

7
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE SOLVENTES, NISTATINA Y
TEMPERATURA EN BICAPAS DE COLESTEROL
OXIDADO"

T E S I S
P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO

P R E S E N T A N
XOCHITL ALMAGUER ESTRADA
MARTHA PATRICIA GUTIERREZ ROJAS

MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1990



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Capítulo I	INTRODUCCION.....	1
A. -	MEMBRANAS CELULARES.....	1
I.A.1	Componentes de las Membranas.....	1
I.A.2	Lípidos.....	1
a)	Lípidos Simples.....	3
b)	Lípidos Complejos.....	6
I.A.3	Proteínas.....	8
B. -	MEMBRANAS ARTIFICIALES.....	10
I.B.1	Modelos moleculares de la Membrana celular.....	10
I.B.2	Modelo del Mosaico Fluido.....	15
C. -	BICAPAS LIPIDICAS NEGRAS.....	18
I.C.1	Propiedades Ópticas de las Bicapas Lipídicas Negras (BLM).....	18
I.C.2	Propiedades Eléctricas de las BLM.....	19
I.C.3	Antibióticos Polienos como modificadores de las BLM....	20
I.C.3.1	Efecto de la Nistatina en la Resistencia y Conductancia de las BLM.....	21
I.C.3.2	Formación de Poros en las Bicapas Lipídicas Negras. (Complejo Colesterol-Nistatina).....	23
	PROPOSITOS DE LA TESIS.....	26

Capítulo II	MATERIAL Y METODOLOGIA.....	27
1.-	Arreglo Experimental.....	27
2.-	Instrumentación Periférica.....	29
3.-	Preparación de Soluciones.....	33
4.-	Formación de Bicapas Lipídicas Negras.....	35
5.-	Limpieza y Tratamiento del Material.....	37
Capítulo III	RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	39
A.	Resistencias iniciales.....	39
B.	Desarrollo en el Tiempo de la Resistencia inicial de la Membrana.....	42
C.	Relación entre la Resistencia de la Membrana y la Concentración de Nistatina.....	47
D.	Relación entre la Concentración de Nistatina Umbral y la Temperatura.....	50
E.	Relación entre la Resistencia de la Membrana y la Temperatura a Concentración de Nistatina constante.....	52
F.	Formación de Membranas con Diferentes Solventes.....	55
G.	Modificación de la Constante de Tiempo de la Membrana por agregado de Solventes.....	60
BIBLIOGRAFIA.....		63

A. -MEMBRANAS CELULARES

Las membranas constituyen una estructura presente en todas las células; en algunas células eucarióticas, las diferentes membranas pueden llegar a constituir hasta el 80% de la masa celular seca total. Las membranas sirven no solamente de barrera para la separación de los compartimientos celulares (con composiciones de solutos diferentes), sino también como base estructural a las que se encuentran unidos sistemas bioquímicos. Entre sus propiedades más generales podemos mencionar que son muy delgadas (entre 6 y 9 nm), (19), pero flexibles y resistentes.

I. A. 1 COMPONENTES DE LAS MEMBRANAS.

La composición molecular de las membranas plasmáticas y de los orgánulos intracelulares (mitocondrias, núcleo, retículo endoplásmico y complejo de Golgi), de muchas células contienen lípidos polares que constituyen entre el 20% y el 60% de la masa de la membrana, dependiendo del tipo de esta, el resto está constituida por proteínas en su mayor parte.

I. A. 2 LIPIDOS.

Los lípidos son moléculas orgánicas insolubles en el agua, que pueden extraerse de las células mediante solventes no polares como el cloroformo, el éter o el benceno. Existen diferentes familias de lípidos, pero las propiedades distintivas de todos ellos derivan de la naturaleza hidrocarbonada de las cadenas hidrófobas de su estructura y de su anfotericidad.

Los lípidos de las membranas desempeñan diversas funciones biológicas: actúan como componentes estructurales, como acarreadores y como almacén energético; sus principales componentes se observan en la Tabla I. A. 1.

Tabla I.A.1. Principales componentes lipídicos de la membrana plasmática en microorganismos, plantas y animales. (3). (2).

ORGANISMOS Y MEMBRANA	LIPIDOS
Levadura (membrana total)	PC = PI = PE > DPG = PS
Cyanobacteria. (membrana total)	MGDG > DGDG > SQDG PG chl α
Bacteria (membrana plasmática)	
Gram-positiva	PG > DPG = PE > aminoacyl-PG glicolípidos.
Gram-negativa	PE > PG > DPG
Plantas	PC > PE > PI glicolípidos esteroides; estigmasterol y sitosterol.
Animales (membrana plasmática)	Fosfolípidos Totales (FTL): PC > PE > Sph > PS = PI = DPG = = PG = sulfolípidos.

Abreviaciones: PS=fosfatidilserina, Sph=esfingomielina,
MGDG=diacilgalactosilglicerol, DGDG=diacildigalactosilglicerol,
SQDG=diacilsulfoquinovosilglicerol, PG=fosfatidilglicerol,
chl α =clorofila α , PC=fosfatidilcolina, PE=fosfatidiletanolamina,
PI=fosfatidilinositol, DPG=difosfatidilglicerol (cardolípidina).

Los lípidos se clasifican en base a las estructuras de sus esqueletos en:

a) LÍPIDOS SIMPLES.

Se caracterizan por que no contienen ácidos grasos complejos, aparecen en las células y en los tejidos en cantidades menores que los lípidos complejos pero se encuentran entre ellos muchas sustancias con intensa actividad biológica, como vitaminas y hormonas. Las dos clases principales de lípidos insaponificables son los Terpenos y Esteroides.

Terpenos:

Los Terpenos pueden ser moléculas lineales o cíclicas, y algunos de ellos contienen estructuras de ambos tipos, estos están constituidos por dos o más unidades de Isopreno, Fig.I.A.1.

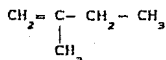


Fig.I.A.1 Isopreno.

En los vegetales se ha identificado un número muy grande de éstos lípidos simples, muchos de los cuales poseen olores, ó sabores característicos, y son componentes principales de los aceites esenciales obtenidos de tales plantas.

Entre los Terpenos más importantes hay tres miembros del grupo de las vitaminas A, E, y K. Aunque estas sustancias se encuentran en cantidades muy pequeñas, desempeñan funciones importantes por ejemplo la vitamina E, tocoferoles (previenen la formación de radicales libres).

Esteroides :

Los Esteroides son derivados del Hidrocarburo tetracíclico saturado perhidro-ciclopentano fenantreno. Fig. I. A. 2.

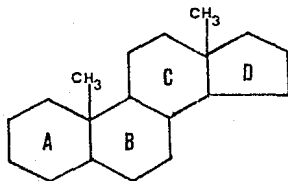


Fig. I. A. 2 Núcleo del perhidro-ciclopentano fenantreno.

Los Esteroides son moléculas liposolubles, complejas, con 4 anillos condensados. Un esteroide importante es el Lanosterol, que es uno de los precursores del Colesterol, estos son miembros de un gran subgrupo de esteroides llamados esteroles que son alcoholes esteroides.

El Colesterol, Fig. I. A. 3, y sus ésteres con ácidos grasos de cadena larga son componentes importantes de las lipoproteínas del plasma y de la membrana celular externa, esta molécula posee un grupo de cabeza polar, el grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo A, el resto de la molécula es una cadena ramificada de 8 ó más átomos de carbono en la posición 17 (estructura no polar relativamente rígida).

b) LIPIDOS COMPLEJOS.

Como ejemplos tenemos a los Esgingolípidos, Fosfoglicéridos, Acilglicéridos y Ceras, a diferencia de los lípidos simples, contienen ácidos grasos como componentes, también reciben el nombre de lípidos saponificables porque producen jabones (sales de ácidos grasos); los ácidos grasos se encuentran en cantidades muy grandes como componentes fundamentales en las células y en los tejidos. Estos ácidos grasos poseen una cadena hidrocarbonada larga con un grupo carboxilo terminal, ésta puede ser saturada, como en el ácido Palmítico, o pueden tener uno ó más enlaces dobles como en el ácido Oléico. Fig.I.A.4.

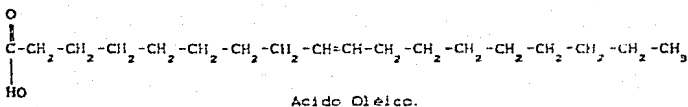
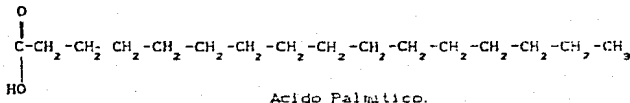


Fig.I.A.4 Dos ácidos grasos.

Los ácidos grasos difieren entre sí por la longitud de su cadena y por el número y la posición de sus enlaces dobles.

De este grupo de lípidos complejos mencionaremos algunas propiedades de los Fosfoglicéridos, ya que son componentes principales característicos de las membranas celulares.

Una de las propiedades de los Fosfoglicéridos es que son solubles en muchos solventes no polares que contengan cierta cantidad de agua, y son extraídos adecuadamente de las células y los tejidos mediante mezclas de cloroformo-metanol. Cuando los Fosfoglicéridos se adicionan al agua se disuelven, pero en cantidades muy pequeñas. La mayor parte del lípido "disuelto" se encuentra en forma de micelas. Fig. I. B. 3. E, dispersas en el sistema acuoso. (1).

1. A. 3 PROTEINAS.

Las proteínas de la membrana juegan un importante papel en la estructura mecánica y permeabilidad de las mismas, ya que actúan como transportadores o canales, y en las propiedades de regulación ó reconocimientos de moléculas.

Cada tipo de membrana contiene varias clases de proteínas y polipéptidos, las proteínas se clasifican en dos categorías:

- Proteínas Extrínsecas ó Periféricas: Estas se encuentran débilmente unidas a la superficie de la membrana.

- Proteínas Intrínsecas ó Integrales: Constituyen el 70% ó más de la proteína total de la membrana y están unidas fuertemente a los lípidos. El estudio de estas proteínas en diferentes membranas ha demostrado que constituyen un grupo heterogeneo en lo que respecta a su peso molecular. Estas pueden estar unidas a Oligosacáridos con los que forman Glucoproteínas.

Los criterios que se utilizan para diferenciar a las proteínas de membrana, se observan en la Tabla I. A. 2. (2).

Tabla I. A. 2 Diferencias entre proteínas
Periféricas e Integrales.(2).

PROPIEDAD	PROTEINA PERIFERICA	PROTEINA INTEGRAL
Requerimientos para su extracción.	Tratamientos suaves.	Tratamientos energicos: detergentes, solventes orgánicos.
Asociación con lípidos en solución.	Generalmente carecen de lípidos.	Generalmente están asociados con lípidos.
Solubilidad.	Solubles en soluciones acuosas.	Generalmente no son solubles en soluciones acuosas.
Ejemplos.	Citocromo C. Espectrina, Acetilcolinesterasa	Enzimas fijas a la membrana; receptores hormonales y sinápticos; antígenos de histocompatibilidad.

B. - MEMBRANAS ARTIFICIALES

1. B.1. MODELOS MOLECULARES DE LA MEMBRANA CELULAR.

Las membranas biológicas son el resultado de la interacción de los lípidos y las proteínas constituyentes. El empleo de películas artificiales monomoleculares, bicapas y multicapas planas esféricas, constituidas por lípidos, son de considerable interés por constituir modelos relativamente simples de las membranas naturales.

Como ya se mencionó ciertos lípidos son importantes, en éste caso los fosfolípidos, ya que se encuentran en las membranas celulares y constituyen un elemento estructural básico de los organismos vivos; esta función vital depende de sus propiedades físicas.

Las moléculas de los Fosfoglicéridos son anfipáticas, la parte hidrófoba la constituyen las largas cadenas de los ácidos grasos, la parte hidrofílica es el extremo dipolar iónico: el grupo fosfato sustituido con sus cargas positiva y negativa. Los Fosfoglicéridos en la interfase entre dos soluciones acuosas tienden a formar bicapas. Estas están constituidas por dos planos de moléculas, contactando sus extremos hidrófobos y con sus extremos polares hacia los medios acuosos.

La interacción entre los grupos polares es la principal responsable de la estructura en bicapa, y existe una unión del orden del 1% de la anterior entre los extremos hidrofóbicos. El espesor total está determinado por la longitud de las cadenas hidrofóbicas. Fig. I.B.1.

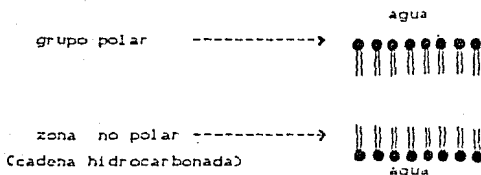


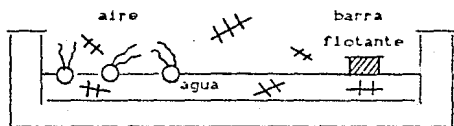
Fig.I.B.1 Bicapa de fosfolípidos.

Las cadenas hidrocarbonadas (hidrofóbicas) se extienden hacia el interior, las cabezas hidrofílicas se extienden hacia la fase acuosa.

La estructura molecular de los lípidos se ha estudiado a través de varios modelos experimentales, los cuales se han realizado tanto con lípidos artificiales como naturales.

Uno de los dispositivos usados para tales estudios es la "balanza de tensión superficial", realizado por Langmuir en 1917; en este equipo se hacen monocapas o películas monomoleculares y multicapas. El procedimiento consiste en dispersar una solución de la sustancia que se ha de investigar sobre la superficie del agua contenida en una bandeja. El solvente se evapora y quedan los lípidos. Fig.I.B.2.a. Por medio de una barra ó barrera móvil flotante, se puede comprimir las moléculas. Fig.I.B.2.b.

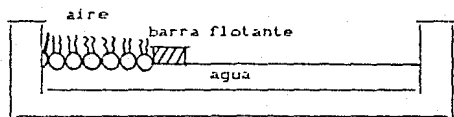
La tensión ejercida sobre ésta se mide por medio de un sistema de torsión muy sensible. La tensión a nivel de una interfase agua-aceite es de aproximadamente de 70-50 dinas por centímetro, pero la tensión superficial de las membranas celulares, está cerca de las 20 dinas/cm. (Nagle y Scott, 1978). (5). Esta baja tensión se supone se debe a la presencia de las proteínas mezcladas con los componentes lipídicos.



a) Se presentan las moléculas orientadas con diferentes ángulos ó agregados en grupos; también la fuga del solvente en ésta etapa.

† moléculas de solvente.

! molécula de lípido.



b) Moléculas agrupadas con alta tensión.

Fig. I. B. 2 Balanza de Langmuir.

Gorter y Grendel en 1926, encontraron que el contenido lipídico de una cierta cantidad de eritrocitos hemolisados era suficiente para formar una capa doble continua de 3 a 4 nm de

espesor sobre toda la superficie celular, y sugirieron que la membrana plasmática estaba formada por una delgada capa doble de moléculas lipídicas. Este resultado fue apoyado por mediciones de impedancia eléctrica con corriente alterna y otros experimentos.

Posteriormente, en 1935 Danielli y Davson propusieron que la membrana plasmática consistía en una bicapa lipídica, con proteínas adheridas a ambas interfaces lípido-agua.

La Fig.I.B.3.A-E, ilustra distintos modelos de membranas basados en este concepto, pero que difieren en la ubicación y/o conformación de la proteína.(2),(4).



A, proteína tipo β .



B, proteína globular.



C, poros proteicos.



D, proteína en el interior de las capas lipídicas.

agua



E, micelas en el agua.

Fig.I.B.3.A-E Modelos propuestos para la estructura molecular de la membrana plasmática.

Años más tarde, este modelo fue simplificado por J.D. Robertson, transformándose en la hipótesis de la "membrana unitaria". Robertson fue el primero en ver al microscopio electrónico en 1950 dicha membrana unitaria. Se postuló que esta, estaba constituida por una bicapa de lípidos polares mixtos con sus cadenas hidrocarbonadas hacia el interior, formando una fase continua de hidrocarburo y sus cabezas hidrofílicas orientadas hacia el plano exterior de la membrana.

Se supuso que cada superficie estaba recubierta por una capa monomolecular de moléculas de proteína con las cadenas polipeptídicas en forma extendida. El espesor total de la membrana unitaria que se estimó era de unos 8.0 a 9.0 nm, y el de la bicapa lipídica de unos 6.0 a 7.0 nm.

En 1965, Bangham definió a los liposomas como otro modelo de membrana, esta es una forma especial de fase lamelar, en la que el agua se encuentra incluida. Los liposomas son estructuras de bicapas vesiculares completamente cerradas, que se forman por exposición de suspensiones de lípidos en agua a ultrasonido. Fig. I.B.4.

Los sistemas de bicapas de esta clase han sido estudiados extensamente como modelos de membranas naturales que parecen contener bicapas fosfolipídicas polares como su fase continua; también son muy útiles para estudiar los mecanismos de permeabilidad, así como para obtener información sobre la interacción lípido-proteína de la membrana.(1).

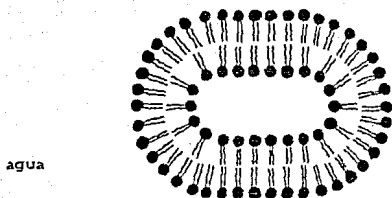


Fig.I.B.4 Sección transversal de un liposoma.
La bicapa fosfolipídica forma una
vesícula completamente cerrada.

I.B.2 MODELO DEL MOSAICO FLUIDO.

El más reciente modelo de estructura de membrana, es el del "Mosaico Fluido". Fig.I.B.5, postulado por S.J. Singer, y G.L. Nicolson en 1972. Propusieron que la matriz o fase continua de estructura de membrana, es una bicapa lipídica polar. La bicapa es fluida porque las colas hidrofóbicas de sus lípidos polares están constituidas por una mezcla apropiada de ácidos grasos saturados y no saturados que es fluida a la Temperatura normal de la célula.

Este modelo propone que las proteínas integrales de la membrana poseen grupos R hidrofóbicos de los aminoácidos sobre sus superficies, lo que provocaría que estas proteínas "se integrasen" en la porción central hidrofóbica de la bicapa. Por otra parte, también propone que las proteínas periféricas o extrínsecas de la membrana poseen grupos R esencialmente hidrofílicos sobre sus superficies, que se encuentran unidos por acción electrostática a las cabezas polares, hidrofílicas, con carga eléctrica de los lípidos de la bicapa.

Las proteínas integrales de la membrana, entre las que se encuentran enzimas y sistemas de transporte, son inactivas a menos que se hallen situadas en el interior del núcleo hidrofóbico de la bicapa, el cual induce la conformación tridimensional adecuada para que exhiban su actividad.

El modelo del "Mosaico Fluido" permite además, que las proteínas de la membrana se desplacen lateralmente. Las proteínas periféricas "flotan", literalmente, sobre la superficie que constituye la bicapa, mientras que las proteínas integrales se encuentran sumergidas, casi completamente, en el núcleo hidrocarbonado.

La libertad de movimiento lateral de las proteínas de la membrana, en la bicapa lipídica, puede experimentar restricciones debido a las atracciones entre las proteínas de la membrana, con lo que se formarían agrupaciones como resultado de las interacciones. Por lo tanto, existe un mosaico ó distribución superficial de proteínas de la membrana en la bicapa lipídica fluida.

Se ha sugerido que tales agrupaciones de las proteínas de la membrana se desplazan lateralmente en la bicapa, lo que explicaría el hecho de que en el ciclo vital de algunos tipos de células, algunas proteínas puedan desplazarse hacia un sitio específico ó zona de membrana, en un proceso llamado *recubrimiento*.

Este modelo puede explicar muchas de las propiedades físicas, químicas y biológicas de las membranas y ha sido aceptado ampliamente como la ordenación más probable de los lípidos y de las proteínas de las membranas.

También explica la variación de espesor de diferentes tipos de membranas, interpreta la asimetría de las membranas naturales, ya que permite que las proteínas de diferentes tipos puedan ordenarse en cada una de las dos superficies de la bicapa lipídica. También provee un modelo que explica las propiedades eléctricas y de permeabilidad de las membranas.(1).

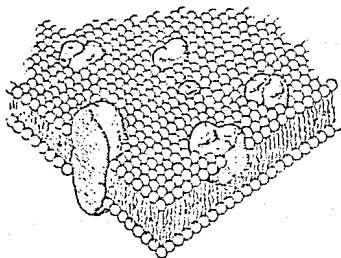


Fig. I. B. S Modelo del Mosaico Fluido para la estructura de la membrana propuesto por Singer-Nicolson.

C. - BICAPAS LIPIDICAS NEGRAS

Como ya se mencionó anteriormente. Danielli y Davson en 1935. fueron los primeros en postular la existencia de una membrana celular formada por bicapas lipídicas, las cuales constituirían la estructura elemental en todas las membranas biológicas. Estas bicapas son modeladas con *Liposomas* (simetría esférica) y *Bicapas Lipídicas Negras* (BLM, simetría plana). (7).

Una BLM puede ser formada por una variedad de soluciones de lípidos simples ó mezclados (de materia blanca de cerebro de buey), levaduras ó haciéndolas a partir de monocapas lipídicas sin solvente.

I.C.1 PROPIEDADES OPTICAS DE LAS BICAPAS LIPIDICAS NEGRAS.

Apenas depositado el lípido disuelto, se observa con una buena iluminación una superficie brillante con colores de interferencia. luego se llega gradualmente a una situación en que se refleja muy poca luz y se le llama "*membrana negra*". (a simple vista la BLM se observa como una area gris).

La formación de la película negra a menudo comienza con ciertas "*manchas*". las regiones negras se observan inicialmente como círculos, estos se extienden, se fusionan y finalmente ocupan el área entera del agujero, salvo el borde engrosado llamado de *Plateau-Gibbs*.

La solución del lípido es desplazada especialmente hacia el borde lateral y superior, aunque hay microgotas suspendidas moviéndose en el área de la bicapa. (8), (8). Estas últimas se suponen que son microgotas de solvente puro (microlentes).

I.C.2 PROPIEDADES ELECTRICAS DE LAS BICAPAS LIPIDICAS NEGRAS.

Si a cada lado de la membrana, en cada uno de los compartimentos se pone un par de electrodos, mediante los cuales se le aplican pulsos cuadrados de d.c. ó a.c., a través de una Resistencia conocida, el potencial transmembranal se registra por medio de un Osciloscopio y un Graficador de papel.

Ahora bien, por medio de estos registros se puede estudiar las propiedades electricas pasivas de las BLM.

Las membranas lipidicas negras presentan ciertas propiedades semejantes a las de las membranas biologicas, pero difieren por su mayor Resistencia electrica y por el hecho de que carecen de selectividad iónica.(9).

Algunas de las propiedades electricas de las membranas biologicas y de las BLM se presentan en la Tabla I.C.1.

Tabla I.C.1 Propiedades electricas de las membranas.(100)(9).

	MEMBRANAS BIOLÓGICAS	BLM	
Espesor	4.0-12.0	1.5-7.5	(nm)
Permeabilidad al agua	0.25-400	1	(10^4 cm/s)
Capacitancia	0.5-1.3	0.4-1.2	($\mu F/cm^2$)
Resistencia	10^7-10^9	10^7-10^8	(Ω/cm^2)
Tensión Superficial	1	0-5	(dinas/cm)

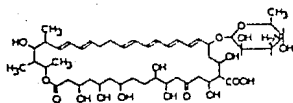
Los estudios experimentales y teóricos de las *BLM* proveen una importante herramienta para el estudio eléctrico de las membranas biológicas, y su naturaleza conductiva. También proveen información importante para las membranas biológicas en áreas como transporte activo, fosforilación, visión, inmunología, conducción nerviosa y transducción de energía.(7).

I. C. 3 ANTIBIOTICOS POLIENOS COMO MODIFICADORES DE LAS BICAPAS LIPIDICAS NEGRAS.

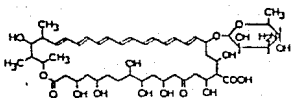
El interés biológico de los antibióticos polienos se debe a su habilidad para hacer "canales acuosos", produciendo un marcado cambio de Conductancia en membranas lipídicas naturales o artificiales, así como la alteración de las propiedades de permeabilidad iónica y de la estructura misma en membranas lipídicas biológicas.(11),(13).

Los antibióticos polienos comprenden un grupo de agentes fungicidas producidos por bacterias del género Streptomyces. Todos los miembros de esta clase presentan un anillo lactona polyhidroxílico de 23-37 átomos de carbono, con 4-7 dobles ligaduras de carbono conjugadas en el anillo; también presentan un grupo carboxilo y un grupo micosamino glucosidicamente unido a el anillo.(11).

La estructura de la Nistatina es parecida a la de la Anfotericina β , Fig.I.C.2, las diferencias consisten en un cambio en la posición de los grupos hidroxilos en el sitio hidrofílico de la molecula, y una interrupción del sistema de la doble ligadura conjugada. En la Anfotericina β están conjugadas 7 dobles ligaduras, mientras que en la Nistatina el sistema de dobles ligaduras está separada entre la doble ligadura 2 y 4 por dos grupos metileno. La interrupción del sistema de doble ligadura permite un doblaje (concurrimento) de su región rígida.(12).



Nistatina



Anfotericina β

Fig.I.C.2 Estructura de Antibióticos Polienos.

I.C.3.1 EFECTO DE LA NISTATINA EN LA RESISTENCIA Y CONDUCTANCIA DE LAS BICAPAS LIPIDICAS NEGAS.

Los antibióticos polienos juegan un papel importante en la caída de la Resistencia de las *BLM*. debido a la formación de canales que hacen a la membrana permeable a iones univalentes.

- Efecto de la Nistatina en un lado de la *PLM*.

Cuando la Nistatina se añade de un sólo lado de una *BLM* que contiene esteroides. después de un corto tiempo, la conductancia aumenta exponencialmente (dependiendo de la concentración de antibiótico añadido). La Conductancia es proporcional de la 4a. a 5a. potencias de la Concentración de Nistatina. Fig.I.C.3.

Las membranas tratadas con Nistatina de un sólo lado son más permeables a cationes univalentes que a aniones, y son virtualmente impermeables a cationes divalentes. (22).(23).(12). (16).(14).

- Efecto de la Nistatina a ambos lados de la BLM.

La respuesta conductiva de una membrana que contiene Colesterol, cuando se le añade Nistatina a ambos lados de la BLM, es similar a la obtenida cuando se le añade de un solo lado. El estado estacionario de la Conductancia, es proporcional alrededor de la 6a. a 12a. relación de potencia de la Concentración de Nistatina.

La Conductancia es conseguida generalmente con menos Concentración de antibiótico cuando se agrega a ambos lados. Fig.I.C.3.

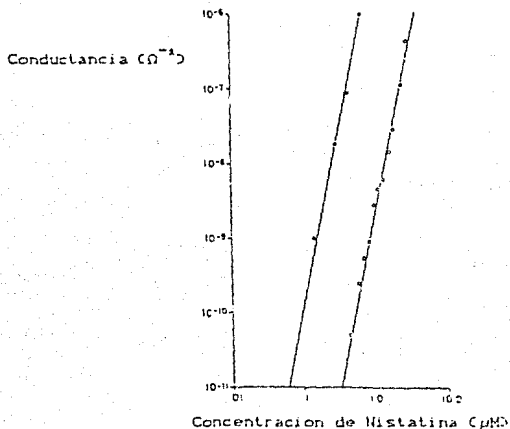


Fig.I.C.3 Relación entre la Conductancia y la Concentración de Nistatina.

○ Nistatina de un sólo lado de la BLM.

● Nistatina a ambos lados de la BLM. (14).

Estas membranas son más permeables a aniones univalentes que a cationes, y son casi impermeables a aniones divalentes. (13), (24), (11), (25), (16), (14).

I.C.3.2 FORMACION DE POROS EN LAS BICAPAS LIPIDICAS NEGRAS. (COMPLEJO COLESTEPOL-NISTATINA).

A partir de los estudios basados en la permeabilidad de las membranas lipídicas, se ha propuesto un modelo de poros Conductores formados por el complejo Colesterol-Nistatina. En 1973 y 1974, y 1975, Andreoli, Finkelstein y Holz, De Kruijff y Demel, y Ridaura R. (21), (20), (12), (26), propusieron que el canal consiste de dos medios poros formados en uno y otro lado de la membrana. (15).

Se propone que los poros están formados por 8 moléculas de antibiótico (el antibiótico se añade a ambos lados de la membrana), ó de 4 a 12 moléculas, dependiendo del tipo de esteroles que se utilice (según Cass. A., Finkelstein, A. and Krespi, V.), (11), interdigitadas con 8 moléculas de esteroles, en forma de cilindro.

Las características de las moléculas hacen posible el complejo Nistatina (N) - Colesterol (C), en el cual la molécula de Colesterol se acomoda parcialmente en los anillos de las moléculas de Nistatina contiguas, el Colesterol está en contacto íntimo solamente con el doble sistema de ligaduras (no hay contacto directo entre los grupos hidrofílicos de la Nistatina y del Colesterol). Como la molécula de Colesterol puede estar presente en ambos lados del sistema de doble ligadura de la molécula de Nistatina, dos complejos equivalentes N-C y C-N pueden ser visualizados. El complejo conduce a un arreglo circular de 8 unidades de N-C formando un complejo de $(-N-C)_8$ (medios poros de forma cilíndrica), como se muestra en la Fig. I. C. 4.

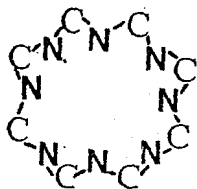


Fig. I. C. 4 Complejo Nistatina-Colesterol (N-C)₈.

El interior del complejo (N-C)₈ es hidrofílico debido a los grupos hidroxilos de las moléculas de *Nistatina*, mientras que el exterior es hidrofóbico debido al sistema conjugado de dobles ligaduras de las moléculas de *Nistatina* y la digitación de las moléculas de *Colesterol*. El grupo hidroxilo del *Colesterol* y de los grupos cargados de la *Nistatina* se localizan en el mismo lado del complejo. Estos residuos son importantes para la orientación del complejo en la bicapa lipídica. Los grupos cargados pueden estar coplanares con los residuos polares de las moléculas fosfolipídicas. Los sustituyentes apolares de *Nistatina* y *Colesterol* tienen orientación paralela a las cadenas de ácido graso del fosfolípido.

Dos *medios poros* a cada lado de la bicapa lipídica son necesarios para completar un *poro conductor*. Fig.I.C.5. Los grupos hidroxilos de la *Nistatina*, los cuales están alineados en el interior del poro, pueden estar implicados en fijar los dos *medios poros*, estabilizando así el canal conductor.(12).(15).

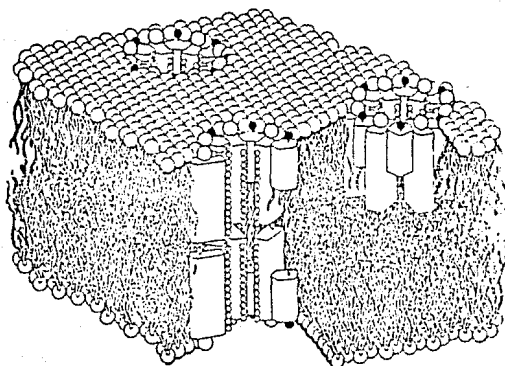


Fig.I.C.5 Esquema representativo de los poros formados por Nistatina y Colesterol en una Bicapa Lipídica Negra.

PROPOSITOS DE LA TESIS.

Debido a la complejidad de la estructura de las membranas biológicas, se han implementado una serie de métodos para la formación de membranas artificiales, ya que su estructura molecular es más sencilla y por lo tanto de más fácil modelaje.

Además es un modelo de membrana natural que nos sirve como instrumento en la reproducción de fenómenos biológicos significativos como son: transporte activo, excitabilidad, selectividad de iones, reacciones antígeno-cuerpo y efectos fotoeléctricos.

Las investigaciones realizadas a la fecha aportan muy poca información referente a los parámetros que afectan la estabilidad y las propiedades eléctricas pasivas de las membranas artificiales.

Existiendo tal problemática por definir se propuso establecer el presente trabajo para aclarar y/o incrementar el conocimiento con respecto al efecto que tienen el antibiótico polieno *Nistatina* la *Temperatura* y los *Solventes* sobre la *Resistencia* y la *Capacitancia* de las *Bicapas Lipídicas Negras*.

- En base a esto, se llevarán a cabo una serie de experimentos en los cuales se verá el efecto que tienen *Concentraciones* crecientes del antibiótico polieno *Nistatina* sobre las *BLM*.

- Se pretenderá establecer una relación entre la *Temperatura* y la *Resistencia* de las membranas, viendo el efecto que causa la variación de *Temperatura* en la formación de los *Sitios Conductores*.

- Finalmente se estudiará el efecto que producen los *Solventes: Decano, Xileno, Tolueno y Benceno* en la respuesta *Capacitiva* de las membranas, (τ = constante de Tiempo).

Capítulo II

MATERIAL Y METODO.

1.- Arreglo Experimental.

a) Parte Mecánica.

Se cuenta con una cámara de acrílico, (b), Fig.II.1, la cual tiene dos compartimentos, uno para el Termómetro graduado en °C. (c), con el cual se monitorea la *Temperatura* durante los experimentos, y el otro para introducir una cámara de teflón o PVC, (d), que tiene una forma cilíndrica de aproximadamente 5 cm. de capacidad, con un agujero en su superficie lateral de aproximadamente 1 mm. de diámetro. (PVC de 0.3 mm. de diámetro), sobre el cual se forma la *BLM*.

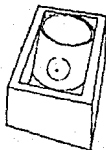


Fig.II.1 Cámaras de Acrílico y de Teflón.

Quando las BLM se encontraban ya formadas, estas eran muy frágiles, cualquier vibración fuerte las podía romper, para evitar esto, las cámaras que sostenían la membrana se deben colocar sobre una mesa antivibratoria (a), Fig.II.2. (B).

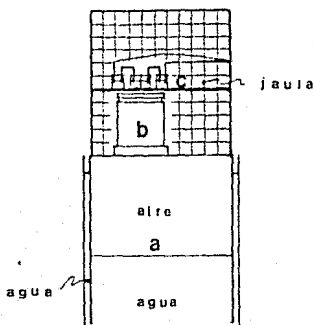


Fig.II.2 a) Mesa Antivibratoria, b) Agitador Magnético,
c) Cámaras para la formación de las membranas
y accesorios.

Ambas cámaras (acrílico y teflón o PVC) son llenadas con 10 cm³ de una solución iónica (de composición variable) y dentro de cada una se colocan pequeños imanes, (e), los cuales son movidos por medio de un agitador magnético, (d), que se encuentra ubicado bajo las cámaras y que mantiene homogénea la solución.

2. - Instrumentación Periférica.

De cada cámara sale un puente de Agar. (g), que conecta a un par de vasos de 5 cm^3 de capacidad, (h), que contienen la solución de KCl 2.5 M y donde se encuentran los electrodos de Ag-AgCl. (i), los cuales se conectan hacia un Estimulador. (j), con el que se puede elegir la *Duración* y la *Amplitud* del pulso cuadrado que se aplica a la membrana, y a un Amplificador. (k), que cuenta con una serie de Resistencias de retroalimentación. (10 K, 100 K, 1 M, 10 M, 100 M, 635 M), las cuales se pueden elegir, Fig.II.3.

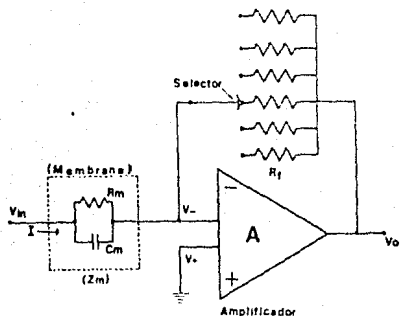


Fig.II.3 Equivalente del Circuito Eléctrico para las medidas de impedancia de las membranas, donde:

V_{in} es el Voltaje de entrada,

I es la Corriente Eléctrica a través de la Membrana,

R_m es la Resistencia de la Membrana,

C_m es la Capacitancia de la Membrana,

Z_m es la Impedancia de la Membrana,

R_f son las Resistencias de retroalimentación, y

V_0 es el Voltaje de salida.

El Arreglo Experimental y el Circuito Electrico usado para las medidas de las propiedades electricas de las membranas, lo muestra a groso modo la Fig.II.4.

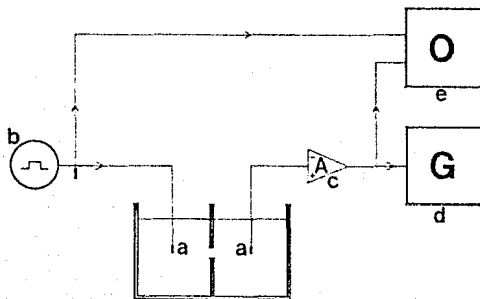


Fig.II.4 Arreglo Experimental y Circuito Electrico.

a) Cámaras con solución iónica donde se forman las BLM. b) Estimulador, c) Amplificador, d) Graficador, e) Osciloscopio. I) Sentido de la Corriente Eléctrica.

El Circuito Eléctrico incluye además un Graficador, (d), el cual registra y guarda las medidas de la señal eléctrica (Resistencia de la membrana, R), de los pulsos de salida. También se tiene un Osciloscopio, (e), por el cual se monitorean las señales de entrada y de salida; la señal registrada en el Osciloscopio y en el Graficador, son de gran ayuda, ya que se puede saber si la solución formadora de membrana ha sido colocada en el agujero de la cámara, y si se ha formado la bicapa, por medio de las medidas de resistencias monitoreadas.

Parte del Arreglo Experimental (cámaras, puentes de Agar, electrodos y lámpara), se encuentran dentro de una jaula de Faraday, (n), para evitar señales parásitas que se puedan introducir en el circuito y aumentar el ruido eléctrico en los registros. Se utiliza una buena tierra física para este dispositivo y circuito.

a) Parte Óptica.

Se cuenta con una lámpara, (n), cuya luz incide sobre la BLM, Fig.II.5. Esta permite localizar el lugar de formación de la membrana y seguir la evolución de esta; ya que está formada la bicapa, esta casi no refleja luz.

En algunos experimentos se utilizó un Laser de He-Ne, el cual se usó también para la iluminación, ya que con éste se evitaba que hubiera un aumento más rápido de *Temperatura* en la solución iónica y de la BLM, pudiendo controlar así esta variable. Ahora bien, la luz incidía igualmente como en la Fig.II.5, ayudando a seguir el cambio de espesor de las Bicapas Lipídicas Negras.

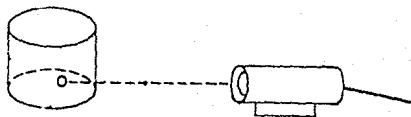


Fig.II.5 Lámpara utilizada para la iluminación de las BLM.

Frente a las cámaras se coloca una lupa, (p), con la cual se puede observar en detalle el desarrollo y la formación de las BLM. En la Fig.11.6 se puede observar el Arreglo Experimental Completo.

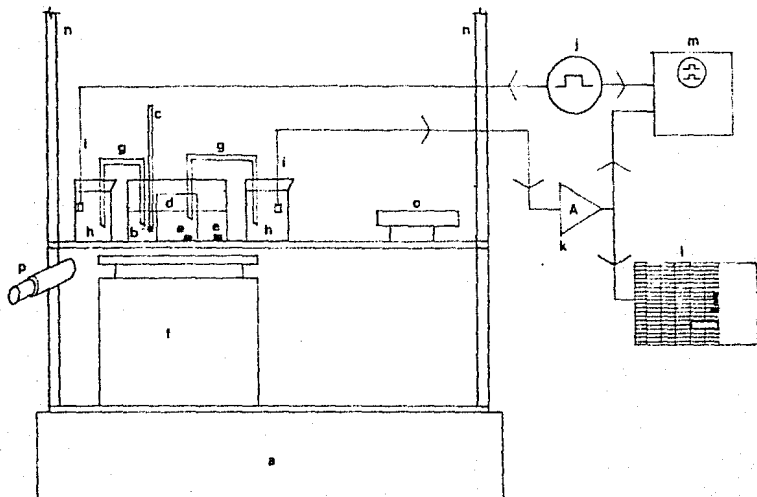


Fig.11.6 Arreglo Experimental Completo.

- a) Mesa Antivibratoria, b) Cámara de Acrílico, c) Termómetro,
- d) Cámara de Teflon, e) Imanes, f) Agitador Magnético,
- g) Puentes de Agar, h) Vasos de precipitado con solución iónica,
- i) Electrodo Impolarizables, j) Estimulador, k) Amplificador,
- l) Graficador, m) Osciloscopio, n) Jaula de Faraday, o) Lámpara,
- p) Lupa.

3. - Preparación de Soluciones.

La solución formadora de membranas se preparó de manera similar al método usado por T: Tien, 1953 (8). Se preparó una solución de Colesterol oxidado al 0.5%, tomando 1 g. de Colesterol envejecido (8), y se disolvió en 200 ml. de Decano. Posteriormente se burbujecó con Argón de 15 a 20 minutos, y después se colocó la solución en frascos color ambar, burbujecando nuevamente cada uno por unos minutos y finalmente se almacenaron a una Temperatura de 4 °C.

Para la preparación del antibiótico Nistatina se utilizaron tres lotes, cada uno de ellos gentileza de la Q.B. Consolidación Núñez C., de los Laboratorios Squibb and Sons de Mexico S.A. de C.V.

El antibiótico fue disuelto en Metanol o DMSO (solución Madre), en cada experimento se tomó una pequeña cantidad y se disolvió en Metanol.

Ahora bien, el líquido que bañaba las membranas era una solución de NaCl 0.1 M.

Para la preparación de los puentes de Agar se utilizaron pequeños capilares (hemocitométricos) de 10 cm. de longitud y 2 mm. de diámetro, doblados como lo muestra la Fig.II.7.

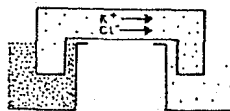


Fig.II.7 Puentes de Agar.

La solución de KCl 3.0 M. se empleó en la preparación de los puentes de Agar y en la solución que estaba en contacto con los electrodos; esta solución se utilizó ya que esta sal constituye un Puente Salino para establecer conexiones entre compartimentos, debido a que los iones K^+ y Cl^- poseen igual movilidad en el agua, evitando así, durante la difusión, una diferencia de Potencial.

Como ya se mencionó anteriormente, se utilizaron electrodos impolarizables de Plata Clorurada, ya que estos dejan pasar corriente eléctrica a través suyo sin producir diferencia de Potencial y modificación química del medio.

Estos electrodos impolarizables, consisten en un alambre de Plata recubierto electrolíticamente de Cloruro de Plata ($AgCl$, sal insoluble en agua), en la cual se llevan a cabo los intercambios de electrolito-metal; esta capa puede cambiar sin afectar al medio.

Además el alambre de Plata se encuentra sumergido en una solución de Cloruro de Potasio, cuya dilución hacia fuera del electrodo tiende a ser muy pequeña gracias a una capa de Agar, evitando así diferencias de Potencial, Fig.II.8.

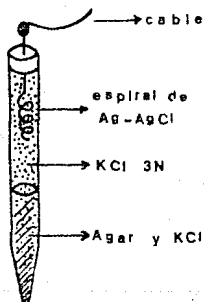


Fig.II.8 Electrodo impolarizable de Plata Clorurada.

Para ver el efecto del Solvente en las membranas, se contó con varias soluciones preparadas de la siguiente manera: a la solución inicial de Colesterol oxidado en *Hexano*, se le adiciono los Solventes a estudiar, *Xileno*, *Benceno*, *Tolueno*, y *Decano*, en una proporción (1:1).

4.- Formación de Bicapas Lipídicas Negras.

Sobre el agujero que presenta la cámara de teflón ó PVC, se coloca una gota de solución formadora de membranas con un pincel ó con una jeringa que tiene una cánula en la punta, Fig.II.9.

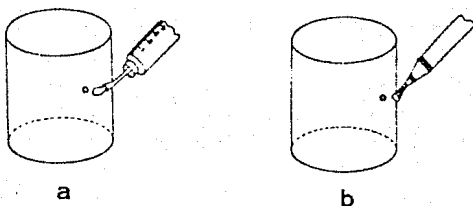


Fig.II.9 a) Jeringa con cánula utilizada para depositar la solución formadora de Membranas.
b) Pincel utilizado con el mismo propósito anterior.

Se puede observar que al inicio de la formación de las *BLM*, estas reflejan luz, posteriormente se ven colores de interferencia, y finalmente estas se observan negras ó grises, (no reflejan luz).

Siendo el teflon un material lipofílico, la gota de Colesterol empieza a restallar por las paredes, por esto y por la presión hidrostática que ejerce la solución salina, la gota comienza a adelgarse hasta quedar formada la bicapa.

Una vez formada la ELM, esta presenta dos zonas: la zona de la bicapa en la cual se pudieron observar a simple vista pequeños puntos brillantes, los cuales son agrupaciones de moléculas de Solventes llamados Micro-lentes; y una zona de mayor espesor (cercana a la orilla del agujero de la cámara), llamada zona de Plateau-Gibbs, en la cual se observan reflejos de luz y en la cual no hay formación de bicapa, Fig. II.10.

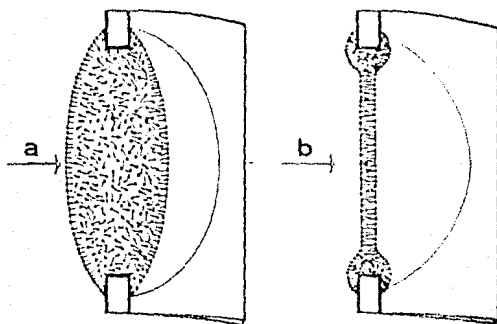


Fig. II.10 Formación de la Bicapa Lipídica Negra.

- a) Gota de solución de Colesterol oxidado; las cabezas hidrofílicas se encuentran dirigidas hacia el medio acuoso, las colas hidrofóbicas están protegidas en la matriz de la gota.
- b) Bicapa Lipídica Negra formada, también se observa la zona de mayor espesor llamada zona de Plateau-Gibbs.

Ya que se había formado la bicapa, se dejaba aproximadamente unos 15 minutos a que se estabilizara y luego se pasaban pulsos de corriente a través de ella para medir su *Resistencia*.

Posteriormente se le adicionaba una cantidad determinada de antibiótico *Nistatina* (2 entre 1 y 10 μ l) a las soluciones que bañaban a la membrana. El antibiótico fue añadido con una jeringa graduada en μ l.

El antibiótico se seguía adicionando en pequeñas cantidades que variaron de 5-50 μ l, también los pulsos de corriente se seguían pasando a través de la membrana hasta que empezaba a caer la *Resistencia*, que era registrada en el Graficador, se esperaba unos minutos a que se estabilizara la membrana y nuevamente se adicionaba *Nistatina*.

La primera *Resistencia* que se medía era la del agujero de la cámara, la cual nos servía de comparación para saber si había o no membrana, después se medía la *Resistencia* de la BLM, y finalmente las *Resistencias* de estas al adicionar el antibiótico.

S.- Limpieza y Tratamiento del material.

Siendo las Bicapas Lipídicas Negras muy sensibles a la contaminación, fue necesario darle un tratamiento adecuado de limpieza a el material utilizado para la formación de éstas.

Algo muy importante en esta parte experimental fue la utilización del agua bidestilada en el lavado del material.

a) Cámaras de Acrílico.

Estas cámaras fueron lavadas con un detergente líquido muy suave, posteriormente se enjuagaron con agua varias veces, y finalmente se enjuagaron con Metanol. (esto último para evitar residuos contaminantes).

b) Cámaras de Teflón.

Este tipo de cámaras necesitó un tratamiento de limpieza más riguroso, ya que era necesario remover todo tipo de residuos contaminantes que hubieran quedado en ellas.

- Primeramente eran lavadas con un detergente líquido muy suave y seguidamente se enjuagaban con agua varias veces.

- Posteriormente se dejaban remojando durante 24 hr. en NaOH, y nuevamente se enjuagaban con agua.

- Finalmente se colocaban en una solución de HCl a una concentración 0.1 M. durante 1 hr. (esto se hacía para neutralizar el NaOH), y por último eran enjuagadas con agua.

- Los pinceles y las jeringas con canula utilizados para la formación de las membranas se lavaban únicamente con Decano, ya que este es un disolvente del Colesterol.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES.

A. - Resistencias iniciales.

Como se observa en la Fig. III.A.1, las *BLM* que se estudiaron presentaron diferentes Resistencias iniciales, (se le llama así a la Resistencia que presenta la Membrana antes de estar en presencia del antibiótico *Nistatina*), que podría ser debido a una ó más de las siguientes causas:

1. - Que en el momento de pintar una membrana con la solución formadora de membranas, se pudo tener una gota de la misma en el lugar donde se esperaba formar la *BLM*, a esto se pueden deber las Resistencias más altas; cuando esto era detectado, se rompía la membrana formada desechando la información recabada sobre ella.

2. - También se tuvieron Resistencias muy bajas porque probablemente al formar las *BLM* estas estaban contaminadas con residuos de *Nistatina*. Aquellas con un valor por debajo de $3 \times 10^{10} \Omega$ ($450 \text{ M}\Omega \times \text{cm}^2$) fueron descartadas.

Suponiendo que la Temperatura afecta la fluidez de las membranas, esperábamos encontrar cambios en la Resistencia inicial en las *BLM* formadas a diferentes Temperaturas. Sin embargo como se muestra en la figura antes mencionada, en el rango de Temperatura de 21°C a 29°C , no se encontró cambios en las Resistencias iniciales, por lo tanto cabe mencionar que la Temperatura no afecta la Resistencia inicial de las *BLM*.

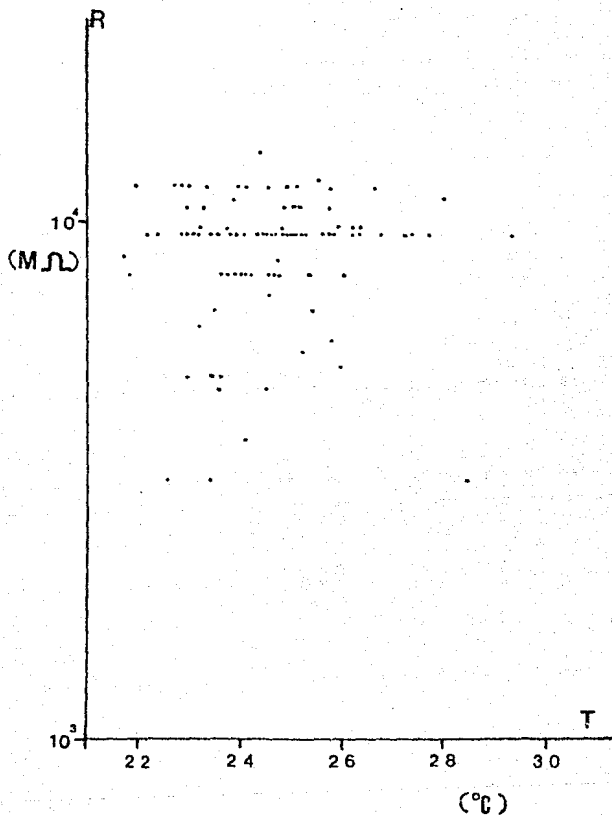


Fig. III.A.1 Relación entre las Resistencias iniciales de las Membranas (R) y la Temperatura (°C). La Temperatura que se midió fue la del medio que bañaba a las membranas.

A pesar de estos resultados, se ha reportado que las membranas de esteroides presentan un sistema similar al de los sistemas liotrópicos, del tipo de cristal líquido.

Este sistema consiste en que las *BLM* de Colesterol oxidado presentan cambios continuos en su estructura, muy suaves, provocando así cambios en su permeabilidad. Ahora bien, estas transiciones de fase se pueden llevar a cabo por efecto de la *Temperatura*; o sea, si se tiene una bicapa lipídica a bajas *Temperaturas*, esta no muestra ninguna transición de fase, en cambio si se aumenta ésta, la *BLM* tiende a tener una estructura más fluida.

Este tipo de estudios son importantes porque la transición de fase tiene relevancia en sistemas biológicos, como el transporte, la respuesta a anestésicos y la respuesta inmunológica, ya que estos pueden ser alterados por cambios en el estado de la membrana.

B. - Desarrollo en el Tiempo de la Resistencia inicial de la Membrana.

A estas *BLM* se les estudio los cambios en su Resistencia inicial con respecto al Tiempo, dependiendo si estas fueron realizadas en ausencia ó en presencia del antibiótico Nistatina.

a) Membranas formadas en ausencia de Nistatina.

Estas membranas fueron formadas en ausencia del antibiótico Nistatina, y se esperaba que no hubiera cambios en sus Resistencias iniciales sin embargo en la Fig.III.B.1 y Fig.III.B.2, se observa que la *BLM* presenta con el Tiempo una caída de Resistencia.

Estos cambios de Resistencia pudieron deberse a que talvez las *BLM* no estaban bien formadas y presentaban agujeros en ella, los cuales dificultaban las mediciones de esta, y por lo tanto con el Tiempo, las membranas presentaron una Resistencia muy baja hasta llegar a romperse.

b) Membranas en presencia de Nistatina.

En este caso a las *BLM* que se formaron se les agregó cierta concentración de Nistatina (≈ entre 1 y 10 μl), en la solución que bañaba las membranas, para comprobar que este antibiótico es el responsable de la caída de Resistencia de las membranas.

En la Fig.III.B.3, se puede ver que en un Tiempo muy grande la membrana tuvo una disminución de Resistencia, con una concentración de Nistatina de 11.75×10^{-6} M (55 μl), a diferencia de la membrana de la Fig.III.B.4, la cual con un Tiempo menor y con una Concentración de Nistatina de 18.56×10^{-6} M (90 μl), se obtuvo una disminución en su Resistencia más rápida.

Estas diferencias entre ambas membranas pudieron deberse a que en la primera no se tenía la bicapa formada, sino que se tenía una membrana gruesa, la cual dió lugar a que se necesitara un Tiempo muy grande para que la Nistatina reaccionara, hubiera formación de poros a través de ella y se obtuviera una caída de Resistencia.

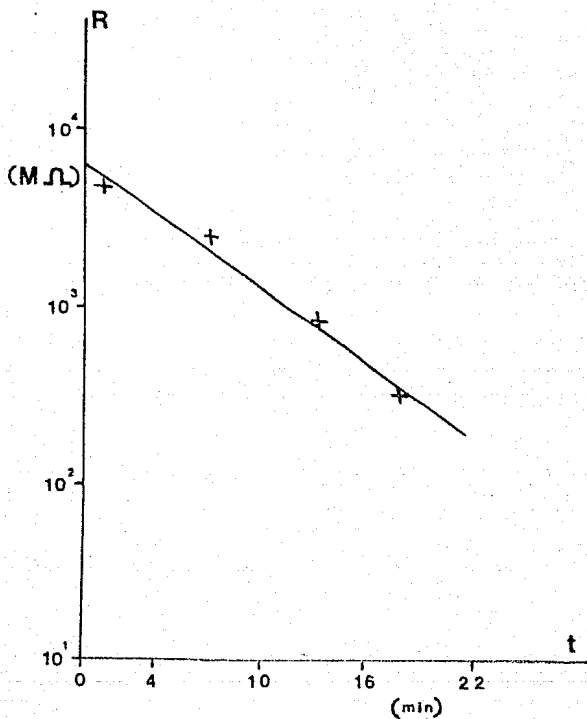


Fig. III.B.1 Relación entre la Resistencia de la Membrana (R) y el Tiempo (min.).

+ - Membrana formada en ausencia de Nistatina.

Ajuste Estadístico: $m = -0.068$ $b = 5,160$ $\bar{z} = -14.705$

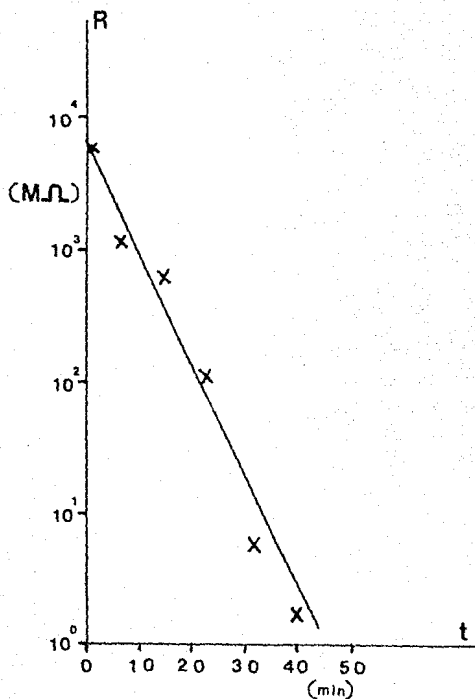


Fig.III.B.2 Relación entre la Resistencia de la Membrana (R) y el Tiempo (min.).

x - Membrana formada en ausencia de Nistatina.

Ajuste Estadístico: $m = - 0.082$ $b = 6,881$ $\bar{c} = - 12.195$

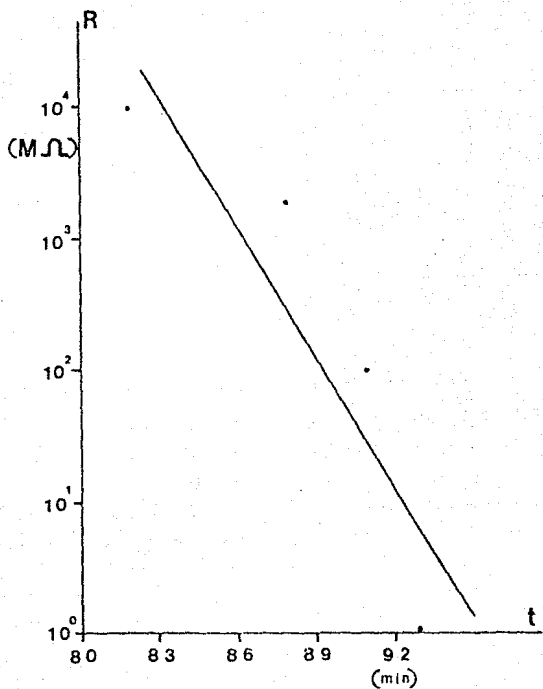


Fig. III.E.3 Relación entre la Resistencia de la Membrana (R) y el Tiempo (min.).

● - Membrana realizada en presencia de Nistatina: $[N] = 11.75 \times 10^{-6}$ M.
 Ajuste Estadístico: $m = -0.33$ $b = 10,603$ $\bar{t} = -3.030$

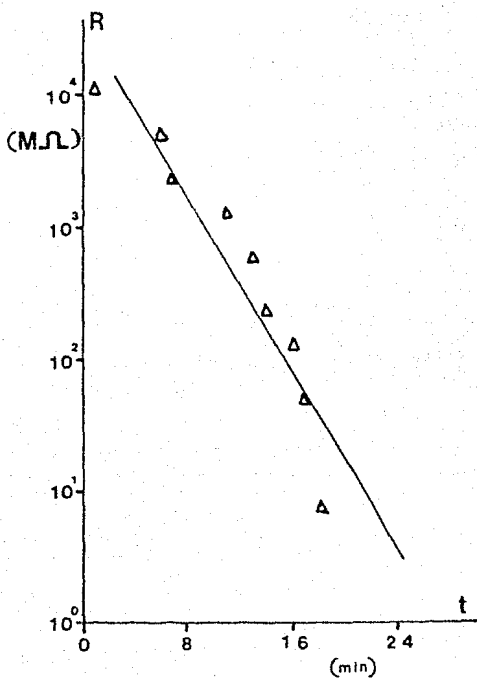


Fig.III.E.4 Relación entre la Resistencia de la Membrana (R) y el Tiempo (min.).

Δ - Membrana realizada en presencia de Nistatina: [N] = 18.58 × 10⁻⁶ M.
 Ajuste Estadístico: m = - 0.16 b = 37,897 \bar{c} = -6.28

C.- Relación entre la Resistencia de la Membrana y la Concentración de Nistatina.

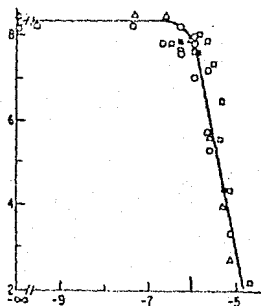
Es conocido que la acción del antibiótico polieno Nistatina, en membranas lipídicas que contienen Colesterol, presentan ciertas características.

Una de estas es que a cierta concentración ($\approx 10^{-6}$ M) de antibiótico a ambos lados de la membrana, la Resistencia decrece desde valores $\approx 10^{10}$ $\Omega\text{-cm}^2$ a $\approx 10^0$ $\Omega\text{-cm}^2$.(11).

Ahora bien, se observa que hay formación de cristales unicos en BLM 's desde concentraciones aproximadamente de 10^{-7} M.(15).

La relación log. Resistencia entre log. Concentración de Nistatina, son como los de la Fig.III.C.1, donde la pendiente puede fluctuar entre 4.5 a valores tan altos como 20-30, dependiendo del tipo de esteroi.(13).

Log Resistencia ($\Omega\text{-cm}^2$)



Log Nistatina (M)

Fig.III.C.1 Relación entre el log. de la Resistencia de la Membrana (R) y el log. de la Concentración de Nistatina (N).(13).

En nuestros experimentos, Fig.III.C.2, vemos valores correspondientes utilizando Colesterol oxidado, el rango de Concentración de Nistatina que se añadió a las BLM, fue entre 10^{-7} M y 10^{-6} M, y las pendientes obtenidas de las rectas log. Resistencia entre log. Concentración de Nistatina estuvieron entre 6.7 y 1.0 aproximadamente, aunque se presentan frecuentemente valores muy altos (≈ 30).

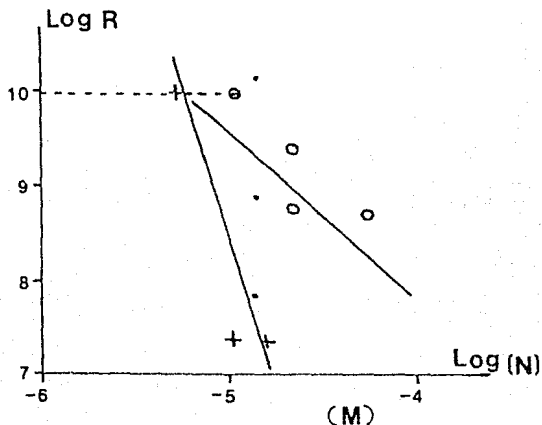


Fig.III.C.2 Pelación entre el log. Resistencia de la Membrana (R), y el log. de la Concentración de Nistatina (N).

Valores Experimentales:

o - [N] = 51.42×10^{-6} M.

+ - [N] = 21.17×10^{-6} M.

• - [N] = 13.85×10^{-6} M.

Ajuste Estadístico:

m = - 1.81 b = 0.78

m = - 6.68 b = - 27.08

m = $\approx \infty$ b = 0

Con los resultados obtenidos nosotros podemos concluir que la disminución en la Resistencia de las BLM, se debe a que la Nistatina llega a una concentración micelar crítica en la solución en equilibrio que rodea la bicapa; esta concentración es aproximadamente de 2 y 3 moléculas de antibiótico polieno. Ahora bien, ambas moléculas de Nistatina y Colesterol, crean canales (poros acuosos) a través de la bicapa, produciendo así una modificación en esta.

La formación de canales ocurre cuando se alcanza una Concentración umbral del antibiótico en la solución, característica de cada membrana. Ahora bien, sabemos que el antibiótico se encuentra en la solución formando dímeros, (21), y que probablemente se incorporen estos dímeros en paquete a la bicapa.

El valor de la pendiente es importante, ya que se interpreta como la molecularidad (o sea, el número de moléculas del monómero Nistatina), que forman un Sitio Conductor a través de la membrana.

Los poros acuosos no están estáticos, estos con la Temperatura se pueden formar ó desensamblar (Cinética de Sitios Conductores), como se verá más adelante.

D. - Relación entre la Concentración de Nistatina Umbral y la Temperatura.

Para que una BLM pueda formar Sitios Conductores rápidamente, se necesita que el polieno se encuentre a igual Concentración en ambos lados de la membrana y que la Temperatura esté en un rango adecuado (22-28°C).

En la Fig.III.D.1, podemos observar los valores obtenidos de nuestros experimentos.

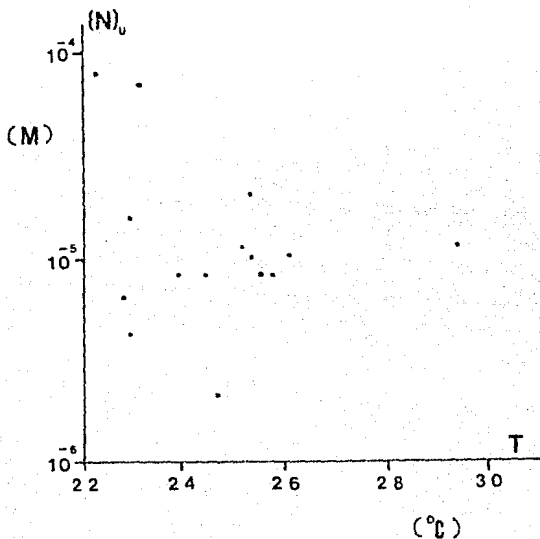


Fig.III.D.1 Relación entre la [Nistatina] UMBRAL (N) y la Temperatura ($^{\circ}C$).

En este caso vemos que se necesita cierta Concentración de Nistatina y cierta Temperatura para que haya una disminución en la Resistencia de la bicapa.

Se puede observar que la cantidad de Concentración de Nistatina que se le agrega a la bicapa va disminuyendo a medida en que la Temperatura aumenta, aproximadamente hasta los 28°C.

Como veremos en resultados posteriores, a Temperaturas altas, la Conductancia decrece probablemente por la rotura de los Sitios Conductores.

E.- Relación entre la Resistencia de la Membrana y la Temperatura a Concentración de Nistatina constante.

Como hemos señalado, con las concentraciones experimentales apropiadas de Nistatina a cierta Temperatura, el polieno reduce la Resistencia de las bicapas.(13), como se observa en las Figuras III.E.1 , III.E.2, y III.E.3

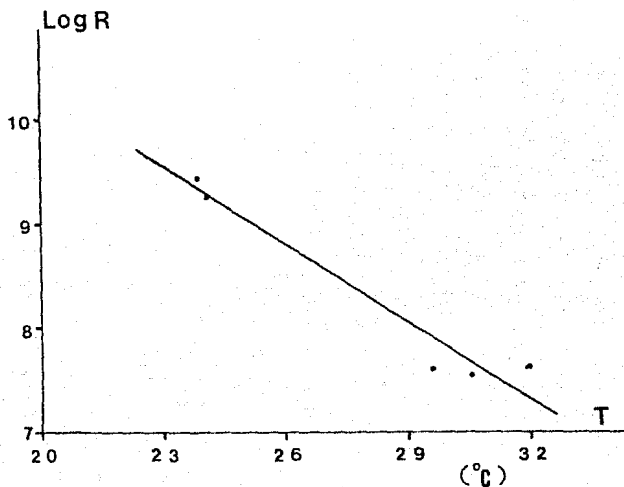


Fig.III.E.1 Relación entre el log. Resistencia de la Membrana (R) y la Temperatura (°C) a [Nistatina]_{cte.}

Valor Experimental:

Ajuste Estadístico:

• - [Nistatina]_{cte.} = 0.431×10^{-6} M.

$m = -0.24$ $b = 15.22$

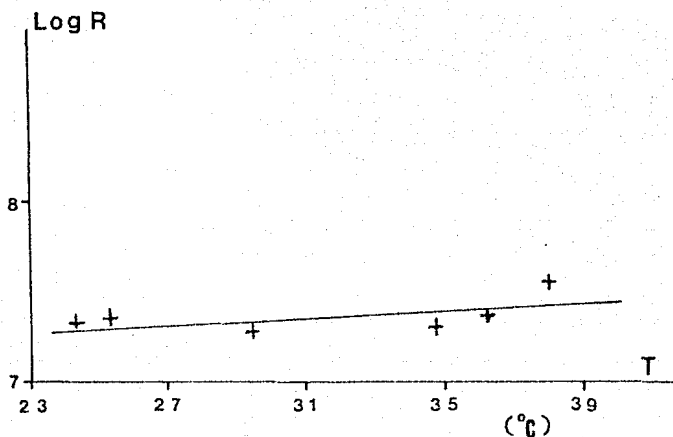


Fig. III. E. 2 Relación entre el log. Resistencia de la Membrana (R) y la Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) a [Nistatina] ct. .

Valor Experimental:

Ajuste Estadístico:

$$+ - [\text{Nistatina}]_{\text{ct.}} = 2.585 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

$$m = 0.010 \quad b = 7.045$$

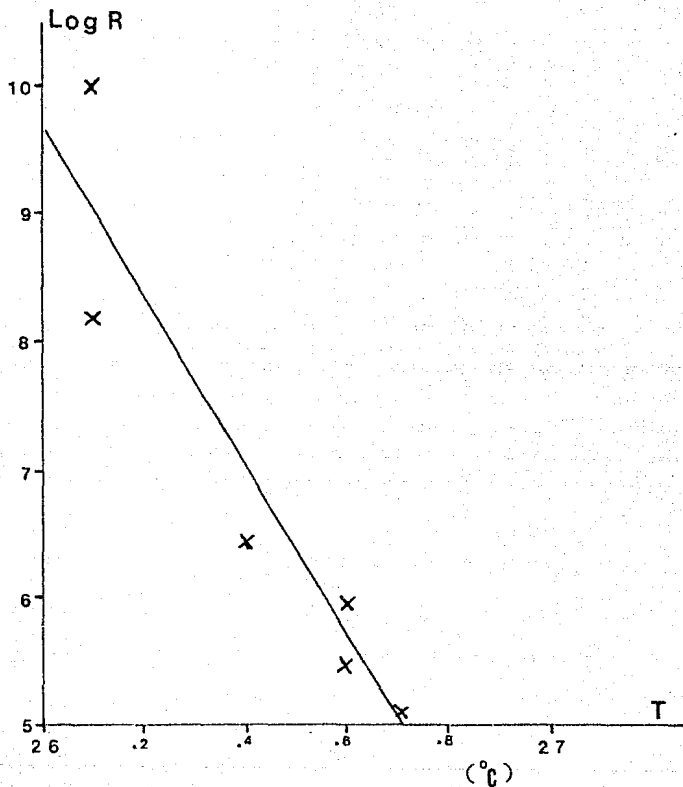


Fig III.E.3 Relacion entre el log. Resistencia de la Membrana (R) y la Temperatura (°C) a [Nistatina]_{cte.}

Valor Experimental:

$$x - [Nistatina]_{cte.} = 1.068 \times 10^{-6} \text{ H.}$$

Ajuste Estadístico:

$$m = -6.65 \quad b = 182.57$$

En las gráficas anteriores de nuestros experimentos, se puede apreciar que la Resistencia de las membranas es muy sensible a la Temperatura, estos cambios de Resistencia se pueden deber a la creación (K_1) y pérdida (K_2) de sitios conductores. Cuando la Temperatura se incrementa mucho ($T > 26^\circ\text{C}$) comienza a prevalecer la rotura de sitios conductores sobre la formación de estos, provocando así cambios en la bicapa.


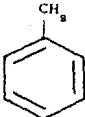
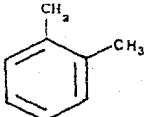
Con estos resultados se puede decir que la interacción de la Nistatina en las BLM, nos podría ayudar para conocer los efectos que presentan los polímeros en sistemas más complejos, como los biológicos, dándonos una útil información para conocer algunos de los mecanismos que regulan el transporte de iones a través de las membranas, ayudándonos también a entender las modificaciones que se producen en las propiedades de permeabilidad iónica cuando se realizan estudios con diferentes tipos de drogas.

F. - Formación de Membranas con Diferentes Solventes.

En esta fase experimental, se formaron membranas a las cuales se les agregó los Solventes Decano, Benceno, Tolueno y Xileno, con una proporción de (1:1) a la solución formadora de membranas.

La Tabla III.F.1 presenta algunas características de los Hidrocarburos usados.

Tabla III.F.1 Características de los Hidrocarburos.

Características	Decano	Benceno	Tolueno	Xileno
Estructura	$C_{10}H_{22}$			
Peso molecular	142.29	78.12	92.15	106.17
Solubilidad:				
H_2O	insoluble	ó	insoluble	insoluble

En la Tabla.III.F.2 se puede apreciar que las membranas formadas con diferentes Solventes agregados al Decano, y con una proporción mayor que la utilizada en las membranas patrón, presentan una mayor Resistencia promedio.

Tabla III.F.2 Membranas Formadas con Diferentes Solventes.

Solvente	Proporción	Resistencia promedio \bar{R}_M
Col. + Decano.	Solución normal.	12,964
Col. + Decano.	(1:1)	15,739
Col. + Benceno.	(1:1)	16,269
Col. + Xileno.	(1:1)	15,678
Col. + Tolueno.	(1:1)	16,086

Nota: Col.; Colesterol.

Estas diferencias de *Resistencia promedio* puede deberse a que las membranas que contienen mayor *Concentración de Solvente* en su plano medio (parte hidrófoba), afecte este la estructura de la membrana ó su composición química, dificultando así migración de iones a través de ella. También puede deberse a que la absorción de los Hidrocarburos en el interior de las *BLM*, produzca un incremento en su espesor produciendo así una mayor *Resistencia*.

Hemos observado (y es un hecho conocido), (18), que un adelgazamiento en el espesor de las *BLM* puede ser producido por medio de la aplicación de *Campos eléctricos* a través de ella.

Estos Campos eléctricos provocan un cambio en el equilibrio de la bicapa y un aumento del Potencial químico de los Solventes en esta, resultando un deslizamiento (migración) de los Solventes hacia los microlentes (agrupaciones de moléculas de Solvente), y el Torus.

El deslizamiento se puede atribuir a una Presión electrostrictiva alta en la bicapa, esta electrostricción es la que induce el proceso de adelgazamiento.

Ahora bien, en la Tabla III.F.3. se observa el estudio de Análisis de Varianza de esta parte experimental, para evaluar si existe Diferencia Significativa entre los grupos de Solventes estudiados.

Tabla III.F.3 Análisis de Varianza para los diferentes grupos de Solventes estudiados.

Frente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Varianza	Razon de Varianza (F)
TRATAMIENTOS	25,492,374	4	6,373,094	40.58 ***
REPLICAS	456,698	3	152,233	0.96
ERROR	1,884,260	12	157,022	
Total	27,833,332	19		

$$MDS = \frac{4 \sqrt{157,022}}{\sqrt{12}} = 458$$

$MDS = 4S_x$	$\bar{X}_{Sol. normal}$	\bar{X}_{Decano}	\bar{X}_{Xilenc}	$\bar{X}_{Toluenc}$	$\bar{X}_{Benceno}$
	13,258	15,752	16,085	16,088	16,272

***3. 26-054
 S. 41 - DDX
 d. 52 - DD. PA

La razón entre las Varianzas generadas por tratamientos (6.373,094) y por factores no controlados (157,022) vale 40.58, que excede el valor límite 6.52 para el 99.9% de los valores de F que aparecen por acción del azar al efectuar muchísimas veces el ensayo, llenando los datos con datos sorteados.

El 99% de los valores de F calculados sobre tablas llenados con datos al azar son inferiores a 5.4.

El valor de $F = 40.58$ no es uno de los que aparece en el 99% de los casos, cuando la única fuente de variación es el azar. Luego, se rechaza la Hipótesis Nula y se confía (a nivel de confianza del 99%) en que existe deficiencia entre tratamientos.

Ahora bien, la Mínima Diferencia Significativa, es la menor diferencia que tendría que existir entre dos promedios muestrales para que los respectivos Intervalos de Confianza correspondientes de los Promedios Poblacionales se excluyesen mutuamente.

$$\begin{array}{cc} \bar{X}_1 & \bar{X}_2 \\ S_1 & S_2 \\ S_{\bar{X}_1} = \frac{S_1}{\sqrt{n_1}} & S_{\bar{X}_2} = \frac{S_2}{\sqrt{n_2}} \\ \left| \begin{array}{cc} \hline \bar{X}_1 - 2S_{\bar{X}_1} & \bar{X}_1 + 2S_{\bar{X}_1} \\ \hline \end{array} \right| & \left| \begin{array}{cc} \hline \bar{X}_2 - 2S_{\bar{X}_2} & \bar{X}_2 + 2S_{\bar{X}_2} \\ \hline \end{array} \right| \end{array}$$

En este caso "n" es el número y se supone que existe una Varianza Común (la del Error).

$$MDS = 4 S_{\bar{X}} = 4 \frac{S_{\text{ERROR}}}{\sqrt{n}} = 4 \frac{\sqrt{\text{Varianza ERROR}}}{\sqrt{n}}$$

G. Modificación de la Constante de Tiempo de la Membrana por agregado de Solventes.

Como se sabe, la estructura de la membrana está constituida por una doble capa lipoproteica, la cual es eléctricamente aislante pero presenta la facultad de permitir movimiento de iones a través de ella. Se puede construir un modelo eléctrico para las propiedades eléctricas pasivas, el cual consiste en un Circuito R-C.

El comportamiento eléctrico del Circuito de Membrana R-C, al inyectarle pulsos de corriente constantes y registrando su Diferencia de Potencial, obedece a la siguiente ecuación:

$$V = V_0 (1 - e^{-t/RC})$$

Cuando cesa el estímulo, el Voltaje a través de la membrana sigue la relación exponencial:

$$V = V_0 e^{-t/RC}$$

donde V_0 = valor máximo alcanzado.

τ = Constante de Tiempo del Circuito.

La Constante de Tiempo, (τ), tiene que ver con los parámetros pasivos de la membrana, y es $\tau = RC$; para obtener el valor numérico de este parámetro se aplica logaritmos a la ecuación exponencial y se tiene:

$$V = V_0 e^{-t/\tau}$$

$$\ln V = \ln V_0 - \frac{t}{\tau} \quad (1)$$

en donde $\ln V_0$ = ordenada al origen.

$$-\frac{1}{\tau} = (RC)^{-1} = \text{valor de la pendiente.}$$

Con respecto a nuestros resultados experimentales, se puede observar en la Fig.III.G.1, que las membranas con distintos Solventes presentan diferentes Constantes de Tiempo, $C = RC$; estas variaciones pueden estar dadas por la Resistencia o la Capacidad.

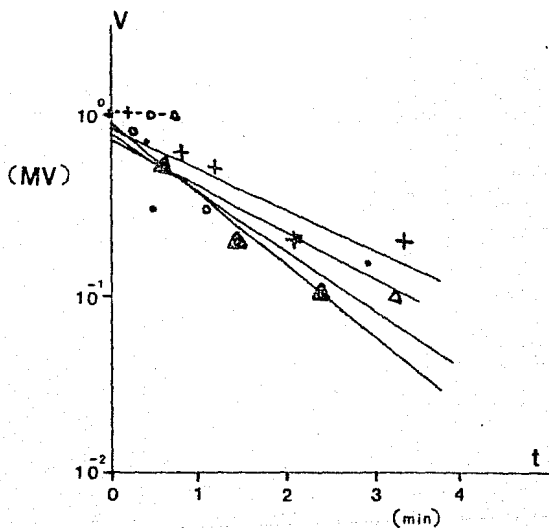


Fig.III.G.1 Modificación de la Constante de Tiempo de la Membrana (τ) por agregado de Solventes.

Valores Experimentales:

Ajuste Estadístico:

+ - Tolueno	$m = -0.22$	$b = 0.85$	$\bar{\tau} = -4.545$
• - Xileno	$m = -0.25$	$b = 0.72$	$\bar{\tau} = -4.00$
Δ - Benceno	$m = -0.32$	$b = 0.79$	$\bar{\tau} = -3.125$
o - Decano	$m = -0.39$	$b = 0.90$	$\bar{\tau} = -2.564$

Tanto la Resistencia como la Capacidad dependen de factores físicos, (ρ y ϵ), y geométricos (longitud y espesor) que podrían modificarse al adicionar los Solventes utilizados.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Lehninger, A.L. 1980. "Bioquímica." 2a ed. Ed. Omega. Barcelona. p.p.:116.
- 2.- De Robertis, E.D.P. y De Robertis, E.M.F. 1982. "Biología Celular y Molecular." 10a ed. Ed. El Ateneo. Argentina. p.p.:612.
- 3.- Harwood, J.L. and Pussell, N.J. 1984. "Lipids in Plants and Microbes." Ed. George and Unwin. London. p.p.:162.
- 4.- Morrison, R.T. y Boyd, R.N. 1976. "Química Orgánica." Ed. Fondo Educativo Interamericano. México. p.p.: 1291.
- 5.- Nagle, J.F. and Scott, H.L. 1978. Biomembrane phase transitions. *Physics Today*.
- 6.- Singer, S.J. and Nicolson, G.L. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175:720-731.
- 7.- Ti Tien, H. 1982. Artificial Planar Bilayer Lipid Membranes. *Membranes and Transport*. 1:165-171.
- 8.- Mueller, P., Rudin, D.O., Ti Tien, H. and Wescott, W.C. 1983. "In recent progress in surface science." *Formation and Properties of Bimolecular Lipid Membranes*. 1:370-393. (ed. Danielli, J.F., et al.) Academic Press, New York.
- 9.- Mueller, P. and Rudin, D.O. 1986. "Laboratory Techniques in Membranes Biophysics." *Biomolecular Lipid Membranes: Techniques of formation, study of Electrical Properties, and Induction of Ionic Gating Phenomena*. (ed. Passow, H. and Stampfl, R.D.) p.p.:141-156. Springer-Verlag, New York.
- 10.- Galindo, O.O.A. 1989. "Automatización de experimentos sobre Propiedades de Membranas Artificiales." Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.

- 11.-Cass,A., Finkelstein,A. and Krespi,V. 1970. The ion permeability induced in thin Lipid Membranes by the Polyene antibiotics Nystatin and Amphotericin. *B. J. Gen. Physiol.* 56(1):100-124.
- 12.-De Kruijff,B. and Demel,A. 1974. Polyene Antibiotic-sterol interactions in Membranes of Acholeplasma laidlawii cells and Lecithin Liposomes: III. Molecular structure of the Polyene Antibiotic-Cholesterol Complexes. *Biochim. Biophys. Acta.* 339:57-70.
- 13.-Andreoli,T.E. and Monahan,M. 1968. The Interactions of Polyene Antibiotics with thin Lipid Membranes. *J. Gen. Physiol.* 52:300-323.
- 14.-Kleinberg,M.E. and Finkelstein,A. 1984. Single-length and Double-length channels formed by Nystatin in Lipid Bilayer Membranes. *J. Membrane Biol.* 60:257-269.
- 15.-Kasumov,Kh.M., Barisova,M.P., Ermishkin,L.N., Patseluyev,V.M., Silberstein,A.Ya. and Vainstein,V.A. 1979. How ionic channel properties depend on the structure of 'Polyene Antibiotic Molecules.? *Biochim. Biophys. Acta.* 551:229-237.
- 16.-Bclard,J. 1986. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties.? *Biochim. Biophys. Acta.* 864:257-304.
- 17.-Coster,H.G.L. and Laver,D.E. 1968. The effect of temperature on lipid-n-alkane interactions in lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta.* 857:95-104.
- 18.-White,S.H. 1980. How electric fields modify alkane solubility in Lipid Bilayers. *Science.* 207:1075-1077.

- 19.-Lenhinger, A.L. 1985. "Bioquímica". Ed. Omega. Barcelona. p.p.:1013.
- 20.-Finkelstein, A., Holz, R. 1973. Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. in membranes. Vol.2. "Lipid Bilayers and Antibiotics." ed. G. Eisenman. p.p.:377-406. Marcel Dekker. New York.
- 21.-Andreoli, T.E. 1973. Kidney International. 4:337-345.
- 22.-Marty, A., Finkelstein, A. 1975. Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin. Differences in its one-sided and two-sided action. J.Gen.Physiol. 65:515-525.
- 23.-Cass, A., Dalmark, M. 1973. Equilibrium dialysis of ions in nystatin-treated red cells. Nature New Biol. 244:47-49.
- 24.-Andreoli, T.E., Dennis, V.W., Weigl, A.M. 1969. The effect of amphotericin B on the water and nonelectrolyte permeability of thin lipid membranes. J.Gen.Physiol. 53:112-156.
- 25.-Holz, R., Finkelstein, A. 1970. The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. J.Gen.Physiol. 56:125-145.
- 26.-Ridaura, S.R. 1973. "Ionic Selectivity of Nystatin pores in Black Lipid Membranes". Tesis Doctoral. University of Seattle. Washington.
- 27.-Kreyszsig, E. 1985. "Introducción a la Estadística Matemática. Principios y Metodos". 8a. ed. Ed. Limusa. México. p.p.:505.
- 28.-Wayne, W.D. 1984. "Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud". 4a. ed. Ed. Limusa. México. p.p.:485.

- 29.-Mardia,K.V., Kent,J.T. and Bibby,J.M. 1982. "Multivariate Analysis". 3a.ed. Ed. Academic Press. U.S.A. p.p.:521.
- 30.-Snedecor,G.W. y Cochran,W.G. 1971. "Metodos Estadísticos". Ed.C.E.C.S.A. México. p.p.:703.
- 31.-Galina,H.S., Labiano,C.S.A., Uribe,C.S. y Trigo,G.A. 1989. "Nistatina y Anfotericina β : Conformaciones en solución y efectos en membranas artificiales". Boletín Soc. Mexicana de Física. 3(2).