

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades:  
Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas;  
Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales;  
Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía;  
Física; Geología; Historia; Ingeniería;  
Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina,  
Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología.  
A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



FJM-Uni 182-Pon  
Estudios espectroscópicos de fosfolíp  
Pons Vallés, Miquel.  
1031738



Biblioteca FJM

Fundación Juan March (Madrid)

SERIE UNIVERSITARIA



Fundación Juan March

Miquel Pons Vallés

Estudios espectroscópicos de  
fosfolípidos polimerizables

182 Estudios espectroscópicos de fosfolípidos polimerizables/Miquel Pons Vallés.

FJM  
Uni-  
182  
Pon  
182



Fundación Juan March  
Serie Universitaria

182



Miquel Pons Vallés

# Estudios espectroscópicos de fosfolípidos polimerizables



Fundación Juan March  
Castelló, 77. Teléf. 435 42 40  
Madrid-6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la  
Convocatoria de Extranjero, 1979, individual.  
Departamento de QUIMICA.*

*Centro de trabajo: Royal Free Hospital School of Medicine.  
University of London (England).*

Los Textos publicados en esta Serie Universitaria son elaborados por los propios autores e impresos por reproducción fotostática.

Depósito Legal.: M-19353-1982

I.S.B.N.: 84-7075-243-X

Impresión: Gráficas Ibérica. Tarragona, 34. Madrid-7

# I N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION . . . . .	7
2. SINTESIS DE FOSFOLIPIDOS DIACETILENICOS . . . . .	8
2.1. Síntesis de ácidos grasos diacetilénicos . . . . .	9
2.2. Acilación de la <u>sn</u> -glicero-3-fosforilcolina . . . . .	10
2.3. Síntesis de fosfolípidos mixtos . . . . .	12
3. ESTUDIOS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO-13. . . . .	14
3.1. Estudio del ácido 10,12-tricosadiinoico . . . . .	15
3.2. Utilización de Yb(fod) <sub>3</sub> en el estudio de ácidos grasos por RMN de carbono-13 . . . . .	18
3.3. Estudio del fosfolípido 1,2-bis(10,12-tricosadiin-oil)- <u>sn</u> -glicero-3-fosforilcolina . . . . .	22
3.3.1. Interacciones entre grupos diacetilénicos . . . . .	25
3.3.2. Tiempos de relajación longitudinales . . . . .	28
4. POLIMERIZACION DE FOSFOLIPIDOS DIACETILENICOS. . . . .	31
5. ESTUDIOS ESPECTROSCOPICOS DE POLIMEROS DERIVADOS DE FOSFOLIPIDOS DIACETILENICOS . . . . .	35
5.1. Espectro visible . . . . .	35
5.2. Espectro de resonancia Raman . . . . .	37
5.3. Cambios irreversibles en el espectro visible . . . . .	38
5.4. Actividad óptica. Espectro de dicroísmo circular . . . . .	39
5.5. Origen de la actividad óptica . . . . .	45
6. APLICACIONES BIOLOGICAS. . . . .	48
7. CONCLUSIONES . . . . .	50
8. BIBLIOGRAFIA Y NOTAS . . . . .	52



Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han contribuido y contribuyen a mi formación científica y personal y me han ayudado antes, durante y después de mi estancia en Londres donde surgió este trabajo.

En especial quiero mencionar al Prof.Dennis Chapman que me honró con su confianza al dirigirme este trabajo, al Dr.José Castells, director del departamento de Química Orgánica de Barcelona y al Dr.Ernest Giralt que, no sólo me introdujo en el mundo de la RMN y la estereoquímica, sino que me brindó en todo momento su consejo y su amistad.



## 1. Introducción

Las membranas constituyen un porcentaje significativo del peso seco de cualquier célula y su presencia es destacada en cualquier sistema vivo. Las membranas celulares tienen un papel activo en multitud de procesos vitales como nutrición, comunicación, reconocimiento de células, biosíntesis, etc.

Esta multitud de papeles activos difícilmente puede reconciliarse con una descripción estática de las membranas, por ello en general se acepta actualmente el modelo del mosaico fluido: los lípidos se encuentran formando una bicapa fluida donde "flotan" las proteínas<sup>(1)</sup>. Esta descripción es también una simplificación pues no tiene en cuenta las interacciones entre lípidos y proteínas o las variaciones locales de fluidez que pueden darse, por ejemplo, como consecuencia de un fenómeno de separación de fases o debido a gradientes de movilidad a través de la bicapa<sup>(2)</sup>.

Para estudiar el efecto de la fluidez en la actividad de las proteínas de membranas se han desarrollado diversos métodos para modular este parámetro: modificación de la composición lipídica en organismos auxotróficos<sup>(3)</sup>, hidrogenación catalítica de los lípidos en el interior de las membranas<sup>(4)</sup>, modificación de la cantidad de colesterol<sup>(5)</sup>.

En este trabajo se han realizado una serie de estudios encaminados a lograr otro tipo de modulación de la fluidez mediante la polimerización de las cadenas laterales de los fosfolípidos. Este trabajo se relaciona, aunque es conceptualmente distinto, con la utilización por Khorana<sup>(6)</sup> de grupos precursores de carbenos para la dimerización fotoquímica de lípidos en membranas.

El grupo polimerizable elegido fué el grupo diacetileno, por su pequeño tamaño y su facilidad de polimerización fotoquímica en fase sólida.



## 2.1. Síntesis de ácidos grasos diacetilénicos

El paso clave en la síntesis de los ácidos grasos fué un acoplamiento de Cadiot-Chodkiewicz<sup>(9)</sup> de un haloalquino con un acetileno terminal. Esta reacción está catalizada por iones Cu(I) y requiere la presencia de una base y un agente reductor.

La dimerización de alquinos terminales, catalizada por sales de Cu(II), está relacionada con el acoplamiento citado y constituye una reacción secundaria que hay que evitar reduciendo al mínimo la presencia de sales de Cu(II). Estas sales se caracterizan por la coloración verde que confieren al medio de reacción. La adición de hidroxilamina regenera el color amarillo indicativo de compuestos de Cu(I).

Otra reacción secundaria es la dimerización del haloalquino. Esta dimerización disminuye en el orden  $I > Br > Cl$ , pero la reactividad hacia el alquino disminuye en el mismo orden, por lo que el óptimo se obtiene según los casos utilizando iodo o bromo. En nuestro caso se utilizó iodo y la dimerización se minimizó añadiendo el iodoalquino lentamente sobre un exceso de alquino. Los rendimientos obtenidos fueron del 25 al 30% de producto recristalizado.

El mecanismo de esta reacción no se conoce. El hecho de que no tenga lugar con haluros de alquilo hace suponer que no se trata de un simple ataque nucleófilo del acetiluro sobre el haloalquino. Uno de los mecanismos que se han sugerido para esta reacción consiste en una primera etapa de formación de un compuesto organocuproso, seguida por una segunda etapa en la cual el carácter saliente del halógeno estaría aumentado por la presencia de una segunda molécula de organometálico, mientras que el carácter nucleófilo del organometálico se acrecentaría mediante la formación de un complejo de cobre con el alquino<sup>(10)</sup>.

La iodación de uno de los alquinos se efectuó tratando el correspondiente magnesiano, obtenido a partir del alquino y bromuro de etilmagnesio, con iodo.

Finalmente, los alquinos se obtuvieron por bromación y deshidrobromación de los correspondientes alquenos.

El esquema de síntesis se presenta en la figura 2.

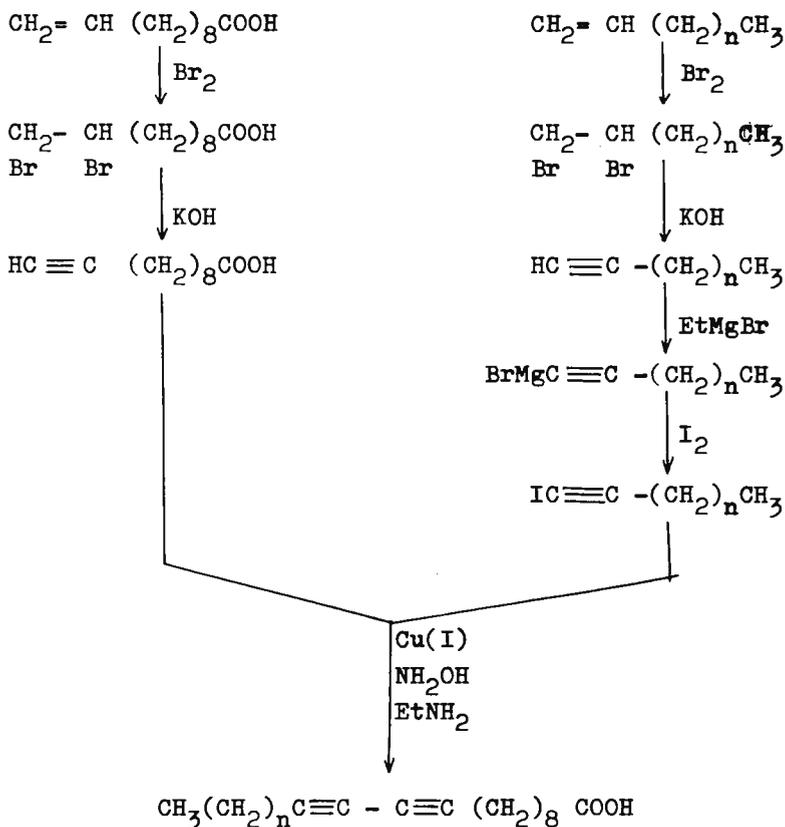


Fig.2

## 2.2. Acilación de la sn-glicero-3-fosforilcolina

En la literatura se encuentran distintos métodos<sup>(11)</sup> para efectuar esta reacción, aunque algunos de ellos no son aconsejables pues dan lugar a productos secundarios de racemización o transposición a través de la formación de fosfatos cíclicos<sup>(12)</sup>.

El método más utilizado actualmente consiste en la reacción del anhídrido del ácido graso con el complejo de cloruro de cadmio de la sn-glicero-3-fosforilcolina, en presencia de dimetilaminopiridina como catalizador<sup>(13)</sup>. Esta reacción tiene lugar en un sistema heterogéneo, pues el complejo de GPC no es soluble en cloroformo, y debe llevarse a cabo en condiciones totalmente anhidras durante 48-52 horas. La actuación de la dimetilaminopiridina como catalizador en reacciones de acilación es conocida y transcurre mediante la formación de un agente acilante intermedio (acilpiridinio). Los rendimientos són buenos (75-85%) respecto a la glicero fosforilcolina, pero hay que utilizar un exceso de anhídrido correspondiente a tres equivalentes de ácido para reducir la formación de lisofosfolípido (1-acil-sn-glicero-3-fosforilcolina).

Para evitar el bajo aprovechamiento del ácido graso sintético se buscó otro método de síntesis. El procedimiento utilizado fué una modificación de la síntesis descrita por Warner y Benson<sup>(14)</sup> para fosfolípidos insaturados. Este método se basa en la activación del carbonilo mediante la formación del acil imidazólido<sup>(15)</sup>. Esto se logra fácilmente por reacción del ácido graso libre con carbonildiimidazol a temperatura ambiente. La mezcla de reacción puede utilizarse directamente para el segundo paso de la reacción.

La reactividad de los acil imidazólidos frente a los alcoholes es relativamente baja pero aumenta mucho en presencia de bases fuertes. El método de Warner y Benson utiliza dimetil sulfuro sódico en dimetil sulfóxido. Esta combinación de disolvente y base presenta la ventaja de que el complejo de sn-glicero-3-fosforilcolina es soluble, y por otra parte, la base es suficientemente impedida para no producir racemización con los tiempos de reacción utilizados. La reacción se efectúa en baño de hielo y atmósfera de nitrógeno, con un tiempo de reacción de 2-3 minutos y utilizando dos equivalentes de ácido.

El problema para la aplicación directa de este método en nuestro caso fué la baja solubilidad del imidazólido en DMSO. Esto se solventó utilizando una mezcla de THF y DMSO<sup>(16)</sup>.

Con el fin de estudiar el efecto de los triples enlaces en la proximidad del grupo polar, se intentó la síntesis del fosfolípido derivado del ácido 2,4-tricosadienoico, en que el grupo diacetilénico está conjugado con el grupo carboxílico. La síntesis del anhídrido no pudo lograrse con dicitclohexilcarbodiimida. Reacción con cloruro de tosilo o anhídrido acético del ácido libre o su sal produjeron un compuesto que por su espectro infrarojo podría ser el anhídrido deseado pero que resultó ser estable al tratarlo con HCl 5N y acetona durante tres días a temperatura ambiente. La reacción con anhídrido acético dió lugar también a la formación del anhídrido mixto, caracterizado por sus propiedades espectroscópicas y sus productos de hidrólisis. Los intentos de acilación de la sn-glicero-3-fosforilcolina con este anhídrido mixto fueron infructuosos. Finalmente los intentos de realizar la acilación a través del imidazolido dieron lugar a una extensa descomposición del producto y una mezcla de productos fosforilados en bajo rendimiento, cuya purificación fué imposible.

### 2.3. Síntesis de fosfolípidos mixtos

En un punto del trabajo nos planteamos la necesidad de sintetizar fosfolípidos conteniendo unicamente una cadena polimerizable. Esto se llevó a cabo utilizando los mismos métodos de acilación ya descritos.

Las 1-acil-sn-glicero-3-fosforilcolinas se obtuvieron por hidrólisis enzimática, con fosfolipasa A<sub>2</sub>, de fosfolípidos naturales y sintéticos. La reacción enzimática es altamente regio- y estereoespecífica e hidroliza unicamente el grupo acilo en la posición 2.

Para la síntesis del fosfolípido III (grupo diacetilénico en posición 2) se partió del producto de hidrólisis enzimática de lecitina de huevo. Este, por la asimetría posicional de los fosfolípidos naturales, contiene unicamente ácidos grasos saturados -palmítico y esteárico- a pesar de que la lecitina de huevo contiene tanto ácidos grasos saturados como insaturados.

Para la síntesis del fosfolípido IV (grupo diacetilénico en posición 1) se partió del fosfolípido I (con dos cadenas

iguales) y se aciló su producto de hidrólisis con un ácido graso saturado.

La síntesis de fosfolípidos mixtos se llevó a cabo por el método del anhídrido ante el temor que las condiciones más enérgicas del método de Warner y Benson pudieran dar lugar a transposiciones de grupo acilo entre las dos posiciones.

Los fosfolípidos sintetizados se caracterizaron por capa fina, IR, RMN y cromatografía de gases de los grupos acilos (como ésteres metílicos). La pureza óptica y posicional se determinó por hidrólisis enzimática con fosfolipasa A<sub>2</sub>.

### 3. Estudios de Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13

La espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de carbono-13 es un método de gran utilidad para el estudio de membranas. A pesar de su baja sensibilidad relativa respecto a la RMN de protón, la RMN de  $^{13}\text{C}$  presenta una serie de ventajas sobre esta para el estudio de lípidos. En primer lugar, la mayor dispersión de los picos permite, en condiciones adecuadas, la observación de cada uno de los átomos de carbono de una larga cadena hidrocarbonada. En segundo lugar, cuando se trabaja en dispersiones acuosas donde la resolución viene determinada por la anchura natural de los picos, la menor constante giro-magnética y la dilución de los núcleos de carbono-13 hace que el ensanchamiento dipolar sea mucho menor. Finalmente, la ausencia de acoplamiento homonuclear permite una interpretación más sencilla de los valores experimentales de tiempos de relajación, obtenidos en condiciones de desacoplamiento total de los protones. Salvo casos especiales, el único mecanismo de relajación importante es la interacción dipolar carbono-hidrógeno.

En este trabajo nos propusimos el estudio de los lípidos diacetilénicos sintetizados, por RMN de carbono-13. El primer paso consistió en la caracterización y asignación de las resonancias, tanto de los fosfolípidos como de los ácidos grasos precursores. Para lograr este objetivo se utilizaron reactivos de desplazamiento, cuya utilidad fué comprobada para una serie de ácidos grasos saturados e insaturados. Las propiedades dinámicas se estudiaron por medio de los tiempos de relajación.

Se prestó especial atención a los efectos que pudiera provocar la existencia de los triples enlaces en medio de la cadena carbonada. Estos pueden ser de tipo conformacional

o pueden ser el resultado de la gran anisotropía de los dos triples enlaces conjugados. Esta anisotropía afecta a la constante de apantallamiento de aquellos núcleos situados cerca en el espacio y puede provocar desplazamientos. Por otra parte, reorientaciones de la molécula de la frecuencia correcta pueden proporcionar un nuevo mecanismo de relajación para los carbonos acetilénicos.

### 3.1. Estudio del ácido 10,12-tricosadiinoico

En la figura 3 se presenta el espectro de carbono-13 a 50MHz del ácido 10,12-tricosadiinoico disuelto en benceno. La asignación de la mayoría de las resonancias es inmediata con la ayuda de la bibliografía<sup>(17)</sup> o por comparación con otros ácidos grasos. La perturbación causada por los triples enlaces en el centro de la cadena permite la resolución de los carbonos correspondientes a los 17 metilenos. La asignación de estas señales fué posible mediante el uso de reactivos de desplazamiento.

Los tiempos de relajación de este ácido se determinaron utilizando una secuencia (180-tau-90-T)<sub>n</sub> en la que el pulso de 90° permite visualizar la relajación después de una inversión de niveles causada por el pulso de 180°<sup>(18)</sup>. Los datos experimentales se ajustaron directamente a una exponencial utilizando un programa de ajuste no lineal<sup>(19)</sup>.

En la tabla 1 se presentan los desplazamientos químicos en benceno y los tiempos de relajación longitudinal (T<sub>1</sub>) de todos los carbonos del ácido 10,12-tricosadiinoico.

En esta tabla puede distinguirse claramente el gradiente de movilidad desde el extremo polar al metilo terminal. El tiempo de relajación del carbonilo es relativamente corto para un carbono cuaternario. Esto probablemente debe atribuirse a la estructura dimerica de los ácidos carboxílicos en solución.

Los tiempos de relajación de los carbonos acetilénicos es muy largo reflejando la ausencia de protones para su relajación. Resulta muy interesante la rapidez de relajación de los metilenos adyacentes a los triples enlaces. Esto indica la difi-

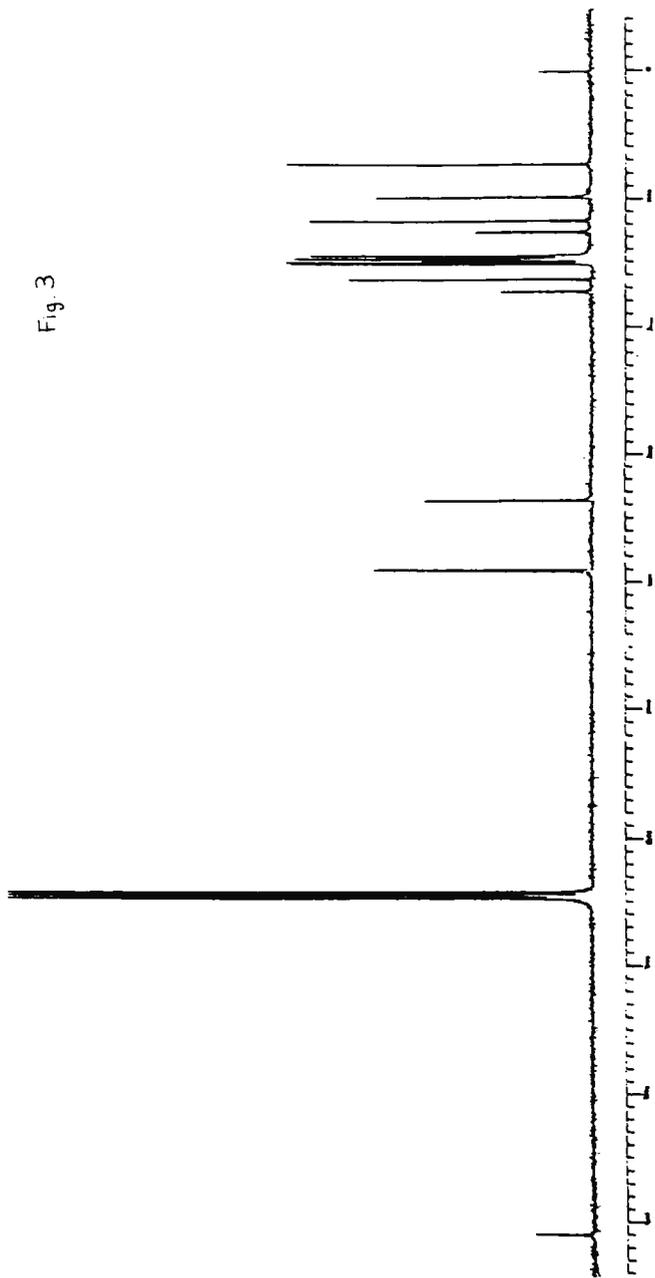


Fig. 3

cultad de reorientación del segmento lineal rígido de seis carbonos incluso en una disolución verdadera. El hecho que este efecto pueda observarse también en el carbono 8 (beta) descarta la posibilidad de un mecanismo de anisotropía de apantallamiento concurrente.

TABLA 1

	Carbono nº	(ppm)	T <sub>1</sub> (seg)
COOH	1	181.50	2.09
	2	34.81	0.77
	3	25.45	0.99
	4	29.75	1.00
	5	29.87	1.20
	6	29.68	1.17 (20)
	7	29.53	1.16
	8	29.18	1.08
$  \begin{array}{c}  \text{CH}_2 \\    \\  \text{C} \\     \\  \text{C} \\    \\  \text{C} \\     \\  \text{C} \\    \\  \text{CH}_2  \end{array}  $	9	19.95	0.95 (20)
	10	78.14	10.15
	11	67.34	17.59
	12	67.29	18.68
	13	78.26	10.46
	14	19.95	0.95 (20)
	15	29.27	1.37
	16	29.68	- (20)
	17	30.02	1.95
	18	30.43	2.39
	19	30.55	2.55
	20	30.31	2.99
	21	32.87	3.79
	22	23.69	4.67
CH <sub>3</sub>	23	14.94	6.30

### 3.2. Utilización de Yb(fod)<sub>3</sub> en el estudio de ácidos grasos por Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13

La existencia de electrones desapareados en los elementos de la serie de los lantánidos puede producir desplazamientos de las señales de RMN de moléculas orgánicas que pasen a formar complejos con dichos iones. La interacción que da lugar a los desplazamientos observados puede ser de tipo dipolar, también llamada de pseudocontacto, o por deslocalización del electrón desapareado sobre el complejo -mecanismo llamado de contacto-. El primero de estos mecanismos es en general el que actúa en átomos situados a más de 2 o 3 enlaces de distancia del ion metálico.

La utilización de lantánidos en RMN reposa en el hecho de que el desplazamiento causado por el mecanismo de pseudocontacto presenta una dependencia geométrica definida. La expresión que rige esta dependencia es<sup>(21)</sup>:

$$\Delta\omega = D' \frac{(3\cos^2\theta - 1)}{r^3} - D'' \frac{(\sin^2\theta \cos 2\varphi)}{r^3}$$

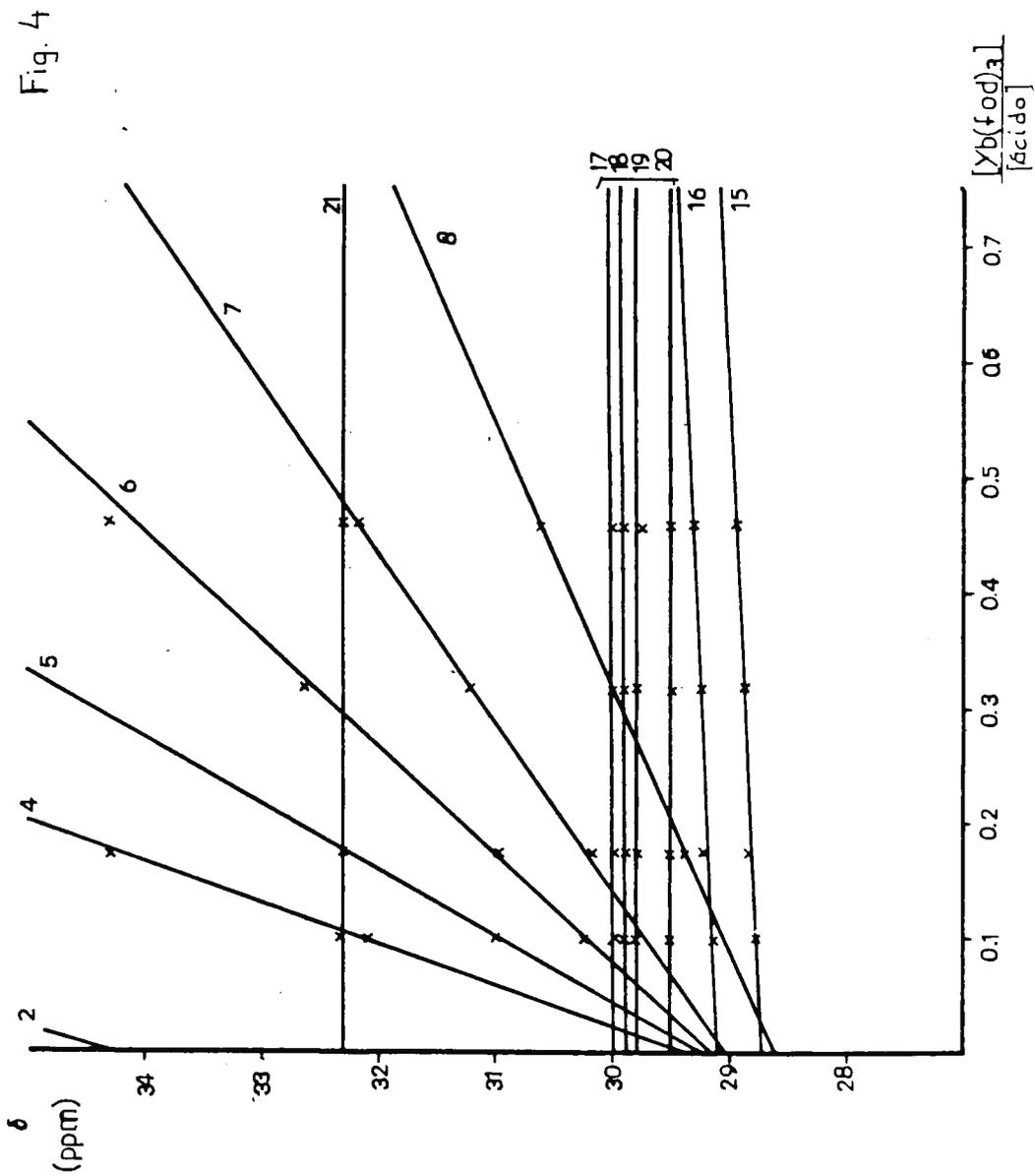
donde D' y D'' son constantes y r,  $\theta$ ,  $\varphi$  son las coordenadas esféricas del núcleo observado, tomando como origen el ion metálico. Si el complejo tiene simetría axial (al menos en la escala de tiempo de la RMN) la expresión se reduce a:

$$\Delta\omega = D' \frac{(3\cos^2\theta - 1)}{r^3}$$

El valor de D' no se conoce, pero puede eliminarse utilizando el cociente de los desplazamientos para dos puntos distintos.

Esta dependencia se ha utilizado con frecuencia para obtener información conformacional de moléculas rígidas, pero se puede utilizar también de un modo cualitativo para la asignación de señales por la distancia de los núcleos correspondientes al punto de complejación.

Para la utilización de reactivos de desplazamiento con ácidos carboxílicos se presentan dos problemas: la baja capacidad de formación de complejos con el ion metálico (la menor entre los compuestos carbonílicos) y la destrucción de los com-



plejos de thd (tetrametil-3,5-heptanodionato) que mantienen el metal en solución en disolventes orgánicos<sup>(22)</sup>.

En nuestro trabajo se utilizó como reactivo de desplazamiento el complejo fluorado de Yterbio  $\text{Yb}(\text{fod})_3$  (fod= 1,1,1, 2,2,3,3-heptafluoro-7,7-dimetiloctanodionato). Los complejos fluorados resisten la presencia de ácidos carboxílicos sin descomponerse y causan un mayor desplazamiento a igual concentración. La elección de Yterbio se debe a que este elemento produce el máximo efecto de tipo dipolar e, incluso para carbono 13, la contribución del mecanismo de contacto es mínima.

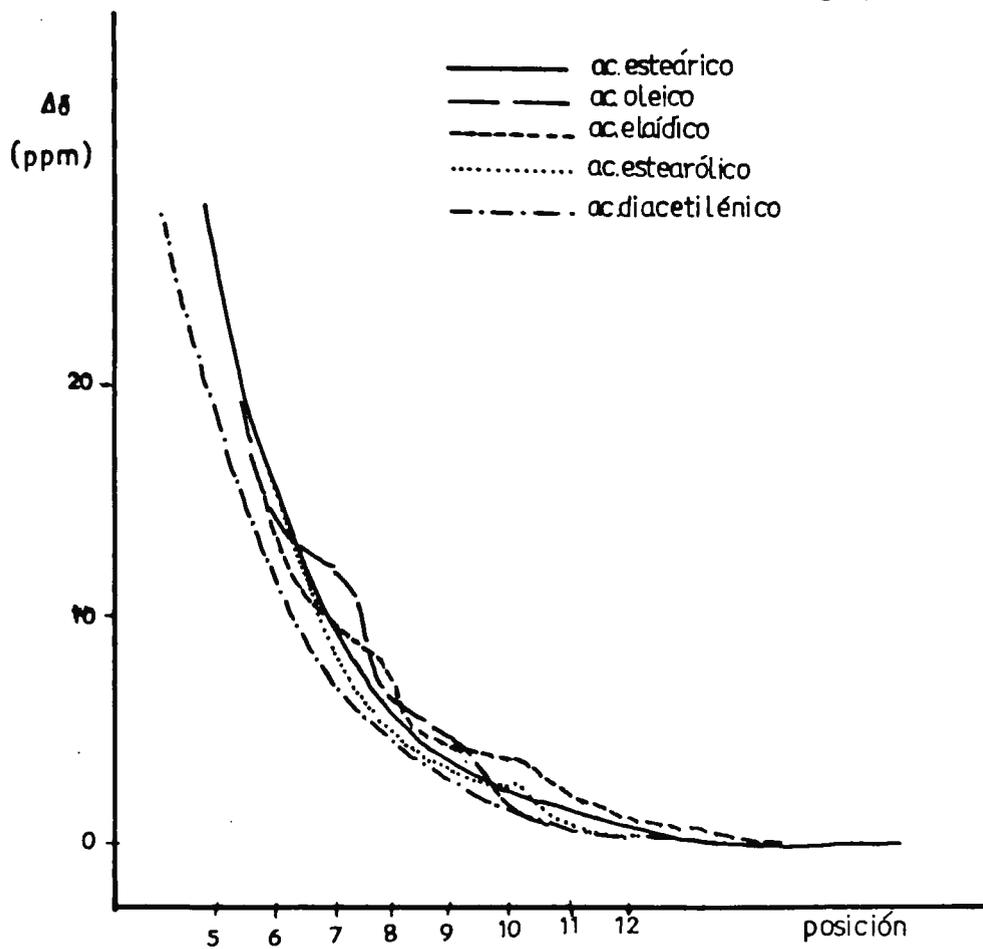
En la figura 4 se presentan los desplazamientos observados para los distintos metilenos del ácido 10,12-tricosadiinoico al aumentar la concentración relativa de  $\text{Yb}(\text{fod})_3$ . De la pendiente de las rectas correspondientes a cada señal puede deducirse la asignación que se presentó en la tabla 1.

Para evaluar la posibilidad de obtener información conformacional a partir de este experimento, se estudió el desplazamiento causado por una determinada concentración de  $\text{Yb}(\text{fod})_3$  sobre los distintos metilenos de la serie de ácidos grasos de 18 átomos de carbono con una insaturación en la posición central y se comparó con los resultados correspondientes para el ácido octadecanoico. En la figura 5 se presenta el desplazamiento, extrapolado a una concentración equimolar de  $\text{Yb}(\text{fod})_3$ , para la serie citada y en función de la posición a lo largo de la cadena.

En esta figura puede verse, en primer lugar, que el efecto del ion Yterbio puede detectarse incluso a 13-14 átomos de distancia. Esto es posible debido a la flexibilidad de la cadena hidrocarbonada. Por otra parte llama la atención que aparezcan desviaciones respecto al desplazamiento observado en el ácido insaturado no sólo en los puntos de insaturación sino también en la posición beta.

La justificación cauntitativa de la magnitud de los desplazamientos no puede hacerse en este caso mediante la simple aplicación de la ecuación de McConnell-Robertson con las distancias medidas sobre modelos moleculares ya que al tratarse de moléculas flexibles, tanto el término angular como la distan

Fig. 5



cia deben tratarse estadísticamente. El resultado experimental obtenido puede entonces servir para la comprobación de los modelos estadísticos considerados.

Utilizando el modelo de "random flight chain", que supone segmentos unidimensionales (sin volumen), de longitud  $b$  unidos por sus extremos sin restricción de ángulos<sup>(23)</sup>, se obtiene que la media de los cuadrados de las distancias entre dos puntos es proporcional al número de segmentos que los separan:

$$\bar{R}^2 = z b^2$$

Por otra parte, considerando una función de distribución angular que consiste en suponer que cada metileno ocupa todos los puntos de una esfera limitada por un cono definido por un ángulo máximo, la ecuación de McConnell se transforma en:

$$\Delta\omega = D \int_0^{\theta_{\max}} \frac{(3\cos^2\theta - 1)}{r^3} w(\theta) d\theta$$

$$\Delta\omega = \frac{D}{r^3} \left[ \frac{3}{4} \sin^2\theta_{\max} + \frac{1}{6} \right]$$

Una de las consecuencias de este modelo sería la desaparición del ángulo mágico, pues la expresión entre paréntesis no cambia de signo para ningún valor de  $\theta$ . Este valor es un parámetro distinto para cada metileno y presumiblemente crecerá hacia el final de la cadena.

El tratamiento de los datos experimentales para el ácido octadecanoico según estos modelos, a pesar de su evidente simplicidad, da resultados cualitativamente correctos.

### 3.3 Estudio del fosfolípido 1,2-bis(10,12-tricosadiinoil)-sn-glicero-3-fosforilcolina

El espectro de RMN de carbono 13 del fosfolípido 1,2-bis(10,12-tricosadiinoil)-sn-glicero-3-fosforilcolina, registrado a 50MHz, en solución de  $d_6$ -benceno, se presenta en la figura 6. La asignación, hecha a partir de datos de la bibliografía, por comparación con el espectro del ácido y considerando el espectro "off resonance", se presenta en la tabla 2.

Fig. 6

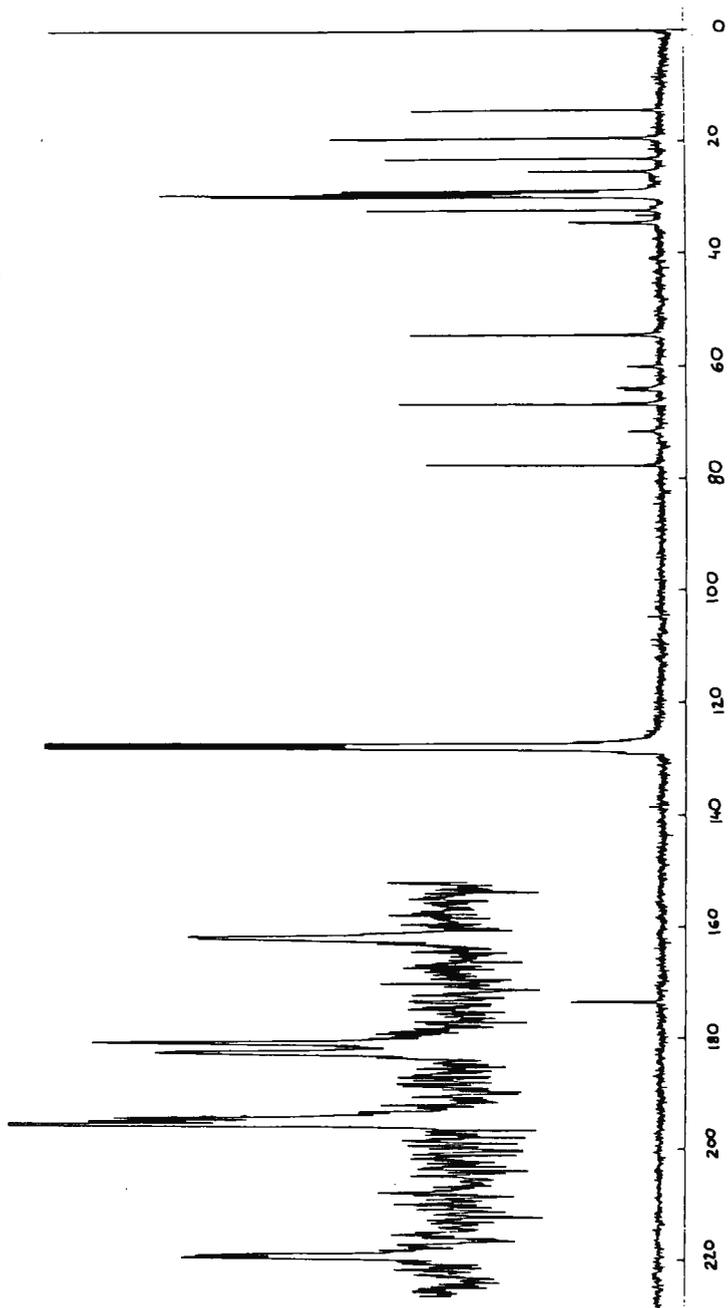


TABLA 2

n <sup>o</sup> de orden	asignación	(ppm)
1	<u>C</u> OOH	173.49 (1)(2)
2	<u>C</u> OOH	173.35 (2)
3	<u>C</u> C-C <u>C</u>	77.65
4	<u>C</u> HOCOR	71.59
5	C <u>C</u> -C C	66.75
6	<u>CH</u> <sub>2</sub> N <sup>†</sup>	66.55
7	<u>CH</u> <sub>2</sub> OP-glicerol	64.16
8	<u>CH</u> <sub>2</sub> OCOR	63.80
9	<u>CH</u> <sub>2</sub> OP-colina	59.96
10	N <sup>†</sup> ( <u>CH</u> <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	54.47
11	<u>CH</u> <sub>2</sub> COO-	34.68 (2)
12	<u>CH</u> <sub>2</sub> COO-	34.49 (2)
13	<u>CH</u> <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	32.35
14	<sup>19</sup> CH <sub>2</sub>	30.04
15	<sup>18</sup> CH <sub>2</sub>	29.94
16	<sup>20</sup> CH <sub>2</sub> + ? (2C)	29.79 (3)
17	?CH <sub>2</sub>	29.69 (3)
18	?CH <sub>2</sub> (2C)	29.52 (3)
19	<sup>16</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C C-	29.35
20	-C CCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> - <sup>7</sup> CH <sub>2</sub>	29.23
21	<sup>15</sup> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> C C-C C	28.97
22	-C C-C CCH <sub>2</sub> <sup>8</sup> CH <sub>2</sub>	28.83
23	<u>CH</u> <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO-	25.48 (2)
24	<u>CH</u> <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO-	25.38 (2)
25	<u>CH</u> <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	23.16
26	<u>CH</u> <sub>2</sub> C C-C CCH <sub>2</sub>	19.55
27	<u>CH</u> <sub>2</sub> C C-C CCH <sub>2</sub>	19.49
28	<u>CH</u> <sub>3</sub>	14.41

- (1) Valores relativos a TMS. Solución en benceno-d<sub>6</sub> a 20°C
- (2) Las dos señales proceden de las dos cadenas de ácido graso.
- (3) Las resonancias de los metilenos se asignaron por comparación con el ácido libre. Los carbónos 4,5,6 y 17 no pudieron asignarse de esta forma.

El espectro del mismo producto se obtuvo también en una dispersión sonicada, en agua, a 60°C, y se presenta en la figura 7.

Los fosfolípidos del tipo fosforilcolina forman espontáneamente en agua estructuras multilamelares cerradas. Cada una de estas láminas está formada por una bicapa, mantenida por interacciones hidrofóbicas, idéntica a la que se encuentra en membranas naturales. Estos sistemas constituyen excelentes modelos para el estudio de la estructura de los lípidos en membranas.

Cuando las dispersiones acuosas de fosfolípidos se someten a un tratamiento con ultrasonidos se forman pequeñas vesículas, unilamelares, de 200-300 nm de diámetro. El pequeño tamaño de estas vesículas permite su reorientación rápida, y la difusión lateral de los fosfolípidos en una superficie de alto grado de curvatura produce una distribución isotrópica de orientaciones y elimina la interacción dipolar, permitiendo así la obtención de espectros con una resolución comparable a la que se obtiene en disolución.

### 3.3.1. Interacciones entre grupos diacetilénicos

Roberts y cols<sup>(24)</sup> demostraron la existencia de desplazamientos de los picos en los espectros de RMN de carbono 13 de compuestos cíclicos conteniendo dos grupos diacetilénicos al disminuir el tamaño del ciclo. Este desplazamiento de las señales, tal como discutían los propios autores, podía tener dos orígenes: cambios en la hibridación de los carbonos acetilénicos al aumentar la tensión del anillo o un efecto de la anisotropia diamagnética del segundo grupo diacetilénico.

En nuestro trabajo encontramos un fenómeno similar. El pico correspondiente a los carbonos diacetilénicos externos presenta un desplazamiento y ensanchamiento importantes al pasar de una solución orgánica a una dispersión acuosa. Este fenómeno es perfectamente reversible.

Para determinar el origen de este efecto se estudió el espectro a distintos campos magnéticos. El resultado se presenta en la tabla 3.

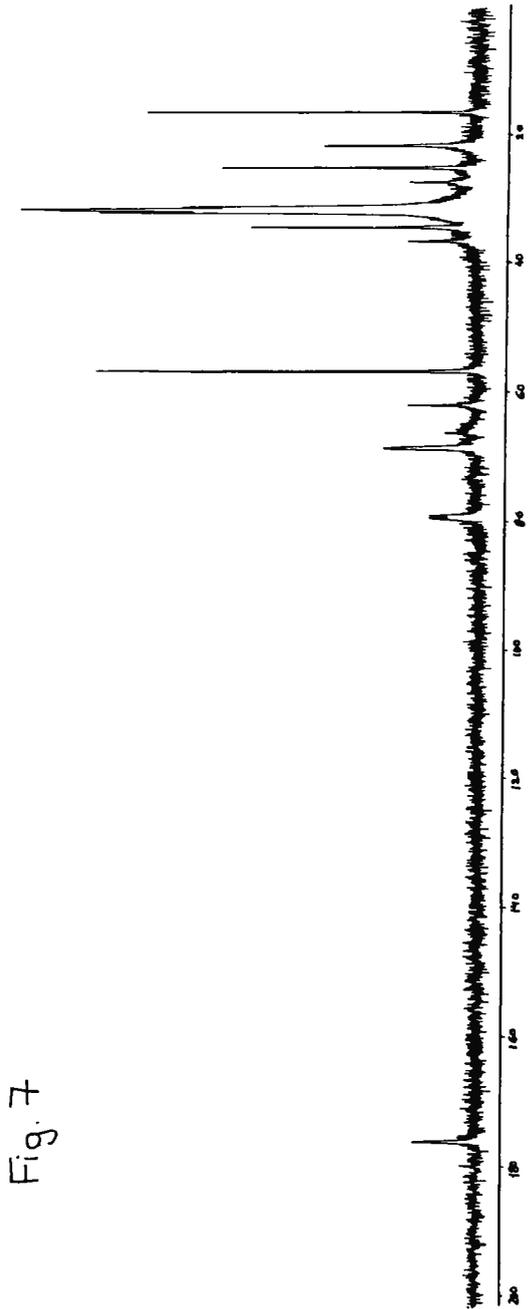


Fig. 7

TABLA 3

Anchura de la banda a altura mitad de la señal correspondiente a los carbonos acetilénicos externos ( $\delta \approx 78$  ppm), medida a diferentes frecuencias.

Frecuencia del espectrómetro	$(\Delta\nu)_k$ (Hz)	$(\Delta\delta)_k$ (ppm)
22.63 MHz	27	1.2
50.31	60	1.2
62.89	75	1.2
90.52	105	1.2

La relación lineal entre el ensanchamiento observado y la frecuencia del espectrómetro permite afirmar que se trata de un efecto de desplazamiento químico y permite descartar otras posibilidades alternativas, como podría ser una disminución muy importante del tiempo de relajación, que si es de tipo dipolar debería ser independiente del campo magnético y si es debida a la anisotropía de desplazamiento debería variar de forma cuadrática.

De acuerdo con la hipótesis de Roberts, y teniendo en cuenta la ausencia de tensión en nuestro sistema, la explicación más razonable consiste en atribuir el ensanchamiento y desplazamiento observados a la anisotropía diamagnética de los triples enlaces.

Se estudió también, en las mismas condiciones, el espectro de un fosfolípido conteniendo unicamente una cadena de ácido graso diacetilénico. También en este caso pudo observarse un ensanchamiento de las bandas, aunque menor que en el caso del fosfolípido con dos cadenas conteniendo diacetileno. Este resultado parece indicar que la interacción entre cadenas pertenecientes a fosfolípidos distintos también es importante. Este punto tiene interés al discutir (ver más adelante) los posibles tipos de polimerización.

### 3.3.2. Tiempos de relajación longitudinales

Para obtener información sobre los cambios en la movilidad de las cadenas de ácido graso causados por la introducción de los grupos acetilénicos rígidos, se estudiaron los tiempos de relajación en dispersiones acuosas de fosfolípidos cuyos grupos acilo contienen dos, uno o ningún triple enlace.

El tiempo de relajación longitudinal o spin-red ( $T_1$ ), representa la constante de tiempo de la exponencial que describe el retorno de la magnetización macroscópica a su valor de equilibrio tras una perturbación que implique cambios en la población de los distintos niveles.

A nivel microscópico, para que haya transferencia de energía del núcleo al entorno, dicho núcleo debe estar sometido a interacciones fluctuantes de la frecuencia apropiada. La función de densidad espectral ( $J$ ) proporciona la amplitud del campo magnético local a la frecuencia de Larmor del núcleo que se relaja. Para un movimiento isotrópico vale <sup>(25)</sup>:

$$J(\omega) = \langle H_{loc}^2(0) \rangle \frac{2\tau_c}{1+\omega^2\tau_c^2}$$

La escala de tiempo de los movimientos que afectan a la relajación son del orden de  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  segundos.

El origen de los campos magnéticos locales,  $H_{loc}$ , puede ser diverso, el más común es aquel en que dichos campos magnéticos proceden de la interacción dipolar con protones directamente unidos al núcleo de carbono 13 que se relaja. En este caso:

$$H_{loc} = \frac{1}{2} \mu_i \frac{3\cos^2\theta - 1}{r^3}$$

En presencia de desacoplamiento de los protones, la relajación de los carbonos por este mecanismo tiene lugar siguiendo una exponencial sencilla con una constante de tiempo dada por:

$$1/T_1^{DD} = \frac{\mu^2 \gamma_H^2 \gamma_C^2}{20 r_{CH}^6} (J_0(\omega_H - \omega_C) + 3J_1(\omega_C) + 6J_2(\omega_H + \omega_C))$$

Cuando  $(\omega, \tau_c) \ll 1$ , el tiempo de relajación se hace independiente del campo magnético y puede relacionarse directamente con  $\tau_c$

Se determinaron los tiempos de relajación en dispersiones acuosas de fosfolípidos sintéticos conteniendo dos grupos acilo idénticos con dos, uno y ningún triple enlace. Concretamente se estudiaron los fosfolípidos: 1,2-bis(10,12-tricosadiinoil)sn-glicero-3-fosforilcolina, 1,2-bis(8-octadecinoil)sn-glicero-3-fosforilcolina y 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosforilcolina.

Las determinaciones se efectuaron a 333 K en dispersiones sonicadas conteniendo 50-70 mg/ml de fosfolípido en tampón fosfato (0.05M pH=7.0) con un 50% de D<sub>2</sub>O y 0.1mg/ml EDTANa<sub>2</sub>. Las dispersiones se desgasaron burbujeando N<sub>2</sub> y se mantuvieron en todo momento por encima de la temperatura de transición de los fosfolípidos. El método utilizado para la determinación fué el mismo que en el caso del ácido tricosadiinoico y los resultados experimentales se ajustaron directamente a una exponencial. Los resultados experimentales se presentan en la tabla 4.

En todos los casos puede observarse un gradiente de movilidad, reflejado en un tiempo de relajación prolongado para los carbonos situados cerca del metilo terminal y un tiempo corto para los metilenos situados en el extremo polar de la cadena.

Los carbonos cuaternarios presentan tiempos de relajación más largos debido a la ausencia de protones directamente unidos a ellos. Resulta interesante observar, sin embargo, que así como en el caso del monoacetileno los tiempos de relajación de los carbonos carbonílicos y acetilénicos son comparables, para el fosfolípido diacetilénico el valor encontrado para los carbonos acetilénicos es mucho menor.

Hay que destacar también en la tabla 4 la rapidez de relajación de los metilenos contiguos a los triples enlaces en el fosfolípido diacetilénico. Para el fosfolípido monoacetilénico el valor encontrado es más parecido al resto de los metilenos en el centro de la cadena.

TABLA 4

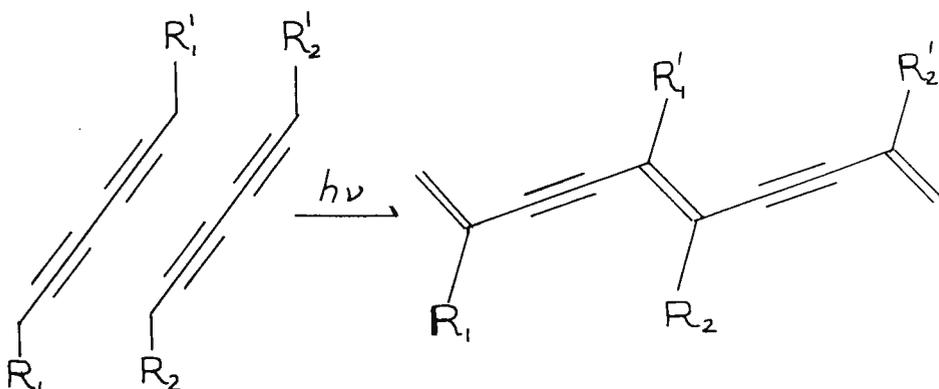
Tiempos de relajación en dispersiones acuosas de fosfolípidos  
 Temperatura = 333K  $T_1$  en segundos

asignación	grupo acilo		
	HEXADECANOIL	8-OCTADECINOIL	TRICOSADIINOIL
Triples enlaces	0	1	2
COO-	3.0	3.5	3.0 $\pm 0.5$
$\underline{\text{CH}_2\text{COO-}}$	0.33	0.30	0.37 $\pm 0.06$
$\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO-}}$	0.4	0.4	0.3 $\pm 0.1$
$(\text{CH}_2)_n$	0.6	0.8	0.5
$\underline{\text{CH}_2\text{C C}}$	-	0.6	0.28 $\pm 0.02$
$\text{C}\equiv\text{C}$	-	3.4	1.3/1.2 $\pm 0.1$
$\underline{\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3}$	1.18	0.98	1.19 $\pm 0.07$
$\underline{\text{CH}_2\text{CH}_3}$	1.8	2.0	1.9 $\pm 0.1$
$\text{CH}_3$	5.0	5.4	3.7 $\pm 0.3$
$(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$	0.83	1.20	1.09 $\pm 0.03$
$\text{CH}_2\text{OPcolina}$	0.5	0.5	0.4 $\pm 0.1$

La gran velocidad de relajación de los carbonos acetilénicos y los correspondientes metilenos en alfa indica que la movilidad de este segmento en el interior de la bicapa es muy pequeña. Esto está de acuerdo con las interacciones entre diacetilenos observadas también por carbono 13. Comparativamente, la restricción de la movilidad en el centro de la cadena tiene lugar en un grado mucho menor en el caso de un solo acetileno. Estas interacciones explican la baja temperatura de transición de los fosfolípidos diacetilénicos en relación con el número total de átomos de carbono en las cadenas de ácido graso.

#### 4. Polimerización de fosfolípidos diacetilénicos

Los diacetilenos presentan una reacción de polimerización inducible térmica o fotoquímicamente que tiene lugar únicamente en fase sólida. Esta reacción permite obtener cristales únicos de polímero a partir de cristales de monómero. El esquema de polimerización es el siguiente<sup>(26)</sup>:

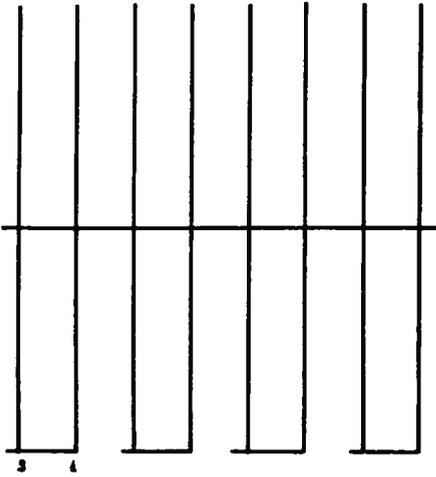


El mecanismo de esta polimerización está poco claro pero parece que intervienen carbenos como especies intermedias. Estudios cinéticos indican que una vez iniciada la reacción, la propagación es muy rápida, dando lugar a polímeros de peso molecular elevado, siendo la propagación limitada por los defectos del cristal<sup>(27)</sup>. El polímero resultante es altamente insaturado lo que le confiere una coloración característica.

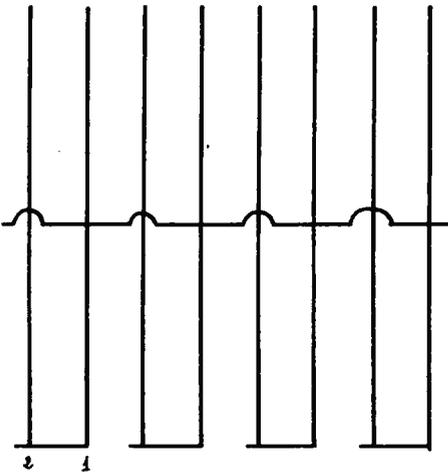
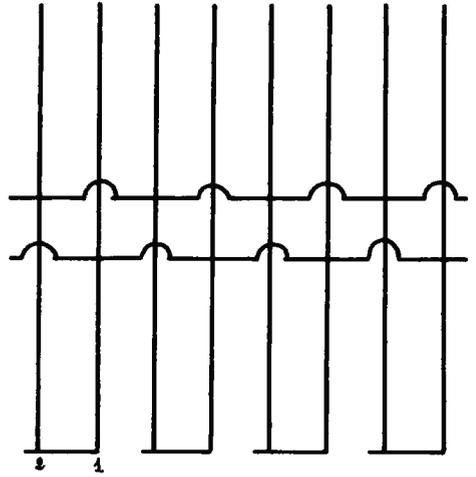
Los fosfolípidos hidratados presentan dos fases principales dependiendo de la temperatura. El paso de una fase a otra ocurre a la temperatura de transición ( $T_c$ ) detectable calorimétricamente y por distintos métodos espectroscópicos.<sup>(28)</sup> Por

Fig. 8

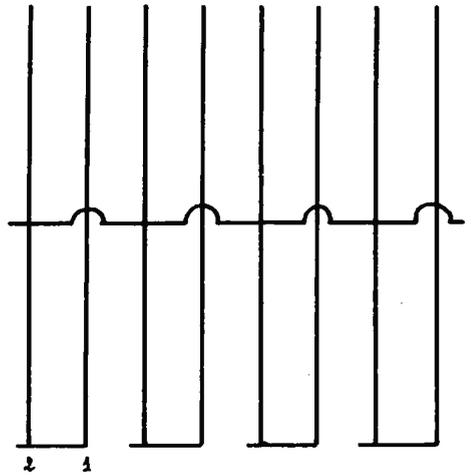
I



II



III



IV

debajo de esta temperatura se produce un aumento de orden de las cadenas alifáticas equivalente a una cristalización de dichas cadenas. Se ha podido comprobar que la polimerización de los fosfolípidos diacetilénicos solamente tiene lugar por debajo de la temperatura de transición.

En nuestro caso la polimerización se llevó a cabo mediante luz ultravioleta con un máximo de emisión a 254 nm sobre dispersiones acuosas de fosfolípido a 0°C o sobre discos de KBr conteniendo 2-5% de fosfolípido comprimidos en ausencia de aire. El polímero obtenido es soluble en cloroformo y puede extraerse junto con el fosfolípido que no ha reaccionado. La purificación se efectuó mediante una columna de Sephadex LH-60. Los rendimientos obtenidos para el fosfolípido 1,2-bis(10,12-tricosadiiniloil)*sn*-glicero-3-fosforilcolina son del 6-7% utilizando discos de KBr y del 15% utilizando dispersiones acuosas. En este caso los rendimientos están limitados por la aparición de polímero insoluble a partir de un cierto tiempo de irradiación.

La existencia de dos cadenas polimerizables en un mismo fosfolípido abre la posibilidad de una serie de estructuras distintas para el polímero correspondiente. Estas se presentan en la figura 8.

Según este esquema los polímeros con estructuras I (enlaces intra e intermoleculares) y II ("ladder-polymer"), no podrían dar puntos de entrecruzamiento, pero las estructuras III y IV dejan la mitad de las cadenas sin reaccionar. La polimerización de parte de estas cadenas produciría puntos de entrecruzamiento que darían lugar a la insolubilidad del polímero resultante.

Las pruebas experimentales que apoyan la idea de que el polímero insoluble es fruto de entrecruzamiento son la perfecta solubilidad de polímeros de composición definida (tipos III y IV) y la solubilización del producto entrecruzado por digestión con fosfolipasa A<sub>2</sub>.

Para tener polímeros de estructura definida se sintetizaron fosfolípidos conteniendo únicamente una cadena polime-

rizable en las posiciones 1 ó 2. Por irradiación estos fosfolípidos sólo pueden dar un tipo de polímero (III y IV respectivamente). Estos dos tipos de polímero presentan espectros de dicroísmo circular apreciablemente distintos y pueden utilizarse como referencia para interpretar diferencias en el producto de polimerización de fosfolípidos con dos grupos diacetilénicos en distintas condiciones.

Las conclusiones que se desprenden de este estudio son que el polímero de tipo III se forma preferentemente a temperaturas muy inferiores a la temperatura de transición, mientras que el polímero IV se forma con facilidad a temperaturas más elevadas, aunque siempre por debajo de la temperatura de transición<sup>(29)</sup>.

La formación de polímero de tipo I no puede descartarse aunque la conformación adoptada por el grupo polar de los fosfolípidos provoca algunas dificultades para entender la polimerización entre las dos cadenas del mismo fosfolípido. Respecto a la estructura de tipo II, esta se halla presente en los puntos de entrecruzamiento que dan lugar a polímero insoluble pero no parece que sea una estructura mayoritaria en los bajos porcentajes de conversión utilizados.

## 5. Estudios espectroscópicos de los polímeros derivados de fosfolípidos diacetilénicos

La naturaleza altamente insaturada del esqueleto polimérico hace de este una sonda ideal para estudiar la conformación del propio polímero y su respuesta a los cambios del ambiente donde está inmerso. Por ello se estudió el espectro visible del polímero en distintas condiciones. La estructura y conformación del polímero pudo estudiarse también por otras técnicas aprovechando el cromóforo del esqueleto polimérico: Espectroscopia de resonancia Raman y dicroísmo circular.

### 5.1. Espectro visible

El esqueleto de los polidiacetilenos se compone de dobles y triples enlaces alternados que le confieren una coloración intensa que puede ir desde el amarillo ( $\lambda_{\max}=450-470$ ) hasta el azul ( $\lambda_{\max}=650$ ). La naturaleza de las transiciones que dan lugar a estas absorciones es todavía motivo de discusión. Estudios de fotoconducción demuestran que el estado excitado de menor energía no es una banda de conducción. Cálculos teóricos sugieren que el primer estado excitado puede describirse como una combinación de excitones asociados con los enlaces y estados de transferencia de carga. Los mismos autores sugieren que este componente de transferencia de carga debería ser muy sensible a cambios en la estructura o conformación de las cadenas laterales<sup>(30)</sup>.

Los polímeros diacetilénicos habitualmente son muy insolubles en cualquier disolvente. Solamente en algunos casos, cuando las cadenas laterales presentan unas características especiales de solvatación y movilidad, tiene lugar la disolución del polímero. Al iniciarse este trabajo, sólo se encon-

traba en la literatura<sup>(31)</sup> un tipo de polidiacetilenos solubles, conteniendo grupos carboximetiluretano en las cadenas laterales. Estos polímeros solubles presentan cambios en su espectro visible, inducidos por variaciones de la temperatura o del disolvente, que han sido atribuidos por Patel<sup>(32)</sup> a diferencias en la planaridad del esqueleto insaturado.

Los polímeros derivados de fosfolípidos diacetilénicos presentan una banda ancha en su espectro de absorción en cloroformo, con un máximo entre 450 y 470 nm. Este espectro es independiente de la temperatura entre 0 y 50°C. El coeficiente de absorción es de  $3.3 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 460 nm.

El polímero en metanol presenta un espectro que cambia con la temperatura: a 50°C el espectro es parecido al obtenido en cloroformo, pero cuando la temperatura desciende el espectro se hace bimodal, con máximos a 529 y 490 nm.

El espectro visible del polímero contenido en vesículas parcialmente polimerizadas presenta cambios con la temperatura semejantes a los observados en metanol: a elevada temperatura (50°C) presenta una única banda ancha, que da lugar a dos picos, a 519 y 474 nm, al descender la temperatura.

El paralelismo de estos cambios con los observados por Patel<sup>(33)</sup>, sugieren que el espectro visible de estos fosfolípidos poliméricos podría constituir una sonda para los cambios conformacionales que tienen lugar en membranas biológicas. Por ello nos propusimos un pequeño estudio de los factores que afectan los cambios en el espectro visible.

Para este estudio se aprovechó la propiedad de estos fosfolípidos poliméricos purificados para dispersarse en presencia de otros fosfolípidos dando vesículas mixtas. De esta manera se pudo variar la composición cuantitativa y cualitativa de las vesículas.

Los resultados obtenidos indican que al aumentar la proporción de polímero respecto al fosfolípido acompañante el pico a mayor longitud de onda se hace más importante. Por otra parte, utilizando como fosfolípidos acompañantes 1,2 dimiristoil fosforilcolina, 1,2 dilinoleilfosforilcolina o un extracto natural de lecitina de soja, se vió que no hay variación en la tem-

peratura a la que tienen lugar los cambios en el espectro. Esto sugiere que esta transición es intrínseca del polímero.

Se intentó también estudiar los cambios en el espectro visible de dispersiones de polímero y otro fosfolípido al variar la cantidad de colesterol añadido. El colesterol tiene un papel modulador de la fluidez de los fosfolípidos<sup>(33)</sup>: por debajo de la temperatura de transición aumenta la fluidez de la membrana mientras que por encima de ella la disminuye. No pudimos observar ningún cambio significativo en el espectro del polímero en DMPC (1:1) o DLPC (1:1) en presencia de distintas cantidades (1:0.4 ; 1:0,7) de colesterol. El colesterol actúa sobre la parte de la cadena próxima al grupo polar y afecta la densidad de empaquetamiento de las cadenas. No es sorprendente por tanto que no tenga ningún efecto cuando las cadenas están unidas covalentemente entre sí. Este resultado, junto con el anterior, indica que el estado de fluidez de los lípidos acompañantes no afecta la transición observada en el espectro visible.

## 5.2. Espectro de resonancia Raman

La intensa absorción visible del esqueleto insaturado del polímero permite la observación del espectro de vibración asociado con el cromóforo mediante la técnica de resonancia Raman. Esta técnica es complementaria del infrarrojo ya que las transiciones que por ella se observan son prohibidas por las reglas de selección de la espectroscopía infrarroja. Por otra parte, cuando la longitud de onda de excitación coincide o se aproxima a un máximo de absorción, se produce un gran aumento de la intensidad de las vibraciones que afectan al cromóforo. De esta forma puede observarse esta parte de la molécula sin problemas debidos a superposición de señales intensas del disolvente u otros grupos presentes.

En la tabla 5 se presentan las frecuencias de vibración obtenidas por esta técnica utilizando dos longitudes de onda y a diferentes temperaturas. Los datos se refieren a una solución metanólica de polímero puesto que las dispersiones de vesículas, por su turbidez, dan lugar a dispersión no selectiva

de la luz incidente.

TABLA 5  
Resonancia Raman

Frecuencia de excitación ( $\text{cm}^{-1}/\text{nm}$ )	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Frecuencia de vibración	
		Doble enlace ( $\text{cm}^{-1}$ )	Triple enlace ( $\text{cm}^{-1}$ )
$2.1 \cdot 10^4$ (476.2)	-25	1520	2120
$1.92 \cdot 10^4$ (520.8)	-28	1519	2117
$1.92 \cdot 10^4$ (520.8)	+20	1517	2115

La uniformidad de los valores obtenidos parece indicar que el cambio en el espectro visible del polímero en metanol no está asociado a modificaciones de la estructura del cromóforo que afecten el orden de enlace <sup>(34)</sup>.

### 5.3. Cambios irreversibles en el espectro visible

Todos los cambios descritos hasta ahora son totalmente reversibles. En algunos casos, sin embargo, fué posible la observación de otros cambios de tipo irreversible. Estos cambios tienen lugar cuando la polimerización produce una forma metaestable del polímero que puede relajarse en condiciones apropiadas.

Un fenómeno de este tipo se observó al polimerizar vesículas de 1-acil, 2-(10,12-tricosadiinoil)sn-glicero-3-fosforilcolina. La polimerización de este sistema tiene lugar rápidamente a cero grados, con rendimiento elevado, dando un polímero de peso molecular alto. La dispersión resultante presenta un color rojo oscuro que corresponde a un máximo en el espectro de absorción a 540 nm. El espectro de la suspensión de vesículas polimerizadas no experimenta ningún cambio durante 72 h a cero grados, pero sufre un desplazamiento irreversible a 520nm por calentamiento a temperatura ambiente o disrupción mecánica de la muestra a cero grados.

Otro ejemplo de cambio irreversible en el espectro

visible de fosfolípidos diacetilénicos polimerizados, se encontró al polimerizar vesículas de 1,2 bis(10,12-tricosadiinoil)-sn-glicero-3-fosforilcolina conteniendo la proteína ATPasa dependiente del calcio. Este sistema presentó un rendimiento de polimerización bajo. Sin embargo la suspensión resultante tenía coloración azul correspondiente a un máximo de absorción a 616 nm. La absorción a una frecuencia tan baja indica un sistema muy ordenado. En los polímeros con carboximetiluretanos la absorción a 620 nm corresponde a la estructura totalmente planar, estabilizada por puentes de hidrógeno intramoleculares.

Calentamiento o sonicación de la muestra de polímero más proteína causa un desplazamiento irreversible del máximo de absorción a 530 nm.

#### 5.4. Actividad óptica. Espectro de dicroísmo circular

En compuestos que no poseen ningún plano de simetría, la absorción de la luz polarizada circularmente en uno u otro sentido no es igual. Esto permite la observación de la actividad óptica asociada a las distintas transiciones del espectro de absorción. Esto constituye la espectroscopía de dicroísmo circular.

Los fosfolípidos naturales poseen un centro quiral en la posición 2 del resto de glicerol, en la zona polar de la molécula. Los fosfolípidos diacetilénicos sintetizados por nosotros mantienen esta quiralidad, puesto que en su síntesis se utilizó un grupo polar de origen natural y se evitaron las condiciones que pudieran dar lugar a racemización. Este centro quiral se encuentra separado del esqueleto polimérico, que constituye nuestro cromóforo, por una cadena de nueve átomos de carbono.

De acuerdo con lo esperado, las soluciones en cloroformo de fosfolípidos poliméricos no presentan actividad óptica asociada con la absorción del esqueleto insaturado.

Cuando se estudian soluciones del polímero derivado del fosfolípido 1,2-bis(10,12-tricosadiinoil)-sn-glicero-3-fosforilcolina, en metanol, se observa actividad óptica asociada con las dos bandas del espectro visible. El espectro de dicrois

mo circular (fig.9) consiste en una banda negativa estrecha asociada con el pico a 530 nm y un sistema positivo-negativo ancho que cruza la línea de base aproximadamente en el centro de la otra banda de absorción.

Las dispersiones acuosas de mezclas polímero-monomero presentan también actividad óptica. Al igual que las soluciones metanólicas, hay una banda estrecha, de signo negativo, asociada con el pico a mayor longitud de onda, pero el sistema positivo negativo ha sido sustituido por una banda negativa ancha.

Ambos tipos de preparaciones presentan variaciones de su espectro de dicroísmo circular con la temperatura. La actividad óptica desaparece por encima de 20°C en las soluciones metanólicas y aumenta al disminuir la temperatura hasta -15 °C, donde se estabiliza. En la figura 10 se presenta una representación gráfica de esta variación. Las dispersiones acuosas presentan una variación paralela pero el rango de temperatura se encuentra desplazado unos 30° a temperaturas más altas.

La forma sigmoidal de la curva sugiere una transición definida entre dos estados. Aplicando el formalismo para este modelo<sup>(35)</sup> pueden extraerse unos parámetros termodinámicos aparentes que se presentan en la tabla 6

TABLA 6

Datos termodinámicos aparentes para el polímero derivado del fosfolípido 1,2-bis(10,12-tricosadiinóil)glicerofosforilcolina

-vesículas en lecitina de soja (1:1)

Temperatura de transición = 30°C

Parámetros termodinámicos  $\Delta H_p^0 = 21 \text{ Kcal/mol}$   $\Delta S_p^0 = 70 \text{ cal/K mol}$

- solución metanólica

Temperatura de transición = 0°C

Parámetros termodinámicos  $\Delta H_p^0 = 9 \text{ Kcal/mol}$   $\Delta S_p^0 = 32 \text{ cal/K mol}$

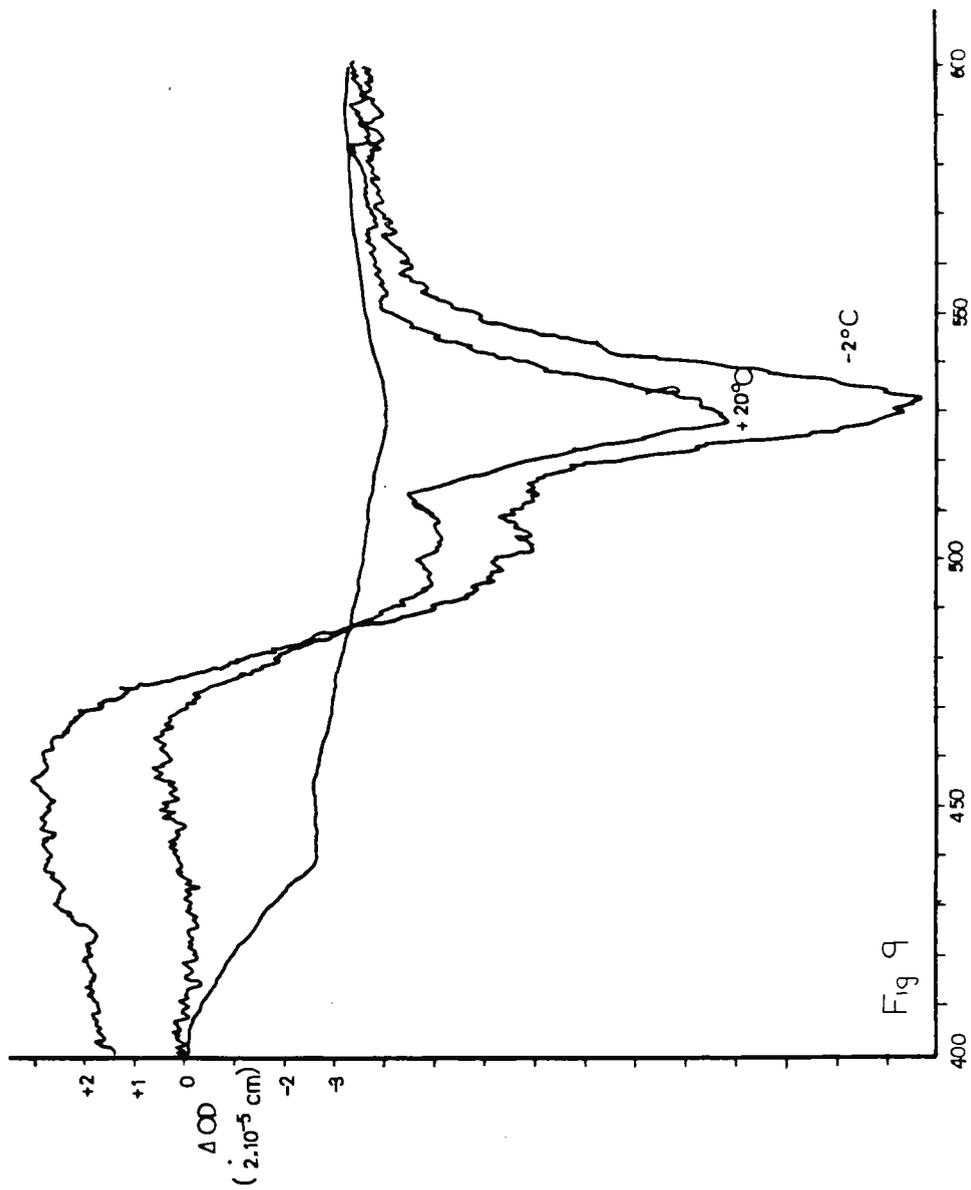
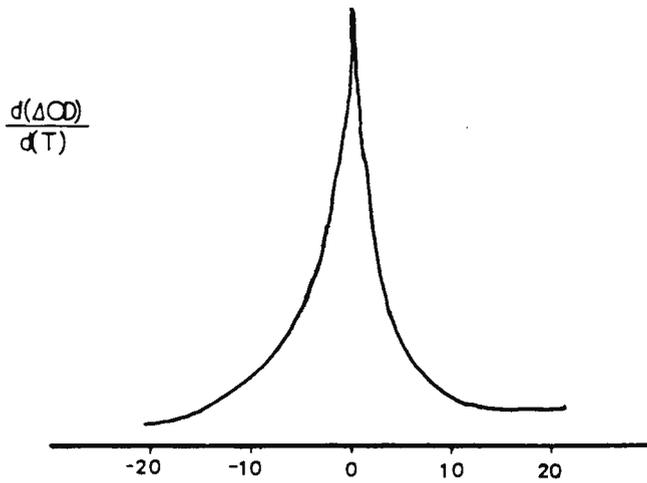
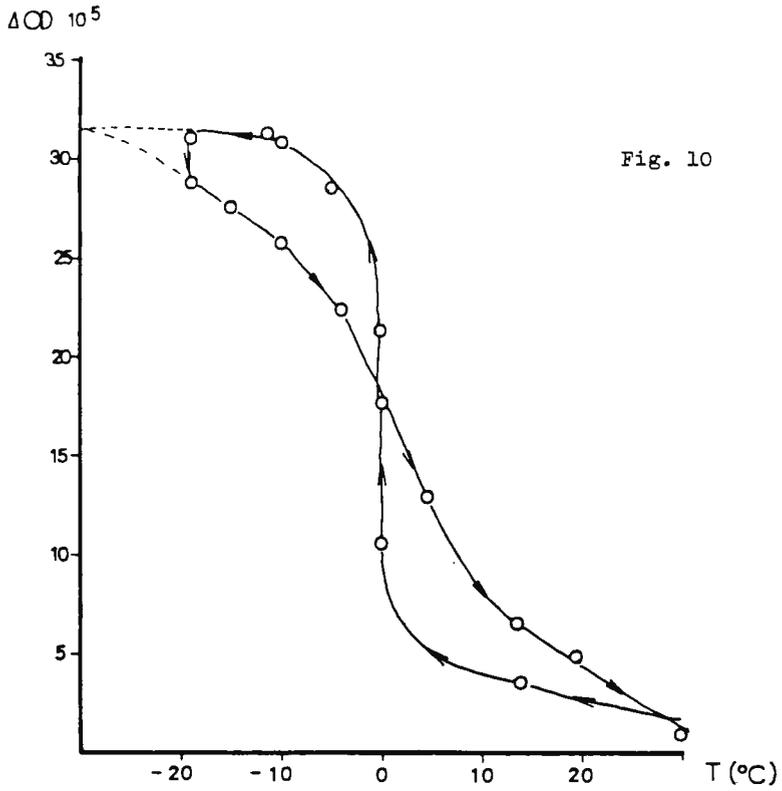


Fig 9



Se estudiaron paralelamente los espectros de dicroísmo circular de polímeros derivados de fosfolípidos conteniendo únicamente una cadena polimerizable en la posición 1 ó 2. En el segundo caso el espectro de dicroísmo circular es muy intenso y se caracteriza por una banda estrecha a 520 nm superpuesta a un sistema positivo-negativo de intensidad mucho menor. Aunque se producen cambios con la temperatura, la banda estrecha asociada con el pico a mayor longitud de onda no llega a desaparecer. El polímero derivado del fosfolípido con la cadena polimerizable en la otra posición (1) presenta menor actividad óptica y su espectro de dicroísmo circular, caracterizado por dos bandas negativas que reproducen el espectro visible, es idéntico al obtenido al polimerizar vesículas de 1,2-bis(10,12-tricosadiinoil)sn-glicero-3-fosforilcolina.

Las observaciones realizadas por la Dra. Alonso<sup>(36)</sup> sobre vesículas de 1,2-bis(10,12-pentacosadiinoil)sn-glicero-3-fosforilcolina, polimerizadas a diferentes temperaturas indican cambios en el espectro visible y rendimiento de polimerización que pueden interpretarse como variaciones en la composición del polímero obtenido. Se estudió el espectro de dicroísmo circular de una serie de vesículas de este fosfolípido polimerizadas a distintas temperaturas y se observó que los cambios en el espectro visible estaban acompañados de cambios en la forma del espectro de dicroísmo circular que, de acuerdo con los espectros de polímeros de composición química definida, indicaban un predominio de la polimerización de la cadena 1 a baja temperatura y un aumento progresivo de la polimerización de la cadena 2 a una temperatura más alta.

En esta serie pudo observarse también una variación de la actividad óptica respecto a la absorción en el visible. Esta relación aumenta con la temperatura de polimerización hasta un máximo y vuelve a descender al acercarse a la temperatura de transición (Fig. 11).

Las variaciones en la estructura del polímero obtenido a distintas temperaturas seguramente proceden de cambios en el empaquetamiento de los grupos diacetilenos en el interior

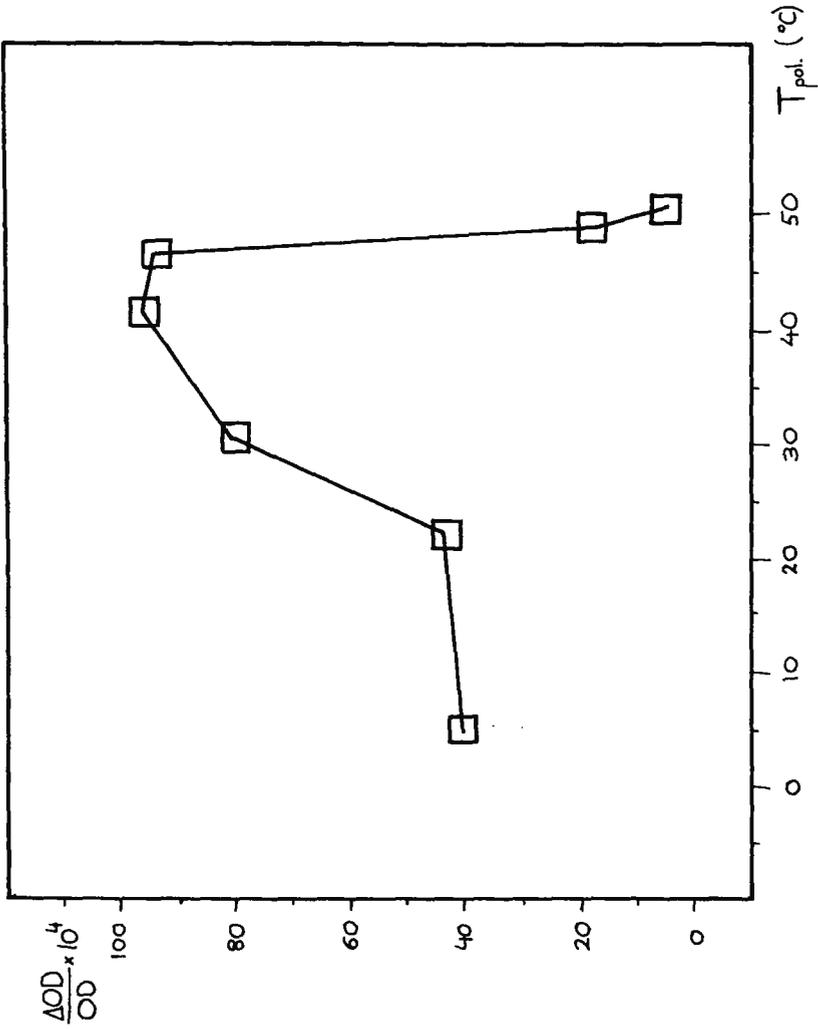


Fig. 11

de la bicapa, que pasan por un punto óptimo para la polimerización a temperaturas diferentes para las dos cadenas de un fosfolípido. Las variaciones en la intensidad del espectro probablemente proceden de cambios en la actividad óptica intrínseca de cada tipo de polímero aunque otras explicaciones son posibles.

Las vesículas polimerizadas de 1,2- bis(10,12-tricosadiinoil)sn-glicero-3-fosforilcolina, conteniendo la proteína ATPasa dependiente del calcio de retículo sarcoplásmico (EC 3.6.1.3), presentan un espectro de dicroísmo circular muy interesante. Después de polimerizar a cero grados el espectro presenta una banda negativa de gran intensidad a 630 nm y un sistema positivo-negativo centrado a 640 nm de intensidad menor.

Al aumentar la temperatura se produce un desplazamiento de todo el sistema a menores longitudes de onda, con un descenso simultáneo de intensidad. Paralelamente aparece un sistema igual alrededor de 530 nm que crece en intensidad hasta llegar a un máximo (Fig.12).

La aparición de un estado metaestable muy ordenado - con absorción en la zona de 630-640 nm- y la similaridad del espectro de dicroísmo circular con el obtenido del polímero en que sólo la posición 2 de los fosfolípidos ha sufrido entrecruzamiento sugiere que la proteína causa una ordenación de parte del lípido, que es el que reacciona preferentemente dando un polímero de actividad óptica elevada y estructura correspondiente a la forma IV de la figura 8

### 5.5 Origen de la actividad óptica

La actividad óptica en sistemas estructuralmente simétricos puede ser de origen configuracional y conformacional. En el primer caso el cromóforo adquiere actividad óptica debido a la proximidad física de un centro quiral que crea un ambiente asimétrico. En el segundo caso el propio cromóforo adopta una conformación asimétrica.

Los polímeros de fosfolípidos diacetilénicos poseen un centro asimétrico en el carbono 2 del resto de glicerol. Sin embargo en los liposomas, el contacto directo entre el cen

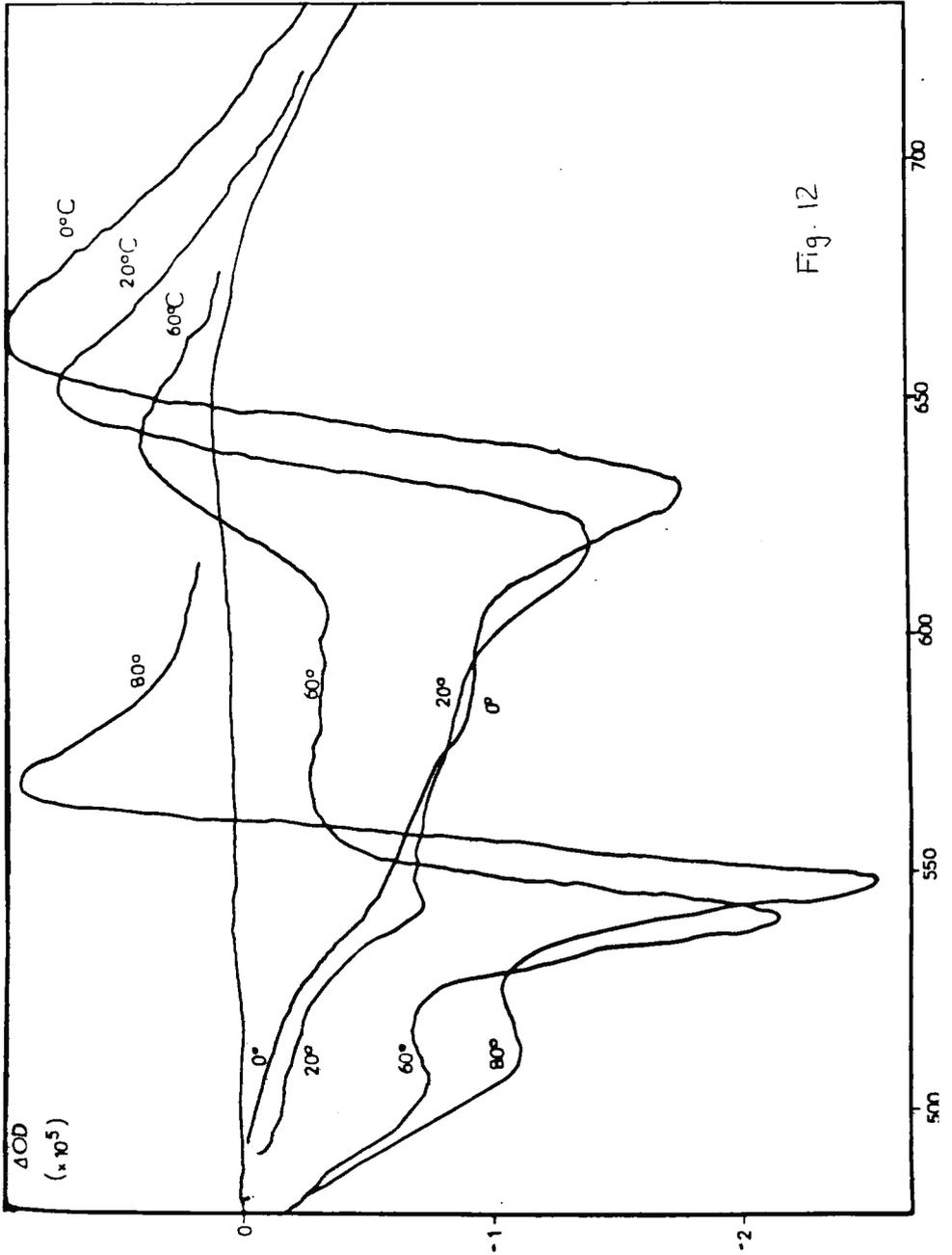
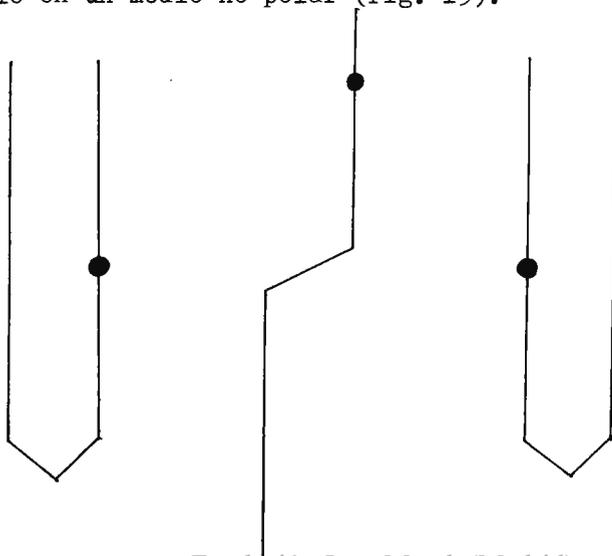


Fig. 12

tro asimétrico y el cromóforo es imposible puesto que el segundo está en el interior de la bicapa, mientras que el primero se encuentra cerca de la superficie acuosa. Por otra parte, todos los intentos de inducir quiralidad en polidiacetilenos solubles por adición de solutos quirales o disolventes asimétricos fueron infructuosos. Hemos de suponer pues que la actividad óptica observada refleja una conformación asimétrica del polímero.

Debe destacarse la observación de que la actividad óptica depende del disolvente empleado: en ningún caso se ha podido observar actividad óptica en soluciones de cloroformo, que es un buen disolvente de las cadenas carbonadas. Asimismo, la solubilidad de las cadenas de ácido graso en metanol disminuye al disminuir la temperatura y paralelamente, la actividad óptica se hace más importante. Estas observaciones sugieren un papel importante de las interacciones de tipo hidrofóbico en la transmisión de la quiralidad desde el grupo polar.

Pueden sugerirse dos modelos que explican la mayoría de los datos experimentales. El primero de ellos consistiría en un plegamiento de tipo helicoidal de las cadenas alifáticas que podría transmitir la asimetría del grupo polar al interior de la bicapa. El segundo se basa en la existencia posible de dos estructuras enantioméricas cuya interconversión sólo es posible en un medio no-polar (Fig. 13).



## 6. Aplicaciones Biológicas

Las proteínas intrínsecas de membrana son aquellas que precisan para su actividad de un sistema de bicapa en el que se hallan total o parcialmente inmersas.

Para comprobar la capacidad de nuestros lípidos sintéticos para proporcionar el ambiente lipídico apropiado para proteínas intrínsecas de membrana, se llevó a cabo un proceso de substitución de los lípidos naturales de dos proteínas intrínsecas por lípidos diacetilénicos sintéticos. Este proceso se llevó a cabo disolviendo la membrana natural con ayuda de un detergente (desoxicolato) y eliminando a continuación dicho detergente en presencia de un exceso de lípido sintético.

Las proteínas tratadas de este modo fueron, bacteriorodopsina (de la membrana púrpura de Halobacterium halobium) y la ATPasa dependiente de calcio del retículo endoplásmico de conejo. La primera proteína es capaz de formar un gradiente de protones a través de la membrana utilizando energía luminosa y su actividad se determinó cualitativamente por la variación del pH de una suspensión de vesículas reconstituidas al iluminarlas. En el segundo caso la actividad se determinó por el método de Rosing modificado<sup>(37)</sup>, encontrándose que su valor coincidía con el obtenido efectuando la reconstitución con lípidos naturales.

La irradiación con luz UV de las muestras de bacteriorodopsina causa la destrucción del pigmento de la proteína, por lo que no pudo determinarse su actividad después de polimerizar. La irradiación de complejos con ATPasa y lípidos polimerizables causa un descenso de la actividad enzimática del 50%, mientras que los controles, conteniendo lípidos saturados, permanecen inalterados.

En el departamento de Química Biofísica del Royal Free Hospital School of Medicine, donde se ha llevado a cabo este trabajo, se está estudiando la incorporación de lípidos polimerizables en membranas de microorganismos auxotróficos para los ácidos grasos. Se ha conseguido incorporar en la membrana de Acholeplasma laidlawii ácidos grasos diacetilénicos de cadena relativamente corta (C-20) y polimerizarlos con luz UV y se están ensayando otros métodos de polimerización.

Otros intentos de aplicación de lípidos polimerizables pretenden estabilizar estructuras de bicapa, en liposomas o depositadas sobre diferentes superficies, mediante entrecruzamiento de los lípidos constituyentes. Estas aplicaciones tienen interés en medicina (ya que los liposomas son transportadores potenciales de fármacos pero resultan poco estables en el torrente sanguíneo) o para producir recubrimientos biocompatibles para aplicaciones especiales.

## 7. Conclusiones

En el marco de un estudio sobre el uso de fosfolípidos polimerizables para la determinación de la estructura de las membranas y el efecto de la fluidez de los lípidos en la actividad de las proteínas intrínsecas de membrana, se han sintetizado y purificado glicerofosforilcolinas conteniendo uno o dos grupos diacetilénicos que pueden polimerizar en fase sólida por acción de la luz ultravioleta.

Se ha estudiado el espectro de RMN de carbono 13 de los fosfolípidos diacetilénicos y de sus ácidos grasos precursores. En este trabajo se han podido asignar todas las señales del ácido y la mayor parte de las del fosfolípido, mediante el uso de reactivos de desplazamiento y tiempos de relajación. Se ha estudiado el uso de reactivos de desplazamiento para la determinación de distancias relativas en moléculas flexibles.

Se han observado efectos de proximidad entre grupos diacetilénicos en distintas cadenas de ácidos grasos en un mismo fosfolípido o en fosfolípidos distintos. Este efecto consiste en el ensanchamiento de los picos correspondientes y se ha podido descubrir su origen mediante la determinación de la dependencia de la anchura de banda con el campo magnético.

Se ha estudiado la movilidad de las cadenas alifáticas de fosfolípidos con dos, uno o ningún triple enlace, mediante la determinación de los tiempos de relajación y se ha puesto de manifiesto la difícil reorientación del sistema diacetilénico.

Se han polimerizado los lípidos sintetizados, en distintas condiciones y se ha comprobado la existencia de distintos tipos de polímero y puntos de entrecruzamiento en el polímero obtenido a partir de fosfolípidos con dos cadenas polime-

rizables. Los distintos tipos de polímero se han caracterizado por síntesis de fosfolípidos que sólo pueden dar un tipo de polimerización.

Se han estudiado los espectros visible, reman y de dicroísmo circular de los polímeros resultantes, en distintas condiciones. Se ha comprobado la dependencia del espectro visible y de dicroísmo circular con la polaridad del disolvente y la temperatura.

Se ha detectado por primera vez actividad óptica en un polímero diacetilénico y se han sugerido modelos para explicar su origen.

Se ha comprobado la capacidad de los lípidos diacetilénicos para proporcionar un ambiente lipídico compatible con la actividad de las proteínas bacteriorodopsina y ATPasa dependiente del calcio.

8. Bibliografía y Notas

1. Singer, S.J., Nicolson, G.L.; Science, 175, 720-31 (1972)
2. Singer, S.J., Ann.Rev.Biochem., 43, 805-33 (1974)
3. McElhaney, R.N., J.Mol.Biol., 84, 145-57 (1974)
4. Chapman, D., Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 73, 3971-5 (1976)
5. Chapman, D., Symposia of the Faraday Soc., 5, 163-74 (1971)
6. Khorana, H.G. et al., Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 74, 4315-19(1977)
7. La nomenclatura utilizada en los trabajos sobre fosfolípidos no es única y en distintas publicaciones aparecen indistintamente citados como derivados del glicerol (considerando la fosforilcolina como un substituyente)-nomenclatura adoptada aquí- o como derivados del ácido fosfatídico (1-acil,2-acil-sn-glicero-3-fosfórico).

La designación de la configuración del centro quiral del resto de glicerol tradicionalmente se hace mediante la numeración estereoespecífica (sn) que es aquella que se obtiene numerando de arriba a abajo el glicerol en proyección de Fisher cuando el hidroxilo secundario se coloca hacia la izquierda (configuración L).

8. Brockerhoff, H., Yurkowski, M.; Can.J.Biochemistry., 43, 1777 (1965)
9. Eglinton, G., McCrae, W., Adv.Org.Chem., 4, 225-328 (1963)
10. Ayres, D.G., "Carbanions in Synthesis" Oldbourne Press, London(66)
11. Slotboom, A.J., Bensen, P.P.M.; Chem.Phys.Lipids, 5, 301 (1970)
12. Baer, E., Buchnea, D., Can.J.Biochem.Physiol., 37, 953-9 (1959)
13. Khorana, H.G. et al., Proc.Natl.Acad.Sci,USA, 74, 4315-19(1977)
14. Warner, T.G., Benson, A.A., J.Lipid Res., 18, 548-52 (1977)
15. Staab, H.A., Angew.Chem.Inter.Ed., 1, 351-67 (1962)
16. Hermetter, A., Paltauf, F.; Chem.Phys.Lipids, 28, 111-15 (1981)

17. Zeisberg, R., Bohlmann, F.; Chem. Ber., 107, 3800-3805 (1974)
18. Vold, R.L. et al; J. Chem. Phys., 48, 3831 (1968)
19. Levy, G.C., Lichter, R., Nelson, G. "<sup>13</sup>C NMR Spectroscopy", Wiley New York (1980)
20. La coincidencia accidental de los picos hace menos fiables estos datos, especialmente para los carbonos 6 y 16, que posiblemente presentan tiempos más diferentes.
21. Morris, A.T., Dwek, R.A.; Quart. Rev. Biophys., 10, 421-84 (1977)
22. Dyer, D.S., Cunningham, J.A., Brooks, J.J., Sievers, R.E., Rondeau, R.E.; in "NMR shift reagents", Sievers, R.E. Ed. Acad. Press (1973)
23. Morawetz, H., "Macromolecules", Wiley-Interscience, NY (1965)
24. Charrier, C., Dorman, D.E., Roberts, J.D., J. Org. Chem., 38, 2644 (1973)
25. Wehrli, F.W., Wirthlin, T. "Interpretation of carbon-13 NMR Spectra", Heyden, New York (1976)
26. Baughman, R.H., Yee, K.C.; J. Polym. Sci. Macromol. Rev., 219 (1978)
27. Chance, R.R., Patel, G.N., J. Polym. Sci. Polym. Phys., 16, 859 (1978)
28. Chapman, D., Quart. Rev. Biophysics, 8, 185-235 (1975)
29. Johnston, D.S., Sanghera, S., Pons, M., Chapman, D.; BBA, 602, 57 (1980)
30. Philpott, M.R., Chem. Phys. Lett., 50, 18-21 (1977)
31. Patel, G.N., Walsh, E.K., J. Polym. Sci. Polym. Lett., 17, 203 (1979)
32. Patel, G.N. et al, J. Polym. Sci. Polym. Lett. 16, 607-14 (1978)
33. Chapman, D. et al, Biol. Membr., 2, 91-144 (1973)
34. Bloor, D., Batchelder, D.N., Proc. 5<sup>th</sup> Int. Conf. Raman Spec. Univ. Friburg, Verlag-Friburg 1976
35. Tanford, C., Adv. Protein Chemistry, 23, 122-282 (1968)
36. Alonso, A. Comunicación Personal
37. Hoffmann, W., Sarzala, G., Gomez-Fernandez, J.C., Goñi, F., Restall, C. J. Mol. Biol., 141, 119-132 (1980)





# FUNDACION JUAN MARCH

## SERIE UNIVERSITARIA

### TITULOS PUBLICADOS

### Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- |    |                                                                                                                                 |    |                                                                                                              |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2  | Mulet, A.:<br>Estudio del control y regulación, mediante un calculador numérico, de una operación de rectificación discontinua. | 28 | Zugasti Arbizu, V.:<br>Analizador diferencial digital para control en tiempo real.                           |
| 4  | Santiuste, J. M.:<br>Combustión de compuestos oxigenados.                                                                       | 29 | Alonso, J. A.:<br>Transferencia de carga en aleaciones binarias.                                             |
| 5  | Vicent López, J. L.:<br>Películas ferromagnéticas a baja temperatura.                                                           | 30 | Sebastián Franco, J. L.:<br>Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.            |
| 7  | Salvá Lacombe, J. A.:<br>Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.                                       | 39 | Blasco Olcina, J. L.:<br>Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.   |
| 8  | Plá Carrera, J.:<br>Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.                                                 | 44 | Sánchez Rodríguez, L.:<br>Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae.                                   |
| 11 | Drake Moyano, J. M.:<br>Simulación electrónica del aparato vestibular.                                                          | 45 | Acha Catalina, J. I.:<br>Sistema automático para la exploración del campo visual.                            |
| 19 | Purroy Unanua, A.:<br>Estudios sobre la hormona Natriurética.                                                                   | 47 | García-Sancho Martín, F. J.:<br>Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.                 |
| 20 | Serrano Molina, J. S.:<br>Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.                                    | 48 | García García, A.:<br>Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.         |
| 22 | Pascual Acosta, A.:<br>Algunos tópicos sobre teoría de la información.                                                          | 49 | Trillas, E., y Alsina C.:<br>Introducción a los espacios métricos generalizados.                             |
| 25 | I Semana de Biología:<br>Neurobiología.                                                                                         | 50 | Pando Ramos, E.:<br>Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.                                  |
| 26 | I Semana de Biología:<br>Genética.                                                                                              | 51 | Orozco, F., y López-Fanjul, C.:<br>Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora. |
| 27 | I Semana de Biología:<br>Genética.                                                                                              |    |                                                                                                              |

- 52 Gallego Fernández, A.:  
**Adaptación visual.**
- 55 Castellet Solanas, M.:  
**Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.**
- 56 Sánchez Lazo, P.:  
**Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.**
- 57 Carrasco Llamas, L.:  
**Estudios sobre la expresión genética de virus animales.**
- 59 Afonso Rodríguez, C. N.:  
**Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.**
- 63 Vidal Costa, F.:  
**A la escucha de los sonidos cerca de  $T_{lc}$  en el  $4He$  líquido.**
- 65 Andréu Morales, J. M.:  
**Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.**
- 66 Blázquez Fernández, E.:  
**Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.**
- 69 Vallejo Vicente, M.:  
**Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.**
- 76 Martín Pérez, R. C.:  
**Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el  $Cr_2O_3$  policristalino.**
- 80 Guerra Suárez, M.ª D.:  
**Reacción de Ámidas con compuestos organoaluminicos.**
- 82 Lamas de León, L.:  
**Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.**
- 84 Repollés Moliner, J.:  
**Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.**
- 86 II Semana de Biología:  
**Flora y fauna acuáticas.**
- 87 II Semana de Biología:  
**Botánica.**
- 88 II Semana de Biología:  
**Zoología.**
- 89 II Semana de Biología:  
**Zoología.**
- 91 Viéitez Martín, J. M.:  
**Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.**
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:  
**Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.**
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:  
**Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.**
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:  
**Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.**
- 96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:  
**Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.**
- 101 Fernández de Heredia, C.:  
**Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina.**
- 103 Guix Pericas, M.:  
**Estudio morfométrico, óptico y ultraestructural de los inmuncitos en la enfermedad celíaca.**
- 105 Llobera i Sande, M.:  
**Gluconeogénesis «in vivo» en ratas sometidas a distintos estados tiroideos.**
- 106 Usón Finkenzeller, J. M.:  
**Estudio clásico de las correcciones radiactivas en el átomo de hidrógeno.**
- 107 Gallán Jiménez, R.:  
**Teoría de la dimensión.**
- 111 Obregón Perea, J. M.ª:  
**Detección precoz del hipotiroidismo congénito.**

- 115 Cacicedo Egües, L.:  
**Mecanismos moleculares de acción de hormonas tiroideas sobre la regulación de la hormona tirótopa.**
- 121 Rodríguez García, R.:  
**Caracterización de lisozimas de diferentes especies.**
- 122 Carravedo Fantova, M.:  
**Introducción a las Orquídeas Españolas.**
- 125 Martínez-Almoyna Rullán, C.:  
**Contribución al estudio de la Manometría Ano-rectal en niños normales y con alteraciones de la continencia anal.**
- 127 Marro, J.:  
**Dinámica de transiciones de fase: Teoría y simulación numérica de la evolución temporal de aleaciones metálicas enfriadas rápidamente.**
- 129 Gracla García, M.:  
**Estudio de cerámicas de interés arqueológico por espectroscopia Mössbauer.**
- 131 García Sevilla, J. A.:  
**Receptores opiáceos, endorfinas y regulación de la síntesis de monoaminas en el sistema nervioso central.**
- 132 Rodríguez de Bodas, A.:  
**Aplicación de la espectroscopia de RPE al estudio conformacional del ribosoma y el tRNA.**
- 136 Aragón Reyes, J. J.:  
**Interacción del Ciclo de los Purín Nucleótidos con el Ciclo del Acido Cítrico en Músculo Esquelético de Rata durante el Ejercicio.**
- 139 Genís Gálvez, J. M.:  
**Estudio citológico de la retina del camaleón.**
- 140 Segura Cámara, P. M.:  
**Las sales de tiazolio ancladas a soporte polimérico insoluble como catalizadores en química orgánica.**
- 141 Vicent López, J. L.:  
**Efectos anómalos de transporte eléctrico en conductores a baja temperatura.**
- 143 Nieto Vesperinas, M.:  
**Técnicas de prolongación analítica en el problema de reconstrucción del objeto en óptica.**
- 145 Arias Pérez, J.:  
**Encefalopatía portosistémica experimental.**
- 147 Palanca Soler, A.:  
**Aspectos Faunísticos y Ecológicos de Carábidos Altoaragoneses.**
- 150 Vioque Cubero, B.:  
**Estudio de procesos bioquímicos implicados en la abscisión de la acituna.**
- 151 González López, J.:  
**La verdadera morfología y fisiología de Azotobacter: células germinales.**
- 152 Calle García, C.:  
**Papel modulador de los glucocorticoides en la población de receptores para insulina y glucagón.**
- 154 Alberdi Alonso, M.<sup>a</sup> T.:  
**Paleoecología del yacimiento del Neógeno continental de Los Valles de Fuentidueña (Segovia).**
- 156 Gella Tomás, F. J.:  
**Estudio de la fosforilasa kinasa de hígado y leucocitos: purificación, características y regulación de su actividad.**
- 157 Margalef Mir, R.:  
**Distribución de los macrofitos de las aguas dulces y salobres del E. y NE. de España y dependencia de la composición química del medio.**
- 158 Alvarez Fernández-Represa, J.:  
**Reimplantación experimental de la extremidad posterior en perros.**
- 161 Tomás Ferré, J. M.<sup>a</sup>:  
**Secreción y reutilización de trifosfato de adenosina (ATP) por sinaptosomas colinérgicos.**
- 163 Ferrándiz Leal, J. M.:  
**Estudio analítico del movimiento de rotación lunar.**

- 164 Rubió Lois, M.; Uriz Lespe, M.ª J., y Bibiloni Rotger, M.ª A.:  
**Contribución a la fauna de esponjas del litoral catalán. Esponjas córneas.**
- 165 Velasco Rodríguez, V. R.:  
**Propiedades dinámicas y termodinámicas de superficies de sólidos.**
- 166 Moreno Castillo, I.:  
**Ciclo anual del zooplancton costero de Gijón.**
- 168 Durán García, S.:  
**Receptores insulínicos en hipotálamo de rata: localización subcelular y mecanismo (s) de regulación.**
- 169 Martínez Pardo, R.:  
**Estudio del mecanismo secretor de hormona juvenil en oncopeltus fasciatus.**
- 171 García Jiménez, J.:  
**Fusariosis del gladiolo: un estudio preliminar.**
- 173 Fernández Aláez, C.:  
**Análisis estructural en sabinares de la provincia de León.**
- 174 Furio Egea, J.:  
**Citokinas en agrrios. Actividades endógenas, efectos fisiológicos y aplicaciones.**
- 180 Moreno Rodríguez, J. M.:  
**Estudios ecológicos en jarales (cistion laurifolii): Variación anual de algunos factores del entorno y manifestaciones fenológicas.**





