Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Permeabilidad de membranas

Payá, Miguel A.

1972

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Payá, Miguel A.. (1972). Permeabilidad de membranas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1410_Paya.pdf

Cita tipo Chicago:
Payá, Miguel A.. "Permeabilidad de membranas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1972.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1410_Paya.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

DEPARTAMENTO DE QUIMICA INORGANICA Y ANALITICA

—oOo—

PERMEABILIDAD DE MEMBRANAS

—oOo—

Miguel A. Payá

1410 =

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Director : Dr. Adolfo Portela

1972

A mis padros

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar aqui mi agradecimiento a todos aquellos que de una forma u otra contribuyeron a la realización del presente trabajo y en especial

al Dr. Adolfo Portela, quien propuso el tema de este trabajo, dirigió su realización y me facilitó los elementos necesarios para llevar adelante la parte experimental.

al Dr. Ariel H. Guerrero quien fue mi Consejero de estudio y me brindó la oportunidad de trabajar con el Dr. Portela.

al Dr. Ernesto Timmermann por su apoyo en las fases finales.

al personal de imprenta de la Biblioteca de esta facultad sin cuya valiosa colaboración hubiese sido imposible realizarlo.

M.A.P.

Oct. 1972

I N D I C E

		Pág.
Agradecimientos		I
Indice de tablas		IV
PARTE I	Introducción y objeto del trabajo	1
1-1 :	Introducción	2
1-2 :	Objeto del trabajo	3
1-3 :	Como pasan las sustancias a través de la membrana	4
1-4 :	Ecuaciones convencionales	6
1-5 :	Estructura y composición de la membrana	7
PARTE II	Teoría y plan de trabajo	12
2-1 :	Termodinámica. Permeabilidad a no electrolitos	13
2-2 :	Plan de trabajo	24
PARTE III	Dispositivo experimental y ecuaciones practicas para el cálculo.	26
3-1 :	Dispositivo experimental	27
3-2 :	Procedimiento experimental	31
3-3 :	Determinación de las variaciones de volumen de la fibra.	33
3-4 :	Ecuaciones practicas para el cálculo	37
PARTE IV	Resultados	44
4-1 :	Coeficientes de permeabilidad al agua (Pw) y fracción de volumen osmóticamente activa (W)	45
4-2:	Coeficiente de reflexión σ	49
4-3:	Coeficiente de permeabilidad a solutos Ps	51

Pág.

4-4 4-4 : Coeficiente de reflexión σ en función de pH y coeficiente de permeabilidad a solutos Ps en función de la concentración de etilen glicol 52

4-5 : Cálculo de los coeficientes fenomenológicos 53

PARTE V Interpretación de resultados y conclusiones 67

5-1 : Coeficientes fenomenológicos 68

5-2 : Poros 69

5-3 : Difusión 79

5-4 : Difusión facilitada 82

5-5 : Conclusiones finales 84

Apéndice I : Deducción de la ecuación que permite calcular la fracción de volumen osmóticamente activa (W) 89

Apéndice II : Curvas teóricas y datos experimentales utilizados para el cálculo del coeficiente de permeabilidad al agua (Pw) 90

Apéndice III : Datos experimentales utilizados para calcular el coeficiente de reflexión σ 93

Apéndice IV : Datos experimentales utilizados en la determinación de Ps 97

Apéndice V : Curvas teóricas utilizadas para el cálculo del radio equivalente del poro 99

Bibliografía 100

INDICE DE TABLAS

		Pág.
Tabla I :	Composición de la membrana	10
Tabla II :	Ringer normal	37
Tabla III:	Solución base	37
Tabla IV :	Soluciones utilizadas para determinar Pw y W	45
Tabla V :	Coeficiente de permeabilidad al agua para distintas tenicidades.	48
Tabla VI :	Soluciones utilizadas para determinar el coeficiente de reflexión σ	5[illegible]
Tabla VII:	Coeficiente de reflexión para distintos solutos	49
Tabla VIII:	Soluciones utilizadas para determinar Ps	51
Tabla IX :	Coeficientes de permeabilidad a solutos	51
Tabla X :	Coeficiente de permeabilidad a soluto (Ps) para etilen glicol a distintas concentraciones	52
Tabla XI :	Coeficientes fenomenológicos	54
Tabla XII:	Radios medios para distintos solutos	74
Tabla XII':	Valores de $(1-\sigma)_{teo.}$ y $(1-\sigma)_{exp.}$	76
Tabla XIII:	Número de uniones hidrógeno por función de acuerdo al grupo	81
Tabla XIV :	$\ln Ps.M^{1/2}$ para distintos solutos	82
Tabla XV :	Datos de Ps, Lp', y σ de la membrana utilizada y los mismos datos para otras membranas que figuran en la bibliografía.	86

P A R T E I

I N T R O D U C C I O N

Y

O B J E T O D E L T R A B A J O

1-1 Introducción

Los antiguos filósofos y naturalistas llegaron a la conclusión que todos los animales y vegetales estaban constituidos por unos pocos elementos que se repetían en cada uno de ellos.

Se referían a las estructuras macroscópicas de un organismo; como raíces, hojas, flores, etc, comunes a distintos vegetales o a los organismos que se repiten en el reino animal.

Mucho tiempo después, debido al invento de los lentes de aumento, se descubrió que detrás de esta estructura macroscópica existe una estructura microscópica.

En el siglo XIX se reconoció a la célula como la "unidad de la materia viviente" o como la "primera representante de la vida"

También se encontró que una célula aislada, puede constituir un organismo entero, o bien agruparse y diferenciarse en tejidos y órganos formando un organismo multicelular.

Por lo tanto, la célula es una unidad morfológica y fisiológica en la estructura de los seres vivos, asi como el átomo lo es en la estructura química.

Se la puede considerar como un organismo en si misma, muy especializado y compuesto por muchos elementos; la suma de los cuales constituyen la unidad celular. Si por medios mecánicos o de otra naturaleza se destruye la organización celular, la función de la célula también se altera y aunque pueden persistir algunas de las propiedades vitales, pierde su significado como unidad organizada y muere.

Es de fundamental interés tener en cuenta que si bien la composición de la célula es constante, ella resulta distinta de la composición del líquido extracelular, cosa que se manifiesta por la existencia en su interior de sustancias ausentes en el medio extracelular y por la presencia intracelular de sustancias que si bien son idénticas a las que existen en el medio extracelular, se encuentran sin embargo a concentraciones muy diferentes.

Como es posible esta situación?

Las células estan rodeadas por una delgada película de unos 100 Å de espesor, la membrana celular, la cual realiza un control continuo sobre la entrada y salida de distintos iones y moléculas de las mismas desempeñandose en cierto modo como una " aduana " biológica.

A nivel de la membrana se salta de la enorme complejidad de un ser vivo a la comparativamente simple organización del medio.

La membrana celular debe permitir y regular celosamente el pasaje de ciertas sustancias y evitar el de otras para que puedan funcionar correctamente los procesos enzimáticos que participan en la síntesis de proteínas, en los fenómenos de herencia, en la respiración celular, en la fotosíntesis, etc.

La velocidad y precisión con que la membrana ejecuta sus funciones es sorprendente.

Una ameba es capáz de absorber en cinco minutos las proteínas disueltas en un volúmen cincuenta veces mayor que el de la propia ameba.

La membrana celular de un glóbulo rojo reconoce con suficiente rapidez las moléculas de L-arabinosa y D-arabinosa, como para absorber en segundos miles de moléculas de la primera y no dejar pasar ni una sola de la segunda.

Como distingue la membrana a una de otra? Como reconoce al potasio, al agua, a una vitamina, a una hormona, entre miles de sustancias? Que mecanismos utiliza para hacerlas pasar a su través?

I-2 OBJETO DEL TRABAJO

Un gran número de trabajos han sido realizados estudiando la permeabilidad de una membrana celular, (2)(3)(3), (4). Dichos trabajos fueron hechos fundamentalmente sobre eritrocitos de especies diferentes (humanos, vacunos, etc) y sobre una gran cantidad de células vegetales, en este caso la membrana en cuestión es la de una célula muscular, también llamada fibra muscular, aislada del músculo tibial anterior del anfibio sud americano Leptodactylus Ocellatus (rana).

Seran determinados los tres coeficientes fenomenológicos Lp Lpd y Ld (los cuales seran luego definidos) para agua y distintos solutos no electrolitos, derivados de la aplicación de termodinámica de procesos irreversibles a permeabilidad de membranas biológicas y se interpretaran los datos experimentales obtenidos, por medio de alguno de los mecanismos mediante los cuales se trata de explicar como una sustancia atraviesa una membrana

Los parámetros determinados experimentalmente son : Pw (coeficiente de permeabilidad al agua), Ps (coeficiente de permeabilidad a solutos), y σ (coeficiente de reflexión) a partir de los cuales pueden determinarse los valores de Lp, Lpd, y Ld. Las sustancias estudiadas son : Agua, glicerol, formamida, acetamida, etilen glicol, manitol, urea, y sacarosa.

COMO PASAN LAS SUSTANCIAS A TRAVES DE LA MEMBRANA CELULAR

Los mecanismos fundamentales mediante los cuales se trata de explicar como pasan las sustancias a través de la membrana son :

a) DIFUSION SIMPLE : es una de las formas más sencillas de pasaje, una molécula de la solución que baña la célula se disuelve en la membrana, difunde a través de éstay se redisuelve en el solvente (agua) del citoplasma.

b) SITIOS FIJOS: si la sustancia estudiada no es soluble en la membrana en lugar de pasar a través de la misma por difusión simple, lo hara migrando a lo largo de sitios fijos dispersos en su interior, es decir mientras la difusión simple resulta semejante a la difusión de un soluto en medio acuoso, la migración a través de sitios fijos, supone la existencia en la membrana de lugares específicos, los cuales deben ser alcanzados por las distintas sustancias para que les sea posible atravesar la membrana.

c) POROS: hasta hace pocos años se suponia que un poro era un agujero cilíndrico perpendicular a la superficie de la membrana, de configuración estable y electricamente neutro.

Actualmente se tiene, en cambio, la idea de que constituyen soluciones de continuidad de forma cilíndrica o bien irregular, de tamaño variable y curso tortuoso a través de la membrana.

Es posible, además, que en las membranas biológicas, los poros aparezcan ydesaparezcan continuamente, pero en forma tal que estadísticamente siempre existe un área de poros estables equivalentes a la suma de un cierto número de poros hipotéticamente cilíndricos, los cuales seleccionan el pasaje de sustancias a través de la membrana, fundamentalmente por sus características geométricas.

d) VEHICULOS :hay sustancias que cruzan la membrana formando complejos con moléculas (vehículos) de la misma.

El complejo vehículo-sustrato generalmente se mueve mucho más fácilmente en el ambito de la membrana que la sustancia sola y la cruza más rapidamente.

La unión de la sustancia permeante con el vehículo puede ser de naturaleza diversa : uniones covalentes, puentes hidrógeno, atracciones electrostáticas, etc .

e) TRANSPORTE ACTIVO : todos los mecanismos descriptos hasta ahora conducen a igualar concentraciones de una sustancia a ambos lados de la membrana, ya que una vez que la concentración en la célula alcanza el valor de la concentración en el medio, el flujo neto se anula.

En el caso de iones, la distribución final depende además del potencial eléctrico de la membrana y de la presencia de macroiones no difusibles.

Pero existen numerosos casos en que las células, utilizando su energía metabólica impide que se alcance esa igualdad final de concentraciones, dando lugar a que la concentración celular de la sustancia se mantenga constantemente menor que la concentración del medio o que la alcance y sobrepase; todo sucede como si se bombeara activamente la sustancia de un lado a otro de la membrana.

Este tipo de pasaje, presente unicamente en membranas biológicas, se denomina transporte activo y el mecanismo involucrado en el mismo suele denominarse "bomba ".

CUACIONES CONVENCIONALES

La descripción convencional de transporte a través de membra-as hace uso de dos ecuaciones, una para flujo de soluto y una para flujo de olumen.

Consideremos un sistema isotermico que consiste de dos compar-imentos, uno interior designado por el subíndice i y otro exterior designa-o con el subíndice o, los dos comportimentos estan separados por una membra-a y solo se consideran solutos no electrolitos.

La ecuación para flujo de soluto esta dada por (1) :

$$\frac{dZi}{dt} = Ps \cdot A \cdot (Cso - Csi) \qquad 1-1$$

ionde Zi es el número de moles de soluto i permeante que pasa al comparti-iento interior, A es el área de la membrana, Cso y Csi son las concentracio-ios externas e internas de soluto al tiempo t=0, expresadas en mol.l^{-1} y Ps es el coeficiente de permeabilidad al soluto e incluye el espesor de la iembrana y representa el número de moles por unidad de tiempo que atraviesan a membrana, cuando la diferencia de concentración entre el compartimento nterno y externo, como asi también el área de la membrana son la unidad.

La ecuación para flujo de volumen esta basada entre la pro-orcionalidad del mismo (usualmente identificado con el flujo de agua) y la iferencia de concentración entre el compartimento interno y externo.(1).Co-io en general el flujo de soluto es en sentido contrario al flujo de solvente ic se tiene :

$$\frac{dVw}{dt} = -Pw \cdot A \cdot (Cso - Csi) \qquad 1-2$$

ondo Pw tiene el mismo significado que Ps pero ahora para el solvente (agua) n este caso Csi y Cso representan la suma de las concentraciones de todos os solutos, sean o no permeables, al tiempo t =0.

A pesar de la gran cantidad de información acumulada sobre los fenómenos de permeabilidad, las ecuaciones convencionales de flujo de volúmen y soluto, no describen el comportamiento físico de la membrana (1), y los datos de permeabilidad obtenidos por diferentes métodos no son cuantitativamente comparables.

La insuficiencia de las ecuaciones de permeabilidad fueron observadas por varios autores (1) y muchos intentos fueron hechos para complementarlas; sin embargo no se han desarrollado ecuaciones generales capaces de explicar totalmente el fenómeno.

Una solución a este problema puede ser obtenida por medio de la aplicación de termodinámica de procesos irreversibles.

La aplicación de termodinámica al problema de permeabilidad de membranas lleva a la conclusión que las ecuaciones I-1 y I-2 son incompletas debido a que consideran que sólo son necesarios dos coeficientes para caracterizar la permeabilidad de un sistema soluto-solvente.

En el tratamiento termodinámico, como se verá luego, para caracterizar el comportamiento de membranas permeables al solvente y a un soluto, es necesario el conocimiento de tres coeficientes, los cuales reciben el nombre de coeficientes fenomenológicos.

-5 ESTRUCTURA Y COMPOSICION DE LA MEMBRANA

Puesto que el problema a tratar es el pasaje de sustancias a través de la membrana, vamos en principio a esquematizar la estructura más aceptada, que moléculas la componen y cómo están estas moléculas colocadas.

a) Microscopía electrónica

Se demostró (30) en la superficie de casi todas las células tipo estudiadas la presencia de una capa de 75 a 100 Å de ancho la cual es fijada por medio de sustancias de alta densidad electrónica tal como el tetróxido de osmio, permanganato de potasio, acetato de ur

nilo.

Esta capa limitante está formada por dos capas oscuras de cerca de 25 Å de ancho separadas por una capa clara de 25 a 30 Å.

Al par de capas oscuras separadas por una clara, se la denomina " unidad de membrana ".

b) Composición Química

Está constituída principalmente por proteínas y lípidos, con cantidades muy pequeñas de polisacaridos y ácidos nucleicos (5).

Los mucopolisacaridos en cantidades menores, aparentemente juegan un rol importante en el comportamiento inmunológico de los glóbulos rojos y en el potencial eléctrico de la superficie celular.

Presumiblemente la capa externa de la célula está recubierta por los mucopolisacaridos conteniendo regiones con grupos cargados negativamente fuertemente orientados (31).

El lípido en mayor cantidad es el colesterol, existiendo fosfolípidos, (lecitinas, cefalinas) y esfingolípidos (esfingomielina y cerebrósidos) Fig. 1 .

El peso de proteínas es mayor que el de lípidos, encontrándose diferentes fracciones proteicas, algunas de las cuales presentan actividad enzimática. La relación depende del tipo de célula. (Tabla I)(

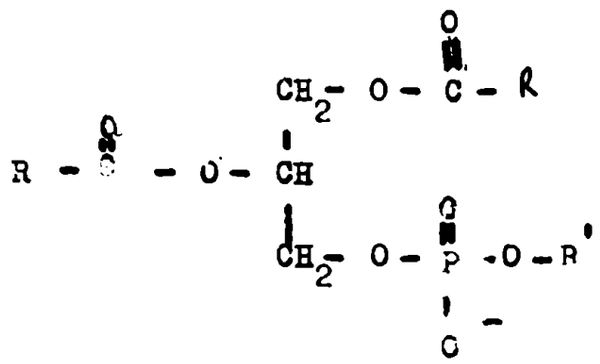
c) Estructura de mielina y un modelo para la membrana celular

Muchos fosfolípidos se hinchan cuando son colocados en contacto con agua y forman las llamadas figuras de mielina (5) las cuales son visibles como largas estructuras tubulares bajo el microscopio óptico.

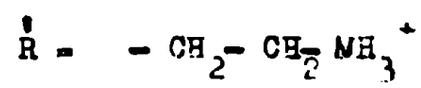
Estructuras similares son obtenidas cuando una fibra nerviosa es humedecida, los fosfolípidos son los agentes activos que producen estas figuras. Estas han sido estudiadas por microscopía electrónica, se ven líneas de 10 a 20 Å separadas por bandas de luz de 25 a 30 .

Las formas de mielina pueden absorver proteínas para formar estructuras en las cuales la densidad de las bandas oscuras es na-

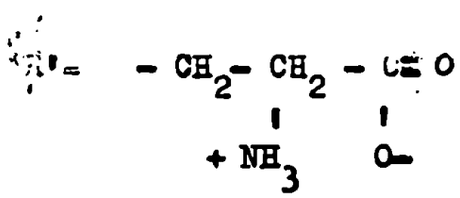
CEFALINAS Y LECITINAS



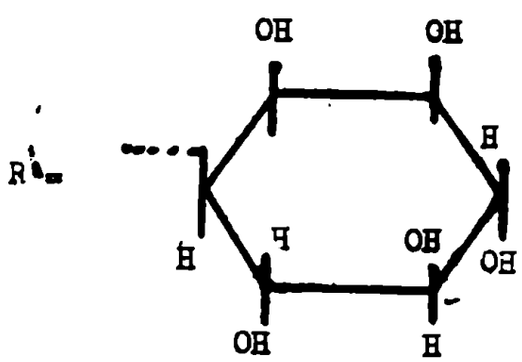
Fórmula General



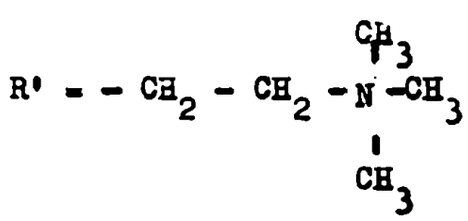
Fosfatidil etanolamina



Fosfatid il serina



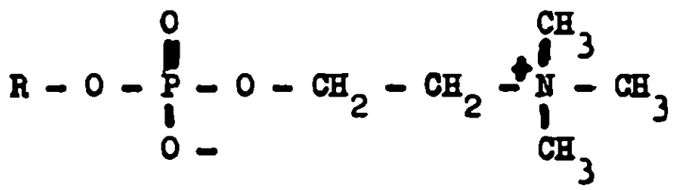
Fosfatidil inositol

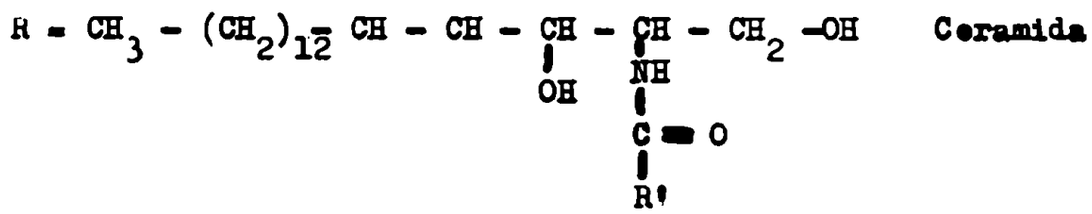


Fosfatidil colina

Fig. 1

ESFINGOMIELINA





COLESTEROL

Sigue la cadena

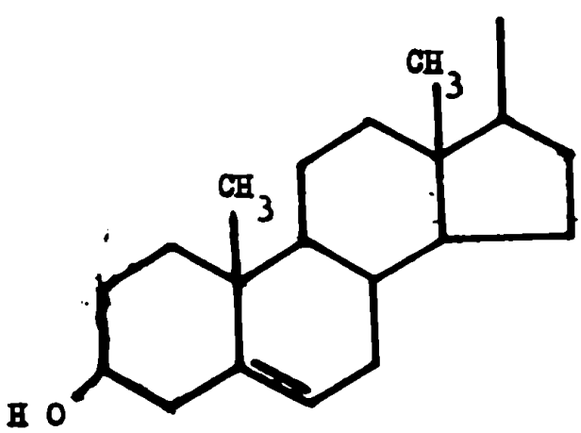


Fig. 1

T A B L A I

Especies	Proteínas %	Lípidos %	Comentarios
Músculo de Rata (35)	65	15	Lípidos, fundamentalmente fosfolípidos.
Hígado de Rata (36)	85	10	El 50% de los fosfolípidos es licitina, el colesterol es 1/3 del total de lípidos

yor que con fosfolípidos puros; pero la característica de bandas oscuras y claras alternadas es mantenida.

Los fosfolípidos solos, en contacto con el agua, forman una estructura similar a la unidad de membrana, (32), la adición de proteínas intensifica las bandas oscuras y no modifica las claras, se postula entonces que la proteína está unida a la parte del lípido dirigida hacia afuera y lejos de la parte que está dirigida hacia adentro.

Ahora, como la molécula de fosfolípido tiene una gran parte hidrófoba compuesta por las cadenas de ácidos grasos, y una parte hidrófila compuesta por los grupos fosfato esterificados, es de esperar que los grupos hidrófilos estén ubicados preferentemente en la interfase acuosa y que la parte hidrófoba estén enfrentadas entre si, unas con otras.

De acuerdo a estos estudios se sugiere para la membrana la siguiente estructura (5) Fig. 2. (46)

Es decir una doble capa lípida con sus cadenas hidrofobicas paralelas entre sí y recubiertas exteriormente por una capa de proteínas con las partes hidrófobas orientadas hacia el interior de la capa lipidica.

Este es el modelo propuesto por Danielli. Las fuerzas de van der Wals serían las responsables de la cohesión entre las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos y los puentes hidrógeno y las fuerzas electrostáticas de origen ionico establecerían la unión proteína- proteína y proteína - lípidos.

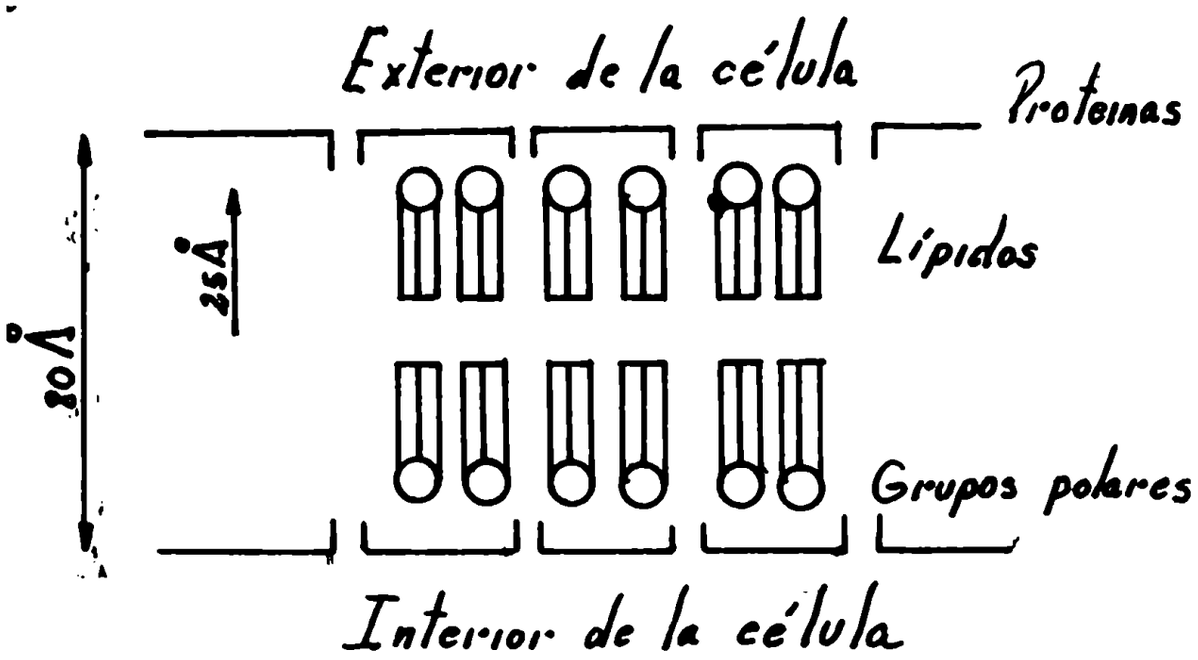

Exterior de la célula
Proteinas
Lípidos
Grupos polares
Interior de la célula
25Å
80Å

FIG. 2

PARTE II

TEORIA Y

PLAN DE TRABAJO

2-1 TERMODINAMICA . PERMEABILIDAD A NO ELECTROLITOS

Se trata la aplicación de termodinámica de procesos irreversibles a procesos de transporte a través de membranas biológicas.

En la Fig. 3 se da un esquema que representa los requerimientos más simples que se deben tener en cuenta para transporte a través de membranas.

El sistema consiste de dos compartimentos separados por una membrana de espesor Δx .

Los compartimentos pueden tener diferentes concentraciones de sustancias que pueden penetrar en la membrana y también sustancias a las cuales la membrana es impermeable, pero que contribuye a producir una diferencia de presión osmótica a través de la misma.

Más aún, se puede imponer diferentes presiones a ambos compartimentos de tal manera de mantener una diferencia de presión ΔP constante en el sistema.

Las condiciones en este caso difieren notablemente de las que se tienen en sistemas continuos, las diferencias mayores son :

a) No hay gradientes de concentración en las soluciones externas, todos los gradientes de potencial químico se producen dentro de la membrana, donde el estudio de las fuerzas no es posible.

b) El flujo de un compartimento al otro tiene que pasar a través de un límite entre la fase solución y la fase membrana. O sea el sistema envuelve una transición discontinua.

Se ha desarrollado en detalle el tratamiento termodinámico para sistemas continuos y su adaptación a sistemas discontinuos, (6) aquí solo mencionaremos las ecuaciones fundamentales.

El punto de partida para la descripción termodinámica de procesos discontinuos bajo condiciones isotermicas, es el cálculo de la producción local de entropía durante el mismo.

En el caso de un sistema de dos componentes, en el cual dos soluciones del mismo solvente y soluto están separadas por una membrana,

tendremos (1) ,(6)

$$\frac{diS}{dt} = \frac{1}{T}(U^{o}w - U^{i}w)\,Jw + \frac{1}{T}(U^{o}s - U^{i}s)\,Js \qquad 2\text{-}1$$

Donde diS / dt es la producción local de entropía por unidad de tiempo; U°w y U°s los potenciales químicos del solvente y de soluto de una parte de la membrana y $U^{i}w$ y $U^{i}s$ de la otra; T la temperatura absoluta y Jw y Js los flujos de solvente y soluto respectivamente.

De 2-1

$$\phi = \frac{T\,diS}{dt} = (U^{o}w - U^{i}w)\,Jw + (U^{o}s - U^{i}s)\,Js \qquad 2\text{-}2$$

Donde ϕ es la función disipación; si ésta es por unidad de área, también lo serán Jw y Js. Como vemos la función disipación está compuesta por la suma de productos de flujos y sus correspondientes fuerzas conjugadas; la diferencia de potenciales químicos.

Es conveniente transformar las fuerzas termodinámicas en cantidades más simples, para ello vamos a suponer que las soluciones se comportan idealmente obteniéndose entonces (6):

$$\phi = (Jw.\bar{V}w + Js.\bar{V}s).\Delta P + \left(\frac{Js}{\bar{C}s} - \frac{Jw}{\bar{C}w}\right) R.T\,\Delta Cs \qquad 2\text{-}3$$

Donde $\bar{C}s$ es una concentración media . Si Cso /Csi es aproximadamente la unidad, entonces (6) .

$$\bar{C}s = \frac{Cso + Csi}{2} \qquad 2\text{-}4$$

Cw es concentración media de agua, $\bar{V}w$ y $\bar{V}s$ son los volúmenes parciales molares de solvente y soluto respectivamente, ΔP y ΔCs son las difere

cias de presión hidrostática y de concentraciones de soluto entre el compartimento externo e interno del sistema de la Fig. 3.

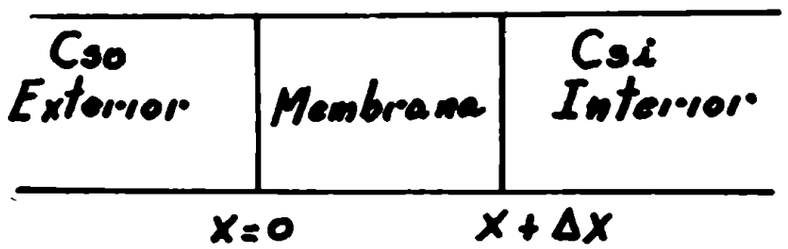


FIG. 3

Como se ve en 2-3 la función disipación es representada por una nueva serie de flujos y fuerzas.

Las nuevas fuerzas son ΔP y $RT \Delta Cs$, que son las fuerzas empleadas normalmente en permeabilidad de membranas a no-electrolitos. Los flujos conjugados son :

El flujo de volúmen total por unidad de área:

$$Jv = Jw.\bar{V}w + Js.\bar{V}s \qquad 2\text{-}5$$

El flujo relativo de soluto a solvente, el cual es simplemente la velocidad relativa delsoluto con respecto a la del solvente (agua).

$$Jd = \frac{Js}{\bar{C}s} - \frac{Jw}{\bar{C}w} \qquad 2\text{-}6$$

Reemplazando en ecuación 2-3

$$\phi = Jv.\Delta P + Jd.R.T\Delta Cs \qquad 2\text{-}7$$

Expresión de la función disipación en función de las fuerzas impulsoras ΔP y $RT \Delta Cs$.

ECUACIONES FENOMENOLOGICAS RELACIONANDO FLUJOS Y FUERZAS

La función disipación puede ser calculada cuando son conocidos los flujos y fuerzas actuantes y no dá ninguna información suplementaria.

Sin embargo la situación es distinta cuando existe correlación entre flujos y fuerzas.

Entre las relaciones más comunes entre flujos y fuerzas podemos nombrar:

El flujo de calor, el cual es proporcional al gradiente de temperatura; el flujo de materia que es proporcional al gradiente de concentración, la intensidad de corriente es proporcional a la fuerza electromotriz, etc.

Evidencias experimentales demuestran que la simple dependencia entre un flujo y su fuerza conjugada, no siempre existen.

Por ejemplo, se comprobó el comportamiento osmótico y eléctrico de una membrana porosa y se encontró que la aplicación de una fuerza electromotriz puede producir no solo flujo de cargas; sino que también un flujo no conjugado de volumen.

Por otro lado, la aplicación de una presión hidrostática producirá además de un flujo de volumen, un flujo de electricidad no conjugado de la fuerza aplicada.

Este y otros ejemplos, llegan a establecer que existe copulación entre fuerzas de un tipo y flujos de otro.

Para procesos suficientemente lentos, cualquier flujo depende en forma directa y lineal no solo de la fuerza conjugada, sino que también de fuerzas no conjugadas (6).

Usando la relación general entre todos los flujos y fuerzas y la función disipación, es posible derivar ecuaciones útiles que confirman hechos conocidos, y otras que indican correlación entre fenómenos.

Onsager (7) fué el primero en aplicar la dependencia lineal entre flujos y fuerzas a magnitudes termodinámicas, de ello resultan

una serie de ecuaciones fenomenológicas; las cuales pueden ser escritas de la siguiente manera :

$$Ji = L_{11}.X_1 + L_{12}.X_2 + \ldots\ldots + L_{1n}.X_n$$

$$\vdots$$

$$Jn = L_{n1}.X_1 + L_{n2}.X_2 + \ldots\ldots + L_{nn}X_n$$

$$\text{o} \quad Ji = L_{ik}.X_k \qquad (i = 1,2,3,\ldots\ldots n) \qquad 2\text{-}8$$

El significado de estas ecuaciones puede ser explicado de l siguiente manera : (6)

Consideremos un sistema en el cual hay n flujos simultaneos $J_1, J_2, \ldots J_n$; a cada flujo puede asignarse una fuerza conjugada $X_1, X_2 \ldots X_n$. La elección de la fuerza conjugada está restringida de tal manera que el producto de la fuerza por el coeficiente L_{ik} , tenga unidades de producción de entropía o de energia . (6) .

De acuerdo con los descubrimientos de Fick (difusión), Ohm (electricidad) y otros; se puede escribir que los flujos son linealmente proporcionales a sus fuerzas conjugadas, el coeficiente de proporcionalidad es L_{ii}.

Sin embargo, la ecuación 2-8 muestra que el flujo J_1 puede ser también impulsado por las fuerzas $X_2, X_3, \ldots X_n$, si los coeficientes cruzados $L_{12}, L_{13}, \ldots L_{1n}$, son distintos de cero, lo mismo con J_2 $J_3, \ldots J_n$.

En general una fuerza X_k contribuirá a un flujo Ji si $L_{ik} \neq 0$ para $k \neq i$.

Finalmente la ecuación implica que la dependencia de los flujos con las fuerzas conjugadas es también lineal.

La aplicación de la ecuación 2-8 presenta considerables dificultades, aún en el caso de dos flujos y dos fuerzas; hay cuatro coeficientes, los cuales deben ser determinados experimentalmente.

Para el caso de tres flujos y tres fuerzas el número de

coeficientes es nuevo haciendo el análisis experimental muy dificultoso.

Este inconveniente se ve atenuado, por la aplicación de la ley de Onsager (6),(7).

Esta expresa que :

$$L_{ik} = L_{ki} \quad \text{con} \quad k \neq i \qquad 2\text{-}9$$

Un gran número de hechos experimentales han sido analizados y se observó que la ecuación 2-9 se cumple con mucha aproximación, sobre la base de ello, la relación de Onsager puede ser considerada entonces como una ley perfectamente establecida, cuya validez experimental va más allá de la justificación matemática.

Los coeficientes de proporcionalidad de ecuación 2-8 son llamados coeficientes fenomenológicos.

PROPIEDADES DE MEMBRANAS

De ecuación 2-7 se ve que cuando $\Delta C_s = 0$

$$\phi = Jv . \Delta P$$

y por ecuación 2-8, Jv puede escribirse como:

$$Jv = Lp . \Delta P \qquad 2\text{-}10$$

Donde Lp es un coeficiente fenomenológico, al que se le da normalmente el nombre de coeficiente de filtración.

Este coeficiente tiene el caracter de una mobilidad y representa el flujo de fluido por unidad de diferencia de presión.

Cuando $\Delta P = 0$

$$\phi = Jd . R . T . \Delta C_s \qquad y$$

$$Jd = Ld . R . T . \Delta C_s = \qquad 2\text{-}11$$

Donde la diferencia de presión osmótica causa un flujo difusional caracterizado por otro coeficiente fenomenológico, Ld , el cual representa una mobilidad difusional por unidad de presión osmótica.

Las condiciones expresadas anteriormente se cumplen solo cuando los dos flujos son independientes, esto ocurre en un número muy limitado de membranas.

Para membranas biológicas Kedem y Katchalsky (1) y Curran y Katchalsky (6) proponen las siguientes ecuaciones fenomenológicas :

$$Jv = Lp \cdot \Delta P + Lpd \cdot R. T. \Delta Cs$$

$$Jd = Ldp. \Delta P + Ld \cdot R. T. \Delta Cs \qquad 2\text{-}12$$

El significado físico de estas ecuaciones puede ser comprendido como sigue :

Cuando se aplica una diferencia de presión Δ P a través de la membrana; según 2-10, se obtiene un flujo neto de volumen, determinado por el coeficiente de filtración Lp. Pero si la membrana es semipermeable, esto es, más permeable al solvente que al soluto, la diferencia de presión aplicada, obliga a pasar más solvente que soluto a través de la membrana; el fluido que sale tiene una composición distinta al fluido que entra a la membrana, lo que indica un cambio de velocidad relativo de soluto a solvente como consecuencia de la diferencia de presión aplicada.

El flujo Jd está entonces también determinado por Δ P, el coeficiente que los relaciona es Ldp, tercer coeficiente fenomenológico, llamado coeficiente de ultrafiltración.

Cuando existe un gradiente de concentración a través de la membrana, existe, ecuación 2-11, un flujo Jd, determinado por el coeficiente Ld, pero además, existe un flujo de volúmen, el flujo osmótico.

El coeficiente que relaciona el flujo y la fuerza es Lpd, el que recibe el nombre de coeficiente osmótico.

De acuerdo a ecuación 2-12, para membranas biológicas tenemos :

Cuando Δ Cs =0

$$Jv = Lp . \Delta P \quad y \quad Jd = Ldp . \Delta P$$

Cuando $\Delta P = 0$

$$Jv = Lpd . R . T . \Delta Cs$$
$$Jd = Ld . R . T . \Delta Cs \qquad 2\text{-}13$$

MEMBRANA SEMIPERMEABLE IDEAL

Se llama membrana semipermeable ideal, a aquella membrana que solo permite el pasaje de solvente. Para este tipo de membrana Js es cero, y de ecuaciones 2-5 y 2-6 se tiene :

$$Jv = Jw . \bar{V}w \quad y \quad Jd = - \frac{Jw}{\bar{c}w}$$

Si las soluciones son diluidas $1/\bar{C}w$ es proximadamente igual a $\bar{V}w$ y entonces resulta :

$$- Jd = Jv$$

En este caso, flujo de volumen y flujo de difusión son debidos a solvente; de ecuación 2-12, sumando y reagrupando se tiene :

$$0 = (Lp + Ldp) . \Delta P + (Ld + Lpd) . R . T . \Delta Cs \qquad 2\text{-}14$$

Si ΔP y ΔCs son distintos de cero, para que se cumpla ecuación 2-14 se debe cumplir :

$$Lp + Ldp = 0 \quad y \quad Ld + Lpd = 0$$

O sea :

$$Lp = - Ldp \quad y \quad Ld = - Lpd$$

y como por ecuación 2-9, Lpd = Ldp se tiene :

$$Lp = - Lpd = - Ldp = Ld \qquad 2\text{-}15$$

O sea para una membrana semipermeable ideal, el sistema está totalmente caracterizado por un solo coeficiente fenomenológico, el coeficiente de filtración Lp.

COEFICIENTE DE REFLEXION

Cuando la membrana no es ideal, Ldp (o Lpd) es distinto de Lp; en el caso límite de membranas no selectivas, es decir membranas que no distinguen entre soluto y solvente, en lo que respecta a su pasaje a través de la misma, Lpd (o Ldp) es cero.

Si se aplica una diferencia de presión hidrostática ΔP entre el lado interno y externo de la membrana a $\Delta Cs = 0$, por ecuac. 2-12 Jd es cero.

A la misma conclusión,se llega para flujo de volumen, cuando la membrana no es selectiva; cuando ΔCs es distinto de cero, y ΔP es cero, según ecuac. 2-12 $Jv = 0$.

En los casos intermedios, entre membranas ideales y membranas no selectivas, el valor de Lpd (o Ldp) varía entre cero y Lp.

El coeficiente de reflexión σ se define (6) como :

$$\sigma = \frac{-Lpd}{Lp} \qquad 2\text{-}16$$

Es claro que σ, es cero para una membrana no selectiva ($Lpd = Ldp = 0$) y σ es uno, para una membrana ideal. ($Lpd = Lp$).

Para los casos intermedios σ es mayor que cero y menor que uno. Es decir σ da una medida de la permeabilidad del soluto; cuanto menor es Lpd, menor es σ y mayor es la permeabilidad de la membrana al soluto.

En virtud de ecac. 2-13 y 2-16 se tiene :

Para una membrana ideal

$$Jv = Lpd \cdot R \cdot T \cdot (Cso - Csi) = Lp.R.T. (Csi - Cso) \qquad 2\text{-}17$$

y para casos intermedios :

$$Jv = Lp \cdot \sigma \cdot R \cdot T (Csi - Cso) \qquad 2\text{-}18$$

MOVILIDAD DEL SOLUTO

El flujo medido no es generalmente Jd; sinó el flujo de soluto Js; este flujo en términos de Jd y Jv, por ecuac. 2-5 y 2-6 es (6)

$$Jd + Jv = \frac{Js}{\bar{C}s} - \bar{V}w \cdot Jw + \bar{V}w \cdot Jw + \bar{V}s \cdot Js = \frac{Js}{\bar{C}s} \cdot (1 + Cs \cdot \bar{V}s)$$

Si las soluciones son muy diluidas, $Cs \cdot \bar{V}s$ es mucho menor que uno y

$$(Jd + Jv) \cdot \bar{C}s = Js \qquad 2\text{-}19$$

Js es medido generalmente a Jv =0, en este caso de acuerdo a ecuac. 2-12

$$\Delta P = \frac{-Lpd}{Lp} R \cdot T \cdot \Delta Cs$$

y remplazando en 2-19 con Jv =0

$$Js = \frac{Lp \cdot Ld - Lpd^2}{Lp} \bar{C}s \cdot R \cdot T \cdot \Delta Cs \qquad 2\text{-}20$$

Como se vio en sección 1-4 (1), el flujo de soluto, es proporcional a Δ Cs. Si la constante de proporcionalidad Ps es

$$Ps = w \cdot R \cdot T \cdot \qquad 2\text{-}21$$

$$Js = w \cdot R \cdot T \cdot \Delta Cs$$

y comparando esta ecuación, con la ecuación 2-20, se tiene :

$$w = \frac{Lp \cdot Ld - Lpd^2}{Lp} \bar{C}s = (Ld - Lp \cdot \sigma^2) \cdot \bar{C}s \qquad 2\text{-}22$$

Donde w es la movilidad del soluto, y w.R.T representa el número de moles de soluto que atraviesan la membrana por unidad de tiempo y por unidad de área cuando a ambos lados de la membrana la diferencia de concentración es la unidad.

Por lo tanto es el equivalente a un coeficiente de permeabilidad al soluto para Jv =0.

Si Jv no es cero, reemplazando Jv y Jd en ecuac. 2-19 se tie

$$Js = \bar{C}s.Lp\ (\Delta P - \sigma\ R.T.\ \Delta Cs) + \bar{C}s.Ldp.\ \Delta P + \bar{C}s.Ld.R.T.\ \Delta Cs$$

y reemplazando Ldp y Ld de ecuac. 2-16 y 2-22 respectivamente

$$Js = \bar{C}s.Lp.\ (1-\sigma).\ \Delta P + \left[w - \bar{C}s.Lp.(1-\sigma).\ \sigma\right].R.T.\ \Delta Cs$$

Si $\Delta P = 0$

$$Js = w.R.T.\ \Delta Cs + (1 - \sigma).\ \bar{C}s.\ Jv \qquad 2\text{-}23$$

que representa el flujo de soluto a través de una membrana bajo la acción de una diferencia de concentración. ΔCs

SISTEMAS MULTICOMPONENTES CON UN SOLO PERMEANTE

En estudios biológicos, no se trata simplemente con sistemas conteniendo solo un soluto y el solvente; sobre ambos lados de la membrana hay un gran número de componentes, aunque solo dos, un soluto y el solvent pasan a través de la misma.

Consideremos un sistema que contiene un solvente (w), un solu to permeante (s), y muchos solutos no permeantes (i).

Estos solutos no permeantes producen una diferencia de presió osmótica a través de la membrana, equivalente a R.T. Δ Ci y que es simila a aplicar una diferencia de presión hidrostática.

Los flujos Jv y Jd serán en este caso :

$$Jv = Lp.R.T.\ \Delta Ci - Lp.\sigma s.R.T.\ \Delta Cs$$

$$Jd = -\sigma s.Lp.R.T.\ \Delta Ci + Ld.R.T.\ \Delta Cs$$

Combinando estas ecuaciónes, se tiene para flujo de soluto,

(ecuac. 2-19)

$$Js = Jv.\ (1 - \sigma_s).\ \bar{C}s + w_s.R.T\ \Delta\ Cs \qquad 2\text{-}24$$

Esta ecuación representa el flujo de soluto permeante a través de una membrana, producido por una diferencia de concentración Δ Cs del sol permeante.

RELACION ENTRE LOS COEFICIENTES FENOMENOLOGICOS Y LOS COEFICIENTES DETERMINADOS EXPERIMENTALMENTE

Los coeficientes experimentales (Pw, Ps, σ) se determinaron observa do el cambio de volumen que sufre la célula en función del tiempo, c do se la somete a la acción de soluciones de concentración variable.

De ecuac. 1-2 y 2-12 se ve que a Δ P =0, para membranas los :

$$Lp\ .R\ .T = Pw \qquad 2\text{-}25$$

De ecuac. 2-16, determinando el valor de Lp y de σ para distintos solutos se puede determinar Lpd(= Ldp) y por ecuac. 2-22

$$\frac{w}{\bar{C}s} + Lp\ .\ \sigma^2 = Ld \qquad 2\text{-}26$$

O sea conociendo Lp, σ , y w, para distintos solutos, de determinarse el cuarto coeficiente fenomenológico Ld.

El inconveniente que surge, es que w debe ser determinad Jv =0, experimentalmente se lo determina siguiendo el cambio de volu que sufre la célula con el tiempo, pero en la ecuac. 2-24 se ve que s es cercano a uno o sea que los solutos no son demasiado permeantes (1 - σ).Cs.Jv es aproximadamente cero y w se puede identificar con coeficiente convencional Ps (ecuac. 2-21) determinado experimentalm

2-1 PLAN DE TRABAJO

Experimentalmente se determina :

a) Comportamiento osmótico general de la célula

b) volumen osmoticamente activo de la célula.

c) coeficiente de permeabilidad al agua (P w)

d) coeficiente de permeabilidad a solutos (Ps): glicerol, urea, formamida, etilen glicol, acetamida,

e) coeficiente de reflexión para solutos : glicerol, urea, formamida, etilen glicol, acetamida, manitol, sacarosa.

Con estos datos experimentales es posible calcular los coeficientes fenomenologicos Lp , Lpd ,y Ld y además el radio equivalente del poro de la membrana.

Las sustancia s estudiadas son tales que durante la experiencia, no son utilizadas por los procesos metabólicos que ocurren en la célula.

P A R T E III

DISPOSITIVO EXPERIMENTAL Y

ECUACIONES PRACTICAS PARA EL CALCULO

DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

La base del método experimental consistió en la medición de las variaciones de volumen en función del tiempo que sufría una única fibra muscular aislada del músculo tibial anterior del anfibio sudamerican Leptodactylus Ocellatus (rana).

Estos cambios de volumen fueron provocados por modificacion en la tonicidad del medio que rodeaba la fibra, reemplazando moléculas lativamente impermeables por otras de permeabilidad apreciable.

Estos cambios fueron producidos en un sistema de circulació continua.

Los cambios de volúmen de la fibra (célula), fueron regist dos por microfotografías seriadas.

DETALLES DE CONSTRUCCIÓN

En una cámara de vidrio fué montado el músculo tibial, esta cámara servía tanto para la disección de la fibra, como de cámara de mez cla y observación.

Una vez disecada la fibra, la cámara era colocada en la pl tina (p) de un microscopio y conectada por un lado con un recipiente con teniendo el medio de recambio (a) y por otro a una bomba de vacío (v).

Ambas vías podían ser abiertas o cerradas simultaneamente por medio del robinete (b). Fig. 4.

CAMARA DE DISECCION, MEZCLA Y OBSERVACION

Esta cámara fué construida de un tubo de vidrio de 48 mm de diámetro y 16,5 mm de altura, al que se soldó un fondo del mismo materia de 1,5 mm de espesor.

En ambos extremos de un diámetro se colocaron los tubos de entrada y salidas de las soluciones (e , s) Fig, 5.

Estos fueron realizados en vidrio, teniendo ambos un diámet interno de 2,7 mm y un diámetro externo de 6 mm.

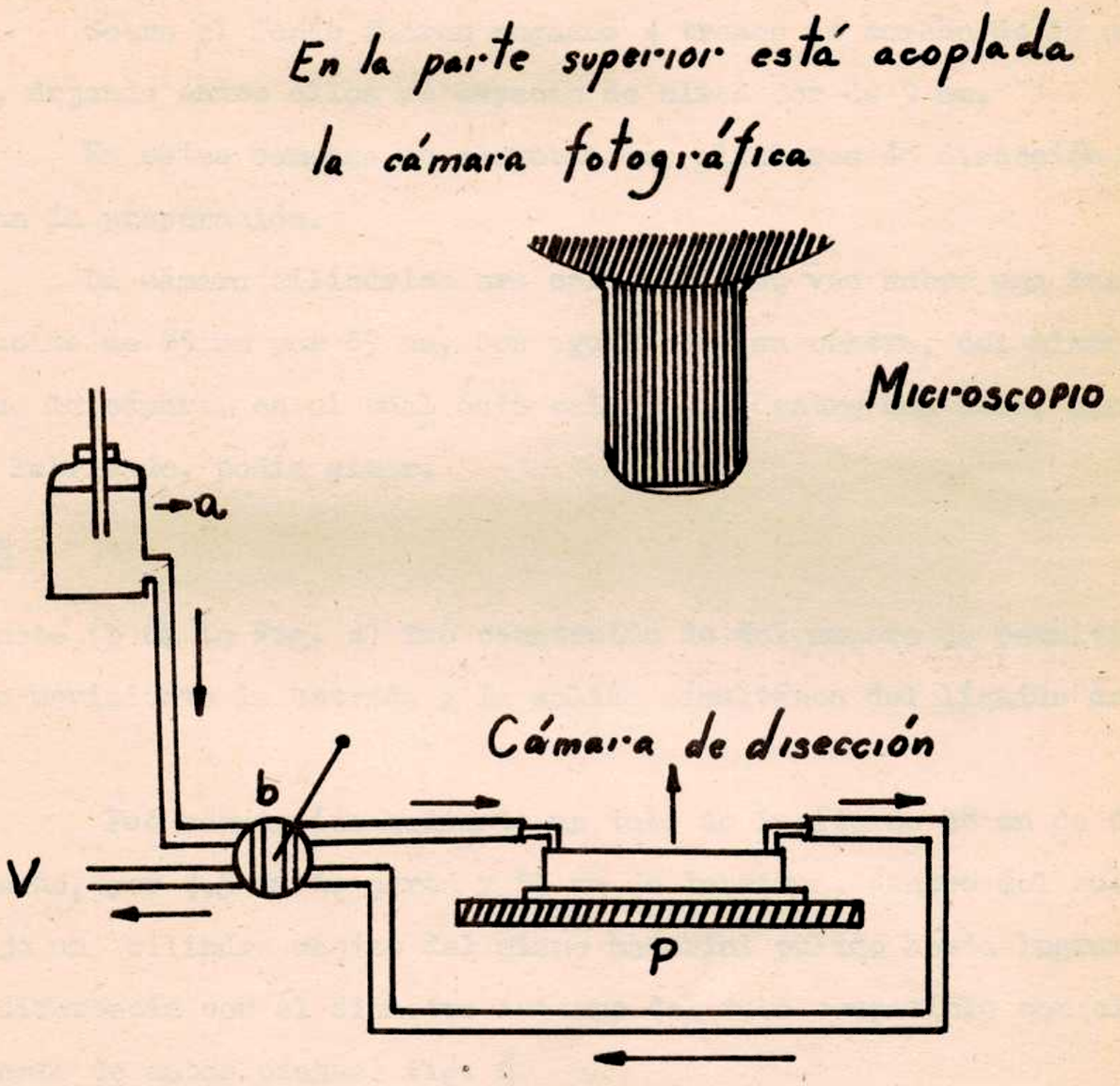

En la parte superior está acoplada
la cámara fotográfica
Microscopio
a
b
V
Cámara de disección
P

Fig. 4

El tubo de entrada fué conectado de manera que su extremo i ferior quedara a 3 mm del fondo de la cámara.

El tubo de salida entraba en contacto con el fondo, pero su extremo inferior estaba cortado en 45°.

Sobre el fondo fueron pegados 4 trozos de corcho de 10 mm e espesor, dejando entre ellos un espacio de alrededor de 9 mm.

En estos corchos se clavaban los alfileres de disección que sostenían la preparación.

La cámara cilíndrica era colocada a su vez sobre una base i na de lucíte de 85 mm por 69 mm, con agujero en su centro, del mismo di metro que la cámara, en el cual está calzaba, y dentro del cual, conve temente lubricado, podía girar.

ROBINETE

El robinete (b en la Fig. 4) fué construido de tal manera de permitir un único movimiento la entrada y la salida simultánea del líquido de l cámara.

Fué construído mediante un tubo de lucíte de 38 mm de diá tro externo, por 4,5 mm de pared y 55 mm de longitud, dentro del cual introdujo un cilindro macizo del mismo material pulido hasta lograr l mínima diferencia con el diámetro interno del tubo compatible con el d plazamiento de ambas piezas. Fig. 6

Se realizaron entonces dos perforaciones transversales de mm y sobre las bocas de estas, en el tubo externo, fueron soldados cua tubos cortos de 4 mm de diámetro interno, dos de cada lado, destinados recibir los tubos de entrada y salida.

El enfrentamiento de los agujeros en la posición abierta era asegurada por un tope.

RECIPIENTE CON RINGER DE RECAMBIO

El ringer de recambio era colocado en una ampolla de drio Pirex de 500 ml. de capacidad y sostenéndo a 35-38 cm. del plano

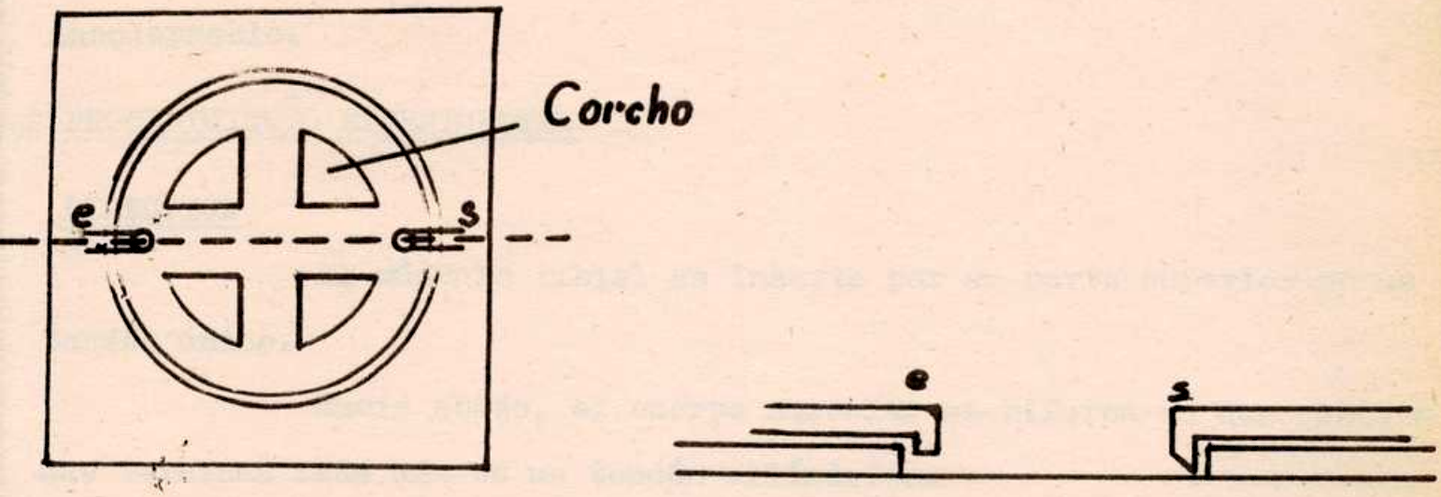


FIG. 5

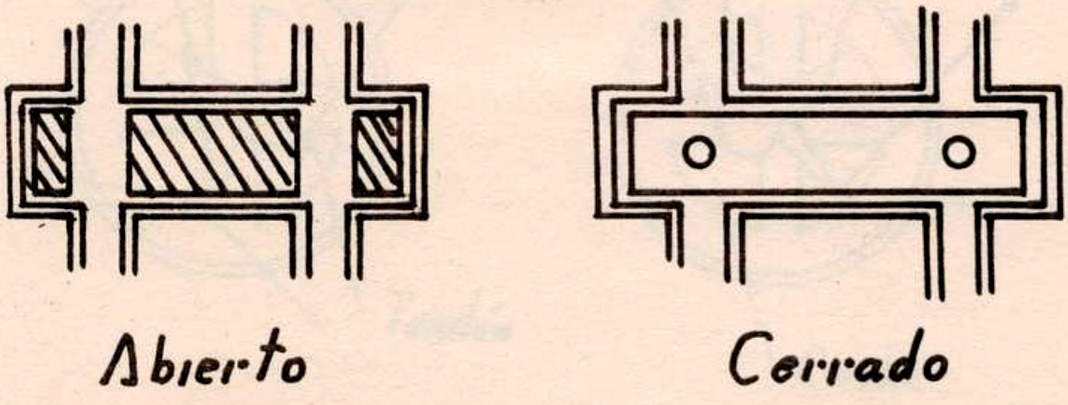


FIG. 6

la cámara, su borde inferior.

Este recipiente estaba conectado con el robinete por un tubo de goma rubia de 5 mm. de diámetro.

La conexión al vacío, del mismo diámetro, eran de goma incolapsable.

1-2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

DISECCION

El músculo tibial se inserta por su parte superior en un tendón único.

Hacia abajo, el cuerpo muscular se bifurca en dos cabezas que terminan cada una en un tendón cilíndrico.

Al separar el músculo del animal se trató que todos los tendones quedaran de la máxima longitud.

Una vez separado el músculo, fué fijado en la cámara de disección por medio de alfileres de entomólogo. Fig. 7a y 7b.

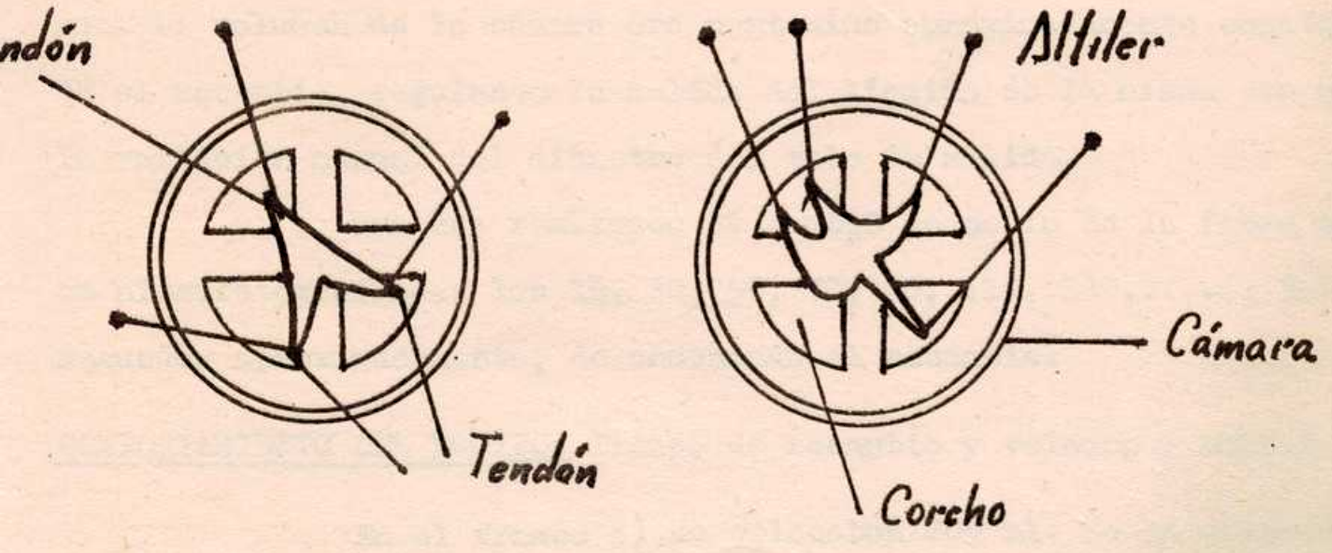


Fig. 7a y 7b

A continuación se realizó un corte longitudinal en el tendón terminal de la cabeza derecha utilizando una tijera de iridectomía.

Tomando este corte con una pinza muy delgada fué posible separar un delgado fascículo de fibras, de este fascículo, utilizando agu de microdisección se separó una única fibra (célula).

La microdisección se realizó bajo microscopio binocular de reflexión marca Spencer de 60 aumentos.

El preparado se hallaba sumergido en una solución standa que luego será descripta.

FORMA DE TRABAJO

Una vez obtenida una única fibra, la cámara en la que se realizó la microdisección era pasada a la platina del microscopio en el dispositivo experimental.

Una vez enfocada la fibra, se obtenían microfotografías d rante un lapso de 10 minutos, para considerar al sistema en equilibrio mótico.

Se trabajó siempre a temperatura entre 22-25 °C.Luego por medio del robinete de recambio era conectado el sistema de recambio con nuo. El volumen de la cámara era mantenido aproximadamente constante du te el recambio, regulando la salida del líquido de la misma por medio d la variación manual del diámetro del tubo de salida.

Una vez realizado el cambio de medio de la fibra se obte an microfotografías a los 15, 30, 50, 70, 90, 110, 130,....., 300 y 600 segundos aproximadamente, de comenzado el recambio.

COMPORTAMIENTO DEL EQUIPO. Tiempo de recambio y volumen y caudal de rec

En el frasco a) se colocaban 200 ml. de la solución de p ba a la que se quería someter a la fibra, una vez conectada la cámara a sistema, la circulación duraba cerca de 10 seg. En este tiempo el volu líquido circulante era de 86 ∓ 7 ml.El caudal resultante era de 8,6 ∓0, ml. /seg.

DETERMINACION DE LAS VARIACIONES DEL VOLUMEN DE LA FIBRA

La determinación de las variaciones de volúmen de la fil realizaron en base a mediciones de la variación del radio de la misma

Para poder determinar las variaciones de volúmen en base variaciones de radio, debemos aceptar previamente que la fibra muscula puede ser considerada como cilindro y que la misma no modifica su lo tud durante la experiencia.

La fibra muscular puede ser considerada un cilindro : para comprobar la veracidad de esta afirmación, se obtuvieron microfo grafías de distintos diámetros de la fibra a lo largo de la misma.

En general se encontró que el error debido a consider la fibra cilíndrica era menor del 2 %.

La fibra no modifica su longitud durante la experien la fibra disecada era colocada en la cámara a una tensión similar a l se encuentra en estado fisiológico, lo que se logró dándole una longi similar a la que presenta in-vivo.

Dado que los extremos de la fibra están fijos, un ac miento es imposible que se produzca.

La única posibilidad de variación se debería a un ev aumento de la misma. Esto se traduciria en un pandeo de la fibra en l nara. Fig. 8 .

FIG. 8

Si esto ocurriera se produciría un desenfoque de la fibra observarla en el microscopio, a partir de la modificación en el micro co del instrumento para lograr nuevo enfoque, sería posible calcular flexión producida.

Sin embargo este efecto fué observado raramente y sin gra magnitud, además se consideró que con una flexión de 2 mm , muy supe a la observada experimentalmente, el aumento de longitud correspondie era del 2%, lo que haria caer a este error dentro del error del méto por eso se considera la longitud constante durante la experiencia.

DETERMINACION DEL VOLUMEN EN BASE AL RADIO

Aceptadas las dos presunciones anteriores y sal que el volúmen de un cilíndro es :

$$Vc = \pi \cdot R^2 \cdot l$$

Donde Vc es el volúmen de una célula cilíndrica, R radio de la misma, longitud de la célula.

Si se produce un cambio de volúmen sin modific de largo, será :

$$Vco = \pi \cdot Ro^2 \cdot l$$

$$Vc = \pi \cdot R^2 \cdot l$$

Vco es el volúmen de la célula a t=0 y Vc a un tiempo t.La variación lativa de volúmen será :

$$\frac{Vc}{Vco} = \frac{R^2}{Ro^2}$$

Es decir que conociendo los radios inicial y final nos determinar las variaciones relativas de volúmen.

MEDIDA DEL TIEMPO

El tiempo era medido por medio de un cronómetro puest

marcha simultaneamente con el comienzo del experimento. El error cometido en el mismo era de 5/10 ya que si bien la aproxima del instrumento era de la décima de segundo, la lectura hecha sin de lo, tenía un error de ese orden.

En resumen, con el método anteriormente descripto, se ob ron valores de la variación de volumen en función del tiempo, en fib musculares aisladas, al ser sometidas a diferentes medios.

MEDIDA DEL VALOR DEL RADIO

Las microfotografías de las fibras fueron ampliadas; l dición del radio se realizó sobre la ampliación, con un compás de de puntas y el valor fué determinado sobre una regla que aproximaba al mm con lo cual el error en la medición del diámetro de la fibra fué que el 1%.

Al medir el radio de la fibra se presentaba la posibil de error debido a la falta de definición del borde celular por defic cias de enfoque.

Cuando el enfoque era correcto la indefinición caía de del error de la regla. Cuando el enfoque era defectuoso se desecharon microfotos con errores mayores de 3%.

MICROSCOPIO

Se utilizó un microscopio Carl Zeiss binocular, con di tivo microfotográfico, siendo la fibra enfocada con un objetivo 10/0 y un juego de oculares C 10X . Las microfotografías se obtuvieron po dio de un ocular Kpl 25X y una cámara Contax IIa, de 35 mm. de origen alemán.

PELICULA

Se utilizó rollos de 32 mm marca Ilford Pan de 36 mm ;p nático, 50 ASA, 18 Din de grano fino; revelado por los procesos com

CARACTERISTICAS DE LA AMPLIADORA

Autonega - Modelo D 3 . Tiene un lente Kodak, Ektar F. Abertura del diafragma 4,5. Distancia focal para ampliación 75 mm. Distancia máxima entre el lente y plano de medida 92cm.

DETERMINACION DE LA AMPLIACION TOTAL DEL SISTEMA

Microscopio + Cámara fotográfica + Ampliadora

Se utilizó una cámara Fuch Roshontal para recuento celular c líquido cefalo raquídeo de las siguientes características :

Superficie total : 1 mm^2, número de cuadrados pequeños : 256 lado de cuadrado pequeño : 1/16 mm.

Se fotografió un lado de un cuadrado pequeño de 1/16 mm. de longitud con el sistema indicado, y se midió el mismo en la ampliadora, obteniéndose un valor de 18 cm., por lo cual el factor de ampliación viene dado por :

$$M = \frac{Vm}{Vr} \qquad M = \frac{18.00}{(1/16) \cdot 10^{-1}} = 2880$$

Vm : valor medido ; Vr : valor real ; M : ampliación total del sistema.

MEDIDA DE CONCENTRACIONES

Se realiza por medio de un Fisko Osmometer modelo G-62, el cual mide presiones osmóticas por el método del descenso crioscópico, c una aproximación de 0.001 °C. Para medir temperatura se utiliza un termi tor y la variación de resistencia con la temperatura, es compensada con puente de Wheastone de diseño especial , usando el método de balanco, re trándolo por medio de un galvanómetro.

Está calibrado detal manera que en el dial se leen directamente mosmol/litro. La escala se calibra con soluciones Standard de NaCl de 100 mosmol/l y 500 mosmol/l provistas por el fabricante. El baño de c frianiento de la solución está constituido por agua y propilenglicol en una relación de 3 a 1 .

SOLUCIONES UTILIZADAS

Describiremos dos : la solución standard (Ringer normal) que es utilizada en todos los experimentos, y la solución base, la cual es utilizada agregando distintas concentraciones de electrolitos y no electrolitos

En las tablas Ci representa la concentración molar ($mmol.l^{-1}$) calculada; di representa la concentración en masa ($g.l^{-1}$) calculada.

RINGER NORMAL pH = 7,4

TABLA II

i	$Ci/m.mol.l^{-1}$	$di/g.L^{-1}$	Procedencia
NaCl	111.20	6.4994	Fisher
KCl	2.50	0.1864	Malinckrodt
$CaCl_2$	1.89	0.2130	Baker Chem. Co.
NaH_2PO_4	0.50	0.0688	Baker Chem. Co.
Na_2HPO_4	2.50	0.3549	Malinckrodt

Por osmometria está solución tiene una concentración osmótica activa de 222.00 $mosmol.l^{-1}$.

SOLUCION BASE

TABLA III

	NaCl	KCl	$CaCl_2$	NaH_2PO_4	Na_2HPO_4
$di/g.l^{-1}$	-	0.1864	0.2130	0.6880	0.3549
$Ci/mmol.l^{-1}$	-	2.50	1.89	0.50	2.50

ECUACIONES PRACTICAS PARA EL CALCULO

COEFICIENTE DE PERMEABILIDAD AL AGUA (Pw)

Si elflujo de volumen es solamente debido a la presencia tanto en la parte externa como la interna de la membrana, de solutos que no pasan por la membrana ($\sigma = 1$), según lo visto en 2-1, ecuac.2-17, se tiene :

$$Jv = \frac{dVw}{d\,t} = Pw \cdot A \cdot (Csi - Cso) \qquad 3\text{-}1$$

$$\text{con} \quad Pw = Lp \cdot R \cdot T = Lp' \qquad 3\text{-}2$$

Cuando entra agua a la célula, Csi (concentración de soluto dentro de la célula) varia de la siguiente manera :

$$Csi = \frac{Csio \cdot Vwo}{Vw}$$

Donde el subíndice o significa condiciones iniciales y Vw el volúmen de agua celular a un tiempo t. En esta ecuación se supone que el volúmen de agua es el volúmen de solución.

Reemplazando en 3-1

$$\frac{dVw}{dt} = \left(\frac{Csio.Vwo}{Vw} - Cso\right) \cdot A \cdot Pw$$

Considerando Cso (concentración de soluto fuera de la célula) constante e integrando entre t=0 y t se obtiene (17 , 18)

$$t = \frac{1}{Pw.A.Cso^2}\left[Csio.Vwo.\ln \frac{Csio.Vwo - Cso.Vwo}{Csio.Vwo - Cso.Vw} - Cso(Vw - Vwo)\right]$$

Como experimentalmente se mide variación de volúmen celular en función del tiempo, es conveniente expresar ésta ecuación en función de las propiedades medidas.

Según V. Sidel y A. SOlomon (17) se tiene :

$$t = \frac{W.Vco}{Pw.A.T^2.Csio}\left[\ln \frac{1-T}{1-T\left(1+\frac{\Delta Vc}{W.Vco}\right)} - \frac{T.\Delta Vc}{W.Vco}\right] \qquad 3\text{-}3$$

ndo :

Vco : volumen inicial de la célula a t = o

Vc : volumen de la célula a un tiempo t.

Δ Vc : Vc - Vco

T = Cso/Csio, tonicidad relativa inicial.

W = fracción de volumen osmóticamente activo.

El volumen osmóticamente activo según Ponder (19) es de principalmente a dos factores :

existe agua de hidratación de las proteínas

hay partes rígidas de la célula

representa la fracción del volumen inicial de la célula Vco, que pu tervenir osmóticamente. Esta fracción esta relacionada con el volumen icial de la célula y el volumen a un tiempo t, Vc , por la ecuación

$$\frac{Vc}{Vco} = 1 + W.\left(\frac{1}{T} - 1\right) \qquad 3\text{-}4$$

deducción de la ecuac. se puede ver en el apéndice I.

En virtud del parrafo 3-3

$$Vco = \pi .Ro^2.l \qquad (\text{ a } t = 0 \text{ })$$

$$Vc = \pi .R^2.l \qquad (\text{ a } t = t \text{ })$$

$$A = 2.\pi .Ro.l$$

emplazando en ecuac. 3-3

$$= \frac{W.Ro}{2.Pw.T^2.Csio}\left[\ln\frac{1 - T}{1 - T\left[1 + \frac{(R^2/Ro^2) - 1}{W}\right]} - T\left[\frac{(R^2/Ro^2) - 1}{W}\right]\right.$$

3-5

Si $\dfrac{(R^2/Ro^2) - 1}{W} = Z$ y $t' = \dfrac{t}{Ro.W}$, se tiene :

$$t' = \frac{1}{2.Pw.T^2.Csio}\left[\ln\frac{1 - T}{1 - T.(1 + Z)} - T.Z\right] \qquad 3\text{-}6$$

de acuerdo a ecuac. 3-6 para cada valor de Pw, dando valores a Z, se pu den obtener curvas teóricas de t' en función de Z, para dada tonicidad.

COEFICIENTE DE REFLEXION σ

De ecuac. 2-18 se tiene :

$$Jv = \frac{dVw}{dt.A} = Lp.R.T.\sigma.(Csi - Cso) = Pw.\sigma.(Csi - Cso) \qquad 3\text{-}7$$

$$Csi = \sum Cri + Ci_{NaCl} \qquad Cso = \sum Cro + Co_{NaCl} + Cox$$

donde Cri y Cro son las concentraciones internas y externas iniciales d electrolitos no permeantes tales que : $\sum Cri = \sum Cro$.

$Ci_{Na\,Cl}$ y Co_{NaCl} son las concentraciones internas y externas iniciales de cloruro de sodio, al cual, mientras dura la experiencia, l membrana es impermeable, y Cox es la concentración de la molécula de prueba de la cual se quiere determinar el coeficiente de reflexión.

Reemplazando en 3-7 :

$$\frac{dVw}{dt.A} = Pw.\left(\sum Cri + Ci_{NaCl} - \sum Cro - Co_{NaCl} - \sigma x.Cox\right)$$

$$\frac{dVw}{dt} = Pw.A.(Ci_{NaCl} - Co_{NaCl} - \sigma x.Cox) = K - Pw.A.\sigma x.Cox \qquad 3\text{-}$$

los coeficientes de reflexión para cloruro de sodio y los electrolitos no permeantes son la unidad, σx es el coeficiente de reflexión para l

molécula de prueba, K es una constante tal que :

$$K = Pw.A.(Ci_{NaCl} - Co_{NaCl})$$

Cuando dVw/dt = 0, de ecuac. 3-8 se tiene :

$$0 = K - Pw.A.\sigma x.Cox \qquad \text{o sea} \qquad K = Pw.A.\sigma x.Cox$$

$$Pw.ACox.\sigma x = Pw.A..(Ci_{NaCl} - Co_{NaCl})$$

$$\sigma x = \frac{(Ci_{NaCl} - Co_{NaCl})}{Cox} \qquad 3\text{-}9$$

o sea conociendo la diferencia $Ci_{NaCl} - Co_{NaCl}$ y determinando graficamente el valor de Cox que hace que a t = 0, dVw/dt sea nulo, es posible calcular el coeficiente de reflexión de los solutos por medio de la ecuac. 3

COEFICIENTE DE PERMEABILIDAD A SOLUTOS. Ps

De ecuac. 2-24 se ve que si el soluto no es muy permeante $1 - \sigma_s$ es aproximadamente cero y

$$Js = w_s.R.T.A.(Cso - Csi) = Ps.A.(Cso - Csi) \qquad 3\text{-}10$$

donde $$Ps = w_s.R.T. \qquad 3\text{-}11$$

El método empleado para medir Ps es similar a los anteriores se miden los cambios de volumen en función del tiempo, midiendo primero el volumen de equilibrio en Ringer normal y luego agregando una solución de Ringer que contenga la molécula de prueba, para la cual se quiere determinar Ps. La fibra esta entonces en una solución hipertónica y disminuye su volumen. Cuando la sustancia penetrante comienza a pasar, el agua la sigue osmóticamente y la fibra se hincha nuevamente hasta llegar al equilibrio.

Si la velocidad de movimiento de agua es mucho mayor que la de moléculas de soluto, la fibra estara siempre en equilibrio osmótico y se cumple (4)(44)(45) :

$$So + Cso = Csi + Si \qquad 3\text{-}12$$

donde Se y Si se refieren a las concentraciones externas e internas de r permeantes, las cuales son iguales cuando la célula esta en equilibrio, lo tanto el número de moles de sustancia no permeante dentro de la célu es en todo momento Se.Vo, donde Vo es el volumen de equilibrio de la lula. A tiempo t = 0 , Csi = 0 y el volumen de la célula sera Vo, que el volumen que alcanza la célula para que :

$$Cso + So = Si \qquad 3\text{-}13$$

donde Cso es la concentración de sustancia permeante en la parte exyer de la célula. A un tiempo t, donde el volumen de la célula es V, se tie

$$Cso + So = \frac{Zi + So.Vo}{V} \qquad 3\text{-}14$$

donde Zi es el número de moles de permeante dentro de la célula al tiem t, Si es igual a Se.Vo/ V y se considera que Cso se mantiene constante de ecuac. 3-14 :

$$V.(Cso + So) = Zi + So.Vo \qquad 3\text{-}15$$

puesto que Cso, So, y Vo son constantes, derivando 3-15 con respecto al tiempo (4) :

$$\frac{dV}{dt} . (Cso + So) = \frac{dZi}{dt} \qquad 3\text{-}16$$

De ecuac. 3-12

$$Cso - Csi = Cso - \frac{Zi}{V} = So\left(\frac{Vo}{V} - 1\right)$$

y reemplazando en ecuac. 3-10

$$Js = \frac{dZi}{dt} = Ps.A.Se.\left(\frac{Ve}{V} - 1\right) \qquad 3\text{-}17$$

y reemplazandoen 3-16

$$\frac{dV}{dt}.(Cso + Se) = Ps.A.Se.\left(\frac{Ve}{V} - 1\right)$$

$$\frac{dV}{dt} = \frac{Ps.A.Se}{(Cso + Se)}.\left(\frac{Ve}{V} - 1\right)$$

; integrando entre 0 y t (4) se tiene :

$$- V - Ve.\ln(Ve - V) \Big|_{Ve}^{V} = \frac{Ps.A.Se.t}{Cse + Se} \qquad 3\text{-}18$$

lividiendo ambos miembros por Ve se tiene :

$$- \frac{V}{Ve} - \ln(Ve - V) \Big]_{Ve}^{V} = \frac{Ps.A.Se.t}{(Cse + Se).Ve}$$

Si $V/Ve = V'$ y $Ve' = Ve/Ve$, y definiendo $t_{1/2}$, como el tiempo al cual se cumple :

$$V'_{1/2} = \frac{1}{2}\left(\frac{Ve + Ve}{Ve}\right)$$

tendremos :

$$- V' - \ln(Ve - Ve.V') \Big]_{Ve'}^{V'_{1/2}} = \frac{Ps.A.Se.t_{1/2}}{(Cse + Se).Ve} \qquad 3\text{-}18$$

$$- \frac{1}{2}\left(\frac{Ve + Ve}{Ve}\right) - \ln\left[Ve - Ve\frac{1}{2}\left(\frac{Ve + Ve}{Ve}\right)\right] + \frac{Ve}{Ve} + \ln\left(Ve - Ve\frac{Ve}{Ve}\right)$$

ecuac. 3-19

la célula se comporta como un osmómetro (4), en virtud de ecuac. 3-13 esto que el número de moles de sustancia no permeante dentro de la célu es Se.Vo

$$\frac{Se.Vo}{Vo} = Si = (Se + Cso) \quad y \qquad 3\text{-}20$$

$$Vo = \frac{Se.Vo}{Se + Cso}$$

y remplazando en ecuac. 3-19

$$\ln 2 - \frac{Cso}{2.(Se + Cso)} = \frac{Ps.A.t_{1/2}.Se}{Vo.(Cso + Se)}$$

$$Ps = \left[\ln 2 - \frac{Cso}{2.(Se + Cso)} \right] \frac{(Cso + Se).Vo}{Se.A.t_{1/2}}$$

mo

$$\frac{Vo}{A} = \frac{\pi .Ro^2 . 1}{2.\pi .Ro^2 .1} = Ro/2$$

$$Ps = \left[\ln 2 - \frac{Cso}{2(Se + Cso)} \right] \frac{(Cso + Se). Ro}{2.Se.t_{1/2}} \qquad 3\text{-}$$

ecuac. 3-21, permite calcular el valor de Ps para distintos solutos de rminando el $t_{1/2}$ para una dada concentración de molécula penetrante.

P A R T E IV

R E S U L T A D O S

COEFICIENTE DE PERMEABILIDAD AL AGUA (Pw) Y FRACCION DE VOLUMEN OSMOTICAMENTE ACTIVA (W).

La técnica utilizada es la descripta en 3-2 y 3-4. Las soluc nes de pH = 7.4 estan descriptas en la tabla IV.

T A B L A IV

Sistema	A	B	C	D
	$Ci/mmol.l^{-1}$	$Ci/mmol.l^{-1}$	$Ci/mmol.l^{-1}$	$Ci/mmol.l^{-1}$
Sol. base	7.39	7.39	7.39	7.39
NaCl	50.81	84.04	133.40	166.80

la solución base esta descripta en la tabla III. Las concentraciones osm cas activas de las soluciones son : 109.00, 173.00. y 333.00 $mosmol.l^{-1}$ pectivamente. T es la relación entre la concentración osmoticamente ac de la solución de prueba a la concentración osmoticamente activa del R normal. Los valores de T (tonicidad) hallados son : 0.49, 0.78, y 1.41 : pectivamente.

De ecuac. 3-4 se tiene :

$$\frac{Vo}{Vco} = \frac{Ro^2}{Ro^2} = 1 + \left(\frac{1}{T} - 1\right)$$

En la fig. 9a se representan los valores de Ro^2/Ro^2 obtenidos en funció $\left(\frac{1}{T} - 1\right)$, siendo Ro el valor del radio de la fibra cuando llego al librio, es decir cuando su volumen ya no varia con el tiempo. Los valor experimentales obtenidos de Ro^2/Ro^2 en función del tiempo para distinta tonicidades se dan en el apéndice II.

Como se ve en la fig. 9a, para tonicidades 0.78, 1.16, los valores obtenidos estan alineados y se puede obtener, de acuerdo a 3-4, el valor de W por la pendiente de la recta. Esta determinada por c dos mínimos da un valor de 0.79 ∓ 0.06.

Los valores para T = 0.49 se alejan de este comportamie y el valor de W calculado a partir de la ecuac.

$$W = \frac{(Ro^2/Ro^2) - 1}{\frac{1}{T} - 1}$$

la un resultado de 0.51 ∓ 0.02.

La explicación de este fenómeno puede ser la siguiente : Cuando una célula animal está rodeada por una solución hipotónica, su volumen puede aumentar hasta un cierto límite, el cual varia con los distintos tipos de célula. Cuando la concentración del medio exterior es tal que se ha alcanzado ese límite y no se ha alcanzado el equilibrio osmótico, pueden suceder dos casos :

1) Que la concentración del medio exterior sea tan baja que se produzca la ruptura de la fibra.Este proceso se conoce con el nombre de hemolisis cuando la célula en cuestion es un globulo rojo.

2) Que el aumento de volumen celular sea resistido por las paredes celulares. En este último caso, se ejerce una presión sobre la solución interior capaz de prevenir o disminuir el flujo neto de agua.De esta manera se obtendria un valor de Ve (volumen de equilibrio) menor que el esperado. Al ser menor el valor de Ve, por ecuac. 3-4, se tendria una explicación de porque se obtiene un valor inferior para W.

La otra solución hipotónica utilizada (T = 0.78) ya no presenta esta desviación, lo cual señalaria que se alcanza el equilibrio osmótico antes de llegar al límite de elasticidad de la fibra (célula) utilizada.

En la fig. 9 estan representadas las curvas teóricas obtenidas de t' en función de Z para cada valor de Pw, para T = 1.16. Los valores numéricos de las curvas teóricas, para las distintas tonicidades se dan en el apéndice II.

Experimentalmente se mide como varia la relación R^2/Ro^2 en función del tiempo al introducir la fibra en una solución hipotónica o hipertónica. En la fig. 10 y 11, se ve como varia el volumen de la fibra al

cambiar el medio en el cual se encuentra. En la fig. 10a la fibra está sumergida en Ringer normal (T = 1 , condiciones iniciales). Cuando se la sumerge en una solución hipotónica (T = 0.49), después de un tiemp t, la fibra aumenta su volumen, (fig. 10b) pues entra agua a la célul Lo mismo sucede para tonicidad T = 0.78.

Cuando la fibra se sumerge en una solución hipertónica, di minuye su volumen, (fig. 11b, T = 1.16) con respecto a su volumen en Ringer normal, (fig. 11a) esto es debido a que sale agua de la célula Lo mismo sucede para tonicidad T = 1.41.

Los valores experimentales se comparan con las curvas teó ricas y de esa manera se determinan los valores de Pw para las distinta tonicidades. En la fig. 12 se dan como ejemplo una curva experimental para T = 1.16, comparada con la curva teórica correspondiente a Pw = 0. Para las tonicidades T = 0.78 y T = 1.41, todas las curvas son del tipo dadas en la figura. En cambio para la tonicidad T = o,49, está la diyun tiva respecto a que valor de W usar, el correspondiente a las otras to nicidades y que es constante, o el valor propio de 0.51. En las figuras 13 y 14 se representan una curva experimental para los dos valores de W

Es evidente que las curvas teóricas reproducen bien las curvas experimentales solamente en el caso de W = 0.51. En cambio pa ra W = 0.79 solo coincide para bajos valores de t'. Sin embargo si la célula no llego al equilibrio osmótico, el valor de W = 0.51 no es co rrecto. Por lo tanto no es de sorprender que con W = 0.79 solo se ob tenga coincidencia para bajos valores de t', pues alli, la célula se encuentra todavia debajo del límite de elasticidad de las paredes. Con sideramos que el valor de Pw obtenido de esta manera es comparable con el de las otras tonicidades.

Por otra parte como el valor de W está determinado por Re la coincidencia teórico experimental en el caso de W = 0.51 (fig. es normal. De aqui se obtiene un valor de Pw de 0.13 ± 0.02 cm^4.osmol. $seg.^{-1}$ y que esta representado en linea de puntos en la fig. 15.

Es interesante notar que el método utilizado para el calcul do Pw difiere apreciablemente del utilizado por distintos investigadores al determinar el mismo parámetro sobre globulos rojos. Estos trabajos se realizan sobre un gran número de células, obteniendose por lo tanto un va lor medio de Pw promediando sobre todas las experiencias en conjunto. En este trabajo en cambio se determina el valor de Pw sobre una célula provi mente aislada. El valor medio de Pw se obtiene luego promediando los resu tados de cada experimento individual.

En la tabla V se dan los valores de Pw medios obtenidos y e la fig. 15 se los representa graficamente

T A B L A V

T	$Pw/cm^4.osmol.l^{-1}$	$\bar{Pw}/cm^4.osmol.l$
0.49 (W = 0.51)	0.14, 0.13, 0.15, 0.13, 0.15, 0.11, 0.10	0.13 ∓ 0.
0.49 (W = 0.79)	0.10, 0.09, 0.10, 0.10, 0.10, 0.10, 0.07	0.09 ∓ 0.
1.16 (W = 0.79)	0.08, 0.10, 0.10, 0.10,	0.10 ∓ 0.
1.41 (W = 0.79)	0.08, 0.08, 0.09, 0.10	0.09 ∓ 0.
0.78 (W = 0.79)	0.08, 0.10, 0.11, 0.11, 0.11	0.10 ∓ 0.
	PROMEDIO :	$\bar{Pw}$ = 0.095 ∓ 0

Como indica la fig. 15, con W = 0.79 no se encuentra depen dencia de Pw con T y su valor constante es 0.095 $cm^4.osmol.^{-1}seg.^{-1}$. En cambio si se toma en cuenta el valor de Pw para T = 0.49 calculado con W 0.51, Pw depende de T, aunque el valor de Pw para tonicidad T = 1, no di fiere significativamente del valor medio dado más arriba (W = 0.79 etc.). Esto quiere decir que para los fines de este trabajo, podemos utilizar el Pw medio dado sin inconvenientes, por lo cual no se ha investigado más el

efecto señalado en soluciones hipotónicas.

COEFICIEN TE DE REFLEXION

La técnica es la descripta en 3-2 y 3-4. Las soluciones utilizadas estan descriptas en la tabla VI, todas contienen a la solución base (tabla III) y moléculas de prueba en distintas concentraciones.

Experimentalmente se determina la variación relativa de volumen en función del tiempo, datos que figuran para distintas moléculas en el apéndice III. De la representación de esta variación relativa de volumen en función del tiempo, puede determinarse esa variación cuando t tiende a cero, (fig. 16) por medio de las pendientes de la curva. La variación relativa de volumen cuando t tiende a cero representada en función de Cex, que es la concentración inicial exterior de la molécula de prueba, se puede ver en la fig. 17 para glicerol y en la fig. 18 se representan todas las rectas obtenidas para las distintas sustancias estudiadas. Estas rectas fueron determinadas por cuadrados mínimos. Determinando graficamente el valor de Cex para el cual dVw/dt = 0, puede calcularse por medio de la ecuac. 3-9 el valor del coeficiente de reflexión (tabla VII).

T A B L A VII

Sustancia	Relación Isosmolar	σ
Sacarosa	136/138	0.98 ± 0.06
Manitol	136/133	1.02 ± 0.05
Urea	136/155	0.88 ± 0.06
Glicerol	136/150	0.91 ± 0.05
Acetamida	136/163	0.83 ± 0.04
Formamida	136/189	0.72 ± 0.04
Etilen glicol	136/195	0.70 ± 0.01

T A B L A VI

	Solución	di/g.l^{-1}	Ci/mmol.l^{-1}	pH	Nº de exper.	Procedencia
SACAROSA	A	5.20	15.20	7.4	4	Baker Chemical Co.
	B	46.51	136.00	7.4	3	
	C	88.24	256.70	7.4	4	
MANITOL	A	2.77	15.20	7.4	4	Sigma Chemical Co.
	B	24.78	136.00	7.4	3	
	C	46.89	256.70	7.4	4	
UREA	A	0.91	15.20	7.4	4	Baker Chemical Co.
	B	8.16	136.00	7.4	3	
	C	15.46	256.70	7.4	4	
GLICEROL	A	1.41	15.20	7.4	4	B.D.H
	B	12.41	136.00	7.4	4	
	C	23.62	256.70	7.4	4	
ACETAMIDA	A	0.88	15.20	7.4	4	Merck
	B	5.16	87.50	7.4	4	
	-	-	-	-	-	
FORMAMIDA	A	0.68	15.20	7.4	3	Merck
	B	3.94	87.50	7.4	3	
	-	-	-	-	-	
ETILEN GLICOL	A	0.94	15.20	7.4	3	Merck
	B	8.44	136.00	7.4	3	
	C	15.91	256.70	7.4	3	

COEFICIENTES DE PERMEABILIDAD A SOLUTOS Ps

La técnica utilizada está descripta en 3-4, y en la tabla se dan las soluciones utilizadas las cuales tienen pH = 7.4.

T A B L A VIII

Sustancia	Ci/mmol.l^{-1}
Glicerol	500
Urea	500
Etilen glicol	500
Formamida	500
Acetamida	500

todas las soluciones tienen además Ringer normal, con una concentrac osmóticamente activa Se de 222 mosmol.l^{-1}.

En la fig. 19 se muestra como ejemplo el gráfico obtenid do la molécula penetrante es la acetamida, indicando $t_{1/2}$, $V'_{1/2}$, y

En el apéndice IV estan dados los valores experimentales tenidos de $t_{1/2}$, para distintos solutos y en la tabla IX se dan los v lores de Ps obtenidos.

T A B L A IX

Sustancia	Ps.10^5/cm.seg.$^{-1}$				$\bar{P}$s.10^5/cm.se
Acetamida	1.20	1.10	1.30	1.00	1.15 ± (
Formamida	1.22	1.34	1.19		1.25 ± (
Etilen glicol	1.30	1.26	1.34	1.27	1.28 ± (
Glicerol	0.14	0.10	0.10		0.11 ± (
Urea	0.28	0.30	0.20		0.26 ± (

EFICIENTE DE REFLEXION σ EN FUNCION DEL pH Y COEFICIENTE DE PERMEABI-
DAD A SOLUTOS Ps EN FUNCION DE LA CONCEN TRACION DE ETILEN GLICOL

Como se vera luego en la parte 5, para interpretar mejor el
mportamiento del etilen glicol, es conveniente determinar su coeficiente
e reflexión a otro pH y el coeficiente de permeabilidad Ps a distintas
nconcentraciones.

Para la determinación de σ se utilizó la misma técnica des-
ipta en 3-2 y 3-4. El pH de las soluciones utilizadas es de 5.5, al cual
llega por cambio en la relación de PO_4H^{-2} / $PO_4H_2^-$ en las soluciones
scriptas en la tabla VI. En el apéndice III se dan los valores experimen-
les obtenidos y el valor de σ hallado es de 0.92 ± 0.01. (fig. 20).

Para la determinación de Ps se utilizó la misma técnica des-
ipta en 3-4. Las concentraciones de etilen glicol utilizadas, expresadas
$mol.l^{-1}$ son : 0.25, 2.00, y 4.00. Los datos experimentales se dan en el
éndice IV y en la tabla X se dan los valores de Ps obtenidos.

T A B L A X

$Ci/mol.l^{-1}$	10^5. Ps/cm.seg.$^{-1}$				10^5. Ps/cm.seg.$^{-1}$
0.25	1.14	1.20	1.21		1.19 ± 0.04
0.50	1.30	1.26	1.34	1.27	1.28 ± 0.04
2.00	2.20	2.40	1.90	2.00	2.10 ± 0.25
4.00	2.00	2.40	2.60	2.90	2.47 ± 0.30

mo se ve Ps solo se mantiene constante para concentraciones de 0.25 y 0.5
olar. Para concentraciones mayores se observa una marcada variación. Se
ntento trabajar a concentraciones mayores con el objeto de observar si se
lega a una nueva constancia, pero se produce la ruptura de la fibra.
nclusive no son muy confiables los valores obtenidos para Ci = 4mol.l^{-1}.
on el valor de σ determinado anteriormente, (apartado 4-2) tenemos los
iguientes valores de σ en función de pH :

H = 7.4 σ = 0.70 ± 0.01 , pH = 5.5 σ = 0.92 ± 0.01.

CULO DE LOS COEFICIENTES FENOMENOLOGICOS

De acuerdo a ecuac. 2-17 y 3-2, cuando se trabaja con solutos permeantes se tiene :

$$Lp' = Lp.R.T = Pw$$

decir, directamente Lp' esta dado por el valor de Pw obtenido experimen- te. Si se considera que la velocidad de pasaje de agua es mucho mayor qu de solutos, cuando se trabaja con sustancias que pasan a través de la m na, el valor de Lp' puede considerarse igual al valor obtenido cuando s pasa agua.

Lpd' (= Ldp') puede ser calculado a partir de las relacion nidas en ecuac. 2-16 donde :

$$Lpd' = Lpd.R.T$$

Ld' puede calcularse a partir de ecuac. 2-26 y 3-11 siendo :

$$Ld' = Ld.R.T \qquad y \qquad \bar{C}s = \frac{Csi + Cso}{2}$$

de Csi y Cso son las concentraciones internas y externas de molécula pe nte.

Los valores de Lp' , Lpd' y Ld', estan dados en la tabla XI. valores de Ld' están calculados para una concentración media $\bar{C}s$ de 250 $m.l^{-1}$

T A B L A XI

STANCIA	$Lp'.10^2$ (cm^4/osmol.seg.)	$Lpd'.10^2$ (cm^4/osmol.seg.)	$Ld'.10^2$ (cm^4/osmol.seg.)
EA	9.5	8.4	8.3
ICEROL	9.5	8.6	8.3
ETAMIDA	9.5	7.9	11.0
ILEN GLICOL	9.5	6.6	9.8
RMAMIDA	9.5	6.8	9.8
CAROSA	9.5	9.3	-
NITOL	9.5	9.7	-

ra agua Lp' = Lpd' = Ld' con un valor de $9.5.10^2$ cm^4/osmol.seg.
ra sacarosa y manitol no se calculo Ld' porque no se determinó el lor de Ps.

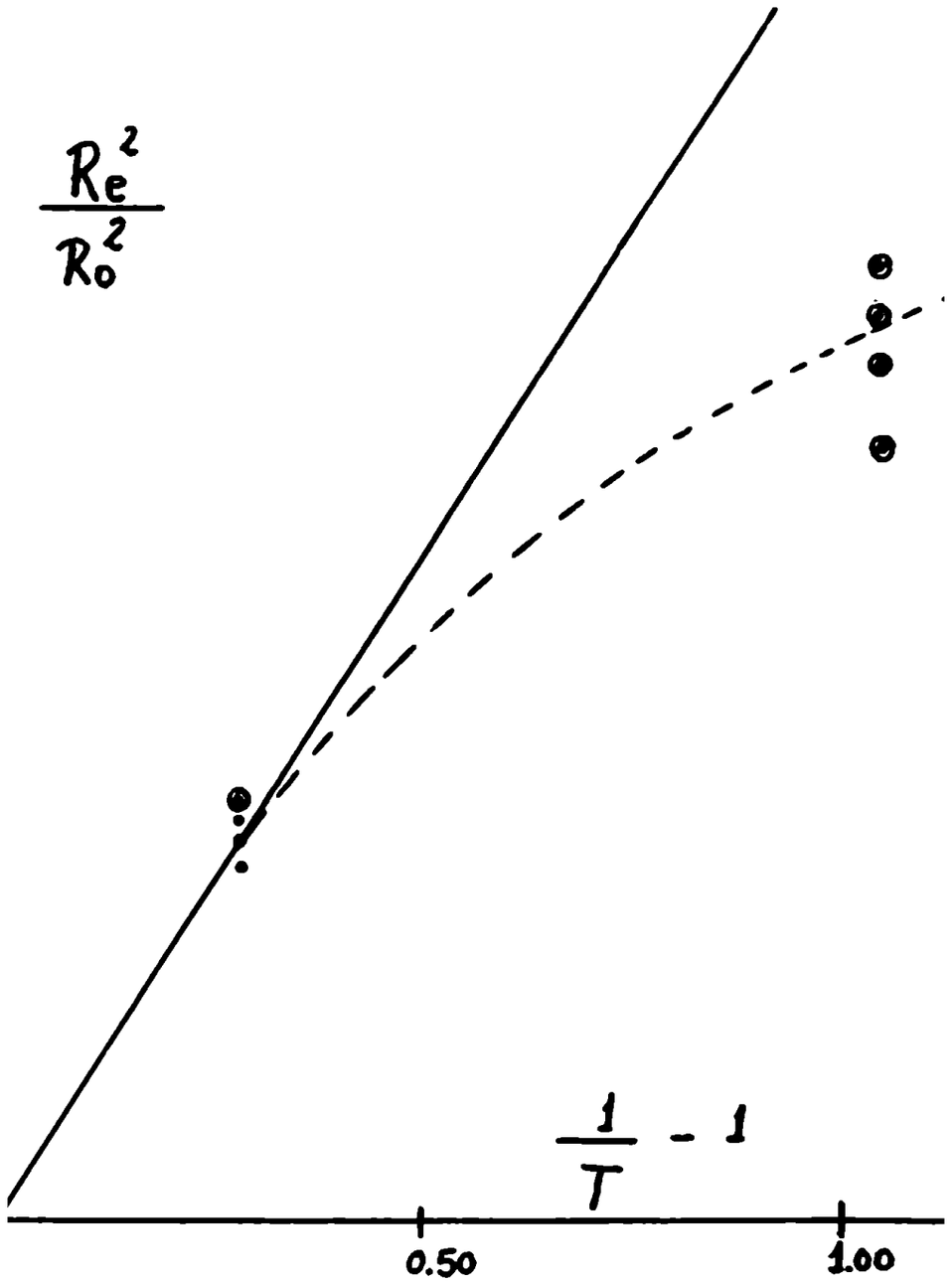


FIG. 9a

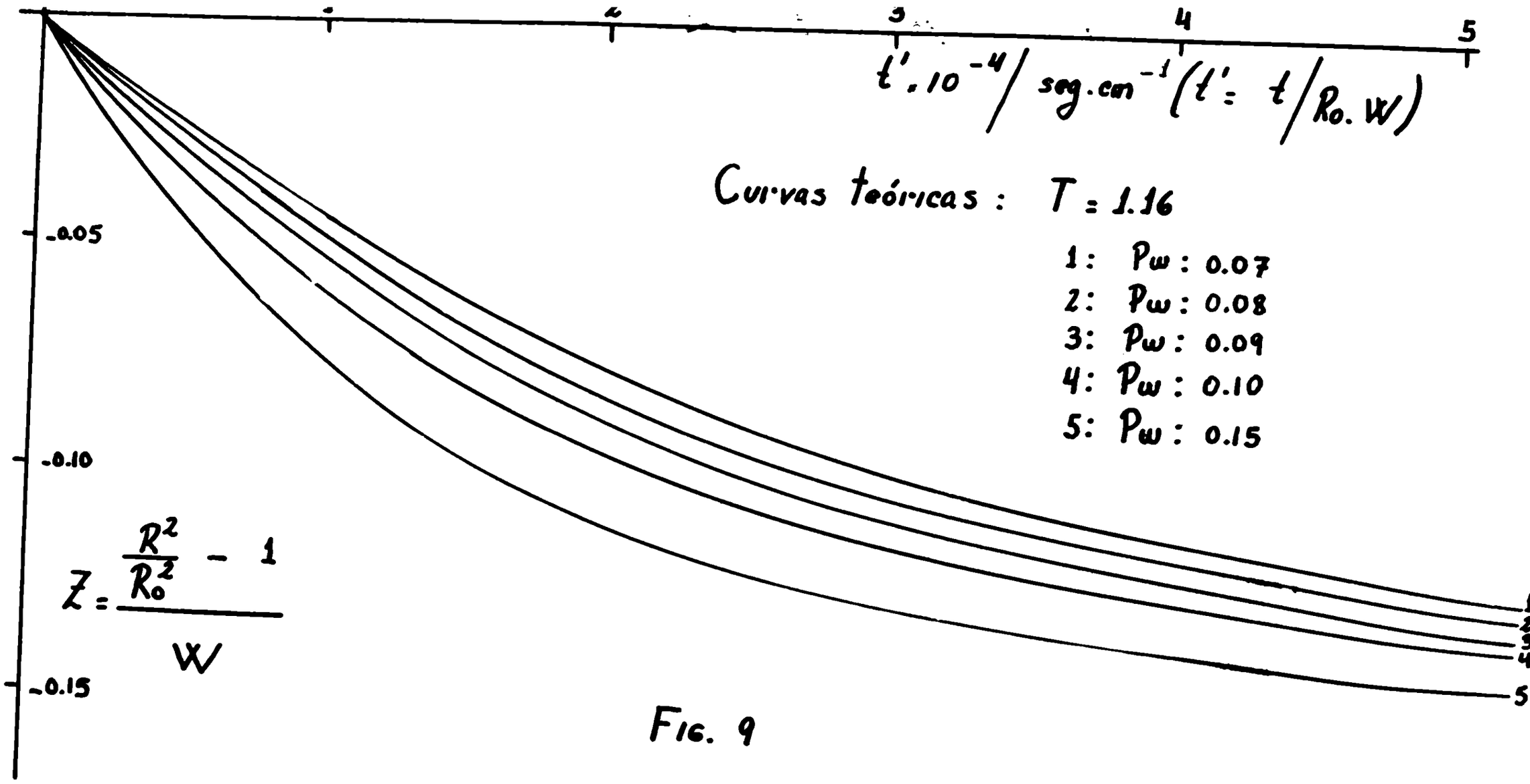

3
4
5
t'.10^-4 / seg.cm^-1 (t' = t/Ro.W)
Curvas teóricas : T = 1.16
1: Pw : 0.07
2: Pw : 0.08
3: Pw : 0.09
4: Pw : 0.10
5: Pw : 0.15
-0.05
-0.10
-0.15
Z = (R²/Ro² - 1) / W
5

FIG. 9

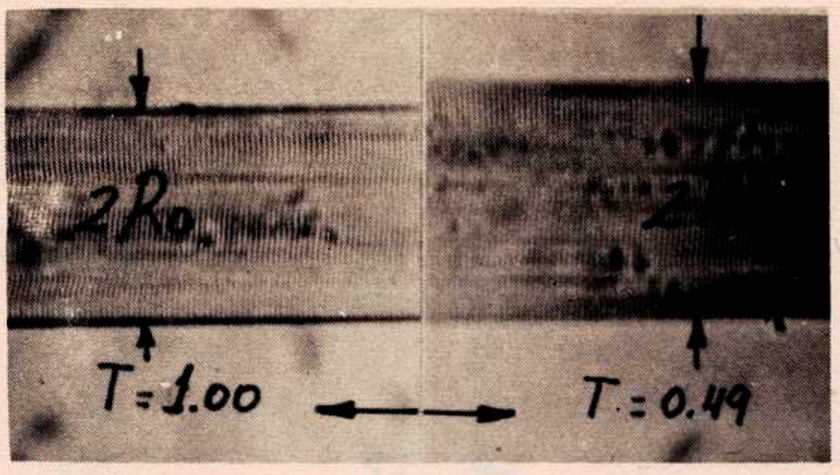


Fig. 10a Fig. 10b

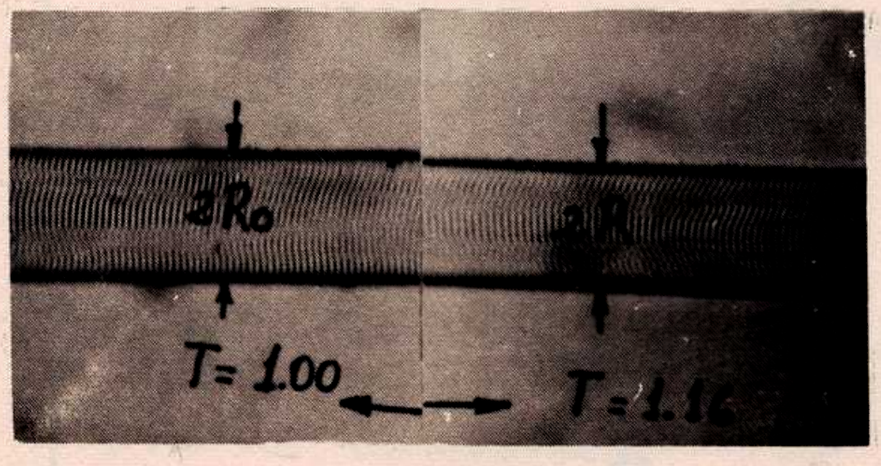


Fig. 11a Fig. 11b

Esto es una ampliación arbitraria del negativo primit
esa ampliación es mucho menor que la utilizada experimentalmen
para realizar las medidas del radio de la fibra y tiene por ob
mostrar como varia el volumen de la fibra en función del tiemp

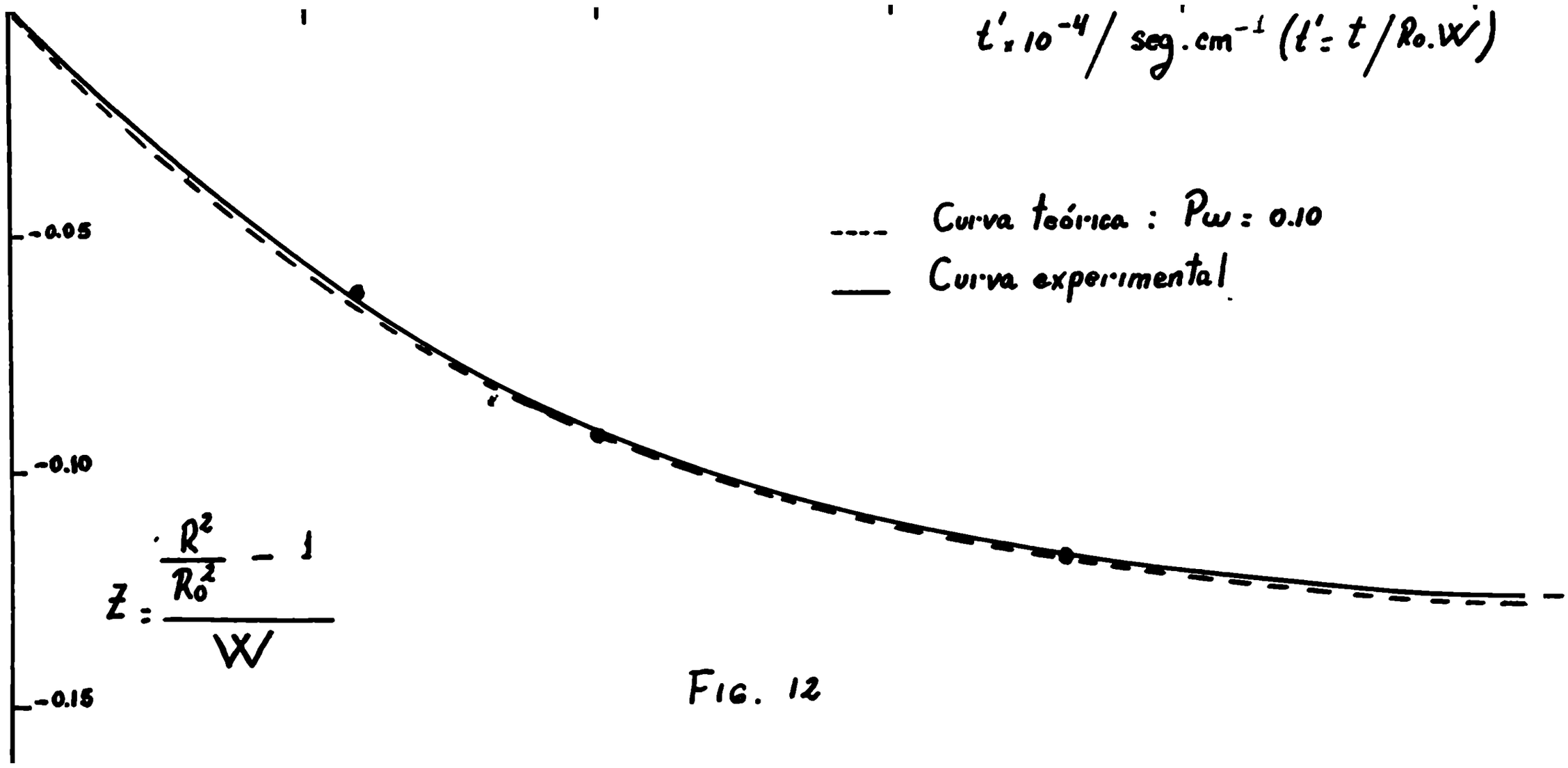

$t' \times 10^{-4} / seg.cm^{-1}$ $(t' = t / R_o.W)$
Curva teórica : $P_w = 0.10$
Curva experimental
-0.05
-0.10
-0.15
$Z = \frac{\frac{R^2}{R_o^2} - 1}{W}$

FIG. 12

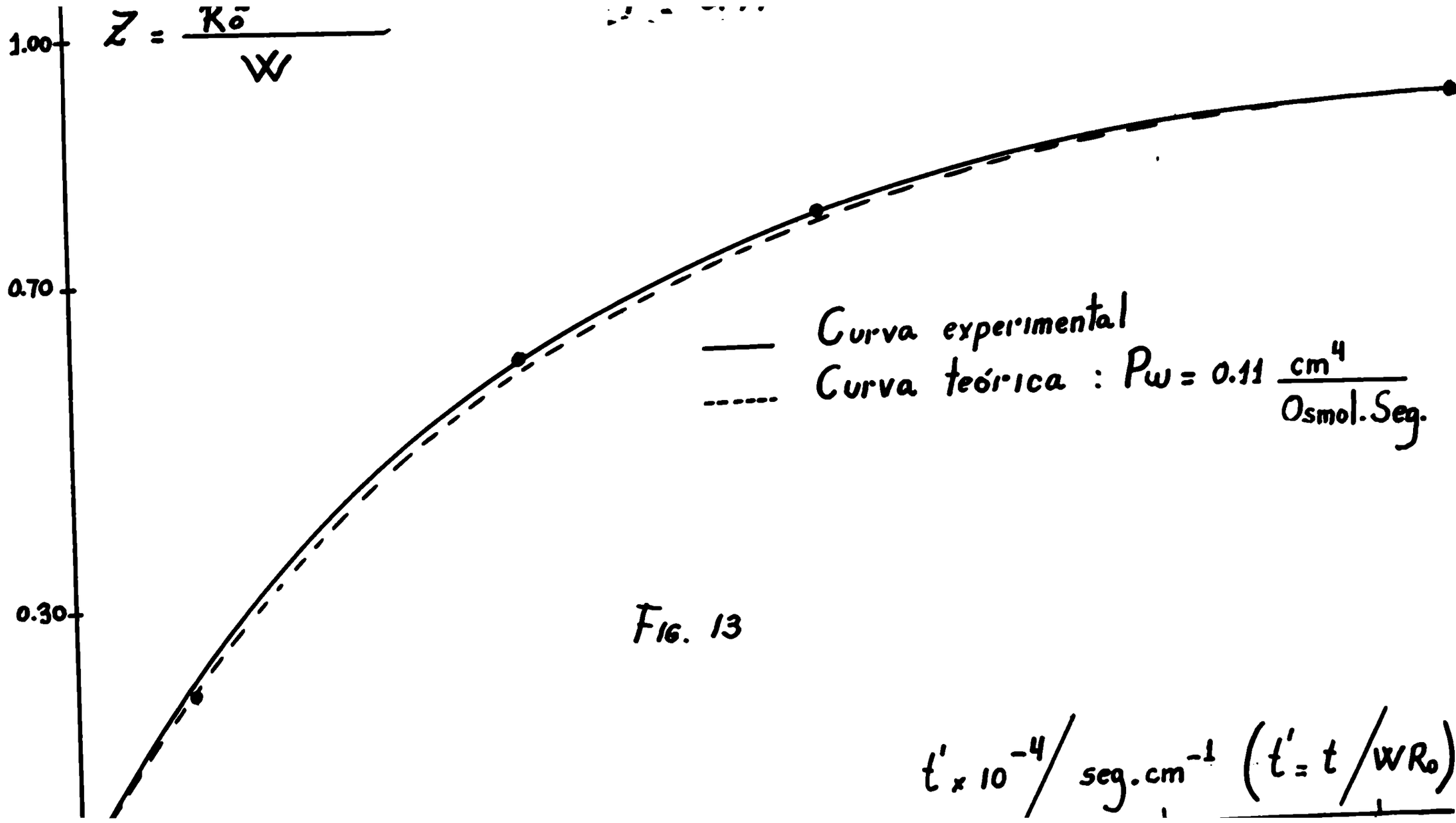

$Z = \frac{K\bar{o}}{W}$
1.00
0.70
0.30
Curva experimental
Curva teórica : $P_W = 0.11 \frac{cm^4}{Osmol.Seg.}$
$t' \times 10^{-4} / seg.cm^{-1}$ $(t' = t / WR_0)$

FIG. 13

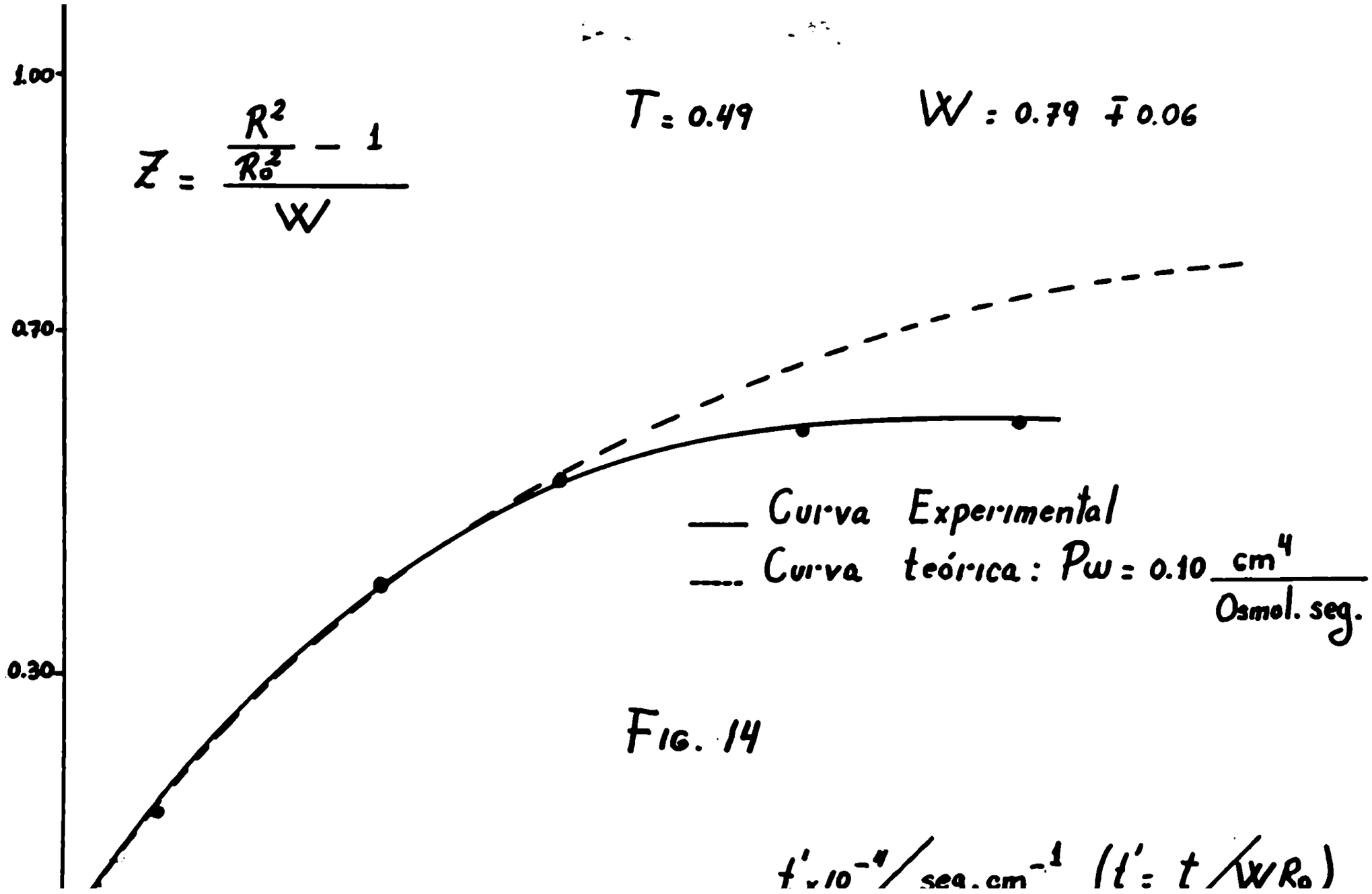
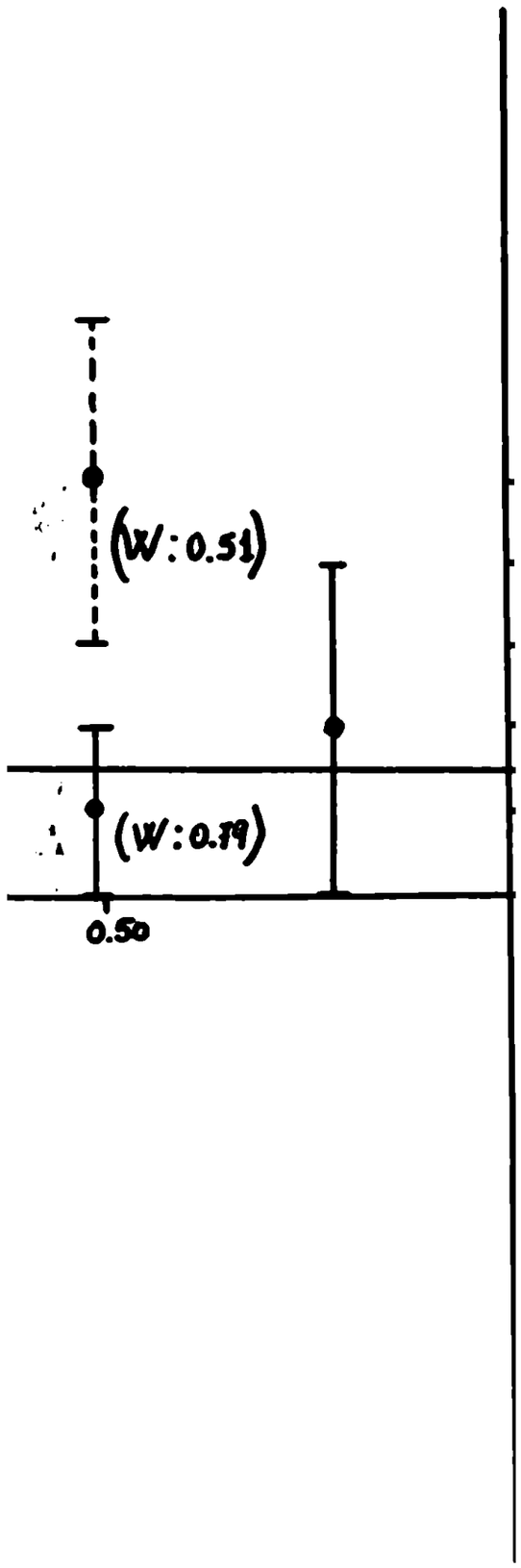

1.00
0.70
0.30
$Z = \dfrac{\frac{R^2}{R_0^2} - 1}{W}$
T = 0.49
W = 0.79 ∓ 0.06
Curva Experimental
Curva teórica: $P_W = 0.10 \dfrac{cm^4}{Osmol.\ seg.}$
$t' \cdot 10^{-4} / seg.\ cm^{-1}$ $(t' = t / W R_0)$

FIG. 14


(W: 0.51)
(W: 0.19)
0.50

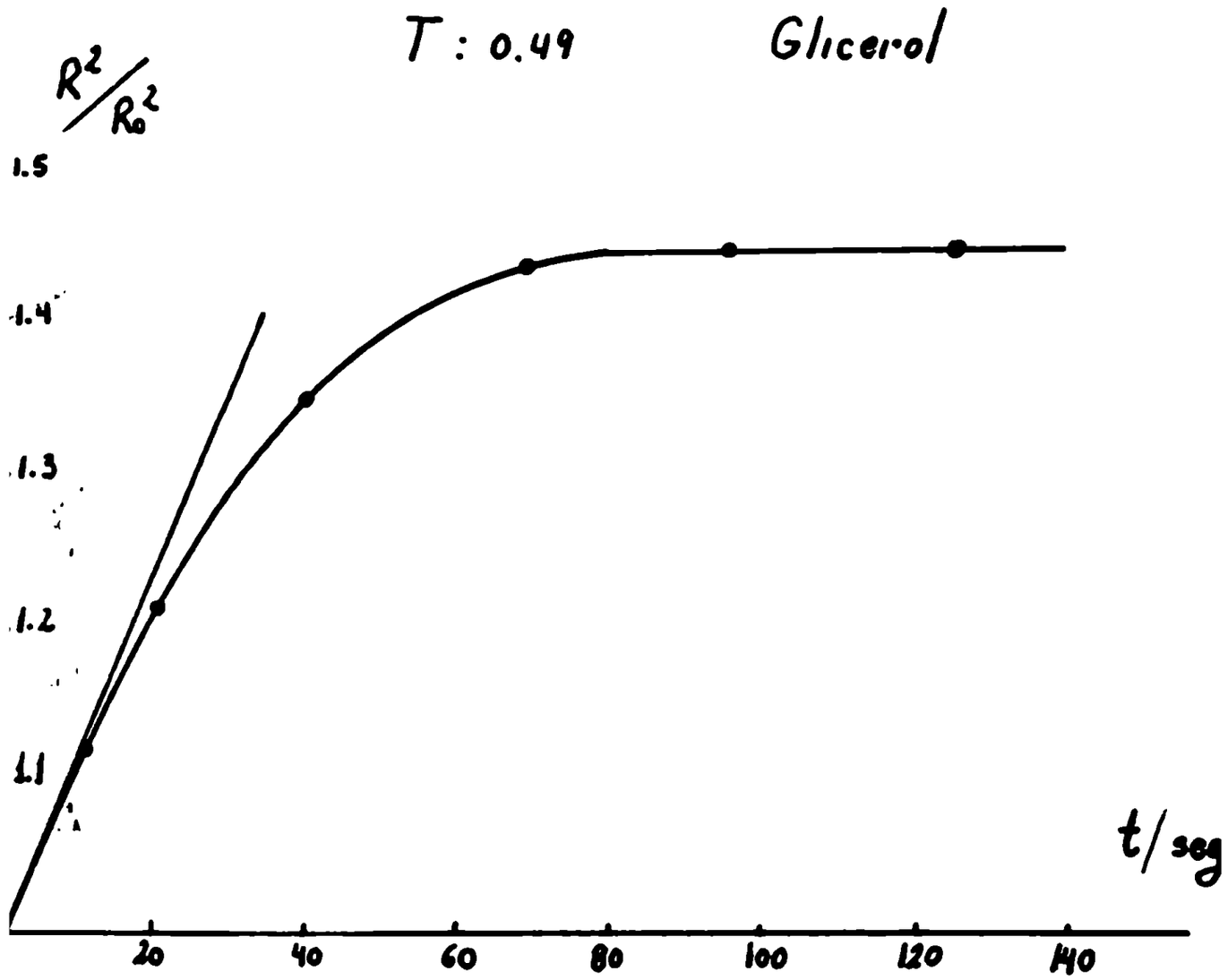


Fig. 16

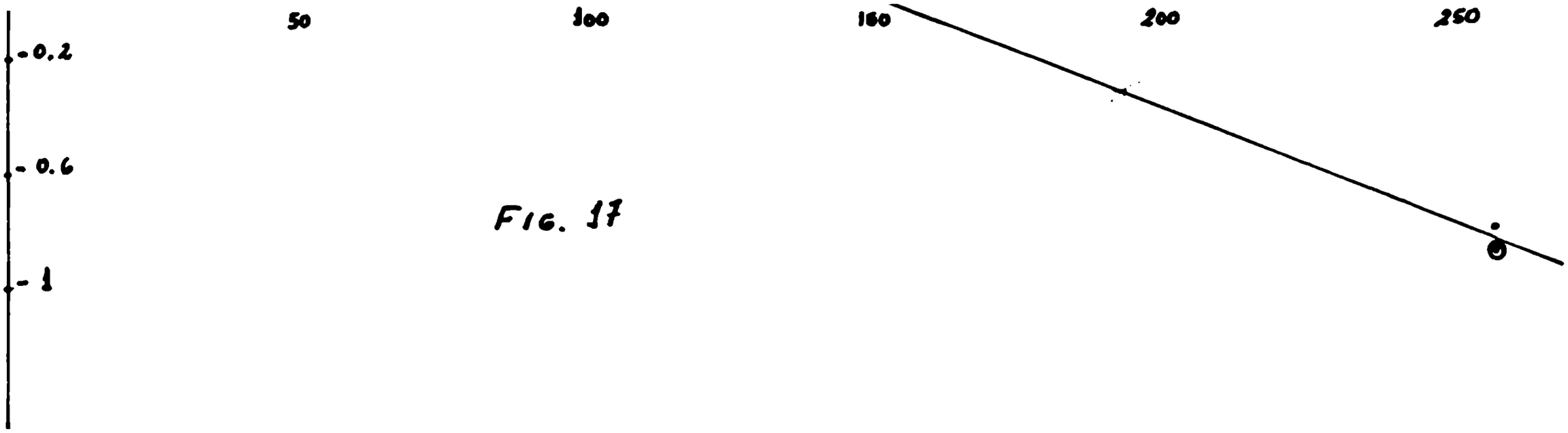
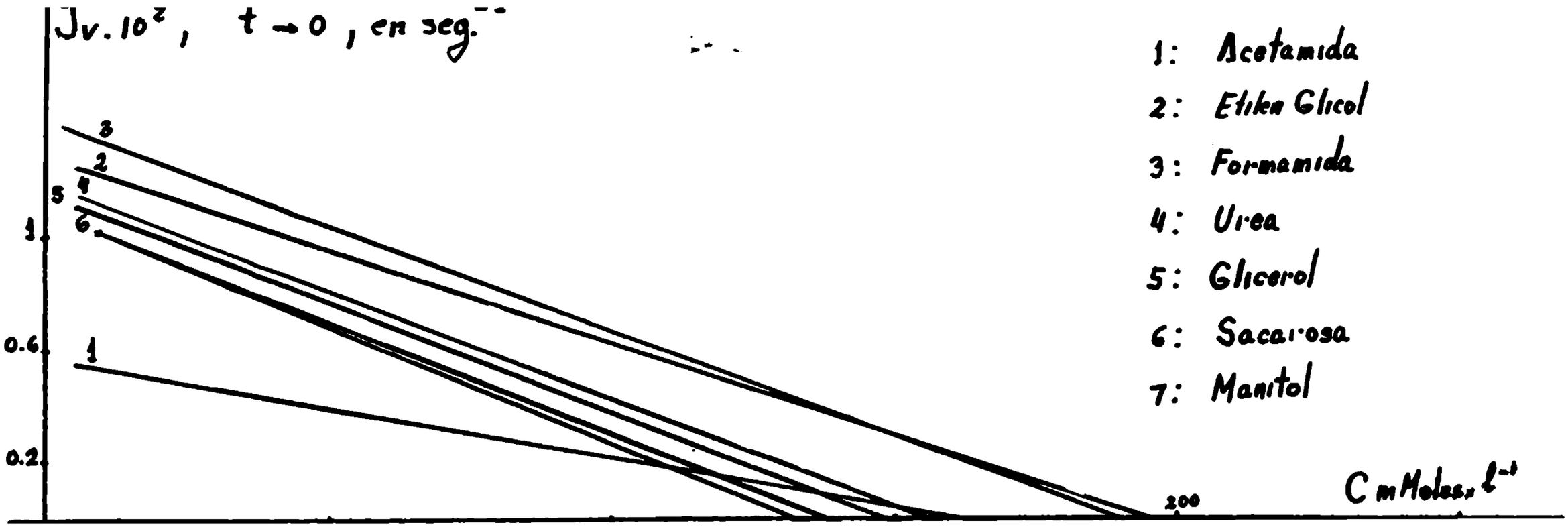
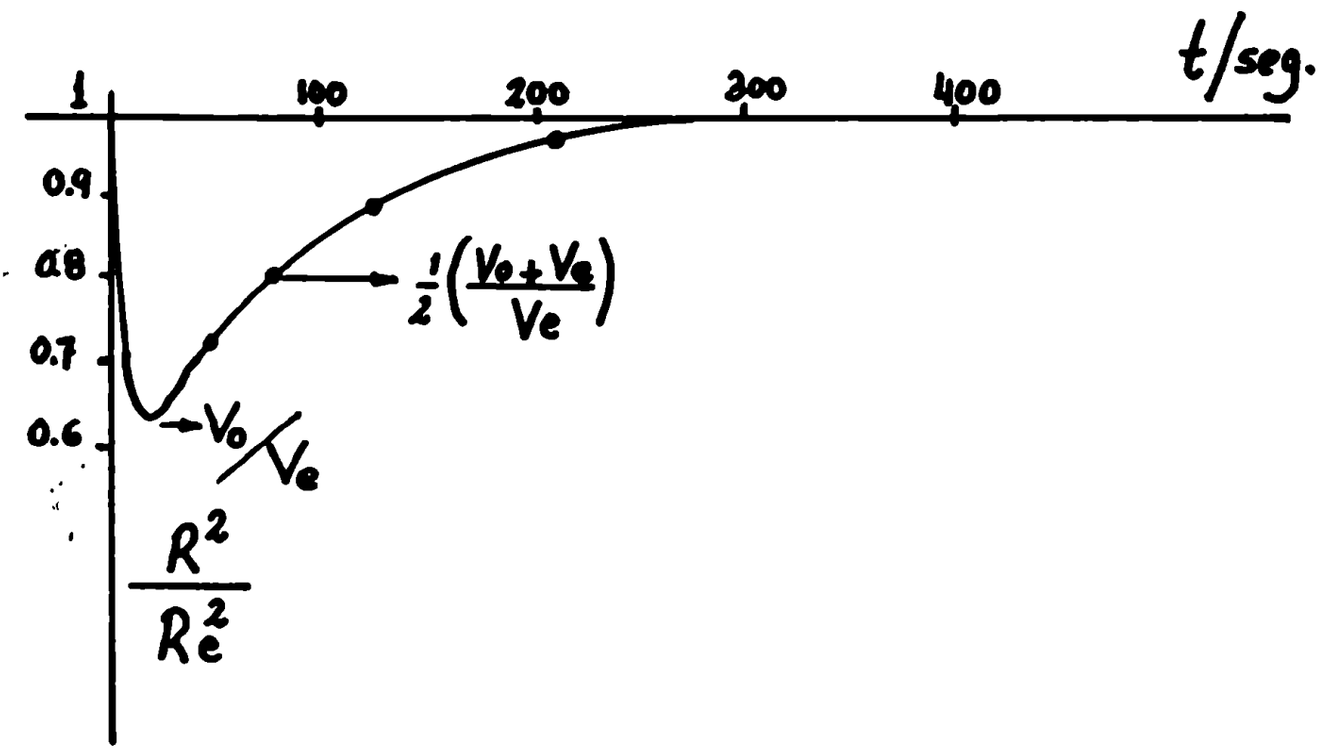


FIG. 17


Jv.10², t → 0, en seg.⁻¹
1: Acetamida
2: Etilen Glicol
3: Formamida
4: Urea
5: Glicerol
6: Sacarosa
7: Manitol
1
0.6
0.2
200
C mMoles.l⁻¹



Acetamida

Fig. 19

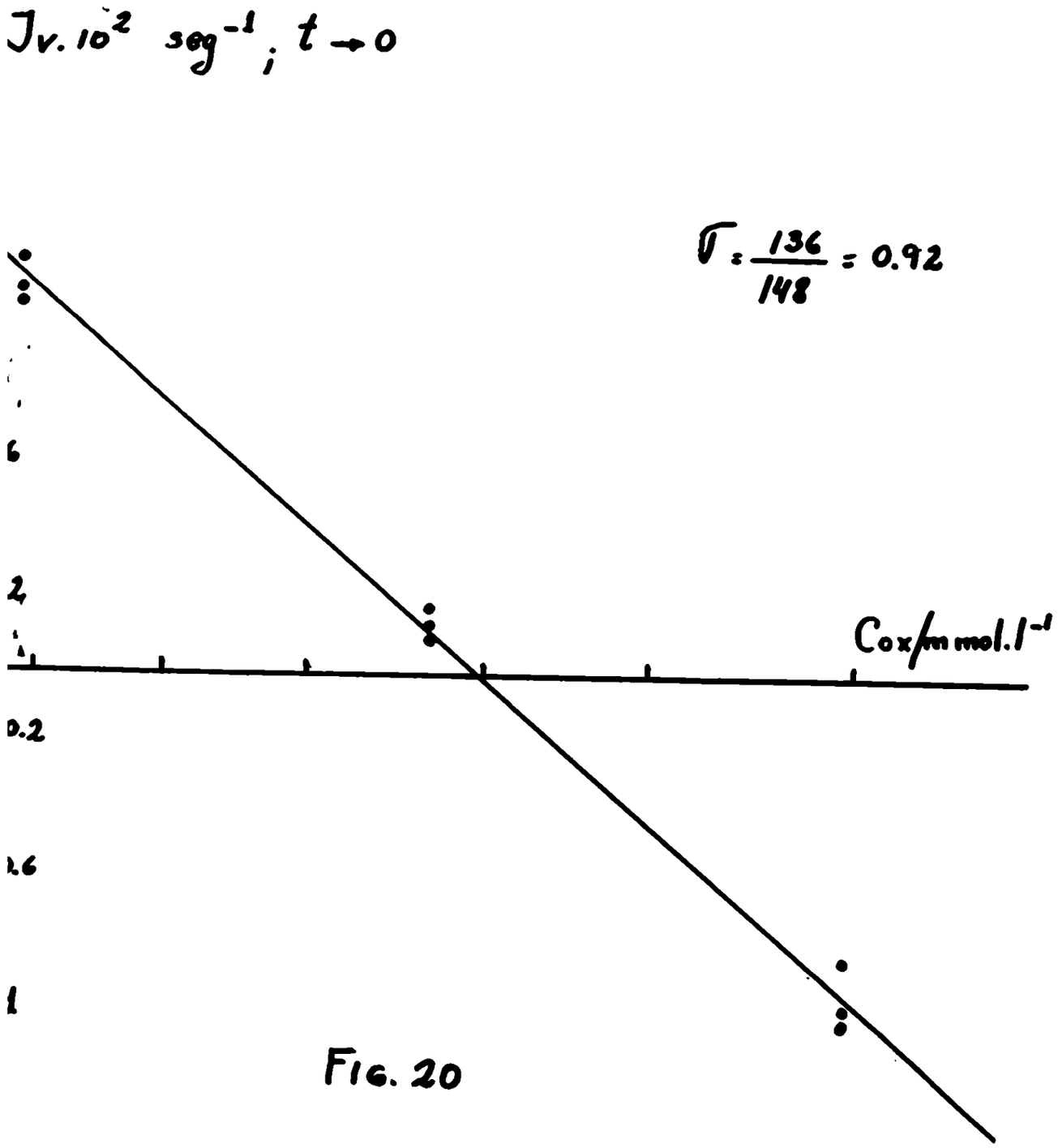


FIG. 20

P A R T E V

INTERPRETACION DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Se ha estudiado la permeabilidad del solvente (Pw), al soluto (Ps), la selectividad (σ) de la membrana para distintos solutos y se ha calculado a partir de estos datos experimentales los coeficientes fenomenológicos teóricos dados por la termodinámica de procesos irreversibles.

Existen diversas teórias, enunciadas en el apartado 1-3, para explicar el mecanismo de transporte a través de la membrana de soluto. Nuestros datos experimentales permiten someter estas teorías a exámen para ver hasta que punto son aceptables, es decir, que sus predicciones concuerdan con la experiencia. Analizaremos asi la teoría de los poros y la teoría de difusión. En el caso especial del etilen glicol también se la teoría de difusión facilitada.

COEFICIENTES FENOMENOLOGICOS

En la tabla XI estan dados los valores obtenidos de los coeficientes fenomenológicos. El coeficiente Lp' ha sido considerado constante pues los datos de las tablas VII y IX, muestran que los solutos son mucho menos permeantes que el agua y su contribución a Lp' se puede considerar despreciable. Esta situación ya se ha supuesto en el calculo de Lp' y queda asi confirmada.

Los datos del coeficiente Lpd' (= Ldp') muestran que el etilen glicol es el más permeante de todos los solutos utilizados, pues que de acuerdo a lo expuesto en el apartado 2-1, a menor Lpd' (o menor más permeante es el soluto. Los menos permeantes entre los solutos estudiados son la sacarosa y el manitol, los cuales presentan el valor de Lpd' mayor (σ aproximadamente la unidad)

En lo que respecta a Ld', los valores obtenidos no son del todo confiables. Esto se debe a lo siguiente :

1) Para el calculo de Ld', se ha identificado al coeficiente de permeabilidad Ps, medido experimentalmente, con el coeficiente w.R.T (ecuac. 3-1 3-11).Al determinar Ps, cambia continuamente el volumen de la célula, por lo tanto el soluto entra a la misma por difusión y por arrastre de las

›léculas de agua, es decir existe un flujo de volumen (ecuac. 2-24) mientra
ıe w se define como el coeficiente de permeabilidad del soluto a Jv=0.Ade-
ıs, en las ecuaciones utilizadas para obtener Ps (4) (apartado 3-4) se su-
›ne que la membrana se comporta como si fuera semipermeable ideal (ecuac.
-20), es decir, no permite el pasaje de soluto, cuando en verdad se está
ıdiendo la permeabilidad al mismo!

Para el calculo de Ld' se ha supuesto valido que :

$$\bar{C}s = \frac{Csi + Cso}{2}$$

esto solo valo cuando Δ Cs es pequeño, condición que no se cumple estri-
ımente en las experiencias realizadas,

No obstante, en la tabla XI se ve que los valores de Ld' ob-
›nidos son mayores para aquellos solutos a los cuales la membrana es más
›rmeante (tablas VII y VIII). Esto indica que la velocidad relativa de sol
solvente en su pasaje a través de la membrana, es mayor para etilen glicol
›etamida y formamida que para glicerol y urea.

›ROS

Los resultados obtenidos (9,10,11,12) mostraron que el flu
› de agua bajo la acción de un gradiente de presión hidrostática era mayor
ıe el obtenido debido a difusión el cual era determinado siguiendo el movi-
.ento de agua marcada (THO).

Cuando se trabaja con membranas celulares muchas veces es
.ficil producir un gradiente de presión hidrostática, lo que se produce es
ı gradiente de presión osmótica.

Si se acepta la existencia de poros, de acuerdo a lo expre
ıdo por A. Mauro (13), un gradiente de presión osmótica produce un gradien-
› presión hidrostática. Esto es debido a que las moléculas de solvente en
ı poro estan protegidas del bombardeo de otras, por las moléculas de solut
›l lado que la concentración de soluto es mayor, mayor sera la protección

por lo tanto menor la presión producida como consecuencia de choques en
e moléculas de solvente en el poro y la solución.

Es decir un gradiente de presión osmótica, producirá en los
tremos de los poros, una diferencia de presión hidrostática.

El flujo de agua a través de una membrana celular, bajo la
ción de un gradiente osmótico puede entonces escribirse como : (14,17)

$$Jw = Jv + Jd \qquad 5\text{-}1$$

decir la suma de dos flujos, uno Jd producido por la diferencia de act
dad de agua a ambos lados de la membrana, y otro Jv producido por la di
rencia de presión osmótica (presión hidrostática) en los extremos de l
nales cilíndricos propuestos.

Las suposiciones que se hacen para deducir las ecuaciones
s siguientes : (14)

El flujo de agua ocurre a través de poros cilíndricos de radio uniform
rpendiculares al plano de la membrana.

La membrana es impermeable al soluto.

El flujo de difusión cumple la ley de Fick.

El flujo de volumen cumple la ley de Poiseuille, con la viscocidad del
gua dentro de los poros igual que en la solución.

De acuerdo a estas suposiciones (17,18) se tiene :

$$Jw = \frac{dVw}{dt} = Pw.A. \left(\frac{CsioVwo}{Vw} - Cso \right) \qquad 5\text{-}2$$

nde :

; área de la membrana

sio : concentración interna de soluto

so : concentración externa de soluto

wo : volumen inicial de agua en la célula

w : volumen de agua en la célula al tiempo t.

Pw tiene el mismo significado que el coeficiente de filtraci Lp' (15,22) definido en 2-1 y esta dado por :

$$Pw = \frac{1}{\Delta x} \cdot \frac{1}{A} \left(Dw\bar{V}w + \frac{r^2 . R . T}{8 \eta} \right) \qquad 5-3$$

Aw es el área de los poros en la membrana que permiten el pasaje de agua, Dw es el coeficiente de difusión del agua, $\bar{V}w$ el volumen parcial molar de agua, η viscocidad del agua, Δx espesor de la membrana, r radio del por de la membrana. Como se ve Pw depende del radio del poro de la membrana.

En lo que se refiere a estudios de permeabilidad a molécul de no electrolitos, los primeros fueron realizados (16) sobre glóbulos ro usando la ecuación de Vant Hoff o sea :

$$\Pi = R . T . Cs \qquad 5-4$$

Sin embargo encarando el problema desde el punto de vista termodinámico, ve (6,20,23) que :

$$\Pi_{exper.} = \sigma . \Pi_{teor.} \qquad 5-5$$

lo que indica que la presión osmótica experimental, Π exper., es igual la teórica, Π teo., solo en el caso en que la membrana no permita el pa je de soluto.

En la teoría de poros se supone que la membrana seleccion el pasaje de sustancias fundamentales por sus caracteristicas geométricas o sea que a mayor radio de la molécula penetrante, menor sera su permeabi lidad.

En la tabla XII se dan los valores de los radios de las m léculas utilizadas (16). Teniendo en cuenta estos valores de radios y obse vando los datos de la tabla VII, se puede ver que a medida que aumenta el tamaño de la molécula el valor de σ se acerca a la unidad, es decir Π exper. = Π teo.

Para determinar la relación existente entre σ y el radio del poro es necesario tener en cuenta los trabajos realizados por J.R. Pappenheimer (21,11), el cual observo que la relación $A/\Delta x$, donde A es el área de los poros de la membrana disponible para difusión, disminuia a medida que aumentaba el radio de la molécula de penetrante y que la disminución era mayor cuando menor era el radio de los poros de la membrana. Estos estudios fueron realizados con membranas de celulosa, de las cuales se conocia el radio medio del poro. Se sugirio la existencia de dos factores los cualos eran los responsables aparentes de la disminución del área para difusión.El primero corresponde a la condición que para entrar en un poro la molécula debe pasar a través de la abertura, sin tocar las paredes. El centro de la mplécula, debe por lo tanto, pasar a través de un círculo de radio r - a . (fig. 21).

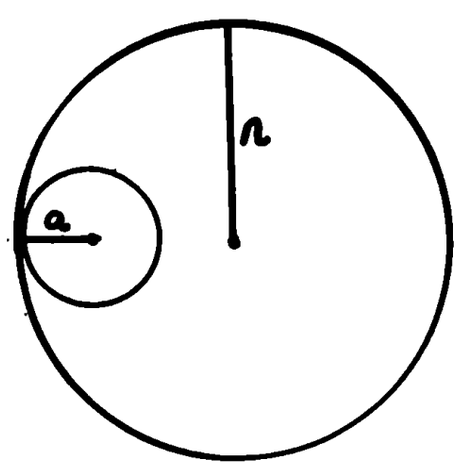


FIG. 21

donde r es el radio del poro y a es el radio de la molécula.

El segundo factor corresponde a la fricción entre la molécula que se mueve dentro del poro y las paredes del mismo. La restricción total a difusión, debida a los dos factores combinados se encontro que cumplia la siguiente relación empírica : (21,11)

$$\frac{As}{Ao} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)\left[1 - 2.104\left(\frac{a}{r}\right) + 2.09\left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0.95\left(\frac{a}{r}\right)^5\right]$$

En el caso en que además de un flujo de difusión existe un flujo de volumen se propone la siguiente relación empírica : (24,20)

$$\frac{As}{Ao} = \left[2\left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 - \left(1 - \frac{a}{r}\right)^4\right]\left[1 - 2.104\left(\frac{a}{r}\right) + 2.09\left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0.95\left(\frac{a}{r}\right)^5\right]$$

donde As es el área efectiva para solutos y Ao el área total de los poros en la membrana.

De acuerdo al modelo del poro, si la membrana selecciona el pasaje de sustancias sólo por sus caracteristicas geométricas tendremos tres casos :

a) Llamando As al área de los poros de la membrana disponibles para el pasaje de soluto y Aw el área disponible para agua, cuando no pasa soluto a través de la membrana As/Aw es nulo. Este seria el caso para el cual $\sigma = 1$

b) El radio de la molécula de soluto es mayor que la de la molécula de agua entonces As/Aw es menor que la unidad y σ es mayor que cero y menor que uno

c) El radio de la molécula de soluto es similar a el radio de la molécula de agua. As/Aw es aproximadamente la unidad. Este es el caso para el cual $\sigma =$

R. Durbin , H. Frank y A.K. Solomon, (25) dan la siguiente ecuación, que expresa matemáticamente lo anterior para soluto y solvente moviendose dentro de poros en la membrana :

$$1 - \sigma = \frac{As}{Aw} \qquad 5\text{-}7$$

y de ecuacion 5-6 se tiene :

$$1 - \sigma = \frac{\left[2\left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 - \left(1 - \frac{a}{r}\right)^4\right]\left[1 - 2.104\frac{a}{r} + 2.09\left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0.95\left(\frac{a}{r}\right)^5\right]}{\left[2\left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 - \left(1 - \frac{a}{r}\right)^4\right]\left[1 - 2.104\frac{a}{r} + 2.09\left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0.95\left(\frac{a}{r}\right)^5\right]} \quad 5$$

donde r es el radio del poro, a es el radio de la molécula de soluto y es el radio de la molécula de agua.

El radio de los poros puede calcularse de distintas maneras (12,22), una de ellas es a partir de ecuac. 5-8 (16,26,20). Conociendo e valor de σ, a para distintos solutos y aw, se pueden obtener curvas te ricas de σ en función de a, para cada valor de r. (Apéndice 5, fig.23).

Comparando los valores experimentales con las curvas teóric es posible determinar el radio equivalente del poro.

T A B L A XII

SUSTANCIA	Rad. medio a/Å
GLICEROL	2.74
SACAROSA	4.50
UREA	2.30
ACETAMIDA	2.27
FORMAMIDA	2.20
MANITOL	4.00
ETILEN GLICOL	2.24
AGUA	1.50

En la fig. 22 se comparan los datos experimentales de σ (tabla VII) con las curvas teóricas. Los valores de σ señalan aceptabl mente que el radio medio del poro es de 3.5 $\mp$ 0.5 Å. Por lo cual podemos decir que la membrana se comporta, como si seleccionara el pasaje de sól tos a través de la misma fundamentalmente por el tamaño de los mismos. L excepción es el etilen glicol, el cual presenta un valor de σ menor qu el que cabria esperar de su radio. Esta desviación se nota en la fig. 22.

El valor del radio medio del poro obtenido es del mismo orden que el obtenido por D. Goldstein y A. Solomon (16) los cuales enc traron que el valor del radio para la membrana celular de globulos rojo humanos esta comprendido entre 3.5 Å y 4.5 Å .

Otro enfoque, que permite analizar σ es en base a coefic tes friccionales. Es posible transformar los coeficientes fenomenológic definidos termodinámicamente en coeficientes friccionales (27,6). Si el je de soluto y solvente se produce a través de canales existentes en la brana, O. Kedem y A. Katchalsky proponen la siguiente expresion (5,28)

$$\sigma = 1 - \frac{w.\bar{V}s}{Lp} - \frac{As}{Aw} \qquad 5.9$$

donde w es el coeficiente de permeabilidad al soluto a flujo de volumen Lp es el coeficiente de filtración, $\bar{V}s$ el volumen parcial molar del sol As/Aw es la relación entre el área de la membrana disponible para el pa de soluto y el área disponible para el solvente. Dicha relación esta da por (5,28) :

$$\frac{As}{Aw} = \frac{Ks.fsw}{\varphi w.(fsw + fsm)} \qquad 5-10$$

fsm, fsw, fwm son los coeficientes friccionales entre soluto-membrana, to-solvente y solvente-membrana respectivamente dentro de la membrana, el coeficiente de distribución de soluto entre la membrana y la fase ac y φw es la fracción de agua en la membrana.

Comparando las ecuac. 5-7 y 5-9, se ve que ambas coincid

$$\frac{w.\bar{V}s}{Lp} \ll \frac{As}{Aw}$$

que es equivalente a que :

$$\frac{w.\bar{V}s}{Lp} \ll 1 - \sigma$$

Con los valores de Ps (=w.R.T, tabla IX) y Pw (o sea Lp.R.T, tabla X posible calcular el valor de Ps.$\bar{V}$s / Pw (o sea w.$\bar{V}$s / Lp) y comparar los datos de (1 - σ) obtenidos experimentalmente. En la tabla XII se los resultados.

T A B L A XII

SUSTANCIA	$Vs/cm^3.mol^{-1}$	$Ps.\bar{V}s/Pw$	$(1-\sigma)_{exper.}$
UREA	44.99	0.00105	0.12
GLICEROL	73.10	0.00073	0.09
FORMAMIDA	39.72	0.00552	0.28
ACETAMIDA	58.30	0.00609	0.17
ETILEN GLICOL	55.64	0.00465	0.30

El volumen parcial molar de los solutos fue calculado para urea, glicer y etilen glicol a partir de datos de densidad de las soluciones (49) po el método de volumen aparente dado por Lewis y Randall (29). Los valore obtenidos no difieren mucho de los valores de volumen molar del soluto. Como para los otros solutos no se encontraron datos experimentales como para poder calcular el volumen parcial molar, se utilizaron directamen los volumenes molares de los mismos(densidades tomadas del Handbook of Chemistry and Physics).

En la tabla XII se puede ver que los valores de $(1-\sigma)_{expe}$ son mucho mayores que los valores de $Ps.\bar{V}s/Pw$, por lo tanto analizado desde otro punto de vista, se puede decir que la ecuac. 5-7 propuesta p R. Durbin, H. Frank y A. Solomon, es valida para la membrana estudiada, que además el soluto y solvente pasan a través de la membrana por los m mos poros propuestos, puesto que fsw es distinto de cero. (ecuac. 5-10)

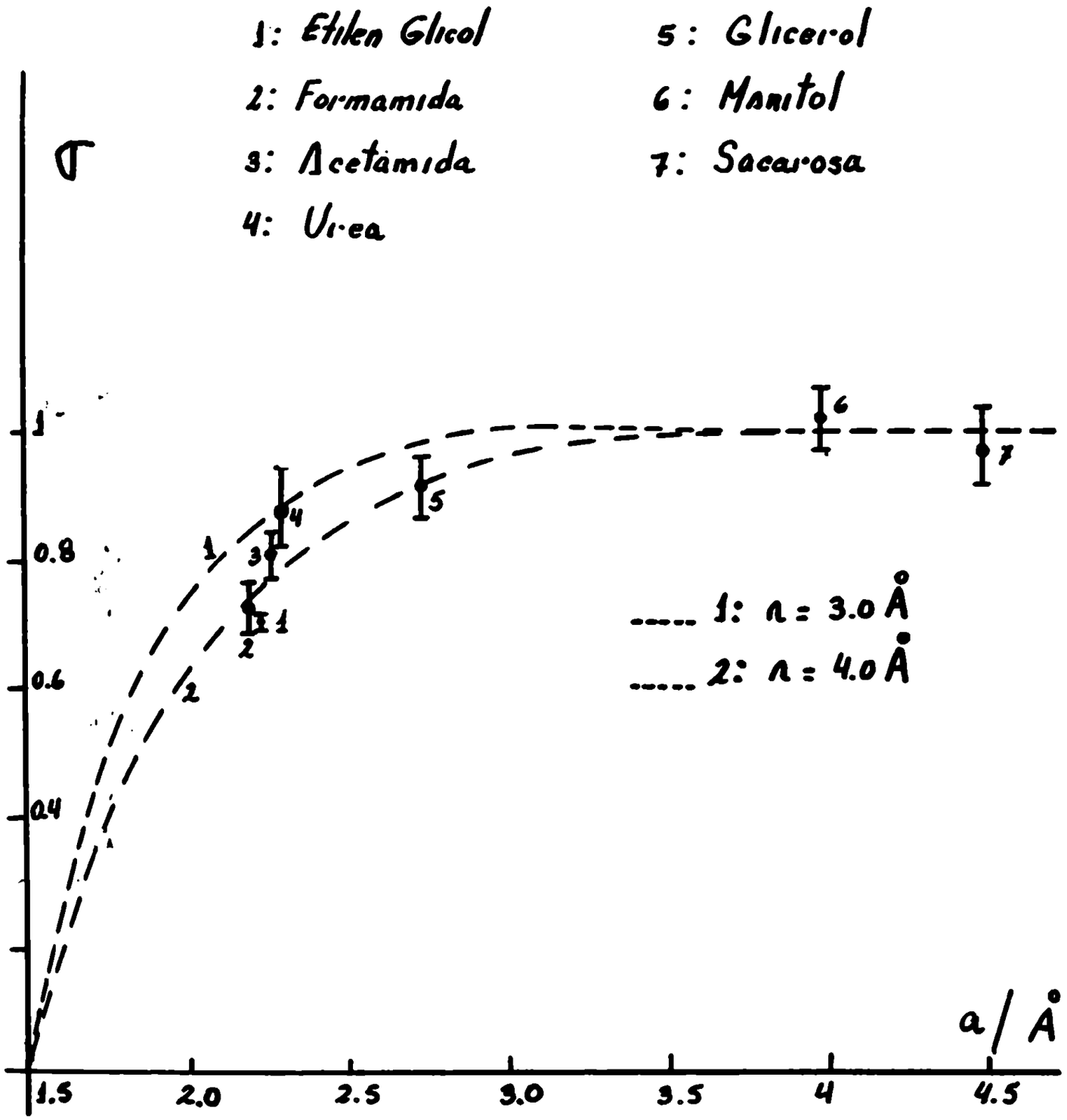

1: Etilen Glicol
2: Formamida
3: Acetamida
4: Urea
5: Glicerol
6: Manitol
7: Sacarosa
σ
1
0.8
0.6
0.4
1.5
2.0
2.5
3.0
3.5
4
4.5
a / Å
1: r = 3.0 Å
2: r = 4.0 Å

FIG. 22

Curvas teóricas.

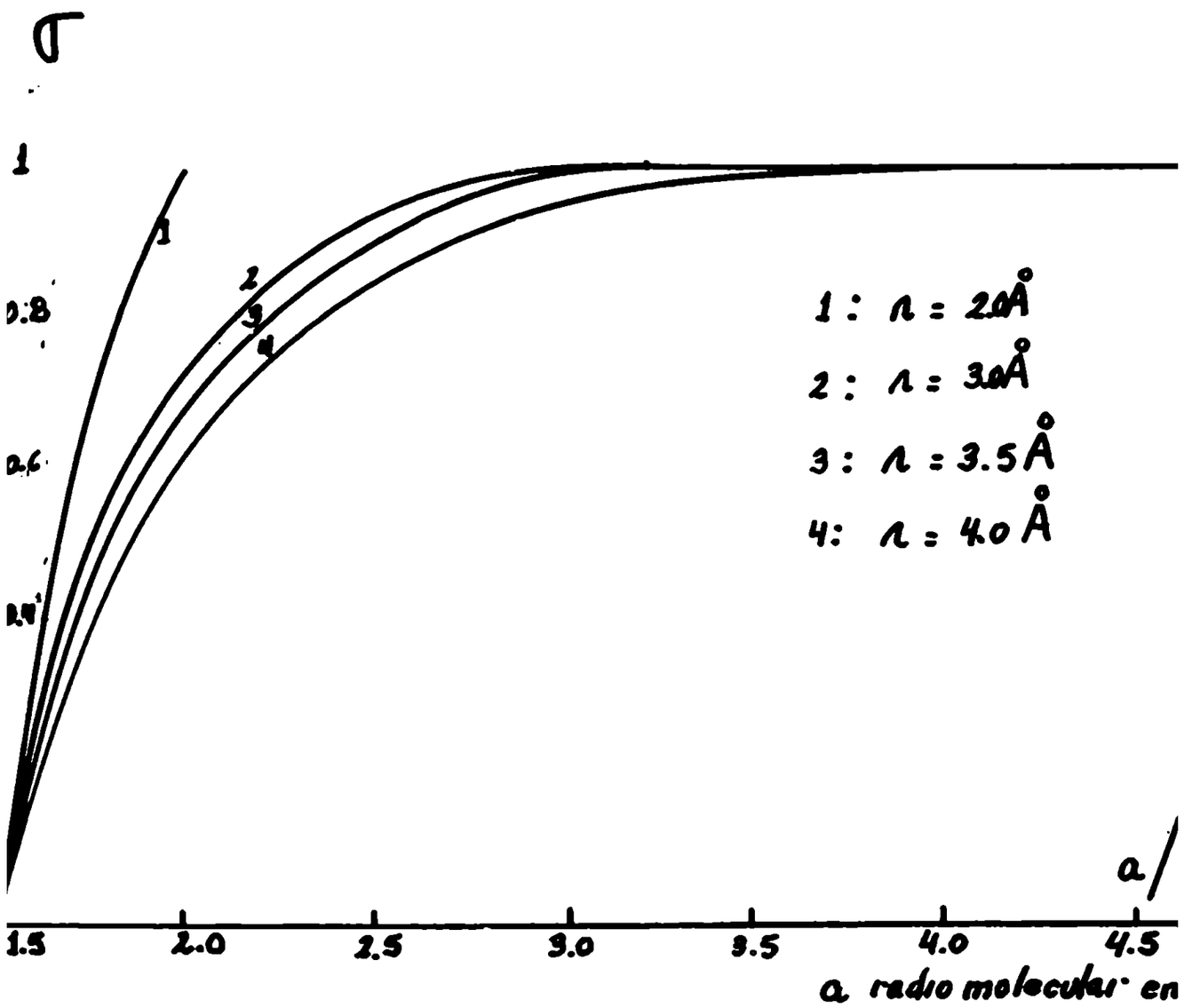


FIG. 23

-3 DIFUSION

De acuerdo con ecuac. 1-1, se puede suponer que para una mem brana se deba cumplir la ley de Fick (4,5) la cual se expresa como :

$$\frac{dZi}{dt} = - D.A. \frac{dC}{dt} \qquad 5\text{-}11$$

donde dZi/dt es el número de moléculas que cruzan la membrana a través de un área A en el intervalo de tiempo dt, cuando una diferencia de concentra ción dC es aplicada a ambos lados de la membrana de espesor dx. D es el co ficiente de difusión y representa el número de moléculas de soluto que pas a través de la membrana por unidad de gradiente de concentración. El espes de la membrana, dx, no es determinable con exactitud, por eso se expresa l ecuac. 5-11 en función de la permeabilidad Ps (5) quedando entonces :

$$\frac{dZi}{dt} = - Ps.A. dC$$

que es idéntica a la ecuac. 1-1.

Glasstone, Laidler y Eyring (33) enfocan el problema de difusión desde el punto de vista de la existencia de un retículo en la es tructura de líquidos y aplican la teoría de velocidades absolutas. Se post lan espacios en el líquido.Una molécula adyacente a un espacio puede mover hacia el dejando un nuevo espacio en la posición anterior.

Estos autores dan para el coeficiente de difusión, consi derando soluciones ideales, la siguiente expresión :

$$D = \frac{k.T}{h} e^{- \Delta G^{\neq} / R.T} . \lambda \qquad 5\text{-}12$$

Donde k es la constante de Boltzman, h la constante de P
T la temperatura absoluta, λ la distancia entre dos posiciones sucesiv
de equilibrio, R la constante de los gases y $\Delta G^{\neq}$ es la energía libre
standard de activación para que una molécula se mueva de un espacio a o

Experimentalmente se demostró (5,34) que el producto Ps.
es una constante.M es el peso molecular de sustancias no electrolíticas
toma el valor 2 cuando el radio de la molécula de soluto es menor que 2.
y n = 3 cuando el radio es mayor que 2.5 λ.Referido a pesos moleculares
n = 2 para valores menores que 300 y n = 3 para pesos moleculares mayore
(5,34).

Si multiplicamos ambos miembros de ecuac. 5-12 por $M^{1/n}$
tiene :

$$D.M^{1/n} = \frac{k.T}{h} \lambda^2 . e^{-\Delta G^{\neq}/R.T} . M^{1/n} = C \qquad 5\text{-}13$$

donde C es una constante. Esto se cumple también para moléculas que tie
gran capacidad de formar uniones hidrógeno(alcoholes polihidroxilados,
teínas) (34), o sea que $D.M^{1/n}$ no depende del número de uniones hidróge
que el soluto pueda formar con el solvente.

Las consideraciones anteriores pueden ser aplicadas cu
do existe una fase discontinua, como en el caso de la membrana celular.
niendo en cuenta el modelo de la doble capa lipídica propuesto por Dani
cuando mayor es la solubilidad del soluto en lípidos, que es el compone
mayoritario de la membrana (tabla I), mayor será la facilidad de pasa
do la sustancia a través de la misma (5). Cuando mayor es el número de
nos hidrógeno que puede formar el soluto, mayor sera su solubilidad en
y menor en lípidos. Si se supone que la mplécula debe romper todas las
nes hidrógeno que forma en la fase acuosa para pasar a través de la int
$D.M^{1/n}$ dependera de dicho número de uniones y en ese caso no sera const
(5,34). Si llamamos Q al aumento de energía libre en el estado de trans

correspondiente a una union hidrógeno, habrá un aumento de energía lil do por NQ cal/mol (5).N es el número de uniones hidrógeno que puede fo la molécula. La ecuac. 5-13 se convierte entonces en :

$$D.M^{1/n} = \frac{k.T}{h} \lambda^2 . e^{(-\Delta G^{\ddagger} - NQ)/R.T} . M^{1/n} = C.e^{-NQ/R.T}$$

y dividiendo ambos miembros por Δx, espesor de la membrana

$$Ps.M^{1/n} = C'.e^{-NQ/R.T}$$

donde $C' = C / \Delta x$, y tomando logaritmos :

$$\ln Ps.M^{1/n} = \ln C' - QN/R.T \qquad 5\text{-}14$$

Como los pesos moleculares de las sustancias estudiadas son menores q 300, el valor de n es 2. La ecuac. 5-14 indica que la representación fica de $\ln Ps.M^{1/2}$ en función de N debe ser una recta de pendiente Q/

En la tabla XIII se dan los valores de N propuestos po Stein (5) para los distintos grupos funcionales.

T A B L A XIII

FUNCION	GRUPO	N
- OH	Alcohol, azúcar, glicoles, ac. carboxílicos	2
H-O-H	Agua	4
$-NH_2$	Aminas primarias Amidas primarias	2
-N(R)H	Aminas secundarias Amidas secundarias	1
-CO-	Ac. carboxílicos, Amidas, aldehidos	1

En la tabla XIV se dan los valores de ln $Ps.M^{1/2}$ experimo y en la fig 24 están representados en función de N.

T A B L A XIV

SUSTANCIA	$Ps.M^{1/2}.10^5/cm.mol^{1/2}.seg.^{-1}$	ln $Ps.M^{1/2}$
UREA	2.01	- 10.81
GLICEROL	1.05	- 11.46
ETILEN GLICOL	7.30	- 9.19
ACETAMIDA	8.83	- 9.33
FORMAMIDA	8.04	- 9.43

En la fig. 24 se observa que con la excepción del etilen glicol, lo tos utilizados cumplen con buena aproximación la ecuac. 5-14, es de que presentan datos experimentales los cuales pueden ser interpreta poniendo que atraviesan la membrana por un mecanismo de difusión. E glicol, presenta un valor de ln $Ps.M^{1/2}$ mayor que el esperado. El v de Q calculado a partir de la pendiente de la recta (fig, 24) da tado de 0.43 kcal./mol.

4 DIFUSION FACILITADA

Se supone en la membrana, la existencia de un sistem cializado que es el encargado de regular el pasaje a mayor o menor dad de una sustancia a través de la membrana.Debido a la gran canti experimentos realizados por muchos investigadores (37,38,39,40,41,4 sistema en el cual ocurre difusión facilitada reune alguna de las tes características (5) :

a) La velocidad de entrada de una sustancia es mayor que la que pod esperada del número de uniones hidrógeno que pueden formar los grup molécula.

b) Si la sustancia es ópticamente activa, la velocidad de entrada d

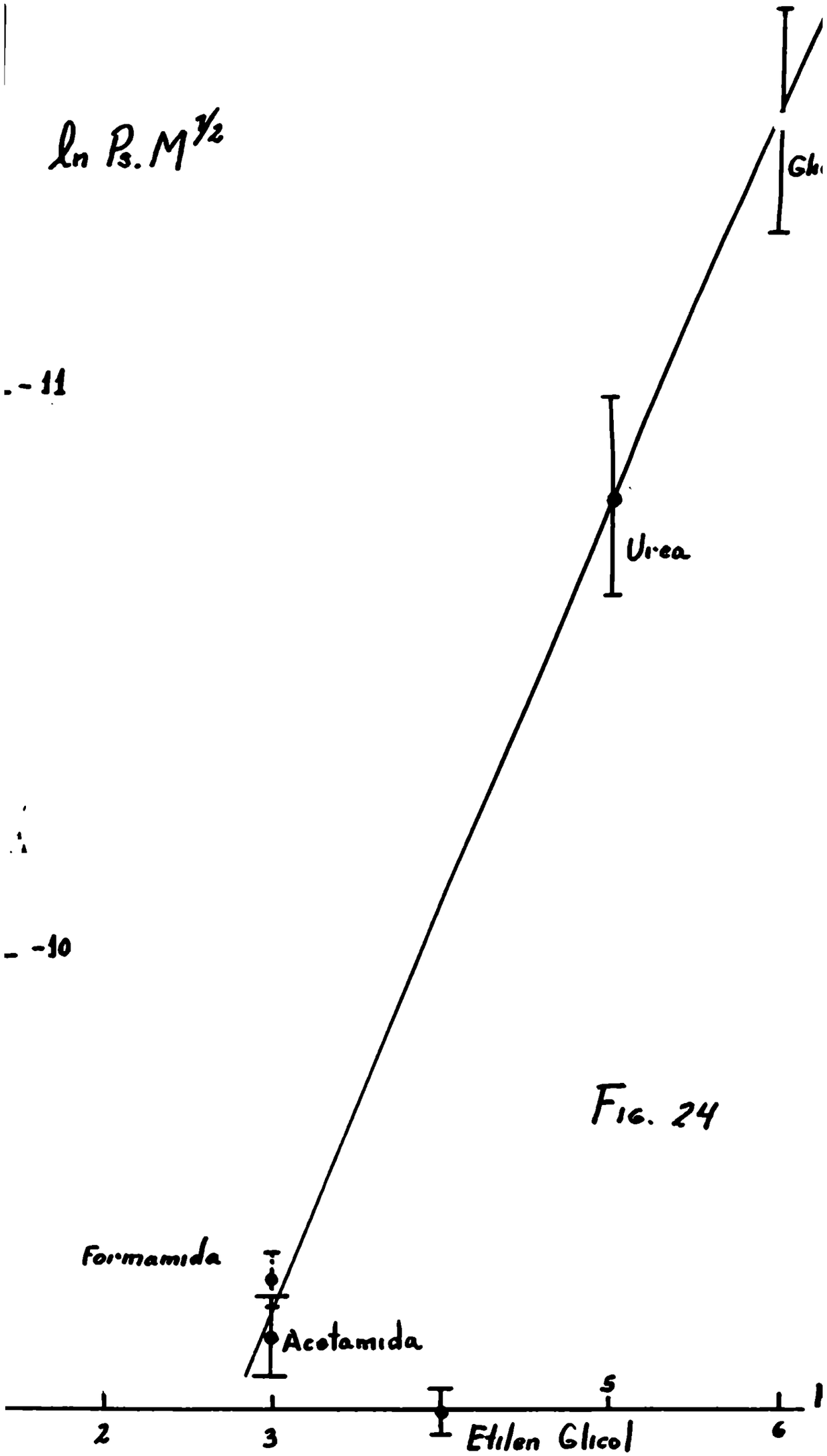

ln Ps. M^1/2
-11
-10
Gli
Urea
Formamida
Acetamida
Etilen Glicol
2
3
5
6

Fig. 24

isómeros es distinta.

c) No se cumple la ley de Fick al alcanzar un cierto valor de la
tración.

d) La velocidad de penetración puede ser reducida por sustancias
fieren químicamente de la sustancia penetrante pero que actúan i
do enzimas.

e) La velocidad de penetración es reducida por la presencia de s
de estructura similar.

f) La velocidad de penetración depende del pH de la solución.

Según lo visto en el parrafo 5-3, el comportamient
etilen glicol cumple la condición a). Experimentalmente se deter
coeficiente de reflexión σ, el cual es una medida de la permea
del soluto, a distinto pH que en el apartado 3-5, y el coeficie
meabilidad a solutos Ps a distintas concentraciones.

De estos resultados se deduce que σ depende de
0.70 ∓ 0.01 a pH = 7.4, y σ 0.92 ∓ 0.01 a pH = 5.5. Cumple la c
f).

En lo que respecta a Ps se ve que se mantiene co
sólo para concentraciones 0.25 y 0.50 molar, sufriendo para con
ciones mayores una marcada variación. Estos hechos muestran que
tema cumple la condición c), pues si se cumpliera la ley de Fic
beria mantenerse constante para todas las concentraciones de so
lizadas.

Estos hechos muestran que el etilen glicol cump
las condiciones a), f), y h). Es decir reune las características
sarias como para considerar que el mecanismo de transporte de l
cula a través de la membrana se realiza por difusión facilitada

Se realiza el calculo de los parámetros defini
esta teoría (Ks y Mmax.) (43,44,45). Los datos no son present
puesto que se tienen pocos valores de Ps en función de la conce

dato indispensable para el cálculo.

5-5 CONCLUSIONES FINALES

Las ecuaciones convencionales que representan el flujo d luto y solvente a través de la membrana están dadas por :

$$Js = Ps \cdot A \cdot (Cso - Csi) \qquad 1\text{-}1$$

$$Jv = -Pw \cdot A \cdot (Cso - Csi) \qquad 1\text{-}2$$

En muchos casos (como por ejemplo el agua posada) (48) se observa el comportamiento de la membrana no puede ser interpretado por medi los dos coeficientes definidos en la ecuaciones 1-1 y 1-2.

El tratamiento termodinámico aplicado por Katchalsky a cesos de transporte a través de membranas, permite definir para un toma ternario (soluto, solvente, membrana) tres coeficientes teó Estos están relacionados con tres coeficientes experimentales los c les se determinan.Mediante éstos se puede caracterizar completamen comportamiento de la membrana.Los coeficientes experimentales son : 1) L'p , el cual se identifica con Pw, coeficiente definido por la 1-2.

2) w el cual se identifica con Ps, coeficiente definido por la ecu 1-1, cuando el flujo de volumen Jv es nulo.

3) σ coeficiente de reflexión ignorado en las ecuaciones conven nales.

Teóricamente es posible interpretar los datos experi tales obtenidos de estos coeficientes, pero no se puede hacer lo m con los coeficientes fenomenológicos (teóricos), puesto que aún no teoría alguna que lo permita.

En lo que respecta al mecanismo que utilizan las sus cias estudiadas para atravesar la membrana de la célula utilizada

las experiencias, un análisis de los datos experimentales muestra qu ra algunos solutos, (glicerol, urea, acetamida, formamida, manitol, carosa) el flujo producido por un gradiente de presión osmótica, po describirse adecuadamente por la ley de Poiseuille, con poros de dime nes físicas aceptables en la membrana en cuestión. El paso de soluto vente se produciría por los mismos poros propuestos.

Se observa también que el comportamiento de urea, glic formamida y acetamida, puede describirse, teniendo en cuenta la formu de Stein, como un transporte por simple difusión a través de la memb

Esto indica que los datos experimentales pueden interp se por ambos modelos y por lo tanto no es posible deshechar ninguno los dos.

Sin embargo, tanto un modelo como el otro, no permite plicar totalmente el comportamiento de una de las moléculas probadas etilen glicol. Esto indica que para algunas moléculas, el pasaje a t vés de la membrana se realiza por otro mecanismo total o parcialment tinto. Para el caso del etilen glicol, el mecanismo de pasaje sería fusión facilitada, en el cual, sin descartar ya sea el modelo de por o el mecanismo de difusión simple, se supone en la membrana celular diada, la existencia de un sistema especializado, el cual produce el mento o disminución de la velocidad de pasaje a través de la membran La molécula de soluto se encontraría unida dentro de la membrana a u molécula de vehículo, formando un complejo vehículo-soluto el cual s ve de un lado a otro de la membrana.

A conclusiones similares podría llegarse con los ot solutos utilizados. Esto no ha sido investigado puesto que escapa a intenciones de este trabajo. Además el comportamiento de los solutos lizados, en las condiciones experimentales utilizadas, pueden ser in pretado ya sea por un mecanismo de difusión simple o por un mecanis poros.

Por último, en la tabla XV se dan los valores de los coeficientes obtenidos experimentalmente sobre la fibra muscular utilizada y los mismos datos para otras membranas que figuran en la bibliografía

T A B L A XV

MEMBRANA	SOLUTO	10^5. w/cm.seg.$^{-1}$	σ	L'p/cm^4.mol$^-$
Piel de sapo	Acetamida	0.0098	0.89	0.098
Alga	Urea	0.0019	1.00	0.26
Glóbulos rojos humanos.	Urea	4	0.62	0.23
	Etilen glicol	1.9	0.63	
	Glicerol	-	0.88	
	Acetamida	-	0.58	
Fibra muscular de rana.	Urea	0.26	0.88	0.095
	Acetamida	1.15	0.83	
	Formamida	1.25	0.72	
	Etilen glicol	1.28	0.70	
	Glicerol	0.11	0.91	
	Sacarosa	-	0.98	
	Manitol	-	1.02	

Para la fibra muscular de rana el valor de w se lo consideró idéntico al valor de Ps.

A P E N D I C E I

Cuando una célula cambia su volumen en respuesta de un aumento o dism
de la presión osmótica del medio exterior, se cumple en general la re

$$\Pi_o.(Vco - b) = \Pi . (Vc - b) \qquad A1\text{-}1$$

Donde Π_o es la presión osmótica original del medio exterior, Π es l
sión osmótica del nuevo medio exterior, Vco es el volumen original de
lula, Vc es el volumen de equilibrio, y b es una constante que repres
corrección debida al volumen ocupado por los materiales osmóticamente
tivos de la célula. El valor de b varía con los diferentes tipos de c

El volumen inicial de la célula está dado por :

$$Vco = b + Vco.W \qquad A\ 1.2$$

donde W representa la fracción de volumen inicial de la célula que pu
tuar osmóticamente.

De ecuac. A 1-2, se puede despejar el valor de b

$$b = Vco - Vco.W$$

y reemplazando en ecuac. A 1-1

$$\Pi_o.Vco - \Pi_o.(Vco - Vco.W) = \Pi.Vc - \Pi.Vco.(1 - W)$$

$$\Pi_o.Vco - \Pi_o.Vco.(1 - W) = \Pi.Vc - \Pi.Vco.(1 - W)$$

dividiendo ambos miembros por Π y Vco :

$$\frac{\Pi_o}{\Pi} - \frac{\Pi_o}{\Pi} (1 - W) = \frac{Vc}{Vco} - (1 - W)$$

como Π / Π_o , es la tonicidad relativa T, se tiene :

$$\frac{1}{T} - \frac{1}{T} (1 - W) = \frac{Vc}{Vco} - (1 - W)$$

y

$$\frac{Vc}{Vco} = \frac{W}{T} - W + 1 = 1 + W.(\frac{1}{T} - 1)$$

A P E N D I C E II

) CURVAS TEORICAS

a) Tonicidad T = 0.49

$Pw/cm^4.osmol.^{-1}seg.^{-1}$	Z	0.10	0.30	0.60
0.07	$t'.10^{-4}/seg.cm^{-1}$	0.69	2.57	7.51
0.08	"	0.60	2.24	6.55
0.09	"	0.53	1.99	5.82
0.10	"	0.51	1.86	5.11
0.11	"	0.44	1.62	4.75
0.12	"	0.40	1.50	4.41
0.13	"	0.37	1.39	4.10
0.14	"	0.34	1.28	3.75
0.20	"	0.24	0.89	2.60

b) Tonicidad T = 0.78

$Pw/cm^4.osmol^{-1}.seg.^{-1}$	Z	0.10	0.15	0.20
0.08	$t'.10^{-4}/seg.cm^{-1}$	1.71	3.09	5.27
0.10	"	1.37	2.48	4.22
0.11	"	1.22	2.18	3.67
0.13	"	1.00	1.79	3.02
0.15	"	0.91	1.65	2.81
0.20	"	0.68	1.24	2.11

c) Tonicidad T = 1.16

$Pw/cm^4.osmol^{-1}.cm^{-1}$	Z	-0.05	-0.10	-0.11
0.07	$t'.10^{-4}/seg.cm^{-1}$	1.29	3.67	4.37
0.08	"	1.08	2.98	3.66
0.09	"	0.96	2.67	3.28
0.10	"	0.86	2.40	2.90
0.15	"	0.60	1.70	2.03
0.20	"	0.43	1.20	1.46

d) Tonicidad T = 1.41

$Pw/cm^4.osmol^{-1}.cm^{-1}$	Z	-0.10	-0.15	-.20
0.07	$t'.10^{-4}/seg.cm^{-1}$	0.88	1.47	2.27
0.08	"	0.77	1.28	1.98
0.09	"	0.67	1.14	1.73
0.10	"	0.62	0.97	1.57
0.11	"	0.56	0.88	1.43
0.20	"	0.31	0.48	0.79

2) DATOS EXPERIMENTALES

a) Tonicidad T = 0.49 W = 0.51

Exper.	t/seg.	10	30	50	70	90	110	130	Ro10
N°1	R^2/Ro^2	1.24	1.42	1.50	1.54	1.54	-	-	0.8
2	"	1.15	1.38	1.46	1.50	1.51	1.51	-	1.0
3	"	1.15	1.32	1.41	1.47	1.51	1.51	-	1.5
4	"	1.10	1.30	1.40	1.45	1.46	1.46	-	1.3
5	"	1.10	1.29	1.40	1.46	1.49	1.51	1.51	1.7
6	"	1.10	1.31	1.40	1.44	1.45	1.46	1.46	1.3
7	"	1.14	1.31	1.39	1.44	1.50	1.50	-	1.1

Con W = 0.79 los valores de Pw obtenidos son : 0.10, 0.09, 0.10, 0
0.10, y 0.07 respectivamente.

b) Tonicidad T = 0.78

Exper.	t/seg	10	30	50	70	90	110	130	$R10^3$/cm
1	R^2/Ro^2	1.07	1.16	1.20	1.21	1.21	-	-	0.84
2	"	1.07	1.15	1.19	1.21	1.22	1.22	1.22	1.20
3	"	1.07	1.17	1.21	1.23	1.25	1.25	-	1.07
4	"	1.07	1.16	1.20	1.23	1.24	1.25	1.25	1.16
5	"	1.07	1.16	1.20	1.22	1.24	1.24	-	1.15

c) Tonicidad T = 1.16

Exper.	t/seg.	10	30	50	70	90	110	130	$Ro10^3$/c
1	R^2/Ro^2	0.97	0.93	0.91	0.90	0.90	-	-	2.30
2	"	0.96	0.89	0.87	0.86	0.86	-	-	0.95
3	"	0.95	0.90	0.89	0.89	-	-	-	0.95
4	"	0.96	0.91	0.88	0.87	0.87	-	-	1.02

d) Tonicidad T = 1.41

Exper.	t/seg	10	30	50	70	90	110	$Ro10^3$/cm
1	R^2/Ro^2	0.93	0.85	0.82	0.80	0.80	-	1.15
2	"	0.91	0.82	0.79	0.79	-	-	1.28
3	"	0.88	0.81	0.78	0.78	-	-	1.20
4	"	0.93	0.84	0.83	0.76	0.76	-	2.20

A P E N D I C E III

DATOS EXPERIMENTALES

1) SACAROSA : pH = 7.4

Experim.	Ci/mmol.l^{-1}	t/seg.	10	20	30	40
1	15.20	R^2/Ro^2	1.10	1.20	1.27	1.32
2	"	"	1.10	1.19	1.27	1.34
3	"	"	1.10	1.19	1.27	1.34
4	"	"	1.08	1.16	1.23	1.30
1	136.00	R^2/Ro^2	1.00	1.00	1.00	1.00
2	"	"	1.00	1.00	1.00	1.00
3	"	"	0.98	0.96	0.95	0.94
1	256.70	R^2/Ro^2	0.90	0.85	0.80	0.78
2	"	"	0.90	0.83	0.79	0.77
3	"	"	0.88	0.80	0.74	0.70
4	"	"	0.88	0.80	0.74	0.70

2) MANITOL : pH = 7.4

Experim.	Ci/mmol.l^{-1}	t/seg.	10	20	30	40
1	15.20	R^2/Ro^2	1.12	1.23	1.34	1.42
2	"	"	1.12	1.22	1.30	1.37
3	"	"	1.09	1.16	1.22	1.26
4	"	"	1.09	1.16	1.21	1.25
1	136.00	R^2/Ro^2	1.00	1.00	1.00	1.00
2	"	"	1.00	1.00	1.00	1.00
3	"	"	0.98	0.97	0.96	0.94
1	256.70	R^2/Ro^2	0.87	0.79	0.75	0.73
2	"	"	0.93	0.89	0.87	0.86
3	"	"	0.93	0.89	0.86	0.85
4	"	"	0.93	0.88	0.85	0.83

3) UREA : pH =7.4

Experim.	Ci/mmol.l^{-1}	t/seg.	10	20	30	40
1	15.20	R^2/Ro^2	1.09	1.17	1.23	1.
2	"	"	1.09	1.18	1.26	1.
3	"	"	1.09	1.18	1.26	1.
4	"	"	1.09	1.18	1.26	1.
1	136.00	R^2/Ro^2	1.02	1.03	1.05	1.
2	"	"	1.02	1.03	1.05	1.
3	"	"	1.02	1.03	1.04	1.
1	256.70	R^2/Ro^2	0.94	0.88	0.84	0.
2	"	"	0.91	0.84	0.79	0.
3	"	"	0.91	0.84	0.79	0.
4	"	"	0.91	0.84	0.79	0.

4) GLICEROL : pH = 7.4

Experim.	Ci/mmol.l^{-1}	t/seg.	10	20	30	40
1	15.20	R^2/Ro^2	1.10	1.17	1.23	1.
2	"	"	1.10	1.20	1.28	1.
3	"	"	1.11	1.20	1.28	1.
4	"	"	1.09	1.16	1.22	1.
1	136.00	R^2/Ro^2	1.03	1.05	1.08	1.
2	"	"	1.03	1.05	1.08	1.
3	"	"	1.01	1.02	1.03	1.
4	"	"	1.01	1.02	1.03	1.
1	256.70	R^2/Ro^2	0.90	0.84	0.79	0.
2	"	"	0.90	0.84	0.79	0.
3	"	"	0.91	0.85	0.79	0.
4	"	"	-.93	0.87	0.82	0.

ACETAMIDA : pH = 7.4

Experim.	Ci/mmol.l^{-1}	t/seg.	10	20	30	40
1	15.20	R^2/Ro^2	1.03	1.07	1.10	1.13
2	"	"	1.05	1.10	1.13	1.17
3	"	"	1.06	1.10	1.15	1.18
4	"	"	1.07	1.14	1.19	1.24
1	87.50	R^2/Ro^2	1.02	1.04	1.06	1.07
2	"	"	1.02	1.04	1.06	1.07
3	"	"	1.03	1.05	1.08	1.10
4	"	"	1.04	1.08	1.10	1.12

) **FORMAMIDA :** pH = 7.4

Experim.	Ci/mmol.l^{-1}	t/seg.	10	20	30	40
1	15.20	R^2/Ro^2	1.12	1.21	1.30	1.39
2	"	"	1.12	1.23	1.34	1.41
3	"	"	1.15	1.28	1.38	1.44
1	87.50	R^2/Ro^2	1.06	1.11	1.17	1.22
2	"	"	1.08	1.14	1.20	1.27
3	"	"	1.09	1.18	1.25	1.30

) ETILEN GLICOL : pH = 7.4

Experim.	Ci/mmol.l^{-1}	t/seg.	10	20	30	40
1	15.20	R^2/Ro^2	1.09	1.16	1.22	1.28
2	"	"	1.11	1.22	1.31	1.38
3	"	"	1.16	1.27	1.36	1.42
1	136.00	R^2/Ro^2	1.04	1.07	1.10	1.12
2	"	"	1.04	1.07	1.10	1.12
3	"	"	1.05	1.10	1.14	1.18
1	256.70	R^2/Ro^2	0.94	0.89	0.85	-
2	"	"	0.96	0.93	0.90	-
3	"	"	0.96	0.93	0.90	-

) ETILEN GLICOL : pH = 5.5

Experim.	Ci/mmol.l^{-1}	t/seg	10	20	30	40
1	15.20	R^2/Ro^2	1.11	1.20	1.28	1.34
2	"	"	1.11	1.19	1.26	1.32
3	"	"	1.10	1.18	1.25	1.30
1	136.00	R^2/Ro^2	1.02	1.03	1.04	-
2	"	"	1.01	1.02	1.03	-
3	"	"	1.01	1.02	1.02	-
1	256.70	R^2/Ro^2	0.91	0.89	0.86	0.85
2	"	"	0.92	0.87	0.85	0.85
3	"	"	0.93	0.85	0.84	0.84

A P E N D I C E IV

1) ACETAMIDA : Cso = 0.500 mol.l^{-1}

Experim.	Ro.10^3/cm	$t_{1/2}$/seg.	Ps.10^5/cm.seg^{-1}
1	1.14	55	1.20
2	1.13	58	1.10
3	1.38	60	1.30
4	1.04	56	1.00

2) FORMAMIDA : Cso = 0.500 mol.l^{-1}

Experim.	Ro.10^3/cm	$t_{1/2}$/seg.	Ps.10^5/cm.seg^{-1}
1	1.30	51	1.[illegible]
2	1.60	52	1.34
3	1.34	48	1.19

3) ETILEN GLICOL

a) Cso = 0.250 mol.l^{-1}

Experim.	Ro.10^3/cm	$t_{1/2}$/seg.	Ps.10^5/cm.seg^{-1}
1	0.88	38	1.14
2	0.78	30	1.20
3	0.76	31	1.21

b) Cso = 0.500 mol.l^{-1}

Experim.	Ro.10^3/cm	$t_{1/2}$/seg.	Ps.10^5/cm.seg^{-1}
1	1.14	49	1.30
2	0.97	42	1.26
3	1.18	48	1.34
4	0.94	41	1.27

c) Cso = 2 mol.l^{-1}

Experim.	Ro.10^3/cm	$t_{1/2}$/seg.	Ps.10^5/cm.seg.$^{-1}$
1	0.95	55	2.20
2	1.47	74	2.40
3	1.50	66	1.90
4	1.28	78	2.00

d) Cso = 4.000 mol.l^{-1}

Experim.	Ro.10^3/cm	$t_{1/2}$/seg.	Ps.10^5/cm.seg.$^{-1}$
1	0.86	86	2.00
2	0.74	72	2.40
3	0.88	70	2.60
4	1.31	87	2.90

4) <u>GLICEROL</u> : Cso = 0.500 mol.l^{-1}

Experim.	Ro.10^3/cm	$t_{1/2}$/seg.	Ps.10^5/cm.seg.$^{-1}$
1	1.39	522	0.14
2	0.74	426	0.10
3	0.90	480	0.10

5) <u>UREA</u> : Cso = 0.500 mol.l^{-1}

Experim.	Ro.10^3/cm	$t_{1/2}$/seg.	Ps.10^5/cm.seg.$^{-1}$
1	1.52	310	0.28
2	0.75	252	0.20
3	1.45	228	0.30

A P E N D I C E V

CURVAS TEORICAS

r/Å	a/Å	1.50	1.60	1.80	2.00	2.50	3.00	3.50	4.00
2.00	σ	0.00	0.25	0.73	1.00	-	-	-	-
3.00	σ	0.00	0.21	0.56	0.74	0.95	1.00	-	-
3.50	σ	0.00	0.20	0.50	0.69	0.90	0.98	1.00	-
4.00	σ	0.00	0.19	0.45	-	0.86	0.96	-	1.00

BIBLIOGRAFIA

1) Kedem, O. y Katchalsky, A. , Biochim. Biophys. Acta 27,229,1958
2) Jacob, M. H., J. Cellular Comp. Physiol. 4,161,1934
3) Stein, W. D. ,Exptl. Cell Res. 11,232,1956
4) Stein, W. D. , Biochim. Biophys. Acta 59 , 35 , 1962
5) Stein, W. D. , The movement of molecules across Cell Membranes. Academic Press 1967.
6) Katchalsky, A. y Curran, P. , Nonequilibrium Thermodynamics in Biophysics. Harvard University Press 1965.
7) Onsager, L., Phys. Rev. 37 , 405 , 1931
8) Jacobs, M. H., J. Cellular Comp. Physiol.,7 , 197 , 1935
9) Villegas, L. , Biochim. Biophys.,Acta 136 , 590 , 1967
10) Koefoed-Johnsen, V. y Ussing, H. , Acta Physiol. Scand. 28 , 60, 1953
11) Pappenheimer, J., Renkin, E. y Borrero, L.,Amer. J. Physiol. 167 ,13,1951
12) Paganelli, C. y Solomon, A.,J. Gener. Physiol.,41 , 259 , 1957
13) Mauro, A.,Science, 126 , 252 , 1957
14) Durbin, R. , J. Gener. Physiol. 44 , 315 , 1960
15) Daynti, J. y Ginzburg, B. , Biochim. Biophys. Acta 79 , 102 , 1964
16) Goldstein, D. y Solomon, A. , J. Gener. Physiol. 44 , 87 , 1960
17) Sidel, V. y Solomon, A. , J. Gener. Physiol. 41 , 243 , 1957
18) Jacob, M. , Biol. Bull. 62 , 178 , 1932
19) Fonder, E. , Protoplasmatologia 10 , 66 , 1955
20) Whittembury, G. , J. Gener. Physiol. 46 , 180 , 1962
21) Pappenheimer, J. , Physiol. Rev. 33 , 387 , 1953
22) Villegas, R. , Barton, T. y Solomon, A. , J. Gener. Physiol. 42 ,355,1958
23) Staverman, A. , Trans. Faraday Soc. 48 , 176 , 1952
24) Renkin, E. , J. Gener. Physiol. 38 , 225 , 1954
25) Durbin, R. , Frank, H. y Solomon, A. , J. Gener. Physiol. 45 , 535, 1956

) Lindemman, B. y Solomon, A. , J. Gener. Physiol. 45 , 801 , 1962

) Ginzburg, B. y Katchalsky, A. , J. Gener. Physiol. 47 , 403 , 1963

) Kedem, O. y Katachalsky, A. , J. Gener. Physiol. 45 , 144 , 1961

) Lewis, G. y Randall, M. , Thermodinamics , McGraw-Hill 1961

) Robertson, J. , Collular membranes in development, Academic Press 1964

) Seaman, G. y Heard, D. , J. Gener. Physiol. 44 , 251 , 1960

) Fernández-Moran, H. , Symposio of the International Society for Coll Biology , Vol. 1 , Academic Pro's 1962

) Glasstone, S. , Laidler, J. , y Eyring, H. , The Theory of Rate Processes McGraw-Hill 1941

) Stein, W. D. , Comprehensive Biochemistry , Vol. 2 , Elsevier Publishing Company 1962

) Kono, T. y Colowick, S. , Arch. Biochem. Biophys. 93 , 520 , 1961

melot, P. , Biochim. Biophys. Acta 90 , 126 , 1964

) Wilbrandt, W. y Rosemberg, T. , Pharmacol. Rev. 13 , 109 , 1961

) Stein, W. D. , Recent. Prog. Surface Sci. 1 , 300 , 1964

) Stein, W. D. , J. Physiology 125 , 163 , 1954

) LeFevre, P. y McGinniss, G. , J. Gener. Physiol. 44 , 87 , 1960

) Rosemberg, T. y Wilbrandt, W. , Exptl. Cell Res. 9 , 49 , 1955

) Widdas, W. , J. Physiology 118 , 23 , 1952

) LeFevre, P. y Kolbert, A. , J. Gener. Physiology 50 , 1907 , 1967

) Stein, W. D. , Biochim. Biophys. Acta 59 , 66 , 1969

) Stein, W. D. , Biochim. Biophys. Acta 59 , 47 , 1962

) Dawson, H. y Danielli, J. , The permeability of natural membranes Cambridge Univ. Press 1952

7) Stein, W. D. , J. Biochemistry 105 , 17 , 1967

8) Zeuthen, E. y Prescott, D. , Acta Physiol. Scand. 28 , 77 , 1953

9) International Critical Tables