

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y
MATERIALES

“PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS DE LECITINA CON POTENCIALES APLICACIONES COMO MODELOS DE MEMBRANA”

Como requisito para obtener el grado de

Maestra en Ciencia de Materiales

Presenta

Q.B.C Rocío Viridiana León Irra

Director de Tesis

Dr. Amir Maldonado Arce

Codirectora de Tesis

Dra. Irlanda Lagarda Díaz

Hermosillo, Sonora

Agosto del 2020

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

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Castro', with a stylized flourish at the end.

Dra. Teresa del Castillo Castro

Jefe del Departamento

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de doctorado de Rocío Viridiana León Irra han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.



Dr. Amir Maldonado Arce
(Presidente)



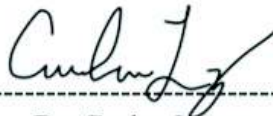
Dra. Irlanda Lagarda
(Secretario)



Dra. Judith Tanori
(Sinodal)



Dr. José Carmelo Encinas
(Sinodal)



Dr. Carlos Luna
(Sinodal Externo)

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios por llenar mi vida de bendiciones y permitirme lograr cada meta que me propongo.

A mi familia por apoyarme, en especial a mi madre por ser el pilar más fuerte en mi vida, siempre dándome su ejemplo de fortaleza. Todos mis logros son para ella.

A mi pareja por su apoyo incondicional en cada etapa de mi crecimiento, porque siempre ha creído en mí, me ha motivado e impulsado a seguir adelante a pesar de las adversidades.

A mis amigos del posgrado que hicieron este proceso más llevadero, divertido y porque aprendí de cada uno de ellos, en especial a mi amiga Gina que sin ella esta etapa no hubiera sido lo mismo.

Ante todo, al Dr. Amir Maldonado por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por siempre haber tenido la disposición de resolver cualquier duda y apoyarme de la mejor manera, además de ser un excelente director de tesis, fue para mí un amigo.

A mi codirectora la Dr. Irlanda Lagarda por todos sus consejos y aportaciones en estos años.

A la Dra. Alicia Alonso y al Dr. Félix Goñi por abrirme las puertas de su laboratorio en el instituto de Biofísica de la Universidad del País Vasco y permitirme colaborar con ellos, sobre todo por recibirme con los brazos abiertos, fue muy gratificante el periodo de mi estancia.

A la Universidad de Sonora por la formación académica y por ser mi segunda casa.

Al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, por aceptarme en el programa del posgrado.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT, por financiar mi posgrado.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABLAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT.....	X
CAPÍTULO 1	11
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS.....	13
1.1 Objetivo general	13
1.2 Objetivos Particulares	13
CAPÍTULO 2	14
ANTECEDENTES.....	14
2.1 La membrana plasmática.....	14
2.2 Lípidos de membrana	15
2.3 Vesículas o Liposomas.....	19
2.4 Técnicas de caracterización.....	25
CAPÍTULO 3	33
MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1 Preparación de Liposomas	33
3.2 Técnicas Dispersivas	35
3.3 Técnicas Microscópicas	37
CAPÍTULO 4.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1 Dispersión Dinámica de Luz (DLS).....	41
4.2 Dispersión de rayos-X a ángulos pequeños (SAXS).....	65
4.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	66
4.4 Microscopía Óptica	69
CAPÍTULO 5	71
CONCLUSIONES	71
PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....	73
REFERENCIAS	74
APÉNDICE	79

LISTA DE FIGURAS

Fig.1 Modelo del mosaico fluido de la estructura de una membrana biológica, como se propuso originalmente en 1972. Esquema visto en sección transversal de tamaño submicrónico de una membrana celular, los cuerpos sólidos con superficies de corte punteadas representan proteínas integrales de membrana, que a largo alcance se distribuyen aleatoriamente en el plano de la membrana. A corto alcance, algunas proteínas integrales de membrana forman complejos proteicos integrales específicos. La figura representa proteínas integrales en una fase de bicapa lipídica completamente fluida, y no contiene otras estructuras asociadas a membrana o dominios de membrana de diferentes composiciones [8,9].....	15
Fig. 2 Esquema de lípidos Saponificables basado en la clasificación de lípidos de Yeagle [10].	17
Fig. 3 Esquema de lípidos No Saponificables basado en la clasificación de lípidos de Yeagle [10].	17
Fig. 4 Esquema del proceso de saponificación de lípidos [13].	18
Fig. 5 A) Secciones de una molécula de fosfolípido. B) Liposoma esférico en medio acuoso [4].	20
Fig. 6 Clasificación estructural de las vesículas [20].	21
Fig. 7 Mecánismo de formación de vesículas por Lasic, D.D., Recherche 20, 904, 1989..	22
Fig. 8 Esquema del equipo para Mediciones de Dispersión Dinámica de Luz [34].	27
Fig. 9 Esquema del principio básico del equipo de SAXS.....	28
Fig. 10 Esquema de un Microscopio Electrónico de Transmisión.....	30
Fig. 11 Esquema del microscopio invertido en una vista lateral [50].	32
Fig. 12 Esquema paso a paso de la formación de vesículas: preparación del lípido-hidratación con agitación de la película lipídica.	34
Fig. 13 Fotografía del goniómetro Brookhaven Instruments, modelo BI-200SM.	36
Fig. 14 Fotografía del equipo SAXSpace (Anton Paar).....	37
Fig. 15 Fotografía del microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo JEM-2010..	38
Fig. 16 Diagrama esquemático que ilustra el procedimiento comúnmente utilizado en la tinción negativa. (A) Mezcla; (B) Gota a gota [51].	39

Fig. 17 Microscopio Óptico Invertido Leica DMIL.....	40
Fig. 18 Interpretación de la función de correlación. Gráfica tomada del curso teórico-práctico en la tecnología DLS-NIBS (Dynamic Light Scattering-Non-Invasive Back Scatter) para el uso del equipo Zetasizer Nano de la firma Marlvern Panalytical. Iesmat (Instrumentación Especifica de Materiales).....	43
Fig. 19 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 1 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.	44
Fig. 20 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 1 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.	44
Fig. 21 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 2 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.	45
Fig. 22 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 2 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.	45
Fig. 23 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 3 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.	46
Fig. 24 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 3 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.	46
Fig. 25 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Mediciones 1, 2 y 3 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.	47
Fig. 26 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 1 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.	51
Fig. 27 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 1 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.	52
Fig. 28 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 2 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.	52
Fig. 29 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 2 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.	53
Fig. 30 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 3 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.	53
Fig. 31 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 3 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.	54

Fig. 32 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Mediciones 1, 2 y 3 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.....	55
Fig. 33 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 1 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.....	58
Fig. 34 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 1 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.....	58
Fig. 35 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 2 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.....	59
Fig. 36 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 2 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.....	59
Fig. 37 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 3 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.....	60
Fig. 38 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 3 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.....	60
Fig. 39 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Mediciones 1, 2 y 3 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.....	61
Fig. 40 Espectro de SAXS de vesículas de lectina ($[l]= 15 \text{ mg/ml}$).....	66
Fig. 41 Micrografías de TEM de vesículas de Lecitina formadas en agua. Las estructuras fueron analizadas después de la tinción negativa. La barra de escala corresponde a $1 \mu\text{m}$	67
Fig. 42 Micrografías de TEM de vesículas de Lecitina formadas en agua. Las estructuras fueron analizadas después de la tinción negativa. La barra de escala corresponde a $0.5 \mu\text{m}$	67
Fig. 43 Espectroscopía de Rayos X de Dispersión de Energía (EDS) de vesículas de Lecitina.	68
Fig. 44 Micrografías ópticas de vesículas de Lecitina observadas bajo el objetivo de 20X. La barra de escala corresponde a $20 \mu\text{m}$	70
Fig. 45 Micrografías ópticas de vesículas de Lecitina observadas bajo el objetivo de 40X. La barra de escala corresponde a $20 \mu\text{m}$	70
Fig. 46 Micrografías ópticas de vesículas de Lecitina observadas bajo el objetivo de 63X. La barra de escala corresponde a $40 \mu\text{m}$	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Parámetros obtenidos en la medición 1 de la primera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.....	49
Tabla 2 Parámetros obtenidos en la medición 2 de la primera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.....	49
Tabla 3 Parámetros obtenidos en la medición 3 de la primera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.....	50
Tabla 4 Resumen de las Tablas 1, 2 y 3. Valores de diámetro hidrodinámico promedio y polidispersidad obtenidos en las mediciones de la primera muestra mediante DLS. ..	50
Tabla 5 Parámetros obtenidos en la medición 1 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.....	56
Tabla 6 Parámetros obtenidos en la medición 2 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.....	56
Tabla 7 Parámetros obtenidos en la medición 3 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.....	56
Tabla 8 Resumen de las Tablas 5, 6 y 7. Valores de diámetro hidrodinámico promedio y polidispersidad obtenidos en las mediciones de la segunda muestra mediante DLS...	57
Tabla 9 Parámetros obtenidos en la medición 1 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.....	62
Tabla 10 Parámetros obtenidos en la medición 2 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.....	62
Tabla 11 Parámetros obtenidos en la medición 3 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.....	63
Tabla 12 Resumen de las Tablas 9, 10 y 11. Valores de diámetro hidrodinámico promedio y polidispersidad obtenidos en las mediciones de la tercera muestra mediante DLS.	63

RESUMEN

En el presente trabajo se prepararon vesículas de Lecitina mediante el método de hidratación de lípidos. Los agregados se estudiaron mediante diferentes técnicas de caracterización tales como Dispersión Dinámica de Luz (DLS), Dispersión de Rayos- X a Ángulos Pequeños (SAXS), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopía Óptica (OM). Los resultados obtenidos a través de estas técnicas fueron la distribución de tamaño y la morfología del sistema de vesículas de Lecitina. Debido al método de preparación utilizado, las vesículas resultantes fueron esféricas en su mayoría, heterogéneas, moderadamente polidispersas y de un tamaño aproximado entre 500 nm y varias micras.

ABSTRACT

In the present work, Lecithin vesicles were prepared using the lipid hydration method for subsequent study using different characterization techniques such as Dynamic Light Scattering (DLS), Small-Angle X-ray Scattering (SAXS), Transmission Electron Microscopy (TEM) and Optical Microscopy (OM). The results obtained through these techniques were the size distribution and morphology of the Lecithin vesicle system. Due to the preparation method used, the vesicles were mostly spherical, heterogeneous, moderately polydisperse and their size of approximately 500 nm to several microns.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años la ciencia ha evolucionado originando un nuevo giro, el modelo “nano”, representado por dos nuevas disciplinas denominadas nanociencia y nanotecnología, que han permitido el desarrollo y la manipulación de materiales a escala nanoscópica. Dichos materiales poseen tamaños desde 1 a 100 nanómetros [1].

La fabricación, el estudio y la caracterización de estas estructuras a nivel nanoscópico han permitido descubrir el gran potencial que poseen estos materiales con propiedades prometedoras para diversas aplicaciones [1].

Dentro de estos materiales se encuentran las vesículas o liposomas que han llamado mucho la atención debido a su amplia aplicación como vehículos de suministros controlados de fármacos en la industria farmacéutica y como modelo de biomembranas en la biología [2-3].

Las vesículas son estructuras cerradas compuestas de bicapas de moléculas de fosfolípido, las cuales poseen un carácter anfipático. Esto significa que dichas moléculas constan de una región polar que corresponde a la cabeza del fosfolípido y una región apolar correspondiente a la cola del mismo [4].

Debido a esta composición lipídica, las vesículas tienen una toxicidad más baja que otros vehículos, lo cual las convierte en sistemas prometedores para la entrega de una amplia gama de medicamentos que requieren tratamientos específicos, tiempo de circulación controlados, efectos secundarios reducidos y una acción farmacológica óptima [5].

La liberación de fármacos y la ingeniería de tejidos han sido de gran interés particularmente en medicina y en ciencias de la salud, originando un gran aumento en las investigaciones en estos campos [6].

Por lo tanto, los estudios recientes se enfocan en mejorar la vectorización de los sistemas de suministros de fármacos a sistemas específicos, para esto lo que se busca es funcionalizar la superficie de las vesículas ya sea con polímeros, proteínas, glucolípidos naturales o sintéticos, entre otros. Esto con la finalidad de dirigir el fármaco sin alterar su estructura y por supuesto, su actividad biológica [5].

Para lograr una aplicación con estos sistemas, es necesario conocer primeramente las propiedades biofísicas de tales liposomas, es decir, se requiere conocer su tamaño, composición lipídica, estructura, morfología, entre otras características, para tener la certeza de que el sistema de vesículas cumple con todos los criterios de ser buenos candidatos en la liberación de fármacos o en cualquier otro enfoque deseado.

En este trabajo hemos preparado vesículas o liposomas de Lecitina de yema de huevo por el método de hidratación de lípidos. Los agregados obtenidos fueron caracterizados mediante técnicas de dispersión de radiación (luz y rayos X) y de microscopía (óptica y electrónica). Los sistemas obtenidos serán utilizados para encapsular proteínas en un estudio posterior. El trabajo desarrollado en la presente tesis servirá como base para dicho estudio.

En el transcurso del proyecto de Maestría se realizó una estancia de investigación en el Instituto de Biofísica (UPV/EHU, CSIC), en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad del País Vasco. En dicha visita, se trabajó en el grupo de la Dra. Alicia Alonso y el Dr. Félix Goñi. Durante el periodo de estancia se estudió la preparación de liposomas mediante diferentes técnicas tales como: sonicación, electroformación en alambre y extrusión de lípidos. Estos liposomas fueron preparados en presencia de un marcador fluorescente con la finalidad de evaluar la rigidez y las diferentes fases de la membrana lipídica. Aunque esta investigación tiene una temática relativamente cercana al trabajo realizado en la presente tesis, se describe en una sección independiente (apéndice) y no en el cuerpo de la tesis.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Preparar y estudiar algunas propiedades de vesículas de Lecitina de yema de huevo.

1.2 Objetivos Particulares

1. Preparar vesículas multilamelares gigantes (MLV's) de Lecitina de yema de huevo (comercial) mediante el método de hidratación de lípidos.
2. Determinar el tamaño y características de las vesículas mediante las técnicas de Dispersión Dinámica de Luz (DLS), Dispersión de Rayos X a Ángulos pequeños (SAXS), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopía Óptica.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 La membrana plasmática

La estructura y la función de las células no sería posible sin las membranas plasmáticas, que además de separar a la célula de su entorno externo, también se encarga de definir los compartimentos internos de las células eucariotas, incluyendo el núcleo y los orgánulos citoplasmáticos [7].

Actualmente se sabe que la formación de las membranas biológicas se basa en las propiedades de los lípidos y que todas las membranas celulares comparten una organización estructural común: bicapas de fosfolípidos con proteínas asociadas. Comprender la organización y estructura de las membranas fue un paso crucial para poder descifrar las bases moleculares del comportamiento celular, ya que, en la época de los sesentas, se tenía claro la composición de las membranas celulares, pero, no se sabía cómo se organizaban las moléculas de lípidos y de proteínas presentes en dicha membrana. Incluso, el hecho de reconocer diferencias en la composición de proteínas y lípidos en las diferentes membranas celulares, dio hincapié a que ciertos investigadores pensarán que distintos tipos de membranas eran incapaces de compartir una organización estructural común [7,8].

No obstante, Jonathan Singer y Garth Nicolson trataron de solucionar esta discrepancia. Ellos creían que los mismos principios básicos podrían describir a todas las membranas celulares, en cuanto a la organización de los lípidos y proteínas. Y en base a ciertas consideraciones termodinámicas e integración de varios resultados experimentales, propusieron el modelo del mosaico fluido en el año de 1972 ilustrado en la Fig.1. Este modelo representa a la membrana como un mosaico de componentes lipídicos y proteicos que pueden moverse fluidamente sobre la superficie de la membrana [8]. En base a nuevas investigaciones este modelo ha ido evolucionando a lo largo de los años, sin embargo, sigue siendo relevante ya que nos proporciona una buena descripción básica de nano-estructuras de una gran variedad de membranas tanto intracelulares como extracelulares, permitiendo comprender de esta manera las diversas funciones de dichas membranas en la biología celular [9].

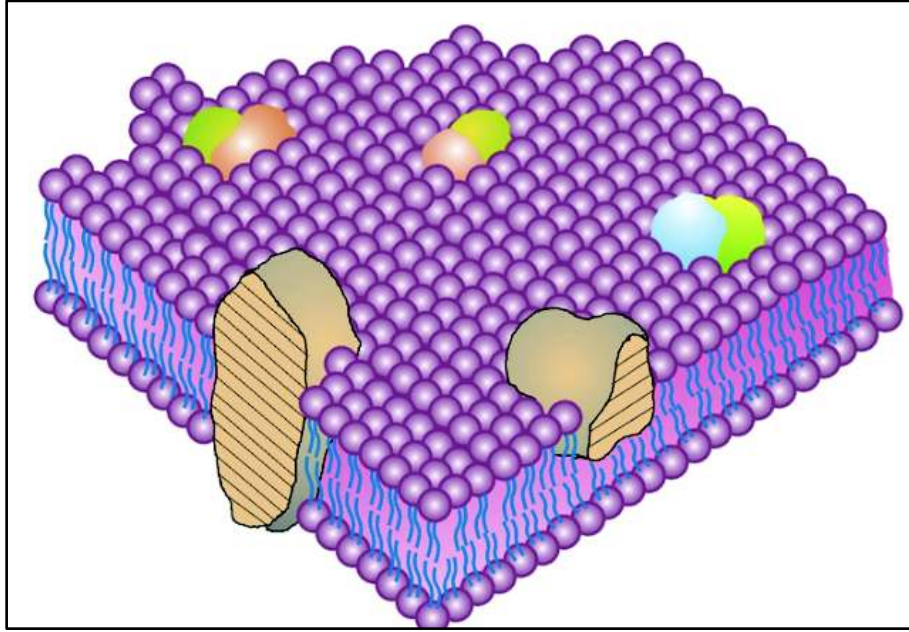


Fig.1 Modelo del mosaico fluido de la estructura de una membrana biológica, como se propuso originalmente en 1972. Esquema visto en sección transversal de tamaño submicrónico de una membrana celular, los cuerpos sólidos con superficies de corte punteadas representan proteínas integrales de membrana, que a largo alcance se distribuyen aleatoriamente en el plano de la membrana. A corto alcance, algunas proteínas integrales de membrana forman complejos proteicos integrales específicos. La figura representa proteínas integrales en una fase de bicapa lipídica completamente fluida, y no contiene otras estructuras asociadas a membrana o dominios de membrana de diferentes composiciones [8,9].

2.2 Lípidos de membrana

En general, un lípido (del griego lipos = grasa) puede ser definido como un compuesto de bajo o intermedio peso molecular, el cual está compuesto de una proporción sustancial de átomos de carbono ligados en su mayoría con átomos de hidrógeno; se pueden decir que son “moléculas hidrocarbonadas” [10]. Algunos compuestos lipídicos naturales incluyen: ácidos grasos, jabones, detergentes, esteroides, mono-, di-, y triglicéridos; y compuestos más complejos tales como: fosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos y lipopolisacáridos.

Los lípidos de membrana consisten en un amplio rango de compuestos anfipáticos (anfifílicos), es decir, que contienen una región polar (cabeza hidrofílica) y una región no polar (cola hidrofóbica hidrocarbonada) [10]. Los lípidos son solubles en solventes orgánicos tales como: alcanos, benceno, éter, alcanos clorados (p.e., cloroformo, tetraclorocarbano),

metanol y mezcla de estos solventes. Las mezclas de cloroformo y metanol son usadas como solventes universales de lípidos [11].

Los lípidos más simples, después de los alcanos simples y terpenos, son los ácidos grasos de cadena larga, los cuales son constituyentes de todos los lípidos esterificados y complejos. Generalmente los ácidos grasos más abundantes contienen entre 14 y 24 átomos de carbono; tienen un grupo carboxílico en un extremo (COO^-) y pueden ser saturados, en donde todos los átomos de carbono están enlazados al máximo número de átomos de hidrógeno posible, o insaturados en donde los átomos de carbono pueden estar unidos mediante dobles o triples enlaces. Las cadenas hidrocarbonadas largas (regularmente $C > 11$) de los ácidos grasos contienen enlaces no polares entre carbono e hidrógeno $C-H$, por lo tanto, esta propiedad es la responsable de que sean incapaces de interactuar con las moléculas de agua. Dicha naturaleza hidrofóbica de los ácidos grasos rige en gran medida el comportamiento de los lípidos complejos, permitiendo la formación de las membranas biológicas. [12]

Los lípidos complejos se dividen en glicerofosfolípidos y esfingolípidos, que son los lípidos de membrana más comunes, aunque también existen los glicolípidos que de igual manera forman parte de la estructura membranosa. Estos lípidos se diferencian del resto ya que además de estar conformados por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno contienen otros elementos como nitrógeno, fósforo, azufre u otra biomolécula como un sacárido [10].

La clasificación de los lípidos es arbitraria, en muchos textos los lípidos están clasificados en orden de menor a mayor complejidad, Sin embargo, a veces, se utilizan criterios más prácticos [10], esto depende principalmente de las características de los lípidos.

En este trabajo los lípidos han sido clasificados en dos categorías: lípidos saponificables y lípidos no saponificables. La clasificación se ilustra en las Fig. 2 y 3 respectivamente, siguiendo los criterios descritos por Philip L. Yeagle [10].

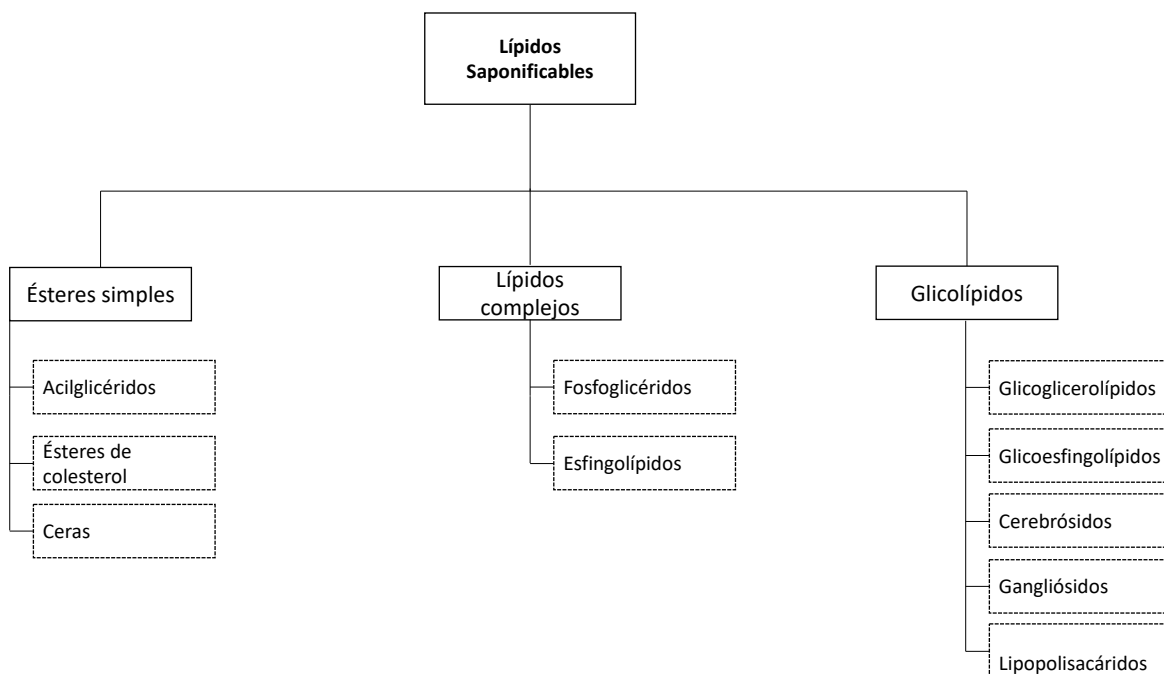


Fig. 2 Esquema de lípidos Saponificables basado en la clasificación de lípidos de Yeagle [10].

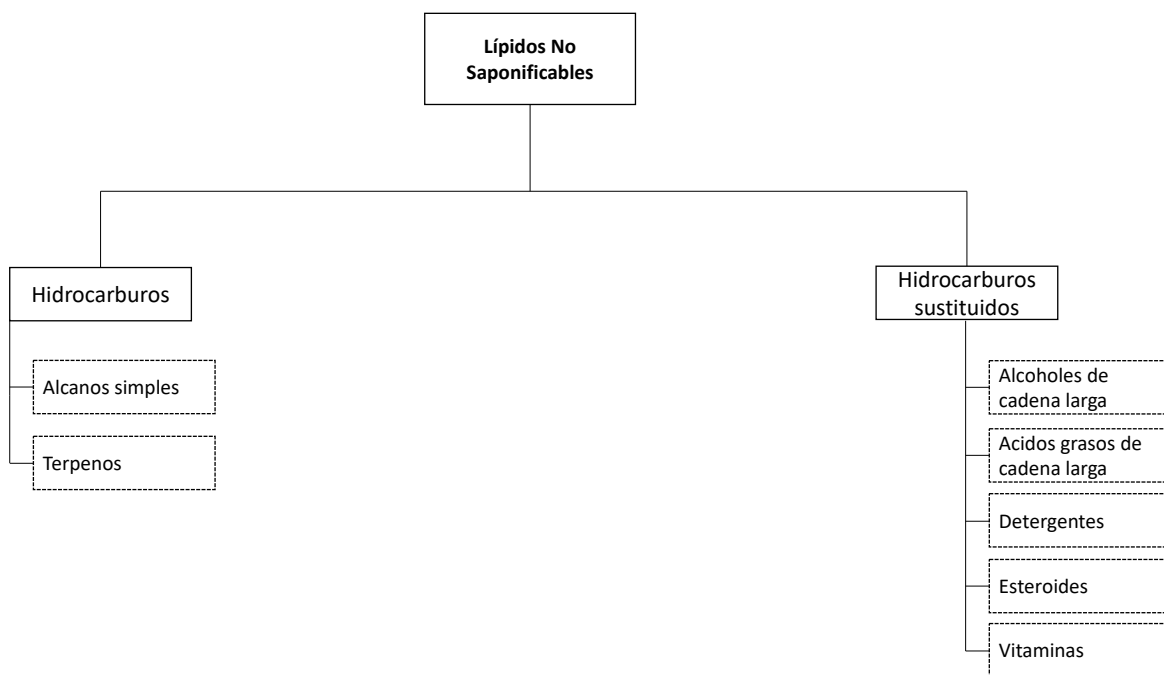


Fig. 3 Esquema de lípidos No Saponificables basado en la clasificación de lípidos de Yeagle [10].

Los lípidos saponificables son aquellos que pueden ser hidrolizados por grupos -OH y dan lugar a jabones o sales de los ácidos grasos. El proceso de saponificación (Fig.4) consiste en la hidrólisis de un éster originando un ácido carboxílico (ácido graso en el caso de un lípido) y un alcohol [13].

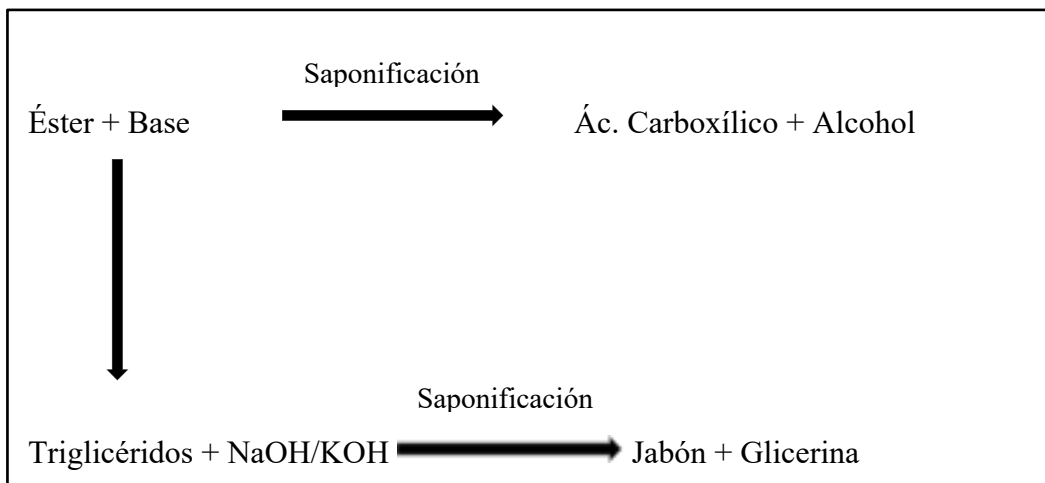


Fig. 4 Esquema del proceso de saponificación de lípidos [13].

Dependiendo del tipo de alcohol, los lípidos saponificables se clasifican en acilglicéridos o grasas, ceras, esfingolípidos y fosfoglicéridos.

En cambio, los lípidos no saponificables o no hidrolizables, como su nombre lo dice, son aquellos que no se hidrolizan en presencia de -OH [11]. En esta clasificación se encuentran las vitaminas, terpenos, esteroides, entre otros.

Los lípidos llevan a cabo funciones biológicas de suma importancia: son la principal reserva de energía, son un componente indispensable en la estructura de las membranas celulares, además participan en la señalización celular, entre otras [12].

Los bloques de construcción fundamentales de todas las membranas celulares son los fosfolípidos, que son moléculas anfipáticas, que consisten en dos cadenas de ácidos grasos hidrófobas unidas a un grupo de cabeza hidrófila que contiene fosfato. Gracias a la naturaleza de sus propiedades, los fosfolípidos tienen la capacidad de auto-asociarse para formar espontáneamente bicapas lipídicas al estar en contacto con soluciones acuosas. Las colas conformadas de ácidos grasos insolubles en agua, se incorporan en el interior de la

membrana, mientras que el grupo de la cabeza polar está expuesto en ambos lados, en contacto con el agua. Dichas bicapas de fosfolípidos forman una barrera estable entre dos compartimentos acuosos y representan la estructura básica de todas las membranas biológicas [4,7]. Las uniones que presentan estas bicapas lipídicas son interacciones de tipo no covalentes.

Los fosfolípidos pueden clasificarse según la naturaleza de su cabeza polar. Si la carga de la cabeza polar es negativa, se denominan como aniónicos, catiónicos si la cabeza polar tiene carga positiva y zwitteriónicos si la cabeza polar no tiene carga, pero tiene un dipolo eléctrico. Otro factor importante son la longitud y el grado de insaturación de cada cadena de ácido graso (cola del fosfolípido), ya que estos factores rigen la flexibilidad de la membrana [14].

2.3 Vesículas o Liposomas

La palabra “vesícula” se deriva de la palabra latina vesícula -ae, que significa vejiga pequeña [15]. Los liposomas son vesículas esféricas compuestas por bicapas de moléculas de fosfolípido, las cuales poseen un carácter anfifílico, que al momento de ser inmersas en un solvente acuoso se acomodan espontáneamente orientando su cabeza polar en dirección hacia el agua y las colas apolares en dirección hacia el solvente orgánico repeliendo las moléculas de agua [3,4]. En la Fig. 5 se ilustra el esquema de un liposoma y las secciones que lo conforman.

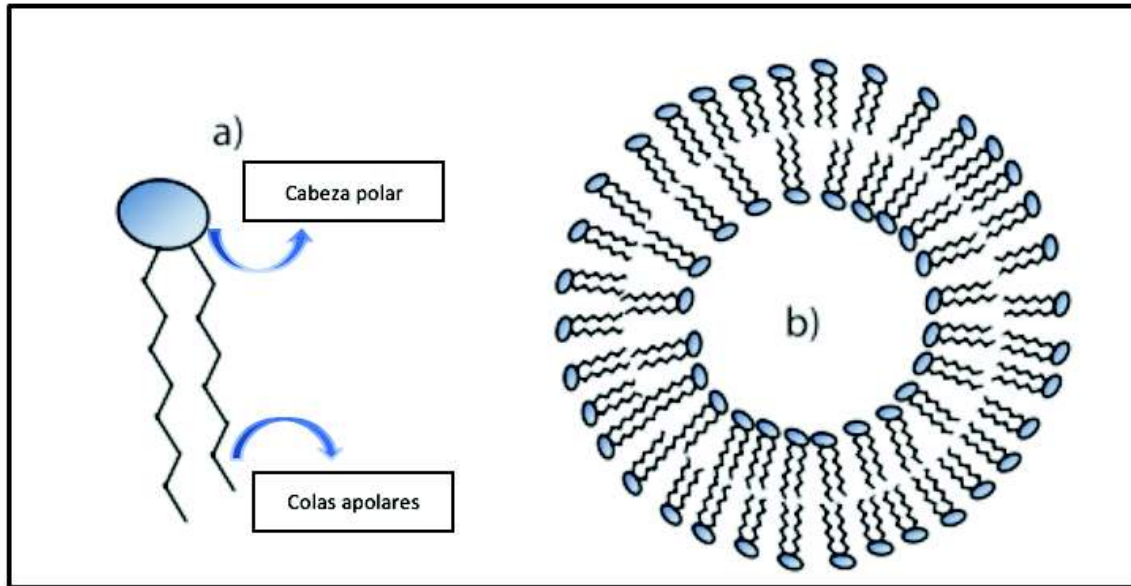


Fig. 5 A) Secciones de una molécula de fosfolípido. B) Liposoma esférico en medio acuoso [4].

Típicamente se denominan liposomas a las vesículas formadas por fosfolípidos, y vesículas si están formadas por lípidos, sin embargo, para los liposomas ambas denominaciones son aceptadas [6]. Por lo tanto, para fines prácticos, en esta tesis se utilizarán como sinónimo vesícula y liposoma.

Las vesículas formadas por lípidos que se encuentran en las membranas biológicas, específicamente fosfolípidos tales como POPC 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina, comúnmente se denominan vesículas lipídicas o liposomas [15,16].

2.3.1 Clasificación de los liposomas

Los liposomas son clasificados ampliamente según su tamaño, la carga superficial del fosfolípido que puede ser neutra, aniónica o catiónica; por su lamelaridad, es decir, el número de bicapas presentes uni-,oligo o multilamelares y también últimamente los liposomas han sido clasificados según su aplicación, por ejemplo en la industria farmacéutica y cosmética [17,18].

Basándonos únicamente en el dimensionamiento, estas estructuras se categorizan dependiendo de su tamaño. Por ejemplo, se denominan vesículas unilamelares pequeñas

(SUVs) cuando tienen un diámetro de 25-100 nm, vesículas unilamelares grandes (LUVs) cuando se forman estructuras de 100 nm-1µm y vesículas unilamelares gigantes (GUVs) para vesículas mayores a 1 µm. Todas estas estructuras incluyen una única bicapa o lamela que separa el solvente interno y externo. Sin embargo, existe el caso en donde las vesículas están formadas por muchas lamelas y son designadas como vesículas multilamelares gigantes (MLVs), vesículas oligolamelares grandes (LOVs) y vesículas oligolamelares pequeñas (SOVs) [17,19]. En la Fig.6 se muestra la clasificación estructural de las vesículas en función de su tamaño y sus bicapas lipídicas.

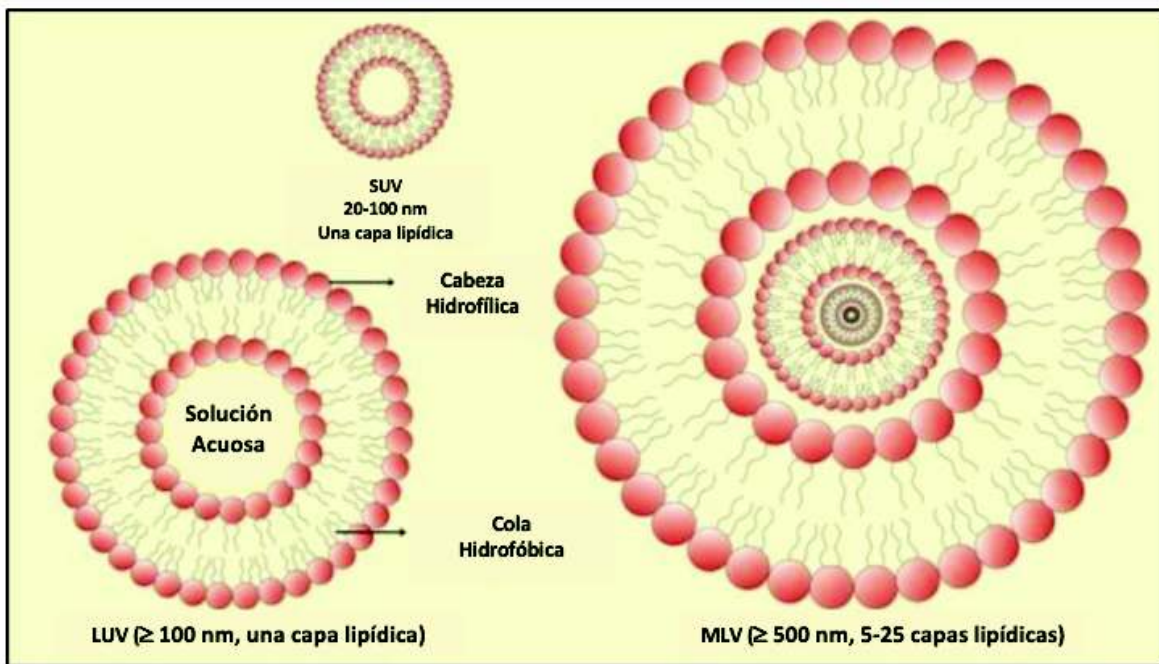


Fig. 6 Clasificación estructural de las vesículas [20].

2.3.2 Formación de las vesículas o liposomas

Los liposomas se forman a partir de la hidratación de las películas lipídicas o pastel de lípidos. Al estar en contacto con un medio acuoso, estas bicapas lipídicas apiladas se vuelven fluidas y se hinchan, al momento de agitarlas se desprenden y se cierran automáticamente para formar a las grandes vesículas multilamelares (MLVs). Si se requiere reducir el tamaño de las MLVs es necesario aplicar energía sónica, es decir, la sonicación o bien, energía

mecánica, es decir, la extrusión [21]. En la Fig. 7 se ilustra esquemáticamente el mecanismo anteriormente descrito para la formación de las vesículas.

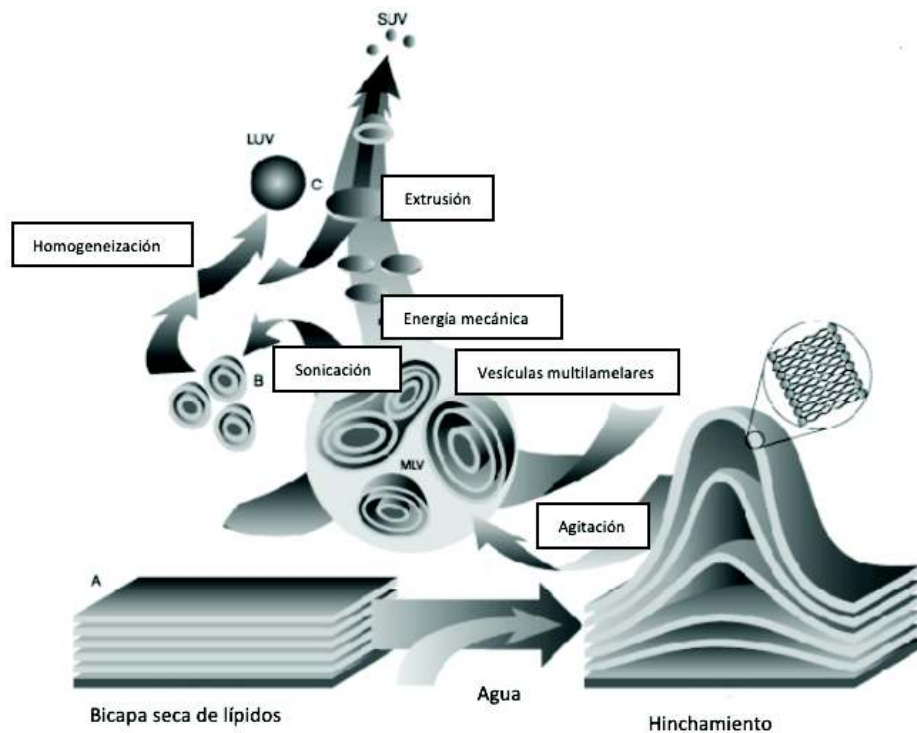


Fig. 7 Mecanismo de formación de vesículas por Lasic, D.D., Recherche 20, 904, 1989.

2.3.3 Métodos de obtención de vesículas

En la actualidad existen muchas técnicas para formar liposomas, estas técnicas se han ido desarrollando y actualizando a través de los años. Estos métodos dependen directamente del tipo de vesícula que se quiera obtener, ya sean pequeñas o grandes, unilamelares o multilamelares, etc. Aquí se presentan algunas técnicas convencionales para la obtención de diferentes tipos de liposomas.

Obtención de liposomas de tipo MLVs: generalmente este tipo de vesículas se forman espontáneamente mediante la hidratación de películas lipídicas secas, utilizando grandes volúmenes de medios acuosos como agua o una solución amortiguadora. Se encuentran en la literatura reportados varios métodos para obtener MLVs, sin embargo, en su gran mayoría

estas técnicas están basadas en el método de Bangham el cual consiste en la disolución de lípidos en una fase orgánica, típicamente cloroformo/metanol 2:1 v/v, seguido de la eliminación de dicho disolvente orgánico utilizando una corriente de nitrógeno y alto vacío, para formar una película lipídica. Finalmente, la película lipídica es hidratada con un medio acuoso, llevada a cabo simultáneamente con agitación suave con el fin de separar las bicapas lipídicas hinchadas y formar estructuras esféricas selladas. Los liposomas que se forman mediante esta técnica tienen un tamaño promedio de varias micras, son muy heterogéneos y contienen generalmente de siete a diez bicapas concéntricas, cada una de ellas separadas por una fina capa de agua. De hecho, este método es considerado como uno de los métodos más simple pero efectivo para la formación de MLV's [3,19, 22-26].

Si se requiere reducir el tamaño y las lamelas de las MLV's es necesario acudir a otras técnicas de preparación de liposomas que básicamente parten del método anteriormente descrito, ya que para todos los casos se requiere la hidratación del lípido.

Obtención de liposomas de tipo GUV's: aquí se describe el método de electroformación en alambre para preparar vesículas unilamelares gigantes. En esta técnica se utiliza un generador de corriente a baja frecuencia aplicado a una película lipídica hidratada. Los lípidos previamente mezclados en una solución cloroformo:metanol se depositan en una superficie sólida (alambre) de platino con ayuda de una jeringa Hamilton y se mantienen al vacío durante un par de horas. Una vez evaporado el solvente orgánico, se procede a la hidratación de los lípidos utilizando un medio acuoso que puede ser agua, una solución amortiguadora o una solución acuosa de sacarosa. Finalmente se aplica un campo eléctrico externo durante dos horas que promueve la formación de estructuras esféricas (GUV's) [15,22,27].

Obtención de liposomas tipo LUVs: el método que se describe se denomina evaporación en fase reversa y se puede utilizar tanto para lípidos puros como para mezclas de lípidos. En este método se requieren pequeñas cantidades del medio hidratante, es decir, la fase acuosa. Se parte de una disolución de los fosfolípidos en un solvente orgánico que se mezcla con la fase acuosa en una relación de volúmenes 1:3 (fase orgánica/fase acuosa). Tras la adición de la fase acuosa, el sistema se sonica utilizando un sonicador de tipo baño dando como resultado una emulsión. Luego, la fase orgánica es eliminada mediante un evaporador rotatorio bajo una presión reducida originando liposomas en una fase de gel intermedio.

Finalmente, tras una vigorosa agitación se forman vesículas de diferentes tamaños que van aproximadamente desde pocos nanómetros hasta micras, esto va a depender de la composición y concentración de los lípidos, de la temperatura, fuerza de sonicación y tiempo [6, 28-29].

Obtención de liposomas de tipo SUV's: la técnica comúnmente utilizada se denomina extrusión de liposomas y consiste en hacer pasar varias veces una solución de lípidos a través de un filtro de policarbonato con tamaño de poro definido, usando un gas presurizado o un sistema de émbolo a base de jeringa para producir vesículas que tengan un diámetro cercano al tamaño de poro del filtro utilizado. Para reducir el tamaño de las vesículas formadas es importante que la extrusión se lleve a cabo a una temperatura superior a la T_m del lípido, ya que no tendrá éxito el intentar extruir por debajo de la T_m debido a que la membrana porosa retiene a las vesículas rígidas que no pueden pasar a través de los poros. Generalmente se realizan 10 pases de la solución lipídica a través de la membrana; mediante cada pase la suspensión de lípidos debe comenzar a aclararse para producir una solución transparente ligeramente turbia, esto es porque al momento de reducir el tamaño de las vesículas en la suspensión, se va disminuyendo la dispersión de la luz inducida por las partículas grandes. Mediante este método se obtienen vesículas relativamente monodispersas y de tamaño controlado [4,21-22,30]. Para esta técnica se puede utilizar tanto el extrusor convencional o instrumentos más pequeños como el mini extrusor de la compañía Avanti polar lipids.

Como nota importante: es crucial para cualquier tipo de técnica de preparación de liposomas, que el medio hidratante a utilizar este siempre por encima de la temperatura de transición del lípido, ya que de esta manera le permite hidratarse en su fase fluida.

2.3.4 Aplicaciones de las vesículas

Las vesículas o liposomas han sido ampliamente estudiados debido a sus propiedades y a sus diversas aplicaciones actuales y potenciales [27]. Inicialmente estos sistemas formados por fosfolípidos han sido usados comúnmente como modelo para estudiar el comportamiento de membranas biológicas. Como ejemplo se incluyen las propiedades mecánicas de la membrana, formación de dominios lipídicos, el estudio de la dinámica lipídica, fusión, entre

otras [15]. Esto es debido a que muestran ciertas similitudes con las membranas reales: estructura, composición, selectividad y permeabilidad. Además, son capaces de incorporar a su estructura diferentes moléculas de carácter hidrofílico, hidrofóbico y anfílico [6]. Sin embargo, conforme ha avanzado el tiempo, estos sistemas han ido evolucionando y cada vez sus estudios han aumentado en gran escala, por lo cual en la actualidad existen diversas aplicaciones de los liposomas entre ellas la más destacable es su uso como vehículos de fármacos controlados [20, 25, 26, 31, 32].

Gracias a su composición lipídica, las vesículas presentan una toxicidad menor en comparación con otros vehículos, por lo que se piensa que dichas vesículas son sistemas prometedores para la entrega de una amplia gama de medicamentos que requieren tratamientos específicos, tiempos de circulación controlados, efectos secundarios reducidos y una acción farmacológica óptima. La posibilidad de dirigir un fármaco hacia tejidos específicos sin cambiar su estructura y, por lo tanto, su actividad biológica, es fundamental para las aplicaciones terapéuticas. Por consiguiente, los esfuerzos se han dirigido a mejorar la vectorización de los sistemas liberadores de fármacos a tejidos diana específicos [5,33].

2.4 Técnicas de caracterización

2.4.1 Dispersión Dinámica de Luz:

La dispersión dinámica de luz también conocida como espectroscopía de correlación de fotones o dispersión de luz cuasi elástica, es una técnica que se utiliza para medir el radio hidrodinámico promedio de las partículas en la región submicrónica [34-35].

Los fundamentos teóricos de la dispersión de luz están basados en la teoría de dispersión de Rayleigh desarrollada en 1881, enfocada para partículas esféricas pequeñas en comparación con la longitud de onda de la radiación y en la teoría de Mie desarrollada en 1908 enfocada para partículas esféricas de tamaño aproximadamente equivalente a la longitud de onda de la luz iluminadora [36-38].

En el método de dispersión dinámica de luz se mide la luz dispersada por una suspensión coloidal a un cierto ángulo θ . Debido al movimiento Browniano (movimiento aleatorio) de

las partículas coloidales, la luz dispersada presenta fluctuaciones en la intensidad, cuya frecuencia temporal está relacionada con el movimiento de las partículas. Partículas lentas (por ejemplo, las de diámetro grande) dispersan la luz con fluctuaciones de más baja frecuencia que las partículas rápidas (por ejemplo, las de diámetro pequeño). Esto permite relacionar las fluctuaciones en la luz dispersada con el diámetro hidrodinámico D_H de las partículas mediante el coeficiente de difusión traslacional utilizando la ecuación de Stokes-Einstein [34].

$$D_H = \frac{K_B T}{3\pi\eta D}$$

Donde D_H es el diámetro hidrodinámico de la esfera supuesta, K_B es la constante de Boltzmann $1.380\ 6488(13) \times 10^{-23}$ J/K, T es la temperatura absoluta en Kelvin, η es la viscosidad del líquido en el que se mueve la partícula, y D es el coeficiente de difusión traslacional de la partícula [39].

En la figura 8 se presenta un esquema de un instrumento básico de DLS. El equipo consta de un láser (1) que proporciona una fuente de luz que ilumina la muestra contenida en una celda (2). La luz dispersada por las partículas que se están moviendo en todas las direcciones es recolectada mediante un detector (3) posicionado típicamente a 90° (esta posición varía dependiendo de cada experimento y del tipo de instrumento). La intensidad de la luz dispersada por las partículas debe de estar dentro de un intervalo específico de valores, de lo contrario el detector se saturará, para esto se utiliza un atenuador (4) que reduce la intensidad de la fuente del láser. Este atenuador se ajusta dependiendo del tipo de muestras, es decir, si se trabaja con partículas pequeñas (muestras diluidas) o con partículas grandes (muestras concentradas). Posteriormente la señal del detector se pasa a un circuito de procesamiento denominado correlador (5). El correlador compara la intensidad de la dispersión en intervalos de tiempos sucesivos para obtener la velocidad a la que varía la intensidad. Esta información del correlador pasa luego a una computadora (6) donde finalmente un software analizará los datos y derivará la información del tamaño [34]. Para esto, primero se calcula la llamada

función de correlación, la cual se ajusta a un decaimiento exponencial simple; de la constante de tiempo del decaimiento se obtiene el coeficiente de difusión de las partículas, el cual se alimenta en la ecuación de Stokes-Einstein para obtener el diámetro hidrodinámico.

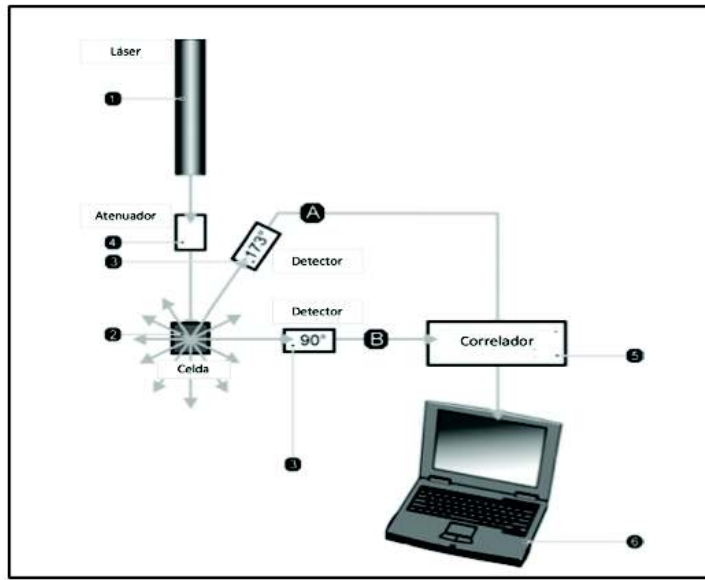


Fig. 8 Esquema del equipo para Mediciones de Dispersión Dinámica de Luz [34].

Como observación importante, las muestras analizadas por dispersión dinámica de luz deben de ser líquidas, diluidas y se deben filtrar para eliminar cualquier partícula de polvo que pudiera intervenir en la medición.

2.4.2 Dispersión de rayos-X a ángulos pequeños (SAXS):

La dispersión de rayos X a ángulos pequeños (SAXS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que es usada para determinar la estructura de un sistema de partículas en términos de promedio de tamaño de partículas o formas [40-41].

Por otra parte, esta técnica también ha sido de gran utilidad para evaluar las propiedades mecánicas de las membranas biomiméticas. En cuanto a la estructura de la bicapa lipídica, existen dos parámetros estructurales que han sido ampliamente estudiados debido a su importancia: el grosor de la bicapa y el área lateral por lípido [42].

En la técnica de SAXS se pueden analizar muestras líquidas, sólidas y pueden contener dominios sólidos, líquidos o gas, ya sean del mismo material o de la combinación de otro [40].

La dispersión de rayos X a bajo ángulo es ampliamente utilizada para estudiar materiales biológicos, polímeros, coloides, metales, minerales, entre otros. Como requisito estos materiales deben de estar en la escala nanoscópica ya que esta técnica analiza muestras del orden de 1 a 100 nm con un ángulo que va de 0.10° a 10° [40].

En la fig.9 se muestra esquemáticamente el principio básico del equipo SAXS. Generalmente la muestra es irradiada con un haz de rayos X monocromático. Estos rayos X viajan a través de la muestra y cada partícula iluminada dispersa la radiación y es fuente de una señal. Por lo tanto, el espectro de dispersión resultante es debido a la estructura promedio de las partículas iluminadas. De la distribución de intensidades a bajo ángulo se obtiene información sobre el tamaño de las partículas, morfología y estructura interna [6, 40, 43].

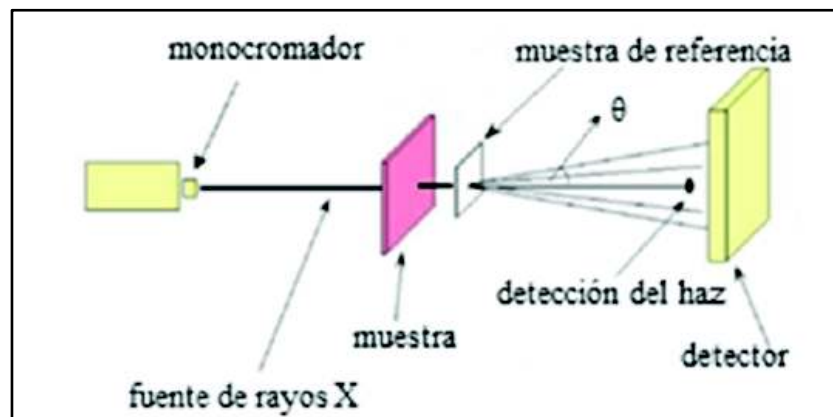


Fig. 9 Esquema del principio básico del equipo de SAXS.

2.4.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM):

Es ampliamente reconocido que la microscopía electrónica de transmisión es una técnica central para la caracterización de nano materiales [44].

Esta técnica sirve para estudiar una amplia gama de materiales, el requerimiento es que cuenten con una preparación adecuada y que tengan dimensiones dentro del rango nanométrico o bien sub-micrométrico. El microscopio electrónico de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) es una herramienta crucial para obtener información detallada del material en estudio, tales como morfología, cristalografía y composición química, este último es posible gracias a la ayuda de la espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (EDS) que viene incluida en la mayoría de los microscópicos electrónicos modernos [45].

En la Fig.10 se ilustra esquemáticamente el funcionamiento básico de un microscopio electrónico de transmisión. El TEM produce una señal a partir de un haz de electrones que es generado al calentar un filamento comúnmente de tungsteno; el haz de electrones interactúa con la muestra al atravesarla y es recogido por un detector que produce imágenes bidimensionales. El haz de electrones tiene una alta energía debido a que se acelera mediante un voltaje del orden de 100-200 keV. Una parte de estos electrones son transmitidos, otros son dispersados y otros dan lugar a interacciones que producen distintos fenómenos como emisión de luz o rayos X [6, 46-47].

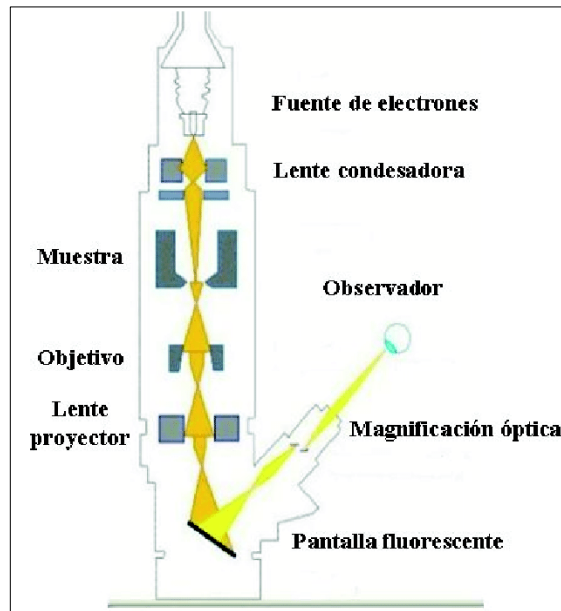


Fig. 10 Esquema de un Microscopio Electrónico de Transmisión.

Nota importante: para esta técnica la preparación de la muestra es un paso crucial para poder obtener resultados exitosos. La muestra debe de ser delgada: como máximo de 100 nm, es decir, tiene que ser parcialmente transparente a los electrones. Si la muestra a tratar es un sistema biológico, es necesario llevar a cabo la técnica de tinción negativa para generar un buen contraste. El objetivo es obtener micrografías de buena calidad.

2.4.4 Microscopia Óptica

El microscopio óptico ha sido ampliamente utilizado en el área de la ciencia, en investigaciones dentro del campo de la química y la biología, ya que gracias a esta técnica se puede estudiar la morfología y organización de estructuras microscópicas. Estos especímenes pueden ser de cualquier tipo: materia viva, cristales, minerales, en sí, cualquier tipo de material del orden de micras en adelante [48].

En la actualidad el microscopio óptico invertido es uno de los más utilizados y al igual que cualquier tipo de instrumento microscópico sirve para obtener una imagen aumentada de objetos minúsculos o detalles muy pequeños de los mismos. El microscopio óptico 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. Algunos microscopios ópticos pueden aumentar un objeto por encima de las 2.000 veces [49].

En el microscopio invertido la estructura óptica del microscopio está colocada al revés que en un microscopio óptico convencional. En el microscopio invertido la luz parte desde la bombilla situada en la parte superior de la columna trasera, atraviesa el condensador situado encima de la platina, llega al objetivo colocado por de la platina y desde allí a los oculares y/o a los sistemas de recogida de imagen, es decir, cámaras fotográficas, video, entre otros [50].

En la Fig.11 se describe el funcionamiento básico del microscopio invertido. La luz producida por una bombilla halógena (1) situada en el mástil posterior del microscopio atraviesa la lente del condensador (2) y pasa por el portafiltros, donde se sitúan los filtros anulares o de colores (3), y por el diafragma iris (4) antes de llegar al espécimen colocado en la platina (5). La luz que atraviesa la muestra es captada por el objetivo situado en el revolver junto a los demás objetivos del microscopio (6). El enfoque se realiza gracias a los tornillos macrométrico y micrométrico (7) situados en el lateral del microscopio. La luz llega al mástil frontal del microscopio donde se localizan los oculares (8) y los sistemas de captación de imagen y video (9) como cámaras fotográficas o de videograbación [50].

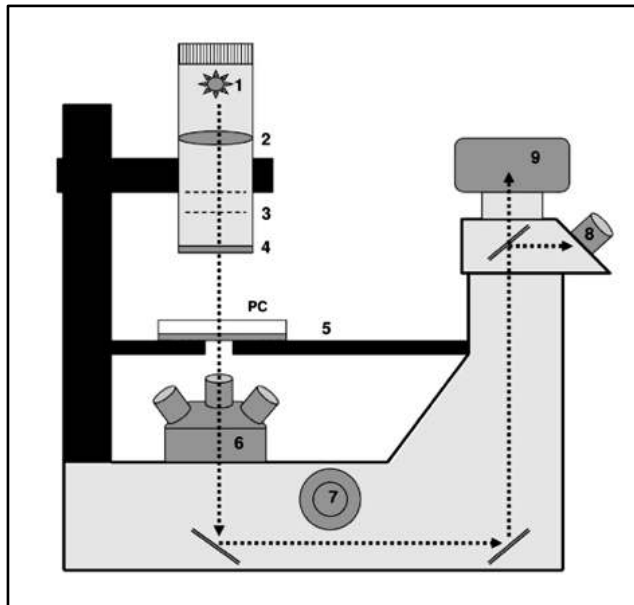


Fig. 11 Esquema del microscopio invertido en una vista lateral [50].

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección haremos un listado de los materiales y métodos que utilizamos para preparar y estudiar las vesículas de Lecitina.

Para este estudio se utilizó como lípido la Lecitina de la yema de huevo (L- α -Phosphatidylcholine) comprado a Avanti Polar Lipids con una pureza del 99%. Este material a temperatura ambiente es sólido en forma de polvo y es soluble en solventes orgánicos. Su temperatura de almacenamiento es de - 20°C.

Todos los reactivos fueron de grado comercial asegurando que cumplieran con los estándares de pureza para cada técnica en particular.

- Cloroformo (CHCl₃, Sigma Aldrich $\geq 99.8\%$ de pureza)
- Metanol (CH₃OH, Sigma Aldrich $\geq 99.9\%$ de pureza)

3.1 Preparación de Liposomas

Las propiedades de los lípidos pueden variar dependiendo de su composición, es decir, si son lípidos catiónicos, aniónicos o neutros. Sin embargo, se puede utilizar el mismo método de preparación para todas las vesículas lipídicas, independientemente de su composición [21].

El procedimiento que se llevó a cabo en este trabajo es el de hidratación de lípidos y consta básicamente de dos elementos generales, los cuales involucran la preparación de una película lipídica seca y su posterior hidratación bajo agitación. Dichos elementos se muestran en la figura 12.

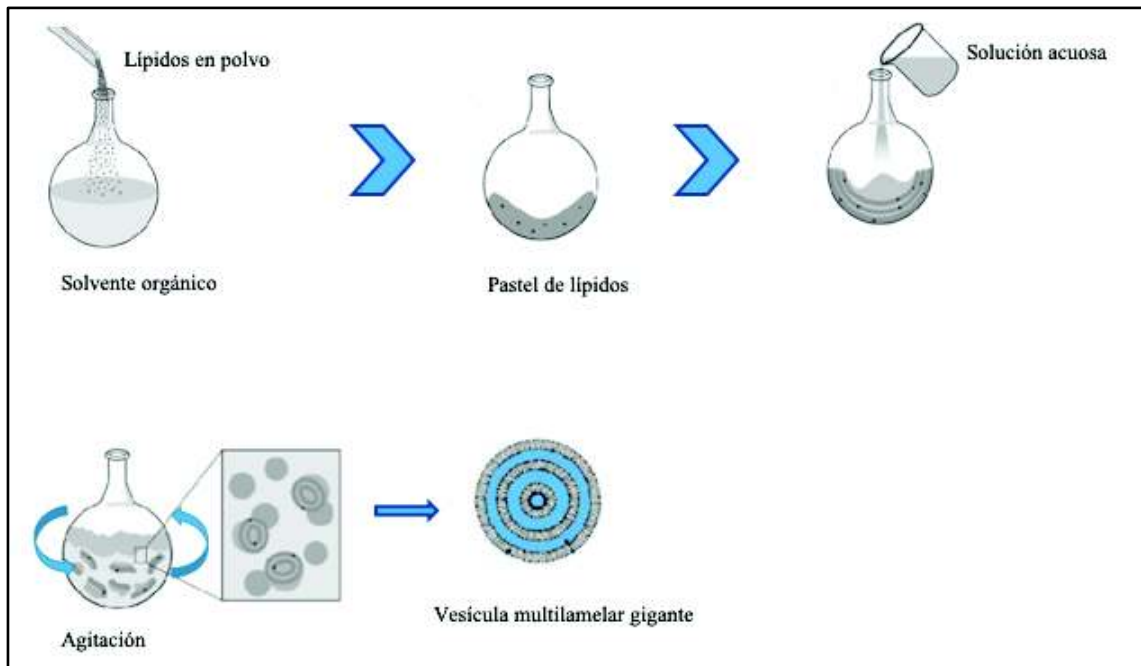


Fig. 12 Esquema paso a paso de la formación de vesículas: preparación del lípido-hidratación con agitación de la película lipídica.

A. Preparación del lípido para hidratación

Para preparar las vesículas de lecitina, lo primero que se debe de hacer es asegurarse de que la mezcla de lípidos esté totalmente homogénea. Para esto, los lípidos deben disolverse y mezclarse en un solvente orgánico. Para llevar acabo este procedimiento se utilizó una mezcla de cloroformo/metanol en una proporción de 2:1 v/v. La intención es obtener una solución lipídica clara indicativa de que los lípidos se han mezclado totalmente.

La solución lipídica fue preparada a 10-20 mg de Lecitina por ml de solvente orgánico (cloroformo/metanol), se mezcló vigorosamente hasta homogeneizar y posteriormente la fase orgánica se eliminó en una campana extractora de flujo laminar agitando intermitentemente para formar una película lipídica alrededor del vial. Una vez que se ha evaporado el solvente orgánico, la película lipídica se dejó al vacío durante dos horas para eliminar cualquier traza orgánica que pudiera haber quedado.

B. Hidratación de la película lipídica o pastel de lípidos

El siguiente paso es la hidratación de la película lipídica formada en el paso A. Esto se logra simplemente añadiendo un solvente acuoso a la película lipídica: agua, solución amortiguadora o solución de sacarosa. En este trabajo el medio hidratante fue agua ultrapura Milli-Q. La fase acuosa fue previamente calentada por arriba de la temperatura de transición de la lecitina (41°C) antes de añadirla a la película seca para lograr que los lípidos se hidrataran en su fase fluida, es decir, en la fase líquido desordenado l_d . Esta hidratación se llevó a cabo aproximadamente durante 1 hora con agitación vigorosa intermitente cuidando la temperatura durante todo el periodo ($< 41^\circ\text{C}$) con ayuda de un baño de agua. El producto de la hidratación es una suspensión de vesículas grandes multilamelares (MLV's); estos agregados son análogos en estructura a una cebolla, con las bicapas lipídicas vecinas separadas por una capa de agua.

3.2 Técnicas Dispersivas

3.2.1 Dispersión Dinámica de Luz (DLS):

Las soluciones de liposomas preparadas se diluyeron y se transfirieron a un vial específico para el goniómetro de dispersión de luz (DLS) BI-200MS de Brookhaven Instruments. Cada muestra se analizó por triplicado a una longitud de onda de 637 nm en un ángulo de 90° con una intensidad de láser de 50% y una potencia de 20 mW, con un baño térmico a una temperatura constante de 25°C , el tiempo de medición fue de 1 minuto en cada corrida. Para cada muestra analizada se obtuvo la polidispersidad, la función de correlación, los datos de la señal y el diámetro hidrodinámico promedio calculado mediante la ecuación de Stokes-Einstein. En la Fig. 13 se muestra el equipo utilizado en las mediciones de DLS.

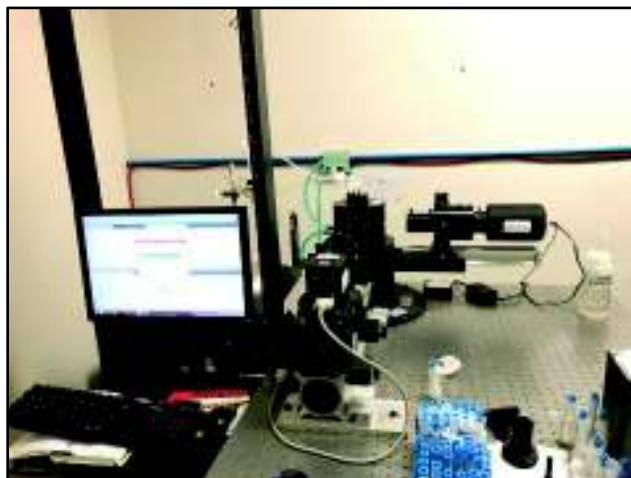


Fig. 13 Fotografía del goniómetro Brookhaven Instruments, modelo BI-200SM.

3.2.2 Dispersión de rayos-X a ángulos pequeños (SAXS):

Las mediciones se llevaron a cabo en un equipo SAXSpace (Anton Paar) operando a una longitud de onda $\lambda = 1.55 \text{ \AA}$. bajo un ángulo de $0.1^\circ - 10^\circ$ (ver Fig.14).

Se introdujeron por separado tres capilares o viales al equipo de SAXS, uno vacío, otro con el disolvente y otro con la solución de liposomas cuyas características son las que se quieren estudiar. En general, el tiempo de medida depende de la muestra a analizar y del contraste de la densidad electrónica, puede ir desde unos minutos hasta horas. Generalmente las muestras de liposomas se miden en un tiempo relativamente bajo del orden de minutos. Las curvas de dispersión $I(q)$ vs. q se corrigieron restando el disolvente puro.



Fig. 14 Fotografía del equipo SAXSpace (Anton Paar).

3.3 Técnicas Microscópicas

3.3.1 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM):

El TEM fue utilizado para investigar la morfología y el tamaño de las vesículas de lecitina. Las mediciones se llevaron a cabo en un equipo JEOL modelo JEM-2010 (ver Fig.15) operando a 200 kV adquiriendo las micrografías de manera digital a través de una cámara CCD de Gatan modelo SC200 incorporada al equipo. El análisis de la espectroscopía de dispersión de energía de rayos-X (EDS) permitió obtener la composición química del sistema de vesículas.



Fig. 15 Fotografía del microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo JEM-2010.

Para obtener micrografías de buena calidad, es decir, con un buen contraste, se utilizó la técnica de tinción de negativa [51] aplicada para muestras biológicas como es el caso de las vesículas. Esto se debe a que estos especímenes generalmente están formados por elementos químicos con números atómicos bajos por lo que es necesario prepararlos con especies químicas de número atómico mayor como son los metales pesados [52].

Esta técnica se puede realizar de dos formas, ya sea mezclando la muestra biológica con el metal pesado o bien, añadiendo estos compuestos gota a gota, es decir, una gota de la muestra luego una gota del metal [51]. En este estudio se utilizó la tinción negativa gota a gota que se describe a continuación.

Se tomó una cantidad de 10 μl de la muestra de vesículas y se colocó en un soporte o rejilla de cobre recubierta de carbono y se eliminó el exceso con un papel de filtro secante, posteriormente se recubrió la muestra con una gota (10 μl) del metal pesado ácido fosfotúngstico y se volvió a eliminar el exceso con la ayuda del papel filtro secante, la mezcla se dejó secar a temperatura ambiente y luego se mantuvo al vacío por unas horas. Finalmente,

la muestra se analizó en el microscopio electrónico de transmisión. En la figura 16 se muestran los dos procedimientos de tinción negativa paso a paso.

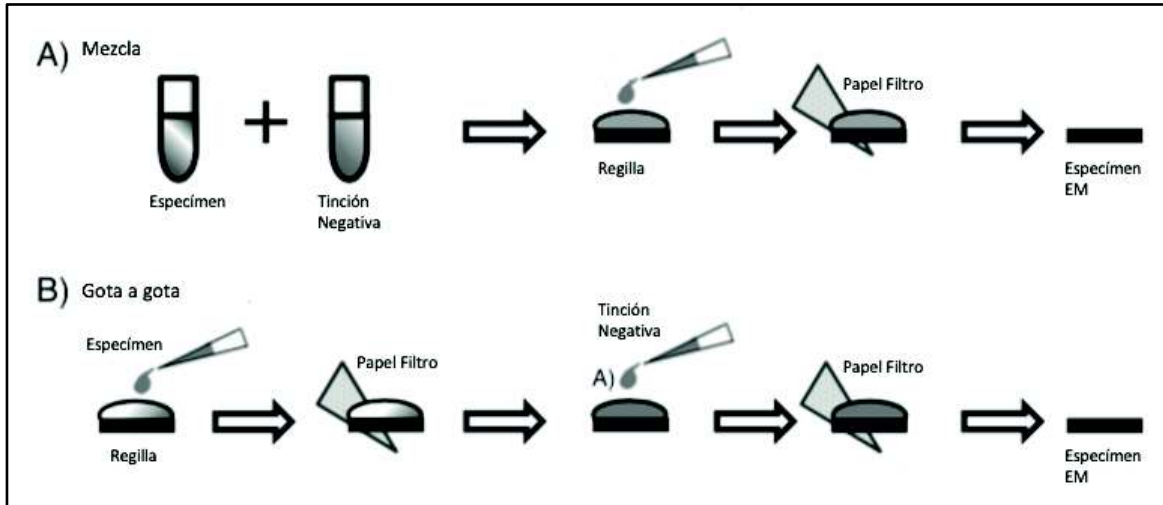


Fig. 16 Diagrama esquemático que ilustra el procedimiento comúnmente utilizado en la tinción negativa. (A) Mezcla; (B) Gota a gota [51].

3.3.2 Microscopía Óptica

Las mediciones se llevaron a cabo en un microscopio invertido Leica DMIL con una cámara integrada que permitió capturar fotos y vídeos (ver Fig.17).

Para obtener imágenes de las vesículas a diferentes magnificaciones, se tomó una gota de la solución lipídica, se colocó en un cubre objetos y se analizó en fresco bajo el microscopio invertido.



Fig. 17 Microscopio Óptico Invertido Leica DMIL.

En el siguiente capítulo se muestran los resultados obtenidos mediante estas técnicas de caracterización y su respectiva interpretación.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente capítulo se discuten las características de las vesículas de Lecitina formadas mediante el método de hidratación de lípidos. La presentación esta estructurada en dos partes: 1) técnicas dispersivas (Dispersión Dinámica de luz y Dispersión de Rayos X a Ángulos pequeños) y técnicas de microscopía (Microscopía Electrónica de Transmisión y Microscopía Óptica). A continuación, se presentan los resultados obtenidos mediante estas técnicas de caracterización en el orden anteriormente mencionado.

4.1 Dispersión Dinámica de Luz (DLS)

La técnica de DLS se usó para obtener el radio hidrodinámico (R_H) promedio de las vesículas de Lecitina en solución y la polidispersidad de la muestra. Aunque se prepararon más muestras, aquí se muestran los resultados significativos de tres sistemas de vesículas de Lecitina preparadas todas bajo las condiciones que se describe en el capítulo 3; cada muestra se analizó por triplicado a 25°C y a un ángulo de 90°.

Antes de entrar al detalle de los resultados, definiremos los parámetros de entrada y de salida del instrumento de dispersión de luz [39,53], estos datos aparecen en las tablas de los resultados que se muestran posteriormente.

Parámetros de entrada (ajustables por el operador):

Primer decaimiento y último decaimiento: Indican el intervalo de tiempo en que se calcula la función de correlación; los valores típicos están entre 5 μ s – 100 ms.

Tiempo Transcurrido: Tiempo de duración del experimento.

Longitud de onda (λ): Longitud de onda del láser He-Ne utilizado en el goniómetro.

Ángulo (θ): Ángulo al cual esta posicionado el detector de luz/ángulo de dispersión.

Temperatura: Temperatura constante en grados Celsius del baño de circulación del equipo DLS. Según la temperatura a la que se quiere analizar la muestra.

Líquido: Líquido utilizado para suspender las partículas (muestra).

Viscosidad: Corresponde a la viscosidad del disolvente o líquido en suspensión, es decir, el líquido en el cual las partículas se mueven (en este caso, agua).

Índice de refracción: Corresponde al índice de refracción de líquido de la muestra (agua en nuestro caso).

Parámetros de salida (obtenidos en el experimento):

Atot: Número de cuentas totales durante el experimento (fotones detectados).

A CR (promedio): Indica la tasa de recuento promedio (en kilocuentas por segundo), es decir, el número de fotones por segundo para la entrada A.

M. Base: Indica la línea de base medida. Este parámetro es necesario para los ajustes de la función de correlación.

C. Base: Hace referencia a la línea de base calculada (una línea de base calculada se determinada a partir del número de muestras y los recuentos totales) / Primer canal cuentas sobre la línea calculada. Este parámetro es necesario para los ajustes de la función de correlación.

Diferencia de base: Es la diferencia porcentual entre la línea de base medida y la línea de base calculada. Este parámetro es necesario para los ajustes de la función de correlación.

Diámetro efectivo: Indica el radio hidrodinámico promedio de las partículas en suspensión.

Polidispersidad: Indica la medida del ancho de la distribución de tamaño.

En la técnica de dispersión dinámica de luz se mide la intensidad luminosa dispersada por la muestra a un cierto ángulo en función del tiempo. A partir de las fluctuaciones en la intensidad, se calcula la denominada función de correlación. Para el caso de agregados esféricos (muestra monodispersa), dicha función decae exponencialmente en función del tamaño de las partículas: cuando las partículas son pequeñas (movilidad grande) el decaimiento es rápido; cuando las partículas son grandes (movilidad reducida) el decaimiento es lento. En ambos casos, del tiempo de decaimiento se puede obtener el coeficiente de difusión y a partir de este, el radio hidrodinámico de las partículas. En el caso de partículas no perfectamente esféricas, las funciones de correlación pueden también ajustarse a exponenciales. Del decaimiento se obtiene un diámetro hidrodinámico efectivo de los agregados.

El correlador aplicado en el DLS es básicamente un comparador de señales y brinda información del tamaño de las partículas que están en movimiento Browniano constante. La distribución de tamaño obtenida es una gráfica de la intensidad relativa de la luz dispersada por partículas en varias clases de tamaños, por lo tanto, se conoce como una distribución de tamaño de intensidad [34]. En la fig.18 se ilustra una función de correlación típica y su respectiva interpretación. El tiempo inicial de decaimiento indica si el tamaño promedio de las partículas es grande o pequeño; el gradiente de la función de correlación indica que tan monodispersa o polidispersa es la muestra y la línea de base indica si hay presencia de partículas grandes o agregados. Una línea de base plana sugiere que no se encuentran estas partículas grandes o agregados, en cambio una línea de base no plana indica que sí están presentes.

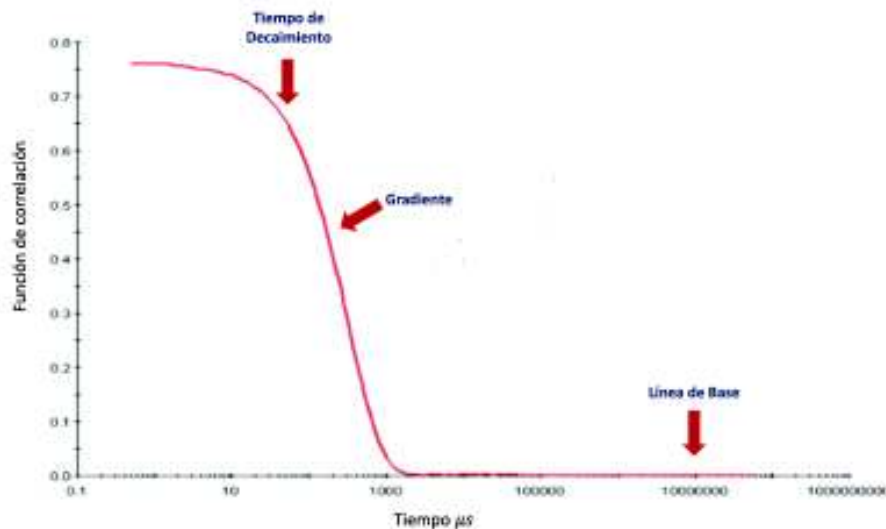


Fig. 18 Interpretación de la función de correlación. Gráfica tomada del curso teórico-práctico en la tecnología DLS-NIBS (Dynamic Light Scattering-Non-Invasive Back Scatter) para el uso del equipo Zetasizer Nano de la firma Malvern Panalytical. Iesmat (Instrumentación Específica de Materiales).

En las siguientes figuras 19, 21 y 23 se muestra la gráfica de las señales de fluctuación, es decir, las fluctuaciones de las partículas en el tiempo para la primera muestra de vesículas de Lecitina a una concentración de 15 mg/ml, medidas a 90° y su respectiva función de correlación típica $C(q,t)$ (figuras 20, 22 y 24).

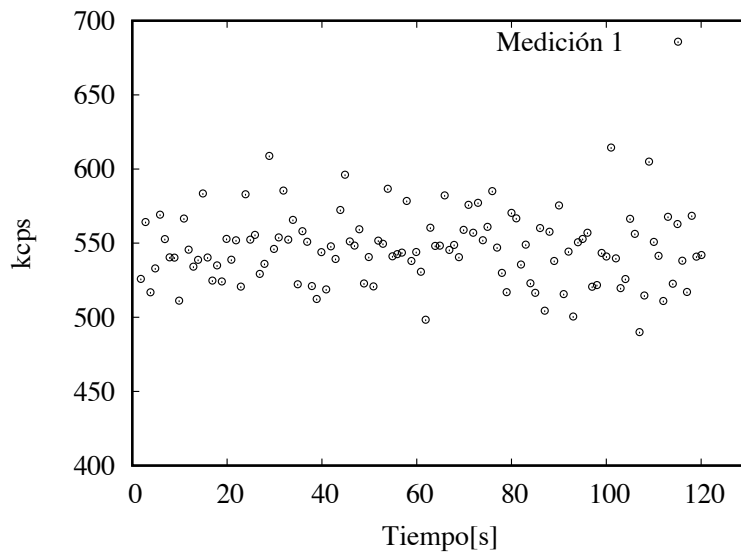


Fig. 19 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 1 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.

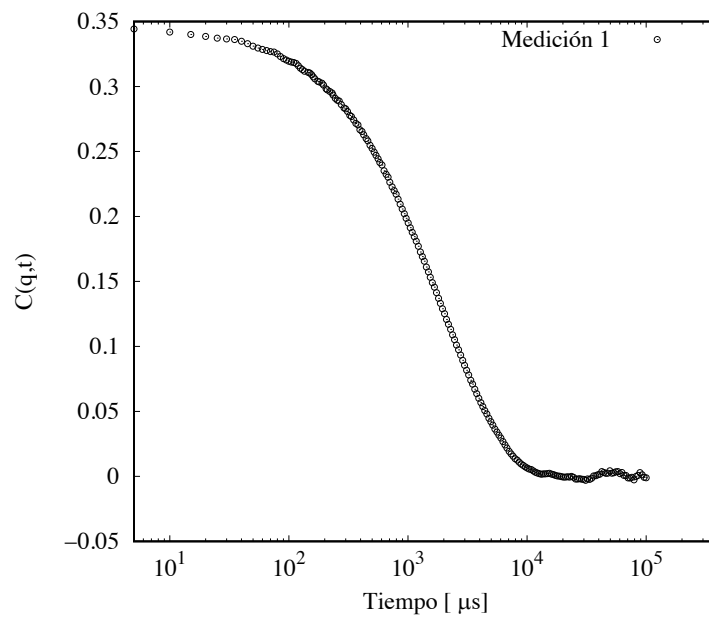


Fig. 20 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 1 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.

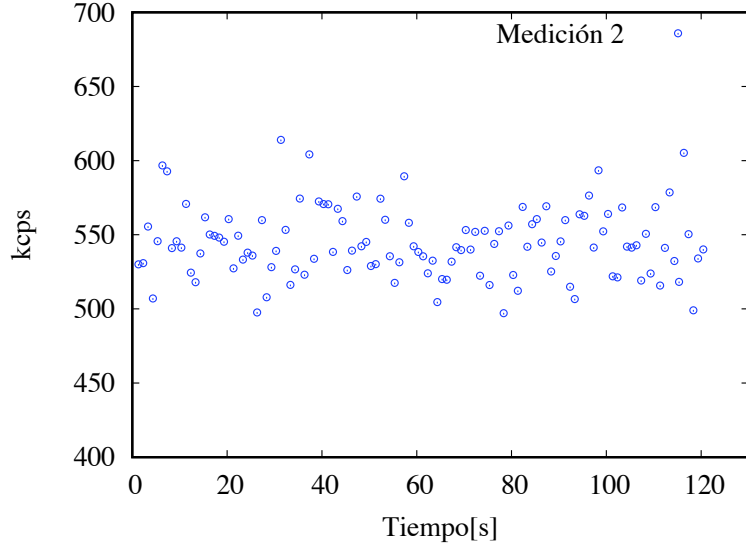


Fig. 21 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 2 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.

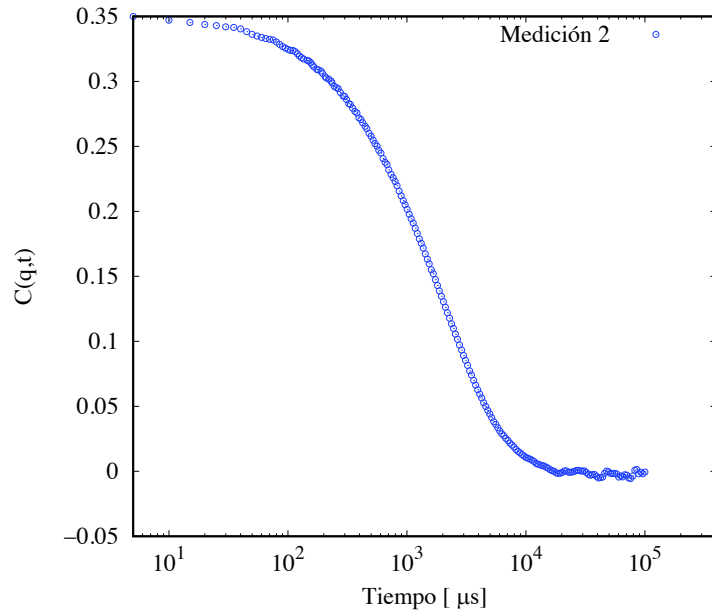


Fig. 22 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 2 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.

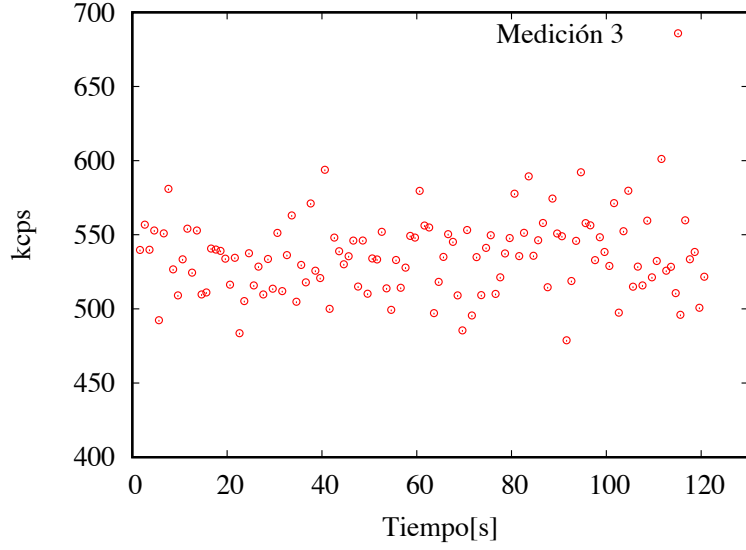


Fig. 23 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 3 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.

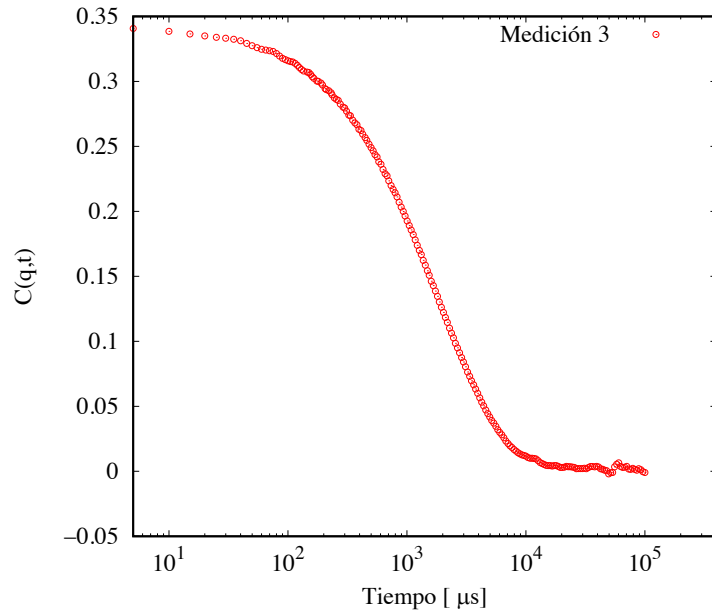


Fig. 24 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 3 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.

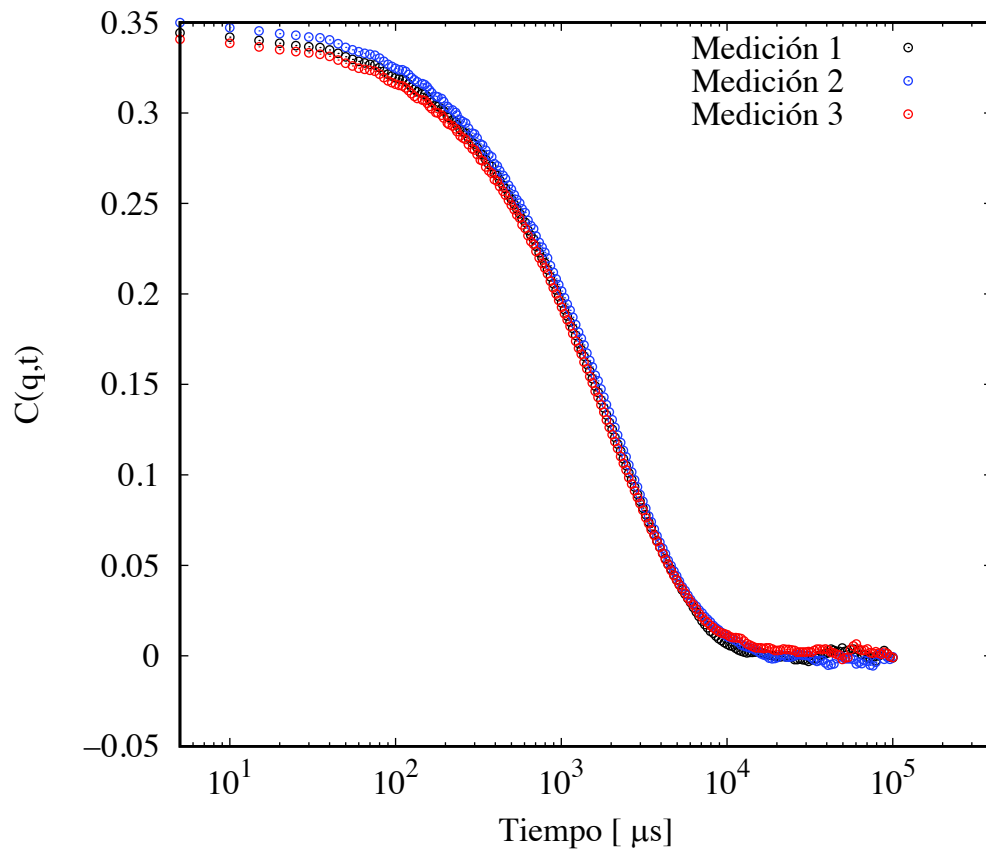


Fig. 25 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Mediciones 1, 2 y 3 de la primera muestra de vesículas de Lecitina.

En las figuras 19, 21 y 23 se ilustran las gráficas de fluctuaciones de intensidad de las partículas respecto al tiempo, dichas fluctuaciones son típicas de muestras con partículas grandes, ya que la velocidad a la que se producen estas fluctuaciones de intensidad es lenta [34].

Por otra parte, todas las funciones de correlación se ajustaron bien a exponenciales. Las funciones de correlación de las tres mediciones para la primera muestra de vesículas de Lecitina son típicas de partículas grandes. Como se muestra en las Fig. 20, 22 y 24 la intensidad de la señal cambia lentamente y la correlación persiste durante mucho tiempo, es decir, el momento en que la curva (correlación) comienza a decaer se ve a partir de los 100 μ s. Además, se puede apreciar que la línea de decaimiento es extendida (ancha) con una línea de base no plana, esto es indicativo de una muestra moderadamente polidispersa. Normalmente para partículas pequeñas (diámetro ≤ 100 nm) y monodispersas, la señal de intensidad decae más rápidamente, típicamente antes de los 100 μ s y la línea de decaimiento es más inclinada [11,34,54]. En la Fig. 25 se muestran todas las funciones de correlación en una misma gráfica para la primera muestra de vesículas, donde el comportamiento de la función de correlación para las tres corridas es prácticamente el mismo.

En las siguientes Tablas (1, 2 y 3) se muestran todos los parámetros anteriormente mencionados, tanto los de entrada como los obtenidos mediante la medición de DLS de la primera muestra de vesículas.

Tabla 1 Parámetros obtenidos en la medición 1 de la primera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.

Primer Decaimiento	5.0 μ s	Índice de Refracción	1.331
Último Decaimiento	100.0 ms	Atot	5.6255×10^7
Tiempo Transcurrido	00:02:00	A CR (promedio)	545.9 kcps
Longitud de Onda	637.0 nm	M. Base	1.5390×10^8
Ángulo	90.0	C. Base	1.5354×10^8
Temperatura	25.0 °C	Diferencia de base	0.233%
Líquido	Agua	Diámetro Efectivo	617.6 nm
Viscosidad	0.890 cP	Polidispersidad	0.318

Tabla 2 Parámetros obtenidos en la medición 2 de la primera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.

Primer Decaimiento	5.0 μ s	Índice de Refracción	1.331
Último Decaimiento	100.0 ms	Atot	5.6235×10^7
Tiempo Transcurrido	00:02:00	A CR (promedio)	544.0 kcps
Longitud de Onda	637.0 nm	M. Base	1.5255×10^8
Ángulo	90.0	C. Base	1.5295×10^8
Temperatura	25.0 °C	Diferencia de base	-0.257%
Líquido	Agua	Diámetro Efectivo	638.7 nm
Viscosidad	0.890 cP	Polidispersidad	0.311

Tabla 3 Parámetros obtenidos en la medición 3 de la primera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.

Primer Decaimiento	5.0 μ s	Índice de Refracción	1.331
Último Decaimiento	100.0 ms	Atot	5.5407×10^7
Tiempo Transcurrido	00:02:01	A CR (promedio)	535.1 kcps
Longitud de Onda	637.0 nm	M. Base	1.4823×10^8
Ángulo	90.0	C. Base	1.4824×10^8
Temperatura	25.0 °C	Diferencia de base	-0.007%
Líquido	Agua	Diámetro Efectivo	666.7 nm
Viscosidad	0.890 cP	Polidispersidad	0.183

De todos los parámetros obtenidos, los de mayor relevancia son el D_H promedio y la polidispersidad de la muestra. Por lo tanto, en la Tabla 4 se muestra un resumen de las tres mediciones de la primera muestra, involucrando únicamente el radio hidrodinámico promedio y la polidispersidad.

Tabla 4 Resumen de las Tablas 1, 2 y 3. Valores de diámetro hidrodinámico promedio y polidispersidad obtenidos en las mediciones de la primera muestra mediante DLS.

Mediciones	D_H	Polidispersidad
No.1	617.6 nm	0.318
No.2	638.7 nm	0.311
No.3	666.7 nm	0.183

El promedio del D_H de la primera muestra fue de 641 nm y el promedio de la polidispersidad de la muestra fue de 0.271.

A continuación, se presentan las gráficas y tablas para el segundo sistema de vesículas de Lecitina a una concentración de 15 mg/ml, medidas por triplicado a 90°.

En las Figuras 26, 28 y 30 se muestra la gráfica de las señales de fluctuación de las vesículas de Lecitina medidas a 90° y su respectiva función de correlación típica $C(q,t)$ (Fig. 27, 29 y 31).

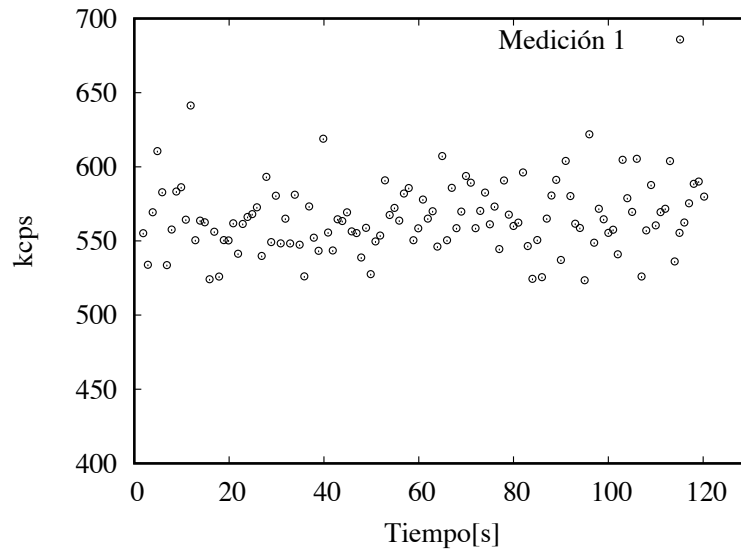


Fig. 26 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 1 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.

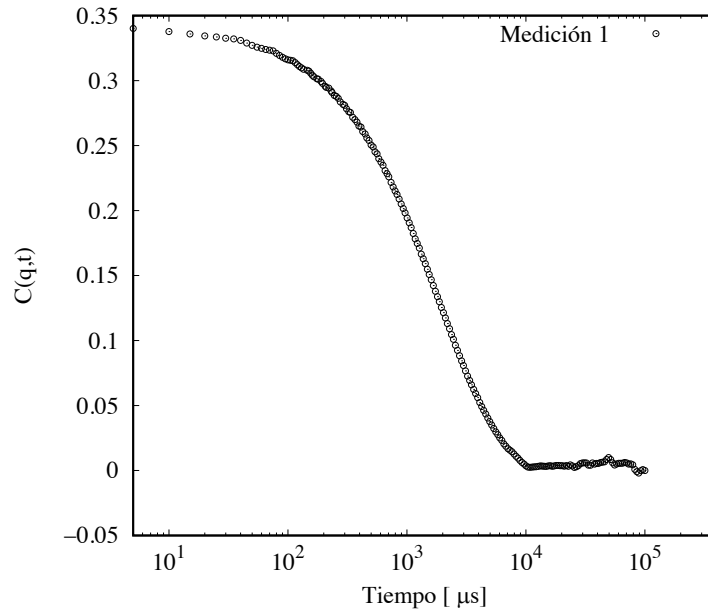


Fig. 27 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 1 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.

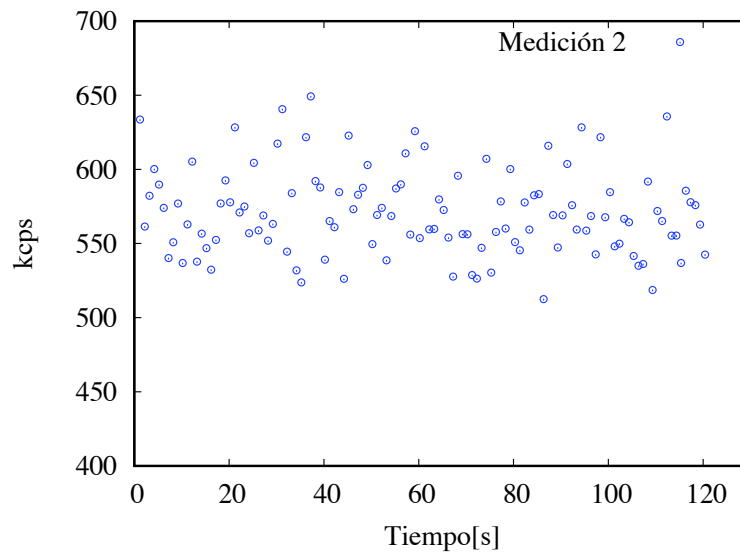


Fig. 28 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 2 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.

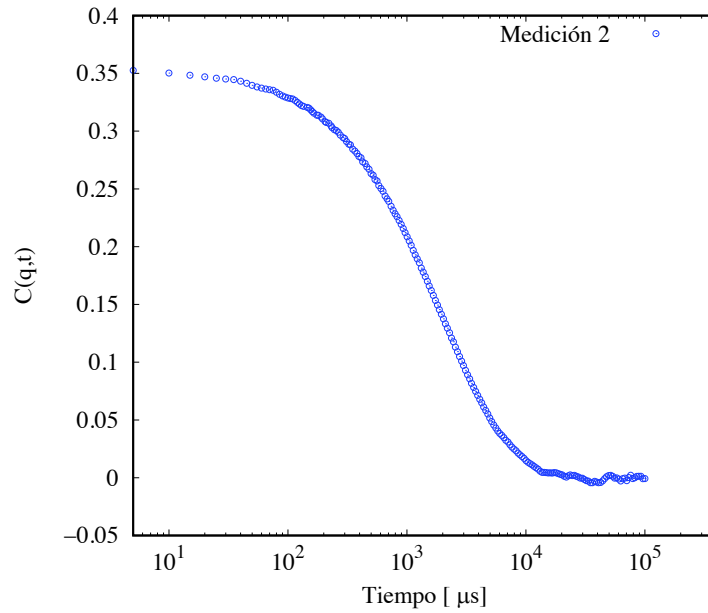


Fig. 29 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 2 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.

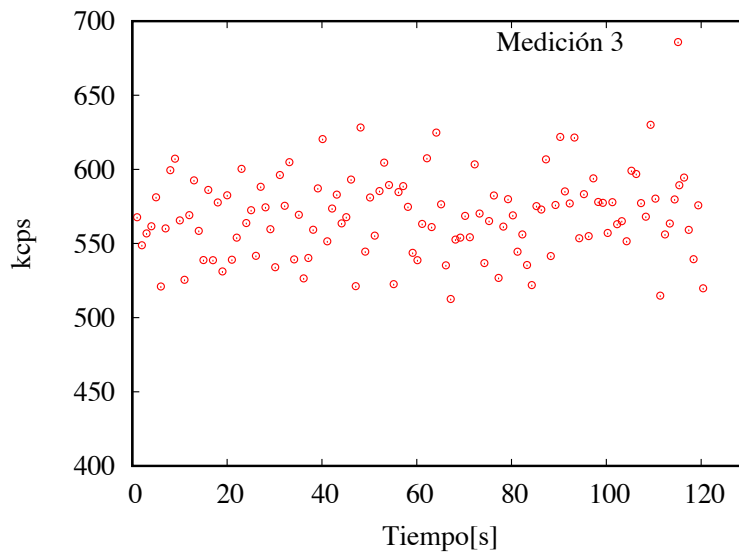


Fig. 30 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 3 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.

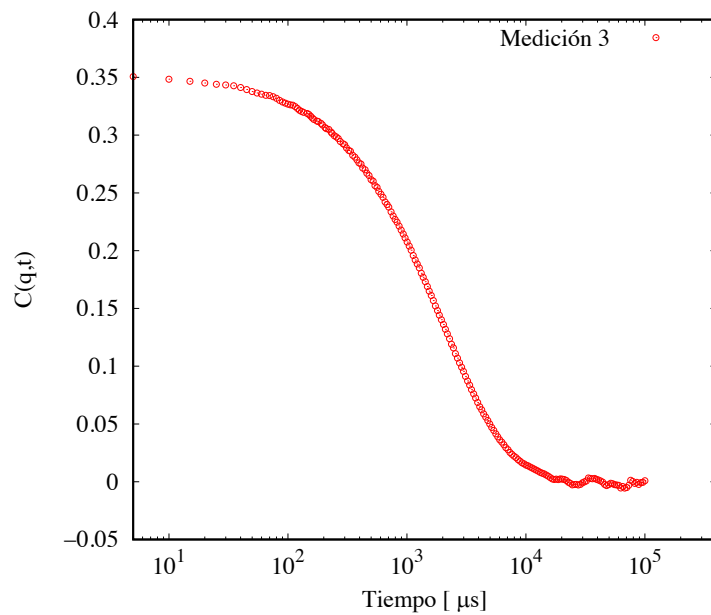


Fig. 31 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 3 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.

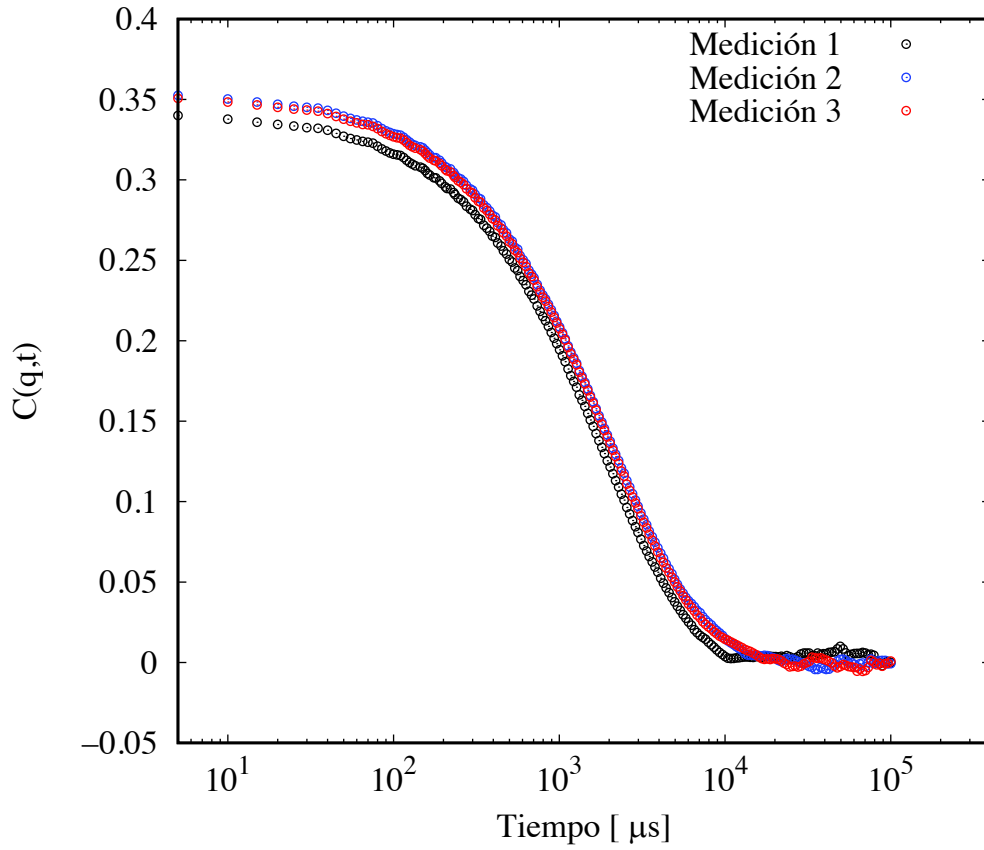


Fig. 32 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Mediciones 1, 2 y 3 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina.

Los resultados de las gráficas de las fluctuaciones típicas de intensidad y de la función de correlación (26-32), muestran un comportamiento muy similar al descrito para la muestra 1. Se trata de un sistema de vesículas de Lecitina conformado por partículas grandes y moderadamente polidisperso. Los resultados indican un tiempo de decaimiento aproximadamente entre $100 \mu\text{s}$ y 1 ms , una línea de decaimiento ancha y una línea de base no plana.

De igual manera que en el caso de la primera muestra, para la segunda muestra también se presentan los parámetros obtenidos mediante la medición de DLS. (Tablas 5, 6 y 7).

Tabla 5 Parámetros obtenidos en la medición 1 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.

Primer Decaimiento	5.0 μ s	Índice de Refracción	1.331
Último Decaimiento	100.0 ms	Atot	5.8337×10^7
Tiempo Transcurrido	00:02:00	A CR (promedio)	565.2 kcps
Longitud de Onda	637.0 nm	M. Base	1.6521×10^8
Ángulo	90.0	C. Base	1.6486×10^8
Temperatura	25.0 °C	Diferencia de base	0.212%
Líquido	Agua	Diámetro Efectivo	700.1 nm
Viscosidad	0.890 cP	Polidispersidad	0.119

Tabla 6 Parámetros obtenidos en la medición 2 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.

Primer Decaimiento	5.0 μ s	Índice de Refracción	1.331
Último Decaimiento	100.0 ms	Atot	5.8968×10^7
Tiempo Transcurrido	00:02:00	A CR (promedio)	570.4 kcps
Longitud de Onda	637.0 nm	M. Base	1.6887×10^8
Ángulo	90.0	C. Base	1.6817×10^8
Temperatura	25.0 °C	Diferencia de base	0.419%
Líquido	Agua	Diámetro Efectivo	688.3 nm
Viscosidad	0.890 cP	Polidispersidad	0.306

Tabla 7 Parámetros obtenidos en la medición 3 de la segunda muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.

Primer Decaimiento	5.0 μ s	Índice de Refracción	1.331
Último Decaimiento	100.0 ms	Atot	5.8741×10^7
Tiempo Transcurrido	00:02:00	A CR (promedio)	568.2 kcps
Longitud de Onda	637.0 nm	M. Base	1.6679×10^8
Ángulo	90.0	C. Base	1.6688×10^8
Temperatura	25.0 °C	Diferencia de base	-0.054%
Líquido	Agua	Diámetro Efectivo	676.5 nm
Viscosidad	0.890 cP	Polidispersidad	0.312

En la Tabla 8 se muestran los parámetros resumidos de las tres mediciones de la segunda muestra, involucrando únicamente el diámetro hidrodinámico promedio y la polidispersidad.

Tabla 8 Resumen de las Tablas 5, 6 y 7. Valores de diámetro hidrodinámico promedio y polidispersidad obtenidos en las mediciones de la segunda muestra mediante DLS

Mediciones	D_H	Polidispersidad
No.1	700.1 nm	0.119
No.2	688.3 nm	0.306
No.3	676.5 nm	0.312

El promedio del D_H de la segunda muestra fue de 688.8 nm y el promedio de la polidispersidad de la muestra fue de 0.246.

Finalmente, En las siguientes gráficas (Fig. 33, 35 y 37) se muestra el gráfico de las señales, es decir, de las fluctuaciones de las partículas en el tiempo de las vesículas de Lecitina medidas a 90° para la tercera muestra preparada a una concentración de 15 mg/ml y su respectiva función de correlación típica C(q,t) (Fig. 34, 36 y 38).

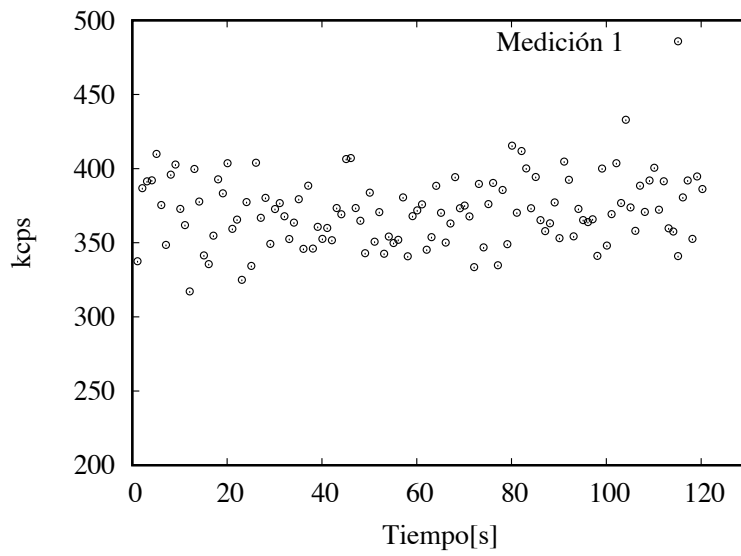


Fig. 33 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 1 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.

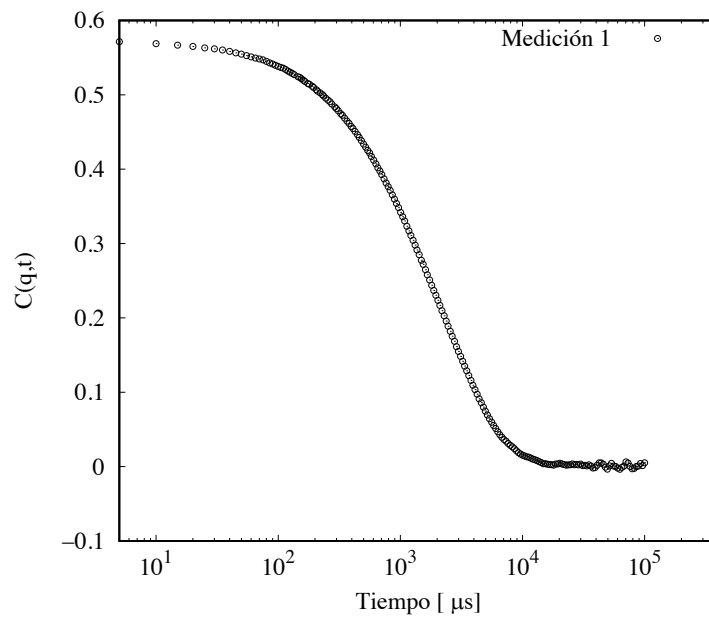


Fig. 34 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 1 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.

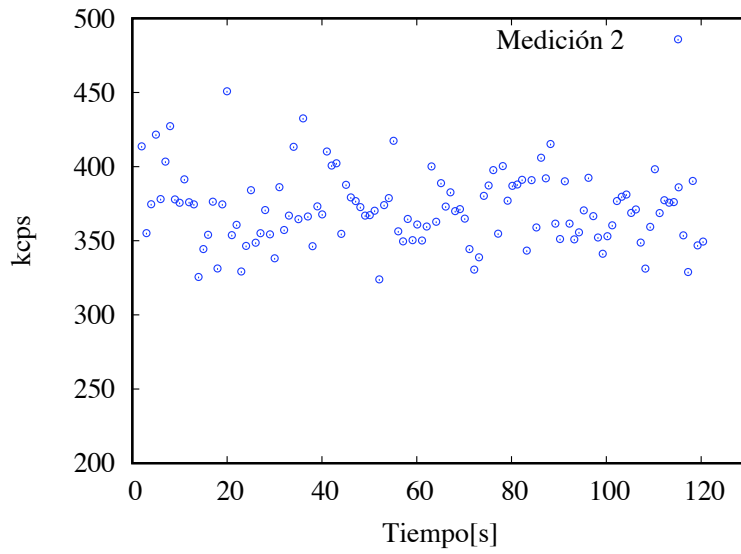


Fig. 35 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 2 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.

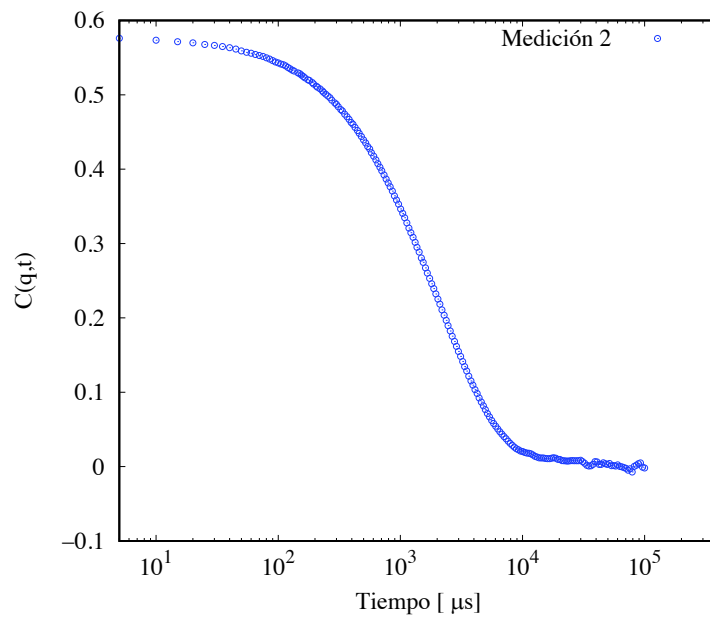


Fig. 36 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 2 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.

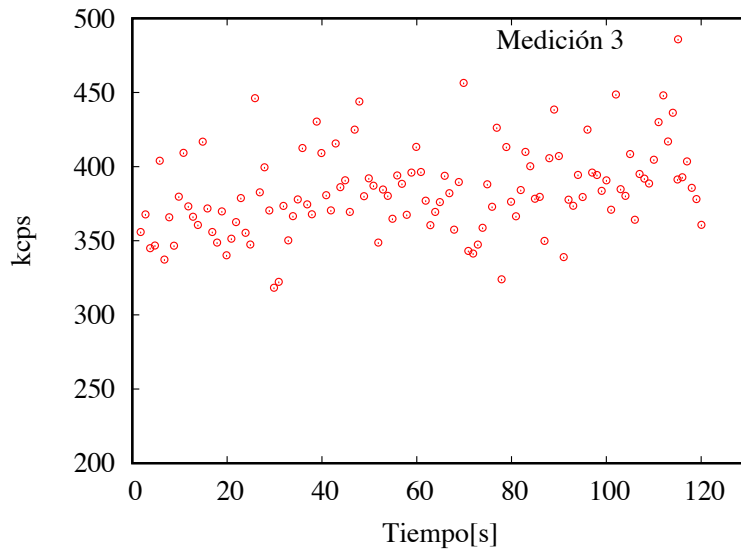


Fig. 37 Fluctuaciones típicas de intensidad de la medición 3 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.

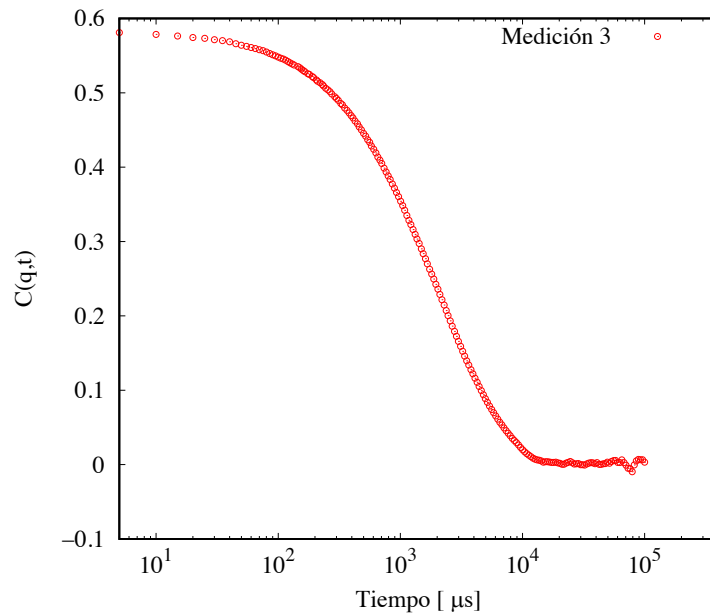


Fig. 38 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Medición 3 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.

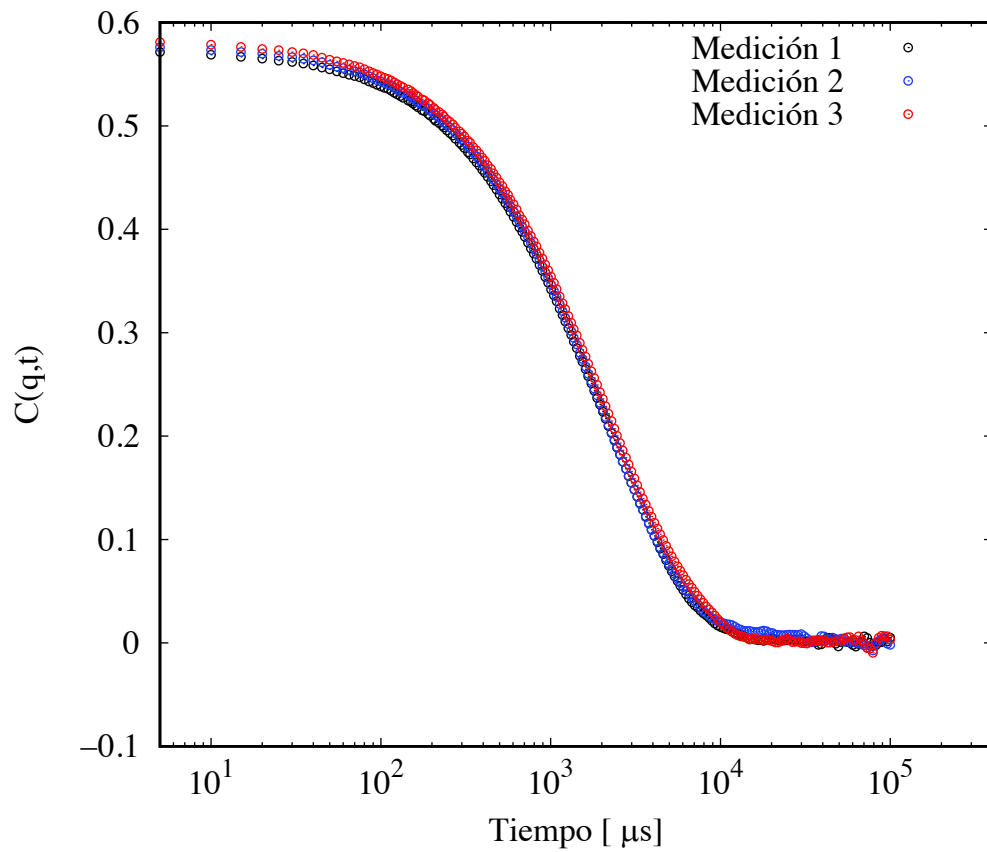


Fig. 39 Función de correlación típica $C(q,t)$ medida a $\theta = 90^\circ$. Mediciones 1, 2 y 3 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina.

Los resultados de las gráficas de las fluctuaciones típicas de intensidad y de la función de correlación (33-39), muestran un comportamiento muy similar al descrito para la muestra 1 y 2. Nuevamente se trata de un sistema de vesículas de Lecitina conformado por partículas grandes y moderadamente polidisperso. Con un tiempo de decaimiento que se aprecia aproximadamente después de los 100 μ s y antes de 1 ms, una línea de decaimiento ancha y una línea de base no plana.

En las siguientes Tablas (9, 10 y 11) se muestran los parámetros obtenidos mediante la medición de DLS de la tercera preparación de vesículas.

Tabla 9 Parámetros obtenidos en la medición 1 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.

Primer Decaimiento	5.0 μ s	Índice de Refracción	1.331
Último Decaimiento	100.0 ms	Atot	3.8214×10^7
Tiempo Transcurrido	00:02:00	A CR (promedio)	370.8 kcps
Longitud de Onda	637.0 nm	M. Base	7.0869×10^7
Ángulo	90.0	C. Base	7.0850×10^7
Temperatura	25.0 °C	Diferencia de base	0.026%
Líquido	Agua	Diámetro Efectivo	694.2 nm
Viscosidad	0.890 cP	Polidispersidad	0.231

Tabla 10 Parámetros obtenidos en la medición 2 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.

Primer Decaimiento	5.0 μ s	Índice de Refracción	1.331
Último Decaimiento	100.0 ms	Atot	3.8357×10^7
Tiempo Transcurrido	00:02:00	A CR (promedio)	371.6 kcps
Longitud de Onda	637.0 nm	M. Base	7.1787×10^7
Ángulo	90.0	C. Base	7.1268×10^7
Temperatura	25.0 °C	Diferencia de base	0.729%
Líquido	Agua	Diámetro Efectivo	724.2 nm
Viscosidad	0.890 cP	Polidispersidad	0.177

Tabla 11 Parámetros obtenidos en la medición 3 de la tercera muestra de vesículas de Lecitina mediante DLS.

Primer Decaimiento	5.0 μ s	Índice de Refracción	1.331
Último Decaimiento	100.0 ms	Atot	3.9365×10^7
Tiempo Transcurrido	00:02:00	A CR (promedio)	382.6 kcps
Longitud de Onda	637.0 nm	M. Base	7.5497×10^7
Ángulo	90.0	C. Base	7.5302×10^7
Temperatura	25.0 °C	Diferencia de base	0.260%
Líquido	Agua	Diámetro Efectivo	711.3 nm
Viscosidad	0.890 cP	Polidispersidad	0.302

En la Tabla 12 se muestran los parámetros resumidos de las tres mediciones de la tercera muestra, involucrando únicamente el radio hidrodinámico promedio y la polidispersidad.

Tabla 12 Resumen de las Tablas 9, 10 y 11. Valores de diámetro hidrodinámico promedio y polidispersidad obtenidos en las mediciones de la tercera muestra mediante DLS.

Mediciones	D_H	Polidispersidad
No.1	694.2 nm	0.231
No.2	724.2 nm	0.177
No.3	711.3 nm	0.302

El promedio del D_H de la tercera muestra fue de 709.9 nm y el promedio de la polidispersidad de la muestra fue de 0.237.

El D_H promedio de las tres muestras de vesículas de Lecitina fue de 641 nm, 688.8 nm y 709.9 nm respectivamente. Mientras que la polidispersidad para la primera muestra fue de 0.271, para la segunda muestra 0.246 y para la tercera muestra 0.237. Estos valores arrojados mediante las mediciones de DLS nos indican que se trata de un sistema conformado por partículas relativamente grandes, pero no mayores a una micra y que es un sistema no

monodisperso, es decir, que se encuentran partículas de diferentes tamaños con una polidispersidad > 0.05 . El método más conocido para analizar la polidispersidad es el método de cumulantes propuesto por primera vez por Denis E. Koppel [55]. Cuando la polidispersidad es igual a cero, la muestra es monodispersa y, a medida que la polidispersidad aumenta, también lo hace el ancho de la distribución. Como generalización, se encuentra que el análisis acumulativo funciona mejor cuando la polidispersidad ≤ 0.3 , aproximadamente. Para determinar esta polidispersidad se requiere un ajuste de segundo orden y para determinar la inclinación se requiere un ajuste de tercer orden [39]. Los valores que se encuentran por encima de 1 indican que la muestra es muy polidispersa, incluso se considera no adecuada para medir con DLS (ISO13321).

El diámetro y la polidispersidad obtenidos en las tres muestras coinciden con sus respectivas gráficas de correlación y de fluctuación de intensidad, ya que en todos los casos (muestra 1, 2 y 3) el tiempo de decaimiento se presentó entre 100 y 1000 μs con una línea de base no plana indicativo de la presencia de partículas o agregados grandes con un rango medio de polidispersidad. Además, las fluctuaciones de las partículas respecto al tiempo fueron relativamente lentas, lo cual también nos indica que el sistema de vesículas de Lecitina está compuesto por partículas grandes, ya que, en base al movimiento Browniano, a mayor tamaño de la partícula más lenta es su fluctuación [34].

Por otra parte, el realizar las mediciones por triplicado para cada muestra de vesículas de Lecitina fue con la intención de tener una buena calidad de los datos obtenidos durante las mediciones y una mayor estadística de estos datos. En teoría al realizar tres repeticiones de una misma muestra, el D_H promedio, el tiempo de decaimiento y las kilocuentas por segundo de las partículas, deberían ser similares en todas las repeticiones. En este trabajo las tres mediciones de cada muestra arrojaron valores muy similares de tasa de cuentas (kcps) lo cual nos dice que probablemente durante el tiempo de medición, las vesículas de Lecitina (partículas) no se agregaron entre ellas y no sedimentaron. En cuanto al diámetro hidrodinámico promedio obtenido de la repetición de medidas en cada muestra, presentó una variación menor al 2% lo cual de igual manera nos indica que durante el tiempo en que realizó cada medición, las partículas fueron estables.

4.2 Dispersión de Rayos-X a Ángulos Pequeños (SAXS).

La morfología de las vesículas de Lecitina fue probada a través del análisis de SAXS. Las intensidades de dispersión fueron graficadas en función del vector de dispersión Q definido como:

$$Q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

En donde Q es el ángulo de dispersión y λ la longitud de onda del rayo X incidente.

La intensidad de rayos X dispersada por las partículas depende de Q y por lo tanto depende de θ .

La Fig.40 muestra el espectro de SAXS de la solución de vesículas de Lecitina 15 mg/ml en agua a 25 °C. El espectro obtenido presenta formas de línea característico de una esfera, ya que decae hasta llegar a un mínimo, posteriormente sube hasta llegar a un máximo y finalmente vuelve a bajar. Este patrón o factor de forma se encuentra establecido en la literatura y oscila de una manera típica de la forma de la partícula, por lo tanto, las curvas obtenidas del sistema de vesículas mediante las mediciones de SAXS en este estudio, coincide con el factor de forma reportado en otros estudios [30,37,39,40,50]. En el presente trabajo no se realizó el ajuste de diferentes parámetros como el radio, grosor, densidad electrónica, entre otros, ya que sólo se buscaba estudiar la forma de las vesículas de Lecitina y no su estructura interna ni el tamaño.

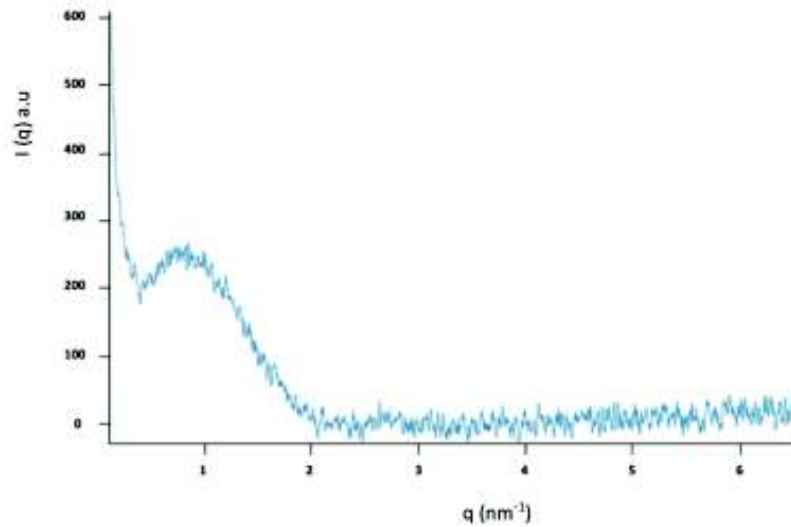


Fig. 40 Espectro de SAXS de vesículas de lectina ($[c] = 15 \text{ mg/ml}$).

4.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las micrografías de TEM que se muestran en la Fig.41 y Fig.42 revelaron para todo el sistema de vesículas de Lecitina, la formación de estructuras esféricas de tamaño variado generalmente en el rango de $0.5 \mu\text{m}$ (500 nm). Se pueden observar agregados grandes y pequeños en las micrografías, lo cual coincide con los resultados del análisis de dispersión dinámica de luz, ya que el D_H promedio de las vesículas fue casi de 700 nm presentando polidispersidad en la muestra. En las micrografías se puede apreciar un fondo negro de apariencia líquida en las partículas esféricas, interfiriendo en la calidad de las imágenes de TEM. Se cree que pudo ser efecto de la preparación de la muestra de vesículas (tinción negativa), quizá la cantidad añadida del metal pesado ácido fosfotúngstico no hizo buen contraste con la muestra.

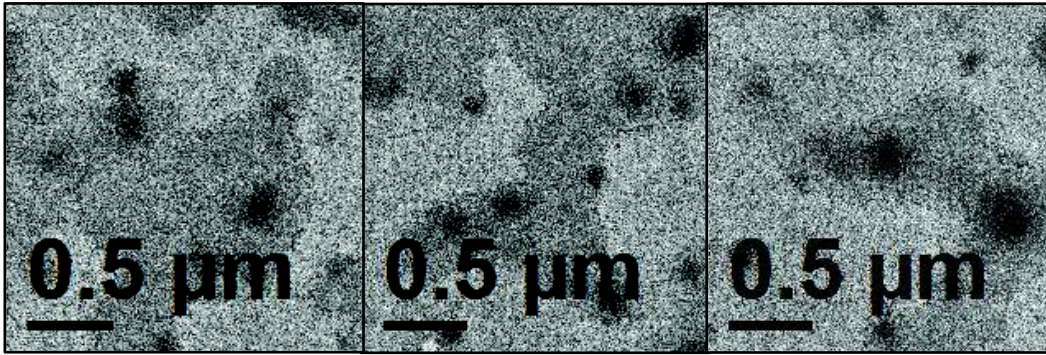


Fig. 42 Micrografías de TEM de vesículas de Lecitina formadas en agua. Las estructuras fueron analizadas después de la tinción negativa. La barra de escala corresponde a 0.5 μm .

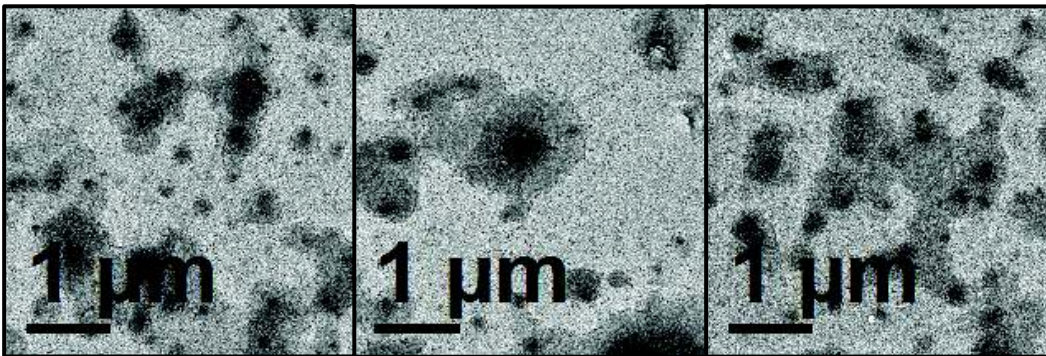


Fig. 41 Micrografías de TEM de vesículas de Lecitina formadas en agua. Las estructuras fueron analizadas después de la tinción negativa. La barra de escala corresponde a 1 μm .

Para conocer los elementos químicos que conforman el sistema de vesículas de Lecitina se realizó la espectroscopía de rayos X de dispersión de energía (EDS). Se muestra en la gráfica de la Fig.43 los picos correspondientes a los elementos químicos presentes en las vesículas. Los elementos de principal interés son el fósforo (P), carbono (C), oxígeno (O) y nitrógeno (N) ya que son los elementos que componen al fosfolípido (Lecitina). Todos estos elementos están presentes en la gráfica de EDS a excepción del nitrógeno. Los demás elementos presentes se piensan que corresponden a sales que pudieran ser producto del medio acuoso utilizado en el paso de hidratación de la preparación de las vesículas. Excepto el cobre que se debe al soporte utilizado en la preparación la muestra previa al análisis de TEM. Otro punto que hay que mencionar es que el ácido fosfotúngstico con el que se recubrió a las vesículas en la tinción negativa, contiene fósforo, por lo cual se recomienda analizar las

vesículas con otro metal pesado o sin teñirlas para descartar que el pico de P presente en el análisis de EDS se deba al ácido fosfotúngstico.

En otras palabras, gracias al análisis de EDS se pudieron detectar los elementos químicos que conforman a la lecitina de la yema de huevo (comercial) utilizada en el proceso de fabricación de liposomas mediante el método de hidratación de lípidos. Estos elementos se aprecian en la siguiente figura.

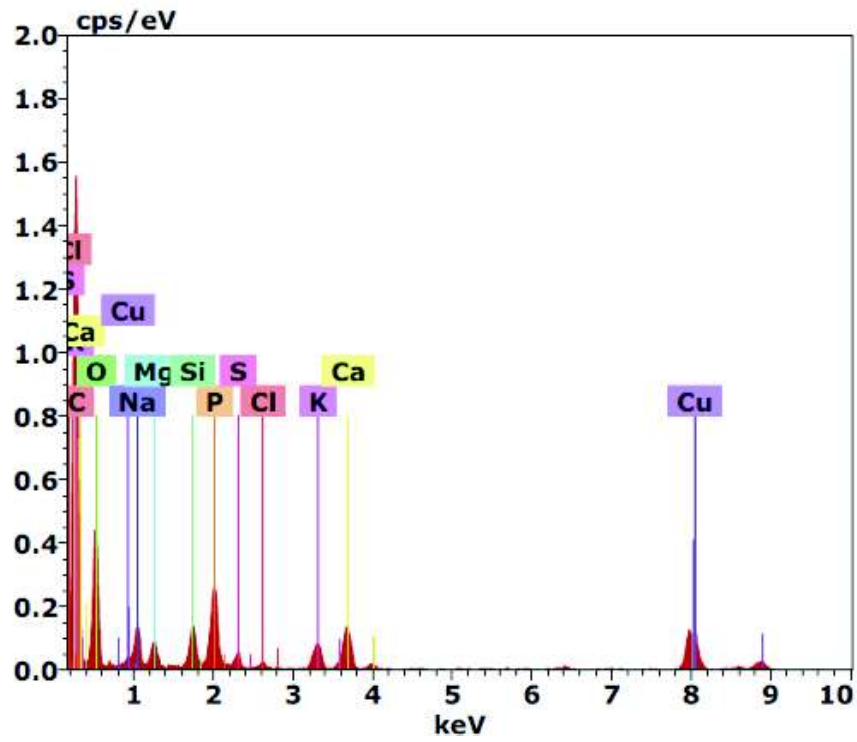


Fig. 43 Espectroscopía de Rayos X de Dispersión de Energía (EDS) de vesículas de Lecitina.

4.4 Microscopía Óptica

Las vesículas de Lecitina fueron observadas a diferentes magnificaciones mediante el microscopio óptico invertido. Las imágenes obtenidas revelaron partículas esféricas de diferentes tamaños, aunque también hay evidencia de artefactos y aglomeración de partículas. Por lo tanto, se trata un sistema de vesículas heterogéneo. Las vesículas de menor tamaño no se observan aquí ya que el microscopio óptico no tiene la capacidad para distinguir objetos de escala nanométrica. A pesar de esto, las imágenes vistas en el microscopio óptico coinciden con los resultados obtenidos mediante las técnicas anteriormente descritas. Es decir, los agregados grandes vistos aquí contribuyen a la polidispersidad presente en los análisis del DLS y al radio hidrodinámico promedio obtenido, ya que en el equipo de DLS se pueden analizar sistemas dentro de un rango de tamaño que va desde 1 nm hasta 10 μm [39]. El hecho del que el diámetro hidrodinámico D_H promedio sea de escala nanométrica podría deberse a que contribuyen más las partículas de menor tamaño, que las de mayor tamaño, es decir, en el sistema predominan las partículas pequeñas.

Por otra parte, la línea de base no plana de la gráfica de la función de correlación podría deberse a los aglomerados que aparecen en las micrografías ópticas. La mayoría de las vesículas que se muestran en las Figuras 44, 45 y 46 tienen una morfología esférica, lo cual es coherente con el espectro obtenido mediante el análisis de SAXS y con las micrografías electrónicas obtenidas mediante el análisis de TEM, aunque lógicamente la escala de tamaño de las vesículas no es la misma para las diferentes técnicas.

En las siguientes figuras (Fig. 44, 45 y 46) se muestran las imágenes de las vesículas de Lecitina vistas en fresco utilizando diferentes objetivos.

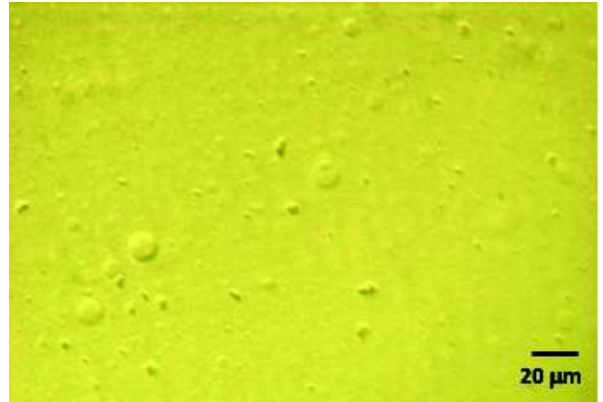
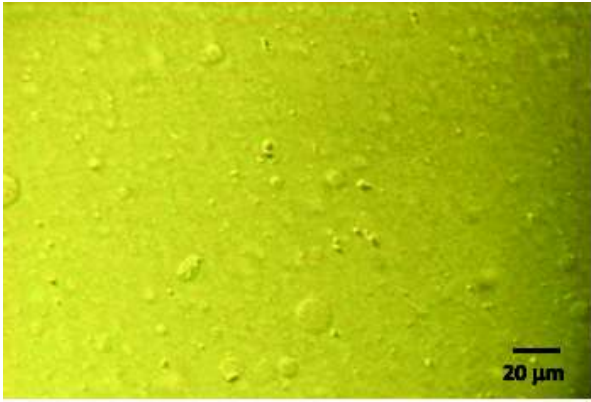


Fig. 44 Micrografías ópticas de vesículas de Lecitina observadas bajo el objetivo de 20X. La barra de escala corresponde a 20 μm .

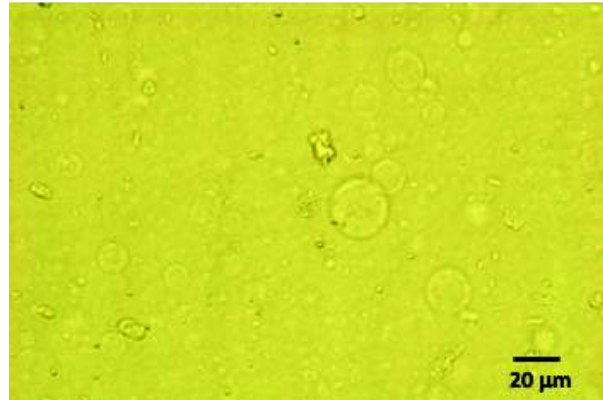
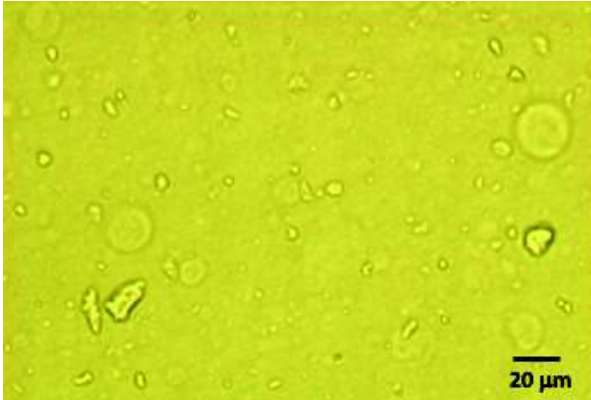


Fig. 45 Micrografías ópticas de vesículas de Lecitina observadas bajo el objetivo de 40X. La barra de escala corresponde a 20 μm .

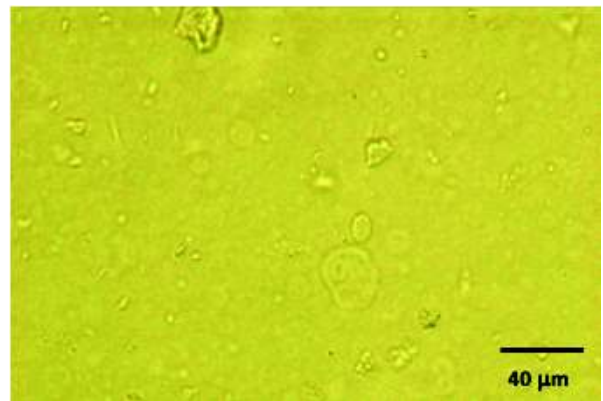
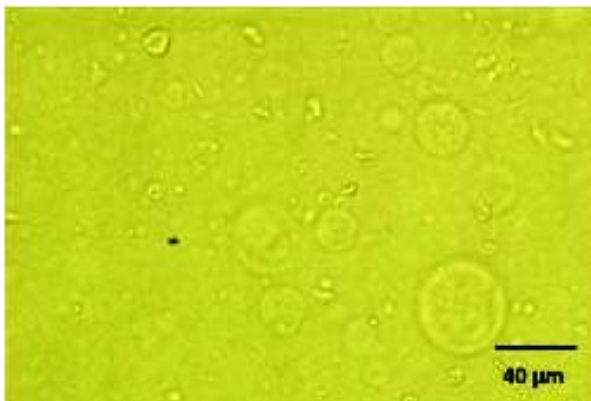


Fig. 46 Micrografías ópticas de vesículas de Lecitina observadas bajo el objetivo de 63X. La barra de escala corresponde a 40 μm .

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

Durante este trabajo de Maestría se prepararon diferentes sistemas de vesículas de Lecitina de yema de huevo mediante el método de hidratación de lípidos. Se variaron ciertas condiciones como la concentración de Lecitina, el solvente orgánico y la temperatura de del medio hidratante. Dado que el trabajo buscaba estandarizar de alguna manera los métodos de preparación de estos sistemas, se prepararon una gran cantidad de muestras. Sin embargo, en la sección de resultados y discusión se mostraron solamente algunos resultados representativos.

Cabe señalar que la Lecitina de yema de huevo es una mezcla de lípidos que tienen en común la cabeza polar: fosfatidilcolina; la variación en las especies que conforman la mezcla ocurre en las colas hidrofóbicas. Este lípido es de muy fácil extracción y purificación; por eso mismo es fácil de conseguir comercialmente. Esa es una de las razones por las cuales se escogió este sistema: para estandarizar la fabricación de liposomas con un método sencillo y utilizando un lípido fácilmente disponible.

Al variar los parámetros mencionados anteriormente se buscó establecer las condiciones óptimas para formar los liposomas y estandarizar el método de obtención, permitiendo de esta manera la fabricación de vesículas con las mismas características en cada preparación, como se discute en el capítulo anterior.

Una vez formadas las vesículas de Lecitina mediante el método de hidratación de lípidos, se estudiaron algunas de sus características mediante diferentes técnicas de caracterización tales como: Dispersión Dinámica de Luz (DLS), Dispersión de Rayos X a Ángulos pequeños (SAXS), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y Microscopía Óptica (OM).

Estas técnicas de caracterización de liposomas se realizaron inmediatamente después de la preparación de dichos liposomas para obtener un control de calidad adecuado de los resultados. En un trabajo posterior sería deseable estudiar la evolución con el tiempo de las muestras, para tener una idea de su estabilidad.

Los resultados obtenidos, tales como la distribución de tamaño y la morfología de las vesículas concuerdan con el método de preparación. De hecho, los liposomas que se obtuvieron mediante la hidratación de la película lipídica fueron muy heterogéneos, es decir,

se formaron liposomas de diferentes tamaños, generalmente en el orden de 500 nm a varias micras, con diferentes membranas, separadas entre sí por una capa de agua.

La técnica de hidratación de lípidos como vemos, es una técnica muy efectiva para la formación de vesículas multilamelares gigantes (MLVs).

Si se desea tener un sistema de vesículas más homogéneo, monodisperso y con un tamaño igual o menor a 100 nm, se recomienda utilizar la técnica de extrusión de lípidos. Esta técnica permite obtener sistemas de liposomas de características más controladas.

También se recomienda realizar más experimentos para encontrar las condiciones ideales para obtener micrografías electrónicas de las vesículas de Lecitina. Para ello se sugiere recubrir las vesículas con un metal pesado distinto al ácido fosfotúngstico como, por ejemplo, el acetato de uranilo o molibdato de amonio, previo al análisis de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). O bien, no teñirlas, simplemente dejarlas evaporar en la rejilla o soporte de cobre y posteriormente analizarlas. Esto con el objetivo de evitar el fosforo del agente de tinción y estar seguros que este elemento (detectado en los espectros de EDS) proviene de las membranas de fosfolípido.

Por otra parte, si se funcionalizan estos sistemas de vesículas, podrían utilizarse en potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica, como vehículos acarreadores de una amplia gama de fármacos requeridos en tratamientos específicos. Mediante la funcionalización se puede controlar el tiempo de circulación y se pueden tener efectos secundarios reducidos y una acción farmacológica óptima. Sin embargo, antes de desarrollar una posible aplicación práctica, es necesario hacer estudios de ciencia básica sobre los sistemas descritos. Es decir, se requiere conocer las características del sistema de vesículas como su morfología, tamaño, lamelaridad, entre otras, como se estudió en la presente tesis, para tener la certeza de que el sistema descrito será un candidato potencial para la aplicación pensada.

PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES

En el trabajo de tesis anteriormente descrito, se prepararon vesículas unilamerales gigantes (MLVs) mediante el método de hidratación de lípidos, a raíz de esto surgieron nuevas posibilidades o líneas para explorar en un futuro como son:

1. Preparar vesículas unilamelares pequeñas (SUV's) mediante el método de extrusión de lípidos. Las SUVs formadas por este método son homogéneas, tiene un tamaño reducido y controlado, lo cual es importante a la hora de pensar en las posibles aplicaciones de los liposomas en el área de la medicina, ya que estas vesículas podrían utilizarse para encapsular proteínas o algún fármaco con propiedades únicas, por ejemplo, propiedades anticancerígenas, antitumorales, entre otras. En otras palabras, podrían utilizarse como vehículos liberadores de fármacos dirigidos a un blanco específico.
2. Utilizar un medio hidratante diferente al agua, como solución tampón o solución de azúcar en el método de preparación de vesículas según la aplicación de dichas vesículas y propiedades del o los fosfolípidos utilizados.
3. Preparar las vesículas lipídicas con y sin tinción negativa previamente a su análisis por TEM, con la finalidad de ver si se mejora el contraste para las micrográficas obtenidas en el TEM.
4. Preparar las vesículas lipídicas mediante la técnica de tinción negativa probando un metal pesado diferente al ácido fosfotúngstico para su análisis por TEM, esto con la intención de tener la certeza de que el pico del elemento fósforo visto en el análisis de EDS corresponde únicamente al fósforo presente en la Lecitina y no en el metal pesado.
5. Y finalmente, estudiar el efecto de agregar proteínas con propiedades únicas a las vesículas de Lecitina formadas mediante el método de extrusión de lípidos, como posible aplicación en el área de la medicina y farmacéutica.

Dejamos algunas de estas perspectivas para un trabajo posterior que aborde el problema con mayor profundidad.

REFERENCIAS

- [1] T. Torres Cebada, “Nanoquímica y Nanotecnología: Nuevos materiales, polímeros y máquinas moleculares,” *Encuentros Multidiscip.*, vol. 4, no. 12, pp. 20–25, 2002.
- [2] R. Ghosh and J. Dey, “Vesicle Formation by L-Cysteine-Derived Unconventional Single- Tailed Amphiphiles in Water: A Fluorescence, Microscopy, and Calorimetric Investigation,” *Langmuir*, vol 30, pp. 13516-13524, 2014, doi: 10.1021/la5022214Y.
- [3] P. Patil and S. Jadhav, “Novel methods for liposome preparation,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 177, pp. 8–18, 2014, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011.
- [4] A. Arteaga, L. Valenzuela, A. Fontes, and R. López, “Polimorfismo de liposomas.,” *Epistemus*, vol. 18, no. 9, pp. 90–95, 2007.
- [5] M. C. dos Santos *et al.*, “Self-assembled carbohydrate-based vesicles for lectin targeting,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 148, pp. 12–18, 2016, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.08.053.
- [6] M. Ruano Aldea, “Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas,” 2012.
- [7] Cooper, G., Hausman, R. (2007). *The cell a molecular approach*. Washington, DC 20036 U.S.A: ASM Press, c / o The American Society.
- [8] S.J. Singer, G.L. Nicolson, *The Fluid Mosaic Model of the structure of cell membranes*, *Science* 175 (1972) 720–731.
- [9] G. L. Nicolson, “The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years,” *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1838, no. 6, pp. 1451–1466, 2014, doi: 10.1016/j.bbamem.2013.10.019.
- [10] Philip L Yeagle, *The STRUCTURE of BIOLOGICAL*. 2005.
- [11] M. Bicu, D. Clenciu, and M. Mota, “TYPES OF LIPIDS A-D THEIR IMPACT ON HEALTH,” pp. 1–9.
- [12] Cooper, G., Hausman, R. *La Célula*. 2010. 47-48.
- [13] Juan Antonio Jaramillo Sánchez. *Biología*. 2004. 29-30.
- [14] W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, and E. A. Evans, “Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers,” *Biophys. J.*, vol. 79, no. 1, pp. 328–339, 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76295-3.

- [15] P. Walde, K. Cosentino, H. Engel, and P. Stano, "Giant Vesicles: Preparations and Applications," *ChemBioChem*, vol. 11, no. 7, pp. 848–865, 2010, doi:10.1002/cbic.201000010.
- [16] F. Szoka, D. Papahadjopoulos "Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)," *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 1980. 9:467-508.
- [17] M. Gupta, D. N. Chauhan, V. Sharma, N. S. Chauhan, "Novel Drug Delivery Systems for Phytoconstituents 2020.
- [18] A. S. Ulrich, "Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles," *Biosci. Rep.*, vol. 22, no. 2, pp. 129–150, 2002, doi: 10.1023/A:1020178304031.
- [19] D. D. Lasic, "The mechanism of vesicle formation," *Biochem. J.* 256, 1-11, 1988, doi: 10.1042/bj2560001.
- [20] A. Alexander, Ajazuddin, R. J. Patel, S. Saraf, and S. Saraf, "Recent expansion of pharmaceutical nanotechnologies and targeting strategies in the field of phytopharmaceuticals for the delivery of herbal extracts and bioactives," *J. Control. Release*, vol. 241, pp. 110–124, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.09.017.
- [21] Protocolo de preparación de liposomas Avanti Polar Lipids. Disponible en:<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/liposome-preparation.html> al 2020.
- [22] J. H. Hervás, Z. Antón, and A. Alonso, "Biophysical studies of LC3 family proteins," *Methods in Molecular Biology*, vol. 1880. pp. 91–117, 2019, doi: 10.1007/978-1-4939-8873-0_5.
- [23] K. Tsumoto, H. Matsuo, M. Tomita, and T. Yoshimura, "Efficient formation of giant liposomes through the gentle hydration of phosphatidylcholine films doped with sugar," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 68, no. 1, pp. 98–105, 2009, doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.09.023.
- [24] J. P. Reeves and R. M. Dowben, "Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles," *J. Cell. Physiol.*, vol. 73, no. 1, pp. 49–60, 1969, doi: 10.1002/jcp.1040730108.
- [25] S. Vemuri and C. T. Rhodes, "Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review," *Pharm. Acta Helv.*, vol. 70, no. 2, pp. 95–111, 1995, doi: 10.1016/0031-6865(95)00010-7.
- [26] L. A. Meure, N. R. Foster, and F. Dehghani, "Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: A review," *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 3, pp. 798–809, 2008, doi: 10.1208/s12249-008-9097-x.

- [27] F. Thege, “Single-step microfluidic generation of cell-sized giant unilamellar vesicles: Characterization and dielectrophoretic patterning and sorting”, 2011.
- [28] F. Szoka and D. Papahadjopoulos, “Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 75, no. 9, pp. 4194–4198, 1978, doi: 10.1073/pnas.75.9.4194.
- [29] S. Batzri and E. D. Korn, “Single bilayer liposomes prepared without sonication” BBA report, vol. 298, no. 4, pp.1015-1019, 973, doi: 10.1016/0005-2736(73)90408-2.
- [30] P. J. Patty and B. J. Frisken, “The pressure-dependence of the size of extruded vesicles,” *Biophys. J.*, vol. 85, no. 2, pp. 996–1004, 2003, doi: 10.1016/S0006-3495(03)74538-X.
- [31] A. S. Ulrich, “Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles,” *Biosci. Rep.*, vol. 22, no. 2, pp. 129–150, 2002, doi: 10.1023/A:1020178304031.
- [32] J. O. Eloy, M. Claro de Souza, R. Petrilli, J. P. A. Barcellos, R. J. Lee, and J. M. Marchetti, “Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2014, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.029.
- [33] J. B. Vega, “Doctoral thesis Lipid-lipid interactions in membranes and their role in apoptosis”, 2009.
- [34] Malvern and M. Instruments, “Dynamic Light Scattering: An Introduction in 30 Minutes,” *Tech. Note MRK656-01*, pp. 1–8, 2011.
- [35] J. Pencer and F. R. Hallett, “Effects of Vesicle Size and Shape on Static and Dynamic Light Scattering Measurements”, *Langmuir* 2003, 19, 7488-7497.
- [36] A. A. Kokhanovsky, “Light Scattering Reviews”, Springer, vol. 6, 2012, doi: 10.1007/978-3-642-15531-4.
- [37] L. Rayleigh, “X. On the electromagnetic theory of light,” *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.*, vol. 12, no. 73, pp. 81–101, 1881, doi: 10.1080/14786448108627074.
- [38] Mie, G., Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. Vol. 330. 1908, Leipzig: Ann.Phys. 377.
- [39] Brookhaven Instruments Corporation, “Instruction Manual for BI-9000AT Digital Autocorrelator,” 1998.
- [40] H. Schnablegger, Y. Singh “the SAXS guide - Anton Paar.pdf.” 2017.

- [41] T. Narayanan, J. Gummel, and M. Gradzielski, *Probing the Self-Assembly of Unilamellar Vesicles Using Time-Resolved SAXS*, 1st ed., vol. 20. Elsevier Ltd., 2014.
- [42] P. Heftberger *et al.*, “Global small-angle X-ray scattering data analysis for multilamellar vesicles: the evolution of the scattering density profile model,” *J. Appl. Crystallogr.*, vol. 47, no. 1, pp. 173–180, 2014, doi: 10.1107/S1600576713029798.
- [43] J. A. Bouwstra, G. S. Gooris, W. Bras, and H. Talsma, “Small angle X-ray scattering: possibilities and limitations in characterization of vesicles,” *Chem. Phys. Lipids*, vol. 64, no. 1–3, pp. 83–98, 1993, doi: 10.1016/0009-3084(93)90059-C.
- [44] J. Grinblat, “Jem-2100: Applications in Nanotechnology”, Bar-Ilan Institute of Nanotechnology and Advanced Materials, vol. 45, no.1, 2010.
- [45] G. L. Tellez, A. R. V. Nestor, “Universidad Autónoma del Estado de México.”
- [46] A. F. Ariza and D. G. Giralzdes, “Cryo-electron microscopy. Solving the molecular structure of life at the atomic detail”, vol. 6, no. 1, 2017.
- [47] “Jem-2100 Electron *Microscope*”, *Copyright 2004 JEOL Ltd.*
- [48] Y. G. Morales, “Síntesis de perovskita CH₃NH₃PbI₃ para el estudio de su degradación acelerada”, 2009.
- [49] D. W. H. Heidcamp, “Cell Biology Laboratory Manual”, Biology Department, Gustavus Adolphus College.
- [50] P. E. G. Loyzaga, “CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES Y HUMAS. Aplicaciones en Medicina Regenerativa” ISBN: 978-84-9983-738-3, pp. 41, 2011.
- [51] L. Zhang, H. Tong, M. Garewal, and G. Ren, “Optimized negative-staining electron microscopy for lipoprotein studies,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1830, no. 1, pp. 2150–2159, 2013, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.09.016.
- [52] K. Yase, *Transmission Electron Microscopy*, vol. 43, no. 2. 1994.
- [53] Brookhaven Instruments Corporation, “Instruction Manual for BI-200SM Goniometer Ver. 2.0,” 1989.
- [54] A. G. Dal Bó *et al.*, “Self-assembled carbohydrate-based micelles for lectin targeting,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 7, pp. 3453–3461, 2011, doi: 10.1039/c0sm01411g.

- [55] D. E. Koppel, "Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: The method of cumulants," *J. Chem. Phys.*, vol. 57, no. 11, pp. 4814-4820, 1972, doi: 10.1063/1.1678153.
- [56] A. Alonso and F. M. Goñi, "The Physical Properties of Ceramides in Membranes," *Annu. Rev. Biophys.*, vol. 47, no. 1, pp. 633–654, 2018, doi: 10.1146/annurev-biophys-070317-033309.
- [57] J. Sot, L. A. Bagatolli, F. M. Goñi, and A. Alonso, "Detergent-Resistant, Ceramide-Enriched Domains in Sphingomyelin/Ceramide Bilayers," *Biophys. J.*, vol. 90, no. 3, pp. 903–914, 2006, doi: 10.1529/biophysj.105.067710.
- [58] I. Pascher, "Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 455, pp. 433–451, 1976, [doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90316-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90316-3).

APÉNDICE

Como complemento a los estudios de Maestría en Ciencia de Materiales se realizó una estancia de investigación en la Universidad del País Vasco en el Instituto de Biofísica (UPV/EHU, CSIC), en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, bajo el grupo de trabajo de la Dra. Alicia Alonso y el Dr. Félix Goñi.

Durante el periodo de estancia se trabajó en la preparación de liposomas mediante diferentes técnicas tales como: sonicación, electroformación en alambre y extrusión de lípidos. Además, se tuvo la oportunidad de colaborar en el artículo titulado como: “Phase-selective staining of model and cell membranes, lipid droplets and lipoproteins with the single-photon fluorescence probes PA and PK” para la revista BBA-biomembranes (artículo en revisión). En dicho trabajo la contribución fue llevar a cabo experimentos con modelos de Vesículas Multilamelares Gigantes (MLV's) y Vesículas Unilamelares Gigantes (GUV's) formadas mediante la técnica de sonicación y electroformación en alambre respectivamente para su posterior estudio mediante ensayos espectrofluorométricos y de microscopía de fluorescencia confocal.

Tanto las MLV's como las GUV's fueron preparadas con diferentes composiciones lipídicas: POPC (1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfocolina), DPPC (dipalmitoil fosfatidilcolina), eggSM (esfingomielina de la yema de huevo), Cer (ceramida), eggSM:Col (esfingomielina:colesterol), Cer:Col (ceramida:colesterol), entre otras, las cuales se mezclaron adicionalmente con una sonda o marcador fluorescente derivado de Pireno conocido abreviadamente como PK.

Para la formación de las MLV's mediante la técnica de sonicación, la mezcla de lípido-sonda fue evaporada bajo una corriente de N₂ para eliminar el solvente orgánico (solución de cloroformo-metanol presente tanto en la preparación del lípido puro como en la preparación de la sonda PK). Después de la evaporación, la solución se mantuvo en un desecador conectado a alto vacío durante 2 horas con la intención de eliminar cualquier solvente orgánico residual. En este paso se formó una película lipídica-sonda alrededor del vial, la cual es hidratada mediante la adición de una solución tampón a una temperatura superior a

la temperatura de transición T_m del lípido, permitiendo de esta manera que el lípido se hidrate en su fase fluida. Posteriormente se realizaron una serie de ciclos de agitación con vórtex para favorecer la formación de las vesículas. El producto de la hidratación es una gran vesícula multilamelar de estructura análoga a una cebolla. Para romper las capas o lamelas de las MLV's y reducir de esta forma su tamaño, las vesículas se sonicaron en un sonicador de tipo, cuidando de igual manera que la temperatura del baño estuviera por encima de la T_m del lípido. La sonicación se realizó durante 10 minutos. Durante todo el proceso de preparación de las MLV's se cuidó que todo el sistema estuviera expuesto lo menos posible a la luz, debido a que la sonda es fotosensible. Finalmente se realizaron ensayos espectrofluorométricos de las MLV's de diferentes composiciones a 405 nm para medir la proporción de intensidad rojo/azul (ratio).

Para la formación de las GUV's mediante la técnica de electroformación en alambre (ver Fig.1) se utilizó un generador de corriente a baja frecuencia aplicado a una película lipídica hidratada. A grosso modo, la mezcla de lípido-sonda se deposita en cada uno de los alambres de platino que contiene el pocillo de manera cuidadosa con la ayuda de una jeringa Hamilton, los pozos se colocan en una gradilla de hielo seco y mediante una especie de caja de papel aluminio se protegen totalmente de luz (para evitar que la sonda se degrade) y se mantienen al vacío durante 90 minutos. Transcurrido el tiempo, cada pocillo se monta en una cámara PRETGUV3 (ver Fig. 1) que permite la visualización directa bajo el microscopio, se añade sacarosa previamente calentada por encima de la T_m del lípido a cada pozo con la finalidad de hidratar a dichos lípidos, se conecta la cámara montada con los pocillos al generador de corriente durante 2 horas. Finalmente se realizaron ensayos de microscopía de fluorescencia confocal.

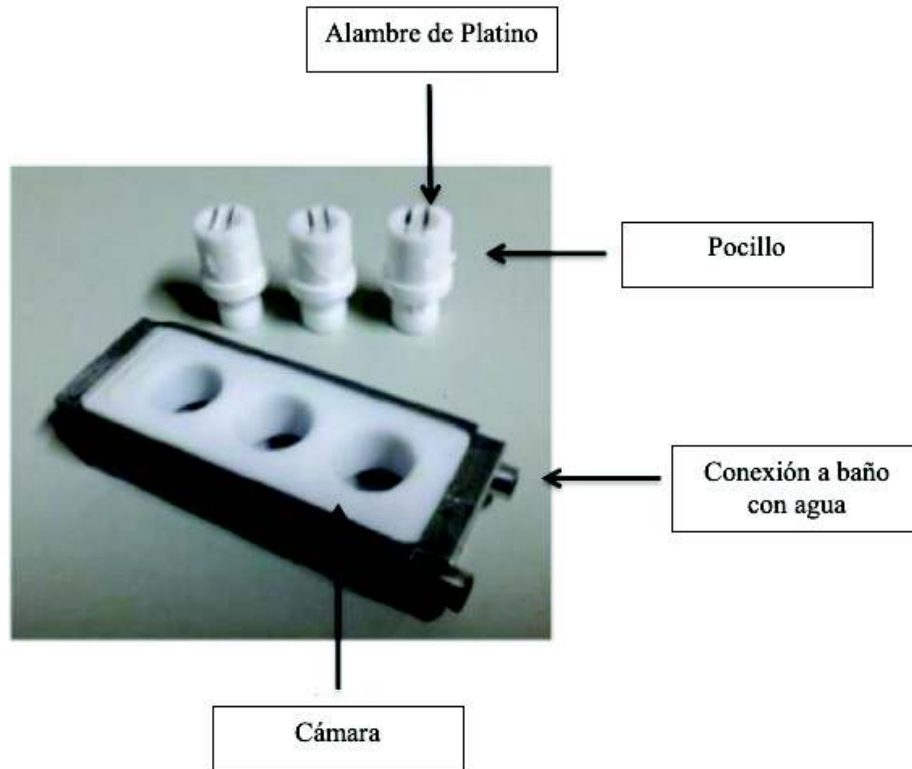


Fig.1 Cámara de PTFE con pocillos circulares para la formación de GUV's sobre alambres de platino.

El objetivo de la estancia de trabajo fue estudiar a través del marcador fluorescente PK las fases y la rigidez de la membrana, es decir, de las MLV's y las GUV's. Y se vio mediante los resultados de estos ensayos que con la sonda PK se pueden distinguir las diferentes fases de la membrana: líquido ordenado, líquido desordenado y gel. Además, mediante la proporción de intensidad rojo/azul (RBIR) se pudo evaluar el comportamiento de las vesículas en términos de rigidez.

RESULTADOS

Los espectros de excitación y de emisión de PK (Fig. 2A) se registraron en vesículas multilamelares compuestas de POPC, SM: Col (relación mol de 70:30), o SM de huevo puro, a 0.4 % de PK. Estas tres composiciones existen, en exceso de agua y a temperatura ambiente, en tantas fases lamelares diferentes, respectivamente, la fase de líquido desordenado (Ld), líquido ordenado (Lo) y gel (L β).

El análisis de los datos se realizó utilizando la respuesta radiométrica de PK, es decir, calculando la proporción de intensidad integral de las regiones rojo/azul de la banda de emisión (573-613 nm/500-530 nm) (Fig. 2A). En la figura 2B se muestran los valores adimensionales de RBIR para las diferentes composiciones lipídicas, el RBIR más alto correspondió a las fases Ld, por ejemplo, DOPC, y POPC. Por el contrario, los RBIR más bajos se asociaron a las bicapas en la fase Lo, por ejemplo, SM: Col (70:30), y DPPC: Col (70:30). Las bicapas en la fase de gel L β , como SM y DPPC, emitieron un RBIR a valores intermedios entre las fases Lo y Ld. Los datos sugieren que la sonda PK puede unirse a los lípidos permitiendo distinguir entre las tres principales fases lamelares en las membranas. El efecto de orden de colesterol detectado utilizando PK se ve en la figura 2C, en la que los valores de RBIR de una bicapa basada en SM se trazan en función de la concentración del colesterol. El RBIR disminuyó fácilmente con el aumento de las concentraciones de colesterol hasta que, por encima del 20% de colesterol, el sistema estaba en una fase Lo prácticamente pura. Es posible que las estructuras planas y rígidas de colesterol y PK sean responsables del comportamiento observado de la sonda.

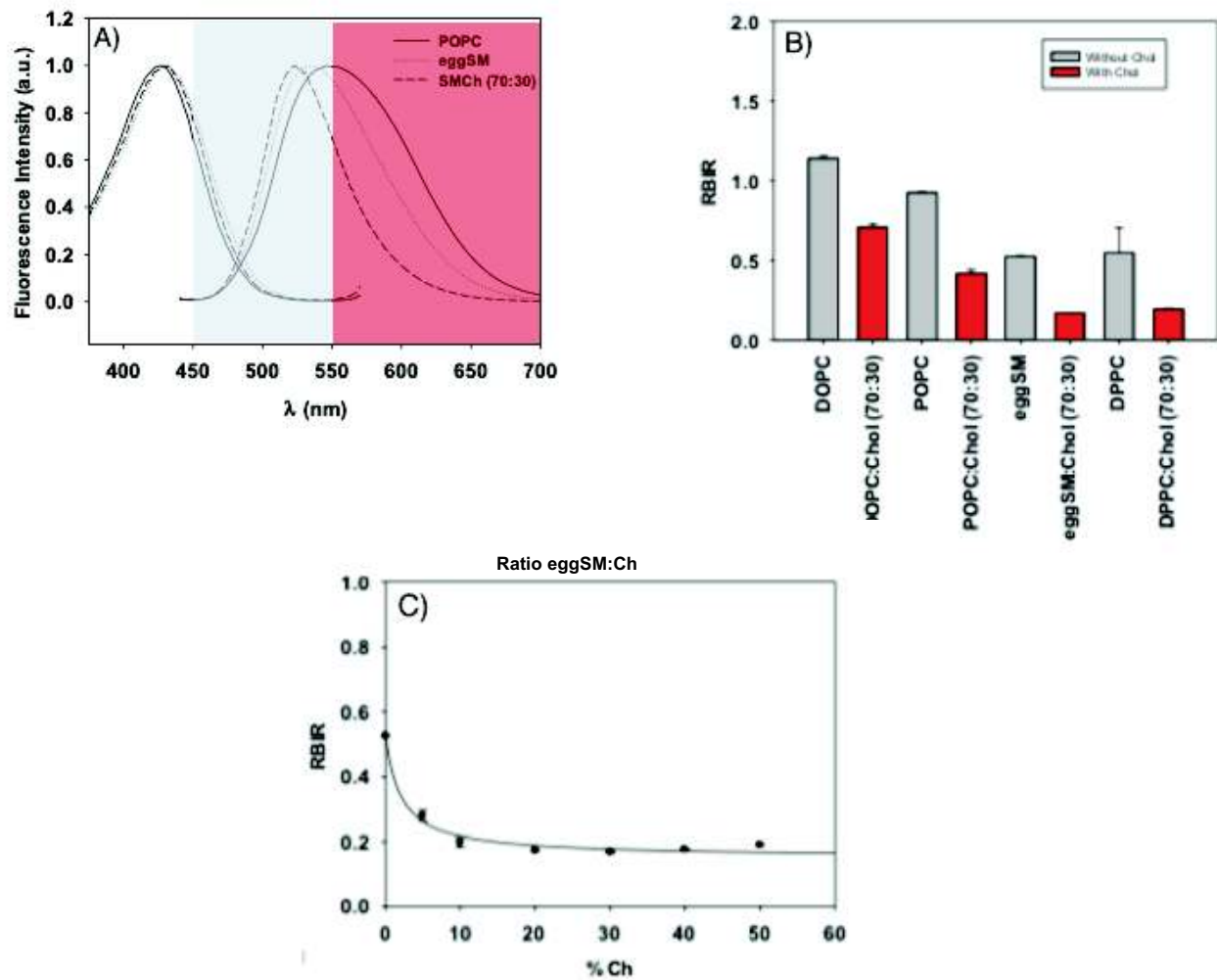


Fig.2 Resultados obtenidos mediante los experimentos de espectroscopía de fluorescencia usando MLV's a las que se les añadió 0.4% de PK. **Fig. 1 A)** Los espectros de excitación y emisión de PK se registraron en vesículas multilamelares compuestas de POPC, SM: Col (relación 70:30) y SM de huevo puro, a 0.4 % de PK. El análisis de los datos se realizó utilizando la respuesta radiométrica de PK, es decir, calculando la proporción de intensidad integral de las regiones rojo/azul de la banda de emisión (573-613 nm / 500-530 nm). En la **Fig. 1B)** se muestran los valores adimensionales de RBIR para las diferentes composiciones lipídicas. En la **Fig. 1C)** se ve el efecto de orden de colesterol detectado utilizando PK en la que los valores de RBIR de una bicapa basada en SM se trazan en función de la concentración del colesterol.

La ceramida (Cer) es estructuralmente muy diferente de colesterol (Col), pero comparte con el esteroil la capacidad de aumentar el orden de la cadena de fosfolípidos [56]. Se realizó una serie de mediciones RBIR con bicapas (vesículas multilamelares) compuestas de SM pura, SM: Cer (70:30), SM: Col (70:30) y SM: Cer: Col (70:30:30 y 54:23:23) (Fig.3). Contrariamente a nuestra predicción, el RBIR no disminuyó con Cer, aunque los efectos de rigidez y ordenamiento de este esfingolípido son bien conocidos [56]. Esto probablemente se debió a otra propiedad de la Cer, es decir, su incapacidad para mezclarse con fosfolípidos, dando lugar a dominios segregados lateralmente [57] en los que PK no pudo entrar. Sin embargo, tanto SM: Col (70:30) como SM: Cer: Col (70:30:30) exhibieron valores RBIR similares que estaban muy por debajo de los de SM pura. Una interpretación preliminar sería que PK "no podía reconocer" Cer, por lo tanto, las dos últimas mezclas eran equivalentes desde el punto de vista de la sonda (marcador fluorescente). Los dominios enriquecidos con Cer son en general inaccesibles para las sondas, debido a la alta densidad de enlaces H intermoleculares [58].

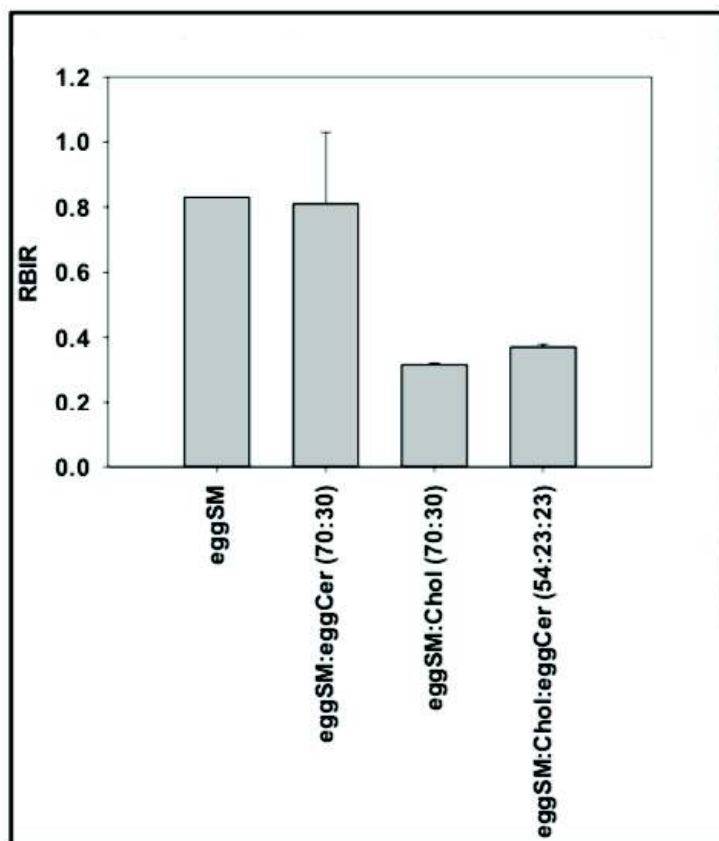


Fig.3 Efecto de colesterol y ceramida sobre la proporción Rojo/Azul de la esfingomielina.

En la Fig. 4 se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia confocal de vesículas unilamelares gigantes (GUV's) marcadas con PK. En la mezcla DOPC:SM:COL (2:1:1) (Fig.4, arriba) se observaron vesículas marcadas uniformemente en donde se pueden diferenciar las dos fases Lo y Ld. Sin embargo, en las vesículas que contenían DOPC:SM:COL (2:1:1) más 10% de CER aparecieron regiones oscuras (sin marcar) correspondientes a dominios ricos en Cer, permitiendo identificar las tres fases de la membrana Lo, Ld y L β (Fig. 4 abajo).

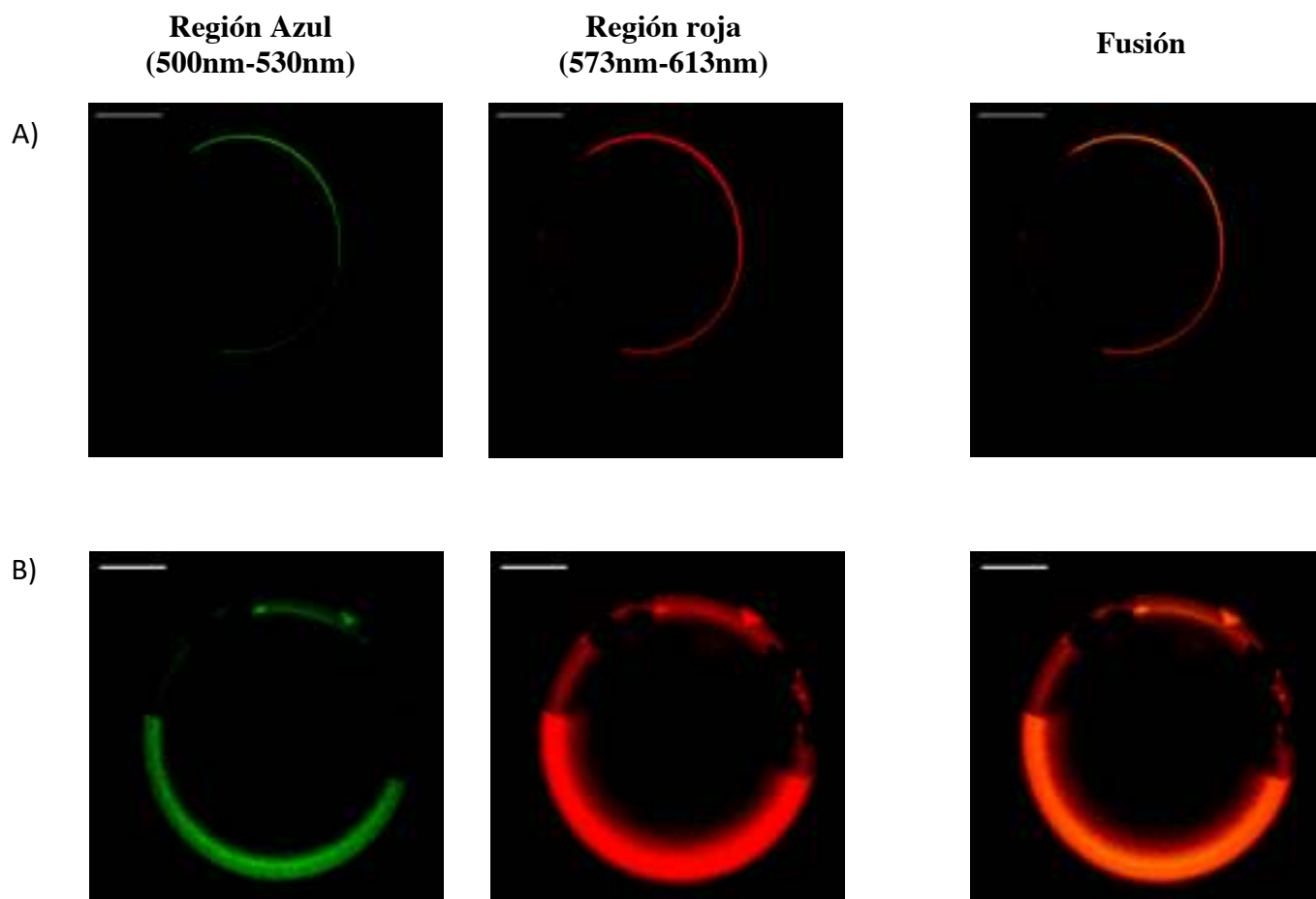


Fig.4 Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia confocal de *GUV's* marcadas con PK. A) vesículas preparadas con mezcla DOPC:SM:COL + PK. B) Vesículas preparadas con mezcla de DOPC:SM:COL más 10% de CER + PK.

En general, los valores de RBIR obtenidos de preparaciones comparables utilizando los métodos espectroscópicos y microscópicos fueron similares, pero no exactamente los mismos. Con el fin de obtener valores adecuadamente homogéneos independientemente del método de medición, se utilizó un coeficiente de corrección para los valores RBIR de la microscopía confocal.

CONCLUSIÓN

Los resultados con modelos de membrana mediante espectroscopía (MLV's) y microscopía (GUV's) sugieren que podría usarse el marcador PK para distinguir entre las tres principales fases de la membrana: L_d, L_o y gel. Además, mediante el parámetro radiométrico, la proporción de intensidad rojo/azul se puede evaluar el comportamiento de las vesículas en términos de rigidez.