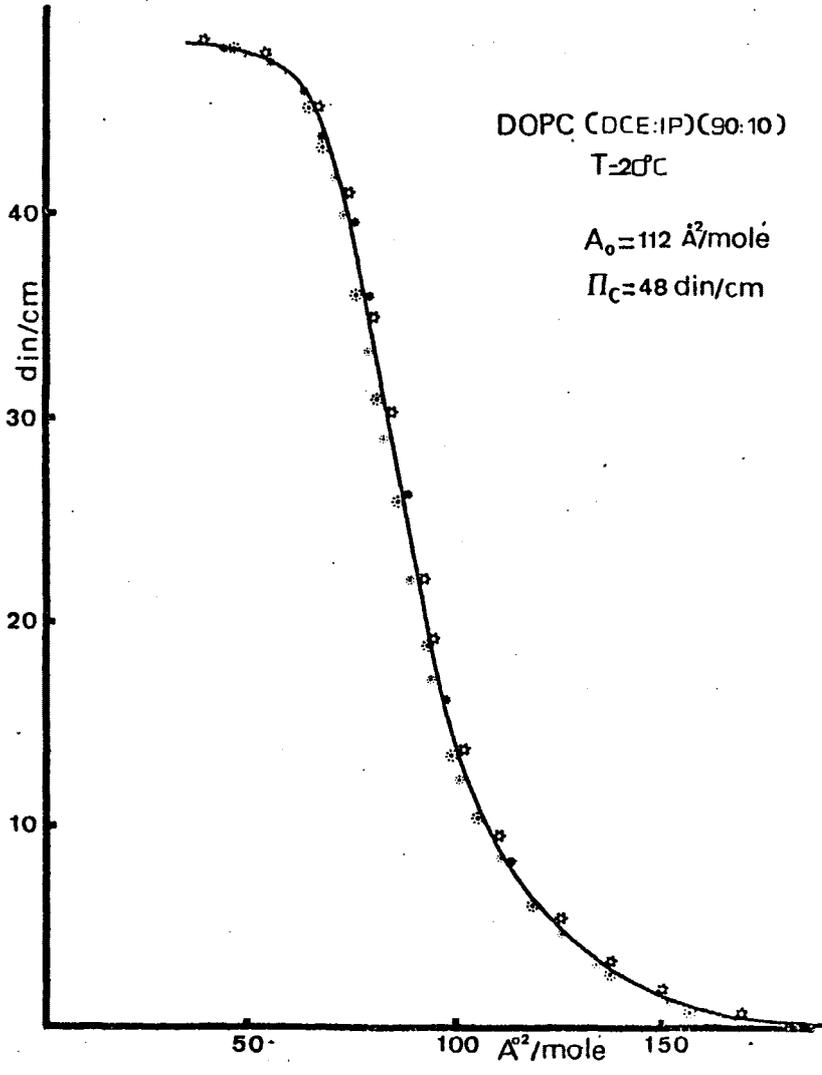


Fig. 5:- Isotherma de compresión  $\gamma$ -A de lecitina sintética Insaturada (DOPC).

Por el trazado de las isothermas de compresión de ambas lecitinas, se observa un comportamiento de carácter expandido con áreas límite ( $\Pi \rightarrow 0$ ) de  $A_0 = 98.5 \pm 3.0 \text{ \AA}^2/\text{molé}$  para PC y  $A_0 = 112 \pm 3.0 \text{ \AA}^2/\text{molé}$  para DOPC. Las presiones de colapso  $\Pi_{cPC} = 46.8 \text{ din} \cdot \text{cm}^{-1}$  y  $\Pi_{cDOPC} = 48 \text{ din} \cdot \text{cm}^{-1}$ , muestran ligeras diferencias como cabría esperar, ya que la lecitina natural, por estar constituida por una serie de fosfatidilcolinas con distinto grado de insaturación, presenta un colapso menos cooperativo que la DOPC sintética. Estos resultados están en buena concordancia con los descritos por otros autores (80) (37).

### 3.2. FORMACION DE MONOCAPAS PURAS DE POLIPEPTIDOS. POLI-L-METIONINA Y POLI- $\gamma$ -METIL-L-GLUTAMATO.

La formación y estudio de monocapas de poli-L-metionina (PM) y poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato (PHG) se ha llevado a cabo bajo las siguientes condiciones experimentales:

- concentración final de la solución de extensión: comprendida en el intervalo: 0.4 - 0.6 mgrs/ml.
- líquido soporte: ClH  $10^{-3}$  -ClNa 0.2 M
- volumen de la muestra sembrada: 125-100  $\pm$   $2 \cdot 10^{-4}$ - $2 \cdot 10^{-4}$  ml.
- superficie total de extensión: 932.25 cm<sup>2</sup>
- temperatura: 20  $\pm$  0.2° C
- velocidad de la barrera de compresión: discontinua a intervalos de 1 mm/min.
- sensibilidad de la balanza:  $\pm$  0.18 din . cm<sup>-1</sup>/mm en el registro gráfico para presiones superficiales y  $\pm$  0.7 Å<sup>2</sup>/residuo/mm en el registro gráfico para áreas superficiales.

#### 3.2.1. Monocapas de poli-L-metionina. Isotermas de compresión. Efecto del disolvente

Para la formación de las monocapas de poli-L-metionina (PM) se han utilizado dos disolventes de diferente naturaleza.

- a) Un disolvente poco polar constituido por 1,2 dicloroetano (DCE) y una pequeña cantidad de ácido dicloro-acético

(DCA) en la proporción DCE: DCA; 98: 2.

- b) Un disolvente polar constituido por ácido dicloroacético solamente.

Las isotermas de compresión respectivas se muestran en la fig. 6 donde cada curva representa el promedio de cuatro a seis determinaciones experimentales.

Las monocapas formadas con disolvente de extensión no polar muestran por el trazado de la isoterma una zona de compresibilidad  $-(\frac{dA}{d\pi}) \frac{1}{A}$  baja para áreas muy grandes, comenzando a ejercer una presión superficial apreciable a aproximadamente  $25 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$  y casi inmediatamente se produce un rápido aumento de dicha presión al disminuir el área, lo que indica un comportamiento de monocapa muy condensada, hasta que se alcanza una zona de transición de gran compresibilidad que se inicia a aproximadamente  $10 \text{ din} \cdot \text{cm}^{-1}$  para dar paso nuevamente a una zona en la que la presión sube rápidamente al disminuir el área disponible por molécula.

Las monocapas formadas a partir de una disolución de extensión en un disolvente polar comienzan a ejercer presión superficial para valores de áreas superficiales más pequeñas que en el caso anterior; a aproximadamente  $20 \text{ \AA}^2/\text{resid.}$ , se produce de igual modo un rápido aumento de dicha presión aunque con un comportamiento menos condensado y no se observa zona de transición, siguiendo el tramo final de la curva una trayectoria semejante a la de la monocapa obtenida con disolvente no polar.

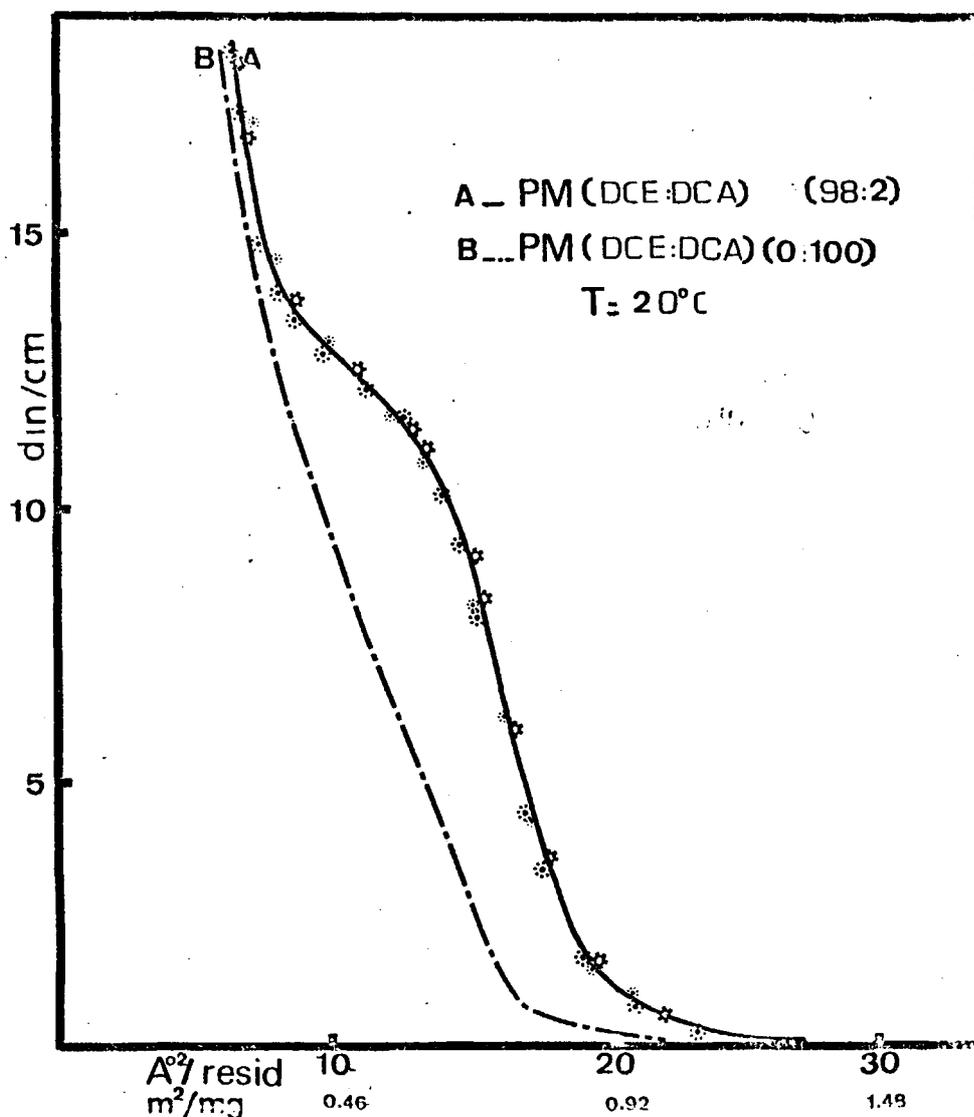


Fig. 6.- Isotherma de compresión  $\pi$ -A de poli-L-metionina (PM)  
 Efecto del disolvente.

Se obtiene un área límite ( $h \rightarrow 0$ ), para el primer caso, de  $19.4 \pm 0.7 \text{ \AA}^2/\text{resid}$  y  $17 \pm 0.7 \text{ \AA}^2/\text{resid}$  para el segundo. - Estos resultados son concordantes con los descritos por otros autores para condiciones experimentales semejantes (81).

### 3.2.2. Estudio de la reversibilidad de la monocapa de PM obtenida con un disolvente no polar.

Experimentos de compresión y descompresión de la monocapa de PM muestran que el trazado de la isoterma obtenida por descompresión de la monocapa desde una presión superficial cualquiera por debajo de la correspondiente a la transición coincide dentro del error experimental con la obtenida por compresión. Si la descompresión se inicia a una presión superior a la que corresponde a dicha transición, se observa un ciclo de histeresis y la meseta aparece en la descompresión a una presión superficial inferior. Si se prosigue la descompresión hasta áreas superficiales elevadas y nuevamente se comprime la monocapa, se obtienen valores concordantes con la compresión inicial, lo que indica una reversibilidad de la disposición superficial de las moléculas que constituyen la monocapa al estado inicial después de la extensión. Fig. 7.

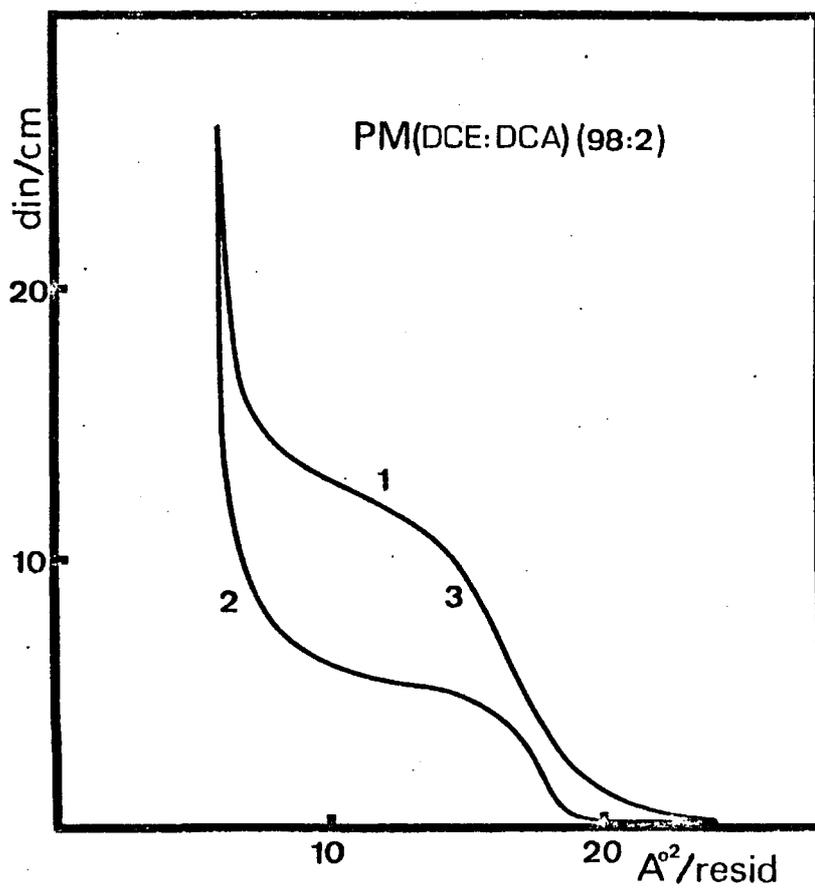


Fig. 7.- Estudio de la reversibilidad en la compresión y descompresión de una monocapa de poli-L-metionina (PM) en disolvente no polar: 1.primerá compresión; 2.descompresión; 3.segunda compresión.

3.2.3. Monocapas de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato. Isotermas de compresión. Efecto del disolvente

Se han utilizado para la formación y estudio de las monocapas de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato (PMG) los siguientes disolventes de extensión:

- a) Un disolvente no polar constituido por 1,2 dicloroetano (DCE) y una pequeña cantidad de ácido dicloroacético (DCA) en la proporción DCE:DCA; 98:2
- b) Un disolvente polar constituido por piridina (PD) y una pequeña cantidad de ácido dicloroacético (DCA) en las proporciones PD: DCA; 94: 6.

Las isotermas de compresión respectivas se muestran en la Fig. 8 donde cada curva representa el resultado promedio de cuatro a seis determinaciones experimentales.

Las monocapas formadas utilizando un disolvente poco polar, Fig. 8 A, según el trazado de la isoterma de compresión, comienzan a ejercer presión superficial para valores del área ocupada alrededor de  $30 \text{ \AA}^2/\text{resid}$ , iniciándose un tramo de compresibilidad pequeña donde aumenta rápidamente la presión superficial al disminuir el área disponible por molécula y concluye en una zona de transición de máxima compresibilidad al final de la cual aparece una nueva subida de presión superficial al disminuir el área. Por último, para valores de alrededor de  $10 \text{ \AA}^2/\text{resid}$  tiene lugar un nuevo cambio de pendiente.

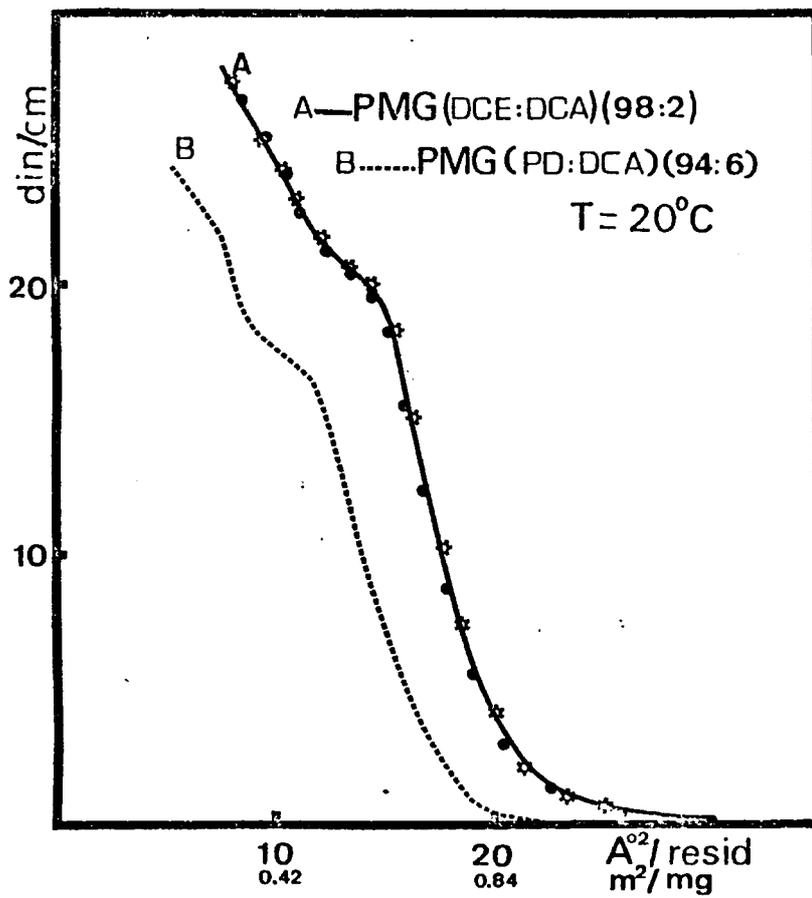


Fig. 8.- Isotherma de compresión  $\pi$ -A del poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato (PMG). Efecto del disolvente.

La monocapa formada con disolvente polar es análoga a la anterior en el trazado de la isoterma de compresión, pero la zona de transición aparece a valores inferiores de presión superficial, y el valor de la área límite ( $H \rightarrow 0$ ) es inferior  $16.8 \pm 0.7 \text{ \AA}^2/\text{resid}$ , mientras que para la obtenida con disolvente no polar es de  $19.8 \pm 0.7 \text{ \AA}^2/\text{resid}$ . Fig. 8 B.

#### 3.2.4. Estudio de la reversibilidad de la monocapa de PMG obtenida con disolvente no polar

Una vez realizada la compresión de la monocapa de PMG se somete a descompresión iniciándose ésta en dos puntos diferentes: para un valor de la presión inferior a la que corresponde a la zona de transición, se observa que las dos isotermas de compresión-descompresión son coincidentes dentro del error experimental, por el contrario, si se han alcanzado valores de presión superficial superiores a dicha zona, al descomprimir la monocapa se observa un ciclo de histéresis en el trazado de la isoterma. Cuando la descompresión se realiza hasta valores de área lo suficientemente grandes, próximos al área inicial de extensión, y se comprime de nuevo la monocapa, se obtiene una curva análoga a la primera, indicando una reversibilidad al estado inicial de las moléculas que constituyen la monocapa. Fig. 9.

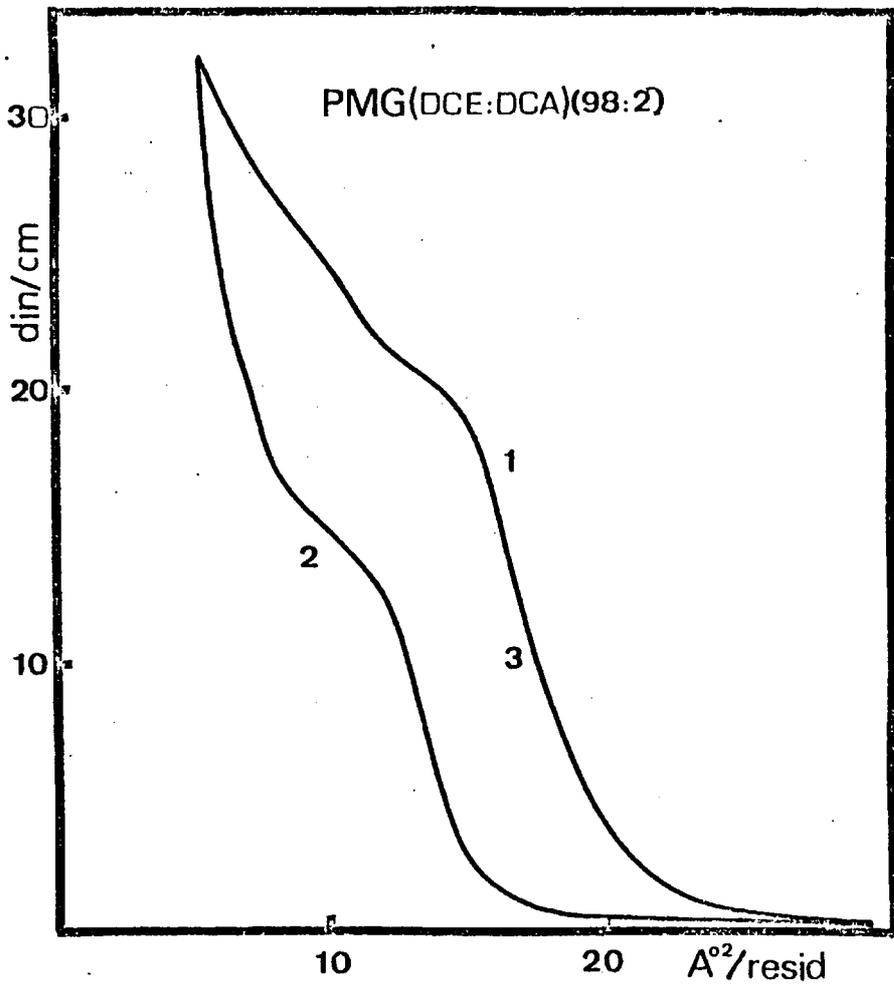


Fig. 9.- Estudio de la reversibilidad en la compresión y descompresión de una monocapa de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato (PMG) en disolvente no polar: 1.primera compresión; 2.descompresión; 3.segunda compresión.

### 3.3. MONOCAPAS MIXTAS DE POLIPEPTIDOS Y FOSFOLIPIDOS

La formación y estudio de monocapas mixtas de poli-L-metionina y poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato con fosfatidilcolina de yema de huevo y 1,2 dioleilfosfatidilcolina se han efectuado en las siguientes condiciones experimentales:

- extensión conjunta de ambos componentes previa mezcla de sus disoluciones respectivas, (polipéptido DCE:DCA; 98:2 y fosfolípido DCE:IP;90:10), en las proporciones deseadas.
- volumen de siembra:  $115 \times 2 \cdot 10^{-4} \pm 2 \cdot 10^{-4}$  ml
- líquido soporte: ClH  $10^{-3}$ M + ClNa 0.2M
- superficie total de extensión:  $932.25 \text{ cm}^2$
- temperatura:  $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$
- velocidad de la barrera de oómpresión: discontinua a intervalos de 1 mm/min
- sensibilidad de la balanza:  $\pm 0.26 \text{ din} \cdot \text{cm}^{-1}/\text{mm}$  en el registro gráfico para B presión superficial, y el intervalo de  $\pm 0.7$  a  $\pm 3 \text{ \AA}^2/\text{residuo}/\text{mm}$  en el registro gráfico para el área superficial.

#### 3.3.1. Monocapas mixtas de poli-L-metionina y fosfatidilcolina de yema de huevo. Red de isoterms de compresión

En la fig. 10 se muestra la red de isoterms de compresión II-A correspondiente a las monocapas mixtas del sistema PM-PC para las siguientes fracciones molares expre-

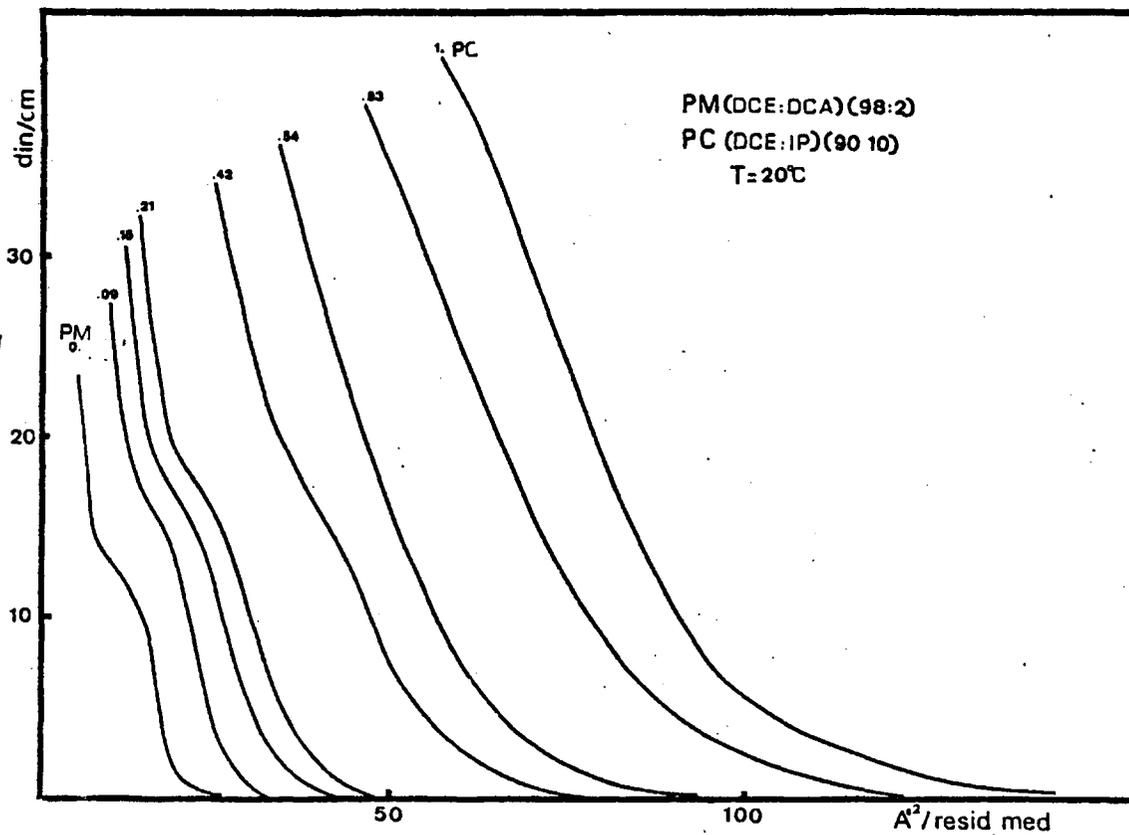


Fig.10.- Red de isothermas de compresi3n  $\pi$ -A de monocapas de poli-L-metionina (PM) y fosfatidilcolina natural (PC) en disolvente no polar, extendidas conjuntamente. Se indica la fracci3n molar en fosfolípido de la mezcla.

sadas en fosfolípido: 0.09, 0.15, 0.21, 0.42, 0.54 y 0.83. Las curvas representan un promedio de al menos cinco medidas.

Se observa como en las monocapas ricas en PM, la zona de transición característica de este componente se hace menos brusca y aparece a valores de presión superficial superiores a medida que aumenta la fracción molar de fosfolípido PC en la monocapa mixta. Para valores de fracción molar expresada en función del componente PC superior o igual a 0.54 no se observa dicha transición.

### 3.3.2. Monocapas mixtas de poli-L-metionina y 1,2 dioleilfosfatidilcolina. Red de isoterms de compresión

En la fig. 11 se muestra la red de isoterms de compresión correspondientes a las monocapas mixtas del sistema PM-DOPC, para las distintas fracciones molares expresadas en fosfolípido: 0.04, 0.1, 0.15, 0.2, 0.41, 0.51, -- 0.78. Las curvas representan un promedio de al menos cinco medidas.

El resultado es análogo al presentado para el anterior sistema PM-PC, en lo referente a como la zona de transición característica del componente PM va modificándose a medida que aumenta la proporción de fosfolípido en la monocapa mixta, hasta desaparecer para una fracción de 0.51 de fosfolípido. También se observa como las diferentes curvas para igual valor de presión superficial tienen mayor -

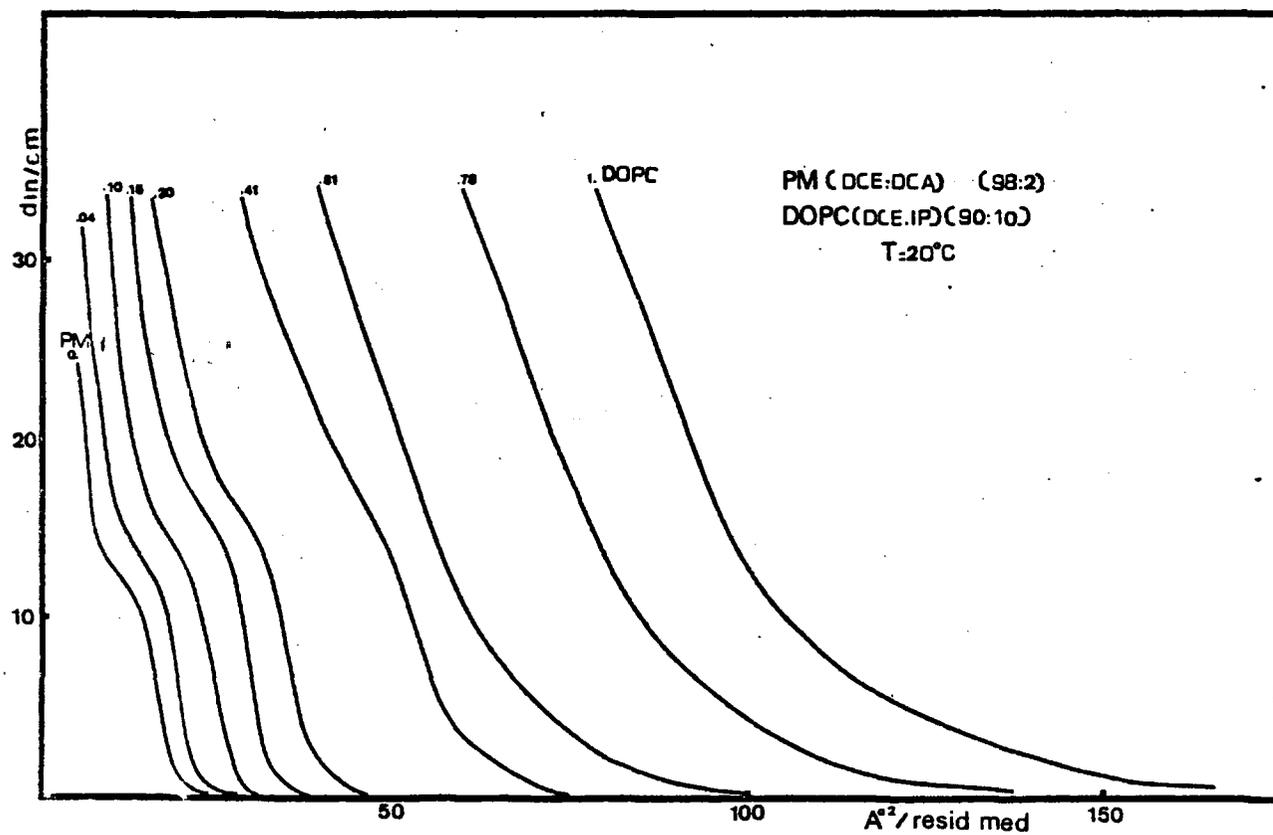


Fig.-11.- Red de isothermas de compresión  $\pi$ -A de monocapas de poli-L-metionina (PM) y 1,2 dioleil-L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (DOPC) en disolvente no polar, extendidas conjuntamente. Se indica la fracción molar en fosfolipido de la mezcla.

área por residuo medio que en el anterior sistema.

3.3.3. Monocapas mixtas de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato y fosfatidilcolina de yema de huevo. Red de isothermas de compresión

En la fig. 12 se muestra la red de isothermas de compresión correspondiente a las monocapas mixtas del sistema PMG-PC para las fracciones molares que, expresadas en función del fosfolípido, corresponden a 0.09, 0.16, 0.23, 0.44, 0.56, 0.81. Las curvas representadas son un promedio de al menos cinco medidas.

Se observa como la zona de transición característica del polipéptido PMG aparece a igual valor de presión superficial, aproximadamente  $18 \text{ din} \cdot \text{cm}^{-1}$ , en las curvas A correspondientes a las monocapas mixtas para las fracciones molares 0.09, 0.16, 0.23, 0.44, 0.55, aunque para este último valor solo se observa una inflexión y a partir de esta, es decir, para la fracción 0.8 la curva es semejante a la característica del fosfolípido.

3.3.4. Monocapas mixtas de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato y 1,2-dioleilfosfatidilcolina. Red de isothermas de compresión

En la fig. 13 se muestra la serie de curvas II-A correspondientes a las monocapas mixtas del sistema PMG-DOPC

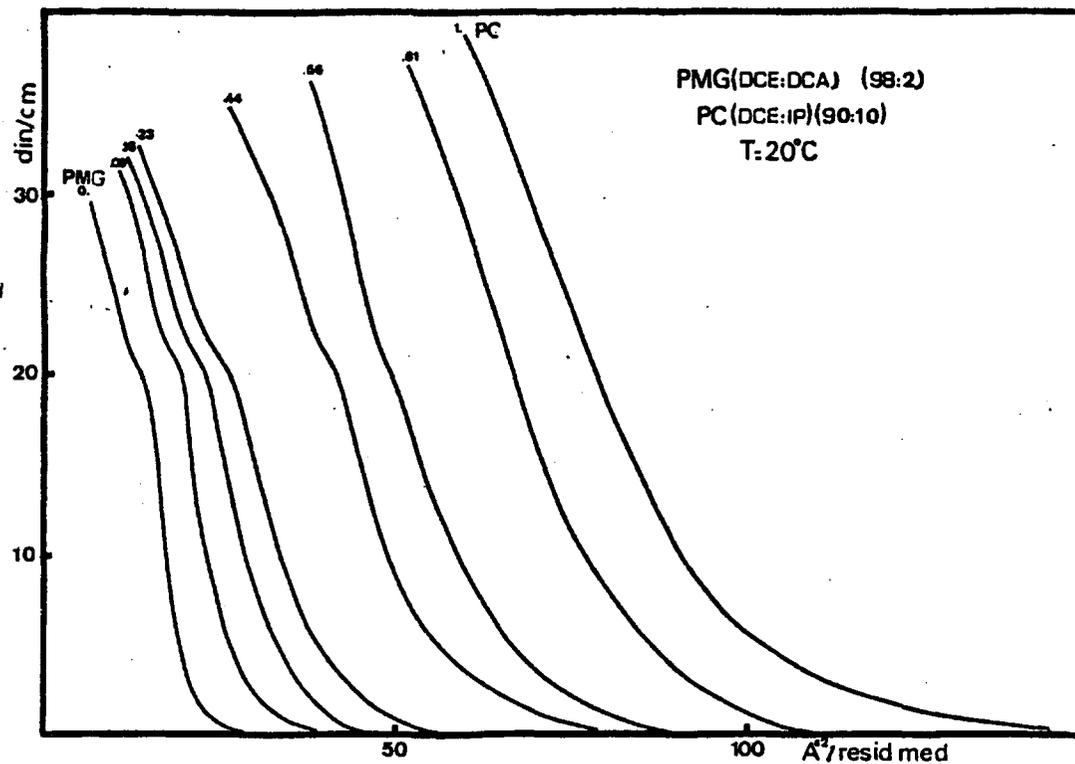
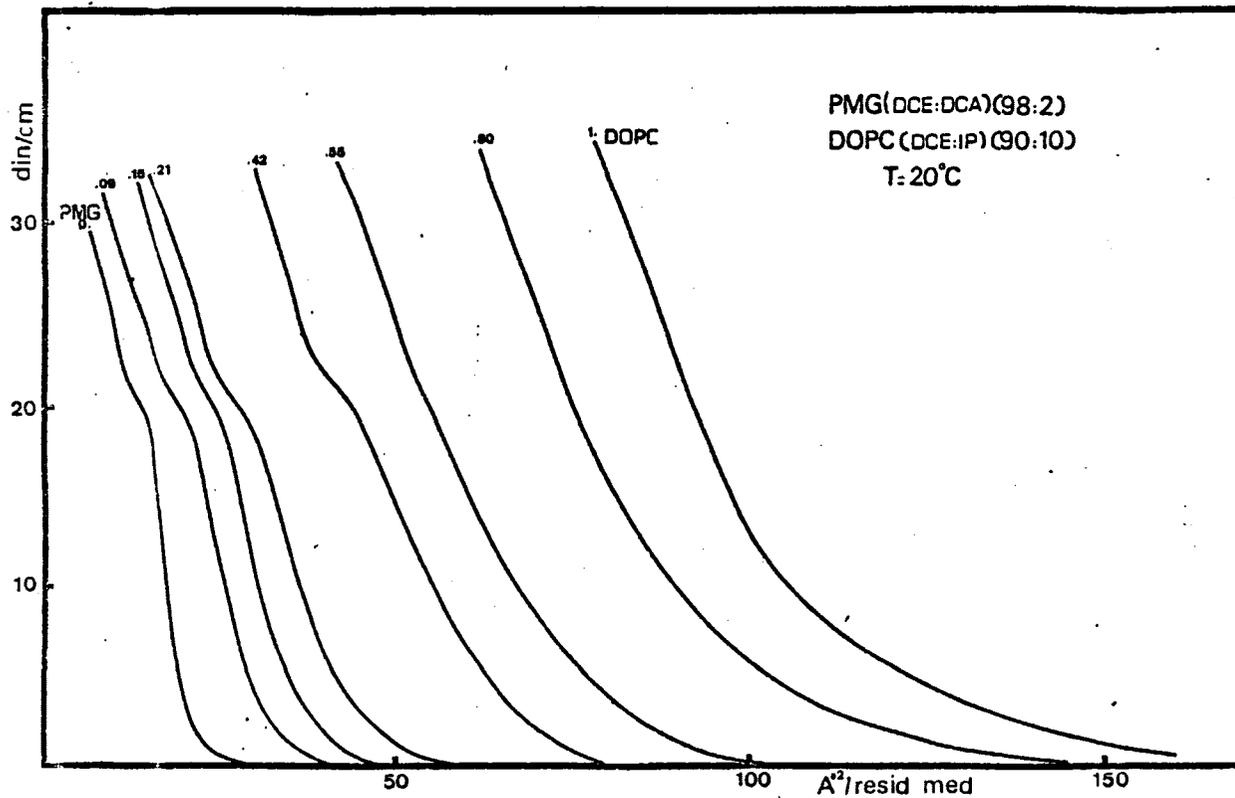


Fig.12.- Red de isothermas de compresión  $\pi$ -A de monocapas de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato(PMG) y fosfatidilcolina natural(PC) en disolvente no polar, extendidas conjuntamente. Se indica la fracción molar en fosfolípido de la mezcla.

11



72

Fig. 13.- Red de isothermas de compresión  $\pi$ -A de monocapas de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato (PMG) y 1,2 dioleil-L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (DOPC) en disolvente no polar, extendidas conjuntamente. Se indica la fracción molar en fosfolípido de la mezcla.

para las fracciones molares expresadas en fosfolípido: 0.09, 0.15, 0.21, 0.42, 0.55 y 0.80. Las curvas II-A representadas son un promedio de al menos cinco medidas.

El comportamiento de esta red de isothermas de compresión es semejante al del anterior sistema PMG-PC, ya que sigue apareciendo a igual valor de presión superficial la zona de transición del polipéptido en las diferentes curvas  $\pi$ -A: 0.09, 0.15, 0.21, 0.42 0.55 y también para este último valor de fracción molar se observa solo una inflexión, como única diferencia es la ocupación de mayores áreas para las monocapas mixtas en este sistema PMG-DOPC.

7362

DISCUSSION

#### 4.1. MONOCAPAS DE FOSFOLIPIDOS

Los fosfolípidos utilizados para el objeto de nuestro estudio tienen diferente composición química; la lecitina de yema de huevo (PC) contiene cadenas acilo grasas saturadas e insaturadas, la lecitina sintética (DOPC) es totalmente insaturada. La existencia de dobles enlaces cis disminuye, en tres dimensiones, el punto de transición gel a cristal-líquido  $T_t = -10^\circ\text{C}$  para PC y  $T_t = -22^\circ\text{C}$  para DOPC (82)(83); dicha temperatura de transición es muy importante ya que nos permite predecir el estado físico de una monocapa a cualquier temperatura. De este modo, el haber realizado todas nuestras medidas a  $20^\circ\text{C}$  o sea, por encima del valor de ambas temperaturas de transición, nos ha conducido a obtener monocapas expandidas.

Las isoterms de compresión recogidas en las fig. 4 y 5, muestran en ambos casos que no existe ninguna región intermedia, siendo la isoterma correspondiente a DOPC más expandida por estar totalmente insaturadas las cadenas hidrocarbonadas.

Aunque su significado físico no está claro, a efectos comparativos el área límite  $A_0$  calculada al extrapolar  $a\pi = 0$  la zona de compresibilidad más baja de la isoterma nos da, en general, una idea del área de la sección transversal de la molécula. En el caso que nos ocupa, los valores que se obtienen en la interfase son  $A_0(\text{PC}) = 98,5 \pm 3,0 \text{ \AA}^2/\text{molé}$  y  $A_0(\text{DOPC}) = 112 \pm 3,0 \text{ \AA}^2/\text{molé}$ .

En una interfase aire/agua podemos suponer el grupo -

zwitteriónico en el interior del soporte acuoso, más o menos alineado, paralelo a la superficie, dependiendo del pH y fuerza iónica del mismo, el esqueleto glicerol perpendicular a dicho plano (23), y las cadenas hidrocarbonadas fuera del plano de la interfase más o menos perpendiculares al mismo, según el estado físico de la monocapa.

La existencia de dobles enlaces en las cadenas hidrocarbonadas conduce a un decrecimiento general en la ordenación de éstas, por la introducción de un elemento rígido  $\text{>C=C<}$ , ya que los dobles enlaces se encuentran generalmente en la conformación cis, que impide a las cadenas hidrocarbonadas asumir una configuración completamente extendida; por tanto perturba el empaquetamiento paralelo y reduce las interacciones de tipo van der WAALS entre cadenas adyacentes. La interacción entre cadenas hidrocarbonadas adyacentes en un film monomolecular puede calcularse a partir del empaquetamiento molecular (área por molécula para una presión determinada), utilizando la ecuación de la energía de dispersión LONDON - van der WAALS (24) en la que la interacción es inversamente proporcional a la quinta potencia de la distancia entre cadenas parafínicas y directamente proporcional al número de grupos metileno.

Esta energía de interacción debe ser menor para el caso de la DOPC que para la PC, ya que en esta última, una parte de las cadenas hidrocarbonadas puede estar perpendicular al plano de la interfase, por ser saturadas, aunque la otra cadena se hallase en una posición más inclinada y por consiguiente ocupando un área mayor en la misma. En el caso de la

DOPC al tener todos los residuos hidrocarbonados insaturados, la monocapa es más expandida y las áreas ocupadas por moléculas deberán ser mayores como se observa experimentalmente.

## 4.2. MONOCAPAS DE POLIPEPTIDOS

### 4.2.1. Poli-L-metionina (PM)

Desde hace tiempo es sabido que la conformación presente en un polipeptido en solución, se mantiene en las monocapas formadas en interfases aire/agua (51). Esto hace esperar la existencia de una cierta correspondencia entre la isoterma de compresión de la monocapa y la conformación del polipéptido en solución por efecto del disolvente.

Siguiendo esta pauta, varios autores realizaron medidas para la PM por espectroscopía infrarroja de películas depositadas por evaporación, a partir de las disoluciones empleadas para extender la monocapa (52), mostrando que la pérdida del disolvente no implica ningún cambio en la configuración respecto a la que el polipéptido mantiene en disolución.

Por otro lado, se ha sugerido que la transición manifestada por la aparición de una zona de gran compresibilidad, que presentan las isotermas de varios poliaminoácidos y en concreto la de la PM obtenida de disoluciones en disolvente no polar, está asociada a la conformación ordenada  $\alpha$ -hélice del polipéptido, y que esta transición desaparece por estar el poliaminoácido en forma de cadenas estadísticas cuando se utilizan en la extensión de la monocapa disolventes polares.

En este sentido las isotermas obtenidas por nosotros para monocapas de PM en ambos tipos de disolvente muestran que: la zona de transición registrada en la Fig. 6 A, en di-

solvente no polar desaparece cuando se forma la monocapa en disolvente polar Fig. 6 B. El área ocupada por residuo en ambas monocapas para valores iguales de presión superficial, en zonas anteriores a la correspondiente a la transición, es bastante más pequeña en la formada con disolvente polar, según se observa en la curva  $\pi$ -A; sin embargo para la zona inmediatamente superior a la de la transición, ambas monocapas ocupan áreas muy semejantes, es decir, ambas isothermas de compresión, en sus tramos finales, siguen una trayectoria casi idéntica. Esto nos indica, en principio, que la conformación ordenada  $\alpha$ -hélice que presenta la PM en disolvente no polar para valores bajos de presión superficial, puede, de alguna manera, al aumentar suficientemente esta presión, no existir totalmente como tal conformación ordenada y comportarse de forma análoga a su situación en disolvente polar.

Por medidas de potencial de superficie varios autores (52) han observado una fluctuación en los valores obtenidos para áreas muy grandes ( $100 \text{ \AA}^2/\text{resid}$ ) en monocapas formadas en disolvente no polar, debido probablemente al carácter condensado de la monocapa, que en esta situación forma islotes por agregación de algunas moléculas del polipéptido.

Partiendo de que la PM en una interfase aire/agua mantiene una conformación  $\alpha$ -hélice en un disolvente no polar y que a áreas grandes se encuentra formando islotes de pocas moléculas, hemos realizado los correspondientes modelos moleculares a escala.

Se emplearon modelos atómicos CPK, Schwarz Bioresarch 1,25 cm/Å; el modelo molecular de PM en configuración  $\alpha$ -hélice se realizó con 16 residuos o restos. Los cálculos que se exponen a continuación se efectuaron por proyección del modelo sobre papel milimetrado, teniendo en cuenta que la traslación o avance de la hélice por resto es, aproximadamente, 1,5 Å:

a) - Área ocupada por residuo para un número especificado de cadenas polipeptídicas en  $\alpha$ -hélice de 16 restos aminoácidos con empaquetamiento paralelo y sin interpenetración de los restos laterales. Tabla I

b) - Área ocupada por residuo para un número especificado de cadenas polipeptídicas en  $\alpha$ -hélice de 16 residuos, con empaquetamiento paralelo y con máxima interpenetración de sus restos laterales. Tabla II.

De los valores de estas tablas se deduce: que el área por residuo varía con el grado de asociación y, que a partir de 5  $\alpha$ -hélices o más los valores medios del área por residuo no varían mucho con el número de las mismas. Fig. 14.

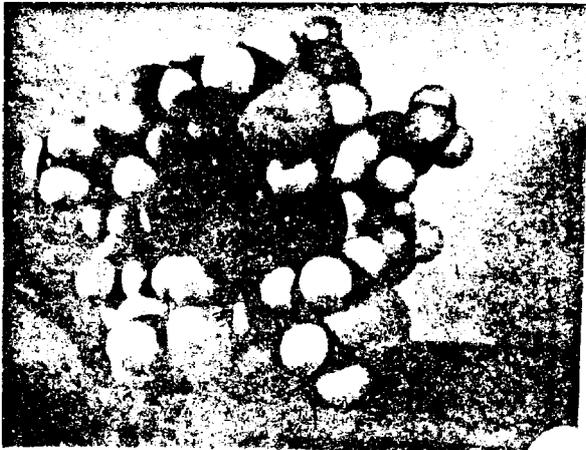
Si se comparan los valores obtenidos a partir de modelos, Tablas I y II, con los registrados en la isoterma de compresión para una monocapa de PM en disolvente no polar, - fig. 6 A, se observa que la concordancia es buena para islotes formados por alrededor de 5 cadenas asociadas lateralmente de PM.

En la isoterma  $\pi$ -A de PM, para aproximadamente 28 Å<sup>2</sup>/residuo, la monocapa comienza a ejercer presión superficial,

80



Modelo molecular de poli-L-metionina



Sección transversal

Tabla I : Variación del área/residuo con el grado de asociación en paralelo sin interpenetración de cadenas laterales

número de conjuntos de $\alpha$ -hélices asociadas.	Area media $\pm 0,02 \text{ \AA}^2/\text{resid.}$
1	19,11
2	22,65
3	23,09
4	23,36
5	23,53
10	23,93
15	24,09
20	24,16

Tabla II: Variación del área/residuo con el grado de asociación en paralelo con máxima interpenetración de cadenas laterales.

número de conjuntos de $\alpha$ -hélices asociadas	Area media $\pm 0,02 \text{ \AA}^2/\text{resid.}$
2	15,40
3	13,70
4	13,36
5	13,13
10	12,61
15	12,43
20	12,32

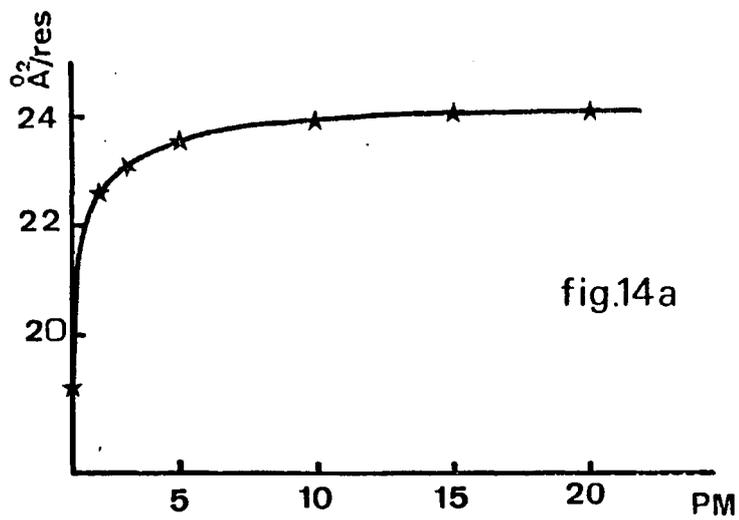


fig.14a

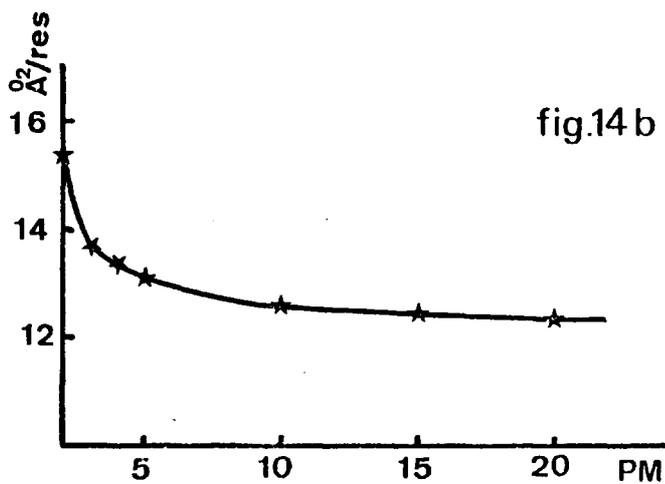


fig.14 b

Fig. 14.- Variación del área por residuo con el número de conjuntos de  $\alpha$ -helices asociadas de poli-L-metionina (PM).  
a. sin interpenetración de sus cadenas laterales.  
b. con máxima interpenetración.

y, para  $0,3 \text{ din. cm}^{-1}$  ( $23,6 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$ ) los islotes pueden estar constituidos por alrededor de 5 cadenas que se hallan en contacto sin producirse la interpenetración de cadenas laterales. A medida que se comprime la monocapa aparece una zona condensada, de compresibilidad muy pequeña, donde se van comprimiendo los islotes produciéndose la interpenetración de las cadenas laterales; al final de esta zona, aproximadamente a  $10 \text{ din. cm}^{-1}$  ( $14-15 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$ ) aparece la transición característica de la PM en la que, aproximadamente a  $11,3 \text{ din. cm}^{-1}$  ( $12,3 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$ ) se produciría la máxima interpenetración de las cadenas adyacentes sin que haya necesidad de una deformación de la conformación ordenada  $\alpha$ -hélice. Según los modelos moleculares, las áreas por residuo a presiones superficiales superiores requerirían un cambio conformacional o la separación de parte de las cadenas de la interfase, como refleja la curva  $\pi$ -A, pudiendo suceder que dicha zona de transición sea el resultado de un cambio conformacional de empaquetamiento en la monocapa que pasa de un estado condensado de baja compresibilidad y áreas por residuo grandes, como resultado de la asociación en islotes de las cadenas  $\alpha$ -hélice, a una situación parecida a la que se observa a presiones elevadas en las monocapas obtenidas en disolvente polar y por lo tanto a una conformación desordenada.

Varios autores por medidas espectroscópicas de PM (52), referidas a distinta polaridad del disolvente y para presiones superficiales superiores a la correspondiente a la zona de transición, encuentran ausencia de dicroísmo lineal, es decir,

ausencia de la conformación ordenada  $\alpha$ -hélice. Este hecho avala la hipótesis de que la transición está relacionada con un cambio conformacional.

Por tanto, la interpretación del comportamiento de la isoterma de compresión debe estar relacionado con la conformación  $\alpha$ -hélice, ya que se pueden formar unidades muy ordenadas de pocas moléculas, debido a interacciones atractivas intermoleculares. Estas unidades polimoleculares, de gran rigidez, se alinearán con mayor o menor facilidad según su longitud durante la compresión, predominantemente paralelas a la barrera móvil; cuando la presión alcanza un valor determinado, esta estructura molecular se rompe, dando lugar a un reagrupamiento molecular que aunque sea más desordenado es más compacto; esto implicaría un cambio conformacional aunque ello no afecte a toda la molécula. La aparición de un ciclo de histeresis, fig. 7 para descompresiones realizadas a partir de presiones superiores a la zona de transición y no para inferiores, nos induce a pensar que la estructura inicial en  $\alpha$ -hélice de las moléculas que constituyen la monocapa, a áreas grandes, es la más estable, y que la transición, que aparece por la compresión, a un estado de las moléculas con áreas por residuo más bajas, no implica probablemente un cambio conformacional total e irreversible, sino un empaquetamiento más compacto que supondría la pérdida de alineación de las  $\alpha$ -hélices sin variar mucho la proporción de la conformación primitiva.

#### 4.2.2. Poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato

La isoterma de compresión obtenida para monocapas de PMG extendidas a partir de disoluciones en disolvente poco polar, fig. 8 A, es semejante a la obtenida por otros autores (49) y está relacionada con una conformación ordenada del tipo  $\alpha$ -hélice. Se observa, sin embargo, que la transición ( $18 \text{ din. cm}^{-1}$ ) es menos pronunciada en la isoterma obtenida en el presente trabajo debido probablemente a que se ha utilizado un polímero de masa molecular mucho más pequeña (5300). La zona de transición característica de polipéptidos en disolvente no polar que presentan una cierta ordenación en la interfase, como consecuencia de una conformación  $\alpha$ -hélice o  $\beta$ -estructura, puede depender de la masa molecular ya que para moléculas lo suficientemente pequeñas puede existir un menor grado de ordenación y el proceso, que supone el posible paso a otro tipo de conformación que implique una reordenación molecular, puede ser menos cooperativo, dando así lugar a una transición menos pronunciada. En experimentos realizados con poli- $\beta$ -bencil-L-aspartato de alta y baja masa molecular se encontró análoga diferencia en la isoterma de compresión (53) (68).

También es de señalar que, para presiones superficiales superiores a la citada transición, aproximadamente a  $24 \text{ din.cm}^{-1}$  aparece un nuevo cambio de pendiente; MALCOLM explica las transiciones observadas, por una posible formación de nuevas capas de moléculas (bi o tricapas) de PMG sobre la capa primitiva en contacto con la superficie del

agua, que serían arrancadas de la interfase por un proceso cooperativo (84).

Cuando la monocapa de PMG se forma a partir de una disolución en disolvente polar, la isoterma de compresión, fig. 8 B es en nuestro caso muy semejante a la correspondiente - preparada con disolvente no polar, aunque ocupando áreas superficiales más pequeñas para iguales valores de presión superficial, con una zona de transición que se inicia aproximadamente a  $16 \text{ din.cm}^{-1}$ , esta transición no ha sido descrita - por otros autores (49) (48) para experimentos realizados con disolventes diferentes.

En principio consideramos que la transición apuntada por nosotros podría estar relacionada con la presencia de otro tipo de estructura o conformación ordenada que en este - caso puede ser de tipo  $\beta$  (81). Una conformación de estructura se ha relacionado también con la transición observada en - monocapas de gramicidina S (85).

CORNELL (50) al estudiar espectros de D.C. de monocapas depositadas por la técnica de LANGMUIR-BLODGETT sugiere que las películas de PMG son casi  $\alpha$ -hélice pura cuando las monocapas se extienden en disolvente no polar, y mezclas de  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -cadena cuando el disolvente de extensión contiene piridina.

Para áreas grandes el potencial superficial, que se mide con un electrodo de hilo de platino, muestra valores oscilantes, lo que sugiere que la monocapa está formada por islotes o agregados (51). Partiendo de esta observación, así -

como del hecho de que el PMG mantiene una conformación  $\alpha$ -hélice cuando se extiende en una interfase aire/agua a partir de disoluciones muy ricas en disolvente no polar, se han realizado modelos moleculares a escala de forma análoga al caso de la PM. Dichos modelos se construyen con cadenas polipeptídicas de 16 residuos; los valores que se exponen a continuación se determinaron por proyección de los modelos sobre papel milimetrado:

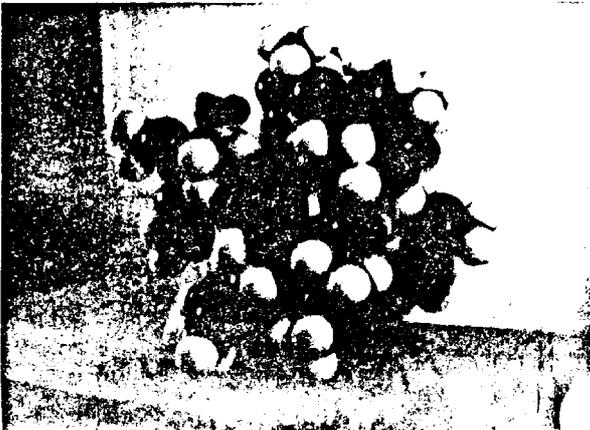
- a.- Las áreas ocupadas por residuo para un número especificado de  $\alpha$ -hélices de PMG de 16 residuos, con empaquetamiento paralelo y sin interpenetración de sus cadenas laterales viene dada en la tabla III.
- b.- Las áreas ocupadas por residuo para un número especificado de conjuntos de  $\alpha$ -hélices de 16 residuos, con empaquetamiento paralelo y con máxima interpenetración de sus cadenas laterales viene en la tabla IV.

De los valores de estas tablas se deduce: que el área por residuo varía con el grado de asociación y, que a partir de aproximadamente 5  $\alpha$ -hélices los valores medios del área por residuo no varían mucho con el número de las mismas. Fig. 15.

Los valores estimados con los modelos (Tablas III y IV, se contrastan con los registrados en la isoterma de compresión para una monocapa de PMG en disolvente no polar. Fig. 8 A. Se observa que la concordancia es buena para islotes formados --



Modelo molecular de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato



Sección transversal

Tabla III: Variación del área/residuo con el grado de asociación en paralelo sin interpenetración de cadenas laterales.

número de conjuntos de $n$ -hélices asociados.	Area media $\pm 0,02 \text{ \AA}^2/\text{resid}$
1	19,06
2	20,84
3	21,06
4	21,19
5	21,28
10	21,48
15	21,56
20	21,60

Tabla IV: Variación del área/residuo con el grado de asociación en paralelo con máxima interpenetración de cadenas laterales.

Número de conjuntos de $\alpha$ -hélices asociados	Area media $\pm 0,02 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$
2	13,11
3	12,38
4	11,95
5	11,66
10	11,00
15	10,76
20	10,63

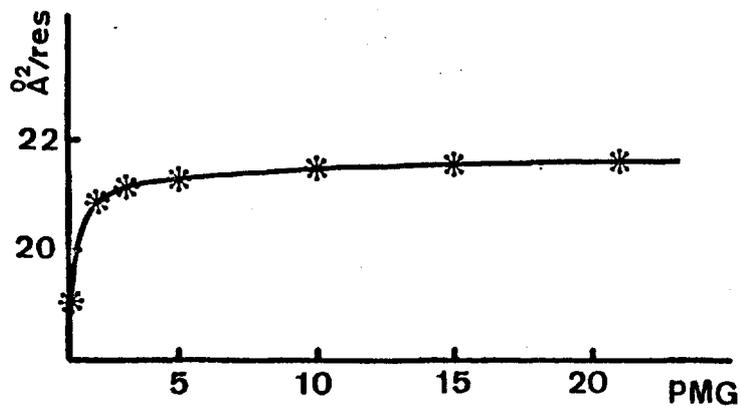


Fig. 15 a.

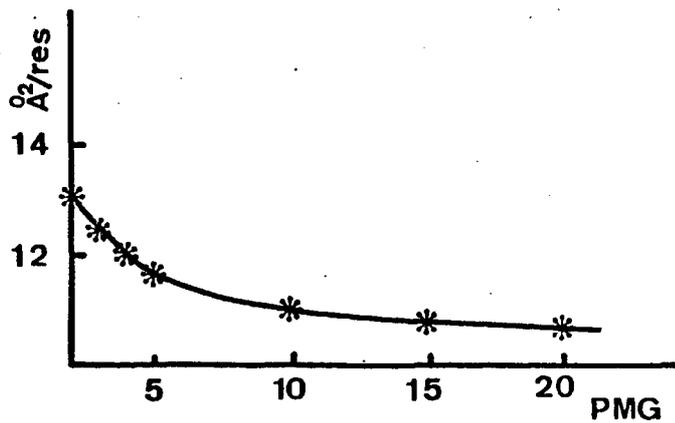


Fig. 15 b.

Fig.15.- Variación del área por residuo con el número de conjuntos de  $\alpha$ -helices asociadas de poli- $\gamma$ -metil-L-glutanato (PMG).

- sin interpenetración de sus cadenas laterales
- con máxima interpenetración.

por alrededor de 5 cadenas asociadas lateralmente de PMG.

En la isoterma  $\pi$ -A se observa que, para áreas de aproximadamente  $30 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$  la monocapa comienza a ejercer presión superficial apreciable; alrededor de  $2,2 \text{ din.cm}^{-1}$  de presión, que corresponde a un área de  $21,3 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$ , está en buen acuerdo con la que se obtendría si la monocapa estuviera constituida por islotes de aproximadamente 5  $\alpha$ -hélices de PMG sin que existiese interpenetración de las cadenas laterales. Según esta hipótesis, le correspondería una progresiva ordenación de los islotes en los que, las cadenas laterales de las  $\alpha$ -hélices se van interpenetrando hasta llegar a la zona de transición, de máxima compresibilidad. Esta transición no requiere necesariamente la separación de la interfase de las cadenas  $\alpha$ -hélice, de acuerdo con los modelos moleculares correspondientes. Para presiones superiores, de aproximadamente  $24 \text{ din.cm}^{-1}$ , se observa un nuevo cambio de pendiente en la curva  $\pi$ -A; el área superficial es entonces  $10,5 \text{ \AA}^2/\text{residuo}$  valor para el que no es posible acomodar una conformación  $\alpha$ -hélice.

CORNELL(50.) por estudios de D.C. de monocapas de PMG transferidas a presiones superiores al valor de la zona de transición, observa que existen características de  $\alpha$ -hélice, lo que estaría de acuerdo con la hipótesis de otros investigadores(48.) que interpretan la zona de transición como el paso de una monocapa ordenada en  $\alpha$ -hélice a la formación de bicapas o multicapas de moléculas que conservarían la conformación  $\alpha$ -helicoidal.

Recientemente TAKEDA y col.(90) a partir de estudios espectroscópicos y de microscopía electrónica de películas de po

li- $\gamma$ -metil-L-glutamato transferidas desde monocapas en la interfase aire/agua, a presiones constantes, anterior y superior a la zona de transición, han concluido que las moléculas de PMG se hallan en conformación  $\alpha$ -hélice sobre dicha interfase y que la zona de transición puede considerarse como el paso de monocapa a bicapa conservándose la conformación y orientación molecular.

Por otro lado, los estudios con modelos moleculares ponen de manifiesto que no es necesario separar de la interfase las cadenas  $\alpha$ -hélice del poliaminoácido, al menos en la primera transición observada.

Las bicapas podrían formarse después del cambio brusco de compresibilidad posterior, así pues, no puede descartarse la posibilidad de que la primera transición se deba a un nuevo tipo de ordenación molecular en la monocapa por ruptura parcial de enlaces intramoleculares y pérdida de la alineación  $\alpha$ -hélice, seguida de un apilamiento molecular en bicapa o multicapas al aumentar la compresión.

También conviene señalar que, el PMG es el éster menos hidrofóbico del ácido poli-L-glutámico y, una monocapa de PMG en la interfase aire/agua tiene una estructura cristalina(51) lo que al ir aumentando la presión superficial hace que la cohesión entre las cadenas adyacentes sea bastante grande; estas características, unidas a la rigidez del esqueleto de la hélice pueden posibilitar el que la deformación o cambio de la estructura ordenada sea más difícil, favoreciéndose así el apilamiento molecular con formación de bicapas que pasarían

facilmente a multicapas y esto explicaría la inestabilidad o segunda transición observada en estas monocapas.

Finalmente el ciclo de histéresis, fig. 9, observado en las monocapas en el que la segunda compresión se superpone con la primera, indica que como con la PM, la conformación en  $\alpha$ -hélice inicial es estable y se regenera al descomprimir la monocapa.

#### 4.3. MONOCAPAS MIXTAS

En las monocapas mixtas es esencial abordar el problema de la miscibilidad. El hecho de que dos componentes que forman monocapas puedan mezclarse en una solución y extenderse en la interfase aire/agua, no proporciona plena certeza de que se formen monocapas mixtas homogéneas (54). Si los componentes que forman la monocapa no son miscibles, las propiedades de la monocapa mixta serán un promedio de las correspondientes a las monocapas de los componentes puros, para igual presión y temperatura. Cualquier desviación de esta simple regla de la aditividad, indica alguna forma de interacción o acoplamiento molecular, y por consiguiente la existencia de miscibilidad de las moléculas que constituyen la monocapa. Es importante señalar que tales interacciones pueden implicar, además a las moléculas del sustrato por lo cual las propiedades de las monocapas pueden no reflejar tan sólo la interacción molecular específica entre los componentes insolubles de la misma (86).

Se puede encontrar una presión de colapso o de transición, que es la máxima presión a la que la monocapa es estable en relación con el sustrato en un determinado estado. Esta presión de transición puede ser considerablemente más baja que la presión superficial a la que el verdadero colapso por separación de las moléculas de la interfase, comienza a aparecer en un experimento de compresión de la monocapa.

Dicha presión de colapso o de transición es una prueba de la miscibilidad de los componentes en mezclas superficiales. Dos componentes son inmiscibles cuando se obtienen dos presiones de colapso diferentes e iguales a las de las monocapas de los componentes puros, mientras que hay solamente una para la mezcla si ambos componentes son perfectamente miscibles (57). Evidentemente son posibles, y así se observan situaciones intermedias que dependen de las concentraciones relativas de los componentes, en las que se modifica la presión de colapso o de transición del componente más inestable aunque subsistan, de alguna manera, las correspondientes a las de los componentes puros.

#### 4.3.1. MONOCAPAS MIXTAS DE POLI-L-METIONINA Y FOSFATIDILCOLINA DE YEMA DE HUEVO

A partir de la red de isoterma de compresión PH-PC, hemos planteado el estudio de la compatibilidad superficial de ambos componentes.

En la Fig. 16, se representan las áreas superficiales expresadas en  $\text{\AA}^2/\text{residuo medio}$  frente a la fracción molar del fosfolípido PC a varias presiones superficiales constantes (5, 10 y 20  $\text{din.cm}^{-1}$ ) Como se puede observar, hay una variación lineal del área ocupada con la fracción molar de PC; esto significa que la conducta de las áreas es aditiva y por tanto que, o bien los dos componentes forman una solución

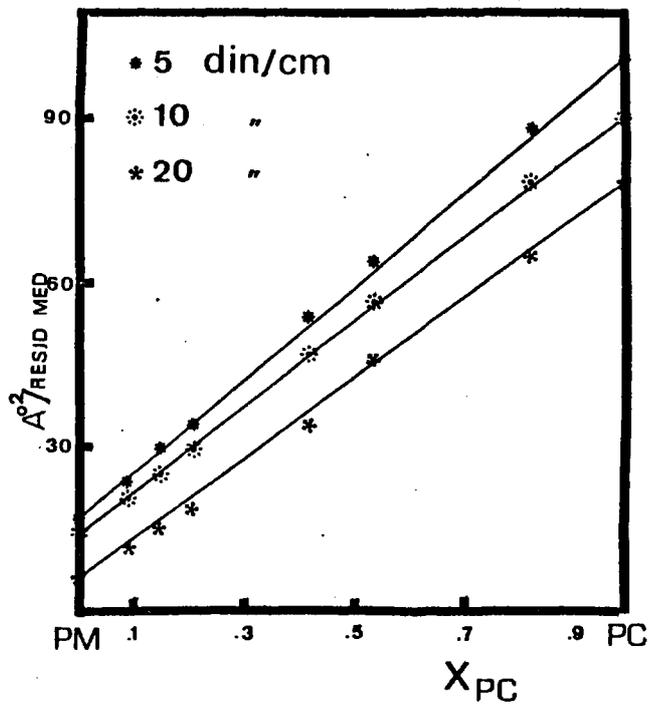


Fig 16.- Area por residuo medio en función de la fracción molar de fosfatidilcolina natural(PC) en monocapas mixtas de PM-PC, para las presiones superficiales de 5, 10 y 20  $\text{din.cm}^{-1}$ .

ideal bidimensional o ambos son inmiscibles.

Una variante de la representación anterior es la que se muestra en las fig. 17 donde se indica el área ocupada por el polipeptido puro y en la mezcla PM-PC, todo ello referido a la fracción molar de la PM a presiones superficiales inferiores y superiores a su punto de transición. El área media ocupada por la PM es, en todos los casos, siempre la misma.

En la fig. 18, se representa la presión de transición del PM frente a la fracción molar del fosfolípido, PC; se observa como dicha transición tiene lugar a presiones superficiales mayores al aumentar la concentración de PC en la monocapa mixta, hasta un valor aproximado de  $x_{PC} = 0,2$  a partir del cual se mantiene constante hasta  $x_{PC} = 0,42$ . Para valores superiores a  $x_{PC} = 0,42$  las isotermas no muestran ninguna inflexión y las curvas  $\pi$ -A, son de forma semejante a la correspondiente al fosfolípido puro.

Estos resultados pueden ser indicativos de que el fosfolípido afecta a la transición característica de la PM, y por tanto existe una posible compatibilidad superficial sin que se altere la ordenación o empaquetamiento de algunas moléculas del polipeptido que condiciona la aparición de la transición.

Sin embargo, la variación introducida en la presión de transición de la PM, por la presencia del fosfolípido, sugiere un cierto tipo de interacción entre las moléculas de este componente y los islotes ordenados que forman las molé

100

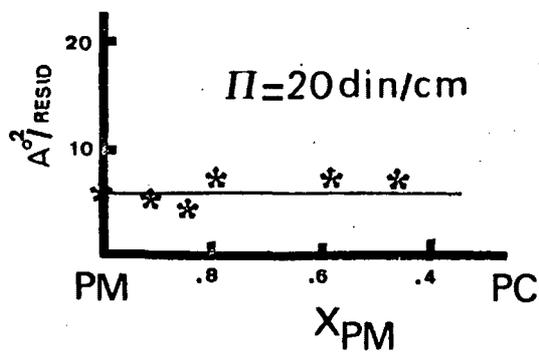
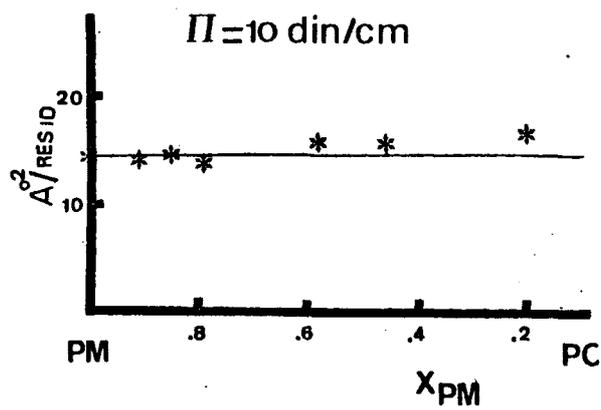


Fig.17.- Area por residuo ocupada por poli-L-metionina (PM) en función de su fracción molar - en las monocapas mixtas de PM-PC, para las presiones superficiales de 10 y 20  $\text{din.cm}^{-1}$

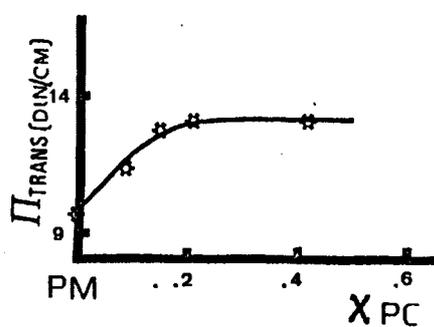


Fig.18.- Variación de la presión de transición de poli-L-metionina(PM) en función de la fracción molar de fosfatidilcolina natural (PC), en monocapas mixtas de PM-PC.

culas  $\alpha$ -helicoidales de la PM (52). De alguna manera las moléculas de PC modifican la estabilidad de la estructura ordenada de la PM, haciendo que la transición tenga lugar a presiones mayores al aumentar su número en la monocapa y dando lugar a que el proceso tenga además un carácter menos cooperativo (compresibilidades más bajas). El hecho de que se llegue a un valor de  $\chi_{PC}$  a partir del cual no hay variación en el efecto indicado, sugiere una acción cuantitativa, probablemente relacionada con el perímetro exterior de los islotes constituyentes de la monocapa de la PM.

Por todo esto es posible que los islotes de polipéptido se rodeen de moléculas de fosfolípido, de forma que estas modulan la acción de sus cadenas laterales en el fenómeno de la transición, ya que ésta depende, fundamentalmente, de la naturaleza de las cadenas laterales del polipéptido y de las interacciones hidrofóbicas entre las mismas (87).

#### 4.3.2. MONOCAPAS MIXTAS DE POLI-L-METIONINA Y 1,2 DIOLEIL-L- $\alpha$ -FOSFATIDILCOLINA.

En la fig. 19 representamos las áreas superficiales expresadas en  $\text{\AA}^2/\text{resid medio}$  frente a la fracción molar del fosfolípido, DOPC, a varias presiones superficiales constantes (5, 10 y 20  $\text{din.cm}^{-1}$ ). Se observa una variación lineal del área ocupada con la fracción molar de DOPC; por tanto se sigue la ley de aditividad de áreas, indicando que, o bien ambos

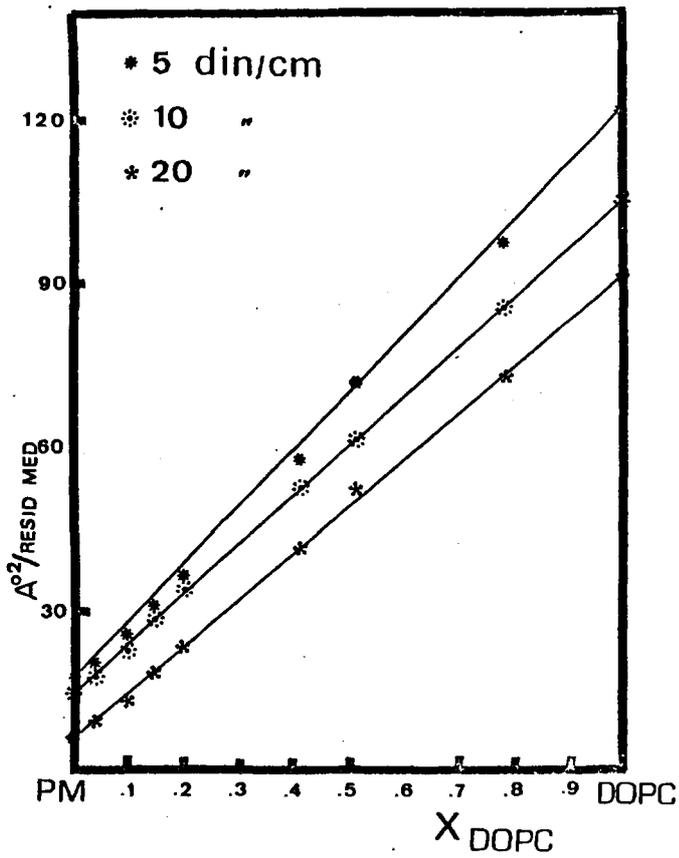


Fig.19.- Area por residuo medio en función de la fracción molar de 1,2 dioleil- $L\alpha$ -fosfatidilcolina(DOPC) en monocapas mixtas de PM-DOPC, para las presiones superficiales 5, 10 y 20  $\text{din.cm}^{-1}$ .

culas  $\alpha$ -helicoidales de la PM (52). De alguna manera las moléculas de PC modifican la estabilidad de la estructura ordenada de la PM, haciendo que la transición tenga lugar a presiones mayores al aumentar su número en la monocapa y dando lugar a que el proceso tenga además un carácter menos cooperativo (compresibilidades más bajas). El hecho de que se llegue a un valor de  $\chi_{PC}$  a partir del cual no hay variación en el efecto indicado, sugiere una acción cuantitativa, probablemente relacionada con el perímetro exterior de los islotes constituyentes de la monocapa de la PM.

Por todo esto es posible que los islotes de polipéptido se rodeen de moléculas de fosfolípido, de forma que estas modulan la acción de sus cadenas laterales en el fenómeno de la transición, ya que ésta depende, fundamentalmente, de la naturaleza de las cadenas laterales del polipéptido y de las interacciones hidrofóbicas entre las mismas (87).

#### 4.3.2. MONOCAPAS MIXTAS DE POLI-L-METIONINA Y 1,2 DIOLEIL-L- $\alpha$ -FOSFATIDILCOLINA.

En la fig. 19 representamos las áreas superficiales expresadas en  $\text{\AA}^2/\text{resid}$  medio frente a la fracción molar del fosfolípido, DOPC, a varias presiones superficiales constantes (5, 10 y 20  $\text{din.cm}^{-1}$ ). Se observa una variación lineal del área ocupada con la fracción molar de DOPC; por tanto se sigue la ley de aditividad de áreas, indicando que, o bien ambos

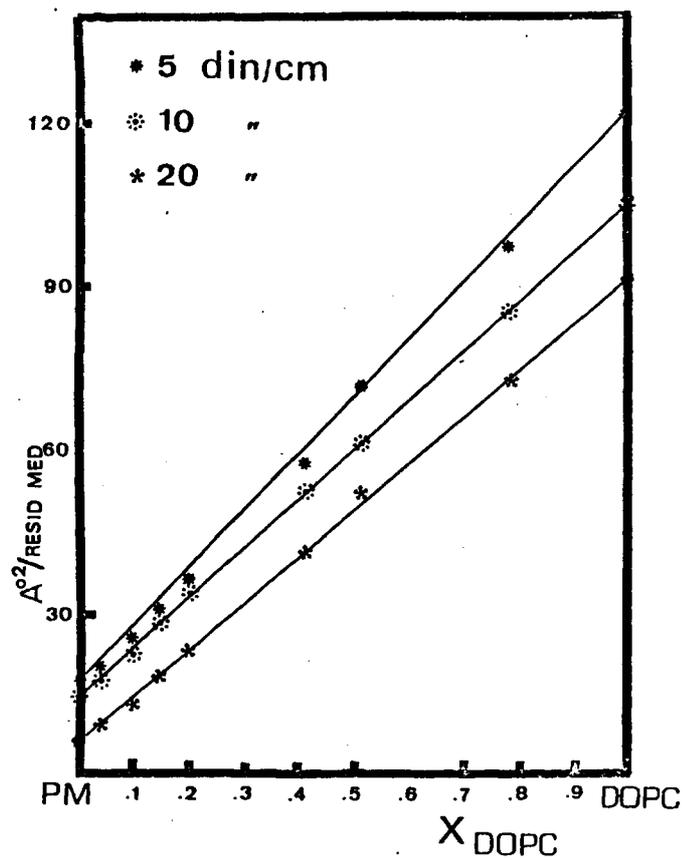


Fig.19.- Area por residuo medio en función de la fracción molar de 1,2 dioleil-L- $\alpha$ -fosfatidil-colina(DOPC) en monocapas mixtas de PM-DOPC, para las presiones superficiales 5, 10 y 20  $\text{din.cm}^{-1}$ .

componentes forman una disolución ideal bidimensional o son inmiscibles.

Una variante de esta representación se muestra en la fig. 20, donde se indica el área ocupada por el polipeptido, PM, frente a la fracción molar de éste a presiones superficiales inferiores y superiores a la presión de transición; se observa un comportamiento independiente de la fracción molar de polipeptido PM.

En la fig. 21, se representa la presión de transición de la PM frente a la fracción molar del fosfolípido, DOPC, en la monocapa mixta. Se comprueba un aumento lineal de la misma con la concentración de DOPC hasta un valor aproximado de  $X_{\text{DOPC}} = 0,2$ , a partir del cual se mantiene constante hasta  $X_{\text{DOPC}} = 0,41$ . Para valores mayores de  $X_{\text{DOPC}} = 0,41$  las isothermas muestran un tipo de comportamiento semejante al fosfolípido puro DOPC.

Queda reflejado en todas las representaciones gráficas, anteriormente indicadas, que la diferencia entre una monocapa mixta formada con un polipéptido y un fosfolípido parcialmente insaturado y otro en la que éste sea totalmente insaturado, no conlleva, en su trazado, modificación sustancial alguna. Sólo debe anotarse que el área/residuo medio ocupada por la monocapa mixta frente a la fracción molar del fosfolípido, es superior con el componente insaturado total debido a la influencia del enlace cis de las cadenas hidrocarbonadas de DOPC.

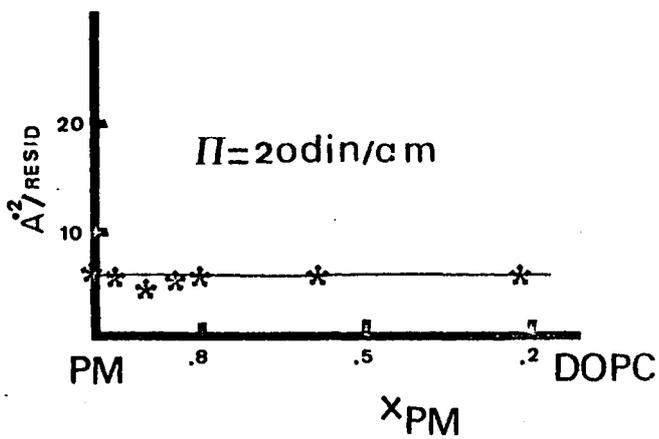
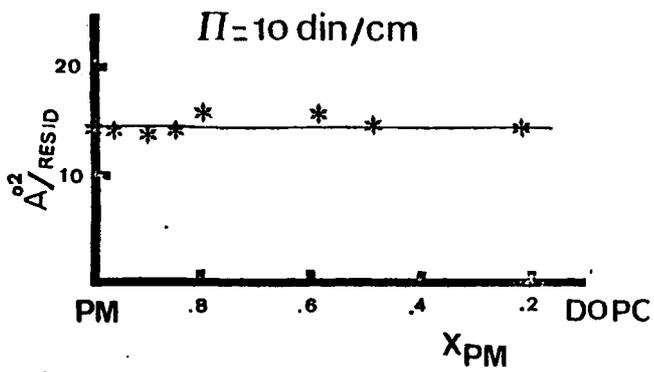


Fig.20.- Area por residuo ocupada por poli-L-metionina (PM) en función de su fracción molar en las monocapas mixtas de PM-DOPC, para las presiones superficiales de 10 y 20  $\text{din.cm}^{-1}$ .

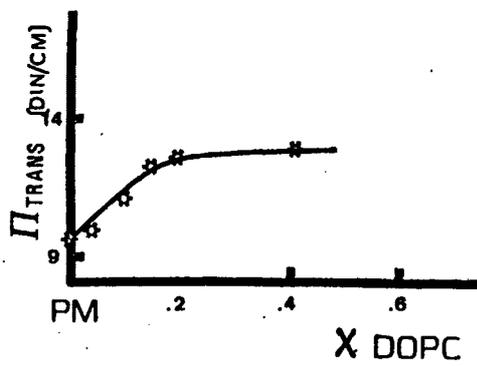


Fig.21.- Variación de la presión de transición de poli-L-metionina(PM) en función de la fracción molar de 1,2 dioleil-L- $\alpha$ -fosfatidilcolina(DOPC) en monocapas mixtas de PM-DOPC.

Otros autores (88) han estudiado monocapas mixtas obtenidas a partir de una disolución que contiene los dos componentes, polipeptido (PM) y fosfolípido (lecitina saturada), en un disolvente poco polar, observando también una posible compatibilidad o miscibilidad en la monocapa mixta. Como en nuestro caso, la transición que aparece en las monocapas ricas en polipéptido, tiene lugar a presiones cada vez más elevadas y la zona de transición es menos acusada a medida que aumenta la fracción molar del fosfolípido.

#### 4.3.3. ANÁLISIS DE LOS SISTEMAS PM-PC, DOPC, PARA LA FRACCIÓN MOLAR EN FOSFOLIPIDO $x_F = 0,17$

En las representaciones gráficas de la variación de la presión superficial de la transición del polipéptido PM frente a la fracción molar de los fosfolípidos (figs. 18 y 21) se observa como ya se ha expuesto anteriormente que el valor de la presión superficial aumenta hasta  $x_F = 0,17$  y a partir de este valor desaparece dicho comportamiento para permanecer casi constante la presión superficial.

Como se sugirió en el apartado 4.2.1. correspondiente al sistema PM-PC, este comportamiento puede estar relacionado con el perímetro exterior de los islotes constituyentes de la monocapa de PM. Por esta razón se ha planteado un análisis matemático en el que se establece una relación entre el perímetro

medio de los islotes de la poli-L-metionina con el que corresponde al número de moléculas de fosfolípido que la rodean, para la fracción molar de fosfolípido  $X_F = 0,17$ .

Hemos supuesto para la realización de los cálculos lo siguiente:

- a) - Que los islotes de PM están constituidos por hélices asociadas en paralelo que yacen en la interfase y que cada una ocupa un espacio cuadrangular, igual al producto de su longitud por el espaciado que se estima a partir de los datos aportados por los modelos moleculares.
- b) - El diámetro de la sección transversal del fosfolípido, calculado por modelos atómicos CPK, Schwarz Bioresearch  $1,25 \text{ cm}/\text{\AA}$ , se ha considerado  $7,2 \text{ \AA}$  que es el más pequeño posible ya que su sección no es circular.
- c) - Las moléculas de fosfolípidos que rodean a un islote de PM no son compartidas por otro islote.

Se han tenido en cuenta, además, los siguientes parámetros:

$n$  = Número de residuos de la cadena  $\alpha$ -hélice de longitud promedio.  $311$

$p$  = Número de hélices que se asocian en paralelo para formar el islote.

$N$  =  $n \cdot p$ ; Número total de residuos por islote

$d$  = Diámetro de la sección transversal de las  $\alpha$ -hélices de la poli-L-metionina en  $\text{\AA}$ .  $11 \text{ \AA}^2$

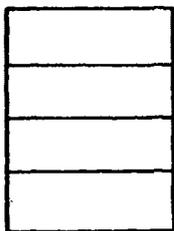
$X$  = Fracción molar de fosfolípido en la monocapa

$\alpha$  = Fracción de solapamiento entre dos hélices que se asocian en paralelo.

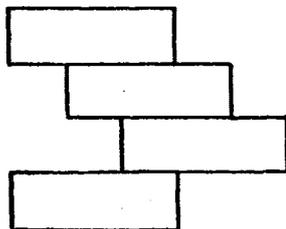
Como se sabe, en una hélice polipeptídica, está bien establecido que el avance de la hélice por residuo es de  $1,5 \text{ \AA}$ ; por lo tanto el perímetro de una cadena aislada será

$$n \cdot 1,5 \cdot 2 + 2d = 2(1,5 \cdot n + d)$$

Supongamos que los islotes estén constituidos como promedio por hélices de la misma longitud y ordenadas de manera que se solapen completamente (esquema a).



esquema:a



esquema:b

El perímetro de los mismos en función del número de hélices será, por consiguiente:

$$\text{Para 1 hélice } P_1 = (n \cdot 1,5 + d)2 = 2 \cdot n \cdot 1,5 + 1 \cdot 2d$$

$$\text{Para 2 " } P_2 = (n \cdot 1,5 + d)2 + 2d = 2 \cdot n \cdot 1,5 + 2 \cdot 2d$$

$$\text{Para 3 " } P_3 = (n \cdot 1,5 + d)2 + 4d = 2 \cdot n \cdot 1,5 + 3 \cdot 2d$$

$$\text{Para p " } P_p = (n \cdot 1,5 + d)2 + (2p-1)d = 2 \cdot n \cdot 1,5 + p \cdot 2d$$

$$\text{De donde } P_p = 2 \cdot n \cdot 1,5 + p \cdot 2d \quad \text{\AA} \quad (1)$$

A su vez, el perímetro real de moléculas de fosfolípido que rodean los islotes del polipéptido, suponiendo que todas están alrededor de los mismos y no formando asociaciones entre sí, será:

$$P_R = K \frac{X}{1-X} N \cdot 7,2 \text{ \AA} \quad (2)$$

donde K es la fracción de moléculas de los fosfolípidos -- existentes en la monocapa, empleados en rodear los islotes.

Para la fracción molar de fosfolípidos  $X_f = 0,17$  en la que ya no existe un cambio en las condiciones de la transición de la monocapa, suponemos que las moléculas de fosfolípido han cerrado el perímetro de los islotes de PM, con lo que tendremos que:

$$P_R = P_P$$

Esto permite obtener alguna información sobre el tamaño de los islotes, suponiendo que se cumplen las condiciones - establecidas y utilizando los resultados experimentales obtenidos.

Para los cálculos se han tenido en cuenta las variaciones siguientes respecto del modelo sencillo inicial:

- a) - Proporción de fosfolípido (K) que interviene en rodear los islotes y, que por lo tanto, produce un efecto de interacción que se observa para  $X = 0,17$ . En la fig.22 (líneas llenas) se representa la variación de  $P_R$  en función del número de moléculas de PM para 100%, 75%, 50% y 25% de utilización de moléculas de fosfolípido - que rodean los islotes; esto se refleja en la ecuación (2) con un factor K de corrección que valdrá 1;0,75;0,5 ó 0,25 respectivamente.
- b) - Longitud promedio de la hélice. Se puede considerar equivalente a una molécula entera de PM (311 residuos -

de metionina como promedio), media molécula y un cuarto de molécula; es decir, que la molécula esté constituida por una sola hélice o doblada dos o cuatro veces. En la fig. 22 (líneas punteadas) se representan los perímetros en  $\text{Å}$ , en función del número de moléculas de PM, utilizando la ecuación (1).

- c) - Otro factor importante a considerar es el correspondiente al grado de solapamiento entre las cadenas de poli-L-metionina. En la ecuación (1) se consideró que era del 100%; en caso de que existan situaciones como la que se muestra en el esquema b es necesario hacer una corrección para el cálculo del perímetro de los islotes, que vendrá dado por:

$$n \cdot 1,5 \cdot 2 (p-1) (1-\alpha)$$

y que se aplica a la ecuación (1). El factor de solapamiento vale 1 cuando éste es total y 0 en el caso en que no lo hubiera en absoluto y no se formasen islotes.

De este modo la ecuación (1) se transforma en:

$$P_{\alpha} = n \cdot 1,5 \cdot 2 (1 + (p-1)(1-\alpha)) + p \cdot 2d \text{ Å} \quad (3)$$

siendo ahora  $P_{\alpha}$ , el valor del perímetro del islote al introducir el factor de solapamiento.

En las fig. 23, 24 y 25 líneas punteadas se han representado la variación de P para distintos valores de solapamiento, frente al número de moléculas de polipéptido.

Los puntos de corte de las líneas obtenidas de la representación de las ecuaciones  $P_R$  y  $P_{\alpha}$ , indican los valores



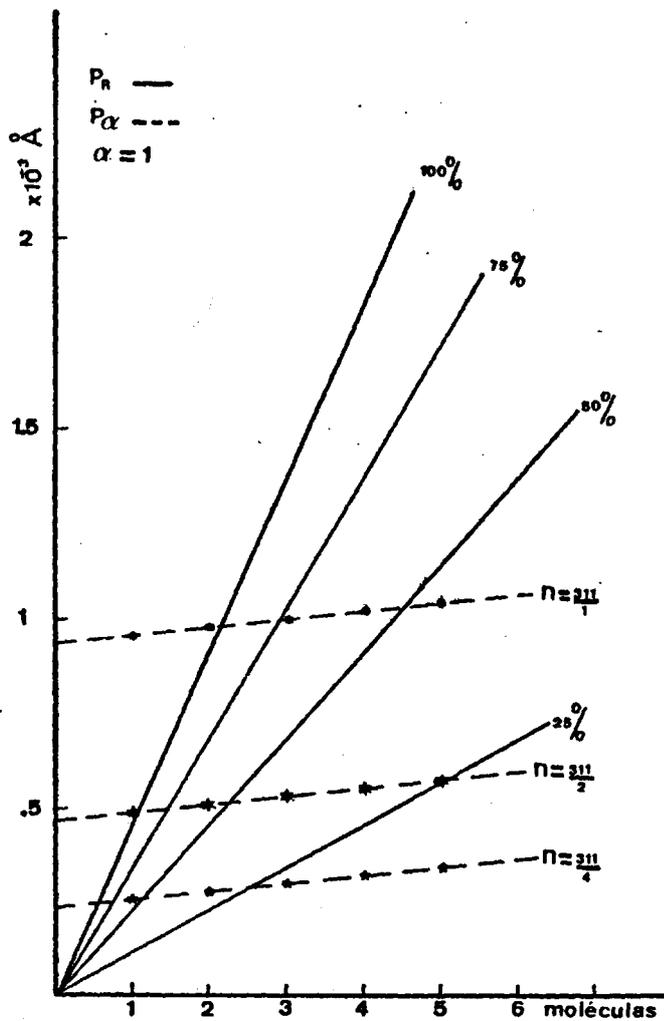


Fig.22.-  $P_r$ , perímetro real de las moléculas de fosfolípido que rodean el islote de PM para las proporciones del 100%, 75%, 50% y 25% en función del número de moléculas de PM.  $P_\alpha$ , perímetro del islote de PM para helices de 311, 311/2 y 311/4 residuos, con un solapamiento del 100%, en función del número de moléculas de PM.

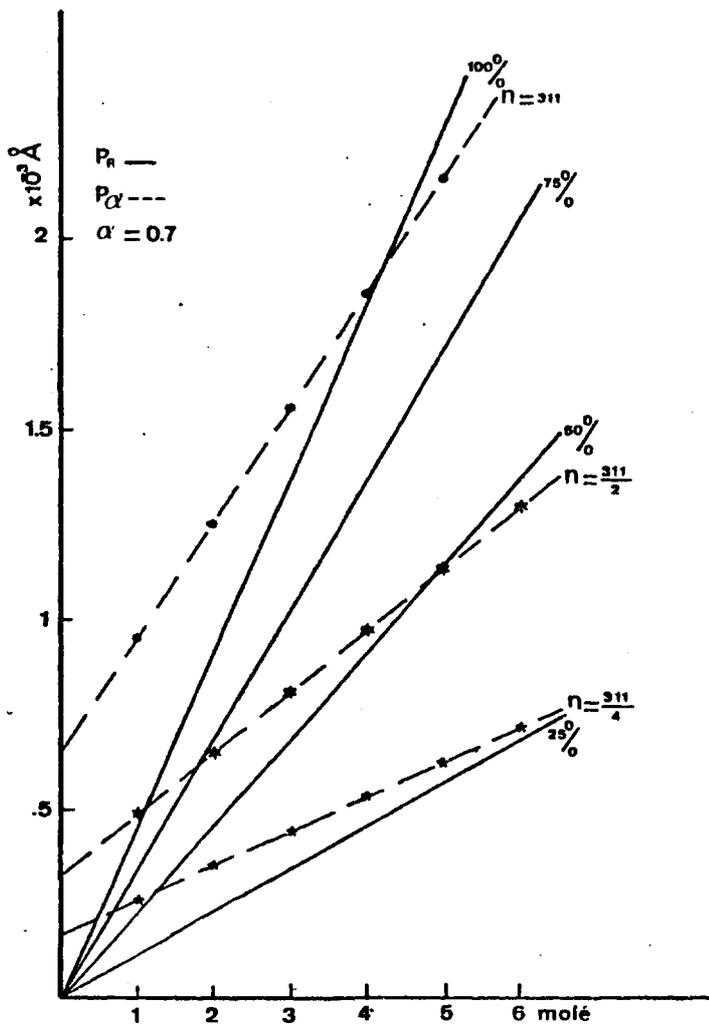


Fig. 23.-  $P_r$ , perímetro real de las moléculas de fosfolípido que rodean el islote de PH para las proporciones del 100%, 75%, 50% y 25% en función del número de moléculas de PH.  $P_\alpha$ , perímetro del islote de PH para helices de 311, 311/2 y 311/4 residuos, con un solapamiento del 70%, en función del número de moléculas de PH.

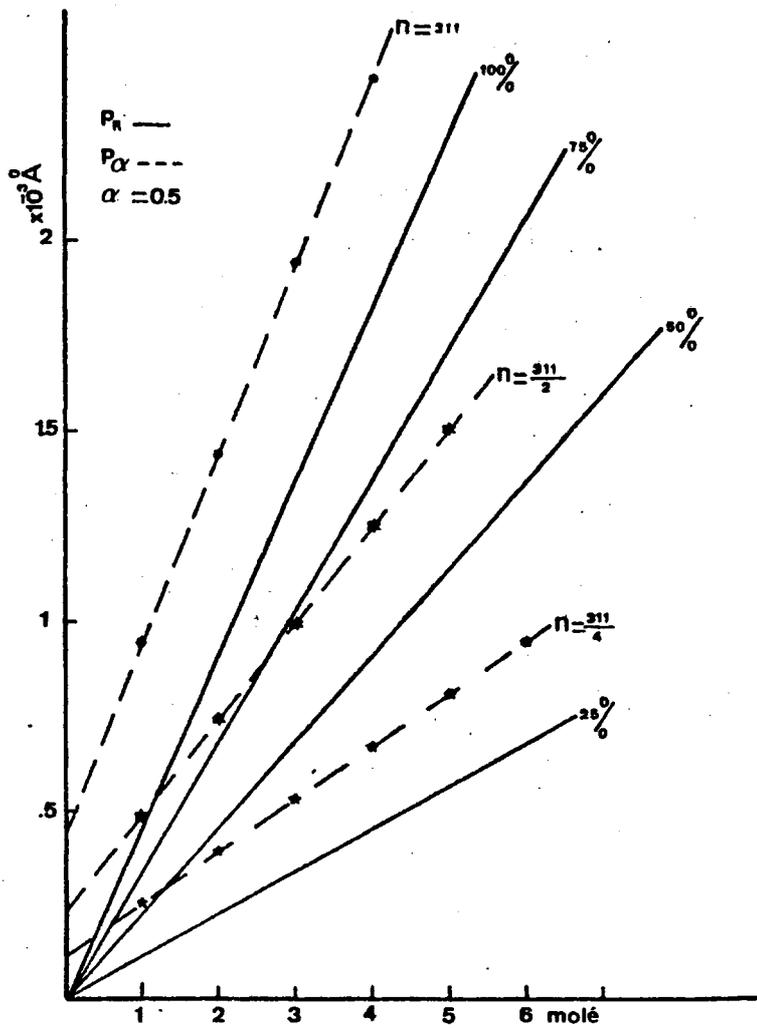


Fig. 24.-  $P_r$ , perímetro real de las moléculas de fosfolípido que rodean el islote de PM para las proporciones del 100%, 75%, 50% y 25% en función del número de moléculas de PM.  $P_\alpha$ , perímetro del islote de PM para hélices de 311, 311/2 y 311/4 residuos, con un solapamiento del 50%, en función del número de moléculas de PM.

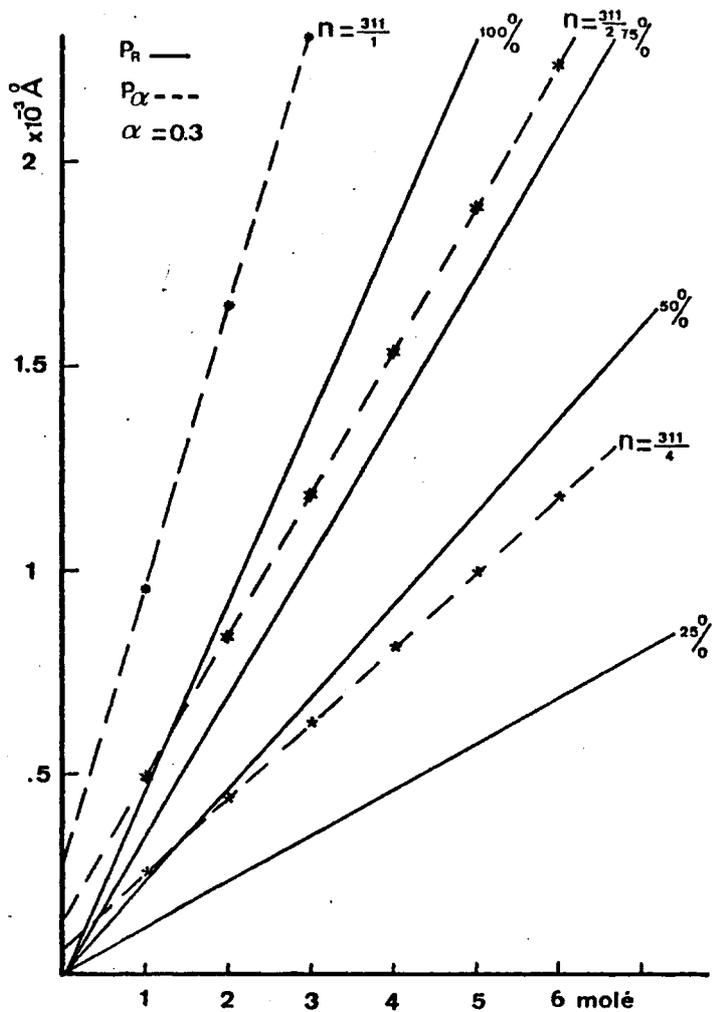


Fig. 25.-  $P_r$ , perímetro real de las moléculas de fosfolípido que rodean el islote de PM para las proporciones del 100%, 75%, 50% y 25% en función del número de moléculas de PM.  $P_\alpha$ , perímetro del islote de PM para helices de 311, 311/2 y 311/4 residuos, con un solapamiento del 30%, en función del número de moléculas de PM.

del perímetro de los islotes y el número de moléculas de polipéptido compatibles con los supuestos aceptados y con la fracción molar de polipéptido  $X = 0,17$  obtenida experimentalmente.

Estos valores están recogidos en las tablas V, VI, VII y VIII de las que se observa lo siguiente:

1.- Para un solapamiento del 100%

a.- El número de moléculas por islote para la fracción de fosfolípidos considerada apenas varía con la longitud de la hélice, es decir, es independiente de que la hélice sea una molécula entera, media o un cuarto.

b.- El factor de utilización de fosfolípido que rodea el islote influye casi proporcionalmente en el número de moléculas de aquel; para  $K = 1$  (100%), aproximadamente, 2 moléculas; para 0,5 (50%) aproximadamente 4,5 moléculas y para 0,25 (25%) aproximadamente 10 moléculas. En este último caso el sistema de ecuaciones (1) y (2) no tienen solución para moléculas no dobladas.

2.- Solapamiento no total

a.- al disminuir el solapamiento aumenta tanto el valor del perímetro que en las condiciones establecidas hay sólo un número limitado de soluciones al problema. Sólo para un 100% de utilización de las moléculas de fosfolípido hay soluciones en la mayoría de los casos.

Tabla V: Número de moléculas de PM, con un solapamiento del 100% que intervienen en la formación de islotes.

P <sub>n</sub> : Número de hélices que tiene la cadena PM	P <sub>R</sub> : Proporción de fosfolípido %			
	100%	75%	50%	25%
1 hélice	2.15	2.9	4.5	
2 hélices	2.2	2.9	4.5	10.2
4 hélices	2.2	3.0	4.6	10.2

Tabla VI: Número de moléculas de PM, con un solapamiento del 70%, que intervienen en la formación de is lotes

P <sub>n</sub> : Número de hélices que tiene la cadena PM	P <sub>R</sub> :Proporción de fosfolípido %		
	100%	75%	50%
1 hélice	4.2		
2 hélices	2.2	3.5	9.6
4 hélices	1.8	2.6	4.8

Tabla VII: Número de moléculas de PM, con un solapamiento del 50% que intervienen en la formación de islotes

$P_x$ : Número de hélices que tiene la cadena PM	$P_R$ : Proporción de fosfolípido %		
	100%	75%	50%
1 hélice			
2 hélice	2.4	5.2	
4 hélice	1.6	2.4	5.2

Tabla VIII: Número de moléculas de PM, con un solapamiento del 30% que intervienen en la formación de islotes

$R_N$ : Número de hélices que tiene la cadena PM	$P_R$ : Proporción de fosfolípido %		
	100%	75%	50%
1 hélice			
2 hélice	2.1		
4 hélice	0.8	1.8	4.0

b.- independientemente del factor de utilización  $k$  de los fosfolípidos, el número de posibles moléculas que constituyen los islotes disminuye al disminuir la longitud de la hélice.

Anteriormente, en el apartado 4.2. de este capítulo referido a poli-L-metionina, se calculó, por modelos moleculares, los valores para el área por residuo en función del número de hélices paralelas que se pueden asociar para formar un islote de PM. Cuando estos valores se contrastan con los observados en la isoterma de compresión de las capas monomoleculares correspondientes, se encuentran valores que corresponden a los contrastados con modelos para asociaciones de alrededor de 5 hélices y que en cierto modo esta asociación representa un valor próximo al límite.

Los cálculos realizados en los sistemas PM-PC, PM-DOPC correspondientes a la fracción molar en fosfolípido  $X_F = 0,17$  para obtener asimismo información sobre el posible tamaño de los islotes de PM, muestran también el número aproximado de 5 moléculas (ver tablas V, VI, VII y VIII) dentro de varias posibilidades que exponemos a continuación:

- 1.- Un solapamiento de las hélices del 100%, estando la molécula de PM formada por 1,2 o 4 hélices, daría como resultado islotes constituidos por, aproximadamente, 4,5 moléculas con un 50% de utilización de fosfolípido.
- 2.- Un solapamiento de las hélices del 70%, estando las mo

lécúlas formadas bien por 1 o por 4 hélices, produciría islotes de aproximadamente 4 moléculas con un 100% de utilización de fosfolípido, y aproximadamente 5 moléculas con un 50% de utilización respectivamente.

- 3.- Con un solapamiento de las hélices del 50% cuando las moléculas están formadas bien por 2 o 4 hélices, tendríamos como resultado islotes formados por 5 moléculas con un 75% y un 50% de utilización respectivamente.

De todo esto se puede concluir que hay una gran posibilidad de que los islotes estén constituidos por unas 2 a 5 moléculas que formasen un número no claramente determinado de hélices en paralelo, aunque mayor de 4, con un grado de solapamiento de alrededor del 70% y una utilización de fosfolípido entre el 100% y el 50%. Esto estaría de acuerdo con los valores experimentales del área por residuo obtenidos de las isoterms de compresión de las monocapas puras de PM y con la existencia de un valor límite en la modificación de la presión de transición, por la presencia de fosfolípido, que se observa en las monocapas mixtas PM-PC, DOPC y que corresponde a la fracción molar 0,17.

#### 4.3.4. MONOCAPAS MIXTAS DE POLI-*p*-METIL-L-GLUTAMATO Y FOSFATIDILCOLINA NATURAL

La fig. 26 nos muestra la variación del área por residuo medio en función de la fracción molar de fosfolípido para el sistema PMG-PC para diferentes valores constantes de presión superficial (5,10,16  $\text{din.cm}^{-1}$ ). En todos los casos se observa un comportamiento lineal. La citada representación nos indica que para presiones inferiores a la transición ambos componentes forman una disolución ideal, o bien que son inmiscibles - (89).

Para la presión superficial de 16  $\text{din.cm}^{-1}$  los datos de la anterior representación muestran, como se indica en la fig. 27 que el área ocupada por el polipéptido PMG en función de su proporción en la monocapa mixta presenta un valor constante e independiente de la proporción de polipéptido en el sistema.

Las fig. 26 y 27 nos registran los resultados para el valor de presión superficial 24  $\text{din.cm}^{-1}$  correspondiente a zonas superiores a la de transición, se observa una desviación negativa de la idealidad. Este fenómeno puede deberse a la expulsión de parte de las moléculas que forman la monocapa de PMG con formación de una bicapa como sugiere MALCOLM (84). Esto explicaría, además, el cambio de pendiente que aparece para valores de presiones superiores aunque próxima al correspondiente a la de transición.

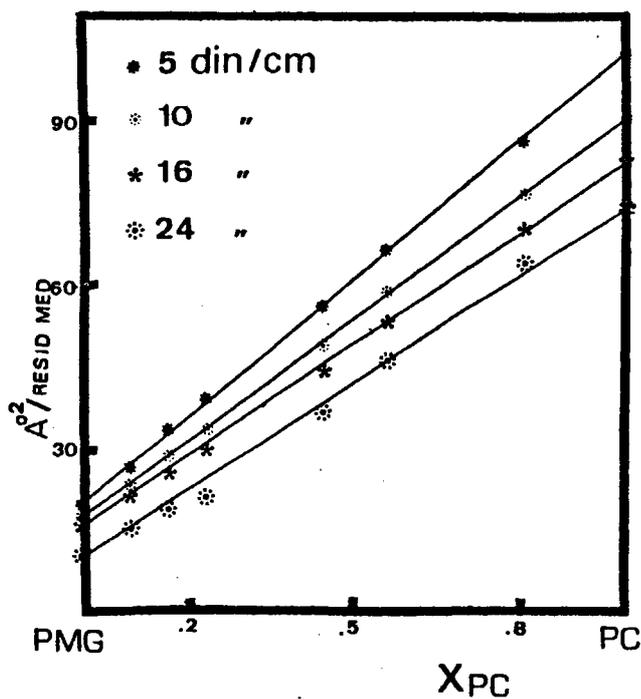


Fig.26.- Area por residuo medio en función de la fracción molar de fosfatidilcolina natural(PC) en monocapas mixtas de PMG-PC, para las presiones superficiales de 5, 10, 16 y 24  $\text{din.cm}^{-1}$ .

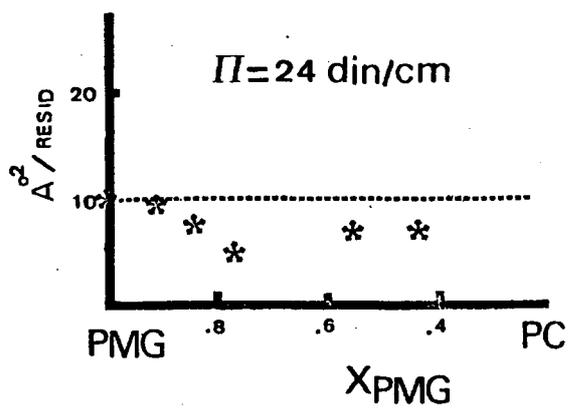
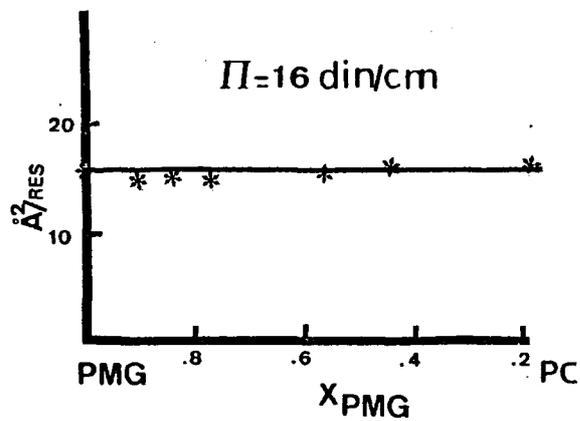


Fig.27.- Area por residuo ocupada por poli-*p*-metil-L-glutamato(PMG) en función de su fracción molar en las monocapas mixtas de PMG-PC, para las presiones superficiales de 16 y 24  $\text{din.cm}^{-1}$ .

En la fig. 28 se representa el valor de la presión de transición del polipéptido en función de la fracción molar de fosfolípido PC. Dentro del error experimental no hay variación de la presión de transición con la composición de la monocapa mixta, es decir, los valores para la transición en las mezclas fosfolípido-polipéptido coinciden con el valor de este último. Estos resultados sugieren que ambos componentes son inmiscibles.

#### 4.3.5. MONOCAPAS MIXTAS DE POLI- $\gamma$ -METIL-L-GLUTAMATO y 1,2 DIOLEIL-L- $\alpha$ - FOSFATIDILCOLINA

En el sistema PMG-DOPC hemos seguido para su estudio el mismo criterio que el indicado para mezcla PMG-PC.

La fig. 29 nos muestra la variación del área por residuo medio en función de la fracción molar de fosfolípido en la monocapa mixta para diferentes valores constantes de presión superficial (5,10,16  $\text{din.cm}^{-1}$ ). En todos los casos se observa un comportamiento lineal.

En la fig. 30, se representa para la presión superficial de 16  $\text{din.cm}^{-1}$  el área ocupada por el polipéptido PMG en función de su proporción en la monocapa mixta, mostrando una variación lineal e independiente de la proporción de dicho polipéptido en el sistema.

Las fig. 29 y 30 nos registran los resultados para el valor de presión superficial de 24  $\text{din.cm}^{-1}$ , se observa una

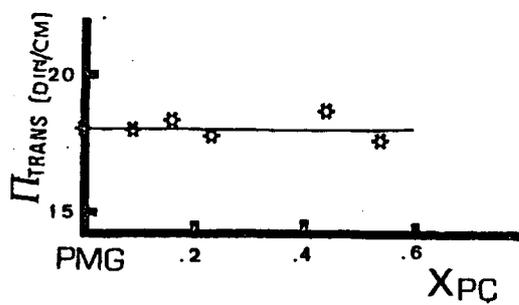


Fig.28.- Variación de la presión de transición de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato(PMG) en función de la fracción molar de fosfatidilcolina natural(PC), en monocapas mixtas de PMG-PC.

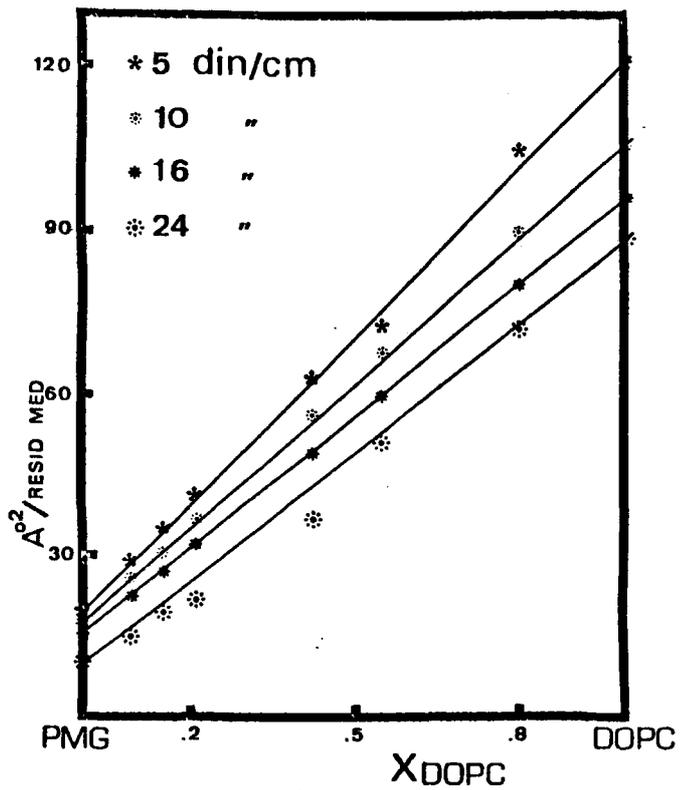


Fig.29.- Area por residuo medio en función de la fracción molar de 1,2 dioleil-L- $\alpha$ -fosfatidilcolina(DOPC) en monocapas mixtas de PMG-DOPC para las presiones superficiales de 5, 10, 16 y 24  $\text{din.cm}^{-1}$ .

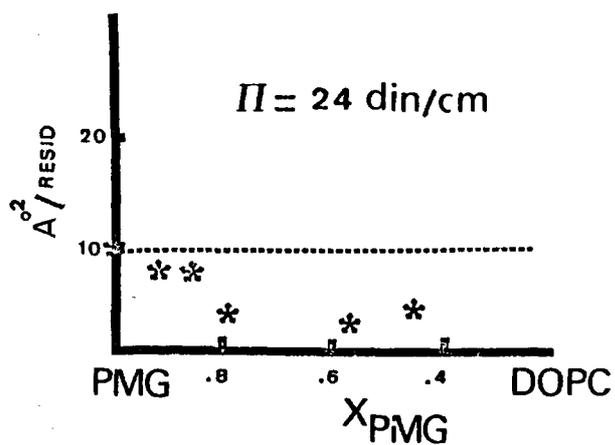
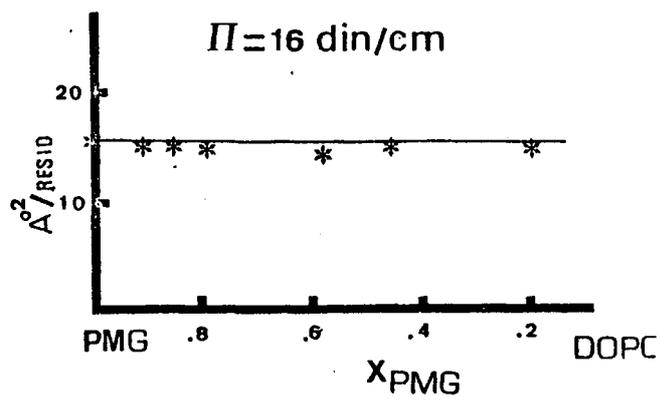


Fig. 30.- Area por residuo ocupada por poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato (PMG) en función de su fracción molar en las monocapas mixtas de PMG-DOPC, para las presiones superficiales de 16 y 24  $\text{din.cm}^{-1}$ .

desviación negativa de la idealidad.

En la fig. 31 se representa el valor de la presión de transición del polipéptido en función de la fracción molar de fosfolípido DOPC. Se observa un comportamiento independiente de la composición de fosfolípido en la monocapa mixta como en el caso de las mezclas PHG-PC.

El comportamiento de ambos sistemas es semejante y sugiere una incompatibilidad de los componentes, la única influencia del fosfolípido va referida al mayor área ocupada por residuo medio en la monocapa mixta.

Estos resultados contrastan con los obtenidos para las mezclas PM-PC y PM-DOPC y ponen de manifiesto la importancia en estos fenómenos de la naturaleza de las cadenas laterales de los poliaminoácidos puesto que ambos sistemas mantienen hasta la zona de transición característica de cada polipéptido, una conformación ordenada  $\alpha$ -hélice.

G.GABRIELLI y col. (68) (67) han estudiado monocapas mixtas de polipéptidos y ácidos grasos; así con el poli- $\gamma$ -benzil-L-glutamato los resultados son diferentes para la mezcla con ácido aráquico que para con el ácido oléico, aunque ambos sistemas cumplen la ley de aditividad de las áreas medias, su comportamiento respecto a la presión de transición indica una incompatibilidad en el primer caso mientras que son compatibles para el segundo, lo que sugiere, según los autores, la importancia del factor estérico para el acoplamiento de polímeros polipeptídicos y lípidos.

BIRDI (70) estudió monocapas mixtas de poli-L-alanina y

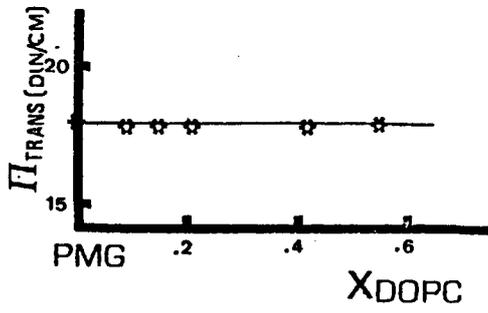


Fig. 31.- Variación de la presión de transición de poli- $\gamma$ -metil-L-glutamato(PMG) en función de la fracción molar de 1,2 dioleil-L- $\alpha$ -fosfatidilcolina(DOPC), en monocapas mixtas de PMG-DOPC.

lípidos en la interfase aire/agua observando tres presiones de transición o colapso. El primer y tercer valor de presión fueron idénticos en magnitud a las presiones de colapso de los componentes puros, mientras que el segundo valor se encontró estar relacionado con el lípido presente en el sistema y, aunque las monocapas mixtas en ambos sistemas cumplen la ley de aditividad, este autor sugiere que la magnitud del estado de colapso intermedio puede estar relacionada con las fuerzas de van der WAALS presentes en las monocapas de lípidos.

CHATELAIN y col. (63) estudiaron la interacción lípido-polipéptido en la interfase aire/agua extendiendo aquel en un soporte acuoso mientras que el polipéptido se disolvía en el mismo. Las medidas de presiones y radiactividad superficiales sugieren que la interfase lípido-agua no induce un cambio de conformación del polipéptido adsorbido y que el número de moléculas de polipéptido que se fija sobre la monocapa de lípido depende exclusivamente de una interacción electrostática; aunque la naturaleza de la interacción entre las moléculas de lípido y polipéptidos en el plano de las interfases es, sin embargo, esencialmente hidrofóbica.

SHAFER (65) estudió la interacción de diferentes poliaminoácidos con monocapas de lípidos observando que solamente se producen cambios de presión superficial cuando los poliaminoácidos básicos interactúan con monocapas de lípidos cargados negativamente.

Todo esto indica la gran complejidad del fenómeno de in

teracción polipéptido-lípido ya que, con gran probabilidad intervienen, tanto la naturaleza de las interacciones entre las propias moléculas de polipéptido, como las que pueda -- existir entre las cadenas laterales de las mismas y los lípidos, sin dejar de lado consideraciones de tipo estérico - que pueden jugar también un papel importante.

El hecho de que el PMC sea uno de los polipéptidos más cristalinos de la serie de los poli-L-glutamatos sustituidos puede estar relacionado con su incapacidad para ser compatible con fosfolípidos en la interfase. Por otro lado, la presión de transición más alta que la PM sugiere una mayor estabilidad de su estructura ordenada en la interfase, que indica unas interacciones más fuertes relacionadas con la naturaleza del residuo lateral.

133

133<sup>2</sup>

| -

CONCLUSIONES

- 1.- La conformación molecular de los poliaminoácidos estudiados depende de la naturaleza del disolvente empleado para su extensión en la interfase aire-agua y está relacionada con el comportamiento de la monocapa observándose isoterms de compresión distintas para el mismo polipéptido. En general una conformación ordenada  $\alpha$ -hélice de la macromolécula, hace que las curvas  $\pi$ -A presenten una zona de transición de gran compresibilidad que se inicia a una presión superficial característica del poliaminoácido. Esta transición desaparece para conformaciones desordenadas (ovillo estadístico) y se mantiene aunque las isoterms difieren para estructuras ordenadas del tipo
  
- 2.- En el caso de la poli-L-metionina las isoterms de compresión registradas para las monocapas obtenidas con disoluciones del polipéptido en disolvente no polar (conformación  $\alpha$ -hélice) muestra un comportamiento condensado de la monocapa y una transición a aproximadamente  $10 \text{ din.cm}^{-1}$ . Con disolvente polar (conformación ovillo estadístico) las isoterms muestran un empaquetamiento mayor de las moléculas (áreas por residuo menores) y no hay zona de transición. A presiones elevadas, después de la transición, la isoterma indica un comportamiento semejante en los dos casos estudiados.
  
- 3.- Para el poli-p-metil-L-glutamato se observa un comporta-

miento cualitativamente semejante si el disolvente empleado es no polar (conformación  $\alpha$ -hélice) o, polar (conformación en  $\beta$ -estructura). En ambos casos aparece una zona de transición de alta compresibilidad. Sin embargo la conformación  $\alpha$ -hélice determina áreas por residuo mayores y el inicio de la transición es a  $18 \text{ din.cm}^{-1}$ . Para las  $\beta$ -estructura la transición se inicia a  $16 \text{ din.cm}^{-1}$ .

- 4.- Los estudios por compresión y descompresión sucesivas de las monocapas ponen de manifiesto la presencia de un ciclo de histeresis en las formadas por los polipéptidos en conformación  $\alpha$ -hélice. La descompresión a grandes áreas por residuo hace que las moléculas recobren el estado inicial lo que indica que este es el más estable, y que la transición en este caso no supone un cambio conformacional total o irreversible .
- 5.- Estudios comparativos de las áreas por residuo observadas en las isoterms de compresión, calculadas a partir de los modelos moleculares a escala, indican que las moléculas de polipéptido en  $\alpha$ -hélice deben estar asociadas en paralelo, formando islotes de al menos 5 hélices. Por otro lado, el inicio de la transición de alta compresibilidad no implica necesariamente la separación de la interfase de las estructuras  $\alpha$ -hélice y el apilamiento de las mismas en bicapas. La transición podría explicarse al menos en el caso de la PM por un cambio confor

macional parcial y un mayor empaquetamiento molecular, como sugieren algunos autores a partir de resultados espectroscópicos.

- 6.- Las monocapas mixtas correspondientes a los sistemas PM-PC, DOPC y PMG-PC, DOPC cumplen en todos los casos la ley de aditividad para cualquier composición de la monocapa, lo que indica que sus componentes son inmiscibles, ya que por el mantenimiento de las características de la isoterma del poliaminoácido en las monocapas mixtas, no cabe esperar una disolución ideal de los mismos.
  
- 7.- En el caso de las monocapas mixtas de PM-fosfolípidos, es posible, sin embargo, un cierto grado de compatibilidad entre los componentes, que sugiere una interacción lípido-polipéptido ya que se observa en las isotermas de compresión una modulación de la zona de transición observada con moléculas  $\alpha$ -helicoidales, debida al fosfolípido. La presión a la que se inicia el proceso aumenta al aumentar la presencia de fosfolípido hasta un valor límite, que corresponde a una fracción molar de fosfolípido 0,17. Un análisis matemático para esta fracción molar de lípido correspondiente a los sistemas PM-PC, DOPC, permite estimar el tamaño de los islotes de poli-L-metionina rodeadas de fosfolípido. Los resultados concuerdan con los obtenidos con modelos moleculares.

8.- El grado de insaturación del fosfolípido no influye en los resultados obtenidos, únicamente produce un efecto de mayor expansión en las monocapas mixtas al aumentar el grado de insaturación. Por otro lado, las características químicas de los residuos laterales del aminoácido como responsables de las interacciones entre las cadenas del polipéptido, parecen determinar la compatibilidad superficial con los fosfolípidos estudiados sin que el grado de insaturación de los mismos tenga ningún efecto apreciable.

137'

137<sup>2</sup>

1 -

**BIBLIOGRAFIA**

BIBLIOGRAFIA

- 1.- DANIELLI, J.F. y DAVSON, H.:  
J.Cell. Comp. Physiol. S., 495 (1935)
- 2.- GORTER, E. y GREDEL, F.:  
J.Exp.Med. 41 (1925), 439
- 3.- ROBERTSON J.D.:  
Progress in Biophysics and Biophys. Chem. 10,354(1960)
- 4.- BENSON, A.A.:  
J.Am. Oil Chemist's Soc., 43, 265 (1966)
- 5.- SINGER, S.J. y NICOLSON, G.L.:  
Science, 175 (1972) 720
- 6.- SINGER, S.J.:  
Ann. Rev. Biochem. 43, 805 (1974)
- 7.- RAY, T.K., CRONAN, J.E. y MANS, R.D.:  
J.Biol. Chem. 245, (1970), 6442
- 8.- OSEROFF, A., ROBBINS, P. y BURGER, M.X.:  
Ann.Rev. Biochem 42, (1973) 647

- 9.- JAIN, M.K.:  
The bimolecular lipid membrane. Van Nostrand Reinhold  
Company (1972).
- 10.- CHAPMAN, D., WILLIAMS, R. y LADBROOKE, B.:  
Chem. Phys. Lipids, 1, (1967) 445
- 11.- LUZZATI, V.:  
In Biological membranes pp. 71-123, Academic Press, New  
York (1968).
- 12.- LEVINE, Y.K., BAILEY, A.I. and WILKINS, M.H.F.:  
Nature, Lond 220, 577-578 (1968)
- 13.- LEVIN, I.W. and FOWLER BUSH, S.:  
Biochim. Biophys. Acta, 640 (1981) 760.
- 14.- HUANG, C. and THOMPSON, T.E.:  
J.Mol. Biol. 15, (1966), 539
- 15.- BANGHAM, A., STANDISH, M. and WEISSMAN, G.:  
J.Mol. Biol. 13 (1965) 253
- 16.- DE KRUYJFF, B., CULLIS, P. and RADDI, G.:  
Biochim. Biophys. Acta, 406, (1975) 6
- 17.- MELCHOIR, D.L. and STEIN, J.M.:  
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 5 (1976) 205

- 18.- CHAPHAN, D.:  
Q.Rev. Biophys., 8, (1975) 185
- 19.- MELCHIOR, D.L. and STEIM, J.M.:  
Ann. Rev. Biophys. Bioengeng. 5, (1976) 205
- 20.- TREDGOLD, R.H.:  
Adv. Phys. 26, (1977) 79
- 21.- NAGLE, J.F. and SCOTT, H.L.:  
Phys. Today (Febr. 1978) 38
- 22.- CULLIS, P.R. and DE KRUIJFF, B.:  
Biochim. Biophys. Acta, 559 (1979) 399
- 23.- SEELIG, J.:  
Progr. Colloid and Polymer Sci. 65, (1978) 172
- 24.- SHIPLEY, G.G.:  
Biological Membranes, pp. 1-89. Academic Press, London  
and New York, (1973)
- 25.- SEELIG, J.  
Biochim. Biophys. Acta 575, (1978) 105
- 26.- PHILLIPS, M.C. and CHAPMAN:  
Biochim. Biophys. Acta, 163, (1968) 301

- 27.- BLODGETT, K.B.:  
J.Amer. Chem. Soc. 57 (1935) 1007
- 28.- GAINES, G.L.:  
Insoluble monolayers at Liquid-Gas Interfaces, Wiley-Interscience, New York (1966).
- 29.- GERSHFELD, N.L.  
Ann. Rev. Phys. Chem., 27 (1976) 349
- 30.- GORTER, E. and GREDEL, F.:  
J.Exp. Med. 41 (1927) 439
- 31.- ANDERSON, P.J. and PETHICA, B.A.:  
Biochemical Problems of Lipids. Butterworths, London (1965) pp.24
- 32.- PETHICA, B.A.:  
Structural and Funtional Aspects of Lipoproteins in li-ving systems. Academic Press (London and New York)(1969)
- 33.- CANDENHEAD, D.A.:  
Recent Progress in Surface Sci. 3 (1970) 169
- 34.- VAN DELNEN, L.H., HOUTSHULLER, U.H.T., DE HÖAS, G.T. and MULLER, E.:  
J.Pharm.Pharmacol. 14 (1962) 429

- 35.- PHILLIPS, M.C. and CHAPMAN, D.:  
Biochim. Biophys. Acta, 163 (1968) 301-313
- 36.- SHAH, D.O. and SCHULMAN, J.H.:  
J.Lipid. Res. 8, (1967 a) 227
- 37.- SHAH, D.D. and SCHULMAN, J.H.:  
J.Colloid Interface Sci. 25, (1967) 107
- 38.- STANDISH, M.M. and PETHICA, B.A.:  
Trans. Far. Soc. 64, (1968) 1113
- 39.- TEISSIE, J.:  
Chem. Phys. Lipids, 25 (1979) 357-368
- 40.- NAGLE, J.F.:  
J.Membrane Biol. 27, (1976) 233
- 41.- PHILLIPS, M.C., WILLIAMS, R.M. and CHAPMAN, D.:  
Chem. Phys. Lipids, 3, (1969) 234
- 42.- HUI, S.W., COWDEN, M., PAPAHAOJPOULOS, D., PARSONS, D.F.:  
Biochim. Biophys. Acta, 382, (1975) 265
- 43.- ALBRECHT, O., GRULER, H. and SACKMANN, E.:  
J. de Phys., 39, (1978) 301

- 44.- SCHELLMAN, J.A. and SCHELLMAN, C.:  
The proteins, p. 1. Academic Press, New York (1964)
- 45.- SHARPE, L.H.:  
Proc. Chem. Soc., (1961) p. 461
- 46.- BLOUT, E.R., de LOZE, C., BLOOM, S.M. and FASMAN, G.D.:  
J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 3787
- 47.- FRASER, R.D.B., HARRAP, B.S. Mc. RAE T.P., STEWART, F.  
H.C. and SUZUKI, E.:  
J. Mol. Biol. 14 (1965) 423
- 48.- LOEB, G.I. and BAIER, R.:  
J. Colloid, Sci. 27 (1968) 38
- 49.- GOUPIL, D.W. and GOODRICH, F.C.:  
J. Colloid Interface Science, 62 (1977) 142
- 50.- CORNELL, D.G.  
J. Colloid Interface Science, 70 (1979) 167
- 51.- MALCOLM, B.R.  
Proc. Roy. Soc. A. 305 (1968) 363-385
- 52.- LLOPIS, J., ESPAÑA, F., SAIZ, J.L. y ALBERT, A.:  
Anales de Química, 69 (1973) 1229

- 53.- GABRIELLI, G. and DAVIDSON, A.:  
Progr. Colloid and Polymer Sci. 58 (1975) 169
- 54.- CRISP, D.J.:  
Surface chemistry, Supplement to Research (London)(1949)  
pp.23
- 55.- GAINES, G.L.:  
J.Colloid Interface Science, 21, (1966) 315
- 56.- JOOS, P.:  
Bull. Soc. Chim. Belges, 76 (1967) 591
- 57.- JOOS, P.:  
Bull. Soc. Chim. Belges, 78, (1969) 207
- 58.- PHILLIPS M.C., LADBROOKE B.D. and CHAPMAN, D.:  
Biochim. Biophys. Acta, 196 (1970) 35
- 59.- CHAPMAN, D., OWENS, N.F., PHILLIPS, M.C. and WALKER, D.A.:  
Biochim. Biophys. Acta, 183 (1969) 458.
- 60.- JOOS, P., DEMEL, R.A.:  
Biochim. Biophys. Acta, 183 (1969) 447
- 61.- BIRDI, K.S.:  
J.Colloid Interface Science 57 (1976) 228

- 62.- DEMEL, R.A., LOHON, Y., GEURTS van KESSEL, W.S.M.,  
VOSSBERG, F.G.A. and van DEENEN, L.L.M.:  
Biochim. Biophys. Acta, 311, (1973) pp.507
- 63.- CHATELAIN, P., BERLINER, G., RUYSSCHAERT, J.M. and  
JAFF, J.:  
J.Colloid Interface Science, 51 (1975) 239
- 64.- MILLER, I.R., BACH, D.:  
Chemistry and Physics of Lipid, 13 (1974) 453
- 65.- SHAFER, P.T.:  
Biochim. Biophys. Acta, 373 (1974) 425
- 66.- TRURNIT, H.J.:  
J.Colloid Sci. 15, (1960) 1
- 67.- GRABIELLI, G.:  
J.Colloid Interface Science, 53 (1975) 148
- 68.- GRABIELLI, G. and D'AUBERT, C.:  
Colloid and Polymer Sci. 256, (1978) 1165
- 69.- GRABIELLI, G. and D'AUBERT, C.:  
Colloid and Polymer Sci. 258, (1980) 56

- 70.- BIRDI, K.S. and SORENSEN, K.E.:  
Colloid and Polymer Sci. 257 (1979) 942
- 71.- LANGMUIR, J.  
Ann. Rept. Smithsonian Inst. 261 (1963)
- 72.- DERVICHIAN, D.G.:  
Biochimie, 53, (1971) 21-25
- 73.- VALLS, P.O.:  
Tesis Doctoral.- Facultad de Farmacia de Barcelona(1970)
- 74.- FOLCH, J.M., LEES, and G.H. SLOANE-STANLEY;  
J.Biol. Chem. 226 (1957) 497
- 75.- ROUSER, G., KRITCHEWSKY, G. YAMAMOTO, A., SIMON, G.,  
GALLI, G. and BAUMAN, A.J.  
Meth. Enzymol., 14 (1969) 272
- 76.- PAPAHDJOUPOULOS, D. and MILLER, N.:  
Biochem. Biophys. Acta, 135 (1967) 624
- 77.- DITTMER, J. and LESTER R.E., J.:  
Lipid Res., 5 (1964) 126
- 78.- FANCON, J.F. and LUSSAN, C.:  
Comptes Rendus, C-277, 14 (1973) 591

- 79.- BARTLETT, G.R.:  
J.Biol. Chem., 234 (1959) 466
- 80.- DEMEL, R.A., VAN DEENEN, L.L.M. and PETHICA, B.A.:  
Biochim. Biophys. Acta, 135, (1967) 11-19
- 81.- ESPAÑA, F., ALBERT, A., SAIZ, J.L.:  
Anales de Química, Vol. 70 (1974) 777
- 82.- DE GIER, J., MANDEPSLOOT, J.G. and VAN DEENEN, L.L.M.:  
Biochim. Biophys. Acta, 226, (1969) 561
- 83.- CHAPMAN, D.:  
Some Recent Studies of Lipids, Lipid-Cholesterol and Membrane Systems. pag. 91-140. Vol 2 (1973) Academic Press.
- 84.- MALCOLM, B.R.  
J.Polymer Sci., Part C 34, (1971) 87
- 85.- MELNIK, E.I., SEMENOV, S.N. and MIROSHNIKOV, A.I.:  
Membrane Transport Processes, Vol. 2 pág. 261-266. Edited by Tosteson, D.C.; Sowshnikov, Y.A.; R.Latorre, Raven Press, New York (1978).
- 86.- FOWKES, F.M.:  
J.Phys. Chem. 67, (1963) 1982

- 87.- BIRDI, K.S.  
J.Colloid. Interface Sci. 43 (1973) 545
- 88.- ALBERT, A., ARNERO, A., ESPAÑA, F.:  
VII International Congress on Surface Active Substances,  
Moscow, 12-18 September, 1976. Section B, Part 1, Vol.2  
pág. 202-212
- 89.- PHILLIPS, M.C., JOOS, P.:  
Kolloid Z. u. Z. Polymer, 238, (1970) 499
- 90.- TAKEDA, F., MATSUMOTO, H., TAKENAKA, T. and FUJYOSHI, Y.  
J.Colloid on Interface Sciences, Vol. 84 (1981) pp.220.

