

TRABAJO ESPECIAL DE LICENCIATURA

Caracterización de la dinámica molecular y propiedades elásticas de membranas de liposomas flexibles mediante relaxometría magnética nuclear

María Belén Marzola Coronel

FACULTAD DE MATEMÁTICA, ASTRONOMÍA, FÍSICA
Y COMPUTACIÓN
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Marzo de 2017

Directora: Dra. Carla Cecilia Fraenza



Caracterización de la dinámica molecular y propiedades elásticas de membranas de liposomas flexibles mediante relaxometría magnética nuclear por Marzola Coronel María Belén y Fraenza Carla Cecilia se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons ution-NonCommercial-SinDerivar 2.5 Argentina](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/arg/).

Resumen

Este trabajo de investigación se basó en el estudio de la dinámica molecular y propiedades elásticas de lípidos en membranas de liposomas utilizando principalmente la técnica de resonancia magnética nuclear denominada relaxometría con ciclado rápido de campo magnético.

Se midieron perfiles de dispersión de R_1 para distintas formulaciones de liposomas a base de SPC (Fosfatidilcolina de Soja) y distintos detergentes (BrijO20, tween80 y SDC) para flexibilizar la membrana, a concentraciones de hasta un 40 % molar.

Se validó con éxito un modelo existente para describir la tasa de relajación espín-red R_1 de protones de lípidos en membranas de liposomas, para el caso de vesículas flexibles, el cual permitió obtener información sobre la dinámica de los lípidos y las propiedades elásticas de las vesículas.

Abstract

This research was based on the study of the molecular dynamics and elastic properties of lipids in liposome membranes using mainly the nuclear magnetic resonance technique called relaxometry with fast magnetic field cycling.

R_1 dispersion profiles were measured for different liposome formulations based on SPC (Soy Phosphatidylcholine) and various detergents (BrijO20, tween80 and SDC) to flexibilize the membrane, at concentrations of up to 40 % molar.

An existing model was successfully validated to describe the spin-lattice relaxation rate R_1 of lipid protons in liposome membranes, in the case of flexible vesicles, which allowed to obtain information on the dynamics of lipids and elastic properties of the vesicles.

Clasificación (PACS): 76.60.-k

Palabras claves: lípidos, detergentes, liposomas, liposomas flexibles, relaxometría con ciclo rápido de campo magnético.

Índice general

Introducción	1
1. Marco Teórico	3
1.1. Sistema de estudio	3
1.1.1. Lípidos	3
1.1.2. Liposomas	4
1.1.3. Detergentes	5
1.1.4. Liposomas Flexibles	6
1.2. Técnica experimental	7
1.2.1. Generalidades de RMN	7
1.2.1.1. Teoría básica	7
1.2.1.2. Absorción de energía y relajación espín red: sistema de dos niveles	9
1.2.1.3. Introducción del “sistema rotante”	12
1.2.1.4. Relajación y señal de inducción libre	13
1.2.2. Relaxometría con ciclado rápido de campo magnético	16
1.2.2.1. Fundamentos	16
1.2.2.2. Funcionamiento: secuencias	17
2. Métodos experimentales y de procesamiento	21
2.1. Experimental	21
2.1.1. Preparación de la muestra	21
2.1.1.1. Cálculo de las masas de cada componente	21
2.1.1.2. Pasos de la preparación	22
2.1.2. Determinación del tamaño de los liposomas	24
2.1.3. Perfiles de dispersión de la tasa de relajación espín-red	24
2.1.3.1. Descripción general y parámetros utilizados	24
2.1.3.2. Breve descripción del equipo	25
2.1.3.3. Medición genérica de un punto del perfil	25
2.2. Modelo Teórico	27
2.2.1. Densidades espectrales	27
2.2.2. Descripción del modelo utilizado	30

2.3. Procesamiento de los perfiles de dispersión de la tasa de relajación: Programa de ajuste	32
2.3.1. Método de parámetros iniciales aleatorios y minimización de PROM . . .	32
2.3.1.1. Primera restricción	33
2.3.1.2. Segunda restricción	33
2.3.2. Criterios utilizados	34
2.3.2.1. Rangos	34
2.3.2.2. Determinación del valor de las restricciones	36
2.3.3. Errores	36
3. Resultados y Análisis de datos	37
3.1. Sensibilidad de la dispersión de R_1 a las diferentes instancias de la preparación de liposomas	37
3.1.1. Post-Hidratación	37
3.1.2. Post-Ciclos térmicos	38
3.1.3. Post-Extrusión	39
3.1.4. DLS	40
3.2. Liposomas flexibles: liposomas con detergente	41
3.2.1. SPC: <i>Muestra base</i>	42
3.2.2. SPC + distintas concentraciones molares de BrijO20	46
3.2.3. SPC + 20% molar de tween80 y desoxicolato de sodio	50
3.2.3.1. Tween80	51
3.2.3.2. Desoxicolato de sodio	52
3.2.3.3. Análisis	53
3.2.4. Comparación entre los distintos detergentes	53
3.3. Incorporación del detergente en la membrana del liposoma	56
3.3.1. Tween80	56
3.3.2. BrijO20	63
4. Conclusiones	67
Bibliografía	71
Apéndice	75

Introducción

Las propiedades viscoelásticas e hidrodinámicas de la membrana de vesículas lipídicas, comúnmente llamadas liposomas, resultan de particular interés en una creciente cantidad de problemas biotecnológicos. Diferentes propiedades de las mismas han sido intensamente estudiadas en las últimas décadas.

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 [1] [2] [3], mientras que otros analizan propiedades elásticas de la membrana de estas vesículas a través de la *constante elástica de flexión* κ . El creciente interés, tanto en la industria farmacéutica-cosmetológica como en grupos académicos, en la investigación y desarrollo de liposomas flexibles 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. Particularmente la constante κ tiene una relación de proporcionalidad inversa con un parámetro llamado deformabilidad o adaptabilidad de las vesículas, siendo este, uno de los parámetros más relevantes relacionados a la dinámica de penetración en la piel.

En general, las técnicas experimentales utilizadas para la caracterización de propiedades elásticas de vesículas, 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.

Entre los métodos tradicionales para el estudio de la constante elástica de flexión κ 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 [4], también se utilizan técnicas de video microscopía óptica en donde se aplica un análisis de Fourier a las fluctuaciones térmicas observadas en vesículas gigantes [5] [6] y, por último, la extrusión de las vesículas a través de membranas porosas con la consecuente medición de la deformabilidad [7]. 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, al margen de que las tres son técnicas altamente invasivas.

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 de costo razonable, volumen limitado y facilidad de instalación, mantenimiento y uso. Dentro de las técnicas de RMN utilizadas en el estudio de membranas lipídicas se encuentra la relaxometría con ciclado rápido de campo, o FFC por sus siglas en inglés. A diferencia de otras técnicas de RMN, este método permite estudiar procesos dinámicos colectivos como lo son las fluctuaciones de orden y procesos difusivos lentos, los que están estrechamente vinculados con las propiedades viscoelásticas de la membrana [8].

Desde hace varios años en el laboratorio de relaxometría y técnicas especiales (LaRTE) de la FaMAF, UNC, se viene trabajando en el desarrollo y perfeccionamiento de una metodología experimental basada en la técnica de relaxometría con ciclado rápido de campo magnético, para la caracterización de propiedades viscoelásticas de membranas de diferentes formulaciones de liposomas o sistemas similares. En trabajos previos [9] [10] [11] [12] se presentó un modelo para interpretar la dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones, para liposomas unilamelares. Además de proporcionar información general sobre la dinámica de los lípidos que conforman la membrana de los liposomas, este modelo permite inferir sobre las propiedades elásticas de la misma por medio de la constante elástica κ , que es uno de los parámetros físicos involucrados en el modelo. Este modelo ha sido validado a partir de mediciones de κ para vesículas dopadas con colesterol de manera de incrementar el valor de la constante. Los resultados obtenidos sugieren que la aplicación de la técnica al estudio de las propiedades viscoelásticas de estos sistemas es prometedora [9] [10] [11] [12].

Específicamente el objetivo de este trabajo fue la aplicación del modelo ya desarrollado para el estudio de liposomas flexibles con el fin de seguir extendiendo su validación esta vez al límite opuesto de flexibilidad de las membranas. Por lo tanto se llevaron a cabo experimentos en vesículas flexibles, compuestas de SPC (fosfatidilcolina de soja) y diferentes detergentes iónicos (desoxicolato de sodio) y no iónicos (tween80 y BrijO20) para flexibilizar la membrana, a concentraciones de hasta un 40% mol. Adicionalmente se verificó la sensibilidad de la técnica a las distintas instancias de la preparación de los liposomas con el fin de asegurar la efectividad de diversos procesos como el de incorporación del detergente a la membrana.

se unen dos ácidos grasos 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.

Los fosfolípidos poseen una función estructural ya que son un componente principal de todas las membranas celulares debido a su capacidad de formar bicapas lipídicas [13]. En este trabajo se utilizó un fosfolípido particular llamado fosfatidilcolina de soja (SPC) comprado en “Lipoid” con el nombre comercial “PHOSPHOLIPON 90 G” y cuya especie predominante es en un 94% $C_{42}H_{80}NO_8P$ con cadenas doblemente insaturadas y, en un 4%, posee Lisofosfatidilcolina ($C_{25}H_{50}NO_7P$). En la figura 1.2 se esquematiza la estructura de la especie predominante.

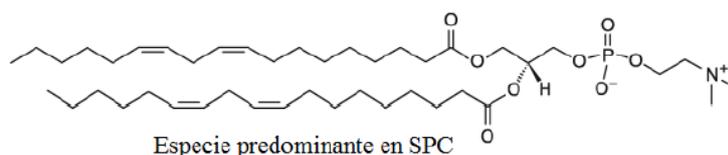


Figura 1.2: Estructura molecular de la fosfatidilcolina de soja (SPC), en el extremo derecho se observan los grupos polares, y en el extremo izquierdo se muestran las cadenas apolares.

1.1.2. Liposomas

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 formar una variada gama de estructuras, que depende en general de la concentración y la temperatura.

Para determinadas concentraciones en un medio acuoso, 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 los rodea. Tales sistemas no están en equilibrio termodinámico pero pueden ser estables durante varios días. El tamaño de un liposoma puede ir desde unos $20nm$ hasta varios micrómetros de radio, y puede estar compuesto de una (unilamelar) o varias membranas concéntricas (multilamelar), cada una de las cuales tiene $6nm$ de espesor.

Los lípidos de la membrana de un liposoma pueden encontrarse en diferentes fases dependiendo de la concentración de lípidos y de la temperatura. En este trabajo, siempre se trabajó en la *fase lamelar en el estado líquido-cristalino*. En esta fase, los lípidos se encuentran acomodados en bicapas donde las cadenas están altamente desordenadas, pero en promedio se encuentran perpendiculares al plano de la bicapa. En la figura 1.3 se esquematiza un liposoma.

La importancia de estudiar este tipo de sistemas es su utilidad para el transporte controlado por diferentes vías (principalmente vías oral, dermal/transdermal y parenteral) de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos en su núcleo acuoso y bicapa lipídica respectivamente.

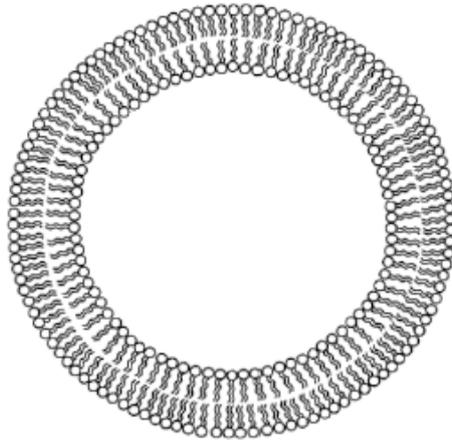


Figura 1.3: representación esquemática de un liposoma. Los círculos representan los grupos polares mientras que las líneas onduladas hacen referencia a las cadenas hidrocarbonadas.

1.1.3. Detergentes

Los detergentes, también conocidos como surfactantes, son compuestos químicos que en este trabajo se utilizarán como agentes para flexibilizar membranas lipídicas ya que tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial de un líquido. Usualmente son compuestos orgánicos anfífilos, también considerados como un grupo especial de lípidos [14]. Por lo tanto esta naturaleza dual les permite la alineación de los mismos en las interfases cuando se encuentran en solución. Produciendo así la disminución de la tensión superficial de la membrana, como se mencionó antes.

Los detergentes, por “su cuenta” también exhiben la propiedad de autoagregación como los lípidos. A bajas concentraciones, los surfactantes existen en forma monomérica en soluciones acuosas, mientras que al aumentar su concentración al límite característico, llamado Concentración Micelar Crítica (CMC), las moléculas del detergente se agrupan formando micelas.

En este trabajo se utilizaron tres detergentes particulares para preparar liposomas deformables: desoxicolato de sodio ó “DOCNa” ($C_{24}H_{39}NaO_4$) con masa molar $M_w = 414,55g/mol$, “Brij O20” ($C_{58}H_{116}O_{21}$) con masa molar $M_w = 1150g/mol$ y “tween80” ($C_{64}H_{124}O_{26}$) con masa molar $M_w = 1310g/mol$. El primero de estos es iónico mientras que los otros dos son no-iónicos. En las figuras 1.5, 1.4 y 1.6 se muestra esquemáticamente la estructura de cada uno de ellos.

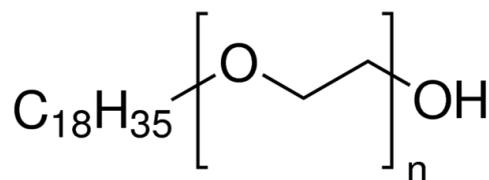


Figura 1.4: Estructura del detergente BrijO20 (nombre comercial) utilizado en este trabajo para flexibilizar la membrana de liposomas y así obtener liposomas deformables. $n \sim 20$.

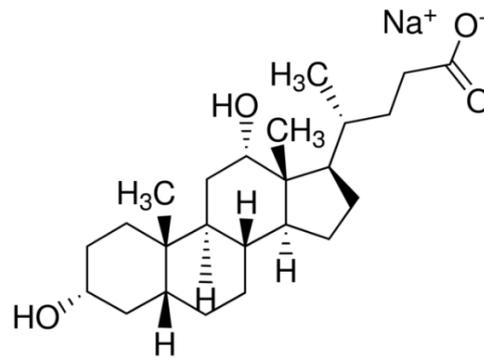


Figura 1.5: Estructura del desoxicolato de sodio (DOCNa) utilizado en este trabajo para flexibilizar la membrana de liposomas y así obtener liposomas deformables.

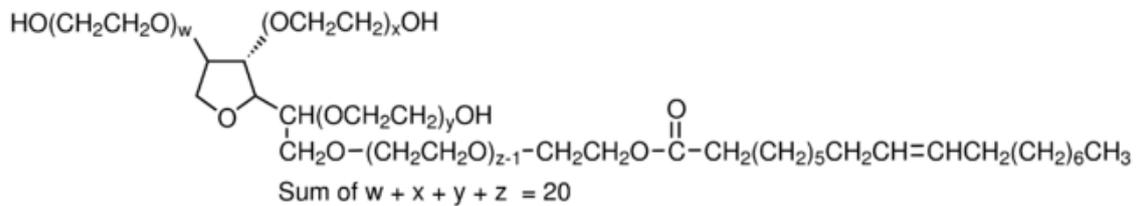


Figura 1.6: Estructura del detergente tween80 (nombre comercial) utilizado en este trabajo para flexibilizar la membrana de liposomas y así obtener liposomas deformables.

1.1.4. Liposomas Flexibles

Un liposoma flexible es una vesícula que posee una membrana con una constante elástica de flexión $\kappa \simeq 2K_B T$, 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 rutas transdermales, pese a que su tamaño puede superar de dos a diez veces el tamaño del poro. El hecho de que la parte exterior de la membrana sea 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 [15] [16] [17]. Este es el motor que impulsa a estas vesículas a penetrar en la piel.

Usar la vía transdermal para la administración de fármacos tiene la ventaja de 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 presentar una vía cómoda y conveniente para el paciente. Principalmente evita el metabolismo de primer paso a través del hígado, lo cual disminuye la biodisponibilidad del fármaco además de generar efectos secundarios indeseados [18], 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 ($\sim 10^{-3}m$) para permitirle a diferentes tipos de virus y bacterias ingresar al organismo [19].

Los liposomas convencionales demostraron no ser sistemas eficientes para el transporte transdermal debido a que son demasiado rígidos ($\kappa \simeq 15K_B T$) para deformarse, por lo tanto no pueden atravesar la piel intactos [16]. Tampoco demostraron 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 para ser sensibles al gradiente acuoso de la piel [16].

Es posible obtener un liposoma flexible por medio de formar la bicapa de la vesícula con una mezcla de dos o más componentes con diferentes capacidades de adaptarse al estrés externo. De esta manera, cuando la vesícula necesite pasar por pequeños conductos se producirá un reacondamamiento 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 energía de deformación [20].

La composición general de un liposoma flexible se basa en el lípido (SPC por ejemplo) más la adición de diversos detergentes. Los detergentes más utilizados son “DOCNa”, “tween80”, “Span80” y “CNa” (Colato de Sodio).

Con el objetivo de indicar cuan flexible es la membrana del liposoma, toma relevancia la medición de la constante elástica de flexión κ . Entre los métodos más comunes para medir κ en vesículas deformables, se encuentran el *método de aspiración de vesículas con micropipetas* [21] [22], que consta de un capilar de diámetro del orden de $5 - 10\mu m$ y un microscopio óptico, por lo que este método sólo sirve para vesículas gigantes (tamaños del orden de $20\mu m$), y es una técnica invasiva. Además se encuentran las técnicas ópticas basadas en reflexión como *elipsometría* y *reflectividad de rayos X* [23] [24], las cuales no son invasivas, pero requieren de una preparación especial de la muestra a analizar. Por otro lado existe un método experimental que posee su fundamentación teórica [7], que permite obtener κ a partir de mediciones de la cantidad de masa filtrada por una membrana porosa con tamaño de poros conocidos, en función de la presión aplicada en dirección normal a la membrana. Adicionalmente, existe otro método experimental ampliamente usado [25] [26] [27] [28] 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.

1.2. Técnica experimental

1.2.1. Generalidades de RMN

1.2.1.1. Teoría básica

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es un fenómeno que se da en los sistemas magnéticos que poseen momento magnético y momento angular de espín no nulos.

Si se tiene un núcleo y se aplica un campo magnético estático \vec{B}_0 , se genera una interacción la cual se puede representar con el siguiente Hamiltoniano:

$$\mathcal{H} = -\vec{\mu} \cdot \vec{B}_0 \quad (1.1)$$

donde $\vec{\mu}$ es el momento magnético del núcleo estudiado. El signo negativo indica que la energía magnética es menor si $\vec{\mu}$ es paralelo al campo \vec{B}_0 .



Figura 1.7: Esquema de la orientación de un momento magnético asociado a un espín 1/2 en presencia de un campo magnético externo.

Es decir que si se tiene un sistema de espines en equilibrio con un reservorio, al cual se lo denomina *la red*, bajo la acción de un campo \vec{B}_0 , el mismo adquiere una magnetización \vec{M}_0 alineada a lo largo de la dirección del campo externo de modo de minimizar su energía magnética. [29]

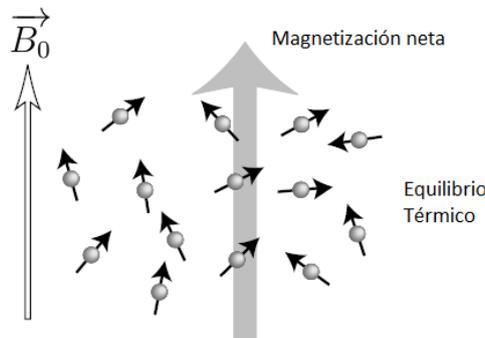


Figura 1.8: Esquema del estado de equilibrio térmico en un sistema de espines 1/2.

El momento magnético del núcleo, es proporcional al momento angular de espín (\vec{I}) del mismo:

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I} \quad (1.2)$$

donde la constante de proporcionalidad γ , es llamada *constante giromagnética*. Por lo tanto la ecuación 1.1 puede reescribirse en términos de \vec{I} de la siguiente manera:

$$\mathcal{H} = -\gamma \vec{I} \cdot \vec{B}_0 \quad (1.3)$$

Si se asume el campo \vec{B}_0 paralelo a la dirección \hat{z} del sistema de laboratorio, los autovalores de este hamiltoniano serán múltiplos de los autovalores m del operador I_z (componente en z del momento angular de espín total). Por lo tanto los niveles de energía permitidos para este sistema son:

$$E_m = -\gamma\hbar B_0 m \quad m = I, I-1, \dots, -I \quad (1.4)$$

donde \hbar es la constante de Plank reducida

Lo que se quiere, es ser capaz de detectar este conjunto de niveles de energía por algunas formas de absorción espectral. Para ello, se debe introducir una interacción que pueda causar transición entre niveles, por lo tanto, la interacción debe ser dependiente del tiempo y, para que se satisfaga la conservación de la energía, debe tener una frecuencia angular ω tal que:

$$\Delta E = \hbar\omega \quad (1.5)$$

donde ΔE es la diferencia de energía entre las energías Zeeman inicial y final.

En un experimento típico de RMN se conduce energía hacia el sistema de espines en forma de pulsos de radiofrecuencia (rf) en direcciones perpendiculares a \vec{B}_0 con el objeto de llevarlo a un estado de no equilibrio con la red. De esta forma se inducen transiciones entre los niveles Zeeman.

Si se asume que esta perturbación se aplica en la dirección \hat{x} del sistema de laboratorio, la misma permite transiciones sólo entre los niveles m y m' con $m' = m \pm 1$. Por lo que se obtiene lo siguiente:

$$\Delta E = -\gamma\hbar B_0 m - (-\gamma\hbar B_0(m \pm 1)) \quad (1.6)$$

Entonces de las ecuaciones 1.5 y 1.6, se tiene que la frecuencia de la perturbación debe ser:

$$\omega = \gamma B_0 \quad (1.7)$$

Esta frecuencia es conocida como “frecuencia de Larmor”. [30]

1.2.1.2. Absorción de energía y relajación espín red: sistema de dos niveles

Se considerará un sistema de espines 1/2 como es el caso de los espines nucleares de los átomos de Hidrógeno, los cuales se estudian en este trabajo. Las energías permitidas, considerando la interacción con un campo magnético \vec{B}_0 , están dadas por:

$$E = -\gamma\hbar B_0 m \quad m = 1/2, -1/2 \quad (1.8)$$

por lo tanto se tiene un sistema de dos niveles como se muestra en la figura 1.9.



Figura 1.9: Esquema de los niveles de energía generados por la interacción de un sistema de espines $1/2$ con un campo magnético de magnitud B_0

Sean N_+ y N_- la cantidad de núcleos en el estado $m = 1/2$ y $m = -1/2$ respectivamente. La cantidad total de núcleos $N = N_+ + N_-$ se mantiene constante, pero la aplicación de un campo alternante $\vec{B}_1(t)$ produce transiciones entre los niveles. Teniendo esto se definen las siguientes cantidades:

$$W_{\uparrow} : \text{probabilidad de transición por segundo del estado } m=1/2 \text{ al } m=-1/2 \quad (1.9)$$

$$W_{\downarrow} : \text{probabilidad de transición por segundo del estado } m=-1/2 \text{ al } m=1/2 \quad (1.10)$$

Si se aplicara la teoría de perturbaciones dependientes del tiempo se obtendría que $W_{\uparrow} = W_{\downarrow}$. Pero hay que tener en cuenta que existe otro sistema, la red, el cual acepta y entrega energía desde y hacia el sistema de núcleos respectivamente.

El cambio de población de los niveles se puede expresar mediante la siguiente ecuación diferencial (se tratará particularmente el cambio de población del nivel $m = -1/2$)

$$\frac{dN_+}{dt} = N_- W_{\downarrow} - N_+ W_{\uparrow} \quad (1.11)$$

Si inicialmente el sistema esta en equilibrio se tiene que:

$$\frac{dN_+^0}{dt} = 0 = N_-^0 W_{\downarrow} - N_+^0 W_{\uparrow} \quad (1.12)$$

donde el supraindice 0 indica población inicial. Por lo tanto,

$$\frac{N_-^0}{N_+^0} = \frac{W_{\uparrow}}{W_{\downarrow}} \quad (1.13)$$

Utilizando principios básicos de mecánica estadística se puede describir la población de un nivel de la siguiente forma:

$$n_i = \frac{e^{-E_i/K_B T}}{\sum_i e^{-E_i/K_B T}} \quad (1.14)$$

donde E_i es la energía del nivel i -ésimo, K_B es la constante de Boltzman y T es la temperatura. Así, el cociente de poblaciones iniciales puede escribirse de la siguiente forma:

$$\frac{N_-^0}{N_+^0} = e^{-\Delta E/K_B T} = e^{-\gamma \hbar B_0/K_B T} = \frac{W_{\uparrow}}{W_{\downarrow}} \quad (1.15)$$

Es posible observar como la existencia de la red influye en la distribución de las poblaciones, ya que sino se tendría este cociente igual a 1. Por lo tanto, la tasa de transición de los núcleos

depende de la probabilidad de que el reservorio esté en un estado que permita dicha transición.

En la figura 1.10 se ilustra el sistema completo:

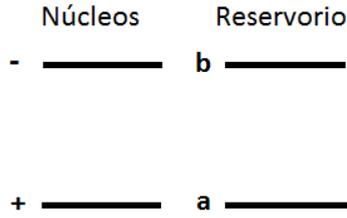


Figura 1.10: Esquema de los niveles de energía generados por la interacción de un sistema de espines 1/2 con un campo magnético de magnitud B_0 y los correspondientes a la interacción de la red con el mismo campo.

Ahora las probabilidades de transición por segundo $W_{\uparrow/\downarrow}$ están condicionadas. Si el sistema está equilibrio se puede escribir lo siguiente:

$$N_- N_b W_{-;b \rightarrow +;a} = N_+ N_a W_{+;a \rightarrow -;b} \quad (1.16)$$

Y, en este caso se puede afirmar que $W_{-;b \rightarrow +;a} = W_{+;a \rightarrow -;b}$. Por lo tanto la población relativa del sistema de núcleos y la red es igual :

$$\frac{N_-}{N_+} = \frac{N_a}{N_b} \quad (1.17)$$

Si se redefinen las cantidades W_{\uparrow} y W_{\downarrow} de la siguiente forma, la ecuación 1.11 sigue teniendo la misma validés pero con estas nuevas cantidades:

$$W_{\uparrow} = N_a W_{+;a \rightarrow -;b} \quad (1.18)$$

$$W_{\downarrow} = N_b W_{-;b \rightarrow +;a} \quad (1.19)$$

Si se define la cantidad $n = N_+ - N_-$ y, recordando que $N = N_+ + N_-$ es la cantidad total de nucleos del sistema, se puede escribir la población de cada nivel de la siguiente forma:

$$N_- = \left(\frac{N - n}{2} \right) \quad (1.20)$$

$$N_+ = \left(\frac{N + n}{2} \right) \quad (1.21)$$

Por lo tanto, utilizando estas expresiones y recordando que la población total del sistema de nucleos se mantiene constante, la ecuación 1.11 queda de la siguiente manera:

$$\frac{dn}{dt} = (W_{\downarrow} + W_{\uparrow}) \left(N \frac{W_{\downarrow} - W_{\uparrow}}{W_{\downarrow} + W_{\uparrow}} - n \right) \quad (1.22)$$

Para expresar esto de una forma más amigable, se definen las siguientes cantidades importantes:

$$\frac{1}{T_1} = W_{\downarrow} + W_{\uparrow} \quad (1.23)$$

donde T_1 es un tiempo característico asociado a como el sistema se acerca al equilibrio térmico, y se denomina *tiempo de relajación espín-red*, y:

$$n_0 = N \frac{W_{\downarrow} - W_{\uparrow}}{W_{\downarrow} + W_{\uparrow}} \quad (1.24)$$

donde n_0 es la diferencia de poblaciones en equilibrio.

Así la ecuación 1.22 queda de la siguiente forma:

$$\frac{dn}{dt} = \frac{n_0 - n}{T_1} \quad (1.25)$$

Resolviendo esto, se obtiene la siguiente expresión para $n(t)$:

$$n(t) = n_0 - n_0 e^{-t/T_1} \quad (1.26)$$

El tiempo característico T_1 está asociado a cambios de energía globales, ó equivalentemente a variaciones en la población de los niveles. Clásicamente está vinculado con la variación de la magnetización en la dirección paralela al campo aplicado, es decir en este caso, a M_z . [30]

1.2.1.3. Introducción del “sistema rotante”

Si se tiene una partícula con momento magnético $\vec{\mu}$ y momento angular \vec{I} inmersa en un campo magnético \vec{B}_0 , el mismo le produce un torque que cambia su dirección, de forma tal que:

$$\frac{d\vec{I}}{dt} = \vec{\mu} \times \vec{B}_0 \quad (1.27)$$

Luego, como $\vec{\mu} = \gamma \vec{I}$, se obtiene lo siguiente:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \vec{\mu} \times (\gamma \vec{B}_0) \quad (1.28)$$

Se puede ver que para todo tiempo el cambio en $\vec{\mu}$ es perpendicular a $\vec{\mu}$ y a \vec{B}_0 y, de la ecuación 1.1 se puede observar también, que el ángulo entre $\vec{\mu}$ y \vec{B}_0 debe ser fijo para que se conserve la energía. Por lo tanto $\vec{\mu}$ se mueve alrededor de un eje paralelo al campo aplicado con un ángulo fijo respecto al mismo, describiendo “un cono” alrededor de dicho eje. En la figura 1.11 se ilustra esquemáticamente este fenómeno.

Este movimiento se denomina “precesión” y ocurre a la denominada frecuencia de Larmor, cuyo módulo es $w_0 = |\gamma \vec{B}_0|$.



Figura 1.11: Esquema del movimiento de precesión que describe un momento magnético en presencia de un campo externo.

Se quiere introducir un sistema en el que sea más fácil y práctico describir el movimiento de $\vec{\mu}$, al cual llamaremos sistema rotante ya que rota a una frecuencia $\vec{\omega}$ respecto al sistema de laboratorio.

Se puede demostrar que el movimiento de $\vec{\mu}$ en el sistema de laboratorio y en el sistema rotante están relacionados de la siguiente manera [30].

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \frac{\delta\mu}{\delta t} + \vec{\omega} \times \vec{\mu} \quad (1.29)$$

donde $\frac{\delta}{\delta t}$ hace referencia variaciones temporales en el sistema rotante.

Utilizando la expresión encontrada en la ecuación 1.28 se puede reescribir esta ecuación de la siguiente forma:

$$\vec{\mu} \times (\gamma\vec{B}_0) = \frac{\delta\mu}{\delta t} + \omega \times \vec{\mu} \quad (1.30)$$

Por lo tanto, sólo despejando se puede encontrar una expresión para el movimiento de $\vec{\mu}$ en el sistema rotante

$$\frac{\delta\vec{\mu}}{\delta t} = \vec{\mu} \times (\gamma\vec{B}_0 + \omega) \quad (1.31)$$

Se puede observar que el movimiento de $\vec{\mu}$ en el sistema rotante obedece la misma ecuación que en el sistema de laboratorio pero con un campo efectivo $\vec{B}_{eff} = \vec{B}_0 + \frac{\omega}{\gamma}$

Entonces es posible ver que si la velocidad angular del sistema rotante toma el valor $\omega = -\gamma B_0$ (condición de resonancia), $\vec{\mu}$ permanece quieto en este sistema y precesa con esta velocidad en el sistema de laboratorio. Es importante destacar que esta frecuencia de precesión es igual a la frecuencia de resonancia para la absorción de energía del sistema (ecuación 1.7). [30]

1.2.1.4. Relajación y señal de inducción libre

En esta sección se analizará que pasa cuando se lleva al sistema de espines a un estado de no equilibrio con la red. Para ello se aplican perturbaciones durante cortos períodos de tiempo

(comparados con la duración del experimento), llamadas *pulsos de radiofrecuencia*.

Si se aplica un pulso descrito por un campo alterno de la siguiente forma:

$$\vec{H}_1(t) = B_1 \cos(\omega t) \hat{i}, \quad (1.32)$$

las ecuaciones de movimiento de $\vec{\mu}$ en el sistema de laboratorio y en el sistema rotante, dadas por las ecuaciones 1.28 y 1.31 respectivamente, quedan modificadas de la siguiente manera:

$$\frac{d\vec{\mu}}{dt} = \vec{\mu} \times \gamma(\vec{B}_0 + \vec{B}_1(t)) \quad (1.33)$$

$$\frac{\delta\vec{\mu}}{\delta t} = \vec{\mu} \times \gamma[(B_0 - \omega/\gamma)\hat{k} + B_1\hat{i}] \quad (1.34)$$

Se puede ver que en el sistema rotante $\vec{\mu}$ experimenta un campo efectivo $\vec{B}_{eff} = (B_0 - \omega/\gamma)\hat{k} + B_1\hat{i}$, precesando en torno a este campo a una velocidad angular $\omega = \gamma B_{eff}$. En la figura 1.12 se esquematiza este fenómeno.

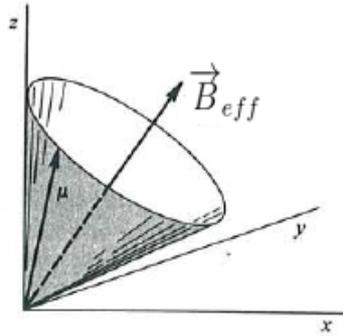


Figura 1.12: Esquema de la precesión de un momento magnético alrededor de un campo magnético de magnitud B_{eff}

Si el sistema está en resonancia ($\omega = -\gamma B_0$), se tiene que $\vec{B}_{eff} = \vec{H}_1$. Aquí se ve claramente la importancia de definir el sistema rotante, debido a la simplicidad con la que puede describirse el movimiento de $\vec{\mu}$ en la condición de resonancia.

Si el sistema de espines está en equilibrio con el campo \vec{B}_0 y se aplica una perturbación correspondiente a lo que se denomina un pulso de $\pi/2$, la magnetización queda perpendicular a \vec{B}_0 . Esto se logra combinando la amplitud y duración del pulso de forma tal que al sistema se le entregue la energía necesaria para que esto ocurra.

Cuando la perturbación (\vec{B}_1) desaparece, para retornar al equilibrio térmico, el sistema de espines necesita disipar este exceso de energía, lo que se describe como “relajación”. En este proceso los espines interactúan entre ellos y con “la red”. Los resultados de esta evolución pueden describirse por un conjunto de ecuaciones llamadas “**Ecuaciones de Bloch**”, las cuales se muestran a continuación:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 + M_z}{T_1} + \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_z \quad (1.35)$$

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_x - \frac{M_x}{T_2} \quad (1.36)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma(\vec{M} \times \vec{B})_y - \frac{M_y}{T_2} \quad (1.37)$$

Resolviendo estas ecuaciones luego de la aplicación del pulso de radiofrecuencia, se puede observar el siguiente comportamiento general:

El decaimiento de las componentes transversales (M_x y M_y), está caracterizado por la constante de tiempo T_2 denominada comunmente como “tiempo de relajación espín-espín”, el cual está determinado por procesos de interacción entre espines así como por fluctuaciones de la red. Resolviendo las ecuaciones de Bloch correspondientes se obtiene que la dependencia temporal de la magnetización transversal M_{\perp} :

$$M_{\perp}(t) = M_0 e^{i\omega_0 t} e^{-t/T_2} \quad (1.38)$$

Debido al factor oscilante $e^{i\omega_0 t}$, este proceso produce una fuerza electro-motriz, la cual es detectada por la misma bobina encargada de generar los pulsos de radiofrecuencia. La señal detectada se denomina “señal de RMN”, “señal de inducción libre” ó FID (por sus siglas en inglés). En la figura 1.13 se esquematiza este proceso.

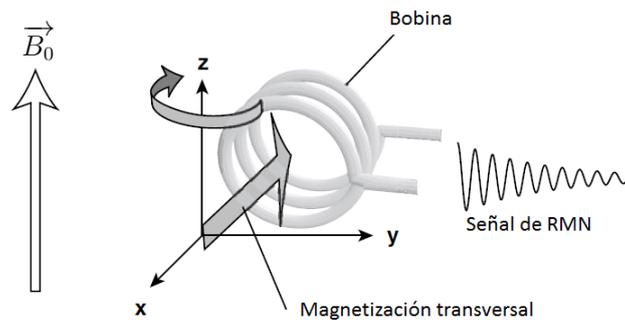


Figura 1.13: Esquema de la adquisición de la FID (señal de RMN) por medio de la bobina generadora de los pulsos de rf.

La recuperación de la componente longitudinal ocurre con un tiempo característico T_1 , denominado “tiempo de relajación espín-red” y está determinado por los mecanismos que involucran una transferencia energética desde el sistema de espines a la red. Resolviendo la ecuación 1.35, se obtiene la siguiente expresión para la evolución temporal de la componente longitudinal de la magnetización:

$$M_z(t) = (M_z(0) - M_0)e^{-t/T_1} + M_0 \quad (1.39)$$

donde M_0 es la magnetización de equilibrio y $M_z(0)$ es la componente longitudinal de la magnetización inmediatamente después de la aplicación del pulso de radiofrecuencia. [30]

Vale la pena destacar la equivalencia entre las ecuaciones 1.26 y 1.39.

1.2.2. Relaxometría con ciclado rápido de campo magnético

1.2.2.1. Fundamentos

La relaxometría con ciclado rápido de campo ó FFC NMR (por sus siglas en inglés) es una técnica de Resonancia Magnética Nuclear que permite obtener tiempos de relajación de un sistema de núcleos en función del campo magnético externo aplicado [32].

Si se mide la dependencia de T_1 con el valor de campo, se obtiene la denominada “curva de dispersión de la tasa de relajación espín-red”, la cual consiste en expresar la tasa de relajación $R_1 = T_1^{-1}$ en función de la frecuencia de Larmor. Es importante aclarar que cuando durante todo un experimento se trabaja sólo con un tipo de núcleo (Hidrógeno en nuestro caso), se acostumbra expresar la magnitud de los campos magnéticos en términos de la “frecuencia de Larmor”. Es decir que en vez de mencionar el valor de un dado campo magnético como su magnitud acompañado de su unidad (Tesla, Gauss) en algún sistema de unidades, se menciona la frecuencia de Larmor que tiene un núcleo en dicho valor de campo.

La importancia de obtener la curva de dispersión reside en el hecho de que bajo ciertas aproximaciones, la inversa del tiempo de relajación espín-red (R_1) se puede describir en términos de funciones de la frecuencia de Larmor, conocidas como “Densidades Espectrales” [31]. Estas funciones son las transformadas de Fourier de las funciones de correlación de cada uno de los procesos dinámicos del sistema. Por lo tanto una vez que se mide la curva de dispersión de un sistema, se obtiene información de los procesos dinámicos que intervienen en la relajación del mismo.

La técnica de ciclado de campo permite medir tiempos de relajación para campos magnéticos externos típicamente en el rango desde pocos kHz hasta aproximadamente $40MHz$. El límite inferior de este rango está determinado por la existencia de limitaciones dadas por los valores de campos locales u otros campos externos que pudieran existir en el laboratorio y que no estén compensados correctamente, los cuales pueden influir indeseadamente en la relajación. Entonces es importante determinar el valor de los mismos para obtener el límite inferior en el rango de campo magnético externo a utilizar en cada experimento. Por limitaciones electrónicas sólo es posible alcanzar como máximo, campos de $40MHz$ con esta técnica, siendo el rango de $40 - 900MHz$ suplementado por mediciones de T_1 con aparatos de RMN convencionales a campo fijo y, el límite de alta frecuencia ($\sim 900MHz$) está determinado por los campos magnéticos alcanzados con imanes superconductores.

1.2.2.2. Funcionamiento: secuencias

Las dos secuencias de campo ciclado que se usan comunmente para la medición de T_1 son: La secuencia Pre - Polarizada (PP) y la secuencia No - Polarizada (NP). El principio de funcionamiento y sus características se describen a continuación.

Secuencia PP

Esta secuencia se utiliza para medir T_1 a campos muy bajos (en general menores a 10MHz). En la figura 1.14 se muestra un esquema de la misma:

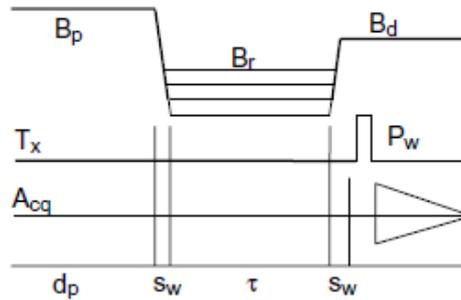


Figura 1.14: Esquema de la secuencia pre-polarizada. Se muestra gráfica y cualitativamente los distintos valores que toma el campo B_0 . Se puede ver que el campo B_r se esquematiza con más de una “línea” debido a que su valor varía durante el experimento. El pulso de radiofrecuencia se denota con las letras P_w , τ es el período temporal en que la magnetización se encuentra bajo la acción del campo B_r , y el lapso de tiempo en que el campo B_0 cambia de un valor a otro se denota con las letras sw [33].

La muestra es polarizada en un campo magnético B_p , tan alto como técnicamente sea posible donde se forma una magnetización de equilibrio proporcional al campo $M_0(B_p)$. El proceso de relajación tiene lugar en un campo B_r el cual es el que cambia su valor para poder medir el perfil de dispersión y, el intervalo de tiempo que el sistema se encuentra sometido a este campo, depende de las propiedades relaxométricas de la muestra. La magnetización inicial en este campo B_r se asume igual a la magnetización en el campo de polarización ya que se ignora la relajación ocurrida durante el intervalo de cambio “sw”, por lo que se tiene $M_z(0) = M_0(B_p)$. Luego, la misma empieza a relajarse hacia la nueva magnetización de equilibrio proporcional al campo de relajación $M_0(B_r)$, y relajará (disminuirá en este caso) más, mientras mayor sea el tiempo τ que se deje expuesta a este campo. Este tiempo τ es el que va cambiando en cada secuencia a campo B_r fijo para determinar un valor de T_1 . En este intervalo de tiempo, el valor al que relaja la magnetización está dado por una de las soluciones de las ecuaciones de Bloch:

$$M_z(\tau) = M_0(B_r) + [M_0(B_p) - M_0(B_r)]e^{-\tau/T_1} \quad (1.40)$$

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, se aplica en este caso un pulso de $\pi/2$ (también se pueden utilizar ecos de espín) para observar la FID.

Finalmente toma lugar el proceso de repolarización de la muestra, antes de que comience el ciclo nuevamente.

Secuencia NP

Cuando el valor del campo de relajación es próximo al valor de polarización, la evolución de la magnetización toma lugar entre un valor inicial y final de campo muy cercanos, lo cual incrementa el error de la medición. En estos casos es preferible utilizar la secuencia NP ya que aumentar el valor del campo B_p no es una posibilidad debido a impedimentos electrónicos.

Por lo tanto esta secuencia se utiliza para medir T_1 a valores de campo próximos al valor de polarización, en este caso la magnetización crece desde un valor inicial proximo a cero. La misma se esquematiza en la figura 1.15 [33]:

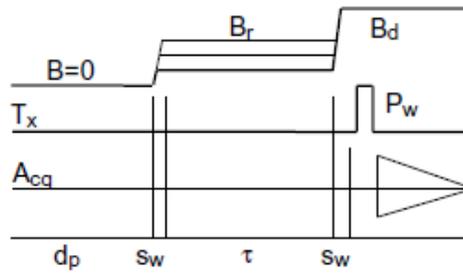


Figura 1.15: Esquema de la secuencia no-polarizada. Se muestra gráfica y cualitativamente los distintos valores que toma el campo B_0 . Se puede ver que el campo B_r se esquematiza con más de una “línea” debido a que su valor varía durante el experimento. El pulso de radiofrecuencia se denota con las letras P_w , τ es el período temporal en que la magnetización se encuentra bajo la acción del campo B_r , y el lapso de tiempo en que el campo B_0 cambia de un valor a otro se denota con las letras sw .

En esta secuencia se inicia el ciclo sin ningún campo de polarización $B_0(0) = 0$, por lo tanto la curva de relajación se construye a partir de un valor de magnetización cercano a cero $M_z(0) \sim 0$. Luego se enciende el campo de relajación y la magnetización empieza a crecer para llegar al valor de equilibrio con este campo. La magnetización será más grande mientras mayor sea el tiempo τ que se deje sometido el sistema a este campo. La evolución de la misma puede entonces describirse con la siguiente ecuación:

$$M_z(\tau) = M_0(B_r)(1 - e^{-\tau/T_1}) \quad (1.41)$$

Luego la señal es detectada de la misma manera que en la secuencia PP.

Aclaraciones y especificaciones:

1. Todas las variaciones de campo se hacen cumpliendo la condición de adiabaticidad. Esto quiere decir que el cambio debe realizarse en un período de tiempo suficientemente corto

como para que la magnetización no relaje al nuevo valor de campo pero a la vez, tiene que ser lo suficientemente largo para que la magnetización permanezca en el eje \hat{z} ya que sino, la magnetización podría empezar a precesar alrededor de un campo efectivo formado por B_r y los campos locales.

2. El motivo por el cual B_p y B_r tienen que tomar valores tan altos como técnicamente sea posible se explica a continuación: en un experimento de RMN convencional, se sabe que la relación señal ruido de la FID, tiende a disminuir para campos bajos. La dependencia de la relación señal ruido “ S/R ” con la intensidad del campo magnético es casi cuadrática [32], y, en consecuencia, la pérdida de señal es un factor limitante grave en la RMN a campos bajos. La solución del problema con campo cíclico (FC) consiste en prepolarizar la muestra en un campo mayor (B_p) para construir una magnetización más fuerte, luego se permite evolucionar al sistema de espines en el campo bajo al que se desea trabajar y, la detección de la señal de RMN después de la evolución se realiza en un tercer campo (B_d) [33]. De esta manera la relación señal ruido modifica su dependencia, tornándose proporcional a B_p y a $B_d^{1/2}$.
3. El motivo por el cual la detección de la señal se realiza a un determinado valor de campo B_d fijo, es para evitar resintonizar el “probe” a cada valor de B_r .

Capítulo 2

Métodos experimentales y de procesamiento

2.1. Experimental

2.1.1. Preparación de la muestra

Se prepararon liposomas de SPC (Fosfatidilcolina de Soja) dopados con distintos detergentes (Brij O20, tween80 y DOCNa) a distintas concentraciones molares (9 %, 20 % y 40 %) según el caso, suspendidos en agua deuterada (D_2O). Se procuró que el diámetro de los mismos no supere los 100nm por la aplicabilidad deseada.

Todas las formulaciones de liposomas fueron preparadas por la autora de este trabajo, en el Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), de la facultad de ciencias químicas, UNC, en la ciudad de Córdoba.

El motivo por el que el medio de suspensión es agua deuterada (D_2O) y no agua (H_2O) es que se desea detectar la señal de RMN proveniente únicamente de los núcleos de hidrógeno de los lípidos y detergentes. Por lo que, si el medio de suspensión fuera agua, la señal que se detectaría sería en mayor medida proveniente de los núcleos de hidrógeno del H_2O , ya que debido a la falta de resolución espectroscópica de la técnica de RMN a utilizar, no se podría discriminar la señal proveniente de cada tipo de hidrógeno.

Como la frecuencia de la perturbación aplicada en los experimentos a realizar es proporcional a la constante giromagnética del hidrógeno, no se generan transiciones entre los niveles de energía provenientes de la interacción del campo externo \vec{B}_0 con los restantes elementos que componen la muestra ya sean deuterios, oxígenos, fósforos, carbonos, etc. Es decir que lo que ocurre es que se “invisibilizan” los núcleos de todos los elementos que no sean hidrógenos.

2.1.1.1. Cálculo de las masas de cada componente

La proporción de detergente respecto de la cantidad total de lípido más detergente, se midió en concentraciones molares, siempre manteniendo fija la masa total de lípidos+detergente. Por

lo tanto, conociendo la concentración molar que se desea y la masa molar o peso molecular de cada uno de los componentes, se puede obtener la masa con la que hay que trabajar de cada uno de los compuestos, para obtener la concentración deseada. A continuación se muestra la forma de llegar a estos valores.

La concentración molar de detergente se define de la siguiente manera:

$$c = \frac{N_{det}}{N_{lip} + N_{det}} \quad (2.1)$$

donde N indica cantidad de moles

Se tiene que para un compuesto

$$M = Nm \quad (2.2)$$

donde, M es la masa total, y m la masa molar del compuesto.

Así la masa total (M_T) con la que se trabajará viene dada por :

$$M_T = N_{det}m_{det} + N_{lip}m_{lip} \quad (2.3)$$

Como se va a considerar M_T fija, e igual a una cantidad conocida, los valores que faltan averiguar son la cantidad de moles a utilizar de cada sustancia.

De la ecuación 2.1 se puede obtener la siguiente expresión:

$$N_{det} = \frac{c}{1-c} N_{lip} \quad (2.4)$$

Usando esto, es posible reescribir la masa total de la siguiente forma:

$$M_T = \left[\frac{c}{1-c} m_{det} + m_{lip} \right] N_{lip} \quad (2.5)$$

despejando N_{lip} de la ecuación 2.5, se obtiene una expresión para la cantidad de moles de lípidos a utilizar:

$$N_{lip} = \frac{M_T}{\left[m_{lip} + \frac{c}{1-c} m_{det} \right]} \quad (2.6)$$

Combinando las ecuaciones 2.4 y 2.6 se obtiene una expresión para la cantidad de moles de detergente a utilizar:

$$N_{det} = \frac{cM_T}{(1-c)m_{lip} + cm_{det}} \quad (2.7)$$

Finalmente utilizando la ecuación 2.2 se obtiene la cantidad de masa de cada componente que se necesita para preparar liposomas con una concentración molar c de detergente.

2.1.1.2. Pasos de la preparación

1. PESAJE

Se utilizó una balanza digital con una apreciación de $0,0001g$. El pesaje se realizó colocando el material dentro de un tubo cónico de vidrio de peso conocido y se utilizó un recipiente diferente para cada componente (lípidos y detergente). La masa total que se utilizó en todos los experimentos fue: $M_T = M_{lip} + M_{det} = 61,19mg$

2. DISOLUCIÓN

Los lípidos, se disolvieron en $2ml$ de cloroformo aproximadamente, mientras que el detergente se disolvió en un $1ml$ de solvente que consta de 80% cloroformo y 20% metanol.

En el caso de estar trabajando con lípidos y detergente, una vez que están disueltos, se mezclan las dos soluciones en un mismo recipiente.

3. FORMACIÓN DEL “FILM”

Se secó el solvente con una corriente de Nitrógeno, mientras se maniobraba el recipiente de tal forma de ayudar a que mientras se iba secando, los lípidos o la mezcla de lípidos más detergente quedaran adheridos lo más uniformemente posible a las paredes del mismo formando un film.

Una vez formado el film, se dejó el recipiente en vacío durante tres horas aproximadamente para terminar de evaporar el solvente.

Todo el procedimiento descrito hasta ahora se realizó con el objetivo de favorecer la hidratación cuando se agrega la solución acuosa ya que el lípido es bastante insoluble en agua. Por lo que, si se agregara directamente el buffer acuoso, el lípido tendería a excluirse del agua formando grandes agregados difíciles de desarmar. Entonces con este procedimiento se logra formar capas monomoleculares en las paredes del tubo cónico.

4. HIDRATACIÓN

La muestra se hidrató con $1,3ml$ de agua deuterada. Primero se agregaron $0,8ml$ y se agitó la solución con un “agitador vortex” para ayudar a la hidratación. Luego se agregaron los $0,5ml$ de D_2O restantes y se volvió a agitar. Si al finalizar este procedimiento se observaba que todavía quedaban restos de film sin disolver, se introducía la muestra en un baño térmico a $40^\circ C$ aproximadamente por unos minutos y se volvía a agitar.

5. TRATAMIENTO TÉRMICO

Una vez realizada la hidratación se transpasó la muestra a un “eppendorf” y se lo sometió a cinco ciclos térmicos de frío-calor que consisten en introducir la muestra $5min$ en un baño térmico a $313K$ e inmediatamente después ponerla en un recipiente con Nitrógeno líquido ($77K$) otros $5min$. Este tratamiento favorece a que el agua pesada interactúe mejor con los grupos polares de los fosfolípidos. Lo que se obtiene en esta instancia es una suspensión de liposomas multilamelares.

Como la distribución de tamaños de estas vesículas no es uniforme se realizó el siguiente y último paso de la preparación.

6. EXTRUSIÓN

Este proceso consiste en pasar las vesículas por membranas de policarbonato con poros de $100nm$ en este caso. De esta forma se obliga a las vesículas a adoptar una forma esférica con diámetro promedio definido por los poros de la membrana, implicando esto también que las vesículas dejen de ser multilamelares. El instrumento utilizado para realizar esta tarea se denomina *extrusor* y consta básicamente de una estructura cilíndrica de teflón dentro de un recinto metálico que sostiene firmemente las membranas porosas y, de cada lado de la estructura se adosa una jeringa. Así se hizo pasar diez veces la muestra de una jeringa a la otra atravesando la membrana porosa.

2.1.2. Determinación del tamaño de los liposomas

Para determinar los tamaños promedios de las vesículas que se formaron una vez terminada la preparación, se utilizó un equipo de dispersión dinámica de luz láser (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, UK), utilizando un ángulo de detección de 173° y provisto de un láser de He-Ne operando a una longitud de onda de $633nm$. Estas mediciones fueron realizadas en el CIQUIBIC con la ayuda de la Dra. Laura Fanani.

La dispersión dinámica de luz ó DLS (por sus siglas en inglés), es una técnica que puede ser usada para determinar el perfil de la distribución de tamaños de pequeñas partículas en suspensión.

En términos generales, el equipo consta de una fuente de luz monocromática, específicamente un laser, el cual atraviesa primero un polarizador y luego incide en la muestra. La luz dispersada pasa a través de un segundo polarizador donde es adquirida por un fotomultiplicador, el cual proyecta un patrón sobre una pantalla. Todas las moléculas de la solución son alcanzadas por el laser, las cuales refractan la luz en todas las direcciones. Se pueden dar procesos de interferencia constructiva o destructiva, lo cual define un patrón característico. Una vez logrado esto, se repite el procedimiento varias veces cada cortos intervalos de tiempo.

Para analizar los datos se utiliza un modelo basado en el uso de la función de autocorrelación y, como resultado, se obtiene la distribución de tamaños que tienen las vesículas de la muestra.

Es necesario mencionar que las muestras deben tener una concentración inferior a las utilizadas para relaxometría.

2.1.3. Perfiles de dispersión de la tasa de relajación espín-red

2.1.3.1. Descripción general y parámetros utilizados

Los perfiles de dispersión de la tasa de relajación espín-red, fueron medidos usando la técnica de relaxometría con ciclado rápido de campo, con un relaxómetro “Spinmaster FC2000/C/D”

(Stelar; Mede, Italia) y usando un volumen de muestra de $1ml$. En todos los casos se utilizó un campo magnético de polarización de $15MHz$, y un campo de adquisición de $14,19MHz$ (expresados en frecuencia de Larmor para núcleos de hidrógeno). Los perfiles se midieron dentro del rango de frecuencias de $30KHz$ a $15MHz$ (valores del campo de relajación), rango en el cual se puede asegurar que las mediciones no están afectadas por la presencia de campos locales [10]. La cantidad de puntos que componen el perfil se fijó en 30 y, la medición del mismo demoró entre $2hs$ y $5hs$ según la temperatura de la medición y, el porcentaje y tipo de detergente adicionado. Una vez preparadas las muestras, el período de tiempo en el que se la sometió a todas las mediciones no fue nunca mayor a 10 días. Luego de este lapso no se puede garantizar el estado de estabilidad de la muestra. La temperatura de la muestra fué controlada con una variación de $1K$ aproximadamente, usando el control de temperatura del relaxómetro.

2.1.3.2. Breve descripción del equipo

Las partes principales de un equipo de FFC son: el imán, la fuente de alimentación de pulsos, el sistema de refrigeración, la unidad de radiofrecuencia, la unidad de control de temperatura de la muestra y el módulo de adquisición. En la figura 2.1 se muestra un esquema general de un equipo de FFC [33]:

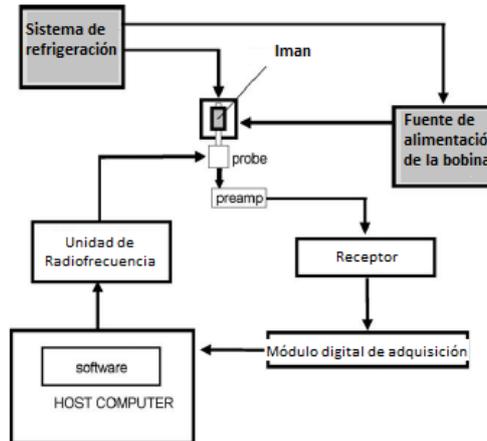


Figura 2.1: Esquema general de las partes de un equipo de FFC.

2.1.3.3. Medición genérica de un punto del perfil

Como ya se mencionó, un perfil de dispersión de la tasa de relajación es justamente un gráfico del valor de R_1 en función del campo magnético B_r en el cual tiene lugar la relajación. Por lo tanto, para la medición de un punto de esta curva lo que se hace es fijar un valor de campo B_r , y se repite el ciclo ya descrito pero variando el tiempo τ en el que la muestra permanece en este campo. Este ciclo se realizó 16 veces por lo que se obtuvieron curvas con 16 puntos para la determinación de un valor de T_1 .

Secuencia NP: Esta secuencia se utilizó para la medición de los valores de R_1 correspondientes a campos magnéticos B_r entre $10MHz$ y $15MHz$. En este caso mientras mayor sea el

tiempo τ que la muestra se encuentra sometida al campo de relajación, mayor será la magnetización adquirida y más parecida al valor de saturación correspondiente a este valor de campo B_r . Por lo tanto se obtiene una curva de “recuperación de la magnetización”. Típicamente luce como en la figura 2.2:

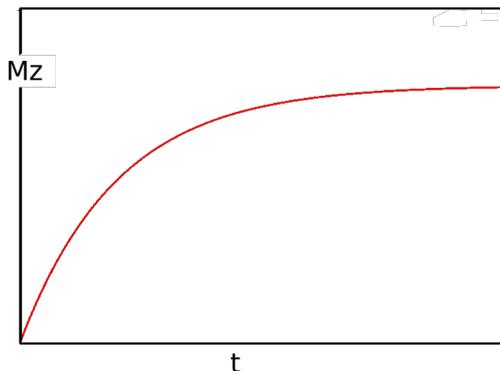


Figura 2.2: Esquema cualitativo de la forma funcional de la magnetización en función de tiempo utilizando una secuencia NP.

Secuencia PP: Esta secuencia se utiliza para la medición de los valores de R_1 correspondientes a campos magnéticos entre 30KHz y 10MHz . A diferencia de la secuencia NP, mientras más larga sea la permanencia del sistema en el campo de relajación, más va a decrecer la magnetización respecto a su valor alcanzado en el campo de polarización, pareciéndose al valor en equilibrio con el campo B_r . En este caso se obtienen gráficos como el de la figura 2.3, que ilustran la pérdida de magnetización.

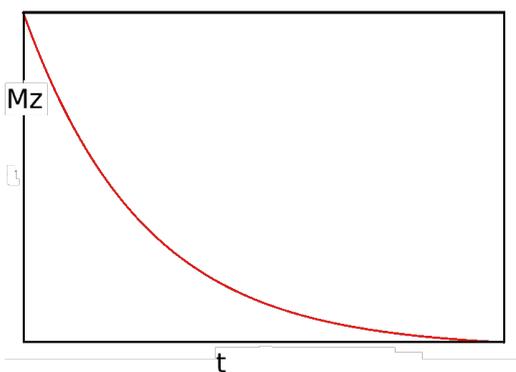


Figura 2.3: Esquema cualitativo de la forma funcional de la magnetización en función de tiempo utilizando una secuencia PP.

El valor de cada T_1 se obtuvo ajustando por cuadrados mínimos cada curva de crecimiento/disminución de la magnetización según sea el caso. Los procesos de relajación resultaron ser todos monoexponenciales y, las funciones de ajustes utilizadas según la secuencia aplicada, fueron las dadas por las ecuaciones 1.40 y 1.41 en el marco teórico.

La detección de la señal consistió en medir la FID luego de un pulso de 90° de duración de $6,5\mu\text{s}$. Se adquirió la integral bajo un sector muy pequeño de la FID cercano al punto máximo

de la misma, de modo de aprovechar el mayor valor de señal y, al mismo tiempo, no lidiar con posibles imperfecciones de los primeros puntos de la misma.

Para mejorar la relación señal-ruido, se repitió la medición de la señal una determinada cantidad de veces. Cada una de estas repeticiones se denomina *scan*. La cantidad de scans se fija antes de empezar a medir un perfil de dispersión y se mantiene fijo durante toda la medición, siendo su valor típico en este caso, ocho scans.

2.2. Modelo Teórico

Si bien la técnica de relaxometría con ciclado rápido de campo no presenta resolución espectroscópica como otras técnicas de RMN, la misma no es invasiva y permite estudiar procesos dinámicos lentos como lo es la dinámica colectiva de la membrana. Esta técnica tiene la ventaja de ser sensible a procesos en un amplio rango de escalas de tiempo ($10^{-3}s$ a $10^{-9}s$) y ha sido aplicada exitosamente para estudiar la dinámica molecular en gran cantidad de materiales [9], [32], [10], [11].

El estudio mediante FFC implica el desarrollo de un modelo para interpretar la dispersión de la tasa de relajación espín-red. En esta sección se describirá el modelo utilizado en este trabajo.

2.2.1. Densidades espectrales

El modelo con el que se trabajó, está descrito en función de las densidades espectrales asociadas a cada proceso dinámico interviniente en la relajación espín-red. En este apartado, se introducen y describen brevemente lo que son las densidades espectrales en general y que información brindan.

Se considera un sistema de espines nucleares interactuantes bajo la acción de un campo \vec{B}_0 . Se denominan campos locales a los campos magnéticos producidos por el entorno de cada núcleo ya que cada molécula está llena de partículas magnéticas: los electrones y los otros núcleos también son fuentes de campo magnético. Estos campos son pequeños en comparación con el campo externo aplicado y fluctúan rápidamente por el movimiento térmico. Por lo tanto, cada espín nuclear considerado precesa alrededor de un campo magnético levemente distinto en magnitud y dirección que varía temporalmente, el cual es la suma del campo externo aplicado y el campo local dado por el entorno. Estos movimientos desarman la isotropía y llevan al sistema a una orientación tal que la energía magnética se minimice. Consecuentemente se llega a un estado estable anisotrópico denominado equilibrio térmico. Este mecanismo mediante el cual se alcanza un nuevo estado de equilibrio es lo que se conoce como relajación.

La dependencia temporal del campo perturbativo está fuertemente vinculado con la dinámica de las moléculas en las cuales se encuentran los espines nucleares estudiados.

Para un tratamiento desde un punto de vista más teórico y cuantitativo [29] de cómo una

perturbación afecta el sistema de espines, se define la función de autocorrelación $G_{mk}(\tau)$, la cual brinda información de cómo la perturbación en cierto tiempo se correlaciona con su valor un tiempo τ después y, aporta una estimación de cuán rápido fluctúa el campo perturbativo.

$$G_{mk}(\tau) = \langle m | \mathcal{H}_1(t - \tau) | k \rangle \langle k | \mathcal{H}_1(t) | m \rangle \quad (2.8)$$

donde $\mathcal{H}_1(t)$ es el hamiltononiano de la perturbación y, k y m son estados de energía en los que se puede encontrar el sistema, en este caso $m, k = \pm 1/2$.

Por simplicidad se considerará que el campo perturbativo se encuentra en la dirección \hat{x} , por lo que se puede reescribir la ecuación 2.8 de la siguiente manera:

$$G(\tau) = \langle B_x(t - \tau) \rangle \langle B_x(t) \rangle \quad (2.9)$$

Para analizar la forma funcional de $G(\tau)$ se plantea que:

- Si el intervalo τ es pequeño comparado con la escala temporal de las fluctuaciones, los valores del campo en los “dos tiempos” van a ser similares, por lo que $B_x(t)B_x(t + \tau) \approx \langle B_x^2(t) \rangle$.
- Si el intervalo τ es largo comparado con la escala de tiempo de las fluctuaciones, entonces el sistema pierde su “memoria” y no hay ninguna relación consistente entre los valores de la función separados por este tiempo τ . Por lo tanto en este caso $B_x(t)B_x(t + \tau) \approx 0$.

Entonces la función autocorrelación tiende a su valor máximo mientras más chico sea el valor de τ y tiende a cero para valores de τ grandes, como se ilustra en la figura 2.4

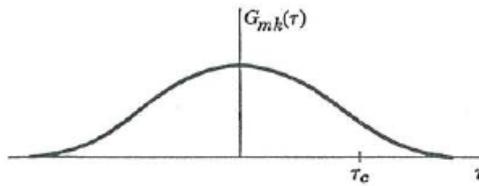


Figura 2.4: Esquema cualitativo de la forma funcional de la función de autocorrelación

Para poder trabajar en el espectro de energías, se introduce la función **Densidad espectral** $J(w)$, la cual se define como el doble de la Transformada de Fourier de la función de autocorrelación:

$$J(w) = 2 \int_0^{\infty} G(\tau) e^{-i w \tau} d\tau \quad (2.10)$$

Siguiendo un procedimiento semicualitativo [29] se puede llegar a las siguientes expresiones para las probabilidades de transición del sistema de estudio (sistema de dos niveles) como

funciones de la densidad espectral $J(w)$ entre otros parámetros, donde se tuvo en cuenta la entrega y absorción de energía de la red.

$$W_{\downarrow} = W(1 - \frac{1}{2}B) \quad (2.11)$$

$$W_{\uparrow} = W(1 + \frac{1}{2}B) \quad (2.12)$$

donde $W = \frac{1}{2}\gamma^2 \langle B_x^2 \rangle J(w_0)$ y, $B = \frac{\hbar\gamma B_0}{K_B T}$

Se puede ver que las probabilidades de transición son ambas proporcionales a la densidad espectral del campo fluctuante a la frecuencia de Larmor w_0 .

Estas ecuaciones son equivalentes a las ecuaciones 1.18 y 1.19, descriptas en la sección 1.2.1.2. Reescribiendo la ecuación 1.23 con estas nuevas expresiones para W_{\downarrow} y W_{\uparrow} se obtiene:

$$\frac{1}{T_1} = W_{\downarrow} + W_{\uparrow} = 2W = \gamma^2 \langle B_x^2 \rangle J(w_0) \quad (2.13)$$

Se observa que mientras más grande sea el valor de J en w_0 , más grande será la tasa de relajación $R_1 = \frac{1}{T_1}$, por lo que el tiempo de relajación T_1 será más corto, lo que implica que el proceso de relajación será más rápido o “eficiente”.

Bajo ciertas condiciones se puede asumir que la función de autocorrelación cumple con la siguiente expresión:

$$G(\tau) = \langle (B_x^2) \rangle e^{-\|\tau\|/\tau_c} \quad (2.14)$$

donde τ_c se denomina **tiempo de correlación** de las fluctuaciones, y, cualitativamente, indica cuanto tiempo tarda el campo aleatorio en cambiar de signo. El tiempo de correlación depende de parámetros físicos como la temperatura. En general este tiempo decrece si se calienta la muestra, ya que al incrementar la temperatura, los movimientos moleculares se agilizan. Pasa lo contrario si la muestra se enfría.

Por lo tanto si la función $G(\tau)$ toma la forma dada en la ec. 2.14, se obtiene la siguiente expresión para la densidad espectral:

$$J(w) = 2 \langle B_x^2 \rangle \frac{\tau_c}{1 + w^2 \tau_c^2} \quad (2.15)$$

Bajo estas hipótesis ecuación 2.13 toma la siguiente forma:

$$\frac{1}{T_1} = \gamma^2 \langle B_x^2 \rangle \frac{\tau_c}{1 + (w_0 + \tau_c)^2} \quad (2.16)$$

en donde se observa una dependencia explícita particular entre el tiempo de relajación espín-red y campo magnético externo aplicado \vec{B}_0 a través de w_0 .

2.2.2. Descripción del modelo utilizado

En trabajos previos [9], [10], [11], [12], se ha descrito y validado con éxito un modelo para interpretar la dispersión de la tasa de relajación espín red de protones obtenida con la técnica de Relaxometría con ciclado rápido de campo, para liposomas unilamelares de diferentes tamaños (100nm -200nm) a diversas temperaturas y compuestos por uno (lípidos) y dos componentes (lípidos más colesterol o detergente), en la fase líquido cristalina desordenada. Además de proporcionar información sobre la dinámica de los lípidos de la membrana de los liposomas, el modelo permite inferir sobre las propiedades viscoelásticas de la misma por medio de la constante elástica κ que es uno de los parámetros físicos involucrados en el modelo.

En este modelo, la tasa de relajación espín-red, R_1 , puede describirse como:

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = A_{FO}J_{FO}(w) + A_DJ_D(w) + A_RJ_R(w) + A_{MR} \quad (2.17)$$

donde T_1 es el tiempo de relajación espín-red, $J_{FO}(w)$, $J_D(w)$ y $J_R(w)$ son las densidades espectrales correspondientes a los procesos dinámicos “FO”, “D” y “R”, respectivamente, considerados en el modelo y, $w = 2\pi\nu_0$ es la frecuencia de Larmor.

Específicamente, “FO” corresponde al proceso denominado “*Fluctuaciones de Orden*”, es decir, fluctuaciones en la dirección del vector normal a la membrana, el mismo, indica un promedio del orden orientacional local de los lípidos. Este proceso es debido a movimientos **colectivos** de los lípidos, los cuales generan fluctuaciones de la forma de la vesícula. En la figura 2.5 se muestra cualitativamente este proceso.

En cuanto a “D” y “R” corresponden a la *difusión* en una superficie curva y *rotación* de los lípidos en la membrana del liposoma, respectivamente. En la figura 2.5 se muestran cualitativamente estos procesos.

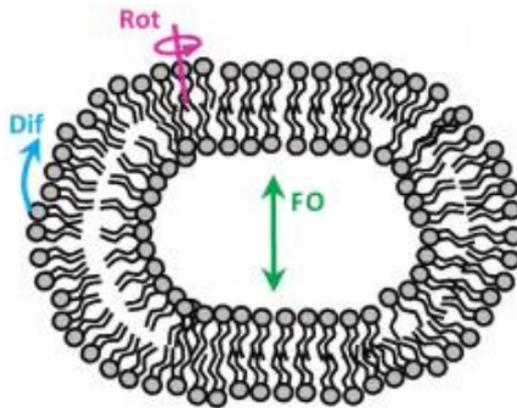


Figura 2.5: Esquema cualitativo de los distintos procesos dinámicos que experimentan los lípidos en la membrana de un liposoma.

- Los factores A_j son las amplitudes correspondiente a cada proceso y están definidas como:

$$A_j = \frac{9}{8r_j^6} \gamma^4 \hbar^2 \left(\frac{\mu}{4\pi} \right)^2 \quad \text{con } j = FO, D, R \quad (2.18)$$

donde r_j es la distancia efectiva entre núcleos de hidrógeno relevante para cada proceso dinámico.

- A_{MR} es una constante que corresponde a movimientos rápidos, los cuales no son dispersivos en el rango de frecuencias consideradas y, w , es la frecuencia de Larmor para protones, la cual explicita la dependencia con el campo magnético.
- La densidad espectral correspondiente a las **fluctuaciones de orden** está dada por el modelo de Vilfan [39]:

$$J_{FO}(w) = \frac{K_B T}{2\pi\kappa} \sum_{l=2}^{l_{max}} \frac{l(l+1)(2l+1)}{(l^2+l-2)(l^2+l+\sigma)} \frac{\tau_l}{(1+w^2\tau_l^2)} \quad (2.19)$$

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 ($l_{max} \sim \pi R_0/a$, donde a es la distancia promedio entre moléculas y R_0 el radio de la vesícula). T es la temperatura, κ es la constante elástica de flexión, σ es la tensión lateral efectiva, K_B es la constante de Boltzman y, τ_l está dado por la siguiente expresión:

$$\tau_l = \frac{\eta R_0^3}{\kappa} \frac{(2l+1)(2l^2+2l-1)}{l(l+1)(l+2)(l-1)(l^2+l+\sigma)} \quad (2.20)$$

siendo η 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 [38]:

$$J_D(w) = \frac{1}{5} \left[\frac{\tau_D}{1+(w\tau_D)^2} + 4 \frac{\tau_D}{1+(2w\tau_D)^2} \right] \quad (2.21)$$

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

$$\tau_D = \left[\frac{6D}{R_0^2} + \frac{3K_B T}{4\pi\eta R_0^3} \right]^{-1} \quad (2.22)$$

siendo D la constante de difusión.

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

$$J_R(w) = \left[\frac{\tau_R}{1+(w\tau_R)^2} + 4 \frac{\tau_R}{1+(2w\tau_R)^2} \right] \quad (2.23)$$

donde τ_R es el tiempo de correlación característico asociado al proceso de rotación.

En el modelo dado por la ecuación 2.17, 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 [10].

Para el caso de liposomas compuestos por lípidos y detergente, se utilizó el tratamiento llamado “*análisis de una sola población*” definido para membranas con dos componentes ([12]). Este análisis consiste en aplicar el modelo dado por la ecuación 2.17 bajo la suposición de que la membrana se encuentra en la fase líquido cristalina desordenada aún con la presencia de detergente tal que los parámetros físicos relevantes, para los cuales se utilizaron valores de la literatura obtenidos con diversas técnicas, proporcionan valores promedios sobre toda la población de lípidos modulados de acuerdo al contenido de detergente.

2.3. Procesamiento de los perfiles de dispersión de la tasa de relajación: Programa de ajuste

Para poder ajustar las curvas medidas con el modelo descrito en el sección anterior, se utilizó una metodología de ajustes automáticos a través de un programa escrito en FORTRAN, el cual se encarga de la búsqueda de una curva de ajuste óptima, es decir, que mejor describa la curva experimental. En esta sección se muestran los criterios básicos en los que se basa el programa y se describe brevemente el procedimiento de ajuste.

Se puede observar que en el modelo dado por la ecuación 2.17, aparecen tres parámetros físicos relevantes (κ , τ_D , τ_R), tres amplitudes (A_{FO} , A_D , A_R) y una constante (A_{MR}), por lo que, se tiene siete parámetros a determinar al momento de encontrar la curva de ajuste óptima.

No se puede utilizar un ajuste convencional por cuadrados mínimos con 7 parámetros de ajuste libres, ya que la curva óptima que se obtendría podría no tener sentido físico, sumado al hecho de que esto no serviría como una validación del modelo.

2.3.1. Método de parámetros iniciales aleatorios y minimización de PROM

En cuanto a los parámetros del modelo, a la hora de ajustar la curva, no pueden adoptar un valor libremente sino que se mueven en un rango pre-fijado, el cual está determinado según otros trabajos cuyas mediciones han sido llevadas a cabo con diversas técnicas experimentales. Así se genera un hiperespacio de posibles soluciones de 7 dimensiones.

El programa no se basa en inicializar los parámetros y luego desarrollar un método de convergencia a partir de los mismos (se intentó algo similar pero no dió resultado), sino que se toman aleatoriamente conjuntos de 7 parámetros dentro del hiperespacio establecido y se verifica que el ajuste cumpla ciertas restricciones previamente establecidas.

2.3.1.1. Primera restricción

La primera restricción a la que se somete el conjunto inicial de parámetros elegidos aleatoriamente es la siguiente:

$$\frac{\|R_{1i}^{exp} - R_{1i}^{mod}\|}{R_{1i}^{exp}} \leq \Delta \quad i = 1, \dots, N_{datos} \quad (2.24)$$

donde R_{1i}^{exp} y R_{1i}^{mod} representan los valores experimentales y modelados de R_1 a la frecuencia w_{0i} respectivamente, N_{datos} es la cantidad total de datos de la curva (en general 30) y, Δ es un número (en general entre 0,1 y 0,25) que funciona como una cota y se calcula para cada curva experimental. Δ 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_{1i}^{exp} dividido $prom_e_i$, como se muestra en la ecuación 2.25

$$dif_max = max_val \left(\frac{\|prom_e_i - R_{1i}^{exp}\|}{prom_e_i} \right) \quad i = 1, \dots, N_{datos} \quad (2.25)$$

donde $prom_e_i$ es el promedio entre R_{1i-1}^{exp} y R_{1i+1}^{exp} , como se describe en la ecuación 2.26

$$prom_e_i = (R_{1i-1}^{exp} + R_{1i+1}^{exp})/2 \quad i = 2, \dots, N_{datos} - 1 \quad (2.26)$$

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

De esta manera, el cálculo de *dif_max* brinda 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 toma Δ igual a tres veces el valor de *dif_max*, y luego se prueba si es posible disminuir la cota de esta restricción, tanto como la curva experimental lo permita.

Así, inicialmente el programa calcula el valor de Δ utilizando las ecuaciones 2.25 y 2.26, luego elige aleatoriamente un conjunto de siete parámetros (dentro del rango permitido) y, calcula R_{1i}^{mod} para todos los valores de frecuencia medidos. Posteriormente utiliza la restricción 2.24 para saber si toma este conjunto de parámetros o los descarta. Si los parámetros no cumplen la restricción, se eligen aleatoriamente 7 parámetros nuevos y se vuelve a calcular todo, pero si cumplen la restricción, estos parámetros pasan a “ser evaluados” por la segunda restricción.

2.3.1.2. Segunda restricción

Una vez que el programa encuentra un conjunto de parámetros que cumple con la primera restricción dada por la ecuación 2.24, se procede a utilizar el criterio de optimización, el cual también es un criterio de restricción para los parámetros. El mismo está dado por la siguiente expresión:

$$PROM = \frac{1}{N_{datos}} \sum_{i=1}^{N_{datos}} \frac{\|R_{1i}^{exp} - R_{1i}^{mod}\|}{R_{1i}^{exp}} \leq q_pmax \quad (2.27)$$

La cota $q_{p,max}$, se calcula para cada curva experimental y está dada como mínimo por el valor de dif_max o un valor mayor (en general entre 0.04 y 0.1) en el 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 primera restricción de la ecuación 2.24, que se cumpla la ecuación 2.27. Si no se cumple, el programa debe seguir buscando otro conjunto de parámetros y repetir nuevamente todo el proceso descripto.

Finalmente si el conjunto de parámetros tomados aleatoriamente cumple con las restricciones de las ecuaciones 2.24 y 2.27, 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 de la ec. 2.24, se están 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.

Por lo que lo que se utiliza es un método semiautomático que se describe a continuación:

1. Eliminación manual de puntos experimentales que se van de la tendencia general de la curva.
2. Elección aleatoria del conjunto de siete parámetros dentro del hiperespacio establecido por la literatura bajo las restricciones dadas por las ecuaciones 2.24 y 2.27, sin considerar los puntos eliminados en el paso 1.
3. Cálculo de la función de ajuste.
4. Segunda eliminación de puntos según la siguiente restricción:

$$\|(R_{1i}^{exp} \pm \sigma_i^{exp} - R_{1i}^{mod})| \leq PROM \times R_{1i}^{mod} = \sigma_{ajuste}^i \quad i = 1, \dots, N_{datos} \quad (2.28)$$

Se puede observar que σ_{ajuste}^i es el error asignado a los puntos calculados R_{1i}^{mod} de la curva de ajuste. Por lo tanto que los datos experimentales cumplan esta condición se lo interpreta como que son “ajustados” por la función propuesta ya que se encuentran dentro de la banda de error del ajuste.

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

En el trabajo citado en la referencia [9] se explica con mayor detalle el desarrollo y funcionamiento de este método.

2.3.2. Criterios utilizados

2.3.2.1. Rangos

Como se mencionó en el apartado 2.3.1, los 7 parámetros de ajuste se mueven dentro de un rango pre-fijado por la literatura, los cuales se listan en la tabla 2.1. [9]

Parámetros	límite inferior	límite superior
κ [J]	$1,0 \cdot 10^{-20}$	$1,5 \cdot 10^{-19}$
τ_D [s]	$1,0 \cdot 10^{-6}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$
τ_R [s]	$1,0 \cdot 10^{-10}$	$1,0 \cdot 10^{-7}$
A_D [s ⁻²]	$1,6 \cdot 10^7$	$9,9 \cdot 10^9$
A_{OF} [s ⁻²]	$1,6 \cdot 10^7$	$9,9 \cdot 10^9$
A_R [s ⁻²]	$1,6 \cdot 10^7$	$9,9 \cdot 10^9$

Tabla 2.1: Resumen de los intervalos más probables para cada parámetro físico en la fase liquidocristalina desordenada.

Las soluciones que el programa encuentra, no siempre son físicamente aceptables. Por este motivo, hay que tener presentes ciertos criterios para tomar o descartar una solución. Uno de los criterios fundamentales fué, que el valor que adquiere cada una de las amplitudes en los diferentes ajustes, no se diferencien en más de un 20 %. Lo que fundamenta este criterio es que en la ecuación 2.18 se puede observar que las amplitudes dependen de la distancia efectiva r_j entre núcleos de hidrógeno relevantes para cada proceso dinámico, ya sean distancias intermoleculares como lo es en el caso de la difusión ó, distancias intramoleculares como es el caso de las fluctuaciones de orden. Por lo tanto si las amplitudes varían considerablemente respecto de una concentración o temperatura previa, implica que estos radios también lo están haciendo y eso no es físicamente posible (por la forma funcional de las amplitudes, si una de ellas varía por ejemplo, en un 100 %, implica que el valor del radio correspondiente, varió en un 35 %).

Por lo tanto, luego de usar el rango mostrado en la tabla 2.1 para los ajustes de todos los perfiles obtenidos y verificar que los parámetros cumplen las tendencias esperadas en general, es decir que se encuentran soluciones en las que la constante elástica κ y los tiempos τ_D y τ_R tienden a disminuir tanto con el aumento de la temperatura como con el aumento de la concentración de detergente, se procedió a adaptar estos rangos para cada ajuste según los criterios que se detallan a continuación, con el objetivo de ayudar a la convergencia del programa a una solución en la que **todos** los parámetros posean valores físicamente aceptables.

Entonces, se fue modificando el rango de los parámetros progresivamente, a medida que la temperatura o la concentración de detergente aumentaban. Es decir que el rango de cada uno de los parámetros con el que se ajustó un cierto perfil a una dada temperatura y concentración de detergente, se acotó por los valores obtenidos para un perfil a la temperatura anterior (*cota1*) ó a la misma temperatura y concentración de detergente anterior (*cota2*). Los criterios para modificar los rangos se detallan a continuación:

1. El rango de los parámetros κ , τ_D , y τ_R se acotó superiormente por el mínimo de los valores de cada parámetro entre las *cota1* y *cota2*.
2. El rango de las amplitudes A_D , A_{OF} y A_R se tomó como el valor dado para cada amplitud a la temperatura anterior más el 20 % como límite superior y menos el 20 % como límite

inferior.

3. En cuanto a la constante de movimientos rápidos A_{MR} , el límite superior se tomó como el valor de R_1 a $15MHz$, y el límite inferior como este valor menos 4 unidades.

Estas restricciones se aplicaron para todas las mediciones salvo para las correspondientes a $291K$, con las que se tuvieron los siguientes criterios:

1. *SPC*: Se utilizó el rango más amplio posible, es decir el mostrado en la tabla 2.1
2. *SPC + 9%mol* de BrijO20, *SPC + 20%mol* de tween80 y *SPC + 20%mol* de SDC: se acotó sólo el valor de κ por el correspondiente a *SPC* a la misma temperatura, el resto de los parámetros con los rangos dados por la tabla 2.1.

2.3.2.2. Determinación del valor de las restricciones

Una vez que se tiene determinado el rango para los parámetros, se ejecuta el programa de ajuste con valores relativamente grandes de las cotas requeridas por las restricciones explicadas en las subsecciones 2.3.1.1 y 2.3.1.2. Una vez que el programa converge, es decir que encuentra un conjunto de parámetros que cumplen las restricciones impuestas (solución), se procede a “ajustar” estas restricciones es decir disminuir los valores de las cotas Δ y q_{pmax} . Estos valores se siguen disminuyendo hasta que el programa deja de converger en un lapso de tiempo razonable.

De esta manera se obtienen curvas de ajuste con los valores de las cotas de las restricciones optimizadas y cuyos parámetros de ajuste cumplen las tendencias esperadas.

2.3.3. Errores

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.

Capítulo 3

Resultados y Análisis de datos

Con el objetivo de seguir expandiendo el modelo presentado en el capítulo dos, se realizaron distintos tipos de experimentos, los cuales se detallan en este capítulo.

Todas las mediciones mostradas fueron realizadas por la autora de este trabajo, en el Laboratorio de Relaxometría y Técnicas Especiales (LaRTE) de FaMAF, UNC, Córdoba y en el Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), de la facultad de ciencias químicas, UNC, Córdoba.

3.1. Sensibilidad de la dispersión de R_1 a las diferentes instancias de la preparación de liposomas

Se realizó este estudio para verificar si cada instancia de la preparación de la muestra de liposomas tenía el efecto deseado y si la técnica utilizada podía detectarlo a través de mostrar cambios en la dispersión de R_1 .

La composición de la muestra utilizada para este experimento fué únicamente a base de SPC.

En términos generales, lo que se midió fue un perfil de dispersión de la tasa de relajación espín-red luego de cada proceso relevante en la preparación de liposomas, específicamente luego de la hidratación, luego de los ciclos térmicos, y por último, una vez terminada la extrusión (muestra final).

Todos los perfiles que se muestran en esta sección se comparan con un perfil de dispersión obtenido previamente correspondiente a una muestra que posee la misma composición pero con el proceso de preparación finalizado. Los perfiles poseen 15 puntos en vez de 30 para ahorrar tiempo de medición, pero esto no es relevante ya que las curvas obtenidas no van a ser ajustadas sino que sólo se desea analizar su comportamiento.

3.1.1. Post-Hidratación

Una vez formado el film, se procedió a la hidratación de la muestra, siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.1.1. Luego, se separó una pequeña proporción de la muestra para

realizar un experimento de DLS y, lo restante se utilizó para la medición del perfil de dispersión.

El perfil de dispersión obtenido, se ilustra en la figura 3.1.

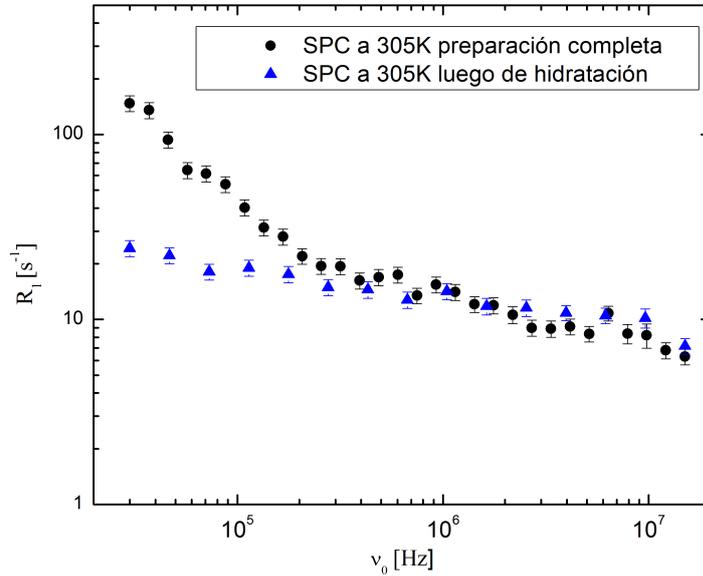


Figura 3.1: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC (●) y para una suspensión de SPC luego de la hidratación (▲).

Se puede observar una gran diferencia entre los dos perfiles ya que para $\nu_0 = 15MHz$ los valores de R_1 de ambas muestras ilustradas son indistinguibles y es aproximadamente $R_1 \sim 7s^{-1}$, pero para $\nu_0 = 30KHz$ la muestra con la preparación completa posee un valor de R_1 mayor a $100s^{-1}$, mientras que el valor de R_1 de la muestra que sólo está hidratada, es inferior a $30s^{-1}$. Por lo tanto se puede ver que comparativamente, este último perfil es mucho menos dispersivo.

3.1.2. Post-Ciclos térmicos

Una vez terminada la medición anterior se procedió a realizarle a la muestra el tratamiento térmico. El perfil de dispersión obtenido luego de este proceso, se ilustra en la figura 3.2.

Si se comparan las figuras 3.1 y 3.2 se puede observar que el perfil no cambió considerablemente respecto al paso de preparación anterior, es decir, presenta características mucho menos dispersivas que el correspondiente perfil de la muestra con preparación completa.

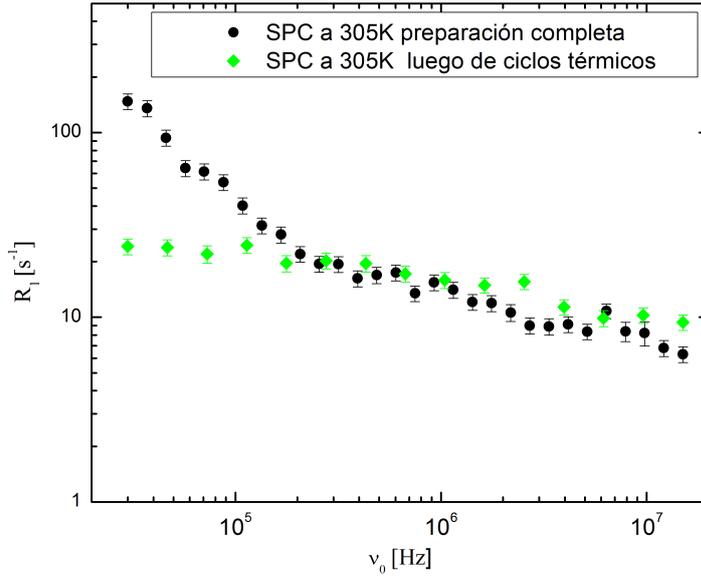


Figura 3.2: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC (●) y para una suspensión de SPC luego de el tratamiento térmico (◆).

3.1.3. Post-Extrusión

Por último, luego de los ciclos térmicos se sometió la muestra al proceso de extrusión. Este paso se realizó para verificar si se podía reproducir un perfil típico de liposomas de SPC (muestra con preparación completa). Ambos perfiles (suspensión de SPC luego de la extrusión y liposomas de SPC) se ilustran en la figura 3.3.

Las curvas no son 100 % indistinguibles, pero como lo que se desea observar son las propiedades dispersivas de la misma, se podría decir que ambas curvas poseen las mismas características a tal fin. La discrepancia observada se puede deber tal vez a diferencias en la temperatura del experimento no reportadas.

La medición de este último perfil demuestra la importancia de realizar todos y cada uno de los pasos de preparación descritos en la sección 2.1.1 en orden de obtener un perfil con las características del graficado en la figura 3.3 y similares a las obtenidas para liposomas en trabajos previos [10] [11].

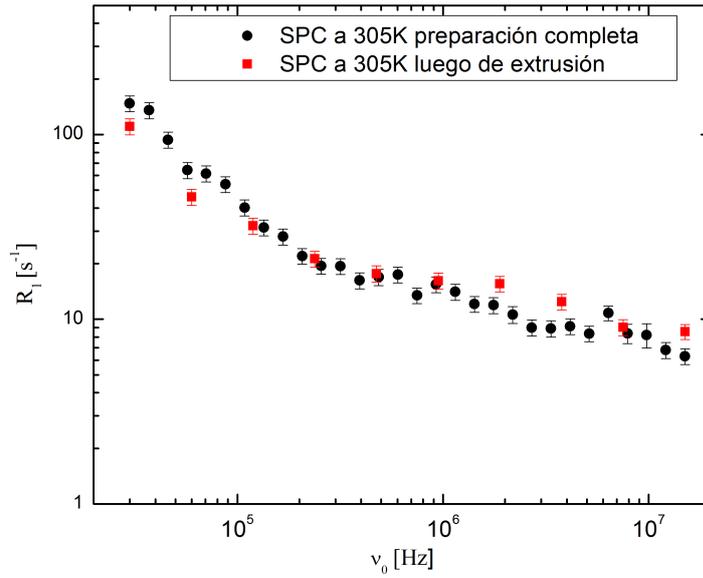


Figura 3.3: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC (●) y para una suspensión de SPC luego de la extrusión (■).

3.1.4. DLS

Para completar este análisis de la preparación, se sometió a las muestras correspondientes a las instancias previa y posterior a la extrusión, a un estudio de dispersión dinámica de luz para observar la influencia que posee este proceso en la distribución de tamaños de las vesículas. Los resultados se muestran en las figuras 3.4 y 3.5 donde se pueden observar la distribución de diámetros de las vesículas según la cantidad (“número”) que posean un determinado diámetro, correspondientes a antes y después de la extrusión, respectivamente.

En la figura 3.4 se puede observar que antes de realizar la extrusión se tienen vesículas de tamaños de $800nm$, $900nm$ y $1000nm$ aproximadamente, mientras que una vez realizado este proceso (diámetro de poro del filtro = $100nm$), lo que se obtiene son vesículas de diámetros mucho más pequeños ($\sim 30 - 40nm$ y $\sim 80 - 90nm$).

Este último análisis destaca la importancia del proceso de extrusión para eliminar grandes agregados.

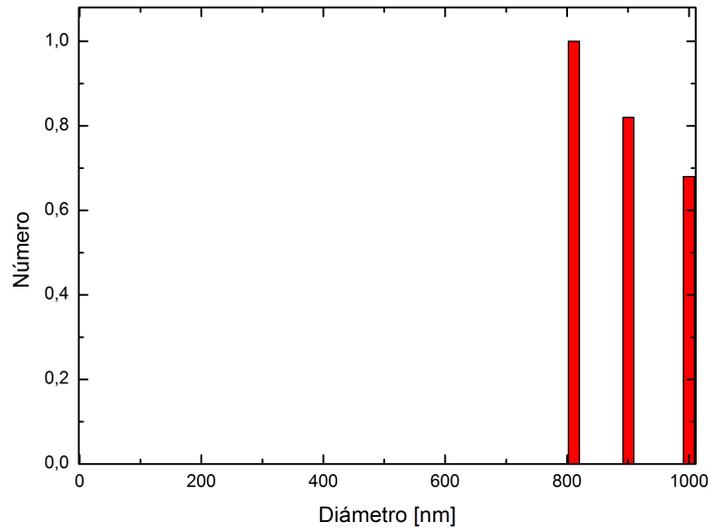


Figura 3.4: Distribución de diámetros de las vesículas según la cantidad que posee un determinado diámetro, antes de la extrusión

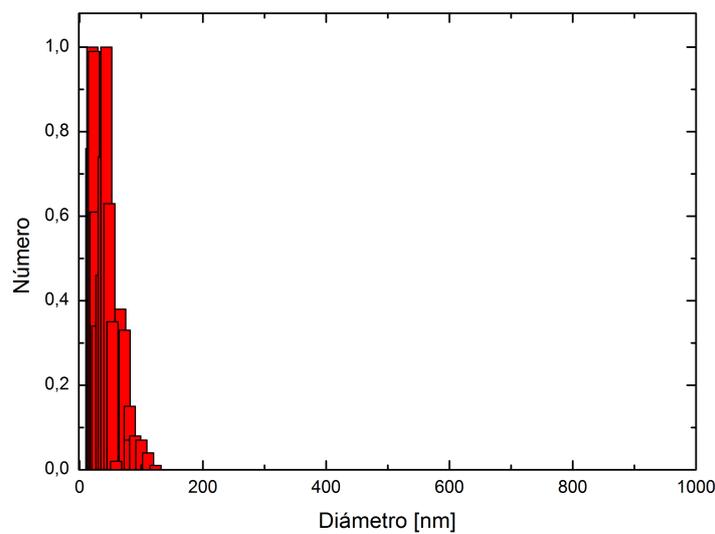


Figura 3.5: Distribución de diámetros de las vesículas según la cantidad que posee un determinado diámetro, luego de la extrusión, usando una membrana de tamaño de poro de 100nm de diámetro.

3.2. Liposomas flexibles: liposomas con detergente

Como el objetivo del trabajo es continuar con la validación del modelo (ecuación 2.17) para el caso de liposomas flexibles, fue necesario buscar trabajos en los que se realicen experimentos con estos tipos de liposomas y, cuantifiquen los diferentes parámetros físicos involucrados en el modelo, entre ellos, la constante elástica “ κ ”, para poder comparar cuantitativamente los

resultados obtenidos.

Para el caso de κ sólo se encontró un trabajo que cumpla estas características: [7]. En el mismo se afirma que para liposomas con una concentración molar de un 20% del detergente no iónico BrijO20, la constante elástica de flexión κ disminuye en un 80% respecto a su valor para liposomas sin detergente, decreciendo linealmente hasta alcanzar este valor máximo de flexibilidad. Es decir que a partir de una concentración de un 20% molar, por más que se aumente la concentración de detergente (hasta 50%mol), la constante elástica no varía.

Así, con la intención de validar el modelo para estos liposomas super flexibles, el lípido utilizado en el trabajo de referencia [7] fue el mismo que se empleó en todos los experimentos realizados (SPC de Lipoid), así como el detergente “BrijO20” en alguno de ellos. La elección de este detergente por parte de los autores previamente mencionados, resultó sorprendente debido a que no se encuentra entre los detergentes “mas populares” para flexibilizar membranas reportados por la bibliografía [40]. Asimismo, resultó de interés usarlo en los experimentos realizados debido a que se trataba de un detergente no iónico y, experimentos previos realizados con detergentes iónicos (SDC) no mostraron tanta variación en κ , sino que sólo de un 30 – 40% [9].

Teniendo así los mismos componentes de la formulación de liposomas usada en el trabajo de referencia [7], se procedió a preparar liposomas con tres distintas concentraciones molares de detergente: 9%mol, 20%mol y 40%mol.

Para poder estudiar paralelamente la influencia de la temperatura, cada experimento se repitió para cuatro temperaturas diferentes: 291K, 305K, 313K y 328K. Siendo 305K la temperatura de la piel, la cual es relevante debido a que la aplicación de este tipo de sistemas es para transporte transdermal de fármacos.

Los perfiles de dispersión fueron ajustados con el modelo y el protocolo explicado en la sección 2.3.

3.2.1. SPC: *Muestra base*

Para poder estudiar los efectos del detergente, primero fue necesario estudiar las propiedades de una muestra de liposomas de SPC sin agregados, a la cual llamamos “*muestra base*”.

Las curvas experimentales de dispersión de la tasa de relajación R_1 para liposomas de SPC, entre 291K y 328K se muestran en las figuras 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9 respectivamente. Las mismas se ilustran con sus respectivos ajustes, usando el método descrito en la sección 2.3, también se incluyen las contribuciones de cada proceso dinámico involucrado. Los parámetros del ajuste son mostrados en la tabla 3.1.

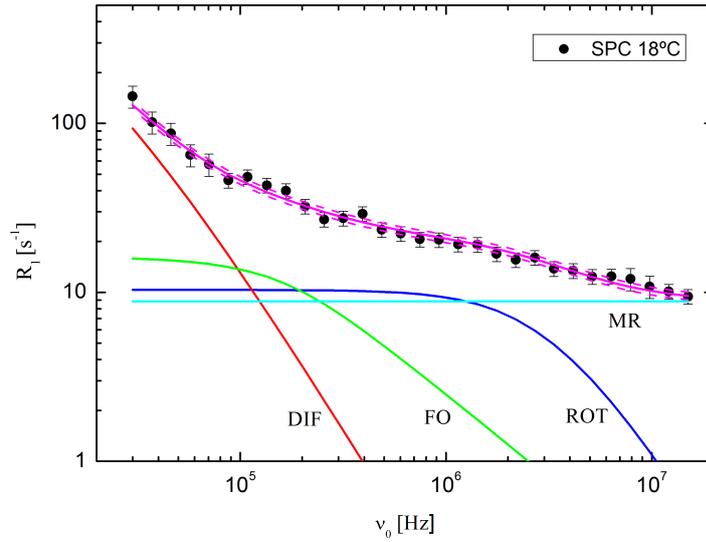


Figura 3.6: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC a 291K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.1.

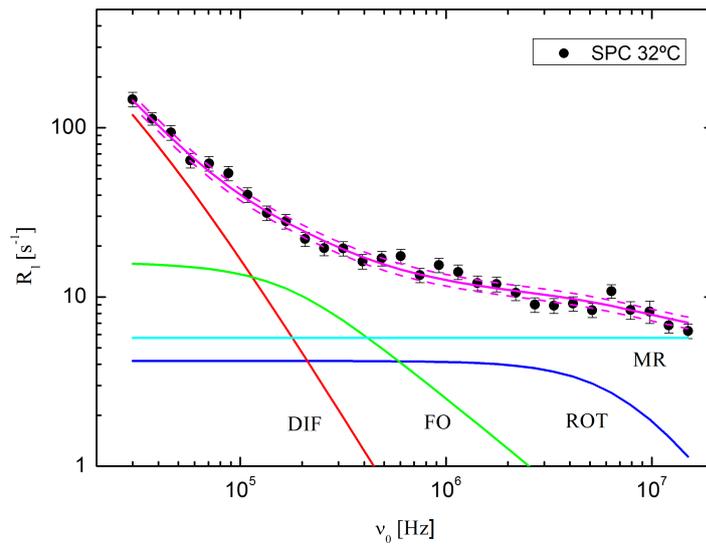


Figura 3.7: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC a 305K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.1.

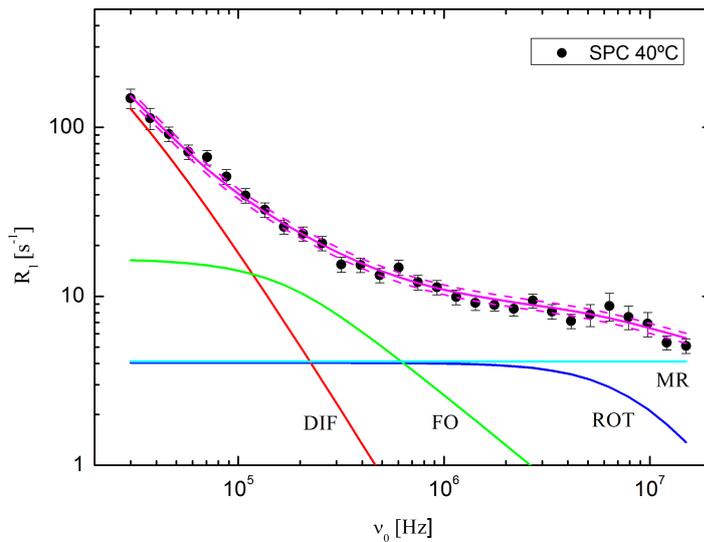


Figura 3.8: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC a 313K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.1.

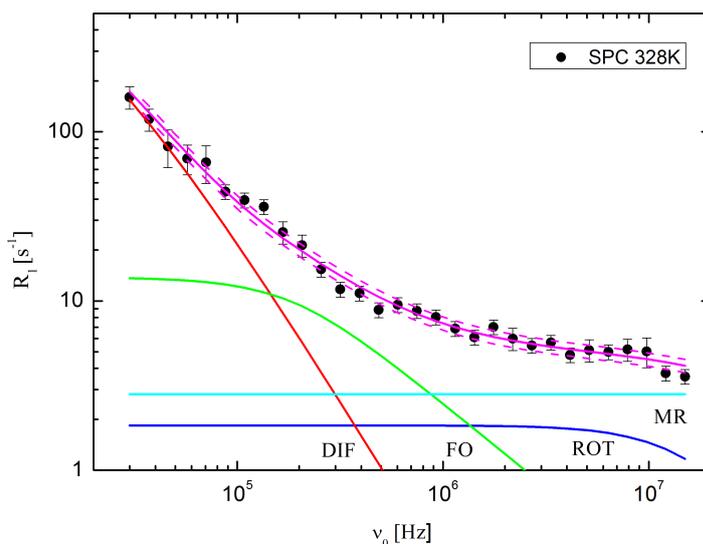


Figura 3.9: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC a 328K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.1.

Parámetros	Valores obtenidos de ajuste			
T [K]	291K	305K	313K	328K
$\kappa * 10^{-20}$ [J]	7 ± 1	$6,4 \pm 0,6$	$5,4 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,5$
$\tau_D * 10^{-4}$ [s]	$3,3 \pm 0,5$	$3,1 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,3$
$\tau_R * 10^{-8}$ [s]	$2,8 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,2$	$0,86 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,05$
$A_D * 10^9$ [s^{-2}]	$5,4 \pm 0,8$	$6,4 \pm 0,6$	$6,6 \pm 0,8$	$7,7 \pm 0,6$
$A_{OF} * 10^9$ [s^{-2}]	$1,7 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$
$A_R * 10^7$ [s^{-2}]	$7,3 \pm 0,6$	8 ± 1	$9,3 \pm 0,7$	$8,2 \pm 0,9$
A_{MR} [s^{-1}]	9 ± 1	$5,7 \pm 0,5$	$4,1 \pm 0,3$	$2,8 \pm 0,2$

Tabla 3.1: Parámetros correspondientes a las curvas de ajuste de la dispersión de la tasa de relajación espín-red usando el modelo de la sección 2.3 para liposomas compuestos de SPC a diferentes temperaturas.

Comparación según la temperatura

En la figura 3.10 se ilustran los ajustes correspondientes a las mediciones de SPC a las distintas temperaturas. El gráfico no se realiza con las curvas experimentales ya que los ajustes las describen muy bien y, debido al tamaño de los puntos, no se podría apreciar la tendencia de las curvas y sería más difícil la comparación gráfica.

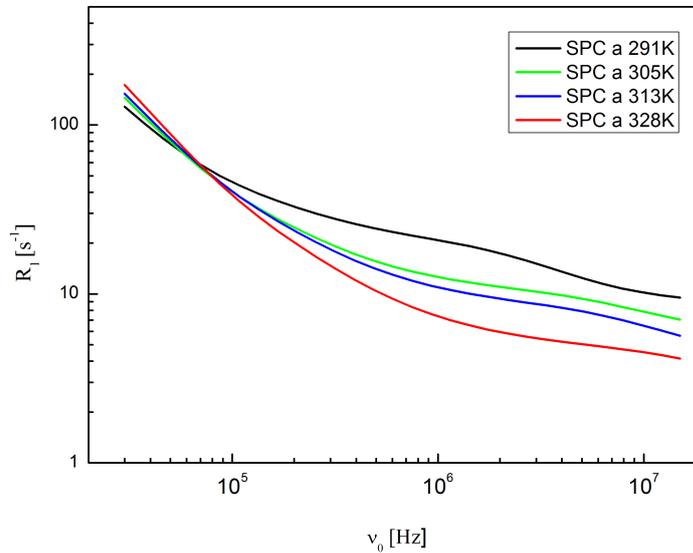


Figura 3.10: Ajustes correspondientes a las curvas de dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC a las distintas temperaturas: 291K (negro), 305K (verde), 313K (azul), y 328K (rojo).

Se puede observar que a bajas frecuencias las cuatro curvas describen las mismas características y son indistinguibles dentro de banda de error asociada a cada una de ellas (la cual no está graficada). También se puede observar que la dispersividad de las mismas aumenta con la temperatura, en concordancia con la tendencia esperada [11].

En las figuras 3.6, 3.7, 3.8 y 3.9 se puede observar que las curvas experimentales pueden ser descritas muy bien por el modelo de la ecuación 2.17.

En cuanto a la variación de los parámetros (ver tabla 3.1), se observa que el valor de la constante elástica de flexión disminuye con el aumento de la temperatura, presentando una variación de un 37% en todo el rango de temperaturas estudiadas. Por otro lado τ_D y τ_R también disminuyen a medida que la temperatura aumenta, estando todos estos resultados en concordancia con el efecto esperado [11]. Por último, las amplitudes A_D , A_{FO} y A_R no presentan variaciones significativas con la temperatura, dentro de los errores experimentales.

3.2.2. SPC + distintas concentraciones molares de BrijO20

Una vez caracterizada la *muestra base* se procedió a la preparación de las muestras de liposomas de SPC con las distintas concentraciones de detergente. Los resultados obtenidos se detallan a continuación.

Las curvas experimentales y sus correspondientes ajustes usando el método descrito en la sección 2.3, para liposomas de SPC con 9%mol, 20%mol y 40%mol de BrijO20 agregado, para 305K se muestran en las figuras 3.11, 3.12 y 3.13, respectivamente. Los gráficos correspondientes a las restantes temperaturas (291K, 313K y 328K) se muestran en el **Apéndice**. Los correspondientes parámetros del ajuste son mostrados en las tablas 3.2, 3.3 y 3.4 respectivamente.

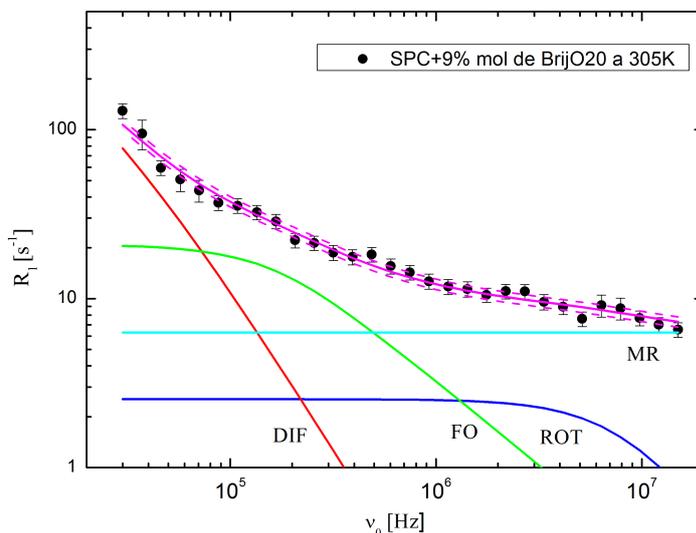


Figura 3.11: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+9%mol de BrijO20 a 305K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.2.

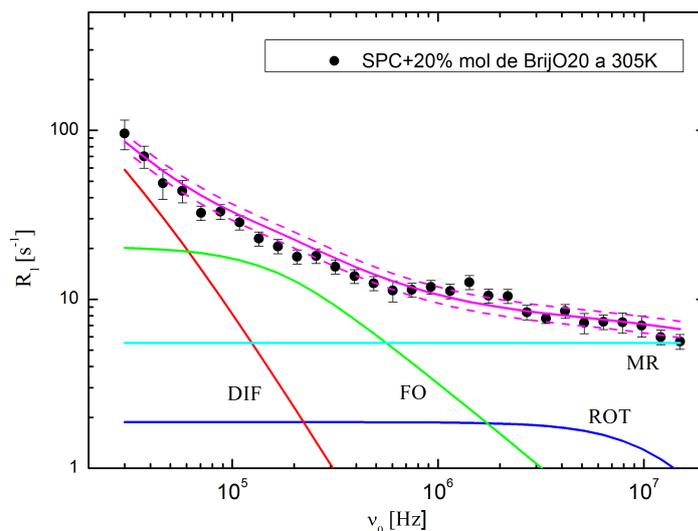


Figura 3.12: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de BrijO20 a 305K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.3.

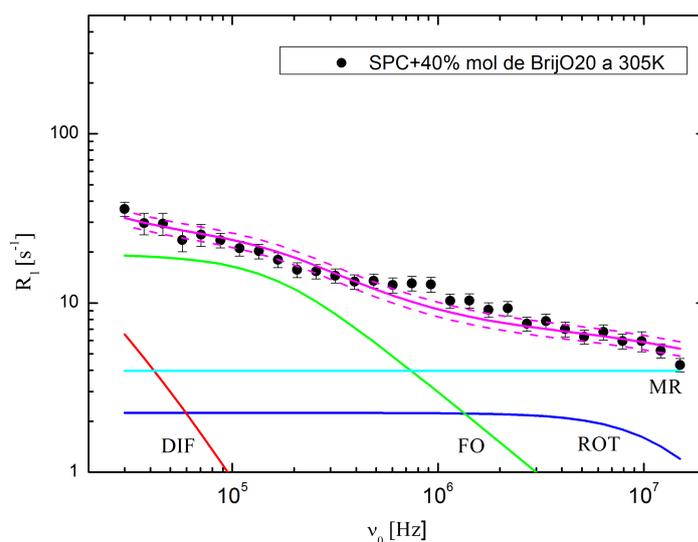


Figura 3.13: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+40%mol de BrijO20 a 305K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.4.

Parámetros	Valores obtenidos de ajuste			
T [K]	291K	305K	313K	328K
κ^*10^{-20} [J]	$7,4 \pm 0,9$	$6,2 \pm 0,5$	$6,0 \pm 0,6$	$5,4 \pm 0,7$
$\tau_D^*10^{-4}$ [s]	$3,1 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,4$	$2,0 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,4$
$\tau_R^*10^{-8}$ [s]	$2,7 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
$A_D^*10^9$ [s ⁻²]	$4,3 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,5$	3 ± 2	$3,3 \pm 0,4$
$A_{OF}^*10^9$ [s ⁻²]	$1,8 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,2$	1 ± 1
$A_R^*10^7$ [s ⁻²]	$6,3 \pm 0,8$	6 ± 2	$7,7 \pm 0,5$	6 ± 2
A_{MR} [s ⁻¹]	$8,3 \pm 0,5$	$5,8 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,3$

Tabla 3.2: Parámetros correspondientes a las curvas de ajuste de la dispersión de la tasa de relajación espín-red usando el modelo de la sección 2.3 para liposomas compuestos de SPC+9%mol de BrijO20 a diferentes temperaturas (ver figura 3.11, y figuras 4.1, 4.2 y 4.3 en el **Apéndice**).

Parámetros	Valores obtenidos de ajuste			
T [K]	291K	305K	313K	328K
κ^*10^{-20} [J]	$7,1 \pm 0,8$	$6,3 \pm 0,9$	$6,1 \pm 0,7$	$5,2 \pm 0,5$
$\tau_D^*10^{-4}$ [s]	$3,1 \pm 0,5$	$2,8 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,3$
$\tau_R^*10^{-8}$ [s]	$1,4 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,3$	$0,8 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,3$
$A_D^*10^9$ [s ⁻²]	$3,6 \pm 0,6$	$2,9 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,6$	$2,2 \pm 0,3$
$A_{OF}^*10^9$ [s ⁻²]	$2,1 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$
$A_R^*10^7$ [s ⁻²]	7 ± 2	6 ± 2	4 ± 1	3 ± 1
A_{MR} [s ⁻¹]	$7,9 \pm 0,8$	$5,5 \pm 0,4$	$4,1 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,2$

Tabla 3.3: Parámetros correspondientes a las curvas de ajuste de la dispersión de la tasa de relajación espín-red usando el modelo de la sección 2.3 para liposomas compuestos de SPC+20%mol de BrijO20 a diferentes temperaturas (ver figura 3.12, y figuras 4.4, 4.5 y 4.6 en el **Apéndice**).

Parámetros	Valores obtenidos de ajuste			
T [K]	291K	305K	313K	328K
κ^*10^{-20} [J]	$6,9 \pm 0,9$	$6,2 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,5$	$5,4 \pm 0,2$
$\tau_D^*10^{-4}$ [s]	$2,5 \pm 0,6$	2 ± 2	$1,2 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,5$
$\tau_R^*10^{-8}$ [s]	$1,2 \pm 0,6$	$0,5 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,2$
$A_D^*10^9$ [s ⁻²]	$1,2 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,2$	$0,21 \pm 0,06$	$0,7 \pm 0,1$
$A_{OF}^*10^9$ [s ⁻²]	$2,0 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,2$	$0,90 \pm 0,05$	$0,92 \pm 0,03$
$A_R^*10^7$ [s ⁻²]	8 ± 1	8 ± 2	$5,2 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,7$
A_{MR} [s ⁻¹]	$6,4 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,2$

Tabla 3.4: Parámetros correspondientes a las curvas de ajuste de la dispersión de la tasa de relajación espín-red usando el modelo de la sección 2.3 para liposomas compuestos de SPC+40%mol de BrijO20 a diferentes temperaturas (ver figura 3.13, y figuras 4.7, 4.8 y 4.9 en el **Apéndice**).

Se puede observar en los gráficos muy buena concordancia entre las curvas experimentales y los ajustes según el modelo de la ecuación 2.17 y, los parámetros obtenidos están en los rangos establecidos por la literatura [9].

En la figura 3.14 se muestra un gráfico comparativo de los perfiles de dispersión de liposomas de SPC con diferentes concentraciones molares de BrijO20 a 305K

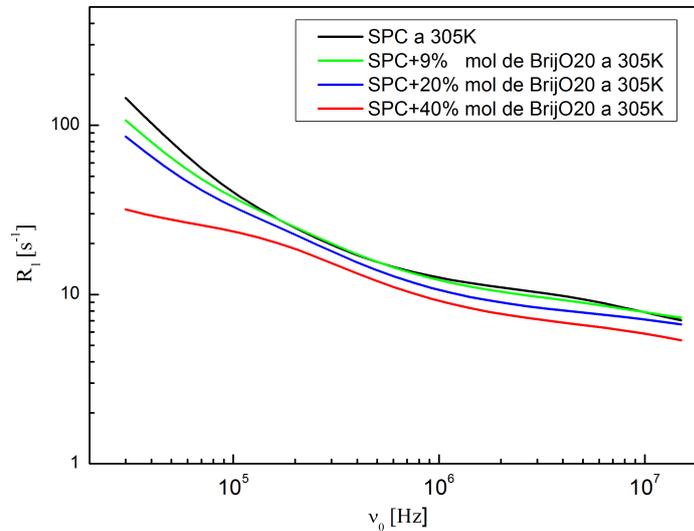


Figura 3.14: Ajustes correspondientes a las mediciones de la dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas compuestos de SPC y diferentes concentraciones molares de BrijO20 a 305K: 0%mol (negro), 9%mol (verde), 20%mol (azul), y 40%mol (rojo).

Analizando la figura 3.14, se ve claramente que el detergente produce variaciones en los perfiles a las frecuencias más bajas (menores a 200KHz) lo cual en principio se traduciría en variaciones en los parámetros asociados a los procesos de difusión y fluctuaciones de orden. También se puede notar que hasta la concentración del 20%mol los perfiles no muestran grandes variaciones, siendo el efecto del detergente mucho más notable para la concentración de 40%mol. Se observaron variaciones muy leves en los parámetros por la presencia del detergente (ver tablas 3.1, 3.2, 3.3 y 3.4), como se describe a continuación: κ tiende a disminuir levemente con la concentración de detergente lo cual está vinculado con una membrana levemente más flexible, presentando variaciones máximas de alrededor del 10%, no estando en concordancia con lo reportado por otros autores [7]. Esto podría justificarse con el hecho de que la forma de preparación y medición podrían influir en el valor de κ medido [34], [35], [36], [37]. Por otro lado, τ_D prácticamente no presentó variaciones dentro del error experimental y, τ_R presentó poca variación con tendencia no clara. En cuanto a las amplitudes correspondientes a los procesos de fluctuaciones de orden (A_{OF}) y rotaciones (A_R), no se observaron variaciones significativas.

El mayor efecto del detergente reside en el aporte a la relajación espín-red por parte del proceso de difusión, el cual 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 .

En cuanto al comportamiento con la temperatura, en la figura 3.15 se ilustran los ajustes correspondientes a las mediciones de SPC+20% molar de BrijO20 a las distintas temperaturas.

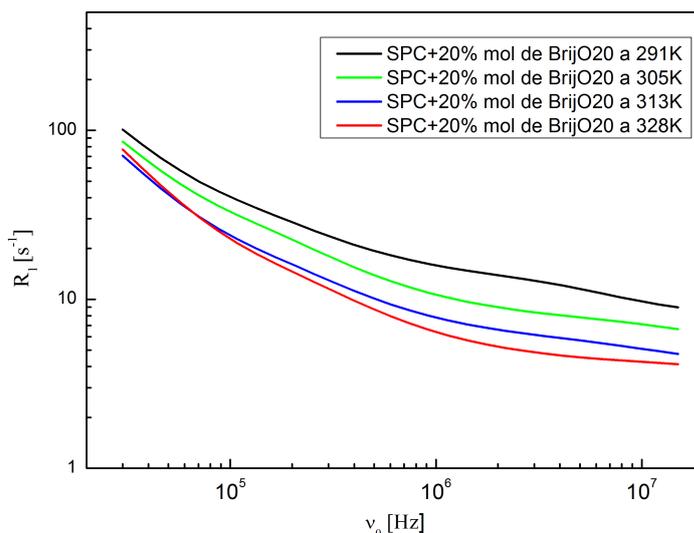


Figura 3.15: Ajustes correspondientes a las curvas de dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20% molar de BrijO20 a las distintas temperaturas: 291K (negro), 305K (verde), 313K (azul), y 328K (rojo).

Se cumplen las mismas tendencias que las observadas en SPC. Los parámetros κ , τ_D y τ_R en general tienden a disminuir con el aumento de la temperatura. Las excepciones pueden deberse a que el sistema se encuentre en otra fase producto de una determinada temperatura y concentración de detergente.

3.2.3. SPC + 20% molar de tween80 y desoxicolato de sodio

Como no se pudo obtener una disminución considerable en la constante elástica de flexión utilizando BrijO20, se procedió a realizar formulaciones con otros dos detergentes para intentar flexibilizar la membrana de liposomas.

Los detergentes utilizados fueron elegidos teniendo en cuenta los más utilizados en la bibliografía. Se eligieron tween80 y desoxicolato de sodio (SDC).

Se eligió trabajar a una concentración fija. La misma se determinó teniendo en cuenta que se necesitaba trabajar con una concentración en la cual se pudiese alcanzar la máxima flexibilidad posible y, a la vez, no tener riesgo de estar cerca de la concentración micelar crítica en la cual, el detergente deja de interactuar con los lípidos y se autoagrega formando micelas. Como se quería comparar los resultados con las mediciones en las que se utilizó BrijO20, fue necesario trabajar a una concentración igual a alguna de las que se haya usado con este detergente. Por lo tanto la concentración molar a la que se trabajó fue de un 20%.

3.2.3.1. Tween80

Las curvas experimentales y ajustadas, usando el método descrito en la sección 2.3, para liposomas de SPC con 20%mol de tween80 agregado, se muestran en la figura 3.16 la correspondiente a 305K, y en el **Apéndice** las correspondientes a las temperaturas restantes (291K, 313K y 328K). Los parámetros del ajuste son mostrados en la tabla 3.5.

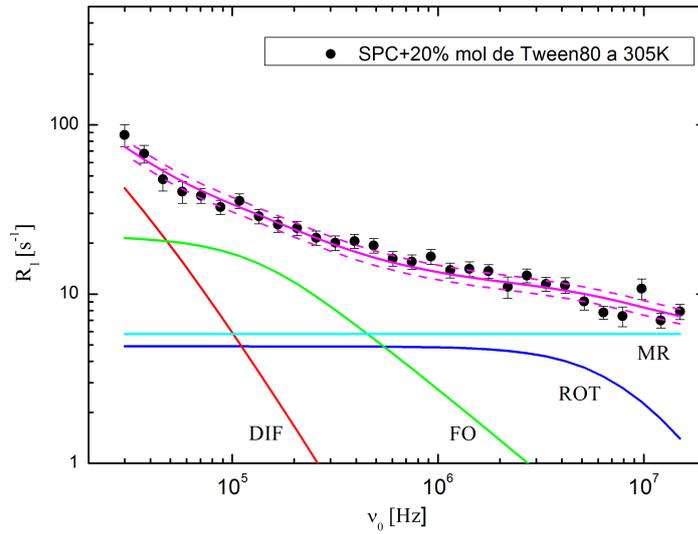


Figura 3.16: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de tween80 a 305K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.5.

Se puede observar que la curva experimental puede describirse muy bien por el modelo de la ecuación 2.17, estando todos los parámetros dentro de los rangos establecidos por la literatura (ver tabla 3.5).

Parámetros	Valores obtenidos de ajuste			
T [K]	291K	305K	313K	328K
$\kappa \cdot 10^{-20}$ [J]	$5,1 \pm 0,7$	$5,0 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,4$	$3,7 \pm 0,4$
$\tau_D \cdot 10^{-4}$ [s]	3 ± 2	$1,9 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,3$
$\tau_R \cdot 10^{-8}$ [s]	$2,1 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,2$	$0,79 \pm 0,07$	$0,45 \pm 0,08$
$A_D \cdot 10^9$ [s ⁻²]	$1,7 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,5$
$A_{OF} \cdot 10^9$ [s ⁻²]	$1,3 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,3$	$0,9 \pm 0,1$
$A_R \cdot 10^7$ [s ⁻²]	11 ± 1	10 ± 2	11 ± 1	12 ± 2
A_{MR} [s ⁻¹]	$8,1 \pm 0,6$	6 ± 1	$3,2 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,3$

Tabla 3.5: Parámetros correspondientes a las curvas de ajuste de la dispersión de la tasa de relajación espín-red usando el modelo de la sección 2.3 para liposomas compuestos de SPC+20%mol de tween80 a diferentes temperaturas (ver figura 3.16 y, figuras 4.13, 4.14 y 4.15 en el **Apéndice**).

3.2.3.2. Desoxicolato de sodio

Las curvas experimentales y ajustadas, usando el método descrito en la sección 2.3, para liposomas de SPC con 20 %mol de SDC agregado, se muestran en: la figura 3.17 la correspondiente a 305K, y en el **Apéndice** las correspondientes a las temperaturas restantes (291K, 313K y 328K). Los parámetros del ajuste son mostrados en la tabla 3.6.

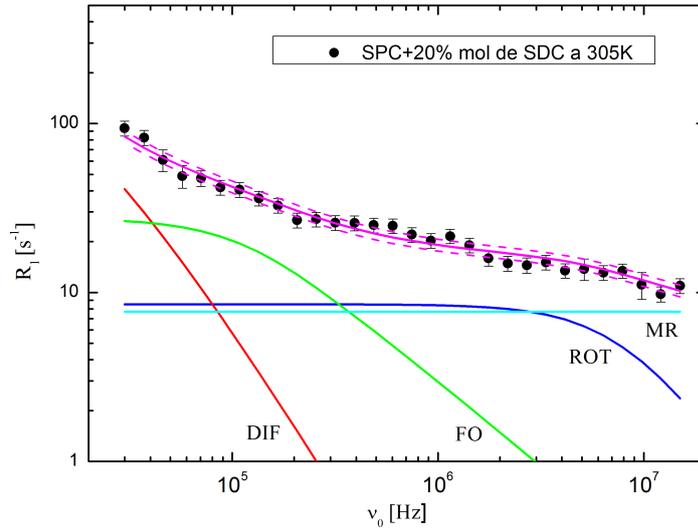


Figura 3.17: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de SDC a 305K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.6.

Se puede observar que la curva experimental puede describirse muy bien por el modelo de la ecuación 2.17, estando todos los parámetros dentro de los rangos establecidos por la literatura (ver tabla 3.6).

Parámetros	Valores obtenidos de ajuste			
T [K]	291K	305K	313K	328K
$\kappa * 10^{-20}$ [J]	$4,4 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,2$	$4,0 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,3$
$\tau_D * 10^{-4}$ [s]	3 ± 2	$1,4 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,3$	1 ± 2
$\tau_R * 10^{-8}$ [s]	$2,1 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
$A_D * 10^9$ [s ⁻²]	$1,1 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,2$	$0,9 \pm 0,3$
$A_{OF} * 10^9$ [s ⁻²]	$1,3 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$
$A_R * 10^7$ [s ⁻²]	15 ± 1	17 ± 2	17 ± 3	19 ± 3
A_{MR} [s ⁻¹]	13 ± 1	$7,7 \pm 0,8$	$5,4 \pm 0,7$	$3,4 \pm 0,6$

Tabla 3.6: Parámetros correspondientes a las curvas de ajuste de la dispersión de la tasa de relajación espín-red usando el modelo de la sección 2.3 para liposomas compuestos de SPC+20%mol de SDC a diferentes temperaturas (ver figura 3.17 y, figuras 4.16, 4.17 y 4.18 en el **Apéndice**).

3.2.3.3. Análisis

Ambos detergentes provocaron un comportamiento similar en los parámetros de ajuste:

1. Se observaron las siguientes variaciones en los parámetros por la presencia del detergente (ver tablas 3.5 y 3.6): la constante elástica κ mostró una ligera tendencia a disminuir con el porcentaje de detergente (40% en el mayor de los casos), lo cual es compatible con una membrana con mayor deformabilidad o flexibilidad debido a la presencia del detergente [41]. El hecho de que κ 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 [42]. Los tiempos de correlación (rotacional τ_R y de difusión τ_D) disminuyeron levemente con el contenido de detergente. En cuanto a la amplitud asociada a las rotaciones (A_R) y a las fluctuaciones de orden (A_{OF}), no presentaron variaciones considerables dentro del error experimental.
2. Se observó un comportamiento similar al caso del detergente BrijO20 en cuanto a que el aporte a la relajación espín-red por parte del proceso de difusión, disminuye con la aplicación de los detergentes, lo cual se apreció a través de la disminución del valor de A_D . Este comportamiento indica que el proceso de difusión empieza a dejar de ser efectivo como mecanismo de relajación.
3. En cuanto al comportamiento con la temperatura, se observaron en términos generales las mismas tendencias en los parámetros que en el caso de liposomas de SPC sin agregados (ver tabla 3.1).

3.2.4. Comparación entre los distintos detergentes

Para comparar los resultados obtenidos por la acción de los tres detergentes utilizados, en la figura 3.18 se muestran los ajustes correspondientes a las curvas experimentales de liposomas de SPC y SPC con 20% molar de cada detergente a 305K. Comportamientos similares se observan a las otras temperaturas.

Los parámetros correspondientes a cada uno de los ajustes se muestran comparativamente en la tabla 3.7.

De la figura 3.18 se puede observar que la curva que más se diferencia de la curva de la muestra base es la correspondiente a la que posee SDC, lo cual a su vez se ve reflejado en mayores cambios en los parámetros de ajuste (ver tabla 3.7).

En cuanto a las curvas correspondientes a SPC más tween80 y a SPC más BrijO20, se puede observar que son similares dentro de la banda de error (la cual no está graficada), entre 30KHz y 400KHz, región en la cual contribuye de manera importante a la relajación espín-red el proceso de las fluctuaciones de orden el cual está vinculado a las propiedades elásticas

de la membrana del liposoma por medio de κ . Asimismo los parámetros de ajuste no reflejan lo observado en el gráfico, ya que para el caso de tween80, se observan mayores variaciones, principalmente en κ , mientras que para el caso de BrijO20 la mayoría de los valores obtenidos son indistinguibles respecto de la muestra base dentro de los errores experimentales.

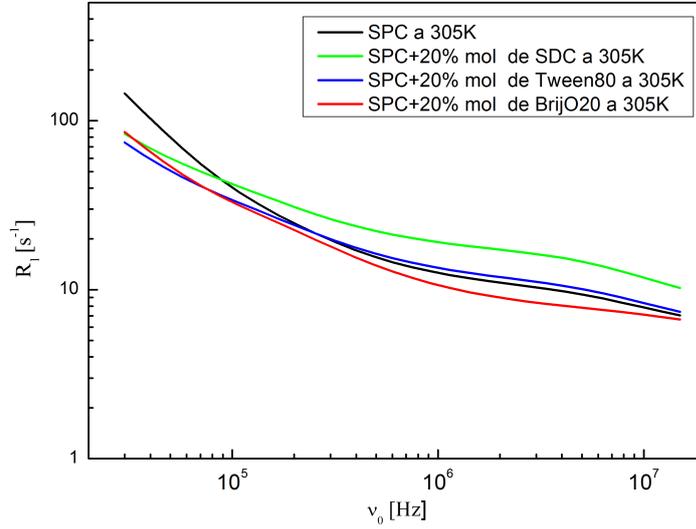


Figura 3.18: Ajustes correspondientes a las mediciones de la dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas compuestos de SPC (curva negra) y SPC más distintos detergentes en una concentración molar del 20 % a 305K: SDC (verde), tween80 (azul), y BrijO20 (rojo).

Parámetros	Valores obtenidos de ajuste			
Cantidad de	SPC	SPC+20 %mol	SPC+20 %mol	SPC+20 %mol
	detergente	de BrijO20	de tween80	de SDC
$\kappa * 10^{-20} [\text{J}]$	$6,4 \pm 0,9$	$6,3 \pm 0,9$	$5,0 \pm 0,7$	$4,3 \pm 0,6$
$\tau_D * 10^{-4} [\text{s}]$	$3,0 \pm 0,9$	$2,8 \pm 0,9$	2 ± 1	1 ± 3
$\tau_R * 10^{-8} [\text{s}]$	$1,0 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,2$
$A_D * 10^9 [\text{s}^{-2}]$	6 ± 2	3 ± 1	$1,4 \pm 0,8$	$1,0 \pm 0,7$
$A_{OF} * 10^9 [\text{s}^{-2}]$	$1,4 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,3$
$A_R * 10^9 [\text{s}^{-2}]$	$0,08 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,03$
$A_{MR} [\text{s}^{-1}]$	5 ± 1	6 ± 1	5 ± 1	8 ± 2

Tabla 3.7: Parámetros correspondientes a las curvas de ajuste de la dispersión de la tasa de relajación espín-red usando el modelo de la sección 2.3 para liposomas compuestos de SPC y SPC más distintos detergentes en una concentración molar del 20 % a 305K: SDC, tween80, y BrijO20.

El hecho de que se observe esta diferencia en los parámetros de ajuste entre estos dos experimentos es complicada de explicar debido a que, las moléculas de ambos detergentes (BrijO20 y tween80), poseen características similares a grandes rasgos como lo son la ionicidad

(ambos son detergentes no-iónicos) y la masa molecular ($\sim 1100 - 1300 \text{g/mol}$ la cual es mucho mayor a la de SPC $\sim 800 \text{g/mol}$). Por lo tanto, esta discrepancia puede estar producida por la interacción de cada una de estas moléculas con los lípidos de la membrana del liposoma, lo cual está íntimamente vinculado con la estructura particular de cada uno de ellos.

Por otro lado, pese al hecho de que las curvas sean similares, se puede observar que la correspondiente a tween80 agregado, posee una pendiente considerablemente diferente a la curva de la muestra base (cruzandose a los 300MHz aproximadamente), mientras que la curva correspondiente al BrijO20 “va copiando” la pendiente de la curva de la muestra base a las frecuencias más chicas, entre 100kHz y 500kHz , y se apartan levemente para frecuencias menores a los 100kHz .

En resumen, el detergente con mayor efectividad en cuanto a la flexibilización de la membrana del liposoma, es el desoxicolato de sodio, esto podría deberse a su carácter iónico o a su masa molecular, la cual es mucho más pequeña ($414,55 \text{g/mol}$) que la de los otros detergentes (ver tabla 3.7).

En cuanto al proceso de difusión, se realizó el siguiente análisis: considerando que las amplitudes A_D , A_{OF} y A_R dependen del parámetro físico r_j como lo indica la ecuación 2.18, definido como la distancia efectiva entre protones relevante para cada proceso dinámico, sus valores no deberían cambiar demasiado para las diferentes formulaciones de liposomas, por lo que sólo podrían aceptarse leves variaciones debidas a la temperatura y tal vez a la concentración de detergente. Asimismo, para el caso de liposomas con detergente se observaron variaciones de A_D de hasta el 84% con 20%mol de detergente (para los tres detergentes utilizados, ver tabla comparativa 3.7) y variaciones del 97% para 40%mol de BrijO20 (ver figura 3.13 y tablas 3.1 y 3.4) respecto de su valor para liposomas de SPC. Específicamente, para el caso de liposomas dopados con BrijO20 se puede ver claramente que A_D decae progresivamente con el contenido de detergente (comparar tablas 3.1, 3.2, 3.3 y, 3.4). Adicionalmente los errores asignados a los parámetros A_D y τ_D son bastante elevados (alcanzaron valores del 70% para τ_D y del 200% para A_D). Por lo tanto, el hecho de que A_D disminuya tanto con el contenido de detergente podría interpretarse como una pérdida en la efectividad del proceso de difusión como mecanismo de relajación. Dicho de otra manera, las fluctuaciones de orden toman mayor relevancia con el contenido de detergente lo cual es acorde a tener liposomas con una membrana más flexible y así la relajación espín-red a bajas frecuencias está mayoritariamente descrita por este proceso. Asimismo, pese a que se intentaron analizar las curvas medidas en términos de un modelo simplificado sin incluir la contribución debida a la difusión, no se tuvo éxito. Los valores de κ obtenidos con este modelo simplificado diferían en un poco más del 20% respecto al valor obtenido con el modelo completo. Por lo tanto se decidió conservar el análisis considerando la difusión como mecanismo de relajación con una pequeña contribución.

Vale la pena aclarar que en general se está suponiendo que al agregar moléculas de detergente a los liposomas las mismas son de menor tamaño que los lípidos, contribuyendo minoritariamente a la señal de RMN total. De esta manera la dinámica total puede asumirse como

la descrita por los lípidos y dada por la ecuación 2.17. Esto es equivalente a decir que las moléculas de detergente copian la dinámica de los lípidos. Estas suposiciones se cumplen en el caso del detergente SDC cuyo peso molecular es menor al de los lípidos y sólo contribuye como máximo al 10 % de protones totales en la muestra cuando su concentración es del 20 %mol. Por otro lado, en el caso de los detergentes BrijO20 y Tween80 sus respectivas moléculas son más masivas y aportan más cantidad de protones que cada molécula de lípido. De hecho para una concentración del 20 %mol y 40 %mol, ambos detergentes contribuyen con alrededor del 25 % y 50 % del total de protones, respectivamente. Esto generó ciertos cuestionamientos respecto a la aplicabilidad del modelo de la ecuación 2.17 y se planteó la posibilidad de modificarlo levemente considerando la dinámica propia de las moléculas de detergente. Asimismo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos y mostrados en los gráficos y tablas a lo largo de este trabajo, los cuales reflejan una muy buena concordancia con el modelo planteado, se decidió hacer todo el análisis ignorando lo antes mencionado en principio y se realizará un análisis más profundo a futuro.

3.3. Incorporación del detergente en la membrana del liposoma

Debido a que no se encontró una justificación clara para algunos de los resultados obtenidos y mostrados en las secciones anteriores, se decidió realizar experimentos que permitan comprobar si el detergente se estaba incorporando en la membrana del liposoma.

Como los resultados más difíciles de interpretar correspondían a las muestras que poseían BrijO20 y tween80, se realizó este análisis para ambos detergentes.

3.3.1. Tween80

Considerando que la tasa de relajación R_1 es aditiva, se propuso medir los perfiles de dispersión de R_1 de las dos componentes por separado, es decir un perfil de dispersión de liposomas SPC y un perfil de dispersión de tween80 suspendido en D_2O . Luego si se suman matemáticamente estos perfiles, el resultado (“perfil suma”) sería el perfil de dispersión que se obtendría para una muestra de SPC+20%mol de tween80 (como con la que se trabajó en la sección anterior), si el detergente no se hubiera introducido en la membrana. En este caso, en la muestra se tendrían liposomas formados de SPC únicamente y moléculas de tween80 en el estado de no agregación y/o formando micelas.

Por lo tanto si este “perfil suma” fuera indistinguible con el de SPC+20%mol de tween80 medido, implicaría que este último proviene de una muestra compuesta por las dos componentes por separado, es decir una muestra en donde el detergente no está incorporado en la membrana de los liposomas. Si esto no ocurre, es decir si estos dos perfiles son distinguibles, implicaría que el detergente (o un porcentaje del mismo), sí se incorporó en la membrana del liposoma.

Cabe aclarar que como no se tenía certeza de si el procedimiento de preparación de los liposomas influía o no en lo que ocurría con el detergente, la preparación de la muestra de detergente se realizó siguiendo todo el proceso de preparación de una muestra estándar, es decir que se incluyó la formación del film, el tratamiento térmico, la extrusión, etc. A esta muestra se la denominó “film de tween80”. Paralelamente se preparó una muestra simplemente disolviendo el detergente en agua pesada para conocer como influye el proceso de preparación en el detergente. A esta muestra se la denominó “tween80 sin film”.

En la figura 3.19 se muestran los perfiles de dispersión de R_1 de las dos muestras de detergente (film de tween80 y tween80 sin film). En el mismo gráfico se incluye el perfil de SPC+20 %mol de tween80 a modo de comparación.

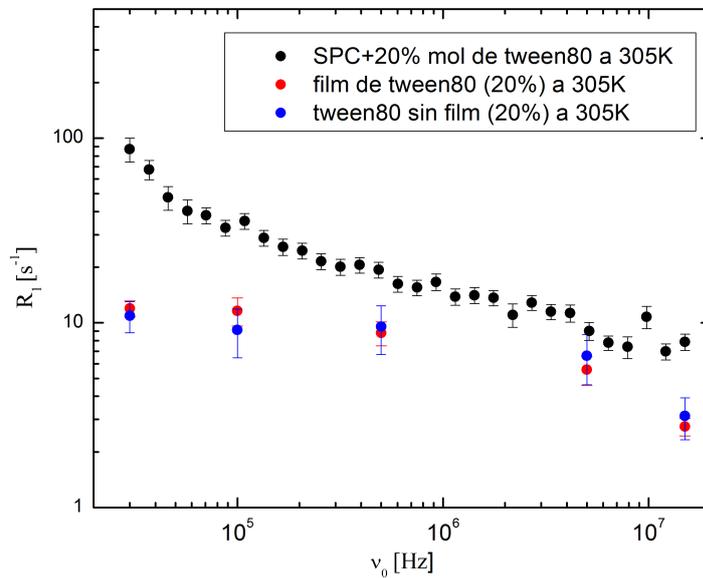


Figura 3.19: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20 %mol de tween80 (●) (negro) y de una suspensión de tween80 (●) con distintos procesos de preparación: con formado de film (rojo) y sin formado de film (azul) a 305K.

Se puede observar que los perfiles de ambas muestras de detergente son indistinguibles dentro de los errores experimentales, lo cual indica que el proceso de preparación no influye en el comportamiento del detergente, o en su defecto, la técnica no es sensible a la diferencia. Ambas muestras presentan un compartamiento levemente dispersivo en el rango de frecuencias estudiadas.

Se procedió a la determinación del “perfil suma”, para ello primero se realizó la suma de los valores de R_1 de la siguiente manera: $R_1^{suma} = R_1^{SPC} + R_1^{tween80}$. El resultado se muestra comparativamente junto a los perfiles de la muestra base y de SPC+20 %mol de tween80 en la figura 3.20.

Se observa que este “perfil suma” discrepa con los dos perfiles de referencia graficados, salvo

en el rango entre 30KHz y 100KHz donde es indistinguible respecto al perfil de la muestra base. Este comportamiento indica, como se explicó previamente, que cuando se prepara una muestra de liposomas de $\text{SPC}+20\%mol$ de tween80 , todo el detergente (o una alta proporción del mismo) se incorpora en la membrana del liposoma.

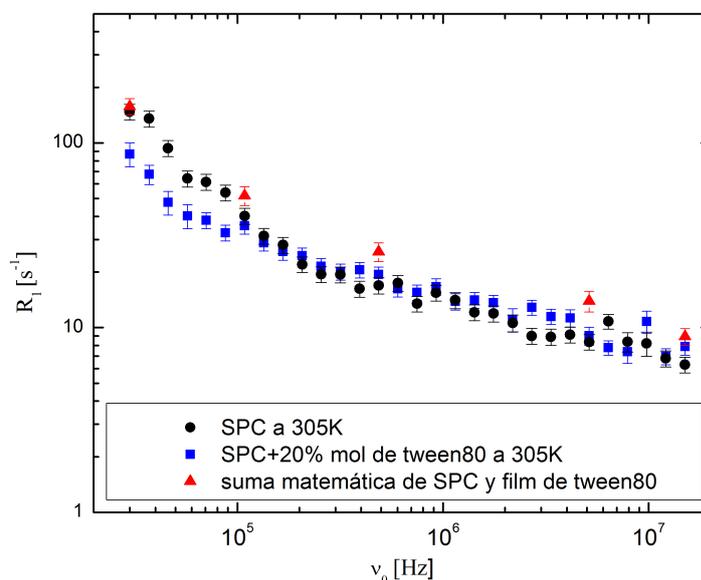


Figura 3.20: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC (●), $\text{SPC}+20\%mol$ de tween80 (■) y el perfil suma (▲).

Por último intentando reproducir el “perfil suma” experimentalmente, se decidió mezclar las dos muestras estudiadas, es decir, los liposomas de SPC y la muestra de detergente suspendido en D_2O .

Como no es posible saber si existen diferencias entre las dos preparaciones de la muestra de detergente al mezclarlas con los liposomas, se decidió realizar el experimento dos veces, es decir preparando dos muestras: liposomas de SPC + film de tween80 y liposomas de SPC + tween80 sin film.

Las dos muestras fueron preparadas simultáneamente. Después de 12 hs aproximadamente, se midió el perfil de SPC + tween80 sin film y el perfil de SPC + film de tween80 , en la figura 3.21 se muestran los perfiles de dispersión de las mismas, en donde también se incluye a modo comparativo, los perfiles correspondientes a la muestra base y a la muestra de $\text{SPC} + 20\%mol$ de tween80 , también se muestra el perfil suma.

Se puede observar que, los perfiles de SPC + film tween 80 y $\text{SPC}+ \text{tween 80}$ sin film discrepan con el perfil suma pero, son indistinguibles dentro del error experimental entre sí (por lo que se concluye que el proceso de preparación no afecta al comportamiento del detergente) y respecto del perfil de $\text{SPC}+20\%mol$ de tween80 . Esto implica que la muestra de $\text{SPC}+20\%mol$ de tween80 tiene el mismo comportamiento que una muestra en la que las dos componentes de la

preparación podrían estar separadas, es decir que de acuerdo a este resultado, en las muestras con las que se trabajó y cuyos resultados se mostraron en secciones previas, el detergente podría no estar incorporado en la membrana. Pero también estaba la hipótesis de que en lapso de tiempo entre que se mezclaron las muestras y se realizaron las mediciones ($\sim 12hs$), el detergente se hubiera incorporado en la membrana del liposoma.

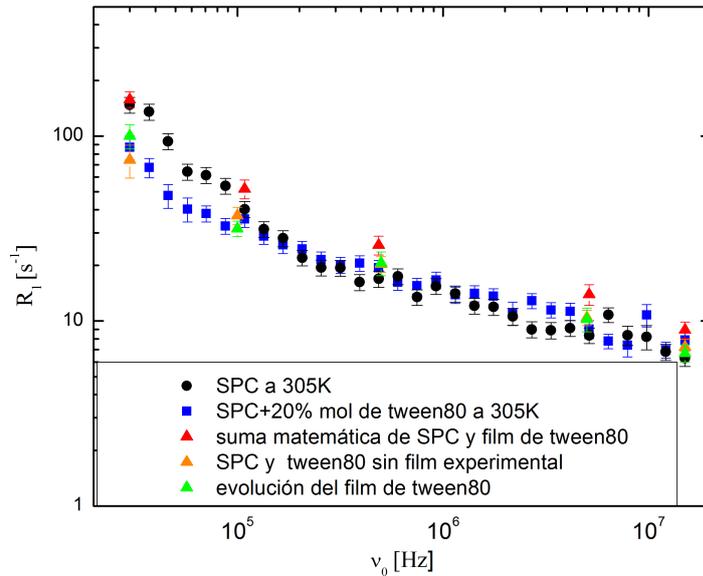


Figura 3.21: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC (●), SPC+20%mol de tween80 (■), el perfil suma (▲) (rojo) y las dispersiones experimentales de SPC + film de tween80 (▲) (verde) y SPC + tween80 sin film (▲) (naranja).

Para verificar esta última hipótesis debía asegurarse de que en las muestras no hubiese detergente que no estuviese en la membrana. Se sabe que si las moléculas de detergente se encuentran suspendidas en alguna solución, bajo ciertas condiciones de concentración y temperatura, se autoagregan formando micelas, las cuales poseen un diámetro mucho menor que los liposomas ($\sim 10nm$). Por lo tanto se hizo un estudio con DLS a las muestras, para verificar que en las mismas no hubiese componentes con diámetro del orden del tamaño de micelas y de esta manera poder verificar que el detergente se encontraba incorporado en la membrana de los liposomas.

Primero se le realizó un estudio de DLS a las muestras de tween80 con y sin film para ver si efectivamente se encontraban micelas. En las figura 3.22 y figura 3.23 se muestran los gráficos de la distribución de diámetros de los agregados según la cantidad (“número”) que posean un determinado diámetro, correspondientes a las muestras de film de tween80 y de tween80 sin film, respectivamente.

Se puede observar que en ambos casos las distribuciones están centradas alrededor de $10nm$ aproximadamente, esto indica que, efectivamente, las muestras de detergente están compuestas

por agregados de ese diámetro.

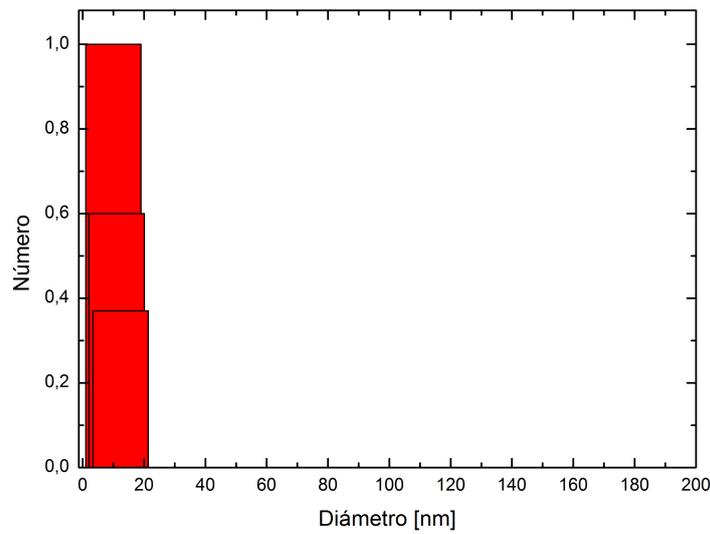


Figura 3.22: Distribución de diámetros de los agregados según la cantidad que posee un determinado diámetro, correspondiente a una suspensión de film de tween80

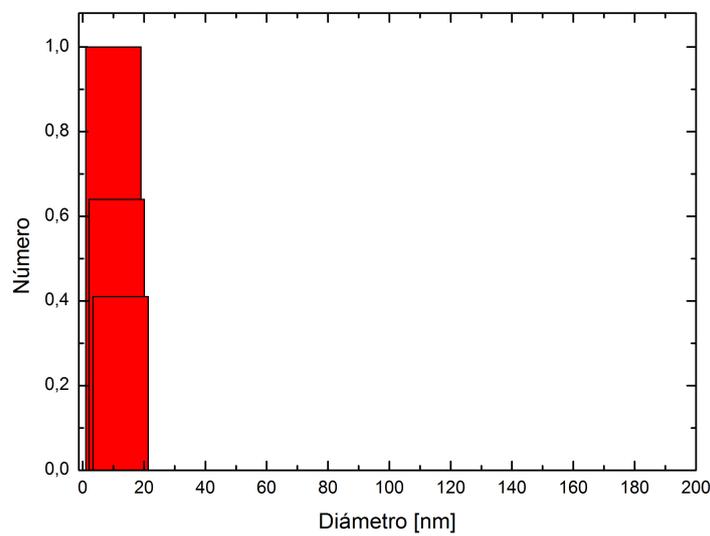


Figura 3.23: Distribución de diámetros de los agregados según la cantidad que posee un determinado diámetro, correspondiente a una suspensión de tween80 sin film.

Se procedió entonces a la obtención de los gráficos de DLS de las muestras mezcla. En las figura 3.24 y figura 3.25 se muestran los gráficos de la distribución de diámetros de las vesículas según la cantidad (“número”) que posean un determinado diámetro, correspondientes a las muestras mezcla de SPC más film de tween80 y de SPC más tween80 sin film, respectivamente.

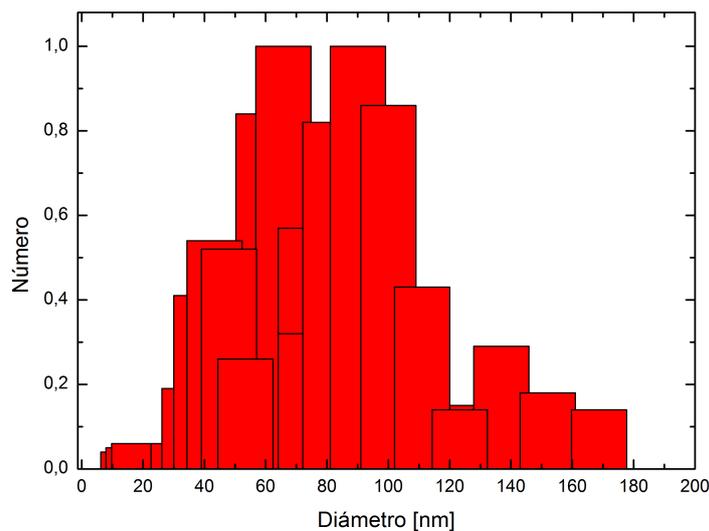


Figura 3.24: Distribución de diámetros de las vesículas según la cantidad que posee un determinado diámetro, correspondiente a una suspensión de SPC+film de tween80.

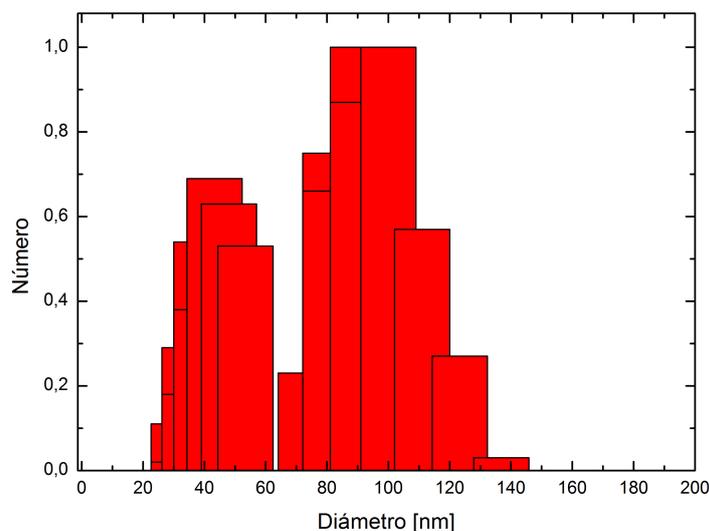


Figura 3.25: Distribución de diámetros de las vesículas según la cantidad que posee un determinado diámetro, correspondiente a una suspensión de SPC+tween80 sin film.

Lo que se observa es que en ninguno de los dos gráficos se encuentran picos centrados en $10nm$, por lo tanto se puede concluir que se cumple la hipótesis que se planteó, es decir que luego de $12hs$, el detergente se incorporó en la membrana.

En resumen se puede afirmar que la muestra de SPC+20%mol de tween80 con la que se trabajó tenía el detergente incorporado en la membrana de los liposomas. También se puede afirmar que sin importar como se prepare la muestra, esperando un tiempo mayor a $12hs$, el

detergente se incorpora en la membrana de los liposomas.

Evolución de la muestra: incorporación del detergente

Uno de los motivos por los que se planteó la hipótesis de que en el lapso de tiempo entre que se prepararon las muestras “mezcla” y se midieron los perfiles, el detergente se había incorporado en la membrana, provino del siguiente suceso:

Inmediatamente después de haberse mezclado las muestras de SPC y las diferentes suspensiones de tween80 en D_2O , se procedió a la medición del perfil de SPC + film de tween80. En la figura 3.26 se muestra el perfil de dispersión obtenido, en donde también se incluyó a modo comparativo, los perfiles correspondientes a la muestra base, a la muestra de SPC+20 %mol de tween80, y el perfil suma.

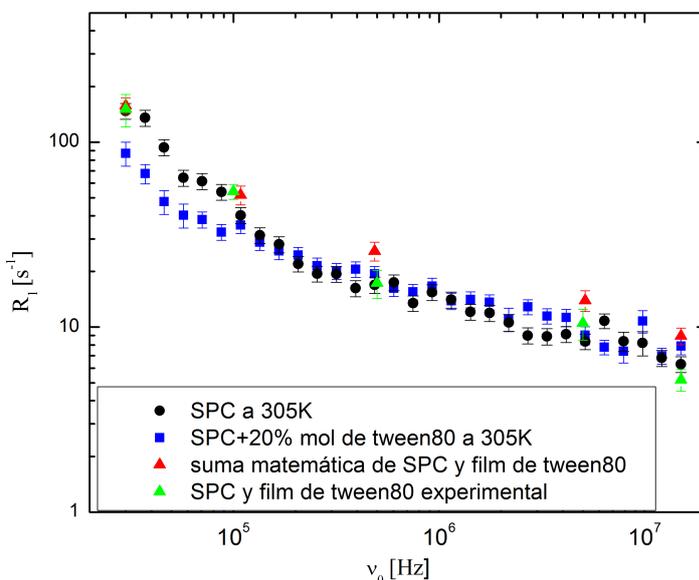


Figura 3.26: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC (●), SPC+20 %mol de tween80 (■), SPC+film de tween80 (▲) (verde) y el perfil suma (▲) (rojo).

Se observa que la mezcla se comporta como si el agregado de detergente no influyera en el comportamiento de los liposomas, es decir que si el detergente no se introduce en la membrana, no genera cambios en el perfil total (su perfil es indistinguible del perfil de SPC, dentro del error experimental).

Después de 12hs, como se mencionó previamente, se midió nuevamente este mismo perfil. El resultado se muestra en la figura 3.27, en el mismo gráfico se incluyen los perfiles graficados en la figura 3.26 (sin el perfil suma).

Lo que se observa es que el perfil de SPC + film de tween80 cambió, se podría decir que evolucionó. Esto implica que se produjo un cambio en la muestra respecto del momento de la

medición anterior. Este cambio es lo que se asoció con la incorporación del detergente en la membrana de los liposomas.

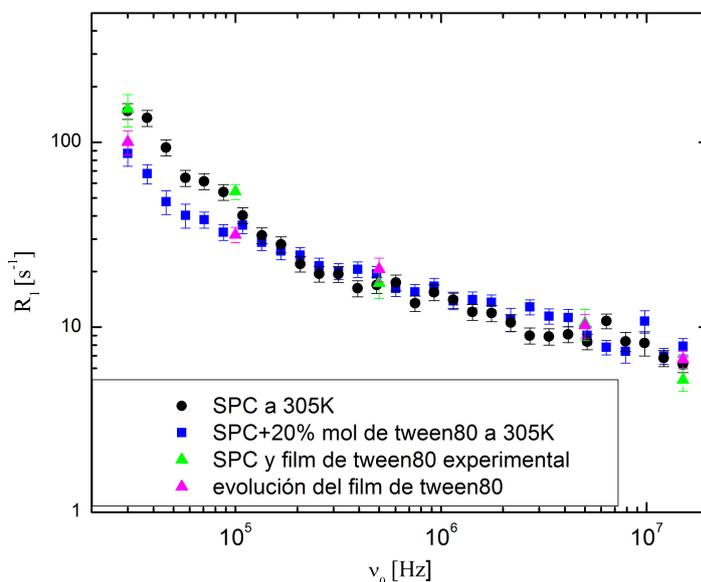


Figura 3.27: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC (●), SPC+20%mol de tween80 (■), SPC+film de tween80 (▲) (verde) y su evolución (▲) (rosa).

3.3.2. BrijO20

Con el objetivo de seguir el mismo protocolo utilizado para tween80, lo primero que se realizó fue la medición de un perfil del detergente BrijO20 suspendido en D_2O . Como se comprobó que el proceso de preparación no influía en el comportamiento de las moléculas de detergente, simplemente se disolvió el mismo en agua pesada en las mismas proporciones usadas para preparar liposomas con 20%mol y 40%mol de BrijO20, ya que fueron las concentraciones usadas en los experimentos realizados.

En la figura 3.28 se muestran los perfiles de dispersión correspondientes a las muestras de detergente en una concentración del 20%mol y 40%mol respectivamente, junto con el perfil correspondiente a SPC más 20%mol de BrijO20.

Los perfiles correspondientes a las distintas concentraciones molares del detergente son indistinguibles y levemente dispersivos en el rango de frecuencias estudiadas.

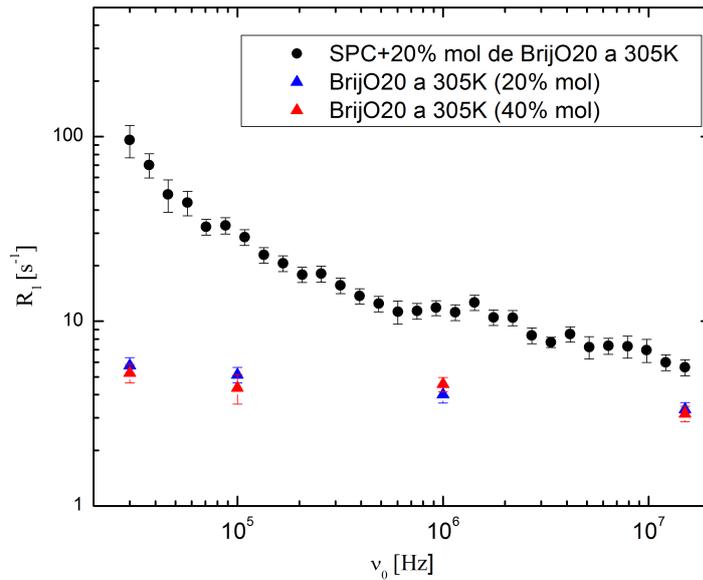


Figura 3.28: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de BrijO20 (●) y de una suspensión de BrijO20 (▲) con distintas concentraciones: 20 % (azul) y 40 % (rojo) a 305K.

Se procedió entonces a realizar la suma matemática de los valores de R_1 de los perfiles de dispersión de SPC y de 20%mol de BrijO20, el resultado se muestra comparativamente con los perfiles de la muestra base y de SPC+20%mol de BrijO20 en la figura 3.29.

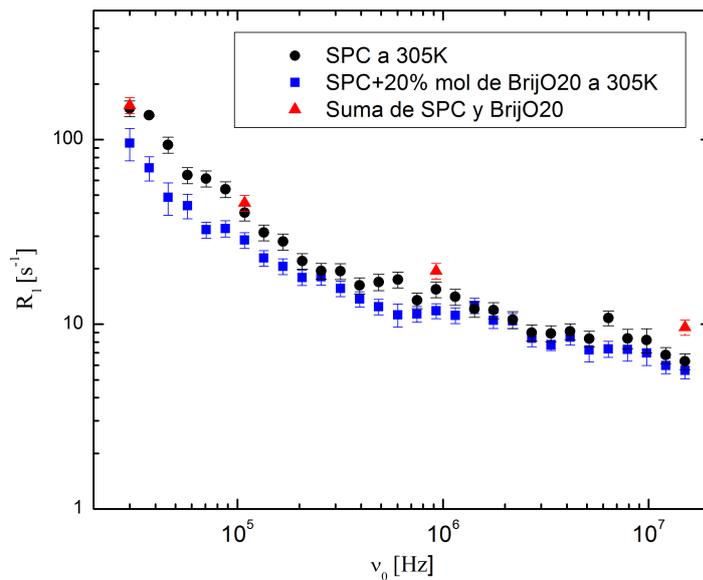


Figura 3.29: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC (●), SPC+20%mol de BrijO20 (■) y el perfil suma (▲).

El perfil suma presenta el mismo comportamiento que para el caso anterior, es decir que discrepa con los dos perfiles de referencia graficados, salvo en el rango entre 30KHz y 100KHz donde es indistinguible respecto al perfil de la muestra base. Este comportamiento indicaría que cuando se prepara $\text{SPC}+20\%mol$ de BrijO20, el detergente se incorpora en la membrana del liposoma.

Para poder finalizar este análisis queda pendiente la corroboración experimental de los puntos del perfil suma junto con los correspondientes estudios de DLS.

Capítulo 4

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 κ 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 pudo extender con éxito el modelo al caso de liposomas flexibles (liposomas dopados con detergente). Los parámetros físicos involucrados en el modelo siguen en general las tendencias esperadas según la literatura.

No fue posible reproducir resultados obtenidos por el grupo de investigación de Gregor Cevc utilizando la misma formulación de liposomas flexibles, específicamente liposomas de SPC dopados con distintos porcentajes de BrijO20. Esto podría deberse a diferencias en la preparación de los liposomas (entre ellas el medio de suspensión) ó, al hecho de que se utilizaron distintas técnicas experimentales, lo cual ha sido discutido en trabajos de otros autores. Pese a este resultado, no se culpa a la técnica experimental usada (RMN con ciclado rápido de campo) ya que se comprobó que es lo suficientemente sensible para detectar cambios en las propiedades elásticas de liposomas dopados con otros detergentes y aditivos. Adicionalmente, esta falta de reproducibilidad ya ha sido mencionada por diversos autores y vale la pena destacar que existen intereses y/o aplicaciones comerciales en varias publicaciones del grupo de G. Cevc que podrían condicionar a los resultados mostrados.

En cuanto a los tres detergentes utilizados, se observaron las mismas características en las variaciones generales de los parámetros del modelo, pero influyendo algunos en más proporción que otros:

- La constante elástica de flexión κ disminuyó en un 10 % con el agregado de BrijO20 en un 40 %mol, un 30 % con el agregado de twenn80 en un 20 %mol y un 40 % para el caso de SDC en un 20 %mol. Por lo que, en términos generales se logró flexibilizar la membrana

de los liposomas.

- Los tiempos τ_R y τ_D asociados a los procesos dinámicos de rotación y difusión respectivamente, presentaron una leve tendencia a disminuir con el contenido de detergente y con el aumento de la temperatura.
- Las amplitudes relacionadas con los procesos de fluctuaciones de orden (A_{OF}) y rotaciones (A_R), presentaron variaciones no significativas dentro del error experimental, lo cual concuerda con las características de estas cantidades ya que están vinculadas con parámetros físicos (distancias entre protones) que deberían mantenerse fijos, o a lo sumo presentar mínimas variaciones.
- En los tres casos el proceso de difusión perdió efectividad como mecanismo de relajación, lo que se vió reflejado en la abrupta disminución de la amplitud A_D (de hasta un 97 %).

En cuanto a las propiedades intrínsecas de la muestra, se logró la siguiente caracterización:

- Se verificó que cada instancia de la preparación de liposomas tiene el efecto deseado y que la técnica utilizada puede detectar tales efectos a través de mostrar cambios en la dispersión de R_1 .
- Se verificó la incorporación del detergente (el experimento se realizó con tween80) en la membrana de los liposomas a través de experimentos de DLS y cambios en los perfiles de dispersión. Pudiéndose afirmar que sin importar como se prepare la muestra, esperando un tiempo mayor a 12hs, el detergente se incorpora en la membrana de los liposomas.

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

Perspectivas futuras

Resta a futuro realizar los experimentos y analizar las propuestas que se listan a continuación:

- Testear si es posible describir los perfiles de dispersión de SPC + 40%mol de BrijO20 con el modelo simplificado sin el aporte de la difusión, debido a que con esta formulación se encontraron los indicios más claros de que este proceso dejaba de tener importancia.

- Realizar el análisis de la incorporación del detergente en la membrana pero para el caso de SPC + 20 %*mol* de BrijO20 para averiguar si la diferencia en el valor de κ respecto del valor correspondiente para SPC + 20 %*mol* de tween80 reside en este hecho.
- Realizar un diagrama de fases de SPC, dado que se observaron comportamientos extraños en como variaba el tiempo de correlación rotacional en función del detergente agregado y la temperatura.
- Realizar experimentos adicionando detergentes no iónicos y/o menos masivos (“span80” específicamente, entre otros) para comprobar si la mayor flexibilidad adquirida por la membrana está relacionada con el tamaño de los detergentes y/o con la ionicidad de los mismos.

Bibliografía

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Almeida PF, Vaz WL, Thompson TE. Lipid diffusion, free area, and molecular dynamics simulations. *Biophys J.* 2005;88(6):4434.
- [4] Mouritsen OG. *Life - As a Matter of Fat: The Emerging Science of Lipidomics* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2004.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Rommel E, Noack F, Meier P, Kothe G. Proton spin relaxation dispersion studies of phospholipid membranes. *J Phys Chem.* 1988;92(10):2981-7.
- [9] Fraenza C.C., Caracterización de la dinámica molecular en nanoestructuras supramoleculares globulares mediante relaxometría magnética nuclear, Tesis doctoral, FaMAF, UNC, 2016.
- [10] 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.
- [11] 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.

- [12] Fraenza CC, Meledandri CJ, Anoardo E, Brougham DF. The Effect of Cholesterol on Membrane Dynamics on Different Timescales in Lipid Bilayers from Fast FieldCycling NMR Relaxometry Studies of Unilamellar Vesicles. *ChemPhysChem*. 2014;15(3):425–35.
- [13] Gennis RB. *Biomembranes: molecular structure and function*. Springer Science and Business Media; 2013.
- [14] Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta BBA-Rev Biomembr*. 1975;415(1):29–79.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Shaw JE, Chandrasekaran SK. In *pharmacology of the skin*, Greaves. Springer-Verlag, Berlin; 1999.
- [19] 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.
- [20] Gompper G, Kroll DM. Driven transport of fluid vesicles through narrow pores. *Phys Rev E*. 1995;52(4):4198.
- [21] Martínez-Balbuena L, Maldonado-Arce A, Hernández-Zapata E. Elasticidad de las membranas biológicas. *Rev Mex Física E*. 2010;56(1):107–22.
- [22] 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.
- [23] Meunier J. Measurement of the bending elastic modulus of a flat monolayer at a liquid interface. *J Phys Condens Matter*. 1990;2(S):SA347.
- [24] Meunier J, Lee LT. Bending elasticity measurements of a surfactant monolayer by ellipsometry and x-ray reflectivity. *Langmuir*. 1991;7(9):1855–60.
- [25] 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.

- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] Chaudhary H, Kohli K, Kumar V. Nano-transfersomes as a novel carrier for transdermal delivery. *Int J Pharm.* 2013;454(1):367–80.
- [29] Levitt MH. *Spin Dynamics*. UK: Wiley; 2008.
- [30] Slichter CP. *Principles of magnetic resonance*. Berlin: Springer; 1990.
- [31] Abragam A. *The principles of nuclear magnetism*. Oxford university press; 1961
- [32] Kimmich R, Anorado E. Field-cycling NMR relaxometry. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc.* 2004;44(3):257–320.
- [33] Anorado E, Galli G, Ferrante G. Fast-Field-Cycling NMR: Applications and Instrumentations. *Appl Magn Reson.* 2001; 20:365-404.
- [34] Dimova R. Recent developments in the field of bending rigidity measurements on membranes. *Adv Colloid Interface Sci.* 2014;208:225–34.
- [35] Nagle JF. Introductory Lecture: Basic quantities in model biomembranes. *Faraday Discuss.* 2013;161(0):11–29.
- [36] 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.
- [37] Bouvrais H, Duelund L, Ipsen JH. Buffers affect the bending rigidity of model lipid membranes. *Langmuir.* 2014;30(1):13–6.
- [38] Halle B. Theory of spin relaxation by diffusion on curved surfaces. *J Chem Phys.* 1991;94(4):3150–68.
- [39] 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.
- [40] Walve J. R., Bakliwal S. R., Rane B. R., Pawar S. P., *Int. J. App. Biol. Pharm. Techn.* 2 (2011), 204-213.
- [41] Cevc G. Material transport across permeability barriers by means of lipid vesicles. *Handb Biol Phys.* 1995;1:465–90.

- [42] 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.

Apéndice

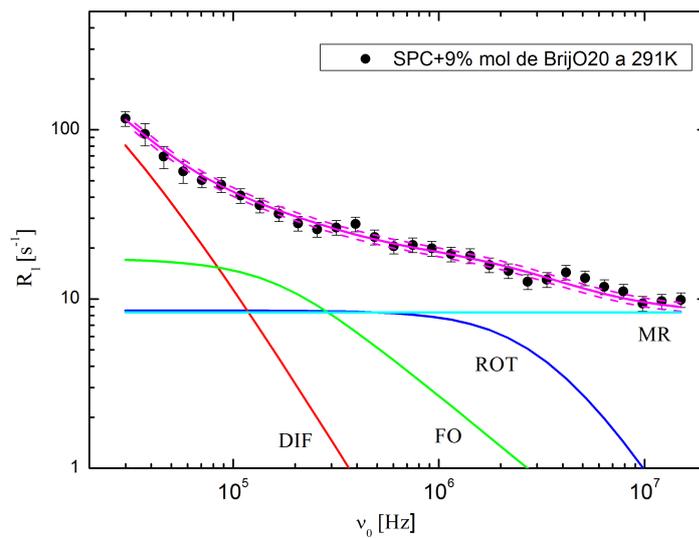


Figura 4.1: Dispersion experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+9%*mol* de BrijO20 a 291K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.2.

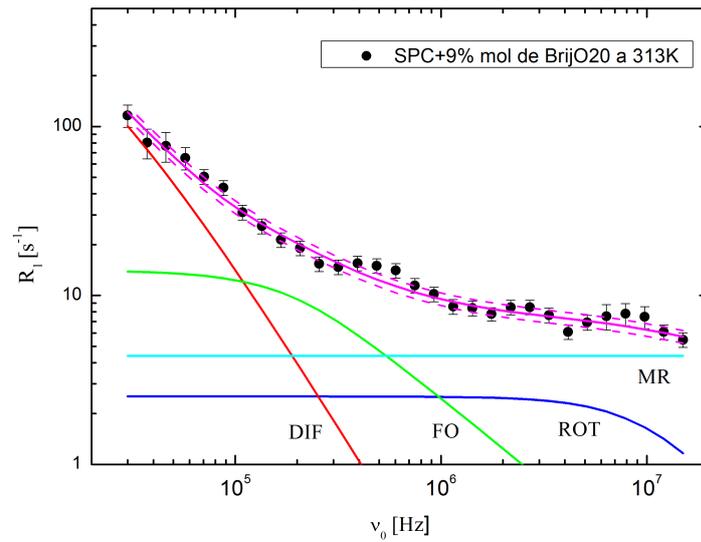


Figura 4.2: Dispersion experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+9%mol de BrijO20 a 313K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.2.

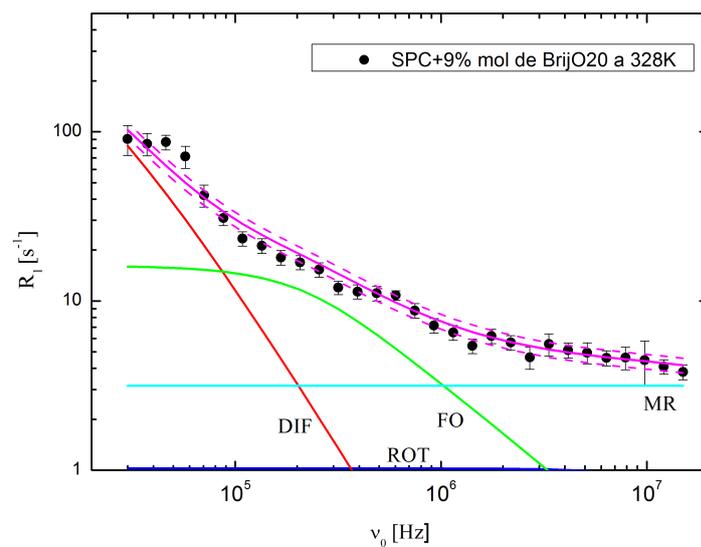


Figura 4.3: Dispersion experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+9%mol de BrijO20 a 328K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.2.

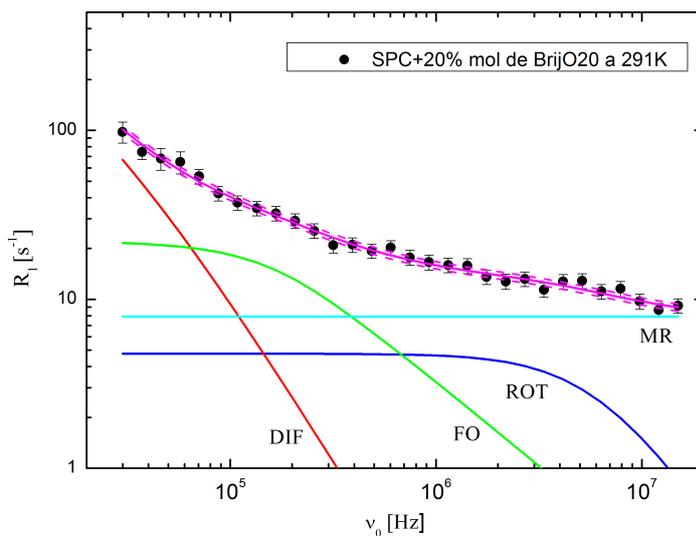


Figura 4.4: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de BrijO20 a 291K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.3.

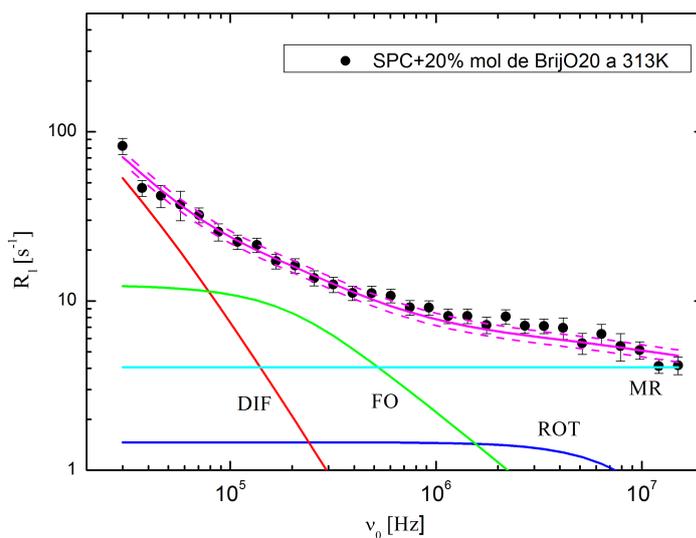


Figura 4.5: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de BrijO20 a 313K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.3.

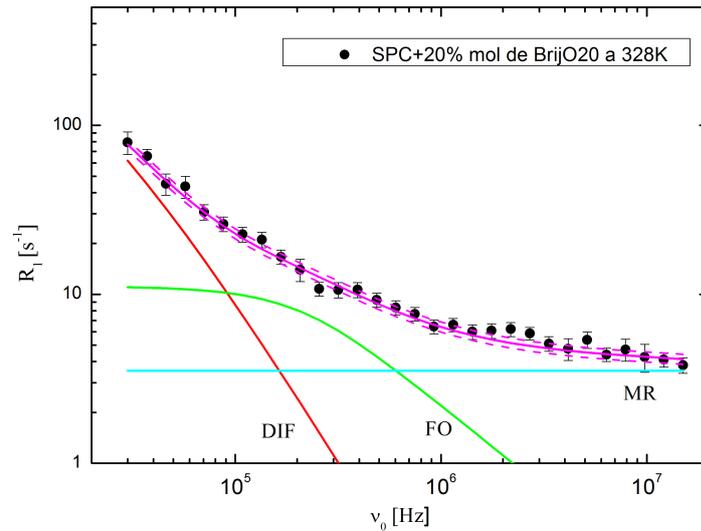


Figura 4.6: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de BrijO20 a 328K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.3.

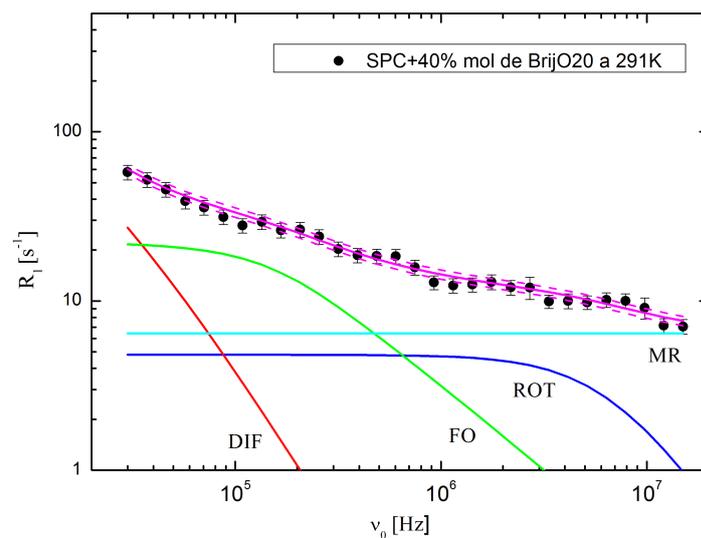


Figura 4.7: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+40%mol de BrijO20 a 291K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.4.

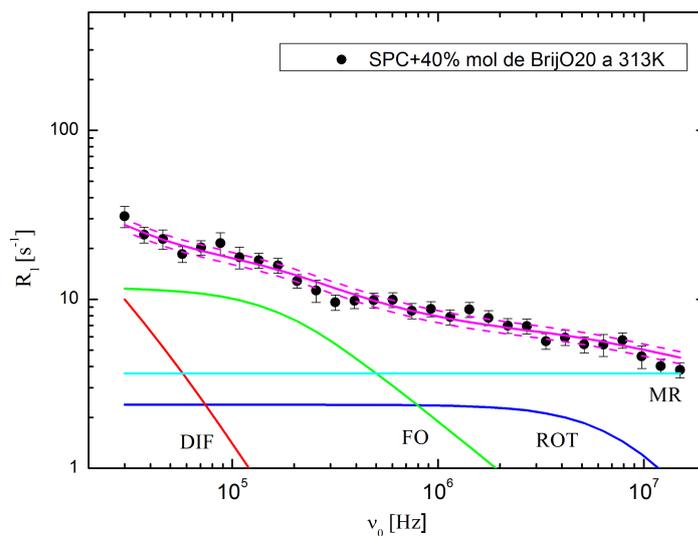


Figura 4.8: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+40%*mol* de BrijO20 a 313K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.4.

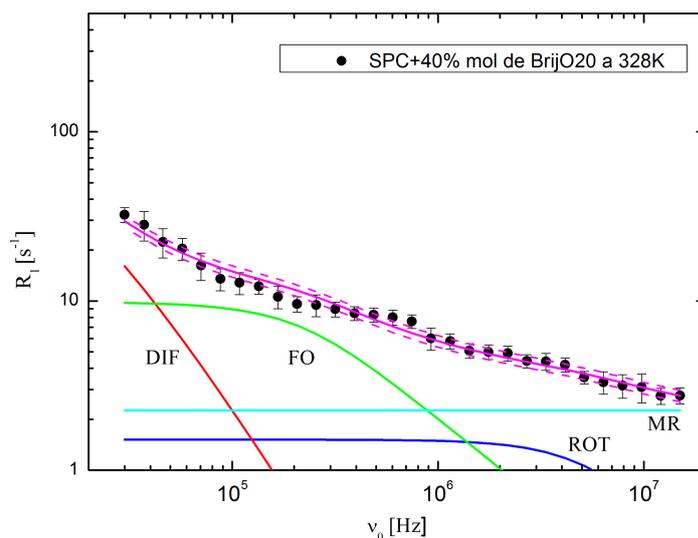


Figura 4.9: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+40%*mol* de BrijO20 a 328K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.4.

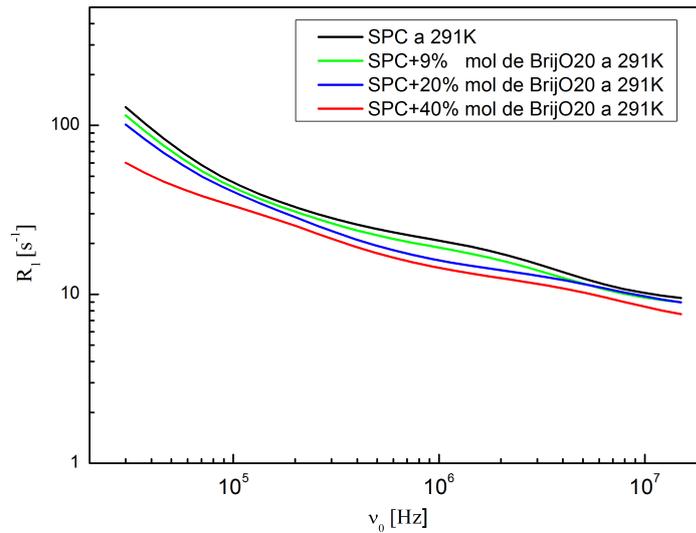


Figura 4.10: Ajustes correspondientes a las mediciones de la dispersion experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas compuestos de SPC y diferentes concentraciones molares de BrijO20 a 291K: 0%mol (negro), 9%mol (verde), 20%mol (azul), y 40%mol (rojo).

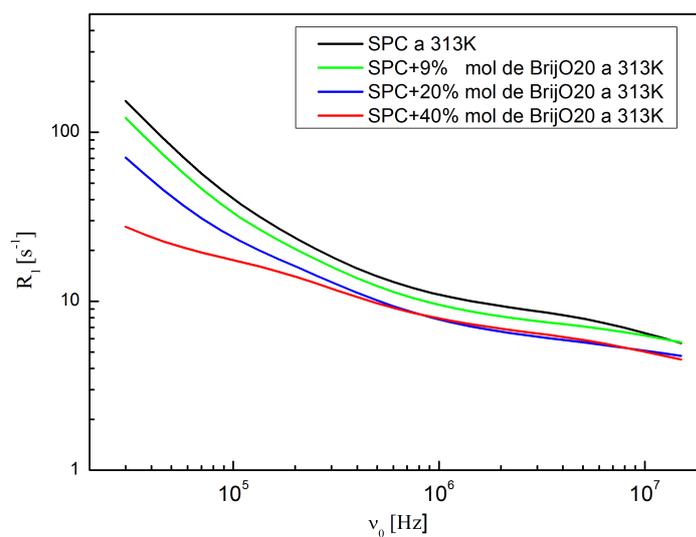


Figura 4.11: Ajustes correspondientes a las mediciones de la dispersion experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas compuestos de SPC y diferentes concentraciones molares de BrijO20 a 313K: 0%mol (negro), 9%mol (verde), 20%mol (azul), y 40%mol (rojo).

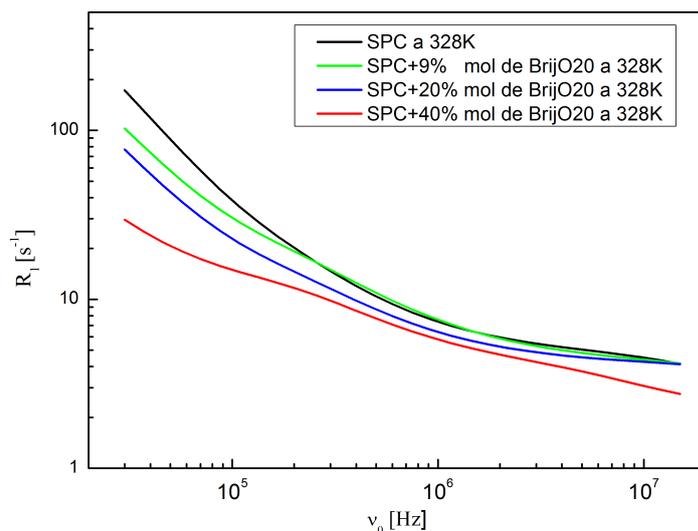


Figura 4.12: Ajustes correspondientes a las mediciones de la dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas compuestos de SPC y diferentes concentraciones molares de BrijO20 a 328K: 0%mol (negro), 9%mol (verde), 20%mol (azul), y 40%mol (rojo).

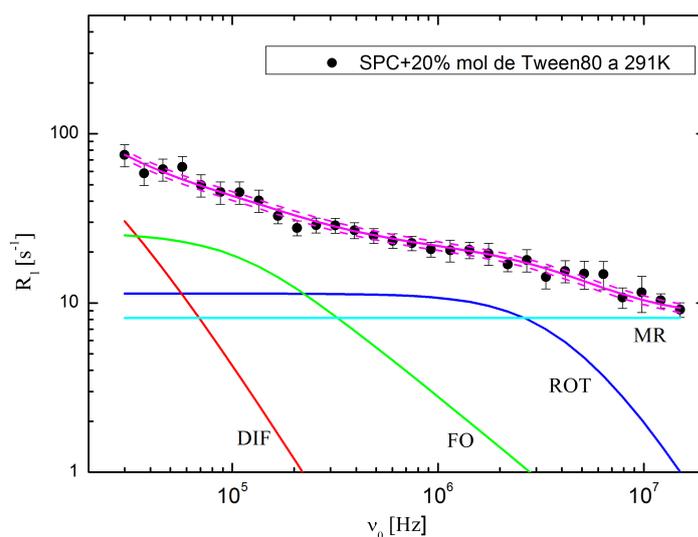


Figura 4.13: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de tween80 a 291K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.5.

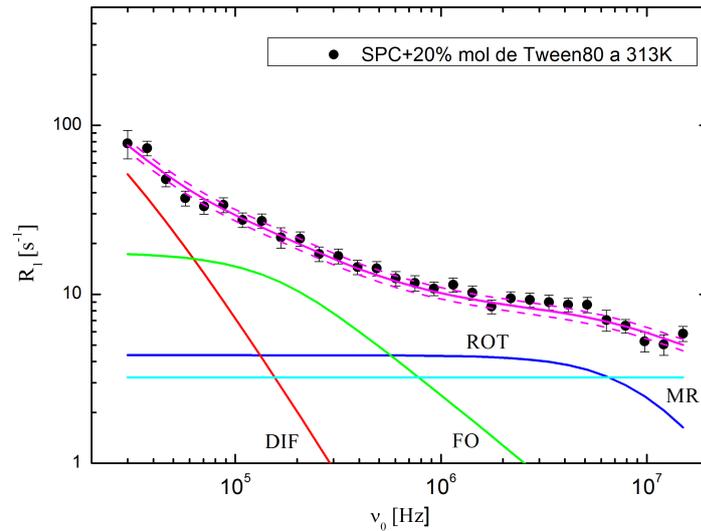


Figura 4.14: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de tween80 a 313K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.5.

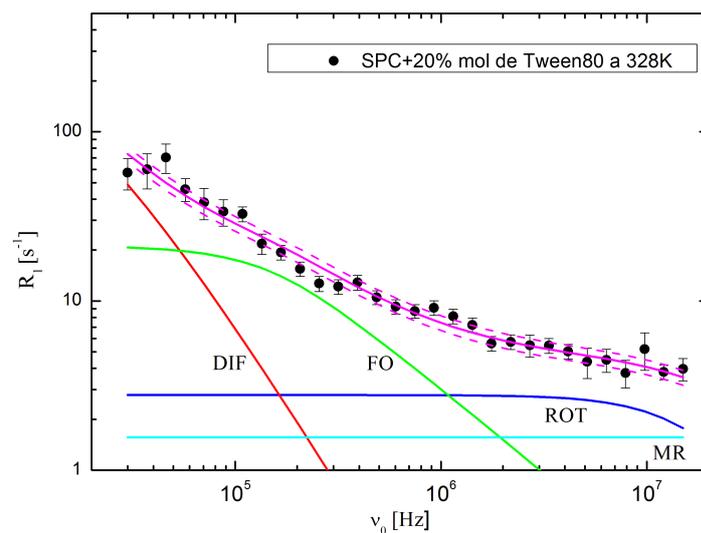


Figura 4.15: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de tween80 a 328K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.5.

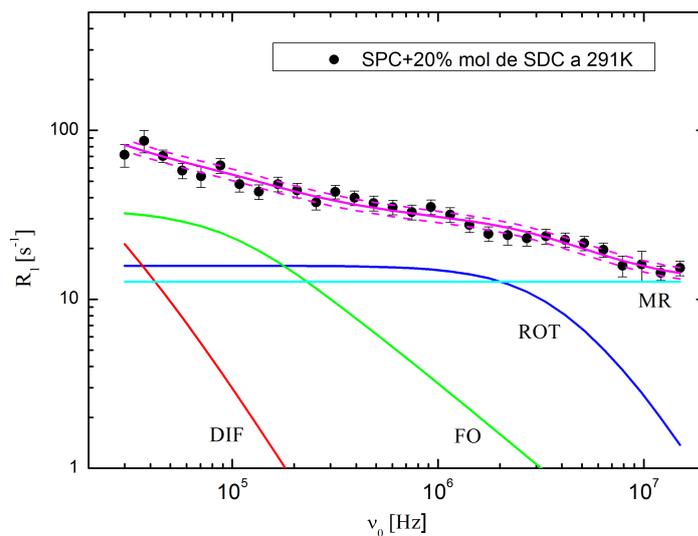


Figura 4.16: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de SDC a 291K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.6.

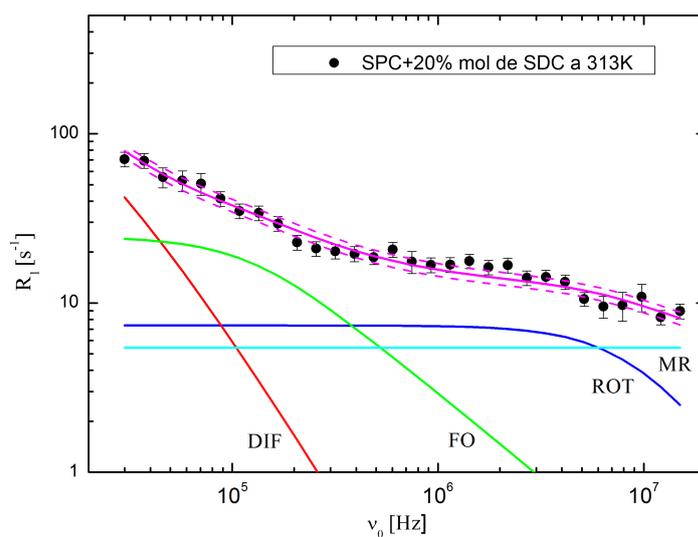


Figura 4.17: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de SDC a 313K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.6.

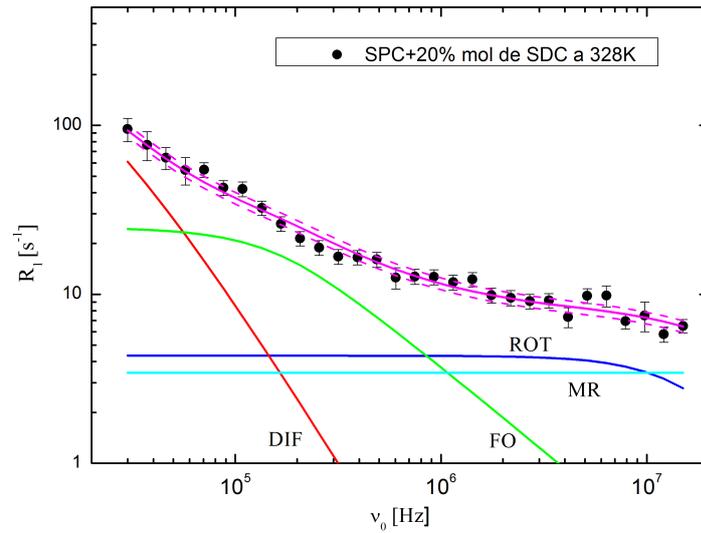


Figura 4.18: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC+20%mol de SDC a 328K (●). La curva de ajuste es mostrada en magenta. Las contribuciones para cada tipo de movimiento están incluidas: fluctuaciones de orden (verde), difusión (rojo), rotación (azul), y movimientos rápidos (cian). Los parámetros relevantes se muestran en la tabla 3.6.

Agradecimientos

La cantidad de gente que me ayudó en todo este camino es muchísima, seguro que me olvido de alguien..

Primero que nada quiero agradecer a mi mamá y mi papá por su apoyo incondicional en absolutamente todo y en todo momento. También a mi hermana por saber convivir con mis momentos de mal humor y ver una peli conmigo cada vez que me hizo falta. Gracias a mis cuatro abuelos, tíos, primo, y resto de la familia por todo el cariño que siempre hace falta.

Gracias Carla por todo tu tiempo apoyo y ayuda tanto en el trabajo como en las cuestiones ajenas al mismo, aprendí muchísimo y fue muy lindo trabajar con vos, disfruté mucho hacer cada parte del trabajo. Gracias por guiarme tan bien y por dejarme participar y escuchar mis ideas.

Infinitas gracias a todos mis profesores porque me enseñaron mucho más que física. Especialmente quiero mencionar a Clemar, Clyde, Alberto y Daín por ponerle tantas pilas, esfuerzo, pasión y buena onda a la docencia, gracias por toda su ayuda cada vez que los necesité no solo en lo académico sino también en lo personal. Gracias también a Anardo por la buena predisposición para ayudarme y guiarme todas las veces que lo necesité.

Gracias a los que fueron mis ayudantes, sobretodo a Nati Clementi y Nati Altamirano por guiarme y motivarme en primer año.

La pasé increíblemente bien todos estos años, hubiera sido imposible transitar este camino sin mis compañeros, mejor dicho mis amigos, gracias por toda su ayuda desinteresada en toodo. Gracias por compartir tantas horas de estudio y de mates y de asados y de charlas, son lo mas lindo que me llevo de este lugar, estoy increíblemente feliz de haberlos conocido, son gente muy bella y se armó un grupo hermoso, me pone muuy feliz. No los voy a nombrar a todos porque me voy a olvidar de alguno y no quiero, si leen esto algun día van a saber que estoy hablando de ustedes. No puedo no mencionarte Javi, sos un amigo increíble, gracias por taaaanto como siempre digo, no me alcanzarían los reglones para mencionar en todo lo que me ayudaste. Gracias Li sos incondicional, tambien me ayudaste un montón, compartimos tantas cosas, conocí una de esas amigas de las que son para siempre. Gracias Aru por todas tus recontra resuper pilas y buena onda, gracias por estar siempre en todas sos una amiga increíble, contagias ganas. Gracias Juan, Agus, Negro, Diego, Santi porque todos confiaron en mi mas que yo y me apoyaron desde

el principio. Gracias a Santi y Ompré por tantas horas de estudio y fin de semanas lindos. Gracias Jose, Ale, Barbarita, Sofi, Lupe, Nati son unas amigas hermosísimas estoy muy muy contenta de haberlas conocido, gracias por escucharme siempre y compartir tantas cosas. Gracias Fran y Santi por todas las lindas salidas a correr y demases, gracias Yamil por ser tan Yamil y bancarme siempre. Gracias a todos los que compartieron tiempo con migo de verdad que conocerlos fue lo mas lindo.

Gracias a la gente del LaRTE por toda la ayuda buena predisposición y buena onda, me sentí muy cómoda desde el primer día que empecé con el trabajo.

Gracias a todos los chicos del centro de estudiantes por toda su dedicación y esfuerzo por los demás, gracias a todos los no docentes en especial a María José y a Ignacio por toda la buena predisposición y ayuda.

Muchas gracias al tribunal por todo su tiempo y dedicacion al corregir mi trabajo.

Gracias a vos Co por ser mas que una amiga, y escucharme y aconsejarme tan bien siempre sos una hermana de la vida.

Gracias a todos mis otros amigos, Agus, Nati, y todo el resto, por saber comprender mi falta de tiempo.

Gracias a todas las familias amigas por acompañarme siempre, son mi familia también.

Y por supuesto gracias a la Universidad pública por dejarme vivir esta hermosa experiencia y haberme brindado esta oportunidad.