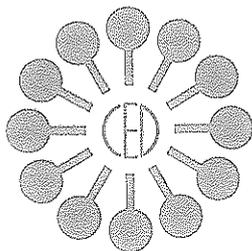


# COMUNICACIONES

presentadas a la

**XXVI JORNADAS DEL COMITE  
ESPAÑOL DE LA DETERGENCIA**



# COMITÉ ESPAÑOL DE LA DETERGENCIA TENSIOACTIVOS Y AFINES (C.E.D.)

C/. JORGE GIRONA, 18-26 - TELS. 204 02 12 - 204 06 00 - FAX 204 59 04 - 280 53 00 - TELEX 97977 IDEB E - 08034-BARCELONA

Dr. A. de la Maza  
CID/CSIC  
Barcelona

Barcelona, 4 abril 1995

Ref.: Solubilización de liposomas por octil glucósido

Deseo agradecerle, en nombre del Comité Científico de las XXVI Jornadas del CED y en el mío propio, su fructífera colaboración en el desarrollo de las mismas, lo que sin duda ha contribuido en el éxito alcanzado.

Confiando poder contar de nuevo con su interesante participación en futuras Jornadas, le saluda atentamente,

J. Sánchez Leal  
Secretario General

JSL/ms

# COMUNICACIONES

Siglas para las referencias bibliográficas de estas comunicaciones:  
Jorn. Com. Esp. Deterg. 261 (1995) pág. ... a...



Editado en Barcelona, en 1995, por:  
«COMITE ESPAÑOL DE LA DETERGENCIA,  
TENSIOACTIVOS Y AFINES»  
(C.E.D.)

C/ Jordi Girona Salgado, 18-26  
08034 - BARCELONA  
ESPAÑA

Con la colaboración de:



Generalitat de Catalunya  
Departament d'Indústria i Energia  
Direcció General de Seguretat Industrial

Polimerización en emulsión con siembra de partículas de alúmina. A. VALEA, M.L. GONZALEZ .....	323
Influencia del tensioactivo en la polimerización núcleo-corteza. A. VALEA, M.L. GONZALEZ .....	337
Solubilización de liposomas por octil glucosido. A. DE LA MAZA, J.L. PARRA .....	353
Relative reactivities in alkylbenzene sulphonation a kinetic and mechanistic model. D.W. ROBERTS .....	369
An effective thickening biopolymer for acid systems. V. GUILLOU, P. BOITTIAUX .....	379
3-O-Acyl-D-glucose derivative micelle formation, CMC and thermodynamics. R. BIKANGA, P. BAULT, P. GODE, G. RONCO, P. VILLA .....	387
HLB Determination of 3-O-Acyl-D-glucose derivatives.	397

## SOLUBILIZACION DE LIPOSOMAS POR OCTIL GLUCOSIDO

A. de la Maza y J.L. Parra, Departamento de Tensioactivos C.I.D.- C.S.I.C

### SUMMARY

The transitional stages induced by the interaction of the surfactant Octyl Glucoside on phosphatidylcholine liposomes were studied by means of light scattering and permeability changes. A linear correlation was observed between the effective surfactant/lipid molar ratio ( $R_e$ ) and the OG concentration in the initial and final interaction stages despite showing almost a constant value during bilayer saturation. The bilayer/aqueous phase partition coefficient ( $K$ ) decreased in the subsolubilizing interaction steps and increased during solubilization. Thus, whereas a preferential distribution of surfactant monomers in the aqueous phase with respect to the lipid bilayers took place in the initial interaction steps a larger association of OG molecules with these lipids in bilayers occurred during solubilization. The initial steps of bilayer saturation (50-70% permeability) were attained for a lower free surfactant ( $S_w$ ) than that for its critical micellar concentration ( $cmc$ ). When  $S_w$  reached the OG  $cmc$  solubilization started to occur ( $R_{e_{sat}}$ )

### RESUMEN

Se han investigado los estadios implicados en la interacción del tensioactivo octil glucosido sobre liposomas constituidos por fosfatidilcolina. Se han estudiado los cambios en la permeabilidad de las bicapas y la variación de luz dispersada por el sistema tensioactivo/lípido durante dicho proceso. Se observa una correlación lineal entre las relaciones molares de tensioactivo/lípido ( $R_e$ ) y la concentración total de tensioactivo en los intervalos inicial y final del proceso. Sin embargo, la  $R_e$  permaneció constante durante la saturación de las bicapas. Los coeficientes de distribución del tensioactivo entre bicapa y medio acuoso ( $K$ ) disminuyeron a lo largo de las interacciones subsolubilizantes y aumentaron durante la solubilización. Así, mientras en las primeras etapas del proceso se observa una mayor presencia del tensioactivo en el medio acuoso, en la solubilización se aprecia una mayor asociación de las moléculas de tensioactivo con los lípidos de las bicapas que conduce a la formación de sistemas micelares mixtos. Los estadios iniciales de saturación de las bicapas se alcanzaron para concentraciones de tensioactivo libre inferiores a las de su  $cmc$ . Sin embargo, cuando la concentración de tensioactivo libre alcanzó la  $cmc$  se inició el proceso de solubilización.

-----  
Dirección postal  
Calle Jorge Girona, 18-26  
08034 Barcelona, España.

## INTRODUCCION Y OBJETIVOS

Los tensioactivos son agentes indispensables en los procesos de solubilización y de reconstitución de membranas [1-3]. Así, se han publicado un buen número de trabajos sobre los principios que gobiernan la interacción de tensioactivos con modelos simplificados de membranas tales como los liposomas [4-7]. Esta interacción conduce a la ruptura de estructuras lamelares y a la formación de micelas mixtas lipido-tensioactivo. Una importante contribución a tales estudios ha sido hecha por Lichtenberg [8] quien postuló que la relación molar efectiva tensioactivo/lípido ( $R_e$ ) capaz de producir saturación y solubilización de estas estructuras dependía de la concentración micelar crítica del tensioactivo así como de los coeficientes de distribución del tensioactivo entre las bicapas y el medio acuoso ( $K$ ), además de la propia naturaleza de los tensioactivos.

Los mecanismos de solubilización y reconstitución de bicapas lipídicas por tensioactivos han sido objeto de numerosas especulaciones en que los fragmentos de bicapa aparecen como estructuras intermedias cruciales tanto en la formación como en los procesos de solubilización [9-11]. Sin embargo, los mecanismos de estas transiciones todavía no se conocen claramente debido a que no se han realizado una detallada descripción de los mismos. Uno de los tensioactivos más comúnmente usados en estos procesos es el tensioactivo no iónico octil glucósido (OG), que presenta una relativamente alta cmc, característica muy adecuada para la reconstitución de bicapas, presentando asimismo un bajo poder desnaturalizante de proteínas y [12-17].

En anteriores investigaciones hemos estudiado algunos parámetros implicados en las interacciones de tensioactivos con liposomas a niveles subsolubilizantes y solubilizantes [18-20]. En el presente trabajo se estudia detalladamente el proceso global implicado en la interacción del tensioactivo octil glucósido con liposomas unilamelares constituidos por fosfatidilcolina, tanto a nivel subsolubilizante como a nivel solubilizante.

## PARTE EXPERIMENTAL

### **Materiales**

La fosfatidilcolina (PC) se purificó a partir de lecitina de huevo (Merck) según el método descrito por Singleton (21) comprobándose su pureza por cromatografía en capa fina (TLC). El tensioactivo octil glucósido, fue suministrado por Rohm and Haas. El tampón PIPES [Piperazina-1,4 bis(2-etanosulfónico ácido)] fue suministrado por Merck S.A. El tampón utilizado se preparó a partir de 10 mM PIPES y fue ajustado a pH 7.20 con NaOH. Dicho tampón contenía asimismo 100mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las membranas de policarbonato fueron suministradas por Nucleopore. El agente fluorescente 5-(6)Carboxifluoresceína (CF) fue suministrado por Eastman Kodak y posteriormente fue purificado por cromatografía en columna (22)

### **Preparación de liposomas**

Liposomas unilamelares de tamaño definido (200nm) se prepararon por extrusión de vesículas unilamelares obtenidas por el método de fase inversa (15). La extrusión se realizó a través de membranas de policarbonato de tamaño de poro decreciente comprendido entre 800-200 nm, hasta alcanzar un tamaño homogéneo de distribución de vesícula (24). A fin de estudiar los cambios de permeabilidad de los liposomas los liposomas conteniendo en su interior CF se aislaron del agente fluorescente no encapsulado por separación en columna utilizando resina Sephadex G-50 medium (Pharmacia). El rango de concentraciones de fosfolípido en los liposomas estudiados estuvo comprendido entre 1.0 y 10.0 mM.

### **Concentración lipídica y distribución de tamaños de vesícula de los liposomas**

La concentración fosfolipídica de los liposomas se determinó por medio de cromatografía en capa fina acopiada a un sistema automático de detección de ionización de llama (FID) (Introskan MK-5, Iatron Lab. Inc. Tokyo, Japan) [25]. La distribución de tamaños de las vesículas y los índices de polidispersidad (P.I.) de dichas poblaciones después de su preparación y durante su interacción con el tensioactivo OG se determinaron utilizando un espectrofotómetro de correlación fotónica Malvern (Autosizer 4700c PS/MV). Las determinaciones se hicieron en todos los casos por

medidas del número de partículas a 25°C con un ángulo de lectura de 90°. Después de la preparación de los liposomas el tamaño medio de partícula varió muy poco (PC concentración coimpureificada entre 1.0-10.0 mM) presentando en todos los casos valores cercanos a 200 nm (P.I. menor que 0.1), lo cual indicó que la distribución de tamaño de vesícula obtenido fue muy homogéneo.

### Parámetros de solubilización

Al definir los parámetros implicados en la solubilización de liposomas es esencial considerar que las mezclas de lípidos y tensioactivos no presentan un comportamiento ideal debido a las interacciones específicas de sus componentes, tal como se ha demostrado para diversos compuestos anfifílicos [26,27]. A fin de evaluar las alteraciones causadas por el tensioactivo OG sobre bicapas lipídicas, se define la relación molar efectiva OGIPL. Re en un agregado (liposoma o micela) como [8]:

$$Re = \frac{[\text{tensioactivo total}] - [\text{tensioactivo monomérico}]}{[\text{fosfolípido total}] - [\text{fosfolípido monomérico}]} \quad (1)$$

El segundo término del denominador es despreciable debido a la baja solubilidad del fosfolípido en agua. Asimismo, está generalmente admitido que la incorporación de los tensioactivos a los liposomas, produciendo la saturación y la posterior solubilización de estas estructuras está gobernado por un equilibrio en la distribución de las moléculas del tensioactivo entre las bicapas lipídicas y el medio acuoso.

A partir del análisis del modelo de bipartición para sistemas de sales biliares/lecitina propuesto por Schurtenberger [28], Lichtenberg [8] y Almog [13] demostraron que para mezclas de lípidos (concentración PL (mM)) y tensioactivo (concentración  $S_T$  (mM)), en medio acuoso diluido, la distribución de tensioactivo entre las bicapas lipídicas y el medio acuoso presenta un coeficiente de partición  $K$ , dado (in  $\text{mM}^{-1}$ ) por

$$K = \frac{S_B}{[\text{PLI-S}] \cdot S_W} \quad (2)$$

donde  $S_B$  es la concentración de tensioactivo en las bicapas (mM) y  $S_W$  es su

concentración en el medio acuoso (mM). Para  $PL \gg S_B$ , la definición de K, tal como es dada por Schurtenberger, resulta:

$$K = \frac{S_B}{(PL \cdot S_w)} = \frac{Re}{S_w}$$

donde Re es la relación efectiva *tensioactivo/fosfolípido* ya indicada: ( $Re = S_B/PL$ ). Bajo cualquier otra condición debe emplearse la ecuación 2 para definir K, resultando

$$K = \frac{Re}{S_w [1 + Re]} \quad (4)$$

Esta aproximación es consistente con los datos experimentales ofrecidos por Lichtenberg [8] y Almog [13] para diferentes mezclas *tensioactivo/fosfolípido* para un amplio rango de valores de Re. Dado que el rango de concentraciones de fosfolípido usadas en nuestra investigación es similar a las usadas por Almog, el parámetro K ha sido determinado usando esta ecuación.

La determinación de estos parámetros se llevó a cabo en base a la dependencia lineal existente entre las concentraciones de *tensioactivo necesarias para alcanzar dichos parámetros* y la correspondiente concentración de fosfolípido en los liposomas que puede ser descrita por la ecuación:

$$S_T = S_w + Re \cdot [PL] \quad (5)$$

donde la Re y la concentración acuosa de *tensioactivo* ( $S_w$ ) corresponden para cada recta respectivamente con la pendiente y la ordenada en el origen.

Las *tensiones superficiales* de las soluciones tamponadas *conteniendo concentraciones de crecientes del tensioactivo OG1* fueron determinadas por medio del método del anillo [29] utilizando un tensiómetro automático Krüss. La *concentración de tensioactivo OG* fue determinada a partir del cambio en la pendiente de los valores de *tensión superficial* al representarlos frente a la correspondiente concentración de *tensioactivo*.

### **Alteraciones en la permeabilidad y solubilización de liposomas**

Las alteraciones en la permeabilidad de los liposomas causadas por el *tensioactivo OG*

se determinaron midiendo el incremento de la intensidad de fluorescencia de dichas suspensiones debidas a la CF difundida desde el interior de las vesículas a la fase acuosa exterior [22]. Las medidas de fluorescencia se realizaron utilizando un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540. La excitación del sistema se ajustó a una longitud de onda de 495 nm, obteniéndose la máxima emisión de fluorescencia de la CF a la longitud de onda de 515,4 nm. Las medidas de intensidad de fluorescencia se realizaron a 25°C. Los porcentajes de CF difundida se calcularon por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ difusión CF} = \frac{I_1 - I_0}{I_\infty - I_0} \cdot 100 \quad (6)$$

donde  $I_0$  es la intensidad inicial de fluorescencia de las suspensiones de liposomas cargadas con CF en ausencia del tensioactivo,  $I_1$  es la intensidad de fluorescencia medida transcurridos 40 minutos después de la adición del tensioactivo a las suspensiones de liposomas. Este intervalo de tiempo fue escogido como el mínimo periodo de tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en la difusión de la CF en el intervalo de concentraciones lipídicas investigadas (1.0 -10.0 mM).  $I_\infty$  corresponde a la intensidad de fluorescencia que permanece después de la total destrucción de los liposomas [22].

Con respecto a la solubilización de los liposomas, ha sido previamente demostrado que la determinación de los valores estáticos de light-scattering de las suspensiones liposoma/tensioactivo constituye una muy adecuada técnica para el estudio cuantitativo de la solubilización de bicapas lipídicas por tensioactivos [7]. En consecuencia, las perturbaciones solubilizantes producidas por el tensioactivo OG en las suspensiones de liposomas se estudiaron usando dicha técnica. El proceso completo de solubilización puede básicamente caracterizarse por tres parámetros denominados;  $Re_{50\%}$ ,  $Re_{50}$  y  $Re_{min}$ , según la nomenclatura adoptada por Lichtenberg [30]. Estos parámetros corresponden a las relaciones  $Re$  a las que los valores de light-scattering empiezan a decrecer, alcanzan el 50% de su valor inicial y finalmente presentan un valor mínimo y constante. Estos parámetros correspondieron a las relaciones molares OG/fosfolípido a las que el tensioactivo : (a) saturó los liposomas, (b) promovió el 50% de solubilización de las

bicapas y (c) produjo la completa solubilización de estas estructuras.

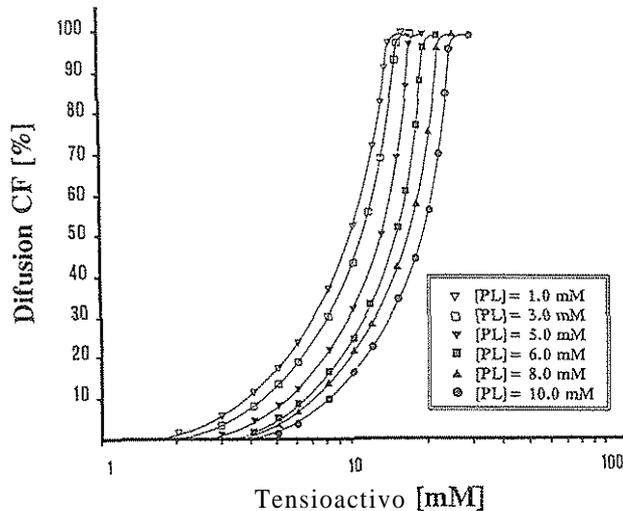
Las suspensiones de liposomas se ajustaron a una adecuada concentración lipídica (desde 2.0 a 20.0 mM). A estas soluciones se añadieron idénticos volúmenes de soluciones adecuadas del tensioactivo y las mezclas resultantes se dejaron en reposo durante un periodo de 24 horas hasta alcanzar su equilibrio. Este período de tiempo fue escogido como el tiempo mínimo necesario para alcanzar un completo equilibrio tensioactivo/ liposome para el rango de concentraciones lipídicas estudiadas [6].

Las medidas de light-scattering se realizaron utilizando un espectrofluorímetro a 25°C ajustando sus dos monocromadores a 500nm. Los ensayos se realizaron por triplicado y los resultados indicados son el valor medio de los hallados.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Para concentraciones subsolubilizantes de tensioactivo, se realizó una investigación sistemática de los cambios en la permeabilidad de los liposomas estudiando los cambios en la difusión de la CF encapsulada en dichas estructuras. La Figura 1 muestra la influencia de la concentración de tensioactivo en los cambios de permeabilidad de las suspensiones de liposomas. Las concentraciones de tensioactivo que dieron lugar a los diferentes porcentajes de difusión de CF se representaron gráficamente frente a la concentración de fosfolípido. A partir de dicha representación se estableció una aceptable relación lineal entre ambos parámetros en todos los casos. Las rectas obtenidas corresponden a la ecuación 5 a partir de la cual se determinaron los parámetros  $R_e$  y  $K$ . Estos resultados incluyendo la concentración de tensioactivo libre  $S_w$  y los coeficientes de regresión de cada una de las rectas obtenidas se incluyen en la Tabla I.

Al aumentar el % de CF difundido se observó una tendencia opuesta en la evolución de los parámetros  $R_e$  y  $K$ . Asimismo el valor de  $S_w$  aumentó al aumentar el % de difusión de la CF. Teniendo en cuenta que el valor experimental de la CMC del OG fue de 18.0 mM, los valores de  $S_w$  fueron en todos los casos inferiores a los de su CMC, confirmando que las alteraciones en la permeabilidad fueron determinadas por la acción de los monómeros del tensioactivo.



**Figura 1.** Difusión de la CF contenida en el interior de liposomas inducida por la presencia del tensioactivo OG.

De acuerdo con el procedimiento descrito por Urbaneja, las interacciones solubilizantes OG/liposomas fueron estudiadas por medio de los cambios de luz dispersada por estos sistemas 24 horas después de la adición del tensioactivo [6]. La Figura 2 muestra las curvas de solubilización de los liposomas (conc. lipídica 1.0 mM - 10.0 mM) resultantes de la adición de cantidades crecientes de OG. A bajas concentraciones de OG se observa un aumento en la luz dispersada debido a la incorporación de moléculas de OG a las bicapas, hasta alcanzar su saturación. Cantidades crecientes de OG conducen a la disminución de la intensidad de luz dispersada hasta un valor constante (solubilización). Las concentraciones de OG para los diferentes % de luz dispersada se obtuvieron por métodos gráficos. Representando la concentración de OG con respecto a la concentración lipídica se obtuvieron rectas en las que, en todos los casos, se estableció una aceptable correlación lineal. A partir de estas rectas (ecuación 5) se determinaron los correspondientes valores de  $Re$  y  $K$  que se indican en la Tabla I.

CF release %	$S_w$ [mM]	Re mole/mole	$r^2$	K, [mM <sup>-1</sup> ]
10	1.8	0.20	0.988	0.092
20	3.4	0.40	0.991	0.084
30	5.3	0.60	0.992	0.070
40	7.2	0.80	0.995	0.061
50	9.1	1.00	0.995	0.054
60	10.0	1.05	0.992	0.051
70	11.0	1.10	0.993	0.047
80	12.0	1.14	0.994	0.044
90	12.95	1.16	0.991	0.041
100	13.9	1.18	0.989	0.038
Light-Scattering %				
100	17.80	1.30	0.992	0.031
90	17.85	1.50	0.990	0.033
80	17.90	1.75	0.991	0.035
70	17.95	1.95	0.991	0.036
60	17.97	2.20	0.992	0.038
50	18.00	2.40	0.993	0.039
40	18.06	2.67	0.994	0.040
30	18.12	2.90	0.993	0.041
20	18.18	3.15	0.991	0.041
10	18.23	3.35	0.990	0.042
0	18.30	3.60	0.990	0.042

**Tabla I.** Parámetros Re, K y  $S_w$  obtenidos en la interacción OG/PC liposomas. Se incluyen los coeficientes de regresión de las rectas obtenidas.

En condiciones subsolubilizantes se aprecia un aumento del valor de Re a medida que el decrece el % de luz dispersada, siendo los valores obtenidos de  $Re_{100}$  y  $Re_{0}$  similares a los previamente descritos [13, 15]. Una tendencia similar se observa para los valores de K que presentan un máximo en los estadios finales del proceso. La concentración de  $S_w$  fue en todos los casos similar a la cmc del OG. La Figura 3 muestra la variación

de Re (Fig 3-A) y K (Fig 3-B) respecto [OG] durante la interacción OG/liposomas (conc lipidica constante 5.0 mM). Se indica la [OG] para interacciones subsolubilizantes y solubilizantes

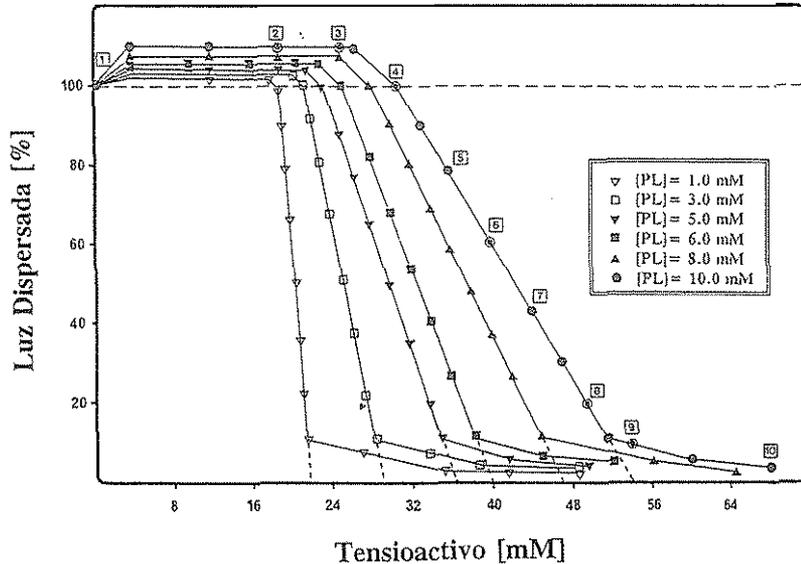


Figura 2. Variación en el % de luz dispersada por los sistemas tensioactivo/liposoma respecto a la concentración de OG.

En las etapas iniciales de la interacción (10-50% permeabilidad) se establece una correlación lineal entre Re y [OG]. Concentraciones crecientes de OG dan lugar a un menor incremento de Re, que alcanza un valor casi constante para el 100% de permeabilidad. La extrapolación de esta curva (línea discontinua) conduce al valor inicial de Re para la solubilización de las bicapas (Re,,). La adición de más tensioactivo dan lugar asimismo a un crecimiento lineal de Re (ahora más marcado) hasta la completa solubilización de las vesículas. El valor de K (Fig 3-B), disminuyó en las interacciones subsolubilizantes especialmente para valores de permeabilidad entre 20-60%. La extrapolación de dicha línea (línea discontinua) conduce directamente al valor inicial de K para la solubilización de las bicapas (100% luz dispersada, Re,,). Cantidades adicionales de tensioactivo dan lugar a un ligero aumento de K.

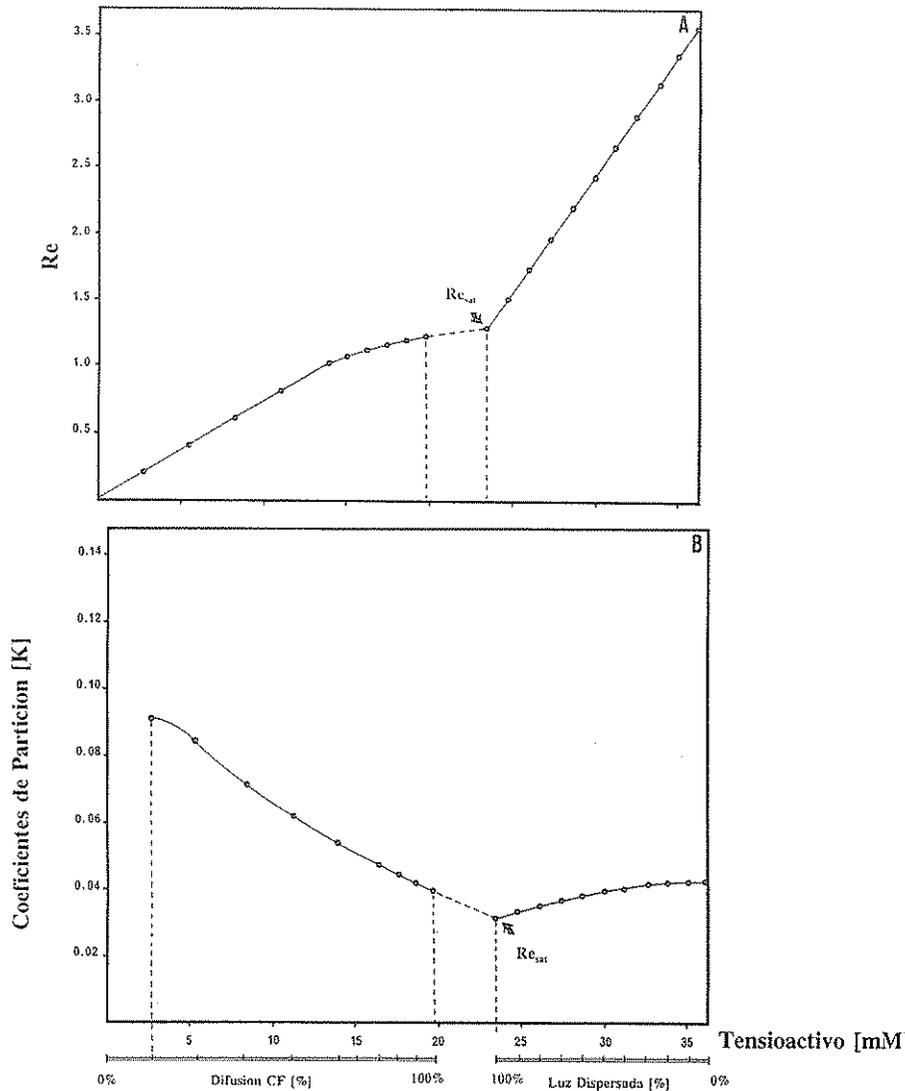
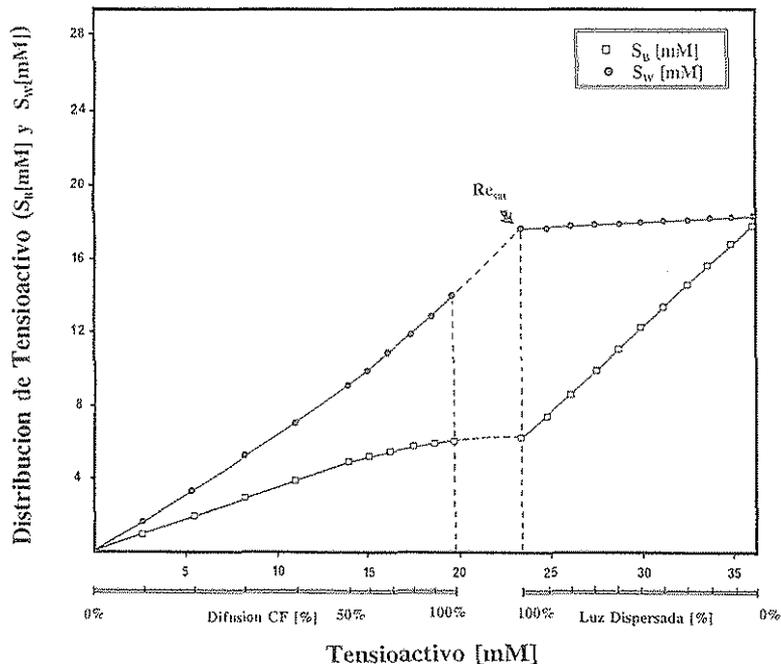


Figura 3. Variación de  $R_e$  (A) y de  $K$  (B) respecto a la [OG] durante la interacción de OG/PC liposomas para una conc. lipídica constante (5.0 mM).

De estos resultados puede deducirse que a lo largo de todo el proceso (bicapa o micelas mixtas) la interacción molecular OG/PC depende de las diferentes organizaciones

estructurales de ambos componentes. Así, el bajo inicial aumento de  $Re$  (50-100 % permeabilidad) puede correlacionarse con la saturación de las bicapas por OG. Sin embargo, la evolución opuesta de  $Re$  y  $K$  indica que en esta etapa la distribución de las moléculas de OG está gobernada por una preferencial distribución de monómeros del tensioactivo en la fase acuosa con respecto a las bicapas lipídicas. Así, en las etapas previas a la solubilización aparecen simultáneamente dos procesos. Por un lado, la saturación de las bicapas por el tensioactivo y por el otro lado el incremento preferencial de la concentración de tensioactivo libre  $S_w$ . El intervalo [50% permeabilidad - 100% luz dispersada] corresponde a las etapas de saturación de las bicapas por el tensioactivo. Mayores [OG] que las correspondientes al 100% de luz dispersada dieron lugar a un incremento de ambos parámetros. Así, la mayor parte de las moléculas de tensioactivo se incorporaron a las bicapas para formar micelas mixtas hasta la completa solubilización de las mismas,  $S_w$  permaneciendo constante con un valor similar al de su cmc.

La Figura 4 muestra la variación de  $S_b$  y  $S_w$  con respecto a la concentración de tensioactivo para una concentración de fosfolípido 5.0 mM. Puede observarse que, en las etapas subsolubilizantes, los parámetros  $S_b$  y  $S_w$  aumentaron linealmente hasta 50% de permeabilidad, siendo la pendiente de  $S_w$  más pronunciada. Cantidades adicionales de OG dieron lugar a aumentos de  $S_w$  y de  $S_b$  hasta alcanza el 100% de permeabilidad. La extrapolación de estas curvas (líneas discontinuas) condujo en ambos casos a sus valores correspondientes al inicio de la solubilización (100% luz dispersada). En este punto, la concentración de  $S_w$  fue similar a la cmc del tensioactivo. La adición de nuevas cantidades de OG dieron lugar a un brusco incremento lineal del valor de  $S_b$  y a un valor casi constante de  $S_w$  hasta la solubilización de las bicapas. El comportamiento de estos dos parámetros a lo largo del proceso confirma a nivel subsolubilizante la incorporación preferencial de monómeros de tensioactivo al medio acuoso así como la mayor asociación de las moléculas de OG con la PC de las bicapas durante la solubilización. Comparando las Figuras 3-A y 4 se observa que la etapa inicial de la saturación de las bicapas (50-70% de permeabilidad) se alcanzó aproximadamente para una concentración de tensioactivo libre de 9.1-11.0 mM (aproximadamente el 50-60% de la cmc del tensioactivo).



**Figure 4.** Variación de  $S_B$  y  $S_W$  respecto a la coiceitration de OG a lo largo de la interacción de OG/PC liposomas, (coiceitration lipídica 5,0 mM).

El parámetro  $Re_{crit}$ , (indicado en estas Figuras) corresponde a la relación molar exacta tensioactivo/fosfolípido necesaria para la iniciación de la solubilización de las bicapas via micelas mixtas. La  $[OG]$  correspondiente a cada  $Re_{crit}$ , para cada coiceitration lipídica puede ser considerada como la concentración del nuevo sistema OG/fosfolípido formado.

## CONCLUSIONES

La interacción molecular OG/PC depende de los distintos estadios de agregación de ambos componentes durante el proceso de interacción (bicapas lipídicas o micelas mixtas). Teniendo en cuenta la variación no lineal de los parámetros  $Re$  y  $K$  parameter respecto a la coiceitration de tensioactivo presente, podemos deducir se produce una significativa variación en la concentración de tensioactivo libre a lo largo del proceso.

Así, mientras en las etapas subsolubilizantes se produce una preferencial distribución de las moléculas de tensioactivo en la fase acuosa con respecto a las bicapas lipídicas (simultáneamente a la saturación de las bicapas), durante la solubilización se produce una mayor asociación del tensioactivo con los lípidos de las bicapas. La etapa inicial de la saturación de las bicapas se alcanzó cuando el sistema alcanzó el 50-70% de permeabilidad y para menores concentraciones de tensioactivo libre que las de su cmc. Crecientes concentraciones de tensioactivo conducen simultáneamente a una progresiva saturación de las bicapas y un incremento de la concentración de tensioactivo libre hasta alcanzar un valor de  $S_w$  similar al de la cmc del tensioactivo. En este momento se inicia el proceso de solubilización

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Foresta, B., Henao, F. & Champeil, P. (1992). *Eur. J. Biochem*, 209, 1023-1034.
2. Wach, A., Dencher, N.A., & Gräber, P. (1993). *Eur. J. Biochem*, 214, 563-568.
3. Kerry, C.J., Sudan, H.L., Abutidze, K., Mellor, I.R., Barnard, E.A. & Usherwood, P.N.R., (1993). *Mol. Pharmacol. M.* 142-152
4. Goñi, F.M., Urbaneja, M.A., Arrondo, J. L. R., Alonso, A. & Durrani A.A., (1986). *Eur. J. Biochem*, **160**, 659-665.
5. Levy, D., Gulik, A., Seigneuret, M. & Rigaud, J.L., (1990). *Biochemistry*, 29, 9480-9488.
6. Urbaneja, M.A., Alonso, A., González-Mañas, J.M., Goñi, F.M., Partearroyo, M.A., Tribout, M. & Paredes, S. (1990). *Biochem. J.*, 270, 305-308.
7. Kragh-Hansen, U., le Marie M., Noël J.P., Gulik-Krzywicki, T. and Møller J.V. (1993). *Biochemistry*, 32, 1648-1656.
8. Lichtenberg, D. (1985). *Biochim. Biophys. Acta*, **821**, 470-478
9. Lasić, D. (1988). *Biochem. J.* 256, 1-11
10. Edwards, K. & Almgren, M. (1991). *J. Colloid Interface Sci.*, 147, 1-21
11. Edwards, K., Almgren, M., Bellare J. & Brown, W., (1989). *Langmuir*, **5**, 473-478
12. Miguel, M.G., Eidelman, O., Ollivon, M. and Walter, A. (1989). *Biochemistry*, **28**, 8921-8928.
13. Almog, S., Litman, B.J., Wimley, W., Cohen, J., Wachtel, E.J., Barenholz, Y., Ben-Shaul, A. & Lichtenberg, D., (1990). *Biochemistry*, **29**, 4582-4592.
14. Ollivon M., Eidelman, O., Blumenthal, R. & Walter, A., (1988). *Biochemistry*, 27, 1695-1703.

- Paternostre, M.T., Roux, M., & Rigaud J.L., (1988). *Biochemistry*, **27**, 2668-2677.
- Cully, D.F. & Paress, P.S.. (1991). *Mol. Pharmacol.* **40**, 326-332
- Lummis, S.C.R. & Martin, I.L., (1992). *Mol. Pharmacol.* **41**, 18-26.
- de la Maza, A., Paria, J.L., García, M<sup>a</sup> T., Ribosa, I. & Sánchez Leal, J. (1992). *J. Colloid Interface Sci.*, **148**, 310-316.
- de la Maza, A. & Parra, J.L.. (1992). *Langmuir*, **8**, 2422-2426
- de la Maza, A. and J.L. Parra. (1993). *Langmuir*, **9**, 870-873.
- Singleton, W.S., Gray, M.S., Brown, M. L & White, IL., (1965). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 53-57.
- Weinstein, J.N., Ralston, E., Leserman, L.D., Klausner, R.D., Dragsten, P., Henkart, P. & Blumenthal, R. (1986). "*Liposome Technology*" (G. Gregoriadis, Ed.), Vol III, Chap 13, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Allen, T.M., (1986). "*Liposome Technology*" (G. Gregoriadis, Ed.), Vol I, Chap 8, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Mayer, L.D., Hope, M.J. & Cullis, P.R.. (1986). *Biochim. Biophys. Acta*, **858**, 161-168.
- Ackman, R.G., McLeod, C.A. & Banerjee, A.K. (1990). *J. of Planar Chrom.* **3**, 450-490.
- Tanford, C. in "*The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Wiley and Sons, New York, (1980).
- Hall, D.G. in "*Nonionic Surfactants. Physical Chemistry*" (Schlick, M.J, Ed.), Surfactant Science Series, Volume 23, Chap 5. Marcel Dekker, New York, (1987).
28. Schurtenberger, P., Mazer, N. & Känzig, W. *J. Phys. Chem.* **89**, 1042-1049, (1985)
29. Lunkenheimer, K. & Wantke D.. (1981). *Colloid and Polymer Sci.*, **259**, 354-366.
30. Lichtenberg, D., Robson, R.J. & Dennis, E.A., (1983). *Biochim. Biophys. Acta*, **737**, 285-304.
31. Ruiz, J., Goñy, F.M. & Alonso, A.. (1988). *Biochim. Biophys. Acta*, **937**, 127-134.