

Estudio experimental de propiedades viscoelásticas en membranas de liposomas mediante relaxometría magnética nuclear con ciclado rápido de campo magnético

Josefina Perlo¹

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

Universidad Nacional de Córdoba

Marzo, 2011

© FaMAF - UNC 2011

Director: Dr. Esteban Anordo

¹Becario de CONICET

Dedicatoria

A Esteban, Nery y Nelson Perlo.

Resumen

La dinámica de los lípidos en membranas biológicas ha sido objeto de enorme interés para la comunidad científica durante muchos años. Las propiedades viscoelásticas e hidrodinámicas de las membranas son cruciales para determinar su función como barrera de permeabilidad selectiva. Algunas aplicaciones biomédicas de los liposomas dependen críticamente de las interacciones moleculares microscópicas dentro de las membranas, las cuales determinan propiedades como la deformabilidad, la permeabilidad, el tamaño de la vesícula y su estabilidad. Estos sistemas y las membranas biológicas en general han sido estudiadas de manera amplia en las últimas tres décadas, tanto estructural como dinámicamente, utilizando una gran variedad de técnicas experimentales. A pesar de ello, poco se ha avanzado en la utilización de la relaxometría con ciclado de campo (también conocida como fast field cycling o FFC) para el estudio de la dinámica en membranas, no existiendo, hasta el inicio de este trabajo, un estudio sistemático en sistemas unilamelares. En esta tesis se estudió la dinámica molecular y las propiedades viscoelásticas en membranas lipídicas en liposomas aplicando la técnica de relaxometría FFC.

La técnica de relaxometría magnética nuclear (NMR-FFC) resultó ser una herramienta útil para el estudio y la caracterización de la dinámica molecular en liposomas formulados con diferentes lípidos, diferentes tamaños, diferentes temperaturas y para diferentes contenidos de colesterol en membrana. Los datos de la relajación de 1H fueron interpretados en términos de procesos dinámicos y sus correspondientes modelos exitosamente utilizados para interpretar las dispersiones de la relajación en liposomas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dioleoilfosfatidilcolina (DOPC): fluctuaciones de orden, difusión traslacional sobre una superficie curva, difusión rotacional y movimientos rápidos. Estos resultados fueron aplicados para la determinación de las propiedades elásticas de las membranas.

Los resultados obtenidos sugieren que el coeficiente de difusión tiende a aumentar con el diámetro del liposoma y con la temperatura, mientras que el tiempo de correlación rotacional decrece con la temperatura. La constante elástica de flexión se observó que decrece con el aumento de la temperatura y crece con el aumento del contenido de colesterol en la membrana.

Abstract

Lipids dynamics in biological membranes has been of enormous interest to the scientific community for many years. The viscoelastic and hydrodynamic properties of the membranes are crucial for their function as a selective permeability barrier. Some biomedical applications of liposomes depend critically on microscopic molecular interactions within the membranes, which determine properties such as deformability, permeability, vesicle size and stability. These systems and biological membranes in general have been studied extensively in the last three decades, both structure and dynamics, using a variety of experimental techniques. However, a little progress has been done in the use of field-cycled relaxometry (also known as fast field cycling or FFC) for the study of dynamics in membranes. Until the beginning of this work, a systematic study of unilamellar systems was lacking. In this thesis we study the molecular dynamics and viscoelastic properties in lipid membranes of liposomes using the FFC relaxometry technique.

The FFC-NMR technique proved to be a useful tool for the study and characterization of the molecular dynamics in liposomes containing different lipids, of different sizes, at different temperatures and different contents of cholesterol. Relaxation data of 1H were interpreted in terms of dynamic processes and their corresponding models successfully used to interpret relaxation dispersions in DMPC and DOPC liposomes: order fluctuations, translational diffusion over a curved surface, rotational diffusion and fast motions. These results were applied to the determination of the elastic properties of membranes.

The obtained results suggest that the diffusion coefficient tends to increase with the diameter of the liposome and temperature, while rotational correlation time decreases with temperature. The elastic bending constant decreases with increasing temperature and increases with the cholesterol content.

Índice general

Abstract	IV
Agradecimientos	1
1. Introducción	2
1.1. Lípidos	4
1.1.1. Lípidos anfifílicos	5
1.1.2. Características del autoensamble	5
1.1.3. Fases de las estructuras lipídicas en sistemas acuosos	6
1.2. Liposomas	8
1.2.1. Formación de liposomas	8
1.3. Importancia del colesterol en la membrana celular	9
1.4. Técnicas experimentales.	9
1.4.1. Relaxometría con ciclado rápido de campo.	9
1.4.2. Relajación en el sistema rotante.	11
1.5. Organización de la tesis.	11
2. Dinámica molecular de lípidos en liposomas.	13
2.1. Difusión sobre una superficie curva	16
2.2. Fluctuaciones de orden	19
2.3. Movimientos rápidos.	22
3. Modelos de relajación.	24
3.1. Fluctuaciones de orden.	27
3.2. Difusión sobre una superficie curva.	28
3.3. Movimientos rápidos.	32
3.4. Densidad espectral compuesta	32
4. Técnicas experimentales.	34
4.1. Resonancia Magnética Nuclear	34
4.1.1. Elementos de Resonancia	34
4.1.2. El campo de rf	36
4.2. Relajación en el sistema laboratorio	37
4.2.1. Cambios adiabáticos	39
4.3. Técnicas experimentales	41

4.3.1. Relaxometría con ciclado rápido de campo.	41
4.3.2. Curvas de relajación para campos bajos ($B_r \ll B_p$)	43
4.3.3. Relaxometría en el sistema rotante.	46
5. Estudio de la dinámica molecular en membranas lipídicas de liposomas: Resultados y discusión.	48
5.1. Preparación de la muestra.	48
5.2. Medición del campo local	49
5.2.1. Campo local en liposomas suspendidas.	51
5.3. Experimentos de dispersión de la tasa de relajación.	52
5.3.1. Mediciones de la tasa de relajación espín-red en función de la frecuencia de Larmor en liposomas	52
5.4. Interpretación de las dispersiones de las tasas de relajación.	53
5.4.1. Discusión	59
5.5. Dependencia de las dispersiones de la relajación de 1H con el tamaño de los liposomas.	59
5.6. Dependencia de la relajación de 1H con la temperatura.	65
5.7. Dependencia de la tasa de relajación de 1H con el contenido de colesterol.	68
5.8. Análisis de los pre-factores.	72
6. Propiedades viscoelásticas de membranas lipídicas.	74
6.1. Descripción teórica de las propiedades elásticas de vesículas.	74
6.2. Métodos experimentales de medición de κ	76
7. Medición de la constante elástica de flexión κ.	82
7.1. Sistemas DMPC/colesterol	84
7.2. Experimentos de dispersión de la tasa de relajación en función de la frecuencia.	85
7.3. Resultados	86
7.4. Análisis de los resultados.	88
8. Interacción acústica-director en la fase esméctica A.	93
9. Conclusiones.	98
10. Publicaciones	101
Bibliografía	102

Índice de figuras

1.1.	Algunos de los lípidos anfifílicos que se utilizan normalmente para construir los liposomas. En la parte izquierda se muestran los grupos polares y en la derecha las cadenas hidrofóbicas.	5
1.2.	Concepto de empaquetamiento geométrico: el parámetro surfactante, las estructuras y las correspondientes fases: L : solución micelar, H : fase hexagonal, L_α : fase lamelar. Los subíndices I y II denotan las fases normal e invertida, respectivamente.	6
1.3.	Vista transversal de las bicapas en las fases lamelares con cadenas ordenadas. Los grupos polares se empaquetan en arreglos hexagonales bidimensionales.	7
1.4.	Transición de fase de la mezcla agua-DMPC.	8
1.5.	Representación esquemática de un liposoma. Los círculos representan los grupos polares mientras que las líneas onduladas hacen referencia a las cadenas hidrocarbonadas.	9
1.6.	Representación de la formación de un liposoma por reducción de la energía de borde debida a la interacción de las cadenas de hidrocarburo con el medio acuoso.	10
1.7.	Colesterol.	10
2.1.	Rangos de tiempos a los cuales algunas técnicas son sensibles a la dinámica molecular. Los rangos de tiempos son aproximados.	14
2.2.	Representación esquemática de los principales procesos dinámicos que ocurren en una membrana biológica. Los rangos de tiempos de correlación asociados son aproximaciones.	15
3.1.	Dependencia con la frecuencia de la función densidad espectral para tres radios diferentes R_0 de la vesícula. Los parámetros usados en el gráfico son: $\kappa = 4 \times 10^{-20} J$, $\eta = 1,1 \times 10^{-3} Ns/m^2$, $\sigma = 0$ y $T = 298K$	29
3.2.	Dependencia con la frecuencia de la función densidad espectral para tres valores diferentes de κ . Los parámetros usados en el gráfico son: $R_0 = 50nm$, $\eta = 1,1 \times 10^{-3} Ns/m^2$, $\sigma = 0$ y $T = 298K$	29

3.3.	Dependencia con la frecuencia de la función densidad espectral para tres valores diferentes de la temperatura. La viscosidad del medio soporte depende de la temperatura; las correspondientes viscosidades para cada temperatura son: $\eta = 1,3 \times 10^{-3} \text{Ns/m}^2$ para $T = 291\text{K}$, $\eta = 1,1 \times 10^{-3} \text{Ns/m}^2$ para $T = 298\text{K}$ y $\eta = 0,82 \times 10^{-3} \text{Ns/m}^2$ para $T = 310\text{K}$. Los parámetros usados en el gráfico son: $R_0 = 50\text{nm}$, $\sigma = 0$ y $\kappa = 4 \times 10^{-20} \text{J}$	30
3.4.	Dependencia con la frecuencia de la función densidad espectral para tres valores diferentes de la constante de difusión. Los parámetros usados en el gráfico son: $T = 298\text{K}$, $\eta = 1,1 \times 10^{-3}$ y $R_0 = 50\text{nm}$	31
4.1.	En el sistema laboratorio los espines nutan y precesan alrededor del eje del campo magnético. En el sistema rotante, que rota a frecuencia ω , sólo se observa la nutación con frecuencia $\Omega = \gamma B_{ef}$	38
4.2.	La figura muestra la temperatura final alcanzada para cambios adiabáticos en el campo magnético aplicado. Se nota que la temperatura final no cambia mucho cuando $H_f < H_L$	41
4.3.	Magnetización M_f versus campo aplicado H_f para cambios adiabáticos en H_f . Se asume que $H_i^2 \gg H_L^2$. Note que M_f es independiente de H_f cuando $H_f^2 \gg H_L^2$, y va a cero cuando H_f tiende a cero.	42
4.4.	Diagrama en bloque de un relaxómetro típico con ciclado de campo. los cuadros en gris representan unidades diseñadas específicamente para el ciclado de campo. El probe consiste de una cabezal con un circuito sintonizado a la frecuencia de resonancia donde se encuentra la muestra.	43
4.5.	Representación esquemática de un ciclo típico del campo magnético principal B_0 desarrollado con un relaxómetro RMN de ciclado de campo.	44
4.6.	Representación esquemática de las escalas de tiempo y frecuencia que cubren las diversas técnicas experimentales NMR. Los rangos indicados se refieren a resonancia de protones. Figura extraída de referencia [11].	44
4.7.	Ciclado de campo para campos de relajación bajos ($B_r \ll B_p$): representación esquemática de la densidad de flujo externa B_0 , amplitud del campo de radio frecuencia B_1 , y la magnetización M_z en los distintos intervalos de tiempo del ciclado de campo. Figura extraída de referencia [11].	45
4.8.	Representación del comportamiento de la magnetización durante el pulso de lock de duración fija. Después de apagar el campo de RF la magnetización precesa en torno al campo efectivo.	47
5.1.	Representación esquemática de la formación de vesículas unilamelares y multilamelares. Se incluyen las estructuras moleculares del DMPC y del DOPC.	50
5.2.	Dispersión de diámetros de las vesículas de DMPC.	50

5.3.	Magnetización normalizada como una función de ν_1 a tiempo de lock fijo $\tau = 5ms$ para una suspensión de DMPC a $T = 310K$. El decaimiento de la magnetización cuando la amplitud del lock se reduce es una consecuencia de los campos locales residuales. La componente de campo local promedio a lo largo del eje de cuantización del sistema laboratorio puede determinarse como se describe en el texto. Las barras de errores corresponden a la dispersión de los datos después de 10 repeticiones para cada frecuencia.	51
5.4.	Datos de la dispersión de la tasa de relajación de 1H , para suspensiones de liposomas de DMPC de $R_0 = 54nm$ a $T = 310K$ (puntos rojos) y de DOPC de $R_0 = 50nm$ a $T = 298K$ (puntos negros).	53
5.5.	Digrama de flujo del modelo para simular las dispersiones de relajación de 1H	54
5.6.	Dispersión de la relajación experimental para una suspensión de liposomas de DMPC, con radio medio $R_0 = 54nm$ a $T = 310K$ (puntos experimentales en negro). La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Las contribuciones de cada uno de los movimientos se incluyen: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), y movimientos rápidos (azul). Ver parámetros en la tabla 5.1. Puede observarse que alrededor de $1MHz$ el modelo subestima R_1 , sugiriendo que un mecanismo que contribuye, relevante dentro de este rango, está ausente en nuestra interpretación.	56
5.7.	Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 54nm$, a $T = 310K$. La curva de dispersión simulada que incluye la corrección se muestra en rojo. Una nueva contribución Lorentziana asociada con difusión rotacional de moléculas lipídicas es incluida (rosa), con $\tau_R = 1,8 \times 10^{-8}s$ y $A_R = 0,6 \times 10^8s^{-2}$. Las otras contribuciones son las mismas que en la figura 5.6, con los mismos parámetros que en la simulación previa, dados en la tabla 5.1, con excepción de la contribución independiente de la frecuencia que ahora es $A_{FM} = 5,5s^{-1}$	57
5.8.	Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 50nm$, at $T = 298K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Los mecanismos que contribuyen son los mismos que se muestran en la figura 5.7. Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.2.	58
5.9.	Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 98nm$, a $T = 310K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.3.	60
5.10.	Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 91nm$, a $T = 298K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.4.	61

5.11. Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 120nm$, a $T = 298K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celestes), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.4.	61
5.12. Dispersiones de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC a $T = 298K$ para $R_0 = 50$ (negro), $R_0 = 91$ (rojo) y $R_0 = 120nm$ (azul). Se incluyen las correspondientes contribuciones de las densidades espectrales para fluctuaciones de orden y difusión para cada uno de los tamaños.	63
5.13. Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 120nm$, a $T = 291K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celestes), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.5.	65
5.14. Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 120nm$, a $T = 310K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celestes), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.5.	66
5.15. Dispersiones de la relajación experimental para suspensiones de LUVs de DOPC de $R_0 = 120nm$ a $T = 291$ (azul), 298 (negro) y $310K$ (rojo).	66
5.16. Análisis de Arrhenius para el proceso de difusión molecular.	68
5.17. Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 80nm$, a $T = 298K$ con 10% de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celestes), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.6.	69
5.18. Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 68nm$, a $T = 298K$ con 25% de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celestes), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.6.	70
5.19. Dispersiones de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC a $T = 298K$ para $R_0 = 80$ con 10% de colesterol (negro) y para $R_0 = 68$ con 25% de colesterol (rojo). Se incluyen las correspondientes contribuciones de las densidades espectrales.	70
6.1. Videomicrografía de presurización de una vesícula. Figura extraída de la referencia [145].	79

7.1.	Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 120nm$, a $T = 298K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Obtenida de la figura 5.11	83
7.2.	Diagrama de fase DMPC/colesterol.	84
7.3.	Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 303K$ sin colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.	89
7.4.	Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 303K$ con 3% de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.	89
7.5.	Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 328K$ con 3% de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.	90
7.6.	Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 318K$ con 10% de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.	91
7.7.	Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 328K$ con 10% de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.	91
7.8.	Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 328K$ con 20% de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.	92

8.1. Simulación de a^2 como función de la frecuencia del campo acústico externo en resonancia. Tres frecuencias diferentes se indican: lejos de resonancia, a la mitad del máximo y en el máximo.	97
8.2. Dispersión en frecuencia de Larmor de bajo sonicación simulada para la fase esméctica A.	97

Indice de tablas

2.1. Valores de la constante de difusión obtenidos con diferentes técnicas experimentales, en diferentes sistemas y a diferentes temperaturas. Las siguientes abreviaturas corresponden a los siguientes compuestos: SOPC (1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), SLPC (1-estearoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfocolina), SAPC (1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina), SDPC (1-estearoil-2-docosahexaenoil-sn-glicero-3-fosfocolina) y DLPC (dilignoceroylfatidilcolina).	23
5.1. Parámetros correspondientes a la simulación de la dispersión de la relajación para liposomas de DMPC de $R_0 = 54nm$ a $T = 310K$ representada en la figura 5.6 y las correspondientes referencias.	55
5.2. Parámetros correspondientes a las simulación de la dispersión de la relajación para liposomas de DOPC de $R_0 = 50nm$ a $T = 298K$ representada en la figura 5.8 y las correspondientes referencias.	58
5.3. Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas a $T = 310K$ para liposomas de DMPC de diferentes tamaños.	62
5.4. Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas a $T = 298K$ para liposomas de DOPC de diferentes tamaños.	62
5.5. Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas para liposomas de DOPC de $R_0 = 120nm$ a diferentes temperaturas.	67
5.6. Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas a $T = 298K$ para liposomas de DOPC con diferentes contenidos de colesterol.	69
5.7. Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas a $T = 298K$ para liposomas de DOPC sin colesterol con $R_0 = 91nm$ y con 10% de colesterol con $R_0 = 80nm$	71
5.8. Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas a $T = 298K$ para liposomas de DOPC sin colesterol con $R_0 = 50nm$ y con 25% de colesterol con $R_0 = 68nm$	72

7.1. Parámetros correspondientes a las simulación de la dispersión de la relajación para liposomas de DMPC de $R_0 = 50nm$ a diferentes temperaturas y con diferentes contenidos de colesterol.	88
7.2. Comparación de las tendencias de los parámetros obtenidas de las simulaciones del capítulo 5, donde el experimento se realizó en un amplio rango de frecuencias, y de este capítulo, donde el experimento se realizó en un rango restringido de frecuencias.	92

Agradecimientos

En esta parte de la tesis quiero tomar unos renglones para decir Gracias!

Gracias, Esteban. Por todo el conocimiento que me haz transmitido en estos años, por guiarme, por acompañarme y por enseñarme que con esfuerzo la solución a todo problema se asoma.

Gracias a mi familia. Por el apoyo incondicional que me brindaron. Gracias Juanfra, porque me renovaste el aire en el momento oportuno.

Gracias a mis amigos y compañeros de FaMAF por todo lo compartido y por todo el cariño que me brindaron.

Gracias a mis amigos de siempre, que siempre formaron parte de mi vida.

Gracias al grupo de Guillermo Montich del CIQUIBIC, por la paciencia y disponibilidad para ayudarme a preparar las muestras.

Capítulo 1

Introducción

El trabajo presentado en esta tesis se basa en el estudio de las propiedades viscoelásticas en membranas de liposomas utilizando como herramienta principal la Resonancia Magnética Nuclear. En particular, el objetivo básico es poder avanzar en el estudio de tales sistemas mediante la utilización de la técnica de ciclado rápido de campo magnético. En este capítulo se hace una descripción general de lípidos y liposomas. Se analizan las diferentes fases de las estructuras lipídicas en sistemas acuosos y se discute la influencia del colesterol, notando la importancia que tiene dentro de las membranas celulares. Finalmente se hace una breve revisión de las técnicas experimentales utilizadas

Los materiales que dan origen a mesofases líquido-cristalinas están compuestos por moléculas orgánicas que presentan una fuerte anisotropía geométrica. Estas moléculas tienden a alinearse en forma parcial definiendo dominios en los cuales existe una dirección preferencial, la cual se describe mediante un vector denominado director. El director adopta diferentes orientaciones en distintos lugares de la muestra y fluctúa en el tiempo. Las fluctuaciones térmicas del ordenamiento del director dan origen a un proceso dinámico colectivo denominado fluctuaciones de orden, el cual está presente tanto en mesofases termotrópicas [1, 2, 3, 4, 5], liotrópicas [6, 7], como en sistemas de membranas biológicas [8].

La dinámica de los lípidos en membranas biológicas ha sido objeto de enorme interés para la comunidad científica durante muchos años [9]. Las propiedades viscoelásticas e hidrodinámicas de las membranas son cruciales para determinar sus propiedades funcionales. Apesar de que estos sistemas y las membranas biológicas en general han sido estudiadas ampliamente en las últimas tres décadas, tanto propiedades estructurales como dinámicas utilizando una gran variedad de técnicas experimentales, poco se ha avanzado en la utilización de la relaxometría con ciclado de campo (también conocida como fast field cycling o FFC) para el estudio de la dinámica en membranas. En esta tesis se estudió la dinámica molecular y las propiedades viscoelásticas en membranas lipídicas en liposomas aplicando la técnica de relaxometría

FFC.

Partiendo de la teoría semiclásica de relajación [10], bajo ciertas aproximaciones como aleatoriedad de los procesos dinámicos y la consideración de que los campos locales del sistema son mucho menores que el campo externo aplicado, la inversa del tiempo de relajación espín-red (T_1^{-1}) se puede escribir como una combinación lineal de ciertas funciones de la frecuencia de Larmor, conocidas como densidades espectrales (esto es cierto siempre que los efectos de correlación cruzada sean de menor importancia). Dichas funciones contienen la información de la dinámica de la red. De esta manera, conociendo la dependencia de T_1^{-1} en función de la frecuencia, o curva de dispersión, se obtiene información de los procesos dinámicos que intervienen en la relajación del sistema de espines y del rango de frecuencias en el cual son efectivos. Las densidades espectrales son las transformadas de Fourier de las funciones de correlación. Las últimas contienen la física relevante del problema relacionando así los tiempos medidos con los parámetros físicos involucrados (viscosidad, constantes elásticas, etc.) y las variables controladas externamente (temperatura, frecuencia, orientation, etc.).

La relaxometría con ciclado de campo permite obtener el tiempo de relajación espín-red (T_1) del sistema de núcleos estudiado (en nuestro caso protones) en función del campo externo aplicado en un amplio rango, típicamente desde algunos kHz hasta varios MHz . Sin embargo, existen ciertas limitaciones en cuanto a la utilización de esta técnica para obtener la curva de dispersión $T_1(\omega_0)$ (donde ω_0 es la frecuencia de Larmor) cuando las mediciones se llevan a cabo a valores del campo externo que son comparables en magnitud con los campos locales. En este caso el tiempo medido no es estrictamente el tiempo de relajación longitudinal [11]. Por esta razón es conveniente antes que nada estimar la magnitud de los campos locales del sistema, a los fines de obtener un límite inferior en el rango del campo magnético externo.

Para estimar este límite se utilizó la técnica de relajación en el sistema rotante [12, 13]. Esta consiste básicamente en observar el comportamiento de la magnetización (en el sistema rotante) en función de la intensidad del pulso de lock (B_1), luego de un pulso de $\pi/2$, para una duración del lock fija. A partir de la curva obtenida $M(B_1)$ y con un modelo apropiado [12, 13], se puede estimar la componente longitudinal de los campos locales de la muestra.

En cuanto a la interpretación de la curva de relajación existen, en principio, dos alternativas. Una de ellas se basa en considerar que la curva de relajación es el resultado del aporte de distintos procesos dinámicos, independientes entre sí [8, 14]. Cada uno de estos aportes está basado sobre consideraciones físicas características del sistema estudiado. En esta descripción, cada proceso dinámico en general puede

contar con el sustento de que haya sido verificado y caracterizado utilizando alguna otra técnica. Por otro lado, existe a priori, la posibilidad de obtener una expresión para $T_1^{-1}(\omega_0)$ bajo ciertas aproximaciones sin hacer referencia a un modelo dinámico en particular [15, 16]. Este es conocido como modelo de aproximación libre, y en principio es aplicable en general a soluciones de proteínas. Básicamente considera que la relajación es el resultado de dos tipos de movimientos: los de la macromolécula como un todo y los movimientos internos. El modelo provee dos parámetros que representan en forma efectiva la velocidad de los movimientos internos y el grado de restricción interna. Sin embargo, más adelante se demuestra que este modelo no es aplicable a la dinámica de lípidos en liposomas debido a que no cumplen todas las condiciones sobre las cuales fue formulado.

Finalmente, la técnica de relajación magnética nuclear (NMR) mediante ciclado rápido de campo (FFC) resultó ser una herramienta útil para el estudio y la caracterización de la dinámica molecular en liposomas de diferentes especies, de diferentes tamaños, a diferentes temperaturas y para diferentes contenidos de colesterol. Los datos de la relajación de 1H fueron interpretados en términos de procesos dinámicos y sus correspondientes modelos exitosamente utilizados para interpretar las dispersiones de relajación en liposomas de DMPC y DOPC: fluctuaciones de orden [17, 18, 19], difusión traslacional sobre una superficie curva [20], difusión rotacional [21] y movimientos rápidos. Con movimientos rápidos se hace mención a todo proceso dinámico que sea de carácter estocástico y con tiempos de correlación asociado mucho más cortos que $1/\omega_0$.

Los resultados obtenidos sugieren que el coeficiente de difusión tiende a crecer con el diámetro del liposoma y con la temperatura, mientras que el tiempo de correlación rotacional decrece con la temperatura. La constante de elasticidad de flexión se observó que decrece con el aumento de la temperatura y crece con el aumento del contenido de colesterol en la muestra.

1.1. Lípidos

Un cristal líquido [1, 5] es un estado de la materia intermedio entre un líquido isotrópico y un sólido cristalino, ya que posee fluidez y además exhibe orden orientacional de largo alcance y, a veces, orden posicional. Dependiendo de la estructura molecular, estos compuestos pasan a través de distintas fases antes de llegar al estado de líquido isotrópico. Los cristales líquidos liotrópicos son formados por mezclas de moléculas anfífilas (moléculas que contienen una cabeza polar, frecuentemente iónica, y cadenas hidrofóbicas) y un solvente, el cual es generalmente agua. Las fases dependen de la presión, pero principalmente de la temperatura y de la concentración de las sustancias que los componen [22]. Un ejemplo de cristales líquidos liotrópicos son los lípidos.

Los lípidos, junto con las proteínas y los ácidos nucleicos, son biomoléculas esenciales en la estructura y el funcionamiento de la materia viviente. Los lípidos con los que trabajamos en este caso son lípidos anfifílicos. Este tipo de lípido es el componente básico predominante de las membranas biológicas.

1.1.1. Lípidos anfifílicos

Los lípidos anfifílicos tienen una amplia variedad de aplicaciones, tan diversa como en detergentes, pinturas, revestimiento de papel, comida y productos farmacéuticos. Su propiedad especial es la de unirse espontáneamente (autoensamble) en una variedad de estructuras que son útiles en un gran número de áreas. La razón por la cual pueden unirse espontáneamente para formar una variedad de microestructuras es su preferencia dual hacia el solvente. Todos los lípidos anfifílicos consisten de una parte que es soluble en solventes no polares, y una segunda parte que es soluble en solvente polares (Fig. 1.1). En aplicaciones biológicas, el solvente es agua, entonces uno habla de las partes hidrofóbica e hidrofílica. En general la parte hidrofóbica consiste de cadenas de hidrocarburos, mientras que la parte hidrofílica está compuesta por el llamado grupo polar.

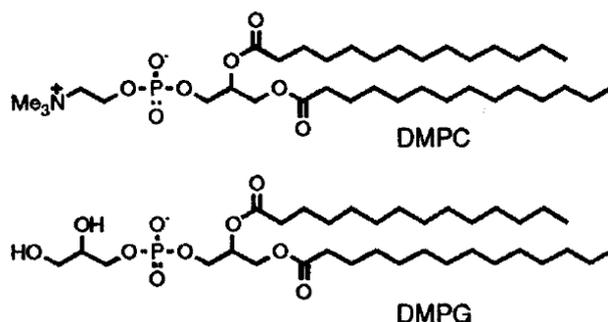


Figura 1.1: Algunos de los lípidos anfifílicos que se utilizan normalmente para construir los liposomas. En la parte izquierda se muestran los grupos polares y en la derecha las cadenas hidrofóbicas.

Los fosfolípidos son una clase de lípidos y son un componente principal de todas las membranas celulares, ya que pueden formar bicapas lipídicas. Son un tipo de lípidos compuestos por una molécula de glicerol, a la que se unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato.

1.1.2. Características del autoensamble

El autoensamble no sólo está determinado por la contribución hidrofóbica mencionada arriba, también está relacionado con parámetros moleculares del lípido. El

llamado parámetro surfactante, que tiene en cuenta el volumen hidrofóbico, el largo de las cadenas y el área del grupo polar, es un parámetro útil en la determinación de las diferentes estructuras. El parámetro surfactante esta definido por [23]:

$$S \equiv \frac{v}{la_0} \quad (1.1)$$

donde v es el volumen de la porción hidrofóbica, l es el largo de la cadena y a_0 es el área efectiva por grupo polar. El valor de este parámetro relaciona las propiedades de la molécula con la curvatura media de la estructura formada. Por ejemplo, pequeños valores de S implican estructuras altamente curvadas (micelas), mientras que para $S \sim 1$ se forman bicapas planas. La figura 1.2 muestra el concepto de empaquetamiento geométrico.

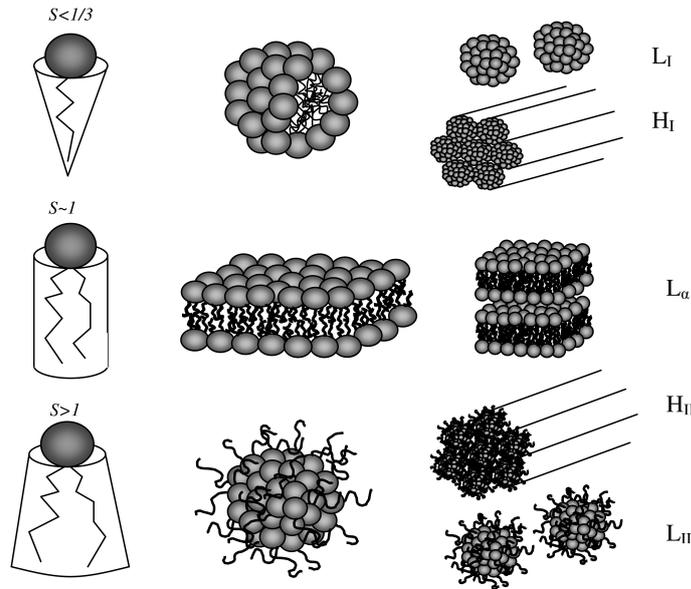


Figura 1.2: Concepto de empaquetamiento geométrico: el parámetro surfactante, las estructuras y las correspondientes fases: L : solución micelar, H : fase hexagonal, L_α : fase lamelar. Los subíndices I y II denotan las fases normal e invertida, respectivamente.

1.1.3. Fases de las estructuras lipídicas en sistemas acuosos

Debido a las interacciones hidrofóbicas, los lípidos se pueden encontrar en las siguientes fases que dependen de las concentraciones de lípidos que se encuentran en el medio acuoso, así como de la temperatura

- Micelas

Cuando la concentración de fosfolípidos supera la superficie del medio acuoso se forman estructuras llamadas micelas. Estas micelas pueden existir en diferentes tamaños y su núcleo está compuesto por un pequeño volumen de hidrocarburo puro capaz de disolver sustancias no polares, mientras que la superficie polar asegura la solubilidad de la micela en agua. (L_I y L_{II} en la figura 1.2).

- Fases lamelares con cadenas ordenadas

Las fases lamelares con cadenas ordenadas se encuentran en la región de bajas concentraciones de agua y bajas temperaturas en el diagrama de fases. Consisten básicamente de bicapas simétricas de lípidos. Las cadenas hidrocarbonadas son prácticamente rígidas y paralelas y organizadas en redes bidimensionales. Las cadenas pueden ser perpendiculares al plano de la bicapa (L_β) o con un grado de inclinación ($L_{\beta'}$). Este ángulo aumenta con el contenido de agua. En la fase $P_{\beta'}$ el plano sufre una distorsión de forma ondulatoria (figura 1.3).

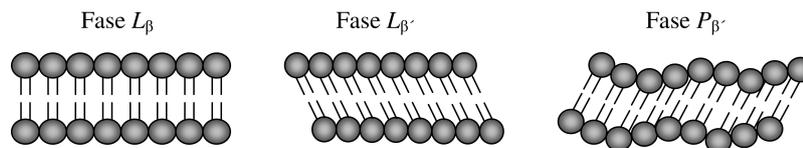


Figura 1.3: Vista transversal de las bicapas en las fases lamelares con cadenas ordenadas. Los grupos polares se empaquetan en arreglos hexagonales bidimensionales.

- Fase lamelar en el estado líquido-cristalino: tipo α

En este tipo de conformación las cadenas están altamente desordenadas, pero el promedio de las cadenas está perpendicular al plano de la bicapa. La fase lamelar L_α es la más común en sistemas lípido-agua (Figura 1.2). La estructura consiste en bicapas lipídicas planas, todas paralelas y equidistantes, separadas por capas de agua (interfases).

- Fases en un sistema agua-DMPC

En solución acuosa, los lípidos anfifílicos al principio se disuelven como monómeros, pero al superar cierta concentración se unen espontáneamente para minimizar las interacciones hidrofóbicas desfavorables, y forman una variada gama de estructuras, dependiendo en general de la concentración y la temperatura. El comportamiento de las fases de la mezcla agua-DMPC ha sido estudiado por varias técnicas

[8] que muestran que cuando la hidratación es máxima ($> 25\%$ de agua) DMPC sufre dos transiciones como función de la temperatura. La transición principal que es entre el estado líquido cristalino (L_α) y la fase intermedia ($P_{\beta'}$) y la llamada pre-transición entre el estado intermedio y la fase gel ($L_{\beta'}$). En el siguiente esquema se representa la temperatura de transición entre esas fases.

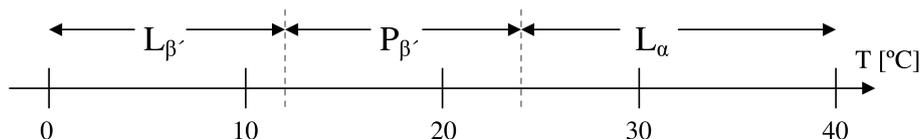


Figura 1.4: Transición de fase de la mezcla agua-DMPC.

1.2. Liposomas

Los liposomas son estructuras esféricas cerradas (auto contenidas), compuestas de bicapas lipídicas curvadas, las cuales encierran en su interior parte del solvente que lo rodea (Fig. 1.5). El tamaño de un liposoma puede ir desde unos $20nm$ hasta varios micrómetros, y puede estar compuesto de una (unilamelar) o varias membranas concéntricas (multilamelar), cada una de las cuales puede tener aproximadamente $4nm$ de espesor.

Los liposomas son membranas compuestas de una bicapa lipídica. Similar a las membranas celulares, la membrana de un liposoma determina cuáles moléculas difunden a través de ella [24]. La integridad de la membrana de los liposomas es importante para el control de la difusión de drogas hidrofílicas, encapsuladas en el núcleo acuoso de las vesículas.

1.2.1. Formación de liposomas

Para grandes excesos de agua las bicapas de fosfolípidos se cierran espontáneamente formando liposomas. Sus propiedades están relacionadas directamente con las de la fase L_α . Tales sistemas no están en equilibrio termodinámico aunque pueden ser estables durante varios días. Se han sugerido muchos mecanismos para la formación de liposomas, algunos de ellos más complicados que otros. Uno considera que la transición desde una bicapa plana hasta un liposoma depende de la competencia entre dos cantidades: la energía de curvatura y la energía de borde de la bicapa. Para un fragmento lamelar plano en un ambiente acuoso, habrá una alta energía de interacción entre las cadenas hidrofóbicas y el medio acuoso. Una curvatura del plano tiende a reducir esta energía de borde por un lado, pero se induce una energía de curvatura.

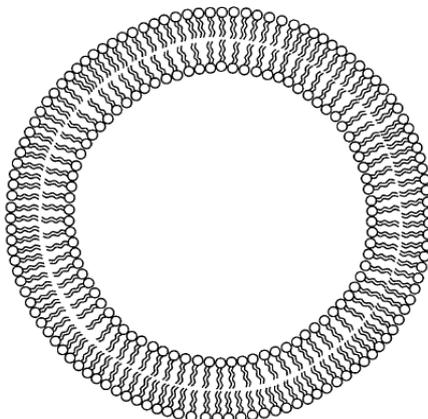


Figura 1.5: Representación esquemática de un liposoma. Los círculos representan los grupos polares mientras que las líneas onduladas hacen referencia a las cadenas hidrocarbonadas.

Sin embargo la energía de interacción en los bordes es mayor, por lo que la bicapa se seguirá curvando hasta cerrarse completamente. De esta manera no hay interacción de las cadenas con el agua y la energía de borde es nula. La figura 1.6 representa el mecanismo descripto. Por otro lado, la energía de curvatura alcanza su valor máximo, por lo tanto son más favorables los liposomas de mayor diámetro.

1.3. Importancia del colesterol en la membrana celular

El colesterol (figura 1.7) representa un 23% de los lípidos de membrana. En la membrana se dispone con el grupo hidroxilo hacia el exterior de la célula (ya que ese hidroxilo interactúa con el agua). El colesterol es un factor importante en la fluidez y permeabilidad de la membrana ya que ocupa los huecos de la membrana. A mayor cantidad de colesterol, menos permeable y fluida es la membrana.

1.4. Técnicas experimentales.

1.4.1. Relaxometría con ciclado rápido de campo.

La relaxometría con ciclado de campo [11] es una técnica que permite obtener la dependencia con la frecuencia de Larmor (o campo magnético) de diversos tiempos de relajación. El término relaxometría es normalmente utilizado en el contexto de mediciones de tiempos de relajación en general. Relajación transversal y efectos de-

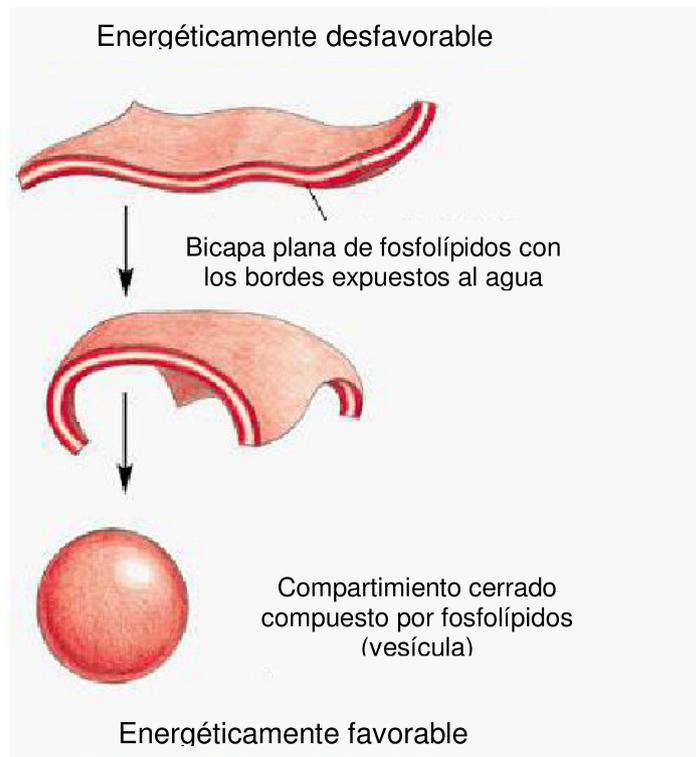


Figura 1.6: Representación de la formación de un liposoma por reducción de la energía de borde debida a la interacción de las cadenas de hidrocarburo con el medio acuoso.

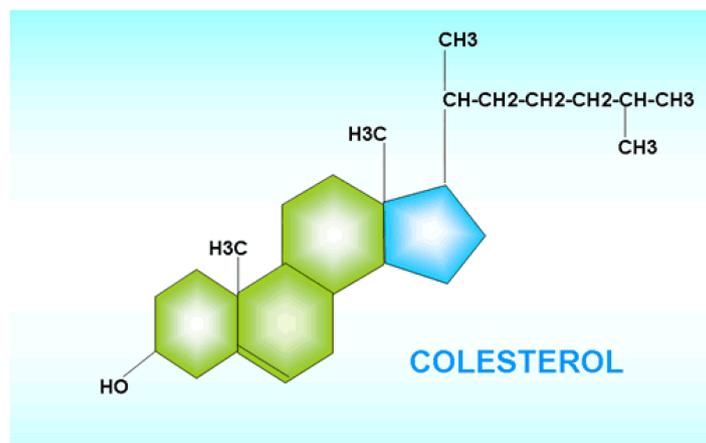


Figura 1.7: Colesterol.

bidos a acoplamiento dipolar residual pueden ser también empleados como fuente de información suplementaria.

Los principales campos de aplicación de la relaxometría con ciclado rápido de campo son: (i) procesos de relajación relacionados a la superficie de fluidos en materiales porosos; (ii) dinámica de polímeros; (iii) tejidos de biopolímeros y biológicos; (iv) cristales líquidos y bicapas lipídicas. FFC es la única técnica de RMN que permite cubrir varios órdenes de magnitud en frecuencia con el mismo instrumento. En esta tesis se demostró que este hecho hace que la relaxometría NMR-FFC sea una herramienta poderosa para la identificación y caracterización de la dinámica molecular en sistemas de membranas lipídicas.

1.4.2. Relajación en el sistema rotante.

En la mayoría de los sistemas mesomórficos y sólidos, los campos locales residuales son relevantes en un intervalo de frecuencias de Larmor crucial para la correcta interpretación de la curva de dispersión de la relajación espín-red. La técnica de relajación en el sistema rotante [12, 13] permite obtener información de las componentes residuales del campo local a lo largo de la dirección impuesta por el campo magnético externo.

1.5. Organización de la tesis.

La tesis está organizada de manera cronológica a fines que el lector pueda seguir como evolucionó el análisis y cómo surgieron las nuevas ideas.

Capítulo 1 Es el capítulo de introducción que se acaba de presentar. Se presentan los conceptos necesarios para un buen entendimiento de la tesis, lípidos, liposomas y colesterol; así como una rápida descripción de las dos técnicas de RMN empleadas.

Capítulo 2 En este capítulo se hace una breve introducción de la dinámica en general de lípidos en membranas biológicas y de las técnicas hasta el momento utilizadas para su análisis. Luego se describen los antecedentes relevantes de los procesos dinámicos que se consideraron estar presentes en la membranas teniendo en cuenta la escala de tiempo del experimento.

Capítulo 3 Teniendo ya identificados los procesos dinámicos que dan lugar a la relajación espín-red, en este capítulo se hace un estudio bibliográfico de los modelos de relajación existentes y adaptables a cada proceso. Finalmente, se muestra la propuesta de modelo de relajación espín-red con el cual se analizaron los datos experimentales.

Capítulo 4 Este es el capítulo experimental. Aquí se introduce al lector brevemente al mundo de la RMN y se hace una descripción detallada de las dos técnicas experimentales utilizadas: relaxometría con ciclado rápido de campo y relaxometría en el sistema rotante.

Capítulo 5 Se describe la preparación de la muestra y los experimentos llevados a cabo. Se muestran los resultados experimentales y se hace un análisis de datos para liposomas formulados con diferentes lípidos, diferentes tamaños de liposomas, diferentes temperaturas y para diferentes contenidos de colesterol en membranas.

Capítulo 6 En este capítulo se describen las propiedades viscoelásticas de membranas lipídicas en liposomas. Se presenta una descripción teórica de los modelos y de los métodos para medir la constante elástica de flexión.

Capítulo 7 Se hicieron nuevos experimentos en un rango más pequeño de frecuencia, a diferentes temperaturas y diferentes contenidos de colesterol, con el fin de poder medir la constante elástica de flexión con la técnica que se propone en la tesis.

Capítulo 8 En este capítulo se propone un modelo para la energía de interacción entre el campo acústico y el director esméctico local. Se investigan los detalles de esta interacción.

Capítulo 9 En este capítulo se presentan las conclusiones de la tesis. Aunque en otros capítulos ya se han destacado algunos resultados importantes, en éste se unen todos los resultados obtenidos a lo largo de la tesis y se resaltan los más importantes.

Capítulo 2

Dinámica molecular de lípidos en liposomas.

En este capítulo se presenta un estudio bibliográfico de la dinámica molecular de lípidos en membranas biológicas. Se presta especial atención a aquellos procesos que son dominantes en la escala de tiempos de los experimentos que se realizaron. Se concluye que en tal escala de tiempos hay tres procesos significativos: difusión molecular sobre una superficie curva, fluctuaciones de orden orientacional y movimientos rápidos (rápidos con respecto a la escala de tiempos observada.)

Dado que los conocimientos adquiridos a partir de la caracterización físico-química de la dinámica en membranas lipídicas son de importancia para la biología celular y la bionanotecnología, un amplio rango de métodos experimentales han sido aplicados a su estudio [25]. Esto es necesario ya que los procesos dinámicos en membranas lipídicas ocurren sobre un amplio rango de escalas temporales, con tiempos de correlación asociados que van desde 10^{-15} s, para vibraciones moleculares, hasta horas para los procesos flip-flop [26, 27].

La resonancia magnética nuclear (RMN) con ciclado rápido de campo es una técnica sensible a la dinámica sobre una escala temporal muy amplia. Otras técnicas que han sido aplicadas incluyen espectroscopía infrarroja y Raman, resonancia paramagnética electrónica (EPR), espectroscopía de correlación por fluorescencia (FCS), recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueado (FRAP), espectroscopía de rayos X y experimentos de dispersión de neutrones. En la figura 2.1 se muestran los tiempos a los cuales algunas técnicas son sensibles a la dinámica molecular. Se nota que la RMN, con ayuda del ciclado de campo, cubre un amplio rango en la escala temporal.

En contraste a la vasta actividad experimental, hay algunos esfuerzos teóricos para entender las propiedades de la membranas. La mayoría de estos estudios han

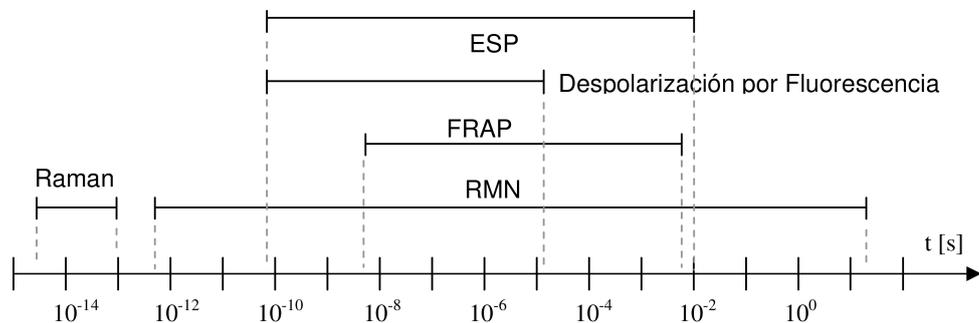


Figura 2.1: Rangos de tiempos a los cuales algunas técnicas son sensibles a la dinámica molecular. Los rangos de tiempos son aproximados.

sido basados en un modelo de red para la bicapa lipídica [28, 29, 30, 31]. Los estados conformacionales de las cadenas son agrupados todos en un número pequeño de estados (~ 10) con diferentes formas y degeneraciones. Simulaciones dinámicas computacionales proveen una localización dependiente del tiempo de todas las moléculas de las membranas, permitiendo una descripción más detallada de los movimientos moleculares [32, 33]. Pero para alcanzar esta resolución, las simulaciones se basan en potenciales efectivos de interacción que son ajustados para reproducir datos experimentales [34]. Una descripción cuantitativa de lo encontrado experimentalmente depende del grado de complejidad del Hamiltoniano de interacción. Simulaciones computacionales realistas a nivel atómico han evolucionado como una técnica complementaria [35, 36] en el estudio de bicapas. Tales métodos han hecho un sustancial progreso durante los últimos diez años [37, 38, 39]. Hoy, simulaciones computacionales se realizan sobre membranas de tamaños superiores a 1000 lípidos y se extienden hasta tiempos superiores a los $10ns$ [40].

Los datos espectroscópicos sobre orden y dinámica en membranas son típicamente analizados en términos de parámetros de orden [8, 41] y tiempos de correlación asociados a cada proceso [8, 42]. Los parámetros de orden son una medida de la orientación de vectores representando ligaduras químicas, segmentos moleculares, moléculas o ensambles de moléculas. Por otro lado, los tiempos de correlación hacen referencia a la escala de tiempo para la reorientación de esos vectores. En membranas, la escala de tiempos de correlación cubre un rango de aproximadamente 15 órdenes de magnitud, desde los femtosegundos hasta segundos u horas. En general, los tiempos de correlación aumentan cuando aumenta el tamaño del segmento que se mueve. Los movimientos de ligaduras químicas individuales en general son los más rápidos. Luego siguen los movimientos de lípidos como un todo, movimientos colectivos de los lípidos o movimientos ondulatorios de la membrana y finalmente, en el caso de los liposomas, la dinámica propia de la estructura globular en el medio acuoso de soporte.

En la figura 2.2 están representados los principales movimientos reconocidos y estudiados hasta el momento, los cuales son:

- Vibraciones en lo largo de una ligadura química y oscilaciones torsionales de ligaduras (femtosegundos).
- Libraciones en la orientación de una ligadura (picosegundos).
- Rotaciones alrededor de ligaduras químicas (pico-nanosegundos).
- Reorientación de los lípidos a lo largo de su eje por medio de difusión (nanosegundos).
- Difusión lateral de los lípidos en el plano de la membrana (nano-microsegundos).
- Fluctuaciones de orden (microsegundos a segundos).
- Flip-flop de lípidos a través de las capas de la bicapa lipídica (milisegundos a horas).

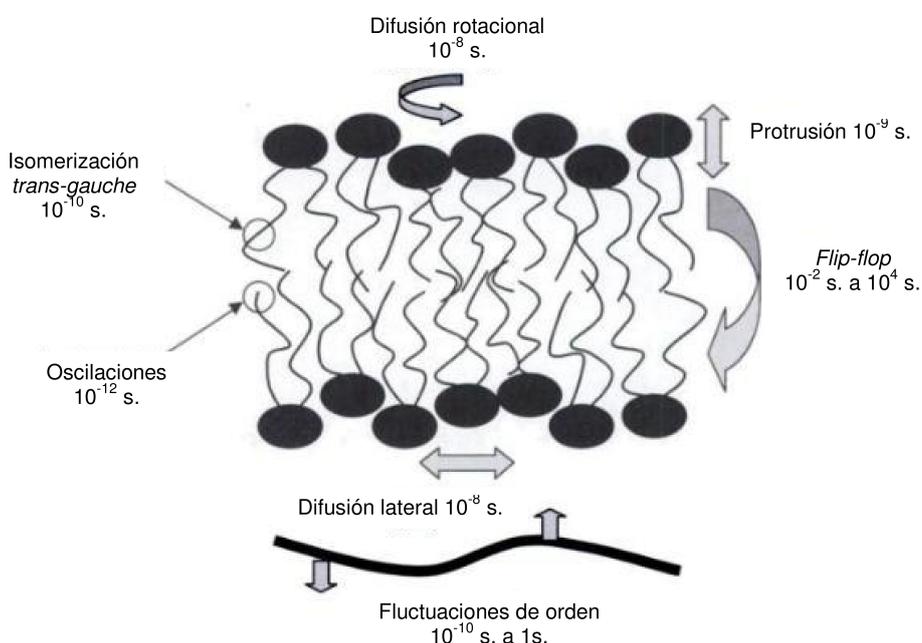


Figura 2.2: Representación esquemática de los principales procesos dinámicos que ocurren en una membrana biológica. Los rangos de tiempos de correlación asociados son aproximaciones.

El objetivo de las siguientes secciones fue recolectar de la literatura información sobre los procesos presentes en membranas. En tales secciones se detallan los tres procesos dinámicos relevantes en la escala de tiempo experimental que están presentes en las membranas lipídicas. Procesos tipo flip-flop requieren de un movimiento de traslación a lo largo de la normal a la membrana y una rotación de 180° respecto a este eje. Las velocidades asociadas a este movimiento han sido medidas por EPR [26], RMN [43] y técnicas de fluorescencia. En modelos de membranas compuestas por lípidos con cadenas saturadas, el tiempo medio para un proceso de flip-flop puede ser desde horas hasta días. Esto no es sorprendente pues tal movimiento trans-bicapa de lípidos requiere que el grupo polar hidrofílico atraviese el la parte central hidrofóbica de la membrana, un evento muy poco probable. Esto es, tal proceso dinámico ocurre con tiempos característicos muy grandes, por lo que no fue considerado.

2.1. Difusión sobre una superficie curva

La difusión lateral de lípidos en una membrana biológica es uno de los parámetros claves para su funcionamiento, interviniendo en los procesos celulares tales como agregación o adhesión celular. Las membranas celulares naturales presentan un sistema complejo y heterogéneo, el cual hace la descripción de sus propiedades biológicas totalmente dificultosa. Así, un número de sistemas modelos con estructuras y composiciones lipídicas simplificadas son usadas en diversos estudios. Mediciones realizadas sobre este proceso proveen una importante perspectiva sobre la estructura y la organización lateral de la misma. Las técnicas más utilizadas para estudiar difusión son RMN y métodos ópticos con marcadores fluorescentes.

Si la difusión sobre la membrana no es restringida un lípido viaja, en primera aproximación, una distancia $x = (4Dt)^{1/2}$ desde el origen durante un tiempo de observación t , donde D es la constante de difusión lateral. Sin embargo, esta estimación está basada en la suposición de que el lípido no encuentra obstáculos durante su viaje por la membrana. De esta manera, la heterogeneidad de las membranas, debida a la presencia de dominios con diferentes composiciones lípidos/proteínas, introduce una aparente dependencia de la velocidad de difusión respecto a la distancia recorrida. Es decir, si observamos la difusión sobre distancias cortas, es menos probable que aparezcan obstáculos que si observamos difusión sobre grandes distancias. Por lo tanto, las velocidades de difusión tienen una tendencia a ser menores si observamos el viaje de lípidos sobre grandes distancias. Cada experimento es sensible sobre una escala de distancias específica: transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) es medida sobre distancia de 10 a 100; experimentos de RMN con gradiente de campo magnético pulsado (PFG-NMR) son sensibles a difusión de lípidos sobre distancias en el rango de $100nm$ a $10\mu m$, dependiendo del gradiente utilizado; y mediciones por FRAP son sensibles a distancias del orden de $1\mu m$. La diferencia entre las velocidades de difusión medidas como función de la distancia recorrida contiene información acerca del tamaño de los dominios, las formas y las propiedades.

La presencia de la difusión lateral en liposomas de membranas lipídicas fue demostrada tanto experimentalmente como en simulaciones de la dinámica molecular. Kornberg y McConnel [44] muestran evidencia de difusión lateral en vesículas de fosfatidilcolina (PC) observando el efecto que producen espines marcados de PC sobre el espectro de resonancia nuclear. El espectro de resonancia nuclear de vesículas de PC se ensancha a causa de los espines-marcados en PC; tal ensanchamiento es proporcional a la concentración de espines marcados en PC. Proponen como posibles candidatos responsables del ensanchamiento (y por lo tanto, de la difusión lateral) a la colisión entre vesículas, al intercambio de espines marcados entre vesículas, la fusión de vesículas y a movimientos internos de la vesícula. Concluyen que estos últimos son los responsables de la difusión lateral.

Mediciones de difusión lateral rápida de lípidos en vesículas y en membranas biológicas fueron realizadas mediante RMN de 1H [45]. Los valores de T_1 de protones de fosfatidilcolina diluída en vesículas del mismo lípido con las cadenas deuteradas muestran que la relajación intermolecular es importante en la bicapa protonada completa. Hay un número de movimientos moleculares posibles los cuales podrían dominar esta relajación intermolecular. La relajación dipolar intermolecular de protones fue modelada utilizando un modelo que Torrey [46, 47] adaptó para el movimiento de difusión en un líquido con densidad de espín uniforme; lo que corresponde a una situación en la cual un núcleo puede existir en uno de dos estados: a) unidos en un pozo de potencial y b) un estado excitado térmicamente en el cual el núcleo se puede mover rápidamente como un movimiento tipo difusivo aleatorio antes de que vuelva a ser atrapado en el pozo de potencial. Se consideran como posibles procesos dinámicos responsables de la relajación al movimiento rotacional relativo de los vecinos más cercanos, a los movimientos oscilatorios perpendiculares a la superficie de la vesícula y a la difusión lateral de las moléculas lipídicas en el plano de la membrana. Se concluye que la difusión lateral es el candidato más admisible para el movimiento intermolecular que domina la relajación transversal T_2 .

El problema de difusión lateral se estudió teóricamente aplicando el análisis clásico del movimiento Browniano a un modelo hidrodinámico [48]. El movimiento Browniano de difusión de partículas ocurre en un entorno altamente anisotrópico. Una movilidad traslacional (independiente de la velocidad) puede definirse si la viscosidad del líquido que soporta a la membrana se tiene en cuenta. Los cálculos del modelo sugieren que una situación realista para la difusión traslacional sería que esta sea aproximadamente cuatro veces más rápida que la difusión rotacional en el caso isotrópico.

FRAP es un método que mide la difusión lateral de lípidos marcados fluorescentemente. Típicamente, una molécula lipídica, la cual ha sido rotulada con fluorescencia, se introduce en una membrana de interés. La irradiación subsecuente de una pequeña región de la membrana ($1\mu m$ en diámetro) con un rayo laser conduce a la

destrucción química del fluoróforo (fotoblanqueamiento). Cuando el laser se apaga, la intensidad de la fluorescencia dentro del spot retorna debido a la difusión lateral de moléculas no blanqueadas desde el entorno hacia el spot irradiado. FRAP ha sido utilizado para medir difusión en función de la temperatura en bicapas de L- α -dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) soportadas sobre obleas de silicio oxidado [49]. También se utilizó para desarrollar un extenso estudio de la difusión lateral de un fosfolípido en la mezcla binaria de DMPC-colesterol, por arriba de la temperatura de fusión del fosfolípido [50]. En las regiones del diagrama de fase donde existe una única fase cristalina-líquida, la difusión puede ser cuantitativamente descrita por la teoría de volumen libre, usando una ecuación híbrida de Macedo-Litovitz. Una interpretación consistente de los datos de difusión puede proveerse basada esencialmente en la idea que el efecto primario de la adición del colesterol a la bicapa es ocupar volumen libre. En un trabajo más reciente de Almeida [51] también se mide la difusión usando la técnica de FRAP. Trabajan en DMPC y DMPC/colesterol, y miden D en función de la temperatura.

Dispersión dinámica de luz por fibra óptica (FODLS) [52] fue utilizada para medir coeficientes de difusión de corto alcance de liposomas cargados y no cargados de fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilserina (PS). Espectroscopia de correlación de fluorescencia [53] se utilizó para determinar el coeficiente de difusión lateral en vesículas gigantes de dioleoyl-fosfatidilcolina (DOPC). La ventaja de trabajar en vesículas unilamelares gigantes es que su bicapa es de baja curvatura y no requiere de un sustrato. Además, las vesículas son más o menos del tamaño de una célula.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica que mide temperaturas y flujos de calor asociados con transiciones en materiales como una función del tiempo y la temperatura [54, 55, 56]. Espectroscopia por resonancia magnética nuclear de deuterones junto con DSC [28] se utilizaron para estudiar la dinámica de la mezcla de colesterol con dipalmitoyl-fosfatidilcolina (DPPC) con cadenas deuteradas. Un diagrama de fase como función de la temperatura y el contenido de colesterol se ha construido. Se identifican tres regiones de coexistencia de dos fases. Se encontró que ocurren cambios dramáticos en el ancho de línea de 2H RMN, los cuales suceden pasando a través de las transiciones de fase. También se vio que el colesterol causa cambios en la dinámica y el orden molecular de la membrana en las fases fluida (L_α) y fase gel ($P_{\beta'}$ y $L_{\beta'}$) así como también introduce una nueva fase termodinámica a altas concentraciones de colesterol, la fase β . El cambio más obvio en la fase L_α (fase termodinámica estable encontrada a bajas concentraciones de colesterol por encima de la temperatura de transición), viendolo con un experimento 2H RMN, es el gran incremento en el orden orientacional promedio de las cadenas lipídicas. Este incremento en el orden de las cadenas es acompañado de un incremento en el grosor de la bicapa.

La espectroscopia de correlación de fluorescencia (FCS) es otra técnica que permite determinar coeficientes de difusión de proteínas fluorescentes y otros fluoróforos. Para ello, utilizando un microscopio confocal se miden las fluctuaciones en la intensidad de fluorescencia dentro de un pequeño volumen de observación que contiene unas pocas moléculas. Luego el análisis de la correlación temporal de dichas fluctuaciones permite obtener información del coeficiente de difusión y de la concentración. La combinación de FCS con microscopía de fluorescencia confocal (CFM) se utilizó para estudiar la dinámica lipídica y la organización en el conjunto de rafts en vesículas unilamelares gigantes preparadas con varias mezclas de lípidos. Coeficientes de difusión en función de la concentración de colesterol se reportan para mezclas binarias de esfingomiélin(SM)/colesterol, DPPC/colesterol y distearoilfosfatidilcolina(DSPC)/colesterol [57]. También se utilizaron en vesículas unilamelares gigantes preparadas con mezclas ternarias de DOPC/SM/colesterol [58], donde encontraron que a altas concentraciones de colesterol la difusión de los lípidos disminuye tras la adición de colesterol. La combinación de ambas técnicas también fue utilizada para estudiar la dinámica lipídica en vesículas gigantes unilamelares (VGU). La formación de dominios en VGUs de mezclas de un fosfolípido no saturado (DOPC), un fosfolípido saturado (DSPC) y colesterol fue visualizada mediante CFM [59]. El objetivo principal de tal estudio era conocer mejor cómo se mueven los lípidos dentro de la bicapa y el efecto del colesterol sobre la dinámica lipídica en la presencia de coexistencia de fases. Mediante el método se observan los cambios del coeficiente de difusión como función del contenido de colesterol.

RMN de gradiente de campo pulsado fue utilizado para determinar directamente el coeficiente de difusión lateral para las siguientes bicapas macroscópicamente alineadas: DMPC, SM, POPC y DOPC con colesterol [60]. Diferencias en la dependencia de concentración y energías de activación aparentes de la difusión de los lípidos son claramente observadas. Mediante RMN de gradiente de campo pulsado estudiaron el efecto sobre la difusión cuando se incrementa la insaturación en la cadena alcaína grasa de la PC [61].

En la tabla 2.1 se presentan los valores de la constante de difusión obtenidas en diferentes sistemas y con diferentes técnicas experimentales:

2.2. Fluctuaciones de orden

Las membranas lipídicas fluidas son objetos blandos y altamente flexibles los cuales son susceptibles a fluctuaciones de forma térmicamente inducidas. La longitud de las escalas asociadas con el fenómeno de ondulación de vesículas gigantes se extiende desde dominios microscópicos a mesoscópicos. Debido al cutoff en la escala de lon-

gitud óptica, solamente las longitudes de onda de las deformaciones de forma más largas son observables. Las mediciones de las fluctuaciones de forma se basan en un análisis de Fourier de ondulaciones de la membrana excitada térmicamente (fluctuaciones de forma de la vesícula) usando métodos de videomicroscopía [66, 67, 68]. Las ondulaciones pueden ser analizadas para obtener el módulo elástico de flexión de la membrana. Otras técnicas que pueden usarse para estimar la constante elástica de flexión de una única vesícula incluyen aspiración por micropipetas en el régimen de baja tensión [69] y deformación de una vesícula en un campo eléctrico [70].

En vesículas, las fluctuaciones de orden orientacionales se originan en las fluctuaciones de forma de la esfera. Son movimientos colectivos de la bicapa completa y dan lugar a relajación espín-red nuclear dipolar modulando la orientación del vector internuclear con respecto al campo magnético externo. Estudios experimentales indican que las membranas sufren ondulaciones con tiempos de correlación que cubren más de seis órdenes de magnitud desde una fracción de microsegundos hasta segundos, mientras que la longitud de onda correspondiente de tales ondulaciones va desde los nano hasta los micrómetros. Las amplitudes y las frecuencias de las fluctuaciones de orden están directamente relacionadas con las propiedades elásticas de la membrana, la viscosidad de la solución y la distancia a otras membranas.

La relaxometría magnética nuclear con ciclado de campo [42, 71] ha sido usada para probar movimientos moleculares colectivos en cristales líquidos. Estos movimientos representan un mecanismo signficante de relajación espín-red en cristales líquidos termotrópicos a frecuencias por debajo de $10^6 Hz$. A frecuencias más altas varios tipos de movimientos no colectivos (debidos en general a difusión traslacional y rotaciones moleculares locales) dominan y tienden a enmascarar las fluctuaciones de orden. Sin embargo, los mecanismos de movimientos que contribuyen a la relajación en cristales líquidos liotrópicos y membranas biológicas son menos claros [8, 18, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79]. La dinámica de movimientos lentos no colectivos compite con las fluctuaciones de orden en el rango de frecuencias bajas, pudiendo así dar lugar a reorientaciones mediadas por difusión traslacional a lo largo de una superficie curva [8, 20, 72]. Estos movimientos no pueden ser fácilmente discriminados de las ODF a menos que se examine la relajación en un amplio rango de frecuencias.

Las expresiones de las tasas de relajación espín-red cuadrupolares fueron calculadas para 2H y ^{14}N en bicapas lipídicas [80]. Los resultados se presentan para un modelo general de difusión rotacional anisotrópica que describe reorientaciones segmentales o moleculares en la bicapa, y después el análisis se extiende incluyendo las fluctuaciones locales relativamente lentas del director con respecto a la normal macroscópica de la bicapa. Se concluye que la contribución dominante a las velocidades de relajación 2H de bicapas de DPPC saturadas surge de las fluctuaciones de orden colectivas.

Mediciones de dispersión de relajación espín-red de 1H de bicapas lipídicas han sido llevadas a cabo cubriendo un rango de seis ordenes de magnitud [8]. Al igual que para sistemas esmécticos termotrópicos, se interpretó oportunamente que las fluctuaciones de orden [81] contribuyen al proceso de relajación solamente a frecuencias extremadamente bajas en el régimen de los kHz . Sin embargo fue recientemente demostrado que dicha interpretación es incorrecta, generando una confusión en la aplicación de la técnica de relaxometría con ciclado de campo a estos sistemas [11, 82].

Estudios de movimientos colectivos en membranas lipídicas macroscópicamente ordenadas [83] fueron realizados mediante mediciones de relajación espín-espín de 2H [75]. La anisotropía y dispersión en frecuencia de pulsos, del tiempo de relajación espín-espín en una secuencia CPMG se empleó para evaluar la principal contribución a la relajación transversal de espín de 2H en membranas lipídicas [84]. El análisis de los experimentos es llevado a cabo en términos del formalismo del operador densidad, empleando el método estocástico de Liouville. Se concluyó que los movimientos colectivos de los lípidos constituyen el proceso de relajación transversal dominante.

RMN de protones fue empleada como una prueba para la dinámica colectiva de cadenas hidrocarbonadas en $C_{10}H_{21}NH_3Cl$ [85], una biomembrana modelo sometida a una secuencia de transiciones de fase estructurales irreversibles. Las mediciones de relajación espín-red en el sistema rotante revelan una dinámica colectiva de cadenas crítica a bajas frecuencias en el régimen de los kHz , la cual está asociada con la transición de fase configuracional de la cadena de interdigitada a nointerdigitada.

Mediciones de relajación transversal de espín empleando secuencias de pulsos Carr-Purcell pueden dar información detallada de la dinámica de movimientos lentos en biomembranas [86, 87]. Se investigaron dos mecanismos de relajación, fluctuaciones de forma de la vesícula y difusión lateral de moléculas a lo largo de la superficie curva de la esfera. Concluyen que en el rango de los kHz , las fluctuaciones de orden constituyen el proceso de relajación dominante.

En soluciones acuosas concentradas, la mayoría de los lípidos forman una fase lamelar L_α : una pila de bicapas anfifílica separadas por capas de solventes. A temperatura ambiente usualmente las bicapas tienen la estructura de fluidos bidimensionales. La pila de bicapas exhibe comportamiento cuasi-líquido en dos dimensiones, y un orden cuasi-cristalino en la dirección perpendicular a las capas. Por lo tanto, la fase lamelar L_α se asemeja a un cristal líquido esméctico. Sobre escalas moleculares grandes, interacciones en fluidos complejos pueden investigarse mediante simulaciones moleculares [88, 89, 90, 91, 92]. Los resultados de las simulaciones pueden usarse luego para verificar la validez de teorías mesoscópicas. En un trabajo [93] se extiende este tipo de estudios a pilas lamelares enteras de bicapas. Tal sistema se lo investiga usan-

do un modelo fenomenológico fuera de red de una mezcla solvente-anfifílico. Analizan el espectro de fluctuaciones de las membranas y pueden extraer una longitud de correlación en el plano. Tales resultados concuerdan con lo obtenido con predicciones de la teoría armónica discreta.

Se reporta una determinación experimental de la estructura y fluctuaciones de una bicapa lipídica, en una configuración plana que facilita la adquisición de los datos de dispersión en la superficie mediante dispersión de la reflectividad de rayos X y dispersión no especular [94]. Se combinan mediciones de dispersión especulares y no especulares de bicapas lipídicas de PC con 17 o 18 carbonos flotando en agua cerca de una pared plana cubierta por una capa de lípidos. Se presenta un esquema coherente de la estructura subyacente y de las fluctuaciones de la bicapa fosfolipídica libre.

2.3. Movimientos rápidos.

El último proceso dinámico que se considera importante son los movimientos rápidos con respecto a la escala de tiempos que observamos experimentalmente. Dentro de este grupo se pueden mencionar fluctuaciones vibracionales internas, libraciones, la isomerización, rotaciones de grupos químicos pequeños, etc.

Para el caso de lípidos con cadena doble (ej. fosfatidilcolinas) el aumento de temperatura provoca un incremento en la movilidad de la cadena hidrocarbonada, provocando una isomerización trans-gauche, es decir un cambio en la estructura de la cadena. Los tiempos de correlación para los procesos de isomerización trans-gauche pueden ser determinados por mediciones de tiempos de relajación con distintas técnicas [8, 95]. En la escala de tiempos de experimentos de resonancia de espines electrónicos (ESR), isomerización trans-gauche de cadenas de fosfatidilcolinas es un movimiento relativamente rápido. En experimentos de 2H -NMR en moléculas de DMPC específicamente marcadas, los tiempos de correlación determinados están en el rango 10^{-12} s a 10^{-10} s. Este rango de tiempos está de acuerdo con mediciones realizadas con la técnica de relaxometría con ciclado de campo aplicada a protones [8].

En la fase líquido-cristalina el proceso de rotación de lípidos constituye un movimiento rápido en la escala de tiempos de 2H -NMR. Mediciones del tiempo de relajación espín-red de protones sugieren tiempos de correlación para este proceso del orden de 2×10^{-8} s [96]. Otros reportes [97] basados en el espectro de ESR de cadenas marcadas de DMPC arrojan valores entre 10^{-9} s y 10^{-7} s para la fase líquido-cristalina. Por otro lado mediciones de la dispersión del tiempo de relajación de protones [8] dan valores del orden de 5×10^{-9} s a $35^\circ C$.

$D[m^2s^{-1}]$	Sistema	Temperatura[K]	Método	Referencia
$0,9 \times 10^{-12}$	lecitina de huevo	293	T_2	[45]
$1,8 \times 10^{-12}$	lecitina	298	ESR	[62]
$1 - 8 \times 10^{-12}$	DMPC y DOPC	283 - 313	FRAP	[49]
$3,97 \times 10^{-12}$	PS	-	FODLS	[52]
$4,86 \times 10^{-12}$	PC	-	FODLS	[52]
$7,5 \times 10^{-12}$	DMPC	308	FRAP	[63]
$6,0 \times 10^{-12}$	DMPC	299	FRAP	[64]
3×10^{-12}	DLPC	298	FCS	[65]
11×10^{-12}	DMPC	308	pfg-NMR	[60]
8×10^{-12}	SM	328	pfg-NMR	[60]
10×10^{-12}	DOPC	303	pfg-NMR	[60]
$24 - 17 \times 10^{-12}$	SOPC(0 - 40) %col	333	pfg-NMR	[61]
$18 - 11 \times 10^{-12}$	SOPC(0 - 40) %col	323	pfg-NMR	[61]
$12 - 8 \times 10^{-12}$	SOPC(0 - 40) %col	313	pfg-NMR	[61]
$8 - 4 \times 10^{-12}$	SOPC(0 - 40) %col	303	pfg-NMR	[61]
$4 - 2 \times 10^{-12}$	SOPC(0 - 40) %col	294	pfg-NMR	[61]
$31 - 20 \times 10^{-12}$	SLPC(0 - 40) %col	333	pfg-NMR	[61]
$22 - 14 \times 10^{-12}$	SLPC(0 - 40) %col	323	pfg-NMR	[61]
$15 - 10 \times 10^{-12}$	SLPC(0 - 40) %col	313	pfg-NMR	[61]
$10 - 5 \times 10^{-12}$	SLPC(0 - 40) %col	303	pfg-NMR	[61]
$6 - 2 \times 10^{-12}$	SLPC(0 - 40) %col	294	pfg-NMR	[61]
$35 - 21 \times 10^{-12}$	SAPC(0 - 40) %col	333	pfg-NMR	[61]
$25 - 15 \times 10^{-12}$	SAPC(0 - 40) %col	323	pfg-NMR	[61]
$18 - 10 \times 10^{-12}$	SAPC(0 - 40) %col	313	pfg-NMR	[61]
$12 - 6 \times 10^{-12}$	SAPC(0 - 40) %col	303	pfg-NMR	[61]
$7 - 3 \times 10^{-12}$	SAPC(0 - 40) %col	294	pfg-NMR	[61]
$38 - 26 \times 10^{-12}$	SDPC(0 - 40) %col	333	pfg-NMR	[61]
$27 - 19 \times 10^{-12}$	SDPC(0 - 40) %col	323	pfg-NMR	[61]
$20 - 13 \times 10^{-12}$	SDPC(0 - 40) %col	313	pfg-NMR	[61]
$14 - 8 \times 10^{-12}$	SDPC(0 - 40) %col	303	pfg-NMR	[61]
$9 - 5 \times 10^{-12}$	SDPC(0 - 40) %col	294	pfg-NMR	[61]
$0,105 \times 10^{-12}$	<i>SM(0,45)DOPC(0,45)COL(0,1)</i>	-	FCS	[58]
$0,255 \times 10^{-12}$	<i>SM(0,4)DOPC(0,4)COL(0,2)</i>	-	FCS	[58]
$0,795 \times 10^{-12}$	<i>SM(0,33)DOPC(0,33)COL(0,33)</i>	-	FCS	[58]
$0,8 \times 10^{-12}$	<i>SM(0,53)DOPC(0,13)COL(0,33)</i>	-	FCS	[58]
$(4 - 13) \times 10^{-12}$	DMPC	299 - 323	FRAP	[50]
$(6,3 - 2,5) \times 10^{-12}$	DOPC(0 - 67) %col	-	FCS	[57]
$(7 - 1,1) \times 10^{-12}$	DLPC(0 - 67) %col	-	FCS	[57]

Tabla 2.1: Valores de la constante de difusión obtenidos con diferentes técnicas experimentales, en diferentes sistemas y a diferentes temperaturas. Las siguientes abreviaturas corresponden a los siguientes compuestos: SOPC (1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina), SLPC (1-estearoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfolina), SAPC (1-estearoil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosfolina), SDPC (1-estearoil-2-docosaheptaenoil-sn-glicero-3-fosfolina) y DLPC (dilinoceroylfatidilcolina).

Capítulo 3

Modelos de relajación.

En el capítulo anterior se concluyó que hay tres procesos significativos: difusión molecular sobre una superficie curva, fluctuaciones de orden y movimientos rápidos (rápidos con respecto a la escala de tiempos observada). Este capítulo está dedicado a los modelos de relajación espín-red correspondientes a cada uno de los procesos que intervienen.

Los experimentos de relajación tratan con los grados de libertad de los espines nucleares [10] y proveen información acerca de la red a través de la evolución temporal del sistema de espines. Es usual pensar en el sistema de espines como un sistema termodinámico en contacto con un reservorio (la red) con un gran número de grados de libertad. En un experimento típico, se entrega energía en forma de pulsos de radiofrecuencia hacia el sistema de espines, con el objetivo de llevarlo a un estado de no equilibrio con la red. Luego se le permite al sistema de espines entrar en contacto con la red durante un período de evolución, siendo el último paso la observación de los resultados de la evolución. La recuperación del estado de equilibrio ocurre con un tiempo característico denominado tiempo de relajación espín-red (T_1), y está determinado por la eficiencia de los mecanismos de relajación espín-red. La cantidad que se mide es el tiempo de relajación espín-red, el cual depende de la interacción intra e intermolecular de los espines nucleares con los campos magnéticos y eléctricos locales; siendo éstos modulados por los movimientos moleculares subyacentes.

Cualquier teoría de relajación relaciona los tiempos de relajación medidos con las propiedades microscópicas de la muestra. Se considerará el intervalo de frecuencias donde las condiciones del límite de colisión débil de la teoría semiclásica son válidas. En este límite, las fluctuaciones son intensas durante la escala de tiempos de los procesos de relajación, incluso antes de que ejerzan una influencia perceptible en el sistema de espines. En este formalismo, los tiempos de relajación están representados a través de funciones densidades espectrales que modelan la dinámica de la red. A su vez, las densidades espectrales son las transformadas de Fourier de las funciones

de correlación correspondientes. Las últimas contienen la física relevante del problema relacionando así los tiempos medidos con los parámetros físicos involucrados (viscosidad, constantes elásticas, etc.) y las variables controladas externamente (temperatura, frecuencia, orientation, etc.). En la ausencia de especies paramagnéticas, las fluctuaciones de la interacción dipolar homo-nuclear son consideradas los mecanismos de relajación dominantes para núcleos 1H . Dentro de este esquema, el tiempo de relajación espín-red para una muestra promediada orientacionalmente puede ser expresado como [10]

$$\frac{1}{T_1} = K[J_1(\omega) + 4J_2(2\omega)], \quad (3.1)$$

donde $K = (9/8r^6)\gamma^4\hbar^2(\mu_0/4\pi)^2$, r es la distancia media entre protones, γ es la razón giromagnética de los protones, \hbar es la constante de Plank dividida por 2π , y μ_0 es la permeabilidad magnética del vacío. Finalmente, $\omega = 2\pi(\nu_0 + \nu_L)$, donde ν_0 es el campo magnético en unidades de frecuencia de Larmor de 1H , y ν_L la componente de campo local promedio a lo largo del eje de cuantización. La corrección por la componente normal es menos relevante en tanto que en este trabajo solamente se considerarán los datos para los campos magnéticos muy por encima de la magnitud del campo local B_L .

En la ecuación (3.1), la densidad espectral resultante corresponde a la transformada de Fourier de la función de correlación que incluye toda la dinámica del sistema. Esto será el producto de las funciones de correlación correspondientes a cada proceso dinámico involucrado. Comúnmente se asume que los diferentes mecanismos que contribuyen son estadísticamente independientes, en cuyo caso la función de correlación del sistema se reducirá a la suma de las funciones de correlación de los movimientos individuales. Una separación en la escala de tiempos es también frecuentemente invocada ya que permite la reducción del producto a una suma, y por lo tanto la densidad espectral total puede reducirse a la suma de las densidades espectrales de los movimientos independientes que contribuyen [8, 18]. Para un determinado sistema dinámico complejo, la suposición de que no hay correlación cruzada entre los diferentes procesos debe ser validada [98].

La discriminación de los diferentes mecanismos de relajación está usualmente basada en la identificación de las leyes de dispersión en el rango de frecuencia medido. Un ejemplo típico es la ley de dispersión de raíz cuadrada de la frecuencia en nemáticos, la cual se manifiesta claramente en el rango de los kHz [99].

La interpretación de la curva de dispersión de T_1 normalmente se basa en la superposición de las densidades espectrales asociadas a los diferentes procesos dinámicos considerados [8, 42, 74, 100]. Por ejemplo, mezcla de agua con laurato de potasio liotrópico [74] en fases anisotrópicas fueron descritas en el rango de $10^2 - 10^8 Hz$

como una superposición de tres procesos debidos a (a) fluctuaciones orientacionales del director, (b) rotaciones moleculares locales, y (c) autodifusión molecular. Datos de relajación sobre un rango de frecuencia $100\text{Hz} \leq \nu \leq 300\text{MHz}$ de membranas fosfolipídicas [8] en fase líquida cristalina fueron evaluados en términos de fluctuaciones de orden del director, rotación molecular, autodifusión lateral, y rotaciones inducidas traslacionalmente. El problema de tales procedimientos es que la elección de mecanismos de relajación potenciales tiende a ser ambiguo debido al gran número de parámetros de ajuste.

Velocidades de relajación espín-red de ^1H , ^2H y ^{13}C en membranas de bicapas lipídicas dependen fuertemente de la intensidad del campo magnético aplicado [77, 80, 101, 102, 103, 104]. Estas velocidades se han modelado teniendo en cuenta dos principales componentes, una debida a movimientos rápidos locales de cadenas alquílicas, y otra debida a movimientos colectivos lentos. La correlación entre ellas se desprecia [80, 101].

Otro modelo utilizado para interpretar los datos de experimentos de RMN es el método de aproximación libre [15, 105, 106]. En principio es aplicable a macromoléculas en solución y distingue básicamente dos tipos de movimientos que intervienen en experimentos de relajación en RMN: los movimientos de la macromolécula como un todo y los movimientos internos de las moléculas que componen la macromolécula. La forma funcional de este modelo es la suma de dos Lorentzianas y tiene básicamente dos parámetros ajustables que pueden ser interpretados dentro de algún modelo dinámico en particular. De cualquier modo, éste presenta dificultades significantes: (i) La relación de los valores de τ_c con las propiedades físicas de las membranas no es trivial (la dinámica colectiva de membranas no puede ser caracterizada por un único tiempo de correlación). (ii) La descripción de la dinámica colectiva en términos de funciones Lorentzianas es problemática. (iii) El número de contribuciones requeridas para ajustar los datos es muy sensible al rango de los datos, y en nuestras experiencias es también sensible a pequeños cambios en el tamaño hidrodinámico promedio de las vesículas y de la temperatura.

El modelado apropiado para las fluctuaciones colectivas en membranas de bicapas ha sido objeto de estudio tanto en el campo experimental como teórico [18, 77, 78, 79]. Ciertos métodos [77, 78] están basados en fluctuaciones del director del tipo nemáticas 3D. En la referencia [18], ondulaciones de capas 2D de membranas (no acopladas) fueron sugeridas como un mecanismo de fluctuación. Más tarde la atención se centró en la influencia del acoplamiento de capas [79] en sistemas de bicapas, a pesar de que no pudo ser confirmado con claridad en los estudios experimentales [76].

Otros experimentos se han realizado sobre un rango pequeño de frecuencias y no

pueden discriminar entre la dependencia ω_0^{-1} de sistemas 2D o la dependencia $\omega_0^{-1/2}$ de un nemático 3D. Para la discriminación de mecanismos de relajación en materiales líquido-cristalinos se han requerido experimentos que cubran cuatro órdenes de magnitud de frecuencias [99].

La base teórica para el cálculo de la relajación espín-red nuclear debida a ondulaciones de una membrana plana fue propuesta inicialmente por Marqusee [18]. Asumió que las membranas son de extensión infinita, y por lo tanto se pueden despreciar los efectos introducidos por los límites finitos. En el trabajo se propuso que los movimientos a baja frecuencia pueden ser modelados apropiadamente como fluctuaciones del director de una estructura plana. Se encontró que la relajación espín-red inducida por ondulaciones de membranas planas depende linealmente de la frecuencia de larmor ($T_1^{-1} \propto \omega^{-1}$), similar a un termotrópico con una estructura de planos [107]. También asumió que no ocurre acoplamiento entre membranas individuales en la misma solución. Esto está sin duda justificado para vesículas unilamelares. Suele asumirse que sistemas multilamelares están también desacoplados, en contraste con los cristales líquidos esmécticos A [107, 108].

3.1. Fluctuaciones de orden.

Fluctuaciones cuasi-esféricas [66] en vesículas unilamelares fueron propuestas como el mecanismo de fluctuaciones de orden principal a través de estudios de relajación de espines nucleares [86, 87]. La densidad espectral correspondiente fue calculada por M. Vilfan et al. en el límite de pequeñas deformaciones [19]. La vesícula se considera como una cáscara cuasi esférica flácida de radio R_0 con un volumen constante $V = (4/3)\pi R_0^3$ y área fija A . Para una descripción cuantitativa, la superficie esférica deformada puede ser representada como:

$$R(\theta, \phi) = R_0[1 + u(\theta, \phi)], \quad (3.2)$$

donde $u(\theta, \phi)$ representa el desplazamiento instantáneo de la superficie de la vesícula desde su forma esférica en términos de los ángulos polar y azimutal que definen la posición de la esfera. $u(\theta, \phi)$ puede ser convenientemente expandida en término de armónicos esféricos que representan los modos normales discretos. Por analogía con el caso de los cristales líquidos, la función de correlación correspondiente puede ser definida en términos de las componentes de un vector unitario $\mathbf{n} = (n_r, n_\theta, n_\phi)$ representando la dirección instantánea de la normal local a la membrana:

$$J_{OF}(\omega) = Re \int_{-\infty}^{\infty} [\langle n_\theta(0)n_\theta^*(t)* \rangle + \langle n_\phi(0)n_\phi^*(t)* \rangle] e^{-i\omega t} dt. \quad (3.3)$$

Para fluctuaciones pequeñas, las componentes del vector unitario y el desplazamiento instantáneo están relacionados por:

$$n_\theta = -\frac{\partial u(\theta, \phi)}{\partial \theta} \quad (3.4)$$

$$n_\phi = \frac{-1}{\sin \theta} \frac{\partial u(\theta, \phi)}{\partial \theta}. \quad (3.5)$$

Por lo tanto, se obtiene la densidad espectral como una suma de contribuciones de modos individuales de excitación caracterizados por el número l (el mismo índice que se usa para armónicos esféricos), que va desde la contribución a la relajación del modo mínimo ($l = 2$), hasta el valor máximo determinado por las dimensiones moleculares ($l_{max} \approx \pi R_0/a$, donde a es la distancia promedio entre moléculas vecinas):

$$J_{OF}(\omega) = \frac{k_B T}{2\pi\kappa} \sum_{l=2}^{l_{max}} \frac{l(l+1)(2l+1)}{(l^2+l-2)(l^2+l+\sigma)} \frac{\tau_l}{(1+\omega^2\tau_l^2)}. \quad (3.6)$$

Aquí, κ es el módulo elástico de flexión, k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura, σ la tensión lateral efectiva y τ_l está dado por:

$$\tau_l = \frac{\eta R_0^3}{\kappa} \frac{(2l+1)(2l^2+2l-1)}{l(l+1)(l+2)(l-1)(l^2+l+\sigma)}, \quad (3.7)$$

donde η es la viscosidad del fluido soporte. Sobre una escala logarítmica, el modelo resulta en una dependencia con la frecuencia lineal sobre un amplio rango de frecuencias, con un plateau a frecuencias bajas, el valor del cual depende de T , R_0 , η , κ y σ . Las figuras 3.1, 3.2 y 3.3 muestran la dependencia en frecuencia de la función densidad espectral para diferentes tamaños de las vesículas, diferentes valores de κ y diferentes temperaturas, respectivamente. Se puede ver una dependencia del tipo ν^{-1} sobre un amplio rango de frecuencias. Dentro de este régimen lineal, $J(\nu)$ es independiente del tamaño de la vesícula, de la tensión lateral efectiva σ y de la viscosidad del medio η ; dejando así al módulo elástico de flexión como el único parámetro relevante. Por otro lado, R_0 , σ , η y κ determinan la frecuencia de corte donde $J(\nu)$ pasa a ser independiente de la frecuencia.

3.2. Difusión sobre una superficie curva.

Coefficientes de difusión tan altos como $10^{-11} m^2 s^{-1}$ fueron reportados para moléculas fosfolipídicas en la fase líquido-cristalina de membranas modelos [109, 110, 111]. Está bien establecido que la difusión es un proceso dinámico importante que toma lugar en sistemas con membranas curvadas.

En el contexto presente, la teoría propuesta por Halle para la relajación de espín debida a la difusión sobre superficies curvas es apropiada [20]. Teniendo en mente sistemas fluidos organizados, existe toda una variedad de movimientos moleculares que pueden gobernar el acoplamiento espín-red fluctuante en el tiempo. Típicamente, hay fluctuaciones rápidas de amplitud espacial relativamente pequeña, debidas a movimientos altamente localizados, superimpuestos con fluctuaciones más lentas de amplitud mayores, debidas a la modulación de la magnitud y orientación del acoplamiento localmente promediado. Si estos dos tipos de movimientos ocurren sobre escalas temporales diferentes, las funciones de correlación pueden descomponerse en

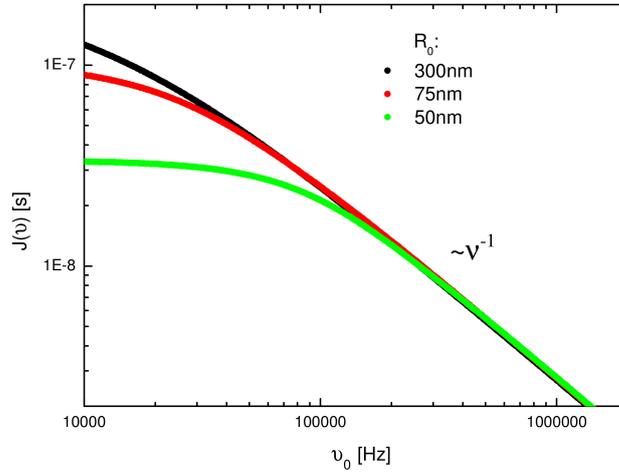


Figura 3.1: Dependencia con la frecuencia de la función densidad espectral para tres radios diferentes R_0 de la vesícula. Los parámetros usados en el gráfico son: $\kappa = 4 \times 10^{-20} J$, $\eta = 1,1 \times 10^{-3} Ns/m^2$, $\sigma = 0$ y $T = 298K$.

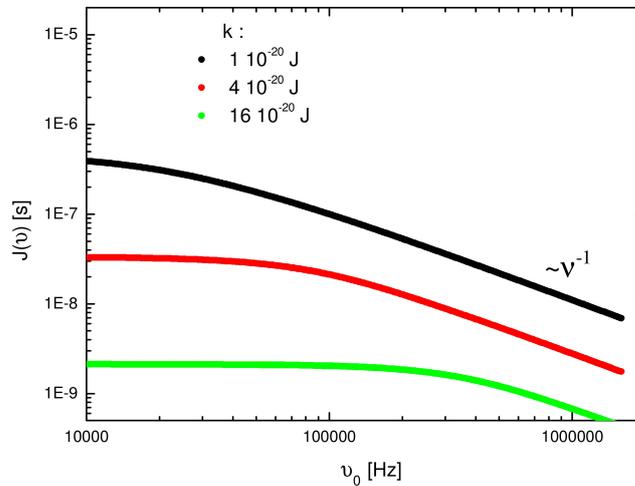


Figura 3.2: Dependencia con la frecuencia de la función densidad espectral para tres valores diferentes de κ . Los parámetros usados en el gráfico son: $R_0 = 50nm$, $\eta = 1,1 \times 10^{-3} Ns/m^2$, $\sigma = 0$ y $T = 298K$.

dos partes independientes asociadas con movimientos rápidos y lentos [112, 113, 114]. Este trabajo se focalizó sobre la parte de las funciones de correlación que se deben a los movimientos lentos. Se consideró un sistema fluido el cual contiene agregados, asumiendo que la suspensión está suficientemente diluida para evitar interacción di-

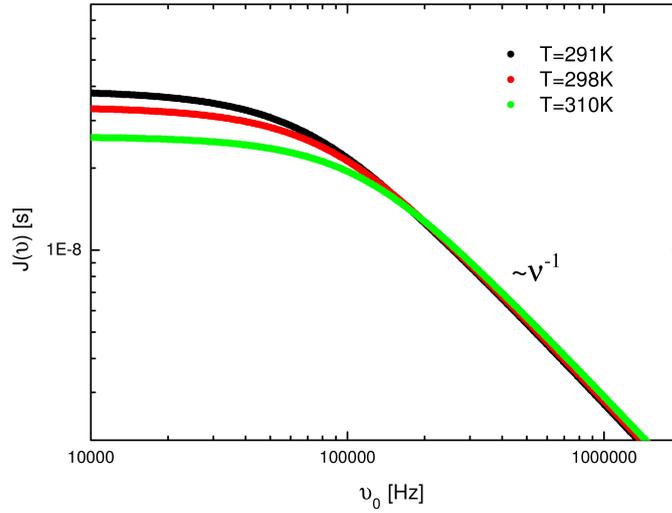


Figura 3.3: Dependencia con la frecuencia de la función densidad espectral para tres valores diferentes de la temperatura. La viscosidad del medio soporte depende de la temperatura; las correspondientes viscosidades para cada temperatura son: $\eta = 1,3 \times 10^{-3} \text{Ns/m}^2$ para $T = 291\text{K}$, $\eta = 1,1 \times 10^{-3} \text{Ns/m}^2$ para $T = 298\text{K}$ y $\eta = 0,82 \times 10^{-3} \text{Ns/m}^2$ para $T = 310\text{K}$. Los parámetros usados en el gráfico son: $R_0 = 50\text{nm}$, $\sigma = 0$ y $\kappa = 4 \times 10^{-20} \text{J}$.

recta entre liposomas. En nuestro caso, la fracción de volumen de liposomas en las muestras puede ser tan alto como 10 %, de manera que ocurren interacciones directas entre liposomas. Sin embargo, el hecho de que el tamaño promedio de los liposomas permanezca estable por varios días, demuestra que dichas interacciones son débiles. De todos modos, en cualquier caso tales interacciones modificarían solamente las propiedades reorientacionales de la esfera entera. Por lo tanto, se considera tener dos contribuciones: el movimiento traslacional de las moléculas a lo largo de la superficie esférica y la reorientación de la esfera como un todo. En el caso de soluciones micelares isotrópicas, el modelo se reduce a una función Lorentziana:

$$J_D = \frac{1}{5} \left[\frac{\tau_D}{1 + (\omega\tau_D)^2} + 4 \frac{\tau_D}{1 + (2\omega\tau_D)^2} \right] \quad (3.8)$$

donde τ_D es un tiempo de correlación común relacionado al tiempo de correlación de difusión rotacional, τ_{RD} , y al tiempo de correlación de difusión en la superficie τ_{TD} , dado por:

$$\frac{1}{\tau_D} = \frac{1}{\tau_{RD}} + \frac{1}{\tau_{TD}} \quad (3.9)$$

con

$$\tau_{RD} = \frac{4\pi\eta R_0^3}{3k_B T} \quad (3.10)$$

$$\tau_{TD} = \frac{R_0^2}{6D}, \quad (3.11)$$

siendo D la constante de difusión traslacional. El coeficiente de difusión puede ser estimado desde un análisis clásico de movimientos Brownianos dentro del régimen hidrodinámico [48]. En este modelo la membrana es considerada ser una lámina plana infinita de fluido con una viscosidad dada (plano lipídico) separadas por regiones infinitas de viscosidad más baja (fluido soporte). El lípido es considerado como un cilindro cuyo eje es perpendicular al plano de la lámina, y se mueve bajo la acción de un movimiento Browniano.

En la figura 3.4 se muestra el comportamiento de la densidad espectral de difusión como función de la frecuencia para diferentes valores de la constante de difusión. Para los cálculos se utilizaron los siguientes parámetros: $R_0 = 50nm$, $T = 298K$ y $\eta = 1,1 \times 10^{-3}$. Los coeficientes de difusión considerados para la difusión fueron: $D = 1 \times 10^{-12}[m^2s^{-1}]$, $D = 1 \times 10^{-11}[m^2s^{-1}]$ y $D = 1 \times 10^{-10}[m^2s^{-1}]$, las cuales corresponden a tiempos de correlación de difusión de $\tau_D = 10,5 \times 10^{-5}s$, $\tau_D = 3,21 \times 10^{-5}s$, $\tau_D = 0,4 \times 10^{-5}s$, respectivamente. Para constantes de difusión más chicas, el tiempo de correlación es más grande, lo cual se puede observar de la figura 3.4 que las funciones de correlaciones correspondientes a D más pequeños decaen a frecuencias menores.

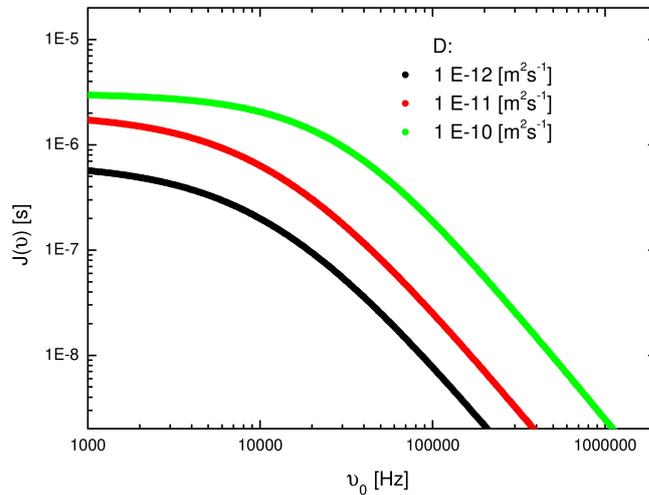


Figura 3.4: Dependencia con la frecuencia de la función densidad espectral para tres valores diferentes de la constante de difusión. Los parámetros usados en el gráfico son: $T = 298K$, $\eta = 1,1 \times 10^{-3}$ y $R_0 = 50nm$.

Un análisis similar se puede hacer para el comportamiento de la densidad espectral de difusión en función de la temperatura y el radio. De las ecuaciones (3.9), (3.10) y

(3.11) se tiene que el tiempo de correlación de difusión está dado por:

$$\tau_D = \left[\frac{6D}{R_0^2} + \frac{3k_B T}{4\pi\eta R_0^3} \right]^{-1} \quad (3.12)$$

Entonces se observa que para temperaturas menores, τ_D aumenta; lo que significa que para temperaturas chicas la densidad espectral decae a frecuencias más chicas. Un comportamiento inverso resulta del análisis con respecto al radio.

3.3. Movimientos rápidos.

El tercer mecanismo relevante de relajación que tiene que ser considerado son los movimientos rápidos de moléculas individuales o de partes internas de ella. Dentro de este grupo se pueden mencionar a las fluctuaciones vibracionales internas, libraciones, isomerizaciones, las rotaciones de grupos químicos pequeños, las fluctuaciones de las cadenas hidrocarbonadas, etc. Los tiempos de correlación asociadas a estos procesos van normalmente desde 10^{-10} a 10^{-12} s, convirtiéndose en dispersivos a frecuencias superiores a varios MHz . No es posible discriminar entre estos mecanismos dentro del rango de frecuencias estudiadas (unos pocos kHz a $20MHz$). Ellos añaden una contribución independiente de la frecuencia representada por una constante, A_{FM} .

3.4. Densidad espectral compuesta

Como la amplitud de los movimientos rápidos de naturaleza estocástica es generalmente pequeña, ellos pueden ser considerados estadísticamente independientes de la dinámica que gobierna la relajación a campos bajos. La velocidad de decaimiento de la función de correlación para movimientos rápidos, $G_{FM}(t)$, es mucho más rápida que para fluctuaciones de orden y difusión lenta; así los movimientos rápidos pueden ser considerados en forma separada, sin correr el riesgo de la subestimación de los términos de correlación cruzada. En principio, las fluctuaciones de orden y la difusión están acopladas, ya que la molécula que difunde transporta información con respecto a la orientación del orden local. Sin embargo, se puede observar que:

1. Una consideración práctica que puede tenerse en cuenta es que el transporte de información del orden está restringido, porque la caminata aleatoria por difusión de las moléculas lipídicas se limita a un área pequeña. En concreto, en $100ns$, el área recorrida por el lípido difundiéndose es sólo 3 veces el área de sección transversal de un único lípido [51]. La información sobre el orden sólo es conservada por las moléculas lipídicas por un tiempo máximo determinado por el tiempo de correlación hidrodinámico más largo correspondiente a $l = 2$, típicamente $\tau_{l=2} \approx 3\mu s$. En este tiempo, el área recorrida por una molécula es menor que 100 veces el área transversal de la molécula; un área demasiado pequeña para un útil intercambio de información entre regiones de curvatura diferentes de la membrana.

2. Tomando una perspectiva diferente, se puede generalizar el cálculo de Freed correspondiente a una correlación cruzada entre las fluctuaciones de orden nemáticas y un proceso Lorentziano [98]. En ese caso hay una longitud de onda mínima para la perturbación que se propaga, la cual está asociada con las dimensiones moleculares. Por lo tanto la correspondiente frecuencia de corte, ω_c , se encuentra en el rango de los MHz . El resultado de Freed extendido a fluctuaciones de orden esmécticas dentro del rango $\omega \ll \omega_c$, se puede aproximar por la densidad espectral:

$$J(\omega) \approx A_D J_D + A_{OF} J_{OF} \left[1 - \alpha \left(\frac{\omega}{\omega_c} \right) \left(1 + \frac{\tau_D}{1 + (\omega\tau_D)^2} \right) \right] \quad (3.13)$$

donde $A_{OF} \approx A_D$ son los prefactores de amplitud correspondientes. Para $\omega_c \approx 10^9 Hz$, puede verificarse que:

$$\alpha \left(\frac{\omega}{\omega_c} \right) \left[1 + \frac{\tau_D}{1 + (\omega\tau_D)^2} \right] \ll 1 \quad (3.14)$$

tiene validez para ω en el rango de $10^4 - 10^7 rad.s^{-1}$ con $\tau_D \approx 10^{-5} s$. Así, en una primera aproximación, se puede ignorar la correlación cruzada entre las contribuciones dinámicas difusionales y colectivas.

Finalmente, en este modelo simple la tasa de relajación, R_1 , puede expresarse como:

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = A_{OF} J_{OF}(\omega) + A_D J_D(\omega) + A_{FM} \quad (3.15)$$

donde $J_{OF}(\omega)$ está dada por (3.6) y (3.7), y $J_D(\omega)$ por las ecuaciones (3.8), (3.9), (3.10) y (3.11); y A_{FM} es una constante. Esta será la ecuación básica con la cual se analizarán las dispersiones de R_1 medidas en liposomas con diferentes características.

Capítulo 4

Técnicas experimentales.

La técnica de relaxometría con ciclado rápido de campo combinada con relaxometría en el sistema rotante fueron utilizadas para el estudio de la dinámica molecular individual y colectiva en sistemas de liposomas. Para un buen entendimiento del funcionamiento de ambas técnicas, este capítulo comienza con la definición de los elementos básicos de la RMN. Luego se describe el proceso de relajación en el sistema laboratorio haciendo énfasis en cómo se comporta la magnetización cuando el sistema está atravesando el proceso de ciclado del campo magnético. Finalmente se describen las dos técnicas experimentales.

4.1. Resonancia Magnética Nuclear

La resonancia magnética es un fenómeno que se encuentra en sistemas magnéticos que poseen momento magnético y momento angular. El término resonancia magnética implica que estamos en sintonía con una frecuencia natural del sistema magnético. Esta frecuencia natural corresponde al movimiento de precesión giroscópica del momento magnético nuclear alrededor de un campo magnético estático externo.

4.1.1. Elementos de Resonancia

Tomemos como sistema a tratar el núcleo de un átomo, el cual posee un momento magnético total μ y un momento angular total \mathbf{J} . El momento magnético y el momento angular son paralelos, con lo que se tiene

$$\mu = \gamma \mathbf{J}, \tag{4.1}$$

donde γ es un escalar llamado razón giromagnética y es una característica particular de cada núcleo.

El momento angular de una partícula con espín es un vector que en los casos mas generales puede apuntar a cualquier dirección del espacio. Ahora supongamos que ponemos a la muestra en presencia de un campo magnético externo $B_0\mathbf{k}$ y nos preguntamos qué ocurre con los espines en este caso.

Si pensamos en la aguja de una brújula sabemos que en presencia de un campo magnético la aguja se alinea con éste. Sin embargo, los espines no son exactamente agujas de una brújula y lo que ocurre es que en presencia de un campo empiezan a moverse alrededor de este.

El momento magnético se mueve en un cono, manteniendo el ángulo entre el momento de espín y el campo magnético constante. Este movimiento se llama precesión. El ángulo del cono depende de la dirección inicial de los espines.

La frecuencia de precesión de los espines magnéticos viene dada por la frecuencia de Larmor:

$$\omega_0 = \gamma B_0. \quad (4.2)$$

El sentido de la precesión lo determina el signo de la razón giromagnética γ que depende del núcleo que observemos.

En la teoría cuántica, μ y \mathbf{J} son tratados como operadores (vectores). El significado del concepto de que dos operadores sean "paralelos" se encuentra considerando los elementos de matriz de los operadores. Podemos definir el operador momento angular adimensional \mathbf{I} , tal que $\mathbf{J} = \hbar\mathbf{I}$. De la mecánica cuántica sabemos que I^2 tiene autovalores $I(I+1)$, donde I puede ser tanto entero como semientero. Luego, como I^2 conmuta con cualquier componente de \mathbf{I} (por ejemplo I^z), podemos trabajar en una base común a ambos. Llamaremos m a los autovalores de I^z , donde $m = I, I-1, \dots, -I$, tendrá $2I+1$ valores posibles. El significado de (4.1) es que

$$(Im|\mu_x|Im) = \gamma\hbar(Im|I_x|Im) \quad (4.3)$$

donde μ_x y I_x son componentes de los operadores μ e \mathbf{I} a lo largo de una dirección arbitraria x .

En presencia de un campo magnético externo B_0 , un núcleo adquiere la energía de interacción dada por el Hamiltoniano, al que en adelante nos referiremos como Hamiltoniano Zeeman H_Z

$$H_Z = -\mu \cdot \mathbf{B}_0. \quad (4.4)$$

Tomando el campo externo orientado según la dirección \mathbf{z} de nuestro sistema de referencia, el Hamiltoniano queda

$$H_z = -\hbar\gamma B_0 I^z \quad (4.5)$$

y tiene los siguientes autovalores

$$E_m = -\hbar\gamma B_0 m. \quad (4.6)$$

Tenemos entonces un espectro discreto de autovalores, uno espera ser capaz de detectar su presencia mediante alguna forma de absorción espectral.

Para satisfacer la conservación de la energía, la interacción debe ser dependiente del tiempo y con la frecuencia angular ω tal que

$$\hbar\omega = \Delta E \quad (4.7)$$

donde ΔE es la diferencia entre las energías Zeeman del estado inicial y del estado final.

Para producir estas transiciones en RMN se aplica un campo alterno de radio frecuencia perpendicular al campo \mathbf{B}_0 . Si consideramos la aplicación de un campo alterno en la dirección x y escribimos tal campo en términos de una amplitud B_1 y frecuencia angular ω debemos incluir en el Hamiltoniano total un término de la forma

$$H_{rf} = -\hbar\gamma B_1 I^x \cos(\omega t). \quad (4.8)$$

El operador I^x tiene elementos de matriz entre estados m y m , $(m|I_x|m)$, los cuales se anulan a menos que $m = m \pm 1$. Consecuentemente las transiciones permitidas son entre niveles contiguos de energía, dando

$$\hbar\omega \approx \Delta E = \hbar\omega_0. \quad (4.9)$$

Para campos magnéticos de 3000 a 10000 Gauss los sistemas nucleares resuenan típicamente a $\omega/2\pi \sim 10MHz$ (radio frecuencias).

Se considera un conjunto de los N espines que constituyen la muestra macroscópica. Si el sistema se encuentra en equilibrio térmico, la probabilidad de ocupación de cada nivel E_m estará dada por la distribución de Boltzmann. Esto causa que el sistema tenga una magnetización neta en la dirección del campo magnético externo.

La aplicación de campos de rf durante un cierto lapso de tiempo produce transiciones de la población de equilibrio. La forma en que el sistema se recupera al estado de equilibrio termodinámico es justamente lo que brinda la información del sistema.

4.1.2. El campo de rf

Hemos mencionado que la aplicación de un campo de rf permite apartar al sistema de espines del equilibrio siempre que se excite con la frecuencia adecuada; esto posibilita la detección de una respuesta del sistema.

Consideremos que a la muestra se le aplica un campo magnético el cual es la suma de dos campos, un campo estático aplicado en el eje z y un campo alterno aplicado en dirección perpendicular al campo estático. Con el fin de reservar el símbolo ω para una cantidad positiva, introduciremos el símbolo ω_z ; componente de ω a lo largo del eje z . ω_z puede por lo tanto ser positiva o negativa. Así, podemos escribir

$$\mathbf{B}_1 = [\mathbf{i} \cos(\omega_z \mathbf{t}) + \mathbf{j} \sin(\omega_z \mathbf{t})]. \quad (4.10)$$

Ahora nos preguntamos por la ecuación de movimiento de un espín incluyendo los efectos de ambos campos, $\mathbf{B}_0 = B_0 \mathbf{k}$ y $\mathbf{B}_1(\mathbf{t})$.

$$\frac{d\mu}{dt} = \mu\gamma \wedge [\mathbf{B}_0 + \mathbf{B}_1(\mathbf{t})]. \quad (4.11)$$

La dependencia temporal de \mathbf{B}_1 puede ser eliminada usando un sistema de coordenadas que rota alrededor de la dirección z a frecuencia ω_z . En tal sistema de coordenadas, \mathbf{B}_1 será estático. Como el eje de rotación coincide con la dirección de \mathbf{B}_0 , \mathbf{B}_0 será también estático. Tomemos el eje x en el sistema rotante a lo largo de \mathbf{B}_1 . Luego (4.11) se convierte en

$$\frac{\partial\mu}{\partial t} = \mu \wedge [\mathbf{k}(\omega_z + \gamma\mathbf{B}_0) + \mathbf{i}\gamma\mathbf{B}_1]. \quad (4.12)$$

En la terna rotante se define la rotación fuera de resonancia (tomando $\omega_z = -\omega$),

$$\delta\omega = \omega - \omega_0 \quad (4.13)$$

Esta frecuencia está relacionada con los corrimientos químicos de los espines y con la frecuencia de referencia. Decimos que trabajamos en condición de resonancia al fijar la frecuencia portadora (*carrier*) en $\omega = \omega_0$, en cuyo caso $\delta\omega = 0$.

La ecuación (4.12) debe ser reescrita para enfatizar si trabajamos en condición de resonancia o fuera.

$$\frac{\partial\mu}{\partial t} = \mu \wedge \gamma \left[\left(B_0 - \frac{\omega}{\gamma} \right) \mathbf{k} + \mathbf{B}_1 \mathbf{i} \right] = \mu \wedge \mathbf{B}_{\text{ef}} \quad (4.14)$$

donde

$$\mathbf{B}_{\text{ef}} = \left(\mathbf{B}_0 - \frac{\omega}{\gamma} \right) \mathbf{k} + \mathbf{B}_1 \mathbf{i}. \quad (4.15)$$

Físicamente (4.14) establece que en el sistema rotante, el momento actúa como si éste experimentara efectivamente un campo magnético estático \mathbf{B}_{ef} . El momento por lo tanto precesa en un cono de ángulo fijo alrededor de la dirección de \mathbf{B}_{ef} a frecuencia angular γB_{ef} .

4.2. Relajación en el sistema laboratorio

Un sistema típico que se considera es un grupo de N espines de espín I y razón giromagnética γ , en presencia de un campo externo \mathbf{B}_0 (Hamiltoniano Zeeman o H_Z), y todos acoplados por una interacción dipolar magnética representada por un Hamiltoniano dipolar H_d . La solución de la ecuación de Schrödinger son las funciones de onda ψ_n de energía E_n del sistema total.

$$H\psi_n = (H_Z + H_d)\psi_n = E_n\psi_n. \quad (4.16)$$

Como la ecuación (4.16) es muy difícil de resolver ya que depende de las coordenadas de 10^{22} espines, se puede asumir que los espines están en equilibrio térmico

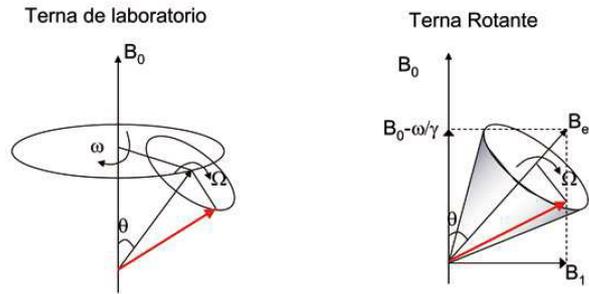


Figura 4.1: En el sistema laboratorio los espines nutan y precesan alrededor del eje del campo magnético. En el sistema rotante, que rota a frecuencia ω , sólo se observa la nutación con frecuencia $\Omega = \gamma B_{ef}$.

con un reservorio de temperatura θ , los n estados del sistema total se ocuparán con probabilidades fraccionales p_n , dadas por un factor de Boltzmann

$$p_n = \frac{1}{Z} e^{-E_n/k_B\theta} \quad (4.17)$$

donde Z es la función partición

$$Z = \sum_n e^{-E_n/k_B\theta}. \quad (4.18)$$

Cantidades tales como la energía promedio \bar{E} y la magnetización \bar{M}_z pueden calcularse

$$\bar{E} = \sum_n p_n E_n \quad (4.19)$$

$$\bar{M}_z = \sum_n \gamma \hbar (n | I_z | n) p_n. \quad (4.20)$$

A menudo es válido para núcleos y electrones usar la aproximación de alta temperatura. Se expande la exponencial (4.18) en una serie de potencias, manteniendo solamente los términos principales. Luego la suma se hace fácilmente

$$Z = Tr \left\{ 1 - \frac{H}{k_B\theta} + \frac{1}{2} \frac{H^2}{k_B^2\theta^2} - \dots \right\} = (2I + 1)^N + \frac{1}{2k_B^2\theta^2} Tr H^2 + \dots \quad (4.21)$$

donde se utiliza el hecho de que $Tr H = 0$, tanto para H_Z como para H_D . Usando estos métodos se encuentra que

$$\bar{E} = - \frac{C(H_0^2 + H_L^2)}{\theta} \quad (4.22)$$

y

$$\mathbf{M} = \frac{C\mathbf{H}_0}{\theta}, \quad (4.23)$$

donde

$$C = \frac{N\gamma^2\hbar^2 I(I+1)}{3k_B} \quad (4.24)$$

es la constante de Curie, y H_L es una cantidad denominada campo local, la cual es del orden del campo que un núcleo produce a sus vecinos.

Notemos que (4.23) dice que cuando $H_0 = 0$, $M = 0$. Supongamos que H_0 es bajado a cero tan repentinamente que M no tiene tiempo de cambiar. Inmediatamente después que $H_0 = 0$ se tiene un caso donde $M \neq 0$. Pero si había una temperatura, (4.23) muestra que M debe ser cero. Por lo tanto se puede concluir que en ese instante el sistema no puede ser descrito por una temperatura.

Otra cantidad que es de mucha utilidad es la entropía σ . La entropía mide el grado de orden de un sistema. En un proceso reversible en el cual no hay flujo de calor desde adentro hacia afuera de un sistema, la entropía se mantiene constante.

$$\sigma = \frac{\bar{E} + k_B\theta \ln Z}{\theta}. \quad (4.25)$$

Evaluando Z y \bar{E} se obtiene

$$\sigma = Nk_B \ln(2I+1) - \frac{C}{2} \frac{H_0^2 + H_L^2}{\theta^2}. \quad (4.26)$$

4.2.1. Cambios adiabáticos

Asumamos que el sistema de espines está térmicamente aislado del exterior y que puede o no estar en equilibrio térmico. La primera de estas suposiciones se satisface si los experimentos se desarrollan sobre una escala de tiempos corta comparada con el tiempo de relajación espín-red. Esto implica que el Hamiltoniano del sistema incluye sólo variables internas del sistema ya que la relajación espín-red resulta de términos que involucran variables internas y externas del sistema. Si el sistema está en equilibrio térmico interno, una temperatura de espín se aplica y se pueden considerar tres casos:

Hamiltoniano independiente del tiempo

En este caso la energía media es una constante en el tiempo, sea o no sea el sistema describable por una temperatura de espín. Se considera un sistema inicialmente en un estado de no equilibrio térmico. Se supone que todas las partes del sistema están acopladas. se espera que eventualmente el sistema logre un equilibrio interno descrito por una temperatura final θ_f . Si se sabe la energía al instante cero, la cual llamaremos E_0 , haciendo uso del hecho que la energía se conserva, se puede computar la temperatura final.

$$\bar{E} = E_0 = -\frac{C(H_0^2 + H_L^2)}{\theta_f}, \quad (4.27)$$

luego

$$\theta_f = -\frac{C(H_0^2 + H_L^2)}{E_0}. \quad (4.28)$$

La magnetización que finalmente resulta una vez alcanzado el equilibrio térmico interno es alcanzada por medio de la ley de Curie,

$$\mathbf{M} = \mathbf{C} \frac{\mathbf{H}_0}{\theta_f}. \quad (4.29)$$

Durante el proceso de estabilización térmica interna, la entropía no es constante ya que procesos irreversibles como la relajación toman lugar. La entropía queda dada por el valor de θ_f

$$\sigma_f = Nk_B \ln(2I + 1) - \frac{C}{2} \frac{H_0^2 + H_L^2}{\theta_f^2}. \quad (4.30)$$

El Hamiltoniano cambia lentamente (adiabáticamente) en el tiempo

El criterio de lentitud se refiere a que a todo tiempo las transferencias internas de energía deben ser lo suficientemente rápidas para que el sistema siempre sea describible por una única temperatura θ . Bajo estas circunstancias, los cambios son reversibles y la entropía del sistema permanece constante. Así, desde (4.26) se tiene que $(H_0^2 + H_L^2)/\theta^2$ permanece constante. Si se comienza con un campo inicial H_i a temperatura θ_i y el campo cambia adiabáticamente hasta un valor final H_f , la temperatura θ_f está dada por la relación

$$\frac{H_i^2 + H_L^2}{\theta_i^2} = \frac{H_f^2 + H_L^2}{\theta_f^2} \quad (4.31)$$

Enfriamiento por desmagnetización adiabática puede ser vista en (4.31) tomando $H_i^2 \gg H_L^2$, y $H_f^2 \ll H_L^2$. Esto corresponde a ver qué sucede cuando una muestra está inicialmente en un campo magnético fuerte y se cambia el campo a cero. Luego se encuentra que

$$\theta_f = \left(\frac{H_L}{H_i} \right) \theta_i \ll \theta_i \Rightarrow \text{enfriamos}. \quad (4.32)$$

La figura 4.2 muestra un gráfico de θ_f versus H_f para un campo inicial H_i mucho mayor que el campo local, y para una temperatura inicial θ_i arbitraria.

La magnetización puede calcularse a partir de la ley de Curie si la temperatura se obtiene de (4.31). Para el caso en que hay una magnetización inicial M_i en un campo inicial H_i mucho mayor que el campo local, la magnetización final M_f es

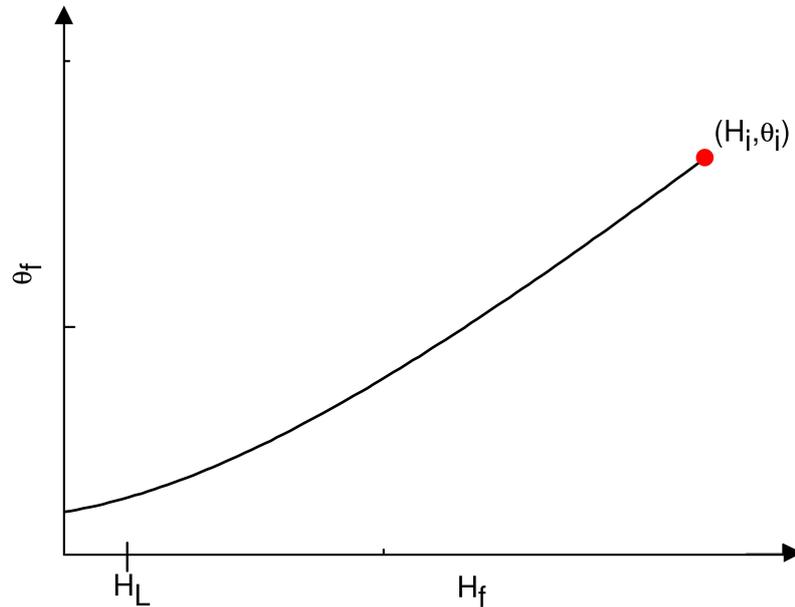


Figura 4.2: La figura muestra la temperatura final alcanzada para cambios adiabáticos en el campo magnético aplicado. Se nota que la temperatura final no cambia mucho cuando $H_f < H_L$.

$$M_f = M_i \frac{H_f}{\sqrt{H_f^2 + H_L^2}}. \quad (4.33)$$

Este resultado se muestra en la figura 4.3. Note que durante el proceso de enfriamiento, M_f permanece en el valor inicial M_i hasta que H_f se hace comparable al campo local H_L , a causa de que para valores grandes de H , θ_f es proporcional a H_f .

4.3. Técnicas experimentales

4.3.1. Relaxometría con ciclado rápido de campo.

La relaxometría con ciclado de campo [11] es una técnica que permite obtener la dependencia con la frecuencia de Larmor (o campo magnético) de diversos tiempos de relajación. El término relaxometría es normalmente utilizado en el contexto de mediciones de tiempos de relajación en general. Relajación transversal y efectos debidos a acoplamiento dipolar residual pueden ser también empleados como fuente de información suplementaria.

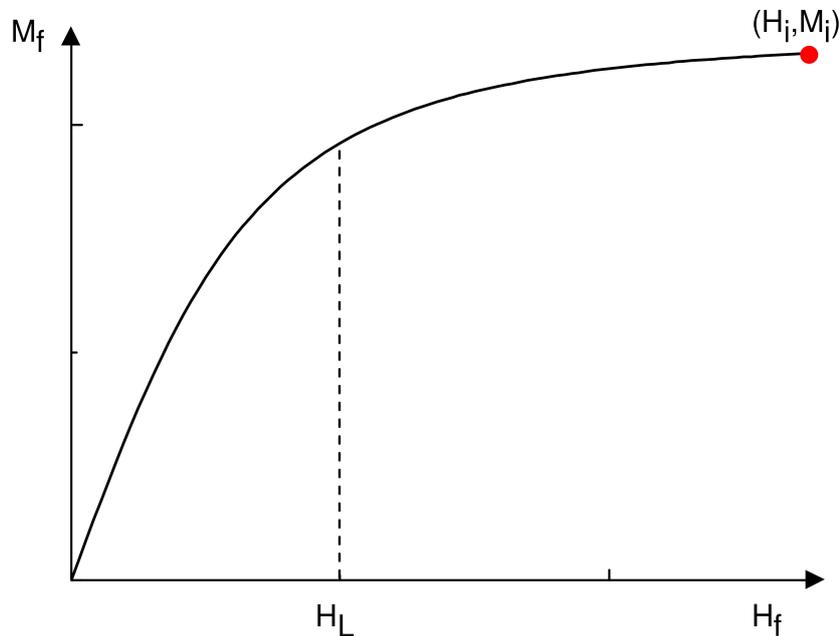


Figura 4.3: Magnetización M_f versus campo aplicado H_f para cambios adiabáticos en H_f . Se asume que $H_i^2 \gg H_L^2$. Note que M_f es independiente de H_f cuando $H_f^2 \gg H_L^2$, y va a cero cuando H_f tiende a cero.

La figura 4.4 muestra un diagrama en bloque de un típico relaxómetro con ciclado de campo. En la figura 4.5 se representa el principio de funcionamiento de un experimento típico de relaxometría con ciclado de campo. La muestra es polarizada en un campo magnético B_p , tan alto como técnicamente sea posible. El proceso de relajación tiene lugar en un intervalo de tiempo que depende de la intensidad del campo de relajación B_r . La señal remanente después de este intervalo de relajación es detectada en un campo B_d , de nuevo, tan alto como sea posible.

Para la detección de la señal remanente luego de la relajación se observa el Decaimiento de Inducción Libre (FID) luego de un pulso de $(\pi/2)$, o a través de la observación del eco de espín producido por una secuencia de dos o más pulsos. Finalmente toma lugar el proceso de repolarización de la muestra, antes de que comience el ciclo nuevamente. La técnica de ciclado de campo permite medir tiempos de relajación para campos magnéticos externos típicamente en el rango desde unos kHz hasta aproximadamente $40MHz$ (figura 4.6). Luego, en el rango de $40 - 100MHz$ el experimento puede ser suplementado por mediciones del tiempo de relajación espín-red realizadas con aparatos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) convencionales.

Los rangos de frecuencias cubiertos de esta manera para la relajación de protones y deuterones son respectivamente:

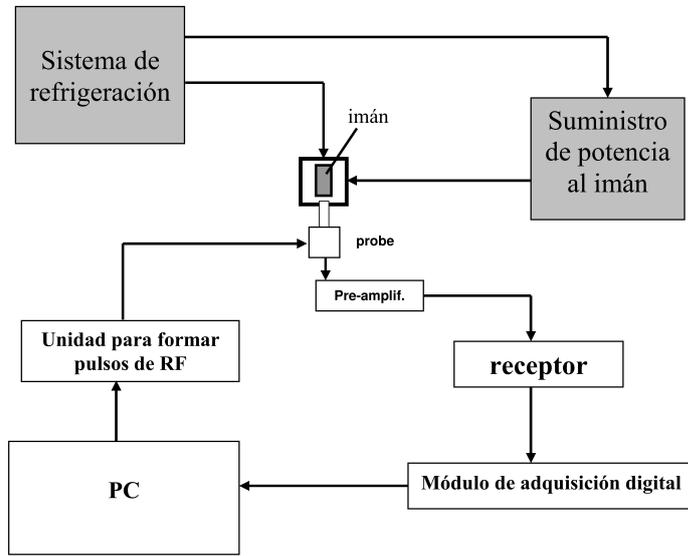


Figura 4.4: Diagrama en bloque de un relaxómetro típico con ciclado de campo. los cuadros en gris representan unidades diseñadas específicamente para el ciclado de campo. El probe consiste de una cabezal con un circuito sintonizado a la frecuencia de resonancia donde se encuentra la muestra.

$$10^3 Hz \leq \nu_{proton} \leq 10^9 Hz$$

$$10^2 Hz \leq \nu_{deuteron} \leq 10^8 Hz$$

Los límites de alta frecuencia dados en las ecuaciones anteriores están determinados por los campos magnéticos alcanzables por los imanes superconductores. A bajas frecuencias, en cambio, existen varios factores que pueden restringir la aplicación de la relaxometría con ciclado de campo, principalmente:

- El campo local representando la parte secular (residual) del sistema de espines acoplados puede exceder en valor de campo magnético externo en el intervalo de relajación del ciclo.
- La compensación del campo magnético externo (u otros campos no deseados presentes en el laboratorio) en la muestra puede ser imperfecta, etc.

4.3.2. Curvas de relajación para campos bajos ($B_r \ll B_p$)

Consideremos un experimento de resonancia simple con un campo magnético rotante de frecuencia angular ω , transversal al campo estático H_0 , sintonizado exactamente en resonancia

$$\omega = \gamma H_0 \tag{4.34}$$

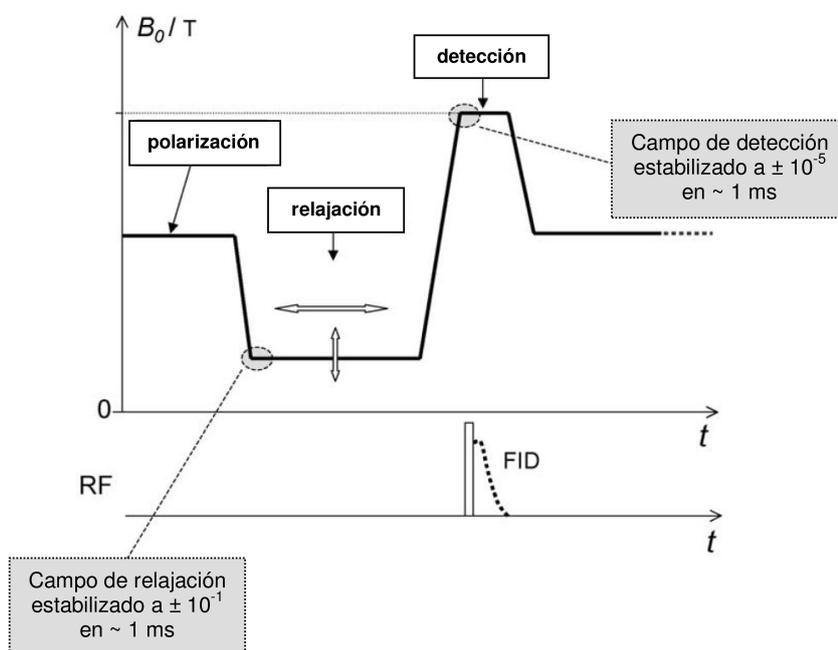


Figura 4.5: Representación esquemática de un ciclo típico del campo magnético principal B_0 desarrollado con un relaxómetro RMN de ciclado de campo.

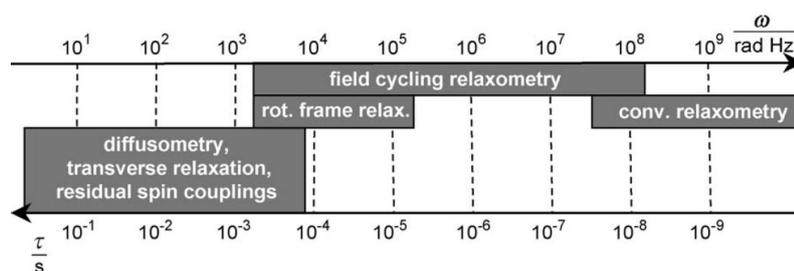


Figura 4.6: Representación esquemática de las escalas de tiempo y frecuencia que cubren las diversas técnicas experimentales NMR. Los rangos indicados se refieren a resonancia de protones. Figura extraída de referencia [11].

Las ecuaciones de Bloch describen la interacción de la magnetización en presencia de campos magnéticos. El comportamiento de M_z bajo un campo externo B_0 está dado por

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{T_1}. \quad (4.35)$$

Al resolver esta ecuación [115] se obtiene que

$$M_z(t) = M_\infty - (M_\infty - M_0)e^{-t/T_1}. \quad (4.36)$$

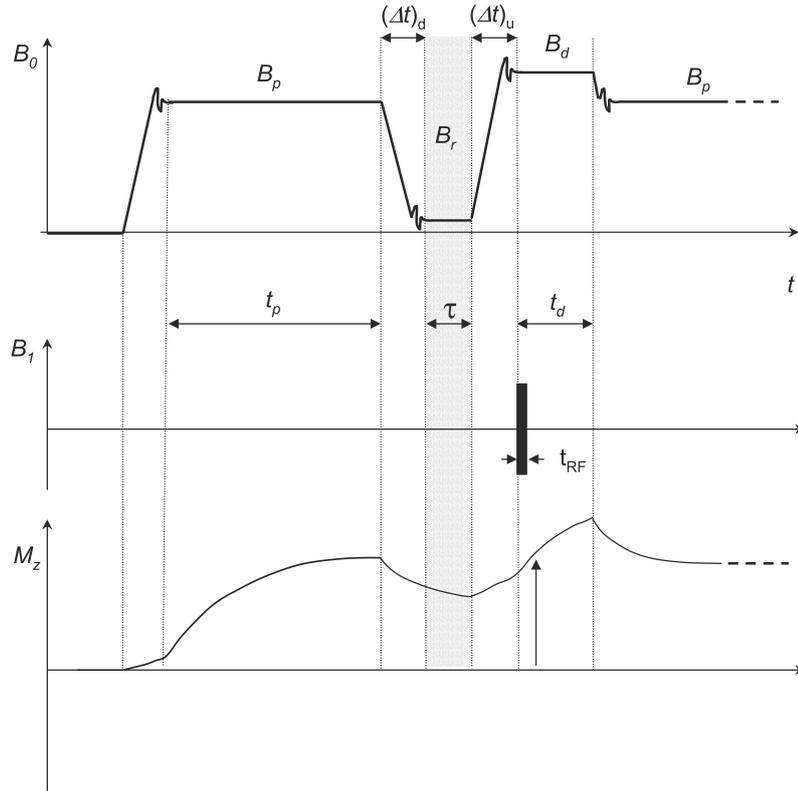


Figura 4.7: Ciclado de campo para campos de relajación bajos ($B_r \ll B_p$): representación esquemática de la densidad de flujo externa B_0 , amplitud del campo de radio frecuencia B_1 , y la magnetización M_z en los distintos intervalos de tiempo del ciclado de campo. Figura extraída de referencia [11].

La figura 4.7 define los intervalos de tiempo y las densidades de flujo que se discutirán en lo siguiente. La muestra es polarizada en un campo B_p , el cual se elige tan alto como sea posible (en compatibilidad con los requisitos técnicos del instrumento). La magnetización de equilibrio a este valor de campo particular se alcanza con suficiente precisión después de una acople de tiempos de relajación espín-red. En este tramo del experimento la magnetización está dada por la siguiente expresión:

$$M_z^1(t_p) = M_\infty(B_p)(1 - e^{-t_p/T_1(B_p)}), \quad (4.37)$$

donde $M_0 = 0$ y $M_\infty = \frac{CB_p}{\mu\theta_0} = cte$.

El campo magnético es luego disminuido a un campo de relajación preseleccionado, B_r , en el cual la relajación espín-red será examinada. Por un lado, la velocidad de conmutación del campo debe ser lo suficientemente grande para evitar pérdida de magnetización por relajación durante el proceso en que el campo cambia. Por otro lado, debe ser lo suficientemente lento para permitir cambios adiabáticos en el campo. En el campo de relajación, el cual se asume ser mucho mayor que el campo local debido a las interacciones seculares residuales, la magnetización se alinea a lo largo de la dirección del campo magnético externo, y es inicialmente igual a la magnetización de equilibrio de Curie en el campo de polarización, $M_z^2(0) = M_z^1(\infty) = M_z^1(t_p)$, donde por el momento se ignora la pérdida por relajación durante el intervalo de conmutación. Luego, en el intervalo de relajación, la magnetización relaja a un nuevo valor de equilibrio, $M_\infty(B_r) = \frac{CB_r}{\mu\theta_{B_r}}$ de acuerdo a (4.36):

$$M_z^2(\tau) = M_\infty(B_r) - [M_\infty(B_r) - M_\infty(B_p)] (1 - e^{-t_p/T_1(B_p)}) e^{-\tau/T_1(B_r)}. \quad (4.38)$$

Finalmente el campo magnético se cambia a un valor tan grande como sea posible (B_d) para proceder a la detección. La magnetización que sobrevive después del intervalo de relajación τ se detecta por ejemplo con la ayuda de un $\pi/2$ -pulso de RF. Después de haber registrado la señal, el campo se regresa al valor de polarización. Después de un período de acople de los tiempos de relajación espín-red el ciclo completo comienza nuevamente.

Luego, incrementando el intervalo τ , se puede registrar la curva de relajación para un dado campo de relajación (B_r). La dispersión de la relajación espín-red es escaneada punto por punto pasando B_r a través de una serie de valores discretos sobre un rango de campos (o frecuencias) deseados.

4.3.3. Relaxometría en el sistema rotante.

La técnica de relajación en el sistema rotante permite obtener información sobre la magnitud de los campos locales residuales en materiales con algún grado de organización molecular [12, 13]. Se entiende por campo local residual al valor correspondiente del campo en la posición de un espín nuclear dado, debido a las contribuciones no promediadas (debido a la presencia de la dinámica molecular) de todos los demás espines de la muestra.

La técnica consiste básicamente en el *spin-lock* (o anclaje de espín) [116]. La muestra se coloca en un campo magnético externo B_0 . Luego de un tiempo del orden o superior a $3T_1$, se tiene una magnetización macroscópica M_0 paralela a B_0 . Luego se aplica un pulso de $\pi/2$ en la dirección x en el sistema rotante, el cual rota la magnetización al plano $x-y$. Inmediatamente después del pulso, en el sistema rotante, la magnetización está fija a lo largo de la dirección y . Si la fase de la RF se cambia en 90° , el campo B_1 rota y permanece a lo largo de la magnetización en el sistema rotante. La magnetización se dice que está anclada al campo. Luego la magnetización precesa

alrededor de un campo efectivo B_{ef} , el cual es la suma de B_1 y B_L (componente del campo local en la dirección z) y finalmente relaja a un valor de equilibrio con una constante $T_{1\rho}$ (figura 4.8).

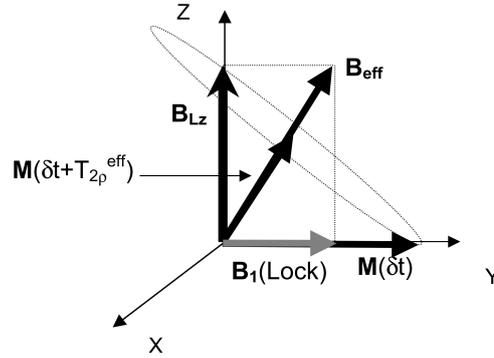


Figura 4.8: Representación del comportamiento de la magnetización durante el pulso de lock de duración fija. Después de apagar el campo de RF la magnetización precesa en torno al campo efectivo.

El experimento se repite variando la intensidad del campo aplicado B_1 y manteniendo fijo el tiempo durante el cual el campo se aplica. La evolución de la magnetización como función del campo se dedujo para cristales líquidos nemáticos [13], quienes presentan una componente de campo local distinta de cero a lo largo del eje Zeeman.

$$M(\nu_1) = \frac{M_0}{1 + (\frac{B_L}{B_1})^2} \exp - \frac{\tau}{B_L^2 + B_1^2} \left[\frac{B_1^2}{T_b} + \frac{B_L^2}{T_D \exp(\frac{B_1^2}{B_L^2})} \right] \quad (4.39)$$

Aquí M_0 es la magnetización inicial, B_1 es la amplitud del campo de lock (and $\nu_1 = \gamma B_1$ es la frecuencia de Larmor en el sistema rotante), T_D es el tiempo de relajación dipolar (que incluye contribuciones debidas a reorientaciones moleculares repentinas, y otras contribuciones o mecanismos que puedan contribuir), T_b es el tiempo de relajación espín-red a lo largo del campo B_1 , el cual es equivalente a $T_{1\rho}$ (tiempo de relajación espín-red en el sistema rotante) lejos de la región de los campos locales. T_D se asume ser del mismo orden que T_b [13].

Capítulo 5

Estudio de la dinámica molecular en membranas lipídicas de liposomas: Resultados y discusión.

Relaxometría con ciclado rápido de campo y relaxometría en el sistema rotante se utilizaron para el estudio de la dinámica en liposomas compuestos de 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) o 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC). La dependencia en frecuencia de Larmor de las tasas de relajación espín-red fueron interpretadas en términos de mecanismos de relajación claramente definidos. El análisis se hizo primero con liposomas de diferente composición, luego se extendió a liposomas con diferentes tamaños, diferentes temperaturas y diferentes contenidos de colesterol. La consistencia del modelo con los datos experimentales establece el uso de la relaxometría para el estudio de la dinámica en membranas sobre una amplia escala temporal.

5.1. Preparación de la muestra.

El sistema de liposomas suspendidos en agua deuterada (D_2O) se preparó siguiendo el método que se describe a continuación, el cual puede separarse en tres etapas:

1. Disolución de 70,6mg de DMPC o DOPC (y colesterol en el caso que corresponda) en 2mL de cloroformo ($CHCl_3$) y secado con corriente de nitrógeno (N_2), luego se pone unas horas en vacío para terminar de eliminar el solvente.

Esto se hizo para formar capas monomoleculares en las paredes del tubo cónico, para favorecer la hidratación cuando luego se le agregue la solución acuosa. El lípido es bastante insoluble en agua, y si al polvo del lípido agregamos directamente el buffer acuoso, va a tender a excluirse del agua formando grandes agregados difíciles de desarmar.

2. Hidratación de la muestra agregando el buffer acuoso (1,5mL de D_2O) más tratamiento térmico. El tratamiento térmico consiste en 5 ciclos de shock térmico (aire líquido-baño caliente a $35^\circ C$), y finalmente calentamiento durante una noche a $40^\circ C$. Estas temperaturas deben estar por encima de la temperatura de transición del lípido.

Esta etapa se realiza para hidratar el lípido, donde todo el tratamiento térmico favorece que el agua interactúe bien con los grupos polares de los fosfolípidos. Se forma una suspensión (no solución, tiene la propiedad de dispersar luz a diferencia de una solución verdadera) del lípido, en forma de vesículas multilamelares (VM), que son como cebollas, con múltiples bicapas de lípidos superpuestas. La distribución de tamaños de estas vesículas esféricas no es uniforme, es decir, hay una distribución amplia del número de bicapas por liposoma.

3. Extrusión pasando los VMGs por membranas de policarbonato con poros de un cierto diámetro.

Esto se hace para obligar a las vesículas a adoptar una forma esférica con diámetro promedio definido por las membranas de policarbonato, por lo que a las vesículas no les queda otra que tener una única bicapa. De este manera se forman las VUGs (Vesículas unilamelares grandes).

Cuando se trabaja con muestras con colesterol hay que tener la precaución de estar siempre en la fase líquido-cristalina desordenada, ya que al incorporar colesterol la fase puede cambiar. El tratamiento térmico y la extrusión se deben realizar aproximadamente a $10^\circ C$ por encima de la temperatura de transición.

En la figura 5.1 se esquematiza la formación de vesículas unilamelares y multilamelares.

5.2. Medición del campo local

Para la medición del campo local se preparó una muestra de DMPC y otra de DOPC, las cuales fueron extrusadas pasando las MLVs por membranas de policarbonato con poros de $100nm$ de diámetro. Para medir tal diámetro se utilizó la técnica de dynamic light scattering con un equipo Nicomp 380 de la compañía Particle Sizing Systems, Santa Barbara, CA. Estas mediciones se realizaron en el departamento de Química Biológica, CIQUIBIC (Facultad de Ciencias Químicas - UNC). El siguiente gráfico (figura 5.2) muestra la dispersión de diámetros de los liposomas de DMPC. El diámetro medido de las vesículas fue $d \sim (117 \pm 25)nm$.

La técnica de relajación espín-lock a tiempo de lock fijo en el sistema rotante fue utilizada para estimar la componente residual promedio de los campos locales (B_L) a lo largo del eje de cuantización principal [13]. Este valor es necesario ser calculdo para corregir la frecuencia de Larmor efectiva a frecuencias bajas sentida por los espines, y para decidir la frecuencia mínima desde la cual los datos de relajación pueden ser

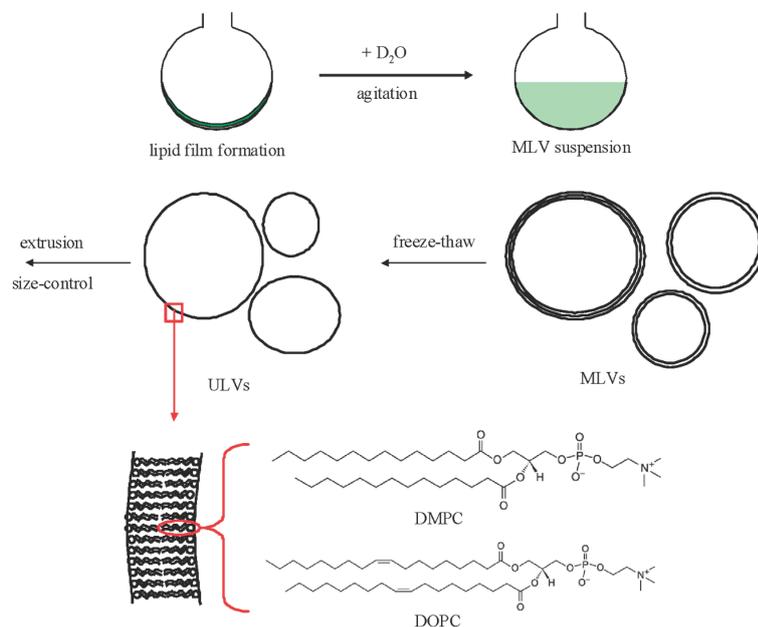


Figura 5.1: Representación esquemática de la formación de vesículas unilamelares y multi-lamelares. Se incluyen las estructuras moleculares del DMPC y del DOPC.

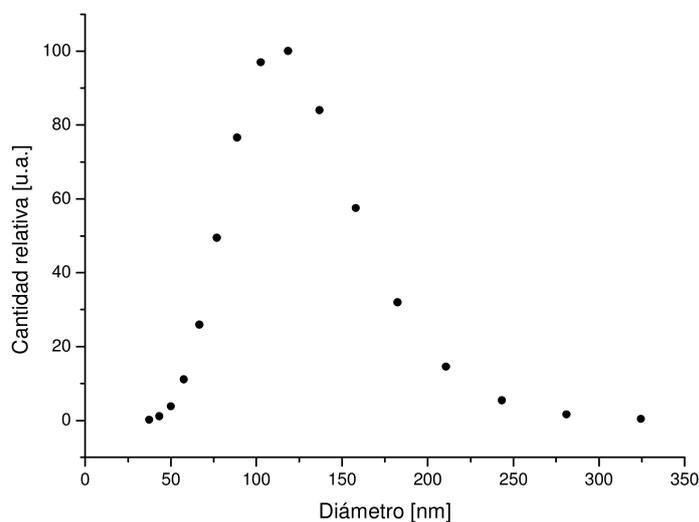


Figura 5.2: Dispersión de diámetros de las vesículas de DMPC.

considerados libres de efectos de campo local no deseados. La frecuencia del sistema rotante fue escaneada desde 6 a $40kHz$. La longitud del pulso de $\pi/2$ fue $2,6\mu s$ y se trabajó a una frecuencia de Larmor de $19,181MHz$. El equipo se basa en una

consola Stelar Spinmaster y un electroimán Bruker BE10. El probe fue adaptado a un transmisor de potencia Kalmus LP-1000. La temperatura de la muestra fue medida directamente en el volumen de la muestra dentro de $\pm 1K$ con un termómetro digital CHY 503. La intensidad de la FID se midió como función de la amplitud del campo de lock B_1 a un tiempo de lock fijo de $5ms$.

5.2.1. Campo local en liposomas suspendidas.

Los datos experimentales y la correspondiente función de ajuste se muestran en la figura 5.3, claramente mostrando un decaimiento de la magnetización cuando el campo de lock aplicado es reducido en intensidad.

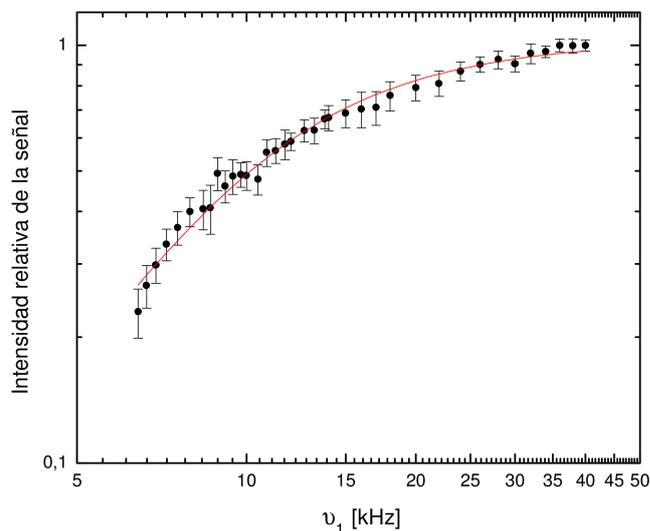


Figura 5.3: Magnetización normalizada como una función de ν_1 a tiempo de lock fijo $\tau = 5ms$ para una suspensión de DMPC a $T = 310K$. El decaimiento de la magnetización cuando la amplitud del lock se reduce es una consecuencia de los campos locales residuales. La componente de campo local promedio a lo largo del eje de cuantización del sistema laboratorio puede determinarse como se describe en el texto. Las barras de errores corresponden a la dispersión de los datos después de 10 repeticiones para cada frecuencia.

La evolución de la magnetización para un espín-lock en resonancia en presencia de un campo local está dada por la ecuación (4.39) vista en el capítulo anterior. Con las condiciones ya mencionadas se obtuvieron valores de B_L (en unidades de frecuencia de Larmor) de $(12 \pm 1)kHz$ y $(11 \pm 1)kHz$ para DMPC y DOPC, respectivamente. Esto significa que la evolución de la magnetización a frecuencias comparables, o menores que, el campo local puede estar influenciada por otros procesos distintos a la relajación espín-red. Por lo tanto, mediciones de la velocidad de relajación espín-red, $R_1 = T_1^{-1}$, estarán limitadas a frecuencias mayores a B_L .

5.3. Experimentos de dispersión de la tasa de relajación.

Dispersiones de la tasa de relajación ($R_1 = 1/T_1$) de 1H se midieron usando la técnica por RMN de ciclado rápido de campo [11] con un relaxómetro Spinmaster FFC-2000 Fast Field Cycling NMR (Stelar, Mede, Italia) para muestras de liposomas de $1mL$ de volumen. Las mediciones mostradas en este capítulo fueron realizadas por Carla Meledandri, del Instituto Nacional para Biotecnología Celular, de Dublin, Irlanda. En todos los casos se usó un campo magnético de polarización de $0,329T$ (equivalente a $14MHz$ para 1H), que fue encendido durante un período de $0,5s$ para generar la magnetización en la muestra. El valor del campo de adquisición fue $0,217T$ ($9,25MHz$). Una velocidad de conmutación de campo de $0,47T.ms^{-1}$ ($20MHz.ms^{-1}$) fue utilizado en todos los casos, con un tiempo de conmutación de $1,5ms$ para permitir que el campo magnético se re-establezca en un valor de equilibrio. Una velocidad de digitalización de $1MHz$ se utilizó para la adquisición, mientras que el tiempo muerto del espectrómetro fue de aproximadamente $20\mu s$. Para la FID se tomaron muestras de 512 puntos en el intervalo de tiempo $25 - 540\mu s$, después del pulso de 90° el cual tuvo una duración de $7,5\mu s$.

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

5.3.1. Mediciones de la tasa de relajación espín-red en función de la frecuencia de Larmor en liposomas

Liposomas en suspensión de DOPC y DMPC de diámetro alrededor de los $100nm$ fueron preparadas por extrusión, para facilitar la comparación de las dispersiones de la relajación de las suspensiones para ambos lípidos. Para asegurarse que los lípidos estén en la fase líquido-cristalina fluida, las mediciones se hicieron al menos a $10K$ por encima de la temperatura de transición de fase principal (T_m) del lípido; las cuales ocurren a $\sim 297K$ y $\sim 255K$ para DMPC y DOPC respectivamente [117]. Así, las temperaturas de medición de $310K$ y $298K$ fueron elegidas para DMPC y DOPC.

La figura 5.4 muestra las dispersiones de la tasa de relajación de liposomas de DOPC y DMPC obtenidas mediante el método de ciclado de campo en el rango de frecuencias de $30kHz$ a $15,2MHz$, donde se puede estar seguros que las mediciones no están afectadas por la presencia de los campos locales. Es inmediatamente claro de la figura 5.4 que la dependencia en frecuencia de la tasa de relajación es compleja; no puede ser modelada usando una única función Lorentziana, la cual correspondería a un único proceso dinámico estocástico aleatorio. Hay también un aparente incremento en la dispersión de los datos en el rango un poco menor a $1MHz$, indicando un cambio en el mecanismo de relajación por debajo de esta frecuencia. Esto es particularmente aparente para la suspensión de DOPC.

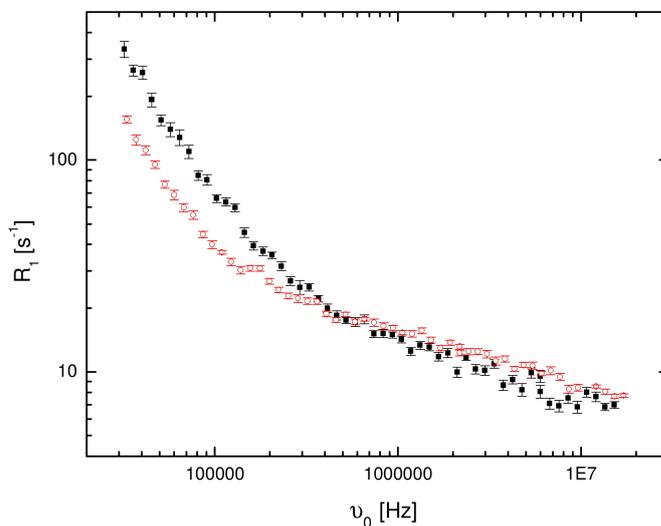


Figura 5.4: Datos de la dispersión de la tasa de relajación de 1H , para suspensiones de liposomas de DMPC de $R_0 = 54nm$ a $T = 310K$ (puntos rojos) y de DOPC de $R_0 = 50nm$ a $T = 298K$ (puntos negros).

5.4. Interpretación de las dispersiones de las tasas de relajación.

En el capítulo 3 se encontró un método basado en evidencias físicas para interpretar las dispersiones de la relajación espín-red en liposomas. Teniendo tal método en mente se adoptó el siguiente modelo sistemático para simular las dispersiones de relajación de 1H en liposomas:

1. Identificar los movimientos que contribuyen y asignar las funciones densidad espectral apropiadas.

2. Fijar los parámetros físicos relevantes dentro de sus intervalos más probables, usando valores de la literatura. Esta es la principal razón por la cual la tesis se ha centrado en liposomas de DMPC y DOPC, ya que las propiedades de bicapas formadas por estos lípidos están muy bien caracterizadas por diferentes técnicas experimentales.
3. Ajustar la contribución independiente de la frecuencia (una constante), y seleccionar el valor óptimo para cada parámetro dentro de su intervalo más probable para reproducir la dispersión de la velocidad de relajación experimental.
4. Hacer ajustes finos de las amplitudes (prefactores) de cada una de las contribuciones de las densidades espectrales. Esto se hizo manualmente observando la mayor concordancia entre las simulaciones y los datos experimentales.

En la figura 5.5 se presenta un diagrama de flujo del procedimiento descrito.

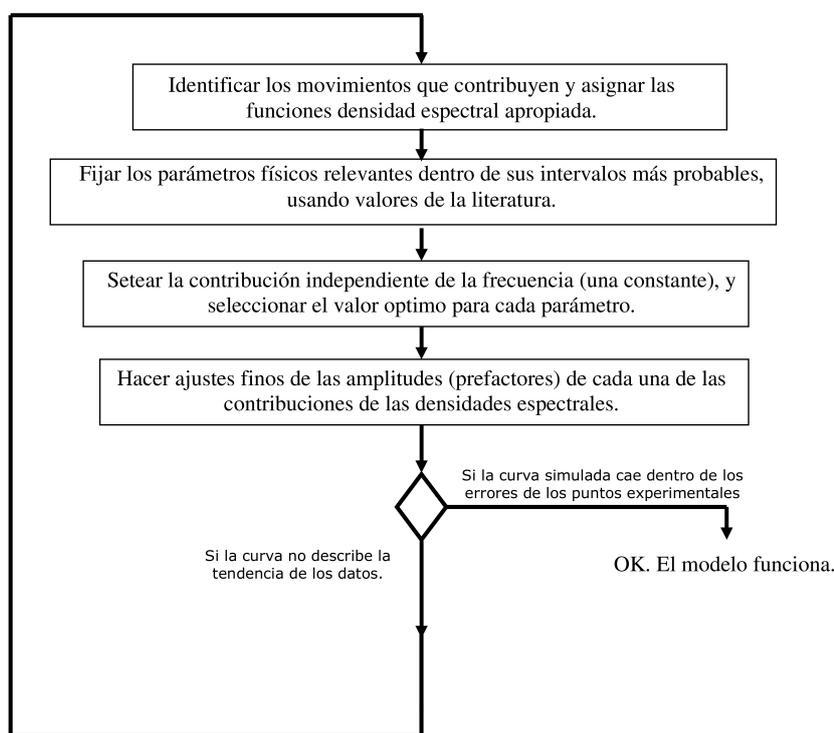


Figura 5.5: Diagrama de flujo del modelo para simular las dispersiones de relajación de 1H .

Los pre-factores están en gran parte determinados por la distancia efectiva entre los protones que contribuyen a cada proceso, originados de la dependencia habitual inversa a la sexta potencia. En todos los casos los pre-factores que se utilizan corres-

ponden a distancias efectivas entre protones que van desde 2,6 hasta 4,7 Å. Esta distancia efectiva puede diferir para cada mecanismo contribuyente dependiendo de la naturaleza del proceso de relajación y de la ubicación dentro de la molécula de los protones que contribuyen de manera dominante [74]. Sin embargo, en esta etapa el objetivo no es utilizar los datos para obtener información estructural, sino más bien concentrarse en establecer el número y la forma de las contribuciones de las densidades espectrales que se requieren para interpretar los datos; es decir, para establecer la viabilidad de la metodología. La aplicación del método para extraer información física para suspensiones de liposomas, sólo será posible después de que el modelo sea probado en diferentes circunstancias, tal como se verá en las siguientes secciones.

La figura 5.6 muestra el resultado de este modelo descrito en el capítulo 3 por la ecuación (3.15) para la interpretación de la dispersión de relajación de 1H de una suspensión de liposomas de DMPC de $R_0 = 54nm$ a $T = 310K$. Los parámetros del modelo correspondientes a la curva de dispersión de la relajación simulados se presentan en la Tabla 5.1. Los errores de cada una de las cantidades fueron determinados analizando la sensibilidad de la curva simulada a variaciones de cada parámetro. El intervalo de error corresponde al máximo corrimiento de la curva simulada dentro del error experimental (aproximadamente el tamaño de los puntos datos). Es muy importante tener en cuenta que no es posible producir un acuerdo razonable con la dispersión de relajación experimental que se muestra, sin incluir la contribución Lorentziana a baja frecuencia correspondiente al proceso de difusión.

Parámetro	Valor del modelo	Rango	Referencias
$\eta D_2O[kg/s.m]$	$0,82 \times 10^{-3}$	$(0,8 - 1,3) \times 10^{-3}$	[66, 118]
σ	0	0 - 25	[19, 66, 110]
$a[nm]$	1	1 - 1,2	[48, 86, 119]
$\kappa[J]$	$(3,1 \pm 0,6) \times 10^{-20}$	$4 \times 10^{-21} - 4,2 \times 10^{-19}$	[66, 120]
$A_{OF}[s^{-2}]$	$(8,0 \pm 1,8) \times 10^8$	$1,6 \times 10^7 - 6,4 \times 10^{10}$	[73, 121]
$A_D[s^{-2}]$	$(2,0 \pm 0,6) \times 10^9$	$1,6 \times 10^7 - 6,4 \times 10^{10}$	[73, 121]
$D[m^2s^{-1}]$	$(0,8 \pm 0,2) \times 10^{-11}$	$10^{-12} - 10^{-10}$	[48, 49, 51]
$A_{FM}[s^{-1}]$	$(7,5 \pm 1,3)$	-	-

Tabla 5.1: Parámetros correspondientes a la simulación de la dispersión de la relajación para liposomas de DMPC de $R_0 = 54nm$ a $T = 310K$ representada en la figura 5.6 y las correspondientes referencias.

Es claro de la figura 5.6 que el modelo simple subestima R_1 en el rango bajo de los MHz , especialmente entre $600kHz$ y $3MHz$. Esto sugiere que se debe considerar

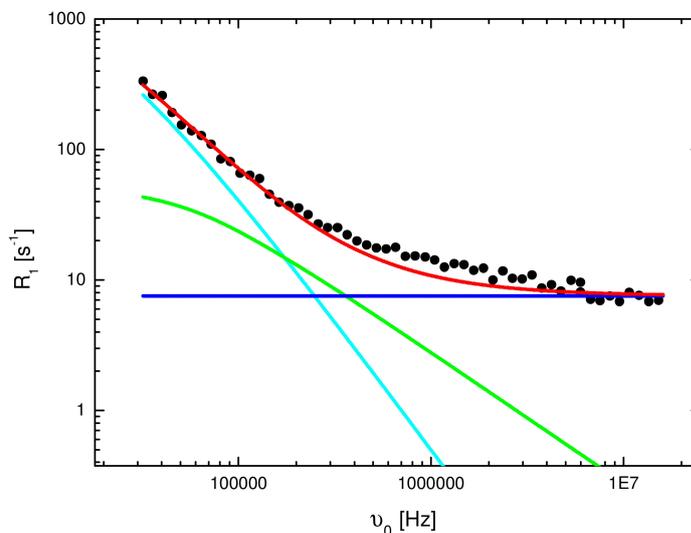


Figura 5.6: Dispersión de la relajación experimental para una suspensión de liposomas de DMPC, con radio medio $R_0 = 54nm$ a $T = 310K$ (puntos experimentales en negro). La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Las contribuciones de cada uno de los movimientos se incluyen: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), y movimientos rápidos (azul). Ver parámetros en la tabla 5.1. Puede observarse que alrededor de $1MHz$ el modelo subestima R_1 , sugiriendo que un mecanismo que contribuye, relevante dentro de este rango, está ausente en nuestra interpretación.

un proceso dinámico adicional, efectivo dentro de ese rango de frecuencias. En otras palabras, se requiere una interacción más en el modelo sistemático, descriptos arriba en los pasos 1 a 4. Asumiendo una contribución Lorentziana para este nuevo proceso, el tiempo de correlación asociado debería ser del orden de 10^{-6} a $10^{-8}s$. Una suposición de este modelo simple es que todos los movimientos excepto las fluctuaciones de orden y la difusión son demasiado rápidos para contribuir a la dispersión en el rango de frecuencias accesibles. Este enfoque se adoptó para chequear la aplicabilidad de la función densidad espectral más simple posible y evitar una sobreinterpretación de los datos. Ahora es evidente que los datos requieren una contribución a la densidad espectral total de un proceso dinámico que opere a la escala de tiempos mencionada.

Tiempos de correlación, τ_c en el rango de 10^{-7} a $10^{-10}s$ han sido sugeridos para isomerizaciones de cadenas o rotaciones moleculares a lo largo de su eje largo y se ha mostrado que afectan el ancho de línea de 1H y 2H [96]. Más recientemente, simulaciones de dinámica molecular y relaxometría a alta frecuencia de 2H y ^{13}C fueron usadas para determinar la difusión rotacional del lípido entero, sugiriendo valores de τ_c en el rango de 10^{-7} a 10^{-8} [122]. Así, habiendo precedentes para contribuciones a la relajación en este rango de frecuencias, es posible incorporar un término adicional Lorentziano a la densidad espectral total. Ya que los movimientos rápidos son el principal mecanismo a frecuencias mayores que $600kHz$, los argumentos de independencia estadística y separación de escalas de tiempo pueden nuevamente ser evocadas. La

ecuación (3.15) se convierte en

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = A_{OF}J_{OF}(\omega) + A_DJ_D(\omega) + A_RJ_R(\omega) + A_{FM} \quad (5.1)$$

donde A_R es el factor de amplitud rotacional y la densidad espectral $J_R(\omega)$ tiene la misma forma que la ecuación (3.8), pero con τ_D reemplazado por el tiempo de correlación rotacional τ_R .

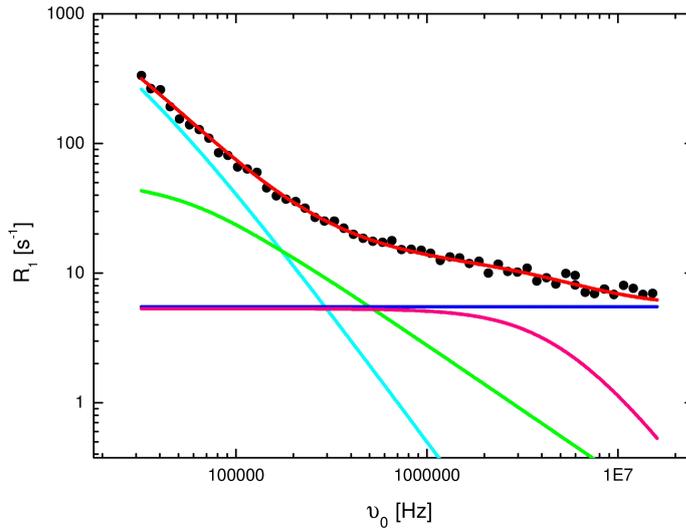


Figura 5.7: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 54nm$, a $T = 310K$. La curva de dispersión simulada que incluye la corrección se muestra en rojo. Una nueva contribución Lorentziana asociada con difusión rotacional de moléculas lipídicas es incluida (rosa), con $\tau_R = 1,8 \times 10^{-8}s$ y $A_R = 0,6 \times 10^8 s^{-2}$. Las otras contribuciones son las mismas que en la figura 5.6, con los mismos parámetros que en la simulación previa, dados en la tabla 5.1, con excepción de la contribución independiente de la frecuencia que ahora es $A_{FM} = 5,5s^{-1}$.

La adición de esta contribución de densidad espectral Lorentziana (con un tiempo de correlación $\tau_R = (1,8 \pm 1,7) \times 10^{-8}s$ y amplitud $A_R = (0,6 \pm 0,1) \times 10^8 s^{-2}$) mejora la dispersión simulada (ver figura 5.7). Entonces la simulación reproduce la curva experimental R_1 , dentro del error, sin ningún cambio en ninguno de los otros parámetros, excepto en un pequeño ajuste en el término independiente de la frecuencia, el cual se reduce a $A_{FM} = (5,5 \pm 1,3)s^{-1}$. Este resultado sugiere que una contribución de un movimiento sobre la escala de tiempo esperada para rotación molecular es verdaderamente eficiente alrededor de $1MHz$ y no puede ser despreciada.

El mismo modelo sistemático fue aplicado para simular la dispersión de la relajación de liposomas de DOPC de $R_0 = 50nm$ a $T = 298K$. Nuevamente la inclusión de un término de difusión rotacional de las moléculas se requiere para obtener un acuerdo satisfactorio con los datos experimentales (ver figura 5.8). Los parámetros correspondientes están dados en la tabla 5.2.

Parámetro	Valor del modelo	Rango	Referencias
$\eta D_2O [kg/s.m]$	$1,1 \times 10^{-3}$	$(0,8 - 1,3) \times 10^{-3}$	[66, 118]
σ	0	0 - 25	[19, 66, 110]
$a [nm]$	1	1 - 1,2	[48, 86, 119]
$\kappa [J]$	$(4,9 \pm 0,9) \times 10^{-20}$	$4 \times 10^{-21} - 4,2 \times 10^{-19}$	[120, 123, 124]
$A_{OF} [s^{-2}]$	$(0,8 \pm 0,3) \times 10^9$	$1,6 \times 10^7 - 6,4 \times 10^{10}$	[73, 121]
$A_D [s^{-2}]$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^9$	$1,6 \times 10^7 - 6,4 \times 10^{10}$	[73, 121]
$D [m^2 s^{-1}]$	$(0,3 \pm 0,2) \times 10^{-11}$	$10^{-12} - 10^{-10}$	[53, 57, 59, 60]
$A_R [s^{-2}]$	$(1,6 \pm 0,4) \times 10^8$	$1,6 \times 10^7 - 6,4 \times 10^{10}$	[73, 121]
$\tau_R [s]$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$10^{-10} - 10^{-7}$	[8, 96, 122]
$A_{FM} [s^{-1}]$	$(4,5 \pm 1)$	—	—

Tabla 5.2: Parámetros correspondientes a las simulación de la dispersión de la relajación para liposomas de DOPC de $R_0 = 50nm$ a $T = 298K$ representada en la figura 5.8 y las correspondientes referencias.

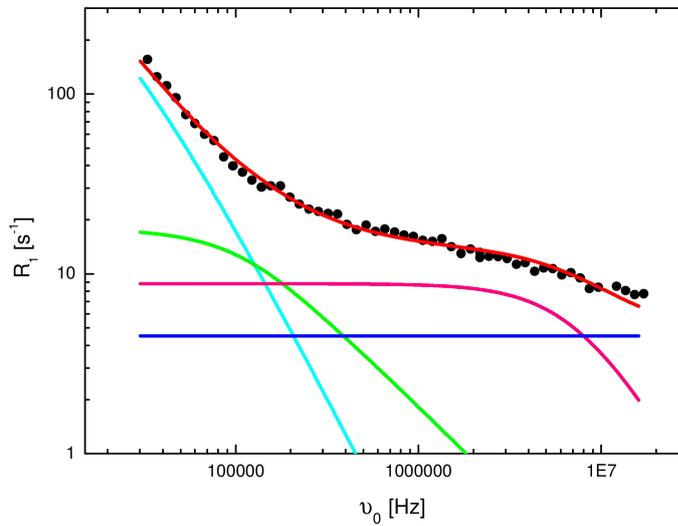


Figura 5.8: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 50nm$, at $T = 298K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Los mecanismos que contribuyen son los mismos que se muestran en la figura 5.7. Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.2.

5.4.1. Discusión

El buen acuerdo entre las dispersiones de relajación simuladas y experimentales para ambos, DMPC y DOPC, es muy alentador. Es importante enfatizar que el presente análisis, por el momento, no proporciona una mayor comprensión de las diferencias entre la dinámica de DMPC y DOPC; los valores publicados para los parámetros físicos de estas membranas son suficientes para reproducir las dispersiones de relajación experimentales de 1H en liposomas.

Un exámen de los valores numéricos que producen las simulaciones en las figuras 5.7 y 5.8 revela una tendencia en los parámetros de movimientos moleculares lipídicos para DMPC y DOPC que resulta consistente con valores obtenidos de la literatura a partir de experimentos independientes. Por ejemplo, la insaturación presente en DOPC se sabe que desorganiza el empaquetamiento de las cadenas, resultando así en el incremento del área media interfacial por lípido; valores de 59,6 y 72,5 han sido reportados para DMPC y DOPC, respectivamente [125]. Esto resulta en un incremento en la velocidad del movimiento rotacional de las moléculas fosfolipídicas [126] consistente con una reducción en el tiempo de correlación. Los valores de τ_R de $1,8 \times 10^{-8}$ y $1,1 \times 10^{-8}$ usados en nuestras simulaciones para DMPC a $T = 310K$ y DOPC a $298K$, respectivamente, son consistentes con esta tendencia. En el caso de difusión, mediciones mediante RMN de gradiente de campo pulsado (PFG) del coeficiente de difusión de lípidos en bicapas alineadas macroscópicamente también han sido desarrolladas [60]. Valores de D_{PFG} de $\approx 12 \times 10^{-12} m^2 s^{-1}$ pueden ser deducidos para DMPC a $T = 310$ (mediciones PFG a $T = 308$ y $T = 313$), y un valor de D_{PFG} de $8 \times 10^{-12} m^2 s^{-1}$ a $T = 298K$ fueron reportados para DOPC. A pesar que los valores para los coeficientes de difusión utilizados en nuestras simulaciones son algo más bajos (8×10^{-12} y $3 \times 10^{-12} m^2 s^{-1}$, para DMPC y DOPC, respectivamente), ellos están dentro de los rangos de la literatura [48, 49, 53, 57, 59, 60, 51] y parecen mostrar la misma tendencia que lo reportado por Filippov et al. [60].

Para analizar la robustez del método el siguiente paso fue analizar si el método es sensible a cambios en el tamaño de las vesículas, en la temperatura y en el contenido de colesterol agregado.

5.5. Dependencia de las dispersiones de la relajación de 1H con el tamaño de los liposomas.

Con el objetivo de hacer un análisis en función del tamaño, se realizaron experimentos en DMPC a $T = 310K$ para $R_0 = 54nm$ (figura 5.7, ya analizada anteriormente) y $R_0 = 98nm$ (figura 5.9); y en DOPC a $T = 298$ para $R_0 = 50nm$ (figura 5.8, ya analizada), $R_0 = 91nm$ (figura 5.10) y $R_0 = 120nm$ (figura 5.11). Las figuras muestran la dispersión de la relajación simulada utilizando los parámetros de

las tablas 5.3 y 5.4. Las contribuciones de las densidades espectrales también están incluidas en cada figura.

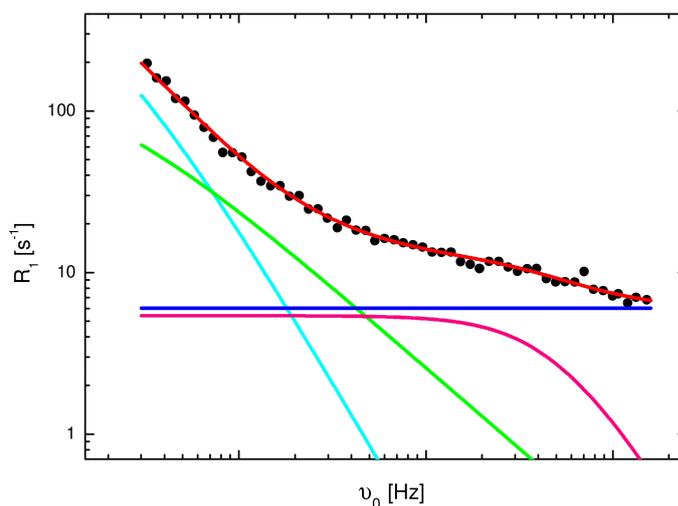


Figura 5.9: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 98nm$, a $T = 310K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.3.

En la figura 5.12 se presentan las dispersiones de la relajación, registrados a $298K$ para LUVs de DOPC de diferentes tamaños hidrodinámicos promedios. Es claro que para esta temperatura casi no hay dependencia con el tamaño de R_1 para $\nu_0 > 200kHz$, pero hay una disminución muy ligera para $\nu_0 < 100kHz$. Este efecto es más marcado para liposomas de $50nm$. Estas observaciones indican que los movimientos que determinan la relajación de 1H a altas frecuencias no se ven afectados por cambios en la curvatura de la membrana (sobre el rango de tamaños estudiados), pero esto no es así a bajas frecuencias. Un comportamiento muy similar se observó en las dispersiones registradas a $310K$ para liposomas de DMPC sobre el mismo rango de tamaños. Así que para liposomas con $R_0 > 100nm$, se puede decir que las mediciones de dispersión son débilmente dependientes del tamaño. Mediciones previas sugieren que la presencia de campos locales impiden mediciones verdaderas de R_1 para frecuencias inferiores a $11kHz$ para LUVs de DOPC y DMPC. A los fines de asegurar la correcta interpretación de los parámetros de relajación, se ha tomado el criterio de limitar el rango de frecuencias a considerar a $\nu_0 > 30kHz$ (aproximadamente tres veces el campo local). Los datos de relajación que se presentan en el resto de la tesis se limitan al rango $30kHz < \nu_0 < 17MHz$.

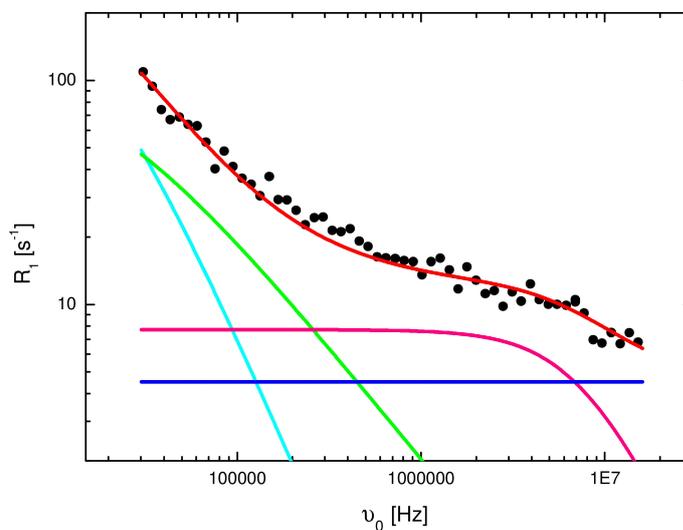


Figura 5.10: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 91\text{nm}$, a $T = 298\text{K}$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.4.

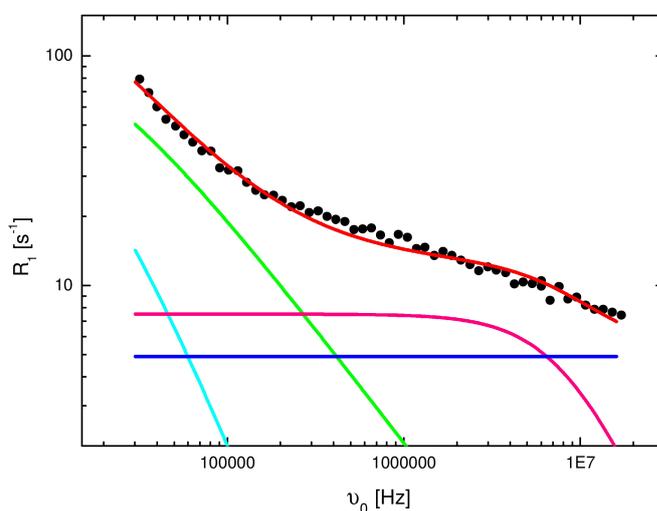


Figura 5.11: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 120\text{nm}$, a $T = 298\text{K}$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.4.

Parámetro		
$R_0[nm]$	54	98
$\eta D_2O[kg/s.m]$	$0,82 \times 10^{-3}$	$0,82 \times 10^{-3}$
σ	0	0
$a[nm]$	1	1
$\kappa[J]$	$(3,1 \pm 0,6) \times 10^{-20}$	$(3,1 \pm 0,6) \times 10^{-20}$
$A_{OF}[s^{-2}]$	$(8,0 \pm 1,8) \times 10^8$	$(7 \pm 3) \times 10^8$
$A_D[s^{-2}]$	$(2,0 \pm 0,6) \times 10^9$	$(0,9 \pm 0,3) \times 10^9$
$\tau_D[s]$	$(4,1 \pm 0,7) \times 10^{-5}$	$(4,0 \pm 1,1) \times 10^{-5}$
$D[m^2s^{-1}]$	$(0,8 \pm 0,2) \times 10^{-11}$	$(3,7 \pm 1,4) \times 10^{-11}$
$A_R[s^{-2}]$	$(0,6 \pm 0,1) \times 10^8$	$(0,6 \pm 0,2) \times 10^8$
$\tau_R[s]$	$(1,8 \pm 1,7) \times 10^{-8}$	$(1,8 \pm 0,7) \times 10^{-8}$
$A_{FM}[s^{-1}]$	$(5,5 \pm 1,3)$	$(6,0 \pm 1)$

Tabla 5.3: Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas a $T = 310K$ para liposomas de DMPC de diferentes tamaños.

Parámetro			
$R_0[nm]$	50	91	120
$\eta D_2O[kg/s.m]$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$
σ	0	0	0
$a[nm]$	1	1	1
$\kappa[J]$	$(4,9 \pm 0,9) \times 10^{-20}$	$(5,4 \pm 0,8) \times 10^{-20}$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^{-20}$
$A_{OF}[s^{-2}]$	$(0,8 \pm 0,3) \times 10^9$	$(1,0 \pm 0,3) \times 10^9$	$(0,85 \pm 0,25) \times 10^9$
$A_D[s^{-2}]$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^9$	$(0,6 \pm 0,2) \times 10^9$	$(0,2 \pm 0,1) \times 10^9$
$\tau_D[s]$	$(7 \pm 1) \times 10^{-5}$	$(7 \pm 3) \times 10^{-5}$	$(8 \pm 4) \times 10^{-5}$
$D[m^2s^{-1}]$	$(0,3 \pm 0,2) \times 10^{-11}$	$(1,8 \pm 1,5) \times 10^{-11}$	$(3 \pm 2) \times 10^{-11}$
$A_R[s^{-2}]$	$(1,6 \pm 0,4) \times 10^8$	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^8$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^8$
$\tau_R[s]$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
$A_{FM}[s^{-1}]$	$(4,5 \pm 1)$	$(4,5 \pm 1,5)$	(5 ± 1)

Tabla 5.4: Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas a $T = 298K$ para liposomas de DOPC de diferentes tamaños.

Ya se ha señalado que las principales diferencias en las dispersiones de relajación ocurren a baja frecuencia. El examen de las tablas 5.3 y 5.4 muestra que para ambos lípidos, los parámetros para los movimientos rápidos, A_R , τ_R y A_{FM} , no cambian de manera significativa (dentro de los errores) en todo el rango de tamaños. Por lo tanto,

la discusión se centra en las contribuciones de la difusión y las fluctuaciones de orden (figura 5.12).

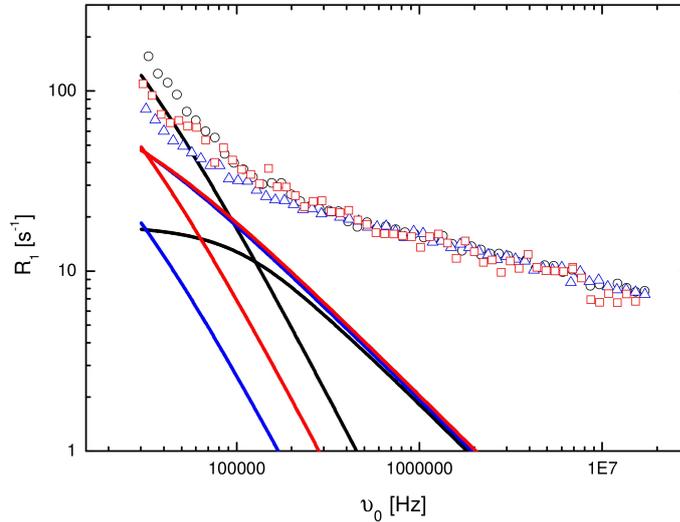


Figura 5.12: Dispersiones de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC a $T = 298K$ para $R_0 = 50$ (negro), $R_0 = 91$ (rojo) y $R_0 = 120nm$ (azul). Se incluyen las correspondientes contribuciones de las densidades espectrales para fluctuaciones de orden y difusión para cada uno de los tamaños.

Para liposomas de DOPC de diferentes tamaños, a $295K$, se encontró que; (i) usando valores para κ dentro del rango reportado resultó una buena consistencia de la simulación con los datos experimentales, y (ii) los datos no demandaron cambios significativos en κ dentro del rango de tamaños estudiados, lo que sugiere una débil dependencia con el tamaño. Los valores de κ estuvieron entre $(4,8 - 5,4) \times 10^{-20} J$, que es equivalente a $12 - 13K_B T$. Los valores de la literatura para bicapas de DOPC incluyen reportes de $8,5$ y $7,6 \times 10^{-20} J$, a 288 y $303K$, respectivamente ($T \gg T_m$ para DOPC), obtenidos desde dispersión de rayos X en liposomas y en bicapas orientadas [127]. También hubo un reporte reciente [128] de presurización por micropipetas de vesículas de bicapas gigantes, que dió un valor de $8,5 \times 10^{-20} J$, a $291K$. La extrapolación de los datos desde los experimentos de presión osmótica más viejos [129] sobre liposomas de tamaño similar sugiere un valor de κ de $3,3 \times 10^{-20} J$, a $295K$. Esto confirma que los valores de κ obtenidos a partir de nuestro modelo se encuentran en el rango correcto, y que la débil dependencia con el tamaño es físicamente realista.

Para el resto de los parámetros se encontró que usando valores tomados desde estudios experimentales independientes nuevamente se produce una excelente consistencia entre los datos y las simulaciones. Se encontró que los datos requieren que el

tiempo de correlación para el movimiento difusivo, τ_D , sea débilmente dependiente del tamaño, lo cual es esperado ya que la difusión es esencialmente un proceso impulsado térmicamente. El correspondiente coeficiente de difusión aumenta en forma significativa con el tamaño, debido a la curvatura más reducida de las liposomas más grandes. Los valores para D de $(0,3 - 3,0) \times 10^{-11} m^2 s^{-1}$ son físicamente razonables. Coeficientes de difusión lateral se han medido directamente mediante RMN de gradiente de campo pulsado para bicapas planas orientadas de DOPC en este rango de temperatura, reportando valores [60] en el rango de $(0,7 - 1,5) \times 10^{-11} m^2 s^{-1}$.

Después de haber discutido la consistencia del modelo, la figura 5.12 muestra que se pueden identificar dos regímenes dinámicos diferentes. Para frecuencias superiores a $150 kHz$, las fluctuaciones de orden son claramente dominantes sobre la difusión, y en este rango de frecuencias, la contribución de la primera es débilmente sensible a los cambios de tamaño. Esta observación está en pleno acuerdo con las predicciones teóricas [19]. En el rango de frecuencias más bajas, esta situación sólo es válida para los tamaños más grandes, pero se produce un cruce entre $R_0 = 91$ y $50 nm$. Para $R_0 = 50 nm$ la contribución de las fluctuaciones de orden se reduce y aparece una clara meseta. De nuevo, esto está de acuerdo con las producciones del modelo teórico. Físicamente, el *plateau* indica un valor de corte para las fluctuaciones de forma en cuanto las membranas se aproximan al límite elástico, presumiblemente debido al aumento de curvatura mayor.

En cuanto a la contribución de la difusión, las simulaciones muestran un aumento en el factor de intensidad A_D con la disminución de tamaño. Este cambio, que es esencial para reproducir el comportamiento experimental, es equivalente a una ligera disminución de la distancia efectiva entre los protones para curvaturas mayores. Este hallazgo puede ser atribuido al fuerte cambio en el régimen difusivo con la curvatura. Por ejemplo, la constante de difusión se reduce de $3,7 \times 10^{-11}$ a $0,8 \times 10^{-11} m^2/s$ para DMPC a $310 K$ (ver Tabla 5.3) y un orden de magnitud para DOPC a $298 K$ (ver Tabla 5.4), cuando la curvatura se incrementa. La creciente contribución de la difusión y la aparición de un *plateau* en la contribución de las fluctuaciones de orden (entre $R_0 = 91$ y $50 nm$), resulta en una significativa dependencia con el tamaño de R_1 para liposomas más pequeños, (ver figura 5.12).

Las simulaciones son por lo tanto cualitativamente consistentes con las expectativas y numéricamente consistentes con experimentos independientes. Tanto los efectos descritos anteriormente para las contribuciones de la difusión y las fluctuaciones de orden a las dispersiones se observan también en las simulaciones de liposomas de DMPC. Para liposomas de R_0 mayores a $100 nm$, estos efectos son débiles y las dispersiones son esencialmente independientes del tamaño.

5.6. Dependencia de la relajación de 1H con la temperatura.

Para hacer un análisis del comportamiento de los procesos dinámicos de relajación en función de la temperatura se realizaron mediciones en liposomas de DOPC de $R_0 = 120nm$ a $T = 291K$ (figura 5.13) y $T = 310K$ (figura 5.14). Las figuras muestran la dispersión de la relajación simulada utilizando los parámetros de la tabla 5.5. Las contribuciones de las densidades espectrales también están incluidas en cada figura.

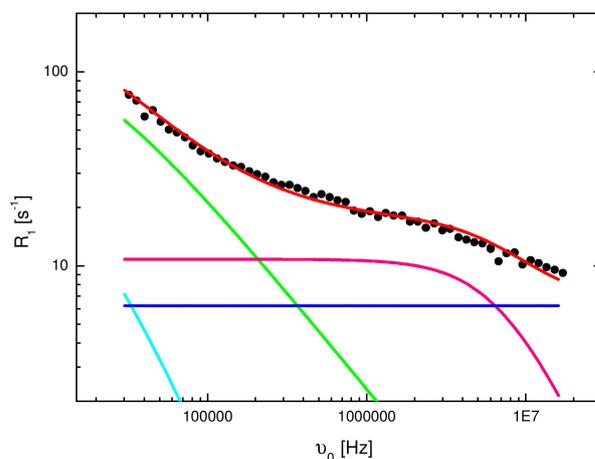


Figura 5.13: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 120nm$, a $T = 291K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.5.

Dispersiones de la relajación registradas para liposomas de DOPC de $R_0 = 120nm$ a 291, 298 (figura 5.11) y 310K se muestran en la Figura 5.15. Cabe señalar que este tamaño está dentro del rango en que las dispersiones son muy débilmente dependientes del tamaño. Dentro del rango de 100 a 30kHz la dependencia con la temperatura gradualmente se debilita hasta no haber diferencia apreciable en R_1 .

Contrariamente a lo que se observa con la dependencia con el tamaño, el principal efecto de la temperatura se encuentra a frecuencias altas. Una vez más la coherencia de las simulaciones con las dispersiones experimentales es muy buena. Todos los parámetros utilizados en las simulaciones se presentan en la Tabla 5.5. Las simulaciones muestran que las contribuciones de las fluctuaciones y la difusión son un poco

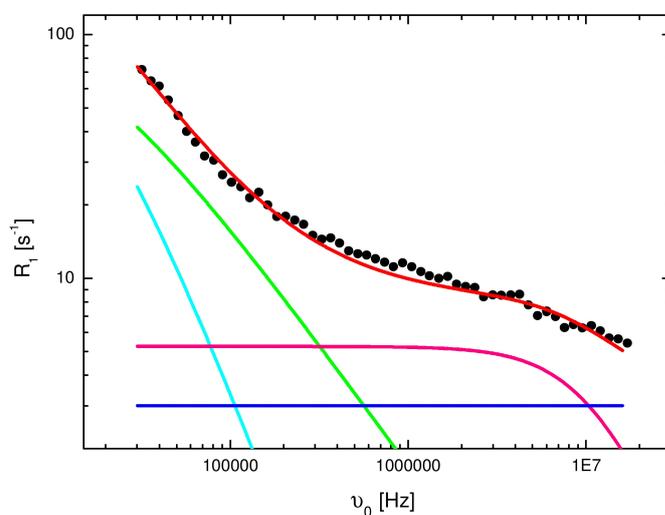


Figura 5.14: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 120nm$, a $T = 310K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.5.

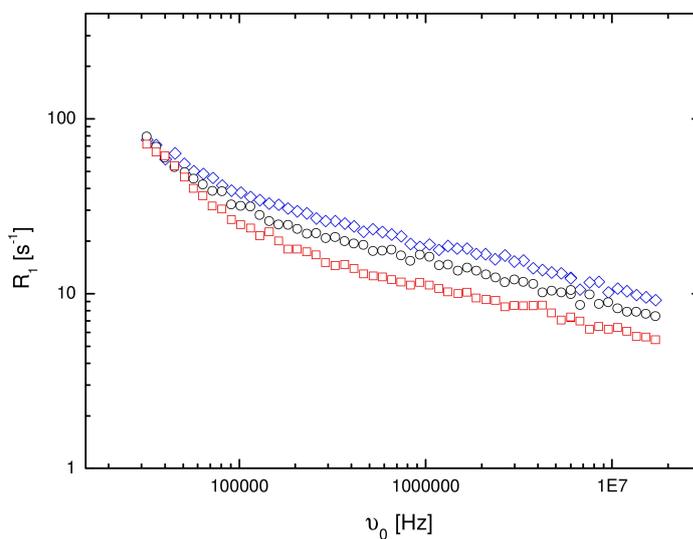


Figura 5.15: Dispersiones de la relajación experimental para suspensiones de LUVs de DOPC de $R_0 = 120nm$ a $T = 291$ (azul), 298 (negro) y $310K$ (rojo).

menos importantes que la contribución de los movimientos más rápidos.

Parámetro			
Temperatura [K]	291	298	310
$\eta D_2O [kg/s.m]$	$1,3 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$	$0,82 \times 10^{-3}$
σ	0	0	0
$a [nm]$	1	1	1
$\kappa [J]$	$(6 \pm 1) \times 10^{-20}$	$(4,8 \pm 0,5) \times 10^{-20}$	$(3,0 \pm 0,7) \times 10^{-20}$
$A_{OF} [s^{-2}]$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^9$	$(0,85 \pm 0,25) \times 10^9$	$(0,45 \pm 0,25) \times 10^9$
$A_D [s^{-2}]$	$(0,1 \pm 0,5) \times 10^9$	$(0,2 \pm 0,1) \times 10^9$	$(0,2 \pm 0,2) \times 10^9$
$\tau_D [s]$	$(9 \pm 8) \times 10^{-5}$	$(8 \pm 4) \times 10^{-5}$	$(6 \pm 5) \times 10^{-5}$
$D [m^2 s^{-1}]$	$(2,7 \pm 1,3) \times 10^{-11}$	$(3,0 \pm 1,9) \times 10^{-11}$	$(3,8 \pm 1,8) \times 10^{-11}$
$A_R [s^{-2}]$	$(1,8 \pm 0,4) \times 10^8$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^8$	$(1,4 \pm 0,4) \times 10^8$
$\tau_R [s]$	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^{-8}$	$(0,7 \pm 0,2) \times 10^{-8}$
$A_{FM} [s^{-1}]$	(6 ± 2)	(5 ± 1)	$(3,0 \pm 1)$

Tabla 5.5: Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas para liposomas de DOPC de $R_0 = 120nm$ a diferentes temperaturas.

Para lograr una buena consistencia entre las simulaciones y los datos se encuentra que es necesario que los tiempos de correlación para los movimientos difusivos y de rotación disminuyan con la temperatura, tal cual como se espera para procesos activados térmicamente. Un análisis de Arrhenius (fig. 5.16) demuestra energías de activación muy bajas, $< 1kJ.mol^{-1}$, en ambos casos. El decrecimiento en τ_D está inversamente correlacionado con un aumento en el coeficiente de difusión, ecuación (3.9). El aumento observado en D con la temperatura es consistente con los resultados obtenidos a partir de mediciones con gradiente de campo pulsado por RMN en bicapas planas de DOPC orientadas [60].

El otro parámetro obtenido a partir de las simulaciones que se encuentra fuertemente influenciado por la temperatura es κ , el módulo elástico de flexión. Como se mencionó anteriormente, nuestro método arroja valores de κ (a temperatura ambiente) para DOPC, que están en buen acuerdo con aquéllos obtenidos usando otras técnicas. Nuestras simulaciones también sugieren un decrecimiento del 50% en κ entre temperaturas de 291 y 310K. Un reciente estudio de dispersión de rayos X, sobre LUVs de DOPC y bicapas orientadas, [127] también demuestran que bicapas de DOPC se hacen menos rígidas (κ menor) con el incremento de la temperatura (desde 298 a 318K). Un consenso todavía no se ha establecido en todos los casos, por ejemplo experimentos de eco de espín de neutrones [130] en LUVs de DMPC de $R_0 = 200nm$ sugieren importantes aumentos en κ con la temperatura entre 301 y 333K, también en la fase L_α . Sin embargo de estudios de videomicroscopía, de liposomas de DMPC gigantes (y por lo tanto curvatura despreciable) se obtiene que no hay dependencia con la temperatura de 298 a 313K [131].

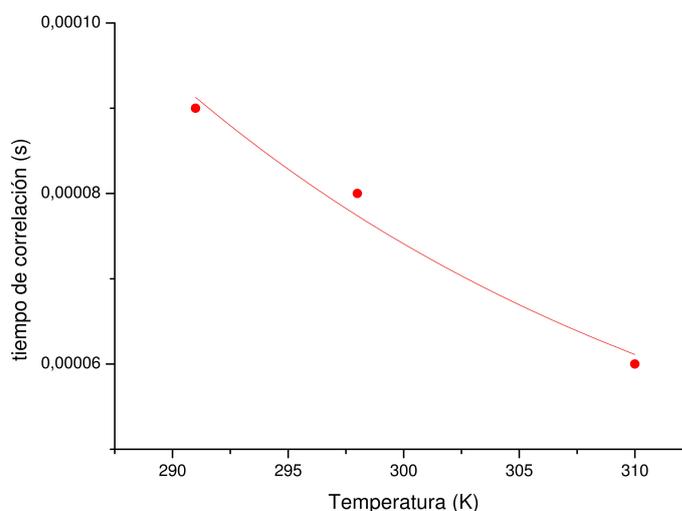


Figura 5.16: Análisis de Arrhenius para el proceso de difusión molecular.

5.7. Dependencia de la tasa de relajación de 1H con el contenido de colesterol.

Para hacer un análisis del comportamiento de los procesos dinámicos de relajación en función del contenido de colesterol se prepararon dos muestras de liposomas de DOPC con diferentes contenidos de colesterol. Se realizaron mediciones de la dispersión de la relajación de 1H a $T = 298K$ en liposomas de $R_0 = 80nm$ y 10% de colesterol (figura 5.16) y en LUVs de $R_0 = 68nm$ con 25% de colesterol (figura 5.17). Las figuras muestran la dispersión de la relajación simulada utilizando los parámetros de la tabla 5.6, incluyendo las correspondientes contribuciones de los diferentes procesos dinámicos.

En la figura 5.19 se presentan las dispersiones de la relajación, registrados a $298K$ para liposomas de DOPC de $R_0 = 80nm$ con 10% de colesterol y liposomas de DOPC de $R_0 = 68nm$ con 25% de colesterol. Se observa que las curvas de dispersión presentan una leve tendencia a ser similares a frecuencias altas. Los cambios presentes en los mecanismos de relajación son debidos a diferentes contenido de colesterol en las muestras, y también pueden estar presentes algunos cambios menores debidos a que los radios son parecidos, pero no iguales. Como ya se discutió en otra sección, cambios en la dinámica debido a cambios en el tamaño de las liposomas pueden reflejarse en cambios en la constante de difusión. Si existen cambios en la dinámica más rápida, tales cambios serán atribuidos a la presencia de diferentes concentraciones de colesterol, ya que la dinámica rápida no depende del tamaño de las liposomas.

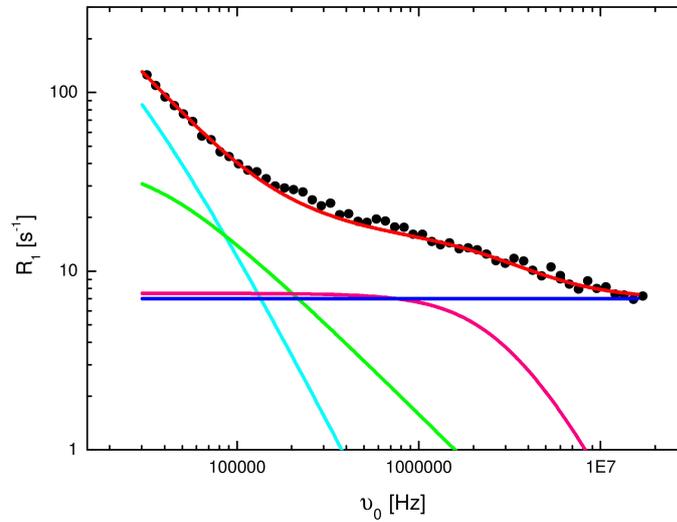


Figura 5.17: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 80nm$, a $T = 298K$ con 10 % de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.6.

Parámetro		
% colesterol	10	25
$R_0[nm]$	80	68
$\eta D_2O[kg/s.m]$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$
σ	0	0
$a[nm]$	1	1
$\kappa[J]$	$(7 \pm 1) \times 10^{-20}$	$(8 \pm 1) \times 10^{-20}$
$A_{OF}[s^{-2}]$	$(1,0 \pm 0,5) \times 10^9$	$(2,0 \pm 0,5) \times 10^9$
$A_D[s^{-2}]$	$(0,9 \pm 0,4) \times 10^9$	$(6,7 \pm 0,8) \times 10^9$
$\tau_D[s]$	$(6 \pm 1) \times 10^{-5}$	$(19 \pm 1) \times 10^{-5}$
$D[m^2s^{-1}]$	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^{-11}$	$(0,18 \pm 0,03) \times 10^{-11}$
$A_R[s^{-2}]$	$(0,5 \pm 0,1) \times 10^8$	$(0,9 \pm 0,2) \times 10^8$
$\tau_R[s]$	$(3 \pm 2) \times 10^{-8}$	$(3,0 \pm 0,7) \times 10^{-8}$
$A_{FM}[s^{-1}]$	$(7 \pm 1,3)$	$(8,5 \pm 1)$

Tabla 5.6: Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas a $T = 298K$ para liposomas de DOPC con diferentes contenidos de colesterol.

De la tabla 5.6 se observa que los tiempos de correlación rotacionales no son sensibles a cambios en el contenido de colesterol. Los valores de las constantes de difusión fueron determinados a partir de mediciones con gradiente de campo pulsado

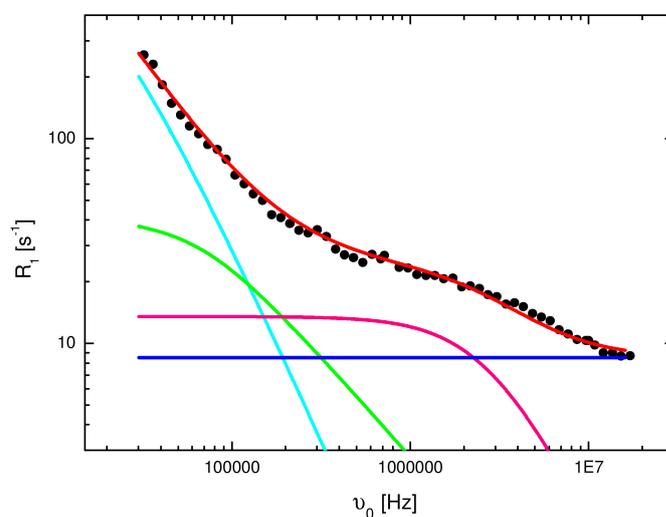


Figura 5.18: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 68nm$, a $T = 298K$ con 25 % de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 5.6.

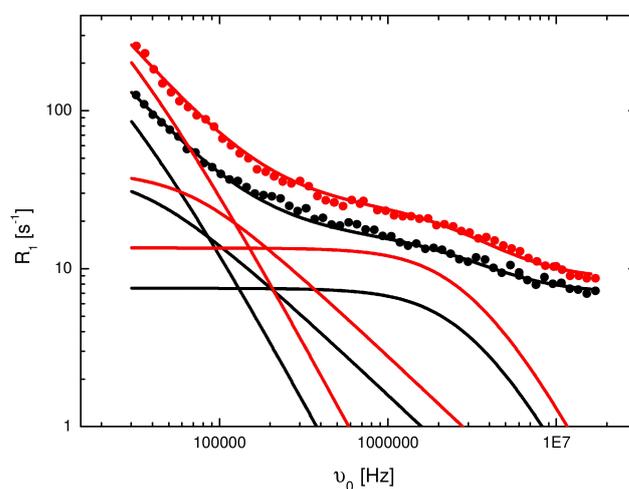


Figura 5.19: Dispersiones de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC a $T = 298K$ para $R_0 = 80$ con 10 % de colesterol (negro) y para $R_0 = 68$ con 25 % de colesterol (rojo). Se incluyen las correspondientes contribuciones de las densidades espectrales.

en bicapas de DOPC orientadas a $T = 298K$ [60]. De las tablas 5.7 y 5.8 se observa que D decrece un 12 % (con respecto a bicapas sin colesterol) con un 10 % de colesterol, y

un 41 % con 25 %. El tiempo de correlación para la difusión aumenta con el contenido de colesterol siendo esto consistente con el cambio en D .

Para obtener una buena consistencia entre las simulaciones y los datos es necesario que la constante elástica de flexión tienda a aumentar con el contenido de colesterol, lo cual es razonable ya que el colesterol hace que las membranas lipídicas sean más rígidas [66, 67, 129, 131, 120].

Con el fin de validar los comportamientos encontrados con la comparación de estas dos muestras, dos nuevas tablas comparativas se presentan: tabla 5.7, donde se comparan los resultados obtenidos para DOPC sin colesterol con $R_0 = 91nm$ a $T = 298K$ (figura 5.10, tabla 5.4) con DOPC con 10 % de colesterol con $R_0 = 80nm$ a $T = 298K$ (figura 5.17, tabla 5.6); y tabla 5.8, donde se comparan los resultados obtenidos para DOPC sin colesterol con $R_0 = 50nm$ a $T = 298K$ (figura 5.8, tabla 5.2 o tabla 5.4) con DOPC con 25 % de colesterol con $R_0 = 68nm$ a $T = 298K$ (figura 5.18, tabla 5.6).

Parámetro		
% colesterol	0	10
$R_0[nm]$	91	80
$\eta D_2O[kg/s.m]$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$
σ	0	0
$a[nm]$	1	1
$\kappa[J]$	$(5,4 \pm 0,8) \times 10^{-20}$	$(7 \pm 1) \times 10^{-20}$
$A_{OF}[s^{-2}]$	$(1,15 \pm 0,3) \times 10^9$	$(1,0 \pm 0,5) \times 10^9$
$A_D[s^{-2}]$	$(0,45 \pm 0,2) \times 10^9$	$(0,9 \pm 0,8) \times 10^9$
$\tau_D[s]$	$(7 \pm 3) \times 10^{-5}$	$(6 \pm 1) \times 10^{-5}$
$D[m^2s^{-1}]$	$(1,8 \pm 1,5) \times 10^{-11}$	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^{-11}$
$A_R[s^{-2}]$	$(1,4 \pm 0,3) \times 10^8$	$(0,5 \pm 0,2) \times 10^8$
$\tau_R[s]$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(3 \pm 0,7) \times 10^{-8}$
$A_{FM}[s^{-1}]$	$(4,5 \pm 1,5)$	(7 ± 1)

Tabla 5.7: Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas a $T = 298K$ para liposomas de DOPC sin colesterol con $R_0 = 91nm$ y con 10 % de colesterol con $R_0 = 80nm$.

Las tablas 5.7 y 5.8 arrojan comportamientos de los parámetros consistentes con lo ya analizado. La constante elástica de flexión aumenta con la incorporación de

Parámetro		
% colesterol	0	25
$R_0[nm]$	50	68
$\eta D_2O[kg/s.m]$	$1,1 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-3}$
σ	0	0
$a[nm]$	1	1
$\kappa[J]$	$(5,4 \pm 0,9) \times 10^{-20}$	$(8 \pm 1) \times 10^{-20}$
$A_{OF}[s^{-2}]$	$(0,8 \pm 0,3) \times 10^9$	$(2,0 \pm 0,5) \times 10^9$
$A_D[s^{-2}]$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^9$	$(6,7 \pm 0,8) \times 10^9$
$\tau_D[s]$	$(7 \pm 1) \times 10^{-5}$	$(19 \pm 1) \times 10^{-5}$
$D[m^2s^{-1}]$	$(0,3 \pm 0,2) \times 10^{-11}$	$(0,18 \pm 0,03) \times 10^{-11}$
$A_R[s^{-2}]$	$(1,6 \pm 0,4) \times 10^8$	$(0,9 \pm 0,2) \times 10^8$
$\tau_R[s]$	$(1,1 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$(3 \pm 0,7) \times 10^{-8}$
$A_{FM}[s^{-1}]$	$(4,5 \pm 1)$	$(8,5 \pm 1)$

Tabla 5.8: Parámetros correspondientes a las simulaciones de las dispersiones de la relajación registradas a $T = 298K$ para liposomas de DOPC sin colesterol con $R_0 = 50nm$ y con 25 % de colesterol con $R_0 = 68nm$.

colesterol. El tiempo de difusión τ_D nuevamente aumenta con el contenido de colesterol en la tabla 5.8, pero no presenta cambios, dentro del error, en la tabla 5.7. La constante de difusión en ambos casos disminuye con el colesterol, lo que refleja el hecho de que la presencia de las moléculas de colesterol restringe el desplazamiento de los lípidos. Aquí el tiempo de correlación presenta una tendencia a aumentar con el colesterol.

De las tablas 5.6, 5.7 y 5.8 se puede observar que los factores de intensidad A_{FO} y A_R , sólo en algunos casos presentan un ligero cambio, pero en general no presentan cambio significativos. A_D no varía mucho para las muestras sin colesterol y la muestra con 10 % de colesterol, pero para liposomas con 25 % de colesterol A_D presenta un abrupto aumento. Esto puede deberse a que a grandes concentraciones de colesterol, la dinámica propia del colesterol empieza a jugar un papel importante para la relajación a frecuencias bajas. Entonces, debe haber otro proceso dinámico referente al colesterol que para bajas concentraciones no está presente, pero a concentraciones mayores se empieza a notar.

5.8. Análisis de los pre-factores.

Hay dos componentes para la simulación de la contribución de cada proceso dinámico, la dependencia con la frecuencia de la densidad espectral y el pre-factor de amplitud. Mientras que el primero está determinado por el proceso dinámico pertinente, los pre-factores son determinados por la distancia efectiva entre los protones, que surgen de la dependencia habitual inversa a la sexta potencia:

$$A^{ij} = \frac{9}{8r_{ij}^6} \gamma^4 \hbar^2 \left(\frac{\mu_0}{4\pi} \right)^2. \quad (5.2)$$

En general se ha encontrado que la dependencia con el tamaño de los pre-factores es débil, como uno esperaría. La única excepción es en el caso de la difusión, A_D aumenta para liposomas más pequeños, como ya se mencionó. Del mismo modo, la dependencia con la temperatura de los pre-factores es débil, tanto para la difusión como para la rotación molecular. Para los movimientos rápidos, A_{FM} se encuentra que disminuye un poco con la temperatura. En este caso particular los cambios en los pre-factores no puede ser exclusivamente relacionados con los cambios en las distancias entre los protones (también incluye la contribución densidad espectral Lorentziana en un régimen no-dispersivo). Por último, los pre-factores para las fluctuaciones de orden, A_{OF} , disminuyen con el aumento de la temperatura, por encima de $291K$. El decrecimiento resultó ser de un 35 % y un 65 % a $298K$ y $310K$, respectivamente. Dada la dependencia a la inversa de la sexta potencia estos valores corresponden a un aumento en la separación media entre núcleos con el aumento de la temperatura de 15 y 20 % en comparación a $291K$. Se encontró que la dependencia de los pre-factores con el contenido de colesterol es débil para las fluctuaciones de orden y para las rotaciones moleculares. Como ya se mencionó, A_D aumenta con el colesterol. A_{FM} aumenta con el colesterol cuando pasamos de 0 % a 10 %, pero se mantiene igual para 10 % y 25 %

En cuanto a la información dinámica proporcionada por las simulaciones, se ha establecido que el método puede ser utilizado para simular los datos de relajación para liposomas de tamaño similar, de diferente composición usando valores físicamente realistas de los parámetros involucrados. El estudio realizado demuestra la robustez de la técnica, con simulaciones de las dispersiones de relajación para liposomas de diferentes tamaños, registrados sobre un rango de temperaturas y con diferentes contenidos de colesterol. Esto le da credibilidad a las suposiciones claves del método: que los procesos relevantes son, fluctuaciones de orden, difusión, rotaciones moleculares y movimientos rápidos, y que los modelos físicos correspondientes a las diferentes densidades espectrales son adecuados para los sistemas estudiados.

Capítulo 6

Propiedades viscoelásticas de membranas lipídicas.

En este capítulo se presenta una revisión teórica de las propiedades elásticas de membranas lipídicas en vesículas, las cuales están determinadas por dos tipos de deformaciones elásticas. Debido a que un parámetro clave para determinar las propiedades elásticas es la energía elástica de flexión y su módulo asociado κ , se presenta un listado de los métodos experimentales para la medición de κ .

6.1. Descripción teórica de las propiedades elásticas de vesículas.

Las propiedades elásticas de vesículas están en general determinadas por tres modos clásicos de deformación: deformaciones de elongación puras, deformaciones de corte puras y deformaciones de flexión puras. La elasticidad de vesículas en estado fluido está determinada esencialmente por la primera y la última contribución [132].

En la representación energética de la ley de Hook, la energía elástica de corte por unidad de área puede expresarse como

$$g_{sh} = \frac{1}{2}\mu(\lambda^2 - \lambda^{-2} - 2), \quad (6.1)$$

donde μ es el módulo elástico de corte (en unidades de erg/cm^2) y $\lambda = L/L_0$ es la razón de extensión lateral la cual caracteriza la transformación de un elemento de área de forma cuadrada (de longitud L_0) en un rectángulo de longitud L (manteniendo el área constante). A veces es de ayuda expresar la ley de Hook en términos de la ecuación de fuerza

$$\tau_1 - \tau_2 = \mu(\lambda + \lambda^{-1}), \quad (6.2)$$

donde τ_1 y τ_2 son las tensiones (en mN/m) que se tienen que aplicar para elongar y comprimir los tamaños del elemento de área para estabilizar la forma rectangular.

La densidad de energía asociada con la tensión lateral isotrópica (que actúa en cada uno de los cuatro lados del elemento de área) está dada por

$$g_{ext} = \frac{1}{2}K(\delta A/A)^2, \quad (6.3)$$

donde K es el módulo de compresibilidad del área y $\delta A/A$ es el cambio de área relativo.

La situación para la deformación de flexión es más compleja y depende de si se trata de una bicapa con extremos libres o si se trata de una vesícula cerrada. En el primer caso la deformación de flexión es equivalente a la deformación splay de una bicapa esméctica. La principal contribución viene de la inclinación mutua de moléculas lipídicas adyacentes, y el módulo elástico de flexión es igual a la constante elástica de splay (K_{11}) multiplicada por el grosor de la bicapa ($\kappa = K_{11}d$). Para expresar la deformación de flexión en términos de los desplazamientos de la bicapa (u) en la dirección normal, con la ecuación de Helfrich se tiene que la energía elástica por unidad de área es

$$g_{flex} = \frac{1}{2}\kappa \left(\frac{\delta^2 u}{\delta x^2} + \frac{\delta^2 u}{\delta y^2} - c_0 \right)^2, \quad (6.4)$$

donde $c_x = \delta^2 u / \delta x^2$, $c_y = \delta^2 u / \delta y^2$ son los radios principales de curvatura y c_0 es la curvatura espontánea.

El comportamiento de la vesícula debido a la flexión está en general determinado por las limitaciones de volumen fijo, V , área promedio fija, $\langle A \rangle$ y diferencia de área fija, ΔA , entre las monocapas interna y externa la cual está dada por

$$\Delta A \approx d \int dA (c_x + c_y)^2, \quad (6.5)$$

donde la integral va sobre ambas monocapas.

La rigidez de flexión, κ' , es diferente a la que aparece en la ecuación (6.4) y puede ser expresada en términos de la compresibilidad de las dos monocapas [133]:

$$\kappa' = d^2 \frac{K_i K_o}{(K_i + K_o)}. \quad (6.6)$$

Como también la energía de splay puede ser expresada en términos de la variación de las compresibilidades laterales en la dirección de la normal a la membrana [134, 135, 136], κ' y κ se espera que sean similares. Ya que κ' está determinada por limitaciones globales de área promedio fija $\langle A \rangle$ es llamada módulo de flexión global para distinguirlo del módulo local κ .

6.2. Métodos experimentales de medición de κ .

Las vesículas lipídicas representan sistemas modelo simple para el estudio de propiedades estructurales y dinámicas de las biomembranas. Un parámetro crucial para determinar las propiedades elásticas de una membrana cerrada es la energía elástica de flexión y el módulo asociado κ . Varios métodos han sido desarrollados para este estudio.

Métodos microscópicos incluyen:

- Difracción de neutrones [137].
- Difracción de rayos X [123, 138, 139, 140, 141, 142].
- Dispersión difusa de rayos X [94, 124, 127, 143]
- Espectroscopia de eco de espín de neutrones (NSE) [130]
- RMN [86, 87, 144]

Estos métodos dan datos sobre la estructura a nivel molecular, pero modelos numéricos o simulaciones de la dinámica molecular son requeridos para relacionar estos datos a propiedades macroscópicas [89].

Métodos macroscópicos incluyen:

- Calorimetría de escaneo diferencial [138].
- Micropipetas [69, 145, 146].
- Videomicroscopía por contraste de fase de fluctuaciones de forma [66, 67, 68, 131, 147, 148, 149, 150, 151, 152].
- Microscopía de fuerza atómica [153, 154].
- Dinamometría óptica [155].
- Microscopía confocal diferencial [156, 157]

Los métodos macroscópicos ofrecen mediciones más directas de la respuesta de la membrana a perturbaciones externas, pero los métodos de contacto son en su mayor parte invasivos, lo cual puede conducir a sacar de su estado natural al material.

Difracción de rayos X

Para aplicar esta técnica se utiliza radiación X, definida por su banda de frecuencias, que está comprendida entre la de la radiación ultravioleta y la de los rayos γ . Este tipo de radiación se produce cuando una partícula de masa pequeña pero altamente energética incide sobre un material. La colisión produce una perturbación en la materia y parte de la energía se transforma en radiación X. Para generar radiación X se suelen utilizar electrones como partículas para producir el impacto con la materia, ya que son muy eficaces y, al mismo tiempo, resultan sencillos de controlar y de generar. Por encima de una cierta tensión umbral, la radiación emitida por un tubo de rayos X presenta un espectro formado por radiaciones de distintas longitudes de onda. De la información que nos proporciona la difracción de los rayos X, se pueden distinguir dos aspectos diferenciados y complementarios: por una parte, la geometría de las direcciones de difracción, que está condicionada únicamente por el tamaño y la forma de la celda elemental del cristal, de modo que conociendo estas direcciones es posible averiguar el sistema cristalino. El otro aspecto viene dado por las intensidades de estos rayos difractados, que están íntimamente relacionadas con la naturaleza de los átomos y con las posiciones que éstos ocupan en la red cristalina, de forma que su medida constituye un procedimiento para obtener información tridimensional acerca de la estructura interna del cristal.

Por lo general se utiliza difracción de rayos X y tensión osmótica en la fase hexagonal inversa (H_{II}) para medir dimensiones estructurales, curvaturas espontáneas y módulos de flexión, por ejemplo, de monocapas de dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) dopadas con cantidades en aumento de dioleoylglycerol (DOG) [140]. DOG es un perturbador fuerte de bicapas planas de fosfolípidos. Este convierte multicapas a la fase hexagonal inversa, integrada por monocapas muy curvada. Graficando parámetros estructurales de la fase H_{II} , con el cambio de contenido de agua en un nuevo sistema de coordenadas definido, se muestra que la deformación elástica de las monocapas de lípidos se puede describir como de flexión en torno al plano central de área constante. También se derivan los factores de conversión y se estiman las curvaturas espontánea y módulos de flexión para la superficie neutra que, a diferencia de los parámetros del plano central, son propiedades intrínsecas que se aplican a otras deformaciones y geometrías.

Dispersión difusa de rayos X.

Bicapas lipídicas han sido estudiadas como modelos de sistemas blandos bidimensionales [158]. Pueden ser caracterizadas por su estructura estática y su dinámica, y fluctuaciones térmicas de equilibrio. Mediciones estructurales dan información de la variación de composición química (usando neutrones) o densidad electrónica (usando rayos X) a lo largo del eje z normal al plano de la bicapa [125]. Estudios estructurales son dificultosos, aún para bicapas lipídicas puras, porque son sistemas de materia condensada blanda y fluctuante. Como consecuencia, no presentan una estructura cristalina claramente definida. La fase termodinámica biológicamente relevante es la fase fluida L_α , la cual, cuando está completamente hidratada, no tiene órdenes de difracción suficientemente altos para análisis cristalográficos. La razón de la desaparición de los órdenes altos de difracción en sistemas en fase L_α bien hidratada viene de la teoría de dispersión de cristales líquidos esmécticos [159, 160], y no se debe a un cambio en la estructura de las membranas [161]. Sistemas multilamelares completamente hidratados generan gran dispersión de difusión por rayos X corrompiendo las intensidades de los picos de Bragg que son usados en análisis estructurales biofísicos convencionales [94]. Sin embargo, usando un algoritmo eficiente para fitear las amplias regiones de los datos de difusión a la teoría cristalina líquido esméctica clásica, se obtiene el módulo de flexión de las membranas [124].

Espectroscopia de eco de espín de neutrones

Espectroscopia de eco de espín de neutrones (NSE) es un método dinámico, ideal para el estudio de fluctuaciones térmicas de biomembranas ya que sus tiempos de correlación ($0,1ns$ a $100ns$) y sus escalas de longitud (10 a 10^3) se superponen con aquellos de las fluctuaciones de membrana celular. Mediante la técnica NSE se midió la elasticidad para fosfolípidos saturados y monosaturados con el mismo número de hidrocarbonos [130]. La función de dispersión intermedia adquirida a través de NSE fue analizada mediante el modelo de membranas 2D de Zilman-Granek modelo [162, 163]. Exploran el hecho de cómo la presencia del enlace doble y el grosor de la parte hidrofóbica afectan la elasticidad de flexión de bicapas lipídicas en la fase L_α .

Resonancia magnética nuclear

Mediciones de la relajación transversal de espín nuclear empleando secuencias de pulso tipo Carr-Purcell (CP) pueden proporcionar información detallada de la dinámica de movimientos lentos en biomembranas [86, 87]. Se desarrolló un modelo de relajación para el análisis de tales experimentos desarrollados en vesículas cuasi-esféricas unilamelares. La base del modelo es la ecuación estocástica de Liouville en la cual se consideran dos procesos de relajación diferentes, fluctuaciones de forma de la vesícula y difusión traslacional de las moléculas. Se muestra que para vesículas de radio $R_0 \geq 200nm$, las fluctuaciones de forma de la vesícula constituyen el proceso

de relajación transversal dominante. La teoría está desarrollada para la relajación transversal de ^{13}P dependiente de la frecuencia, ($R_{2,\infty}^{CO}(\omega)$). El análisis de perfiles de dispersión $R_{2,\infty}^{CO}(\omega)$ es un modo directo de determinar el módulo elástico de flexión y otros parámetros viscoelásticos de las vesículas. Sin embargo, cabe destacar la limitación de este método para vesículas de menor tamaño, o en casos en los que la difusión no puede ser despreciada.

Micropipetas

Métodos de micropipetas sensitivas se han usado para medir la relación entre la tensión y el área de la superficie proyectada en membranas fluidas de vesículas sobre un rango de 4 órdenes de magnitud en tensión [69]. A tensión baja, los datos confirman lo predicho por la teoría de equilibrio: el área proyectada crecerá logarítmicamente con la tensión en cuanto las fluctuaciones de forma estén más restringidas. La pendiente de $\ln(\text{tensión})$ vs. dilatación de área da el módulo elástico de flexión. A causa de que las membranas son de escaso espesor, son extremadamente flexibles. Por ello, mediciones de la rigidez de flexión no son simples o directas. El método experimental es simple: una vesícula gigante es primero levemente sacada de su forma esférica y luego aspirada en una pequeña pipeta de succión calibrada (figura 6.1). La longitud de la proyección de la vesícula dentro de la pipeta provee una medida directa del área proyectada de la vesícula.

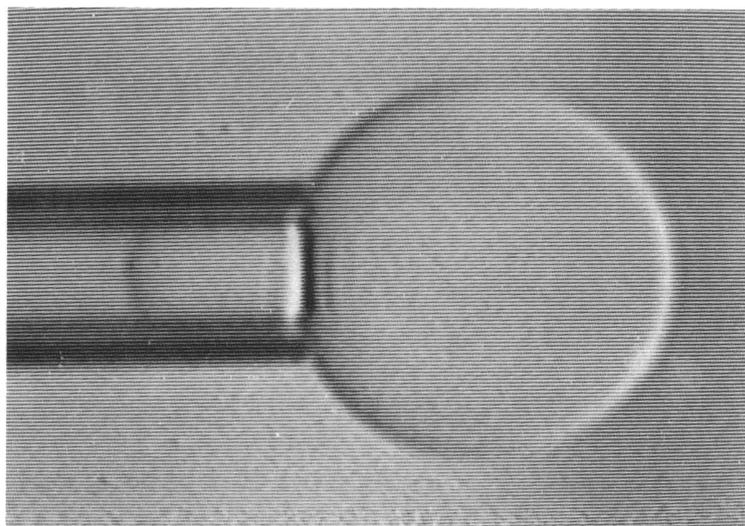


Figura 6.1: Videomicrografía de presurización de una vesícula. Figura extraída de la referencia [145].

Videomicroscopía por contraste de fase de fluctuaciones de forma.

La técnica de videomicroscopía por contraste de fase de fluctuaciones de forma permite estudiar las propiedades elásticas de vesículas gigantes. El método establecido es registrar una serie de imágenes microscópicas de una vesícula fluctuando en el tiempo, se analiza con Fourier las formas para obtener las amplitudes medias cuadráticas de los desplazamientos de los modos normales como una función del número de onda, y luego se correlaciona los resultados con lo predicho por la teoría de equipartición en equilibrio [66, 67, 68, 131].

Espectroscopia de microscopía de fuerza atómica.

Propiedades mecánicas de las membranas lipídicas tales como su rigidez de flexión gobiernan la morfología de liposomas y juegan un papel importante en procesos como fusión y adhesión de membranas. Mediciones de fuerza versus deformación son el modo más directo para medir esto, pero los datos experimentales son escasos y principalmente vienen de técnicas que se limitan a vesículas gigantes. La espectroscopia de microscopía de fuerza atómica [154] se presenta como un método que permite mediciones de deformación de vesículas de tamaño del orden de los submicrones. Se usa esta técnica en DPPC para medir la rigidez de liposomas pequeños ($R < 200nm$) y se demuestra que las constantes elásticas de la membrana y la rigidez de flexión pueden derivarse usando un modelo analítico basado en la teoría de cáscara.

Dinamometría óptica

En este tipo de técnicas las partículas son manipuladas por medio de un sistema de captura óptica [164]. Los experimentos se realizan con gotas de latex de tamaño micrométricas adheridas a las membranas de vesículas gigantes [155]. En su movimiento las esferas de latex sienten el estado de la membrana. Arriba de la temperatura de transición del DMPC, las partículas pueden moverse sobre la superficie de la vesícula, espontáneamente (movimiento Browniano) o conducidas por una fuerza externa. Mediante dinamometría óptica, se puede medir la resistencia elástica de la membrana a la variación de la distancia entre las partículas. Se propone una interpretación relacionando la respuesta elástica con el módulo de curvatura de la membrana.

Microscopía confocal diferencial

Se desarrolló un método totalmente óptico para medir la rigidez de flexión de

bicapas lipídicas en de todas sus fases. La rigidez de flexión se estudió presionando las vesículas noinvasivamente con fuerzas ópticas y midiendo su deformación directamente con una técnica óptica de resolución nanométrica. La resolución nanométrica se logró con la técnica confocal diferencial [156, 157]. Se trabajó con vesículas de DPPC de radio $10 - 20\mu m$. En esta técnica la membrana se ilumina con un rayo láser de baja potencia con una fuerte orientación. Cuando la membrana se coloca ligeramente por encima o por por debajo del plano focal, el tamaño y la divergencia del rayo reflejado son muy sensibles al cambio de la distancia entre la membrana y el plano focal. Al volver a centrar el rayo retroreflejado en filtro espacial pin-hole y midiendo la potencia transmitida, la posición de la membrana puede ser determinada precisamente.

Capítulo 7

Medición de la constante elástica de flexión κ .

Ya comprobado que al agregar colesterol a una muestra o al variar la temperatura las propiedades elásticas de las membranas lipídicas en liposomas cambian, se planteó la idea de analizar la dependencia del tiempo de relajación espín-red (T_1) de protones con la frecuencia de Larmor en un rango restringido de 200kHz a 2MHz. Dicha elección surge luego de observar que en tal intervalo las fluctuaciones de orden son el proceso dinámico dominante. Además, tal proceso es el que contiene información de las propiedades elásticas. Se midió el tiempo de relajación espín-red (T_1) de protones para seis valores de frecuencia de Larmor diferentes, dentro del intervalo mencionado, en liposomas de 100nm de diámetro, compuestos de DMPC con diferentes porcentajes de colesterol y sin colesterol y a diferentes temperaturas.

Las fluctuaciones de orden son el proceso dinámico que contiene información de las propiedades elásticas de las membranas que constituyen sistemas de vesículas. Aunque el efecto de las fluctuaciones de orden colectivas se extiende sobre un amplio rango dinámico, la contribución relativa de este mecanismo a la tasa de relajación total se espera que sea más grande a frecuencias de los kHz donde los efectos de los movimientos moleculares rápidos son despreciados. Esto se pudo observar analizando las curvas de dispersión de la relajación espín-red (T_1) de protones analizadas en el capítulo anterior. En la figura 7.1 se muestra la curva de dispersión de la tasa de relajación para liposomas de DOPC con $R_0 = 120nm$, a $T = 298K$; donde se ve claramente que en el rango de 200kHz a 2MHz las fluctuaciones de orden son el proceso dinámico dominante responsable de la relajación.

Entonces, se llegó a la idea de que midiendo la curva de dispersión en este intervalo reducido, se puede obtener información de la elasticidad de la membrana. Para validar que tal experimento es sensible a los cambios de la constante elástica, se nece-

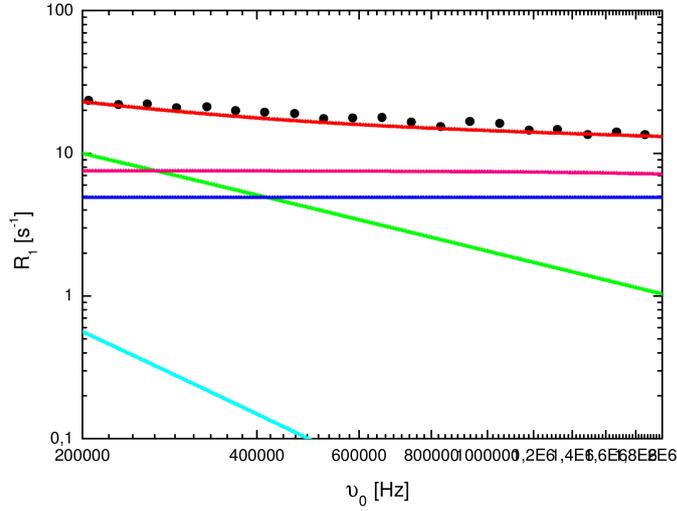


Figura 7.1: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DOPC, con $R_0 = 120nm$, a $T = 298K$. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste), rotación molecular (rosa) y movimientos rápidos (azul). Obtenida de la figura 5.11

sita trabajar con diferentes muestras las cuales tengan diferentes elasticidades. Ya se demostró en el capítulo 6 que al agregar colesterol a una muestra, o al variar su temperatura, ciertos parámetros físicos cambian (la elasticidad particularmente). La idea es obtener resultados que se puedan comparar con otros obtenidos desde otras técnicas experimentales, como por ejemplo video microscopía por contraste de fase [131].

De la figura 7.1 se ve que en este rango de frecuencias las rotaciones moleculares no presentan dispersión (tiempos de correlación del orden de $10^{-8}s$), por lo tanto, en el análisis de los datos las rotaciones moleculares no estarán modeladas por una función Lorentziana de la frecuencias, sino por medio de una constante. Entonces los datos experimentales serán con la siguiente función:

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = A_{OF}J_{OF}(\omega) + A_D J_D(\omega) + A_{FM}, \quad (7.1)$$

donde las densidades espectrales de las fluctuaciones de orden y de la difusión ya fueron definidas, (3.6) y (3.8) respectivamente. Aquí las rotaciones moleculares están consideradas en A_{FM} .

7.1. Sistemas DMPC/colesterol

Con el fin de lograr un estudio cuantitativo de las propiedades de las bicapas lipídicas compuestas de fosfolípidos es esencial conocer el diagrama de fase correspondiente. Un diagrama de fase del sistema DMPC/colesterol fue obtenido por Almeida [50] utilizando las técnicas de NMR, DSC y ESR (figura 7.2). En el diagrama se muestran las separaciones de fase inducidas por el colesterol y la temperatura.

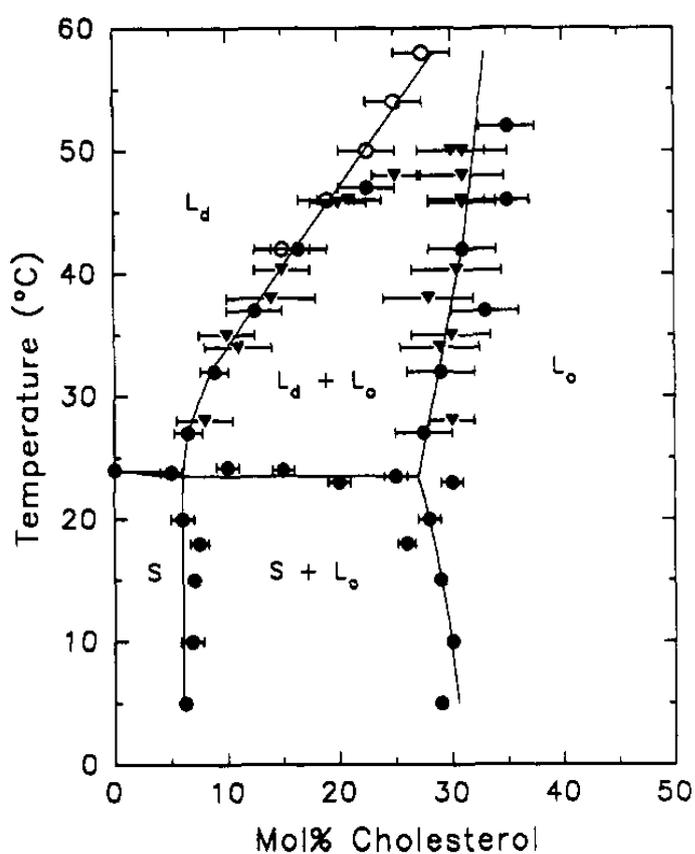


Figura 7.2: Diagrama de fase DMPC/colesterol.

Es interesante notar que a temperaturas superiores a T_m ($23,9^{\circ}C$), este sistema puede existir en fase líquido-cristalina desordenada (L_d), a concentraciones bajas de colesterol, y fase líquido-cristalina ordenada (L_o), a concentraciones altas de colesterol. También existe una región en el diagrama de fase en la cual ambas fases coexisten.

Como en esta tesis se hizo un estudio de la dinámica molecular de bicapas lipídicas en fase líquido-cristalina desordenada, cuando se trabaja con muestras de DMPC con

colesterol hay que tener la precaución de estar siempre en esta fase. La preparación de las muestras es la misma que se detalló en el capítulo 5.

Todas las muestras utilizadas aquí fueron suspensiones de liposomas de $R_0 = 50nm$. Los porcentajes de colesterol usados para preparar las muestras fueron, 3%, 10% y 20%. Aquí se presentan los cálculos que determinan la cantidad (en gramos) de DMPC y de colesterol requeridas para la preparación de las diferentes muestras.

La masa total $M = 0,0706gr$ está dada por

$$M = M_D + M_C = N_D m_D + N_C m_C, \quad (7.2)$$

donde N_D y N_C son el número de moléculas de DMPC y de colesterol respectivamente, y $m_D = 1,1258 \cdot 10^{-21}gr$ y $m_C = 6,4208 \cdot 10^{-22}gr$ son los pesos de una molécula de DMPC y de una de colesterol respectivamente.

Sea $p = \frac{N_C}{N_C + N_D}$ el porcentaje de colesterol en la muestra. Entonces N_D y N_C están dados por las siguientes expresiones:

$$N_D = M \left[m_D + m_C \left(\frac{p}{1-p} \right) \right]^{-1} \quad (7.3)$$

y

$$N_C = \left(\frac{p}{1-p} \right) N_D. \quad (7.4)$$

Entonces, para un dado porcentaje de colesterol se puede calcular las respectivas masas de DMPC y colesterol.

- DMPC + 3% de colesterol: $p = 0,03$, $M_D = 0,0694gr$ y $M_C = 0,0012gr$.
- DMPC + 10% de colesterol: $p = 0,1$, $M_D = 0,0664gr$ y $M_C = 0,0042gr$.
- DMPC + 20% de colesterol: $p = 0,2$, $M_D = 0,06179gr$ y $M_C = 0,00881gr$.

7.2. Experimentos de dispersión de la tasa de relajación en función de la frecuencia.

Dispersiones de la tasa de relajación de 1H se midieron usando la técnica de ciclado rápido de campo [11] con un relaxómetro Spinmaster (Stelar, Mede, Italia) para muestras de liposomas de $1mL$ de volumen. En todos los casos se usó un campo

magnético de polarización de 12MHz , que fue encendido durante un período de 1s para generar la magnetización en la muestra. El valor del campo de adquisición fue $9,649\text{MHz}$. Una velocidad de conmutación de campo de $3\text{MHz}\cdot\text{ms}^{-1}$ fue utilizada en todos los casos, con un tiempo de conmutación de 2ms para permitir que el campo magnético se establezca en su valor de equilibrio. Una velocidad de digitalización de 1MHz se utilizó para la adquisición, mientras que el tiempo muerto del espectrómetro fue de aproximadamente $30\mu\text{s}$. Para la FID se tomaron muestras de 64 puntos en el intervalo de tiempo $30 - 94\mu\text{s}$, después del pulso de 90° el cual tuvo una duración de $6,2\mu\text{s}$. Todas las mediciones fueron realizadas en el laboratorio de Relaxometría y Técnicas Especiales, FaMAF.

Los valores de R_1 fueron determinados de las curvas de recuperación de la magnetización por ajuste de cuadrados mínimos. Los valores de R_1 no fueron sensibles a la ventana temporal sobre la cual la FID fue muestreada. El proceso de relajación de espín para todas las muestras resultó ser monoexponencial, dentro del error, a todas las frecuencias. La temperatura de la muestra fue medida directamente en el volumen de la muestra dentro de $\pm 1\text{K}$ aproximadamente con un termómetro digital CHY 503. El tiempo para cada experimento está limitado por la estabilidad de las suspensiones. Para obtener los datos de R_1 , la magnetización se registra en una escala temporal dividida en 16 bloques, cada uno obtenido de 120 repeticiones para cada una de las frecuencias. El tiempo de medición total fue de 10 días para cada curva de dispersión, durante el cual las suspensiones no cambiaron. Para asegurarnos esto, después de terminar con la curva de dispersión de cada muestra, algunos valores de T_1 se midieron nuevamente, y también se midió el tamaño de los liposomas. Los experimentos se realizaron en resonancia a 6 valores de campo (B_r) distintos: $0,20522\text{MHz}$, $0,32718\text{MHz}$, $0,52123\text{MHz}$, $0,73881\text{MHz}$, $0,9334\text{MHz}$ y $1,3215\text{MHz}$.

7.3. Resultados

Con el objetivo de hacer un análisis en función del contenido de colesterol y a diferentes temperaturas, se realizaron experimentos en:

- DMPC sin colesterol a $T=303\text{K}$
- DMPC con 3% de colesterol a $T=303\text{K}$
- DMPC con 3% de colesterol a $T=328\text{K}$
- DMPC con 10% de colesterol a $T=318\text{K}$
- DMPC con 10% de colesterol a $T=328\text{K}$
- DMPC con 20% de colesterol a $T=328\text{K}$

Todos los datos experimentales fueron analizados con la ecuación (7.1). El procedimiento para obtener la curva simulada es el mismo que ya se mencionó anteriormente. Primero se diferencian cuáles son parámetros conocidos de la literatura y cuáles son parámetros libres para ambos procesos. Las cantidades que se suponen conocidas son: R_0 , a , σ y T . Los parámetros desconocidos son las amplitudes de los procesos (A_{OF} y A_D), el tiempo de correlación de difusión (τ_D) y la constante elástica de flexión (κ). Ya que la cantidad que se desea obtener desde la curva simulada es κ (la cual está contenida en las fluctuaciones de orden) se quiere que el único parámetro libre en tal proceso sea κ . En el capítulo 5 se hizo un análisis similar para DMPC a $T = 310K$ con un radio de $R = 54nm$ barriendo la frecuencia de Larmor desde $30kHz$ hasta $100MHz$. Como las fluctuaciones de orden dominan en un rango de $200kHz$ a $2MHz$ (el cual está contenido en el otro intervalo), entonces se consideró el valor de A_{OF} obtenido en ese análisis.

Finalmente, para simular la función (7.1) se tienen como parámetros a definir A_D , τ_D , A_{FM} y κ . De la literatura se define el rango de validez para los parámetros A_D , τ_D y κ . A_{FM} es la contribución constante de los movimientos rápidos la cual puede estimarse desde el gráfico considerando que es valor de $1/T_1$ cuando ν_0 se hace grande. El valor A_{OF} se fija a $7,5E8[m^{-2}]$.

El proceso para obtener la curva óptima es el siguiente: se simula una primera curva R_1^j con parámetros ($A_D^j, \tau_D^j, \kappa^j$) elegidos al azar dentro del intervalo de validez de cada parámetro (el supraíndice j enumera la cantidad de curvas simuladas hasta llegar a la óptima). Se calcula un parámetro estadístico que refleje cuán aproximada es la curva a los datos experimentales. Se denomina a tal parámetro Δ^j , el cual se define como

$$\Delta^j = \frac{\sum_{x=1}^6 (R_1^j(\nu_0^{(x)}) - R_1^{data}(\nu_0^{(x)}))^2}{6}. \quad (7.5)$$

Se continúa dando diferentes valores a los parámetros libres con el fin de encontrar aquellos parámetros que minimicen Δ ($(A_D^{opt}, \tau_D^{opt}, \kappa^{opt})$), a los cuales llamaremos óptimos. A fines de ordenar el trabajo para encontrar el Δ^{min} , los valores de los parámetros para las siguientes curvas no son elegidos al azar. Teniendo en cuenta que los tres procesos dinámicos intervinientes son estadísticamente independientes, se trata de optimizar los procesos en forma independiente y de manera tal que el primer proceso a optimizar sea el que menos parámetros libres tenga. En nuestro caso lo que se hizo fue optimizar primero la constante de los movimientos rápidos. Luego se continuó con la constante elástica de las fluctuaciones de orden y finalmente con los dos parámetros de la difusión.

Una vez encontrada la curva que mejor simula los datos experimentales, se calculan los errores de los parámetros. A modo de ejemplificar el criterio adoptado, veamos

el caso del cálculo del error de κ (Para todos los errores se procede de la misma manera). Se dejan todos los parámetros fijos (con excepción de κ) en sus valores óptimos ($A_D^{opt}, \tau_D^{opt}, A_{FM}^{opt}$) y el único que se varía es κ . Se adoptó el criterio de considerar que una curva cae fuera del error, cuando ésta se aleja un 20 % de la curva óptima. Luego el valor máximo (o mínimo) que κ puede adoptar ($\kappa^>$) es tal que $\Delta(\kappa^>)$ sea aproximadamente igual a $[\Delta^{min} \pm 0,2\Delta^{min}]$.

En la siguiente tabla se presentan los parámetros óptimos obtenidos con sus respectivos errores para cada muestra.

Colesterol	0 %	3 %	3 %	10 %	10 %	20 %
T[K]	303 ± 1	303 ± 1	328 ± 1	318 ± 1	328 ± 1	328 ± 1
$\eta[Ns/m^2]10^{-3}$	1,1	1,1	0,82	0,82	0,82	0,82
$A_{OF}[s^{-2}]10^8$	$7,5 \pm 1,1$	$7,5 \pm 1,0$	$6,5 \pm 0,7$	$6,5 \pm 0,9$	$6,7 \pm 1,1$	$8,0 \pm 1,5$
$\kappa[J]10^{-20}$	$2,9 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,4$	$2,1 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,8$	$4,0 \pm 0,6$	$3,5 \pm 0,5$
$A_D[s^{-2}]10^9$	$2,1 \pm 0,5$	$2,4 \pm 0,6$	$1,0 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,4$	$5,5 \pm 1,0$
$\tau_D[s]10^{-5}$	$4,0 \pm 0,7$	$4,5 \pm 0,8$	$3,9 \pm 1,3$	$4,5 \pm 2,5$	$3,8 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,5$
$D[m^2/s]10^{-12}$	$7,4 \pm 2,2$	$6,2 \pm 2,0$	$6,34 \pm 5,35$	5 ± 12	$6,6 \pm 2,1$	$6,1 \pm 1,5$
$A_{FM}[s^{-1}]$	18 ± 1	$13,8 \pm 1,2$	$7,5 \pm 0,8$	$4,8 \pm 0,5$	$7,5 \pm 0,9$	11 ± 1
Figura	7.3	7.4	7.5	7.6	7.7	7.8

Tabla 7.1: Parámetros correspondientes a las simulación de la dispersión de la relajación para liposomas de DMPC de $R_0 = 50nm$ a diferentes temperaturas y con diferentes contenidos de colesterol.

En las siguientes figuras se muestran los datos experimentales son su correspondiente curva R_1 simulada para los siguientes casos: DMPC a $T = 303K$ sin colesterol (Fig 7.3), DMPC a $303K$ con 3 % de colesterol (Fig 7.4), DMPC a $328K$ con 3 % de colesterol (Fig 7.5), DMPC a $318K$ con 10 % de colesterol (Fig 7.6), DMPC a $328K$ con 10 % de colesterol (Fig 7.7) y DMPC a $328K$ con 20 % de colesterol (Fig 7.8).

7.4. Análisis de los resultados.

Antes de analizar estos resultados, recordemos las tendencias de los parámetros que arrojaron los estudios hechos en el capítulo 5 en cuanto a la variación de colesterol y de temperatura. Con respecto a la difusión se tiene que, el tiempo de correlación τ_D aumenta con el colesterol y disminuye con la temperatura, la constante de difusión D aumenta con la temperatura y disminuye con el colesterol, y la intensidad A_D aumenta

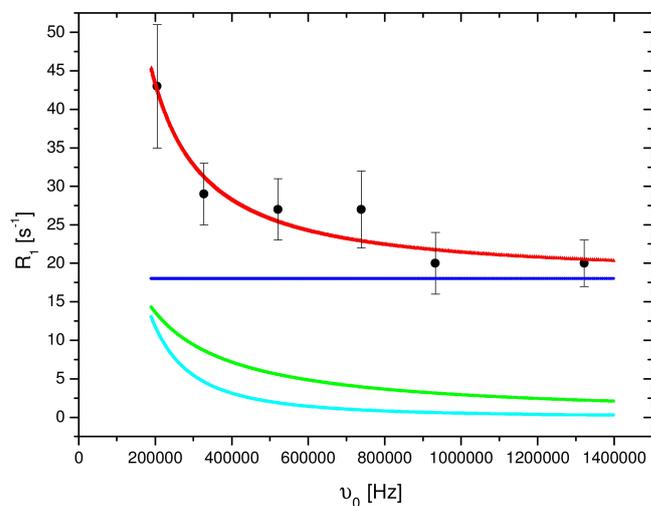


Figura 7.3: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 303K$ sin colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.

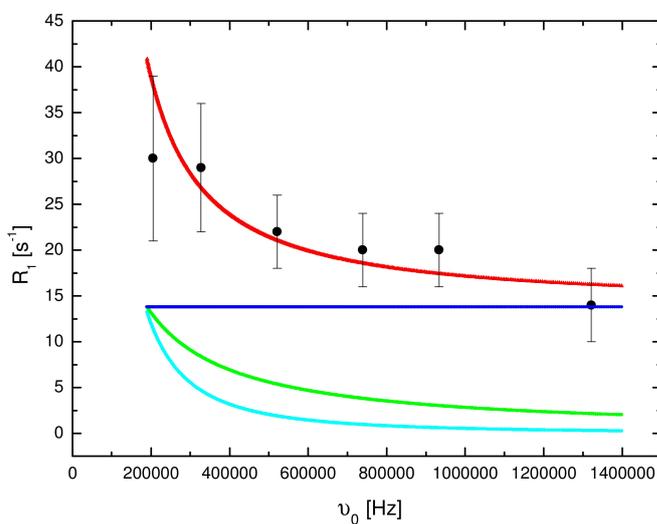


Figura 7.4: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 303K$ con 3% de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.

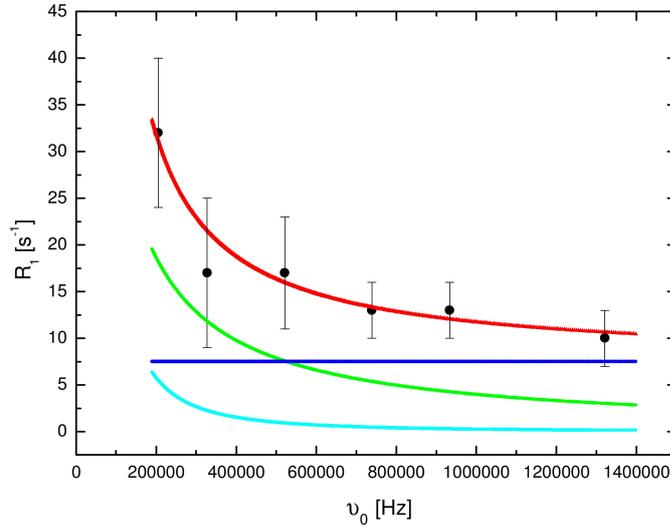


Figura 7.5: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 328K$ con 3% de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.

con el colesterol. En cuanto a las fluctuaciones de orden se tiene que la constante elástica de flexión κ aumenta con el colesterol y disminuye con la temperatura y la intensidad A_{OF} no presenta variaciones significativas.

De los resultados obtenidos en este capítulo se puede observar que: con respecto a la difusión la única tendencia reproducible es la de A_D aumentando con el colesterol. Ni τ_D ni D muestran ser sensibles ni a cambios en la temperatura ni en el contenido de colesterol. En lo que respecta a las fluctuaciones de orden, se observa que κ disminuye cuando subimos la temperatura. También se vé que tiene una tendencia de aumentar cuando se aumenta el contenido de colesterol en la muestra. A_{OF} no presenta cambios.

Estos resultados reflejan que la técnica experimental utilizada (en este pequeño rango de frecuencias de Larmor) no sólo es sensible a cambios de la elasticidad de la muestra, sino que también, con un análisis teórico adecuado, permite la cuantificación de la constante elástica para liposomas. Entonces, se puede decir que, mediante relaxometría de ciclado rápido de campo se ha encontrado un método para medir la constante de elasticidad de flexión en vesículas de $50nm$ de radio. El método en un rango restringido de frecuencias de Larmor no requiere del conocimiento detallado del

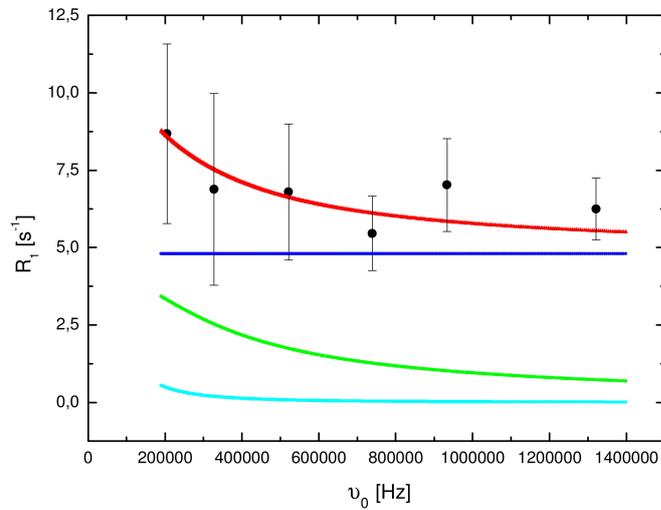


Figura 7.6: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 318K$ con 10 % de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.

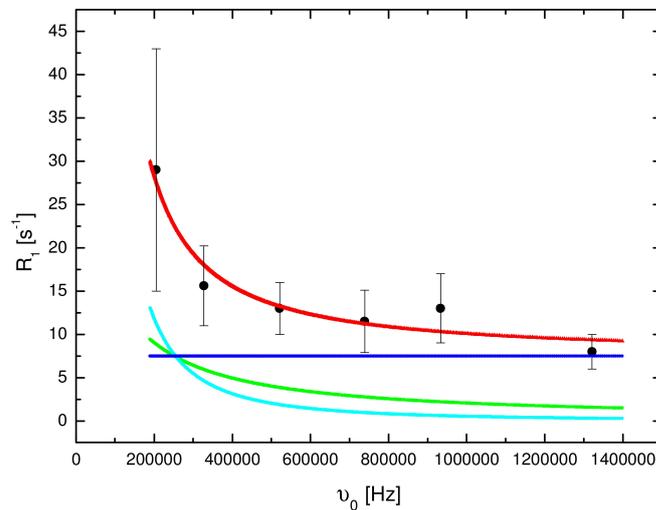


Figura 7.7: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 328K$ con 10 % de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.

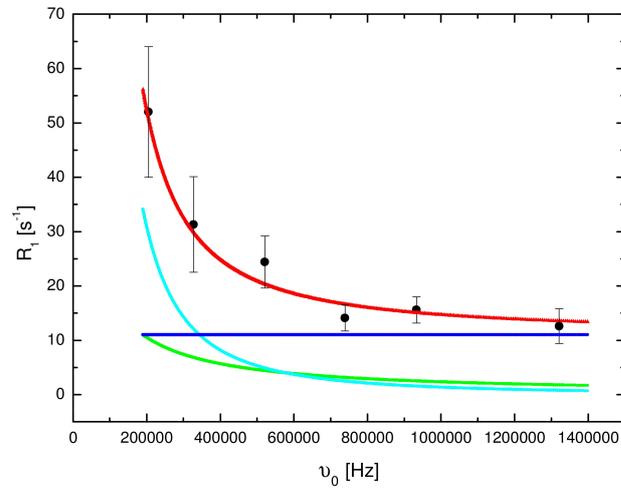


Figura 7.8: Dispersión de la relajación experimental para suspensiones de liposomas de DMPC, con $R_0 = 50nm$, a $T = 328K$ con 20 % de colesterol agregado. La curva de dispersión simulada se muestra en rojo. Se incluyen los mecanismos que contribuyen a la relajación: fluctuaciones de orden (verde), difusión (celeste) y movimientos rápidos (azul). Todos los parámetros usados están dados en la tabla 7.1.

Parámetro	Capítulo 5	Este capítulo
κ	aumenta con el colesterol	aumenta con el colesterol
κ	disminuye con T	disminuye con T
A_{OF}	no varía significativamente	no varía significativamente
A_D	aumenta con el colesterol	aumenta con el colesterol
D	aumenta con T	no presenta cambios
D	disminuye con el colesterol	no presenta cambios
τ_D	aumenta con el colesterol	no presenta cambios
τ_D	disminuye con T	no presenta cambios

Tabla 7.2: Comparación de las tendencias de los parámetros obtenidas de las simulaciones del capítulo 5, donde el experimento se realizó en un amplio rango de frecuencias, y de este capítulo, donde el experimento se realizó en un rango restringido de frecuencias.

resto de los procesos dinámicos.

Capítulo 8

Interacción acústica-director en la fase esméctica A.

Antes de comenzar con el estudio en liposomas, se planificó extender estudios previos de relaxometría magnética nuclear bajo estimulación acústica en cristales líquidos nemáticos a sistemas lamelares, como son por ejemplo los cristales líquidos esmécticos, las membranas biológicas, etc. La motivación para estos estudios era comprender los mecanismos de interacción entre el campo acústico y la membranas. Se realizó un estudio teórico de cómo afecta el ultrasonido a la relajación espín-red en cristales líquidos esmécticos A. En este capítulo se presentan detalles de tal estudio. Se muestra que la interacción entre el campo acústico y el director esméctico puede optimizarse si el campo acústico externo copia un automodo del sistema.

El estudio de la relajación magnética nuclear, simultáneamente con estimulación acústica, provee una nueva herramienta para la investigación de la dinámica colectiva en sistemas mesomórficos, particularmente en estructuras de organización molecular como las que ocurren en fases esmécticas [165]. El sonido puede modificar la orientación de las moléculas en un cristal líquido [166]. El estudio de esta interacción combinada a la técnica de relajación por RMN permite estudiar características dinámicas que toman lugar a nivel microscópico, como así también, conseguir comprender los procesos involucrados. La principal ventaja de este método es la posibilidad de analizar diferentes mecanismos que no pueden diferenciarse por medio de un experimento de relajación normal. Uno de los aspectos fundamentales a comprender es cómo interactúa el campo acústico con la orientación de las moléculas en la fase esméctica. Con respecto a la energía de interacción, ya se ha propuesto un modelo para la fase nemática. La consistencia de este modelo fue verificada a través de experimentos de RMN y de experimentos ópticos [167, 168]. Una extensión de estos resultados a la fase esméctica A mostró ser consistente, sin embargo esta extensión no incluyó las características esenciales de un esméctico [169, 170]. En el transcurso de esta tesis se logró describir la interacción entre el sonido y el director teniendo en

cuenta las características de la naturaleza esméctica [171].

Las variables relevantes en una fase esméctica A son el director \vec{n} y el desplazamiento de las capas u . Estas dos variables interactúan con el campo externo aplicado y una con otra. Haciendo un análisis similar al ya hecho para nemáticos [168], la teoría elástica del continuo establece que \vec{n} y u aparecen como una expansión polinomial que contiene los términos de orden menor, debido a las condiciones de simetría. La energía de interacción para la fase esméctica puede escribirse como:

$$f_s = \zeta_s n_i n_j (\partial_i \partial_j u) + \xi_s n_i n_j (\partial_i u) (\partial_j u) \quad (8.1)$$

donde f_s es la energía de interacción entre los campos acústicos y el director en la fase esméctica A, y ξ_s, ζ_s son las susceptibilidades acústicas esmécticas correspondientes.

Cuando el sistema está sujeto a un campo acústico caracterizado por un vector de onda \vec{k} y una frecuencia ω , se produce un efecto oscilante sobre el desplazamiento de las capas:

$$u(\vec{r}, t) = u_0 \sin(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t). \quad (8.2)$$

Introduciendo esta cantidad en la energía de interacción y promediando sobre oscilaciones rápidas, se tiene que

$$\langle f_s \rangle = \frac{1}{2} \xi_s u_0^2 (\vec{n} \cdot \vec{k})^2 = \frac{1}{2} a^2 (\vec{n} \cdot \vec{k})^2. \quad (8.3)$$

Se encuentra que a^2 está proporcionalmente relacionado con el cuadrado de la amplitud del movimiento de las capas. Entonces, ahora lo interesante es ver si esta cantidad depende de algún parámetro que se pueda manipular externamente, a fines de poder variar a^2 . Es de interés poder variar externamente a^2 , ya que en trabajos previos [169, 170] se observaron cambios en T_1 al variar a^2 . Para esmécticos A, se tiene que una onda de ultrasonido afecta la relajación espín-red de la siguiente forma [170]:

$$T_1 = \beta \left[\frac{1}{\sqrt{D}} \eta_1 K_{11}^{-3/2} Y + j(\omega_L) \right]^{-1} \quad (8.4)$$

donde K_{11} es la constante elástica de deformación (splay), D es la constante de difusión, η_1 una viscosidad, β una constante y

$$Y = \frac{B}{D} \int_0^1 \frac{dx}{\left(\frac{B}{D} (1-x^2) + \frac{K_{33}}{K_{11}} x^2 \right)^{3/2} \sqrt{x^2 - \frac{a^2}{D} + \sqrt{(x^2 - \frac{a^2}{D})^2 + (\frac{\omega_L}{\omega_{s1}})^2}}} \quad (8.5)$$

y

$$j(\omega_L) = \frac{1}{K_{22}K_{33}^{1/2}\sqrt{|D-a^2|}} \frac{1}{\sqrt{\sqrt{1+(\frac{\omega_L}{\omega_{s2}})^2}-1}}}, \quad (8.6)$$

K_{22} y K_{33} son constantes elásticas de torsión y flexión, B es el módulo de compresión y ω_{s1} y ω_{s2} son funciones de D , de a y de las viscosidades.

La densidad de energía libre elástica para una fase esméctica A 3D, la cual tiene una estructura de capas con un orden unidimensional a lo largo de las capas y un comportamiento tipo fluido dentro de las capas, es

$$f_e = \frac{1}{2} \left[B \left(\frac{\partial u}{\partial z} \right)^2 + K \left(\frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} \right)^2 \right] \quad (8.7)$$

$$= \frac{1}{2} [B(\nabla_z u)^2 + K(\Delta_{\perp} u)^2], \quad (8.8)$$

donde B y K son, respectivamente, las constantes de compresión de las capas y elástica de ondulación. La fuerza actuante sobre cada capa consiste de una fuerza elástica, $-\delta f_e/\delta u$, y de una viscosa, $\eta_3 \frac{\delta}{\delta t} \nabla_{\perp}^2 u$, siendo η_3 la viscosidad de corte [172]. Este análisis se planteó con la idea de hacer una vista gruesa del problema, y no intentar una descripción teórica detallada la cual, desafortunadamente, conduce a complicaciones no deseadas. En aproximación lineal, la ecuación de movimiento tiene la forma:

$$\rho \frac{\delta^2 u(\vec{r}, t)}{\delta t^2} = (B \nabla_z^2 - K \Delta_{\perp}^2) u(\vec{r}, t) + \eta_3 \frac{\delta}{\delta t} \nabla_{\perp}^2 u(\vec{r}, t). \quad (8.9)$$

Representando la solución de (8.9) como una onda plana, se obtienen las autofrecuencias del sistema:

$$\omega_{eig} = -iD_q \mp \sqrt{\alpha_q^2 - D_q^2} = -iD_q \mp \omega_0^2 \quad (8.10)$$

$$\text{donde } D_q = \frac{\eta_3 q_{\perp}^2}{2\rho} \text{ y } \alpha_q^2 = \frac{Bq_z^2 + Kq_{\perp}^4}{\rho}.$$

Ahora se considera la solución cuando un dispositivo externo deposita energía acústica en el sistema. Se incluye un término adicional en la energía libre f_a que considera la presión dependiente del espacio y el tiempo $p_a(\vec{r}, t)$ aplicada a las capas esmécticas como una consecuencia del contacto con la fuente acústica externa:

$$f_a = - \int d\vec{r} u(\vec{r}, t) p_a(\vec{r}, t). \quad (8.11)$$

La ecuación de movimiento tiene la forma:

$$\rho \frac{\delta^2 u(\vec{r}, t)}{\delta t^2} = (B \nabla_z^2 - K \Delta_{\perp}^2) u(\vec{r}, t) + \eta_3 \frac{\delta}{\delta t} \nabla_{\perp}^2 u(\vec{r}, t) + p_a(\vec{r}, t). \quad (8.12)$$

La solución de la ecuación de movimiento incluirá una contribución del estado transitorio que depende de las condiciones iniciales. Este término decae con el tiempo y no es de interés aquí. Nosotros solamente estamos interesados en la solución del estado estacionario, independiente de las condiciones iniciales:

$$u(\vec{r}, t) = \text{Re}[u_0 \exp i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)] \quad (8.13)$$

Si se asume que la onda acústica controlada externamente coincide con un auto-modo del sistema, se obtiene:

$$u(\vec{r}, t) = \frac{p_0}{\rho} \frac{1}{\sqrt{(\omega_0^2 + D_q^2 - \omega^2)^2 + (2D_q\omega)^2}} \exp i(\omega t - \vec{k} \cdot \vec{r} + \delta) \quad (8.14)$$

Entonces, se encontró aquí la amplitud de movimiento del plano como función de parámetros propios de los esmécticos y como función de la frecuencia del sonido. Entonces,

$$a^2 = \frac{\xi_s p_0^2}{\rho^2} \frac{1}{(\omega_0^2 + D_q^2 - \omega^2)^2 + (2D_q\omega)^2}. \quad (8.15)$$

El análisis de los resultados puede explicarse a partir de las figuras 8.1 y 8.2. La primera muestra una simulación de a^2 en función de la frecuencia del sonido. Se observa que la intensidad de la interacción entre el sonido y el director puede ser controlada variando la frecuencia acústica. Claramente se ve la presencia de una resonancia, donde la interacción entre el sonido y el director esméctico toma su máximo valor. De ese gráfico se han tomado tres puntos, a fin de visualizar el efecto de la aplicación del sonido sobre T_1 (figura 8.2). Las funciones simuladas representan T_1 sin sonido aplicado, y T_1 con tres valores diferentes de frecuencias acústicas aplicadas (son las respectivas a la figura 8.1). T_1 se graficó como función de la frecuencia de Larmor. Se observa que para la resonancia el alejamiento con respecto a la curva sin sonido es mayor. Estos resultados sugieren que es posible detectar tal resonancia mediante el estudio de la dispersión de T_1 en función de la frecuencia de Larmor.

La extensión de este resultado a una membrana unilamelar es un tema pendiente, pero su aplicación a sistemas multilamelares es casi directa. Una razón para el estudio de cómo interactúa el campo acústico con un sistema unilamelar, se relaciona a la posibilidad de modular la permeabilidad de la membrana o comprender posibles mecanismos de sonoporación reversible o ruptura. Sin embargo, un paso previo fundamental para lograr dicho entendimiento es el conocimiento cabal de la dinámica y propiedades de orden molecular subyacentes. Como ya se dijo, al comenzar estos estudios se verificó que dicha información no existía en forma consistente en la literatura. Así es que finalmente, esta tesis se centró principalmente en este aspecto.

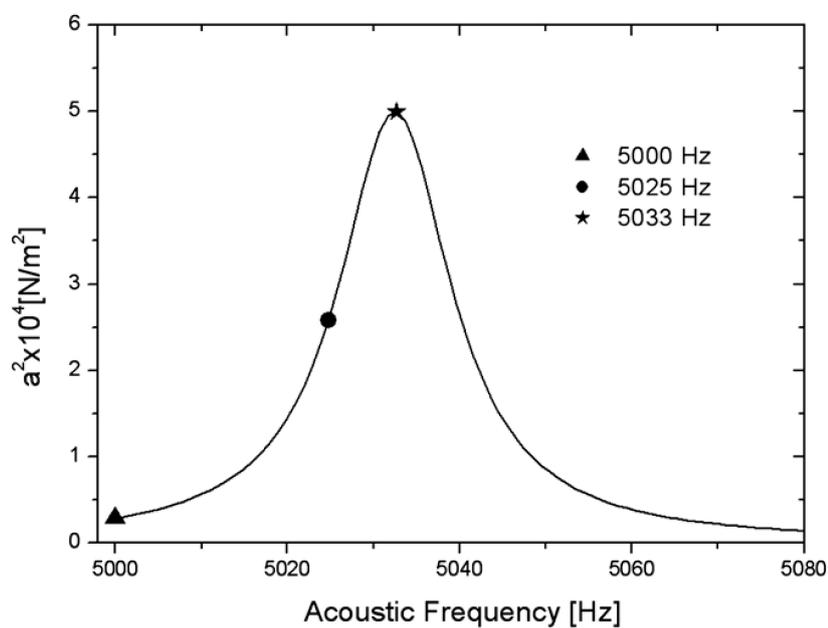


Figura 8.1: Simulación de a^2 como función de la frecuencia del campo acústico externo en resonancia. Tres frecuencias diferentes se indican: lejos de resonancia, a la mitad del máximo y en el máximo.

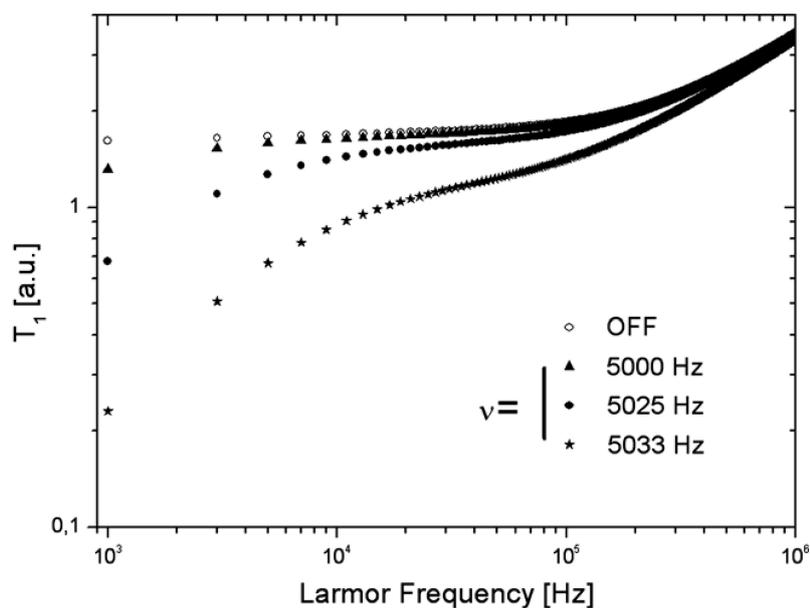


Figura 8.2: Dispersión en frecuencia de Larmor de bajo sonicación simulada para la fase esméctica A.

Capítulo 9

Conclusiones.

Como se mencionó anteriormente, originalmente se planificó extender estudios previos de relaxometría magnética nuclear bajo estimulación acústica en cristales líquidos nemáticos a sistemas lamelares, como son por ejemplo los cristales líquidos esmécticos, las membranas biológicas, etc. En el capítulo 8 se describió el estudio teórico del papel que juega el ultrasonido en la relajación espín-red en cristales líquidos esmécticos A. Luego, a los fines de evitar interacción entre planos esmécticos, se desvió la atención a liposomas de membranas biológicas. Para poder comprender la naturaleza de las interacciones entre el campo acústico y las propiedades mesoscópicas de un sistema, es imperativo conocer previamente los detalles de la dinámica molecular subyacente. Se observó que la dinámica de los lípidos no estaba para nada caracterizada en forma consistente en la literatura. La mayoría de las técnicas experimentales utilizadas sólo permitían observar un determinado proceso y en una escala de tiempos restringida. A partir de allí, el problema pasó a ser el estudio de dicha dinámica, utilizando técnicas de relaxometría que permiten barrer fácilmente 4 órdenes de magnitud en escalas de tiempo. Luego, estos estudios revelaron la potencialidad de la técnica experimental usada para la determinación de las propiedades elásticas de la membrana. En este capítulo se resume lo obtenido a partir del estudio de la dinámica molecular en membranas lipídicas de liposomas.

Se ha desarrollado un método sistemático basado en evidencia para la interpretación de los movimientos en sistemas simples de membranas. Se encontró que los datos de relajación de 1H para liposomas pueden ser interpretados en términos de fluctuaciones de orden (inducidas por las fluctuaciones de forma de la lipósfera), difusión traslacional sobre una superficie curva, difusión rotacional y dinámica molecular rápida, los cuales son todos físicamente consistentes con experimentos independientes. Se encontró también que la inclusión de una correlación cruzada entre los diferentes modos dinámicos no se requiere para reproducir los datos experimentales, los cuales soportan fuertemente la suposición que éstas son contribuciones menores a la densidad espectral total. El método propuesto minimiza el número de compo-

nentes incluidos en la interpretación permitiendo un análisis sencillo y contrastable con resultados obtenidos mediante otras técnicas experimentales.

La consistencia del método fue demostrada en liposomas de diferente composición, con diferentes contenidos de colesterol, de diferentes tamaños y a diferentes temperaturas. El éxito de nuestra propuesta en reproducir las dispersiones de la relajación experimentales demostró que nuestro método es sensible principalmente a diferencias en κ y D . La literatura sugiere que disolviendo otros lípidos o soluciones lipofílicas en bicapas lipídicas alteran significativamente ambas propiedades [60, 129]. Por lo tanto, la aplicación de nuestra propuesta a sistemas de liposomas de composición más compleja, puede dar nuevas ideas en la influencia del tipo de lípido sobre las propiedades y las funciones de la membrana.

Una consecuencia importante de este trabajo fue que nos permitió descubrir que colectando datos en un rango muy restringido de frecuencias, se puede obtener (con cierta precisión) información importante de las propiedades elásticas de los liposomas (tema de alto impacto para la industria farmacéutica). Esta observación nos llevó a realizar nuevos experimentos, ahora en un rango de frecuencias de 200 kHz a 2 MHz. Estos datos experimentales fueron analizados con una versión simplificada del modelo propuesto. Se obtuvo que hay ciertos parámetros que no son muy sensibles en esta escala de tiempos restringida, pero nuestro parámetro de interés (la constante elástica de flexión) sí resultó sensible. Esto daría lugar a la idea de construir un equipo simplificado, que trabaje en un rango de frecuencias restringido, y que junto con un análisis simple permitiría medir la constante elástica de flexión en liposomas de radios incluso menores a los 200 nm.

En resumen:

- Se analizó teóricamente el comportamiento de una fase esméctica termotrópica en presencia de campo acústico, observándose la posible existencia de una resonancia hidrodinámica. La extensión de este resultado a una vesícula multilamelar, y con ciertos cambios no explorados aún a sistemas unilamelares, podría derivar en un mecanismo de control de permeabilidad o ruptura de la membrana.
- Se caracterizó la dinámica molecular de lípidos simples en vesículas unilamelares. Puede decirse que por primera vez se discutieron los procesos dinámicos en forma integral, consistente a su vez con estudios previos de experimentos independientes de otros autores utilizando diferentes técnicas experimentales.
- El modelo propuesto para la interpretación de los resultados demostró ser robusto y consistente para liposomas con diferentes formulaciones, tamaños, temperatura y contenido de colesterol. El trabajo sienta las bases para el uso de

la técnica de relaxometría magnética nuclear con ciclado rápido de campo en liposomas.

- Se demostró que la técnica puede ser exitosamente aplicada para el estudio de las propiedades elásticas de vesículas unilamelares, limitando las mediciones a un rango restringido de frecuencias (0.2MHz-2MHz).
- Este último resultado sugiere la posibilidad de desarrollar un instrumento especial simplificado que opere solamente en dicho rango de frecuencias.

Capítulo 10

Publicaciones

- Perlo J. y Anoardo E., Estudio de campos locales residuales mediante relaxometría magnética nuclear en el sistema rotante, *Revista Mexicana de Física*, **52** (2006) 230-237.
- Perlo J. y Anoardo E., Fixed lock-time relaxation dispersion in the rotating frame, *Journal of Magnetic Resonance*, **181** (2006) 262-270.
- Perlo J., Aguirre L. E., Revelli J. y Anoardo E., On the acoustic-director interaction in the smectic-A phase, *Chemical Physics Letters*, **450** (2007) 170-174.
- Meledandri C., Perlo J., Farrher E., Brougham D. F. y Anoardo E., Interpretation of Molecular Dynamics on Different Timescales in Unilamellar Vesicles using Field-Cycling NMR Relaxometry, *Journal of Physical Chemistry B*, **113** (2009) 15532-15540.
- Perlo J., Meledandri C., Anoardo E. y Brougham D. F., Temperature and size-dependence of membrane molecular dynamics in unilamellar vesicles. A fast field-cycling NMR relaxometry study, *Journal of Physical Chemistry B*, en prensa.

Bibliografía

- [1] P. G. de Gennes and J. Prost, *The Physics of the Liquid Crystal*, Clarendon Press, Oxford, 2 (nd) Edition (1993).
- [2] Weger M., Cabane B., *J. Phys. Colloq.* **30** (1969) C4.
- [3] Pincus P., *Solid State Commun.* **7** (1969) 415.
- [4] Vertogen G. y de Jeu W., *Thermotropic Liquid Crystals*. Springer-Verlag. Berlin (1988).
- [5] Chandrasekhar S., *Liquid Crystals*. Cambridge University - Cambridge (1992).
- [6] Quist P., Blom I y B. Halle, *J. Magn. Reson.* **100** (1992) 267.
- [7] Khüner W., Rommel E. y F. Noack, *Z. Naturforschung* **42a** (1987) 127.
- [8] E. Rommel, F. Noack, P. Meier and G. Kothe, *J. Phys. Chem.* **92**, 2981 (1988).
- [9] Gawrisch K., *The Structure of Biological Membranes. The Dynamics of Membrane Lipids*; Yeagle P. L., Ed.; CRC Press: New York, 2005, p. 540.
- [10] Abragam A., *The Principles of Nuclear Magnetism*, Oxford U. P., London (1961).
- [11] Kimmich R. y Anorado E., *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* **44** (2004) 257.
- [12] Perlo J. and Anorado E., *Revista Mexicana de Física* **52** (2006) 230.
- [13] Perlo J. and Anorado E., *J. Magn. Reson.* **181** (2006) 262.
- [14] Wachowics M., Jurga S. y Vilfan M., *Phys. Rev. E*, **70** (2004) 031701.
- [15] Lipari G. y Szabo A., *J. Am. Che. Soc.* **104**, 4546 (1982).
- [16] Lipari G. y Szabo A., *J. Am. Che. Soc.* **104**, 4559 (1982).
- [17] Blinc R., Hogenboom D. L., O'Reilly D. E. y Peterson E.M., *Phys. Rev. Lett.* **23** (1969) 969.
- [18] Marqusee J. A., Warner M. y Dill K., *J. Chem. Phys.* **81** (1984) 6404.

- [19] Vilfan M., Althoff G., Vilfan I. y Kothe G., Phys. Rev. E. **64** (2001) 022902.
- [20] Halle B., J. Chem. Phys. **94** (1991) 3150.
- [21] Degiorgio V., Piazza R. y Jones R. B., Phys. Rev. E. **52** (1995) 2707.
- [22] W. H. De Jeu and G. Vertogen, Thermotropic Liquid Crystals: Fundamentals, Springer Verlag, Berlin (1988).
- [23] Charvolin J. y Tardieu A., Solid State Physics, Supplement **14** (1978) 207.
- [24] Kheirilomoon A., Dayton P. A., Lum A. F. H., Little E., Paoli E. E., Zheng A. and Ferrara K. W., J. Controlled Release **118** (2007)275.
- [25] Membrane Spectroscopy; E. Grell, Ed.; Springer Verlag: Berlin, 1981.
- [26] Kornberg R. D. y McConnell H. M., Biochemistry **10** (1971) 1111.
- [27] Regev R., Yeheskely-Hayon D., Katzir H. y Eytan G. D., Biochem. Pharm. **70** (2005) 161.
- [28] Vist M. R. y Davis J. H. Biochemistry **29** (1990) 451.
- [29] Oldfield E., Meadows M., Rice D. y Jacobs R., Biochemistry **17** (1978) 2727.
- [30] Blume A. y griffin R. G., Biochemistry **21** (1982) 6230.
- [31] Ipsen J. H., Mouritsen O. G. y Bloom M., Biophys. J. **57** (1990) 405.
- [32] Pastor R. W., Venable R. M. y Karplus M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA **88** (1991) 892.
- [33] Pastor R. W. y Feller S. E., Time scales of lipid dynamics and molecular dynamics, en Biological Membranes: A molecular Perspective from Computation and Experimental. Eds. Merz K. M. y Roux B., Boston (1996), 3.
- [34] Feller S. E., Molecular Dynamics simulation of phospholipids bilayers. In *Lipid Bilayers*. Eds. Katsaras J. y Gutberlet T., Springer, New York (2000), 89.
- [35] Egberts E. y Berendsen H. J. C., J. Chem. Phys. **98** (1988) 1712.
- [36] Heller H., Schaefer M. y Schulten K., J. Phys. Chem. **97** (1993) 8343.
- [37] Pastor R. W., Curr. Opin. Struct. Biol. **4** (1994) 486.
- [38] Tieleman D. P., Marrink S. -J. y Berendsen H. J. C., Biochim. Biophys. Acta **1331** (1997) 235.
- [39] Scott H. L., Curr. Opin. Struct. Biol. **12** (2002) 495.
- [40] Hofsäß C., Lindahl E. y Edholm O., Biophys. J. **84** (2003) 21921.

- [41] Latorre R., López-Barneo J., Bezanilla F. y Llinás R., *Biofísica y fisiología celular*, Universidad de Sevilla, España-Printer, España, 1996.
- [42] Noack F., Notter M. y Weiss W., *Liquid Crystals* **3** (1988) 907.
- [43] de Kruijff B. y Wirtz K. W. A., *Biochem. Biophys. Acta* **255** (1977) 311.
- [44] Kornberg R. D. y McConnell H. M., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68** (1971) 2564.
- [45] Lee A. G., Birdsall N. J. M. y Metcalfe J. C., *Biochemistry* **12** (1973) 1650.
- [46] Torrey H. C., *Phys. Rev.* **22** (1953) 962.
- [47] Resing H. A. y Torrey H. C., *Phys. Rev.* **131** (1963) 1102.
- [48] Saffman P. G. y Delbruck M., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72** (1975) 3111.
- [49] Tamm L. K. y McConnell H. M., *Biophys. J.* **47** (1985) 105.
- [50] Almeida P. F. F., Vaz W. L. C. y Thompson T. E. *Biochemistry* **31** (1992) 6739.
- [51] Almeida P. F., Vaz W. L. y Thompson T. E., *Biophys. J.* **88** (2005) 4434.
- [52] Haro-Pérez C., Quesada-Pérez M., Callejas-Fernández J., Casals E., Estelrich J. e Hidalgo-Alvarez R., *J. Chem. Phys.* **119** (2003) 628.
- [53] Przybylo M., Sýkora J., Humpolíčková J., Benda A., Zan A. y Hof M., *Langmuir* **22** (2006) 9096.
- [54] McMullen T. P. W. y McElhaney R. N., *Biochim. Biophys. Acta* **1234** (1995) 90.
- [55] Prenner E. J., Lewisa R. N. A. H, Kondejewska L. H., Hodgesa R. S. y McElhaneya R. N., *Biochim. Biophys. Acta* **1417** (1999) 211.
- [56] Lohnera K. y Prenner E. J., *Biochim. Biophys. Acta* **1462** (1999) 141.
- [57] Kahya N., Scherfeld D., Bacia K. y Schwille P., *J. Struc. Biol.* **147** (2004) 77.
- [58] Kahya N., Scherfeld D., Bacia K., Poolman B. y Schwille P., *J. Biol. Chem.* **278** (2003) 28109.
- [59] Scherfeld D., Kahya N. y Schwille P. J., *Biophys. J.* **85** (2003) 3758.
- [60] Filippov A., Oräd G. y Lindblom G., *Biophys. J.* **84** (2003) 3079.
- [61] Filippov A., Oräd G. y Lindblom G., *Biophys. J.* **93** (2007) 3182.
- [62] Devaux P. y McConnell H. M., *J. Amer. Chem. Soc.* **94** (1972) 4475.
- [63] Rubenstein J. L. R., Smith B. A. y McConnell H. M., *Proc. Natl. Aca. Sci. USA.* **76** (1979) 15.

- [64] Alecio M. R., Golan D. E., Veatch W. R. y Rando R. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **79** (1982) 5171.
- [65] Korlach J., Schwille P., Webb W. W. y Feigenson G. W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96** (1999) 8461.
- [66] Henriksen J., Rowat A. C. e Ipsen J. H., Eur. Biophys. J. **33** (2004) 732.
- [67] Duwe H. P., Kaes J. y Sackmann E., J. Phys. France **51** (1990) 945.
- [68] Duwe H. P. y Sackmann E., Physica A **63** (1990) 410.
- [69] Evans E. y Rawicz W., Phys. Rev. Lett. **64** (1990) 2094.
- [70] Niggeman G., Kummrow M. y Helfrich W., Phys. II Fr. **5** (1995) 413.
- [71] Noack F., Progr. NMR Spectrosc. **18** (1986) 171.
- [72] Kimmich R. y Weber H. W., Phys. Rev. B, **47** (1993)788.
- [73] Kimmich R., Schnur G. y Scheuermann, Chem. Phys. Lipids **32** (1983) 271.
- [74] Kühner W., Rommel E., Noack F. y Meier P., Z. Naturforsch A **42** (1987)127.
- [75] Stohrer J., Gröbner G., Deimer D., Weisz K., Mayer C. y Kothe G. J. Chem Phys., **95** (1991)672.
- [76] Struppe J., Noack F. y Klose G., Z. Naturforsch A **52** (1997) 681.
- [77] Brown M. F., J. Chem. Phys. **80** (1984) 2808, 2832.
- [78] Brown M. F., Ellena J. F., trindle C. y Williams G. D., J. Chem. Phys. **84** (1986) 465.
- [79] Halle B., Phys. Rev. E **50** (1994) R2415.
- [80] Brown M. F., J. Chem. Phys. **77** (1982) 1576.
- [81] de Gennes P. G., The Physics of Liquid Crystals (Clarendon, Oxford, 1974).
- [82] Anoardo E., Bonetto F. y Kimmich R., Phys. Rev. E **68** (2003) 022701.
- [83] Jarrel H. C., Smith I. C. P., Jovall P. A., Mantsch H. y Siminovitch D. J., J. Chem. Phys. **88** (1988) 1260.
- [84] Bloom M. y Sternin E., Biochemistry **26** (1987) 2101.
- [85] Lee K. W., Lee C. H., Oh D. K., Kang J. K., Lee C. E. y Kim J., Phys. Rev. E **64** (2001) 042903.
- [86] Althoff G., Frezzato D., Vilfan M., Stauch O., Schubert R., Vilfan I., Moro G. J. y Khote G., J. Phys. Chem. B **106** (2002) 5506.

- [87] Althoff G., Stauch O., Vilfan M., Frezzato D., Moro G. J., Hauser P., Schubert R. y Khote G., *J. Phys. Chem. B* **106** (2002) 5517.
- [88] Müller M. y Schick M., *J. Chem. Phys.* **105** (1996) 8282.
- [89] Goetz R., Gompper G. y Lipowsky R., *Phys. Rev. Lett.* **82** (1999) 221.
- [90] Werner A., Müller M., Schmid F. y Binder K., *Phys. Rev. E* **59** (1999) 728.
- [91] Werner A., Müller M. y Schmid F., *J. Chem. Phys.* **110** (1999) 5370.
- [92] Marrink S. J. y Mark A. E., *J. Chem. B.* **105** (2001) 6122.
- [93] Loison C., Mareschal M., Kremer K. y Schmid F., *J. Chem. Phys.* **119** (2003) 13138.
- [94] Dailant J., Bellet-Amalric E., Braslau A., Charitat T., Fragneto G., Graner F., Mora S., Rieutord F. y Stidder B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (2005) 11639.
- [95] Brown M. F., Seelig J. y Häberlen, *J. Chem. Phys.* **70** (1979) 5045.
- [96] Petersen N. O. y Chan S. I., *Biochem.* **16** (1977) 2657.
- [97] Lange A., Marsh D., Wassmer K-H., Meier P. y Kothe G., *Biochem.* **24** (1985) 4383.
- [98] Freed J. H., *J. Chem. Phys.*, **66** (1977) 4183.
- [99] Wölfel W., Noack F. y Stroker M., *Z. Natureforsch Teil A* **30** (1975) 437.
- [100] Pusiol D. y Noack F., *Liquid Crystals* **5** (1989) 377.
- [101] Brown M. F., Ribeiro A. A. y Williams G. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (1983) 4325.
- [102] Kroon P. A., Kainosho M. y Chan S. I., *Biochim. Biophys. Acta* **433** (1976) 282.
- [103] Brown M. F. y Davis J. H., *Chem. Phys. Lett.* **79** (1981) 431.
- [104] Jeffrey K. R., Wong T. C., Burnell E. E., Thompson M. J., Higgs T. P. y Chapman N. R., *J. Magn. reson.* **36** (1978) 151.
- [105] Halle B., Jóhannesson H. y Venu K., *J. Magn. Reson.* **135** (1998) 1.
- [106] King R. y Jardetzky O., *Chem. Phys. Lett.* **55** (1978) 15.
- [107] Blinc R., Luzar M., Vilfan M. y Burgar M., *J. Chem. Phys.* **63** (1975) 3445.
- [108] Blinc R., Vilfan M., Luzar M., Seliger J. y Zagar V., *J. Chem. Phys.* **68** (1978) 303.

- [109] Lindblom G., Wennerström H. y Arvidson G., *Int. J. Quantum Chem.* **S2** (1977) 153.
- [110] Bloom M., Evans E. y Mouritsen O. G., *Q. Rev. Biophys.* **24** (1991) 293.
- [111] Lindblom G. y G. Orädd G., *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **26** (1994) 483.
- [112] Halle B., Wennerström H. y Piculell L., *J. Phys. Chem.* **88** (1984) 2482.
- [113] Halle B. y Wennerström H., *J. Chem. Phys.* **75** (1981) 1928.
- [114] Halle B., *Mol. Phys.* **53** (1984) 1427.
- [115] Kimmich R. *NMR Tomography, Diffusometry, Relaxometry*, Springer, Berlin (1997) page 140.
- [116] Fukushima E. y Roeder S. B. W., *Experimental pulse NMR*, Addison-Wesley, Massachusetts (1997).
- [117] Koynova R. y Caffrey M., *Biochim. Biophys. Acta* **1376** (1998) 91.
- [118] *Handbook of Chemistry and Physics*, 74th ed.; D. Lide; 1993-1994.
- [119] Umegawa Y., Matsumori N., Oishiv T. y Murata M., *Biochemistry* **47** (2008) 13463.
- [120] Duwe H. P. y Saffman P. G., *Physica A* **163** (1990) 410.
- [121] Mishra V. K., Anantharamaiah G. M., Segrest J. P., Palgunachari M. N. y Chaddha M., *J. Biol. Chem.* **281** (2006) 6511.
- [122] Lindahl E. y Edholm O. J., *J. Phys. Chem. B* **115** (2001) 4938.
- [123] Tristam-Nagle S., Petrache H. I. y Nagle J. F., *Biophys. J.* **75** (1998) 917.
- [124] Liu Y. y Nagle J. F., *Phys. Rev. E* **69** (2004) 040901.
- [125] Nagle J. F. y Tristam-Nagle S., *Biochim. Biophys. Acta* **1469** (2000) 159.
- [126] Alves M. y Peric M., *Biophys. Chem.* **122** (2006) 66.
- [127] Pan J., Tristam-Nagle S., Kucerka N. y Nagle J. F., *Biophys. J.* **94** (2008) 117.
- [128] Rawicz W., Olbrich K. C., McIntosh T., Needham D. y Evans E., *Biophys. J.* **79** (2000) 328.
- [129] Chen Z. y Rand R. P., *Biophys. J.* **73** (1997) 267.
- [130] Yi Z., Nagao M. y Bossev D. P., *J. Phys.: Cond. Matt* **21** (2009) 155104.

- [131] Méléard P., gerbeaud C., Pott T., Fernandez-Puente L., Bivas I., Mitov M. D., Dufourcq J. y Bothorel P., *Biophys. J.* **72** (1997) 2616.
- [132] Sackmann E y Lipowsky R., *Handbook of Biological Physics*, Elsevier Science B.V. (1995) capítulo 5.
- [133] Evans E. A., *Biophys. J.* **14** (1974) 923.
- [134] Szleifer I., Kramer D., Ben-Shaul A., Gelbart W. M. y Safran S. A., *J. Chem. Phys.* **92** (1990) 6800.
- [135] Petrov A. G., Mitov M. D. y deizhanski A. I., Edge energy and pore stability in bilayer lipid membranes, in: *Advances in Liquid Crystal Research and Application*, ed. L. Bata (Pergamon Press, Oxford), 1980.
- [136] Petrov A. G. y Bivas I., Elastic and flexoelectric aspects of out-of-plane fluctuations in biological and model membranes, in: *Progress in Surface Science*, **16**, ed. S. G. Davison (Pergamon Press, Oxford) pp.389-512 (1984).
- [137] Buldt G., et al, *Nature (London)* **271** (1978) 182.
- [138] Janiak M. J., et al, *J. Biol. Chem.* **254** (1979) 6068.
- [139] Lemmich J. *et al*, *Phys. Rev. E* **53** (1996) 5169.
- [140] Leikin S., Kozlov M. M., Fuller N. L. y Rand R. P., *Biophys. J.* **71** (1996) 2623.
- [141] Fuller N. y Rand R. P., *Biophys. J.* **81** (2001) 243.
- [142] Fuller N., Benatti C. R. y Rand R. P., *Biophys. J.* **85** (2003) 1667.
- [143] Tristram-Nagle S. y Nagle J. F., *Biophys. J.* **93** (2007) 2048.
- [144] Heaton N., Reimer D. y Kothe G., *Chem. Phys. Lett.* **195** (1992) 448.
- [145] Needham D. y Evans E., *Biochemistry* **27** (1988) 8261.
- [146] Zhelev D. V., et al, *Biophys. J.* **67** (1994) 720.
- [147] Engelhardt H., Duwe H. P. y Sackmann E., *J. Phys. Lett.* **46** (1985) 395.
- [148] Bivas I., Hanusse P., Bothorell P., Lalanne J. y Aguerre-Chariol O., *J. Physique* **48** (1987) 855.
- [149] Mitov M. D., et al, *Advances in Supramolecular Chemistry*, edited by G. W. Gokel (JAI Press, Greenwich, 1992), **2**, pp 93-139.
- [150] Zilker A., et al., *Phys. Rev. A* **46** (1992) 7998.
- [151] Vitkova V., Meleard P. y Pott T., *Eur. Biophys. J.* **35** (2006) 281.
- [152] Häckl W., Seifert U. y Sackmann E., *J. Physique II* **7** (1997) 1141.

- [153] Shao Z. y Yang J., *Q. Rev. Biophys.* **28** (1995) 195.
- [154] Delorme N. y Fery A., *Phys. Rev. E* **74** (2006) 030901(R).
- [155] Dimova R., et al. *Biophys. J.* **79** (2000) 340.
- [156] Lee C. H. y Wang J., *Opt. Commun.* **135** (1997) 233.
- [157] Lee C. H., Lin W. C. y wang J., *Phys. Rev. E* **64** (2001) 020901(R).
- [158] Helfrich W., *Z. Naturforsch* **28** (1973) 693.
- [159] Caillé A., *C. R. Acad. Sc. Paris: Ser. B* **274** (1972) 891.
- [160] Als-Nielsen J., Litster J. D., Birgeneau R. J., Kaplan M., Safinya C. R., Lindergaard-Andersen A. y Mathiesen S., *Phys. Rev. B* **22** (1980) 312.
- [161] Nagle J. F., Zhang R., Tristram-Nagle S., Sun W., Petrache H. y Suter R. M., *Biophys. J.* **70** (1996) 1419.
- [162] Zilman A. y Granek R., *Phys. Rev. Lett.* **77** (1996) 4788.
- [163] Zilman A. y Granek R., *Phys. Rev. Lett.* **284** (2002) 195.
- [164] Velikov K., Dietrich C., Hadjiisky A., Danov K. y Pouligny B., *Europhys. Lett.* **40** (1997) 405.
- [165] Anoardo E. y Bonetto F. en *Modern Magnetic Resonance*, G. A. Webb Ed., Springer (2006).
- [166] Helfrich W., *Phys. Rev. Lett.* **29** (1972) 1583.
- [167] Bonetto F., Anoardo E. y Kimmich R., *Chem. Phys. Lett.* **361** (2003) 237.
- [168] Selinger J., Spector M., Greanya V., Weslowsky B., Shenoy D. y Shashidhar R., *Phys. Rev. E* **66** (2002) 051708.
- [169] Bonetto F. y Anoardo E., *Phys. Rev. E* **68** (2003) 021703.
- [170] Bonetto F. y Anoardo E., *J. Chem. Phys.* **121** (2004) 554.
- [171] Perlo J., Aguirre L. E., Revelli J. y Anoardo E., *Chem. Phys. Lett.* **450** (2007) 170.
- [172] P. C. Martin, O. Parodi and P. S. Pershan, *Phys. Rev. A* **6** 2401 (1972).