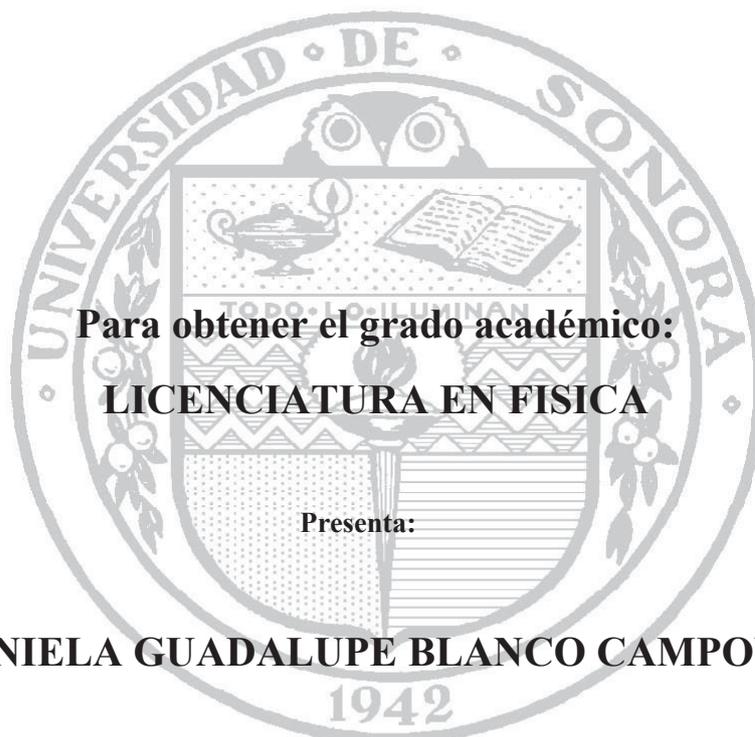


UNIVERSIDAD DE SONORA
DIVISIÓN DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Física

**INTERACCIÓN LIPOSOMA – ERITROCITO EN AMBIENTE
IÓNICO**



**Para obtener el grado académico:
LICENCIATURA EN FÍSICA**

Presenta:

DANIELA GUADALUPE BLANCO CAMPOY

Hermosillo, Sonora

Septiembre 2016

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



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

AGRADECIMIENTOS

En este presente trabajo quiero agradecer a mi papá Jaime y a mi mamá Rossy que sin ellos no estaría aquí, por el apoyo moral, económico y por creer en mí.

A mis hermanos Ana Karen y Jaime que me soportaron en esos días de estrés donde no me salían las gráficas en el Kaleidagraph.

A mi asesor de tesis, Dr. Ricardo López Esparza que sin él no estaría presentando este trabajo, por su (infinita) paciencia y dedicación.

A mis sinodales el Dr. Ramón Íñiguez Palomares, la C. Dra. Mónica Acosta Elías y al Dr. César Rodríguez Beas.

A mis amigos de la escuela, Dupont, Juan, Carlos, Juan Enrique, Paulina, Arturo, Sarahí, Yakxín, Luís, Enrique, Tadeo Alan, Darana, Mauro, que de seguro les pedí que me ayudaran con algo de la parte experimental de esta tesis o simplemente agradecerles por escucharme mientras me quejaba o lloraba porque no me salía algo.

A Sandra y a la Dra. Marisela Saldaña en el laboratorio de Biofísica Molecular, al Dr. Ramón Íñiguez y a la Dra. Ericka Rodríguez, en el laboratorio de Biomateriales, al Dr. Heriberto Acuña en el laboratorio de Termodinámica ya que ahí pasé gran parte del tiempo transcurrido en este trabajo de tesis y al Dr. Amir Maldonado. Agradezco el tiempo, material proporcionado, equipo y sabiduría que me han brindado.

Se agradece al grupo de Materia Condensada Blanda del Departamento de Física de la Universidad de Sonora, por facilitar el uso del equipo de Dispersión de Luz (BI-200SM).

Al Potter, Ricardo, Sandra, Jesús que fueron los donadores de sangre ya que permitieron ser pinchados, ¡por la ciencia!

Contenido	i
Índice de figuras	iv
Justificación	1
Objetivo general	2
Objetivos particulares	2
I. Generalidades	3
1.1 Fosfolípidos	3
1.1.2 Estructuras formadas por fosfolípidos	4
1.2 Liposomas	5
1.2.1 Morfología	5
1.2.2 Clasificación	6
1.3 Formación de liposomas y métodos de preparación	7
1.3.1 Hidratación	8
1.3.2 Sonicación	9
1.3.3 Extrusión	9
1.4 Eritrocitos	10
1.4.1 Morfología de eritrocitos	11
1.5 Interacciones y fenómenos asociados	14
1.5.1 Ósmosis	14
1.5.2 Tensión superficial	17
1.5.3 Interacciones de van der Waals	18
1.5.4 Interacciones de Coulomb	19
1.6 Sistema compuesto eritrocito + liposoma	23
1.6.1 Trabajos actuales: eritrocito membrana	23
II. Materiales y métodos	26
2.1 Moléculas y solventes	26
2.1.2 Método de preparación del solvente	28
2.1.3 Método de purificación de eritrocitos	28
2.1.4 Método de preparación de liposomas	29
2.2 Técnicas experimentales	30
2.2.1 Microscopía de contraste interdiferecial (DIC)	30
2.2.2 Dispersión dinámica de la luz (DLS)	34
2.2.2.1 Experimento de dispersión	35
2.2.2.2 Expansión de cumulantes	37

2.2.2.3	Característica del equipo experimental	38
2.2.3	Aplicación de campo eléctrico sinusoidal a eritrocitos	39
III.	Resultados y discusión	41
3.1	Mediciones y observaciones preliminares	41
3.1.1	pH y conductividad de solvente	41
3.2	Microscopía Óptica (DIC)	42
3.2.1	Liposomas DPPC	43
3.2.1.1	Liposomas en buffer	43
3.2.1.2	Liposomas en medio hipotónico	44
3.2.1.3	Liposomas en medio isotónico	44
3.2.1.4	Liposomas en medio hipertónico	45
3.2.2	Eritrocitos	46
3.2.2.1	Eritrocitos en buffer	47
3.2.2.2	Eritrocitos en medio hipotónico	48
3.2.2.3	Eritrocitos en medio isotónico	51
3.2.2.4	Eritrocitos en medio hipertónico	52
3.2.3	Eritrocitos + liposomas	53
3.2.3.1	Eritrocitos + liposomas en buffer	53
3.2.3.2	Eritrocitos + liposomas en medio hipotónico	55
3.2.3.3	Eritrocitos + liposomas en medio isotónico	57
3.2.3.4	Eritrocitos + liposomas en medio hipertónico	59
3.2.4	Discusión de resultados de DIC	61
3.3	Dispersión dinámica de la luz (DLS)	62
3.3.1	Liposomas en buffer	64
3.3.2	Liposomas en medio hipotónico	65
3.3.3	Liposomas en medio isotónico	65
3.3.4	Liposomas en medio hipertónico	66
3.3.5	Discusión de resultados de DLS	69
3.4	Eritrocitos en campo eléctrico sinusoidal	70
3.4.1	Discusión de resultados de campo eléctrico sinusoidal	71
IV.	Conclusiones y perspectivas	73
V.	Bibliografía	75

VI.	Anexos	77
	Anexo I	77
	Anexo II	84
	Anexo III	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Dibujo de fosfolípido	4
Figura 1.2	Estructuras formadas por fosfolípidos	5
Figura 1.3	Tipos de liposomas	7
Figura 1.4	Pasos de preparación de liposomas por el método de hidratación	8
Figura 1.5	Extrusor utilizado para preparación de liposomas nanométricos	10
Figura 1.6	Dibujo de un eritrocito en ambiente fisiológico	11
Figura 1.7	Acantocitos	12
Figura 1.8	Eliptocitos	12
Figura 1.9	Esferocitos	13
Figura 1.10	Megalocitos	13
Figura 1.11a	Eritrocito en medio isotónico	16
Figura 1.11b	Eritrocito en medio hipotónico	16
Figura 1.11c	Eritrocito en medio hipertónico	16
Figura 1.12	Fuerzas de interacción entre moléculas de agua en el interior del líquido y en la interface líquido-vapor	17
Figura 1.13	Diferentes expresiones de la interacción de van der Waals dependiendo de la geometría del sistema	19
Figura 1.14	Diagrama esquemático de algunos sistemas moleculares	20
Figura 1.15	Distribución de contraiones en una doble capa eléctrica	21
Figura 2.1	Estructura molecular de la molécula de DPPC	26
Figura 2.2	HEPES ácido y básico utilizados para lograr un solvente con pH de 7.6	27
Figura 2.3	Esquema de la óptica de un microscopio DIC	31
Figura 2.4	Formación de una imagen de DIC	33
Figura 2.5	Esquema de un experimento de dispersión de luz	35
Figura 2.6	Porta ITOs, construido para la aplicación de campo eléctrico	39
Figura 2.7	Arreglo experimental para aplicar un campo eléctrico a eritrocitos	40
Figura 3.1	Imagen de microscopía óptica DIC. Liposomas en buffer	43
Figura 3.2	Imagen de microscopía óptica DIC. Liposomas en medio hipotónico	44
Figura 3.3	Imagen de microscopía óptica DIC. Liposomas en medio isotónico	45
Figura 3.4	Imagen de microscopía óptica DIC. Liposomas en medio hipertónico	46
Figura 3.5a	Imagen de microscopía óptica 20x. Eritrocitos en buffer	47
Figura 3.5b	Histograma de tamaños para eritrocitos en buffer	48

Figura 3.6a	Imagen de microscopía óptica DIC. Eritrocitos en medio hipotónico	49
Figura 3.6b	Histograma de tamaños para eritrocitos en medio hipotónico	50
Figura 3.7a	Imagen de microscopía óptica DIC. Eritrocitos en medio isotónico	50
Figura 3.7b	Histograma de tamaños para eritrocitos en medio isotónico	51
Figura 3.8a	Imagen de microscopía óptica DIC. Eritrocitos en medio hipertónico	52
Figura 3.8b	Histograma de tamaños para eritrocitos en medio hipertónico	53
Figura 3.9a	Imagen de microscopía óptica 20x. Eritrocitos + liposomas en buffer	54
Figura 3.9b	Histograma de eritrocitos + liposomas en buffer	55
Figura 3.10a	Imagen de microscopía óptica DIC. Eritrocitos + liposomas en medio hipotónico	56
Figura 3.10b	Histograma de eritrocitos + liposomas en medio hipotónico	57
Figura 3.11a	Imagen de microscopía óptica DIC. Eritrocitos + liposomas en medio isotónico	58
Figura 3.11b	Histograma de eritrocitos + liposomas en medio isotónico	59
Figura 3.12a	Imagen de microscopía óptica DIC. Eritrocitos + liposomas en medio hipertónico	60
Figura 3.12b	Histograma de eritrocitos + liposomas en medio hipertónico	61
Figura 3.13a	Intensidad de dispersión vs tiempo en un experimento de DLS	63
Figura 3.13b	Función de correlación típica de DLS	63
Figura 3.14	Gráfica Γ vs q^2 para liposomas en buffer	64
Figura 3.15	Gráfica Γ vs q^2 para liposomas en medio hipotónico	65
Figura 3.16	Gráfica Γ vs q^2 para liposomas en medio isotónico	66
Figura 3.17	Gráfica Γ vs q^2 para liposomas en medio hipertónico	67
Figura 3.18	Gráficas de Coeficiente de Difusión vs [NaCl]	68
Figura 3.19	Radio hidrodinámico por gráficas Γ vs q^2	68
Figura 3.20a	Eritrocitos en buffer aplicando un campo eléctrico	70
Figura 3.20b	Eritrocitos en medio hipotónico aplicando un campo eléctrico	70
Figura 3.20c	Eritrocitos en medio isotónico aplicando un campo eléctrico	70
Figura 3.20d	Eritrocitos en medio hipertónico aplicando un campo eléctrico	70
Figura 3.21a	Eritrocitos + liposomas en buffer aplicando un campo eléctrico	71
Figura 3.21b	Eritrocitos + liposomas en medio hipotónico aplicando un campo eléctrico	71
Figura 3.21c	Eritrocitos + liposomas en medio isotónico aplicando un campo eléctrico	71
Figura 3.21d	Eritrocitos + liposomas en medio hipertónico aplicando un campo eléctrico	71

JUSTIFICACIÓN

El estudio de la interacción de membranas biológicas con macromoléculas en medio acuoso es importante ya que ayuda a comprender fenómenos biológicos como la fusión celular, el intercambio de iones y la difusión de moléculas al interior o exterior de la célula, la formación de balsas lipídicas, entre otros. Históricamente, esta importancia se ejemplifica con el estudio del eritrocito ($5 - 8 \mu m$ de diámetro) y el descubrimiento de que la membrana es una bicapa lipídica con proteínas transmembranales ancladas en ella. Tal descubrimiento llevó a la propuesta del mosaico fluido y sus posteriores adecuaciones a medida que se fueron obteniendo resultados experimentales por técnicas avanzadas. Por otra parte, la importancia del eritrocito, como célula, se hace notar en las propiedades mecánicas de su membrana. Una de estas propiedades, la elasticidad (módulo elástico), le permite al eritrocito cambiar su forma para pasar por capilares estrechos ($2 - 3 \mu m$ de diámetro) del sistema circulatorio, de modo que transporta oxígeno a los diferentes órganos del cuerpo de una manera eficiente. Las propiedades mecánicas de membrana, dependen del tipo de moléculas que la conforman y del tipo de solvente que le rodea. Así, en el caso del eritrocito, la proporción lípido/proteína le permite tener un alto valor del módulo elástico de membrana y adoptar la forma de disco bicóncavo cuando la concentración de iones es la misma en el interior y exterior del eritrocito. Sin embargo, esta forma cambia cuando se tienen concentraciones diferentes en el interior y exterior. Abordar de nuevo las interacciones eritrocito liposoma es de importancia así nos ayuda a proponer un modelo para la fusión celular y la formación de eritrocitos deformados, al final del Capítulo I exponemos algunos trabajos actuales que se han realizado con el sistema: eritrocito, liposoma, eritrocito + liposoma.

Objetivo general

Estudiar la interacción eritrocito liposoma en ambiente iónico.

Objetivos particulares

Caracterizar los cambios morfológicos del eritrocito en presencia de liposomas de tamaño nanométrico a pH constante y diferentes concentraciones salinas.

Determinar la influencia de iones en la estabilidad de eritrocitos a pH constante y diferentes concentraciones iónicas.

Estudiar la estabilidad de eritrocitos a pH contante y bajo la influencia de un campo eléctrico.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

Introducción.

En este capítulo presentamos generalidades sobre las moléculas que conforman la membrana celular y algunos aspectos teóricos que permiten comprender la interacción de la membrana con la macromolécula en ambiente iónico.

1.1 Fosfolípidos

Los fosfolípidos están compuestos por una parte hidrofóbica (colas apolares) y una parte hidrofílica (cabeza polar) como se muestra en la Figura 1.1. La cabeza polar está compuesta por un grupo fosfato (cargado negativamente) unido a otro grupo como la colina (cargado positivamente). Por otra parte, las colas apolares están compuestas por una cadena de hidrocarburos, a las cuales se les pueden incorporar diferentes ácidos grasos.

Las moléculas de fosfolípido son los principales componentes de la membrana biológica. Poseen la capacidad de desplazarse en el interior de ésta, gran parte debido al grado de saturación química de las colas hidrocarbonadas que conforman su estructura. El grado de saturación química es un factor que determina la fluidez de la membrana y se define por la cantidad de enlaces dobles en las cadenas de hidrocarburos. Un hidrocarburo (o hidrato de carbono) se considera saturado si no contiene enlace doble, e insaturado si presenta al menos uno [1].

Un tipo particular de fosfolípido, *dipalmitoífosfatidilcolina*, actúa en el funcionamiento de los pulmones, ya que requiere un aporte constante de estas moléculas para mantener la elasticidad de los tejidos pulmonares y la humedad necesaria para una respiración adecuada [2].

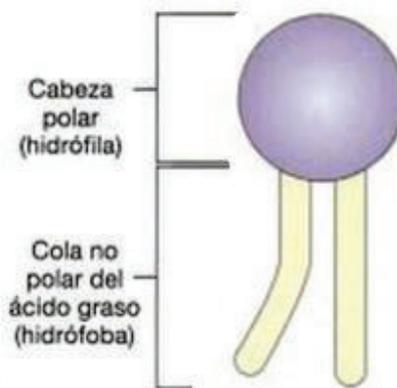


Figura 1.1 Dibujo de fosfolípido mostrando las regiones hidrofóbicas (cola apolar) e hidrofílica (cabeza polar) [1].

1.1.2 Estructuras formadas por fosfolípidos

Los fosfolípidos juegan un papel muy importante en la membrana celular, ya que controlan la transferencia de moléculas al interior o exterior de la célula [3].

La estructura que tienen las moléculas de fosfolípido hace posible que participen en el intercambio de sustancias entre un sistema acuoso y uno lipídico. En medio acuoso, las colas de los fosfolípidos tienden a formar un ambiente hidrofóbico que impide las interacciones con el agua. Así, las moléculas de fosfolípido dejan sus extremos hidrófilos en contacto con el agua y se autoensamblan formando micelas, bicapas (lamelas), liposomas y fase esponja (Figura 1.2) [4]. Estas estructuras contienen una gran cantidad de fosfolípidos y han servido como sistemas modelo para estudiar diversos fenómenos celulares como la difusión confinada de proteínas transmembranales, transporte de iones, elasticidad de membranas, etc.

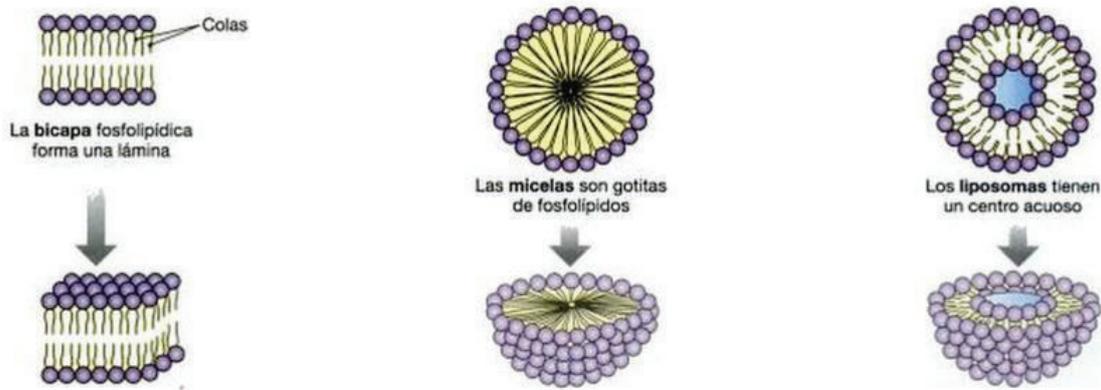


Figura 1.2 Estructuras formadas por fosfolípidos: a) micela, b) bicapas, c) liposomas [1].

1.2 Liposomas

Los liposomas son sistemas cerrados compuestos por fosfolípidos en forma de bicapas concéntricas separadas por compartimientos acuosos [5].

Por su compatibilidad con los sistemas biológicos, los liposomas tienen gran importancia en la investigación, ya que la membrana de los liposomas sirve como modelo para estudiar la interacción de proteínas con el citoplasma, la difusión molecular y la fusión celular. De igual manera, han sido utilizados para medir la elasticidad de membranas y la formulación de teorías que permiten explicar fenómenos a nivel celular, teniendo múltiples aplicaciones en la industria cosmética y farmacéutica [6].

1.2.1 Morfología

Existen diferentes factores que intervienen en la morfología que adoptan los liposomas; uno de ellos es el método de preparación. Para la formación de liposomas del orden de 1-10 micras de diámetro se requiere utilizar el método de hidratación; para disminuir el tamaño a

varios nanómetros y tener una muestra monodispersa, se trabaja con el método de sonicación. Detallaremos estos métodos en el Capítulo II.

Los liposomas elaborados por hidratación se pueden observar mediante Microscopía Óptica o Contraste de Interferencia Diferencial y son muy útiles para estudiar la interacción membrana macromolécula mediante técnicas como pinzas ópticas o micropipetas.

Existen otros parámetros importantes para controlar la formación de liposomas, como la concentración de fosfolípidos, la temperatura de transición del fosfolípido, pH y sales presentes. La combinación de estas variables puede llevar a la coexistencia de liposomas esféricos, cilíndricos, helicoidales, combinación cilindro y agregados [7].

Los liposomas, como las micelas, no son estructuras rígidas o estáticas. Las moléculas que conforman las bicapas de moléculas de fosfolípidos del liposoma entran y salen de la estructura manteniendo un radio promedio. Así, las moléculas se difunden a lo largo de la bicapa debido al movimiento browniano y otras se trasladan de una monocapa (perpendicular a la bicapa) a otra en un proceso difusivo denominado flip - flop. Por otra parte, el liposoma, se mueve en el solvente como resultado de las fluctuaciones térmicas e interactúa con los demás liposomas por medio de interacciones de van der Waals, eléctricas o entrópicas [8].

1.2.2 Clasificación

De acuerdo a las características estructurales de los liposomas ya sea el número de bicapas y/o tamaño, se pueden clasificar en *multilamelares* y *unilamelares* (Figura 1.3) [7]. Las vesículas multilamelares (MLVs, del inglés *Multi Lamellar Vesicles*). Se caracterizan en poseer múltiples bicapas (membranas) concéntricas, tipo cebolla, separadas entre sí por un espacio acuoso de aproximadamente 5 nm de espesor. Sus diámetros varían entre 1 -10 µm. Por otra parte, las vesículas *unilamelares* poseen un compartimento central polar y una sola bicapa lipídica. Se clasifican en *vesículas unilamelares grandes* (LUVs, del inglés *Large Unilamellar*

Vesicles) con tamaños del orden de 100 – 500 nm y gran capacidad de encapsulación de moléculas, y *vesículas unilamelares pequeñas* (SUVs, del inglés *Small Unilamellar Vesicles*) con tamaños menores a 100 nm. Suelen obtenerse por tratamiento de una suspensión de MLVs con ultrasonido [8].



Figura 1.3 Tipos de liposomas [9].

1.3 Formación de liposomas y métodos de preparación

Los liposomas se forman a una temperatura superior a la de transición (T_c) de los fosfolípidos que los constituyen. Al aumentar la temperatura de éstos se produce un aumento en la movilidad de las colas apolares de los fosfolípidos, hacia un estado líquido cristalino en el que la fluidez aumenta, produciendo un incremento en la libertad rotacional y en el área por lípido de las cadenas [3].

Al ser hidratadas una o varias películas delgadas de fosfolípidos se separan durante la agitación uniendo sus extremos a lo largo, las vesículas multilamelares interactúan con el hidrocarbano de la bicapa en los bordes. Entonces, una vez que las partículas se formaron, se puede reducir el tamaño de la partícula.

Para la obtención de liposomas a diferentes tamaños existen diferentes tipos de métodos de formación de liposomas que a continuación presentaremos.

1.3.1 Hidratación

Para este método, los liposomas se preparan con una mezcla de lípidos (fosfolípidos) disueltos en un solvente orgánico para obtener una mezcla homogénea éstos. Comúnmente se utiliza cloroformo.

Las soluciones de lípidos son preparadas típicamente a una concentración entre 10 y 20 mg/ml de solvente orgánico. Una vez que los lípidos se mezclan con el solvente, éste es removido mediante el secado en la campana de vacío durante 3 horas, para así formar una película de lípidos. También se puede evaporar mediante el uso de nitrógeno o argón (para volúmenes pequeños) o mediante un rotavapor (para volúmenes grandes y pequeños). La película de lípido se obtiene removiendo el residuo de solvente orgánico colocado en el vial para después hidratarla añadiendo un medio acuoso al contenedor. El producto mediante el método de hidratación son vesículas grandes y multilaminares (LMV) (Figura 1.4) [10 – 11].

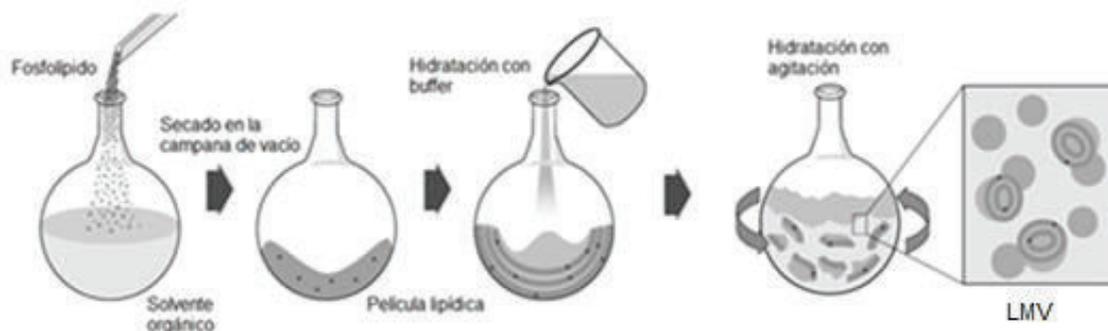


Figura 1.4. Pasos de preparación de liposomas por el método de hidratación [10].

1.3.2 Sonicación

Este método es tal vez el más utilizado para la preparación de vesículas pequeñas unilamelares. La desventaja de este método es que, existe una posible degradación de los fosfolípidos y de los compuestos a encapsular. Consiste en aplicar vibraciones de alta intensidad que generan ultrasonido para agitar las partículas de una muestra, sonicar vesículas LMV produce pequeñas vesículas unilamelares SUV. [10 – 12].

Hay dos técnicas de sonicación:

- a) Sonda de ultrasonido. La superficie de la muestra con liposomas se pone en contacto con una punta que genera intensidad. Mayor superficie, baja intensidad de ultrasonido.
- b) Baño ultrasónico. La dispersión de los liposomas en un recipiente tiene lugar en un baño ultrasónico, controlando la temperatura de transición del lípido.

1.3.3 Extrusión

Este método empieza cuando finaliza el de hidratación; una vez obtenida la muestra, se hace pasar por un extrusor como el señalado en la Figura 1.5 y se sigue el protocolo que a continuación se indica: las vesículas unilamelares se hacen pasar por un filtro de un tamaño de poro definido donde se hidrata la pieza de teflón con el búfer a utilizar, se colocan dos filtros de soporte en el centro de las piezas de soporte de membrana interna, se añade una gota de agua antes de colocar la membrana con el diámetro requerido, y después se coloca la membrana en la parte más alta del metal, se acoplan las dos piezas de metal y se colocan en el soporte.

Se instala una jeringa de un lado del extrusor como se muestra en la Figura 1.5 y se llena la otra jeringa con el fosfolípido hidratado. Entonces, este método consiste en pasar de una jeringa a otra mediante la membrana el fosfolípido hasta observarlo más claro (se

recomienda realizar esto aproximadamente doce veces). El tamaño de los liposomas depende del filtro de tamaño de poro definido por el que se hace pasar la muestra [10 – 12].



Figura 1.5. Extrusor utilizado para preparación de liposomas nanométricos.

1.4 Eritrocitos

Los eritrocitos (también llamados glóbulos rojos o hematíes), son los elementos más numerosos en la sangre. La hemoglobina es uno de sus principales componentes, y su función es transportar el oxígeno hacia los diferentes tejidos del cuerpo. Los eritrocitos de los mamíferos, carecen de núcleo y de mitocondrias, así facilitando el transporte de oxígeno ya que ocupan menor gasto de energía.

El eritrocito normal tiene la forma de un disco bicóncavo de $7.8 \mu m$ de diámetro, y $\sim 0.5 \mu m$ de espesor (Figura 1.6) [13]. Su citoplasma contiene en mayor parte el pigmento hemoglobina, una proteína que le concede su característico color rojo y es la responsable del transporte de oxígeno.

El eritrocito está compuesto por fosfolípidos como fosfatidilcolina (lecitina) 13%, esfingomielinina 26%, fosfatidiletanolamina (cefalina) 27%, fosfatidilinositol y proteínas como la espectrina y ancrina.

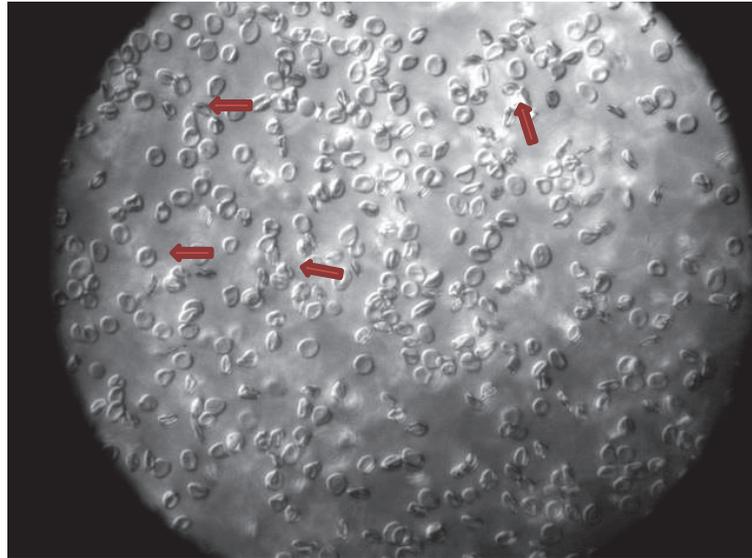


Figura 1.6. Eritrocito bicóncavo.

La membrana del eritrocito contiene proteínas y glucoproteínas incrustadas en el fluido de la bicapa lipídica que le otorga un comportamiento viscoelástico. Las glucoproteínas siálicas (ácido siálico) son las responsables de que adquiera una superficie negativamente cargada generando una fuerza de repulsión, denominada potencial zeta [14].

La proporción 1:1 (aproximadamente) entre fosfolípidos y proteínas de la membrana es importante para mantener las propiedades mecánicas de la membrana celular y su permeabilidad selectiva.

1.4.1 Morfología de eritrocitos

La morfología de los eritrocitos se altera por factores fisicoquímicos, enfermedades y cambios de presión osmótica. Entre las formas de eritrocitos anormales más frecuentes se encuentran [15]:

Los acantocitos (Figura 1.7) del griego *acantha* que significa espina. La forma de estos eritrocitos se observa en numerosos estados patológicos en los cuales existen alteraciones debido a los lípidos de la membrana, modificando la relación colesterol/fosfolípidos en ciertas zonas de la membrana de modo que la viscosidad de la membrana aumenta y por consiguiente, disminuye su fluidez hasta causar la deformabilidad.

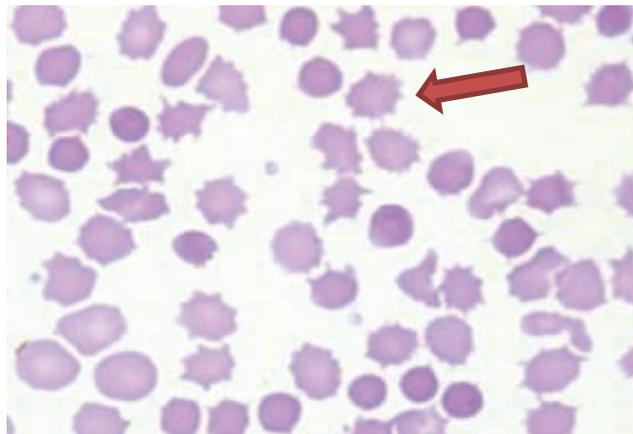


Figura 1.7 Acanthocitos. Glóbulos rojos con múltiples proyecciones de la membrana celular y su presencia se asocia con padecimientos hepáticos [16].

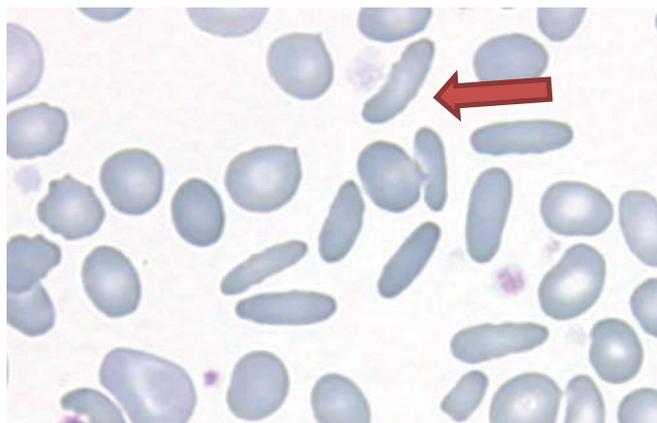


Figura 1.8. Eliptocitos. Eritrocitos de forma elíptica y el defecto puede ser heredado o adquirido. Están relacionados con distintos tipos de anemias [17].

Por otro lado, están los *eliptocitos* (Figura 1.8) que se presentan en forma de disco bicóncavo oval con polarización de la hemoglobina. La forma de estos eritrocitos está relacionada con las proteínas de esqueleto de membrana.

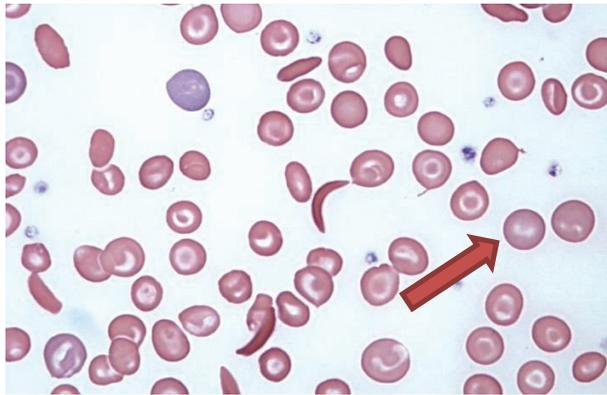


Figura 1.9. Esferocitos. El disco adopta configuración esferoidal. Cuando el volumen de los glóbulos rojos disminuye, se debe a la esferocitosis hereditaria [18].

También están los *esferocitos* (Figura 1.9), células rojas casi de forma esférica y se presentan en la esferocitosis hereditaria causada por mutaciones en los genes que transcriben una proteína llamada espectrina y otras proteínas de la membrana del hematíe. Estas proteínas son necesarias para mantener la forma del hematíe de modo que estos defectos disminuyen la elasticidad de membrana.

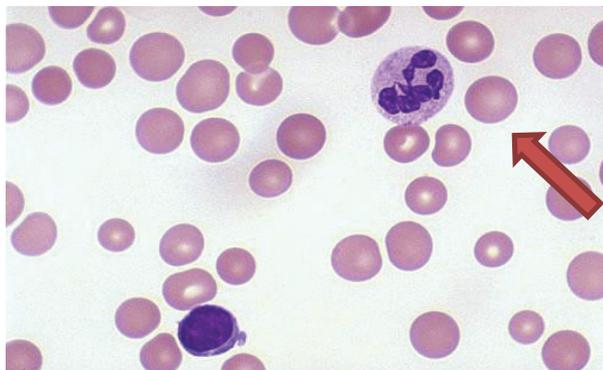


Figura 1.10. Megalocitos que se presentan en las anemias megaloblásticas [18].

Finalmente tenemos al megalocito (Figura 1.10) que significa “glóbulo rojo de gran tamaño”, con dimensiones entre 12 y 13 μm . Se observan en la sangre de los embriones y en anemias.

1.5 Interacciones y fenómenos asociados

Una interacción es la fuerza que existe entre dos o más cuerpos. Las interacciones fundamentales son la fuerza gravitacional, electromagnética, fuerzas débiles y fuertes. En sistemas coloidales y biofísicos las interacciones más importantes son las fuerzas intermoleculares. Algunas interacciones pueden asociarse al carácter estadístico del sistema y el movimiento de las moléculas en el mismo.

A continuación, hablaremos de forma breve de las interacciones que se abordan en el presente trabajo y fenómenos importantes para entender los cambios de forma de los eritrocitos. Entre estos fenómenos está la ósmosis que es fundamental para comprender su estabilidad estructural.

1.5.1 Ósmosis

La ósmosis toma un papel muy importante en los procesos biológicos ya que el transporte del agua (como disolvente) y otras moléculas a través de las membranas biológicas, es esencial en muchos procesos de los organismos vivos. De acuerdo al medio en que se encuentre una célula, la ósmosis varía. La función de la ósmosis es mantener hidratada a la membrana celular [19].

La membrana celular tiene propiedades que permiten el paso controlado de sustancias a su interior. En el interior de la célula se encuentra el citoplasma, compuesto por una solución acuosa viscosa (proteínas solubles, azúcares, iones y aminoácidos) que cuando la célula (en este caso el eritrocito) es expuesta a un medio de diferentes concentraciones de soluto (en

nuestro caso cloruro de sodio, NaCl), la membrana permite la entrada y salida de soluto, hasta alcanzar el equilibrio, dentro y fuera de la membrana.

En un medio *isotónico*, las presiones dentro y fuera de la célula son iguales, por lo que la concentración en sal es la misma (1.54 mM), así el volumen del eritrocito no se altera (Figura 1.11a). Se dice que los eritrocitos se encuentran naturalmente en un medio isotónico por eso, los sueros que se aplican por intravenosa son isotónicos.

Para el *medio hipotónico*, la solución contiene una baja concentración de soluto (0.68 mM), en comparación a la del citoplasma. La presión en el interior de la célula es menor que en el exterior (Figura 1.11b). De esta manera la célula se hincha y el agua difunde desde afuera hacia el interior de la célula.

Por otra parte, en un medio *hipertónico*, la concentración es más elevada (3.08 mM) fuera de la célula que, en el interior, así, la presión en el exterior es menor que en el interior (Figura 1.11c). Esto lleva a que la célula se deshidrate de modo que el agua fluya del interior al exterior. La formación de otras formas como las que hemos mencionado anteriormente no son fáciles de explicar si se toma en cuenta únicamente la presión osmótica. Para ellos se requiere considerar modelos que tomen en cuenta la rigidez de membrana y presencia de aglomerados (balsas lipídicas, por ejemplo). Los fundamentos físicos del ósmosis se presentan en el Anexo I.

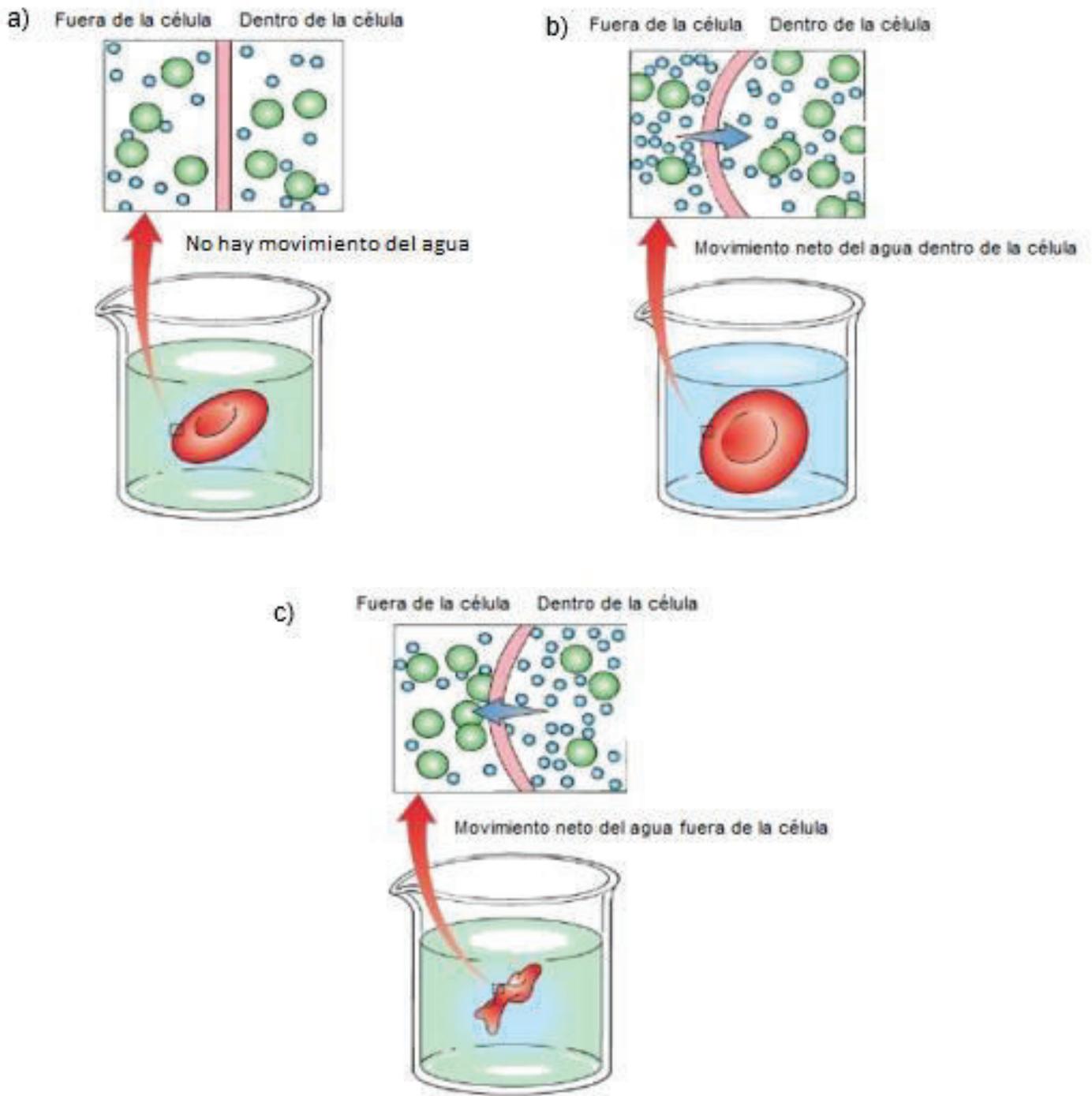


Figura 1.11. Eritrocito en distintos medios: a) isotónico, b) hipotónico, c) hipertónico [20].

1.5.2 Tensión superficial

Otro de los parámetros importantes para entender la morfología de eritrocitos y liposomas es la tensión superficial. El fenómeno de tensión superficial se puede explicar mediante el hecho de que un líquido actúa como si estuviera bajo tensión, la cual actúa paralelamente a la superficie, surge de las fuerzas de atracción entre las moléculas (Figura 1.12). Las fuerzas que presentan las moléculas que están en el interior del líquido se anulan. Mientras que las moléculas que se encuentran en la interface líquido-vapor experimentan una fuerza tangencial con respecto a la superficie que contrae el líquido [21].

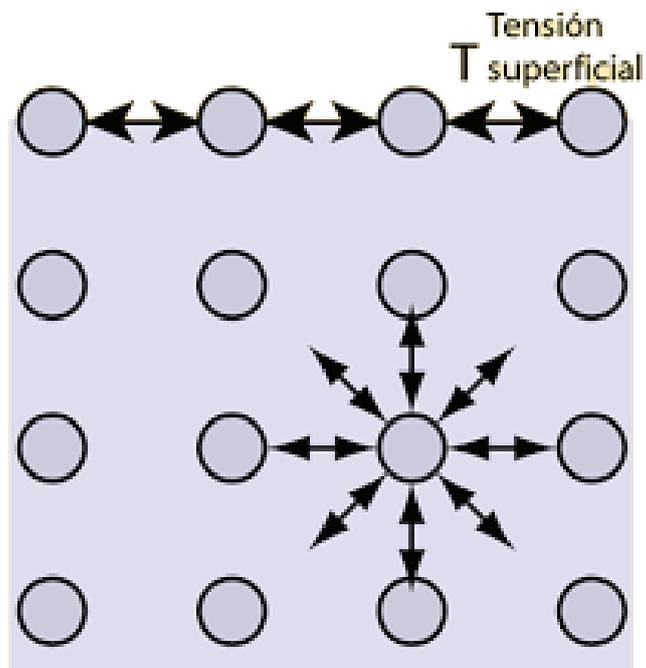


Figura 1.12. Fuerzas de interacción entre moléculas de agua en el interior del líquido y en la interface líquido-vapor [21].

Esta cantidad se define como la fuerza F por unidad de longitud ℓ que actúa de forma tangencial a la interface líquido-vapor. Matemáticamente se expresa como [21 – 22]

$$\gamma = \frac{F}{\ell}. \quad (1)$$

1.5.3 Interacciones de van der Waals

Junto con las interacciones electrostáticas, las interacciones de van der Waals son las fuerzas predominantes de cohesión y adhesión en la materia.

Los objetos hechos del mismo material siempre se atraen entre sí debido a los dipolos inducidos. La intensidad de los enlaces de van der Waals es relativamente débil, con energías del orden de $\sim 1 \text{ kJmol}^{-1}$, pero las fuerzas actúan entre todos los tipos de átomos y moléculas.

Las interacciones de van der Waals son de origen mecánico cuántico y surge de la interacción de dipolos oscilantes. El potencial $V_{12}(r)$ que da lugar a la dispersión de van der Waals entre moléculas de tipo 1 y 2 se definen como

$$V_{12}(r) = -\frac{1}{24(\pi\epsilon_0)^2} \frac{1}{r^6} \sum_{n,k} \frac{|\langle n|\vec{m}|0\rangle_1|^2 |\langle k|\vec{m}|0\rangle_2|^2}{(E_1^n - E_1^0) + (E_2^k - E_2^0)} \equiv -\frac{A_{12}}{r^6} \quad (2)$$

Donde $\langle n|\vec{m}|0\rangle_1$ es el momento dipolar de transición desde el estado n a 0 para la molécula 1, r es la distancia entre las dos moléculas y A_{12} es la constante Hamaker. E_1^n y E_1^k son las energías del estado n y k para la molécula 1 y 2 respectivamente. Hay un decaimiento característico de $1/r^6$ del potencial entre las moléculas semejantes a puntos, con una sola constante de Hamaker característica de proporcionalidad que depende de la variedad de la molécula considerada. Las fuerzas de van der Waals también son llamadas interacción de dispersión, debido a que las mismas cantidades determinan tanto las propiedades ópticas de las moléculas como las fuerzas entre ellas.

Las fuerzas de van der Waals son de largo alcance y pueden ser efectivas desde grandes distancias ($> 10 \text{ nm}$) hasta distancias interatómicas ($< 0.1 \text{ nm}$). Las fuerzas pueden ser repulsivas o atractivas como se muestra en la Figura 1.13. A grandes separaciones, el efecto de la velocidad finita de propagación de la interacción también se vuelve importante [22].

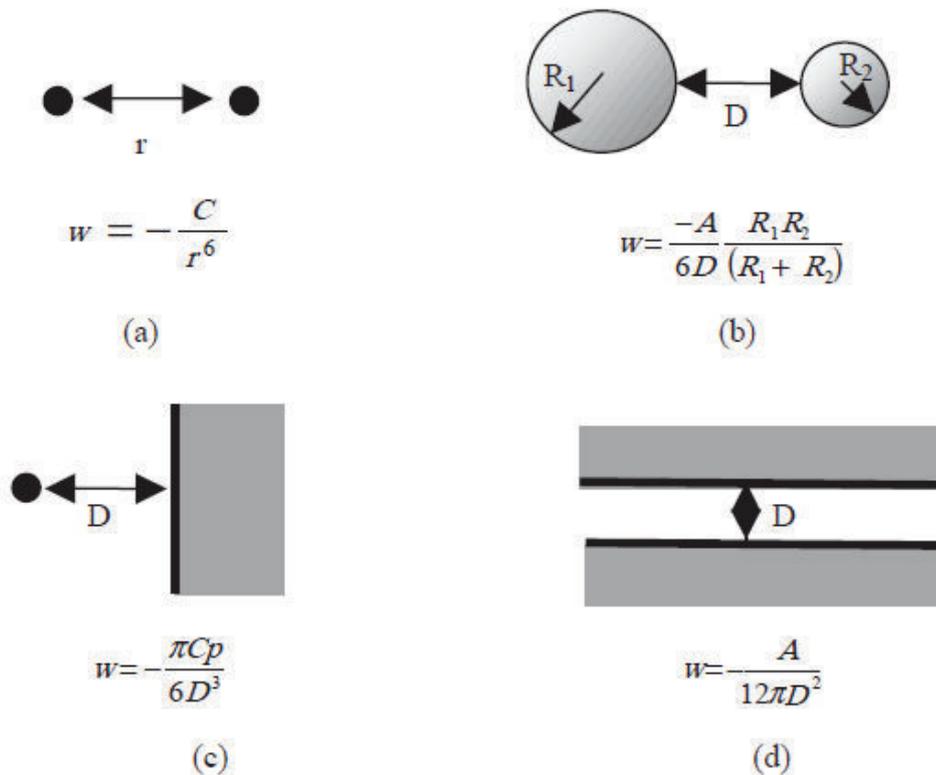


Figura 1.13. Diferentes expresiones de la interacción de van der Waals dependiendo de la geometría del sistema. a) átomos puntuales, b) esferas, c) átomo/pared y d) superficies planas [22].

1.5.4 Interacciones de Coulomb

La energía potencial eléctrica entre dos cargas puntuales q_1 y q_2 está dada por

$$E_C = \frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 r} \quad (3)$$

Donde ε es la permitividad dieléctrica del medio, ε_0 en el vacío es la permitividad, q_1 y q_2 son las magnitudes de las dos cargas y r es la distancia entre las cargas.

Otra energía de interacción importante es la energía potencial E_p , entre un dipolo p y una carga puntual q

$$E_p = -\frac{p^2 q^2}{(4\pi\varepsilon_0)^2 3kTr^2} \quad (4)$$

Donde kT es la energía térmica y p el momento dipolar.

Del mismo modo hay una energía de interacción E_{pp} entre dos dipolos eléctricos separados dada por

$$E_{pp} = \frac{p_1 p_2 K}{4\pi\varepsilon_0 r^3} \quad (5)$$

Donde K es una constante.

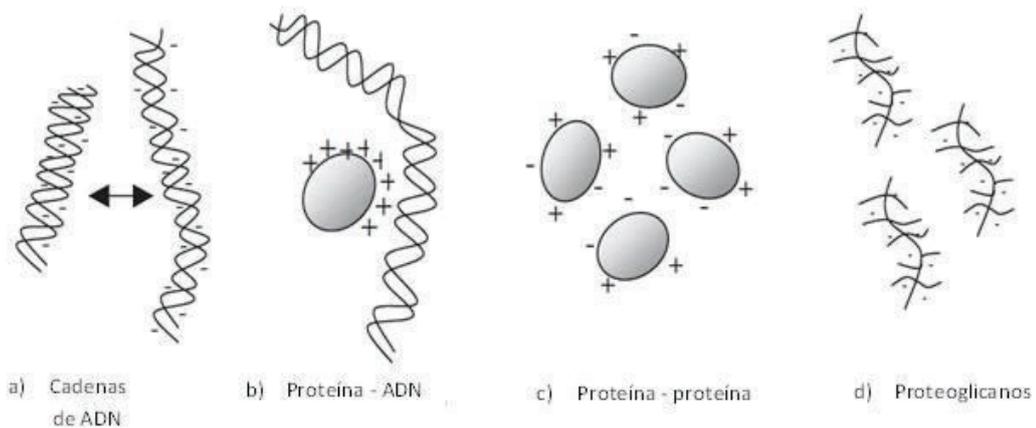


Figura 1.14. Diagrama esquemático de algunos sistemas moleculares. La electrostática domina las interacciones de las fuerzas intermoleculares a) ácidos nucleicos, b) ácidos nucleicos y proteínas, c) la agregación de proteínas y d) proteoglicanos. Adaptada de [22].

Para una gran variedad de moléculas biológicas, las fuerzas electrostáticas son de vital importancia para su funcionamiento y proporcionan una interacción de largo alcance dominante (Figura 1.14).

Una doble capa eléctrica se forma alrededor de grupos cargados en una solución acuosa como se observa en la Figura 1.15. Este proceso debido a la doble capa apantalla las interacciones de Coulomb que son importantes al momento de determinar las fuerzas electrostáticas resultantes. La carga de una superficie de un líquido puede ocurrir de dos maneras: por la disociación de grupos de superficie o por la adsorción de iones sobre la superficie.

El potencial químico para la doble capa eléctrica que rodea a un sistema acuoso cargado es la suma de dos términos:

$$\mu = ze\psi + kT \log \rho \quad (6)$$

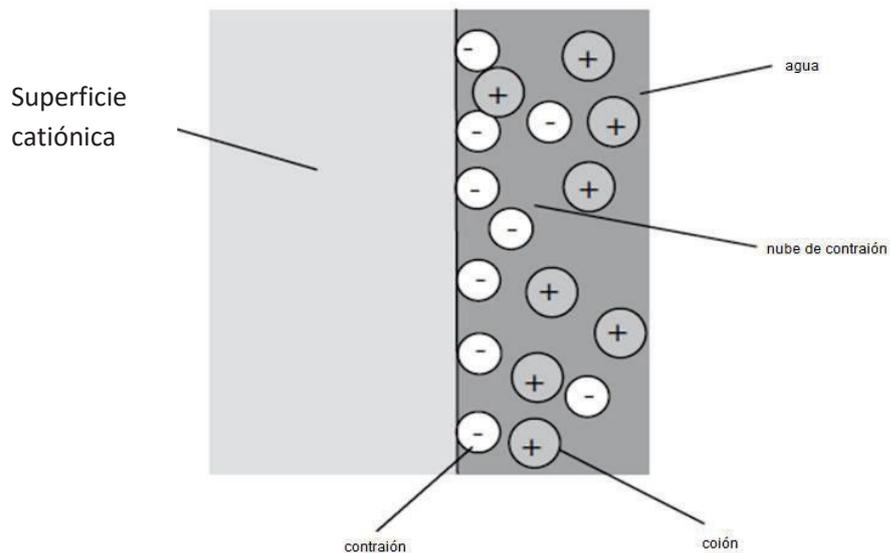


Figura 1.15. Distribución de contraiones en una doble capa eléctrica alrededor de una superficie positivamente cargada [22].

Donde ψ es el potencial eléctrico, ρ la densidad de contraiones, kT es la energía térmica, z es la valencia de los grupos cargados en la molécula, y e es la carga del electrón. El primer término es debido a la energía electrostática y la segunda es la contribución de la entropía los contraiones. La forma del potencial químico puede ser expresarse como:

$$\rho = \rho_0 e^{-ze\psi/kT} \quad (7)$$

Donde ρ_0 está relacionado con el potencial químico:

$$\rho_0 = e^{\mu/kT} \quad (8)$$

La ecuación de Poisson para la electrostática, se relaciona con el potencial ψ para la concentración libre de iones $\rho_{ión libre}$ inmersos en un dieléctrico a una distancia x de la superficie cargada:

$$\epsilon_r \epsilon_0 \frac{d^2\psi}{dx^2} = -\rho_{ión libre} \quad (9)$$

donde ϵ_0 es la permitividad del espacio libre y ϵ_r es la permitividad relativa del dieléctrico en el cual están incrustados los iones. La ecuación de Poisson para la electrostática se puede combinar con la distribución de Boltzmann para la distribución térmica de las energías de iones, para tener la ecuación de Poisson-Boltzmann

$$\frac{d^2\psi}{dx^2} = -\frac{ze\rho}{\epsilon_r \epsilon_0} e^{-ze\psi/kT} \quad (10)$$

El modelo DLVO (nombre dado por sus creadores: Derjaguin, Landau, Verwey, Oberbeek) que consiste en la suma de potenciales permite el estudio de interacción entre partículas esféricas. El potencial viene dado por

$$V(r) = -\frac{A}{12\pi r^2} + \frac{64kTc_0^*\Gamma_0^2}{\kappa} e^{-\kappa r} \quad (11)$$

Donde A es la constante de Hamaker para las fuerzas de van der Waals, κ^{-1} es la longitud de apantallamiento de Debye, c_0^* es la concentración en sal y Γ_0 viene dado por $(zq\psi/4kT)$ [22 – 23].

1.6 Sistema compuesto eritrocitos + liposomas

Es importante destacar los trabajos actuales que se están haciendo en el mundo con el sistema compuesto por eritrocito + liposomas por lo que a continuación hablaremos de los más destacados para obtener un mejor panorama de las aplicaciones que puede tener el estudio de este sistema.

1.6.1 Trabajos actuales: eritrocito membrana

La membrana del eritrocito tiene la propiedad de flexibilidad y resistencia que le permite el paso por los capilares estrechos y soportar las presiones mecánicas de las turbulencias vasculares de los distintos territorios que recorre.

En la Universidad de Vienna se estudió el efecto de la curcumina liposomal en glóbulos rojos in vitro, debido a la importancia que tienen sus propiedades anti inflamatorias, anti oxidantes y anti microbiales. La curcumina es casi insoluble en agua y estable a pH ácido. Este estudio indica que los cambios en la morfología de los eritrocitos pueden representar una señal temprana de la toxicidad de la curcumina en humanos [24].

Pawlikowska, B. y col. caracterizaron la interacción de la membrana de la genisteína (isoflavona presente en soya y algunos vegetales que pueden actuar como estrógenos en el cuerpo) y su correlación con los efectos biológicos en las células. En este estudio se encontró que la genisteína afecta la libertad dinámica de cabeza y la parte hidrofóbica de los lípidos en los liposomas, así como en la membrana del glóbulo rojo [25].

En el 2010 se realizó un estudio de cómo alteraban los liposomas el comportamiento de la fase térmica y la composición de las membranas celulares en los glóbulos rojos. Se encontró que los liposomas formados por fosfolípidos de cadena corta causan un aumento en la temperatura de los glóbulos rojos. A su vez, se encontró que el incremento de lípidos en los glóbulos rojos coincide con la disminución en la relación de colesterol a fosfolípido [26].

Por otra parte, un estudio realizado en Polonia muestra que existen cambios en la morfología de la membrana del eritrocito debido a componentes que pertenecen a las antocianinas, ya que éstas se incorporan en la región externa de la membrana de los eritrocitos, afectando a su forma, reflejándose en el aumento de equinocitos (constituye una variación morfológica de los glóbulos rojos donde el eritrocito luce de menor tamaño con prolongaciones distribuidas regularmente en su superficie) [27].

Las vesículas gigantes unilamelares (GUVs, por sus siglas en inglés) proveen información importante ya que poseen una membrana muy parecida al modelo realístico que se tiene de las biomembranas, debido a su curvatura. Lo mismo para las membranas biocomplejas ya que sus componentes pueden ser controladas sistemáticamente [28].

Entre los estudios de propiedades eléctricas podemos mencionar el de Levine, S. y col. [29] quienes desarrollaron la teoría de electroforesis para el eritrocito humano. Esta teoría encuentra que la mayoría de las cargas que se producen por el ácido siálico están contenidas en el glicocálix. Esta capa es modelada como una membrana permeable de moléculas de polielectrolito que está unida a la membrana celular, así las cargas están distribuidas alrededor de esta capa.

En el 2011 se estudiaron las propiedades eléctricas de los eritrocitos humanos y sus cambios ante un campo eléctrico externo, usando como punto de partida el hecho de que la salinidad fisiológica de los seres humanos es isotónica. Los resultados de este estudio

muestran que, conforme se aumenta la salinidad aumenta la resistencia mecánica hasta llegar a un punto máximo y después empieza a disminuir debido al proceso de crenación que sufren los eritrocitos [30].

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Este capítulo está dividido en dos secciones. En la primera de ellas, presentamos las características fisicoquímicas de moléculas, búfer y solvente, así como los métodos usados para la preparación de muestras. Dentro de esta misma, incluimos los pasos seguidos para la purificación de eritrocitos para su observación en DIC. La segunda sección, describe las técnicas experimentales del Microscopio de Contraste Interferencial (DIC), de la Dispersión Dinámica de Luz (DLS) utilizadas en este trabajo.

2.1 Moléculas y solvente

El fosfolípido usado en este trabajo para la preparación de liposomas fue DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina), fórmula molecular $C_{40}H_{80}NO_8P$, peso molecular de 734.039 g/mol, y una temperatura de transición $T_c = 41^\circ C$, comprado en Avanti Polar Lipids. El DPPC es un fosfolípido de carga neutra con 99% de doble cola hidrofóbica con 16 carbonos saturados cada una, su cabeza polar es zwitteriónica (Figura 2.1.) que contiene el porcentaje siguiente de componentes químicos: C 65.45%, H 10.98%, N 1.91%, O 17.44%, P 4.22%. DPPC fue disuelto en cloroformo para tener una concentración inicial de $4.9 \frac{\mu g}{ml}$.

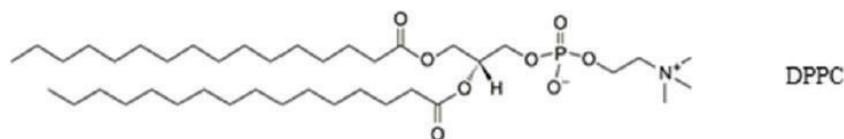


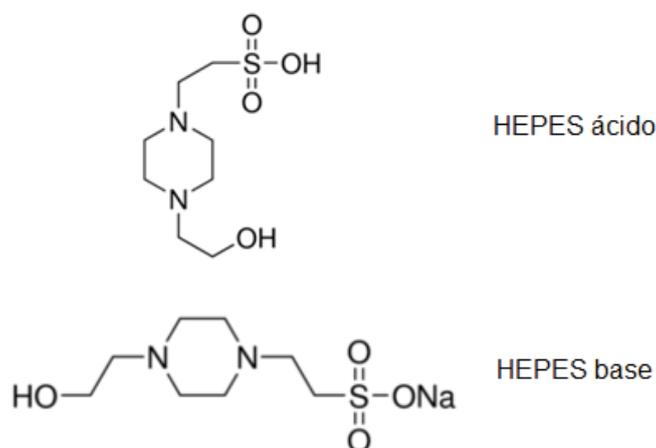
Figura 2.1. Estructura molecular de la molécula de DPPC

[Imagen tomada del catálogo de Sigma Aldrich].

Cloruro de sodio (NaCl ; $P_M = 58.44 \text{ g/mol}$) de Sigma Aldrich, fue utilizado para cambiar las propiedades eléctricas del solvente para tener concentraciones hipotónica, isotónica e hipertónica.

El agua utilizada para la preparación del buffer fue tipo Mili-Q con conductividad $2.44 \frac{\mu\text{S}}{\text{cm}}$, la cual fue medida con un ZetaSizer de marca Malvern.

Para la preparación del buffer se empleó HEPES ÁCIDO (4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinetanosulfónico; $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$; $P_M = 238.30 \text{ g/mol}$) y HEPES BÁSICO (4-(2-hidroxiethyl)piperazina-1-etanosulfónico; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$; $P_M = 260.29 \text{ g/mol}$), ambos con una pureza de 99.5% de Sigma Aldrich. La proporción de estas moléculas para lograr un pH fisiológico fue de $80.19 \mu\text{M}$ y $9.98 \mu\text{M}$ respectivamente. La estructura molecular de estas moléculas se muestra en la Figura



2.2

Figura 2.2. HEPES ácido y básico utilizados para lograr un solvente con pH de 7.6

[Imagen tomada del catálogo de Sigma Aldrich].

Con el objetivo de producir contraste óptico en las muestras de liposomas y eritrocitos para la observación con Microscopio Óptico y/o DIC, se utilizó sacarosa ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$; $P_M = 342.30$

g/mol) y glucosa ($C_6H_{12}O_6$; $P_M = 180.16$ g/mol), ambos con 99.5% de pureza de Sigma Aldrich, a concentración de 2 mM y 2 mM.

Para la purificación de eritrocitos se utilizó Búfer fosfato salino (PBs 1x: cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio) para conseguir un ambiente adecuado a pH fisiológico (7.3 – 7.4) y Lymphoprep (diatrizoato de sodio, polisacárido, densidad 1.077 ± 0.001 g/ml, osmolaridad 290 ± 15 mOsm) para separar los componentes de la sangre (leucocitos, plaquetas, plasma, eritrocitos) mediante gradiente de densidad.

2.1.2 Método de preparación del solvente (búfer)

En matraz de 1 L se prepararon cuatro soluciones búfer.

1. Agregar 500 ml de agua destilada en el matraz.
2. Agregar concentración de $80.19 \mu M$ de HEPES ácido.
3. Agregar concentración de $9.98 \mu M$ de HEPES base.
4. Agregar de 6.8 mM de NaCl para obtener el medio hipotónico.
5. Agregar de 15.4 mM de NaCl para obtener el medio isotónico.
6. Agregar 30.8 mM de NaCl para obtener el medio hipertónico.
7. Dejar agitar durante 1 hora en placa con agitador magnético.
8. Completar 500 ml hasta llegar al aforo.

Sugerencia: Filtrar soluciones con membrana de policarbonato $0.2 \mu m$ de tamaño de poro para eliminar polvo presente en la muestra. Agregar 5 gotas NaOH para ajustar el pH.

2.1.3 Método de purificación de eritrocitos

1. Obtención de sangre mediante donadores (~ 10 ml).
2. Agregar Lymphoprep (7 ml) a tubo cónico (estéril).

3. Introducir el tubo cónico con sangre + lymphoprep en centrifugadora a 1500 revoluciones por minuto (RPM) durante 30 minutos.
4. Retirar capa de Lymphoprep con pipeta automática (con cuidado de no romper el gradiente).
5. Agregar PBs 1x al tubo cónico la misma cantidad que se tiene de eritrocitos.
6. Centrifugar tres veces a 2500 RPM y en cada ocasión retirar PBs 1x y agregar nuevamente éste con la misma cantidad que se tiene de eritrocitos.

Dicho proceso se tuvo que realizar debido a que la sangre está compuesta por plaquetas, monocitos, plasma, etc.

2.1.4 Método de preparación de liposomas

1. Colocar una alícuota (en un vial de 4 ml) de 180 μ l de DPPC a una concentración de $4.9 \frac{\mu g}{\mu l}$ disuelto en cloroformo a secar durante tres horas en la campana de vacío.
2. Hidratar con 3ml de la solución buffer la alícuota en el vial (obteniendo una concentración de $0.294 \frac{\mu g}{\mu l}$)
3. Sonicar durante tres minutos por arriba de T_c .
4. Refrigerar vial con alícuota hidratada durante 24 horas a 4°C.
5. Colocar la muestra en jeringa de 250 μ l que se observa en el mini extrusor (arreglo que se muestra en el Capítulo I).
6. Usar membrana de policarbonato de 50 nm de diámetro de poro.
7. Realizar el proceso antes mencionado en el Capítulo I, alrededor de 12 veces.

Con el objetivo de preparar liposomas de radio hidrodinámico en la escala nanométrica, se usaron membranas de policarbonato de 50 *nm* de diámetro de poro y se ambientó con las cuatro soluciones buffer al igual que los filtros de soporte. Este tamaño de poro permite obtener radios hidrodinámicos cercanos a 60 *nm* (120 *nm* de diámetro) lo que implica un proceso de coalescencia de los liposomas al pasar de un lado al otro de la membrana durante el proceso de extrusión.

Sugerencia: al momento de pasar la muestra de una jeringa a otra, a través de la membrana de policarbonato ejercer presión moderada ya que una alta presión puede ocasionar la ruptura de la membrana.

La ventaja de este extrusor es la facilidad de uso y transportación, además de permitir trabajar con pequeños volúmenes de muestra y la optimización de material.

2.2 Técnicas experimentales

Las bases teóricas de las técnicas experimentales y el equipo correspondiente utilizado en este trabajo de tesis serán descritas en esta sección. Incluiremos un apartado para hablar de la técnica de formación de liposomas por electroformación y la celda utilizada para aplicar un campo eléctrico sinusoidal entre placas a eritrocitos en medio iónico

2.2.1 Microscopía de contraste interdiferecial (DIC) [31]

La técnica de Contraste de interferencia diferencial (DIC, por sus siglas del inglés Differential Interference Contrast) diseñada y desarrollada en la década de los 50s. La configuración óptica de un microscopio DIC se presenta en la Figura 2.3.

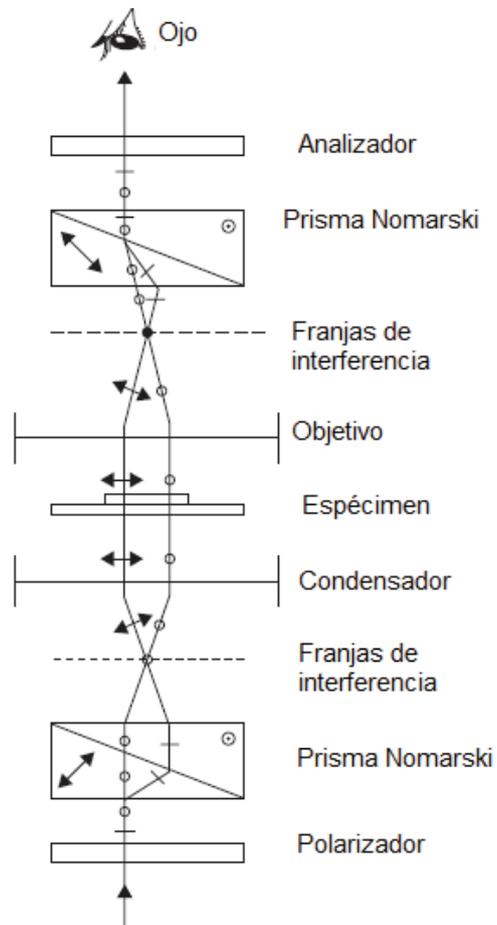


Figura 2.3. Esquema de la óptica de un microscopio DIC. Adaptado de [32].

Consta de dos polarizadores, dos primas Nomarski, el condensador, el objetivo y la muestra. El principio de la técnica puede entenderse de la siguiente manera: luz polarizada linealmente se divide en dos ondas ortogonales desplazadas lateralmente y recombinadas en una onda polarizada elípticamente por prismas Wollaston o prismas Wollaston modificados, conocidos como prismas Nomarski. Los prismas Wollaston se construyen a partir de dos cuñas (calcita o de cuarzo) que se cementan juntos, de modo que los ejes ópticos de los dos cristales birrefringentes que forman un prisma, son perpendiculares entre sí. Los prismas Wollaston son a menudo demasiado gruesos para ser colocados en frente del lente condensador o detrás del lente objetivo de modo que el centro de la interface del prisma está situado en el plano focal

frontal del lente condensador y el plano focal posterior de la lente objetivo, respectivamente. Este problema se puede superar mediante el uso de prismas Nomarski, en la que el eje óptico en el primer cristal en un prisma es oblicuo con respecto al segundo. Debido a esta disposición, las ondas se dividen y recombinan fuera del prisma. Los prismas Nomarski se colocan en el microscopio de tal modo que el plano fuera del prisma, donde las ondas se dividen, se coloca en el plano focal frontal del condensador y el plano, en el que las ondas se recombinan fuera del segundo prisma, se coloca en el plano focal posterior del objetivo. Con el fin de entender cómo se produce contraste con un microscopio DIC basado en la luz polarizada; se consideran cuatro pares de ondas producidas por el prisma menor Wollaston o Nomarski. La interface del prisma se coloca en el plano focal frontal del condensador, de manera que la onda ordinaria y la onda extraordinaria parecen divergir desde el plano focal frontal del condensador y salir del condensador como un haz paralelo en fase. Imagine que un par de ondas pasan a través de la envolvente (A), un par de ondas pasan a lo largo de un borde de un objeto (B), un par de ondas pasan a través del centro del objeto (C), y el último par de ondas pasa a lo largo del otro borde del objeto (D) (Figura 2.4).

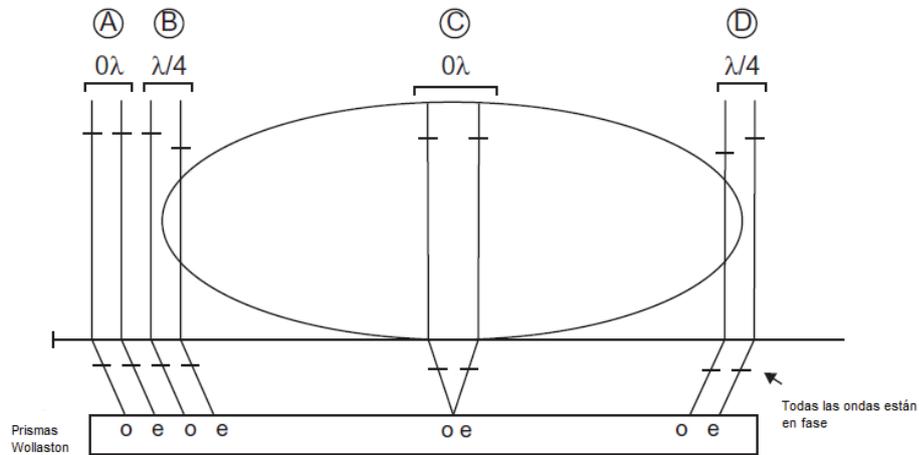


Figura 2.4 Formación de una imagen de DIC. Los dos miembros de cada par de ondas han sido separadas lateralmente pero no axialmente [32].

El primer y tercer par de ondas (A y C) no experimentan diferencia de camino óptico, mientras que una de las ondas de un par en el segundo y cuarto par de ondas (B y D) experimentará una diferencia de camino óptico con respecto al otro par de ondas. Supongamos que el objeto, como la mayoría de los objetos biológicos, introduce un retraso de fase $\lambda / 4$ entre las ondas ordinaria y extraordinaria de un par. También suponga que el segundo prisma está ubicado con el fin de introducir otro cambio de fase de $\lambda / 4$ entre los miembros de un par de modo que el rayo ordinario está retardado en relación al rayo extraordinario. Parejas donde tanto las ondas ordinarias y extraordinarias van a ir a través de la envolvente, o pares donde tanto las ondas ordinarias y extraordinarias pasan a través de regiones donde no hay diferencias en la longitud de camino óptico, estarán $\lambda / 4$ fuera de fase después de que son recombinadas por el segundo prisma. La onda resultante estará polarizada circularmente y estas regiones aparecerán gris en la imagen. Por otra parte, pares de ondas cuya onda ordinaria experimenta un cambio de fase a medida que pasa a través de un espécimen, estará $\lambda / 2$ fuera de fase después de haber sido recombinado por el segundo prisma (D). La onda resultante estará polarizada linealmente paralela al azimut de transmisión máxima del

analizador y este punto en la imagen aparecerá brillante. Un par de ondas cuya onda extraordinaria experimenta un cambio de fase a medida que pasa a través de la muestra estará 0λ fuera de fase después de haber sido recombinado por el segundo prisma B. La onda resultante estará polarizada linealmente paralela al azimut de la transmisión máxima del polarizador y este punto de la imagen aparecerá oscuro. Como resultado de la conversión de los gradientes de camino óptico en diferencias de intensidad, la imagen aparece como si la muestra fuera un objeto tridimensional iluminado lateralmente. Sin embargo, la apariencia tridimensional de la imagen, que asemeja a un espécimen que es iluminado de forma oblicua, es sólo una ilusión.

Para la realización de experimentos de DIC, se utilizó un microscopio Olympus IX71, con un sistema DIC (analizador, prismas Nomarski y corredera de DIC con el que se selecciona longitud de onda) funcional únicamente con un objetivo de 60x.

2.2.2 Dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés) [33]

El fenómeno de dispersión de luz se presenta cuando se separan las ondas electromagnéticas de distintas frecuencias al atravesar un material.

A diferencia de la reflexión de la luz, el fenómeno de dispersión de luz está relacionado a la interacción de la radiación electromagnética con las moléculas de un sistema. El campo eléctrico de la radiación incidente induce una polarización oscilante de los electrones en las moléculas de la muestra. Así, las moléculas se comportan como fuentes secundarias de radiación y subsecuentemente radian (dispersan) luz en todas direcciones. Parámetros físicos como la polarización de la luz, la distribución angular y la intensidad de la radiación dispersada, están determinados por el tamaño, forma e interacciones moleculares en la muestra. De esta forma, con la ayuda de la electrodinámica y la mecánica estadística es posible obtener información sobre la estructura y dinámica molecular del medio que dispersa.

dispersión a diferentes tiempos mediante un programa computacional, se construye la función de correlación. Gráficamente, la función de correlación aparece como una exponencial decreciente con un tiempo característico τ , de decaimiento. Para difusión browniana, este tiempo característico, se relaciona con el coeficiente de difusión D y al vector de onda q por la ecuación

$$\frac{1}{\tau} = \Gamma = Dq^2 \quad (2.1)$$

El lado izquierdo de la igualdad, puede obtenerse ajustando la función de correlación para una q dada, mediante una función exponencial decreciente de la forma $Ae^{-\Gamma t}$. Una gráfica de Γ vs q^2 permite obtener el coeficiente de difusión D si la relación obtenida es lineal y asegura que la difusión se debe únicamente a movimiento browniano. Suponiendo que la muestra es muy diluida y monodispersa, el valor del coeficiente de difusión, D , es utilizado en la ecuación de Stokes-Einstein para determinar el radio hidrodinámico R_h de la partícula

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (2.2)$$

Donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta y η la viscosidad del solvente.

Este valor de radio hidrodinámico, puede ser calculado por un programa informático para cada función de correlación para construir una distribución de tamaños. El máximo de esta distribución, es el valor promedio del radio hidrodinámico, mientras que el ancho de esta distribución, está relacionado al valor del índice de polidispersión. Pequeños índices de polidispersión (< 0.1) dan una distribución angosta, indicando que la muestra es monodispersa (compuesta de partículas del mismo tamaño): altos valores de índice de polidispersión indicarán que la muestra contiene partículas de tamaños muy distintos. En algunos casos, es posible separar la distribución de tamaños correspondiente a dos o más partículas de distinto tamaño,

mediante una “distribución de tamaños en número o volumen (en lugar de intensidad). Los ajustes mediante una o varias funciones exponenciales, no siempre es convenientes, principalmente si la muestra es polidispersa, y tiene errores asociados a la línea base y la selección de datos del experimento. Para reducir errores en la determinación de Γ y calcular el valor del índice de polidispersión, es común optar por el método de cumulantes.

2.2.2.2 Expansión de cumulantes [33]

Puesto que para una muestra polidispersa, cada partícula tiene tamaño distinto, cada una de ellas tendrá una función de correlación diferente. La función de correlación global se expresa como la superposición de todas las funciones de correlación asociadas al conjunto de partículas

$$g(t) = \int G(\Gamma)e^{-\Gamma t} d\Gamma \quad (2.3)$$

Con la condición $\int_0^\infty G(\Gamma)d\Gamma = 1$. La forma de $g(t)$ es equivalente a la definición de una función generadora de momento

$$g_1(\tau) = \int_0^\infty G(\Gamma)e^{-\Gamma\tau} d\Gamma = M(-\tau, \Gamma) \quad (2.4)$$

El m-ésimo momento de la distribución está dado por la m-ésima derivada de M con respecto a τ

$$m_m(\Gamma) = \int_0^\infty G(\Gamma)\Gamma^m e^{-\Gamma\tau} d\Gamma \quad (2.5)$$

De igual manera, el logaritmo de $g_1(\tau)$ es equivalente a la definición de la función generadora de cumulantes $K(-\tau, \Gamma)$ y el m-ésimo cumulante de la distribución está dado por:

$$k_m(\Gamma) = \left. \frac{d^m K(-\tau, \Gamma)^m}{d(-\tau)^m} \right|_{-\tau=0} \quad (2.6)$$

con los cumulantes

$$k_1(\tau) = \int_0^{\infty} G(\Gamma)\Gamma d\Gamma = \bar{\Gamma} \quad (2.7)$$

$$k_2(\tau) = \mu_2$$

$$k_3(\tau) = \mu_3$$

$$k_4(\tau) = \mu_4 - 3\mu_2^2$$

Expandiendo en serie de Taylor la función K alrededor de $\tau = 0$ y considerando la relación de Seigert se tiene que la función de correlación puede ajustarse por:

$$\ln(g_2(\tau) - B) = \ln\beta + 2(-\bar{\Gamma}\tau + \frac{k_2}{2!}\tau^2 - \frac{k_3}{3!}\tau^3 + \dots) \quad (2.8)$$

Donde $\bar{\Gamma}$ es el valor promedio de la frecuencia característica, k_2 es la varianza y el índice de polidispersión se calcula por $IP = \frac{k_2}{\bar{\Gamma}^2}$.

2.2.2.3 Características del equipo experimental.

Utilizamos un DLS marca Brookhaven Instruments con láser de tipo diodo y polarización vertical, de potencia variable 5 mW a 30 mW con *una* $\lambda = 637 \text{ nm}$, detector foto diodo de avalancha (APD).

Para los experimentos de DLS las muestras obtenidas por extrusión fueron nuevamente filtradas a través de filtros de $0.2 \mu\text{m}$ de tamaño de poro para así poder observarla en el DLS y obtener una mejor intensidad y menor polidispersidad. Los tubos para DLS fueron limpiados con alcohol etílico y después se colocaron en el baño decalín controlado con el programa Brookhaven Instruments – Dynamic Light Scattering Software.

2.2.3 Aplicación de campo eléctrico sinusoidal a eritrocitos

En la aplicación de esta técnica utilizamos portamuestras conductores llamados ITOs. Para la aplicación de ondas eléctricas sinusoidales, se construyó un porta ITOs (Figura 2.6) en colaboración con Arturo Rodríguez Gil y el apoyo del Taller de Máquinas y herramientas. Los ITOs fueron limpiados de acuerdo al siguiente protocolo: Primeramente, los ITOs se pre lavaron con acetona; luego, fueron sumergidos en una solución acuosa al 10% de NaOH a la cual se le aumentó la temperatura hasta 55°C en baño térmico durante 3 minutos bajo agitación. Finalmente, los ITOs se enjuagaron con agua desionizada por un minuto, hasta que se observó que las capas de agua se deslizaron completamente a través de la superficie de los ITOs.

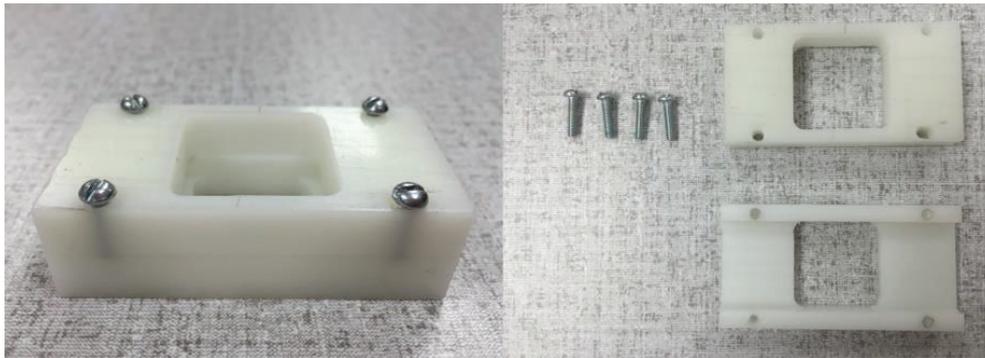


Figura 2.6. Porta ITOs, construido para la aplicación de campo eléctrico.

La muestra (liposoma y/o eritrocitos) fue colocada en el porta muestras para así observarlas en el microscopio. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Pulnix modelo TM-6740GE controlada por el programa Launch Coyote Applications (Figura 2.7)

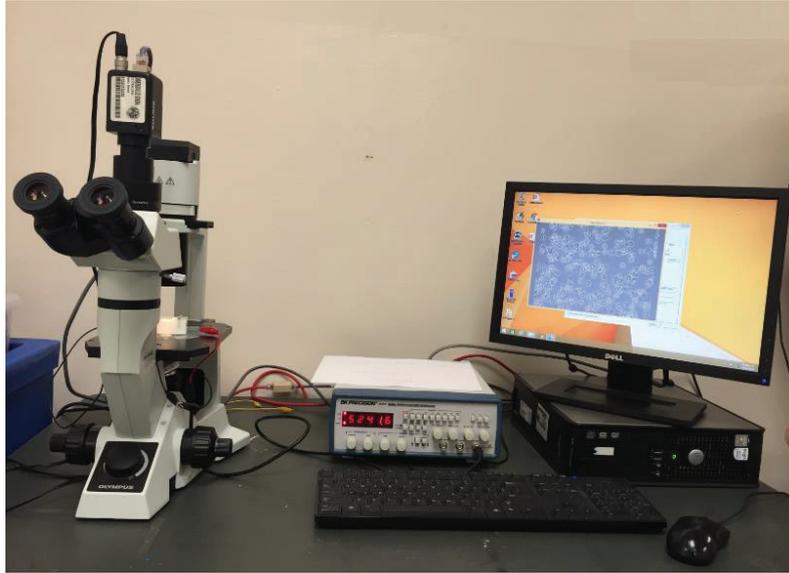


Figura 2.7. Arreglo experimental para aplicar un campo eléctrico a eritrocitos. En la parte central se muestra el generador de funciones.

En este capítulo hemos presentado los métodos de preparación de muestras y las técnicas utilizadas. De igual manera, hemos incluido aspectos teóricos para ajustar datos experimentales obtenidos por DLS. Consideramos que lo abarcado en este capítulo, puede permitir entender y discutir los resultados experimentales que presentaremos en el Capítulo III.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo está dividido en dos secciones. Primeramente, presentamos los resultados obtenidos al medir la conductividad y pH de las soluciones que se prepararon. Después presentamos los resultados obtenidos mediante la técnica del Microscopio DIC, es decir el promedio en cuanto a tamaños de los eritrocitos en diferentes medios. Después ofrecemos las gráficas obtenidas para los coeficientes de difusión, radio hidrodinámico, diámetro efectivo obtenidos con ayuda del DLS y finalmente mostraremos cómo reaccionan los eritrocitos aplicando un campo eléctrico (corriente directa).

3.1 Mediciones y observaciones preliminares

3.1.1 pH y conductividad de solvente

Con el objetivo de lograr un ambiente con pH fisiológico similar al que rodea al eritrocito en su medio ambiente natural (pH ~7.4), se preparó un búfer siguiendo el protocolo marcado en el capítulo II de esta tesis. El pH de los búfer se midió con el equipo Thermo Scientific ORION VERSASTAR Advanced Electronemetry Meter. La conductividad se obtuvo mediante el equipo ZetaSizer Malvern. A continuación, presentamos en la Tabla I los valores obtenidos para dichas soluciones.

Tabla I. Conductividad y pH

	σ ($\mu S/cm$)	pH	C (mM)
Buffer	8.63	7.6	0
Hipotónico	69.96	7.6	6.8
Isotónico	118.66	7.6	15.4
Hipertónico	206	7.6	30.8

Conductividad (σ) y pH de solventes utilizados en liposomas y eritrocitos.

Como puede observarse, la conductividad de la solución aumenta conforme se incrementa la concentración de NaCl.

3.2 Microscopía Óptica (DIC)

Esta sección está dedicada a presentar los resultados experimentales obtenidos por la técnica DIC. Como se explicó en el Capítulo I, el DIC que trabajamos en esta tesis funciona con un objetivo de 60x.

Al final de la sección, se discuten los resultados experimentales obtenidos por esta técnica para cada uno de los sistemas estudiados: Liposomas, eritrocitos + solución, liposomas + eritrocitos.

1.2.1 Liposomas de DPPC

La técnica de DIC la utilizamos en este caso para asegurarnos de que realmente estábamos formando liposomas, a continuación, se presentan las imágenes tomadas mediante la técnica DIC en los distintos medios.

1.2.1.1 Liposomas en búfer

La imagen capturada con DIC para liposomas en búfer se muestra en la Figura 3.1. Se observa un bajo porcentaje de liposomas esféricos; sin presencia de agregados y ausencia de liposomas cilíndricos.

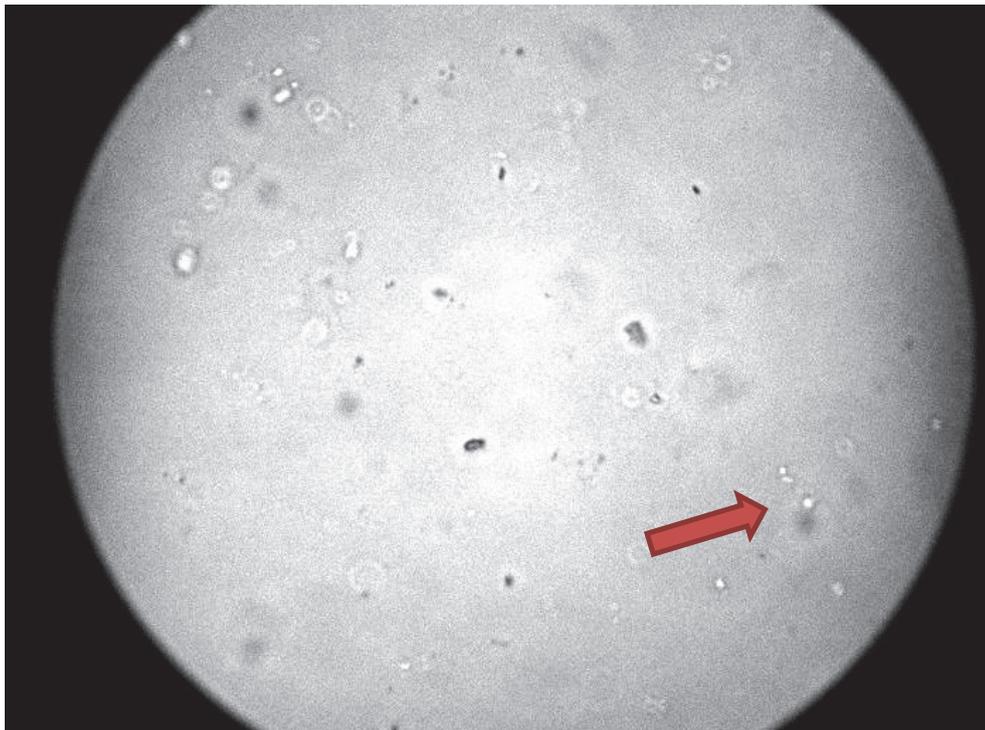


Figura 3.1. Imagen de microscopía óptica DIC. Liposomas en búfer (objetos claros y esféricos)

1.2.1.2 Liposomas en medio hipotónico

La imagen con DIC para liposomas en medio hipotónico se muestra en la Figura 3.2. Se observan liposomas esféricos del mismo orden de tamaño (cualitativamente) de los liposomas en buffer. No se observan cambios apreciables de forma debido al medio hipotónico.

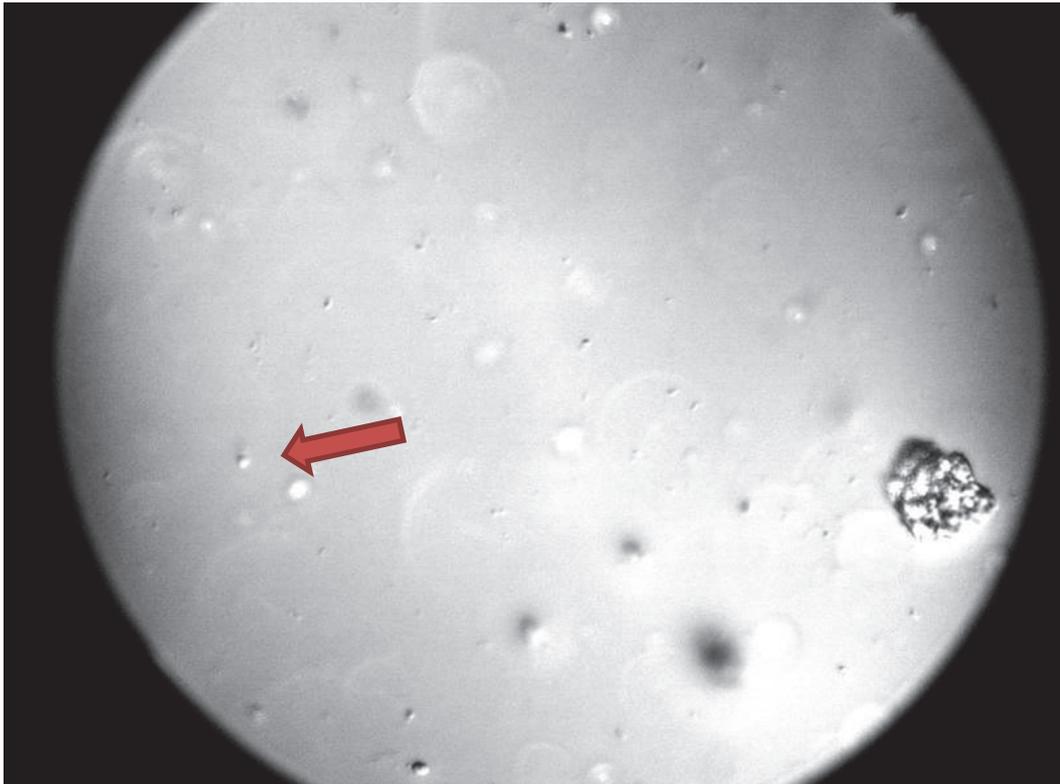


Figura 3.2 Imagen de microscopía óptica DIC. Liposomas en medio hipotónico (objetos claros y esféricos)

1.2.1.3 Liposomas en medio isotónico

La imagen con DIC para liposomas en medio isotónico se muestra en la Figura 3.3. Se observan liposomas con forma de esferas y cilindros por lo que sí hay cambios de forma (cualitativamente hablando), debido al medio expuesto con una solución isotónica. Por otra parte parece presentarse una disminución en el tamaño de los liposomas esféricos a esta concentración de sal. Esto pudiera deberse a la formación de la capa de solvatación y capas

iónicas que favorecen una distribución de tamaños más pequeña que permite una mayor estabilidad del sistema.

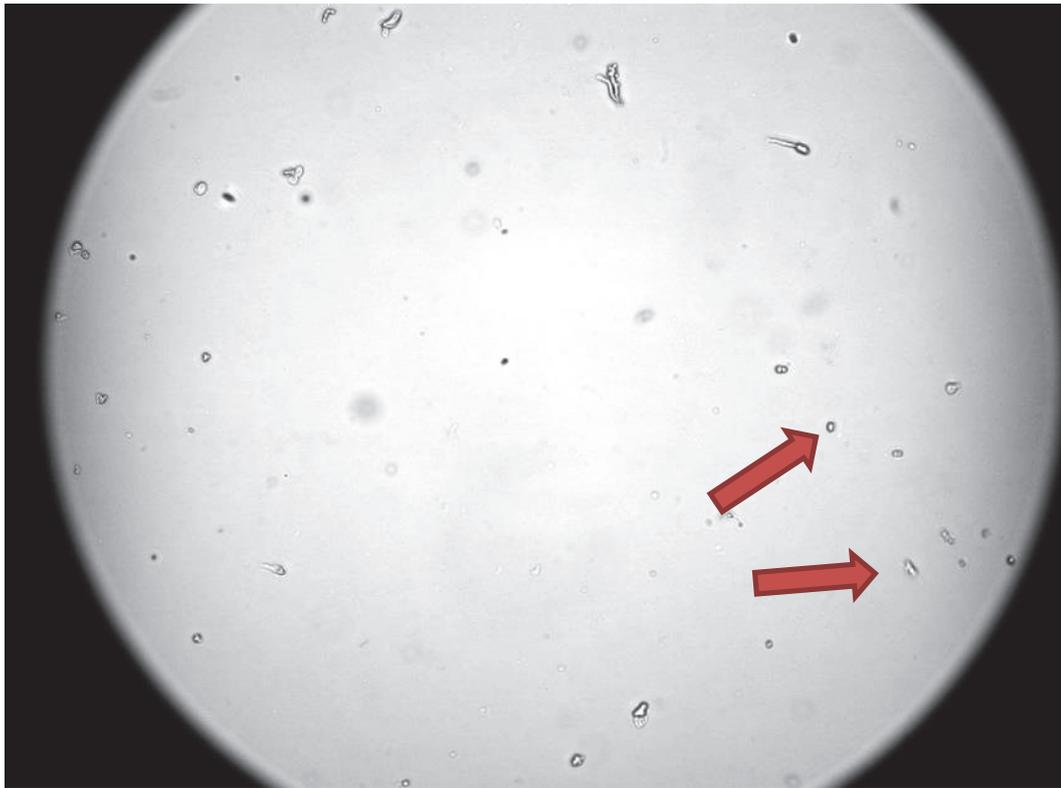


Figura 3.3 Imagen de microscopía óptica DIC. Liposomas en medio isotónico (objetos claros esféricos y cilíndricos).

1.2.1.4 Liposomas en medio hipertónico

La imagen con DIC para liposomas en medio hipertónico se muestra en la Figura 3.4. Se observa una menor cantidad de liposomas esféricos y cilíndricos con una disminución de tamaño, por lo que también presentan cambios de forma.

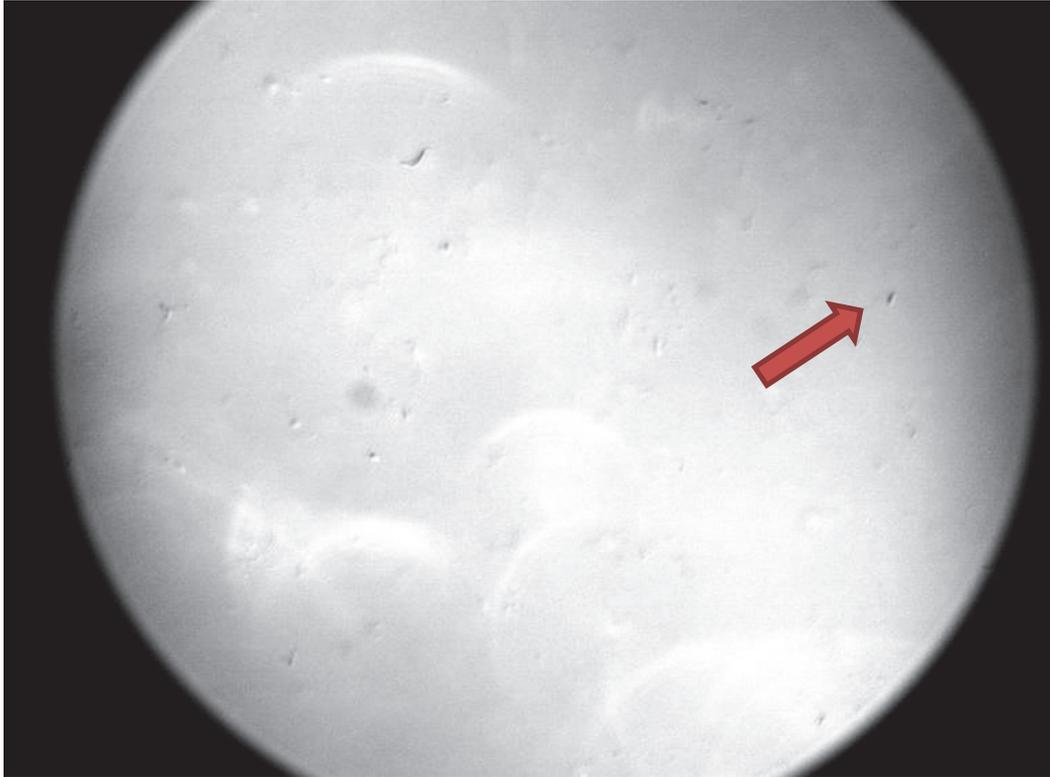


Figura 3.4. Imagen de microscopía óptica DIC. Liposomas en medio hipertónico (objetos claros, esféricos y cilíndricos).

3.2.2 Eritrocitos

Tamaños de eritrocitos, con escala

Para medir los tamaños de los eritrocitos en microscopía DIC (60x) se tomó una imagen de $100\ \mu\text{m}$ de longitud que equivalen a 448 píxeles en el programa Image (programa de procesamiento de imagen digital) y en Microscopía Óptica 20x, una imagen de $100\ \mu\text{m}$ de longitud que equivale a 156 píxeles. Para calcular el diámetro promedio, se tomaron en cuenta cuatro formas de eritrocitos: esferocitos, acantocitos, eritrocitos bicóncavos y eritrocitos tipo pasa, ya que su forma facilita la medición del diámetro. Para estudiar los cambios posibles en el tiempo, se tomaron imágenes cada 10 minutos durante 1 hora.

3.2.2.1 Eritrocitos en búfer

En la Figura 3.5a mediante microscopía óptica (objetivo de 20x) se observa que para eritrocitos en ausencia de sal se muestran eritrocitos en su forma esférica, denominados esferocitos y eritrocitos bicóncavos. El histograma de tamaños para estos eritrocitos se muestra en la Figura 3.5b.

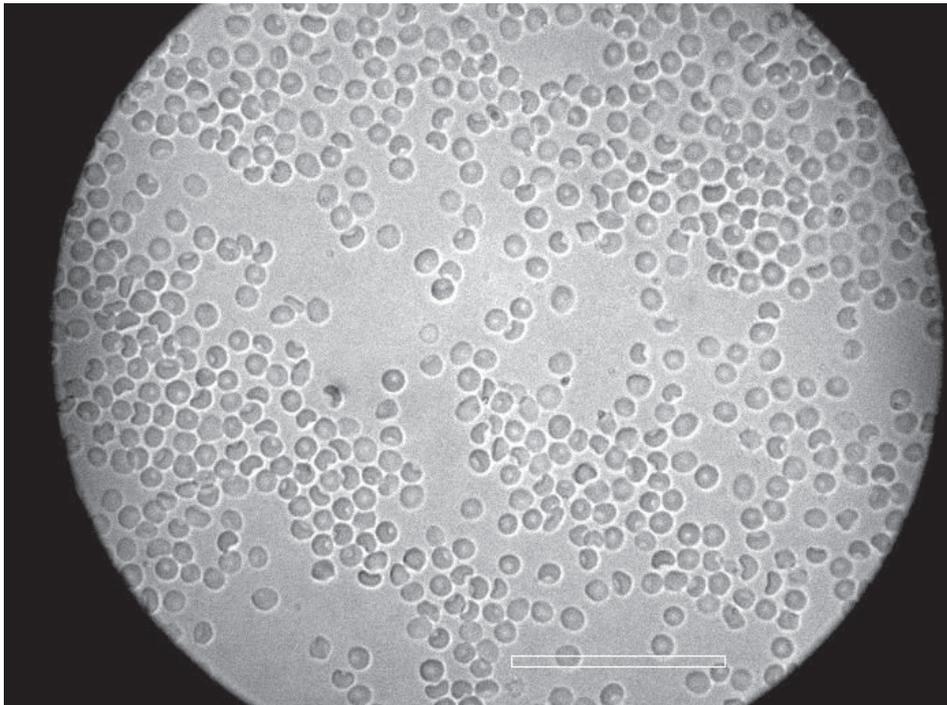


Figura 3.5 a) Imagen a $t = 60 \text{ min}$ de microscopía óptica 20x para eritrocitos en búfer. La escala equivale a $100 \mu\text{m}$.

Podemos observar en la Figura 3.5b. el histograma para eritrocitos en buffer y se observa que para t_0 (color verde) tenemos un porcentaje del 100% para los esferocitos, mientras que para $t = 60 \text{ min}$ (color verde) tenemos un porcentaje del orden del 80%, percibiendo un cambio en el diámetro promedio de 11.24 y 16.04 nm respectivamente. Para el caso de los eritrocitos bicóncavos, no hay presencia de estos al tiempo t_0 , pero al tiempo $t = 60 \text{ min}$ (color gris) tenemos un porcentaje del 19.51% y se percibe la presencia de éstos con un diámetro promedio de 15.97 μm .

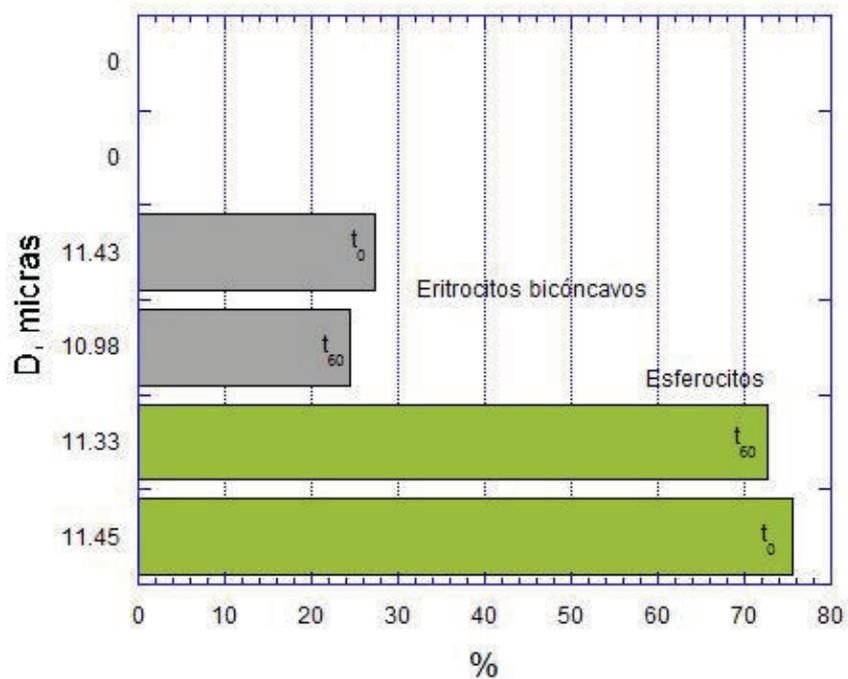


Figura 3.5 b) Histograma de tamaños para eritrocitos en buffer. Las barras de error son inapreciables.

3.2.2.2 Eritrocitos en medio hipotónico

En medio hipotónico eritrocitos (Figura 3.6a) se observan eritrocitos en su forma bicóncava (normal), un porcentaje pequeño tanto de acantocitos como de esferocitos y la presencia de eritrocitos “arrugados” tipo pasa. El histograma de tamaños para estos eritrocitos se muestra en la Figura 3.6b.

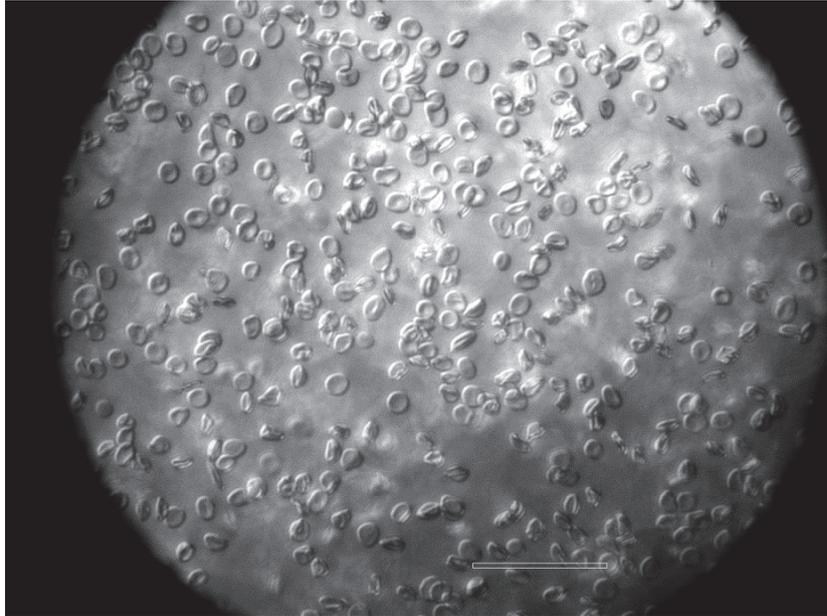


Figura 3.6a Imagen a t_0 microscopía óptica DIC. Eritrocitos en medio hipotónico. La escala representa 50 nm .

Podemos observar en la Figura 3.6b. el histograma para eritrocitos en medio hipotónico y se observa que para t_0 (color verde) tenemos un porcentaje del 4% para los esferocitos, mientras que para $t = 60 \text{ min}$ (color verde) tenemos un porcentaje del orden del 26.31%, percibiendo un cambio en el diámetro promedio de 7.40 y 7.12 nm respectivamente. Para el caso de los eritrocitos bicóncavos, al tiempo t_0 tenemos una población del 69.35% y al tiempo $t = 60 \text{ min}$ (color gris) tenemos un porcentaje del 54.13% y se percibe la presencia de éstos con un diámetro promedio de 8.02 μm . Mientras que para los acantocitos en t_0 existe una pequeña población del 1.61% y en $t = 60 \text{ min}$. aumenta hasta 5.26%. Hay una elevada presencia de eritrocitos tipo pasa (color negro) en t_0 que disminuye casi en un 50% a $t = 60 \text{ min}$.

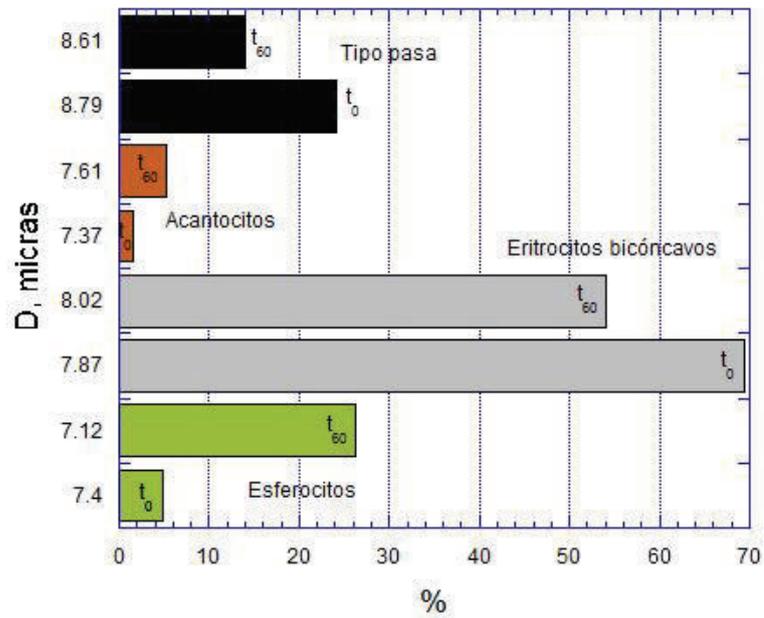


Figura 3.6 b) Histograma de eritrocitos en medio hipotónico. Las barras de error son inapreciables.

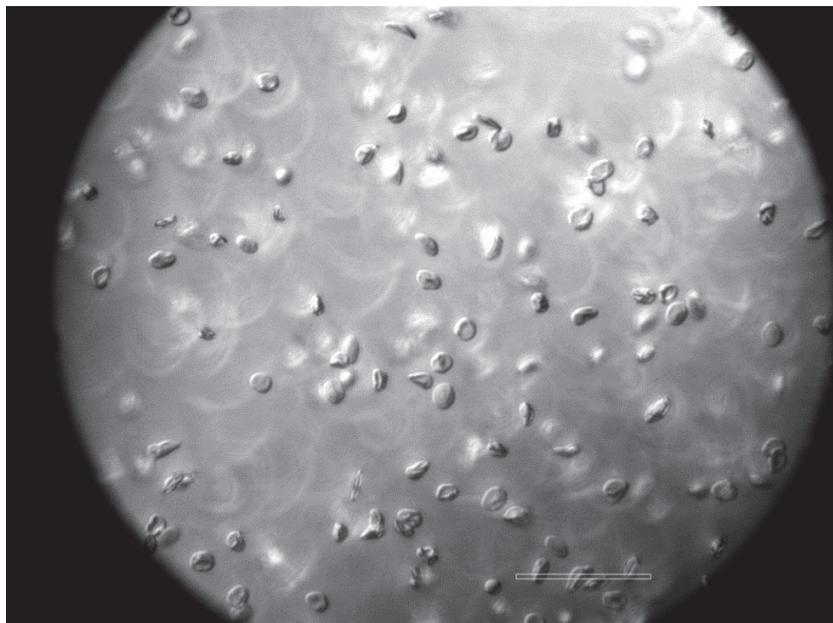


Figura 3.7 a) Imagen a t_0 de microscopía óptica DIC. Eritrocitos en medio isotónico. La escala representa 50 μm .

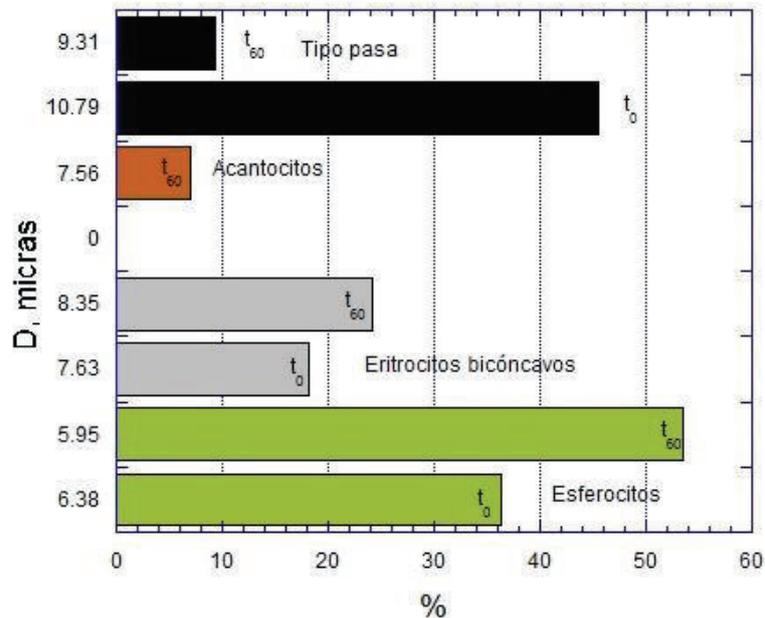


Figura 3.7 b) Histograma de eritrocitos en medio isotónico. Las barras de error son inapreciables.

3.2.2.3 Eritrocitos en medio isotónico

Mediante la técnica DIC, se muestran eritrocitos en medio isotónico en la Figura 3.7a. A simple vista, en proporción, se observan esferocitos y la presencia de eritrocitos “arrugados” tipo pasa. Podemos observar en la Figura 3.7b el histograma de tamaños para eritrocitos en medio isotónico y nos podemos percatar que existe un aumento de población para los esferocitos (color verde) y una disminución en el diámetro. Para el caso de los eritrocitos bicóncavos (color gris) a t_0 existe una población del 18% y $7.63 \mu\text{m}$ de diámetro promedio, por otro lado para $t = 60 \text{ min}$ la población aumenta su población y diámetro. No se registra presencia de acantocitos al t_0 hasta y en $t = 60 \text{ min}$ existe una pequeña población del 7.07% con $7.5 \mu\text{m}$ de diámetro. Para los eritrocitos tipo pasa (color negro) en t_0 existe una población del orden del 45% que desciende drásticamente en $t = 60 \text{ min}$ a 9%.

3.2.2.4 Eritrocitos en medio hipertónico

Las imágenes capturadas con DIC se muestran en la Figura 3.8a. para eritrocitos en medio hipertónico. Se pueden apreciar eritrocitos “arrugados” tipo pasa, esto es debido al medio altamente saturado en sal en el que se encuentran los eritrocitos, esferocitos y eritrocitos bicóncavos. El histograma de tamaños para estos eritrocitos se muestra en la Figura 3.8b.

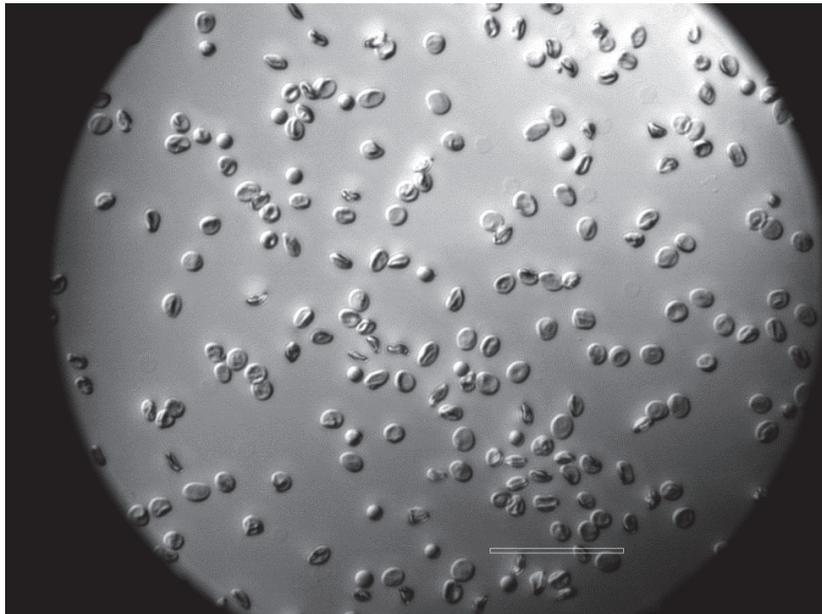


Figura 3.8 a) Imagen a $t = 60 \text{ min}$ de microscopía óptica DIC. Eritrocitos en medio hipertónico.

La escala representa $50 \mu\text{m}$.

Podemos observar en la Figura 3.8b el histograma de tamaños para eritrocitos en medio hipertónico y nos podemos percatar que para eritrocitos deshidratados en el tiempo t_0 (color verde) con un porcentaje poblacional del orden de 21% con un diámetro promedio de $6.52 \mu\text{m}$ que disminuye en $t = 60 \text{ min}$. Mientras que para eritrocitos bicóncavos (color gris) y tipo pasa (color negro) este comportamiento se repite ya que el diámetro disminuye pero la población aumenta. No hay presencia de acantocitos.

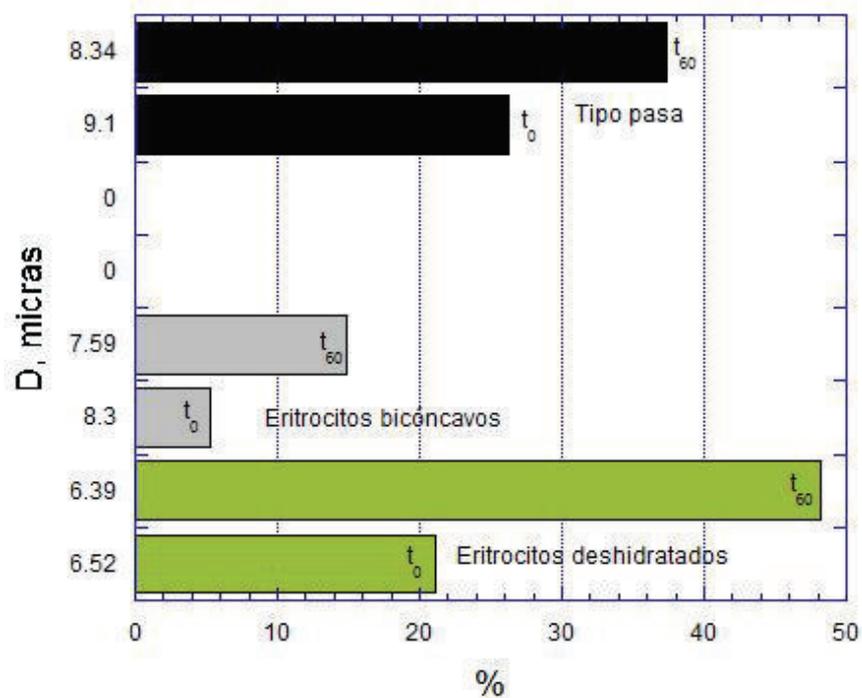


Figura 3.8 b) Histograma de eritrocitos en medio hipertónico. Las barras de error son inapreciables.

3.2.3 Eritrocitos + liposomas

Ahora presentamos el sistema anterior añadiéndole liposomas micrométricos, usando la misma metodología que en el sistema anterior. Cabe mencionar que los liposomas no se aprecian en las siguientes figuras debido a su tamaño (nm) que es muy pequeño comparado al tamaño de los eritrocitos (μm). A continuación, presentamos los resultados.

3.2.3.1 Eritrocitos + liposomas en búfer

Mediante MO (objetivo 20x), se presenta el sistema eritrocitos + liposomas en la Figura 3.9a. Podemos percibir una extensa población de eritrocitos en su forma esférica, denominados esferocitos. El histograma de tamaños para estos eritrocitos se muestra en la Figura 3.9b. Al momento de hincharse quiere decir que la concentración de soluto es menor fuera de la membrana que adentro, por lo que tiende a hincharse.

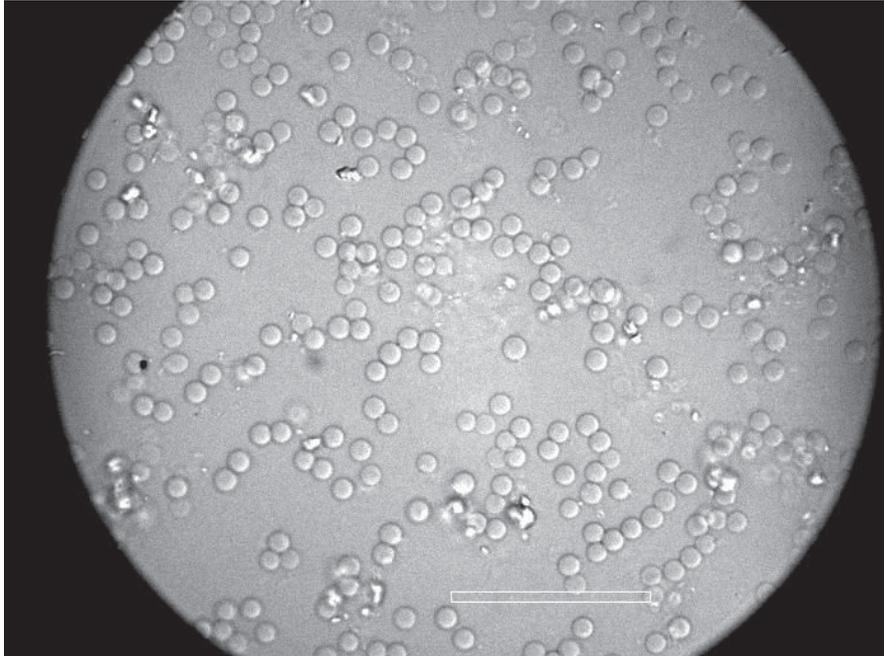


Figura 3.9. a) Imagen a $t = 60 \text{ min}$ de microscopía óptica 20x. Eritrocitos + liposomas en búfer. La escala es de $100 \mu\text{m}$.

La Figura 3.9b muestra el histograma de tamaños para eritrocitos + liposomas en ausencia de sal, se observa que para los esferocitos en t_0 (color verde) hay un porcentaje del 75.55% mientras que para $t = 60 \text{ min}$ 72.77% con un diámetro promedio del $11.33 \mu\text{m}$. Por otro lado, para el caso de los eritrocitos bicóncavos, en t_0 tenemos un porcentaje del orden de 24.44% con un diámetro promedio de $10.98 \mu\text{m}$, mientras que para t_{60} se muestra una población del 27.77% con un diámetro promedio de $11.43 \mu\text{m}$.

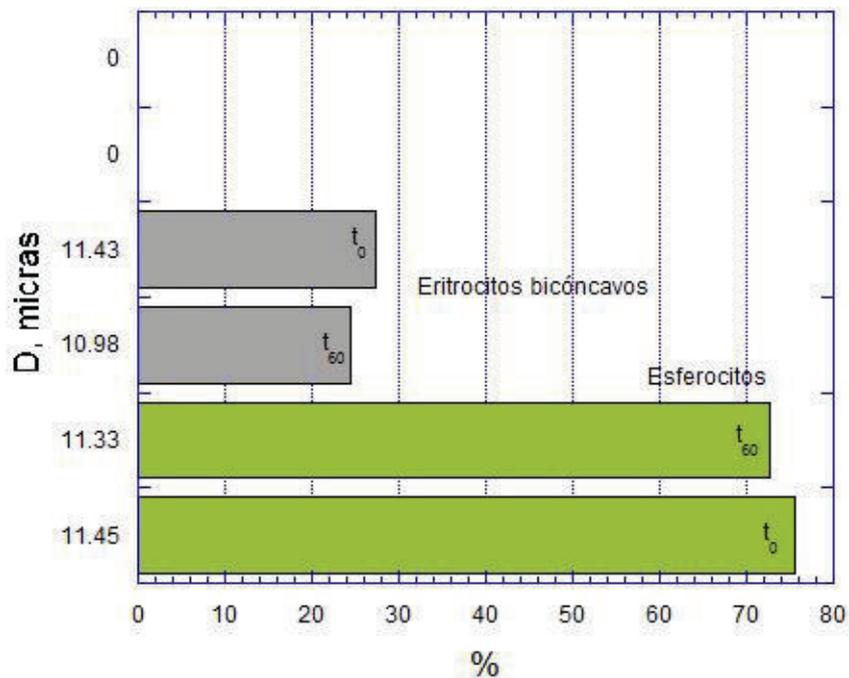


Figura 3.9 b) Histograma de eritrocitos + liposomas en buffer. Las barras de error son inapreciables.

3.2.3.2 Eritrocitos + liposomas en medio hipotónico

La técnica DIC para eritrocitos + liposomas en medio hipotónico se muestra en la Figura 3.10a. Podemos apreciar una mayor cantidad de eritrocitos “arrugados” tipo pasa, esferocitos, acantocitos y eritrocitos bicóncavos. Lo cual corresponde a lo que observamos cuando estudiamos sólo el sistema de eritrocitos en medio hipotónico. Podemos decir que la presencia de liposomas en el sistema de eritrocitos no afecta la forma de éstos. El histograma de tamaños para estos eritrocitos + liposomas se muestra en la Figura 3.10b

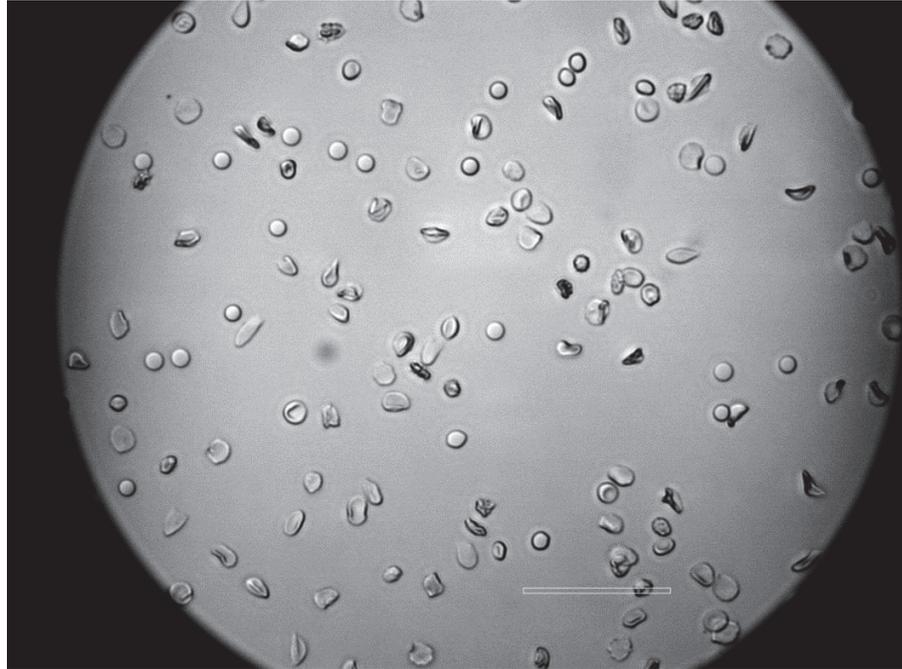


Figura 3.10 a) Imagen a $t = 60 \text{ min}$ de microscopía óptica DIC. Eritrocitos + liposomas en medio hipotónico. La escala representa $50 \mu\text{m}$.

Podemos observar en la Figura 3.10b el histograma de tamaños para eritrocitos + liposomas en medio hipotónico y nos podemos percatar que para esferocitos (color verde) en el tiempo t_0 tenemos un porcentaje del 23.07% y en $t = 60 \text{ min}$, 58.82%, disminuyendo su diámetro. Para eritrocitos bicóncavos (color gris) en t_0 existe una población del 26% con un diámetro de $7.37 \mu\text{m}$. Mientras que 60 minutos después, éste disminuye en diámetro y población. Mientras que los acantocitos (color naranja) tienen cambios inapreciables. Por otro lado, los eritrocitos tipo pasa (color negro), disminuye su población y conservando su diámetro.

Comparando con el sistema de eritrocitos en medio hipotónico, los liposomas parecen afectar al diámetro de los eritrocitos en sus diferentes formas.

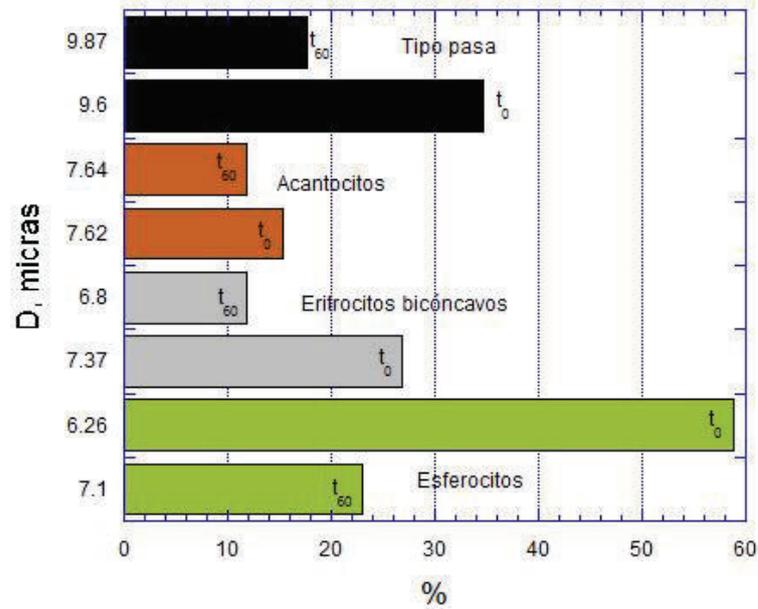


Figura 3.10 b) Histograma de eritrocitos + liposomas en medio hipotónico. Las barras de error son inapreciables.

3.2.3.3 Eritrocitos + liposomas en medio isotónico

La observación con DIC para eritrocitos + liposomas en medio isotónico se muestra en la Figura 3.11a. Podemos observar la presencia de esferocitos, eritrocitos bicóncavos y eritrocitos “arrugados” tipo pasa. El histograma de tamaños para estos eritrocitos se muestra en la Figura 3.11b.

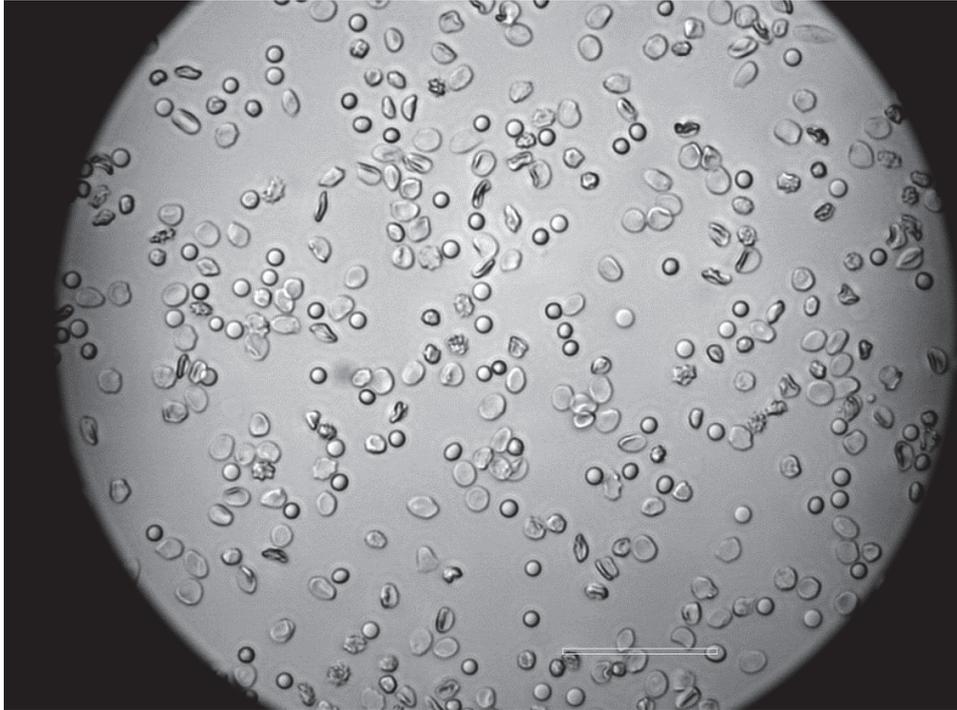


Figura 3.11 a) Imagen a t_0 de microscopía óptica DIC. Eritrocitos + liposomas en medio isotónico. La escala representa $50 \mu m$.

En Figura 3.11b se presenta el histograma de tamaños para eritrocitos + liposomas en medio isotónico y nos podemos percatar que para los esferocitos (color verde) en t_0 existe una población del 56% con un diámetro del orden de $5.4 \mu m$, en $t = 60 \text{ min}$ se mantiene igual el diámetro y aumenta su población a 68%. Los eritrocitos bicóncavos (color gris) mantienen su población y su diámetro. Mientras que los acantocitos (color naranja) en t_0 presentan un diámetro del orden de $7.51 \mu m$ con una población del 19% y en el caso de los eritrocitos tipo pasa (color negro) también se mantiene el tamaño de su diámetro y la población.

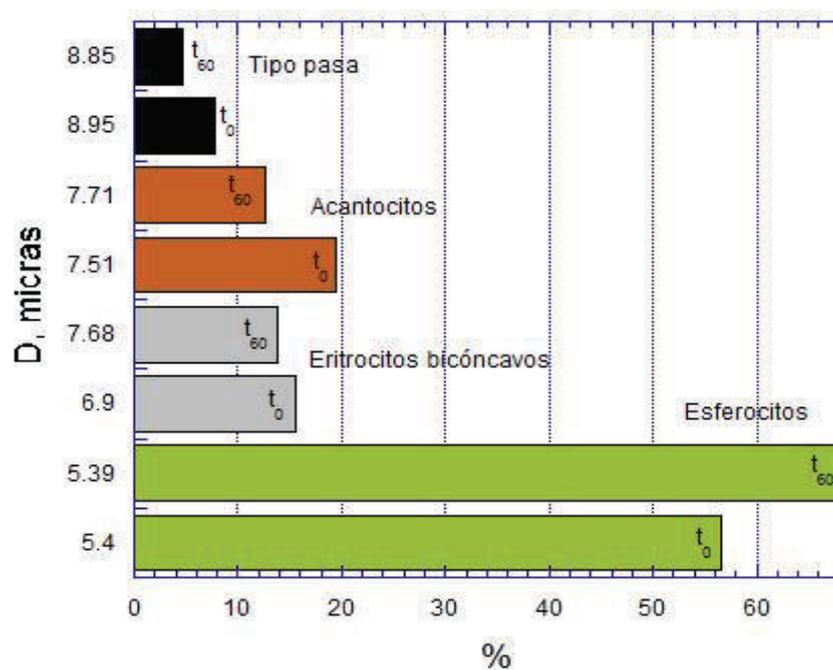


Figura 3.11 b) Histograma de eritrocitos + liposomas en medio isotónico. Las barras de error son inapreciables.

3.2.3.4 Eritrocitos + liposomas en medio hipertónico

Aplicando la técnica DIC para eritrocitos + liposomas en medio hipertónico se muestra en la Figura 3.12a. Podemos apreciar esferocitos, eritrocitos “arrugados” tipo pasa, y eritrocitos bicóncavos esto es debido al medio altamente saturado en sal en el que se encuentran los eritrocitos. El histograma de tamaños para estos eritrocitos se muestra en la Figura 3.12b.

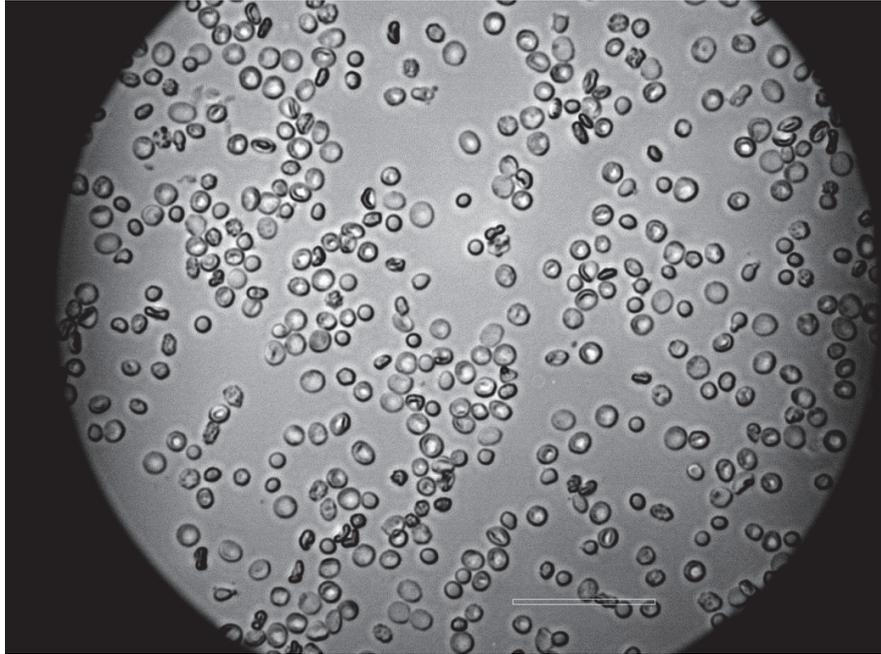


Figura 3.12 a) Imagen a $t = 60 \text{ min}$ de microscopía óptica DIC. Eritrocitos + liposomas en medio hipertónico. La escala representa $50 \mu\text{m}$.

En Figura 3.12b se presenta el histograma de tamaños para eritrocitos + liposomas en medio hipertónico. Se observa que para los eritrocitos deshidratados (color verde) en t_0 se tiene una población del 26% con $5.55 \mu\text{m}$ de diámetro, en $t = 60 \text{ min}$ aumenta ligeramente un 29% con un diámetro de $5.86 \mu\text{m}$. Los eritrocitos bicóncavos (color gris) presentan $7.47 \mu\text{m}$ de diámetro con una población del orden de 42%. Mientras que los acantocitos (color naranja) tienen un diámetro de $6.2 \mu\text{m}$ con un 11% de población y para $t = 60 \text{ min}$, éste aumenta su diámetro y población a $6.45 \mu\text{m}$ y 16% respectivamente.

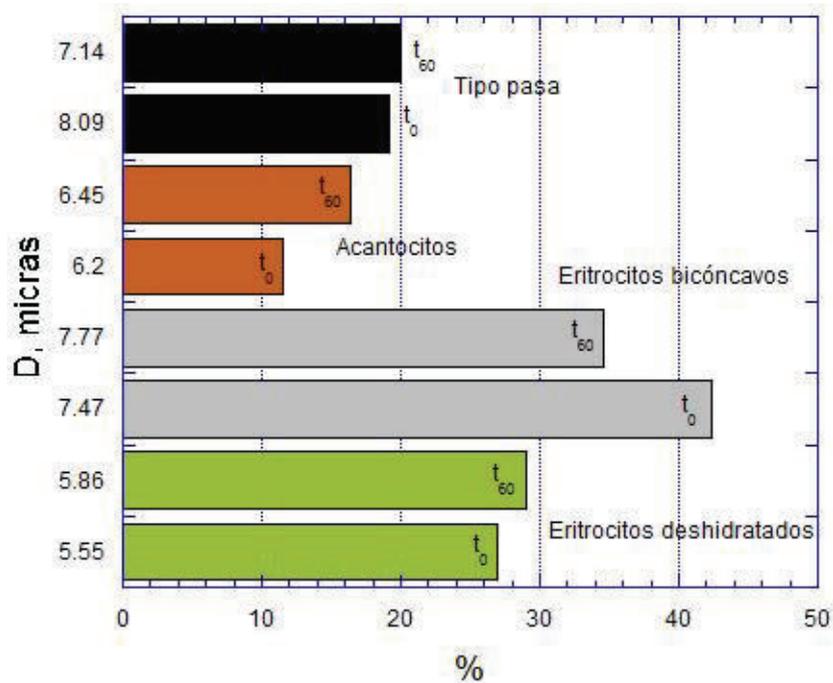


Figura 3.12 b) Histograma de eritrocitos + liposomas en medio hipertónico. Las barras de error son inapreciables.

3.2.4 Discusión de resultados de DIC

Los resultados obtenidos por Microscopía Óptica y DIC indican que:

- La presencia de sales en el solvente afecta la morfología de los eritrocitos. Este resultado coincide con lo ya publicado en la literatura.
- Cuando se añaden liposomas en baja concentración al medio iónico, también existe interacción, pero el liposoma parece afectar de forma diferente dependiendo del medio.

Tales observaciones indican que las interacciones liposoma eritrocito estabilizan el sistema, pero favoreciendo una u otra forma y número de población dependiendo del grado iónico. Así, la interacción electrostática liposoma - eritrocito, liposoma – liposoma, eritrocito -

eritrocito y liposoma (o eritrocito) – solvente favorece la presencia selectiva de morfologías del hematíe.

3.3 Dispersión dinámica de luz

Los resultados experimentales obtenidos para el sistema de liposomas en sus cuatro variantes (ausencia de sal, hipotónico, isotónico, e hipertónico) se presentan en esta sección. Al final de la sección se discuten los resultados experimentales. Puesto que en un experimento de DLS se requiere estabilidad termodinámica. A continuación, se presentan las consideraciones de estabilidad que se tomaron en cuenta para proceder a tomar como válidos los resultados experimentales.

Para hacer mediciones en el DLS, se tomó una muestra de liposomas con diferentes búferes, a 4 ángulos diferentes. 50°, 70°, 90° y 110°. Corridas de 2 minutos, 4 mediciones a 25°C. El experimento fue repetido una vez más en una segunda muestra para cada una de las concentraciones salinas.

Consideraciones de estabilidad

Primeramente, nos aseguramos que la intensidad de dispersión en el tiempo fluctuara alrededor de una línea horizontal, es decir, un valor promedio y que no disminuyera ni aumentara drásticamente (Figura 3.13a). En segundo lugar, se aseguró que la diferencia entre la línea base y el valor de la función de correlación a tiempos posteriores al tiempo característico fuera inapreciable (cualitativamente hablando) (Figura 3.13b). Estas dos consideraciones, en nuestra opinión, son importantes y necesarias para considerar estabilidad termodinámica y reproducibilidad de resultados.

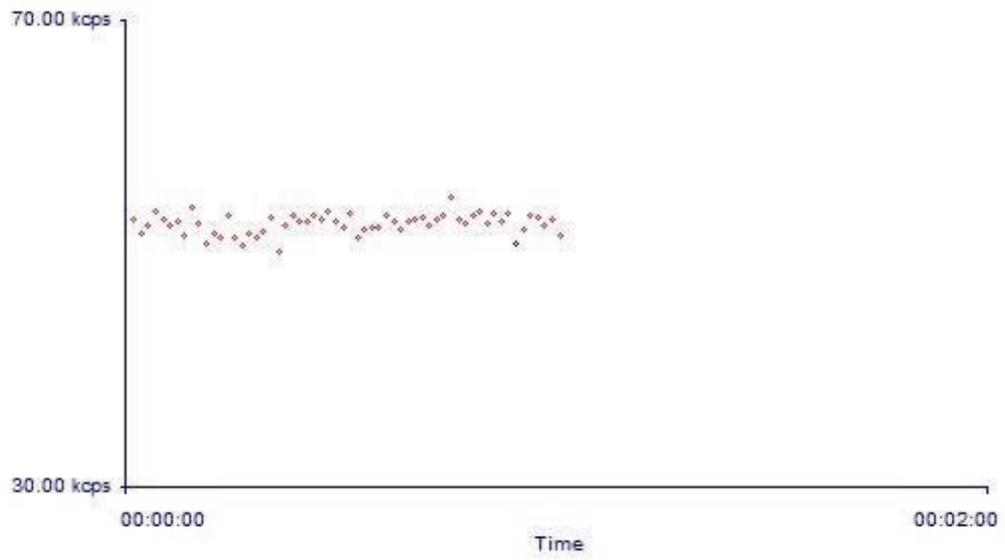


Figura 3.13 a) Intensidad de dispersión vs tiempo en un experimento de DLS.

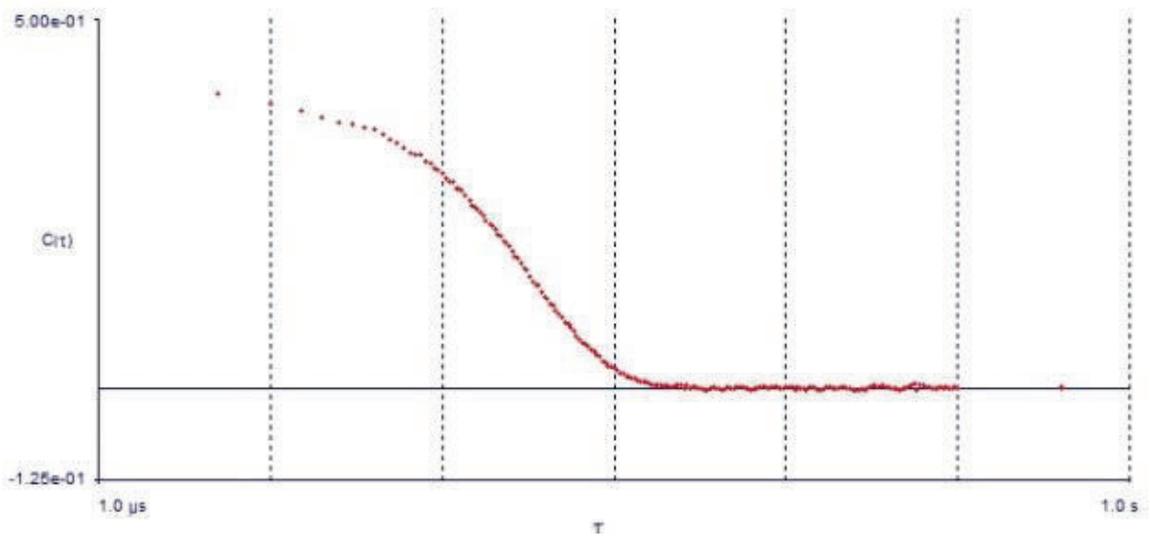


Figura 3.13 b) Función de correlación típica en DLS. Las figuras corresponden a un experimento de liposomas en medio hipotónico.

3.3.1 Liposomas en búfer

En la Figura 3.14 se presenta el inverso del tiempo característico (Γ) vs el cuadrado del vector de onda (q^2). Los puntos experimentales representan el promedio de 10 medidas (5 medidas por muestra). Se observa una dependencia lineal entre Γ y q^2 . El ajuste lineal permite encontrar el coeficiente de difusión, el cual es la pendiente de la recta. Se observa que la línea recta no interseca en $y = 0$. El valor de este coeficiente es $5.0425 \times 10^6 \pm 2.3566 \times 10^5 \text{ nm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ que corresponde a un radio hidrodinámico de $59.98 \pm 4.45 \text{ nm}$. (Ver Anexo II)

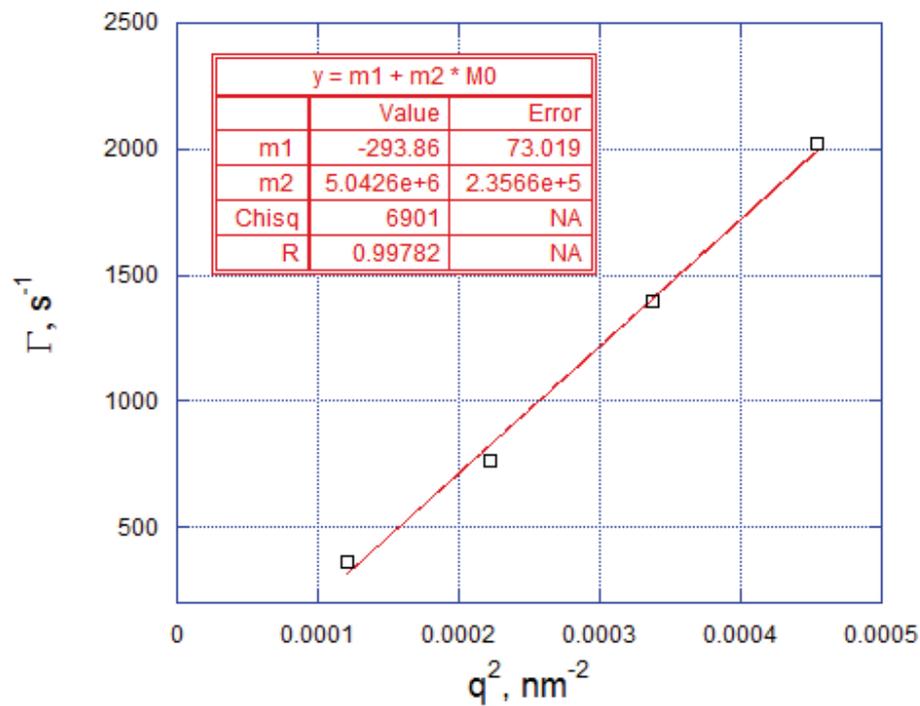


Figura 3.14 La gráfica representa el inverso del tiempo característico Γ vs el cuadrado del vector de onda q^2 , correspondiente a liposomas extruidos en búfer.

3.3.2 Liposomas en medio hipotónico

Como en el caso de liposomas en ausencia de sal Γ tiene una dependencia lineal en q^2 (Figura 3.15). El ajuste por una línea recta nos da un coeficiente de difusión de $4.4164 \times 10^6 \pm 3.083 \times 10^5 \text{ nm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ que corresponde a $59.98 \pm 6.29 \text{ nm}$ de radio. Nuevamente el intercepto en $y \neq 0$ (Ver Anexo II).

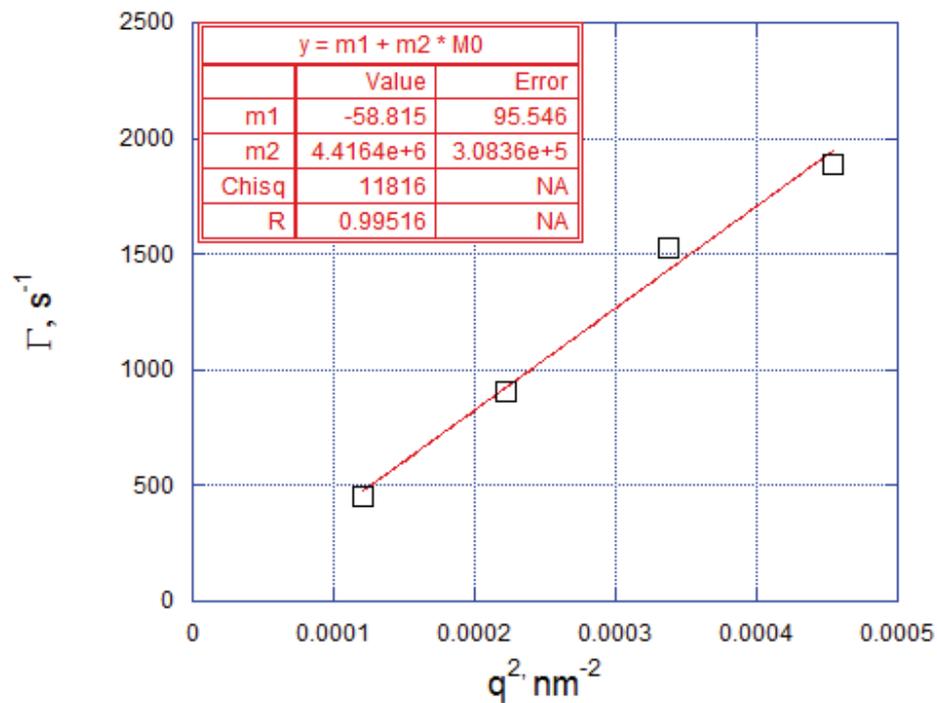


Figura 3.15 La gráfica representa el inverso del tiempo característico Γ vs el cuadrado del vector de onda q^2 , correspondiente a liposomas extruidos en medio hipotónico.

3.3.3 Liposomas en medio isotónico

Para este sistema Γ también tiene una dependencia lineal en q^2 (Figura 3.16). El ajuste por una línea recta nos da un coeficiente de difusión de $4.8725 \times 10^6 \pm 1.0493 \times 10^5 \text{ nm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ que

corresponde a $51.62 \pm 1.67 \text{ nm}$ de radio. De nuevo el intercepto en $y \neq 0$ pero un poco mayor que el obtenido para liposomas en medio hipotónico (Ver Anexo II).

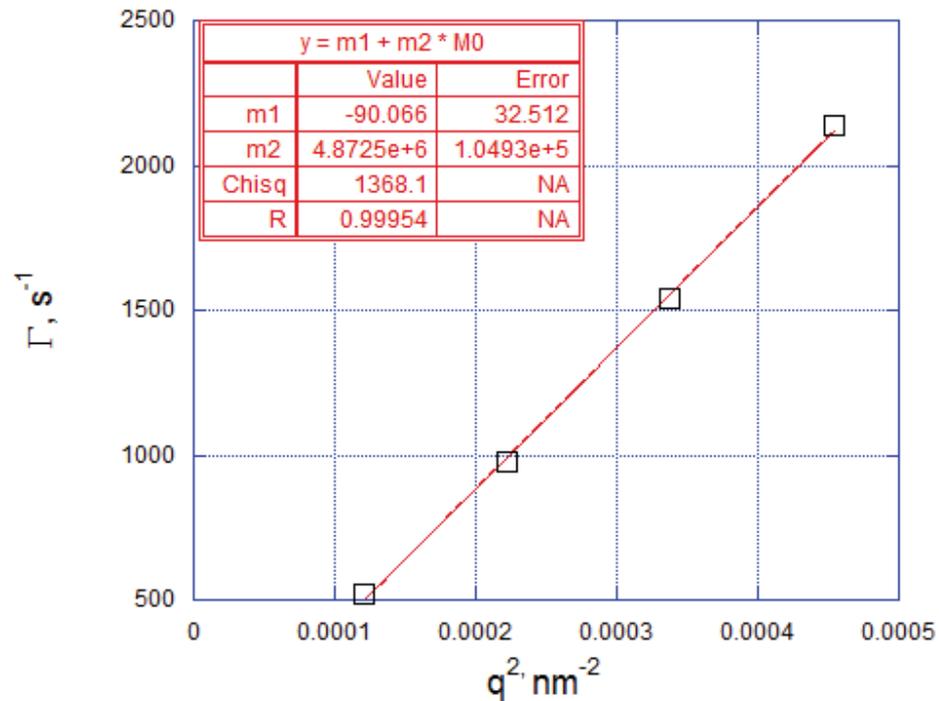


Figura 3.16. La gráfica nos muestra el inverso del tiempo característico Γ vs el cuadrado del vector de onda q^2 , correspondiente a liposomas extruidos en medio isotónico.

3.3.4 Liposomas en medio hipertónico

Como para los tres sistemas anteriormente presentados, Γ también tiene una dependencia lineal en q^2 (Figura 3.17). El ajuste por una línea recta nos da un coeficiente de difusión de es $4.7645 \times 10^6 \pm 2.9298 \times 10^5 \text{ nm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ que corresponde a $60.41 \pm 8.94 \text{ nm}$ de radio. Se obtiene de nuevo un intercepto en $y \neq 0$ del mismo orden que para el caso de liposomas en ausencia de sal (Ver Anexo II).

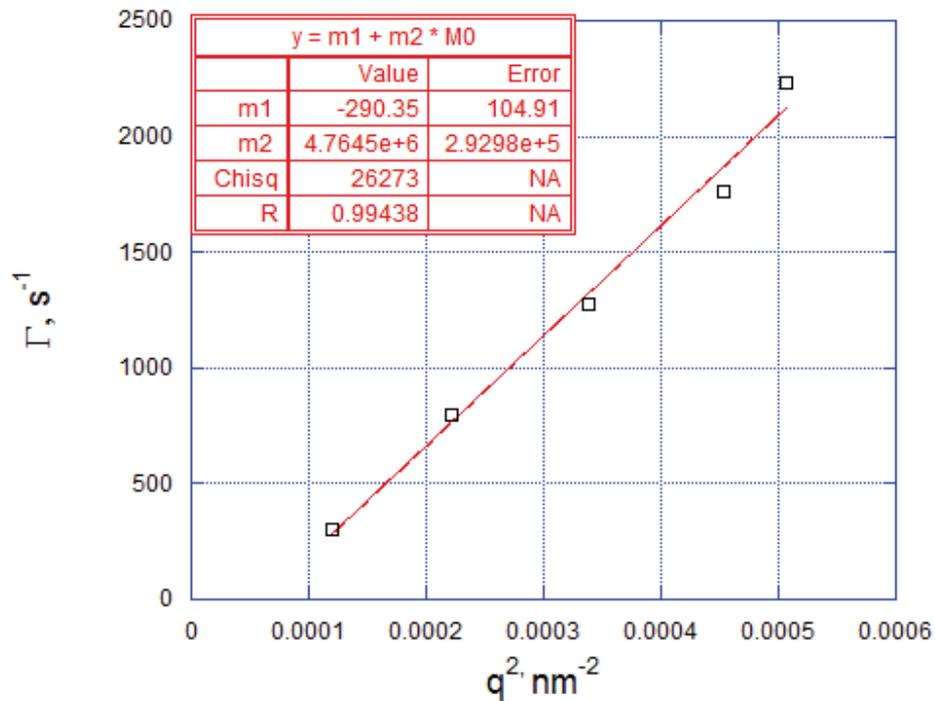


Figura 3.17. Gráfica de inverso del tiempo característico Γ vs el cuadrado del vector de onda q^2 , correspondiente a liposomas extruidos en medio hipertónico.

El conjunto de coeficientes de difusión obtenidos está graficado en la Figura 3.18. El promedio obtenido (línea horizontal) es de $4.3145 \times 10^6 \text{ nm}^2 \text{ s}^{-1}$. Se observa que la desviación estándar es mayor para liposomas en medio hipotónico y en medio hipertónico (Ver Anexo II). El radio correspondiente a los coeficientes de difusión obtenidos está graficado en la Figura 3.19. Como se observa la menor variación se da para un radio de liposomas en medio isotónico. El valor promedio de radio obtenido para todos los casos (muy cercano al de liposomas en medio isotónico) es de 57.97 nm . Para ver más sobre los cálculos de índice de polidispersidad, radio efectivo, etc. consultar Anexo III.

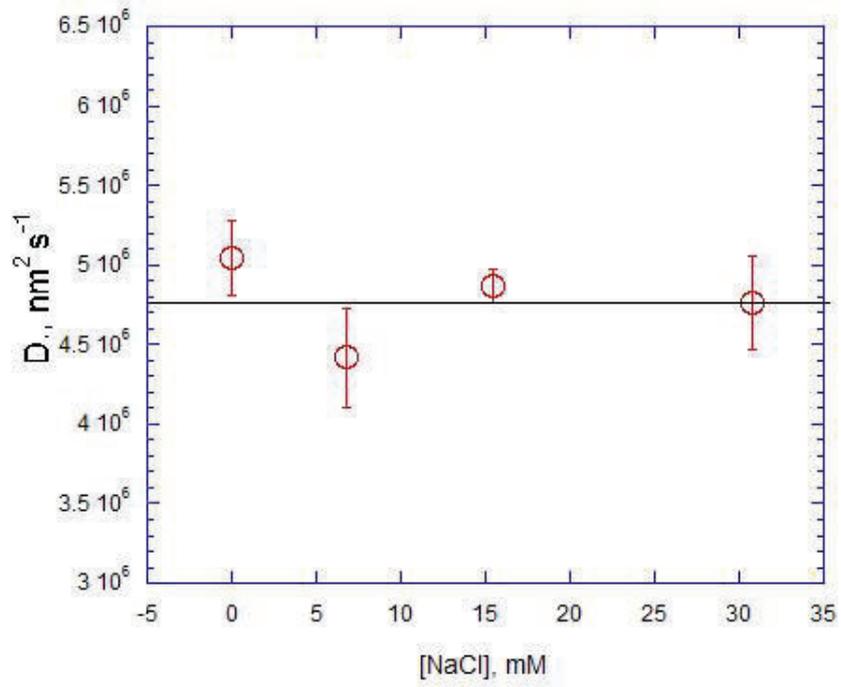


Figura 3.18. Gráfica de Coeficiente de Difusión vs [NaCl]

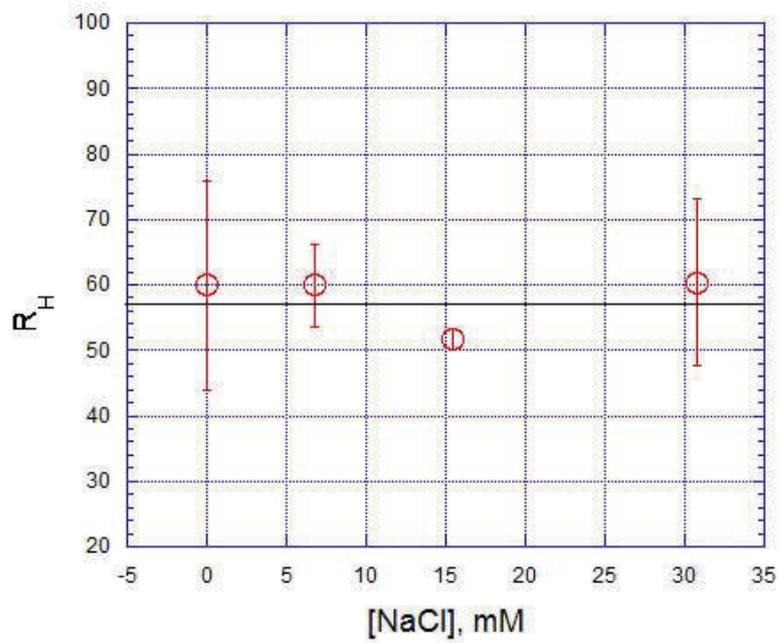


Figura 3.19. Radio hidrodinámico (R_H) vs [NaCl] para todos los sistemas estudiados. La línea horizontal representa el radio hidrodinámico promedio con un valor de 57.97 nm.

3.3.5 Discusión de resultados de DLS

Comparando los cuatro coeficientes de difusión obtenidos de las pendientes de las gráficas para liposomas en distintos medios, podemos decir que es razonable que para el caso de liposomas en ausencia de sal tenga un valor mayor lo que proporciona mayor facilidad de movimiento en el disolvente. Sabemos que el coeficiente de difusión depende del tamaño, forma del soluto, viscosidad del solvente, temperatura y de la naturaleza de la partícula que difunde. En nuestro caso, las variaciones de tamaño son mínimas y podemos considerar que, para las concentraciones trabajadas, el coeficiente de difusión es independiente de las concentraciones de sal.

Respecto a la desviación del ajuste lineal del cero de intercepción, las causas posibles son: a) la existencia de más de una distribución de tamaño y, b) el efecto de interacciones hidrostáticas separa el sistema en dos o más poblaciones de liposomas con altos índices de polidispersión (ver Anexo III).

3.4 Eritrocitos en campo eléctrico sinusoidal

En esta sección tenemos a nuestro sistema de eritrocitos en distintos medios, pero ahora aplicando un campo electro sinusoidal. A continuación, presentamos los resultados obtenidos (Figura 3.20).

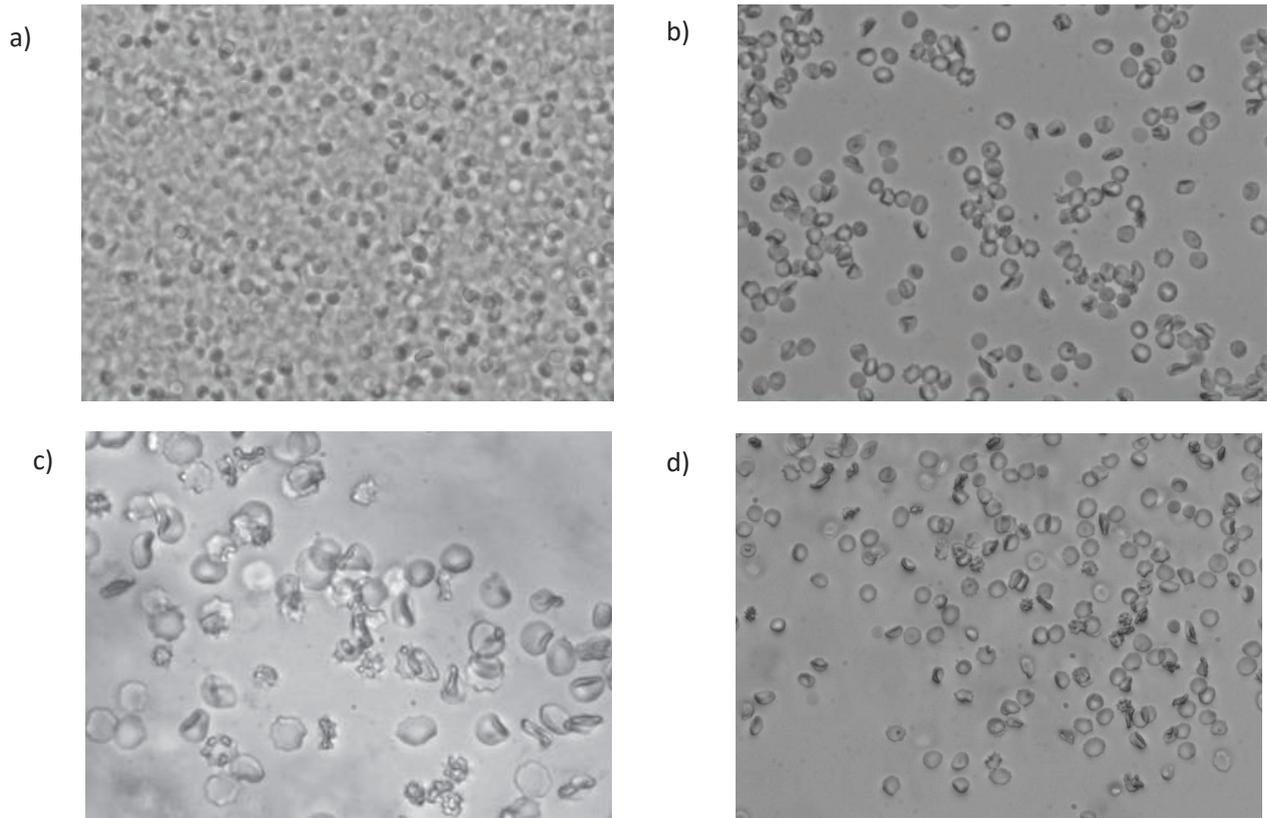


Figura 3.20. Eritrocitos aplicando corriente directa. Observación en campo claro objetivo 20x. a) en ausencia de sal, b) en medio hipotónico, c) medio isotónico, d) medio hipertónico

Retomamos el sistema eritrocito + liposoma, pero ahora aplicando campo eléctrico sinusoidal para estudiar si el contacto con ésta más un campo perturba la forma de los eritrocitos. A continuación, presentamos los resultados (Figura 3.21).

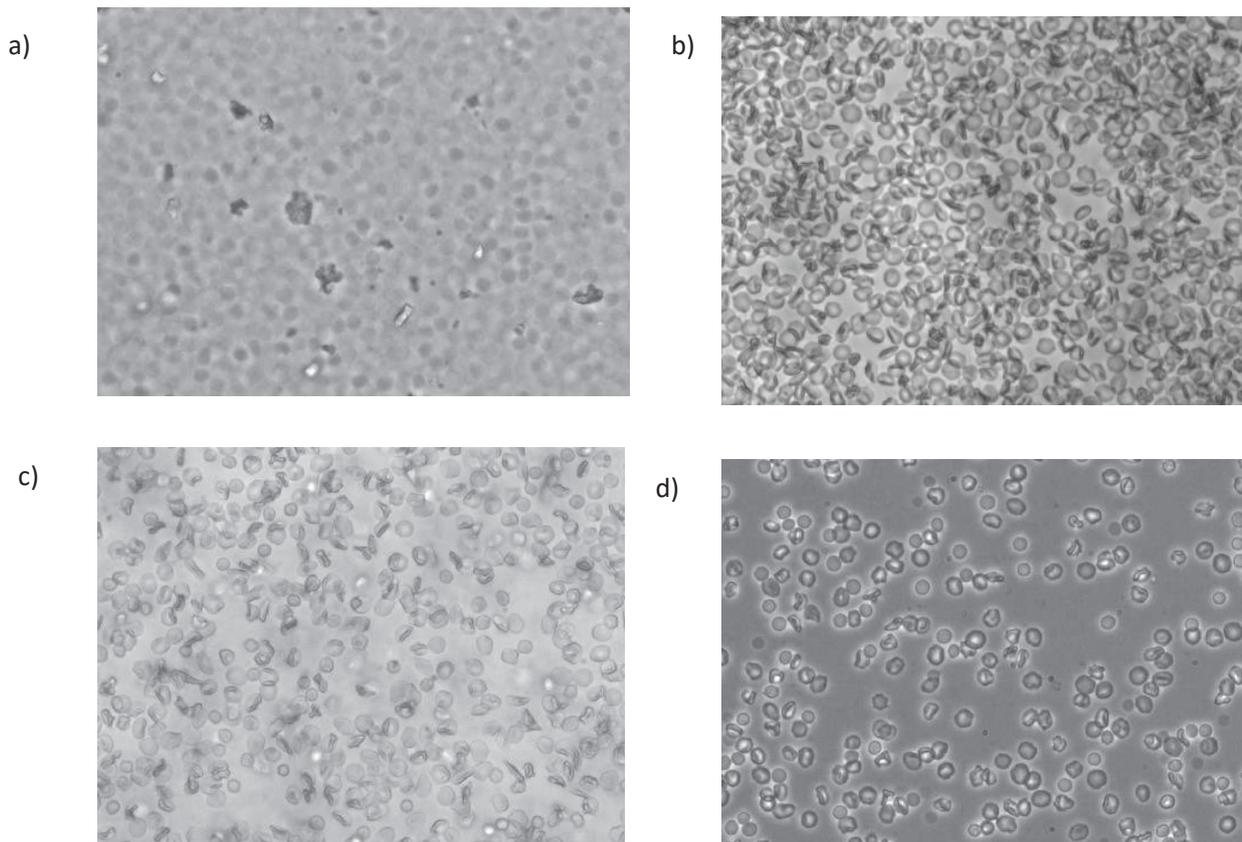


Figura 3.21. Eritrocitos + liposomas aplicando corriente directa. Observación en campo claro objetivo 20x.

a) en ausencia de sal, b) en medio hipotónico, c) medio isotónico, d) medio hipertónico

3.4.1 Discusión de resultados de campo eléctrico sinusoidal

Una comparación cualitativa de los resultados experimentales obtenidos por Microscopía Óptica y presentados en las imágenes anteriores indica que:

- a) Para el sistema eritrocito + liposoma al aplicar un campo sinusoidal (corriente alterna), no se muestran diferencias apreciables en tamaño y forma.
- b) Por otro lado, cuando añadimos un campo eléctrico directo al campo sinusoidal a eritrocitos + liposomas en ausencia de sal y en medio isotónico, éste no producía un

flujo; en medio hipotónico e hipertónico se producía un flujo, donde el campo era perpendicular a la superficie y el flujo tangente a la superficie.

Estos resultados indican que el flujo de eritrocitos + liposomas puede deberse al flujo de iones libres o atados tanto al liposoma como al eritrocito en la dirección perpendicular al campo. El flujo en esta dirección, contrario al flujo que debiera presentarse en la dirección del campo, puede deberse a diferencias de temperatura generadas por la diferencia de potencial (calentamiento de los ITOs), ya que se observó que estos se sobrecalentaban.

IV. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se concluye que el tamaño y morfología del **eritrocito en ausencia de liposomas** son afectados por el búfer y medio salino. Las formas que prevalecen en medio hipotónico son las de esferocito y eritrocito bicóncavo; para el medio isotónico la de esferocito es la mayoritaria, mientras que para medio hipertónico se tiene un mayor porcentaje de eritrocito deshidratado.

Con respecto al sistema **eritrocito + liposoma**, se observó que los eritrocitos bicóncavos en búfer aumentan su población y diámetro. En medio hipertónico disminuye su población, pero aumenta su tamaño. Para el medio isotónico, aumenta su tamaño, pero disminuye su población. Los acantocitos en buffer no coexisten; en medio hipotónico conservan el tamaño y disminuye población. Para el medio isotónico, disminuye su población y tamaño mientras que, en medio hipertónico, la población y tamaño de acantocitos aumenta.

Por otra parte, la **aplicación de un campo eléctrico sinusoidal** junto con uno directo, genera un flujo perpendicular al campo para medios hipotónicos e hipertónicos.

Perspectivas

Por otra parte, los resultados de DLS abren una perspectiva para construir un modelo de interacción eritrocito + liposoma tomando como base la interacción DLVO y el efecto de tamaño en los cambios de forma y número de eritrocitos en medio acuoso iónico. Liposomas con menor radio hidrodinámico conducirían a una mayor área de contacto con el eritrocito de modo de incrementar la magnitud de las interacciones.

Una segunda perspectiva de este trabajo de tesis sería extensión de este trabajo mediante experimentos de potencial zeta, microscopía confocal y microscopía electrónica.

Adicionalmente estudios complementarios con diferentes búferes y fosfolípidos cargados pueden dar información complementaria para comprender la interacción eritrocito liposoma.

Finalmente, una extensión posible del trabajo es estudiar el proceso de fusión celular mediante la aplicación de campos eléctricos a un sistema compuesto por liposomas catiónicos preparados por electroformación y eritrocitos.

V. BIBLIOGRAFÍA

1. Silverthorn, D. Fisiología Humana. Cuarta edición, Editorial Panamericana, 2008.
2. Torres, J. & Durán, S. (2015). Fosfolípidos: Propiedades y efectos sobre la salud. *Nutrición hospitalaria*, **31**, 76-83.
3. Devlin T. M. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. Cuarta edición, Ed. Reverté, 2004.
4. Stein W. D. Transport and diffusion across cell membranes. Academic Press. 1986.
5. Hernández, G. et al Treatise on Pharmaceutical Medicine. Ed. Panamericana (2010), 136-138.
6. Israelachvili J. Intermolecular and Surface forces third ed. Elsevier, 2011.
7. Akbarzadeh, A. et al (2013). Liposomes: classification, preparation and applications. *Nanoscale Research Letters* **8**, 1-9.
8. Arteaga, A. et al (2015). Polimorfismo de liposomas. *Epistemus* **18**, 90-95.
9. Murillo, M. et al. (2001) Controlled liberation of active principles by means of new galenic formulations. *Rev Med Univ Navarra* **4**, 19-34.
10. Lasic, D. (1997) Liposomes in Gene Delivery, CRC Press LLC. Avanti.
11. Dua, J, et al. (2012). Liposome: methods of preparation and applications. *International Journal of Pharmaceutical Studies and Research* **3**, 14-20.
12. Szoka, F., (1980) Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). *Ann. Rev. Biophys. Bioeng* **9**, 41.
13. Muñoz, S. (2006) Modeling Human Erythrocytes Shape and Size Abnormalities. *Bioelectromagnetism* **7**, 521-7.
14. Fernandes, H., Cesar, C. & Barjas, M. (2011) Electrical properties of red blood cell membrane and immunhematological investigation, *Rev Bras Hematol Hemoter* **4**, 297-301.
15. Bratosin, D. et al (1998). Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochemie* **80**, 173-195.
16. Carr J. H. & Rodak B. F. Atlas de Hematología clínica, tercera ed., Ed. Panamericana, 2010.
17. Manascero G., Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas, Ed. Centro Editorial Javeriano, 2003.
18. Miale J., Hematología: medicina de laboratorio, Ed. Reverté, 1985.

19. García C., Introducción a la termodinámica de sistemas abiertos. México: El Colegio Nacional, 1981.
20. Merí, A. Fundamentos de fisiología, primera edición, Editorial médica panamericana, 2005.
21. Giancoli, D. Física para ciencias e ingeniería, cuarta edición, Prentice Hall, 2008, 359-360.
22. Waigh T., Applied Biophysics: A Molecular approach for Physical Scientists, John Wiley & Sons, 2007, 25-44.
23. Reitz J. R., Milford F. J. and Christy R. W., Fundamentos de la Teoría Electromagnética, tercera edición, Fondo de Cultura Interamericano, 1984.
24. Storcka, A. et al (2013). Effect of Liposomal Curcumin on Red Blood Cells In Vitro. *Anticancer Research* **33**, 3629-3634.
25. Pawlikoska-Pawlega B. et al. (2014), Biophysical characterization of genistein–membrane interaction and its correlation with biological effect on cells — The case of EYPC liposomes and human erythrocyte membranes, *Biochim Biophys Acta* **1838**(8), 2127-38.
26. Stoll C. et al. (2011), Liposomes alter thermal phase behavior and composition of red blood cell membranes. *Biochim Biophys Acta* **1808**(1), 474-81.
27. Bonarska-Kujawa, D., Pruchnik, H. and Kleszczyńska H. (2012). Interaction of selected anthocyanins with erythrocytes and liposome membranes. *Cell Mol Biol Lett.* **17**(2), 289-308.
28. Menger, F. M. and Angelova, M. I. (1998) Giant Vesicles: Imitating the Cytological Processes of Cell Membrane. *Accounts of Chemical Research*, **12**, 789-797.
29. Levine, S. (1983) Theory of the electrokinetic behavior of human erythrocytes. *Biophys J.* **42**(2), 127-135.
30. Venegas, A., Tiusabá, J. and Garavito, G. (2013). Study of Electrical Properties of Human Erythrocytes. *Revista Colombiana de Física*, **45**(1), 96-100.
31. Wayne, R. Light and Video Microscopy, segunda edición, Elsevier/Academic Press, 2014.
32. Berne B. & Pecora R., Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology, and Physics, John Wiley & Sons, 1990, 10-91.
33. Barron A. R. Editor. Physical Methods in Chemistry and Nano Science. Rice University, 2012.

V. ANEXOS

Anexo I. Ósmosis

Para definir el fenómeno del osmosis, visualicemos un sistema dividido por una membrana rígida, permeable a la componente (1) (Figura A1)

El sistema consta de dos fases: la fase (1), con una componente, y la fase (2), con dos componentes. El ejemplo más común es imaginar al sistema como azúcar y agua, llamando a uno soluto y al otro solvente. Las presiones en ambas fases no son necesariamente iguales; además, existen dos pistones a los extremos que controlan los volúmenes de las fases.

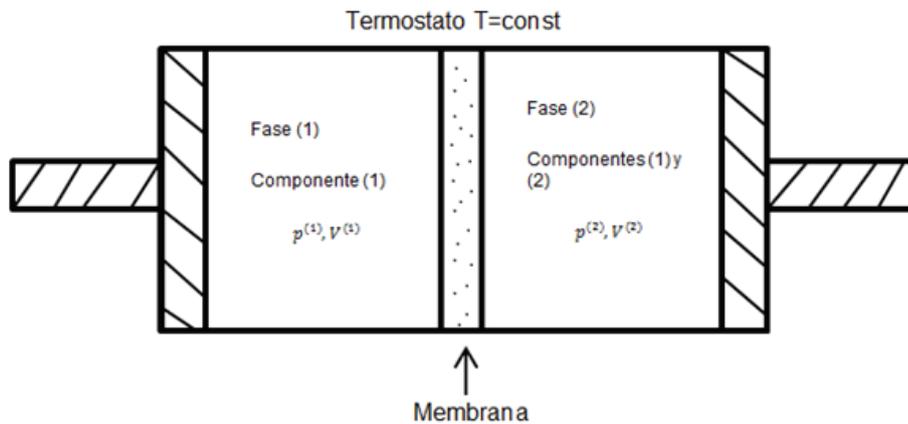


Figura A1. Modelo básico para entender el fenómeno de la osmosis [13].

El sistema en un estado de equilibrio tiene volúmenes $V^{(1)}$ y $V^{(2)}$ pero si el sistema deja de estar en equilibrio, el trabajo realizado por el sistema se representa como

$$dW_{0,rev} = p^{(1)}dV^{(1)} + p^{(2)}dV^{(2)} \quad (A1)$$

Sustituyendo en la primera ley de la termodinámica

$$\Delta\phi = \Delta U - (\Delta W_0)_{rev} - TdS - \sum_i \sum_j \mu_i^{(j)} d\eta_i^{(j)} \quad (A2)$$

Obtenemos

$$\delta\varphi = \delta U - T\delta S + p^{(1)}\delta V^{(1)} + p^{(2)}\delta V^{(2)} \quad (\text{A3})$$

Donde δ representa un proceso virtual infinitesimal hacia un estado de equilibrio con mayor grado de restricciones. Esta ecuación tiene una semejanza con la variación de una función de Gibbs. Para extraer las características de equilibrio del sistema, se necesita un potencial termodinámico que tenga un valor extremal para las restricciones iniciales; es decir, se necesita una función termodinámica que imite a φ para distintas trayectorias.

Sea

$$\emptyset = U - TS + p^{(1)}V^{(1)} + p^{(2)}V^{(2)} \quad (\text{A4})$$

Donde \emptyset es una función termodinámica, ya que es función de U, T, S, p y V; (sin ser la función de Gibbs, ya que $p^{(1)} \neq p^{(2)}$).

Ahora, si se toma una trayectoria donde la temperatura y las presiones son constantes, tenemos que

$$(\delta\emptyset)_{T,p^{(1)},p^{(2)}} = \delta U - T\delta S + p^{(1)}\delta V^{(1)} + p^{(2)}\delta V^{(2)} \quad (\text{A5})$$

Y

$$(\delta\emptyset)_{T,p^{(1)},p^{(2)}} = (\delta\varphi)_{T,p^{(1)},p^{(2)}} = 0$$

\emptyset imita a φ para esta trayectoria en particular. Si se introduce la hipótesis de aditividad para la energía interna y la entropía

$$U = U^{(1)} + U^{(2)} \quad (\text{A6})$$

$$S = S^{(1)} + S^{(2)} \quad (\text{A7})$$

Entonces,

$$\emptyset = [U^{(1)} + p^{(1)}V^{(1)} - TS^{(1)}] + [U^{(2)} + p^{(2)}V^{(2)} - TS^{(2)}] \quad (\text{A8})$$

Esto es, \emptyset es la suma de las funciones de Gibbs para cada fase, pero no es la función de Gibbs de todo el sistema, debido a que no se tiene definida una presión para el sistema total.

Si tomamos la variación de \emptyset considerando al sistema abierto:

$$(\delta\emptyset)_{T,p^{(1)},p^{(2)}} = \delta[G^{(1)} + G^{(2)}]_{T,p^{(1)},p^{(2)}} = (\delta G^{(1)})_{T,p^{(1)}} + (\delta G^{(2)})_{T,p^{(2)}} \quad (\text{A9})$$

Para $i = 1, 2$

$$G^{(i)} = U^{(i)} + p^{(i)}V^{(i)} - TS^{(i)}$$

$$\delta G^{(i)} = \delta U^{(i)} + p^{(i)}\delta V^{(i)} + V\delta p^{(i)} - T\delta S^{(i)} - S\delta T^{(i)} \quad (\text{A10})$$

Y $\delta U^{(i)}$ para sistemas abiertos está dada por

$$\delta U^{(1)} = T\delta S^{(1)} - p^{(1)}\delta V^{(1)} + \mu_1^{(1)}\delta\eta_1 \quad (\text{A11})$$

$$\delta U^{(2)} = T\delta S^{(2)} - p^{(2)}\delta V^{(2)} + \mu_1^{(2)}\delta\eta_1 + \mu_2^{(2)}\delta\eta_2 \quad (\text{A12})$$

Reduciendo las ecuaciones nos queda que

$$(\delta S)_{T,p^{(1)},p^{(2)}} = \mu_1^{(1)}\delta\eta_1 + \mu_1^{(2)}\delta\eta_1 + \mu_2^{(2)}\delta\eta_2$$

Es decir,

$$(\delta\emptyset)_{T,p^{(1)},p^{(2)}} = \mu_1^{(1)}\delta\eta_1 + \mu_1^{(2)}\delta\eta_1 + \mu_2^{(2)}\delta\eta_2 = 0 \quad (\text{A13})$$

Como $\eta_1 = \eta_1^{(1)} + \eta_1^{(2)}$

$$\delta\eta_1^{(1)} = -\delta\eta_1^{(2)} \quad (\text{A14})$$

Por ser un estado cerrado, y

$$\delta\eta_2^{(2)} = 0 \quad (\text{A15})$$

Porque la membrana es permeable, únicamente, a la componente (1). Sustituyendo se obtiene

$$(\delta\Phi)_{T,p^{(1)},p^{(2)}} = (\mu_1^{(1)} - \mu_1^{(2)}) \delta\eta_1^{(1)} = 0$$

Es decir,

$$\mu_1^{(1)} = \mu_1^{(2)} \quad (\text{A16})$$

Así, los potenciales químicos de la componente a la que es permeable la membrana, son iguales. Existe un equilibrio entre las fases, a pesar de que las presiones entre las dos fases no son iguales. Debido a que las presiones son diferentes y los potenciales químicos iguales podemos hablar de presión osmótica entre las dos fases separadas por la membrana y la podemos definir como

$$\Pi = p^{(2)} - p^{(1)}$$

Para determinar esta diferencia de presiones como función de las concentraciones de las componentes en ambas fases, recurrimos a la igualdad de potenciales químicos; la segunda ley de la termodinámica para sistemas abiertos establece que los potenciales químicos, son funciones de las presiones, la temperatura y las concentraciones

$$\mu_i^{(j)} = \mu_i^{(j)}(T, p^{(j)} \eta_i^{(j)})$$

Usando la ecuación de Gibb-Duhem (para una sola fase), el potencial químico queda

$$d\mu_1^{(1)} = v_1^{*(1)} dp^{(1)} - s_1^{*(1)} dT \quad (\text{A17})$$

Donde $v_1^{*(1)}$ es el volumen de la componente (1) por mol y $s_1^{*(1)}$ es la entropía por mol. Para la segunda fase, el potencial químico depende de las concentraciones de las dos componentes, entonces

$$d\mu_1^{(2)} = v_1^{*(2)} dp^{(2)} - s_1^{*(2)} dT + \left(\frac{\partial \mu_1^{(2)}}{\partial \eta_1^{(2)}} \right)_{T,p^{(2)}} d\eta_1^{(2)} + \left(\frac{\partial \mu_1^{(2)}}{\partial \eta_2^{(2)}} \right)_{T,p^{(2)}} d\eta_2^{(2)} \quad (18)$$

Donde $v_1^{*(2)}$ es el volumen por mol de la componente (1) en la fase (2), y $s_1^{*(2)}$ es la entropía por mol de la componente (1) en la fase (2).

Volviendo a la condición de equilibrio,

$$d\mu_1^{(1)} = d\mu_2^{(2)} \quad (A19)$$

Y resolviendo este sistema en forma diferencial, suponiendo que inicialmente se tienen las dos fases sin la componente (2). En la primera fase hay $\eta_1^{(1)}$ moles de la componente (1) y en la segunda fase hay $\eta_1^{(2)}$ moles de la misma componente, (es decir, inicialmente la presión osmótica es cero $\Pi = 0$)

Si agregamos a la fase (2), $\eta_2^{(2)}$ moles de la componente (2), manteniendo la presión en la fase (1) fija. Para contrarrestar el efecto de añadir $\eta_2^{(2)}$ moles a la fase (2), T es constante y $p^{(2)}$ puede variar, así

$$d\mu_1^{(1)} = 0 \quad (A20)$$

Debido a $p^{(1)} = cte$ y $T = cte$,

$$d\mu_1^{(2)} = 0$$

Como $d\eta_1^{(2)} = 0$ y $dT = 0$, sustituyendo estos valores en la ec. (18)

$$v_1^{*(2)} dp^{(2)} = - \left(\frac{\partial \mu_1^{(2)}}{\partial \eta_2^{(2)}} \right)_{T,p^{(2)}} d\eta_2^{(2)} \quad (\text{A21})$$

Esta ecuación se puede integrar ahora bajo la condición inicial de que, para $\eta_2^{(2)} = 0$, la presión en la fase (2) es igual a la presión en la fase (1), y para una concentración arbitraria $\eta_1^{(2)}$, la presión en la fase (2) es $p^{(2)}$, de manera que

$$\Pi = p^{(2)} - p^{(1)} = \int_0^{\eta_2^{(2)}} \frac{1}{v_1^{*(2)}} \left(\frac{\partial \mu_1^{(2)}}{\partial \mu_2^{(2)}} \right)_{T,p^{(2)}} d\eta_2^{(2)} \quad (\text{A22})$$

La ecuación anterior es la expresión más general para calcular la presión osmótica entre dos fases, separadas por una membrana semipermeable a sólo una de las componentes y para poder evaluarla se necesita saber de qué manera dependen los términos en la integral de la concentración $\eta_2^{(2)}$.

Si suponemos que la solución es ideal:

$$\mu_1^{(2)} = \mu_1^{(2)}(T, p^{(2)}) + RT \ln x_1^{(2)} = \mu_1^{\circ(2)}(T, p^{(2)}) + RT \ln \eta_1^{(2)} - RT \ln(\eta_1^{(2)} + \eta_2^{(2)})$$

Y como la solución es ideal

$$v_1^{*(2)} = v_1^{\circ(2)}$$

Y el volumen molar de la componente (1) en la fase (2) es el mismo que ocuparía esa componente como sustancia pura en la fase (2)

$$v_1^{\circ(2)} = v_1^{\circ*}$$

Donde $v_1^{\circ*}$ es el volumen por ml de la componente (1) a temperatura T y presión $p^{(2)}$. Nos queda que la presión osmótica para soluciones ideales es

$$\Pi = \frac{RT}{v_1^*} \int_0^{\eta_2^{(2)}} \frac{d\eta_2^{(2)}}{\eta_1^{(2)} + \eta_2^{(2)}} = -\frac{RT}{v_1^*} \ln x_1^{(2)} \quad (\text{A23})$$

Donde $x_1^{(2)}$ es la fracción molar de la componente transferible en la fase (2). Haciendo una última aproximación

$$x_2^{(2)} \ll x_1^{(2)} < 1 .$$

Puesto que $x_1^{(2)} + x_2^{(2)} = 1$, se tiene $\ln x_1^{(2)} = \ln(1 - x_2^{(2)}) \simeq -x_2^{(2)}$, de aquí entonces

la presión osmótica es igual a

$$\Pi = \frac{RT}{v^{(2)}} \eta_2^{(2)} \quad (\text{A24})$$

Anexo II. Gráficas Γ vs q^2

Para hacer estas gráficas, se tomó el promedio de gamma obtenido por el programa que controla el equipo de DLS. Para obtener el vector de onda se hicieron los siguientes cálculos

Sabemos que

$$q = \frac{4\pi\eta}{\lambda} \text{sen} \frac{\theta}{2}$$

Donde $\eta = 1.333$ es el índice de refracción y $\lambda = 637 \text{ nm}$ la longitud de onda del láser, variando $\theta = 50^\circ, 70^\circ, 90^\circ$ y 110°

Entonces,

Para 50°

$$q = \frac{4\pi(1.33)}{637 \text{ nm}} \text{sen} \frac{50}{2} = 0.0109 \quad q^2 = 1.2073 \times 10^{-4} \text{ nm}^{-2}$$

Para 70°

$$q = \frac{4\pi(1.33)}{637} \text{sen} \frac{70}{2} = 0.0149 \quad q^2 = 2.2239 \times 10^{-4}$$

Para 90°

$$q = \frac{4\pi(1.33)}{637} \text{sen} \frac{90}{2} = 0.0183 \quad q^2 = 3.38 \times 10^{-4}$$

Para 110°

$$q = \frac{4\pi(1.33)}{637} \text{sen} \frac{110}{2} = 0.0212 \quad q^2 = 4.5360 \times 10^{-4}$$

Teniendo los valores del vector de onda podemos graficar gamma vs q^2

Como se mencionó en el Capítulo II, la pendiente de la curva es el coeficiente de difusión (ecuación 2.2), el cual se relaciona al radio hidrodinámico, mediante la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 2):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_H}$$

Para el cálculo del radio hidrodinámico, hemos considerado la viscosidad del solvente (agua)

$$\eta = 8.9 \times 10^{-22} \frac{N \cdot s}{nm^2}, \text{ y } k_B T = 4.1144 \times 10^{-12} N \cdot nm \text{ considerando } T = 298.15 \text{ K.}$$

Coeficiente de Difusión ($nm^2 \cdot s^{-1}$)

	BUFFER	HIPO	ISO	HIPER
Muestra 1	3.4458×10^6	3.8064×10^6	4.8617×10^6	4.764×10^6
Muestra 2	5.0426×10^6	4.4164×10^6	4.6434×10^6	3.5367×10^6
σ	1.12×10^6	4.31×10^5	1.56×10^5	8.67×10^5

Obtenemos

$R_H(nm)$

	BUFFER	HIPO	ISO	HIPER
Muestra 1	71.17	64.43	50.44	51.47
Muestra 2	48.63	55.53	52.80	69.35
Promedio	59.9	59.98	51.62	60.41

Como R_H es el radio calculado con la ecuación anterior, para comparar el diámetro que nos arrojó el programa del DLS con el calculado obtenemos

Diámetro calculado(nm)

	BUFFER	HIPO	ISO	HIPER
Muestra 1	142.34	128.86	100.88	102.95
Muestra 2	97.27	111.06	105.62	1138.70
Promedio	119.80	69.96	103.25	120.82

Comparándolo con el *Diámetro efectivo (Eff.Dia)* que nos arrojó el programa

Eff.Dia(nm)

	BUFFER	HIPO	ISO	HIPER
Muestra 1	187.94	132.60	111.42	134.77
Muestra 2	136.56	103.84	95.59	159.59
Promedio	162.25	118.22	203.50	147.18

Anexo III. Índice de polidispersión (IP)

BUFFER	50°	70°	90°	110°
Muestra 1	0.1677	0.2282	0.2312	0.262
Muestra 2	0.2604	0.2222	0.2262	0.2144
Promedio	0.2140	0.2252	0.2287	0.2382
Total	0.2265			

HIPOTÓNICO	50°	70°	90°	110°
Muestra 1	0.1665	0.124	0.1402	0.0897
Muestra 2	0.2058	0.1894	0.1824	0.1598
Promedio	0.1861	0.1572	0.1613	0.1247
Total	0.1573			

ISOTÓNICO	50°	70°	90°	110°
Muestra 1	0.1595	0.1557	0.2795	0.1485
Muestra 2	0.1682	0.1666	0.1594	0.194
Promedio	0.1638	0.1611	0.2169	0.1712
Total	0.1783			

HIPERTÓNICO	50°	70°	90°	110°
Muestra 1	0.2262	0.1923	0.1748	0.1832
Muestra 2	0.169	0.156	0.139	0.179
Promedio	0.1976	0.174	0.156	0.1811
Total	0.1771			

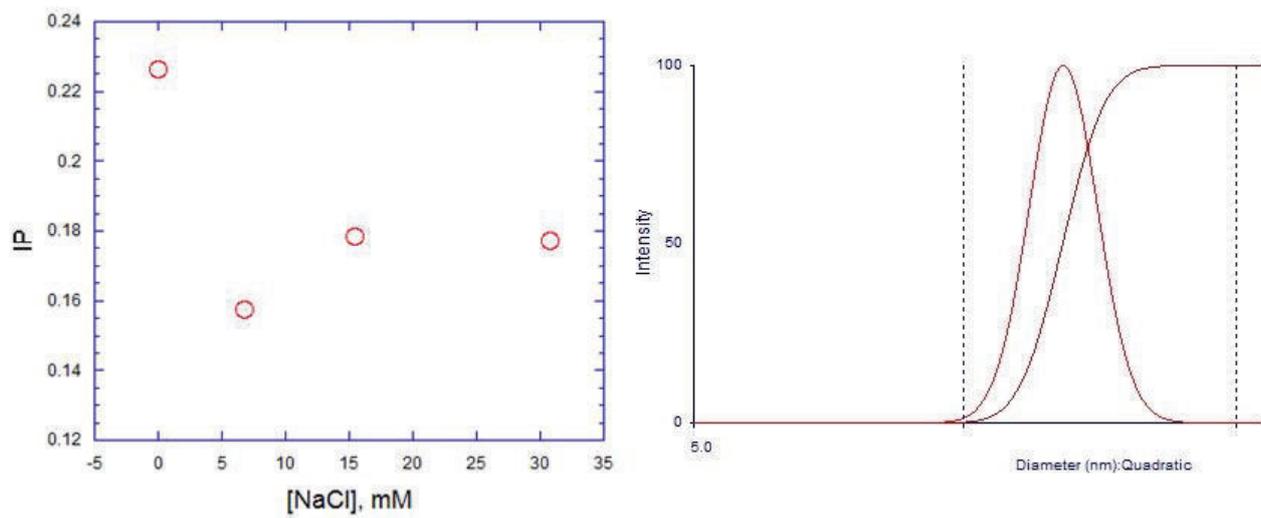


Figura A2. Índice de polidispersidad (IP) vs [NaCl] para todos los sistemas estudiados. Las barras de error son del tamaño del símbolo.