

UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y
MATERIALES

EFFECTO DE SALES SOBRE LA FORMA Y TAMAÑO DE
LIPOSOMAS FORMADOS A PARTIR DE
UNA MEZCLA DE FOSFOLÍPIDOS



QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
ANA BERTHA LÓPEZ OYAMA

HERMOSILLO, SONORA

DICIEMBRE DE 2006

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CARTA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de **Ana Bertha López Oyama**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias, en el Programa de Maestría en Polímeros y Materiales.

Dr. Amir Darío Maldonado Arce
Presidente

Dra. Lorena Machi Lara
Secretaria

Dra. Marina Ezquerro B.
Vocal

Dr. Rogerio Sotelo Mundo
Vocal Externo

Dr. Ricardo López Esparza
Suplente

*La esperanza
hace que agite el naufrago
sus brazos en medio de las aguas,
aún cuando no vea tierra
por ningún lado.*

Ovidio (43 AC-17)

DEDICATORIA

A Elisa y Hector

*Por ser esa parte que le hacía falta
a mi vida y que la llena de satisfacciones
cada día... Cuando sonríen, cuando juegan,
cuando aman, me doy cuenta que todo esto
vale la pena...*

Ana

AGRADECIMIENTOS

A Hector, por ser mi compañero, mi amigo, mi amor, mi todo... Este trabajo lleva tu esfuerzo, tu paciencia y tu comprensión... Te amo.

A Elisa por ser quien ilumina mis días y le da sentido a mí existir, cada mañana cuando te veo a mi lado me siento cada vez más fuerte, te amo mi chiquita.

A mi familia por apoyarme en todo momento, a Julia, mi madre y mis hermanos, Ignacio, Jesús, Mario e Irazema.

A Mario, mi padre, aunque pasa el tiempo siempre estas aquí, en la sonrisa de mi hija, en los libros, en el cielo.

A mis tíos y primos que siempre están ahí y siguen creciendo y siguen siendo igual, simplemente mi familia.

A mi nueva familia, Rodrigo, Dora, Tania, Julián y Juan Rodrigo, gracias por todo el apoyo que nos han brindado, la vida se llena de esos detalles pequeños que hasta pueden pasar desapercibidos.

A Mónica, Aaron, Armida, Ricardo, Adriana, Pacheco, Enrique, Emmanuel, Maribel, Cuco, Alma y Noel, gracias.

A Eduardo Larios, por su apoyo en criofractura.

A mis compañeros del laboratorio de Biofísica, Gerardo, Alfredo y César (que ya se fue de mojado).

A mi jurado, Dra. Marina Ezquerro, Dra. Lorena Machi Lara, Dr. Rogerio Sotelo y Dr. Ricardo López Esparza, gracias por el tiempo dedicado a este trabajo.

Quiero agradecer a Amir Maldonado por la dirección en este trabajo, por ser mi asesor y encauzarme en este camino, gracias por todo.

A H. Acuña por todo el apoyo brindado, gracias maestro.

Agradecemos el financiamiento al Proyecto “Materiales Biomoleculares” (CONACyT 0074).

A la Universidad de Sonora, especialmente al DIPM.

A todos aquellos que directa ó indirectamente fueron partícipes de este proceso, que culmina en estas páginas...

Ana

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABLAS	<i>iii</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>vi</i>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	4
ANTECEDENTES	5
Hidrocarbonos	5
Lípidos	7
Clasificación de los Lípidos	9
Lípidos anclados	11
Solubilidad de Lípidos	12
Clasificación de los lípidos basados en su interacción con el agua	12
Formación de agregados lipídicos en agua	13
Fosfolípidos	13
Fosfatidilcolina	16
Fosfatidilserina	17
Unión de Iones	18
Cationes Inorgánicos	21
Aniones Inorgánicos	23
Iones Orgánicos	24
Repulsión Electrostática	25
Liposomas	26
Técnicas de Preparación	29
Uso de los Liposomas	31
Elección del Lípido como una Función de la Aplicación	32

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	33
Preparación de las Soluciones	34
Preparación de Liposomas Gigantes	34
Observación de Liposomas	34
Microscopia Óptica	34
Montaje Experimental	35
Aspectos Teóricos de Microscopia Óptica	37
Caracterización Mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS)	38
Montaje Experimental	39
Aspectos Teóricos de Dispersión de Luz	39
Microscopia Electrónica de Transmisión Mediante la Técnica de Criofractura (FFEM)	40
Montaje Experimental	42
Aspectos Teóricos de FFEM	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
Resultados de Microscopia Óptica	44
Proporción 10:0 (SOPC:SOPS)	45
Proporción 9:1(SOPC:SOPS)	52
Proporción 8:2 (SOPC:SOPS)	59
Proporción 7:3 (SOPC:SOPS)	64
Proporción 6:4 (SOPC:SOPS)	71
Dispersión Dinámica de Luz	80
Microscopia Electrónica de Transmisión Mediante la Técnica de Criofractura	94
CONCLUSIONES	98
BIBLIOGRAFÍA	100

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Concentraciones y proporciones utilizadas para formar las películas de lípido	33
2. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales monovalentes (SOPC:SOPS 10:0). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de NaCl y KCl. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución ó aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.	48
3. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales divalentes (SOPC:SOPS 10:0). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de MgCl ₂ y CaCl ₂ . En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.	51
4. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales monovalentes (SOPC:SOPS 9:1). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de NaCl y KCl. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.	55
5. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales divalentes (SOPC:SOPS 9:1). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro	

promedio para las diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y $CaCl_2$. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

57

6. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales monovalentes (SOPC:SOPS 8:2). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de NaCl y KCl. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

61

7. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales divalentes (SOPC:SOPS 8:2). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y $CaCl_2$. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

63

8. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales monovalentes (SOPC:SOPS 7:3) KCl no se muestra. En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de NaCl (KCl no presentó resultados). En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

67

9. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales divalentes (SOPC:SOPS 7:3). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y $CaCl_2$.

En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

70

10. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales monovalentes (SOPC:SOPS 6:4). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de NaCl y KCl. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

74

11. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales divalentes (SOPC:SOPS 6:4). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y $CaCl_2$. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

75

12. Promedios de coeficiente de difusión y radio hidrodinámico para los ángulos de 40 a 110 en los que se llevaron a cabo las mediciones en DLS. Se realizaron 5 corridas de 30 segundos cada una.

91

13. Promedios de coeficiente de difusión y radio hidrodinámico en el tiempo medidos a 90°.

95

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura de la molécula de octadecano	5
2. estructura de la molécula de cis-9-octadeceno	6
3. Representación esquemática de una bicapa lipídica, donde se observa el ambiente iónico en el que se encuentra inmerso la célula.	7
4. Representación esquemática de la membrana celular donde se aprecia la bicapa lipídica.	8
5. Representación de una bicapa lipídica donde se observa la orientación cabeza-cabeza y cola hidrofóbica-cola hidrofóbica	9
6. Representación de la estructura de un fosfolípido. Los grupos colina, fosfato y glicerol, forman la cabeza hidrofílica y en conjunto se conocen como fosfatidilcolina.	15
7. Estructura de la molécula de fosfatidilcolina	17
8. Estructura de la molécula de fosfatidilserina	18
9. Representación de un liposoma y la bicapa lipídica que lo compone.	27
10. Cámara de observación donde se deposita la muestra para ser observada al microscopio óptico	36
11. Arreglo experimental del microscopio óptico utilizado en el Laboratorio de Biofísica de la Universidad de Sonora	36
12. Representación del Microscopio compuesto	38
13. Arreglo experimental del dispersor de luz utilizado en el Laboratorio de fluidos Complejos de la Universidad de Sonora	40
14. Arreglo experimental del equipo de criofractura y del microscopio electrónico utilizado en el laboratorio de Microscopia de la Universidad de Sonora	43
15. Liposoma obtenido de la mezcla formada por SOPC:SOPS (10:0) hidratado con una solución de KCl 1 mM	46

16. Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 10:0 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con NaCl y KCl a 1 y 3 mM y glucosa 0.063 M.	47
17. Liposomas obtenidos en la proporción 10:0 al mezclar SOPC:SOPS hidratado con CaCl ₂ 100 mM	49
18. Distribución de los diámetros de los agregados para la proporción 10:0 SOPC:SOPS hidratada con MgCl ₂ y CaCl ₂ 3 y 100 mM y glucosa 0.063 M.	50
19. Producción de vesículas y diámetro promedio de los agregados en función de la concentración salina, para las cuatro sales utilizadas en la proporción 10:0 SOPC:SOPS. Las líneas son sólo guías visuales.	52
20. Liposomas obtenidos al hidratar la mezcla SOP:SOPS (9:1) con KCl 100 mM	53
21. Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 9:1 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con NaCl y KCl 100 mM y glucosa 0.063 M.	53
22. Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 9:1 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con CaCl ₂ y MgCl ₂ 1 mM y glucosa 0.063 M.	56
23. Producción de vesículas y diámetro promedio de los agregados en función de la concentración salina, para las cuatro sales utilizadas en la proporción 9:1 SOPC:SOPS. Las líneas son sólo guías visuales.	58
24. Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 8:2 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con NaCl 1 y 10 mM y glucosa 0.063 M.	60
25. Liposomas obtenidos al hidratar con CaCl ₂ 1 mM	62
26. Liposomas obtenidos al hidratar la mezcla de fosfolípidos	

SOPC:SOPS con glucosa 0.063 M, esto es, sin sales	62
27. Producción de vesículas y diámetro promedio de la agregados en función de la concentración salina, para las cuatro sales utilizadas para la proporción 8:2 de la mezcla SOPC:SOPS. Las líneas son sólo guías visuales.	60
28. Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 7:3 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con NaCl 3 y 30 mM así como glucosa 0.063 M.	64
29. Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 7:3 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con MgCl ₂ y CaCl ₂ 100 y 3 mM respectivamente y glucosa 0.063 M.	66
30. Producción de vesículas y diámetro promedio de la agregados en función de la concentración salina, para las cuatro sales utilizadas en la proporción 7:3 SOPC:SOPS. Las líneas son sólo guías visuales.	69
31. Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 6:4 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con NaCl 1 y 10 mM y glucosa 0.063 M.	71
32. Producción de vesículas y diámetro promedio de la agregados en función de la concentración salina, para las cuatro sales utilizadas en la proporción 6:4 SOPC:SOPS. Las líneas son sólo guías visuales.	73
33. Gráficas de DLS donde se muestran 5 etapas (A - E) del análisis temporal para la muestra m4.	76
34. Funciones de correlación obtenidas mediante DLS para la muestra m4 donde se aprecia un decaimiento a tiempos mayores a 100 ms.	83
35. Gráficas de DLS donde se muestran 5 etapas (A - E) del análisis temporal para la muestra m29 donde se observa el cambio en radio hidrodinámico.	84
	86

36. Cambio de radio hidrodinámico a medida que cambia el ángulo de la muestra m29 medido mediante dispersión de luz.	87
37. En esta figura se observa como cambia el radio hidrodinámico a medida que cambia el ángulo de la muestra m29 medido mediante dispersión de luz.	88
38. Funciones de correlación obtenidas mediante DLS para la muestra m29 donde se aprecia un decaimiento a tiempos mayores a 10 ms.	89
39. Cambio de coeficiente de difusión a medida que cambia el ángulo de la muestra m4 medido mediante dispersión de luz.	90
40. Graficas de distribución de tamaños en el análisis en el tiempo llevado a cabo mediante DLS, las lecturas se llevaron a cabo cada 30 minutos, aquí se presentan cada 60 min.	93
41. Funciones de correlación obtenidas mediante DLS para la muestra evtie donde se aprecia un decaimiento entre 10 y 100 ms.	94
42. Micrografía obtenida mediante FFEM donde se observa un liposoma de aproximadamente 10 nm de diámetro. La observación se llevó a cabo a 100 K. La barra es de 50 nm.	96
43. Micrografía obtenida mediante FFEM donde se observa un liposoma de aproximadamente 400 nm. La imagen fue amplificada a 80 K. La barra es de 100 nm.	97

RESUMEN

En este trabajo nos propusimos obtener liposomas a partir de una mezcla de fosfolípidos y observar el efecto de 4 sales (NaCl, KCl, MgCl₂ y CaCl₂) en la forma y tamaño de los agregados obtenidos, se prepararon 5 mezclas de SOPC:SOPS (10:0, 9:1, 8:2, 7:3 y 6:4). Los liposomas en solución salina fueron observados mediante microscopía óptica, dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión mediante la técnica de criofractura (FFEM). El efecto de los iones monovalentes sobre la población de liposomas observados mediante microscopía óptica fue el de incrementar el tamaño y cantidad de agregados, sin embargo al comparar los datos de cantidad y tamaño de los liposomas con los obtenidos al hidratar con la solución que sólo contenía glucosa 0.063 M el resultado fue que en ninguna proporción de SOPC:SOPS se incrementó la cantidad de agregados. Por otra parte el efecto de los iones divalentes, a excepción de la proporción 6:4 donde no se obtuvieron agregados al hidratar con glucosa 0.063 M, fue el de no producir vesículas de tamaño mayor al obtenido con las muestras hidratadas con glucosa. Al hidratar con NaCl en la proporción 6:4 (SOPC:SOPS) se obtuvieron los liposomas de mayor tamaño y cantidad. En los experimentos de dispersión de luz se obtuvieron los radios hidrodinámicos y coeficientes de difusión de las muestras observadas, al realizar un análisis temporal se observó que las vesículas siguen presentando el mismo comportamiento en la distribución de tamaños. En los experimentos de FFEM se obtuvieron micrografías donde se pueden observar vesículas de menor tamaño a las obtenidas con los instrumentos anteriores.

INTRODUCCIÓN

Los fosfolípidos son componentes funcionalmente activos de las membranas biológicas, se encuentran involucrados en las propiedades de las membranas. Se dice que hay más de cien tipos de moléculas de lípido en una membrana biológica, las cuales difieren en la composición del ácido graso y los sustituyentes localizados en el grupo cabeza de la molécula, además el contenido de fosfolípido varía de órgano a órgano y de especie a especie. En general se establece que los fosfolípidos son moléculas complejas, contienen fósforo en la cabeza polar y una región hidrocarbonada usualmente unida a través de una base esfingosina. Otras características de estas moléculas es que son las más representativas en las membranas biológicas en lo referente a fosfolípidos neutros (fosfatidilcolina) y fosfolípidos cargados (fosfatidilserina). Por ello han sido seleccionados para el estudio del presente trabajo. La fosfatidilcolina es uno de los fosfoglicéridos más abundantes en los animales y a menudo en plantas superiores y levaduras. Contiene colina como grupo cabeza esterificado al ácido fosforico. Es un componente común y predominante de los eritrocitos, también se puede encontrar en plantas, animales y células bacterianas.

Los liposomas o vesículas son membranas compuestas de una o varias bicapas de lípido los cuales encapsulan un volumen pequeño del medio en el cual han sido preparados. Su morfología les permite encapsular compuestos solubles en agua en su volumen interno. Dependiendo de su composición estos agregados pueden ser químicamente estables en tiempos de horas ó quizá hasta años. Por otro lado, ya que son fáciles de preparar poseen la habilidad de reproducir la organización y las funciones principales de las células, y presentan

una similitud con bicapas biológicas, los liposomas son ampliamente utilizados como modelos de membranas biológicas, por lo que se han convertido en modelos interesantes para llevar a cabo estudios de mecanismo molecular de los seres vivos.

El interés de estudio de los liposomas se encuentra en distintos campos tales como la física, fisicoquímica, farmacología, cosmetología, alimentos y biofísica. Por lo que en trabajo se estudiaron liposomas formados por mezclas de fosfatidilcolina y fosfatidilserina.

El tamaño y la estructura de los liposomas se encuentran determinados por el método utilizado para su preparación. Por otra parte las propiedades de estos agregados están dadas por el tipo de lípido utilizado en la composición de la membrana (Lasic, 2000). La influencia de la composición química de las bicapas de fosfolípido en la estructura de las vesículas aún no ha sido entendida completamente. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, se encontró que las formas de los liposomas formados por mezclas de fosfatidilcolina y fosfatidilserina dependen de la proporción relativa entre ambos fosfolípidos. Como la fosfatidilserina es un fosfolípido cargado, una de las posibles explicaciones del fenómeno mencionado está relacionada con efectos electrostáticos en la membrana. Por esta razón se decidió agregar sales en el proceso de preparación de los liposomas para estudiar el efecto de los iones sobre los mismos.

En este trabajo se estudio la influencia de iones monovalentes y divalentes sobre la forma y el tamaño de liposomas de una mezcla de fosfatidilserina y fosfatidilcolina en diferentes proporciones; además se estudiaron las características de la población de agregados en función tanto de la concentración relativa de ambos fosfolípidos, como del tipo y la concentración de sal.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la influencia de la concentración y del tipo de sal sobre la población de vesículas formadas a partir de una mezcla de fosfatidilcolina y fosfatidilserina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar bicapas lipídicas a partir de una mezcla de dos fosfolípidos: fosfatidilcolina y fosfatidilserina
- Observar el efecto de diferentes sales sobre la población (formas y tamaños) de las vesículas obtenidas
- Caracterizar las vesículas mediante microscopía óptica, dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión con la técnica de criofractura (FFEM).

ANTECEDENTES

Hidrocarburos

Los hidrocarburos forman parte de los lípidos y pueden ser saturados (Figura 1); ó insaturados (Figura 2), cíclicos ó alifáticos ó pueden exhibir una combinación de ellos. Comprender el comportamiento de los hidrocarburos alifáticos es importante porque proporcionan una visión de la configuración de la cadena alifática. Desde el punto de vista químico, se sabe que al reemplazar un hidrógeno con otro átomo se forma un grupo de hidrocarburo monosustituido cuando se da la sustitución de algún átomo ó grupo químico se puede llevar a cabo en cualquier lugar de la cadena hidrocarbonada, si la sustitución se lleva a cabo en la posición 1 de la cadena se produce una molécula con características polares con propiedades físicas y químicas diferentes a las de la cadena sin sustituir. La interacción de tales moléculas con solventes, como por ejemplo el agua, puede ser determinada por la naturaleza del grupo polar, la masa y la estructura de la parte hidrocarbonada. Esas moléculas han sido llamadas anfífilas ó moléculas que exhiben una afinidad con el agua y el aceite (Small, 1986).

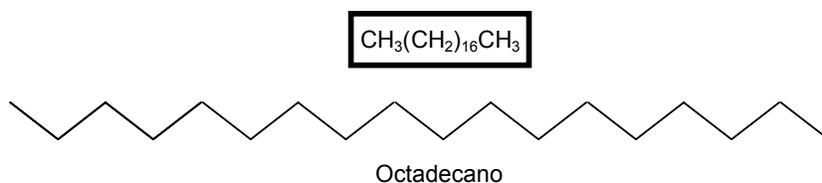


Figura 1.- Estructura de la molécula de octadecano

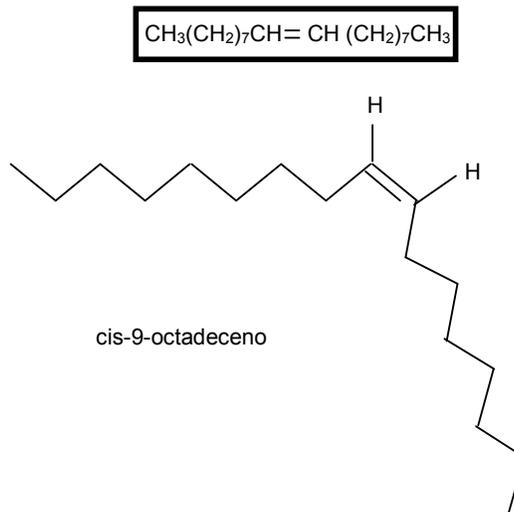


Figura 2.- Estructura de la molécula de cis-9-octadeceno

Las moléculas anfifílicas en solución muestran una rica estructura auto organizada, los fosfolípidos naturales ó surfactantes artificiales disueltos en agua pueden formar estructuras unilamelares o multivesiculares consistentes en una pila de capas de lípido y agua. Su estructura precisa y su estabilidad, dependen de las características químicas del lípido, la temperatura, la concentración del lípido y la carga de superficie, la fuerza iónica de la solución acuosa (concentración de sal) y en algunos casos el tipo y la cantidad del co-surfactante agregado (Pincus, 1990). Las propiedades mecánicas de las membranas se derivan de las fuerzas no covalentes tales como el efecto hidrofóbico, fuerzas estéricas e interacciones electrostáticas. (Shoemaker, 2002). Las fuerzas electrostáticas han tenido atención especial ya que todas las membranas biológicas son ricas en lípidos aniónicos y son por lo tanto cargados en solución acuosa (Figura 3). Las interacciones electrostáticas contribuyen al balance de

fuerzas en la bicapa y esto puede tener implicaciones en las propiedades mecánicas de las membranas lipídicas (Shoemaker, 2002).

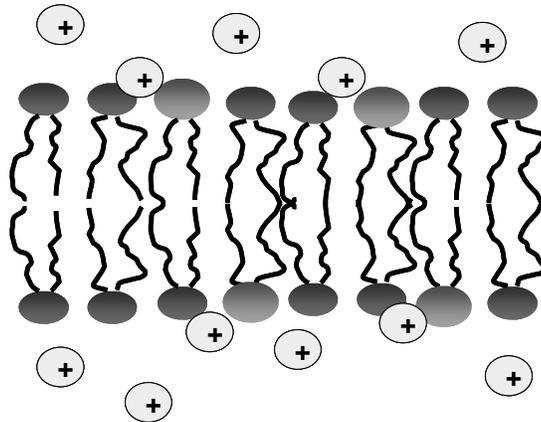


Figura 3.- Representación esquemática de una bicapa lipídica, donde se observa el ambiente iónico en el que se encuentra inmerso la célula.

Lípidos

Se puede definir a un lípido como una molécula de peso molecular intermedio que contiene una porción sustancial de hidrocarburo alifático ó aromático; se trata de una de las tres principales clases de moléculas orgánicas esenciales, se encuentran en todos los seres vivientes y juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad de los organismos vivos ya que forman una barrera que separa el medio intracelular del extracelular (Figura 4). Los lípidos forman un grupo de compuestos orgánicos el cual se encuentra

ampliamente distribuido en los sistemas vivos, proveen la estructura primaria de soporte para la membrana celular; los lípidos en la membrana poseen una proporción amplia de colas hidrofóbicas y grupos cabeza polares (Hull, 2004). El término lípido se refiere a un gran número de compuestos que poseen propiedades de solubilidad similares.

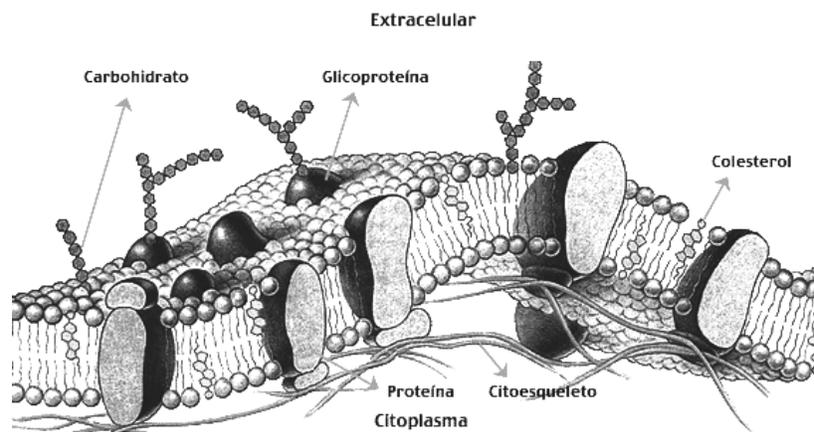


Figura 4.- Representación esquemática de la membrana celular donde se aprecia la bicapa lipídica.

Los lípidos proveen la estructura primaria para las membranas celulares ensamblándose en dos hojas opuestas conocidas como bicapa lipídica, los lípidos en las membranas celulares poseen un amplio rango de cadena hidrocarbonada y grupos cabeza polares. las colas hidrofóbicas presentes en los lípidos, para protegerse del agua, se ensamblan en estructuras; la estructura de bicapa adoptada por los lípidos en la membrana celular es una de varias posibles estructuras (Figura 5).

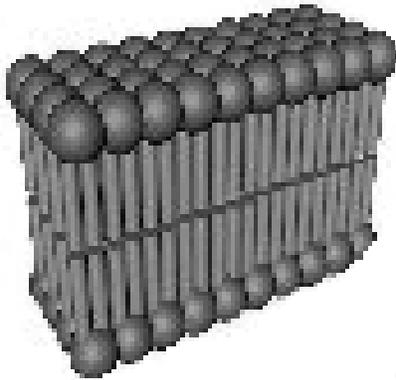


Figura 5.- Representación de una bicapa lipídica donde se observa la orientación cabeza-cabeza y cola hidrofóbica-cola hidrofóbica

Clasificación de los Lípidos

Los lípidos se clasifican en no polares y polares, los primeros son insolubles en el bulto y no se distribuyen para formar monocapas en la superficie y pueden ser clasificados empíricamente de acuerdo a su comportamiento con el agua. Son muy solubles en solventes orgánicos como el hexano, cloroformo ó benceno. En este grupo se puede incluir carotenoides, hidrocarburos, esteroides, ceras y glicéridos (Small, 1986, Prasad, 1994).

Los lípidos polares tienen una solubilidad de superficie y forman monocapas estables ó inestables. En este grupo se incluyen fosfoglicéridos, glicolípidos y esteroides, los cuales no se rigen solamente por las fuerzas de Van der Waals sino también por enlaces puente de hidrógeno y en algunos casos por interacciones electrostáticas, por otra parte, pueden ser clasificados

empíricamente de acuerdo a su comportamiento en agua, en cuatro grupos (Small, 1986).

La clase I incluye a los anfífilos como el colesterol y las ceras, los lípidos que pertenecen a la clase I son insolubles en el bulto pero se pueden distribuir en la interfase para formar una monocapa estable, en esta clase se pueden encontrar triglicéridos, ácidos grasos de cadena larga no ionizados, alcoholes, aminas, colesterol y vitaminas liposolubles y miembros de sus clases (Small, 1986).

La clase II a los lípidos insolubles, con una muy baja concentración micelar crítica, a este grupo pertenecen componentes muy importantes de la membrana celular, tal como fosfatidilcolina de cadena larga, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y esfingomielina, los lípidos que pertenecen a la clase II son virtualmente insolubles en agua, pero el agua se puede solubilizar en su parte hidrofílica de su estructura provocando que se inflen. A esta clase pertenecen muchos componentes de las membranas celulares. Muchos lípidos de esta clase tienen una capacidad finita para inflarse, los monoglicéridos, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina y los cerebrósidos incorporan de un 10 a un 45 % de agua por peso en su estructura que se infló. Otros lípidos se organizan de tal forma que adquieren una estructura de cristales líquidos lamelares que son al menos 90% de agua por peso (Small, 1986).

En la clase IIIA se encuentran los lípidos solubles, formadores de micelas, por arriba de su concentración micelar crítica. Esta clase incluye lisolecitinas, diacilfosfolípidos con cadenas cortas y las sales de ácidos grasos de cadena larga. Los lípidos de la clase IIIB incluyen los anfífilos solubles tal como las sales biliares y saponinas que forman micelas pero no líquidos cristalinos esmécticos

por arriba de su concentración micelar crítica pero forman cristales líquidos liotrópicos en un contenido bajo de agua (McIntosh y Magid, 1992, Small, 1986).

La solubilidad o concentración micelar crítica (cmc) depende de la energía libre ganada cuando una molécula anfifílica aislada en solución se convierte en un agregado. La cmc de los diacil fosfolípidos en agua en general es pequeña y depende de la longitud de la cadena y del tipo de grupo cabeza (McIntosh y Magid). La cmc medida para dipalmitoilfosfatidilcolina (16 carbonos por cadena) y didecanoilfosfatidilcolina (10 carbonos por cadena) es 4.6×10^{-10} M y 5×10^{-6} M, respectivamente.

Lípidos Anclados

En este grupo se encuentran los ácidos grasos y los ácidos hidroxi-ácidos unidos covalentemente mediante enlace tipo éster, amida o glicosídico predominantemente a estructuras polisacáridas. Estos ácidos grasos son extraíbles por hidrólisis ácida o básica del enlace covalente. Todos los lípidos saponificables contienen ácidos grasos como bloques de construcción, solo trazas de ácidos grasos se encuentran presentes en forma libre en los tejidos y las células. Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con una o varias cadenas hidrocarbonadas y un grupo carboxilo terminal. La cadena hidrocarbonada puede contener uno ó más dobles enlaces (Prasad, 1994). Los ácidos grasos difieren uno de otro con respecto a la longitud de la cadena hidrocarbonada y al grado de saturación lo cual gobierna sus propiedades físicas y del compuesto que las compone.

Solubilidad de Lípidos

La solubilidad de lípidos en agua es muy baja, muchos lípidos así como los alcanos, alcoholes, ácidos grasos, presentan una solubilidad que puede ser medida. La solubilidad es menor por debajo del punto de fusión y a una temperatura dada disminuye a medida que la longitud de la cadena hidrocarbonada ó el tamaño de la parte hidrofóbica se incrementa. Algunos de los lípidos más polares forman soluciones acuosas ópticamente claras. La solubilidad de tales lípidos puede ser tan grande como 60 gr/100 gr de solución. Esos lípidos tienen una solubilidad baja como monómeros pero forman espontáneamente agregados pequeños de moléculas llamadas micelas donde su solubilidad verdadera es excedida

Clasificación de los lípidos basados en su interacción con el agua. En agua algunos lípidos son completamente insolubles, mientras que otros no lo son. En la interfase, ciertos lípidos no polares pueden no distribuirse del todo, mientras que otras moléculas no polares si lo pueden hacer para formar monocapas ya sean estables ó inestables. El comportamiento de los lípidos depende de la aportación relativa de la parte hidrofóbica ó la parte hidrofílica ó de la parte hidrocarbonada de la molécula. Los grupos hidrofílicos fuertes se unen fuertemente a varias moléculas de agua y requieren una apreciable cantidad de energía para rehidratar esos grupos en un ambiente hidrocarbonado.

Por otra parte, la fuerza de un grupo lipofílico es proporcional a su área de superficie hidrofóbica y requieren de energía para desplazar tales grupos de la cadena hidrocarbonada que fue solvatada en agua. Si la parte hidrofílica es más

fuerte que la parte hidrocarbonada, la molécula tenderá a ser soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos. Los grupos hidrofílicos incluyen carboxilos ionizados ($-\text{COO}^-$), sulfatos, sulfonatos, fosfatos, aminas cuaternarias, azúcares, polialcoholes, polietóxidos y muchos grupos neutros. Por otra parte, si la parte hidrocarbonada es más fuerte que la parte hidrofílica, la molécula tiende a ser insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos (Small, 1986).

Formación de agregados lipídicos en agua. Las moléculas polares, como los lípidos de naturaleza dual, poseen un mollete hidrofóbico que no es afín al agua y un mollete polar que si es afín al agua en el caso de los fosfolípidos, el mollete hidrofóbico consiste de cadenas de acil y el hidrofílico consiste de derivativo de ácido fosfórico. La energía libre interfacial de atracción del agua es lo que conduce a la eliminación del contacto del agua con la porción hidrocarbonada (McIntosh y Magid, 1992), es lo que dirige la eliminación del contacto agua-porción hidrocarbonada.

Fosfolípidos

Son moléculas complejas de origen biológico, contienen fósforo en la cabeza polar y una región hidrocarbonada usualmente unida a través de una base esfingosina (Small, 1986). Son componentes funcionalmente activos de las membranas biológicas, se ven involucrados en propiedades de las membranas

(Figura 6). Existen más de cien variaciones de moléculas de lípido en una membrana biológica, las cuales difieren una de otra por la composición del ácido graso y los sustituyentes localizados en el grupo cabeza de la molécula (Small, 1986).

El contenido de fosfolípido varía de órgano a órgano y de especie a especie. Entre los años 1846 y 1847 Gobley aisló de la yema de huevo y cerebro un lípido al que le llamó lecitina del griego *lekithos* que significa yema de huevo, del cual pudo obtener ácido glicerofosfórico y ácidos grasos, posterior al descubrimiento se mostró que este fosfolípido contenía a la colina como base (Ansell, 1982). Estas moléculas son ubicuas a los organismos vivos. Mientras que muchos fosfolípidos tienen dos cadenas alifáticas, como la fosfatidilcolina, los isoderivativos tienen una cadena alifática y tienden a ser solubles mientras que los de cadena doble tienden a ser insolubles. El grupo polar puede variar, de los fosfolípidos neutros, tales como la fosfatidilcolina, fosfoglicerol y el ácido fosfatídico. Los fosfolípidos cargados presentan diferentes propiedades físicas a diferentes estados de ionización. Los fosfolípidos neutros pueden interactuar con iones, especialmente los divalentes, así que el grado de hidratación está marcadamente influenciado por la unión de iones. La porción hidrocarbonada de la molécula puede ser saturada ó puede contener cadenas saturadas e insaturadas, siendo esta la condición usual. En el último caso, las dos cadenas son probablemente incompatibles (Ansell, 1982).

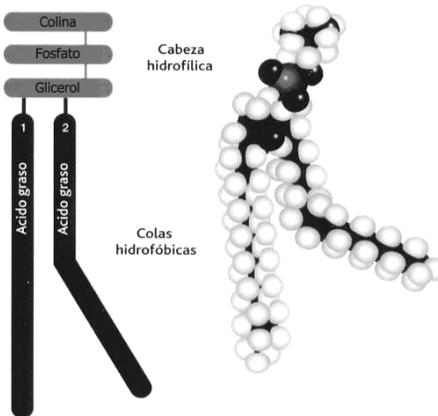


Figura 6.- Representación de la estructura de un fosfolípido. Los grupos colina, fosfato y glicerol, forman la cabeza hidrofílica y en conjunto se conocen como fosfatidilcolina.

Los enlaces químicos en los fosfolípidos son de tres tipos, enlaces carbono-carbono, ester y fosfoester. Estas propiedades químicas determinan las propiedades principales de los fosfolípidos y su estabilidad. A pH 7 los fosfolípidos son lo suficientemente estables (Cevc, 1993).

En presencia de agua los fosfolípidos forman espontáneamente estructuras organizadas que pueden ser esferas, discos, micelas cilíndricas ó bicapas y vesículas (McIntosh y Magid, 1992). Bajo condiciones fisiológicas los fosfolípidos de la membrana celular se encuentran en dos tipos, cargados y neutros. Estos últimos incluyen a dos de los más comunes, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Varios fosfolípidos de membrana poseen una carga negativa en condiciones fisiológicas, entre estos se encuentran fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y fosfatidilserina.

La presencia de cationes monovalentes ó divalentes en la fase fluida cambia las propiedades de hidratación de los fosfolípidos cargados. Para muchos cationes monovalentes, como K^+ , Na^+ o Cs^+ , los espacios fluidos entre bicapas de fosfatidilserina ó fosfatidilglicerol adyacentes decrecen al incrementarse la concentración salina debido al apantallamiento de la carga. A concentraciones mayores a 1 M de NaCl, KCl ó CsCl, los cambios son pocos ó ninguno sobre la estructura de la bicapa (Hauser y Shipley, 1983; McIntosh y Magid, 1992). El efecto producido debido a la adición de cationes divalentes es el deshidratar las multicapas de fosfatidilserina.

El catión más estudiado es el calcio (Ca^{+2}), el cual se une al grupo fosfato de la fosfatidilserina, provocando que el agua se libere de entre las bicapas y de los grupos cabezas polares. El Ca^{+2} se une entre grupos cabeza de fosfatidilcolina en el plano de la membrana, disminuyendo el área por molécula y removiendo el agua de la región del grupo cabeza, la unión de este catión a la bicapa de fosfatidilserina produce una composición $Ca(PS)_2$. Por otra parte el Mg^{+2} tiene un efecto similar deshidratante, además de elevar la temperatura de fusión por alrededor de $40^{\circ}C$ en la bicapa de fosfatidilserina (McIntosh y Magid, 1992).

Fosfatidilcolina

Es uno de los fosfoglicéridos más abundantes en los animales y a menudo en plantas superiores y levaduras. Contiene colina como grupo cabeza esterificado al ácido fosforico (Figura 7) (Prasad, 1994). Es un fosfolípido de 18

19.70% y P 3.81% (Figura 8). Debido a su carácter aniónico a pH fisiológico las interacciones de fosfatidilserina con cationes se ha visto implicada en eventos de asociación con membranas, tal como la fusión de membranas, separación de fase de lípidos (Hauser y Shipley, 1984).

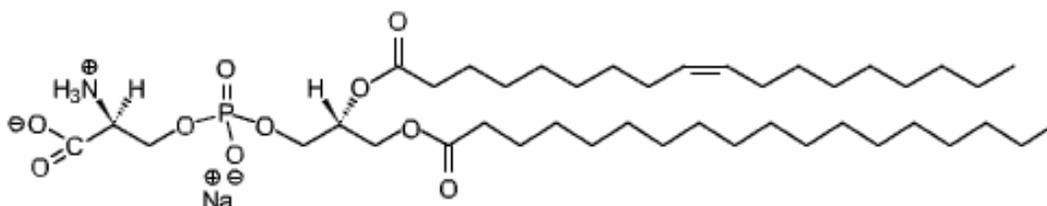


Figura 8.- Estructura de la molécula de fosfatidilserina

Unión de Iones

Un ión es una partícula que se forma cuando un átomo neutro o un grupo de átomos ganan o pierden uno o más electrones. Un átomo que pierde un electrón forma un ion de carga positiva, llamado catión; un átomo que gana un electrón forma un ion de carga negativa, llamado anión.

Para comprender la unión de iones a las moléculas de fosfolípido, se debe comprender el comportamiento de los iones en el bulto y en la vecindad de la interfase membrana-solución. Los protones y los iones hidroxilo difieren distintamente de los iones a este respecto por un número de características.

En el agua, los protones se asocian con la molécula H_2O por el par de electrones del oxígeno, estos producen un ión hidronio, H_3O^+ , el cual se acerca a su capa de hidratación por la unión de tres ó cuatro moléculas de agua. El ión hidronio se acomoda cerca de un grupo protonable de una molécula de fosfolípido y puede donar sus protones al ligando. Esto da como resultado la formación de un par de electrones no compartidos y la generación de un exceso de carga positiva en el sitio de enlace. Los iones hidroxilo se forman por el acoplamiento de un par de electrones entre el oxígeno y el hidrógeno y por la aceptación de un electrón para completar el octeto del oxígeno. Estos iones juegan un papel importante en la iónización de moléculas de fosfatidilcolina. La unión de iones hidrógeno e hidroxilo a un lípido ionizado es a menudo mediado por el desplazamiento de un electrón, tal como en la formación de nuevos enlaces, tales enlaces deben ser referidos como una quimosorción más que una adsorción física (Cevc, 1993).

Los iones pequeños ó multivalentes, con una alta carga iónica, son solvatados fuertemente (hidratados). En solventes polares tales como el agua, cerca de seis ó más moléculas de agua se encuentran fuertemente unidas a estos iones en la primera capa de hidratación. En la segunda capa de hidratación, el efecto del ión central es mucho más débil. Los aniones haluro, los cuales tienen un radio atómico más grande comparado con los cationes de álcali metálicos del mismo periodo, son caracterizados por una disminución en la hidratación y una capa de hidratación primaria más flexible a pesar de su habilidad para formar enlaces de hidrógeno con el agua (Cevc, 1993). Si las interacciones ión-solvente son más fuertes que las interacciones intermoleculares en el solvente, los iones

tienden a ser positivamente hidratados. La entropía del agua se ve disminuida por tales iones, mientras se incrementa cerca de otros tipos de iones con una densidad de carga baja. Estos últimos iones son considerados hidratantes negativos o rompe estructuras ó entidades caotrópicas. La transición entre cosmotropos ó caotropos se cree que ocurre hipotéticamente por un ión cargado con un radio de 0.11 nm. Los iones sodio son cosmotropos débiles y los iones Cl^- son caotropos débiles. El cloruro de sodio, no afecta las estructuras en el bulto apreciablemente (Cevc, 1993).

Cuando un ión se acerca a la membrana de fosfolípido esta experimenta diversas fuerzas. La más conocida es la electrostática de largo alcance, la fuerza coulombica. Esta fuerza es proporcional al producto de todas las cargas involucradas y es inversamente proporcional a la constante dieléctrica local $\tilde{\epsilon}$ (Cevc, 1993).

Los iones orgánicos pueden unirse a las membranas a nivel de grupo cabeza o cadenas hidrocarbonadas en virtud de su naturaleza anfifílica. Los iones orgánicos grandes comprenden entidades de una sola carga en cualquiera de los extremos de la cadena alifática, son moléculas anfifílicas. Algunos lípidos se incluyen en esta categoría. Las porciones alifáticas de estas moléculas no interactúan con el agua pero tienden a formar interacciones hidrofóbicas entre ellas, excluyendo al agua y formando interacciones de van der Waals, la región polar de la molécula se ordena con el agua haciendo puentes de hidrógeno. El efecto de estas interacciones entre el soluto con el soluto y con el solvente, son muy dependientes de la concentración. Excepto en soluciones muy diluidas, estas fuerzas causan que las moléculas anfifílicas se asocien formando micelas. El tamaño predicho y la forma de la micela depende en gran medida de la longitud y

grado de insaturación de las cadenas alquilo. Para alquilos largos y muchos grados de asimetría, la micela no será esférica sino elíptica pareciendo un disco plano. Cuando el disco se hace mayor, los anfífilos forman bicapas que son el origen de las membranas biológicas. El destino final de los iones orgánicos que interactúan con los lípidos de la membrana es determinado por fuerzas coulombicas de largo alcance, interacciones ión-dipolo (Cevc, 1993).

La teoría de Gouy Chapman predice que los contraiones se acumularán cerca de la superficie de la membrana cargada para compensar la carga neta opuesta en las moléculas de fosfolípido. Esto asegura electro neutralidad en todo el sistema (Cevc, 1993). Los iones contrarios que se encuentran de la superficie cargada fuertemente en una medida considerable apantallan su carga (Schukin, 1988). Por el contrario, los coiones, son reducidos de la doble capa iónica resultante. Cuando los iones de un cierto tipo se unen a una membrana lipídica, se debe tomar en cuenta el cambio resultante en la densidad de carga de superficie. La unión de iones a fosfolípidos no necesariamente conduce a una deshidratación completa. Debido a eso no hay una distinción estricta entre los planos de enlace interior y exterior cuando sea posible. Aunque muchas membranas biológicas son cargadas negativamente mucha de la investigación que se ha realizado en vesículas se ha concentrado en las vesículas de lípidos electrostáticamente neutras (Claessens, 2004).

Cationes Inorgánicos

Las interacciones ión-fosfolípido son gobernadas por fuerzas electrostáticas. A pH bajo, cuando todas las moléculas de ácido fosfatídico están

completamente protonadas, sólo unos cuantos cationes divalentes se unen a la bicapa lipídica. La introducción de las cargas negativas en membranas de fosfatidilcolina inicialmente electroneutra debido a la adición de cargas negativas ó por la unión de iones ClO_4^- a la superficie de la bicapa incrementa significativamente la unión de iones calcio a la superficie cargada negativamente de la membrana. Por el contrario, la afinidad de bicapas de fosfatidilserina por Li^+ ó Ca^{2+} es suprimida a medida que la superficie de la membrana disminuye más allá de la instauración de la cadena ó de la incorporación de fosfolípidos neutros (Cevc, 1993).

El enlace de cationes divalentes y trivalentes a las moléculas de fosfolípido es sensible a la concentración del electrolito de soporte, tal como NaCl, esto se ve afectado por la separación interbicapa y viceversa, el valor de pH en el bulto, temperatura y efectos de transición de fase. La afinidad de Ca^{+2} por vesículas formadas con fosfatidilserina parece incrementar significativamente si la agregación de las vesículas es inducida por la adición de 0.6-0.8 mM de CaCl_2 . Por otra parte, la adición de Ca^{+2} a bicapas de fosfatidilglicerolfosfatidilcolina se ve reducida al decrecer la separación intermembrana. La afinidad de los fosfolípidos por los cationes parece seguir la secuencia:

lantánidos > metales de transición > tierras alcalinas > álcalis metálicos

Esto documenta, una vez más, la importancia de las interacciones electrostáticas en el proceso del enlace ión-membrana. Tales fuerzas no son sólo el factor importante en este respecto. Las interacciones ión-fosfolípidos son mediadas por el campo atómico local de los residuos polares de los fosfolípidos.

Esta puede ser la razón por la cual los cationes divalentes ó trivalentes tienen una alta afinidad por los fosfolípidos neutros. Estudios combinados de ^1H -, ^{13}C y ^{31}P -NMR implican fuertemente que los cationes inorgánicos interactúan predominantemente con los grupos fosfodiéster de los grupos cabeza de los fosfolípidos. Esta conclusión es soportada por estudios de espectroscopia de infrarrojo (IR), difracción de neutrones y datos de ESR. Los datos deducidos por IR muestran que las interacciones ión-fosfolípido pueden causar deshidratación parcial y cambios conformacionales de los grupos cabeza del lípido. Las interacciones ión-fosfolípido pueden resultar en una deshidratación parcial del ión enlazado (Cevc, 1993).

La afinidad de los cationes por las moléculas pequeñas, los cuales han sido usados como modelos de grupos cabeza de fosfolípidos, son apreciablemente menores que los reportados para bicapas de fosfolípidos en la membrana. La espectroscopia de IR muestra que el catión Ca^{2+} no se asocia con las moléculas de glicerofosfoserina pero se une fuertemente a las bicapas de fosfatidilserina. La estequiometría de cationes monovalentes unidos a lípidos acídicos se cree que es 1:1. Varias líneas de evidencia sugieren que los cationes divalentes se pueden enlazar a fosfolípidos cargados negativamente, tal como la fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y ácido fosfatídico con una estequiometría 1:1 y 2:1 (Cevc, 1993).

Aniones Inorgánicos

La unión de aniones inorgánicos a membranas de fosfolípido es menos explorado que la asociación entre lípidos y cationes. Existe evidencia convincente de que la unión de aniones a bicapas de lípidos se ve fuertemente afectada por

fuerzas electrostáticas así como la asociación lípido-catión. La unión de los aniones Cl^- , Br^- , NO_3^- y SCN^- a membranas de diacilmetilamonio cargadas positivamente es más fuerte que el ión correspondiente unido al fosfolípido zwitteriónico correspondiente. El tamaño del anión es un factor importante en el proceso de enlace. Un incremento en el tamaño del radio del anión de 0.181 nm (Cl^-) a 0.236 nm (ClO_4^-) magnifica la constante de enlace, para la asociación anión-fosfatidilcolina, por más de dos órdenes de magnitud. Esto en parte es debido a la transferencia del exceso de carga local del anión a los grupos cabeza del fosfolípido y vice versa; este fenómeno puede ser una consecuencia de las diferentes polarizabilidad iónica en ambos casos (Cevc, 1993).

Basado en datos publicados de unión a aniones, se puede escribir la siguiente serie de afinidad para fosfatidilcolina interactuando con diferentes aniones:



Este orden corresponde a la adsorbabilidad de los aniones y sugiere que tal efecto puede resultar de la adsorción de superficie a la membrana, esto resulta en una alteración del campo eléctrico en la membrana (Clarke, 1999)

Iones Orgánicos

La adsorción de iones orgánicos a capas de fosfolípido es regulada por muchos y diversos factores. Uno de esos es la fuerza electrostática de largo alcance, la cual causa una acumulación de iones cerca de la superficie del lípido. Los cambios conformacionales ó el empaque molecular modificado inducido por

iones enlazados puede jugar un papel similar. Los anfifílicos catiónicos y aniónicos parecen cambiar la orientación de los grupos cabeza del lípido, posiblemente por repelerse ó atraerse electrostáticamente en el dipolo del N terminal del grupo cabeza de fosfatidilcolina, respectivamente (Cevc, 1993).

Uno de los factores cruciales que determinan cuan fuertemente se puede unir un ión hidrofóbico a la membrana de fosfolípido es lo que se conoce como potencial del dipolo, creado por los residuos polares del lípido. Este potencial es idéntico a la diferencia de potencial entre la interfase membrana-agua y el interior de la membrana y puede ser igual a varios cientos de milivolts (interior positivo). El potencial bipolar de la bicapa favorece el enlace de aniones hidrofóbicos e impide el enlace de cationes orgánicos a la membrana de fosfolípido.

Repulsión Electroestática

Las multicapas formadas a partir de fosfolípidos con una carga neta, tal como fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol ó fosfatidilserina crecen indefinidamente en soluciones de electrolitos monovalentes a concentraciones menores a 1 M, debido primeramente a la repulsión electrostática entre bicapas. Por otra parte para fosfolípidos neutros tal como fosfatidilcolina, las bicapas formadas crecen al ser hidratadas con soluciones que contienen cationes tal como Ca^{+2} , esto se explica en términos de que el Ca^{+2} se une al grupo fosfato impartiendo una carga neta positiva a la superficie de la bicapa y posteriormente agrega una presión repulsiva electrostática. El cambio en la composición electrolítica del medio de dispersión

conduce a determinadas variaciones en la estructura de la doble capa y se acompaña de intercambio iónica, o sea, transición de una parte de solución de una parte de los iones que antes se encontraban en la doble capa. El carácter de variación de la doble capa viene determinado por las propiedades de los iones contrarios y coiones añadidos a la disolución (Schukin, 1988).

Liposomas

Los liposomas son vesículas compuestas de fosfolípidos, los cuales se encuentran organizados en bicapas, contienen una fase acuosa interna así como en el exterior. Las membranas son sistemas de multicomponentes que juegan un papel importante en un gran número de procesos celulares. La movilidad de las moléculas en las membranas es un factor crítico al considerar la eficiencia de los procesos bioquímicos que se llevan a cabo en la membrana.

En presencia de agua los fosfolípidos se organizan espontáneamente en estructuras moleculares como esféricas, micelas cilíndricas ó en bicapas y vesículas. La respuesta a preguntas referidas a las fuerzas que determinan las estructuras ordenadas fue planteada considerando el caso de la formación de micelas, asumiendo que la auto-agregación fue conducida termodinámicamente por el efecto hidrofóbico, se ha asumido que las cadenas hidrocarbonadas se confinan completamente en el interior de la micela. Los grupos cabeza polares se colocan en la superficie de los agregados, manteniéndose ahí mediante enlace fuerte al agua.

La membrana de los liposomas se encuentra compuesta de una o varias bicapas de lípido y encapsula un volumen pequeño del medio en el cual han sido preparados. Su morfología les permite encapsular compuestos solubles en agua en su volumen interno. Dependiendo de su composición estos agregados pueden ser químicamente estables en tiempos de horas ó quizá hasta años. La estabilidad física depende de la concentración de liposoma y las interacciones de partícula (Figura 9). La habilidad de los liposomas para reproducir la organización y las funciones principales de las células es lo que los ha convertido en modelos interesantes para llevar a cabo estudios de mecanismo molecular de los seres vivientes.

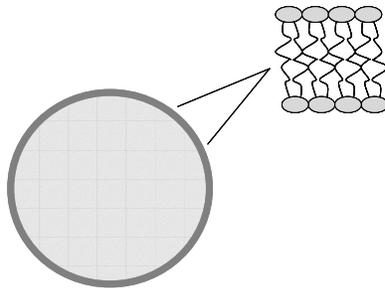


Figura 9.- Representación de un liposoma y la bicapa lipídica que lo compone.

Las vesículas unilamelares gigantes son capas esféricas de 5-200 μm de diámetro (Menger, 1998), proveen una oportunidad única de estudiar la física estadística y la fisicoquímica de las membranas anfifílicas (Döbereiner, 2000), están compuestas de una bicapa de lípido, estas vesículas pueden ser

observadas al microscopio óptico siendo este su mayor atributo, ya que son visibles se pueden monitorear diversos cambios morfológicos tales como endocitosis, exocitosis, fusión celular y otros procesos citomiméticos (Menger, 1998), así como diversas aplicaciones tecnológicas incluida la liberación de fármacos, terapia génica, pinturas, entre otras (Malucci, 2005). Estas vesículas poseen membranas fluidas que pueden adquirir distintas formas de acuerdo a la naturaleza de las moléculas de lípido y al ambiente físico (Menger, 1998).

Estas vesículas son membranas cerradas las cuales exhiben fluctuaciones térmicas cuando la temperatura ambiente se encuentra por arriba de la temperatura de transición fluido-gel (Döbereiner, 2000). La preparación de liposomas gigantes es aparentemente sencilla si no se utilizan sales, siendo una formación espontánea después de la hidratación del lípido. La formación espontánea implica que las bicapas de lípido tienden a separarse una de otra y así la membrana tiende a ser unilamelar. En presencia de sales la producción de liposomas gigantes es baja ó insignificamente pequeña (Akashi, 1998). Los estudios biofísicos de sistemas de bicapas puras sugieren que las sales pueden alterar la estructura y la dinámica de los grupo cabeza de fosfatidilcolina (Sachs, 2004). Si se incluyen lípidos cargados en la formación de vesículas unilamelares gigantes, estas se formaran aún en presencia de sales. Las interacciones electrostáticas entre las membranas lipídicas son moduladas extrínsecamente por iones móviles en el medio que las rodea.

Los aniones monovalentes afectan fuertemente las fluctuaciones conformacionales de los grupo cabeza, con la magnitud de este efecto se sigue una serie de Hofmeister: $\text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{NO}_3^- < \text{I}^- < \text{SCN}^- < \text{ClO}_4^-$ (Sachs, 2004). Las membranas biológicas se encuentran rodeadas de un buffer acuoso que contiene

iones Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ó Cl^- a diferentes concentraciones en el medio intracelular y extracelular. Las interacciones electrostáticas entre el buffer iónico y las moléculas del lípido son de gran importancia para la fusión de la membrana, las transiciones de fase ó para que se lleve a cabo el transporte a través de la membrana (Böckmann, 2003). Los cationes divalentes tales como Ca^{2+} y Mg^{2+} promueven en gran medida la formación espontánea de liposomas gigantes formados a partir de fosfolípidos eléctricamente neutros (Akashi, 1998, Böckmann, 2003). Para el caso de lípidos cargados negativamente el catión divalente Ca^{2+} reduce la producción (Akashi, 1998).

Técnicas de Preparación

Los liposomas se preparan de lípidos que formen fases lamelares tales como los fosfolípidos. Estos se pueden mezclar con otros lípidos para acercarse lo más posible a las propiedades de la membrana. Los lípidos más comúnmente utilizados como modelos de membranas son mezclas de fosfatidilserina y ácido fosfático, fosfatidilcolina y fosfatidilserina ó fosfolípidos que pertenezcan a la misma clase como los esfingolípidos ó glicolípidos ó de otra clase como el colesterol. Para incrementar la fracción de vesículas gigantes se han desarrollado diversos métodos de preparación. Se pueden tomar dos rutas para tal fin, la hidratación de la película de lípido ó la fusión de vesículas pequeñas preformadas (Angelova, 2000).

Las técnicas de preparación de liposomas son variadas tales como mecánica, uso de solventes, detergentes. Existen otros métodos que incluyen la

diálisis, deshidratación-rehidratación de vesículas lamelares pequeñas ó su fusión controlada, dilución cromatografía de exclusión en gel, cambios de temperatura ó reacciones bioquímicas (Leng, 2003) así como sonicación y electroformación.

La sonicación es uno de los métodos más populares para producir vesículas de tamaño conocido. La presión inducida rompe las vesículas grandes y las multilamelares, presentes en las muestras hidratadas, en vesículas unilamelares pequeñas con tamaños que van de 5 a 50 nm de diámetro (Malucci, 2005).

La electro-formación es un método que consiste en la producción de vesículas debido a la influencia de un campo eléctrico, mediante esta estrategia experimental a las vesículas obtenidas se les puede controlar el tamaño, lamelaridad a partir de la película inicial de lípido y los parámetros del campo eléctrico aplicado. Es útil para preparar vesículas unilamelares gigantes para estudios que involucran vesículas individuales. Estas vesículas se encuentran entre 5 – 200 μm de diámetro, dependiendo de la composición del lípido, el medio y los parámetros del campo de corriente alterna externa. Las vesículas obtenidas mediante el método de electroformación son modelos ideales para realizar observaciones de micromanipulación y microinyección local (Angelova, 2000).

El método utilizado en el presente trabajo es el de la rehidratación de fosfolípido, el cual consiste en agregar un solvente a una película de fosfolípido previamente deshidratado, para formar las vesículas.

Cuando se preparan liposomas formados a partir de una mezcla de lípidos primero se deben disolver y mezclar los lípidos en un solvente orgánico para asegurar una mezcla homogénea. Usualmente este proceso se lleva a cabo utilizando cloroformo o una mezcla de cloroformo:metanol. Esto es para obtener

una solución de lípido clara para completa la mezcla. Una vez que los lípidos se han mezclado en el solvente este puede ser evaporado usando vacío. La hidratación de la película de lípido seca se logra agregando un medio acuoso. El medio de hidratación generalmente es determinado por la aplicación de las vesículas de lípido. Los medio convenientes para llevar a cabo la hidratación incluyen agua destilada, soluciones tampón, soluciones salinas y soluciones libres de electrolitos. Los productos obtenidos mediante esta técnica son vesículas multilamelares gigantes (LMV).

Uso de los Liposomas

El interés de estudio de los liposomas se encuentra en distintos campos tales como la física, fisicoquímica, farmacología, cosmetología, alimentos y biofísica. El tamaño y la estructura de los liposomas se encuentran determinados por el método utilizado para su preparación, por otra parte las propiedades de la vesícula están dadas por el tipo de lípido utilizado en la composición de la membrana. La estabilidad física de los liposomas esta influenciada por el tamaño del liposoma y la naturaleza del lípido. Los liposomas juegan un papel importante como acarreadores para propósitos terapéuticos, sirven como blancos para ácidos nucleicos cargados negativamente (Russ, 2003). Pueden ser utilizados para estudios de adhesión en diversos soportes. En sistemas biológicos las fuerzas atractivas a menudo son específicas, mientras que las fuerzas repulsivas son típicamente universales.

Elección del Lípido como una Función de la Aplicación

Las características fisicoquímicas de las vesículas están gobernadas por la composición lipídica. Todas las membranas son anfifílicas por naturaleza, esta característica es la responsable de la estructura de bicapa de la membrana ya que los grupos cabeza polar de la molécula se orientan hacia el medio acuoso mientras que la parte hidrofóbica se trata de alejar lo más posible del agua. Los lípidos se dividen en dos clases diferentes como una función de su estructura, los que contienen ácidos grasos y los que no contienen ácidos grasos siendo el colesterol el más representativo. Los lípidos más comunes utilizados como modelos de membrana son una mezcla de fosfolípidos (fosfatidilcolina y ácido fosfatídico, fosfatidilcolina y fosfatidilserina). La fluidez de la membrana ó más precisamente la movilidad lateral y rotacional de las moléculas dependen de la región acil (parte hidrofóbica de la mayoría de los lípidos). Una bicapa de un lípido puro (lípido sintético) puede pasar de fase de gel a fase de líquido cristalino a una temperatura dada, lo cual depende de la longitud de la cadena, el grado de insaturación y el tipo de grupo polar.

El grupo cabeza de los lípidos puede ser no iónico ó zwitteriónico (fosfatidilcolina, etanolamina, etc) el cual puede presentar una carga neta cero, por otra parte podemos encontrar lípidos iónicos (fosfatidilserina, ácido fosfatídico) la ionización depende particularmente del pH del medio acuoso.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Los lípidos utilizados en este trabajo, 1-stearoil-2-oleoil-*sn*-3-fosfocolina (SOPC) y 1-stearoil-2-oleoil-*sn*-3-fosfoserina (SOPS), fueron adquiridos en Avanti Polar Lipids y se emplearon sin una purificación adicional. Los reactivos químicos fueron adquiridos de SIGMA y Fluka.

Los lípidos fueron disueltos en cloroformo, en una concentración de 10 mg/mL, de donde se tomó una alícuota para preparar las mezclas de SOPC:SOPS en las proporciones requeridas, se tomaron 10 microlitros de solución (0.1 mg de lípido, para la proporción 10:0) (Tabla I) . Estas fueron mezcladas bajo una atmósfera de nitrógeno, posteriormente el solvente fue retirado utilizando vacío. La película de lípido obtenida fue rehidratada con las soluciones salinas de fuerza iónica conocida y glucosa.

Tabla I.- Concentraciones y proporciones de lípido utilizadas para formar las películas.

Proporción SOPC:SOPS	Concentración de SOPC (mg/μL)	Concentración de SOPS (mg/μL)
10:0	0.1	0
9:1	0.09	0.01
8:2	0.08	0.02
7:3	0.07	0.03
6:4	0.06	0.04

Preparación de las Soluciones

Se preparó una solución de glucosa 0.063 M y soluciones salinas de KCl, NaCl, MgCl₂ y CaCl₂ en concentraciones de 0, 1, 3, 10, 30 y 100 mM y se utilizó la solución de glucosa en la concentración antes mencionada como blanco, esto es, sin presencia de sales.

Preparación de Liposomas Gigantes

Los lípidos fueron disueltos en cloroformo y almacenados a -20°C , de esta solución se tomó la cantidad necesaria para formar la mezcla de lípidos. Una vez formada esta mezcla se le agregó nitrógeno a temperatura ambiente. Esta nueva mezcla se colocó en el desecador para eliminar el solvente mediante vacío durante 3 horas. La película de lípido completamente seca fue rehidratada con la solución salina, en el mejor de los casos se observó un botón blanco flotando en el tubo de preparación.

Observación de Liposomas

Microscopia Óptica

Esta técnica se utilizó para observar los liposomas formados y así poder estimar el número de agregados presentes en la muestra así como determinar los diámetros de los agregados obtenidos. Se utilizó un microscopio óptico invertido

Leica DMIL auxiliándose con una cámara Sony Hyper HAD acoplada a la computadora para digitalizar las imágenes obtenidas.

Montaje Experimental. Se tomó una alícuota de la solución SOPC:SOPS/Glucosa 0.063 M/solución salina para cada proporción utilizada y otra solución SOPC:SOPS/Glucosa 0.063 M para ser utilizado como blanco, una vez preparadas las soluciones se colocaron en la cámara de observación como se muestra en la figura 10, posteriormente se colocaron en el microscopio y así iniciar la observación directa. En la figura 11 se muestra el arreglo experimental del microscopio óptico utilizado en el Laboratorio de Biofísica de la Universidad de Sonora para observar los liposomas y con los datos obtenidos llevar a cabo la estadística de los tamaños obtenidos en función de la fuerza iónica aplicada. Las muestras que contenían liposomas fueron observadas con el objetivo 40X.

Se utilizó el software Scion Image auxiliándonos de una retícula graduada (100 μm) para medir los diámetros de los agregados obtenidos y con estos datos fabricar histogramas y graficas de producción de vesículas en función a la fuerza iónica aplicada. La cantidad de liposomas en la muestra fue determinada al tomar 9 campos de 12 000 μm^2 como área de barrido, esto se logró contando uno a uno los liposomas formados.

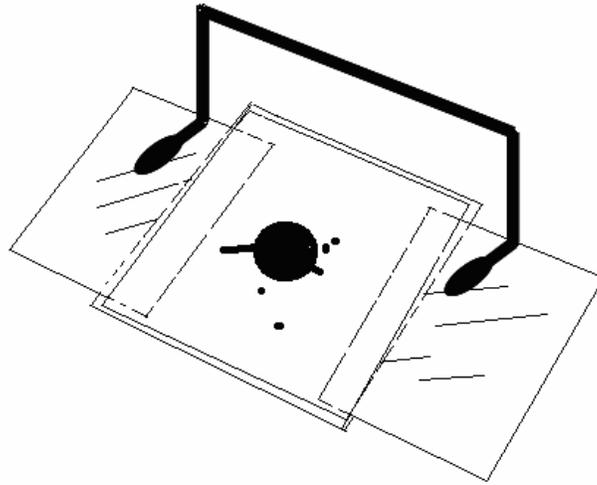


Figura 10.- Cámara de observación donde se deposita la muestra para ser observada al microscopio óptico.



Figura 11.- Arreglo experimental del microscopio óptico utilizado en el Laboratorio de Biofísica de la Universidad de Sonora utilizado para observar los liposomas obtenidos de las mezclas de fosfolípidos.

Aspectos Teóricos de Microscopia Óptica. El microscopio óptico utiliza la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto. El más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Estas lentes pueden aumentar un objeto hasta 15 veces. Por lo general, se utilizan microscopios compuestos, que disponen de varias lentes con las que se consiguen aumentos mayores. El microscopio compuesto consiste en dos sistemas de lentes, el objetivo y el ocular, montados en extremos opuestos de un tubo cerrado. El objetivo está compuesto de varias lentes que crean una imagen real aumentada del objeto examinado. Las lentes de los microscopios están dispuestas de forma que el objetivo se encuentre en el punto focal del ocular. Cuando se mira a través del ocular se ve una imagen virtual aumentada de la imagen real. El aumento total del microscopio depende de las distancias focales de los dos sistemas de lentes.

Las muestras que se examinan con un microscopio son transparentes y se observan con una luz que los atraviesa; se suelen colocar sobre un rectángulo fino de vidrio. El soporte tiene un orificio por el que pasa la luz. Bajo el soporte se encuentra un espejo que refleja la luz para que atraviese el espécimen. El microscopio puede contar con una fuente de luz eléctrica que dirige la luz a través de la muestra (figura 12). La resolución del microscopio óptico puede estar limitado a $0.2 \mu\text{m}$.

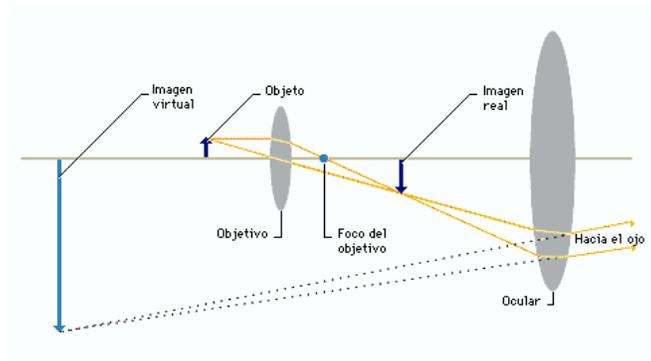


Figura 12.-Representación del Microscopio compuesto

Caracterización Mediante Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

Esta técnica se utiliza para estudiar el coeficiente de difusión de partículas coloidales y agregados moleculares. A partir de dichos coeficientes, se obtienen los radios hidrodinámicos mediante la relación Stokes-Einstein. En el presente trabajo se utilizó dicha técnica para caracterizar el efecto de las sales sobre los liposomas formados a partir de la mezcla de SOPC:SOPS.

La técnica de DLS se basa en la interacción de la luz con la materia, el campo eléctrico induce una polarización oscilante de electrones sobre las moléculas, sirviendo como fuente secundaria de luz, dispersándola posteriormente. Los cambios de frecuencias, la distribución angular, la polarización y la intensidad de la luz dispersada son determinadas por el tamaño, la forma y las interacciones moleculares en el material dispersado. De esta manera, las características de dispersión de un sistema dado, con ayuda de la

electrodinámica y la teoría de la mecánica estadística dependiente del tiempo, pueden dar información de la estructura y de la dinámica molecular del medio dispersante.

Montaje Experimental. La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) se basa en la incidencia de un haz de luz sobre la muestra a estudiar. Dado que la interacción de dicho haz con la muestra depende de la micro estructura de la misma, el análisis de la radiación dispersada en función del ángulo de dispersión (θ) permite obtener información sobre la estructura de la fase estudiada.

En la figura 13 se muestra una fotografía del arreglo experimental utilizado en el laboratorio de Fluidos Complejos de la Universidad de Sonora. Todas las medidas fueron hechas a 632 nm. La señal es analizada con un correlador digital múltiple ALV-5000/EPP. La función de correlación de intensidad fue medida en los ángulos de 30° a 90°. El valor de radio hidrodinámico más pequeño que se puede obtener con esta técnica es de 10 nm.

Aspectos Teóricos de Dispersión de Luz. La intensidad de la luz recibida por el detector en un experimento de DLS fluctúa debido a la dinámica microscópica de la solución estudiada, tales fluctuaciones en la intensidad están relacionadas con la velocidad de difusión de las moléculas dentro y fuera de la región estudiada. La correlación de las fluctuaciones en la intensidad permite obtener información de la dinámica del sistema, por ejemplo del coeficiente de difusión colectivo de los agregados en la solución. El coeficiente de difusión del soluto puede ser medido por medio de la función de auto correlación ($g^2(t)$). Considerando a I_t , como el número de fotones que llegan al detector en un intervalo de tiempo cerrado en t' .



Figura 13.- Arreglo experimental del dispersor de luz utilizado en el laboratorio de Fluidos Complejos de la Universidad de Sonora

Microscopia Electrónica de Transmisión Mediante la Técnica de Criofractura (FFEM)

La potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible. El microscopio electrónico utiliza electrones para iluminar un objeto. Dado que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz, pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas. La longitud de onda más corta de la luz visible es de alrededor de 4.000 ángstrom (1 ángstrom equivale a 0,000000001 metros). La longitud de onda de los electrones que se utilizan en los microscopios electrónicos es de alrededor de 0,5 ángstrom.

Todos los microscopios electrónicos cuentan con varios elementos básicos. Disponen de un cañón de electrones que emite los electrones que chocan contra el espécimen, creando una imagen aumentada. Se utilizan lentes magnéticas para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones, ya que las lentes convencionales utilizadas en los microscopios ópticos no funcionan con los electrones. El sistema de vacío es una parte relevante del microscopio electrónico. Los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, de forma que tiene que hacerse un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características.

Hay dos tipos básicos de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de transmisión (TEM) y el microscopio electrónico de barrido (SEM). Un TEM dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada del espécimen. Para utilizar un TEM debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de ángstroms. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces.

La técnica de criofractura se utiliza para poder observar muestras biológicas ya que mediante este procedimiento las muestras son congeladas bajo una atmósfera de nitrógeno y tras una delicada manipulación se realiza una replica de platino de la muestra congelada la cual puede ser observada en el TEM. Esta técnica nos proporciona tamaños en escala nanométrica.

Montaje Experimental. El equipo utilizado fue JEOL JFD 9010 para congelar las muestras y posteriormente observar la réplica en el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 2010F. El primer paso es congelar las muestras son en nitrógeno líquido a una temperatura de -195° C. Posteriormente, se coloca en un porta muestras. Una vez colocada se monta en un brazo el cual permite la introducción de la muestra en la cámara, una vez dentro se realiza la replica, primero cortando la muestra y después bañándola con platino posteriormente la muestra puede ser observada al microscopio electrónico (Figura 14).

Aspectos Teóricos de FFEM. La técnica de criofractura es una preparación de tejido utilizada en conjunto con la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esta técnica fue originalmente desarrollada para obtener nueva información acerca del contenido interno de la célula. Es uno de los métodos más simples para obtener detalles estructurales de la célula. La técnica revela detalles específicos basados en el comportamiento de los tejidos al ser fracturados. Cuando una célula es fracturada, el plano de fractura sigue un camino de resistencia; las bicapas lipídicas de las membranas probablemente cortarán a lo largo de la mitad de las dos capas ó a través de la región hidrofóbica de la membrana. La técnica de criofractura es una técnica simple, proporciona información fidedigna de las estructuras de la célula, pero presenta algunas desventajas. Una desventaja es que no tiene uso por fuera de las descripciones estructurales obtenidas.



Figura 14.- Arreglo experimental del equipo de criofractura y del microscopio electrónico de transmisión utilizado.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En esta sección se presentan los resultados experimentales obtenidos para las diferentes muestras preparadas. Primeramente se describirán los resultados de los experimentos de microscopia óptica, los cuales nos permiten estudiar las características de la población de vesículas de diámetros mayores que cinco micras, en función de la composición de la membrana (proporción SOPC:SOPS) y de la concentración de iones monovalentes y divalentes. Posteriormente, se discutirán los resultados de los experimentos de dispersión de luz, los cuales permiten estudiar agregados de tamaños más pequeños, así como el comportamiento temporal de las muestras. Finalmente, se presentan los resultados obtenidos mediante microscopia electrónica, los cuales brindan información exploratoria sobre tamaños más pequeños que los observados en microscopia óptica.

Resultados de Microscopia Óptica

Dado que interesaba estudiar el efecto de iones monovalentes y divalentes sobre las propiedades de vesículas con diferentes proporciones de 1-stearoil-2-oleoil-*sn*-3-fosfocolina (SOPC) y 1-stearoil-2-oleoil-*sn*-3-fosfoserina (SOPS), en esta sección presentamos los resultados obtenidos mediante microscopia óptica de la siguiente manera. Se describen las características generales de la población de vesículas (abundancia, tamaños) para las diferentes proporciones SOPC:SOPS estudiadas, en función de la concentración de la sal

correspondiente. Como ilustración y a manera de comparación, se presentan los histogramas de agregados obtenidos para cada sal a diferentes concentraciones de sal. Para cada proporción SOPC:SOPS, la descripción se divide en dos partes: iones monovalentes e iones divalentes.

Proporción 10:0 (SOPC:SOPS)

En esta proporción, las membranas están formadas por un sólo fosfolípido: la fosfatidilcolina (SOPC). Se trata de membranas neutras.

b) Efecto de los iones monovalentes

El efecto de los iones monovalentes se resume en la tabla II. Aunque no hay una tendencia completamente regular, a grandes rasgos se aprecia que este tipo de iones hace que la cantidad de agregados observados disminuya, respecto a las mismas muestras preparadas sin sal en el solvente. La disminución en promedio es más pronunciada para el KCl, donde es del orden de 50 %. Cabe decir que la excepción de esta tendencia se encuentra para la concentración 1 mM, donde la cantidad de agregados aumenta en un 20 %. En cuanto al NaCl, la cantidad de agregados observados disminuye en las proporciones extremas: 1 y 100 mM. De hecho, para 100 mM no se observó ningún agregado en la muestra. En las otras concentraciones, la cantidad de agregados es similar al caso sin sal.

En cuanto al tamaño de las vesículas observadas, los experimentos indican que los iones monovalentes hacen aumentar el diámetro de los agregados observados. De hecho, las concentraciones intermedias de NaCl (entre 3 y 30

mM) provocan que los diámetros sean significativamente mayores, respecto a las muestras sin sal (en el caso sin sal, el diámetro promedio fue de 6 μm). Los aumentos al agregar NaCl son del orden de 40 %. Por otra parte, el agregar KCl hace que los diámetros de las vesículas aumenten ligeramente. El aumento en este caso es del orden de 15 %. En la figura 15 se observa un liposoma obtenido al hidratar con KCl 1mM.

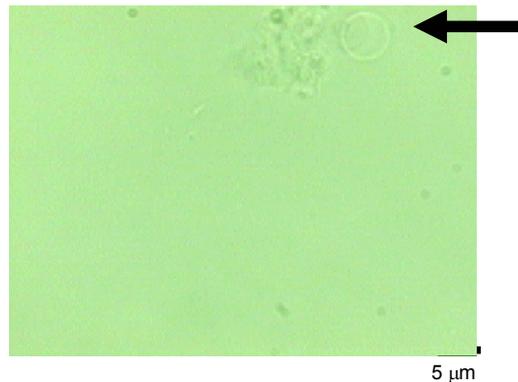


Figura 15.- Liposoma obtenido de la mezcla formada por SOPC:SOPS (10:0) hidratado con una solución de KCl 1mM

En la figura 16 se presentan los histogramas de la población de agregados para las muestras preparadas con NaCl y KCl a 1 y 3 mM así como el histograma de población de agregados de la muestra hidratada con glucosa 0.063 M. Vemos que para concentraciones de 1 mM ambas sales presentan una tendencia similar en lo que respecta al diámetro donde se encontró a la mayor cantidad de agregados. Para el caso de 3 mM se observa que la tendencia es muy similar aún cuando el diámetro donde se encontraron a la mayor cantidad de agregados difiere entre el NaCl y el KCl.

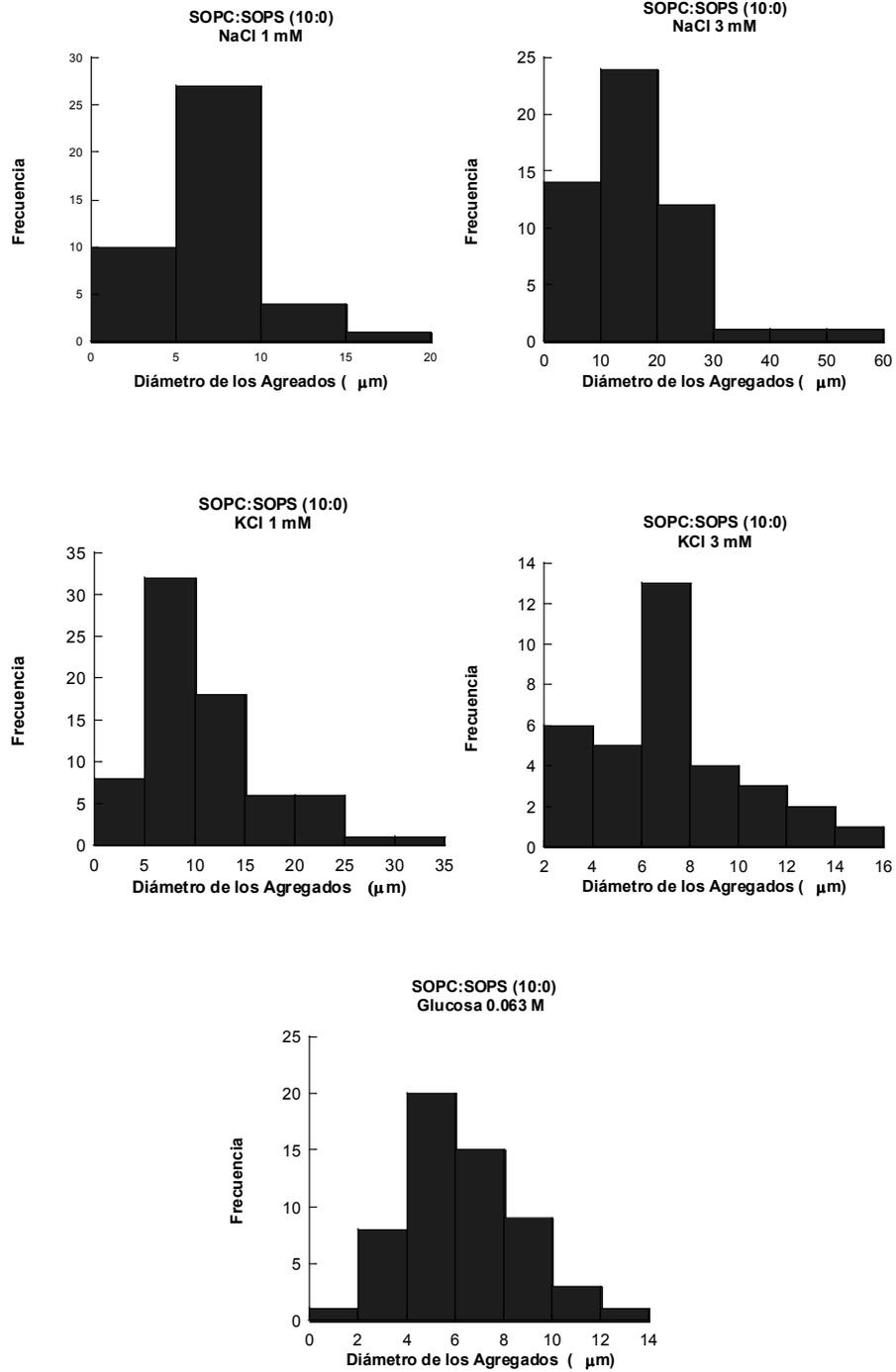


Figura 16.- Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 10:0 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con NaCl y KCl a 1 y 3 mM y glucosa 0.063 M.

Tabla II. Resumen de las observaciones de microscopía óptica para sales monovalentes (SOPC:SOPS 10:0). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de NaCl y KCl. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución ó aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

Concentración salina (mM)	Cantidad de agregados		Diámetro de los agregados (μm)	
	NaCl	KCl	NaCl	KCl
Sin sal	57	57	6 ± 2.3	6 ± 2.3
1	42 -26%-	72 + 26%	7 ± 2.7	10.7 ± 5.85
3	53	34 -40%	16 ± 10.1	7.2 ± 3.02
10	60	35 -40%)	11 ± 7.9	9.2 ± 3.7
30	57	29 -49%)	15 ± 2.5	7.7 ± 4.6
100	0 - 100 %	14 -75%	8 ± 8.1	8 ± 5.3

b) Efecto de los iones divalentes

El efecto de los iones divalentes se resume en la tabla III. De manera general se puede afirmar que los iones divalentes reducen la cantidad de agregados presentes en el sistema. Este efecto es sistemático en el CaCl_2 puesto que la disminución se observa en todas las concentraciones estudiadas. En el caso del MgCl_2 hay dos excepciones notables: 10 y 30 mM, donde la cantidad de agregados aumenta considerablemente respecto al caso sin sal. Tales aumentos

son del orden de 40 %. Los liposomas obtenidos bajo las condiciones ya mencionadas fueron preferentemente esféricos, sin embargo, se encontraron liposomas tubulares (Figura 17).



Figura 17.- Liposomas obtenidos en la proporción 10:0 al mezclar SOPC:SOPS hidratado con CaCl_2 100 mM

En cuanto al tamaño de las vesículas observadas, los experimentos indican que los iones divalentes aumentan sólo ligeramente el diámetro de los agregados. Este aumento es del orden de 10 % para el MgCl_2 y de 15 % para el CaCl_2 . En la figura 18 se muestran histogramas para muestras hidratadas con ambas sales a una concentración de 30 mM, donde se observa una tendencia similar a una concentración de 100 mM con respecto al histograma obtenido a partir de los datos obtenidos de glucosa 0.063 M.

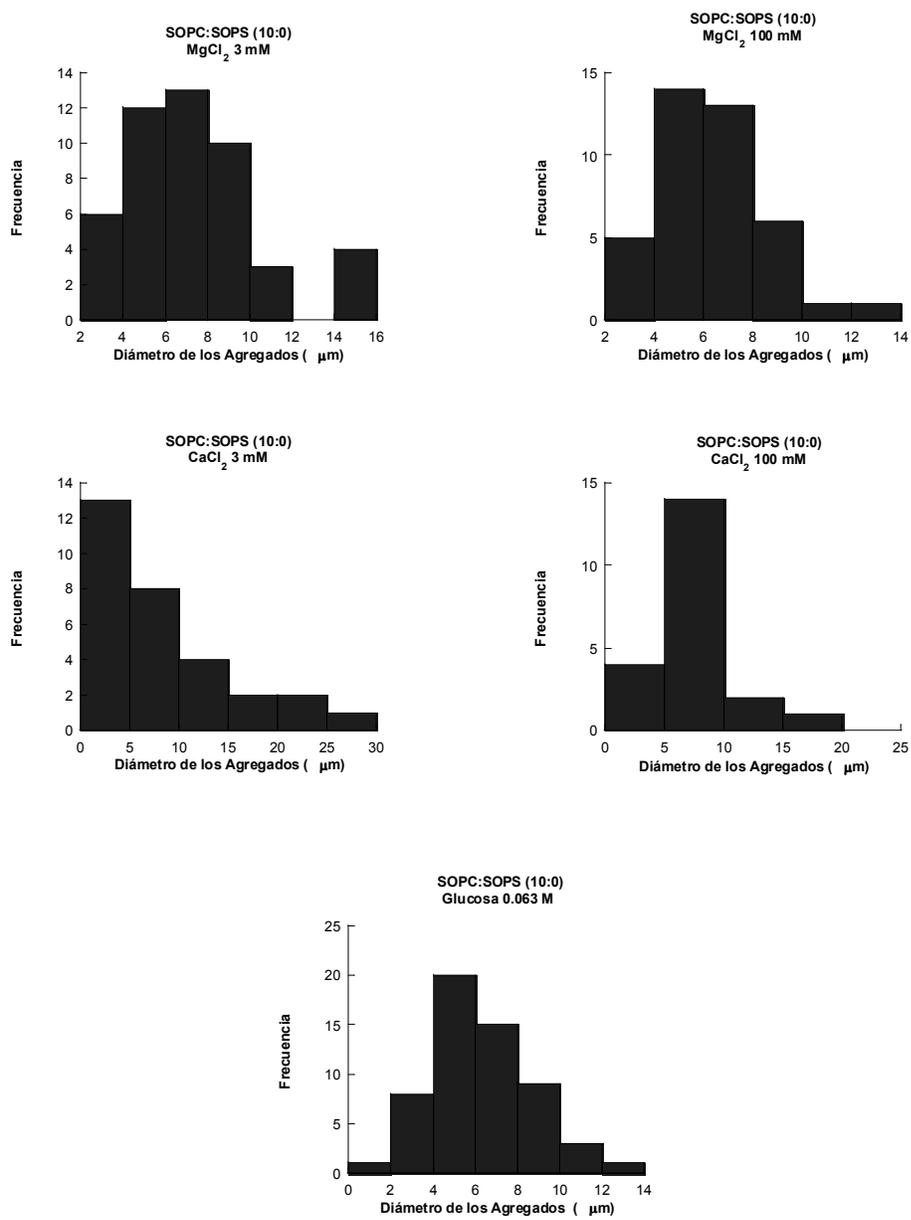


Figura 18.-Distribución de los diámetros de los agregados para la proporción 10:0 SOPC:SOPS hidratada con MgCl_2 y CaCl_2 3 y 100 mM y glucosa 0.063 M.

Tabla III. Resumen de las observaciones de microscopía óptica para sales divalentes (SOPC:SOPS 10:0). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de MgCl₂ y CaCl₂. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

concentración salina (mM)	Cantidad de agregados		Diámetro de los agregados (µm)	
	MgCl ₂	CaCl ₂	MgCl ₂	CaCl ₂
Sin sal	57	57	6 ± 2.3	6 ± 2.3
1	6 -26%-	22 -61%	8.1 ± 5.6	5.43± 2.1
3	48	30 -47%	7.3± 3.2	8.9± 7.2
10	104 +82%	19 -66%	9.04± 4.3	8.5± 9.6
30	90 57%	41	9.2± 5.3	7.8± 3.8
100	40	21	6.2± 2.2	7.6± 3.6

El efecto de los cuatro sales sobre los agregados obtenidos para la proporción 10:0 puede apreciarse en la figura 19. Aunque los comportamientos no son completamente regulares y hay excepciones, en la figura se aprecia que la producción de vesículas se incrementa cuando el solvente es una solución de MgCl₂, pero el tamaño de los agregados es mayor cuando se utiliza NaCl.

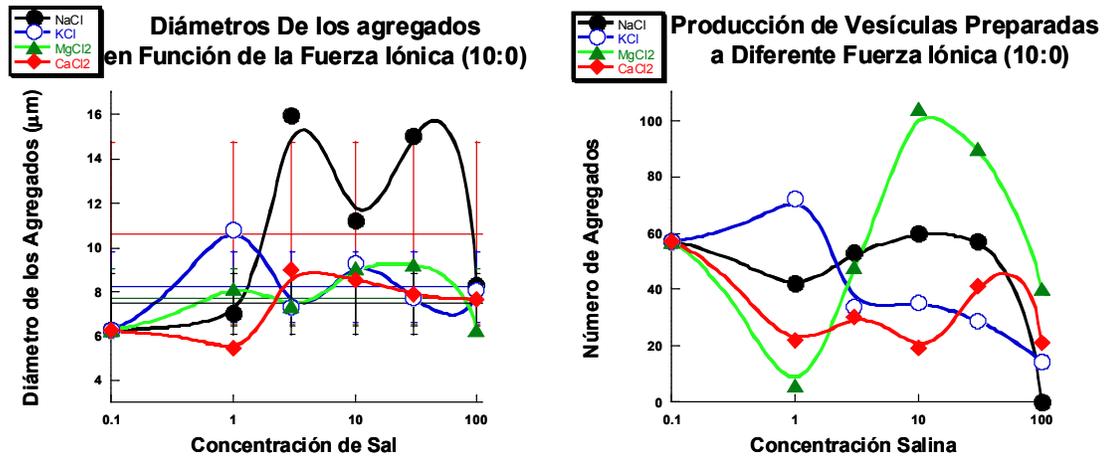


Figura 19.- Producción de vesículas y diámetro promedio de la agregados en función de la concentración salina, para las cuatro sales utilizadas en la proporción 10:0 SOPC:SOPS. Las líneas son sólo guías visuales.

Proporción 9:1 (SOPC:SOPS)

En esta proporción las membranas se encuentran formadas por dos fosfolípidos, la fosfatidilcolina y la fosfatidilserina, en la proporción mencionada, el primero de ellos es neutro y el otro es cargado negativamente.

a) Efecto de los iones monovalente

El efecto de los iones monovalentes se resume en la tabla IV. En esta proporción la tendencia no es regular, se puede decir que los iones utilizados hacen que la cantidad de liposomas disminuya respecto a las muestras preparadas sin sal en el solvente. La disminución en promedio es más pronunciada para KCl, del orden del 90% en 10 mM de la sal. El resto de las concentraciones presenta tendencias similares en lo que respecta a la cantidad de liposomas, obteniéndose en un 50% menos con respecto al blanco utilizado en

1 mM para ambas sales. En la figura 20 se presentan liposomas obtenidos al hidratar con KCl 100 mM.

En lo que respecta al tamaño de las vesículas, este estudio indica que los iones monovalentes aumentan los diámetros de los agregados observados en las concentraciones de 3 a 30 mM y en las concentraciones extremas se observa una disminución en el diámetro obtenido con las muestras obtenidas sin sal, en el caso sin sal el diámetro fue de 9.5 μm . Los aumentos al agregar NaCl son del orden de 60% en 3 mM. El KCl a diferencia del NaCl no provocó un aumento de los diámetros y sólo en 1 mM este aumento fue del orden de 15%. En la figura 21 se presentan los histogramas obtenidos con NaCl y KCl 100 mM y con glucosa 0.063 M.

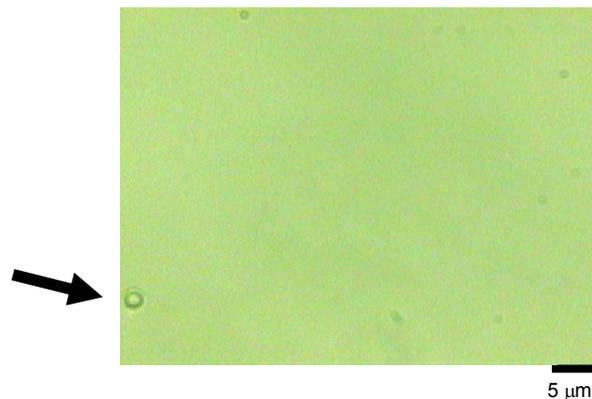


Figura 20.- Liposomas obtenidos al hidratar la mezcla de SOPC:SOPS (9:1) con KCl 100 mM.

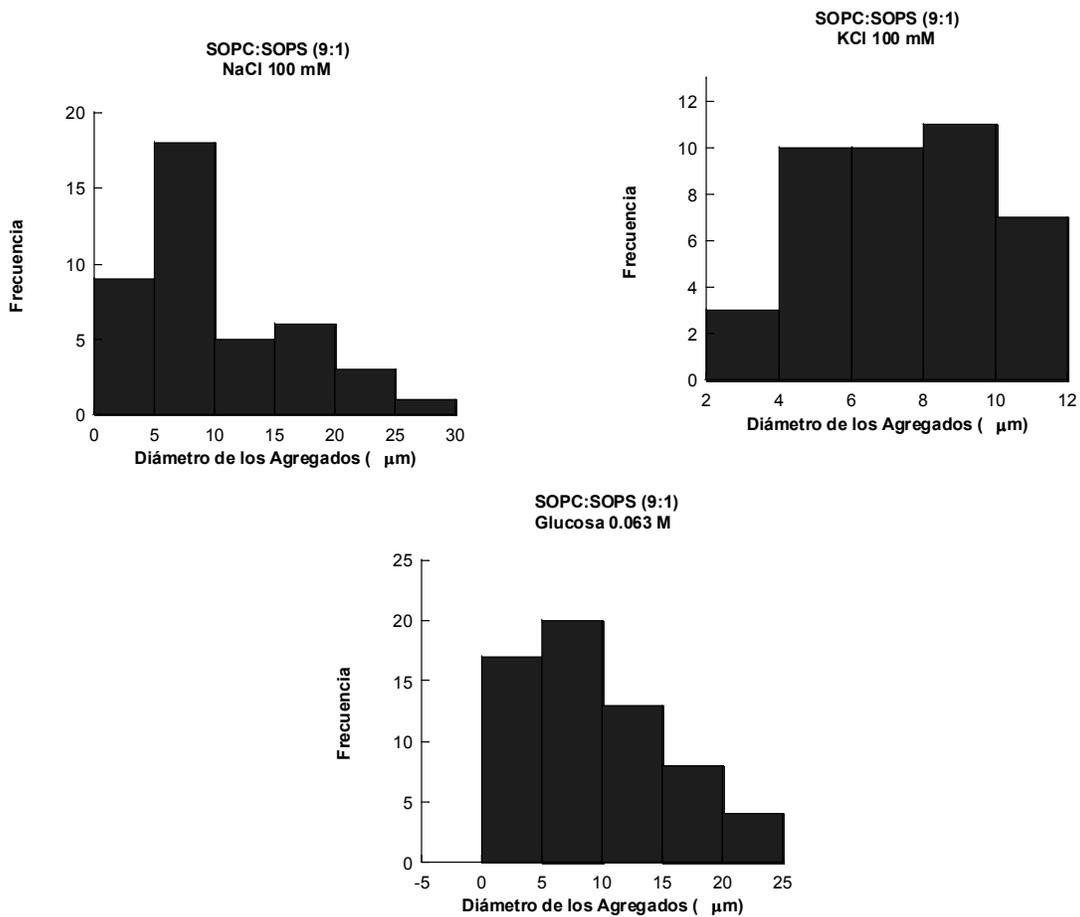


Figura 21.- Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopía óptica, para la proporción 9:1 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con NaCl y KCl 100 mM y glucosa 0.063 M.

b) Efecto de los iones divalentes

El efecto de los iones divalentes se resume en la tabla V. De manera general podemos afirmar que los iones divalentes provocan una disminución en la cantidad de agregados. A concentraciones milimolares mayores a 3 de MgCl_2 se observa que hay una disminución del orden del 60% y en 100 mM este es del

orden del 98%. En el caso del CaCl_2 la tendencia es similar que para el MgCl_2 con la diferencia de que a concentraciones milimolares mayores a 10 es donde se observa que la cantidad de agregados disminuye hasta en un 98% con respecto a las muestras preparadas sin sal.

Tabla IV. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales monovalentes (SOPC:SOPS 9:1). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de NaCl y KCl. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

Concentración salina (mM)	Cantidad de agregados		Diámetro de los agregados (μm)	
	NaCl	KCl	NaCl	KCl
Sin sal	62	62	9.5 ± 5.8	9.5 ± 5.8
1	30 -51%	30 -51%	7 ± 3.7	11 ± 5.4
3	42 -33%	29 -53%	16 ± 3.1	8 ± 4.6
10	40 -35%	5 -91%	11 ± 26.9	8.3 ± 1.7
30	35 -43%	46 -25%	15 ± 3.7	8.5 ± 3.9
100	42 -33%	41 -33%	8 ± 6.4	7 ± 2.4

En lo que se refiere al tamaño de las vesículas observadas, los experimentos indican que los iones divalentes sólo aumentan ligeramente el diámetro en 3 mM para ambas sales. Este aumento es del orden del 13% para el $MgCl_2$ y del 18% para el $CaCl_2$ y para el resto de las concentraciones los diámetros no presentaron un aumento con respecto a los liposomas obtenidos con las muestras sin sal.

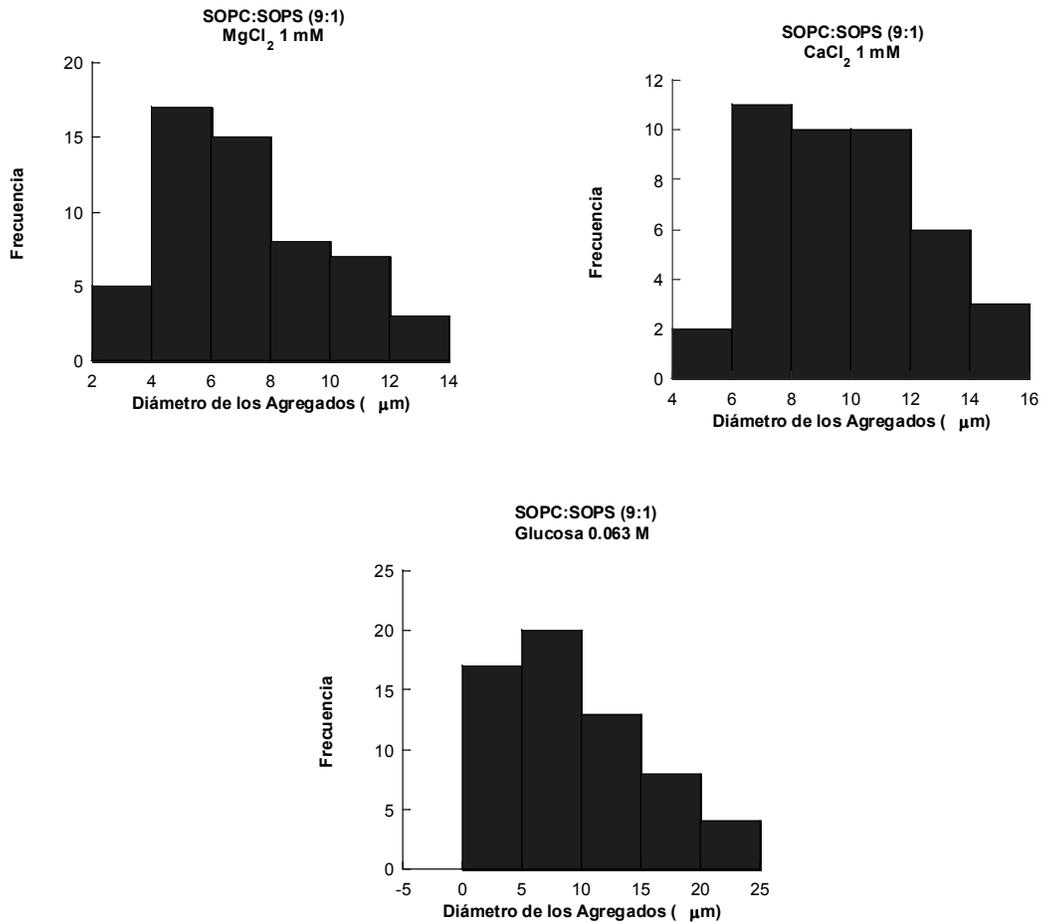


Figura 22.- Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 9:1 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con $CaCl_2$ y $MgCl_2$ 1 mM y glucosa 0.063 M.

En la figura 22 presentamos los histogramas de la población de agregados para las muestras preparadas con NaCl y KCl 100 mM, donde se observa que la tendencia no es muy similar entre ellos, pero al hacer la comparación con respecto al histograma obtenido con glucosa 0.063 M esta es similar al obtenido con NaCl 100 mM tanto en el diámetro donde se encontraron la mayor cantidad de agregados así como en el diámetro máximo de los liposomas obtenidos.

Tabla V. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales divalentes (SOPC:SOPS 9:1). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de MgCl₂ y CaCl₂. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

concentración salina (mM)	Cantidad de agregados		Diámetro de los agregados (μm)	
	MgCl ₂	CaCl ₂	MgCl ₂	CaCl ₂
Sin sal	62	62	9.5± 5.8	9.5± 5.8
1	55	42 -32%	7.2± 2.5	9.5± 2.6
3	19 -69%	48	8.2± 3.4	11.3± 4.2
10	0 -100%	1 -98%	0	2.23± 0
30	7 -88%	4 -93%	3.9± 0.8	5.8± 2.2
100	1 -98%	2 -96%	5.3± 0	5.2± 1.9

El efecto de las 4 sales sobre los agregados obtenidos para la proporción 9:1 puede apreciarse en la figura 23. Aunque el comportamiento no es completamente regular y se observan excepciones, en la figura se observa que los iones monovalentes aumentan la cantidad y el tamaño de los liposomas obtenidos. A medida que se aumenta la fuerza iónica los iones divalentes presentan una disminución muy marcada con respecto a la cantidad de vesículas obtenidas con NaCl y KCl, con respecto al tamaño de las vesículas este se observa constante a concentraciones milimolares menores a 10 de los iones monovalentes.

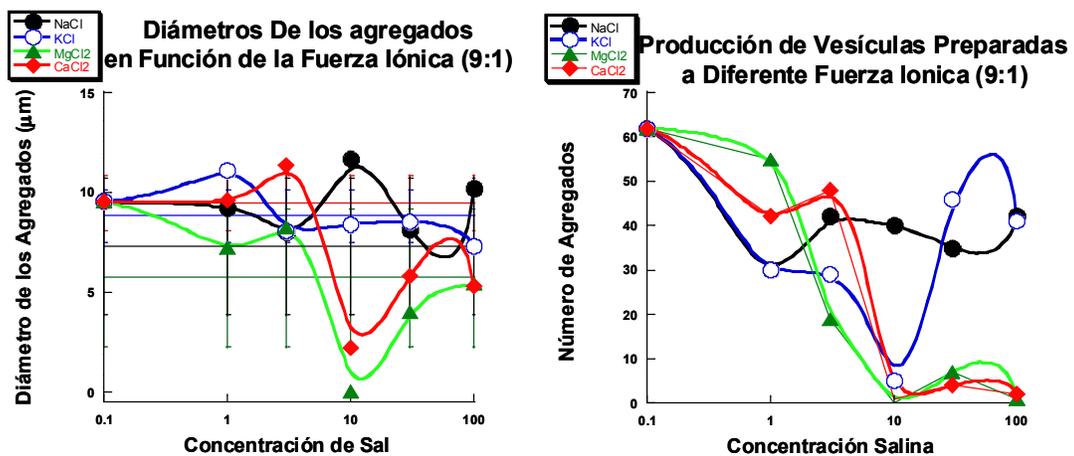


Figura 23.- Producción de vesículas y diámetro promedio de la agregados en función de la concentración salina, para las cuatro sales utilizadas en la proporción 9:1 SOPC:SOPS. Las líneas son sólo guías visuales.

Proporción 8:2 (SOPC:SOPS)

En esta proporción, las membranas están formadas por una mezcla de fosfolípidos, SOPC:SOPS, un fosfolípido neutro (SOPC) y uno cargado negativamente (SOPS).

b) Efecto de los iones monovalentes

El efecto de los iones monovalentes se resume en la tabla VI, aunque la tendencia no es regular, se puede decir que ambas sales presentan un aumento de agregados en 10 mM y el NaCl presentó la mayor cantidad de liposomas en 100 mM donde es del orden de +195%. Cabe decir que la excepción de esta tendencia es en 3 mM donde no se observaron agregados. En cuanto al KCl la mayor cantidad de liposomas se observaron en 10 mM donde el orden es del +43%, pero en 3 mM, al igual que NaCl, presentó una disminución más pronunciada del orden del -90%.

En lo que respecta al tamaño de las vesículas observadas, los iones monovalentes presentaron una disminución en el diámetro de los liposomas obtenidos siendo para 3 mM,, donde se encontraron los liposomas de menor diámetro (en esta concentración no se encontraron agregados para NaCl) del orden de -72% con respecto al blanco. No se observó una tendencia regular en lo que respecta al diámetro de los agregados, nunca se observaron liposomas con diámetros mayores a los obtenidos sin sal.

En la figura 24 se presentan los histogramas de la población de agregados para las muestras preparadas con NaCl y KCl en las concentraciones de 1 y 10 mM, la concentración de 1 mM en ambas sales presenta una tendencia similar, los histogramas reflejan un comportamiento similar en la frecuencia así como en

el diámetro máximo de los agregados obtenidos. Por otra parte, al hablar de las graficas obtenidas al hidratar las muestras con 10 mM de las sales se observa un comportamiento similar, sin embargo el diámetro mayor se observó con KCl 100 mM. Al comparar los 4 histogramas presentados con el de glucosa 0.063 M se observa una tendencia similar con las muestras obtenidas con las sales monovalentes a concentraciones milimolares de 10, esto se observa en la figura 24.

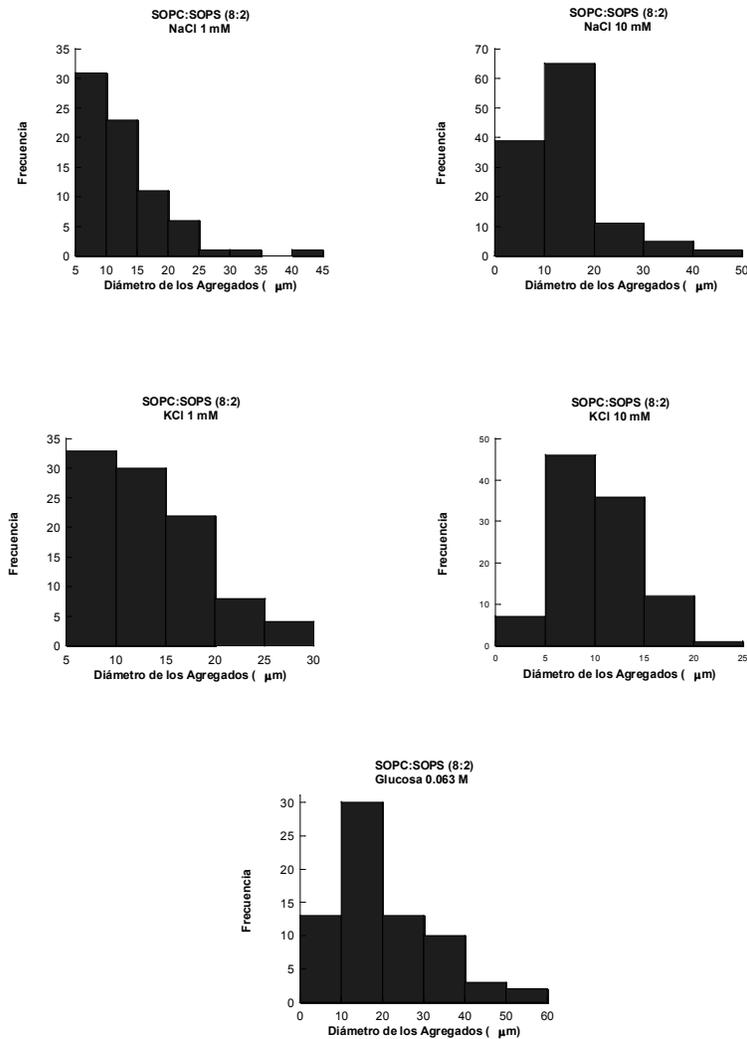


Figura 24.- Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 8:2 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con NaCl 1 y 10 mM y glucosa 0.063 M.

Tabla VI. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales monovalentes (SOPC:SOPS 8:2). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de NaCl y KCl. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

Concentración salina (mM)	Cantidad de agregados		Diámetro de los agregados (μm)	
	NaCl	KCl	NaCl	KCl
Sin sal	71	71	19.75 \pm 12.1	19.75 \pm 12.1
1	74	94 +32%	13 \pm 6.6	13 \pm 5.4
3	0 -100%	7 -90%	0	5.5 \pm
10	122 +71%	102 +43%	13.9 \pm 7.9	10.2 \pm 3.7
30	72	58 -18%	8.8 \pm 5.8	11.3 \pm 4.5
100	210 +195%	37 -47%	10.9 \pm 5.5	8.2 \pm 3.5

b) Efecto de los iones divalentes

El efecto de los iones divalentes se resume en la tabla VII. De manera general podemos afirmar que los iones divalentes reducen la cantidad de agregados significativamente hasta en un 80% en ambas sales y para el caso de MgCl₂ en 3 mM no presentó liposomas. La tendencia no es regular en ambas sales.

En cuanto al tamaño de las vesículas observadas, los experimentos indican que los iones divalentes no incrementan los diámetros de los liposomas en alguna concentración de sal utilizada.

Los iones divalentes en ninguna concentración aumentan la cantidad y diámetro de los liposomas obtenidos en esta proporción. En la figura 25 se observan liposomas obtenidos al hidratar con CaCl_2 1 mM y en la figura 26 se observa un liposoma hidratado con la solución de glucosa 0.063 M, sin sales, en la figura obtenida con glucosa e observa un liposoma de mayor tamaño al obtenido con la solución salina.

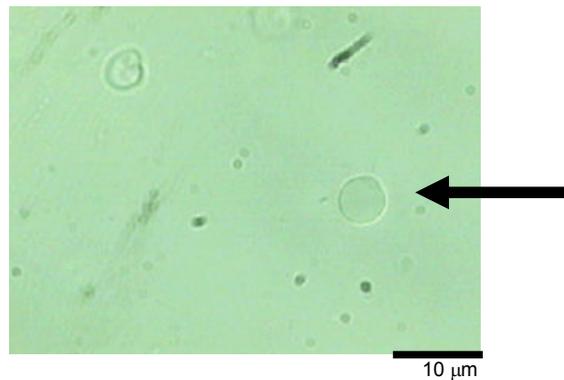


Figura 25.- Liposomas obtenidos al hidratar con CaCl_2 1 mM.

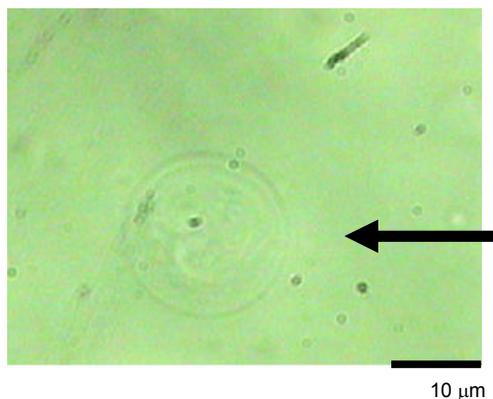


Figura 26.- Liposomas obtenidos al hidratar la mezcla de fosfolípidos SOPC:SOPS con glucosa 0.063 M, esto es, sin sales.

Tabla VII. Resumen de las observaciones de microscopía óptica para sales divalentes (SOPC:SOPS 8:2). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y $CaCl_2$. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

Concentración salina (mM)	Cantidad de agregados		Diámetro de los agregados (μm)	
	$MgCl_2$	$CaCl_2$	$MgCl_2$	$CaCl_2$
Sin sal	71	71	19±12	19±12
1	14	39 -45%	8±3.2	10±5
3	0	11	0	9±3.8
10	8	19	6.6±2.06	7±2
30	14	15	6.7±4.4	12±3.8
100	14 -80%	6 -91%	6.5±2.7	6±3.5

El efecto de las 4 sales sobre los agregados obtenidos para la proporción 8:2 puede apreciarse en la figura 27. Aunque el comportamiento no es completamente regular y se observan excepciones, en la figura se observa que los iones monovalentes incrementan la cantidad en todas las concentraciones de sal, con respecto al tamaño de los agregados obtenidos estos son mayores a

concentraciones milimolares de 1 y para el resto de las concentraciones los tamaños varían.

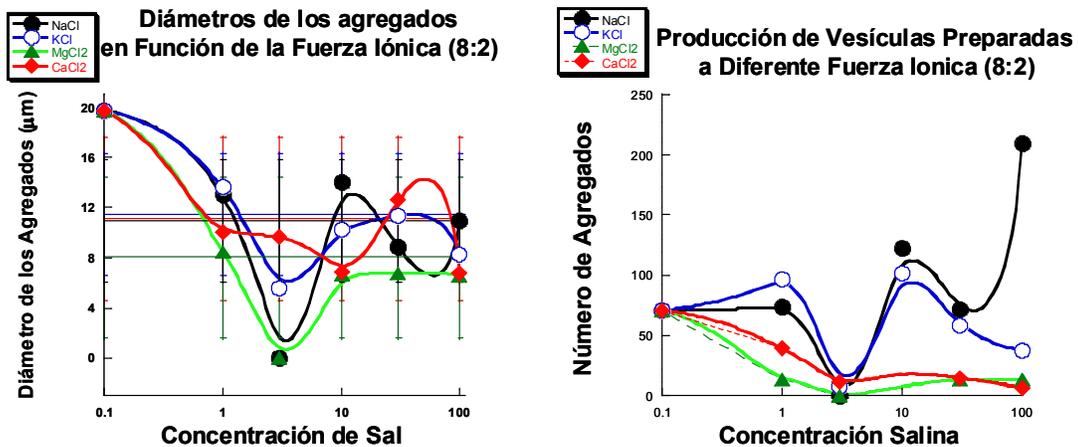


Figura 27.- Producción de vesículas y diámetro promedio de la agregados en función de la concentración salina, para las cuatro sales utilizadas para la proporción 8:2 de la mezcla SOPC:SOPS. Las líneas son sólo guías visuales.

Proporción 7:3 (SOPC:SOPS)

En esta proporción las membranas están formadas por una mezcla de fosfolípidos, fosfatidilcolina y fosfatidilserina en una proporción 7:3 respectivamente

a) Efecto de los iones monovalentes

El efecto de los iones monovalentes se resume en a tabla VIII. KCl no mostró agregados en alguna concentración de sal. Aunque no hay una tendencia regular, a grandes rasgos podemos decir que este tipo de iones hace que la cantidad de agregados observados disminuya, respecto a las mismas muestras

preparadas sin sal. En 3 y 30 mM de NaCl se observa un aumento más pronunciado de 22 hasta el 100%, sin embargo en 100 mM se encontraron liposomas en una cantidad menor del orden del 30% siendo esta la cantidad menor de vesículas.

En lo referente al tamaño de las vesículas, los experimentos indican que el NaCl en ninguna concentración proporcionó diámetros mayores al orden de 40% con respecto al blanco utilizado, a medida que se aumenta la fuerza iónica los diámetros disminuyen de 25 a 18 μm .

En la figura 28 se presentan los histogramas de la población de agregados para las muestras preparadas con NaCl 3 y 30 mM y glucosa 0.063 M, se observa una tendencia similar en los histogramas obtenidos en ambas concentraciones de sal con respecto al diámetro máximo así como en el diámetro donde se obtuvo la mayor cantidad de agregados. Por otra parte, al hacer la comparación con la gráfica obtenida con glucosa se observa que la tendencia es similar a la gráfica de NaCl 30 mM, haciendo referencia al diámetro máximo, se encontró ser mayor en la grafica de glucosa.

b) Efecto de los iones divalentes

El efecto de los iones divalentes se resume en la tabla IX. Se puede afirmar que los iones divalentes en ninguna concentración de sal aumentan la cantidad de agregados obtenidos, el caso particular del MgCl_2 a concentraciones milimolares menores a 30 no se observaron liposomas y en 100 mM, concentración donde si

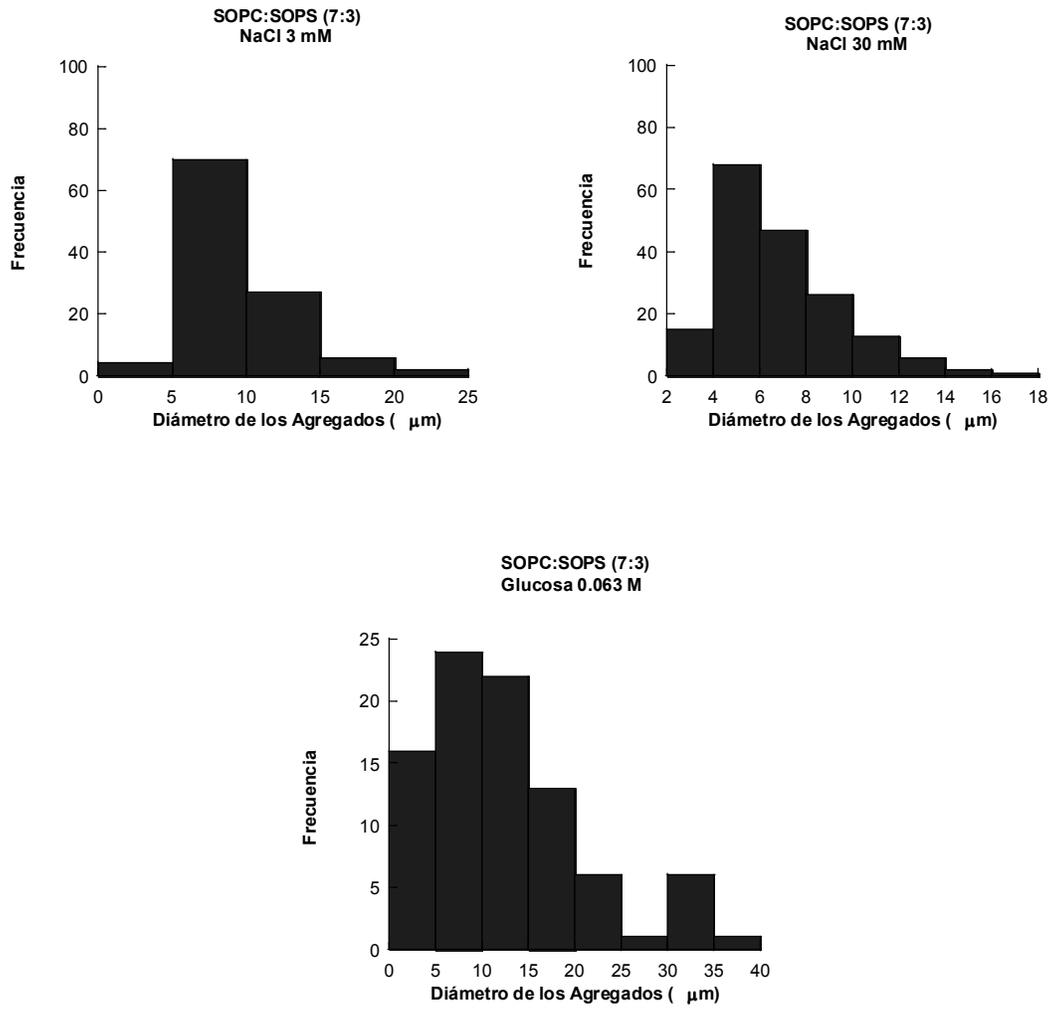


Figura 28.- Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 7:3 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con NaCl 3 y 30 mM así como glucosa 0.063 M.

Tabla VIII. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales monovalentes (SOPC:SOPS 7:3) KCl no se muestra. En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de NaCl (KCl no presentó resultados). En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

Concentración salina (mM)	Cantidad de agregados	Diámetro de los agregados (μm)
	NaCl	NaCl
Sin sal	89	40 \pm 8.3
1	69	25 \pm 3.8
3	109 +22%	25 \pm 3.5
10	70	20 \pm 3.7
30	178 +100%	18 \pm 2.6
100	56 -37%	18 \pm 2.8

se observaron agregados, este no superó la cantidad de liposomas obtenidos con el blanco, presentándose una disminución del orden del 26%. Por otra parte, el CaCl_2 si produjo liposomas en todas las concentraciones de sal utilizadas pero en ninguna fue mayor con respecto a las muestras hidratadas sin sal, esta sal provocó una disminución sistemática llegando a ser hasta del 94% en 1 y 10 mM.

En lo que respecta al tamaño de los agregados, los experimentos indican que en ningún caso el diámetro es mayor al de las muestras sin sal. En la siguiente figura 29 se observa la tendencia de los agregados obtenidos al hidratar con los iones divalentes, MgCl_2 y CaCl_2 100 y 3 mM, respectivamente. Se observa un comportamiento similar en ambas graficas, con respecto al blanco (glucosa 0.063 M), siendo el CaCl_2 3 mM donde se aprecia una tendencia muy similar, tanto en el diámetro de máxima producción de liposomas, como en el diámetro máximo.

El efecto de las 3 sales estudiadas sobre los agregados obtenidos para la proporción 7:3 puede apreciarse en la figura 30. Aunque el comportamiento no es completamente regular y se observan excepciones, en la figura se aprecia que la cantidad de agregados se incrementa con el ion monovalente sin embargo el tamaño de los liposomas se incrementa con CaCl_2 , esto se observa como un comportamiento regular en la cantidad de agregados obtenidos a concentraciones menores a 30 mM y con respecto al tamaño de las vesículas el comportamiento difiere marcadamente ya que no se presenta un comportamiento regular entre el NaCl y el CaCl_2 .

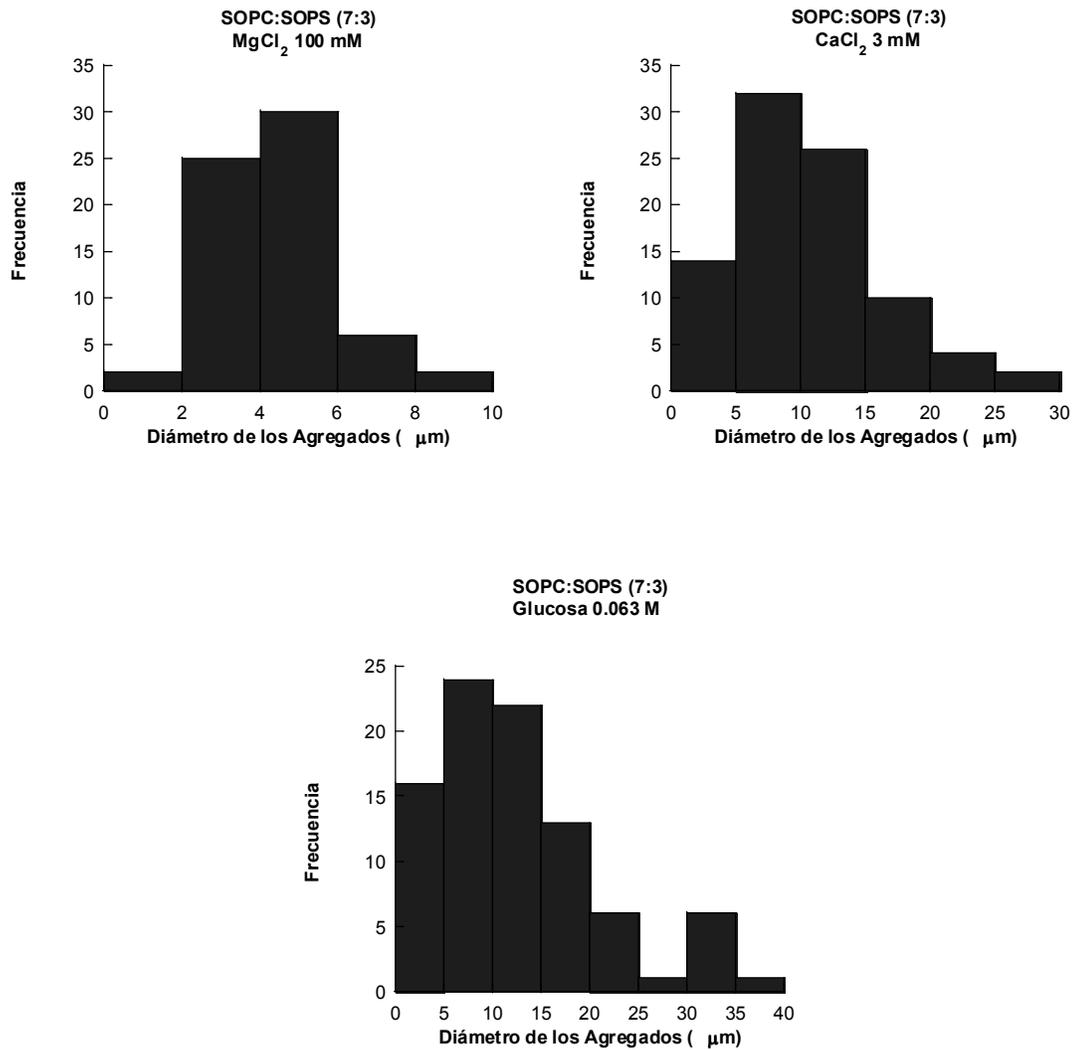


Figura 29.- Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 7:3 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con $MgCl_2$ y $CaCl_2$ 100 y 3 mM respectivamente y glucosa 0.063 M.

Tabla IX. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales divalentes (SOPC:SOPS 7:3). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de MgCl₂ y CaCl₂. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

Concentración salina(mM)	Cantidad de agregados		Diámetro de los agregados (µm)	
	MgCl ₂	CaCl ₂	MgCl ₂	CaCl ₂
Sin sal	89	89	40±8.3	40±8.3
1	0	5 -94%	0	21±6.8
3	0	88	0	26±5.4
10	0	5 -94%	0	11±2.4
30	0	11 -87%	0	28±7.8
100	65 -26%	12	10±1.5	13±3.2

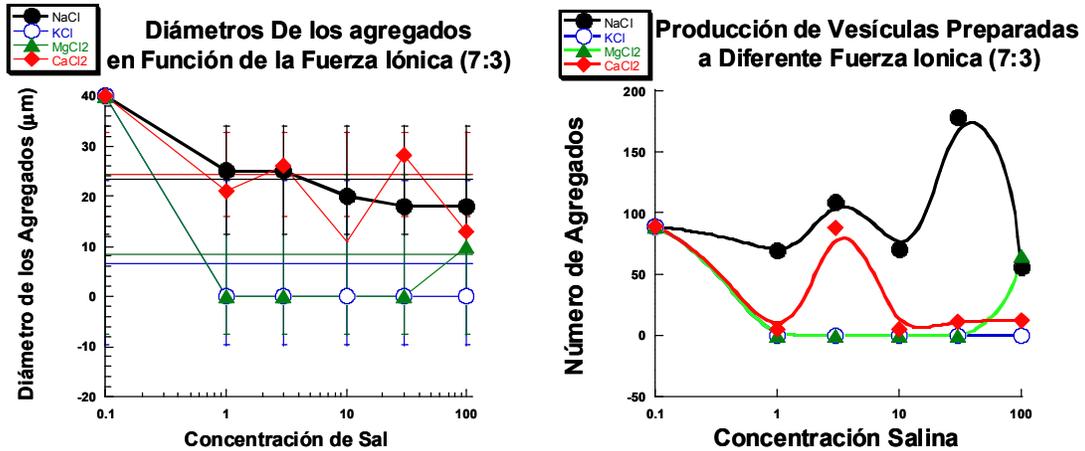


Figura 30.- Producción de vesículas y diámetro promedio de la agregados en función de la concentración salina, para las cuatro sales utilizadas en la proporción 7:3 SOPC:SOPS. Las líneas son sólo guías visuales.

Proporción 6:4 (SOPC:SOPS)

En esta proporción las membranas están formadas por una mezcla de fosfolípidos de (SOPC y SOPS).

a) Efecto de los iones monovalentes

El efecto de los iones monovalentes se resume en la tabla X. La muestra hidratada con glucosa 0.063 M, no produjo liposomas. En la tabla se observa que no existe una tendencia en lo que respecta a la producción de vesículas. En el mejor de los casos, esta fue de 523 liposomas, siendo la mayor cantidad de agregados observados mediante microscopía óptica. A concentraciones milimolares menores a 30 el NaCl superó en cantidad a los agregados obtenidos con KCl, sin embargo, a concentraciones milimolares mayores a 30 fue el KCl el

cual nos proporcionó agregados en mayor cantidad aun cuando esta diferencia no fue tan significativa como lo fue para NaCl.

En lo que respecta al diámetro de las vesículas, NaCl 1 mM fue donde se encontraron a los agregados de mayor tamaño y a concentraciones mayores que 1 mM la tendencia fue muy similar. En lo que respecta al KCl fue también para 1 mM de la sal donde se encontraron los diámetros mas grandes de agregados y para concentraciones mayores a 3 mM y hasta 30 mM la tendencia fue similar y para 100 mM se encontraron los liposomas de menor tamaño obtenidos al hidratar con iones monovalentes.

En la figura 31, se presentan los histogramas obtenidos de las muestras hidratadas con NaCl 1 y 10 mM y KCl 1 mM observadas mediante microscopia óptica en las figuras se observa una tendencia similar entre NaCl 10 mM y KCl 1mM, sin embargo el NaCl presenta una mayor producción de vesículas aún cuando el diámetro máximo es menor al obtenido KCl 1 mM, el diámetro donde se encontró la mayor cantidad de liposomas fue similar para ambas sales.

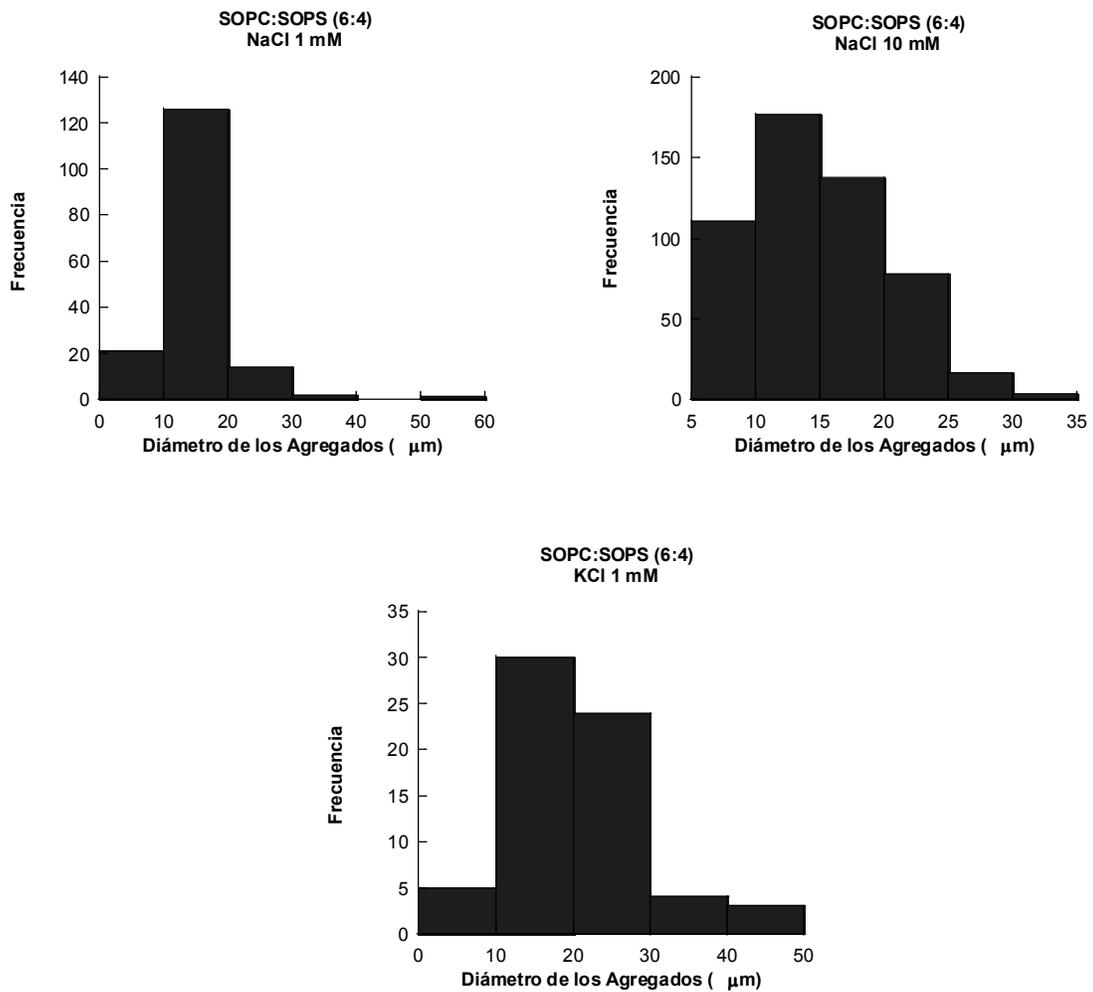


Figura 31.- Distribución de los diámetros de los liposomas medidos mediante microscopia óptica, para la proporción 6:4 de la mezcla de SOPC:SOPS hidratada con NaCl 1 y 10 mM y KCl 1 mM.

Tabla X. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales monovalentes (SOPC:SOPS 6:4). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de NaCl y KCl. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

Concentración salina (mM)	Cantidad de agregados		Diámetro de los agregados (μm)	
	NaCl	KCl	NaCl	KCl
Sin sal	0	0	0	0
1	164	66	60 \pm 5.6	50 \pm 9.1
3	55	23	30 \pm 4.8	25 \pm 5.7
10	523	26	35 \pm 5.3	23 \pm 5.2
30	78	194	40 \pm 5.8	25 \pm 2.7
100	136	141	25 \pm 1.6	12 \pm 1.6

b) Efecto de los iones divalentes

El efecto de los iones divalentes se resume en la tabla XI, el efecto sobre la mezcla de fosfolípidos fue muy similar en ambas sales, ya que estas presentaron un poco producción de agregados y en 1 mM de MgCl_2 y 3 mM (ambas sales) no se observaron liposomas, para concentraciones milimolares mayores a 10 si se observaron agregados, pero la tendencia no fue similar. A diferencia de los agregados obtenidos con las sales monovalentes, para esta proporción, la

diferencia en la cantidad de agregados obtenidos fue muy marcada. En lo que respecta al diámetro de las vesículas, este fue distinto siendo mayor para las muestras hidratadas con $MgCl_2$.

Tabla XI. Resumen de las observaciones de microscopia óptica para sales divalentes (SOPC:SOPS 6:4). En las columnas se muestran la cantidad de vesículas observadas, así como su diámetro promedio para las diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y $CaCl_2$. En los casos donde hubo variaciones significativas respecto a las muestras sin sal (disminución o aumento), se indican en la casilla correspondiente los valores porcentuales de dichas variaciones.

Concentración salina (mM)	Cantidad de agregados		Diámetro de los agregados (μm)	
	$MgCl_2$	$CaCl_2$	$MgCl_2$	$CaCl_2$
Sin sal	0	0	0	0
1	0	11	0	23±5.3
3	0	0	0	0
10	12	1	9±4.1	2±0
30	9	0	7±1.6	0
100	5	20	10±2.3	8±1.2

El efecto de las 4 sales sobre los agregados obtenidos para la proporción 6:4 puede apreciarse en la figura 32. En la figura se observa que los iones monovalentes incrementan la cantidad y el tamaño de los agregados obtenidos, esto es, el NaCl nos proporcionó la mayor cantidad de agregados obtenidos en todas las proporciones estudiadas, se observa en 30 mM el KCl presentó un incremento, sin embargo en ninguna de las concentraciones de sal los iones monovalentes superaron la cantidad de liposomas obtenidos. Por otra parte, al hablar del tamaño de los agregados, el comportamiento es muy similar al de la grafica de producción de vesículas, sólo que el diámetro máximo se obtuvo en 1 mM de NaCl, sin embargo, en ninguna concentración los iones divalentes presentaron tamaños mayores a los obtenidos al hidratar las muestras con soluciones que contenían iones monovalentes.

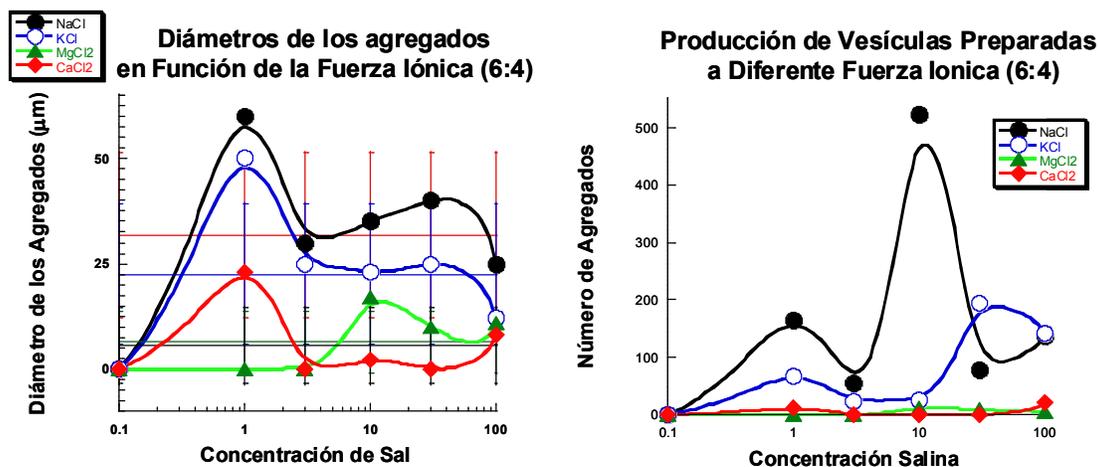


Figura 32.- Producción de vesículas y diámetro promedio de la agregados en función de la concentración salina, para las cuatro sales utilizadas en la proporción 6:4 SOPC:SOPS. Las líneas son sólo guías visuales.

Las muestras fueron preparadas utilizando soluciones salinas para hidratar las películas de lípido formado a partir de la mezcla de fosfolípido, esto con el fin de observar el efecto de la fuerza iónica sobre la población de vesículas obtenidas, tanto en forma como en cantidad.

La suspensión de liposomas fue diluida en un medio externo y examinado en el microscopio óptico invertido, se observaron liposomas gigantes con diámetros de micras, al igual que en la literatura estos liposomas gigantes se apreciaron circulares o levemente circulares (Akashi, 1996).

El efecto de los iones monovalentes sobre la población de agregados fue el de aumentar en la mayoría de las proporciones utilizadas, la cantidad y el tamaño de los liposomas, se menciona que en la mayoría y no en todas ya que el cambio en algunas de ellas es casi imperceptible y por lo tanto no se tomó como significativo. A pesar de su ubicuidad, lo que se conoce acerca de la interacción de los lípidos con los iones monovalentes es menos detallada (Böckmann, 2003).

Las vesículas multilamelares crecen en soluciones salinas que contienen iones monovalentes, esto es una indicación directa de que la sal modifica las interacciones entre las membranas vecinas (Petrache, 2006)

En presencia de agua, los fosfolípidos se organizan espontáneamente en estructuras esféricas, micelas cilíndricas, discos ó en bicapas y vesículas (McIntosh and Maguid, 1992). Las membranas biológicas se encuentran rodeadas de un buffer acuoso que contiene iones Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ó Cl^- con diferentes concentraciones en el medio extracelular e intracelular. Las interacciones electrostáticas entre el buffer iónico y las moléculas de lípido son cruciales para la fusión de la membrana, las transiciones de fase ó el transporte a través de la membrana (Böckmann, 2003). La adsorción de iones a las bicapas de fosfolípido

es regulada por muchos y diversos factores, como lo es la fuerza electrostática de largo alcance, la cual causa una acumulación de iones cerca de la capa de superficie de lípido.

En ninguna proporción estudiada se incrementó el tamaño de las vesículas con la adición de soluciones salinas que contenían iones divalentes, en comparación con los datos obtenidos de la observación al microscopio óptico de las muestras hidratadas con soluciones salinas que contenían iones monovalentes, tomando en cuenta que la mayor cantidad de lípido utilizado fue la fosfatidilcolina, que es un lípido neutro, a concentraciones milimolares menores a 30 los iones divalentes produjeron vesículas de menor tamaño que al utilizar iones monovalentes en las mismas concentraciones, de acuerdo a esto se puede decir que, según estudios realizados acerca de las medidas de fuerzas entre bicapas muestran que el CaCl_2 y el MgCl_2 introducen una fuerza repulsiva de largo alcance entre las membranas de fosfatidilcolina y la interacción neta se vuelve repulsiva a concentraciones entre 1 y 30 mM y la fuerza se hace mas pequeña a altas concentraciones indicando una naturaleza electrostática de la fuerza repulsiva (Akashi, 1998). El Ca^{+2} se une entre grupos cabeza de fosfatidilcolina en el plano de la membrana, disminuyendo el área por molécula y removiendo el agua de la región del grupo cabeza.

Como se mencionó anteriormente el fosfolípido más predominante en las mezclas utilizadas fue la fosfatidilcolina, lo cual indica según la literatura que la interacción con los iones divalentes no es tan marcada como para el caso de los fosfolípidos cargados negativamente como la fosfatidilserina que es el fosfolípido que se utilizó en menor cantidad, las bicapas formadas con fosfatidilserina crecen al ser hidratadas con soluciones que contienen cationes tal como Ca^{+2} ,

esto se explica en términos de que el Ca^{+2} se une al grupo fosfato impartiendo una carga neta positiva a la superficie de la bicapa y posteriormente agrega una presión repulsiva electrostática por otra parte se tiene conocimiento del efecto producido debido a la adición de cationes divalentes es el deshidratar las multicapas de fosfatidilserina.

El efecto de los iones divalentes sobre la mezcla de fosfolípidos utilizados en las 5 proporciones sólo nos produjo agregados de menor tamaño y en menor cantidad con respecto a los iones monovalentes. A concentraciones milimolares menores a 30 se observó que a medida que se aumentaba la concentración del fosfolípido cargado negativamente la cantidad de agregados obtenidos era menor al hidratar con MgCl_2 , mientras que al hidratar con CaCl_2 la cantidad de agregados fue variada, en la literatura se encuentra que las multicapas formadas a partir de fosfolípidos con una carga neta, tal como fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol ó fosfatidilserina crecen indefinidamente en soluciones de electrolitos monovalentes a concentraciones menores a 1 M, debido primeramente a la repulsión electrostática entre bicapas. El catión más estudiado es el calcio (Ca^{+2}), el cual se une al grupo fosfato de la fosfatidilserina, provocando que el agua se libere de entre las bicapas y de los grupos cabezas polares. la unión de este Ca^{+2} a la bicapa de fosfatidilserina produce una composición $\text{Ca}(\text{PS})_2$. Por otra parte el Mg^{+2} tiene un efecto similar deshidratante (McIntosh y Magid, 1992).

Los iones divalentes se pueden unir a fosfolípidos cargados negativamente tales como la fosfatidilserina (Cevc, 1998), interactúan fuertemente con los lípidos cargados, pero también lo hacen moderadamente con los lípidos neutros (Sabin, 2005; Böckmann, 2003) a bajas concentraciones cancelan la carga negativa y

disminuyen la repulsión, a concentraciones altas los iones contribuyen a la membrana cargada positivamente y la repulsión sobreviene se sugiere que a altas concentraciones la membrana adquiere una carga neta positiva y se repelen unas a otras (Akashi, 1998).

El cambio en la composición electrolítica del medio de dispersión conduce a determinadas variaciones en la estructura de la doble capa y se acompaña de intercambio iónica, o sea, transición de una parte de solución de una parte de los iones que antes se encontraban en la doble capa. El carácter de variación de la doble capa viene determinado por las propiedades de los iones contrarios y coiones añadidos a la disolución (Schukin, 1988).

Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

A continuación se describen los resultados experimentales de dispersión de luz, mediante esta técnica se estudian los agregados de tamaños más pequeños, así como el comportamiento temporal de las muestras.

Las vesículas unilamelares han sido objeto de una gran variedad de estudios experimentales esto debido a su importancia como sistemas modelo para emular procesos llevados a cabo en la célula (Pencer, 2001).

Las vesículas son caracterizadas mediante DLS para obtener información sobre el tamaño, la cual es interpretada asumiendo que las vesículas son esféricas. Las medidas de dispersión dinámica de luz de vesículas polidispersas usualmente son analizadas en términos de los momentos de la distribución de tamaños para obtener el tamaño promedio de las vesículas (Pencer, 2003). Los

experimentos de DLS se llevaron a cabo como se describe en la estrategia experimental. Las muestras fueron analizadas en ángulos de 30 a 120 grados. Se realizó un análisis temporal mediante dispersión dinámica de luz a las muestras que contenían liposomas de la mezcla de fosfolípidos, aquí se muestran los resultados para las corridas realizadas en un ángulo de 90 grados, se presentan 5 figuras donde se puede observar una tendencia similar en lo referente a los radios hidrodinámicos obtenidos en la evolución del experimento

Se realizaron lecturas en DLS para obtener datos necesarios que pudiéramos utilizar para conocer los radios hidrodinámicos y coeficientes de difusión de las mezclas de fosfolípidos preparadas. Todas las figuras siguientes corresponden al análisis realizado a la muestra m4, la cual contenía SOPC:SOPS en la proporción 10:0 hidratada con glucosa a 90° en 5 corridas de 30 segundos cada una. La diferencia entre las figuras presentadas es el tiempo en el que fueron tomados los datos. En la figura 33-A se observan 3 poblaciones de liposomas en 10 nm, 100 nm y encontrándose la de mayor tamaño en $\approx 1 \times 10^3$ nm ($\approx 1 \mu\text{m}$). En la figura 33-B se observan nuevamente 3 poblaciones de agregados sólo que en esta figura el pico de menor tamaño se desplazó de 10 nm a ≈ 5 nm y el pico que se encuentra en 100 nm aumento altura y aún continua siendo el radio mayor en $\approx 1 \times 10^3$ nm. Para 33-C, se observa un comportamiento similar que en 33-B sólo que el pico de 100 nm es menor que en la figura anterior y la amplitud del pico encontrado en $\approx 1 \times 10^3$ nm es mayor, la siguiente figura (33-D) presenta un comportamiento similar que 33-C la diferencia más marcada es que el pico de mayor amplitud se encuentra hasta 1×10^6 nm.

En la figura 33-E se pueden observar 4 picos, uno localizado en 10 nm, otro entre 10 y 100 nm, el pico que se había estado observando en 100 nm y el

que habíamos encontrado en $\approx 1 \times 10^3$ nm, pero ahora la diferencia con la figura anterior es que la amplitud es menor. Esto puede indicar que se está llevando a cabo una agregación debido a la formación espontánea de los liposomas ya que la amplitud del pico donde se encuentran los liposomas de mayor tamaño aumenta a medida que pasa el tiempo y ya en la última corrida este regresa de nuevo a la amplitud encontrada en las dos primeras figuras pero con la diferencia de que ahora se tiene una población de agregados en un radio intermedio (entre 10 y 100 nm) entre las 3 poblaciones encontradas durante el experimento. Mediante DLS se pueden obtener datos que nos indican que en la muestra se tienen agregados de menor tamaño a los observados mediante microscopia óptica, ya que los agregados obtenidos en DLS son del orden de nanómetros.

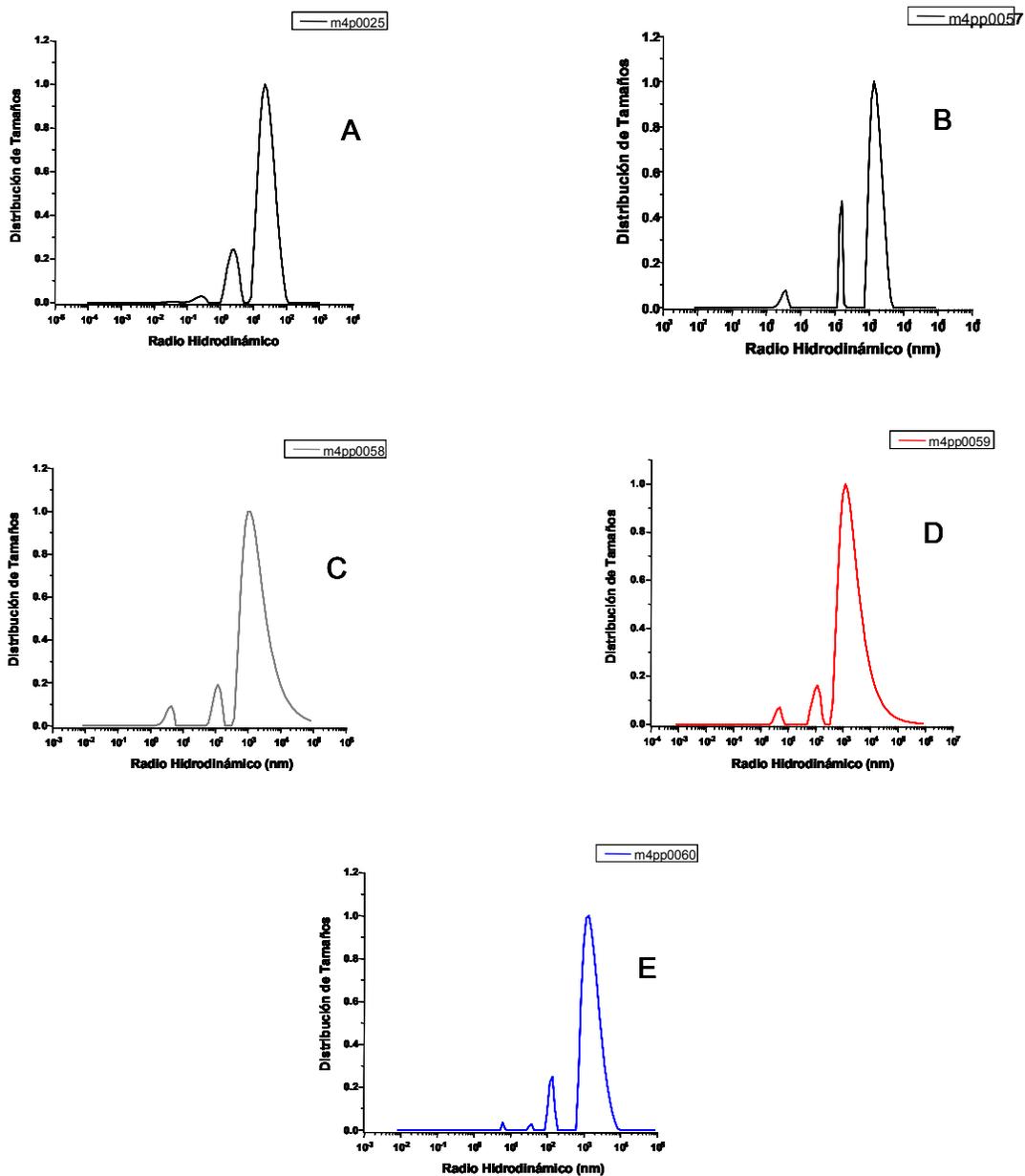


Figura 33.- Gráficas de DLS donde se muestran 5 etapas (A - E) del análisis temporal para la muestra m4. Se observa que existe un incremento en la distribución de tamaños en C y D (90-120 seg) el cual tiende a disminuir en E.

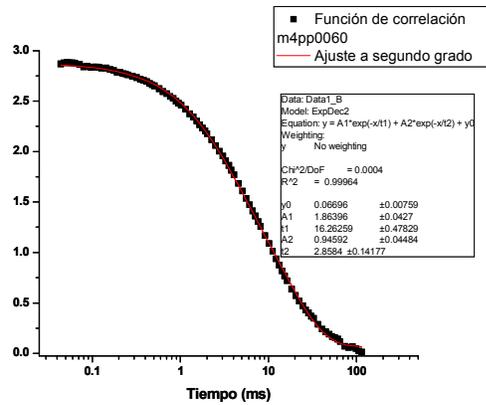
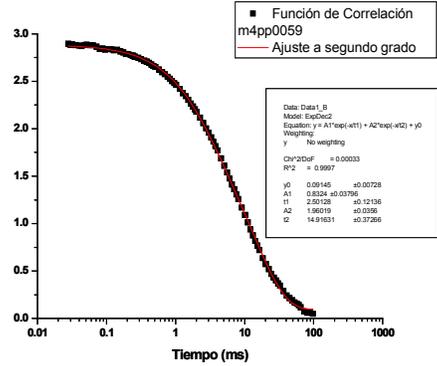
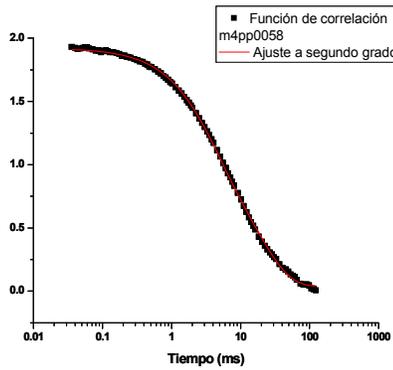
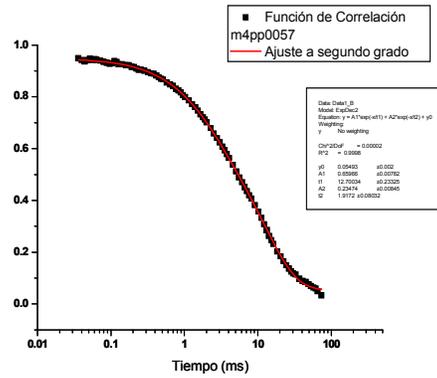
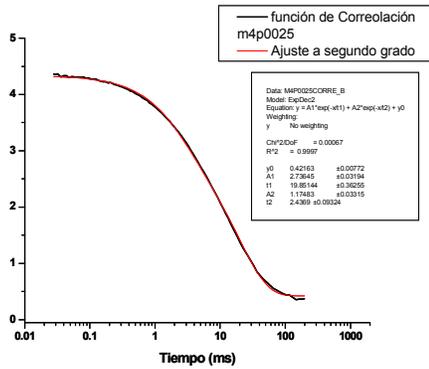


Figura 34.- Funciones de correlación obtenidas mediante DLS para la muestra m4 donde se aprecia un decaimiento a tiempos mayores a 100 ms. Se observa que no existe homogeneidad en las intensidades obtenidas.

En la figura anterior (Figura 34) se muestran las funciones típicas de correlación obtenidas con las muestras m4 a 90°. Estas funciones reflejan la dinámica microscópica de las muestras. Todas son curvas decrecientes que se ajustan bastante bien a dobles exponenciales, lo cual indica dos tiempos de decaimiento en el sistema. En la misma figura se muestran los ajustes teóricos realizados con estas funciones. Los tiempos de decaimiento mayores para cada muestra son del orden de 100 ms. A partir de las funciones de correlación se puede obtener la población de tamaños de los agregados presentes en solución.

Se realizó el mismo análisis descrito previamente para la muestra m29, la cual contenía SOPC:SOPS en proporción 10:0 la cual fue hidratada con KCl 3 mM, para obtener los valores de radios hidrodinámicos y coeficientes de difusión. En la figura 35 se muestran dos picos el primero localizado de 19 a 22 nm y el segundo de 99 a 3161 nm, esto está mostrando dos poblaciones de liposomas de distinto tamaño siendo mayor para el segundo pico. En la siguiente figura (35-B) se observa un pico localizado entre 31.61 y 8481 nm, esto puede sugerir que se está llevando a cabo una agregación de vesículas ya que en la figura siguiente (35-C) se observan 2 picos al igual que en la figura 35-A pero con la diferencia de que el primero presenta agregados de menor tamaño ya que estos se encuentran entre 1.9 y 4.3 nm y en el siguiente pico se observa que la población se encuentra entre 11 y 8483 nm, siguiendo con el análisis de las figuras se observa que para 35-D se obtuvieron 2 picos el primero localizado entre 0.6 a 7.1 nm y el segundo pico entre 16.3 a 3.163×10^4 nm, a diferencia de la figura 35-C el pico número 1 se encuentra desplazado hacia un valor menor de radio hidrodinámico al igual que el pico 2. En lo que respecta a la figura 35-E se encontraron 2 picos el primero

localizado en 0.5 a 5.18 nm y el segundo pico se encontró entre 26.84 y 1.179 x 10⁴ nm.

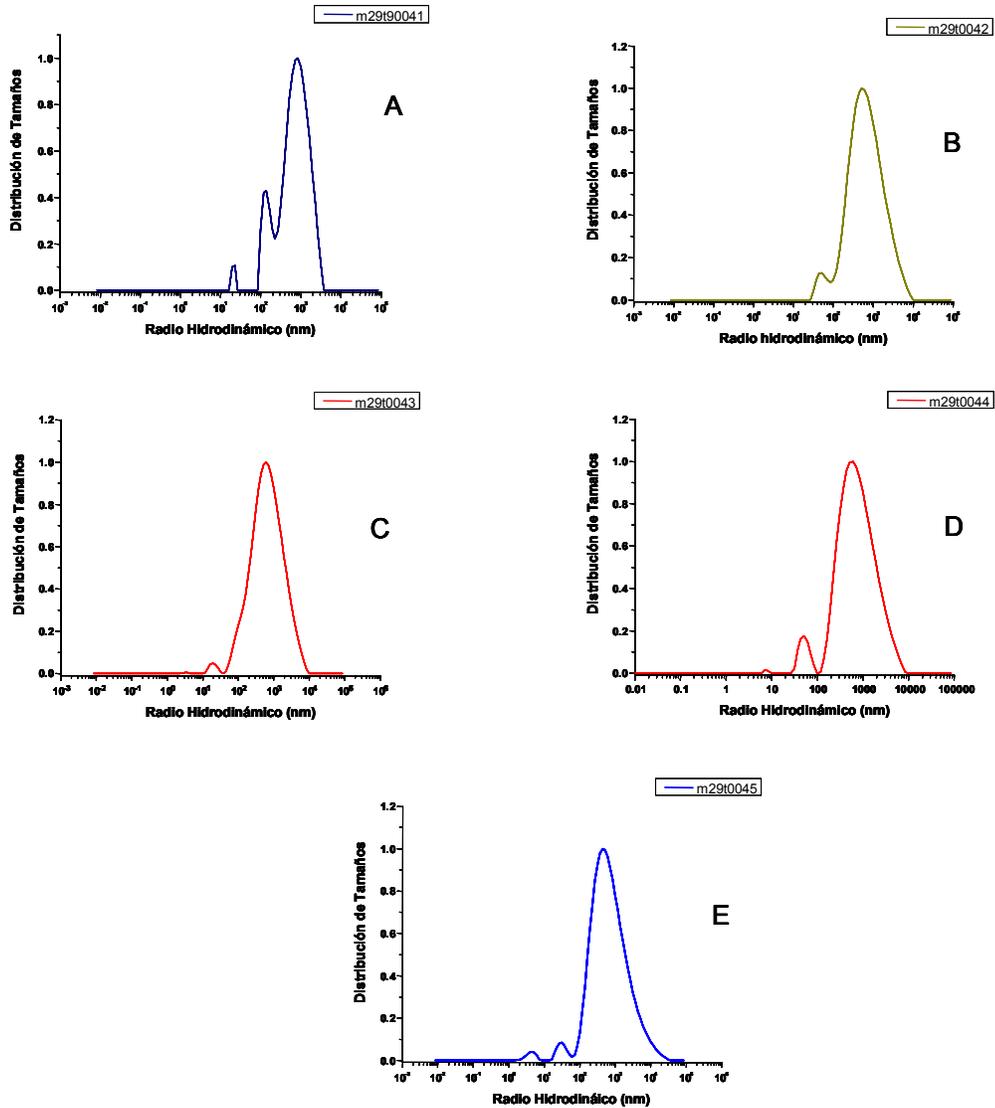


Figura 35.- Gráficas de DLS donde se muestran 5 etapas (A - E) del análisis temporal para la muestra m29 donde se observa el cambio en radio hidrodinámico. Se observa un incremento en la distribución de tamaños en E.

En lo que respecta a los coeficientes de difusión obtenidos de las lecturas mediante DLS se observa que estos no se modifican apreciablemente al cambiar el ángulo, esto significa que el proceso es difusivo. En la siguiente figura (Figura 36) se presentan los coeficientes de difusión en función del ángulo.

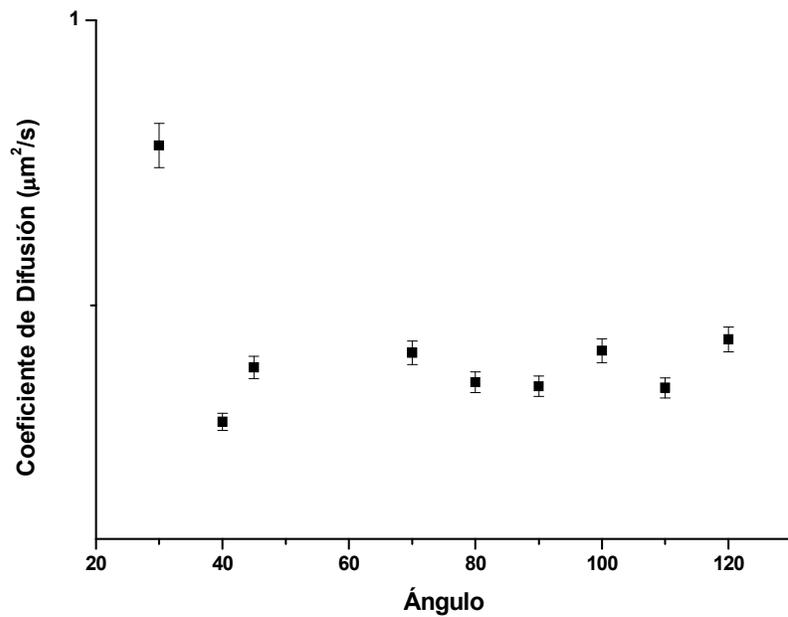


Figura 36- En esta figura se observa como cambia el coeficiente de difusión a medida que cambia el ángulo de la muestra m29 medido mediante dispersión de luz.

En la Figura 37 se muestran los radios hidrodinámicos en función del ángulo

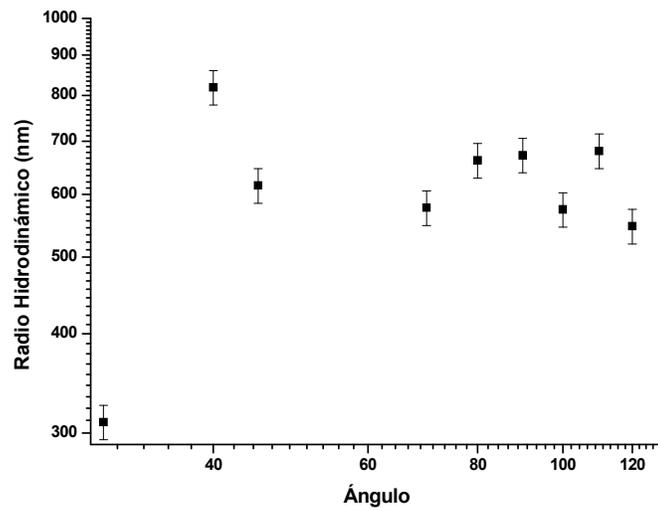


Figura 37.- En esta figura se observa como cambia el radio hidrodinámico a medida que cambia el ángulo de la muestra m29 medido mediante dispersión de luz.

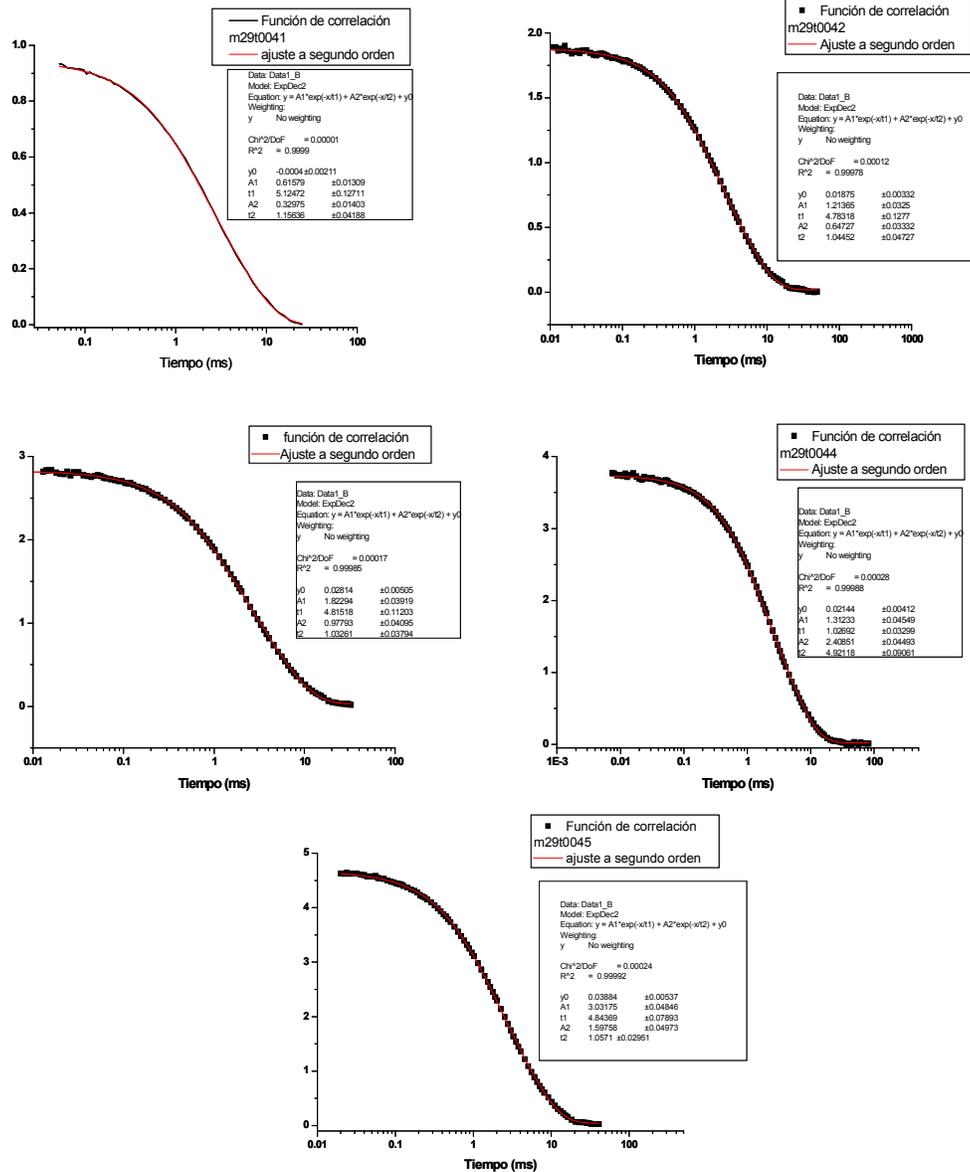


Figura 38.- Funciones de correlación obtenidas mediante DLS para la muestra m29 donde se aprecia un decaimiento a tiempos mayores a 10 ms.

Al igual que para m4, se muestran las funciones de correlación obtenidas al realizar los experimentos de DLS para la muestra m29 donde en la figura 38 se muestran las funciones típicas de correlación obtenidas con las muestras ya

mencionada a 90° . Estas funciones reflejan la dinámica microscópica de las muestras. Al igual que para m4 la muestra m29 presenta un comportamiento decreciente donde se observa que se ajustan bastante bien a dobles exponenciales, lo anterior indica que existen dos tiempos de decaimiento en el sistema. Se presentan los ajustes teóricos realizados con estas funciones. Los tiempos de decaimiento mayores para cada muestra son del orden de 10 ms. A partir de las funciones de correlación se puede obtener la población de tamaños de los agregados presentes en solución. En la siguiente figura se observa como cambia el coeficiente de difusión de la muestra m4 a medida que se cambia el ángulo. De 30 a 100 grados se observa un comportamiento constante, indicando un comportamiento difusivo, salvo para 110° (Figura 39)

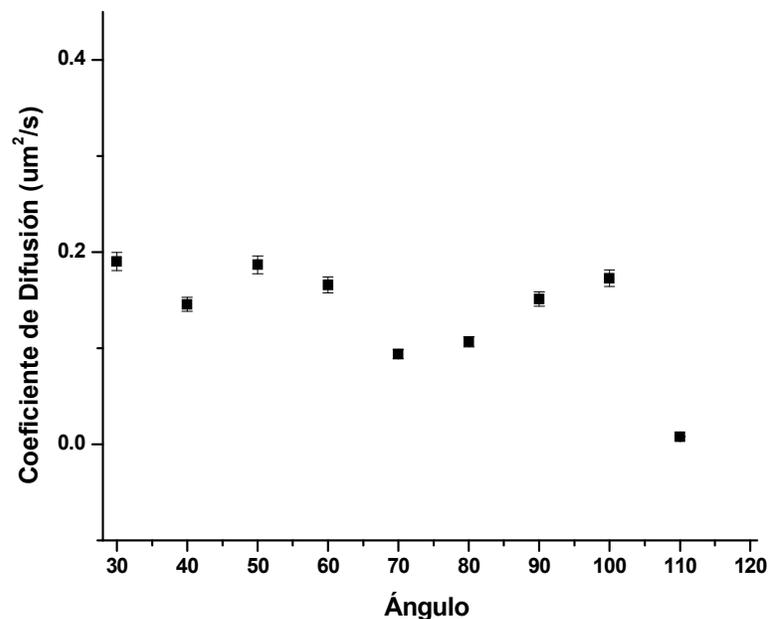


Figura 39.- En esta figura se observa como cambia el coeficiente de difusión a medida que cambia el ángulo de la muestra m4 medido mediante dispersión de luz.

En la tabla XII se muestran los resultados de radio hidrodinámico y coeficientes de difusión para la muestra m4 a diferentes ángulos, donde se observa que estos valores no presentan un comportamiento lineal como en el caso de los resultados presentados anteriormente.

Tabla XII.- En esta tabla se presentan los promedios de coeficiente de difusión y radio hidrodinámico para los ángulos de 40 a 110 en los que se llevaron a cabo las mediciones en DLS para la muestra m4. Se realizaron 5 corridas de 30 segundos cada una.

Ángulo	Radio Hidrodinámico (nm)	Coefficiente de Difusión ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
40	1.4309E+003	0.16907
50	1.5653E+003	0.15426
60	5.3375E+004	0.00453
70	1.3778E+003	0.17488
80	2.5097E+003	0.09617
90	2.3985E+003	0.10068
100	1.5988E+003	0.15034
110	3.5509E+003	0.06788

El análisis temporal de las muestras que contenían liposomas se llevó a cabo mediante DLS, se realizó una corrida a 90° con una duración de 120 segundos, en la distribución de tamaños obtenida se encontró un pico entre 50 nm y 6.004×10^4 nm (Figura 40-A), pasados 60 minutos se llevó a cabo otra corrida (Figura 40-B) durante 20 segundos, donde se observan de nuevo 2 picos de distribución de tamaños, el primero de ellos localizado entre 43.23 nm y 70.81 nm y el segundo pico entre 161.2 nm y 1.367×10^4 nm. 120 minutos después de la primera corrida se obtuvo de nuevo una distribución de tamaños, donde se encontró un solo pico localizado entre 36.59 nm y 1.608×10^4 nm, esta lectura fue durante 40 segundos (Figura 40-C). En la figura 33-D se encontró un pico localizado entre 60.02 nm y 7.075×10^4 nm, esta corrida se llevó a cabo 180 minutos después y la lectura se realizó durante 60 segundos. En la figura 40-E, se observa que después de 210 minutos después de la primera corrida, se observa de nuevo un solo pico localizado entre 60.17 nm y 8.360×10^4 nm, esta lectura se realizó durante 20 segundos. Los radios hidrodinámicos observados en los paneles anteriores difieren marcadamente entre ellos a diferencia de las distribuciones de tamaño obtenidas anteriormente (Figuras 33 y 35). En la siguiente tabla, se muestra un resumen de radios hidrodinámicos y coeficientes de difusión de las muestras analizadas en el tiempo, como se mostró en las graficas de distribución de tamaños, los liposomas no muestran valores constantes al cambiar en el tiempo.

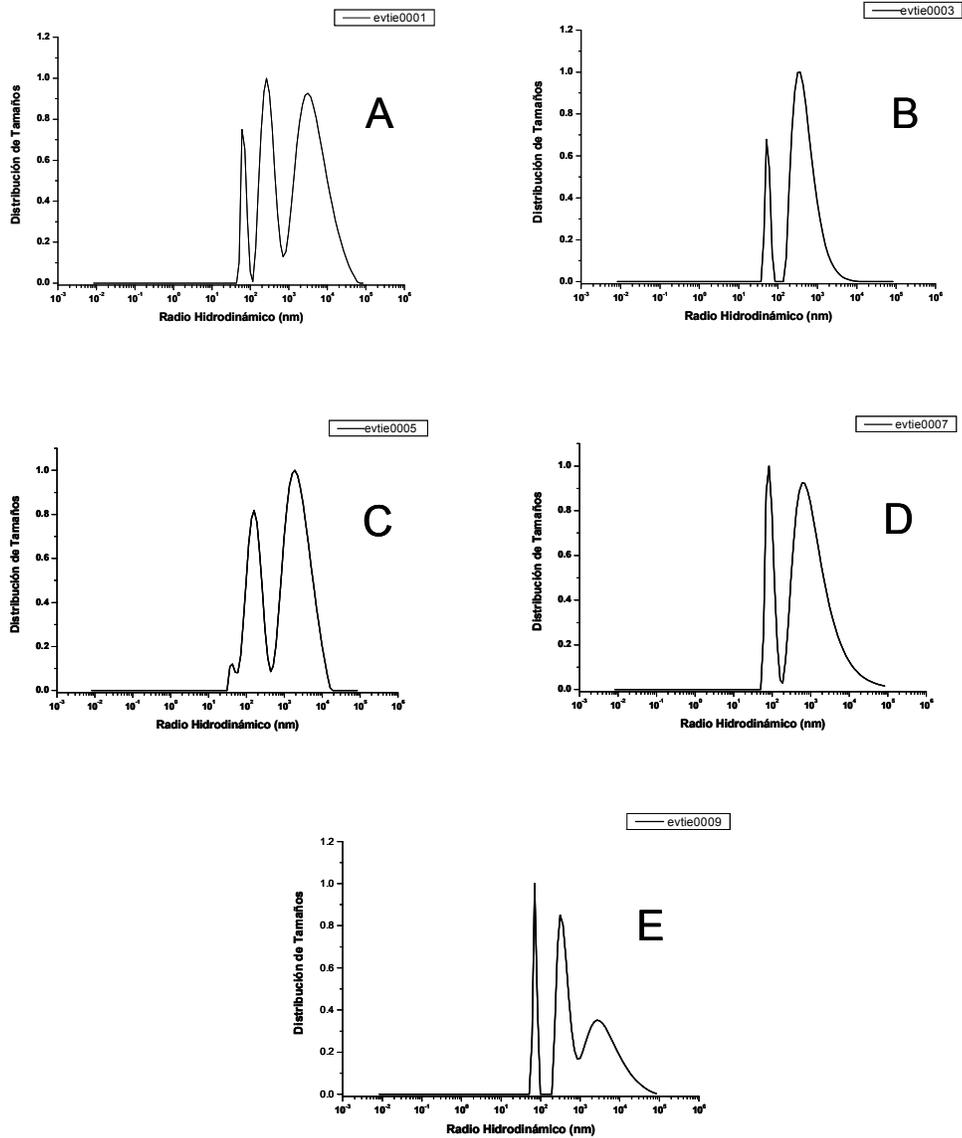


Figura 40.- Se presentan 5 graficas de distribución de tamaños en el análisis en el tiempo llevado a cabo mediante DLS, en la figuras obtenidas se observa que la distribución de tamaños no es constante en el tiempo. Las lecturas se llevaron a cabo cada 30 minutos, aquí se presentan cada 60 min.

En análisis temporal se realizó a 90° y al igual que para m4 y m29, se muestran las funciones de correlación obtenidas al realizar los experimentos de DLS en la figura 41 se muestran las funciones típicas de correlación obtenidas. Estas funciones reflejan la dinámica microscópica de las muestras. Se observa un comportamiento decreciente donde se observa que se ajustan bastante bien a dobles exponenciales, deduciendo de esto que existen dos tiempos de decaimiento en el sistema. Se presentan los ajustes teóricos realizados con estas funciones. Los tiempos de decaimiento mayores para cada muestra varían entre 10 ms y 100 ms. A partir de las funciones de correlación se puede obtener la población de tamaños de los agregados presentes en solución

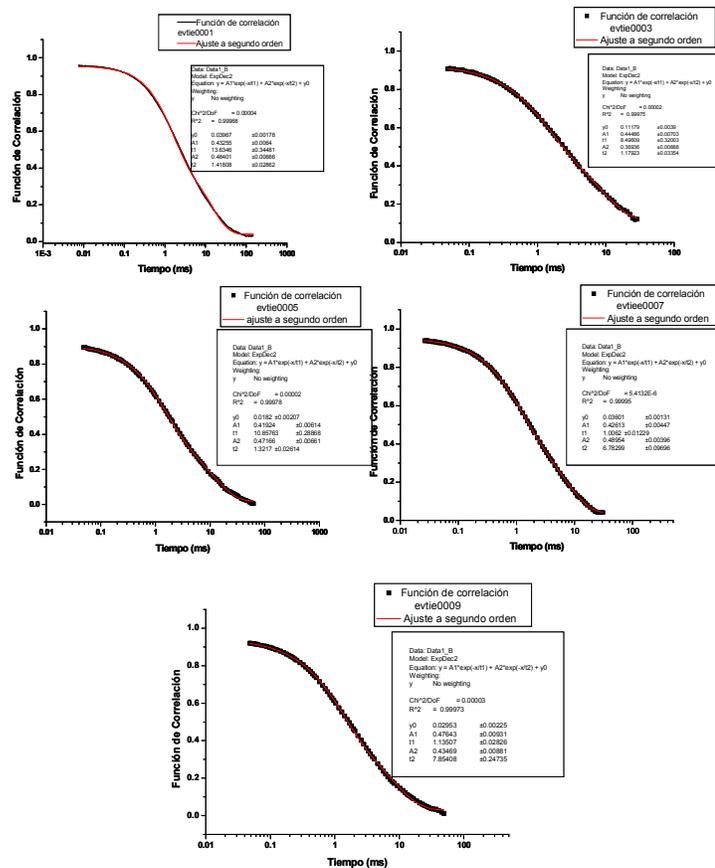


Figura 41.- Funciones de correlación obtenidas mediante DLS para la muestra evtie donde se aprecia un decaimiento entre 10 y 100 ms.

Tabla XIII.- Promedios de coeficiente de difusión y radio hidrodinámico en el tiempo medidos a 90°.

Tiempo (min)	Radio Hidrodinámico (nm)	Coefficiente de Difusión ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)
0	1838.2	1.3193E-001
60	1996.3	1.2156E-001
120	990.37	2.4441E-001
180	783.16	3.0959E-001
240	1099.5	2.2104E-001

Microscopia Electrónica de Transmisión Mediante la Técnica de Criofractura

Las muestras se prepararon como se describe en materiales y métodos. Las replicas obtenidas mediante la técnica de criofractura fueron colocadas en el TEM para amplificar la imagen y obtener las fotografías donde se observan liposomas. En las siguientes figuras se muestran micrografías donde se observa la presencia de liposomas. En la primera micrografía se observa un agregado de menor tamaño a los observados en el microscopio óptico de aproximadamente 133 nm de diámetro, los tamaños observados en la micrografía (Figura 42) para las vesículas que se encuentran rodeando a la vesícula de mayor tamaño son del orden de 15 nm.

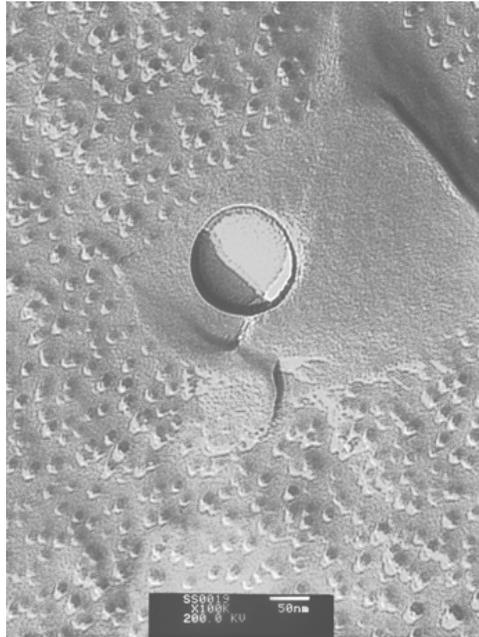


Figura 42- Micrografía obtenida mediante FFEM donde se observa un liposoma de aproximadamente 10 nm de diámetro. La observación se llevó a cabo a 100 K. La barra es de 50 nm.

Las muestras observadas mediante FFEM indican que existen agregados de menor tamaño los observado mediante microscopia óptica, en las figura 43 se aprecia un agregado lipídico de aproximadamente 400 nm de diámetro, siendo este el liposoma de mayor tamaño obtenido mediante FFEM y alrededor de la vesícula cortada se observan liposomas de menor tamaño, las cuales al ser medidas utilizando el software Scion Image estas nos dan un diámetro de aproximadamente 20 nm.

Los experimentos realizados con FFEM indican que en las muestras preparadas con mezclas de fosfolípidos y posteriormente hidratadas con sales nos presentan agregados de menor tamaño a los observados en microscopia óptica y DLS, esto debido a la resolución del microscopio electrónico de transmisión.

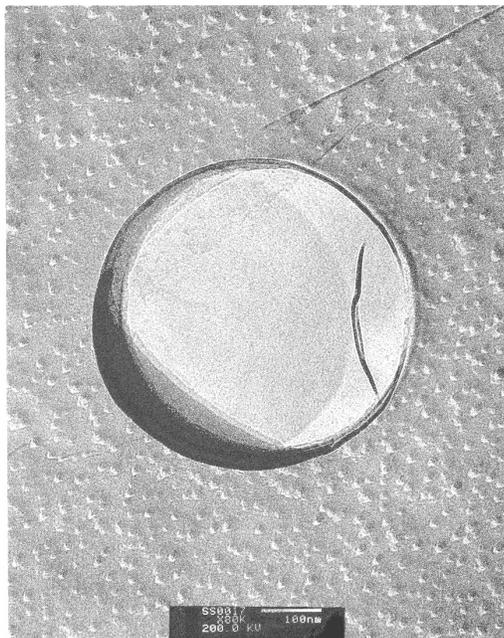


Figura 43.- Micrografía obtenida mediante FFEM donde se observa un liposoma de aproximadamente 400 nm. La imagen fue amplificada a 80 K. La barra es de 100 nm.

CONCLUSIONES

En este trabajo se utilizaron 3 técnicas experimentales para estudiar el efecto de sales en bicapas de fosfolípidos, cada una por su parte proporciona información sobre el sistema que se está estudiando, en el microscopio óptico se observan liposomas de diámetros mayores a $5\ \mu\text{m}$, sin embargo mediante otras técnicas experimentales estos agregados pueden ser cuantificados con metodologías que incluyan equipo de mayor resolución a nivel nanométrico, existe una relación entre ellas ya que podemos correlacionar datos como lo es la distribución de tamaños, en microscopía óptica, DLS y FFEM ya que se pueden observar tamaños del orden de micras a nanómetros, lo cual nos indica que en nuestra muestra se encuentra una gran distribución de tamaños pero que no podría ser determinada sin el auxilio de estas técnicas.

El efecto de las sales en bicapas de mezclas de fosfolípidos se pudo observar de manera más clara en los datos obtenidos de microscopía óptica ya que se pudo monitorear el cambio en forma y tamaño observando y midiendo los radios de los liposomas directamente, con el auxilio de un software, sin embargo mediante DLS se observó el cambio en tamaño y el coeficiente de difusión de los liposomas a diferente ángulo y en diferente tiempo, en una escala menor a la proporcionada por el microscopio óptico, en el mejor de los casos las gráficas de distribución de tamaños no presentaron cambios significativos al igual que los coeficientes de difusión.

Por último en los experimentos de FFEM se obtuvieron micrografías donde se observan liposomas esféricos del orden de nanómetros, que no pudieran haber sido observados en el microscopio óptico sin embargo estos agregados

nanométricos también se reflejan en las graficas de distribución de tamaños obtenidas mediante DLS, ya que mediante esta técnica experimental se obtuvieron distribuciones de tamaño de 10^1 - 10^5 nm lo que nos proporciona el amplio rango de tamaños obtenidos en las 3 técnicas utilizadas.

En este trabajo los iones monovalentes así como los iones divalentes disminuyeron la cantidad de agregados respecto a las mismas muestras preparadas sin sal en el solvente (sólo glucosa 0.063 M). En cuanto al tamaño de las vesículas observadas, los experimentos indican que el efecto de los iones divalentes y monovalentes no presenta un comportamiento regular. Los liposomas de menor tamaño fueron encontrados al utilizar iones divalentes a concentraciones menores a 30 en comparación con los agregados obtenidos con iones monovalentes, debido a que el CaCl_2 y el MgCl_2 introducen una fuerza repulsiva de largo alcance entre las membranas de fosfatidilcolina. Al disminuir la concentración de fosfatidilcolina la cantidad de agregados obtenidos fue menor al hidratar con MgCl_2 mientras que al hidratar con CaCl_2 la cantidad de agregados fue variada. En los experimentos de DLS se encontraron valores de radio hidrodinámico del orden de 1000 nanómetros, a diferencia del microscopio óptico donde el valor mínimo fue de 5 micrómetros, esto es consistente ya que mediante DLS se pueden obtener valores de distribución de tamaños del orden de nanómetros. En el análisis temporal realizado mediante DLS se observó que los radios hidrodinámicos tienden a aumentar en el pico de mayor amplitud lo que podría significar que se está llevando a cabo una agregación.

BIBLIOGRAFÍA

- Akashi, K-I. 1996. Preparation of Giant Liposomes in Physiological Conditions and Their characterization under an Optical Microscope. *Biophysical Journal*. 71:3242-3250.
- Akashi, K-I. 1998. Formation of Giant Liposomes Promoted by Divalent Cations: Critical Role of Electrostatic Repulsion. *Biophysical Journal*. 74:2973-2982.
- Angelova, Miglena. 2000. Liposomes Electroformation, Perspectives in Supramolecular Chemistry Volume 6. Ed. John Wiley & Sons. USA.
- Ansell, G.B. and Spanner, S. 1982. Phospholipids: Phosphatidylserine, -ethanolamine, -choline. Elsevir Biomedical Press. USA
- Böckmann, R.A. 2003. Effect of Sodium Chloride on a Lipid Bilayer. *Biophysical Journal*. 85:1647-1655.
- Cevc, G. 1993. Phospholipids Handbook. Ed. Marcel Dekker. USA
- Claessens, M.M.A.E., van Oort, B.F., Laermakers, F.A.M., Hoekstra, F.A. and Stuart, M.A. 2004. Charged Lipid Vesicles: Effect of Salts on Bending Rigidity, Stability, and Size. *Biophysical Journal*. 87:3882-3893.
- Clarke, R.J. and Lupfert, C. 1999. Influence of Anions and Cations on the Dipole Potential of Phosphatidylcholine Vesicles: a Basis for the Hofmeister Effect. *Biophys J*. 76(5):2614-2624
- Döbereiner, H-G. 2000. Properties of Giant Liposomes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 5:256-263.
- Hauser, H. and Shipley, G.G. 1983. Interactions of Monovalent Cations with Phosphatidylserine Bilayer Membranes. *Biochemistry*. 22:2171-2178

- Hauser, H. and Shipley, G.G. 1984. Interactions of Divalent Cations with Phosphatidylserine Bilayer Membranes. *Biochemistry*. 23:34-41.
- Hull, M., Sauer, D and Hovis, J. 2004. Influence of Lipid Chemistry on the Osmotic Response of Cell Membranes: Effect of Non-Bilayer Forming Lipids. *J. Phys. Chem. B*. 108:15890-15895.
- Lasic, Danilo. 2000. Giant Vesicles: a Historical Introduction, Perspectives in Supramolecular Chemistry Volume 6. Ed. John Wiley & Sons. USA.
- Leng, J., Egelhaaf, S.U. and Cates., M.E. 2003. Kinetics of the Micelle-to-Vesicle Transition: Aqueous Lecithin-Bile Salt Mixture. *Biophysical Journal*. 85:1624-1646.
- Malucci, G., De Spirito, M., Arcovito, G., Boffi, F., Castellano, A.C. and Briganti, G. 2005. Particle Size Distribution in DMPC Vesicles Solutions Undergoing Different Sonication Times. *Biophysical Journal*. 88:3545-3550
- Menger, F.M. 1998. Chemistry and Physics of Giant Vesicles as Biomembranes Models. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2:726-732.
- Pencer, J. and Hallett, F.R. 2003. Effect of Vesicle Size and Shape on Static and Dynamic Light Scattering Measurements. *Langmuir*. 19:7488-7497
- Pencer, J., White Gisele F., and Hallett, F. R. 2001. Osmotically Induced Shape Changes of Large Unilamellar Vesicles Measured by Dynamic Light Scattering. *Biophysical Journal*. 81:2001 2716–2728.
- Petrache, H.I., Tristram-Nagle, S., Harries, D., Kucerka, N., Nagle, J.F. and Parsegian, V.A. 2006, Swelling of Phospholipids by Monovalent Salt. *J. Lipid Research*. 47(2):302-309.

- Pincus, P., Joanny, J-F. and Andelman, D.1990. Electrostatic Interactions, Curvature Elasticity, and Steric Repulsion in Multimembrane Systems. *Europhys. Lett.* 11:763-768
- Russ, C., Heimburg, T. and Grünberg, H. 2003. The Effect of Lipid Demixing on the electrostatic Interaction of Planar Membranes across a Salt Solution. *Biophysical Journal.* 84:3730-3742.
- Sabin, J., Prieto, G., Messinas, P.V., Ruso, J.M., Hidalgo, R. and Sarmiento. 2005. On the Effect of Ca^{2+} and La^{3+} on the Colloidal Stability of Liposomes. *Langmuir.* 21:10968-10975.
- Sachs, J.N. 2004. Changes in Phosphatidylcholine Headgroup Tilt and Water Order Induced by Monovalent Salts: Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal.* 86:3772-3782.
- Schukin, E.D., Pertsov, A.V. and Améline, E.A. 1988. *Química Coloidal.* Ed. Mir Moscú. URSS.
- Shoemaker, S.D., and Vanderlick, T.K. 2002. Intermembrane Electrostatic Interactions Destabilize Lipid Vesicles. *Biophysical Journal.* 83:2007-2014.
- Sidney, S., McIntosh, T.J. Magid A. and Needham, D. 1992. Modulation of the Interbilayer Hydration Pressure by the Addition of Dipoles at the Hydrocarbon/Water Interface. *Biophys J.* 61:786-799.
- Small, Donald. 1986. *Handbook of Lipid Research, The Physical Chemistry of Lipids, From Alkenes to Phospholipids.* Plenum Press. USA.