

# Caracterización de la dinámica molecular en nanoestructuras supramoleculares globulares mediante relaxometría magnética nuclear

Lic. Carla Cecilia Fraenza<sup>1</sup>

Presentado ante la  
Facultad de Matemática, Astronomía, Física y Computación  
como parte de los requerimientos para la obtención del grado de  
Doctor en Física de la  
Universidad Nacional de Córdoba

Marzo de 2016

Director: Dr. Esteban Anordo



Caracterización de la dinámica molecular en nanoestructuras supramoleculares globulares mediante relaxometría magnética nuclear por Carla Cecilia Fraenza se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 2.5 Argentina](#).

<sup>1</sup>Becario de CONICET

# **Dedicatoria**

A toda mi familia por su apoyo  
incondicional en todo momento de mi carrera.

# Índice General

<b>Resumen</b>	<b>V</b>
<b>Capítulo 1: Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. Sistemas estudiados en este trabajo	2
1.1.1. Lípidos	2
1.1.1.1. Lípidos anfifílicos: Fosfolípidos	3
1.1.1.2. Colesterol: Regulador de fluidez en membranas lipídicas	5
1.1.1.3. Detergentes: agentes para flexibilizar membranas lipídicas	6
1.1.2. Polímeros anfipáticos: Copolímeros tribloque	6
1.2. Técnica experimental	8
1.2.1. Generalidades de RMN	8
1.2.2. Relaxometría con ciclado rápido de campo	9
<b>Capítulo 2: Efectos del colesterol en membranas lipídicas</b>	<b>12</b>
2.1. Efectos generales	12
2.2. Estudio de la dinámica molecular de lípidos en membranas con colesterol	13
2.2.1. Enfoques sobre la acción del colesterol en la dinámica de los lípidos	13
2.2.2. Modelo para interpretar la dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones obtenida con la técnica de ciclado de campo	14
2.2.3. Experimentos de dispersión de la tasa de relajación	17
2.2.3.1. Preparación de la muestra	17
2.2.3.2. Modelado de la dispersión de la tasa de relajación	17
2.2.3.3. Medición de la tasa de relajación espín-red en función de la frecuencia de Larmor en liposomas con colesterol	18
<b>Capítulo 3: Ajustes automáticos de los perfiles de dispersión de la tasa de relajación</b>	<b>28</b>
3.1. Planteo del problema a resolver	28
3.2. Automatización	29
3.2.1. Método de parámetros iniciales fijos y minimización de SDC	29
3.2.2. Método de parámetros iniciales aleatorios y minimización de PROM	29
3.2.3. Aplicación del método de parámetros iniciales aleatorios y minimización de PROM	32
<b>Capítulo 4: Liposomas ultradeformables</b>	<b>35</b>
4.1. La piel	35
4.1.1. Características principales	35

4.1.2. Rutas transdermales naturales .....	35
4.2. Mecanismos de transporte transdermal .....	36
4.2.1. Liposomas ultradeformables .....	37
4.3. Elasticidad de membranas de vesículas.....	37
4.3.1. Energía elástica de Helfrich .....	37
4.3.2. Elasticidad en vesículas ultradeformables: medición de la constante elástica de flexión ....	39
4.4. Experimentos de dispersión de la tasa de relajación .....	41
4.4.1. Preparación de la muestra .....	41
4.4.2. Modelado de la dispersión de la tasa de relajación .....	41
4.4.3. Medición de la tasa de relajación espín-red en función de la frecuencia de Larmor en liposomas con detergente.....	41
<b>Capítulo 5: Vesículas gigantes .....</b>	<b>53</b>
5.1. Métodos usados para medir la constante elástica de flexión en GUV.....	53
5.2. Intentando extender el modelo para GUV.....	54
5.3. Dependencia de la constante elástica de flexión con el tamaño de la vesícula.....	58
<b>Capítulo 6: Simplificación del modelo .....</b>	<b>61</b>
6.1. Reducción del modelo .....	61
6.2. Aplicación y validación del modelo simplificado .....	62
<b>Capítulo 7: Polimerosomas .....</b>	<b>69</b>
7.1. Micelas poliméricas como transportadoras de drogas.....	69
7.2. Dinámica molecular en polimerosomas .....	69
7.3. Experimentos de dispersión del tiempo de relajación espín-red .....	70
7.3.1. Preparación de la muestra .....	70
7.3.2. Medición del tiempo de relajación espín-red en el sistema de laboratorio en función de la frecuencia de Larmor .....	70
7.3.3. Medición de la tasa de relajación espín-red en el sistema rotante en función de la frecuencia de Larmor .....	74
7.4. Experimentos usando MFA y espectroscopía por RMN .....	77
<b>Capítulo 8: Conclusiones.....</b>	<b>80</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>82</b>
<b>Apéndice I.....</b>	<b>95</b>
<b>Apéndice II.....</b>	<b>107</b>

# Resumen

Este trabajo de investigación se orientó al estudio de la dinámica molecular, y a través de ésta, al estudio de las propiedades mesoscópicas en diferentes estructuras supramoleculares globulares. Para ello, se utilizaron diferentes técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN), principalmente la relaxometría con ciclado rápido de campo magnético (o FFC por sus siglas en inglés). Se estudiaron diferentes formulaciones de liposomas y vesículas poliméricas suspendidos en medios acuosos.

En esta tesis se hizo uso de un modelo previamente desarrollado para interpretar la dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones, obtenida con la técnica de campo ciclado en liposomas unilamelares. Además de proporcionar información general sobre la dinámica de los lípidos que conforman la membrana de los liposomas, este modelo nos permitió inferir sobre las propiedades elásticas de la misma por medio de la constante elástica de flexión  $\kappa$  (uno de los parámetros físicos involucrados en el modelo). Se llevó a cabo con éxito la extensión de este modelo a sistemas más complejos. Se realizaron mediciones de  $\kappa$  para liposomas de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) dopados con colesterol de manera de incrementar el valor de la constante ( $\kappa \sim 15\text{-}20k_B T$ ). En este caso, fue posible dilucidar experimentalmente la cantidad de lípidos que son afectados por cada molécula de colesterol, según la proporción lípido-colesterol de la membrana. Estos resultados permitieron afianzar la idea de coexistencia de lípidos ordenados y desordenados en la membrana. Los resultados fueron comparados con estudios computacionales de otros autores disponibles en la literatura.

Por otro lado, a los fines de extender éstos estudios al límite opuesto de flexibilidad de las membranas, se llevaron a cabo experimentos en vesículas deformables/ultradeformables compuestas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) o fosfatidilcolina de soja (SPC) y desoxicolato de sodio (DOCNa) como detergente para flexibilizar la membrana ( $\kappa \sim 2k_B T$ ). El modelo permitió nuevamente describir con éxito la dinámica molecular en este tipo de sistemas, mostrando poca variación en la constante elástica de flexión y permitiendo despreciar el proceso de difusión en el caso de liposomas de SPC. Esto último está en concordancia con la simplificación del modelo, en la cual se ha empezado a trabajar en estudios previos y se continúa validando en esta tesis.

Se intentó extender nuestro modelo al caso de vesículas gigantes para así poder comparar nuestros resultados con los provenientes de métodos establecidos en otros trabajos, para la medición de la constante elástica de flexión. La relación señal-ruido extremadamente baja que se observó mediante la técnica de RMN en vesículas gigantes, impidió llevar a cabo los experimentos. Asimismo, la literatura predice la no-dependencia de  $\kappa$  con el radio  $R_o$  de la vesícula en el rango de tamaños de vesículas grandes y gigantes ( $R_o \geq 40\text{nm}$ ).

Los estudios realizados en vesículas poliméricas permitieron discriminar, en términos relaxométricos, los diferentes bloques que componen el copolímero, siendo éste un resultado alentador para el estudio de los procesos que intervienen en la dinámica de liberación de drogas, cuando dichas vesículas poliméricas son utilizadas como vehiculizantes.

**Clasificación (PACS):** 76.60.-k; 82.56.Pp

**Palabras claves:** lípidos, liposomas, dinámica molecular de bicapas lipídicas, relajación espín-red, relaxometría con ciclado rápido de campo magnético.

# Capítulo 1

## Introducción

Las propiedades viscoelásticas e hidrodinámicas de la membrana de vesículas lipídicas (liposomas) o sistemas autoensamblados de polímeros anfipáticos (vesículas poliméricas), resultan de particular interés en una creciente cantidad de problemas biotecnológicos. Diferentes propiedades de vesículas y la membrana que las conforman han sido estudiadas intensamente en las últimas décadas. Propiedades químicas, termodinámicas, topológicas, dinámicas y diferentes modelos fueron estudiados y propuestos (1). Si bien la mayoría de los estudios se concentran en sistemas de membranas biológicas naturales o sintéticas constituidas por diferentes formulaciones lipídicas, en los últimos años también se ha trabajado en la formulación de sistemas basados en copolímeros anfipáticos (2,3).

En términos generales, las propiedades viscoelásticas e hidrodinámicas de sistemas de vesículas se relacionan con la dinámica y estado de orden de las unidades moleculares que componen la membrana. Así, algunos estudios se centran en las propiedades de difusión de los lípidos en formulaciones de liposomas con diferentes contenidos de colesterol o detergentes (4–6), mientras que otros analizan propiedades elásticas de la membrana de estas vesículas a través de la *constante elástica de flexión*  $\kappa$  (7). Algunas técnicas normalmente empleadas en el estudio de estos sistemas son: calorimetría diferencial (DSC), recuperación de fluorescencia o FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), FRET (fluorescence resonance energy transfer), espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS), resonancia paramagnética electrónica (EPR), resonancia magnética nuclear (RMN), video microscopía óptica, métodos basados en deformaciones mecánicas de la membrana (succión o extrusión) y técnicas de dispersión y reflexión (como scattering y reflexión de rayos X y neutrones).

En general, las técnicas experimentales utilizadas para la caracterización de propiedades elásticas de vesículas o liposomas, funcionan satisfactoriamente para unidades con tamaños de varios cientos de nanómetros o varios micrómetros. Otras técnicas que permiten realizar estudios en sistemas de menores dimensiones, presentan dificultades debido a su complejidad o costo, impidiendo el uso masivo de las mismas. El creciente interés, tanto en la industria farmacéutica-cosmetológica como en grupos académicos, en la investigación y desarrollo de liposomas “ultradeformables” (para la incorporación transdermal de agentes químicos), requiere de técnicas experimentales sencillas, confiables y de acceso masivo para la evaluación de las propiedades fisicoquímicas relevantes.

Entre los métodos tradicionales para el estudio de la constante elástica de flexión  $\kappa$  se encuentran el uso de micropipetas, con las cuales se succiona la membrana y se observa la deformación de la misma en la zona de succión (8); el análisis de Fourier de las fluctuaciones térmicas observadas en vesículas

gigantes, utilizando técnicas de video microscopía óptica (9,10) y por último, la extrusión de las vesículas a través de membranas porosas con la consecuente medición de la deformabilidad (11). Sin embargo, las dos primeras técnicas experimentales requieren de vesículas con diámetros del orden del micrómetro o mayores y la última requiere de vesículas flexibles.

Las técnicas de RMN de baja resolución ofrecen dos potenciales ventajas escasamente exploradas a la fecha: es factible extender los estudios a sistemas de escalas de pocas decenas de nanómetros en forma no invasiva, y es posible pensar en instrumentación dedicada de costo razonable, volumen limitado y facilidad de instalación, mantenimiento y uso. Mediante la medición de diferentes tiempos de relajación, queda demostrada la potencialidad de la técnica para la evaluación de diferentes aspectos de la dinámica y orden molecular de los lípidos, indirectamente relacionados con las propiedades viscoelásticas, así como con procesos de intercambio de las moléculas del solvente entre las zonas de adsorción y el volumen libre del mismo (12–15). Dentro de las técnicas de RMN utilizadas en el estudio de membranas lipídicas se encuentra la relaxometría magnética nuclear de campo ciclado, o FFC por sus siglas en inglés (fast field cycling) (16). A diferencia de otras técnicas de RMN mencionadas anteriormente, la relaxometría FFC permite estudiar procesos dinámicos colectivos como son las fluctuaciones de orden y procesos difusivos lentos, los que están estrechamente vinculados a las propiedades viscoelásticas de la membrana (17). Trabajos recientes, llevaron a cabo un estudio experimental exhaustivo de la dinámica molecular en liposomas unilamelares de DMPC (dimiristoilfosfatidilcolina) y DOPC (dioleoilfosfatidilcolina) de 100nm en agua pesada (RMN de protones) (18,19) y sugieren que la aplicación de la técnica al estudio de las propiedades viscoelásticas de estos sistemas es prometedora. La aplicación de estos resultados a la caracterización y diseño de vesículas ultradeformables, representa una herramienta de potencial uso en la industria farmacológica y en cosmética (20–22).

Específicamente, el objetivo de esta tesis fue el desarrollo y perfeccionamiento de una metodología experimental basada en la técnica de relaxometría magnética nuclear de campo ciclado, para la caracterización de propiedades viscoelásticas de membranas en diferentes formulaciones de liposomas o sistemas similares. Como se mencionó anteriormente, esta metodología tiene sus orígenes en trabajos previos (18,19) por lo que esta tesis se centró en mejorar y extender su validez a sistemas más complejos, como así también en la simplificación del modelo del cual hace uso esta metodología, con el objetivo futuro de aplicar todos los resultados en el desarrollo de tecnología propia para medir  $\kappa$  de manera no invasiva.

## 1.1. Sistemas estudiados en este trabajo

A lo largo de este trabajo se utilizaron diferentes componentes para la formación de las vesículas. Algunos de ellos fueron la base estructural de las mismas, como lípidos o polímeros, y otros fueron aditivos para regular las propiedades viscoelásticas de la membrana, como colesterol o detergentes. En esta sección se hace una breve descripción de las principales propiedades de cada uno de ellos.

### 1.1.1. Lípidos

### 1.1.1.1. Lípidos anfifílicos: Fosfolípidos

Un lípido es una molécula orgánica compuesta principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno. Los lípidos poseen una amplia gama de funciones, desde funciones estructurales, hormonales, de transporte, hasta biocatalizadoras y de reserva energética.

Los *lípidos anfifílicos* son un tipo de lípidos que consisten de una parte que es soluble en solventes no polares, y una segunda parte que es soluble en solventes polares. En aplicaciones biológicas, el solvente es agua, entonces uno habla de las partes hidrofóbica e hidrofílica, respectivamente. En general la parte hidrofóbica consiste de cadenas hidrocarbonadas, mientras que la parte hidrofílica está compuesta por el llamado grupo polar. Dentro de esta clase de lípidos, se encuentran los *fosfolípidos*, los cuales poseen función estructural dado que son un componente principal de todas las membranas celulares debido a su capacidad de formar bicapas lipídicas (23). Están compuestos por una molécula de glicerol, a la que se unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato. Este último está unido a otro grupo de átomos, entre los que generalmente está incluido el nitrógeno, como es el caso del grupo colina a base del cual se forman las fosfatidilcolinas. En la Figura 1.1 se muestra la estructura típica de un fosfolípido. En este trabajo nos concentraremos en solo tres fosfolípidos particulares, dos de ellos sintéticos y uno natural. Específicamente son: dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) de fórmula molecular  $C_{44}H_{84}NO_8P$ ; dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) de fórmula molecular  $C_{36}H_{72}NO_8P$ , y fosfatidilcolina de soja (SPC), cuya especie predominante tiene fórmula molecular  $C_{42}H_{80}NO_8P$ , siendo fosfolípidos de cadenas insaturadas, saturadas, y doblemente insaturadas, respectivamente. Sus estructuras se muestran en la Figura 1.2.

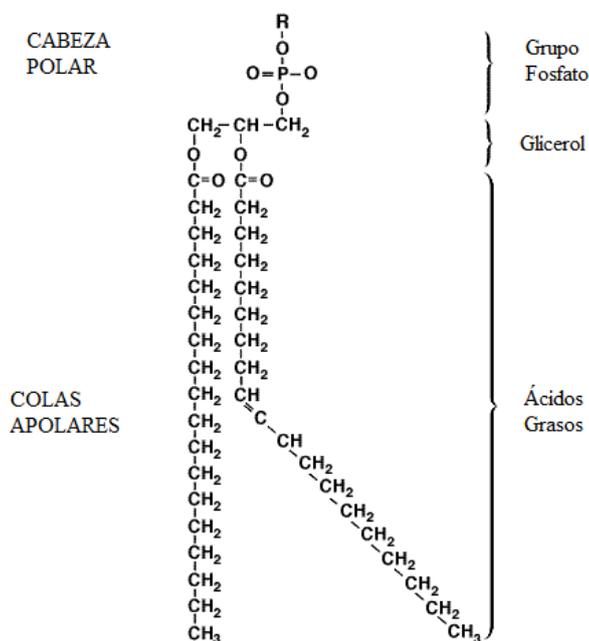


Figura 1.1. Estructura de un fosfolípido. La parte de la cabeza polar indicada con la letra *R* representa el grupo de átomos unidos al grupo fosfato, entre los que generalmente está incluido el nitrógeno, como es el caso del grupo colina.

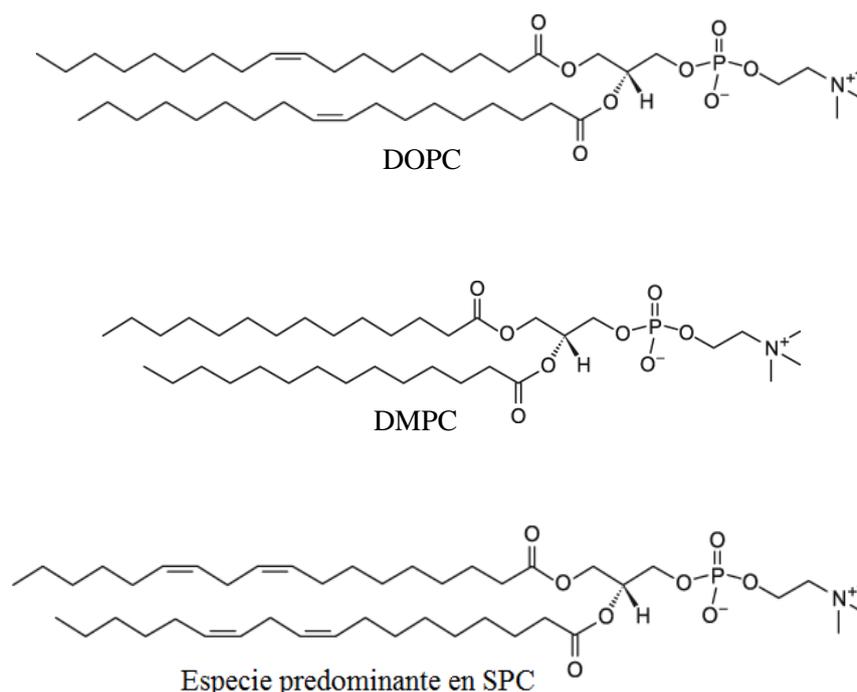


Figura 1.2. Fosfolípidos utilizados en este trabajo para la formación de liposomas. En el extremo derecho se observan las cabezas o grupos polares, y en el extremo izquierdo se muestran las cadenas apolares.

En solución acuosa, los lípidos anfifílicos al principio se disuelven como monómeros, pero al superar cierta concentración se unen espontáneamente para minimizar las interacciones hidrofóbicas desfavorables, y forman una variada gama de estructuras, que dependen en general de la concentración y la temperatura.

Para grandes excesos de agua los fosfolípidos forman bicapas que se curvan y se cierran espontáneamente en estructuras cuasi-esféricas llamadas *liposomas*, los cuales encierran en su interior parte del solvente que lo rodea (Figura 1.3). Tales sistemas no están en equilibrio termodinámico aunque pueden ser estables durante varios días. El tamaño de un liposoma puede ir desde unos 20nm hasta varios micrómetros, y puede estar compuesto de una (unilamelar) o varias membranas concéntricas (multilamelar), cada una de las cuales tienen aproximadamente 6nm de espesor. La importancia de estudiar este tipo de sistemas es su utilidad para el transporte controlado de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos en su núcleo acuoso y bicapa lipídica, respectivamente (24).

Los lípidos de la membrana de un liposoma pueden encontrarse en diferentes fases dependiendo de la concentración de lípidos como de la temperatura. Es esta tesis siempre trabajaremos en la *fase lamelar en el estado líquido-cristalino o fase  $L_{\alpha}$* . En este tipo de conformación los lípidos se encuentran acomodados en bicapas donde las cadenas están altamente desordenadas, pero en promedio las cadenas se encuentran perpendiculares al plano de la bicapa.

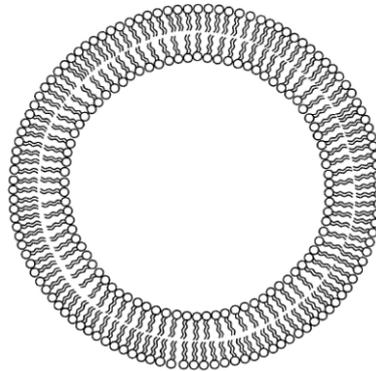


Figura 1.3. Representación esquemática de un liposoma. Los círculos representan los grupos polares mientras que las líneas onduladas hacen referencia a las cadenas hidrocarbonadas.

### 1.1.1.2. Colesterol: Regulador de fluidez en membranas lipídicas

El colesterol es un lípido que se encuentra dentro del grupo de los esteroides por poseer una estructura de anillos a base de esterano (25). Consiste en una pequeña cabeza polar dada por el grupo hidroxilo, y el resto de su estructura, la cual es apolar, está formada por cuatro anillos, tres de ellos hexagonales y uno pentagonal y una cola hidrocarbonada (Figura 1.4). Una de sus principales funciones es la función estructural dado que es especialmente abundante en las membranas de las células, donde ayuda a mantener la firmeza y la integridad de las mismas regulando las condiciones de fluidez. Por otro lado, el colesterol también ayuda a separar los fosfolípidos de manera que las cadenas de ácidos grasos no puedan unirse y hacer que la membrana se cristalice. Considerando estas propiedades del colesterol, a menudo se lo incluye en la formulación de liposomas para dar más rigidez a la bicapa y para tratar de mejorar la estabilidad de estas vesículas, como se muestra a lo largo de esta tesis.

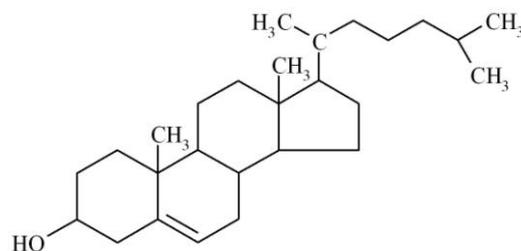


Figura 1.4. Estructura de una molécula de colesterol. Su pequeña cabeza polar (grupo hidroxilo) se observa en el extremo izquierdo de la molécula y el resto de su estructura corresponde a su parte apolar (cuatro anillos y cadena hidrocarbonada).

### 1.1.1.3 Detergentes: agentes para flexibilizar membranas lipídicas

Los *detergentes*, también conocidos como tensoactivos o *surfactantes*, son compuestos químicos, también considerados como un grupo especial de lípidos (26), que tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial de un líquido, es decir, disminuyen la cantidad de energía por unidad de área necesaria para aumentar la superficie del líquido. Usualmente son compuestos orgánicos anfifílicos, permitiéndoles esta naturaleza dual la alineación de los mismos en las interfases cuando se encuentran en solución, produciendo así el efecto de superficie antes mencionado.

Los detergentes también exhiben la propiedad de autoagregación. A bajas concentraciones, los surfactantes existen en forma monomérica en soluciones acuosas, mientras que al incrementar paulatinamente su concentración hasta alcanzar el límite característico, llamado Concentración Micelar Crítica (CMC), las moléculas del detergente se agrupan formando micelas, como una consecuencia de su naturaleza dual.

Cuando en una solución acuosa de lípidos se agrega una baja concentración de un detergente, debido a su característica anfipática, se agrega en su mayoría a la membrana de los liposomas formados por los lípidos, disminuyendo la tensión superficial de la misma. Consecuentemente, permite adaptar su forma de manera fácil y rápida ante algún tipo de estrés externo (26). En otras palabras, un detergente en baja concentraciones le otorga mayor flexibilidad a la membrana de un liposoma.

En este trabajo, utilizaremos un detergente en particular para preparar liposomas deformables, a saber: desoxicolato de sodio (DOCNa), el cual es aniónico y posee una CMC entre 2 y 6 mM en el rango de temperaturas de 20 a 50 °C, aproximadamente (Figura 1.5).

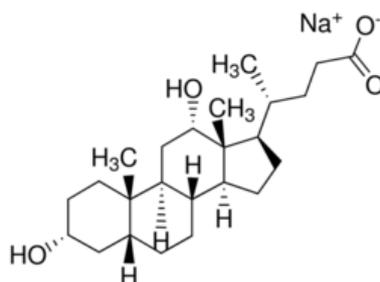


Figura 1.5. Estructura del desoxicolato de sodio (DOCNa) utilizado en este trabajo para flexibilizar la membrana de liposomas y así obtener liposomas deformables.

### 1.1.2. Polímeros anfipáticos: Copolímeros tribloque

Un *polímero* es una macromolécula compuesta de unidades estructurales repetitivas llamadas monómeros, las cuales típicamente están conectadas por enlaces covalentes. Los polímeros poseen un variado rango de propiedades las cuales les permiten cumplir diferentes funciones, desde ser los principales componentes de plásticos sintéticos hasta ser parte de biopolímeros naturales como los ácidos nucleicos y las proteínas que son esenciales para la vida.

Los polímeros que poseen un solo tipo de unidad repetitiva se denominan *homopolímeros*, mientras que los que poseen diferentes tipos de monómeros reciben el nombre de *heteropolímeros* o *copolímeros*. En un copolímero, los monómeros distintos pueden estar distribuidos de manera aleatoria o periódica. Dentro de este tipo de polímeros se encuentran los *copolímeros en bloques* los cuales poseen dos o más homopolímeros como unidades repetitivas. Cuando estas unidades repetitivas son

solo dos, las cuales llamaremos A y B, y están distribuidas en tres bloques de la siguiente manera  $A_m B_n A_m$ , el copolímero resultante se denomina *copolímero tribloque*.

En este trabajo, nos centraremos particularmente en los copolímeros tribloque compuestos por óxido de etileno (OE) y óxido de propileno (OP), a los que se conoce con el nombre genérico de “Poloxamer” y el nombre comercial “Pluronic”. Su estructura química es  $(OE)_m(OP)_n(OE)_m = (POE)(POP)(POE)$ , o de manera extendida  $HO(C_2H_4O)_m(C_3H_6O)_n(C_2H_4O)_mH$ .

A temperaturas por debajo de los  $6^\circ C$  tanto el POE como el POP son solubles en agua, pero cuando la temperatura se incrementa, el bloque POP se transforma en hidrofóbico mientras que los dos bloques POE siguen siendo hidrofílicos. En consecuencia, este tipo de polímero posee una estructura anfipática en un amplio rango de temperaturas. Esto les permite formar agregados llamados *micelas* en medios acuosos (Figura 1.6) a partir de ciertas concentraciones y/o temperaturas específicas denominadas concentración micelar crítica (CMC) y temperatura micelar crítica (TMC), respectivamente. El número de agregación puede ir desde 30 a 10.000 copolímeros. El valor de la CMC depende de la temperatura, pero para este tipo de polímeros su valor se encuentra dentro del rango de 0,01 a 10% m/V para temperaturas entre 10 y

$60^\circ C$ . La importancia de estudiar este tipo de sistemas es su utilidad para el transporte controlado de fármacos hidrofóbicos en el núcleo de la micela (27,28).

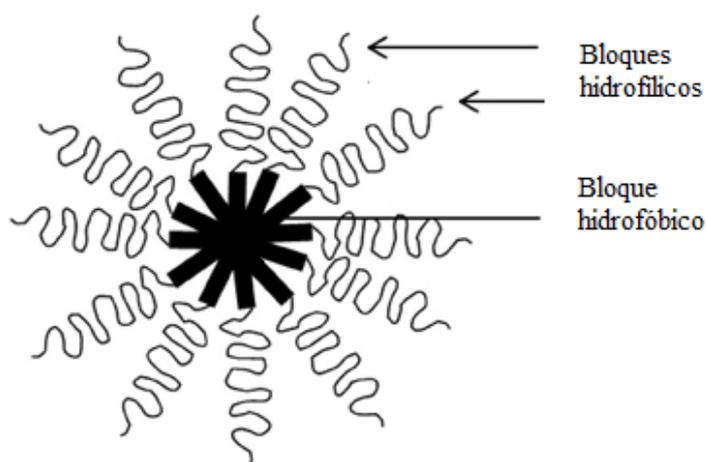


Figura 1.6. Estructura de una micela polimérica. Su núcleo está formado por los bloques hidrofóbicos mientras que su capa externa, en contacto con el medio acuoso, está formada por los bloques hidrofílicos.

Los copolímeros tribloque en solución acuosa pueden presentar diferentes fases dependiendo de la concentración y/o temperatura. Por debajo de las CMC (TMC) no se agregan, permaneciendo en su estado individual llamado unímero. A partir de la CMC (TMC) empiezan a agregarse formando micelas, pero aún es posible encontrar unímeros. Mientras mayor sea la concentración (temperatura), menor será la probabilidad de encontrar unímeros. En esta instancia existe una cinética de intercambio entre las fases micelar y de unímeros. Si la concentración (temperatura) se continúa incrementando aún más, es posible obtener fases formadas por las micelas, como lo son las mesofase cúbica con características de gel y mesofases líquidas cristalinas, como la hexagonal y lamelar (29).

En esta tesis se utilizaron tres diferentes copolímeros tribloque, a saber: Pluronic F68 ( $OE_{80}OP_{27}OE_{80}$ ), F108 ( $OE_{141}OP_{44}OE_{141}$ ), y F127 ( $OE_{101}OP_{56}OE_{101}$ ). Algunas de sus características se muestran en la Tabla 1.1.

PLURONIC	N° OE	N° OP	Peso molecular promedio total	Peso porcentual POE	Peso molecular promedio POP
<b>F68</b>	80	27	8400	80	1800
<b>F108</b>	141	44	14600	80	3000
<b>F127</b>	101	56	12600	70	3600

Tabla 1.1. Algunas características para los copolímeros tribloque usados en este trabajo: Pluronic F68, F108 y F127.

## 1.2. Técnica experimental

### 1.2.1. Generalidades de RMN

Muchas han sido las técnicas empleadas durante años para el estudio de sistemas biológicos. Dentro de estas técnicas, la *Resonancia Magnética Nuclear* (RMN) es una de las más poderosas debido a que es no invasiva y a que permite estudiar los sistemas desde el punto de vista molecular.

La resonancia magnética (30,31) es un fenómeno que se encuentra en sistemas magnéticos que poseen momento magnético y momento angular no nulo. El término resonancia magnética implica que estamos “en sintonía” con una frecuencia natural del sistema magnético, en este caso la frecuencia de precesión giroscópica o *frecuencia de Larmor* del momento magnético en un campo magnético estático externo.

La aplicación de un campo magnético  $\mathbf{B}$  a un momento magnético asociado a un espín nuclear  $\mathbf{M} = \gamma\hbar\mathbf{I}$ , donde  $\gamma$  es la razón giromagnética del núcleo,  $\hbar$  la constante de Planck dividida  $2\pi$  e  $\mathbf{I}$  es el operador momento angular, produce una energía de interacción de los núcleos de la forma  $-\mathbf{M}\cdot\mathbf{B}$ . Esta interacción es la base de la RMN. Entonces tenemos el siguiente Hamiltoniano:

$$H = -\mathbf{M}\cdot\mathbf{B} \quad [1.1]$$

Tomando que el campo sea  $B_0$  a lo largo de  $z$ , encontramos que:

$$H = -\gamma\hbar B_0 I_z \quad [1.2]$$

donde  $I_z$  es la componente  $z$  del operador  $\mathbf{I}$ . Los valores de energías permitidos son:

$$E = -\gamma\hbar B_0 m \quad m = I, I-1, \dots, -I \quad [1.3]$$

Uno espera ser capaz de detectar la presencia de tal conjunto de niveles de energía por algunas formas de absorción espectral. Para ello, necesitamos tener una interacción que pueda causar las transiciones entre niveles. Para satisfacer la conservación de la energía, la interacción debe ser dependiente del tiempo y de una frecuencia angular  $\omega$  tal que:

$$\hbar\omega = \Delta E \quad [1.4]$$

donde  $\Delta E$  es la diferencia de energía entre las energías Zeeman inicial y final.

Supóngase ahora un sistema de espines nucleares bajo la acción de un campo magnético estático  $B_0$  dirigido según el eje  $z$  del sistema de laboratorio, y considérese al sistema de espines como un sistema termodinámico en contacto con un reservorio (la red) con un gran número de grados de libertad. La condición de equilibrio está caracterizada por un estado de polarización con una magnetización  $M_0$  alineada a lo largo de la dirección de campo magnético externo.

En un experimento típico de RMN, se conduce energía hacia el sistema de espines en forma de pulsos  $B_1$  de radiofrecuencia (rf) aplicados en direcciones perpendiculares a  $B_0$ , con el objetivo de llevarlo a un estado de no equilibrio con la red. Es decir, se inducen transiciones entre los niveles de energía Zeeman. Al introducir una energía adicional al sistema, aparecen una componente longitudinal y una transversal de la magnetización relativa a  $B_0$ . Para retornar al estado de equilibrio térmico, el sistema de espines necesita disipar este exceso de energía lo que se describe como *relajación*. Entonces, si se le permite al sistema de espines interactuar entre ellos y entrar en contacto con la red durante un período de evolución, y se observan los resultados de dicha evolución, se comprueba que cumplen con las denominadas *ecuaciones fenomenológicas de Bloch* (32), las cuales describen la evolución temporal de las componentes de la magnetización en el sistema de laboratorio y se expresan en forma vectorial como:

$$\frac{d\vec{M}(t)}{dt} = \gamma \vec{M}(t) \times \vec{B}_0 + \frac{1}{T_1} [M_o - M_z(t)] \hat{z} - \frac{1}{T_2} M_{\perp}(t) \quad [1.5]$$

donde  $M_z$  y  $M_{\perp}$  son la componente paralela y la componente vectorial perpendicular a  $B_0$ , respectivamente.

Al resolver estas ecuaciones se obtiene la dependencia temporal de la magnetización en los planos longitudinal y transversal. Estas dependencias tienen forma exponencial, donde la constante de caída es el inverso de los denominados *tiempos de relajación*.

Así, la recuperación de la componente longitudinal ocurre con un tiempo característico denominado *tiempo de relajación longitudinal o espín-red*  $T_1$ , y está determinado por la eficiencia de los mecanismos de relajación espín-red, es decir, mecanismos que involucran una transferencia energética desde el sistema de espines a la red. Así, la evolución temporal de  $M_z$  está dada por:

$$M_z(t) = (M_z(0) - M_o) e^{-t/T_1} + M_o \quad [1.6]$$

donde  $M_z(0)$  es la componente longitudinal de la magnetización inmediatamente después de la aplicación del pulso de radiofrecuencia. Notar que si aplicamos lo que se denomina un pulso de  $\pi/2$ , es decir, le entregamos al sistema de espines la cantidad necesaria de energía para llevar la magnetización al plano transversal al eje impuesto por  $B_0$  (en nuestro caso, el plano x-y), entonces  $M_z(0) = 0$  y la ecuación [1.6] se simplifica de la siguiente manera:

$$M_z(t) = M_o \left( 1 - e^{-t/T_1} \right) \quad [1.7]$$

Por otro lado, el decaimiento de las componentes transversales, las cuales son proporcionales a la *señal de RMN o FID* (free induction decay), está caracterizado por la constante de tiempo llamada *tiempo de relajación transversal o espín-espín*  $T_2$ , y está determinado por procesos de interacción entre espines, como así también por fluctuaciones de la red. Así la evolución temporal de  $M_{\perp}$  está dada por:

$$M_{\perp}(t) = M_o e^{i\omega_o t} e^{-t/T_2} \quad [1.8]$$

donde  $\omega_o$  es la denominada frecuencia de Larmor y representa la frecuencia de precesión de la magnetización en torno a la dirección impuesta por el campo  $B_0$ .

### 1.2.2. Relaxometría con ciclado rápido de campo

La relaxometría con ciclado rápido de campo (también conocida como *fast field cycling o FFC*) es una técnica de RMN que nos permite obtener diversos tiempos de relajación del sistema de núcleos estudiado (en nuestro caso  $^1\text{H}$  o protones) en función del campo magnético externo aplicado (33). El

término relaxometría es normalmente utilizado en el contexto de mediciones de tiempos de relajación en general.

En la Figura 1.7 se representa el principio de funcionamiento de un experimento típico de relaxometría con ciclado de campo. La muestra es polarizada en un campo magnético  $B_p$ , tan alto como técnicamente sea posible. El proceso de relajación tiene lugar en un intervalo de tiempo que depende de las propiedades relaxométricas de la muestra. La señal remanente después de este intervalo de relajación es detectada en un campo  $B_d$ , de nuevo, tan alto como sea posible. Para la detección de la señal remanente luego de la relajación se observa la FID después de un pulso de  $\pi/2$  o el eco de espín producido por una secuencia de dos o más pulsos. Finalmente toma lugar el proceso de repolarización de la muestra, antes de que comience el ciclo nuevamente, pudiendo ser necesario un intervalo con el campo magnético desactivado por razones térmicas.

La técnica de ciclado de campo permite medir tiempos de relajación para campos magnéticos externos típicamente en el rango desde unos kHz hasta aproximadamente 40MHz (expresado en frecuencia de Larmor  $\nu_0 = \omega_0/2\pi$  de protones). Luego, en el rango de 40 a 900MHz el experimento puede ser suplementado por mediciones del tiempo de relajación realizadas con aparatos de RMN convencionales a campo fijo, siendo el límite de alta frecuencia determinado por los campos magnéticos alcanzables con imanes superconductores. Para medir a bajas frecuencias, es decir en el orden de algunos kHz o inferiores, existen limitaciones dadas por los valores de campos locales u otros campos externos que pudieran existir en el laboratorio y que no estén compensados correctamente. Entonces es importante determinar, antes que nada, el valor de los mismos, a los fines de obtener un límite inferior en el rango del campo magnético externo a utilizar en los experimentos. Para esto, se puede utilizar la técnica de relajación en el sistema rotante (34,35), la que permite obtener información de las componentes residuales del campo local a lo largo de la dirección impuesta por el campo magnético externo.

En esta tesis, hicimos uso de la técnica con ciclado rápido de campo para medir la dependencia de  $T_1$  en función de  $\nu_0$  y así obtener la curva de dispersión de la tasa de relajación espín-red  $R_1(\nu_0) = T_1^{-1}(\nu_0)$ . La importancia de obtener esa curva reside en lo que se describe a continuación. Partiendo de la teoría semiclásica de relajación (30), bajo ciertas aproximaciones como aleatoriedad de los procesos dinámicos y la consideración de que los campos locales del sistema son mucho menores que el campo externo aplicado, la inversa del tiempo de relajación espín-red ( $T_1^{-1}$ ) se puede describir en términos de ciertas funciones de la frecuencia de Larmor, conocidas como densidades espectrales. Estas funciones son las transformadas de Fourier de las funciones de correlación de cada uno de los procesos dinámicos del sistema (contienen la información de la dinámica de la red). De esta manera, conociendo la dependencia de  $T_1^{-1}$  en función de la frecuencia, o curva de dispersión, se obtiene información de los procesos dinámicos que intervienen en la relajación del sistema de espines y del rango de frecuencias en el cual son efectivos.

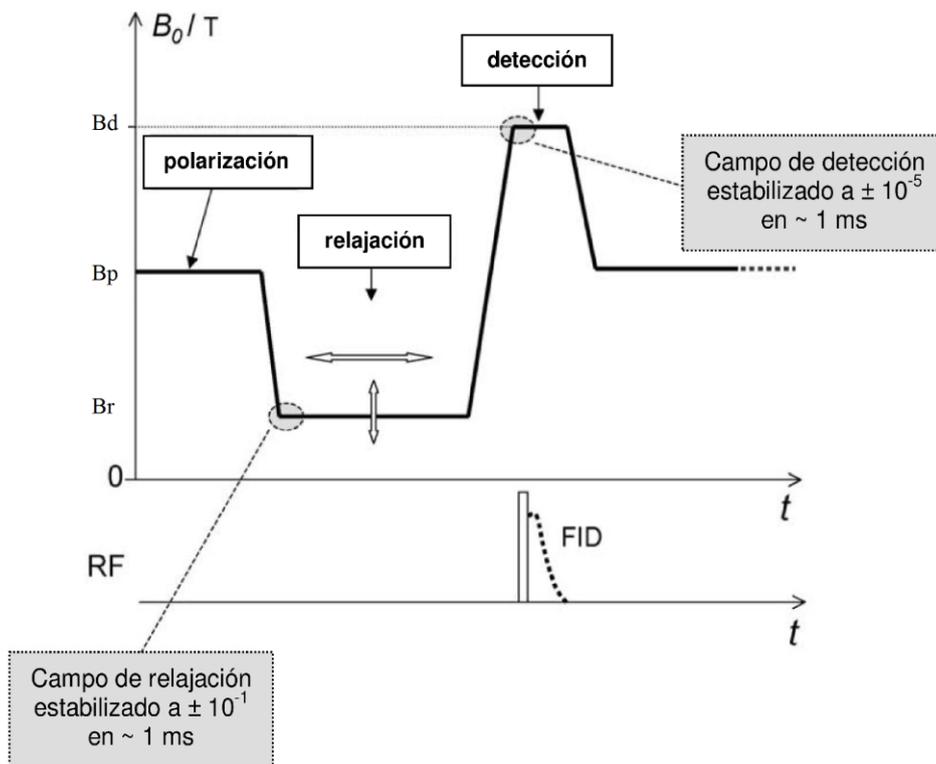


Figura 1.7. Representación esquemática de un ciclo típico del campo magnético principal  $B_0$  generado con un relaxómetro de RMN con ciclado de campo (33).

# Capítulo 2

## Efectos del colesterol en membranas lipídicas

### 2.1. Efectos generales

Las membranas biológicas son entidades bastante complejas que contienen diversos lípidos y proteínas, siendo los primeros el principal componente. Entre los lípidos presentes, el colesterol juega un rol muy importante debido a su participación en la formación de dominios que parecieran ser primordiales en la regulación de la actividad de ciertas proteínas de la membrana (36). Considerando la importancia de entender la influencia del colesterol en las propiedades de la membrana, se usan modelos simples de membranas formados solo por lípidos y colesterol (36).

El control sobre la estabilidad física de los liposomas se convierte en un requisito previo importante para el uso efectivo de los mismos como portadores de drogas. En consecuencia, el colesterol es a menudo incluido en la formulación de liposomas para dar más rigidez a la bicapa y para tratar de mejorar la estabilidad de los mismos. Por lo tanto, nuevamente se ve la importancia de conocer la acción de colesterol en la membrana.

Entre los principales efectos del colesterol en una bicapa lipídica en fase *líquido cristalina desordenada* ( $l_d$ ), podemos mencionar: el aumento en el parámetro de orden de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos (37–49) mediante la reducción del número de isomerizaciones trans-gauche (50). Esto lleva a una disminución en la movilidad de los primeros grupos  $\text{CH}_2$  de estas cadenas y a un incremento en el espesor de la bicapa, siendo este efecto más fuerte para lípidos saturados (45,51,52). Además, el colesterol genera una disminución del área efectiva por lípido, lo que se denomina efecto de condensación del colesterol (53,54); la disminución de la interacción y del espacio libre entre lípidos (53,55); el incremento de la constante elástica y la disminución de la permeabilidad de la membrana (47,54). Por otro lado, la influencia del colesterol en la dinámica de los lípidos no es drástica en los procesos de difusión traslacional y rotacional, pues estos continúan siendo como si ocurrieran en una fase fluida, sin presencia de colesterol (56–59). Por otro lado, se ha demostrado que el colesterol tiene una influencia significativa en los procesos dinámicos de lípidos en la escala de tiempo de sub-nanosegundos (60), como lo son el movimiento de un defecto de la cadena a lo largo de las cadenas hidrocarbonadas y la rotación parcial de la molécula como un todo, entre otros, los cuales probablemente sean importantes para el transporte lateral y trans-bicapa de moléculas pequeñas. Adicionalmente, podemos mencionar como efecto del colesterol, la aparición de una nueva fase a ciertos valores de temperatura y/o valores de concentración de colesterol, denominada fase *líquido cristalina ordenada* ( $l_o$ ) (61,62). En esta fase las cadenas de los lípidos están altamente ordenadas, pero las tasas de movimientos traslacionales y rotacionales son similares a los de la fase fluida ( $l_d$ ).

## 2.2. Estudio de la dinámica molecular de lípidos en membranas con colesterol

El efecto del colesterol en la dinámica de membranas lipídicas ha sido intensamente estudiado en numerosos trabajos utilizando un amplio rango de técnicas experimentales, cada una de ellas sensibles a una escala de tiempo dinámica particular. Por ejemplo, las *técnicas de fluorescencia*, como FRAP (en inglés, fluorescence recovery after photo-bleaching), han sido aplicadas en muchas composiciones y estructuras de membrana, incluyendo vesículas unilamelares gigantes y pequeñas, con la cual se ha obtenido información sobre la difusión de los lípidos (un proceso dinámico en una escala de tiempo intermedia) y sobre el ordenamiento de sus cadenas por la presencia del colesterol (55,63). Sin embargo, el uso de marcadores en las técnicas de fluorescencia, además de modificar la composición binaria de la membrana, podría alterar las propiedades de la misma que están siendo estudiadas (64). Entre las *técnicas espectroscópicas* usadas para estudiar difusión en membranas se encuentra la Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE) (65–67), pero nuevamente requiere del uso de marcadores, además de ser aplicada típicamente para el estudio de vesículas multilamelares (las cuales no representan un buen sistema modelo de membranas), ni tampoco son de gran utilidad como transportadores de fármacos. Por otro lado, las *técnicas de RMN* para el estudio de dinámica en membranas con colesterol también han sido ampliamente aplicadas, pues son sensibles a procesos en una extensa gama de escalas de tiempo. Entre ellas encontramos: espectroscopia de RMN (68); RMN con gradiente de campo pulsado (PFG-NMR) utilizada para estudiar difusión lateral en el rango de  $\sim 10^{-5}$ s, pero por lo general sólo para bicapas orientadas macroscópicamente (4,69) ó vesículas multilamelares (70,71); así también, espectroscopia de RMN con gradiente de campo pulsado y rotación al ángulo mágico (su sigla en inglés, PFG-MAS-NMR) (70,71). Este último método combina la alta resolución del MAS con la capacidad de medir coeficientes de difusión para cada componente en el sistema, ya sean esteroides ó fosfolípidos, sin el uso de marcadores perturbantes. Por otro lado, la relaxometría con ciclado de campo de alta resolución, en la cual una contribución importante para la relajación es la anisotropía del corrimiento químico, permite estudiar la dinámica de sectores moleculares individuales debido a su resolución espectroscópica (72–74), mientras que la técnica de relaxometría con ciclado de campo de baja resolución o ciclado rápido de campo (FFC-NMR), si bien no presenta resolución espectroscópica, permite estudiar procesos dinámicos lentos como lo es la dinámica colectiva de la membrana debido a la escala temporal a la cual es sensible la técnica. De hecho, presenta la ventaja de ser sensible a procesos en un amplio rango de escalas de tiempo, desde  $10^{-3}$  a  $10^9$ s y ha sido aplicada exitosamente para estudiar dinámica molecular en gran cantidad de materiales (18,19,33).

### 2.2.1. Enfoques sobre la acción del colesterol en la dinámica de los lípidos

Si consideramos liposomas unilamelares compuestos de dos componentes, es decir, fosfolípidos y colesterol, es posible encontrar en la literatura dos descripciones diferentes de cómo se modifica la dinámica molecular de los lípidos por la presencia del colesterol. Según algunos autores, el sistema permanece en la fase líquido cristalina desordenada ( $l_d$ ) hasta una concentración de colesterol del 40%mol para lípidos insaturados y del 5-15%mol para lípidos saturados, a temperatura ambiente (4,75), en donde los parámetros asociados a los diferentes procesos dinámicos son modificados de una manera promedio sobre toda la población de lípidos. Por otro lado, existen otros trabajos (41–43,76,77) en los cuales se define un “radio de acción” ( $R_A$ ) alrededor de cada molécula de colesterol y por lo tanto la población de lípidos es dividida entre los lípidos que no son afectados por la presencia del mismo y los que sí. Los primeros son comúnmente considerados en una fase  $l_d$ , mientras que los segundos poseen una estructura más rígida y ordenada por lo que son descritos en una fase líquida cristalina ordenada ( $l_o$ ). Por lo tanto, estos trabajos plantean la idea de que cada molécula de colesterol ordena solo un pequeño número de lípidos, pudiéndose extender su acción un poco más allá de los

primeros vecinos, pero con un efecto que decae gradualmente con la distancia a la molécula de colesterol.

Hasta el momento, el enfoque planteado en el cual se divide la población de lípidos entre lípidos afectados y no afectados por el colesterol, ha sido reportado como resultado de simulaciones numéricas (41–43,76,77), sin tener fundamentación experimental. Las simulaciones computacionales de dinámica molecular tienen el potencial de proporcionar propiedades estructurales y dinámicas de las membranas lipídicas a escala atómica, lo cual complementa y ayuda en la interpretación de los resultados experimentales. Sin embargo los métodos computacionales siguen siendo algo limitados, incluso hoy en día, pues el número de moléculas incluidas (en el orden de los cientos de moléculas de lípidos) sigue siendo bastante bajo, al igual que el tiempo total de las simulaciones (en el rango de los cientos de nanosegundos). Consecuentemente, el objetivo de nuestro trabajo es tratar de elucidar, basándonos en los resultados de nuestros experimentos, si en una membrana compuesta de fosfolípidos y colesterol tenemos una o dos poblaciones de lípidos. Para ello, se realizaron dos interpretaciones diferentes de los perfiles de dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones para este tipo de sistema, considerando los dos enfoques mencionados anteriormente, como se describe en las siguientes secciones.

## 2.2.2. Modelo para interpretar la dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones obtenida con la técnica de ciclado de campo

En trabajos previos (18,19) se ha descrito y validado un modelo para interpretar la dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones obtenida con la técnica de RMN con ciclado de campo, para liposomas unilamelares de un solo componente, en la fase líquido cristalina desordenada ( $l_d$ ). El modelo fue validado con éxito para liposomas preparados con diferentes lípidos (DMPC y DOPC), tamaños (100-200 nm) y temperaturas, usando valores de la literatura para las diferentes constantes físicas y parámetros involucrados en el modelo. Por lo tanto, se demostró que este modelo es una herramienta útil para estudiar la dinámica y las propiedades viscoelásticas de membranas de un solo componente. En este modelo, la tasa de relajación espín-red,  $R_1$ , puede describirse como:

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = A_{FO} J_{FO}(\omega) + A_D J_D(\omega) + A_R J_R(\omega) + A_{MR} \quad [2.1]$$

donde  $T_1$  es el tiempo de relajación espín-red y  $J_{FO}(\omega)$ ,  $J_D(\omega)$  y  $J_R(\omega)$  son las densidades espectrales correspondientes a los procesos dinámicos  $FO$ ,  $D$  y  $R$ , respectivamente, considerados en el modelo. Específicamente,  $FO$  corresponde al proceso denominado fluctuaciones de orden, es decir, fluctuaciones en la dirección del vector normal a la membrana que indica un promedio del orden orientacional local de los lípidos, y son debidas a movimientos colectivos de los lípidos que generan fluctuaciones de forma de la vesícula.  $D$  y  $R$  corresponden a la difusión en una superficie curva y rotación de los lípidos en la membrana del liposoma, respectivamente. Los  $A_j$  son sus correspondientes amplitudes definidas como  $(9/8r^6) \gamma^4 \hbar^2 (\mu/4\pi)^2$  donde  $r_j$  es la distancia efectiva  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  relevante para cada proceso dinámico,  $\omega = 2\pi\nu_0$  es la frecuencia de Larmor y  $A_{MR}$  es una constante que corresponde a movimiento rápidos, los cuales no son dispersivos en el rango de frecuencias consideradas. La densidad espectral correspondiente a las fluctuaciones de orden está dada por el modelo de Vilfan (78):

$$J_{FO}(\omega) = \frac{k_B T}{2\pi\kappa} \sum_{l=2}^{l_{\max}} \frac{l(l+1)(2l+1)}{(l^2+l-2)(l^2+l+\sigma)} \frac{\tau_l}{(1+\omega^2\tau_l^2)} \quad [2.2]$$

donde la sumatoria corre sobre las contribuciones de cada uno de los modos hidrodinámicos, caracterizados por el índice  $l$ , estando su máximo valor determinado por las dimensiones moleculares

( $l_{max} \approx \pi R_o/a$ , con  $a$  siendo la distancia promedio entre moléculas y  $R_o$  el radio de la vesícula).  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura,  $\kappa$  es la constante elástica de flexión,  $\sigma$  es la tensión lateral efectiva, y  $\tau_l$  está dado por:

$$\tau_l = \frac{\eta R_o^3}{\kappa} \frac{(2l+1)(2l^2+2l-1)}{l(l+1)(l+2)(l-1)(l^2+l+\sigma)} \quad [2.3]$$

siendo  $\eta$  la viscosidad del medio en el que se suspenden las vesículas.

La densidad espectral correspondiente a la difusión en una superficie curva está dada por el modelo de Halle, que bajo la condición de solución isotrópica de vesículas, se reduce a una función Lorentziana (79):

$$J_D(\omega) = \frac{1}{5} \left[ \frac{\tau_D}{1+(\omega\tau_D)^2} + 4 \frac{\tau_D}{1+(2\omega\tau_D)^2} \right] \quad [2.4]$$

donde  $\tau_D$  es el tiempo de correlación característico asociado al proceso de difusión y está dado por:

$$\tau_D = \left[ \frac{6D}{R_o^2} + \frac{3k_B T}{4\pi\eta R_o^3} \right]^{-1} \quad [2.5]$$

siendo  $D$  la constante de difusión.

Por último, la densidad espectral correspondiente a las rotaciones moleculares está dada por una función Lorentziana:

$$J_R(\omega) = \left[ \frac{\tau_R}{1+(\omega\tau_R)^2} + 4 \frac{\tau_R}{1+(2\omega\tau_R)^2} \right] \quad [2.6]$$

donde  $\tau_R$  es el tiempo de correlación característico asociado al proceso de rotación. En el modelo dado por la ecuación [2.1], la tasa de relajación total puede escribirse como una sumatoria de los aportes de los tres procesos dinámicos considerados dado que se puede demostrar que las correlaciones cruzadas son despreciables (18).

Consideremos ahora liposomas con colesterol con la intención de extender el modelo al caso de membranas con dos componentes. Las curvas experimentales para  $1/T_1$  obtenidas con la técnica de FFC-NMR para este sistema fueron analizadas por medio de dos tratamientos diferentes.

En el primero, llamado “*análisis de una sola población*”, el modelo de la ecuación [2.1] se aplicó bajo la suposición de que la membrana estaba en la fase líquido cristalina desordenada ( $l_d$ ) aún con la presencia del colesterol. Para los parámetros físicos relevantes, se utilizaron valores de la literatura obtenidos con diversas técnicas, que proporcionaban valores promedios sobre toda la población de lípidos modulados de acuerdo al contenido de colesterol.

En el segundo tratamiento, llamado “*análisis de las dos poblaciones*”, consideramos dos diferentes tipos de poblaciones de lípidos; una de ellas formada por los lípidos fuertemente afectados por la presencia de una molécula de colesterol cercana, y la otra formada por los lípidos que están lo suficientemente lejos de una molécula de colesterol como para ser considerados completamente no afectados. El límite entre estas dos poblaciones o regiones se define por medio de un área de acción del colesterol, determinada por un radio de acción ( $R_A$ ), centrada en cada molécula de colesterol. Una representación gráfica de la organización de los lípidos y el colesterol en este análisis se muestra en la Figura 2.1.

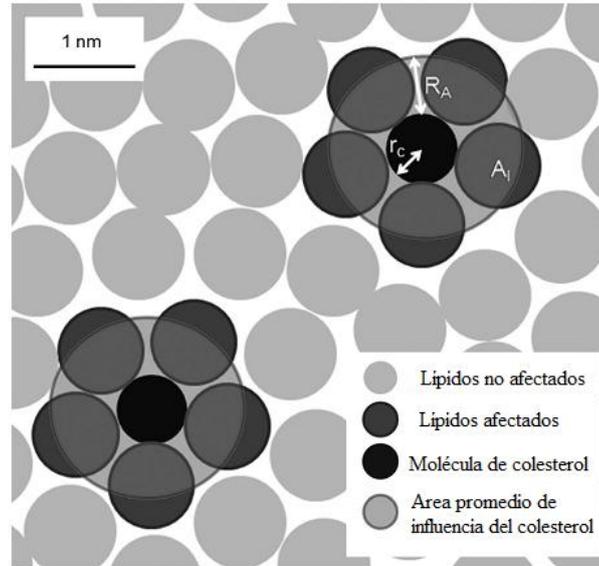


Figura 2.1. Representación gráfica del *análisis de las dos poblaciones*. La vista es perpendicular al plano de la bicapa. Los discos representan los lípidos, las moléculas de colesterol y el área de acción del colesterol, según se indica en la figura con la escala de grises. El punto de vista es desde una posición perpendicular al plano de la bicapa.

Considerando que las fronteras entre estos dos dominios pueden ser atravesadas por los lípidos (71), vamos a suponer que hay intercambio de lípidos entre estas dos poblaciones pero el tiempo en el cual un lípido se ordena/desordena al entrar/salir del área de acción de una molécula de colesterol es mucho más corto que el tiempo del experimento, permitiéndonos así tener dos poblaciones perfectamente distinguibles. Los lípidos no afectados se consideraron completamente libres de cualquier influencia del colesterol, es decir, fueron considerados en la fase de  $l_d$  teniendo la misma dinámica ya descrita para liposomas de un solo componente. Los lípidos afectados, que poseen un orden local mucho mayor debido a la influencia del colesterol, se consideraron, a los efectos del cálculo, en la fase  $l_o$ . Cabe destacar, que los dominios definidos en este análisis no están relacionados con los dominios llamados *rafts* (80–82) que presentan fase  $l_o$  y están formados básicamente por colesterol y lípidos saturados.

En este análisis, se aplicó el modelo original modificado según lo describe la ecuación [2.7], tal que los parámetros físicos relevantes correspondientes a la dinámica de los lípidos afectados fueron obtenidos de la literatura para lípidos en la fase  $l_o$ . Así, la tasa de relajación,  $R_1$ , fue descrita como:

$$\begin{aligned}
 R_1^{Total} &= R_1^{naf} + R_1^{af} \\
 &= \frac{N^{naf}}{N} \left( A_{FO}^{naf} J_{FO}^{naf}(\omega) + A_D^{naf} J_D^{naf}(\omega) + A_R^{naf} J_R^{naf}(\omega) \right) \\
 &+ \frac{N^{af}}{N} \left( A_{FO}^{af} J_{FO}^{af}(\omega) + A_D^{af} J_D^{af}(\omega) + A_R^{af} J_R^{af}(\omega) \right) + A_{MR}^{Total}
 \end{aligned} \tag{2.7}$$

donde los superíndices *af* y *naf* significan lípidos afectados y no afectados, respectivamente;  $N$  representa el número total de lípidos en la muestra;  $N^{naf}$  y  $N^{af}$  representan el número de lípidos no afectados y afectados respectivamente y están dados por las siguientes expresiones:

$$N^{naf} = N - N^{af} \tag{2.8}$$

$$N^{af} = N_C \cdot \frac{A}{A_l} \quad [2.9]$$

donde  $N_C$  es el número total de moléculas de colesterol,  $A = \{\pi \cdot (R_A + r_C)^2 - \pi \cdot r_C^2\}$  es el área efectiva o promedio de acción del colesterol,  $r_C$  es el radio promedio de una molécula de colesterol y  $A_l$  es el área promedio de los lípidos afectados.

### 2.2.3. Experimentos de dispersión de la tasa de relajación

#### 2.2.3.1. Preparación de la muestra

Se prepararon liposomas suspendidos en agua deuterada ( $D_2O$ ) compuestos de lípidos de dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) y colesterol a diferentes concentraciones, siendo los radios de las vesículas de 68 y 80 nm. La preparación de las vesículas fue realizada por Carla Meledandri, del Instituto Nacional de Biotecnología Celular, de Dublin, Irlanda. El método de preparación se describe a continuación, el cual puede separarse en tres etapas:

1. Se disolvieron 70,6mg de DOPC y, 10 y 25% mol de colesterol, en 2mL de cloroformo ( $CHCl_3$ ) y se secó con corriente de nitrógeno ( $N_2$ ), dejándose luego unas horas en vacío para terminar de eliminar el solvente. Esto se hizo para formar capas monomoleculares en las paredes del tubo cónico, para favorecer la hidratación cuando luego se le agregue la solución acuosa. El lípido es bastante insoluble en agua, y si al polvo del lípido agregamos directamente el buffer acuoso, va a tender a excluirse del agua formando grandes agregados difíciles de desarmar.

2. Se hidrató la muestra agregando el buffer acuoso (1,5mL de  $D_2O$ ) más tratamiento térmico. El tratamiento térmico consistió en 5 ciclos de shock térmico (aire líquido por unos minutos-baño caliente a  $35^\circ C$  por unos minutos), y finalmente calentamiento durante una noche a  $40^\circ C$ . Estas temperaturas deben estar por encima de la temperatura de transición del lípido  $T_m$  ( $T_m = -18,3^\circ C$  para DOPC). Esta etapa se realiza para hidratar el lípido, donde todo el tratamiento térmico favorece que el agua interactúe bien con los grupos polares de los fosfolípidos. Se formó así una suspensión del lípido, en forma de liposomas multilamelares, que son como cebollas, con múltiples bicapas de lípidos superpuestas. La distribución de tamaños de estas vesículas esféricas no es uniforme, es decir, hay una distribución amplia del número de bicapas por liposoma.

3. Se llevó a cabo la extrusión pasando las vesículas multilamelares por membranas de policarbonato con poros de un cierto diámetro. Esto se hace para obligar a las vesículas a adoptar una forma esférica con diámetro promedio definido por las membranas de policarbonato, por lo que a las vesículas no les queda otra que tener una única bicapa. De esta manera se forman las vesículas unilamelares. Los tamaños promedios de las mismas fueron determinados por medio de mediciones de dispersión dinámica de luz (dynamic light scattering, DLS), en un equipo de dispersión dinámica de luz láser (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, UK) usando un ángulo de detección de  $173^\circ$  y provisto de un láser He-Ne operando a una longitud de onda de 633 nm.

#### 2.2.3.2. Modelado de la dispersión de la tasa de relajación

Las curvas experimentales de los perfiles de dispersión de  $R_1$  fueron interpretadas a partir de los modelos descriptos anteriormente (ver sección 2.2.2). Se adoptó el modelo sistemático exitosamente utilizado en trabajos previos (18,19) con pequeñas modificaciones, como se describe a continuación:

- (i) Se fijaron los parámetros físicos relevantes, que aparecen en el modelo, dentro de sus intervalos más probables, usando valores de la literatura.

- (ii) Se ajustó la contribución independiente de la frecuencia (una constante) y se seleccionó el valor óptimo para cada parámetro dentro de su intervalo más probable.

(iii) Se hicieron ajustes finos de las amplitudes (pre-factores) de cada una de las contribuciones de las densidades espectrales. La optimización de la curva se obtuvo mediante la minimización manual de la suma de las diferencias al cuadrado (SDC) entre la curva simulada y los datos experimentales, definida según la ecuación [2.10]:

$$SDC = \sum_i (R_{li}^{exp} - R_{li}^{mod}) \quad [2.10]$$

donde  $R_{li}^{exp}$  y  $R_{li}^{mod}$  representan los valores experimentales y modelados de  $R_l$  a la frecuencia  $\nu_{0i}$ , respectivamente. Mientras menor sea el valor de SDC, la curva modelada reproduce de manera más acertada a los datos experimentales.

Los errores fueron determinados mediante el análisis de la sensibilidad de la curva modelada a las variaciones de cada parámetro. El intervalo de error obtenido para cada parámetro corresponde al máximo desplazamiento de la curva modelada dentro del error experimental (aproximadamente el tamaño de los puntos que se observan en los gráficos).

### 2.2.3.3. Medición de la tasa de relajación espín-red en función de la frecuencia de Larmor en liposomas con colesterol

Las dispersiones de la tasa de relajación de protones se midieron usando la técnica de RMN con ciclado rápido de campo (33) con un relaxómetro Spinmaster FFC- 2000 Fast Field-Cycling NMR (Stelar; Mede, Italia) para un volumen de muestras de liposomas de 1 ml. Las mediciones mostradas en este capítulo fueron realizadas por Carla Meledandri, del Instituto Nacional de Biotecnología Celular, de Dublin, Irlanda. En todos los casos se usó un campo magnético de polarización de 0,329T (equivalente a 14MHz para  $^1\text{H}$ ), que fue encendido durante un período de 0,5s para generar la magnetización en la muestra. El valor del campo de adquisición fue 0,217T (9,25MHz). Una velocidad de conmutación de campo de  $0,47\text{T}\cdot\text{ms}^{-1}$  ( $20\text{MHz}\cdot\text{ms}^{-1}$ ) fue utilizado en todos los casos, con un tiempo de conmutación de 1,5ms para permitir que el campo magnético se re-establezca en un valor de equilibrio. Una velocidad de digitalización de 1 MHz se utilizó para la adquisición, con un tiempo muerto de alrededor de 20  $\mu\text{s}$ . Para la FID se tomaron muestras de 512 puntos en el intervalo de tiempo 25- 540 $\mu\text{s}$ , obtenida mediante un pulso de  $90^\circ$  de 7,5  $\mu\text{s}$  de duración.

Los valores de  $R_1$  fueron determinados de las curvas de recuperación de la magnetización por ajuste de cuadrados mínimos. Estos valores no fueron sensibles a la ventana temporal sobre la cual la FID fue muestreada. El proceso de relajación de espín para todas las muestras resultó ser monoexponencial, dentro del error, a todas las frecuencias. La temperatura de la muestra fue controlada dentro de los 0,5K aproximadamente utilizando el controlador de temperatura variable Spinmaster. Las temperaturas se calibraron externamente utilizando una termocupla de Cu-Al en un tubo de RMN de 10 mm. El tiempo para cada experimento estuvo limitado por la estabilidad de las suspensiones. Después de varios días se observaron cambios en  $R_1$  y en el tamaño hidrodinámico. Los datos presentados aquí fueron obtenidos típicamente de 64 repeticiones para cada una de las frecuencias y el tiempo de medición total fue de 24h para cada curva de dispersión, durante el cual las suspensiones no cambiaron.

Los perfiles se midieron dentro del rango de frecuencias de 30 kHz a 15,2 MHz, donde podemos asegurar que las mediciones no están afectadas por la presencia de los campos locales (18). Los liposomas utilizados se encontraban en la fase líquido cristalina y estaban compuestos de DOPC y colesterol a las concentraciones de 10%mol y 25%mol. Los experimentos se realizaron en suspensiones de liposomas con radios hidrodinámicos promedios de 80 y 68 nm, a 298 K.

Cabe señalar que la técnica de RMN con ciclado rápido de campo es una técnica de baja resolución debido al rango de frecuencias en el cual trabaja por lo tanto, la señal adquirida no puede distinguir las contribuciones de los protones de los diferentes componentes de la muestra. En nuestras muestras, tenemos protones en los lípidos, en las moléculas de colesterol y en el DOH formado. Este último se forma debido a la cinética de intercambio de protones entre moléculas de  $\text{D}_2\text{O}$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . Asimismo, los protones de los lípidos son los más abundantes, por lo que podemos considerar que la señal que medimos proviene básicamente de los lípidos. Además, la presencia de los protones del colesterol y

del DOH no altera significativamente los perfiles de dispersión. Mientras las moléculas de colesterol, como así las posibles moléculas de DOH ligadas a los lípidos, siguen la dinámica de los lípidos en primera aproximación, la contribución a la relajación debida a las moléculas libres de DOH no es dispersiva (constante).

### Análisis de una sola población

Las curvas experimental y modelada usando éste análisis para liposomas de DOPC a 298 K con: (a) 10%mol de colesterol y radio  $R_0 = 80$  nm, y (b) 25%mol de colesterol y radio  $R_0 = 68$  nm, se muestran en las Figuras 2.2 y 2.3, respectivamente. Los correspondientes parámetros del modelo están dados en las Tablas 2.1 y 2.2.

De las curvas simuladas se observa que, considerando el mismo modelo usado para liposomas sin colesterol (18,19), es posible reproducir la curva experimental muy bien para ambos porcentajes de colesterol. Los valores numéricos de todos los parámetros se encuentran dentro del rango esperado de acuerdo a la literatura (comparar Tablas 2.1 y 2.2 con tabla 2.3). Notar que los valores correspondientes a 0% de colesterol en las tablas 2.1 y 2.2 fueron adaptados para tener en cuenta la diferencia de tamaño de los liposomas, utilizando el modelo establecido para la dependencia del tamaño en membranas de un solo componente (19).

Las variaciones de los parámetros, debidas a la presencia del colesterol, mostrados en las Tablas 2.1 y 2.2, sugieren cambios en las propiedades de la membrana, de acuerdo con la literatura (ver Tabla 2.3). Entre ellas encontramos que la constante elástica se incrementa (más rigidez en la membrana), la constante de difusión traslacional disminuye y el tiempo de correlación rotacional aumenta.

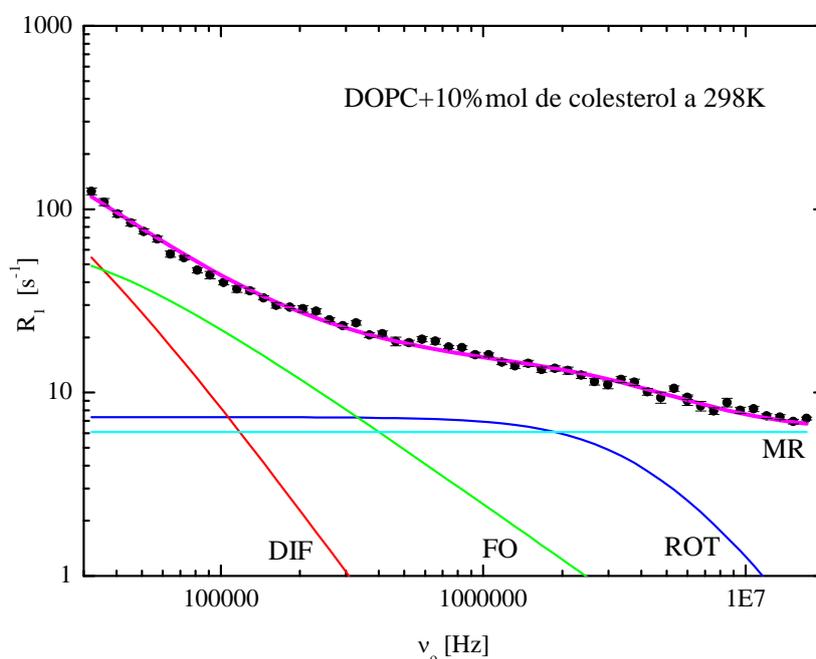


Figura 2.2 Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DOPC con 10%mol de colesterol, radio  $R_0 = 80$ nm a 298K (●). La curva de dispersión modelada usando el análisis de una sola población es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros correspondientes se muestran en la Tabla 2.1.

Parámetros	Valores obtenidos del modelado		Variación porcentual
% molar de colesterol	0	10	-----
$\eta$ D <sub>2</sub> O [Kg/s.m]	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	-----
$\sigma$	0	0	-----
$a$ [nm]	1	1	-----
$\kappa$ [J]	$(5,4 \pm 0,8) \times 10^{-20}$	$(6,3 \pm 0,9) \times 10^{-20}$	17
$A_{FO}$ [s <sup>-2</sup> ]	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^9$	40
$D$ [m <sup>2</sup> /s]	$(13 \pm 4) \times 10^{-12}$	$(7 \pm 2) \times 10^{-12}$	-46
$\tau_D$ [s]	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	71
$A_D$ [s <sup>-2</sup> ]	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(1,2 \pm 0,4) \times 10^9$	20
$\tau_R$ [s]	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(2,1 \pm 0,5) \times 10^{-8}$	91
$A_R$ [s <sup>-2</sup> ]	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^8$	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^8$	-30
$A_{MR}$ [s <sup>-1</sup> ]	$(5 \pm 1)$	$(6,1 \pm 0,9)$	22

Tabla 2.1. Parámetros correspondientes al modelado de la dispersión de la tasa de relajación usando el *análisis de una sola población*, para liposomas de  $R_0 = 80\text{nm}$  compuestos de DOPC y 10 % mol de colesterol, a 298 K (ver Figura 2.2). Los parámetros para liposomas de DOPC con 0mol% de colesterol son mostrados a modo de comparación (18,19).

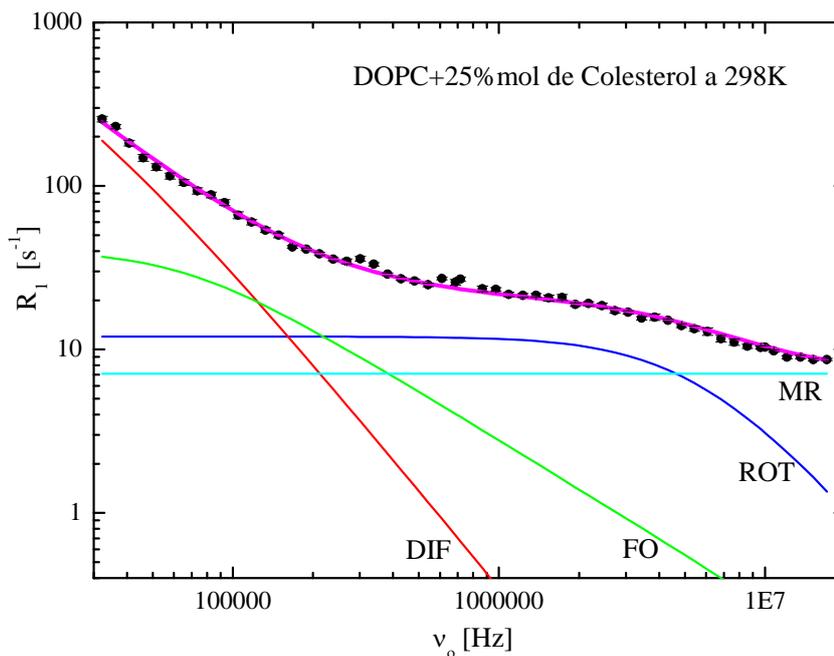


Figura 2.3. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DOPC con 25%mol de colesterol, radio  $R_0 = 68\text{nm}$  a 298K (●). La curva de dispersión modelada usando el *análisis de una sola población* es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 2.2.

Parámetros	Valores obtenidos del modelado		Variación porcentual
% molar de colesterol	0	25	-----
$\eta$ D <sub>2</sub> O [Kg/s.m]	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	-----
$\sigma$	0	0	-----
$a$ [nm]	1	1	-----
$\square$ [J]	$(5,4 \pm 0,9) \times 10^{-20}$	$(8 \pm 1) \times 10^{-20}$	48
$A_{FO}$ [s <sup>-2</sup> ]	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(2,0 \pm 0,4) \times 10^9$	100
$D$ [m <sup>2</sup> /s]	$(8,8 \pm 0,3) \times 10^{-12}$	$(5,5 \pm 0,8) \times 10^{-12}$	-38
$\tau_D$ [s]	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	43
$A_D$ [s <sup>-2</sup> ]	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^9$	$(3,5 \pm 0,3) \times 10^9$	170
$\tau_R$ [s]	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	45
$A_R$ [s <sup>-2</sup> ]	$(2,0 \pm 0,3) \times 10^8$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^8$	-25
$A_{MR}$ [s <sup>-1</sup> ]	(5±1)	(7,1±0,8)	42

Tabla 2.2. Parámetros correspondientes al modelado de la dispersión de la tasa de relajación usando el *análisis de una sola población*, para liposomas de  $R_0 = 68\text{nm}$  compuestos de DOPC y 25%mol de colesterol, a 298 K (ver Figura 2.3). Los parámetros para liposomas de DOPC con 0mol% de colesterol son mostrados a modo de comparación (18,19).

Parámetros	Rango de los parámetros en la fase $l_d$			Referencias	Rango de los parámetros en la fase $l_o$	Referencias
	0	10	25			
% molar de colesterol	0	10	25		$\geq 35$ $\leq 50$	
$\eta$ D <sub>2</sub> O [Kg/s.m]	$(0,8-1,3) \times 10^{-3}$	$(0,8-1,3) \times 10^{-3}$	$(0,8-1,3) \times 10^{-3}$	(83,84)	$(0,8-1,3) \times 10^{-3}$	(83,84)
$\sigma$	0-25	0-25	0-25	(10,78,85)	0-25	(10,78,85)
$a$ [nm]	1-1,2	1-1,2	1-1,2	(86-89)	1-1,2	(86-89)
Área del colesterol [nm <sup>2</sup> ]	-----	0,32-0,39	0,32-0,39	(39,41,42,90)	0,32-0,39	(39,41,42,90)
Área por lípido [nm <sup>2</sup> ]	0,71-0,74	0,7-0,72	0,64-0,69	(54,90-92)	-----	-----
$\kappa$ [J]	$0,4 \times 10^{-20}$ - $1 \times 10^{-19}$	$(6,1-8,8) \times 10^{-20}$	$(6,4-8) \times 10^{-20}$	(47,54,91,93,94)	$3,5\kappa_{ld} \leq \kappa_{lo} \leq 6\kappa_{ld}$	(56,95)
$A_{FO}$ [s <sup>-2</sup> ]	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	(96,97)	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	(96,97)
$D$ [m <sup>2</sup> /s]	$10^{-12}$ - $10^{-10}$	$(5,8-7) \times 10^{-12}$	$(4,9-6) \times 10^{-12}$	(57,59,69,84,86,98-100)	$D_{ld}/4 \leq D_{lo} \leq D_{ld}/2$	(51,55,57,75,101)
$A_D$ [s <sup>-2</sup> ]	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	(96,97)	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	(96,97)
$\tau_R$ [s]	$10^{-10}$ - $10^{-7}$	$10^{-10}$ - $10^{-7}$	$10^{-10}$ - $10^{-7}$	(17,102,103)	$2\tau_{Rld} \leq \tau_{Rlo} \leq 4\tau_{Rld}$	(101)
$A_R$ [s <sup>-2</sup> ]	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	(96,97)	$1,6 \times 10^7$ - $9,9 \times 10^9$	(96,97)
$R_A$ [nm]	-----	0,5-3		(41-43,76,77,104)	0,5-3	(41-43,76,77,104)
Numero de lípidos afectados por cada molécula de colesterol	-----	1-9		(43,76,105)	1-9	(43,76,105)

Tabla 2.3. Resumen de los intervalos más probables para cada parámetro físico en las fases  $l_d$  y  $l_o$ , con sus correspondientes referencias.

### Análisis de las dos poblaciones

Con este análisis, se modelaron curvas para diferentes cantidades relativas de lípidos afectados y no afectados por el colesterol, según el siguiente procedimiento:

(i) Se fijaron los parámetros correspondientes a la dinámica de los lípidos no afectados. Estos fueron los mismos que aquellos para 0% de colesterol, adaptados según el tamaño del liposoma.

(ii) Se fijaron los parámetros correspondientes a la dinámica de los lípidos afectados dentro de sus intervalos más probables, de acuerdo con los valores de la literatura para la fase  $l_o$ .

(iii) Se seleccionaron uno de los diez valores entre 10% y 100% para la fracción de lípidos afectados, lo cual es equivalente a seleccionar un valor para el radio de acción del colesterol,  $R_A$  (ver ecuación [2.9]).

(iv) Se determinó la curva óptima para cada valor de  $R_A$  por medio de ajustar los parámetros de los lípidos afectados, dentro de sus intervalos más probables. Esto se hizo de forma manual mediante la búsqueda del mejor acuerdo entre el modelado y los datos experimentales. A partir de esta curva se extrajeron los valores más probables para la fase  $l_o$ .

(v) Se determinó el valor óptimo de  $R_A$ , es decir la fracción de lípidos afectados, minimizando la suma de las diferencias al cuadrado SDC dada por la ecuación [2.10].

Así vemos que con este procedimiento podemos obtener el radio de acción del colesterol, es decir, el número promedio de lípidos afectados,  $N^{af}$ , para cada concentración de colesterol. Notar que según la ecuación [2.7], hemos supuesto que el valor de  $N^{af}$  es el mismo para todos los procesos dinámicos (en promedio).

El resultado de este procedimiento para liposomas de DOPC a 298K con colesterol a las concentraciones del 10% mol y 25% mol se muestra en las Figuras 2.4 y 2.5, respectivamente, en las cuales la SDC aparece en función del porcentaje de lípidos afectados. Es posible observar de estas figuras, que el porcentaje de lípidos afectados que minimiza el valor de la SDC fue del 90% para liposomas con 25 % mol de colesterol, lo que equivale a un  $R_A = 0,48$  nm y un número de lípidos afectados por molécula de colesterol de  $\sim 3$ . En el caso del 10% mol de colesterol, el porcentaje de lípidos afectados que minimiza el valor de la SDC fue del 40%, lo que equivale a un  $R_A = 0,63$  nm y a un número de lípidos afectados por molécula de colesterol de  $\sim 4$ . Las curvas experimental y modelada correspondientes a estos valores de  $N^{af}$  se presentan en las Figuras 2.6 y 2.7, y los parámetros correspondientes se muestran en las Tablas 2.4 y 2.5, para 10 y 25 % mol de colesterol, respectivamente.

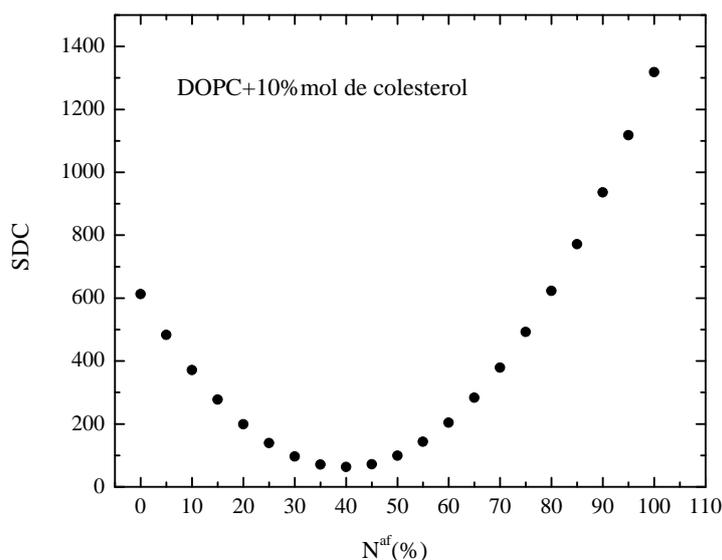


Figura 2.4. Valores de SDC en función del porcentaje de lípidos afectados para liposomas de DOPC a 298K con 10% mol de colesterol y radio  $R_0=80$  nm. El mínimo muestra que la curva óptima corresponde a 40% de lípidos afectados.

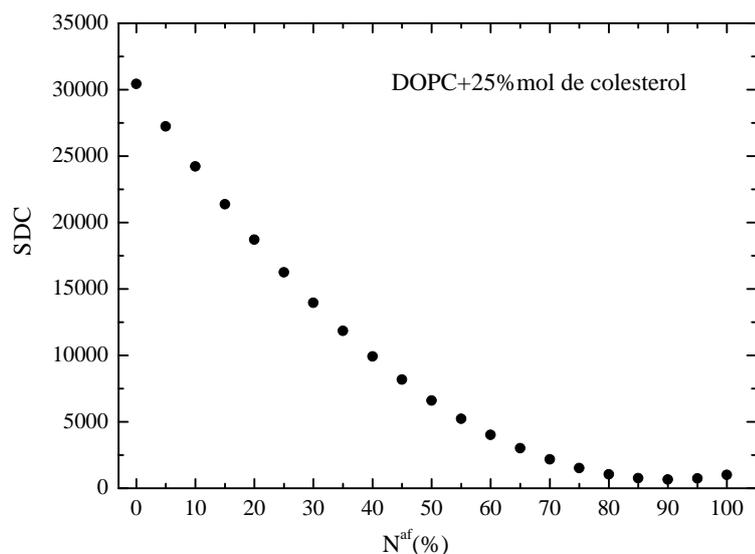


Figura 2.5. Valores de SDC en función del porcentaje de lípidos afectados para liposomas de DOPC a 298K con 25%mol de colesterol y radio  $R_0=68$  nm. El mínimo muestra que la curva óptima corresponde a 90% de lípidos afectados.

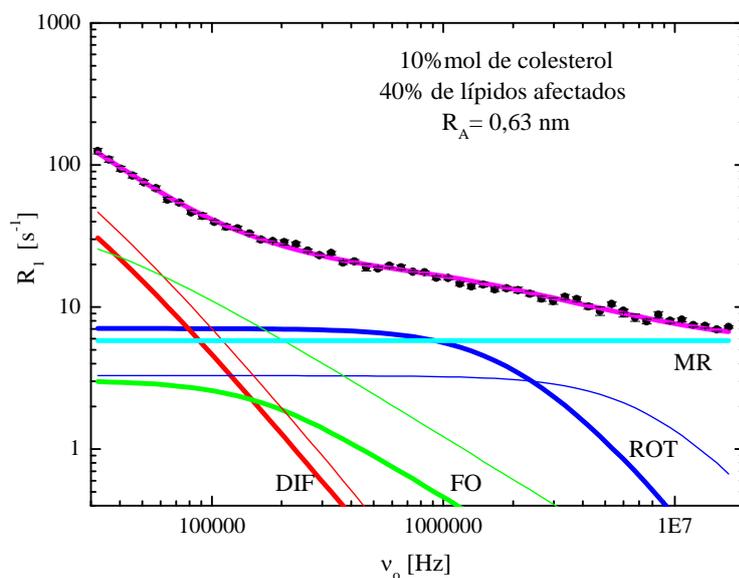


Figura 2.6. Dispersión experimental de la tasa de relajación para una suspensión de liposomas de DOPC con 10%mol de colesterol, radio  $R_0 = 80$ nm a 298K ( $\bullet$ ). La curva de dispersión modelada usando el *análisis de las dos poblaciones* es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Las líneas más gruesas corresponden a los lípidos afectados. Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 2.4

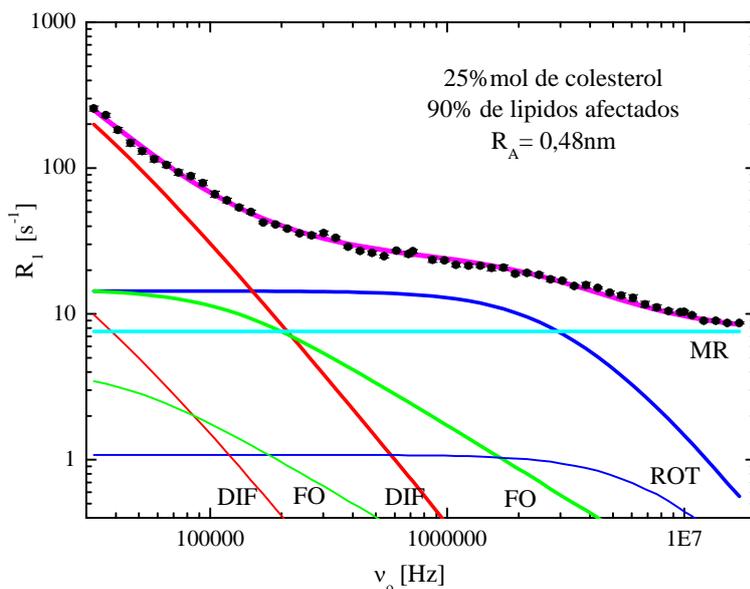


Figura 2.7. Dispersión experimental de la tasa de relajación para una suspensión de liposomas de DOPC con 25% mol de colesterol, radio  $R_0 = 68\text{nm}$  a  $298\text{K}$  ( $\bullet$ ). La curva de dispersión modelada usando el *análisis de las dos poblaciones* es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Las líneas más gruesas corresponden a los lípidos afectados. Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 2.5.

Parámetros	Valores obtenidos del modelado	
	Lípidos no afectados (fase $l_d$ )	Lípidos afectados (fase $l_o$ )
$\eta_{D_2O}$ [Kg/s.m]	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$
$\sigma$	0	0
$a$ [nm]	1	1
Área del colesterol [ $\text{nm}^2$ ]	-----	0,35
Área por lípido [ $\text{nm}^2$ ]	0,73	0,71
$\kappa$ [J]	$(5,4 \pm 0,8) \times 10^{-20}$	$(30 \pm 10) \times 10^{-20}$
$A_{FO}$ [ $\text{s}^{-2}$ ]	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(3 \pm 2) \times 10^9$
$D$ [ $\text{m}^2/\text{s}$ ]	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^{-11}$	$(0,5 \pm 0,2) \times 10^{-11}$
$\tau_D$ [s]	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(1,5 \pm 0,5) \times 10^{-4}$
$A_D$ [ $\text{s}^{-2}$ ]	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(2,1 \pm 0,9) \times 10^9$
$\tau_R$ [s]	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(4,4 \pm 0,9) \times 10^{-8}$
$A_R$ [ $\text{s}^{-2}$ ]	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^8$	$(0,8 \pm 0,1) \times 10^8$
$A_{MR}$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$(5,8 \pm 0,6)$	
$R_A$ [nm]	-----	0,63
Numero de lípidos afectados por cada molécula de colesterol	-----	3,6

Tabla 2.4. Parámetros correspondientes al modelado de la dispersión de la tasa de relajación usando el *análisis de las dos poblaciones* con 40% de lípidos afectados, para liposomas de  $R_0 = 80\text{nm}$  compuestos de DOPC y 10% mol de colesterol, a  $298\text{K}$  (ver Figura 2.6).

Parámetros	Valores obtenidos del modelado	
	Lípidos no afectados (fase $l_d$ )	Lípidos afectados (fase $l_o$ )
$\eta$ D <sub>2</sub> O [Kg/s.m]	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$
$\sigma$	0	0
$a$ [nm]	1	1
Área del colesterol [nm <sup>2</sup> ]	-----	0,35
Área por lípido [nm <sup>2</sup> ]	0,73	0,64
$\kappa$ [J]	$(5,4 \pm 0,9) \times 10^{-20}$	$(30 \pm 10) \times 10^{-20}$
$A_{FO}$ [s <sup>-2</sup> ]	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(5,1 \pm 1,9) \times 10^9$
$D$ [m <sup>2</sup> /s]	$(8,8 \pm 0,3) \times 10^{-12}$	$(5,5 \pm 0,8) \times 10^{-12}$
$\tau_D$ [s]	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$
$A_D$ [s <sup>-2</sup> ]	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^9$	$(4,3 \pm 0,4) \times 10^9$
$\tau_R$ [s]	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(3,7 \pm 0,5) \times 10^{-8}$
$A_R$ [s <sup>-2</sup> ]	$(2,0 \pm 0,3) \times 10^8$	$(0,9 \pm 0,1) \times 10^8$
$A_{MR}$ [s <sup>-1</sup> ]	(8,4 ± 0,2)	
$R_A$ [nm]	-----	0,48
Numero de lípidos afectados por cada molécula de colesterol	-----	2,7

Tabla 2.5. Parámetros correspondientes al modelado de la dispersión de la tasa de relajación usando el *análisis de las dos poblaciones* con 90% de lípidos afectados, para liposomas de  $R_0 = 68\text{nm}$  compuestos de DOPC y 25% mol de colesterol, a 298 K (ver Figura 2.7).

Los resultados obtenidos muestran claramente que también es posible generar, con el análisis de las dos poblaciones, curvas modeladas que están en muy buena concordancia con las curvas experimentales para ambas concentraciones de colesterol. Además, los valores numéricos utilizados para los parámetros de las curvas óptimas (Tablas 2.4 y 2.5) están en el rango esperado de acuerdo a la literatura (comparar las Tablas 2.4 y 2.5 con Tabla 2.3) y sus variaciones con el colesterol coinciden con las expectativas físicas, como se discute más adelante.

## Análisis y discusión

Los resultados obtenidos con ambos análisis sugieren fuertemente que el modelo utilizado anteriormente en otros trabajos para explicar el perfil de la tasa de relajación espín-red en liposomas de un solo componente (18,19) se puede extender para el estudio de liposomas que contienen colesterol en la membrana. Sin embargo, como dos análisis diferentes pueden ser utilizados para reproducir los perfiles experimentales, es necesario hacer una evaluación completa y comparativa entre ellos. Los valores de SDC calculados para cada simulación nos proveen una forma de comparar los resultados obtenidos con los dos análisis para los porcentajes de colesterol estudiados.

Si consideramos las curvas modeladas a los dos porcentajes de colesterol usando el mismo análisis, en el caso del *análisis de una sola población*, el valor de SDC para la simulación con 10% mol de colesterol fue aproximadamente 4,4 veces más pequeño que para el caso de 25% mol. Por otro lado, para el *análisis de las dos poblaciones*, el valor de SDC para la curva correspondiente al 10% mol fue aproximadamente 10 veces menor que la de 25% mol de colesterol. Claramente ambos análisis reproducen mucho mejor los perfiles experimentales a un menor contenido de colesterol. Esto probablemente se deba a que la dinámica de colesterol, la cual llega a ser más importante a mayor contenido de colesterol, no está incluida de forma independiente en nuestros análisis.

Si ahora consideramos las curvas modeladas al mismo porcentaje de colesterol usando diferentes análisis, en el caso de 10% mol de colesterol, el valor de SDC usando el *análisis de una población* fue aproximadamente 3,3 veces más grande que para el *análisis de las dos poblaciones*. Por otro lado, en

el caso de 25% mol de colesterol, el valor de ese factor fue de alrededor de 1,4. Así, los valores de SDC sugieren que el análisis de las dos poblaciones proporciona una mejor descripción de los datos experimentales. En la Tabla 2.6 se comparan los resultados para los dos porcentajes molares de colesterol usando ambos análisis.

En el *análisis de una población* se asumió que el colesterol induce una modulación de los parámetros viscoelásticos de toda la membrana permaneciendo en la fase líquida cristalina desordenada,  $l_d$ , a 298 K. Los resultados fueron consistentes, para ambos porcentajes de colesterol, con las observaciones de otros autores que se pueden encontrar en la literatura (57,75), estando los parámetros obtenidos dentro del rango esperado (comparar las Tablas 2.1 y 2.2 con la Tabla 2.3). Al comparar los valores de  $\tau_D$  para 0, 10 y 25% mol de colesterol es posible apreciar un ligero incremento en el mismo con el contenido de colesterol como era esperado de acuerdo con otros trabajos (57,59,70). Un comportamiento similar se observó para los valores de  $\tau_R$  (56). Estos resultados sugieren que el colesterol hace más lentos los procesos de difusión y rotación de los lípidos. La constante elástica  $k$  mostró un ligero incremento con el contenido de colesterol, también de acuerdo con otros estudios reportados en la literatura (47,54). Este resultado se atribuyó a la estructura más rígida y ordenada que adquieren los lípidos por la presencia de colesterol (37–49). Por último, las amplitudes  $A_j$  no mostraron un cambio muy grande con la adición del colesterol, pero sus variaciones fueron mayores para el caso de 25% mol de colesterol (ver Tablas 2.1 y 2.2). Atribuimos este efecto a la dinámica del colesterol, pues a medida que la concentración aumenta, las moléculas de colesterol contribuyen más a la señal de  $^1\text{H}$  y su dinámica empieza a ser relevante. Dado que no hemos incluido en el modelo un término especial que refleje la dinámica de colesterol (ver ecuación [2.1]), esta contribución es absorbida por las amplitudes de los procesos dinámicos de los lípidos. Esta aproximación es equivalente a la suposición implícita de que el colesterol sigue la dinámica de los lípidos, que en principio es razonable para la difusión, de acuerdo con otros autores (71) y para las fluctuaciones de orden.

El *análisis de dos poblaciones*, el cual estuvo inspirado en resultados de simulaciones computacionales (41–43,76,77), permitió obtener perfiles de la tasa de relajación que concuerdan muy bien con los datos experimentales para ambos porcentajes de colesterol, estando los parámetros obtenidos dentro del rango esperado (comparar las Tablas 2.4 y 2.5 con la Tabla 2.3). El parámetro clave a determinar con esta metodología fue  $R_a$ , lo cual se hizo por comparación estadística entre las curvas experimentales y modeladas. Los resultados mostraron que hay alrededor de 3 lípidos afectados por cada molécula de colesterol, lo cual es consistente con el rango de valores provenientes de simulaciones de dinámica molecular encontrados en la literatura (76,105). Respecto a los restantes parámetros físicos obtenidos mediante las curvas óptimas, se observó que los procesos de difusión y rotación eran más lentos para los lípidos afectados, y la constante elástica  $k$  aumentó aproximadamente 5,5 veces en la fase de  $l_o$ , lo cual es consistente con una estructura local más rígida y ordenada por efecto del colesterol. Las amplitudes  $A_j$  no mostraron grandes cambios entre las dos poblaciones de lípidos. Sin embargo, las variaciones fueron mayores para el caso de 25% mol de colesterol (ver Tablas 2.4 y 2.5) lo cual, una vez más, se puede atribuir a la mayor influencia de la dinámica del colesterol a medida que aumenta su concentración. Además, esto se evidencia con el hecho de que la curva óptima para 10% mol de colesterol genera un valor de SDC menor que la correspondiente a 25% mol (ver Tabla 2.6).

Parámetros	Análisis de una sola población (fase $l_d$ )	Análisis de dos poblaciones		Análisis de una sola población (fase $l_d$ )	Análisis de dos poblaciones	
		60% Lípidos no afectados (fase $l_d$ )	40% Lípidos afectados (fase $l_o$ ) $R_a = 0,63\text{nm}$		10% Lípidos no afectados (fase $l_d$ )	90% Lípidos afectados (fase $l_o$ ) $R_a = 0,48\text{nm}$
Porcentaje molar de colesterol	10	0	10	25	0	25
$R_o$ (nm)	80	80		68	68	
$\square$ (J)	$(6,3 \pm 0,9) \times 10^{-20}$	$(5,4 \pm 0,8) \times 10^{-20}$	$(30 \pm 10) \times 10^{-20}$	$(8 \pm 1) \times 10^{-20}$	$(5,4 \pm 0,9) \times 10^{-20}$	$(30 \pm 10) \times 10^{-20}$
$A_{FO}$ ( $s^{-2}$ )	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^9$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(3 \pm 2) \times 10^9$	$(2,0 \pm 0,4) \times 10^9$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(5,1 \pm 1,9) \times 10^9$
$D$ ( $m^2/s$ )	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^{-11}$	$(1,3 \pm 0,4) \times 10^{-11}$	$(0,5 \pm 0,2) \times 10^{-11}$	$(5,5 \pm 0,8) \times 10^{-12}$	$(8,8 \pm 0,3) \times 10^{-12}$	$(5,5 \pm 0,8) \times 10^{-12}$
$\tau_D$ (s)	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(1,5 \pm 0,5) \times 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-4}$
$A_D$ ( $s^{-2}$ )	$(1,2 \pm 0,4) \times 10^9$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(2,1 \pm 0,9) \times 10^9$	$(3,5 \pm 0,3) \times 10^9$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^9$	$(4,3 \pm 0,4) \times 10^9$
$\tau_R$ (s)	$(2,1 \pm 0,5) \times 10^{-8}$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(4,4 \pm 0,9) \times 10^{-8}$	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(3,7 \pm 0,5) \times 10^{-8}$
$A_R$ ( $s^{-2}$ )	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^8$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^8$	$(0,8 \pm 0,1) \times 10^8$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^8$	$(2,0 \pm 0,3) \times 10^8$	$(0,9 \pm 0,1) \times 10^8$
$A_{MR}$ ( $s^{-1}$ )	$(6,1 \pm 0,9)$	$(5,8 \pm 0,6)$		$(7,1 \pm 0,8)$	8,4	
SDC	211	63		942	661	

Tabla 2.6. Análisis comparativo de los parámetros físicos más importantes de los modelados de los perfiles de la tasa de relajación, para liposomas de DOPC con 10 y 25% mol de colesterol a 298K, usando los análisis de una y de dos poblaciones.

En resumen, con nuestra metodología de análisis hemos encontrado que para liposomas con colesterol los perfiles de la tasa de relajación espín-red de protones son más consistentes con la división de la población de lípidos en afectados y no afectados por el colesterol, que con la descripción de una única fase promedio (ver valores de SDC en la Tabla 2.6). Además, obtuvimos la primera estimación experimental del número de lípidos afectados por cada molécula de colesterol, para concentraciones de colesterol de hasta 25% mol, dando esto un sustento a diversos estudios computacionales previos, realizados por otros autores.

Así, hemos validado la técnica de RMN con ciclado rápido de campo magnético para el estudio de dinámica molecular en liposomas multicomponentes, demostrándose además que esta técnica tiene la habilidad de proporcionar información sobre la rigidez de la membrana (pues nos permite obtener el valor de la constante elástica de flexión) y sobre la movilidad lateral de los lípidos mediante un único experimento que es no invasivo/destructivo para los liposomas.

# Capítulo 3

## Ajustes automáticos de los perfiles de dispersión de la tasa de relajación

Como se mostró en el capítulo anterior, existe un modelo para interpretar la dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones en liposomas unilamelares, con (106) y sin colesterol agregado (18,19). La obtención de la mejor curva según este modelo que describe el perfil de dispersión se ha basado en un método manual, en el cual se utiliza como criterio de parada la minimización de la SDC (ver ecuación [2.10]). Con el objetivo de generar una metodología automática de búsqueda de la curva de ajuste o modelado óptima, es decir, que mejor describa la curva experimental, se escribió un programa simple en FORTRAN que se encarga de buscar dicha curva. A continuación se describe esta metodología automática.

Vale la pena mencionar que estos estudios apuntan al análisis sistemático de muestras de liposomas de diferentes formulaciones, siendo importante para ello poder implementar una metodología que trate a los datos de diferentes muestras con un único criterio y en forma automática.

### 3.1. Planteo del problema a resolver

Consideremos el modelo dado por la ecuación [2.1]. Se puede observar que en este modelo aparecen tres parámetros físicos relevantes ( $k$ ,  $\tau_D$ ,  $\tau_R$ ), tres amplitudes ( $A_{FO}$ ,  $A_D$ ,  $A_R$ ) y una constante ( $A_{MR}$ ), por lo que podríamos decir que tiene asociado siete parámetros a determinar al momento de querer encontrar la curva de ajuste óptima. La metodología que se aplicó para obtener las curvas mostradas en el capítulo 2, estuvo basada en una búsqueda bibliográfica previa que permitiera determinar los valores que puede tomar cada parámetro, según otros trabajos cuyas mediciones han sido llevadas a cabo con diversas técnicas experimentales. Una vez fijados esos rangos, se procedía a la búsqueda manual de la mejor combinación de los siete parámetros antes mencionados tal que reprodujeran la curva experimental tomando el mínimo valor de la suma de las diferencias al cuadrado SDC (ver ecuación [2.10]). Esta metodología funcionó muy bien pero era poco eficiente considerando el gran consumo de tiempo que involucraba. Por lo tanto, se procedió a escribir un programa muy sencillo en FORTRAN que se encarga de buscar automáticamente la mejor combinación de parámetros dentro de los rangos establecidos, como se describe en la siguiente sección. Cabe destacar, que si utilizáramos un ajuste convencional por cuadrados mínimos con siete parámetros de ajuste libres, la curva óptima que obtendríamos podría no tener sentido físico, sumado al hecho de que esto no serviría como una validación del modelo.

### 3.2. Automatización

#### 3.2.1. Método de parámetros iniciales fijos y minimización de SDC

Inicialmente se intentó automatizar exactamente el mismo procedimiento que se llevaba a cabo en forma manual para encontrar la curva óptima. Este procedimiento consistía en darle valores iniciales (dentro de los rangos preestablecidos) a los siete parámetros, que llamaremos  $k_{ini}$ ,  $\tau_{Dini}$ ,  $\tau_{Rini}$ ,  $A_{FOini}$ ,  $A_{Dini}$ ,  $A_{Rini}$ , y  $A_{MRini}$ , y se le pedía al programa que calcule el valor de SDC, que llamaremos  $SDC_{ini}$ . Luego, dejando fijos seis de los siete parámetros en esos valores iniciales, se variaba el séptimo parámetro dentro del rango y con un paso preestablecido, hasta encontrar un valor que permitiera obtener una SDC menor que  $SDC_{ini}$ . Se repetía el mismo procedimiento siete veces, cada vez variando un parámetro diferente, pero en cada paso se reemplazaban los valores de los parámetros iniciales por los nuevos parámetros encontrados, como se describe en la Figura [3.1], en donde el subíndice  $opt$  se ha utilizado para referirse al nuevo valor encontrado para cada parámetro:

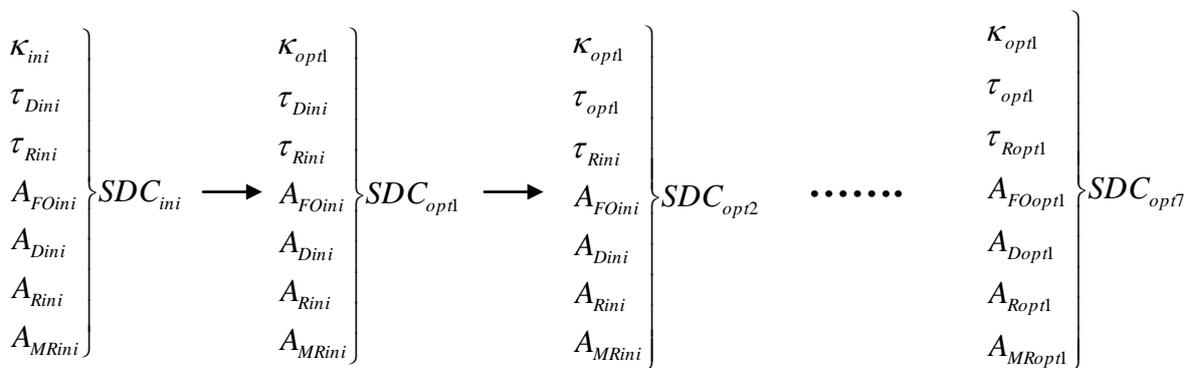


Figura 3.1. Diagrama de funcionamiento del método de parámetros iniciales fijos y minimización de SDC.

Este procedimiento de siete pasos era repetido  $N$  veces, siendo  $N$  el número de iteraciones, cuyo valor se fijaba antes de empezar a correr el programa. Esta metodología de cálculo de la curva óptima no tuvo éxito cuando se la intentó automatizar básicamente por dos motivos. Primero, no tenía un criterio de parada, dado que el número de iteraciones  $N$  era establecido por el usuario, sin tener un criterio claro para la elección de su valor. Efectivamente se comprobó que el hecho de que  $N$  creciera no implicaba que el programa convergiera a una mejor solución. Segundo, se observó una alta dependencia del resultado con los valores iniciales de los parámetros, tal que el programa encontraba mínimos locales para la función SDC, quedándose estancado en ellos sin recorrer todo el hiperespacio establecido por los rangos de los siete parámetros, siendo el ajuste final muy malo (pese al valor de bajo de SDC).

#### 3.2.2. Método de parámetros iniciales aleatorios y minimización de PROM

Intentando resolver el inconveniente planteado en el método de la sección 3.2.1 respecto a que el programa no recorre todo el hiperespacio establecido por los rangos de valores de los siete parámetros, decidimos tomar aleatoriamente conjuntos de siete parámetros dentro del hiperespacio establecido. Es decir, en lugar de entregarle al programa un conjunto de valores iniciales, le permitimos que los elija aleatoriamente dentro de los intervalos preestablecidos. Además, introdujimos un nuevo método de optimización llamado *PROM* que está asociado a la minimización del promedio de las diferencias absolutas entre valores medidos y ajustados de  $R_l$  (ver ecuación [3.5]).

Utilizamos una función generadora de números aleatorios e impusimos la siguiente restricción de selección de este conjunto inicial de parámetros:

$$\frac{|R_{li}^{exp} - R_{li}^{mod}|}{R_{li}^{exp}} \leq \Delta \quad i = 1, \dots, N_{datos} \quad [3.1]$$

donde  $R_{li}^{exp}$  y  $R_{li}^{mod}$  representan los valores experimentales y modelados (o ajustados) de  $R_l$  a la frecuencia  $\nu_{0i}$ , respectivamente, y  $\Delta$  es un número (en general entre 0,1 y 0,25) que funciona como una cota y se calcula para cada curva experimental.  $\Delta$  se obtiene de calcular una cantidad llamada *dif\_max* definida como el valor máximo del módulo de la diferencia entre  $prom_e_i$  y  $R_{li}^{exp}$ , como se muestra en la ecuación [3.2].

$$dif\_max = \max\_val \left( \frac{|prom_e_i - R_{li}^{exp}|}{prom_e_i} \right) \quad i = 1, \dots, N_{datos} \quad [3.2]$$

donde  $prom_e_i$  es el promedio entre  $R_{li-1}^{exp}$  y  $R_{li+1}^{exp}$ , como se describe en la ecuación [3.3].

$$prom_e_i = (R_{li-1}^{exp} + R_{li+1}^{exp})/2 \quad i = 2, \dots, N_{datos} - 1 \quad [3.3]$$

donde  $prom_e_1 = R_{11}^{exp}$  y  $prom_e_{N_{datos}} = R_{1N_{datos}}^{exp}$ .

De esta manera, el cálculo de *dif\_max* nos da una idea de cuán lejos están algunos puntos medidos de la tendencia general de la curva, siendo  $prom_e_i$  una forma de estimar esta tendencia. Finalmente, se decidió tomar  $\Delta$  igual a tres veces el valor de *dif\_max*.

Así, inicialmente el programa calcula el valor de  $\Delta$  utilizando las ecuaciones [3.2] y [3.3], luego elige aleatoriamente un conjunto de siete parámetros (siempre dentro de los rangos permitidos) y calcula  $R_{li}^{mod}$  para todos los valores de frecuencia medidos. Posteriormente, utiliza la ecuación [3.1] para saber si toma ese conjunto de parámetros o lo descarta. Se pudo comprobar que el imponer esta restricción inicial, reduce mucho el tiempo de cálculo.

Una vez que el programa encuentra un conjunto de parámetros que cumple con la restricción inicial dada por la ecuación [3.1], se procede a utilizar el criterio de optimización que, como se mostrará posteriormente, también será un criterio de parada. Considerando que para ello se venía haciendo uso de la minimización de SDC, se continuó usando este criterio al cual se le adicionaron otros dos, a modo de comparación y se definen de la siguiente manera:

$$SIGMA = \frac{|R_{li}^{exp} - R_{li}^{mod}|}{R_{li}^{exp}} \quad i = 1, \dots, N_{datos} \quad [3.4]$$

$$PROM = \frac{1}{N_{datos}} \sum_{i=1}^{N_{datos}} \frac{|R_{li}^{exp} - R_{li}^{mod}|}{R_{li}^{exp}} \quad [3.5]$$

Se obtuvieron resultados usando los tres criterios de optimización (SDC, SIGMA y PROM) y se verificó que los mejores resultados se conseguían usando la minimización de PROM, tomando así solo éste como criterio de optimización para el cálculo de las futuras curvas. Para permitir que este método converja a un resultado se estableció una cota  $\alpha$  (en general entre 0,04 y 0,1) para el valor de la función PROM, como se muestra en la ecuación [3.6]. Esta cota, la cual se llamó  $q\_pmax$  en el programa, se calcula nuevamente para cada curva experimental y está dada como mínimo por el valor de *dif\_max* o un valor mayor en caso de que el programa no converja a ningún resultado en un tiempo finito. Entonces el programa verifica como segundo paso, luego de pasar la restricción inicial de la ecuación [3.1], que se cumpla la ecuación [3.6]. Si no se cumple, el programa debe seguir buscando otro conjunto de parámetros y repetir nuevamente todo el proceso descrito.

$$PROM = \frac{1}{N_{\text{datos}}} \sum_{i=1}^{N_{\text{datos}}} \frac{|R_{1i}^{\text{exp}} - R_{1i}^{\text{mod}}|}{R_{1i}^{\text{exp}}} \leq \alpha. \quad [3.6]$$

Finalmente, si el conjunto de parámetros tomados al azar cumple con las restricciones de las ecuaciones [3.1] y [3.6], el programa calcula la curva de ajuste.

Esta metodología de optimización tiene una pequeña debilidad y es el hecho de que al pedirle a los puntos de la curva calculada que cumplan con la restricción inicial de la ecuación [3.1], estamos descartando conjuntos de parámetros que podrían ser buenos, por culpa tal vez de unos pocos puntos que se encuentran muy alejados de la tendencia de la curva. Esto nos motivó a introducir en el programa alguna metodología automática de eliminación de puntos que están mal medidos antes de aplicar todo el procedimiento previamente descrito. Con este objetivo en mente, se intentó buscar un criterio que permitiera identificar los puntos experimentales que no seguían la tendencia general de la curva, y por lo tanto no serían considerados en la selección inicial de parámetros que cumplan con las restricciones [3.1] y [3.6]. La función más sencilla con la que se empezó fue un polinomio de grado uno, es decir, se aproximó la curva experimental de a tramos por rectas tal que el criterio que se estableció para eliminar puntos fue el hecho de obtener variaciones abruptas en las pendientes de estas rectas. Cuando la variación entre las pendientes de dos rectas consecutivas era menor a un cota preestablecida, entonces el punto era conservado, caso contrario no se lo consideraba para el ajuste inicial. Es decir, este criterio describía la curva experimental por rectas consecutivas que involucraran de a cinco puntos (el punto central era el punto a evaluar), cuyo empalme debía ser lo más suave posible. Las fallas de este método fueron que no permitía evaluar la calidad de los puntos de los extremos de la curva y los puntos que eliminaba eran muchas veces puntos que efectivamente si seguían la tendencia de la curva. Se intentó utilizar polinomios de mayor grado combinados con funciones más complejas como una exponencial, pero no tuvimos éxito. Es decir, no fue posible encontrar un criterio automático que sea capaz de descartar para el cálculo del ajuste aquellos puntos que se van de la tendencia general de la curva.

Así, se decidió hacer uso de un método semiautomático para la eliminación de puntos, dado que requiere de una intervención manual al inicio, que consiste de los siguientes pasos:

- 1) Eliminación manual de puntos experimentales  $N_{\text{manual}}$  que están claramente fuera de la tendencia de la curva, es decir, aquellos que son distinguibles por estar fuera de la dispersión estadística de puntos a lo largo de la curva;
- 2) Cálculo de la curva de ajuste que cumple con las restricciones [3.1] y [3.6] usando  $(N_{\text{datos}} - N_{\text{manual}})$ ;
- 3) Segunda eliminación de puntos  $N_{+1prom\_curva}$  usando el siguiente criterio:

$$\left| (R_{1i}^{\text{exp}} \pm \sigma_i^{\text{exp}}) - R_{1i}^{\text{mod}} \right| \leq PROM \times R_{1i}^{\text{mod}} = \sigma_{\text{ajuste}}^i \quad i = 1, \dots, N_{\text{datos}} \quad [3.7]$$

- 4) Cálculo de la curva final usando  $(N_{\text{datos}} - N_{+1prom\_curva})$ ;

5) Se repiten los pasos 3 y 4 usando la nueva curva calculada en el paso 4, y cuantas veces sea necesario hasta que se cumpla la ecuación [3.7] para todos los puntos.

Notar que en la ecuación [3.7] se definió la cantidad  $\sigma_{\text{ajuste}}^i$  que se consideró como el error de los puntos calculados  $R_{1i}^{\text{sim}}$  en la curva de ajuste.

A continuación se resume la metodología completa semiautomática para obtener la curva de ajuste óptima y cuyo código escrito en FORTRAN se muestra en el Apéndice I.

- 1) Eliminación manual de puntos que se van de la tendencia general de la curva;
- 2) Elección aleatoria del conjunto de 7 parámetros dentro del hiperespacio establecido por la literatura bajo la restricción inicial dada por la ecuación [3.1], sin considerar los puntos eliminados en el paso 1;
- 3) Cálculo de la función de ajuste usando el criterio de optimización PROM y el criterio de parada de la ecuación [3.6];
- 4) Segunda eliminación de puntos usando el criterio establecido por la ecuación [3.7];

- 5) Se repiten los pasos 2 y 3, ahora sin considerar los puntos eliminados en el paso 4, y en caso de ser necesario se repite el paso 4 nuevamente.

### 3.2.3. Aplicación del método de parámetros iniciales aleatorios y minimización de PROM

Para demostrar que la metodología descrita en la sección anterior funciona, se aplicó la misma para analizar curvas de liposomas de DMPC con radio  $R_0 = 50\text{nm}$ , entre 303 y 328K, y con diferentes contenidos de colesterol (0 y 3%mol). Para ello se empleó el modelo de la ecuación [2.1]. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 3.2, 3.3 y 3.4 y en el Apéndice II. Las curvas de trazos (segmentos) que se muestran a la par de la curva de ajuste en todas estas figuras representan lo que se definió como el error del ajuste  $\sigma_{\text{ajuste}}^i$ . Los parámetros de todas las curvas de ajuste óptimas están expuestos en la Tabla 3.1.

Analizando los valores de los parámetros de la Tabla 3.1, se puede observar que se cumplen todas las tendencias esperadas, estando sus valores dentro de los rangos establecidos por la literatura (4,6,9,14,17,47,55,75,98,102,107,108). Por un lado, si evaluamos las variaciones según la temperatura, se observa que la constante elástica de flexión  $\kappa$  sufre leves variaciones con el incremento de la temperatura, con una leve tendencia a decrecer, en concordancia con la literatura para liposomas de DMPC (107). El mismo comportamiento se observa para las constantes de tiempo asociadas a los procesos de difusión y rotación, es decir,  $\tau_D$  y  $\tau_R$  tienden a decrecer con la temperatura, siendo estos procesos más rápidos a altas temperaturas (4,55,75,109). Por otro lado, si consideramos las variaciones de los parámetros  $\kappa$ ,  $\tau_D$  y  $\tau_R$  con el contenido de colesterol (a temperatura fija e igual a 328K) es posible apreciar un ligero incremento en los mismos con el contenido de colesterol, pese a que su cantidad es muy pequeña. Nuevamente este resultado concuerda con el de otros trabajos (9,47,55,56,107) y se adjudica a la estructura más rígida y ordenada que adquieren los lípidos por la presencia de colesterol, haciendo más lentos los procesos de difusión y rotación. Por último, las amplitudes  $A_j$  no mostraron un cambio muy grande ni con la temperatura, ni con la adición del colesterol.

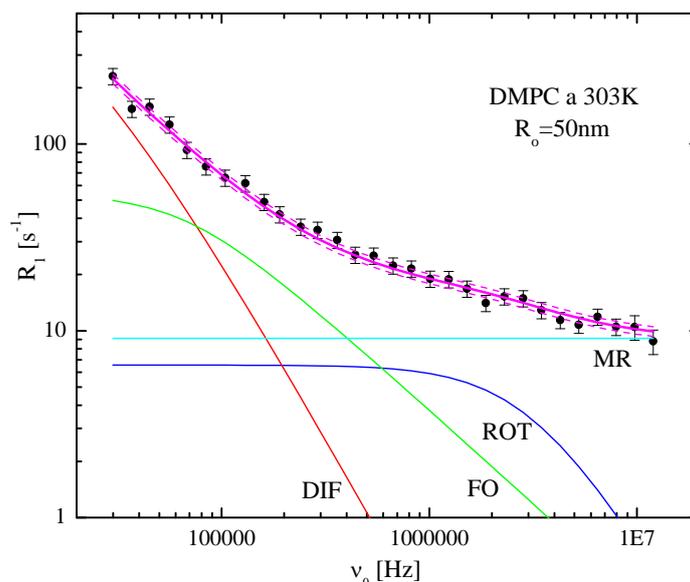


Figura 3.2. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 303K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste optimizada con la metodología descrita en la sección 3.2.2 se muestra en magenta. Las contribuciones de cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 3.1.

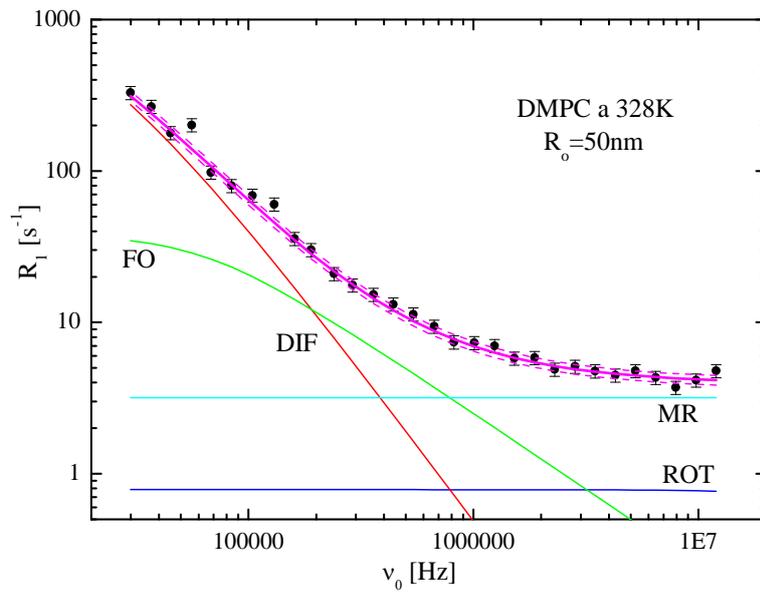


Figura 3.3. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 328K (●). La curva de ajuste optimizada con la metodología descrita en la sección 3.2.2 se muestra en magenta. Las contribuciones de cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 3.1.

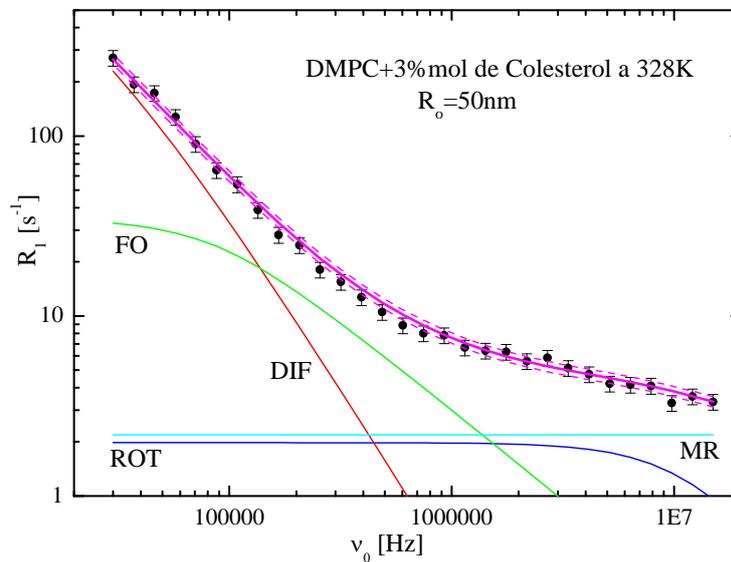


Figura 3.4. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC+3%mol de colesterol con radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 328K (●). La curva de ajuste optimizada con la metodología descrita en la sección 3.2.2 se muestra en magenta. Las contribuciones de cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 3.1.

Parámetros	Valores obtenidos del ajuste				
	0	0	0	0	3
% mol Colesterol	0	0	0	0	3
T [K]	303	310	318	328	328
$R_0$ [nm]	50	50	50	50	50
$\eta_{D_2O}$ [kg/s.m]	$0,97 \times 10^{-3}$	$0,82 \times 10^{-3}$	$0,72 \times 10^{-3}$	$0,6 \times 10^{-3}$	$0,6 \times 10^{-3}$
$N_{datos}$	30	30	30	30	30
$N_{manual}$	1	2	5	3	0
$N_{+1prom\ curva}$	0	0	1	2	0
$\Delta$	0,141	0,158	0,166	0,183	0,227
$\alpha$	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07
$\kappa$ [J]	$(2,8 \pm 0,6) \times 10^{-20}$	$(2,9 \pm 0,7) \times 10^{-20}$	$(2,2 \pm 0,6) \times 10^{-20}$	$(1,7 \pm 0,5) \times 10^{-20}$	$(2,2 \pm 0,5) \times 10^{-20}$
$A_{OF}$ [ $s^{-2}$ ]	$(9 \pm 2) \times 10^8$	$(8 \pm 2) \times 10^8$	$(6 \pm 3) \times 10^8$	$(3 \pm 1) \times 10^8$	$(5 \pm 1) \times 10^8$
$\tau_D$ [s]	$(4,0 \pm 0,7) \times 10^{-5}$	$(3,4 \pm 0,4) \times 10^{-5}$	$(2,2 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	$(1,5 \pm 0,5) \times 10^{-5}$	$(2,0 \pm 0,4) \times 10^{-5}$
$D$ [ $m^2/s$ ]	$(7 \pm 2) \times 10^{-12}$	$(8 \pm 1) \times 10^{-12}$	$(14 \pm 2) \times 10^{-12}$	$(22 \pm 2) \times 10^{-12}$	$(15 \pm 4) \times 10^{-12}$
$A_D$ [ $s^{-2}$ ]	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^9$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^9$	$(0,8 \pm 0,2) \times 10^9$	$(0,7 \pm 0,3) \times 10^9$	$(0,8 \pm 0,2) \times 10^9$
$\tau_R$ [s]	$(3 \pm 1) \times 10^{-8}$	$(1,7 \pm 0,7) \times 10^{-8}$	$(0,7 \pm 0,4) \times 10^{-8}$	$(0,1 \pm 0,1) \times 10^{-8}$	$(0,6 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
$A_R$ [ $s^{-2}$ ] $\times 10^8$	$(0,5 \pm 0,1) \times 10^8$	$(0,4 \pm 0,1) \times 10^8$	$(0,7 \pm 0,1) \times 10^8$	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^8$	$(0,6 \pm 0,2) \times 10^8$
$A_{MR}$ [ $s^{-1}$ ]	$(9,1 \pm 0,8)$	$(6,6 \pm 0,7)$	$(3,8 \pm 0,6)$	$(3,2 \pm 0,7)$	$(2,2 \pm 0,4)$
<b>PROM</b>	0,059	0,058	0,076	0,073	0,066

Tabla 3.1. Parámetros correspondientes a las curvas de ajuste optimizadas de la dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para liposomas de DMPC con  $R_0 = 50$ nm, entre 303 y 328K, con diferentes contenidos de colesterol (ver Figuras 3.2, 3.3, 3.4 y Figuras del Apéndice II).

Así, podemos concluir que esta metodología semiautomática para calcular las curvas simuladas óptimas funciona correctamente, dando resultados que tienen sentido físico y coherentes con resultados encontrados en la literatura. Por lo tanto, de ahora en adelante se empleará esta metodología para calcular los ajustes de las curvas experimentales de dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones en liposomas.

El método propuesto asemeja en ciertos aspectos la minimización por cuadrados mínimos. Se optó por la minimización de la diferencia absoluta entre los datos y el ajuste, por ser esta una operación con menor tiempo de cálculo, aunque el resultado final no es críticamente dependiente de esta elección. La curva de ajuste obtenida con nuestra metodología es en realidad sub-óptima, pues depende de los parámetros aleatorios tomados en el hiperespacio. La metodología podría mejorarse mediante el uso de algoritmos genéticos u otras maquinarias matemáticas más refinadas, aunque en su mayoría convergerían a otras soluciones sub-óptimas, muy probablemente sin grandes cambios en la significancia física del resultado. Se optó por el método sencillo descrito en este capítulo, ya que el mismo es derivado directamente del procedimiento manual que se utilizaba anteriormente (ver capítulo 2). No obstante, es un punto a refinar en el futuro, así como la incorporación de algoritmos eficientes automáticos que permitan la depuración previa de puntos experimentales fuera de tolerancia.

# Capítulo 4

## Liposomas ultradeformables

Con la intención de continuar con la extensión del modelo del capítulo 2 al caso de liposomas bi-componentes, pero ahora en el extremo opuesto de flexibilidad, es decir, vesículas con mayor flexibilidad, en este capítulo se analizan dispersiones de la tasa de relajación espín-red en suspensiones de liposomas formulados a tal fin. Este tipo de vesículas presenta una alta importancia actualmente debido a su utilidad para el transporte transdermal de fármacos.

### 4.1. La piel

#### 4.1.1. Características principales

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y constituye una excelente barrera biológica. Su espesor no supera los 2000  $\mu\text{m}$  (2 mm), contribuye al 4% del peso corporal aproximadamente, y es entre  $10^2$  y  $10^4$  veces menos permeable que las paredes de los capilares sanguíneos. Está compuesta básicamente por tres capas, la *epidermis*, la *dermis* y la *hipodermis*.

La *epidermis* es la capa más externa, posee una estructura muy rígida, un espesor entre 20 a 200  $\mu\text{m}$ , y las células en esta capa están organizadas en clústeres (110–112). Está formada por varios estratos, siendo el *estrato córneo* el más externo (5-20  $\mu\text{m}$ ) y la primera y más dificultosa barrera que se debe superar para poder atravesar la piel.

La región debajo de la epidermis es llamada *dermis*, posee una rigidez intermedia, su espesor es de 5 a 20 veces más ancho que el de la epidermis (100 a 4000  $\mu\text{m}$ ) y en esta capa se encuentran los capilares sanguíneos. Por último, la capa más profunda de la piel, la *hipodermis*, posee vasos sanguíneos y nervios más largos que los encontrados en la dermis y sirve para el almacenamiento de grasas.

#### 4.1.2. Rutas transdermales naturales

La piel constituye un medio de transporte muy atractivo para las moléculas hidrofílicas debido al gradiente acuoso que aquella posee, siendo la concentración de agua del 10 al 30% en el estrato córneo (superficie de la piel expuesta al aire) incrementándose progresivamente en los estratos más profundos de la epidermis hasta alrededor de un 75 % en el último estrato (estrato basal) (113–116). Luego, el contenido de agua se mantiene aproximadamente constante en las capas más profundas.

Existen varias rutas transdermales para el transporte de moléculas, siendo las más potenciales las rutas *transcelular*, *intercelular* y *folicular* (110–112,117) como se muestra en la Figura 4.1. Estas rutas, que las denominaremos en términos generales como *poros*, constituyen el 0,001% de la superficie total de la piel. La ruta transcelular es través de los característicos clústeres de células de la epidermis, la cual presenta una alta resistencia, siendo el tamaño típico de estos conductos de ~1-10nm

y su abundancia de  $\sim 10^9$  por  $\text{cm}^2$  (112). La ruta intercelular está dada por los espacios entre clústeres de células, siendo el tamaño típico de estos conductos de  $\sim 10^2 \text{nm}$  y su abundancia de  $\sim 10^8$  por  $\text{cm}^2$  (112). Mientras la primera vía es el camino más directo, ofrece más resistencia para la molécula que la segunda ruta, siendo ésta última la ruta más usada debido a su baja resistencia (110,111). Por último, la ruta folicular está dada por los folículos pilosos, la cual presenta el mayor tamaño de poros ( $\sim 10^4 \text{nm}$ ) pero su abundancia es muy baja ( $\sim 10^2$  por  $\text{cm}^2$ ), lo cual la hace una vía un poco ineficiente para el transporte transdermal de moléculas.

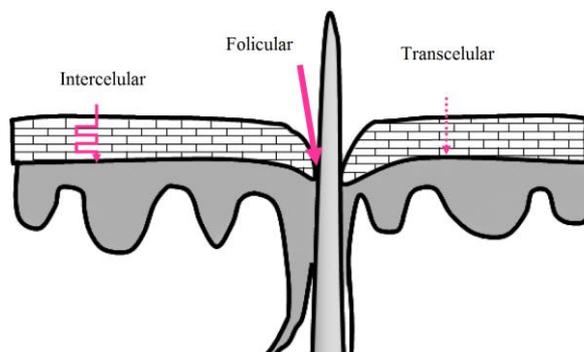


Figura 4.1. Principales rutas transdermales naturales: intercelular, folicular y transcelular. La capa más externa de la piel con estructura de pequeños bloques (clusters) es la epidermis.

## 4.2. Mecanismos de transporte transdermal

La vía transdermal para la administración de fármacos ha adquirido actualmente gran interés por parte de las empresas farmacéuticas, ya que evita varios problemas asociados con las principales vías de administración de medicamentos como lo son la vía oral (digestiva) y la vía parenteral (básicamente intravenosa), además de representar una vía cómoda y conveniente para el paciente. Principalmente evita el efecto de primer paso o metabolismo de primer paso a través del hígado, lo cual disminuye la biodisponibilidad del fármaco además de generar efectos secundarios indeseados (118), y prescinde del uso de jeringas, el cual constituye un método bastante agresivo para la piel dado que genera orificios en la misma que tardan alrededor de un día en cerrarse y que presentan un tamaño lo suficientemente grande ( $\sim 10^{-3} \text{m}$ ) para permitirle a diferentes tipos de virus y bacterias ingresar al organismo (112).

El obstáculo más importante en la administración transdermal de medicamentos es la barrera intrínseca de la piel, dada por su capa más externa, es decir, el estrato córneo, que ofrece el obstáculo principal para la difusión de bioactivos que intentan alcanzar los vasos sanguíneos de la dermis. Así, es de alto interés generar sistemas de transporte transdermal de fármacos que puedan atravesar la epidermis sin agredirla, es decir, utilizando poros naturales de la piel. Esto requiere de sistemas de transporte no invasivos (o de invasión mínima) básicamente para minimizar el dolor y el peligro de infecciones, que puedan suministrar el fármaco de manera controlada, que permitan potenciar la permeabilidad de la piel y que posean dimensiones estables en el rango de los nanómetros (112).

Recientemente, varias estrategias se han utilizado para llevar a cabo la administración transdermal de compuestos bioactivos eficientemente (112). Entre ellas se encuentran las *partículas balísticas* que requieren del uso de fuentes de energía para darles el impulso necesario para que atraviesen la piel; la *sonoporación* que utiliza ultrasonido y la *electroporación* que hace uso de pulsos de alto voltaje, para ampliar el tamaño de los poros naturales y generar nuevos; y las *microagujas*. Todas ellas, además de ser agresivas para la piel, presentan una limitación en la cantidad de droga que pueden transportar ( $\sim 1 \text{mg}$ ), algunas de ellas requieren de una fuente de energía externa, y el número de nuevos conductos que pueden generar es limitado ( $\sim 10^2 \text{cm}^{-2}$ ) y de amplio tamaño ( $\geq 10^3 \text{nm}$ ) siendo un riesgo para la integridad del organismo. Por otro lado, se encuentran los *sistemas vesiculares ultraflexibles* (tales

como etosomas y transfersomas) los cuales permiten el transporte transdermal de fármacos de manera no invasiva (119–122). Mientras algunos autores aseguran el efectivo traspaso de estas vesículas a través de la epidermis, prácticamente intactas hasta el torrente sanguíneo de la dermis (119,120,123), otros trabajos aseguran la ruptura de las mismas en las primeras capas de la piel, sin tener acceso a los conductos sanguíneos (124–127).

#### 4.2.1. Liposomas ultradeformables

Un *liposoma ultradeformable* es una vesícula que posee una membrana altamente flexible ( $\kappa \sim 2k_B T$ ), lo cual le permite ser utilizada para el transporte y liberación controlada de una variedad de drogas a través de los poros naturales de la piel. Gracias a los componentes de su membrana, esta vesícula puede adaptar su forma a las condiciones del ambiente rápida y fácilmente, permitiéndole atravesar las barreras impuestas por las diferentes rutas transdermales, pese a que su tamaño puede superar de dos a diez veces el tamaño del poro e incluso más. El hecho de poseer una membrana altamente hidrofílica hace que la vesícula tienda a evitar la deshidratación que sufriría al quedarse en la superficie externa de la piel y consecuentemente sigue el gradiente acuoso que naturalmente posee la piel (128–130). Esto es el motor que impulsa a estas vesículas a penetrar la piel. Los liposomas convencionales demostraron no ser sistemas eficientes para el transporte transdermal debido a que son demasiados rígidos ( $\kappa \sim 15k_B T$ ) para deformarse, por lo tanto no pueden atravesar la piel intactos o se rompen al intentar hacerlo (129). Tampoco mostraron utilidad las micelas lipídicas mixtas, formadas por lípidos y detergentes, las cuales se generan cuando la concentración del detergente supera la CMC, debido a que poseen la propiedad de ser muy pequeñas (con radio de algunos nanómetros) para ser sensibles al gradiente acuoso de la piel (129).

Es posible obtener un liposoma ultraflexible, es decir, con  $\kappa \sim k_B T$ , por medio de preparar la bicapa de la vesícula con una mezcla de dos o más componentes con diferentes “curvaturas espontáneas”, es decir, con diferentes capacidades a adaptarse a estrés externo. De esta manera, cuando la vesícula necesite pasar por pequeños conductos se producirá un reacomodamiento de los componentes de la membrana de la misma, de forma tal que el componente que mejor se adapte a curvaturas pronunciadas se acumulará en las zonas altamente deformadas, reduciendo así el costo de la energía de deformación (131).

En general, los liposomas deformables están compuestos de fosfolípidos, en su mayoría de origen natural como la fosfatidilcolina de soja (SPC), proveniente de la lecitina de soja, o fosfatidilcolina de huevo y un detergente para flexibilizar la membrana, generalmente colato de sodio (CNa) o desoxicolato de sodio (DOCNa). Asimismo, existen otras formulaciones de vesículas con otro tipo de aditivos para flexibilizar la membrana (122).

### 4.3. Elasticidad de membranas de vesículas

#### 4.3.1. Energía elástica de Helfrich

Existe una expresión para la energía elástica de una membrana biológica y está dada por el modelo desarrollado por el científico alemán Wolfgang Helfrich (132). Una breve descripción de este modelo se muestra a continuación, basada en la adaptación hecha por otros trabajos (133).

Considerando que el espesor de una membrana biológica es tan pequeño (~5-6 nm), al menos comparado con las dimensiones de una célula (~ $\mu\text{m}$ ), permite aproximar a la bicapa como una superficie bidimensional inmersa en el solvente. Si suponemos que la bicapa se encuentra en equilibrio con la solución acuosa y teniendo en cuenta que se encuentra sujeta a las fluctuaciones térmicas del solvente, entonces su energía está caracterizada por las deformaciones que la membrana puede sufrir (compresión o expansión de la bicapa en la dirección lateral y deformaciones en la dirección normal a la superficie). La energía libre de una bicapa (por unidad de área),  $f$ , debe ser invariante bajo cualquier parametrización de la superficie, dado que es un concepto físico que no depende de la descripción matemática utilizada. Luego entonces, dicha energía debe ser una función de las curvaturas media  $H$  y

gaussiana  $K$  (que no dependen de la parametrización de la superficie) las cuales están definidas de la siguiente manera:

$$H = \frac{1}{2}(c_1 + c_2); \quad [4.1]$$

$$K = c_1 \cdot c_2, \quad [4.2]$$

donde  $c_1$  y  $c_2$  son las curvaturas principales de la superficie, las cuales se definen punto a punto.

En el equilibrio la bicapa puede considerarse aproximadamente plana, al menos localmente. Las deformaciones respecto a dicho estado están caracterizadas por curvaturas muy pequeñas, es decir, el radio de curvatura correspondiente es mucho mayor que el espesor de la bicapa. Esto permite desarrollar la función  $f = f(H, K)$  mediante una serie de Taylor (a segundo orden en las curvaturas  $c_1$  y  $c_2$ ):

$$f(H, K) \approx f_o + f_1 H + f_2 H^2 + f_3 K, \quad [4.3]$$

donde las constantes  $f_o, f_1, f_2$  y  $f_3$  dependen en principio del área promedio por molécula; en particular,  $f_o$  corresponde a la energía libre de una bicapa plana ( $c_1$  y  $c_2$  iguales a cero). Completando cuadrados en la ecuación [4.3] y definiendo las siguientes cantidades:

$$\sigma \equiv f_o - \frac{f_1^2}{4f_2}; \quad \kappa \equiv 2f_2; \quad c_o \equiv -\frac{f_1}{2f_2}; \quad \bar{k} \equiv f_3, \quad [4.4]$$

la energía libre por unidad de área de la bicapa toma la siguiente forma:

$$f = \frac{1}{2} \kappa (H - c_o)^2 + \bar{k} K + \sigma, \quad [4.5]$$

donde  $\sigma$ ,  $\kappa$ ,  $\bar{k}$  y  $c_o$  son la tensión superficial, el módulo elástico de curvatura media o constante elástica de flexión, el módulo elástico de curvatura gaussiana y la curvatura espontánea de la membrana, respectivamente. Estas variables son conocidas como los “*parámetros de Helfrich*”.

Así, la energía total de la bicapa o *energía elástica de Helfrich* está dada por la integral sobre el área total de la misma:

$$F = \int_S \left[ \frac{1}{2} \kappa (H - c_o)^2 + \bar{k} K + \sigma \right] dA. \quad [4.6]$$

En ausencia de fuerzas externas y para una superficie cerrada de topología fija, se cumple que los términos de la energía de Helfrich que contienen la tensión superficial y el módulo elástico de curvatura gaussiana son constantes. En general se intenta obtener información sobre el sistema en el estado de equilibrio, por lo tanto se busca minimizar la energía total. En este caso los términos constantes no son relevantes y por este motivo  $F$  suele describirse con una expresión más simplificada dada por el primer término de la ecuación [4.6] (que contiene el módulo elástico de curvatura media), como se muestra en la ecuación [4.7]:

$$F = \int_S \left[ \frac{1}{2} \kappa (H - c_o)^2 \right] dA. \quad [4.7]$$

En esas condiciones, la energía elástica de Helfrich toma la forma de un potencial armónico que depende de la curvatura media  $H$  en forma análoga a como la energía potencial de un resorte depende de su deformación. Entonces, el módulo de curvatura media (o constante elástica de flexión),  $\kappa$ , es análogo a la constante de rigidez de un resorte y puede interpretarse como una constante de rigidez (ante deformaciones de curvatura) de la membrana. Cuando  $\kappa$  tiene valores pequeños, la membrana es flexible; cuando  $\kappa$  asume valores grandes, la membrana es rígida. Entonces, el término de curvatura media está relacionado con las fluctuaciones de forma u ondulaciones (sin cambio topológico) que

experimenta la membrana por efectos de la energía térmica del solvente. La curvatura espontánea  $c_o$  está asociada a la asimetría de las monocapas que forman la bicapa, por lo que cuando está formada por un solo tipo de moléculas, no existe curvatura espontánea y el estado de equilibrio tiende a ser el de una membrana plana ( $c_o = 0$ ).

#### 4.3.2. Elasticidad en vesículas ultradeformables: medición de la constante elástica de flexión

Las vesículas deformables/ultradeformables para el transporte transdermal de drogas han sido ampliamente estudiadas (11,122,127–130,134–136). Los experimentos más comunes básicamente miden el flujo de vesículas a través de membranas porosas naturales (piel humana y de animales) y artificiales en función de la presión aplicada paralelamente a la normal de la membrana y del cociente entre los radios de la vesícula, la cual se supone cuasi esférica, y del poro, considerado de tipo cilíndrico. Algunos de estos experimentos han sido acompañados por técnicas de fluorescencia para determinar la profundidad de penetración (127–129) y han caracterizado las vesículas mediante un parámetro llamado *deformabilidad*, *valor de elasticidad* (122,134–136), o *adaptabilidad* (11,129), definido básicamente como una cantidad que es proporcional a la inversa de la *constante elástica de flexión*  $\kappa$ .

Entre los métodos más comunes para medir  $\kappa$  en vesículas deformables/ultradeformables se encuentran el *método de aspiración de vesículas con micropipetas* (133,137), que consta de un capilar de diámetro del orden de 5-10  $\mu\text{m}$  y un microscopio óptico, por lo que este método solo sirve para vesículas gigantes (tamaños del orden de 20  $\mu\text{m}$ ), y es una técnica invasiva. Además, se encuentran las técnicas ópticas basadas en reflexión como *elipsometría* y *reflectividad de rayos X* (138,139), las cuales no son invasivas, pero requieren de una preparación especial de la muestra a analizar, la cual consiste en hacer un “film” a base de la bicapa lipídica (bicapa extendida).

Por otro lado, existe un método experimental que posee su fundamentación teórica (11), que permite obtener  $\kappa$  a partir de mediciones de la cantidad de masa filtrada  $m$  por una membrana porosa con tamaños de poros conocidos, en función de la presión aplicada  $\Delta p$  en la dirección de la normal de la membrana. La fundamentación de este método se describe a continuación. Partiendo de la *ley de Darcy*, se cumple:

$$J = P \Delta p, \quad [4.8]$$

donde  $J$  es el flujo de liposomas a través de la membrana por unidad de tiempo y de área,  $P$  es la penetrabilidad de los liposomas en los poros, y  $\Delta p$  es la presión aplicada. Así, podemos obtener la ecuación “experimental” para la penetrabilidad, dada por (11):

$$P_{exp}(\Delta p) = \frac{1}{\Delta p \cdot A_f} \frac{dm}{dt}, \quad [4.9]$$

donde  $J$  estaría dado por  $\frac{1}{A_f} \frac{dm}{dt}$ , siendo  $A_f$  el área total del filtro o membrana porosa.

Por otro lado, si consideramos el proceso de penetración de una vesícula de diámetro promedio mayor que el del poro, vemos que se trata de un proceso activado pues la vesícula debe deformarse para pasar por el poro y lo hace a un costo de energía dado por la energía de activación  $E_A$ . Considerando que las curvas experimentales de  $P_{exp}$  versus  $\Delta p$  son de carácter sigmoidal (11), se puede suponer que existe una distribución de las energías de activación que está dada por una distribución de Maxwell-Boltzmann (140). Así, la densidad de vesículas  $n$  con energía  $E_v$  y energía de activación  $E_A$ , está dada por:

$$n(E_A, E_v) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \frac{1}{E_v^{3/2}} \sqrt{E_A} \exp\left(-\frac{E_A}{E_v}\right), \quad [4.10]$$

donde se considera que la energía de activación puede tomar un valor mínimo  $E_A^*$  y la energía de la vesícula  $E_v$  consta de dos componentes, una pequeña contribución de energía térmica  $k_B T$ , y la energía de deformación  $W_d$ . Si se integra  $n(E_A, E_v)$  entre  $E_A^*$  e infinito, se obtiene la función penetrabilidad  $P(E_A^*, E_v)$  que representa la totalidad de vesículas que atraviesan la membrana. De esta manera se demuestra que (11):

$$P(E_A^*, E_v) = 1 - \operatorname{erf}\left(\sqrt{E_A^*/E_v}\right) + \sqrt{\frac{4E_A^*}{\pi E_v}} \exp\left(-E_A^*/E_v\right), \quad [4.11]$$

donde  $\operatorname{erf}$  es la función error. La energía de deformación  $W_d$  está dada por el trabajo hecho por la presión aplicada  $\Delta p$  para hacer que la vesícula se deforme y pase por el poro, tal que en primera aproximación es proporcional a  $\Delta p$ . Si se desprecia la energía térmica frente a  $W_d$ , es posible obtener una ecuación teórica para la penetrabilidad en función de la presión aplicada  $\Delta p$ , como se muestra en la siguiente ecuación:

$$P(\Delta p) = P_{max} \left\{ 1 - \operatorname{erf}\left(\sqrt{p^*/\Delta p}\right) + \sqrt{\frac{4p^*}{\pi \Delta p}} \exp\left(-p^*/\Delta p\right) \right\}, \quad [4.12]$$

donde se ha usado en la ecuación [4.11] el hecho de que  $E_v \propto \Delta p$  y  $E_A^* \propto p^*$ , siendo  $p^*$  el valor de la presión aplicada para la que se cumple que la  $E_v = E_A^*$ .  $P_{max}$  representa el valor máximo que puede alcanzar la penetrabilidad cuando  $\Delta p \rightarrow \infty$ , cuyo valor depende de parámetros como la viscosidad y temperatura de la suspensión y de las propiedades del filtro empleado. Notar que se cumple que  $P(\Delta p = p^*) = 0,57P_{max}$ .

Se ha demostrado (11) que las curvas experimentales de  $P_{exp}$  en función de  $\Delta p$  obtenidas usando la ecuación [4.9] siguen el comportamiento dado por la ecuación teórica [4.12], validando así el modelo.

El valor de  $p^*$  es un parámetro que solo depende de las propiedades de las vesículas y está vinculado con la capacidad de adaptación que éstas tienen para pasar por los estrechos poros de la barrera impuesta, en términos de presión. Por lo tanto, se puede definir la *adaptabilidad*  $a^*$  de las vesículas como la inversa de  $p^*$ :

$$a^* = 1/p^*. \quad [4.13]$$

Se ha demostrado numérica (131) y experimentalmente (11), que existe una relación de proporcionalidad entre la presión umbral o de activación  $p^*$  y la constante elástica de flexión  $\kappa$  de la bicapa de la vesícula. Por lo tanto, si se miden pares de valores  $(\Delta p, P_{exp})$  usando la ecuación [4.9] y la curva resultante se ajusta según el modelo de la ecuación [4.12] tomando como parámetros de ajuste a  $p^*$  y  $P_{max}$ , es posible obtener el valor de  $\kappa$  de la siguiente manera:

$$\kappa = \frac{p^* \cdot \kappa_{ref}}{P_{ref}^*} \quad [4.14]$$

donde  $\kappa_{ref}$  y  $P_{ref}^*$  corresponden a los valores de la constante elástica de flexión y la inversa de la adaptabilidad de una vesícula tomada como referencia, respectivamente. Esta podría ser una vesícula formada solo por fosfolípidos pudiéndose asumir así que en promedio se cumple que  $\kappa_{ref} \approx 15k_B T$ . Usando la ecuación [4.14] se puede escribir la penetrabilidad dada por la ecuación [4.12] en función de la constante elástica de flexión:

$$P(\Delta p) = P_{max} \left\{ 1 - \operatorname{erf}\left(\sqrt{\frac{P_{ref}^*}{\Delta p \cdot \kappa_{ref}} \cdot \kappa}\right) + \sqrt{\frac{4}{\pi} \frac{P_{ref}^*}{\Delta p \cdot \kappa_{ref}} \cdot \kappa} \exp\left(-\frac{P_{ref}^*}{\Delta p \cdot \kappa_{ref}} \cdot \kappa\right) \right\}. \quad [4.15]$$

Adicionalmente, existe otro método experimental ampliamente usado (122,134–136) basado en la medición del flujo de vesículas por una membrana porosa y en la relación entre los tamaños de las vesículas y los poros. Este método permite obtener una estimación de la constante elástica de flexión mediante un parámetro llamado *deformabilidad* o *valor de elasticidad* definido por:

$$D = J \cdot \left( \frac{r_v}{r_p} \right)^2, \quad [4.16]$$

donde  $J$  es un flujo de vesículas por unidad de tiempo y de área,  $r_v$  es el tamaño de las vesículas luego de pasar por la barrera y  $r_p$  es el tamaño de los poros de la barrera. El parámetro  $D$  es proporcional a la inversa de  $\kappa$  (141), por lo tanto:

$$\kappa \propto 1/D. \quad [4.17]$$

Así vemos de la ecuación [4.7] que a medida que una vesícula se hace más flexible, y por lo tanto su deformabilidad  $D$  se incrementa,  $\kappa$  disminuye.

## 4.4. Experimentos de dispersión de la tasa de relajación

### 4.4.1. Preparación de la muestra

Se prepararon liposomas suspendidos en agua deuterada ( $D_2O$ ) utilizando lípidos de DMPC o SPC (fosfatidilcolina de soja) y desoxicolato de sodio (DOCNa) como detergente para flexibilizar la membrana, a diferentes concentraciones (3,10 y 20% mol), siendo los radios de las vesículas de 50 nm. El método de preparación fue idéntico al utilizado para liposomas con colesterol descrito en el capítulo 2, pero reemplazando el agregado de colesterol por el del detergente en la proporción correspondiente. Además, la disolución se llevó a cabo usando una mezcla de cloroformo-metanol en una razón de 9:1. Todas las formulaciones de liposomas fueron preparadas por la autora de esta tesis, en el centro de investigaciones en química biológica de Córdoba (CIQUIBIC), de la facultad de ciencias químicas, UNC, en la ciudad de Córdoba.

### 4.4.2. Modelado de la dispersión de la tasa de relajación

Las curvas experimentales de los perfiles de dispersión de  $R_I$  obtenidos para liposomas con detergente agregado fueron interpretadas mediante el modelo de la ecuación [2.1], con la intención nuevamente de extender el mismo al caso de membranas con dos componentes, pero esta vez en el extremo opuesto de flexibilidad. Para modelar estas curvas y calcular los errores de los parámetros obtenidos, se adoptó el método sistemático descrito en la sección 3.2.2 del capítulo 3.

### 4.4.3. Medición de la tasa de relajación espín-red en función de la frecuencia de Larmor en liposomas con detergente

Las dispersiones de la tasa de relajación de protones se midieron usando la técnica de RMN con ciclado rápido de campo con un relaxómetro Spinmaster FC2000/C/D (Stelar; Mede, Italia) para un volumen de muestras de liposomas de 1 ml. Todas las mediciones mostradas en este capítulo fueron realizadas por la autora de la tesis, en el Laboratorio de Relaxometría y Técnicas Especiales (LaRTE) de FaMAF, UNC, en Córdoba. En todos los casos se usó un campo magnético de polarización y de adquisición de 15MHz, expresado en frecuencia de Larmor para protones. Los perfiles se midieron dentro del rango de frecuencias de 30 kHz a 15 MHz (valores del campo de relajación), donde podemos asegurar que las mediciones no están afectadas por la presencia de los campos locales (18). Los valores de  $R_1$  fueron determinados de las curvas de recuperación de la magnetización por ajuste de

cuadrados mínimos. Estos valores no fueron sensibles a la ventana temporal sobre la cual la FID fue muestreada. El proceso de relajación de espín para todas las muestras resultó ser monoexponencial, dentro del error, a todas las frecuencias.

La temperatura de la muestra fue controlada con una variación de 1K aproximadamente utilizando el controlador de temperatura del relaxómetro. Las temperaturas se calibraron externamente utilizando una termocupla de Cu-Al en un tubo de RMN de 10 mm. El tiempo empleado para medir cada curva de dispersión fue entre una a cinco horas, dependiendo de la muestra y de la temperatura, y nunca se superó el tiempo de estabilidad de las suspensiones (aproximadamente una semana).

Los liposomas utilizados se encontraban en la fase líquido cristalina y estaban compuestos de DMPC (para poder comparar con mediciones sin detergente hechas con este lípido) o SPC con el agregado del detergente DOCNa, a concentraciones del 3, 10 y 20%mol. Los experimentos fueron realizados para liposomas con radios hidrodinámicos promedios de 50nm y a diferentes temperaturas entre 303K y 328K.

Vale la pena mencionar que en nuestras muestras, tenemos protones en los lípidos, en las moléculas de detergente (no supera el 12% de la población total de protones en nuestro caso) y en el DOH formado. Asimismo, los protones de los lípidos son los más abundantes, por lo que podemos considerar que la señal que medimos proviene básicamente de los lípidos.

Además, la presencia de los protones del detergente y del DOH no altera significativamente los perfiles de dispersión. Mientras las moléculas de detergente, como así las moléculas de DOH, ambas ligadas a los lípidos, siguen la dinámica de los lípidos en primera aproximación, la contribución a la relajación debida a las moléculas libres de DOH no es dispersiva (constante). Por otro lado, se analizó el efecto en los perfiles de dispersión de las moléculas de detergente no ligadas a la bicapa lipídica, tanto en estado libre (de no agregación) como en estado de agregación micelar, lo cual efectivamente podría suceder considerando que las concentraciones de detergente usadas en nuestros experimentos se encuentran entre 2 y 14 mM, superando la concentración micelar crítica ( $CMC_{DOCNa} \approx 2-6$  mM en el rango de temperaturas de 20 a 50 °C). Los experimentos mostraron que no son dispersivas en el rango de frecuencias considerado, por lo tanto, solo contribuyen con una constante al perfil de dispersión total.

### Liposomas de DMPC con diferentes porcentajes molares de DOCNa

Las curvas experimentales de dispersión de la tasa de relajación  $R_l$  para liposomas de DMPC, con 3, 10 y 20%mol del detergente DOCNa agregado, entre 303 y 328 K, se muestran en las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4, respectivamente. El comportamiento de estos perfiles con la temperatura corresponde con la esperada(19). Es posible observar que prácticamente no existe diferencia, dentro del error experimental, entre las curvas con 3 y 10%mol de DOCNa para todas las temperaturas consideradas. Incluso, no se distinguen de los perfiles correspondientes a liposomas de DMPC sin detergente a las mismas temperaturas, como se muestra en la Figura 4.5 solo a 303K. Por el contrario, los perfiles para liposomas de DMPC con 20%mol de DOCNa tienen una curvatura diferente, como se muestra en los perfiles de la Figura 4.4 (ver Figura 4.5 para comparación con las curvas a otros porcentajes de detergente).

Las curvas experimentales con sus respectivos ajustes usando el método descrito en la sección 3.2.2, para liposomas de DMPC a 308 K con 3, 10, y 20%mol de DOCNa agregado y radio  $R_0 = 50$  nm, se muestran en las Figuras 4.6, 4.7 y 4.8, respectivamente. Los correspondientes parámetros del ajuste son mostrados en la Tabla 4.1. Los rangos extraídos de la literatura de algunos de los parámetros físicos involucrados en el modelo se muestran en la Tabla 4.2, mientras que los parámetros restantes conservan los mismos rangos en fase  $l_d$  mostrados en la Tabla 2.3 del capítulo 2.

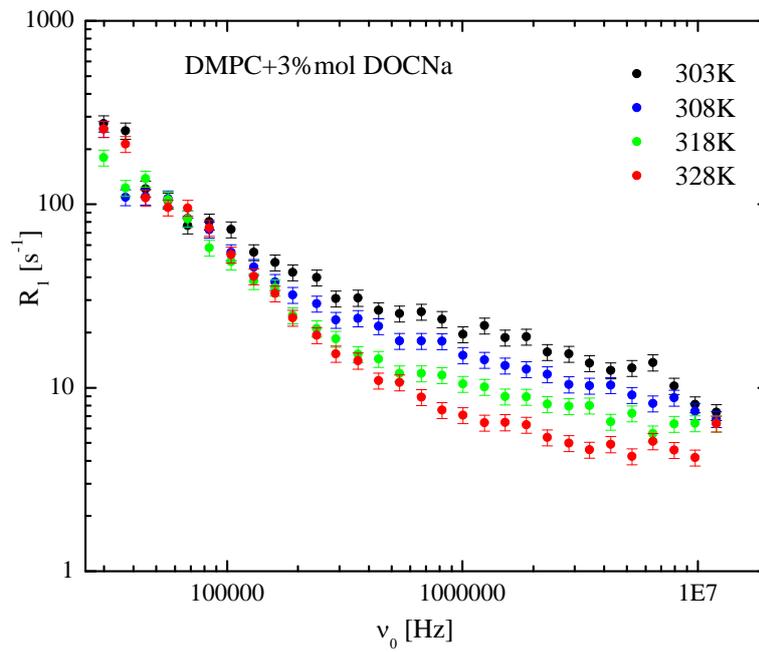


Figura 4.2. Dispersiones medidas de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 3% mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50$ nm y a diferentes temperaturas, entre 303 y 328K

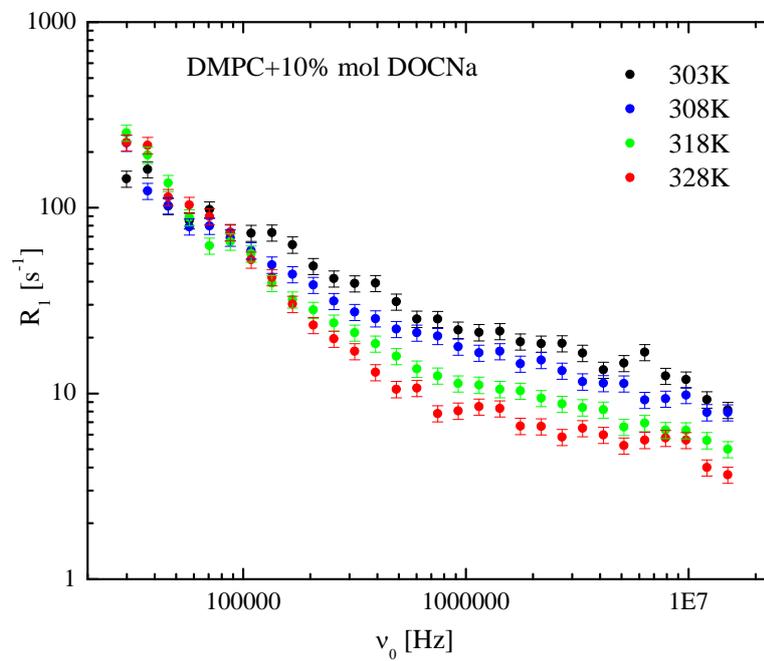


Figura 4.3. Dispersiones medidas de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 10% mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50$ nm y a diferentes temperaturas, entre 303 y 328K.

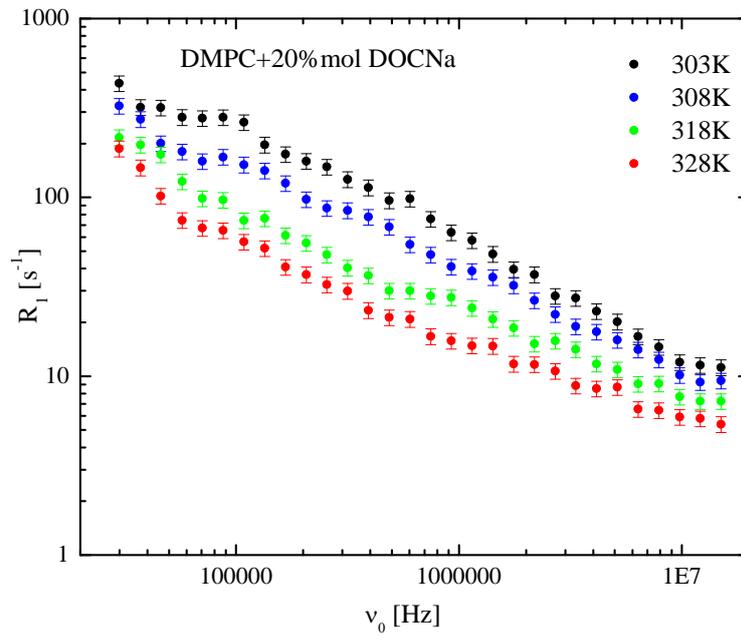


Figura 4.4. Dispersiones medidas de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 20% mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  y a diferentes temperaturas, entre 303 y 328K.

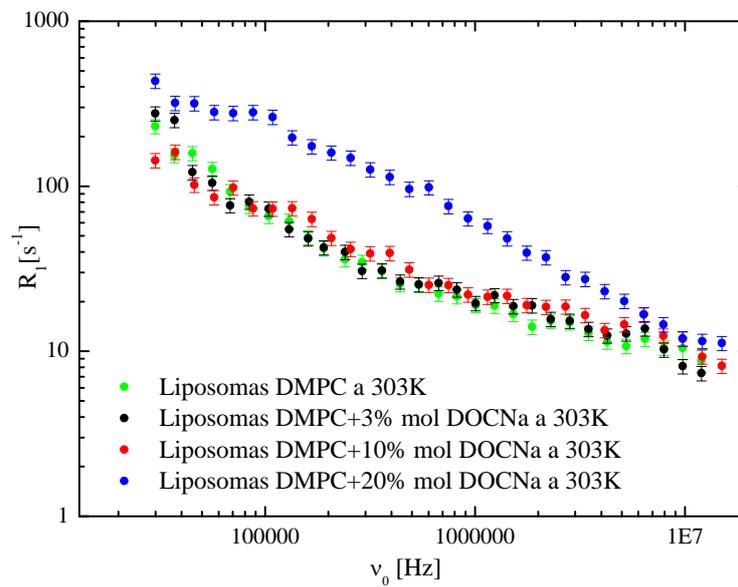


Figura 4.5. Comparación de los perfiles de dispersión de la tasa de relajación espín-red para suspensiones de liposomas de DMPC con 0, 3, 10 y 20% mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  y a 303K.

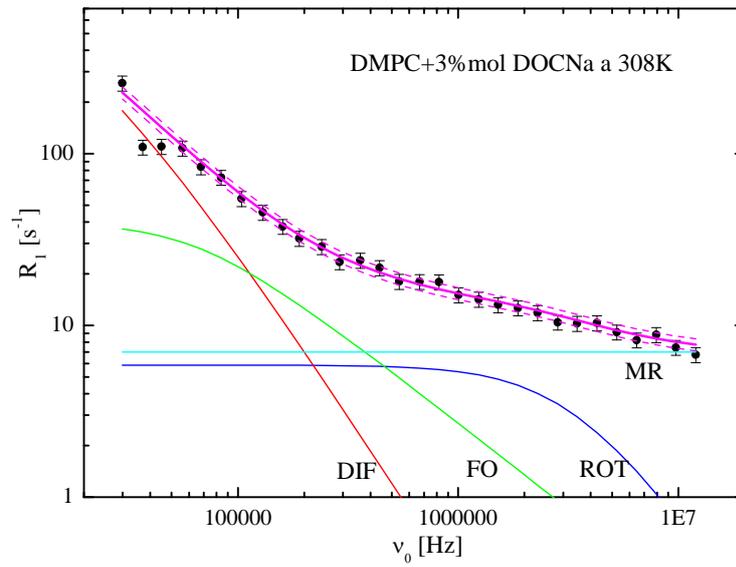


Figura 4.6. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 3% mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 308K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.1.

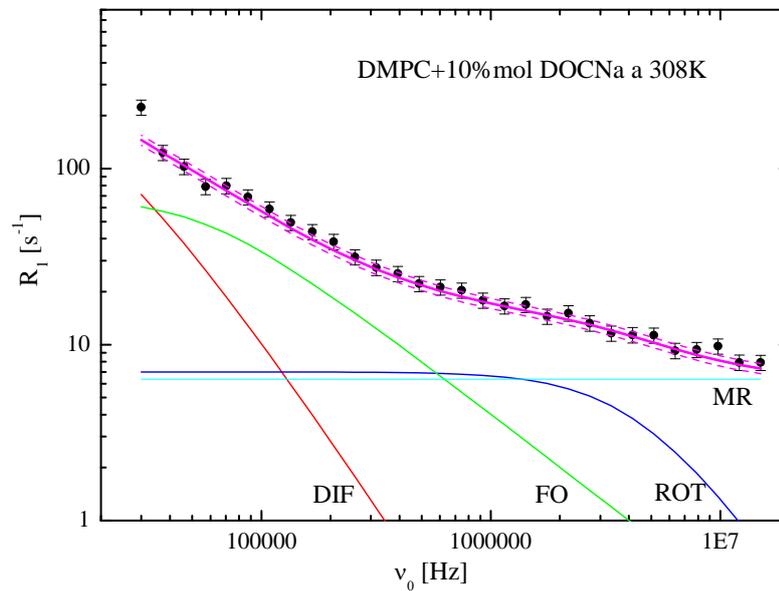


Figura 4.7. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 10% mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 308K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.1.

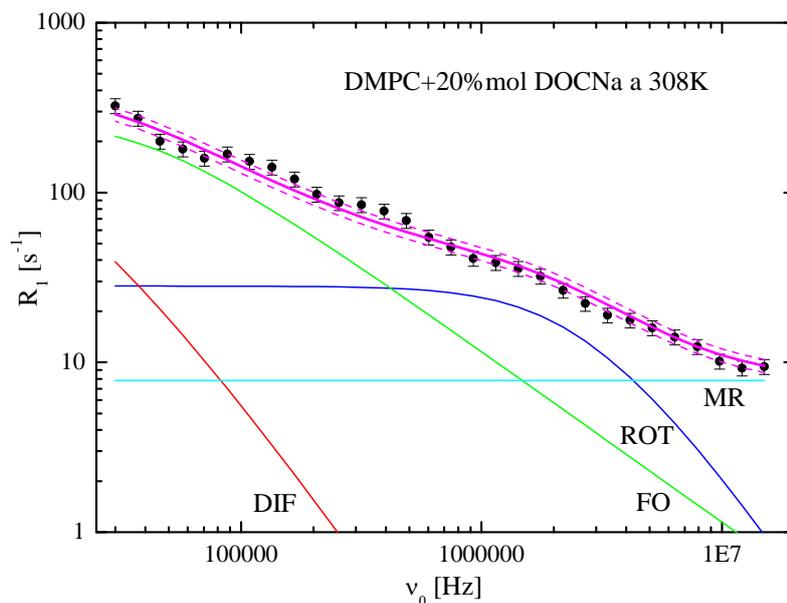


Figura 4.8. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 20% mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 308K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.1.

De las curvas ajustadas (ver Figuras 4.6, 4.7 y 4.8) se observa que es posible reproducir la curva experimental muy bien para los tres porcentajes de detergente, dentro de los errores experimentales. Los valores numéricos de todos los parámetros se encuentran dentro del rango esperado de acuerdo a la literatura (comparar Tablas 4.1 y 4.2). Notar que los valores correspondientes a liposomas de DMPC con 0% mol de detergente que se muestran en la Tabla 4.1 fueron extraídos del capítulo 3 a modo de comparación.

Se observaron leves variaciones en los parámetros por la presencia del detergente, como se describe a continuación. La constante elástica  $\kappa$  mostró una ligera tendencia a disminuir con el porcentaje de detergente, lo cual es compatible con una membrana con mayor deformabilidad o flexibilidad debido a la presencia del detergente (ver ecuación [4.17]) (141). El hecho de que  $\kappa$  no presentó grandes variaciones, puntualmente para liposomas de DMPC con agregados de DOCNa, está en concordancia con otros trabajos que no observan variaciones en la deformabilidad de la membrana para el mismo tipo de vesículas a través de mediciones de microviscosidad (142). Considerando que se han reportado grandes variaciones (de hasta el 80%) en  $\kappa$  en liposomas de fosfatidilcolina de soja (SPC) con detergente agregado de hasta un 20% mol (11), se llevaron a cabo mediciones en liposomas a base de SPC con DOCNa agregado, como se muestra más adelante en esta misma sección.

La constante de difusión  $D$  mostró un leve incremento con el contenido de detergente (ver Tabla 4.1), siendo este un resultado esperado debido a la mayor flexibilidad de la membrana por la presencia del detergente. Adicionalmente, se observó que el aporte a la relajación espín-red por parte del proceso de difusión disminuye a medida que el porcentaje de detergente se incrementa (comparar Figuras 4.6, 4.7 y 4.8).

El tiempo de correlación rotacional se incrementó levemente, con el contenido de detergente (ver Tabla 4.1). Por último, las amplitudes  $A_{FO}$  y  $A_R$  no mostraron un cambio significativo con la adición del detergente.

Adicionalmente, se midieron perfiles de dispersión de  $R_1$  para liposomas de DMPC con 3, 10 y 20% mol de DOCNa agregado, a 303, 318 y 328 K. Los gráficos con las curvas experimentales y sus

correspondientes ajustes se encuentran en el apéndice II y los parámetros del ajuste aparecen en la Tabla 4.3. Si se mantiene fijo el porcentaje de detergente, es posible observar una ligera tendencia a decrecer con la temperatura en los parámetros  $\kappa$ ,  $\tau_D$  y  $\tau_R$ . Por otro lado, si fijamos la temperatura, se pueden apreciar para 303, 318 y 328K, las mismas tendencias en todos los parámetros como se describió para 308K, con el contenido de detergente.

Parámetros	Valores obtenidos del ajuste			
% mol DOCNa	0	3	10	20
T [K]	310	308	308	308
$R_o$ [nm]	50	50	50	50
$\eta D_2O$ [kg/s.m]	$0,82 \times 10^{-3}$	$0,87 \times 10^{-3}$	$0,87 \times 10^{-3}$	$0,87 \times 10^{-3}$
$N_{datos}$	30	30	30	30
$N_{manual}$	2	2	0	0
$N_{+Iprom\_curva}$	0	2	1	0
$\Delta$	0,158	0,187	0,182	0,18
$\alpha$	0,06	0,062	0,09	0,09
$\kappa$ [J]	$(2,9 \pm 0,7) \times 10^{-20}$	$(2,5 \pm 0,4) \times 10^{-20}$	$(2,1 \pm 0,2) \times 10^{-20}$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^{-20}$
$A_{OF}$ [s <sup>-2</sup> ]	$(0,8 \pm 0,2) \times 10^9$	$(0,6 \pm 0,1) \times 10^9$	$(0,7 \pm 0,1) \times 10^9$	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^9$
$\tau_D$ [s]	$(3,4 \pm 0,4) \times 10^{-5}$	$(3,3 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(2,8 \pm 0,3) \times 10^{-5}$	$(2,6 \pm 0,8) \times 10^{-5}$
$D$ [m <sup>2</sup> /s]	$(8 \pm 1) \times 10^{-12}$	$(9 \pm 1) \times 10^{-12}$	$(11 \pm 2) \times 10^{-12}$	$(12 \pm 5) \times 10^{-12}$
$A_D$ [s <sup>-2</sup> ]	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^9$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(0,4 \pm 0,1) \times 10^9$	$(0,2 \pm 0,2) \times 10^9$
$\tau_R$ [s]	$(1,7 \pm 0,7) \times 10^{-8}$	$(2,6 \pm 0,4) \times 10^{-8}$	$(2,0 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(3,5 \pm 0,5) \times 10^{-8}$
$A_R$ [s <sup>-2</sup> ]	$(0,4 \pm 0,1) \times 10^8$	$(0,5 \pm 0,1) \times 10^8$	$(0,7 \pm 0,1) \times 10^8$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^8$
$A_{MR}$ [s <sup>-1</sup> ]	$(6,6 \pm 0,7)$	$(7,0 \pm 0,5)$	$(6,4 \pm 0,4)$	$(8 \pm 1)$
<i>PROM</i>	0,058	0,08	0,066	0,088

Tabla 4.1. Parámetros correspondientes a los ajustes de la dispersiones de la tasa de relajación para liposomas de  $R_0=50\text{nm}$  compuestos de DMPC y diferentes porcentajes molares de DOCNa, a 308 K (ver Figuras 4.6, 4.7 y 4.8). Los parámetros para liposomas de DMPC con 0mol% de detergente a 310K (ver Tabla 3.1 del Capítulo 3) son mostrados a modo de comparación

Parámetro	Rango para T=298-328K	Referencias
$\kappa$ [J]	$(0,8-14) \times 10^{-20}$	(9,11,47,107)
$D$ [m <sup>2</sup> /s]	$(3-26) \times 10^{-12}$	(4,6,55,75,98,108,143,144)

Tabla 4.2. Resumen de los intervalos más probables para la constante elástica de flexión  $\kappa$  y la constante de difusión  $D$ , para liposomas de DMPC y SPC, con y sin detergente, con sus correspondientes referencias.

Parámetros	Valores obtenidos del ajuste											
	3	3	3	3	10	10	10	10	20	20	20	20
% mol DOCNa	3	3	3	3	10	10	10	10	20	20	20	20
T [°K]	303	308	318	328	303	308	318	328	303	308	318	328
$R_0$ [nm]	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
$\eta_{D_2O}$ [kg/s.m] $\times 10^{-3}$	0,97	0,87	0,72	0,6	0,97	0,87	0,72	0,6	0,97	0,87	0,72	0,6
$N_{datos}$	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
$N_{manual}$	2	2	1	3	2	0	1	3	0	0	0	0
$N_{+1prom\_curva}$	2	2	1	2	2	1	1	1	1	0	0	2
$\Delta$	0,196	0,187	0,199	0,192	0,18	0,182	0,196	0,202	0,25	0,18	0,18	0,25
$\alpha$	0,09	0,062	0,07	0,07	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,07	0,1
$\kappa$ [J] $\times 10^{-20}$	2,9±0,4	2,5±0,4	1,5±0,2	1,1±0,3	2,8±0,2	2,1±0,2	1,5±0,2	1,1±0,2	2,4±0,2	1,5±0,1	1,2±0,1	0,9±0,1
$A_{OF}$ [s <sup>-2</sup> ] $\times 10^9$	0,4±0,1	0,6±0,1	0,3±0,1	0,2±0,1	1,4±0,1	0,7±0,1	0,2±0,1	0,2±0,1	3,9±0,4	1,5±0,1	0,7±0,1	0,4±0,1
$\tau_D$ [s] $\times 10^{-5}$	4,1±0,4	3,3±0,3	2,2±0,3	1,5±0,3	4±1	2,8±0,3	2,0±0,2	1,4±0,3	3,8±0,7	2,6±0,8	1,9±0,8	1,0±0,7
$D$ [m <sup>2</sup> /s] $\times 10^{-12}$	7±1	9±1	14±3	22±6	8±3	11±2	16±2	24±6	8±2	12±5	17±9	36±30
$A_D$ [s <sup>-2</sup> ] $\times 10^9$	1,3±0,2	1±0,3	0,6±0,1	0,5±0,2	0,3±0,1	0,4±0,1	0,7±0,1	0,5±0,2	0,3±0,1	0,2±0,2	0,20±0,08	0,10±0,07
$\tau_R$ [s] $\times 10^{-8}$	3,1±0,5	2,6±0,4	1,5±1,0	0,5±0,4	2,4±0,2	2,0±0,3	1,5±0,2	0,8±0,2	4,3±0,4	3,5±0,5	2,9±0,8	1,8±0,6
$A_R$ [s <sup>-2</sup> ] $\times 10^8$	0,8±0,1	0,5±0,1	0,2±0,1	0,3±0,1	1,0±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1	0,3±0,1	2,1±0,2	1,6±0,2	0,9±0,2	0,7±0,1
$A_{MR}$ [s <sup>-1</sup> ]	7,8±0,3	7±0,5	5,3±0,4	3,5±0,4	7,7±0,5	6,4±0,4	4,5±0,5	3,8±0,4	9,1±0,9	8±1	5,6±0,8	4,7±0,9
PROM	0,101	0,08	0,068	0,085	0,093	0,066	0,074	0,089	0,086	0,088	0,055	0,083

Tabla 4.3. Parámetros correspondientes a los ajustes de las dispersiones de la tasa de relajación de liposomas de  $R_0=50$ nm compuestos de DMPC y diferentes porcentajes molares de DOCNa (3, 10 y 20% mol), entre 303 y 328K (ver Figuras 4.6, 4.7, 4.8 y del Apéndice II).

### Liposomas de SPC con diferentes porcentajes molares de DOCNa

Las curvas experimental y ajustada usando el método descrito en la sección 3.2.2, para liposomas de SPC a 305 K con 0 y 20% mol de DOCNa agregado y radio  $R_0 = 50$  nm, se muestran en las Figuras 4.9 y 4.10, respectivamente. Los correspondientes parámetros son mostrados en la Tabla 4.4.

Es posible observar que estos perfiles presentan una curvatura similar a la observada para liposomas de DMPC+20%mol DOCNa (ver Figura 4.4). De las curvas ajustadas (ver Figuras 4.9 y 4.10) se observa que es posible reproducir la curva experimental muy bien para los dos porcentajes de detergente (0 y 20% mol DOCNa), dentro de los errores experimentales. Los valores numéricos de todos los parámetros se encuentran dentro del rango esperado de acuerdo a la literatura (comparar Tablas 4.2 y 4.4).

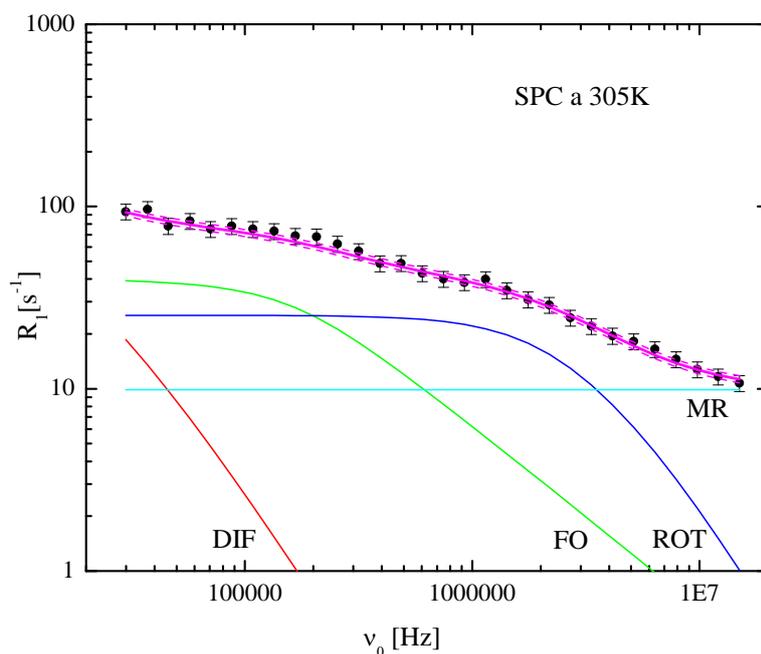


Figura 4.9. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de lipomasas de SPC de radio  $R_0 = 50\text{nm}$ , a 305K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.4.

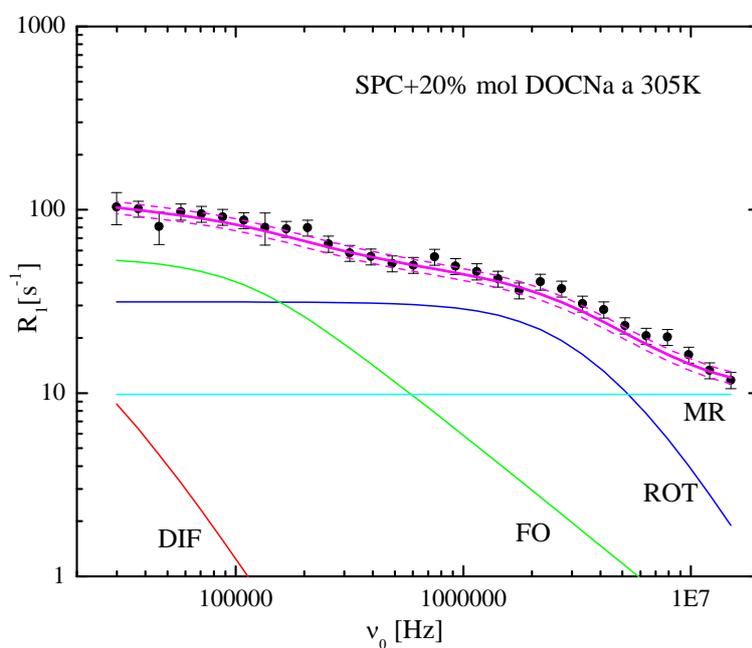


Figura 4.10. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de lipomasas de SPC con 20%mol de DOCNa, de radio  $R_0 = 50\text{nm}$ , a 305K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.4.

Parámetros	Valores obtenidos del ajuste							
	Modelo con difusión				Modelo sin difusión			
% mol DOCNa	0	0	20	20	0	0	20	20
T [K]	305	313	305	313	305	313	305	313
$R_o$ [nm]	50	50	50	50	50	50	50	50
$\eta D_2O$ [kg/s.m] $\times 10^{-3}$	0,92	0,78	0,92	0,78	0,92	0,78	0,92	0,78
$N_{datos}$	30	30	30	30	30	30	30	30
$N_{manual}$	0	0	0	0	0	0	0	0
$N_{+1prom\ curva}$	0	0	1	0	0	0	0	0
$\Delta$	0,15	0,15	0,2	0,2	0,15	0,18	0,18	0,2
$\alpha$	0,05	0,05	0,09	0,08	0,05	0,06	0,07	0,08
$\kappa$ [J] $\times 10^{-20}$	6,3 $\pm$ 0,8	5,1 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,5	3,9 $\pm$ 0,3	5,8 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,2	4 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 0,2
$A_{OF}$ [s $^{-2}$ ] $\times 10^9$	3,5 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 0,5	2,2 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,2	2 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,2
$\tau_D$ [s] $\times 10^{-5}$	3,6 $\pm$ 1,5	3,2 $\pm$ 1,9	2,3 $\pm$ 1,7	1,8 $\pm$ 1,4	-----	-----	-----	-----
$D$ [m $^2$ /s] $\times 10^{-12}$	8 $\pm$ 5	9 $\pm$ 8	14 $\pm$ 13	19 $\pm$ 18	-----	-----	-----	-----
$A_D$ [s $^{-2}$ ] $\times 10^8$	1,0 $\pm$ 0,6	1,0 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,4	-----	-----	-----	-----
$\tau_R$ [s] $\times 10^{-8}$	3,2 $\pm$ 0,6	2,1 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,3	3,1 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,3
$A_R$ [s $^{-2}$ ] $\times 10^8$	1,6 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,2	2,4 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,3
$A_{MR}$ [s $^{-1}$ ]	9,9 $\pm$ 1,1	7,3 $\pm$ 1,2	9,8 $\pm$ 1,1	7,2 $\pm$ 0,9	9,3 $\pm$ 1,0	7,2 $\pm$ 0,8	9,4 $\pm$ 1,2	6,5 $\pm$ 0,6
PROM	0,044	0,045	0,084	0,08	0,043	0,057	0,064	0,077

Tabla 4.4. Parámetros correspondientes a las curvas de ajuste de la dispersión de la tasa de relajación espín-red usando el modelo de la ecuación [2.1] con y sin el proceso de difusión, para liposomas de  $R_0=50$ nm compuestos de SPC y diferentes porcentajes molares de DOCNa (0 y 20%mol), a 305 y 313K (ver Figuras 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, y del Apéndice II).

Se observaron variaciones en los parámetros por la presencia del detergente, como se describe a continuación. La constante elástica  $\kappa$  mostró una ligera tendencia a disminuir con el porcentaje de detergente, lo cual es compatible con una membrana con mayor deformabilidad o flexibilidad debido a la presencia del detergente (ver ecuación [4.17]) (141). El hecho de que  $\kappa$  no presentó grandes variaciones está en concordancia con otros trabajos que no observan variaciones significativas en la deformabilidad de la membrana para el mismo tipo de vesículas a través de mediciones de microviscosidad (142). No se observan las variaciones significativas (de hasta el 80% con 20%mol de detergente) que se han reportado en  $\kappa$  en liposomas de SPC (11), lo cual puede deberse al efecto electrostático del detergente sobre la constante elástica de flexión (145). Mientras que en nuestros experimentos hemos utilizado un detergente iónico (DOCNa), el trabajo que observó las variaciones relevantes en  $\kappa$  usó un detergente no iónico (11).

El tiempo de correlación rotacional disminuyó levemente, con el contenido de detergente (ver Tabla 4.4) y las amplitudes  $A_{FO}$  y  $A_R$  no mostraron un cambio significativo con la adición del detergente.

La constante de difusión  $D$  mostró un leve incremento con el contenido de detergente (ver Tabla 4.4), siendo este un resultado esperado debido a la mayor flexibilidad de la membrana por la presencia del detergente. Además, se observó que el aporte a la relajación espín-red por parte del proceso de difusión disminuye a medida que el porcentaje de detergente se incrementa, lo cual se apreció a través de la disminución significativa del valor de  $A_D$  y los grandes errores asociados a los parámetros  $D$  y  $\tau_D$ . Este comportamiento indica que el proceso de difusión deja de ser efectivo como mecanismo de relajación, y es posible considerar el análisis de las curvas medidas en términos de un modelo simplificado que no incluya esta contribución. Por lo tanto, se usó el modelo en su versión simplificada para describir los perfiles, como se muestra en las Figuras 4.11 y 4.12. Fue posible describir los perfiles perfectamente considerando solo los procesos de fluctuaciones de orden, rotaciones, y contribuciones de movimientos rápidos intramoleculares, sin observar variaciones significativas en los parámetros, dentro de los errores experimentales, si los comparamos a aquellos

obtenidos usando el modelo completo. Adicionalmente, la precisión con la cual se pueden determinar  $\kappa$  y  $\tau_R$  mejora en el caso del modelo simplificado, lo cual se evidencia en los valores de los errores asociados a estos parámetros (ver Tabla 4.4).

Adicionalmente, se midieron perfiles de dispersión de  $R_1$  para liposomas de SPC con 0 y 20% mol de DOCNa agregado, a 313 K. Los gráficos con las curvas experimentales y sus correspondientes ajustes se encuentran en el apéndice II y los parámetros del ajuste aparecen en la Tabla 4.4. Si se mantiene fijo el porcentaje de detergente, es posible observar una ligera tendencia a decrecer con la temperatura en los parámetros  $\kappa$ ,  $\tau_D$  y  $\tau_R$ . Por otro lado, si fijamos la temperatura, se pueden apreciar a 313K las mismas tendencias en todos los parámetros como se describió para 305K, con el contenido de detergente. El análisis sin considerar el proceso de difusión para los perfiles a 313K también se llevó a cabo y los gráficos con los ajustes correspondientes se muestran en el apéndice II y los parámetros de ajuste en la Tabla 4.4. Nuevamente, no se observaron variaciones significativas en los parámetros, dentro de los errores experimentales, si los comparamos a aquellos obtenidos usando el modelo completo, mientras que la precisión con la cual se pueden determinar  $\kappa$  y  $\tau_R$  mejora en el caso del modelo simplificado

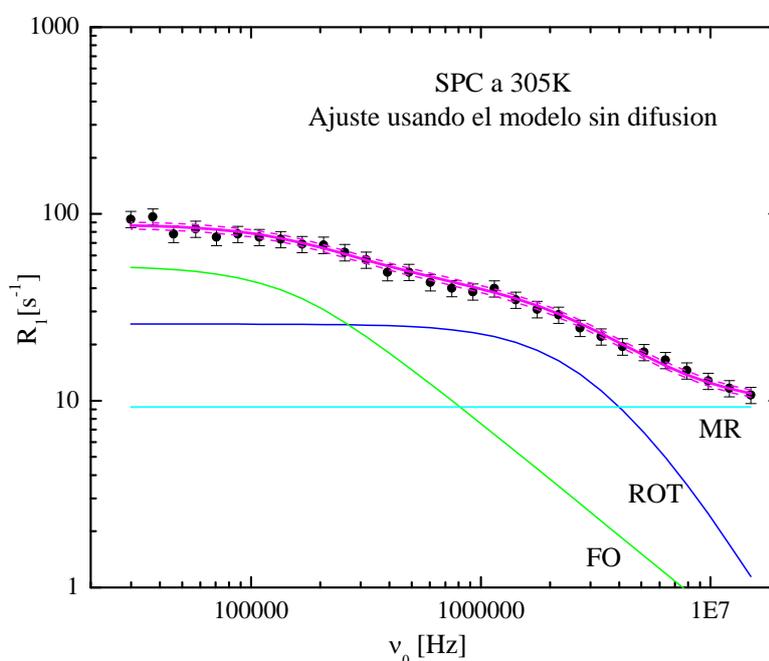


Figura 4.11. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC de radio  $R_0 = 50\text{nm}$ , a 305K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste usando el modelo sin difusión es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.4.

En resumen, fue posible describir con éxito la dinámica molecular de liposomas con detergente usando el modelo descrito en el capítulo 2 (ecuación [2.1]). Todos los parámetros físicos involucrados siguieron la tendencia esperada según la literatura, tanto con la temperatura como con el porcentaje de detergente. Adicionalmente, fue posible utilizar una versión simplificada del modelo para describir los perfiles de liposomas de SPC debido a que el aporte a la relajación espín-red por parte del proceso de difusión empezó a ser irrelevante. Esta tendencia también fue observada levemente para liposomas de DMPC con 20% mol de detergente agregado. Por último, no se observaron grandes variaciones en  $\kappa$ , pese a que el contenido de detergente fue elevado y a que se utilizó el lípido SPC, el cual se ha establecido como el lípido estándar para la preparación de

liposomas deformables/ultradeformables. En estudios futuros, se planea utilizar un detergente no iónico para la preparación de estas vesículas, a fin de intentar reproducir las grandes variaciones en la deformabilidad y en la constante elástica que han sido reportadas en la literatura.

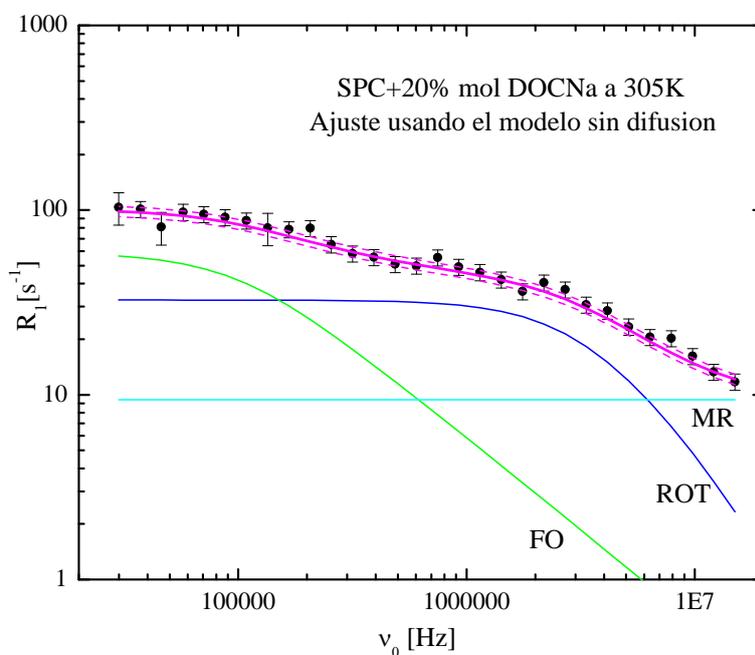


Figura 4.12. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC con 20% mol de DOCNa, de radio  $R_0 = 50\text{nm}$ , a 305K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste usando el modelo sin difusión es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.4.

# Capítulo 5

## Vesículas gigantes

A los fines de poder comparar nuestros resultados con los provenientes de métodos establecidos por la literatura para medir la constante elástica de flexión, en este capítulo se intenta extender nuestro modelo al caso de vesículas gigantes unilamelares (GUV). De esta manera, se validaría nuestra metodología como una herramienta más para el estudio de propiedades elásticas de membranas de liposomas.

### 5.1. Métodos usados para medir la constante elástica de flexión en GUV

Existe una clasificación de las vesículas unilamelares según el tamaño que poseen, las cuales se consideran estructuras cuasi-esféricas, siendo su diámetro promedio la variable que determina su tamaño. Si su tamaño es menor a los 100nm, se denominan *vesículas unilamelares pequeñas*, que denotaremos en forma breve como *SUV* por su sigla en inglés (small unilamellar vesicle). Si su tamaño se encuentra entre los 100nm y 1  $\mu\text{m}$ , se denominan *vesículas unilamelares grandes*, que denotaremos en forma breve como *LUV* (large unilamellar vesicle). Por último, si su tamaño es mayor que 1  $\mu\text{m}$ , se denominan *vesículas unilamelares gigantes*, que denotaremos en forma breve como *GUV* (gigant unilamellar vesicle).

Como se ha mencionado en el capítulo 1, entre los métodos más tradicionales para el estudio de la constante elástica de flexión  $\kappa$  en vesículas gigantes, se encuentran el uso de micropipetas, con las cuales se succiona la membrana y se observa la deformación de la misma en la zona de succión (8) y el análisis de Fourier de las fluctuaciones térmicas de la membrana (9,10). Ambos métodos requieren del uso de video microscopía óptica.

La técnica de aspiración con micropipetas introducido por Evans y Needham (146–148) ha sido aplicada para el estudio de propiedades elásticas de membranas de diferentes composiciones (137,149–155). Consiste en succionar, por medio de un capilar de vidrio (de diámetro interno  $\sim 5\text{-}10 \mu\text{m}$ ), una parte de la membrana de la vesícula (y con ello tensionar la misma), lo cual permite medir el área almacenada en las ondulaciones de la membrana. En el régimen de baja tensión, se observa una relación lineal entre la dilatación del área de la membrana (diferencia entre el área de la vesícula con ondulaciones en su estado natural y área de la vesícula bajo tensión a causa de la micropipeta) y el logaritmo de la tensión aplicada, cuya pendiente permite obtener el valor de la constante elástica de flexión. Uno de los parámetros que se miden para estimar esta dilatación del área es la longitud de la porción de vesícula aspirada por la pipeta, para lo cual se necesita el uso de microscopía óptica. Algunos inconvenientes que presenta esta técnica son: el hecho de que es invasiva; la adhesión de la membrana a la pipeta, lo cual puede superarse usando el recubrimiento apropiado en el capilar; en general subestima el valor de  $\kappa$  debido a que la variación de área de la membrana que se observa al succionar puede deberse a leves estiramientos de la mismas y no solo a las ondulaciones naturales.

Por otro lado, el método de análisis de fluctuaciones fue establecido hace casi 40 años por Brochard y Lennon aplicado a eritrocitos (156) y por Servuss et al. en vesículas tubulares (157). Más tarde se amplió a vesículas gigantes (158) y la teoría fue refinada por Helfrich (159) y Milner y Safran (160). El análisis de las fluctuaciones de forma de membranas de vesículas está basado en la recopilación de una secuencia de imágenes obtenidas con microscopía óptica. Así, las fluctuaciones de forma inducidas térmicamente alrededor de equilibrio son monitoreadas y se determinan los valores cuadráticos medios de las mismas. Este método ha sido aplicado ampliamente para el estudio de propiedades elásticas de vesículas cuasi-esféricas (9,10,158,161,162).

Desde un punto de vista experimental, probablemente este método es uno de los menos exigentes, ya que se basa en la observación directa de vesículas gigantes mediante video microscopía. Una de las pocas desventajas de este método reside en el requisito de que las vesículas deben exhibir fluctuaciones visibles, lo que implica una baja tensión en la membrana. Particularmente, este método no puede aplicarse a vesículas en la fase de gel. El método ha sido continuamente mejorado en las últimas décadas (163–166).

Nuestra metodología establecida en los capítulos anteriores para estudiar dinámica molecular de membranas de liposomas, y con ello obtener información de las propiedades elásticas de la membrana, ha sido aplicada solamente al caso de vesículas grandes (específicamente,  $R_0 = 50\text{-}80\text{nm}$ ). Como se muestra en la siguiente sección, se intentó extender nuestro modelo al caso de vesículas gigantes, por medio de llevar a cabo experimentos en dichos sistemas y comparar nuestros valores de  $\kappa$  con los obtenidos usando el método de análisis de fluctuaciones (considerando que es un método adoptado por parte de la comunidad científica para medir  $\kappa$ ).

## 5.2. Intentando extender el modelo para GUV

Los experimentos se llevaron a cabo con vesículas gigantes de DMPC suspendidos en agua pesada ( $D_2O$ ) con  $R_0$  entre 6,5 y 25  $\mu\text{m}$ , preparados por la Ing. Ma. Florencia Peralta del Laboratorio de Biofísica de Membranas y Nanotecnología, del Instituto de Investigaciones Médicas Mercedes y Martín Ferreyra de la ciudad de Córdoba. Se disolvió 1 mg de DMPC en cloroformo ( $CHCl_3$ ) y se secó con corriente de nitrógeno ( $N_2$ ), dejándose luego unas horas en vacío para terminar de eliminar el solvente. Posteriormente se hidrató el film de lípidos formados agregando el buffer acuoso (1 ml de  $D_2O$ ). Este método de preparación lo llamaremos *método por hidratación* (*gentle hydration* en inglés). Notar que la masa de lípidos utilizada en este caso no supera el 2% de la masa utilizada para preparar liposomas grandes (61,19mg).

Todas las mediciones mostradas en este capítulo fueron realizadas por la autora de la tesis, en el Laboratorio de Relaxometría y Técnicas Especiales (LaRTE) de FaMAF, UNC, en Córdoba. Se utilizó la secuencia PP1E (secuencia de campo ciclado pre-polarizada con un eco) con los siguientes parámetros: valores del campo de polarización ( $B_p$ ) y relajación ( $B_r$ ) de 15MHz; valor del campo de detección ( $B_d$ ) de 14,2MHz; tiempos de polarización  $\tau_p$  y relajación  $\tau_r$  de 1s y 2ms, respectivamente; número de scans igual a 500; atenuación del pulso de radio frecuencia de 28 dB; factor de ganancia del receptor igual a uno, y frecuencia de corte del filtro de audio de 200000Hz.

En la Figura 5.1 se muestra la señal del eco de Hahn a 15MHz para vesículas gigantes de DMPC a 310K. La relación señal-ruido extremadamente baja que se observó mediante la técnica de RMN en estas vesículas gigantes, impidió llevar a cabo los experimentos. La señal de RMN obtenida mediante la secuencia de eco de Hahn, se vio reducida alrededor de unas 60 veces respecto al valor que usualmente se observaba con los liposomas grandes con los que veníamos trabajando, mientras que la relación señal ruido se redujo aproximadamente 25 veces.

Con el objetivo de incrementar la señal, se preparó una nueva muestra de vesículas gigantes de DMPC que consistía en una mezcla de vesículas preparadas con dos métodos, para así incrementar la densidad de las mismas. Los métodos fueron: método por hidratación (como se describió anteriormente) y por *electroformación* (167). Asimismo, no se logró incrementar la señal, como se puede apreciar en la Figura 5.2, si se la compara con la Figura 5.1.

Por otro lado, se decidió medir la señal del eco de Hahn de una muestra de 1ml de agua pesada ( $D_2O$ ) a 310K para saber si contenía protones que estuvieran aportando señal. En la Figura 5.3 se muestra la señal antedicha, lo cual no solo confirma la presencia de protones si no que es indistinguible de la correspondiente a las vesículas gigantes (comparar Figuras 5.1, 5.2 y 5.3). Una comparación de los valores máximos de las amplitudes de las señales para vesículas gigantes de DMPC y agua pesada parcialmente protonada a 310K se muestra en la Figura 5.4, donde se observa que los tres valores de señal son indistinguibles dentro del error experimental (pese a la leve tendencia a crecer con la densidad de protones).

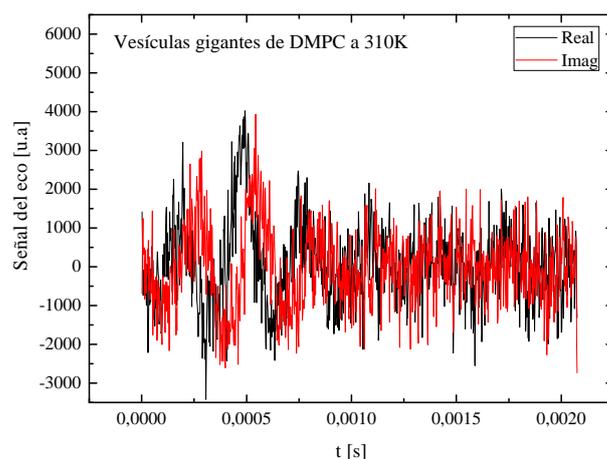


Figura 5.1. Señal del eco de Hahn para vesículas gigantes de DMPC a 310K, preparados con el *método por hidratación*, en un campo magnético de 15MHz.

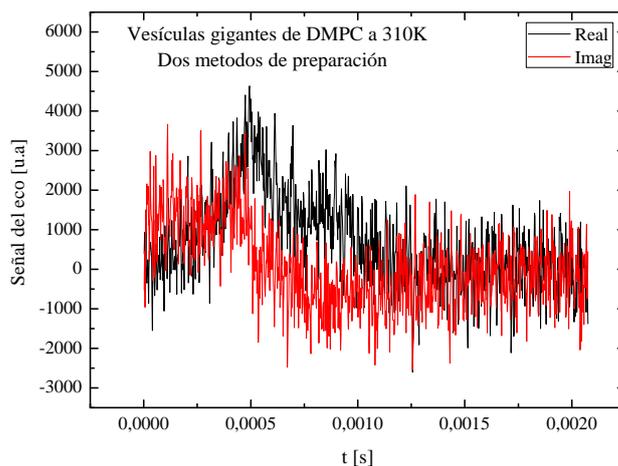


Figura 5.2. Señal del eco de Hahn para vesículas gigantes de DMPC a 310K, preparados con el *método por hidratación y electroformación*, en un campo magnético de 15MHz.

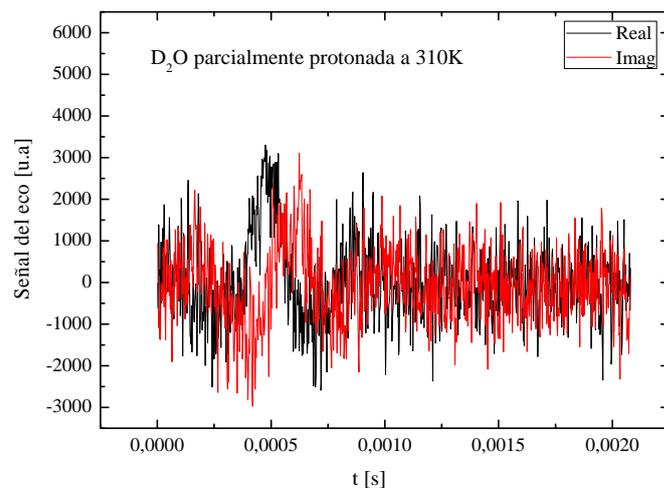


Figura 5.3. Señal del eco de Hahn para una muestra de 1ml de agua pesada parcialmente protonada, a 310K, en un campo magnético de 15MHz.

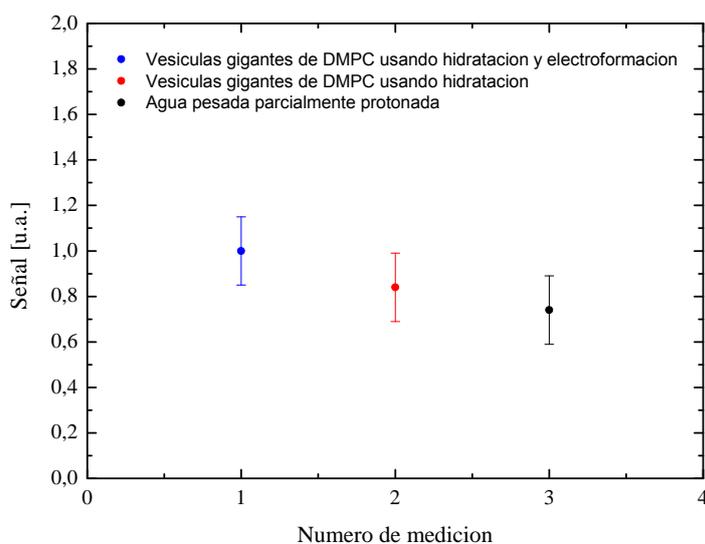


Figura 5.4. Comparación de los valores máximos de la amplitud de las señales del eco de Hahn para una muestra de 1ml de agua pesada parcialmente protonada y para vesículas gigantes preparados por hidratación y por hidratación + electroformación, a 310K y campo magnético de 15MHz.

Esto nos hizo pensar que en realidad la señal que estábamos midiendo en la muestra de vesículas provenía mayoritariamente del agua pesada parcialmente protonada, enmascarado la proveniente de los lípidos debido a su valor tan bajo. Esto se verificó completamente con las mediciones de tiempo de relajación espín-red  $T_1$  a 15MHz que se efectuaron en vesículas gigantes de DMPC y en el agua pesada parcialmente protonada, a 310K. En las Figuras 5.5 y 5.6 se muestran las curvas de valor máximo de la amplitud de la señal de RMN versus el tiempo de polarización  $\tau_p$  del campo magnético, en una secuencia de campo ciclado no-polarizada (NP), con sus correspondientes ajustes por cuadrados mínimos (obtenidos con el programa OriginPro 8).

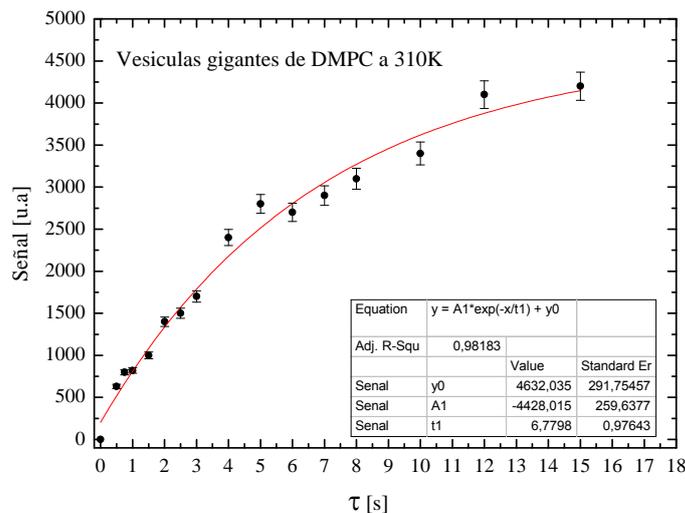


Figura 5.5. Valor máximo de la amplitud de la señal de RMN obtenida con la secuencia NP en función del tiempo de polarización  $\tau_p$  del campo magnético de 15MHz, para vesículas gigantes de DMPC a 310K, preparados usando los métodos de hidratación y electroformación. La curva roja corresponde a la curva de ajuste, tal que sus parámetros de ajuste se muestran en la tabla inserta en el gráfico.

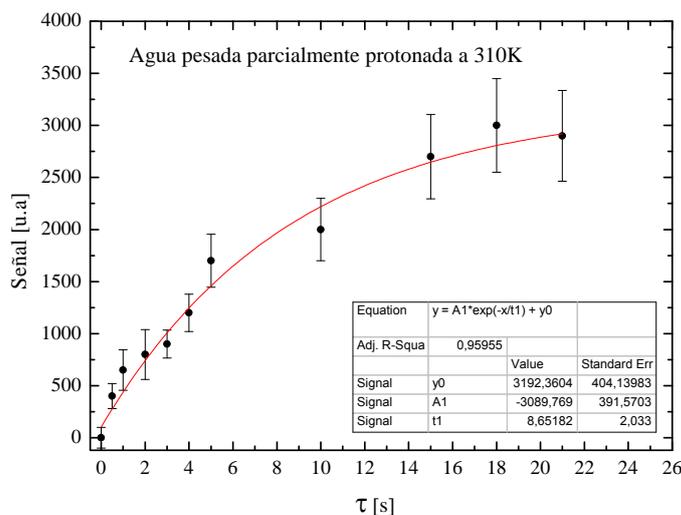


Figura 5.6. Valor máximo de la amplitud de la señal de RMN obtenida con la secuencia NP en función del tiempo de polarización  $\tau_p$  del campo magnético de 15MHz, para una muestra de agua pesada parcialmente protonada a 310K. La curva roja corresponde a la curva de ajuste, tal que sus parámetros de ajuste se muestran en la tabla inserta en el gráfico

El valor de  $T_1$  a 15MHz para vesículas de DMPC a 310K fue de  $(7 \pm 1)$ s, mientras que para la muestra de agua pesada parcialmente protonada a 310K se obtuvo un valor de  $(9 \pm 2)$ s. Vemos que estos valores son indistinguibles dentro del error experimental, concluyendo que efectivamente la mayor parte de la señal que medimos en el sistema de vesículas de DMPC suspendidos en  $D_2O$ , no proviene de los lípidos. Esto nos imposibilitó medir la dispersión de la tasa de relajación espín-red para vesículas gigantes. Notar que podría pensarse que este inconveniente se superaría si utilizáramos agua pesada a una concentración del 99,99%. Sin embargo, la relación señal ruido demostró ser muy baja, incluso con el aporte de señal de los protones presentes en el agua pesada. Por lo tanto, esto hizo

que no tuviera sentido intentar repetir los experimentos con muestras preparadas con un solvente con tal pureza. Considerando que no fue posible validar el modelo experimentalmente en el caso de vesículas gigantes, en la siguiente sección se analizan resultados de otros autores vinculados a la dependencia de la constante elástica de flexión con el tamaño de las vesículas.

### 5.3. Dependencia de la constante elástica de flexión con el tamaño de la vesícula

El tamaño de una vesícula podría modificar las características y propiedades mecánicas de su membrana. Este efecto se ve intensificado cuando el liposoma es pequeño debido a que las dimensiones del espesor de la bicapa empiezan a ser comparables con las del tamaño de la vesícula, ya que las tensiones y curvatura de la membrana aumentan considerablemente. Particularmente, existen diversos trabajos que muestran una dependencia de propiedades mecánicas, como la constante elástica de flexión y la constante de estiramiento de área ( $K_A$ ), con el radio de la vesícula (168–171). Asimismo, aún no está claro en la literatura como es la dependencia funcional exacta de estas constantes, pero podemos deducirla según la información disponible.

Si consideramos a la bicapa de la membrana del liposoma como un conjunto de finas capas elásticas y teniendo en cuenta la teoría clásica de la elasticidad (172), la constante elástica de flexión  $\kappa$  puede ser escrita de la siguiente manera (137,153,173,174):

$$\kappa = \beta K_A d^2, \quad [5.1]$$

donde  $d$  es el espesor de la bicapa, y  $\beta$  es una constante que vale 1/48 cuando la membrana se considera como monocapas desacopladas libres de deslizarse una sobre la otra, y vale 1/12 cuando se consideran monocapas completamente acopladas. Vale la pena recalcar que existen algunos trabajos en los cuales se ha verificado experimentalmente esta expresión para un amplio rango de vesículas (137,153).

Por otro lado, se ha observado mediante cálculos numéricos que en el caso de vesículas pequeñas, cuando el tamaño del liposoma disminuye, la bicapa se hace más delgada, es decir,  $d$  decrece (171). Esto se justifica con el hecho de que se incrementa el desorden orientacional de los lípidos a medida que la vesícula se hace más pequeña. Así, la dependencia funcional de  $d$  con el radio  $R$  del liposoma puede describirse en forma aproximada por la siguiente ecuación (171):

$$d = d_\infty - \frac{A}{R^2}, \quad [5.2]$$

donde  $d_\infty$  representa el espesor de una membrana infinitamente extensa, es decir, con  $R \rightarrow \infty$  y  $A$  es una constante positiva.

Como se mencionó anteriormente, la constante  $K_A$  puede depender del tamaño del liposoma, principalmente en el caso de vesículas pequeñas ( $R$  menor a 50 nm). Se ha mostrado que esta constante decae con  $R$  convergiendo a un valor constante para vesículas con radio mayor a 50nm aproximadamente (168). En este trabajo no se describe este comportamiento con ninguna función matemática, pero la tendencia de la curva es de la forma  $K_A \sim 1/R^n$ , donde  $n$  es un exponente constante y par, por lo que supondremos en primera aproximación que  $n \approx 2$ . Asumiendo este comportamiento funcional para  $K_A$  y considerando las ecuaciones [5.1] y [5.2], podríamos obtener la dependencia de la constante elástica de flexión  $\kappa$  con  $R$  de la siguiente manera:

$$\kappa(R) \approx \beta \left( C_1 + \frac{C_2}{R^2} \right) \left( d_\infty - \frac{A}{R^2} \right)^2, \quad [5.3]$$

donde  $C_1$  y  $C_2$  son constantes positivas. Así, una estimación de  $\kappa$  en función de  $R$  sería:

$$\kappa(R) \approx a_1 + \frac{a_2}{R^2} + \frac{a_3}{R^4} + \frac{a_4}{R^6}, \quad [5.4]$$

donde  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ , y  $a_4$  son constantes. Adicionalmente este mismo comportamiento para  $\kappa$  se puede obtener de la curva  $\kappa$  vs.  $R$  calculada por otros autores (170) para liposomas pequeños y grandes. En la Figura 5.1 puede observarse la curva de puntos extraída del trabajo antes mencionado y la curva de ajuste obtenida con el programa OriginPro 8, mostrando una excelente concordancia entre ellas. Los parámetros del ajuste se muestran insertos en dicha figura. Esto confirma aún más la estimación de la ecuación [5.4].

Finalmente, podríamos concluir que la constante elástica de flexión solo varía con el tamaño de la vesícula, incrementando su valor abruptamente, si su radio es menor a los 40/50nm aproximadamente. Para radios mayores, es decir, para vesículas grandes y gigantes,  $\kappa$  se mantiene prácticamente constante. Este comportamiento es bastante intuitivo, dado que es natural pensar que cuando el tamaño de la vesícula es muy pequeño la energía necesaria para doblar la membrana es mucho más alta.

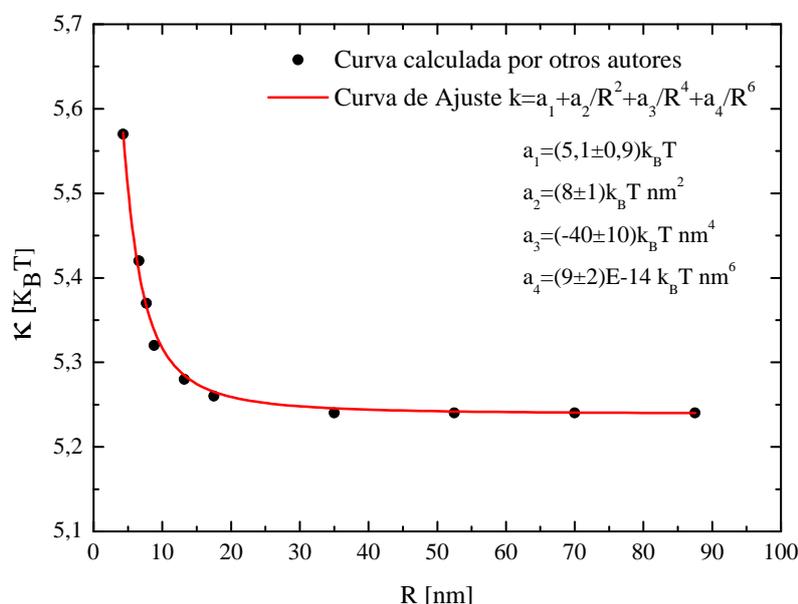


Figura 5.7. Constante elástica de flexión  $\kappa$  en función del radio  $R$  de la vesícula. La curva de puntos ha sido extraída de la referencia (170) sobre la cual se superpone la curva de ajuste (curva continua en rojo) que indica que  $\kappa \sim 1/R^6$ . Los parámetros del ajuste se muestran insertos en la figura.

Considerando que la literatura predice la no-dependencia de  $\kappa$  con el radio  $R$  de la vesícula en el rango de tamaños de vesículas grandes y gigantes ( $R \geq 40\text{nm}$ ), no deberían observarse variaciones entre los valores de la constante elástica de flexión obtenidos utilizando la técnica de análisis de Fourier de las fluctuaciones térmicas de la membrana en vesículas gigantes y nuestra metodología en vesículas grandes, si la composición de las vesículas es idéntica. Asimismo, para vesículas de DMPC, se han reportado con el primer método valores de  $\kappa$  iguales a  $(14 \pm 0,3) \times 10^{-20} \text{J}$  a 310K (145,175) mientras que nuestra metodología nos entregó un valor de  $(3,1 \pm 0,6) \times 10^{-20} \text{J}$ , a la misma temperatura. Existen algunos trabajos en los cuales se discute sobre posibles causas de estas variaciones (176,177), siendo no solo la técnica el principal motivo, sino también las condiciones de medición (7,178) (tipo de buffer y presencia de varias moléculas).

Concluimos de este capítulo entonces que las diferencias observadas en los valores de  $\kappa$  medidos con las diferentes técnicas, pueden tener su origen en cuestiones intrínsecas a cada técnica experimental. Esto requiere de un estudio detallado de las condiciones en que se preparan las muestras para cada caso, de cómo las muestras son afectadas por cada técnica en el proceso de medición, y de los procesos físicos que relacionan las mediciones propiamente dichas con el valor de  $\kappa$ .

# Capítulo 6

## Simplificación del modelo

Se ha mostrado (179) que es posible medir  $\kappa$  en un rango reducido de frecuencias (aproximadamente de 100kHz a 2MHz). Esto se basa en el hecho de que la dinámica colectiva, la cual es particularmente sensible a  $\kappa$ , es dominante sobre el proceso de difusión y es el único proceso dispersivo en dicho rango de frecuencia. Como se verá a continuación, el análisis de la dinámica molecular en un rango restringido de frecuencias permitirá simplificaciones en el modelo utilizado, facilitando la obtención de  $\kappa$  en condiciones favorables. En este capítulo se describe en que consiste exactamente esta simplificación del modelo y se lo pone a prueba en diversas formulaciones de liposomas, a diferentes temperaturas.

### 6.1. Reducción del modelo

Como se mencionó en el capítulo 2, la dispersión de la tasa de relajación  $R_1(\nu)$  de los protones de membranas lipídicas se puede explicar en términos de los siguientes procesos dinámicos (18,19):

1. Fluctuaciones locales de orden debido a las fluctuaciones de forma del esferoide del liposoma (FO).
2. Difusión traslacional de los lípidos sobre una superficie curva (D).
3. Rotaciones moleculares de los lípidos (R).
4. Movimientos internos rápidos dentro de las moléculas de lípidos (MR).

La curva modelada para  $R_1(\nu)$  se obtuvo a partir de la adición de las contribuciones de cada mecanismo:

$$R_1(\nu) = \frac{1}{T_1}(\nu) = R_1^{FO}(\nu) + R_1^D(\nu) + R_1^R(\nu) + R_1^{MR}. \quad [6.1]$$

Como se observa en la Figura 6.1, existen dos puntos de cruce que indican frecuencias particulares, donde se pueden observar dos características importantes:

- 1) El punto en el lado izquierdo define la frecuencia en la cual las contribuciones de los procesos de difusión traslacional y fluctuaciones de orden se cruzan ( $8,5 \times 10^4$  Hz en la Figura 6.1). Es decir, define la frecuencia mínima  $\nu_m$  en la cual las fluctuaciones de orden empiezan a ser dominantes sobre la difusión traslacional.
- 2) El punto de la parte derecha define la frecuencia donde la contribución del proceso de rotación empieza a ser dispersiva. Es decir, define la frecuencia máxima  $\nu_M$  hasta la cual las rotaciones no pueden distinguirse del resto de los movimientos rápidos.

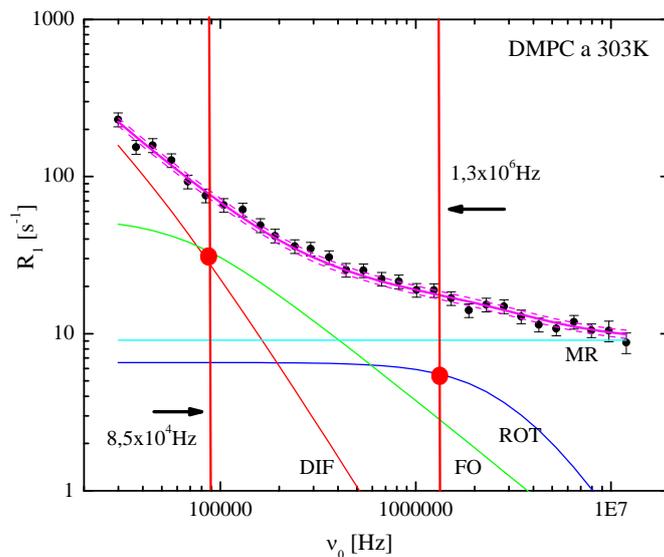


Figura 6.1. Dispersión medida de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con radio  $R_0 = 50\text{nm}$ , a  $303\text{K}$  ( $\bullet$ ). La curva de dispersión ajustada usando el modelo de la ecuación [6.1] es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Las líneas verticales rojas determinan el rango reducido de frecuencia ( $8,5 \times 10^4 \text{ Hz}$ – $1,3 \times 10^6$ , en este caso).

Estos dos puntos de cruce, definen lo que llamaremos el *rango reducido de frecuencias*. Dentro de este rango, las fluctuaciones de orden se convierten en dominantes sobre el proceso de difusión y son el único proceso dispersivo. Una consecuencia directa de este hecho es que el modelo físico dado por la ecuación [6.1] se puede simplificar dentro de este intervalo, volviéndose más robusto para la extracción, a partir del perfil de dispersión, de la constante elástica de flexión  $\kappa$ . Entonces, dentro de ese rango reducido de frecuencias, el modelo puede ser simplificado de la siguiente manera:

$$R_1(\nu) = R_1^{FO}(\nu) + R_1^{Offset}, \quad [6.2]$$

donde las contribuciones a la tasa de relajación de los movimientos rápidos y las rotaciones moleculares pueden ser reemplazados por una única constante independiente de la frecuencia, es decir,  $R_1^{Offset} = R_1^R + R_1^{MR}$ . Esto último es una consecuencia directa del hecho de que la contribución constante de las rotaciones moleculares no puede distinguirse del resto de los movimientos rápidos, que tampoco son dispersivos. Además, la contribución correspondiente a la difusión en una superficie curva puede ser despreciada debido a que las fluctuaciones de orden son absolutamente dominantes.

Vale la pena recordar que en la ecuación [6.2] la dependencia con  $\kappa$  puede verse a través de  $R_1^{FO}$  (ver ecuación [2.2] para mayor detalle de esta dependencia funcional). Así, en esta versión simplificada del modelo aparece solo un parámetro físico relevante ( $\kappa$ ), una amplitud ( $A_{FO}$ ) y una constante ( $R_1^{Offset}$ ), por lo que podríamos decir que tiene asociado tres parámetros a determinar al momento de querer encontrar la curva de ajuste óptima.

## 6.2. Aplicación y validación del modelo simplificado

Con el fin de verificar si el modelo simplificado reproduce los valores de la constante elástica de flexión obtenida usando el modelo completo, y con ello validar la reducción descrita en la sección

6.1, se llevaron a cabo ajustes de los perfiles de dispersión de la tasa de relajación usando el modelo simplificado, en el rango reducido de frecuencias. Este análisis se hizo para curvas correspondientes a liposomas de DMPC, de DMPC con colesterol y detergente agregado y liposomas de SPC con y sin detergente agregado, a diferentes temperaturas.

### Liposomas de DMPC

En las Figuras 6.1 y 6.2 se muestran las curvas experimentales y ajustadas usando el modelo completo dado por la ecuación [6.1] y el modelo simplificado de la ecuación [6.2], respectivamente, para liposomas de DMPC a 303K. El mismo análisis se realizó para liposomas de DMPC a 310, 318 y 328K, para liposomas de DMPC con 3%mol de colesterol agregado a 328K, y para liposomas de DMPC con 20%mol de detergente DOCNa agregado a 318K. En las Figuras 6.3 y 6.4, se muestran las curvas experimentales y ajustadas usando el modelo simplificado, para liposomas de DMPC con 3%mol de colesterol a 328K, y de DMPC con 20%mol de DOCNa agregado a 318K, respectivamente. Los ajustes restantes se muestran en el Apéndice II. En todos los casos, la determinación del rango reducido de frecuencias se hizo determinando los dos límites  $\nu_m$  y  $\nu_M$  descriptos gráficamente en la Figura 6.1, cuyos valores se muestran en la Tabla 6.1. Se observa que es posible definir un rango reducido de frecuencia promedio dado por  $118 \times 10^3$  -  $2,2 \times 10^6$  Hz, para liposomas a base de DMPC. Los parámetros relevantes provenientes de los ajustes se muestran en la Tabla 6.2.

Se puede observar que la concordancia entre las curvas experimentales en el rango reducido de frecuencias y las curvas ajustadas usando el modelo simplificado es muy buena, dentro de los errores experimentales (ver Figuras 6.2, 6.3 y 6.4). En la Tabla 6.3 se comparan los valores de  $\kappa$  obtenidos en ambos casos para todas las formulaciones de liposomas de DMPC analizadas en esta sección.

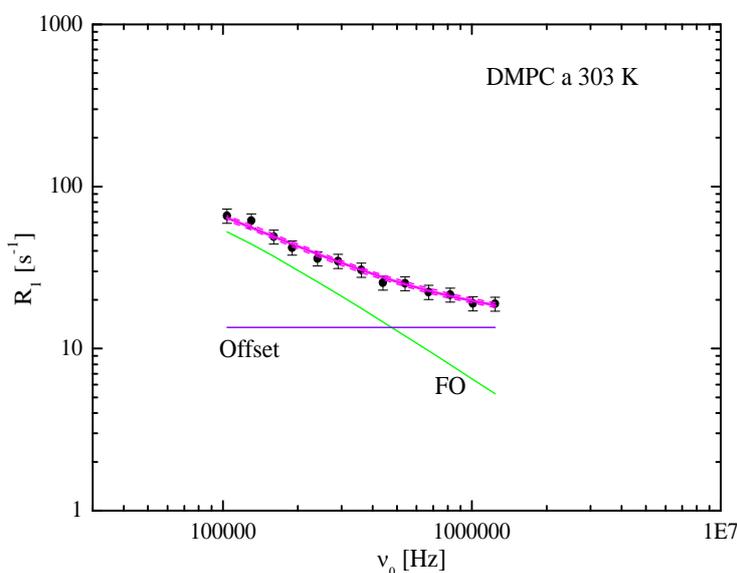


Figura 6.2. Dispersión medida de la tasa de relajación espín-red en el rango reducido de frecuencias para una suspensión de liposomas de DMPC con radio  $R_0 = 50$  nm, a 303K (●). La curva de dispersión ajustada usando el modelo simplificado de la ecuación [6.2] es mostrada en magenta. Las contribuciones de las fluctuaciones de orden (verde), y de la constante de offset (violeta) son incluidas. Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 6.2

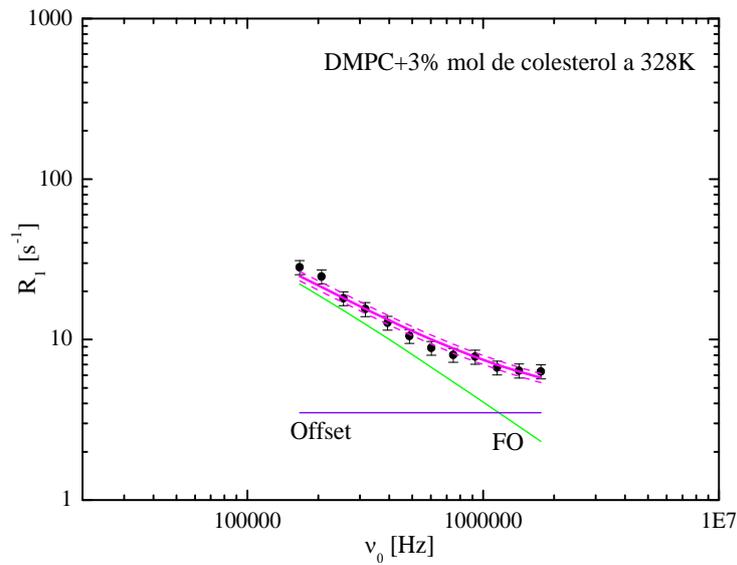


Figura 6.3. Dispersión medida de la tasa de relajación espín-red en el rango reducido de frecuencias para una suspensión de liposomas de DMPC+3%mol de colesterol con radio  $R_0 = 50\text{nm}$ , a 328K (●). La curva de dispersión ajustada usando el modelo simplificado de la ecuación [6.2] es mostrada en magenta. Las contribuciones de las fluctuaciones de orden (verde), y de la constante de offset (violeta) son incluidas. Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 6.2

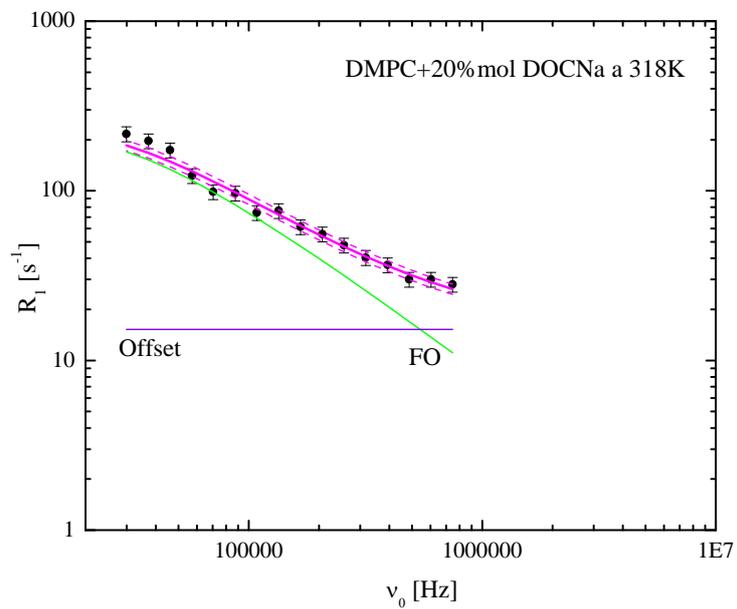


Figura 6.4. Dispersión medida de la tasa de relajación espín-red en el rango reducido de frecuencias para una suspensión de liposomas de DMPC+20%mol de DOCNa con radio  $R_0 = 50\text{nm}$ , a 318K (●). La curva de dispersión ajustada usando el modelo simplificado de la ecuación [6.2] es mostrada en magenta. Las contribuciones de las fluctuaciones de orden (verde), y de la constante de offset (violeta) son incluidas. Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 6.2

T [K]±1	% mol DOCNa	% mol Colesterol	$\nu_m$ [Hz] x10 <sup>3</sup>	$\nu_M$ [Hz] x10 <sup>6</sup>
303	0	0	85	1,3
310			130	1,4
318			120	2,5
328			195	5,5
328		3	150	1,8
318	20	0	29	0,75

Tabla 6.1. Rangos reducidos de frecuencia calculados a partir de curvas ajustadas utilizando el modelo completo de la ecuación [6.1], para perfiles de dispersión de la tasa de relajación espín-red de liposomas de DMPC con diferentes porcentajes molares de detergente DOCNa o colesterol. Es posible definir un rango reducido de frecuencia promedio dado por  $118 \times 10^3$ -  $2,2 \times 10^6$  Hz.

Parámetros	Valores obtenidos del ajuste					
% mol DOCNa	0	0	0	0	0	20
% mol Colesterol	0	0	0	0	3	0
T [°K]±1	303	310	318	328	328	318
$R_o$ [nm]	50	50	50	50	50	50
$\eta D_2O$ [kg/s.m] x10 <sup>-3</sup>	0,97	0,82	0,72	0,6	0,6	0,72
$N_{datos}$	13	9	15	16	12	16
$N_{manual}$	0	0	0	0	0	0
$N_{+1prom\_curva}$	0	0	0	1	0	0
$\Delta$	0,1	0,101	0,22	0,197	0,15	0,18
$\alpha$	0,05	0,05	0,098	0,05	0,07	0,08
$\kappa$ [J] x10 <sup>-20</sup>	2,6±0,3	2,9±0,3	2,1±0,2	2,0±0,3	1,8±0,2	1,0±0,1
$A_{OF}$ [s <sup>-2</sup> ] x10 <sup>9</sup>	1,5±0,1	1,4±0,1	0,90±0,08	0,70±0,07	0,60±0,04	0,7±0,1
$R_l^{offset}$ [s <sup>-1</sup> ]	14±1	7,5±1	4,6±0,8	3,5±0,4	3,5±0,3	15±1
<b>PROM</b>	0,034	0,048	0,097	0,046	0,065	0,069

Tabla 6.2. Parámetros correspondientes a las curvas de ajuste de las dispersiones de la tasa de relajación para liposomas compuestos de DMPC y diferentes porcentajes molares de DOCNa (20% mol) o colesterol (3% mol), entre 303 y 328K (ver Figuras 6.2, 6.3, 6.4 y del Apéndice II).

T [K]±1	% mol DOCNa	% mol Colesterol	$\kappa$ [J] x10 <sup>-20</sup> Modelo completo	$\kappa$ [J] x10 <sup>-20</sup> Modelo simplificado
303	0	0	2,8±0,6	2,6±0,3
310			2,9±0,7	2,9±0,3
318			2,2±0,6	2,1±0,4
328			1,7±0,5	2,0±0,3
328		3	2,2±0,5	1,8±0,2
318	20	0	1,2±0,1	1,0±0,1

Tabla 6.3. Comparación de los valores de  $\kappa$  obtenidos de las curvas ajustadas utilizando el modelo completo (ecuación [6.1]) y el modelo simplificado (ecuación [6.2]) para todas las formulaciones de liposomas de DMPC analizadas en esta sección.

Como se observa en la Tabla 6.3, los valores de la constante elástica obtenidos de los ajustes usando el modelo completo y simplificado, son indistinguibles, dentro de los errores experimentales. La Figura 6.5 muestra estos resultados en forma gráfica, en donde se observa claramente la mayor precisión con la que se determina esta constante cuando se usa el modelo reducido.

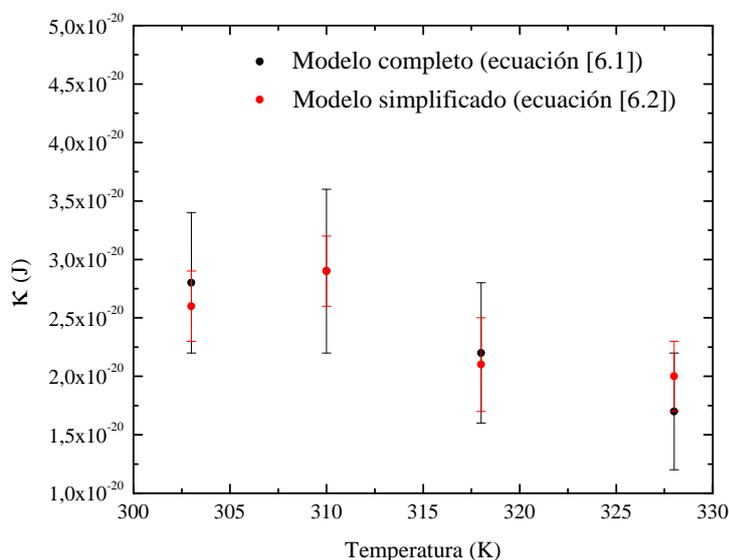


Figura 6.5. Comparación de los valores de  $\kappa$  obtenidos de las curvas ajustadas utilizando el modelo completo (ecuación [6.1]) y el modelo simplificado (ecuación [6.2]) para liposomas de DMPC, a diferentes temperaturas.

### Liposomas de SPC

En las Figuras 6.6 y 6.7, se muestran las curvas experimentales y ajustadas usando el modelo simplificado, para liposomas de SPC y SPC con 20%mol de DOCNa, a 313K, respectivamente. Los valores de  $\nu_m$  y  $\nu_M$  se muestran en la Tabla 6.4. Es posible definir un rango reducido de frecuencia promedio dado por  $29 \times 10^3$ -  $0,98 \times 10^6$  Hz, para liposomas a base de SPC. Los parámetros relevantes provenientes de los ajustes se muestran en la Tabla 6.5.

Se puede observar que la concordancia entre las curvas experimentales en el rango reducido de frecuencias y las curvas ajustadas usando el modelo simplificado es muy buena (ver Figuras 6.6 y 6.7), dentro de los errores experimentales. En la Tabla 6.6 se comparan los valores de  $\kappa$  obtenidos en ambos casos para las dos formulaciones de liposomas a base de SPC analizadas en esta sección.

%mol DOCNa	$\nu_m$ [Hz] $\times 10^3$	$\nu_M$ [Hz] $\times 10^6$
0	29	0,75
20	29	1,2

Tabla 6.4. Rangos reducidos de frecuencia calculados a partir de curvas ajustadas utilizando el modelo completo de la ecuación [6.1], para perfiles de dispersión de la tasa de relajación espín-red de liposomas de SPC con diferentes porcentajes molares de detergente DOCNa, a 313K. Es posible definir un rango reducido de frecuencia promedio dado por  $29 \times 10^3$ -  $0,98 \times 10^6$ Hz.

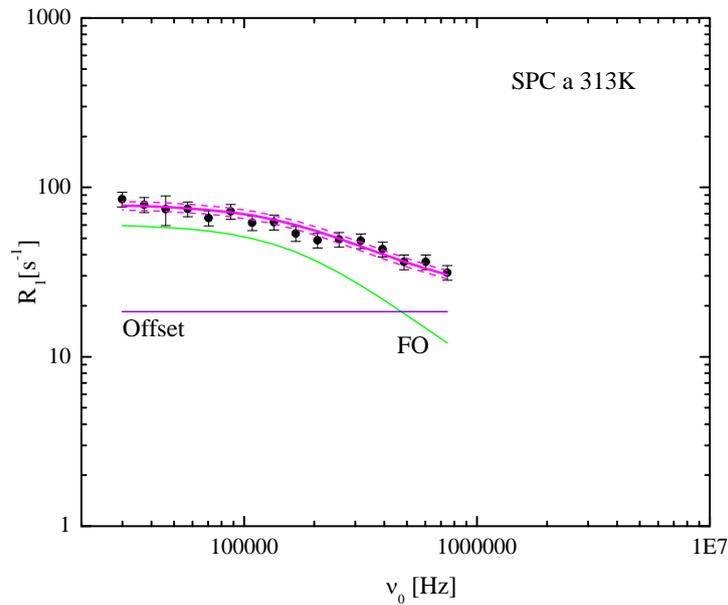


Figura 6.6. Dispersión medida de la tasa de relajación espín-red en el rango reducido de frecuencias para una suspensión de liposomas de SPC con radio  $R_0 = 50\text{nm}$ , a 313K (●). La curva de dispersión ajustada usando el modelo simplificado de la ecuación [6.2] es mostrada en magenta. Las contribuciones de las fluctuaciones de orden (verde), y de la constante de offset (violeta) son incluidas. Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 6.5.

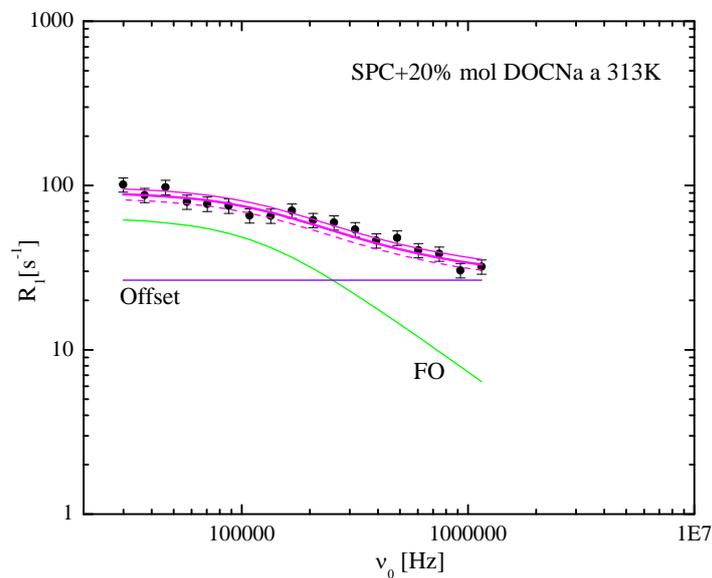


Figura 6.7. Dispersión medida de la tasa de relajación espín-red en el rango reducido de frecuencias para una suspensión de liposomas de SPC+20% mol de DOCNa con radio  $R_0 = 50\text{nm}$ , a 313K (●). La curva de dispersión ajustada usando el modelo simplificado de la ecuación [6.2] es mostrada en magenta. Las contribuciones de las fluctuaciones de orden (verde), y de la constante de offset (violeta) son incluidas. Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 6.5.

Parámetros	Valores obtenidos del ajuste	
% mol DOCNa	0	20
T [°K]±1	313	313
$R_o$ [nm]	50	50
$\eta D_2O$ [kg/s.m] $\times 10^{-3}$	0,78	0,78
$N_{datos}$	16	18
$N_{manual}$	0	0
$N_{+1prom\_curva}$	0	0
$\Delta$	0,15	0,015
$\alpha$	0,06	0,08
$\kappa$ [J] $\times 10^{-20}$	5,1±0,2	3,9±0,1
$A_{OF}$ [s <sup>-2</sup> ] $\times 10^9$	4,0±0,7	2,4±0,6
$R_l^{offset}$ [s <sup>-1</sup> ]	19±1	27±1
<i>PROM</i>	0,058	0,075

Tabla 6.5. Parámetros correspondientes a la curvas de ajuste de las dispersiones de la tasa de relajación espín-red para liposomas compuestos de SPC y diferentes porcentajes molares de DOCNa, a 313K (ver Figuras 6.6 y 6.7).

% mol DOCNa	$\kappa$ [J] $\times 10^{-20}$ Modelo completo	$\kappa$ [J] $\times 10^{-20}$ Modelo simplificado
0	5,1±0,5	5,1±0,2
20	3,9±0,3	3,9±0,1

Tabla 6.6. Comparación de los valores de  $\kappa$  obtenidos de las curvas ajustadas utilizando el modelo completo (ecuación [6.1]) y el modelo simplificado (ecuación [6.2]) para liposomas de SPC con 0 y 20% mol de DOCNa, a 313K.

Como se observa en la Tabla 6.6, nuevamente los valores de la constante elástica obtenidos de los ajustes usando el modelo completo y simplificado, son indistinguibles, dentro de los errores experimentales. Además, los errores de esta constante son menores cuando se usa el modelo reducido.

En conclusión, basándonos en los resultados tanto para liposomas a base de DMPC como de SPC, podemos afirmar que el modelo simplificado es evidentemente más sensible a la constante elástica de flexión, permitiendo obtener  $\kappa$  con mayor precisión y en menor tiempo.

# Capítulo 7

## Polimerosomas

En este capítulo se presentan resultados preliminares del estudio de la dinámica molecular de vesículas poliméricas utilizando la técnica de relaxometría magnética nuclear con ciclado de campo. Al igual que en el caso de liposomas, se estudian las propiedades de relajación de protones de vesículas suspendidas en agua deuterada.

### 7.1. Micelas poliméricas como transportadoras de drogas

La administración de fármacos que poseen baja solubilidad en fluidos biológicos todavía representa una importante limitación para la industria farmacéutica, siendo el caso de alrededor del 50% de las drogas. Entre las estrategias existentes para superar este problema, la inclusión de fármacos hidrofóbicos en micelas poliméricas es una de las alternativas más atractivas y versátiles (180,3,2). Los copolímeros tribloque anfifílicos compuestos por óxido de etileno (OE) y óxido de propileno (OP), son materiales termosensibles que muestran propiedades de agregación en medios acuosos. Debido a su capacidad para formar sistemas micelares estables en agua, estos materiales son estudiados ampliamente para la solubilización de medicamentos poco solubles en agua (27,28).

### 7.2. Dinámica molecular en polimerosomas

Los procesos dinámicos presentes en copolímeros o micelas poliméricas están caracterizados por una amplia escala temporal, que va a partir de  $\sim 10^{-12}$  s para vibraciones y rotaciones moleculares de los grupos internos que conforman los unímeros (copolímero sin agregarse), hasta movimientos mucho más lentos asociados a reorientaciones de los agregados y a los procesos de fisión-fusión de micelas ( $\sim 10^{-1}$  s) (181). Si bien se ha progresado mucho en la elucidación de la estructura de agregados de copolímeros, la dinámica molecular de los mismos aún sigue siendo poco conocida.

Existen dos procesos dinámicos espontáneos que ocurren en las soluciones micelares, a saber, el intercambio del copolímero entre los estados de unímero y micela y la formación/ruptura de micelas. Estos procesos son los más comúnmente estudiados y han sido ampliamente discutidos en la literatura durante décadas (182–192) usando diferentes técnicas. Los valores reportados sobre la escala de tiempo de estos procesos son variantes debido a que los experimentos de los diferentes estudios han sido realizados en diferentes polímeros bajo distintas condiciones de temperatura y concentración. Asimismo, se los puede asociar con diferentes escalas de tiempo. El primero es el más rápido (microsegundos a algunos milisegundos) y el segundo es lo suficientemente lento (cientos de milisegundos) para no ser siempre observable con las técnicas experimentales comúnmente usadas y ocurre principalmente vía fusión/fisión de agregados submicelares.

El intercambio de unímeros es un proceso complejo en el que el glóbulo hidrófobo del copolímero se desenrolla o despliega (uncoils, unfolds) al ingresar a la micela. En la expulsión, una vez que el unímero alcanza pleno contacto con el solvente, el copolímero se enrolla o pliega (coils, folds) nuevamente con el fin de evitar el contacto entre el medio acuoso y el bloque hidrófobo POP (191). Es

decir, el intercambio de una molécula individual del copolímero con la micela, tienen asociado un mecanismo de plegado y desplegado.

Por otro lado, se han llevado a cabo estudios del proceso de difusión en este tipo de sistemas (193). Los autores presentan un estudio del efecto de las diferentes fases estructurales o de agregación en la difusión del copolímero usando la técnica de RMN con gradiente de campo pulsado (PFG-NMR). Debido a la crítica dependencia de la estructura con la temperatura y concentración, se han observado, en una amplia variedad de estos polímeros, diferentes fases estructurales. Estas fases se obtienen progresivamente al ir incrementando la concentración y/o la temperatura. Se concluyó que el proceso de difusión está gobernado principalmente por el tipo de ordenamiento en las diferentes estructuras en lugar de estar determinado por la cantidad de obstáculos o volumen disponible. Así, en la fase micelar, considerando la difusión de la micela como un todo, se reportó un valor del coeficiente de difusión (decreciente con la concentración del polímero) en el rango de  $10^{-12}$ - $10^{-11}$  m<sup>2</sup>/s.

Estudios utilizando dispersión de neutrones en Pluronic F68, distinguieron dos procesos de relajación, prácticamente insensibles a los cambios de fases de la solución (194). El proceso más lento fue asociado a una dinámica de Rouse del bloque POP, mientras que el proceso más rápido fue adjudicado a los modos de difusión longitudinales del bloque POE. En concordancia con las diferentes dinámicas moleculares de los bloques POP y POE, estudios de relajación por RMN a 600 MHz, revelaron diferentes valores de  $T_1$  para los grupos -CH<sub>2</sub> y -CH<sub>3</sub> de dichos bloques, con diferentes formas funcionales con la temperatura (195).

### 7.3. Experimentos de dispersión del tiempo de relajación espín-red

#### 7.3.1. Preparación de la muestra

Se prepararon micelas suspendidas en agua deuterada (D<sub>2</sub>O) utilizando tres tipos diferentes de copolímeros tribloque de nombre comercial Pluronic, a saber: F68 (EO<sub>80</sub>PO<sub>27</sub>EO<sub>80</sub>), F108 (EO<sub>141</sub>PO<sub>44</sub>EO<sub>141</sub>), y F127 (EO<sub>101</sub>PO<sub>56</sub>EO<sub>101</sub>) a concentraciones entre 10 y 22,5% m/v. El método de preparación fue el siguiente: se mezcló el copolímero con D<sub>2</sub>O en diferentes proporciones (concentraciones medidas como masa del polímero en volumen de solución), a temperatura ambiente. Luego, la mezcla fue colocada de 12 a 24 horas, a una temperatura entre 277 y 279K dado que tanto el OE y el OP son hidrofílicos a estas temperaturas y eso favorece la disolución del polímero. Una vez que la solución lucía totalmente transparente, fue colocada a una temperatura mayor o igual a la TMC a modo de obtener micelas, considerando la concentración de la misma.

#### 7.3.2. Medición del tiempo de relajación espín-red en el sistema de laboratorio en función de la frecuencia de Larmor

Las dispersiones del tiempo de relajación espín-red ( $T_1$ ) de protones para soluciones acuosas de polímeros se midieron usando la técnica de RMN con ciclado rápido de campo con un relaxómetro Spinmaster FFC- 2000 (Stelar; Mede, Italia). Todas las mediciones mostradas en este capítulo fueron realizadas por la autora de esta tesis y por el Dr. German Farrher en la Facultad de Matemáticas y Ciencias Naturales (Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften) de la Universidad Técnica de Ilmenau (Technische Universität Ilmenau) situada en Ilmenau, Alemania. En todos los casos se utilizó un campo magnético de polarización de 0,47 T (equivalente a 20 MHz para <sup>1</sup>H), el cual se encendía por período de tiempo entre 1 y 2 s para generar la magnetización de la muestra, dependiendo de la muestra y la temperatura. El valor del campo de adquisición fue de 0,392 T (16,7 MHz). Los perfiles se midieron dentro del rango de frecuencias de 8 kHz a 20 MHz (valores del campo de relajación, en general entre 10-24 valores diferentes en este rango), teniendo en cuenta que los campos locales medidos (no mostrados) fueron inferiores a 1 KHz para todas las muestras. Éstos fueron medidos utilizando experimentos en el sistema rotante utilizando la denominada *secuencia de Lock*, que consistió en el estudio de la dispersión de la señal de RMN, a duración del pulso de lock fijo, en función de la intensidad de campo de radiofrecuencia aplicado (34,35).

Los valores de  $T_1$  fueron determinados de las curvas de recuperación de la magnetización por ajuste de cuadrados mínimos. Estos valores no fueron sensibles a la ventana temporal sobre la cual la FID fue muestreada. Se encontró que el proceso de relajación spin-red de la magnetización era monoexponencial en todas las frecuencias para algunas soluciones acuosas de Pluronic y biexponencial para otras. Típicamente, se midió la señal entre 12 y 24 veces para cada tiempo de recuperación  $\tau$  de la magnetización (12-30 valores diferentes de  $\tau$ ). La temperatura de la muestra fue controlada con una variación de 1K aproximadamente utilizando el controlador de temperatura variable Spinmaster.

Se midieron dispersiones para soluciones acuosas compuestas por Pluronic F68, F108 y F127 a diferentes concentraciones (10-22.5% w/v) y temperaturas (276-298 K).

### Pluronic F127

En la Figura 7.1 se muestra el perfil de dispersión de  $T_1$  para una solución acuosa de Pluronic F127 a una concentración de 10% m/v, y a una temperatura de 291K. La muestra se encontraba en fase de solución y estaba compuesta de micelas y unímeros (moléculas del polímero sin agregarse) considerando que la TMC a esta concentración es de alrededor de 291K (196,197). Fue necesario realizar un análisis biexponencial de la recuperación de la magnetización y por lo tanto  $M_z(\tau)$  fue considerada de la siguiente manera:

$$M_z(t) = A_{T_{\text{corto}}} e^{-\tau/T_{\text{corto}}} + A_{T_{\text{largo}}} e^{-\tau/T_{\text{largo}}} + M_o, \quad [7.1]$$

donde  $T_{\text{corto}}$  y  $T_{\text{largo}}$  son los tiempos de relajación espín-red “corto” y “largo”, respectivamente,  $A_{T_{\text{corto}}}$  y  $A_{T_{\text{largo}}}$  son las amplitudes asociadas a cada componente de la relajación y  $M_o$  es el valor a de la magnetización en el equilibrio ( $\tau \rightarrow \infty$ ). A pesar de que ambas componentes de  $T_1$  muestran una dispersión muy débil,  $T_{\text{corto}}$  parece ser más dispersivo.

Considerando la baja dispersión obtenida a una concentración del 10% m/v, se midió el perfil de dispersión para una solución acuosa de Pluronic F127 a una concentración más alta. En la Figura 7.2 se muestran los perfiles de dispersión de  $T_{\text{corto}}$  y  $T_{\text{largo}}$  para una solución acuosa de Pluronic F127 a una concentración de 22,5% m/v, medida a 287 y 293K. La muestra se encontraba en fase de solución y estaba compuesta de micelas y unímeros a 287K y presentaba fase de gel y estaba compuesta por micelas a 293K (196,197). Nuevamente, la dispersión en ambas componentes de  $T_1$  es muy débil, siendo la correspondiente a  $T_{\text{corto}}$  levemente más dispersiva. Además, no se observan diferencias, dentro de los errores experimentales, entre los perfiles medidos en fase de solución y en fase de gel.

Por otro lado, se observó un comportamiento biexponencial en  $T_1$  para Pluronic F127 en fase sólida (sin disolver en agua) medido a 20MHz y a una temperatura de 300K (resultado no mostrado). Este resultado nos induce a pensar que esta característica biexponencial de  $T_1$  podría estar vinculada a propiedades del polímero y a consecuencia de eso se analizó el cociente de las amplitudes asociadas a cada componente de  $T_1$ . Así, se calculó el cociente  $R$  definido por la ecuación [7.2] teniendo en cuenta que el polímero F127 contiene 808 y 336 protones en los grupos POE (polióxido de etileno) y POP (polióxido de propileno), respectivamente. Luego, las dos componentes observadas en  $T_1$  fueron atribuidas a las diferentes dinámicas moleculares de los bloques POE y POP, siendo  $T_{\text{corto}}$  asociado al bloque POP (de movilidad más restringida por encontrarse en el centro del copolímero) y  $T_{\text{largo}}$  a los bloques POE (presenta mayor libertad de movimiento por encontrarse en los extremos). Esto se basó en resultados de otros trabajos (194,195), y en la concordancia que existe entre el valor teórico para el cociente de amplitudes (ecuación [7.2]) y el obtenido experimentalmente que se muestra en la Figura 7.3.

$$R = \frac{N^\circ \text{ protones POP}}{N^\circ \text{ protones POE}} = 0,416 = \left[ \frac{A_{T_{\text{corto}}}}{A_{T_{\text{largo}}}} \right]_{\text{teórico}} \quad [7.2]$$

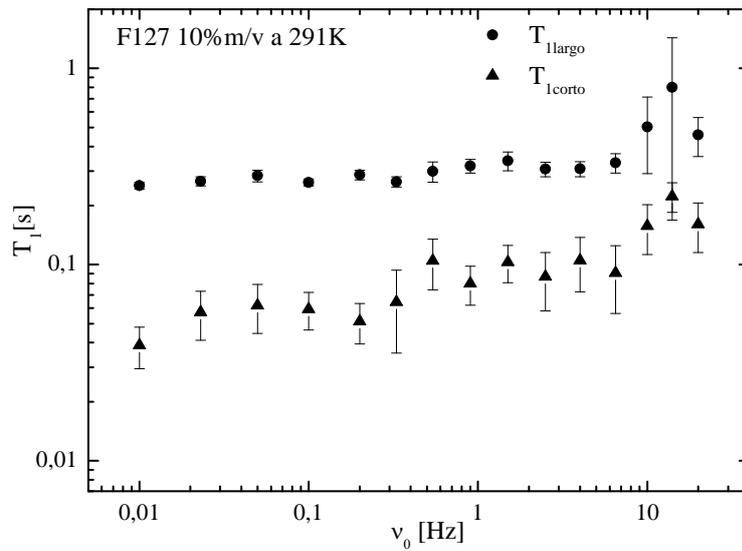


Figura 7.1. Perfiles de dispersión de las dos componentes de  $T_1$  para una solución acuosa de Pluronic F127 a 10% w/v, y 291K. La muestra se encontraba en fase de solución y estaba compuesta de micelas y unímeros. El perfil de  $T_{1corto}$  parece ser más dispersivo.

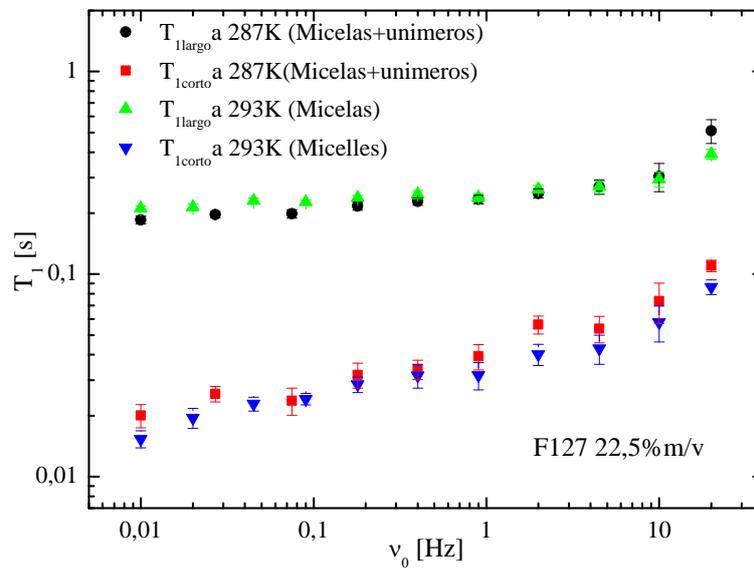


Figura 7.2. Perfiles de dispersión de las dos componentes de  $T_1$  para una solución acuosa de Pluronic F127 a 22,5% m/v, medidas a 287 y 293K. La muestra se encontraba en fase de solución y estaba compuesta de micelas y unímeros a 287K y presentaba fase de gel y estaba compuesta por micelas a 293K. El perfil de  $T_{1corto}$  parece ser más dispersivo nuevamente, en ambos casos.

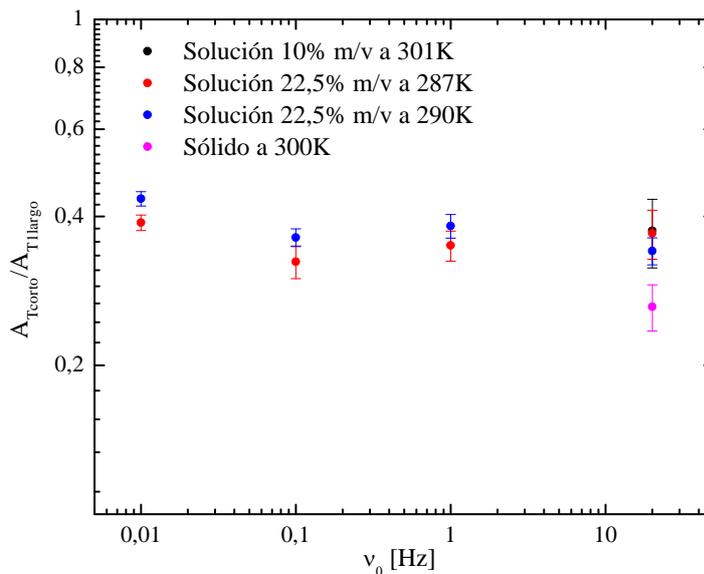


Figura 7.3. Cociente de las amplitudes  $A_{T1corto}$  y  $A_{T1largo}$  asociadas a las dos componentes de  $T_1$  para Pluronic F127 a diferentes concentraciones, temperaturas y frecuencias, en fase sólida y fase solución.

### Pluronic F68 y F108

En las Figuras 7.4 y 7.5 se muestran los perfiles de dispersión de  $T_1$  para soluciones acuosas de Pluronic F68 y F108, respectivamente, a una concentración de 22,5% m/v, medidos a 287 y 298K. Según los diagramas de fase para estos polímeros (196–198), las muestras se encontraban en fase de solución a ambas temperaturas y estaban compuestas de micelas y unímeros para F68 y básicamente unímeros a 287K y micelas a 298K, para F108. En este caso, la magnetización mostró un comportamiento monoexponencial y el perfil de  $T_1$  nuevamente fue poco dispersivo. Asimismo,  $T_1$  parece ser levemente más dispersivo en la fase micelar que en la fase de unímeros como se muestra en la Figura 7.5.

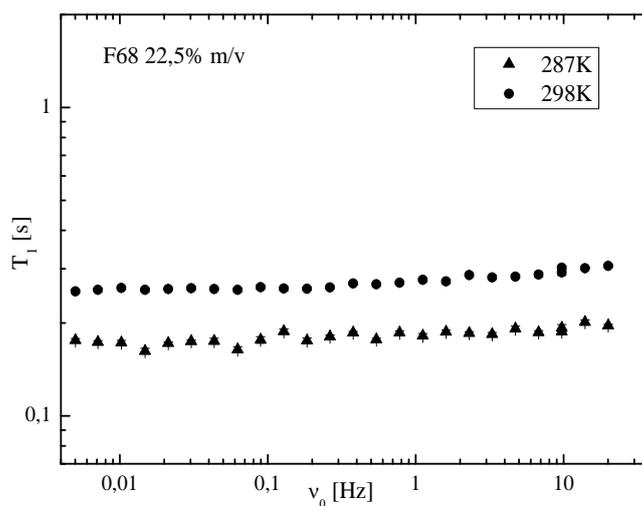


Figura 7.4. Perfil de dispersión de  $T_1$  para una solución acuosa de Pluronic F68 a 22.5% m/v, a 287K y 298K. La muestra se encontraba en fase de solución y estaba compuesta de micelas y unímeros a ambas temperaturas. Se observa una muy débil dispersión en la única componente de  $T_1$ .

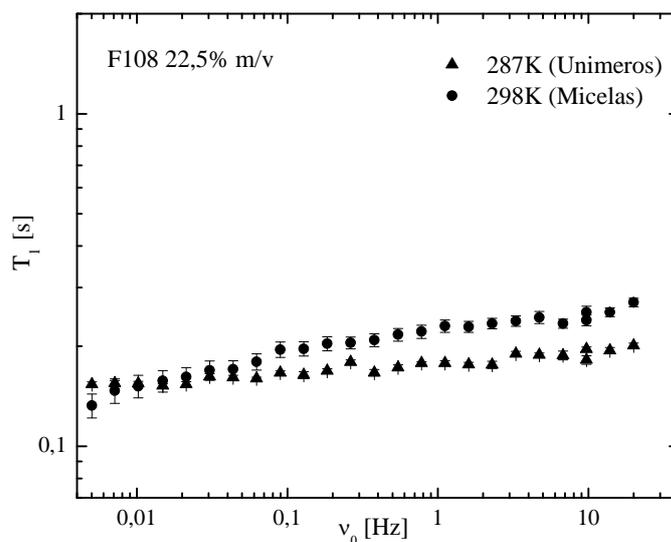


Figura 7.5. Perfil de dispersión de  $T_1$  para una solución acuosa de Pluronic F108 a 22,5% m/v, a 287K y 298K. La muestra se encontraba en fase de solución a ambas temperaturas y estaba compuesta básicamente de unímeros a 287K y de micelas a 298K. Aunque se observa una débil dispersión en la única componente de  $T_1$  a ambas temperaturas, ésta es levemente más dispersiva en la fase micelar.

### 7.3.3. Medición de la tasa de relajación espín-red en el sistema rotante en función de la frecuencia de Larmor

Se midieron dispersiones del tiempo de relajación espín-red de protones para soluciones acuosas de polímeros en el sistema rotante ( $T_{1\rho}$ ), usando la secuencia de spin-lock (35), con un espectrómetro Bruker Minispec mq20 (20 MHz). Vale la pena mencionar que el sistema rotante es un sistema de referencia que rota a la frecuencia de Larmor respecto al sistema de laboratorio (30). El rango de frecuencias considerado para el campo de lock ( $f_{lock}$ ) fue de 6 kHz a 22 kHz. Se encontró que el proceso de relajación spin-red de la magnetización en el sistema rotante era monoexponencial en todas las frecuencias para algunas soluciones acuosas de Pluronic y biexponencial para otras. La temperatura de la muestra se controló con una variación de 1K aproximadamente utilizando la unidad de control de temperatura del instrumento Bruker Minispec.

Se midieron dispersiones para soluciones acuosas compuestas por Pluronic F68 al 10% m/v y F127 al 22,5% m/v, a 298K. Sus perfiles de dispersión se muestran en las Figuras 7.6 y 7.7, respectivamente. Considerando los valores de TMC para estos polímeros (196,197), las muestras se encontraban en fase de solución y compuesta de unímeros y micelas para F68, y en fase de gel y compuesta por micelas para F127.  $T_{1\rho}$  exhibió sólo una componente para F68, pero dos componentes,  $T_{1\rho corto}$  y  $T_{1\rho largo}$ , se ponen de manifiesto, como en el caso de  $T_1$ , para F127. No se observa dispersión en los perfiles de  $T_{1\rho}$  de ambos polímeros, en el rango de frecuencia medido.

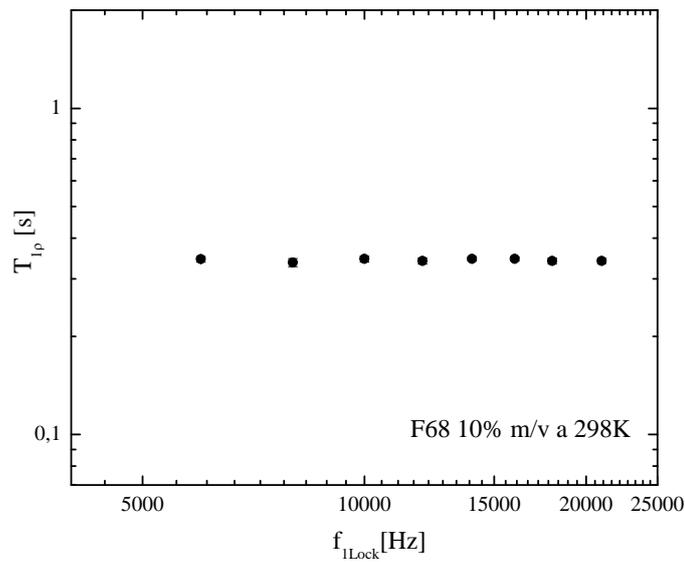


Figura 7.6. Perfil de la única componente de  $T_{1p}$  para una solución acuosa de Pluronic F68 al 10% m/v, a 298K (fase solución). No se observa dispersión en el rango de frecuencias medidas.

Teniendo en cuenta que se observan dos componentes de  $T_{1p}$  para Pluronic F127, nuevamente se hizo un análisis del cociente de amplitudes asociadas a cada componente ( $A_{T_{1pcorto}}$  y  $A_{T_{1plargo}}$ ) que se muestra en la Figura 7.8. Se observa una muy buena concordancia entre el cociente de amplitudes medidas y su valor teórico ( $R=0,416$ ) dado por la ecuación [7.2].

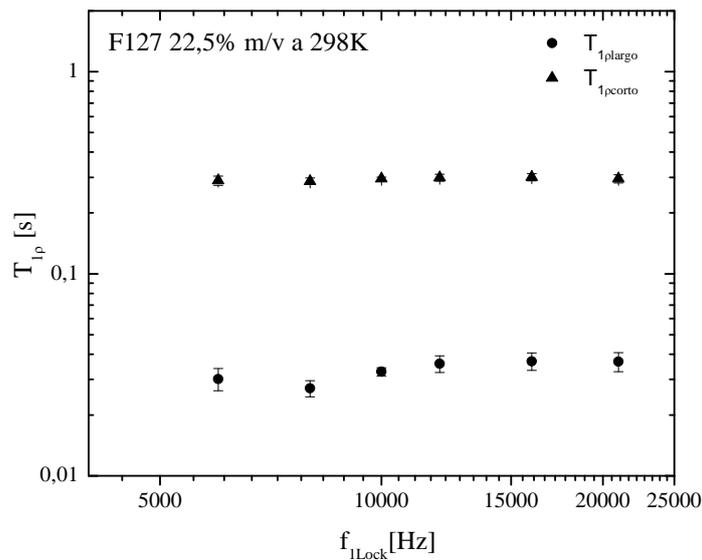


Figura 7.7. Perfiles de las dos componentes de  $T_{1p}$  para una solución acuosa de Pluronic F127 a 22,5% m/v, a 298K (fase gel). No se observa dispersión en ninguna de las dos componentes en el rango de frecuencias medido.

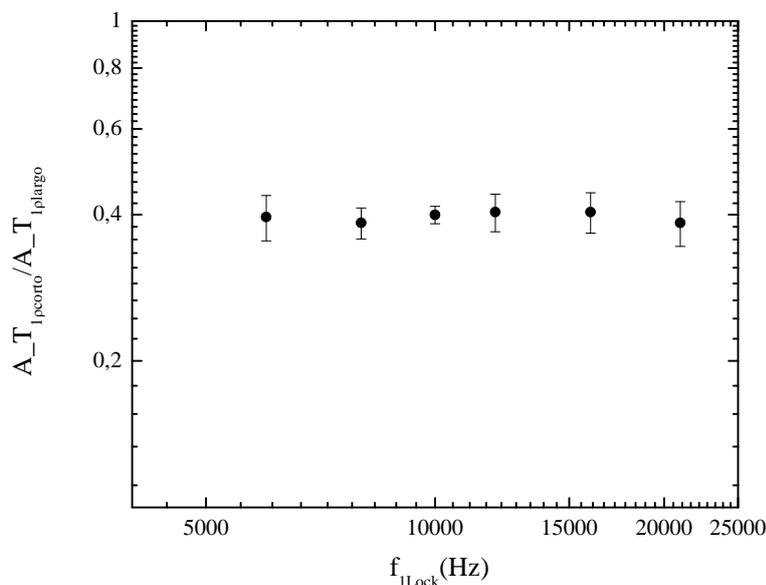


Figura 7.8. Cociente de amplitudes asociadas a las dos componentes de  $T_{1\rho}$  para Pluronic F127 al 22,5% m/v, a 298K (fase gel).

En resumen, podemos decir que a través de mediciones de perfiles de dispersión del tiempo de relajación espín-red (tanto  $T_1$  como  $T_{1\rho}$ ), fue posible distinguir las diferentes dinámicas moleculares asociadas a los bloques POE y POP del copolímero Pluronic F127. Sin embargo, no fue así para los copolímeros F68 y F108. Esto puede explicarse a través de considerar los valores del cociente  $R$  para estos dos copolímeros. Si consideramos la cantidad de protones que tienen los bloques POP y POE que tienen los copolímeros F68 y F108, obtenemos  $R_{F68} = 0,253$  y  $R_{F108} = 0,234$  (mientras que  $R_{F127} = 0,416$ ). Entonces, las diferentes dinámicas de los grupos POE y POP están presentes en los tres copolímeros estudiados en este capítulo, pero solo se evidencian en términos relaxométricos cuando  $R$  se aproxima más a uno. Notar que el hecho de que  $R$  se aproxime a uno, implica que el aporte de protones por parte de los bloques POE y POP se parecen. Cuando estas poblaciones de protones son muy diferentes ( $R \ll 1$ ), la mayor enmascara a la menor.

Se ha estado trabajando en un modelo para explicar la débil dispersión en  $T_1$  junto a sus características bi-componente en algunos casos. Hasta el momento, se han intentado describir las dispersiones observadas en  $T_1$  considerando un modelo que consta de un término dado por la dinámica de Rouse (199) (básicamente para describir la dinámica del bloque POP), más una contribución genérica dada por la inversa de una función Lorentziana, para considerar otros tipos de procesos presentes en la dinámica del bloque POE y que no pueden ser descriptos por el modelo de Rouse. Este posible modelo se muestra en la siguiente ecuación:

$$T_1(\nu) = \frac{1}{\left[ A_L \left( \frac{\tau_L}{1 + (2\pi\nu\tau_L)^2} + \frac{2\tau_L}{1 + (4\pi\nu\tau_L)^2} \right) + A_R \tau_R \ln \left( \frac{1}{2\pi\nu\tau_R} \right) \right]} + C, \quad [7.3]$$

donde  $\tau_R$  es un tiempo característico llamado *tiempo de Rouse*,  $\tau_L$  es un tiempo característico de los procesos descritos por la Lorentziana,  $A_R$  y  $A_L$  son las amplitudes asociadas a la dinámica de Rouse y a los procesos restantes, respectivamente y  $C$  es una constante.

El perfil medido más su curva de ajuste según la ecuación [7.3] para una solución acuosa de Pluronic F68 a una concentración de 22,5% m/v, a 298K, se muestran en la Figura 7.9. Tanto  $\tau_L$  como  $\tau_R$  tomaron valores en el rango de los nanosegundos. Se observa una muy buena concordancia entre la curva experimental y el modelo propuesto, dentro de los errores experimentales.

Aún se sigue trabajando a fin de verificar si el modelo de la ecuación [7.3] es el modelo correcto para describir las dispersiones del tiempo de relajación espín-red mostradas en este capítulo.

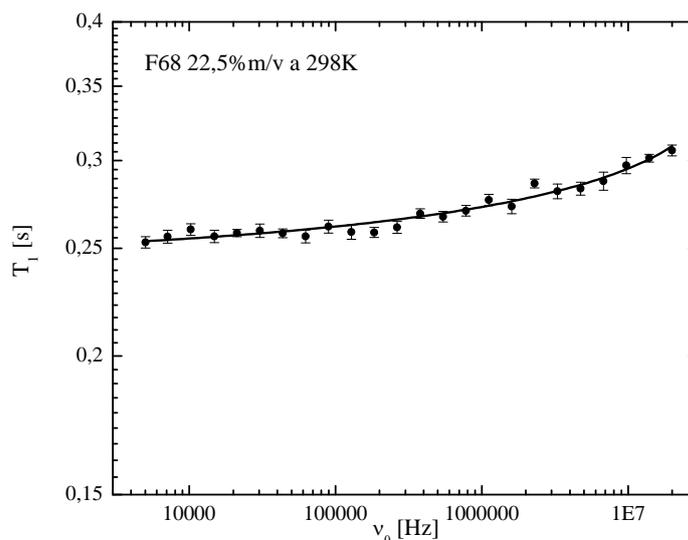


Figura 7.9. Perfil de dispersión de  $T_1$  para una solución acuosa de Pluronic F68 al 22,5% m/v, a 298K. La muestra se encontraba en fase de solución y estaba compuesta de micelas y unímeros.

#### 7.4. Experimentos usando MFA y espectroscopía por RMN

Como complemento, se obtuvieron imágenes con la técnica de microscopía de fuerza atómica (MFA) a modo de tener una descripción visual del sistema con el que estábamos trabajando. Las imágenes correspondientes para micelas deshidratadas a base de Pluronic F68 y F127 a una concentración del 10% m/v, a 298K, se muestran en las Figuras 7.10 y 7.11, respectivamente. Se observaron agregados de diámetros promedio de  $(500 \pm 100)$  nm para micelas de F68 y  $(650 \pm 100)$  nm para micelas de F127. Según la literatura, el radio hidrodinámico obtenido vía DLS (dispersión dinámica de luz) y dispersión de neutrones para micelas a base de copolímeros tribloque se encuentra entre 4 y 13nm (194,197). Estos valores son prácticamente independientes de la concentración del polímero. Por lo tanto, considerando las dimensiones de los agregados observados en las imágenes, vemos que corresponden a agregados de micelas.

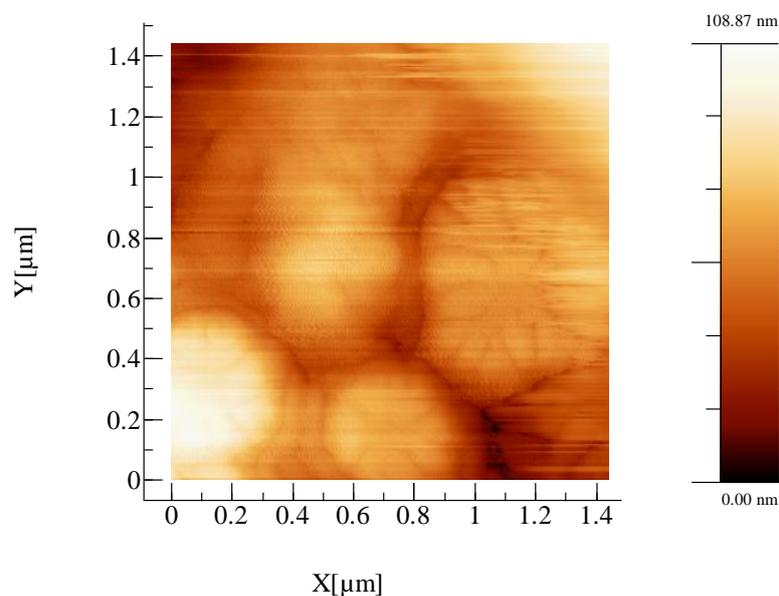


Figura 7.10. Imagen por MFA de micelas deshidratadas a base de Pluronic F68 a una concentración del 10% m/v y a 298K. Se observó un diámetro promedio de los agregados de  $(500\pm 100)\text{nm}$ .

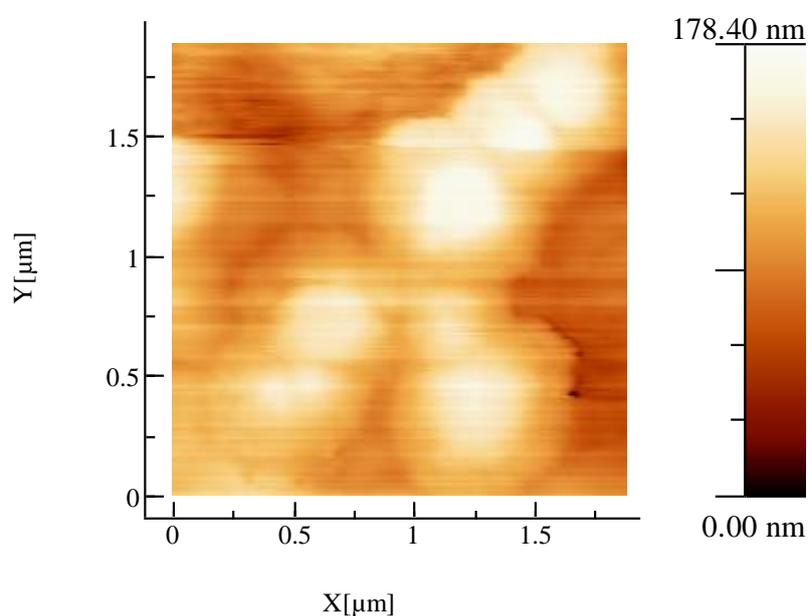


Figura 7.11. Imagen por MFA de micelas deshidratadas a base de Pluronic F127 a una concentración del 10% m/v y a 298K. Se observó un diámetro promedio de los agregados de  $(650\pm 100)\text{nm}$ .

Por otro lado, se midió el espectro de RMN de una solución acuosa de Pluronic F127 al 10% m/v, a 295K y a una intensidad de campo magnético de 7,05 T (300MHz en términos de frecuencia de Larmor de protones). El espectro se muestra en la Figura 7.12. El medio acuoso en el cual el

copolímero fue disuelto en  $D_2O$ , como ha sido para todas las muestras preparadas a lo largo del capítulo.

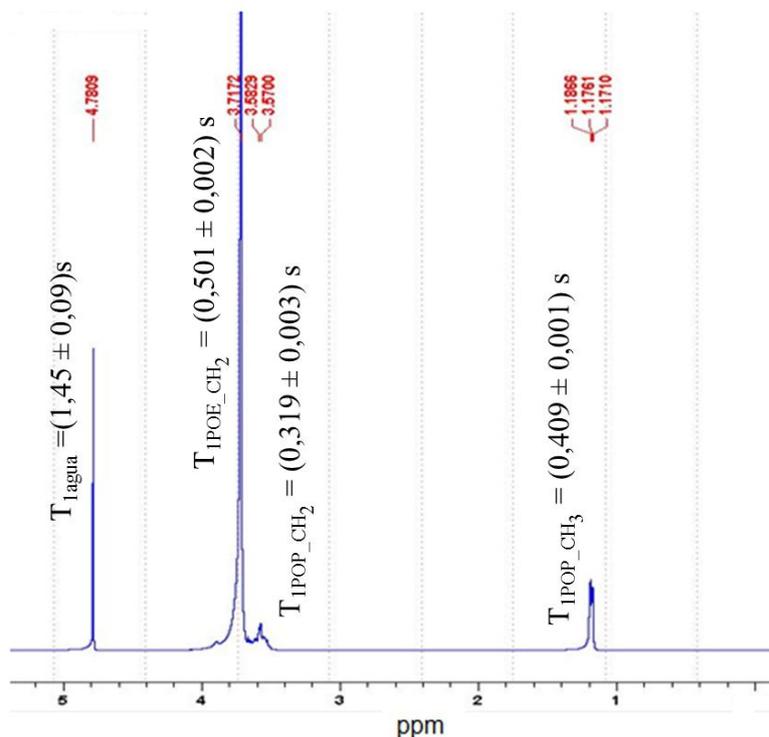


Figura 7.12. Espectro de RMN de una solución acuosa de Pluronic F127 al 10% m/v, a 295K y a una intensidad de campo magnético de 7,05 T (300MHz).

En el espectro de la Figura 7.12, se distinguen los picos correspondientes al grupo  $-CH_2-$  del bloque POP (3,6 ppm) y del bloque POE (3,7 ppm), y al grupo  $-CH_3$  del bloque POP (1,2 ppm). Notar que el pico a 4,8ppm corresponde a protones presente en el solvente. Adicionalmente, se muestran insertos en dicha figura los valores de  $T_1$  medidos a 300MHz. Se observa que  $T_1$  para los protones del bloque POP son más cortos que los correspondientes al bloque POE, lo cual está en concordancia con la movilidad más restringida que presentan los protones del grupo POP.

# Capítulo 8

## Conclusiones

En este trabajo se hizo uso de un modelo desarrollado en trabajos previos, para estudiar la dinámica molecular de lípidos en membranas de liposomas. Este modelo permite describir el perfil de dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones, obtenida con la técnica de RMN con ciclado rápido de campo magnético. Del mismo, es posible extraer la constante elástica de flexión  $\kappa$  de la membrana de liposomas de forma no invasiva, siendo un parámetro de creciente interés para el desarrollo de vesículas flexibles para el transporte transdermal de fármacos.

Se extendió exitosamente el modelo antedicho para liposomas grandes dopados con colesterol (membrana rígida,  $\kappa \sim 15\text{-}20k_B T$ ) a concentraciones de hasta 25% mol. Se llevaron a cabo dos tipos de análisis de las curvas de dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones, encontrando que son más consistentes con la división de la población de lípidos en afectados y no afectados por el colesterol, que con la descripción de una única fase promedio. Además, obtuvimos la primera estimación experimental del número de lípidos ordenados por cada molécula de colesterol, permitiendo esto aclarar resultados muy dispares obtenidos por simulaciones computacionales por diferentes autores.

Se validó el modelo para liposomas grandes dopados con detergente (membrana flexible,  $\kappa \sim 2k_B T$ ) a concentraciones de hasta 20% mol, observándose que el proceso de difusión deja de ser efectivo como mecanismo de relajación a las concentraciones más altas de detergente (20% mol), siendo más evidente para algunos lípidos. En consecuencia, se pudo considerar el análisis de las curvas medidas en términos de un modelo simplificado sin incluir la contribución debida a la difusión. No solo no se observaron variaciones significativas en los parámetros, dentro de los errores experimentales, al compararlos con aquellos obtenidos usando el modelo completo, sino que la precisión con la cual se pudieron determinar mejoró en el caso del modelo simplificado.

Se continuó con la validación de una simplificación del modelo, iniciada en trabajos previos. Esta se basó en el hecho de que existe un rango reducido de frecuencias (aproximadamente de 100kHz a 2MHz) donde la dinámica colectiva, la cual es particularmente sensible a  $\kappa$ , es dominante sobre el proceso de difusión y es el único proceso dispersivo. Esta simplificación permitió obtener la constante elástica de flexión para diversas formulaciones de liposomas con mayor precisión y en menor tiempo, estando sus valores en concordancia con aquellos obtenidos con el modelo completo en el rango extendido de frecuencias.

Se implementó con éxito una metodología automática para el análisis de las curvas de dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones, la cual permitió tratar a los datos de diferentes muestras con un único criterio y en forma sistemática.

Se intentó extender nuestro modelo al caso de vesículas gigantes para así poder comparar nuestros resultados con los provenientes de métodos establecidos como métodos convencionales para la medición de la constante elástica de flexión. La relación señal-ruido extremadamente baja que se observó mediante la técnica de RMN en vesículas gigantes, impidió llevar a cabo los experimentos. Asimismo, las diferencias que se observaron en los valores de  $\kappa$  medidos con las diferentes técnicas, no fueron asociadas a la diferencia de tamaño entre vesículas grandes y gigantes, dado que la literatura predice la no-dependencia de  $\kappa$  con el radio  $R$  en este rango de tamaños ( $R \geq 40\text{nm}$ ), sino que se consideró que su origen se encontraba en cuestiones intrínsecas a cada técnica experimental, como por ejemplo, el modo de preparación de la muestra. Este es un aspecto que requiere de una mayor investigación.

Los estudios realizados en vesículas poliméricas a base de copolímeros tribloque permitieron discriminar, en términos relaxométricos, los diferentes bloques que componen el copolímero, en concordancia con las diferentes dinámicas moleculares de los mismos. Aún se sigue trabajando en el modelo para describir los perfiles del tiempo de relajación espín-red de protones de este tipo de vesículas.

Así, hemos demostrado una vez más la potencialidad de la técnica de RMN con ciclado rápido de campo magnético para el estudio de dinámica molecular en vesículas multicomponentes, demostrándose además que esta técnica tiene la habilidad de proporcionar información sobre la rigidez de la membrana (pues nos permite obtener el valor de la constante elástica de flexión) y sobre la movilidad lateral de los lípidos mediante un único experimento que es no invasivo/destructivo para los liposomas.

Resta a futuro analizar la potencialidad de esta técnica para estudiar la dinámica de liberación de drogas bajo estímulos externos o cambios del ambiente, su aplicabilidad concreta en grupos que desarrollan formulaciones específicas de liposomas, analizar la simplificación de la técnica de manera de habilitarla a usuarios no-especializados, refinar los modelos teóricos utilizados, mejorar el tratamiento numérico-estadístico de los ajustes automáticos, entre otros aspectos.

# Referencias

1. Pabst G, Kučerka N, Nieh M-P, Katsaras J. Liposomes, lipid bilayers and model membranes: from basic research to application. CRC Press; 2014.
2. Cabral H, Kataoka K. Progress of drug-loaded polymeric micelles into clinical studies. *J Controlled Release*. 2014;190:465–76.
3. Ahmad Z, Shah A, Siddiq M, Kraatz H-B. Polymeric micelles as drug delivery vehicles. *Rsc Adv*. 2014;4(33):17028–38.
4. Filippov A, Orädd G, Lindblom G. The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers. *Biophys J*. 2003;84(5):3079–86.
5. Kahya N, Scherfeld D, Bacia K, Schwille P. Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy. *J Struct Biol*. 2004;147(1):77–89.
6. Almeida PF, Vaz WL, Thompson TE. Lipid diffusion, free area, and molecular dynamics simulations. *Biophys J*. 2005;88(6):4434.
7. Dimova R. Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes. *Adv Colloid Interface Sci*. 2014;208:225–34.
8. Mouritsen OG. *Life - As a Matter of Fat: The Emerging Science of Lipidomics* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2004.
9. Duwe H de, Sackmann E. Bending elasticity and thermal excitations of lipid bilayer vesicles: modulation by solutes. *Phys Stat Mech Its Appl*. 1990;163(1):410–28.
10. Henriksen J, Rowat AC, Ipsen JH. Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity. *Eur Biophys J*. 2004;33(8):732–41.
11. Wachter C, Vierl U, Cevc G. Adaptability and elasticity of the mixed lipid bilayer vesicles containing non-ionic surfactant designed for targeted drug delivery across the skin. *J Drug Target*. 2008;16(7-8):611–25.
12. Wilkinson DA, Morowitz HJ, Prestegard JH. Hydration of phosphatidylcholine. Adsorption isotherm and proton nuclear magnetic resonance studies. *Biophys J*. 1977;20(2):169.
13. Lee KW, Lee CH, Oh DK, Kang JK, Lee CE, Kim J. Low-frequency collective chain dynamics in a model biomembrane. *Phys Rev E*. 2001;64(4):042903.
14. Lindahl E, Edholm O. Molecular dynamics simulation of NMR relaxation rates and slow dynamics in lipid bilayers. *J Chem Phys*. 2001;115(10):4938–50.
15. Althoff G, Stauch O, Vilfan M, Frezzato D, Moro GJ, Hauser P, et al. Transverse nuclear spin relaxation studies of viscoelastic properties of membrane vesicles. II. Experimental results. *J Phys Chem B*. 2002;106(21):5517–26.

16. Kimmich R, Schnur G, Scheuermann A. Spin-lattice relaxation and lineshape parameters in nuclear magnetic resonance of lamellar lipid systems: fluctuation spectroscopy of disordering mechanisms. *Chem Phys Lipids*. 1983;32(3):271–322.
17. Rommel E, Noack F, Meier P, Kothe G. Proton spin relaxation dispersion studies of phospholipid membranes. *J Phys Chem*. 1988;92(10):2981–7.
18. Meledandri CJ, Perlo J, Farrher E, Brougham DF, Anoardo E. Interpretation of Molecular Dynamics on Different Time Scales in Unilamellar Vesicles Using Field-Cycling NMR Relaxometry. *J Phys Chem B*. 2009;113(47):15532–40.
19. Perlo J, Meledandri CJ, Anoardo E, Brougham DF. Temperature and Size-Dependence of Membrane Molecular Dynamics in Unilamellar Vesicles by Fast Field-Cycling NMR Relaxometry. *J Phys Chem B*. 2011;115(13):3444–51.
20. Honeywell-Nguyen PL, Gooris GS, Bouwstra JA. Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid vesicle components and a model drug from these vesicle formulations into human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 2004;123(5):902–10.
21. Wiechers JW. Science and applications of skin delivery systems. Allured Publ.; 2008.
22. R Khan N, S Harun M, Nawaz A, Harjoh N, W Wong T. Nanocarriers and their actions to improve skin permeability and transdermal drug delivery. *Curr Pharm Des*. 2015;21(20):2848–66.
23. Gennis RB. Biomembranes: molecular structure and function. Springer Science & Business Media; 2013.
24. Parveen S, Misra R, Sahoo SK. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2012;8(2):147–66.
25. Cook RP. Cholesterol: chemistry, biochemistry, and pathology. Elsevier; 2015.
26. Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta BBA-Rev Biomembr*. 1975;415(1):29–79.
27. Chiappetta DA, Sosnik A. Poly (ethylene oxide)–poly (propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *Eur J Pharm Biopharm*. 2007;66(3):303–17.
28. Chiappetta DA, Facorro G, de Celis ER, Sosnik A. Synergistic encapsulation of the anti-HIV agent efavirenz within mixed poloxamine/poloxamer polymeric micelles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med*. 2011;7(5):624–37.
29. Ulrich K, Galvosas P, Kärger J, Grinberg F. “Pore-Like” Effects of Super-Molecular Self-Assembly on Molecular Diffusion of Poly (Ethylene Oxide)-Poly (Propylene Oxide)-Poly (Ethylene Oxide) in Water. *Materials*. 2012;5(5):966–84.
30. Abragam A. The principles of nuclear magnetism. Oxford university press; 1961.
31. Slichter CP. Principles of magnetic resonance. Berlin: Springer; 1990.
32. Bloch F. Nuclear induction. *Phys Rev*. 1946;70(7-8):460.

33. Kimmich R, Anoardo E. Field-cycling NMR relaxometry. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2004;44(3):257–320.
34. Perlo J, Anoardo E. Estudio de campos locales residuales mediante relaxometría magnética nuclear en el sistema rotante. *Rev Mex Física.* 2006;52(3):230–7.
35. Perlo J, Anoardo E. Fixed lock-time relaxation dispersion in the rotating frame. *J Magn Reson.* 2006;181(2):262–70.
36. Finegold LX. Cholesterol in membrane models. CRC Press; 1992.
37. Lindblom G, Johansson LB, Arvidson G. Effect of cholesterol in membranes. Pulsed nuclear magnetic resonance measurements of lipid lateral diffusion. *Biochemistry (Mosc).* 1981;20(8):2204–7.
38. Shin YK, Freed JH. Dynamic imaging of lateral diffusion by electron spin resonance and study of rotational dynamics in model membranes. Effect of cholesterol. *Biophys J.* 1989;55(3):537.
39. Ipsen JH, Mouritsen OG, Bloom M. Relationships between lipid membrane area, hydrophobic thickness, and acyl-chain orientational order. The effects of cholesterol. *Biophys J.* 1990;57(3):405.
40. Scott HL. Lipid-cholesterol interactions. Monte Carlo simulations and theory. *Biophys J.* 1991;59(2):445.
41. Edholm O, Nyberg AM. Cholesterol in model membranes. A molecular dynamics simulation. *Biophys J.* 1992;63(4):1081.
42. Robinson AJ, Richards WG, Thomas PJ, Hann MM. Behavior of cholesterol and its effect on head group and chain conformations in lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys J.* 1995;68(1):164.
43. Chiu SW, Jakobsson E, Mashl RJ, Scott HL. Cholesterol-induced modifications in lipid bilayers: a simulation study. *Biophys J.* 2002;83(4):1842–53.
44. Hofsäß C, Lindahl E, Edholm O. Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayers with cholesterol. *Biophys J.* 2003;84(4):2192–206.
45. Warschawski DE, Devaux PF. Order parameters of unsaturated phospholipids in membranes and the effect of cholesterol: a  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  solid-state NMR study at natural abundance. *Eur Biophys J.* 2005;34(8):987–96.
46. Martinez-Seara H, Róg T, Pasenkiewicz-Gierula M, Vattulainen I, Karttunen M, Reigada R. Interplay of unsaturated phospholipids and cholesterol in membranes: effect of the double-bond position. *Biophys J.* 2008;95(7):3295–305.
47. Pan J, Mills TT, Tristram-Nagle S, Nagle JF. Cholesterol perturbs lipid bilayers nonuniversally. *Phys Rev Lett.* 2008;100(19):198103.
48. de Meyer F, Smit B. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(10):3654–8.
49. Alwarawrah M, Dai J, Huang J. A molecular view of the cholesterol condensing effect in DOPC lipid bilayers. *J Phys Chem B.* 2010;114(22):7516–23.

50. Davies MA, Schuster HF, Brauner JW, Mendelsohn R. Effects of cholesterol on conformational disorder in dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers. A quantitative IR study of the depth dependence. *Biochemistry (Mosc)*. 1990;29(18):4368–73.
51. Simons K, Vaz WL. Model systems, lipid rafts, and cell membranes 1. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2004;33:269–95.
52. Bhide SY, Zhang Z, Berkowitz ML. Molecular dynamics simulations of SOPS and sphingomyelin bilayers containing cholesterol. *Biophys J*. 2007;92(4):1284–95.
53. Smondyrev AM, Berkowitz ML. Structure of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayer at low and high cholesterol concentrations: molecular dynamics simulation. *Biophys J*. 1999;77(4):2075–89.
54. Mathai JC, Tristram-Nagle S, Nagle JF, Zeidel ML. Structural determinants of water permeability through the lipid membrane. *J Gen Physiol*. 2008;131(1):69–76.
55. Almeida PF, Vaz WL, Thompson TE. Lateral diffusion in the liquid phases of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol lipid bilayers: a free volume analysis. *Biochemistry (Mosc)*. 1992;31(29):6739–47.
56. Weisz K, Gröbner G, Mayer C, Stohrer J, Kothe G. Deuteron nuclear magnetic resonance study of the dynamic organization of phospholipid/cholesterol bilayer membranes: molecular properties and viscoelastic behavior. *Biochemistry (Mosc)*. 1992;31(4):1100–12.
57. Filippov A, Orädd G, Lindblom G. The effect of cholesterol on the lateral diffusion of phospholipids in oriented bilayers. *Biophys J*. 2003;84(5):3079–86.
58. Scherfeld D, Kahya N, Schwille P. Lipid dynamics and domain formation in model membranes composed of ternary mixtures of unsaturated and saturated phosphatidylcholines and cholesterol. *Biophys J*. 2003;85(6):3758–68.
59. Kahya N, Scherfeld D, Bacia K, Poolman B, Schwille P. Probing lipid mobility of raft-exhibiting model membranes by fluorescence correlation spectroscopy. *J Biol Chem*. 2003;278(30):28109–15.
60. Tu K, Klein ML, Tobias DJ. Constant-pressure molecular dynamics investigation of cholesterol effects in a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer. *Biophys J*. 1998;75(5):2147–56.
61. Vist MR, Davis JH. Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: deuterium nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry (Mosc)*. 1990;29(2):451–64.
62. Huang TH, Lee CWB, Das Gupta SK, Blume A, Griffin RG. A carbon-13 and deuterium nuclear magnetic resonance study of phosphatidylcholine/cholesterol interactions: Characterization of liquid-gel phases. *Biochemistry (Mosc)*. 1993;32(48):13277–87.
63. Ariola FS, Li Z, Cornejo C, Bittman R, Heikal AA. Membrane fluidity and lipid order in ternary giant unilamellar vesicles using a new bodipy-cholesterol derivative. *Biophys J*. 2009;96(7):2696–708.
64. Franova M, Repáková J, Capkova P, Holopainen JM, Vattulainen I. Effects of DPH on DPPC–Cholesterol Membranes with Varying Concentrations of Cholesterol: From Local Perturbations to Limitations in Fluorescence Anisotropy Experiments. *J Phys Chem B*. 2010;114(8):2704–11.

65. Kusumi A, Subczynski WK, Pasenkiewicz-Gierula M, Hyde JS, Merkle H. Spin-label studies on phosphatidylcholine-cholesterol membranes: effects of alkyl chain length and unsaturation in the fluid phase. *Biochim Biophys Acta BBA-Biomembr.* 1986;854(2):307–17.
66. Kusumi A, Pasenkiewicz-Gierula M. Rotational diffusion of a steroid molecule in phosphatidylcholine membranes: effects of alkyl chain length, unsaturation, and cholesterol as studied by a spin-label method. *Biochemistry (Mosc).* 1988;27(12):4407–15.
67. Pasenkiewicz-Gierula M, Subczynski WK, Kusumi A. Rotational diffusion of a steroid molecule in phosphatidylcholine-cholesterol membranes: fluid-phase microimmiscibility in unsaturated phosphatidylcholine-cholesterol membranes. *Biochemistry (Mosc).* 1990;29(17):4059–69.
68. Giordani C, Wakai C, Yoshida K, Okamura E, Matubayasi N, Nakahara M. Cholesterol location and orientation in aqueous suspension of large unilamellar vesicles of phospholipid revealed by intermolecular nuclear overhauser effect. *J Phys Chem B.* 2008;112(9):2622–8.
69. Filippov A, Orädd G, Lindblom G. Domain formation in model membranes studied by pulsed-field gradient-NMR: the role of lipid polyunsaturation. *Biophys J.* 2007;93(9):3182–90.
70. Gaede HC, Gawrisch K. Lateral diffusion rates of lipid, water, and a hydrophobic drug in a multilamellar liposome. *Biophys J.* 2003;85(3):1734–40.
71. Scheidt HA, Huster D, Gawrisch K. Diffusion of cholesterol and its precursors in lipid membranes studied by  $^1\text{H}$  pulsed field gradient magic angle spinning NMR. *Biophys J.* 2005;89(4):2504–12.
72. Roberts MF, Redfield AG. High-resolution  $^{31}\text{P}$  field cycling NMR as a probe of phospholipid dynamics. *J Am Chem Soc.* 2004;126(42):13765–77.
73. Sivanandam VN, Cai J, Redfield AG, Roberts MF. Phosphatidylcholine “wobble” in vesicles assessed by high-resolution  $^{13}\text{C}$  field cycling NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc.* 2009;131(10):3420–1.
74. Roberts MF, Redfield AG, Mohanty U. Phospholipid Reorientation at the Lipid/Water Interface Measured by High Resolution  $^{31}\text{P}$  Field Cycling NMR Spectroscopy. *Biophys J.* 2009;97(1):132–41.
75. Filippov A, Orädd G, Lindblom G. Influence of cholesterol and water content on phospholipid lateral diffusion in bilayers. *Langmuir.* 2003;19(16):6397–400.
76. Jedlovszky P, Mezei M. Effect of cholesterol on the properties of phospholipid membranes. 1. Structural features. *J Phys Chem B.* 2003;107(22):5311–21.
77. Dai J, Alwarawrah M, Huang J. Instability of cholesterol clusters in lipid bilayers and the cholesterol’s umbrella effect. *J Phys Chem B.* 2009;114(2):840–8.
78. Vilfan M, Althoff G, Vilfan I, Kothe G. Nuclear-spin relaxation induced by shape fluctuations in membrane vesicles. *Phys Rev E.* 2001;64(2):022902.
79. Halle B. Theory of spin relaxation by diffusion on curved surfaces. *J Chem Phys.* 1991;94(4):3150–68.
80. Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 1997;387(6633):569–72.

81. Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest.* 2002;110(5):597–603.
82. Pike LJ. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res.* 2009;50(Supplement):S323–8.
83. Kestin J, Imaishi N, Nott SH, Nieuwoudt JC, Sengers JV. Viscosity of light and heavy water and their mixtures. *Phys Stat Mech Its Appl.* 1985;134(1):38–58.
84. Lide DR. *Handbook of Chemistry and Physics*, Vol. edited by 4-70. CRC Press, Boca Raton, Florida; 1993.
85. Bloom M, Evans E, Mouritsen OG. Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Q Rev Biophys.* 1991;24(03):293–397.
86. Saffman PG, Delbrück M. Brownian motion in biological membranes. *Proc Natl Acad Sci.* 1975;72(8):3111–3.
87. Althoff G, Frezzato D, Vilfan M, Stauch O, Schubert R, Vilfan I, et al. Transverse nuclear spin relaxation studies of viscoelastic properties of membrane vesicles. I. Theory. *J Phys Chem B.* 2002;106(21):5506–16.
88. Althoff G, Stauch O, Vilfan M, Frezzato D, Moro GJ, Hauser P, et al. Transverse nuclear spin relaxation studies of viscoelastic properties of membrane vesicles. II. Experimental results. *J Phys Chem B.* 2002;106(21):5517–26.
89. Umegawa Y, Matsumori N, Oishi T, Murata M. Ergosterol Increases the Intermolecular Distance of Amphotericin B in the Membrane-Bound Assembly As Evidenced by Solid-State NMR†. *Biochemistry (Mosc).* 2008;47(51):13463–9.
90. Hung W-C, Lee M-T, Chen F-Y, Huang HW. The condensing effect of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J.* 2007;92(11):3960–7.
91. Tristram-Nagle S, Petrache HI, Nagle JF. Structure and interactions of fully hydrated dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys J.* 1998;75(2):917–25.
92. Pan J, Tristram-Nagle S, Kučerka N, Nagle JF. Temperature dependence of structure, bending rigidity, and bilayer interactions of dioleoylphosphatidylcholine bilayers. *Biophys J.* 2008;94(1):117–24.
93. Duwe H de, Sackmann E. Bending elasticity and thermal excitations of lipid bilayer vesicles: modulation by solutes. *Phys Stat Mech Its Appl.* 1990;163(1):410–28.
94. Liu Y, Nagle JF. Diffuse scattering provides material parameters and electron density profiles of biomembranes. *Phys Rev E.* 2004;69(4):040901.
95. Trouard TP, Nevzorov AA, Alam TM, Job C, Zajicek J, Brown MF. Influence of cholesterol on dynamics of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers as studied by deuterium NMR relaxation. *J Chem Phys.* 1999;110(17):8802–18.
96. Kimmich R, Schnur G, Scheuermann A. Spin-lattice relaxation and lineshape parameters in nuclear magnetic resonance of lamellar lipid systems: fluctuation spectroscopy of disordering mechanisms. *Chem Phys Lipids.* 1983;32(3):271–322.
97. Mishra VK, Anantharamaiah GM, Segrest JP, Palgunachari MN, Chaddha M, Sham SS, et al. Association of a Model Class A (Apolipoprotein) Amphipathic  $\alpha$  Helical Peptide with Lipid

- HIGH RESOLUTION NMR STUDIES OF PEPTIDE· LIPID DISCOIDAL COMPLEXES. *J Biol Chem.* 2006;281(10):6511–9.
98. Tamm LK, McConnell HM. Supported phospholipid bilayers. *Biophys J.* 1985;47(1):105.
  99. Kahya N, Scherfeld D, Bacia K, Schwille P. Lipid domain formation and dynamics in giant unilamellar vesicles explored by fluorescence correlation spectroscopy. *J Struct Biol.* 2004;147(1):77–89.
  100. Przybylo M, Sýkora J, Humpolíčková J, Benda A, Zan A, Hof M. Lipid diffusion in giant unilamellar vesicles is more than 2 times faster than in supported phospholipid bilayers under identical conditions. *Langmuir.* 2006;22(22):9096–9.
  101. Wu E, Jacobson K, Papahadjopoulos D. Lateral diffusion in phospholipid multibilayers measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry (Mosc).* 1977;16(17):3936–41.
  102. Petersen NO, Chan SI. More on the motional state of lipid bilayer membranes: interpretation of order parameters obtained from nuclear magnetic resonance experiments. *Biochemistry (Mosc).* 1977;16(12):2657–67.
  103. Lindahl E, Edholm O. Molecular dynamics simulation of NMR relaxation rates and slow dynamics in lipid bilayers. *J Chem Phys.* 2001;115(10):4938–50.
  104. Pandit SA, Chiu S-W, Jakobsson E, Grama A, Scott HL. Cholesterol packing around lipids with saturated and unsaturated chains: a simulation study. *Langmuir.* 2008;24(13):6858–65.
  105. Engelman DM, Rothman JE. The Planar Organization of Lecithin-Cholesterol Bilayers. *J Biol Chem.* 1972 Jun 10;247(11):3694–7.
  106. Fraenza CC, Meledandri CJ, Anoardo E, Brougham DF. The Effect of Cholesterol on Membrane Dynamics on Different Timescales in Lipid Bilayers from Fast Field-Cycling NMR Relaxometry Studies of Unilamellar Vesicles. *ChemPhysChem.* 2014;15(3):425–35.
  107. Meleard P, Gerbeaud C, Pott T, Fernandez-Puente L, Bivas I, Mitov MD, et al. Bending elasticities of model membranes: influences of temperature and sterol content. *Biophys J.* 1997;72(6):2616.
  108. Wu E, Jacobson K, Papahadjopoulos D. Lateral diffusion in phospholipid multibilayers measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry (Mosc).* 1977;16(17):3936–41.
  109. Weisz K, Gröbner G, Mayer C, Stohrer J, Kothe G. Deuteron nuclear magnetic resonance study of the dynamic organization of phospholipid/cholesterol bilayer membranes: molecular properties and viscoelastic behavior. *Biochemistry (Mosc).* 1992;31(4):1100–12.
  110. Schatzlein A, Cevc G. Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (Transfersomes). *Br J Dermatol.* 1998;138(4):583–92.
  111. Carrer DC, Vermehren C, Bagatolli LA. Pig skin structure and transdermal delivery of liposomes: a two photon microscopy study. *J Controlled Release.* 2008;132(1):12–20.

112. Cevc G, Vierl U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal. *J Controlled Release*. 2010;141(3):277–99.
113. Warner RR, Myers MC, Taylor DA. Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile. *J Invest Dermatol*. 1988;90(2):218–24.
114. Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta BBA-Biomembr*. 1992;1104(1):226–32.
115. Caspers PJ, Lucassen GW, Bruining HA, Puppels GJ. Automated depth-scanning confocal Raman microspectrometer for rapid in vivo determination of water concentration profiles in human skin. *J Raman Spectrosc*. 2000;31(8/9):813–8.
116. Boncheva M, De Sterke J, Caspers PJ, Puppels GJ. Depth profiling of Stratum corneum hydration in vivo: a comparison between conductance and confocal Raman spectroscopic measurements. *Exp Dermatol*. 2009;18(10):870–6.
117. Patzelt A, Lademann J. Drug delivery to hair follicles. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;
118. Shaw JE, Chandrasekaran SK. In pharmacology of the skin, Greaves. Springer-Verlag, Berlin; 1999.
119. Cevc G, Blume G. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, Transfersomes. *Biochim Biophys Acta BBA-Biomembr*. 2001;1514(2):191–205.
120. Cevc G, Schätzlein A, Richardsen H. Ultradeformable lipid vesicles can penetrate the skin and other semi-permeable barriers unfragmented. Evidence from double label CLSM experiments and direct size measurements. *Biochim Biophys Acta BBA-Biomembr*. 2002;1564(1):21–30.
121. Cevc G. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(5):675–711.
122. Duangjit S, Obata Y, Sano H, Onuki Y, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, et al. Comparative study of novel ultradeformable liposomes: menthosomes, transfersomes and liposomes for enhancing skin permeation of meloxicam. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(2):239–47.
123. Cevc G, Gebauer D, Stieber J, Schätzlein A, Blume G. Ultraflexible vesicles, Transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim Biophys Acta BBA-Biomembr*. 1998;1368(2):201–15.
124. El Maghraby GM, Williams AC, Barry BW. Can drug-bearing liposomes penetrate intact skin? *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(4):415–29.
125. Bahia APC, Azevedo EG, Ferreira LA, Frézard F. New insights into the mode of action of ultradeformable vesicles using calcein as hydrophilic fluorescent marker. *Eur J Pharm Sci*. 2010;39(1):90–6.
126. Gillet A, Lecomte F, Hubert P, Ducat E, Evrard B, Piel G. Skin penetration behaviour of liposomes as a function of their composition. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011;79(1):43–53.

127. Bloksgaard M, Brewer J, Bagatolli LA. Structural and dynamical aspects of skin studied by multiphoton excitation fluorescence microscopy-based methods. *Eur J Pharm Sci.* 2013;50(5):586–94.
128. Cevc G, Schätzlein A, Blume G. Transdermal drug carriers: basic properties, optimization and transfer efficiency in the case of epicutaneously applied peptides. *J Controlled Release.* 1995;36(1):3–16.
129. Cevc G, Schätzlein AG, Richardsen H, Vierl U. Overcoming semipermeable barriers, such as the skin, with ultradeformable mixed lipid vesicles, transfersomes, liposomes, or mixed lipid micelles. *Langmuir.* 2003;19(26):10753–63.
130. Cevc G, Gebauer D. Hydration-driven transport of deformable lipid vesicles through fine pores and the skin barrier. *Biophys J.* 2003;84(2):1010–24.
131. Gompper G, Kroll DM. Driven transport of fluid vesicles through narrow pores. *Phys Rev E.* 1995;52(4):4198.
132. Helfrich W. Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z Für Naturforschung C.* 1973;28(11-12):693–703.
133. Martínez-Balbuena L, Maldonado-Arce A, Hernández-Zapata E. Elasticidad de las membranas biológicas. *Rev Mex Física E.* 2010;56(1):107–22.
134. van den Bergh BA, Wertz PW, Junginger HE, Bouwstra JA. Elasticity of vesicles assessed by electron spin resonance, electron microscopy and extrusion measurements. *Int J Pharm.* 2001;217(1):13–24.
135. Duangjit S, Obata Y, Sano H, Kikuchi S, Onuki Y, Opanasopit P, et al. Mentosomes, novel ultradeformable vesicles for transdermal drug delivery: optimization and characterization. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(10):1720–8.
136. Chaudhary H, Kohli K, Kumar V. Nano-transfersomes as a novel carrier for transdermal delivery. *Int J Pharm.* 2013;454(1):367–80.
137. Rawicz W, Olbrich KC, McIntosh T, Needham D, Evans E. Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys J.* 2000;79(1):328–39.
138. Meunier J. Measurement of the bending elastic modulus of a flat monolayer at a liquid interface. *J Phys Condens Matter.* 1990;2(S):SA347.
139. Meunier J, Lee LT. Bending elasticity measurements of a surfactant monolayer by ellipsometry and x-ray reflectivity. *Langmuir.* 1991;7(9):1855–60.
140. Skrdla PJ, Robertson RT. Semiempirical equations for modeling solid-state kinetics based on a maxwell-boltzmann distribution of activation energies: applications to a polymorphic transformation under crystallization slurry conditions and to the thermal decomposition of AgMnO<sub>4</sub> crystals. *J Phys Chem B.* 2005;109(21):10611–9.
141. Cevc G. Material transport across permeability barriers by means of lipid vesicles. *Handb Biol Phys.* 1995;1:465–90.
142. Gillet A, Grammenos A, Compère P, Evrard B, Piel G. Development of a new topical system: drug-in-cyclodextrin-in-deformable liposome. *Int J Pharm.* 2009;380(1):174–80.

143. Vaz WL, Criado M, Madeira VM, Schoellmann G, Jovin TM. Size dependence of the translational diffusion of large integral membrane proteins in liquid-crystalline phase lipid bilayers. A study using fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry (Mosc)*. 1982;21(22):5608–12.
144. Blackwell MF, Gounaris K, Zara SJ, Barber J. A method for estimating lateral diffusion coefficients in membranes from steady-state fluorescence quenching studies. *Biophys J*. 1987;51(5):735.
145. Rowat AC, Hansen PL, Ipsen JH. Experimental evidence of the electrostatic contribution to membrane bending rigidity. *EPL Europhys Lett*. 2004;67(1):144.
146. Evans EA. Bending elastic modulus of red blood cell membrane derived from buckling instability in micropipet aspiration tests. *Biophys J*. 1983;43(1):27.
147. Evans E, Needham D. Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *J Phys Chem*. 1987;91(16):4219–28.
148. Evans E, Rawicz W. Entropy-driven tension and bending elasticity in condensed-fluid membranes. *Phys Rev Lett*. 1990;64(17):2094.
149. Fournier J-B, Ajdari A, Peliti L. Effective-area elasticity and tension of micromanipulated membranes. *Phys Rev Lett*. 2001;86(21):4970.
150. Manneville J-B, Bassereau P, Ramaswamy S, Prost J. Active membrane fluctuations studied by micropipet aspiration. *Phys Rev E*. 2001;64(2):021908.
151. Dimova R, Seifert U, Pouligny B, Förster S, Döbereiner H-G. Hyperviscous diblock copolymer vesicles. *Eur Phys J E*. 2002;7(3):241–50.
152. Henriksen JR, Ipsen JH. Measurement of membrane elasticity by micro-pipette aspiration. *Eur Phys J E*. 2004;14(2):149–67.
153. Bermudez H, Hammer DA, Discher DE. Effect of bilayer thickness on membrane bending rigidity. *Langmuir*. 2004;20(3):540–3.
154. Heinrich V, Rawicz W. Automated, high-resolution micropipet aspiration reveals new insight into the physical properties of fluid membranes. *Langmuir*. 2005;21(5):1962–71.
155. Shchelokovskyy P, Tristram-Nagle S, Dimova R. Effect of the HIV-1 fusion peptide on the mechanical properties and leaflet coupling of lipid bilayers. *New J Phys*. 2011;13(2):025004.
156. Brochard F, Lennon JF. Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes. *J Phys*. 1975;36(11):1035–47.
157. Servuss RM, Harbich V, Helfrich W. Measurement of the curvature-elastic modulus of egg lecithin bilayers. *Biochim Biophys Acta BBA-Biomembr*. 1976;436(4):900–3.
158. Schneider MB, Jenkins JT, Webb WW. Thermal fluctuations of large quasi-spherical bimolecular phospholipid vesicles. *J Phys*. 1984;45(9):1457–72.
159. Helfrich W. Size distributions of vesicles: the role of the effective rigidity of membranes. *J Phys*. 1986;47(2):321–9.

- 
160. Milner ST, Safran SA. Dynamical fluctuations of droplet microemulsions and vesicles. *Phys Rev A*. 1987;36(9):4371.
  161. Faucon JF, Mitov MD, Méléard P, Bivas I, Bothorel P. Bending elasticity and thermal fluctuations of lipid membranes. Theoretical and experimental requirements. *J Phys*. 1989;50(17):2389–414.
  162. Gracià RS, Bezlyepkina N, Knorr RL, Lipowsky R, Dimova R. Effect of cholesterol on the rigidity of saturated and unsaturated membranes: fluctuation and electrodeformation analysis of giant vesicles. *Soft Matter*. 2010;6(7):1472–82.
  163. Henriksen JR, Ipsen JH. Thermal undulations of quasi-spherical vesicles stabilized by gravity. *Eur Phys J E*. 2002;9(4):365–74.
  164. Döbereiner H-G, Gompper G, Haluska CK, Kroll DM, Petrov PG, Riske KA. Advanced flicker spectroscopy of fluid membranes. *Phys Rev Lett*. 2003;91(4):048301.
  165. Pécréaux J, Döbereiner H-G, Prost J, Joanny J-F, Bassereau P. Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *Eur Phys J E*. 2004;13(3):277–90.
  166. Genova J, Vitkova V, Bivas I. Registration and analysis of the shape fluctuations of nearly spherical lipid vesicles. *Phys Rev E*. 2013;88(2):022707.
  167. García-Sáez AJ, Carrer DC, Schwille P. Fluorescence Correlation Spectroscopy for the Study of Membrane Dynamics and Organization in Giant Unilamellar Vesicles. In: Weissig V, editor. *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 2: Biological Membrane Models* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 493–508.
  168. Sun S-T, Milon A, Tanaka T, Ourisson G, Nakatani Y. Osmotic swelling of unilamellar vesicles by the stopped-flow light scattering method. Elastic properties of vesicles. *Biochim Biophys Acta BBA-Biomembr*. 1986;860(3):525–30.
  169. Liang X, Mao G, Ng KS. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *J Colloid Interface Sci*. 2004;278(1):53–62.
  170. Claessens M, Leermakers FAM, Hoekstra FA, Cohen Stuart MA. Entropic stabilization and equilibrium size of lipid vesicles. *Langmuir*. 2007;23(11):6315–20.
  171. Lin C-M, Li C-S, Sheng Y-J, Wu DT, Tsao H-K. Size-dependent properties of small unilamellar vesicles formed by model lipids. *Langmuir*. 2011;28(1):689–700.
  172. Landau LD, Lifshitz EM. *Theory of Elasticity*, vol. 7. Course Theor Phys. 1986;3:109.
  173. Goetz R, Gompper G, Lipowsky R. Mobility and elasticity of self-assembled membranes. *Phys Rev Lett*. 1999;82(1):221.
  174. Picas L, Rico F, Scheuring S. Direct measurement of the mechanical properties of lipid phases in supported bilayers. *Biophys J*. 2012;102(1):L01–3.
  175. Rowat AC, Brask J, Sparman T, Jensen KJ, Lindblom G, Ipsen JH. Farnesylated peptides in model membranes: a biophysical investigation. *Eur Biophys J*. 2004;33(4):300–9.

- 
176. Nagle JF. Introductory Lecture: Basic quantities in model biomembranes. *Faraday Discuss.* 2013;161(0):11–29.
  177. Nagle JF, Jablin MS, Tristram-Nagle S, Akabori K. What are the true values of the bending modulus of simple lipid bilayers? *Chem Phys Lipids.* 2015;185:3–10.
  178. Bouvrais H, Duelund L, Ipsen JH. Buffers affect the bending rigidity of model lipid membranes. *Langmuir.* 2014;30(1):13–6.
  179. Perlo J. Estudio experimental de propiedades viscoelásticas en membranas de liposomas mediante relaxometría magnética nuclear con ciclado rápido de campo magnético. 2011;
  180. Rösler A, Vandermeulen GW, Klok H-A. Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64:270–9.
  181. Rharbi Y. Fusion and fragmentation dynamics at equilibrium in triblock copolymer micelles. *Macromolecules.* 2012;45(24):9823–6.
  182. Aniansson EAG, Wall SN. Kinetics of step-wise micelle association. *J Phys Chem.* 1974;78(10):1024–30.
  183. Halperin A, Alexander S. Polymeric micelles: their relaxation kinetics. *Macromolecules.* 1989;22(5):2403–12.
  184. Hecht E, Hoffmann H. Kinetic and calorimetric investigations on micelle formation of block copolymers of the poloxamer type. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp.* 1995;96(1):181–97.
  185. Haliloglu T, Bahar I, Erman B, Mattice WL. Mechanisms of the exchange of diblock copolymers between micelles at dynamic equilibrium. *Macromolecules.* 1996;29(13):4764–71.
  186. Dormidontova EE. Micellization kinetics in block copolymer solutions: Scaling model. *Macromolecules.* 1999;32(22):7630–44.
  187. Rharbi Y, Li M, Winnik MA, Hahn KG. Temperature dependence of fusion and fragmentation kinetics of Triton X-100 micelles. *J Am Chem Soc.* 2000;122(26):6242–51.
  188. Rharbi Y, Winnik MA. Solute exchange between surfactant micelles by micelle fragmentation and fusion. *Adv Colloid Interface Sci.* 2001;89:25–46.
  189. Thurn T, Couderc-Azouani S, Bloor DM, Holzwarth JF, Wyn-Jones E. Ultrasonic relaxation in micellar solutions of nonionic triblock copolymers. *Langmuir.* 2003;19(10):4363–70.
  190. Rharbi Y, Bechthold N, Landfester K, Salzman A, Winnik MA. Solute exchange in synperonic surfactant micelles. *Langmuir.* 2003;19(1):10–7.
  191. Zana R, Marques C, Johnner A. Dynamics of micelles of the triblock copolymers poly (ethylene oxide)–poly (propylene oxide)–poly (ethylene oxide) in aqueous solution. *Adv Colloid Interface Sci.* 2006;123:345–51.
  192. Denkova AG, Mendes E, Coppens M-O. Non-equilibrium dynamics of block copolymer micelles in solution: recent insights and open questions. *Soft Matter.* 2010;6(11):2351–7.

- 
193. Ulrich K, Galvosas P, Kärger J, Grinberg F. “Pore-Like” Effects of Super-Molecular Self-Assembly on Molecular Diffusion of Poly (Ethylene Oxide)-Poly (Propylene Oxide)-Poly (Ethylene Oxide) in Water. *Materials*. 2012;5(5):966–84.
  194. Yardimci H, Chung B, Harden JL, Leheny RL. Phase behavior and local dynamics of concentrated triblock copolymer micelles. *J Chem Phys*. 2005;123(24):244908.
  195. Ma J, Guo C, Tang Y, Xiang J, Chen S, Wang J, et al. Micellization in aqueous solution of an ethylene oxide–propylene oxide triblock copolymer, investigated with  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy, pulsed-field gradient NMR, and NMR relaxation. *J Colloid Interface Sci*. 2007;312(2):390–6.
  196. Alexandridis P, Holzwarth JF, Hatton TA. Micellization of poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide)-poly (ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules*. 1994;27(9):2414–25.
  197. Alexandridis P, Hatton TA. Poly (ethylene oxide) poly (propylene oxide) poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp*. 1995;96(1):1–46.
  198. Alexandridis P, Nivaggioli T, Hatton TA. Temperature effects on structural properties of Pluronic P104 and F108 PEO-PPO-PEO block copolymer solutions. *Langmuir*. 1995;11(5):1468–76.
  199. Kimmich R, Fatkullin N. Polymer chain dynamics and NMR. In: *NMR• 3D Analysis• Photopolymerization*. Springer; 2004. p. 1–113.

# Apéndice I

```
PROGRAM Dinamica_Liposomas_Automatizado_Sac_puntos_AMANO
IMPLICIT NONE
```

```
!Todos los parametros
```

```
REAL(8), PARAMETER :: a = 1.D-9, w0 = 12000.D0
REAL(8), PARAMETER :: sigma = 0.0D0, eta = 0.97D-3, R0 = 5.0D-8, T = 303.0D0, kB = 1.38D-23
INTEGER, PARAMETER :: N = 1, N_datos_ini = 29, N_datos_iter=30, N_tirada_max = 150,
INTEGER, PARAMETER :: N_iteraciones=1
REAL(8), PARAMETER :: Cota_converg = 0.06
```

```
!Valores reales
```

```
REAL(8) :: Pi, JOF, JD, JR, sum_dif_cuad, JR_1, JR_2, h, Rand, s, Max_error, q_p, q_p_max
REAL(8) :: tau_1, termino_1, twopiom, JD_1, JD_2, q_1, q_p_todospuntos
REAL(8) :: calc_1, calc_2, dif_max, dif_min, q_p_gen, q_posta, Max_error_todospuntos
```

```
!Valores enteros
```

```
INTEGER :: l, i, l_max, k, j, n_tirada, ISEED1, ISEED2, n_max
```

```
!Vectores
```

```
REAL(8), DIMENSION(1:N_datos_ini):: w_ini, R1_experim_ini, sigma_R1_ini, prome, R1_ini_log
REAL(8), DIMENSION(1:N_datos_iter) :: w_iter, R1_experim_iter, sigma_R1_iter, R1_mas, R1_men
REAL(8), DIMENSION(:), ALLOCATABLE :: ajuste_1, frec, R1_exp
CHARACTER*12, DIMENSION(1:7) :: parametros
REAL(8), DIMENSION(1:7) :: valor_param_ini, valor_param
REAL(8), DIMENSION(1:7) :: valor_param_fin_mp, valor_param_fin_mp_posta
```

```
!Matriz de rango y paso
```

```
REAL(8), DIMENSION(1:7,1:3) :: rango_paso
REAL(8), DIMENSION(1:N_datos_iter,1:4) :: partes_ajuste
COMMON/RSEED/ISEED1,ISEED2
EXTERNAL RAND
```

```
ISEED1 = 32323110
```

```
ISEED2 = 88554619
```

```
!*****
```

```
n_tirada = 0
Pi = acos(-1.D0)
l_max = NINT(Pi*R0/a) q_1
= dble(0.21)
q_p = dble(0.21)
```

```
!*****
```

! Definición del vector de parámetros, indicando en qué orden está definido cada uno

```

parametros(1) = 'kapa = '
parametros(2) = 'TD ='
parametros(3) = 'TR='
parametros(4) = 'AD = '
parametros(5) = 'AOF = '
parametros(6) = 'AR = '
parametros(7) = 'AMR = '

```

!\*\*\*\*\*

! Lectura de los datos de las mediciones, considerando todos los puntos medidos

```
OPEN (UNIT = 18, FILE = 'datos_mediciones_DMPC_30C.dat')
```

```
DO i = 1, N_datos_iter
```

```
  READ(18,*) w_iter(i), R1_experim_iter(i), sigma_R1_iter(i)
```

```
END DO
```

```
CLOSE(18)
```

```
2000 FORMAT(d10.6,3x,d10.6,3x,d10.6)
```

! Lectura de los datos de las mediciones considerando algunos puntos sacados a mano

```
OPEN (UNIT = 18, FILE = 'datos_mediciones_DMPC_30C_Puntos sacados.dat')
```

```
DO i = 1, N_datos_ini
```

```
  READ(18,*) w_ini(i), R1_experim_ini(i), sigma_R1_ini(i)
```

```
  !PRINT*, w(i), R1_experim(i)
```

```
END DO
```

```
CLOSE(18)
```

```
1000 FORMAT(d10.6,3x,d10.6,3x,d10.6)
```

```
PRINT*, ' '
```

```
PRINT*, 'Ya lei los datos'
```

```
PRINT*, ' '
```

! Lectura del rango y paso de cada parámetro escritos de la siguiente forma: min, max y paso

```
OPEN (UNIT = 18, FILE = 'rango_paso_param_DMPC_30C.dat')
```

```
DO i = 1, 7
```

```
  READ(18,1100) rango_paso(i,:)
```

```
  !PRINT*, rango_paso(i,:)
```

```
END DO
```

```
CLOSE(18)
```

```
1100 FORMAT(d8.2,1x,d8.2,1x,d7.1)
```

```
PRINT*, ' '
```

```
PRINT*, 'Ya leí los rangos de todos los parámetros'
```

```
PRINT*, ' '
```

```
PRINT*, ' '
```

```
PRINT*, 'PRIMERA PARTE: SELECCION DE PARAMETROS CON RESTRICCION "dif_max"'
```

```
PRINT*, 'Y CALCULO AJUSTE CON CRITERIO MIN_PROM'
```

```
PRINT*, ' '
```

```

!*****
!*****
! PRIMERA PARTE
!*****
!*****
! Elige los parámetros al azar en la hipersuperficie de parámetros definida en el archivo rango_paso
! y solo se queda con aquellos que cumplen con la restricción de que la diferencia (absoluta) entre
! el punto medido y el ajuste, dividida el valor medido, sea menor que dif_max*N (para todos los
! puntos medidos)

! Luego, calcula el mejor ajuste con el criterio Min_prom: minimiza el valor promedio de las
! diferencias absolutas entre los puntos medidos y los del ajuste, es decir, minimiza la suma de los
! módulos de las diferencias entre puntos medidos y calculados, y lo hace hasta que esta suma sea
! menor que un dado valor preestablecido (del orden del 5%) llamdo Cota_converg
! Cálculo de restricción "dif_max" para selección de parámetros. Consideramos escala logarítmica
! para R1

R1_ini_log(:) = log10(R1_experim_ini)

!PRINT*, 'w[Hz] ', ' ', 'R1_experim_ini ', ' ', 'prome '

DO i = 2, N_datos_ini-1
  prome(i) = (R1_ini_log(i-1)+R1_ini_log(i+1))*dble(0.5)
!PRINT*, w_ini(i), R1_ini_log(i), prome(i)
END DO
prome(1) = R1_ini_log(1)
prome(N_datos_ini) = R1_ini_log(N_datos_ini)

dif_max = maxval(abs(prome(:)-R1_ini_log(:))/prome(:))
dif_min = minval(abs(prome(2:N_datos_ini-1)-R1_ini_log(2:N_datos_ini-1))/prome(2:N_datos_ini-1))

PRINT*, ' '
PRINT*, 'Diferencia relativa maxima:', dif_max
PRINT*, ' '
PRINT*, 'Diferencia relativa minima:', dif_min
PRINT*, ' '

q_pmax = dble(Cota_converg)

IF (q_pmax.LT.dif_max) q_pmax = dif_max
dif_max = dif_max*dble(3.)
IF (dif_max.LT.dble(0.1)) dif_max = dble(0.1)

PRINT*, '3*dif_max:', dif_max
ALLOCATE(ajuste_1(1:N_datos_ini))

s = 0
k = 1

DO WHILE (q_p.GE.dble(q_pmax))

200 CONTINUE

```

```
s = s + dble(1.)
```

```
! Cálculo del conjunto de parámetros aleatorios
```

```
DO i = 1,7
```

```
    valor_param_ini(i) = Rand(1.D0)*(rango_paso(i,2)-rango_paso(i,1))+rango_paso(i,1)
```

```
END DO
```

```
! Establezco los valores de los parámetros en la función de ajuste como aquellos calculados con  
! el generador de números aleatorios
```

```
valor_param(:) = valor_param_ini(:)
```

```
! Cálculo de la función de ajuste usando el conjunto de parámetros generados aleatoriamente
```

```
sum_dif_cuad = 0.D0
```

```
q_p = 0.D0
```

```
    DO j = 1, N_datos_ini
```

```
        twopiom = 2.D0*Pi*(w_ini(j)+w0)
```

```
        JR_1 = (1.D0+(twopiom*valor_param(3))**2)
```

```
        JR_2 = (1.D0+(2.D0*twopiom*valor_param(3))**2)
```

```
        JR = (valor_param(3)/JR_1 + 4.D0*valor_param(3)/JR_2)
```

```
        JD_1 = (1.D0+(twopiom*valor_param(2))**2)
```

```
        JD_2 = (1.D0+(2.D0*twopiom*valor_param(2))**2)
```

```
        JD = (2.D-1)*(valor_param(2)/JD_1 + 4.D0*valor_param(2)/JD_2)
```

```
        JOF = 0.0
```

```
        DO l = 2, l_max
```

```
            h = dble(l)
```

```
            tau_l = (eta*R0*R0*R0/valor_param(1))*((2.D0*h+1.D0)*(2.D0*h*h+2.D0*h-1.D0))
```

```
            tau_l = tau_l/(h*(h+1.D0)*(h+2.D0)*(h-1.D0)*(h*h+h+sigma))
```

```
            termino_l = (kB*T/(2.D0*Pi*valor_param(1)))*(h*(h+1.D0)*(2.D0*h+1.D0)*tau_l)
```

```
            termino_l = termino_l/((h*h+h-
```

```
            2.D0)*(h*h+h+sigma)*(1.D0+(twopiom*tau_l)*(twopiom*tau_l)))
```

```
            JOF = JOF +termino_l
```

```
        END DO
```

```
    ajuste_1(j) = JR*valor_param(6) + JD*valor_param(4) + JOF*valor_param(5) + valor_param(7)
```

```
! Hacemos uso de la restricción inicial para ver si los parámetros tomados aleatoriamente son los  
! deseados
```

```
IF (abs(ajuste_1(j)-R1_experim_ini(j))/R1_experim_ini(j)>dif_max) GOTO 200
```

```
sum_dif_cuad = sum_dif_cuad + (ajuste_1(j)-R1_experim_ini(j))**2
```

```
q_p = abs(ajuste_1(j)-R1_experim_ini(j))/R1_experim_ini(j) + q_p
```

```
END DO
```

```
Max_error =maxval(abs(ajuste_1(:)-R1_experim_ini(:))/R1_experim_ini(:))
```

```
q_p =q_p/dble(N_datos_ini)
```

```

IF (q_p < q_1) THEN
valor_param_fin_mp(:) = valor_param_ini(:) q_1 = q_p
END IF

k =k+1
END DO
PRINT*, '          '
PRINT*, 'RESULTADOS FINALES: '
PRINT*, 'Numero de iteraciones param_ini:', k PRINT*,
'Sum_dif_cuad:',          sum_dif_cuad PRINT*,
'Max_error:', Max_error
PRINT*, 'Min_prom:', q_p
PRINT*, '          '
PRINT*, 'Parametros: '

DO i = 1,7
  PRINT*, parametros(i), valor_param_fin_mp(i) END DO

DEALLOCATE(ajuste_1)

! Guardo los parámetros calculados en esta primera parte

OPEN(9,FILE='parametros_finales_minprom_PRIMERA_PARTE.dat')
  DO i = 1,7
    WRITE(9,*) i, valor_param_fin_mp(i)
  END DO
CLOSE(9)

! Cálculo del ajuste usando los parámetros finales obtenidos en esta Primera Parte y para
! todos los valores de frecuencia

valor_param(:) = valor_param_fin_mp(:)

ALLOCATE(ajuste_1(1:N_datos_iter))

q_p_todospuntos = 0.D0
DO j = 1, N_datos_iter

  twopiom = 2.D0*Pi*(w_iter(j)+w0)

  JR_1 = (1.D0+(twopiom*valor_param(3))**2)
  JR_2 = (1.D0+(2.D0*twopiom*valor_param(3))**2)
  JR = (valor_param(3)/JR_1 + 4.D0*valor_param(3)/JR_2)

  JD_1 = (1.D0+(twopiom*valor_param(2))**2)
  JD_2 = (1.D0+(2.D0*twopiom*valor_param(2))**2)
  JD = (2.D-1)*(valor_param(2)/JD_1 + 4.D0*valor_param(2)/JD_2)
  JOF = 0.0
  DO l = 2, l_max

    h = dble(l)
    tau_l = (eta*R0*R0*R0/valor_param(1))*((2.D0*h+1.D0)*(2.D0*h*h+2.D0*h-1.D0))
    tau_l = tau_l/(h*(h+1.D0)*(h+2.D0)*(h-1.D0)*(h*h+h+sigma))

```

```

termino_1 = (kB*T/(2.D0*Pi*valor_param(1)))*(h*(h+1.D0)*(2.D0*h+1.D0)*tau_1)
termino_1 =termino_1/((h*h+h-2.D0)*(h*h+h+sigma)*(1.D0+(twopiom*tau_1)*(twopiom*tau_1))

JOF = JOF + termino_1
END DO
ajuste_1(j) = JR*valor_param(6) + JD*valor_param(4) + JOF*valor_param(5) + valor_param(7)

partes_ajuste(j,1) = JR*valor_param(6)
partes_ajuste(j,2) = JD*valor_param(4)
partes_ajuste(j,3) = JOF*valor_param(5)
partes_ajuste(j,4) = valor_param(7)

q_p_todospuntos = abs((ajuste_1(j)-R1_experim_iter(j))/R1_experim_iter(j)) + q_p_todospuntos

END DO
q_p_todospuntos= q_p_todospuntos/dbl(N_datos_iter)

Max_error_todospuntos = maxval(abs(ajuste_1(:)-R1_experim_iter(:))/R1_experim_iter(:))
PRINT*, ' '
PRINT*, 'q_p_todospuntos =', q_p_todospuntos
PRINT*, ' '
PRINT*, 'Nro Punto', ' ', 'frecuencia [Hz]', ' ', 'Dif_%_R1experim_ajuste [%]'

OPEN(UNIT=18, FILE='ajuste_minprom_PRIMERA_PARTE.dat')
OPEN(UNIT=19,FILE='Dif_porc_R1experim_ajuste_PRIMERA_PARTE.dat')
OPEN(UNIT=20, FILE='partes_ajuste_1-2_minprom_PRIMERA_PARTE.dat')
OPEN(UNIT=22, FILE='partes_ajuste_3-4_minprom_PRIMERA_PARTE.dat')

WRITE(18,*) 'w[Hz]', ' ', 'R1_experim', ' ', 'Ajuste'
WRITE(19,*) 'w[Hz]', ' ', 'Dif_%_R1experim_ajuste'
WRITE(20,*) 'rotac', ' ', 'diff'
WRITE(22,*) 'FO', ' ', 'MR'

DO j = 1, N_datos_iter

WRITE(18,*) w_iter(j), R1_experim_iter(j), ajuste_1(j)
WRITE(19,*) w_iter(j), abs((R1_experim_iter(j)-ajuste_1(j))/R1_experim_iter(j))*100
WRITE(20,*) partes_ajuste(j,1), partes_ajuste(j,2)
WRITE(22,*) partes_ajuste(j,3), partes_ajuste(j,4)

PRINT*, j, w_iter(j), abs((R1_experim_iter(j)-ajuste_1(j))/R1_experim_iter(j))*100
END DO

PRINT*, ' '
PRINT*, 'Max_error_todospuntos',Max_error_todospuntos

CLOSE(18)
CLOSE(19)
CLOSE(20)

DEALLOCATE(ajuste_1)

```

```

!*****
!*****
!
!                               SEGUNDA PARTE
!*****
!*****

```

! En una segunda instancia y tomando todos los puntos medidos, descarta solamente los puntos que !se van de N\*sigma del ajuste logrado antes, lo cual descarta finalmente puntos que no cumplen con ! la tendencia de la curva ajustada (sigma = promedio de las diferencias porcentuales, q\_p)  
! Vuelve a ajustar la curva con la restricción inicial y considerando la Cota\_converg

```

PRINT*, ' '
PRINT*, ' '
PRINT*, ' '
PRINT*, 'SEGUNDA PARTE_SACADA DE PUNTOS QUE SE VAN DE LA TENDENCIA DEL AJUSTE
CALCULADO EN LA'
PRINT*, 'PRIMERA PARTE Y RECALCULO DE AJUSTE SIN CONSIDERAR PUNTOS ELIMINADOS
EN ESTA PARTE'
PRINT*, ' '

```

```

q_p_gen = dble(1.)
q_posta = dble(1.)
k = 0
DO WHILE (abs((q_p_gen-q_p)/q_p)*dble(100.).GT.dble(2.))
k = k+1
PRINT*, ' '
PRINT*, 'Iteracion:', k

```

```

q_p_gen = q_p
valor_param_fin_mp_posta(:) = valor_param_fin_mp(:)
ALLOCATE(ajuste_1(1:N_datos_iter))

```

! Cálculo de la función de ajuste usando el conjunto de parámetros  
!valor\_param\_fin\_mp obtenidos en la primera parte

```

valor_param(:) = valor_param_fin_mp(:)

```

```

DO j = 1, N_datos_iter

```

```

twopiom = 2.D0*Pi*(w_iter(j)+w0)

```

```

JR_1 = (1.D0+(twopiom*valor_param(3))**2)

```

```

JR_2 = (1.D0+(2.D0*twopiom*valor_param(3))**2)

```

```

JR = (valor_param(3)/JR_1 + 4.D0*valor_param(3)/JR_2)

```

```

JD_1 = (1.D0+(twopiom*valor_param(2))**2)

```

```

JD_2 = (1.D0+(2.D0*twopiom*valor_param(2))**2)

```

```

JD = (2.D-1)*(valor_param(2)/JD_1 + 4.D0*valor_param(2)/JD_2)

```

```

JOF = 0.0D0

```

```

DO l = 2, l_max

```

```

h = dble(l)

```

```

tau_1 = (eta*R0*R0*valor_param(1))*((2.D0*h+1.D0)*(2.D0*h*h+2.D0*h-1.D0)) tau_1 =
tau_1/(h*(h+1.D0)*(h+2.D0)*(h-1.D0)*(h*h+h+sigma))

```

```

termino_1 = (kB*T/(2.D0*Pi*valor_param(1)))*(h*(h+1.D0)*(2.D0*h+1.D0)*tau_1) termino_1
= termino_1/((h*h+h-2.D0)*(h*h+h+sigma)*(1.D0+(twopiom*tau_1)*(twopiom*tau_1)))

JOF = JOF + termino_1
END DO

ajuste_1(j) = JR*valor_param(6) + JD*valor_param(4) + JOF*valor_param(5) + valor_param(7)

END DO

!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
!
!                               PARTE A
! Eliminación de puntos que quedan fuera de N*q_p (considerando el sigma experimental de cada R1) de la
! curva de ajuste obtenida de la primera parte

R1_mas(:) = R1_experim_iter(:)+sigma_R1_iter(:) R1_men(:) =
R1_experim_iter(:)-sigma_R1_iter(:)

l = 0
DO i = 1, N_datos_iter
  calc_1 = abs(R1_mas(i)-ajuste_1(i))
  calc_2 = abs(R1_men(i)-ajuste_1(i))
  IF (min(calc_1, calc_2).LT.dble(3.)*q_p) THEN l = l+1
  ELSE
    PRINT*, 'Saco', i END IF
END DO

n_max = l

ALLOCATE(frec(1:n_max)) ALLOCATE(R1_exp(1:n_max))

l = 0
DO i = 1, N_datos_iter
  calc_1 = abs(R1_mas(i)-ajuste_1(i))
  calc_2 = abs(R1_men(i)-ajuste_1(i))
  IF (min(calc_1, calc_2).LT.dble(3.)*q_p) THEN l = l+1
    frec(l) = w_iter(i)
    R1_exp(l) = R1_experim_iter(i)
  END IF
END DO

DEALLOCATE(ajuste_1)

PRINT*, 'Me quede con', n_max, 'datos'
PRINT*, ' '

ALLOCATE(ajuste_1(1:n_max))
!*****
n_tirada = 0
Pi = acos(-1.D0)
l_max = NINT(Pi*R0/a)

```

```
q_1 = dble(0.21)
q_p = dble(0.21)
```

```
!*****
!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!
!
```

### PARTE B

! REPETICION PARTE 1: Elige los parámetros al azar en la hipersuperficie definida en el  
! archivo rango\_paso y solo se queda con aquellos que cumplen con la restricción de que la !diferencia  
(absoluta) entre el punto medido y el ajuste, dividida el valor medido, sea menor !que dif\_max\* 2(para  
todos los puntos medidos).

! Luego, calcula el mejor ajuste con el criterio Min\_prom: minimiza el valor promedio de !las  
diferencias absolutas entre los puntos medidos y los del ajuste, es decir, minimiza la !suma de los  
módulos de las diferencias entre puntos medidos y calculados, y lo hace hasta !que esta suma sea  
menor que un dado valor preestablecido (del orden del 4%) llamado !Cota\_converg

```
s = 0
DO WHILE (q_p.GE.dble(Cota_converg))
```

```
300 CONTINUE
s = s + dble(1)
```

! Cálculo del conjunto de parámetros aleatorios

```
DO i = 1,7
  valor_param_ini(i) = Rand(1.D0)*(rango_paso(i,2)-rango_paso(i,1))+rango_paso(i,1)
END DO
```

```
valor_param(:) = valor_param_ini(:)
```

! Cálculo de la función de ajuste usando el conjunto de parámetros generados aleatoriamente  
considerando solo los puntos que sobrevivieron a la restricción impuesta en la Parte A.

```
sum_dif_cuad = 0.D0
q_p = 0.D0
```

```
DO j = 1, n_max
```

```
twopiom = 2.D0*Pi*(frec(j)+w0)
```

```
JR_1 = (1.D0+(twopiom*valor_param(3))**2)
JR_2 = (1.D0+(2.D0*twopiom*valor_param(3))**2)
JR = (valor_param(3)/JR_1 + 4.D0*valor_param(3)/JR_2)
```

```
JD_1 = (1.D0+(twopiom*valor_param(2))**2)
JD_2 = (1.D0+(2.D0*twopiom*valor_param(2))**2)
JD = (2.D-1)*(valor_param(2)/JD_1 + 4.D0*valor_param(2)/JD_2) JOF = 0.0
```

```
DO l = 2, l_max
```

```
h = dble(l)
tau_1 = (eta*R0*R0*R0/valor_param(1))*((2.D0*h+1.D0)*(2.D0*h*h+2.D0*h-1.D0)) tau_1 =
tau_1/(h*(h+1.D0)*(h+2.D0)*(h-1.D0)*(h*h+h+sigma))
```

```

termino_1 = (kB*T/(2.D0*Pi*valor_param(1)))*(h*(h+1.D0)*(2.D0*h+1.D0)*tau_1) termino_1
= termino_1/((h*h+h-2.D0)*(h*h+h+sigma)*(1.D0+(twopiom*tau_1)*(twopiom*tau_1)))

JOF = JOF + termino_1
END DO
ajuste_1(j) = JR*valor_param(6) + JD*valor_param(4) + JOF*valor_param(5) + valor_param(7)

! Hacemos uso de la restricción inicial para ver si los parámetros tomados aleatoriamente son los !deseados

IF (abs(ajuste_1(j)-R1_exp(j))/R1_exp(j)>dif_max) GOTO 300
sum_dif_cuad = sum_dif_cuad + (ajuste_1(j)-R1_exp(j))**2
q_p = abs(ajuste_1(j)-R1_exp(j))/R1_exp(j) + q_p
END DO

Max_error = maxval(abs(ajuste_1(:)-R1_exp(:))/R1_exp(:))
q_p = q_p/dbl(n_max)

IF (q_p < q_1) THEN
    valor_param_fin_mp(:) = valor_param_ini(:) q_1 = q_p
END IF

END DO

DEALLOCATE(frec, R1_exp, ajuste_1)

PRINT*, '      ' PRINT*,
'RESULTADO: '
PRINT*, 'sum_dif_cuad:', sum_dif_cuad
PRINT*, 'Max_error:', Max_error
PRINT*, 'Min_prom:', q_p
PRINT*, '      '

IF (q_p<q_posta) THEN q_posta = q_p
END IF
END DO

PRINT*, '      '
PRINT*, '      '
PRINT*, 'Despues de', k, 'iteraciones, el resultado final es:'
PRINT*, 'Min_prom:', q_posta
PRINT*, 'Parametros: '
DO i = 1,7
    PRINT*, parametros(i), valor_param_fin_mp_posta(i)
END DO

!*****
!*****
!TERCERA Y ULTIMA PARTE: GUARDO LOS RESULTADOS Y CALCULO AJUSTE
! FINAL CON PARAMETROS DE LA SEGUNDA PARTE_Parte B
!*****
!*****
! Guardo los parámetros finales

```

```

OPEN(9,FILE='parametros_finales_minprom_SEGUNDA_PARTE.dat')
DO i = 1,7
    WRITE(9,*) i, valor_param_fin_mp_posta(i)
END DO
CLOSE(9)

```

! Cálculo del ajuste final usando los parámetros finales obtenidos en la Segunda parte e parte B !y para todos los valores de frecuencia

```

valor_param(:) = valor_param_fin_mp_posta(:)
ALLOCATE(ajuste_1(1:N_datos_iter))

```

```
DO j = 1, N_datos_iter
```

```
twopiom = 2.D0*Pi*(w_iter(j)+w0)
```

```
JR_1 = (1.D0+(twopiom*valor_param(3))**2)
```

```
JR_2 = (1.D0+(2.D0*twopiom*valor_param(3))**2)
```

```
JR = (valor_param(3)/JR_1 + 4.D0*valor_param(3)/JR_2)
```

```
JD_1 = (1.D0+(twopiom*valor_param(2))**2)
```

```
JD_2 = (1.D0+(2.D0*twopiom*valor_param(2))**2)
```

```
JD = (2.D-1)*(valor_param(2)/JD_1 + 4.D0*valor_param(2)/JD_2) JOF = 0.0
```

```
DO l = 2, l_max
```

```
h = dble(l)
```

```
tau_1 = (eta*R0*R0*R0/valor_param(1))*((2.D0*h+1.D0)*(2.D0*h*h+2.D0*h-1.D0))
```

```
tau_1 = tau_1/(h*(h+1.D0)*(h+2.D0)*(h-1.D0)*(h*h+h+sigma))
```

```
termino_1 = (kB*T/(2.D0*Pi*valor_param(1)))*(h*(h+1.D0)*(2.D0*h+1.D0)*tau_1)
```

```
termino_1 = termino_1/((h*h+h-
```

```
2.D0)*(h*h+h+sigma)*(1.D0+(twopiom*tau_1)*(twopiom*tau_1)))
```

```
JOF = JOF + termino_1
```

```
END DO
```

```
ajuste_1(j) = JR*valor_param(6) + JD*valor_param(4) + JOF*valor_param(5) + valor_param(7)
```

```
partes_ajuste(j,1) = JR*valor_param(6)
```

```
partes_ajuste(j,2) = JD*valor_param(4)
```

```
partes_ajuste(j,3) = JOF*valor_param(5)
```

```
partes_ajuste(j,4) = valor_param(7)
```

```
END DO
```

```
PRINT*, '      '
```

```
PRINT*, '      '
```

```
PRINT*, 'RESULTADOS FINALES'
```

```
PRINT*, 'Nº Punto, frecuencia [Hz], Dif_%_R1_ajuste [%]'
```

```
OPEN(UNIT=18, FILE='ajuste_minprom_SEGUNDA_PARTE.dat')
```

```
OPEN(UNIT=19, FILE='partes_ajuste_1-2_minprom_SEGUNDA_PARTE.dat')
```

```
OPEN(UNIT=20, FILE='partes_ajuste_3-4_minprom_SEGUNDA_PARTE.dat')
```

```
WRITE(18,*) 'w[Hz]', '      ', 'R1_experim', '      ', 'Ajuste'
```

```

WRITE(19,*) 'rotac',' ', 'diff'
WRITE(20,*) 'FO',' ', 'MR'

DO j = 1, N_datos_iter
WRITE(18,*) w_iter(j), R1_experim_iter(j), ajuste_1(j)
WRITE(19,*) partes_ajuste(j,1), partes_ajuste(j,2)
WRITE(20,*) partes_ajuste(j,3), partes_ajuste(j,4)
PRINT*, j, w_iter(j), abs((R1_experim_iter(j)-ajuste_1(j))/R1_experim_iter(j))*100
END DO

CLOSE(18)
CLOSE(19)
CLOSE(20)
DEALLOCATE(ajuste_1)
END PROGRAM

!*****
!
!                               FUNCTION RAND
!*****
!
!                               FUNCTION RAND(DUMMY)
!
! This is an adapted version of subroutine RANECU written by F. James
! (Comput. Phys. Commun. 60 (1990) 329-344), which has been modified to
! give a single random number at each call.
!
! The 'seeds' ISEED1 and ISEED2 must be initialized in the main program
! and transferred through the named common block /RSEED/.
!
! Some compilers incorporate an intrinsic random number generator with
! the same name (but with different argument lists). To avoid conflict,
! it is advisable to declare RAND as an external function in all sub-
! programs that call it.
!
!   IMPLICIT DOUBLE PRECISION (A-H,O-Z), INTEGER*4 (I-N)
!   PARAMETER (USCALE=1.0D0/2.147483563D9)
!   COMMON/RSEED/ISEED1,ISEED2
!
!   I1=ISEED1/53668
!   ISEED1=40014*(ISEED1-I1*53668)-I1*12211
!   IF(ISEED1.LT.0) ISEED1=ISEED1+2147483563
!
!   I2=ISEED2/52774
!   ISEED2=40692*(ISEED2-I2*52774)-I2*3791 IF(ISEED2.LT.0)
!   ISEED2=ISEED2+2147483399
!
!   IZ=ISEED1-ISEED2
!   IF (IZ.LT.1) IZ=IZ+2147483562 RAND=IZ*USCALE
!
!   RETURN
!   END

```

# Apéndice II

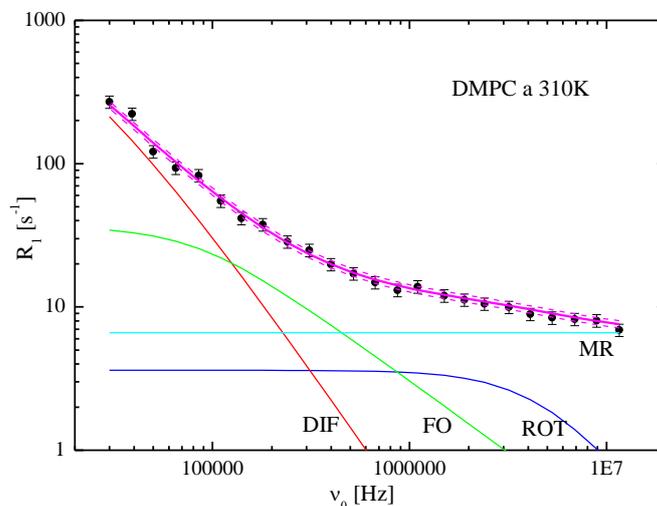


Figura II.1. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 310K (●). La curva de ajuste optimizada con la metodología descrita en la sección 3.2.2 se muestra en magenta. Las contribuciones de cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 3.1

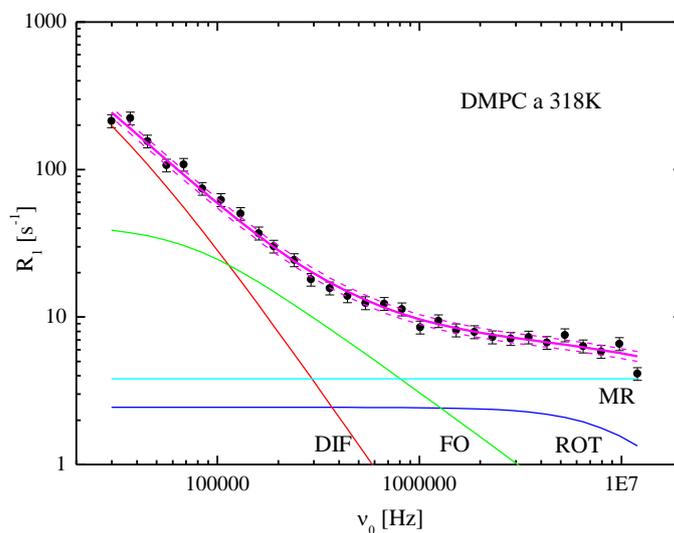


Figura II.2. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 318K (●). La curva de ajuste optimizada con la metodología descrita en la sección 3.2.2 se muestra en magenta. Las contribuciones de cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 3.1.

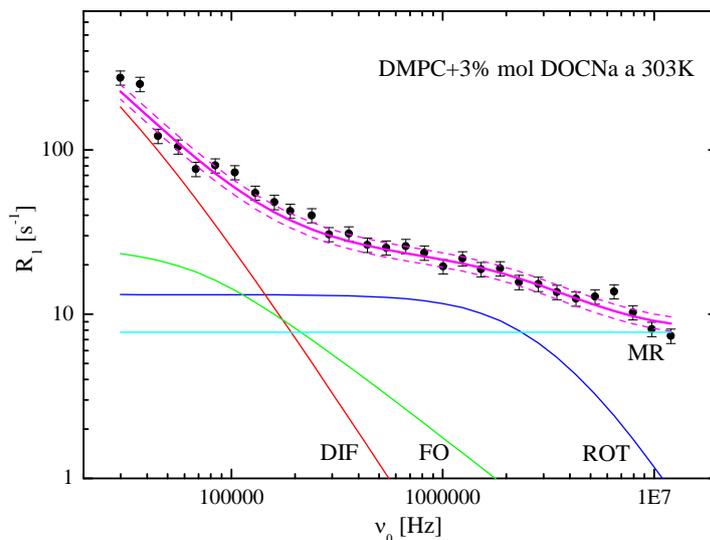


Figura II.3. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 3%mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 303K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.3.

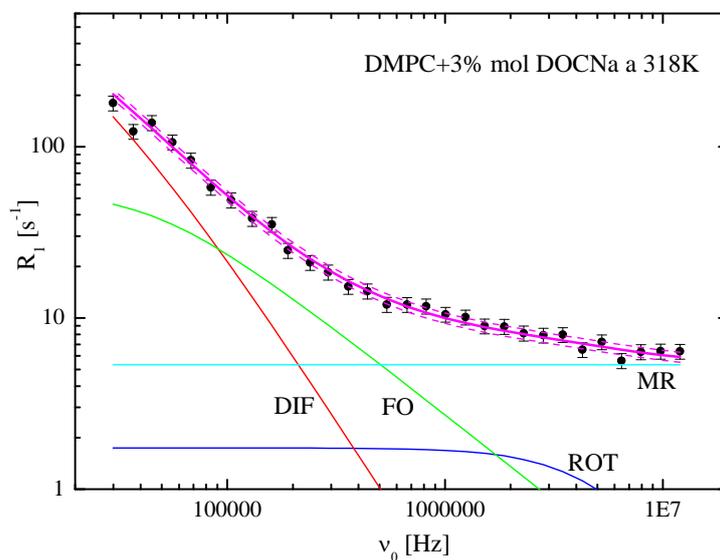


Figura II.4. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 3%mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 318K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.3.

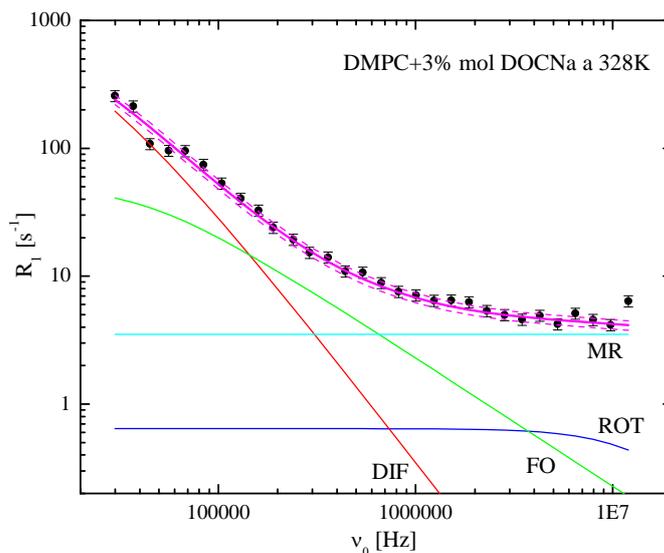


Figura II.5. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 3%mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 328K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.3.

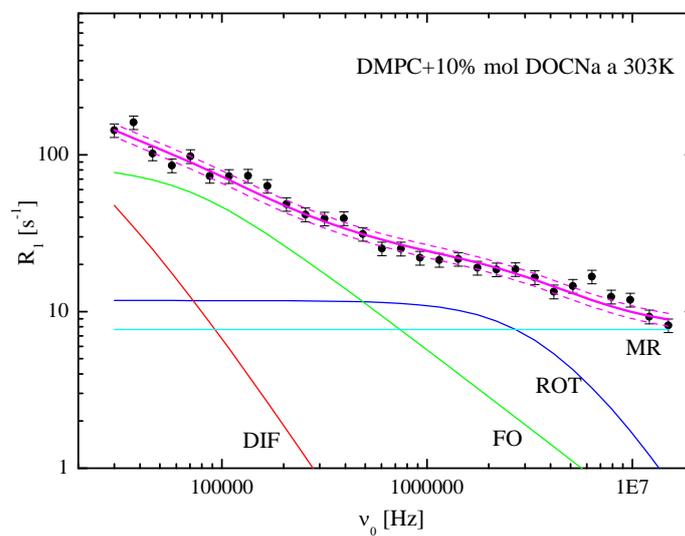


Figura II.6. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 10%mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 303K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.3.

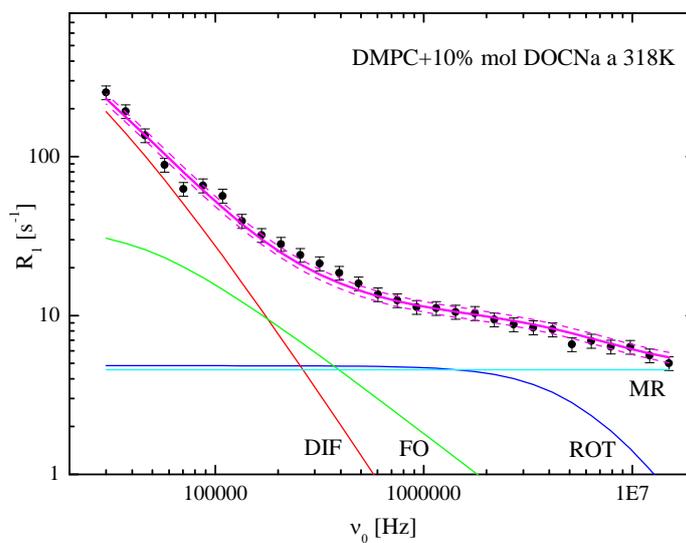


Figura II.7. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 10%mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 318K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.3.

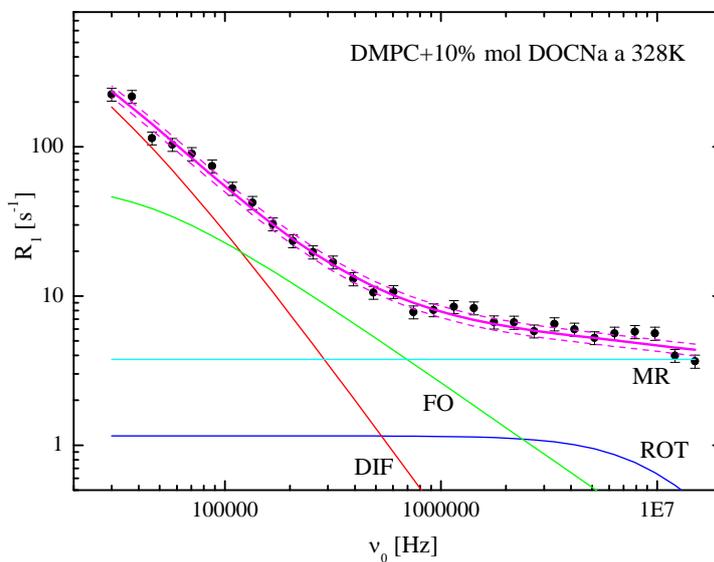


Figura II.8. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 10%mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 328K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.3.

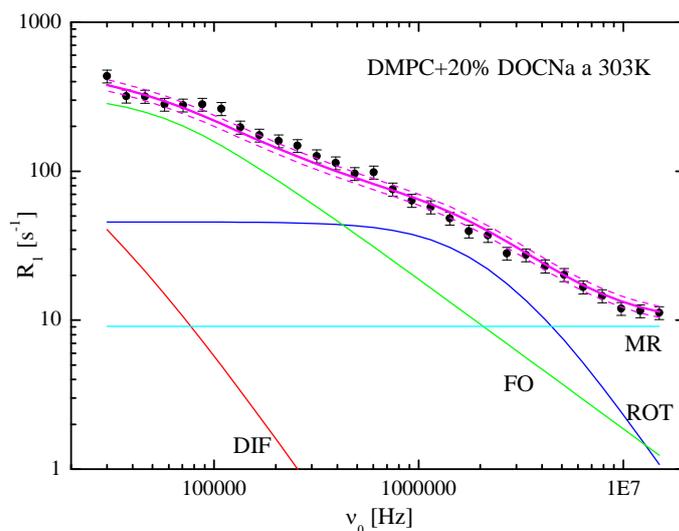


Figura II.9. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 20%mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 303K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.3.

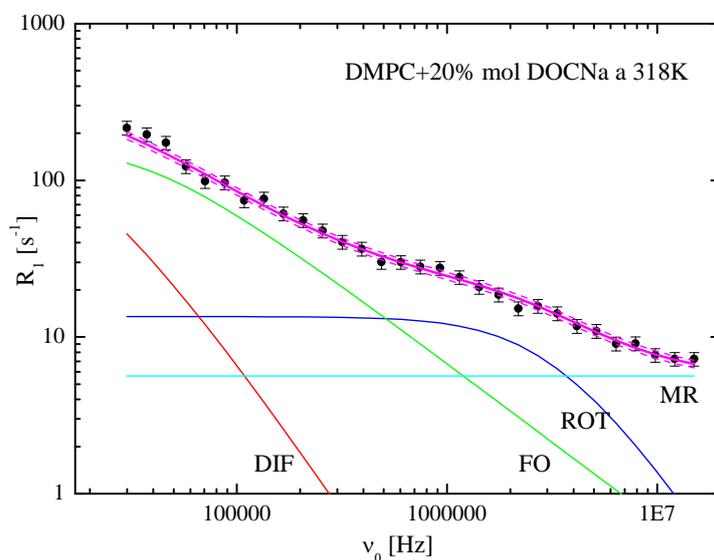


Figura II.10. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 20%mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 318K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.3.

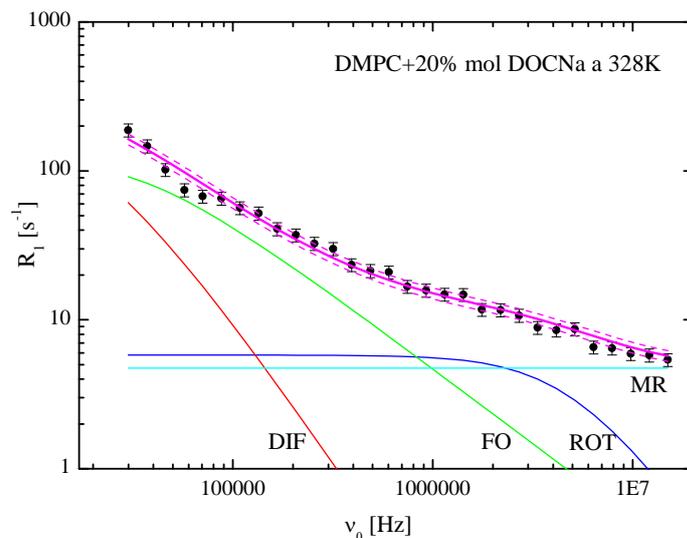


Figura II.11. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC con 20% mol de DOCNa, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 328K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.3.

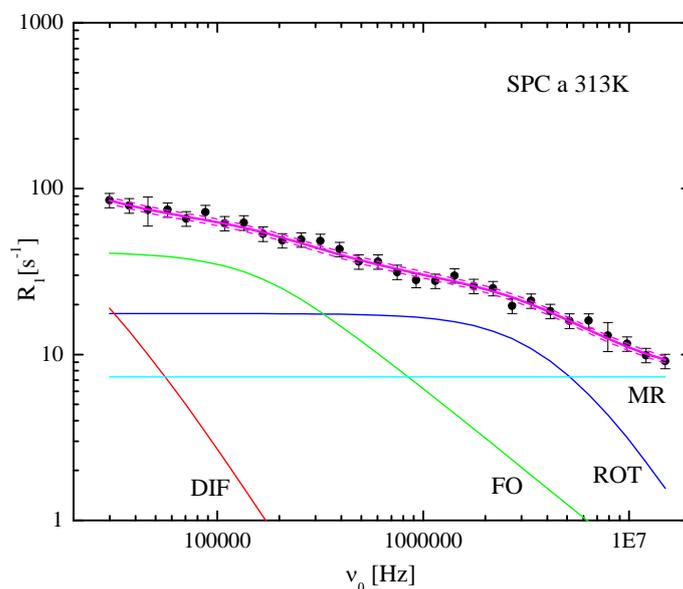


Figura II.12. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC, radio  $R_0 = 50\text{nm}$  a 313K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.4.

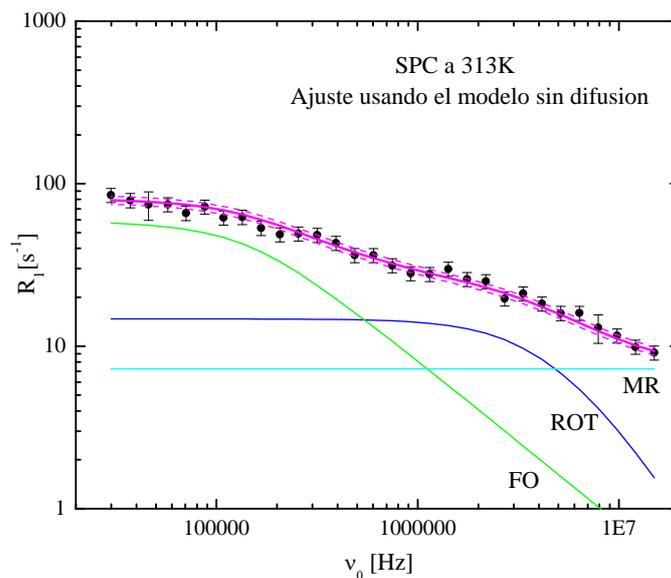


Figura II.13. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC, radio  $R_0=50\text{nm}$  a 313K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste usando el modelo sin difusión es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.4.

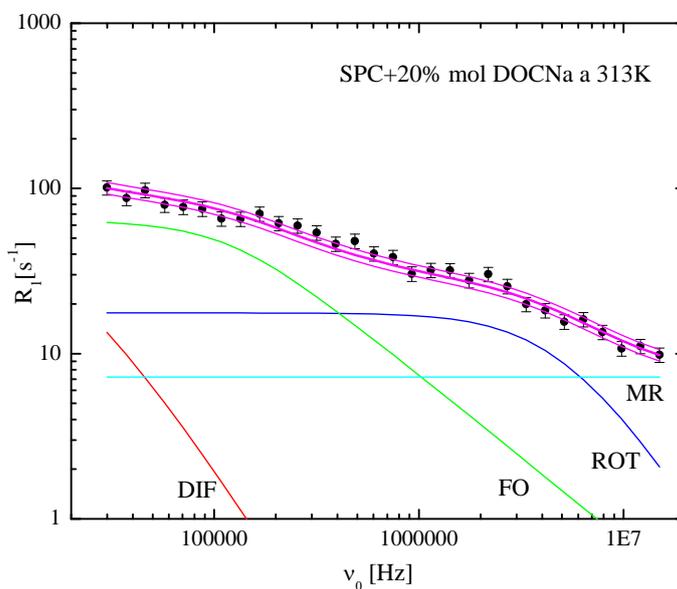


Figura II.14. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC con 20% mol de DOCNa, radio  $R_0=50\text{nm}$  a 313K ( $\bullet$ ). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.4.

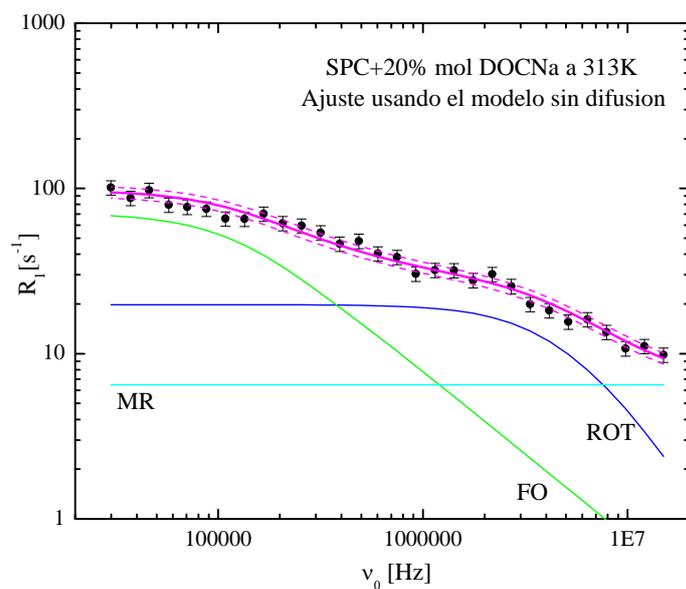


Figura II.15. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC, con 20% mol de DOCNa, radio  $R_0=50\text{nm}$  a 313K (●). La curva de ajuste usando el modelo sin difusión es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento son incluidas: fluctuaciones de orden (verde), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 4.4.

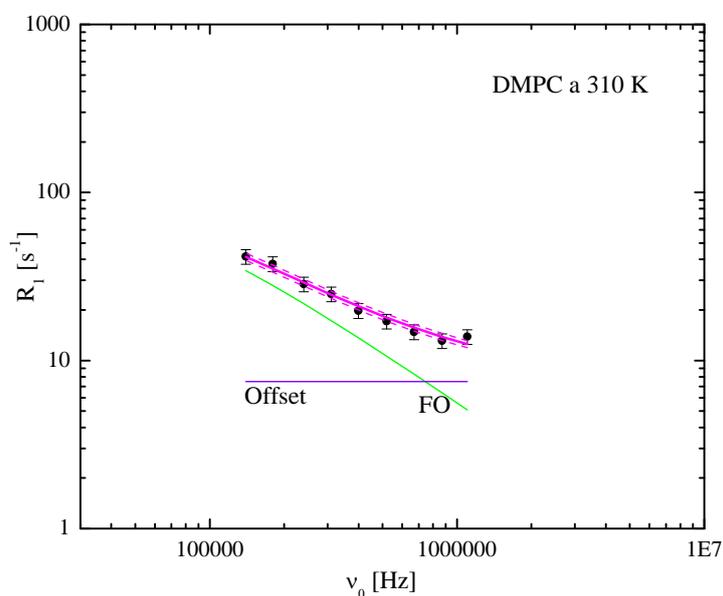


Figura II.16. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC, con radio  $R_0=50\text{nm}$ , a 310K (●). La curva de ajuste usando el modelo simplificado de la ecuación [6.2] es mostrada en magenta. Las contribuciones de las fluctuaciones de orden (verde), y de la constante de offset (violeta) son incluidas. Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 6.2

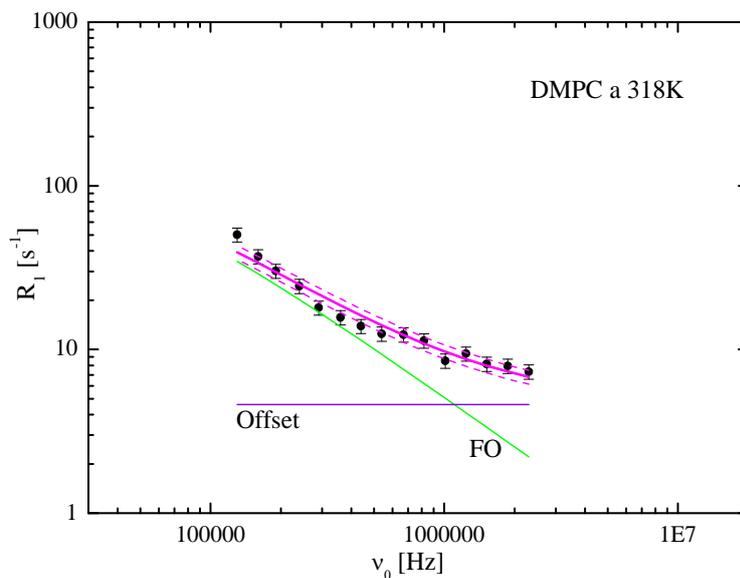


Figura II.17. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC, con radio  $R_0=50\text{nm}$ , a 318K (●). La curva de ajuste usando el modelo simplificado de la ecuación [6.2] es mostrada en magenta. Las contribuciones de las fluctuaciones de orden (verde), y de la constante de offset (violeta) son incluidas. Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 6.2

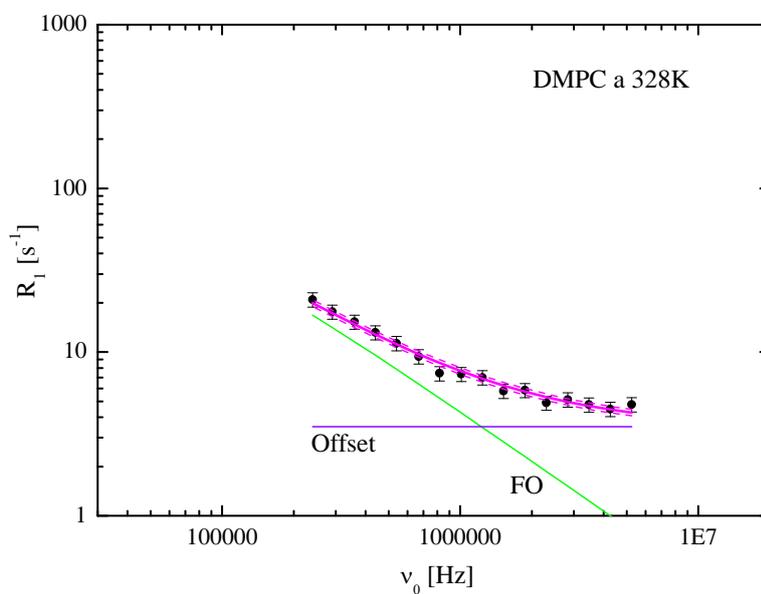


Figura II.18. Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de DMPC, con radio  $R_0=50\text{nm}$ , a 328K (●). La curva de ajuste usando el modelo simplificado de la ecuación [6.2] es mostrada en magenta. Las contribuciones de las fluctuaciones de orden (verde), y de la constante de offset (violeta) son incluidas. Los parámetros relevantes se muestran en la Tabla 6.2.