

Appendix III. Resum en català

Presentació

Un dels primers principis de l'Univers és que l'energia ni es crea ni es destrueix, sinó que es transforma. Des de l'absorció d'un fotó per un àtom fins a la generació d'ATP en una cèl·lula l'energia és transformada constantment. En el cas de l'àtom, si no absorbeix cap fotó del camp de radiació roman en el seu estat fonamental, però la no generació d'energia en una cèl·lula pot desencadenar la mort d'aquesta.

La molècula d'ATP (*adenosine triphosphate*) es produeix per la incorporació d'un fosfat inorgànic a una molècula d'ADP (*adenosine diphosphate*) mitjançant una reacció anomenada fosforilació oxidativa. Aquesta reacció es produeix en orgànuls presents en l'interior de la cèl·lula, un del quals és el mitocondri.

El mitocondri és un orgànul present en cèl·lules animals i fongs. Una de les peculiaritats d'aquest orgànul és que la seva bicapa interior és molt diferent de l'exterior. En aquesta bicapa interior es troba ubicat el citocrom *c*, una proteïna de membrana involucrada en la cadena respiratòria en la que es produeix ATP. L'alliberament del citocrom *c* de la bicapa impedeix la generació d'ATP, i per tant d'energia, el que pot desencadenar la mort cel·lular.

Degut a la rellevància del citocrom *c* en la generació d'energia dins la cèl·lula, el coneixement de l'ambient lipídic en què es troba és de gran importància i pot aportar nous coneixements per impedir el seu alliberament durant l'apoptosi o mort cel·lular programada.

Motivació i evolució personal

Quan vaig decidir aplicar els meus coneixements de Física a la Biofísica o la Biologia va ser molt difícil treballar en un laboratori de la Facultat de Farmàcia. Durant la meua llicenciatura en Física jo no vaig fer servir cap mena de material biològic i els meus coneixements sobre el tema eren quasi nuls. Al principi la Tesi estava centrada en l'estudi de models de membrana utilitzant fosfolípids sintètics. Així doncs, l'any 2001, el grup posseïa un espectrofluorímetre on vaig començar a formar-me en estudis de fluorescència, en particular d'interacció de sondes fluorescents de superfície, com l'ANS o el Laurdan[®] i el Prodan[®], amb vesícules. Llavors el grup va adquirir una cubeta de Langmuir Blodgett de Nima[®] on vaig millorar els meus coneixements i habilitats en la formació d'isotermes i extracció de pel·lícules de Langmuir Blodgett. Paral·lelament a la realització dels experiments amb monocapes vaig realitzar el meu treball experimental del DEA, "*Nanomodificació per oxidació anòdica d'una superfície de silici (111) mitjançant el microscopi de força atòmica*", on vaig convertir-me en autousuari del microscopi de força atòmica. Després d'aquests estudis inorgànics vaig aplicar els meus coneixements d'AFM a la matèria tova. Vaig començar amb l'estudi i caracterització de pel·lícules de Langmuir Blodgett sobre mica en aire, però el seu interès biològic és restringit a membranes biològiques molt específiques. La visualització de SPBs en condicions fisiològiques feia el sistema molt més atractiu. Durant els dos últims anys el meu treball de Tesis es va centrar en l'estudi de les interaccions d'una petita proteïna redox, el citocrom *c*, amb els models de membrana estudiats anteriorment. Tot i que s'han aconseguit resultats encara existeixen experiments per realitzar en el futur.

Estructura

No he estat gaire innovador en l'estructura de la Tesis, i està estructurada com les Tesis típiques. El Capítol I és una basta Introducció on es resumeixen les bases de les pel·lícules de Langmuir Blodgett, les membranes biològiques i el microscopi de força atòmica, així com les seves aplicacions. Aquest capítol acaba amb una estudi de l'estat actual de la Nanotecnologia en el món. En el Capítol II presento els Objectius del treball

que han motivat aquesta investigació. El Capítol III és un resum del Material i el Capítol IV engloba els Mètodes Experimentals utilitzats en el present treball. Els Capítols V i VI incorporen els Resultats i la Discussió, respectivament, i el Capítol VII es reserva per les Conclusions obtingudes de les discussions. En Capítol VIII es citen totes les referències que han aparegut en el treball. Al final del text, existeixen alguns Apèndix amb els meus articles publicats, els que estan enviats i un ampli resum de la present Tesis en català.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Pel·lícules de Langmuir-Blodgett

1.1.1. Breu història de l'origen de les pel·lícules de LB

Des de l'antiguitat és coneguda la immiscibilitat dels olis amb l'aigua. Un dels primers científics que va escriure sobre els efectes de l'oli sobre l'aigua va ser Plini el vell (23-79), en el seu treball enciclopèdic *Història Natural*: '*... l'aigua de mar és suavitzada per l'oli, per tant els nedadors escampen oli per la seva superfície perquè suavitza el rugós element ...*'. D'aquí esdevingué la tradició que l'oli calmava les aigües més turbulentes.

No va ser, però, fins 1774 quan Benjamin Franklin (1706-1790) va realitzar el primer experiment documentat de la interacció dels olis sobre l'aigua. Franklin va realitzar uns quants càlculs quantitativs de si una cullera de té plena (2 ml) d'oli era estesa sobre una àrea de mig acre i va trobar que el gruix de la pel·lícula sobre la superfície d'aigua devia ser inferior a 2 nm. Tot i la importància de l'experiment, que per primer cop determinava substàncies en l'ordre dels nanòmetres, l'experiment de Franklin va passar inadvertit per la comunitat científica.

Més de cent anys després de l'experiment de Benjamin Franklin es va realitzar un estudi més acurat de l'efecte de l'oli sobre la superfície de l'aigua. Aquest experiment el va dur a terme Lord Rayleigh (1842-1919), originàriament John William Strut, l'any 1890 on va repetir l'experiment de Franklin, però estimant que l'extensió màxima de l'oli sobre l'aigua determinava que la pel·lícula d'oli estigués formada per una molècula de gruix, és a dir entre 1 i 2 nm. Tot i que els resultats van ser publicats només alguns experts en la matèria li van donar ressò. Paral·lelament a l'experiment de Lord Rayleigh, una dona alemanya, Agnes Pockles (1862-1935), va desenvolupar una rudimentària balança de superfície a l'aigüera de la seva cuina on va determinar l'existència de contaminació en funció de l'àrea de diferents olis. Aquests experiments, amb el suport de Lord Rayleigh, van ser publicats a *Nature* [Pockles, 1891; Pockles, 1892] i van donar el tret de sortida al estudis quantitativs de monocapes d'àcids grassos, alcohols i èsters.

A finals de la dècada de 1910 i principis de la de 1920 Irwing Langmuir (1881-1957), un treballador dels laboratoris de l'empresa *General Electric* on treballava en el camp de les monocapes moleculars, va ser el primer a realitzar estudis sistemàtics de la interacció entre diferents lípids i l'aigua [Langmuir, 1917]. De l'experiència obtinguda va desenvolupar la teoria de fenòmens de superfície que en particular explica el comportament dels tensioactius en la superfície de l'aigua. Aquests estudis van culminar en el premi Nobel en química l'any 1932. L'any 1920 Langmuir va aconseguir dipositar molècules d'àcids grassos en un suport sòlid, però va ser Katharine Blodgett (1898-1979) la primera a descriure detalladament el procediment seqüencial de la deposició de monocapes lipídiques sobre suports sòlids [Blodgett, 1935]. A aquests tipus de monocapes se les anomena pel·lícules de Langmuir-Blodgett (*LB films*), mentre que a les monocapes que no es transfereixen són conegudes per monocapes de Langmuir o monocapes exteses.

Tot i el gran avenç que va reportar la fabricació d'un instrument per quantificar l'àrea que ocupen els lípids i la tècnica per transferir-los a substrats sòlids, no va ser fins 1979 que es va realitzar la primera conferència internacional sobre pel·lícules de Langmuir-Blodgett. A partir de llavors l'interès dels científics de diferents branques de la ciència es va incrementar, sobretot en la utilització de les monocapes com a model de membrana i de les pel·lícules de Langmuir-Blodgett com a recobriment multicapa de superfícies.

1.1.2. Pressió superficial

Les substàncies que poden modificar la tensió superficial presents en la interfase aire-aigua es poden considerar, en primera aproximació, com un gas ideal en dues dimensions. L'equivalent al volum és l'àrea superficial i l'equivalent a la pressió és la pressió superficial que es defineix com:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma$$

on γ_0 és la tensió superficial en absència de les substàncies en la interfase i γ la tensió superficial en presència d'aquestes substàncies. Aquestes substàncies, de manera

general, solen ser de dues naturaleses diferents: partícules inorgàniques, com pot ser l'òxid de silici, i substàncies anfiopàtiques.

1.1.3. Isoterma d'un fosfolípid

La isoterma d'un fosfolípid pot aportar informació de l'estat físic en què es troba la monocapa, i per tant de la molècula a aquella temperatura. La isoterma s'obté comprimint lateralment la monocapa a una velocitat constant mentre s'enregistra la pressió de superfície. Aquest procés es troba representat a la Figura 1.

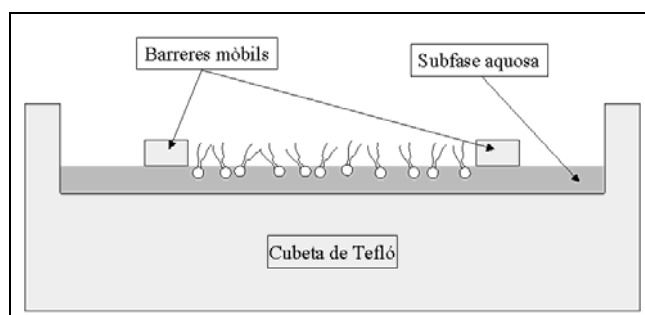


Figura 1. Representació dels fosfolípids en una isoterma.

Existeixen dos punts en la isoterma que es mantenen sigui quina sigui la naturalesa del fosfolípid: el punt en què apareix pressió superficial diferent de zero i el punt del col·lapse. L'àrea per molècula a molt baixa pressió superficial depèn molt de l'estat de les molècules a l'inici de l'experiment. En l'estat inicial els fosfolípids es troben molt allunyats els uns dels altres i, degut a que es troben a una certa temperatura, les cadenes hidrocarbonades es poden trobar en qualsevol inclinació respecte la perpendicular amb la interfase. En comprimir lateralment les molècules es van apropant fins que les àrees específiques entren en contacte (Figura 2). En aquest punt comença a enregistrar-se pressió superficial diferent de zero i conforme augmenta el seu valor es va disminuint l'àrea específica que ocupa cadascuna de les molècules individuals limitant progressivament els moviments de les cadenes hidrocarbonades fins al col·lapse.

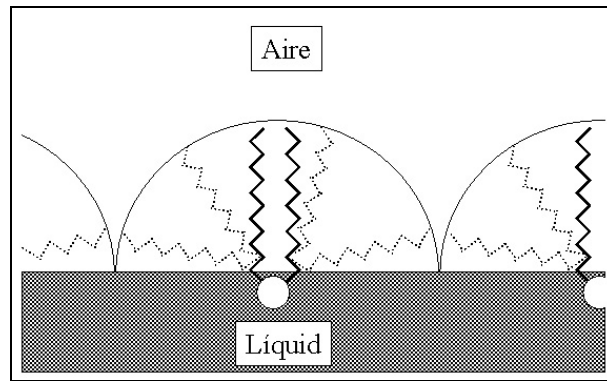


Figura 2. Esquematització de la pressió inicial.

L'àrea per molècula i la pressió superficial en el punt de col·lapse és l'empremta indicativa del fosfolípid i no depèn de com es trobaven les molècules de fosfolípid a l'inici de l'experiment. En el punt de col·lapse els fosfolípids sofreixen una pressió tant alta que no es poden mantenir en forma de capa monomolecular. Així la monocapa es trenca mitjançant dos processos diferents: enviant material cap a la subfase aquosa o enviant material cap a l'aire formant bicapes fosfolipídiques.

Per entendre l'efecte del col·lapse es pot realitzar un petit càlcul de l'equivalència entre pressió superficial i pressió: si s'aplica una pressió superficial de 30 mN/m sobre una monocapa de 10 cm d'extensió i 3 nm d'alçada s'obté que s'està exercint una pressió lateral d'unes **100 atmosferes** sobre la monocapa. Amb aquest càlcul es pot entendre el per què del col·lapse de les monocapes a pressions superfícials altes ($\pi > 40$ mN/m).

1.1.4. Extracció d'una pel·lícula de LB

En l'apartat anterior s'ha detallat el procés pas a pas de la compactació d'una monocapa des d'una pressió superficial propera a zero fins el col·lapse de la mateixa. Si s'atura la compactació a una pressió superficial desitjada es podrà traspasar la monocapa a un substrat sòlid. L'obtenció de la pel·lícula de Langmuir-Blodgett dependrà de les propietats d'hidrofobicitat del material que conforma el substrat. Si el material és hidrofòbic es submergeix el substrat sobre la monocapa mentre es manté la pressió superficial constant. Si el material és hidrofílic el substrat ha d'estar immers en la subfase abans d'incorporar el lípid que conformarà la monocapa i extreure'l elevant-

lo de la subfase aquosa a la pressió superficial desitjada mantenint-la constant. Aquest procés està representat a la Figura 3. Un cop obtinguda la monocapa sobre el substrat es poden obtenir multicapes reproduint l'experiment segons la hidrofobicitat de l'última capa extreta.

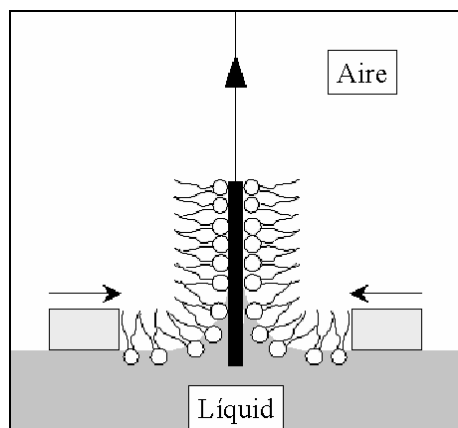


Figura 3. Extracció d'una pel·lícula de LB.

1.1.5. Principi d'estats equivalents

S'ha realitzat multitud d'estudis per intentar comparar la pressió superficial d'una monocapa amb la pressió lateral dins de la bicapa d'un liposoma [Thuren et al., 1986; Kontiila et al., 1988; Feng, 1999]. La idea de poder comparar propietats físiques d'un liposoma amb les d'una monocapa a una certa pressió superficial s'anomena principi d'estats equivalents [Peterson and Brzezinski, 1992; Peterson and Kenn, 1994]. Avui en dia sembla establert que les propietats físiques d'un liposoma són comparables a la d'una monocapa a una pressió superficial propera a 30 mN/m [Marsh, 1996, Cevc and Marsh, 1987].

1.2. Membranes biològiques

En la secció anterior s'ha introduït un model de membrana pla. Tot i que aquest model és entès perfectament existeixen pocs sistemes biològics en la natura on pugui ser aplicat. Així doncs per mimetitzar les membranes biològiques són necessaris models esfèrics.

1.2.1. Membrana cel·lular

Per portar a terme les reaccions químiques per la vida, tant les cèl·lules eucariotes com les procariotes necessiten un medi intern específic. Aquest medi es manté gràcies a la presència d'una barrera, la membrana cel·lular, que delimita els contorns de la cèl·lula. Aquesta membrana té moltes funcions:

- ✓ aïllar selectivament l'interior de la cèl·lula del medi extern.
- ✓ regular l'intercanvi de substàncies entre l'interior i l'exterior de la cèl·lula.
- ✓ comunicació entre cèl·lules i la possible fusió.
- ✓ mantenir la pressió osmòtica entre l'interior i l'exterior de la cèl·lula.
- ✓ ...

Algunes cèl·lules presenten més d'una membrana per mantenir aïllades regions dins de la cèl·lula. Cada una d'aquestes membranes té una composició diferent que els permet realitzar les seves funcions específiques. Alguns exemples són les membranes de diferents orgànuls com la mitocondria, els reticles endoplasmàtics, el nucli, etc.

1.2.2. Composició de la membrana

La composició de les membranes naturals és molt diferent segons la cèl·lula a la que pertanyen, però totes elles tenen en comú que presenten un 40 % en pes de lípids i un 60 % en pes de proteïnes [Guidotti, 1972; Lotan and Nicholson, 1981]. A la Taula I es mostra la diferent composició lipídica d'algunes membranes biològiques.

Taula I. Composició lipídica aproximada de diferents membranes cel·lulars. [Alberts et al., 2003].

Lípid	Percentatge total de lípid en pes					
	Membrana plasmàtica de cèl·lula hepàtica	Membrana plasmàtica de glòbul vermell	Mielina	Mitocòndria (membranes interna i externa)	Reticle endoplasmàtic	Bacteri <i>E.coli</i>
Colesterol	17	23	22	3	6	0
PE	7	18	15	25	17	70
PS	4	7	9	2	5	Traces
PC	24	17	10	39	40	0
Esfingomielina	19	18	8	0	5	0
Glicolípid	7	3	28	Traces	Traces	0
Altres	22	13	8	21	27	30

1.2.3. Mitocòndria

La mitocòndria (del Grec *mitos* filament + *khondrion* grànul) és un orgànul que es troba en quasi totes les cèl·lules eucariotes. Cada cèl·lula conté moltes mitocòndries que poden arribar a ocupar el 25 % del volum del citoplasma. A primera vista la mitocòndria sembla un bacteri dins del citosol, ja que són estructures cilíndriques amb diàmetres al voltant de 0,5 – 1 µm. Cada mitocòndria té dues membranes ben diferenciades: la membrana externa i la membrana interna que es troben separades per l'espai intermembranar. La membrana interna encercla un espai anomenat matriu on es troben molt enzims i l'ADN. La membrana interna es troba doblegada formant les crestes que penetren dins de la matriu, per tant la membrana interna pot tenir una longitud varies vegades més gran que la longitud de la membrana externa. A la Taula II es mostra la diferent composició de la membrana externa i interna per cèl·lules cardíaques on es pot apreciar que la CL només es troba a la membrana interna.

Taula II. Composició lipídica de la membrana externa i interna de mitocondries de cèl·lules cardíques [Daum, 1985].

		Tant per cent de lípids total				
		CL	PE	PC	PI	Altres
Cèl·lules cardíques	Membrana interna	25	38	27	3	7
	Membrana externa	< 1	28	56	9	6

1.2.4. Citocrom c

El citocrom c (*cit c*) és una proteïna perifèrica dèbilment unida a la membrana interna de les mitocondries. És una proteïna essencial en la cadena respiratòria que es troba ubicada entre la *cit c* oxidasa i la *cit c* reductasa transportant un electró entre ambdós complexes. *Cit c* és una homo proteïna de 104 aminoàcids amb un pes molecular de 12384 daltons. De tots els aminoàcids, només 24 presenten càrrega positiva mentre que uns altres 12 presenten càrrega negativa. Aquesta proteïna té un punt isoelèctric de 10 [Malmgren et al., 1978], per tant el *cit c* presenta una càrrega positiva en condicions fisiològiques.

1.2.5. Apoptosis

Quan les cèl·lules són danyades o no són necessàries en l'organisme són destruïdes per un procés anomenat apoptosis o mort cel·lular. Durant el desenvolupament dels organismes el procés d'apoptosi és necessari per tal que els òrgans i teixits adquireixin la seva estructura i funcions. En un organisme adult sa milers de milions de cèl·lules moren en la medul·la òssia i en l'intestí i les cèl·lules de les membranes entre els dits d'un fetus experimenten el procés d'apoptosis per formar correctament els dits. L'apoptosis és el procés que regula la correcta divisió cel·lular, si una cèl·lula és danyada i no pot induir la seva pròpia mort, pot originar un càncer si es divideix sense restriccions.

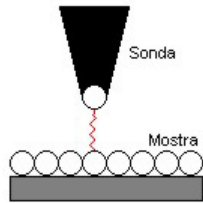
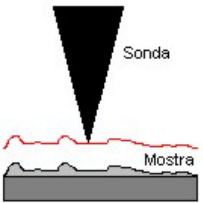
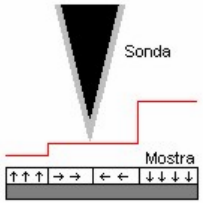
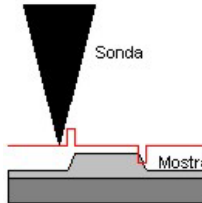
L'apoptosis s'entén com un conjunt de successius processos que causen la mort de la cèl·lula a través de la cascada proteolítica de caspases, però encara no es coneix bé què és el que origina la cascada. Existeixen molts treballs que creuen que l'inici de la

cascaada és deguda a l'alliberament del *cit c* de la membrana interna de la mitocòndria [Jiang and Wang, 2000; Jiang and Wang, 2000; Garrido et al., 2006].

1.3. Microscòpies de Sonda Pròxima

Les tècniques de SPM permeten l'estudi de les propietats de la topografia de materials des d'escala atòmica fins a escala micromètrica. Les microscòpies de sonda pròxima més destacades són: STM, AFM, MFM i LFM. Una comparació entre les diferents microscòpies es troba a la Taula III.

Taula III. Comparació de les tècniques de SPM més destacades.

	STM	AFM	MFM	LFM
Mostra	Conductora	Conductora / no conductora	Magnètica	Conductora / no conductora
Mesura	Canvis en la densitat electrònica d'estats de la superfície	Canvis en la topografia de la superfície	Canvis en el camp magnètic de la superfície	Canvis en les forces laterals de la superfície
Imatge				
Detecció	Corrent entre la sonda i la mostra.	Desplaçament de la sonda degut a la rugositat de la mostra.	Diferència de camp magnètic entre la sonda i la mostra.	Canvi en la inclinació de la sonda per tal de resseguir la mostra perpendicularment a aquesta.

1.3.1. Microscopi de força atòmica

Fes de la seva invenció en 1986 per Bining, Gerber i Quate [Bining et al., 1986] l'AFM ha estat una de les microscòpies més utilitzades en les investigacions a nivell molecular i amb resolució atòmica. L'AFM té moltes aplicacions, des de la determinació d'estructures atòmiques a la mesura amb bacteris vius. Totes elles es poden agrupar en tres grans blocs:

Aplicacions inorgàniques: Aquestes aplicacions van ser les primeres que es van estudiar ja que l'AFM va ser usat en el seu primer experiment per analitzar superfícies ceràmiques (Al_2O_3) en aire [Binning et al., 1986]. L'AFM s'utilitza per visualitzar superfícies que l'STM no pot observar perquè no són conductores, com són les ceràmiques o alguns semiconductors.

Aplicacions biològiques: Habitualment les molècules orgàniques no són conductores. Per analitzar-les es pot utilitzar el microscopi òptic, però la seva resolució no és prou bona per sota del micròmetre. L'AFM pot visualitzar mostres en ambients biomimètics amb gran resolució i fins i tot pot observar processos biològics mentre succeeixen (Muller, 1996). Aquesta microscòpia és una de les eines més potents per determinar la topografia de biomolècules amb una resolució subnanomètrica [Muller et al., 1995; Schabert et al., 1995]. Entre d'altres l'AFM s'ha utilitzat per analitzar ADN, proteïnes, membranes, cèl·lules, etc...

Aplicacions mixtes: Degut a que la nanotecnologia és un procés on la Biologia ha de ser present, però que necessiten dels principis de la Física per obtenir lectures mesurables, es necessita unir ambdós móns. Això es pot aconseguir en els anomenats *biosensors*. Un biosensor pot ser definit com un dispositiu analític compacte que incorpora un detector biològic integrat a un transductor fisicoquímic. Així el detector biològic pot transmetre el senyal cap al dispositiu fisicoquímic que transforma el senyal biològic en una típica senyal elèctrica mesurable.

1.4. Nanotecnologia

La nanotecnologia, tal i com el seu nom indica, és la tecnologia a escala nanomètrica. El prefix *nano*, que en grec significa petit, indica la mil milionèsima part de la unitat a la que es refereix, per tant, un nanòmetre és equivalent a 10^{-9} m. Així un cabell humà té una amplada de 200000 nanòmetres, una cèl·lula humana mesura al voltant de 10000 nanòmetres, un bacteri aproximadament 1500 nanòmetres, el virus causant de la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) té un diàmetre de 100 nanòmetres, una proteïna pot tenir un diàmetre mig de 10 nanòmetres, mentre que una cadena d'

ADN té un gruix aproximat d'un nanòmetre, o el que és el mateix, 8 àtoms d'oxigen col·locats en fila.

El control de materials a escala nanomètrica ha esdevingut un tema de recerca interdisciplinari en física, química, ciència de materials, enginyeries i biologia. La nanotecnologia es pot definir com l'estudi, desenvolupament i processament de materials, dispositius i sistemes, l'estructura dels quals és necessàriament inferior als 100 nm per obtenir el seu correcte funcionament. En la *International Conference on Production Engineering* que es va realitzar a Tokyo el 1974, Norio Taniguchi en la seva conferència: " *On the basic concept of Nanotechnology* " va ser el primer a emprar el mot nanotecnologia.

1.4.1. Nanotecnologia en el món

Com exemple de la importància del desenvolupament de nanotecnologies, el pressupost dels Estats Units d'Amèrica, en aquest camp, per l'any 2002 va ser de 604 milions de dòlars, desglossat en 10 departaments o agències. Entre les que més fons van obtenir hi havia: la *National Science Foundation* (33%), el Departament de Defensa (30%) i el Departament d'Energia (15%). A Espanya, en contrapartida, en el nou Pla Nacional d'Investigació Científica, Desenvolupament i Innovació Tecnològica del 2000-2003 el mot nanotecnologia apareix d'una manera peculiar: " *El campo de la nanotecnología se halla actualmente en un estado de "emergencia incipiente", en gran medida dirigido hacia la biotecnología y a nivel de laboratorio, con las correspondientes excepciones. Las nanotecnologías, aun debiendo ser consideradas con gran interés, deberían ser de prioridad inferior a la de la microtecnología* ". Així doncs el nou Pla Nacional considera poc interessant la nanotecnologia i només la té com a últim objectiu dins del disseny de micro sistemes.

Cal destacar la importància que els militars donen a la nanotecnologia degut al gran potencial que podria tenir en la fabricació d'armes intel·ligents, completament autònomes i de gran precisió, bateries de gran potència miniaturitzades, equipament militar auto-reparable, sensors i biosensors així com desenvolupament de noves armes químiques i biològiques.

Un dels països que més interès té en la nanotecnologia és el Regne Unit el qual lidera l'educació en nanotecnologia a Europa. La *European Society for Precision Engineering and Nanotechnology* (EuSPEN) es dedica a agrupar i educar científics i enginyers que treballen en el camp de la nanotecnologia i potenciar la nanotecnologia cap a nous mercats.

1.4.2. Aplicacions nanotecnològiques

Citant a K.E. Drexler, creador de la teoria de la nanotecnologia: “ ... *la nanotecnologia permetrà la fabricació bottom – up (des del fons cap a dalt)*”. És a dir que dispositius macroscòpics podran ser construïts àtom per àtom. Els defectes i dislocacions podrien ser eliminats des del principi ja que els àtoms estarien en les posicions correctes. Es podrien construir aleacions perfectes així com qualsevol tipus de monocristall.

El món a nanoescala no pot ser entès per una sola ciència, sinó per un compendi d'elles, per tant les aplicacions són interdisciplinàries i podran solucionar els problemes de la societat del dia a dia. Algunes aplicacions es troben resumides a continuació:

Aplicacions computacionals: L'emmagatzament d'informació podrà ser millorat a altes densitats de gravació. Un altra aplicació serà la fabricació de xips produint nanotransistors integrats que podran transmetre la informació més ràpidament. Els transistors serien molècules autoensamblades i la computadora molecular podria ser una realitat.

Aplicacions mèdiques: Es desenvoluparan nous materials i instrumentació mèdica que milloraran la biocompatibilitat i la bioactivitat dels implants així com disminuiran les seqüeles en les operacions, per exemple, eliminació de les cicatrius per recobriment amb nanoestructures. La autoorganització d'estructures obrirà el camí cap a la generació de nous teixits i materials biomimètics que ajudaran en un futur a la síntesi i substitució d'òrgans.

Aplicacions en la seguretat: La detecció de agents biològics o químics amb una gran especificitat ajudarà a la prevenció i detecció d'atacs. La falsificació de documentació o de bitllets de banc es podrà detectar per etiquetes nanoscòpiques.

Aplicacions en ciència de materials: El desenvolupament de nous materials que no es puguin erosionar o que siguin resistents a l'aigua ajudaran a la fabricació de màquines que han de treballar en condicions extremes. La fabricació de noves màquines amb aquests materials permetrà l'existència de motors a escala molecular que seran els pilars de la indústria en el futur. Aquestes màquines nanoscòpiques seran l'escalpel que eliminaran els tumors dels pacients amb un mínim impacte en el pacient durant l'operació. Ells repararan els teixits a escala molecular i tancaran ferides des de l'interior de l'organisme. En el futur aquests motors moleculars seran capaços de reparar les molècules d'ADN incrementant l'esperança de vida.

Com a resum, a la Figura 4 es representa l'evolució de les distàncies de treball en funció de les dècades, des del 1940 fins un futur proper, per diferents branques de la ciència.

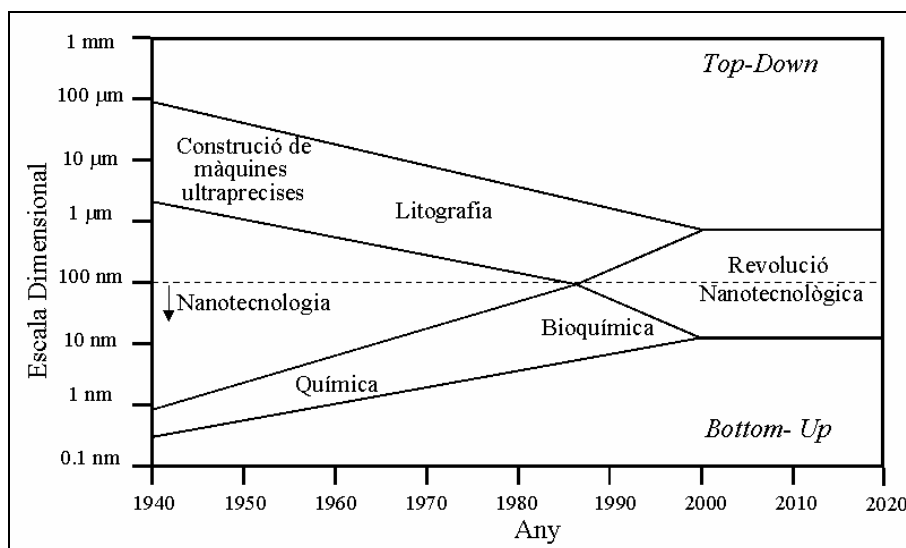


Figura 4. Evolució de les distàncies de treball en funció de les dècades.

La miniaturització dels components permet construir màquines a escala microscòpica des de la dècada de 1950. Posteriorment la litografia per feixos energètics va permetre la modificació d'estructures per sota del micròmetre a partir dels anys 1970, reduint la

grandària dels objectes que es poden fabricar. Paral·lelament la química va començar a comprendre les lleis que regeixen les associacions de molècules individuals fins arribar a la bioquímica que estudia l'autoensamblatge d'unitats funcionals complexes. Ambdues filosofies de treball, la *bottom-up* i la *top-down* convergiran en un futur pròxim, permetent l'entesa del món macroscòpic amb els conceptes establerts del món microscòpic amb l'ajuda de models i simulacions matemàtiques.

2. OBJECTIUS

El principal objectiu d'aquesta Tesi és l'estudi fisicoquímic de la membrana interna de la mitocòndria i la interacció del *cit c* amb models de membrana. S'ha utilitzat dos models de membrana: el model de membrana pla (monocapes) i el model de membrana esfèric (micel·les i liposomes). Per mimetitzar la membrana interna de la mitocòndria s'ha utilitzat tres fosfolípids, POPE, POPC i CL.

Els objectius específics d'aquest treball són:

- Obtenir les monocapes mescla més termodinàmicament estables dels tres fosfolípids.
- Estudiar la diferent incorporació del *cit c* en monocapes mixtes i pures.
- Observar i caracteritzar les pel·lícules de LB pures i mescles per AFM.
- Estudiar la variació del potencial de superfície degut a l'adsorció de *cit c* en liposomes de diferent composició lipídica.
- Visualització per AFM de l'extensió de SPBs i la possible formació de dominis.
- Determinació de l'adsorció del *cit c* en els diferents dominis en les SPBs.

3. RESULTATS

3.1. Estudis termodinàmics en monocapes fosfolipídiques

3.1.1. Mescles de POPE i CL

La Figura 5 mostra la variació de la π en funció de l'àrea per molècula per POPE pur, CL pura i per les barreges d'ambdós.

La monocapa de POPE pur mostra una transició LC-LC' a una $\pi = 36.0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Es pot observar una altra transició en la isoterma de POPE a una $\pi = 45.5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ i a π majors la monocapa assoleix la pressió de col·lapse a una $\pi = 50.7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Les monocapes de CL pura i les monocapes mescles es troben sempre en la fase LE i no mostren cap transició. Quan la CL s'incorpora progressivament a la monocapa, l'àrea per molècula de la monocapa barreja s'incrementa. Si la monocapa de POPE no es considera, les pressions superficials de col·lapse disminueixen monòtonament quan la fracció molar de CL augmenta. Aquest fet suggereix certa miscibilitat entre les molècules de POPE i CL.

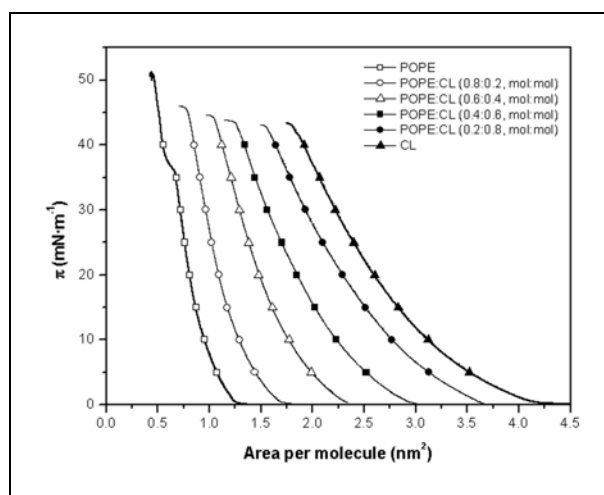


Figura 5. Isotermes de POPE pur, CL pura i les barreges de POPE:CL a 24 °C.

Els valors de A^E es mostren en la Figura 6 en funció de la fracció molar de CL a diverses pressions superficials.

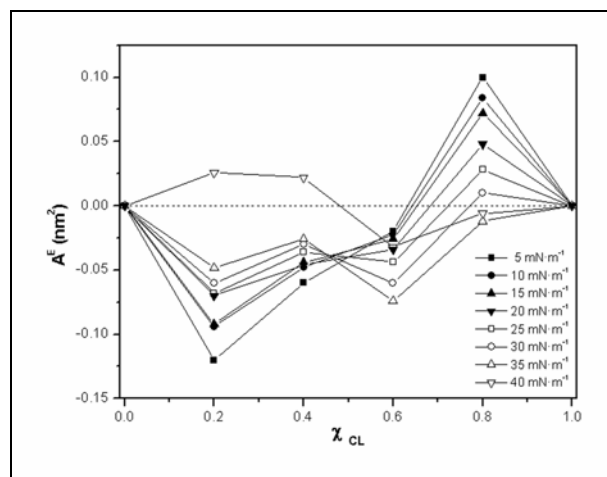


Figura 6. A^E en funció de la fracció molar de CL de monocapes pures i barreges de POPE i CL.

A fraccions molars altes, $\chi_{CL} \geq 0.8$, els valors de A^E són positius i disminueixen el seu valor quan la pressió superficial s'incrementa, mentre que a fraccions molars baixes de CL els valors de A^E són negatius. Valors positius de A^E indiquen inestabilitat en la monocapa degut a l'aparició de forces intermoleculares de repulsió en la monocapa. Existeix un mínim a $\chi_{CL} = 0.2$ per quasi totes les pressions superficials analitzades i disminueix el seu valor absolut quan la pressió superficial s'incrementa.

A la Figura 7 es representa la variació de $\Delta_{mix}G$ per les monocapes mesclades de POPE i CL en funció de la fracció molar de CL per diferents pressions superficials. D'aquesta figura s'observa un mínim a $\chi_{CL} = 0.2$ per quasi totes les pressions superficials. Un mínim en el gràfic indica la monocapa barrejada més estable estudiada. A altes fraccions molars de CL, $\chi_{CL} \geq 0.8$, els valors de $\Delta_{mix}G$ tendeixen cap a valors positius. De manera similar que en l'anàlisi dels valors de A^E , les monocapes amb fracció molar alta de CL presenten repulsió entre veïns tal i com es pot observar en la disminució dels valors absoluts de $\Delta_{mix}G$.

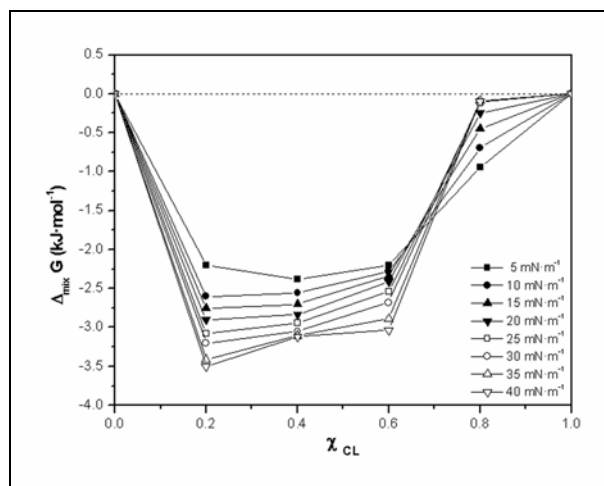


Figura 7. $\Delta_{mix}G$ en funció de la fracció molar de CL de monocapes pures i barreges de POPE i CL.

Per valors de $\chi_{CL} < 0.8$ es troben valors de $\Delta_{mix}G$ grans quan s'augmenta la pressió superficial, mentre que per valors de $\chi_{CL} \geq 0.8$ la resposta davant l'increment de la pressió superficial és oposat. Aquest fet suggereix que les molècules de CL, a fraccions molars per sota de 0,8, poden ser compactades sense repulsió i que les forces intermoleculars a la monocapa són forces d'atracció. A la regió $\chi_{CL} = 0,8 - 1,0$ la compactació lateral origina repulsió entre fosfolípids en la monocapa.

La miscibilitat de les molècules de POPE i CL va ser estudiada més profundament. Es va realitzar les isoterms de dues noves monocapes amb valors $\chi_{CL} = 0,05$ i $\chi_{CL} = 0,10$ tal i com es pot veure a la Figura 8. Per una banda, la monocapa amb $\chi_{CL} = 0,10$ és completament consistent amb les monocapes mostrades en la Figura 5 quan la CL s'introdueix progressivament a la barreja. Per l'altra banda, la monocapa amb $\chi_{CL} = 0,05$ mostra algunes diferències: primer, la monocapa té dues pressions de col·lapse, una a una $\pi \sim 45,9 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ i una altra a una $\pi \sim 50,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$; segon, aquesta monocapa mostra la transició LC-LC' a una $\pi \sim 39,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ suggerint que existeix una certa miscibilitat entre les molècules de POPE i CL a aquesta fracció molar.

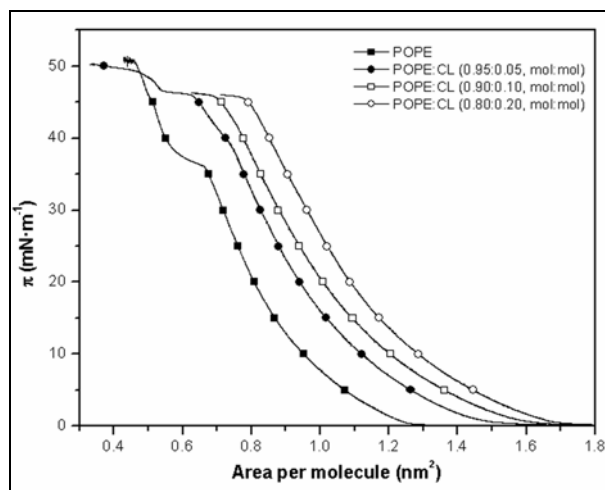


Figura 8. Anàlisi de monocapes barreja de POPE i CL per $\chi_{\text{CL}} \leq 0,20$.

3.1.2. Monocapa de POPE

De les isoterms avaluades en aquest treball, el POPE és l'únic fosfolípid pur que presenta una transició de fase. Per avaluar aquesta transició, es van realitzar diferents isoterms de POPE pur a diferents temperatures.

Les isoterms es van realitzar a 6 temperatures diferents entre 11 °C i 37 °C. A la Figura 9 es mostra la variació de la pressió superficial de POPE pur en funció de l'àrea per molècula a diferents temperatures.

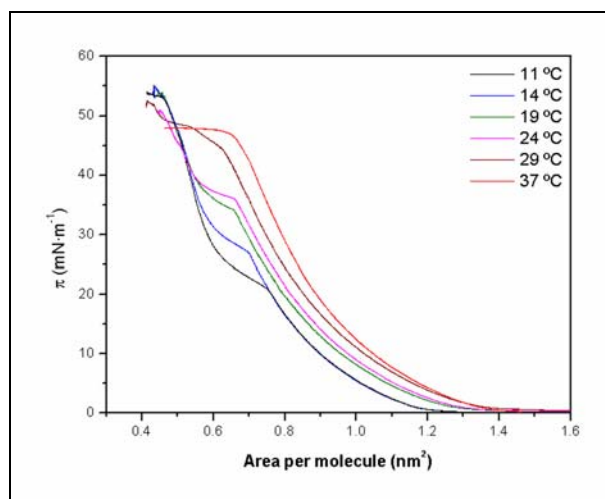


Figura 9. Isoterma de POPE pur a diferents temperatures.

D'aquesta figura es pot veure que la monocapa de POPE mostra la transició LC-LC' a temperatures inferiors a 37 °C i varia la seva pressió superficial amb la temperatura. A 11 °C es troba a una $\pi = 21 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, però a 24 °C ha arribat a una $\pi = 36 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. Les pressions superficials de col·lapse varien amb la temperatura, també. Mentre que per sota de 19 °C roman a una $\pi \sim 53,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, a temperatures superiors disminueix a una $\pi = 51 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ i finalment per la temperatura més alta assoleix un valor de $\pi = 47,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La disminució de la pressió superficial de col·lapse es pot atribuir a la progressiva desaparició de la transició LC-LC'. A més a més, l'àrea per molècula del POPE pur augmenta el seu valor quan la temperatura s'incrementa.

Un altra punt interessant en la Figura 9 és la posició de la segona transició que és molt subtil i presenta una $\pi \sim 45 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ per monocapes amb temperatura inferior a 29 °C. La transició esdevé més pronunciada en la monocapa de 29 °C amb una $\pi = 48,4 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ i desapareix per la monocapa de 37 °C.

3.1.3. Adsorció del *cit c* en monocapes

Les monocapes de POPE pur, CL pura i POPE:CL(0,8:0,2, mol:mol) van ser compactades fins a una π de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ i es va injectar el *cit c* sota la monocapa a través del port d'injecció.

A la Figura 10 es mostra la variació de l'increment de l'àrea per molècula degut a la incorporació del *cit c* en funció del temps. Totes les monocapes estudiades van sofrir un increment progressiu de la seva àrea per molècula degut a la adsorció del *cit c*. La monocapa de CL mostra el màxim valor de ΔA mentre que la monocapa de POPE mostra el menor valor de ΔA . La monocapa barrejada de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) mostra una resposta intermèdia entre ambdós fosfolípids purs tot i la baixa fracció molar de CL.

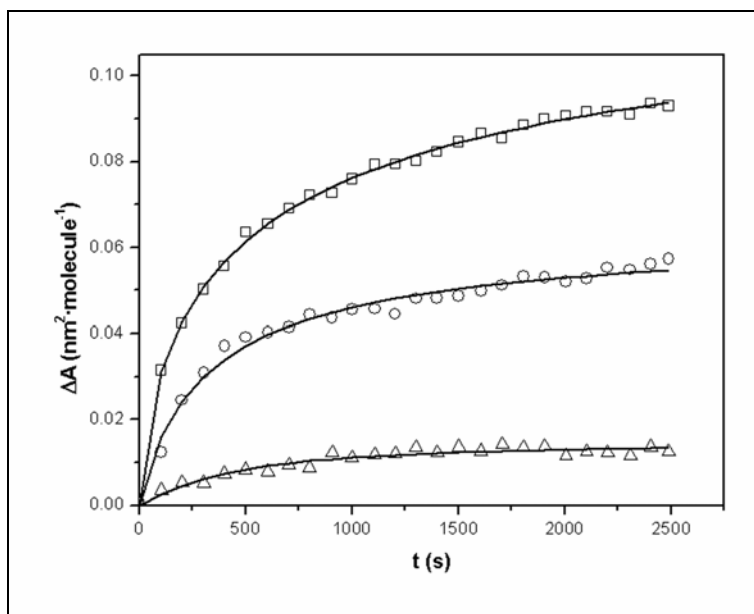


Figura 10. Variació de l'àrea per molècula degut a l'adsorció de *cit c* a monocapes de POPE (Δ), POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) (\circ) i CL (\square).

3.2. Caracterització de pel·lícules de LB per AFM

Les pel·lícules de LB van ser extretes sobre mica recent clivada. Totes les pel·lícules van ser escanejades en aire i en mode de contacte.

3.2.1. Pel·lícula de LB de POPE pur

A la Figura 11 es mostren dues imatges d'AFM de pel·lícules de LB de POPE pur a dues pressions superficials.

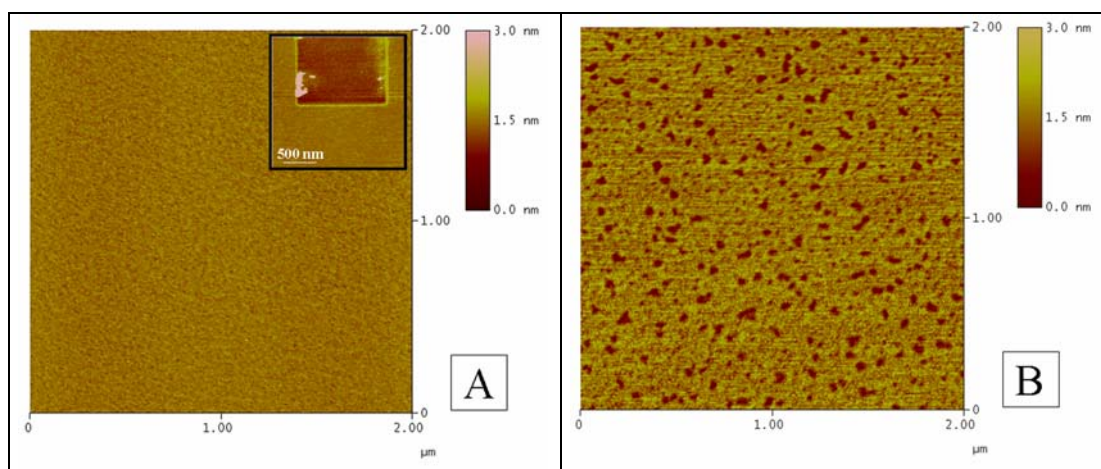


Figura 11. Pel·lícules de LB de POPE pur a π de A) 20 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$ i B) 30 $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$.

A la Figura 11A es mostra una monocapa de POPE a una π de $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En la imatge inserida es pot veure la mateixa imatge on s'ha rascat amb la punta de l'AFM un quadrat de $\sim 1 \mu\text{m}^2$ per mesurar l'alçada de la capa. La monocapa presenta una alçada de $0,30 \text{ nm}$ amb una rugositat (Ra) de $0,05 \text{ nm}$. A la Figura 11B es mostra una monocapa de POPE a una π de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. A la imatge es pot veure una monocapa que recobreix tota la superfície de la mica amb molts petits forats rodons. Aquestes estructures tenen diàmetres de $\sim 75 \text{ nm}$ i una profunditat de $1,16 \text{ nm}$. En aquest cas el valor de Ra es de $0,14$ que és el triple que en el cas de la monocapa a una pressió superficial de $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

A la Figura 12 es mostra una imatge d'AFM de la monocapa de POPE pur a una pressió superficial de $36,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, que és una π més alta que la π de la transició LC-LC'.

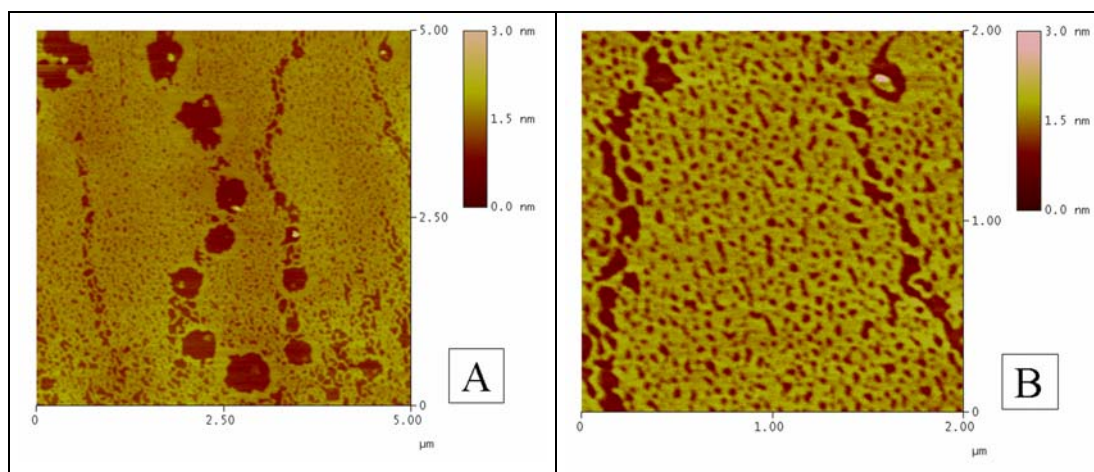


Figura 12. A) Pel·lícula de LB de POPE pur a π de $36,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ B) imatge ampliada de 12A.

A la Figura 12A es mostra una pel·lícula que cobreix la superfície de la mica amb grans estructures rodones que trenquen l'homogeneïtat de la capa. L'alçada de la monocapa és de $0,80 \text{ nm}$ amb un valor de Ra de $0,16$ i existeixen dos tipus d'estructures rodones amb diàmetres de 500 nm i de 90 nm . Cal destacar que les estructures rodones estan alineades i formen fissures en la monocapa. A la Figura 12B es mostra una ampliació de la imatge de la Figura 12A. En la imatge es pot veure una regió similar a l'apareguda a la Figura 11B entre una d'aquelles fissures.

A la Figura 13 es mostra una pel·lícula de LB de POPE pur a una π de $39 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, π més alta que la π de la transició LC-LC'.

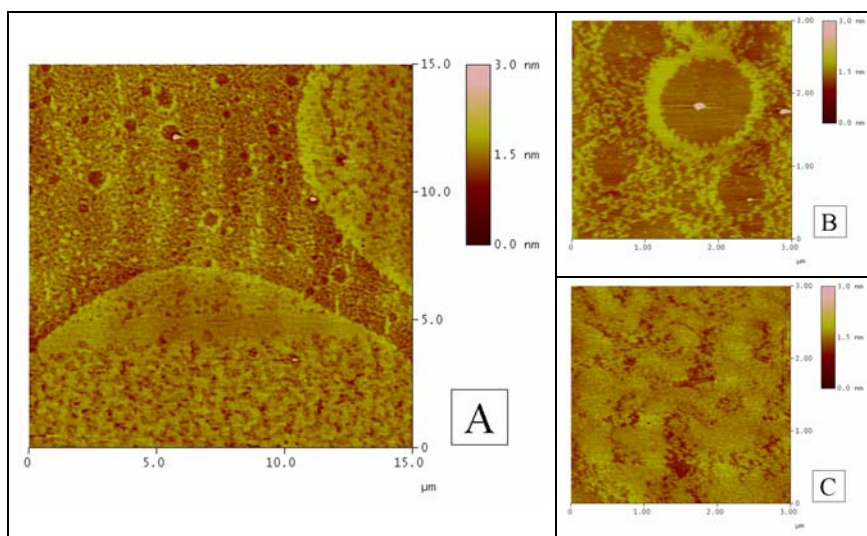


Figura 13. A) Pel·lícula de LB de POPE pur a π de $39 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, B) imatge ampliada de l'estructura baixa i C) imatge ampliada de l'estructura alta.

La Figura 13A mostra dues regions ben diferenciades: una regió de menor alçada que presenta grans estructures rodones (Figura 13B) i una altra regió de major alçada que és més condensada (Figura 13C) i presenta marges ben marcats amb l'altre regió. La regió dins dels forats té una alçada semblant a la rugositat de la mica, l'estructura que forma els forats té una alçada de $1,19 \text{ nm}$ i l'estructura més condensada és $0,63 \text{ nm}$ més alta que l'estructura anterior.

3.2.2. Pel·lícula de LB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol)

A la Figura 14 es mostren dues imatges d'una pel·lícula de LB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) a dues π diferents.

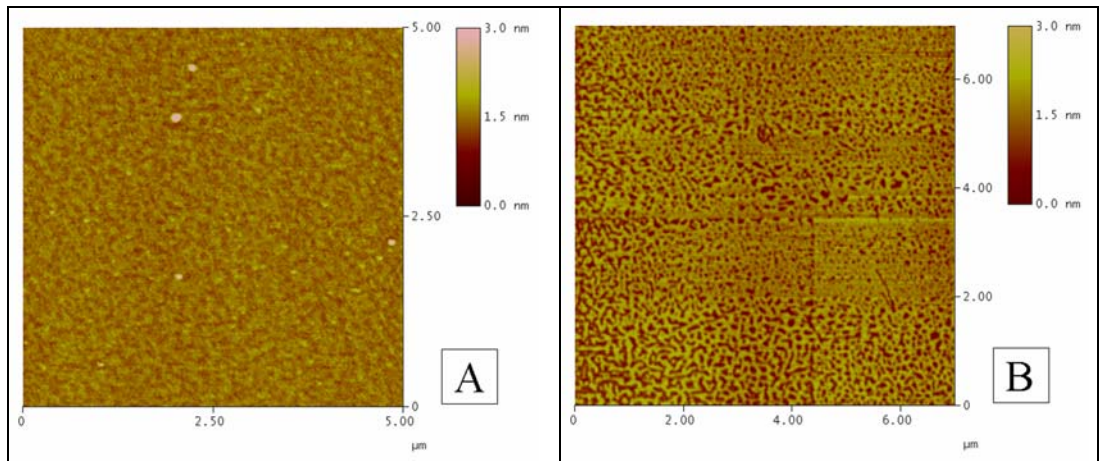


Figura 14. Pel·lícules de LB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) a π de A) $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ i B) $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

A la Figura 14A es mostra una pel·lícula de LB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) a una π de $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En aquesta imatge la monocapa recobreix la totalitat de la superfície de la mica amb un valor de Ra de $0,11 \text{ nm}$ i hi apareixen algunes protuberàncies sobre la monocapa. D'aquesta imatge es pot observar que la monocapa mostra una certa estructura bidimensional homogèniament distribuïda. A la Figura 14B es mostra una pel·lícula de LB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) a una π de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. En aquesta imatge es mostren dues estructures amb una diferència d'alçada de $1,33 \text{ nm}$ on l'estructura més alta mostra diferent estructura en diferents regions.

A la Figura 15 es mostra una imatge ampliada de la Figura 14B on s'observen les dues distribucions que la monocapa pot adoptar. Dins el quadrat blanc l'estructura més alta forma canals, mentre que dins del rectangle blanc l'estructura més alta forma una monocapa més compacta amb petites regions rodones d'alçada més baixa. Aquesta inhomogeneïtat pot ser deguda a una separació de fase de la monocapa barrejada en les diferents regions.

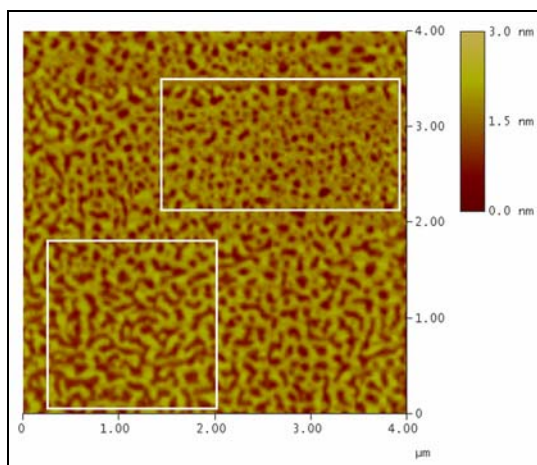
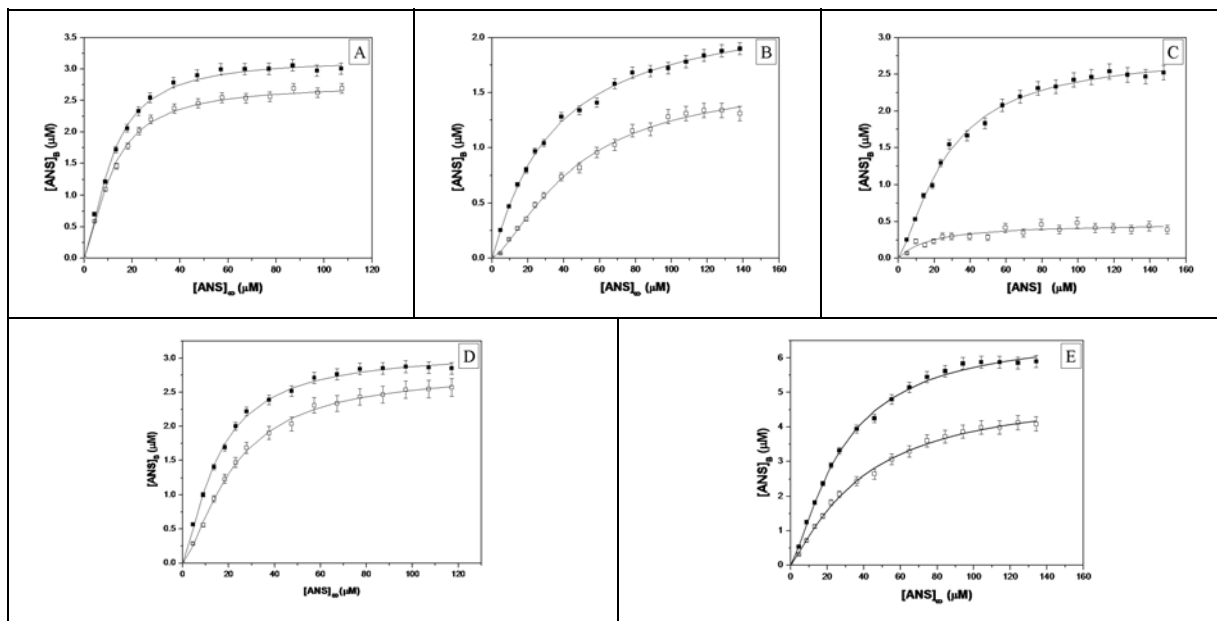


Figura 15. Imatge ampliada de la Figura 15B on es mostren les dues estructures lipídiques.

3.3. Estudis superficials de fluorescència

A la Figura 16 es mostra l'ANS unit en funció de l'ANS lliure per totes les composicions assajades. D'aquestes imatges es pot veure clarament que la CL pura i el POPE pur mostren la màxima i la mínima disminució degut a l'adsorció del *cit c*.



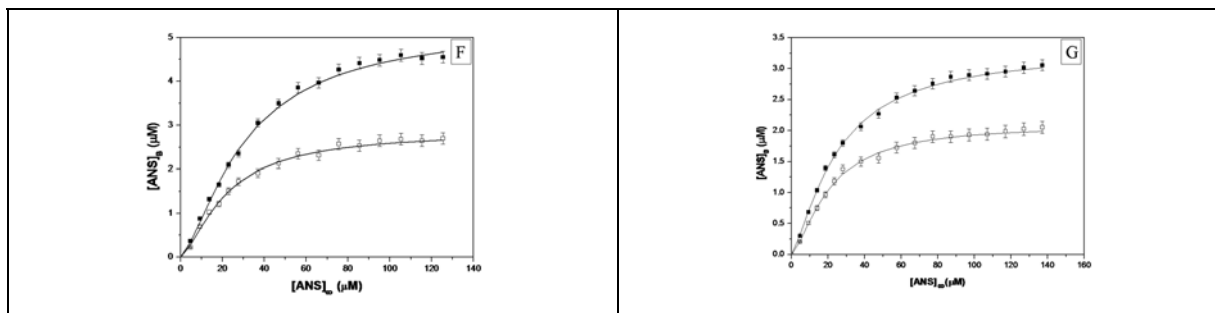


Figura 16. Concentració d'ANS unit en funció de la concentració d'ANS lliure per mostres amb (□) i sense (■) *cit c* per A) POPC, B) POPE, C) CL, D) POPE:POPC (0,6:0,4, mol:mol), E) POPC:CL (0,6:0,4, mol:mol), F) POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) i G) POPE:POPC:CL (0,5:0,3:0,2, mol:mol:mol).

Els valors de $\Delta\psi$ es van calcular segons les equacions de l'apartat de metodologia. A la Taula IV es resumeixen els valors de $\Delta\psi$ deguts a l'adsorció del *cit c* per les mostres estudiades.

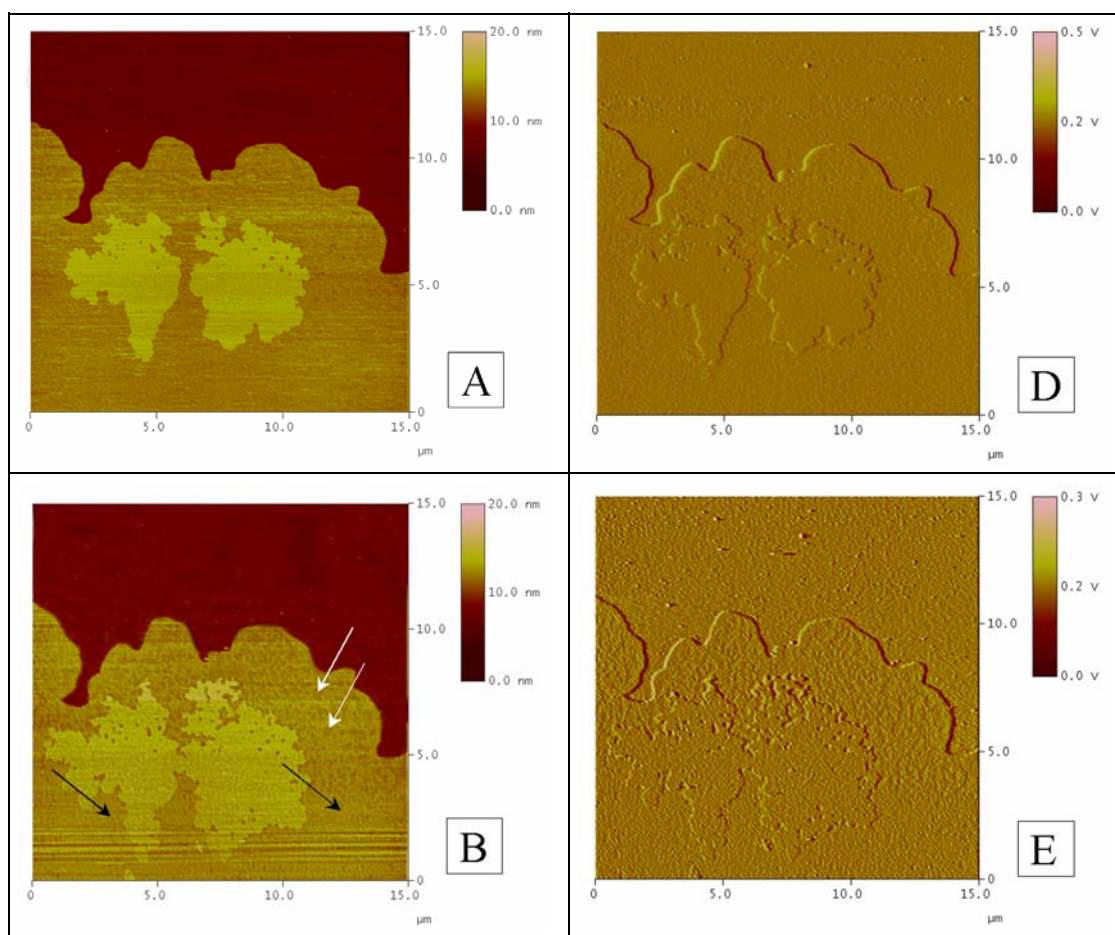
Taula IV. Valors de $\Delta\psi$ deguts a la incorporació de *cit c*.

Composició lipídica	$\Delta\psi$ (mV)
POPC	+ 1,2 ± 0,2
POPE	+ 7,5 ± 0,4
CL	+ 13,4 ± 1,5
POPE:POPC (0,6:0,4, mol:mol)	- 6,5 ± 0,7
POPC:CL (0,6:0,4, mol:mol)	- 0,9 ± 0,4
POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol)	+ 13,5 ± 0,6
POPE:POPC:CL (0,5:0,3:0,2, mol:mol:mol)	+ 1,5 ± 0,3

D'aquesta taula es pot observar que les composicions que presenten el màxim augment en el seu $\Delta\psi$ degut a la incorporació del *cit c* són la CL pura i el POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) amb un valor de + 13,5 mV. D'altra banda la barreja POPE:POPC (0,6:0,4, mol:mol) experimenta una disminució de 6.5 mV mentre que POPC, POPC:CL (0,6:0,4, mol:mol) i POPE:POPC:CL (0,5:0,3:0,2, mol:mol:mol) sofreixen una variació de $\Delta\psi$ de ~1 mV en valor absolut. Les mostres de POPE van mostrar un increment de + 7.5 mV en el seu valor de $\Delta\psi$.

3.4. Caracterització de SPBs per AFM

La Figura 17 mostra una seqüència d'imatges d'una SPB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol). Les imatges mostren la SPB on s'ha incrementat la temperatura des de 4 °C (imatges A i D) fins a 37 °C (imatges C i F). La imatge topogràfica a 4 °C (imatge A) presenta dos dominis en la SPB i de la imatge de l'amplitud (imatge D) s'observa que són plans. Quan la temperatura s'incrementa fins 24 °C apareix un nou domini (imatge B). Al principi s'observa com petites estructures rodones 0,45 nm més baixes que el domini més baix de la imatge A (fletxes negres en les imatges B i C) i que són indicats amb fletxes blanques en la imatge B. Així coexisteixen 3 dominis lipídics: el baix, l'intermedi i l'alt.



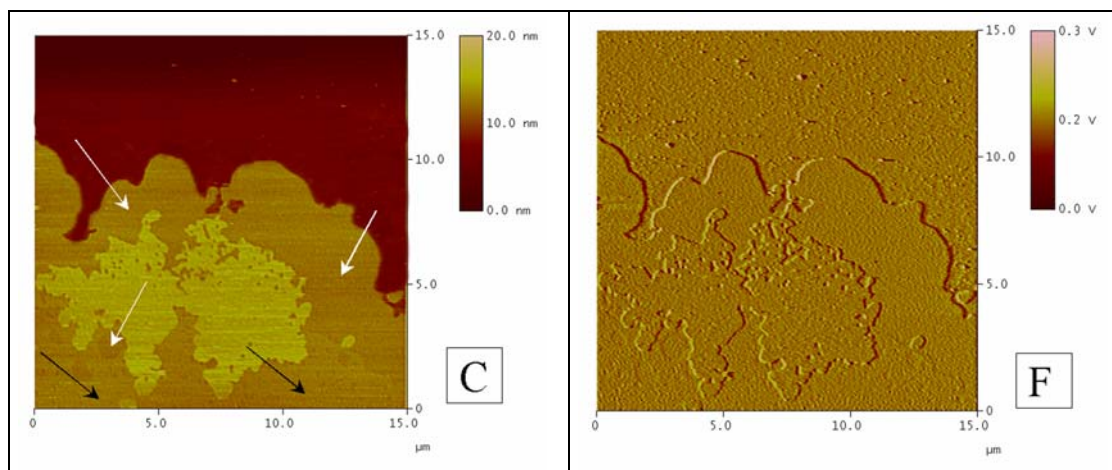


Figura 17. Imatges topogràfiques i d'amplitud d'una SPB de POPE:CL (0.8:0.2, mol:mol) durant l'augment de la temperatura des de A) 4 °C fins C) 37 °C. Les fletxes blanques i negres corresponen als dominis lipídics baix i intermedi, respectivament.

En la imatge C es presenta la mostra a 37 °C i el nou domini lipídic (fletxes blanques) que apareix a la imatge B s'estén a una àrea major, restringint el domini intermedi (fletxes negres) a una àrea menor. De la imatge d'amplitud corresponent (imatge F) es pot veure que el domini lipídic més baix és més pla que l'intermedi.

A la Taula V es resumeixen els paràmetres topogràfics de la SPB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol).

Table V. Paràmetres de la SPB de POPE:CL (0.8:0.2, mol:mol) a diferents temperatures.

Domini Lipídic	T = 24 °C		T = 37 °C	
	h (nm)	Ra (nm)	h (nm)	Ra (nm)
Baix	4,7 ± 0,2	0,14	4,2 ± 0,2	0,17
Intermedi	5,1 ± 0,2	0,16	4,7 ± 0,1	0,19
Alt	6,6 ± 0,2	0,13	6,4 ± 0,2	0,23

3.4.1. Anàlisi de les mostres de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) per DSC i RMN

Totes les imatges presentades anteriorment presenten dominis lipídics quan la temperatura s'incrementa. Per aquesta raó es va realitzar un estudi termodinàmic amb DSC de les mostres de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) per diferents *buffers* de resuspensió.

A la Figura 18 es mostra les endotermes de les mostres de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) ressuspeses en 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, a pH 7,40 (línia discontinua) i 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, a pH 7,40 (línia contínua).

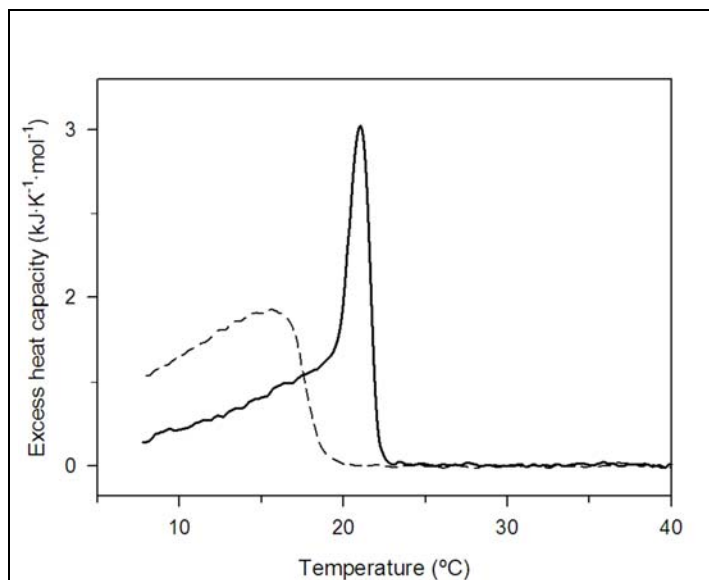


Figura 18. Endoterma de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol). Les línies contínua i discontinua corresponen a mostres amb i sense calci en el *buffer* de ressuspensió.

L'endoterma sense calci, línia discontinua, mostra un pic ample centrat a 15,6 °C, mentre que l'endoterma amb calci, línia contínua, presenta una àmplia regió i un pic molt esmolat a 20,9 °C. Aquest últim pic és molt similar a una endoterma d'un fosfolípid pur.

A la Figura 19 es mostra els espectres de ³¹P-RMN de mostres de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) a tres temperatures. La mostra sense calci (línia discontinua) està principalment formada per vesícules en solució, mentre que en la mostra amb calci (línia contínua) apareixen dues estructures, vesícules i fases hexagonals (*H_{II}*).

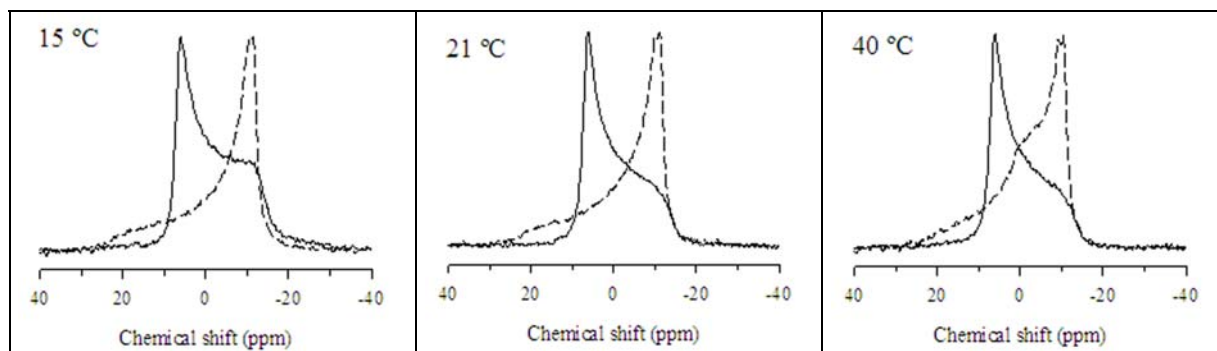


Figura 19. Espectre de ^{31}P -NMR de dispersions de POPE:CL (0,8:0,2, mol/mol) a 15 °C, 21°C, i 40 °C. Les línies contínua i discontinua corresponen a mostres amb i sense calci en el *buffer* de ressuspensió.

3.5. Incorporació *in situ* de *cit c* a les SPBs

La Figura 20 mostra dues seqüències d'imatges topogràfiques, d'amplitud i de fase d'AFM abans (A, B i C) i després (D, E i F) de la incorporació de *cit c* a la mostra a través de la cel·la.

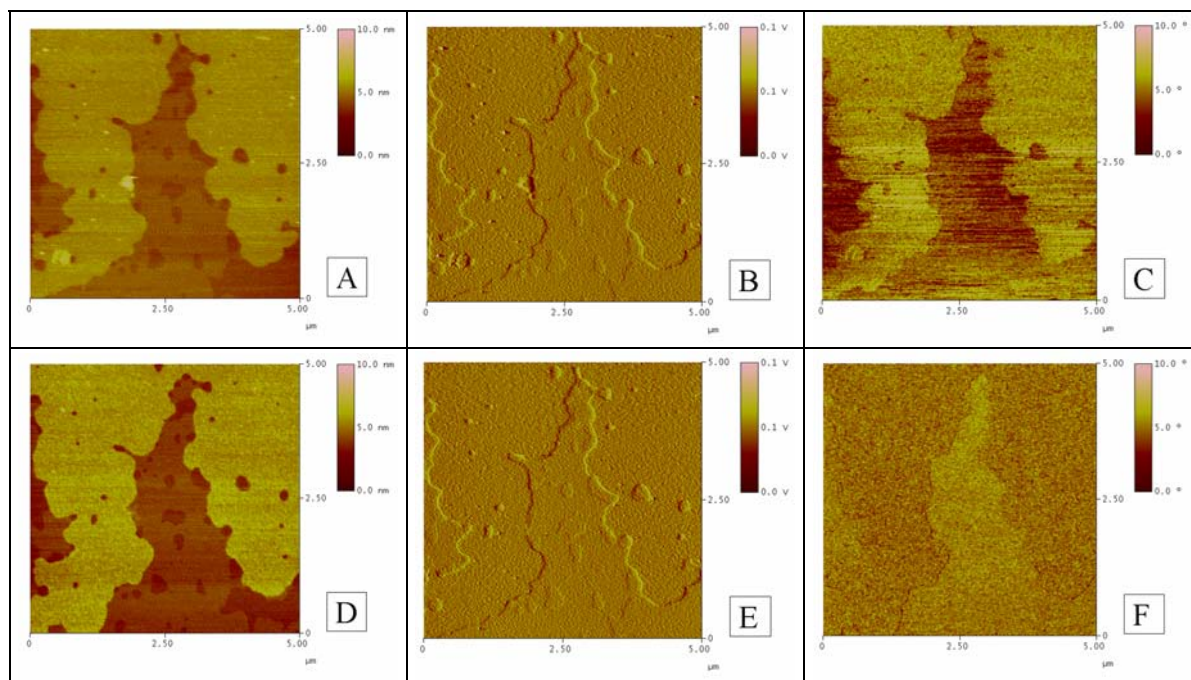


Figura 20. Imatges de la topografia, amplitud i fase d'una SPB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) abans (A, B, C) i després (D, E, F) de la incorporació de *cit c*.

Les imatges en la Figura 20 són imatges ampliades de la Figura 17. A la imatge A es mostren els 3 diferents dominis lipídics. Ells tenen 4,7 nm, 5,10 nm i 6,60 nm d'alçada des de la mica amb valors de *Ra* de 0,14 nm, 0,16 nm i 0,13 nm pels dominis lipídics baix, intermedi i alt, respectivament. Quan es va injectar el *cit c* a la mostra (imatge D)

els dominis no van canviar ni en dimensions ni en forma. Els dominis baix i intermedi presenten valors d'alçada i Ra semblants als d'abans de la injecció del *cit c*, però el domini alt mostra una alçada de 7,50 m, amb un valor de Ra de 0,29. Aquest increment en l'alçada del domini alt suggereix que el *cit c* s'ha unit específicament a aquest domini.

De les imatges corresponents a la fase es pot veure que abans de la injecció del *cit c* el domini alt presenta un contrast (escala de color) amb els altres dos dominis, mentre que després de la injecció del *cit c* el contrast entre el domini alt i els altres dos s'ha invertit. Això reforça la idea que el *cit c* s'ha unit específicament a un dels dominis, en aquest cas el domini més alt.

A la Taula VI es mostren resumits els paràmetres de la SPB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) abans i després de la injecció del *cit c*.

Taula VI. Paràmetres de la SPB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) abans i després de la incorporació de *cit c*.

		Injecció del <i>cit c</i>	
		Abans	Després
Alçada (nm)	Baix	4,70 ± 0,20	4,80 ± 0,30
	Intermedi	5,10 ± 0,20	5,30 ± 0,30
	Alt	6,60 ± 0,20	7,50 ± 0,40
Ra (nm)	Baix	0,14	0,15
	Intermedi	0,16	0,16
	Alt	0,13	0,29
	Mica	0,18	0,20

4. DISCUSSIÓ

4.1. Estudis termodinàmics en monocapes fosfolipídiques

4.1.1. Mescles de POPE i CL

Les isoterms de CL pura i barreges es troben en fase de LE mentre que el POPE presenta una transició que es pot observar a una π de $36,0 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ que en la literatura s'identifica com una transició LC-LC' [Rey Gómez-Serranillos et al., 2004]. Si no es considera la isoterma de POPE pur, les π_c de les barreges disminueixen quan s'incrementa la fracció molar de CL. Això confirma un comportament de gas ideal per la monocapes amb $\chi_{\text{CL}} \geq 0,2$.

Les monocapes mescla tenen diferents valor de A^E segons la π i la fracció molar de CL. A la única π de $40 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ els valors de A^E es troben distribuïts aleatòriament a prop de la línia que representa el comportament ideal. Aquest fet pot ser explicat de dues maneres: ambdós fosfolípids es troben completament segregats l'un de l'altre formant dominis o les molècules d'ambdós fosfolípids formen una barreja ideal. Valors negatius de A^E es troben per $\chi_{\text{CL}} \leq 0,6$ mentre que valors positius es troben per $\chi_{\text{CL}} \geq 0,8$. Aquest comportament es pot entendre si es considera que les molècules de CL, a fraccions altes de CL, poden interaccionar entre elles originant repulsió entre les molècules. Aquestes forces de repulsió poden contrarestar les forces atractives fent que els valors absoluts de A^E disminueixin i puguin arribar a generar valors positius. Existeix un mínim per $\chi_{\text{CL}} = 0,2$ indicant que les forces d'atracció entre molècules és òptima.

Els valors de $\Delta_{\text{mix}}G$ són tots negatius, però per $\chi_{\text{CL}} = 0,8$ ells tendeixen cap a zero. Valors negatius són indicatius de l'existència de forces d'atracció entre molècules. A altes fraccions molars de CL la repulsió entre molècules de CL contraresten aquesta atracció disminuint el valor absolut dels valors de $\Delta_{\text{mix}}G$.

La composició més estable, POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol), correspon amb les fraccions molars d'ambdós lípids en les membranes internes naturals de la mitocòndria.

4.1.2. Monocapa de POPE

La monocapa de POPE mostra la transició anomenada LC-LC' a 24 °C que desapareix gradualment quan s'incorpora CL a la mescla. Les isoterms a diferents temperatures mostren que la transició LC-LC' desapareix per temperatures més altes de 29 °C. Quan la temperatura s'augmenta l'àrea per molècula de la transició disminueix monòtonament mentre que la π augmenta. A baixes temperatures les molècules són menys dinàmiques i la formació de ponts d'hidrogen entre molècules adjacents permet la formació d'una estructura bidimensional que incrementa l'àrea per molècula de la transició. Quan la temperatura s'incrementa les molècules augmenten la seva mobilitat impeding la formació d'aquest ponts d'hidrogen. Així les molècules es poden compactar més arribant a àrees per molècules menors. El fet que la transició LC-LC' no aparegui a 37 °C és degut a que la monocapa experimenta inestabilitat lateral fent que col·lapsi abans d'arribar a la transició.

4.1.3. Adsorció del *cit c* en monocapes

La monocapa de CL mostra el valor màxim de ΔA degut a l'adsorció del *cit c*, mentre que el POPE pur mostra valors molt inferiors. La CL és un fosfolípid amb càrrega negativa i pot unir-se al *cit c* per forces electrostàtiques, mentre que el POPE és un fosfolípid zwitteriònic que pot unir el *cit c* degut a la formació de ponts d'hidrogen i forces de van der Waals. La monocapa barreja POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) presenta adsorció de *cit c* principalment per forces electrostàtiques degut als alts valors de ΔA , però no es pot menysprear la unió per forces de van der Waals degut a l'alta proporció de POPE. En l'anàlisi termodinàmic a 24 °C s'indicava que existia segregació lateral en aquesta monocapa, per tant les molècules de POPE i CL no es troben distribuïdes homogèniament en la monocapa. Aquesta distribució asimètrica genera regions enriquides de CL on el *cit c* es pot unir per forces electrostàtiques i regions on ho pot fer per forces de van der Waals o ponts d'hidrogen (regions enriquides en POPE).

4.2. Caracterització de pel·lícules de LB per AFM

Les pel·lícules de POPE pur i de la barreja d'ell amb la CL, segons l'anàlisi termodinàmic, van ser extretes sobre un suport pla com és la mica. La visualització d'aquestes pel·lícules amb l'AFM aportarà informació de la seva disposició en la interfase aire-aigua.

La pel·lícula de LB de POPE pur mostra diferents estructures a diferents π d'extracció. A una π de $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ la imatge de POPE mostra una estructura homogènia que recobreix la superfície de la mica. A una π de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ la pel·lícula de LB recobreix la superfície de la mica amb una monocapa amb nombrosos forats rodons. Aquestes estructures podrien ser el primer pas en la reorganització de les molècules per desencadenar la transició LC-LC' del POPE. Així la reordenació de les molècules de segons cap a primers veïns genera un espai lliure de molècules. Aquest efecte es pot observar a la Figura 21. Si aquest procés succeeix de manera cooperativa, molts forats apareixerien degut a la homogeneïtat de la monocapa.

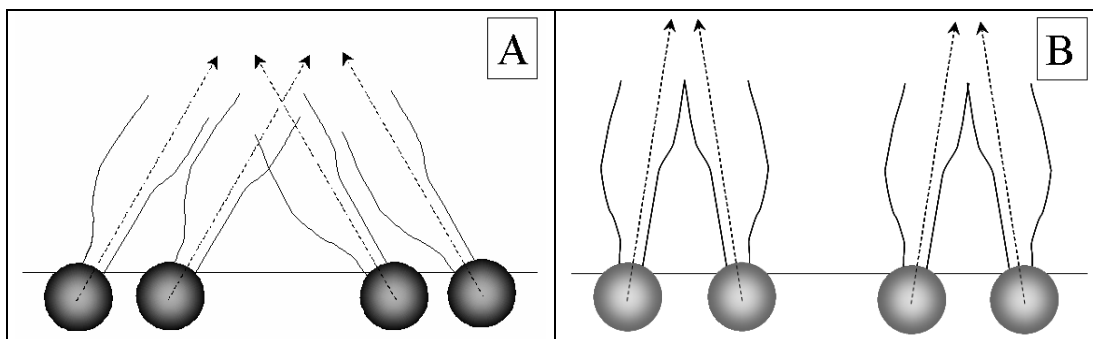


Figura 21. Fosfolípids orientats cap a A) segons i B) primers veïns.

Quan la π és augmentada més enllà de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ la monocapa de POPE pur experimenta un procés de relaxació que incrementa el diàmetre dels espais buits observats anteriorment. Aquest procés de relaxació pot ser produït per la fusió de petits forats per generar-ne de més grans. Simultàniament a aquest procés de relaxació apareix la compactació de la monocapa. Això explicaria les dues estructures observades en la Figura 13: una molt semblant a la pel·lícula de LB a una π de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ però amb defectes amb diàmetres més grans, i una altra més alta que correspon a material més

condensat. Aquesta estructura més condensada no és homogènia, mostra fractures i fissures en la seva superfície i forma estructures de 25 μm diàmetre.

La pel·lícula de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) a una π de 20 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ mostra una estructura molt similar a la del POPE a la mateixa π . Però la que és interessant és la pel·lícula a una π de 30 $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ on es veuen dos tipus d'estructures. Una molt similar a la CL pura i l'altra molt similar a la del POPE pur. Aquesta imatge podria corroborar la segregació lateral d'ambdues molècules que ja va ser determinada per l'anàlisi termodinàmic.

4.3. Estudis fluorimètrics de superfície

La incorporació de *cit c* a liposomes va ser investigada mesurant la variació del potencial electrostàtic de superfície produït degut a la proteïna en liposomes purs i barreja. Com s'esperava la fluorescència del liposomes utilitzats com a blanc van mostrar majors valors de fluorescència. El *cit c* té càrrega positiva a pH 7,40 i competeix pels llocs d'unió amb la sonda fluorescent fent que menys molècules d'ANS s'uneixin als liposomes.

L'única barreja que conté CL que va mostrar un increment en el valor de $\Delta\psi$ és la POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol). Les altres barreges mostren molt poca variació en els seus valors de $\Delta\psi$ mentre que la mostra POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) mostra un increment de + 14 mV. Aquesta diferent adsorció del *cit c* suggereix que alguna cosa passa en la superfície de la POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) que afavoreix l'adsorció del *cit c*. Així poden existir dominis enriquits en CL que generarien zones de càrrega negativa que afavoriria la unió del *cit c* davant l'adsorció en altres molècules. A més a més el *cit c* es pot unir a l'altre domini (enriquit en POPE) de manera inespecífica.

4.4. Caracterització de SPBs per AFM

Des de la seva invenció l'AFM [Binning et al., 1986] ha evolucionat en una eina fonamental per la caracterització de mostres biològiques sota condicions biomimètiques com són la visualització de bacteris, membranes, caracterització i manipulació de proteïnes i d'ADN [Dufrene and Lee, 2000; Santos and Castanho, 2004].

Les mostres de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) mostren moltes diferències si el *buffer* de resuspensió conté o no calci en la seva composició. L'endoterma de DSC de liposomes amb calci mostra un pic molt prim a una temperatura molt semblant a la del POPE pur. Això suggereix que pot existir segregació de lípids en la mostra. L'espectre de ^{31}P -RMN a 21 °C amb calci demostra que la mostra està formada principalment per fases hexagonals (H_{II}). Quan aquesta mostra s'incuba sobre la mica, la SPB no es forma per fusió de vesícules sinó per la fusió de micel·les invertides [Domènech et al., 2007]. El model hipotètic de la formació de les bicapes a partir de les fases H_{II} es mostra a la Figura 22.

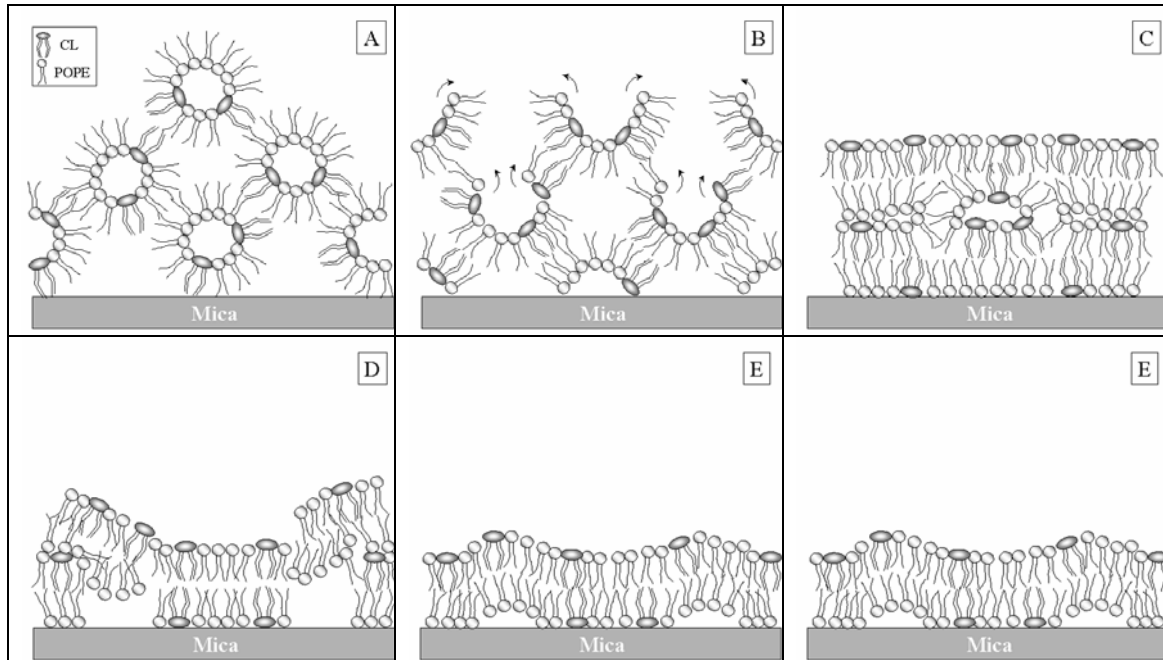


Figura 22. Representació esquemàtica de la formació de la SPB a partir d'estructures H_{II} en solució [Domènech et al., 2007].

L'extensió de les suspensions de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) forma SPBs rodones amb diàmetres de $\sim 50 \mu\text{m}$, allunyades les unes de les altres i sense material adsort entre elles.

Una de les observacions més rellevant d'aquest treball és que les SPBs d'aquesta composició mostra dominis de lípids a totes les temperatures assajades. A temperatures per sota de $24 \text{ }^\circ\text{C}$ es veuen 2 dominis clarament, l'alt i l'intermedi amb una diferència d'alçada de $1,5 \text{ nm}$. Aquest domini alt es troba restringit a la seva àrea inicial només quan el domini intermedi l'engloba. A temperatures superiors a $24 \text{ }^\circ\text{C}$ el domini intermedi sofreix una transició mentre l'alt gairebé no es modifica. Així a aquesta temperatura existeixen 3 dominis: l'alt, l'intermedi i el baix. El domini baix mostra una diferència d'alçada de $0,5 \text{ nm}$ amb el domini intermedi i que pot ser degut a una diferent inclinació de les espècies, una distribució asimètrica de les espècies o la formació de fases no lamelars. Quan el domini intermedi s'enretira del marge de la SPB i apareix el domini baix, el domini alt pot difondre contra el domini baix que és menys rígid. Al principi el domini alt i intermedi estan en equilibri i les línies de força entre dominis estan en equilibri. Quan el domini intermedi sofreix la transició deguda a l'increment de la temperatura aquestes forces queden descompensades i el domini alt es pot estendre sobre el domini baix. Tot i que el domini alt recobreix més superfície de la SPB a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ que a $24 \text{ }^\circ\text{C}$ la seva alçada no varia. A $37 \text{ }^\circ\text{C}$, el domini alt mostra la mateixa alçada que a $24 \text{ }^\circ\text{C}$ mentre que la diferència d'alçada entre el domini baix i l'intermedi segueix sent de $0,5 \text{ nm}$.

4.5. Incorporació *in situ* de *cit c* a les SPBs

El *cit c* és una proteïna perifèrica localitzada a la membrana interna de la mitocòndria. És una proteïna petita ancorada lleugerament a la membrana i mostra unes dimensions de $6 \times 6 \text{ nm}^2$ per difracció de raig X.

És convenient recordar que la SPB de POPE:CL (0,:0,, mol:mol) mostra segregació de lípids a totes les temperatures assajades. Així es pot pensar que el *cit c* es pot unir a un dels dominis o es pot unir de manera diferent a cada un dels dominis. Quan el *cit c* s'injecta per la cel·la el domini alt augmenta el seu valor de *Ra* de $0,19 \text{ nm}$ a $0,29 \text{ nm}$, el

que pot indicar que les proteïnes s'hi han adsort. Per altra banda els valors de les alçades i la rugositat del dominis intermedi i baix no varien després de la injecció del *cit c*. Sorprèn que el contrast de la fase entre el domini alt i els dominis intermedi i baix s'inverteix després de la injecció de la proteïna. Això suggereix que el *cit c* es troba unit a una de les dues estructures, en aquest cas al domini alt.

5. CONCLUSIONS

El principal objectiu del treball d'aquesta Tesi era l'estudi de les propietats fisicoquímiques de la membrana interna de la mitocòndria i la interacció del *cit c* amb models de membrana. Per aconseguir-ho es van utilitzar diverses tècniques: monocapes de Langmuir i pel·lícules de Langmuir Blodgett, espectroscòpia de la fluorescència, Microscòpia d'Angle de Brewster i la Microscòpia de Forces Atòmiques.

Les principals conclusions es basen en els següents fets:

Les monocapes pures i mixtes de POPE, POPC i CL formen monocapes estables a 24 °C. Mentre els sistemes POPE-POPC i POPC-CL formen barreges ideals, les barreges de POPE-CL mostren immiscibilitat parcial. Les monocapes més estables segons les dades de $\Delta_{mix}G$ són POPE:POPC (0,6:0,4, mol:mol), POPC:CL (0,6:0,4, mol:mol) i POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol). En el sistema POPC:CL (0,6:0,4, mol:mol) la proporció de CL és més alta que en la membrana interna de la mitocòndria. Per altra banda la fracció molar en POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) coincideix amb la proporció en què es troben en la membrana interna de la mitocòndria.

La monocapa de POPE pura mostra dues transicions a temperatures inferiors a 37 °C. La primera transició apareix quan les molècules s'orienten des de segons veïns cap a primers veïns confirmat per l'anàlisi dels valors de C_s . Aquests valors de C_s són molt similars abans i just després d'aquesta transició. La segona transició, menys definida, correspon a una transició cap a una fase més condensada. Per una banda, aquesta segona transició cap a estructures més condensades és confirmat per l'anàlisi de BAM on les estructures condensades es detectes fàcilment. Per l'altra banda la resolució d'aquesta tècnica no permet la visualització dels canvis produïts durant la primera transició perquè la variació en la inclinació de les molècules de POPE és molt petita.

La visualització per AFM de pel·lícules de LB pures i de les barreges més estables aporten informació de l'organització molecular en la interfase aire-aigua. Les pel·lícules

de LB de POPC pura, POPC:CL (0,6:0,4, mol:mol) i POPE:POPC:CL (0,5:0,3:0,2, mol:mol:mol) mostren pel·lícules esteses sense cap estructura definida, mentre que la de CL mostra una pel·lícula monomolecular que mostra una estructura en forma de canal a una π de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$. La topografia de les pel·lícules de LB de POPE pur a $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ i $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ és diferent. Mentre a $20 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ s'observa una estructura plana, a $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ s'observen molts forats en la superfície de la monocapa. Quan la pressió superficial d'extracció s'augmenta, la pel·lícula de LB mostra la mateixa estructura però els forats tenen un diàmetre més gran. La pel·lícula de LB extreta a una π més alta que la primera transició mostra una estructura més alta, més condensada, envoltada per una estructura expandida que recobreix la resta de la monocapa. La pel·lícula de LB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) a una π de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ mostra diferents estructures en diferents regions el que suggereix l'existència de segregació lateral dels fosfolípids. Tot i que no és conclouent perquè ambdues regions no tenen límits ben definits, una regió és molt similar a la pel·lícula de LB de CL extreta a la mateixa π , mentre que l'altra és molt semblant a la pel·lícula de LB de POPE pur a una π de $30 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

L'adsorció del *cit c* en monocapes revela que el *cit c* mostra una adsorció específica a la CL pura tal i com s'observa dels experiments a π constant. El *cit c* mostra poca adsorció en fosfolípids zwitteriònics com el POPE i el POPC purs. En les monocapes barreja, el *cit c* es troba integrat més internament en la monocapa POPC:CL, mentre que pel POPE:CL el *cit c* s'adsorbeix superficialment. Els dominis de CL presents en la mescla promourien l'adsorció preferent del *cit c*.

La variació del potencial electrostàtic de superfície degut a l'adsorció del *cit c* en liposomes suggereix que el *cit c* mostra un lloc d'unió preferent a liposomes de CL pura i a la barreja POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol). La unió del *cit c* a liposomes de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) no és degut exclusivament a la càrrega elèctrica superficial sinó a una organització específica en la interfície dels liposomes, segregació de fases lipídiques. Els liposomes amb POPC mostren valors negatius de $\Delta\psi$ suggerint que el *cit c* pot penetrar dins dels liposomes.

Les SPBs de POPE:POPC (0,6:0,4, mol:mol) i POPC:CL (0,6:0,4, mol:mol) no mostren dominis tèrmics quan la temperatura s'incrementa. Ambdós sistemes formen SPBs amb topografies homogènies i ambdós estan per sota de la seva T_m en liposomes quan es troben adsorts sobre el substrat. Les SPBs de POPE:POPC:CL (0,5:0,3:0,2, mol:mol:mol) mostren separació lateral de fosfolípids en resposta al canvi de temperatura. A 24 °C la SPB mostra una estructura plana sense estructures mentre que a 4 °C i a 37 °C apareix un domini més alt i un més baix, respectivament. L'aparició d'aquests nous dominis pot ser degut a què la SPB es fon capa a capa progressivament. La SPB de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) mostra una separació de lípids a qualsevol temperatura assajada, el domini alt, suggerint que és de composició diferent a la resta de la SPB, un domini enriquit en CL. Quan la temperatura s'incrementa de 24 °C a 37 °C el domini intermedi comença a desaparèixer per donar lloc al domini baix. Podem concloure que els dominis baix i intermedi són dominis tèrmics enriquits en POPE.

Les mostres de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) exhibeixen diferent comportament quan el catió calci es troba en el *buffer* de ressuspensió. L'endoterma de DSC de la mostra amb calci mostra un pic esmolat a una T_m similar a la del POPE pur, mentre que sense calci l'endoterma de DSC mostra una T_m a un valor inferior. L'espectre de ^{31}P -RMN de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) exhibeix que la mostra amb calci està formada per estructures en fase H_{II} en solució mentre que la mostra sense calci està formada per vesícules.

La injecció *in situ* de *cit c* en les SPBs de POPE:POPC (0,6:0,4, mol:mol) i POPE:POPC:CL (0,5:0,3:0,2, mol:mol:mol) no mostren molècules individuals de *cit c* ni en les imatges topogràfiques ni de fase. La disminució en l'alçada després de la injecció del *cit c* pot ser causada per la desestabilització de la SPB deguda a l'adsorció del *cit c* dins de la SPB. La incorporació de molècules de *cit c* a SPBs de POPC:CL (0,6:0,4, mol:mol) produeix una solubilització parcial de la SPB formant agregats petits de lípid que apareixen sobre la superfície de la SPB. La imatge de la fase mostra que algunes d'aquestes estructures tenen fase diferent que la superfície de la SPB indicant que són agregats de *cit c*. L'adsorció del *cit c* en les SPBs de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) es va observar de dues maneres diferents: i) com agregats de proteïna en els marges del domini alt i ii) com molècules individuals sobre el domini alt.

La conclusió final d'aquesta Tesi és: “ *El calci indueix fases H_{II} en mostres de POPE:CL (0,8:0,2, mol:mol) en solució. Aquesta composició és la monocapa barrejada d'ambdós fosfolípids més estable i correspon a la fracció molar en la membrana interna de les mitocòndries. L'extensió d'aquestes micel·les invertides forma bicapes planes en suports sòlids mostrant segregació lateral de lípids en els dominis enriquits de CL on el cit c es pot unir específicament. En aquesta configuració el POPC seria una espaiador en els dominis enriquits en POPE formant la matriu de la membrana*”. El procés invers podria ser la possible explicació de l'alliberament del cit c de la membrana interna de la mitocòndria durant l'apoptosi.

6. REFERÈNCIES

- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P., *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed.; Garland Science Publications: New York, **2002**.
- Binning, G.; Quate, C. F.; Gerber, C., Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* **1986**, 56, (9), 930-933.
- Blodgett, K. B., Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *Journal of the American Chemical Society* **1935**, 57, 1007-1022.
- Cevc, G.; Marsh, D., *Phospholipid Bilayers. Physical Principles and Models*. Wiley-Interscience: New York, **1987**.
- Daum, G., Lipids of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1985**, 822, (1), 1-42.
- Domènech, Ò.; Sanz, F.; Montero, M. T.; Hernández-Borrell, J., Supported planar bilayers from hexagonal phases. *Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes* **2007**, 1768, 100-106.
- Dufrene, Y. F.; Lee, G. U., Advances in the characterization of supported lipid films with the atomic force microscope. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2000**, 1509, (1-2), 14-41.
- Feng, S. S., Interpretation of Mechanochemical Properties of Lipid Bilayer Vesicles from the Equation of State or Pressure-Area Measurement of the Monolayer at the Air-Water or Oil-Water Interface. *Langmuir* **1999**, 15, (4), 998-1010.
- Garrido, C.; Galluzzi, L.; Brunet, M.; Puig, P.; Didelot, C.; Kroemer, G., Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation* **2006**, 1-11.
- Guidotti, G., Membrane Proteins. *Annual Review of Biochemistry* **1972**, 41, 731-752.
- Jiang, X.; Wang, X., Cytochrome c Promotes Caspase-9 Activation by Inducing Nucleotide Binding to Apaf-1. *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, (40), 31199-31203.
- Jiang, X.; Wang, X., Cytochrome c Mediated Apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* **2004**, 73, (1), 87-106.
- Kontiila, R.; Salonen, I.; Virtanen, J. A.; Kinnunen, P. K. J., Estimation of the Equilibrium Lateral Pressure in Liposomes of 1-Palmitoyl-2-[10-(pyren-1-yl)-10-ketodecanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine and the Effect of Phospholipid Phase Transition. *Biochemistry* **1998**, 27, (19), 7443-7446.

-
- Langmuir, I., The Constitution and Fundamental Properties of Solid and Liquids. II. Liquids. *Journal of the American Chemical Society* **1917**, 39, 1848-1906.
 - Lotan, R.; Nicholson, G. L., *Advanced Cell Biology*. L.M. Schwartz and M.M. Azar. Van Nostrand: New York, **1981**.
 - Malmgren, L.; Olsson, Y.; Olsson, T.; Kristensson, K., Uptake and retrograde axonal transport of various exogenous macromolecules in normal and crushed hypoglossal nerves. *Brain Research* **1978**, 153, (3), 477-493.
 - Marsh, D., Lateral pressure in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1996**, 1286, 183-223.
 - Muller, D. J.; Buldt, G.; Engel, A., Force-induced conformational change of bacteriorhodopsin. *Journal of Molecular Biology* **1995**, 249, (2), 239-243.
 - Peterson, I. R.; Brzezinski, V.; Kenn, R. M.; Seitz, R., Equivalent states of amphiphilic lamellae. *Langmuir* **1992**, 8, (12), 2995-3002.
 - Peterson, I. R.; Kenn, R. M., Equivalence between Two-Dimensional and Three-Dimensional Phases of Aliphatic Chain Derivatives. *Langmuir* **1994**, 10, (12), 4645-4650.
 - Pockels, A., Surface Tension. *Nature* **1891**, 43, 437.
 - Pockels, A., *Nature* **1892**, 46, 418.
 - Rey Gómez-Serranillos, I.; Miñones Jr, J.; Dynarowicz-Latka, P.; Miñones, J.; Conde, O., Surface Behavior of Oleoyl Palmitoyl Phosphatidyl Ethanolamine (OPPE) and the Characteristics of Mixed OPPE-Miltefosine Monolayers. *Langmuir* **2004**, 20, 11414-11421.
 - Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B., An overview of the biophysical applications of atomic force microscopy. *Biophysical Chemistry* **2004**, 107, 133-149.
 - Schabert, F. A.; Henn, C.; Engel, A., Native Escherichia coli OmpF porin surfaces probed by atomic force microscopy. *Science* **1995**, 268, (5207), 92-94.
 - Thuren, T.; Virtanen, J. A.; Kinnune, P. K. J., Estimation of the equilibrium lateral pressure in 1-palmitoyl-2-[6(pyren-1-yl)]hexanoylglycerophospholipid liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids* **1986**, 41, (3-4), 329-334.

Agraïments

Com aquest apartat potser és el que més gent llegeix espero no deixar-me a ningú, i si algú creu que hi hauria de ser i me n'he oblidat que em perdoni i s'hi afegeixi.

En primer lloc voldria agrair als meus directors de tesi per la gran oportunitat de deixar-me dur a terme aquest treball dins del seu grup d'investigació. La visió intuïtiva de la ciència del Dr. Faust Sanz Carrasco i el treball del dia a dia amb el Dr. Jordi Hernández Borrell han fet possible que aquesta tesi sigui una realitat.

També voldria fer una especial menció per la Dra. M^a Teresa Montero Barrientos per la seva incondicional ajuda tant en temes burocràtics, i tant difícils de tractar, com pel seu gran coneixement en fluorescència i monocapes.

Especial agraïment al Dr. Antoni Morros de la Universitat Autònoma de Barcelona per la seva col·laboració en la realització dels experiments de DSC i RMN, i al Dr. Jordi Ignés del Departament de Química Física de la Universitat de Barcelona per la seva ajuda en la realització dels experiments de BAM.

Voldria agrair les bones estones passades amb els companys. Per un costat la part *nano*, a la Muriel Arimon, en Felipe Caballero, la Fernanda Cantero, en Jordi Díaz, en Raúl Díaz, l'Aleix Garcia, en Sergi Garcia, en Pau Gorostiza, en Diego Kormes, en Gerard Oncins, l'Albert Verdagué, la Carolina Vericat. En especial a l'Ismael Díez, per les hores passades davant l'AFM, així com les bones estones fora d'ell. Per l'altra banda la part *bio*, a la Laura Picas, la Mònica Pijoan i en José Luís Vázquez. Voldria fer una especial menció a una persona, sense ella una part d'aquesta tesi no seria possible, però el que és més important, li estaré sempre agraït pel seu recolzament en els mals moments, gràcies per ser la meva amiga Lorena. També vull agrair a la Sandra Merino

per ajudar-me a conèixer la part biològica de la ciència així com el seu incondicional suport.

Durant aquests anys de tesis he conegut a molta gent, però voldria destacar a la Montse, la Neus, el Víctor i la Maria. Sobretot per les bones estones passades fora dels àmbits de la ciència. També voldria agrair la bona convivència amb tota la gent del Departament de Fisicoquímica de la Facultat de Farmàcia.

Gràcies també a en Miquel, la Mariona i l'Anna per amenitzar-me les vacances d'estiu, si no fos per ells no hagués desconnectat mai.

I com no, no puc acabar els agraïments sense donar les gràcies al meu pare i a la meva mare. Ells són els que m'han fet tal i com sóc i m'han donat l'educació i sobretot l'oportunitat d'arribar a on, per ara, he arribat. Aquesta tesi és per vosaltres.

Òscar Domènech

