



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Facultad de Farmacia
Departamento de Química-Física

**INTERACCIONES EN MONOCAPAS DE COLESTEROL
CON ÁCIDOS GRASOS SATURADOS E INSATURADOS
(OMEGA-3, OMEGA-6 Y OMEGA-9)**



JOSÉ LUIS FIDALGO RODRÍGUEZ
Santiago de Compostela, 2015



LOS DOCTORES JOSÉ MIÑONES CONDE Y OLGA CONDE MOUZO, PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CERTIFICAN

Que el trabajo descrito en la presente memoria, con el título “**INTERACCIONES EN MONOCAPAS DE COLESTEROL CON ÁCIDOS GRASOS SATURADOS E INSATURADOS (OMEGA-3, OMEGA-6 Y OMEGA-9)**”; que presenta el Licenciado en Farmacia **José Luis Fidalgo Rodríguez** para optar al grado de doctor en Ciencia y Tecnología Química, ha sido realizado bajo su dirección y tutoría en el Departamento de Química-Física de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman la presente en Santiago de Compostela, a 12 de Noviembre de 2015.

Director: José Miñones Conde

Tutora: Olga Conde Mouzo



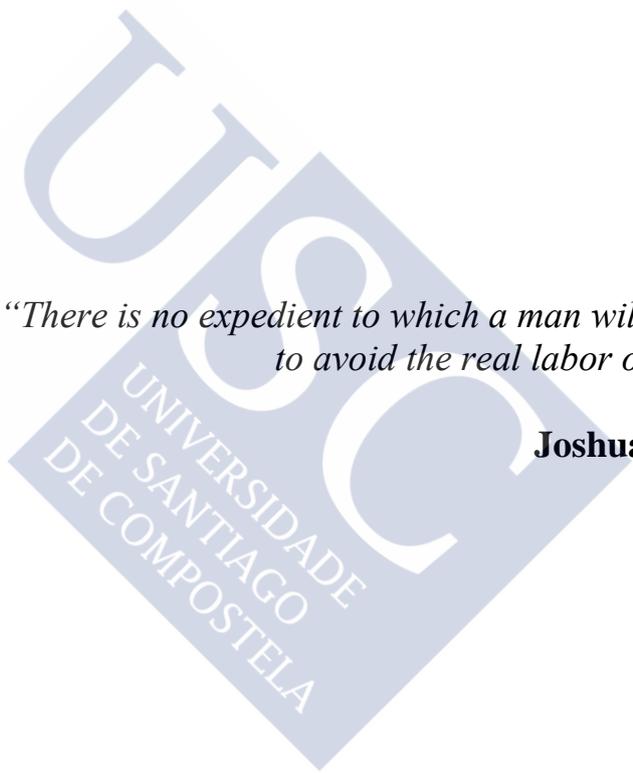


A mis padres



*“There is no expedient to which a man will not resort
to avoid the real labor of thinking”*

Joshua Reynolds





Índice

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	GRASAS	3
1.2	ÁCIDOS GRASOS.....	7
1.2.1	Nomenclatura	8
1.2.2	Ácidos grasos omega-3 (n-3): Tipos y Fuentes	13
1.2.3	Ácidos grasos omega-6 (n-6): Tipos y Fuentes	15
1.2.4	Ácidos grasos omega-9 (n-9): Tipos y fuentes.....	17
1.2.5	Biosíntesis de PUFAs a partir de ácidos grasos esenciales ω -3 y ω -6	19
1.2.5.1	PUFAs de la serie omega-3.....	19
1.2.5.2	PUFAs de la serie omega-6.....	19
1.2.6	Biosíntesis de Eicosanoides	23
1.2.6.1	Eicosanoides de la serie 2	23
1.2.6.2	Eicosanoides de la serie 3	25
1.2.6.3	Eicosanoides de la serie 1	27
1.2.7	Inflamación: Eicosanoides como mediadores químicos	29
1.3	COLESTEROL.....	33
1.3.1	Generalidades.....	33
1.3.2	Metabolismo.....	35
1.3.2.1	Biosíntesis del colesterol.....	35
1.3.2.2	Rutas metabólicas	38
1.3.3	Aterosclerosis	43
1.4	MONOCAPAS DE LANGMUIR.....	47
1.4.1	Técnica de monocapas	49
1.4.2	Presión superficial	52
1.4.3	Estabilidad de las monocapas.....	53
1.4.4	Estados físicos de las monocapas.....	55
1.4.4.1	Monocapas en estado gaseoso	57
1.4.4.2	Monocapas expandidas.....	59
1.4.4.3	Monocapas condensadas	62
1.4.4.4	Transición entre los estados de las monocapas.....	65
1.4.4.4.1	Transición de monocapas gaseosas.....	67
1.4.4.4.2	Transición de líquido expandido a líquido condensado	68
1.4.4.5	Relación del estado físico y el área molecular	71

1.4.5	Monocapas mixtas, consideraciones teóricas.....	74
2	OBJETIVOS	87
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	95
3.1	REACTIVOS, DISOLVENTES Y SUSTRATO ACUOSO.....	97
3.1.1	Sustancias utilizadas	97
3.1.2	Preparación de las disoluciones de extensión.....	97
3.1.3	Soporte o sustrato acuoso.....	100
3.2	DESCRIPCIÓN DE LOS DISPOSITIVOS DE MEDIDA	101
3.2.1	Balanza de superficies	101
3.2.2	Microscopio de ángulo de Brewster.....	104
3.2.2.1	Fundamento	104
3.2.2.2	Características del microscopio bam	108
3.3	TECNICA OPERATORIA	113
3.3.1	Registro de isotermas π -a.....	113
3.3.2	Obtención de imágenes bam y medida del espesor relativo	114
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	117
4.1	COLESTEROL.....	119
4.1.1	Isoterma π -A y módulo de compresibilidad	119
4.1.2	Microscopía de ángulo de Brewster	122
4.1.2.1	Espesor y configuración molecular	122
4.1.2.2	Imágenes BAM y morfología	126
4.1.3	Influencia del número de moléculas	128
4.1.4	Influencia de la temperatura	129
4.2	ÁCIDO ESTEÁRICO.....	131
4.2.1	Isoterma π -A y módulo de compresibilidad	131
4.2.2	Microscopía de ángulo de Brewster	134
4.2.2.1	Espesor y configuración molecular	134
4.2.2.2	Imágenes BAM y morfología	137
4.2.3	Influencia del número de moléculas	140
4.2.4	Influencia de la temperatura	142
4.3	ÁCIDO OLEICO.....	144
4.3.1	Isoterma π -A y módulo de compresibilidad	144
4.3.2	Microscopía de ángulo de Brewster	146
4.3.2.1	Espesor y configuración molecular	146

4.3.2.2	Imágenes BAM y morfología	149
4.3.3	Influencia del número de moléculas	151
4.3.4	Influencia de la temperatura	153
4.4	ÁCIDO LINOLEICO	155
4.4.1	Isoterma π -A y módulo de compresibilidad	155
4.4.2	Microscopía de ángulo de Brewster	157
4.4.2.1	Espesor y configuración molecular	157
4.4.2.2	Imágenes BAM y morfología	159
4.4.3	Influencia del número de moléculas	161
4.4.4	Influencia de la temperatura	163
4.5	ÁCIDO α -LINOLÉNICO	166
4.5.1	Isoterma π -A y módulo de compresibilidad	166
4.5.2	Microscopía de ángulo de Brewster	168
4.5.2.1	Espesor y configuración molecular	168
4.5.2.2	Imágenes BAM y morfología	170
4.5.3	Influencia del número de moléculas	171
4.5.4	Influencia de la temperatura	173
4.6	ÁCIDO γ -LINOLÉNICO	176
4.6.1	Isoterma π -A y módulo de compresibilidad	176
4.6.2	Microscopía de ángulo de Brewster	178
4.6.2.1	Espesor y configuración molecular	178
4.6.2.2	Imágenes BAM y morfología	180
4.6.3	Influencia del número de moléculas	181
4.6.4	Influencia de la temperatura	183
4.7	ÁCIDO ESTEARIDÓNICO	186
4.7.1	Isoterma π -A y módulo de compresibilidad	186
4.7.2	Microscopía de ángulo de Brewster	188
4.7.2.1	Espesor y configuración molecular	188
4.7.2.2	Imágenes BAM y morfología	190
4.7.3	Influencia del número de moléculas	192
4.7.4	Influencia de la temperatura	194
4.8	ÁCIDO EICOSADIENOICO	197
4.8.1	Isoterma π -A y módulo de compresibilidad	197
4.8.2	Microscopía de ángulo de Brewster	199

4.8.2.1	Espesor y configuración molecular	199
4.8.2.2	Imágenes BAM y morfología	201
4.8.3	Influencia del número de moléculas	203
4.8.4	Influencia de la temperatura	204
4.9	ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS MONOCAPAS DE LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS	207
4.9.1	Isotermas de compresión	207
4.9.2	Representaciones del módulo de compresibilidad frente a la presión superficial	208
4.9.3	Espesores de las monocapas	211
4.9.4	Imágenes BAM.....	212
4.10	MEZCLA DE ÁCIDO ESTEÁRICO CON COLESTEROL	215
4.10.1	Isotermas π -A y módulos de compresibilidad	215
4.10.2	Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla	221
4.10.2.1	Mezcla $X_{STA} = 0,9$	221
4.10.2.2	Mezcla $X_{STA} = 0,7$	224
4.10.2.3	Mezcla $X_{STA} = 0,5$	226
4.10.2.4	Mezcla $X_{STA} = 0,3$	228
4.10.2.5	Mezcla $X_{STA} = 0,1$	230
4.10.3	Área molecular media	232
4.10.1	Funciones de exceso	234
4.10.1.1	Área de exceso	234
4.11	MEZCLA DE ÁCIDO OLEICO CON COLESTEROL	235
4.11.1	Isotermas π -A y módulos de compresibilidad	235
4.11.2	Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla	240
4.11.2.1	Mezcla $X_{OA} = 0,9$	240
4.11.2.2	Mezcla $X_{OA} = 0,7$	242
4.11.2.3	Mezcla $X_{OA} = 0,5$	244
4.11.2.4	Mezcla $X_{OA} = 0,3$	246
4.11.2.5	Mezcla $X_{OA} = 0,1$	248
4.11.3	Área molecular media	250
4.11.4	Funciones de exceso	251
4.11.4.1	Área de exceso	251
4.11.4.2	Energía libre de exceso (ΔG_{exc})	252

4.12	MEZCLA DE ÁCIDO LINOLEICO CON COLESTEROL.....	255
4.12.1	Isotermas π -A y módulos de compresibilidad.....	255
4.12.2	Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla	260
4.12.2.1	Mezcla $X_{LA} = 0,9$	260
4.12.2.2	Mezcla $X_{LA} = 0,7$	262
4.12.2.3	Mezcla $X_{LA} = 0,5$	264
4.12.2.4	Mezcla $X_{LA} = 0,3$	266
4.12.2.5	Mezcla $X_{LA} = 0,1$	268
4.12.3	Área molecular media	270
4.12.4	Funciones de exceso.....	271
4.12.4.1	Área de exceso	271
4.12.4.2	Energía libre de exceso (ΔG_{exc}).....	271
4.13	MEZCLA DE ÁCIDO α -LINOLÉNICO CON COLESTEROL.....	273
4.13.1	Isotermas π -A y módulos de compresibilidad.....	273
4.13.2	Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla	278
4.13.2.1	Mezcla $X_{\alpha LA} = 0,9$	278
4.13.2.2	Mezcla $X_{\alpha LA} = 0,7$	280
4.13.2.3	Mezcla $X_{\alpha LA} = 0,5$	282
4.13.2.4	Mezcla $X_{\alpha LA} = 0,3$	284
4.13.2.5	Mezcla $X_{\alpha LA} = 0,1$	286
4.13.3	Área molecular media	288
4.13.4	Funciones de exceso.....	289
4.13.4.1	Área de exceso	289
4.13.4.2	Energía libre de exceso (ΔG_{exc}).....	290
4.14	MEZCLA DE ÁCIDO γ -LINOLÉNICO CON COLESTEROL	291
4.14.1	Isotermas π -A y módulos de compresibilidad.....	291
4.14.2	Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla	296
4.14.2.1	Mezcla $X_{\gamma LA} = 0,9$	296
4.14.2.2	Mezcla $X_{\gamma LA} = 0,7$	298
4.14.2.3	Mezcla $X_{\gamma LA} = 0,5$	300
4.14.2.4	Mezcla $X_{\gamma LA} = 0,3$	302
4.14.2.5	Mezcla $X_{\gamma LA} = 0,1$	304
4.14.3	Área molecular media	306
4.14.4	Funciones de exceso.....	307

4.14.4.1	Área de exceso	307
4.14.4.2	Energía libre de exceso (ΔG_{exc}).....	307
4.15	MEZCLA DE ÁCIDO ESTEARIDÓNICO CON COLESTEROL.....	309
4.15.1	Isotermas π -A y módulos de compresibilidad.....	309
4.15.2	Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla	314
4.15.2.1	Mezcla $X_{SDA} = 0,9$	314
4.15.2.2	Mezcla $X_{SDA} = 0,7$	316
4.15.2.3	Mezcla $X_{SDA} = 0,5$	318
4.15.2.4	Mezcla $X_{SDA} = 0,3$	320
4.15.2.5	Mezcla $X_{SDA} = 0,1$	322
4.15.3	Área molecular media	324
4.15.4	Funciones de exceso.....	325
4.15.4.1	Área de exceso	325
4.15.4.2	Energía libre de exceso (ΔG_{exc}).....	325
4.16	MEZCLA DE ÁCIDO EICOSADIENOICO CON COLESTEROL.....	327
4.16.1	Isotermas π -A y módulos de compresibilidad.....	327
4.16.2	Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla	332
4.16.2.1	Mezcla $X_{EA} = 0,9$	332
4.16.2.2	Mezcla $X_{EA} = 0,7$	334
4.16.2.3	Mezcla $X_{EA} = 0,5$	336
4.16.2.4	Mezcla $X_{EA} = 0,3$	338
4.16.2.5	Mezcla $X_{EA} = 0,1$	340
4.16.3	Área molecular media	342
4.16.4	Funciones de exceso.....	343
4.16.4.1	Área de exceso	343
4.16.4.2	Energía libre de exceso (ΔG_{exc}).....	343
4.17	.- ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FUNCIONES DE EXCESO DE LAS MONOCAPAS MIXTAS DE COLESTEROL-ÁCIDOS GRASOS.....	345
5	CONCLUSIONES.....	349
6	BIBLIOGRAFÍA	355



1 INTRODUCCIÓN



1.1 GRASAS

En el año 1823, Michel Eugène Chevreul, tras años de investigaciones con sustancias lipídicas, determinó que la grasa que consumimos se podía dividir en dos tipos básicos: sólida, a la que denominó *stearine*, y líquida, la cual bautizó como *elaine* (en francés). Años después, estas dos sustancias acuñarían el nombre de ácido esteárico y ácido oleico, respectivamente. Según Chevreul, las diferencias observadas en las propiedades de las grasas examinadas eran debidas a las diferentes proporciones de estas dos sustancias. En sus memorias, también acuñó el nombre de *cholesterine* para la sustancia cristalina que purificó a partir de cálculos biliares (Chevreul, 1823).

Desde entonces, la comunidad científica avanzó extraordinariamente en el estudio y conocimiento de las grasas, término genérico que hoy en día se utiliza para designar a varias clases de lípidos, concretamente *acilglicéridos*, ésteres en los que uno, dos o tres ácidos grasos se unen a una molécula de glicerina formando monoglicéridos, diglicéridos o triglicéridos, respectivamente.

En nuestro organismo el consumo de grasas es importante, no solo porque constituyen la principal reserva de energía del cuerpo humano, sino también por otros motivos:

- Intervienen en la formación de productos esenciales como son los fosfolípidos, el colesterol, las hormonas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos y neurotransmisores.
- Aportan los ácidos grasos esenciales, no sintetizables por el propio organismo, pero imprescindibles en cuestiones tan decisivas como la formación de la membrana celular, el buen funcionamiento del cerebro o la acción hormonal, entre otras.
- Son necesarias para la circulación sanguínea, la absorción digestiva y el transporte de las vitaminas liposolubles. Estas vitaminas son fundamentales para diversas funciones esenciales del organismo.
- Contribuyen, con las ingestas adecuadas, al equilibrio y la variedad necesarias (se recomienda que el 30-35 % de las kilocalorías ingeridas provengan de lípidos).
- Constituyen una protección mecánica para diversos órganos vitales (riñones, corazón...).

- Desde el punto de vista dietético, mejoran la textura de los alimentos, aumentando aspectos organolépticos como el sabor, el aroma, el gusto, la suavidad... haciéndolos más agradables y placenteros.

Por lo general, los ácidos grasos constituyentes de las grasas poseen una estructura lineal, no ramificada, con un número par de átomos de carbono, predominando los saturados en las grasas de origen animal y los insaturados en las de origen vegetal.

En el primer caso se trata de grasas formadas por triglicéridos (**Figura 1.1.A**) sólidos a temperatura ambiente. Entre las **grasas saturadas** se encuentran el sebo, tocino, panceta, bacon, y diversas mantecas (cacao, cacahuete, etc).

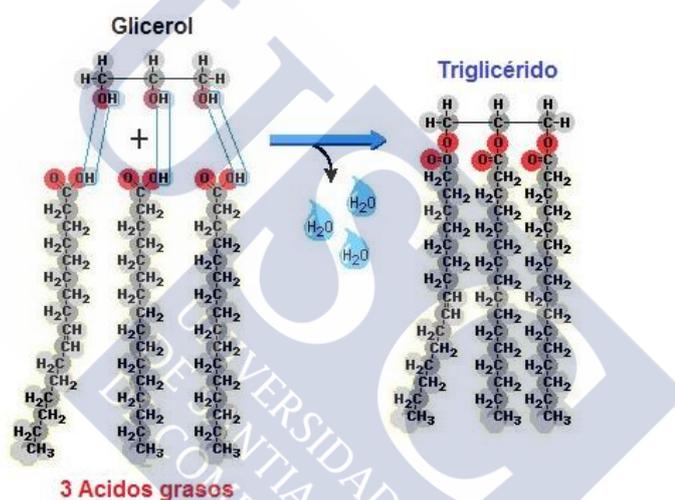


Figura 1.1.A.- Triglicérido de una grasa saturada

Las grasas de este tipo formadas por ácidos grasos de cadena larga (más de 10 átomos de carbono), como son los ácidos láurico, mirístico y palmítico, se consideran que elevan los niveles plasmáticos del colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad LDL (conocido popularmente como “colesterol malo”).

Un segundo tipo de grasas son las constituidas en su mayor parte por ácidos grasos insaturados. Estas **grasas insaturadas** son líquidas a temperatura ambiente y comúnmente se les conoce como *aceites* (aceite de oliva, de girasol, de soja...). Son beneficiosas para el cuerpo humano por sus efectos sobre los lípidos plasmáticos (Sacks & Katan, 2002) (Wardlaw & Snook, 1990) y algunas contienen ácidos grasos esenciales,

que el organismo no puede fabricar, siendo la ingesta directa el único modo de conseguirlos.

A su vez, las grasas insaturadas pueden subdividirse en dos grupos:

Grasas monoinsaturadas

Contienen ácidos grasos con un solo doble enlace, como el ácido oleico o el erúxico (ácido docosanoico). Reducen los niveles plasmáticos de colesterol asociado a las lipoproteínas LDL (Williams, y otros, 1999) y elevan los de las lipoproteínas HDL (llamadas comúnmente "colesterol bueno"), por lo que facilitan la eliminación de la acumulación de placas en las paredes arteriales, que pueden ser la causa de un ataque cardíaco o accidente vascular. Además de las aceitunas, se encuentran en el aguacate y en algunos frutos secos.

Grasas poliinsaturadas

Formadas por ácidos grasos de las familias omega-3 y omega-6, denominados así por la posición que ocupa el primer doble enlace de la molécula, contado a partir del grupo metilo de su cadena hidrocarbonada. Cada una de estas familias presenta un precursor a partir del cual se sintetizan los demás ácidos grasos que forman parte de las mismas: el ácido alfa-linolénico (ALA) es el precursor de los omega-3 y el linoleico (LA) de los omega-6. Ambos son *ácidos grasos esenciales*, necesarios para un correcto funcionamiento fisiológico del organismo, pero que no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano. Su ausencia en el organismo está relacionada con numerosas enfermedades: cáncer, hipertrofia prostática, aterosclerosis, disminución del cociente intelectual, obesidad, diabetes, reuma, problemas circulatorios, etc. La mayoría de las grasas insaturadas son de origen vegetal.

Grasas trans.

Por regla general, los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados que se encuentran en los aceites vegetales poseen configuración *cis*, pero si estos aceites sufren un proceso industrial de hidrogenación parcial para transformarlos en grasas semisólidas o sólidas, los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados que perduran tras el proceso de hidrogenación presentan conformación *trans*. Es por ello por lo que se llaman grasas *trans*, cuya configuración es parecida a la de las grasas animales

(saturadas) (**Figura 1.1.B**). La industria alimentaria las utiliza para aumentar el tiempo de caducidad y mejorar el sabor y la textura de los productos en los que intervienen: la comida rápida, los alimentos fritos, palomitas de maíz, margarina, bollería, pasteles, galletas...

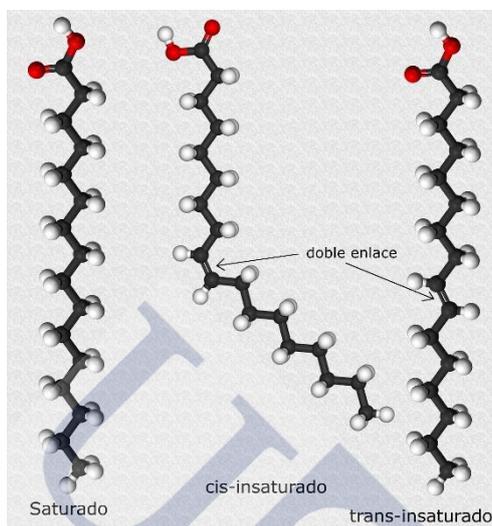


Figura 1.1.B.- Configuración estructural de ácidos grasos saturados e insaturados.

Estas grasas son muy perjudiciales para la salud, ya que son altamente aterogénicas (el organismo no las distingue de las saturadas), contribuyendo a elevar los niveles de lipoproteínas LDL y de los triglicéridos y disminuyendo peligrosamente los niveles de HDL. Por esta razón, la Agencia Alimentaria de Estados Unidos (FDA) anunció recientemente que se iría limitando progresivamente el uso de estas grasas en los alimentos comercializados en Estados Unidos. La razón esgrimida para ello es que éstas se consideran, según los términos utilizados por ese organismo, "un peligro para la salud pública". Por otra parte, en ese mismo comunicado la FDA publicó que entre 2003 y 2012 el uso de grasas *trans* se redujo un 78% en Estados Unidos. Hasta el momento en Europa solo en algunos países como Austria, Dinamarca, Islandia y Suiza disponen de una normativa que establece que las grasas *trans* no pueden superar el 2% en los productos alimentarios. En el resto de Europa, solo está limitada la cantidad de ácidos grasos *trans* en leches para lactantes, en cuyo caso la directiva prohíbe que se supere el 3% de contenido graso total. En los demás casos, no es obligatorio especificar en la etiqueta la cantidad de grasas *trans* que contiene un producto; únicamente se informa al consumidor de que contienen *grasas hidrogenadas o parcialmente hidrogenadas*.

1.2 ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos se encuentran formando parte de los fosfolípidos, glucolípidos y esfingolípidos de la bicapa de las membranas celulares, confiriéndoles propiedades diferentes de acuerdo con el ácido graso predominante, repercutiendo todo ello en el contenido de los lípidos plasmáticos (HDL, LDL), en la síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, en la acción del endotelio, las enfermedades inflamatorias, las autoinmunes, e incluso en el cáncer. Por otra parte, en los últimos años se han realizado progresos en lo referente al papel de algunos ácidos grasos, o de sus derivados metabólicos, como moduladores de la expresión de genes (Jump, 1999). Al actuar como ligandos de receptores nucleares desencadenan una gran variedad de respuestas celulares: inducen la diferenciación de adipocitos, modifican la resistencia a la insulina, regulan la presión vascular, inducen la apoptosis de células tumorales, modifican el metabolismo de los carbohidratos, etc. Esta nueva función de los ácidos grasos los identifica como importantes reguladores de los genes, con lo cual actualmente se les relaciona con algo más que con la mera producción de energía (Sanhueza & Valenzuela, 2006).

Constan de una cadena alquílica con un grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) terminal. La coexistencia de ambos componentes convierte a los ácidos grasos en moléculas *anfipáticas*, con una región hidrófoba (la cadena hidrocarbonada) y otra polar, hidrófila (el extremo carboxilo), que interactúa con el agua. Cuanto más largas sean las cadenas hidrocarbonadas y menos dobles enlaces tengan, mayor es la posibilidad de formación de enlaces de Van der Waals y, en consecuencia, menor es su solubilidad en agua. Por otra parte, esta solubilidad también depende de que el grupo carboxilo se encuentre ionizado o no. Puesto que el valor del pK está comprendido entre 4 y 5, en medios neutros o alcalinos se encuentran ionizados y son más solubles en agua.

Cuando se extienden en la interfase aire/agua forman una monocapa (si la cantidad depositada es suficientemente pequeña) en la que las colas hidrocarbonadas se encuentran orientadas hacia el aire, y la cabeza polar se ancla en el agua, estableciéndose puentes de hidrógeno entre el grupo carboxilo y el agua.

Por lo general las cadenas hidrocarbonadas poseen un número par de átomos de carbono. La razón de esto es que en el metabolismo, las cadenas de ácido graso se sintetizan y se degradan mediante la adición o eliminación de dos átomos de carbono. No obstante, hay excepciones, ya que se encuentran ácidos grasos de número impar de átomos de carbono en la leche y grasa de los rumiantes, procedentes del metabolismo bacteriano del rumen, y también en algunos lípidos de vegetales, que no son utilizados comúnmente para la obtención de aceites.

Los ácidos grasos constituyentes de los mamíferos tienen estructuras relativamente sencillas, presentando una cadena lineal, pero los de otros organismos pueden ser muy complejos; por ejemplo, con un anillo de ciclopropano (ácido lactobacílico) o de ciclopenteno (ácido chaulmógrico), con un triple y un doble enlace (ácido nemotínico, ácido 6,9 octadeceninoico), o con ramificaciones en la cadena: ácido tuberculoesteárico (10-metil esteárico), cerebrónico (2-hidroxi C24:0) o ricinoleico (12-hidroxi C18:1) (Devlin, 2004).

1.2.1 Nomenclatura

Hay tres formas de denominar los ácidos grasos:

1. **Común**, impuesta por la tradición.
2. **Sistemática**, según las reglas de la IUPAC.
3. **Abreviadas o numéricas**:
 - sistema "delta" (Δ)
 - sistema "omega" (ω)
 - sistema "n"

1. *Nombre común*

Se utilizan nombres no químicos, sino los **relacionados con su origen**, es decir, con las fuentes de donde fueron aislados por primera vez. Algunos ejemplos son los siguientes:

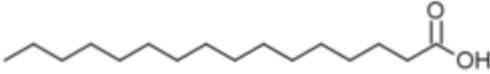
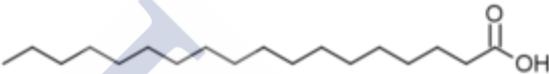
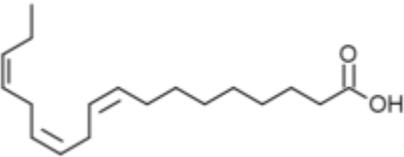
Nombre común	Origen
Ácido palmítico	en el aceite de palma
	
Ácido esteárico	del griego <i>stéar</i> : grasa, sebo
	
Ácido oleico	en el aceite de oliva
	
Ácido linoleico	en el lino
	
Ácido α -linolénico	en el lino
	

Tabla 1.2.A.- Ejemplos de nombres comunes de ácidos grasos.

Otros nombres comunes son: araquídico y araquidónico (cacahuete), butírico (del latín *butyrum*, manteca, por su olor a manteca rancia), cáprico, caprílico, caproico (olor a cabras), láurico (laurel), málico (de *malum*, manzana), cítrico (de *citrus*, limón, naranja), (margárico (margarina), mirístico (del latín *mirystica fragans*, nuez moscada), pelargónico (aceite de pelargonium), valérico (valeriana).

2. Nomenclatura sistemática o química (IUPAC)

Los nombres describen las estructuras en detalle en función de las reglas de nomenclatura de la química orgánica definidas por la IUPAC. Al carbono carboxílico le corresponde el número 1 y las demás posiciones se definen en referencia a éste.

Ejemplos:

En la **Tabla 1.2.B** se indica la **nomenclatura sistemática** correspondiente a los mismos ácidos que se utilizaron en la denominación común, comparando ambas.

Nombre común	Nombre sistemático	Descripción
Ácido palmítico	Acido hexadecanoico	16 átomos de C, saturado
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	18 átomos de C, saturado
Ácido oleico	Ácido <i>cis</i> -9-octadecenoico	18 átomos de C, con un doble enlace entre los carbonos 9 y 10
Ácido linoleico	Ácido <i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienoico	18 átomos de C, con un doble enlace entre los carbonos 9 y 10 y otro entre los carbonos 12 y 13
Ácido α -linolénico	Ácido <i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	18 átomos de C, con tres dobles enlaces: entre los carbonos 9 y 10, entre 12 y 13, entre 15 y 16

Tabla 1.2.B.- Comparación entre la nomenclatura común y la sistemática de los ácidos grasos.

3. Nomenclaturas abreviadas o numéricas

Las nomenclaturas abreviadas o numéricas son las más utilizadas; se asume que los dobles enlaces están en configuración *cis* (la más habitual en los ácidos grasos naturales) y que están separados por un grupo metileno, a menos que se indique lo contrario.

En el **sistema “delta” (Δ)**, el primer número en la nomenclatura indica la longitud de la cadena (número de átomos de carbono). Seguidamente, detrás de dos puntos, se señala el número de dobles enlaces. A continuación la letra griega Δ seguida de uno o más números indica la posición de los dobles enlaces, contada desde el grupo carboxilo, al que se le asigna el número 1. Así, el ácido palmítico se designa como 16: 0, en donde 16 es el número de átomos de carbono y 0 el número de dobles enlaces (saturado), mientras que el ácido oleico es 18:1 Δ^9 (18 átomos de carbono con un doble enlace situado entre el C 9 y el C 10, contado desde el grupo carboxilo). Del mismo modo, el ácido α -linolénico, con 18 átomos de carbono y tres dobles enlaces, se denomina 18:3 $\Delta^{9,12,15}$. Algunos autores prescinden de la letra Δ sustituyéndola por un paréntesis con la posición de los dobles enlaces. Para el ácido α -linolénico la nomenclatura es: 18:3 (9,12,15).

El sistema omega (ω) es bastante popular hoy en día (Holman, 1964) para nombrar a los ácidos grasos insaturados y será el que utilizaremos más frecuentemente. Toma como referencia el extremo metilo (CH_3 -) de la molécula (carbono ω , minúscula; Ω mayúscula) e indica la posición del primer doble enlace contando desde el carbono ω , es decir, el carbono más alejado del carboxilo, al que se asigna la última letra del alfabeto griego ya que, tradicionalmente, al carbono contiguo al grupo carboxilo se le ha denominado alfa. De ahí derivan las denominaciones de ácidos ω -3, ω -6 y ω -9. Un ácido graso ω -3 será el que tenga su primer doble enlace entre los carbonos 3 y 4, y un ácido graso ω -6 tendrá el primer doble enlace entre los carbonos 6 y 7, siempre a contar desde el extremo CH_3 -.

La nomenclatura omega es muy útil cuando se consideran los ácidos grasos desde el punto de vista biológico, porque define familias de ácidos grasos (ω -3, ω -6, ω -9), las cuales agrupan a los que están sujetos a unos mismos procesos bioquímicos, en los que la estructura terminal del ácido graso no se ve alterada debido a que en los seres vivos las modificaciones metabólicas de los ácidos grasos se producen a partir del extremo carboxilo; así, numerando desde el metilo se mantiene la relación entre los ácidos grasos que pertenecen a una misma serie metabólica. En la designación del número total de átomos de carbono y de enlaces insaturados se sigue el mismo

procedimiento que el del sistema “delta”. Así, el ácido linoleico se nombra como 18:2 ω -6, en donde 18 es, como siempre, el número de átomos de carbono, 2 son los dobles enlaces que posee y ω -6 señala que el primer doble enlace se sitúa entre el C6 y el C7, contados a partir del terminal $-\text{CH}_3$ de la cadena hidrocarbonada. El segundo doble enlace estará separado del primero por un grupo metileno, por lo que se situará entre los carbonos C9 y C 10, siempre contados a partir del terminal de la cadena.

La variante “n” consiste simplemente en sustituir el símbolo ω por la letra n.

Una comparación de las distintas nomenclaturas se muestra en la **Tabla 1.2.C** (Graciani, 2006).

Nombres				
Común	Sistemática (IUPAC)	Sistema delta	Sistema omega	Sistema n
Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	16:0	16:0	16:0
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	18:0	18:0	18:0
Ácido oleico	Ácido <i>cis</i> -9-octadecenoico	18:1 Δ^9	18:1 ω -9	18:1n-9
Ácido linoleico	Ácido <i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienoico	18:2 $\Delta^{9,12}$	18:2 ω -6	18:2n-6
Ácido α -linolénico	Ácido <i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	18:3 $\Delta^{9,12,15}$	18:3 ω -3	18:3n-3
Ácido araquidónico	Ácido <i>todo cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$	20:4 ω -6	20:4n-6
EPA	Ácido <i>todo cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$	20:5 ω -3	20:5n-3
DHA	Ácido <i>todo cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$	22:6 ω -3	22:6n-3

Tabla 1.2.C.- Comparación de los distintos sistemas de nomenclatura de los ácidos grasos.

1.2.2 Ácidos grasos omega-3 (n-3): Tipos y Fuentes

1. Tipos

Existen varios tipos de ácidos grasos omega-3, siendo los que se muestran en la Tabla 1.2.C los de mayor relevancia biológica. El precursor de todos ellos es el ácido α -linolénico (α -LA), cuya estructura fue elucidada en 1909 (Erdmann, Bedford, & Raspe, 1909) y sintetizado cuarenta años más tarde (Raphael & Sondheimer, 1950). Los dos primeros tipos de la serie son de cadena corta y el resto de cadena larga. Se trata de ácidos grasos poliinsaturados que el organismo no es capaz de sintetizar, por lo que deben ser aportados por la dieta, ya que son esenciales para el normal funcionamiento del cuerpo humano.

Nombre común	Nomenclatura	Nombre químico
Ácido alfa-linolénico (α -LA)	18:3 (n-3)	Ácido octadeca-9,12,15-trienoico
Ácido estearidónico (SDA)	18:4 (n-3)	Ácido octadeca-6,9,12,15-tetraenoico
Ácido eicosatetraenoico (ETA)	20:4 (n-3)	Ácido eicosa-8,11,14,17-tetraenoico
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 (n-3)	Ácido eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoico
Ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 (n-3)	Ácido docosa-7,10,13,16,19-pentaenoico
Ácido docosahexanoico (DHA)	22:6 (n-3)	Ácido docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico

Tabla 1.2.D- Lista de ácidos grasos omega 3

2. Fuentes

Las fuentes más ricas en ácidos Omega-3 son los pescados azules, peces de aguas frías, incluyendo el salmón, pez que supuestamente posee el nivel más bajo de contaminación. Además de éste, fuentes importantes son la sardina, la caballa, el arenque, la anchoa y la caballa, cuyos contenidos en omega - 3 son, aproximadamente: sardina 3,3%; caballa 2,5%; arenque 1,7%; anchoa 1,4%; salmón 1,4% (Nasiff-Hadad, y otros, 1990).

En el reino vegetal la fuente más importante se encuentra en las *semillas de chía* (*Salvia hispánica*), planta herbácea cultivada en México, Nicaragua y Guatemala, cuya

fracción grasa posee la concentración de ácidos Omega 3 más alta conocida hasta ahora, con un porcentaje del 58-65% en ácido omega 3 α -ALA (499 g/kg) (Ayerza & Coates, 1999) (Peiretti & Gai, 2009). Otra fuente importante es la salvia romana (*Salvia sclarea*), cuyo aceite contiene cerca del 50-60% de ácido α -LA. A diferencia de otras alternativas vegetales, los ácidos grasos de ambas plantas son sumamente estables, por contener estas plantas antioxidantes naturales.

La *Sacha Inchi*, una variedad de maní de origen amazónico que se encuentra principalmente en Perú, contiene un 83% de ácidos insaturados, de los cuales el 48% corresponde a ácidos Omega-3. El *aceite de perilla*, obtenido de las semillas de las hierbas perennes del género *Perilla*, normalmente de la *Perilla frutescens*, contiene un 50-60% de ácido omega 3 alfa-linolénico. En regiones de Asia el aceite de *perilla* se usa como aceite comestible, aunque es más valorado por sus propiedades medicinales que por su sabor.

Otras fuentes de origen vegetal son las *semillas de lino*, de las cuales se extrae el aceite de linaza, que contiene un 72% de ácidos poliinsaturados (45-65% de ácidos omega -3 y el resto de omega-6), los *cañamones*, semillas del cáñamo (*Cannabis*), con un alto valor proteico (hasta un 34%) y de elevado contenido en ácidos grasos esenciales, de tipo omega-3 y omega-6 en una proporción de 3:1, que son muy útiles en la prevención de artritis y reumatismos, entre otro gran número de afecciones, y las *nueces*, que si bien proporcionan una elevada cantidad de calorías (700 Kcal por 100 g), son muy beneficiosas para la salud cardiovascular por su elevado contenido en ácidos omega -3. El ácido α -LA está presente en verduras de hoja y en algunos *aceites* como el de *colza* o el de *soja*: El *aceite de canola* (procedente de la colza genéticamente modificada para reducir el contenido en ácido erúxico) presenta un reducido contenido en ácidos saturados y un porcentaje elevado en omega-3.

1.2.3 Ácidos grasos omega-6 (n-6): Tipos y Fuentes

1. Tipos

Los ácidos grasos omega 6 (ω -6) son un tipo de ácidos grasos considerados como esenciales, siendo el ácido linoleico (LA) el precursor de la serie.

En la Tabla 1.2.D se presentan los de mayor interés biológico.

Nombre común	Nomenclatura	Nombre químico
Ácido linoleico (LA)	18:2 (n-6)	Ácido 9,12-octadecadienoico
Ácido gamma-linolénico (γ -LA)	18:3 (n-6)	Ácido 6,9,12-octadecatrienoico
Ácido eicosadienoico (EA)	20:2 (n-6)	Ácido 11,14-eicosadienoico
Ácido araquidónico (AA)	20:4 (n-6)	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico
Ácido docosadienoico	22:2 (n-6)	Ácido 13,16-docosadienoico
Ácido adrenico	22:4 (n-6)	Ácido 7,10,13,16-docosatetraenoico
Ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 (n-6)	Ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico

Tabla 1.2.E.- Lista de ácidos grasos omega 6

2. Fuentes

Además de las citadas en el apartado anterior, en cuyo caso se encuentran combinados con los ácidos grasos omega-3, las principales fuentes de los ω -6 son las que se indican a continuación.

El ácido linoleico (LA), precursor de esta serie de ácidos, se encuentra en grandes proporciones en muchos aceites usados frecuentemente, incluyendo *aceites de girasol, de maíz, de cártamo y de soja*. Se trata de aceites vegetales promovidos por la industria alimentaria para evitar el consumo del colesterol existente en las grasas saturadas (manteca de cerdo, por ejemplo). Por ello, suelen ser muy abundantes en la dieta habitual, sobre todo el aceite de girasol y el de soja. También se puede encontrar en *nueces, cacahuètes, semillas de girasol, uva, maíz y sésamo*.

El ácido γ -linolénico se encuentra presente en aceites menos frecuentes, tales como de *borraja* (en una proporción del 18-25%) (Guil-Guerrero, García Maroto, & Gimenez Gimenez, 2001), verdura utilizada habitualmente en dietas de adelgazamiento por sus propiedades depurativas y diuréticas. Es fuente de numerosos ácidos grasos

esenciales, que son necesarios para la síntesis de prostaglandinas, precursoras de hormonas que regulan las diferentes funciones de nuestro cuerpo. Este ácido omega-6 también se encuentra en el *aceite de onagra* (en una proporción del 10%), originario de América del Norte, utilizado por los indios americanos por sus propiedades medicinales. Este aceite también es rico en ácido linoleico (70%) (Guil-Guerrero, García Maroto, & Gimenez Gimenez, 2001).

Igualmente son fuentes naturales de ácidos grasos omega-6 la manteca de cerdo, los embutidos y el hígado, pero también las carnes rojas, la carne de cerdo, el atún rojo, la yema de huevo y los lácteos grasos como leche entera, queso y mantequilla contienen cantidades considerables de ácido araquidónico. Las aves de corral, especialmente las procedentes de animales alimentados de piensos con alto contenido de maíz, soja y otros granos ricos en este tipo de ácidos, son también importantes fuentes de ácidos omega-6.



1.2.4 Ácidos grasos omega-9 (n-9): Tipos y fuentes

1. Tipos

También se conocen como ácidos oleicos, por ser éste el precursor de la serie, y a diferencia de los omega-3 y omega-6 el cuerpo los produce, pero aún así la ingesta de los mismos en los alimentos es beneficiosa. Su nombre proviene del hecho de que el doble enlace se encuentra situado en la novena posición contada desde el extremo omega. La lista de los más importantes se muestra en la **Tabla 1.2.F.**

Nombre común	Nomenclatura	Nombre químico
Ácido oleico (OA)	18:1 (n-9)	9-ácido octadecenoico
Ácido gadoleico	20:1 (n-9)	11-ácido eicosenoico
Ácido erúcico	22:1 (n-9)	13-ácido docosenoico
Ácido nervónico	24:1 (n-9)	15-ácido tetracosenoico

Tabla 1.2.F.- Lista de ácidos grasos omega 9

2. Fuentes

Los alimentos con mayor contenido en ácidos omega 9 son básicamente aquellos de origen vegetal, ricos en grasas, como el aguacate, y los frutos secos (almendras, avellanas, pistachos, piñones, nueces y cacahuetes).

El *ácido oleico* se encuentra en los aceites de oliva, canola, girasol, y nuez en una proporción superior al 70%. Estos aceites han surgido como una alternativa más saludable y altamente funcional a los aceites de cocina parcialmente hidrogenados, que a menudo tienen un alto contenido de grasas *trans* y saturadas no saludables. El aceite de canola, acrónimo de "Canadian oil low acid", fue introducido en el mercado en 1978 por científicos canadienses en sustitución del aceite de colza, que contiene elevados niveles de ácido erúcico, que provoca lesiones de corazón. Con un contenido en oleico comprendido entre el 40 y el 50% se encuentran el aceite de cárcamo, de cacahete, de almendras y de soja, siendo los de maíz y amaranto los de menor contenido (20-30%).

El *ácido gadoleico* se encuentra en la mostaza blanca, los piñones, los pistachos mostaza, las semillas de amapola, el jengibre, el centeno y, junto con el ácido oleico, en el aceite de cacahuete.

El *ácido erúxico* se encuentra en las semillas de plantas crucíferas, como la mostaza, la colza, el aceite de mostaza y de canola.

En la **Tabla 1.2.G** se presentan los alimentos ordenados de mayor a menor contenido en ácidos omega-9. Figura además el contenido en ácidos omega-6 y omega-3.

Alimento por 100 g	Ácido oleico Omega-9 (g.)	Ácido linoleico Omega-6 (g.)	Ácido linolénico Omega-3 (g.)
Aceite de oliva	70	9,1	0,85
Avellanas	45,8	8,5	0,11
Aceite de cacahuete	44,8	32	0
Aceite de palma	37,1	10,1	0,3
Pistachos	34,8	7,9	0
Almendras	32,6	12,6	0,26
Margarina de maíz	32,6	31,3	0,65
Aceite de maíz	29,4	50,4	0,9
Anacardos	24,4	7,2	0,15
Cacahuetes	21,6	12,8	0,35
Aceite de soja	20,8	51,5	7,3
Aceite de girasol	20,2	63,2	0,1
Aceite de hígado de bacalao	18,3	2,6	1,1
Aguacate	15,1	0,7	1,17
Nueces	10,8	34	8
Pipas de girasol	10,7	37,4	0,08
Aceite de coco	5,8	1,8	0
Queso de bola	5,3	0,44	0,25
Queso de Burgos	3,6	0,43	0,46
Atún en aceite vegetal	3,6	5,3	0,13
Coco rallado seco	3,5	1,5	0
Carne de ternera	2,1	0,35	0

Tabla 1.2.G.- Alimentos ricos en ácidos grasos omega 9, omega-6 y omega-3.

1.2.5 Biosíntesis de PUFAs a partir de ácidos grasos esenciales ω -3 y ω -6

Los ácidos grasos esenciales omega-3 (α -LA) y omega-6 (LA) comparten un metabolismo oxidativo similar así como el mismo grupo de enzimas implicados en el mismo. Estos ácidos se absorben en el intestino y por medio de la sangre son llevados hasta el hígado donde se metabolizan a través de una serie de reacciones alternas de elongación (alargamiento de la cadena hidrocarbonada) y de desaturación (insaturación de la cadena) mediante la acción de las correspondientes enzimas (elongasas y desaturasas), dando lugar a la formación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de hasta 24 átomos de carbono y hasta 6 enlaces dobles (llamados PUFAs, *poly unsaturated fatty acids*). Estas rutas necesitan las enzimas desaturasa Δ -6D y Δ -5D, una elongasa del sistema microsómico y la beta-oxidación en los peroxisomas (Moore, Hurt, Yoder, Sprecher, & Spector, 1995) (Sprecher, 2002) (D'Andrea, y otros, 2002).

1.2.5.1 PUFAs de la serie omega-3

En lo que se refiere a la **serie ω -3**, el ácido graso esencial α -LA (18:3 n-3), precursor de la serie, se convierte primero en ácido estearidónico (SDA; 18:4 n-3), con un doble enlace más que el ácido inicial, mediante la acción de la Δ -6D desaturasa, para dar lugar posteriormente, tras una elongación y una desaturación Δ -5D al ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) tal como recoge la **Figura 1.2.A**. De este modo, a través de este mecanismo se ha pasado del ácido graso precursor, con 18 átomos de carbono y tres dobles enlaces, a otro de 20 átomos de carbono y 5 dobles enlaces.

1.2.5.2 PUFAs de la serie omega-6

Cuando se trata de los **ácidos grasos omega-6**, el proceso es similar. Partiendo del LA (18:2 n-6), puede convertirse en el ácido eicosadienoico (EA; 20:2 n-6) por acción de la elongasa correspondiente o dar lugar al ácido γ -linolénico (γ -LA; 18:3 n-6) mediante la actuación de la Δ -6D desaturasa. Ambos ácidos grasos resultantes darán lugar al ácido dihomo- γ -linolénico (D γ -LA; 20:3 n-6) por mediación de los enzimas Δ -6D o elongasa, respectivamente. A su vez, a partir del D γ -LA se sintetiza el ácido araquidónico (AA; 20:4 n-6) con la ayuda de la Δ -5D desaturasa.

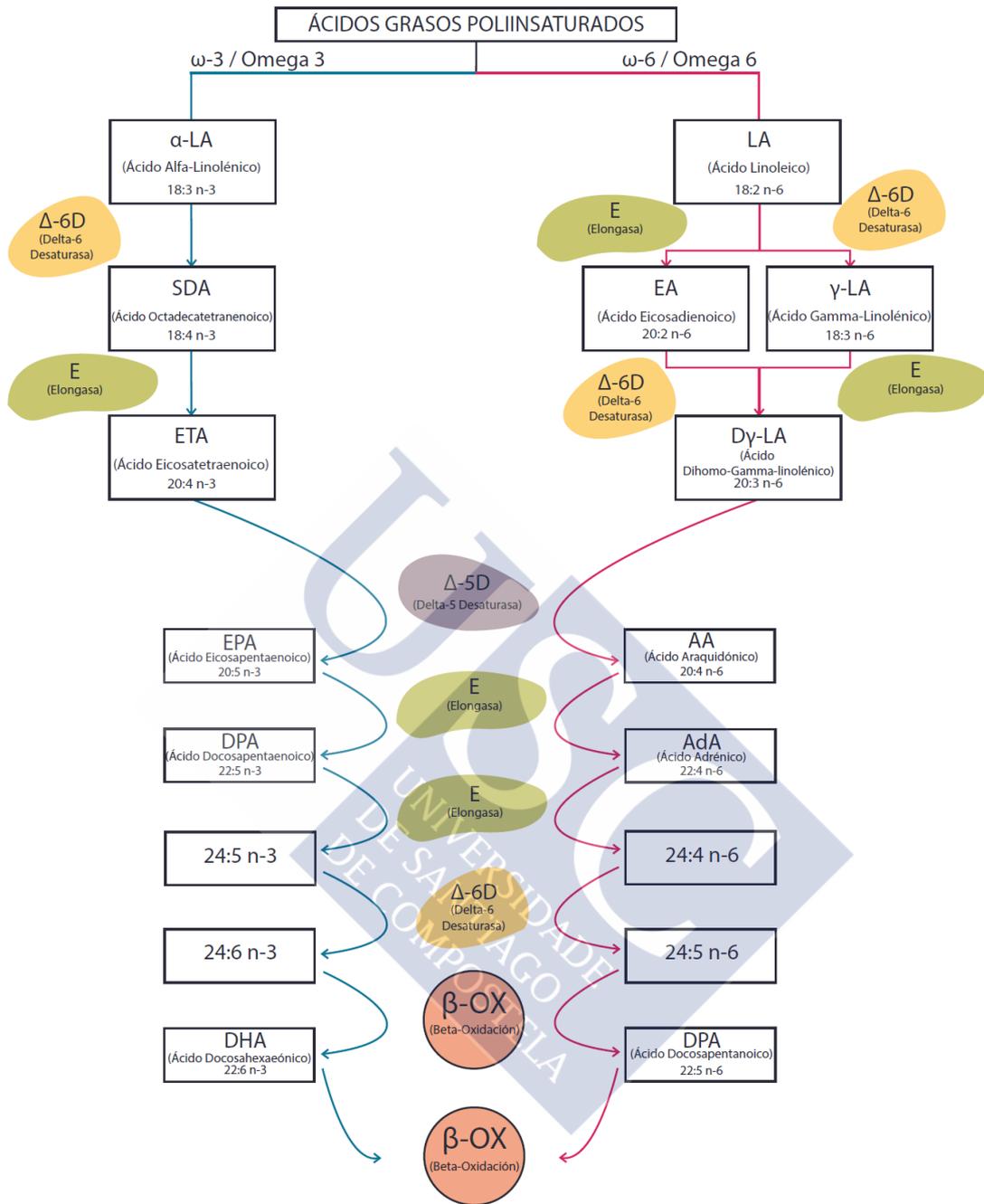


Figura 1.2.A.- Metabolismo ácidos grasos omega 3 y 6

A partir del EPA y del AA, sucesivas elongaciones y desaturaciones en cada una de las series dan lugar a la síntesis de un ácido graso de 24 átomos de carbono con 6 dobles enlaces en el caso de los omega-3 (24:6 n-3), y con 5 dobles enlaces en los omega-6 (24:5 n-6). El destino de estos ácidos grasos poliinsaturados es el de sufrir una

retroconversión a sus homólogos de 22 átomos de carbono mediante un proceso de oxidación, denominado β -oxidación, debido a que la supresión de los dos átomos de carbono tiene lugar en los carbonos beta de la cadena hidrocarbonada. De este modo se sintetizan los ácidos docosahexaenoico (DHA; 22:6 n-3) en la serie de los omega-3 y el ácido docosapentanoico (DPA; 22:5 n-6) en la serie de los omega-6. Estos procesos se llevan a cabo en las *peroxisomas*, órganos del citoplasma que contienen oxidasas y catalasas, que son enzimas que intervienen en el acortamiento de los ácidos grasos de cadena muy larga para su completa oxidación en las mitocondrias, donde sufrirán un proceso catabólico consistente en la eliminación de 2 átomos de carbono en cada ciclo de oxidación hasta quedar reducido el ácido graso a una molécula de acetil-CoA que, a su vez, será oxidada para la obtención directa de energía química (ATP).

Existen todavía algunas cuestiones sin resolver relacionadas con la complejidad inherente a los procesos que conllevan a que los precursores de los ácidos grasos omega-3 y omega-6 se conviertan en ácidos PUFAs. Se sabe que en los humanos estos procesos ocurren de forma lenta, pero la ratio de conversión todavía no se conoce de forma exacta. Por ejemplo, no está claro qué cantidad de α -LA se convierte en EPA y DHA, aunque en el caso particular del DHA se sabe que su ratio de síntesis es bajo. Debido a esto, junto con la baja proporción de ácidos grasos omega-3 en las dietas occidentales, y a la importancia de los PUFAs en muchos procesos fisiológicos, se considera necesario aumentar el nivel de los ácidos omega-3 en la dieta, a base de incrementar el consumo de alimentos ricos en estos compuestos, presentes fundamentalmente, tal como se ha comentado, en pescados como el salmón, sardinas, caballas, arenques, etc. Fue precisamente la alta ingesta de este tipo de pescados en las poblaciones de Groenlandia, norte de Canadá y Alaska, relacionada con su reducida tasa de mortalidad cardiovascular a pesar de su alto consumo de grasa, superior al 30% de los requerimientos energéticos, lo que hizo sospechar que los ácidos grasos ω -3, particularmente los de cadena larga, podrían tener propiedades protectoras cardiovasculares (Bang, Dyerberg, & Sinclair, 1980) (Petrova, Dimitrov, Willett, & Campos, 2011). Estos resultados fueron confirmados en estudios realizados posteriormente en poblaciones con una alimentación similar, las cuales evidenciaron,

además de una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares, una menor manifestación de enfermedades inflamatorias (Egert & Stehle, 2011). Datos similares obtenidos en la población japonesa que, como es bien sabido, tiene una dieta rica en pescados de mar que contienen cantidades elevadas de EPA y DHA, demuestran también una menor incidencia de enfermedades isquémicas cardíacas y aterosclerosis (Kinjo, y otros, 1999). Del mismo modo, estudios epidemiológicos han acumulado datos que demuestran que el consumo de ácidos grasos ω -3 de cadena larga reduce el riesgo de muerte cardiovascular (Albert, y otros, 1998).

Las dos rutas metabólicas de los ácidos grasos omega-3 y omega-6 que se acaban de describir son independientes entre sí y no se produce reacción cruzada alguna. No obstante, ambas rutas omparten los mismos enzimas, dando lugar a una competencia de los ácidos grasos por ellos. El ácido graso que predomine en la dieta determinará qué tipo de PUFA será el mayoritario en los niveles celulares y plasmáticos. Dado que en las dietas occidentales existe un notable predominio de consumo de alimentos con elevado contenido en ácido linoleico LA (de la serie omega-6), con respecto a los que contienen ácido linolénico (α -LA), de la serie omega-3, los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga mayoritarios corresponden a los de la serie omega-6, es decir, existe un predominio de ácido araquidónico (AA) frente a los PUFAs de la serie omega-3, los cuales, como veremos, están implicados en la formación de eicosanoides, compuestos con importantes propiedades antiinflamatorias, entre otras. En los últimos años el consumo de omega-6 ha aumentado y disminuido el de omega-3 en paralelo con el aumento de enfermedades cardíacas. Por esta razón, se intenta buscar una proporción "ideal" de ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la dieta (Simopoulos A. , 2008), habiéndose establecido en una relación 2:1 o 4:1. En una típica dieta norteamericana la proporción de ácidos grasos omega-6 puede llegar a ser de 11 a 30 veces mayor que la de omega-3, explicando el aumento en la tasa de trastornos inflamatorios, enfermedades coronarias, artritis y depresión (Hibbeln, 2006).

1.2.6 Biosíntesis de Eicosanoides

Los eicosanoides son un grupo de moléculas de carácter lipídico originadas por la oxigenación de los ácidos grasos omega-3 y omega-6 (**Figura 1.2.B**). Cumplen amplias funciones como mediadores de la inflamación y de la respuesta inmune en vertebrados e invertebrados. Los precursores de los mismos son el AA, el EPA y el D γ -LA, es decir, ácidos grasos poli-insaturados de 20 átomos de carbono (de ahí su nombre genérico). Los nombres específicos de estos eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) derivan del hecho de que son sintetizadas en la próstata, en las plaquetas (trombocitos) y en los leucocitos, respectivamente.

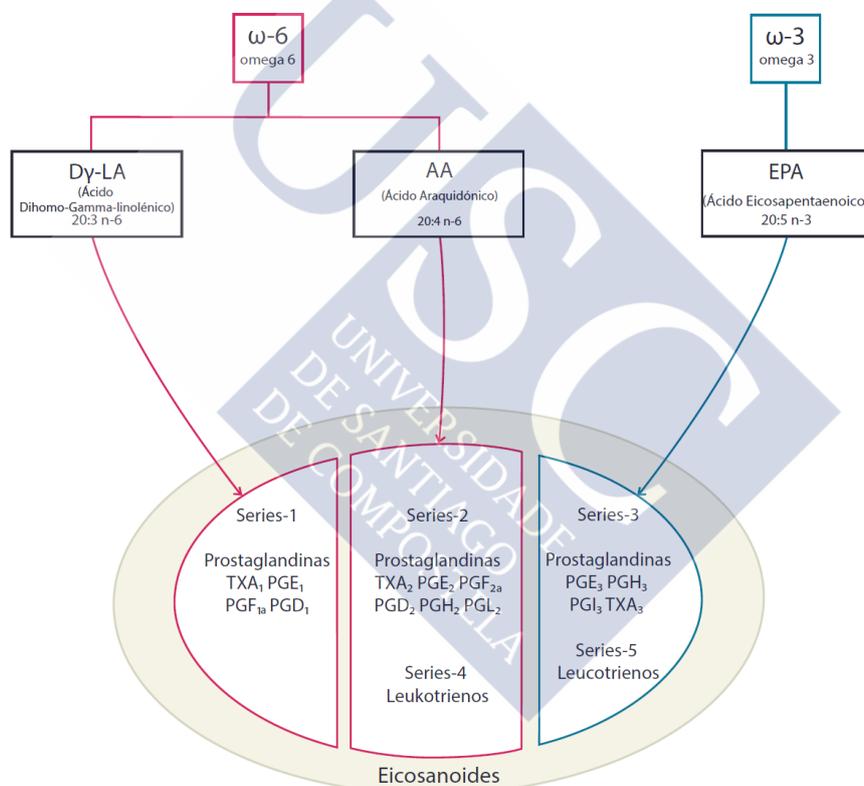


Figura 1.2.B.- Biosíntesis Eicosanoides

1.2.6.1 Eicosanoides de la serie 2

Los eicosanoides más abundantes son los correspondientes a la serie 2, procedentes del ácido araquidónico, que es normalmente el ácido graso poliinsaturado más abundante en la dieta.

Durante las primeras etapas de un proceso inflamatorio, el AA es liberado desde los fosfolípidos de las membranas celulares por activación de la enzima fosfolipasa A₂ (FLA₂). Posteriormente, un grupo de enzimas conocidas como ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y lipooxigenasas (LOX) metabolizan al AA generando eicosanoides bioactivos, entre los que se encuentran las prostaglandinas y tromboxanos de la serie 2 (por contener 2 dobles enlaces) y leucotrienos de la serie 4 (Calder, Yaqoob, Thies, Wallace, & Miles, 2002). Para ello, el AA tiene dos vías distintas de acción: la primera (**vía cíclica**) (**Figura 1.2.C**) involucra a las COX (1-2), las cuales convierten el AA en prostaglandina PGH₂ (Holinstat, y otros, 2011), la cual, posee una vida muy corta metabolizándose, por una parte para originar el tromboxano A₂ (TXA₂) y, por otra, en prostaglandinas PGI₂ (prostaciclina), PGE₂, PGD₂ y PGF₂. De éstas, la prostaglandina E₂ es un potente mediador de la inflamación, del dolor, de la fiebre y del aumento de la permeabilidad vascular (Sampath & Ntambi, Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism, 2005). Es también un mediador importante de la vasodilatación. Por el contrario, el tromboxano A₂ es vasoconstrictor.

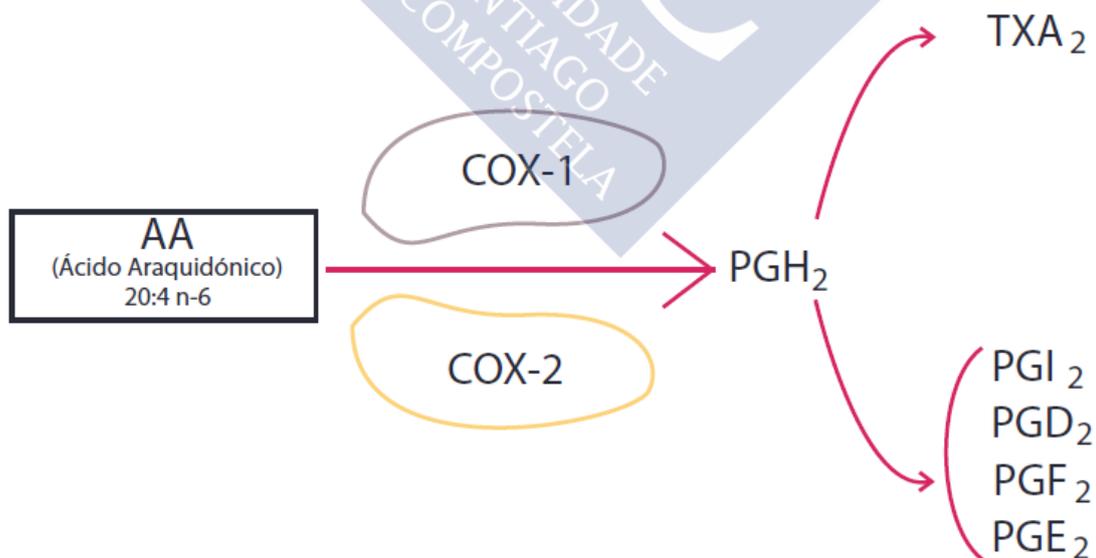


Figura 1.2.C.- Vía cíclica de formación de eicosanoides a partir del AA.

La segunda vía del AA (**vía lineal**) (**Figura 1.2.D**) involucra a la enzima 5-lipoxigenasa que da lugar a la formación del leucotrieno LTA_4 , el cual se convierte, por una parte, en leucotrieno B_4 (LTB_4) gracias a la intervención de la *enzima LTA_4 hidrolasa*, y por otra, en LTC_4 (por acción de la *enzima LTC_4 sintasa*) que a su vez origina posteriormente los leucotrienos D_4 , E_4 y F_4 . Todos ellos son potentes agentes pro-inflamatorios que aumentan la permeabilidad vascular, la actividad de las células inmunes, y estimulan la liberación de citoquinas inflamatorias (Xi, Cohen, Barve, & Chen, 2001).

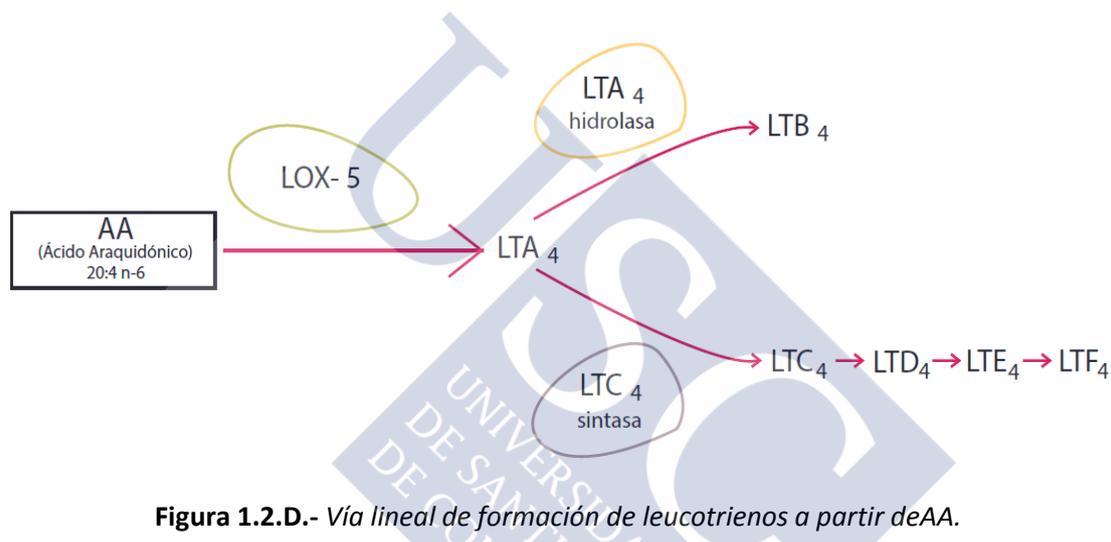


Figura 1.2.D.- Vía lineal de formación de leucotrienos a partir de AA.

En definitiva, los productos del metabolismo del AA (PGE_2 , TXA_2 y LTB_4) tienen propiedades pro-inflamatorias, por lo que todos los fármacos que reducen la producción de estos compuestos son beneficiosos para reducir la inflamación y la correspondiente patología vascular. Una clase de medicamentos ampliamente utilizados, los antiinflamatorios no esteroideos, tales como ibuprofeno, naproxeno, indometacina, etc., actúan sobre las enzimas ciclooxygenasas, inhibiendo su acción y, en consecuencia, la producción de eicosanoides derivados del AA.

1.2.6.2 Eicosanoides de la serie 3

En los humanos y en animales, las dietas ricas en EPA aumentan la proporción de estos ácidos grasos omega-3 en la bicapa de las membranas celulares, particularmente en los linfocitos, lo cual, además de reducir el contenido de AA en la bicapa por un efecto

de competencia (Su, Huang, Chiu, & Shen, 2003) (Phinney, Odin, Johnson, & Holman, 1990) disminuye la generación de los productos pro-inflamatorios que acabamos de describir, derivados del AA (Lapillone, Clark, & Heird, 2004) (Sampath & Ntambi, 2004). Esto se debe a que el EPA es un buen sustrato de las enzimas ciclooxigenasas y de la lipooxigenasa-5, por lo que compite con el AA en la generación de eicosanoides, inhibiendo la formación de prostaglandinas PGE₂, tromboxanos TXA₂ y leucotrienos LTB₄, con propiedades pro-inflamatorias (Sampath & Ntambi, 2004) (Wall, Ross, Fitzgerald, & Stanton, 2010), y produciendo, entre otros eicosanoides, prostaglandina TXA₃ (una prostaciclina de la serie 3, con tres dobles enlaces), la cual es un inhibidor de la agregación plaquetaria (Calder, y otros, 2009) (Holinstat, y otros, 2011). Los demás productos de la conversión del EPA en eicosanoides de la serie 3 (TXA₃, prostaglandinas I₃ y E₃ y leucotrienos LTB₅) (**Figura 1.2.B**) son significativamente poco potentes en estimular la inflamación, la vasoconstricción y la agregación plaquetaria, e incluso pueden antagonizar los efectos típicamente pro-inflamatorios de los eicosanoides derivados del AA (Layé, 2010) (Cottin, Sanders, & Hall, 2011) (**Tabla 1.2.H**).

	Vía	AA	EPA
PLAQUETAS	Ciclooxigenasas	Tromboxano A ₂ <i>Agregación plaquetaria</i> <i>Vasoconstrictor</i>	Tromboxano A ₃ <i>Biológicamente</i> <i>inactivo</i>
CÉLULAS ENDOTELIALES	Ciclooxigenasas	Prostaglandinas Serie 2 <i>Proinflamatorias</i>	Prostaglandinas Serie 3 <i>Antiagregación</i> <i>Vasodilatador</i>
LEUCOCITOS	Lipooxigenasas	Leucotrieno B ₄ <i>Proinflamatorio</i> <i>Quimiotáxico</i> <i>Adhesión celular</i>	Leucotrieno B ₅ <i>Antiinflamatorio</i> <i>No quimiotáxico</i> <i>Inhibe adhesión</i>

Tabla 1.2.H.- Efectos metabólicos de los tromboxanos, prostaglandinas y leucotrienos derivados del ácido araquidónico (AA) y del ácido eicosapentaenoico (EPA)

1.2.6.3 Eicosanoides de la serie 1

Una tercera ruta para la producción de eicosanoides la constituye aquella que parte del ácido ácido dihomo-gamma-linolénico (20:3 n-6) (D γ -LA) como precursor de eicosanoides de la serie 1 (**Figura 1.2.B**), los cuales poseen importantes acciones biológicas.

La liberación de D γ -LA de las membranas celulares se produce por la acción de la fosfolipasa A, de igual modo que en el caso del AA. Una vez liberado el D γ -LA, compete con el AA para unirse a las ciclooxigenasas para dar origen a los eicosanoides de la serie, cuyas prostaglandinas (PG₁) y tromboxanos (TXA₁) presentan características estructurales similares a los compuestos de la serie 2, pero propiedades biológicas muy diferentes, puesto que son sustancias anti-inflamatorios que inducen la vasodilatación e inhiben la agregación plaquetaria.

Por otro lado, cuando el D γ -LA es sustrato de la enzima 15-LOX no origina leucotrienos como el AA, pero si produce ácido 15-hidroxicotrienoico (15-HETE), potente inhibidor de la enzima 5-LOX, responsable de la conversión del AA en leucotrieno LTB₄ que, como se señaló antes, es un destacado agente inflamatorio. Por tanto, el D γ -LA también inhibe la inflamación a través de la ruta lineal de los eicosanoides.

El ácido D γ -LA no suele estar presente en grandes cantidades en nuestra dieta habitual, pero se puede encontrar en el aceite de onagra y en el de borraja, comercializados como suplementos alimentario. El problema es que un elevado consumo de estas fuentes de D γ -LA puede conducir a que este ácido pueda tomar la ruta de formación de AA, tal como se observa en la **Figura 1.2.A** y, en consecuencia, la producción de prostaglandinas pro-inflamatorias de la serie 2. Para evitarlo, la clave está en la relación entre ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la dieta: si faltan ácidos grasos omega-3, concretamente ácido α -linolénico, el D γ -LA se convertirá en las prostaglandinas "malas" de la serie 2. Si en cambio la dieta es rica en α -LA, el D γ -LA se convierte en prostaglandinas "buenas" de la serie 1. La causa de esto radica en la enzima Δ 5-desaturasa. Como se puede apreciar en la **Figura 1.2.A**, esta enzima actúa en dos reacciones bioquímicas a la vez: por un lado, en la conversión de D γ -LA en ácido araquidónico (es decir, el camino que queremos evitar), y por otro en la conversión de

α -LA en otros ácidos grasos omega-3. Pues bien, si hay abundante α -LA la $\Delta 5$ -desaturasa estará ocupada en seguir esta segunda ruta, y no le quedará capacidad para metabolizar el $D\gamma$ -LA en ácido araquidónico y otros omega-6. Y sin $\Delta 5$ -desaturasa libre, el $D\gamma$ -LA se convertirá directamente en prostaglandinas de la serie 1 mediante la acción de otras enzimas (ciclo-oxigenasas y lipo-oxigenasas). Por tanto, a la hora de tomar aceite de onagra o de borraja, es muy importante asegurarse de seguir una dieta rica en α -LA para asegurar la biosíntesis de eicosanoides de la serie 1.



1.2.7 Inflamación: Eicosanoides como mediadores químicos

La inflamación es un mecanismo de defensa natural frente a agresiones externas por el cual factores protectores como los anticuerpos y las células fagocíticas, que se encuentran localizados normalmente en la sangre, pueden penetrar en el tejido y tener acceso a los sitios de invasión de elementos extraños. Se trata de una respuesta inespecífica del organismo que se inicia a través de mediadores químicos de la inflamación, entre los que se encuentran las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Matheus, 1988) (Abbas, 1999), a los que algunos autores consideran como hormonas locales (Ilyiná, 1995) debido a que no existen depósitos de ellos en las células, sino que se sintetizan y liberan localmente según la demanda. Además, se metabolizan con rapidez por lo que son detectables solo por periodos cortos (Margni, 1989).

No todos los tejidos pueden sintetizar los eicosanoides mediadores de la inflamación puesto que depende de la batería enzimática que exista en cada uno de ellos; por ejemplo, las plaquetas sólo cuentan con la tromboxano sintetasa, produciendo una importante cantidad de tromboxano A₂, pero carecen de enzimas para sintetizar prostaglandinas, por lo que las plaquetas son elementos formes de la sangre con capacidad exclusiva de ser agregantes. A₂.

Las células del endotelio vascular son ricas en la enzima prostaciclina sintetasa formando PGI₂. Las PGE₂, PGF₂ Y PGD₂ se encuentran difundidas en casi todas las células del cuerpo, con la excepción de los glóbulos rojos y los linfocitos. Las células del músculo cardíaco producen PGI₂, PGE₂ y PGF₂ en cantidades más ó menos iguales (Voet, 1992). Por otra parte, las células del encéfalo sintetizan PGD₂, las endoteliales del hígado PGI₂ y las endocrinas producen prostaglandinas PGE₁ y PGE₂.

Los leucocitos forman leucotrienos. Por ejemplo, los neutrófilos y los eosinófilos producen LTB₄ y los basófilos LTC₄, LTD₄ y LTE₄, los cuales son también sintetizados por los mastocitos en los pulmones, desempeñando un papel importante como agentes broncoconstrictores (Margni, 1989) (Abbas, 1999).

Los signos de la inflamación aguda, conocidos desde hace tiempo, son el rubor (enrojecimiento), el tumor, el calor y el dolor. Los eicosanoides están involucrados en todos ellos, como veremos a continuación).

- *Enrojecimiento.*- Tras la agresión externa (la picadura de un insecto, por ejemplo) se inicia la respuesta clásica de la inflamación. Ciertos vasoconstrictores de corta duración, como el TXA₂ se liberan rápidamente después de la lesión haciendo que, inicialmente, el lugar de la agresión pueda tornarse momentáneamente pálido. Luego, la liberación de vasodilatadores como PGE₁, PGI₂, PGE₂, y PGD₂ provoca que los vasos sanguíneos se dilaten y la lesión se enrojezca (rubor).

- *Inflamación.*- Al inicio de la inflamación aguda las células del tejido dañado son las productoras de eicosanoides, ya que los fagocitos PMN no son productores eficientes de prostaglandinas (Bohinski, 1991) (Abbas, 1999). Los exudados que se producen en los momentos iniciales del proceso inflamatorio son ricos en leucocitos formadores de leucotrienos LTB₄, los cuales, junto con las prostaglandinas de la serie 2, provocan un aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos y, consecuentemente, una salida del plasma hacia los tejidos conjuntivos, hinchándolos, con formación local de edema (Stites & Stobo, 1966). El proceso también libera citoquinas proinflamatorias.

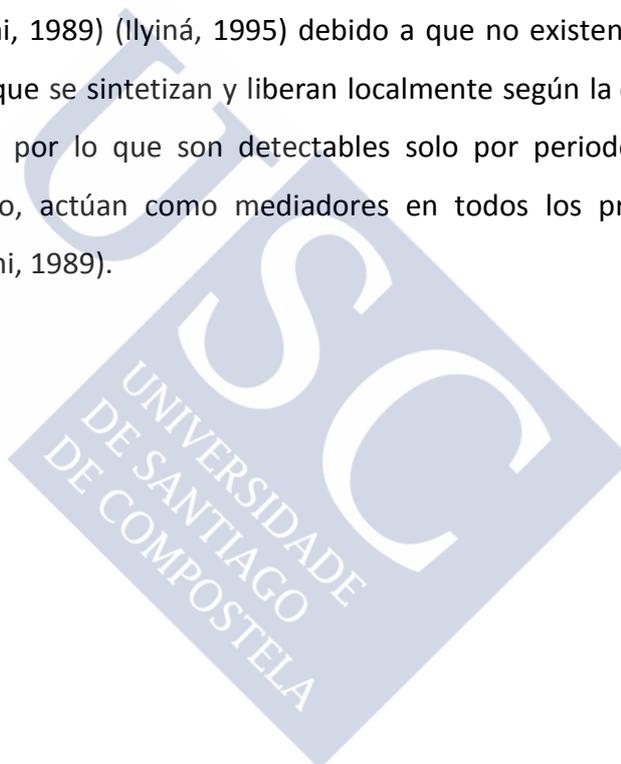
- *Dolor.*- El dolor se debe a la presión ejercida en las terminales nerviosas por la acumulación de líquido extravascular y a la liberación de mediadores químicos, como las citoquinas, que incrementan la actividad de COX-2. Ello eleva los niveles de PGE₂ e I₂, causantes del dolor, siendo PGI₂ la más efectiva debido a su capacidad de elevar los niveles intracelulares de AMP cíclico (Margni, 1989) (Stites & Stobo, 1966), haciendo más sensibles a los nervios del dolor. Los leucotrienos (LTB₄) también se tornan en un sistema de amplificación del mecanismo del dolor en el proceso inflamatorio (Matheus, 1988) (Díaz Argüelles, 2001).

- *Calor (Fiebre).*- La PGE₂ es un potente agente pirético. Interacciona con las citoquinas para producir la fiebre que se observa en las respuestas inflamatorias sistémicas que aparecen en las infecciones. La suplementación dietaria con EPA y DHA es capaz de reducir la producción de estas citoquinas que se liberan cuando los macrófagos y monocitos son activados (Camuesco, y otros, 2006). Si bien estas citoquinas son potentes activadores de la función inmune, el exceso de actividad de estas sustancias contribuye a la inflamación patológica, situación observada en la inflamación intestinal crónica (Nieto, Torres, Ríos, & Gil, 2002), en la artritis reumatoidea

(Hurst, Zainal, Caterson, Hughes, & Harwood, 2010), entre otras patologías inflamatorias.

Por otra parte, la aspirina es un inhibidor de la prostaglandina PGE₂ e inhibe la síntesis de otras PG inflamatorias. Junto con los anti-inflamatorios no esteroideos (paracetamol, butiprofeno, ibuprofeno) bloquean la acción del COX y detienen la síntesis de eicosanoides de la serie 2, limitando así la fiebre o el calor de la inflamación localizada.

Estas prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos que intervienen como mediadores químicos de la inflamación son considerados por algunos autores como hormonas locales (Margni, 1989) (Ilyiná, 1995) debido a que no existen depósitos de ellos en las células, sino que se sintetizan y liberan localmente según la demanda y se metabolizan con rapidez por lo que son detectables solo por periodos cortos. De acuerdo don lo expuesto, actúan como mediadores en todos los procesos de la inflamación aguda (Margni, 1989).





1.3 COLESTEROL

1.3.1 Generalidades

Fue aislado por primera vez a finales del s. XVIII por Couvreur a partir de cálculos biliares y, en principio, se denominó *colesterina*, como se señaló al inicio de este capítulo. La fórmula empírica ($C_{27}H_{46}O$) no se llegó a conocer hasta el año 1888, cuando F. Reinitzer la descifró (Reinitzer, 1888). Al descubrirse la presencia de un grupo hidroxilo pasó a llamarse colesterol. Los trabajos sobre el colesterol continuaron debido a los estudios sobre su estructura llevados a cabo por Heinrich Wieland que fueron galardonados con el Premio Nobel en Química en 1927. Sin embargo, la estructura presentada en 1928 no era del todo correcta y fue en 1932 cuando Wieland y Schönberg dieron con la verdadera (Wieland & Schönberg, 1932).

El colesterol es esencial para la fabricación y constitución de las membranas celulares, regulando sus propiedades físicoquímicas, en particular su fluidez. Más del 90% del colesterol del organismo se localiza en las membranas, mientras que sólo un 7% circula por el plasma. Es precursor de:

1. sales biliares, esenciales en la absorción de algunos nutrientes lipídicos y vía principal para la excreción del colesterol.
2. vitamina D, necesaria para el metabolismo del calcio en los huesos
3. hormonas sexuales como progesterona, estrógenos y testosterona.
4. hormonas corticoesteroides: cortisol y aldosterona.

Además, el colesterol es un importante protector cutáneo debido a que, junto con otras sustancias lipoides que también se depositan en grandes cantidades en la piel, impide la absorción de sustancias hidrosolubles a través de la piel, ya que es inerte frente a los ácidos y solventes, los cuales, de lo contrario, podrían penetrar fácilmente en el organismo. Además, estos lípidos también evitan la evaporación masiva de agua por la piel.

La carencia de colesterol puede producir graves alteraciones, principalmente en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), que en muchas ocasiones son letales.

Por último, el colesterol es necesario para la síntesis y secreción de lipoproteínas, las cuales son necesarias para su transporte y el de triglicéridos en la sangre, puesto que ambas sustancias son insolubles en agua.

En la **Figura 1.3.A** se presenta la fórmula estructural del colesterol.

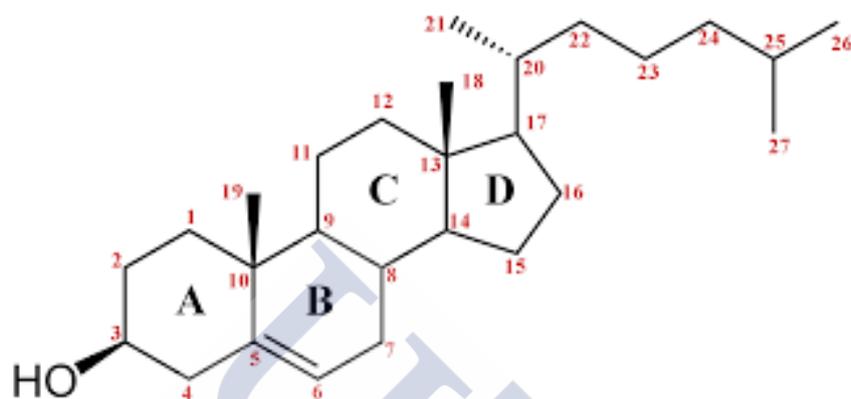


Figura 1.3.A.- Fórmula estructural del colesterol

Consta de un núcleo de *ciclopentanoperhidrofenantreno* o *esterano* formado por cuatro anillos, denominados A, B, C y D, que presentan varias sustituciones:

1. Dos radicales metilo en las posiciones C-10 y C-13.
2. Una cadena alifática ramificada de 8 carbonos en la posición C-17.
3. Un grupo hidroxilo en la posición C-3.
4. Un doble enlace entre los carbonos C-5 y C-6.

Los cuatro anillos del esterano y la cadena hidrocarbonada sustituyente del anillo D del colesterol constituyen una estructura compacta, rígida e hidrófoba aunque la molécula es anfifílica porque tiene una pequeña parte polar constituida por el grupo hidroxilo del carbono 3 y una cola o porción apolar formada por el carbociclo de núcleos condensados y los sustituyentes alifáticos. Así, el colesterol, al igual que otros lípidos, es insoluble en agua y bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo.

1.3.2 Metabolismo

1.3.2.1 Biosíntesis del colesterol

El colesterol existente en nuestro organismo proviene de dos **fuentes** principales:

1.- La **alimentación** (colesterol **exógeno**) que es la responsable de un tercio de los aportes diarios (0,3 g/día, aproximadamente). Entre los alimentos más ricos en colesterol encontramos sobre todo:

- los de origen animal como la carne roja, el pato, las vísceras, la charcutería (embutidos, *foie gras*) y el marisco.
- la manteca de cerdo y algunos aceites con alto contenido en ácidos grasos saturados y sus derivados: la bollería industrial, la repostería, patatas fritas y los snacks en general.
- la leche y lácteos enteros, la nata y los quesos grasos.
- los alimentos elaborados que contengan aceites en sus ingredientes como mayonesas, empanadillas y productos rebozados.

2.- La fabricación o **síntesis** (colesterol **endógeno**) por parte de las células, que corresponde a la mayor parte de los aportes diarios (1 g/día, aproximadamente). La fabricación del colesterol tiene lugar en el retículo endoplasmático liso de prácticamente todas las células de los animales vertebrados. Aunque el hígado es el lugar principal, se sabe que otros muchos tejidos también lo sintetizan, por ejemplo: intestino, piel, pared arterial y otros. Está regulada en parte por el aporte de colesterol exógeno, ya que niveles dietéticos altos de colesterol o la presencia de precursores del mismo, dan lugar a una disminución de su síntesis hepática. Por el contrario, los factores que causan disminución en los niveles de colesterol sirven para estímulo de su biosíntesis. En consecuencia, el organismo se autorregula para conseguir un nivel óptimo de colesterol en el mismo. No obstante, una ingesta exagerada de colesterol exógeno o una anomalía en la producción de colesterol endógeno, causando un incremento de su producción, puede provocar el deterioro del mecanismo de autorregulación, incrementándose los niveles de colesterol en sangre.

La síntesis de colesterol en el hepatocito se produce a partir de la enzima acetil-CoA (que como vimos es el producto de la oxidación de las grasas) mediante una cadena de reacciones de condensación, reducción e hidroxilación (Brown & Goldstein, 1978), siendo la **conversión de la β -hidroxi- β -metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) a mevalonato**, catalizada por la correspondiente enzima reductasa, **la reacción limitante** de la síntesis (**Figura 1.3.B**). En el hígado e intestino se han detectado las mayores cantidades de este enzima, de forma que de 2/3 a 3/4 partes del colesterol total del organismo se sintetiza en estos órganos (Kenelly & Rodwell, 1985) (Gill, 1985). De un modo resumido se pueden agrupar las reacciones químicas de la síntesis de la siguiente manera (Lehninger, 2009):

- Tres moléculas de acetil-CoA se combinan entre sí formando mevalonato, el cual es fosforilado a 3-fosfomevalonato 5-pirofosfato.
- El 3-fosfomevalonato 5-pirofosfato es descarboxilado y desfosforilado a pirofosfato de isopentenilo.
- El ensamblaje sucesivo de seis moléculas de pirofosfato de isopentenilo origina el escualeno, vía pirofosfato de geranilo y pirofosfato de farnesilo.
- La ciclación del escualeno da lanosterol.
- El lanosterol se convierte en colesterol después de numerosas reacciones sucesivas, enzimáticamente catalizadas, que implican la eliminación de tres grupos metilo ($-\text{CH}_3$), el desplazamiento de un doble enlace y la reducción del doble enlace de la cadena lateral.

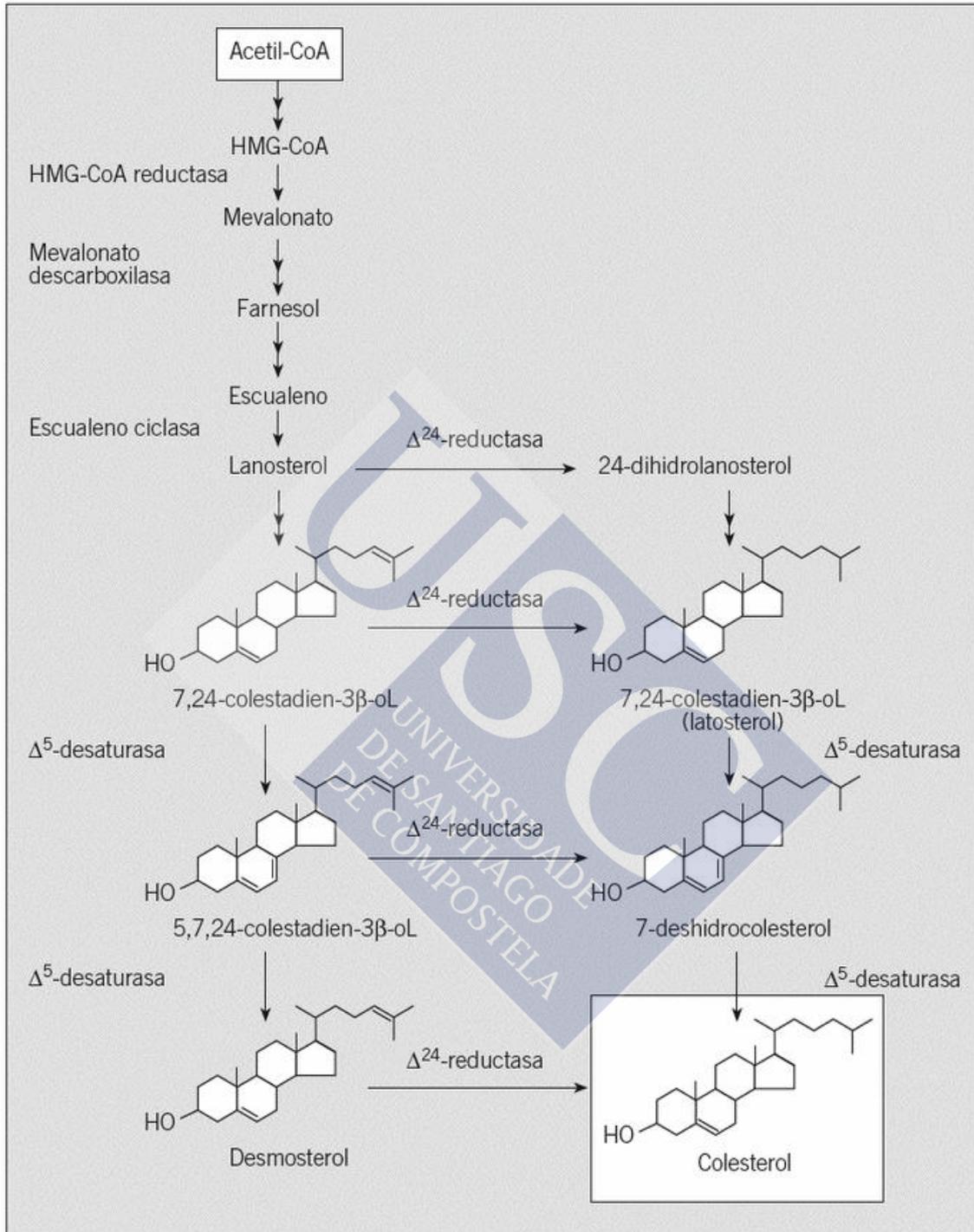


Figura 1.3.B.- Reacciones químicas en la biosíntesis del colesterol

1.3.2.2 Rutas metabólicas

En los organismos sanos el colesterol sintetizado en el hígado en virtud de su biosíntesis, junto con el reabsorbido en el tracto digestivo a partir de los alimentos, está en equilibrio con el excretado en las heces y con el utilizado en el metabolismo (síntesis de sales biliares, hormonas, vitamina D, formación de membranas, etc). La resultante de este equilibrio constituye el *pool* metabólico del colesterol en virtud del cual se logra mantener constante su nivel en el organismo. De lo contrario hay que recordar que la acumulación de este lípido en las arterias está asociada con enfermedades cardiovasculares y apoplejía (suspensión súbita de la acción cerebral debida a derrames sanguíneos en el encéfalo o en las meninges).

En la **Figura 1.3.C** se esquematizan las relaciones entre los tejidos periféricos, el hígado y el intestino en el mantenimiento de la homeostasis del colesterol (Ros, 2006).

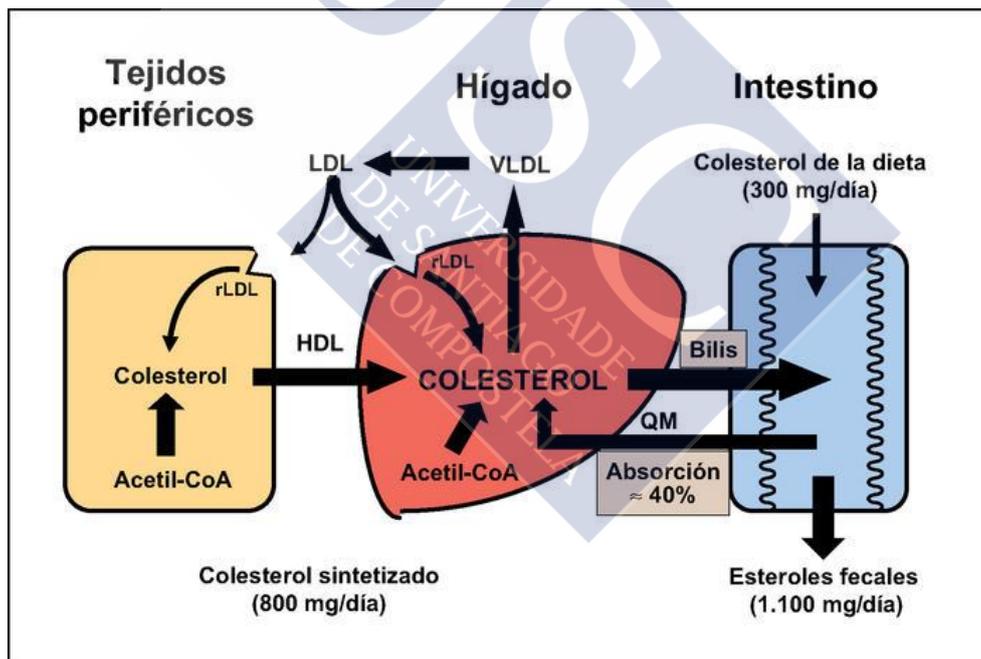


Figura 1.3.C.- Homeostasis del colesterol en el organismo. HDL: proteínas de alta densidad; rLDL: receptor para las lipoproteínas de baja densidad (LDL); QM: quilomicrones; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

Ruta intestino-higado.

Entre un 95%-98% del colesterol que ingerimos está esterificado con ácidos grasos. Los ésteres del colesterol no sufren ninguna modificación en la digestión bucal y gástrica. Es en el **intestino delgado** en donde la enzima *colesterol estereasa* hidroliza prácticamente el 100% de los ésteres con la ayuda de las sales biliares, que actúan como activadores de la enzima (Huff, 2003). El colesterol libre difunde en forma de micelas con los ácidos biliares a través de la membrana de las células de la mucosa intestinal y una vez dentro de éstas, en el endotelio intestinal, es de nuevo esterificado en una proporción del 40% con ayuda de la enzima *acilCoA-colesterol-acil-transferasa* (ACAT) (Chen, 2001), eliminándose el resto por las heces. (Es necesario destacar que el colesterol, a diferencia de otras moléculas, no se metaboliza hasta originar CO₂ y H₂O, de modo que la única vía de eliminación es la intestinal).

El colesterol re-esterificado pasa a la sangre para ser conducido hacia los órganos y sistemas del organismo donde se le requiera. Pero como es un compuesto que no se disuelve en agua ni en disoluciones acuosas como el plasma sanguíneo, necesita unirse a sustancias solubles como las proteínas formando parte de unas partículas sintetizadas en el intestino llamadas **quilomicrones (QM)**, que contienen los ésteres de colesterol, proteínas, y triglicéridos procedentes de la dieta. Se trata de una clase de lipoproteínas muy poco densas porque contienen mucha grasa, aunque son las de mayor tamaño (Figura 1.3.D).

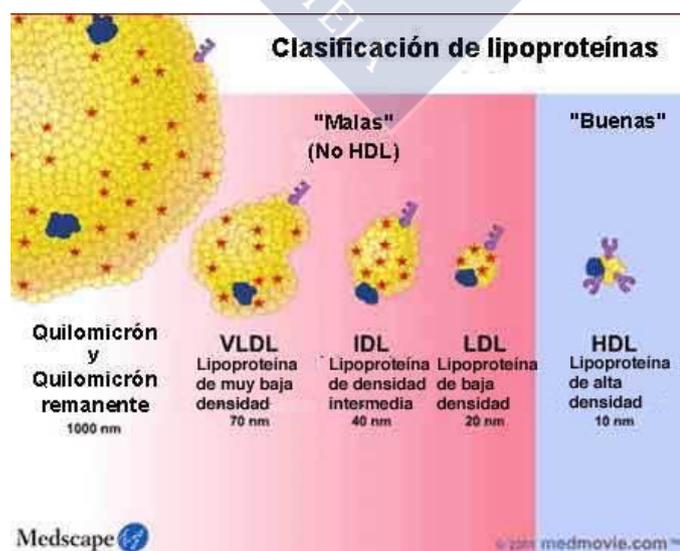


Figura 1.3.D.- Quilomicrón y lipoproteínas

Los quilomicrones llegan a la circulación sanguínea por vía linfática y mientras circulan van descargando sus triglicéridos en los músculos (a los que aportan energía) y en los tejidos adiposos (donde se almacenan como reserva) (Miyazaki, Sakai, Sakamoto, & Horiuchi, 2003). A medida que se van descargando de grasa disminuyen de tamaño, de modo que llegan menguados al hígado, pero enriquecidos en ésteres de colesterol. En las células del hígado estos residuos son captados por moléculas receptoras que los reconocen y los introducen en el hepatocito para que éste haga uso de ellos según sus requerimientos. De esta manera, el colesterol de la alimentación es incorporado a las células hepáticas. Parte del colesterol que las células no utilizan es excretado en forma de ácidos biliares o de colesterol libre, el cual puede ser reabsorbido por el intestino, reiniciándose así el ciclo (**Figura 1.3.C**, parte derecha). En cada vuelta de este ciclo el organismo pierde algo de colesterol por las heces.

Ruta tejidos-higado.

Además del colesterol intestinal que llega al hígado a través de los QM, también llega el colesterol sintetizado en los tejidos periféricos, transportado por las **lipoproteínas de alta densidad (HDL, high density lipoproteins)**. Éstas, al igual que las demás lipoproteínas, son partículas esféricas que están constituidas por dos porciones (**Figura 1.3.E**): un núcleo interno (que contiene ésteres de colesterol y triglicéridos) y una capa externa formada por fosfolípidos, colesterol libre y apoproteínas (el término “apo” se refiere a la proteína en su forma libre) (Packard, 1982).



Figura 1.3.E.- Representación esquemática de una lipoproteína.

Las lipoproteínas del tipo HDL, originalmente pequeñas, se vuelven como globos al retirar el colesterol de las células, y así llegan al hígado donde hay un receptor específico para la fracción proteica (apoA) del HDL, convirtiéndose el colesterol en ácidos y sales biliares que se excretan con la bilis (parte izquierda de la **Figura 1.3.C**). Se ha demostrado que niveles altos de HDL se relacionan con la disminución de la incidencia de infarto cardiaco; por eso al colesterol transportado por estas lipoproteínas HDL se le reconoce popularmente como *colesterol bueno*. El tabaquismo, la obesidad, la vida sedentaria, y los andrógenos disminuyen su concentración en el suero

Ruta hígado-tejidos

Cuando la dieta contiene más ácidos grasos de los que son necesarios, éstos se convierten en triglicéridos en el **hígado** y se empaquetan con las apolipoproteínas específicas y el colesterol formando **lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL**, “very low-density lipoproteins”). El exceso de glúcidos en la dieta también se puede convertir en triglicéridos en el hígado, exportándose en forma de VLDL. Estas lipoproteínas circulan durante varios días en la sangre desde el hígado hacia los tejidos muscular y adiposo, donde, al igual que los quilomicrones, descargan parte de sus triglicéridos y proteínas, con participación de la enzima *lipoprotein-lipasa*, cargándose en colesterol y transformándose sucesivamente en **lipoproteínas IDL y LDL**; es decir, a medida que van perdiendo estos componentes su densidad va aumentando desde muy baja (VDL), pasando por una intermedia (IDL) y, finalmente, baja (LDL).

Las lipoproteínas **LDL**, que contienen una carga muy alta de colesterol, son las encargadas de transportar la mayor parte de éste en la sangre, casi las tres cuartas partes (Packard, 1982). Las LDL son captadas por cualquier órgano del organismo (incluyendo el hígado) mediante un mecanismo de endocitosis gracias a receptores específicos (rLDL) que se encuentran en la membrana celular (**Figura 1.3.C**). El 60-80% de estos receptores se encuentra en el hígado, dependiendo su número de la cantidad de colesterol intracelular. Esta vía está autorregulada, de forma que cuando la célula hepática tiene cubiertas sus necesidades de colesterol se suprime la síntesis de receptores de LDL. Por el contrario, ante una demanda de colesterol, la síntesis de receptores específicos para LDL se ve aumentada (Brown & Goldstein, 1978) (Gill, 1985).

De este modo el hígado actúa como una computadora: procesa los datos del colesterol recibido procedentes del intestino y de los tejidos periféricos y regula la cantidad de colesterol que debe producir a partir de su propia síntesis con el fin de conseguir un estado de equilibrio entre el colesterol recibido y el consumido en la fabricación de ácidos biliares, en su excreción (McNamara, y otros, 1987) (Jones, y otros, 1996), en la fabricación de membranas celulares, formación de lipoproteínas VLDL, síntesis de hormonas, vitaminas, etc. (Hopkins, 1992).



1.3.3 Aterosclerosis

Cuando hay un exceso de colesterol en nuestro organismo (por ejemplo, debido a alguna enfermedad genética que da lugar a un incremento de la biosíntesis de colesterol en el hígado), no todo el colesterol transportado por las lipoproteínas LDL puede ser captado por los tejidos extrahepáticos, acumulándose en la sangre y contribuyendo a la formación en el interior de las paredes de los vasos sanguíneos de **placas ateroscleróticas** (Stary, y otros, 1995) (Figura 1.3.F) constituidas, además de colesterol, por depósitos de lípidos, tejido fibroso, plaquetas, células inflamatorias y calcio, que aumentan el grosor de la pared de la arteria, perdiendo ésta su flexibilidad, y provocando ictus e infartos cardíacos al impedir la circulación sanguínea.

Las lesiones características de la aterosclerosis (ateromas) se inician con el aumento de la permeabilidad de la pared de la arteria a las LDL provocado por agresores como tabaco, hipertensión arterial, diabetes, ácidos grasos saturados o determinadas infecciones. Las lipoproteínas LDL se adhieren a la capa íntima de las arterias acompañadas de monocitos (glóbulos blancos), inflamándose la capa por la conversión de los monocitos en macrófagos. Si no hay muchas lipoproteínas LDL, los macrófagos las captan y las digieren, moderándose la reacción inflamatoria.

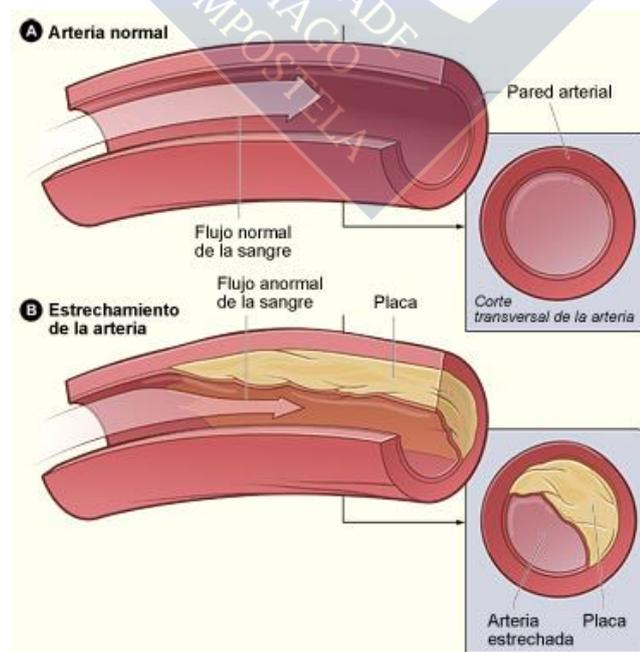


Figura 1.3.F.- Arteria normal y arteria con depósito de placa.

Sin embargo, si hay muchas lipoproteínas LDL en la sangre, las células de la pared arterial interpretan el depósito de colesterol en la misma como una invasión. Ante este hecho excitan al sistema inmune contra la inflamación enviando glóbulos blancos que penetran en el interior de la pared de la arteria, transformándose en macrófagos que fagocitan las partículas de LDL, convirtiéndose en *células espumosas*. Éstas acaban por estallar y formar una masa de macrófagos muertos, colesterol, triglicéridos y restos de lipoproteínas LDL, de color amarillento, que unido a la inflamación local de la íntima, reduce mucho la luz de la arteria, lo que técnicamente se conoce como *estenosis*. Esto, sumado a la aparición de colágeno en el punto de lesión, que atrapa la masa formada, es lo que acaba formando la placa de ateroma.

En la formación de la placa existen varios factores que explican por qué el exceso de colesterol en las lipoproteínas LDL se acumula en la sangre sin ser captado por los tejidos extrahepáticos. Tales factores son:

- 1) Falta de receptores para transportar el colesterol debido a que las lipoproteínas LDL no lo reconocen, acumulándose por este motivo en las placas (pacientes Receptor LDL negativo).
- 2) Existencia de receptores pero con una mutación en un aminoácido que impide la unión con las LDL.
- 3) Existencia de síntesis de receptores sin que se trasladen a la membrana.

Los factores de riesgo que inicialmente provocan desgarros en la luz de las arterias para originar más tarde las placas de ateroma son universalmente reconocidos como los siguientes (Grundyk, Pasternak, Greenland, Smith, & Fuster, 1999):

- Tabaco (Jacobs, y otros, 1999)
- Niveles elevados de colesterol y triglicéridos (Stamler, Wentworth, & Neaton, 1986)
- Hipertensión arterial (Stamler, Stamler, & Neaton, 1993)
- Obesidad
- Sedentarismo
- Dieta con alto porcentaje de grasas saturadas y grasas *trans*
- Antecedentes familiares próximos con aterosclerosis

Aunque habitualmente se afirma que la existencia sostenida de niveles elevados de colesterol LDL (popularmente conocido como *colesterol malo*) por encima de los valores recomendados incrementa el riesgo de sufrir episodios cardiovasculares, de acuerdo con el estudio iniciado en 1948 en la localidad de Framingham (USA) por un conjunto de investigadores sobre 5.209 hombres y mujeres, no se conoce con suficiente seguridad el mecanismo por el cual la reducción del colesterol LDL puede prevenir enfermedades cardiovasculares. Actualmente se sabe que no todas las partículas LDL son del mismo tamaño, sino que existen LDL grandes (de tipo A), que no presentan sensibilidad especial a desarrollar ateromas y LDL pequeñas (de tipo B), que son especialmente sensibles. Se argumenta que las LDL pequeñas pueden atravesar fácilmente los poros de las membranas de las células para llegar a la íntima de las arterias donde ocurre la oxidación de la LDL-colesterol por los radicales libres, cuestión involucrada en el desarrollo de la placa de ateroma. El hecho de que se reconozca la existencia de individuos poco sensibles al desarrollo de ateromas y otros hipersensibles, justifica la importancia de la genética en la evolución de la aterosclerosis.

Normalmente no hay síntomas de la enfermedad hasta que una o más arterias están tan obstruidas con placa aterosclerótica que reduce drásticamente el flujo de sangre. Esta reducción en el flujo de sangre y oxígeno a algunas partes del cuerpo (como el corazón), se denomina *isquemia* y puede ocasionar dolor o molestias. Algunas personas no tienen síntomas hasta que se forma un coágulo de sangre que obstruye por completo una arteria ya estrechada, y causa un ataque cardíaco o derrame cerebral.

Los síntomas de la enfermedad dependen de cuáles son las arterias que se encuentran gravemente obstruidas y qué parte del cuerpo resulta afectada por la reducción en el flujo de sangre:

- Si resultan afectadas las arterias que transportan sangre al músculo del corazón, se trata de una *enfermedad de las arterias coronarias* (EAC). Puede existir un dolor en el pecho llamado *angina de pecho*, que se presenta cuando se esfuerza demasiado y desaparece cuando descansa. También podría existir un ataque cardíaco.

- Si resultan afectadas las arterias que transportan sangre al cerebro, se trata de una *enfermedad cerebrovascular*. Podrá tener lugar un *ataque isquémico* (AIT) o un derrame cerebral.
- Si resultan afectadas las arterias que transportan sangre a las piernas, se trata de una *enfermedad arterial periférica* (EAP). Al caminar se puede sentir un dolor denominado *claudicación intermitente* en los músculos de la pantorrilla o muslo. Este dolor desaparece cuando se detiene y descansa.



1.4 MONOCAPAS DE LANGMUIR

Una monocapa es, según Langmuir, una extensión de moléculas de naturaleza anfifílica en la interfase aire/agua, de grosor unimolecular.

En las últimas décadas, se le ha prestado mucha atención a las monocapas de Langmuir debido a su potencial uso en una variedad de aplicaciones industriales, así como a la diferente percepción que ofrecen de varios problemas biológicos. No obstante, tienen un interés físico intrínseco como modelo de sistemas bidimensional (Knobler, 1990; McConnell H. M., 1991).

- Aplicaciones biológicas:

El mayor interés biológico de las monocapas es debido a su similitud con las bicapas lipídicas que constituyen las membranas celulares (J. P. Slotte, 1993; R. Grimard, 1993; S. W. Hui, 1993). Una membrana celular está constituida por una bicapa lipídica con proteínas incrustadas y forma una vesícula cerrada con agua en el interior y el exterior. La bicapa puede verse como dos monocapas interaccionando de forma débil. Los estudios han mostrado que estas bicapas lipídicas experimentan muchas de las fases de transición que se observan en las monocapas de Langmuir.

A parte de su uso como modelos de membranas celulares, algunos sistemas de monocapas tienen relevancia biológica directa (Rana, Mautone, & Dluhy, 1993; K. Nag, 1993). Destaca entre ellos el surfactante pulmonar, una sustancia que reduce la tensión superficial en los pulmones por un factor de al menos 50. Esta reducción de tensión superficial facilita la expansión y compresión del alvéolo pulmonar con cada soplo respiratorio. Debido a que los niños prematuros suelen tener falta de surfactante pulmonar, muchas investigaciones han tratado de estudiar sus propiedades e intentado aislar sus componentes activos para un uso terapéutico.

- Aplicaciones industriales

El interés tecnológico en las monocapas deriva del elevado número de aplicaciones que presentan los films orgánicos monomoleculares (J. D. Swalen, 1986). Estas aplicaciones incluyen: films ópticos, sensores y transductores, capas protectoras, materiales modelables como fotoresistencias, preparación superficial y modificación (humectación, adhesión) [patternable materials such as photoresists, Surface preparation and modification (wetting, adhesion)] y electrodos modificados químicamente. Muchas de estas aplicaciones incluyen los films multicapa (Langmuir-Blodgett), constituidos por la deposición sucesiva de varias monocapas de Langmuir. El orden y la estructura molecular son parámetros importantes que afectan a la utilidad de estos films. El conocimiento de la inclinación del ordenamiento molecular en las monocapas es de gran importancia para mejorar la tecnología de films monomoleculares.

El estudio de las monocapas formadas por ácidos grasos y colesterol permite determinar las interacciones entre ambos tipos de compuestos, proporcionando información que puede ser extrapolable a las interacciones que acontecerían entre estos lípidos en la bicapa lipídica. Con este modelo se puede controlar de forma sencilla la ordenación molecular, modificando su área y la presión superficial de la monocapa, suponiendo esto una gran ventaja sobre los liposomas y los modelos de bicapas planas. Variando estos valores se pueden obtener datos que proporcionan información fundamental acerca de las interacciones ácido graso-ácido graso, ácido graso-subfase, o ácido graso-colesterol.

1.4.1 Técnica de monocapas

Cuando se deposita una gota de un líquido insoluble sobre la superficie del agua mediante disolventes orgánicos volátiles, puede comportarse de tres formas diferentes:

- Permanecer como una lente sin que exista extensión, en forma de gota.
- Extenderse formando lo que se denomina un film “dúplex”, es decir una película delgada con un espesor tal que las dos interfases, película-aire y agua-película, sean independientes.
- Extenderse en forma de monocapa, dejando el exceso de líquido en forma de gotas en equilibrio con la monocapa.

La gran mayoría de las sustancias orgánicas no volátiles e insolubles en disolventes acuosos son capaces de extenderse sobre la superficie del agua formando una monocapa.

Considerando un elemento Δl del contorno de la gota, ese elemento se encuentra sometido a tres fuerzas (**Ilustración 1.4.A**):

- una fuerza $\gamma_A \Delta l$ debida a la tensión superficial del líquido A en contacto con el aire;
- otra fuerza $\gamma_B \Delta l$ debida a la tensión superficial del líquido B en contacto con el aire;
- y finalmente, una tercera fuerza $\gamma_{AB} \Delta l$ debida a la tensión interfacial de ambos líquidos.

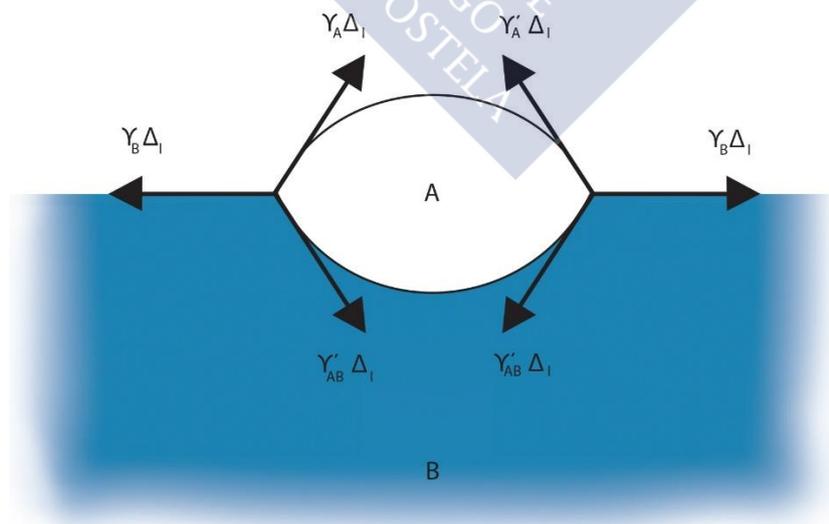


Ilustración 1.4.A- Fuerzas a las que se encuentra sometido un líquido A cuando se extiende sobre un líquido B.

Los vectores que definen estas fuerzas son tangenciales a las superficies líquidas correspondientes. La forma de la gota va a depender de la diferencia entre γ_B y la suma de $\gamma_A + \gamma_{AB}$. Si la resultante de $\gamma_A \Delta l$ y $\gamma_{AB} \Delta l$ es inferior a la fuerza $\gamma_B \Delta l$, la superficie de la gota del líquido A se extenderá por toda la superficie libre de B. Si sucede lo contrario, entonces la superficie del líquido A se contraerá adoptando la forma de la figura.

En el equilibrio se cumplirá:

$$\gamma_{AB} = \gamma_B - \gamma_A \quad (1.1)$$

Esta ecuación se conoce con el nombre de *relación de Antonoff*. Según lo indicado, la condición de extensión será:

$$\gamma_A + \gamma_{AB} < \gamma_B \quad (1.2)$$

lo que es lo mismo que

$$\gamma_B - (\gamma_A + \gamma_{AB}) > 0 \quad (1.3)$$

Esta diferencia se define como coeficiente de extensión inicial:

$$S = \gamma_B - (\gamma_A + \gamma_{AB}) \quad (1.4)$$

El coeficiente de extensión también se puede expresar en función del trabajo de adhesión y del de cohesión. El trabajo de adhesión entre dos líquidos inmiscibles A y B se define como el trabajo necesario para separar 1 cm² de la interfase líquido-líquido y formar dos interfases líquido-aire separadas.

Como el trabajo superficial viene dado por $\gamma \cdot \Delta S$ y ΔS vale 1 cm², el trabajo de adhesión (W_A) se puede expresar de la forma:

$$W_A = \gamma_A + \gamma_B - \gamma_{AB} \quad (1.5)$$

Esta expresión se conoce como *ecuación de Dupré*.

El trabajo de cohesión (W_c) de un líquido es el trabajo necesario para separar en dos partes una columna líquida de 1 cm² de sección:

$$W_C = 2 \cdot \gamma_A \quad (1.6)$$

A la diferencia entre estos dos trabajos se le denomina coeficiente de extensión:

$$S = W_A - W_C = (\gamma_A + \gamma_B - \gamma_{AB}) - 2 \cdot \gamma_A \quad (1.7)$$

o también

$$S = \gamma_B - (\gamma_A + \gamma_{AB}) \quad (1.8)$$

Los trabajos de adhesión y de cohesión de los líquidos están estrechamente relacionados con las energías superficiales de los mismos. Se producirá extensión cuando la tensión superficial del líquido soporte B sea elevada y la correspondiente al líquido a extender A sea baja. La monocapa que así se ha formado será estable si existe un equilibrio adecuado entre los grupos hidrófobo e hidrófilo en las moléculas que la forman, de manera que las características de uno sean suficientes para contrarrestar la atracción que experimenta el otro hacia el soporte acuoso, respectivamente.

Sustancia líquida	Tensión superficial γ (mN/m)
Mercurio	485
Agua	72,75
Ácido oleico	32,5
Benceno	28,85
Tolueno	28,5
Cloroformo	27,13
Acetona	23,7
Alcohol etílico	22,75
Metanol	22,61
n-Hexano	18,43

Tabla 1.4.A.- Tensión superficial de varios líquidos a temperatura de 20°C.

1.4.2 Presión superficial

Las monocapas presentan una tendencia a ocupar la mayor superficie disponible y, como consecuencia, ejercen un empuje sobre cualquier obstáculo que se oponga a su extensión. En un principio se atribuyó este fenómeno a un origen análogo al que da lugar a la presión de un gas, considerándolo como una consecuencia de la agitación térmica de las moléculas que forman la película, las cuales, al chocar con una barrera que se oponga a un desplazamiento, provocan un empuje bidimensional. Al valor de la fuerza que actúa por unidad de longitud se le denominó *presión superficial*.

La descripción de una monocapa de extensión o de Langmuir, se hace en función de su curva presión superficial-área, es decir, de la relación entre la presión superficial observada y el área ocupada por las moléculas del film sobre la superficie del sustrato acuoso. Para obtener estas representaciones, se necesita, obviamente, realizar la medida de la presión superficial simultáneamente a la del área ocupada por la monocapa a medida que se comprime la misma.

En la presente memoria se ha utilizado la lámina de Wilhelmy como método para determinar la presión superficial. En dicho método, se mide la fuerza hacia abajo que sobre una lámina ejerce la superficie o interfase a la cual se desea determinar la tensión cuando ésta toca exactamente dicha superficie. La lámina está unida a un sensor de presión que, a su vez, está acoplado a una cubeta equipada con una barrera, denominada “balanza superficial” (**Ilustración 1.4.B**).



Ilustración 1.4.B.- Ejemplo de balanza superficial de Langmuir.

1.4.3 Estabilidad de las monocapas

En los sistemas formados por monocapas que no estén firmemente empaquetadas, la barrera de energía que impide que se produzca el fenómeno de disolución es pequeña y la velocidad de destrucción de la monocapa viene determinada fundamentalmente por la difusión de las moléculas hacia el sustrato soporte. La estabilidad de una monocapa se ve condicionada por varios factores, entre los cuales destacan, por su importancia, la presión superficial y la temperatura.

Un aumento de la presión superficial suele provocar un incremento en la inestabilidad de la monocapa si el mecanismo de respuesta de la misma es la difusión de moléculas o el colapso. Se conoce como la presión de colapso el valor máximo de presión a la que se puede comprimir una monocapa sin que se produzca una expulsión manifiesta de moléculas que la componen (Lipp, Lee, Zasadzinski, & Waring, 1966). Al sobrepasarse esta presión, la monocapa se destruye y tiene lugar la formación de núcleos y multicapas.

En la **Figura 1.4.A** se muestra una caracterización del colapso de una monocapa mixta de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-fosfatidilglicerol (POPG). En este caso, al comprimir la monocapa cerca del colapso, se forman pequeñas ondulaciones (a) que terminan doblándose (b). Estas dobleces aumentan su tamaño (c y d) dando lugar finalmente a una bicapa (e y f) (Baoukina, Monticelli, Risselada, Marrink, & Tieleman, 2008).

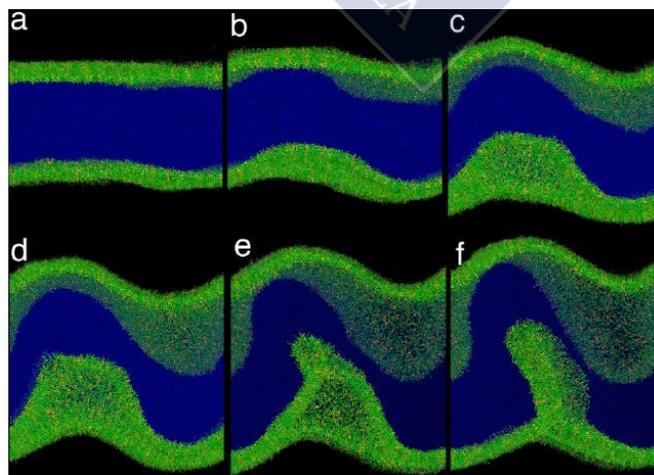


Figura 1.4.A.- Monocapa mixta de DPPC (verde) y POPG (amarillo) de proporción 4:1 sobre agua.

La temperatura es otro factor que también afecta a la estabilidad. Así bien, es de esperar que la velocidad de pérdida de material desde la monocapa se vea aumentada con el incremento de la temperatura debido al descenso de las fuerzas de atracción entre las moléculas de la monocapa y entre éstas y las de la subfase, incluyendo las de enlace de hidrógeno. No obstante, en algunos casos se ha observado el efecto contrario de la temperatura (Binks, 1991).

Por último, cabe mencionar que existen otros factores que influyen en el fenómeno de disolución de las moléculas que constituyen la monocapa: la relación de pK y pH (fundamental en monocapas ionizadas), la masa o el balance hidrofílico-lipofílico.



1.4.4 Estados físicos de las monocapas

Como se ha visto, uno de los indicadores más importantes de las propiedades del material que forman las monocapas viene dado por el registro de la presión superficial en función del área ocupada por cada molécula. Cuando estas medidas se realizan a una temperatura constante, las representaciones obtenidas reciben el nombre de isothermas presión-área (π -A).

Las representaciones obtenidas de esta forma son del estilo de la que se presenta en la **Figura 1.4.B** a partir de la cual se describen los distintos “estados” que puede alcanzar una monocapa.

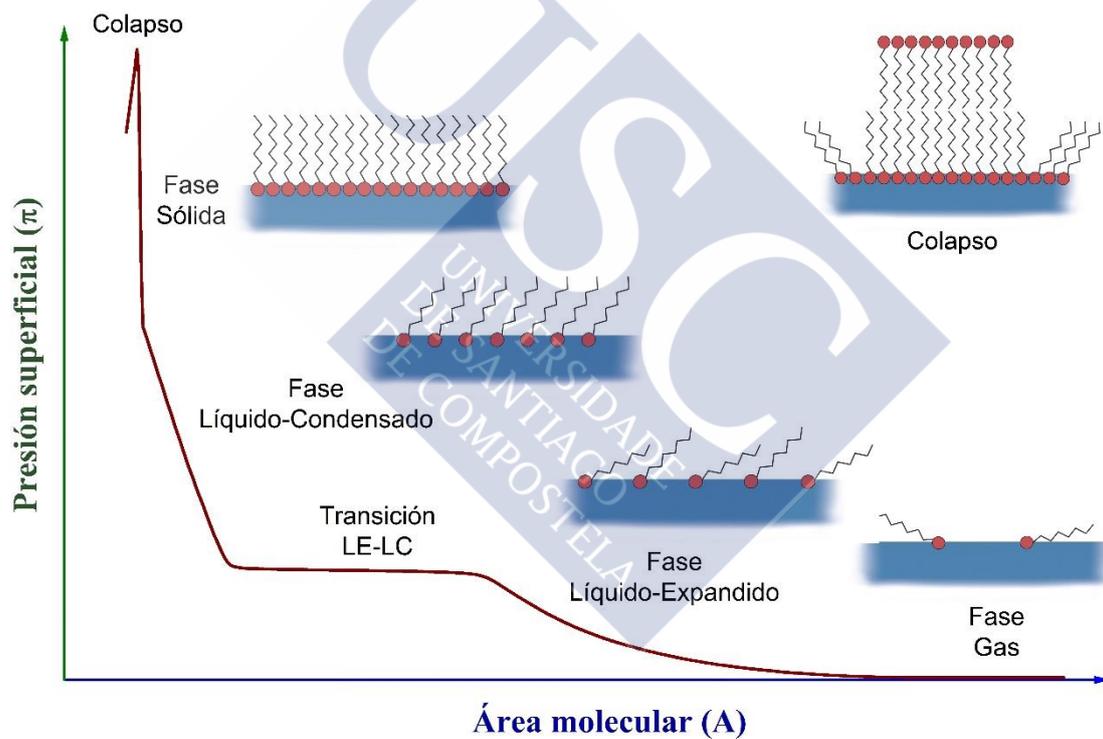


Figura 1.4.B.- Distintos estados por los que puede atravesar una monocapa de una sustancia anfifílica extendida en la interfase aire-agua al ser comprimida según la técnica de Langmuir. Conformación de las moléculas para cada estado.

Inicialmente, las moléculas se encuentran flotando en la superficie del sustrato acuoso, sin ejercer ninguna o muy poca fuerza entre ellas. En esta zona de la isoterma la presión se aproxima a cero y diremos que la monocapa se encuentra en estado “gaseoso” (G), por analogía con los estados de la materia.

A medida que disminuye el área, las moléculas se aproximan más unas a otras y no sólo eso, sino que tienden a adquirir todas la misma orientación, esta región de la isoterma recibe el nombre de “líquido expandido” (LE). Para algún tipo de sustancias, como es el caso de la AmB, la monocapa presenta un estado de transición (LE-LC) en el que la presión se mantiene constante a pesar de la disminución del área. En esta zona, no hay aumento de presión porque lo único que ocurre es que la parte hidrofóbica de la molécula se está levantando en la interfase aire-agua.

Una vez superada esta meseta, la monocapa adquiere un estado de “líquido condensado” (LC), en el que todas las moléculas están orientadas de la misma forma y se produce un aumento brusco de la presión. A continuación, se alcanza un estado de “sólido” (S), en el que las moléculas alcanzan el mayor grado de empaquetamiento y se hallan orientadas perpendicularmente a la superficie del agua. Por último, se llega al colapso, cuando la monocapa se rompe y unas moléculas se superponen sobre otras.

Con el objetivo de establecer los estados físicos que atraviesa una monocapa se determina el módulo de compresibilidad (**Davies & Rideal, 1963**), parámetro calculado a partir de las isothermas π -A que, además, nos permitirá conocer la rigidez o elasticidad de la capa monomolecular, así como la posible presencia de estados de transición, que a veces no son fácilmente observables en las isothermas.

El módulo de compresibilidad, C_s^{-1} , se calcula de acuerdo con la ecuación:

$$C_s^{-1} = -A(d\pi/dA) \quad (1.9)$$

donde A es el área ocupada por la monocapa según la presión π alcanzada. El módulo de compresibilidad es cero en agua y se incrementa al aumentar la cantidad de material superficialmente activo. Cuanto mayor sea el valor obtenido para este parámetro, menos elástica será la monocapa analizada y, por lo tanto, más condensada. Por otro

lado, la presencia de un mínimo en las representaciones del módulo de compresibilidad frente a la presión superficial, es señal de un estado de transición de la monocapa a una presión determinada.

De esta forma, en función del valor de C_s^{-1} se puede determinar el estado físico de la monocapa (**Tabla 1.4.B**).

ESTADO	C_s^{-1} (mN/m)
Gas (G)	0 – 12
Líquido expandido (LE)	12 – 50
Líquido condensado (LC)	100 – 250
Sólido (S)	1000 – 2000

Tabla 1.4.B.- Valores del módulo de compresibilidad para los distintos estados de una monocapa.

1.4.4.1 Monocapas en estado gaseoso

El estado gaseoso es el más simple conceptualmente, al igual que en el caso de la materia en tres dimensiones. En este estado físico, las moléculas se encuentran flotando sobre el sustrato acuoso, encontrándose lo suficientemente separadas como para no ejercer muy poca o ninguna fuerza entre ellas. Tales monocapas se caracterizan por tener una presión superficial que, de manera asintótica, se aproxima a cero a medida que aumenta el área disponible por el film, además de poseer un potencial de superficie constante y una densidad superficial muy baja. En un principio, cualquier sustancia que forme una monocapa puede existir en estado gaseoso si las moléculas están lo suficientemente separadas.

La interpretación del comportamiento π -A de estas monocapas es análogo al análisis cinético correspondiente a la teoría de los gases ideales en tres dimensiones, sin tener en cuenta la subfase líquida. Esta aproximación asume simplemente que las moléculas se mueven con una energía cinética de traslación de $\frac{1}{2} \cdot K \cdot T$ por cada grado de libertad. Las dos dimensiones en el plano de la superficie conducen a una energía cinética total de $K \cdot T$, la cual es la que produce la presión superficial, lo que conduce a una ecuación de gas ideal bidimensional:

$$\pi \cdot A = K \cdot T \quad (1.10)$$

A 25 °C, el valor de $K \cdot T$ es de 411,7 mN/m · Å²/molécula y, entonces, a una presión superficial de 1 mN/m, el área ocupada por una molécula es de, aproximadamente, 400 Å²/molécula; si la presión es de 0,5 mN/m, le corresponde un área de 800 Å²/molécula. Puesto que es una ecuación límite, como su análoga en tres dimensiones, la conformidad con la misma solo se alcanza a muy grandes áreas y bajas presiones.

El hecho de que la **Ecuación 1.10** sea una ecuación límite puede observarse experimentalmente al representar gráficamente π -A frente a la presión, o frente al área: la linealidad se observa a bajos valores de π y se desvía cuando la monocapa es comprimida. La causa de esta desviación parece residir en el tamaño de las moléculas que forman la monocapa, de manera que al encontrarse éstas tendidas en la superficie ocupan un área del orden de 100-200 Å², por lo que la suposición de que la superficie está esencialmente “vacía” se invalida cuando el área de la monocapa se reduce por debajo de varios miles de Å²/molécula. Con el fin de corregir este defecto se ha introducido un término de co-superficie en la ecuación **Ecuación 1.10**:

$$\pi \cdot (A - A_0) = K \cdot T \quad (1.11)$$

en la cual A_0 es, bien un parámetro ajustable, o se asocia con el área molecular observada en films condensados. Aun cuando esta ecuación se aplica con éxito a las monocapas obtenidas en la interfase agua/aceite, es insostenible en el caso de monocapas en la interfase aire/agua. En la práctica se encuentran desviaciones negativas en el caso de monocapas neutras eléctricamente, lo que requeriría que $\pi \cdot A$ fuese mayor que $K \cdot T$. Tal evidencia de la no idealidad se ha atribuido a la existencia de fuerzas atractivas entre las moléculas del film, por analogía con las de van der Waals en el tratamiento de gases.

Se han propuesto varias expresiones para corregir estas desviaciones, como es el caso de la ecuación:

$$\pi \cdot (A - A_0) = q \cdot K \cdot T \quad (1.12)$$

en donde q es menor que 1 (habitualmente 0,7). En la interfase aire/agua esta atracción intermolecular estaría reducida o sería despreciable.

Se ha indicado que las moléculas en monocapas gaseosas están acostadas (**Figura 1.4.B**). Existe la evidencia experimental de este hecho al comparar el comportamiento de monocapas compuestas de moléculas con grupos polares distribuidos en diferentes partes de las mismas. Por ejemplo, los ésteres dibásicos, con un grupo polar a cada lado de la cadena, tienden a formar films gaseosos, mientras que la simple sustitución de un grupo polar por otro apolar origina una monocapa condensada. De forma similar, esteroides con un solo grupo ceto o hidroxílico forman monocapas condensadas, mientras que monocapas de esteroides con grupos polares distribuidos a lo largo de la molécula tienden a ser gaseosas. No obstante, estos resultados no pueden considerarse como concluyentes, debido a las dificultades experimentales que se han mencionado para su comprobación. Sin embargo, Langmuir señaló que las macromoléculas aisladas sobre la superficie del agua permanecen acostadas (Langmuir, 1917), lo que corresponde a la posición de mínima energía. Esta conclusión ha sido criticada más décadas después, y se ha sugerido que, en vez de ello, las moléculas se proyectan hacia fuera de la superficie en un estado enrollado al azar (Aranov & Witten, 1958). Debido al movimiento térmico, es probable que esto sea cierto durante la mayor parte del tiempo, para un determinado tipo de moléculas. En cualquier caso, el peso de la evidencia sugiere que la configuración media en una monocapa gaseosa está más próxima a la de la extensión horizontal que a la vertical.

1.4.4.2 Monocapas expandidas

Las monocapas expandidas, denominadas "*líquido*" (Dervichian D. G., 1939) y "*líquido expandido*" (Harkins, 1952) (Adam N. K., *The Physics and Chemistry of Surfaces*, 1956), presentan un área molecular intermedia entre la correspondiente a las monocapas gaseosas y las condensadas. Las isothermas π -A de estas monocapas

muestran una curvatura considerable, aunque se aproximan al eje de abscisas con un ángulo claramente agudo, en lugar de la forma asintótica observada en el caso de las monocapas gaseosas. Las monocapas son coherentes aún a presiones superficiales bajas, manifestando con ello poca tendencia a que las moléculas de la monocapa se encuentren muy separadas. El área molecular es de dos a tres veces superior a la de la sección transversal de la molécula; así, por ejemplo, sustancias grasas de cadena sencilla, que originan monocapas expandidas, poseen un área extrapolada de 45 a 55 Å²/molécula.

El potencial de supercie (ΔV) no fluctúa, lo que pone de manifiesto que estas monocapas son homogéneas, aumentando ΔV a medida que el área molecular se reduce, de modo que el momento dipolar es insensible a la compresión. Lo mismo ocurre con el registro de espesores, que aumentan paulatinamente sin la presencia de notables oscilaciones. La **Figura 1.4.C** muestra variaciones de presión y espesor para una monocapa de este tipo.

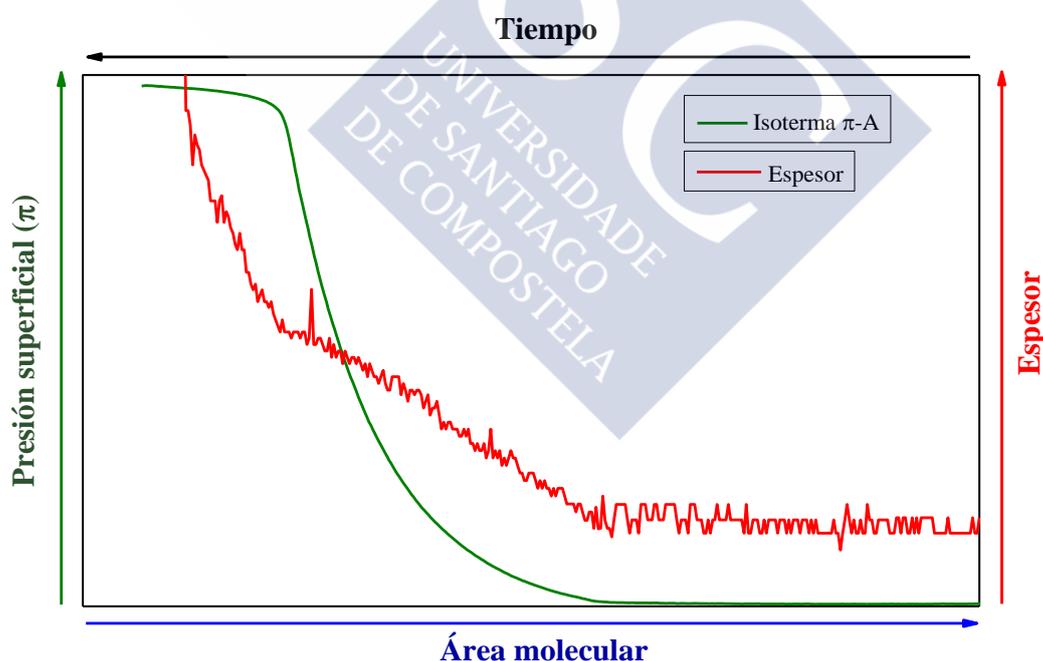


Figura 1.4.C.- Ejemplo de isoterma π -A y espesor-A de una monocapa expandida.

Como hemos visto, cuando la monocapa se encuentra en estado gaseoso, las moléculas reposan horizontalmente y están ampliamente separadas y, como veremos, la monocapa en estado condensado presenta las moléculas con una configuración bien alineada y empaquetada. En monocapas expandidas, la configuración es en cierto modo intermedia entre estos extremos, aunque existe cierta controversia sobre ello. Langmuir introduce el concepto, generalmente aceptado, de que una monocapa expandida puede considerarse como una fase líquida muy fina: las partes hidrocarbonadas en una monocapa expandida adoptan una orientación al azar, más que regular, y sólo los grupos polares se encuentran obligados a estar en contacto con la subfase (**Figura 1.4.B**).

Idealmente, una disposición al azar de las cadenas hidrofóbicas, flexibles como en el líquido, concuerda de modo cualitativo con el comportamiento de las monocapas expandidas. La compresibilidad y la viscosidad de estas monocapas son las esperadas para estas estructuras. Las áreas moleculares que se han encontrado son completamente razonables, puesto que es obvio que una monocapa de estas características no puede expandirse indefinidamente sin desaparición de la capa que en fase volumen se comporta como un líquido, mientras que si las moléculas son forzadas a unirse demasiado, las cadenas tienen que asumir una configuración ordenada más regular.

Langmuir propuso la primera ecuación de estado para la interpretación cuantitativa de las curvas π - A de monocapas expandidas, dando por supuesto que la superficie superior de la monocapa se comporta como un hidrocarburo líquido en fase volumen, existiendo una tensión superficial como la de un líquido. También supuso que la contribución de los grupos polares a la presión superficial podía representarse por una ecuación de gas ideal corregida:

$$\pi_{12} \cdot (A - A_0) = K \cdot T \quad (1.13)$$

si sustituimos,

$$\pi - \pi_0 \cdot (A - A_0) = K \cdot T \quad (1.14)$$

π_0 (que presenta valor negativo) corresponde al coeficiente de extensión de la parte hidrocarbonada de las moléculas de la monocapa, es decir,

$$\pi_0 = \gamma_{agua} - \gamma_{aceite} - \left(\gamma_{aceite} / \gamma_{agua} \right) \quad (1.15)$$

en donde γ son las correspondientes tensiones superficiales e interfaciales. A_0 es la corrección del área debido al tamaño finito de los grupos polares.

1.4.4.3 Monocapas condensadas

En las monocapas condensadas las moléculas están dispuestas en su mayor empaquetamiento posible, justo lo contrario que sucedía con las monocapas gaseosas, en el que las moléculas se situaban alejadas entre sí.

Estas monocapas se pueden considerar como un cristal bidimensional en el que las moléculas se disponen casi verticalmente con los grupos polares terminales en el agua y sus cadenas apolares densamente empaquetadas dirigidas hacia el aire (**Figura 1.4.B**). Las isothermas π -A son casi rectas y verticales, lo que indica una baja compresibilidad de la monocapa. Esto refleja la fuerte presencia de interacciones entre las cadenas como consecuencia de la disposición de las cadenas en su estado empaquetado.

Las isothermas π -A correspondientes a monocapas condensadas de series de compuestos de larga cadena muestran pequeñas variaciones con la longitud de la misma, de forma que el área ocupada por una molécula es sustancialmente independiente del número de átomos de carbono de la cadena saturada. Para una cadena larga sencilla esta área de alrededor de 20 \AA^2 , casi la misma que el área de la sección transversal en el cristal, determinada por medidas de rayos X.

Estudios de difracción de electrones realizados sobre monocapas transferidas a sólidos muestran que las cadenas están orientadas casi verticalmente a la superficie, mientras que las medidas ópticas demuestran que el espesor de estas monocapas es el esperado para cadenas completamente extendidas.

Es realmente importante reconocer el hecho de que la existencia de monocapas insolubles depende de un delicado balance entre fuerzas intermoleculares atractivas y repulsivas. En el caso de monocapas condensadas, las fuerzas atractivas entre las cadenas son de gran importancia. Para el ácido esteárico a un área de $20 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, Salem calculó que las fuerzas de van der Waals, entre las cadenas saturadas, valen más de 8 kcal/mol (Salem, 1962). Sin embargo, estas fuerzas cambian rápidamente con la distancia intermolecular e incluso una separación modesta de las moléculas las reduce considerablemente. Sólo aquellas moléculas que contactan íntimamente pueden exhibir tan grandes interacciones entre las cadenas, formando monocapas condensadas a presiones superficiales bajas. La introducción de un grupo sustituyente, o por ejemplo, de un doble enlace puede alterar el empaquetamiento, cambiando las propiedades de la monocapa.

Las monocapas condensadas, caracterizadas por presentar las moléculas empaquetadas y bien orientadas en la interfase, no son tan simples como a priori se podría esperar, ya que existen múltiples variaciones, si bien pequeñas, en el comportamiento de diferentes monocapas particulares. Estas diferencias han conducido a que varios autores postulasen estados superficiales o fases diferentes dentro del grupo de la categoría general de monocapas condensadas: “*líquido condensado*”, “*superlíquido*” y “*sólido*” (Harkins, 1952); “*empaquetados por las cabezas*” y “*empaquetados por las cadenas*” (Adam N. K., *The Physics and Chemistry of Surfaces*, 1956); y, por último, “*mesomorfo*” y “*sólido*” (Dervichian D. G., 1939).

Algunos de estos estados están bien caracterizados experimentalmente, mientras que otros han sido sugeridos sobre la base de una evidencia experimental limitada. No existe un acuerdo general acerca de su relación con los diferentes empaquetamientos u orientaciones moleculares.

La primera clasificación de monocapas condensadas (Adam N. K., *The Physics and Chemistry of Surfaces*, 1956) se basa en que los diagramas π -A de los films condensados de ácidos grasos, alcoholes y sustancias similares de larga cadena, ofrecen con frecuencia dos segmentos lineales con una clara discontinuidad de pendiente entre ellos. En la región de altas presiones superficiales, la curva es muy empinada, y el área

por molécula se aproxima a la verdadera sección transversal molecular. Adam describe a las monocapas en esta región como si tuvieran “cadenas empaquetadas”.

La forma de las isoterms π -A correspondientes a la zona de bajas presiones superficiales, en donde la monocapa es considerablemente más compresible, varía según los tipos de compuestos. Para alcoholes grasos, por ejemplo, la extrapolación de esta parte a presión cero origina un área de $22 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ y la transición en la compresibilidad tiene lugar a una presión de 10-15 mN/m. En el caso de ácidos grasos saturados, el área extrapolada es casi de $25 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ y la parte supina de la curva se manifiesta a una presión mucho mayor. Adam concluye que esta mayor área corresponde a la ocupada por los grupos polares en la superficie, a bajas presiones. A medida que estas monocapas se comprimen, la orientación de los grupos polares cambia, de forma que permite un empaquetamiento mayor de las cadenas hidrocarbonadas.

Este concepto ha sido modificado por varios investigadores (Schulman & Hughes, 1932) (Langmuir, 1933); sugieren que es la hidratación de los grupos polares quien conduce al incremento del área, siendo la “expulsión” de las moléculas de agua, por incremento de la presión superficial, la responsable de la reducción del área al valor observado en las películas comprimidas.

Alexander concluye que las monocapas con áreas moleculares de 19 a 21 \AA^2 constan de cadenas empaquetadas orientadas verticalmente, mientras que las distintas ramas de las curvas π -A en la región de bajas presiones superficiales pueden interpretarse como consecuencia de varios factores (Alexander, 1982). En concreto, resalta la posible importancia de los enlaces de hidrógeno entre los grupos polares funcionales, aparte de los formados con las moléculas de agua. También pone de manifiesto que para ciertos compuestos la orientación más favorable de los grupos polares puede conducir a una orientación no vertical de las cadenas.

Dervichian (1939) y Harkins (1952) propusieron un esquema basado en la idea de que los cambios en propiedades tales como compresibilidad o viscosidad se relacionan con un cambio claramente definido en la monocapa. Llegan a la conjetura de

que los cambios de fase asociados con las discontinuidades de las monocapas pueden relacionarse con las observadas en tres dimensiones.

Así, la fase correspondiente a los films altamente incompresibles, es decir, a los más densamente empaquetados, es denominada “fase sólida” por estos autores. La fase condensada correspondiente a la región de presión superficial más baja se denomina “líquido condensado” en el esquema de Harkins, y “mesomorfa” en la de Dervichian.

1.4.4.4 Transición entre los estados de las monocapas

Por lo general, las monocapas de moléculas simples exhiben más de un estado físico. En la **Figura 1.4.D** se muestra la isoterma π -A correspondiente a la anfotericina B (Seoane, y otros, 1997); en ella se pueden observar con claridad los diferentes estados vistos hasta el momento: *gas*, *líquido expandido*, *líquido condensado* y *sólido* (la pseudomeseta corresponde a una transición entre líquido expandido y líquido condensado).

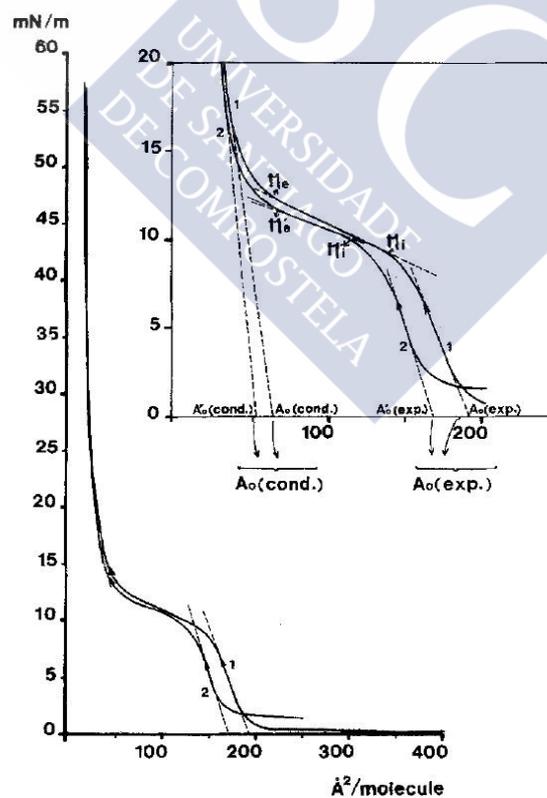


Figura 1.4.D.- Isotherma π -A de la anfotericina B para un depósito de $1,69 \cdot 10^{16}$ (1) y $2,3 \cdot 10^{16}$ (2) moléculas (Seoane, y otros, 1997).

Al estudiar la influencia de la temperatura sobre estas isothermas, se pone de manifiesto un cambio regular de la estabilidad de los diferentes estados gaseosos, expandido y condensado, de modo que a temperaturas bajas es más estable el estado condensado, mientras que a elevadas predomina el estado expandido. En series homólogas de compuestos de larga cadena se producen cambios similares en función de la longitud de la cadena. La reducción de la temperatura o el aumento de la longitud de las cadenas, incrementa la efectividad de tales interacciones, tendiendo a hacer la monocapa más coherente y ordenada.



1.4.4.4.1 Transición de monocapas gaseosas

La transición de una monocapa gaseosa, que se presenta, generalmente, a bajas presiones superficiales, se caracteriza por una “*presión de vapor superficial*” constante a lo largo de un gran intervalo de áreas. Esta presión es la presión superficial correspondiente al equilibrio entre la monocapa gaseosa y la monocapa más coherente (expandida y condensada).

Desde un punto de vista molecular, el fenómeno queda reducido a lo siguiente: a medida que se comprime la monocapa, llega un momento en el que las fuerzas atractivas intermoleculares llegan a ser tan grandes que las moléculas que forman la monocapa se reúnen para formar una monocapa coherente. Este momento corresponde a una licuación bidimensional, de estado gas a líquido (sustancia A en la **Figura 1.4.E**), o condensación, de estado gas a sólido (sustancia B), y la presión superficial de equilibrio es equivalente a la presión de vapor.

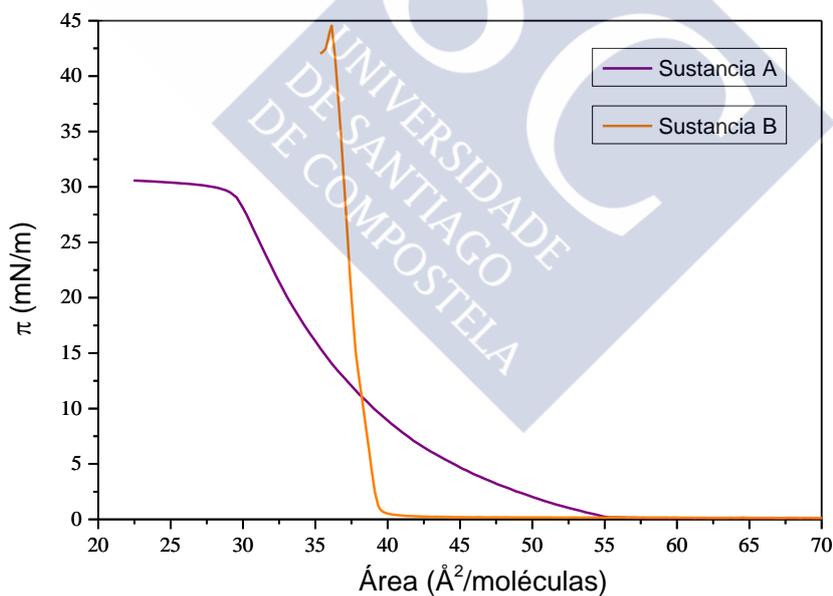


Figura 1.4.E.- Ejemplo de isoterma π -A con transición de estado gas a líquido (Sustancia A) y con transición de estado gas a sólido (Sustancia B).

La constancia de esta presión de vapor está asociada con una variación de entalpía. Dichos calores de vaporización bidimensionales han sido estimados mediante modificación de la ecuación de Clausius-Clapeyron (Adam N. , 1923).

1.4.4.4.2 Transición de líquido expandido a líquido condensado

Una segunda región de transición bien definida es la que existe entre los estados de líquido expandido y líquido condensado. Cuando una monocapa expandida se comprime, aparece bruscamente la transición, caracterizada por un repentino incremento de la compresibilidad; esto ocurre a un área aproximada de 30-40 Å²/molécula para la mayoría de los compuestos grasos de cadena recta. En este punto la curva π -A viene a ser casi paralela al eje del área, como si el área cambiase a presión casi constante.

A medida que el área se aproxima a la de la monocapa condensada, la curva adquiere rápidamente mayor pendiente, de modo que no existe ninguna discontinuidad notable de pendiente cuando se alcanza la región de condensada plena. Las monocapas en esta región de transición entre el estado expandido y el condensado son denominadas por Adam y Harkins como monocapas de “transición” o “intermedios”, mientras que Derviachian los denomina “mesomorfos expandidos”.

Para explicar el comportamiento de la monocapa en esta región de transición se han propuesto varias teorías. La más antigua de todas considera que el comienzo de la transición tiene lugar porque algunas de las moléculas de la monocapa en estado líquido expandido se organizan en grupos o micelas bidimensionales (Langmuir, 1933). Estas micelas pueden contener hasta 15 moléculas; sobre la base de un empaquetamiento hexagonal, la configuración más estable correspondería a 7 o 13 moléculas simples. A medida que la monocapa se comprime, el número de micelas incrementa hasta que esta se hace condensada. Langmuir considera que la presión superficial observada es la suma de las contribuciones de las moléculas individuales y de las micelas, y que las moléculas en las micelas ocupan el área característica de la monocapa condensada, mientras que el área de las moléculas simples es la que corresponde a la presión límite mayor de la

monocapa expandida. Estas suposiciones conducen a una presión superficial total, a cualquier área molecular A , dada por:

$$\pi = \pi_e + \frac{K \cdot T}{\beta \cdot A_e} \cdot \frac{A_e - A}{A - A_e} \quad (1.16)$$

en donde π_e y A_e son la presión superficial y el área molecular, respectivamente, al comienzo de la transición desde la región de líquido expandido; A_c es el área molecular de la monocapa condensada y β el número de moléculas de la micela. Langmuir aplicó esta ecuación a los datos de Adam para ácidos grasos y encontró valores razonables de β , que varían de 5 a 13 según la naturaleza de la molécula.

Diferentes autores han desarrollado otros tratamientos basados en la mecánica estadística de los sistemas condensados (Band, 1940), o en el hecho de que la disminución o impedimento de la rotación molecular (Kirkwood, 1943) puede conducir a la discontinuidad de la compresibilidad que aparece al comienzo de la transición. Aunque esta posibilidad parezca totalmente razonable, la teoría no ha sido aplicada a fin de interpretar cuantitativamente la manera en que se alcanza la disposición ordenada de la fase condensada.

La aplicación de la ecuación de Clausius-Clapeyron a la transición de fase que se está considerando, conduce a la expresión:

$$\frac{d\pi_c}{dT} = \frac{Q_c}{T(A_e - A_c)} \quad (1.17)$$

donde π_c es la presión a la que tiene lugar la condensación superficial y Q_c el calor latente de la condensación (es decir, el calor absorbido o emitido en el cambio de fase). Los términos A_e y A_c representan el área correspondiente a la fase expandida y a la condensada, respectivamente; A_e es el área a π_c y A_c se obtiene extrapolando la parte de la isoterma condensada a $\pi = \pi_c$.

Debido a que la transición de fase no ocurre a una presión superficial constante (existe una ligera pendiente en la isoterma π -A durante la transición), Q_c no puede igualarse al cambio de entalpía (ΔH), ya que hay que incluir el término:

$$\int_{A_e}^{A_c} \pi dA \quad (1.18)$$

En realidad, las medidas de presión superficial no proporcionan la suficiente información como para poder dilucidar acerca de las diferentes estructuras formadas durante las transiciones de fase. Una de las técnicas empleadas para diferenciar los diferentes estados de las monocapas es la microscopía de luz polarizada bajo el ángulo de Brewster, también conocida como microscopía de ángulo de Brewster (BAM) (Lheveder, Meunier, & Hénon, 2000).

Mediante esta técnica se puede visualizar directamente la morfología de la monocapa y, como consecuencia, determinar los cambios estructurales que se producen en la misma cuando es sometida a compresión.

Para la transición líquido condensado a líquido expandido, los valores del calor y de la variación de entropía son positivos para muchas sustancias, tales como ácidos grasos. Esto concuerda con la transición en sistemas tridimensionales y refleja un aumento de la energía potencial de las moléculas y el desorden.

Es a partir de 1983, cuando se pueden visualizar directamente a nivel microscópico las transiciones de fase. Ello es debido gracias a la utilización de la microscopía de fluorescencia técnica en la que una pequeña cantidad de colorante fluorescente se añade a la monocapa. Si la monocapa es heterogénea, es decir, si está formada por regiones de líquido condensado flotando en una fase continua de líquido expandido, el colorante se reparte entre las dos fases de acuerdo con su solubilidad, de modo que si es menos soluble en la fase más densa (líquido condensado), las regiones de esta fase se observarán oscuras sobre un fondo blanco, que corresponde a la fase de líquido expandido. En consecuencia, la microscopía de fluorescencia proporciona un camino muy útil para poder discriminar las diferentes fases LC, LE o G, así como para investigar la estructura de la monocapa en las regiones de coexistencia entre tales fases.

1.4.4.5 Relación del estado físico y el área molecular

La similitud entre las fases tridimensionales y los estados de la monocapa es una herramienta de gran utilidad pero, obviamente, no puede ser exacta debido al importante efecto de la interfase líquido-gas. Sin embargo, a pesar de esta restricción es innegable que existe una gran similitud en la progresión del orden molecular y en la importancia de las fuerzas intermoleculares en las fases gaseosa, líquida y sólida en tres dimensiones por una parte, y los estados gaseoso, expandido y condensado de las monocapas por otra.

En una monocapa gaseosa, las moléculas están lo suficientemente alejadas entre ellas, de forma que las interacciones intermoleculares exhibidas son despreciables y hay razones para suponer que tales moléculas están dispuestas de forma casi horizontal en la superficie del sustrato. También se ha indicado que la distribución de los grupos polares en una molécula compleja y grande puede decidir si la sustancia forma una monocapa coherente o gaseosa. Este hecho a veces puede ser útil para obtener información acerca de la estructura molecular en caso de que se forme una monocapa gaseosa.

Cuando la configuración estable es una monocapa expandida no existe ninguna relación directa entre el tamaño de las moléculas individuales y el área molecular. Sin embargo, a veces es posible obtener algunas conclusiones. Se acepta generalmente que el área molecular observada no puede ser menor que la proyección de la sección transversal molecular, y esto puede servir de regla para establecer ciertas configuraciones moleculares en la monocapa.

También existe una buena razón para pensar que las monocapas expandidas son obtenidas a partir de sustancias que contienen largas cadenas hidrocarbonadas, tipo *líquidas*, mientras que las monocapas condensadas se forman solo si el empaquetamiento puede permitir interacciones entre las cadenas. La comparación de monocapas de compuestos cuyas estructuras difieren solo ligeramente (como la presencia de un doble enlace o una cadena ramificada) puede ser instructiva, ya que la insaturación de las cadenas es muy específica, puesto que los dobles enlaces *cis* son más efectivos en evitar el empaquetamiento que los *trans*. En este sentido, ahora ya se sabe

casi con certeza que el efecto de la insaturación es sobre el empaquetamiento, y no está relacionado con ninguna atracción específica entre el doble enlace y el líquido de la subfase, aunque es verdad que en una monocapa expandida los grupos funcionales, tales como los dobles enlaces, son más accesibles a la subfase líquida.

En films condensados, en los que las moléculas están relativamente orientadas y empaquetadas, la información sobre el tamaño molecular y forma de las moléculas se obtiene a partir de las curvas π -A. Sin embargo, no existe un criterio uniforme para seleccionar los puntos más significativos de la curva π -A de una monocapa condensada, en relación con la selección molecular transversal.

Un método tradicional consiste en extrapolar la parte correspondiente a altas presiones, la de más pendiente, a $\pi=0$, y tomar el *área de presión cero* o *área límite*, $A_{0(\text{estado})}$, como característica de la monocapa. Si existe alguna curvatura en la curva π -A, tal extrapolación puede ser algo incierta. Langmuir y Schaefer critican el procedimiento sobre la base de que no existe ninguna razón teórica para que esta área sea considerada de particular significación (Langmuir & Schaefer, 1937). Indican que es mejor considerar el área a una presión superficial elevada arbitraria, tal como 15 o 30 mN/m.

Así mismo, también se utiliza el área a la cual la presión superficial comienza su ascenso, también conocida como *lift-off* o *área inicial* (A_0), para señalar de esta manera el punto en el que la monocapa abandona el estado gaseoso. En el caso de las monocapas más condensadas, dicho valor suele coincidir con $A_{0(\text{estado})}$.

Otros investigadores prefieren utilizar el área observada en las inflexiones o discontinuidades de las curvas π -A como, por ejemplo, el área de colapso (A_c) o el área de transición (A_t). Para ello se basan en que dichas variaciones reflejan transformaciones de fase de las monocapas asociadas con algún cambio en la estructura o comportamiento de la monocapa. Además, las transiciones son extremadamente agudas y reproducibles. En el caso del área de colapso de la monocapa, que se corresponde con el área mínima en la que las moléculas pueden agruparse, los efectos cinéticos conducirán a pequeñas variaciones del área molecular para cambios apreciables en la presión del colapso, puesto que los films condensados son menos compresibles cerca del colapso.

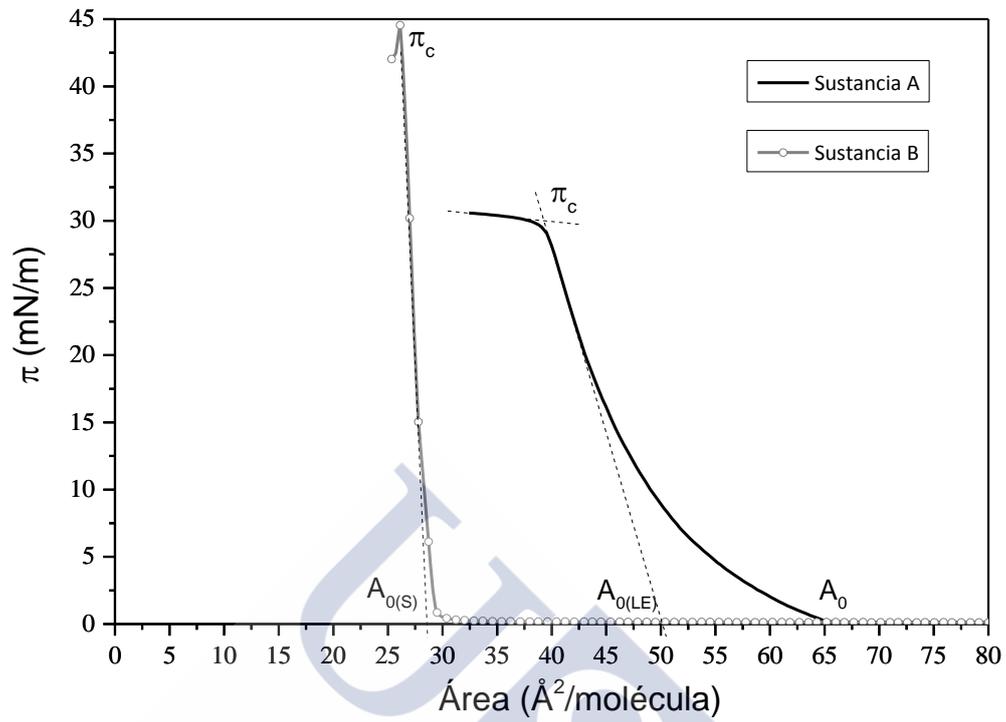


Figura 1.4.F.- Ejemplo de presión de colapso (π_c), área de presión cero ($A_{0(\text{Estado})}$) y área inicial (A_0) para una monocapa que atraviesa por un estado de líquido expandido (sustancia A) y otra por un estado sólido (sustancia B).

1.4.5 Monocapas mixtas, consideraciones teóricas

El estudio de monocapas mixtas presenta enorme importancia, ya que de él se puede obtener información acerca del empaquetamiento y de las interacciones que se pueden establecer entre las moléculas que constituyen la monocapa. Para determinar la naturaleza de las interacciones moleculares que se producen en estas monocapas mixtas, es necesario conocer el grado de miscibilidad de sus componentes en su estado bidimensional.

Cuando los componentes de una monocapa mixta son inmiscibles, la extensión de una mezcla de estos componentes originará “islotos” de un componente distribuidos en la monocapa del otro. Si los “islotos” son suficientemente grandes, será posible detectar su presencia por la aparición de fluctuaciones en el potencial de superficie, si bien lo más natural, es que se originen islotos pequeños conteniendo tan solo algunos cientos de miles de moléculas (imágenes del microscopio de ángulo de Brewster). La **Figura 1.4.G** (monocapas mixtas) muestra esquemáticamente las posibles distribuciones moleculares que pueden resultar de la extensión de una monocapa mixta.

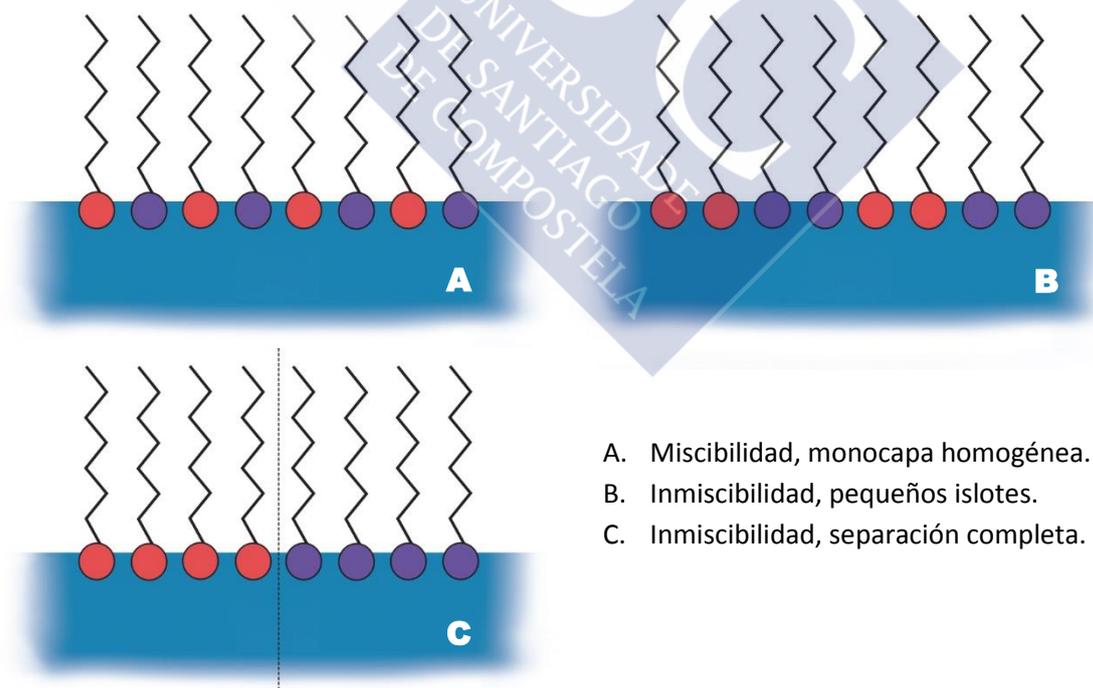


Figura 1.4.G.- Tipos de distribuciones moleculares entre dos componentes.

Las propiedades de una monocapa en la que sus componentes son inmiscibles, reflejarán las de los componentes por separado, de tal manera que una monocapa mixta puede considerarse como constituida por dos monocapas separadas en equilibrio entre sí, correspondientes cada una de ellas a cada uno de los componentes. El área ocupada por la película mixta será la suma de las áreas que obtendrían sus componentes por separado. La misma consideración se puede aplicar a cualquier otra propiedad de la monocapa mixta.

En las monocapas mixtas se cumplirá entonces que a una determinada presión π :

$$A_{1,2} = X_1 \cdot A_1 + X_2 \cdot A_2 \quad (1.19)$$

$A_{1,2}$ es el área molecular media de la monocapa mixta a una determinada presión, es decir, la relación existente entre la superficie ocupada por la monocapa y el número total de moléculas que la integran. X_1 y X_2 son las fracciones molares de los componentes y A_1 y A_2 las áreas moleculares de los componentes puros en sus respectivas monocapas a la misma presión superficial a la que se mide $A_{1,2}$.

De la misma manera, el potencial de superficie viene dado por:

$$\Delta V_{1,2} = X_1 \cdot \Delta V_1 + X_2 \cdot \Delta V_2 \quad (1.20)$$

en la medida de la viscosidad superficial es la fluidez, $\phi = 1/\eta$, quien obedece a estas ecuaciones:

$$\varphi_{1,2} = X_1 \cdot \varphi_1 + X_2 \cdot \varphi_2 \quad (1.21)$$

Estas ecuaciones son válidas siempre que cada molécula posea un entorno idéntico al que tendría en su monocapa pura, de forma que se puedan despreciar las moléculas que se encuentran en las fronteras de los islotes.

En concordancia con estas ecuaciones, la representación gráfica del área molecular media de la monocapa mixta en función de la fracción molar de uno de los componentes dará lugar a una línea recta, cuya ordenada en el origen representa el área molecular del otro componente.

Tal comportamiento no es exclusivo de una monocapa formada por dos componentes inmiscibles, ya que si son miscibles y se componen idealmente es decir, interaccionan entre s3 en la misma medida, por t3rmino medio, en que lo hace cada componente por separado, tambi3n obedecen a la ecuaci3n anterior. Es necesario disponer de informaci3n adicional, que permita definir si la monocapa mixta es una mezcla homog3nea ideal o si, por el contrario, est3 constituida por dos componentes inmiscibles en la interfase.

Una manera de establecer la diferencia existente entre un tipo de comportamiento y otro, consiste en la aplicaci3n de la regla de las fases de *Defay-Crisp* (Defay, Prigogine, Bellemans, & Everett, 1966) (Crisp, 1949), aplicada a sistemas bidimensionales. El procedimiento utilizado por *Crisp* es exactamente an3logo al utilizado por *Gibbs* para deducir la regla de las fases ordinaria. Si se considera que la tensi3n superficial, la temperatura y la presi3n externa son variables independientes, puede escribirse la siguiente ecuaci3n (Gaines G. L., 1967):

$$L = (C_V + C_S) - (F_V + F_S) + 3 \quad (1. 22)$$

Siendo L el n3mero de grados de libertad, C_V el n3mero de componentes en la fase volumen, C_S el n3mero de componentes insolubles en la interfase, F_V el n3mero de fases volumen, y F_S el n3mero de fases superficiales en equilibrio.

Si se extiende una monocapa de un solo componente en la interfase aire/agua (o en la interfase entre dos l3quidos puros), se tendr3 que:

$$C_V = 2 \text{ (aire y agua)}$$

$$C_S = 1 \text{ (sustancia extendida)}$$

$$F_V = 2 \text{ (aire y agua)}$$

La regla de las fases conduce a:

$$L = 4 - F_S \quad (1. 23)$$

Si la monocapa es homog3nea, existir3 una sola fase superficial y entonces el sistema presentar3 3 grados de libertad. Puesto que las isotermas de compresi3n π -A se obtienen a temperatura y presi3n externa constante, resulta un solo grado de

libertad, de modo que deberá existir una relación monovariante entre la presión superficial y el área ocupada por la película. Si por el contrario existiesen dos fases superficiales como sucede en el caso de una monocapa en estado líquido expandido en equilibrio con el estado gaseoso, o en la transición de líquido expandido a líquido condensado, en estos casos sólo existirán dos grados de libertad. Al ser fija la temperatura y presión externa, el sistema será invariante, por lo que la presión superficial permanecerá constante mientras las dos fases superficiales se encuentren en equilibrio, explicándose así la existencia de mesetas en las curvas π -A.

La aplicación de la regla de las fases a una monocapa mixta constituida por dos componentes en la interfase, conduce a $C_v = 2$ (aire y agua); $C_s = 2$ (componentes A y B) y $F_v = 2$ (aire y agua), de forma que:

$$L = 5 - F_s \quad (1. 24)$$

Si los componentes son miscibles, existe una sola fase superficial, por lo que resultan cuatro grados de libertad: temperatura, presión externa, presión superficial y composición del sistema. Puesto que tanto la presión externa como la temperatura se mantienen constantes a lo largo de las experiencias, el sistema así constituido resulta ser bivariante, de modo que se necesita especificar la presión superficial y la composición para que quede perfectamente definido el estado del sistema.

Cuando esta monocapa miscible alcanza el colapso, aparece una fase adicional (monocapa colapsada), de modo que en este caso se tiene que $C_v = 2$ (agua y aceite), $C_s = 2$ (componentes A y B) y $F_v = 3$ (aire, agua y fase colapsada), resultando la siguiente expresión para la regla de las fases:

$$L = 4 - F_s \quad (1. 25)$$

Puesto que los componentes son miscibles continúa habiendo una sola fase superficial en el momento del colapso, por lo que existirán tres grados de libertad, de modo que si la temperatura y presión externa se mantienen constantes, la presión de colapso de la monocapa mixta es la única variable que determina el estado del sistema,

el cual, es por lo tanto, monovariante, es decir, la presión de colapso debe variar con la composición del sistema mixto, **Figura 1.4.H.**

En el caso de que los componentes extendidos sobre la superficie sean inmiscibles, la aplicación de la regla de las fases en la interfase conduce a $C_v = 2$ (aire y agua); $C_s = 2$ (componentes A y B) y $F_v = 2$ (aire/agua), resultando:

$$L = 5 - F_s \quad (1.26)$$

Como el número de fases superficiales son dos ($F_s = 2$), existirán en este caso tres grados de libertad, y puesto que la presión externa y la temperatura se mantienen constantes, el sistema es monovariante, de forma que sólo se necesita especificar la presión superficial para que quede perfectamente definido el estado del sistema. Puesto que la composición de las fases es fija (aunque la composición total de la capa superficial puede ser alterada como consecuencia del cambio de las cantidades de las dos fases).

En el momento en que esta monocapa inmisible alcance la presión de colapso de uno de sus componentes, aparece una fase adicional (la monocapa colapsada), siendo en este caso $C_v = 2$ (agua y aire), $C_s = 2$ (componentes A y B) y $F_v = 3$ (aire, agua y fase colapsada), quedando la regla de las fases de la forma:

$$L = 4 - F_s \quad (1.27)$$

Como $F_s = 2$, existirán dos grados de libertad, de tal forma que si se mantienen constantes la temperatura y la presión externa, el valor de L se hace igual a cero, siendo en este caso el sistema invariante, es decir, en estas condiciones (colapso de la monocapa formada por los componentes inmiscibles) el sistema queda perfectamente definido de modo que la presión de colapso es independiente de la composición de la monocapa mixta. El componente de la monocapa mixta que presenta menor presión colapso es "expulsado" de tal monocapa a la misma presión superficial, independientemente de la proporción en que se encuentra la mezcla, **Figura 1.4.H.**

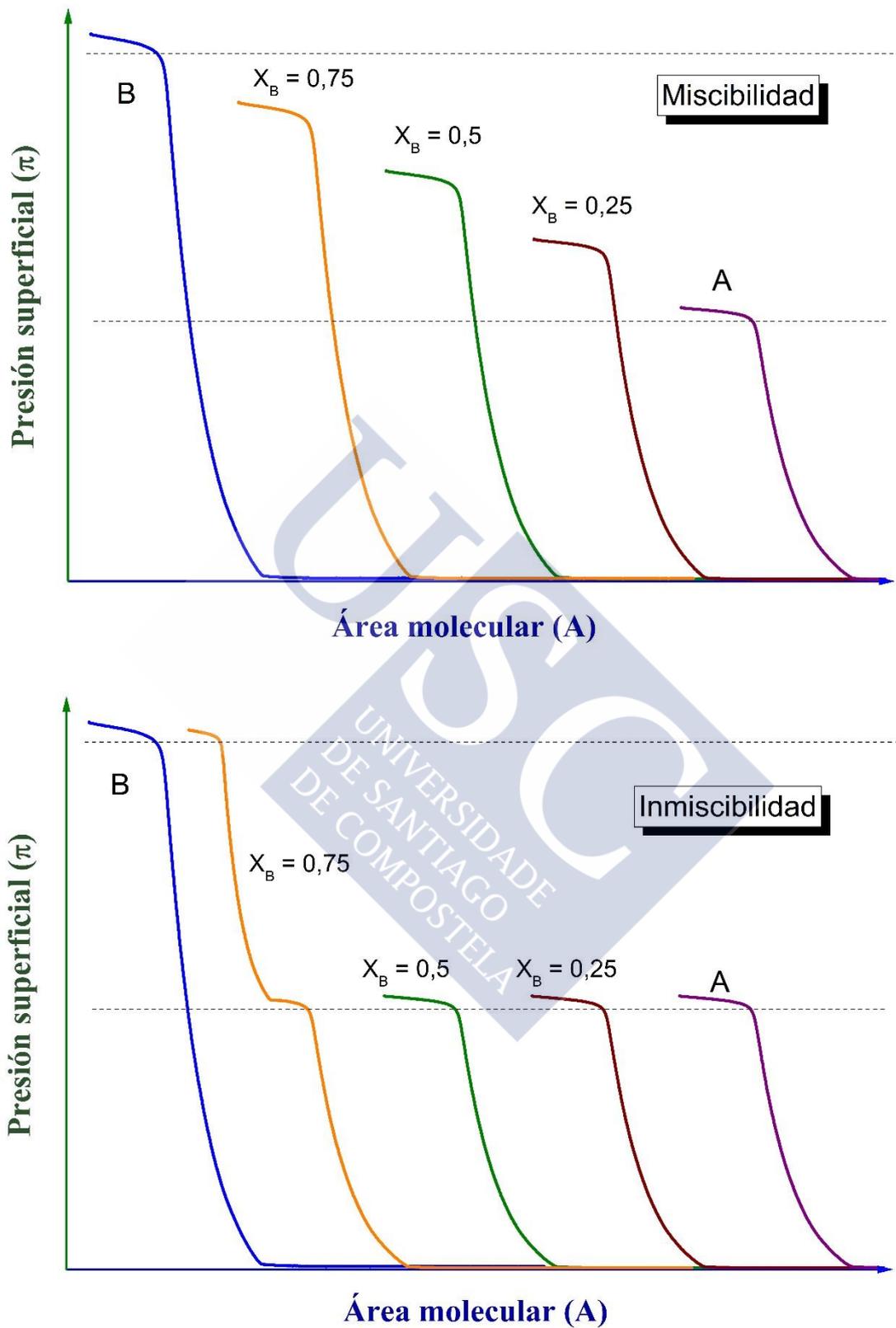


Figura 1.4.H.- Isothermas π -A teóricas para monocapas con componentes miscibles e inmiscibles.

La aplicación de la regla de las fases presenta, por lo tanto, una gran importancia como instrumento para detectar la miscibilidad o inmiscibilidad de los componentes de la monocapa mixta. En el caso de que sean miscibles, es posible conocer el área molecular parcial del componente más fácilmente colapsable, cuyo valor permitirá obtener una cierta información acerca de la magnitud de la interacción entre los componentes. En efecto, en una mezcla de dos componentes 1 y 2, uno de ellos, el más fácilmente colapsable (por ejemplo el 2) es expulsado de la monocapa a una cierta presión que depende de su composición de la monocapa mixta. Para el equilibrio que se establece entre el componente presente en el monocapa y el que se encuentra en la fase volumen colapsada, se puede escribir:

$$\mu_2^m = \mu_2^v \quad (1.28)$$

siendo μ_2^m el potencial químico del componente 2 en la monocapa, y μ_2^v es el que tiene la fase volumen. El primero es una función de la fracción molar y de la presión superficial (Adam N. K., 1956):

$$\mu_2^m = \mu_2^o + R \cdot T \cdot \ln \cdot \gamma_2 \cdot X_2 + \pi \cdot \bar{A} \quad (1.29)$$

En donde μ_2^o es el potencial químico del componente 2 en el estado normal; X_2 , su fracción molar; γ_2 el coeficiente de actividad del componente 2 en el filme; π , la presión superficial a la que es expulsado el mismo, y \bar{A} su área molecular parcial

Las ecuaciones (1.28) y (1.29) conducen a:

$$\mu_2^v = \mu_2^o + R \cdot T \cdot \ln(\gamma_2 \cdot X_2) + \pi \cdot \bar{A} \quad (1.30)$$

Diferenciando, se obtiene:

$$\bar{A} = -R \cdot T \cdot \frac{d \ln X_2}{d \pi} - R \cdot T \cdot \frac{d \ln \gamma_2}{d \pi} \quad (1.31)$$

De acuerdo con la ecuación 1.31, si el coeficiente de actividad se mantiene constante, la representación gráfica de $\ln X_2$ frente a π conduce una línea recta cuya pendiente permite conocer el valor de \bar{A} .

Si el valor del área molecular parcial del componente 2 coincide, o es muy próxima con la extrapolada correspondiente a ese componente puro (A_0), indica que este componente ocupa en el filme mixto de la misma área que cuando se encuentra puro, comportándose aquél de forma ideal. Por el contrario, si \bar{A} es menor que A_0 , existirá una condensación superficial, como consecuencia de la interacción entre los componentes, y si $\bar{A} > A_0$ se tratará de una expansión.

El tratamiento que se acaba de señalar, debido a Crisp (Crisp, 1949), solo es válido cuando $X_2 \rightarrow 1$, puesto que si $X_2 \rightarrow 0$, entonces $\pi \rightarrow \infty$, lo que es inconsistente con la experiencia, ya que si $X_2 = 0$ (entonces $X_1 = 1$), la presión debe coincidir con la del colapso del componente puro 1.

Otro procedimiento de cálculo del área molecular parcial de un componente, consiste en representar en un sistema de coordenadas del área molecular media, a presión y temperatura constante, en función del número de moléculas de uno de los componentes que entra a formar parte de la película, manteniendo constante la cantidad del otro. La pendiente de esta curva en un punto proporciona el valor del área molecular parcial del componente correspondiente a la composición determinada por dicho punto.

No obstante, este procedimiento es bastante inexacto debido a la dificultad de trazar exactamente las tangentes. Por este motivo, se prefiere el método de la intersección, basado en el siguiente razonamiento.

De acuerdo con la definición del área molecular media:

$$A_{1,2} = \frac{A}{N_1 + N_2} \quad (1.32)$$

(siendo N_1 y N_2 el número de moléculas de cada componente)

El valor de A viene dado por:

$$A = A_{1,2} \cdot (N_1 + N_2) \quad (1.33)$$

Diferenciando (a N_2 constante) y teniendo en cuenta que el área molecular parcial es:

$$\bar{A}_1 = \left(\frac{\partial A}{\partial N_1} \right)_{N_2} \quad (1.34)$$

Por lo tanto:

$$\bar{A}_1 = \left(\frac{\partial A_{1,2}}{\partial N_1} \right)_{N_2} \cdot N_1 + A_{1,2} + \left(\frac{\partial A_{1,2}}{\partial N_1} \right)_{N_2} \cdot N_2 \quad (1.35)$$

Sacando factor común a $\left(\frac{\partial A_{1,2}}{\partial N_1} \right)_{N_2}$, esta igualdad se transforma en:

$$\bar{A}_1 = A_{1,2} + \left(\frac{\partial A_{1,2}}{\partial N_1} \right)_{N_2} \cdot (N_1 + N_2) \quad (1.36)$$

Ahora bien, la derivada con respecto al número de moléculas N_1 se puede transformar en derivada con respecto a la fracción molar X_2 mediante la siguiente relación:

$$\left(\frac{\partial A_{1,2}}{\partial N_1} \right)_{N_2} = \left(\frac{\partial A_{1,2}}{\partial X_2} \right)_{N_2} \cdot \left(\frac{\partial X_2}{\partial N_1} \right)_{N_2} \quad (1.37)$$

Y como $X_2 = \frac{N_2}{N_1 + N_2}$, al diferenciar, suponiendo N_2 constante, resulta:

$$\left(\frac{\partial X_2}{\partial N_1} \right)_{N_2} = - \frac{N_2}{(N_1 + N_2)^2} \quad (1.38)$$

Que al introducir en 1.37 resulta:

$$\left(\frac{\partial A_{1,2}}{\partial N_1} \right)_{N_2} = \left(\frac{\partial A_{1,2}}{\partial X_2} \right)_{N_2} \cdot \left[- \frac{N_2}{(N_1 + N_2)^2} \right] \quad (1.39)$$

Y al sustituir este valor en la ecuación 1.36 se transforma en la expresión:

$$\bar{A}_1 = A_{1,2} - X_2 \left(\frac{\partial A_{1,2}}{\partial X_2} \right)_{N_2} \quad (1.40)$$

O en la equivalente:

$$A_{1,2} = \bar{A}_1 + X_2 \left(\frac{\partial A_{1,2}}{\partial X_2} \right)_{N_2} \quad (1.41)$$

Con arreglo a la ecuación 1.41, si en un diagrama se representa el área molecular media en función de la fracción molar del componente 2, se obtiene una línea recta de

cuya ordenada en el origen se puede calcular el área molecular parcial del componente 1 (o del componente 2, si $A_{1,2}$ se representa en función de X_1).

Cualquier tipo de interacción entre los componentes, diferente a la existente entre los mismos cuando forman un sistema ideal, se traducirá en una alteración del valor del área molecular parcial, por lo que en el diagrama A-X se producirá un cambio brusco de la pendiente de la recta en el punto correspondiente a la concentración a la que se verifica la interacción.

Otra manera de conocer el grado de interacción que se produce entre los componentes miscibles de una monocapa mixta consiste en la aplicación de un tratamiento termodinámico desarrollado (Joos, Bull. Soc. Chim., 1969).

Si la fase colapsada se designa con el supraíndice α , el potencial químico de un componente en esta fase será:

$$\mu_i^\alpha = \mu_i^{o,\alpha} + K \cdot T \cdot \ln X_i^\alpha \quad (1.42)$$

En donde $\mu_i^{o,\alpha}$ es el potencial químico del componente i en el estado normal.

Por otra parte, el potencial químico del componente i en la monocapa (μ_i^s) viene dado por (Defay, Prigogine, Bellemans, & Everett, 1966):

$$\mu_i^s = \mu_i^{o,s} + K \cdot T \cdot \ln \gamma_i \cdot X_i^s + \pi \cdot A_i \quad (1.43)$$

siendo $\mu_i^{o,s}$ el potencial químico del componente i en la monocapa bajo las condiciones estándar; γ_i el coeficiente de actividad; π la presión superficial y A_i el área molecular límite.

En el colapso (equilibrio):

$$\mu_i^s = \mu_i^\alpha \quad (1.44)$$

En una monocapa formada por el componente 1, puro, éste es expulsado de la misma a su presión de colapso, $\pi_{c,1}$, y puesto que $X_i^s = 1$, $X_i^\alpha = 1$, $\gamma_i = 1$ se obtiene de la ecuación 1.42:

$$\mu_i^\alpha = \mu_1^{o,\alpha} \quad (1.45)$$

Y teniendo en cuenta 1.43 y 1.44, resulta:

$$\mu_1^{o,\alpha} = \mu_1^{o,s} + \pi_{c,1} \cdot A_1 \quad (1.46)$$

En donde A_1 es el área molecular límite del componente 1 a su presión de colapso, $\pi_{c,1}$.

Para una monocapa mixta en la que interviene el componente 1, se obtiene de las ecuaciones 1.42, 1.43 y 1.44:

$$\mu_1^{o,\alpha} + KT \ln X_1^\alpha = \mu_1^{o,s} + KT \ln \gamma_1 X_1^s + \pi_{c,m} A_1 \quad (1.47)$$

En donde $\pi_{c,m}$ es la presión del colapso de la monocapa mixta de una determinada composición X_1^s .

Sustituyendo la ecuación 1.46 en 1.47, resulta:

$$X_1^\alpha = X_1^s \cdot \gamma_1 \cdot \exp\left(\frac{\pi_{c,m} - \pi_{c,1}}{K \cdot T} \cdot A_1\right) \quad (1.48)$$

Y de forma similar, para el componente 2:

$$X_2^\alpha = X_2^s \cdot \gamma_2 \cdot \exp\left(\frac{\pi_{c,m} - \pi_{c,2}}{K \cdot T} \cdot A_2\right) \quad (1.49)$$

En donde $\pi_{c,2}$ representa la presión de colapso del componente 2.

Recordando que $X_1^\alpha + X_2^\alpha = 1$, resulta:

$$1 = X_1^s \cdot \gamma_1 \cdot \exp\left(\frac{\pi_{c,m} - \pi_{c,1}}{K \cdot T} \cdot A_1\right) + X_2^s \cdot \gamma_2 \cdot \exp\left(\frac{\pi_{c,m} - \pi_{c,2}}{K \cdot T} \cdot A_2\right) \quad (1.50)$$

Si entre los componentes de la mezcla superficial no existe ninguna interacción distinta de la pueda existir entre las moléculas de los componentes puros, los coeficientes de actividad γ_1 y γ_2 se pueden igualar a la unidad. Aplicando, entonces la ecuación 1.48 se puede obtener una curva ideal de $\pi_{c,m}$ frente a X_1 (o frente a X_2), la cual coincidirá con la que se obtenga experimentalmente. Si esta curva ideal no coincide con la experimental será como consecuencia de la existencia de una interacción diferente entre los componentes de la mezcla, con relación a la existente entre los componentes puros (Joos, Ruysen, Miñones, García Fernández, & Sanz Pedrero, 1969) (Joos & Demel, 1969), lo que conduce a que los coeficientes de actividad γ_1 y γ_2 sean diferentes a la unidad.

Para tal mezcla no ideal, γ_1 y γ_2 están relacionados con un parámetro de interacción de acuerdo con la relación:

$$\gamma_1 = \exp[\xi(x_2^s)^2] \quad (1.51)$$

$$\gamma_2 = \exp[\xi(x_1^s)^2] \quad (1.52)$$

Por otra parte, los coeficientes γ_1 y γ_2 están relacionados entre sí por la ecuación de *Gibbs-Duhem*:

$$X_1^s \cdot d \ln \gamma_1 + X_2^s \cdot d \ln \gamma_2 = 0 \quad (1.53)$$

De modo que el parámetro de interacción en el colapso puede calcularse a partir de las ecuaciones 1.50, 1.51 y 1.52.

El conocimiento del parámetro de interacción ξ permite calcular la energía de interacción ΔE , definida por:

$$\Delta E = E_{1,2} - \frac{E_{1,1} + E_{2,2}}{2} \quad (1.54)$$

Siendo $E_{i,j}$ la energía de interacción existente entre una molécula i y otra j .

En el caso de que los dos componentes de la monocapa mixta formen una red hexagonal cuando se encuentran densamente empaquetados, de modo que cada molécula de un componente se encuentre rodeada por otras seis del otro ($z \cdot L = 6$) (Joos, Ruysen, Miñones, García Fernández, & Sanz Pedrero, 1969) (Joos & Demel, 1969) (Levy, Benita, & Baszkin, 1991) (Mestres, Alsina, Espina, Rodríguez, & Reig, 1992), se puede escribir:

$$\Delta E = \frac{\xi \cdot K \cdot T}{z \cdot L} \quad (1.55)$$

Este tratamiento puede aplicarse si no existe una gran diferencia de tamaño entre los dos componentes. Si esto ocurre, el empaquetamiento es no hexagonal y varía con la composición del sistema mixto (Kasselouri, Coleman, & Bazskin, 1996).

Un procedimiento alternativo para caracterizar las interacciones que tienen lugar en las monocapas mixtas consiste en utilizar la aproximación desarrollada por Goodrich

(1957) y por Pagano y Gershfeld (1972) en la que la energía libre de exceso se calcula de acuerdo con la relación:

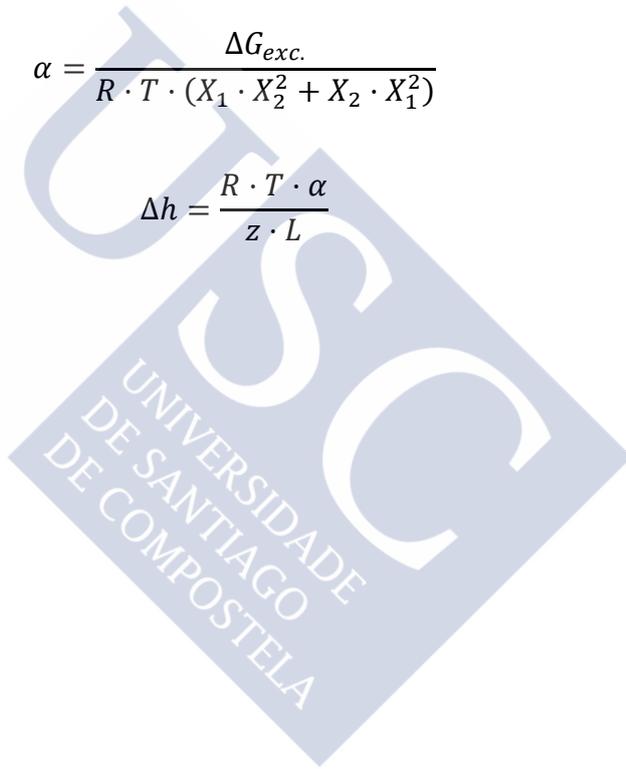
$$\Delta G_{exc.} = N \cdot \int_0^\pi A_{1,2} \cdot d\pi - X_1 \cdot \int_0^\pi A_1 \cdot d\pi - X_2 \cdot \int_0^\pi A_2 \cdot d\pi \quad (1.56)$$

En donde $A_{1,2}$ es el área molecular media ocupada por el filme mixto y A_1 y A_2 son las áreas moleculares de los films puros.

Los valores del parámetro de interacción (α) a diferentes presiones superficiales, así como las correspondientes energías de interacción (Δh) pueden calcularse a partir de las ecuaciones:

$$\alpha = \frac{\Delta G_{exc.}}{R \cdot T \cdot (X_1 \cdot X_2^2 + X_2 \cdot X_1^2)} \quad (1.57)$$

$$\Delta h = \frac{R \cdot T \cdot \alpha}{z \cdot L} \quad (1.58)$$





2 OBJETIVOS



Los primeros datos que evidenciaron los efectos cardioprotectores de los ácidos grasos ω -3 surgieron a partir de los estudios realizados en los esquimales quienes a pesar de tener una elevada ingesta de grasas (superior al 30% de los requerimientos energéticos) presentaban una muy baja incidencia de enfermedades cardiovasculares, identificándose como fuente dietaria de estas grasas los animales de origen marino (mamíferos y pescados azules, ricos en estos lípidos) (Bang, Dyerberg, & Sinclair, 1980). Estos resultados fueron confirmados en estudios realizados posteriormente en poblaciones con una alimentación similar (Kinjo, y otros, 1999) (Egert & Stehle, 2011) y los efectos benéficos de los ω -3 sobre las enfermedades cardiovasculares han sido abundantemente documentados en estudios realizados en humanos y animales (Wang, y otros, 2006) (Slee, McLennan, Owen, & Theiss, 2010). Algunos se atribuyen al EPA y sus derivados metabólicos (Wang, y otros, 2006) (Cottin, Sanders, & Hall, 2011), aunque actualmente se plantea que el DHA sería un agente cardioprotector más potente que el EPA (Borghi & Cicero, 2006).

Estudios epidemiológicos indican que el consumo de PUFAs omega-3 puede afectar favorablemente a la **salud cardiovascular**. En este grupo de estudios se encuentra el proyecto “*The Seven Countries Study*”, primer trabajo importante iniciado en 1958 por el Dr. Ancel Keys, fisiólogo de la Universidad de Minnesota, para investigar la dieta de 12.763 hombres entre 40-59 años pertenecientes a 7 países (Finlandia, Italia, Holanda, Grecia, Yugoslavia, Estados Unidos y Japón) en relación con las enfermedades cardiovasculares. Tras el seguimiento de los voluntarios, se publicaron en 1980 (Keys, 1980) los resultados en los que se concluye la existencia de bajas tasas de enfermedades coronarias en la región del Mediterráneo gracias al elevado consumo de aceite de oliva y de alimentos que constituyen lo que pasó a denominarse *dieta del Mediterráneo*. También se concluyó que un consumo de 30 g/día de pescado reducía el riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria en un 50% en relación a los voluntarios que no consumían pescado (Kromhout, Bosschieter, & de Lezenne Coulander, 1985). Posteriores estudios (Simopoulos A. , 2004) mostraron que las grasas poliinsaturadas (PUFAs) reducen las lipoproteínas LDL y los triglicéridos, incrementado el colesterol HDL.

El estudio "*The Western Electric*" determinó que un consumo de más de 35 g/día de pescado presentaba un riesgo relativo de mortalidad por enfermedad coronaria de 0,62 en comparación con los que casi nunca consumían pescado (Daviglus, Stamler, & Orenca, 1997), mientras que el proyecto "*US Physicians' Health*" demostró que el consumo semanal de pescado estaba asociado a un riesgo relativo de 0,48 de muerte súbita cardíaca (Albert, y otros, 1998). En el mismo sentido, el estudio sobre "*Prevención de aterosclerosis coronaria mediante intervención con ácidos grasos omega-3 de origen marino*" (también conocido por "SCIMO") demostró una reducción en el desarrollo de la aterosclerosis al administrar dosis bajas de PUFAs omega-3 (1,65 g/día) (Von Schacky, Baumann, & Angerer, 2001).

Otros estudios, como el "*Diet and Reinfarction Trial (DART)*" (Burr, Fehily, Gilbert, & cols., 1989), el "*GISSI-Prevenzione*" (Hopper, Ness, Higgins, Moore, & Ebrahim, 1999) o el "*Lyon Heart*" (Kris-Etherton, Eckel, Howard, & cols., 2001) redundan en la reducción de episodios coronarios, en una proporción que va desde el 30% al 70%, como consecuencia de la ingesta de pescado azul o de la dieta tipo mediterránea, con aporte de ácido oleico y antioxidantes naturales, es decir, de ácidos grasos insaturados.

Aunque aún no está claro el **mecanismo** exacto mediante el cual los ácidos grasos ω -3 ejercen su efecto protector, se han propuesto varios mecanismos posibles, entre los que destacan los siguientes (Carrero, y otros, 2005):

1.- Reducción de triglicéridos (TG).

Los triglicéridos elevados son un factor de riesgo independiente de las enfermedades cardiovasculares, especialmente en individuos con valores reducidos de colesterol HDL. La reducción de TG generada por el consumo de ω -3 es uno de los efectos con mayor evidencia tanto en humanos como en animales (Nodari, y otros, 2011).. Estos ácidos disminuyen el colesterol plasmático y los niveles de TG a través de la inhibición de la biosíntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de triglicéridos en el hígado, sin alterar la biosíntesis de lipoproteínas de elevada densidad (HDL) (Manerba, Vizzardì, Metra, & Dei Cas, 2010). Otros estudios indican que la ingesta de DHA y EPA reduce el aumento de triglicéridos tras el consumo de una dieta rica en

grasas y, por tanto, produce un efecto beneficioso (Zampelas, Roche, & Knapper, 1998) (Layne, Goh, Jumpsen, Ryan, & Chow, 1996).

Sin embargo, el efecto reductor de los niveles plasmáticos de TG, HDL y LDL parece ser inverso cuando se ingieren aceites ricos en ω -6 (Roth & Harris, 2010), indicando que la relación de ácidos grasos ω -3/ ω -6 en la dieta opera como un sensor para la regulación hepática del metabolismo lipídico.

2.- Reducción de la agregación plaquetaria y la trombosis.

Cuando las células vasculares sufren algún tipo de daño, se desencadena un proceso inflamatorio que conlleva una respuesta inmune que conduce a la agregación plaquetaria, la formación de trombos y la aparición de placas de ateroma. El contenido en ácidos grasos de las plaquetas origina la producción de tromboxano A₂ a partir de eicosanoides de la familia ω -6, o de tromboxano A₃ a partir de los de la familia ω -3. Este último posee un efecto proagregante menor que el tromboxano A₂, reduciendo, por tanto, la agregación plaquetaria y la trombosis (Schechtman, y otros, 1996).

Además, el efecto ateroprotector de los omega-3 también parece proceder de su incorporación a los fosfolípidos de las membranas celulares, donde sustituyen parcialmente al ácido araquidónico (AA) produciendo eicosanoides menos protrombóticos y vasoconstrictores que los originados por el AA (Connor, 2000).

3.- Reducción de la presión arterial.

La hipertensión es uno de los factores más importantes de riesgo de las enfermedades cardiovasculares. Entre otros efectos, la hipertensión activa la producción de moléculas de adhesión al endotelio de la pared arterial (Brown & Hu, 2001) contribuyendo al engrosamiento de la misma y al desarrollo de la aterosclerosis. Los ω -3 ejercen leves reducciones en la presión arterial (Wang, y otros, 2006) puesto que estimulan la producción endotelial de óxido nítrico (Harris, 1996), el cual provoca la dilatación de los vasos sanguíneos, reduciendo la presión sanguínea. No obstante, se ha demostrado que sólo cantidades elevadas de aceites de pescado (un mínimo de 3 g/día) producen un descenso significativo de la misma (Appel, Miller, Seidler, & Whelton, 1993) (Morris, Sacks, & Rosner, 1993). Las cantidades de pescado que habría

que consumir para obtener estas dosis efectivas son tan elevadas que en la práctica sólo se alcanzan mediante el consumo de suplementos o alimentos enriquecidos con ω -3.

4.- *Efecto antiarrítmico.*

Un corazón enfermo es susceptible de sufrir irregularidades en la actividad eléctrica (arritmias), que en muchas ocasiones son la causa de muerte súbita cardíaca. Se ha sugerido que los ω -3 podrían tener efectos antiarrítmicos (Metcalf, y otros, 2007). Su acción reguladora cardíaca estaría relacionada con su capacidad para inhibir los canales de calcio tipo-L en las células cardíacas, haciendo al miocardio menos sensible a las arritmias peligrosas (Siscovick, Raghunathan, King, & Weinman, 1996) (De Deckere, Korver, Verschuren, & Katan, 1998) (Adkins & Kelley, 2010) (Leaf, y otros, 2005).

Todos estos mecanismos que intentan explicar la acción cardioprotectora de los ácidos grasos ω -3 se basan en la existencia de respuestas fisiológicas a la ingesta de alimentos ricos en estos ácidos, echándose en falta una explicación a nivel molecular de los procesos que tienen lugar en el sistema grasa-colesterol, que en definitiva es el responsable, por una parte, de la formación del ateroma y de las consecuencias que se derivan del mismo y, por otra, del efecto cardioprotector cuando la grasa está constituida por ácidos ω -3.

Por ello, **el objetivo de este trabajo** es estudiar desde un punto de vista molecular la naturaleza de las interacciones que se producen entre el colesterol y los ácidos grasos ω -3, ω -6 y ω -9 existentes en la dieta alimentaria. Conocida la naturaleza y la magnitud de la interacción, se analiza con detalle la influencia que ejerce sobre la misma la longitud de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos así como el grado de saturación y la posición de los dobles enlaces en la cadena alquílica. Con esta finalidad, los ácidos grasos a estudiar son el ácido esteárico (18:0) (saturado), el ácido oleico (18:1) (monoinsaturado), los ácidos poliinsaturados de la familia omega-3: α -linolénico (18:3 ω -3) y estearidónico (18:4 ω -3) y los ácidos poliinsaturados de la familia omega-6: linoleico (18:2 ω -6), γ -linolénico (18:3 ω -6) y ácido eicosadienoico (20:2 ω -6).

Para llevar a cabo este estudio se hace uso de la técnica de monocapas Langmuir de extensión, la cual constituye un excelente modelo *in vitro* de la bicapa lipídica de la membrana celular. En efecto, la orientación de las moléculas extendidas en la interfase aire/agua cuando forman parte de una monocapa de extensión es tal que los grupos polares de las moléculas se anclan en el agua, mientras que las cadenas hidrocarbonadas apolares permanecen dirigidas hacia el aire. Esta disposición es similar a la que posee la bicapa lipídica de la membrana plasmática.

Mediante esta técnica se llega a conocer el grado de interacción existente entre los componentes de la monocapa mixta formada por colesterol y por diferentes ácidos grasos. Con tal objeto, se compara el comportamiento de estas monocapas con el que presentan los componentes puros. Con los datos obtenidos de esta comparación se determina la naturaleza de las interacciones (atractivas o repulsivas) y el grado de intensidad de las mismas, calculando éste a partir de datos termodinámicos (energía libre de exceso). Por otra parte, la observación microscópica de las monocapas mediante microscopía de ángulo de Brewster (BAM) da información de su morfología y espesor, lo que permite conocer la estructura de la monocapa a nivel molecular.

2 OBJETIVOS

El plan de trabajo que se ha desarrollado se puede resumir en las siguientes fases:

1. Obtención de monocapas de componentes puros (ácidos grasos y colesterol). Registro de las isotermas presión superficial – área (π -A) bajo diferentes condiciones experimentales.
2. Obtención de imágenes BAM en diferentes estados superficiales de cada una de las monocapas correspondientes a los componentes puros y registro del espesor de las mismas.
3. Obtención de monocapas mixtas formadas por colesterol y por cada uno de los ácidos grasos objeto de estudio. Registro de las correspondientes isotermas π -A.
4. Estudio de la morfología mediante BAM de las monocapas mixtas obtenidas y determinación experimental del espesor relativo de las mismas.
5. Estudio comparativo de los sistemas mixtos de colesterol-ácidos grasos. Determinación de parámetros de interacción.





3 PARTE EXPERIMENTAL



3.1 REACTIVOS, DISOLVENTES Y SUSTRATO ACUOSO

3.1.1 Sustancias utilizadas

Los reactivos comerciales utilizados en la elaboración del presente estudio son de pureza reconocida y fueron utilizados sin previos tratamientos de purificación, ya que éstos, llevados a cabo en condiciones que no reúnen los requisitos exigibles a las industrias de productos químicos, pueden dar lugar a su contaminación debido a la presencia de sustancias tensoactivas en la atmósfera.

Los lípidos objeto de estudio en el presente trabajo fueron colesterol, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido alfa-linolénico, ácido gamma-linolénico, ácido estearidónico y ácido eicosadienoico; todos ellos suministrados por Sigma-Aldrich, con una pureza igual o superior al 99%. Las fórmulas estructurales correspondientes a los lípidos estudiados aparecen recogidas en la **Figura 3.1.A**. Respecto al estado físico, tanto el colesterol como el ácido esteárico se presentan en forma de polvo blanco, mientras que el resto se facilitan disueltos en etanol. Su almacenamiento se realizó atendiendo las especificaciones de conservación de los fabricantes.

3.1.2 Preparación de las disoluciones de extensión

Para la preparación de las disoluciones de extensión se estimó conveniente emplear una concentración que estuviese en el intervalo comprendido entre 0.15 y 0.20 mg/ml, concentración suficientemente baja como para permitir que tras su depósito sobre la superficie del agua la presión inicial ejercida por la monocapa fuese inferior a 1 mN/m. El empleo de disoluciones más concentradas presenta el inconveniente de que la adición de una simple gota en exceso provoca una elevación considerable de la presión superficial inicial. Por el contrario, la utilización de disoluciones más diluidas exige el depósito de un volumen grande de las mismas y puede ocasionar desbordamiento del agua de la subfase.

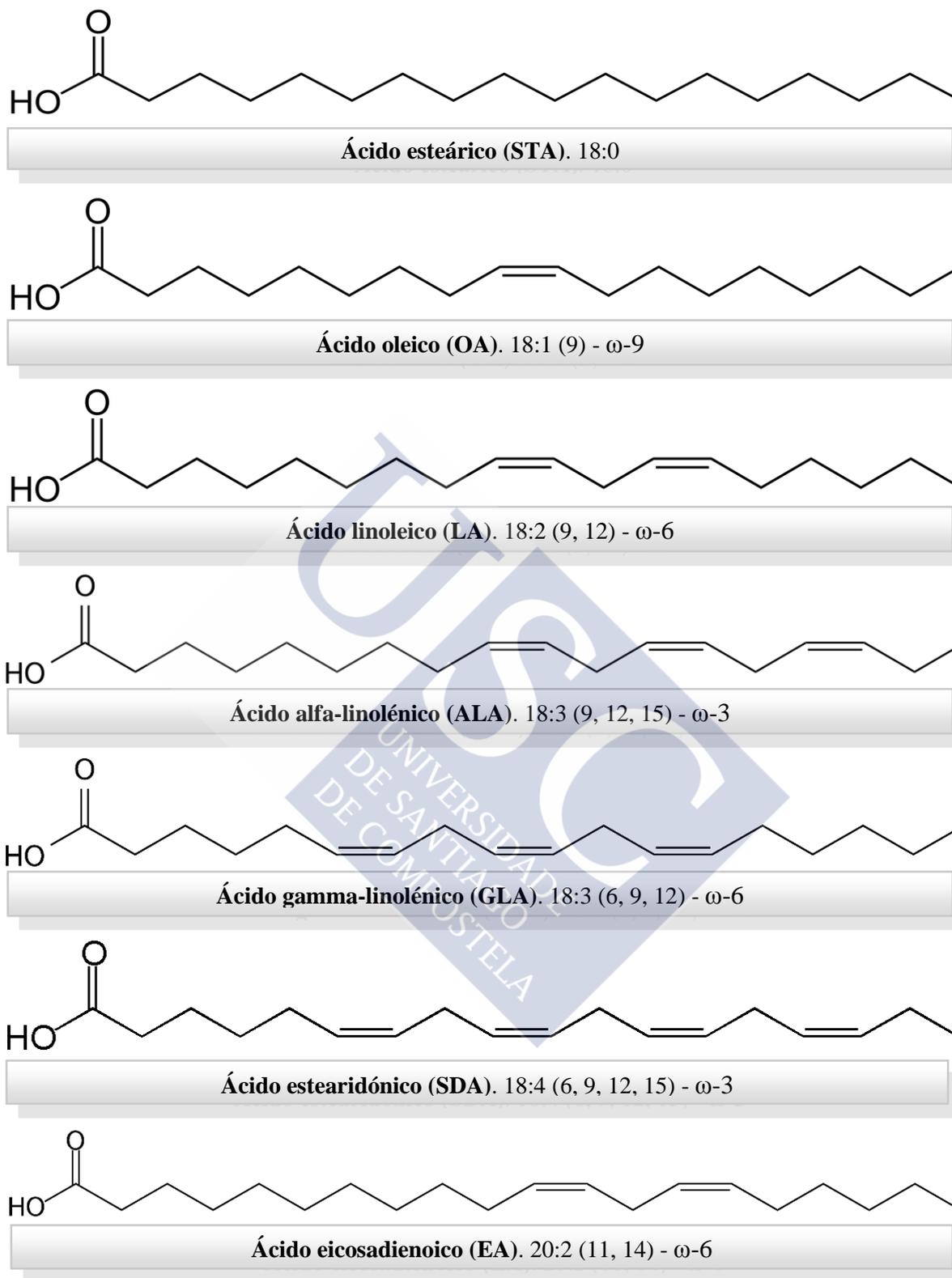


Figura 3.1.A.- Estructuras moleculares de las sustancias estudiadas

Como disolventes se utilizaron etanol y cloroformo, ambos adquiridos a Merck KGaA.

Disoluciones de colesterol: el colesterol se disolvió en una mezcla de cloroformo/etanol en proporción de 1:1 (v/v).

Disoluciones de ácidos grasos: los ácidos grasos se disolvieron en una mezcla de cloroformo/etanol en proporción de 3:1 (v/v).

Las disoluciones de colesterol y ácido esteárico se prepararon pesando una cantidad determinada de dichas sustancias y diluyéndolos en la correspondiente mezcla de disolventes.

Con los ácidos grasos restantes, suministrados en disolución, se prepararon disoluciones “madre”, calculando en cada caso el volumen necesario para obtener la concentración deseada. A partir de éstas, se obtuvieron las disoluciones de extensión.

Se le añadió a cada una de las disoluciones unas gotas de alcohol amílico (0,5%, adquirido a Merk), con la finalidad de lograr una extensión de la monocapa mucho más eficaz (Dervichian D. , 1939) (Dervichian D. , 1940) (Sánchez-González, Cabrerizo-Vílchez, & Gálvez-Ruiz, 1999). La presencia de este alcohol en las disoluciones no afecta al resultado de las monocapas puesto que se evapora inmediatamente después de la deposición.

Las disoluciones se guardaron de forma hermética en recipientes de vidrio opaco que previamente habían sido limpiados con ácido nítrico 65%, abundante agua destilada y posterior secado en estufa. Dichos recipientes fueron almacenados en un desecador herméticamente cerrado y saturado con vapor de los disolventes para evitar la evaporación de los mismos. El tiempo de almacenamiento nunca superó los tres días.

La extensión de las mezclas se llevó a cabo de modo que el número total de moléculas depositado fuese siempre el mismo, variándose para ello la cantidad de moléculas de cada componente en la mezcla, de acuerdo con la fracción molar deseada. El hecho de utilizar siempre el mismo número total de moléculas presenta la ventaja de que todas las isothermas π -A, correspondientes a las diferentes mezclas, se puedan representar en un mismo gráfico, sin necesidad de cambiar los ejes de coordenadas del mismo.

3.1.3 Soporte o sustrato acuoso

Las disoluciones de extensión se depositaron sobre agua desionizada de resistividad 18 M Ω -cm, obtenida por el sistema Milli-RO (Milli-Q) de ósmosis inversa, fabricado por la firma Millipore, consistente en un prefiltro “Rogard” de 10 micras, que se encarga de eliminar el cloro del agua y que va colocado en serie con un cartucho RO de acetato de celulosa, el cual permite eliminar el 90% de los iones y el 99% de la materia orgánica presente en el agua, obteniéndose ésta con la calidad de “grado de laboratorio”.

A continuación, el agua se hace pasar a través del sistema Milli-Q, formado por un filtro de carbón activo, dos cartuchos de resinas de intercambio iónico y un filtro “Organex”, que permite eliminar las últimas trazas de materia orgánica. Finalmente existe un filtro “Millipack”, que se encarga de retener las partículas o microorganismos de tamaño superior a 0.22 μ m. Llegado a este punto, el agua obtenida adquiere la calidad de “grado de reactivo”. Esta agua ultra purificada fue la que se utilizó como sustrato para la elaboración de las monocapas de la presente memoria.

El pH del agua desionizada utilizada para la realización de todos los estudios expuestos en este trabajo se mantuvo en el intervalo de 6 - 7. Para su control, se realizaron mediciones periódicas con un pH-metro o sensor electroquímico de laboratorio.

3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS DISPOSITIVOS DE MEDIDA

3.2.1 Balanza de superficies

Para el registro de las isothermas presión superficial-área (π -A) se ha utilizado la balanza Nima 601BAM (**Figura 3.2.A**), manufacturada por la firma Nima Technology, Ltd. (Coventry, Reino Unido). Está compuesta por una cubeta de politetrafluoroetileno (teflón), una barrera móvil recubierta del mismo material y un sensor de presión.

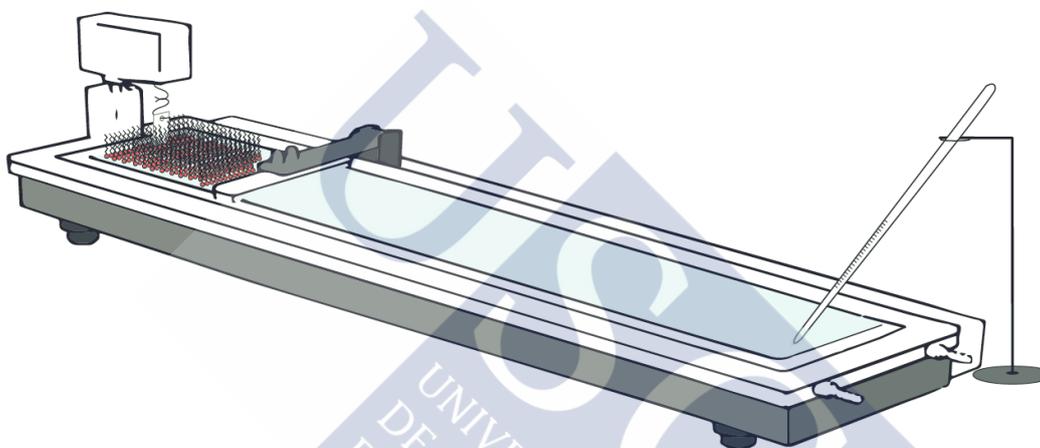


Figura 3.2.A.- Esquema de una balanza superficial

El uso del teflón, el cual es químicamente inerte, hidrofóbico y oleofóbico, evita la cesión de iones al sustrato y se eliminan problemas existentes con las cubetas metálicas usadas hace años (Miñones Trillo, 1995). Por otro lado, este tipo de revestimiento facilita la limpieza de la misma siendo resistente a la mayoría de las sustancias orgánicas.

La balanza presenta unas dimensiones de 7 cm de ancho por 85 cm de largo, ofreciendo una superficie total de 600 cm², aunque la superficie experimental utilizada para la realización de las isothermas π -A de este estudio, fue de 500 cm². El volumen total de agua soporte necesitado para llenar la cubeta es de alrededor de 300 mililitros.

El segundo elemento importante es la barrera móvil que se apoya sobre los dos bordes de la cubeta y se desliza longitudinalmente de un extremo al otro de la cubeta. Esta barrera está recubierta también de politetrafluoroetileno, material hidrofílico que

evita que la película se deslice por debajo de la propia barrera al someterla a compresión pero permite que el sustrato pase por debajo. De esta manera, al mover la barrera se consigue que la superficie de la monocapa se expanda o comprima, sin variar el volumen de la subfase de agua.

En la cubeta existen unos topes para evitar que la barrera móvil entre en contacto con el dispositivo de medida de la presión o que salga de la cubeta cuando invierte su recorrido y llega al final del mismo. El movimiento de la barrera está controlado por un motor de alta precisión, controlado mediante software por ordenador. Se puede modificar la velocidad de compresión desde 10 cm²/min hasta 100 cm²/min. En el presente estudio se mantuvo constante la velocidad de compresión a lo largo de todo el trabajo, siendo ésta 50 cm²/min. Dicha velocidad se puede expresar también en función del número de moléculas depositadas (como variación del área por número de moléculas y tiempo). En la **Tabla 3.2.A** aparecen recogidas las velocidades relativas a los diferentes números de moléculas depositadas en el presente estudio.

Velocidad de compresión (cm ² /min)	Número de Moléculas	Velocidad de compresión (Å ² /molécula·min)
50	2·10 ¹⁶	25
	4·10 ¹⁶	12,5
	6·10 ¹⁶	8,34

Tabla 3.2.A.- Velocidades de compresión relativas al número de moléculas.

El tercer elemento de la balanza es el sensor de presión, situado en uno de los extremos de la cubeta (**Figura 2.2.B**). Para determinar la presión superficial se utilizó el método de wilhelmy (Gaines G. L., 1977), el cual consiste en una lámina de papel de filtro (con dimensiones de 10 mm de ancho y 0.15 mm de grosor), señalada con el número 1 en la figura, que mide la fuerza ejercida hacia abajo por la superficie del agua contenida en la cubeta. Dicha lámina está unida al sensor de presión mediante dos ganchos en forma de "S" enlazados en serie a un pequeño alambre que sobresale del sensor. Un dispositivo de elevación (número 2) permite subir o bajar la lámina hacia la superficie del líquido.

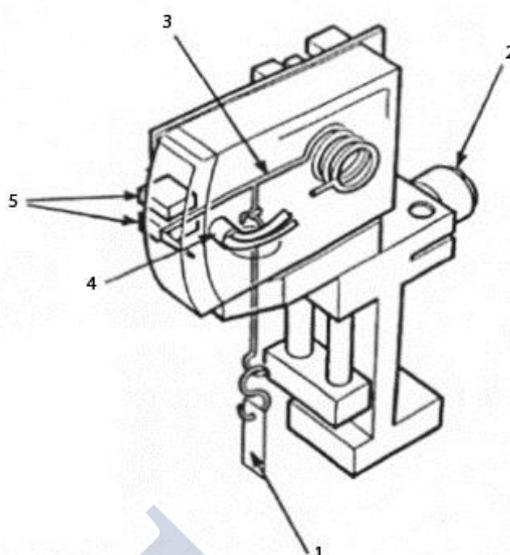


Figura 2.2.B.- *Sensor de presión.*

El sensor de presión tiene una espiral magnética y un brazo móvil (número 3) que está iluminado por un diodo infrarrojo (número 4). La sombra producida por el brazo incide en dos detectores de infrarrojos (número 5) y el control electrónico mantiene el brazo fijo de manera que la sombra incidente en cada detector sea siempre la misma. La fuerza requerida para mantener el brazo fijo se calcula midiendo la corriente que pasa por la espiral. La resolución es de 0.1 mg y la precisión viene determinada por la anchura de la lámina; para una lámina de 10 mm de ancho, es factible una precisión de 0.1 mN/m.

Todas las operaciones de la balanza Nima están controladas por un programa de ordenador, registrándose en la pantalla del mismo las isothermas π -A correspondientes.

Por último, la balanza presenta un serpentín situado en el fondo de la cubeta que se conecta a un circuito de refrigeración con el fin de mantener en todo momento el control de la temperatura con la ayuda de un ultratermostato de circulación (*Digit-Cool*) con una estabilidad de $\pm 0,1$ °C. El rango de temperaturas permitidas por el fabricante para este modelo de balanza comprende desde 10 °C hasta 30 °C. La temperatura de la subfase se mide con un termómetro sumergido en la zona de la misma donde no se deposita monocapa.

3.2.2 Microscopio de ángulo de Brewster

3.2.2.1 Fundamento

El conocimiento de la morfología y espesor de los films extendidos en la interfase aire/agua es de considerable interés práctico, ya que, dependiendo de su estructura, la monocapa presenta propiedades diferentes que repercuten en el comportamiento global del sistema. En los últimos años se han obtenido notables progresos en la caracterización estructural de las monocapas, utilizando para ello nuevas técnicas de observación, tales como difracción de rayos X (Kenn, Böhm, Bibo, Peterson, & Möhwald, 1991) (Paudler, Ruths, & Riegler, 1992), microscopía de fluorescencia (Möhwald, 1990) (McConnell H. , 1991) y, más recientemente, microscopía de ángulo de Brewster (BAM) (Hénon & Meunier, 1991) (Hönig & Möbius, 1991) (Möbius, 1998).

Esta última, que es la utilizada en este trabajo, presenta la ventaja sobre las demás técnicas microscópicas de que permite revelar la existencia de dominios e irregularidades en los filmes (Vollhardt, 1996) sin necesidad de adicionar a la monocapa ninguna sustancia extraña, como por ejemplo un marcador fluorescente, que puede alterar el estado físico de la misma (Lösche, Sackman, & Möhwald, 1983). El fundamento de esta técnica es el siguiente (Lheveder, Meunier, & Hénon, Physical Chemistry of Biological Interfaces, 2000): cuando la luz blanca (luz no polarizada) incide sobre la superficie de separación de dos medios transparentes, no absorbentes, parte de la misma se refracta y parte se refleja (**Figura 3.2.C**). La luz reflejada está siempre parcialmente polarizada, con su plano de polarización perpendicular al plano de incidencia. Del mismo modo, la luz refractada también está polarizada, pero en este caso la dirección del plano de polarización es paralela al plano de incidencia. La intensidad de la luz reflejada depende del ángulo de incidencia (θ_i), así como de la naturaleza de la interfase, utilizándose la reflectividad (reflectancia) como una medida de la misma. Esta magnitud viene definida por la relación entre la intensidad de la luz reflejada y la de la luz incidente.

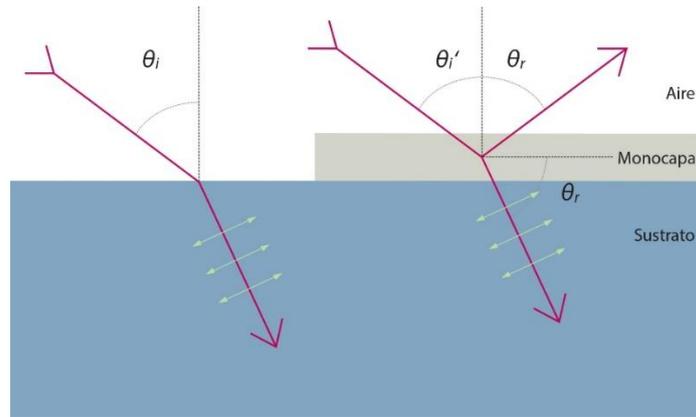


Figura 3.2.C.- Polarización de la luz por reflexión.

Para una interfase Fresnel, es decir, una interfase plana entre dos medios isotrópicos en la que el índice de refracción cambia bruscamente desde n_1 (índice de refracción del medio incidente) hasta n_2 (índice de refracción del segundo medio), la reflectividad viene dada por las fórmulas de Fresnel:

a) La reflectividad del rayo reflejado p-polarizado (polarización paralela al plano de incidencia) es:

$$R_p = \left[\frac{\tan(\theta_i - \theta_r)}{\tan(\theta_i + \theta_r)} \right]^2 \quad (3.1)$$

b) La reflectividad del rayo reflejado s-polarizado (polarización perpendicular al plano de incidencia) es:

$$R_s = \left[\frac{\text{sen}(\theta_i - \theta_r)}{\text{sen}(\theta_i + \theta_r)} \right]^2 \quad (3.2)$$

en donde θ_r es el ángulo de refracción:

$$n_1 \cdot \text{sen} \theta_i = n_2 \cdot \text{sen} \theta_r \quad (3.3)$$

La **Figura 3.2.D** muestra las reflectividades R_p y R_s , en función del ángulo de incidencia, para $n_1 = 1$ (aire) y $n_2 = 1,33$ (agua).

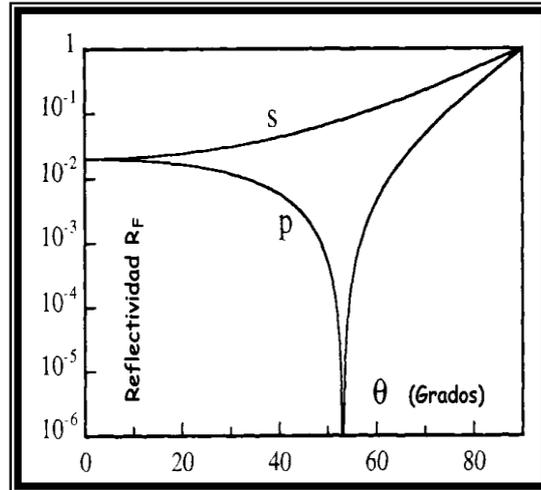


Figura 3.2.D.- Reflectividades R_p y R_s en función del ángulo de incidencia.

Como puede observarse, R_s aumenta a medida que lo hace el ángulo de incidencia, mientras que R_p disminuye al principio hasta un valor 0 y luego aumenta hasta 1. El ángulo de incidencia para el cual $R_p = 0$ recibe el nombre de ángulo de Brewster. La ecuación (3.1) muestra que esto sucede cuando $\tan(\theta_i + \theta_r)$ es infinito, es decir, cuando:

$$\theta_i + \theta_r = \frac{\pi}{2} \quad (3.4)$$

lo que significa que los rayos reflejado y refractado son perpendiculares entre sí.

Las dos ecuaciones (3.3) y (3.4), en el ángulo de Brewster, permiten escribir:

$$\frac{n_2}{n_1} = \frac{\text{sen } \theta_i}{\text{sen } \theta_r} = \frac{\text{sen } \theta_i}{\text{cos } \theta_i} = \tan \theta_{\text{Brewster}} \quad (3.5)$$

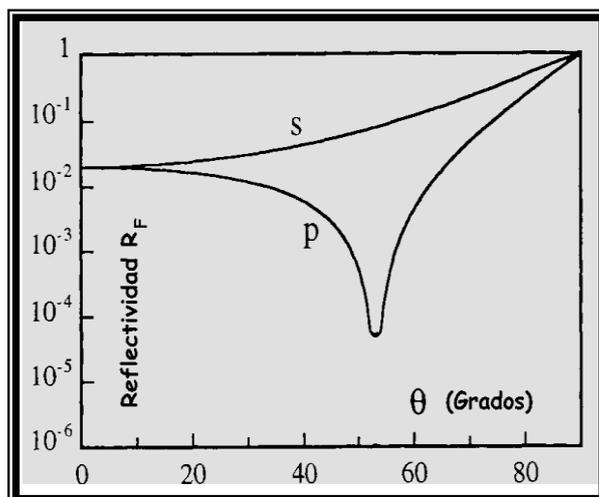


Figura 3.2.E.- Reflectividades R_p y R_s en función del ángulo de incidencia para una monocapa de índice de refracción 1,5 y espesor 20 Å.

De acuerdo con esto, si la luz incidente es p-polarizada, no existe nada de luz reflejada cuando el ángulo de incidencia coincide con el de Brewster, el cual, en el caso del agua, es aproximadamente de 53°. Si se deposita una monocapa sobre la interfase, cambia el índice de refracción del medio (pasa de ser 1.33, que es el índice de refracción del agua, a 1,50 aproximadamente, en una monocapa de 20 Å de espesor), modificándose por ello el valor del ángulo de Brewster y aumentando la reflectividad hasta un valor del orden de $5 \cdot 10^{-5}$ en las proximidades de tal ángulo (**Figura 3.2.E**). Esta pequeña reflectividad es suficiente como para que se pueda visualizar la monocapa, que se manifiesta como una imagen clara sobre un fondo oscuro, correspondiente al agua.

La caracterización cuantitativa del espesor de la monocapa por elipsometría requiere un análisis más complicado (Azzam & Bashara, 1992). En efecto, la intensidad de luz reflejada bajo el ángulo de Brewster depende del espesor y de las propiedades ópticas del filme, estando relacionadas tales magnitudes mediante la ecuación:

$$I = |R_p| \cdot 2 = C \cdot d \cdot 2 \quad (3.6)$$

en donde I es la reflectividad relativa (definida como la relación entre la intensidad reflejada, I_r , y la intensidad incidente, I_0) C es una constante; d es el espesor de la monocapa y R_p es la reflectividad del rayo reflejado p-polarizado, la cual

depende de un conjunto de parámetros ópticos, tales como longitud de onda de la luz, índices de refracción del aire, de la monocapa y del agua y ángulos de incidencia de la luz relativos a los planos de incidencia del aire, de la monocapa y del agua. Con frecuencia, algunos de estos parámetros son desconocidos, especialmente el índice de refracción de la monocapa, pero ello no es óbice para poder conocer el espesor (relativo) del filme en un determinado estado superficial con relación a otro diferente (de Mul & Mann Jr., 1998), de modo que en muchas ocasiones no interesa tanto el conocimiento del espesor real de la monocapa, sino su variación a medida que se comprime la misma. No obstante, recientemente se han desarrollado modelos teóricos para calcular los valores reales del espesor (Overbeck, Hönig, Wolthaus, Gnade, & Möbius, 1994) (Overbeck, Hönig, & Möbius, Thin Solid Films, 1994) (Weidemann, Gehlert, & Vollardt, 1995).

3.2.2.2 Características del microscopio bam

Como se ha indicado en el apartado anterior, la reflectividad correspondiente al rayo reflejado p-polarizado por una interfase, es muy baja (del orden de 10^{-8} para el caso del agua), y aumenta unas mil veces cuando se deposita una monocapa sobre la misma. Pese a este aumento, la observación de la luz reflejada por el filme requiere unas condiciones experimentales que garanticen un ángulo de incidencia correcto, así como una buena polarización del haz incidente, ya que de lo contrario la reflectancia de la monocapa puede verse enmascarada por la del agua. De ahí que se necesite una precisión en el ángulo de Brewster de $0,01^\circ$, la cual es posible obtener mediante un láser, así como un buen polarizador que sólo permita un error en el ángulo de polarización de $0,02^\circ$. Además, el haz incidente debe ser de alta intensidad y la cámara de video de elevada sensibilidad.

En el primer microscopio BAM (**Figura 3.2.F**), el objetivo era el de un microscopio de gran apertura numérica (0,4), que recogía la luz reflejada y dispersada de la superficie para formar una imagen en una cámara de video. Este objetivo era desplazado por medio de un motor, con el objeto de escanear la interfase. Las sucesivas imágenes

formadas en la cámara se procesaban en un ordenador que reconstruía la imagen completa (definitiva).

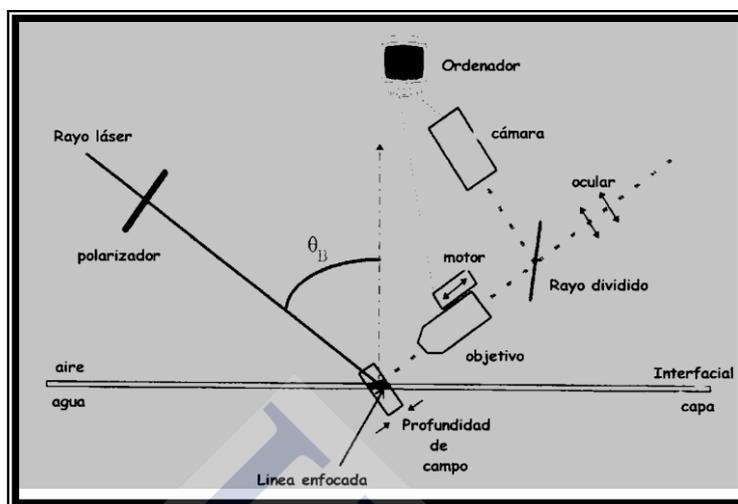


Figura 2.2.F.- Esquema de un microscopio de ángulo de Brewster.

Posteriormente, el objetivo microscópico fue reemplazado por una lente de pequeña apertura, al objeto de aumentar la profundidad de foco y conseguir de esta forma un mayor campo de observación, evitándose el escaneado de la superficie. Con esta modificación se consigue disminuir el tiempo de reconstrucción de la imagen, pero ésta era borrosa en sus bordes. Con la finalidad de obtener una imagen de buena calidad y, a la vez rápida, se empleó más tarde un objetivo de gran apertura numérica (0,97), colocado verticalmente sobre la superficie del agua, con el que se obtiene una gran distancia focal (3 mm) (Lheveder, y otros, 1998). Un agujero practicado en las lentes del objetivo permite la iluminación de la superficie del agua bajo el ángulo de Brewster.

Las medidas elipsométricas y las imágenes BAM que figuran en esta memoria fueron obtenidas utilizando un instrumento diseñado por Overbeck (Overbeck, Hönig, & Möbius, 1993) y comercializado por NFT (Göttingen, Alemania) bajo el nombre de BAM 2 plus (**Figura 3.2.G**), equipado con un láser de 30 mW, que emite luz p-polarizada con una longitud de onda de 690 nm, la cual es reflejada en la interfase aire-agua con un ángulo de $53,1^\circ$ (ángulo de Brewster).

Esta luz reflejada atraviesa primero una lente, después un analizador y finalmente se recoge en una cámara CCD. La resolución lateral del instrumento es de $2\mu\text{m}$ y las

imágenes obtenidas fueron digitalizadas y procesadas para conseguir una óptima calidad, correspondiendo las imágenes mostradas en esta memoria a 768 x 572 píxeles.

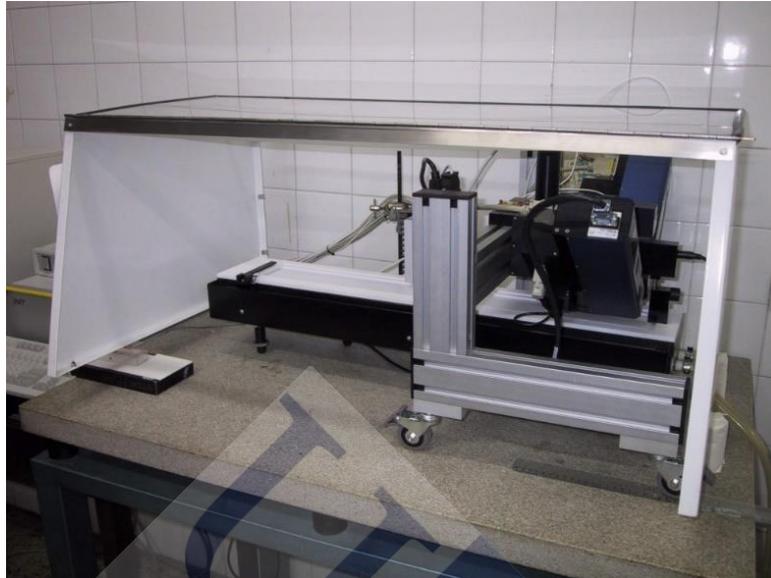


Figura 2.2.G.- Balanza de superficies Nima y BAM 2000 Ellipsometer.

El equipo experimental consta de tres partes: unidad óptico-mecánica, unidad de control electrónico y ordenador personal (software) (Figura 3.2.H).

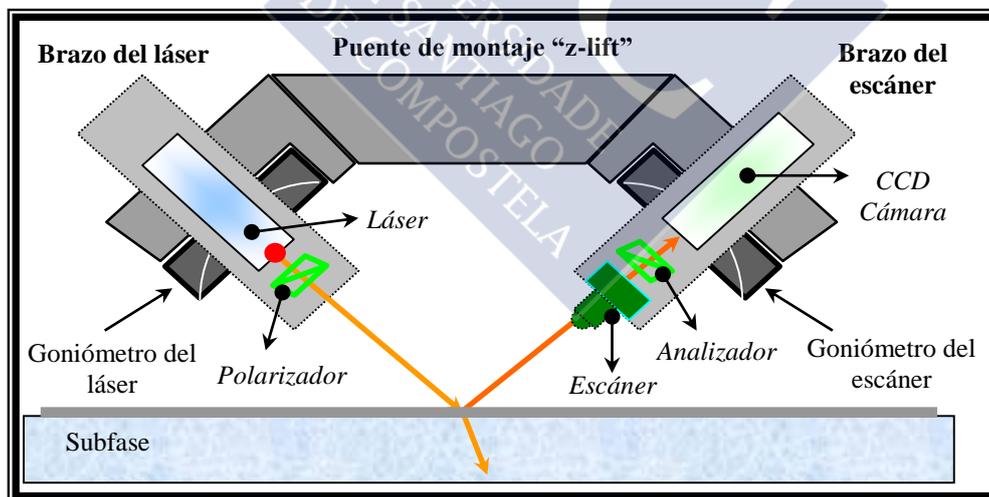


Figura 3.2.H.- Dispositivo experimental del BAM con sus componentes.

La unidad óptico-mecánica consta, a su vez de tres partes:

1. **Puente de montaje.** Soporta el brazo del escáner y el del láser y permite el movimiento de la unidad en la dirección vertical, debido a un motor que lleva acoplado

una excéntrica. Con el mismo se puede conseguir un desplazamiento de unos 10 mm. La función que controla dicho movimiento se denomina “z-lift”.

Por otra parte, esta unidad también permite variar el ángulo de inclinación del brazo del láser y el del escáner, de forma independiente o acoplada. Tales movimientos están controlados por sendos goniómetros, permitiendo modificar de esta forma el ángulo de incidencia del láser sobre la interfase.

2. **Brazo del láser.** Contiene el láser, que emite una radiación de longitud de onda 690 nm y de potencia 30 mW. En este brazo también se encuentra un polarizador que asegura que el haz sea p-polarizado con respecto al plano de incidencia. Esto se lleva a cabo rotando el polarizador hasta conseguir que la señal observada sea mínima. Mecánicamente, esto se consigue mediante una excéntrica.

3. **Brazo del escáner.** Contiene tres componentes:

a) **CCD cámara:** Convierte la señal de intensidad reflejada por la muestra en una imagen de vídeo, que puede ser observada en el monitor. Dichas imágenes poseen una resolución de 2 μm . El ordenador permite controlar la ganancia, dependiendo de la intensidad de luz recibida, así como el nivel de negro, con el fin de obtener una imagen con suficiente contraste. La cámara presenta, además, diferentes velocidades de “shutter”, es decir, diferentes tiempos de exposición que impiden la saturación de la cámara cuando la intensidad reflejada es elevada. Los distintos valores de “shutter” se expresan en fracciones de segundo (tiempo de exposición). El aparato dispone de cuatro: 1/50s; 1/125s; 1/250s y 1/500s. Los valores más altos (1/500s) corresponden a los menores tiempos de exposición y, por tanto, deberán utilizarse cuando la cantidad de luz reflejada sea elevada.

Una función adicional de la cámara es la denominada “gamma”, que permite obtener una respuesta de intensidad no lineal, consiguiéndose con ello una amplificación de las señales débiles, que se traduce en una imagen más uniforme.

b) **Analizador:** Permite obtener información adicional acerca de la anisotropía de la muestra, ya que girando el mismo se consigue que varíe la relación s/p de la luz reflejada (componentes perpendicular y paralela al plano de incidencia,

respectivamente), observándose una inversión del contraste de la imagen cuando los dominios observados son ópticamente anisotrópicos. De este modo se consigue distinguirlos de otros contrastes causados por diferencias de densidad o de espesores en películas isotrópicas. Estas últimas conservan el estado p-polarizado de la luz incidente.

El analizador se puede retirar del haz de luz reflejada hacia la cámara haciéndolo girar un ángulo superior a 200° . Las posiciones más utilizadas del mismo son en los alrededores de la p-posición (0°) y de la s-posición (90°). Para películas delgadas anisotrópicas suele observarse inversión de contraste girando el analizador en el rango de 70° - 110° .

c) **Escáner:** Consta de un dispositivo mecánico que permite mover el objetivo a lo largo de su eje óptico con el fin de enfocar todas las zonas de la imagen, de modo que la imagen final construida a partir de las diferentes zonas escaneadas durante su movimiento se encuentre perfectamente definida en todas sus partes.

La utilización del escáner presenta el inconveniente de que el procesado de la imagen final requiere un tiempo mucho mayor que el que se necesita para obtener una imagen simple, siendo necesario, por lo tanto, que la zona de observación permanezca inmóvil durante todo el proceso, lo que en ocasiones es difícil de conseguir.

3.3 TECNICA OPERATORIA

3.3.1 Registro de isothermas π -a

Para obtener las isothermas de compresión π -A, es decir, una representación de la presión superficial (π) frente al área molecular (A) ocupada por la sustancia extendida en monocapa, previamente se debe limpiar la cubeta con alcohol absoluto (Merck) y posteriormente con agua destilada, repitiendo este proceso varias veces. Para la limpieza de la barrera se utiliza el mismo procedimiento.

A continuación se llena el depósito con la disolución soporte, de tal forma que la superficie del sustrato quede 1 mm por encima de los bordes de las cubetas. Seguidamente se introduce en el sustrato la lámina de Wilhelmy, de papel de filtro, de modo que quede sumergida una tercera parte de la misma. Finalizada esta operación, se ajustan a cero las posiciones de las barreras y las indicaciones de presión superficial, mediante el programa del ordenador, introduciéndose en el mismo las condiciones de la experiencia que se va a realizar (masa molecular de la sustancia a extender, concentración de la disolución de esparcimiento, volumen de depósito, temperatura, número de moléculas depositadas, etc.).

La balanza no necesita ser calibrada cada vez que se hace una experiencia, sino que basta con una calibración de vez en cuando, que se realiza mediante un proceso de pesada, colocando en cada sensor un peso conocido. Este valor, junto con la geometría de la placa de Wilhelmy, es introducido como dato en el ordenador.

Para el depósito de las disoluciones de extensión se utilizó una micropipeta Microman Gilson m250, con rango de volumen desde 50 μ L hasta 250 μ L, de precisión 0,2 μ l, y se lleva a cabo esparciendo pequeñas gotas de dicha disolución sobre todo el área disponible de la superficie del sustrato. Una vez extendida la disolución sobre la superficie de la subfase se esperan cinco minutos antes de proceder a su compresión, con el fin de conseguir la evaporación del disolvente.

3.3.2 Obtención de imágenes bam y medida del espesor relativo

Tal como se indicó antes, para la realización de nuestros estudios el microscopio de ángulo de Brewster se ha adaptado a la balanza de superficies Nima. Ambos dispositivos experimentales se encuentran situados, a su vez, sobre una mesa anti-vibracional y en el interior de una vitrina completamente cerrada con el fin de evitar las corrientes externas de aire y la contaminación por el polvo atmosférico.

Con el fin de obtener imágenes de la mejor calidad y con un elevado grado de contraste, es necesario colocar en el fondo de la balanza un cristal negro, de forma trapezoidal, justo en la zona en donde va a tener lugar la observación microscópica, de modo que el haz de luz refractado incida sobre la región del plano inclinado del cristal (Figura 3.3.A). De esta forma, el cristal actúa como una “trampa” de luz, absorbiendo el rayo refractado, que suele contener más del 90% de la energía incidente. Esto también supone la absorción del calor procedente del láser, evitando así una subida brusca de temperatura en la zona de incidencia de la monocapa.

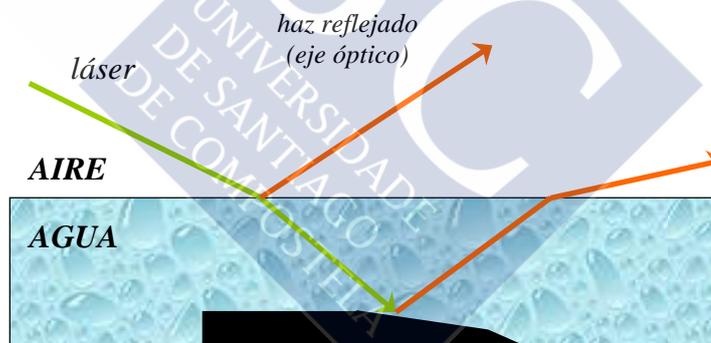


Figura 3.3.A.- Posición del cristal negro en el fondo de la cubeta.

Una vez colocado el cristal y antes de extender la monocapa, se procede a ajustar el ángulo de incidencia del láser al valor de 53° (ángulo de Brewster para la interfase agua/aire). Posteriormente, manipulando el z-lift, se mueve el conjunto óptico-mecánico hasta conseguir visualizar la imagen de la interfase. Superada esta fase, se procede al esparcimiento de la sustancia a estudiar. Para conseguir una mejor visualización de las imágenes, se ajustan los parámetros de la cámara a las condiciones

más favorables, eligiendo para ello el shutter, control de ganancia, gamma, etc, más adecuados.

Para medir el espesor relativo de la película se necesita realizar un precalibrado de la cámara, puesto que ésta realmente no mide intensidades reflejadas (I), que es la magnitud que está relacionada con el espesor de la monocapa, sino *niveles de grises* (GL). Por lo tanto, es necesario conocer la relación entre ambos parámetros, la cual fue establecida por Rodríguez Patino y colaboradores (Langmuir, 1999) (Food Hydrocolloids, 1999) (Langmuir, 2001) para diferentes velocidades de *shutter* (tiempos de exposición de la cámara). A partir de las relaciones obtenidas en cada caso, se puede conocer la reflectividad relativa (I) midiendo los niveles de grises de las imágenes obtenidas durante la compresión de las monocapas y, en consecuencia, determinar el espesor relativo de las mismas, puesto que, como se indicó en diversas ocasiones, ambos parámetros se encuentran relacionados entre sí por la ecuación de Fresnel, recogida en la ecuación (2.5).

Cada vez que se realiza la compresión de una monocapa, se inicia simultáneamente la medición del espesor. Con la balanza nima, obtendremos los valores de presión superficial y el área molecular ocupada por el film (isotermas π -A) en función del tiempo al que se registran cada uno de los valores. Por otro lado, con el microscopio BAM obtendremos los niveles de grises y el espesor en función del tiempo. En consecuencia, se obtienen curvas d - π (espesor relativo en función de la presión superficial), así como curvas d - π - t , en las que se representa simultáneamente el espesor relativo y la presión superficial, en función del tiempo (t).

La interpretación de los espesores registrados se llevó a cabo mediante la asociación de dichos valores con los tamaños y configuraciones moleculares de las sustancias objeto de estudio registradas en la base de datos del Centro Nacional estadounidense para la Información Biotecnológica (NCBI-pubChem).



4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN





4.1 COLESTEROL

4.1.1 Isoterma π -A y módulo de compresibilidad

En la **Figura 4.1.A** se muestra la isoterma π -A correspondiente a la monocapa de colesterol obtenida mediante el depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas sobre agua desionizada a la temperatura de 20 °C y a pH 6-7. Como se puede observar, el colesterol forma una monocapa muy condensada, característica de un estado *sólido*.

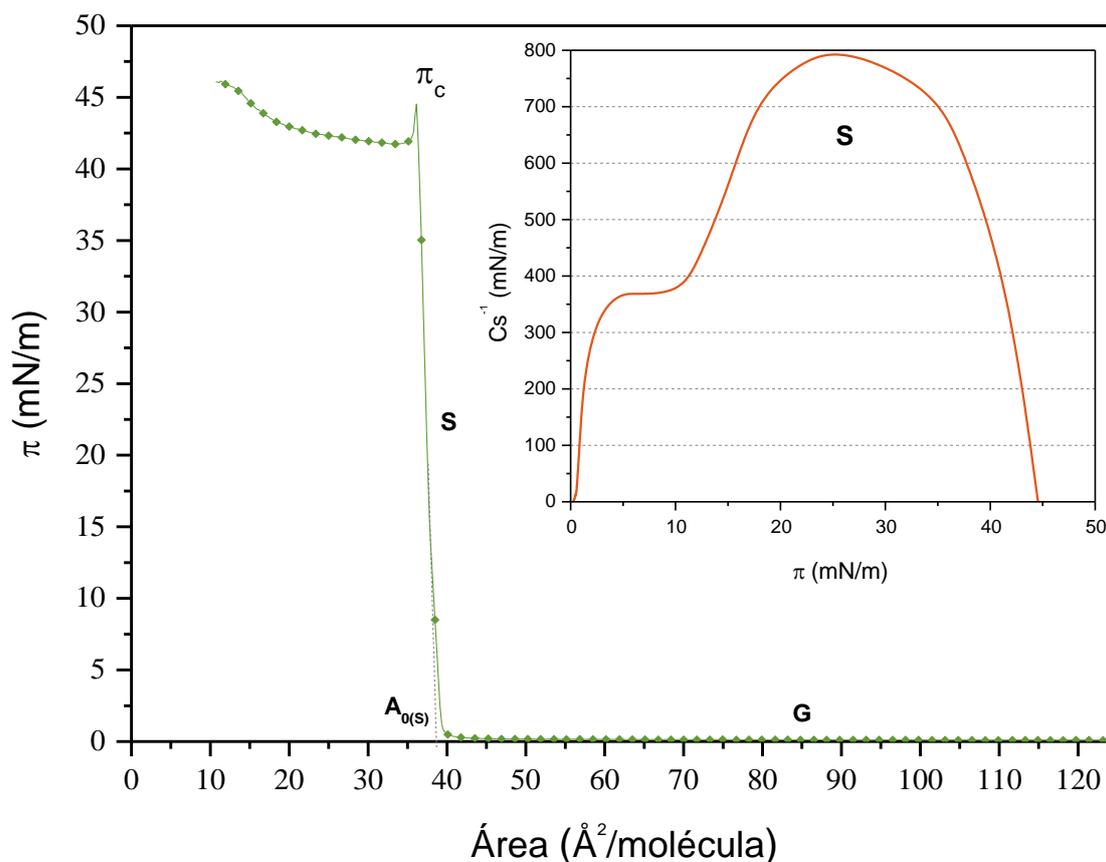


Figura 4.1.A.- Isoterma π -A de la monocapa de **colesterol**, correspondiente al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a pH 6-7 y comprimida a la velocidad de 50 cm^2/min . En el interior, representación del módulo de compresibilidad frente a la presión.

El área límite o área extrapolada obtenida a presión cero ($A_{0(s)}$) es de 38,6 $\text{\AA}^2/\text{molécula}$, valor similar al registrado en la bibliografía por otros autores. Seoane y Makyla registran un valor de 39 $\text{\AA}^2/\text{moléculas}$ (Seoane, y otros, J. Phys. Chem. B, 2000) (Makyla & Paluch, 2009); Motomura y Takano obtienen un valor de 38,5 $\text{\AA}^2/\text{molécula}$ (Motomura, Terazono, Matuo, & Matuura, 1976) (Takano, Ishida, Iwahashi, Araki, &

Irimaya, 1997); Müller-Landau reporta un valor de 38,4 Å²/molécula (Müller-Landau & Cadenhead, 1979); mientras que Ries registra un valor de 37,8 Å²/molécula (Ries Jr. & Swift, 1978). Cuando el sustrato es una disolución tamponada de pH 6, los valores que figuran en la bibliografía son del orden de 39 o 40 Å²/molécula, lo mismo que en subfases de NaCl 0,01 M, tampón fosfato 0,04 M (Lundberg, 1973). Sin embargo, sobre tampones de Britton-Robinson el valor de A₀ resultó ser de 43 Å²/molécula (Taneva & Keough, 1997).

Un parámetro característico de las monocapas es la presión de colapso, ya que su valor es una medida de la fuerza con la que el film se adhiere al sustrato acuoso, es decir, nos informa acerca de la mayor o menor polaridad de los grupos hidrofílicos de las moléculas que constituyen la monocapa. Cuando la monocapa de colesterol alcanza un área de 36,1 Å²/molec se produce el colapso de la misma, registrándose un valor 44,55 mN/m para la presión de dicho colapso, próximo al obtenido por otros autores (Makyla & Paluch, 2009) (Seoane, y otros, J. Phys. Chem. B, 2000) (Hac-Wydro & Wydro, Chemistry and Physics of Lipids, 2007).

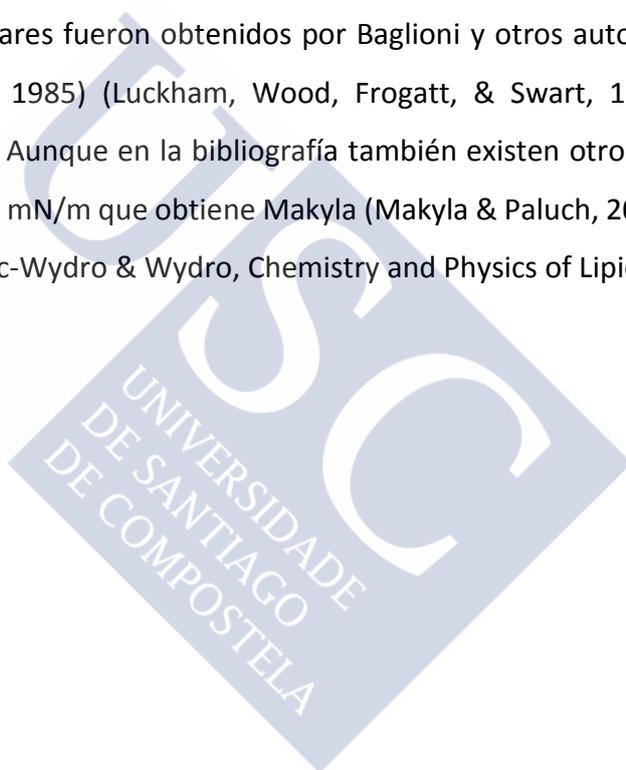
Una forma complementaria de evidenciar el comportamiento de las monocapas consiste en representar el módulo de compresibilidad superficial (C_s⁻¹) en función de la presión superficial o del área molecular. El módulo de compresibilidad representa una medida de la pendiente de las curvas π-A, es decir, **la rigidez de la monocapa**, y viene definido por la expresión:

$$C_s^{-1} = -A \cdot \left(\frac{d\pi}{dA}\right) \quad (4.59)$$

Su valor depende del estado superficial del film, de modo que cuanto mayor sea, más rígida y, por tanto, menos compresible es la monocapa (Davies & Rideal, Interfacial phenomena, 1963).

La representación gráfica del módulo de compresibilidad de la monocapa frente a la presión superficial se muestra en el recuadro interior de la **Figura 4.1.A**. A la presión de 5 mN/m el aumento del módulo de compresibilidad con la presión se estabiliza,

manteniéndose constante hasta una presión de 10 mN/m, dando así lugar a una meseta con valor de $C_s^{-1} = 370$ mN/m que puede ser atribuida a un cambio de fase *sólido-sólido* de segundo orden, puesto que en la isoterma π -A no se pone de manifiesto mediante la existencia de un *plateau* (meseta) de presión constante como sucede en las transiciones de fase de primer orden. Posteriormente, la curva C_s^{-1} - π retoma su escalada ascendente hasta alcanzar un valor máximo de 793 mN/m, coincidiendo con una presión superficial de 25,3 mN/m. Como se puede observar, el máximo valor obtenido de C_s^{-1} es extraordinariamente elevado, tratándose por tanto de una monocapa en estado superficial *sólido*, de acuerdo con los valores establecidos por Davies y Rideal (antes citados). Resultados similares fueron obtenidos por Baglioni y otros autores (Baglioni, Cestelli, & Dei Gabrielli, 1985) (Luckham, Wood, Frogatt, & Swart, 1993) (Fidelio, Maggio, & Cumar, 1986). Aunque en la bibliografía también existen otros valores más dispares, como los de 650 mN/m que obtiene Makyla (Makyla & Paluch, 2009) o los 900 mN/m de Hac-Wydro (Hac-Wydro & Wydro, Chemistry and Physics of Lipids, 2007).



4.1.2 Microscopía de ángulo de Brewster

4.1.2.1 Espesor y configuración molecular

El registro del espesor relativo de la monocapa en función del área ocupada por la misma permite obtener más información sobre la orientación molecular de la monocapa de colesterol (**Figura 4.1.B**). Como se puede observar, el film de colesterol se mantiene sobre la superficie acuosa con un espesor de 0,25 nm mientras se encuentra en estado *gas*. Al comprimir la monocapa y alcanzar el valor de $52 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ el espesor experimenta un aumento instantáneo pasando bruscamente de 0,25 nm a 1,15 nm. A este valor comienza una falsa meseta (“seudomeseta”) en la que el espesor continúa incrementándose paulatinamente hasta alcanzar al final de la misma un espesor de 1,5 nm. A partir de este momento existe de nuevo un incremento brusco del espesor, estabilizándose en un valor promedio aproximado de 2,5 nm en una región en la que existen grandes picos de espesor.

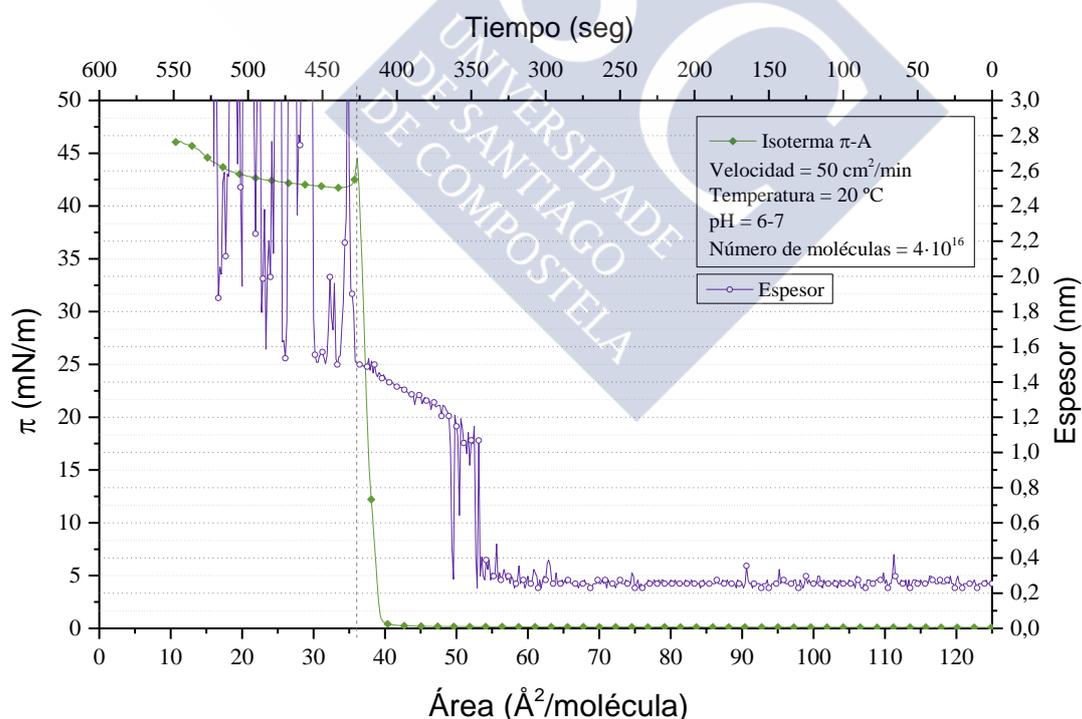


Figura 4.1.B.- Isoterma π -A y curva del espesor relativo de la monocapa de **colesterol**, extendida sobre agua a la temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$, con un depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

En esta figura se observa con claridad la existencia de un desfase de unos 14 Å²/molécula entre el incremento repentino del espesor y el incremento de la presión. Esta circunstancia es debida a que el microscopio de ángulo de Brewster está situado en la balanza de Langmuir en un lugar más próximo a la barrera móvil que comprime la monocapa que a la lámina de Wilhelmy que mide la presión superficial. De este modo, a medida que se comprime la monocapa, el microscopio de Brewster recibe antes la información del estado de la misma que el sensor de presión superficial (lámina de Wilhelmy). Además, la condensación de la monocapa comienza por la región más cercana a la barrera de compresión, por lo que cuando al microscopio le llega la monocapa condensada (en fase sólida), a la lámina de Wilhelmy todavía le está llegando la monocapa en estado expandido (fase gas). Por ello, se registra antes el incremento del espesor que el de la presión superficial. Este “decalaje” es más acusado cuando se comprimen sustancias que forman monocapas condensadas, en cuyo caso al comprimir la monocapa su desplazamiento desde la barrera móvil al sensor de presión es muy lento. Este es el caso del colesterol, cuya monocapa es muy rígida. Sin embargo, cuando se alcanza el colapso, desaparece este desfase debido a que en esta situación la distancia barrera-lámina es muy pequeña y, además, el colapso se transmite instantáneamente a todo el conjunto de la monocapa, llegando al mismo tiempo la información al microscopio y al sensor de presión.

De acuerdo con lo anterior, si no existiese este desfase la curva de espesor en la **Figura 4.1.B** coincidiría más o menos con la de la presión superficial, por lo que el primer incremento brusco del espesor desde 0,25 nm a 1,15 nm debe atribuirse a la transición *gas-sólido* de la monocapa, visualizada en la isoterma π -A por el aumento casi instantáneo de la presión superficial desde $\pi = 0$ a $\pi = 43$ mN/m, aproximadamente. Del mismo modo, la falsa meseta de espesor comprendida entre 1,15 nm y 1,5 nm, previa al colapso de la monocapa, podría deberse a un cambio conformacional de la molécula de colesterol, tal como se verá más adelante. Llegado al colapso, el incremento brusco del espesor desde 1,5 nm hasta 2,5 nm se atribuye a la formación y crecimiento de los núcleos de fase colapsada, puestos de manifiesto en las imágenes BAM que se describirán más adelante.

Para determinar la configuración de las moléculas de colesterol en las diferentes fases de la monocapa y poder confirmar lo hasta aquí expuesto, se debe medir previamente la longitud de la molécula, prescindiendo del grupo hidroxilo ya que en la monocapa este grupo se encuentra sumergido en el agua del sustrato. Por ello, tomamos como punto inicial de medida la posición del C 3 del anillo ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano, donde se encuentra anclado el grupo OH al sustrato, y medimos la longitud de la molécula hasta la posición 17, de donde parte la cadena alifática ramificada de 8 átomos de carbono. Según la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI - PubChem), esta distancia es de 8,71 Å. Por otro lado, la longitud de la cadena alifática puede variar desde 2,55 Å hasta 5,5 Å (NCBI – PubChem) en función de si la cadena se encuentra orientada perpendicularmente o paralelamente con relación al eje principal de la molécula. Teniendo en cuenta estos datos, la máxima longitud posible de una molécula de colesterol (con la cadena alifática perpendicular a la superficie del agua) formando parte de una monocapa sería de 14,21 Å, valor muy próximo al del espesor que hemos obtenido al inicio del colapso (1,5 nm, es decir, 15 Å).

Por otro lado, la longitud del colesterol cuando su cadena alifática se dispone paralelamente al sustrato, manteniéndose el anillo esterano perpendicular al mismo, es de 11,26 Å, valor también muy próximo al del espesor registrado al inicio de la “seudomeseta” (1,15 nm). En este caso existe también la posibilidad de que la molécula de colesterol presente otras configuraciones, por ejemplo, que el anillo esterano no se encuentre orientado completamente de forma perpendicular a la superficie del sustrato, o que el resto alifático no se encuentre del todo orientado horizontalmente, sino formando un cierto ángulo con el eje horizontal. Estas opciones se desecharon al entender que presentan menos estabilidad termodinámica.

Por último, el espesor obtenido experimentalmente para la monocapa de colesterol durante la fase *gas* ha sido de 2,5 Å (0,25 nm). Para alcanzar este valor tan bajo, el anillo ciclopentanoperhidrofenantreno no puede estar orientado verticalmente respecto al sustrato, sino con una cierta inclinación, al tiempo que la cadena alifática debe estar orientada paralelamente a la superficie de agua. Por trigonometría, el ángulo

de inclinación calculado para que la molécula de colesterol tenga un espesor de 0,25 nm es de 13° con relación a la superficie del agua.

La **Ilustración 4.1.A** muestra una representación tridimensional de la configuración molecular que presenta el colesterol en los diferentes estados por los que atraviesa su monocapa. Durante la fase *gas* se postula que las moléculas en la monocapa de colesterol se encuentran inclinadas 13° y manteniendo paralelo el resto alifático con respecto al sustrato acuoso. Esta particular orientación explica el bajo valor del espesor en esta fase (0,25 nm). Al iniciarse la “seudomeseta” el anillo esterano de la molécula de colesterol se encuentra orientado perpendicularmente con relación al sustrato, manteniendo la cadena alifática en posición paralela. De acuerdo con esto se postula que el aumento brusco del espesor que tiene lugar cuando la monocapa pasa del estado *gas* al *sólido* se debe al cambio de orientación del esterano desde la posición inclinada a la vertical. Finalmente, a medida que la compresión sigue su curso, el resto alifático de la cadena lateral del colesterol empieza a elevarse paulatinamente a lo largo de la “seudomeseta” hasta el inicio del colapso.

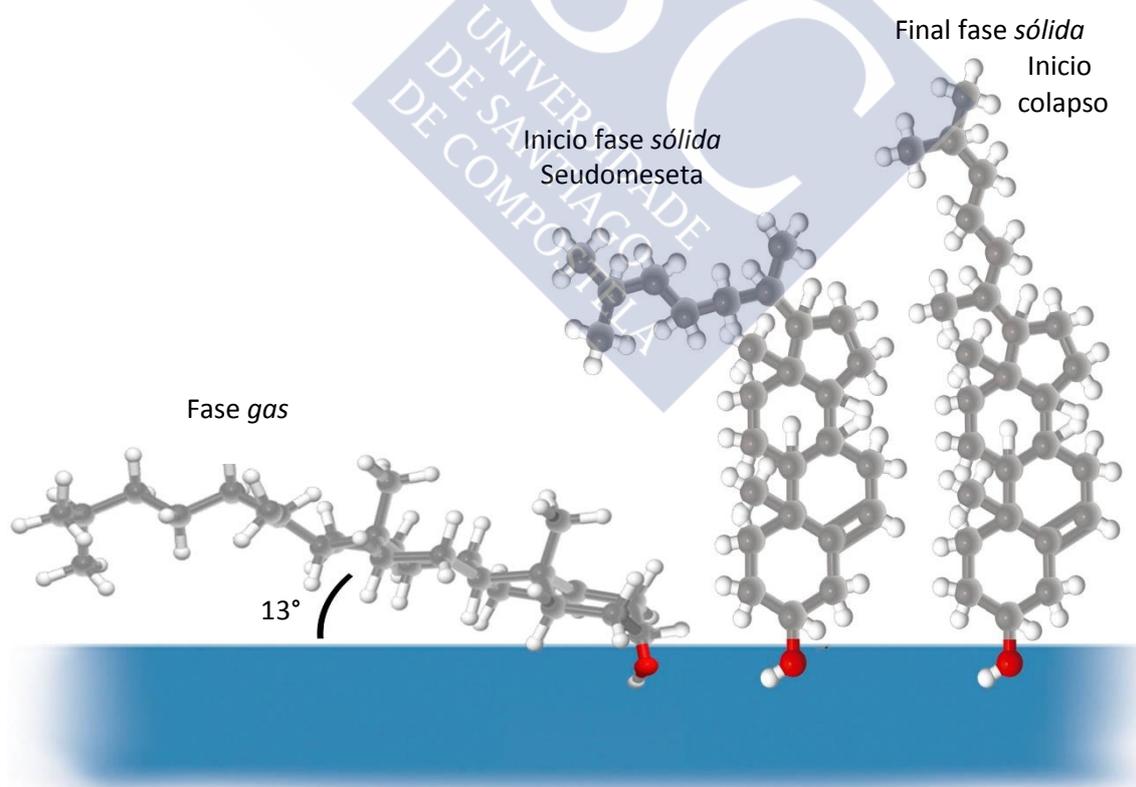


Ilustración 4.1.A.- Representación tridimensional de la conformación molecular que presenta el colesterol en los diferentes estados por los que atraviesa su monocapa.

4.1.2.2 Imágenes BAM y morfología

Para el análisis morfológico de la monocapa de colesterol se registraron imágenes con el microscopio de ángulo de Brewster (BAM) (**Ilustración 4.1.B**). Estas fotografías fueron tomadas en diferentes puntos de la isoterma π -A (**Figura 4.1.C**).

Las **Imágenes A y B**, correspondientes a la fase *gas*, muestran la existencia de grandes dominios grisáceos de colesterol que contienen gotas de agua en su interior, de distinto tamaño, las cuales vistas al microscopio no reflejan la luz polarizada del BAM, por lo que se visualizan de color negro. A estas estructuras se les denomina *espumas* por su semejanza con éstas.

A medida que se comprime la monocapa, las *espumas* se van fusionando y aumentando de tamaño, al tiempo que durante la fusión se expulsan las gotas de agua de su interior, desapareciendo las regiones oscuras (**Imagen C**). Coincidiendo con el incremento de la presión superficial desaparece por completo el agua interior, mostrando una imagen homogénea en la que el colesterol se convierte en único protagonista (**Imagen D**). Esta imagen se mantiene a lo largo de la fase *sólida*, coincidiendo con un estado de elevado empaquetamiento y alta presión superficial.

La imagen homogénea desaparece cuando se produce el colapso, dando lugar a la génesis de importantes núcleos de condensación de monocapa en estado tridimensional (**Imagen E**). Al reducirse el área molecular disponible, estas estructuras se unen en forma de “bastoncillos” con un tamaño variable de entre 4 y 7 Å (**Imagen F**). Estos “bastoncillos” son los responsables de la existencia de picos de espesor de intensidad variable, ya que al pasar los “bastoncillos” bajo el detector del BAM e incidir la luz polarizada sobre ellos se obtiene una señal intensa que da lugar a un pico, seguida de una falta de señal cuando pasa el agua del sustrato bajo el detector.

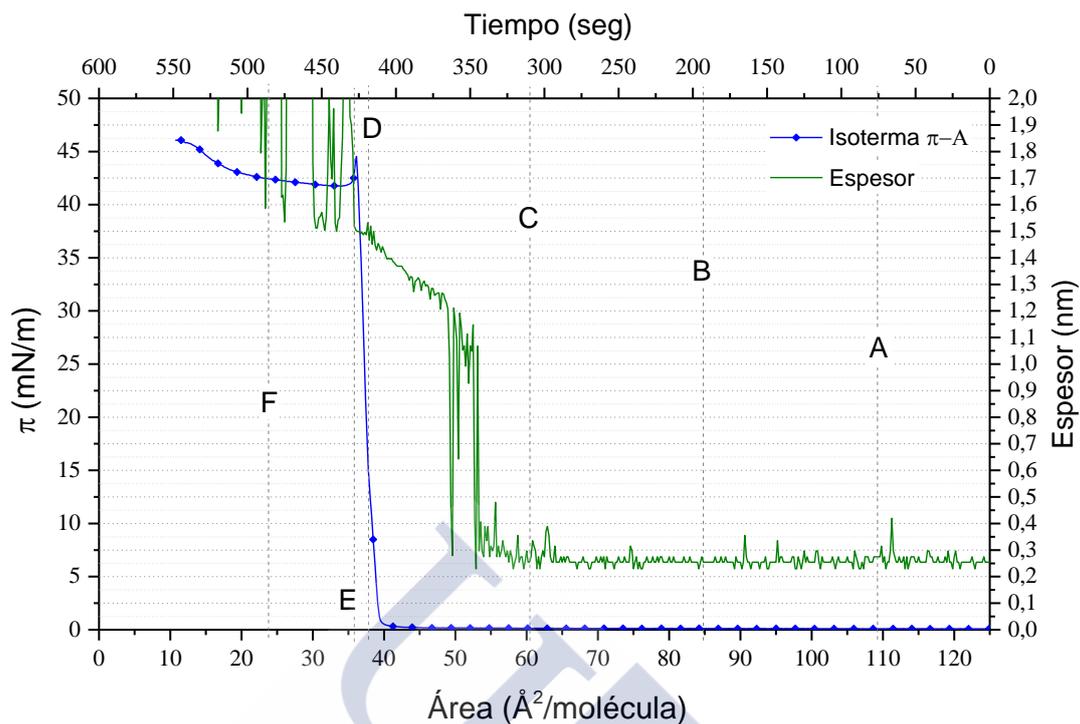


Figura 4.1.C.- Isoterma π -A y curva del espesor de la monocapa de **colesterol**, extendida sobre agua a la temperatura de 20 °C. Diferentes puntos en los que se tomaron las imágenes BAM señalados con A, B, C, D, E y F.

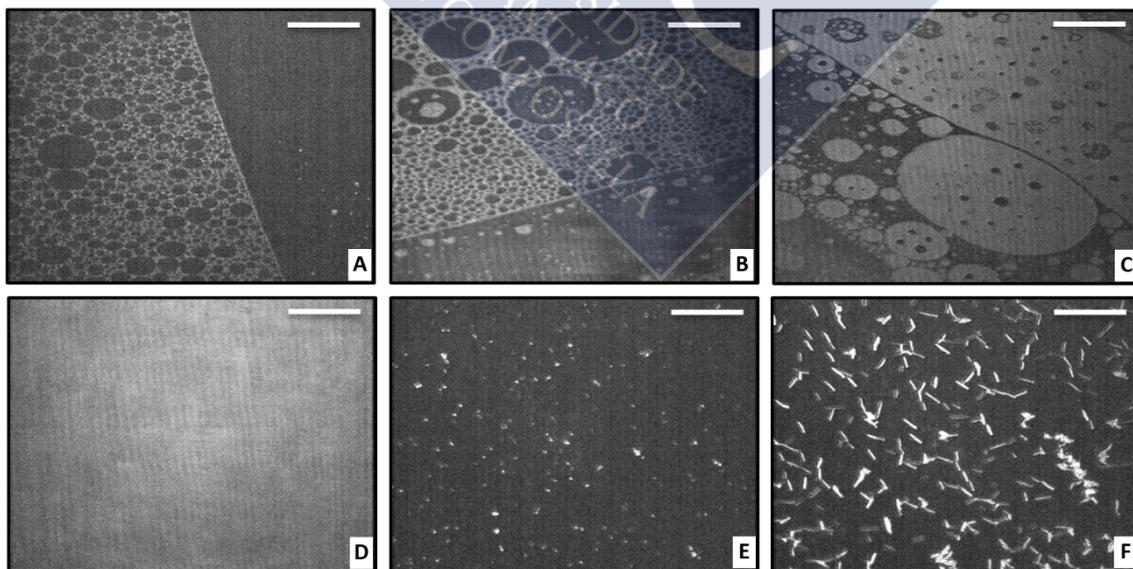


Ilustración 4.1.A.- Imágenes BAM de la monocapa de ácido colesterol puro, correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a pH 6-7 y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.1.3 Influencia del número de moléculas

Se realizó un estudio del número de moléculas depositadas en la superficie del agua para analizar la influencia que la variación de las mismas puede tener en las isothermas π -A (Figura 4.1.D). El experimento se realizó manteniendo iguales el resto de condiciones experimentales. Se depositaron $2 \cdot 10^{16}$, $4 \cdot 10^{16}$ y $6 \cdot 10^{16}$ moléculas de colesterol.

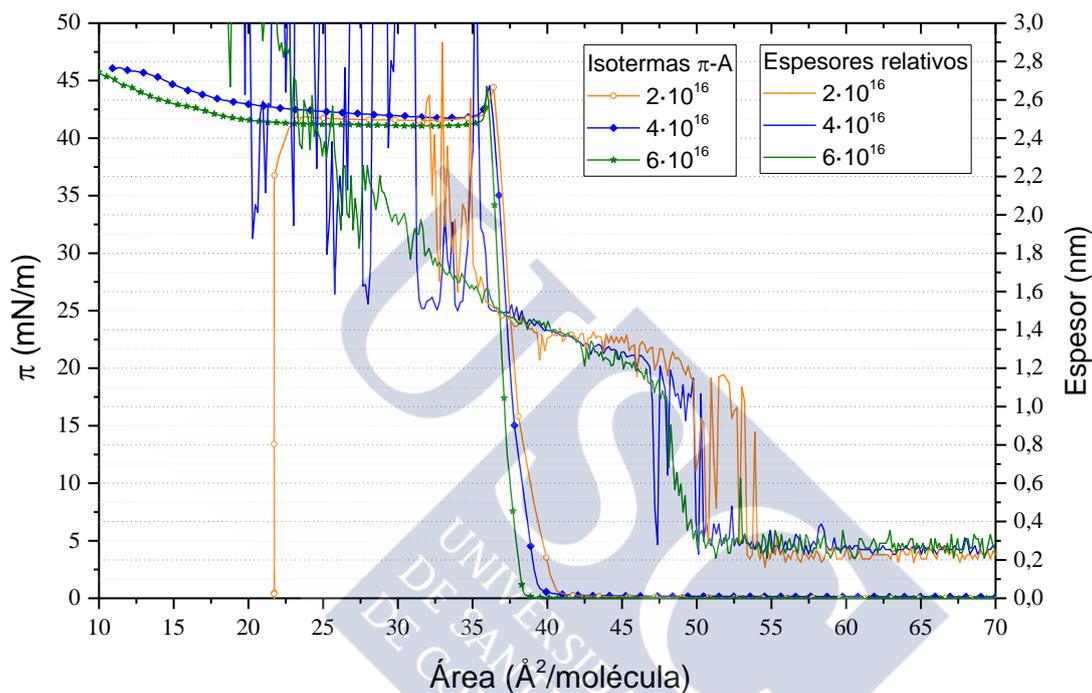


Figura 4.1.D.- Isothermas π -A y curvas del espesor de las monocapas de **colesterol**, correspondientes al depósito de diferentes cantidades de moléculas, extendidas sobre la interfase aire/agua a la temperatura de 20 °C y a velocidad de compresión de 50 cm^2/min .

Los resultados obtenidos indican ligeras variaciones en el área; en concreto, el valor de ésta disminuye con el aumento del número de moléculas depositadas, puesto que éstas no disponen del área necesaria para su presencia en la interfase, hundiéndose en el sustrato.

Las pendientes de las isothermas aumentan ligeramente con el incremento del número de moléculas; esto es debido a que, a pesar de mantener la velocidad de la compresión constante, la velocidad en $\text{Å}^2/\text{molec} \cdot \text{min}$ disminuye al aumentar el número de moléculas ya que a cada una de ellas le corresponde menos superficie. Así pues, una

mayor velocidad en $\text{\AA}^2/\text{molec}\cdot\text{min}$, supone menos tiempo para el empaquetamiento de la monocapa, dando lugar a una isoterma con menor pendiente.

En la **Tabla 3.1.A** aparecen recogidos los datos correspondientes a varios parámetros característicos de las monocapas de colesterol, tales como el área límite en el estado *sólido* ($A_{0(s)}$), la presión y el área a los que tiene lugar el colapso (π_c y A_c respectivamente), el espesor durante la fase *gas* (E_G), y los espesores al inicio y al final de la fase sólida ($E_{S(\text{inicial})}$ y $E_{S(\text{final})}$).

Número de moléculas	$A_{0(s)}$ ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	A_c ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	E_G (nm)	$E_{S(\text{inicial})}$ (nm)	$E_{S(\text{final})}$ (nm)
$2\cdot 10^{16}$	38,9	44,4	36,4	0,23	1,1	1,45
$4\cdot 10^{16}$	38,6	44,5	36,1	0,25	1,15	1,5
$6\cdot 10^{16}$	37,8	44,5	35,9	0,27	1,05	1,47

Tabla 4.1.A.- Valores de parámetros característicos de monocapas de colesterol obtenidos sobre agua por extensión de diferente número de moléculas.

4.1.4 Influencia de la temperatura

El estudio de la influencia de la temperatura (**Figura 4.1.E**) muestra claramente que el área de la isoterma del colesterol apenas se ve influenciada por la variación de la misma. Sin embargo, sí se observan pequeñas diferencias en los valores del módulo de compresibilidad correspondientes a la pequeña meseta situada entre los valores de 5 y 10 mN/m.

En la bibliografía existen estudios similares en los que tampoco se observaron cambios en las características de la monocapa de colesterol por variaciones de temperatura (Cadena-Nava, Martín-Mirones, Vázquez-Martínez, Roca, & Ruiz-García, 2006) (Seoane, Miñones, Conde, & Miñones Jr., 2000).

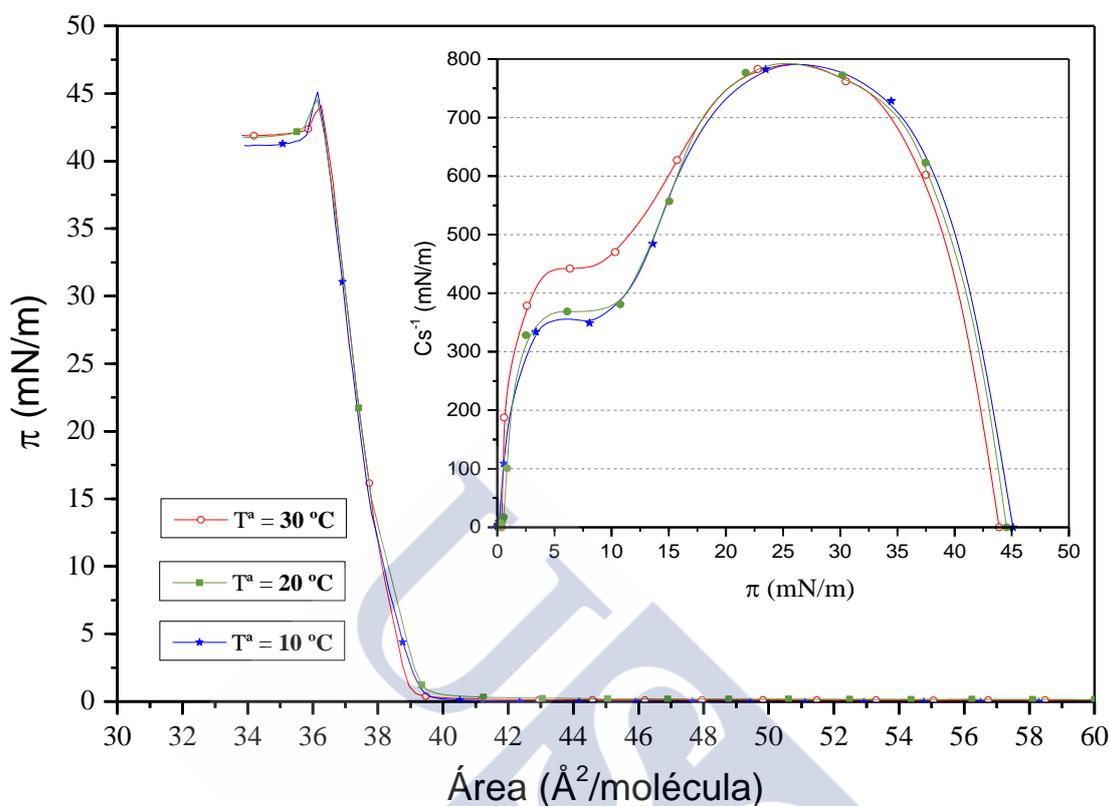


Figura 4.1.E.- Isothermas π -A de las monocapas de *colesterol*, extendidas sobre agua a diferentes temperaturas. En el interior, representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión.

Los valores correspondientes a diferentes parámetros de la monocapa de *colesterol* a diferentes temperaturas, tales como área inicial bajo la curva (A_0), área límite de la fase sólida extrapolada a presión cero ($A_{0(s)}$), presión superficial de colapso (π_c), área molecular a la cual se produce dicho colapso (A_c), valor de módulo de compresibilidad en la meseta ($C_s^{-1}(\text{meseta})$), y módulo de compresibilidad máximo (C_s^{-1}), se muestran en la **Tabla 4.1.B**.

Temperatura ($^\circ\text{C}$)	A_0 ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	$A_{0(s)}$ ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	A_c ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	$C_s^{-1}(\text{meseta})$ (mN/m)	C_s^{-1} (mN/m)
10	39,6	38,6	45,1	36,2	353	791
20	39,5	38,6	44,5	36,1	370	793
30	39,3	38,6	44,1	36,3	442	790

Tabla 4.1.B.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido esteárico obtenidos sobre agua a diferentes temperaturas.

4.2 ÁCIDO ESTEÁRICO

4.2.1 Isoterma π -A y módulo de compresibilidad

La isoterma presión superficial-área (π -A) resultante de extender una monocapa de ácido esteárico (18:1) sobre sustrato acuoso a la temperatura de 20 °C se muestra en la **Figura 4.2.A**. A áreas moleculares superiores a 26 Å²/molécula, el film adopta un estado expandido o estado *gas* (**G**), en el que las moléculas se encuentran tan alejadas entre sí que la compresión de las mismas no modifica la presión superficial. Sin embargo, al continuar la compresión de la monocapa, se produce un aumento continuo de la presión superficial debido al empaquetamiento molecular progresivo que sufren las moléculas. En estas circunstancias, la monocapa adopta un estado condensado, concretamente el estado de *líquido condensado* (**LC**) en un primer momento y, posteriormente, *sólido* (**S**).

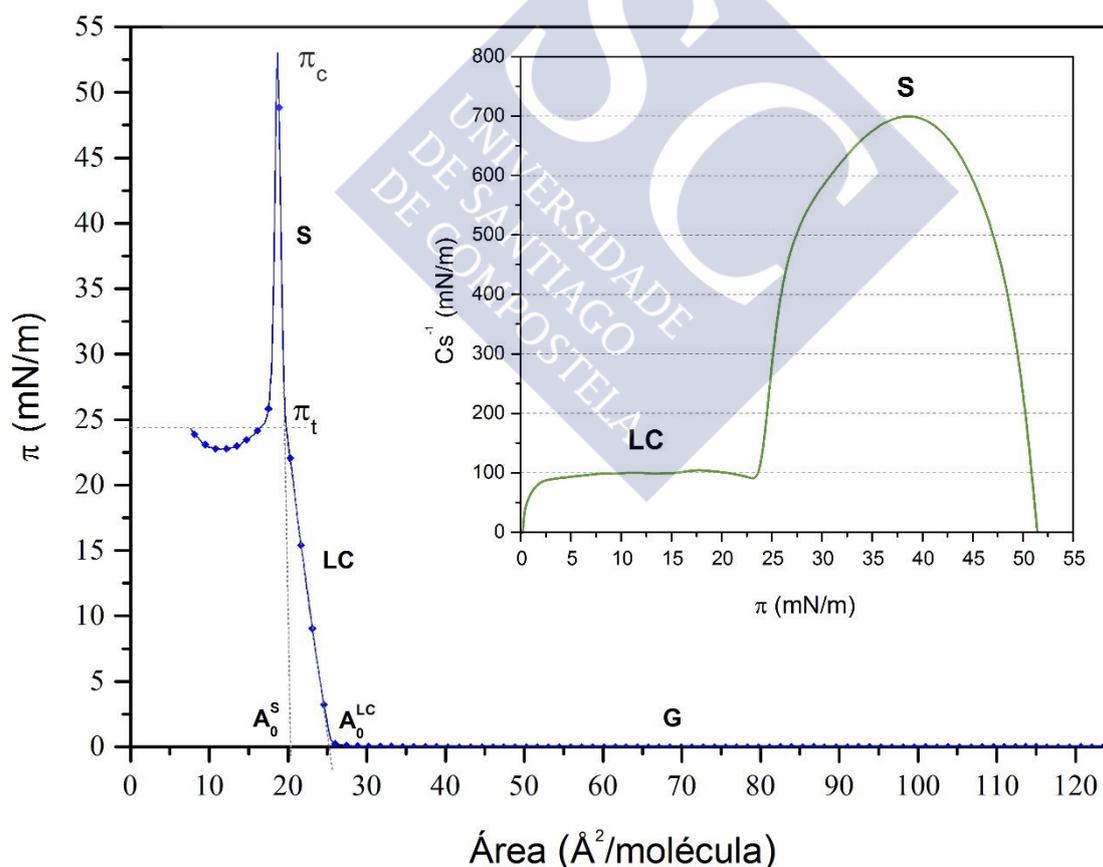


Figura 4.2.A.- Isoterma π -A de la monocapa de **ácido esteárico**, correspondiente al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a la temperatura de 20 °C, pH de 6-7 y comprimida a la velocidad de 50 cm²/min. En el interior, representación del módulo de compresibilidad frente a la presión.

La transición entre ambos estados viene marcada por una discontinuidad en el módulo de compresibilidad a la presión de 24,4 mN/m (recuadro en la figura), característica de un cambio de fase de primer orden. Por extrapolación a presión cero de la región de la isoterma correspondiente al estado *líquido condensado* se obtiene un área límite de $A_{0(LC)} = 25,2 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$.

En el estado *sólido* la monocapa es muy poco compresible como consecuencia del fuerte empaquetamiento de las moléculas. Su módulo de compresibilidad llega a alcanzar un valor muy elevado (702 mN/m), típico de monocapas en este estado. El área límite de la monocapa correspondiente a esta fase es de $A_{0(S)} = 20,3 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, valor coincidente con el obtenido por otros autores (Hifeda & Rayfield, 1985) (Tomoaia-Cotisel, Zsakó, Mocanu, Lupea, & Chifu, 1987), aunque algunos refieren valores próximos a $22 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ (Seoane, y otros, J. Phys. Chem. B, 2000) (Hwang & Kim, 1999) (Datta, Sanyal, Dhanabalan, & Major, 1997).

Como vimos anteriormente, la presión de colapso nos informa acerca de la mayor o menor polaridad de los grupos hidrofílicos de las moléculas que constituyen el film. Las monocapas de surfactantes que se encuentran en estado líquido en fase volumen colapsan de forma reversible a valores de presión que coinciden con los de sus *presiones de extensión de equilibrio*. Sin embargo, las monocapas de surfactantes sólidos, como el ácido esteárico, presentan dos tipos diferentes de colapso: por nucleación y crecimiento de los núcleos o por fractura de la monocapa (Smith & Berg, 1980).

Bajo las condiciones experimentales que se señalan en la leyenda al pie de la **Figura 4.2.A**, el valor obtenido para la presión de colapso del ácido esteárico fue de $\pi_c = 53 \text{ mN/m}$, en cuyo caso el área ocupada por el filme es de $18,7 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. El valor de presión concuerda con el registrado por algunos autores (Seoane, Dynarowicz-tstka, Miñones Jr., & Rey-Gómez Serranillos, 2001) (McFate, Ward, & Olmsted III, 1993) (Hwang & Kim, 1999). Sin embargo, otros refieren presiones de colapso más elevadas (Seoane, y otros, J. Phys. Chem. B, 2000) (Joos, Bull. Soc. Chim. Belg., 1971) (Hac-Wydro & Wydro, Chemistry and Physics of Lipids, 2007). Estas diferencias son debidas a la diferente velocidad de compresión utilizada en estos trabajos, ya que cuanto mayor sea

ésta, más elevada es la presión de colapso (Gaines G. L., Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces, 1966).

Así mismo, la forma del colapso en la isoterma, terminado en pico con una rápida caída de la presión superficial, fue atribuida a la formación de tricapas (McFate, Ward, & Olmsted III, 1993). En cualquier caso, es evidente que la presión a la que la monocapa alcanza el colapso es muy superior a su presión de extensión de equilibrio (π_{eq}), por lo que se halla en un estado termodinámico inestable, tendiendo espontáneamente a la estabilidad disminuyendo la presión superficial hasta alcanzar el valor de π_{eq} . Esto explica la brusca caída de π inmediatamente después del colapso.

La curva obtenida al representar el módulo de compresibilidad (C_s^{-1}) frente a la presión superficial (recuadro interior de la **Figura 4.2.A**), muestra dos regiones diferenciadas: una primera, donde C_s^{-1} es prácticamente independiente de la presión, con un valor medio del módulo de compresibilidad del orden de 105 mN/m. Según Davies y Rideal (1963), este valor es característico de monocapas en estado *líquido-condensado* (**LC**), como se ha comentado antes. La segunda región muestra un primer aumento rápido de la rigidez de la monocapa hasta alcanzar un valor de 500 mN/m, seguida de un aumento más moderado, hasta llegar finalmente a un valor de 702 mN/m, el cual corresponde, de acuerdo con la clasificación propuesta por los autores mencionados, al estado *sólido* (**S**).

4.2.2 Microscopía de ángulo de Brewster

4.2.2.1 Espesor y configuración molecular

El análisis del espesor relativo de las monocapas de ácido esteárico permite obtener información sobre la orientación de las moléculas. En la **Figura 4.2.B** se observa que el espesor de la monocapa, tras mantenerse constante en un valor aproximado de 0,5 nm desde el inicio de la compresión, experimenta un repentino aumento, adquiriendo un valor de 2,1 nm en un intervalo de áreas muy pequeño (del orden de 2 Å²/molécula), valor que se mantiene prácticamente constante hasta alcanzar el colapso (se debe recordar que debido al desfase entre la curva de espesor y la isoterma π -A la subida del espesor se produce antes que la de la presión superficial sincronizándose en el colapso).

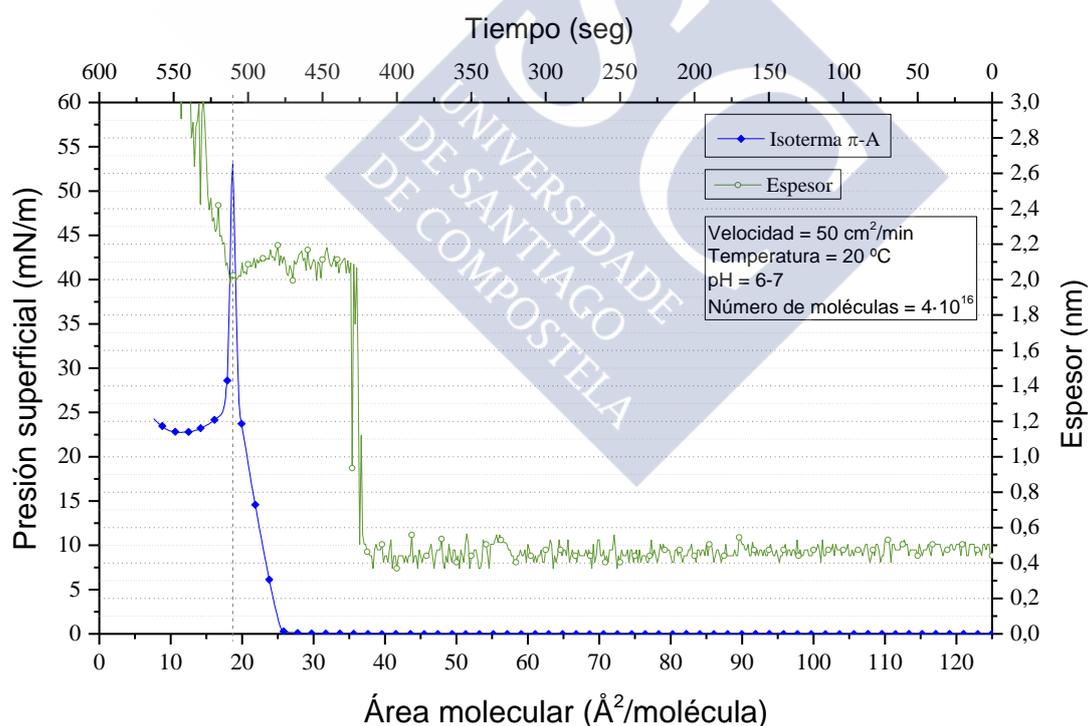


Figura 4.2.B.- Isoterma π -A y curva del espesor relativo de la monocapa de **ácido esteárico**.

El brusco aumento de espesor desde 0,5 nm hasta 2,1nm se atribuye a que las moléculas de ácido graso pasan de tener una posición casi horizontal en la superficie del agua a otra completamente perpendicular a la misma con las cabezas polares ancladas en el sustrato acuoso y las colas hidrofóbicas orientadas hacia el aire. La primera disposición molecular corresponde a la fase *gas*, mientras que la segunda ocurre durante las fases *líquido condensado* y, posteriormente, *sólida*.

En todas las experiencias realizadas se observó un leve mínimo del espesor (del orden de 0,1 nm) en el punto inmediatamente anterior al colapso. Es probable que bajo esta circunstancia de elevada presión superficial, las moléculas se hundan ligeramente en el agua en una cuantía próxima al valor mencionado.

Con el fin de confirmar la orientación de las moléculas que hemos propuesto para justificar la gráfica del espesor de la monocapa, se han comparado los resultados obtenidos experimentalmente del espesor con los datos teóricos de la longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido esteárico. Para ello, se tomó en consideración que la distancia entre dos átomos de carbono unidos por enlace simple es de 1,53 Å y que el ángulo entre los mismos es de 112° (Small, 1988) (estos datos fueron contrastados con los correspondientes a la base de datos del Centro Nacional estadounidense para la Información Biotecnológica, NBI-pubChem). Por otra parte, se ha considerado que los dos átomos de oxígeno del grupo ácido se encuentran sumergidos en el agua, excluyéndolos en el cálculo de la longitud de la cadena hidrocarbonada. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el valor obtenido para la longitud de la cadena fue de 2,19 nm, valor que coincide prácticamente con la medida experimental del espesor al final de la fase condensada (2,1 nm), como puede observarse en la Figura 4.2.B. Ante esta similitud de resultados, la suposición de una orientación perpendicular a la superficie del agua de las moléculas de ácido esteárico en su estado de máxima condensación parece correcta.

Cuando la monocapa se halla en estado *gaseoso*, en los inicios de la compresión, los resultados del espesor (0,5 nm) conducen a una inclinación de las moléculas de aproximadamente 12,5° respecto a la superficie del sustrato acuoso.

En la **Ilustración 4.2.A** se muestra una representación tridimensional de la configuración molecular de las moléculas del ácido esteárico para las fases *gas* y las *condensadas*.

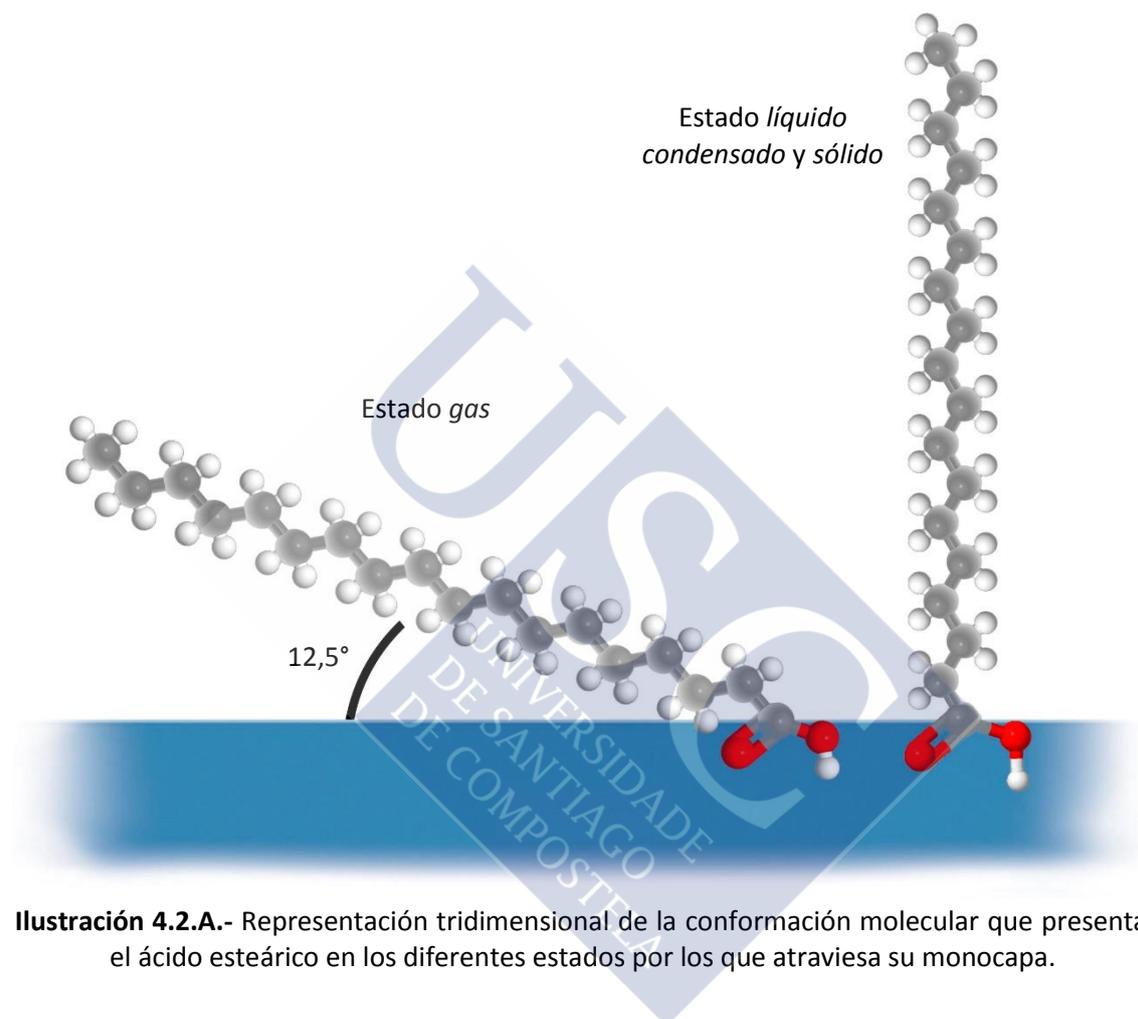


Ilustración 4.2.A.- Representación tridimensional de la conformación molecular que presenta el ácido esteárico en los diferentes estados por los que atraviesa su monocapa.

4.2.2.2 Imágenes BAM y morfología

Para el análisis morfológico de la monocapa de ácido esteárico se registraron imágenes con un microscopio de ángulo de Brewster (BAM). En la **Figura 4.2.C** se muestra la misma **Figura 4.2.B** que se acaba de comentar, pero ahora incluyendo los puntos, señalados mediante letras (**A-F**), en los que se tomaron las imágenes microscópicas, las cuales se presentan en la **Ilustración 4.2.B**.

La **imagen A**, correspondiente a grandes áreas durante la fase *gas*, muestra la existencia de grandes dominios de color gris claro, propios del ácido graso, rodeados o incrustados de zonas oscuras, características del sustrato acuoso. A medida que se comprime la monocapa, los dominios grisáceos se van juntando y desapareciendo las regiones oscuras (**imagen B**). Al llegar al área *lift-off* (área a la que la presión superficial y el espesor aumentan bruscamente), desaparecen por completo las zonas oscuras, convirtiéndose el ácido esteárico en único protagonista de la fotografía (**imagen C**).

En algunas de estas imágenes se observan con claridad sectores delimitados con diferentes densidades de color en cada dominio, evidenciándose una inversión del contraste de la imagen cuando se gira el analizador. Esto es debido a que el ácido esteárico es ópticamente anisotrópico, propiedad óptica muy frecuente en las monocapas formadas por moléculas anfifílicas alargadas constituidas por un grupo polar y una cadena hidrocarbonada apolar inclinada con un determinado ángulo respecto a la superficie de la interfase. Por ello, dependiendo de la dirección desde la que se observen los dominios, la imagen exhibe un contraste diferente.

Sobrepasada la fase *gas*, a lo largo de la fase líquido condensado, la imagen es más homogénea porque los dominios han crecido de tamaño y ocupan la mayor parte del campo de observación del microscopio. No obstante, esta imagen no es completamente homogénea como corresponde a una fase condensada (**imagen D**), poniéndose de manifiesto su heterogeneidad por la existencia de grandes saltos de espesor en la curva espesor-área. En la fase sólida (**imagen E**) desaparece la propiedad anisotrópica, presentando todos los dominios la misma densidad de color. Además, en esta imagen comienza a observarse la presencia de pequeños puntos brillantes

alineados en filamentos curvilíneos, que corresponden a la formación de “embriones” o pequeños núcleos tridimensionales de condensación, los cuales constituyen los gérmenes del colapso del film.

Finalmente, en la **imagen F** se observa de forma nítida los numerosos núcleos tridimensionales de condensación (puntos brillantes) que han crecido en número y tamaño como consecuencia del colapso de la monocapa. Estos son los responsables de los numerosos picos de ruido observados en la curva espesor-área.

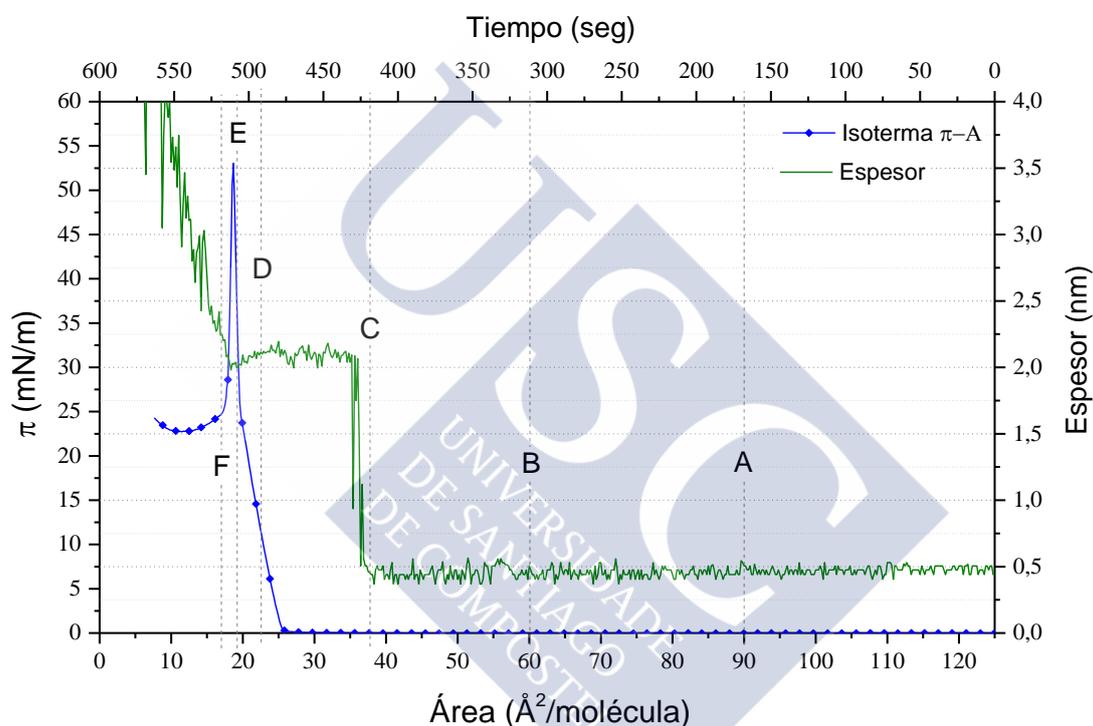


Figura 4.2.C.- Isoterma π -A e incremento del espesor de la monocapa de **ácido esteárico**, extendida sobre agua a la temperatura de 20 °C. Puntos en los que se tomaron las imágenes BAM (A, B, C, D, E y F).

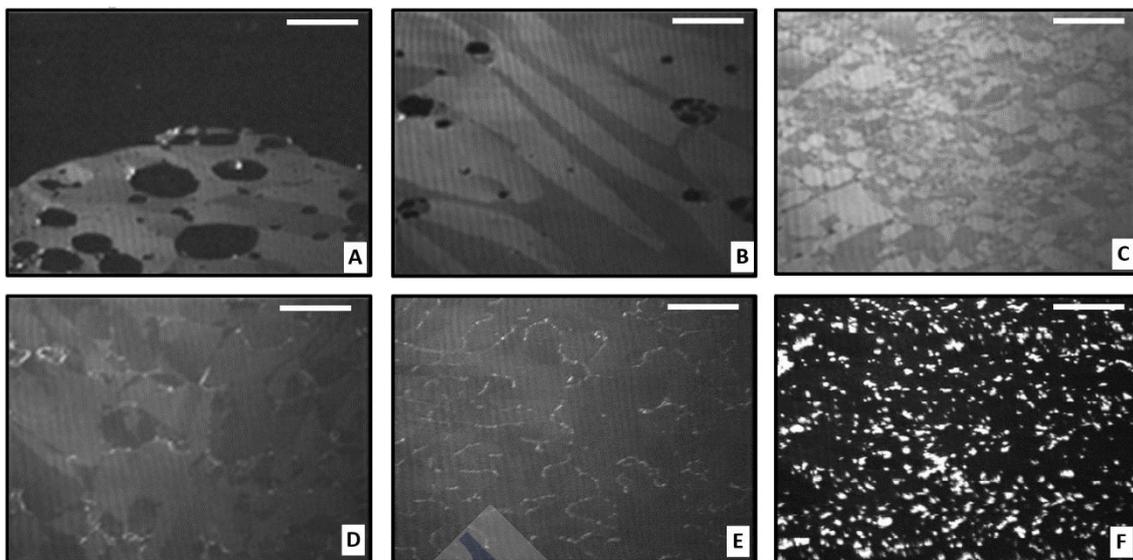


Ilustración 4.2.A.- *Imágenes BAM de la monocapa de ácido esteárico puro, correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a pH 6-7 y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.*



4.2.3 Influencia del número de moléculas

Se realizó un estudio de número de moléculas depositadas en la interfase agua/aire para analizar la influencia que la variación de las mismas puede tener en las isothermas π -A del ácido esteárico (**Figura 4.2.D**). El experimento se realizó manteniendo iguales el resto de condiciones experimentales. Se depositaron $2 \cdot 10^{16}$, $4 \cdot 10^{16}$ y $6 \cdot 10^{16}$ moléculas.

Los resultados obtenidos indican la existencia de cambios en el área molecular; en concreto, el valor de ésta disminuye con el aumento del número de moléculas depositadas. Sin embargo, los valores de presión superficial correspondientes a las distintas fases son muy similares, manteniéndose la misma forma de la isoterma para los diferentes números de moléculas. La disminución del área molecular con el aumento de la cantidad de moléculas depositadas podría ser debida a la expulsión de moléculas hacia la subfase como consecuencia de una saturación de la monocapa.

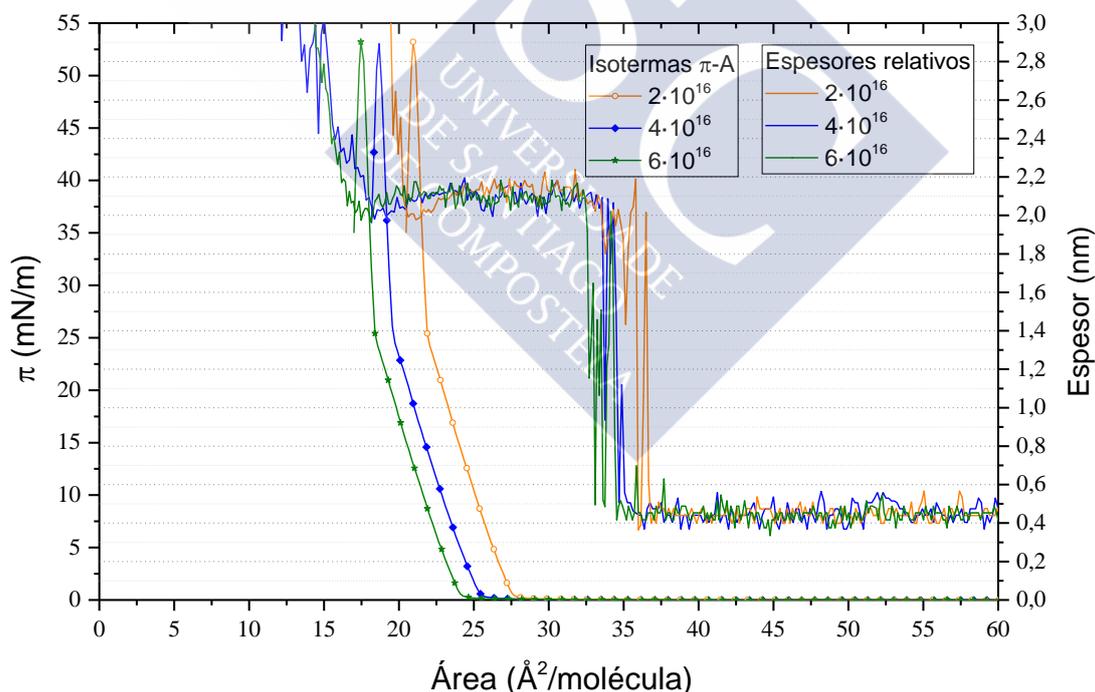


Figura 4.2.D.- Isothermas π -A y curvas de espesor de las monocapas de **ácido esteárico**, correspondientes al depósito de varios números de moléculas, extendida sobre la interfase aire/agua a la temperatura de 20 °C, pH 6-7 y comprimidas a la velocidad de 50 cm²/min.

Los parámetros más característicos de las monocapas de ácido esteárico obtenidas por extensión de diferente número de moléculas se presentan en la **Tabla 4.2.A**. Tales parámetros son: área límite correspondiente a la fase de *líquido condensado* ($A_{0(LC)}$), área límite en el estado *sólido* ($A_{0(S)}$), presión de transición de la fase *líquido condensado* a *sólido* (π_t), área a la que ocurre la transición (A_t), presión de colapso (π_c) y área de colapso (A_c).

Número de moléculas	$A_{0(LC)}$ ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	$A_{0(S)}$ ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	π_t (mN/m)	A_t ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	A_c ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)
$2 \cdot 10^{16}$	27,4	18,9	24,6	21,9	53,1	17,5
$4 \cdot 10^{16}$	25,2	20,3	24,4	19,7	53	18,7
$6 \cdot 10^{16}$	23,9	22,5	24,5	18,4	53,1	20,9

Tabla 4.2.A.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido esteárico correspondiente al depósito de diferente número de moléculas.

En ambos casos, el espesor obtenido presenta un comportamiento similar al exhibido por la monocapa correspondiente a un depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas (**Figura 4.2.B**). En efecto, durante la fase *gas* se registra un espesor cercano a 0,5 nm, con un incremento repentino del mismo antes de A_0 (área a la que la presión superficial comienza a aumentar de forma brusca), presentando el decalaje característico de monocapas condensadas comentado anteriormente. El aumento del espesor relativo propina un registro ligeramente inferior a los 2,2 nm, con un leve descenso antes de producirse el colapso. Con la ruptura del film se produce un solapamiento de moléculas confiriendo un instantáneo y abrupto incremento del espesor.

4.2.4 Influencia de la temperatura

El estudio de la influencia de la temperatura (**Figura 4.2.E**) muestra que a 10 °C el ácido esteárico presenta una monocapa con área molecular bastante inferiores, especialmente en la fase sólida, que las registradas a 20 °C y a 30 °C. Sin embargo, a estas dos últimas temperaturas la diferencia del área molecular es muy pequeña, del orden de 1 Å² y además poseen la misma rigidez, tal como lo evidencian los valores del módulo de compresibilidad representado en el recuadro de la figura.

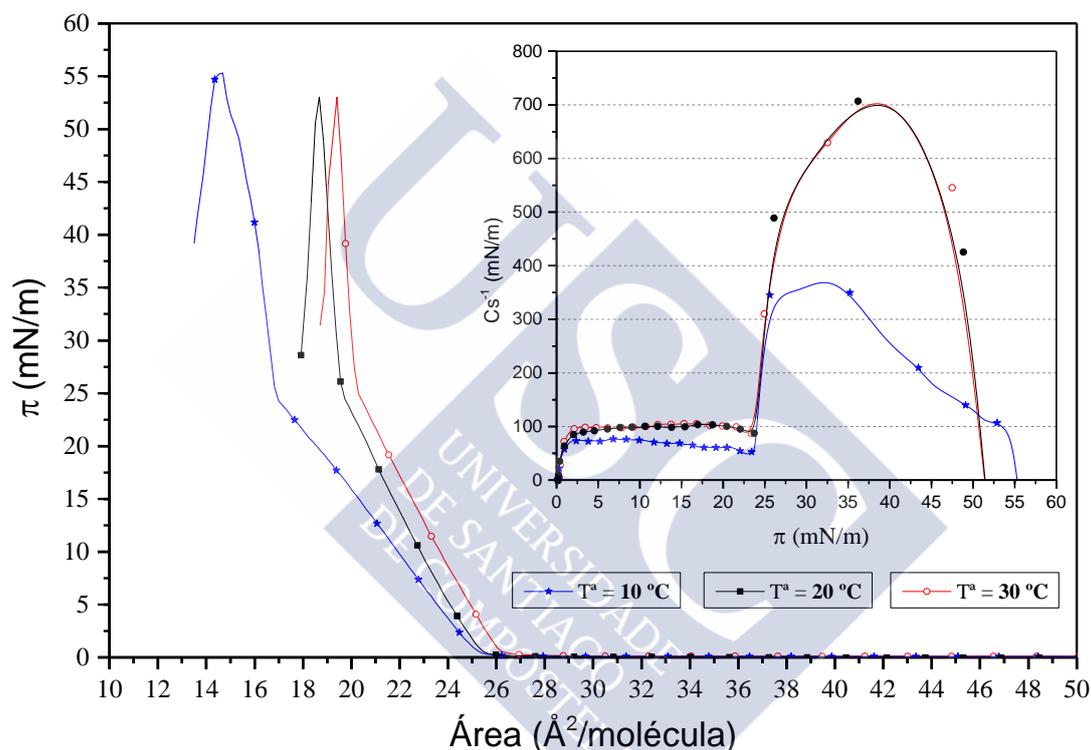


Figura 4.2.E.- Isothermas π -A de las monocapas de **ácido esteárico**, extendidas sobre agua a diferentes temperaturas, correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, comprimidas a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. En el interior, representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión.

El aumento del área ocupada por la monocapa por efecto de la temperatura se atribuye a la disminución de las atracciones de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas, así como a la reducción de las fuerzas de atracción dipolo-dipolo entre los grupos polares de las moléculas, lo que hace que las moléculas posean mayor libertad de movimiento y ocupen mayor área.

En la **Tabla 4.2.B** se muestran algunos parámetros característicos de las monocapas a las tres temperaturas estudiadas. Estos parámetros son: áreas límites correspondientes a la fase *liquido condensado* ($A_{0(LC)}$) y a la fase *sólida* ($A_{0(S)}$), presión de transición LC-S (π_t), presión de colapso (π_c) y módulos de compresibilidad correspondientes a la fase liquido condensado ($C_s^{-1(LC)}$) y fase sólida ($C_s^{-1(S)}$)

Temperatura (°C)	$A_{0(LC)}$ (Å ² /molécula)	$A_{0(S)}$ (Å ² /molécula)	π_t (mN/m)	π_c (mN/m)	$C_s^{-1(LC)}$ (mN/m)	$C_s^{-1(S)}$ (mN/m)
10	25,4	18,1	24,3	55,3	76,7	368
20	25,2	20,3	24,4	53	105	702
30	26	20,9	25	53	104,9	705

Tabla 4.2.B.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido esteárico obtenidos sobre agua a diferentes temperaturas.



4.3 ÁCIDO OLEICO

4.3.1 Isoterma π -A y módulo de compresibilidad

En la interfaz aire/agua, a 10 °C el ácido oleico (18:1, ω -9) da lugar a una monocapa cuya isoterma π -A aparece representada en la **Figura 4.3.A**. Se trata de una isoterma mucho más expandida que la del ácido esteárico; la razón está en la presencia del doble enlace en la cola apolar del ácido oleico, el cual influye en las propiedades de la monocapa impidiendo que las moléculas ocupen una menor área.

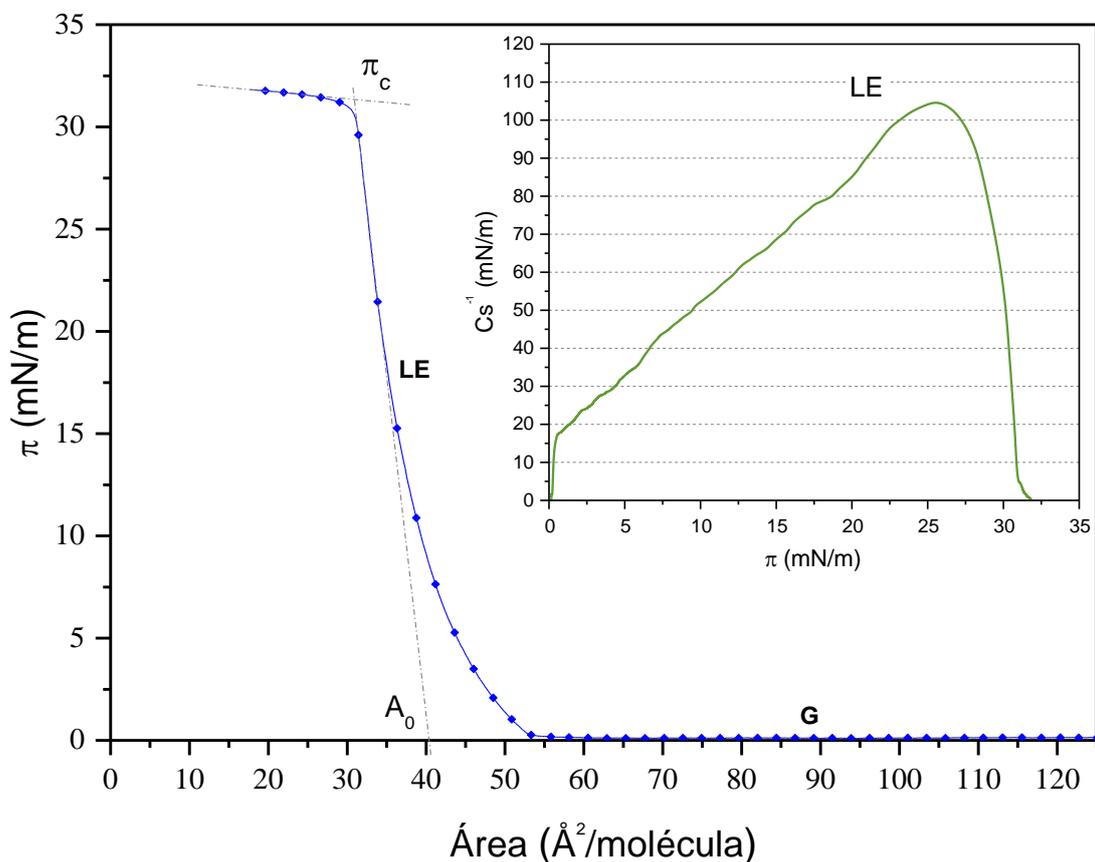


Figura 4.3.A.- Isoterma π -A de la monocapa de **ácido oleico**, correspondiente al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a la temperatura de 10 °C y comprimida a la velocidad de 50 cm^2/min . En el interior, representación del módulo de compresibilidad frente a la presión.

La presión superficial se mantiene inalterada durante la compresión hasta que el área alcanza un valor de $53 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, momento en el cual aumenta paulatina e ininterrumpidamente, como corresponde a un estado *líquido expandido*. Dicho valor coincide con el obtenido por otros autores (Seoane, Dynarowicz-tstka, Miñones Jr., & Rey-Gómez Serranillos, 2001) (Hac-Wydro & Wydro, Chemistry and Physics of Lipids, 2007)..

El área límite o área extrapolada a presión cero, trazada a partir del segmento de mayor pendiente de la región de *líquido expandido* ($A_{0(\text{LE})}$) es de $40,4 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, similar a la obtenida por Tomoia-Cotisel et al. (1987) y ligeramente inferior a los $42 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ que señalan otros autores (Seoane, y otros, J. Phys. Chem. B, 2000) (Peltonen, 1989).

A presiones inferiores a 20 mN/m el módulo de compresibilidad es inferior a 80 mN/m , valor que corresponde a un estado *líquido-expandido (LE)*. Sin embargo, a presiones elevadas se llega a alcanza un valor $104,6 \text{ mN/m}$, característico de monocapas en estado *líquido condensado*. Estos resultados hacen pensar que existe una transición de fases desde un estado *líquido expandido* a otro *líquido condensado*, sin existencia de una meseta de presión constante en la isoterma π -A, característica de las transiciones de primer orden. En la isoterma y en la gráfica del módulo de compresibilidad solo se observa una pequeña discontinuidad a la presión aproximada de 20 mN/m , indicativa de una posible transición de fases de segundo orden.

Se ha tomado como valor de la presión de colapso π_c la intersección de las dos tangentes trazadas en la isoterma: por un lado, la correspondiente al área extrapolada a presión cero de la región de *líquido expandido* y, por otro, la formada por los valores posteriores al colapso. Así pues, el valor de presión de colapso obtenido fue de $\pi_c = 31,4 \text{ mN/m}$, presión bastante inferior a la del ácido esteárico. Dicho resultado es consistente con los obtenidos por otros autores (Seoane, y otros, J. Phys. Chem. B, 2000) (Gericke & Hühnerfuss, 1995) (Hac-Wydro & Wydro, Chemistry and Physics of Lipids, 2007). Al continuar comprimiendo la monocapa tras el colapso, y tal como ocurre en este tipo de monocapas, la presión superficial sigue aumentando continuamente hasta alcanzar $31,8 \text{ mN/m}$.

4.3.2 Microscopía de ángulo de Brewster

4.3.2.1 Espesor y configuración molecular

Conforme a lo presentado en la **Figura 4.3.B**, se produce un incremento continuado del espesor de la monocapa simultáneamente con el inicio de la fase de *líquido expandido*. En este punto, se postula que las moléculas de ácido oleico pasan de una posición horizontal en la interfase a otra cada vez más vertical, aumentando de esta manera el espesor de forma progresiva. Cuando se alcanza el colapso, el espesor aumenta súbitamente debido a la ruptura del film y formación de multicapas.

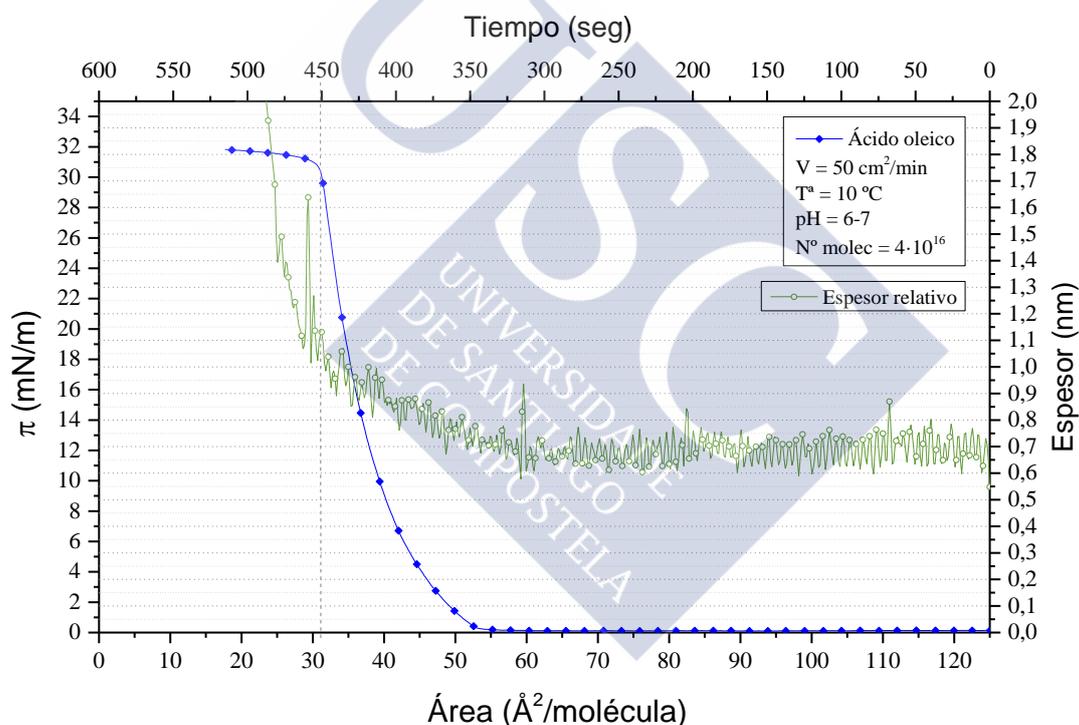


Figura 4.3.B.- Isoterma π -A e incremento del espesor de la monocapa de **ácido oleico**, extendida sobre agua a la temperatura de 10 °C, con un depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimida a la velocidad de 50 cm^2/min .

La simple presencia del doble enlace en la molécula cambia por completo la forma de la gráfica espesor-área molecular de la monocapa. En el caso del ácido esteárico, estudiado en la sección anterior, cuya monocapa es de tipo condensado, las moléculas experimentaban un cambio de orientación instantáneo, pasando de una posición casi horizontal ($12,5^\circ$) a otra vertical. Sin embargo, la insaturación presente en el ácido oleico (ácido graso omega 9) nos muestra un escenario completamente diferente, en el que las moléculas se reordenan e inclinan de forma paulatina y constante hasta alcanzar el colapso.

Con el fin confirmar la distinta orientación de la molécula de ácido oleico en la superficie del agua, según el estado físico en que se encuentre la monocapa, se procedió a la determinación de su tamaño, de la misma forma que se hizo con el ácido esteárico. La conformación de mayor estabilidad de la molécula en su forma tridimensional (NBI-pubChem) viene recogida en la **Ilustración 4.3.A**. De acuerdo con esta configuración, se calculó la longitud de la cadena hidrocarbonada desde el carbono carboxílico (punto de anclaje de la molécula en el agua de la subfase) hasta el carbono 12, que es el más alejado de dicho lugar de anclaje y que, por tanto, determina el máximo valor del espesor de la monocapa en el supuesto de que la molécula se encuentre orientada verticalmente en el sustrato. El valor obtenido de esta medida fue de 1,17 nm.

En la **Figura 4.3.B** se observa que durante el tiempo en que la monocapa permanece en estado *gas*, el espesor medio de la molécula es de 0,69 nm. Admitiendo que en esta situación la molécula se encuentra más o menos acostada sobre la superficie del agua del sustrato, se calculó por trigonometría el valor que debe tener el ángulo de inclinación de la misma para que el espesor valga 0,69 nm, teniendo en cuenta que su longitud es 1,17 nm. El valor obtenido fue de $38,5^\circ$ respecto al plano de la interfase. Por tanto, se sugiere que en fase *gas* las moléculas del ácido graso están orientadas horizontalmente en el agua con esta inclinación.

Al continuar la compresión de la monocapa tras la fase *gaseosa* se reduce el área superficial disponible para las moléculas y se supone que éstas cambian de orientación a lo largo de la fase líquido expandido, aumentando su ángulo de inclinación con relación

a la superficie del agua. Inmediatamente antes del colapso, el espesor de la monocapa alcanza un valor aproximado de 1,1 nm, valor muy próximo a la longitud de la cadena hidrocarbonada correspondiente a la configuración propuesta (1,17 nm). Este resultado nos lleva a pensar que la molécula probablemente llegue a estar completamente vertical cuando alcanza su estado de máximo empaquetamiento.

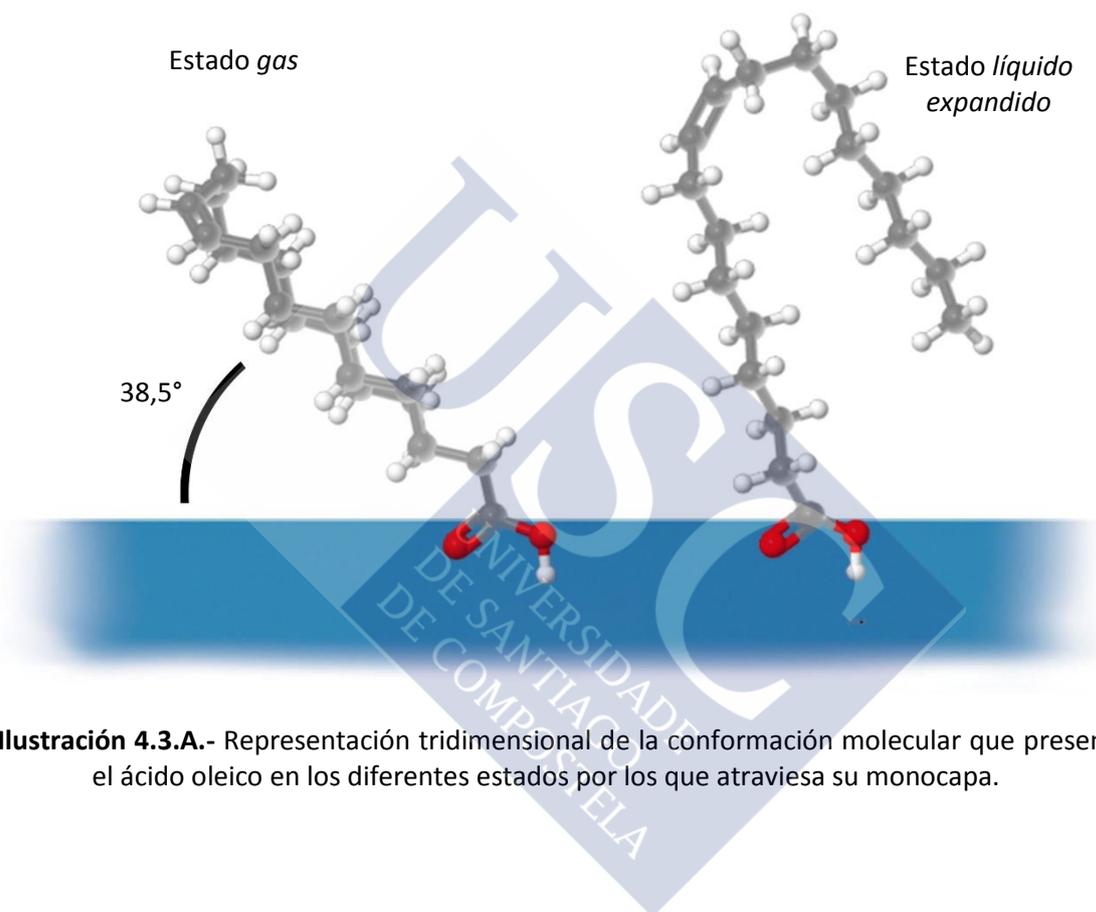


Ilustración 4.3.A.- Representación tridimensional de la conformación molecular que presenta el ácido oleico en los diferentes estados por los que atraviesa su monocapa.

4.3.2.2 Imágenes BAM y morfología

El estudio del ácido oleico se complementó con el análisis de las imágenes BAM, las cuales corresponden a los puntos señalados en la isoterma π -A de la **Figura 4.3.C**. Se observaron tres situaciones bien diferenciadas:

- Una primera durante la cual la monocapa de ácido oleico se encuentra en estado *gas*, donde se observan pequeños dominios claros y ovoides sobre fondo más oscuro de agua (**Imagen A** de la **Ilustración 4.3.A**), cuyo tamaño va en aumento a medida que se reduce el área (**Imagen B**). Este tamaño varía desde 4 μm en el caso de los más pequeños hasta 30 μm en los de mayor tamaño. En la **imagen C** los dominios se han fusionado casi al completo, quedando delimitados unos de otros por zonas pequeñísimas de agua. Esta imagen se ha obtenido en los instantes previos al inicio del incremento de presión y de espesor. Se debe señalar que, a diferencia de las monocapas rígidas de colesterol y ácido esteárico, donde existe un claro desfase entre la gráfica espesor-área y la isoterma presión-área, en la monocapa expandida de ácido oleico no existe este “decalaje”.

- Una segunda etapa caracterizada por una imagen completamente homogénea (**Imagen D**), que corresponde a la monocapa en estado *líquido expandido*. En esta situación se sugiere que las moléculas de ácido oleico se encuentran en íntimo contacto unas con otras ocupando toda la superficie del sustrato acuoso, por lo que la compresión de la monocapa en estas condiciones debe originar un cambio de conformación molecular en virtud del cual aumenta de forma continua el ángulo de inclinación de las moléculas respecto de la interfaz, tal como se indicó antes. Esta situación se mantiene hasta instantes previos a producirse el colapso del film.

- Por último, alcanzado el colapso se forman pequeños núcleos de condensación (**Imagen E**) que a medida que progresa la compresión se van alineando en filas formadas por pequeños dominios tridimensionales (puntos brillantes en la **Imagen F**), que constituyen la fase colapsada durante la cual la presión superficial se mantiene constante.

A diferencia del ácido esteárico, cuando se realizaron las fotografías de la monocapa de ácido oleico no se observó la existencia de anisotropía en ninguno de los estados superficiales por los que atraviesa la monocapa de ácido oleico. Sin duda, la presencia de la insaturación es la responsable de la ausencia de dicha propiedad óptica.

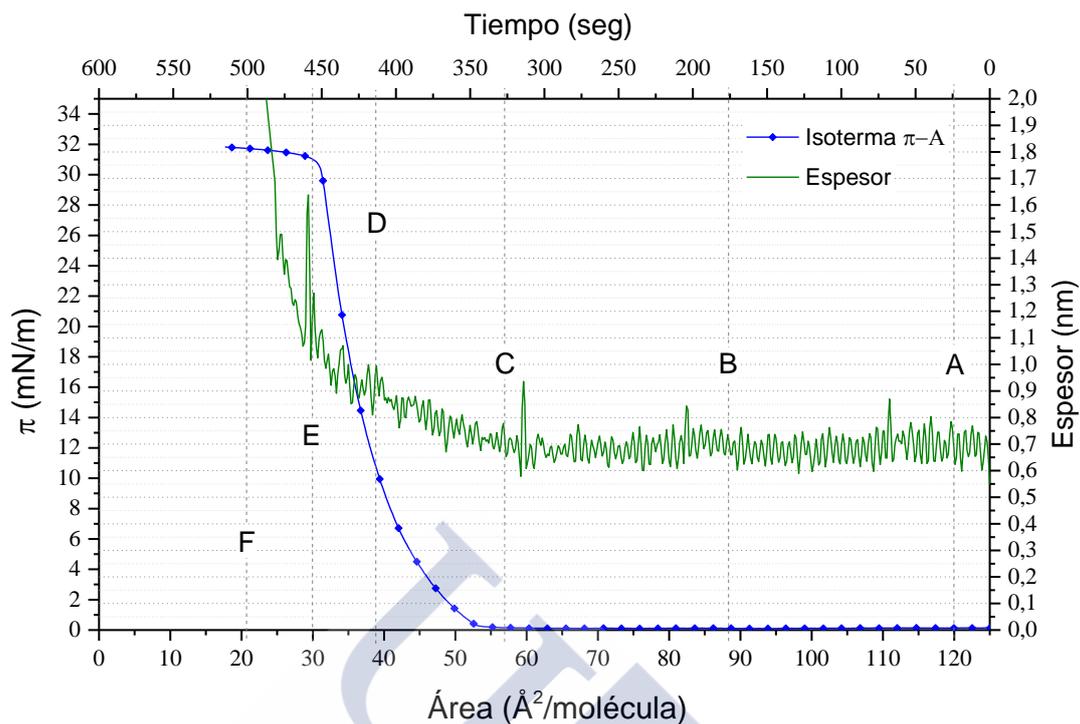


Figura 4.3.C.- Isoterma π -A e incremento del espesor de la monocapa de **ácido oleico**. Diferentes puntos en los que se tomaron las imágenes BAM señalados con A, B, C, D, E y F.

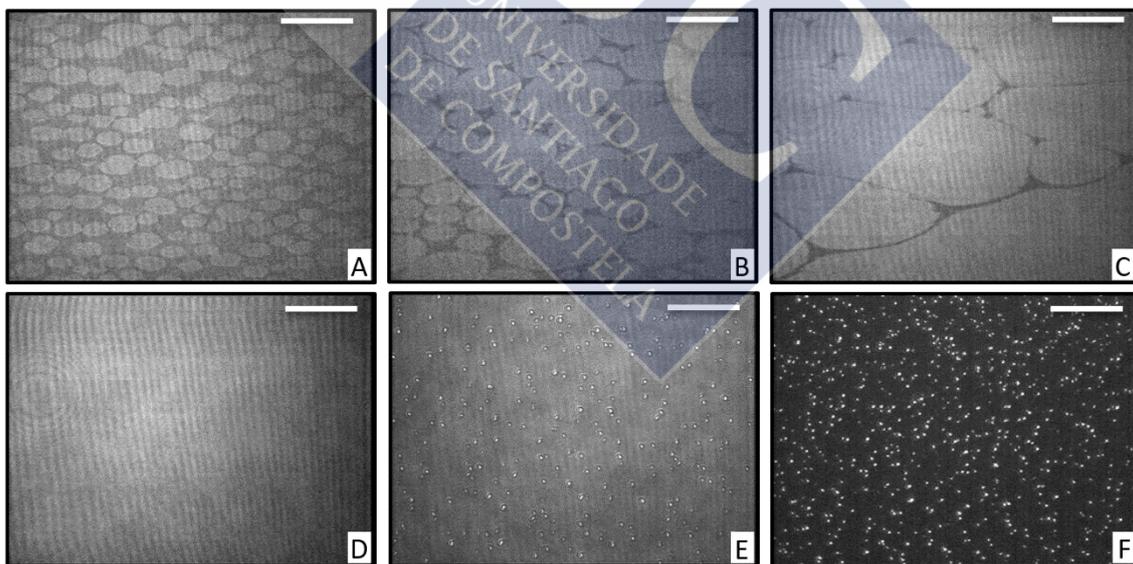


Ilustración 4.3.B.- Imágenes BAM de la monocapa de **ácido oleico**, correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a la temperatura de 10°C . La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.3.3 Influencia del número de moléculas

El estudio de la influencia del número de moléculas de ácido oleico esparcidas sobre el agua (**Figura 4.3.D**) muestra que el aumento de las mismas se corresponde con una disminución del área inicial a partir de la cual la presión empieza a registrar valores superiores a 0. Sin embargo, la presión de colapso no se ve afectada por dicho número.

Las gráficas espesor-área correspondientes a depósitos de $2 \cdot 10^{16}$ y $6 \cdot 10^{16}$ moléculas no muestran una clara diferencia entre ellas. En el estado *gas* el espesor promedio correspondiente a los dos depósitos es de 0,68 nm, mientras que en la fase *líquido expandido* se encuentra entre los 1,1 y 1,15 nm

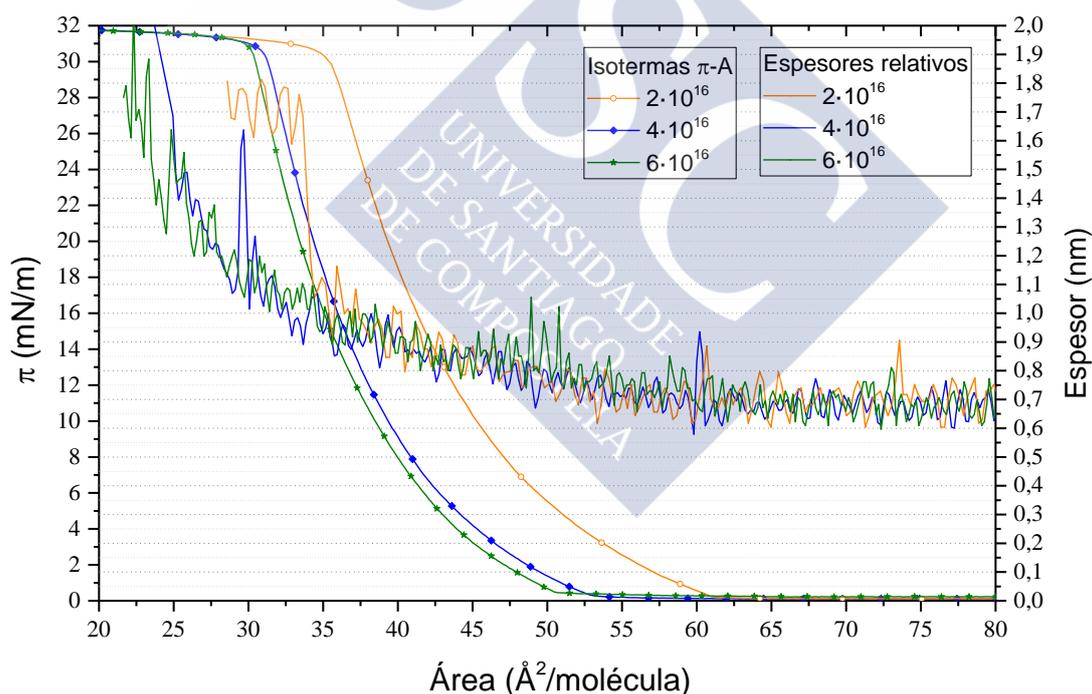


Figura 4.3.D.- *Isotermas π -A y curvas del espesor de las monocapas de ácido oleico, correspondientes al depósito de $2 \cdot 10^{16}$ y $6 \cdot 10^{16}$ moléculas, a temperatura de 10°C y a velocidad de compresión de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.*

En la **Tabla 4.3.A** se recogen los valores más característicos de estas isotermas: el área límite de la fase de líquido expandido extrapolada a presión cero ($A_{0(LE)}$), el área inicial bajo la curva (A_0), la presión superficial de colapso (π_c), el valor del área molecular al cual se produce dicho colapso (A_c), el espesor de la monocapa durante la fase *gas* (E_G) así como el valor máximo de espesor que alcanza la monocapa mientras se encuentra en estado de líquido expandido (E_{LE}).

Número de moléculas	$A_{0(LE)}$ ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	A_0 ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	A_c ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	E_G (nm)	E_{LE} (nm)
$2 \cdot 10^{16}$	46,2	61,1	31,1	35,2	0,68	1,1
$4 \cdot 10^{16}$	40,4	52,9	31,45	30,9	0,69	1,1
$6 \cdot 10^{16}$	39,4	50,6	31,4	29,9	0,68	1,15

Tabla 4.3.A.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido oleico obtenidos sobre agua por extensión de diferente número de moléculas de ácido graso.



4.3.4 Influencia de la temperatura

Para el estudio de temperaturas se realizó la compresión de la monocapa a diferentes valores de temperatura con la finalidad de observar la influencia que ésta tiene en la isoterma π -A. Como se aprecia en la **Figura 4.3.E**, el incremento de temperatura supone un aumento de área molecular de la misma forma que ocurría con el ácido esteárico. Esta circunstancia es típica de los ácidos grasos y se lleva observando desde principios del siglo pasado en numerosos estudios (Adam & Jessop, The Structure of Thin Films. Part VIII. Expanded Films, 1926) (Gaines G. L., Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces, 1966).

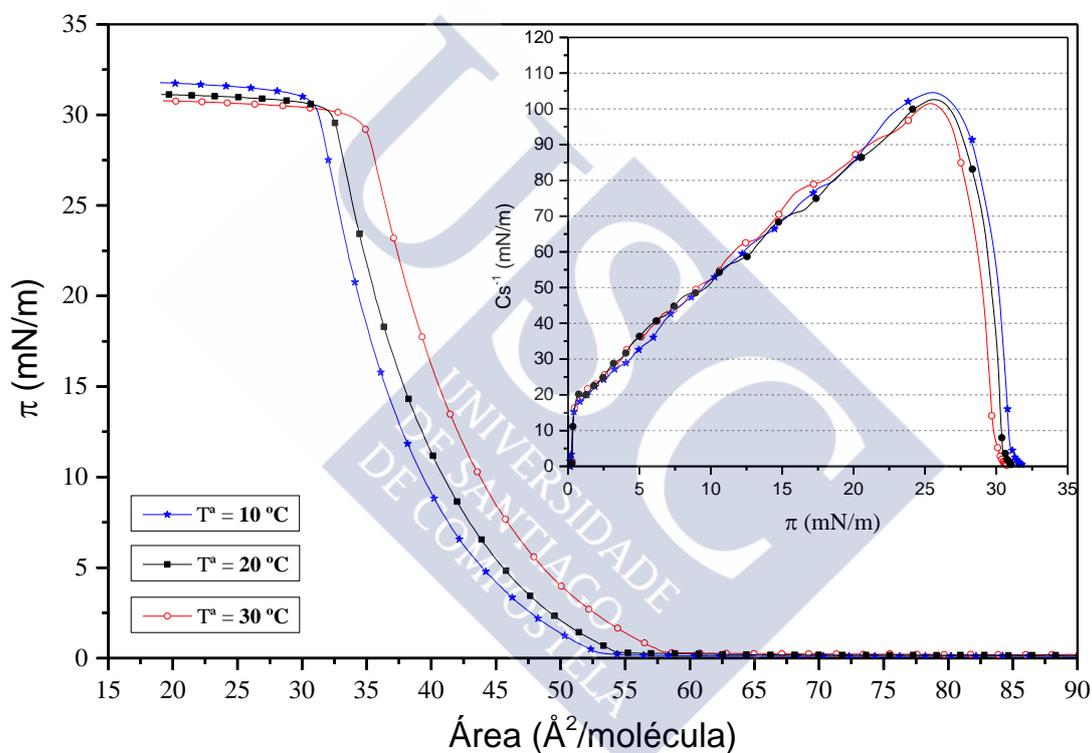


Figura 4.3.E.- *Isotermas π -A de la monocapa de ácido oleico, extendida sobre agua a diferentes temperaturas, correspondiente al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. En el interior, representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión.*

Por otro lado, la bajada de temperatura implica unos resultados de presión de colapso ligeramente mayores. Como ya vimos en el correspondiente estudio del ácido graso saturado, esta característica también es típica de los ácidos grasos.

Se observa también que los valores del módulo de compresibilidad aumentan levemente a medida que la temperatura disminuye, es decir, a mayores temperaturas se forman monocapas de ácido oleico con menor resistencia a la compresión y con las moléculas menos empaquetadas.

Los datos correspondientes a diferentes parámetros de la monocapa de ácido oleico a diferentes temperaturas, tales como áreas límites, presiones de colapso, áreas de colapso y valores de módulo de compresibilidad, se muestran en la **Tabla 4.3.B.**

Temperatura (°C)	$A_{0(L\bar{E})}$ (Å ² /molécula)	A_0 (Å ² /molécula)	π_c (mN/m)	A_{coll} (Å ² /molécula)	$C_s^{-1(L\bar{E})}$ (mN/m)
10	40,4	52,9	31,4	30,9	104,6
20	41,5	54,4	30,7	32,2	102,6
30	44,9	58	30,2	34,7	101,5

Tabla 4.3.B.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido oleico obtenidos sobre agua a diferentes temperaturas.



4.4 ÁCIDO LINOLEICO

4.4.1 Isoterma π -A y módulo de compresibilidad

La isoterma de presión superficial-área molecular (π -A) de la monocapa de ácido linoleico (18:2, ω -6) registrada a 10 °C se muestra en la **Figura 4.4.A**. Como se puede observar, a áreas superiores a 67 Å²/molécula, la monocapa se encuentra en estado *gas* (**G**), en el cual las moléculas de ácido graso se hallan alejadas entre sí, de tal manera que la presión superficial generada es prácticamente nula.

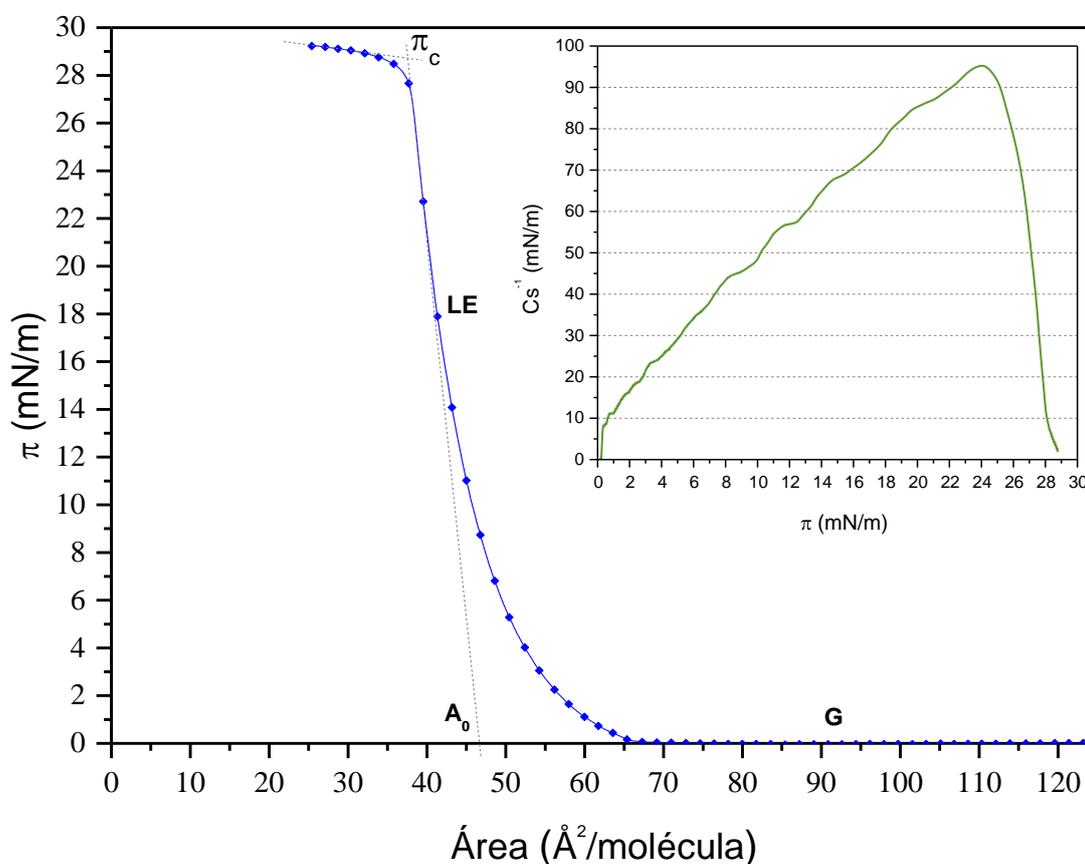


Figura 4.4.A.- Isoterma π -A de la monocapa de **ácido linoleico**, correspondiente al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimida a velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. En el interior, representación del módulo de compresibilidad frente a la presión.

Al reducirse el área, la interacción entre las moléculas de ácido linoleico empieza a generar un continuo incremento del valor de presión superficial, generándose un empaquetamiento molecular progresivo. Bajo estas circunstancias, la monocapa se encuentra en un estado de *líquido expandido* (**LE**).

El estado de *líquido expandido* que presenta la monocapa de ácido linoleico es muy similar al del ácido oleico. Con la extrapolación a presión cero de esta región de la isoterma se obtiene un área límite de $A_{0(LE)} = 46,7 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, valor muy cercano a los $46 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ obtenidos por Seoane (Seoane, Dynarowicz-tstka, Miñones Jr., & Rey-Gómez Serranillos, 2001) y a los $47 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ registrados por otros autores (Makyla & Paluch, 2009) (Peltonen, 1989) (Tomoaia-Cotisel, Zsakó, Mocanu, Lupea, & Chifu, 1987).

El módulo de compresibilidad (interior de la **Figura 4.4.A**) alcanza un máximo de $95,2 \text{ mN/m}$, valor que encaja en el rango correspondiente a estados de *líquido expandido* (Davies & Rideal, Interfacial phenomena, 1963).

Esta fase del film finaliza al alcanzarse un área de $37,6 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, teniendo lugar el colapso de la monocapa de ácido linoleico y la formación de multicapas moleculares. Dicho fenómeno se produce a un valor de presión superficial de $28,7 \text{ mN/m}$. Al continuar la compresión la presión superficial sigue aumentando ligeramente.

La comparación de estos resultados con los del ácido oleico (18:1) indica que la adición de un doble enlace provoca un aumento en las áreas moleculares y un descenso en la presión de colapso así como el módulo de compresibilidad. En efecto, el área límite aumenta $6,3 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, mientras la presión de colapso disminuye $2,7 \text{ mN/m}$.

4.4.2 Microscopía de ángulo de Brewster

4.4.2.1 Espesor y configuración molecular

En la **Figura 4.4.B** se puede observar como el espesor inicia su escalada simultáneamente a la presión superficial, siendo lineal hasta que la monocapa sufre el colapso (en un área de $37,6 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, a los 420 segundos del inicio de la compresión), momento en el cual el espesor sube de forma enérgica como consecuencia de la formación de multicapas moleculares de ácido linoleico.

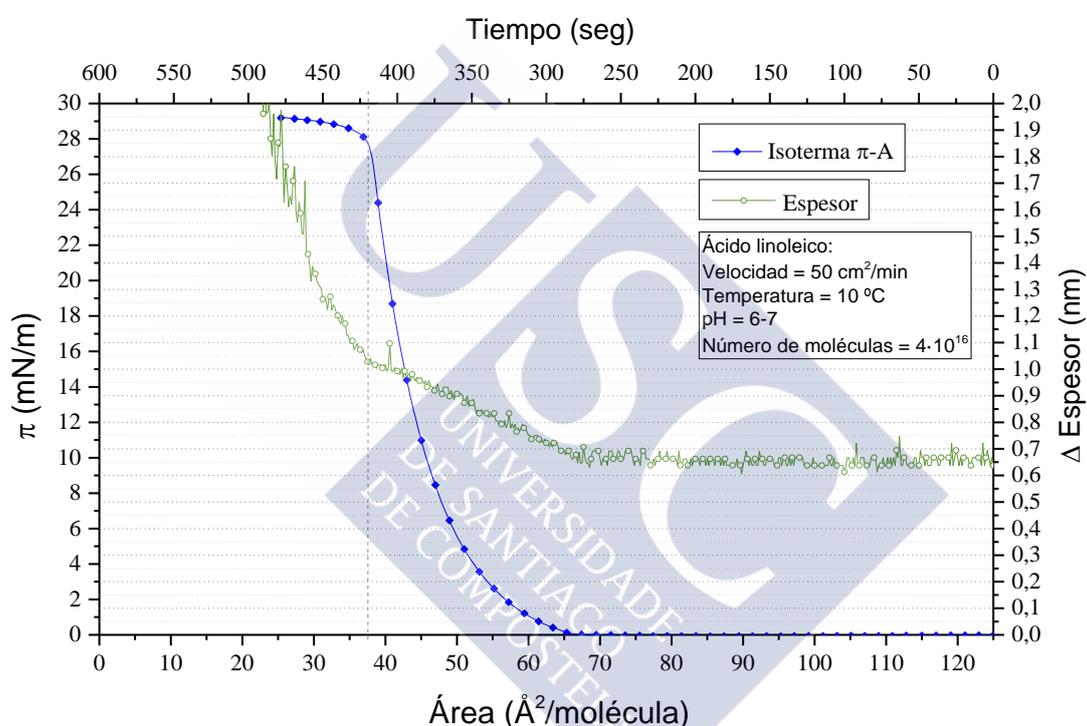


Figura 4.4.B.- Isoterma π -A e incremento del espesor de la monocapa de **ácido linoleico**, extendida sobre agua a la temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}$, con un depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

Así pues, durante la fase *gas* la monocapa de ácido linoleico muestra un espesor de $0,67 \text{ nm}$. En este estado, se espera que las moléculas del ácido graso se encuentren en una posición prácticamente horizontal, paralelas a la superficie del sustrato. Cuando se alcanza un área de $67 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, la cola hidrófoba comienza a levantarse de forma lenta y continua, alejándose de la superficie acuosa y manteniendo el grupo polar en contacto con el agua. Tras el incremento del espesor relativo durante la fase de *líquido expandido*, se obtiene un valor máximo de espesor de $1,025 \text{ nm}$. En este punto, cabe

esperar que las moléculas del ácido linoleico se encuentren perpendicularmente a la superficie del sustrato.

Se realizaron mediciones en la molécula del ácido linoleico para averiguar la máxima distancia desde el carbono carboxílico, dado que se correspondería con el máximo valor del espesor de la monocapa en el supuesto de que la molécula se encuentre orientada verticalmente en el sustrato. Se tomó como máxima distancia la que va desde el carbono carboxílico al décimo segundo carbono según la conformación hallada en las fuentes consultadas (NCBI - pubChem). Dicha distancia es de 1,08 nm

Dado el valor obtenido para el espesor relativo justo antes del colapso (1,025 nm), es de esperar que las moléculas del ácido linoleico alcancen una posición perpendicular respecto de la superficie del sustrato.

Durante la fase *gas* se obtiene un registro del espesor de 0,67 nm, lo cual coincidiría con una inclinación de la molécula de aproximadamente $38,3^\circ$ respecto de la superficie del sustrato acuoso.

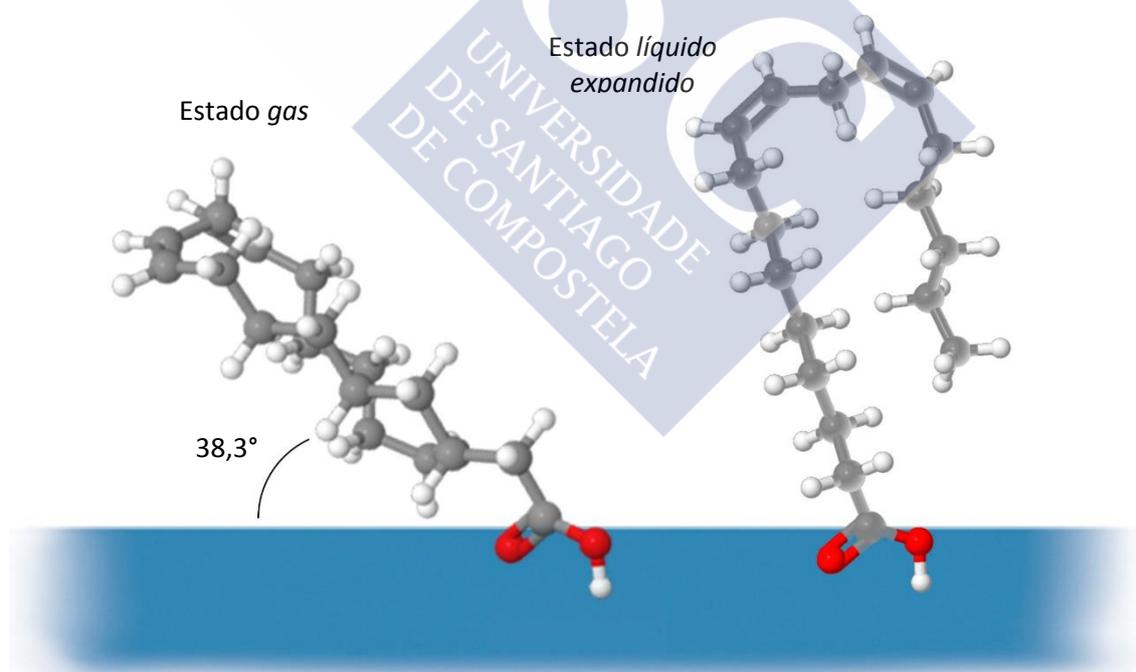


Ilustración 4.4.A.- Representación tridimensional de la conformación molecular que presenta el ácido linoleico en los diferentes estados por los que atraviesa su monocapa.

4.4.2.2 Imágenes BAM y morfología

Las imágenes BAM obtenidas para el ácido linoleico se muestran en la **Ilustración 4.4.B**. Los puntos a los que se tomaron dichas imágenes aparecen señalados en la isoterma y el espesor de la **Figura 4.4.C**.

Al principio de la compresión se observan dominios claros de ácido linoleico circulares y ovoides unidos entre sí, con huecos oscuros en su interior correspondientes al sustrato acuoso (**Imagen A**). Mientras la monocapa se encuentra en estado *gas* y a medida que el área disminuye la presencia del ácido graso va en aumento en las imágenes microscópicas; de la misma forma, el tamaño de los huecos decrece puesto que la superficie está cada vez más cubierta por la monocapa (**Imágenes B y C**).

Con el inicio del incremento simultáneo tanto de presión superficial como de espesor y el cambio de estado desde *gas* a *líquido expandido*, el microscopio nos muestra una imagen homogénea y clara correspondiente a la total presencia del ácido linoleico sobre la superficie, desapareciendo los círculos oscuros de agua (**Imagen D**, tomada a la presión superficial de 5 mN/m). Dicha imagen uniforme se mantiene igual durante todo el tiempo que la monocapa permanece en este estado.

La ruptura o colapso de la monocapa tiene lugar aproximadamente a 36 Å²/molécula, instante en el cual el microscopio muestra una imagen característica de colapso de las monocapas en estado líquido expandido (**Imagen E**). En ella se observan la aparición de cuantiosos dominios brillantes característicos del colapso, cuyo número y tamaño van en aumento al proseguir la compresión del film, dando lugar a las estructuras tridimensionales que se observan en la **Imagen F**.

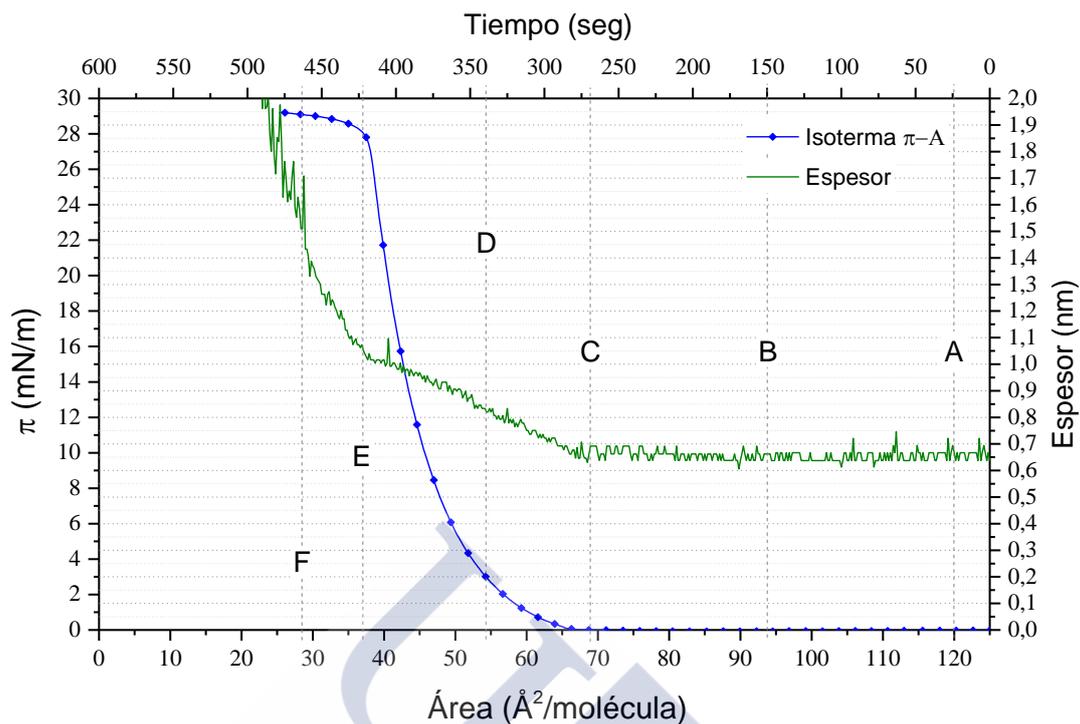


Figura 4.4.C.- Isoterma π -A e incremento del espesor de la monocapa de **ácido linoleico**, extendida sobre agua a la temperatura de 10 °C. Puntos en los que se tomaron las imágenes BAM señalados con A, B, C, D, E y F.

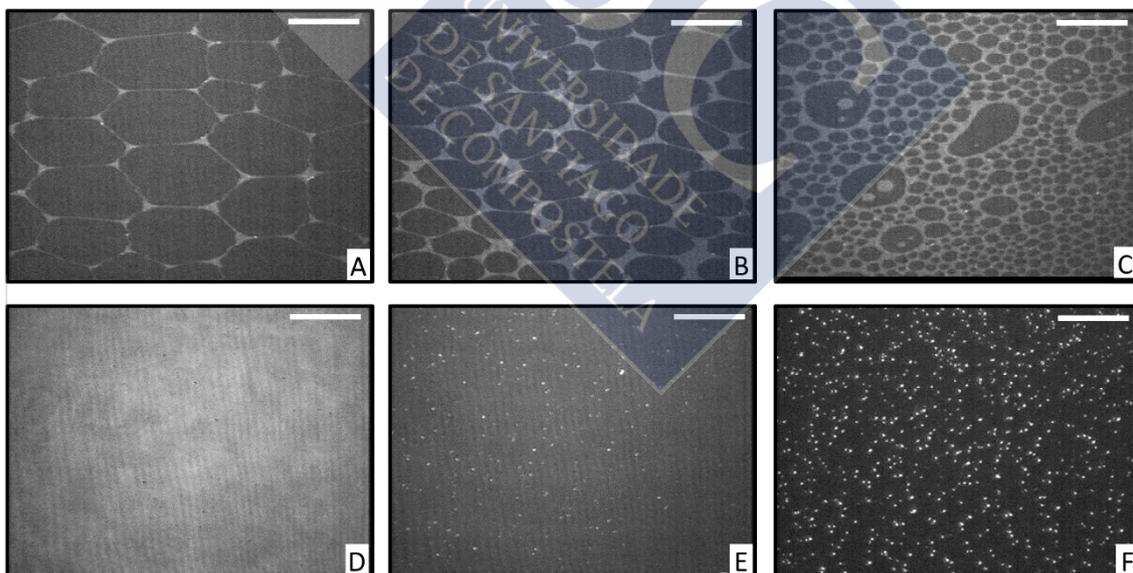


Ilustración 4.4.B.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa de ácido linoleico correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua con pH = 6-7 y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.4.3 Influencia del número de moléculas

El de la influencia del número de moléculas en las monocapas de ácido linoleico se muestra en la **Figura 4.4.D**. A diferencia del ácido oleico, en el caso de este ácido graso omega-6 las isothermas apenas experimentan cambios en el área inicial bajo la curva, concretamente un leve descenso de la misma al aumentar la cantidad de moléculas depositadas. Así mismo, los valores de la presión superficial se muestran prácticamente invariables.

Las curvas de espesor-área registradas para las monocapas correspondientes a un depósito de $2 \cdot 10^{16}$ y $6 \cdot 10^{16}$ moléculas, presentan la misma forma que la propia curva de la monocapa de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas. En todas ellas el espesor relativo experimenta un incremento de forma simultánea al de la presión superficial y, al alcanzar el punto de colapso, sufre una subida abrupta.

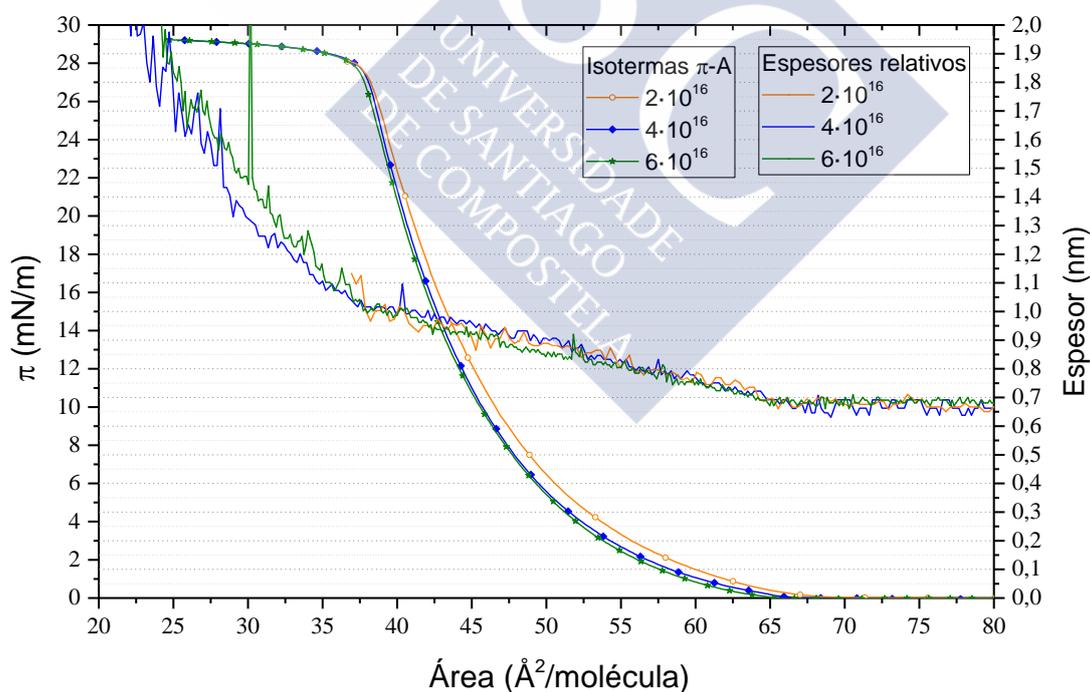


Figura 4.4.D.- Isothermas p - A y espesores de la monocapa de **ácido linoleico**, correspondientes al depósito de $2 \cdot 10^{16}$ moléculas y $6 \cdot 10^{16}$ moléculas.

En la **Tabla 4.4.A** vienen recogidos los valores más característicos de las isotermas y espesores a diferentes número de moléculas, tales como el área inicial bajo la curva (A_0), el área límite de la fase de líquido expandido extrapolada a presión cero ($A_{0(LE)}$), la presión superficial de colapso (π_c), el valor del área molecular al cual se produce dicho colapso (A_c), el espesor de la monocapa durante la fase *gas* (E_G) así como el valor máximo de espesor que alcanza la monocapa mientras se encuentra en estado de líquido expandido (E_{LE}).

Número de moléculas	A_0 ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	$A_{0(LE)}$ ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	A_c ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	E_G (nm)	E_{LE} (nm)
$2 \cdot 10^{16}$	68,4	47,7	28,75	37,8	0,67	1,015
$4 \cdot 10^{16}$	67	46,7	28,7	37,6	0,67	1,025
$6 \cdot 10^{16}$	66,4	46,9	28,8	37,25	0,68	1,03

Tabla 4.4.A.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido linoleico obtenidos sobre agua por extensión de diferente número de moléculas de ácido graso.

4.4.4 Influencia de la temperatura

La introducción de un doble enlace adicional en la cadena hidrocarbonada no polar del ácido oleico da lugar a una sustancia cuya solubilidad se ve aumentada en la subfase acuosa a pH 6-7. Esto se ve claramente cuando se comprimen las monocapas de ácido linoleico a diferentes temperaturas (**Figura 4.4.E**). Es evidente que las monocapas presentan una menor área molecular a medida que la temperatura aumenta o, dicho de otra forma, las isothermas se alejan del eje de las ordenadas a medida que disminuye la temperatura. De forma simultánea, la presión de colapso disminuye al aumentar la temperatura.

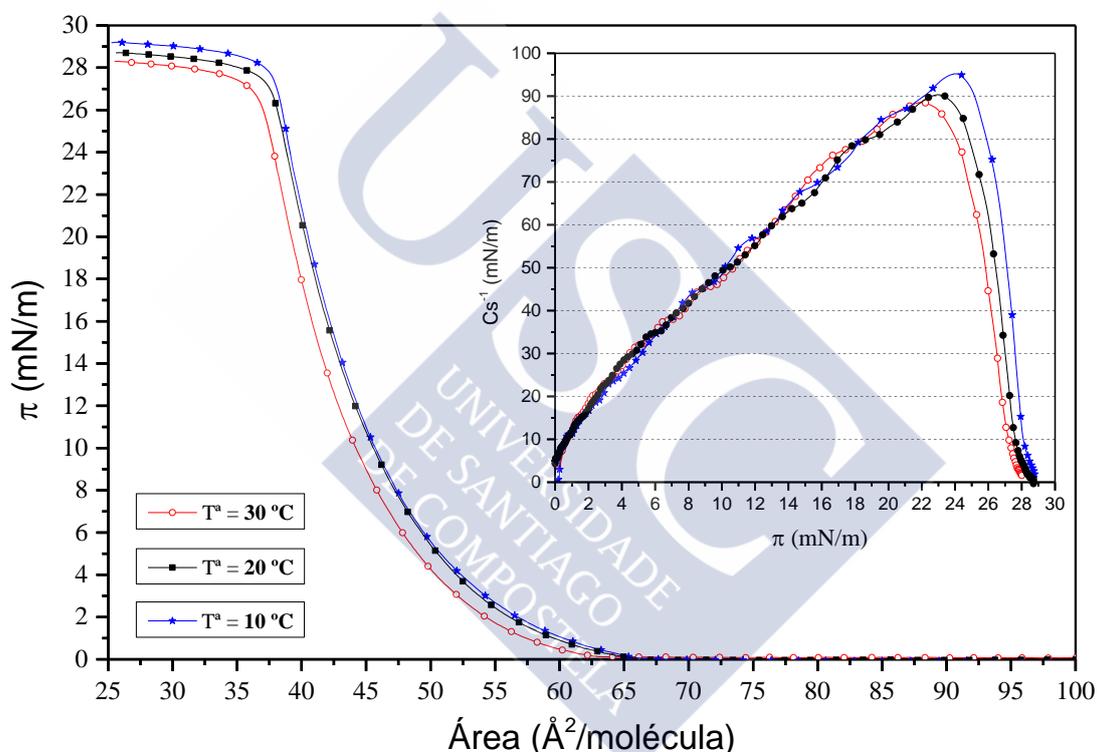


Figura 4.4.E.- Isotermas p - A de las monocapas de **ácido linoleico**, extendidas sobre agua a diferentes temperaturas, correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, comprimidas a velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. En el interior, representación de los correspondientes módulos de compresibilidad frente a la presión.

Estos resultados contradicen lo esperado ya que se sabe que un aumento de la temperatura provoca que los films de ácidos grasos ocupen áreas mayores (Gaines G. L., Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces, 1966), ya que las fuerzas de van der Waals entre las cadenas apolares se debilitan. Como consecuencia, el descenso de las áreas moleculares observado puede ser debido a la solubilidad del film ionizado a pH 6-

7, la cual aumenta con el incremento de la temperatura. Por esta razón, y para minimizar la pérdida de moléculas por disolución se realizaron los estudios a 10 °C.

Los valores correspondientes a diferentes parámetros de la monocapa de ácido linoleico a diferentes temperaturas, tales como área inicial bajo la curva (A_0), área límite de la fase de líquido expandido extrapolada a presión cero ($A_{0(LE)}$), presión superficial de colapso (π_c), área molecular a la cual se produce dicho colapso (A_c) y valores de módulo de compresibilidad máximo (C_s^{-1}), se muestran en la **Tabla 4.4.B**.

Temperatura (°C)	A_0 (Å ² /molécula)	$A_{0(LE)}$ (Å ² /molécula)	π_c (mN/m)	A_c (Å ² /molécula)	C_s^{-1} (mN/m)
10	65,9	46,7	28,7	37,6	95,2
20	65,6	46,5	28,1	37,5	90,3
30	63	45,5	27,7	36,7	88,5

Tabla 4.4.B.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido linoleico obtenidas sobre agua a diferentes temperaturas.

Con la finalidad de analizar más en profundidad la influencia de la temperatura en este ácido graso, el estudio se complementó con la realización de imágenes microscópicas a diferentes temperaturas y presiones superficiales.

El análisis de las imágenes BAM nos confirma la pérdida de moléculas puesto que se observa la formación de dominios de colapso a lo largo de la compresión (**Ilustración 4.4.C**). En efecto, esto ocurre a mayores valores de áreas moleculares y a menores presiones cuanto mayor sea la temperatura, es decir, la disolución de moléculas de ácido linoleico en el sustrato, se produce de manera más efectiva con el aumento de temperatura. De la misma forma, la monocapa de este ácido graso se mantiene más estable a temperaturas inferiores.

Como se puede observar, a áreas elevadas y presión cero (**Imágenes 0 mN/m**), en la fase *gas* se empieza a observar algunos puntos brillantes a la temperatura de 30 °C y, en menor medida, a 20 °C, confirmando la pérdida de material de la monocapa, mientras tanto, a 10 °C no se aprecian estos dominios brillantes. A la presión de 5 mN/m (**Imágenes 5 mN/m**), se observan a 30 y 20 °C la presencia de puntos pequeños

correspondientes a la caída de moléculas, mientras tanto, la imagen correspondiente a la monocapa a 10 °C no presenta evidencias de pérdida molecular. Tampoco se observa a 10 mN/m; sin embargo, tanto a 20 como a 30 °C, hay un elevado número de dominios brillantes propios de la pérdida de material desde la monocapa (**Imágenes 10 mN/m**). Las últimas imágenes nos muestran el colapso final de las diferentes monocapas (**Imágenes 28 mN/m**).

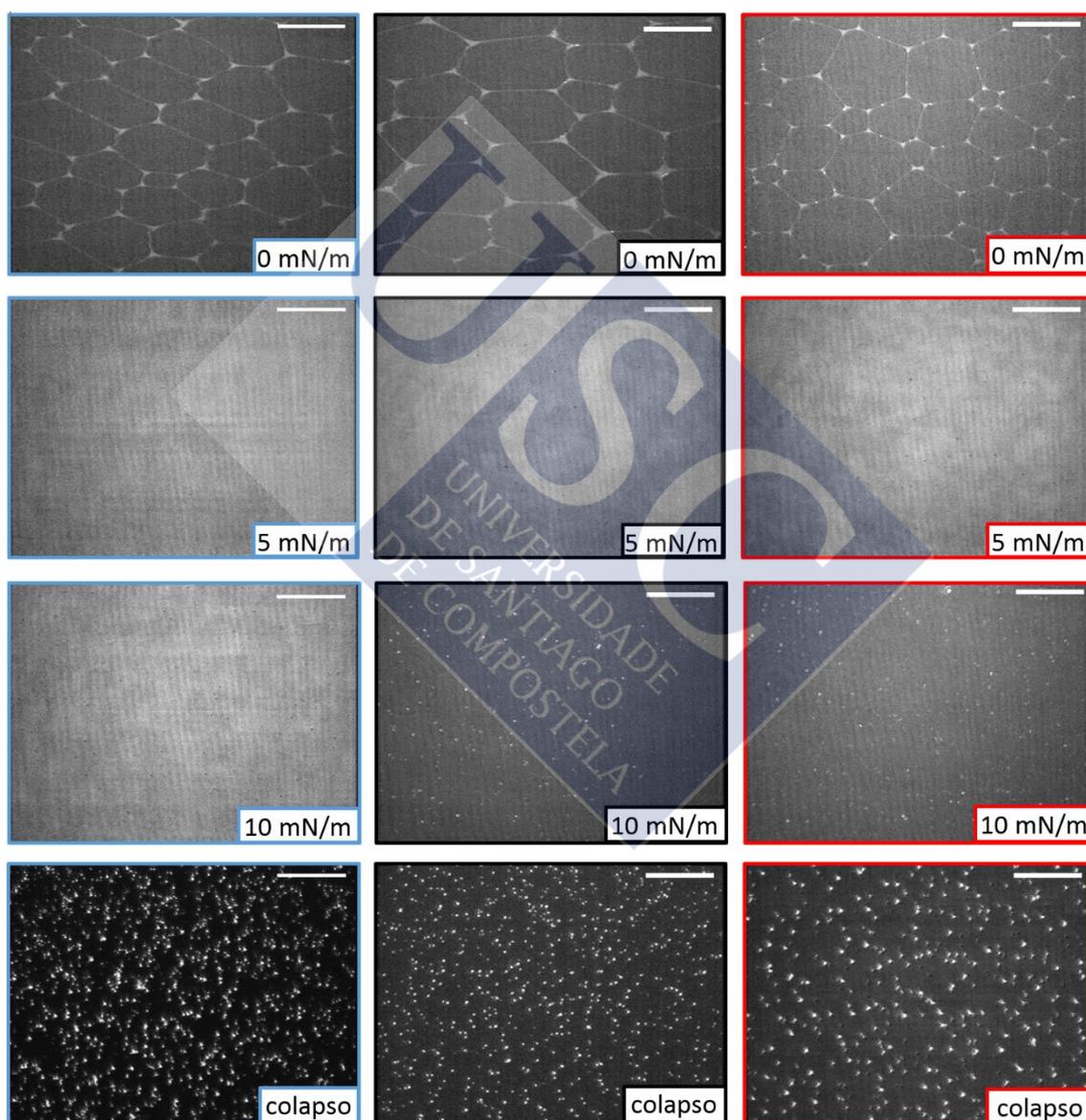


Ilustración 4.4.C.- Imágenes BAM correspondientes a monocapas de ácido linoleico, a diferentes temperaturas (de izquierda a derecha 10, 20 y 30 °C respectivamente) y a la presión superficial señalada. La barra blanca corresponde a una distancia de 20 μm .

4.5 ÁCIDO α -LINOLÉNICO

4.5.1 Isoterma π -A y módulo de compresibilidad

En la **Figura 4.5.A** se muestra la isoterma π -A de la monocapa del ácido α -linolénico (18:3, ω -3), la cual es muy similar a las del resto de ácidos grasos insaturados vistos hasta el momento. Por un lado presenta un área inicial superior a la del ácido linoleico y a la del ácido oleico. Por otro lado, se obtiene una presión de colapso y un módulo de compresibilidad inferiores. Estas tendencias vienen marcadas por el incremento del número de insaturaciones, que incrementan el área molecular, disminuyen la capacidad de empaquetamiento molecular y evitan que la monocapa resultante alcance mayores presiones.

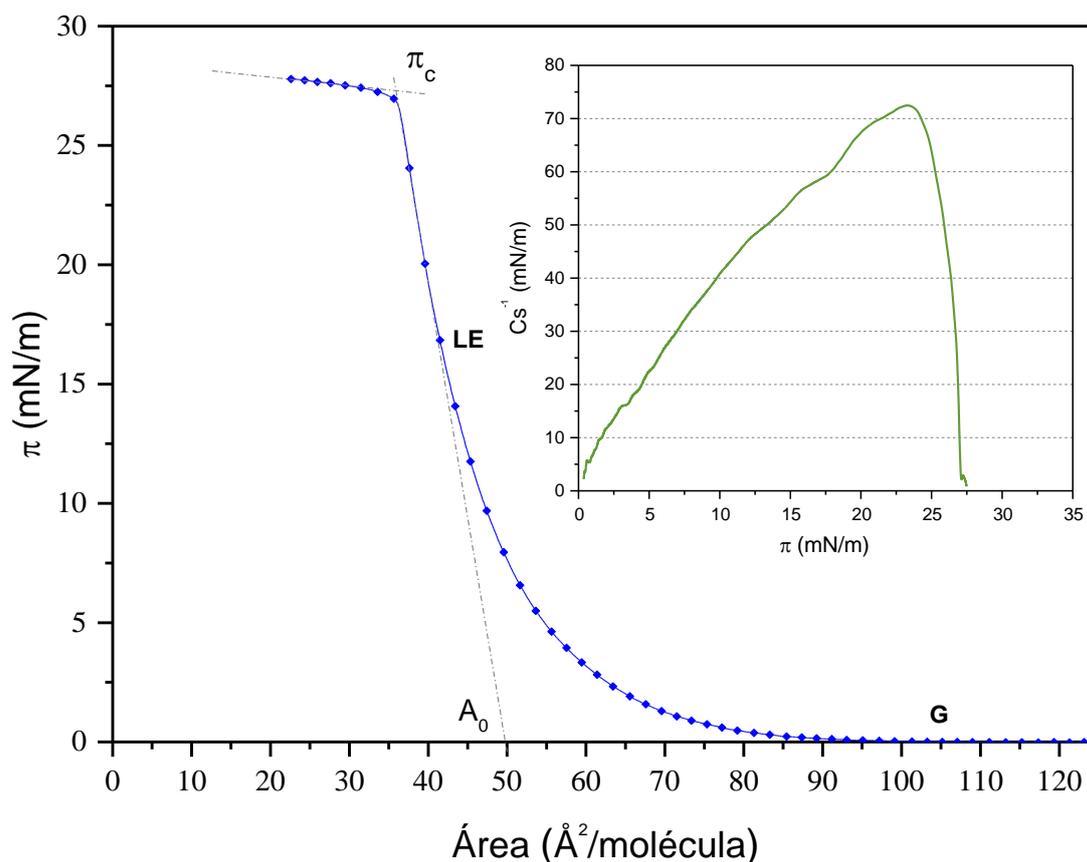


Figura 4.5.A.- Isotherma π -A de la monocapa de **ácido alfa-linolénico**, correspondiente al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a la temperatura de 10 °C y comprimida a la velocidad de 50 cm^2/min . En el interior, representación del módulo de compresibilidad frente a la presión.

La monocapa se mantiene en estado *gas* hasta alcanzar un área de 88 Å²/molécula, momento en el que se inicia el incremento de la presión superficial y la monocapa pasa a encontrarse en estado de *líquido expandido*, tal como indica su módulo de compresibilidad ($C_s^{-1} = 72,4$ mN/m).

El área límite extrapolada a presión cero para la fase de líquido expandido presenta un valor de 49,8 Å²/molécula, próximo a los 48 Å²/molécula publicado por otros investigadores (Peltonen, 1989) (Tomoaia-Cotisel, Zsakó, Mocanu, Lupea, & Chifu, 1987). Otros autores obtienen valores más bajos, como Seoane et al. que logran 44,5 Å²/molécula (Seoane, Dynarowicz-tstka, Miñones Jr., & Rey-Gómez Serranillos, 2001), o incluso valores más bajos, del orden de 40 Å²/molécula, utilizando condiciones experimentales que probablemente favorezca la disolución de este ácido graso, como es el incremento de la temperatura (Hac-Wydro & Wydro, Chemistry and Physics of Lipids, 2007).

El colapso se produce a un área de 35,9 Å²/molécula y una presión de 27,3 mN/m, valor cercano a los obtenidos por otros autores (Seoane, Dynarowicz-tstka, Miñones Jr., & Rey-Gómez Serranillos, 2001) (Hac-Wydro & Wydro, Chemistry and Physics of Lipids, 2007).

4.5.2 Microscopía de ángulo de Brewster

4.5.2.1 Espesor y configuración molecular

En la **Figura 4.5.B** se representa la curva del espesor relativo - área del ácido α -linolénico junto a la isoterma π -A. El espesor se mantiene constante durante la fase *gas* hasta el inicio del aumento de la presión superficial, momento en el que su valor se ve incrementado de forma lineal y constante hasta producirse el colapso de la monocapa.

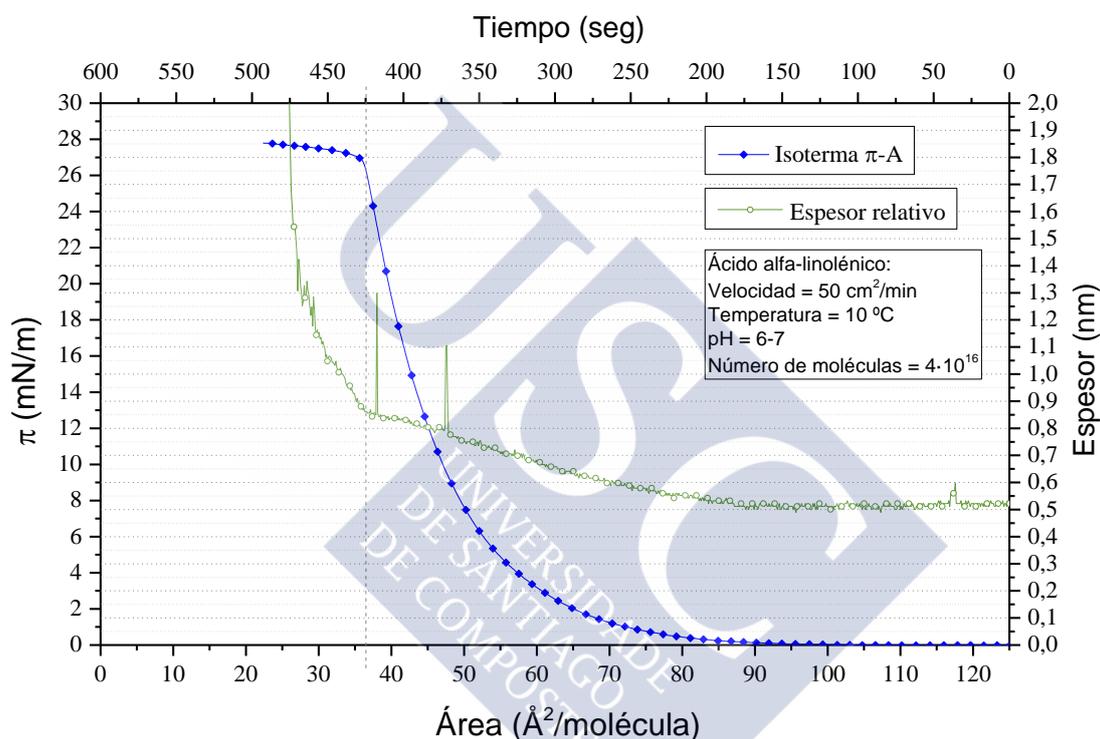


Figura 4.5.B.- Isoterma π -A y curva del espesor relativo de la monocapa de **alfa-linolénico**, extendida sobre agua a la temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}$, con un depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

El espesor de la monocapa mantiene un valor constante mientras el film se encuentra en estado *gas*, registrando un valor promedio de $0,51 \text{ nm}$. Tras la fase *gas* se inicia su escalada simultáneamente a la de la presión, siendo lineal hasta que la monocapa sufre el colapso (a un área de $35,9 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$), momento en el cual el espesor sube de forma abrupta como consecuencia de la formación de multicapas moleculares de ácido α -linolénico. En el punto previo al colapso, se registra un valor de espesor de $0,86 \text{ nm}$.

En la **Ilustración 4.5.A** se muestran las dos configuraciones propuestas para la molécula de ácido α -linolénico en los dos estados que atraviesa. Según estas conformaciones, la mayor distancia desde el carbono del grupo carboxílico (punto de anclaje al agua) se da hasta el décimo carbono (0,853 nm).

Así pues, durante la fase *gas* las moléculas de ácido linoleico se encuentran en una posición inclinada, próximas a la superficie del sustrato, registrándose un espesor de 0,51 nm. Mediante un cálculo trigonométrico se determina que dicho espesor se corresponde con un ángulo de inclinación de las moléculas de $36,7^\circ$.

Cuando se alcanza un área de $85 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, la cola hidrófoba comienza a incrementar el ángulo de inclinación de forma lenta y continua, alejándose de la superficie acuosa y manteniendo el grupo polar en contacto con el agua. Dado el valor obtenido para el espesor relativo justo antes del colapso (0,86 nm), es de esperar que las moléculas del ácido linoleico alcancen una posición perpendicular respecto de la superficie del sustrato.

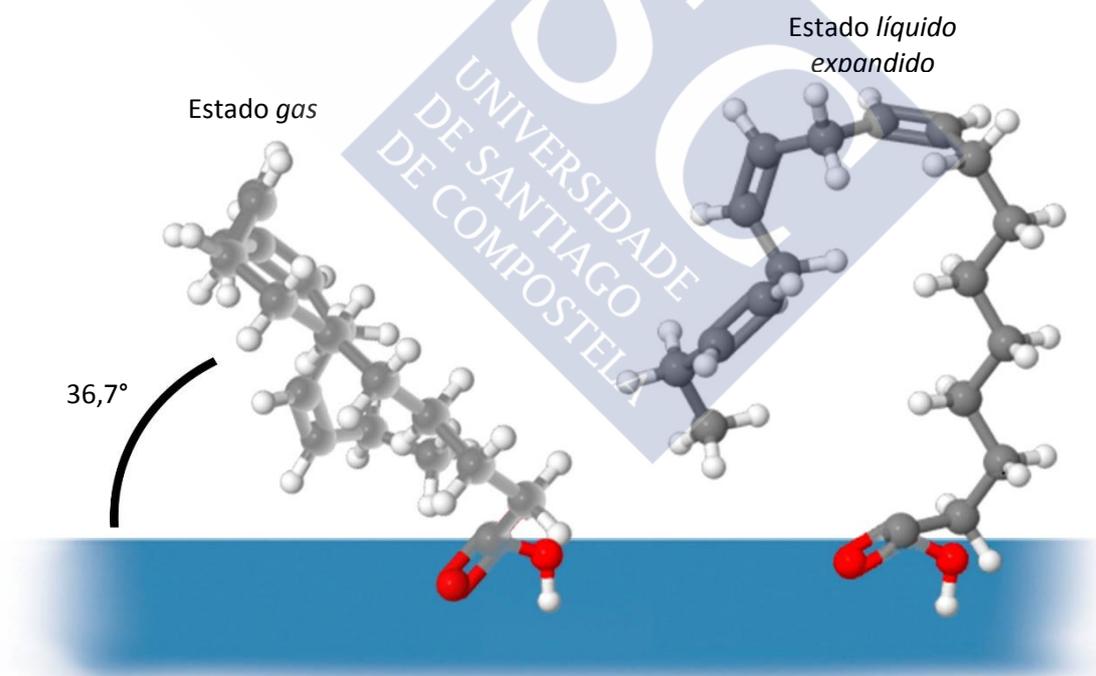


Ilustración 4.6.A.- Representación tridimensional de la conformación molecular del ácido α -linolénico en los dos estados por los que atraviesa su monocapa.

4.5.2.2 Imágenes BAM y morfología

Las imágenes BAM aparecen recogidas en la **Ilustración 4.5.B**. Así mismo, los puntos a los que se tomaron dichas fotografías se señalaron mediante letras en la isoterma π -A y curva del espesor relativo de la **Figura 4.5.C**.

Las imágenes microscópicas de la monocapa de ácido α -linolénico indican que este ácido graso omega-3 se expande con gran facilidad y, mientras la monocapa se encuentra en estado *gas*, no muestra tendencia a agruparse en dominios como sí lo hacen otros ácidos grasos insaturados. En efecto, la **Imagen A**, tomada durante esta fase, se muestra de una forma difusa.

Así mismo, durante el tiempo que la monocapa permanece en estado de líquido expandido se observa una imagen homogénea, característica de los ácidos grasos insaturados cuando atraviesan esta fase (**Imagen B**).

Finalmente, en el colapso sí se observa la primera imagen diferente desde el inicio de la compresión de la monocapa. En efecto, los dominios brillantes y numerosos aparecen al producirse la ruptura del film, tal como se puede observar en la **Imagen C**.

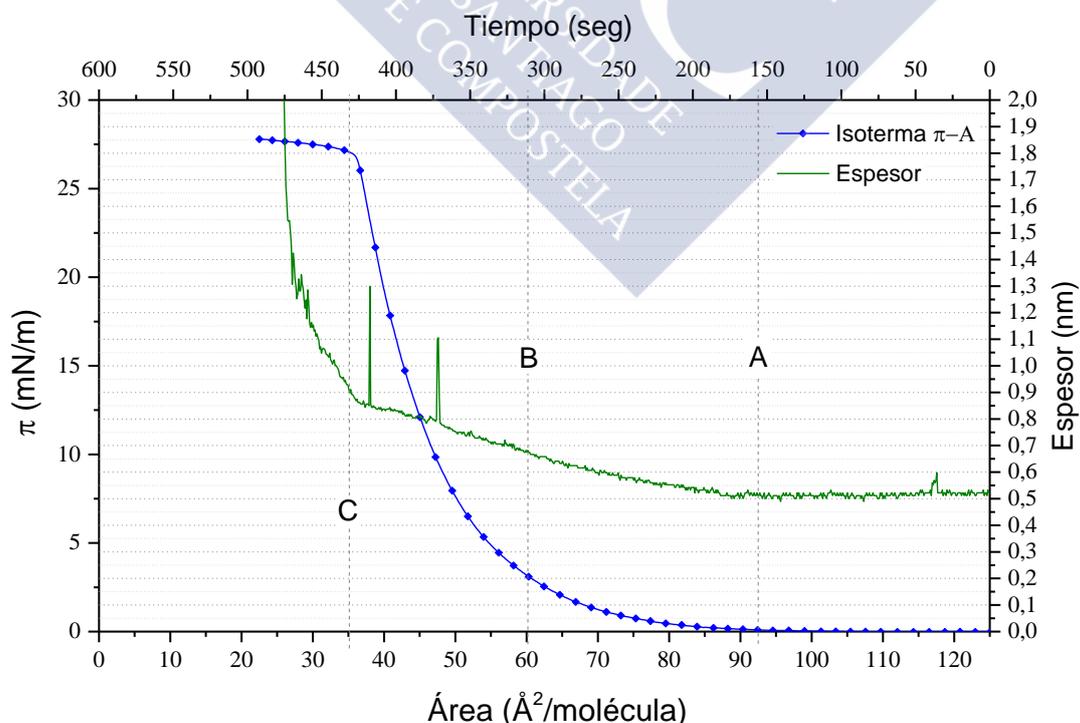


Figura 4.5.C.- Isoterma π -A e incremento del espesor de la monocapa de **ácido α -linolénico**, extendida sobre agua a la temperatura de 10 °C. Diferentes puntos en los que se tomaron las imágenes BAM señalados con A, B y C.

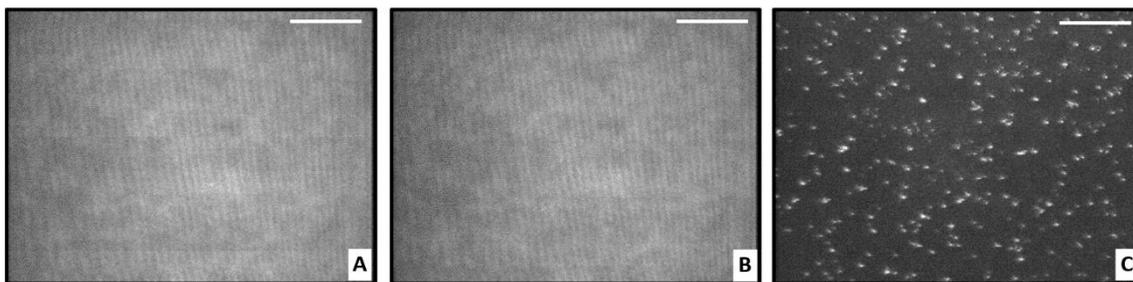


Ilustración 4.5.B.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa de **ácido α -linolénico** extendida sobre agua a pH 6-7 y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.5.3 Influencia del número de moléculas

El estudio de la influencia del número de moléculas (**Figura 4.5.D**) muestra por primera vez un cambio respecto a los ácidos grasos estudiados hasta el momento. Las monocapas de los ácidos esteárico, oleico y linoleico experimentaban un incremento en el área inicial bajo la curva al disminuir el número de moléculas depositadas. Sin embargo, en el caso del ácido α -linolénico ocurre lo contrario, es decir, al depositar un menor número de moléculas, el área inicial bajo la curva de la isoterma presenta un valor inferior al obtenido para el depósito de un mayor número de moléculas.

Las curvas del espesor relativo exhiben una forma muy similar para todas las cantidades de moléculas depositadas. En efecto, el incremento del espesor relativo ocurre de forma simultánea al de la presión y aumentando de forma repentina en el punto de colapso. La isoterma correspondiente al número de moléculas de $6 \cdot 10^{16}$ no presenta fase *gas*, ya que al depositar la disolución de extensión, la presión registrada ya es mayor que cero. Por lo tanto, el primer valor registrado no se corresponde con la fase *gas*, sino que ya pertenece a la de *líquido expandido*.

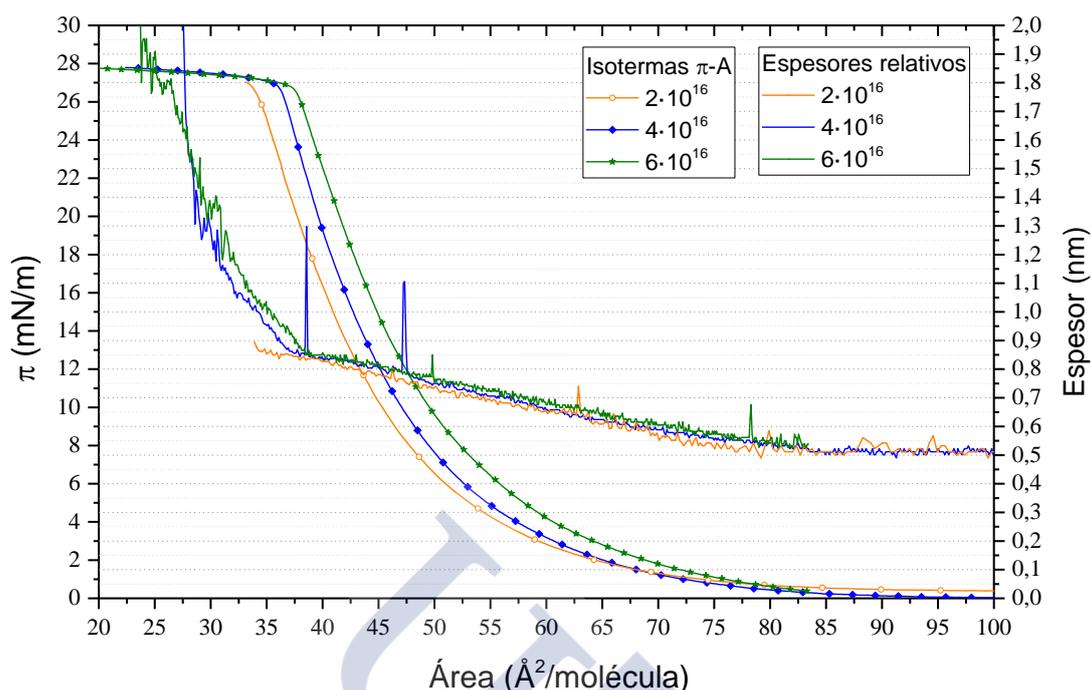


Figura 4.5.D.- Isothermas π -A y curvas de espesor de las monocapas de **ácido α -linolénico**, correspondientes al depósito de varios números de moléculas, extendidas sobre la interfaz aire/agua a la temperatura de 10 °C, pH 6-7 y comprimidas a la velocidad de 50 cm^2/min .

En la **Tabla 4.5.A** se recogen los valores más característicos de las isothermas y espesores a diferentes número de moléculas: el área inicial bajo la curva (A_0), el área límite de la fase de *líquido expandido* extrapolada a presión cero ($A_{0(\text{LE})}$), la presión superficial de colapso (π_c), el valor del área molecular al cual se produce dicho colapso (A_c), el valor de espesor durante la fase *gas* (E_G) y el valor del espesor máximo que alcanza la monocapa mientras se encuentra en estado de *líquido expandido* (E_{LE}).

Número de moléculas	A_0 ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	$A_{0(\text{LE})}$ ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	A_c ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	E_G (nm)	E_{LE} (nm)
$2 \cdot 10^{16}$	90	47,5	27,2	33,9	0,51	0,87
$4 \cdot 10^{16}$	85	49,8	27,3	35,9	0,51	0,86
$6 \cdot 10^{16}$	-	51,1	27,3	37,5	-	0,86

Tabla 4.5.A.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido linoleico obtenidos sobre agua por extensión de diferente número de moléculas de ácido graso.

4.5.4 Influencia de la temperatura

Tal como se observa en la **Figura 4.5.E**, la monocapa del ácido α -linolénico presenta, al igual que la del ácido linoleico, una disminución del área molecular con el aumento de la temperatura experimental, es decir, la monocapa de este ácido graso presenta una manifiesta solubilidad en el sustrato acuoso. Comparando las diferencias de áreas obtenidas para las diferentes temperaturas del ácido α -linolénico respecto de las resultantes del ácido linoleico, queda claro que el problema de la solubilidad es mucho mayor en el caso del ácido α -linolénico.

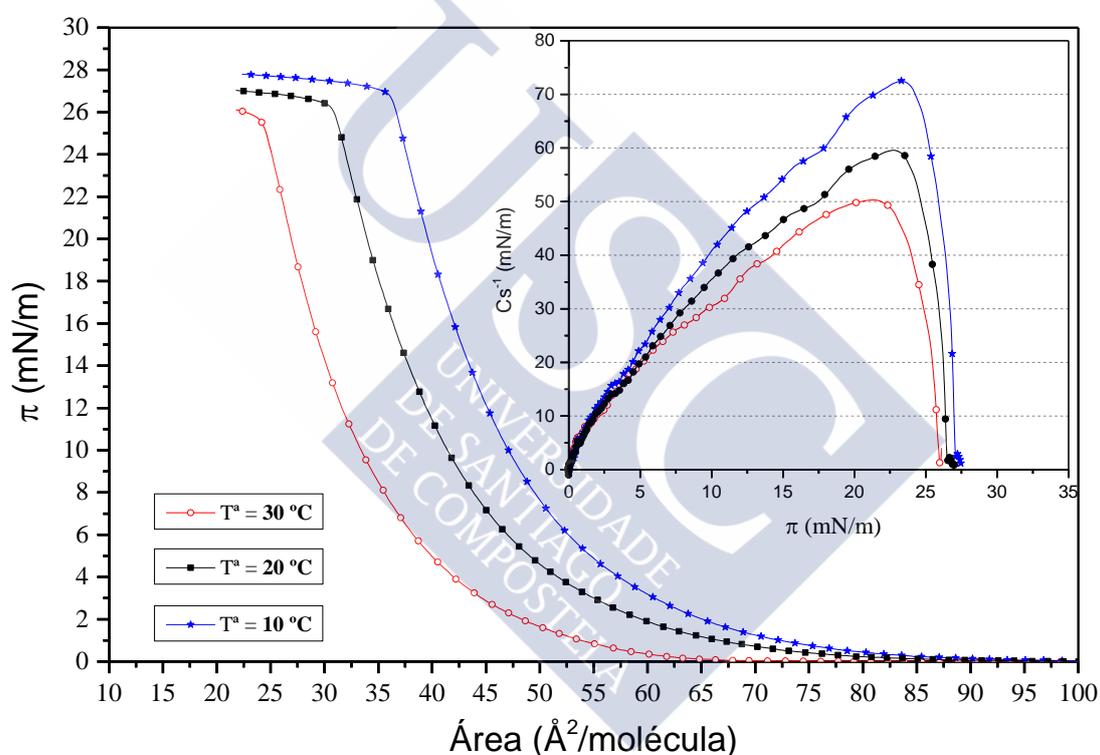


Figura 4.5.E.- Isotermas π -A de las monocapas de **ácido α -linolénico**, extendidas sobre agua a diferentes temperaturas, correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, comprimidas a velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. En el interior, representación de los correspondientes módulos de compresibilidad frente a la presión.

Para establecer una mejor comparación entre la influencia de la temperatura en las monocapas del ácido linoleico y en las de ácido α -linolénico se utilizarán los valores de área de colapso. En el caso de la monocapa de ácido linoleico, a la temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, el área de colapso es de $36,7 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, mientras que a $10 \text{ }^\circ\text{C}$, es de $37,6 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$; es decir, se produce un incremento de $0,9 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. En el caso de la

monocapa de ácido α -linolénico supone, respectivamente, un cambio de área desde 24,1 Å²/molécula hasta 35,9 Å²/molécula, es decir, 11,8 Å²/molécula de diferencia. De esta forma se observa que la inestabilidad de las monocapas a temperaturas elevadas producida por la solubilidad del material del film hacia el sustrato, es mucho más acusada en el caso de las monocapas de ácido α -linolénico.

La **Tabla 4.5.B** muestra los valores correspondientes a diferentes parámetros de la monocapa de ácido α -linolénico a diferentes temperaturas, tales como área inicial bajo la curva (A_0), área límite de la fase de *líquido expandido* extrapolada a presión cero ($A_{0(LE)}$), presión superficial de colapso (π_c), área molecular a la cual se produce dicho colapso (A_c) y valores de módulo de compresibilidad máximo (C_s^{-1}).

Temperatura (°C)	A_0 (Å ² /molécula)	$A_{0(LE)}$ (Å ² /molécula)	π_c (mN/m)	A_c (Å ² /molécula)	$C_s^{-1(LE)}$ (mN/m)
10	88	49,8	27,3	35,9	72,4
20	81	44,2	26,6	30,5	59,6
30	63	36	26	24,1	50,3

Tabla 4.5.B.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido alfa-linolénico obtenidos sobre agua a diferentes temperaturas.

En la **Figura 4.5.F** se recogen las imágenes BAM correspondientes a diferentes puntos de presión superficial y a tres temperaturas diferentes, con la finalidad de analizar con mayor detalle la pérdida de material que experimentan las monocapas de ácido α -linolénico.

Durante la fase *gas*, los dominios típicos de pérdida de materia desde la monocapa sólo se observaron a 30 °C. En cuanto se inició el incremento de la presión superficial, se pudieron observar también en las imágenes microscópicas de 20 °C. Mientras tanto, a 10 °C no se registró ningún dominio que pudiera poner de manifiesto la pérdida de material desde la monocapa. A 20 mN/m se redujo la presencia de puntos brillantes debido, probablemente, a que la elevada presión impida temporalmente la caída de moléculas. Finalmente, el colapso se produce con normalidad, sin presentar diferencias como consecuencia de la variación de la temperatura.

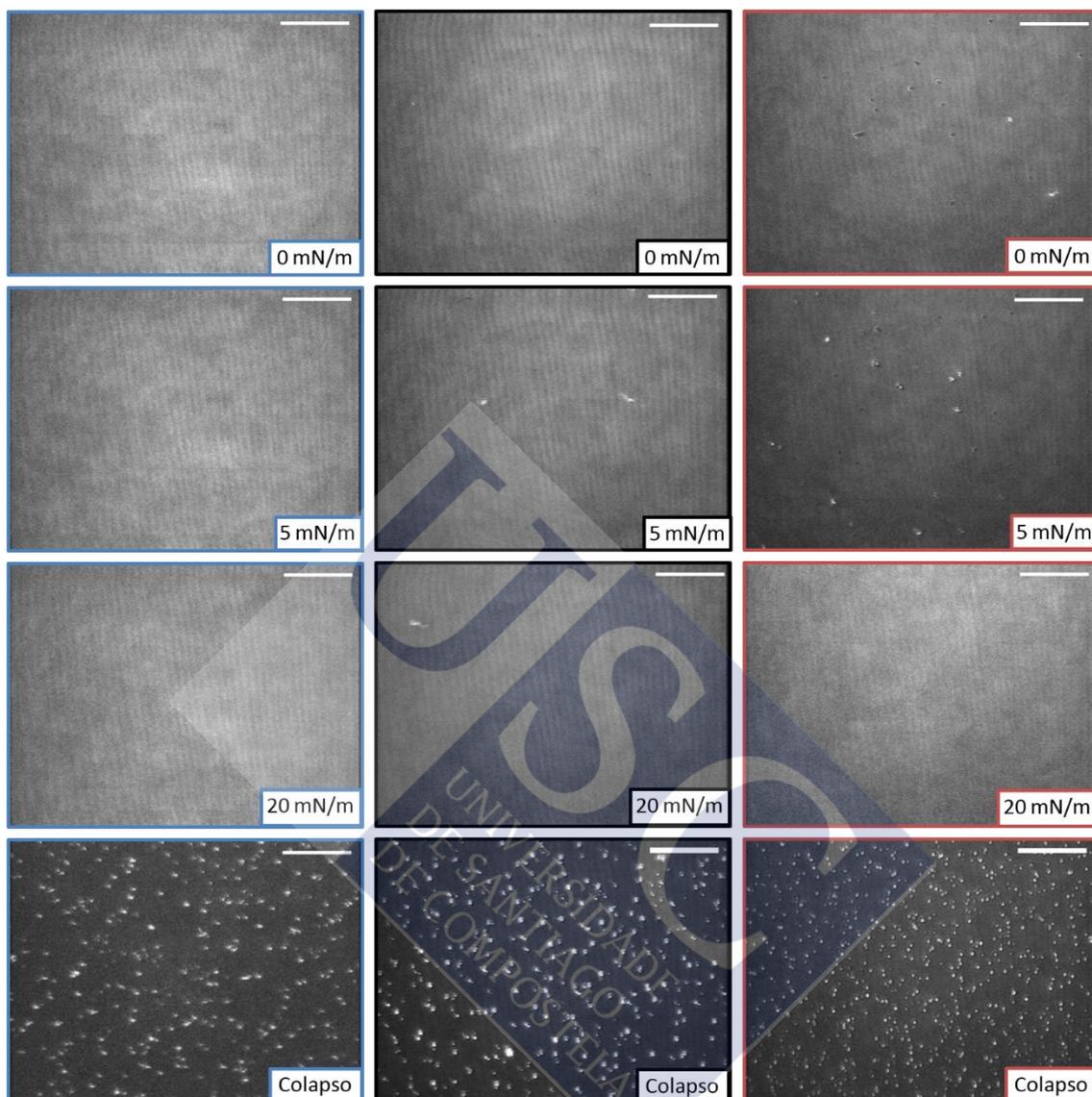


Figura 4.5.F.- Imágenes BAM correspondientes a monocapas de ácido α -linolénico, comprimidas a diferentes temperaturas (de izquierda a derecha 10, 20 y 30 °C respectivamente) y a la presión superficial señalada. La barra blanca corresponde a una distancia de 20 μm .

4.6 ÁCIDO γ -LINOLÉNICO

4.6.1 Isoterma π -A y módulo de compresibilidad

El ácido γ -linolénico (18:3, ω -6) es un isómero del ácido α -linolénico (α LA), puesto que presenta el mismo número de carbonos (18), el mismo número de insaturaciones (3) pero distinta distribución de los dobles enlaces, lo que provoca que el alfa sea omega-3 y el gamma omega-6.

La isoterma π -A generada por la monocapa de ácido γ -linolénico (**Figura 4.6.A**) es muy similar a la obtenida por su isómero. En este caso, el incremento de la presión superficial se produce a un área de 80,5 Å²/molécula, valor inferior en 4,5 Å²/molécula respecto al obtenido por el ácido α -linolénico.

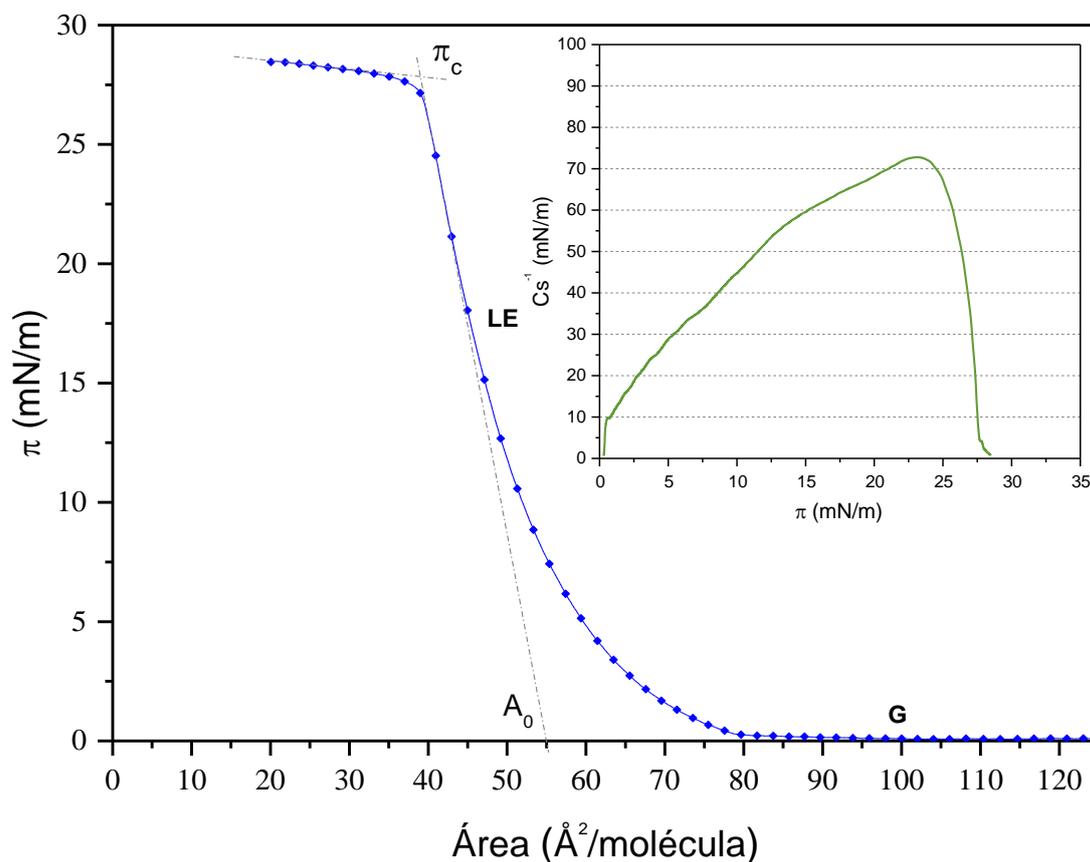


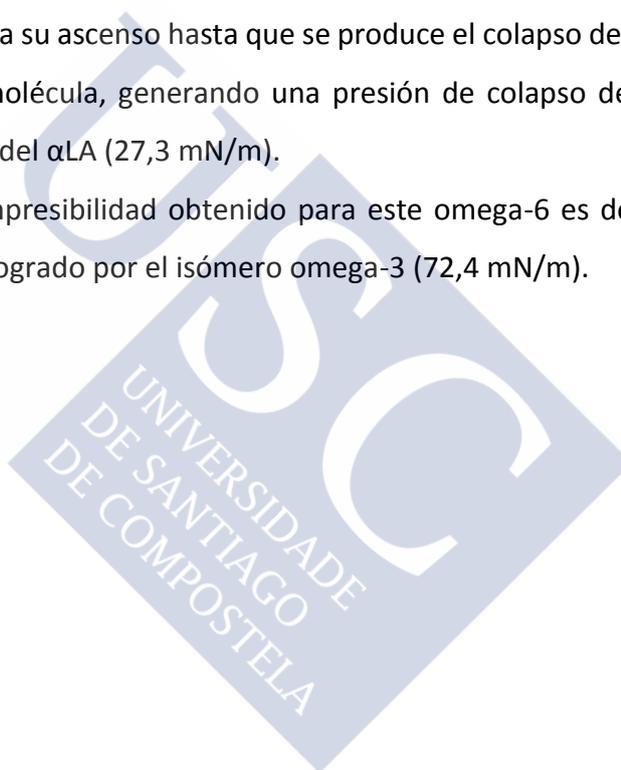
Figura 4.6.A.- Isoterma π -A de la monocapa de **ácido gamma-linolénico**, correspondiente al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a la temperatura de 10 °C, pH 6-7 y comprimida a la velocidad de 50 cm²/min. En el interior, representación del módulo de compresibilidad frente a la presión.

En dicho punto la monocapa sufre una transición en virtud de la cual pasa de un estado *gas* a un estado de *líquido expandido* cuya área límite extrapolada al eje de las ordenadas es de 55,1 Å²/molécula. En este caso, a diferencia del área inicial o *lift-off*, el isómero gamma presenta mayor área límite que el ácido α-linolénico (49,8 Å²/molécula).

Estos datos nos indican que, si bien el αLA sufre un incremento de la presión superficial a un área molecular mayor que el γLA, el αLA presenta mayor capacidad de reordenamiento de sus moléculas así como de empaquetarse para lograr alcanzar una menor área en su estado de *líquido expandido*.

La presión continúa su ascenso hasta que se produce el colapso de la monocapa, en un área de 39,1 Å²/molécula, generando una presión de colapso de 27,8 mN/m, ligeramente superior a la del αLA (27,3 mN/m).

El módulo de compresibilidad obtenido para este omega-6 es de 72,8 mN/m, prácticamente similar al logrado por el isómero omega-3 (72,4 mN/m).



4.6.2 Microscopía de ángulo de Brewster

4.6.2.1 Espesor y configuración molecular

En la **Figura 4.6.B** se muestra el espesor relativo de la monocapa de ácido γ -linolénico junto con la isoterma π -A. En dicha gráfica se puede observar que el espesor inicia su escalada simultáneamente a la de la presión, siendo prácticamente lineal hasta que la monocapa sufre el colapso (a un área de $39,1 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$), momento en el cual el espesor sube de forma enérgica como consecuencia del solapamiento de las moléculas y formación de multicapas de ácido γ -linolénico.

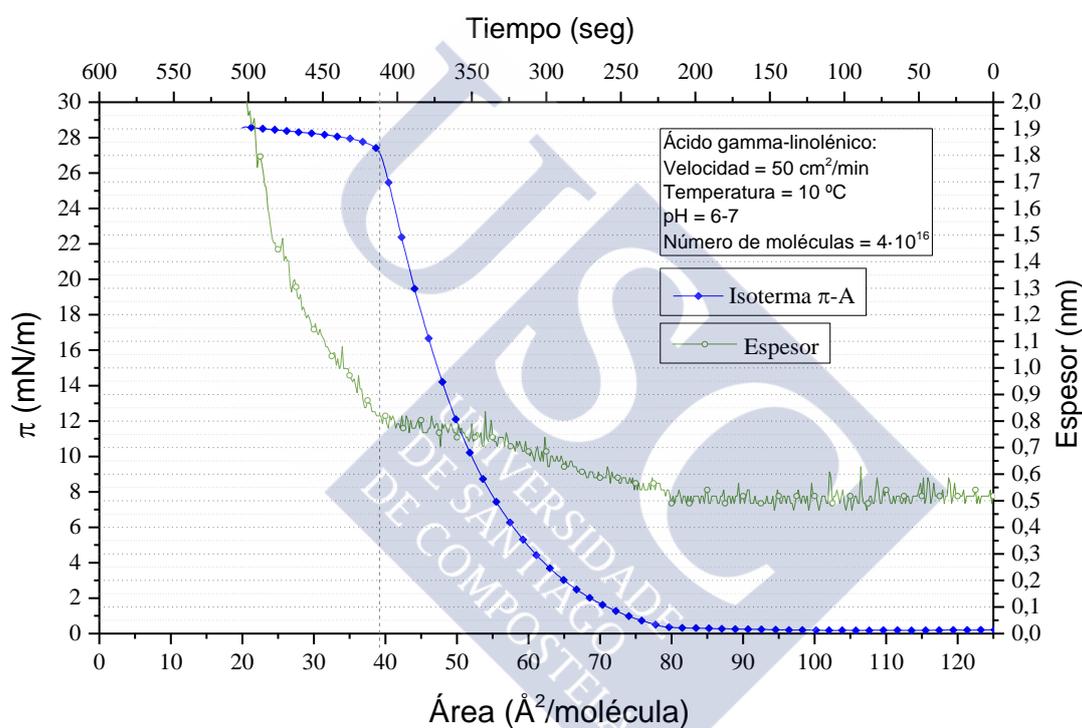


Figura 4.6.B.- Isoterma π -A e incremento del espesor de la monocapa de **gamma-linolénico**, extendida sobre agua a la temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}$, con un depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

Así pues, el espesor medio de ácido γ -linolénico registrado durante la fase *gas* es de $0,52 \text{ nm}$. Por otro lado, el valor máximo de espesor alcanzado por la monocapa durante su fase de *líquido expandido* es de $0,82 \text{ nm}$; punto que antecede inmediatamente al colapso del film. Los valores obtenidos para el ácido α -linolénico fueron de $0,51 \text{ nm}$ y $0,86 \text{ nm}$ para ambas fases respectivamente.

En la **Ilustración 4.6.A** se muestra la posible conformación de la molécula de ácido γ -linolénico según las fuentes consultadas (NCBI). Tras un análisis de varias mediciones realizadas sobre dicha molécula, se determinó que el átomo de carbono más lejano al punto de anclaje de la molécula en el agua de la subfase (carbono del grupo carboxílico) era el noveno y que, por tanto, determina el máximo valor del espesor de la monocapa en el supuesto de que la molécula se encuentre orientada perpendicularmente al sustrato acuoso. Dicha distancia es de 0,778 nm, muy próximo a los 0,82 nm obtenidos como valor máximo de espesor en el estado de *líquido expandido*, lo cual invita a postular que en ese punto las moléculas del ácido graso se encuentran en una posición prácticamente perpendicular al agua.

Respecto al estado *gas*, teniendo en cuenta la distancia máxima de la molécula de 0,778 nm y el valor del espesor durante esta primera fase (0,52 nm) se determinó que las moléculas se encontrarían inclinadas aproximadamente unos 41,9°.

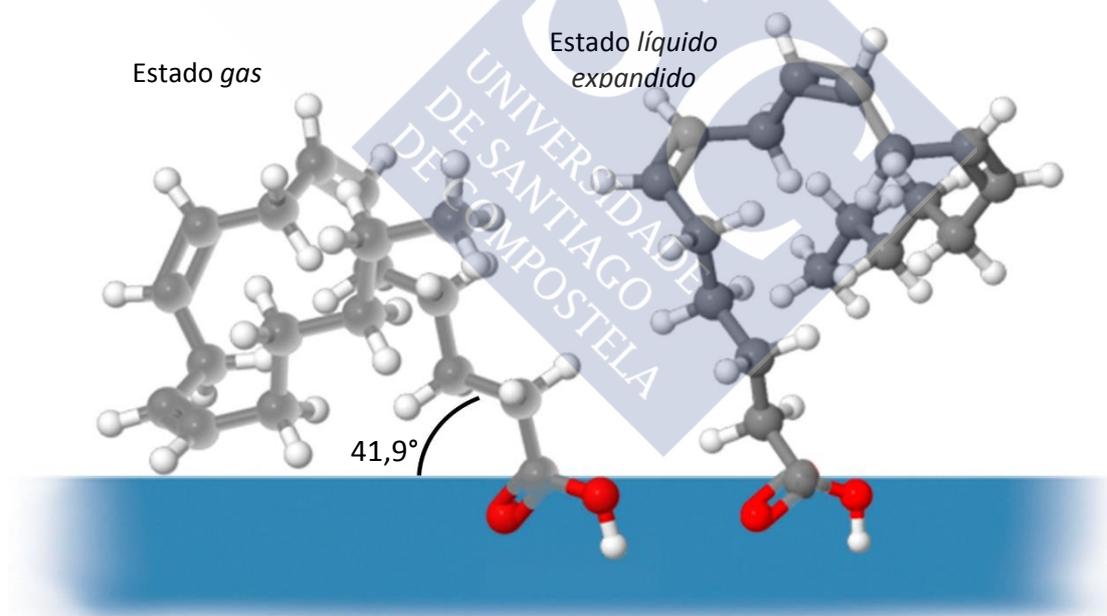


Ilustración 4.6.A.- Representación tridimensional de la conformación molecular del ácido γ -linolénico en los dos estados por los que atraviesa su monocapa.

4.6.2.2 Imágenes BAM y morfología

Las imágenes microscópicas de la monocapa de ácido γ -linolénico (**Ilustración 4.6.B**) muestran la misma homogeneidad desde el estado *gas* hasta el de *líquido expandido* como también ocurría con su isómero.

En efecto, este ácido graso omega-6 se expande con la misma facilidad que el ácido α -linolénico y, mientras la monocapa presenta un estado *gas*, se observa una imagen difusa (**Imagen A**) donde sus moléculas no muestran tendencia a agruparse en dominios como sí hacían las moléculas de los ácidos esteárico, oleico y linoleico.

Así mismo, durante el estado de *líquido expandido* presenta una imagen homogénea, característica de los ácidos grasos insaturados (**Imagen B**).

La imagen homogénea desaparece al producirse el colapso de la monocapa, momento en el que se registraron núcleos brillantes propios de este fenómeno (**Imagen C**). Al continuar la compresión del material restante, los dominios tridimensionales brillantes se unen entre sí formando estructuras de mayor tamaño tal como se aprecia en la **Imagen D**.

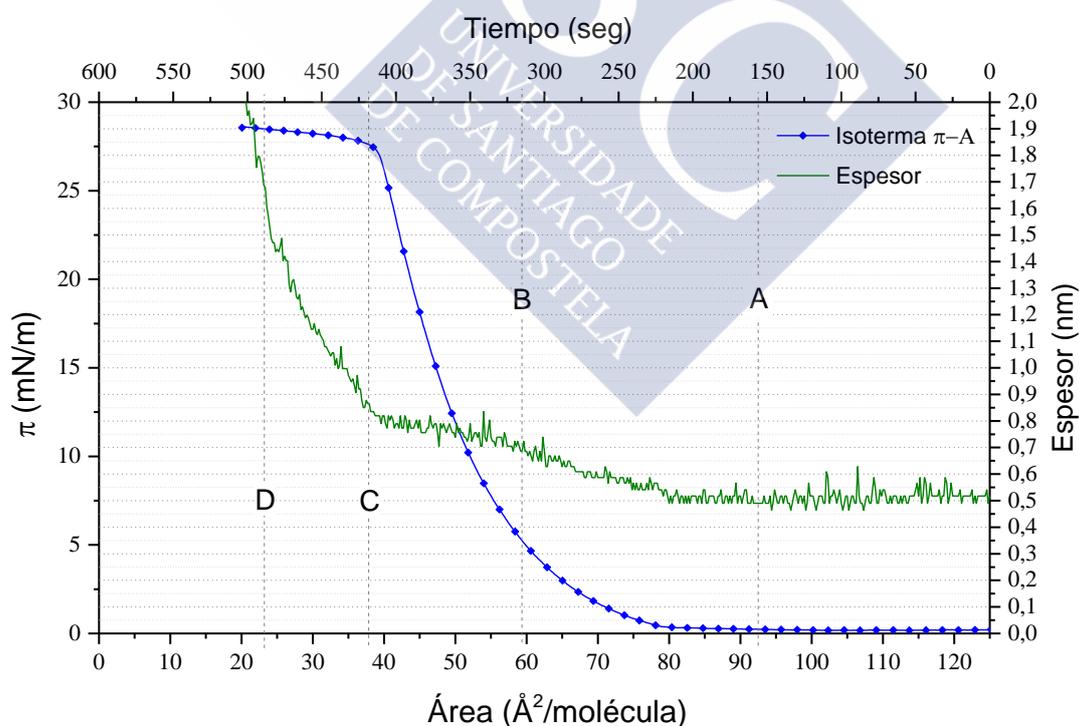


Figura 4.6.C.- Isoterma π -A e incremento del espesor de la monocapa de ácido γ -linolénico, extendida sobre agua a la temperatura de 10 °C. Diferentes puntos en los que se tomaron las imágenes BAM señalados con A, B, C y D.

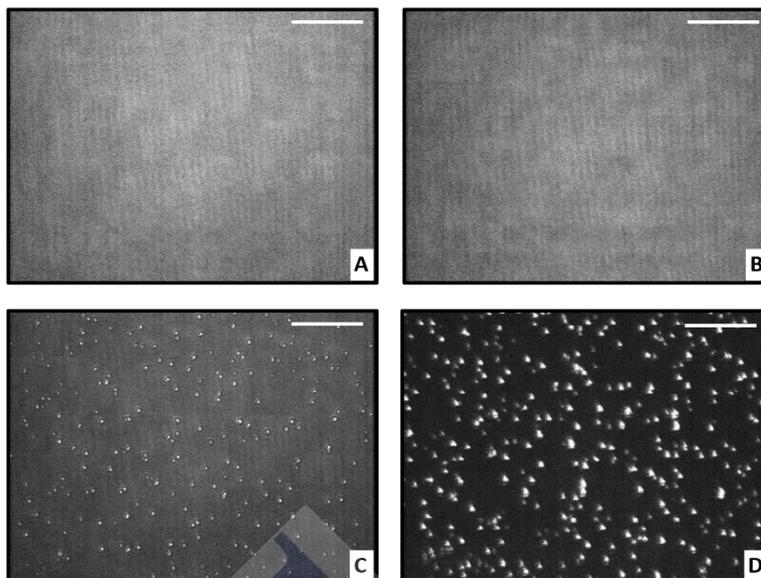


Ilustración 4.6.B.- *Imágenes BAM correspondientes a la monocapa de ácido γ -linolénico, correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a pH 6-7 y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.*

4.6.3 Influencia del número de moléculas

El estudio de la influencia del número de moléculas (**Figura 4.6.D**) muestra un comportamiento similar al observado en las monocapas del ácido α -linolénico. El incremento de la cantidad de moléculas depositadas se corresponde con un ligero aumento en el área inicial bajo la curva, mostrándose prácticamente invariables los valores de la presión superficial.

De la misma forma que ocurría con la monocapa correspondiente a un depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, tanto el depósito de $2 \cdot 10^{16}$ como de $6 \cdot 10^{16}$ moléculas presentan una curva de espesor muy similares, generándose su incremento de forma simultánea al de la presión y alzándose de forma energética en el punto de colapso.

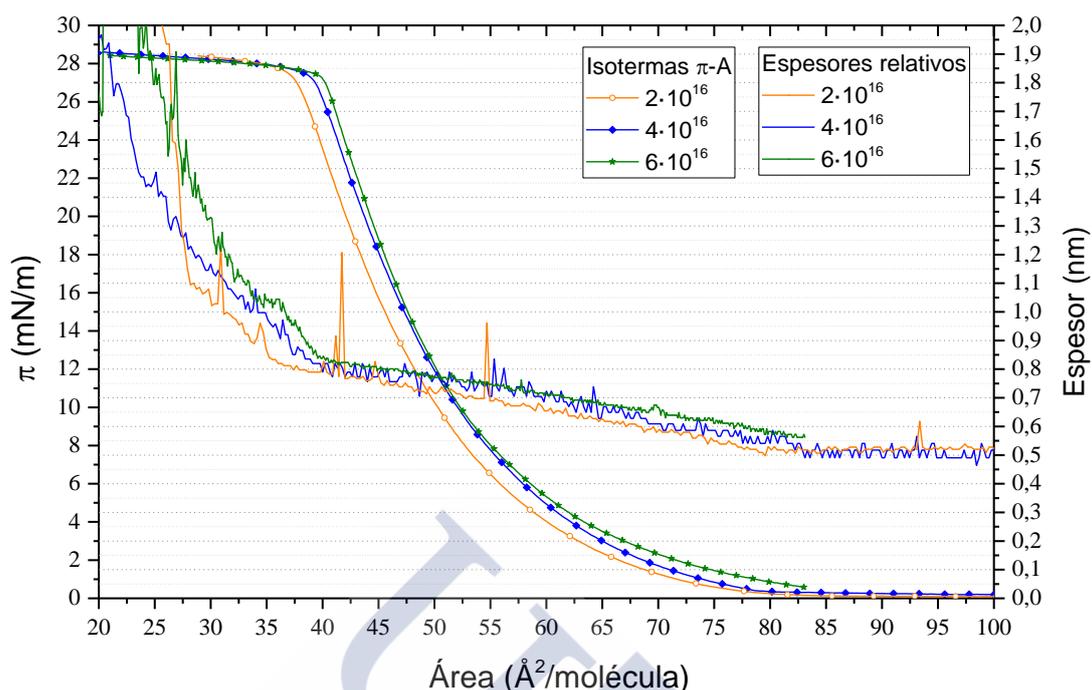


Figura 4.6.D.- Isotermas π -A y curvas de espesor de las monocapas de *ácido γ -linolénico*, correspondientes al depósito de varios números de moléculas, extendidas sobre la interfaz aire/agua a la temperatura de 10 °C y comprimidas a la velocidad de 50 cm^2/min .

Los valores más característicos de las isotermas y espesores a diferentes número de moléculas vienen recogidos en la **Tabla 4.6.A**, tales como el área inicial bajo la curva (A_0), el área límite de la fase de *líquido expandido* extrapolada a presión cero ($A_{0(LE)}$), la presión superficial de colapso (π_c), el valor del área molecular al cual se produce dicho colapso (A_c), el valor de espesor durante la fase *gas* (E_G) y el valor del espesor máximo que alcanza la monocapa mientras se encuentra en estado de *líquido expandido* (E_{LE}).

Número de moléculas	A_0 ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	$A_{0(LE)}$ ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	A_c ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	E_G (nm)	E_{LE} (nm)
$2 \cdot 10^{16}$	77,9	53,9	27,8	37,4	0,52	0,82
$4 \cdot 10^{16}$	80,5	55,1	27,8	39,1	0,52	0,82
$6 \cdot 10^{16}$	-	55,8	27,85	39,7	-	0,83

Tabla 4.6.A.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido linoleico obtenidos sobre agua por extensión de diferente número de moléculas de ácido graso.

4.6.4 Influencia de la temperatura

Tal como se observa en la **Figura 4.6.E**, el ácido γ -linolénico presenta, al igual que su isómero, el ácido α -linolénico, una bajada del área molecular con el aumento de la temperatura experimental, es decir, el film de este ácido graso omega-3 presenta cierta solubilidad en el sustrato acuoso.

En el estudio del ácido α -linolénico, se vio que presentaba una solubilidad mucho más acentuada que el ácido linoleico, presentando una diferencia de $11,8 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ entre las áreas de colapso relativas a las monocapas depositadas a temperaturas de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y de $10 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras, el ácido linoleico tan solo presenta una variación del área molecular de $0,9 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. En el caso del ácido γ -linolénico, dicha diferencia es de $5,5 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, presentando así una solubilidad intermedia respecto a los dos ácidos grasos analizados previamente.

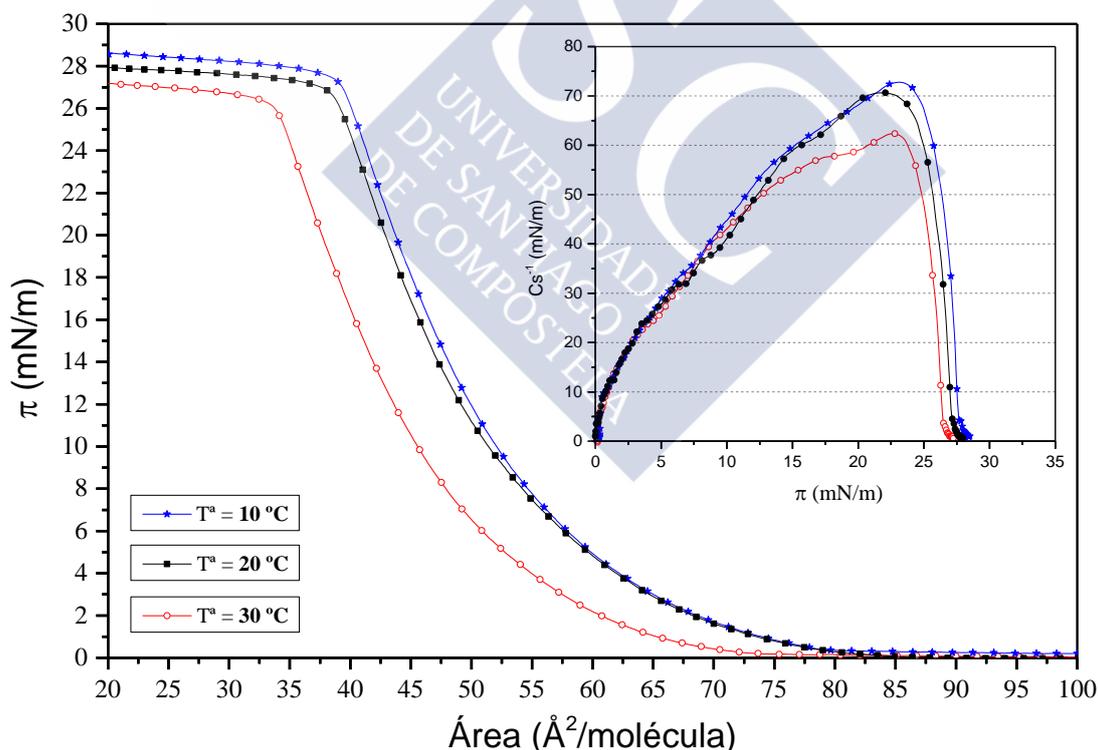


Figura 4.6.E.- Isothermas π -A de las monocapas de **ácido γ -linolénico**, extendidas sobre agua a diferentes temperaturas, correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, comprimidas a velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. En el interior, representación de los correspondientes módulos de compresibilidad frente a la presión.

La **Tabla 4.6.B** muestra los valores correspondientes a diferentes parámetros de la monocapa de ácido γ -linolénico a diferentes temperaturas, tales como área inicial bajo la curva (A_0), área límite de la fase de *líquido expandido* extrapolada a presión cero ($A_{0(LE)}$), área molecular a la cual se produce el colapso (A_c), presión superficial de colapso (π_c) y valores de módulo de compresibilidad máximo (C_s^{-1}).

Temperatura (°C)	A_0 (Å ² /molécula)	$A_{0(LE)}$ (Å ² /molécula)	A_c (Å ² /molécula)	π_c (mN/m)	C_s^{-1} (mN/m)
10	80,5	55,1	39,1	27,8	72,8
20	80,5	55	38,4	27,4	70,7
30	74	49,2	33,6	26,6	62,4

Tabla 4.6.B.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido gamma-linolénico obtenidos sobre agua a diferentes temperaturas.

En la **Ilustración 4.6.C** se muestran las imágenes BAM correspondientes a diferentes puntos de presión superficial y a tres temperaturas diferentes, con la finalidad de analizar con mayor detalle la pérdida de material que experimentan las monocapas de ácido γ -linolénico.

Las imágenes microscópicas muestran que a la temperatura de 10 °C no existe ninguna aparente pérdida de material desde la monocapa, ya que la imagen permanece homogénea a todos los valores de presión superficial.

Durante la compresión de la monocapa a temperatura de 20 °C, se observa una imagen homogénea hasta aproximadamente los 10 mN/m donde se empiezan a ver pequeñas estructuras que nos indican la pérdida de moléculas a la subfase acuosa. Este hecho coincidiría con las isotermas observadas para 10 y 20 °C, puesto que son iguales hasta los 7-8 mN/m donde la comprimida a mayor temperatura empieza a presentar menor área, confirmando así que esta bajada de área se debe a la pérdida de moléculas hacia el sustrato acuoso.

A 30 °C los dominios característicos se observan a lo largo de toda la compresión, poniendo de manifiesto la inestabilidad de la monocapa de ácido γ -linolénico bajo estas condiciones experimentales. Esta circunstancia también coincide con la obtención de la isoterma de menor área.

Las imágenes de los colapsos no se muestran puesto que son idénticas independientemente de la temperatura a la que se realizaron.

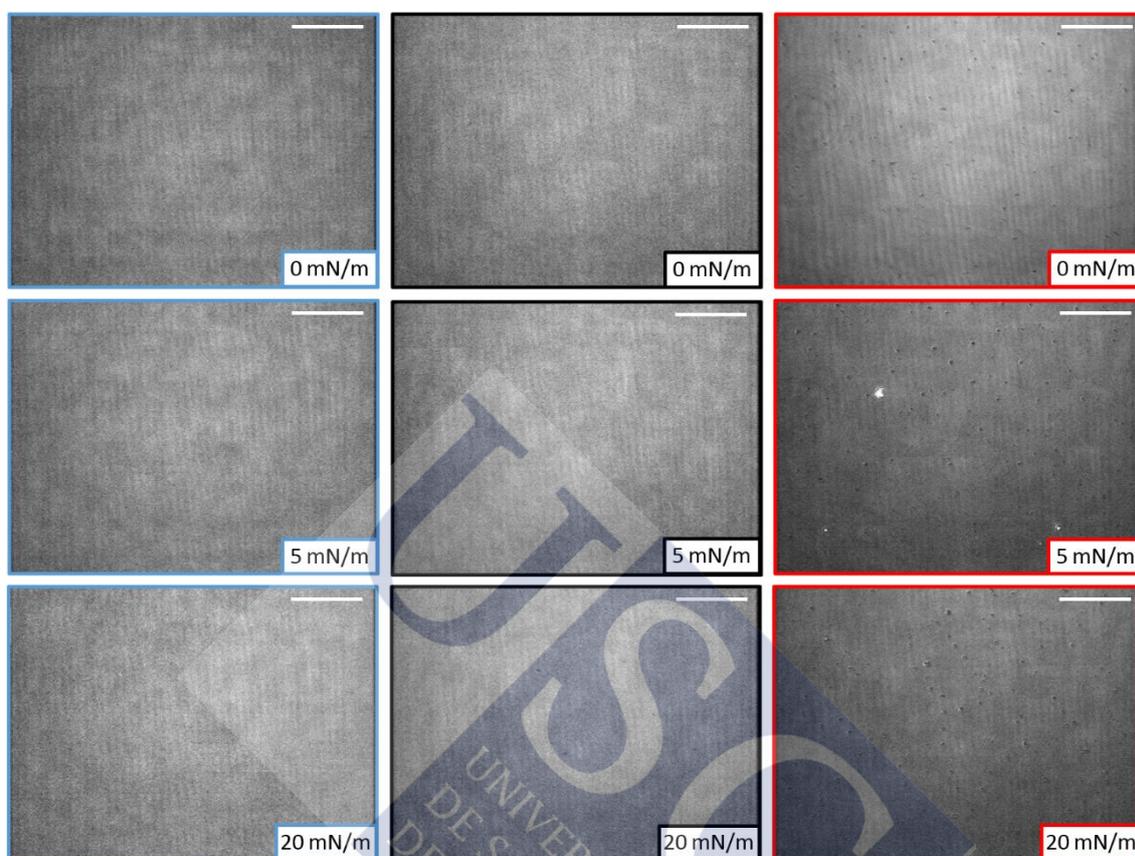


Ilustración 4.6.F Imágenes BAM correspondientes a monocapas de ácido γ -linolénico comprimidas a diferentes temperaturas (de izquierda a derecha 10, 20 y 30 °C respectivamente) y a la presión superficial señalada. La barra blanca corresponde a una distancia de 20 μm .

4.7 ÁCIDO ESTEARIDÓNICO

4.7.1 Isoterma π -A y módulo de compresibilidad

En la **Figura 4.7.A** se muestra la isoterma π -A de la monocapa de ácido estearidónico (18:4, ω -3). Al igual que los anteriores ácidos grasos insaturados, la monocapa de este omega-3 presenta un comportamiento de *líquido expandido*. Su área inicial es la más elevada de todos los ácidos grasos estudiados debido al elevado número de insaturaciones presentes en su molécula (18:4). De la misma forma, el módulo de compresibilidad es el más bajo registrado de todas las sustancias analizadas, manifestando así, una mayor dificultad para empaquetar sus moléculas en la monocapa.

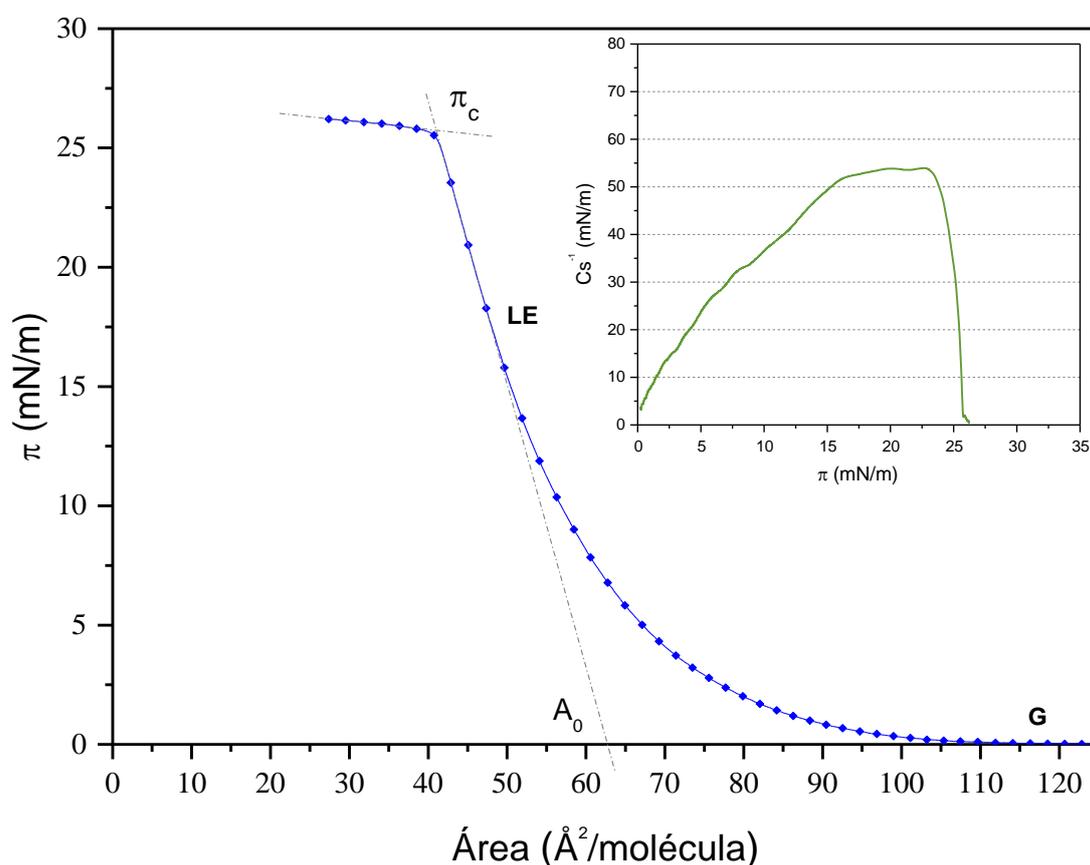


Figura 4.7.A.- Isoterma π -A de la monocapa de **ácido estearidónico**, correspondiente al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a la temperatura de 10 °C, pH 6-7 y comprimida a la velocidad de 50 cm^2/min . En el interior, representación del módulo de compresibilidad frente a la presión.

La fase *gas* de la monocapa de ácido estearidónico está presente durante un corto período de tiempo dado que el área del inicio de la compresión es de 125 Å²/molécula y cuando se reduce a 106,6 Å²/molécula se inicia la transición al estado de *líquido expandido*, mediante la cual las moléculas comienzan a interactuar entre sí, generando un incremento de la presión superficial. Como ya se comentó, este valor muy elevado es debido a la presencia de los cuatro dobles enlaces en la molécula que la privan de mayor libertad y de alcanzar un mayor nivel de empaquetamiento.

El área límite extrapolada al eje de abscisas correspondiente al estado de *líquido expandido* es de 62,7 Å²/molécula. De la misma forma que ocurría con el área inicial, esta área límite también es el valor más elevado de todos los registrados para los ácidos grasos objeto de estudio.

La presión de colapso, determinada tomando la intersección de las dos tangentes trazadas en la isoterma (la correspondiente al área extrapolada a presión cero de la región de *líquido expandido* y la formada por los valores posteriores al colapso), ofrece un valor de 25,8 mN/m, inferior a todas las presiones de colapso obtenidas para el resto de ácidos grasos. El colapso tiene lugar a un área de 40,9 Å²/molécula.

Se obtuvo un módulo de compresibilidad de 54 mN/m, valor inferior al correspondiente al resto de ácidos grasos. Cabe mencionar como curiosidad que el valor obtenido por la monocapa del ácido oleico (104,6 mN/m) es prácticamente el doble que el alcanzado por el ácido estearidónico.

4.7.2 Microscopía de ángulo de Brewster

4.7.2.1 Espesor y configuración molecular

La curva de espesor relativo - área de la monocapa de ácido estearidónico se muestra junto con la isoterma π -A en la **Figura 4.7.B**. En dicha gráfica el espesor inicia su escalada simultáneamente a la de la presión, manteniéndose lineal hasta alcanzar los $40,9 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, momento en el cual el espesor sube de forma fortuita como consecuencia del colapso del film.

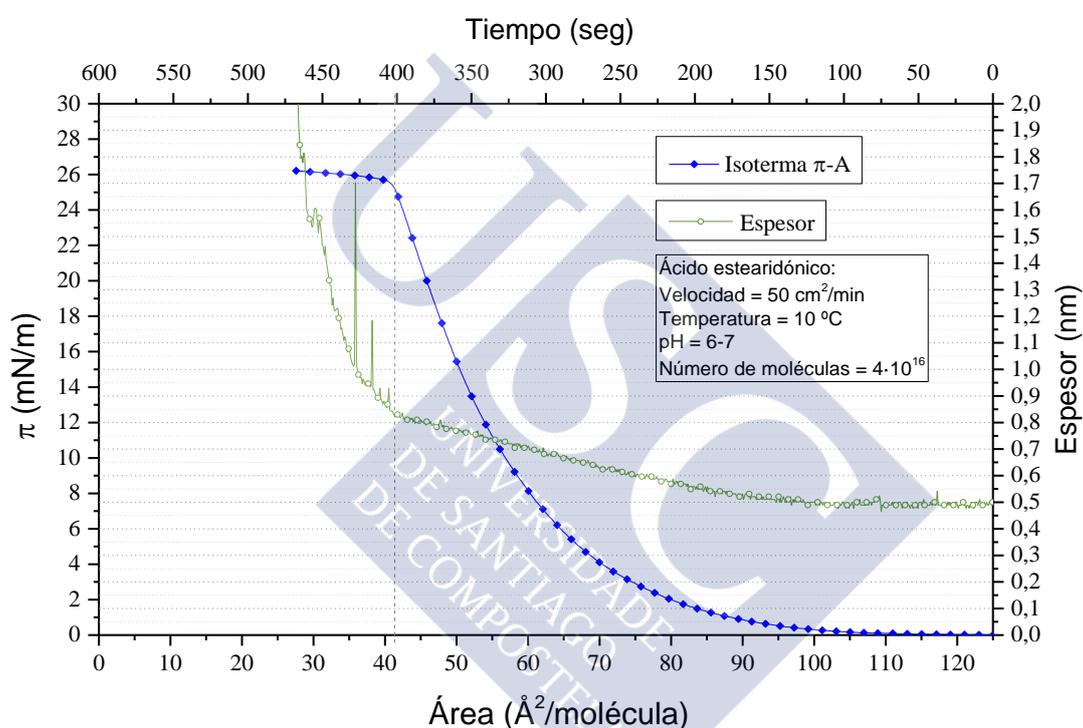


Figura 4.7.B.- Isoterma π -A y curva del espesor relativo de la monocapa de **ácido estearidónico**, extendida sobre agua a la temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}$, con un depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

Así pues, la monocapa de ácido estearidónico registra un espesor de $0,49 \text{ nm}$ durante la fase *gas*. Este espesor relativo es el menor valor obtenido para un ácido graso insaturado de los estudiados en este trabajo.

Durante el estado de *líquido expandido*, el valor máximo de espesor registrado es de $0,83 \text{ nm}$, alcanzado en el instante inmediatamente anterior al colapso de la

monocapa. Tan solo la monocapa del ácido γ -linolénico registra un menor valor en este punto de la isoterma, concretamente 0,01 nm menos.

Al igual que con el resto de sustancias estudiadas, se realizaron los correspondientes estudios de la molécula de ácido estearidónico para determinar la posible configuración molecular en las diferentes fases por las que atraviesa el film. Se vio que la máxima distancia intermolecular desde el carbono del grupo carboxílico se da hasta el décimo carbono y presenta un valor de 0,83 nm. Dicho valor coincide con el registrado cuando la monocapa se encuentra en estado de *líquido expandido*, inmediatamente antes de producirse su colapso. Por lo tanto, se postula que se encuentre con esa conformación y en posición perpendicular respecto de la superficie acuosa en dicho momento.

Respecto a la fase *gas*, teniendo presente que se registró un valor de 0,49 nm, la molécula de ácido estearidónico se encuentra inclinada unos $36,2^\circ$.

En la **Ilustración 4.7.A** se muestran ambas conformaciones moleculares.

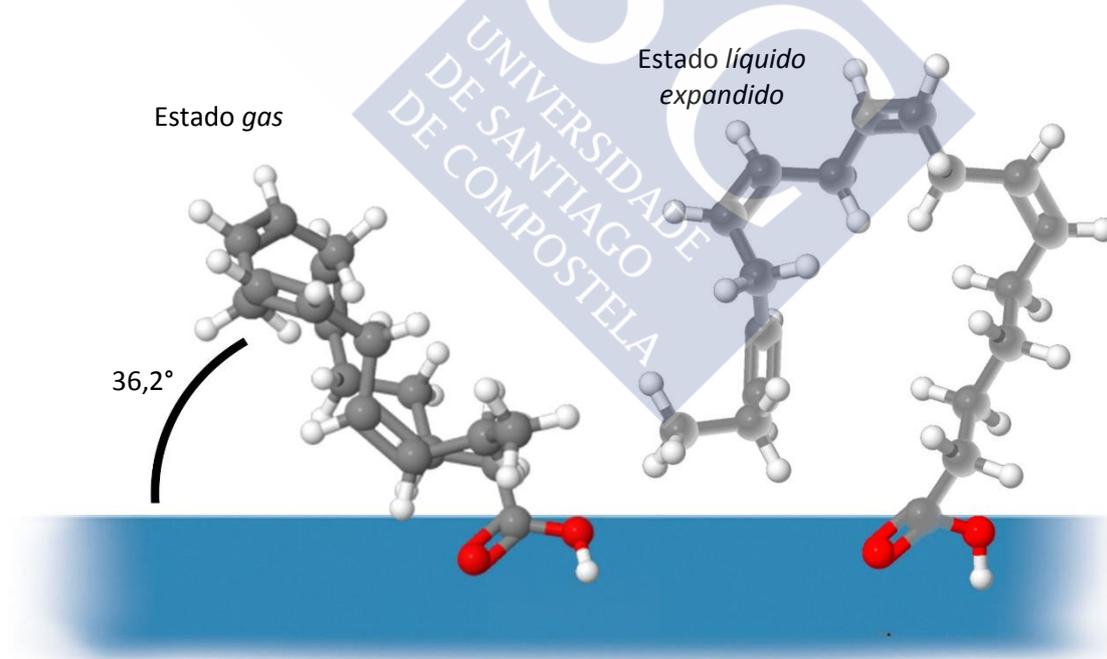


Ilustración 4.7.A.- Representación tridimensional de la configuración molecular del ácido estearidónico en los dos estados por los que atraviesa su monocapa.

4.7.2.2 Imágenes BAM y morfología

En la **Ilustración 4.7.B** se muestran las imágenes BAM correspondientes a la monocapa de ácido estearidónico. Dichas fotografías fueron tomadas en diferentes puntos de la isoterma π -A mostrada en la **Figura 4.7.C** junto a la curva del espesor relativo.

Las imágenes microscópicas nos muestran una imagen homogénea a lo largo de todas las fases *gas* y *líquido expandido*, es decir, no se observa ningún tipo de dominio hasta la ruptura de la monocapa, donde se observan las típicas estructuras brillantes de colapso.

En efecto, la **Imagen A** fue tomada durante la fase *gas* en la que, de la misma forma que ocurría con los ácidos α -linolénico y γ -linolénico, las moléculas del ácido estearidónico se encuentran muy expandidas y no presentan tendencia a formar dominios dando lugar a una fotografía microscópica difusa en su conjunto.

Al disminuir el área, mientras el film atravesaba un estado de *líquido expandido*, se observa una imagen homogénea característica de todos los ácidos grasos insaturados cuando se encuentran en este estado (**Imagen B**).

Al producirse el colapso, se tomó la **Imagen C**, la cual muestra de forma nítida la génesis de los gérmenes o “embriones” propios del colapso. Al continuar la compresión de la monocapa, dichas estructuras aumentan en tamaño, número e intensidad, dando lugar a los dominios brillantes tridimensionales que se muestran en la **Imagen D**.

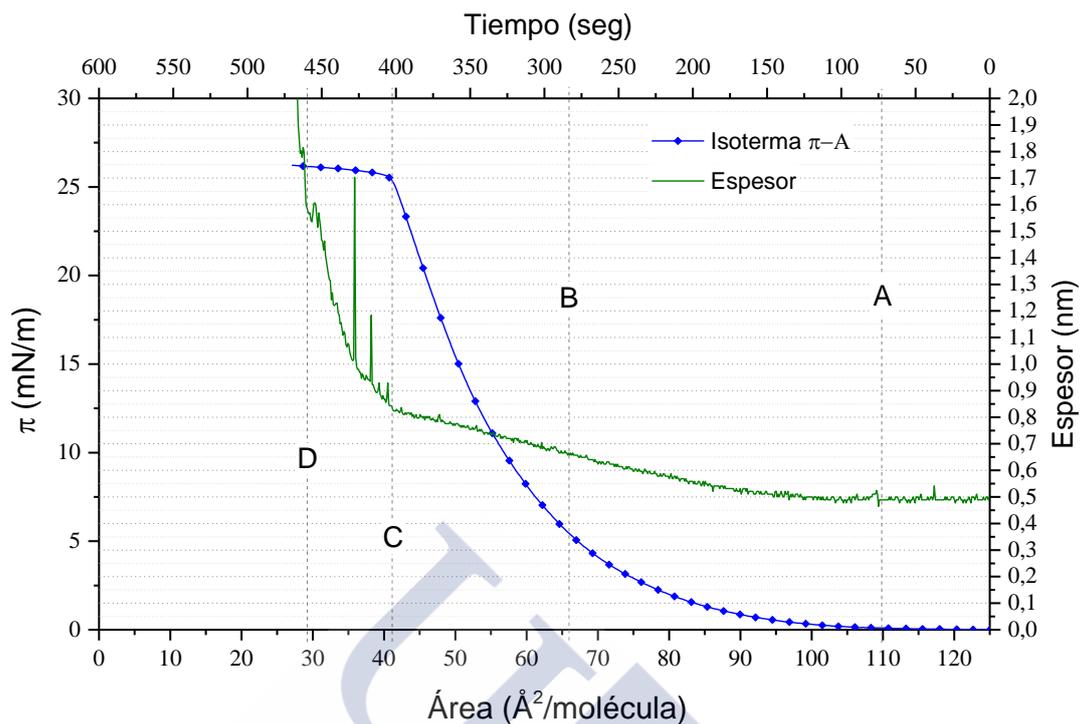


Figura 4.7.C.- Isoterma π -A y curva del espesor relativo de la monocapa de **ácido estearidónico** extendida sobre agua a la temperatura de 10 °C. Diferentes puntos en los que se tomaron las imágenes BAM señalados con A, B, C y D.

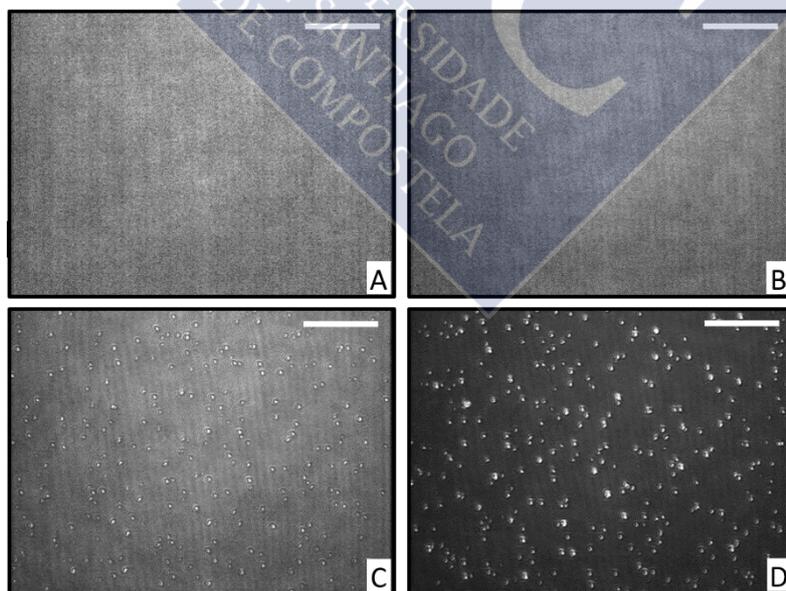


Ilustración 4.7.B.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa de **ácido estearidónico** correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a pH 6-7 y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. La barra blanca corresponde a una distancia

4.7.3 Influencia del número de moléculas

El estudio del número de moléculas (**Figura 4.7.D**) nos vuelve a exponer como la disminución del número de las mismas se corresponde con un descenso en el área inicial bajo la curva, mostrándose prácticamente invariables los valores de la presión superficial. Esta influencia del número de moléculas es similar a la recogida para las monocapas de los ácidos α -linolénico y γ -linolénico; y, a su vez, presenta un comportamiento contrario al mostrado por el resto de ácidos grasos estudiados en el presente trabajo.

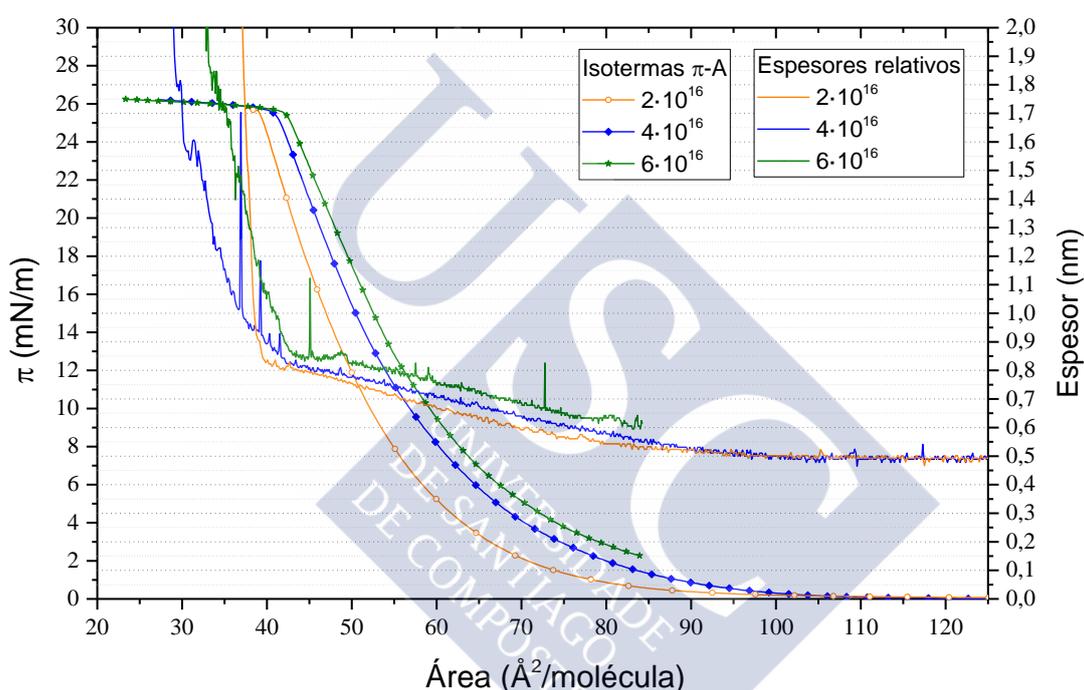


Figura 4.7.D.- Isothermas π -A y curvas del espesor de las monocapas de **ácido estearidónico**, correspondientes al depósito de varios números de moléculas, extendida sobre la interfase aire/agua a la temperatura de 10 °C, pH 6-7 y a velocidad de compresión de ...

De la misma forma que ocurría con la monocapa correspondiente a un depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, tanto para la de $2 \cdot 10^{16}$ como para el film de $6 \cdot 10^{16}$ moléculas, la curva del espesor presenta la misma forma, produciéndose su incremento de forma simultánea al de la presión y adoptando un abrupto crecimiento en el punto de colapso. Cabe mencionar que en la isoterma correspondiente al depósito de $6 \cdot 10^{16}$ moléculas no se observa la fase *gas*, puesto que ésta finaliza a un valor de área molecular superior que el área inicial de compresión.

Los valores más característicos de las isothermas y curvas de espesor a diferentes número de moléculas vienen recogidos en la **Tabla 4.7.A**. Éstos son: el área inicial bajo la curva (A_0), el área límite de la fase de *líquido expandido* extrapolada a presión cero ($A_{0(LE)}$), la presión superficial de colapso (π_c), el valor del área molecular a la cual se produce dicho colapso (A_c), el espesor en la fase *gas* (E_G) y el valor del espesor máximo que alcanza la monocapa mientras se encuentra en estado de *líquido expandido* (E_{LE}).

Número de moléculas	A_0 ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	$A_{0(LE)}$ ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	A_c ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	E_G (nm)	E_{LE} (nm)
$2 \cdot 10^{16}$	100	56,5	25,7	39,2	0,495	0,82
$4 \cdot 10^{16}$	106,6	62,7	25,8	40,9	0,49	0,83
$6 \cdot 10^{16}$	-	66,4	25,75	42,1	-	0,85

Tabla 4.7.A.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido estearidónico obtenidos sobre agua por extensión de diferente número de moléculas de ácido graso.



4.7.4 Influencia de la temperatura

Tal como sucede con los ácidos linoleico y los isómeros linolénicos, el ácido estearidónico también presenta problemas de estabilidad a temperaturas mayores a 10°. Así pues, el área de las isothermas registradas muestra un menor valor cuando el experimento se realiza a temperaturas elevadas (**Figura 4.7.E**).

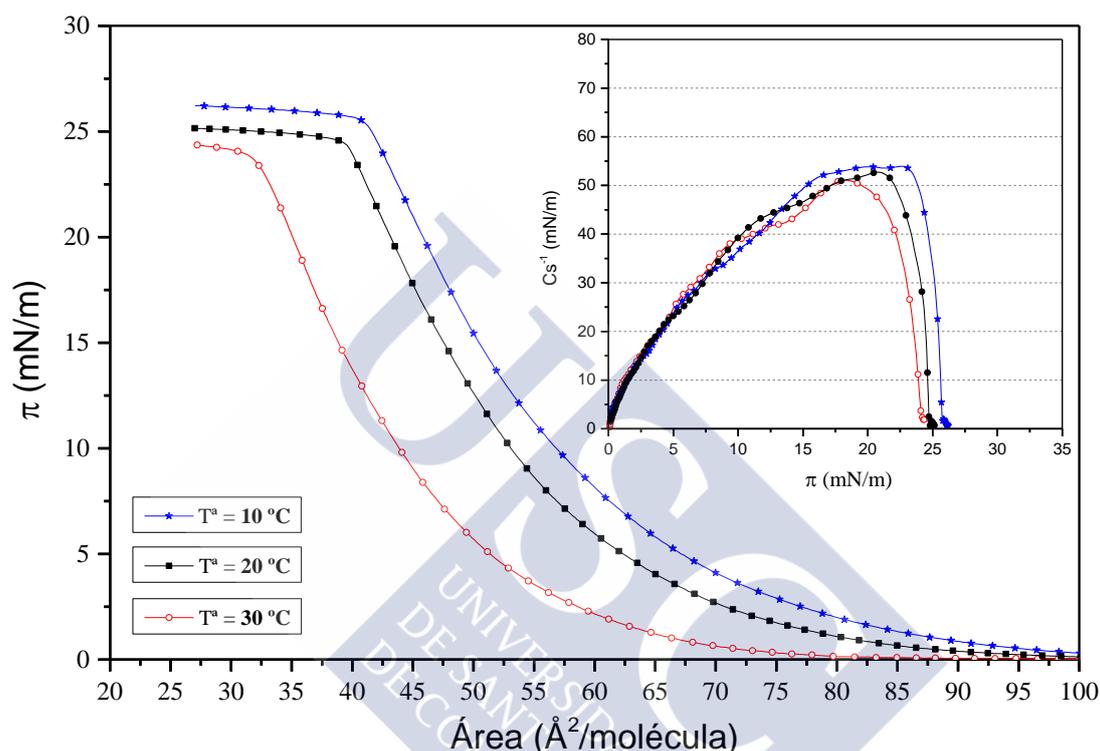


Figura 4.7.E.- Isothermas π -A de las monocapas de **ácido estearidónico**, extendidas sobre agua a diferentes temperaturas, correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, comprimidas a velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. En el interior, representación de los correspondientes módulos de compresibilidad frente a la presión superficial.

Con el objetivo de comparar este fenómeno de solubilidad entre los ácidos grasos insaturados que lo presentan, se compararon el valor de las áreas de colapso. En este caso, las monocapas de ácido estearidónico registran unas áreas de colapso de $35,1 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, $43,2 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ y $45,9 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ para las respectivas temperaturas de 30 , 20 y 10°C . Esto supone un incremento del área de $8,6 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ al descender la temperatura desde los 30°C hasta los 10°C . En los ácidos grasos vistos hasta el momento, se registraron diferencias de áreas de colapso para este descenso de temperatura de $0,9 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ para el ácido linoleico, $5,5 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ para el ácido γ -

linolénico y $12,7 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ para el ácido α -linolénico. Por lo tanto, la solubilidad presente en las monocapas de ácido estearidónico solo se ve superada por el ácido α -linolénico. Se trata de un resultado inesperado, puesto que hasta el momento un mayor número de insaturaciones daba lugar a una mayor solubilidad. La explicación a esta situación se halla probablemente en la conformación molecular de estos ácidos grasos insaturados.

En la **Tabla 4.7.B** se muestran los valores correspondientes a diferentes parámetros de la monocapa de ácido estearidónico a diferentes temperaturas, tales como el área inicial bajo la curva (A_0), área límite de la fase de *líquido expandido* extrapolada a presión cero ($A_{0(LE)}$), área molecular a la cual se produce el colapso (A_c), presión superficial de colapso (π_c) y módulo de compresibilidad máximo (C_s^{-1}).

Temperatura (°C)	A_0 ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	$A_{0(LE)}$ ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	A_c ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	C_s^{-1} (mN/m)
10	106,6	62,7	40,9	25,8	54
20	99,8	59	39,4	24,7	52,7
30	78,1	49	32,3	24	51,1

Tabla 4.7.B.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido estearidónico obtenidos sobre agua a diferentes temperaturas.

Se complementó el presente estudio con la realización de imágenes BAM para detectar posibles dominios indicativos de la pérdida de moléculas por solubilidad. Dichas imágenes aparecen recogidas en la **Ilustración 4.7.C**.

A $30 \text{ }^\circ\text{C}$ se observan los característicos puntos correspondientes a la pérdida de moléculas en todas las imágenes, desde la fase *gas* hasta momentos previos al propio colapso de la monocapa. A $20 \text{ }^\circ\text{C}$ estos dominios brillantes se mantienen también en todas las imágenes aunque disminuyen en número, sobre todo en la fase *gas*. Por último, a $10 \text{ }^\circ\text{C}$ no se observa ningún punto brillante durante la compresión de la monocapa hasta alcanzar el propio colapso del film, descartando así la posibilidad de que exista solubilidad bajo estas condiciones experimentales. Las fotos de dicho colapso son las mismas a las diferentes temperaturas estudiadas.

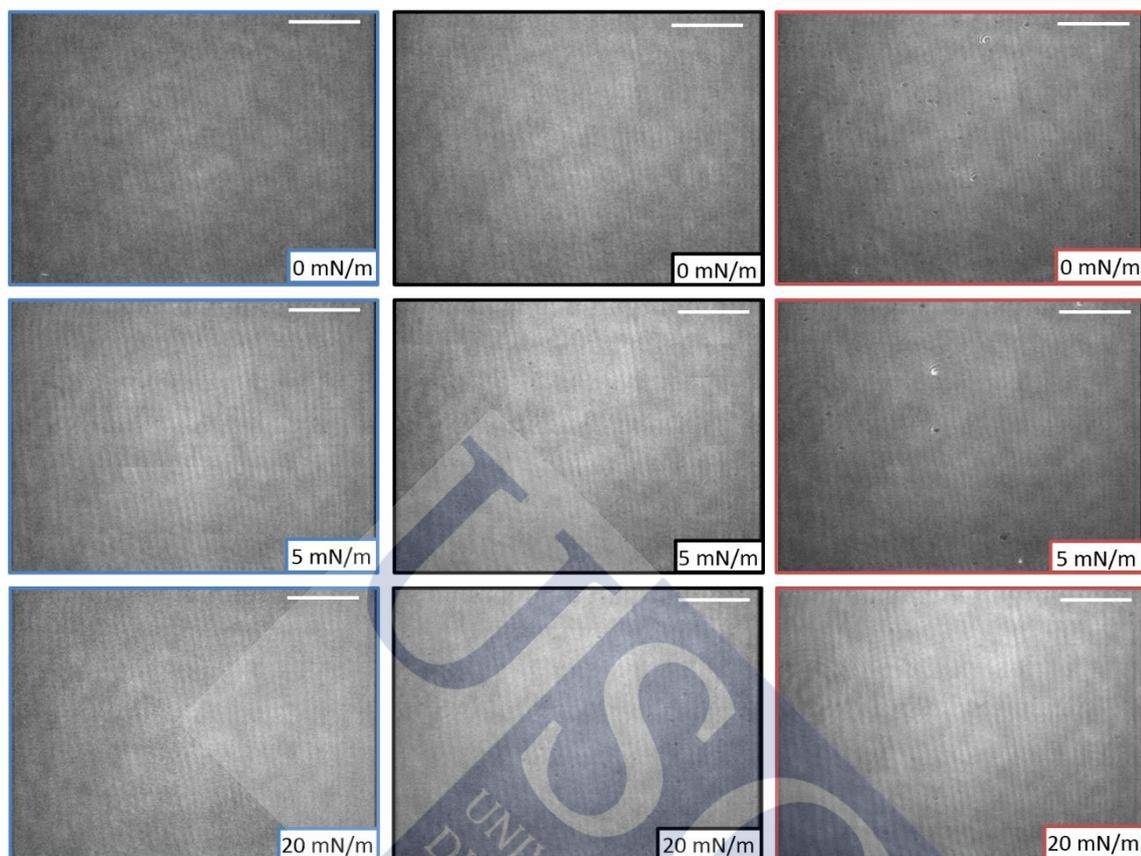


Ilustración 4.7.F.- *Imágenes BAM correspondientes a monocapas de ácido estearidónico comprimidas a diferentes temperaturas (de izquierda a derecha 10, 20 y 30 °C respectivamente) y a la presión superficial señalada. La barra blanca corresponde a una distancia de 20 μm .*

4.8 ÁCIDO EICOSADIENOICO

4.8.1 Isoterma π -A y módulo de compresibilidad

En la **Figura 4.8.A** se muestra la isoterma presión superficial - área correspondiente a la monocapa de ácido eicosadienoico (20:2, ω -6), comprimida a la velocidad de 50 cm²/min, a la temperatura de 10 °C y a pH 6-7.

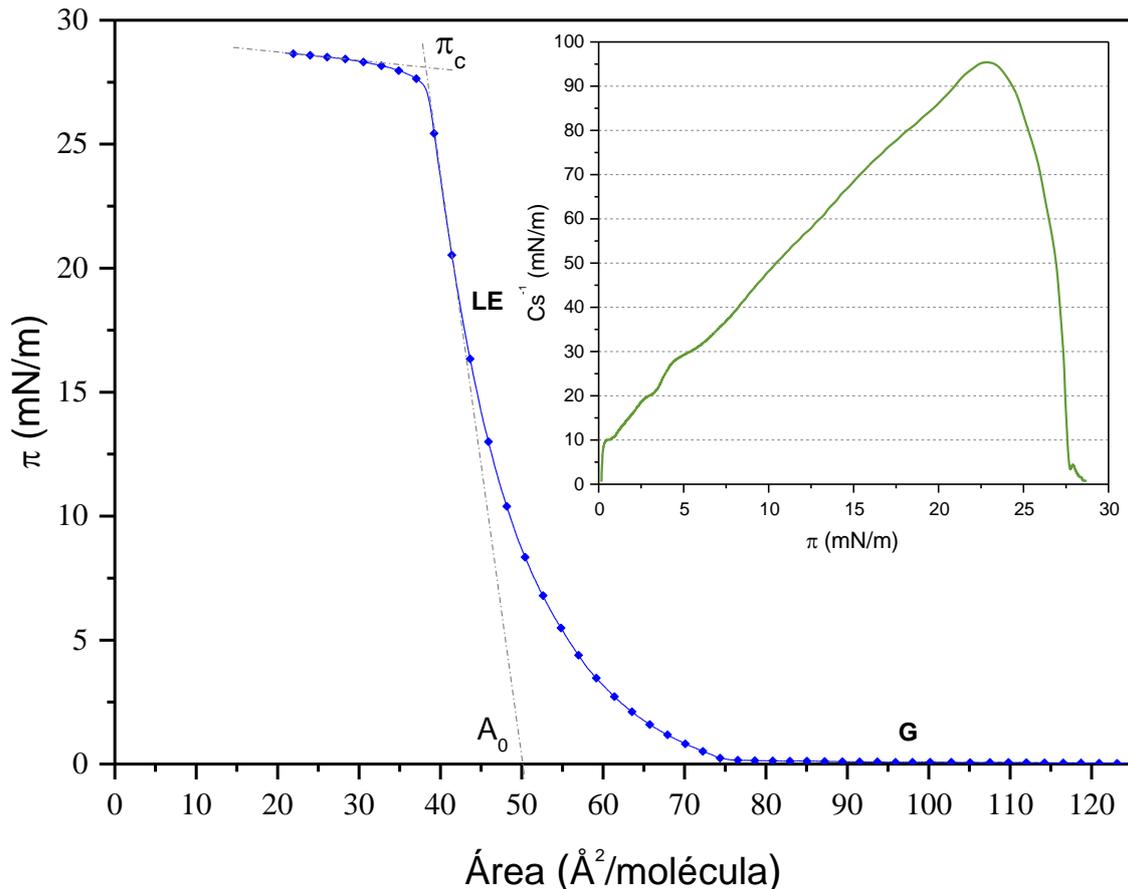


Figura 4.8.A.- Isoterma π -A de la monocapa de **ácido eicosadienoico**, correspondiente al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas. En el interior, representación del módulo de compresibilidad frente a la presión.

La isoterma de este omega-6 nos muestra que su monocapa se mantiene en estado *gas* hasta alcanzar un área de 74,5 \AA^2 /molécula, momento en el cual la presión superficial inicia su escalada. En este punto, el film muestra un comportamiento correspondiente al de un *líquido expandido*, tal como nos indica su módulo de compresibilidad, el cual alcanza un valor máximo de 95,5 mN/m a la presión superficial

de 22,9 mN/m. El área límite o área extrapolada a presión cero del segmento de mayor pendiente de la curva es de 50,1 Å²/molécula, ligeramente superior a los 48 Å²/molécula obtenidos por Peltonen (1989).

Cuando la monocapa de ácido eicosadienoico ocupa un área de 38,2 Å²/molécula tiene lugar el fenómeno de colapso de la monocapa, el cual se produce a una presión superficial de 28,1 mN/m. Este valor es ligeramente inferior al encontrado en la bibliografía, donde se registra una presión de colapso de 29,5 mN/m (Tyrode, Niga, Johnson, & Rutland, 2010). Sin embargo, existen importantes diferencias en las condiciones experimentales utilizadas por el equipo de Tyrode: temperatura de 21 °C, atmósfera de nitrógeno, velocidad de compresión de 10 mm/min, cubeta de tamaño siete veces inferior a la usada en el presente estudio.

Desde el punto de vista comparativo, este ácido graso presenta una gran importancia al presentar el mismo número de insaturaciones y pertenecer al mismo grupo omega que el ácido linoleico (18:2, ω-6). En efecto, la única diferencia estructural radica en los dos átomos de carbono extra que presenta el ácido eicosadienoico respecto del ácido linoleico.

Dicha variación estructural implica un aumento de 3,4 Å²/molécula en el área límite del estado de *líquido expandido* de la monocapa de ácido eicosadienoico. Además, la presión de colapso disminuye desde 28,7 mN/m hasta 28,1 mN/m, presentando el ácido eicosadienoico un área de colapso superior en 0,6 Å²/molécula. Por último, el módulo de compresibilidad es prácticamente el mismo, 95,2 mN/m para el ácido linoleico y 95,5 mN/m en el caso del ácido eicosadienoico. Esta última diferencia nos indica que la monocapa del ácido linoleico presenta una mayor pendiente durante la fase de *líquido expandido*, dado que C_s^{-1} es directamente proporcional al área y a la pendiente.

4.8.2 Microscopía de ángulo de Brewster

4.8.2.1 Espesor y configuración molecular

En la **Figura 4.8.B** se muestra la curva del espesor relativo de la monocapa de ácido eicosadienoico sincronizada con la isoterma π -A. En dicha representación se puede observar como el espesor inicia su escalada de forma simultánea a la de la presión, manteniendo un comportamiento lineal hasta que tiene lugar el colapso del film (área de $38,2 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$), momento en el cual el espesor acelera su ascenso de forma abrupta como consecuencia del colapso de la monocapa.

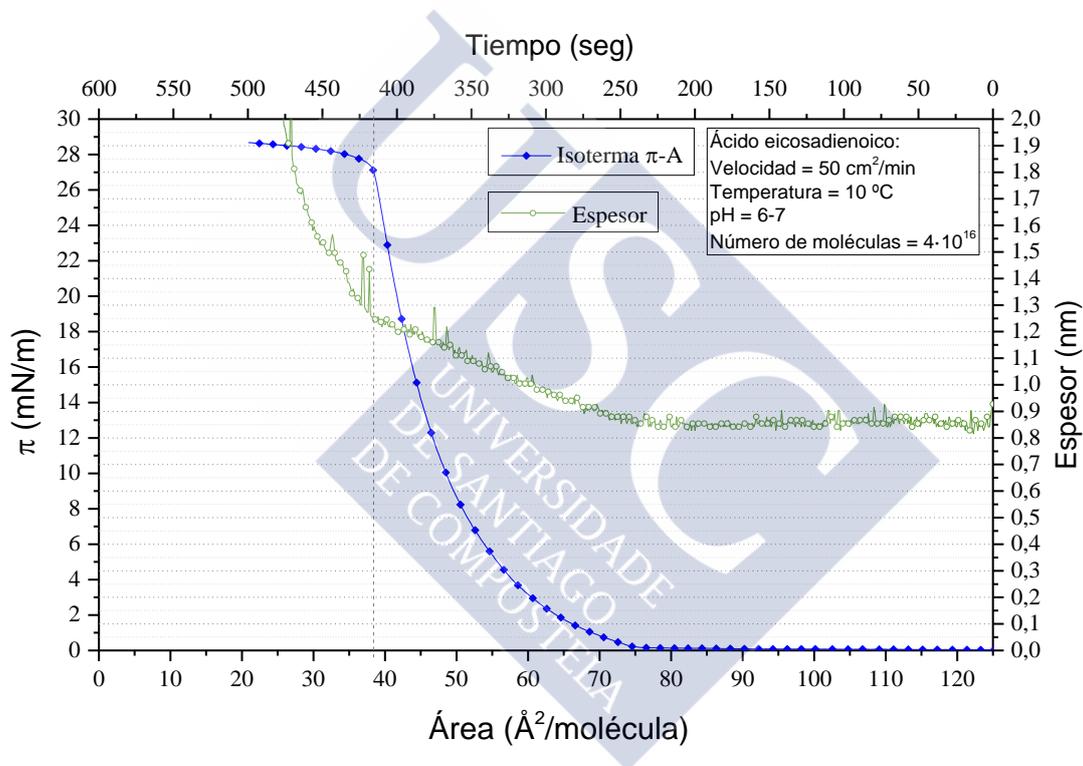


Figura 4.8.B.- Isoterma π -A y curva del espesor de la monocapa de **ácido eicosadienoico**, extendida sobre agua a la temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}$, con un depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimida a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

Según este registro de espesor relativo, la monocapa del ácido eicosadienoico muestra durante la fase *gas* un valor de $0,85 \text{ nm}$. Por otro lado, el valor máximo de espesor alcanzado por el film mientras atraviesa el estado de *líquido expandido* es de $1,25 \text{ nm}$, en el momento inmediatamente previo al colapso de la monocapa. Los valores

obtenidos para el ácido linoleico fueron de 0,67 nm y 1,025 nm para los estados de *gas* y de *líquido expandido* respectivamente.

En la **Ilustración 4.8.A** se muestra la posible conformación de la molécula de ácido eicosadienoico según las fuentes consultadas (NCBI). Tras un análisis de varias mediciones realizadas sobre dicha molécula, se determinó que el átomo de carbono más lejano al carbono del grupo carboxílico era el décimo cuarto. Dicha distancia es de 1,366 nm, valor bastante cercano a los 1,25 nm obtenidos como valor máximo de espesor en el estado de *líquido expandido*, lo cual indica que en ese punto las moléculas del ácido graso se encuentran en una posición casi perpendicular a la superficie del sustrato acuoso.

En cuanto a la fase *gas*, se ha calculado mediante trigonometría que las moléculas del ácido eicosadienoico se encontrarían inclinadas aproximadamente unos $41,9^\circ$.

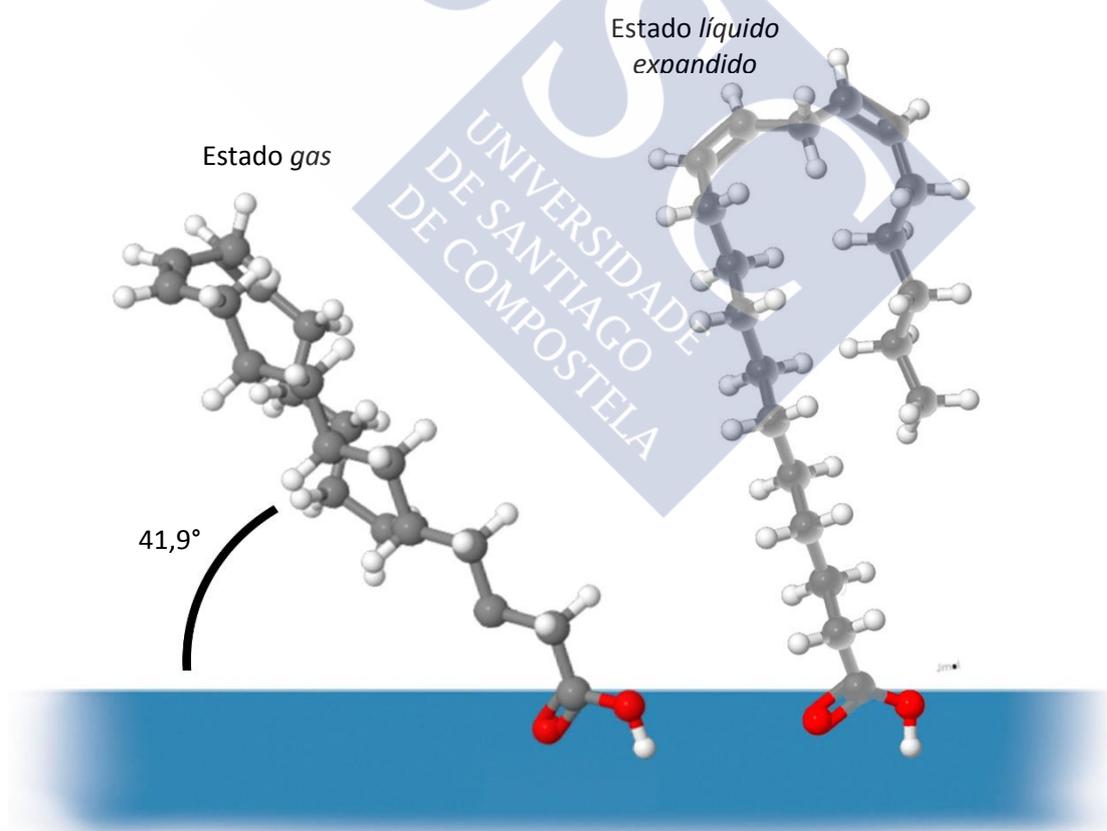


Ilustración 4.8.A.- Representación tridimensional de la conformación molecular que presenta el ácido eicosadienoico en los diferentes estados por los que atraviesa su monocapa.

4.8.2.2 Imágenes BAM y morfología

Las imágenes BAM obtenidas para la monocapa de ácido eicosadienoico se muestran en la **Ilustración 4.8.B**. En la **Figura 4.8.C** se muestra de nuevo la curva del espesor y la isoterma π -A pero ahora incluyendo los puntos, señalados mediante letras (**A-F**), en los que se tomaron las imágenes microscópicas.

Se realizó la **Imagen A** al principio de la compresión, cuando la presión permanece en cero y el espesor relativo en 0,85 nm. En ella se observan dominios grisáceos conteniendo huecos oscuros con agua de forma ovalada, que recuerdan a los observados en la monocapa de ácido linoleico en esta misma fase *gas*.

A medida que el área se reduce, las moléculas adquieren una posición cada vez más vertical, pasando la monocapa a un estado de *líquido expandido*, durante el cual se registra la **Imagen B**, homogénea en su totalidad de la misma forma que ocurre con el resto de ácidos grasos insaturados estudiados cuando se hallan en este estado.

Al producirse el colapso se observan puntos brillantes correspondientes a los gérmenes o “embriones” característicos del mismo, tal como se observa en la **Imagen C**. A menores áreas, los pequeños núcleos tridimensionales de condensación aparecen mucho más definidos (**Imagen D**).

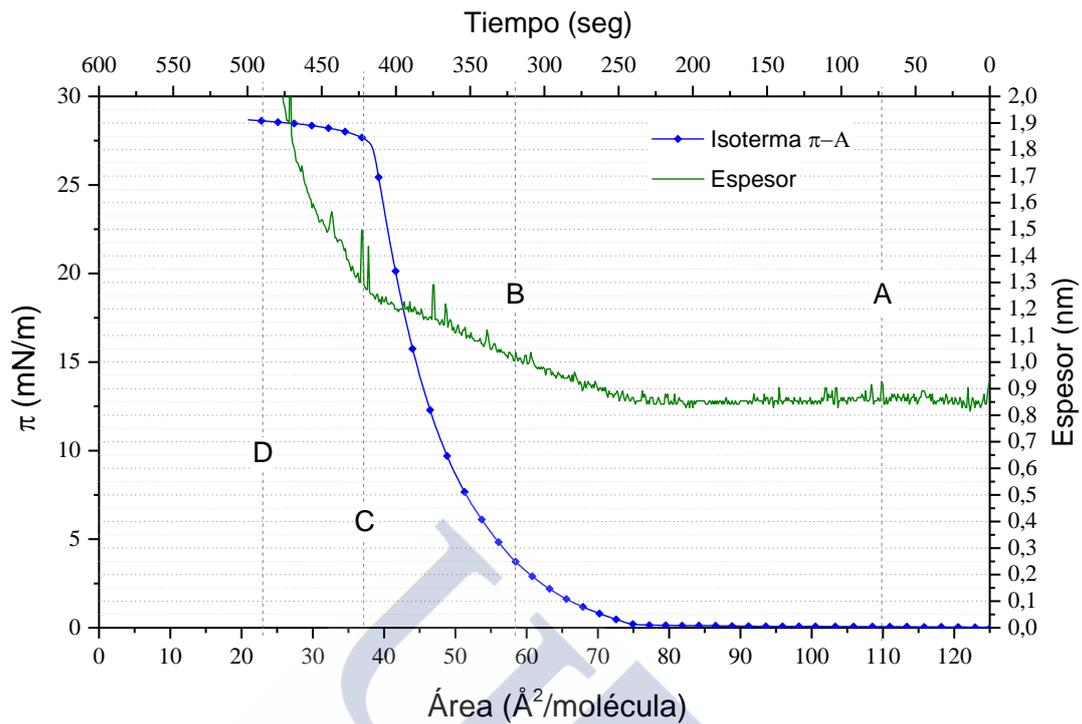


Figura 4.8.C.- *Isoterma π -A y curva del espesor de la monocapa de ácido eicosadienoico extendida sobre agua a la temperatura de 10 °C. Diferentes puntos en los que se tomaron las imágenes BAM señalados con A, B, C y D.*

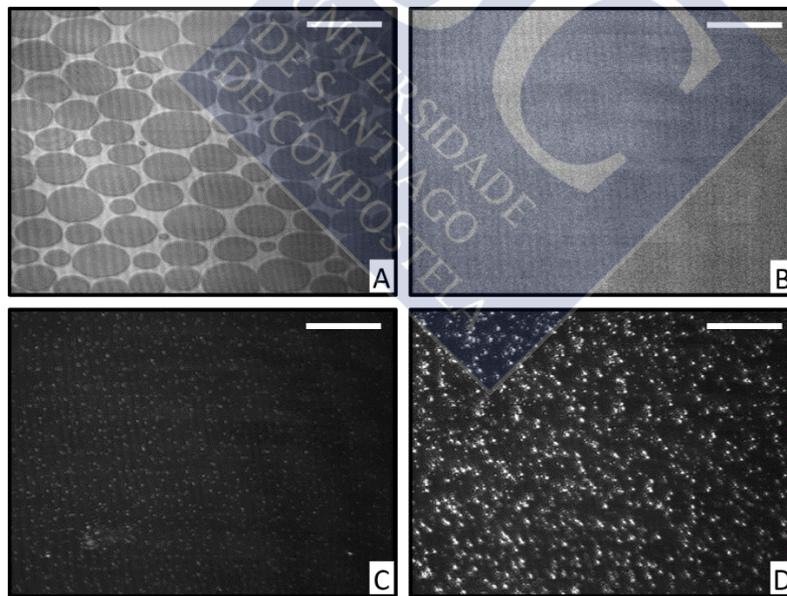


Ilustración 4.8.B.- *Imágenes BAM de la monocapa de ácido eicosadienoico, correspondientes al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, extendida sobre agua a la temperatura de 10 °C. La barra blanca corresponde a una distancia de 20 μm .*

4.8.3 Influencia del número de moléculas

En la **Figura 4.8.D**, se muestran las isothermas de ácido eicosadienoico correspondientes al depósito de $2 \cdot 10^{16}$ y de $6 \cdot 10^{16}$ moléculas, junto con el registro de su espesor relativo. El estudio nos muestra en esta ocasión una mínima variación en las áreas de las isothermas, prácticamente despreciable. En ambos casos, el espesor obtenido presenta un comportamiento similar al exhibido por la monocapa correspondiente a un depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas.

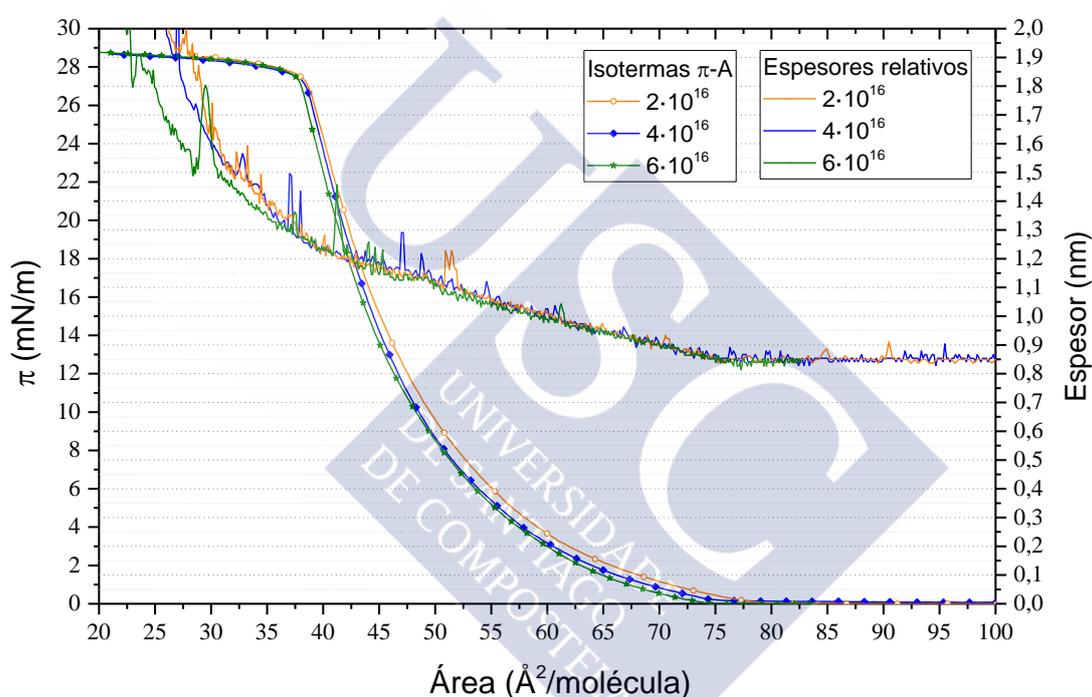


Figura 4.8.D.- Isothermas π -A y curvas de espesor de las monocapas de **ácido eicosadienoico**, correspondientes al depósito de varios números de moléculas, extendidas sobre la interfaz aire/agua a la temperatura de 10 °C, pH 6-7 y comprimidas a velocidad de 50 cm^2/min .

En la **Tabla 4.8.A** se muestran los valores más característicos de las isothermas π -A y curvas de espesores de monocapas de ácido eicosadienoico obtenidas por extensión de diferente número de moléculas tales como el área inicial bajo la curva (A_0), el área límite de la fase de *líquido expandido* extrapolada a presión cero ($A_{0(LE)}$), la presión

superficial de colapso (π_c), el valor del área molecular al cual se produce dicho colapso (A_c), el espesor relativo durante la fase gas (E_G) y el valor del espesor máximo que alcanza la monocapa mientras se encuentra en estado de líquido expandido (E_{LE}).

Número de moléculas	A_0 ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	$A_{0(LE)}$ ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	A_c ($\text{Å}^2/\text{molécula}$)	E_G (nm)	E_{LE} (nm)
$2 \cdot 10^{16}$	77	51,7	28,1	38,4	0,85	1,23
$4 \cdot 10^{16}$	74,5	50,1	28,1	38,2	0,85	1,25
$6 \cdot 10^{16}$	74	50,5	28,2	37,7	0,84	1,27

Tabla 4.8.A.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido eicosadienoico por extensión de diferente número de moléculas de ácido graso.

4.8.4 Influencia de la temperatura

Las monocapas de ácido eicosadienoico (ω -6) no presentan solubilidad en la subfase acuosa. Como se puede observar en la **Figura 4.8.E**, el área bajo las isothermas de las monocapas a diferentes temperaturas, aumenta con el incremento de la temperatura, presentando así un comportamiento similar al descrito en los casos de los ácidos esteárico y oleico. Esta circunstancia indica la importancia del número de insaturaciones para la solubilidad de los ácidos grasos bajo estas condiciones, ya que sí se evidenciaba en aquellos que presentaban un número superior a dos dobles enlaces (ácido γ -linolénico, ácido α -linolénico y ácido estearidónico).

Sin embargo, cabe recordar que las monocapas de ácido linoleico (18:2) sí mostraban tendencia a perder moléculas por disolución cuando se depositaban a una temperatura superior a 10 °C. Teniendo en cuenta que ambos ácidos grasos ω -6 presentan en su estructura molecular dos dobles enlaces, parece lógico achacar esta diferencia a la longitud de la cadena. En efecto, el ácido eicosadienoico presenta dos carbonos más en su cadena apolar que el ácido linoleico, lo cual aporta al primero un mayor carácter hidrófobo que dota de mayor estabilidad a su monocapa.

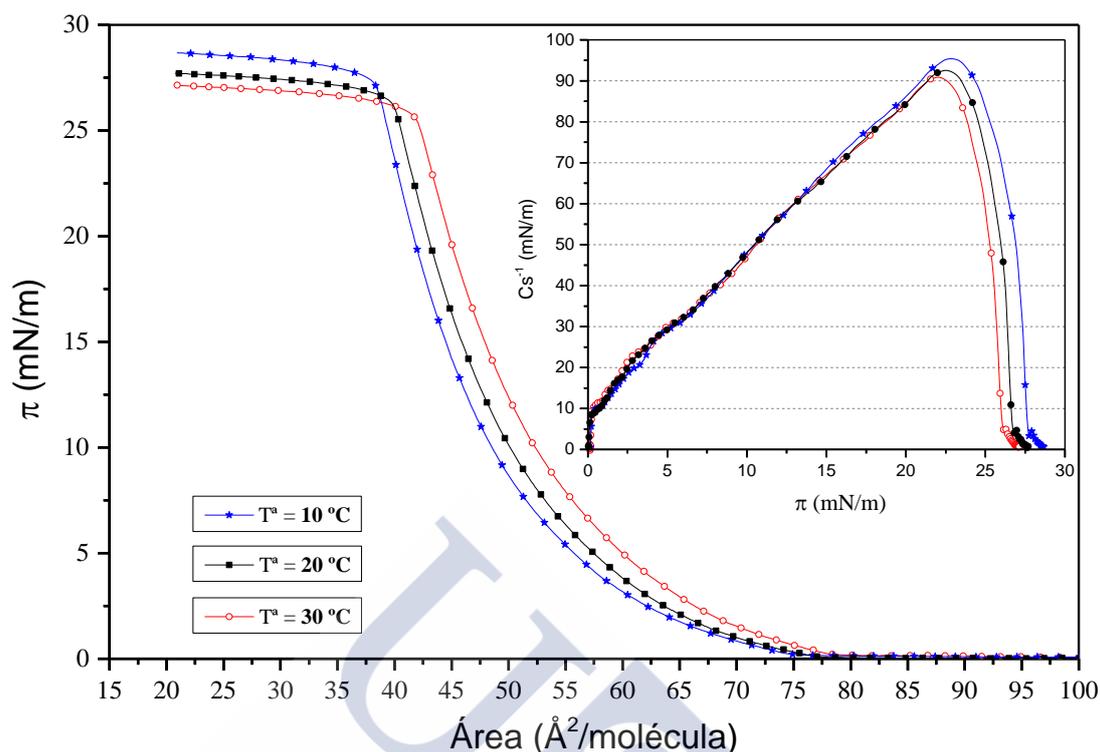


Figura 4.8.E.- Isothermas π -A de la monocapa de **ácido eicosadienoico**, extendida sobre agua a diferentes temperaturas, correspondiente al depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas, comprimida a velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$. En el interior, representación de los correspondientes módulos de compresibilidad frente a la presión.

Un conjunto de valores correspondientes a diferentes parámetros de las monocapas de ácido eicosadienoico a diferentes temperaturas se muestran en la **Tabla 4.8.B**. Estos son el área inicial bajo la curva (A_0), el área límite de la fase de *líquido expandido* extrapolada a presión cero ($A_{0(LE)}$), la presión superficial de colapso (π_c), el área molecular a la cual se produce el colapso (A_c) y el módulo de compresibilidad máximo (C_s^{-1}).

Temperatura ($^\circ\text{C}$)	A_0 ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	$A_{0(LE)}$ ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	A_c ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	C_s^{-1} (mN/m)
10	74,5	50,1	28,1	38,2	95,5
20	75,6	52	27,1	39,5	92,6
30	78,5	54,5	26,6	41,7	90,9

Tabla 4.8.B.- Valores de parámetros característicos de monocapas de ácido eicosadienoico obtenidos sobre agua a diferentes temperaturas.



4.9 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS MONOCAPAS DE LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS

4.9.1 Isotermas de compresión

En la **Figura 4.9.A** aparecen recogidas a efectos comparativos todas las isotermas π -A de los compuestos estudiados. Tales isotermas corresponden a monocapas obtenidas por depósito de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimidas a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$ sobre agua a pH 6-7 y temperatura de $10 \text{ }^\circ\text{C}$.

Prescindiendo del colesterol, en la figura se evidencia un incremento del área molecular de la monocapa a medida que aumenta tanto el número de dobles enlaces como el de átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada de las moléculas. Lo contrario ocurre con la presión de colapso, tal como se aprecia con detalle en el recuadro de la figura.

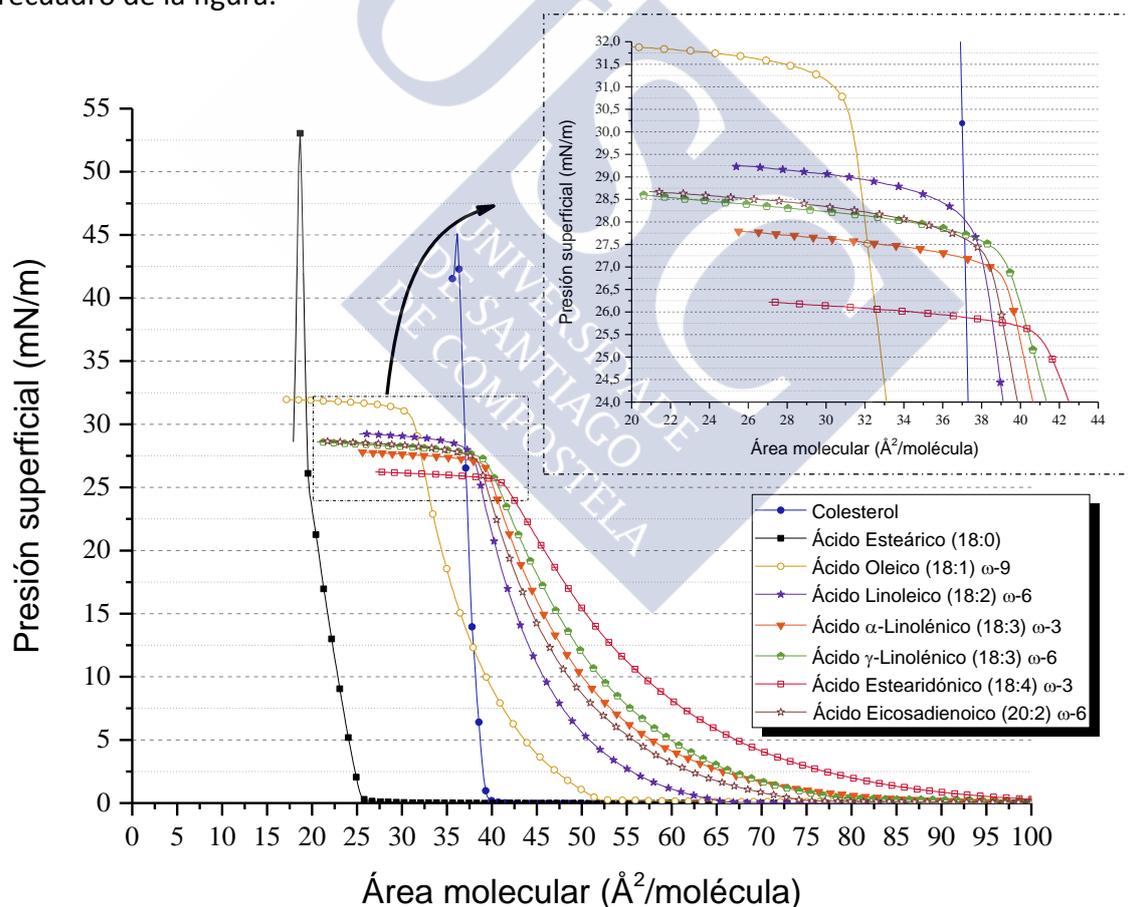


Figura 4.9.A.- Isotermas π -A de las monocapas de *colesterol* y los *ácidos esteárico, oleico, linoleico, α-linolénico, γ-linolénico, estearidónico y eicosadienoico*.

En lo que se refiere a la influencia de la serie omega a la que pertenecen se observa que la monocapa de ácido γ -linolénico (ω -6) presenta en la fase *líquido expandido* un área molecular mayor (entre 2 y 3 Å²/moléc) que la del ácido con el mismo número de átomos de carbono y de dobles enlaces perteneciente a la serie ω -3 (ácido α -linolénico), lo que evidencia la importancia de la posición de los dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos, la cual determina su conformación molecular y su orientación en la interfaz aire/agua.

4.9.2 Representaciones del módulo de compresibilidad frente a la presión superficial

En la **Figura 4.9.B.** se representan los módulos de compresibilidad, en función de la presión superficial, correspondientes a las monocapas de los compuestos estudiados con el fin de comparar la rigidez de las mismas. Se observa que por lo general el módulo de compresibilidad disminuye con el aumento del número de insaturaciones, es decir, a medida que aumenta el número de dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada, las monocapas son menos rígidas, o lo que es lo mismo, más compresibles (más expandidas). Sin embargo, el aumento del número de átomos de carbono parece no influir en este valor, puesto que tanto el ácido linoleico (18:2) como el ácido eicosadienoico (20:2) presentan valores muy similares.

La influencia de la serie omega a la que pertenecen los ácidos grasos estudiados se comprueba al comparar los módulos de compresibilidad de la monocapa del ácido α -linolénico, serie omega 3 (18:3 ω -3), con la del ácido γ -linolénico, serie omega 6 (18:3 ω -6), donde éste, con la misma longitud de la cadena hidrocarbonada y el mismo número de dobles enlaces, pero en distinta posición, presenta una monocapa más expandida (más compresible) que el primero, derivada de la diferente situación de los dobles enlaces en la molécula.

En la **Tabla 4.9.A** se recogen los valores más significativos de determinados parámetros relativos a las monocapas estudiadas, tales como área inicial al inicio de la compresión (A_0), área límite extrapolada a presión cero ($A_{0(\text{límite})}$) (correspondiente a la

fase *sólida* en el caso del colesterol y ácido esteárico y a la fase *líquido expandido* en el caso de los ácidos grasos insaturados), presión de colapso (π_c), área molecular correspondiente al colapso (A_c) y valor máximo de módulo de compresibilidad (C_s^{-1})

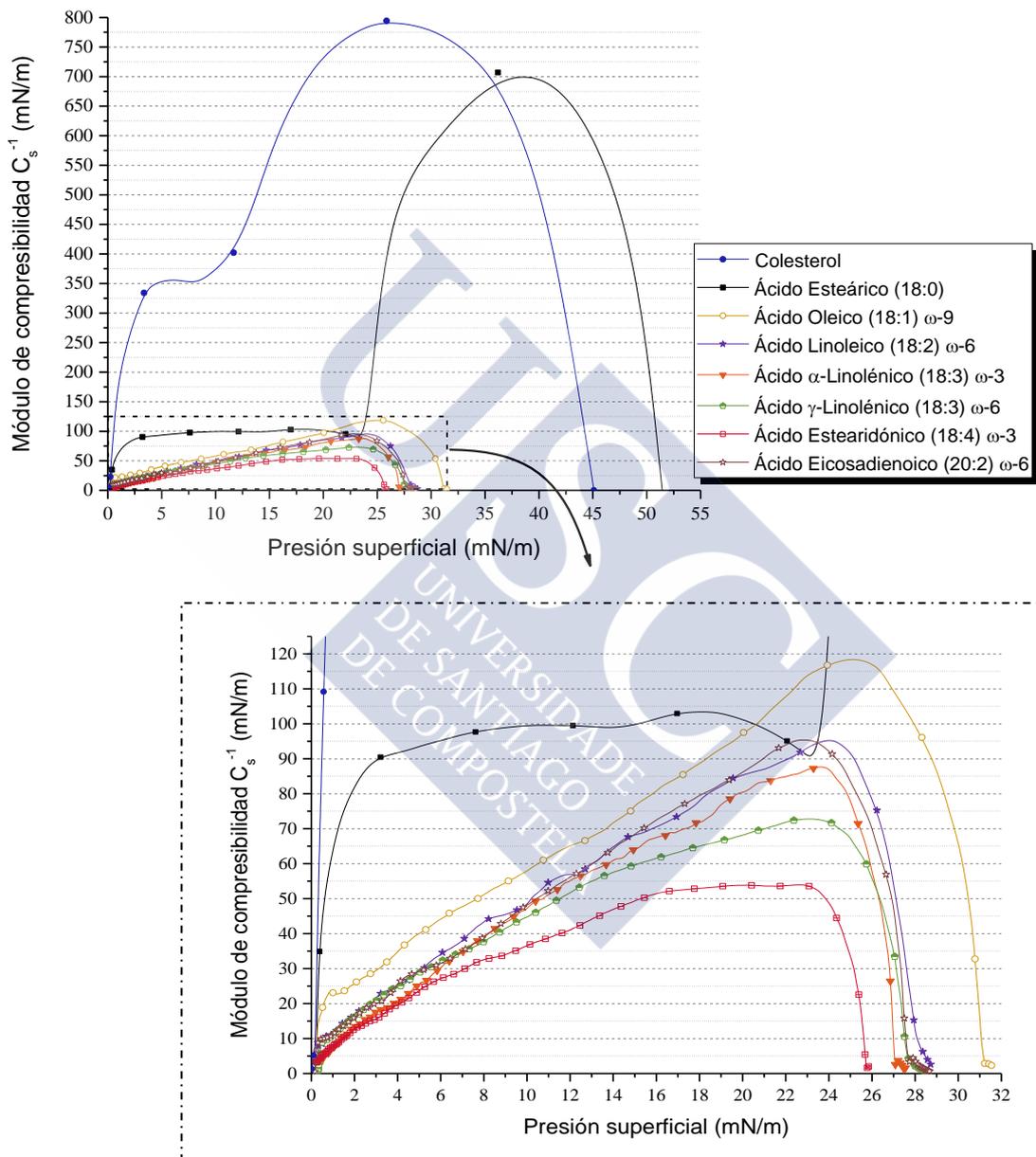


Figura 4.9.B.- Módulos de compresibilidad de las monocapas de *colesterol*, *ácido esteárico*, *ácido oleico*, *ácido linoleico*, *ácido α -linolénico*, *ácido γ -linolénico*, *ácido estearidónico* y *ácido eicosadienoico*.

Ácido Graso	A_0 ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	$A_{0(\text{Estado})}$ ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	π_c (mN/m)	A_c ($\text{\AA}^2/\text{molécula}$)	C_s^{-1} (mN/m)
Colesterol	39,6	38,6	45,1	36,2	791
Ácido Esteárico (18:0)	25,2	20,3	53	18,7	702
Ácido Oleico (18:1) ω -9	53	40,4	31,4	30,9	104,6
Ácido Linoleico (18:2) ω -6	67	46,7	28,7	37,6	95,2
Ácido α -Linolénico (18:3) ω -3	85	49,8	27,3	35,9	72,4
Ácido γ -Linolénico (18:3) ω -6	80,5	55,1	27,9	39,1	72,8
Ácido Estearidónico (18:4) ω -3	106,6	62,7	25,8	40,9	54
Ácido Eicosadienoico (20:2) ω -6	74,5	50,1	28,1	38,2	95,5

Tabla 4.9.A.- Relación de los valores más importantes tomados de las isothermas π -A y módulos de compresibilidad de las monocapas de **colesterol**, **ácido esteárico**, **ácido oleico**, **ácido linoleico**, **ácido α -linolénico**, **ácido γ -linolénico**, **ácido estearidónico** y **ácido**

Un análisis de los datos de esta tabla permite concluir que la monocapa de ácido esteárico (18:0) es la más rígida (más condensada) de todos los ácidos grasos estudiados, con un valor máximo de C_s^{-1} de 702 mN/m, que corresponde a un estado superficial *sólido*. La ausencia de dobles enlaces permite que sus moléculas consigan empaquetarse de una forma muy efectiva generando una monocapa con una elevada rigidez. Por el contrario, la presencia de dobles enlaces en las cadenas hidrofóbicas afecta directamente a su conformación molecular, generando dobleces en sus moléculas y originando monocapas de tipo expandido. Así, la simple presencia de un doble enlace, como ocurre en el ácido oleico (18:1 ω -9), causa un aumento muy significativo del área molecular de la monocapa (desde 20,3 hasta 40,4 $\text{\AA}^2/\text{moléc.}$), al tiempo que una disminución drástica de su módulo de compresibilidad (desde 702 mN/m en el ácido esteárico a 104,6 mN/m en el oleico). Dicho de otro modo, en tanto que la monocapa de ácido esteárico (ácido saturado) es rígida, empaquetándose sus moléculas en un área

reducida, las de los ácidos grasos insaturados son compresibles, tanto más cuanto mayor es su insaturación, ya que ésta impide el empaquetamiento de las moléculas

Como se dijo antes, la elongación de la cadena muestra un ligero aumento del área extrapolada de la monocapa (+3,4 Å²/molécula) tal como se puede observar en la tabla al comparar el ácido linoleico (18:2, ω-6) con el ácido eicosadienoico (20:2, ω-6).

4.9.3 Espesores de las monocapas

Los registros de los diferentes espesores han permitido dilucidar la conformación molecular de las sustancias estudiadas en cada una de sus monocapas. De la misma forma, se calcularon los posibles grados de inclinación de las moléculas respecto de la superficie del sustrato acuoso. En la **Tabla 4.9.B** se recogen los datos de espesor en los diferentes estados por los que atraviesan las monocapas: *gas* (E_G), *líquido expandido* (E_{LE}), *líquido condensado* (E_{LC}) y *sólido* (E_S), así como los grados de inclinación correspondientes a la fase *gas* (G_G).

Ácido Graso	E _G (nm)	G _G (°)	E _{LE} (nm)	E _{LC} (nm)	E _S (inicial) (nm)	E _S (final) (nm)
Colesterol	0,25	13	-	-	1,15	1,5
Ácido Esteárico	0,48	12,5	-	2,1	-	2
Ácido Oleico	0,69	37	1,11	-	-	-
Ácido Linoleico	0,67	38,3	1,025	-	-	-
Ácido α-Linolénico	0,51	36,7	0,86	-	-	-
Ácido γ-Linolénico	0,52	41,9	0,82	-	-	-
Ácido Estearidónico	0,49	36,2	0,83	-	-	-
Ácido Eicosadienoico	0,63	41,9	0,9	-	-	-

Tabla 4.9.B.- Relación de los valores más importantes tomados del registro de los espesores relativos de las monocapas de **ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido α-linolénico, ácido γ-linolénico, ácido estearidónico y ácido eicosadienoico.**

4.9.4 Imágenes BAM

Las imágenes BAM registradas son de gran ayuda para el análisis morfológico de las monocapas. Durante la fase *gas* se observaron cinco tipos de imágenes microscópicas en las monocapas de las sustancias estudiadas (**Ilustración 4.9.A**):

- A. Imagen correspondiente al **colesterol** en la que se observan los característicos dominios en forma de *espuma* o *esponja*, de color gris claro, conteniendo gotas o masas de agua en su interior (regiones oscuras).
- B. Imagen del **ácido esteárico**, con dominios alargados u ovoides, en los que se observan distintas tonalidades de grises dada su propiedad anisotrópica.
- C. Imagen del **ácido oleico**, con dominios claros ovalados rodeados de agua.
- D. Imagen propia del **ácido linoleico** y **ácido eicosadienoico**, con dominios grisáceos conteniendo huecos oscuros con agua de forma ovalada.
- E. Imagen mostrada por los **ácidos α -linolénico, γ -linolénico y estearidónico**, difusa en su conjunto debido a la elevada tendencia por parte de estos ácidos grasos a expandirse y evitar formar dominios.

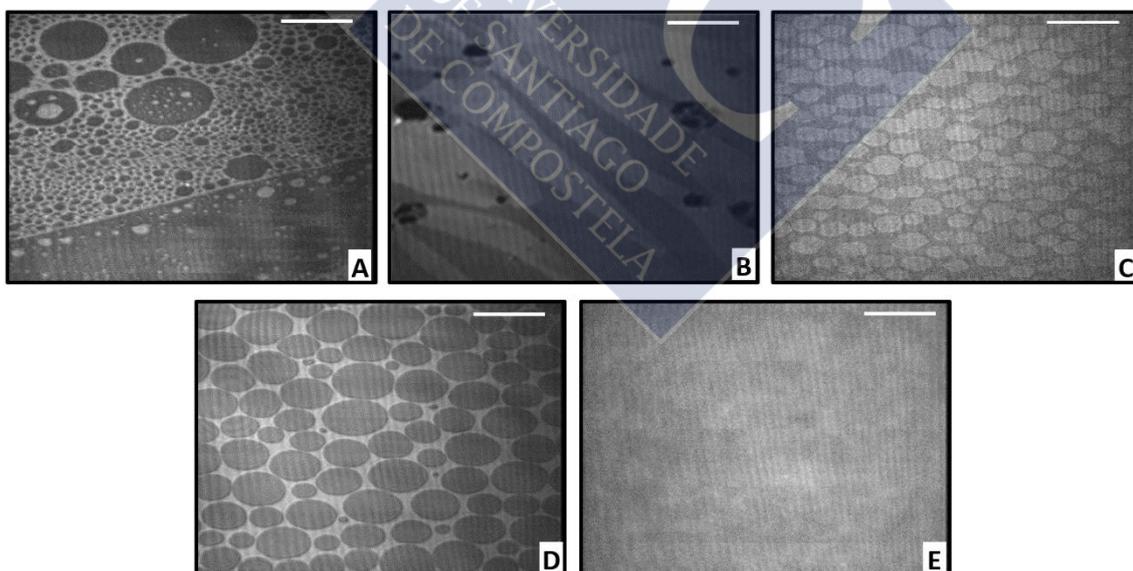


Ilustración 4.9.A.- Diferentes tipos de imágenes BAM de las sustancias estudiadas tomadas durante la fase *gas*.

Durante las fases *líquido expandido* y *sólido* de las monocapas de ácidos grasos insaturados y de colesterol, respectivamente, se observaron imágenes homogéneas, típicas de dichos estados similares a la **Imagen A** de la **Ilustración 4.9.B**. Sin embargo, el ácido esteárico mostró durante sus fases de *líquido condensado* y *sólido* grandes dominios de forma irregular que le confieren a la imagen un aspecto heterogéneo que no es habitual en las imágenes correspondientes a esta fase (**Imagen B**). En la fase *sólida* de este ácido aparecen pequeños puntos brillantes alineados en filamentos curvilíneos, que corresponden a la formación de “embriones” o pequeños núcleos tridimensionales de condensación, los cuales constituyen los gérmenes del colapso del film (**Imagen C**).



Ilustración 4.9.B.- Diferentes tipos de imágenes BAM de las sustancias estudiadas tomadas durante las fases de líquido expandido y sólido.

Estos núcleos aparecen mucho más definidos en todas las imágenes correspondientes al colapso de las monocapas estudiadas (**Imagen A** de la **Ilustración 4.9.C**), los cuales, al continuar la compresión de la monocapa a lo largo del colapso, crecen de tamaño, agrupándose entre sí en forma de racimos (**imagen B**) o de “bastancillos” de tamaño variable comprendido entre 4 y 7 Å, como en el caso del colesterol puro (**imagen C**).

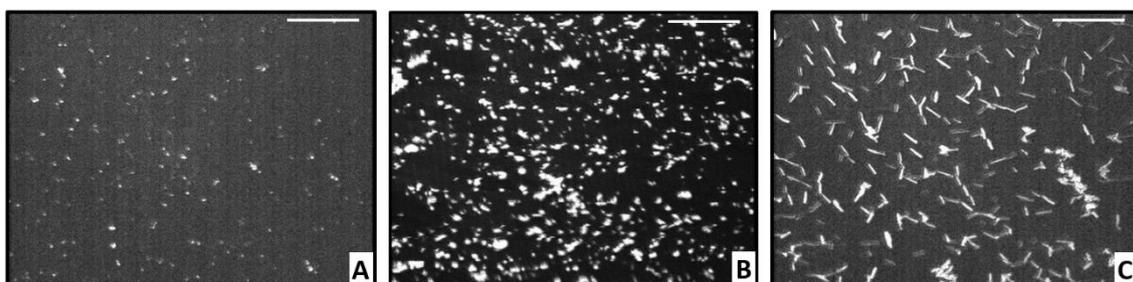


Ilustración 4.9.C.- Diferentes tipos de imágenes BAM de las sustancias estudiadas tomadas durante el colapso.



4.10 MEZCLA DE ÁCIDO ESTEÁRICO CON COLESTEROL

4.10.1 Isotermas π -A y módulos de compresibilidad

En la **Figura 4.10.A** se muestran los resultados obtenidos al extender las monocapas de ácido esteárico, colesterol y sus mezclas sobre sustrato acuoso. En todos los casos, para cada una de las fracciones molares estudiadas, se depositó un total de $4 \cdot 10^{16}$ moléculas de ambos componentes. El agua del sustrato presentó un pH 6-7 (no se utilizó ningún tampón para no introducir iones en el mismo), la temperatura fue de $20\text{ }^\circ\text{C}$ y las monocapas se comprimieron a una velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

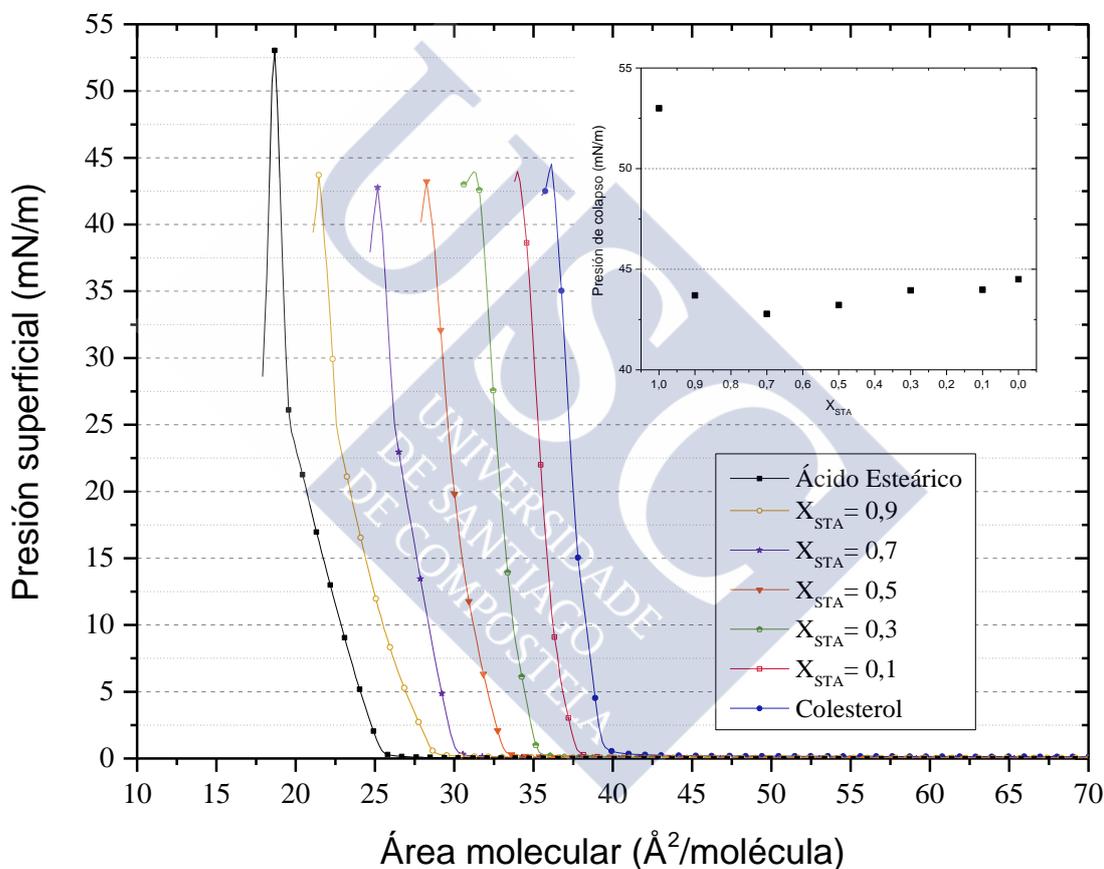


Figura 4.10.A.- Curvas π -A de monocapas de **ácido esteárico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1**; **0,3**; **0,5**; **0,7**; **0,9**). En la gráfica interna se muestran los valores de colapso frente a la fracción molar.

Las curvas π -A correspondientes a las monocapas mixtas se van alejando del eje de coordenadas a medida que disminuye la proporción de ácido esteárico en la mezcla, ocupando un área cada vez mayor, mientras que la presión del colapso permanece en las cinco mezclas en valores en torno a la del propio colesterol (interior **Figura 4.10.A**).

Este dato nos indica, tal como vimos en el capítulo de Introducción referente a monocapas mixtas, que ambos componentes son inmiscibles.

Más adelante, en un análisis más profundo de las isotermas de cada una de las mezclas, podremos ver como las monocapas con mayor contenido en ácido graso presentan un colapso (correspondiente al colesterol) a una determinada presión, seguido de un descenso de la misma para volver a iniciar un aumento de la presión hacia un segundo colapso (el del ácido graso).

La **Figura 4.10.B** muestra los módulos de compresibilidad de las monocapas de los componentes puros y de las diferentes mezclas. Podemos observar claramente que a presiones inferiores a 25 mN/m las monocapas de las mezclas con fracción molar de ácido esteárico comprendida entre 0,7 y 0,9 presentan una meseta de compresibilidad constante que es similar a la del estado *líquido condensado* de este ácido, descrito en la sección 4.2.1. (Figura 4.2.A) y que se puede observar en la figura que estamos comentando. Esta meseta está seguida por un rápido incremento de C_s^{-1} cuyo valor máximo se aproxima al del estado *sólido* de la monocapa de ácido esteárico. Por lo tanto, en este intervalo de concentraciones, en el que el ácido esteárico está en mayor proporción, las monocapas mixtas presentan un comportamiento muy próximo al de este componente puro, sin notarse la presencia del colesterol. Esto confirma la inmiscibilidad de los componentes mixtos en la monocapa.

Por otra parte, la pequeña meseta de la monocapa del colesterol, a presiones comprendidas entre 5 y 7,5 mN/m aproximadamente, también se mantiene, aunque más difuminada, en las monocapas mixtas de fracción molar $X_{STA} = 0,1$ y $0,3$, lo que evidencia el predominio del comportamiento del colesterol en estos casos, sin que el ácido esteárico haga apenas acto de presencia. De nuevo, este hecho pone de manifiesto la incompatibilidad de ambos componentes en el film mixto.

El comportamiento de la monocapa correspondiente a la mezcla de fracción molar 0,5 es intermedio entre el de los componentes puros. Si se admite la inmiscibilidad de los componentes este resultado resulta lógico puesto que al encontrarse ambos en la misma proporción participan en la formación de la monocapa con el mismo peso, sin

que exista predominio de ninguno de ellos. En otras palabras, cada uno se comporta independientemente del otro.

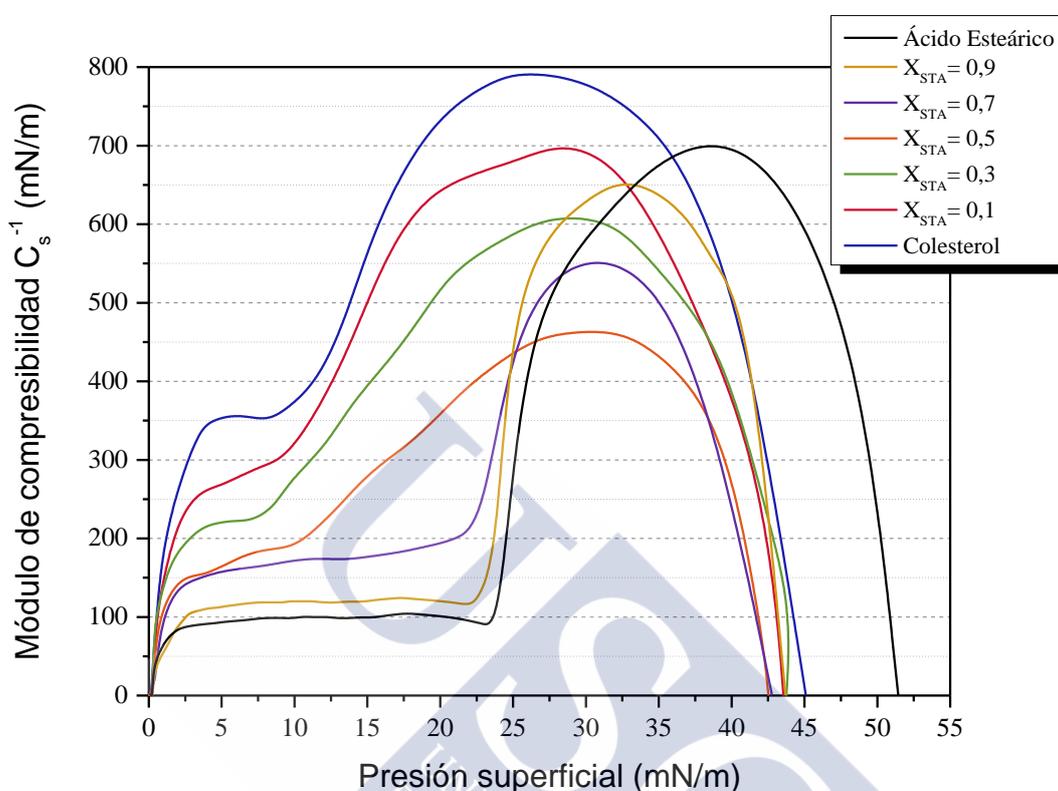


Figura 4.10.B.- Representación de los módulos de compresibilidad de las monocapas de **ácido esteárico, colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**).

Para observar con mayor claridad el efecto del colesterol en la monocapa de ácido esteárico, se representó el módulo de compresibilidad en tres dimensiones frente a la presión superficial (**Figura 4.10.C**).

El módulo de compresibilidad correspondiente a la fase de *líquido condensado* del ácido esteárico va incrementando su valor a medida que el colesterol está más presente en la mezcla. Esta circunstancia es bastante lógica teniendo en cuenta la diferencia importante que existe en los valores de módulo de compresibilidad entre ambos componentes. Por ejemplo, el colesterol presenta a la presión superficial de 5 mN/m un valor de $C_s^{-1} = 353$ mN/m, mientras que el ácido esteárico logra un valor de 93 mN/m para ese mismo valor de presión superficial. Así, las mezclas de ambos

componentes presentan valores intermedios. Sin embargo, a elevadas presiones superficiales, esta tendencia desaparece.

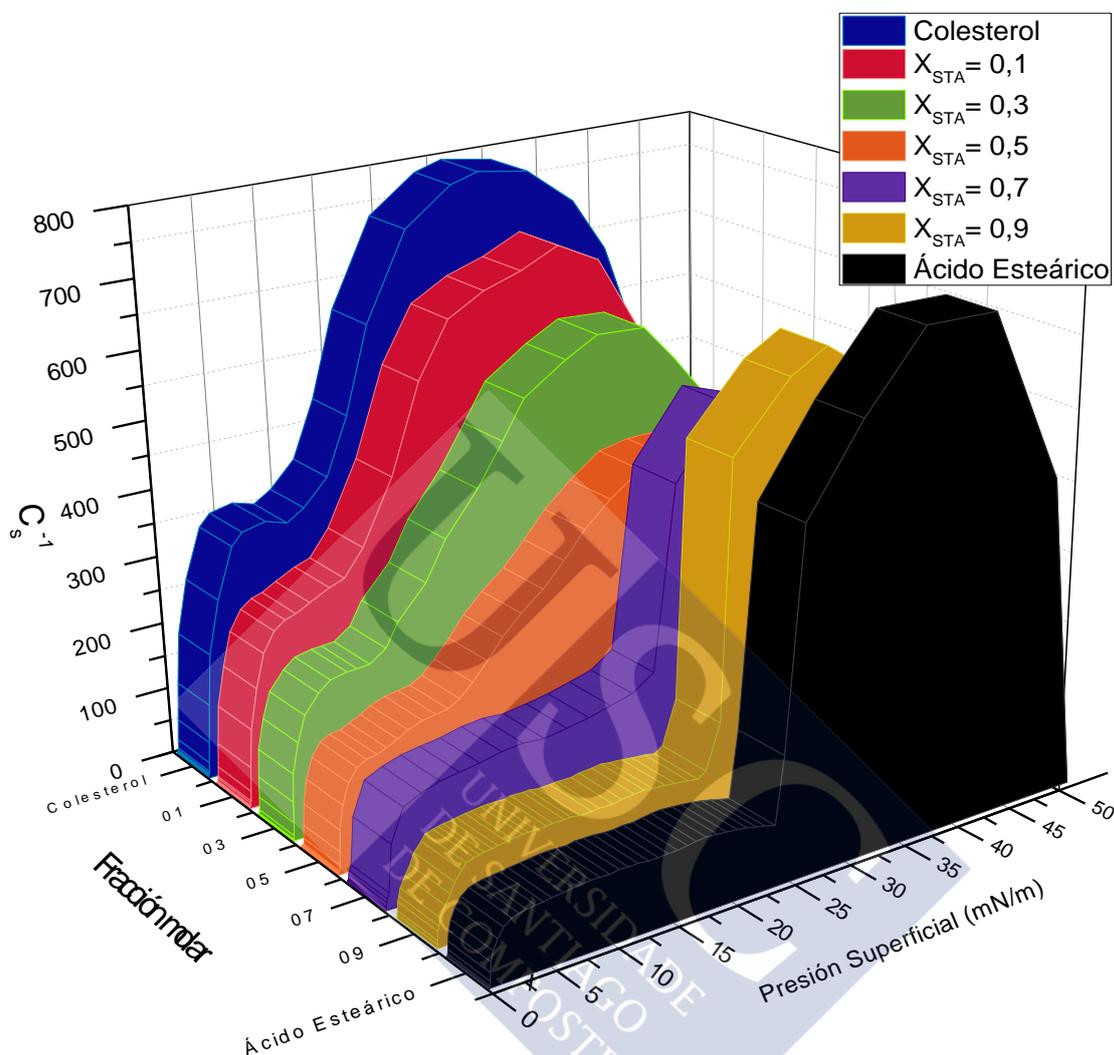


Figura 4.10.C.- Representación tridimensional de los módulos de compresibilidad frente a la presión superficial de monocapas de **ácido esteárico, colesterol** y de mezclas de ambos (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**).

Cuando el ácido esteárico se encuentra en estado *sólido*, presenta valores de módulo de compresibilidad no muy diferentes a los del colesterol (aproximadamente máximos de 700 y 800 mN/m para ácido esteárico y colesterol respectivamente). Sería lógico esperar que las mezclas presentaran máximos que entrasen dentro de ese intervalo aunque en realidad todas y cada una de las cinco mezclas presentan valores inferiores a ambos puros, siendo la mezcla de $X_{STA} = 0,5$ la que presenta el máximo más bajo (463mN/m).

En la **Figura 4.10.D** se muestra el análisis individual del módulo de compresibilidad para cada fracción molar de la mezcla de ácido esteárico y colesterol, cuyos valores de mayor relevancia vienen recogidos en la **Tabla 4.10.A** para los valores de presión indicados.

Módulo de compresibilidad (mN/m)									
X_{STA}	$\pi = 5$	$\pi = 10$	$\pi = 15$	$\pi = 20$	$\pi = 25$	$\pi = 30$	$\pi = 35$	$\pi = 40$	C_s^{-1} máx.
Colesterol	353,18	373,91	562,99	731,55	788,63	777,5	709	501,9	790,6
0,1	269	321,5	499,9	641,9	680,3	690,5	586,8	375,7	696,5
0,3	220,3	277,6	394,2	515,9	586,6	605,8	540,9	384,8	607,6
0,5	165	193,5	278,9	375,9	435,7	462,6	431,4	267,8	463,1
0,7	157,6	171,7	176,6	193,5	422,5	548,7	500,6	239,9	550,7
0,9	112,6	120,2	120,2	120	437,9	627,9	637	508,8	650,4
STA	93,4	98,8	99,9	101,2	277,2	580,4	674	695	699,4

Tabla 4.10.A.- Valores de los módulos de compresibilidad a diferentes presiones superficiales de monocapas mixtas de **ácido esteárico y colesterol** a diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**).

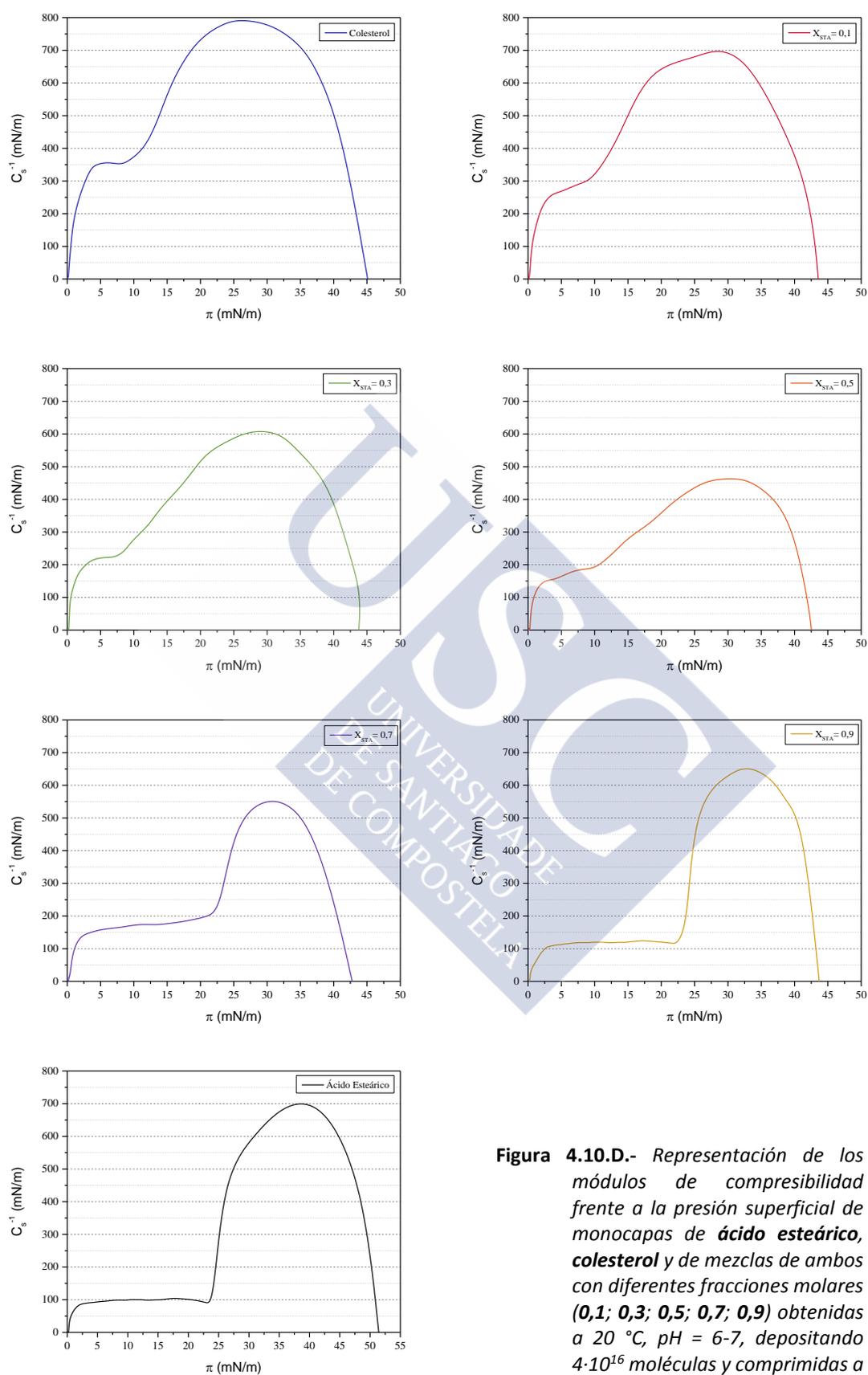


Figura 4.10.D.- Representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión superficial de monocapas de **ácido esteárico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**) obtenidas a 20 °C, pH = 6-7, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimidas a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

4.10.2 Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla

4.10.2.1 Mezcla $X_{STA} = 0,9$

En la gráfica de espesor-área molecular correspondiente a esta mezcla rica en ácido graso (**Figura 4.10.E**) se aprecia que en el estado *gas* la monocapa presenta un espesor de 0,5 nm, igual al registrado para el ácido graso puro. Por tanto, en este estado el espesor del ácido graso domina al del colesterol (0,25 nm).

Al remate de la fase *gas* se produce un incremento repentino y brusco del espesor como consecuencia del cambio de fase de la monocapa mixta desde el estado *gas* al de *líquido condensado*, primero, y *sólido* después, alcanzándose al final de la transición un valor del espesor de 2 nm, casi igual al del ácido esteárico puro en el mismo estado (2,1 nm). Sin embargo, a partir de este momento el comportamiento de la monocapa mixta es diferente al de la monocapa de ácido esteárico puro, ya que en ésta el espesor se mantiene constante en el valor de 2,1 nm (**Figura 4.2.B**), mientras que en el film mixto el espesor continúa aumentando lentamente hasta llegar a un valor aproximado de 2,3 nm. Esta “seudomeseta” del espesor es similar a la del colesterol puro antes de colapsar, habiendo sido atribuida a un cambio conformacional del mismo, tal como se comentó en la sección 4.1.2. En consecuencia, el comportamiento del colesterol en la monocapa mixta, con independencia de su concentración (como se verá en los siguientes apartados), es el mismo que cuando está puro, colapsando a su propia presión de colapso, sin que la presencia del ácido graso modifique su valor. En caso de existir algún tipo de interacción entre los componentes, la presencia de uno de ellos alteraría las propiedades del otro, lo que no ocurre en este caso.

El colapso del colesterol en la monocapa mixta se visualiza en la gráfica espesor-área por un aumento brusco del espesor al final de la seudomeseta y en la isoterma π -A por la presencia en la misma de un pico agudo de presión. Tras el colapso, la presión superficial desciende instantáneamente unos 5 mN/m aunque después presenta un repunte que nos indica que podría ocurrir un segundo colapso a presiones más elevadas, el cual correspondería al ácido graso (Seoane, Miñones, Conde, Iribarnegaray, & Casas, Interactions between Amphotericin B and Sterols in Monolayers. Mixed Films of

Amphotericin B-Cholesterol, 1999). Con la superficie disponible y el número de moléculas utilizado para el estudio, no se logró alcanzar este segundo colapso.

Las **Imágenes A y B** de la **Ilustración 4.10.A**, obtenidas a lo largo de la fase *gas*, ofrecen la existencia de un gran número de dominios de color gris-claro, circulares y ovales, debidos al ácido graso. Su tamaño es diferente, alternándose unos con otros. En la **Imagen C** se observa claramente que los dominios de ácido graso van configurando una imagen cada vez más homogénea. Como cabe esperar, en este estado apenas se observan dominios de colesterol, si bien su mayor presencia en la imagen B podría explicar la existencia de los picos de espesor observados en la gráfica espesor-área, unos más altos (los del ácido) y otros más bajos (los del colesterol).

La **Imagen D** obtenida a la presión superficial de 10 mN/m muestra una masa difuminada de dominios en la que existen pequeños huecos que podrían corresponder a residuos minúsculos de agua englobada en su interior durante el proceso de fusión de los dominios. En la **Imagen E** se observa claramente la formación de pequeños núcleos de condensación precursores del colapso, el cual se pone de manifiesto nítidamente en la imagen F, donde se advierte la presencia de numerosos restos de monocapa colapsada, algunos en forma estrellada, brillantes y de tamaño irregular. La brillantez de estos dominios provocada por la alta reflexión de la luz del BAM en los mismos, en contraste con la nula reflexión experimentada en el agua que rodea a los dominios, causa que durante el colapso se observen numerosos picos de espesor en la gráfica espesor-área.

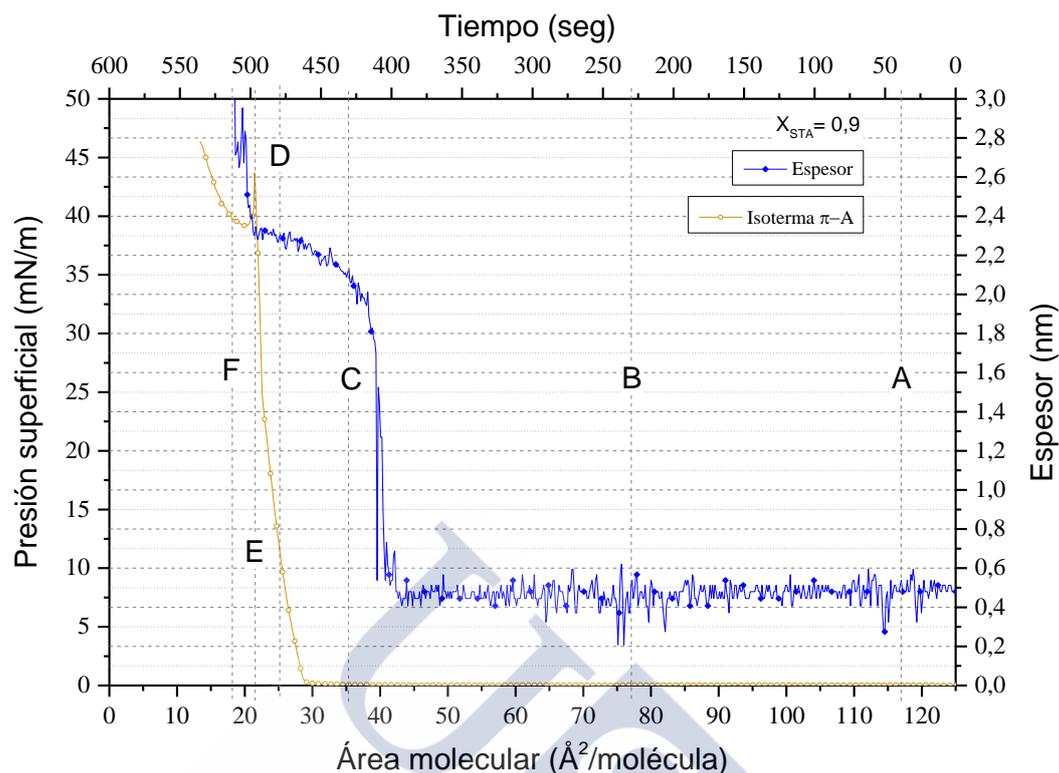


Figura 4.10.E.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido esteárico y colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{STA} = 0,9$ y espesor relativo obtenidas a 20 °C, pH 6-7, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de 50 cm^2/min .

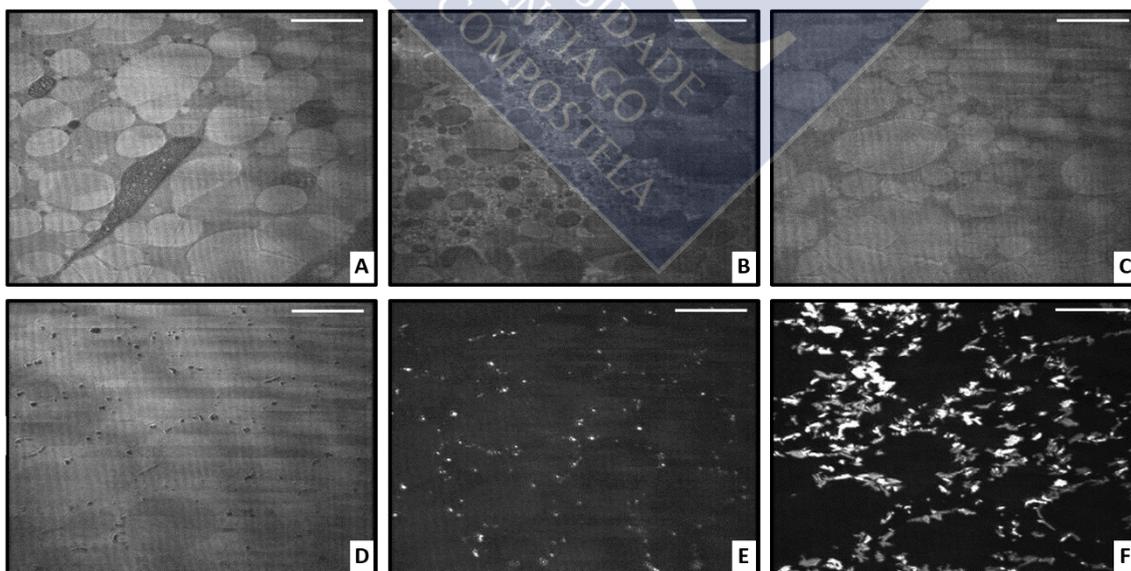


Ilustración 4.10.A.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido esteárico y colesterol ($X_{OLE} = 0,9$). La barra blanca corresponde a una distancia de 20 μm .

4.10.2.2 Mezcla $X_{STA} = 0,7$

La **Imagen A** de la **Ilustración 4.10.B** muestra que a esta fracción molar el colesterol presente en la mezcla se pone en evidencia por la presencia de dominios característicos en forma de *espumas* (masas grisáceas con “agujeros” negros en su interior).

Sin embargo, esta presencia de colesterol no parece influir en los valores de espesor registrados (**Figura 4.10.F**), puesto que estos continúan dominados por el ácido esteárico, que sigue siendo el componente mayoritario de la mezcla y el que tiene mayor espesor, cualquiera que sea el estado superficial en el que se encuentra. Así, durante la fase *gas* de la monocapa el valor de su espesor se mantiene constante en 0,5nm, lo mismo que vimos en la sección anterior. En las demás imágenes microscópicas registradas cuando la monocapa se encuentra en este estado (**Imágenes B y C**) apenas se observan las *espumas*, las cuales son dominadas por la presencia de los dominios circulares y ovals propios del ácido graso. En algunos de estos dominios se observan distintas tonalidades debidas a la anisotropía del ácido esteárico.

Simultáneamente al incremento de presión superficial provocado por la compresión, se produce el aumento del espesor de la monocapa como consecuencia del cambio repentino de la inclinación de las moléculas. Durante este estado condensado, el microscopio escanea la **Imagen D**, con grandes dominios muy difusos. Cuando se alcanza un área molecular de $25 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ se produce el colapso del colesterol existente en la monocapa, observándose antes la existencia de numerosos pequeños “bastoncillos” de colapso incipiente, similares a los del colesterol puro (**Imagen E**), los cuales durante el colapso crecen y se transforman en estructuras de mayor tamaño y más brillantes (**Imagen F**).

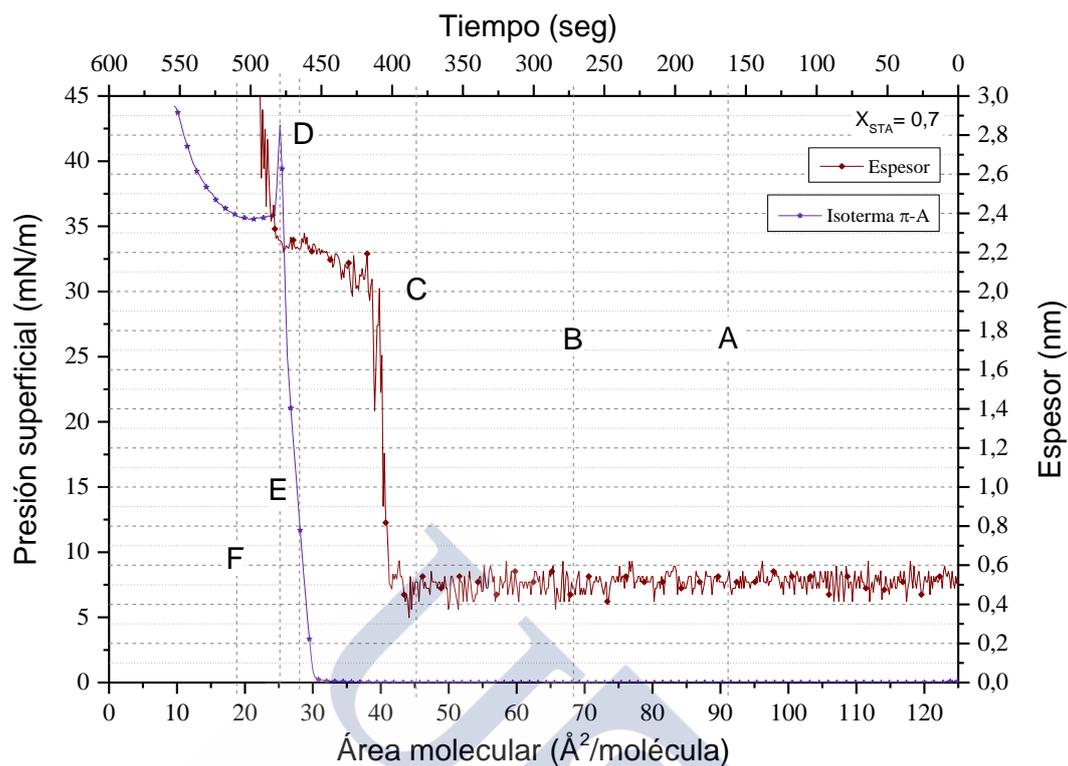


Figura 4.10.F.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido esteárico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{STA} = 0,7$ y espesor relativo obtenidas a 20 °C, pH 6-7, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

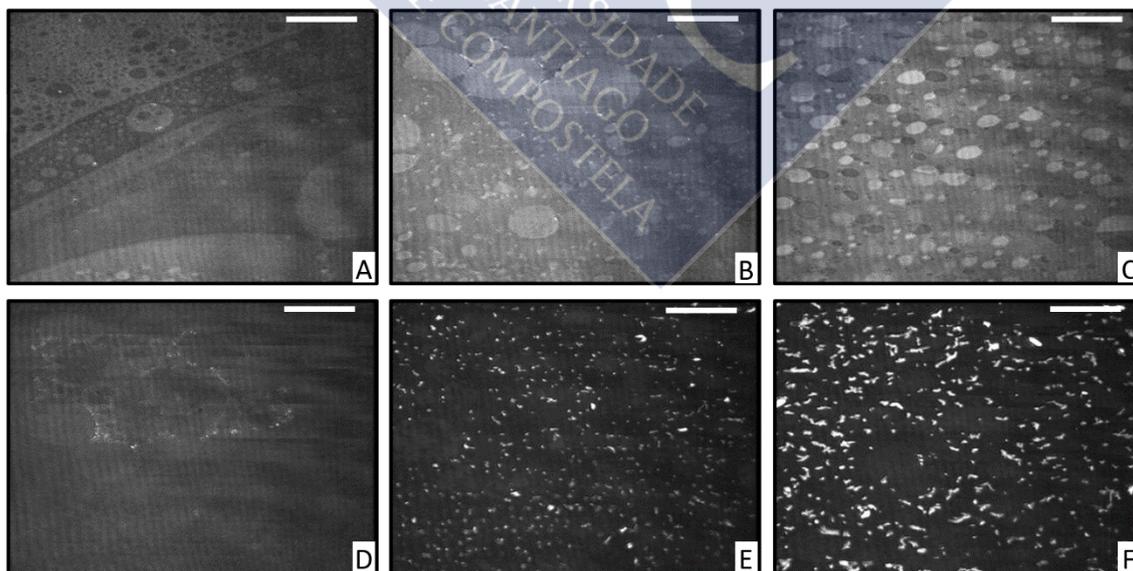


Ilustración 4.10.B.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido esteárico** y **colesterol** ($X_{STA} = 0,7$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.10.2.3 Mezcla $X_{STA} = 0,5$

Tanto la gráfica del espesor como la isoterma π -A de la monocapa mixta (**Figura 4.10.G**) son similares a las registrada para el ácido esteárico. En efecto, durante la fase *gas* el espesor de la monocapa se mantiene constante en un valor aproximado de 0,5 nm, valor que como se ha indicado antes corresponde al obtenido para el ácido esteárico en esta misma fase y asociado a una inclinación de sus moléculas de $12,5^\circ$. Es de esperar que simultáneamente las moléculas del colesterol presentes en la monocapa mixta y en este estado *gas* presenten sus esteranos con el resto alquílico orientado más o menos horizontalmente con respecto a la superficie del sustrato acuoso, si bien el espesor correspondiente a esta orientación es menor que el del ácido graso en las mismas condiciones. Por ello, el espesor de la monocapa mixta está determinado por el del ácido graso.

Como se puede observar en la **Ilustración 4.10.C**, las tres primeras imágenes microscópicas correspondientes al estado *gas* de la monocapa mixta (**Imágenes A, B y C**), muestran una gran presencia de “espumas” de colesterol. Tales “espumas” se mantienen separadas de los pequeños dominios circulares y ovalares constituidos por moléculas de ácido graso, los cuales se fusionan unos con otros y aumentan de tamaño cuando se comprime la monocapa. Lo mismo sucede con las espumas, en las que durante el proceso de agrupamiento quedan atrapadas en su interior moléculas del agua del sustrato, que aparecen en las imágenes BAM como círculos de fondo negro.

A medida que la presión superficial aumenta, la imagen se vuelve más homogénea, dando lugar a la **Imagen D**, obtenida a la presión de 15 mN/m. Al proseguir la compresión y alcanzar el colapso, se registran imágenes similares a las antes expuestas: **Imagen E** mostrando pequeños y brillantes núcleos de condensación e **Imagen F** con numerosos dominios de fase colapsada.

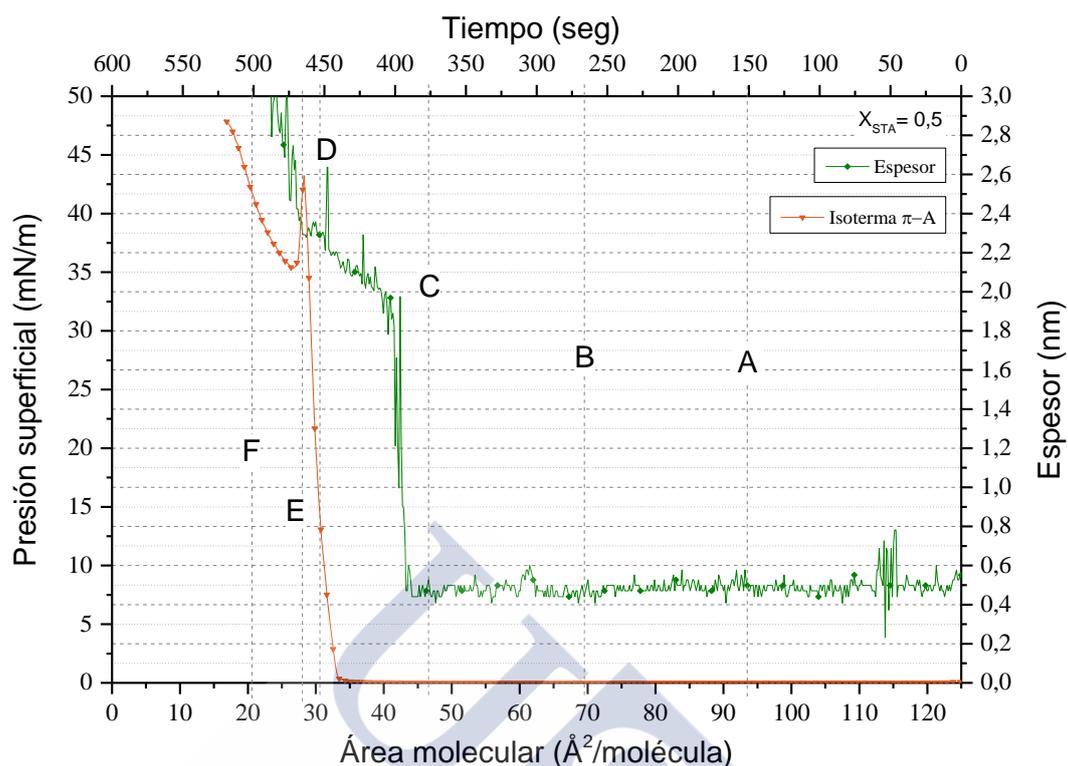


Figura 4.10.G.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido esteárico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{STA} = 0,5$ y espesor relativo obtenidas a 20 °C, pH 6-7, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

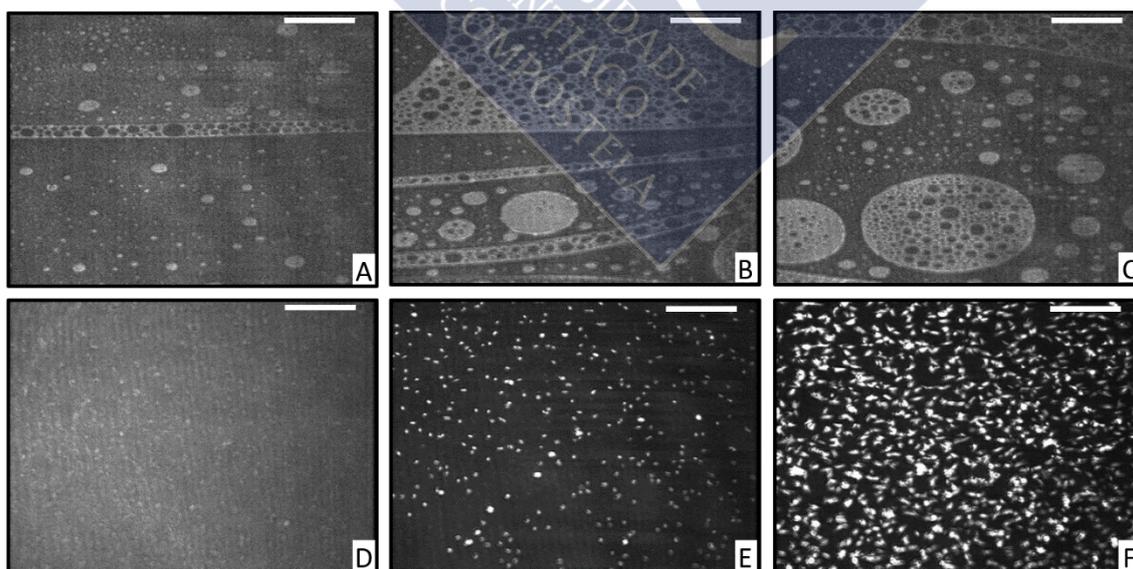


Ilustración 4.10.C.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido esteárico** y **colesterol** ($X_{STA} = 0,5$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.10.2.4 Mezcla $X_{STA} = 0,3$

Las imágenes BAM correspondientes a la monocapa en estado *gas* (**Ilustración 4.10.D**) muestran en este caso una presencia mayoritaria del esteroles desde el inicio de la fase (**Imagen A**) donde se observa gran parte de zona oscura, propia del agua, junto con estructuras *espumosas* propias del colesterol. Al disminuir el área la región oscura del agua va desapareciendo puesto que la monocapa va cubriendo la totalidad de la superficie (**Imagen B**). Antes de que las moléculas cambien su inclinación se registró la **Imagen C**, la cual solo muestra pequeñísimos restos de agua. Toda la superficie está cubierta de monocapa de colesterol, sin que el BAM pueda percibir los dominios de ácido esteárico. La prueba de ello es que la gráfica del espesor de la monocapa mixta es similar a las que acabamos de exponer antes. Esto es debido a que el sensor de medida del espesor es más sensible al componente de la monocapa con mayor espesor (ácido esteárico), que al de menor espesor. Los picos de espesor observados en la gráfica son consecuencia de esta diferente sensibilidad: cuando el sensor detecta la monocapa de ácido graso su respuesta es más intensa que cuando se trata de colesterol.

La **Imagen D** es prácticamente homogénea como corresponde al estado líquido condensado en el que se ha obtenido la misma, y las **Imágenes E y F** muestran con claridad la formación de “bastoncillos” de colesterol, inicialmente pequeños y después más grandes y numerosos como consecuencia de su crecimiento a lo largo del colapso.

Un aspecto a destacar en esta mezcla es que el colapso de la monocapa mixta difiere del de las mezclas antes estudiadas. En efecto, tal como se observa en la **Figura 4.10.H**, una vez producido el colapso del componente minoritario, es decir, del colesterol, la presión no decae bruscamente para volver a aumentar, como sucede en las monocapas con mayor contenido en ácido graso, sino que permanece constante. Esta diferencia de comportamiento se debe a que en la cubeta de la balanza Nima la superficie disponible para depositar la monocapa es pequeña, por lo que se necesita un depósito muy grande de moléculas para lograr que al final de la compresión se alcance el segundo colapso, máxime cuando se trata de mezclas con elevado contenido en colesterol, en cuyo caso la meseta de presión constante correspondiente a su colapso es muy larga, tal como se puede observar en la **Figura 4.1.A** de la sección 4.1.1.

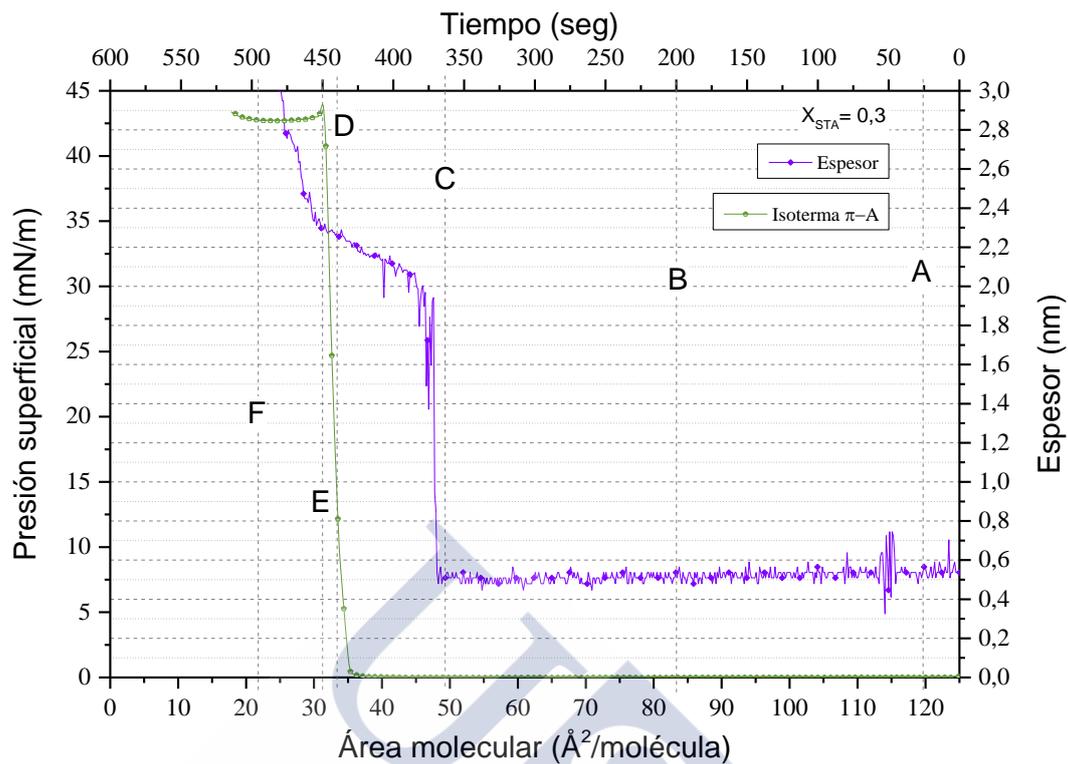


Figura 4.10.H.- Curva π -A de la monocapa mixta de ácido esteárico y colesterol correspondiente a la fracción molar de $X_{STA} = 0,3$ y espesor relativo obtenidas a 20 °C, pH 6-7 depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

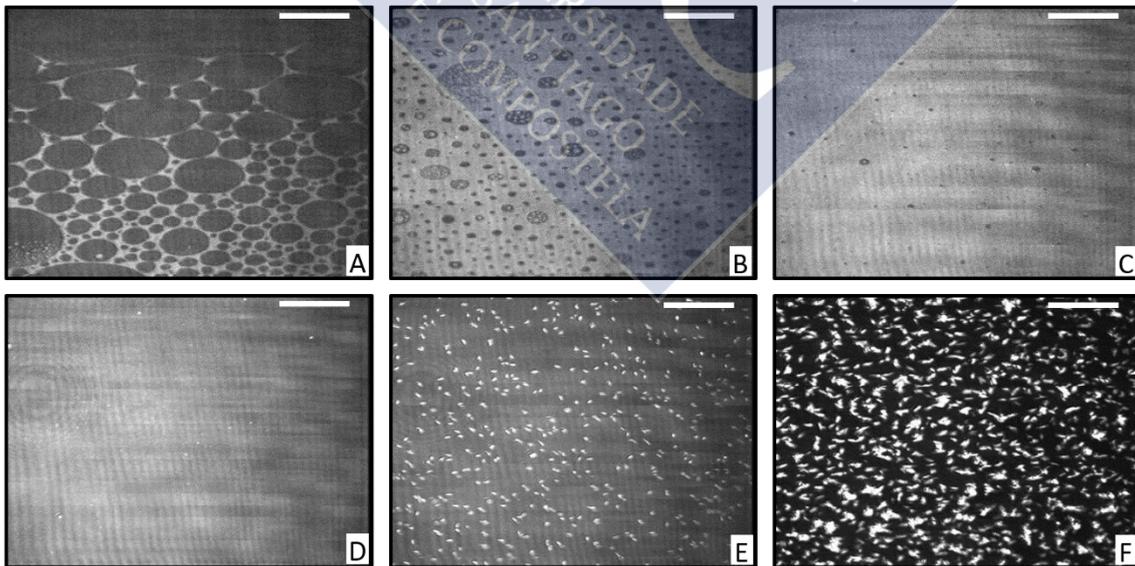


Ilustración 4.10.D.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido esteárico y colesterol ($X_{STA} = 0,3$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.10.2.5 Mezcla $X_{STA} = 0,1$

La monocapa de la mezcla de colesterol con ácido esteárico de fracción molar $X_{STA} = 0,1$ presenta características muy similares a la de $X_{STA} = 0,3$. Solo se puede destacar que la región de presión constante tras el colapso es más alargada en la monocapa de $X_{STA} = 0,1$ debido al mayor contenido en colesterol (**Figura 4.10.I**).

En las imágenes BAM se observa una amplia presencia del colesterol. A áreas elevadas, sus “espumas” conteniendo agua en su interior en forma de pequeñas gotas o de más amplias regiones invaden todo el campo de observación del microscopio. (**Ilustración 4.10.E, Imagen A**). Al continuar la compresión de la monocapa dentro de la fase *gas* va disminuyendo el agua de las espumas (**Imagen B**) hasta quedar reducida a minúsculas gotas (**Imagen C**, correspondiente a instantes antes del cambio de inclinación de las moléculas de la monocapa). Cuando se alcanza el estado condensado de la monocapa la imagen es homogénea, como corresponde a las fases de este tipo (**Imagen D**). Al producirse el colapso, la **Imagen E** muestra los dominios brillantes típicos del colesterol constituidos por pequeños núcleos de condensación en forma de “bastoncillos”. Si se reduce más el área, estos núcleos brillantes se unen y se organizan en forma de bastones de entre 8 y 10 μm de longitud (**Imagen F**).

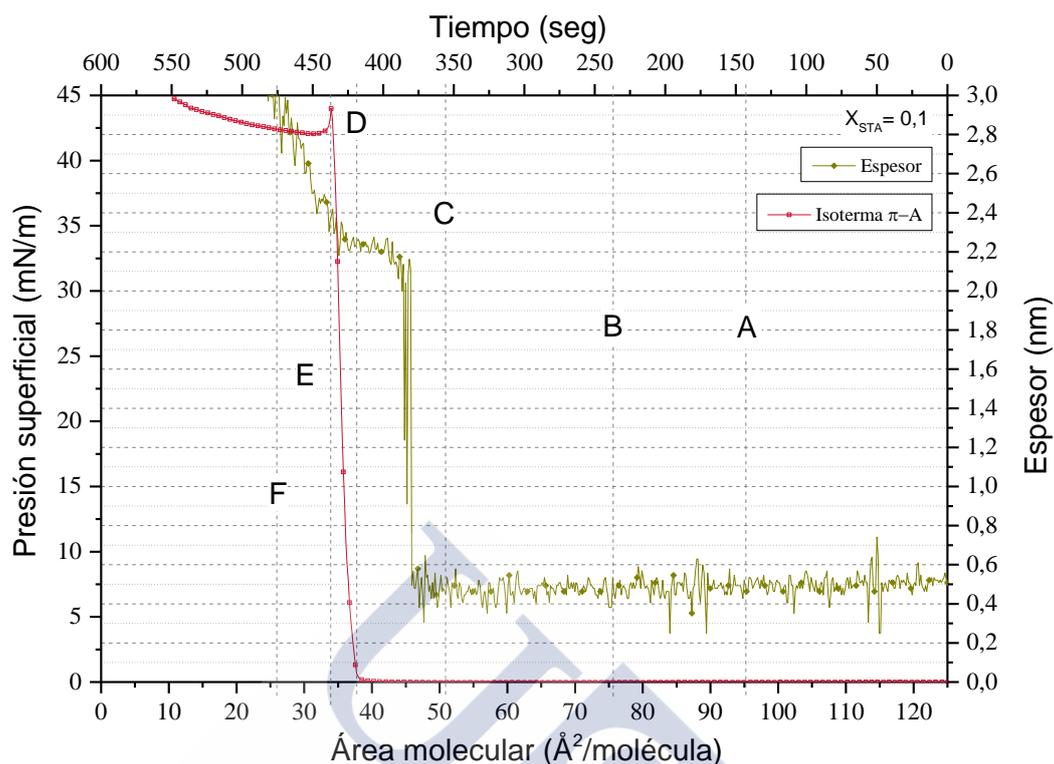


Figura 4.10.I.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido esteárico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{STA} = 0,1$ y espesor relativo obtenidas a 20 °C, pH 6-7, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

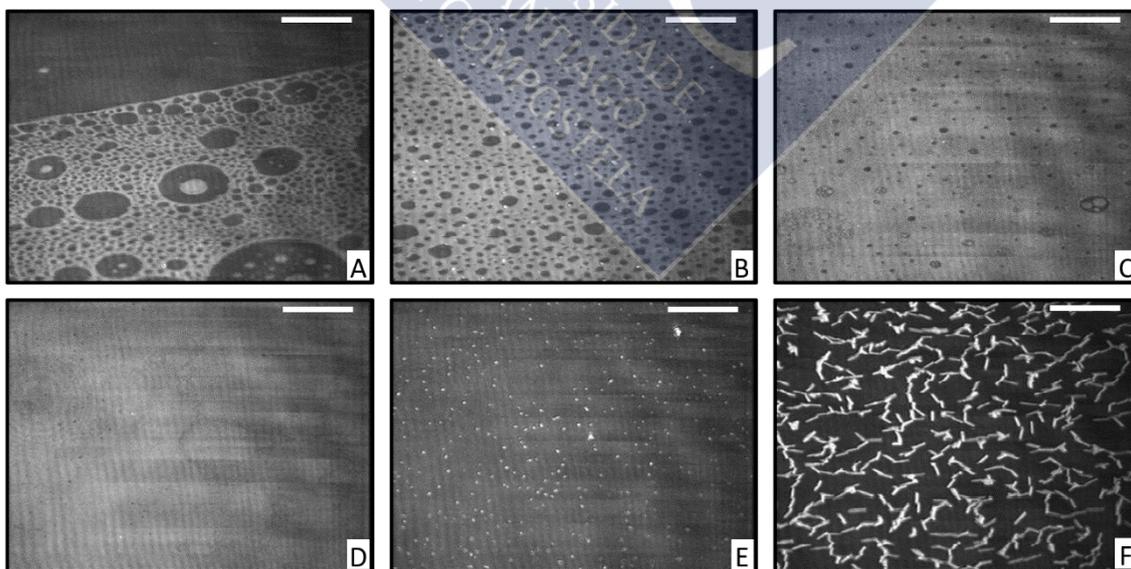


Ilustración 4.10.E.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido esteárico y colesterol ($X_{STA} = 0,1$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.10.3 Área molecular media

Una forma de comprobar la existencia de interacciones entre los componentes de una monocapa mixta, consiste en representar el área molecular media ocupada por la misma (área total dividida por el número de moléculas depositadas de ambos componentes) en función de la fracción molar de uno de los componentes. Si estos son inmiscibles, o bien si son miscibles y presentan un comportamiento ideal, tal representación da lugar a una línea recta, como consecuencia del cumplimiento de la ley de la aditividad de las área (Joos, Ruysen, Miñones, García Fernández, & Sanz Pedrero, 1969) (Seoane, Miñones, Conde, Iribarnegaray, & Casas, Interactions between Amphotericin B and Sterols in Monolayers. Mixed Films of Amphotericin B-Cholesterol, 1999).

$$A_{1,2} = x_1 \cdot A_1 + x_2 \cdot A_2 \quad (4.60)$$

Donde $A_{1,2}$, es el área molecular media del filme mixto a una determinada presión π : x_1 y x_2 son las fracciones molares de cada componente, y A_1 y A_2 son las áreas moleculares de los componentes puros.

Por el contrario, desviaciones de la linealidad ponen de manifiesto la existencia de un comportamiento no ideal de los componentes de la mezcla, con atracciones moleculares entre los mismos (desviaciones negativas) o repulsiones entre ellos (desviaciones positivas).

En la **Figura 4.10.J** se puede observar este tipo de representación a diferentes presiones superficiales. En todos los casos se observa el cumplimiento de la ley de la aditividad de las áreas, poniéndose de manifiesto que las nueve rectas correspondientes a las presiones superficiales seleccionadas para el estudio presentan todas una pendiente negativa.

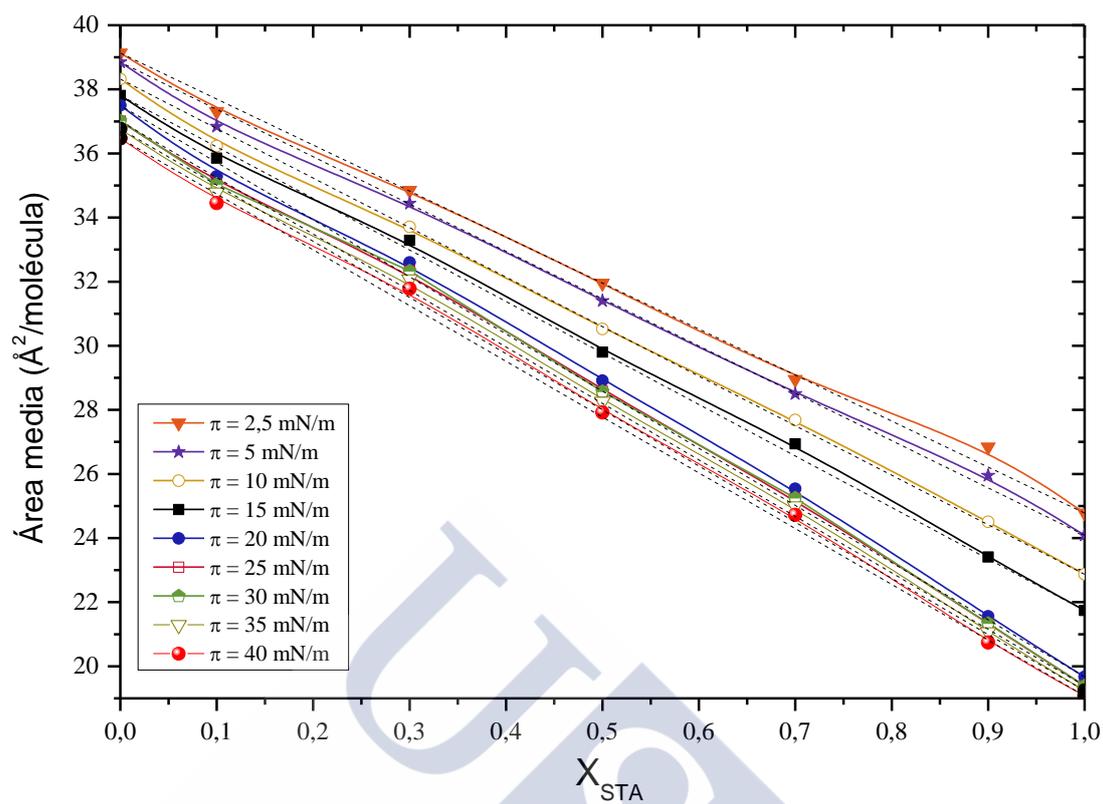


Figura 4.10.J.- Representación del área molecular media frente a la fracción molar de ácido esteárico de la mezcla STA/COL, a los valores de presión superficial indicados.

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.10.1 Funciones de exceso

4.10.1.1 Área de exceso

Otra forma de poner de manifiesto la existencia o no de interacciones entre los componentes de los filmes mixtos, es mediante la determinación del área de exceso de mezcla ($A_{exc.}$), que representa la diferencia existente entre el área molecular ocupada por la monocapa mixta a una determinada presión y el área que ocuparían los componentes si el filme mixto se comportase de forma ideal a la misma presión, es decir:

$$A_{exc.} = A_{1,2} (x_1 \cdot A_1 + x_2 \cdot A_2) \quad (4.61)$$

En definitiva, el área de exceso es una medida de la desviación del comportamiento ideal. Como puede comprobarse en la **Figuras 4.10.K** los valores obtenidos para esta magnitud son próximos a cero, lo que nos indica que ambos componentes son inmiscibles.

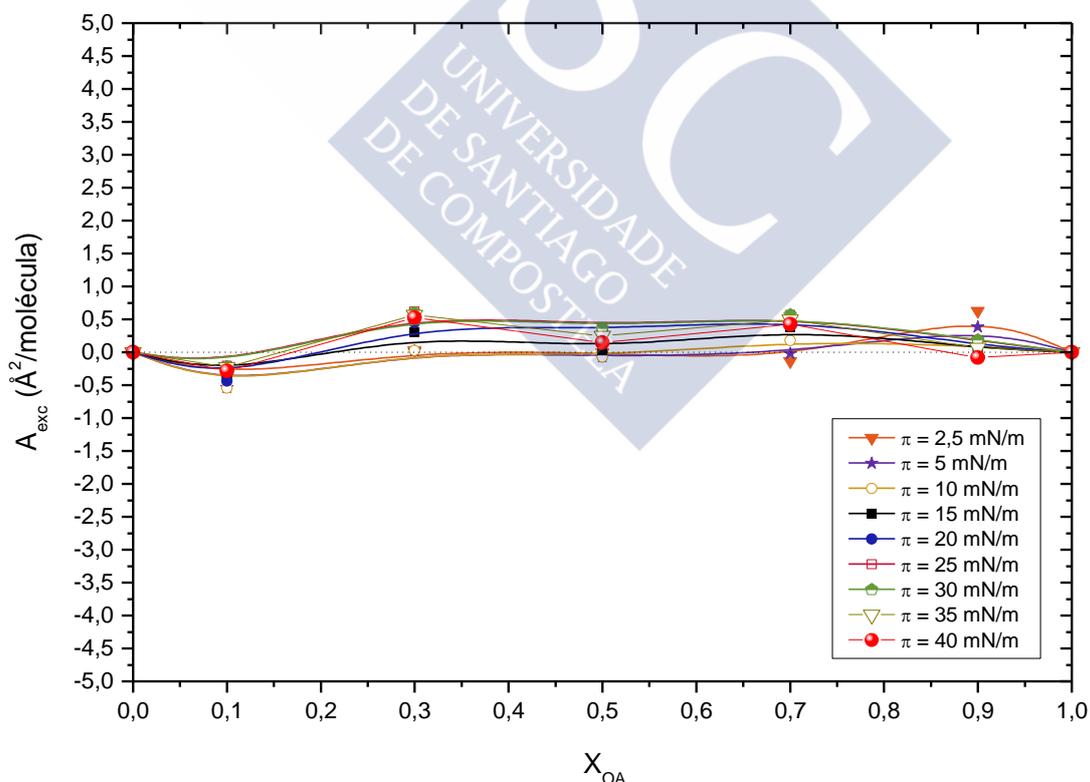


Figura 4.10.K.- Representación del área de exceso de la mezcla STA/COL frente a la fracción molar de ácido esteárico, a los valores de presión superficial indicados.

4.11 MEZCLA DE ÁCIDO OLEICO CON COLESTEROL

4.11.1 Isotermas π -A y módulos de compresibilidad

En la **Figura 4.11.A** se muestran las isotermas π -A de la mezcla de ácido oleico y colesterol. Aquellas cuya fracción molar presenta mayor cantidad de ácido graso que colesterol ($X_{OA} > 0,5$) son similares a la del propio ácido oleico puro, especialmente en las regiones de bajas presiones. En estas situaciones, la adición del colesterol a la monocapa de ácido oleico desplaza lentamente las isotermas hacia el eje de las Y. Sin embargo, cuando las presiones son elevadas, el desplazamiento ocurre hacia el lado contrario y se produce un aumento de la propia presión superficial.

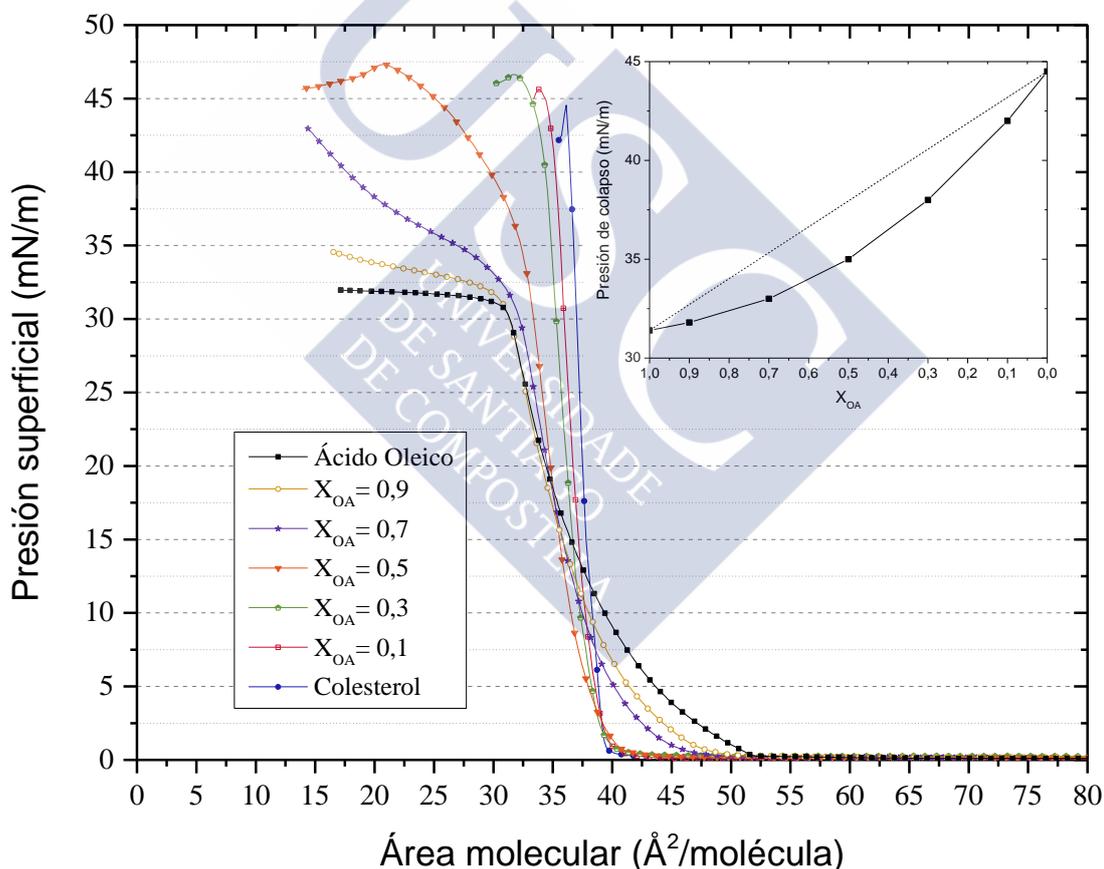


Figura 4.11.A Curvas π -A de monocapas de **ácido oleico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1**; **0,3**; **0,5**; **0,7**; **0,9**) obtenidas a 10 °C, pH 6-7, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimidas a la velocidad de 50 cm^2/min . En el interior, representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión.

En las isothermas con fracción molar $X_{OA} < 0,5$, el comportamiento de los films monomoleculares es similar al del colesterol puro, mostrando así una mayor pendiente. La isoterma de la mezcla de fracción molar X_{OA} igual a 0,5 se comporta de una forma intermedia entre los dos componentes puros.

La representación del módulo de compresibilidad (C_s^{-1}) en función de la presión superficial da lugar a una serie de curvas que nos permiten examinar los diferentes estados por los que atraviesa la monocapa (**Figura 4.11.B**).

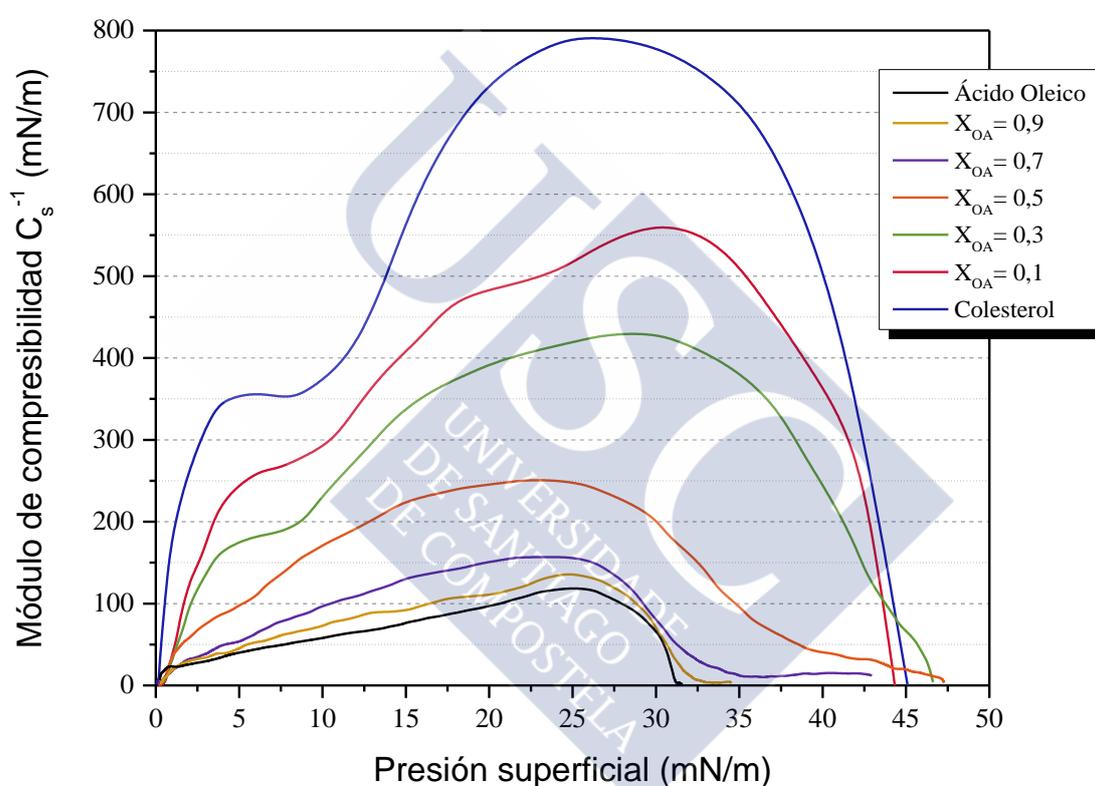


Figura 4.11.B.- Representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión de monocapas de **ácido oleico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**) obtenidas a 10 °C.

Existe una enorme diferencia entre los módulos de compresibilidad de las dos sustancias puras. Como ya hemos visto anteriormente, el colesterol da lugar a una monocapa muy compacta con una elevada resistencia a ser comprimida; mientras que el ácido oleico presenta una monocapa más expandida y con baja resistencia a la compresión.

Como se puede observar, el módulo de compresibilidad aumenta a medida que el colesterol está más presente en la mezcla. La presencia del esteroide produce un efecto de incremento del empaquetamiento molecular, teniendo como consecuencia una mayor resistencia a la compresión por parte de la monocapa.

El enorme efecto condensador del colesterol queda patente en la representación tridimensional del módulo de compresibilidad (**Figura 4.11.C**), donde se puede observar claramente el incremento de la superficie bajo la curva del C_s^{-1} a medida que la presencia del esteroide aumenta.

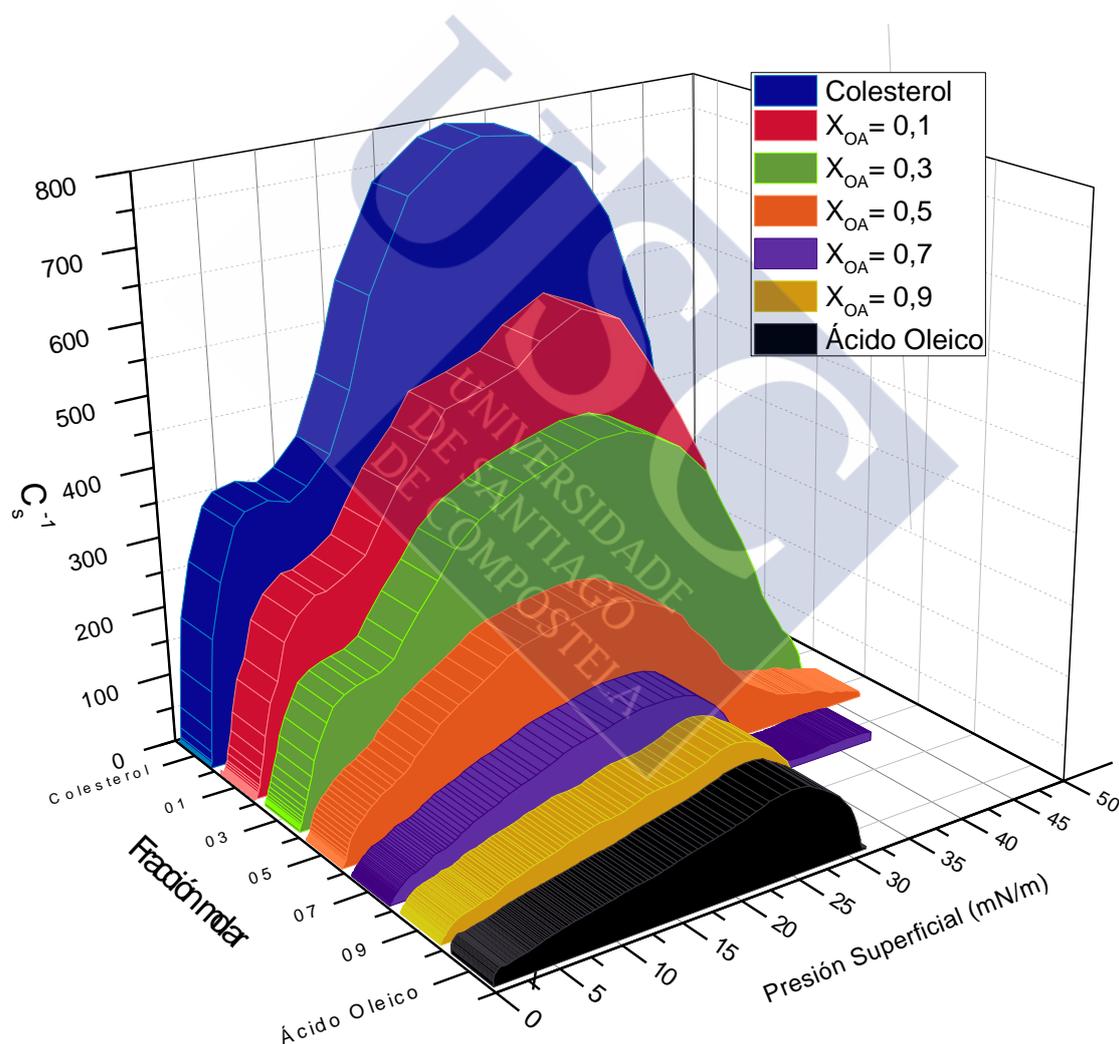


Figura 4.11.C Representación tridimensional de los módulos de compresibilidad frente a la presión superficial de monocapas de **ácido oleico, colesterol** y de mezclas de ambos (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**).

A continuación se muestran los módulos de compresibilidad individuales para cada mezcla (**Figura 4.11.D**). Los valores de módulo de compresibilidad a diferentes presiones superficiales así como los valores máximos alcanzados correspondientes a estos sistemas se recogen en la **Tabla 4.11.A**.

Módulo de compresibilidad (mN/m)							
X_{OA}	$\pi = 2,5$	$\pi = 5$	$\pi = 10$	$\pi = 15$	$\pi = 20$	$\pi = 25$	C_s^{-1} máximo
Colesterol	289,41	353,18	373,91	562,99	731,55	788,63	790,6
0,1	147,38	243,7	292,98	408,25	482,72	517,28	559,42
0,3	117,06	174,8	230,32	337,12	391,3	419,4	429,43
0,5	67,56	97,66	170,79	223,63	245,26	247,71	250,84
0,7	35,01	53,73	96,77	130,21	150,95	155,63	156,97
0,9	32,11	45,26	72,69	92,08	111,04	135,34	135,56
Ácido Oleico	27,65	40,13	57,97	76,48	96,99	118,39	118,39

Tabla 4.11.A Valores de los módulos de compresibilidad a diferentes presiones superficiales de monocapas mixtas de **ácido oleico** y **colesterol** con diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**).

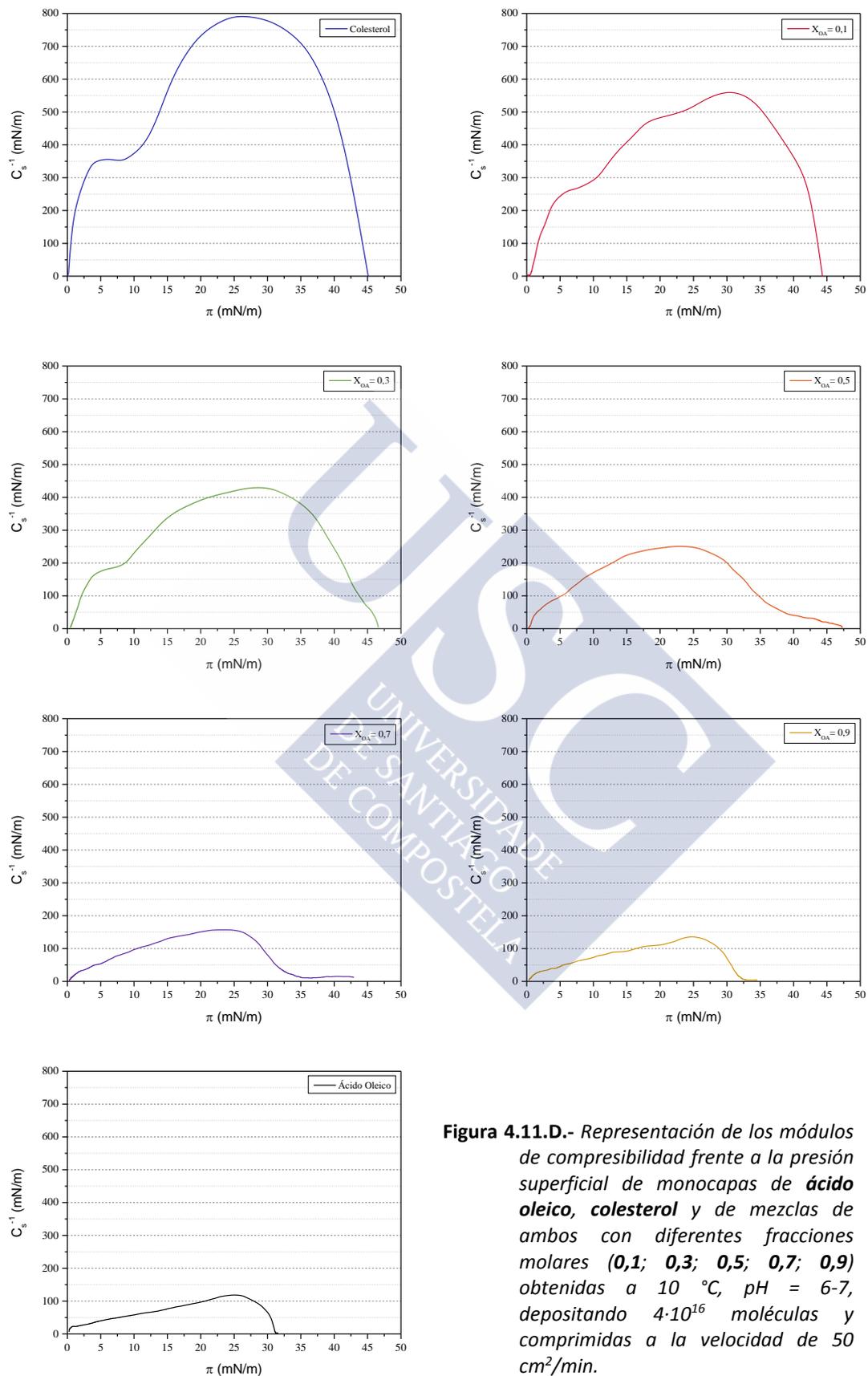


Figura 4.11.D.- Representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión superficial de monocapas de **ácido oleico, colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**) obtenidas a 10°C , $\text{pH} = 6-7$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimidas a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

4.11.2 Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla

4.11.2.1 Mezcla $X_{OA} = 0,9$

En esta primera monocapa mixta con mayor presencia de ácido oleico respecto de colesterol ($X_{OA} = 0,9$), se registra un valor de espesor de 0,7 nm al comienzo de la compresión coincidiendo con el estado *gas* (**Figura 4.11.E**). Dicho valor es muy similar al obtenido por la monocapa de este mismo ácido graso puro, por lo tanto cabe esperar que sea el responsable de dicho valor, más teniendo en cuenta que el colesterol registra cerca de un tercio de dicho valor en su monocapa.

En las imágenes correspondientes a esta fase *gas*, se observa con claridad la presencia de oleico con dominios esféricos y de colesterol en forma de características espumas (**Imágenes A y B**). A medida que continúa la compresión, la imagen se vuelve lentamente homogénea debido a la fusión de los diferentes dominios (**Imagen C**).

Cuando se produce el inicio del incremento de la presión superficial, tiene lugar la escalada lenta y continua del espesor, registrándose una imagen completamente homogénea (**Imagen D**) desde el comienzo del estado de *líquido expandido* hasta su final. Este punto viene determinado por dos circunstancias simultáneas: por un lado, se produce un punto de inflexión en la curva del espesor tras el cual la pendiente aumenta de forma notable; y, por otro, se recoge la **Imagen E**, la cual revela el inicio de la formación de núcleos tridimensionales correspondientes a la ruptura o colapso del film.

Este punto de colapso tiene lugar a un espesor cercano a 1,1 nm, valor que coincide con el obtenido para el oleico puro cuando tiene lugar su correspondiente colapso. Además, es muy cercano al que muestra el colesterol puro cuando se encuentra perpendicular a la horizontal con el resto radical alifático paralelo a la misma.

Al continuar con la compresión, se observa que la presión sigue aumentando ligeramente así como el espesor. Más concretamente, el espesor pasa de 1,1 nm a 1,5 nm antes de producirse una subida repentina. Es probable que este intervalo se corresponda con el aumento de la inclinación del resto alifático del colesterol, dado que los valores son muy similares a los obtenidos con el colesterol puro.

Finalmente, en la **Imagen F** se observan nítidamente los numerosos núcleos de condensación fusionados en forma de puntos brillantes consecuencia colapso.

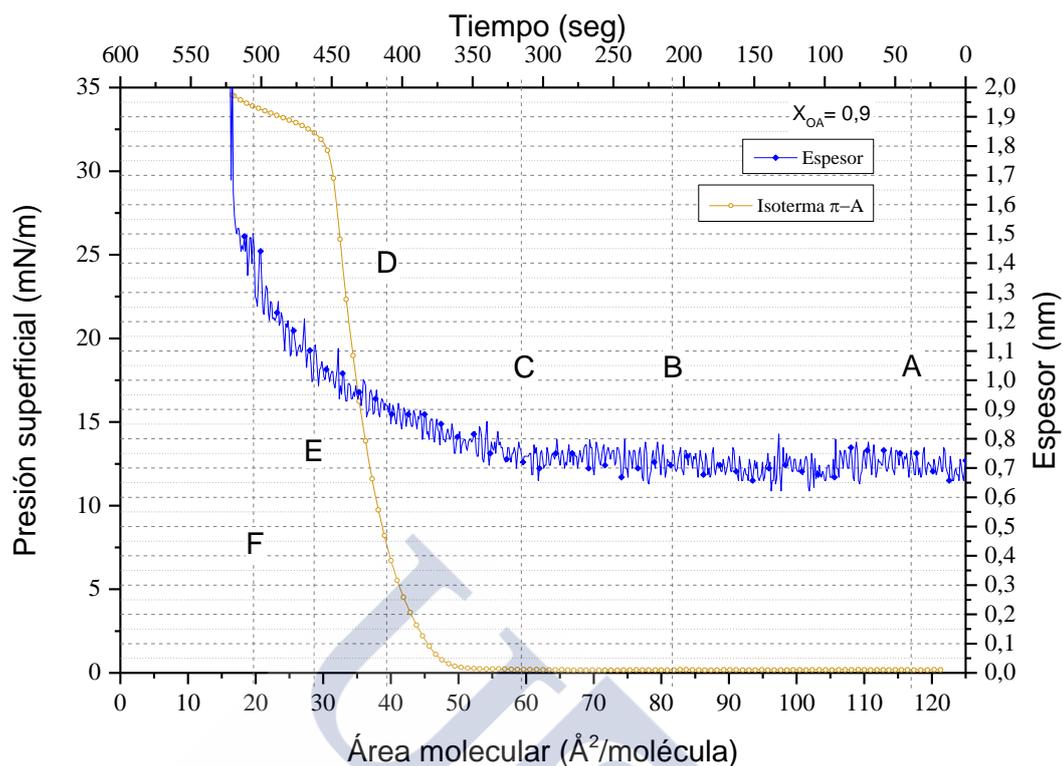


Figura 4.11.E.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido oleico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{OA} = 0,9$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

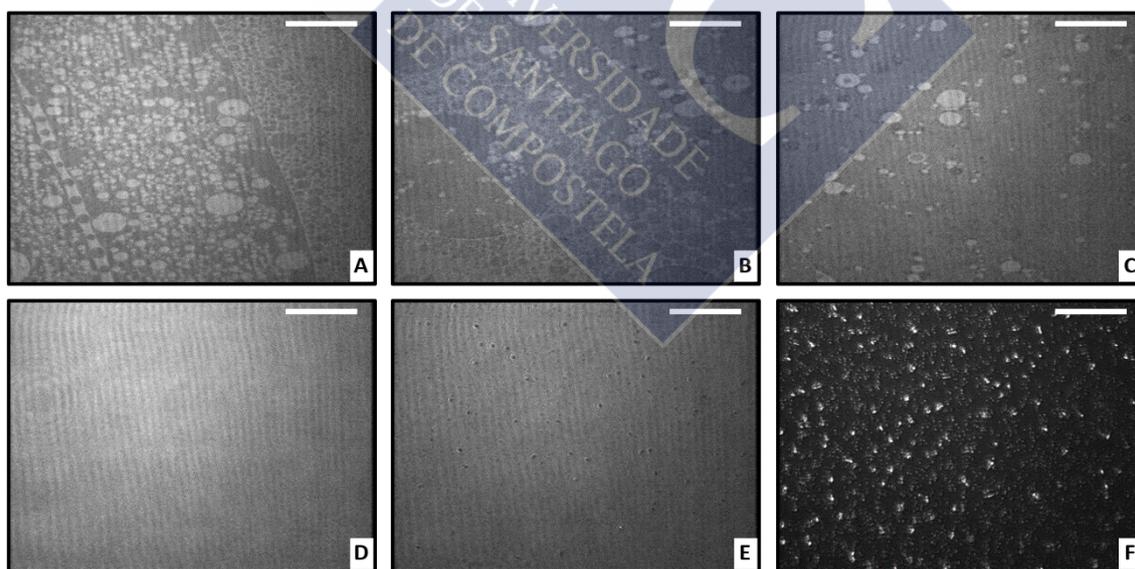


Ilustración 4.11.A.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido oleico** y **colesterol** ($X_{OA} = 0,9$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\ \mu\text{m}$.

4.11.2.2 Mezcla $X_{OA} = 0,7$

Tal como se observa en la **Figura 4.11.F**, el leve aumento de colesterol en la mezcla ($X_{OA} = 0,7$) no influye en los valores de espesor registrados durante la fase *gas*, ya que se mantiene el valor de 0,7 nm correspondientes al ácido oleico. En las imágenes microscópicas registradas cuando la monocapa se encuentra en este estado (**Imágenes A y B**) se pueden observar como los dominios de ambas sustancias se encuentran perfectamente mezclados.

A medida que el área molecular va decreciendo, los dominios de ambas sustancias comienzan a fusionarse (**Imagen C**) mientras, como aparece reflejado en el espesor, las moléculas inician un aumento de su grado de inclinación respecto a la superficie del sustrato.

En este caso, la mayor presencia de colesterol en la mezcla retrasa la aparición de la imagen totalmente homogénea hasta que la presión superficial alcanza un valor de 5 mN/m aproximadamente (**Imagen D**).

El colapso tiene lugar cuando el espesor alcanza un valor de 1,05 nm, momento en el que se pueden observar los primeros dominios o puntos correspondientes a dicho fenómeno (**Imagen E**). Durante este período de tiempo, los valores de espesor registrados tanto para el estado *gas* como para el estado de *líquido expandido* coinciden con los obtenidos cuando la monocapa está constituida únicamente por ácido oleico. Sin embargo, tal como se observó en el estudio de las isoterms, a presiones inferiores a 15 mN/m el área para el ácido graso puro es mayor que cuando está presente en la mezcla el colesterol, ya sea en la mezcla con $X_{OA} = 0,7$ o con $X_{OA} = 0,9$.

En este caso, no se observa un cambio significativo en el incremento del espesor, ya que su gráfica mantiene una misma pendiente de crecimiento aunque sí se observa un aumento del ruido. Posteriormente, el espesor logra un valor de entre 1,3 y 1,4 nm, instante en el que sí aumenta de forma súbita. En este punto, en la **Imagen F** se observan con mayor claridad los núcleos brillantes correspondientes al colapso del film.

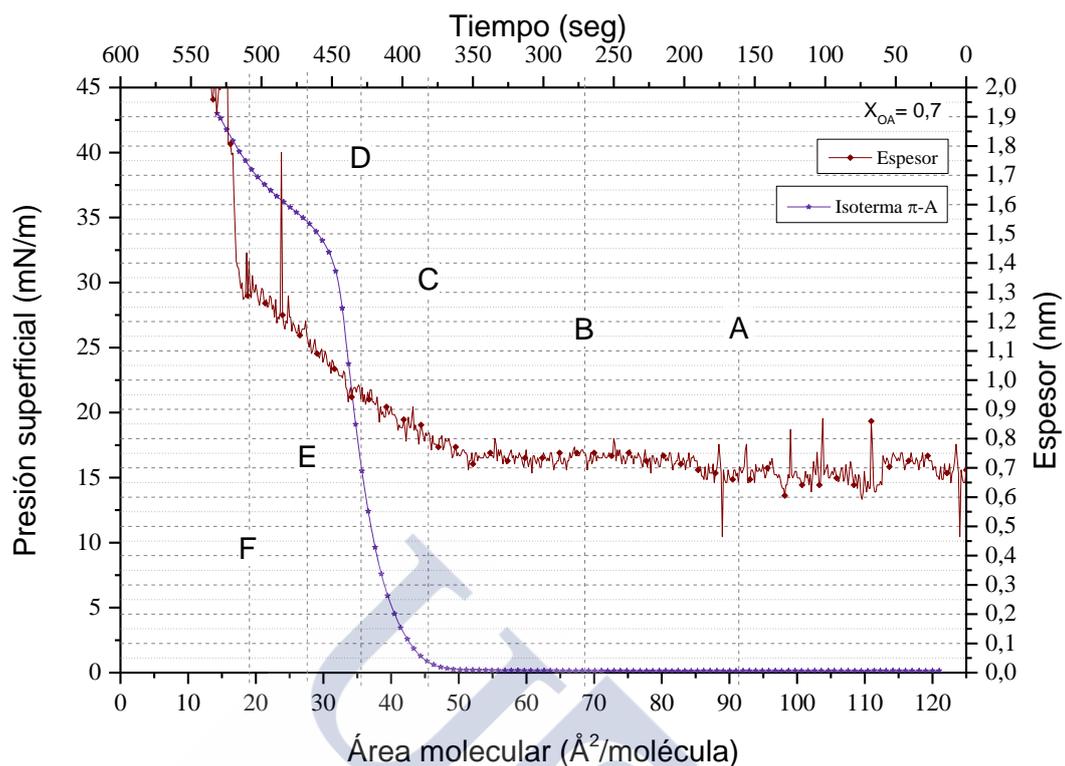


Figura 4.11.F.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido oleico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{OA} = 0,7$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

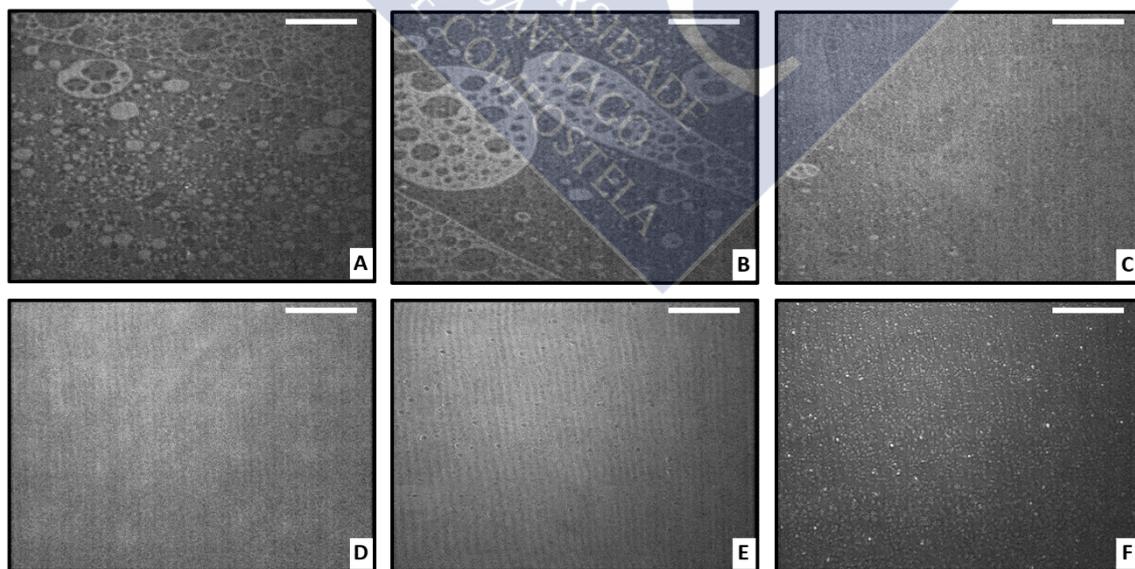


Ilustración 4.11.B.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido oleico** y **colesterol** ($X_{OA} = 0,7$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.11.2.3 Mezcla $X_{OA} = 0,5$

De nuevo el ácido oleico es el que limita el valor del espesor correspondiente al estado *gas* (0,7 nm) manteniéndose constante durante toda esta fase. La **Imagen A** nos muestra una coexistencia de dominios espumosos correspondientes al colesterol con los círculos de color gris claro propios del ácido oleico. A medida que nos acercamos a la transición de estado, observamos una imagen en la que queda patente un mayor grado de mezcla entre las dos sustancias (**Imagen B**).

Con el inicio de la escalada del espesor, tiene lugar la propia de la presión superficial. La **Imagen C**, toma a una presión de 1 mN/m, muestra todavía dominios de ambas sustancias en estado *gas*, aunque probablemente ya nos encontremos en una fase de transición, ya que el incremento de presión nos indica que toda la superficie del sustrato acuoso está cubierta de material de la monocapa, siendo responsable de la zona homogénea parte del ácido oleico en estado de *líquido expandido*.

Se realizó la **Imagen D** a la presión superficial de 10 mN/m. Nos muestra la coexistencia entre el estado *gaseoso* y el *líquido expandido*, correspondientes a los dominios de colesterol en estado *gas*, con bordes claros y espacios interiores abiertos, y a la imagen homogénea del ácido oleico en estado de *líquido expandido*, respectivamente.

En esta mezcla equimolar, la imagen completamente homogénea se logra obtener finalmente cuando la presión superficial alcanza un valor de 20 mN/m (**Imagen E**) y se mantiene hasta que la monocapa colapsa. Dicho fenómeno viene acompañado de la captura microscópica de la **Imagen F**, en la que se observan los dominios brillantes de condensación propios de la ruptura de la monocapa.

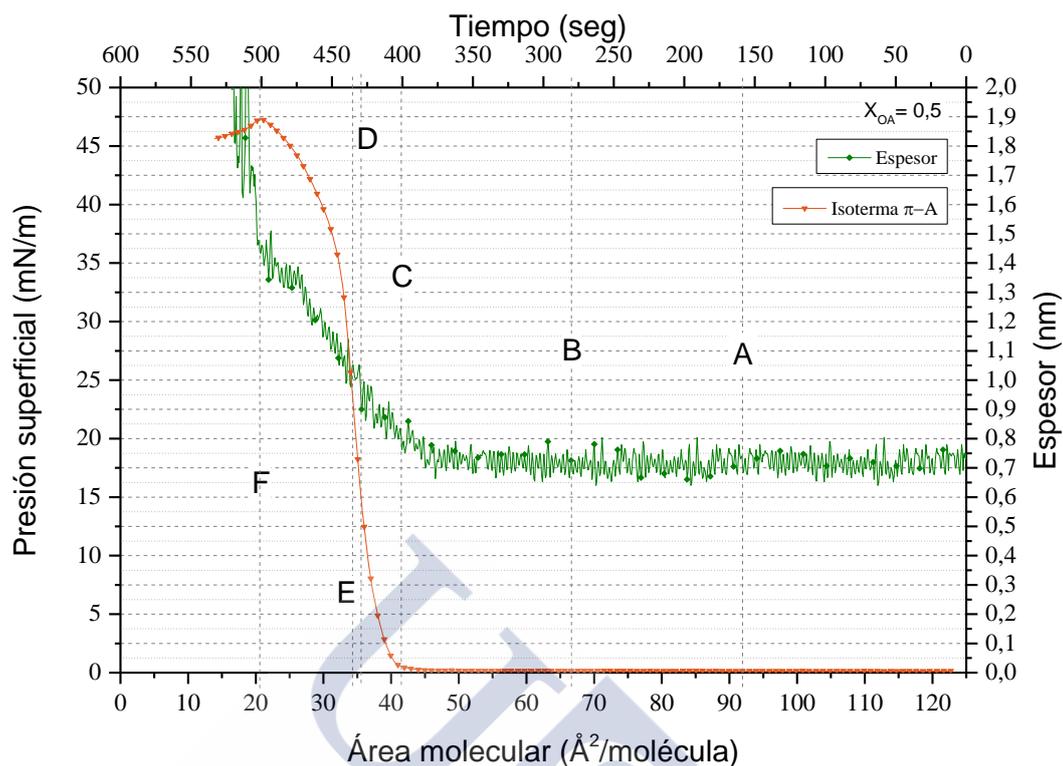


Figura 4.11.G.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido oleico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{OA} = 0,5$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

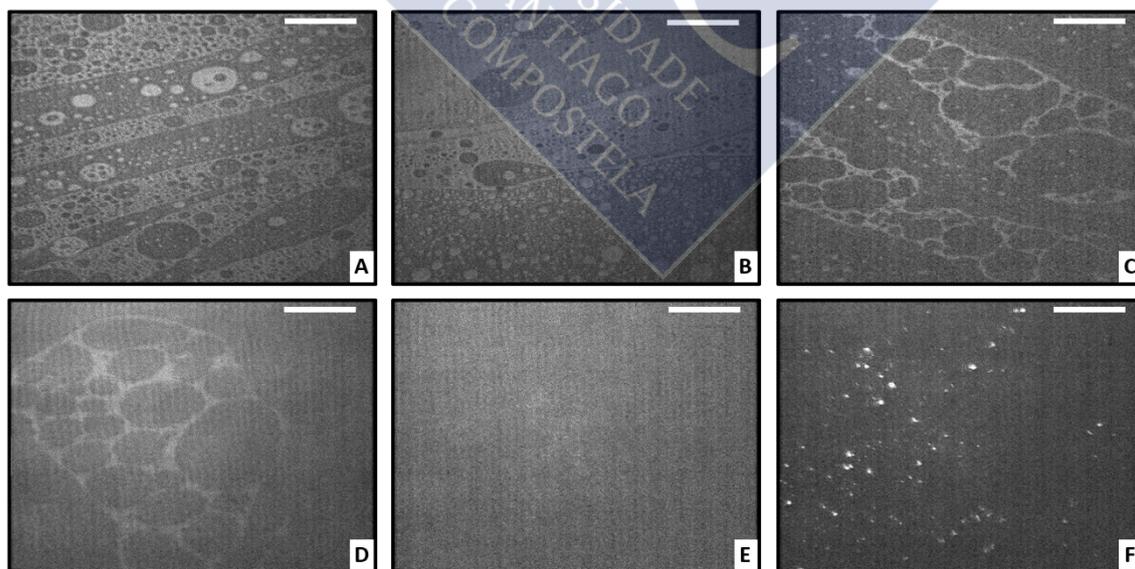


Ilustración 4.11.C.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido oleico y colesterol ($X_{OA} = 0,5$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.11.2.4 Mezcla $X_{OA} = 0,3$

La mayor presencia del colesterol en la mezcla $X_{OA} = 0,3$ tiene como consecuencia un importante aumento del ruido en la gráfica del espesor, principalmente durante el tiempo que la monocapa permanece en estado *gas*. La media de los valores de espesor registrados en esta fase es alrededor de 0,7 nm siendo, de esta forma, el ácido oleico el que marca el valor del mismo. En la **Imagen A** se observa la convivencia de ambas sustancias en estado *gas*, donde se observa, como cabe esperar, una mayor presencia de colesterol. Tal como podemos observar en la **Imagen B**, en los instantes previos al incremento de presión superficial, los dominios se van fusionando.

Al estar presente el colesterol en mayor proporción, la monocapa se vuelve condensada y, como consecuencia, el incremento del espesor se registra antes que el de la presión superficial.

La **Imagen C**, tomada a una presión de 10 mN/m, muestra una clara fase de transición entre el estado *gas* y un estado de *líquido condensado* (a esa presión superficial el valor del módulo de compresibilidad es de 230 mN/m).

El incremento del espesor se ve ligeramente estancado con la formación de lo que se podría definir como meseta, entre los 350 y 380 segundos. Dicho estancamiento se produce a un valor de espesor de 1,1 nm, valor cercano al máximo obtenido para el ácido graso puro y, al mismo tiempo, coincide con la conformación del colesterol cuando el esterano forma un ángulo de 90° con la normal, manteniendo paralelo a la misma su radical alquílico.

A la presión de 20 mN/m se observa una imagen microscópica totalmente homogénea (**Imagen D**) que permanece hasta que se produce el colapso, presentando los dominios brillantes típicos de ruptura de la monocapa (**Imagen E**). Aproximadamente, en este punto el espesor refleja un valor de 1,5 nm correspondientes al máximo valor alcanzado por el colesterol cuando su monocapa se encuentra en estado *sólido* previo al colapso. Al continuar la compresión, los dominios brillantes se van fusionando, teniendo como consecuencia la génesis de cristales brillantes tridimensionales (**Imagen F**).

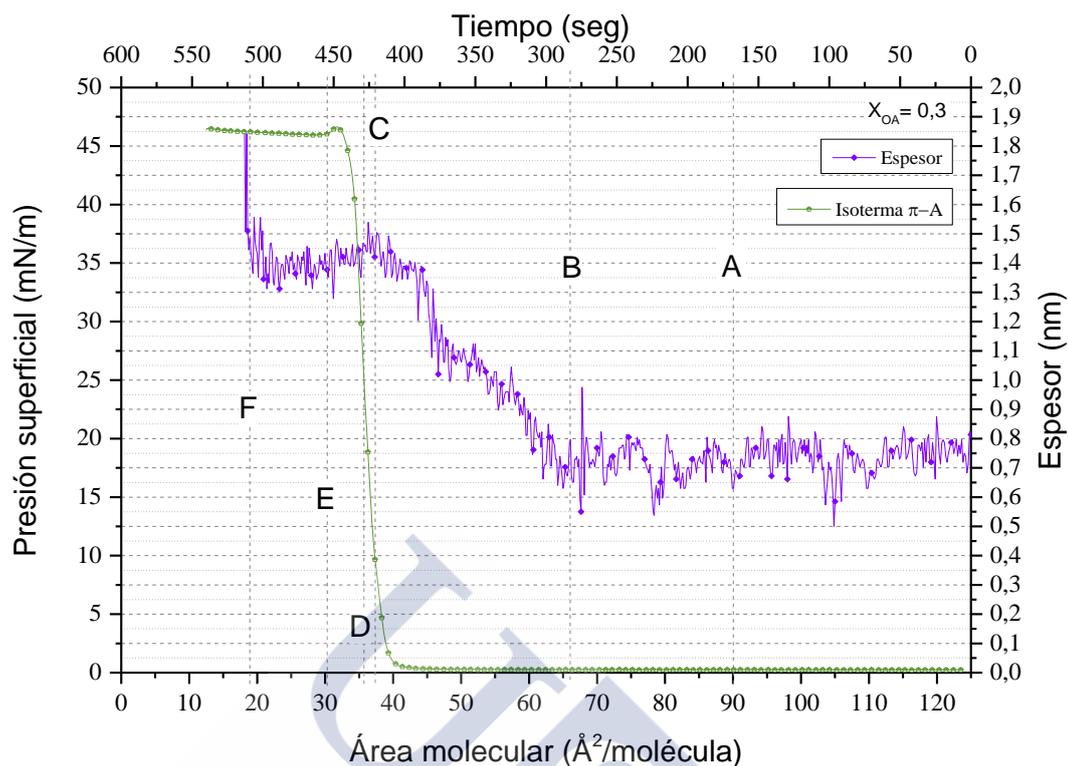


Figura 4.11.H.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido oleico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{OA} = 0,3$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

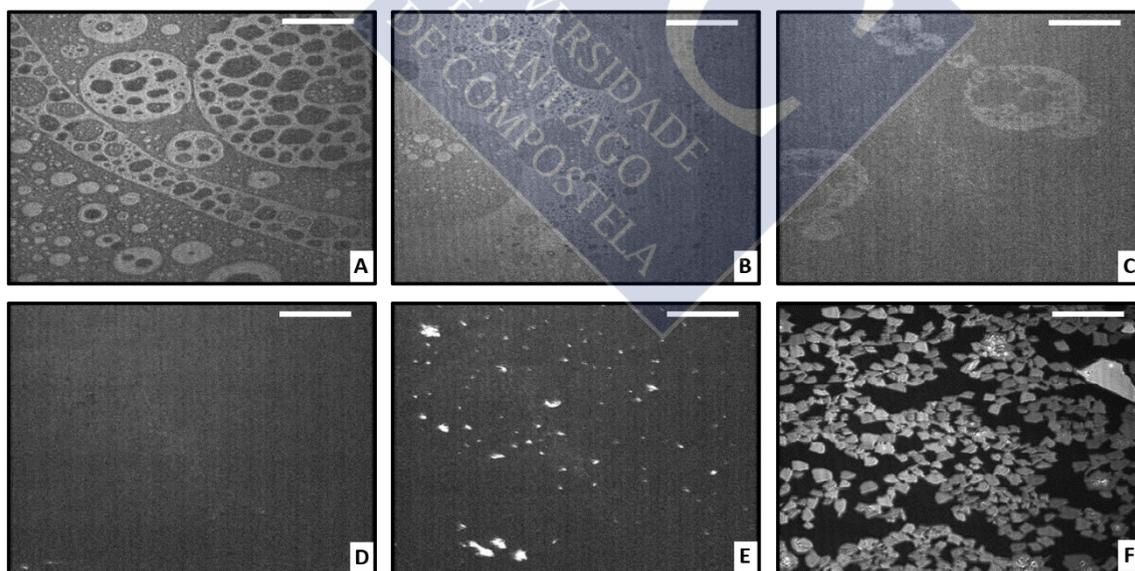


Ilustración 4.11.D.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido oleico** y **colesterol** ($X_{OA} = 0,3$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.11.2.5 Mezcla $X_{OA} = 0,1$

Al contrario de lo que ocurría en las anteriores mezclas, en la de $X_{OA} = 0,1$ el espesor correspondiente al estado *gas* no viene marcado por el ácido oleico debido a su baja presencia. Así pues, esta mezcla logra el mismo espesor que el del colesterol puro cuando se encuentra como único componente de una monocapa, esto es 0,25 nm. El espesor experimenta alguna subida puntual, como por ejemplo entre los 90 y 95 $\text{\AA}^2/\text{molécula}$, debido a la presencia del ácido graso. Esta circunstancia se explica por la presencia o ausencia del ácido graso omega-9 en la zona de medida del microscopio.

Las **Imágenes A y B** muestran la gran presencia del esteroles, resultando de gran dificultad el discernir algún dominio de ácido graso.

A medida que disminuye el área los dominios se van fusionando, dando lugar a la **Imagen C** que se vuelve más homogénea, manteniendo todavía cierta superficie sin ocupar, en concreto, las zonas oscuras marcadas por el sustrato acuoso.

Al tratarse de una monocapa condensada, se registra una subida repentina del espesor de igual forma que ocurría con el colesterol puro. Así pues, se logran los mismos valores, esto es, en un primer momento un espesor de 11 \AA , que se ven aumentado de forma lenta pero constante debido al cambio de inclinación que sufre el resto radical alquílico del colesterol. De igual manera, al adquirir un valor de espesor relativo de 15 \AA , la monocapa sufre el colapso.

A la presión superficial de 10 mN/m se vuelve todo homogéneo (**Imagen D**) manteniéndose así hasta el colapso que tiene lugar a la presión de 45 mN/m. En este momento se observan los dominios brillantes de la **Imagen E**. Al proseguir con la compresión tiene lugar la formación de las estructuras cristalinas tridimensionales en forma de bastones, características del colesterol puro (**Imagen F**).

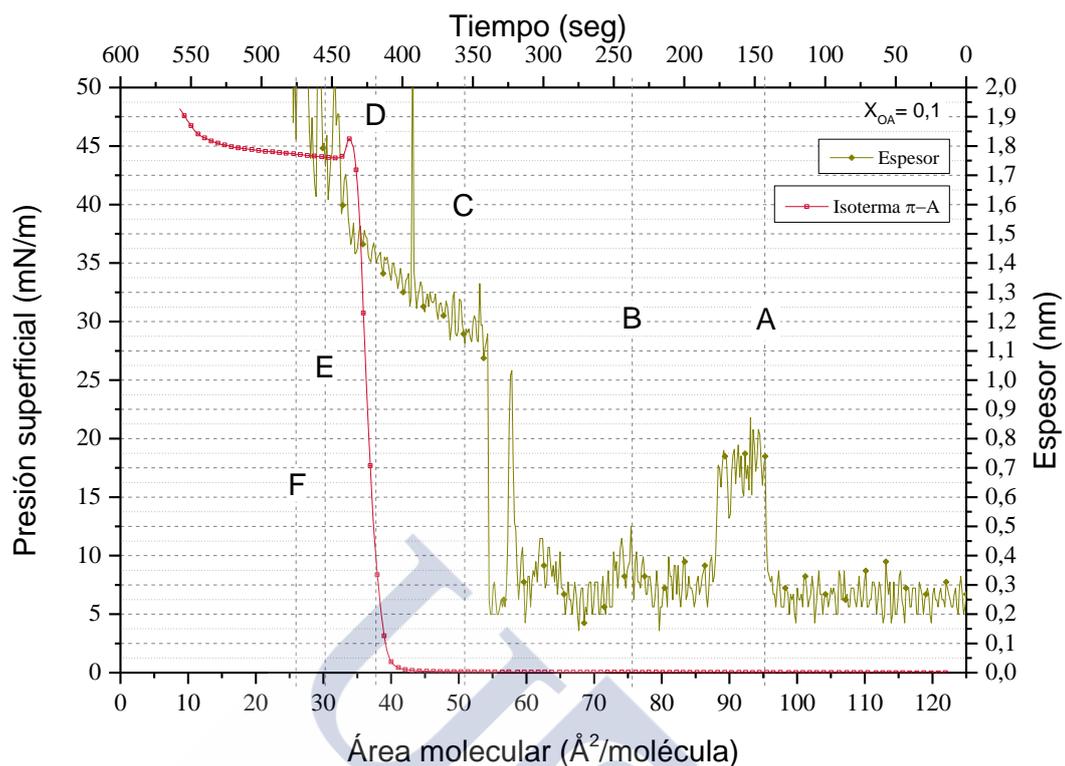


Figura 4.11.I.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido oleico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{OA} = 0,1$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

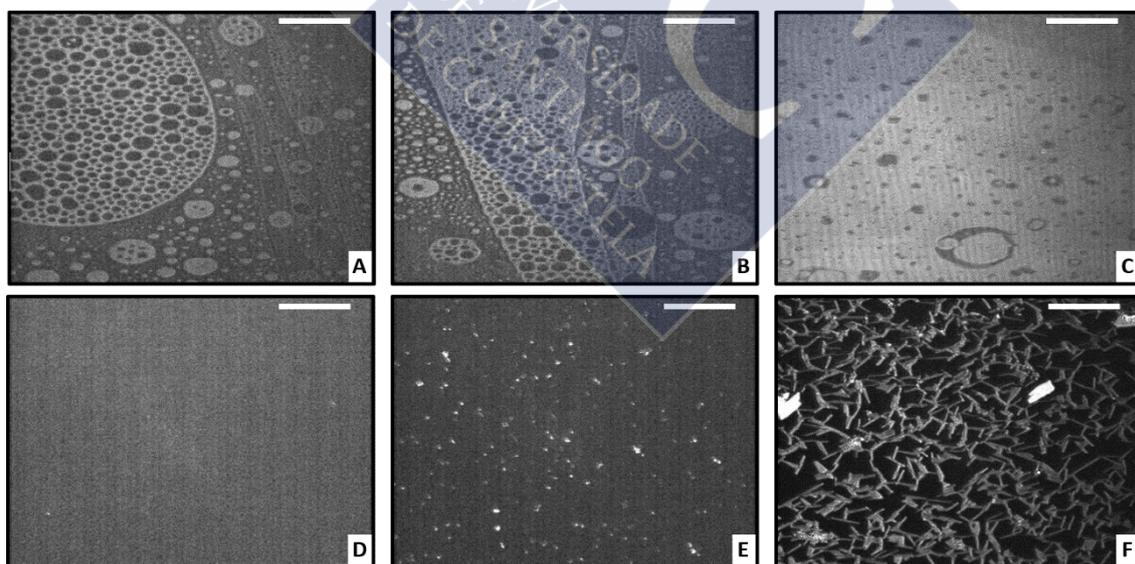


Ilustración 4.11.E.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido oleico** y **colesterol** ($X_{OA} = 0,1$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.11.3 Área molecular media

La representación del área molecular media ocupada por las monocapas mixtas en función de la fracción molar de ácido oleico a diferentes presiones superficiales se recoge en la **Figura 4.11.J**. A diferencia de lo que ocurría con el ácido esteárico, en este caso sí se observan desviaciones, lo que nos indica la existencia de un comportamiento no ideal de los componentes de la mezcla. Al tratarse de desviaciones negativas se pone de manifiesto la presencia de atracciones intermoleculares.

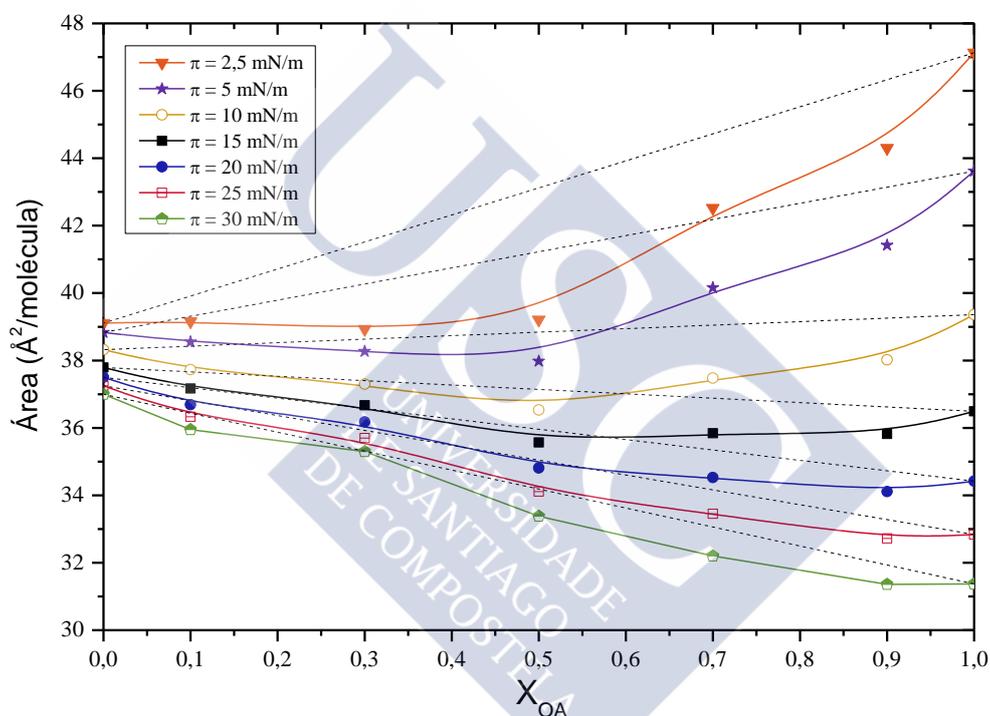


Figura 4.11.J.- Representación del área molecular media ocupada por las monocapas mixtas de **ácido oleico y colesterol** a diferentes presiones superficiales y en función de la fracción molar de OA a 10 °C.

En casi todos los casos se observa el incumplimiento de la ley de la aditividad de las áreas, poniéndose de manifiesto que cuando la representación se hace a una presión superficial superior a 10 mN/m, la pendiente de la recta es negativa, mientras que a presiones superficiales inferiores las pendientes son positivas.

4.11.4 Funciones de exceso

4.11.4.1 Área de exceso

La representación del área de exceso frente a la fracción molar (**Figura 4.11.K**) confirma, tal como cabría esperar, la existencia de desviaciones negativas respecto a comportamiento ideal. Estas desviaciones son más importantes cuanto menor sea la presión superficial, alcanzándose los mayores valores negativos en la mezcla de fracción molar 0,5.

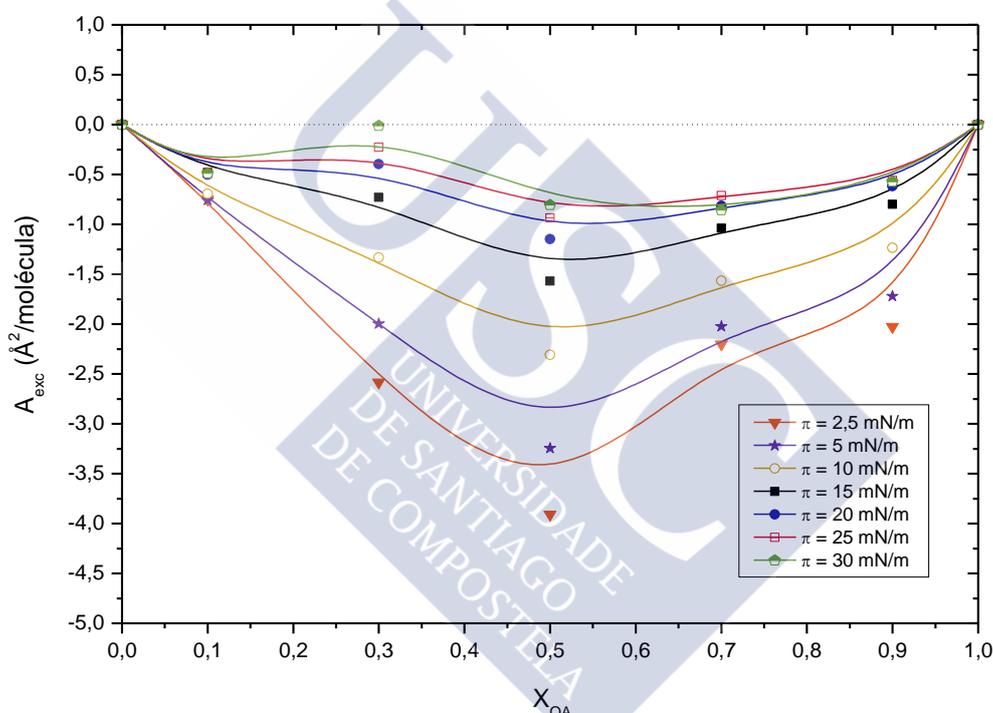


Figura 4.11.K.- Representación del área de exceso a diferentes presiones superficiales de monocapas mixtas de **ácido oleico y colesterol** en función de la fracción molar de OA a 10 °C.

Resultados similares fueron obtenidos por otros autores (Hac-Wydro & Wydro, The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes, 2007) (Seoane, Miñones, Conde, Iribarnegaray, & Casas, Interactions between Amphotericin B and Sterols in Monolayers. Mixed Films of Amphotericin B-Cholesterol, 1999).

4.11.4.2 Energía libre de exceso (ΔG_{exc})

La interacción entre el ácido oleico y el colesterol puede ser también analizada desde el punto de vista termodinámico, utilizando para ello los resultados de la Energía libre de exceso (ΔG_{exc}) de las monocapas mixtas. De acuerdo con Goodrich (Goodrich, Proc. 2nd Int. Congr. Surface Activity, 1957), ΔG_{exc} se puede calcular a partir del área bajo las curvas π -A correspondientes a las mezclas y a los componentes puros, según la expresión:

$$\Delta G_{\text{exc}} = N \cdot \int_{\pi'}^{\pi} (A_{1,2} - x_1 \cdot A_1 - x_2 \cdot A_2) d\pi \quad (4.62)$$

Siendo N el número de Avogadro, A_1 , A_2 y $A_{1,2}$ las áreas moleculares de los componentes puros 1 y 2 de la mezcla respectivamente, a una determinada presión superficial π y x_1 y x_2 las fracciones molares de los componentes en la monocapa mixta. El límite superior de integración se ha elegido arbitrariamente y se utilizaron los valores de 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mN/m, π' es la presión superficial a la que se supone que los componentes de la monocapa se mezclan idealmente. Dicho valor de presión superficial se considera cero, puesto que se asume que los componentes de las mezclas se comportan de forma ideal a dicha presión superficial (Gershfeld, 1972).

El cálculo de la integral se realizó mediante un programa informático. Los valores obtenidos (a siete presiones superficiales diferentes) se representan en función de la fracción molar del ácido oleico en la **Figura 4.11.L**. Se observan de nuevo las desviaciones negativas, siendo la mezcla de fracción molar de ácido oleico de 0,1 la que presenta menores valores de energía libre.

Con la mezcla equimolar se alcanzan los mayores valores de energía libre (cerca de 400 J/mol a 30 mN/m). Por lo tanto se establece la mezcla de fracción molar 0,5 como la de mayor interacción entre los dos componentes puros.

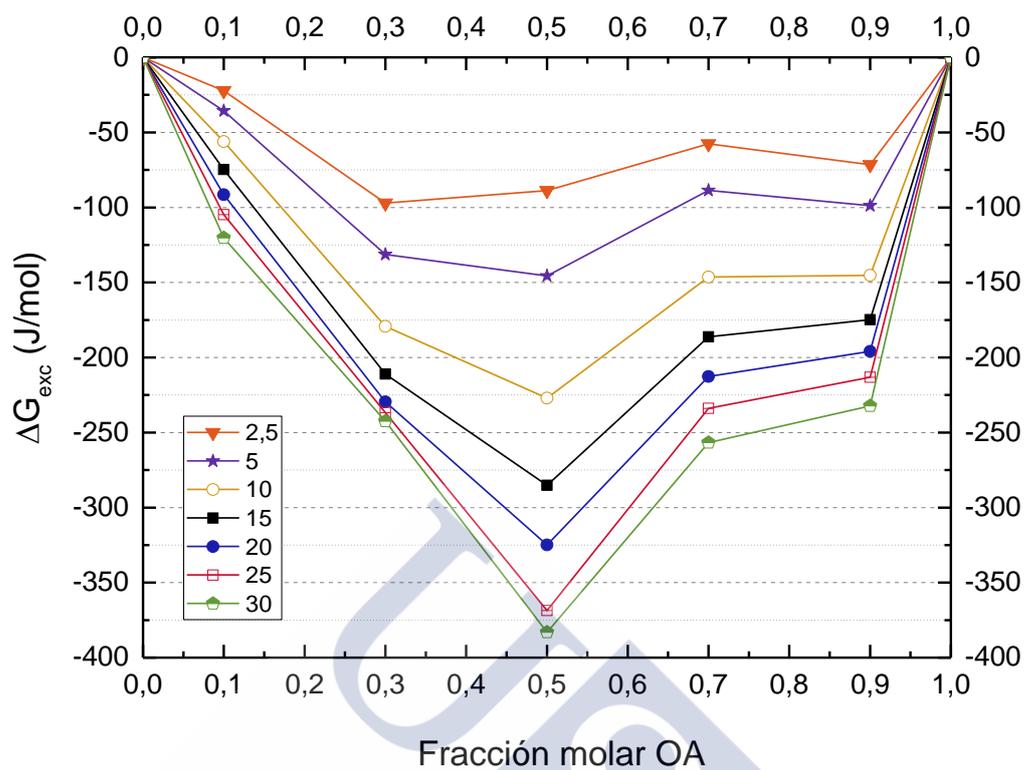


Figura 4.11.L.- Representación de la energía libre de exceso a diferentes presiones superficiales correspondientes al sistema OA-Col.

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



4.12 MEZCLA DE ÁCIDO LINOLEICO CON COLESTEROL

4.12.1 Isotermas π -A y módulos de compresibilidad

Las isotermas de las monocapas de la mezcla de ácido linoleico y colesterol se muestran en la **Figura 4.12.A**. Las monocapas con mayor proporción de ácido linoleico son de tipo *líquido expandido* (curvas 0,7 y 0,9), similares al del ácido graso puro; pero para las que presentan una proporción molar de colesterol mayor a 0,5 (curvas 0,3 y 0,1) son de tipo *sólido*, similares a la del propio colesterol puro.

El colapso de las mezclas ocurre a valores de presión superficial intermedios entre los de los componentes puros, y su valor se ve incrementado al aumentar la presencia de colesterol (interior **Figura 4.12.A**), lo cual nos indica que los dos componentes son miscibles a lo largo del rango de las mezclas.

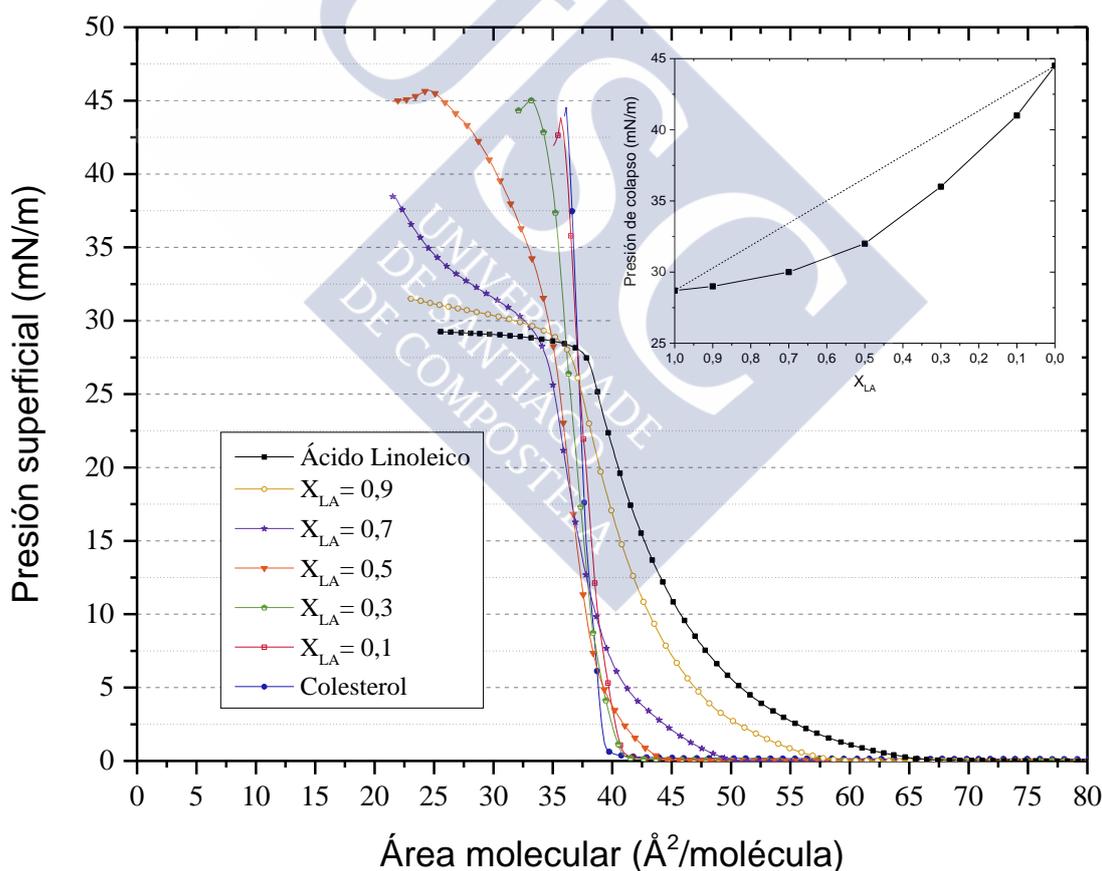


Figura 4.12.A.- Curvas π -A de monocapas de **ácido linoleico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1**; **0,3**; **0,5**; **0,7**; **0,9**) obtenidas a 10 °C, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de 50 cm^2/min . En la gráfica interna se muestran los valores de colapso frente a la fracción molar.

Con el módulo de compresibilidad (**Figura 4.12.B**) se puede observar como aumenta la resistencia de las monocapas de las mezclas a ser comprimidas a medida que el colesterol se encuentra más presente. De la misma forma, la adición de ácido linoleico provoca una disminución en la rigidez de las monocapas.

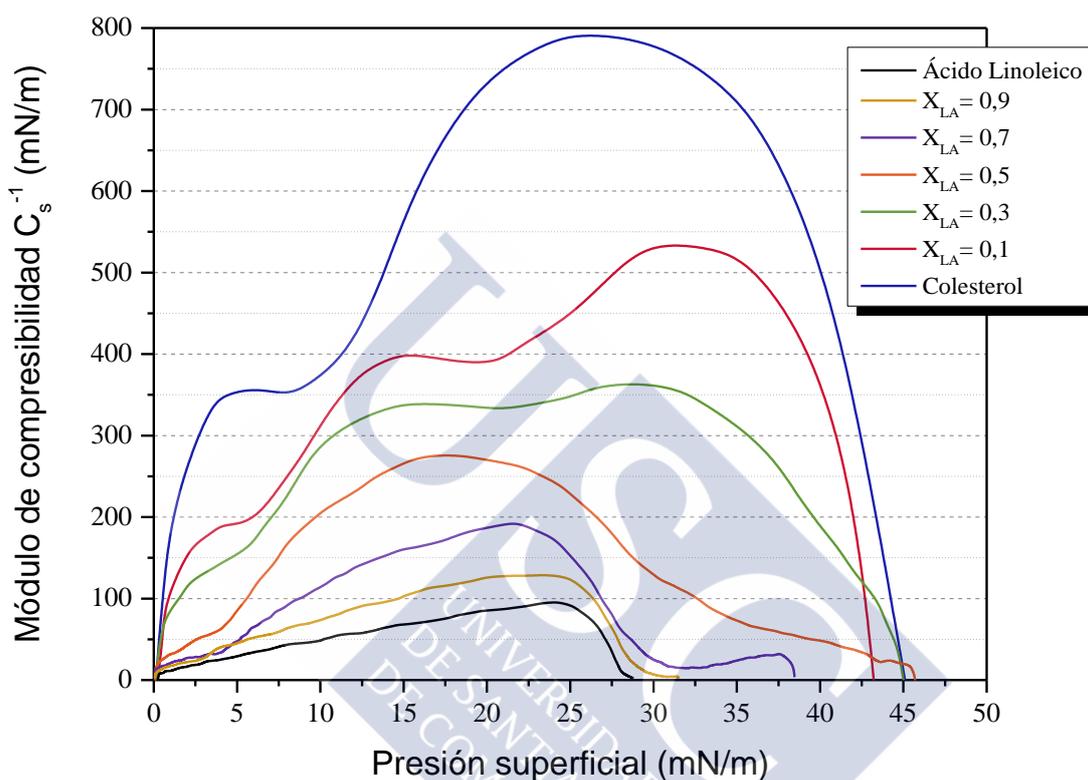


Figura 4.12.B.- Módulos de compresibilidad correspondientes a las isothermas π -A de monocapas de **ácido linoleico, colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**).

De la misma forma que sucede con el ácido oleico, el colesterol incrementa el módulo de compresibilidad del ácido linoleico de manera proporcional a la presencia que el mismo tiene en las diferentes mezclas.

Esta gran capacidad de condensación se ve claramente reflejada en la representación tridimensional del módulo de compresibilidad frente a la presión superficial que muestra la **Figura 4.12.C**.

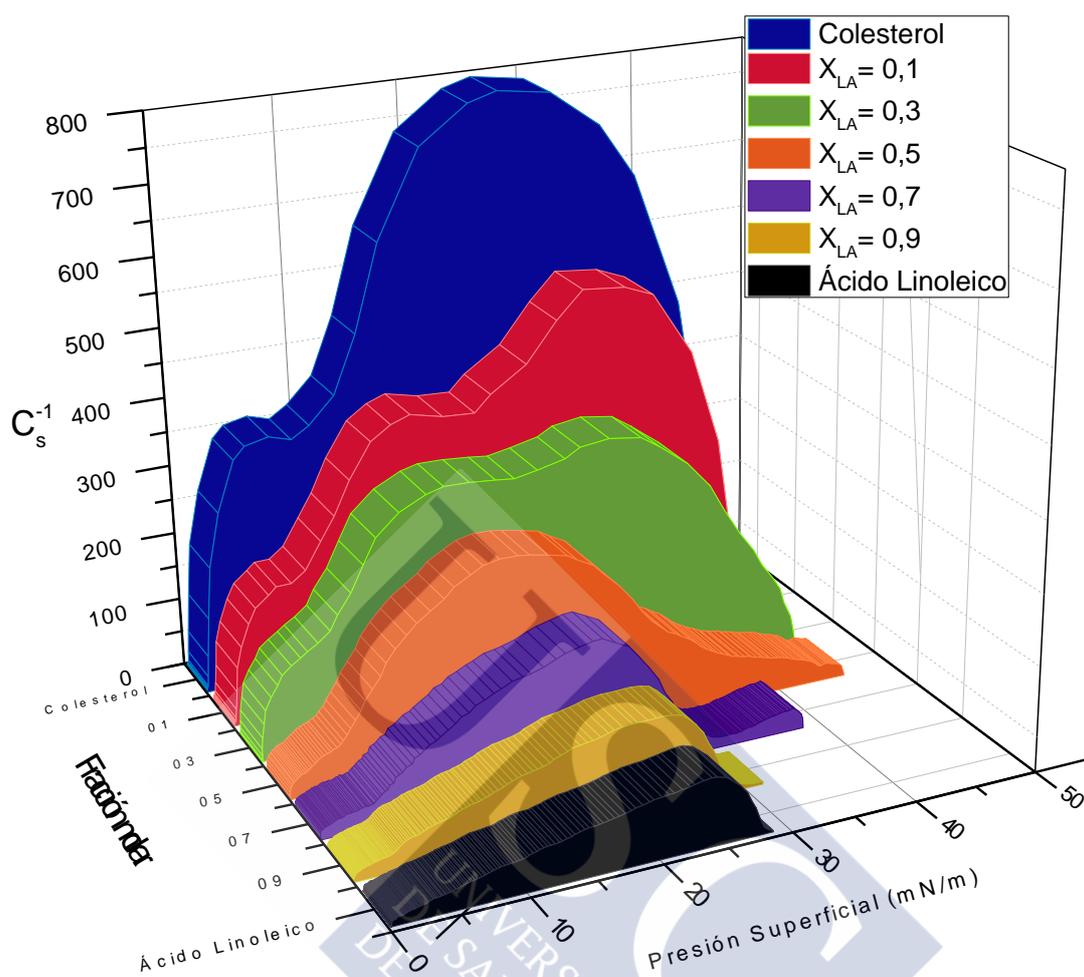


Figura 4.12.C.- Representación tridimensional de los módulos de compresibilidad frente a la presión superficial de monocapas de **ácido linoleico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1**; **0,3**; **0,5**; **0,7**; **0,9**) obtenidas a 10 °C.

A continuación se muestran los módulos de compresibilidad individuales para cada mezcla (**Figura 4.12.D**). Los valores de módulo de compresibilidad a diferentes presiones superficiales así como los valores máximos alcanzados correspondientes a estos sistemas se recogen en la **Tabla 4.12.A**

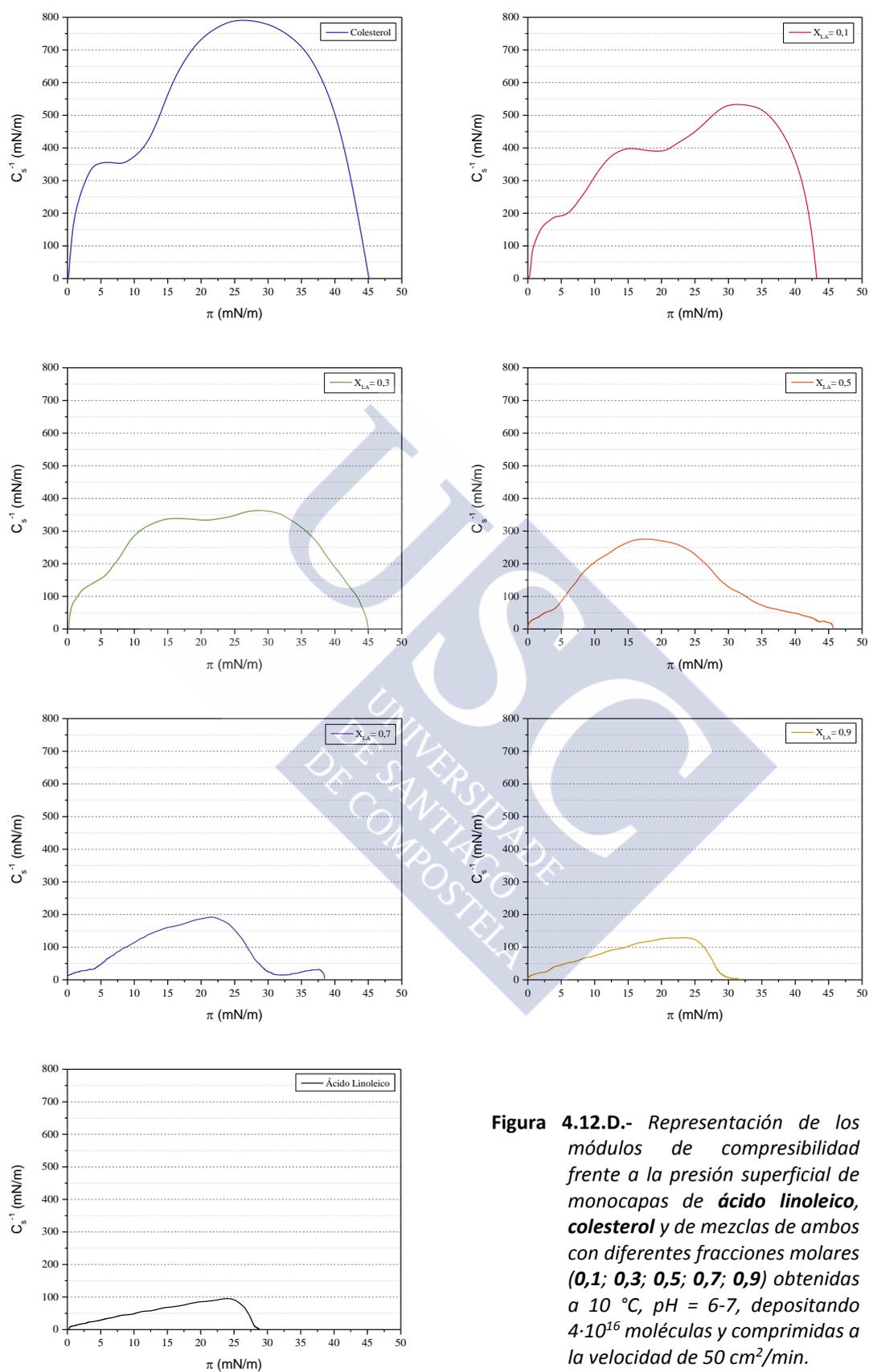


Figura 4.12.D.- Representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión superficial de monocapas de **ácido linoleico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**) obtenidas a 10°C , $\text{pH} = 6-7$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimidas a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

Módulo de compresibilidad (mN/m)							
X_{LA}	$\pi = 2,5$	$\pi = 5$	$\pi = 10$	$\pi = 15$	$\pi = 20$	$\pi = 25$	C_s^{-1} máximo
Colesterol	289,41	353,18	373,91	562,99	731,55	788,63	790,6
0,1	165,44	192,2	311,71	397,77	390,64	449,94	533,11
0,3	122,19	154,52	287,4	340,91	329,32	345,82	366,78
0,5	49,5	85,17	207,13	266,89	269,79	229,65	276,25
0,7	28,32	47,49	114,16	160,31	186,85	152,73	191,75
0,9	23,63	44,37	73,58	102,12	125,98	124,86	129,77
Ácido Linoleico	18,73	29,21	48,61	68,23	85,4	91,64	95,43

Tabla 4.12.A.- Valores de los módulos de compresibilidad a diferentes presiones superficiales de monocapas mixtas de **ácido linoleico y colesterol** a diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**).



4.12.2 Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla

4.12.2.1 Mezcla $X_{LA} = 0,9$

Durante la fase *gas*, la mezcla $X_{LA} = 0,9$ registra un espesor de 0,66 nm (**Figura 4.12.M**), valor que coincide con el espesor de la monocapa de ácido linoleico puro en fase *gas* y que resulta notablemente superior respecto a los 0,25 nm obtenidos con el colesterol puro cuando atraviesa ese mismo estado. Esta circunstancia indica que el valor del espesor viene determinado por el ácido linoleico.

Al principio de la compresión se observan dominios en forma de espuma iguales que los registrados en la monocapa de este ácido graso omega-6 puro (**Imagen A**) con huecos oscuros correspondientes al sustrato acuoso. A medida que se reduce el área, las zonas oscuras adoptan un tamaño menor (**Imagen B**) debido a que la monocapa comienza a ocupar toda la superficie disponible.

Se registró la **Imagen C** a un área de $60 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ en la que todavía se ven pequeños dominios que nos indican que el film todavía se encuentra en fase *gas*.

Con el inicio del aumento de la presión superficial tiene lugar un aumento progresivo del espesor hasta alcanzar aproximadamente 1 nm, valor ligeramente superior al obtenido por el ácido graso puro en este punto de la monocapa (1,08 nm). Así pues, las moléculas del colesterol se muestran durante esta fase de *líquido expandido* en una posición inclinada, interactuando con el ácido graso, de lo contrario se obtendrían valores más elevados de espesor. En esta zona de la isoterma, se obtiene la **Imagen D**, una fotografía homogénea característica de esta fase de *líquido expandido*.

Coincidiendo con el máximo valor de espesor registrado para el estado de *líquido expandido*, se produce el colapso de la monocapa, dando lugar a un aumento más pronunciado del espesor hasta los 1,37 nm. Este espesor es 0,5 nm inferior al del colapso del colesterol puro.

Al producirse el colapso de la monocapa se tomó la **Imagen E**, en la que se observan los dominios brillantes característicos de la ruptura de la monocapa por caída y solapamiento de moléculas. Al reducir el área de compresión, el número de estas estructuras va en aumento así como su tamaño puesto que se unen dando lugar a dominios de mayor tamaño y, por lo tanto, se observan con mayor brillo (**Imagen F**).

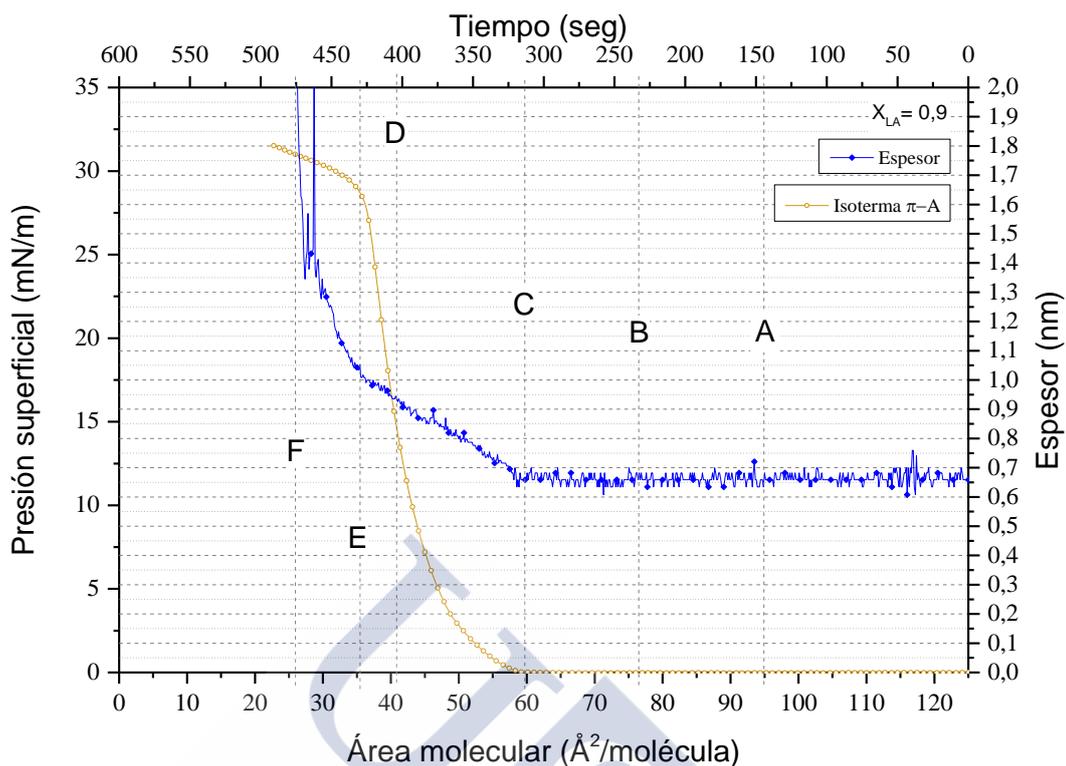


Figura 4.12.E.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido linoleico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{LA} = 0,9$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

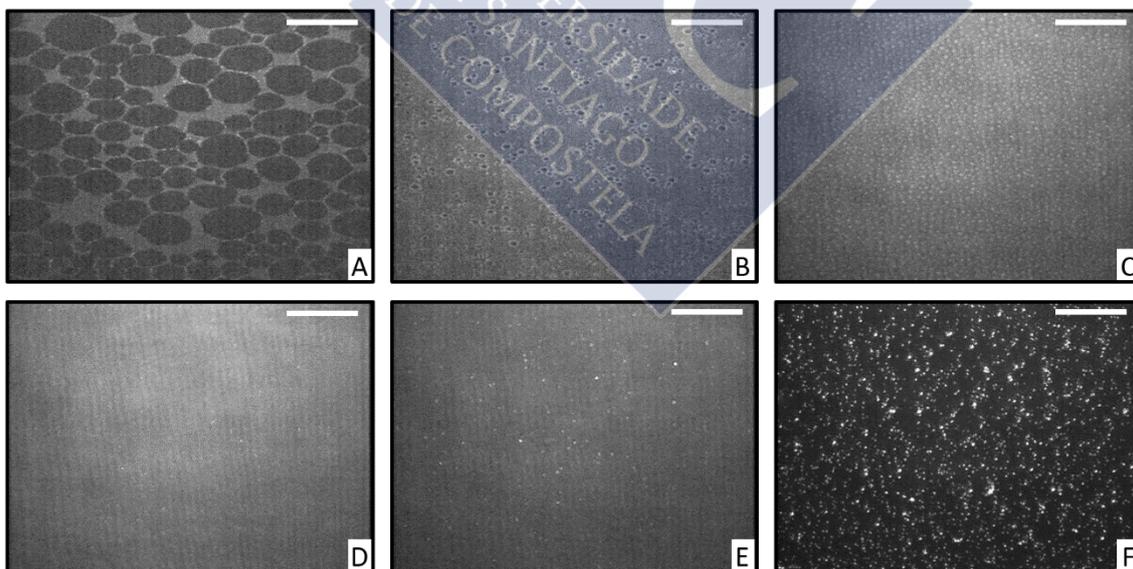


Ilustración 4.12.A.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido linoleico** y **colesterol** ($X_{LA} = 0,9$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.12.2.2 Mezcla $X_{LA} = 0,7$

En la **Figura 4.12.F** se puede observar como al inicio de la compresión el espesor registrado para la monocapa de la mezcla $X_{LA} = 0,7$ es de 0,67 nm, el mismo valor que se registró para la monocapa de ácido linoleico puro. Las imágenes microscopias correspondientes a esta fase (**Imágenes A y B**) presentan huecos oscuros de sustrato acuoso, rodeados por material de monocapa en el que se observan dominios grises más oscuros y otros más claros, mostrándose así una buena interacción de ambos compuestos durante el estado *gas*.

Al aproximarse la monocapa al área inicial, los dominios se reducen, mostrando una tendencia hacia una imagen homogénea (**Imagen C**).

Coincidiendo con el incremento de presión superficial, el espesor sufre una subida lenta e irregular, logrando un espesor aproximado de 1,12 nm, muy próximo al obtenido por el ácido graso puro en el momento previo al colapso, cuando sus moléculas se encuentran prácticamente perpendicular a la superficie. Esta curva de espesor relativo no muestra una subida repentina, lo cual indica que las moléculas de colesterol han experimentado un incremento gradual de su inclinación, de la misma forma que el ácido graso, debido a una interacción entre ambas sustancias.

Durante esta fase de *líquido expandido* se toma la **Imagen D**, la cual se muestra de forma completamente homogénea. Esta misma imagen se observó desde el primer momento que la presión superficial inicia su subida hasta que se produce el colapso del film.

Por último, el colapso muestra de nuevo los dominios característicos del mismo. En un primero momento, pequeños puntos como consecuencia de la pérdida molecular desde la monocapa (**Imagen E**). Se observa en la **Imagen F** de forma nítida como aumentan en tamaño, número y brillo al reducirse el área disponible.

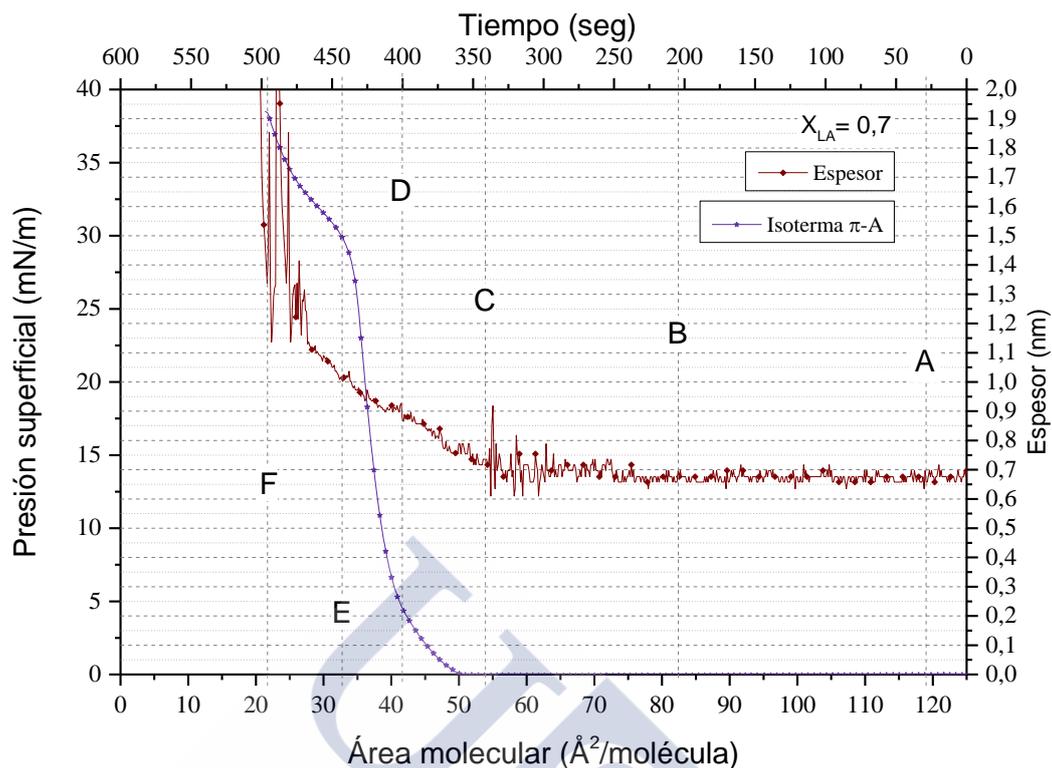


Figura 4.12.F.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido linoleico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{LA} = 0,7$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

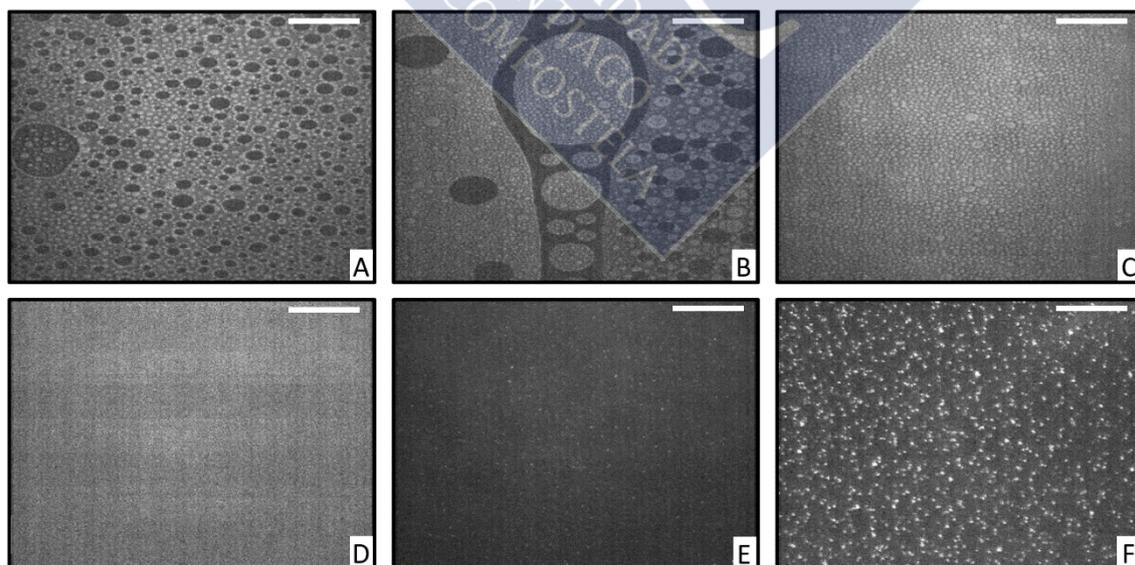


Ilustración 4.12.B.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido linoleico y colesterol ($X_{LA} = 0,7$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.12.2.3 Mezcla $X_{LA} = 0,5$

Los valores de espesor registrados al inicio de la compresión coincidiendo con la monocapa en estado *gas* muestran la misma situación que las vistas anteriormente (**Figura 4.12.G**). Esta mezcla equimolar mantiene durante toda esta fase un espesor promedio de 0,67 nm. correspondiente, como se vio, al propio de la monocapa del ácido graso puro.

Las **Imágenes A y B**, tomadas a elevados valores de área superficial, muestran dominios de ambos componentes en su estado gaseoso. A medida que continúa la compresión, el área molecular disponible se reduce y las zonas oscuras correspondientes al sustrato acuoso desaparecen. La **Imagen C** muestra una gran reducción de estas zonas oscuras, mientras que los dominios de las mezclas ocupan la totalidad de la superficie disponible.

Posteriormente y de forma simultánea a la presión superficial, se produce el incremento de espesor de forma paulatina, siendo este hecho un indicador del cambio de posición experimentado por las moléculas que conforman la mezcla. Así pues, las moléculas empiezan a adoptar una posición cada vez más vertical, produciéndose un cambio de estado en la monocapa, pasando a comportarse como un *líquido expandido*.

El hecho de que el espesor no sufra una subida repentina indica que las moléculas de colesterol se encuentran interaccionando con las del ácido graso omega-6.

Durante esta fase de *líquido expandido*, se observa al principio en la **Imagen D** ciertos dominios a $\pi = 10$ mN/m, debido al cambio de configuración por parte de las moléculas que componen la mezcla. Posteriormente se observa una imagen completamente homogénea.

El colapso ofrece dominios brillantes característicos (**Imagen E**). Al disminuir el área se ven con mayor claridad e intensidad como se puede observar en la **Imagen F**.

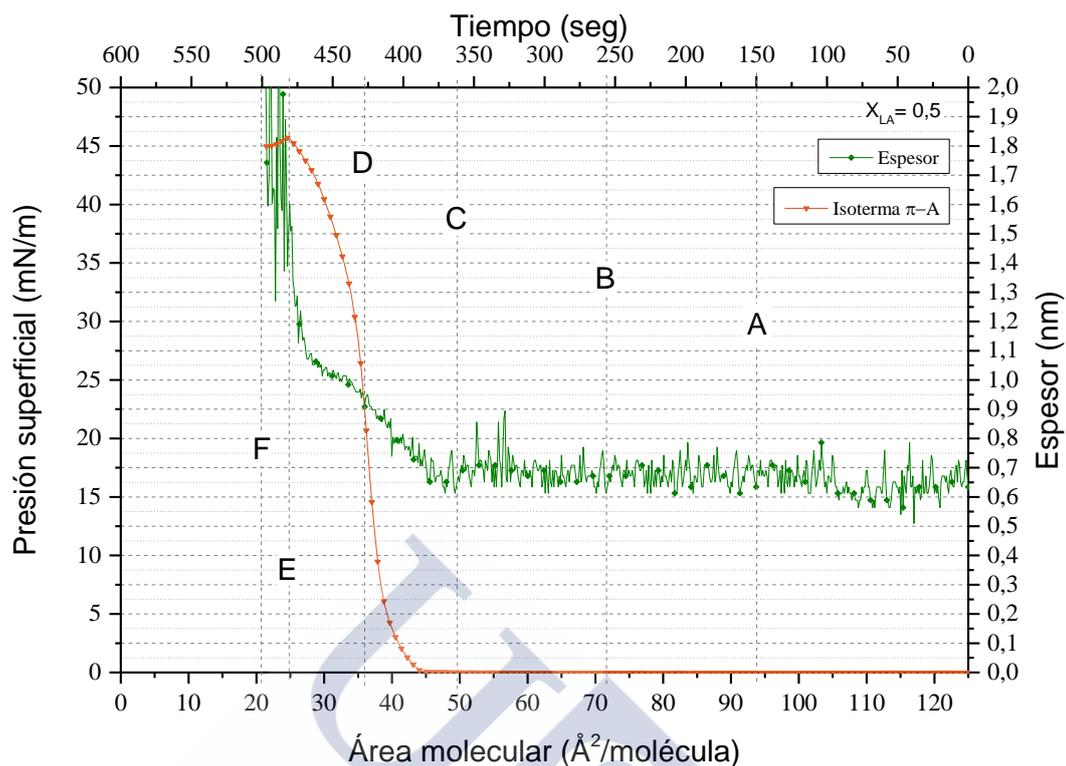


Figura 4.12.G.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido linoleico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{LA} = 0,5$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

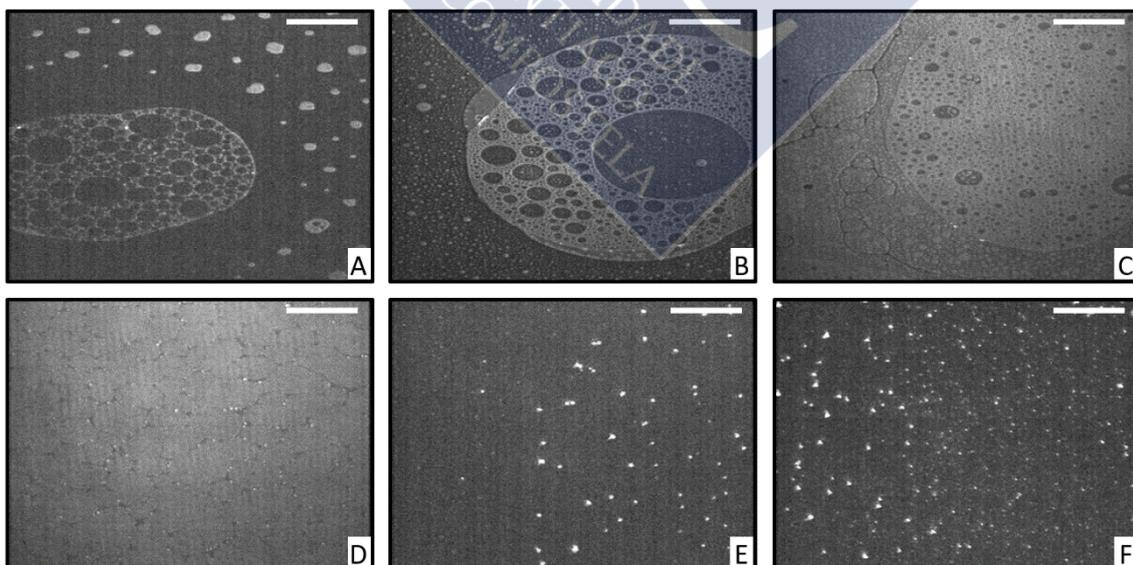


Ilustración 4.12.C.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido linoleico y colesterol ($X_{LA} = 0,5$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.12.2.4 Mezcla $X_{LA} = 0,3$

Durante el estado *gas*, la monocapa mixta de ácido linoleico y colesterol con $X_{LA} = 0,3$ presenta un valor de espesor de entre 0,65 y 0,7 nm (**Figura 4.12.H**). La **Imagen A** muestra dominios característicos de ambos compuestos durante esta fase en la que, a medida que el área disponible para las moléculas va disminuyendo, las zonas oscuras correspondientes al sustrato acuoso van desapareciendo (**Imagen B**). Se observan grandes dominios delimitados por pequeñas zonas más claras que corresponden a colesterol y ácido linoleico respectivamente (**Imagen C**).

El registro del espesor muestra una transición a estado *líquido expandido* marcada por una subida, la cual presenta una mayor pendiente que las vistas con anterioridad, alcanzando un valor inferior a 1 nm. Esta subida repentina viene determinada por la mayoría de moléculas de colesterol frente a las de ácido graso, de tal forma que en esta mezcla se produce una interacción más débil entre ambas sustancias.

Posteriormente, el espesor continúa su ascenso con bastante ruido en un primer momento hasta que, a partir de 1,15 nm, éste se estabiliza. Teniendo en cuenta dicho valor, característico del inicio de la fase condensada del colesterol puro, es muy probable que esta circunstancia se deba a que las moléculas ya se encuentran en una posición perpendicular respecto al sustrato y que el posterior incremento del espesor sea debido al cambio de configuración del resto radical alifático propio del colesterol.

La **Imagen D** muestra una imagen homogénea salpicada por ciertas líneas brillantes correspondientes a las moléculas del ácido linoleico que en este punto se encuentran cambiando de configuración. Posteriormente la imagen se vuelve homogénea hasta producirse el colapso de la monocapa.

El colapso muestra un registro de espesor de 1,37 nm, 0,13 nm inferior al esperado para el colesterol. La **Imagen E** muestra los típicos dominios brillantes correspondientes a la pérdida y solapamiento de moléculas dando lugar a la destrucción de la monocapa. Estos dominios ven aumentado su tamaño y brillo al disminuir el área, llegando a observarse la formación de pequeñas estructuras con formas de “bastones” características del esterol (**Imagen F**).

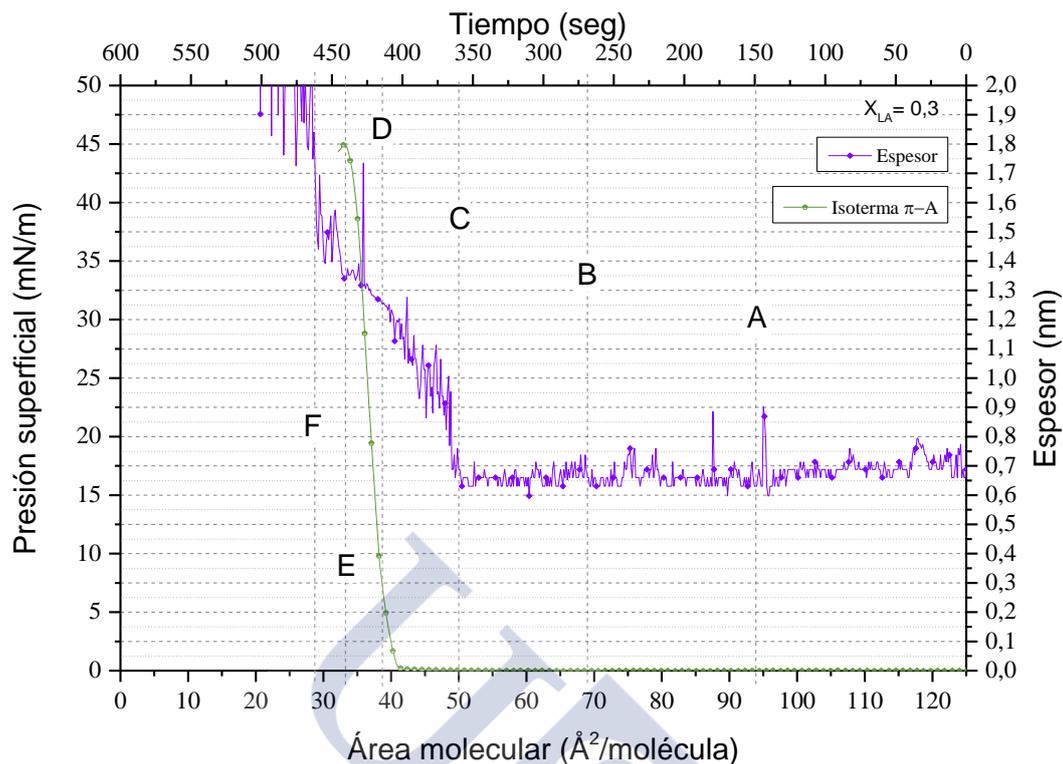


Figura 4.12.H.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido linoleico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{LA} = 0,3$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

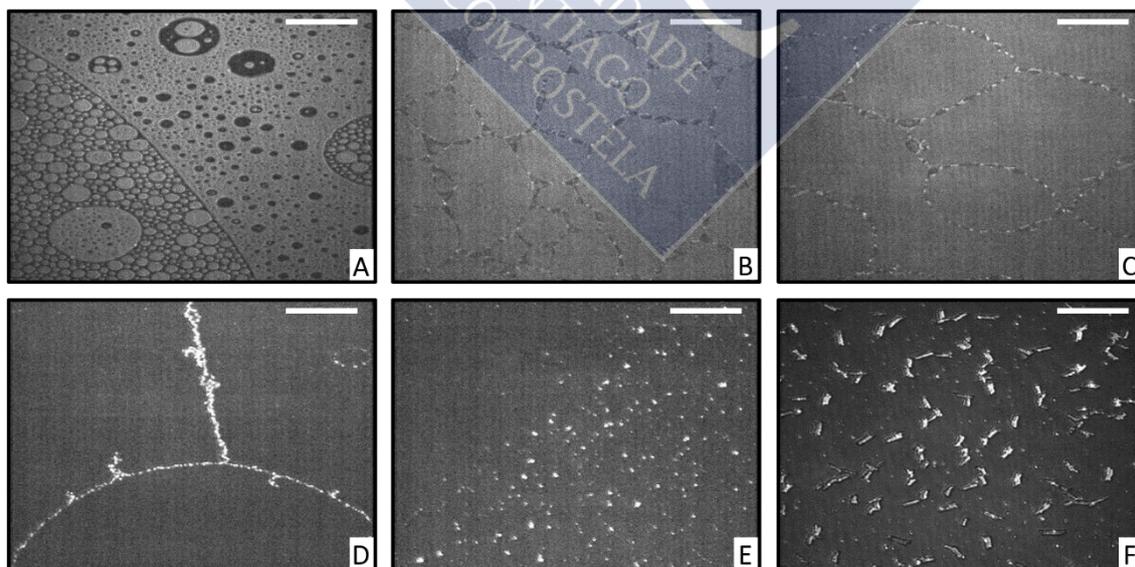


Ilustración 4.12.D.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido linoleico y colesterol ($X_{LA} = 0,3$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.12.2.5 Mezcla $X_{LA} = 0,1$

Tal como se observa en la **Figura 4.12.1**, la isoterma de la mezcla $X_{LA} = 0,1$ presenta un comportamiento muy similar al del colesterol puro. Así mismo, los valores registrados de espesor son bastante análogos. Por un lado, durante la fase *gas* el microscopio solo registra los valores de espesor correspondientes al colesterol, debido a la ausencia de ácido graso en la superficie de medida.

La **Imagen A** nos muestra dominios característicos de colesterol, formando dominios circulares huecos (sustrato acuoso). Paulatinamente se van fusionando, recubriendo la superficie y, por lo tanto, desapareciendo los huecos oscuros (**Imágenes B y C**).

Unos $10 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ antes de iniciarse el aumento de la presión superficial, se registra el incremento del espesor relativo, puesto que se trata de una monocapa muy condensada. El valor aumenta de forma enérgica hasta 1 nm , mostrando una elevada cantidad de ruido hasta los $1,27 \text{ nm}$, momento en el cual el incremento se produce de forma lineal y progresiva. Durante esta fase condensada, se toma la **Imagen D**, la cual muestra unas líneas brillantes formadas, probablemente, por la presencia de las moléculas de ácido linoleico que todavía se encuentran en un proceso de reconfiguración por el cual ven incrementadas su inclinación respecto a la normal del sustrato.

El colapso se produce cuando se registra un valor de espesor de $1,46 \text{ nm}$. El microscopio muestra los característicos embriones o gérmenes estructurales propios de la pérdida de moléculas desde la monocapa en forma de puntos brillantes (**Imagen E**). Dichas estructuras se unen dando lugar a los dominios en forma de bastones brillantes de un tamaño aproximado de 7 \mu m . (**Imagen F**).

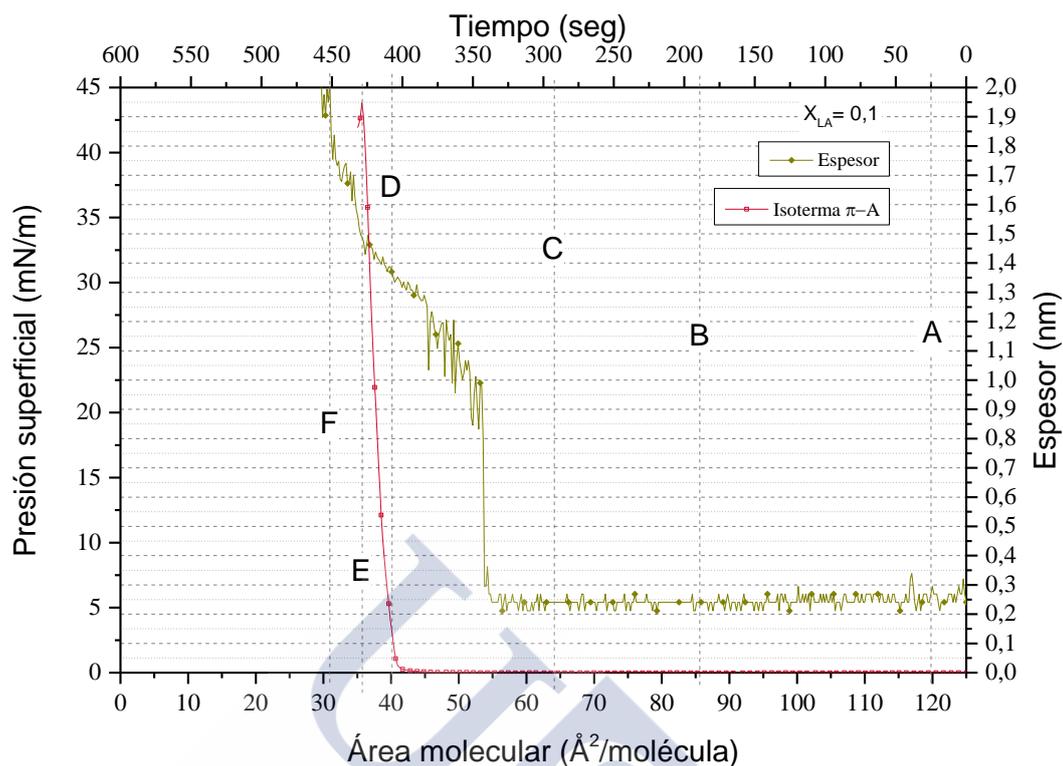


Figura 4.12.I.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido linoleico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{LA} = 0,1$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

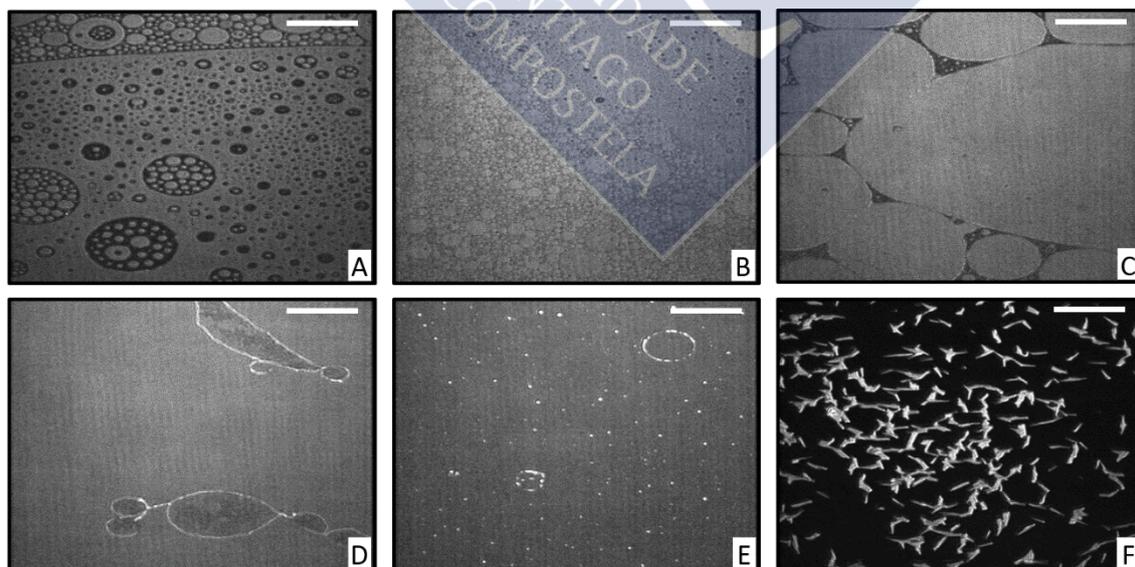


Ilustración 4.12.E.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido linoleico y colesterol ($X_{LA} = 0,1$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\ \mu\text{m}$.

4.12.3 Área molecular media

Con el fin de comprobar la existencia de interacciones entre el ácido linoleico y el colesterol, se representó el área molecular media en función de la fracción molar del ácido graso. Como se puede observar en la **Figura 4.12.J**, existen desviaciones negativas a diferentes presiones superficiales, indicativo de la existencia de atracciones moleculares entre este ácido graso omega-6 y el estero.

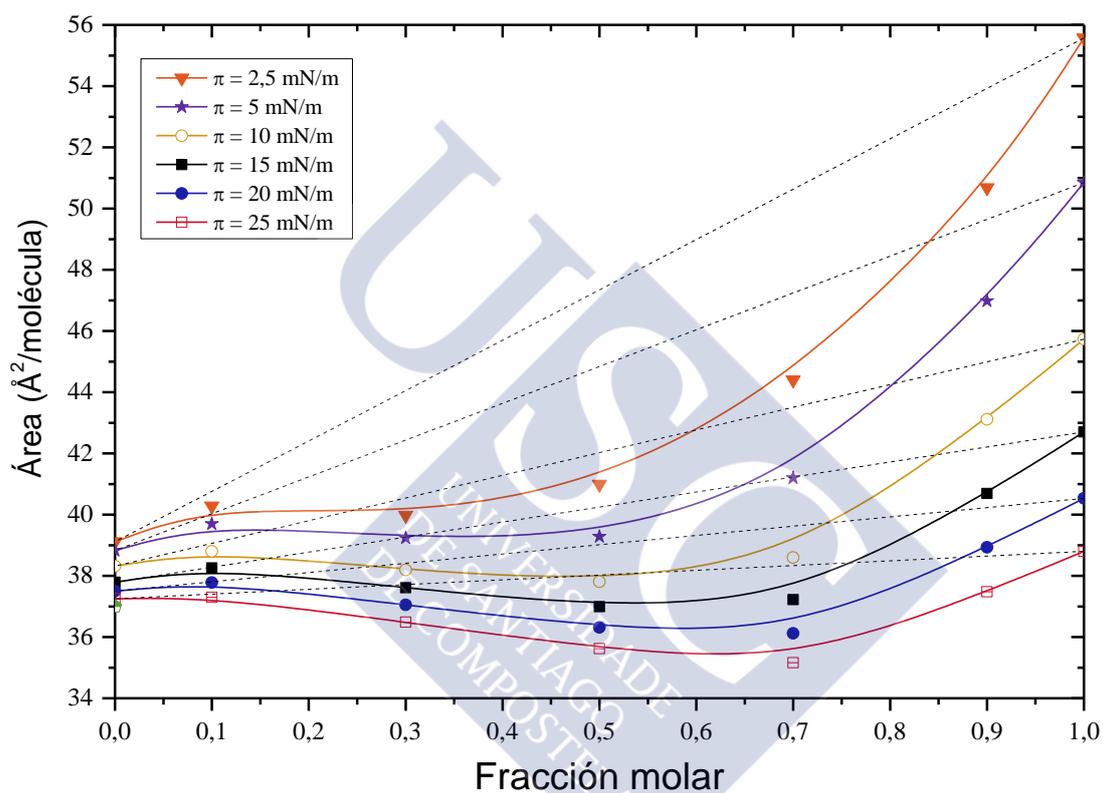


Figura 4.12.J.- Representación del área molecular media frente a la fracción molar de ácido linoleico de la mezcla LA/COL, a los valores de presión superficial indicados.

4.12.4 Funciones de exceso

4.12.4.1 Área de exceso

El área de exceso frente a la fracción molar del ácido linoleico se muestra en la **Figura 4.12.K**. Las mayores desviaciones del comportamiento ideal se obtienen en las mezclas de composición 0,5 y 0,7 de ácido graso, siendo estas desviaciones menores con el aumento de la presión superficial.

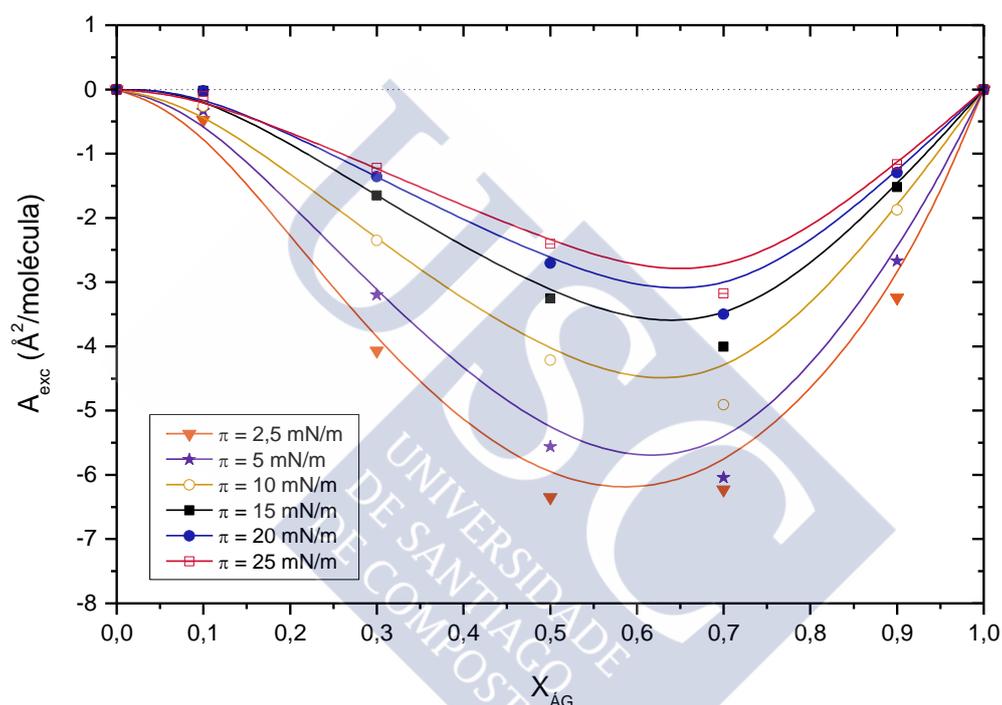


Figura 4.12.K.- Representación del área de exceso de la mezcla LA/COL frente a la fracción molar de ácido linoleico en dicha mezcla, a los valores de presión superficial indicados.

4.12.4.2 Energía libre de exceso (ΔG_{exc})

Con el fin de realizar un análisis termodinámico de la interacción entre el ácido linoleico y el colesterol, se calculó la energía libre de exceso (ΔG_{exc}) de las monocapas mixtas a partir del área bajo las curvas π -A correspondientes a las mezclas y a los componentes puros.

Como se puede observar en la **Figura 4.12.L**, los valores obtenidos son todos negativos a cualquier fracción molar del sistema y a cualquier presión superficial. Esta situación se corresponde con las condiciones termodinámicas de los sistemas de monocapas binarias en las que se producen fuertes interacciones entre sus componentes.

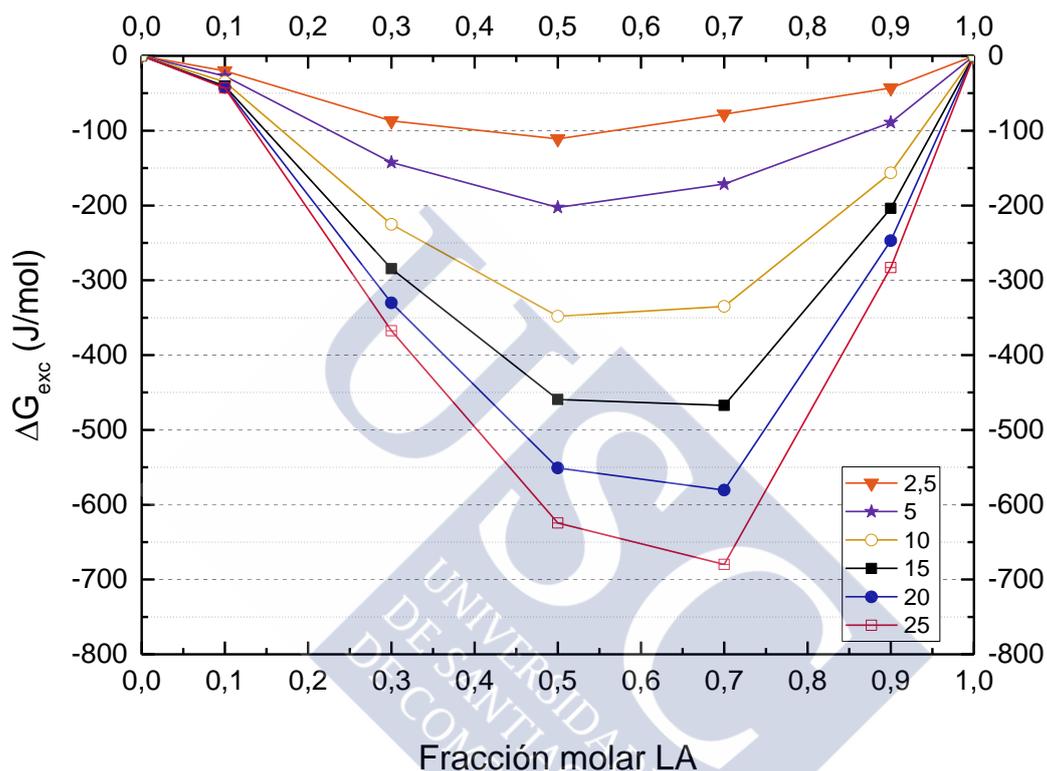


Figura 4.12.L.- Representación de la energía libre de exceso para el sistema LA/COL frente a la fracción molar de ácido linoleico en dicha mezcla, a los valores de presión superficial indicados.

Los valores de energía libre de exceso se vuelven más negativos al aumentar la presión superficial, lo que nos indica que la interacción entre estos dos componentes es mayor a elevadas presiones. Los mayores valores se alcanzan con las fracciones molares de $X_{LA} = 0,5$ y $X_{LA} = 0,7$ del sistema LA/COL. Esto nos indica que los films más estables formados por ácido linoleico y colesterol se obtienen con una proporción desde 1:1 hasta 3:1, de ácido graso y esterol respectivamente.

4.13 MEZCLA DE ÁCIDO α -LINOLÉNICO CON COLESTEROL

4.13.1 Isotermas π -A y módulos de compresibilidad

Las isotermas de las monocapas de la mezcla ácido α -linolénico y colesterol se muestran en la **Figura 4.13.A**. Aquellas mezclas que presentan una mayor proporción de esterol ($X_{\alpha LA} < 0,5$) generan monocapas de tipo *sólido* (curvas 0,1 y 0,3), presentando una forma muy similar a la del propio colesterol. Sin embargo, cuando el componente mayoritario es el ácido graso ($X_{\alpha LA} > 0,5$) las monocapas son de tipo *líquido expandido* (curvas 0,7 y 0,9), similares a la del propio ácido α -linolénico puro. Resulta destacable el comportamiento intermedio presentado por la monocapa de la mezcla equimolar ($X_{\alpha LA} = 0,5$) la cual presenta un considerable desplazamiento hacia el eje de las ordenadas, es decir, un notable descenso en el área molecular fruto, probablemente, de una importante interacción de sus componentes.

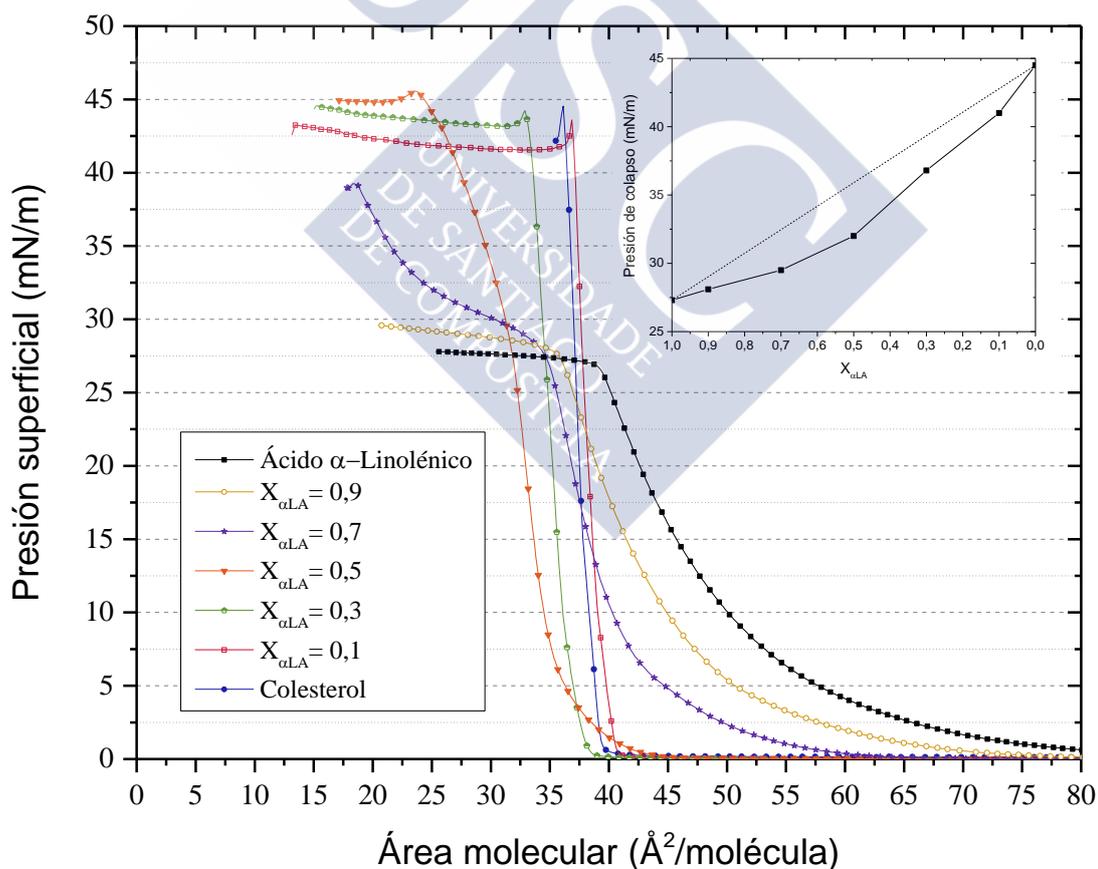


Figura 4.13.A.- Curvas π -A de monocapas de **ácido α -linolénico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**) obtenidas a 10 °C, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de 50 cm^2/min . En la gráfica interna se muestran los valores de colapso frente a la fracción molar.

De la misma forma, el colapso de las mezclas ocurre a valores de presión superficial intermedios a los de los componentes puros y su valor se ve incrementado al aumentar la presencia de colesterol (interior **Figura 4.13.A**), lo cual nos indica que la mezcla está compuesta por componentes miscibles.

En la **Figura 4.13.B**. se muestran los módulos de compresibilidad. En la misma, se pone de manifiesto el elevado poder de condensación que presenta el colesterol sobre los ácidos grasos insaturados. Así, la resistencia de las monocapas de las mezclas a ser comprimidas aumenta a medida que el colesterol se encuentra más presente. De la misma forma, la adición de ácido linoleico provoca una disminución en la rigidez de las monocapas.

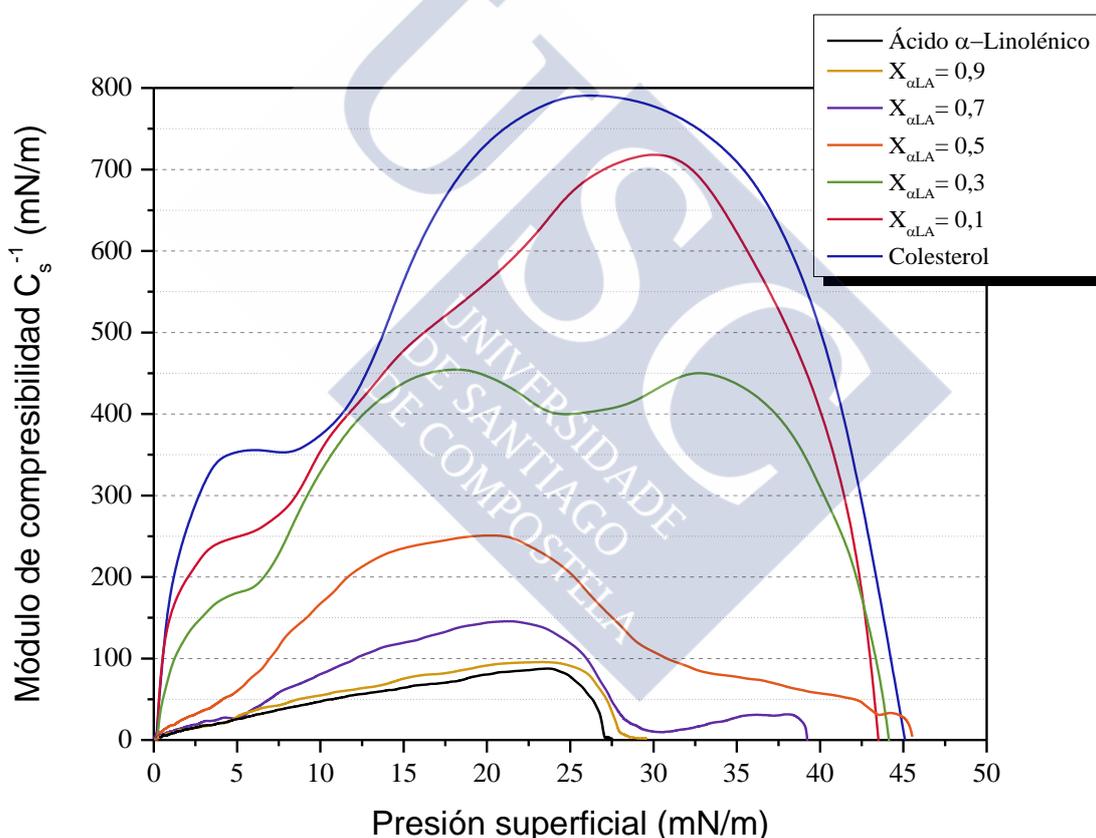


Figura 4.13.B.- Módulos de compresibilidad correspondientes a las isothermas π -A de monocapas de ácido α -linolénico, colesterol y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9).

La elevada condensación ejercida por parte del colesterol sobre este ácido graso omega-3 se observa con mayor nitidez en la representación tridimensional del módulo de compresibilidad frente a la presión superficial (**Figura 4.13.C**).

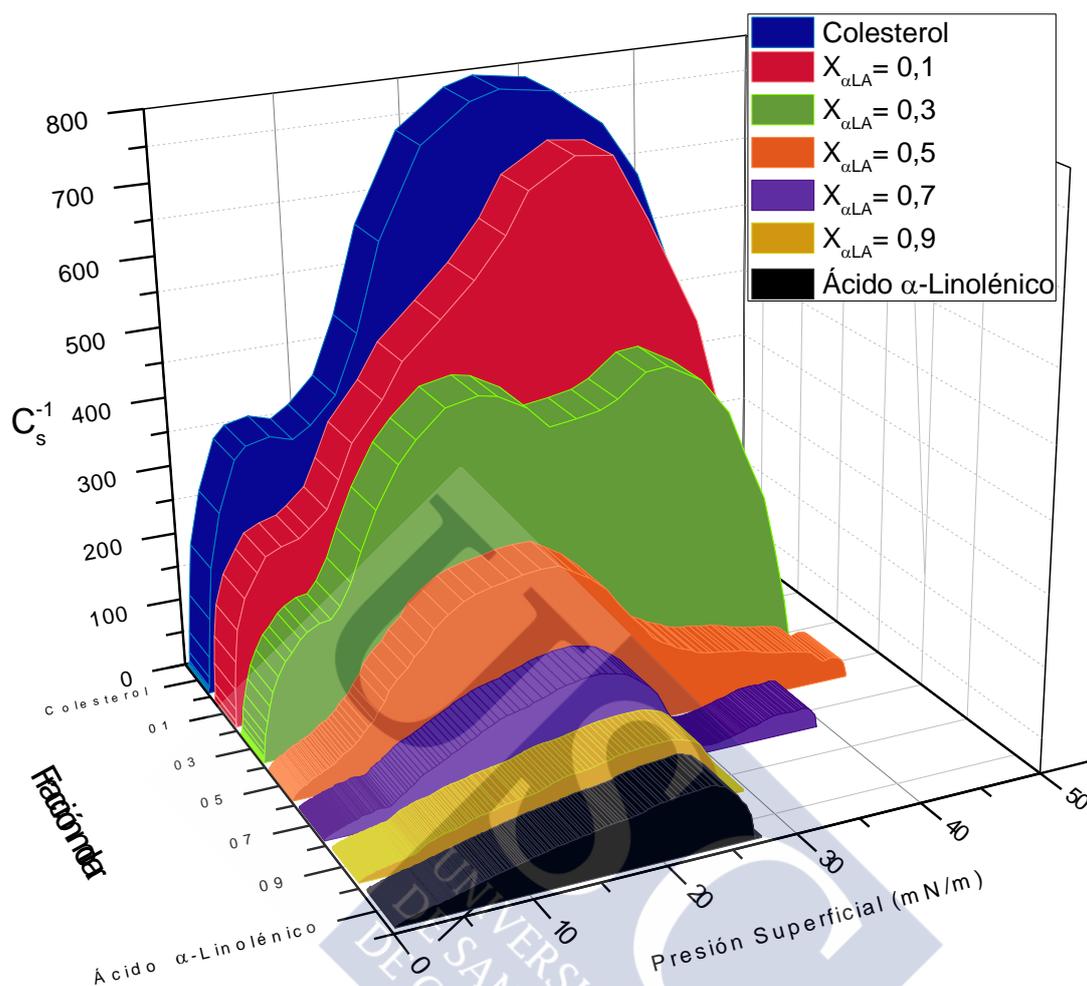


Figura 4.13.C.- Representación tridimensional de los módulos de compresibilidad frente a la presión de monocapas de **ácido α -linolénico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9) obtenidas a 10 °C.

En la **Figura 4.13.D** se muestran los módulos de compresibilidad individuales para cada mezcla. Los valores de módulo de compresibilidad a diferentes presiones superficiales así como los valores máximos alcanzados correspondientes a estos sistemas se recogen en la **Tabla 4.13.A**.

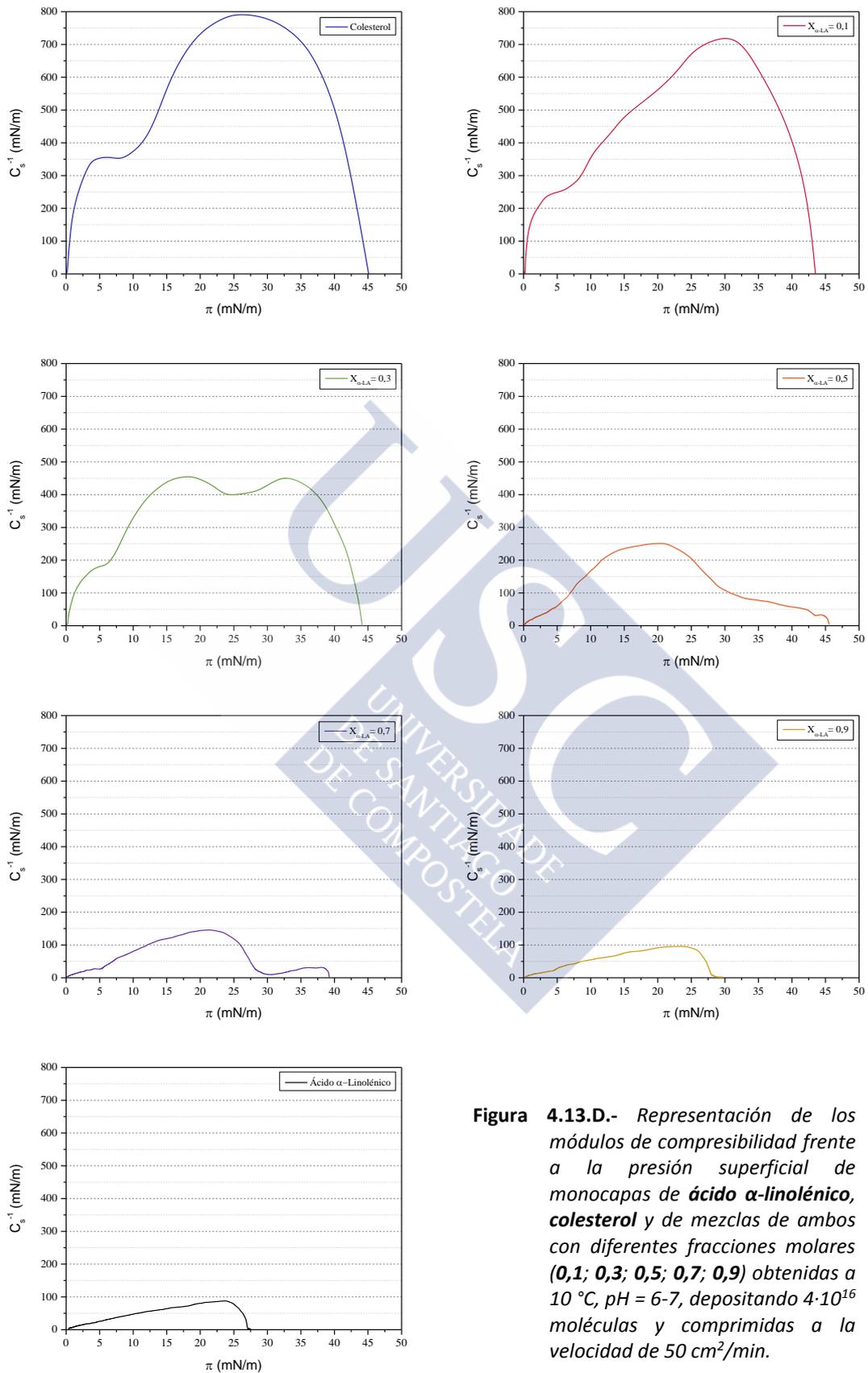


Figura 4.13.D.- Representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión superficial de monocapas de ácido α -linolénico, colesterol y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9) obtenidas a 10 °C, pH = 6-7, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimidas a la velocidad de 50 cm²/min.

Módulo de compresibilidad (mN/m)							
$X_{\alpha LA}$	$\pi = 2,5$	$\pi = 5$	$\pi = 10$	$\pi = 15$	$\pi = 20$	$\pi = 25$	C_s^{-1} máximo
Colesterol	289,41	353,18	373,91	562,99	731,55	788,63	790,6
0,1	213,15	249,05	353,85	477,81	561,87	670,46	717,95
0,3	142,03	180,38	328,65	438,13	446,38	400	454,4
0,5	31,22	59,31	167,22	236,57	251,73	202,9	252,4
0,7	18,73	26,96	81,61	119,29	144,7	120,18	146,04
0,9	15,39	28,32	53,96	75,36	91,19	90,97	95,88
Ácido α - Linolénico	15,3	25,64	47,27	64,21	80,49	77,81	87,63

Tabla 4.13.A.- Valores de los módulos de compresibilidad a diferentes presiones superficiales de monocapas mixtas de **ácido α -linolénico y colesterol** a diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**).



4.13.2 Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla

4.13.2.1 Mezcla $X_{\alpha LA} = 0,9$

Las imágenes microscópicas correspondientes a la mezcla que presenta el menor contenido en colesterol ($X_{\alpha LA} = 0,9$) vuelven a presentar aparentemente una evidente ausencia de dominios durante el estado *gas* de la misma forma que ocurría con el ácido α -linolénico puro. Sin embargo, sí se aprecian con cierta dificultad multitud de microdominios de tamaño inferior a $1 \mu\text{m}$ (**Imágenes A y B**). Esta diferencia respecto a las imágenes obtenidas para la monocapa de este ácido graso omega-3 se debe, sin lugar a dudas, a la presencia del colesterol en la mezcla.

Se registró un valor de espesor de alrededor de $0,55 \text{ nm}$. durante el estado *gas*, valor ligeramente superior al obtenido para el ácido graso puro ($0,51 \text{ nm}$).

Poco antes de cumplirse los 250 segundos desde el inicio del experimento, se produce el aumento simultáneo de espesor y presión superficial, momento en el cual la monocapa pasa de un estado *gas* a otro de *líquido expandido*. La **Imagen C**, realizada a la presión de 10 mN/m , confirma este hecho mostrando la típica fotografía homogénea característica de dicha fase. A medida que transcurre, las moléculas que constituyen el film ven incrementado su ángulo de inclinación respecto de la interfaz acuosa.

En el instante del colapso, la monocapa presenta un espesor de $0,88 \text{ nm}$, valor consistente con el obtenido para la monocapa del ácido graso puro. De la misma forma, esto también nos indica que el colesterol no se encuentra perpendicular al sustrato acuoso, sino que presenta una inclinación de, aproximadamente, 50° .

La **Imagen D**, tomada a la presión superficial de 26 mN/m , muestra los “embriones” o gérmenes del colapso de la monocapa. Estos pequeños puntos aumentan su tamaño y brillo al continuar la compresión de las moléculas. Esta evolución aparece reflejada en las **Imágenes E y F**.

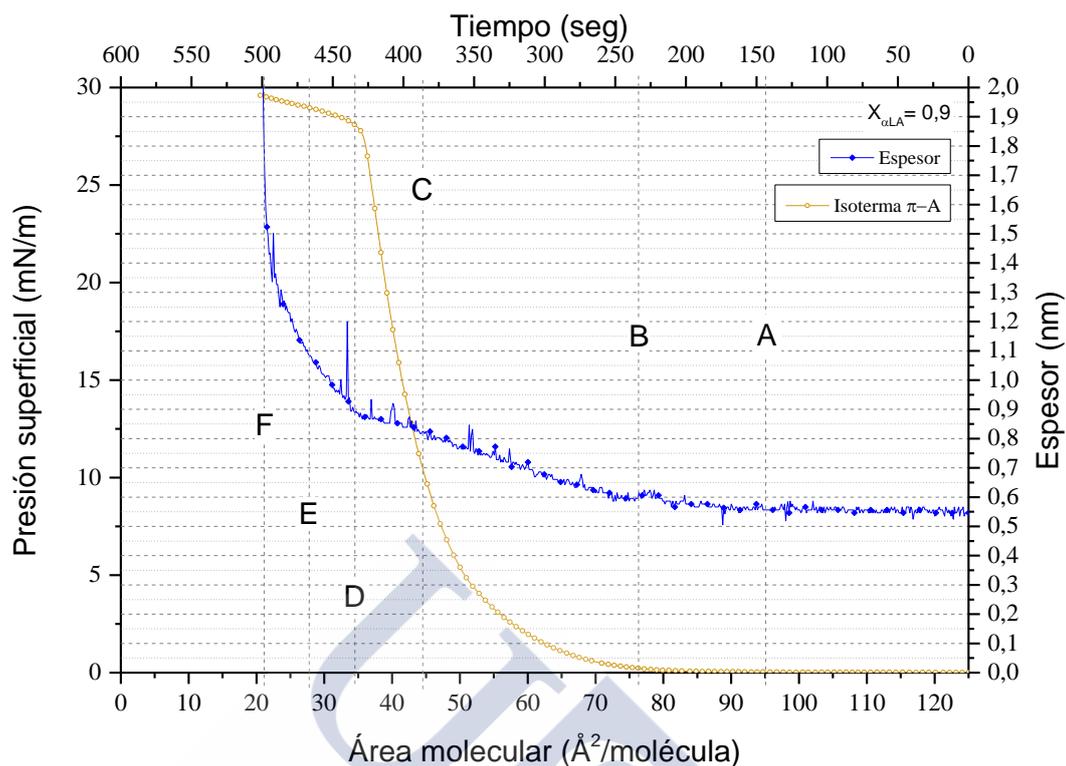


Figura 4.13.E.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido α -linolénico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{\alpha LA} = 0,9$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

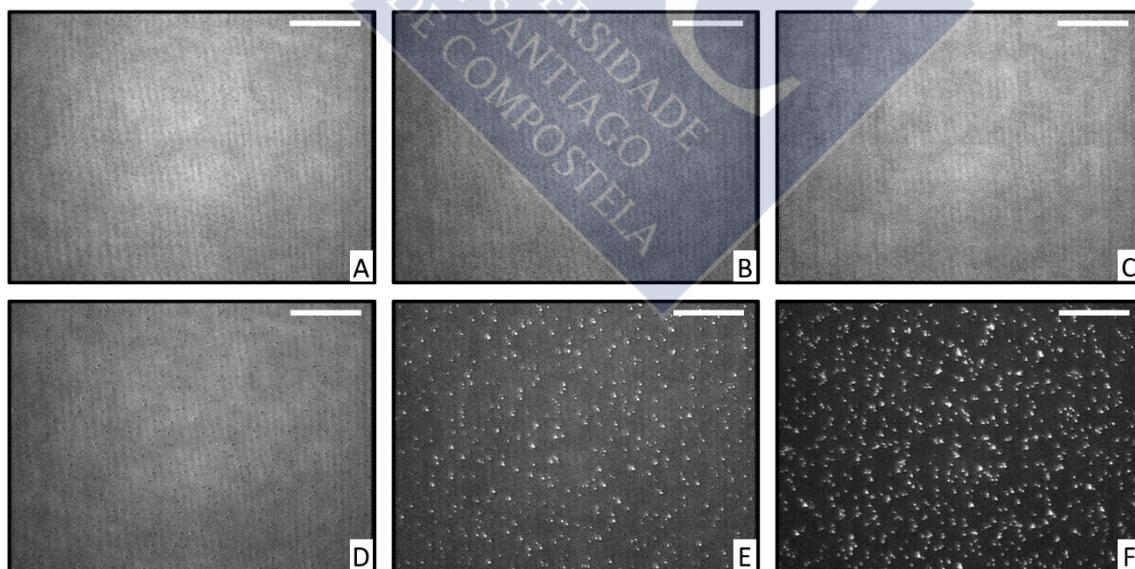


Ilustración 4.13.A.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido alfa linolénico** y **colesterol** ($X_{\alpha LA} = 0,9$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.13.2.2 Mezcla $X_{\alpha LA} = 0,7$

El incremento de la presencia de colesterol en la mezcla ($X_{\alpha LA} = 0,7$) no parece mejorar la visualización de los dominios de ácido graso en las fotografías, tal como se observa en las **Imágenes A y B**.

El espesor registrado por el microscopio durante el estado *gas* es ligeramente inferior a 0,5 nm. Dicho valor viene determinado por la molécula que en ese instante presenta una mayor "altura". Cuando la monocapa de los componentes puros se encuentra en estado *gas*, el colesterol presenta un valor de aproximadamente 0,25 nm, mientras que el ácido α -linolénico muestra un espesor de 0,51 nm. Por lo tanto, es razonable pensar que mientras la monocapa atraviesa el estado *gaseoso* ambas moléculas presentarán su disposición e inclinación original.

Posteriormente, con el cambio de estado, la imagen microscópica se vuelve homogénea durante la totalidad del tiempo en que transcurre la monocapa en estado *líquido expandido* (**Imágenes C y D**).

Con el aumento de presión superficial, la inclinación de las moléculas se verá incrementada de tal forma que sus partes apolares se alejarán del sustrato acuoso. En este caso, el valor de espesor alcanzado en el instante previo al colapso de la monocapa es de 0,97 nm. Ya que se trata de una distancia superior a la registrada para el omega-3 en estado puro, es lógico atribuir dicho valor a la molécula del colesterol. Para ese valor, se calcula que el ángulo de inclinación del mismo sería aproximadamente de $57,5^\circ$.

Finalmente se muestran las **Imágenes E y F** con los dominios brillantes claros correspondientes al fenómeno de colapso en una fase más temprana y otra más madura, respectivamente.

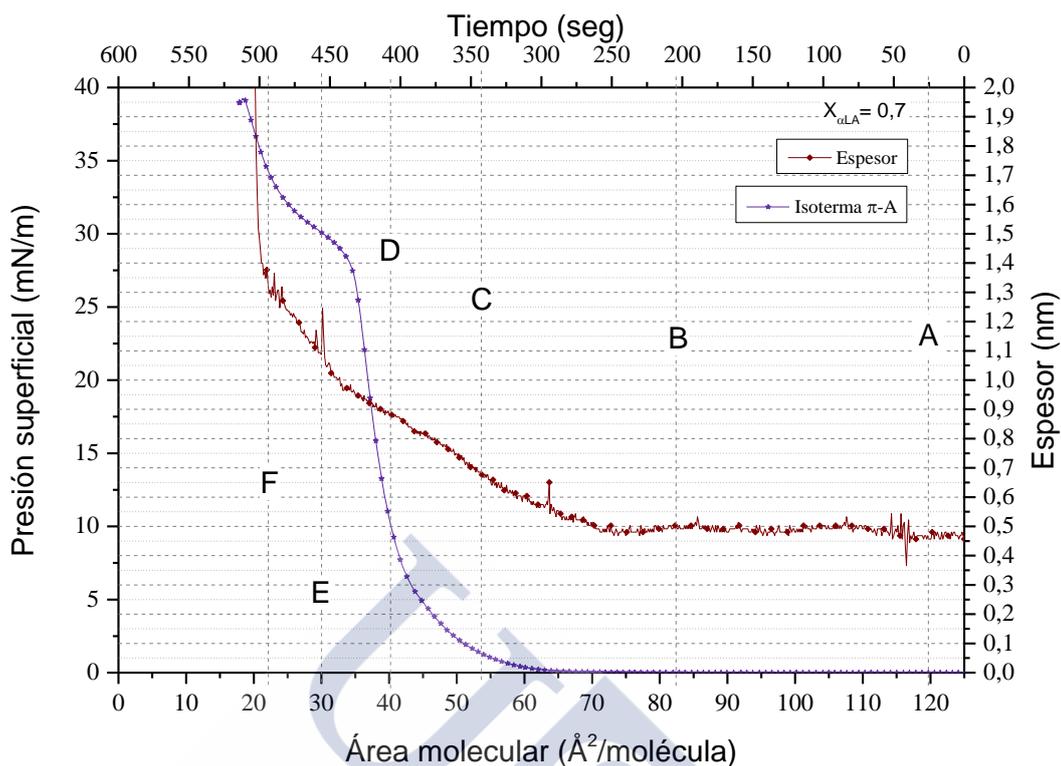


Figura 4.13.F.- Curva π -A de la monocapa mixta de ácido α -linolénico y colesterol correspondiente a la fracción molar de $X_{\alpha LA} = 0,7$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

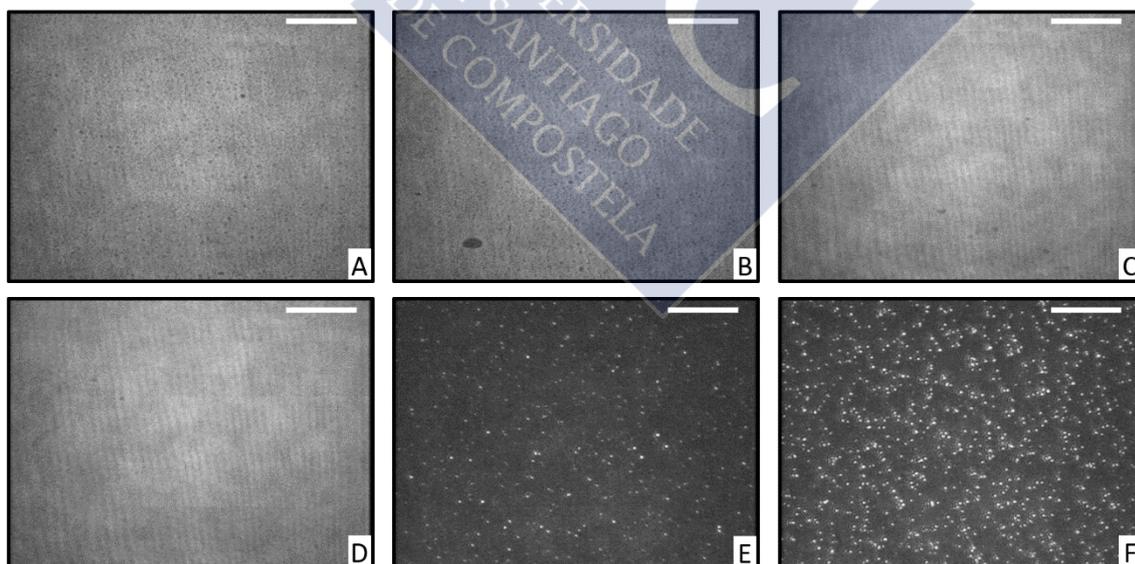


Ilustración 4.13.B.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido alfa linolénico y colesterol ($X_{\alpha LA} = 0,7$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\ \mu\text{m}$.

4.13.2.3 Mezcla $X_{\alpha LA} = 0,5$

La mezcla equimolar de ácido α -linolénico y colesterol permite observar los dominios del ácido graso. En las **Imágenes A y B** se puede ver con claridad esferas claras de pequeño tamaño correspondientes al ácido graso rodeadas por los clásicos dominios espumosos del esterol. El espesor, al igual que en las anteriores mezclas, se mantiene en 0,5 nm indicativo de que las moléculas del ácido α -linolénico presentan la misma configuración en estado *gas* con colesterol que cuando se encuentran constituyendo una monocapa en solitario.

La **Imagen C** se realizó cuando la presión superficial era de 1 mN/m. Se observa que, como consecuencia de la fusión de los dominios, empieza a volverse homogénea. En este punto se produce un cambio de estado de *gas* a *líquido expandido*.

El estado de *líquido expandido* de la monocapa mixta presenta una imagen homogénea (**Imagen D**) y concurre con una subida del espesor que presenta dos pendientes diferentes: una primera sección desde los 0,5 nm hasta 0,87 nm, donde se produce un incremento más veloz y ruidoso y, una segunda, desde 0,87 hasta 1,17 nm donde se observa una disminución de la pendiente así como del ruido. Teniendo en cuenta ambos incrementos así como los espesores que generan ambas sustancias puras en sus respectivas monocapas, es lógico pensar que la primera región pueda tratarse del cambio configuracional experimentado por el ácido graso, mientras que que la segunda sección se corresponde, probablemente, con el giro experimentado por el radical alquílico del colesterol. Sin embargo, el hecho de que no se alcancen los 1,5 nm característicos de la molécula de colesterol cuando esta se encuentra en su conformación más extensa nos indica que el ciclopentanoperhidrofenantreno no se encuentra perpendicular a la normal de la interfase, sino inclinado con un ángulo aproximado de entre 46° y 49° debido a un impedimento estérico provocado por este ácido graso omega-3.

El colapso de la monocapa mixta da lugar a la formación de los dominios brillantes o núcleos tridimensionales (**Imagen E**) cuyo número y tamaño se ven incrementados a medida que prosigue la compresión tal como se muestra en la **Imagen F**.

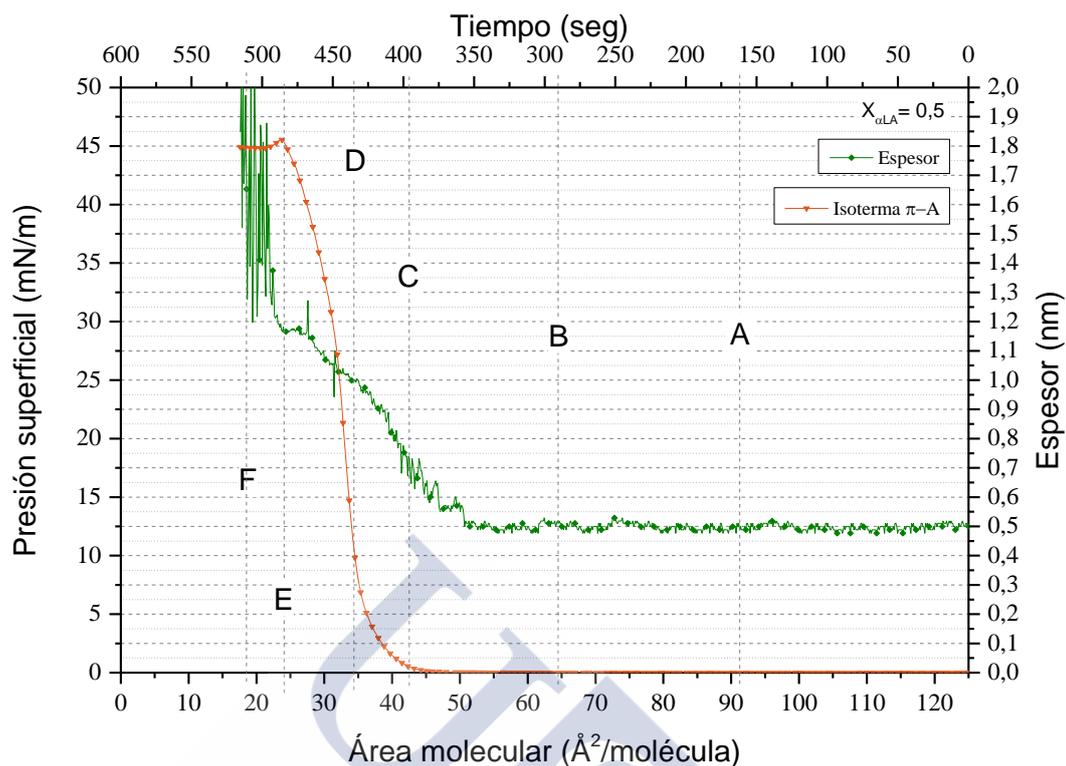


Figura 4.13.G.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido α -linolénico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{\alpha LA} = 0,5$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

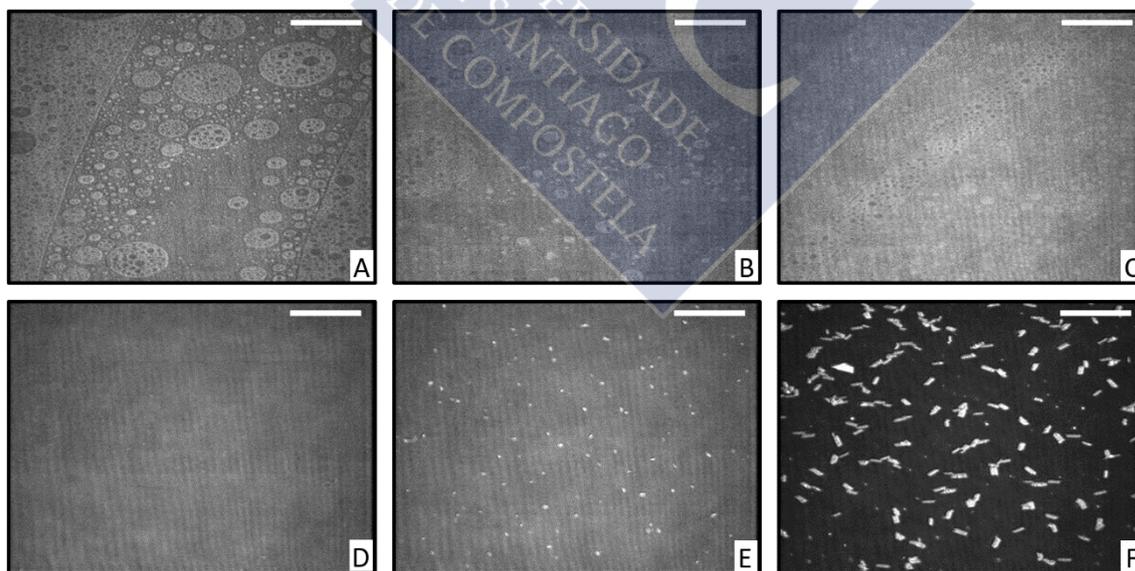


Ilustración 4.13.C.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido alfa linolénico** y **colesterol** ($X_{\alpha LA} = 0,5$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.13.2.4 Mezcla $X_{\alpha LA} = 0,3$

Las **Imágenes A, B y C** corresponden a la monocapa de la mezcla de ácido α -linolénico y colesterol ($X_{\alpha LA} = 0,3$) cuando se encuentra en estado *gas*. En ellas se observan los dominios esféricos oscuros huecos con forma de espuma junto con los circulares claros. Como se ha visto con anterioridad, ambos tipos de dominios son propios del colesterol, mientras que el ácido graso presenta sólo el segundo tipo. Durante esta fase el espesor registrado es de 0,5 nm, al igual que las mezclas con mayor presencia de omega-3.

Esta monocapa presenta un comportamiento más *condensado* que las anteriores debido al incremento del contenido en colesterol. Así pues, el registro del espesor se realiza con antelación al de la presión superficial tal como veíamos para las monocapas más condensadas como la del ácido esteárico o la del propio colesterol.

Cuando se produce la transición entre los estados *gaseoso* y *condensado* se inicia el incremento del espesor como consecuencia del cambio de configuración tridimensional de las moléculas que constituyen la monocapa. Se aprecia un elevado ruido desde 0,5 nm hasta 0,9 nm; este intervalo es aproximadamente el mismo que se obtiene durante la compresión de la monocapa de ácido α -linolénico puro. Tras este primer tramo de incremento de espesor se produce uno nuevo en el que la existencia de ruido se minimiza notablemente. El colapso coincide con un registro de espesor de 1,2 nm.

Durante este estado de *líquido condensado* se observa en todo momento una imagen microscópica homogénea tal como refleja la **Imagen D**, tomada a una presión superficial de 10 mN/m

El colapso tiene lugar a un área de $33 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ generándose la formación de los dominios brillantes típicos de esta ruptura de la monocapa (**Imagen E**). Como se puede observar en la **Imagen F**, dichas estructuras se aglomeran en forma de bastones de un tamaño de 8 \mu m de longitud.

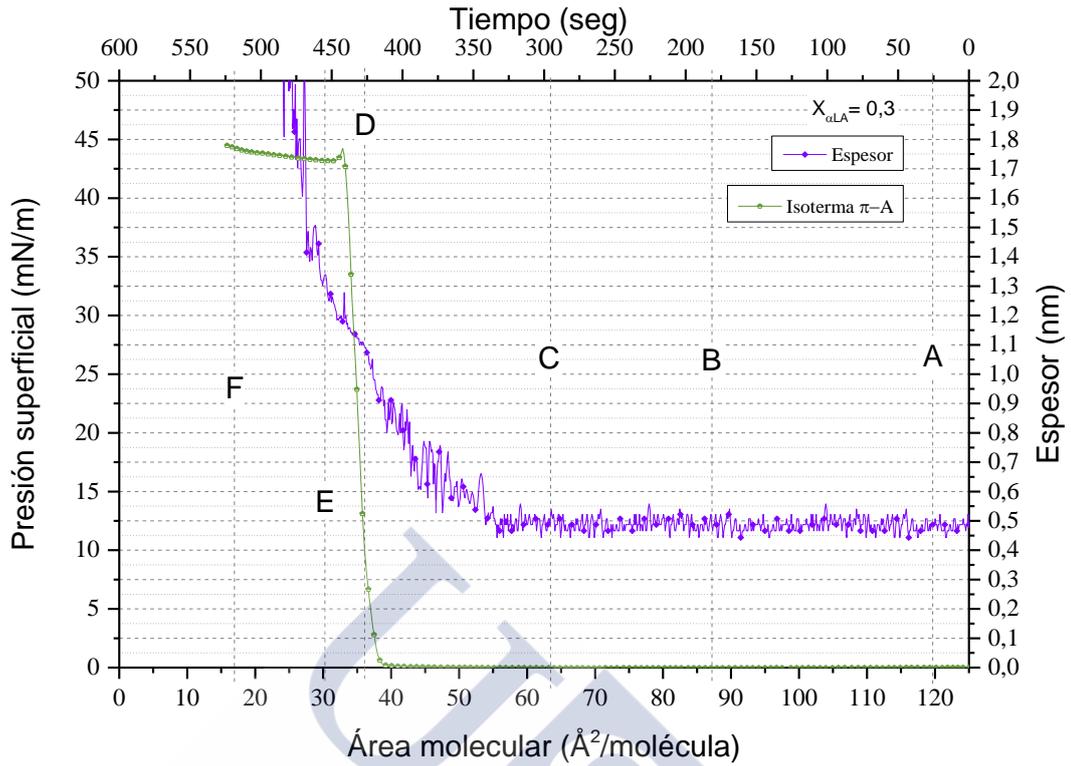


Figura 4.13.H.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido α -linolénico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{\alpha LA} = 0,3$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

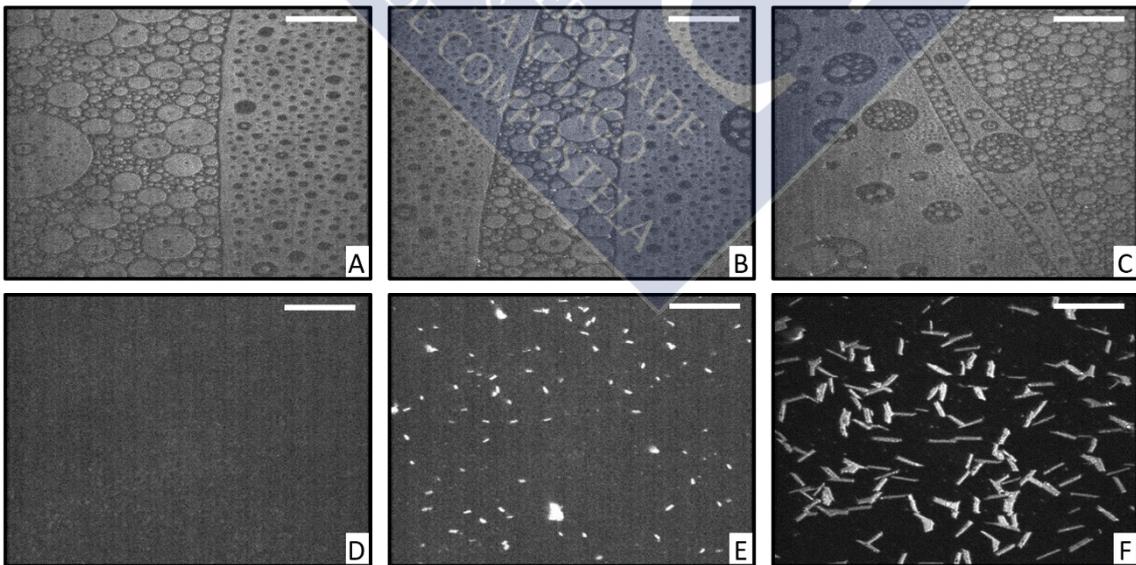


Ilustración 4.13.D.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido alfa linolénico** y **colesterol** ($X_{\alpha LA} = 0,3$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\ \mu\text{m}$.

4.13.2.5 Mezcla $X_{\alpha LA} = 0,1$

El estado *gas* de la monocapa de la mezcla con fracción molar de ácido α -linolénico 0,1 presenta saltos de valores de espesor igual que ocurre con el ácido oleico y linoleico a esta misma fracción molar. El motivo radica en la baja presencia de ácido graso, de tal forma que en determinadas ocasiones este omega-3 se encuentra ausente en el área de medida del microscopio registrando así, única y exclusivamente el espesor correspondiente al colesterol.

En este primer estado se registraron las **Imágenes A y B**, en las cuales se observan los dominios característicos de ambos componentes. A medida que la superficie se reduce, los huecos oscuros correspondientes al sustrato acuoso van desapareciendo tal como se puede observar en la **Imagen C**, tomada en los momentos previos al inicio del incremento de la presión superficial.

De la misma forma que ocurría en la mezcla $X_{\alpha LA} = 0,3$ el incremento del espesor en este estado de mayor condensación se produce en dos tramos bien diferenciados:

- Un primer tramo con mucho ruido y elevada pendiente en el que el espesor alcanza un valor aproximado de 1,1 nm. Se presume que dicho valor viene marcado por una inclinación del ciclopentanoperhidrofenantreno del colesterol de 73°, manteniendo con toda probabilidad su resto radical alquílico paralelo a la normal.
- Un segundo tramo con menor pendiente y bajo ruido, desde 1,1 nm hasta 1,35 nm, momento en el que se produce el colapso. Es probable que el culpable de este incremento sea el resto alquílico del colesterol.

La **Imagen D** muestra el estado *condensado*, caracterizado por la ausencia de dominios hasta que se produce el colapso de la monocapa. Al producirse este fenómeno, se forman las estructuras tridimensionales características del colesterol (**Imagen E**) cuyo número y tamaño van en aumento a medida que se reduce la superficie (**Imagen F**).

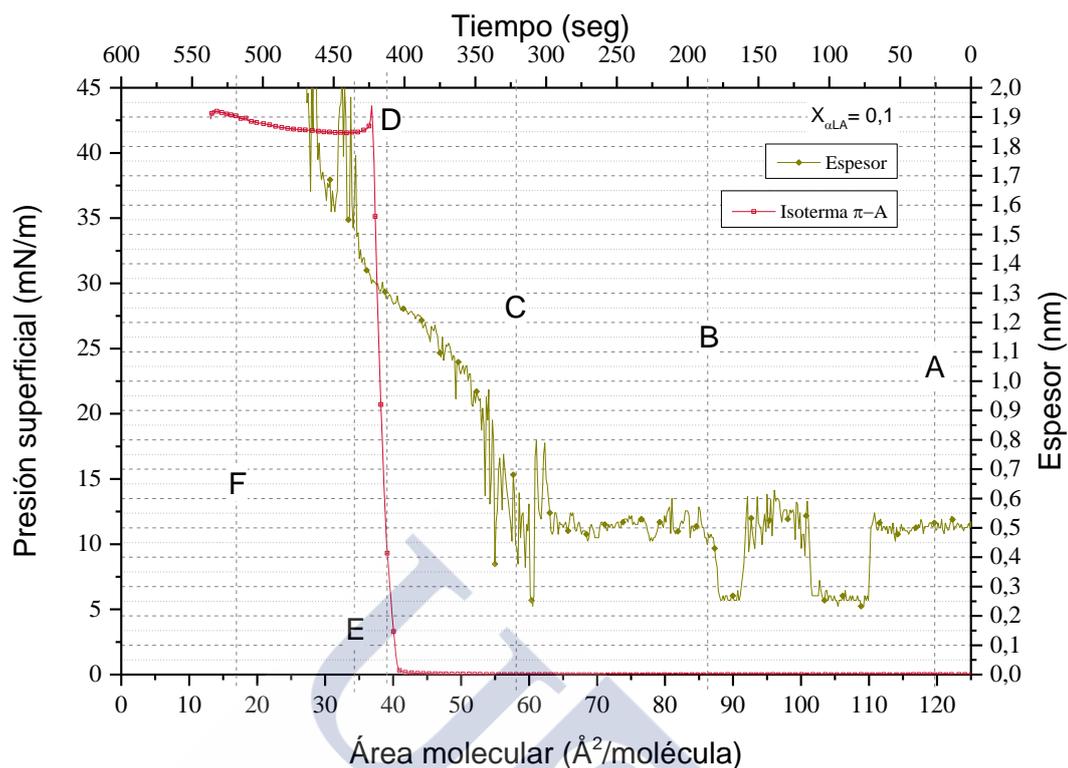


Figura 4.13.I.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido α -linolénico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{\alpha LA} = 0,1$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

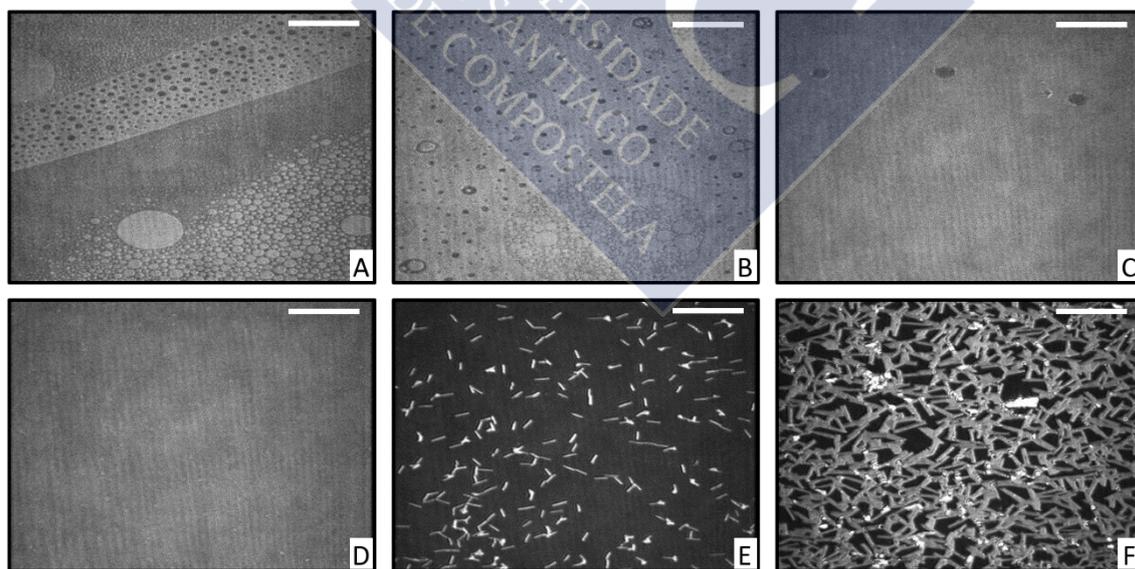


Ilustración 4.13.E Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido alfa linolénico y colesterol ($X_{\alpha LA} = 0,1$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\ \mu\text{m}$.

4.13.3 Área molecular media

La representación del área molecular media en función de la fracción molar de ácido α -linolénico (**Figura 4.13.J**) muestra la existencia de desviaciones de la ley de aditividad de las áreas a diferentes valores de presión superficial. Dichas desviaciones son negativas y más acusadas cuanto menor sea la presión.

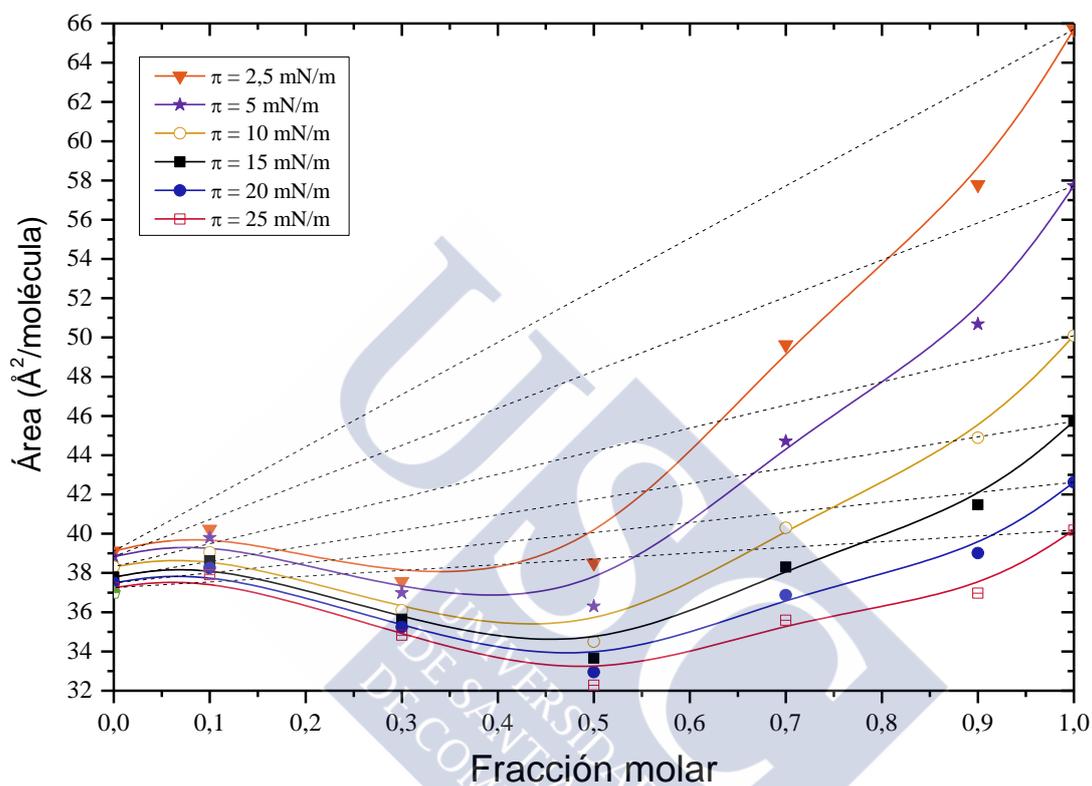


Figura 4.13.J.- Representación del área molecular media frente a la fracción molar de ácido linoleico de la mezcla α LA/COL, a los valores de presión superficial indicados.

4.13.4 Funciones de exceso

4.13.4.1 Área de exceso

El área de exceso frente a la fracción molar del ácido linoleico se muestra en la **Figura 4.13.K**. Todos los valores determinados son negativos excepto tres puntos correspondientes a presiones elevadas de la mezcla $X_{\alpha LA} = 0,1$ fruto, probablemente, de un error experimental. Las mayores desviaciones del comportamiento ideal se obtienen en las mezclas de composición 0,5 y 0,3 de ácido graso, siendo estas desviaciones menores con el aumento de la presión.

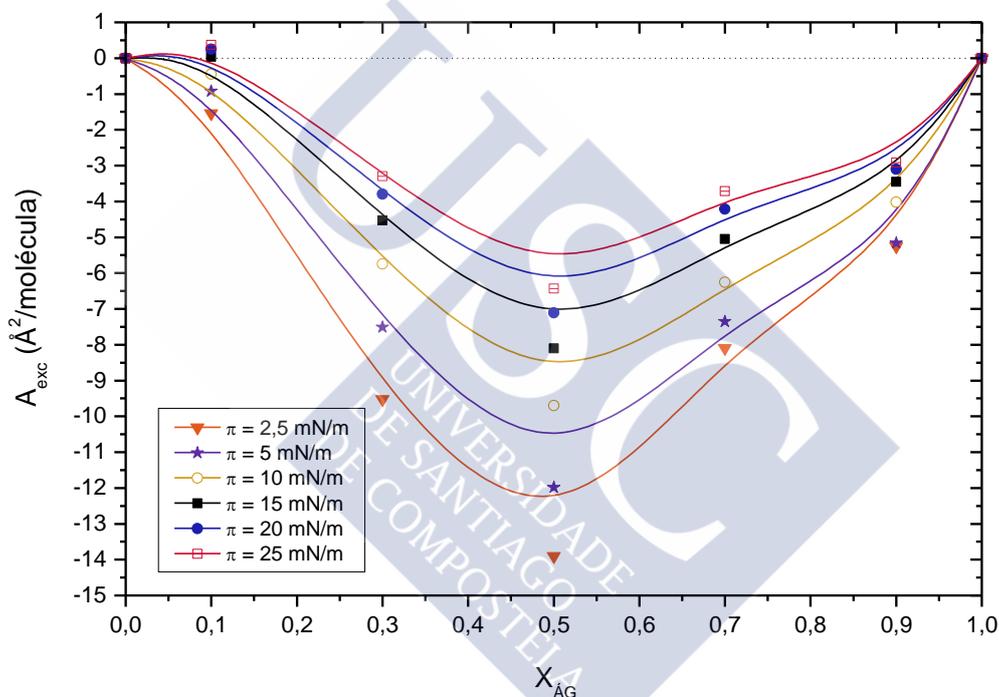


Figura 4.13.K.- Representación del área de exceso de la mezcla $\alpha LA/COL$ frente a la fracción molar de ácido α -linolénico en dicha mezcla, a los valores de presión superficial indicados.

4.13.4.2 Energía libre de exceso (ΔG_{exc})

El análisis termodinámico de la interacción entre el ácido α -linolénico y el colesterol en monocapas, mediante el cálculo de la energía libre de exceso (ΔG_{exc}), se muestra en la **Figura 4.13.L**.

Los valores obtenidos son todos negativos a cualquier fracción molar del sistema y a cualquier presión superficial. Esta situación se corresponde con las condiciones termodinámicas de los sistemas de monocapas binarias en las que se producen interacciones de tipo atractivo entre sus componentes.

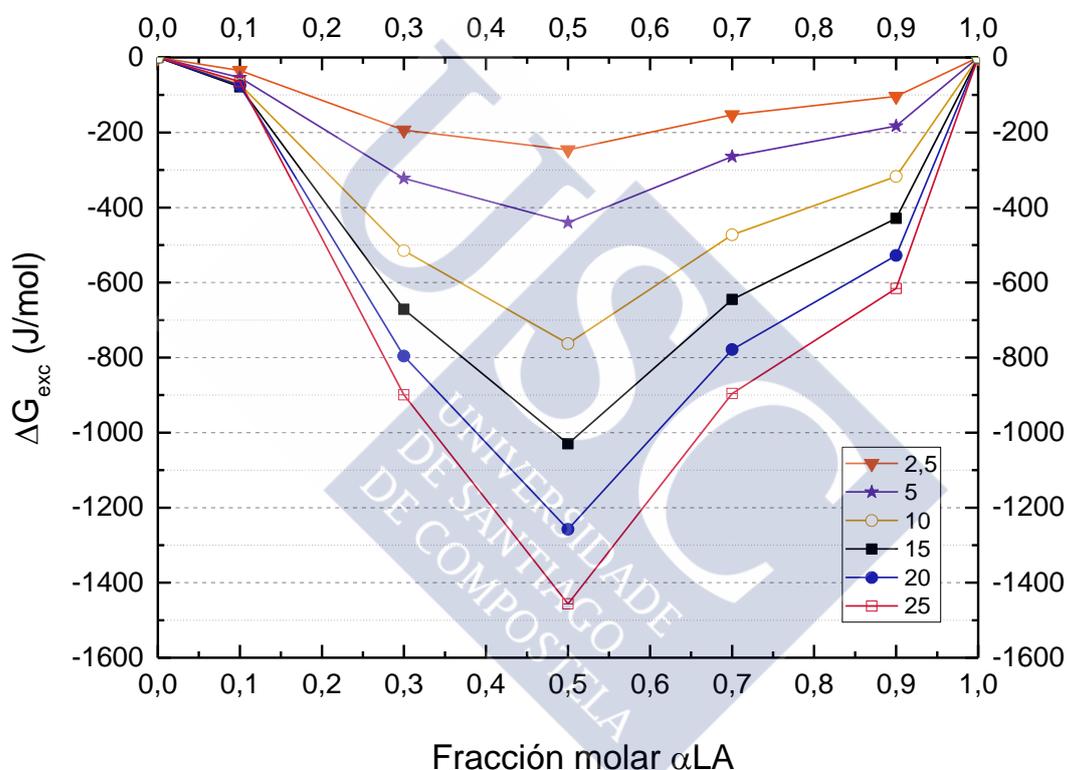


Figura 4.13.L.- Representación de la energía libre de exceso para el sistema α LA/COL frente a la fracción molar de ácido linoleico en dicha mezcla, a los valores de presión superficial indicados.

Los valores de energía libre de exceso se vuelven más negativos al aumentar la presión superficial, lo que nos indica que la interacción entre estos dos componentes es mayor a elevadas presiones. Los mayores valores se alcanzan con la fracción molar de $X_{\alpha LA} = 0,5$ del sistema α LA/COL. Esto nos indica que los films más estables formados por ácido α -linolénico y colesterol se obtienen con una proporción de 1:1.

4.14 MEZCLA DE ÁCIDO γ -LINOLÉNICO CON COLESTEROL

4.14.1 Isotermas π -A y módulos de compresibilidad

El comportamiento de las monocapas de la mezcla ácido γ -linolénico y colesterol (Figura 4.14.A) es muy similar a las observadas en el sistema de ácido α -linolénico y colesterol. En efecto, cuando la fracción molar de ácido γ -linolénico es menor a 0,5 las isotermas obtenidas muestran que las monocapas presentan un estado de tipo *sólido* (curvas 0,1 y 0,3), con una forma muy similar a la del propio colesterol. Cuando su proporción es mayor a 0,5 las monocapas son de tipo *líquido expandido* (curvas 0,7 y 0,9), similares al del ácido γ -linolénico puro. La isoterma correspondiente a la monocapa de mezcla equimolar presenta un comportamiento intermedio.

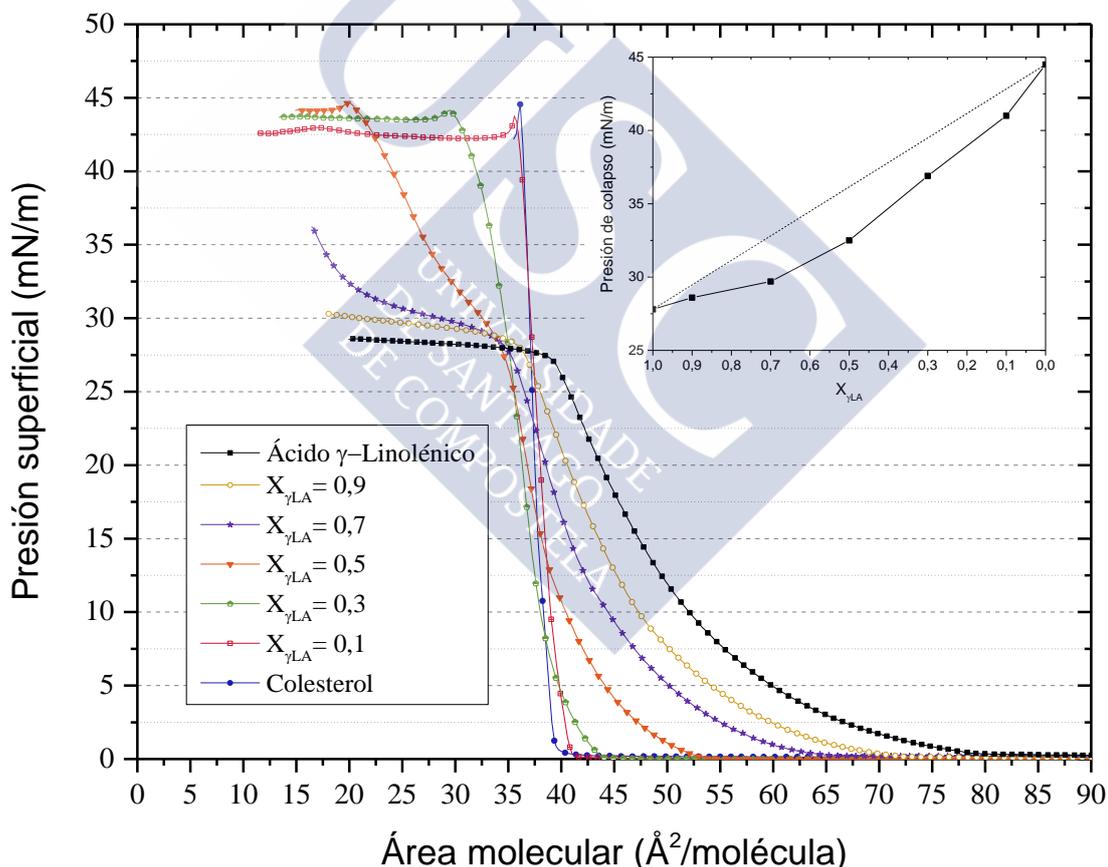


Figura 4.14.A.- Curvas π -A de monocapas de ácido γ -linolénico, colesterol y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9) obtenidas a 10 °C, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de 50 cm^2/min . En la gráfica interna se muestran los valores de colapso frente a la fracción molar.

El colapso de las mezclas ocurre a valores de presión superficial intermedios entre los de los componentes puros, y su valor se ve incrementado al aumentar la presencia de colesterol (interior **Figura 4.14.A**), lo cual nos indica que los dos componentes son miscibles.

En la **Figura 4.14.B**. se muestran los módulos de compresibilidad. En la misma, se pone de manifiesto el elevado poder de condensación que presenta el colesterol sobre los ácidos grasos insaturados. Se puede observar como aumenta la resistencia de las monocapas de las mezclas a ser comprimidas a medida que el colesterol se encuentra más presente. De la misma forma, la adición de ácido linoleico provoca una disminución en la rigidez de las monocapas.

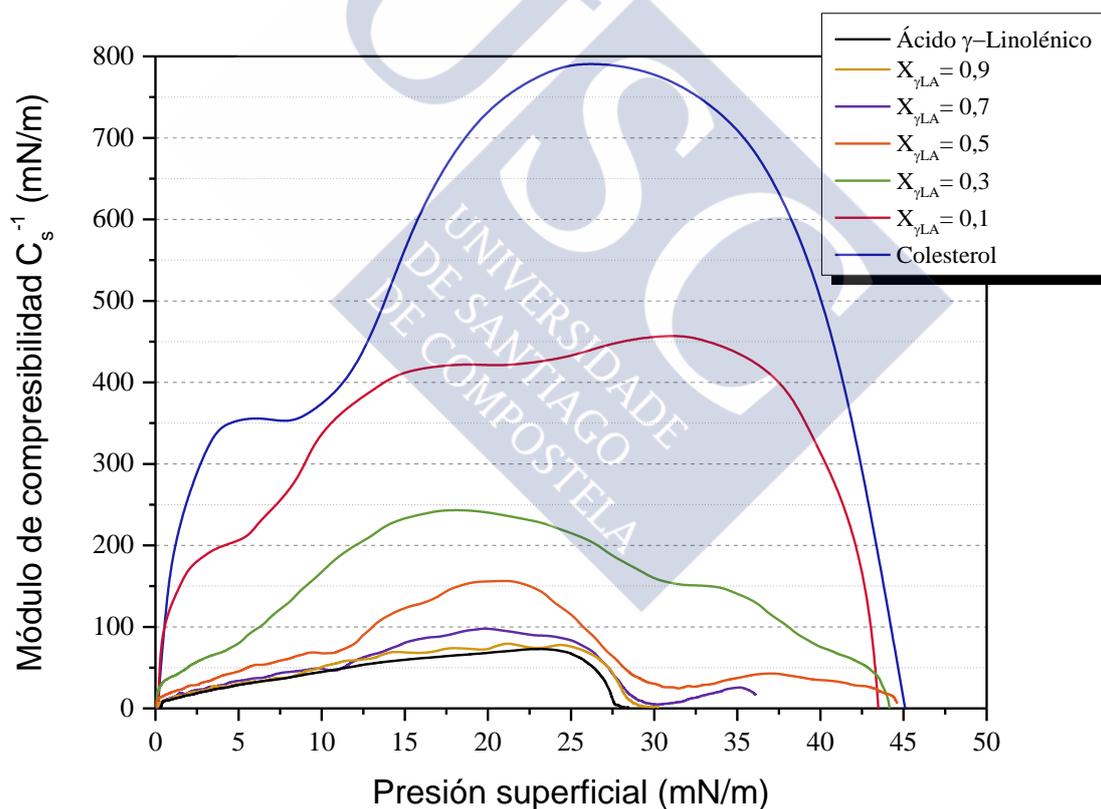


Figura 4.14.B.- Módulos de compresibilidad correspondientes a las isothermas π -A de monocapas de ácido γ -linolénico, colesterol y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9).

Para observar con mayor claridad el efecto condensador del colesterol en la monocapa de ácido γ -linolénico se representó el módulo de compresibilidad en tres dimensiones frente a la presión superficial (**Figura 4.14.C**).

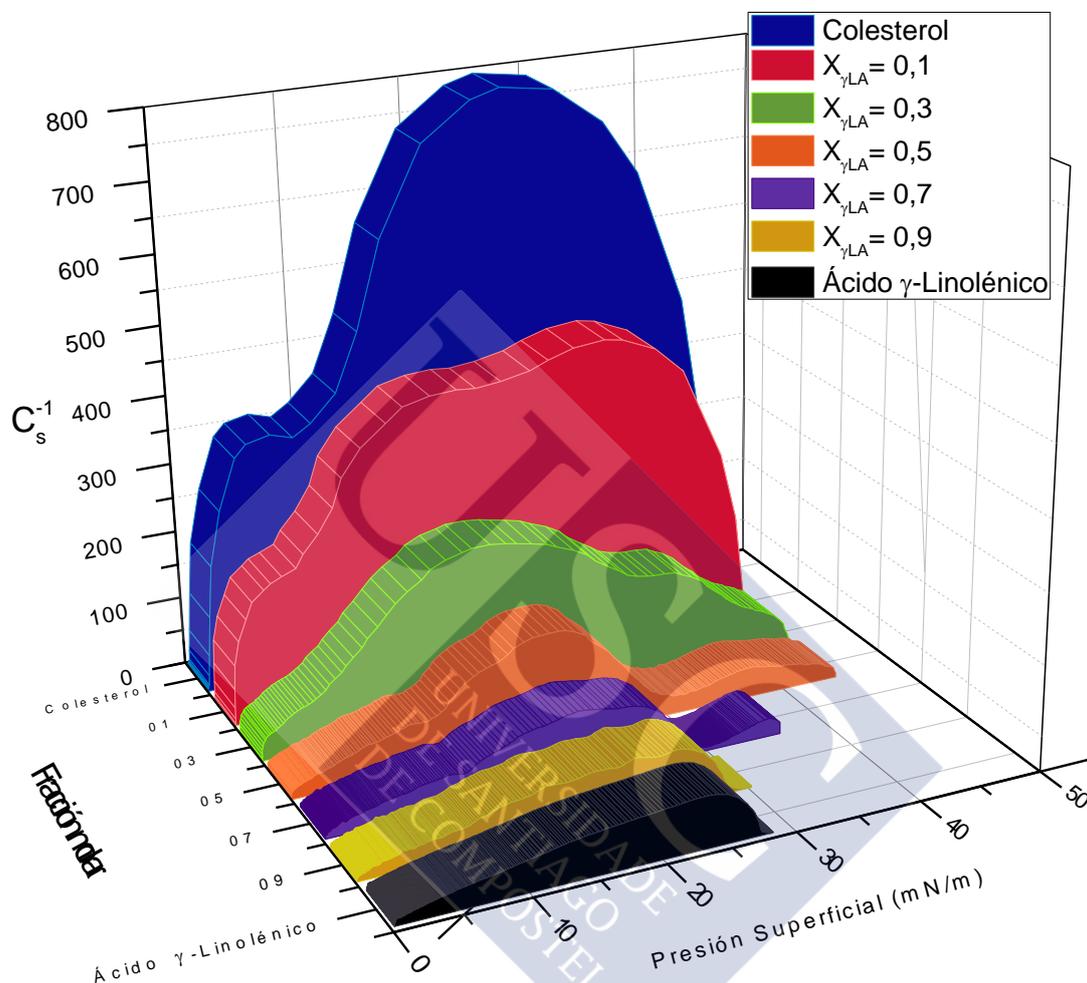


Figura 4.14.C.- Representación tridimensional de los módulos de compresibilidad frente a la presión de monocapas de ácido γ -linolénico, colesterol y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9).

En la **Figura 4.14.D** se muestra el análisis individual del módulo de compresibilidad para cada fracción molar de la mezcla de ácido γ -linolénico y colesterol, cuyos valores de mayor relevancia vienen recogidos en la **Tabla 4.14.A** para los valores de presión indicados.

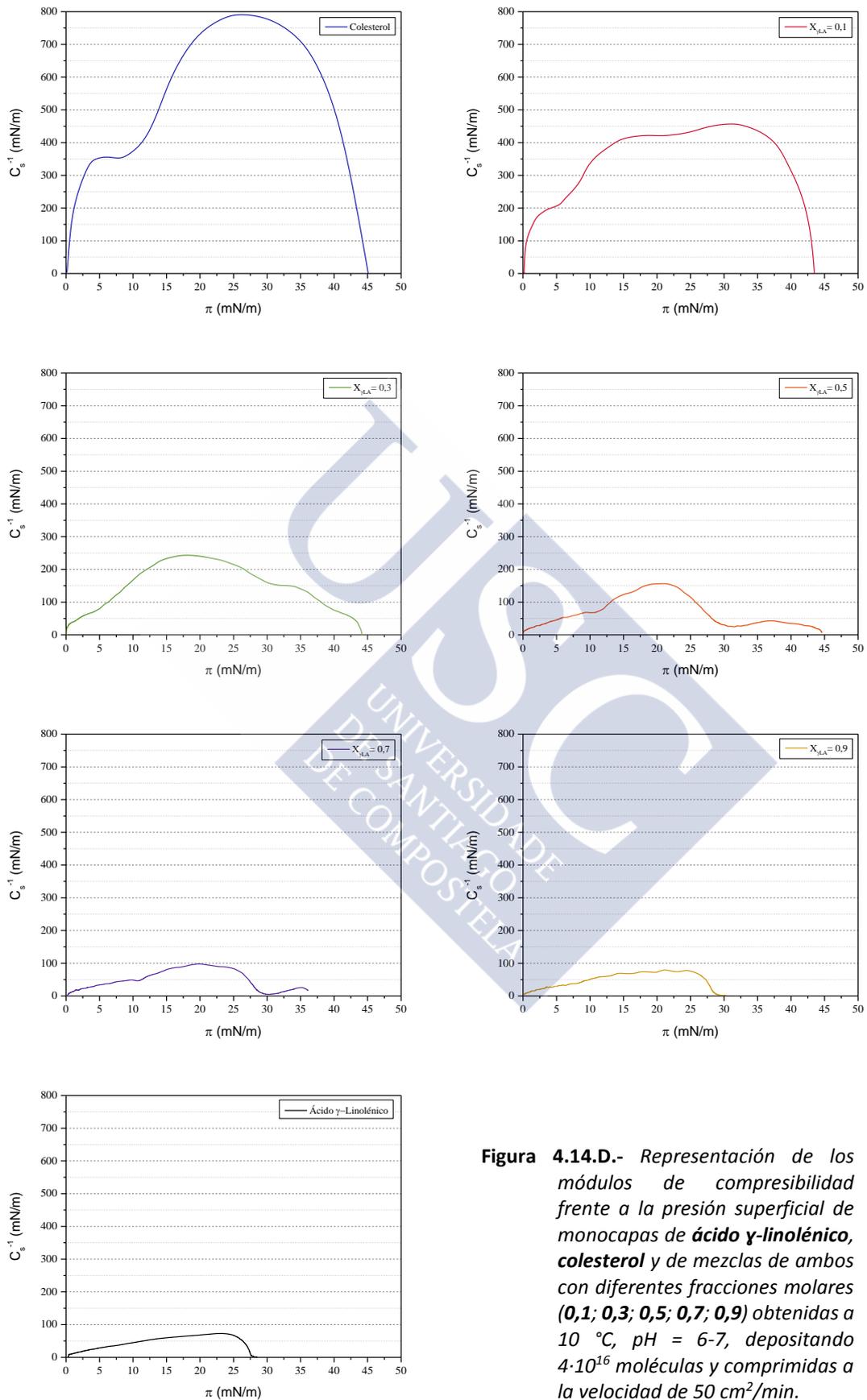


Figura 4.14.D.- Representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión superficial de monocapas de **ácido γ -linolénico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**) obtenidas a 10 °C, pH = 6-7, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimidas a la velocidad de 50 cm²/min.

Módulo de compresibilidad (mN/m)							
X_{yLA}	$\pi = 2,5$	$\pi = 5$	$\pi = 10$	$\pi = 15$	$\pi = 20$	$\pi = 25$	C_s^{-1} máximo
Colesterol	289,41	353,18	373,91	562,99	731,55	788,63	790,6
0,1	183,05	207,13	337,35	416,72	420,29	427,2	458,19
0,3	57,08	80,94	166,78	233,44	238,13	215,38	244,59
0,5	28,76	45,71	68	123,75	155,63	115,5	156,3
0,7	22,74	33,67	48,83	80,04	97,21	83,17	97,66
0,9	20,29	29,65	50,84	68,67	72,46	75,81	79,6
Ácido γ - Linolénico	18,51	28,76	44,82	59,75	68,23	67,34	72,91

Tabla 4.14.A.- Valores de los módulos de compresibilidad a diferentes presiones superficiales de monocapas mixtas de **ácido γ -linolénico y colesterol** a diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9).



4.14.2 Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla

4.14.2.1 Mezcla $X_{\gamma\text{LA}} = 0,9$

El valor del espesor de la monocapa de la mezcla de colesterol y ácido γ -linolénico de fracción molecular $X_{\gamma\text{LA}} = 0,9$ durante el estado *gas* es muy similar al obtenido para la monocapa del ácido graso puro (0,52 nm). A lo largo de esta fase se observan con claridad la presencia de dominios circulares de un diámetro de entre 3 y 6 μm rodeados de zonas oscuras correspondientes al sustrato acuoso (**Imágenes A, B y C**).

En el caso del ácido α -linolénico, la imagen para esta misma fracción molar apenas permitía diferenciar sus dominios debido a su ínfimo tamaño y a la baja tendencia que presentaban sus moléculas a agruparse. En el caso del ácido γ -linolénico se observan con gran claridad, probablemente porque presente una menor tendencia a expandirse respecto a su isómero omega-3.

Dichos dominios se van fusionando a medida que se reduce la superficie disponible para la monocapa, logrando una imagen completamente homogénea en el instante en el que la presión superficial y el espesor relativo inician su incremento, permaneciendo así durante toda la fase de *líquido expandido* (**Imagen D**).

Como vimos, la monocapa presenta un espesor inicial marcado por el ácido γ -linolénico y, en el momento de la ruptura de la monocapa, despliega un valor muy próximo al del propio ácido graso cuando alcanza el colapso al formar monocapa por sí solo (0,85 nm). Estos datos indican que en el momento del colapso el ácido γ -linolénico se encuentra inclinado unos 45° mientras el colesterol alcanza aproximadamente los 48° manteniendo el resto radical alquílico paralelo a la superficie del sustrato acuoso.

El colapso de la monocapa concurre primero con la formación de gérmenes de colapso, pequeños puntos que nos indican la expulsión de moléculas desde el film (**Imagen E**) y, posteriormente, con la maduración de estas estructuras mediante aglomeración en forma de dominios tridimensionales brillantes tal como muestra la **Imagen F**.

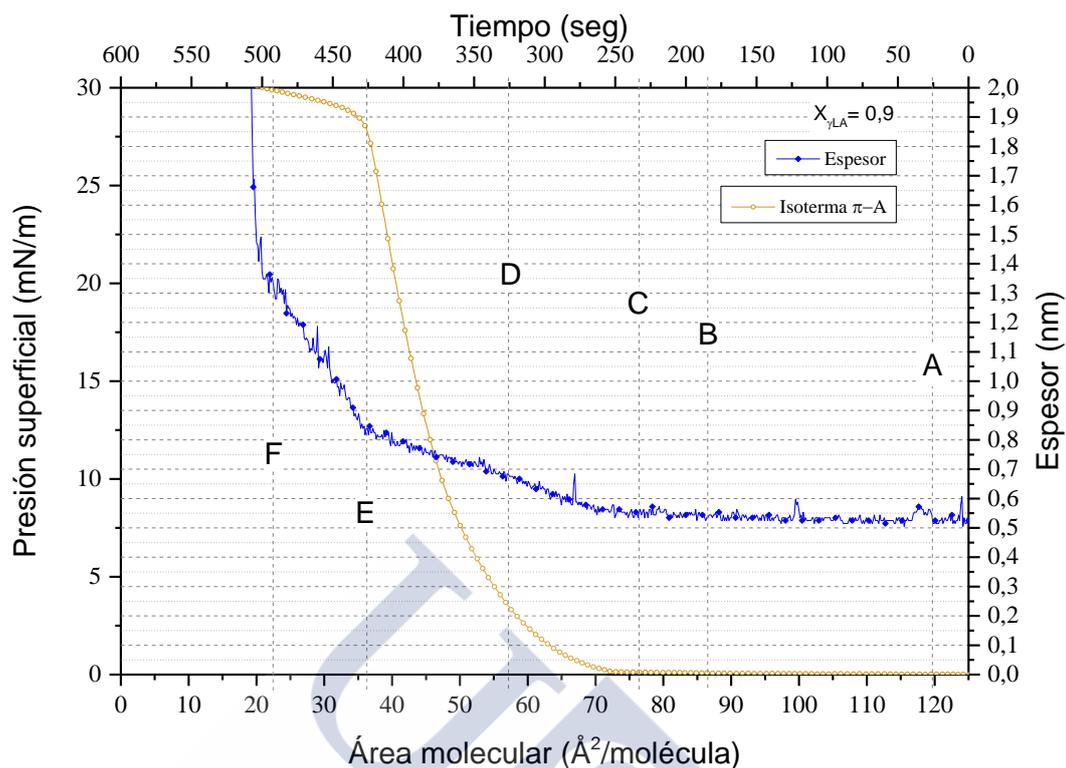


Figura 4.14.E.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido γ -linolénico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{\gamma\text{LA}} = 0,9$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

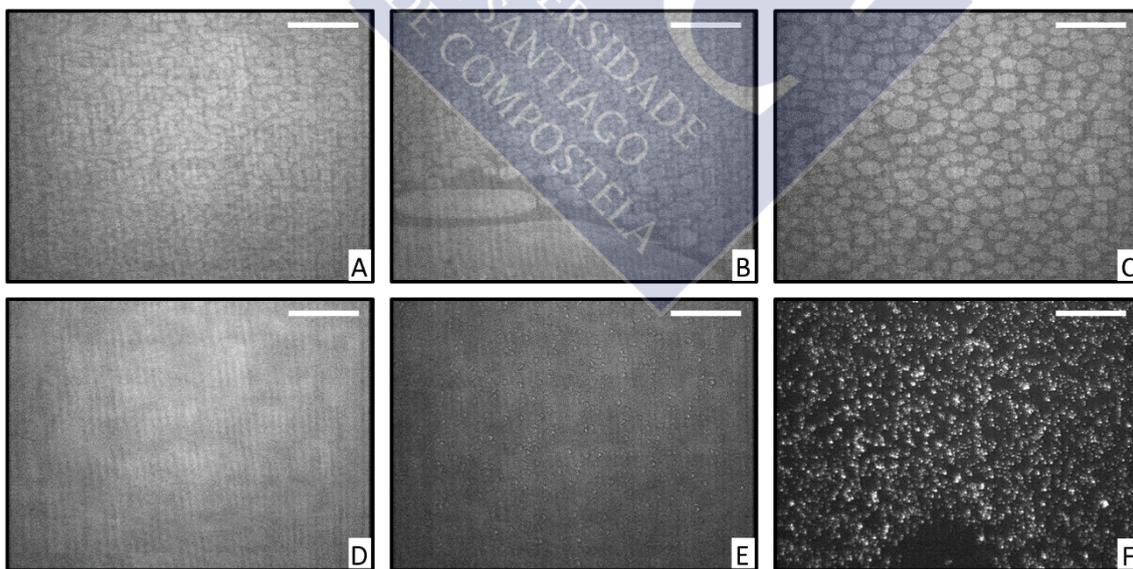


Ilustración 4.14.A.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido gamma linolénico** y **colesterol** ($X_{\gamma\text{LA}} = 0,9$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.14.2.2 Mezcla $X_{yLA} = 0,7$

El incremento de la presencia de colesterol en la mezcla ($X_{yLA} = 0,7$) no muestra influencias sobre el espesor del estado *gas* de la monocapa. Se mantiene en 0,52 nm hasta que se produce el cambio de estado a *líquido expandido*. En la **Imagen A** se observan dominios del ácido graso y alguna forma espumosa correspondiente al esterol. Al disminuir la superficie disponible para las moléculas, los dominios se van fusionando tal como se puede observar en las **Imágenes B y C**.

Los simultáneos incrementos de presión superficial y de espesor marcan el cambio de estado. La imagen microscópica obtenida a lo largo del estado de *líquido expandido* se mantiene en todo momento homogénea (**Imagen D**).

Durante esta fase el espesor asciende paulatinamente mostrando un elevado ruido y alcanzando un valor aproximado de 0,93 nm en el punto de colapso. Dicho valor supera el alcanzado por el ácido graso objeto de estudio cuando colapsa su film puro. Por lo tanto, el valor vendrá determinado por una mayor inclinación de la molécula de colesterol, concretamente del ángulo que presenta el ciclopentanofenantreno respecto de la interfase. Mediante los cálculos trigonométricos se determina que para un espesor de 0,93 nm, el colesterol se encontrará inclinado unos 54° en el punto inmediatamente anterior al colapso de la monocapa.

El colapso ocurre cuando el área correspondiente a cada molécula es de 35 \AA^2 . El microscopio ofrece una visualización clara de los “embriones” o gérmenes de colapso, como se observa en la **Imagen E** fruto de la expulsión de moléculas del film. A menores áreas, estos dominios se agrupan formando estructuras tridimensionales mediante aglomeración, mostrados en forma de puntos blancos brillantes debido al elevado valor de espesor que registra el microscopio (**Imagen F**).

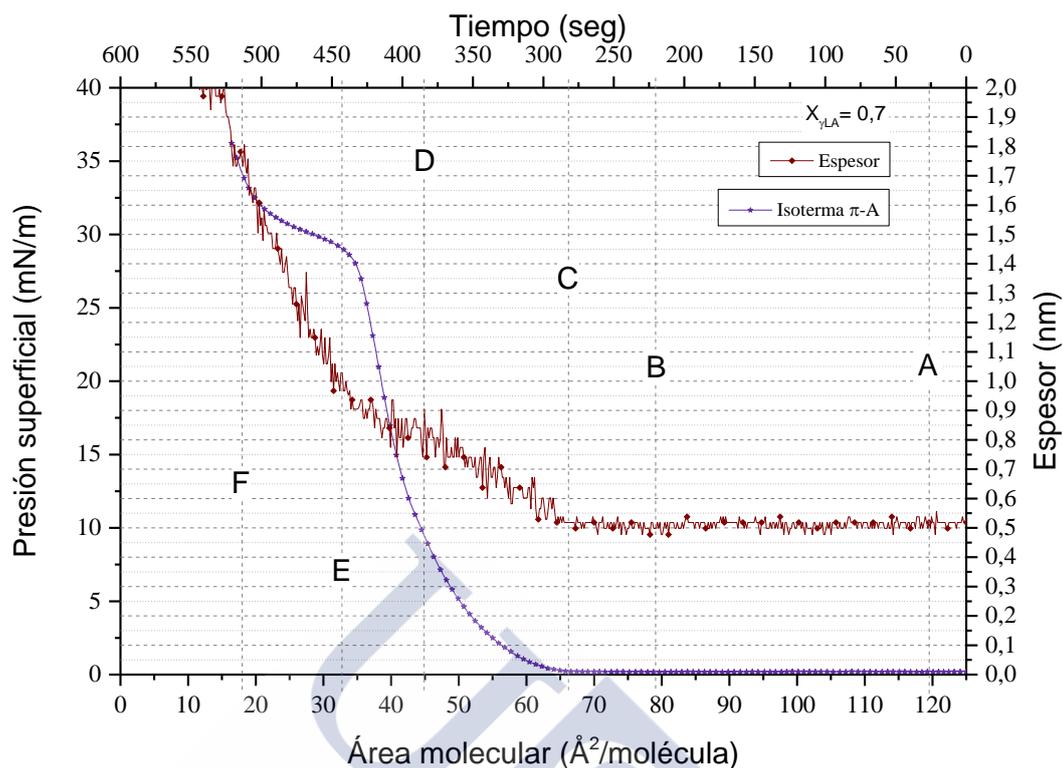


Figura 4.14.F.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido γ -linolénico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{\gamma LA} = 0,7$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

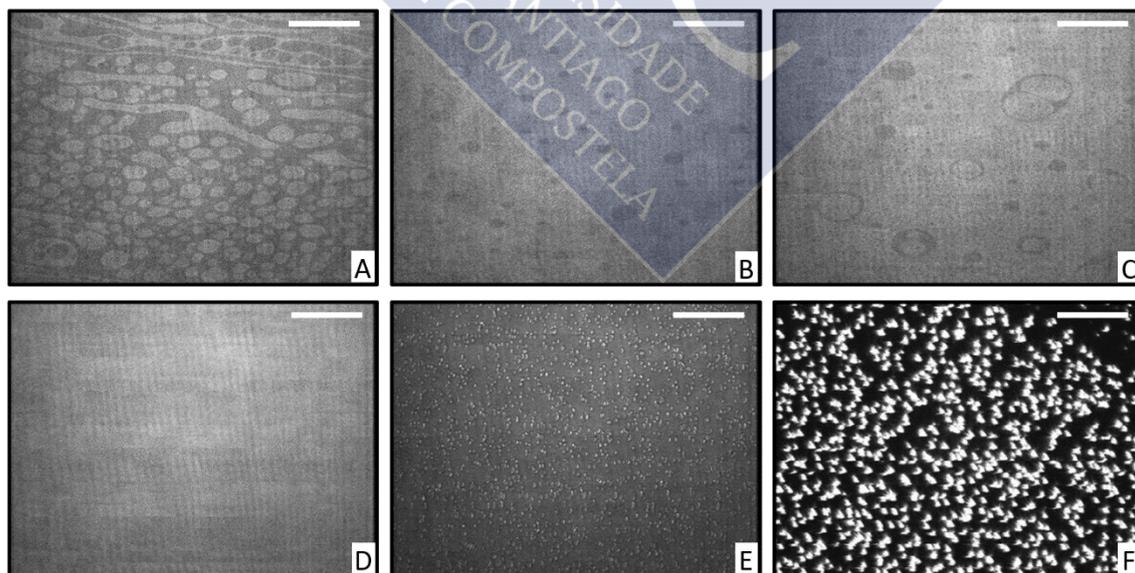


Ilustración 4.14.B.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido gamma linolénico y colesterol ($X_{\gamma LA} = 0,7$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\ \mu\text{m}$.

4.14.2.3 Mezcla $X_{\gamma LA} = 0,5$

Con la mezcla equimolar de ácido γ -linolénico y colesterol se presenta un incremento del ruido del espesor durante el estado *gas*. Las imágenes obtenidas resultan muy claras sobre la interacción de ambos componentes. Tal como se observa en la **Imagen A**, los dominios esféricos del omega-6, ligeramente más claros, están perfectamente integrados en los propios del esterol.

A medida que se comprime la monocapa, las zonas oscuras correspondientes al sustrato acuso van desapareciendo mientras los dominios del material constituyente del film se fusiona (**Imagen B**).

Ante la mayor presencia de colesterol respecto de las anteriores mezclas y, por lo tanto, una mayor condensación de la monocapa, el espesor se registra ciertos instantes antes del propio de la presión superficial.

En la **Imagen C** se puede observar como a la presión de 5 mN/m todavía se aprecian ciertos dominios. Al continuar la compresión de la monocapa se observa una imagen homogénea característica del estado de *líquido expandido* (**Imagen D**).

Se observan dos tramos de espesor con diferente pendiente durante el tiempo que la monocapa permanece en estado de *líquido expandido*. Al principio experimenta una subida muy rápida, atribuible al cambio de la disposición de las moléculas tanto de colesterol como de ácido γ -linolénico desde una posición más inclinada a otra más erguida, alcanzando un espesor cercano a 1 nm. Posteriormente, la pendiente baja de forma muy notoria, lo que se traduce en un incremento lento del espesor atribuible al cambio de inclinación del resto alquílico del colesterol.

El colapso tiene lugar cuando el film presenta un espesor de 1,2 nm. En la **Imagen E** se observa la generación de dominios característicos, cuya aglomeración debida a la reducción de la superficie da lugar a las estructuras tridimensionales de la **Imagen F**.

El hecho de que se alcancen los 1,5 nm, característicos de la molécula de colesterol en su máxima extensión, a un área tan baja como la de 30 Å²/mol nos indica que previamente se expulsó parte del material del film.

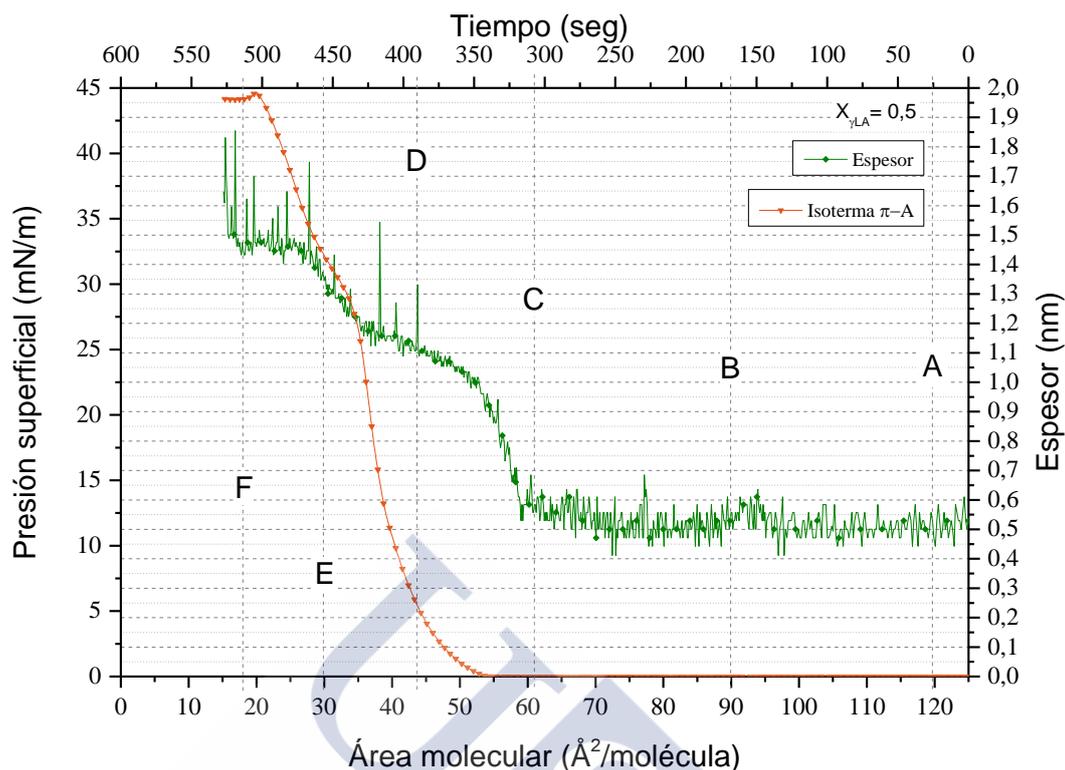


Figura 4.14.G.- Curva π -A de la moncapa mixta de ácido γ -linolénico y colesterol correspondiente a la fracción molar de $X_{\gamma LA} = 0,5$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

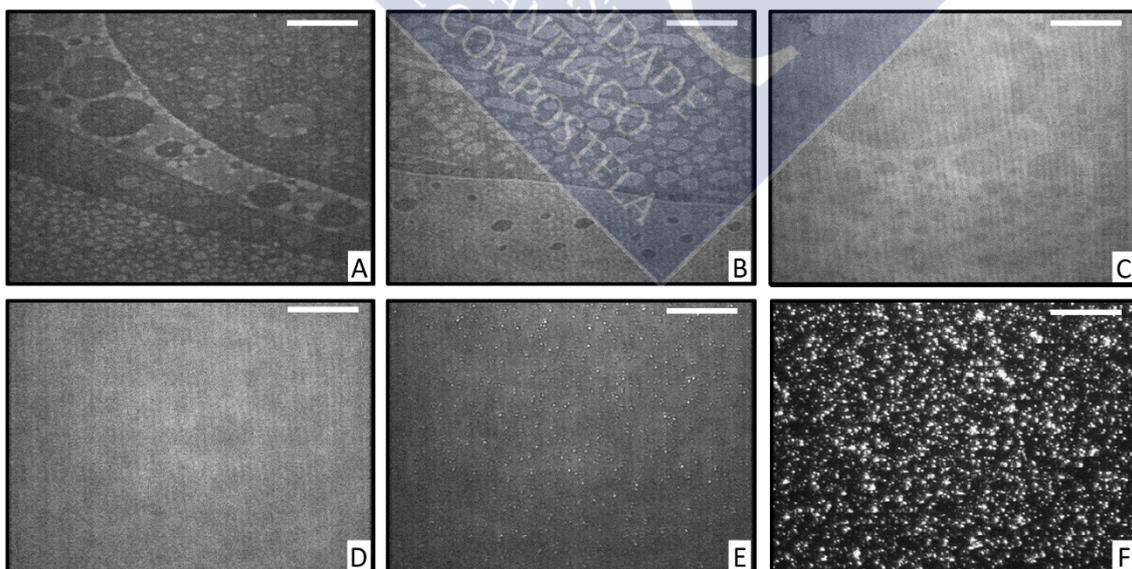


Ilustración 4.14.C.- Imágenes BAM correspondientes a la moncapa mixta formada por ácido gamma linolénico y colesterol ($X_{\gamma LA} = 0,5$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.14.2.4 Mezcla $X_{yLA} = 0,3$

La mayoría de la presencia de colesterol en la mezcla aumenta el ruido del espesor registrado. Así, durante la fase *gas* resulta difícil establecer un valor concreto para el espesor, encontrándose de forma alterada en un intervalo entre los 0,4 y 0,7 nm.

Las **Imágenes A y B** muestran dominios característicos de ambos componentes. La compresión de la monocapa da lugar a una imagen cada vez más homogénea (**Imagen C**). Cuando la presión superficial alcanza los 5 mN/m, se obtiene una imagen microscópica con la presencia de ciertos dominios curvilíneos correspondientes a la reorganización molecular por parte de los componentes de la monocapa (**Imagen D**). A mayores valores de presión superficial se observa una imagen homogénea en su totalidad característica de estos estados que se mantiene hasta la aparición del colapso de la monocapa.

Después de mucho ruido generado por la monocapa en estado *gas*, el espesor sufre un incremento repentino característico del colesterol puro. Se alcanza un valor levemente inferior a 1,2 nm, cercanos al valor de espesor que logra el colesterol por sí mismo (1,15 nm) cuando su grupo esterano se encuentra formando un ángulo de 90° respecto de la normal del sustrato y su radical permanece paralelo al mismo, tal como se postuló anteriormente.

El colapso del film coincide con un valor de espesor de 1,45 nm, cercano al valor de extensión máximo del colesterol cuando se encuentra formando una monocapa pura.

La **Imagen E** nos confirma la ruptura de la monocapa con la aparición de los gérmenes de colapso. A medida que prosigue la compresión, estos dominios se agrupan formando los bastones tridimensionales característicos del colesterol (**Imagen F**), de un tamaño aproximado de 6,5 μm .

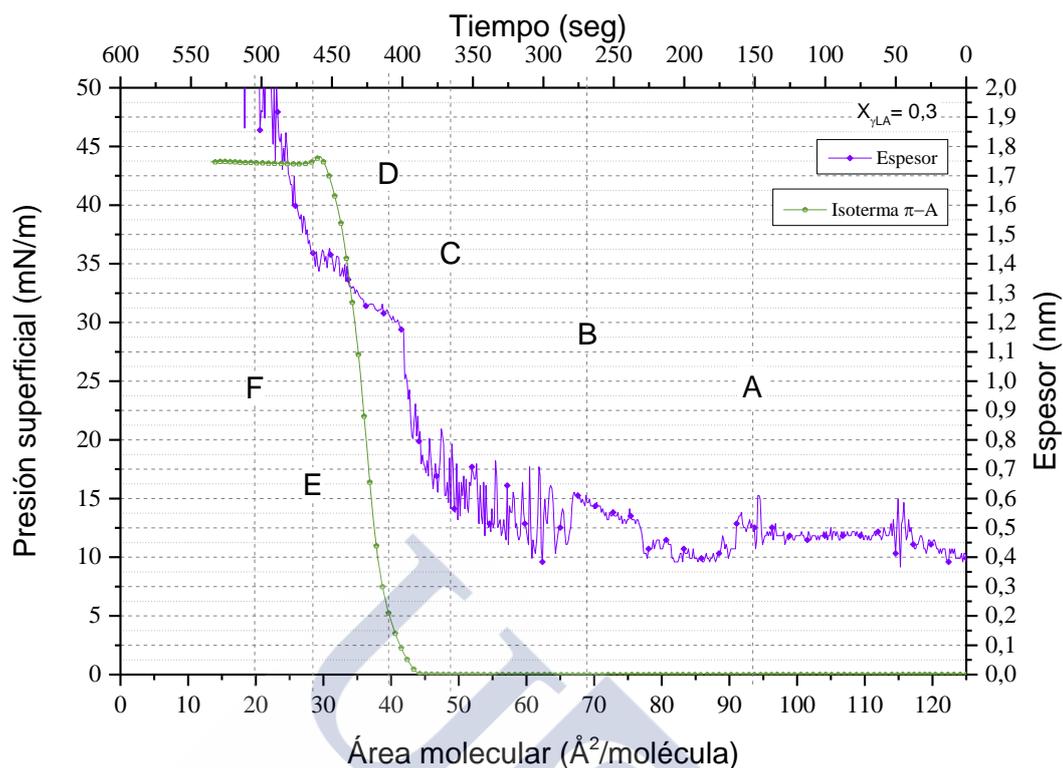


Figura 4.14.H.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido γ -linolénico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{\gamma\text{LA}} = 0,3$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

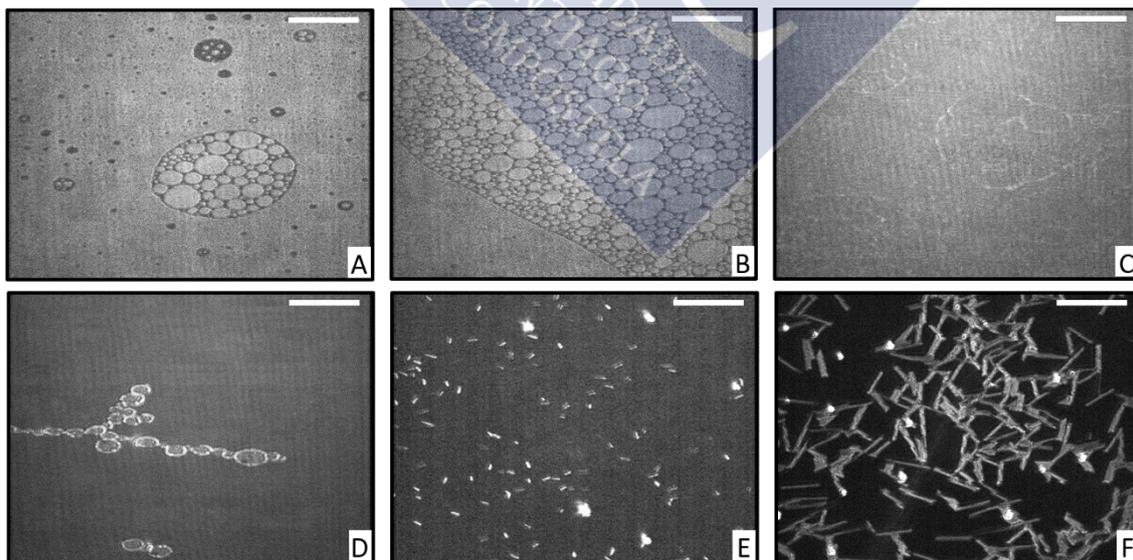


Ilustración 4.14.D.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido gamma linolénico** y **colesterol** ($X_{\gamma\text{LA}} = 0,3$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.14.2.5 Mezcla $X_{yLA} = 0,1$

La elevada presencia de colesterol en esta mezcla se hace patente al observar los dominios de las **Imágenes A y B**. En efecto, se observan estructuras en forma de “espumas” típicas de colesterol con huecos oscuros correspondientes al sustrato acuoso. Al disminuir el área molecular, la imagen generada se vuelve paulatinamente homogénea, desapareciendo las regiones oscuras de agua (**Imagen C**).

La mezcla con fracción molar $X_{yLA} = 0,1$ también presenta un elevado ruido durante la fase *gas*, siendo en este caso más sencillo asociar los valores obtenidos. Pues bien, la pequeña presencia de ácido graso en la mezcla es la razón de que en ciertas ocasiones no esté presente en la superficie de medida objeto del microscopio, siendo el espesor del colesterol el único valor registrado (0,25 nm). En concreto, durante el tiempo que la monocapa permaneció en estado *gas*, se registró la presencia de ácido graso en dos tramos: desde los 90 y los 76 Å²/molécula, y desde los 73 y 66 Å²/molécula. En dichos instantes se pudo obtener un valor de espesor de aproximadamente 0,83 nm, prácticamente el mismo espesor que el obtenido por la monocapa del ácido γ -linolénico puro.

A los 54 Å²/molécula tiene lugar el incremento del espesor relativo, el cual se produce con antelación al de la presión superficial debido al decalaje propio de las monocapas condensadas. Se registra en ese punto un valor de espesor de 1,1 nm correspondientes a la posición perpendicular del grupo esterano de la molécula de colesterol manteniendo paralelo el resto radical alílico respecto de la superficie del agua. Posteriormente el espesor continúa su ascenso de una forma más lenta hasta alcanzar los 1,4 nm antes de producirse el colapso. Este valor de espesor es bastante próximo a los 1,5 nm correspondientes al máximo valor de espesor de la monocapa de colesterol previo al colapso.

La **Imagen D**, tomada a 10 mN/m, muestra estructuras curvilíneas correspondientes probablemente al cambio conformacional de las moléculas de ácido graso. Al producirse el colapso se observa la génesis de los “embriones” o gérmenes propios de este fenómeno (**Imagen E**). Al disminuir el área, estos dominios se agrupan formando estructuras tridimensionales brillantes propias de la fase colapsada con forma de “bastones” característicos del colesterol (**Imagen F**).

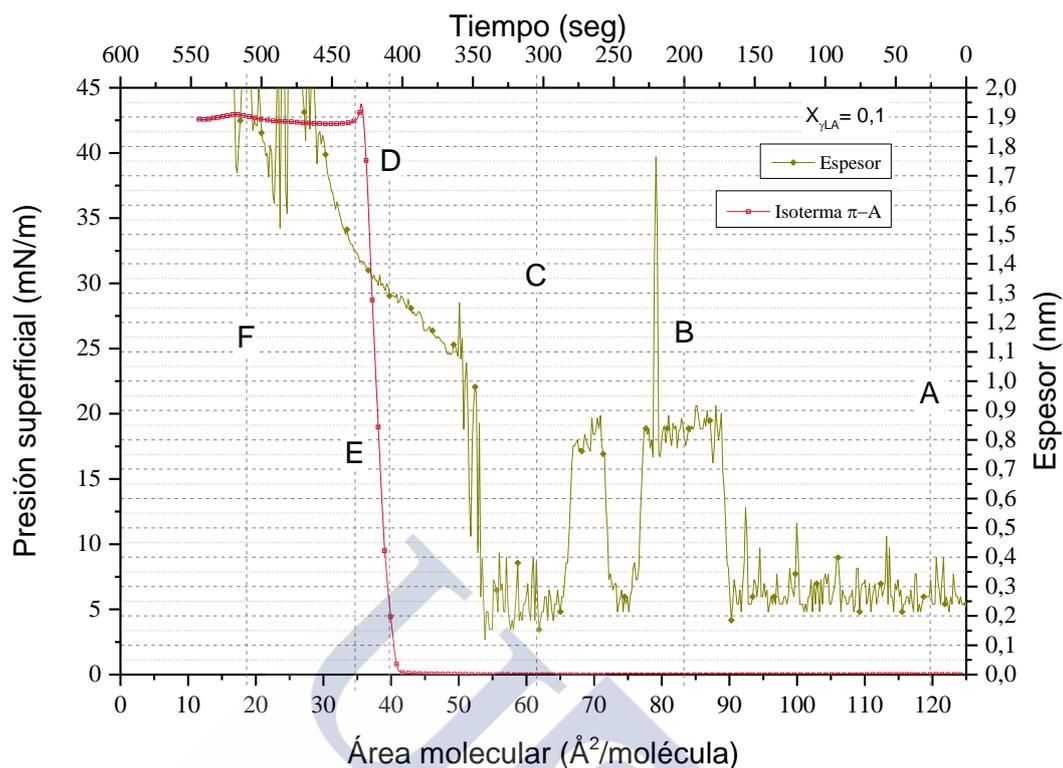


Figura 4.14.I.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido γ -linolénico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{\gamma\text{LA}} = 0,1$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

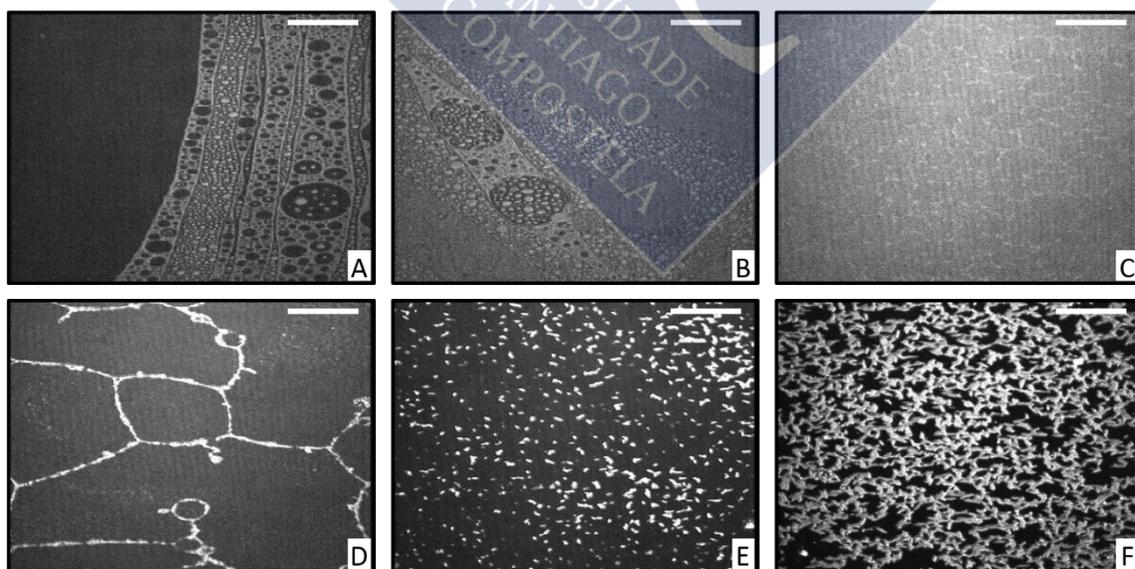


Ilustración 4.14.E.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido gamma linolénico y colesterol ($X_{\gamma\text{LA}} = 0,1$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\ \mu\text{m}$.

4.14.3 Área molecular media

La representación del área molecular media en función de la fracción molar de ácido γ -linolénico, medida a diferentes presiones superficiales da origen a las curvas que se muestran en la **Figura 4.14.J**. En ella se pone de manifiesto la existencia de desviaciones de la ley de aditividad de las áreas a diferentes valores de presión superficial. Dichas desviaciones son negativas y más acusadas cuanto menor sea la presión.

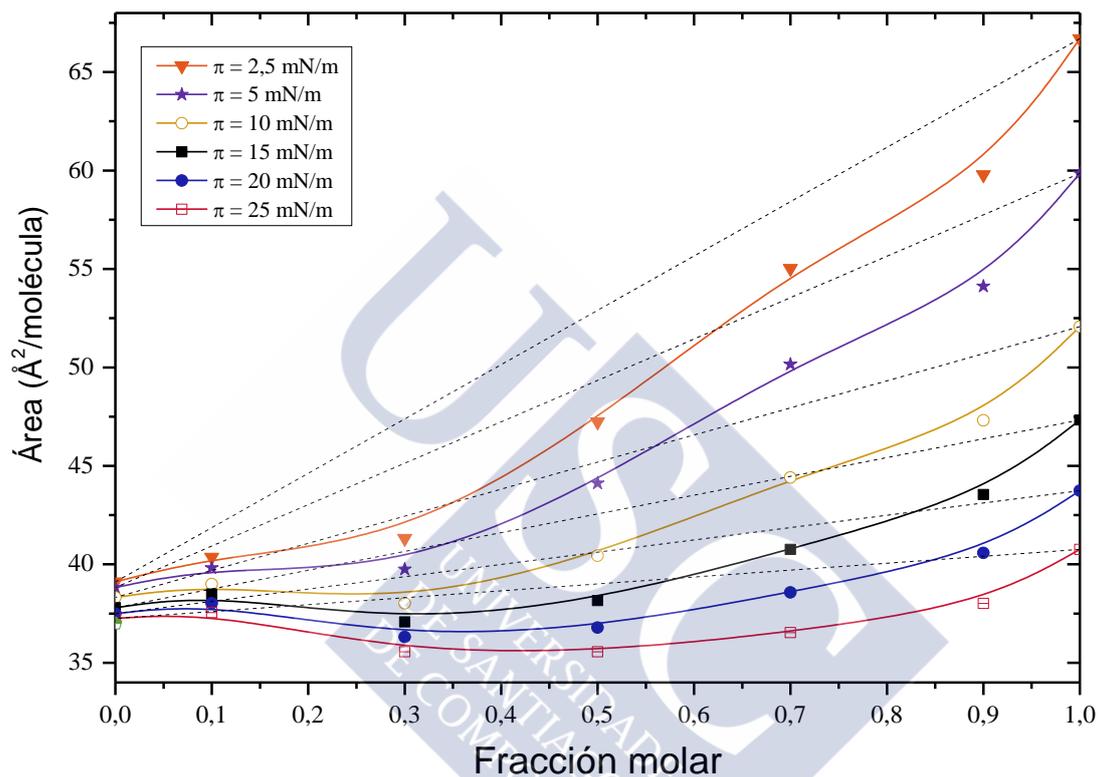


Figura 4.14.J.- Representación del área molecular media frente a la fracción molar de ácido γ -linolénico de la mezcla γ LA/COL, a los valores de presión superficial indicados.

4.14.4 Funciones de exceso

4.14.4.1 Área de exceso

El área de exceso frente a la fracción molar del ácido γ -linolénico se muestra en la **Figura 4.14.K**. Todos los valores determinados son negativos a todas las presiones superficiales. Las mayores desviaciones del comportamiento ideal se obtienen en las mezclas de composición 0,5 y 0,3 de ácido graso, siendo estas desviaciones menores con el aumento de la presión.

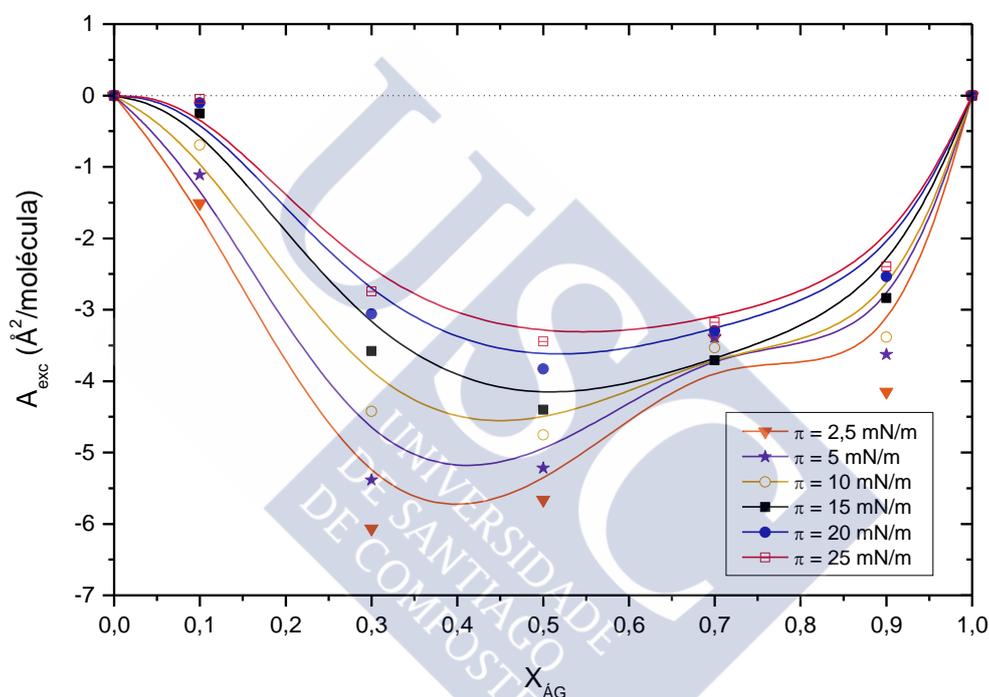


Figura 4.14.K.- Representación del área de exceso de la mezcla γ LA/COL frente a la fracción molar de ácido γ -linolénico en dicha mezcla, a los valores de presión superficial indicados.

4.14.4.2 Energía libre de exceso (ΔG_{exc})

Con el fin de realizar un análisis termodinámico de la interacción entre el ácido γ -linolénico y el colesterol, se calculó la energía libre de exceso (ΔG_{exc}) de las monocapas mixtas a partir del área bajo las curvas π -A correspondientes a las mezclas y a los componentes puros.

Como se puede observar en la **Figura 4.14.L**, los valores obtenidos son todos negativos a cualquier fracción molar del sistema y a cualquier presión superficial. Esta situación se corresponde con las condiciones termodinámicas de los sistemas de monocapas binarias en las que se producen fuertes interacciones entre sus componentes.

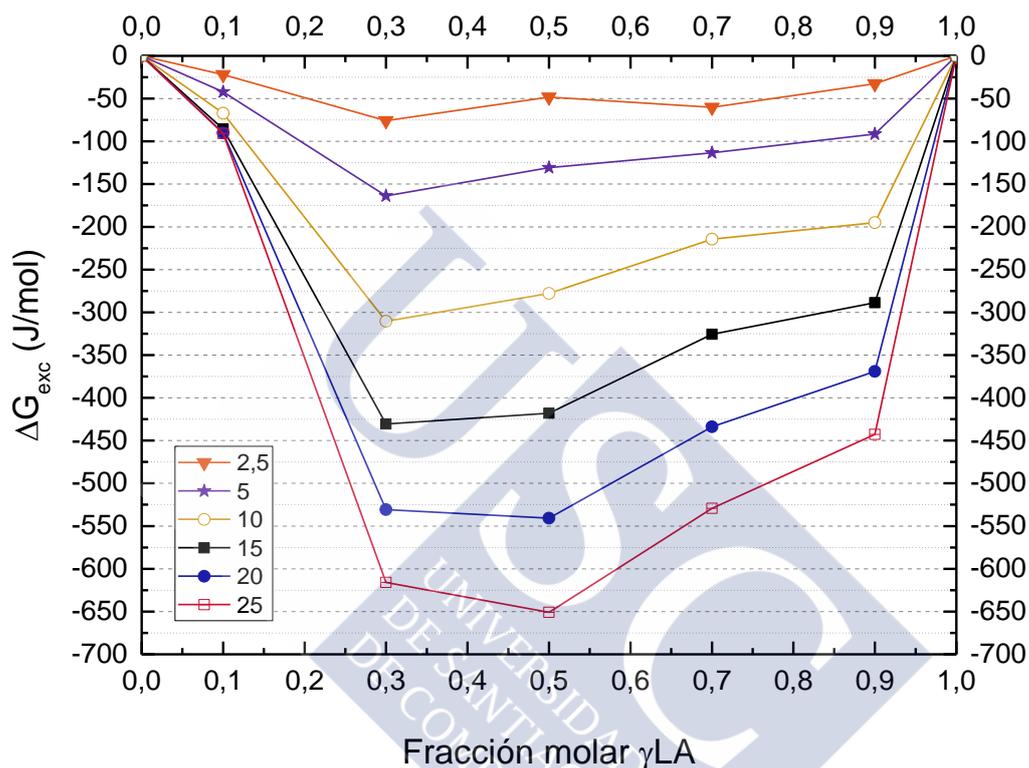


Figura 4.14.L.- Representación de la energía libre de exceso para el sistema γ_{LA}/COL frente a la fracción molar de ácido γ -linolénico en dicha mezcla, a los valores de presión superficial indicados.

Los valores de energía libre de exceso se vuelven más negativos al aumentar la presión superficial, lo que nos indica que la interacción entre estos dos componentes es mayor a elevadas presiones. Los mayores valores se alcanzan con las fracciones molares de $X_{\gamma_{LA}} = 0,3$ y $X_{\gamma_{LA}} = 0,5$ del sistema γ_{LA}/COL . Esto nos indica que los films más estables formados por ácido γ -linolénico y colesterol se obtienen con una proporción de 1:2 respectivamente.

4.15 MEZCLA DE ÁCIDO ESTEARIDÓNICO CON COLESTEROL

4.15.1 Isotermas π -A y módulos de compresibilidad

En la **Figura 4.15.A** se muestran las isotermas correspondientes a las monocapas de la mezcla ácido estearidónico y colesterol. Como se puede observar, a presiones superficiales inferiores a 25 mN/m, la mayor presencia de ácido estearidónico aleja las gráficas del eje de las coordenadas. Sin embargo, a presiones superiores, ocurre lo contrario. Así mismo, la mayor presencia de colesterol en las monocapas mixtas posibilita que se registren mayores presiones superficiales, provocando, de la misma forma, que las isotermas muestren mayor pendiente.

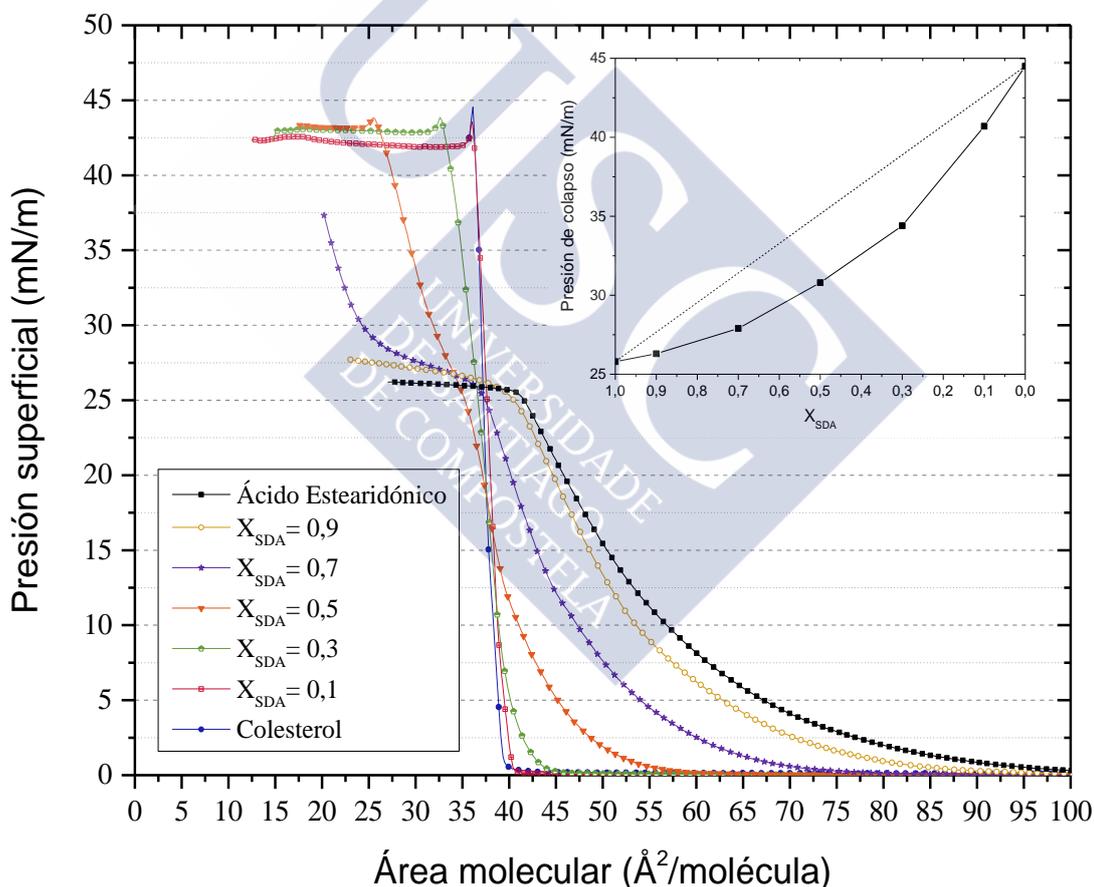


Figura 4.15.A.- Curvas π -A de monocapas de **ácido estearidónico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9) obtenidas a 10 °C, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$. En la gráfica interna se muestran los valores de colapso frente a la fracción molar.

El colapso de las monocapas de las mezclas ocurre a valores de presión superficial intermedios respecto del registrado por los films de los componentes puros, y su valor se ve incrementado al aumentar la presencia de colesterol (interior **Figura 4.15.A**), lo cual nos indica que los dos componentes son miscibles a lo largo del rango de las mezclas.

En la **Figura 4.15.B** se muestran los módulos de compresibilidad. En la misma, se pone de manifiesto el elevado poder de condensación que presenta el colesterol sobre los ácidos grasos insaturados. Se puede observar como aumenta la resistencia de las monocapas de las mezclas a ser comprimidas a medida que el colesterol se encuentra más presente. De la misma forma, la adición de ácido linoleico provoca una disminución en la rigidez de las monocapas.

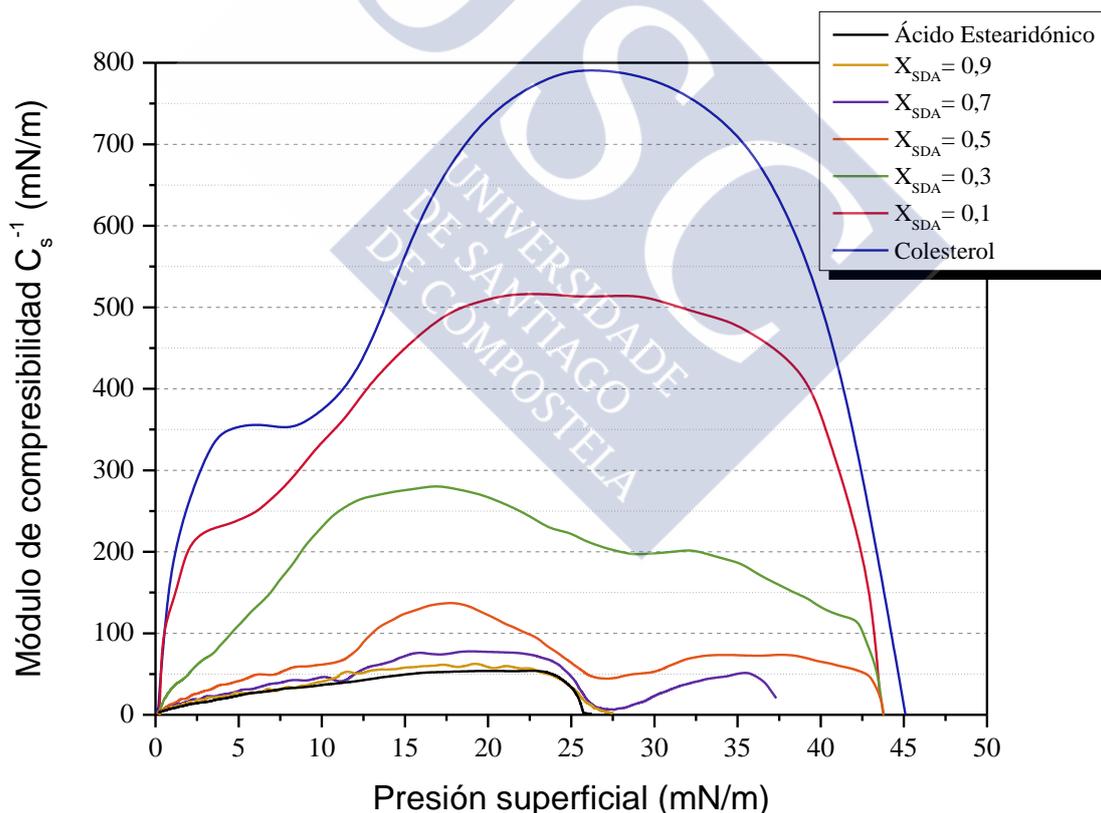


Figura 4.15.B.- Módulos de compresibilidad correspondientes a las isothermas π -A de monocapas de ácido estearidónico, colesterol y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9).

La representación tridimensional del módulo de compresibilidad frente a la presión superficial pone de manifiesto de forma clara el elevado poder condensador del colesterol (**Figura 4.16.C**).

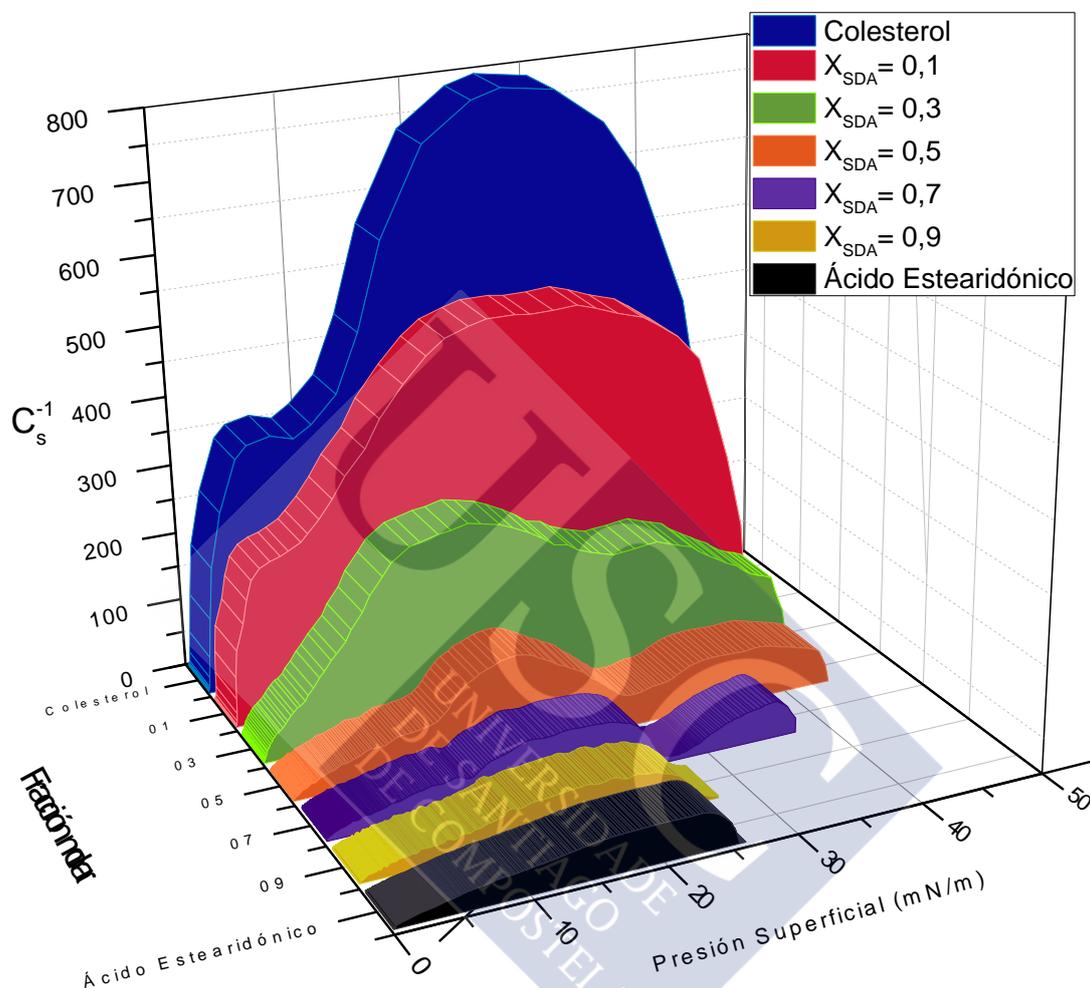


Figura 4.15.C.- Representación tridimensional de los módulos de compresibilidad frente a la presión de monocapas de **ácido esteáridónico, colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**) obtenidas a 10 °C.

En la **Figura 4.15.D** se muestran los módulos de compresibilidad individuales para cada mezcla. Los valores de módulo de compresibilidad a diferentes presiones superficiales así como los valores máximos alcanzados correspondientes a estos sistemas se recogen en la **Tabla 4.15.A**.

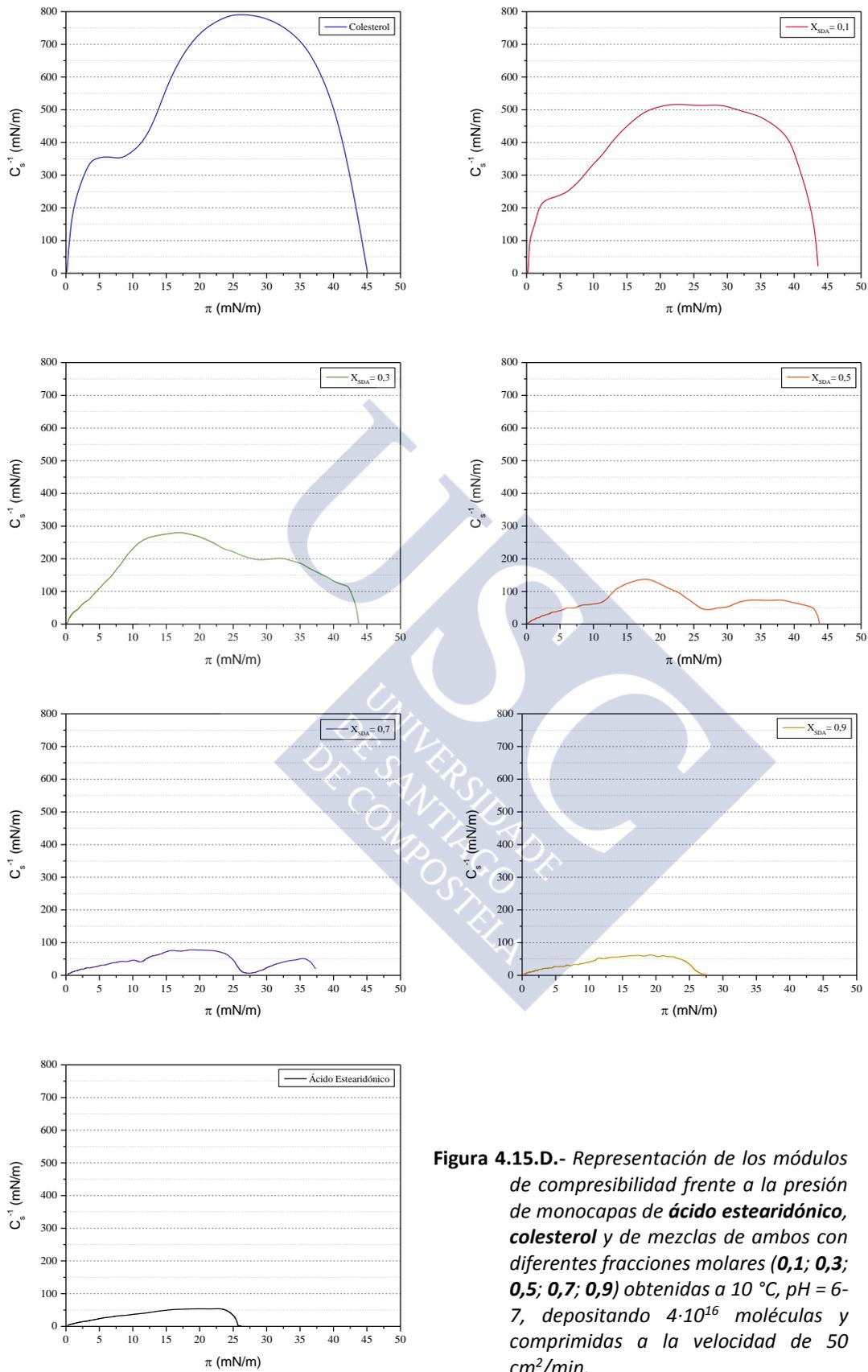


Figura 4.15.D.- Representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión de monocapas de **ácido estearidónico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1**; **0,3**; **0,5**; **0,7**; **0,9**) obtenidas a 10 °C, pH = 6-7, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimidas a la velocidad de 50 cm^2/min .

Módulo de compresibilidad (mN/m)							
X_{SDA}	$\pi = 2,5$	$\pi = 5$	$\pi = 10$	$\pi = 15$	$\pi = 20$	$\pi = 25$	C_s^{-1} máximo
Colesterol	289,41	353,18	373,91	562,99	731,55	788,63	790,6
0,1	217,17	234,78	326,64	445,48	517,95	512,82	519,28
0,3	61,32	109,92	230,32	275,81	266,89	221,85	280,49
0,5	25,42	41,92	63,32	124,19	124,19	64,44	137,57
0,7	18,73	29,43	46,38	71,57	77,59	47,49	78,93
0,9	17,61	26,76	41,25	57,97	58,42	34,11	62,65
Ácido estearidónico	14,27	23,63	36,57	49,49	53,73	33,67	53,96

Tabla 4.15.A.- Valores de los módulos de compresibilidad a diferentes presiones superficiales de monocapas mixtas de **ácido estearidónico y colesterol** a diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**).



4.15.2 Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla

4.15.2.1 Mezcla $X_{SDA} = 0,9$

En la **Figura 4.15.E** se muestran la isoterma π -A y la curva del espesor relativo correspondientes a la monocapa mixta de ácido estearidónico y colesterol con fracción molar $X_{SDA} = 0,9$. Se registra un valor de espesor de 0,5 nm al comienzo de la compresión coincidiendo con el estado *gas*, valor muy próximo a los 0,49 nm registrados en la fase *gas* de la monocapa del ácido graso puro. En este estado es de esperar que las moléculas de colesterol se encuentren con una inclinación de 13° , de la misma forma que en su propia monocapa.

Las imágenes correspondientes a esta fase *gas* ofrecen resultados muy similares a los obtenidos para la monocapa de este ácido graso puro. En efecto, tal como se observa en la **Imagen A**, la fotografía es completamente homogénea. Sin embargo, en ciertas ocasiones se ven algunos dominios ovoides oscuros huecos producidos por la presencia de colesterol en la mezcla (**Imágenes B y C**), debido a su tendencia a formar estructuras espumosas con huecos oscuros de sustrato acuoso.

Cuando se produce el inicio del incremento de la presión superficial, tiene lugar la escalada lenta y continua del espesor, registrándose una imagen completamente homogénea (**Imagen D**) desde el comienzo del estado de *líquido expandido* hasta su final.

En el instante previo al colapso, el espesor relativo registrado es de 0,83 nm., exactamente el mismo valor registrado para la monocapa de este ácido graso omega-3. Por otro lado, se vio que el colesterol obtenía valores superiores a 1,1 nm tras su transición a estado *sólido*. Estos datos nos invitan a pensar que existe cierta interacción entre ambos componentes, la cual impide que el colesterol alcance los valores de espesor tan elevados que logra por sí mismo.

El colapso de la monocapa se produce simultáneamente a un cambio de pendiente en el incremento del espesor, ya que el registro del mismo aumenta de forma notable. Al mismo tiempo, se registra la **Imagen E**, la cual muestra la formación de las estructuras embrionarias de colapso que aumentan en tamaño y número al reducir la superficie disponible para el film (**Imagen F**).

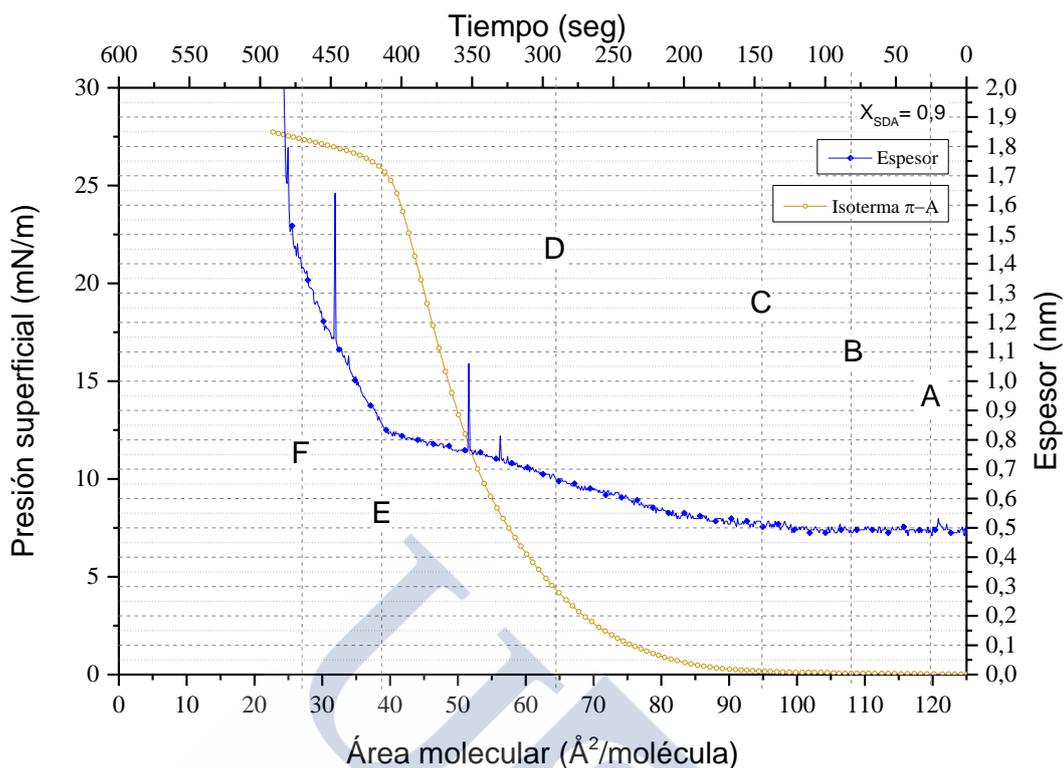


Figura 4.15.E.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido estearidónico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{SDA} = 0,9$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

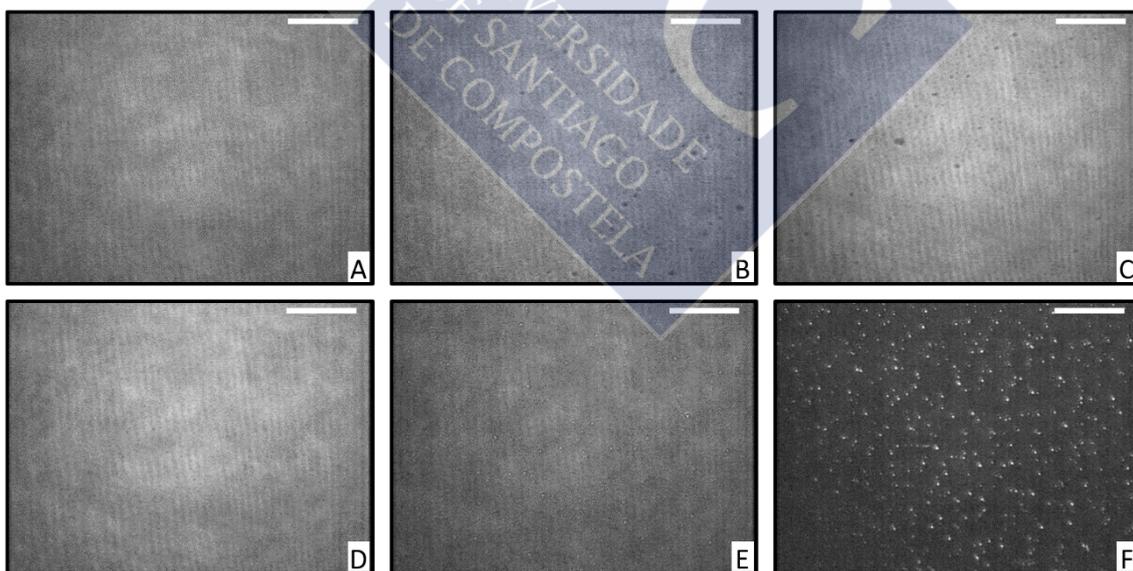


Ilustración 4.15.A.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido estearidónico** y **colesterol** ($X_{SDA} = 0,9$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.15.2.2 Mezcla $X_{SDA} = 0,7$

Las imágenes microscópicas tomadas para la mezcla de ácido estearidónico y colesterol con $X_{SDA} = 0,7$ son muy similares a las obtenidas para la mezcla 0,9. Durante la fase *gas* en alguna de ellas se observa con más claridad estructuras vistas anteriormente en la monocapa de colesterol puro, como los dominios observados en la parte superior de la **Imagen A**. Al disminuir el área molecular, las imágenes se vuelven más homogéneas con la presencia de diminutos huecos oscuros de forma circular producidos por la presencia de colesterol (**Imágenes B y C**).

El valor del espesor relativo obtenido durante el estado *gas* fue de 0,5 nm, consistente con el registrado por la monocapa del ácido graso insaturado cuando se encuentra en dicho estado.

La isoterma π -A es más condensada que la anterior y alcanza mayores valores de presión superficial, resultado esperado dada la mayor presencia de colesterol en la mezcla.

El incremento de la presión superficial sucede de forma simultánea al del espesor relativo. Al producirse este aumento las moléculas de ambos componentes inician un cambio conformacional en el que, de forma lenta y continua, sus ángulos de inclinación se ven incrementados y sus partes hidrófobas se alejan de la superficie acuosa. Así pues, la monocapa sufre una transición a un estado de *líquido expandido*, confirmado por la imagen microscópica homogénea que presenta a lo largo de esta fase (**Imagen D**).

El espesor obtenido al final del estado de *líquido expandido* es de 0,91 nm superior en ocho centésimas al obtenido por el ácido graso puro en este punto crítico previo al colapso.

Finalmente se produce el colapso, claramente marcado por el aumento repentino de la pendiente del espesor relativo. En las **Imágenes E y F** se muestran los dominios brillantes claros correspondientes a dicho fenómeno en una fase más temprana y otra más madura, respectivamente.

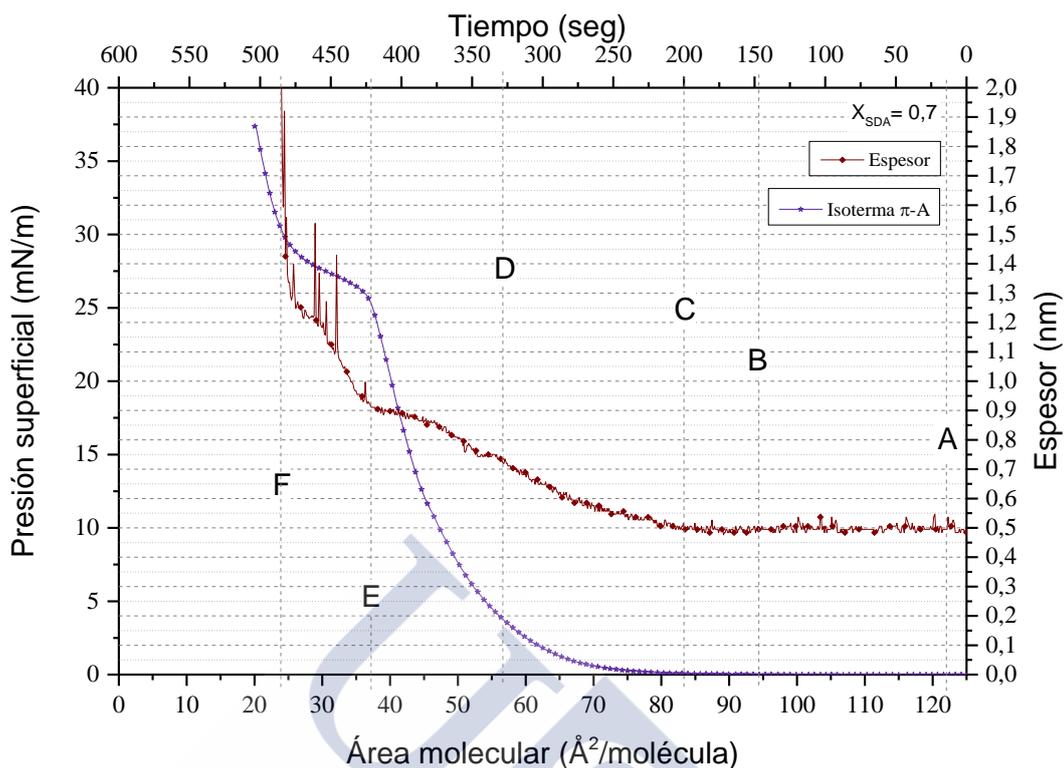


Figura 4.15.F.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido estearidónico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{SDA} = 0,7$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

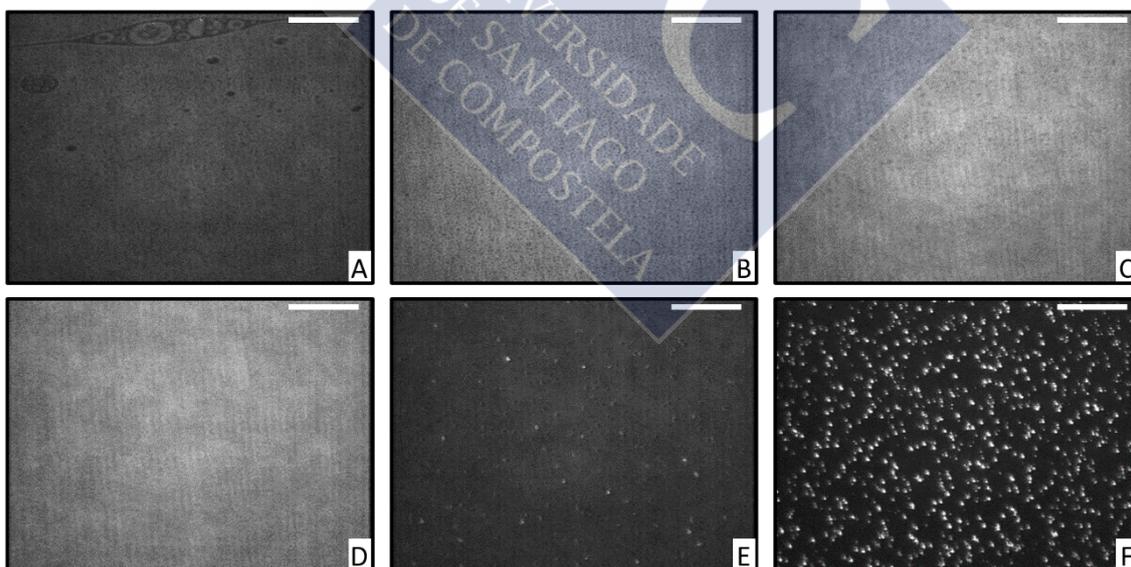


Ilustración 4.15.B.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido estearidónico** y **colesterol** ($X_{SDA} = 0,7$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.15.2.3 Mezcla $X_{SDA} = 0,5$

Los valores de espesor registrados al inicio de la compresión (**Figura 4.15.G**) coincidiendo con la monocapa en estado *gas* nos muestran la misma situación que las vistas en las mezclas analizadas anteriormente. Esta mezcla equimolar mantiene durante toda esta fase un espesor promedio de 0,5 nm, valor que coincide con el registrado por la monocapa del propio ácido graso insaturado.

Las **Imágenes A**, tomada a elevados valores de área superficial, muestra dominios de ambos componentes en su estado *gas*. A medida que continúa la compresión, el área molecular disponible se reduce y las zonas oscuras correspondientes al sustrato acuoso desaparecen. Las **Imágenes B y C** muestran una gran reducción de estas zonas oscuras, mientras que los dominios de las mezclas ocupan la totalidad de la superficie disponible.

Antes de que se inicie el aumento de la presión superficial se produce el incremento del espesor relativo de forma paulatina, siendo este hecho un indicador del cambio conformacional experimentado por las moléculas en virtud del cual aumentan su grado de inclinación respecto a la superficie del sustrato. La razón por la que no se produce el incremento de espesor y presión superficial de forma simultánea radica en la mayor condensación presentada por la monocapa, lo cual da como resultado este decalaje típico de fases condensadas.

Así pues, la subida del espesor presenta una desaceleración a los 0,97 nm, tras la cual prosigue ascendiendo hasta 1,17, momento en el que la subida registrada asciende de forma abrupta. Durante esta fase *condensada* se toma la **Imagen D** a $\pi = 15$ mN/m, homogénea en su totalidad.

El colapso se muestra en el microscopio en forma de “embriones” o gérmenes característicos de dicho fenómeno (**Imagen E**). Como se puede observar en la **Imagen F** al disminuir el área se ve con mayor claridad la formación de estructuras brillantes tridimensionales correspondientes a la fase colapsada.

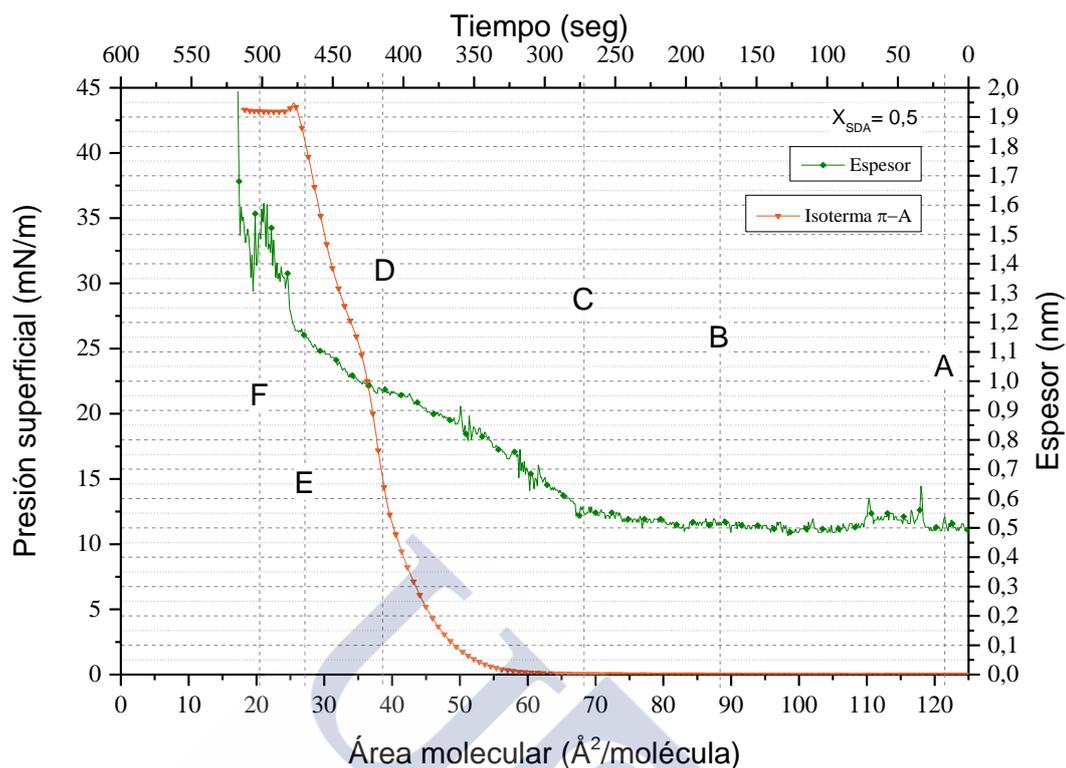


Figura 4.15.G.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido estearidónico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{SDA} = 0,5$ y espesor relativo obtenidas a 10 °C, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

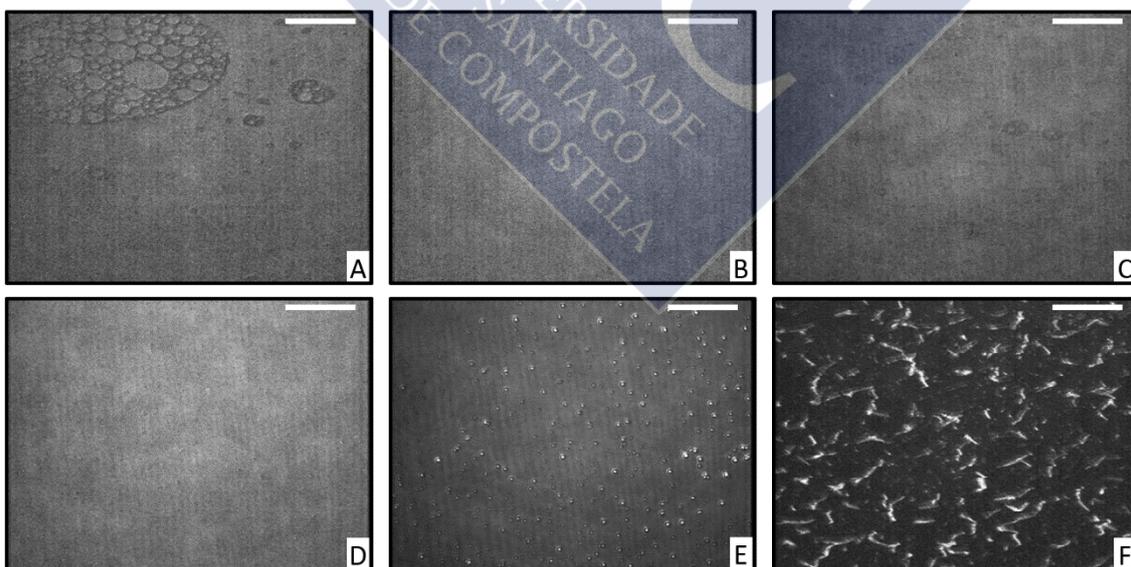


Ilustración 4.15.C.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido estearidónico** y **colesterol** ($X_{SDA} = 0,5$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.15.2.4 Mezcla $X_{SDA} = 0,3$

La monocapa correspondiente a la mezcla de ácido estearidónico y colesterol de fracción molar $X_{SDA} = 0,3$ registra un elevado ruido de espesor relativo durante su fase *gas*. El valor promedio de espesor obtenido mientras la monocapa permanece en este estado es de 0,54 nm, próximo al obtenido por la monocapa del ácido graso cuando se encuentra en esta fase.

Las imágenes tomadas a áreas elevadas muestran dominios en forma de “espumas” característicos del colesterol, zonas grisáceas uniformes propias del estearidónico y otras regiones oscuras correspondientes al sustrato acuoso (**Imágenes A y B**). A medida que se comprime la monocapa, la imagen se vuelve homogénea paulatinamente como se puede observar en la **Imagen C**.

Tal como muestra la **Figura 4.15.H** existe un evidente desfase entre las dos curvas en el inicio del incremento del espesor relativo respecto al de la presión superficial debido que la monocapa generada presenta una importante condensación.

Cuando se alcanza un área de $50 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ el espesor relativo experimenta un aumento repentino hasta alcanzar los 1,15 nm, momento en el cual su ascenso se vuelve más lento y con menos ruido hasta alcanzar un valor ligeramente inferior a los 1,48 nm. Al llegar a este punto y como consecuencia del colapso de la monocapa se registra un incremento abrupto del espesor. Al comparar estos valores de espesor con los obtenidos por las monocapas de los componentes puros se postula que en un primer momento se produce un incremento repentino de la inclinación de las moléculas de colesterol, adoptando así una conformación perpendicular a la superficie acuosa. A continuación, su resto radical alquílico gira de forma progresiva desde una posición paralela a la superficie a otra perpendicular, logrando así un valor próximo al máximo espesor relativo obtenido por la monocapa de colesterol puro.

La **Imagen E** muestra los dominios brillantes característicos del colapso. Al reducirse el área molecular estos dominios se agrupan dando lugar a estructuras cristalinas tridimensionales en forma de “bastones” de un tamaño de entre 8 y 10 μm (**Imagen F**).

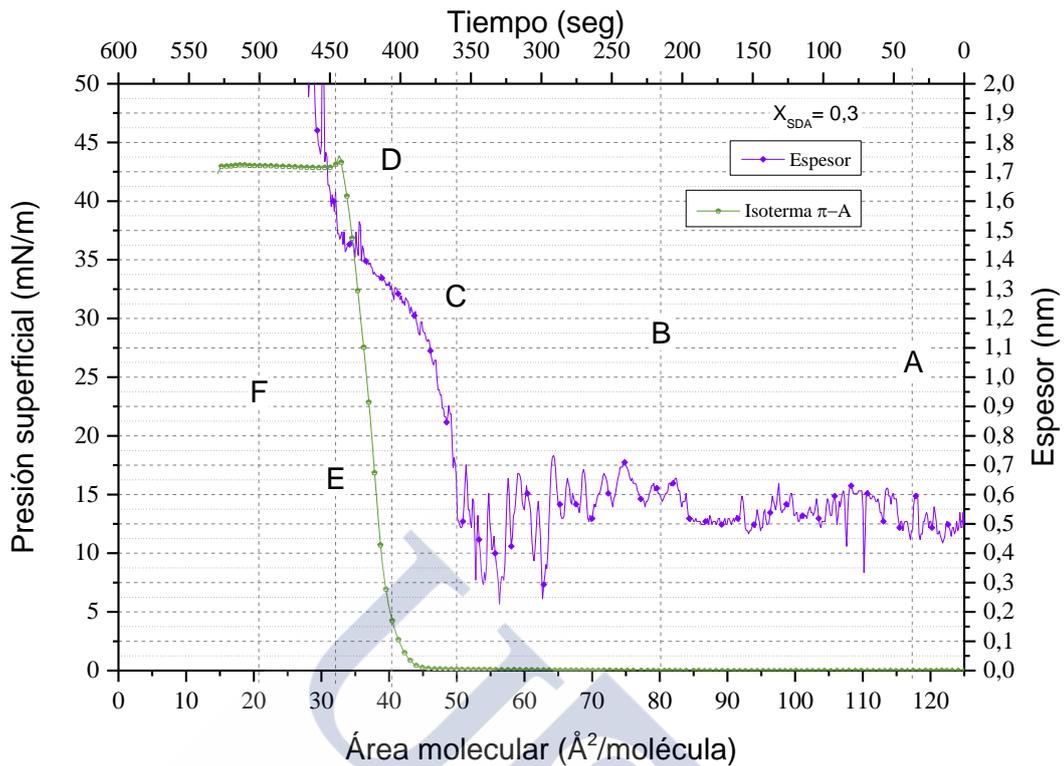


Figura 4.15.H.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido estearidónico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{SDA} = 0,3$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

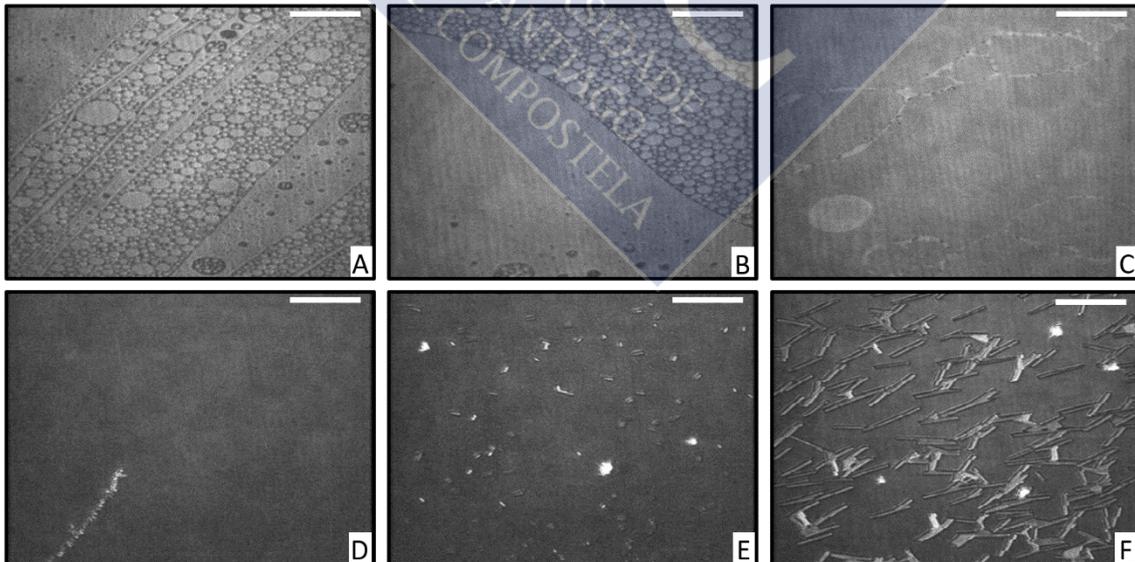


Ilustración 4.15.D.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido estearidónico** y **colesterol** ($X_{SDA} = 0,3$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.15.2.5 Mezcla $X_{SDA} = 0,1$

La monocapa de la mezcla de fracción molar $X_{SDA} = 0,1$ (**Figura 4.15.I**) presenta un elevado ruido del espesor relativo durante la fase *gas*. Al inicio de la compresión muestra unos valores comprendidos entre los 0,25 nm y 0,5 nm, similares a los obtenidos por las monocapas de los componentes puros, colesterol y ácido estearidónico respectivamente. Posteriormente, el espesor relativo presenta una leve tendencia al alza. A $51 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ se produce una subida repentina del mismo hasta los 1,15 nm, característicos del colesterol.

Las **Imágenes A y B**, correspondientes al estado *gas* de la monocapa, muestran dominios en forma de “espumas” y esféricos típicos del colesterol. Al reducir el área molecular, se observa una imagen más homogénea debido a que la monocapa mixta ocupa progresivamente la totalidad de la superficie (**Imagen C**).

De la misma forma que ocurre con las monocapas más condensadas, se produce de nuevo un decalaje entre el aumento del espesor relativo y el de la presión superficial

El incremento repentino del espesor hasta alcanzar los 1,15 nm corresponde al cambio conformacional de las moléculas del colesterol, tal como se comentó anteriormente. Así, el grupo esteroano de esta molécula adopta una posición vertical, perpendicular a la superficie del sustrato acuoso. Posteriormente, el incremento del espesor hasta los 1,5 nm sugiere que el resto radical alquílico del esteroal cambia su inclinación desde una posición horizontal a otra vertical. Por último, el aumento abrupto del espesor se corresponde con la fase colapsada.

Tal como se puede observar en la **Imagen D**, la fase *condensada* muestra una fotografía completamente homogénea. Sin embargo, al producirse el colapso de la monocapa se observan “embriones” o gérmenes propios de esta fase (**Imagen E**). Dichos dominios se agrupan generando estructuras brillantes tridimensionales en forma de “bastones” (**Imagen F**).

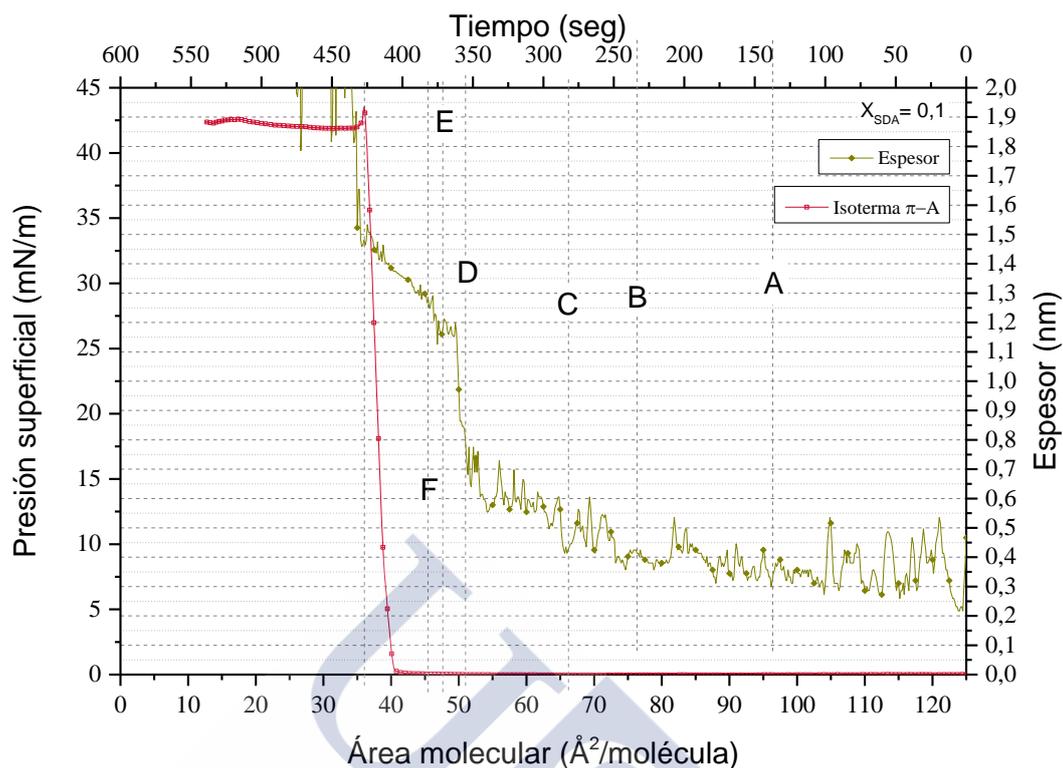


Figura 4.15.I.- Curva π -A de la monocapa mixta de ácido estearidónico y colesterol correspondiente a la fracción molar de $X_{SDA} = 0,1$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

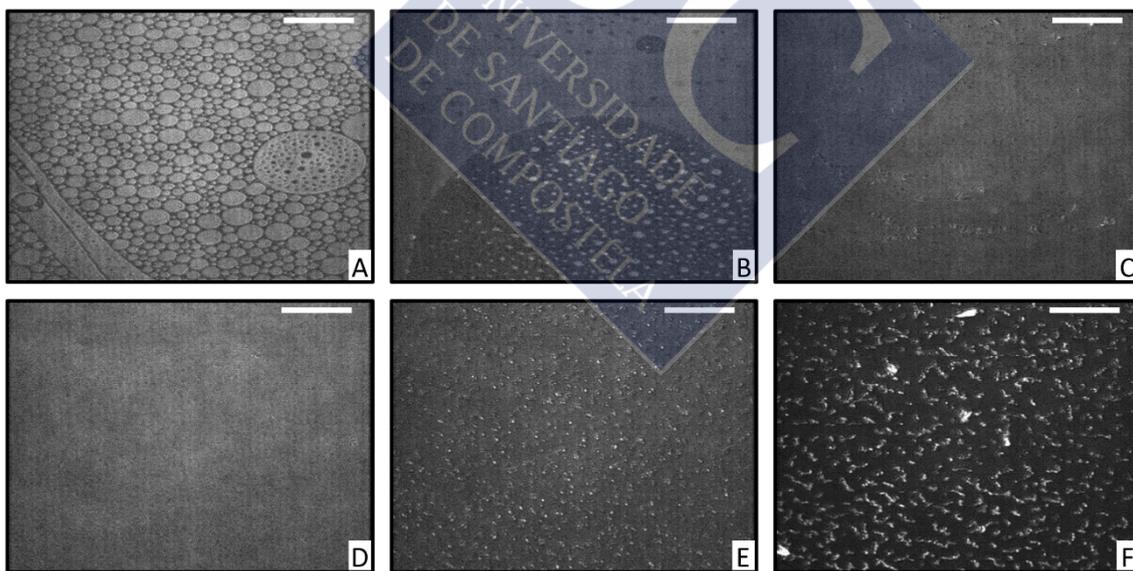


Ilustración 4.15.E.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido estearidónico y colesterol ($X_{SDA} = 0,1$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\ \mu\text{m}$.

4.15.3 Área molecular media

La representación del área molecular media en función de la fracción molar de ácido α -linolénico, medida a diferentes presiones superficiales da origen a las curvas que se muestran en la **Figura 4.15.J**. En ella se pone de manifiesto la existencia de desviaciones de la ley de aditividad de las áreas a diferentes valores de presión superficial. Dichas desviaciones son negativas y más acusadas cuanto menor sea la presión.

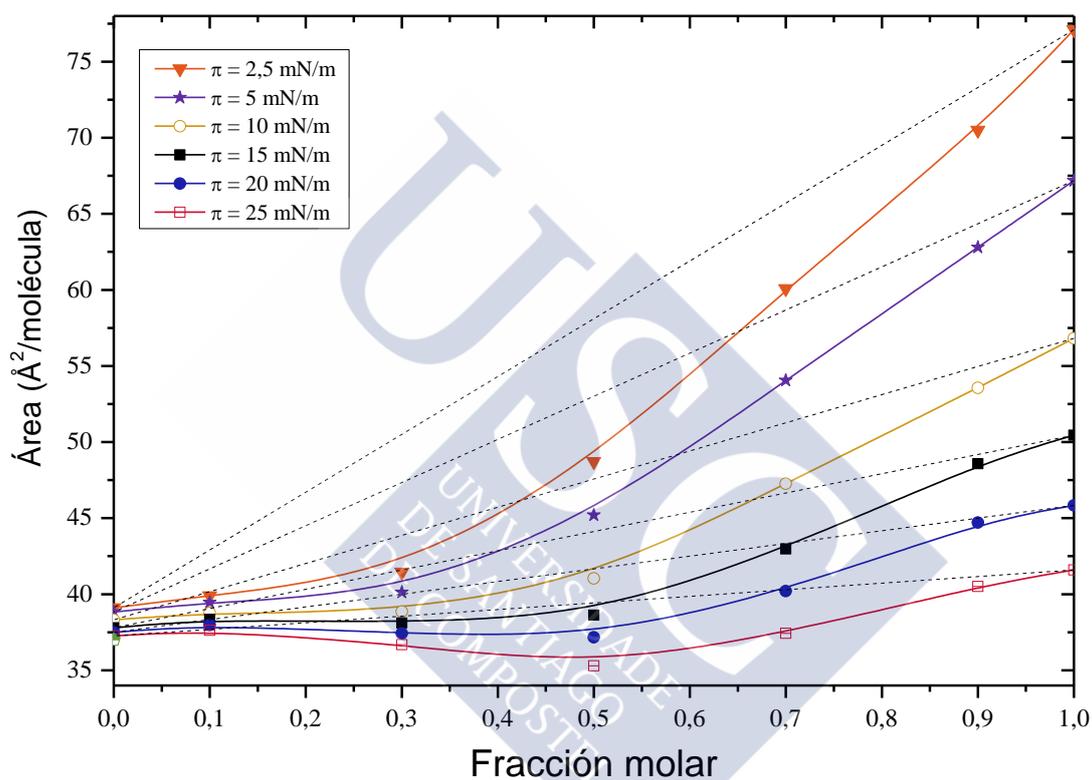


Figura 4.15.J.- Representación del área molecular media frente a la fracción molar de ácido estearidónico de la mezcla SDA/COL, a los valores de presión superficial indicados.

4.15.4 Funciones de exceso

4.15.4.1 Área de exceso

El área de exceso frente a la fracción molar del ácido estearidónico se muestra en la **Figura 4.15.K**. Todos los valores determinados son negativos a todas las presiones superficiales. Las mayores desviaciones del comportamiento ideal se obtienen en las mezclas de composición 0,5 y 0,3 de ácido graso, siendo estas desviaciones menores con el aumento de la presión.

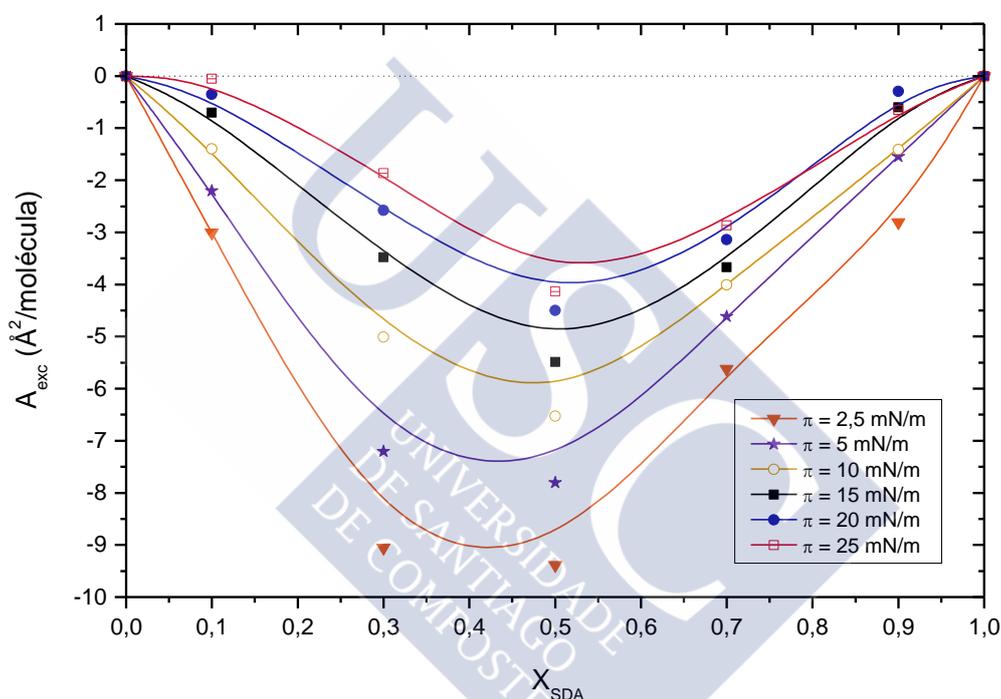


Figura 4.15.K.- Representación del área de exceso de la mezcla SDA/COL frente a la fracción molar de ácido estearidónico en dicha mezcla, a los valores de presión superficial indicados.

4.15.4.2 Energía libre de exceso (ΔG_{exc})

Con el fin de realizar un análisis termodinámico de la interacción entre el ácido estearidónico y el colesterol, se calculó la energía libre de exceso (ΔG_{exc}) de las monocapas mixtas a partir del área bajo las curvas π -A correspondientes a las mezclas y a los componentes puros.

Como se puede observar en la **Figura 4.15.L**, los valores obtenidos son todos negativos a cualquier fracción molar del sistema y a cualquier presión superficial. Esta situación se corresponde con las condiciones termodinámicas de los sistemas de monocapas binarias en las que se producen fuertes interacciones entre sus componentes.

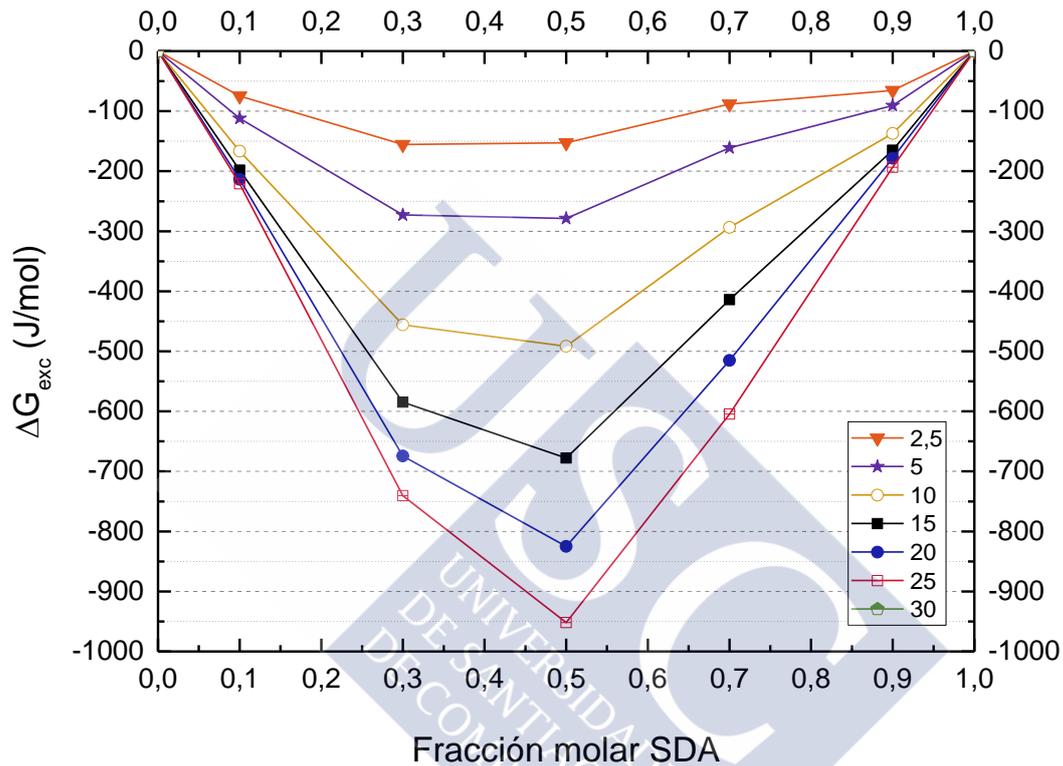


Figura 4.15.L.- Representación de la energía libre de exceso para el sistema SDA/COL frente a la fracción molar de ácido estearidónico en dicha mezcla, a los valores de presión superficial indicados.

Los valores de energía libre de exceso se vuelven más negativos al aumentar la presión superficial, lo que nos indica que la interacción entre estos dos componentes es mayor a elevadas presiones. Los mayores valores se alcanzan con la fracción molar de $X_{SDA} = 0,5$ del sistema SDA/COL. Esto nos indica que los films más estables formados por ácido estearidónico y colesterol se obtienen con una proporción de 1:1.

4.16 MEZCLA DE ÁCIDO EICOSADIENOICO CON COLESTEROL

4.16.1 Isotermas π -A y módulos de compresibilidad

El comportamiento de las monocapas de la mezcla de ácido eicosadienoico y colesterol (**Figura 4.16.A**) es muy similar al observado en los sistemas de ácido graso insaturado y colesterol estudiados anteriormente. Cuando el ácido eicosadienoico es el componente mayoritario de la mezcla (curvas 0,7 y 0,9), las monocapas presentan un estado de *líquido expandido*. Sin embargo, cuando se encuentra en menor proporción (curvas 0,1 y 0,3), las isotermas obtenidas se corresponden a monocapas de tipo *sólido*. Así mismo, la mezcla equimolar da lugar a una monocapa con un comportamiento intermedio.

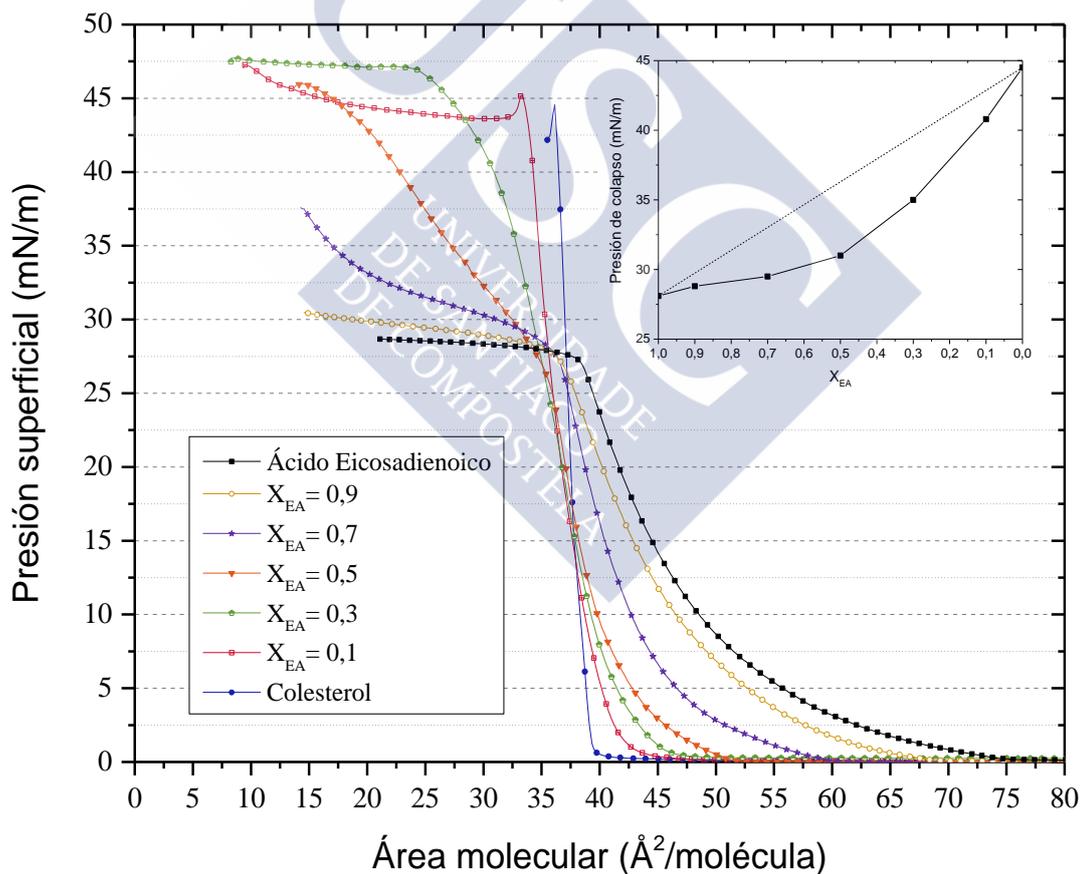


Figura 4.16.A.- Curvas π -A de monocapas de **ácido eicosadienoico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1**; **0,3**; **0,5**; **0,7**; **0,9**) obtenidas a 10 °C, pH = 6-7, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de 50 cm²/min. En la gráfica interna se muestran los valores de colapso frente a la fracción molar.

Tal como se observa en el interior de la **Figura 4.16.A**, el colapso de las mezclas ocurre a valores de presión superficial intermedios al de los componentes puros, y su valor se ve incrementado al aumentar la presencia de colesterol, lo cual nos indica que los dos componentes son miscibles.

En la **Figura 4.16.B** se muestran los módulos de compresibilidad. En dicha gráfica se puede observar como las monocapas con mayor proporción de colesterol presentan una mayor resistencia a la compresión. Así mismo, la mayor presencia del ácido eicosadienoico dota a las monocapas de una menor rigidez.

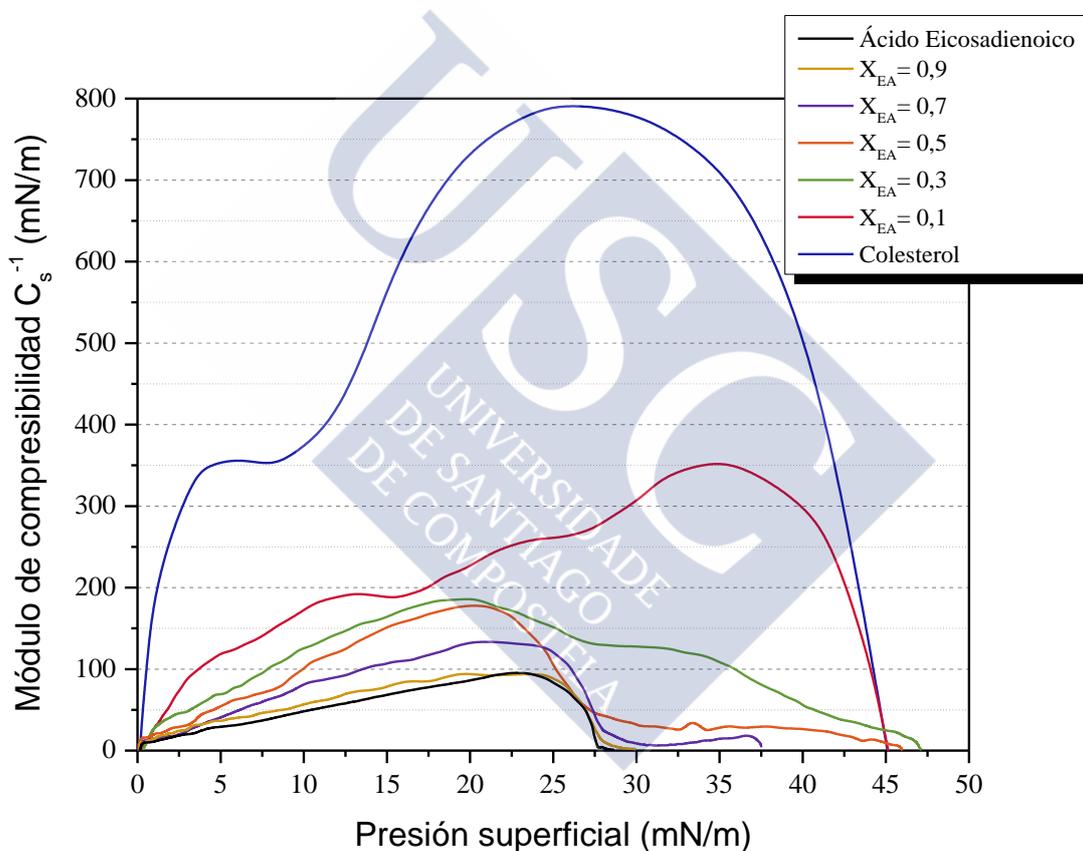


Figura 4.16.B.- Módulos de compresibilidad correspondientes a las isothermas π -A de monocapas de **ácido eicosadienoico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9).

La representación tridimensional del módulo de compresibilidad frente a la presión superficial pone de manifiesto de forma clara el poder condensador del colesterol (**Figura 4.16.C**).

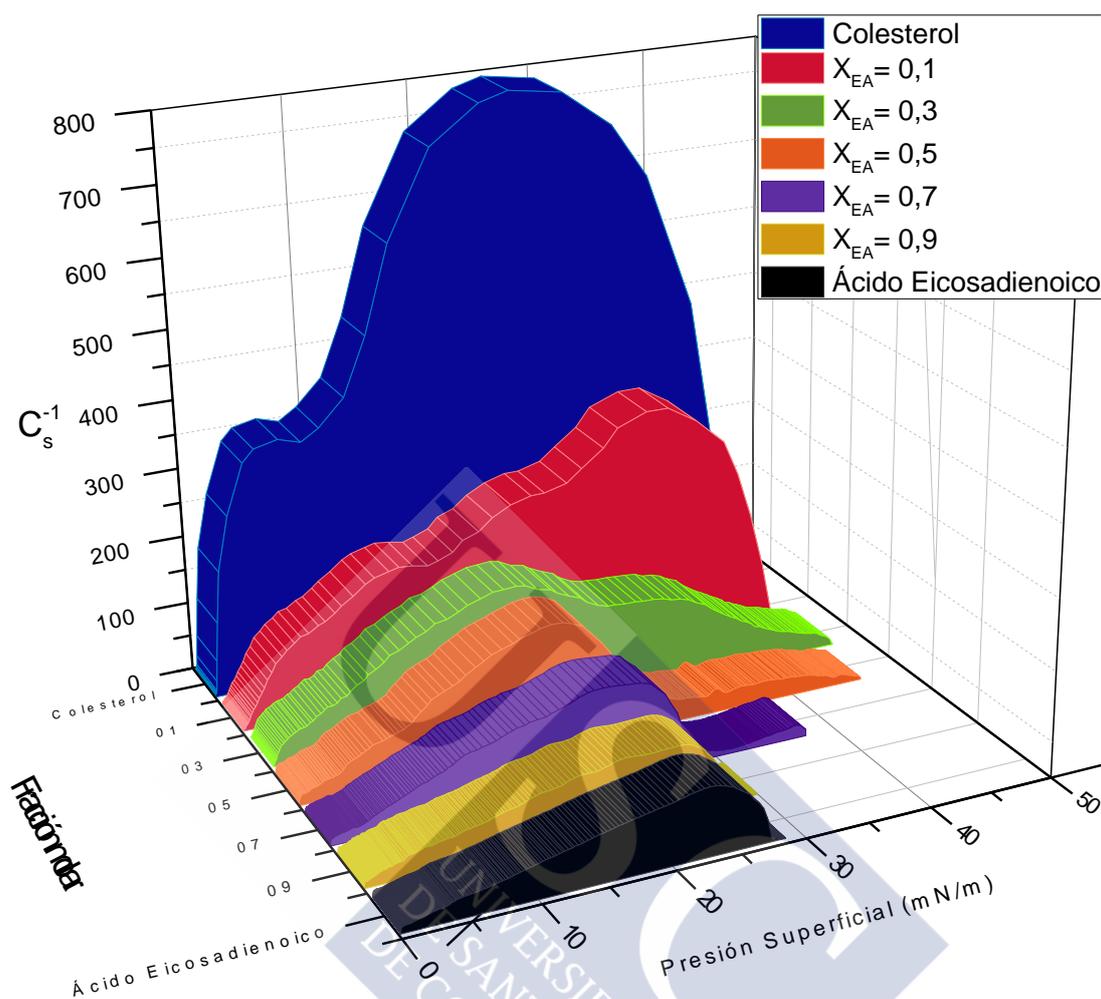


Figura 4.16.C.- Representación tridimensional de los módulos de compresibilidad frente a la presión de monocapas de **ácido eicosadienoico**, **colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9) obtenidas a 10 °C.

En la **Figura 4.16.D** se muestran los módulos de compresibilidad individuales para cada mezcla. Los valores de módulo de compresibilidad a diferentes presiones superficiales así como los valores máximos alcanzados correspondientes a estos sistemas se recogen en la **Tabla 4.16.A**.

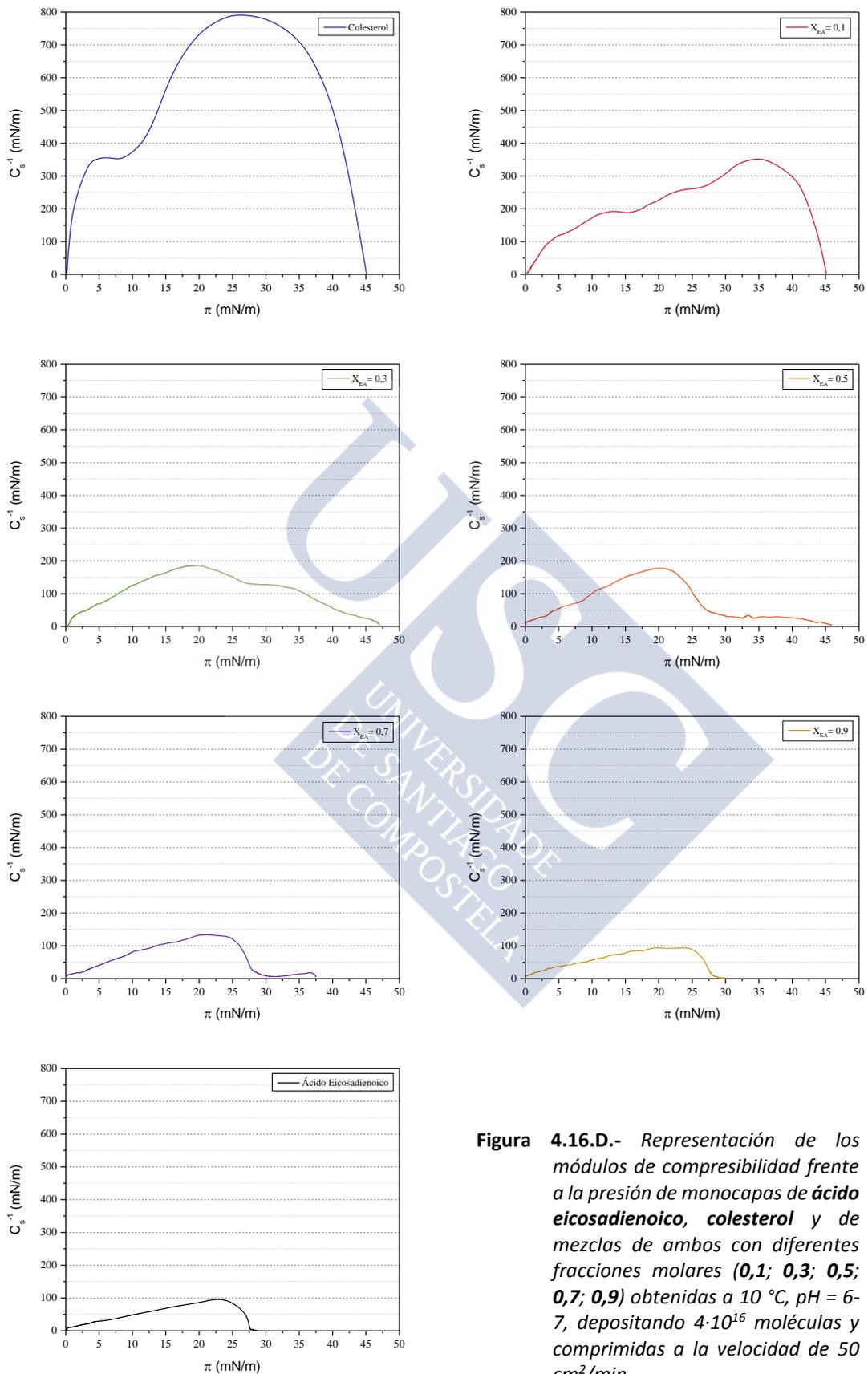


Figura 4.16.D.- Representación de los módulos de compresibilidad frente a la presión de monocapas de **ácido eicosadienoico, colesterol** y de mezclas de ambos con diferentes fracciones molares (**0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9**) obtenidas a 10 °C, pH = 6-7, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimidas a la velocidad de 50 cm^2/min .

Módulo de compresibilidad (mN/m)							
X_{EA}	$\pi = 2,5$	$\pi = 5$	$\pi = 10$	$\pi = 15$	$\pi = 20$	$\pi = 25$	C_s^{-1} máximo
Colesterol	289,41	353,18	373,91	562,99	731,55	788,63	790,6
0,1	72,91	118,62	172,35	188,63	226,98	261,09	351,62
0,3	45,71	69,34	125,53	164,33	185,95	151,62	185,73
0,5	28,99	54,18	101,23	152,29	177,26	104,12	177,48
0,7	20,07	40,8	81,16	107,02	132,22	120,62	133,56
0,9	24,08	36,12	56,41	78,04	93,87	88,74	94,54
Ácido eicosadienoico	18,51	29,21	48,38	68,45	86,29	83,39	95,43

Tabla 4.16.A.- Valores de los módulos de compresibilidad a diferentes presiones superficiales de monocapas mixtas de **ácido eicosadienoico** y **colesterol** a diferentes fracciones molares (0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9).



4.16.2 Microscopía BAM. Imágenes y espesor mezcla

4.16.2.1 Mezcla $X_{EA} = 0,9$

Al principio de la compresión la monocapa de la mezcla $X_{EA} = 0,9$ se encuentra en un estado *gas* durante el cual se registra un espesor similar al obtenido por la monocapa del ácido eicosadienoico puro (0,85 nm). Durante esta fase se registran imágenes microscópicas en las que se observan dominios claros de diferentes tamaños correspondientes al ácido graso rodeados de zonas oscuras propias del sustrato acuoso (**Imágenes A y B**). A medida que disminuye el área molecular los dominios ocupan toda la mayor parte de la superficie y, de forma simultánea, las regiones oscuras van desapareciendo (**Imagen C**).

Cuando el área molecular disminuye por debajo de los $69 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ la monocapa sufre una transición en virtud de la cual las moléculas que la constituyen aumentan su grado de inclinación respecto de la superficie acuosa. Esta circunstancia produce un incremento en la presión superficial y, simultáneamente, un aumento del espesor relativo. Como consecuencia, la monocapa entra en una fase de *líquido expandido* durante la cual se toma la **Imagen D** a la presión superficial de 10 mN/m. Esta fotografía es completamente homogénea como suele suceder cuando una monocapa se encuentra en este tipo de estados.

Cuando se alcanza el colapso el registro del espesor relativo sufre un aumento abrupto debido al solapamiento de moléculas y a la formación de multicapas. El microscopio registra un espesor de 1,25 nm en el momento previo a la ruptura de la monocapa. Este valor coincide con el obtenido para el ácido graso puro en este mismo punto. Por otro lado, el intervalo de la curva del espesor relativo correspondiente a la fase de *líquido expandido* muestra un crecimiento lineal, al contrario de lo que sucede con la monocapa de colesterol puro, en la cual sus moléculas cambiaban de conformación de forma inmediata. Así pues, se postula que durante este estado las moléculas de ambos componentes adoptan, de una forma lenta, una posición cada vez más vertical.

En la **Imagen E** se observan los gérmenes propios del colapso que, al asociarse, dan lugar a estructuras tridimensionales brillantes (**Imagen F**).

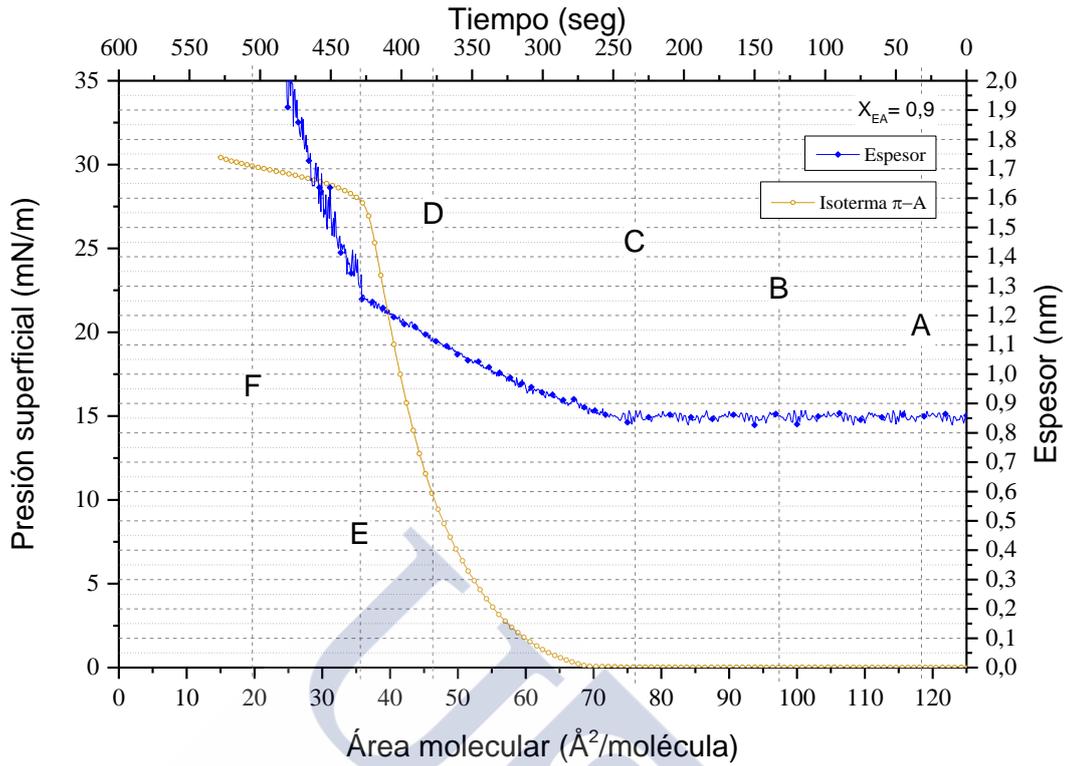


Figura 4.16.E.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido eicosadienoico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{EA} = 0,9$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

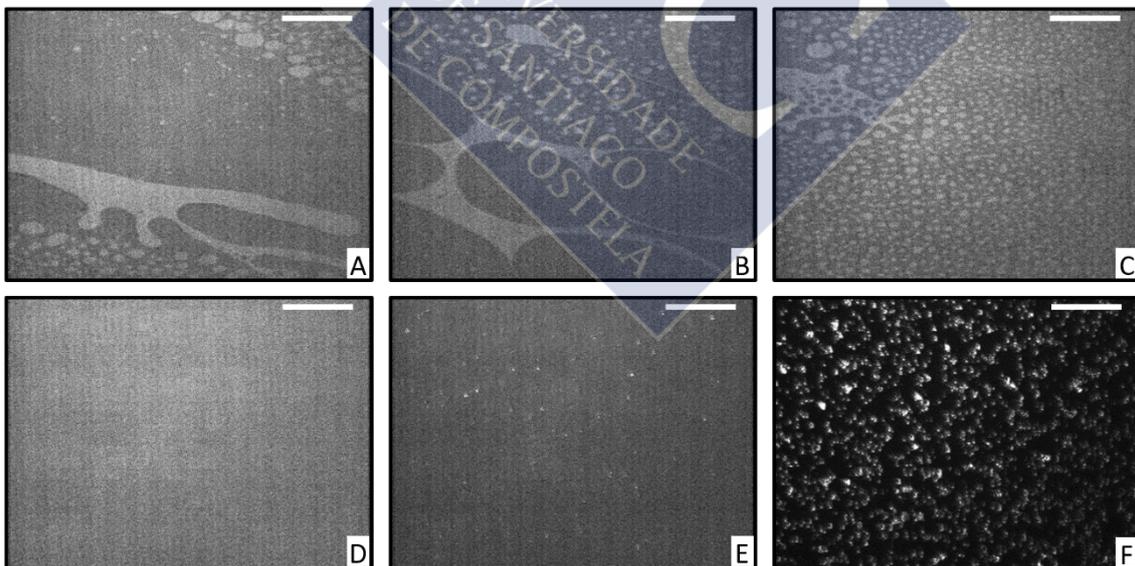


Ilustración 4.16.A.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por ácido eicosadienoico y colesterol ($X_{EA} = 0,9$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.16.2.2 Mezcla $X_{EA} = 0,7$

La monocapa de la mezcla con fracción molar $X_{EA} = 0,7$ presenta durante su estado *gas* dominios similares a los observados para el ácido graso puro. En efecto, la **Imagen A**, tomada a un área de $120 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ muestra dominios grisáceos conteniendo huecos oscuros con agua de forma ovalada. A medida que se reduce el área disponible los huecos correspondientes al sustrato acuoso disminuyen de tamaño mientras los dominios de la mezcla aumentan su presencia en la superficie (**Imagen B**). Cuando el área molecular se encuentra ligeramente por encima de la correspondiente al *lift-off*, la imagen mostrada es casi homogénea (**Imagen C**).

Durante el tiempo que la monocapa permanece en estado *gas*, el valor del espesor relativo registrado es aproximadamente de $0,85 \text{ nm}$, mismo valor que el de la monocapa del ácido graso puro cuando se encuentra en esta fase.

Cuando la monocapa dispone de un área de $60 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ se inicia el estado de *líquido expandido*. La curva del espesor relativo inicia un ascenso lineal hasta alcanzar los $1,15 \text{ nm}$, momento en el cual se produce el colapso de la monocapa. Dicho valor es el mismo que el registrado por la monocapa de ácido eicosadienoico puro. La gráfica muestra un leve aumento de la pendiente tras la ruptura del film. Así mismo, la presión superficial aumenta a medida que se reduce el área molecular disponible hasta presentar un cambio de pendiente fruto del colapso de la monocapa.

Al igual que la mezcla $X_{EA} = 0,9$ durante esta fase las moléculas de ambos componentes experimentan, de una forma progresiva, un cambio conformacional según el cual adoptan una posición cada vez más perpendicular a la superficie del sustrato acuoso.

A lo largo de la fase de *líquido expandido* se observa en todo momento una imagen homogénea, propia de dicho estado (**Imagen D**).

El colapso del film tiene como consecuencia la formación de los “embriones” o gérmenes propios de dicho fenómeno, observados en forma de puntos brillantes en la **Imagen E**. Al proseguir la compresión, estos dominios se unen dando lugar a estructuras tridimensionales brillantes (**Imagen F**).

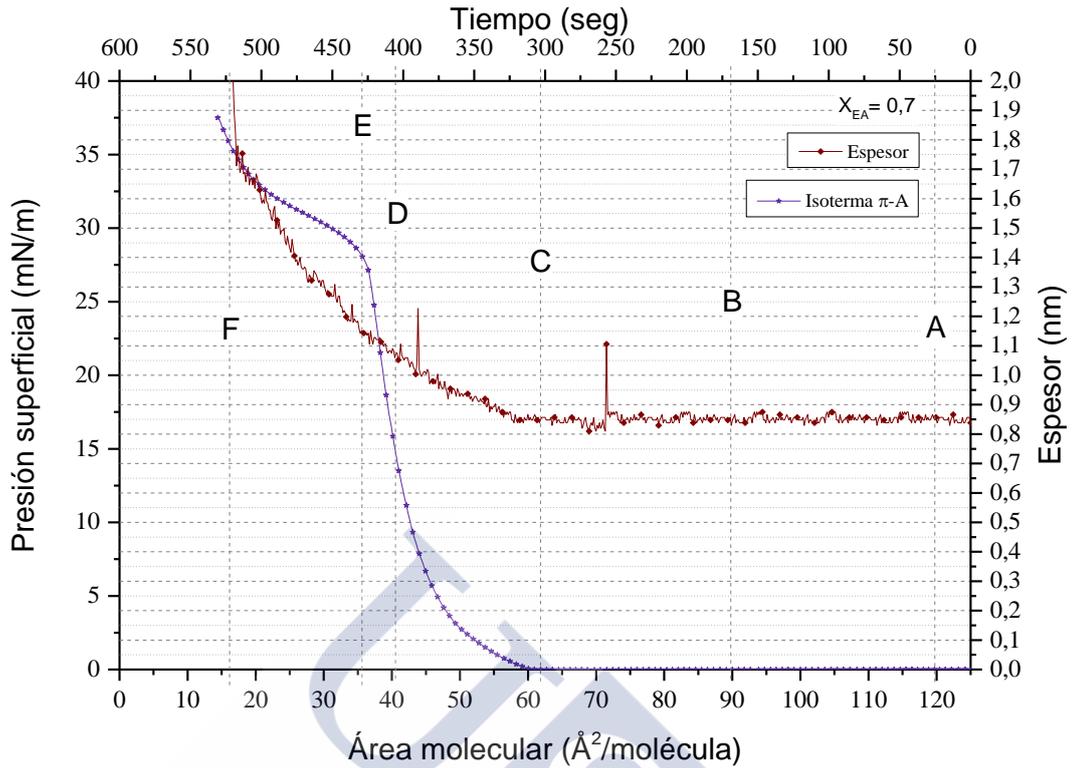


Figura 4.16.F.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido eicosadienoico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{EA} = 0,7$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

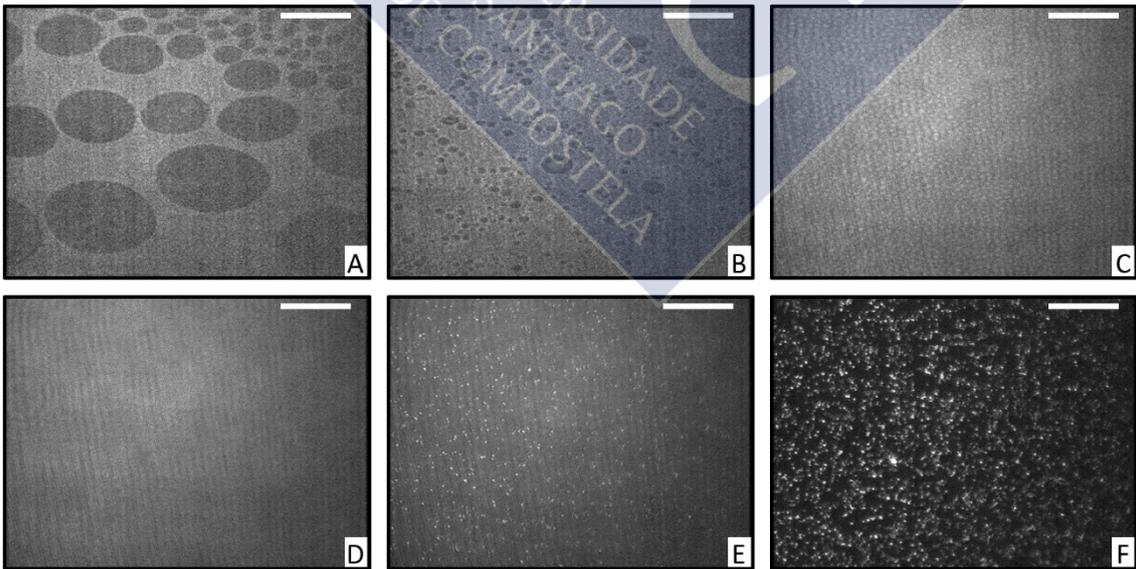


Ilustración 4.16.B.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido eicosadienoico** y **colesterol** ($X_{EA} = 0,7$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.16.2.3 Mezcla $X_{EA} = 0,5$

La curva de espesor-área molecular correspondiente a la monocapa de la mezcla equimolar de ácido eicosadienoico y colesterol muestra que durante el estado *gas* el valor registrado es aproximadamente el mismo que el de la monocapa del ácido graso puro (0,85 nm), de la misma forma que ocurría con las mezclas con ácido eicosadienoico como componente mayoritario.

Las imágenes microscópicas correspondientes a dicha fase muestran dominios correspondientes a ambos componentes. En efecto se observan claramente las estructuras grisáceas conteniendo huecos ovoides oscuros con agua propios del ácido eicosadienoico así como dominios en forma de “espumas” o “esponjas” grisáceas conteniendo agua característicos del colesterol (**Imágenes A y B**). A medida que se reduce el área molecular los dominios se van fusionando dando lugar a grandes estructuras ovoides de color claro rodeadas de sustrato acuoso (**Imagen C**).

Las moléculas que constituyen la monocapa sufren una transición en el momento en el que el área molecular desciende de $51,5 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$. En efecto, en este punto la curva del espesor indica que las moléculas adoptan paulatinamente una posición cada vez más vertical dando lugar a un incremento lineal del registro del mismo. La imagen registrada por el microscopio BAM es homogénea en su conjunto desde la presión superficial de 5 mN/m hasta el punto de colapso, tal como refleja la **Imagen D** tomada a 20 mN/m.

La curva del espesor relativo presenta una discontinuidad al alcanzar los 1,25 nm. En efecto, la pendiente disminuye ligeramente para, finalmente sufrir un abrupto ascenso.

Las **Imágenes E y F** muestran los dominios característicos del colapso en forma de puntos brillantes de tamaño pequeño al principio y, posteriormente, estructuras tridimensionales agrupadas en forma de racimos fruto de la fusión de los gérmenes del colapso.

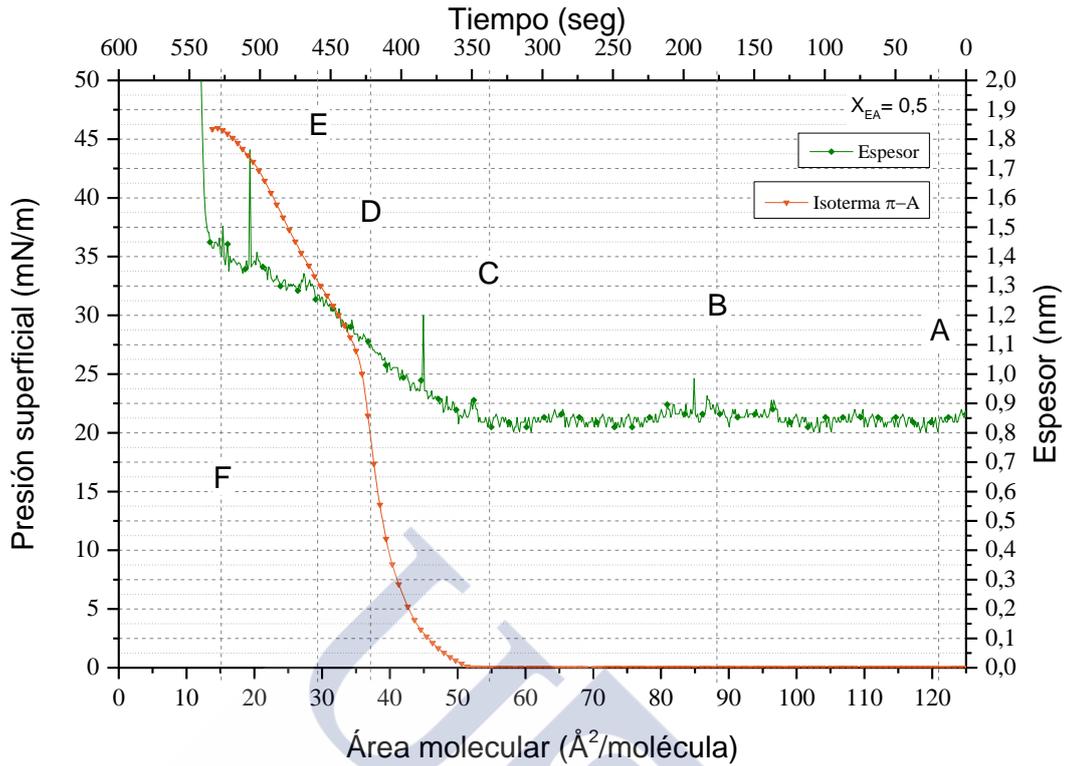


Figura 4.16.G.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido eicosadienoico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{EA} = 0,5$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

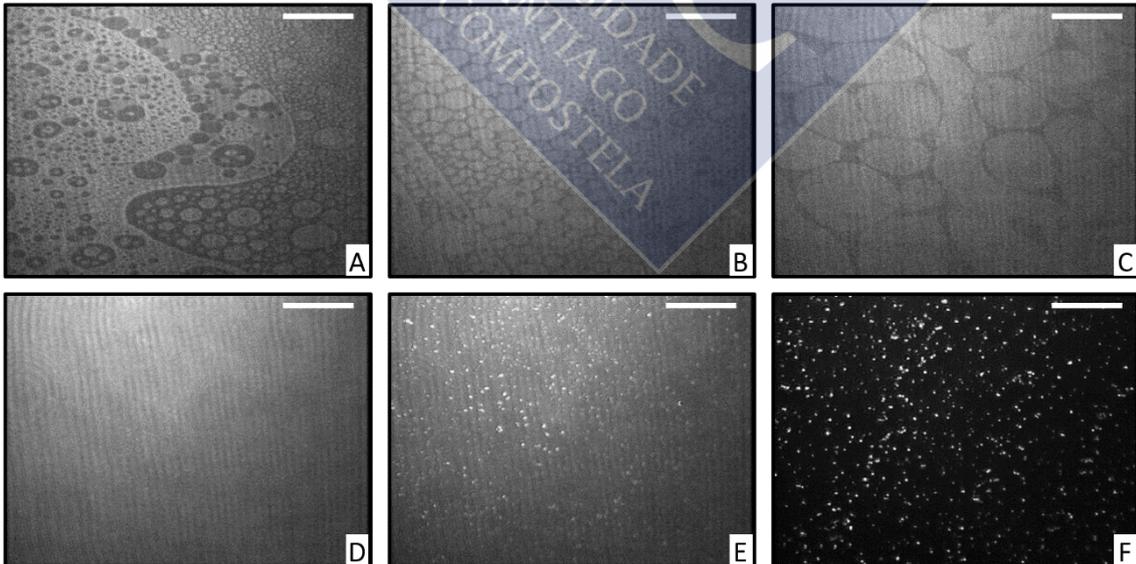


Ilustración 4.16.C.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido eicosadienoico** y **colesterol** ($X_{EA} = 0,5$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.16.2.4 Mezcla $X_{EA} = 0,3$

En comparación con las mezclas de ácido eicosadienoico y colesterol estudiadas hasta el momento, la monocapa de fracción molar $X_{EA} = 0,3$ presenta una curva de espesor-área con un elevado ruido, principalmente mientras la monocapa se encuentra en estado *gas*. Durante esta fase se observan dominios de ambos componentes entremezclados. En efecto, las **Imágenes A y B** muestran los dominios gris claro con huecos llenos de agua correspondientes al ácido eicosadienoico así como estructuras en forma de “espumas” propias del estero. Al reducirse el área disponible y antes del comienzo de la fase de *líquido expandido*, desaparecen paulatinamente las regiones oscuras del sustrato acuoso (**Imagen C**).

El microscopio registra un ascenso del espesor relativo antes de producirse la subida de presión superficial. Como vimos anteriormente, dicho decalaje es típico de monocapas de tipo *condensado*. El espesor aumenta como consecuencia del cambio de estado a *líquido condensado*, mostrando un primer tramo con mayor ruido hasta los 1,05 nm y un segundo hasta alcanzar un valor de 1,27 nm donde forma una pseudomeseta tras la cual sufre un incremento abrupto fruto de la formación de las estructuras tridimensionales del colapso.

Durante esta fase de *líquido condensado* se toma la **Imagen D** en la que se observan todavía unos dominios claros curvilíneos como consecuencia del reordenamiento molecular que sufren los componentes de la mezcla. Al reducirse el área molecular, durante el incremento de presión superficial se observa una imagen homogénea en su conjunto.

El colapso de la monocapa da lugar a las estructuras recogidas en la **Imagen E** en la que se observan los “embriones” o gérmenes característicos de dicho fenómeno en forma de puntos brillantes. La fusión de los mismos genera estructuras brillantes tridimensionales de mayor tamaño propias de la fase colapsada (**Imagen F**).

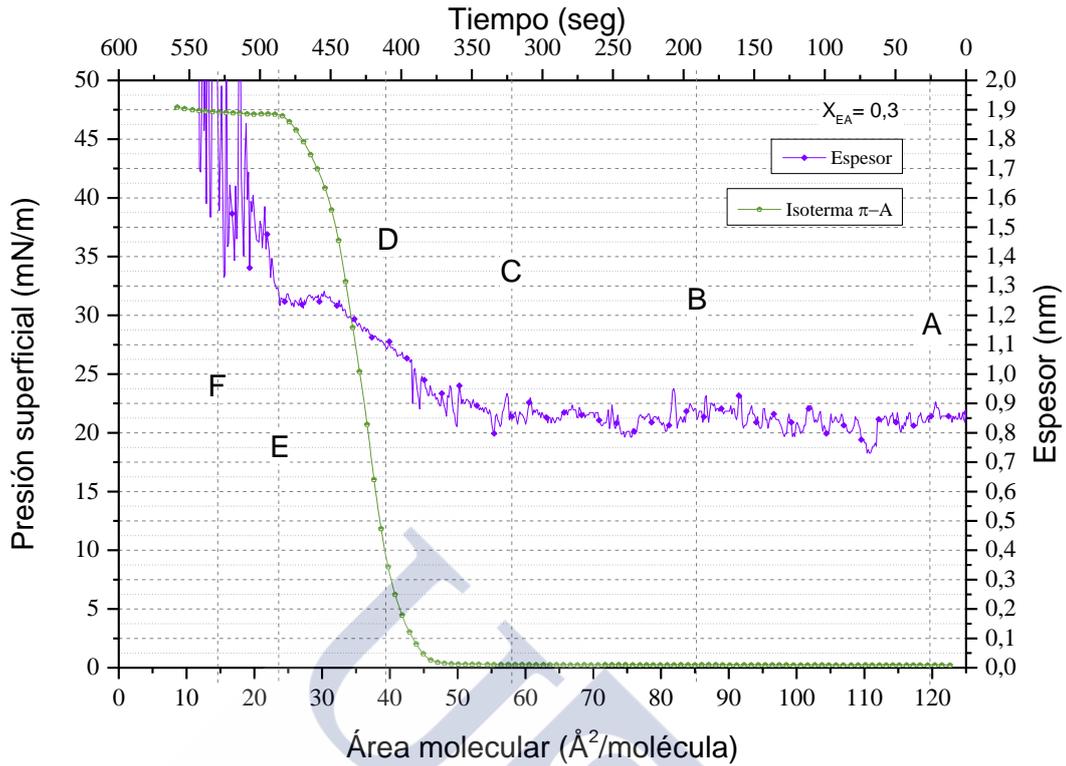


Figura 4.16.H.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido eicosadienoico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{EA} = 0,3$ y espesor relativo obtenidas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50\text{ cm}^2/\text{min}$.

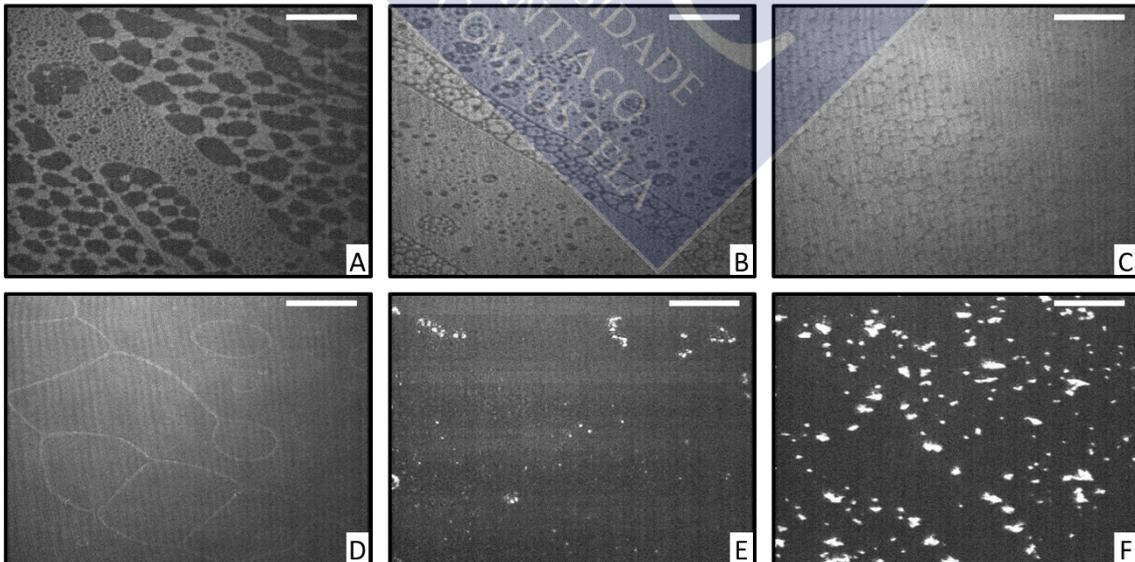


Ilustración 4.16.D.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido eicosadienoico** y **colesterol** ($X_{EA} = 0,3$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20\text{ }\mu\text{m}$.

4.16.2.5 Mezcla $X_{EA} = 0,1$

La isoterma π -A de la mezcla de ácido eicosadienoico y colesterol de fracción molar $X_{EA} = 0,1$ presenta una elevada pendiente como consecuencia del elevado estado de condensación que atraviesa. Esta circunstancia es perfectamente lógica dada la elevada proporción de colesterol en la mezcla.

Durante la fase *gas* se observa que la curva de espesor muestra altibajos constantes desde los 0,27 nm hasta los 0,86 nm. Curiosamente, ambos valores son muy similares a los registrados en las monocapas de los puros. En efecto, la monocapa de colesterol exhibe un espesor de 0,25 nm cuando se encuentra en estado *gas*, mientras que la del ácido eicosadienoico registra un valor de 0,85 nm. Por lo tanto, cuando el microscopio registra los valores de espesor de esta monocapa mixta, en ocasiones se encuentra en la superficie de medida solo moléculas de colesterol, obteniendo así valores cercanos a 0,25 nm, mientras que en otros instantes, la presencia de ácido graso aumenta este valor (0,85 nm).

Las imágenes registradas cuando la monocapa se encuentra en fase *gas* muestran la presencia de dominios correspondientes a ambos componentes (**Imagen A**). A medida que el área disminuye, las regiones grises aumentan en tamaño, fruto de la unión de los dominios de ambos componentes (**Imagen B**). La **Imagen C** tomada a un área de $50 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$, muestra una mayoritaria presencia de dominios de monocapa y unas pequeñas zonas oscuras correspondientes al sustrato acuoso.

La curva del espesor experimenta una subida anterior a la de la presión superficial, dando lugar a un pequeño desfase como consecuencia de la elevada condensación de la monocapa.

Durante la fase *condensada* se toma la **Imagen D** en la que se observan dominios curvilíneos de moléculas que experimentan un cambio conformacional. Al disminuir el área la imagen se vuelve completamente homogénea.

La **Imagen E** muestra la génesis de estructuras brillantes de fase colapsada que, ante el descenso del área molecular se agrupan en forma de “bastones” tridimensionales alargados característicos del colapso del colesterol (**Imagen F**).

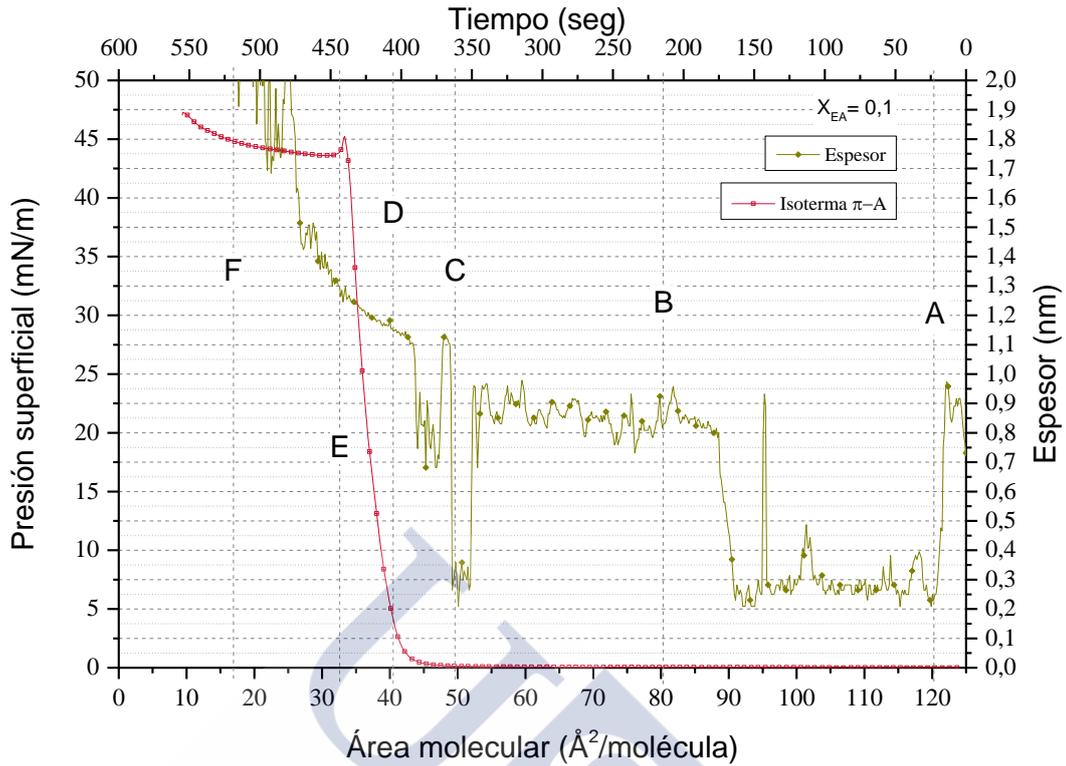


Figura 4.16.I.- Curva π -A de la monocapa mixta de **ácido eicosadienoico** y **colesterol** correspondiente a la fracción molar de $X_{EA} = 0,1$ y espesor relativo obtenidas a 10°C , depositando $4 \cdot 10^{16}$ moléculas y comprimiendo a la velocidad de $50 \text{ cm}^2/\text{min}$.

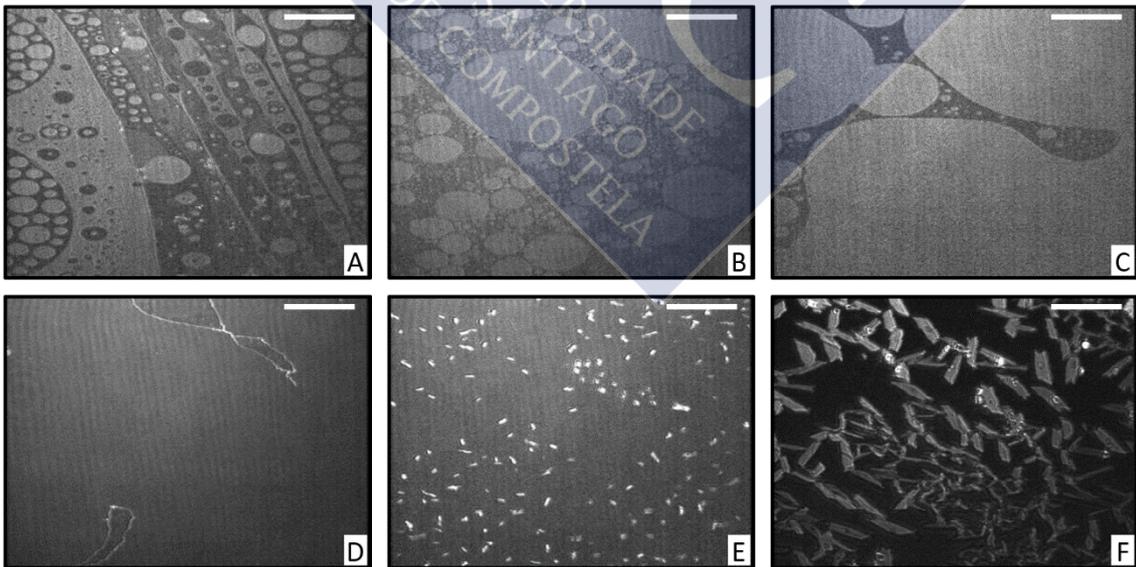


Ilustración 4.16.E.- Imágenes BAM correspondientes a la monocapa mixta formada por **ácido eicosadienoico** y **colesterol** ($X_{EA} = 0,1$). La barra blanca corresponde a una distancia de $20 \mu\text{m}$.

4.16.3 Área molecular media

La representación del área molecular media en función de la fracción molar de ácido eicosadienoico, medida a diferentes presiones superficiales da origen a las curvas que se muestran en la **Figura 3.4.M**. En ella se pone de manifiesto la existencia de desviaciones de la ley de aditividad de las áreas a diferentes valores de presión superficial. Dichas desviaciones son negativas y más acusadas cuanto menor sea la presión.

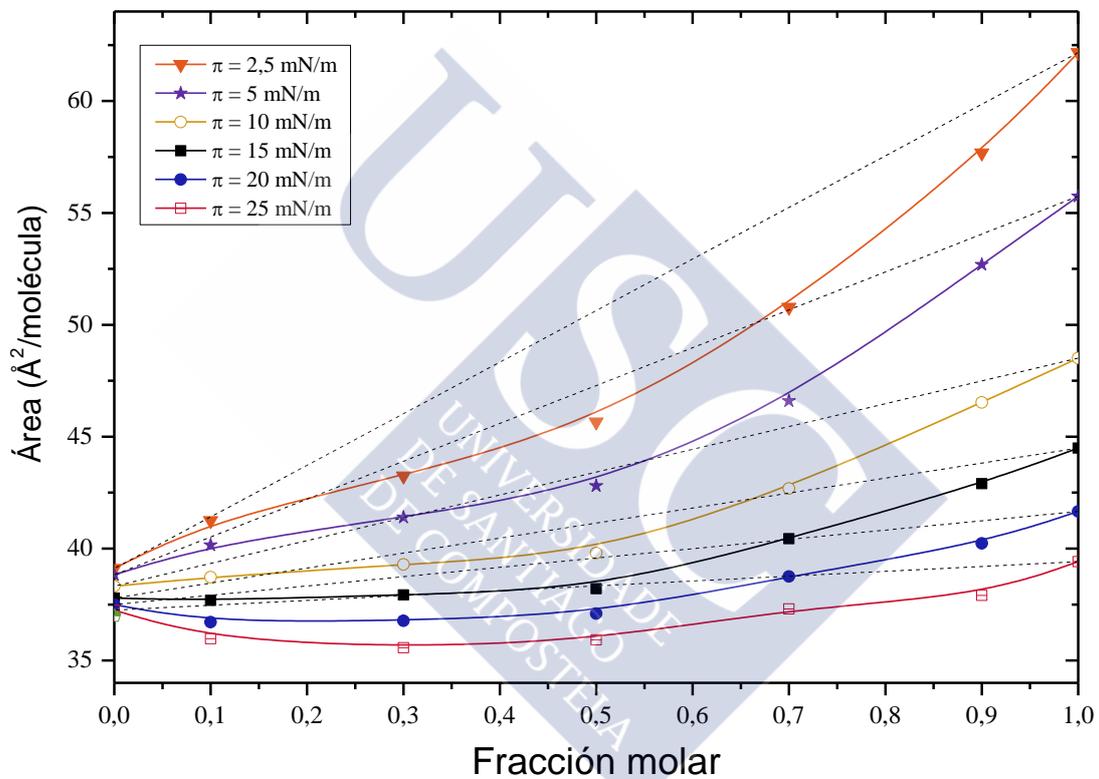


Figura 3.4.M Representación del área molecular media frente a la fracción molar de ácido eicosadienoico de la mezcla EA/COL, a los valores de presión superficial indicados.

4.16.4 Funciones de exceso

4.16.4.1 Área de exceso

El área de exceso frente a la fracción molar del ácido eicosadienoico se muestra en la **Figura 3.4.N**. Todos los valores determinados son negativos a todas las presiones superficiales. Las mayores desviaciones del comportamiento ideal se obtienen en las mezclas de composición 0,5 y 0,3 de ácido graso, siendo estas desviaciones menores con el aumento de la presión.

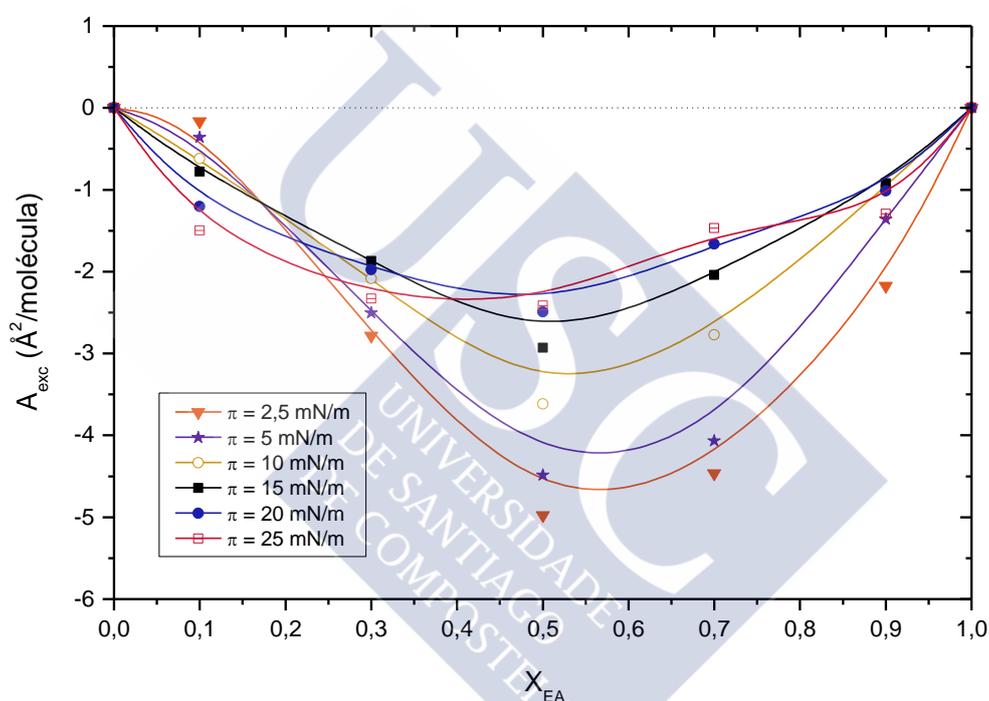


Figura 3.4.N Representación del área de exceso de la mezcla EA/COL frente a la fracción molar de ácido eicosadienoico en dicha mezcla, a los valores de presión superficial indicados.

4.16.4.2 Energía libre de exceso (ΔG_{exc})

Con el fin de realizar un análisis termodinámico de la interacción entre el ácido eicosadienoico y el colesterol, se calculó la energía libre de exceso (ΔG_{exc}) de las monocapas mixtas a partir del área bajo las curvas π -A correspondientes a las mezclas y a los componentes puros.

Como se puede observar en la **Figura 3.4.O**, los valores obtenidos son todos negativos a cualquier fracción molar del sistema y a cualquier presión superficial. Esta situación se corresponde con las condiciones termodinámicas de los sistemas de monocapas binarias en las que se producen fuertes interacciones entre sus componentes.

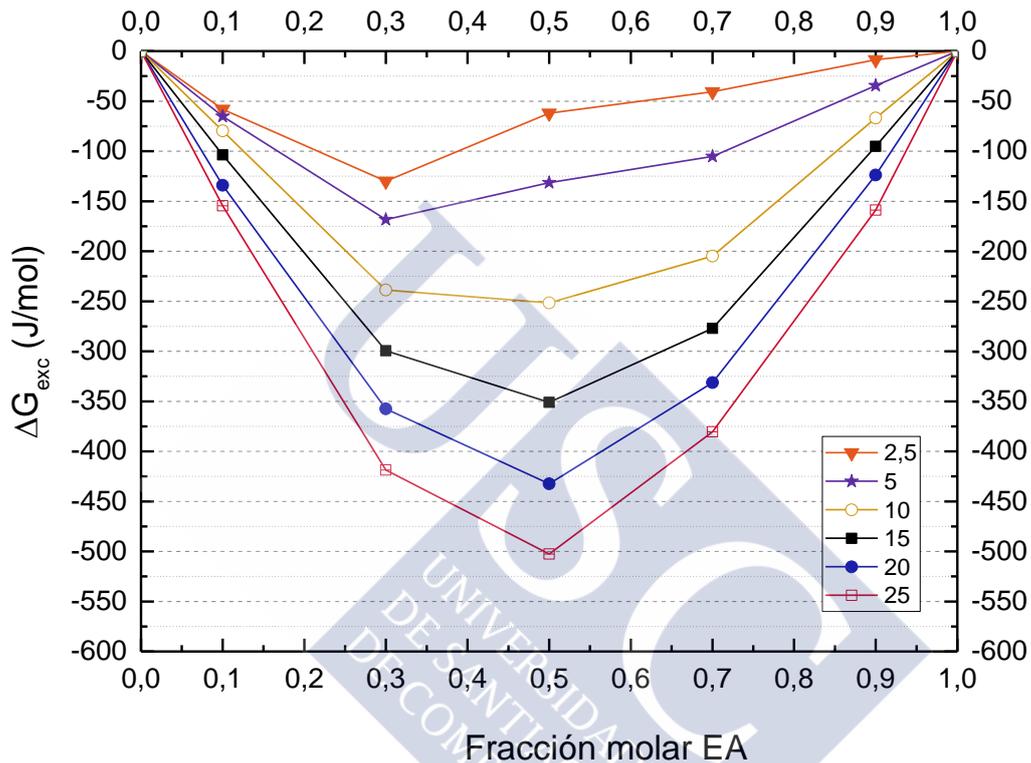


Figura 3.4.O Representación de la energía libre de exceso para el sistema EA/COL frente a la fracción molar de ácido eicosadienoico en dicha mezcla, a los valores de presión superficial indicados.

Los valores de energía libre de exceso se vuelven más negativos al aumentar la presión superficial, lo que nos indica que la interacción entre estos dos componentes es mayor a elevadas presiones. Los mayores valores se alcanzan con la fracción molar de $X_{EA} = 0,5$ del sistema EA/COL. Esto nos indica que los films más estables formados por ácido eicosadienoico y colesterol se obtienen con una proporción de 1:1.

4.17 ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS FUNCIONES DE EXCESO DE LAS MONOCAPAS MIXTAS DE COLESTEROL-ÁCIDOS GRASOS.

Las funciones área y energía libre de exceso obtenidas para cada una de las monocapas mixtas constituidas por colesterol y ácidos grasos ponen de manifiesto la existencia (o no) de interacciones entre los componentes así como la naturaleza de las mismas: atractivas o repulsivas.

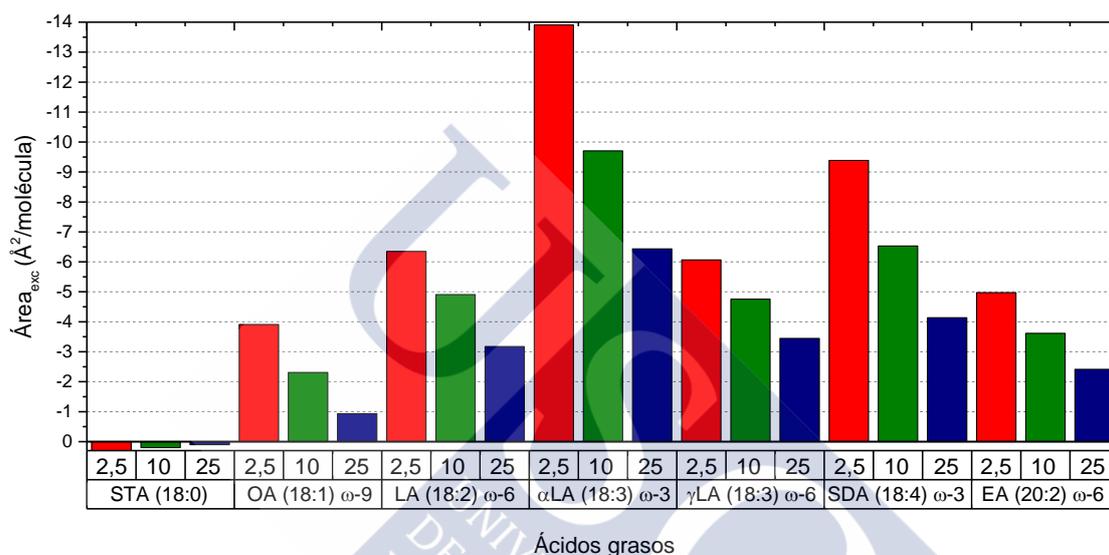


Figura 4.17.A.-Representación del área de exceso para cada una de las monocapas mixtas estudiadas a la presión superficial señalada.

En la **Figura 4.17.A** se muestra un diagrama de barras con los valores de las áreas de exceso (A_{exc}) correspondientes a tres presiones superficiales: 2,5, 10 y 25 mN/m. En cada caso se seleccionó el mayor de los valores de A_{exc} , el cual corresponde en la mayoría de los sistemas estudiados a la monocapa mixta de fracción molar de ácido graso igual a 0,5.

Como se observa en la figura, los mayores valores de A_{exc} , es decir, las mayores desviaciones del comportamiento ideal, corresponden a las monocapas mixtas de colesterol y ácido α -linolénico, seguido de las de colesterol y ácido estearidónico. Ambos ácidos grasos pertenecen a la serie omega-3. Los demás sistemas estudiados, en los que intervienen ácidos grasos omega-6 o bien ácido oleico, presentan valores de A_{exc} inferiores.

En todos los casos los valores de A_{exc} son negativos, es decir, presentan desviaciones negativas del comportamiento ideal como consecuencia de la existencia de fuerzas de atracción entre las moléculas de los componentes que forman la monocapa mixta.

En el sistema constituido por colesterol y ácido esteárico (ácido graso saturado) los valores de A_{exc} son prácticamente nulos, por lo que los componentes del mismo o bien se comportan de forma ideal o son inmiscibles. Los resultados de las medidas de la presión de colapso muestran que son inmiscibles, es decir, no existen interacciones entre los componentes de este sistema.

La otra función de exceso utilizada para comparar el comportamiento de las monocapas mixtas estudiadas fue la energía libre de exceso (ΔG_{exc}). El diagrama de barras de la **Figura 4.17.B** muestra los valores de esta función correspondientes a nuestros sistemas.

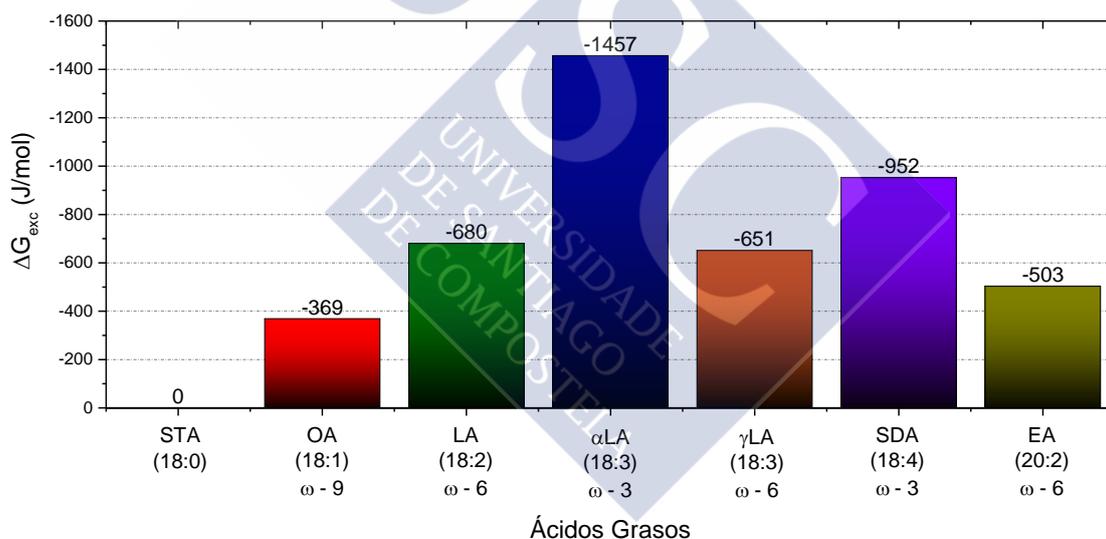


Figura 4.17.B.-Valores de la energía libre de exceso calculados a la presión superficial de 25 mN/m correspondientes a las monocapas mixtas estudiadas

De forma similar a lo que ocurre con el área de exceso, los mayores valores de ΔG_{exc} se encuentran en las mezclas de colesterol y ácidos grasos omega-3. De nuevo, la monocapa mixta de colesterol y ácido graso omega-9 (ácido oleico) es la que presenta menor valor de ΔG_{exc} de todos los sistemas mixtos formados por ácidos grasos insaturados. En la monocapa mixta constituida por el ácido graso insaturado, $\Delta G_{exc} = 0$.

En consecuencia, se puede concluir que la interacción entre el colesterol y los ácidos grasos estudiados solo se produce cuando las cadenas hidrocarbonadas de éstos son insaturadas, aumentando la interacción con el grado de insaturación de las cadenas hasta que éstas alcanzan un valor máximo de tres dobles enlaces. Por otra parte, la interacción es mayor cuando el sistema mixto está formado por ácidos grasos de la serie omega-3.

Los resultados mostrados permiten formular la siguiente hipótesis: los ácidos grasos insaturados que llegan al intestino tras la digestión, interaccionan con el colesterol libre que se libera en el intestino tras el proceso de hidrólisis de los ésteres de colesterol de la dieta. De este modo, la formación de un complejo colesterol-ácido graso de estequiometría 1:1 (fracción molar 0,5), consecuencia de la interacción, retira del intestino hacia las heces parte del colesterol libre existente. El resto de colesterol que no forma parte del complejo se re-esterifica de nuevo y es enviado al hígado a través de los quilomicrones para que este órgano haga uso de él según sus requerimientos.

De esta forma, se disminuiría el contenido de colesterol en el cuerpo humano. Es evidente que en la formación del complejo antes aludido no solo intervendrían los ácidos grasos omega-3, sino también los omega-6 y el ácido oleico (omega-9), aunque con menor efectividad. Así bien, si la dieta es muy rica en ácidos omega-6 o en ácido oleico, la menor efectividad de la interacción con el colesterol se compensaría con el mayor número de moléculas de estos ácidos propicios a interaccionar. De la misma forma, un incremento de la ingesta de ácidos omega-3 disminuiría los niveles de colesterol al impedir su re-esterificación

Según esta hipótesis se justifica la acción nociva de las grasas saturadas en la formación de placas de ateroma debidas al exceso de colesterol en la sangre, ya que según los resultados que hemos expuesto los ácidos grasos saturados son incompatibles con el colesterol y por ello son incapaces de formar el complejo necesario para la reducción del colesterol excesivo de la dieta





5 CONCLUSIONES



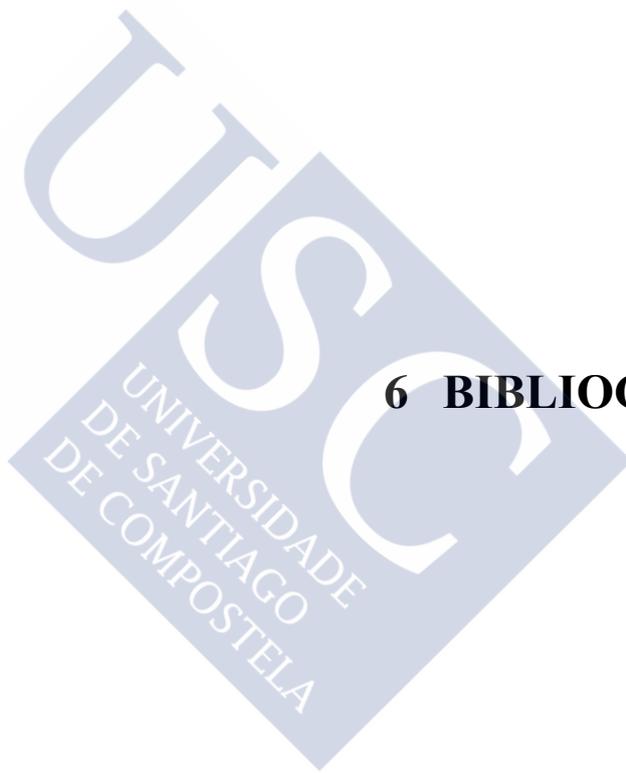
- 1) El tipo de monocapa generada por los ácidos grasos estudiados depende de sus características estructurales de tal forma que:
 - a. La saturación de las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de ácido esteárico (18:0) facilita la constitución de una monocapa muy condensada que alcanza un elevado valor del módulo de compresibilidad, propio del estado *sólido*, y un valor del área límite muy pequeño.
 - b. La presencia de insaturaciones en las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas reduce drásticamente su grado de empaquetamiento, lográndose la formación de monocapas en estado superficial *líquido expandido*. Al aumentar el número de dobles enlaces, los valores de las áreas límites aumentan y los de los módulos de compresibilidad decrecen. Es decir, se obtienen monocapas más compresibles (expandidas), en las que las moléculas ocupan mayor área.
 - c. El aumento del número de átomos de carbono en la cadena hidrocarbonada incrementa ligeramente el área límite de la monocapa, sin apenas afectar al módulo de compresibilidad de la misma.
- 2) Utilizando modelos moleculares a partir del registro de espesores relativos se determinaron las diferentes conformaciones experimentadas por las moléculas de las sustancias estudiadas para cada uno de los estados físicos por los que atraviesan las monocapas, de tal manera que:
 - a. Las monocapas de tipo condensado (colesterol y ácido esteárico) presentan sus moléculas en una posición perpendicular respecto a la superficie del sustrato acuoso en el momento previo al colapso; durante la fase *gas* se hallan en una posición casi horizontal, con un grado de inclinación de 13° . Además el colesterol presenta una conformación intermedia en la que su grupo esterano se encuentra perpendicular a la superficie del agua mientras su resto radical se posiciona en paralelo.
 - b. Las monocapas expandidas (ácidos grasos insaturados) están posicionadas prácticamente de forma perpendicular a la horizontal instantes antes del colapso, mientras que, en la fase *gas*, presentan una inclinación de entre 36 y 42° respecto de la superficie del agua.

- 3) El estudio de las características de las monocapas mixtas formadas por colesterol y ácidos grasos evidencia la existencia de interacciones de tipo atractivo entre los componentes en el caso de ácidos grasos insaturados. En el sistema colesterol-ácido esteárico (saturado) ambos componentes son inmiscibles en la interfaz aire/agua. Las evidencias de este diferente comportamiento fueron las siguientes:
- d. Las presiones de colapso de las monocapas mixtas formadas por colesterol y ácido graso insaturado presentan valores intermedios entre los correspondientes a los componentes puros. Este comportamiento indica que los componentes en la monocapa no actúan por separado uno del otro. Por el contrario, en las monocapas mixtas de colesterol-ácido esteárico cada componente colapsa a la presión de colapso correspondiente a cada uno de ellos, lo que evidencia su inmiscibilidad.
 - e. Los módulos de compresibilidad de las monocapas mixtas en las que intervienen ácidos grasos insaturados son intermedios entre los propios de los componentes puros. En el caso del ácido graso saturado, las mezclas registran valores del módulo inferiores a los de los puros.
 - f. Las imágenes BAM obtenidas en los sistemas mixtos formados por ácidos grasos insaturados muestran la existencia de dominios constituidos por ambos componentes de la mezcla, mientras que las imágenes registradas en el colapso de las monocapas mixtas que contienen ácido esteárico corresponden exclusivamente al colesterol colapsado, sin evidencia de la presencia del ácido graso.
 - g. Los valores del área y de la energía libre de exceso del sistema colesterol - ácido graso saturado son prácticamente nulos, hecho evidente de la ausencia de interacciones entre los componentes de la mezcla. Sin embargo, los films mixtos de colesterol-ácidos grasos insaturados presentan importantes desviaciones negativas del comportamiento ideal (valores negativos de las funciones de exceso) originadas por la existencia de interacciones atractivas entre los componentes

- 4) Las interacciones entre el colesterol y los ácidos grasos insaturados aumentan con el grado de insaturación de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos hasta alcanzar su máxima expresión cuando el número de dobles enlaces es 3. Por otra parte, la interacción es mayor cuando el sistema mixto está formado por ácidos grasos de la serie omega-3 que cuando se trata de ácidos omega-6. Además, la composición de las mezclas es importante, observándose la máxima interacción en las de fracción molar $X_{\text{ácido graso}} = 0,5$.
- 5) Los resultados obtenidos permiten formular una hipótesis según la cual los ácidos grasos insaturados que llegan al intestino tras la digestión de las grasas en el estómago interaccionan con el colesterol libre que se libera en el intestino tras el proceso de hidrólisis de los ésteres de colesterol de la dieta. De este modo, la formación de un complejo colesterol-ácido graso de estequiometría 1:1 (fracción molar 0,5), consecuencia de la interacción, retira del intestino hacia las heces parte del colesterol libre existente. El resto de colesterol que no forma parte del complejo se re-esterifica de nuevo y es enviado al hígado a través de los quilomicrones para que este órgano haga uso de él según sus requerimientos. Esta sería una forma de disminuir el contenido de colesterol en el cuerpo humano. Es evidente que en la formación del complejo antes aludido no solo intervendrían los ácidos grasos omega-3, sino también los omega-6 y el ácido oleico (omega-9), aunque con menor efectividad. Ahora bien, si la dieta es muy rica en ácidos omega-6 o en ácido oleico, la menor efectividad de la interacción con el colesterol se compensaría con el mayor número de moléculas de estos ácidos propicios a interaccionar.

De acuerdo con esta hipótesis se justifica la acción nociva de las grasas saturadas en la formación de placas de ateroma debidas al exceso de colesterol en la sangre, ya que según los resultados que hemos expuesto los ácidos grasos saturados son incompatibles con el colesterol y por ello son incapaces de formar el complejo necesario para la reducción del colesterol excesivo de la dieta.





6 BIBLIOGRAFÍA



- Abbas, K. A. (1999). *Inmunología Celular y Molecular*, 3ª, 431-2. Madrid: Editorial McGraw Hill.
- Adam, N. (1923). *Proc. Roy. Soc. A*, 103, 687. London.
- Adam, N. K. (1956). *The Physics and Chemistry of Surfaces*, 39-55. Oxford: Clarendon Press.
- Adam, N. K., & Jessop, G. (1926). The Structure of Thin Films. Part VIII. Expanded Films. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 112, 362-75.
- Adkins, Y., & Kelley, D. (2010). Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem*, 21, 781-92.
- Albert, C., Hennekens, C., O'Donnell, C., Ajani, U., Carey, V., & Willett, W. (1998). Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA*, 279, 23-8.
- Alexander, A. (1982). *Proc. Roy. Soc., A*, 179, 486-470.
- Appel, L., Miller, E., Seidler, A., & Whelton, P. (1993). Does supplementation of diet with "fish oil" reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. *Arch Int Med*, 153, 429-38.
- Aranov, R. H., & Witten, L. (1958). *J. Chem. Phys.*, 28, 405.
- Ayerza, R., & Coates, W. (1999). An omega-3 fatty acid enriched chia diet: Influence on egg fatty acid composition, cholesterol and oil content. *Canadian journal of animal science*, 79(1), 53-8.
- Azzam, R., & Bashara, N. (1992). *Ellipsometry and Polaroid Light*, 1. Amsterdam, Holland.
- Baglioni, P., Cestelli, G., & Dei Gabrielli, G. (1985). Monolayers of cholesterol at water-air interface: Mechanism of collapse. *J. Colloid Interface Sci.*, 104(1), 143-50.
- Band, W. (1940). *J. Chem. Phys.*, 8, 116.
- Bang, H., Dyerberg, J., & Sinclair, H. (1980). The composition of the Eskimo food in north western Greenland. *Am J Clin Nutr.*, 33, 2657-61.
- Baoukina, S., Monticelli, L., Risselada, H. J., Marrink, S. J., & Tieleman, D. P. (2008). The molecular mechanism of lipid monolayer collapse. *PNAS*, 105(31), 10803-08.
- Binks, B. P. (1991). Insoluble monolayers of weakly ionising low molar mass materials and their deposition to form Langmuir-Blodgett multilayers. *Advances Colloid Interface Sci.*, 34, 343-432.
- Bohinski, R. C. (1991). *Bioquímica*, 5ª, 45, 418, 422, 432-5, 631, 649. Wilmington, Delaware.
- Borghi, C., & Cicero, A. (2006). Recent evidence on the role of omega-3 polyunsaturated fatty acids on blood pressure control and hypertension-related complications. *Future Lipidology*, 1, 569-77.
- Brown, A., & Hu, F. (2001). Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 73, 668-73.
- Brown, M., & Goldstein, M. (1978). General scheme for regulation of cholesterol metabolism in mammalian cells. 173-80. American Physiological Society.
- Burr, M., Fehily, A., Gilbert, J., & cols., y. (1989). Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *The Lancet*, 2, 757-61.
- Cadena-Nava, R. D., Martin-Mirones, J. M., Vázquez-Martínez, E. A., Roca, J. A., & Ruiz-García, J. (2006). Direct observations of phase changes in Langmuir films of Cholesterol. *Revista Mexicana de Física S* 52 (5) 32-40, 52(5), 32-40.

- Calder, P., Albers, R., Antoine, J., Blum, S., Bourdet-Sicard, R., & Ferns, G. (2009). Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr*, *101*(1), S1-45.
- Calder, P., Yaqoob, P., Thies, F., Wallace, F., & Miles, E. (2002). Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr*, *87*, 31-48.
- Camuesco, D., Comalada, M., Concha, A., Nieto, A., Sierra, S., & Xaus, J. (2006). Intestinal anti-inflammatory activity of combined quercitrin and dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, in rats with DSS-induced colitis. *Clin Nutr*, *25*, 466-6.
- Carrero, J., Martín-Bautista, E., Baró, L., Fonollá, J., Jiménez, J., Boza, J., & López-Huertas, E. (2005). *Nutr. Hosp.*, *20*(1), 63-9.
- Chen, H. (2001). Molecular mechanisms of sterol absorption. *J. Nutr.*, *131*, 2603-05.
- Chevreul, M. E. (1823). *Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale*. (F. G. Levrault, Ed.) Paris, France.
- Connor, W. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr*, *71*, 171-5.
- Cottin, S., Sanders, T., & Hall, W. (2011). The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proc Nutr Soc*, *24*, 1-17.
- Crisp, D. (1949). *Surface Chemistry*, 17-23. London: Butterworth.
- D'Andrea, S., Guillou, H., Jan, S., Catheline, D., Thibault, J. N., & Bouriel, M. (2002). The same $\Delta 6$ -desaturase not only acts on 18- but also on 24-carbon fatty acids in very-long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *Biochem. J.*, *364*, 49-55.
- Datta, A., Sanyal, M. K., Dhanabalan, A., & Major, S. S. (1997). *J. Phys. Chem. B*, *101*, 9280-6.
- Davies, J. T., & Rideal, E. K. (1963). *Interfacial phenomena*, *77*, 2, 276. New York: Academic Press.
- Daviglus, M., Stamler, J., & Orenca, A. y. (1997). Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Engl J Med*, *336*, 1046-53.
- De Deckere, E., Korver, O., Verschuren, P., & Katan, M. (1998). Health aspects of fish and n-3 polyunsaturated fatty acids from plant and marine origin. *Eur J Clin Nutr*, *52*, 749-53.
- de Mul, M., & Mann Jr., J. (1998). *Langmuir*, *14*, 2455.
- Defay, R., Prigogine, I., Bellemans, A., & Everett, D. H. (1966). *Surface tension and adsorption*, 166-216. London: Longman.
- Dervichian, D. (1939). *Nature*, *144*, 629.
- Dervichian, D. (1940). *J. Chimie. Physique.*, *37*, 110.
- Dervichian, D. G. (1939). *J. Chem. Phys.*, *7*, 931.
- Devlin, T. M. (2004). *Bioquímica*, 4ª. Barcelona: Reverté.
- Díaz Argüelles, V. (2001). Suplementación enteral de los ácidos grasos esenciales en RN pretérmino. *Rev. Cubana Pediatr.*, *73*(1), 34-42.
- Egert, S., & Stehle, P. (2011). Impact of n-3 fatty acids on endothelial function: results from human interventions studies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, *14*, 121-31.
- Epand, R. M. (2006). Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Prog Lipid Res*, *45*, 279-94.
- Erdmann, E., Bedford, F., & Raspe, F. (1909). The constitution of hexadecatrienoic acid from the glycerides of rape (*Brassica napus*) leaf. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, *42*, 1334-45.

- Fallon, S., & Enig, M. (2001). Tripping Lightly Down the Prostaglandin Pathways. *Price-Pottenger Nutrition Foundation*.
- Fidelio, G. D., Maggio, B., & Cumar, F. (1986). Molecular parameters and physical state of neutral glycosphingolipids and gangliosides in monolayers at different temperatures. *Biochim. Biophys. Acta.*, 854(2), 231-9.
- Gaines, G. L. (1966). *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, 178. (Interscience, Ed.) New York.
- Gaines, G. L. (1967). *Insoluble Monolayers at Liquid-Gas Interfaces*, 281-300. New York: Interscience.
- Gaines, G. L. (1977). *J. Coll. Int. Sci.*, 62, 191.
- Gericke, A., & Hühnerfuss, H. (1995). *Langmuir*, 11, 225.
- Gershfeld, N. L. (1972). Film Balance and the Evaluation of Intermolecular Energies in Monolayers. *Techniques of Surface and Colloid Chemistry and Physics*, 1, 1. (R. Good, R. Stromberg, & R. Patrick, Edits.) New York.
- Gill, J. (1985). Control mechanism in sterol uptake and biosynthesis. *Sterols and Bile Acids*. Elsevier Science Publishers.
- Goodrich, F. C. (1957). *Proc. 2nd Int. Congr. Surface Activity*, 1, 85-91.
- Graciani, E. (2006). Los aceites y grasas: composición y propiedades. 17-8. Madrid: AMV.
- Grundyk, S., Pasternak, R., Greenland, P., Smith, S., & Fuster, V. (1999). Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations. *American College of Cardiology*, 100, 1481-92.
- Guil-Guerrero, J., García Maroto, F., & Gimenez Gimenez. (2001). A Fatty acid profiles from forty nine plant species that are potential new sources of γ -linolenic acid. *JAOCS*, 78, 677-84.
- Hac-Wydro, K., & Wydro, P. (2007). The influence of fatty acids on model cholesterol/phospholipid membranes. *Chem. Phys. Lipids*, 150, 66-81.
- Harkins, W. (1952). Physical Chemistry of Surface Films. *Reinhold Publ. Corp.*, 106-117. New York.
- Harris, W. (1996). n-3 fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. *Lipids*, 31, 243-52.
- Hénon, S., & Meunier, J. (1991). *Rev. Sci. Instrum.*, 62, 936.
- Hibbeln, J. R. (2006). Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83 (1483S-1493S)(6).
- Hifeda, Y., & Rayfield, G. (1985). *J. Colloid Interface Sci.*, 104, 209.
- Hodson, L., Skeaff, C., & Chisholm, W.-A. (2001). The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. *Eur J Clin Nutr*, 55, 908-915.
- Holinstat, M., Boutaud, O., Apopa, P., Vesci, J., Bala, M., Oates, J., & Hamm, H. (2011). Protease-activated receptor signaling in platelets activates cytosolic phospholipase A2 differently for cyclooxygenase-1 and 12-lipoxygenase catalysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31, 435-42.
- Holman, R. T. (1964). Nutritional and metabolic interrelationships between fatty acids. *Fed. Proc.*, 23, 1062-7.
- Hönig, D., & Möbius, D. (1991). *J. Phys. Chem.*, 95, 4590.
- Hopkins, P. (1992). Effects of dietary cholesterol on serum cholesterol: a meta-analysis and review. *Am J Clin Nutr.*, 55, 1060-7.

- Hopper, L., Ness, A., Higgins, J., Moore, T., & Ebrahim, S. (1999). GISSI Prevenzione trial. *The Lancet*, 354, 447-55.
- Huff, M. (2003). Dietary cholesterol, cholesterol absorption, postprandial lipemia and atherosclerosis. *Can J Clin Pharmacol*, 26A-32A.
- Hurst, S., Zainal, Z., Caterson, B., Hughes, C., & Harwood, J. (2010). Dietary fatty acids and arthritis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 82, 315-8.
- Hwang, M., & Kim, K. (1999). *Langmuir*, 15, 3563-9.
- Ilyiná, A. D. (1995). Las prostaglandinas y tromboxanos. Su función como biorreguladores celulares. Parte I. *Bioquímica*, 78, 243-7.
- J. D. Swalen, D. L. (1986). *Langmuir*, 3.
- J. P. Slotte, A. Ö. (1993). *Biochem.*, 32.
- Jacobs, D., Adachi, H., Mulder, I., Kromhout, D., Menotti, A., & Nissinen, A. (1999). Cigarette smoking and mortality risk: twenty-five-year follow-up of the Seven Countries Study. *Arch Intern Med.*, 159, 733-40.
- Jones, P., Pappu, A., Hatcher, L., Li, Z., Illingworth, D., & Connor, W. (1996). Dietary cholesterol feeding suppresses human cholesterol synthesis measured by deuterium incorporation and urinary mevalonic acid levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 16, 1222-8.
- Joos, P. (1969). *Bull. Soc. Chim.*, 78, 207.
- Joos, P. (1971). *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 80, 277.
- Joos, P., & Demel, R. (1969). *Biochim. Biophys. Acta*, 183, 447.
- Joos, P., Ruysen, R., Miñones, J., García Fernández, S., & Sanz Pedrero, P. (1969). *J. Chim. Phys.*, 66, 1665.
- Jump, D. (1999). Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu. Rev. Nutr.*, 19, 63-90.
- K. Nag, a. K. (1993). *Biophys. J.*(1019).
- Kasselouri, A., Coleman, A., & Bazskin, A. (1996). *J. Colloid Interface Sci.*, 180, 384.
- Kenelly, P., & Rodwell, J. (1985). Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by reversible phosphorylation-dephosphorylation. *J. Lipid Res.*, 26, 903-14.
- Kenn, R., Böhm, C., Bibo, A., Peterson, I., & Möhwald, H. J. (1991). *Phys. Chem.*, 95, 2092.
- Keys, A. (1980). Seven Countries. A Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease. 1- 381. Cambridge: Harvard University Press.
- Kinjo, Y., Beral, V., Akiba, S., Key, T., Mizuno, S., & Appleby, P. (1999). Possible protective effect of milk, meat and fish for cerebrovascular disease mortality in Japan. *J Epidemiol.*, 9, 268-74.
- Kirkwood, J. G. (1943). *Surface Chemistry*, 21, 157. AAAS Publ.
- Knobler, C. M. (1990). *Adv. Chem. Phys.*, 72.
- Kris-Etherton, P., Eckel, R., Howard, B., & cols., y. (2001). AHA Science Advisory: Lyon Diet Heart Study. Benefits of a Mediterranean-style, National Cholesterol Education Program/American Heart Association Step I Dietary Pattern on Cardiovascular Disease. *Circulation*, 103, 1823-5 .
- Kromhout, D., Bosschieter, E., & de Lezenne Coulander, C. (1985). The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med*, 312, 1205-9.
- Langmuir, I. (1917). *J. Am. Chem. Soc.*, 39, 1848.
- Langmuir, I. (1933). *J. Chem. Phys.*, 1, 756.

- Langmuir, I., & Schaefer, V. (1937). *J. Am. Chem. Soc.*, 59, 2400.
- Lapillone, A., Clark, S., & Heird, W. (2004). Polyunsaturated fatty acids and gene expression. *Lipid metabolism and therapy. Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 7, 151-6.
- Layé, S. (2010). Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 82, 295-303.
- Layne, K., Goh, Y., Jumpsen, J., Ryan, E., & Chow, P. (1996). Clandinin MT: Normal subjects consuming physiological levels of 18:3(n-3) and 20:5(n-3) from flaxseed or fish oils have characteristic differences in plasma lipid and lipoprotein fatty acid levels. *J Nutr*, 266, 2130-40.
- Leaf, A., Albert, C., Josephson, M., Steinhaus, D., Kluger, J., & Kang, J. (2005). Prevention of fatal arrhythmias in high-risk subjects by fish oil n-3 fatty acid intake. *Circulation*, 112, 2762-8.
- Lehninger. (2009). *Principios de bioquímica*. Barcelona: Omega.
- Levy, M., Benita, S., & Baszkin, A. (1991). *Colloid Surface*, 59, 225.
- Lheveder, C., Hénon, S., Mercier, R., Tissot, G., Fournet, P., & Meunier, J. (1998). *Rev. Sci. Instrum.*, 69, 1446.
- Lheveder, C., Meunier, J., & Hénon, S. (2000). *Physical Chemistry of Biological Interfaces*, 559-575. New York.
- Lipp, M., Lee, K., Zasadzinski, J., & Waring, A. (1966). Phase and morphology changes in lipid monolayers induced by SP-B protein and its minoterminal peptide. *Science*(273), 1196-1199.
- Lösche, M., Sackman, R., & Möhwald, H. (1983). *Ber. Bunsen-Ges. Phys. Chem.*, 87, 848.
- Luckham, P., Wood, J., Frogatt, S., & Swart, R. (1993). The Surface Properties of Gangliosides: I. Monolayer Properties. *J. Colloid Interface Sci.*, 156(1), 164-72.
- Lundberg, B. (1973). Surface balance studies on the interaction of tristearin and triolein with lecithin, cholesterol, and lecthin/cholesterol 1:1 in mixed monolayers. *Acta Academica Abiensis*, 1, 33.
- Makyla, K., & Paluch, M. (2009). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 71, 59-66.
- Manerba, A., Vizzardti, E., Metra, M., & Dei Cas, L. (2010). n-3 PUFAs and cardiovascular disease prevention. *Future Cardiol*, 6, 343-50.
- Margni, R. A. (1989). *Inmunología e Inmunquímica*. 4^a, 325-39. Buenos Aires, Argentina.
- Matheus, C. K. (1988). *Bioquímica*. 2^a, 764-9. España: Editorial McGraw Hill.
- McConnell, H. (1991). *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 42, 171.
- McFate, C., Ward, D., & Olmsted III, J. (1993). *Langmuir*, 9, 1036.
- McNamara, D., Kolb, R., Parker, T., Batwin, H., Samuel, P., & Brown, C. (1987). Heterogeneity of cholesterol homeostasis in man: response to changes in dietary fat quality and cholesterol quantity. *J Clin Invest.*, 79, 1729-39.
- Mestres, C., Alsina, M., Espina, M., Rodríguez, L., & Reig, F. (1992). *Langmuir*, 8, 1338.
- Metcalf, R., James, M., Gibson, R., Edwards, J., Stubberfield, J., & Stuklis, R. (2007). Effects of fish oil supplementation on myocardial fatty acid in humans. *Am J Clin Nutr*, 85, 1222-8.
- Miñones Trillo, J. (1995). *Monocapas y multicapas de Langmuir-Blodgett*. Instituto de España. Real Academia de Farmacia.

- Miyazaki, A., Sakai, M., Sakamoto, Y., & Horiuchi, S. (2003). Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase inhibitors for controlling hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs*, 4, 1095-9.
- Möbius, D. (1998). *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 3, 137.
- Möhwald, H. (1990). *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 41, 441.
- Moore, S., Hurt, E., Yoder, E., Sprecher, H., & Spector, A. (1995). Docosahexaenoic acid synthesis in human skin fibroblasts involves peroxisomal retroconversion of tetracosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.*, 36, 2433-43.
- Morris, M., Sacks, F., & Rosner, B. (1993). Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation*, 88, 523-33.
- Motomura, K., Terazono, T., Matuo, H., & Matuura, R. (1976). Mixed monolayers of cholesterol with fatty acids. *J. Colloid Interface Sci.*, 57(1), 52-7.
- Müller-Landau, F., & Cadenhead, D. (1979). Molecular packing in steroid-lecithin monolayers, part I: Pure films of cholesterol, 3-doxy-cholestane, 3-doxy-17-hidroxy-androstane, tetradecanoic acid and dipalmitoyl-phosphatidylcholine. *Chem. Phys. Lipids*, 25(3), 299-314.
- Nair, J., Vaca, C., & Velic, I. (1997). High dietary omega-6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6, 597-601.
- Nasiff-Hadad, A., Pérez, C., Alvarez, B., Jiménez, P., Pau, H., & de Pablo, M. (1990). Efecto de dieta rica en jurel sobre los lípidos sanguíneos en una escuela de seminternado de adultos. *Rev Cubana Med.*, 29(1), 12-20.
- Nieto, N., Torres, M., Ríos, A., & Gil, A. (2002). Dietary poly-unsaturated fatty acids improve histological and biochemical alterations in rats with experimental ulcerative colitis. *J Nutr*, 132, 11-9.
- Nodari, S., Triggiani, M., Campia, U., Manerba, A., Milesi, G., & Cesana, B. (2011). Effects of n-3 poly-unsaturated fatty acids on left ventricular function and functional capacity in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*, 57, 870-9.
- Overbeck, G., Hönig, D., & Möbius, D. (1993). *Langmuir*, 9, 555.
- Overbeck, G., Hönig, D., Wolthaus, L., Gnade, M., & Möbius, D. (1994). *Thin Solid Films*, 242, 26.
- Packard, C. J. (1982). The hepatobiliary axis and lipoprotein metabolism: effects of bile acid sequestrants and ileal bypass surgery. *J. Lipid Res.*, 23, 1081-98.
- Pagano, R. E., & Gershfeld, N. L. (1972). *J Phys Chem*, 76, 1238-43.
- Paudler, M., Ruths, J., & Riegler, H. (1992). *Langmuir*, 8, 184.
- Peiretti, P., & Gai, F. (2009). Fatty acid and nutritive quality of chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and plant during growth. *Animal Feed Science and Technology*, 148(2/4), 267.
- Peltonen, J. R. (1989). *Thin Solid Films*, 179, 543.
- Petrova, S., Dimitrov, P., Willett, W., & Campos, H. (2011). The global availability of n-3 fatty acids. *Public Health Nutr*. 31, 1-8.
- Phinney, S., Odin, R., Johnson, S., & Holman, R. (1990). Reduced arachidonate in serum phospholipids and cholesteryl esters associated with vegetarian diets in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 51, 385-92.
- R. Grimard, P. T. (1993). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 190.
- Rana, F., Mautone, A., & Dluhy, R. (1993). *Biochem.*, 32, 3169.

- Raphael, R. A., & Sondheimer, F. (1950). The synthesis of long-chain aliphatic acids. From acetylene compounds. Part. III. The synthesis of linolenic acid. *J. Chem.Soc.*, 2100-3.
- Reinitzer, F. (1888). Beiträge zur Kenntnis des Cholesterins. *Monatshefte für Chemie*, 9, 421-41.
- Ries Jr., H. E., & Swift, H. (1978). Monolayers of valinomycin and its equimolar mixtures with cholesterol and with stearic acid. *J. Colloid Interface Sci.*, 64(1), 111-9.
- Rodríguez Patino, J., Carrera, C., & Rodríguez Niño, M. (1999). *Langmuir*, 15, 2484.
- Rodríguez Patino, J., Carrera, C., & Rodríguez Niño, M. (1999). *Food Hydrocolloids*, 13, 401.
- Rodríguez Patino, J., Carrera, C., & Rodríguez Niño, M. (2001). *Langmuir*, 17, 4003.
- Ros, E. (2006). Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática. *Rev Esp Cardiol Supl.*, 6, 52-62.
- Roth, E., & Harris, W. (2010). Fish oil for primary and secondary prevention of coronary heart disease. *Curr Atheroscler Rep*, 12, 66-72.
- S. W. Hui, a. Y. (1993). *Biophys. J.*, 64.
- Sacks, F., & Katan, M. (2002). Randomized clinical trials on the effects of dietary fat and carbohydrate on plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *American Journal of Medicine*, 113 (9B), 13S-24S.
- Salem, L. (1962). *J. Chem. Phys.* 37, 2100.
- Sampath, H., & Ntambi, J. (2004). Polyunsaturated fatty acid regulation of gene expression. *Nutr Rev*, 62, 333-9.
- Sampath, H., & Ntambi, J. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. *Annu Rev Nutr*, 25, 317-40.
- Sánchez-González, J., Cabrerizo-Vílchez, M., & Gálvez-Ruiz, M. (1999). *Colloids Surf.*, 12, 123.
- Sanhueza, C., & Valenzuela, A. (Agosto de 2006). *Rev. chil. nutr.* 33(2). Santiago.
- Schectman, G., Boerboom, L., Hannah, J., Howard, B., Mueller, R., & Kissebah, A. (1996). Dietary fish oil decreases low-density-lipoprotein clearance in nonhuman primates. *Am J Clin Nutr*, 64, 215-21.
- Schulman, J., & Hughes, A. (1932). *Proc. Roy. Soc., A*. 138, 430.
- Seoane, J., Vila Romeu, N., Miñones, J., Conde, O., Dynarowicz, P., & Casas, M. (1997). The behavior of amphotericin B monolayers at the air/water interface. *Prog Colloid Polym Sci.*, 105, 173-9.
- Seoane, R., Dynarowicz-tstka, P., Miñones Jr., J., & Rey-Gómez Serranillos, I. (2001). *Colloid Polym Sci*, 279, 562-70.
- Seoane, R., Miñones, J., Conde, O., & Miñones Jr., J. (2000). Study of the interaction of cholesterol with potentially hypocholesterolemic substances in a monolayer form. *Colloid Surf. A*, 174, 329-40.
- Seoane, R., Miñones, J., Conde, O., Iribarnegaray, E., & Casas, M. (1999). Interactions between Amphotericin B and Sterols in Monolayers. Mixed Films of Amphotericin B-Cholesterol. *Langmuir*, 15, 5567-73.
- Seoane, R., Miñones, J., Conde, O., Miñones Jr., J., Casas, M., & Iribarnegaray, E. (2000). *J. Phys. Chem. B*, 104, 7735-44.
- Simopoulos, A. (2004). ¿Qué tiene de especial la Dieta griega?. En: Leighton, F. y Urquiaga, I. Dietas mediterráneas. La evidencia científica. Ediciones UC. 2-16.

- Simopoulos, A. (11 de Abril de 2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*. doi:10.3181/0711-MR-311
- Simopoulos, A., Leaf, A., & Salem, N. (1999). Essentiality of and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann. Nutr. Metab.*, 43, 127-30.
- Siscovick, D., Raghunathan, T., King, I., & Weinman, S. (1996). Dietary intake and cell membrane levels of chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *J Am Med Assoc*, 274, 1363-7.
- Slee, E., McLennan, P., Owen, A., & Theiss, M. (2010). Low dietary fish-oil threshold for myocardial membrane n-3 PUFA enrichment independent of n-6 PUFA intake in rats. *J Lipid Res*, 51, 1841-8.
- Small, D. (1988). *The Physical Chemistry of Lipids*. Plenum Press, 2ª, 22. (D. J. Hanahan, Ed.) New York and London.
- Smith, R., & Berg, J. (1980). The collapse of surfactant monolayers at the air—water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 74(1), 273-86.
- Sprecher, H. (2002). The roles of anabolic and catabolic reactions in the synthesis and recycling of polyunsaturated fatty acids. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 67, 79-83.
- Stamler, J., Stamler, R., & Neaton, J. (1993). Blood pressure, systolic and diastolic, and cardiovascular risks. US population data. *Arch Intern Med.*, 153, 598-615.
- Stamler, J., Wentworth, D., & Neaton, J. (1986). Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA*, 256, 2823-8.
- Stary, H., Chandler, A., Dinsmore, R., Fuster, V., Glagov, S., & Insull, W. (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *American Heart Association Circulation*, 92, 1355-74.
- Stites, P., & Stobo, D. J. (1966). *Inmunología Básica y Clínica*, 8ª, 214-5. México: El Manual Moderno.
- Su, K., Huang, S., Chiu, C., & Shen, W. (2003). Omega-3 fatty acids in major depressive disorder. A preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Euro Psycho Pharmacol*, 13(4), 267-71.
- Takano, E., Ishida, Y., Iwahashi, M., Araki, T., & Irimaya, K. (1997). Surface Chemical and Morphological Study on Monolayers of Cholesterol, Cholestanol, and Their Derivatives Conjugated with Amino Acid. *Langmuir*, 13(21), 5782-6.
- Taneva, S., & Keough, K. M. (1997). Cholesterol modifies the properties of surface films of dipalmitoylphosphatidylcholine plus pulmonary surfactant-associated protein B or C spread or adsorbed at the air-water interface. *Biochemistry*, 36(4), 912-22.
- Tomoaia-Cotisel, M., Zsakó, J., Mocanu, A., Lupea, M., & Chifu, E. (1987). Insoluble mixed monolayers: III. The ionization characteristics of some fatty acids at the air/water interface. *J. Colloid Interface Sci.*, 117, 464-76.
- Tyrode, E., Niga, P., Johnson, M., & Rutland, M. (2010). Molecular Structure upon Compression and Stability toward Oxidation of Langmuir Films of Unsaturated Fatty Acids: A Vibrational Sum Frequency Spectroscopy Study. *Langmuir*, 26(17), 14024-31.
- Voet, D. (1992). *Bioquímica*. 704-11. Barcelona: Editorial Omega.

- Vollhardt, D. (1996). *Adv. Colloid Interface Sci.*, 64, 143.
- Von Schacky, C., Baumann, K., & Angerer, P. (2001). The effect of n-3 fatty acids on coronary atherosclerosis: results from SCIMO, an angiographic study, background and implications. *Lipids*, 36, 99S-102S.
- Wall, R., Ross, R., Fitzgerald, G., & Stanton, C. (2010). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutr Rev*, 68, 280-9.
- Wang, C., Harris, W., Chung, M., Lichtenstein, A., Balk, E., & Kupelnick, B. (2006). n-3 fatty acids from fish or fish oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary and secondary prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr*, 84, 5-17.
- Wardlaw, G., & Snook, J. (1990). Effect of diets high in butter, corn oil, or high-oleic acid sunflower oil on serum lipids and apolipoproteins in men. 1990. . *American Journal of Clinical Nutrition*, 51, 815-21.
- Weidemann, G., Gehlert, U., & Vollardt, D. (1995). *Langmuir*, 11, 864.
- Wieland, & Schönberg. (1932). *Z. physiol. Chem.*, 211, 261.
- Williams, C., Francis-Knapper, J., Webb, D., Brookes, C., Zampelas, A., Tredger, J., . . . Gibney, M. (1999). Cholesterol reduction using manufactured foods high in monounsaturated fatty acids: a randomized crossover study. *British Journal of Nutrition*, 81, 439-46.
- Xi, S., Cohen, D., Barve, S., & Chen, L. (2001). Fish oil suppressed cytokines and nuclear factor kappa B induced by murine AIDS virus infection. *Nutr Res*, 21, 865-78.
- Zampelas, A., Roche, H., & Knapper, J. (1998). Differences in postprandial lipemic response between Northern and Southern Europeans. *Atherosclerosis*, 139, 83-93.

