La investigación científica en la Universidad Nacional de Santiago del Estero y sus aportes a la sociedad

Mónica Martinez, María Lidia Juliá, Ana María del Pilar Domínguez, Marcia Rizo Patrón, Marta Gulotta, Miguel Sarmiento, María José Benac y Ana Estela Ledesma (Compiladores)

UNSE
Universidad Nacional de Santiago del Estero

ÍNDICE

PRÓLOGO 17
Beatriz López de Mishima; José Togo

INTRODUCCIÓN 21

I. ÁREA TEMÁTICA: CIENCIAS BÁSICAS 26

ACEITES ESENCIALES ROL COMO INSECTICIDAS Y ANTIMICROBIANOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA 28
Sergio Rodríguez; Andrea C. Cutró; Axel Hollmann;

PÉPTIDOS ANTIBACTERIANOS. APLICACIONES EN SALUD Y ALIMENTOS 59
Axel Hollmann; Patricia Maturana; Juan C. Espeche ; Romina Varas; Anike Ferreyra Maillard; Andrea C. Cutro; Sergio Rodriguez

ROL DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO GDF9, BMP15 Y FGF2 EN LA FOLICULOGÉNESIS Y SU IMPORTANCIA EN LA PRODUCCIÓN BOVINA 107
Gustavo Adolfo Palma; Pablo Sebastián Reineri; María Sumampa Coria; Santiago Callejas

VOLTAMETRÍA COMPUTACIONAL DE SUPERFICIES MODIFICADAS 132
Oscar A. Pinto; Pedro Marcelo Pasinetti; Maximiliano Gavilán Arriazu; Rodrigo Giménez

CONTENIDO DE OLIGOELEMENTOS EN VEGETALES DE HOJAS VERDES Y ZANAHORIA 157
Ana E. Ledesma; Jorge N. Leguizamón Carate; Carlos A. Wottitz; Fanny C. Álvarez Escalada; Antonella M. Bucci

EMPLEO DE DOCKING MOLECULAR PARA EL ESTUDIO DE ENZIMAS BACTERIANAS Y OTRAS MOLÉCULAS DE INTERÉS BIOLÓGICO 186
Ana Ledesma; Fanny Álvarez Escalada; Abraham Sesin; Jorge Gómez; Juan Carol Paz; Ana Bustos

PROPIEDADES ESTABILIZANTES Y EMULSIFICANTES DE HIDROCOLOIDES OBTENIDOS DE RECURSOS NATURALES AUTÓCTONOS Y SUBUTILIZADOS DEL NOROESTE ARGENTINO 211
Laura Iturriaga; Matías Alancay; Anabel Ayunta; Claudia Quinzio

CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE SISTEMAS LIPÍDICOS BIOMIMÉTICOS 250
Aníbal Disalvo; María A. Frías; Antonio Sebastián; Hugo A. Pérez[1]; Jimena del Pilar Cejas; Noelia A. Soria[1]; Lina G. Mohtar

II. ÁREA TEMÁTICA: CULTURA Y EDUCACIÓN 307

PRIMERAS APROXIMACIONES HISTÓRICAS SOBRE LA CÁRCEL Y SOCIEDAD EN SANTIAGO DEL ESTERO 308
Silvia Beatriz Rodríguez; Claudia Suárez; Cristina Cuevas; Gabriel Alejandro López Pepa; Santiago Comán;Ramiro Santillán; Verónica Díaz

LAS COMPETENCIAS EN EL PROCESO DE FORMACIÓN DE LOS ESTUDIANTES DEL PROFESORADO EN MATEMÁTICA DE LA FCEYT USANDO GEOGEBRA 334
Nori Esther Cheeín de Auat; María Mercedes Simonetti; Yris Bettiana Rafael; Grabiela Lorena Robles; Lidia Cristina de Pablo; Viviana del Carmen Ledda; Alejandra Beatriz Lima

ENSEÑAR CIENCIAS, DESARROLLAR COMPETENCIAS 361
José Galiano;Andrea Acosta; Paola Bustamante;Evangelina González; Gonzalo Martínez; Gabriela Maguna; Gabriel Gutiérrez

III. ÁREA TEMÁTICA: DESARROLLO HUMANO, ECONÓMICO, SOCIAL Y DE POLÍTICAS PÚBLICAS 411

MEMORIAS E IDENTIDADES EN UN CONTEXTO DE CONFLICTO TERRITORIAL 412
Carlos Bonetti

DESARROLLO ECONÓMICO. CRECIMIENTO, CAMBIO ESTRUCTURAL Y DESIGUALDAD EN REGIONES SUBCAPITALI-

ZADAS DE LA PERIFERIA. EL CASO DE SANTIAGO DEL ESTERO 434
María Noelia Gurmendi; Jorge Luis Silveti

MERCADO DE TRABAJO, INFORMALIDAD Y DESIGUALDADES DE GÉNERO EN SANTIAGO DEL ESTERO 472
Lucas Torres; Jorgelina Cajal;Yanina Saad Giuliano; Eliana Sayago Peralta; Florencia Suarez

IMPLEMENTACIÓN DE INICIATIVAS DE LA RESPONSABILIDAD SOCIAL EMPRESARIA EN SANTIAGO DEL ESTERO. UN ESTUDIO A PARTIR DEL CASO PRODUNOA S.A. 518
Mónica Martinez; Nelva Coria ; Víctor Fernández ; Ana Rosa Rodríguez; Carlos Soza

HACIA UNA COMPRENSIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE LAS DESIGUALDADES Y LA PRODUCCIÓN DE LAS DIFERENCIAS EN SANTIAGO DEL ESTERO. PRINCIPIOS DE CLASIFICACIÓN, REPRODUCCIÓN DE LAS DESIGUALDADES Y FORMAS DE RESISTENCIA EN CAPITALISMOS PERIFÉRICOS 544
Ana Teresa Martínez ; José Vicente Vezzosi; Raúl Esteban Ithuralde; Pablo Concha Merlo; Belén Villavicencio

RESPONSABILIDAD SOCIAL UNIVERSITARIA, AGENCIA MORAL Y CRITERIOS: UNA MIRADA DESDE LAS PERCEPCIONES DE DOCENTES Y ESTUDIANTES DE LA FACULTAD DE HUMANIDADES, CIENCIAS SOCIALES Y DE LA SALUD DE LA UNSE ACERCA DE SU ACCIONAR EN TANTO “INTEGRIDAD”, “SOCIABILIDAD Y SOLIDARIDAD” Y “BIEN COMÚN Y EQUIDAD” 588
Hugo Marcelino Ledesma ; Matías Castro de Achával; Francisco José Muratore

RELEVAMIENTO DE LAS ORGANIZACIONES DE LA ECONOMÍA SOCIAL, POPULAR Y SOLIDARIA EN LAS PROVINCIAS DE SALTA Y JUJUY 613
Edgardo J. F. Argibay; Ofelia Montenegro de Siquot; Luis A. Moyano; Carlos Alberto Siquot Montenegro; Laura Gómez; Eduardo Salinas; Aillen Maman

ENFERMERÍA EN TIEMPOS DE COVID-19 EN SANTIAGO DEL ESTERO: UN RELATO BASADO EN EXPERIENCIAS, DURANTE EL PERIODO 2020 642
Mariano Chávez; María Cáceres; Karina Sayago; Edel Sosa; Rosa Sotomayor

IV. ÁREA TEMÁTICA: GESTIÓN DE LA NATURALEZA Y EL AMBIENTE 663

COMPORTAMIENTO DE PLÁNTULAS DE MEDICAGO SATIVA CV. SALINERA INTA, GERMINADAS BAJO CONDICIONES DE SALINIDAD 664
Alejandra Catan; Claudia Degano; Diego De La Vega;Alicia Fraño; María Targa Villalba

AVANCES EN ESTUDIOS ECONÓMICOS DEL ALGARROBO EN SANTIAGO DEL ESTERO 687
Gabriela Cardona; Jorge García; Sebastián Kees; Víctor Pérez; Rocío Sánchez Ugalde; Miguel Sarmiento

RELACIÓN ENTRE LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA SUBTERRÁNEA Y LOS RESIDUOS DE CONSTRUCCIÓN Y DEMOLICIÓN 714
Carlos A. Wottitz; Fanny C. Álvarez Escalada; Antonio E. Ramírez; Rodrigo A. Ruiz López

LA UNIVERSIDAD VA AL CAMPO 750
Florencia Frau; Florencia Salinas; Nelson Leguizamón Carate; Nora Pece

FLORA LEÑOSA DE BOSQUES SERRANOS EN SANTIAGO DEL ESTERO, ARGENTINA 778
Manuel O. Palacio; Enrique Roger; Sergio O. Vecchioli

RELACIÓN ENTRE INFRAESTRUCTURA VERDE URBANA Y TEMPERATURAS. EL CASO DE DOS SECTORES DE LA CIUDAD CAPITAL DE SANTIAGO DEL ESTERO, ARGENTINA 820
María Florencia Speciale; Hugo Raúl Zerda

LA VEGETACIÓN CHAQUEÑA Y SU RELACIÓN CON DISTURBIOS, DESDE UNA PERSPECTIVA FUNCIONAL. RESPUESTAS DE BOSQUES CHAQUEÑOS A DISTURBIOS 856
Sandra Bravo; Nelly Abdala; Ana Santacruz; Dante Loto; Valeria Ibáñez-Moro[1]; Florencia del Corro[1]; Fernando Ojeda

EVALUACIÓN DE ESPECIES FORESTALES MEJORADAS GENÉTICAMENTE CON FINES DENDROENERGÉTICOS 882
Marta Rosalía Gulotta; Amelia Nancy Giannuzzo; María Elena Carranza ; Rocío Carreras; Felipe Cisneros ; Fany Patricia Coronel; Myriam Ethel Ludueña

GESTIÓN DE SERVICIOS ECOSISTÉMICOS EN ÁREAS FORESTALES Y OTRAS ÁREAS NATURALES. CASOS APLICADOS EN SANTIAGO DEL ESTERO 917

Miguel Sarmiento; Gabriela Cardona; Carlos Bruno; María Soledad Pintos; Cecilia Zurita Bianchini; Matías Carignano; Walter Cassino; Luiz Ribas; Samuel Rivera; Jorge García

PROPUESTAS DE USO SUSTENTABLE DE LOS RECURSOS BOSCOSOS DE LA REGIÓN CHAQUEÑA SECA 961
Juana Graciela Moglia; José Díaz Zirpolo; Ana Belén Cisneros; Vanina Chifarelli; Damián González; Myriam Ethel Ludueña; Federico Calatayú

V. ÁREA TEMÁTICA: TECNOLOGÍAS APLICADAS 1005

INVESTIGACIÓN DE MERCADO DE LA INDUSTRIA DE LA MADERA.EL CASO DE SANTIAGO DEL ESTERO 1006
Rolando Schimpf; Myriam Ludueña; Rocío Sánchez Ugalde

FISIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE ESPECIES FORESTALES BAJO LA ACCIÓN DEL GLIFOSATO 1046
Diego Ariel Meloni; María Cruz Silva; Diolina Moura Silva

PROPIEDADES REOLÓGICAS, TEXTURALES Y SENSORIALES DE GALLETAS DULCES LIBRES DE GLUTEN A BASE DE HARINA DE ARROZ, HABAS, MISTOL Y CHAÑAR 1065
Myriam Elizabeth Villarreal; Karina Eliana Costa Macías; Natalia Emilce Lescano; Fernanda Quiroga; Pablo Ribotta; Norma Cristina Samman

ILUMINACIÓN EFICIENTE Y SOSTENIBLE 1097
Silvina Luján Rigali; María I. Castro Saavedra; Rubén Corbalán; Franco Fernández; Edgar Oscar Palma; María Victoria Saracco; José Luis Torres

LA COMPUTACIÓN UBICUA EN EL DESARROLLO DE APLICACIONES EDUCATIVAS 1137
Elena Beatriz Durán; Margarita María Álvarez; Beatriz Fernández Reuter; Silvina Isabel Únzaga

DETERMINACIÓN DE VARIABLES TÉRMICAS DE HEAT PIPE TUBULARES, UTILIZADOS EN COLECTORES SOLARES PARA CALENTAR AIRE 1185
Carlos Alberto Cattaneo; Aníbal Oscar Gómez Khairallah; Pablo Sebastián Togo

TECNOLOGÍAS COMBINADAS PARA LA CONSERVACIÓN DE VEGETALES MÍNIMAMENTE PROCESADOS 1204
Silvia del Carmen Rodríguez; Mariana Judith Farías; **Diego Ricardo Gutiérrez**; María Laura Lemos

EVALUACIÓN DEL "GEOIDE-AR16",

MEDIANTE MODELOS DE ONDULACIÓN GEOIDAL. ÁREA DE RIEGO DEL RÍO DULCE, SANTIAGO DEL ESTERO 1235
José Goldar; Leonel Ayunta; Gonzalo Gerez; Carlos Gutiérrez; José Paste; Roberto Pirola; Daniel Sandez

PROPUESTA TECNOLÓGICA, CONCEPTUAL Y METODOLÓGICA ORIENTADA AL TRABAJO COLABORATIVO Y GESTIÓN DEL CONOCIMIENTO EN ÁMBITOS EDUCATIVOS PARA EL DESARROLLO DE COMPETENCIAS SOCIALES Y CULTURALES 1284
Mabel Sosa; Ricardo Cordero, Leda Digión, Saritha Figueroa, Ivana Maldonado, Carmen Silva, Isabel Velázquez.

CARACTERIZACIÓN DE ALMIDONES DE TUBÉRCULOS ANDINOS. APLICACIÓN EN EL DISEÑO DE ALIMENTOS 1324
Laura Beatriz Iturriaga; Ana Yanina Bustos; Gonzalo Cruz Ortiz; Lourdes Torres Quinteros; Pablo Daniel Ribotta; Cristina Ferrero

TECNOLOGÍA Y VALOR AGREGADO DE MADERAS, SUS DERIVADOS Y SUBPRODUCTOS DEL SECTOR FORESTOAGRÍCOLA 1349
Estela Margarita Pan; Juan Carlos Medina; Maximiliano Umlandt; Vanesa Jiménez; Feliza Benítez; Agustín Ruíz;

APLICACIONES GEOMÁTICAS DE LOS MODELOS GRAVITACIONALES TERRESTRES (EGM) Y LOS MODELOS DIGITALES DE ELEVACIÓN (DEM) GLOBALES. 1386
Lucrecia Galván; Claudia Infante; Javier Duro; Santiago Amalfi ; Jorge Orieta; Melina Llanos

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE MADERA PARA USOS SÓLIDOS EN ESPECIES CON APTITUD MADERERA DE LA REGIÓN CHAQUEÑA SECA 1429
Juana Graciela Moglia; Ana Belén Cisneros; Damián González; Vanina Chifarelli; José Díaz Zirpolo; Adrián Bender; Miryam Ethel Ludueña

DESARROLLOS INFORMÁTICOS PARA GRUPOS DE APRENDIZAJE EN CONTEXTOS DE COLABORACIÓN ON-LINE 1466
Rosanna Costaguta; María de los Ángeles Menini; Daniela Missio; Germán Lescano; Pablo Santana-Mansilla

PLATAFORMAS DE CATÁLISIS Y DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA BASADAS EN PASTA DE GRAFITO Y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS 1507

CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL DE SISTEMAS LIPÍDICOS BIOMIMÉTICOS

Aníbal Disalvo[1]; María A. Frías[1]; Antonio Sebastián Rosa[1]; Hugo A. Pérez[1]; Jimena del Pilar Cejas[1]; Noelia A. Soria[1]; Lina G. Mohtar[1]

Resumen

Los sistemas biomiméticos más utilizados en los estudios de membranas biológicas son las vesículas lipídicas, en las cuales los lípidos se organizan en una bicapa encerrando un volumen acuoso, y las monocapas de lípidos extendidas sobre la superficie aire/agua. En ambos sistemas, la hidratación de los lípidos determina propiedades termodinámicas y estructurales fundamentales para entender la respuesta al medio ambiente (estrés hídrico, antioxidantes, enzimas, péptidos). Entre ellas se mencionan la distribución del agua en los grupos PO, CO y CH_2, las propiedades mecánicas en procesos de expansión-contracción, los potenciales superficiales y la inserción de iones, péptidos y enzimas en la membrana.

1 Centro de Investigaciones en Biofísica Aplicada y Alimentos (CIBAAL), UNSE – CONICET.

En este capítulo se presentan resultados relevantes a nivel microscópico, mesoscópico y macroscópico mediante espectroscopía infrarroja, espectrofluorometría, compresibilidad y adsorbabilidad en monocapas y bicapas.

Basado en estos estudios, se postula un modelo de membrana lipídica superador que incorpora las propiedades del agua al comportamiento de la membrana. El contacto lípido/agua genera una solución acuosa bidimensional en la cual las cabezas polares de los fosfolípidos se encuentran sumergidos en agua con sus capas de hidratación. El análisis de las propiedades de membrana, según este modelo, está basado en la termodinámica de procesos irreversibles y considera a la interfase como un sistema abierto con respecto al agua. Se describen brevemente las estrategias experimentales que se desarrollaron en los últimos años para poner en valor el rol de la hidratación de los lípidos en su funcionalidad y en las respuestas de las membranas a las condiciones del medio que puedan alterarla. Estos estudios en sistemas biomiméticos son la base de proyección para comprender la respuesta de sistemas de interés biotecnológico y alimentario como células vegetales y bacterias, en donde la actividad del agua es esencial para su estabilidad y conservación.

Palabras claves: membranas lipídicas- sistemas biomiméticos- hidratación- espectroscopía infrarroja- espectrofluorescencia- presión superficial-potencial dipolar-potencial zeta.

Abstract

Biomimetic systems composed by lipids are frequently used to study the basic features of biological membranes. The experimental models consist of vesicles enclosed in lipid bilayers and of monolayers spread of an air water surface.

In both systems, the hydration of the lipids is determinant for the thermodynamic stability and structural dynamics and are a clue to understand the response of membrane to environment and biologically relevant bioeffectors (hydric and oxidative stress, hydrolytic enzymes, peptides antioxidants).

Water is distributed around the membrane's groups such as PO, CO y CH_2, and its exchange determines the mechanical properties in osmotic expansion and contraction, surface potentials, and insertion and adsorption of ions, peptides and enzymes.

In this chapter, recent results obtained at microscopic, mesoscopic and macroscopic level using infrared spectrometry (FTIR/ATR), spectrofluorometric, monolayer compressibility and surface tension in monolayers and bilayers.

On the base of these studies, a new model of lipid membrane is proposed that overcomes the classical ones in which water presence is ignored. In the new proposal, the lipid water interaction is included considering the membrane as composed as a bidimensional solution of hydrated polar groups that extends between the hydrocarbon region and the water solution.

This model can be sustained in terms of the application of the formalism of Thermodynamics of Irreversible Processes, in which the membrane is considered as an open system in respect to water exchange.

Briefly, the strategies employed to make relevant the role of hydration and its consequence on the membrane response. These studies in biomimetic systems are the basis to project and apply new concepts in the development of systems of biotechnological interest both for therapeutical and agrochemical purposes.

Key words: lipid membranes; biomimetic systems; hydration; infrared spectroscopy; spectrofluorometric; surface pressure; dipole potential; zeta potential.

Introducción

Dr. Disalvo, E.A (Dir.); Dra. Frías, M.A.

Los sistemas biomiméticos son aquellos que tratan de reproducir, al menos en parte, las propiedades de sistemas biológicos enteros. En particular, el estudio de la estructura y función de membranas celulares ha avanzado considerablemente cuando se implementaron sistemas experimentales modelo que mimetizan a la membrana lipídica. Las ventajas de estos sistemas es que permiten trabajar a composición y condiciones controladas, lo que favorece la comprensión del rol de cada componente en la membrana y su contribución a las propiedades funcionales como, por ejemplo, permeabilidad, potenciales eléctricos, propiedades mecánicas, etc.

Los sistemas biomiméticos más utilizados en los estudios de membranas biológicas son las vesículas lipídicas, en las cuales los lípidos se organizan en una bicapa cerrada que encierran un volumen acuoso, y las monocapas de lípidos extendidas sobre la superficie aire/agua. Si bien tanto en monocapas como en bicapas se puede trabajar a composición de lípidos controladas en mezclas de diferentes componentes, en las monocapas el área por lípido se determina en forma directa, mientras que en bicapas es necesario realizar algunas consideraciones sobre la ubicación del agua a partir de datos de espesor de bicapa obtenidos por medio de rayos x de pequeños ángulos. Por otro lado, las bicapas son excelentes para determinar las propiedades de permeabilidad y los efectos de la osmolaridad aun cuando la presión superficial de los lípidos no esté controlada.

Por estas razones, ambos sistemas se complementan ya que los estudios con cada uno de ellos aportan información del efecto de diferentes variables. Sin embargo, existe aún hoy una polémica entre la validez y correspondencia de las propiedades entre bicapas y monocapas.

A pesar de la gran ventaja de estos sistemas para describir las propiedades de las membranas en relación con el comportamiento de componentes individuales y su combinación, todavía son muy limitados para predecir y reproducir los fenómenos de la membrana celular. Esto se debe al hecho de que la fase de membrana se toma como un sistema aislado sin intercambio de materia y energía con los alrededores. Esta omisión ha derivado en la inexistencia de un criterio unificador que permita comprender y evaluar las respuestas de ambos sistemas desde el punto de vista termodinámico. Si bien la información experimental y de dinámica molecular ha permitido establecer con cierto grado de certeza que la región de contacto entre los lípidos y la fase acuosa son equivalentes, no existe un formalismo común tanto estructural como termodinámico que las unifique.

Cuando una solución clorofórmica de lípidos se esparce sobre una superficie de agua y aire, se forma una monocapa (Marsh, 1996; Dynarowicz-Łątka *et al.*, 2001). En la interpretación fenomenológica de las monocapas ha prevalecido el enfoque por el cual los lípidos sobre la superficie del agua se comportan como un gas bidimensional y que, por lo tanto, las isotermas de presión superficial/área por molécula son análogas a las curvas presión/volumen descriptas por la ecuación de van der Waals. Sin embargo, este enfoque no considera la interacción del agua con los lípidos y, por lo tanto, no reproducen los datos experimentales.

Por otro lado, cuando los lípidos secos se suspenden en agua, se organizan espontáneamente en bicapas, formando liposomas multilaminales.

La hidratación de las membranas lipídicas ha sido objeto de discusión y análisis, ya que su comportamiento determina las propiedades críticas de las funciones biológicas (Sparr y Wennerström, 2001; Damodaran, 1998; Damodaran y Merz, 1994; Luckey, 2014) que adquiere relevancia cuando las célu-

las sufren estrés hídrico, térmico o salino. Varios estudios han prestado atención a la contribución del agua para determinar el espesor y el área de las membranas lipídicas (Parsegian *et al.*, 2000; Tristram-Nagle y Nagle, 2004), estructura y estabilidad de la membrana (Roy *et al.*, 2016), y su influencia en las propiedades de permeabilidad (Disalvo y De Gier, 1983; Del Regno y Notman, 2018). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de información obtenida mediante diferentes técnicas (RMN, difracción de rayos X y espectroscopía FTIR) que demuestran claramente que el agua es un factor principal en la estructura de la membrana (Disalvo, 2015; Jendrasiak, 1996; Jendrasiak y Smith, 2001; Binder, 2007; Fitter et al., 1999; Milhaud, 2004; Disalvo y Frías, 2013), los modelos de membrana vigentes no tienen en cuenta el agua como un componente estructural y activo en términos de respuesta termodinámica.

En este trabajo se postula un modelo superador que incorpora las propiedades del agua al comportamiento de la membrana. Este modelo considera que el contacto lípido/agua genera una solución acuosa bidimensional en la cual las cabezas polares de los fosfolípidos se encuentran sumergidos en agua con sus capas de hidratación. Dicha solución bidimensional constituye una interfase (es decir, una fase compuesta por cabezas polares hidratadas) entre la zona hidrocarbonada y la fase acuosa (Figura 1).

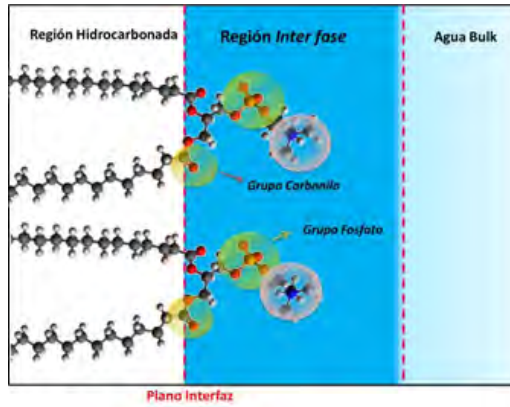

Figura 1. Modelo de membrana que considera una solución bidimensional de grupos polares hidratados entre la zona hidrocarbonada y el agua *bulk*. La zona azul corresponde a agua débilmente ligada y los círculos al agua de hidratación de grupos polares.

El análisis de las propiedades de membrana, según este modelo, está basado en la termodinámica de procesos irreversibles y considera a la interfase como un sistema abierto con respecto al agua. Si se tienen en cuenta las condiciones de actividad de agua y temperatura para una dada composición, el formalismo derivado ha permitido establecer la equivalencia entre monocapas y bicapas.

Asimismo, permite distinguir en principio dos tipos de agua en la membrana: una ligada a los grupos polares (hidratación primaria) y otra en capas secundarias que se extiende hacia la zona no polar denominada agua confinada. La conversión entre ellas permite entender muchos procesos complejos como inserción de aminoácidos, péptidos y antioxidantes y la actividad enzimática superficial. Este modelo contrasta con la definición de interfaz que refiere a un plano imaginario que pasa por la zona de los grupos carbonilos en la región de los

glicerofosfatos (ver Figura 1).

Como puede observarse, el modelo de la solución bidimensional pone en relevancia las propiedades de la zona polar de la membrana dándole un rol tan importante como la zona de las cadenas hidrocarbonadas. Trabajos recientes del laboratorio han logrado establecer una correlación entre las dos zonas en la cual los grupos carbonilos juegan un rol determinante.

Con esta base, este capítulo trata brevemente sobre las estrategias experimentales que se desarrollaron en los últimos años para poner en valor el rol de la hidratación de los lípidos en su funcionalidad y en las respuestas de las membranas a las condiciones del medio que puedan alterarla. Estos estudios en sistemas biomiméticos son la base de proyección para comprender la respuesta de sistemas de interés biotecnológico y alimentario como células vegetales y bacterias, en donde la actividad del agua es esencial para su estabilidad y conservación.

Las metodologías experimentales empleadas en estos estudios y sus aportes están presentados en las siguientes sesiones:

1.- Estudio de la hidratación de membranas lipídicas por medio de espectroscopía infrarroja.

2.- Determinación de diferentes tipos de agua por espectroscopía de fluorescencia. Influencia del colesterol.

3.- Influencia de factores físicos y químicos sobre la hidratación de membranas. Estudios en monocapas lipídicas.

4.- Consecuencia de los estados de hidratación sobre las propiedades superficiales de membranas.

5.- Conclusión y perspectivas.

1.- Estudio de la hidratación de membranas lipídicas por medio de espectroscopía infrarroja

Lic. Rosa, Antonio Sebastián

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica potente y no perturbadora que se ha utilizado con buenos resultados para la detección y caracterización de transiciones de fase en membranas lipídicas modelo y naturales. Esta técnica permite obtener información detallada sobre la estructura y organización de las membranas y otros conjuntos de lípidos en condiciones biológicamente relevantes (Lewis y McElhaney, 2007).

Las ventajas que aporta son su independencia con respecto al tamaño de las moléculas a estudiar, su estado físico o la naturaleza del entorno de la muestra, así como la detección de estructuras de vida media muy baja, del orden de femtosegundos.

La espectroscopia FTIR se basa en los cambios en la energía vibracional de los enlaces al absorber la radiación infrarroja. Si las frecuencias de la radiación incidente y de la vibración de sus enlaces coinciden, la molécula absorbe energía. Se puede decir, por lo tanto, que los enlaces actúan de "cromóforos", por lo que este tipo de espectroscopía no necesita de sondas añadidas a la estructura en estudio. Tanto la frecuencia de la vibración como la probabilidad de que se produzca la absorción de energía dependen de la fuerza y de la polaridad de los enlaces, por eso la influencia de elementos intra e intermoleculares es importante, permitiendo así el estudio de interacciones y cambios inducidos por el entorno (Van De Weert *et al.*, 2001).

El grafico que representa la intensidad de radiación infrarroja absorbida (transmitancia o absorbancia) en función del número de onda es lo que se conoce como espectro infrarrojo

(Figura 2A).

Todas las biomoléculas poseen niveles energéticos de vibración en el intervalo del infrarrojo medio comprendido entre 3000-600 cm^{-1} y presentan múltiples grados de libertad vibracional (Barth y Zscherp, 2002), lo que genera espectros de absorción complejos con solapamientos entre bandas. En el caso particular de los lípidos y de estructura de membranas lipídicas, el espectro de infrarrojo se compone de todas las posibles vibraciones de sus grupos químicos, que se solapan dando bandas complejas formadas por varios componentes (Figura 2A).

espectroscopía por reflexión total atenuada

La espectroscopía por reflexión total atenuada (A*ttenuated Total Reflection*: FTIR-ATR) es una técnica de muestreo utilizada en el campo de infrarrojo, la cual se produce cuando una radiación infrarroja incide en un cristal transmisor y de alto índice de refracción. El cristal está diseñado para permitir una reflexión interna total que crea una onda evanescente sobre la superficie del cristal (Figura 2B).

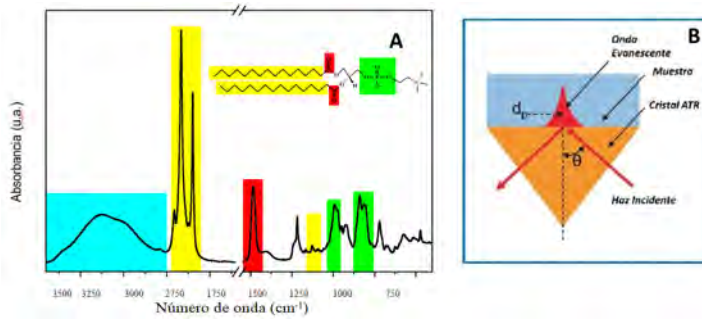

Figura 2. A) Espectro de lípido puro: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (16:0 PC-DPPC) a 25ºC. Cada zona marcada con colores corresponde a cadenas hidrocarbonadas en amarillo, fosfatos en verde, carbonilos en rojo y banda de agua en cyan con su correspondiente banda de vibración en el espectro. B) θ es el ángulo del haz incidente; d_p penetración.

Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en íntimo contacto con el cristal y se registra el espectro infrarrojo. Las absorbancias, aunque dependen del ángulo de incidencia, son independientes del espesor de la muestra, debido a que la radiación solo penetra unos pocos micrómetros.

FTIR-ATR es una técnica particularmente útil para examinar las interacciones péptido- membrana, la dinámica de lípidos y conformación de proteínas de membrana (Menestrina *et al.*, 1999; Van De Weert *et al.*, 2001), la formación de fibras de insulina (Sharp *et al.*, 2002), la asociación de proteínas con bicapas de lípidos (Van De Weert *et al.*, 2001), la formación de bicapas lipídicas (Käsbauer *et al.*, 1999; Käsbauer & Bayerl, 1999), la orientación de proteínas en las superficies sólidas (Terrettaz *et al.*, 2002) y las interacciones lípido-polisacárido. El accesorio de ATR-punta de diamante en donde se coloca la muestra (Figura 3A) se acopla a una cámara para el control de temperatura y humedad relativa en el estudio de hidratación de

membranas. Este tipo de dispositivo permite controlar *in situ* la presión de vapor de agua (humedad relativa) a la que se someten las membranas en estudio. Para ello, se coloca una cápsula de teflón rodeando a la muestra conteniendo soluciones salinas saturadas de actividades de agua conocidas a temperatura controlada (Figuras 3B y C). Mediante el uso de soluciones saturadas de diferentes sales en agua destilada se obtienen valores específicos y constantes de humedad relativa dentro de la cámara de control según se determina mediante un instrumento de actividad de agua (Novasina THD- 200, Pfaeffikon, Suiza) acoplado al compartimiento de la muestra (Figura 3D). Todo el sistema está conectado a un baño de termostatización (+/- 0.1°C) (Gennaro *et al.*, 2019).

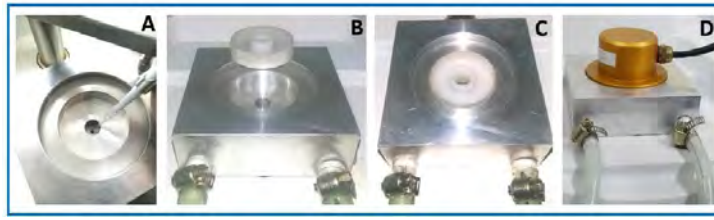

Figura 3. A) Siembra de la muestra sobre el cristal de diamante. B) Solución saturada de sal en recipiente de teflón. C) Inserción de la cápsula con solución saturada en compartimiento de control de temperatura. D) Acoplamiento con el detector de actividad de agua "Novasina".

Las membranas lipídicas son una de las matrices biológicas más importantes en las que tienen lugar los procesos bioquímicos. La disposición de lípidos en particular es impulsada por diferentes arreglos de agua que interactúan con ella y está relacionada con diferentes estados de agua con diferentes niveles de energía en la interfase. Los perfiles de agua cambian si los lípidos se encuentran en estado sólido, en estado gel y en estado líquido cristalino.

De los espectros obtenidos, se puede calcular el parámetro del contenido de agua relativo de la muestra ($I_{\nu}H_2O/I_{\nu}CH_2$) durante el proceso de equilibrio hasta llegar a la humedad correspondiente mediante la relación entre la intensidad o área de la banda de agua con la intensidad o área de alguna banda especifica de la muestra (Figuras 4A y B).

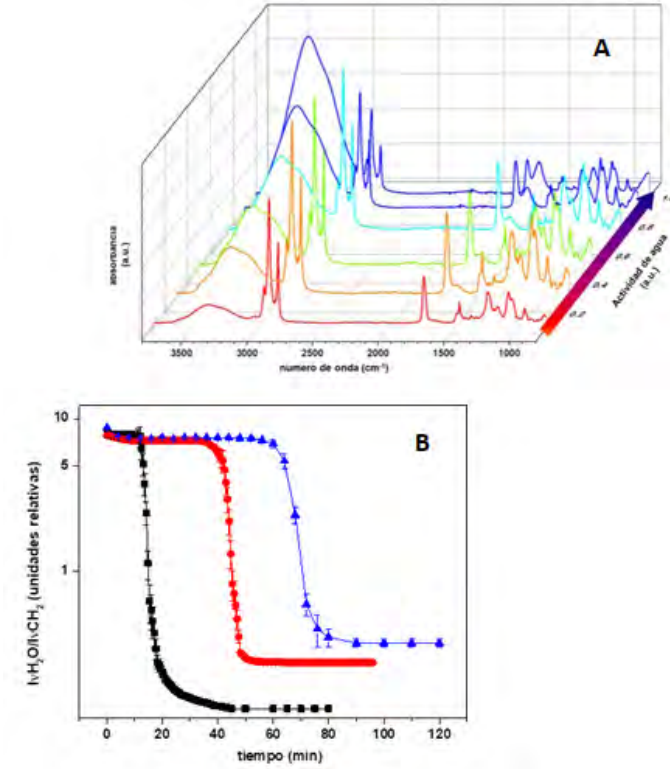

Figura 4. A) Evolución de los espectros de DPPC en función de actividad de agua. B) Evolución del contenido de agua relativa ($I_{\nu}H_2O/I_{\nu}CH_2$) en bicapas de DPPC a lo largo del equilibrio, en humedades relativas controladas al 100% (triangulo azul); 75% (círculo rojo) y 11% (cuadrado negro) a 22 °C.

El seguimiento de la banda de agua de los lípidos ubicada en el rango espectral entre 3400 y 600 cm^{-1} en función del tiempo permite identificar los grupos característicos de los lípidos que se estén estudiando y sus posibles interacciones con el agua. En aquellos casos en los que las bandas de absorción parecen ser una suma de los componentes, se utiliza una combinación de deconvolución Fourier y procedimientos de ajuste de curvas para obtener las estimaciones de la posición de las bandas de componentes para reconstruir el contorno de la envolvente de la banda original (Rosa *et al*., 2019).

Los cambios en el contenido de agua y los estados de agua distintivos se estudiaron en una matriz auto ensamblada de 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) siguiendo los cambios en la frecuencia de vibración asimétrica de los grupos metilenos ($-CH_2$) y la vibración simétrica de los grupos fosfato ($-PO_2-$) a diferentes humedades relativas.

El cambio de frecuencia de los grupos metilenos ($-CH_2$) hacia valores más bajos con la deshidratación (Figura 5, línea roja) está relacionado con el acoplamiento intermolecular de ellos. De igual manera, la frecuencia de los grupos fosfato ($-PO_2-$) aumenta indicando una disminución de su esfera de hidratación (Disalvo *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2020).

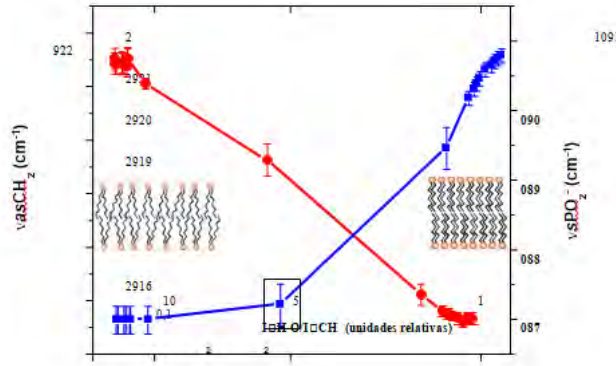

Figura 5. Efecto del contenido de agua sobre los grupos νs PO_2^- (cuadrado azul) y νas CH_2 (círculo rojo) de DPPC inicialmente en fase liquido cristalina (50 °C).

Resultados publicados recientemente indican que existe cierto grado de cooperatividad entre los distintos sitios de hidratación durante los procesos de adsorción, en el sentido de que la ocupación de la región de los grupos fosfatos (-PO_2-) y/o cadenas acílicas es diferente según el estado de la fase, la longitud de la cadena, la presencia de los grupos carbonilo, tipo de cabeza polar y dobles enlaces (Rosa *et al.*, 2019).

La espectroscopía infrarroja permite analizar temperaturas de transición termotrópicas de distintos tipos de lípidos, mezclas lipídicas y el efecto sobre ellas de varios efectores en forma similar a los obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC).

En la Figura 6 se muestra la variación de la temperatura de transición con el porcentaje de humedad relativa seguido en los grupos -CH_2. La transición con la temperatura se desplaza a valores mayores con la disminución del contenido de agua en el rango de HR probado (30 a 100%) cuando se focaliza el grupo metileno (-CH_2).

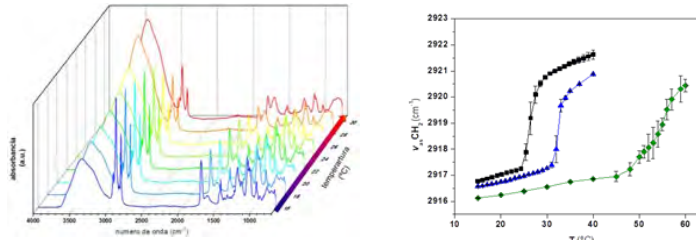

Figura 6. A) Evolución de los espectros de DMPC en función de la temperatura a una aw=1. B) Efecto de la temperatura en la vibración asimétrica de los grupos metilenos (-$CH_{2)}$ para DMPC a diferentes humedades relativas 100% (cuadrados negros), 75% (triángulos azules) y 30% (diamantes verdes).

Los diferentes perfiles de absorción de agua a diferentes HR pueden estar relacionados con la organización del agua en las regiones de la membrana lipídica compuestas por grupos fosfato, carbonilo y metileno donde la interacción del agua es de diferente naturaleza y fuerza. Por lo tanto, es importante seguir los cambios de fase en cada una de esas regiones.

En la Figura 7 se analiza el efecto de la temperatura sobre la vibración simétrica de los grupos fosfato (-PO2-) de bicapas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) con un largo de cadena de 14:0 a diferentes humedades relativas.

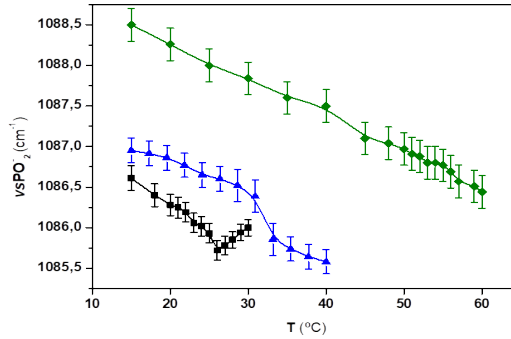

Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la vibración simétrica de los grupos fosfato (-PO2-) para DMPC a diferentes humedades relativas 100% (cuadrados negros), 75% (triángulos azules) y 30% (diamantes verdes).

Los resultados muestran que, para un 100% de HR, el vs PO_2- disminuye hasta una temperatura cercana a la de transición de fase de los lípidos, lo que es indicativo de un aumento de la absorción de agua en el grupo PO. Más allá de ese punto, el vs PO_2- aumenta, lo que señala que el proceso de hidratación no está favorecido por la temperatura en el estado líquido cristalino (cuadrados negros).

Por otra parte, si se observa el comportamiento del agua presente en el sistema, resulta evidente que esta refleja en su estructura la transición sufrida por la matriz lipídica. En Figura 8 se observan las componentes de la banda de agua pura y en presencia de DMPC.

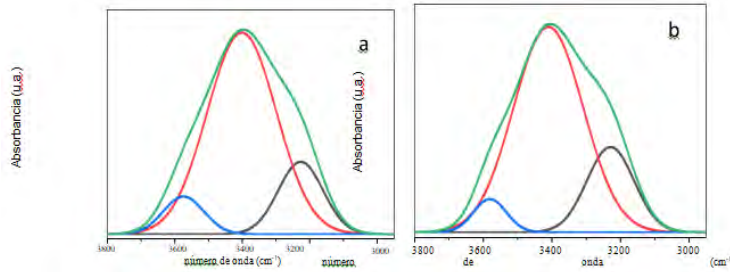

Figura 8. Componentes de las bandas de agua correspondiente al estiramiento -OH entre 3800 a 3000 cm^{-1} para agua pura (a) y DMPC (b) a 20 °C.

El estiramiento -OH del agua líquida es la principal región utilizada para comprender su organización molecular (4000-3000 cm^{-1}). La fuerza del enlace de hidrógeno depende de la naturaleza cooperativa / anti-cooperativa de los enlaces puente hidrógeno circundantes, con los enlaces de hidrógeno más fuertes que dan las frecuencias vibratorias más bajas. Diferentes fosfolípidos asocian el agua en modos particulares de acuerdo con sus estructuras. Por lo tanto, podemos usar el agua como un espejo del estado de la membrana en este tipo de sistemas biológicos.

A 20 °C, los espectros correspondientes al agua pura (Figura 8a) muestran tres especies bien definidas centradas en 3230 $cm^{-1;}$ 3400 cm-1 y 3580 $\pm$ 5 cm^{-1}, relacionados con el número de enlaces H concertados por cada molécula de agua. La población a la frecuencia más alta es compatible con el monómero de agua a lo largo de las cadenas acílicas. El centrado que ocurre alrededor de 3400 cm^{-1} correspondería a moléculas de agua coordinadas con menos de cuatro enlaces H (probablemente alrededor de los grupos de colina). Finalmente, la población con menor frecuencia puede asignarse a moléculas de agua fuertemente unidas. Por lo tanto,

las especies de agua se pueden clasificar tentativamente en moléculas de agua no unidas (nHB), moléculas de agua débilmente unidas (iHB) y moléculas de agua fuertemente unidas (sHB) considerando el número de enlaces de H que pueden concertar con sus vecinas.

El análisis de la banda correspondiente al estiramiento vibracional simétrico de los grupos metilenos (-CH_2) de las cadenas acílicas y las bandas de agua por debajo y por encima de la transición de fase de los lípidos da un fuerte apoyo a la formación de los bolsillos de agua en la matriz lipídica (Alarcón et al., 2016). La formación de estas regiones determina la presencia de poblaciones de diferentes especies de agua, caracterizada por su grado de coordinación de enlace hidrógeno en lípidos en estado líquido cristalino, ya sean saturados o insaturados (Disalvo *et al.*, 2013)

La consideración del agua como un componente estructural de las membranas biológicas, específicamente sus propiedades superficiales y de fase, es relevante para definir los pasos en los procesos de hidratación-deshidratación. Esto implica la interdependencia del grado de hidratación y la dinámica de distintos grupos químicos de los componentes de membrana durante el estrés osmótico e hídrico y la interacción de los efectores biológicos con la membrana.

2.- Determinación de diferentes tipos de agua por espectroscopía de fluorescencia. Influencia del colesterol

Dr. Pérez, Hugo A.

En 1979, Gregorio Weber sintetizó varios derivados del naftaleno sensibles a la polaridad, diseñados para estudiar el estado físico de los lípidos en sistemas de membranas modelo (L A Bagatolli, 2012; Lakowicz, 2006). Entre ellos, el 6-decanoil-2- (N, N-dimetilamino) naftaleno (Laurdan) (Figura 9a) se ubica en la región interfacial hidrofóbica/hidrofílica cerca del grupo carbonilo del fosfolípido, lo que la convierte en una de las sondas de membrana más utilizadas debido a su alta sensibilidad al estado de fase de las membranas (Bagatolli, 2015; Golfetto et al., 2013; Parasassi *et al.*, 1993; Pérez *et al.*, 2019; Pérez *et al.*, 2020).

La fluorescencia del Laurdan depende de la polaridad del entorno. El cambio del dipolo del fluoróforo al excitarse promueve una organización del solvente alrededor del mismo, en este caso agua (Bagatolli *et al.*, 1999). La reorientación de los dipolos del agua alrededor del dipolo en estado excitado de Laurdan (Figura 9b) proporciona información sobre la estructura del agua. La energía requerida para esta reorientación da como resultado un desplazamiento hacia el rojo del espectro de emisión de fluorescencia.

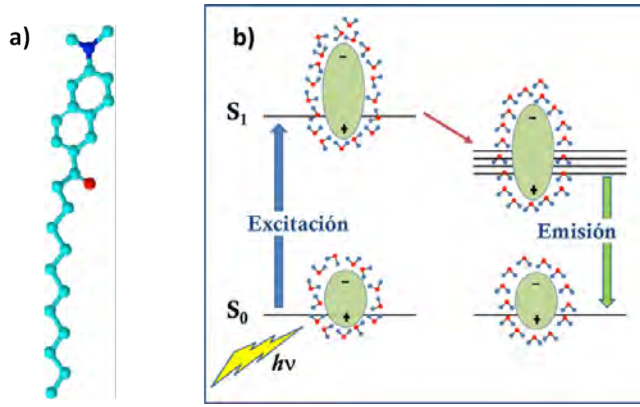

Figura 9. a) Estructura molecular de Laurdan. b) Representación del proceso de relajación dipolar de Laurdan con las moléculas de solvente.

Como se explicó en la sección anterior, las membranas presentan una transición de fase gel a líquido cristalino a una dada temperatura según el fosfolípido que la compone. En esta transición se observa un desplazamiento desde 440 nm hacia el rojo del espectro de emisión de la sonda cerca de 480 nm (Parasassi et al., 1993; Pérez *et al.*, 2021; Pérez *et al.*, 2019; Pérez *et al.*, 2020) (Figura 10a). En base a estos desplazamientos se define un parámetro radiométrico denominado Polarización Generalizada (GP), ecuación 1.

$$GP = \frac{I_{440} - I_{480}}{I_{440} + I_{480}} \quad (1)$$

donde I440 e I480 son las intensidades del máximo de emisión de Laurdan en fase gel y líquido cristalino, respectivamente. La Figura 10b muestra el cambio de GP en función de la temperatura para DPPC.

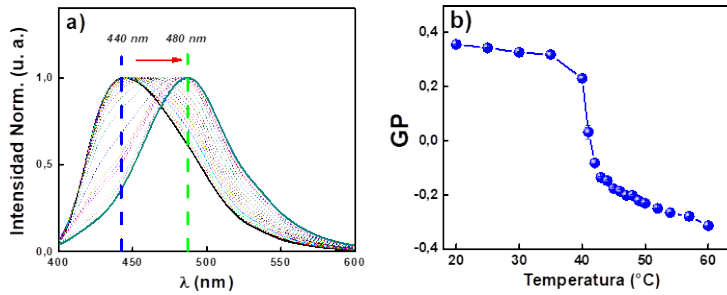

Figura 10. a) Espectros de emisión de Laurdan en vesículas de DPPC en función de la temperatura, desde 11 °C (línea negra) hasta 40 °C (línea cian oscuro). b) Transición de fase de DPPC determinado por la variación de GP con la temperatura.

Resultados recientes mostraron que la penetración del agua es responsable de la relajación dipolar observada por Laurdan en la fase líquida cristalina de bicapas de DPPC. El aumento del porcentaje de colesterol (Col) desplaza el espectro de emisión de Laurdan hacia menores longitudes de onda, lo que se interpretó como consecuencia de una disminución de la polaridad debido al aumento de la rigidez en la membrana por Col. Sin embargo, un desplazamiento similar se observó cuando disminuye el porcentaje de agua en octanol, solvente con propiedades similares a una membrana lipídica en la cual no hay efectos de empaquetamiento (Figura 11). De esta forma, se concluye que los cambios de fluorescencia del Laurdan se deben a la relajación del entorno de agua (Pérez *et al*., 2019).

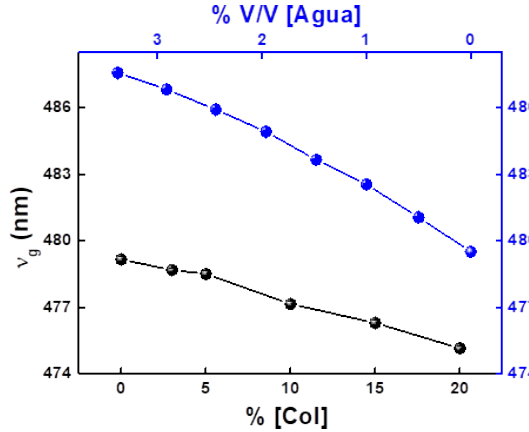

Figura 11. Centro de masa de emisión de Laurdan en función del porcentaje de Col en vesículas de DPPC en fase líquido cristalino (círculos negros) y en función del porcentaje de agua en octanol (círculos azules). Figura tomada de la referencia (Pérez *et al.*, 2019).

En una membrana lipídica, el agua está organizada en sitios de hidratación como los residuos del grupo fosfato (PO) y grupo carbonilo (CO) de los fosfolípidos y entre las cadenas hidrocarbonadas tal como se esquematiza en la Figura 1.

En particular, los grupos carbonilo están ubicados en un plano que corre a lo largo del grupo glicerol y parecen tener una influencia especial en las propiedades interfaciales, ya que su afinidad por el agua puede modificarse por la curvatura, el estado de fase y otras características topológicas (Frías y Disalvo, 2009). Por lo tanto, su presencia puede modular la hidratación relativa de los grupos fosfato y de las cadenas acílicas.

Utilizando las propiedades de fluorescencia del Laurdan arriba descriptas, se compararon los valores de GP en vesículas formadas por éster lípidos (DMPC) y por éter lípidos (14:0 diéter PC).

Los resultados demostraron que los valores de GP para 14:0 diéter PC son menores que en el éster PC en todo el rango de

temperatura (Figura 12), lo que indica que la relajación dipolar del entorno que rodea la sonda es mayor en el éter lípido. En otras palabras, existen dipolos de agua con menor energía de interacción entre ellos y con la membrana.

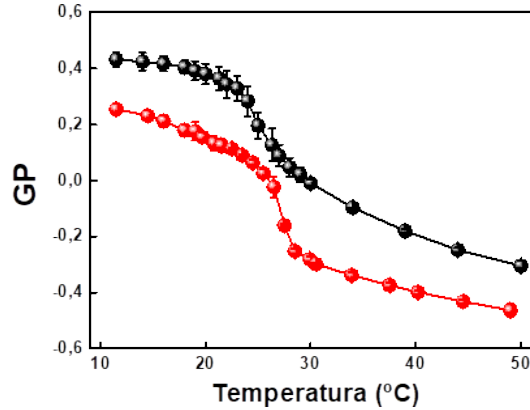

Figura 12. Valores de GP de Laurdan en vesículas de éster-lípido (DMPC) (círculos negros) y 14:0 diéter PC (círculos rojos) en función de la temperatura.

El análisis de las propiedades del agua en la interfase lipídica puede realizarse mediante el método de deconvolución de los espectros de emisión de Laurdan (Bacalum et al., 2013; Zorila et al., 2016). Este consiste en desdoblar el espectro de emisión en dos componentes: una banda centrada en 445 nm y otra banda centrada en 480 nm, denominadas poblaciones no relajadas y relajadas, respectivamente. Para vesículas de DMPC en fase gel, las poblaciones no relajadas presentan mayor contribución en la emisión del Laurdan que las poblaciones relajadas. Contrariamente, en fase líquido cristalino, las poblaciones relajadas tienen mayor contribución en comparación a las poblaciones no relajadas. Para vesículas formadas por éter PC, las contribuciones de las poblaciones relajadas son mayores a las

de su análogo éster PC independientemente del estado de fase en el que se encuentren (Figura 13).

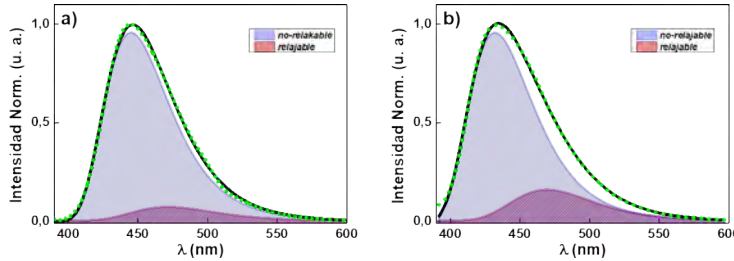

Figura 13. Deconvolución del espectro de emisión de Laurdan en vesículas en fase gel. a) DMPC y b) 14:0 diéter PC.

Los resultados se pueden interpretar postulando que las moléculas de agua en vesículas de DMPC podrían unirse a los grupos PO y CO formando un puente de agua (Ohto et al., 2015; Pérez et al., 2020). Dicho puente estaría restringiendo la movilidad de las moléculas de agua en la interfase lipídica. En ausencia de CO, las moléculas de agua tienen menos restricciones para rotar ya que estarían unidas solo al grupo fosfato, con el consiguiente aumento de la población relajable (Pérez *et al.*, 2020)(Figura 14).

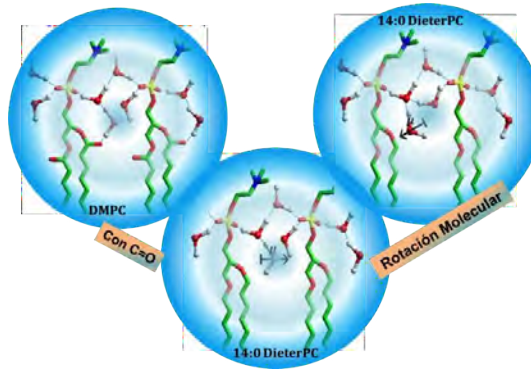

Figura 14. Formación de un puente de agua intramolecular entre los grupos PO y CO en DMPC. En 14:0 diéter PC, la molécula de agua unida al PO puede rotar alrededor del enlace H reorientando al dipolo de agua con respecto al plano de la membrana. Figura tomada de la referencia (Pérez et al., 2020).

La presencia de Col tanto en vesículas de DMPC como de 14:0 diéter PC cambia la distribución de moléculas de agua y, en consecuencia, genera un aumento en la población no relajable. Estas moléculas de agua interaccionan de manera diferente con el Col si el grupo CO está presente en el lípido. En DMPC el puente de agua entre el grupo PO y CO forma un puente hidrógeno con el grupo oxidrilo (OH-) del Col (Figura 15a). En cambio, en vesículas de 14:0 diéter PC, se forma un puente de agua entre el grupo PO y el OH- del Col tal como se observa en la Figura 15b (Pérez *et al.*, 2021).

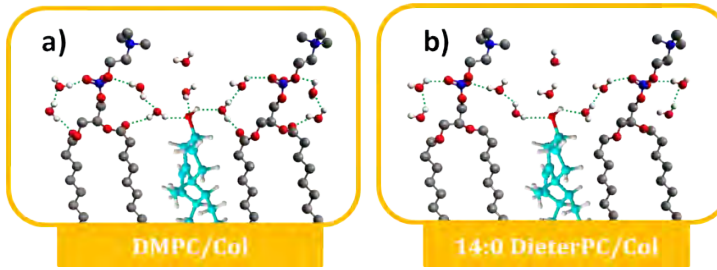

Figura 15. Representación de la formación del puente hidrogeno: a) entre el puente de agua PO y CO del DMPC y el grupo OH del Col y b) formación del puente de agua entre el PO del 14:0 diéter PC y el OH- del Col.

Influencia de factores físicos y químicos sobre la hidratación de membranas. Estudios en monocapas lipídicas

Lic. Cejas, Jimena del Pilar.

Si consideramos la zona de interfase de la Figura 1 como un sistema abierto, el agua es un componente intercambiable cuando una monocapa lipídica es sometida a estrés mecánico por cambios en la presión lateral o cuando las bicapas están bajo estrés osmótico. Las fluctuaciones y propiedades dinámicas que tienen lugar en la membrana lipídica sometidas a estas fuerzas afectan directamente los mecanismos de inserción de bioefectores de diferente naturaleza (Frías y Disalvo, 2020). En este sentido, es interesante analizar comparativamente, las propiedades de hidratación de las membranas compuestas por diferentes estructuras químicas de lípidos, a partir de las propiedades de compresibilidad de la interfase lipídica.

Teniendo en cuenta las propiedades de hidratación descriptas en los puntos anteriores es de interés analizar sus consecuencias sobre las propiedades mecánicas y eléctricas en monocapas y bicapas. Un parámetro importante para obtener información de la monocapa es la determinación de la presión superficial, que se obtiene experimentalmente como:

$$\Pi = \gamma_0 - \gamma \qquad (2)$$

donde $\gamma 0$ es la tensión superficial del agua pura y γ corresponde a la tensión superficial en

presencia del lípido adsorbido.

$$\gamma = (\partial G / \partial A)_T$$

La tensión superficial está dada por la primera derivada de la energía libre (G) con respecto al área superficial (A) a temperatura constante, como se muestra a continuación:

Es decir, la presión superficial es una medida del cambio en la energía libre de las moléculas de agua superficial antes y después de la adsorción de lípidos. Esta reducción neta en la energía libre de las moléculas de agua superficial se debe a la interacción de las moléculas de agua con los grupos polares de las moléculas de lípidos.

Uno de los indicadores más importantes de las propiedades de una monocapa se obtiene midiendo la presión superficial (Π) en función del área molecular (A) a temperatura constante, lo que se conoce como isotermas de compresión. A través de barreras móviles, se comprimen a una velocidad constante los lípidos esparcidos en la interfase aire-agua (Figura 16a). De este modo, a una dada área crítica, se forma una monocapa que es sensible a la compresión lateral, donde las moléculas quedan empaquetadas en distintos estados de fase, dependiendo de la presión a la que son sometidas a temperatura constante.

En la Figura 16b se muestra una isoterma de compresión de una monocapa de Langmuir de DPPC, en el cual las coexistencias de fase se ponen de manifiesto observando los cambios en la pendiente de las isotermas de compresión.

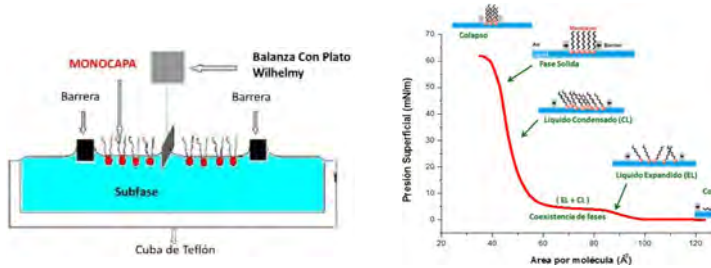

Figura 16. Compresión de una monocapa de lípidos extendidos en una superficie agua-aire. a) Balanza de Langmuir con plato de Wilhelmy para medir presión superficial en función del área. b) Isoterma de compresión de una monocapa de DPPC. Se incluye un esquema de la estructura de los lípidos en cada una de las fases indicadas en la figura.

De acuerdo con la terminología de las diferentes fases de la monocapa, introducida por Harkins *et al.* (1940) y Dervichian (1939), a medida que disminuye el área por molécula, con un consecuente aumento de presión, la monocapa pasa a un estado conocido como fase líquido expandida (LE) y posteriormente a mayor presión a una fase líquido condensada (LC) o un estado sólido. Idealmente, en la coexistencia de fase LE-LC se observa una meseta. A medida que la presión va en aumento, la fase líquida condensada es menos compresible. La fase sólida es muy poco compresible y, si continúa aumentando la presión, se llega al colapso de la monocapa, punto en el cual la presión no puede seguir aumentando sin que los fosfolípidos escapen a la fase acuosa (Córsico *et al.*, 2013).

(3)

$$C^{-1} = -A\left(\frac{\partial \Pi}{\partial A}\right)_T$$

Las propiedades de compresibilidad de las monocapas, sus correspondientes estados de fase y sus transiciones se pueden

determinar mediante los valores y variaciones del módulo de compresibilidad (C-1), dado por la siguiente ecuación (Vollhardt y Fainerman, 2006):

Por lo tanto, las propiedades de compresibilidad de monocapas para cada lípido se pueden determinar a partir de la derivada de las isotermas Π vs A.

Cuanto mayor es el valor de C^{-1}, menor tendencia a comprimirse (ej. fase LC), y viceversa, bajos valores de C^{-1} indican que la monocapa es más laxa (ej. fase LE).

En la Figura 17A se muestran las curvas C-1 vs A para las monocapas de DMPC y 14:0 diéter PC, que difieren en su estructura química por la presencia o ausencia de los grupos carbonilo (CO), respectivamente. La Figura 17B refleja el efecto del incremento de colesterol, en la compresibilidad de las monocapas de DMPC.

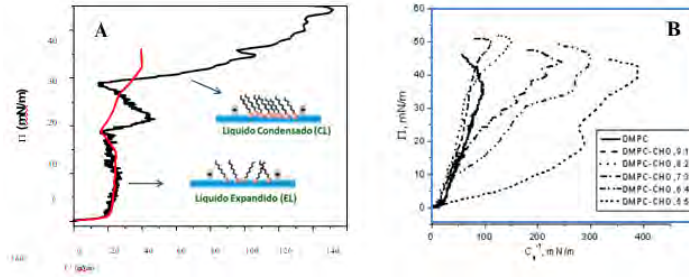

Figura 17. A) Presión superficial vs módulo de compresibilidad para DMPC (línea negra) y 14:0 diéter PC (línea roja) a 15ºC. Adaptada de la referencia (Pérez et al., 2020). B) Presión superficial vs C^{-1} para DMPC a diferentes relaciones de Colesterol a 25ºC. Adaptada de la referencia (Mocanu *et al.*, 2010).

La ausencia de grupos carbonilo afecta significativamente el perfil de compresibilidad (Fig. 17A). La ausencia del pico alrededor de 25 mN/m para 14:0 diéter PC refleja que la compresibilidad está afectada por la organización del agua relacionada

a la formación de enlaces H con los grupos PO y CO, los que le confieren al agua diferentes propiedades de relajación (ver Figura 13 de la sección anterior).

Como se mencionó en la sección anterior, la presencia de colesterol afecta el contenido de agua en la membrana (Pérez *et al.*, 2020; Pérez *et al.*, 2021). En la Figura 17B, el incremento de C-1 en presencia de colesterol en las monocapas de DMPC evidencia el efecto de condensación como resultado del ordenamiento de la cadena y la estabilización de las estructuras mixtas. Los enlaces de hidrógeno entre las moléculas de colesterol y DMPC mediadas por agua (Pérez *et al.,* 2021) da como resultado una mayor densidad de empaquetamiento (Mocanu *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista termodinámico, la presión superficial de la monocapa (π) puede expresarse como una función de la actividad de agua superficial (a_W) por la siguiente ecuación tomando a la monocapa como un gas ideal:

$$\Pi = -\Gamma_{\mathbf{w}} \mathrm{RT} \ln a_{\mathbf{w}} \qquad (4)$$

propuesta por Defay-Prigogine (Defay y Prigogine, 1956; Damodaran, 1998; Disalvo et al., 2013), donde Γw es el número de moles de moléculas de agua por unidad de área de la interfase. La dependencia de ϖ con aW fue modificada de acuerdo con el formalismo de Termodinámica de Procesos Irreversibles (TIP) teniendo en cuenta la interacción lípido agua y agua lípido (Pinto y Disalvo, 2019).

La disminución en la actividad del agua puede ser causada por la absorción de bioefectores a la monocapa que desplazan a las moléculas de agua o interaccionan con ellas (Rao y Damodaran, 2000). Cuando efectores biológicos (antioxidantes, péptidos, etc.) se inyectan en la subfase de la monocapa e interactúan con esta, se genera un aumento (perturbación) en la presión superficial $\Delta\Pi$ (Figura 18).

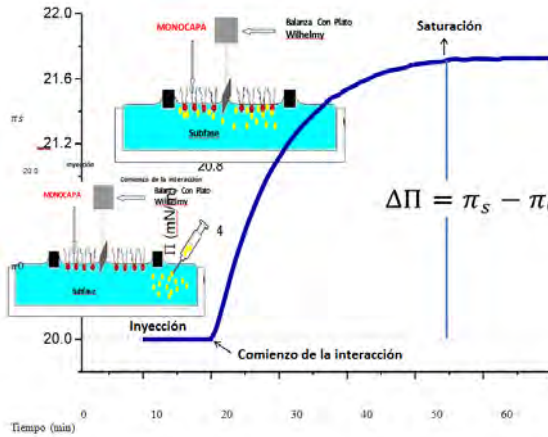

Figura 18. Esquema de una monocapa lipídica y la variación de presión superficial (ΔΠ) luego del agregado de un bioefector en la subfase acuosa.

Los cambios de presión superficial en función de la concentración del bioefector en la subfase, en condiciones de equilibrio, se pueden representar por una isoterma de adsorción tipo Langmuir:

$$\theta = \frac{\Delta\Pi}{\Delta\Pi_{max}} = \frac{[E]^r}{K_d + [E]^r} \qquad (5)$$

donde θ es el grado de cobertura, $\Delta\Pi_{max}$ es el valor de saturación de la presión superficial, [E] es la concentración del bioefector en la subfase, K_d es la constante de disociación y r es el parámetro de heterogeneidad que describe el ancho de la función de distribución de energía, que es 1 para un comportamiento de Langmuir. Los cambios de presión superficial para distintos agregados de bioefector (Figura 19A) pueden ser ajustados según la ecuación 5 mediante la cual se puede cuantificar la afinidad por la membrana ($K_a = K_d^{-1}$) y el valor de r.

La región de la interfase, junto con las colas hidrofóbicas, es una barrera cinética para la permeabilidad de los solutos polares y la absorción de moléculas. La cinética de interacción de una determinada molécula con una monocapa lipídica permiten dilucidar las fuerzas que priman en la interacción.

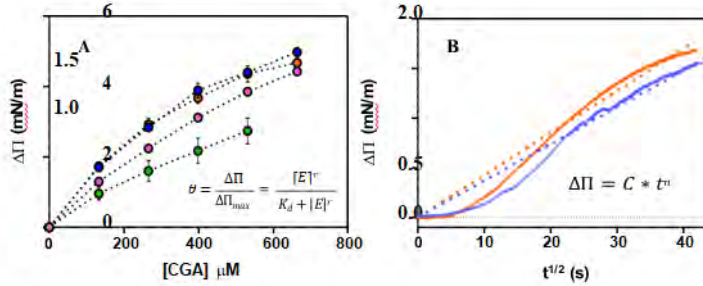

Figura 19. A) Cambios en la presión superficial en función de cantidades crecientes de ácido clorogénico (CGA) en la subfase de monocapas de DMPC (símbolos naranjas); 14:0 diéter PC (símbolos azules), DPPC (símbolos verdes) y 16:0 diéter PC (símbolos magenta). B) Cambios en la presión superficial en función del tiempo expresado como tiempo1/2, después de la adición de 140 μM de CGA a la subfase de monocapas de DMPC (línea naranja), 14:0 diéter PC (línea azul). Gráficas tomadas de Cejas *et al.*, 2020.

Cuando los procesos de adsorción de moléculas a una interfase son controlados por la difusión, la presión superficial puede estar relacionada con el coeficiente de difusión D, que es una función del tiempo expresada por la segunda solución de la ley de Fick según:

$$\Pi = \frac{2RTC_b}{\pi^{1/2}} D^{1/2}\, t^{1/2} \qquad (6)$$

donde la concentración *bulk* del soluto (C_b) permanece efectivamente constante durante el proceso.

Por lo tanto, se pueden caracterizar los procesos de velocidad mediante el coeficiente de relajación n según la siguiente

ecuación empírica (Crank, 1979):

$$\Delta\Pi = C * t^{n} \qquad (7)$$

donde $C = 2RTC_b D^{1/2} \varpi^{-1/2}$. Las constantes C y n son determinadas a partir de análisis de regresión ajustando las curvas $\Delta\Pi$ vs tiempo a la Ecuación 7.

Si n = 0.5 y se grafica $\Delta\Pi$ vs tiempo1/2, se obtiene un comportamiento lineal que corresponde a un proceso fickeano (línea punteada en la figura 19B), es decir, el coeficiente es constante durante el proceso.

Sin embargo, las curvas experimentales para la interacción de CGA en monocapas de éster o éter lípidos dan valores de $n \neq 0.5$ (líneas continuas en la Figura 19B). Este tipo de desviaciones del comportamiento fickeano se consideran asociadas a los cambios del coeficiente de difusión a lo largo del proceso, que pueden relacionarse con una modificación en la matriz lipídica durante el proceso de adsorción. Este comportamiento no fickeano de CGA puede adjudicarse a las interacciones específicas de CGA con los grupos CO y/o PO de la matriz lipídica de éster o éter lípidos (Cejas *et al.*, 2020).

Para demostrar una dependencia del coeficiente n con el estado de la membrana, se analiza el efecto de la presión superficial y la relación de colesterol.

En la Figura 20A, se observa que el patrón cinético evoluciona de un proceso no fickeano ($n > 0.5$) a un proceso fickeano ($n = 0.5$) al pasar de presiones bajas a altas. En la Figura 20B es evidente que el aumento de colesterol modifica el comportamiento a un proceso fickeano.

Teniendo en cuenta que la presión superficial sobre la monocapa fija la actividad del agua en la interfase, se puede concluir que el proceso fickeano se manifiesta cuando el agua disminuye en la membrana ya sea por aumento de la presión superficial o por aumento del colesterol. Es decir, la relajación que implica un proceso no fickeano está relacionada con la

presencia de agua y su reorganización.

a) b)

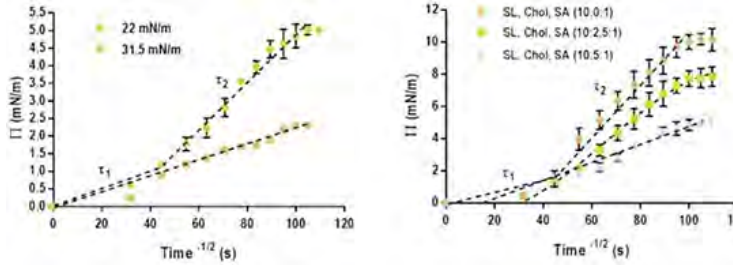

Figura 20. Efecto sobre el patrón de difusión en la interacción de una proteína de superficie con monocapas de PC/SA a diferente: A) Presión superficial 22 mN/m (círculos verdes) y 31.5 mN/m (cuadrados naranjas) y B) diferente relación molar de colesterol: Chol 0 (círculos naranjas); 2.5 Chol (cuadrados verdes); 5 Chol (triángulos azules) (adaptado de Disalvo *et al.*, 2013.)

Consecuencias de la hidratación sobre las propiedades superficiales de membranas lipídicas

Lic. Soria, Noelia A., Dra Lina Mohtar

El modelo basado en la solución bidimensional de cabezas polares con sus capas de hidratación (Figura 1) implica la organización del agua y de los grupos polares en la denominada interfase dando lugar a una asimetría de cargas y polarización de dipolos. Esta reorganización produce una caída del potencial eléctrico entre el plano de la interfaz agua-lípido hasta el seno de la solución acuosa. Los potenciales eléctricos asociados a esta interfase de las membranas son: (ψ_s) potencial superficial y (ψD) potencial dipolar. Estos en cada lado de la bicapa contribuyen al denominado ($\Delta\psi$) potencial transmembrana (Clarke, 2001).

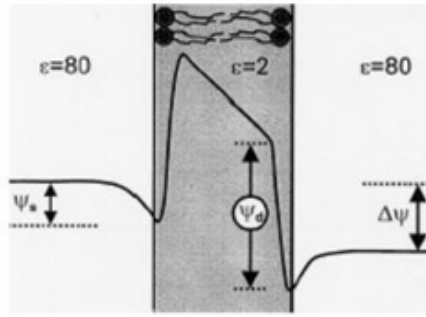

Figura 21. Perfil de potenciales de una bicapa conteniendo 20 mol % de lípidos negativos. (ψ_s) potencial superficial, (ψD) potencial dipolar y ($\Delta\psi$) potencial transmembrana (adaptado de Clarke, 2001).

El potencial superficial tiene consecuencias muy importantes en la estabilidad y función de las biomembranas. El componente de cargas netas de los fosfolípidos constituye un potencial electrostático que afecta la interacción de proteínas, la

conductancia de canales iónicos, la interacción entre membranas, la unión de drogas y la actividad de ciertas enzimas entre otros procesos relacionados (McLaughlin *et al*., 1989).

Si la bicapa lipídica se considera como una delgada película de material no conductor, puede describirse como un simple capacitor cuya capacitancia está dada por la ecuación:

$$C = \varepsilon\, \varepsilon^{o\, A/d} \qquad (8)$$

donde (d) es la distancia que separa los dos planos interfaz agua-lípido (d = 50Å) que encierra la región hidrocarbonada cuya constante dieléctrica (ε) igual a 2; (εo) es la permitividad del espacio libre y A es el área.

Para biomembranas, los valores usuales de capacitancia oscilan alrededor de 1μF/cm2. Este valor no se ajusta al de un capacitor puro. Esto es así porque a la capacitancia y espesor total contribuye también la zona definida como interfase de naturaleza polar (Figuras 1 y 21). Por lo tanto, es importante describir la generación de los potenciales superficial y dipolar en el contexto del modelo de solución bidimensional propuesto.

Potencial Dipolar (Ψ_D)

En general, la permeabilidad de los aniones hidrofóbicos en membranas lipídicas es de varios órdenes de magnitud mayor que los cationes hidrofóbicos. Esto se explica por la presencia de un potencial de carga imagen positivo en el interior de la membrana con respecto al medio acuoso denominado potencial dipolar (ψD). Estructuralmente, este se originaría por dipolos orientados en la interfaz membrana-agua, por las cabezas polares de los fosfolípidos, por las uniones éster de los ácidos grasos con el glicerol y por las moléculas de agua unidas a ellos por uniones hidrógeno (Luzardo *et al*., 2000; Clarke, 2001; Díaz *et al*., 1999).

Las cabezas polares aportan contribuciones negativas y el glicero-acil-éster, positivas. La contribución del agua de hidra-

tación es positiva y es la principal responsable del signo positivo determinado experimentalmente en bicapas totalmente hidratadas (Zheng y Van der Kooi, 1992).

El potencial dipolar se ha asociado a las fuerzas de hidratación, las cuales representan una fuerza repulsiva asociada al volumen excluido de moléculas de agua alrededor de los lípidos. A este potencial se le atribuyen las fuerzas que se oponen al contacto entre membranas durante los procesos de adhesión, adsorción y agregación (Díaz, 1999; Simon, 1989). Por esta razón, el potencial dipolar es una magnitud muy importante cuando se requiere estudiar la adsorción o penetración de bioefectores a una membrana.

Determinación del Potencial Dipolar (Ψ_D)

El potencial dipolar se puede determinar en monocapas lipídicas extendidas sobre una interfase aire–solución (Luzardo et al., 1998). El sistema de medida consiste en un circuito de alta impedancia eléctrica conectando un electrodo de referencia inmerso en la subfase acuosa con un electrodo vibratorio o ionizante según sea el caso sobre la monocapa.

El potencial dipolar se calcula mediante la ecuación:

$$\psi_D = \Delta V = V_{lípido} - V_{solución} \qquad (9)$$

en donde $V_{lípido}$ es el potencial obtenido para la monocapa saturada con lípidos y $V_{solución}$ el potencial medido en la interfaz aire-solución sin lípidos. En estas condiciones, una monocapa de PC presenta un potencial dipolar del orden de los 400 mV. En contraste, para bicapas del mismo lípido los valores obtenidos son del orden de los 227 mV, positivo en el interior. La diferencia entre el potencial dipolar en bicapas o monocapas se adjudica al uso del aire como punto de referencia para las mediciones en monocapas (Clarke, 2001).

Modificaciones de potencial dipolar (ψ_D) por grupos constitutivos y agua polarizada

Las modificaciones en la hidratación de los grupos químicos que componen la zona hidrofílica de los fosfolípidos afectan el potencial dipolar. Si se compara el potencial dipolar de monocapas de DPPC con el de dihexadecilfosfatidilcolina (16:0 diéter PC) que carece de grupos carbonilo, se observa un descenso de 118 mV, desde 227 mV para la DPPC a 109 mV para la 16:0 diéter PC. Esto pone en evidencia la contribución de los grupos carbonilo al ψ_D.

Asimismo, la primera capa de agua polarizada por los grupos carbonilo y fosfato hace una importante contribución al potencial dipolar (Díaz *et al.*, 1999; 2001). Los grupos carbonilo y fosfato en la cabeza polar de los lípidos pueden formar enlaces de hidrógeno a través de sus pares de electrones libres. El agua unida a ellos orienta sus dipolos contribuyendo así al potencial dipolar de la interfase. El agua polarizada puede disminuir en presencia de compuestos polihidroxilados como la trehalosa, que compite por el agua en los sitios de hidratación (Figura 22).

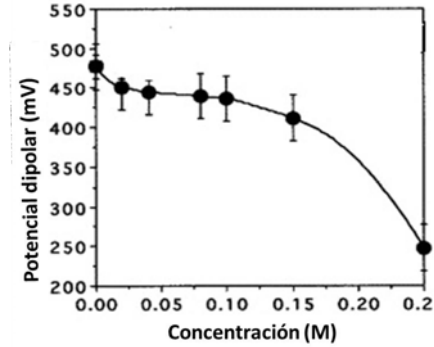

Figura 22. Efecto de la trehalosa (●) sobre el potencial dipolar de las monocapas de DMPC esparcidas en una interfaz aire / solución acuosa a 20 °C. (Figura adaptada de Luzardo, 2000

Determinacion del potencial superficial (potencial zeta)

El potencial superficial (ψ_s) se define como la diferencia de potencial entre la superficie de la membrana y el seno de la solución, y se debe a las cargas fijas presentes en la interfase membrana-agua, por ejemplo, grupos fosfato y aminos. Dichas cargas netas afectan la distribución de iones en la interfase y dan como resultado la formación de una doble capa eléctrica (DCE). Esta distribución de cargas determina el potencial superficial electrostático o de carga (Langner y Kubica, 1999). La DCE está compuesta por al menos dos regiones: una llamada capa Stern o interna de Helmholtz determinada por la adsorción específica de aniones polarizables a la superficie y otra más externa denominada difusa cuyo espesor se define por la longitud Debye y varía con la temperatura.

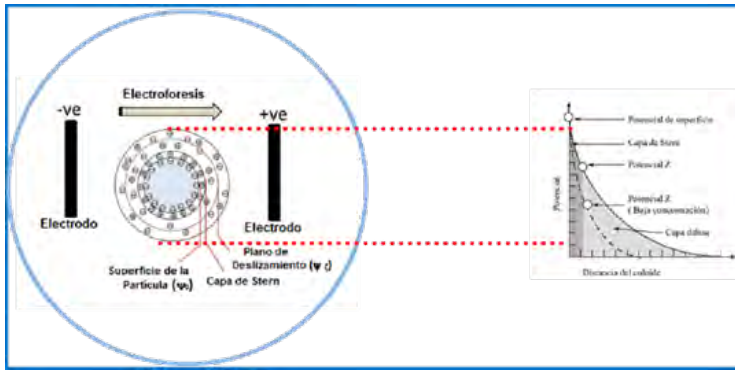

Figura 23. Doble capa eléctrica en una partícula cargada negativamente. A) determinación de la movilidad por electroforesis. B) Caída de potencias entre la superficie de la partícula y la solución (Tomado de Bhattacharjee, 2016).

El potencial eléctrico disminuye con la distancia desde la super-

ficie de la partícula según Ecuación 10:

$$\Psi = \Psi d\ e^{-KX} \qquad (10)$$

donde ψ = potencial de superficie a una distancia x de la capa Stern, ψd = potencial de superficie en la capa Stern, κ = parámetro de Debye-Hückel, x = distancia. Cuando el plano de deslizamiento está muy cerca de la capa Stern, el $\psi d \approx \zeta$ (potencial zeta) y, por lo tanto, la Ecuación (10) queda como la Ecuación (11):

$$\zeta = \zeta d\ e^{-KX} \qquad (11)$$

El parámetro de Debye-Hückel (κ) depende de la fuerza iónica. Por lo tanto, la adición de electrolitos comprime la doble capa y disminuye el potencial de carga.

Cuando se aplica un campo eléctrico continuo, la partícula suspendida se desplaza hacia el electrodo de carga opuesta en relación a su potencial de carga (Figura 23). La relación entre la velocidad de la partícula al campo eléctrico aplicado se denomina movilidad electroforética.

El potencial Zeta (ζ) se calcula a través de la ecuación de Smolowchuvski a partir de los datos de movilidad electroforética (μ) tal como se muestra en la ecuación 12:

$$\zeta = \frac{\eta \mu}{\varepsilon \varepsilon_0} \qquad (12)$$

ε corresponde a la permitividad dieléctrica de la solución acuosa, e_0 la permitividad del

espacio libre y η la viscosidad de la suspensión, respectivamente (Morini *et al.*, 2015).

Su uso está restringido a suspensiones de partículas de diámetro $\geq$ 1 µm en soluciones acuosas de concentración de electrolito relativamente alta ($\geq$10-2M).

El origen del potencial Zeta en membranas lipídicas puede

atribuirse a la orientación de las cabezas polares con respecto al plano de la membrana a una dada temperatura y fuerza iónica tal como se ve en la Figura 23.

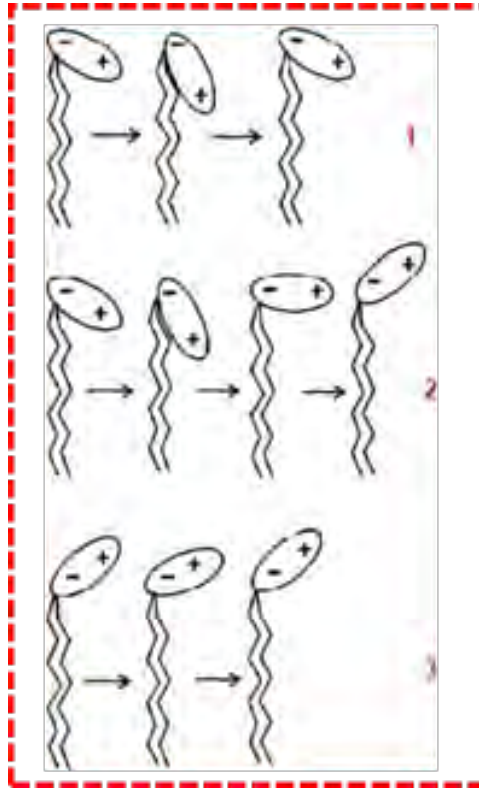

Figura 24. Cambio de dirección del grupo polar del lípido dependiendo de la temperatura en condiciones de baja (1), intermedia (2) y alta (3) fuerza iónica (Tomado de Makino et al., 1991).

Tatulian (1991) adjudica el signo del potencial zeta a la adsorción específica de aniones en la capa de Stern de DMPC según la secuencia ClO4 -,> I-> SCN-> Br-> NO3-,> Cl- = SO42- (Figura 24).

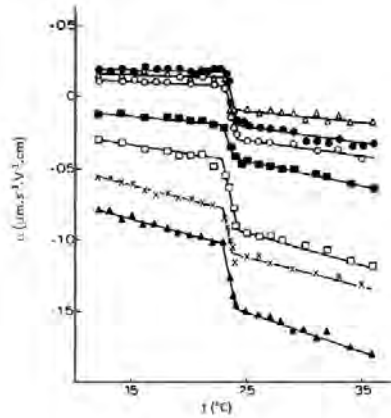

Figura 25. Depencia de la movilidad electroforética de liposomas DMPC con temperaturaen soluciones 0.01 M de K2SO4 (Δ), KCl (•), KNO3 (○), KBr (▪), KSCN (□), KI (x) y KClO4 (▲) a pH 7,4 (Tomado de Tatulian, 1983).

El signo del potencial de superficie en membranas lipídicas no puede predecirse directamente a partir de la composición del grupo de cabeza, ya que varía con el estado de fase y el medio iónico tanto en vesículas multilaminares (MLV) como en las vesículas unilamilares (LUV) según lo reportado por Morini *et al.* (2015).

Cálculo de grado de cubrimiento y afinidad mediante potencial zeta

El grado de cubrimiento (θ) de la superficie externa de liposomas en suspensión se puede determinar a partir de las medidas del potencial zeta, de acuerdo con la ecuación 13:

$$\theta = \frac{(KC)^n}{1+(KC)^n} \qquad (13)$$

donde K es la constante de afinidad y n es el parámetro de heterogeneidad que describe el ancho de la función de distribución de energía, que es 1 para un comportamiento de Langmuir (Lyklema, 2000).

Determinación de la adsorción de iones, aminoácidos y péptidos a membranas lipídicas

La adsorción de Ca2+ a membranas de diferentes composiciones de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) mostró cambios relativos en el valor del potencial zeta como se observa en la Figura 26 (Raffo y Martini, 2010).

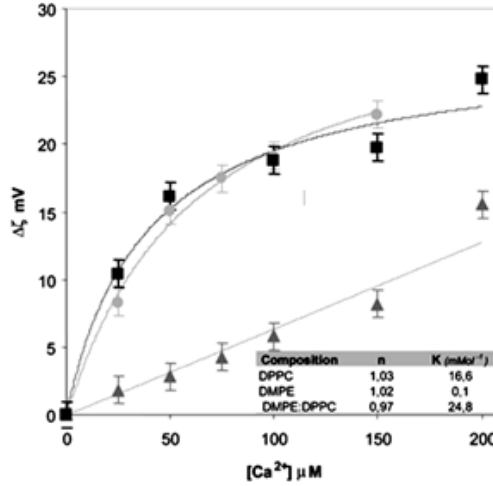

Figura 26. Cambios en potencial zeta de MLV de diferentes composición de lípidos, debido a la presencia de Ca^{2+}:(•) DPPC; (▲) DMPE y (■) DPPC: DMPE (1:1). Tomado de Raffo y Martini (2010).

El parámetro K (Tabla inserta en la Figura 26) muestra diferencias significativas para las diferentes composiciones de lípidos ensayadas. Sin embargo, el parámetro n en todos los casos tuvo un valor ≅ 1, lo que valida un comportamiento de isoterma de Langmuir para la adsorción de Ca^{2+} en los lípidos ensayados.

En la Figura 27 se analiza el comportamiento del potencial zeta en membranas lipídicas de DMPC, DMPE, monometilPE (mmPE) y dimetilPE (dmPE) en presencia de arginina.

Según los valores de K y n reportados en la tabla inserta en la Figura, la unión y la cooperatividad son diferentes en DMPE y con diferente grado de metilación del grupo amino, indicando que la adsorción en PC solo ocurre en estado fluido siguiendo una isoterma tipo Langmuir (n = 1), es decir que la estequiometría de adsorción del soluto al sitio de unión es 1:1.

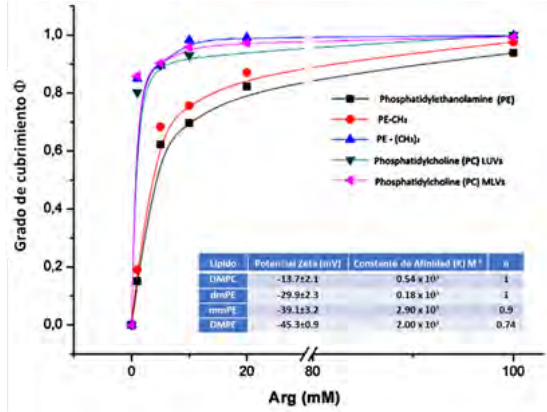

Fig. 27. Isotermas de adsorción para MLV y LUV de lípidos con diferente grado de metilación.La Tabla inserta resume los valores de potencial zeta, constante de afinidad, parámetro de heterogeneidad para la adsorción de arginina en bicapas de lipídicas (Tomado de Disalvo y Bouchet, 2014).

La melitina (ML) es un pequeño péptido catiónico compuesto por 26 residuos de aminoácidos; entre los residuos que la cons-

tituyen se destacan la arginina y la lisina.

En la Figura 28 se muestra el efecto diferencial significativo de la melitina en comparación con Arg-7 y Lys-5 sobre los valores de Pz. En contraste con Lys-5, la melitina muestra un desplazamiento neto a valor positivo en concentraciones muy bajas (Tissera et al., 2019).

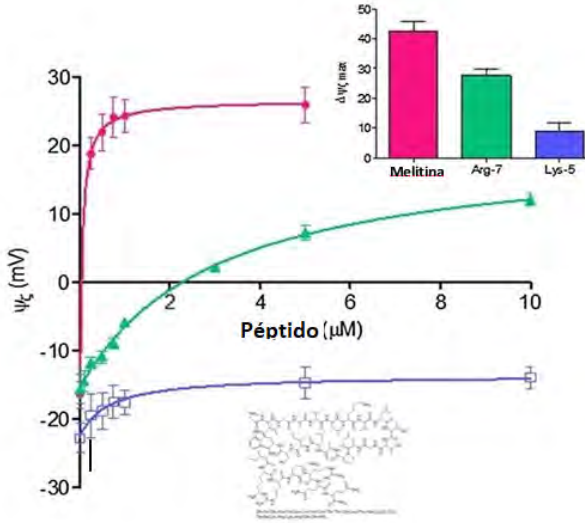

Figura 28. Cambio del potencial zeta de los liposomas DMPC en función de la concentración de péptidos: melitina (●), Arg-7 (▲) y Lys-5 (□). Inserto: Efecto máximo de los péptidos sobre el potencial zeta de los liposomas DMPC para el diferentes péptidos (Tomado de Tissera et al. (2019).

Se concluye que la afinidad de unión de la melitina por DMPC es mayor que la observada para Arg-7 y Lys-5.

caracterización de procesos enzimáticos por medio del potencial zeta (ξ)

Las reacciones de hidrólisis enzimática se pueden estudiar por medio de ξ, por ejemplo, el efecto de la fosfolipasa PLA_2 sobre membranas de fosfatidilcolina. Esta enzima hidroliza el enlace éster sn-2 de los fosfolípidos liberando un ácido graso libre y un lisofosfolípido, y es el ion Ca^{2+} un cofactor esencial para la activación (Qinqin Fei *et al.*, 2018). El ξ cambia con elagregado de este ion hacia valores más positivos en el tiempo, independientemente del lípido con el que se trabaje

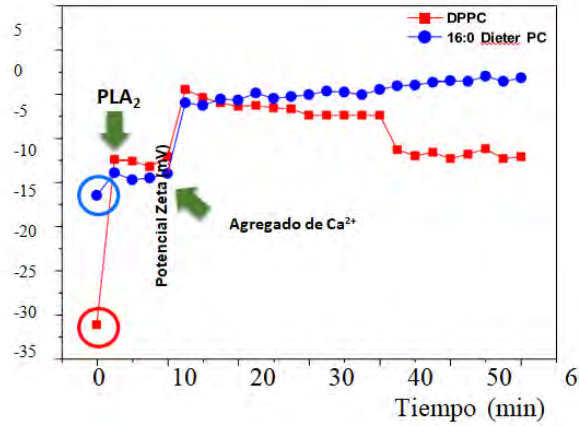

Figura 29.

La Figura 29 muestra que ξ de DPPC y 16:0 diéter PC en presencia de PLA2 son diferentes, luego del agregado de Ca^{2+}. ξ de DPPC evoluciona continuamente a valores negativos a diferencia del 16:0 diéter PC que tiende a un valor de potencial cero. A los 40 min, se produce un cambio significativo en ξ de DPPC hacia valores negativos. Esto puede deberse a una relajación lenta de la estructura de la membrana debido a la

aparición de productos enzimáticos como el ácido palmítico. La ausencia de grupo CO modula el equilibrio de la hidratación entre las cadenas de acilo y los grupos fosfato (Rosa Sebastián *et al.*, 2019) y participa en la formación de defectos según su exposición al medio acuoso, determinando la polaridad de la interfase y la adsorción de Ca^{2+} lo que explicaría en cambio del perfil de ξ (Mohtar *et al.*, 2020)

5.- Conclusión y perspectivas

Los estudios sobre las propiedades del agua en membranas lipídicas por medio de diferentes metodologías permiten concluir que:

El agua está organizada en forma diferente alrededor de los diferentes sitios de hidratación, grupos fosfato, carbonilo y CH2, existiendo una correlación entre los mismos modulada por los grupos carbonilo.

Dicha correlación pone de manifiesto el intercambio entre el agua de hidratación y el agua confinada, lo que da lugar a fluctuaciones en la polaridad de la interfase. Las moléculas de agua en vesículas de DMPC podrían unirse a los grupos PO y CO formando un puente de agua que restringe la movilidad de las moléculas de agua. En ausencia de CO, las moléculas de agua estarían unida solo al grupo fosfato, con lo que aumenta así la población polarizable.

El intercambio entre los distintos tipos de agua puede ser modificado por la presión lateral y por el contenido de colesterol tanto en membrana con y sin carbonilos presentes. La ausencia de grupos carbonilo afecta significativamente el perfil de compresibilidad.

El agua como componente estructural de las membranas biológicas determina propiedades superficiales (potencial dipolar) y de fase de las membranas lipídicas.

Existe interdependencia entre el grado de hidratación y la dinámica de distintos grupos químicos de los componentes de membrana durante el estrés osmótico e hídrico y también interacción de los efectores biológicos con la membrana.

Desde el punto de vista termodinámico, la presión superficial de la monocapa (ϖ) puede expresarse como una función de la actividad de agua superficial (aW). Esta dependencia afecta el proceso de adsorción de bioefectores en el cual la relajación, que implica un proceso no fickeano, está relacionada con la reorganización del agua interfasial. Esta relajación es modulada por aumento de la presión superficial o por aumento del colesterol. Es decir, la ausencia de grupos CO modula el equilibrio de la hidratación entre las cadenas de acilo y los grupos fosfato y participa en la formación de defectos según su exposición al medio acuoso, determinando la polaridad de la interfase y la adsorción de Ca^{2+} y la actividad de ciertas enzimas hidrolíticas superficiales.

Estos estudios en sistemas biomiméticos son la base para comprender las respuestas de sistemas complejos como células enteres (bacterias, vegetales, etc.) en procesos metabólicos y bajo estrés hídrico y oxidativo.

Bibliografía

Alarcón, L. M., de los Ángeles; Frías, M.; Morini, M. A.; Sierra, Belén M.; Appignanesi, G. A. y Disalvo, Aníbal E. (2016). "Water populations in restricted environments of lipid membrane interphases". *European Physical Journal E.* 39(10), pp.

Barth, A. y Zscherp, C. (2002). "What vibrations tell us about proteins". *Quarterly Reviews of Biophysics.* 35(4), pp. 369-430.

Bhattacharjee, Sourav (2016). "DLS and zeta potential – What they are and what they are not? Review". *Journal of Controlled Release.* (235), pp. 337–351.

Binder, H. (2007). "Water near lipid membranes as seen by infrared spectroscopy". *European Biophysics Journal.* (36), pp. 265-279.

Blume, A.; Hiibner, W. y Messner, G. (1988). "Fourier Transform Infrared Spectroscopy of13c=0-labeled Phospholipids Hydrogen Bonding To Carbonyl Groups". *Biochemistry*, 27(21), pp. 8239–8249.

Cejas; J. P.; Rosa, A.S.; Nazareno, M. A.; Disalvo, E.A. y Frías, M. A. (2020). "Interaction of chlorogenic acid with model lipid membranes and its influence on antiradical activity". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 1863(1), pp. .

Clarke, R. J. (2001). "The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection". *Advances in Colloid and Interface Science.* (89-90), pp. 263-281

Córsico, B.; Falomir Lockhart L. J.; Franchini, G. R. y Scaglia, N. (2013). *Análisis estructural y funcional de Macromoléculas.* La Plata: Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).

Crank, J. (1979). *The mathematics of diffusion.* Oxford University Press.

Damodaran, K. V. y Merz, K. M. (1994). "A Comparison of DMPC- and DLPE-Based Lipid Bilayers". *Biophys*. J. 66(4), pp. 1076–1087.

Damodaran, S. (1998). "Water activity at interfaces and its role

in regulation of interfacial enzymes: a hypothesis". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 11(5), pp. 231-237.

Defay, R. y Prigogine, I. (1956). Surface *Tension and Chemiadsorption.* New York: Wiley (Interscience).

Del Regno, A. y Notman, R. (2018). "Permeation Pathways through Lateral Domains in Model Membranes of Skin Lipids". *Phys. Chem. Chem.* Phys. 20(4), pp. 2162–2174.

Dervichian, D. (1939). "Changes of phase and transformations of higher order in monolayers". *The Journal of chemical physics.* (7), pp. 931-948.

Díaz, S.; Amalfa, F.; Biondi de López, A. C. y Disalvo E. (1999). "Effect of water polarized at the carbonyl groups of phosphatidylcholines on the dipole potential of lipid bilayers". Langmuir, 15 5179-5182.

Díaz, S.; Lairion, F.; Arroyo, J.; Biondi de López A. y Disalvo, E. (2001). "Contribution of phosphate groups to the dipole potential of dimyristoylphosphatidylcholine membranes". *Langmuir*. (17), pp. 852- 855.

Disalvo, E. y Frías, M. (2013). "Water state and carbonyl distribution populations in confined regions of lipid bilayers observed by FTIR spectroscopy". *Langmuir*. (29), pp. 6969-6974.

Disalvo, E. A. y De Gier, J. (1983). "Contribution of Aqueous Interphases to the Permeability Barrier of Lipid Bilayers for Non-Electrolytes". *Chem. Phys. Lipids.* 32(1), pp. 39–47.

Disalvo, E. A.; Bouchet, A. M. y Frías, M. A. (2013). "Connected and isolated CH2 populations in acyl chains and its relation to pockets of confined water in lipid membranes as observed by FTIR spectrometry". *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes.* 1828(8), pp. 1683-1689.

Disalvo, E. A.; Hollmann, A.; Semorile, L. y Martini, M. F. (2013). "Evaluation of the Defay- Prigogine model for the membrane interphase in relation to biological response in membrane- protein interactions". *Biochimica et Biophysica Acta.* 1828(8), pp. 1834-1839.

Disalvo, E.A. (2015). "Membrane Hydration: A Hint to a New Model for Biomembranes". *Subcellular biochemistry.*

(71), pp. 1-16.

Disalvo, Edgardo y Bouchet, Ana. (2014). "Electrophoretic mobility and zeta potential of liposomes due to arginine and polyarginine adsorption". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* (440), pp. 170-174.

Dynarowicz-Łątka, P.; Dhanabalan, A. y Oliveira, O. N. (2001). "Modern physicochemical research on Langmuir monolayers". *Advances in colloid and interface science.* 91(2), pp. 221-293.

Fitter, J.; Lechner, R. y Dencher, N. (1999). "Interactions of hydration water and biological membranes studied by neutron scattering". . *Phys. Chem.* B. 103(38), pp. 8036–8050

Frías, M. A. y Disalvo, E. A. (2020). "Breakdown of classical paradigms in relation to membrane structure and functions". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.* 1863(2), pp. .

Gennaro, A.; Rosa, A. S.; Cornelis, P.; Pfeiffer, H., Disalvo, E. A.; Wagner, P. y Wübbenhorst,

M. (2019). "A compact device for simultaneous dielectric spectroscopy and microgravimetric analysis under controlled humidity". *Review of Scientific Instruments.* 90(12), pp. .

Gremlich, H.-U. y Yan, B. (2000). Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials. Boca Raton: CRC Press.

Hübner, W. y Blume, A. (1998). "Interactions at the lipid-water interface". *Chemistry and Physics of Lipids.* 96(1–2), pp. 99-123.

Jendrasiak, G. L. (1996). "The hydration of phospholipids and its biological significance". *The Journal of nutritional biochemistry.* (7), pp. 599-609.

Jendrasiak, G. L. y Smith R. L. (2001). "The effect of the choline head group on phospholipid hydration". *J Chemistry Physics of Lipids.* (113), pp. 55-66.

Käsbauer, M.; Junglas, M. y Bayerl, T. M. (1999). "Effect of cationic lipids in the formation of asymmetries in supported bilayers". *Biophysical Journal.* 76(5), pp. 2600–2605.

Käsbauer, Michael y Bayerl, T. M. (1999). "Formation of domains

of cationic or anionic lipids in binary lipid mixtures increases the electrostatic coupling strength of water-soluble proteins to supported bilayers". *Biochemistry*. 38(46), pp. 15258–15263.

Langner, Marek y Kubica, Krystian (1999). "The electrostatics of lipid surfaces". *Chemistry and Physics of Lipids*. (101), pp. 3-35.

Le Saux, A.; Ruysschaert, J. M. y Goormaghtigh, E. (2001). "Membrane molecule reorientation in an electric field recorded by attenuated total reflection Fourier-transform infrared spectroscopy". *Biophysical Journal*. 80(1), pp. 324-330.

Lewis, R. N. A. y Mcelhaney, R. N. (2007). "Fourier transform infrared spectroscopy in the study practical considerations". *Methods in Molecular Biology*. (400), pp. 207–226.

Luckey, M. (2014). *Membrane Structural Biology: With Biochemical and Biophysical Foundations*. Cambridge University Press.

Luzardo, M del C.; Amalfa, F.; Núñez, A. M.; Díaz S.; Biondi de López, A. C. y Disalvo E. A. (2000). "Effect of Trehalose and Sucrose on the Hydration and Dipole Potential of Lipid Bilayers". *Biophysical J.* (78), pp. 2452-2458.

Luzardo, M. del C.; Peltzer G. y Disalvo E. A. (1998). "Surface potential of lipid interfaces formed by mixtures of phosphatidylcholine of different chain lengths". *Langmuir*. (14), pp. 5858-5861.

Makino, Kimiko; Yamada, Takeshi; Kimura, Mariko; Oka, Takashi; Ohshima, Hiroyuki y Kondo, Tamotsu (1991). "Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data". *Biophysical Chemistry*. (41), pp. 175-183.

Marsh, D. (1996). "Lateral pressure in membranes". *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*. (1286), pp. 183-223.

Menestrina, G.; Cabiaux, V. y Tejuca, M. (1999). "Secondary structure of sea anemone cytolysins in soluble and membrane bound form by infrared spectroscopy". *Biochemi-*

cal and Biophysical Research Communications. 254(1), pp. 174-180.

Milhaud, J. (2004). "New insights into water–phospholipid model membrane interactions". *Biochimica et Biophysica Acta –Biomembranes.* (1663), pp. 19-51.

Mocanu, A., Paşca, R. D., Horovitz, O. y Tomoaia-Cotisel, M. (2010). "Behavior of mixed dmpc-cholesterol monolayers at the air/water interface". En *Chemia XLV*, 2, TOM II (pp. 303-312). Cluj-Napoca, Romania: Studia Universitatis Babeş-Bolyai.

Mohtar, Lina; Ledesma, Ana; Disalvo, Edgardo y Frías, María de los Ángeles (2020). "Influence of carbonyl groups on the interaction of PLA2 with lipid interphases". *Colloid and Interface Science Communications*. 39(11), pp. 1-8.

Morini, Marcela; Sierra, Maria; Pedroni, Viviana; Alarcon, Laureano; Appignanesi, Gustavo y Disalvo, Edgardo (2015). "Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC, DPPC and DMPE lipid vesicles". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. (131), pp. 54-58.

Parsegian, V. A.; Rand, R. P. y Rau, D. C. (2000). "Osmotic Stress, Crowding, Preferential Hydration, and Binding: A Comparison of Perspectives". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 97(8), pp. 3987–3992.

Pinto, O. A. y Disalvo, E. A. (2019). "A New Model for Lipid Monolayer and Bilayers Based on Thermodynamics of Irreversible Processes". *PLoS One.* 14(4), pp. .

Qinqin Fei, David Kent, Wesley M. Botello-Smith, Fariah Nur, Saadia Nur, Abdelaziz Alsamarah, Payal Chatterjee, Maria Lambros y Yun Luo (2018). "Molecular Mechanism of Resveratrol's Lipid Membrane Protection". *Scientific Reports.* (8), pp. 1587-1598.

Raffo, Ximena y Martini, Florencia (2010). "Ca2+ adsorption to lipid membranes and the effect of cholesterol in their composition". *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* (76), pp. 215-220.

Rao, C. S. y Damodaran, S. (2000). "Is surface pressure a me-

asure of interfacial water activity? Evidence from protein adsorption behavior at interfaces". *Langmuir*. 16(24), pp. 9468-9477.

Rosa, Antonio; Cejas, Jimena; Disalvo, Edgardo y Frías, María (2019). "Correlation between the hydration of acyl chains and phosphate groups in lipid bilayers: Effect of phase state, head group, chain length, double bonds and carbonyl groups". BBA – *Biomembranes*. (1861), pp. 1197– 1203.

Rosa, A. S.; Disalvo, E. A. y Frías, M. A. (2020). "Water Behavior at the Phase Transition of Phospholipid Matrixes Assessed by FTIR Spectroscopy". *Journal of Physical Chemistry B.* 124(29), pp. 6236–6244.

Rosa, Antonio S.; Cejas, J. P.; Disalvo, E. A. y Frías, M. A. (2019). "Correlation between the hydration of acyl chains and phosphate groups in lipid bilayers: Effect of phase state, head group, chain length, double bonds and carbonyl groups". *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 1861(6), pp. 1197–1203.

Roy, A.; Dutta, R.; Kundu, N.; Banik, D. y Sarkar, N. A (2016). "Comparative Study of the Influence of Sugars Sucrose, Trehalose, and Maltose on the Hydration and Diffusion of DMPC Lipid Bilayer at Complete Hydration: Investigation of Structural and Spectroscopic Aspect of Lipid-Sugar Interaction". *Langmuir*. 32(20), pp. 5124–5134.

Sharp, J. S.; Forrest, J. A. y Jones, R. A. L. (2002). "Surface denaturation and amyloid fibril formation of insulin at model lipid-water interfaces". *Biochemistry*. 41(52), pp. 15810–15819.

Simon, S. y McIntosh, T. (1989). "Magnitude of the solvation pressure depends on dipole potential". *Proceedings of the National Academy of Sciences.* (86), pp. 9263-9267.

Simon, S. A. y McIntosh, T. J. (1986). "Depth of Water Penetration into Lipid Bilayers". *Methods in Enzymology*. (127), pp. 511-521.

Tatulian, Suren (1983). "Effect of lipid phase transition on the binding of anions to dimyristoylphosphatidylcholine liposo-

mes". B*iochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes.* (2), pp. 189–195.

Terrettaz, S.; Ulrich, W.-P.; Vogel, H.; Hong, Q.; Dover, L. G. y Lakey, J. H. (2002). "Stable self- assembly of a protein engineering scaffold on gold surfaces". *Protein Science.* 11(8), pp. 1927-1925.

Tissera, María; Disalvo, Edgardo; Martini, Florencia y Cutró, Andrea (2019). "Filling gaps in the knowledge of melittin on lipid membranes". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. (561), pp. 136-146.

Van De Weert, M.; Haris, P. I.; Hennink, W. E. y Crommelin, D. J. A. (2001). "Fourier transform infrared spectrometric analysis of protein conformation: Effect of sampling method and stress factors". *Analytical Biochemistry*. 297(2), pp. 160-169.

Vollhardt, D. y Fainerman, V. B. (2006). "Progress in characterization of Langmuir monolayers by consideration of compressibility". *Adv. Colloid Interface.* (127), pp. 83–97.

Zheng, C. y Vanderkooi, G. (1992). "Molecular origin of the internal dipole potential in lipid bilayers: calculation of the electrostatic potential". *Biophys. J.* 63 (4), pp. 935-941.

ISBN 978-987-4456-27-4