

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE FISICA



**CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE VESÍCULAS  
Y FUTURAS APLICACIONES A LA INDUSTRIA**

DESIREÉ SALAS PASTENE

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE FISICA



## **CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE VESÍCULAS Y FUTURAS APLICACIONES A LA INDUSTRIA**

DESIREÉ SALAS PASTENE

Profesor Guía: Dr. Roberto Bernal

Profesores Comisión: Dr. Francisco Melo  
Dr. Jorge Pavez  
Dr. Elsa Abuin

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE  
INGENIERO FÍSICO

SANTIAGO DE CHILE  
NOVIEMBRE DE 2011

# CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE VESÍCULAS Y FUTURAS APLICACIONES A LA INDUSTRIA

Trabajo de Graduación presentado a la Facultad de Ciencia, en cumplimiento parcial de los requerimientos exigidos para optar al título de Ingeniero Físico.

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE CHILE

SANTIAGO DE CHILE

NOVIEMBRE 2011

CARACTERIZACIÓN MECÁNICA DE VESÍCULAS  
Y FUTURAS APLICACIONES A LA INDUSTRIA

DESIREÉ SALAS PASTENE

Este trabajo de graduación fue preparado bajo la supervision del profesor guía Dr. Roberto Bernal, del Departamento de Física y ha sido aprobado por los miembros de la comisión calificadora.

.....  
.....  
.....  
.....

Profesor Guia

.....  
Director

# Agradecimientos

Ya finalizando este largo largo largo recorrido por la carrera de ingeniería física, no puedo no detenerme a pensar en toda la gente que me ha acompañado y ayudado durante todo este tiempo, y lo menos que puedo hacer es agradecerles de todo corazón el cariño entregado y la confianza depositada, confianza que a veces hasta creía no merecer pero que siempre estuvo, constante y fuerte.

La lista es larga, ya que el recorrido también lo fué. Primero que todo, darle gracias a mi familia, en conjunto, por su fé ciega en mí, en particular a mi nona y tata, por soportame todos estos años y cuidarme como una hija, muy buena para salir y muy porfiada, pero que de verdad agradece la oportunidad de haber compartido con ellos todo este tiempo, con todos sus tristes y felices momentos.

Aunque la distancia física existe, siempre estan conmigo, mi mamá, papá, y hermanos Osman y Gonzalo. Me da verguenza el sentir todo ese orgullo que ellos demuestran por mí, que ha hecho que muchas veces me levante de las penas que me han rodeado. Su amor incondicional, que siempre ha acompañado, ha sido una de las principales bases en todos mis logros.

Un pilar fundamental para mí aquí en Santiago es mi tío Vincho, a quien siempre sentí y siento como un segundo papá, que me protege y ayuda de forma desinteresada, preocupado por mis problemas y orgulloso de mis logros.

A Victor, por todo lo que me ha entregado, que creo que realmente se aproxima a infinito. Por su apoyo e incondicionalidad, su generosidad y simpleza, son cosas que cargo siempre conmigo y de las cuales he aprendido y pretendo nunca olvidar.

A Anita, Romina, Nathalie, Aylene y Pauly por su lealtad, cariño, bromas y puntos de vista, su amistad ha sido algo esencial para mí todo este tiempo.

A todos mis amigos de la universidad, de bachillerato y de física, y los de la vida,

por todos los gratos y divertidos momentos vividos junto a ellos.

A mis amigos del laboratorio, y Francisco, que a pesar de no ser un miembro oficial, es uno de los más activos y generosos.

A Roberto, por la oportunidad de ser parte del laboratorio de Biofísica, por todo lo que he aprendido trabajando con él y por el apoyo que me ha brindado en mis proyectos.

Al Leo, por toda su dedicación en el trabajo que realizamos en conjunto.

Más oficialmente al grupo de física no lineal, que agradezco ser parte, por su profesionalismo e investigación de excelencia.

Gracias.

# Resumen

El presente trabajo de tesis tiene como principal objetivo el desarrollo de un método simplificado para la determinación de las propiedades mecánicas en vesículas gigantes.

La primera parte de este trabajo está enfocada en darnos un acercamiento a la teoría de las moléculas anfífilicas y las interacciones a las que estas se encuentran sujetas. Además de describir en profundidad el método de fabricación de vesículas utilizado, Encapsulación continua de gotas cruzando la interfaz (Continuous droplet interface crossing encapsulation, cDIDE). Finalmente ahondamos en el estudio de algunos de los modelos mecánicos existentes para describir dichos sistemas.

La segunda parte involucra todos los experimentos realizados, comenzando con el trabajo hecho en microscopía de fuerza atómica (atomic force microscopy, AFM) para la medición de espesores de las membranas fabricadas. Y como último punto se presentan todos los experimentos de fluctuaciones de forma y análisis del comportamiento de las curvaturas bajo variaciones de la presión osmótica del sistema, además de la determinación de los módulos elásticos de las membranas.

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	<b>6</b>
1.1. Introducción a los Materiales Complejos . . . . .	10
1.2. ¿Qué son los fosfolípidos? . . . . .	11
1.2.1. Formación de estructuras de lípidos . . . . .	15
<b>2. Método de fabricación de vesículas.</b>	<b>21</b>
2.1. Electroformación . . . . .	22
2.2. Extrusión . . . . .	26
2.3. Encapsulación continua de gotas cruzando la interfaz, (cDICE) . . . . .	28
2.3.1. Etapas del método . . . . .	30
<b>3. Modelo de elasticidad y diferencia de área, ADE.</b>	<b>34</b>
3.1. Distintos modelos . . . . .	35
3.1.1. Modelo de curvatura . . . . .	35
3.1.2. Modelo de curvatura espontánea (spontaneous curvature, SC) . . . . .	36
3.2. Modelo de elasticidad y diferencia de area (The Area-Difference-Elasticity model, ADE) . . . . .	37
3.3. Presión osmótica . . . . .	39
<b>4. Adhesión de vesículas a un sustrato.</b>	<b>42</b>
4.1. Mecanismo de adhesión y determinación de concentración . . . . .	44
4.2. Medición de espesor . . . . .	46



<b>5. Determinación de Propiedades Mecánicas.</b>	<b>50</b>
5.1. Caracterización del sistema . . . . .	53
5.1.1. Microscopía de luz y procesamiento de datos . . . . .	54
5.2. Análisis de imágenes . . . . .	56
5.2.1. Curvatura y análisis estadístico . . . . .	57
5.2.2. Distribución de curvaturas v/s tamaño de la vesícula, ley de potencia . . . . .	59
5.2.3. Distribución de curvaturas v/s presión osmótica . . . . .	61
5.2.4. Análisis de Fourier, modos de fluctuación . . . . .	63
5.2.5. Estimación del módulo de bending . . . . .	67
5.2.6. Determinación de constantes elásticas . . . . .	68
<b>6. Discusión y Conclusiones</b>	<b>73</b>
<b>A. Protocolos Vesículas</b>	<b>81</b>
A.1. Materiales: . . . . .	81
A.2. Preparación de los lípidos . . . . .	81
A.2.1. Solución Stock . . . . .	81
A.3. Preparación de Vesículas . . . . .	83
A.3.1. Soluciones . . . . .	83
A.3.2. Experimento . . . . .	84
<b>B. Protocolo AFM</b>	<b>85</b>
<b>C. AFM, Modo de contacto intermitente</b>	<b>86</b>
<b>D. Contraste de fase</b>	<b>89</b>
D.1. Constitución del microscopio de contraste de fase . . . . .	90
D.2. Fundamentos físicos . . . . .	90

# Índice de figuras

1.1. Vesículas fabricadas por cDIDE . . . . .	8
1.2. Esquema comparativo de autoensamblajes de moléculas anfifílicas en: micelas, microemulsiones y vesículas . . . . .	10
1.3. Diferentes tipos de fosfolípidos típicos . . . . .	12
1.4. Esquema de un fosfolípido . . . . .	13
1.5. Tabla 1: Nombres de cadenas y grupos de cabeza . . . . .	14
1.6. Tabla 2: Nombres de lípidos y abreviaciones . . . . .	15
1.7. Auto-ensamble de moléculas anfifílicas: liposomas, micelas y bicapas	16
1.8. Principio de fuerzas hidrofóbicas . . . . .	17
1.9. Organización de fosfolípidos, para un pequeño factor de forma lípidos forman micelas . . . . .	18
1.10. Tabla 3: Diferentes estructuras de acuerdo a su factor de forma. . . .	20
2.1. Dos diferentes geometrías para el dispositivo de electroformación . .	23
2.2. Vesículas formadas por Electroformación . . . . .	24
2.3. Diagrama de electroformación AC . . . . .	25
2.4. Dispositivo y montaje para Extrusión . . . . .	26
2.5. Esquema de extrusión de Vesículas . . . . .	27
2.6. Diversas sustancias encapsuladas en vesículas fabricadas con la técnica cDICE . . . . .	28
2.7. Imagen en PhC de vesículas fabricadas con cDICE . . . . .	29
2.8. Fotografía del montaje experimental de la técnica cDICE . . . . .	30

2.9. Diagrama del montaje experimental de la técnica cDIDE . . . . .	31
2.10. Distribución de tamaños para vesículas con $Ca = 0.08$ . . . . .	32
3.1. Radios de curvatura. . . . .	36
3.2. Efectos de la variación de la concentración de las soluciones en una vesícula. . . . .	40
4.1. Esquema AFM . . . . .	43
4.2. Diagrama de adhesión de vesículas a sustrato . . . . .	44
4.3. Variación de la concentración . . . . .	46
4.4. Medición con AFM . . . . .	48
4.5. Histograma de espesores medidos en bicapas . . . . .	49
5.1. Esquema de diferentes modos de deformaciones de bicapas . . . . .	51
5.2. Diagrama de fases morfológicas de vesículas. . . . .	52
5.3. Vesícula liberada de micropipeta . . . . .	53
5.4. Observación por microscopio de vesículas gigantes. . . . .	54
5.5. Análisis de algoritmo para el contorno de la vesícula. . . . .	55
5.6. Ejemplificación de análisis de datos entrates. . . . .	56
5.7. Distribución de curvaturas. . . . .	58
5.8. Gráfico $\sigma_\kappa$ vs $R_0$ . . . . .	59
5.9. Rectificación relación $\sigma_\kappa(R_0)$ . . . . .	60
5.10. Distribución de $\sigma_\kappa$ en función de razón de concentraciones. . . . .	61
5.11. Relación $\sigma_\kappa * R_0$ con la presión osmótica. . . . .	62
5.12. Espectro de Fourier para distintas concentraciones. . . . .	64
5.13. Relación entre $k_n$ con las concentraciones de las soluciones presentes $C_{int}/C_{out}$ . . . . .	65
5.14. Relación entre $\Delta k_n$ con las concentraciones de las soluciones presentes $C_{int}/C_{ext}$ . . . . .	66

5.15. Relación entre la cantidad $\Delta k_n/k_n$ con las concentraciones de las soluciones presentes $C_{int}/C_{ext}$ . . . . .	67
5.16. Módulos de bending medidos para las distintas concentraciones utilizadas. . . . .	69
5.17. Módulos de stretching determinados para las distintas concentraciones utilizadas. . . . .	71
5.18. Módulos de Young para las distintas concentraciones utilizadas. . . . .	72
6.1. Diferentes regímenes observados en las vesículas ( $\sigma_\kappa * R_0$ vs $C_{int}/C_{ext}$ ). . . . .	76
6.2. Módulos de bending medidos para las distintas concentraciones utilizadas. . . . .	78
6.3. Módulos de bending medidos para las distintas concentraciones utilizadas. . . . .	79
6.4. Módulos de bending medidos para las distintas concentraciones utilizadas. . . . .	80
C.1. Configuración básica del microscopio de fuerza atómica, AFM. . . . .	87
D.1. Comparacion entre Bright field y Contraste de fase. . . . .	90
D.2. Diagrama y corte transversal de un microscopio de Contraste de fase. . . . .	91
D.3. Diagrama y corte transversal de un microscopio de Contraste de fase. . . . .	92

# Capítulo 1

## Introducción

Las vesículas, también conocidas como liposomas, son ensamblajes supramoleculares de moléculas anfifílicas, cuyas interacciones laterales favorecen la formación de membranas ordenadas que separan los medios polares y apolares por la naturaleza de su estructura. Estas han sido ampliamente usadas en el campo de la química supramolecular, y sus aplicaciones abarcan desde la biología como sistemas de estudio modelo, la industria cosmetológica, la industria alimenticia y la industria farmacéutica en "Drug Delivery", principalmente.

Dependiendo del campo de estudio o aplicación en el que serán utilizadas, su tamaño varía desde centenas de nanómetros (emulsiones  $\sim 500 \text{ nm}$ ) hasta las centenas de micrometros. Estas últimas se encuentran en la literatura como GUVs (Giant Unilamellar Vesicles) o GBVs (Giant Bilayer Vesicles). Su tamaño, entre 10 a 100  $\mu\text{m}$  corresponde a un número de agregación de moléculas anfifílicas típicamente del orden de  $10^8$  a  $10^{10}$  por vesícula [1]. Su tamaño las hace atractivas en el sentido que tanto GUVs y GBVs pueden ser manipuladas y observadas bajo un microscopía óptica.

Una de las razones principales de interés, es el auto-ensamblado y auto-organización. Este fenómeno adquiere en las vesículas gigantes una dimensión particular. ¿Por qué y cómo estas moléculas se logran reunir, en cuestión de segundos, en agregados de doble capa perfectamente esféricos?. El *porqué* se asocia con la termo-

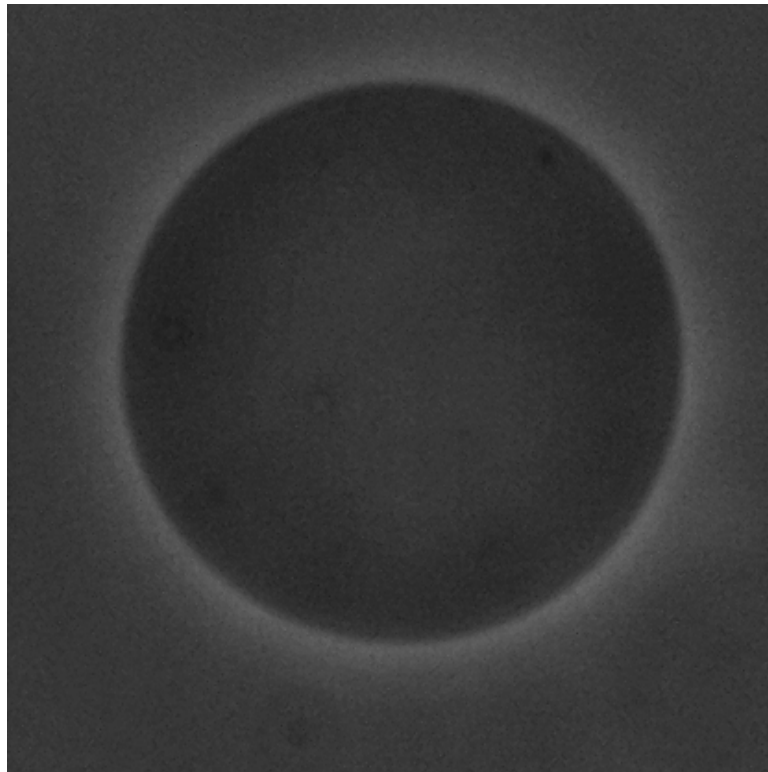
dinámica, y aborda la cuestión de por qué estas estructuras gigantescas, y no otras, son energéticamente favorecidas; el *cómo* tiene más que ver con la vía cinética - cuales son los intermediarios y las tasas a las que se forman las vesículas gigantes. Estas dos categorías de la pregunta todavía no se han respondido satisfactoriamente en el caso de las micelas y vesículas. Aunque algunos modelos y algunas ideas existen, una comprensión adecuada sigue siendo un reto importante tanto para químicos y físicos. La ventaja más obvia de las vesículas gigantes con respecto a las convencionales, es que pueden ser observadas por métodos ópticos. Así, por primera vez, el objeto de investigación se puede ver en un microscopio óptico, como una entidad macromolecular individual. En cuanto a su estructura, un rasgo positivo es la estabilidad de las vesículas gigantes. Una vez formadas se mantienen estables, por lo general durante días.

Con la individualidad viene la compartimentación. El autoensamblaje vesicular produce una membrana permeable que separa el medio acuoso externo del interno . Hay una analogía geométrica con la célula viva, por lo que los liposomas han sido vistos por mucho tiempo como precursores de la protocélula en cuanto a que cuando se tiene un compartimento individual, uno tiene el elemento estructural básico para un modelo celular. Una parte importante de la vida en la Tierra se basa en la vida celular, y todas las células biológicas son sistemas abiertos pero compartimentados; y además de las células, existen una serie de organelos, presentes en las células eucariontas (núcleo, lisosomas, aparato de Golgi, vesículas biológicas), que basan su organización estructural en compartimentos. Un compartimento tiene la posibilidad de definir un núcleo interno que difiere del medio externo - por ejemplo a través de un gradiente de concentración de sustancias especiales, o a través de diferencias en la constante dieléctrica, el pH, la salinidad, así sucesivamente entre los dominios internos y externos.

Un mayor interés en las vesículas gigantes (Fig. 1.1) radica en el hecho de que, debido a su tamaño y estabilidad mecánica, permiten la aplicación de técnicas de microinyección. Las sustancias químicas pueden ser inyectados dentro de las vesícu-

las gigantes mediante microagujas. De esta manera, la vesícula se convierte en un microrreactor gigante y puede ser esto, en principio, diseñado para un estado de considerable complejidad. Ahora es posible realizar una punción múltiple en la misma vesícula gigante, para permitir la adición de una serie de sustancias diferentes en una sucesión temporal.

En cuanto a sus aplicaciones farmacéuticas, dado que podemos controlar su con-



**Figura 1.1:** Fotografía de Vesículas fabricadas por el método de Encapsulación continua de gotas cruzando la interfaz (cDIDE), contraste de fase, 40x .

tenido y modificar o funcionalizar su superficie, el atractivo potencial de las vesículas y su uso como transportadores de fármacos, activados selectivamente, han sido objeto de gran interés y estudio.

Por todos los motivos mencionados se hace evidente lo imprescindible que es, para todo tipo de investigaciones en esta área, la caracterización química y física de las vesículas que se utilicen, independiente de la técnica que se haya usado para

su fabricación. Este segundo punto, la caracterización física, o más precisamente, la caracterización de las propiedades físicas de las vesículas, es nuestra principal meta.

Aquí, presentamos un método de caracterización el que utiliza las 'fluctuaciones de curvatura' observadas en la membrana las cuales contienen información relevante para la determinación de los módulos elásticos de las vesículas.

Esta técnica se complementa con la utilización de microscopía de fuerza atómica (atomic force microscopy, AFM), la cual nos aporta información necesaria para dicha caracterización.

Otro punto trascendental en cualquier estudio con vesículas, es el método que se utilice para su fabricación. La idea principal es siempre trabajar con la técnica que produzca "buenas vesículas", es decir que tengan alto rendimiento, limpieza, reproducibilidad y control en su tamaño, además de ser sencillas en procedimiento y montaje. Por ello el método que utilizamos es el Encapsulación continua de gotas cruzando la interfaz (Continuous droplet interface crossing encapsulation, cDICE), el cual posee todas las características citadas.

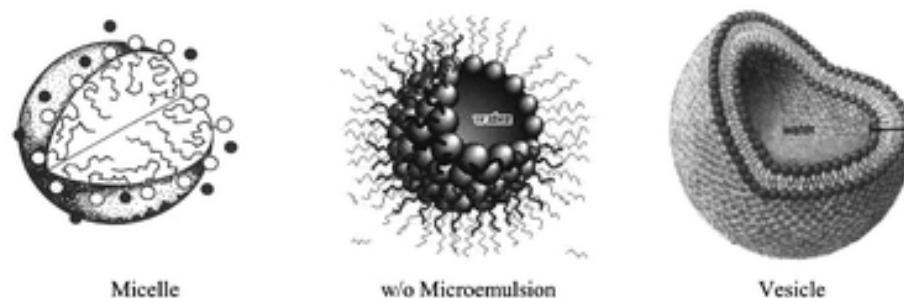
El escrito presentado a continuación es un recorrido a través del "universo" del estudio de las vesículas, comenzando por sus bases físicas y químicas, ciencias siempre ligadas en este campo, conociendo también algunos de los métodos de fabricación, dando hincapié en la técnica utilizada, y finalmente nos adentraremos en la física y matemática aplicada al estudio de los resultados experimentales obtenidos, con el fin de determinar las constantes elásticas, módulos de flexión (bending) y de Young, de la membrana.



## Conceptos fundamentales

### 1.1. Introducción a los Materiales Complejos

Al hablar de materiales complejos, nos referimos a materiales tales como dispersiones coloidales sólidas, polímeros, y auto-ensamblados anfifílicos (micelas, vesículas, etc) y microemulsiones. Materiales sumamente importantes tecnológicamente y además, por su potencial uso como modelos biológicos simples. Leche, sangre, pintura, jabones y detergentes son ejemplos familiares donde las propiedades de dispersión, encapsulación y limpieza son utilizadas. Mientras el estudio de sistemas de un componente como fluidos simples o sólidos se centra en el comportamiento del “bulk”, una serie de consideraciones de la naturaleza de los múltiples componentes de los fluidos complejos requiere del entendimiento de las interfaces entre los materiales. Las propiedades únicas de las dispersiones son a menudo determinadas por el comportamiento de la interface. Esto a menudo deja una considerable simplificación en el estudio y entendimiento del sistema, ya que en lugar de analizar el comportamiento de una compleja mezcla tridimensional, el problema es reducido al estudio de una interface bidimensional.



**Figura 1.2:** Auto-ensamblajes de anfifílicas en micelas, microemulsiones y vesículas.

Finalmente, un rico conjunto de fenómenos y aplicaciones están relacionadas al comportamiento de auto - ensamblajes de *coloides* como se muestra en la figura

## 1.2.

En dichos sistemas generalmente compuesto por moléculas (como jabón) en solución, las “partículas” coloidales no son rígidas; su tamaño y forma es influenciada por fuerzas comparables a las que existen entre ellos y pueden ser “sintonizados” variando la temperatura, solvente, o la química molecular del surfactante.

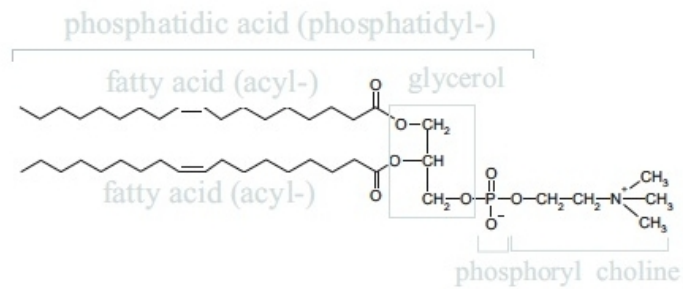
Las moléculas surfactantes se caracterizan por una sección polar que tiende a habitar en un medio de alta constante dieléctrica, como el agua, y una sección apolar hidrocarbonada que es relativamente insoluble en agua [2]. Estas moléculas tienden a agregarse en interfaces aire - agua o aceite - agua con una direccionalidad definida: la parte polar en el agua y la sección de hidrocarburos en el aceite. Las estructuras formadas por estos agregados muestran una variedad de formas y propiedades que van desde arreglos ordenados de micelas ( por ejemplo, agregados esféricos de surfactantes con su parte polar dentro de la superficie de la esfera y solubilizados en agua) a desordenados, como microemulsiones bicontinuas (dispersiones de agua y aceite con monocapas de surfactantes en la interface entre los dominios de agua y aceite). Además de surfactantes de cadenas cortas ( $\leq 20$  grupos de hidrocarburos), polimeros de cadena larga pueden mostrar comportamiento como surfactantes, como por ejemplo “*block copolymers*”. Surfactantes y *block copolymers* son importantes sistemas modelos para estructuras biológicas como paredes celulares, membranas, y materiales de revestimiento de los pulmones. Además, las microestructuras formadas por auto-ensambles coloidales son útiles en el diseño de microcápsulas inteligentes para la industria farmacéutica y de alimentos.

## 1.2. ¿Qué son los fosfolípidos?

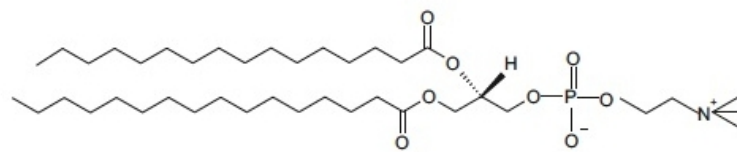
Los fosfolípidos son un tipo de lípidos anfipáticos compuestos por una molécula de glicerol, al que se le unen dos ácidos grasos (1,2 diacilglicerol) y un grupo fosfato (Fig. 1.3). El fosfato se une mediante un *enlace fosfodiéster* a otro grupo de átomos, que frecuentemente contienen nitrógeno, como colina, serina o etanolami-

na y muchas veces posee carga eléctrica neta. Todas las membranas activas de las células poseen una bicapa de fosfolípidos [3].

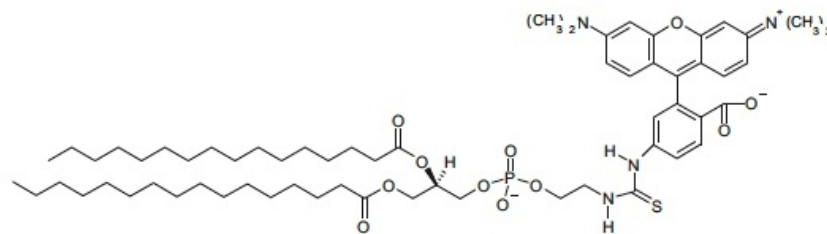
En los fosfolípidos, la región apolar corresponde a largas *cadena alquílicas* de áci-



(a) DOPC.



(c) DPPC.

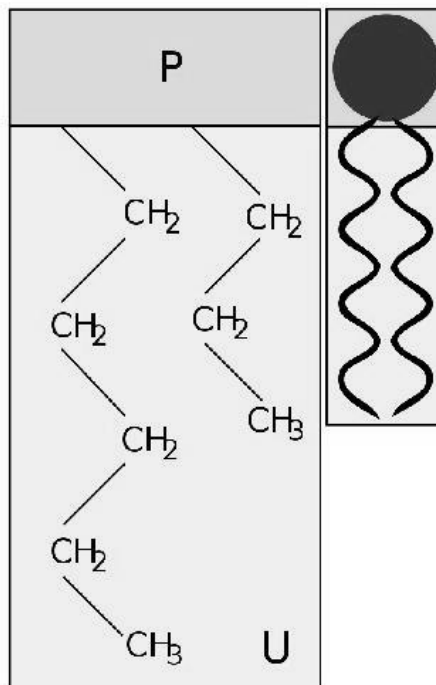


(e) TRITC-DPPE.

**Figura 1.3:** Fosfolípidos típicos.

dos grasos, que se les denominan “colas apolares”, y la región polar corresponde al grupo fosfato (Fig. 1.4), cargado negativamente, y a la molécula unida a él, que puede estar cargada positivamente o poseer grupos hidroxilos (-OH) polares; en

conjunto forman la “cabeza” polar de la molécula.



**Figura 1.4:** Fosfolípido: Grupo polar de la molécula, sección denominada como 'P'. La sección 'U' indica la porción hidrofóbica no cargada de la molécula.

En un entorno acuoso, las cabezas polares de los fosfolípidos tienden a orientarse hacia su entorno polar, mientras que las colas hidrofóbicas tienden a minimizar el contacto con el agua. Las colas no polares del agua de los lípidos tienden a juntarse, formando una bicapa lipídica o una micela.

Las micelas se forman cuando lípidos anfipáticos de una sola cola son colocados en un entorno polar, mientras que las bicapas lipídicas se forman cuando los fosfolípidos de dos colas son colocados en un ambiente polar. Las micelas son esferas de una sola capa y con una longitud del tamaño las cadenas de hidrocarburos, mientras que las bicapas pueden ser considerablemente de mayor tamaño. Las bicapas que se doblan sobre sí mismas forman una esfera vacía, creando así un compartimento separado acuoso, y es en esto en lo que consiste esencialmente la membrana plasmática.

Las micelas y las bicapas se separan del ambiente polar mediante un proceso conocido como “efecto hidrofóbico” y sucede cuando se disuelve una sustancia no polar en un entorno polar, en donde las moléculas polares se acomodan de manera más ordenada alrededor de una sustancia no polar disuelta debido a que las moléculas polares no pueden formar enlaces de *punte de hidrógeno* con las moléculas no polares. Cuando la molécula no polar se separa del medio polar, la entropía de la molécula polar en el medio aumenta. Esto es esencialmente, una forma de separación de fase, similar a la separación espontánea que ocurre entre el agua y el aceite.

Todos los fosfolípidos contienen una o más cadenas de ácidos derivadas de ácidos grasos, las cuales consisten en cadenas hidrocarbonadas unidas a un grupo ácido carboxílico (-COOH). Los ácidos grasos son insolubles en agua y en soluciones salinas; difieren en longitud y en la extensión y posición de sus enlaces dobles. La mayoría de ácidos grasos tiene un número par de átomos de carbono, usualmente 16, 18, o 20. Ácidos grasos sin doble enlace son llamados “saturados”; aquellos con al menos un doble enlace son llamados “insaturados” [4]. Algunos de los nombres más comunes para estas cadenas de ácidos y algunas abreviaciones para head-groups de fosfolípidos son dadas en las siguientes Tablas (figura 1.5).

Numero de carbonos : Numero de enlaces dobles	Nombre de la cadena	Nombre completo	Abreviacion
12 : 0	lauroil	fosfatidilcolina	PC
14 : 0	miristoil	fosfatidiletanolamina	PE
16 : 0	palmitoyl	fosfatidilserina	PS
18 : 0	estearoil	fosfatidilinositol	PI
18 : 1	oleoil		

**Figura 1.5:** Nombres de cadenas y grupos de cabeza.

Cuando una suspensión de fosfolípidos (Fig. 1.6) es dispersada en una solución acuosa, puede formar tres tipos de estructuras diferentes: micelas, láminas de doble capa y liposomas.

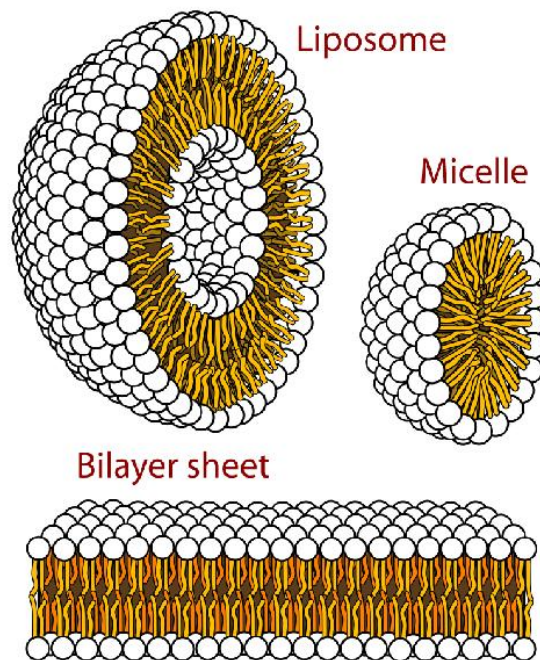
Nombre del lipido	Abreviacion
1,2-dilauroílo-sn-glicero-3-fosfocolina	DLPC
1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina	DMPC
1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina	DPPC
1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina	DOPC
1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	DPPE
1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-[fosfo-L-serina]	POPS
1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-[fosfo-L-serina]	DPSP

**Figura 1.6:** Nombres de lípidos y abreviaciones

El tipo de estructuras formadas por un fosfolípido puro o una mezcla de fosfolípidos depende de la longitud de la cadena de ácidos grasos y del grado de saturación, de la temperatura, de la composición iónica del medio acuoso y en el modo de dispersión de los fosfolípidos en la solución. En las tres formas (Fig. 1.7), interacciones hidrofóbicas causan que las cadenas de ácidos grasos se agregren y excluyan moléculas de agua en el “núcleo”. Micelas raramente son formadas desde fosfoglicéridos naturales, por que sus cadenas de ácidos grasos generalmente son demasiadas para encajar en el interior de la micela. Bajo condiciones favorables, fosfolípidos de la composición presente en las células espontáneamente formas estructuras simetricas como láminas, llamadas bicapas de fosfolípidos, las que tienen aproximadamente dos moléculas de espesor. Cada capa en esta estructura lamelar es llamada *leaflet*.

### 1.2.1. Formación de estructuras de lípidos

La agregación de lípidos es un proceso de auto-ensamblado, mediado por interacciones de lípidos como Van der Waals, hidrofóbicas, interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógenos. En general, la presencia de una molécula hidrofóbica individual en un ambiente acuoso es entropicamente muy poco favorable . Las moléculas de agua son forzadas a construir enlaces-H alrededor de la molécula hidrofóbica, formando las llamadas *estructuras clatrato*, las que representan moléculas



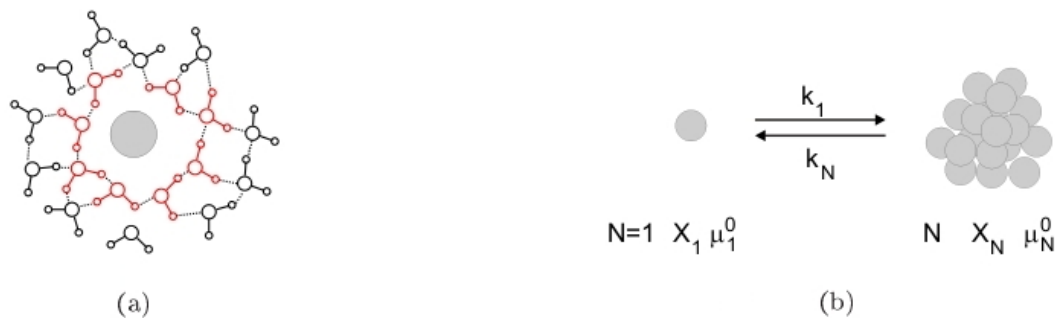
**Figura 1.7:** Las tres principales estructuras que forman los fosfolípidos en solución: liposoma, micela y bicapa

las de  $H_2O$  de alto orden y por lo tanto de baja entropía, como se muestra en la figura 1.8. Para disminuir la cantidad de estructuras clatrato, las moléculas hidrofóbicas tienden a agregarse [4].

Considerando ahora el proceso de auto-ensamblaje de lípidos: membranas de lípidos tienen un 'grupo de cabeza hidrofílica polar' y dos cadenas de hidrocarburos expuestas que son extremadamente hidrofóbicas, significando lo que implica que es necesario un inversión en energía para transferir de un ambiente hidrofóbico (solvente orgánico, arreglo con otros lípidos en micelas o bicapas de lípidos) a un ambiente acuoso. De acuerdo con:

$$\Delta G = \mu_{singledispersed}^0 - \mu_{micellar}^0 = -RT \ln(\chi_{CMC}) \quad (1.1)$$

donde  $\mu_{singledispersed}^0$  es el potencial químico de los fosfolípidos libres en solución y



**Figura 1.8:** Principio de fuerza hidrofóbicas.

- a) Las moléculas de  $H_2O$  (en rojo) en el vecindario junto a las moléculas hidrofóbicas (gris) tienen menos posibilidades de establecer enlaces-H que las moléculas de agua (negro), rodeadas de otras partículas hidrófilas. Esta situación es por lo tanto entrópica desfavorable. b) Monómeros y agregados de moléculas hidrofóbicas se encuentran en un intercambio en equilibrio

$\mu_{micellar}^0$  es el potencial químico de las micelas.

Esta diferencia en los potenciales químicos provocan que la concentración crítica de micela (o concentración crítica micelar)  $\chi_{CMC}$ , que es la medida de la concentración de lípidos al que el 50 *por ciento* de las moléculas libremente dispersas se asocia en micelas, es muy pequeña. Un valor típico para un fosfolípido de doble cadena con 16 carbonos es  $\Delta G \approx 75 kJ/mol \approx 30RT$ , y concentraciones críticas de micela de fosfolípidos de dos cadenas es típicamente del orden de  $10^{-12} M$ .

Moléculas anfifílicas tienen una fuerte tendencia a la agregación. Sin embargo, depende de la forma del lípido y el empaquetamiento de los lípidos, si micelas o bicapas son formadas. La geometría de las moléculas anfifílicas puede ser aproximada por tres parámetros:

1. El área superficial óptima  $a_0$  ocupada por el *headgroup* (debido a la repulsión electrostática entre las moléculas vecinas, esto depende fuertemente del pH y la fuerza iónica de la solución, para lípidos cargados).

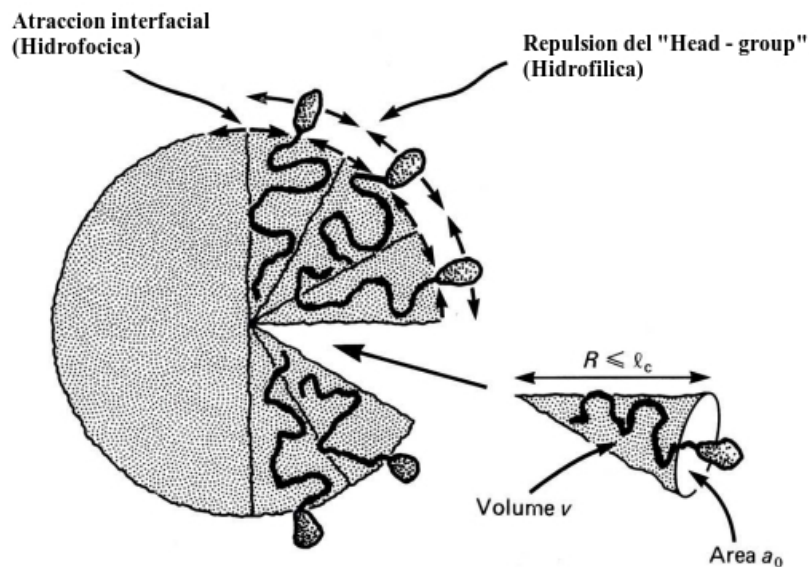


2. El largo de la cadena de hidrocarburos  $l_c$ , que establece un límite superior al tamaño de micela.
3. El volumen molecular de la cola de hidrocarburo  $v$ .

En resumen, la forma final del agregado de lípidos es principalmente determinado por el llamado 'factor de forma' de los lípidos constituyentes:

$$\frac{v}{a_0 l_c}$$

La estructura más simple de los lípidos es la de los agregados esféricos son las micelas. El esquema de una micela dada en la figura 1.2.1 también muestra la influencia de las propiedades de empaquetamiento. Es evidente que la formación de micelas tienen una gran área de *headgroup*  $a_0$  y un pequeño volumen de cadena de hidrocarburos  $v$ . Para una micela el factor de forma tiene que ser más pequeño que  $1/3$ . Dichos lípidos son llamados lípidos de forma cónica.



**Figura 1.9:** Para un pequeño factor de forma lípidos forman micelas.

Para estructuras de bicapas son requeridas pequeñas áreas de *headgroup* y un abultado volumen de cadenas de hidrocarburos, por ejemplo lípidos de forma cilíndricas. El factor de forma debe ser entonces:

$$\frac{1}{2} < \frac{v}{a_0 l_c} < 1 \quad (1.2)$$

Las bicapas están usualmente compuestas de lípidos con dos cadenas de hidrocarburos. En bicapas planas, las cadenas hidrofóbicas en el medio de la estructura están bien acomodadas debido a que se encuentran en un ambiente hidrofóbico y las cabezas hidrofílicas están en una interface acuosa. Pero para los bordes de estas bicapas planas las cadenas de hidrocarburos son expuestas al agua. Además la estructura tenderá a esconder estos bordes del ambiente acuoso conectando los bordes abiertos con otros bordes. Esto resultará en vesículas, estructuras esféricas comparables a burbujas de jabón.

Algunas estructuras de agregados de lípidos con sus correspondientes factores de forma son mostrados en la figura 1.10.

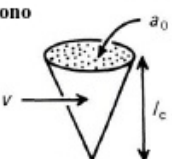



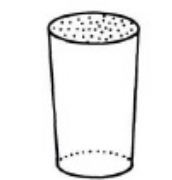
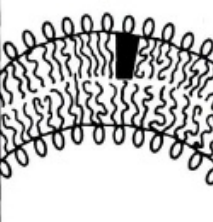
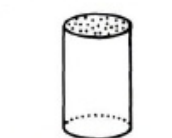
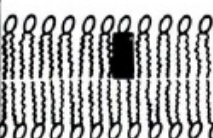

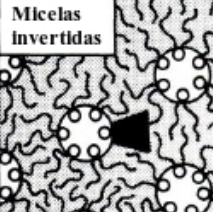
Lípidos	Parametro de empaq. Crítico $v/(a_0l_c)$	Forma de empaquetamiento crítica	Estructuras formadas
Lípidos de una cadena (surfactantes) con una gran area de 'head - group': SDS bajo en sal	$< 1/3$	Cono 	Micelas esféricas 
Lípidos de una cadena con una pequeño area de "head - group ": SDS y CTAB en alta salinidad, lípidos no-iónicos	$1/3-1/2$	Cono truncado 	Micelas cilíndricas 
Lípidos de doble cadenas con una gran area de 'head - group', cadenas fluidas: <i>Phosphatidyl choline (lecithin), phosphatidyl serine, phosphatidyl glycerol, phosphatidyl inositol, phosphatidic acid, sphingomyelin, DGDG<sup>a</sup>, dihexadecyl phosphate, dialkyl dimethyl ammonium salts</i>	$1/2-1$	Cono truncado 	Bicapas flexibles, Vesículas 
Lípidos de doble cadenas con area pequeña de ' head - group, lípidos aniónicos en alta salinidad, cadenas saturadas <i>phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl serine + Ca<sup>2+</sup></i>	$\sim 1$	Cilindros 	Bicapas planas 
Lípidos de doble cadenas con area pequeña de ' head - group, nonionic lipids, poly (cis) unsaturated chains, high T: <i>unsat. phosphatidyl ethanolamine, cardiolipin + Ca<sup>2+</sup>, phosphatidic acid + Ca<sup>2+</sup>, cholesterol, MGDG<sup>b</sup></i>	$> 1$	Cono invertido truncado 	Micelas invertidas 

Figura 1.10: Lípidos forman diferentes estructuras de agregados dependiendo de su factor de forma.

## Capítulo 2

# Métodos de fabricación de vesículas

La fabricación de vesículas es una de las etapas más críticas en su estudio. La necesidad de que la entidad observada presente las mejores condiciones de tamaño, lamelaridad, composición química y limpieza (de ella y su entorno), son las principales limitantes de los distintos métodos de fabricación existentes. Además de las necesidades fundamentales de reproducibilidad y de alto rendimiento.

Entre las técnicas más conocidas se puede mencionar: electroformación, hidratación de película de lípidos, extrusión, doble emulsión o emulsión inversa, entre otras. Todas las cuales garantizan la obtención de vesículas de distintos tamaños y lamelaridad, poseyendo una serie de ventajas y desventajas propias de cada método.

El método de fabricación que implementamos para la fabricación de las vesículas utilizadas, es una nueva técnica llamada Encapsulación continua de gotas cruzando la interfaz (Continuous droplet interface crossing encapsulation, cDICE), la cual describiremos más adelante.

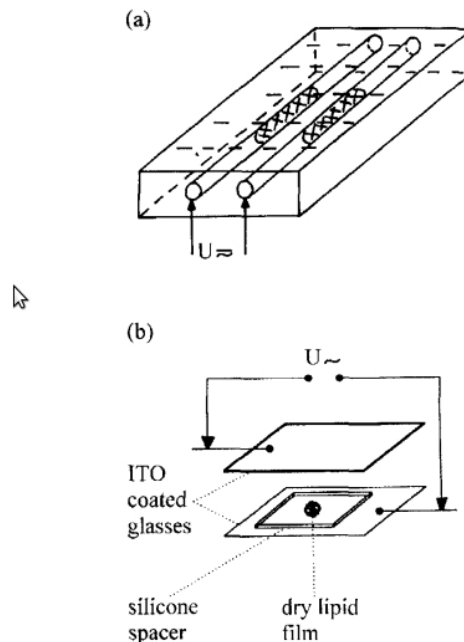
## 2.1. Electroformación

El primer método de electroformación fue establecido por Angelova y Dimitrov <sup>1</sup>, y fue desarrollado para plano- paralelo, así como para cámaras cilíndricas de electroformación, utilizando tanto corriente alterna (AC), y corriente continua (DC) de los campos eléctricos externos. En la electroformación convencional, se realiza un depósito de lípidos en la superficie de uno o dos electrodos de placas de vidrios recubiertas de óxido de indio dopado con estaño (ITO), o cables de platino (Pt) paralelos el uno del otro. Aplicándosele corriente alterna entre los dos electrodos durante la hinchazón de los lípidos en el agua se forman vesículas gigantes (giant vesicles, GVs) unidas al electrodo. Muchos desarrollos y aplicaciones se han descrito desde entonces. Se estableció que la formación de vesículas de una gran variedad de zwitteriones, así como mezclas de lípidos cargadas, pueden ser inducidas y controladas por campos eléctricos externos aplicados durante la inflamación de las películas de lípidos en la superficie de los electrodos en un medio acuoso. Los tamaños, lamellaridad y los rendimientos de las vesículas gigantes unilamelares (giant unilamellar vesicles, GUVs) puede ser controladas por el espesor de la película de lípidos inicial, y los parámetros de la aplicación de campo eléctrico externo (AC o DC).

El montaje experimental consiste en un dispositivo de electroformación y una fuente externa de AC o DC. Un microscopio óptico de contraste de fase, equipado con cámara de video y sistema de grabación de video. La fuente de poder AC es un generador de baja frecuencia, ( 0.1-50 Hz hasta 7V). Un osciloscopio supervisa los parámetros del campo eléctrico aplicado [5]. El dispositivo de electroformación (cámara) puede tener dos geometrías diferentes (figura 2.1).

---

<sup>1</sup>cf. M. I. Angelova and D. S. Dimitrov. *Furuday Discuss. Chem. Soc.*, 81, 303; 345 (1986)



**Figura 2.1:** Configuraciones posibles para el dispositivo de electroformación de liposomas:

- a) dos alambres paralelos cilíndricos para la observación en el extremo del electrodo en una dirección perpendicular al crecimiento de la vesícula.
- b) dos electrodos transparentes en plano paralelo para la observación en la dirección de crecimiento de la vesícula.

Los protocolos de electroformación tienen los siguientes pasos:

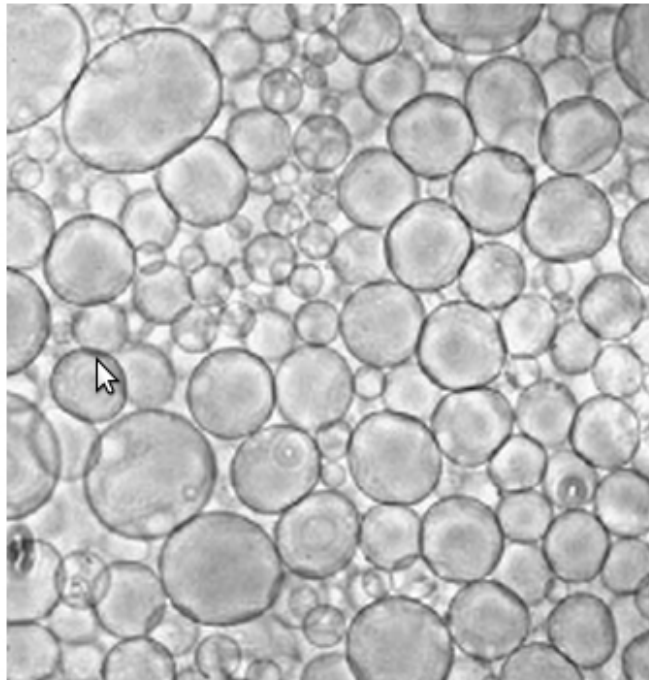
1. depositar una película de lípidos en seco sobre la superficie del electrodo,
2. la aplicación del campo eléctrico externo y llenar la cámara de trabajo con agua o solución acuosa,
3. orientar el crecimiento de la vesícula mediante la aplicación parámetros del campo eléctrico (voltaje y frecuencia).

El protocolo más universal de electroformación es el AC y ha demostrado ser eficaz para la preparación GUVs de una gran variedad de zwitteriones así como para mezclas de lípidos neutrales o con carga. GUVs electroformados (Fig. 2.2) se preparan en agua, o sacarosa a una concentración de 50 mM, o buffers de TRIS a 2 mM,

fosfato, HEPES o *BICINE*.

La electroformación de GUVs se limita a una baja fuerza iónica (por debajo de 10 mM de NaCl). La presencia en el medio de inflamación incluso de 1 mM de  $Ca^{2+}$  es suficiente para evitar la formación de GUVs.

La elección del solvente orgánico donde la película de lípidos seca es depositada, afecta la calidad de las GUVs. Otra desventaja de este método es que el rendimiento y el tamaño de GUVs disminuye fuertemente cuando hay iones (sales) presentes en la solución acuosa [6]. Las mezclas de dos solventes son eficientes para zwitter-

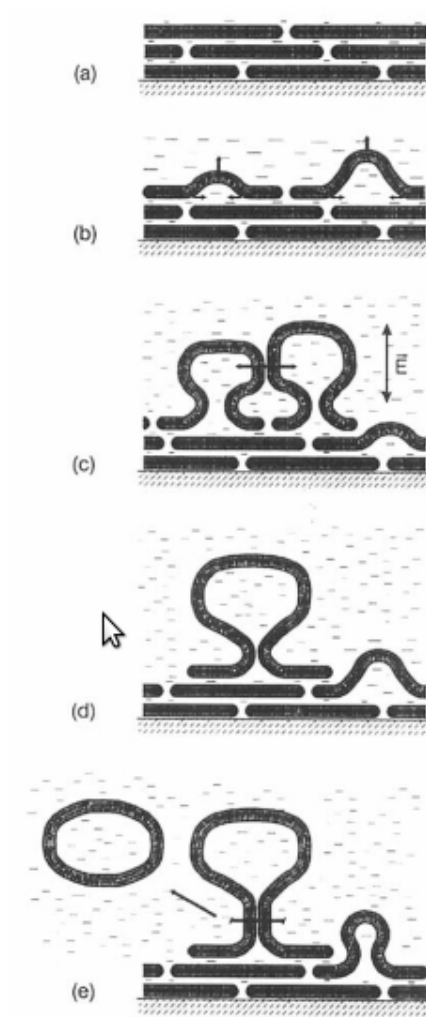


**Figura 2.2:** Fotografía en contraste de fase de vesículas de EggPC creciendo por Electroformación.

riones y deposición películas de lípidos neutral. Cuando un lípido cargado participa es preferible una mezcla de tres solventes.

La electroformación es usada para preparar GUVs que involucran vesículas individuales (*no exigiendo suspensiones de liposomas de alta concentración de lípidos*). Los tamaños de las vesículas están normalmente entre 5 – 200  $\mu m$  de diámetro, de-

pendiendo de la composición del lípido, del medio de hinchazón (swelling medium), y los parámetros del campo AC externo. La tensión de la membrana de las GUVs justo después de su formación depende de la cinética de formación, que puede ser controlada en cierta medida por los parámetros del campo AC externo (figura 2.3).

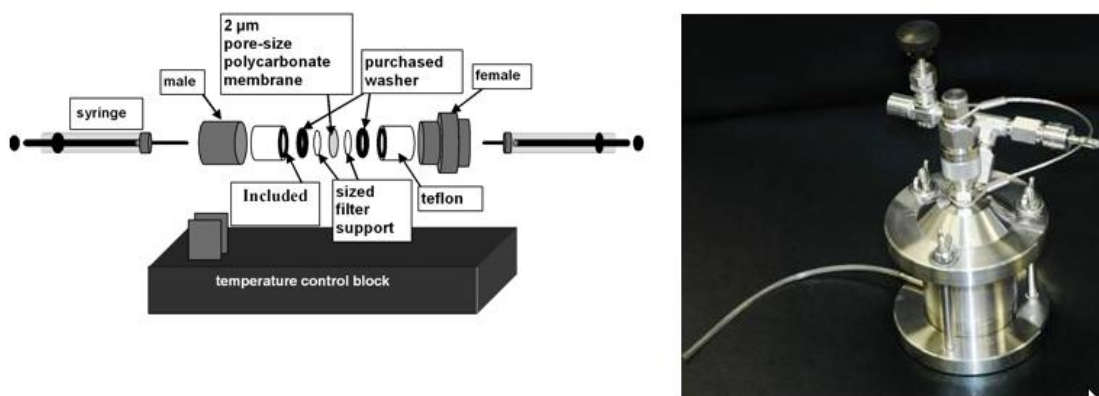


**Figura 2.3:** Diagrama de electroformación AC,  $\vec{E}$  indica la dirección del campo eléctrico externo.



## 2.2. Extrusión

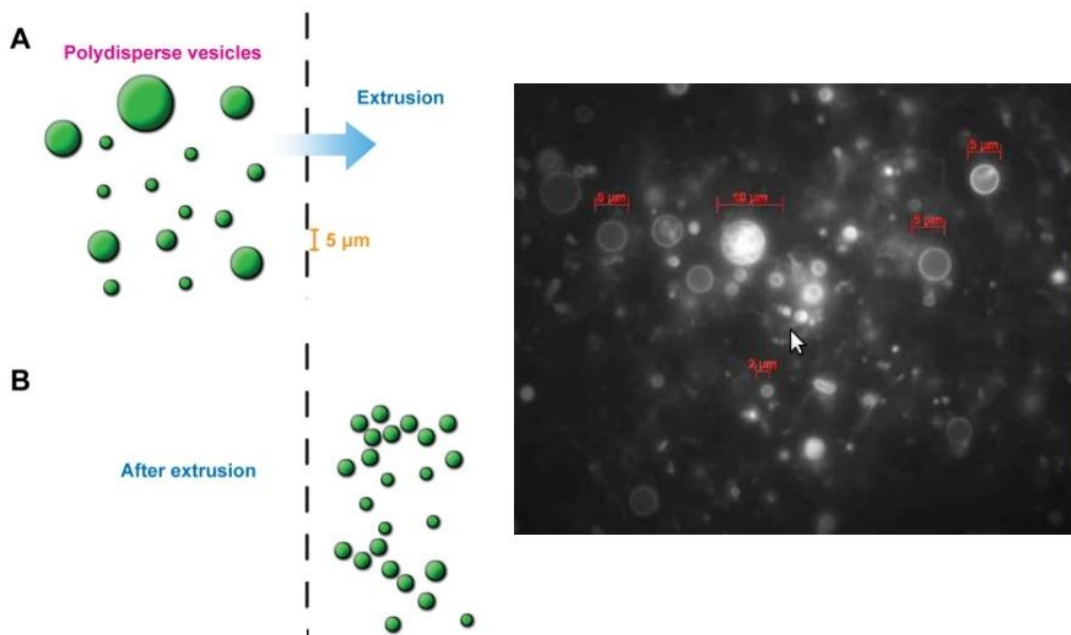
La extrusión es el proceso en el cual una solución de vesículas multilame-  
lares es forzada a pasar a través de una membrana de policarbonato con pequeños  
poros usando gas a alta presión (Fig. 2.4) , normalmente nitrógeno. Este método  
permite obtener una distribución de tamaños más estrecha que las generadas por  
otros procedimientos, centrada en el tamaño del poro de la membrana utilizada. La  
distribución de tamaños también muestra dependencia con la presión de extrusión,  
con la velocidad de flujo de la solución de vesículas y con las características del  
lípidos utilizado [7]. El método de extrusión permite la de preparación de muestras de



**Figura 2.4:** Dispositivo (izquierda) y montaje para Extrusión (derecha)

vesículas grandes y unilame-  
lares a través de pequeños poros. En este proceso, las  
soluciones que contienen vesículas multilame-  
lares muy grandes ( $\geq 1 \mu\text{m}$ ) se ven  
obligadas o extruidas a través de los poros con un diámetro del orden de  $\sim 100$   
nm, utilizando un gas a presión o un sistema basado en un émbolo de jeringa. Este  
método es ampliamente utilizado en aplicaciones de investigación y farmacéutica,  
ya que es una forma relativamente rápida para producir una población de vesícu-  
las más o menos monodispersas de tamaño medio controlado, sin la introducción  
de contaminantes. Extrusión a través de poros de 100 nm resultan en vesículas

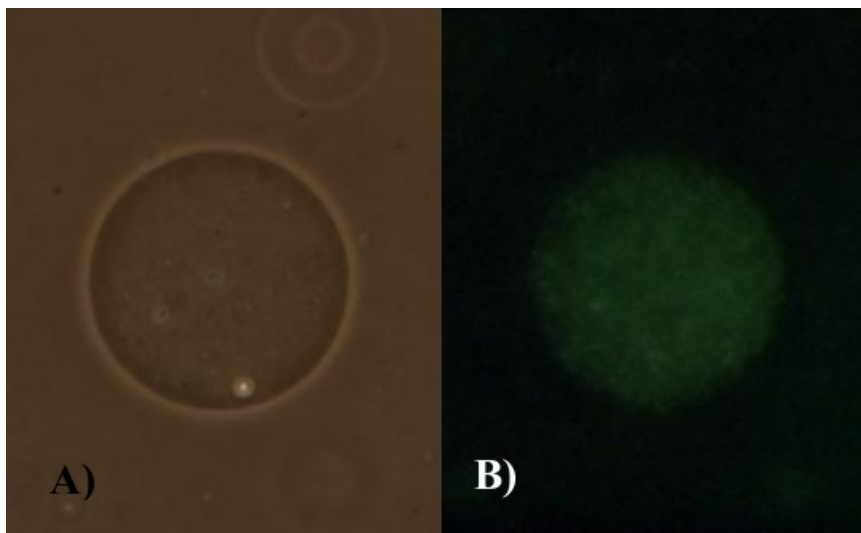
de  $\sim 10$  nm, la extrusión a través de poros de mayor tamaño en general, producen vesículas más pequeñas que el tamaño del poro (Fig. 2.5) , y la extrusión a través de pequeños poros producen vesículas más grandes que el tamaño de los poros. Los resultados de diferentes lípidos indican que el tamaño de la vesícula final podría ser dependiente de los lípidos. La Extrusión se considera infructuosa por debajo de la temperatura de transición de fluido - gel, un efecto que fue atribuido a la disminución de la fluidez de la membrana por debajo de la temperatura de transición.



**Figura 2.5:** Esquema de extrusión (izquierda) y fotografía (derecha) de Vesículas

### 2.3. Encapsulación continua de gotas cruzando la interfaz, (cDICE)

La técnica de Encapsulación continua de gotas cruzando la interfaz (cDICE) [8], desarrollada por los investigadores *Manouk Abkarian, Etienne Loiseau y Gladys Massiera*, representa una gran novedad en el campo de la fabricación de vesículas, en donde destacan la simplicidad del montaje experimental, el alto rendimiento obtenido por muestra y facilidad de encapsulación de diversos materiales (Fig.2.3) .



**Figura 2.6:** Secuencia de imágenes de diferentes vesículas fabricadas con el método de cDICE, encapsulando diversas sustancias en su interior.

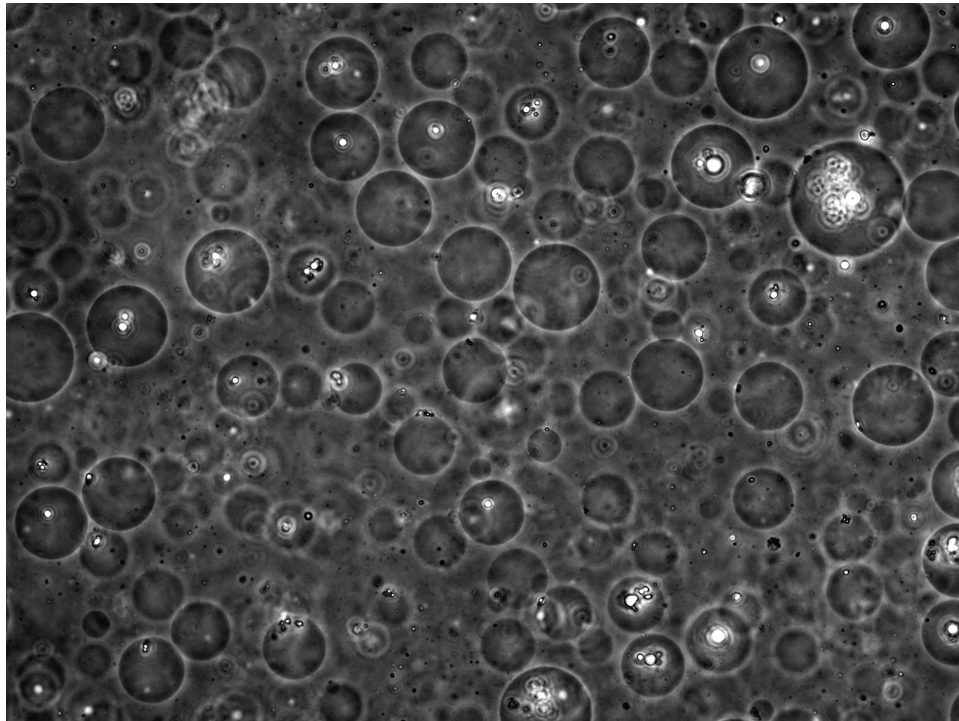
A) vesícula de doble capa fabricada por medio de cDICE observada por microscopía de contraste de fase.

B) Interior de la vesícula que contiene una solución de sucrosa y partículas de latex fluorescentes.

Es una técnica fácil de implementar, que garantiza la producción de vesículas en su mayoría libres de defectos, con una alta tasa de producción (Fig. 2.7) y fácil control de tamaños (con una polidispersidad del 10 por ciento), además de la ver-

satilidad de medios o diferentes sustancias a encapsular, como por ejemplo: diversos medios fisiológicos, suspensión de proteínas, coloides micrométricos, partículas magnéticas o incluso glóbulos rojos.

El montaje es sumamente simple (Fig.2.8) y consiste en una cámara cilíndrica

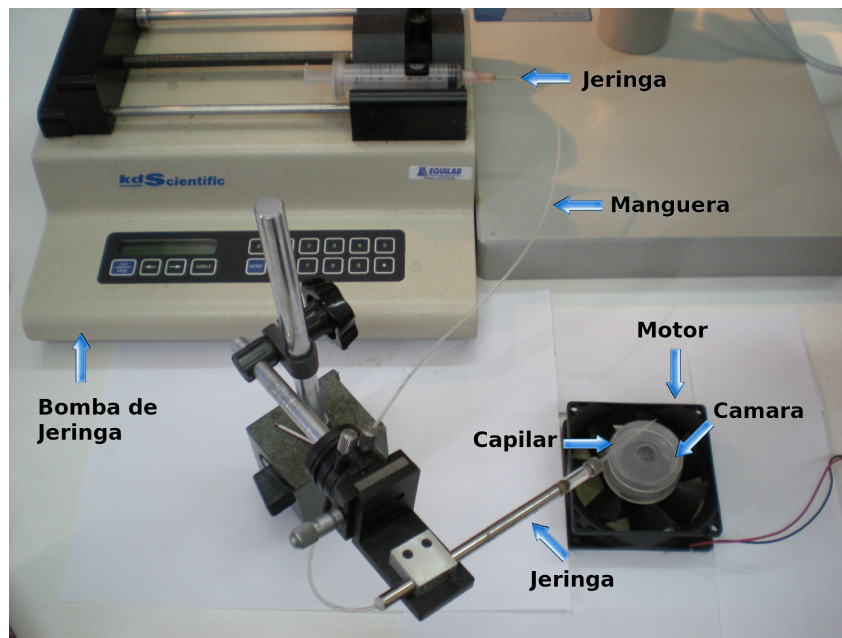


**Figura 2.7:** Imagen en contraste de fase (PhC) de vesículas fabricadas con cDIDE, 10x.

Soluciones empleadas, solución interna partículas super paramagnéticas en sacarosa y solución externa glucosa.

cubierta (con una abertura circular en su centro) que gira mientras se le inyectan secuencialmente (mediante micropipeta en nuestro caso) las siguientes soluciones acuosas: solución acuosa dispersa (DAS), solución de lípidos en aceite (LOS) y aceite *Decane*, formando así dos interfaces entre las tres capas de líquidos inyectadas.

Las tres soluciones utilizadas deben ser inmiscibles entre ellas, y poseer una densidad menor cada una de la anterior que se inyecte, formando así interfaces verticales perpendiculares a la fuerza centrífuga, como vemos en la figura 2.9).

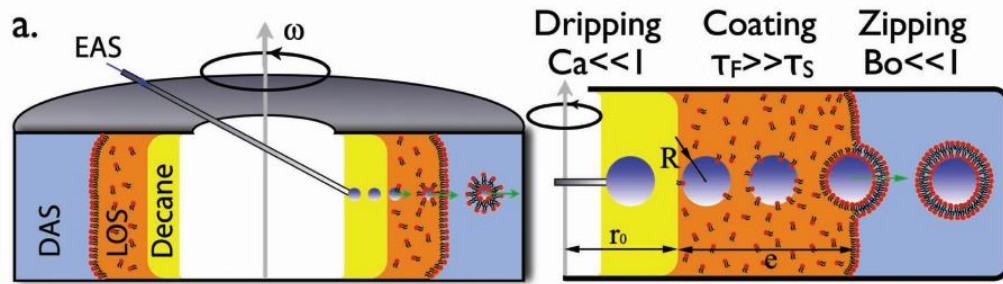


**Figura 2.8:** Fotografías del montaje experimental de la técnica de cDIDE. Vista superior y lateral del montaje.

El siguiente componente de nuestro montaje es el capilar de vidrio por el cual se inyecta una cuarta solución a la cámara en rotación, esta solución acuosa encapsulada (EAS) se introduce en el líquido de menor densidad que está más cerca del eje de rotación y se inyecta a presión constante mediante “goteo” continuo. La solución EAS puede ser una suspensión acuosa a priori de cualquier sustancia que contenga partículas, que cumpla con un tamaño adecuado en comparación con el tamaño del capilar mismo.

### 2.3.1. Etapas del método

La exitosa fabricación de vesículas mediante esta técnica depende de la conclusión de tres pasos fundamentales: la producción de gotas mediante goteo desde el capilar, la absorción de lípidos en las gotas y el cruce de la interface. Los cuales suceden en forma continua y serán detallados a continuación.



**Figura 2.9:** Vista esquemática lateral del montaje. El capilar se fija y la cámara gira a una velocidad  $\omega$ . Gotas de la solución acuosa encapsulada (EAS) “gotear” del capilar en la capa de decano, con bajo número capilar  $Ca$ .

#### ■ Mecanismo de goteo

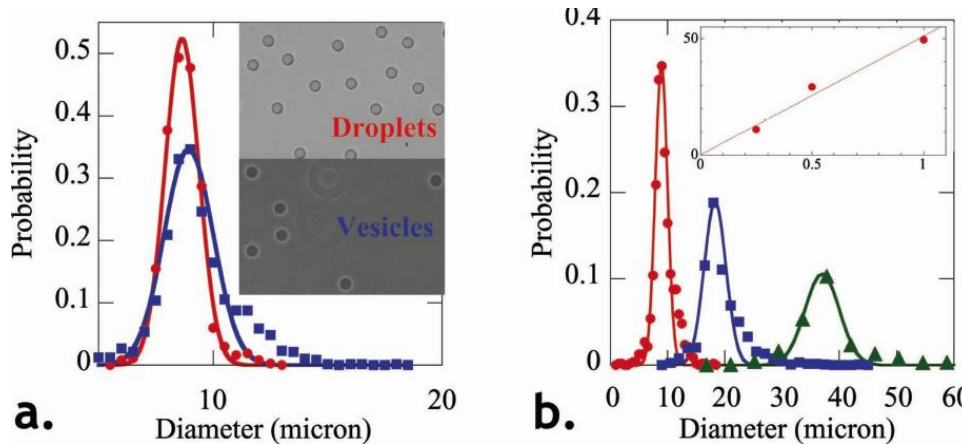
La producción de gotas es controlada por el mecanismo de “goteo” a un número capilar bajo. El número capilar  $Ca$  se define como:

$$Ca = \frac{\eta v}{\gamma} \quad (2.1)$$

donde:

$\eta$  y  $v$  son respectivamente la viscosidad *coflowing fluid* y la velocidad,  $\gamma$  es la tensión interfacial entre EAS/LOS.

El desprendimiento de la gota desde el capilar ocurre para números capilares  $Ca$  menores que 1, debido a que las fuerzas viscosas sobrepasan la tensión interfacial, por lo que el cizalle que ejerce el aceite en rotación provoca que la gota se desprenda y se centrifuge radialmente hacia la interfaz LOS/DAS. Se obtiene una acotada distribución de tamaños, controlada por el tamaño del capilar y  $Ca$ . Para llegar a obtener una polidispersidad de tamaños de gotas menor al 10 por ciento (Fig. 2.10),  $Ca$  decrece a 0,08 utilizando una capa adicional de decano ( $\eta = 0,8 * 10^{-3} Pas$ ) sobre la capa de LOS en la cual se inyecta EAS.



**Figura 2.10:** Distribución de tamaños para vesículas con Ca fijo en 0.08, el tamaño de las puede ser gotas sintonizado variando el diámetro del capilar , el tamaño medio de gota es aproximadamente a tres veces el tamaño del capilar, a Ca = 0.08 y los tamaños promedio de las vesículas son de 10, 20, 40 micrones

- Absorción de lípidos

El segundo mecanismo esencial para la producción de vesículas es la saturación de la interfaz de la gota por los lípidos contenidos en LOS antes que la gota alcance la interface LOS/DAS.

El espesor de la capa de LOS se ajusta de acuerdo a la cinética de absorción de lípidos de dicha gota (esto se mide por el método de “gota colgante”, midiendo el tiempo de absorción característico del lípido  $\tau_S$ ). Este espesor debe permitir que el tiempo de vuelo de la gota a través de esta capa  $\tau_F$ , dado por la ecuación (2.2), sea mayor que  $\tau_S$ , para una concentración dada de lípidos en solución.

$$\tau_F = \frac{9\eta}{2\Delta\rho R^2\omega^2 \ln\left(1 + \frac{e}{r_0}\right)} \quad (2.2)$$

donde

$\omega$  es la velocidad de rotación de la camara

$\eta$  es la viscosidad de LOS

$\Delta\rho$  la diferencia de densidad entre el EAS y LOS

$R$  el radio de las gotas

La fuerza centrífuga  $F_c$  conduce sucesivamente el vuelo de la gota a través de la capa de solución de lípidos en aceite (LOS), recubriéndolas con lípidos hasta la saturación en un tiempo  $\tau_S$  y atravesando dicha capa en un tiempo  $\tau_F$ .

- Cruce de la interface

El cruce de la interfaz LOS/DAS debe ocurrir en un régimen no inercial, bajo número de Bond (que compara las fuerzas de volumen con la tensión interfacial), para cada líquido entre la interfaz, ya que eso garantiza que el volumen de fluido introducido apenas cruce la interfaz, provocando así que el arrastre de aceite y su presencia en la membrana lipídica resulten improbables. El *unswelling* adecuado de las vesículas cDICE y sus consiguientes fluctuaciones de membrana son más indicadores de que la membrana de lípidos se encuentra libre de aceite.



## Capítulo 3

# Modelamiento mecánico de vesículas.

Las membranas de fosfolípidos están compuestas de dos monocapas que debido a efectos hidrofóbicos se encuentran en contacto cercano. No obstante, es razonable asumir que estas monocapas no ejercen entre ellas ninguna fuerza permanente en direcciones laterales, lo que significa que pueden deslizarse una respecto a la otra y así disipar de forma independiente a los esfuerzos mecánicos en esta dirección. Consecuentemente, la energía elástica de una bicapa de fosfolípidos puede ser expresada como la suma de las energías elásticas de las monocapas constituyentes. Las dos monocapas de una membrana cerrada afectan a las demás módulos elásticos debido a las restricciones geométricas que imponen [9].

Los cambios de formas de la vesícula se deben a cambios de temperatura o presión, a la adición de varios anfífilos o adsorbentes, tratamientos mecánicos, eléctricos o magnéticos, o a la adhesión. Los cambios de temperatura inducen diferencias de área / volumen debido a los diferentes coeficientes de dilatación de los lípidos y de las soluciones, así como la respuesta del sistema al estrés externo. Por lo general, los modelos asumen que el espesor de la bicapa es insignificante con respecto al tamaño de la vesícula y que la membrana que se encuentra en estado

líquido, es decir, no resiste las fuerzas de corte o cizalle dentro de la bicapa. Cada monocapa que compone la membrana puede deslizarse una con respecto a la otra. Las moléculas de lípidos son insolubles en la fase acuosa y la tasa de flip-flop, o traslocación de fosfolípidos, es igual a cero [1].

### 3.1. Distintos modelos

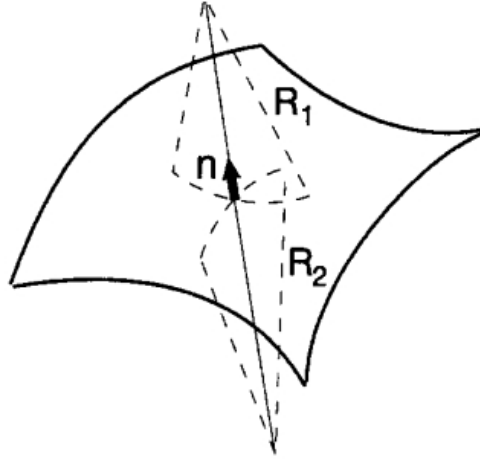
A lo largo de la historia del estudio de las vesículas se han desarrollado en paralelo diversas teorías que tratan de modelar su comportamiento bajo distintos escenarios y restricciones. Las teorías desarrolladas tienen como principal objetivo el modelamiento de las geometrías en equilibrio de las vesículas y las fluctuaciones en su morfología, utilizando como herramienta principal la mecánica del continuo y la geometría diferencial para determinar la energía del sistema, las geometrías accesibles y las propiedades mecánicas de las membranas.

#### 3.1.1. Modelo de curvatura

La diferencia entre el espesor y el diámetro de las vesículas esta entre 3 a 4 ordenes de magnitud ( $h \sim \text{nm}$ , diámetro  $\sim \mu\text{m}$ ) separan el espesor de la bicapa, de alrededor de los nanómetros, de todo el tamaño de las vesículas, del orden de los micrómetros. Esta separación de escalas de longitud sugiere una descripción de la membrana como una superficie en dos dimensiones y no en un espacio tridimensional [10]. Dicha superficie puede ser localmente caracterizada por dos radios de curvaturas  $R_1$  y  $R_2$  (Fig. 3.1).

Para membranas simétricas, la energía de bending local  $f_0$  de una membrana no plana es escrita como una expansión de la curvatura. Al orden mas bajo, se obtiene

$$E_0 = \frac{\kappa_b}{2}(2H)^2 + \kappa_G K \quad (3.1)$$



**Figura 3.1:** Curvatura en una superficie 2D. Las escalas de longitud  $R_1$  y  $R_2$  indican los radios de curvatura. El vector  $n$  denota la normal.

donde

$\kappa_b$  es la constante elástica de flexión (bending)

$\kappa_G$  es la rigidez de flexión Gaussiana

$H$  es la curvatura media

$$H = \frac{(1/R_1 + 1/R_2)}{2} \quad (3.2)$$

$K$  es la curvatura Gaussiana, definida como

$$K = \frac{1}{R_1 R_2} \quad (3.3)$$

### 3.1.2. Modelo de curvatura espontánea (spontaneous curvature, SC)

Este modelo es introducido por *Helfrich* (1973), siendo la energía del sistema

$$E_{SC} = \frac{\kappa_b}{2} \oint dA (2H - C_0)^2 + \kappa_G \oint dA K \quad (3.4)$$

donde  $C_0$  es la curvatura espontánea. La energía junto con las restricciones en el área total y el volumen encerrado en la membrana definen este modelo. El origen

físico de la curvatura espontánea puede ser por un entorno químico diferente en ambos lados de la membrana, o por una composición química diferente de ambas monocapas. En el último caso, la fluidez de los lípidos dará lugar al cambio lateral de la composición de la curvatura local. La curvatura espontánea se transforma en una variable dinámica y no es constante en toda la superficie de la vesícula [11].

### **3.2. Modelo de elasticidad y diferencia de area (The Area-Difference-Elasticity model, ADE)**

Todos los modelos previos pueden considerarse casos particulares de este modelo. La energía elástica de una monocapa puede ser descrita en términos de la suma de dos modos de deformación independiente, los cuales son expansividad isotrópica de área y flexión (bending). Dicha descripción viene de la suposición que una monocapa se comporta como líquido bidimensional en el plano de la membrana y como un cuerpo elástico en el de flexión. Dependiendo de la forma de las moléculas de los fosfolípidos constituyentes de una monocapa, esta puede tener la tendencia de flexionarse espontáneamente, lo que se traduce en general en curvatura espontánea [12].

Las bicapas fluídas responden elásticamente a deformaciones mecánicas las cuales incluyen flexión, estiramiento (stretching) o compresión de la membrana, no hay resistencia al cizalle. La bicapa puede ser idealizada como una lámina cuasi bidimensional constituida por dos monocapas con un número fijo de moléculas de separación. Es mucho más difícil estirar una membrana que deformarla.

En la construcción de una teoría de la morfología de las membranas, se puede asumir entonces, una buena aproximación, que la superficie total de la membrana es fija. Sin embargo, la contribución energética del estiramiento relativo y de la compresión de las dos monocapas, que surgen cuando la membrana está doblada, son del mismo orden de magnitud que la energía de flexión pura, que se origina en el

acomodamiento de las moléculas que componen ambas monocapas. Por lo tanto, hay dos contribuciones a la energía de flexión de una bicapa cerrada: La curvatura de área fija  $A$  de la bicapa, y el estiramiento y compresión relativa de las monocapas. Esto implica una superficie media fija definida por

$$A = \frac{A^{out} + A^{in}}{2} \quad (3.5)$$

que permite cambios diferenciales de área

$$\Delta A = A^{out} - A^{in} \quad (3.6)$$

Así, las cantidades geométricas necesarias para formular la expresión para la energía de flexión son:

- la curvatura local de la membrana  $C_i(r)$  a lo largo de las dos direcciones principales
- la diferencia global de área entre las dos monocapas  $\Delta A$

Se deduce de la geometría diferencial que la última cantidad es proporcional a la integral de la curvatura promedio de la vesícula

$$\Delta A = D \int dA(C_1 + C_2) \quad (3.7)$$

donde  $D$  es el espesor de la bicapa. Esta ecuación hace la conexión explícita entre la forma y la diferencia de área.

La energía total del sistema es

$$E_{ADE} = \frac{\kappa_b}{2} \int dA(C_1 + C_2 - C_0)^2 - \frac{\bar{\kappa}}{2} \frac{\pi}{AD^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad (3.8)$$

Donde  $C_0$  es la curvatura espontánea de la membrana, que da cuenta de los estados posibles no-planos relajados de la bicapa.

$$\Delta A_0 = A_0^{out} - A_0^{in} \quad (3.9)$$

es la diferencia de áreas de las monocapas no estresadas,  $\kappa_b$  y  $\bar{\kappa}$  son los módulos de flexión local y no - local de la membrana.

En el primer término, simplemente se integran las desviaciones locales en la curvatura media del estado de relajación sobre toda el área de la vesícula. El segundo término representa la variación entre la diferencia de superficie real geométrica y la de relajación, la que sería preferida por las monocapas. Ambos términos son de segundo grado y corresponden a una generalización de la ley de Hooke para un resorte en flexión y a la elasticidad del área diferencial.

### 3.3. Presión osmótica

A pesar de que las membranas son permeables al agua, el volumen cerrado de un vesícula es típicamente una variable limitada. La razón radica en la presencia de moléculas a las que la membrana es impermeable, como moléculas de azúcar o grandes iones, que son deliberadamente añadidos a la fase acuosa, o están inevitablemente presentes en baja concentración debido a las impurezas [11]. En cualquier caso, cualquier transferencia neta de agua generaría una presión osmótica que no puede ser contrarrestada por las fuerzas relativamente débiles que surgen de la flexión adicional de la membrana. Por ello, debido a la presencia de dichas moléculas en la solución, a las cuales la membrana es impermeable en las escalas de tiempo considerada, surge presión osmótica en el sistema, manifestándose directamente en diferencias de presión ejercidas sobre la membrana. Esta presión se define como

$$\Pi = R_g T \left( \frac{n}{V} - c \right) \quad (3.10)$$

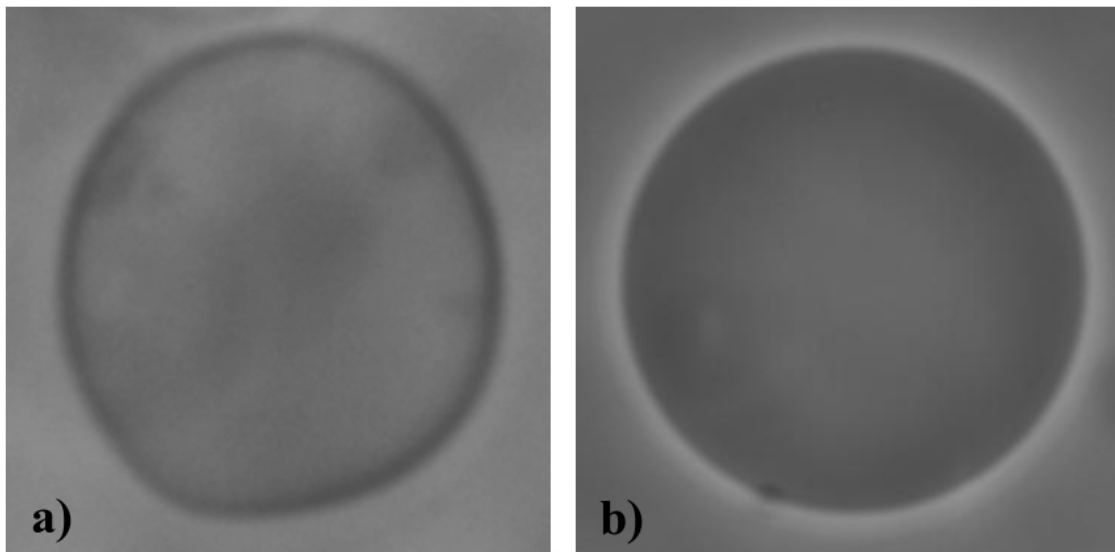
con  $c$  como la concentración en moles por unidad de volumen de las moléculas osmoticamente activa,

$R_g = 8,31 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  es la constante de los gases,

$V$  es el volumen de la vesícula

y  $n$  es el número de moléculas atrapadas dentro de la vesícula.

La diferencia de concentración de solutos en las soluciones interna  $C_{int}$  y externa  $C_{ext}$  de la vesícula, puede inducir cambios en la morfología de la membrana, debido a la presión osmótica que es ejercida sobre esta. Podemos afirmar que ambas cantidades, las concentraciones de ambas soluciones ( $C_{int}$  y  $C_{out}$ ) y la presión osmótica, están relacionada directamente, por lo podemos hablar indistintamente de una o de otra como si nos refirieramos a una misma variable. Los escenarios extremos posibles en los que esta variable puede jugar un importante rol son determinados: equilibrio de concentraciones  $C_{int} = C_{ext}$  y desequilibrio de concentraciones  $C_{int} > C_{ext}$  ó  $C_{int} < C_{ext}$ .



**Figura 3.2:** Efectos de la variación de la concentración de las soluciones en vesículas fabricadas con la técnica de cDIDE

- a)  $C_{int} < C_{ext}$ , donde  $C_{int} = 40$  mM y  $C_{ext} = 100$  mM.
- b)  $C_{int} > C_{ext}$ , donde  $C_{int} = 120$  mM y  $C_{ext} = 100$  mM .

El primer escenario sería el de equilibrio de concentraciones de soluto ( $C_{int} = C_{ext}$ ), donde en una situación ideal sin la presencia de moléculas se encuentra en un estado de equilibrio por lo que la presión osmótica es prácticamente nula y la vesícula no sufre ningún tipo de cambio observable en su morfología.

El segundo escenario al que nos enfrentamos corresponde a una solución interna con mayor concentración de soluto que la externa ( $C_{int} > C_{ext}$ ), en estas condiciones se producirá un flujo transciente de solvente (agua) hacia el interior de la membrana para disolver el exceso de soluto en dicha solución, traduciéndose esto a un mayor volumen interno en la vesícula que el que existiría al estar en equilibrio de concentraciones. Se puede suponer, por lo tanto, que la membrana se encuentra mas tensa que en el primer caso, lo que implica una mayor flexión de esta (Fig. 3.2 b). En un sistema así, la mayor contribución a la energía total, viene dada por la energía de bending de la membrana, por lo que la expresión 3.8, es modificada considerando solo esta contribución.

$$E = \frac{\kappa_b}{2} \int dA (C_1 + C_2 - C_0)^2 \quad (3.11)$$

El último caso extremo ocurre al tener una menor concentración de soluto en la solución interna en comparación con la externa ( $C_{int} < C_{ext}$ ), bajo estas condiciones el flujo de solvente será en la dirección opuesta que en el caso anterior, debido a que para alcanzar el equilibrio el sistema querra acabar con el exceso de soluto presente en él. La morfología de la vesícula sufre cambios observables, pues tiene un menor volumen que en el caso de equilibrio de concentraciones, esto se observa por la presencia de fluctuaciones de la forma de la membrana, es decir variaciones locales en su curvatura (Fig. 3.2 a). Bajo estas condiciones, los aportes a la energía de la flexión y la elasticidad de área diferencial, al igual que en el caso de equilibrio, suponemos son del mismo orden, por lo que la energía total del sistema esta dada por la expresión 3.8.



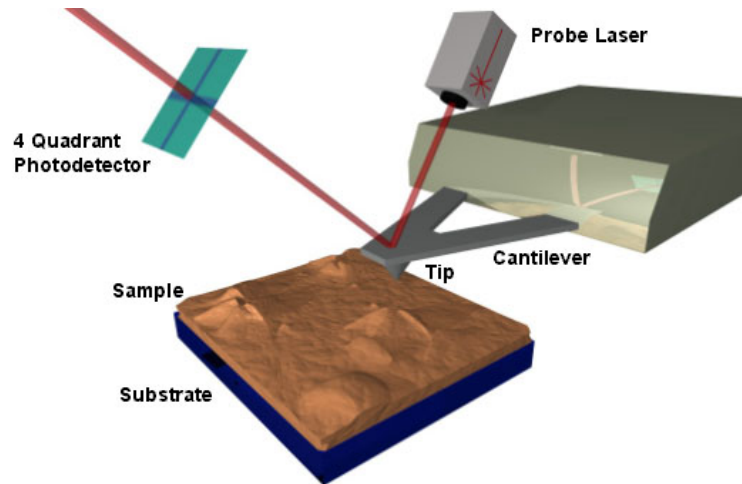
## Capítulo 4

# Adhesión de vesículas a un sustrato, mediciones con AFM

El microscopio de fuerza atómica (atomic force microscopy, AFM) es un microscopio de sonda de barrido que permite realizar simultáneamente imágenes y mediciones de fuerza de interfaces suaves como biomateriales, con una resolución espacial de angstroms y una resolución de fuerzas cerca de los  $10^{-12}$  N.

Básicamente, en AFM (Fig. 4.1) la muestra es barrida por una punta que se monta a un brazo levadizo (cantilever). Durante la exploración, la fuerza entre la punta y la muestra se mide por el control de la deflexión del brazo. Una imagen topográfica de la muestra se obtiene mediante el cambio de la deflexión del brazo levadizo en función de la posición en la muestra. Simultáneamente, es posible registrar las distintas alturas en la muestra durante el barrido. Esta altura es controlada por un circuito de retroalimentación, que mantiene una fuerza constante entre la punta y la muestra [13].

El contraste de la imagen surge debido a que la fuerza entre la punta y la muestra es función tanto de la separación y las propiedades de ambos materiales. En la mayoría de las aplicaciones el contraste de la imagen se obtiene a partir de la repulsión de muy corto alcance (repulsión de Born)[14].



**Figura 4.1:** Esquema de microscopio de fuerza atómica, AFM.

Uno de los métodos que se utiliza para adherir liposomas o vesículas al sustrato es el de *fusión* (McConnell et al. 1986). En el cual, cuando los liposomas alcanzan una superficie sólida que favorece la adhesión se pueden absorber, romper, y extender para formar una doble capa en una superficie hidrofílica o una monocapa sobre una hidrofóbica.

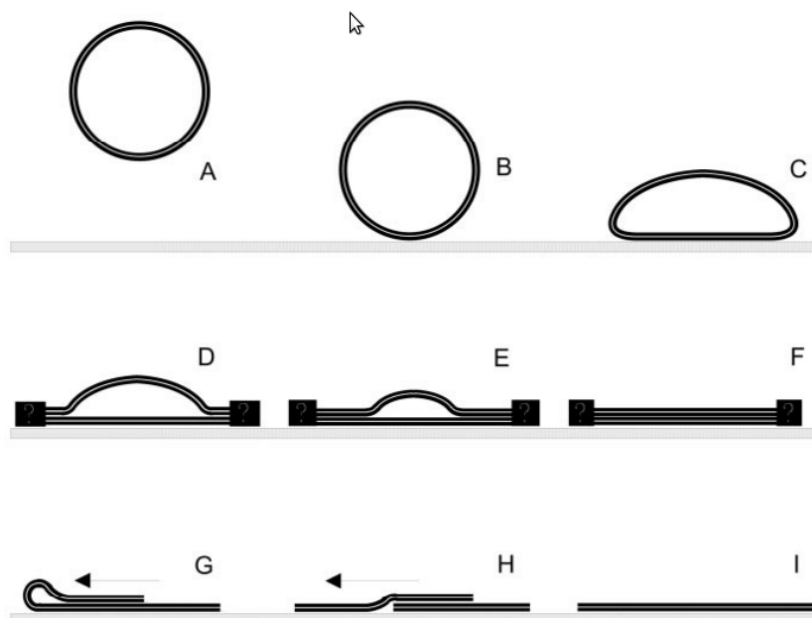
El interés por la forma en que estos procesos tienen lugar, y qué fuerzas están implicadas, se ha incrementado durante los últimos años, con énfasis en el estudio en superficies hidrofílicas. Dichos procesos dependen de varios factores, tales como la superficie, el tamaño, la composición lipídica de los liposomas y otras condiciones experimentales, por ejemplo, la presencia o ausencia de iones  $Ca^{2+}$ . El sustrato utilizado generalmente son láminas de mica, las que se componen de capas cargadas negativamente unidas por cargas positivas intermedias de cationes de potasio ( $K^+$ ). En soluciones acuosas, la superficie de una mica clivada se carga negativamente debido a la disociación de los iones  $K^+$ .

Obtener imágenes en AFM de los liposomas y vesículas es todo un reto, ya que son superficies suaves y dinámicas. Para ello se utilizan los modos de contacto y contacto intermitente (tapping) pues son capaces de capturar muestras suaves (Anexo

C), mostrándose una mejor resolución con el segundo método.

## 4.1. Mecanismo de adhesión y determinación de concentración

La adhesión de vesículas a un sustrato mediante fusión implica una serie de pasos que tienen relación con interacciones de carácter electrostático entre los iones de la solución, la superficie de la mica clivada y la sección polar de los fosfolípidos, produciendo la adhesión y despliegue de las vesículas más próximas a la superficie. Dichos pasos reportados por *Jass y Tjarnhage (2000)*, confirman la siguiente sucesión de etapas: adhesión, ruptura de liposomas aplanados, y formación de un plano de una sola estructura de dos capas en superficies hidrofílicas. De



**Figura 4.2:** Diagrama de los diferentes pasos en que ocurre la adhesión de vesículas a un sustrato mediante fusión.

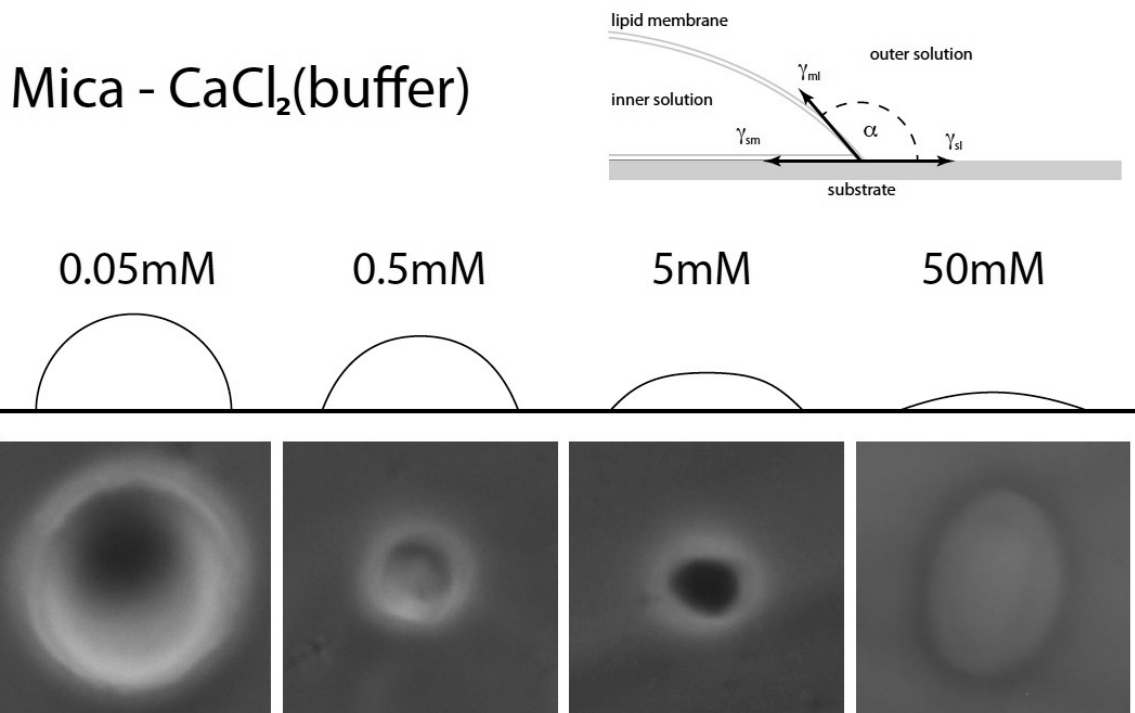
acuerdo a esto el liposoma se aplana desde el exterior hacia el centro hasta que colapsa por completo en sí mismo. Además, algunos despliegues se llevan a cabo durante este proceso de aplanamiento, donde se obtienen dos estructuras de bicapa, una encima de la otra, formando discos de aproximadamente el mismo tamaño. El tránsito a una bicapa única se lleva a cabo de manera que en algunas imágenes se pueden interpretar como deslizamiento (Fig. 4.2 H). En otros casos se prefiere interpretar el movimiento como despliegue (Fig. 4.2 G), lo que implica cierta relación entre las capas. Finalmente, se obtiene una bicapa extendida y adherida sobre la superficie [15].

Uno de los parámetros cruciales en esta etapa es la concentración de iones metálicos o monovalentes presentes en la solución, debido a que su presencia en exceso puede provocar un "sobreaplanamiento" de la bicapa, y por consiguiente una medida no real de su espesor, régimen que llamaremos *interacción fuerte*, o también en un caso completamente opuesto, el apantallamiento de cargas destinadas a la superficie, provocando una interacción débil de la bicapa con el sustrato, régimen que llamaremos *interacción débil*, traducándose esto en una adhesión pobre que puede llegar a no permitir la medición de espesores mediante AFM .

Por este motivo se decidió caracterizar de forma cualitativa el efecto que tiene la concentración de soluto en la solución de iones utilizada en nuestro protocolo de adhesión (Anexo C), mediante la observación de vesículas adheridas a mica empleando para ello un microscopio óptico en contraste de fase, variando dicha concentración en distintos ordenes de magnitud. Este mecanismo de control sólo nos permite tener una idea de como se encuentran las vesículas al momento de ser medidas en AFM, pero sin ningún valor de su espesor.

Se varió la concentración de la solución de  $Ca^{2+}$  desde 0,05; 0,5; 5 hasta 50  $mM$  (Fig. 4.3). De acuerdo a las imágenes obtenidas podemos suponer que entre las concentraciones 0,05 y 0,5  $mM$ , las vesículas se encuentran en el régimen de interacción débil y que a pesar de que en algunos casos nos permite realizar mediciones con AFM, representa valores no reales del espesor de la bicapa. El régimen

de interacción fuerte se obtiene claramente a altas concentraciones de  $Ca^{2+}$  en solución ( $C = 50 \text{ mM}$ ). Por lo que la concentración óptima que pudimos observar es a una concentración de  $CaCl_2$  de  $5 \text{ mM}$ , en donde tenemos la vesículas optimamente adheridas a la superficie.



**Figura 4.3:** Comparación gráfica de la adhesión de vesículas a mica al variar la concentración de la solución de  $Ca^{2+}$ .

## 4.2. Medición de espesor

La medición del espesor de la bicapa de fosfolípidos que compone a la vesícula, al igual que la captura de imágenes y las mediciones de fuerzas, son operaciones complejas, en donde se trata de alterar lo menos posible el sistema que es altamente sensible a cualquier tipo de perturbación o interacción (superficies suaves). Se sabe que el modo de contacto intermitente reduce las fuerzas de fricción y adhesión que

a menudo interfieren con las imágenes de las muestras suaves.

El espesor de la bicapa es un parámetro necesario para la determinación del módulo de flexión  $\kappa_b$  y/o el módulo de Young  $E$  de una vesícula, cantidades relacionados de la siguiente manera, de acuerdo con la teoría de la elasticidad,  $\kappa_b = E/I$ , donde  $I$  es el momento de inercia geométrico del cuerpo, para una superficie isotrópica plana en tres dimensiones es  $I = h^3/[12(1 - \nu^2)]$ , donde  $\nu$  es el cociente de Poisson que para vesículas es de  $\nu = 0,5$  y  $h$  el espesor de la bicapa [13]. La expresión para una bicapa extendida finalmente es

$$\kappa_b = \frac{Eh^3}{12(1 - \nu^2)} \quad (4.1)$$

Las vesículas utilizadas fueron fabricadas con el protocolo cDICE (anexo A), donde el medio interno y externo fue una solución de  $CaCl_2$  a una concentración  $C = 5mM$ .

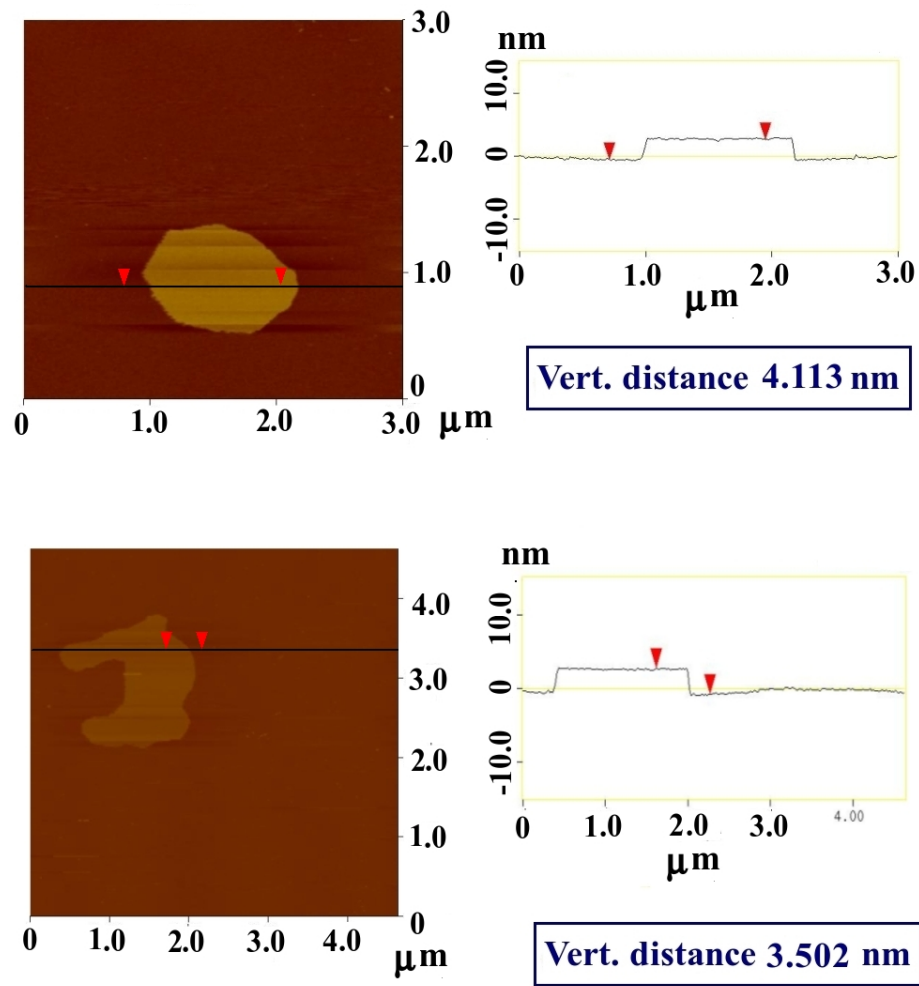
Imágenes en AFM en modo de contacto intermitente de las vesículas adheridas, utilizando el protocolo de adhesión (anexo B), fueron realizadas con microscopio Digital Instruments, Nanoscope IIIa multimode, en una celda de fluido.

Se utilizaron puntas cantilever de Nitruro de Silicio, de constante elástica de 0.12 N/m para las puntas B triangular y 0,31 n/m para las C triangular.

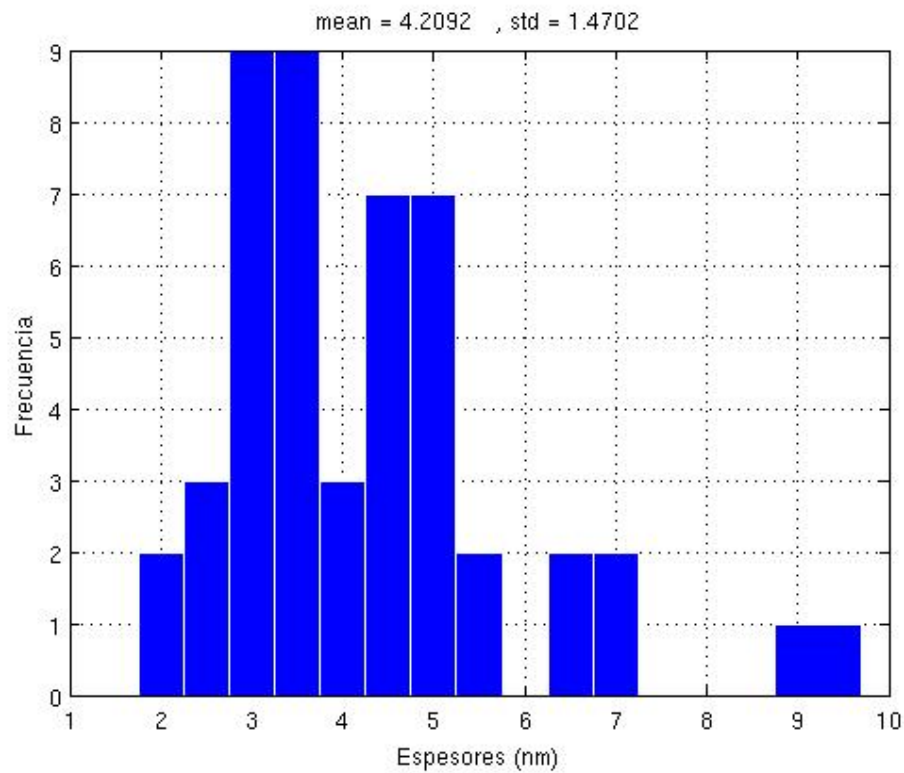
Un ejemplo de las imágenes obtenidas se da en la figura 4.4.

Se realizaron una serie de mediciones similares, con un total de 48 datos que se muestran en el siguiente histograma 4.5.

Donde el valor medio para los espesores medidos es de 4,2092 nm, con una desviación estándar de 1,4702 nm.



**Figura 4.4:** Imágenes de AFM y análisis seccional de vesículas en modo de contacto intermitente adsorbidas sobre mica en solución de  $CaCl_2$  5mM a pH de 7.5.



**Figura 4.5:** Histograma de espesores de vesículas en modo de contacto intermitente adsorbidas sobre mica en solución de  $CaCl_2$  5mM a pH de 7.5. Número total de 48 mediciones.



# Capítulo 5

## Determinación de Propiedades

### Mecánicas

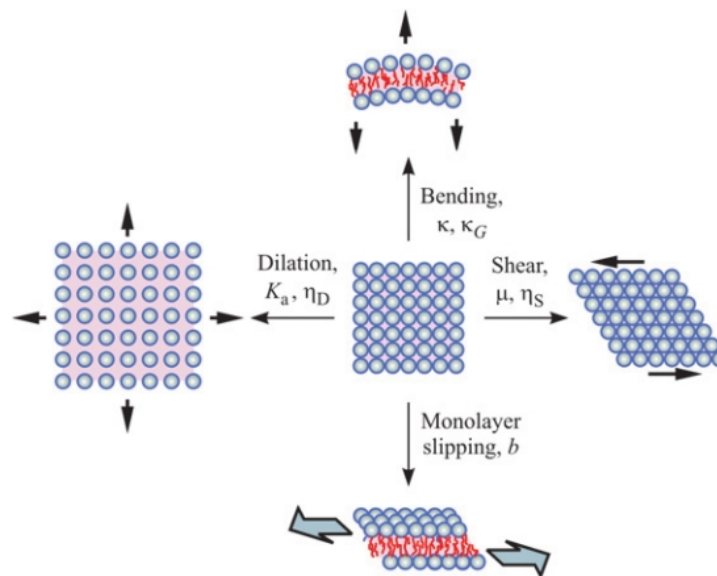
Al considerar las vesículas de una muestra se deben distinguir dos tipos de propiedades : (i) las propiedades colectivas que son características comunes de todas las vesículas en la muestra y dependen principalmente del estado termodinámico y la composición de la membrana, por ejemplo, la rigidez de flexión, la elasticidad de estiramiento y la viscosidad de la membrana, y (ii) las propiedades individuales, que son particulares de cada vesícula, por ejemplo, sus parámetros geométricos o de forma y la curvatura espontánea [4].

- Propiedades colectivas :

De la observación de vesículas gigantes y su respuesta a las diferentes perturbaciones se pueden deducir en principio las propiedades mecánicas y reológicas de sus membranas.

Mecánicamente estas películas pueden ser curvadas, comprimidas o dilatadas, y cizalladas. En estado de equilibrio y en el límite lineal, la respuesta de las membranas a diversas restricciones se caracteriza por las siguientes constantes: la rigidez de flexión o bending  $\kappa_b$  , el módulo de curvatura de Gaussiana  $\kappa_G$  , el módulo de compresibilidad de área  $K_a$ , y el módulo elástico de cizalle  $\mu$ , entre otras [16] (Fig.

5.1).



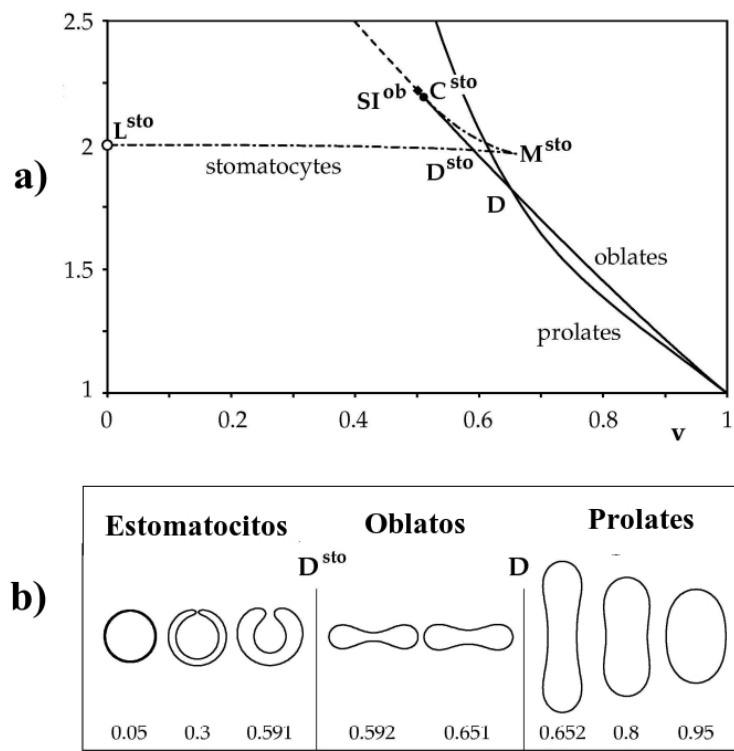
**Figura 5.1:** Presentación esquemática de algunos modos clásicos de deformaciones de bicapas: dilatación, flexión, cizalle, cizallamiento de monocapa, y las constantes que caracterizan la respuesta de la membrana a estas deformaciones.

Por ejemplo, a temperaturas fisiológicas la mayoría de las membranas lipídicas son fluidas, por lo que  $\mu = 0$ . Por debajo de la temperatura de transición de fase de los lípidos, las membranas de un solo componente se cristalizan. Mecánicamente, la doble capa adquiere una elasticidad de cizallamiento distinta de cero ( $\mu \neq 0$ ). En esta llamada fase "gel", el movimiento de inclusión relativo de las membranas es obstaculizado.

- Propiedades individuales:

Además del deslizamiento intermonocapas  $b$  (Fig. 5.1), la naturaleza de las membranas de bicapa se refleja también en la llamada curvatura espontánea. En el caso de una asimetría entre las composiciones de las dos *leaflets* constituyentes la membrana tiene una dirección preferencial de curvatura.

En función de la historia de preparación de cada vesícula, estas pueden tener



**Figura 5.2:** Diagrama de fases morfológicas de vesículas. a) Energía de curvatura ( $F_c$ ) como función del volumen reducido. b) Contornos de formas estacionarias como función del volumen reducido.

su propia curvatura espontánea efectiva. Esto lleva a una rica variedad de formas experimentalmente observables, como prolates, oblatos (oblates), estomatocitos, vesículas de mayor género (es decir, vesículas con asas).

En ausencia de *flip-flop* entre los dos monocapas estas formas pueden ser ubicadas en un diagrama de fases morfológicas (Fig. 5.2) de acuerdo a la curvatura espontánea de la vesícula (diferencia de área entre las dos monocapas) y su volumen reducido  $v$ . Este último se define como el cociente entre el volumen de la vesícula,  $V$ , y el volumen de una esfera de área igual a la superficie de la vesícula  $A$ :

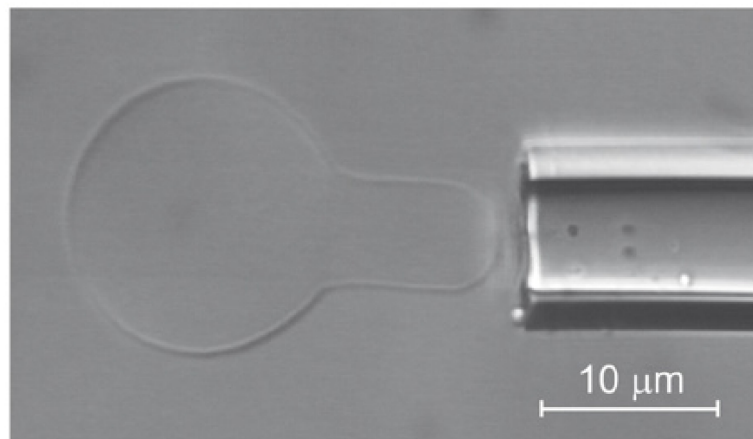
$$v = \frac{3\sqrt{4\pi}V}{A^{3/2}} \quad (5.1)$$

La introducción del volumen reducido como un parámetro es una manera conveniente de caracterizar el exceso de área de las vesículas para las fluctuaciones y los cambios de forma fuera de una esfera. Los valores que  $v$  puede tomar son  $\leq 1$ . Para  $v = 1$  la vesícula es una esfera. Para  $v < 1$  la vesícula tiene exceso de área.

## 5.1. Caracterización del sistema

Como previamente se ha mencionado, muchas propiedades de la membrana lipídica dependen de las diferentes constantes elásticas de la bicapa. Por lo tanto su medición puede dar valiosa información sobre las características de las células y organismos con este tipo de configuración, además de permitir la optimización de las vesículas para variadas aplicaciones.

La rigidez de flexión de las bicapas de lípidos y las energías libres de interacción



**Figura 5.3:** Vesícula liberada de micropipeta, imagen tomada con DIC.

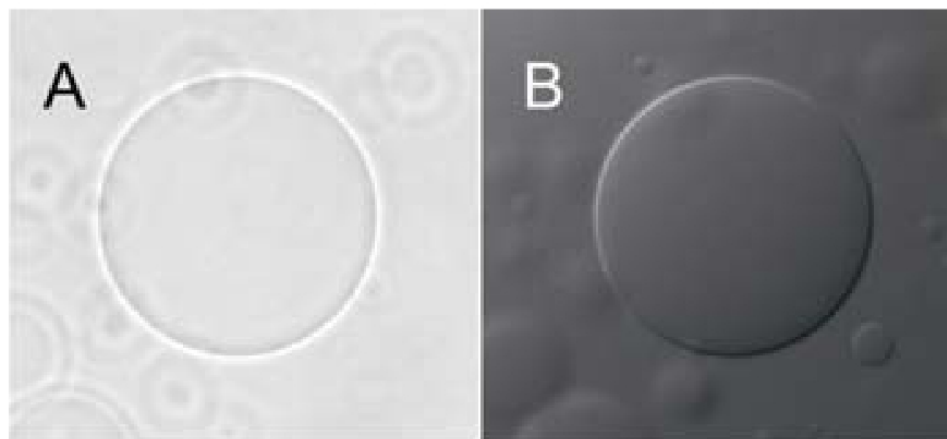
entre las membranas de GUVs se han medido por la manipulación con micropipetas. Las propiedades mecánicas de las bicapas pueden ser medidas en una vesícula, la cual es controlada por succión con micropipeta (Fig. 5.3) a través de los cambios geométricos observados en la membrana por la presión aplicada: tensiones bien definidas dan lugar al área medible y cambios de volumen. Las interacciones entre

vesículas requieren micromanipulación de dos pipetas con las vesículas “atrapadas”. Experimentos más complejos implican ataduras de lípidos con ligandos conectados, partículas de vidrio o partículas paramagnéticas que pueden ser manipuladas magnética, mecánica o químicamente, con lo cual se pueden medir diversos parámetros de la membrana.

Utilizando electropermeabilización se pueden crear poros y es posible seguir su evolución temporal en la membrana de la vesícula.

La elasticidad de flexión de la membrana también puede ser medida mediante el estudio de las fluctuaciones de forma de vesículas tubulares o esféricas, a través de su observación por medio de microscopía óptica [1]. Técnica que utilizaremos en este trabajo para determinar los módulos elásticos de las membranas.

### 5.1.1. Microscopía de luz y procesamiento de datos

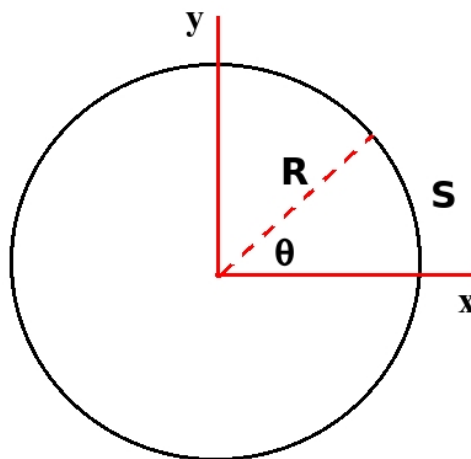


**Figura 5.4:** Observación por microscopio de vesículas gigantes, mediante: A) Contraste de fase (PhC). B) Contraste interferencial (DIC).

Las vesículas gigantes pueden ser observadas directamente con las técnicas convencionales de microscopía de luz como microscopía de contraste de fase (PhC) y microscopía de contraste interferencial (DIC), figura 5.4. A pesar de que el grosor de la membrana de lípidos (alrededor de 4 nm) está muy por debajo del límite de

resolución óptica del microscopio ( $\simeq 0.5 \mu m$ ) las vesículas pueden ser visualizadas debido a la diferencia existente entre los índices de refracción de la membrana y la solución o por el cambio de fase en la luz difractada. Un truco comunmente empleado para mejorar las imágenes obtenidas con microscopía de contraste de fase consiste en utilizar asimetría en el índice de refracción de las soluciones internas y externas de las vesículas (Apéndice D) [16].

Posteriormente se realiza un análisis cuantitativo de las imágenes obtenidas, estudiándose el contorno de la vesícula en el tiempo, que puede ser determinado a partir dichas imágenes. En nuestro caso, se obtuvo esta posición utilizando un sistema de coordenadas locales. El algoritmo escrito en Matlab realiza la siguiente rutina:



**Figura 5.5:** Análisis realizado por algoritmo para el contorno de la vesícula y variables obtenidas.

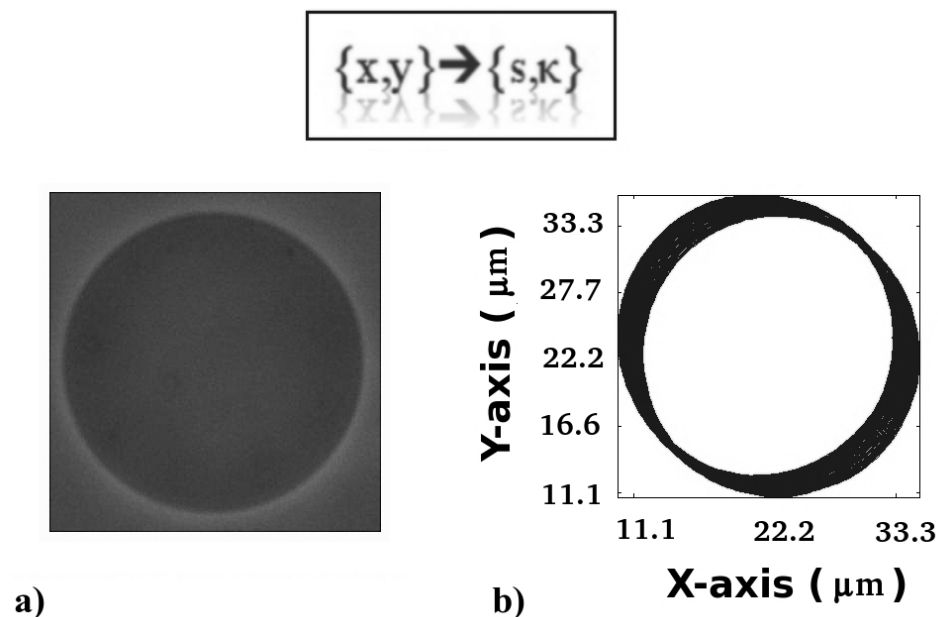
- determina el centro geométrico de la vesícula, punto que será el origen del sistema de referencia,
- a partir de dicho punto se realiza un barrido radial para determinar la posición  $(x, y)$  de la membrana utilizando un perfil de intensidad normal a la superficie.

- de dicha posición se obtiene la longitud desde el centro hasta el contorno o radio de curvatura  $R$ , para luego determinar la longitud de arco  $s$  y la curvatura local  $\kappa$ , para cada punto del contorno.
- Posteriormente se continua realizando este barrido angularmente  $\theta$ , hasta cubrir toda la vesícula.

Este ciclo se realiza con todos los cuadros del video (Fig. 5.5).

## 5.2. Análisis de imágenes

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, el algoritmo escrito en Matlab determina todas las posiciones  $(x, y)$  del contorno de la vesícula, que representan las variables de entrada, y las transforma a longitudes de arco  $s$  y a curvaturas  $\kappa$ , para



**Figura 5.6:** Ejemplificación de análisis de datos entrates. a) Cuadro tomado de un video. b) Determinación del contorno de la vesícula en el tiempo para un video.

todas las imágenes de una única vesícula en algún momento en el tiempo, constituyendo un circuito cerrado de 2 dimensiones que representa la unidad de datos básica a analizar (Fig. 5.6) .

La línea de análisis siguiente comprende el estudio estadístico del comportamiento de las curvaturas de las membranas y el análisis del espectro de fourier de estas, con el fin de determinar sus constantes elásticas.

### 5.2.1. Curvatura y análisis estadístico

La curvatura de la membrana representa un importante parámetro geométrico para la caracterización matemática y física de una vesícula. Este término es definido como:

$$\kappa = \frac{1}{R} = \frac{d\theta}{ds} \quad (5.2)$$

donde  $R$  es el radio de curvatura.

$\theta$  es el ángulo barrido en el contorno de la vesícula.

$s$  es la longitud de arco, la cual es determinada por la siguiente expresión:

$$ds = \sqrt{dx^2 + dy^2} \quad (5.3)$$

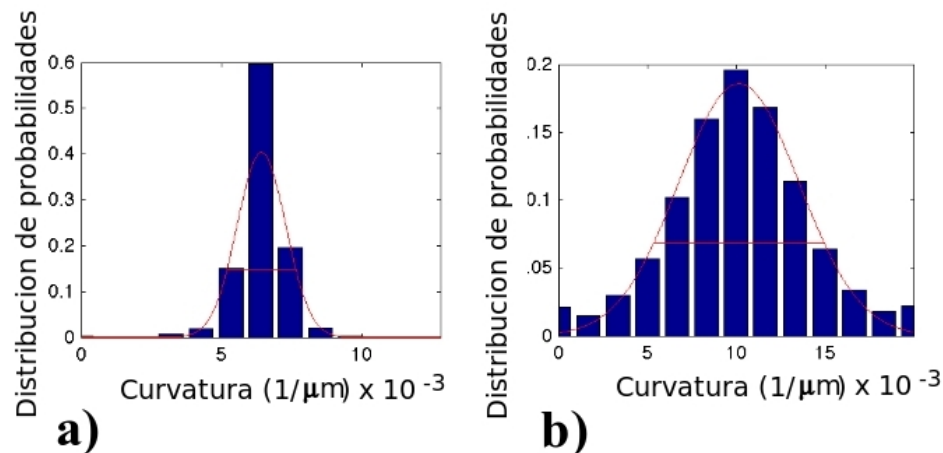
Podemos distinguir dos tipos de curvaturas en una membrana de una vesícula, la curvatura global y la curvatura local, que a pesar de que se determinan a través de la misma ecuación (Ec. 5.2), nos dan diferente información del comportamiento de la membrana. No consideramos la curvatura espontánea pues para vesículas con geometría esférica este valor se aproxima a cero.

La curvatura global la definimos como el valor de la curvatura obtenida del radio de curvatura promedio,  $R_0 = \sum_{i=1}^N R_i$ , con  $N$  el número total de curvaturas medidas por vesícula. Esta cantidad nos da cuenta del valor promedio de curvaturas por vesícula y nos da un parámetro de comparación con respecto a los valores de la curvatura



local.

La curvatura local, también determinada por la Ec. 5.2, representa la curvatura para cada radio  $R_i$  medido en un punto del contorno  $(x_i, y_i)$  de una vesícula, para cada cuadro de una película. Con estas mediciones se realiza un histograma de curvaturas por vesícula (Fig. 5.7) para las diferentes concentraciones de las soluciones externas e internas empleadas, donde la solución interna  $C_{int}$  es de Sacarosa disuelta en agua desionizada y la solución interna  $C_{ext}$  es de Glucosa en agua desionizada.



**Figura 5.7:** Distribución de curvaturas para una vesícula a una concentración de : a)  $C_{int} = 120 \text{ mM}$  y  $C_{ext} = 100 \text{ mM}$ . b)  $C_{int} = 40 \text{ mM}$  y  $C_{ext} = 100 \text{ mM}$ .

En todos los histogramas realizados se observó que las mediciones de curvatura obedece a una distribución Gaussiana. El ancho a la altura media de la campana de Gauss o varianza  $\sigma_\kappa$ , es un parámetro que determina la dispersión de los datos, y nos permite realizar un estudio del comportamiento de la membrana bajo diferencias en la presión osmótica del sistema y diferencias de tamaño de las vesículas.

### 5.2.2. Distribución de curvaturas v/s tamaño de la vesícula, ley de potencia

De los datos obtenidos observamos que el valor de  $\sigma_\kappa$ , es función del tamaño de la vesícula ( o del radio promedio  $R_0$  de esta), registrándose variaciones de este parámetro para un mismo radio de concentraciones, como podemos ver en la Fig. 5.8.

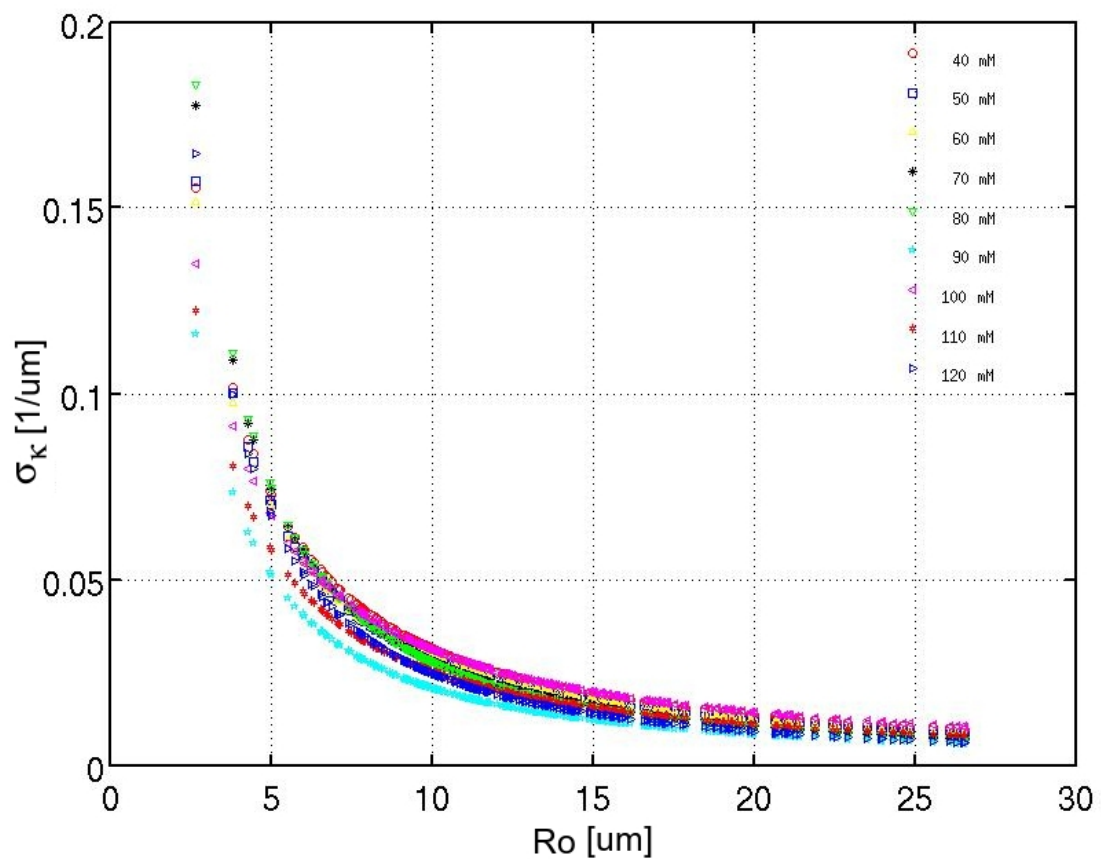


Figura 5.8: Gráfico  $\sigma_\kappa$  vs  $R_0$ .

De acuerdo a lo observado, todas las curvas obtenidas se ajustan a una hipérbola  $y = a * x^b$ , obteniéndose así la siguiente ley de potencia

$$\sigma_\kappa * R_0^{-b} = a \quad (5.4)$$

Donde  $a$  es una constante cuyo valor es dependiente de la concentración de solución. El exponente  $b$ , para nuestras curvas es un valor cercano a  $-1$ .

La rectificación de esta relación nos arroja la siguiente gráfica

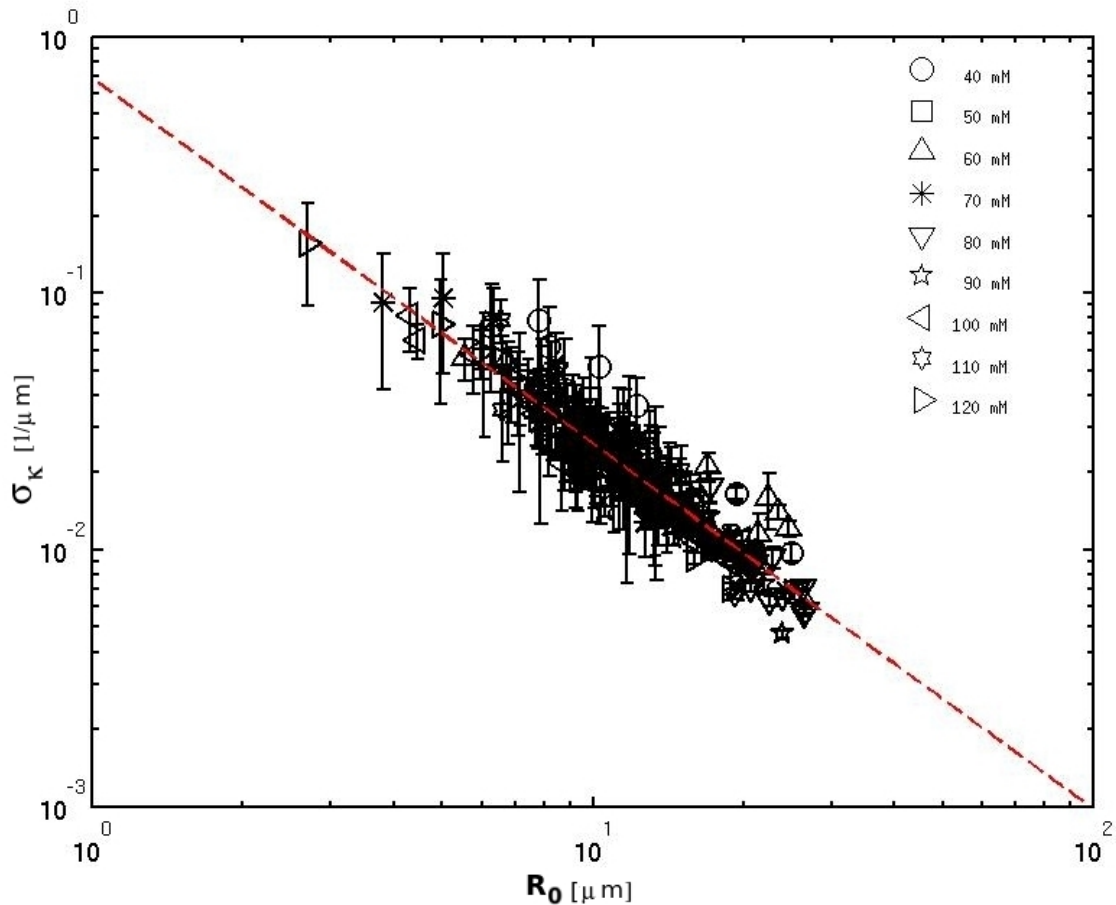


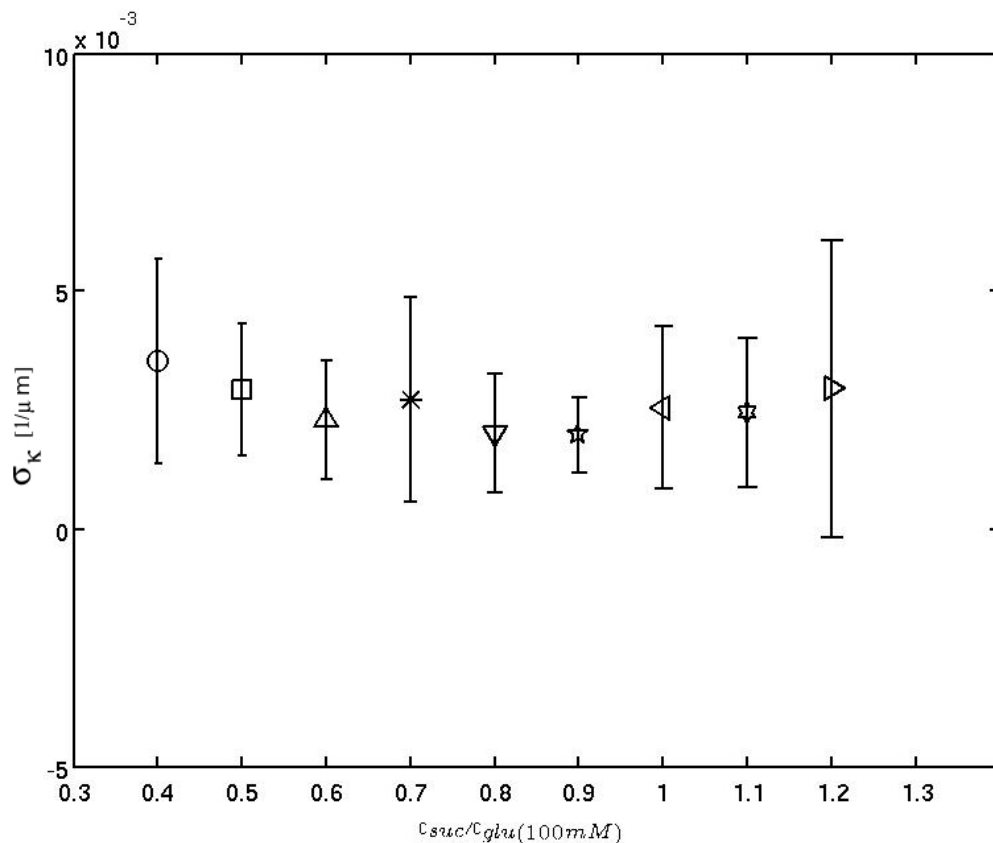
Figura 5.9: Rectificación relación  $\sigma_\kappa(R_0)$ .

Obteniéndose así una relación lineal escrita de la siguiente manera

$$\ln(\sigma_\kappa) + b * \ln(R_0) = \ln(a) \quad (5.5)$$

### 5.2.3. Distribución de curvaturas v/s presión osmótica

Suponemos que de acuerdo al escenario que se encuentre el sistema, establecido por las concentraciones de las soluciones utilizadas, la distribución de curvaturas ( $\sigma_\kappa$ ) tendrá un comportamiento diferente. A concentraciones de la solución interna mayor que la externa  $C_{int} > C_{ext}$ , la membrana se encuentra en un régimen de mayor tensión, como lo hemos discutido previamente en la sección 3.3 (Cap.3), limitando a las vesículas a un rango de curvaturas estrecho en torno a su radio inicial. Al considerar el caso contrario,  $C_{int} < C_{ext}$ , la tensión de la membrana dis-



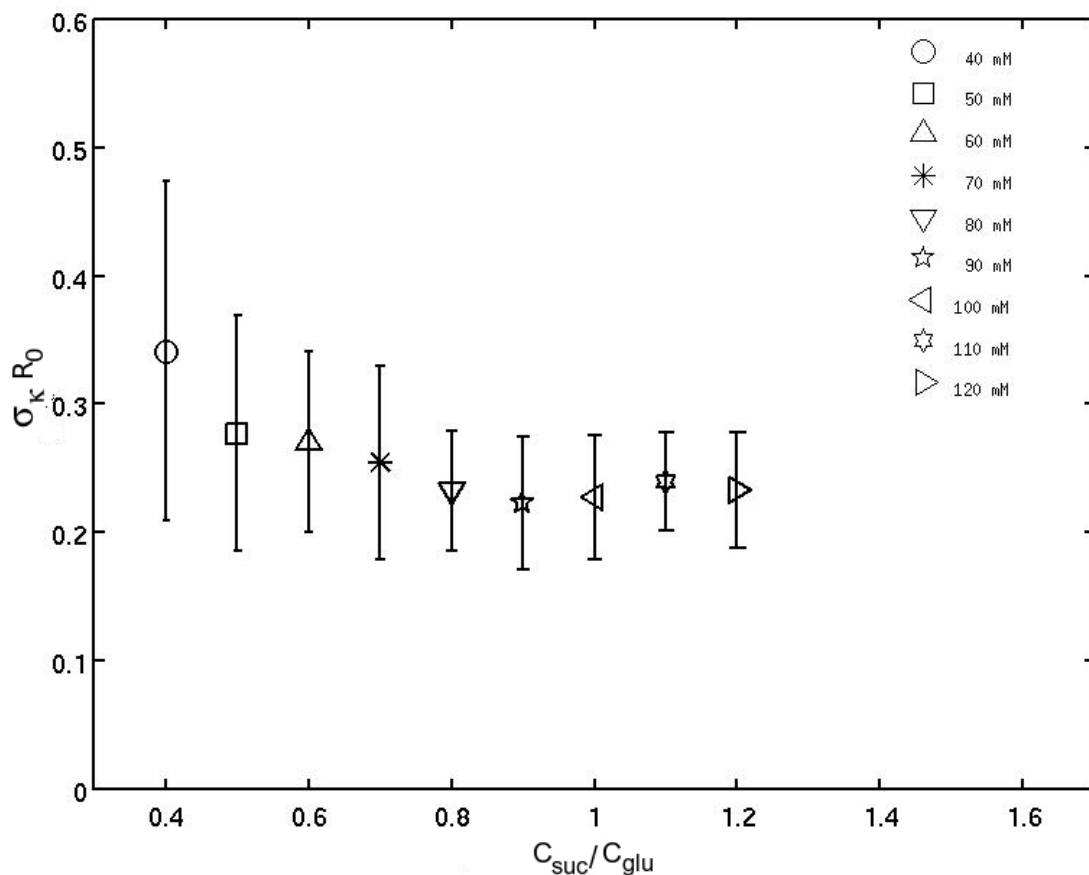
**Figura 5.10:** Distribución de  $\sigma_\kappa$  en función de razón de concentraciones, para una solución interna  $C_{int}$  (Sacarosa) variable y una solución externa  $C_{ext}$  (Glucosa) fija.

minuye dado que el cociente normalizado entre el volumen y el área  $C$  es menor que 1 ( $C = 6\sqrt{\pi}V/S^{3/2}$ ) por lo que la vesícula puede explorar un rango mas amplio

de curvaturas.

Para estudiar dicha hipótesis, se analizó gráficamente el comportamiento en promedio de este parámetro (varianza) para cada razón de concentración estudiada (Fig. 5.10).

Si ponderamos el valor del eje y ( $\sigma_\kappa$ ) por el valor del radio promedio por vesícula ( $R_0$ ), obtenemos una cantidad adimensional e independiente del tamaño de las vesículas,



**Figura 5.11:** Relación  $\sigma_\kappa * R_0$  con las concentraciones de las soluciones presentes  $C_{int}/C_{ext}$ . Donde la solución interna  $C_{int}$  es de Sacarosa y la solución externa  $C_{ext}$  es de Glucosa, ambas diluídas en agua desionizada.

De acuerdo a la Fig. 5.11, se hace evidente el hecho de que existen variaciones

distinguibles en el comportamiento de la cantidad  $\sigma_\kappa * R_0$  para las distintas razones de concentraciones de soluciones  $C_{int}/C_{ext}$  o variaciones en la presión osmótica. Observándose que en el rango de menor tensión sobre la membrana o presión osmótica baja, que identificamos en el intervalo  $0,4 \leq C_{int}/C_{ext} \leq 0,6$ , el parámetro  $\sigma_\kappa * R_0$  tiene un valor mayor que en el rango de mayor tensión o de presiones osmótica alta,  $0,9 \leq C_{int}/C_{ext} \leq 1,2$ . De la gráfica se puede identificar además un intervalo de concentraciones en las que observamos un comportamiento de transición, para el rango  $0,6 < C_{int}/C_{ext} < 0,9$ . Esto nos conduce a crear una clasificación de estos comportamientos en tres regímenes, el primero lo llamamos de *vesícula Floppy* observado en el rango de concentraciones de soluciones  $0,4 \leq C_{int}/C_{ext} \leq 0,6$ , el *régimen intermedio o de transición*  $0,6 < C_{int}/C_{ext} < 0,9$ , y el tercero de *vesícula tensa*, para concentraciones en el intervalo  $0,9 \leq C_{int}/C_{ext} \leq 1,2$ .

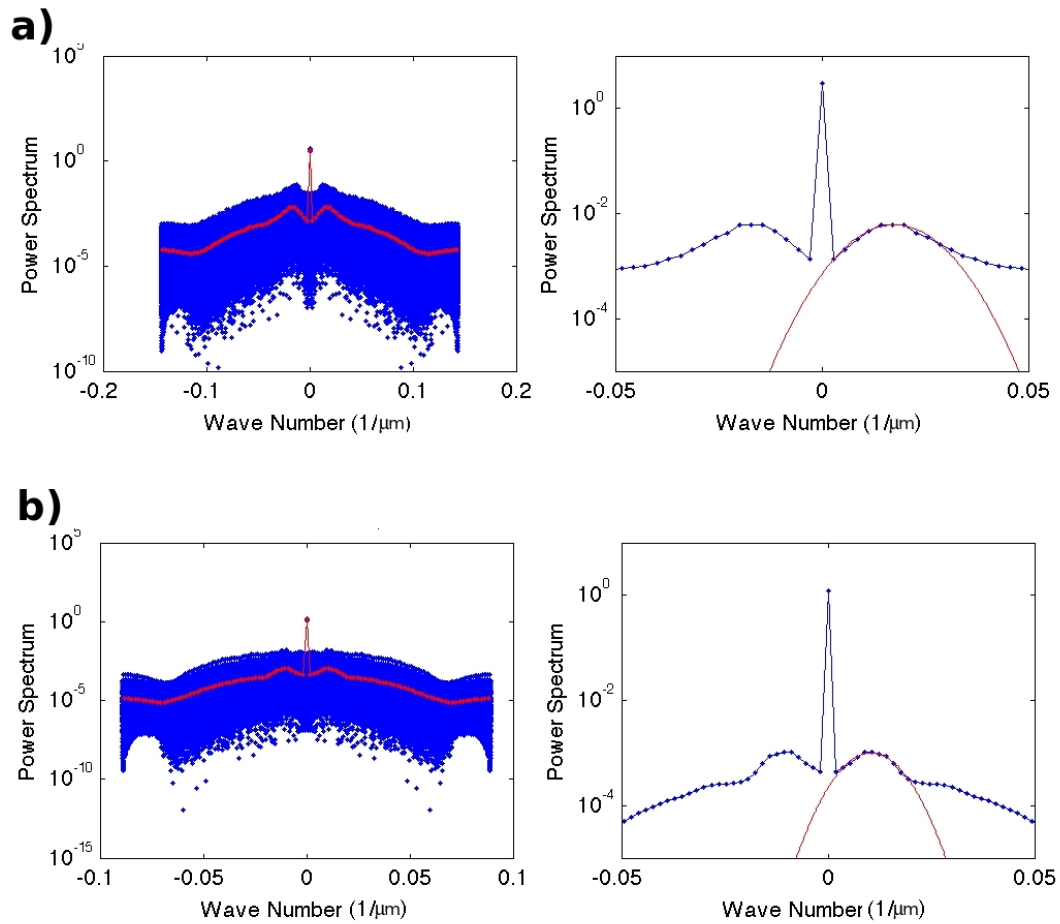
#### 5.2.4. Análisis de Fourier, modos de fluctuación

La transformada de Fourier de una función es una herramienta sumamente útil que nos ayuda a encontrar la distribución de frecuencias de oscilación del sistema que estamos analizando.

Nuestro sistema, vesícula en un medio acuoso de distinta composición que la solución interna, está sujeto a fluctuaciones y es caracterizado por las variables longitud de arco  $s$  y curvatura  $\kappa$ , que pueden ser llevadas al espacio de Fourier para determinar los modos normales de curvatura presentes en él, brindándonos un mecanismo de caracterización del comportamiento de dichas fluctuaciones de forma de las vesículas entorno a la curvatura promedio de estas.

El estudio realizado fue la determinación de los modos normales de curvatura presentes por vesículas  $k_n$ , para todas las concentraciones utilizadas (Fig. 5.12). Determinándose así los modos normales del sistema y la desviación existente con respecto a dichos valores  $\Delta k_n$ .

Para determinar si existe relación entre estas cantidades ( $k_n$  y  $\Delta k_n$ ) y las varia-

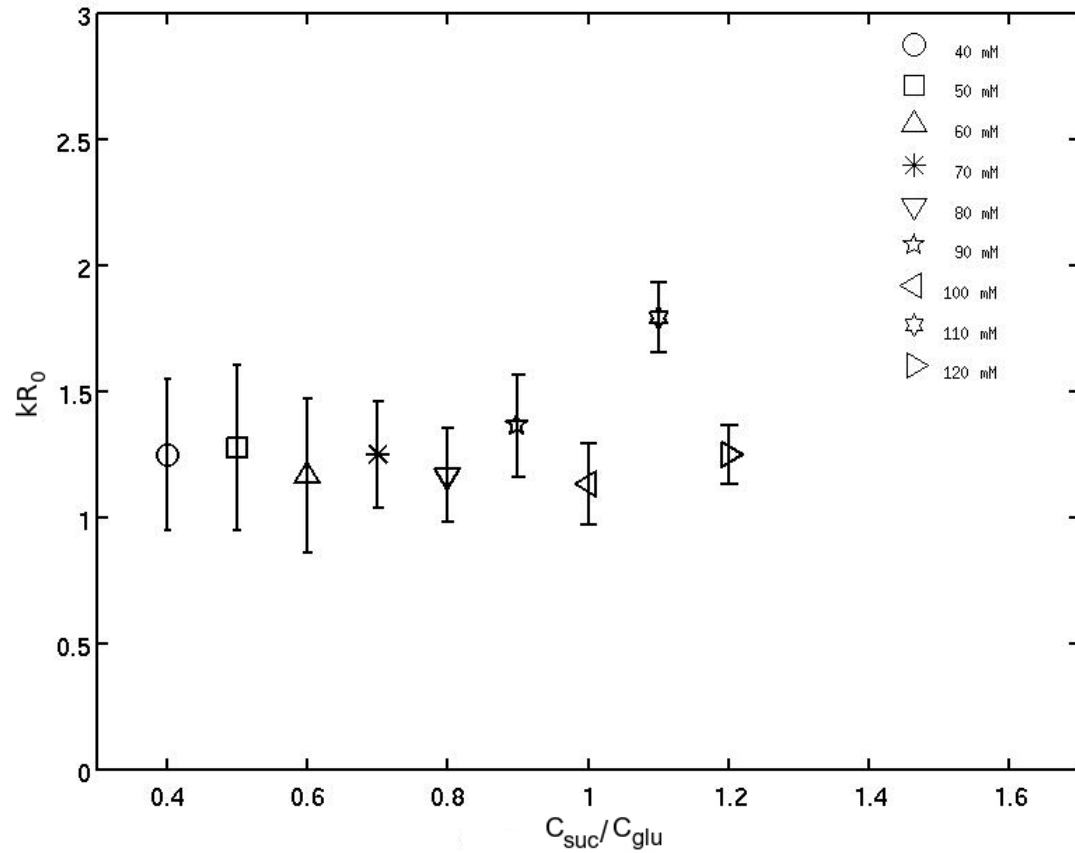


**Figura 5.12:** Espectro de Fourier para distintas concentraciones :

a)  $C_{int} = 40 \text{ mM}$  y  $C_{ext} = 100 \text{ mM}$ . b)  $C_{int} = 120 \text{ mM}$  y  $C_{ext} = 100 \text{ mM}$ .

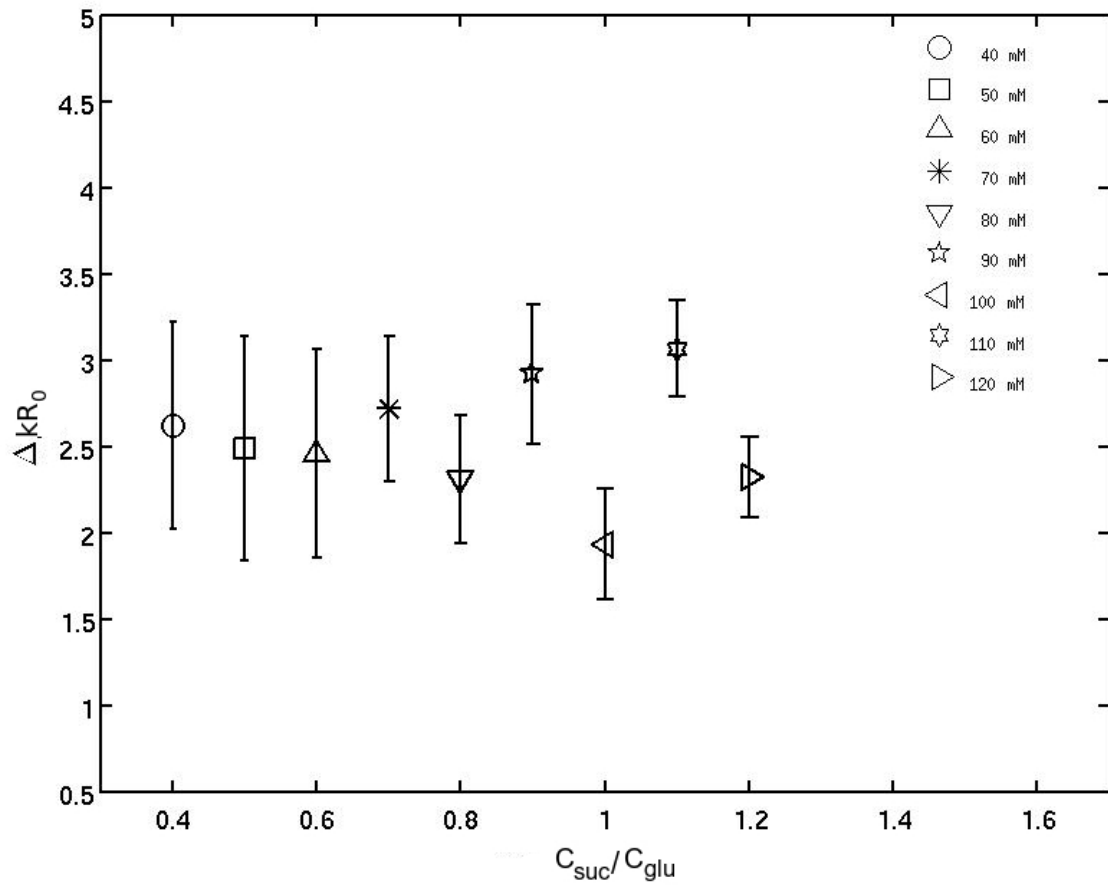
Izquierda: power spectrum de los datos. Derecha: determinación de  $\Delta k_n$ .

ciones de presión osmótica ( $C_{int}/C_{ext}$ ), se realizaron los siguientes gráficos (Fig. 5.13 y 5.14)

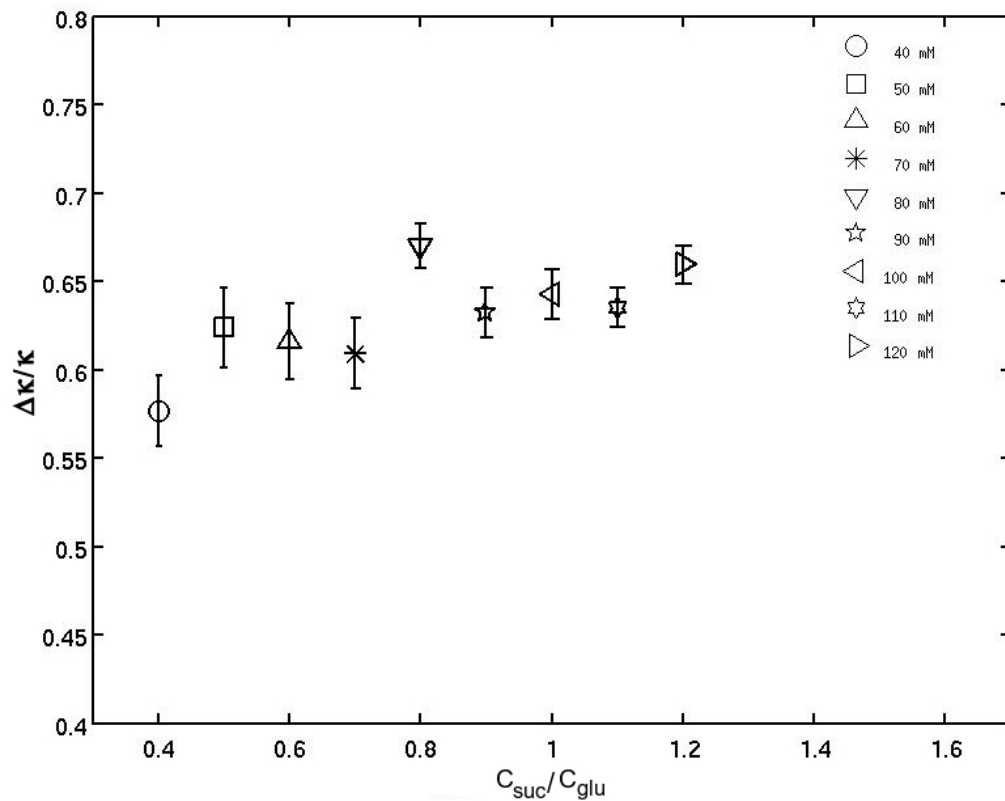


**Figura 5.13:** Relación entre los modos de fluctuación de curvatura  $k_n$  con las concentraciones de las soluciones presentes  $C_{int}/C_{ext}$ . La solución interna  $C_{int}$  es de Sacarosa y la solución externa  $C_{ext}$  es de Glucosa, ambas diluídas en agua desionizada.





**Figura 5.14:** Relación entre las desviaciones de los modos de fluctuación de curvatura  $\Delta k_n$  con las concentraciones de las soluciones presentes  $C_{int}/C_{out}$  ( $C_{int}$  = Sacarosa y  $C_{ext}$  = Glucosa).



**Figura 5.15:** Relación entre la cantidad  $\Delta k_n/k_n$  con las concentraciones de las soluciones presentes  $C_{int}/C_{ext}$  ( $C_{int}$  = Sacarosa y  $C_{ext}$  = Glucosa).

### 5.2.5. Estimación del módulo de bending

El teorema de equipartición de la energía formula la relación existente entre la temperatura de un sistema y su energía media, estableciendo lo siguiente:

*Considere un sistema de  $N$  partículas que se encuentra en equilibrio térmico a temperatura  $T$ , y sea  $\langle \varepsilon \rangle$  la energía promedio de cada partícula del sistema. Cada grado de libertad que aparece en la expresión para la energía de una partícula del sistema en forma cuadrática contribuye en  $kT/2$  a la energía total  $\langle \varepsilon \rangle$  [17].*

De acuerdo con el modelo de Modelo de elasticidad y diferencia de área (ADE), una

vesícula esférica en solución posee la siguiente energía

$$g_{ADE} = \frac{\kappa_b}{2}(C_1 + C_2)^2 - \frac{\bar{\kappa}}{2} \frac{\pi}{AD^2} (\Delta A - \Delta A_0)^2 \quad (5.6)$$

Si la vesícula se encuentra en un rango de baja presión osmótica, el cual identificamos como régimen de baja tensión o de vesícula floppy, como hemos discutido previamente suponemos que la mayor contribución de energía al sistema estará dada por el término de bending, y considerando que ambas curvaturas son aproximadamente iguales para una vesícula esférica  $C_1 = C_2 = C$ , obtenemos la siguiente expresión para la energía de una vesícula floppy:

$$E_{floppy} = 2\kappa_b C^2 \quad (5.7)$$

Utilizando el teorema de equipartición determinamos la relación para nuestro sistema

$$2\kappa_b C^2 = kT \quad (5.8)$$

Relación que nos permite obtener de forma directa el valor del módulo de bending en función de las curvaturas medidas. El término de las curvaturas  $C^2$  es equivalente a  $\sigma_\kappa^2$ . Si lo reemplazamos la expresión para el módulo de bending queda como

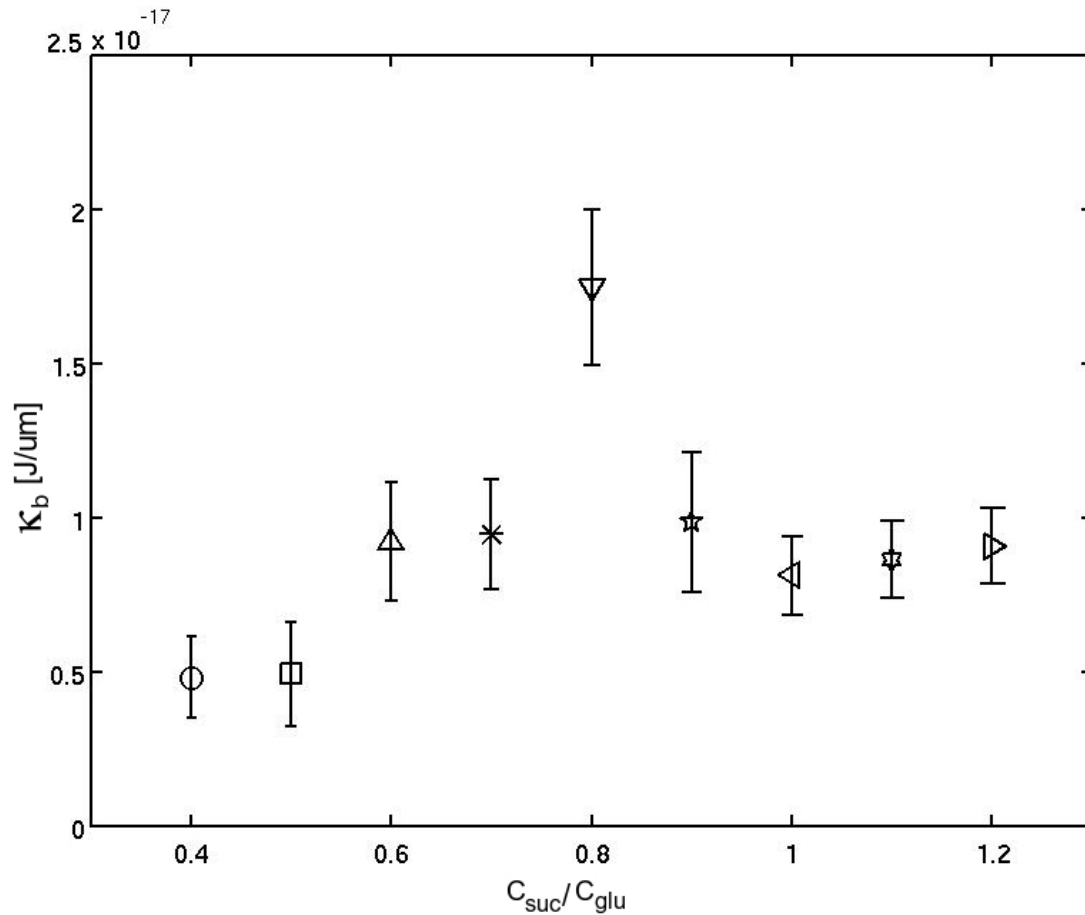
$$\kappa_b = \frac{kT}{2\sigma_\kappa^2} \quad (5.9)$$

Los valores calculados de  $\kappa_b$  para las distintas razones de concentraciones  $C_{int}/C_{ext}$  los podemos observar en la figura 5.16.

### 5.2.6. Determinación de constantes elásticas

El módulo elástico de stretching  $K_a$  es definido a partir de la densidad de energía elástica  $E_A$  que en una aproximación cuadrática se escribe como

$$E_A = \frac{1}{2} K_a \left( \frac{\Delta A}{A} \right)^2 \quad (5.10)$$



**Figura 5.16:** Módulos de bending medidos para las distintas concentraciones utilizadas. Donde la solución interna  $C_{int}$  es de Sacarosa y la solución externa  $C_{ext}$  es de Glucosa, ambas diluídas en agua desionizada.

Se puede estimar desde el módulo de bending  $\kappa_b$  el valor del módulo de stretching  $K_a$  considerando el estiramiento y compresión relativo de las dos monocapas con respecto a la superficie neutral de la membrana. Para un módulo de stretching simétrico por monocapa  $K_m = K_a/2$ , la superficie neutral de la membrana corresponde al plano medio de la bicapa. El área de una monocapa es medida con respecto a su plano medio localizado a una distancia  $D/4$  desde el centro de la bicapa. El cambio de área relativo de una monocapa es determinado por

$$\frac{\Delta A^m}{A} = \pm \frac{D}{4R} \quad (5.11)$$

con  $D$  el espesor de la bicapa.

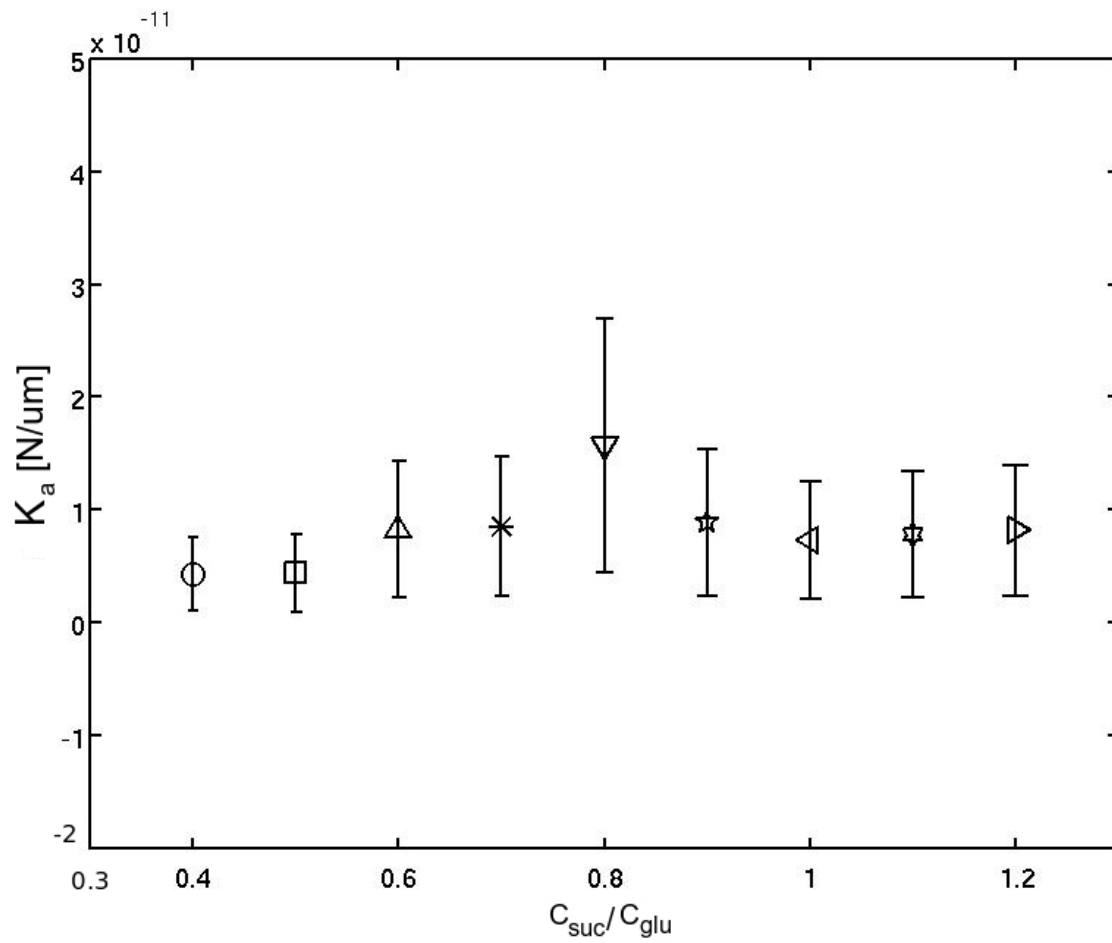
La energía total de bending de la monocapa  $E_B$  es obtenida sumando las contribuciones de estiramiento/compresión  $E_A$  de ambas monocapas

$$E_B = 2E_A^m = \frac{1}{2}(2K_m)\left(\frac{\Delta A}{A}\right)^2 = \frac{1}{2}\left(\frac{K_a D^2}{16}\right)\frac{1}{R^2} \quad (5.12)$$

finalmente, podemos definir el módulo de bending efectivo de la bicapa como

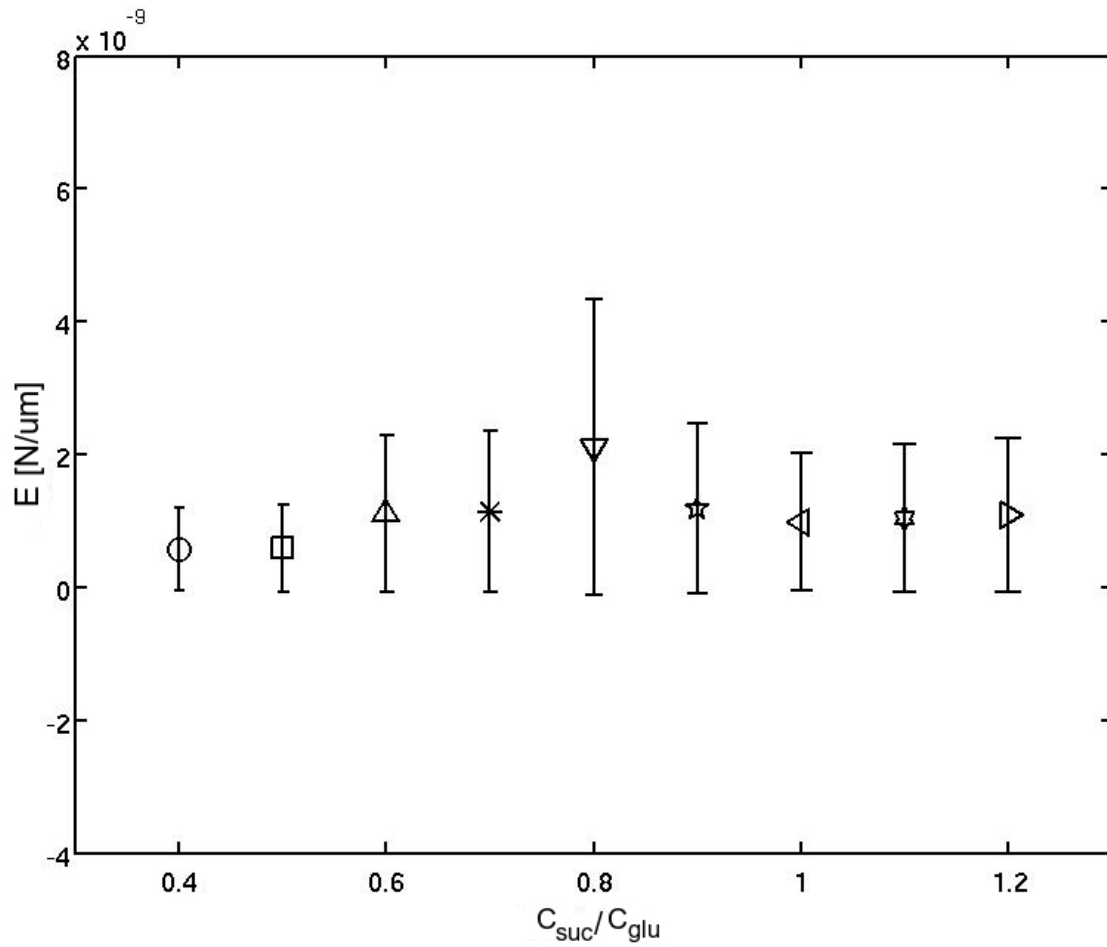
$$\kappa_b = \frac{K_a D^2}{16} \quad (5.13)$$

expresión que relaciona directamente ambos módulos elásticos. A partir de los módulos de bending medidos y utilizando esta expresión, se obtienen los siguientes valores para los módulos de stretching a distintas concentraciones



**Figura 5.17:** Módulos de stretching determinados para las distintas concentraciones utilizadas ( $C_{\text{int}}$  = Sacarosa y  $C_{\text{ext}}$  = Glucosa).

El módulo de Young de las membranas puede ser determinado utilizando la Ec. 4.1, empleando el valor medio del espesor medido con los experimentos de AFM. Los valores obtenidos son los siguientes:



**Figura 5.18:** Módulos de Young para las distintas concentraciones utilizadas ( $C_{\text{int}}$  = Sacarosa y  $C_{\text{ext}}$  = Glucosa).

# Capítulo 6

## Discusión y Conclusiones

El método de Encapsulación continua de gotas cruzando la interfaz (cDIDE), logra exitosamente la fabricación de vesículas gigantes unilamelares. El control en el tamaño y polidispersidad de estas es una gran ventaja que este método nos ofrece, además de su sencilla implementación experimental, sin dejar de mencionar la posibilidad de encapsulación que se tiene para diferentes sustancias y medios o soluciones, la cual utilizamos en este trabajo.

Para soluciones de azúcares, como glucosa y sacarosa, los parámetros experimentales utilizados en el protocolo resultan óptimos para una producción de vesículas libres de defectos. Estos parámetros no son tan indicados para soluciones salinas como las de cloruro de calcio, produciendo vesículas de un tamaño inferior al esperado y una mayor cantidad de residuos en suspensión, en comparación con el caso de las soluciones de azúcares. Esto sucede debido a que dichos parámetros utilizados en nuestro protocolo fueron determinados particularmente para las soluciones de glucosa y sacarosa, por lo que sugerimos que en futuros trabajos sobre todo con soluciones salinas se realice un estudio similar para así optimizar la producción y la calidad de las vesículas a fabricar.

En base a la experiencia obtenida, consideramos este método de gran valor y utilidad para el estudio de las vesículas en las diversas áreas en que éstas son empleadas.



El estudio de la adhesión de vesículas en mica nos dió una idea de la importancia de la concentración de la solución empleada en los protocolos para estudios y mediciones de propiedades de vesículas adheridas a sustratos. Los diferentes comportamientos observados en las vesículas al variar este parámetro se pueden explicar, en una primera aproximación, por interacciones electroestáticas entre los iones presentes en la solución, las cargas en las vesículas y la superficie utilizada. Quedando abierta la tarea de confirmar de forma más acabada dicha hipótesis.

La utilización del modo de contacto intermitente en AFM para medir los espesores de la membranas, implementando el protocolo de adhesión, obtuvo exitosos resultados pues los valores de espesores medidos en las vesículas gigantes fabricadas están acorde con los valores presentados en la literatura especializada. Con lo que podemos afirmar que este método desarrollado es óptimo para cualquier experimento que tenga como fin o requerimiento el adherir eficazmente vesículas a superficies, independiente del tamaño de estas.

El valor medio de los espesores medidos a una concentración de  $CaCl_2 = 5 \text{ mM}$ , para un total de 48 vesículas (Fig. 4.5) es de  $4,2092 \text{ nm}$ , con una desviación estándar de  $1,4702 \text{ nm}$ .

El principal objetivo perseguido en este trabajo es el desarrollo de una técnica sencilla que nos permita medir las propiedades mecánicas en las vesículas gigantes, para ello nos concentramos en el estudio de las fluctuaciones de forma que sufre la membrana bajo ciertas condiciones en el ambiente, particularmente en este caso las variaciones de la presión osmótica del sistema.

Como ya hemos observado en los experimentos de AFM, la concentración de las soluciones empleadas es una variable fundamental del sistema y que además tiene directa relación con la presión osmótica en él, por lo que al variar este parámetro se tiene una inmediata influencia en la presión que sufre la membrana en el medio. Por esta razón se decidió utilizar el efecto provocado por las diferencias de concentra-

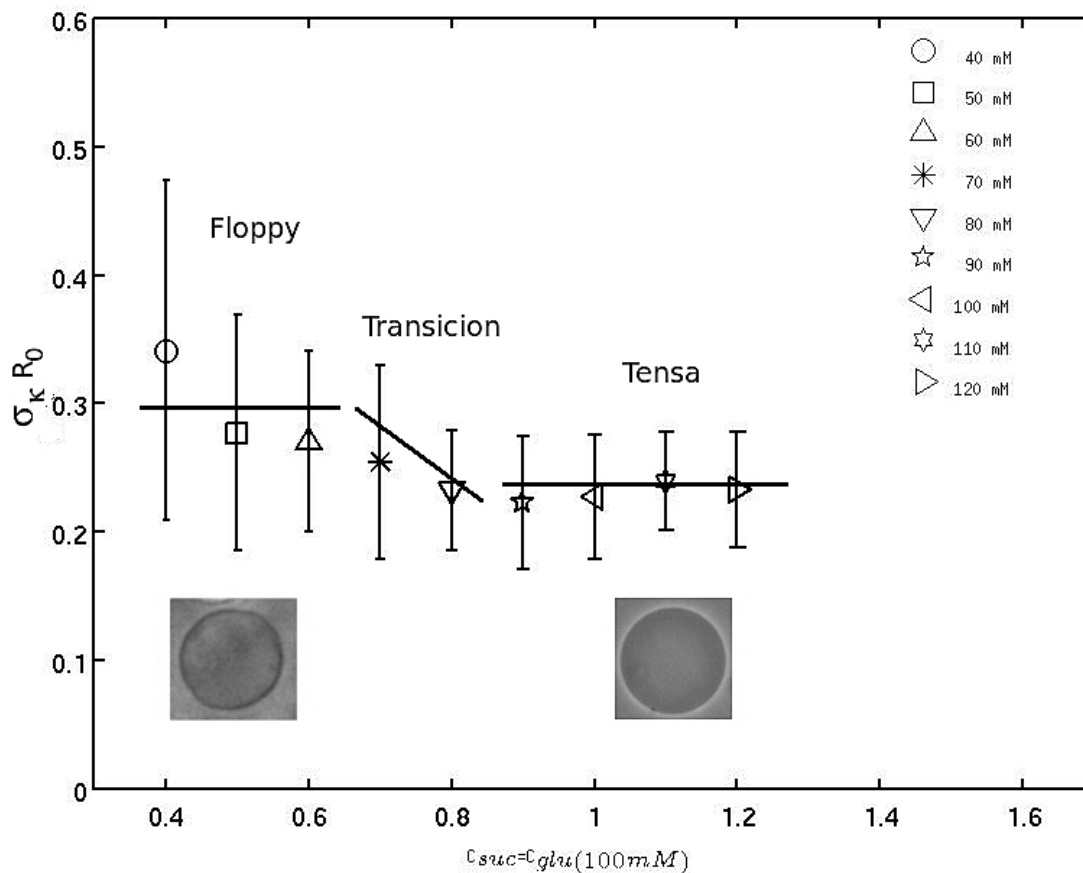
ciones de ambas soluciones para determinar las consecuencias de esta variación en la forma de la membrana de las vesículas.

Para dicho propósito se hace fundamental la accesibilidad a la medición de la dinámica de la membrana, y mediante el método de contraste de fase esto se hace posible para vesículas gigantes, no presentando mayores dificultades para obtener videos de ellas libres en solución.

Como primer paso para realizar este estudio se implementó un código en Matlab capaz de obtener de forma automática la posición, el contorno de la vesícula y desarrollar un análisis estadístico acabado de las variables medidas, además de posibilitar el análisis mediante la transformada de fourier, generando así una poderosa herramienta de análisis.

El estudio de la dinámica del sistema tiene como eje central caracterizar la relación existente entre las curvaturas presentes, con la presión osmótica y el tamaño de las vesículas.

La determinación de las curvaturas locales y el análisis de su distribución por medio de histogramas, evidenció que la distribución de curvaturas por vesícula responde a una distribución Gaussiana (Fig. 5.7). Dicha distribución nos proporcionó un parámetro fundamental para la caracterización del sistema,  $\sigma_\kappa$ , el cual representa la dispersión de curvaturas por vesícula. Este parámetro nos permitió cuantificar el comportamiento de las curvaturas de las membranas para distintas presiones osmóticas. Del gráfico  $\sigma_\kappa * R_0$  versus  $C_{int}/C_{ext}$  (Fig. 5.11), con  $R_0$  el radio de curvatura promedio y  $C_{int}/C_{ext}$  el cociente entre la concentración de la solución interna y la concentración de la solución externa, pudimos comprobar la hipótesis planteada sobre la existencia de diferentes regímenes en el sistema de acuerdo a la presión osmótica o tensión sobre la membrana. Se distinguieron tres regímenes (Fig. 6.1), el de vesícula floppy, el de transición y el de vesícula tensa. En el primero  $C_{int} < C_{ext}$ , la membrana esta sujeta tensiones bajas, esto debido a que al existir una mayor concentración de soluto en el exterior de la vesícula provoca un flujo de solvente desde el interior de esta para tratar de compensar la diferencia de concentración existente entre



**Figura 6.1:** Diferentes regímenes observados en las vesículas. Relación  $\sigma_\kappa * R_0$  con las concentraciones de las soluciones presentes  $C_{int}/C_{ext}$ .

las soluciones que componen el sistema, esto finalmente tiene como consecuencia que en el interior de la vesícula se presente un volumen menor de solvente en comparación a un estado de equilibrio, esto se traduce, para la membrana, en una mayor libertad para explorar un rango más amplio de curvaturas en comparación a un estado de equilibrio de concentraciones. El régimen de transición involucra concentraciones de solución interna menores que la externa ( $0,6 < C_{int}/C_{ext} < 0,9$ ), pero que no llegan nunca a un punto de estabilidad, como sucede en los otros dos tramos. El último régimen aparece cuando  $C_{int} > C_{ext}$ , en cual basándose en las mismas razones planteadas en el caso de las *vesículas floppy* pero en una situación inversa,

la solución interna posee una mayor concentración de soluto que la externa, provocando un flujo de solvente hacia el interior de la vesícula, lo que genera vesículas con mayor volumen que un caso de equilibrio, y que a nivel de membrana provoca una mayor tensión, limitando el rango de curvaturas posibles.

Del estudio de la relación entre la distribución de curvaturas y el tamaño de la vesícula se obtuvo la siguiente ley de potencia (Fig. 5.8)

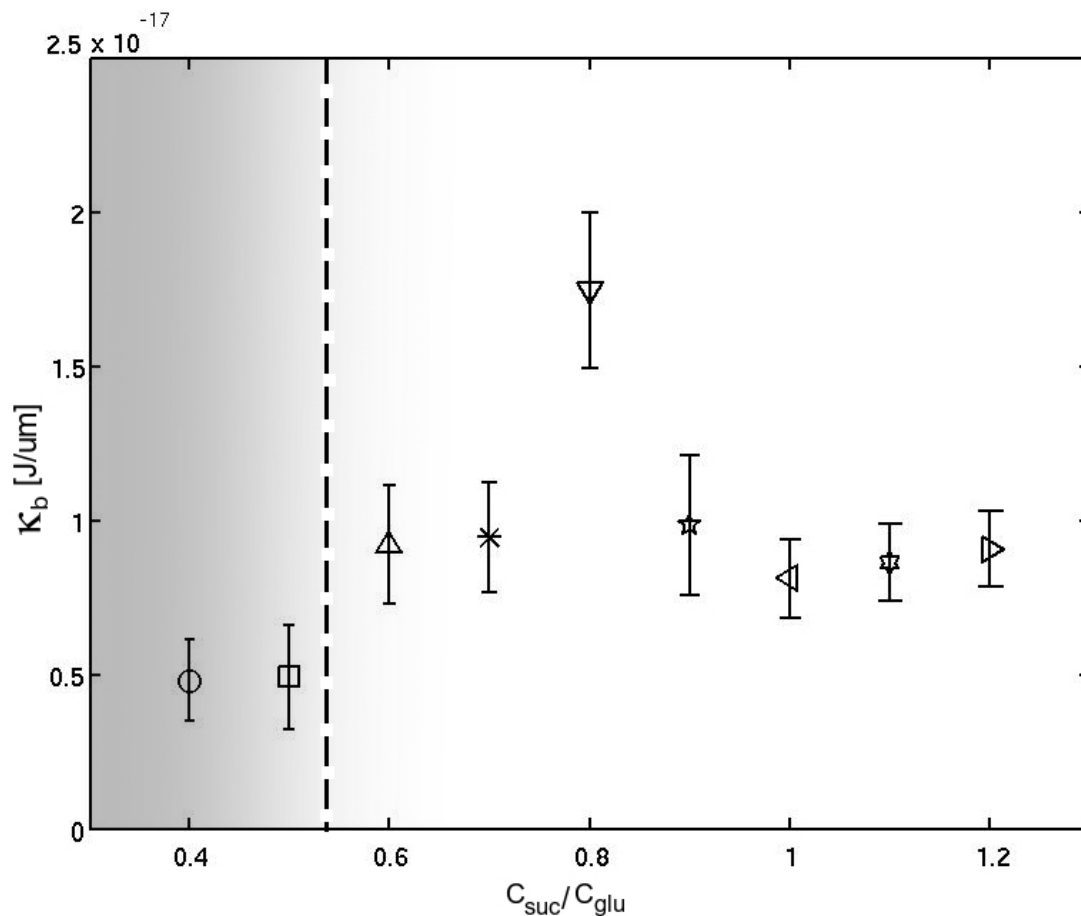
$$\sigma_{\kappa} R_0 = cte \quad (6.1)$$

Esta se cumplió para todas las concentraciones empleadas, determinándose que el valor de la constante es dependiente de la concentración. Del gráfico de la rectificación (Fig.5.9) podemos inferir que todos los datos cumplen con la ley de potencia planteada. Esta relación determinada no fué profundizada en este trabajo, quedando abierta para futuros estudios.

La transformada de fourier determinó los modos normales de curvatura presentes en el sistema. Este rango de curvaturas posibles se define en un intervalo en donde sus valores límites son proporcionados por el modo de respiración y el modo de alta frecuencia. El primer modo tiene relación con la disipación de la energía en la membrana por transferencia de masa, representando el límite inferior del rango de curvaturas permitidas. El límite superior se encuentra en el modo de alta frecuencia, el cual se relaciona con la concentración de energía de bending máxima posible **localizada puntualmente** en la membrana. La figura 5.13 ( $kR_0$  vs  $C_{int}/C_{ext}$ ) nos da cuenta que el modo fundamental para todas las vesículas es aproximadamente el mismo. Del gráfico de  $\Delta kR_0$  vs  $C_{int}/C_{ext}$  (Fig. 5.15) se obtienen los valores del intervalo de modos normales de curvatura posibles en el sistema, el cual se encuentra aproximadamente entre  $1,6 < k < 3,2$ .

El estudio de la dinámica de las fluctuaciones en la morfología de las mem-

branas es un área que se ha desarrollado ampliamente en el último tiempo, enfocándose principalmente en el estudio de las transiciones de fase morfológicas que estas sufren al cambiar ciertas condiciones del entorno, desarrollando para ello una serie de modelos mecánicos provenientes en su mayoría de la mecánica del continuo.



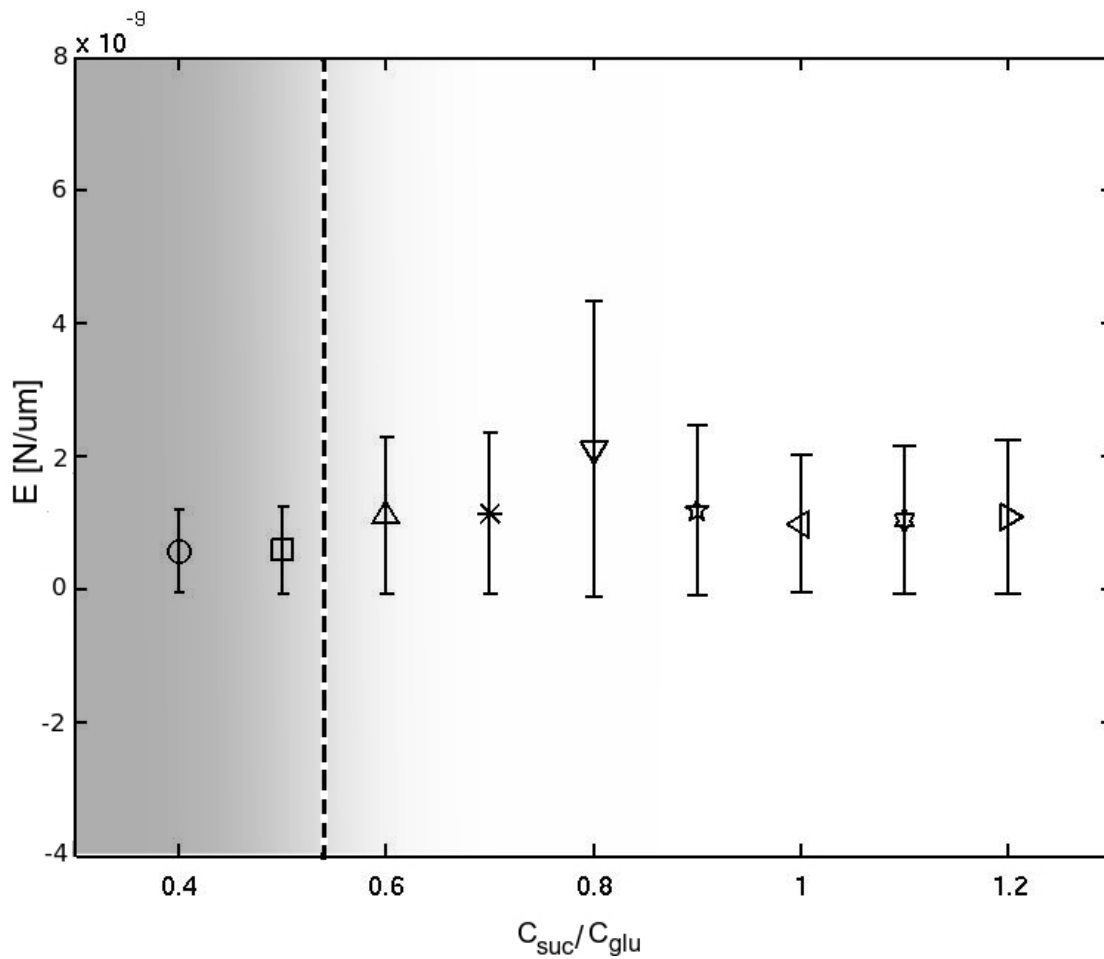
**Figura 6.2:** Módulos de bending medidos para las distintas concentraciones utilizadas.

La complejidad de dichos modelos y la complejidad natural que posee el sistema estudiado, tiene como consecuencia directa la gran dificultad presente para la obtención de las propiedades mecánicas de las vesículas. La confirmación de la existencia de distintos regímenes en el comportamiento de las membranas para distintas concentraciones y su clasificación, permite simplificar el problema y así nos provee de una herramienta para la determinación de las propiedades elásticas de la

vesícula. La simplificación de la ecuación de la energía para vesículas floppy, al considerar sólo el término de bending, nos permite aplicar de forma directa el teorema de equipartición y así calcular el módulo de bending de la membrana (Fig. 6.2).

Este valor obtenido es válido sólo para el intervalo correspondiente al de vesícula floppy, el valor medio obtenido para este rango de concentraciones es:

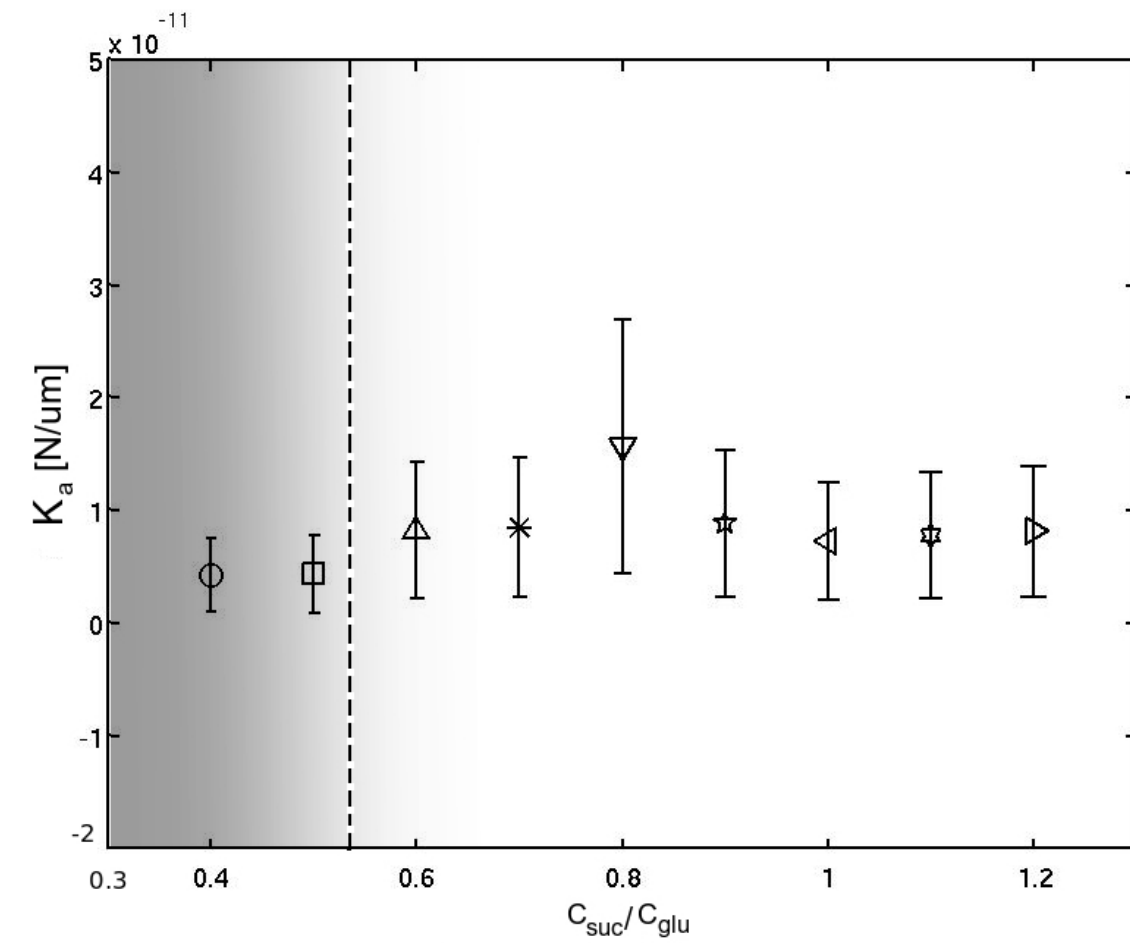
$$\kappa_b = (63,123 \pm 16,482) * 10^{-19} [J/\mu m]$$



**Figura 6.3:** Módulos de bending medidos para las distintas concentraciones utilizadas.

El módulo de young (Fig. 6.3) y stretching (Fig. 6.4) calculado es

$$E = (76,178 \pm 1,165) * 10^{-11} [N/\mu m]$$



**Figura 6.4:** Módulos de bending medidos para las distintas concentraciones utilizadas.

y

$$K_a = (57,004 \pm 24,613) * 10^{-13} \text{ [N}/\mu \text{ m}]$$

# Apéndice A

## Protocolos fabricación de Vesículas

### A.1. Materiales:

1. 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), Sigma Aldrich
2. Cloroformo (puriss. p.a., reag. ISO, reag. Ph. Eur., 99.0-99.4 %), Sigma Aldrich
3. Mineral Oil, Heavy (USP/FCC) , Fisher Chemical
4. Saybolt viscosity: 162 minimum, Paraffin - Liquid, Paraffin Oil, Heavy, Liquid Petrolatum
5. Glucosa anhidrida USP, Lab-Tec.
6. Sacarosa, LOBA Chemie.
7. Cloruro de Calcio, Lab-Tec.

### A.2. Preparación de los lípidos

#### A.2.1. Solución Stock

- Paso 1: dilución de lípidos



$$V_{\text{clorof}} = 10 \text{ ml}$$

$$m_{\text{lip}} = 100 \text{ mg}$$

$$C_{\text{stock}} = 10 \text{ mg/mL (concentración de lípidos disueltos en cloroformo)}$$

Esta solución se mantiene refrigerada a una temperatura de  $-20^\circ \text{C}$ .

### Preparación de la solución de fosfolípidos:

- Paso 1: evaporación del cloroformo

Usando Hot plate a  $37^\circ \text{C}$  o campana de vacío.

Se utiliza un volumen de la solución stock de  $V_{\text{stock}} = 0,5 \text{ mL}$ , el cual se pone en la campana de vacío debe estar un tiempo de 10 - 15 minutos, a una presión de  $10^{-2}$  mBar y a una temperatura de  $22^\circ \text{C}$ .

Debe quedar un film translúcido de fosfolípidos.

- Paso 2: dilución de la película de lípidos en aceite

El volumen de lípidos resultante  $V_{\text{lip*}}$  se diluye un volumen de aceite mineral de  $V_{\text{minoil}} = 10 \text{ mL}$ , quedando una concentración de lípidos en aceite mineal de  $C_{\text{lip*-iol}} = 0,5 \text{ mM/L}$  o  $C_{\text{lip*-iol}} = C_{\text{lip**}} = 0,4 \text{ mg/mL}$ .

Luego de una hora de reposo, esta solución se mezcla en el Sonicador (baño ultrasónico) un tiempo de 2 horas a una temperatura de  $40^\circ \text{C}$ .

- Paso 3: agitación magnética

Finalmente se pipetea un volumen de  $0,5 \mu \text{l}$  de agua desionizada en los  $10 \text{ ml}$  de solución de lípidos en aceite mineral, esto se realiza en una agitador magnético a una temperatura de  $40^\circ \text{C}$ , durante toda la noche. Con esto obtenemos la solución

final de trabajo  $V_{lip^{**}-wat}$ .

## A.3. Preparación de Vesículas

### Consideraciones previas:

Limpiar residuos en jeringa conectada a la bomba mecánica. Esto se hace con agua desionizada.

- Parámetros Bomba:

$$rate = 0.2 \text{ mL/m.}$$

$$Vol = 2 \text{ mL.}$$

- Parámetros motor<sup>1</sup>:

$$\text{Frecuencia requerida: } f_{motor} = 30 \text{ Hz.}$$

$$\text{Voltaje para la frecuencia requerida: } V_{motor} = 7,7 \text{ V.}$$

- Parámetros Bomba Jeringa:

$$rate = 500 \text{ } \mu\text{L/hr.}$$

$$Vol = 500 \text{ } \mu\text{L.}$$

### A.3.1. Soluciones

#### Solución 1

agua desionizada - sacarosa:

$$m_{sacarosa} = 0,34 \text{ g para un volumen total de solución } V_1 = 10 \text{ mL.}$$

---

<sup>1</sup>Estos parámetros están calibrados para trabajar con soluciones hechas con glucosa y sacarosa. Para soluciones de cloruro de sodio, cloruro de calcio es recomendable utilizar un voltaje en el motor de  $V_{motor}$  de  $\approx 10$  a  $12 \text{ V}$ .

## Solución 2

agua desionizada - glucosa:

$m_{glucosa} = 0,18 \text{ g}$  para un volumen total de solución  $V_2 = 10 \text{ mL}$ .

### A.3.2. Experimento

- Paso 1: poner 3 mL de *solución 1* en la jeringa de la bomba

Precaución: revisar que este toda la manguera con solución 1 y que no hayan burbujas de aire en esta antes de comenzar con el experimento.

- Paso 2: poner 1,5 mL de *solución 2* en la cámara de trabajo

Precaución: esto debe hacerse con el motor encendido al voltaje requerido  $V_{motor}$ .

- Paso 3: poner solución de aceite con vesículas  $V_{lip**wat} = 3,5 \text{ mL}$  en la cámara de trabajo

Precaución: esto se hace con micropipeta.

- Paso 4: poner aceite Decane  $V_{decane} = 0,5 \text{ mL}$  en el frasco

Precaución: esto se hace con micropipeta.

- Paso 5: poner *solución 1* en contacto con aceite decane

Esto se debe hacer con la bomba encendida en con los parámetros indicados previamente para rate y volumen, una o dos veces.

Precaución: debe estar en contacto con la capa de aceite decane y no con la *solución de aceite y lípidos*.

# Apéndice B

## Protocolo AFM

- Paso 1: barrer la superficie de la mica en modo contacto (con mínimo de fuerza) al aire. Utilizando la celda de fluidos con la mica recién clivada, se captura una imagen para verificar si la superficie está en óptimas condiciones, además así se obtiene un buen sellado de la celda con el portamuestra.
- Paso 2: (1<sup>o</sup> Inyección) sin sacar la celda inyectar lo suficiente de solución 5 mM de  $CaCl_2$  (Cloruro de calcio en agua desionizada); ajustar los parámetros para medir en modo de contacto intermitente en solución y capturar una imagen de la mica en solución.
- Paso 3: (2<sup>a</sup> Inyección (vesículas)) levantar la punta (con un solo toque) y cambiar la solución de la celda de fluidos inyectando la siguiente solución hasta que la primera sea purgada de la celda: *TRIS HCl* (TBS) pH 7.4 + vesículas 2 a 5 mM aproximadamente +  $CaCl_2$  2 a 5 mM aprox.). Darle tiempo a las vesículas a que se adsorban por alrededor de 12 minutos y comenzar a escanear a no más de 0.45 hz y poca fuerza .

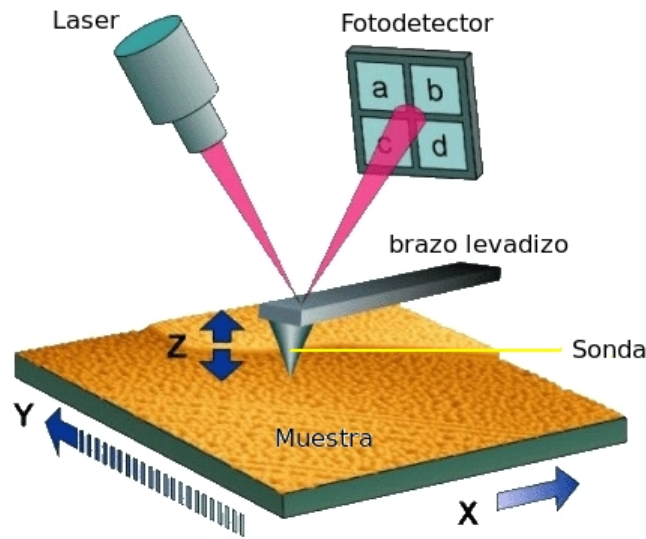
## Apéndice C

# Modo de contacto intermitente en AFM

El Microscopio de fuerza atómica (Atomic Force Microscope, AFM) [18] es un instrumento mecano óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los piconewtons. Al barrer una muestra, es capaz de registrar continuamente su topografía mediante una sonda o punta afilada. La sonda va acoplada a un brazo levadizo o palanca microscópica muy flexible de sólo unos  $200 \mu\text{m}$ , donde su deflexión se comporta como un resorte hookeano. El microscopio de fuerza atómica ha sido esencial en el desarrollo de la nanotecnología, para la caracterización y visualización de muestras a dimensiones nanométricas ( $1 \times 10^{-9} \text{m} = 1 \text{nm}$ ).

En la figura C.1 es mostrado el montaje básico de un AFM. El brazo levadizo o Cantilever tiene comúnmente forma de V o rectangular. Estos tienen un borde libre y una punta afilada, la cual actúa como sonda de interacción. Esta sonda generalmente es de forma de pirámide o cono cilíndrico. Sondas y cantilevers de fabricación comercial son predominantemente de nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) o silicio ( $\text{Si}$ ). Normalmente, la superficie superior del brazo, opuesto a la punta, está recubierto con una delgada superficie reflectante, por lo general de una de oro (Au) o aluminio (Al).

El microscopio de AFM puede realizar dos tipos de medidas: fuerza e imagen.



**Figura C.1:** Configuración básica del microscopio de fuerza atómica, AFM.

En el primer modo (medidas de fuerza) la punta se hace oscilar verticalmente mientras se registra la flexión del brazo. La medida se expresa entonces representando fuerza ( $F$ ) frente a altura ( $Z$ ) sobre la muestra. Las medidas de fuerza son útiles en estudios de fuerzas de adhesión e interacciones de moléculas individuales. También es útil en estudios de indentación de materiales blandos (polímeros) que permitan caracterizar propiedades elásticas de la muestra como el módulo de elasticidad. En el modo de imagen se barre la superficie en el plano de la superficie ( $X$ - $Y$ ) por la punta. Durante el barrido la fuerza interatómica entre los átomos de la punta y los átomos en la superficie muestral provocan una flexión del brazo levadizo. Esta flexión es registrada por un sensor (normalmente balanza óptica) y la señal obtenida se introduce en un circuito de realimentación. Este último controla al piezoeléctrico que determina la altura ( $Z$ ) de la punta sobre la muestra de forma que la flexión del brazo se mantenga a un nivel constante (Normalmente introducido por el operador). Representando la altura de la punta ( $Z$ ) frente a su posición sobre la muestra ( $X$ ,  $Y$ ) es posible trazar un mapa topográfico de la muestra  $Z=Z(X, Y)$ . La fuerza inter-

atómica se puede detectar cuando la punta está muy próxima a la superficie de la muestra.

En las mediciones de imagen en AFM tenemos la posibilidad de trabajar con dos tipos de modos operación: modo contacto y modos dinámicos. En los modos dinámicos se hace vibrar la micropalanca a su frecuencia de resonancia valiéndose para ello del piezoeléctrico. La interacción punta-superficie modifica la amplitud, frecuencia y fase de la resonancia, mientras el circuito de realimentación mantiene constante alguna de estas tres propiedades. Qué propiedad sea ésta es el criterio que determina el modo concreto de operación: Modo de no contacto o de frecuencia modulada (FM-AFM) y el Modo de contacto intermitente (del inglés "tapping mode") o de amplitud modulada (AM-AFM).

En el modo de contacto intermitente, el cantilever es conducido a oscilar arriba y abajo cerca de su frecuencia de resonancia por un pequeño elemento piezoeléctrico montado en el soporte de punta del AFM similar al modo de no contacto. Debido a la interacción de las fuerzas que actúan sobre la punta cuando esta se acerca a la superficie como las fuerzas de Van der Waals, interacciones dipolo-dipolo, fuerzas electrostáticas, etc. provocan que la amplitud de la oscilación disminuya a medida que la punta se acerca a la muestra. Un circuito de retroalimentación es utilizado por el piezoeléctrico para controlar la altura del brazo por encima de la muestra ajustándose esta para mantener constante la amplitud de oscilación del cantilever cuando este barre la muestra. Como la superficie es barrida, la amplitud de oscilación del brazo levadizo cambiará al encontrar diferentes topografías. Este método disminuye el daño producido en la superficie a analizar en comparación con el daño que provocado en el modo contacto. Este modo es lo suficientemente suave, incluso para la visualización de bicapas lipídicas soportadas o para moléculas de polímeros adsorbidas en un medio líquido.

# Apéndice D

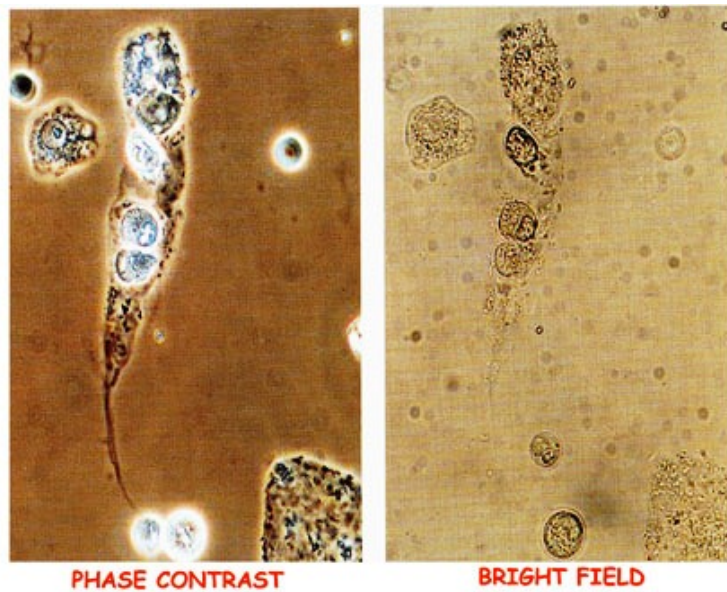
## Contraste de fase

La microscopía de contraste de fase, fue desarrollada fundamentalmente por Zernike en 1932. Se basa fundamentalmente en el retraso que se produce en las ondas de luz al atravesar objetos de distintos índices de refracción, aprovechando y amplificando dichos retrasos.

El microscopio de contraste de fase permite observar células sin colorear y resulta especialmente útil para células vivas.

Este aprovecha las pequeñas diferencias de los índices de refracción en las distintas partes de una célula y en distintas partes de una muestra de tejido. La luz que pasa por regiones de mayor índice de refracción experimenta una deflexión y queda fuera de fase con respecto al haz principal de ondas de luz que pasaron la muestra. Se acoplan otras longitudes de onda fuera de fase por medio de una serie de anillos ópticos del objetivo y del condensador, anula la amplitud de la porción fuera de fase inicial del haz de luz y produce un contraste útil sobre la imagen. Las partes oscuras de la imagen corresponden a las porciones densas del espécimen; las partes claras de la imagen corresponden a porciones menos densas. Por lo tanto estos microscopios se utilizan para observar células vivas, tejidos vivos y cortes semifinos no coloreados. Dos modificaciones del microscopio de fase son el microscopio de interferencia y el microscopio de interferencia diferencial.





**Figura D.1:** Comparación entre Bright field y Contraste de fase observando una célula.

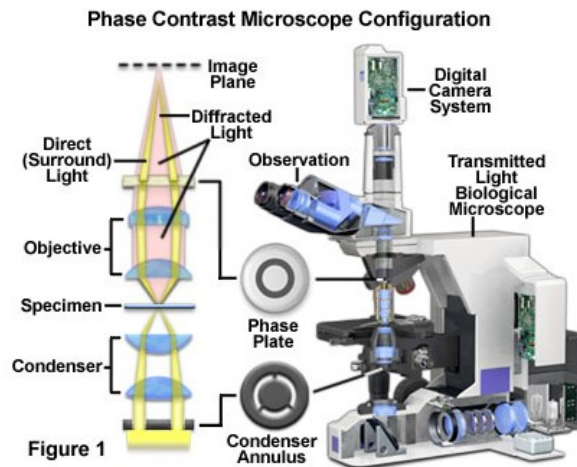
## D.1. Constitución del microscopio de contraste de fase

Fundamentalmente el microscopio de contraste de fase es un microscopio óptico de campo claro con algunas modificaciones, como objetivos y condensadores especiales.

## D.2. Fundamentos físicos

Como ya se ha mencionado, este microscopio se basa en que la luz al atravesar objetos con distintos índices de refracción experimenta retrasos (o desfases), sin embargo estos no son tan notorios como para poder observarlos a simple vista. El microscopio de contraste de fase acentúa dichos retrasos, haciendo que zonas con distintos índices de refracción se traduzcan en una variación de contraste lo cual puede ser observado.

Por medio del condensador se logran separar los rayos luminosos que son difractados por el objeto de los que no lo hacen, al pasar por la muestra los rayos que



**Figura D.2:** Diagrama de corte transversal de un microscopio moderno de contraste de fase vertical (derecha), incluyendo una ilustración esquemática del tren óptico de contraste de fase (izquierda).

atraviesan objetos más densos experimentan un retraso de un cuarto de longitud de onda, y al pasar por el anillo de fase estos rayos, debido a la forma del anillo de fase, estas ondas se retrasan un cuarto de longitud de onda más, en cambio, las que no se han retrasado, pasan por una parte más delgada del anillo de fase y no se siguen retrasando. Entonces estos desfases de las ondas luminosas se perciben como diferencias en el contraste, en distintos tonos de gris. Además el anillo de fase disminuye la intensidad de la luz.

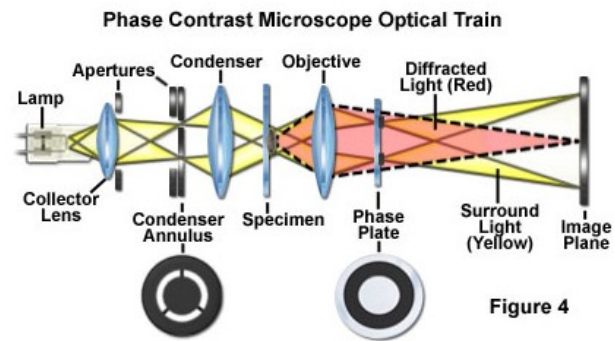


Figure 4

**Figura D.3:** Diagrama de corte transversal de un microscopio moderno de contraste de fase vertical (derecha), incluyendo una ilustración esquemática del tren óptico de contraste de fase (izquierda).

# Bibliografía

- [1] Pier Luigi Luisi and Peter Walde, Giant Vesicles, John Wiley and sons, Switzerland, 2000.
- [2] Samuel A. Safran, Statistical Thermodynamics of Surfaces, Interfaces and Membranes, Westview Press, Vol. 90.
- [3] Steven Goodmans, Medical cell biology, Academic Press, Londres, (art:autor, revista, vol, año, pag).
- [4] Kirsten Bacia and Jakob Schweizer, Practical Course: Giant Unilamellar Vesicles, Institut für Biophysik, Germany, 2005.
- [5] Claudia Toro Vergara, Efecto de la adición de 6-O-Miristil Sacarosa sobre la bicapa de liposomas de POPC y vesículas de DODAC, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Química Orgánica y Físico Química, Universidad de Chile, 2006.
- [6] Yukihiisa Okumura, Hao Zhang, Takuya Sugiyama, and Yuuichi Iwata, JACS communications, Electroformation of Giant Vesicles on a Non-Electroconductive Substrate, 2007.
- [7] D.G. Hunter and B. J. Frisken, Effect of Extrusion Pressure and Lipid Properties on the Size and Polydispersity of Lipid Vesicles, Biophysical Journal, Vol. 74, 1998, 2996 –3002.

- [8] Manouk Abkarian, Etienne Loiseau and Gladys Massiera, Continuous droplet interface crossing encapsulation (cDICE) for high throughput monodisperse vesicle design, *Soft Matter*, 2011, vol. 7, 4610-4614.
- [9] Sasa Svetina, Ales Iglic and Bostjan Zerks, On the Role of the Elastic Properties of Closed Lamellar Membranes in Membrane Fusion, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 710, 79–191.
- [10] Udo Seifert, Fluid vesicles, *Lecture Notes: 'Physics meets Biology: From Soft Matter to Cell Biology*, 2004.
- [11] Udo Seifert, Configurations of fluid membranes and vesicles, *Advances in Physics*, Vol. 46, 13-137.
- [12] H.-G. Dobereiner, Optical Microscopy of Fluctuating Giant Vesicles and Motile Cells, *Soft Matter characterization*, 1293-1338, 2008.
- [13] Xuemei Liang, Guangzhao Mao, K.Y. Simon Ng, Probing small unilamellar Egg-PC vesicles on mica surface by atomic force microscopy, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 34, 2004, 41-51.
- [14] Hans-Jurgen Butt, Brunero Cappella, Michael Kappl, Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications, *Surface Science Reports*, Vol. 59, 1–152.
- [15] Jana Jass, Torbjörn Tjärnhage and Gertrud Pu, From Liposomes to Supported, Planar Bilayer Structures on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study, *Biophysical Journal*, Vol. 79, 2000, 3153-3163.
- [16] Rumiana Dimova, Said Aranda, Natalya Bezlyepkina, Vesselin Nikolov, Karin A Riske and Reinhard Lipowsky, A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy, *Journal of Physics: Condensed Matter*, Vol. 18, 2006, 1151–1176.

- [17] Hans-Gunther Dobereiner, The budding transition of phospholipid vesicles : a quantitative study via phase contrast microscopy, Thesis (Ph.D.), Simon Fraser University, 1989.
- [18] datos(W. Richard Bowen Nidal Hilal, Atomic force microscopy in process engineering, Elsevier Ltd, USA, 2009)