An. Real Acad. Farm. 1981, 47: 85-96

Acción de un extracto de semillas de *M. communis* sobre monocapas de lecitina

por

J. R. CHANTRES, M.ª C. SAINZ, E. OTERO y M. ORTEGA (*)

Departamento de Fisicoquímica Aplicada y Técnicas Instrumentales.
Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid

RESUMEN

Se ha estudiado la alteración producida sobre monocapas de lecitina por la presencia en la subfase acuosa de un extracto de semillas de *M. communis*. Los resultados reflejan un aumento aparente del área por molécula de fosfolípido, lo que se interpreta como debido a una penetración en la monocapa por la sustancia aglutinante contenida en el extracto. Al mismo tiempo esto da lugar a la aparición de dos fases inmiscibles en el film. Por otra parte, en presencia del extracto la monocapa de DPPC ve afectada su transición de fase. El conjunto de estos resultados se discute e interpreta en relación con los datos obtenidos sobre el modelo de liposoma correspondiente.

SUMMARY

The changes induced on PC monolayers upon addition of an extract from *M. communis* seeds to the aqueous subphase have been studied. The apparent increase in the area per PL molecule is interpreted as a result of the *Myrtus communis* agglutinating compound incorporation to the monolayers. Furthermore two separated phases can be detected in the film. On the other hand, presence of extract in the subphase also affects the DPPC monolayers phase transition from expanded liquid to condensed liquid. The whole of these results is discussed an interpreted in relation to previous data obtained using the liposome model.

INTRODUCCIÓN

Los trabajos que Ortega y cols. (1-4) han venido realizando con extractos de semillas de *Myrtus communis*, ponen de manifiesto la presencia en ellos de una sustancia con propiedades hemaglutinan-

(*) Departamento de Técnicas Instrumentales. Facultad de Farmacia. Universidad de Alcalá de Henares.

tes, sin especificidad serológica ni química, ya que su acción no es específica de especie animal o grupo sanguíneo determinado, y además no es inhibida «in vitro» por azúcares sencillos.

En opinión de diversos autores (5-7), su carácter hidrofóbico origina una mayor afinidad por lípidos y lipoproteínas, que por sustancias de composición glucosídica. Ello hace suponer, que, dentro de la relación con la membrana que se establece en la primera fase del proceso de hemaglutinación, la acción de la aglutinina se realice, al menos en parte, mediante un mecanismo que implica su incorporación en la matriz lipídica.

Halperin y Shatiel (8) han demostrado la existencia de áreas hidrófobas en la superficie de los eritrocitos, lo que permite su discriminación mediante cromatografía de afinidad. Por su parte, Schmidt-Ulrich y cols. (9) al estudiar la interacción de la Con A con membranas de timocitos, en condiciones de saturación, han podido observar que el 60-75 por 100 de la misma se fija en lugares distintos al de la glicoproteína que constituye su receptor habitual, siendo la bicapa lipídica su nuevo sitio de acomodación.

Esta unión, no específica a la bicapa, puede influir, sin duda, en de la aglutinación, al alterar la movilidad de otros componentes no lipídicos de la misma.

Sobre esta base, se llevó a cabo, con anterioridad, un estudio de la interacción del extracto de *Myrtus* con liposomas de fosfolípidos puros, utilizados como modelo lipídico de membrana (10).

En el presente trabajo, se ha realizado un intento de obtener más información sobre el proceso citado. Para ello, hemos acudido al modelo de capas monomoleculares, siendo la lecitina de huevo y la dipalmitoil lecitina (lecitina sintética), los dos fosfolípidos utilizados en su preparación.

En las monocapas de lípidos, estos adoptan una configuración en la interfacie aire-agua, similar a la que poseen en la membrana; la formación espontánea de esta capa monomolecular, cuyas características permiten asimilarla a una mitad de la capa lipídica bimolecular, facilita el estudio de fenómenos que tienen lugar en la interfacie agua-liquido, bien sea con los componentes naturales de la membrana o por incorporación de un elemento ajeno a ella. De esta manera, puede obtenerse información directa sobre la penetración o no en dicha estructura, de determinadas moléculas de interés biológico. Asimismo, es posible conocer las condiciones de interfacie que influyen sobre el proceso.

Como en este sentido influye también la composición lipídica de la monocapa, decidimos operar tanto con lecitina de huevo, como con dipalmitoil lecitina, a fin de conocer la influencia del extracto en los cambios de fase correspondientes.

Materiales y métodos

Materiales

La lecitina natural (PC) con que se ha trabajado, fue obtenida en nuestro laboratorio a partir de yema de huevo, según el procedimiento descrito por Folch-Lees (11). Tras purificación en columna de alúmina, el producto se caracterizó finalmente por cromatografía en capa fina, utilizando como soporte Silicagel H, y como eluyente la mezcla de cloroformo-metanol-NH_4OH 7 M (46:18:3; v/v/v). Asimismo, y periódicamente, dicha lecitina fue sometida al control de su estado de oxidación (12).

La DL-α-dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), nos fue suministrada por Sigma Chem. Co., en estado cristalino, grado I, y con una riqueza del 99 por 100.

El extracto de semillas de mirto utilizado, tanto en el presente trabajo como en los previos sobre el modelo de liposoma, fue obtenido siguiendo un método de extracción más completo que el que se utilizaba para la obtención del extracto bruto, ya que éste no reunía en principio las características de pureza mínima necesarias para nuestros estudios.

El procedimiento seguido para la obtención del extracto «purificado», consistió, esencialmente, en la extracción sucesiva por disolventes orgánicos. Como primera medida se procedió a la eliminación de la materia grasa. El polvo de semillas desengrasado, fue tratado con metanol, hasta que se comprobó en el mismo una ausencia total de capacidad hemaglutinante. A continuación y sobre el residuo seco del extracto metanólico, se realizaron unas extracciones Soxhlet, con éter etílico, cloroformo, acetato de etilo y acetona sucesivamente. Las temperaturas alcanzadas, nunca fueron superiores a 50° C. Los distintos residuos así obtenidos, tras evaporación de los respectivos solventes, fueron desecados en estufa de vacío y conservados en desecador.

Analizada la capacidad hemaglutinante de los mencionados residuos, pudo comprobarse que la mayor parte de ella, se encontraba, fundamentalmente, en el que proviene de la extracción con acetona. La incorporación de sustancia activa en los primeros disolventes, es despreciable, y por otra parte, sus residuos son pequeños y de difícil manejo.

Del citado residuo en que se concentraba la actividad hemaglutinante, se procedió, en una última fase, a la extracción con solución acuosa de ClNa 0,9 por 100 durante 24 h., y a la subsiguiente liofilización. En análisis posteriores, se determinó que la actividad espe-

cífica del nuevo extracto liofilizado, resulta ser doce veces superior a la del producto bruto primitivo.

Métodos

El aparato en que se realizaron los estudios de las capas monomoleculares fue construido de acuerdo con el esquema de Verger y de Haas (13), adaptado por nosotros para el conocimiento dinámico de las mismas. Dicho sistema consta de una cámara termostatizada en cuyo interior se encuentra la cubeta que ha de contener el sustrato, así como el mecanismo de arrastre de la barrera de compresión de la monocapa. El dispositivo utilizado para medir la variación de las presiones superficiales consta de una placa de Wilhelmy que cuelga de uno de los brazos de una electromicrobalanza Beckman LM-600, cuya señal pasa a un sistema electrónico, alternativamente barostático, con indicador digital y en conexión con un registrador Baush & Lomb. Velocidad de compresión: 5 cm/min. Sensibilidad: ± 0,1-0,01 din/cm.

De cada monocapa, se obtuvieron dos tipos de registros; en el primero, la subfase estaba constituida por un medio tampón de ácido cítrico/PO_4HNa_2 pH = 5,45, exclusivamente, mientras que en el segundo se había solubilizado el extracto en dicho tampón.

Las muestras para la siembra fueron preparadas tomando un volumen conveniente de la solución clorofórmica madre de fosfolípido y evaporación subsiguiente del solvente bajo corriente de N_2, hasta sequedad. A continuación se disolvía el residuo en un volumen adecuado de éter de petróleo-etanol (4:1, v/v), con una gota de alcohol amílico para favorecer la extensión de las monocapas. Para la siembra, se hizo uso de una microjeringa Hamilton de 50 µl. La cantidad de fosfolípido depositada sobre el soporte, fue, en todas las pruebas, de $2{,}41 \cdot 10^{-8}$ moles. La temperatura del sustrato se mantuvo siempre a 22 ± 1° C mediante la termostatización independiente del mismo.

Ante la inviabilidad de llevar a cabo todos los ensayos utilizando una solución de extracto única y homogénea, ya que el almacenamiento de la misma conduce a degradaciones, cuya influencia es fácilmente detectable por la técnica de monocapas, se optó por reconstituir diariamente la solución del extracto, a partir de los liofilizados, para realizar con ella cada grupo de experiencias.

Resultados

En primer lugar, se procedió a comprobar si el extracto de mirto, en las concentraciones en que iba a ser utilizado, daba monocapa.

En todos los casos, se obtuvo una superficie vacía en el barrido de compresión

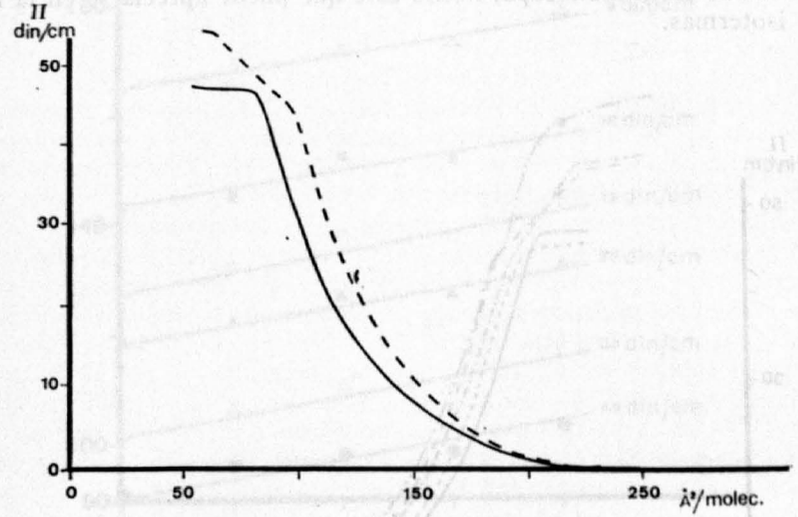

Fig. 1.—Isoterma de compresión de la monocapa de PC, en tampón McIlvaine pH = 5,45: a) en ausencia de extracto (—); b) con extracto en la subfase (1,10 µg/ml) (— — — —).

Al sembrar PC sobre una subfase que contiene extracto, la isoterma de compresión que se registra (fig. 1) indica que la monocapa formada es más expandida que la que se obtiene con la misma PC sobre una subfase carente de extracto. En la figura 2 presentamos las isotermas de PC registradas en ausencia de extracto, y para cuatro concentraciones crecientes de éste. Dado que en presencia de liposomas, el extracto pierde su capacidad hemaglutinante, al tiempo que los modelos sufren una serie de transformaciones (10), nosotros postulamos que la sustancia que es capaz de interaccionar con los fosfolípidos, dispuestos en forma de capa monomolecular, es la misma que provoca los mencionados cambios.

La figura 3 corresponde a la representación, para distintos valores de presión superficial (π), del área media ocupada por cada molécula de fosfolípido, frente a la concentración de extracto. De ella se deduce la existencia de una proporcionalidad entre el efecto expansivo y la concentración de extracto en la subfase.

Las líneas rectas ajustadas para representar dicha proporcionalidad directa, a cada π, son prácticamente paralelas entre sí, confirmando con ello la ausencia de cambios significativos en la compre-

sibilidad. Al mismo tiempo, ello es indicativo de que el aumento de presión superficial no conduce a la expulsión de la sustancia que ha penetrado en la monocapa, hecho éste que puede apreciarse en la red de isotermas.

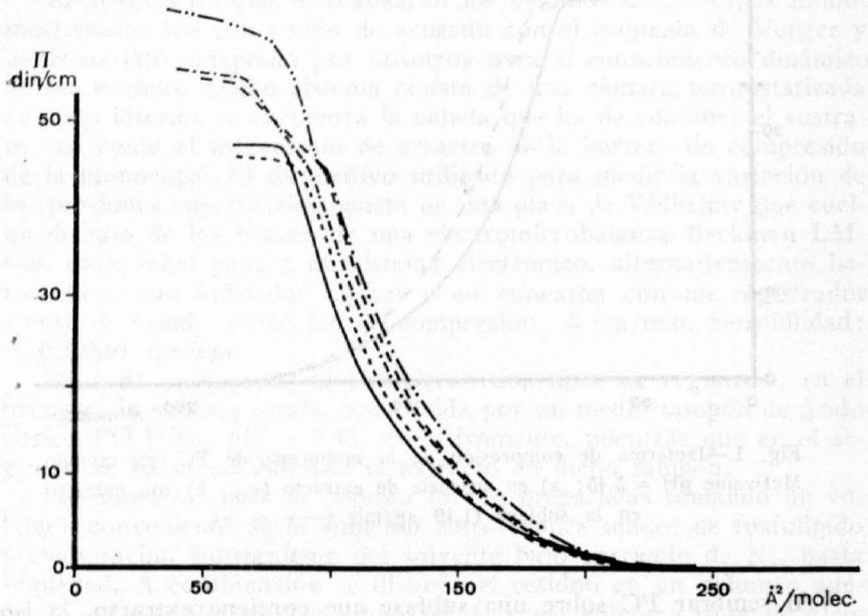

Fig. 2.—Isotermas de compresión de la monocapa de PC, en tampón McIlvaine pH = 5,45: a) en ausencia de extracto (—); b) con extracto en la subfase (0,55 μg/ml) (— — — —); c) ídem 1,10 μg/ml (— — —); e) ídem 1,65 μg/ml (— • —); f) ídem (2,20 μg/ml) (— • • —).

Para presiones superficiales $\pi > 40$ din/cm, entramos en la zona de colapso de la monocapa, donde se producen importantes alteraciones por la presencia del extracto, y que a continuación pasamos a analizar.

La monocapa de PC sobre tampón, colapsa en la región de 47 din/cm. Cuando la subfase está constituida por extracto a distintas concentraciones, todas las isotermas presentan un punto singular en dicha región, cuya localización corresponde a la presión a la que comienza el colapso de la PC. Dicho punto, va siendo progresivamente más impreciso a medida que la concentración de extracto aumenta, llegando a aparecer a presiones mayores un nuevo colapso. En la figura 4, hemos representado el incremento en la

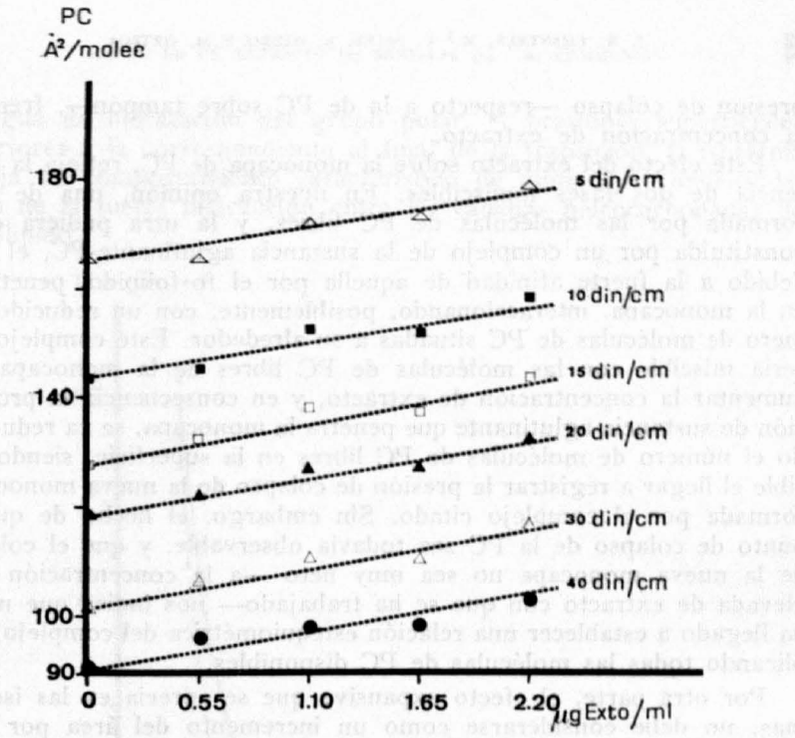

Fig. 3.—Variación del área por molécula de PC con la concentración de extracto en la subfase, a distintas presiones superficiales.

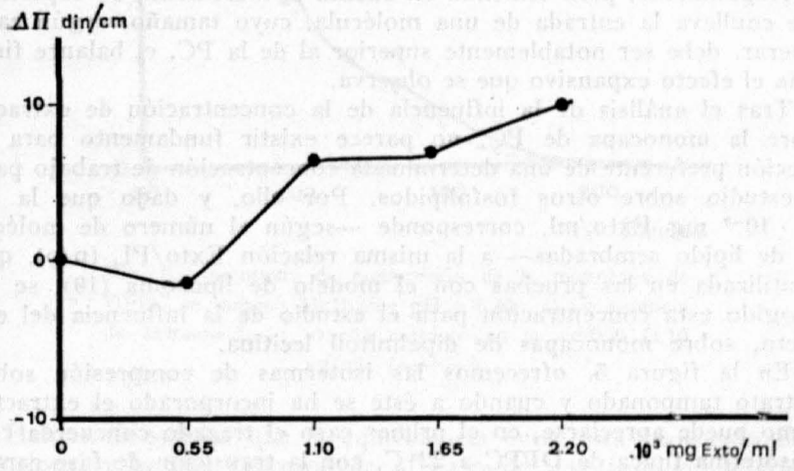

Fig. 4.—Variación de la presión de colapso de monocapas de PC, formadas en presencia de extracto, en función de la concentración de éste en la subfase. $\Delta\pi$ es la diferencia entre la presión a la que se observa el colapso en las isotermas obtenidas en presencia de extracto, y la correspondiente en ausencia del mismo.

presión de colapso —respecto a la de PC sobre tampón—, frente a la concentración de extracto.

Este efecto del extracto sobre la monocapa de PC, refleja la existencia de dos fases inmiscibles. En nuestra opinión, una de ellas formada por las moléculas de PC libres, y la otra pudiera estar constituida por un complejo de la sustancia aglutinante-PC, el cual debido a la fuerte afinidad de aquella por el fosfolípido, penetraría en la monocapa, interaccionando, posiblemente, con un reducido número de moléculas de PC situadas a su alrededor. Este complejo, no sería miscible con las moléculas de PC libres de la monocapa. Al aumentar la concentración de extracto, y en consecuencia la proporción de sustancia aglutinante que penetra la monocapa, se va reduciendo el número de moléculas de PC libres en la superficie, siendo posible el llegar a registrar la presión de colapso de la nueva monocapa, formada por el complejo citado. Sin embargo, el hecho de que el punto de colapso de la PC sea todavía observable, y que el colapso de la nueva monocapa no sea muy neto —a la concentración más elevada de extracto con que se ha trabajado— nos indica que no se ha llegado a establecer una relación estequiométrica del complejo, implicando todas las moléculas de PC disponibles.

Por otra parte, el efecto expansivo que se aprecia en las isotermas, no debe considerarse como un incremento del área por molécula de fosfolípido, sino que sería debido a la incorporación a la monocapa de la sustancia aglutinante. En nuestra opinión, la penetración de ésta, contraería la monocapa al establecerse la interacción correspondiente, pero teniendo en cuenta el incremento de superficie que conlleva la entrada de una molécula, cuyo tamaño, según cabe esperar, debe ser notablemente superior al de la PC, el balance final sería de efecto expansivo que se observa.

Tras el análisis de la influencia de la concentración de extracto sobre la monocapa de PC, no parece existir fundamento para la elección preferente de una determinada concentración de trabajo para el estudio sobre otros fosfolípidos. Por ello, y dado que la de $1{,}1 \cdot 10^{-3}$ mg Exto/ml, corresponde —según el número de moléculas de lípido sembradas— a la misma relación Exto/PL (p/p), que la utilizada en las pruebas con el modelo de liposoma (10), se ha escogido esta concentración para el estudio de la influencia del extracto, sobre monocapas de dipalmitoil lecitina.

En la figura 5, ofrecemos las isotermas de compresión sobre sustrato tamponado y cuando a éste se ha incorporado el extracto. Como puede apreciarse, en el primer caso el trazado concuerda con la isoterma típica de DPPC a 22° C, con la transición de fase característica. Esta, según la opinión comúnmente aceptada, supone el paso de una situación de líquido expandido, a otra de líquido condensado. Algunos autores, la atribuyen a una pérdida de moléculas

de agua de hidratación del grupo polar. A presiones superficiales superiores a la correspondiente al final de la transición, la isoterma refleja un comportamiento característico de monocapa condensada, fruto de la fuerte interacción entre las cadenas hidrocarbonadas de fosfolípido.

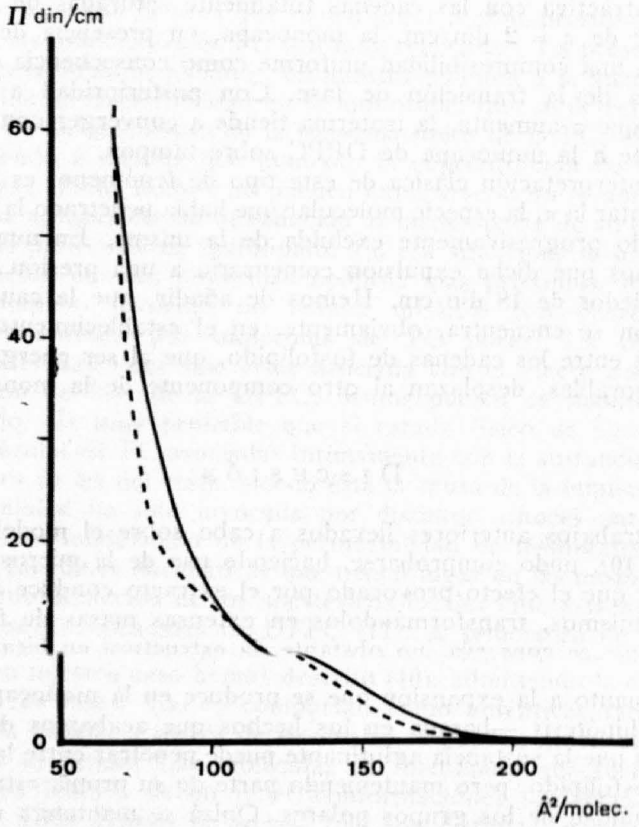

Fig. 5.—Isotermas de compresión de la monocapa de DPPC en tampón McIlvaine pH = 5,45: a) en ausencia de extracto (—); b) con extracto en la subfase (1,10 μg/ml) (— — —).

Hemos de señalar que la equivalencia entre esta transición bidimensional y la que corresponde al paso de una fase gel a cristal líquido en un sistema de tres dimensiones (bicapas), es un hecho ampliamente probado (13).

De la isoterma registrada cuando en la subfase se encuentra pre-

sente el extracto, puede deducirse por tanto que el efecto inmediato de éste es el de difuminar la transición. Por otra parte, a presiones superficiales bajas, y con anterioridad a la transición, se observa una acción condensante, que puede ser atribuida a un fenómeno de ocupación de huecos, como el descrito por Shah y Shulman (14), e interacción atractiva con las cadenas totalmente saturadas de la DPPC. A partir de $\pi = 2$ din/cm, la monocapa, en presencia de extracto, presenta una compresibilidad uniforme como consecuencia de la difuminación de la transición de fase. Con posterioridad a ésta, y a medida que π aumenta, la isoterma tiende a converger con la correspondiente a la monocapa de DPPC sobre tampón.

La interpretación clásica de este tipo de fenómeno, es la de que, al aumentar la π, la especie molecular que había penetrado la monocapa va siendo progresivamente excluida de la misma. En nuestro caso, estimamos que dicha expulsión comenzaría a una presión superficial de alrededor de 18 din/cm. Hemos de añadir, que la causa de esta expulsión se encuentra, obviamente, en el establecimiento de interacciones entre las cadenas de fosfolípido, que al ser energéticamente más favorables, desplazan al otro componente de la monocapa.

Discusión

En trabajos anteriores llevados a cabo sobre el modelo de liposomas (10), pudo comprobarse, haciendo uso de la microscopía electrónica, que el efecto provocado por el extracto conduce a la fusión de los mismos, transformándolos en extensas masas de fosfolípido, en las que se conserva, no obstante, la estructura en bicapa a largo alcance.

En cuanto a la expansión que se produce en la monocapa de PC, nuestra hipótesis —basada en los hechos que acabamos de mencionar—, es que la sustancia aglutinante puede penetrar entre las moléculas de fosfolípido, pero manteniendo parte de su propia estructura en la proximidad de los grupos polares. Quizá se mantenga unida a la interfacie, debido a la existencia de un grupo polar en su molécula, lo que ya hemos postulado en trabajos previos (10). En relación con esto, es sorprendente que una molécula que puede penetrar la monocapa de otro compuesto, y a la que se reconoce un carácter anfifílico, no forme monocapa por sí misma. Realmente, no podemos dar una explicación a este hecho, excepto el apuntar la posibilidad de que la misma muestre distinta conformación en un medio acuoso y en un medio apolar. Si es así, el cambio debe ser reversible, ya que la utilización de disolventes orgánicos, no altera la posterior actividad hemaglutinante evaluada en medio acuoso (10). Un cambio semejante al apuntado, puede tener lugar en la monocapa.

Evidentemente, se podría renunciar a este argumento si se aceptara que la interacción con la monocapa, ocurre, tan solo, a nivel de los grupos polares. Sin embargo, esto no es probable; de hecho, en monocapas de DPPC, en las de dicetil fosfato (10), e incluso en las de colesterol (10), asistimos a un auténtico proceso de expulsión de la sustancia aglutinante desde su localización original, a la fase acuosa. Es más, los sucesos que tienen lugar a altas presiones superficiales en las monocapas de PC son muy relevantes. La presencia del extracto en la subfase, conduce, en nuestra opinión, a la aparición de una situación de inmiscibilidad en la monocapa, que se detecta por la existencia de un precolapso en la isoterma típica de la PC, el cual va desapareciendo a medida que aumenta la concentración de extracto en la subfase. Estos hechos no pueden explicarse si no se admite que la sustancia aglutinante ha introducido al menos parte de su estructura entre las moléculas de fosfolípido. En esa situación, se produciría una asociación con las moléculas lipídicas más próximas, de forma que el complejo formado no resulta miscible con el resto del sistema, constituido por moléculas de PC libres. La causa de esta inmiscibilidad tiene que estar asociada con el efecto que, sobre la transición de fase de la DPPC, hemos puesto de manifiesto en este trabajo. Es muy probable que el estado físico de las cadenas de las moléculas de PC asociadas íntimamente con la sustancia aglutinante difiera de las del resto, siendo ésta la causa de la inmiscibilidad. Esta posibilidad ha sido invocada por distintos autores para explicar efectos de modulación de la permeabilidad de membranas biológicas y de funciones enzimáticas que tienen lugar en las mismas (15); el mecanismo de acción de los anestésicos locales (16), y la acción de la Con A sobre liposomas de DPPC (17). A semejanza de este último caso, se puede interpretar el fenómeno de fusión de los liposomas que en nuestro caso hemos descrito (10), admitiendo la existencia de límites de fases, que se comportan como auténticas fallas en el plano de la bicapa, a través de las cuales se pueden desencadenar los efectos de la fusión. Las moléculas de fosfolípido que forman parte de estos límites, deben tener conformaciones —afectando a las cadenas y a los grupos polares—, que son distintas, y quizás intermedias, entre las que se adoptan en los estados fluido y sólido.

El resultado obtenido con las monocapas de DPPC, corrobora las observaciones realizadas sobre el modelo de liposoma utilizando el marcador fluorescente ANS (10). En ambos casos, el efecto provocado por el extracto tiende a hacer desaparecer las diferencias entre dos estados de distinta ordenación: el estado condensado gel, y el estado fluido cristal-líquido.

La menor capacidad de la sustancia aglutinante para penetrar entre las moléculas de DPPC ordenadas en el estrecho empaquetamiento que supone la fase gel, se refleja en su paulatina expulsión de la co-

rrespondiente monocapa a medida que aumenta la presión superficial y con ello el grado de condensación de las moléculas de fosfolípido y la fuerte interacción entre cadenas. Esto aclara el hecho de que liposomas de DPPC, a temperatura inferior a la de la transición gel-cristal líquido, muestren menor tendencia a la fusión que los constituidos por PC.

Bibliografía

(1) Ortega, M. y A. Dolara: «An. Inst. Bot. A. Y. Cavanilles», **237**, 1966.

(2) Otero, R.: Tesis doctoral, Facultad de Farmacia, Madrid. Complutense, febrero 1974.

(3) Abeger, A.: Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Madrid, Complutense, marzo 1974.

(4) Ródenas, S.: Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Madrid, Complutense, junio 1978.

(5) Ochoa, J. L.: «Pathol. Biol.», **27**, 103, 1979.

(6) Ochoa, J. L. y T. Kristiansen: «Febs. Lett.», **90**, 145, 1978.

(7) Ochoa, J. L., T. Kristiansen y S, Pahlman: «Biochim. Biophys Acta», **577**, 102, 1979.

(8) Halperin, G. y S. Shatiel: «Biochem. Biophys. Res. commun.», **72**, 1497, 1976.

(9) Schmidt-Ulrich, R., D. F. H. Wallach y J. Hendricks: «Biochim. Biophys. Acta», **443**, 587, 1976.

(10) Sainz, C.: Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Madrid, junio 1980.

(11) Folch, J. M., Lees y G. H. Sloane-Stanley: «J. Biol. Chem.», **226**, 497, 1957.

(12) Faucon, J. F. y C. Lussan: «Comptes Rendus», C-277, 14, 591, 1973.

(13) Verger, R. y de Haas, G. H.: «Chem. Phys. Lips.», **10**, 127, 1973.

(14) Phillips, M. C.: *Progress in Surface and Membrane Science*. 139-221, vol. 5, «Academic Press», 1972.

(15) Shah, O. D. y M. J. U. Schulman: *Molecular Association in Biological and Related Systems*. E. D. Goddard, Symposium Chairman. American Chemical Society. Washington, D. C., 1968.

(16) Papahadjopoulos, D., M. Cowden y H. Kimelberg: «Biochim. Biophys. Acta», **330**, 8, 1973.

(17) Lee, A. G.: «Nature», **262**, 545, 1976.

(18) Bosch, J. van der y H. M. McConnell: «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», **72**, 4409, 1975.