

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE MATEMÁTICA, ASTRONOMÍA, FÍSICA Y COMPUTACIÓN

---

SERIE “A”

**TRABAJOS DE FÍSICA**

N.º 15/2018

**CARACTERIZACIÓN DE LA PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS UTILIZANDO RELAXOMETRÍA  
MAGNÉTICA NUCLEAR**

**María B. Marzola, Carla C. Fraenza, Esteban Anoardo**



Editor: Miguel A. Chesta

---

CIUDAD UNIVESITARIA – 5000 CÓRDOBA

REPÚBLICA ARGENTINA

# Caracterización de la preparación de liposomas utilizando Relaxometría Magnética Nuclear

M. B. Marzola Coronel, C. C. Fraenza E. Anardo

Laboratorio de Relaxometría y Técnicas Especiales, Grupo de RMN

Facultad de Matemática, Astronomía y Física, Universidad Nacional de Córdoba

M. Allende y H. de la Torre - Ciudad Universitaria, X5016LAE - Córdoba, Argentina

## Resumen

*Este trabajo de investigación consistió en caracterizar cada paso de la preparación de liposomas utilizando la técnica de relaxometría con ciclado rápido de campo magnético. Para ello, se midieron perfiles de dispersión de la tasa de relajación espín-red  $R_1$  en cada una de las instancias relevantes de la preparación, verificando la efectividad de las mismas. Adicionalmente, se realizaron experimentos complementarios con la técnica de dispersión dinámica de luz o DLS por sus siglas en inglés.*

## Abstract

*This work consisted in characterizing each step of the liposome preparation using the fast field-cycling NMR relaxometry technique. The dispersion profiles of the spin-lattice relaxation rate  $R_1$  were measured for every relevant instance of the preparation in order to check their effectiveness. Additionally, experiments using dynamic light scattering (DLS) technique were carried out.*

## 1. Introducción

**L**as propiedades de la membrana de vesículas lipídicas, comunmente llamadas liposomas, resultan de particular interés en una creciente cantidad de problemas biotecnológicos. La importancia de estudiar este tipo de sistemas es su utilidad para el transporte controlado por diferentes vías, de fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos en su núcleo acuoso y bicapa lipídica respectivamente, así como también para contrastes, transfección, etc.

En trabajos previos [1], [2], [3], [4], [5] se presentó un modelo para interpretar la dispersión de la tasa de relajación espín-red de protones, obtenida con la técnica de relaxometría magnética nuclear con ciclado rápido de campo magnético (o FFC por sus siglas en

inglés) [6], para liposomas unilamelares. Además de proporcionar información general sobre la dinámica de los lípidos que conforman la membrana de los liposomas, este modelo nos permite inferir sobre las propiedades elásticas de la misma. La técnica utilizada ofrece dos potenciales ventajas escasamente exploradas a la fecha: es factible extender los estudios a sistemas de escalas de pocas decenas de nanómetros en forma no invasiva, y es posible pensar en instrumentación de costo razonable, volumen y peso limitado, facilidad de instalación, así como mantenimiento y uso. Por lo que se ha demostrado que es de gran utilidad estudiar estos sistemas con la técnica de FFC.

Específicamente el objetivo de este trabajo fue la verificación de la sensibilidad de la técnica con ciclado rápido de campo a las distintas

instancias de la preparación de liposomas con el fin de asegurar la efectividad de los diversos procesos a los que el sistema es sometido.

## 2. Sistema de estudio: Liposomas

Un lípido es una molécula orgánica compuesta principalmente por carbono e hidrógeno y en menor medida oxígeno. También pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno.

Como en aplicaciones biológicas el solvente utilizado es agua, se puede decir que los *lípidos anfifílicos* son un tipo de lípidos que consisten de una parte hidrofóbica y una parte hidrofílica. En general, la parte hidrofóbica consiste de cadenas hidrocarbonadas, mientras que la parte hidrofílica está compuesta por un grupo polar. Dentro de esta clase de lípidos se encuentran los *fosfolípidos*, los cuales están compuestos por una molécula de glicerol, a la que se unen dos ácidos grasos y un grupo fosfato. Este último está unido a otro grupo de átomos, entre los que generalmente está incluido un nitrógeno, como es el caso del grupo colina, a base del cual se forman las fosfatidilcolinas.

Los fosfolípidos poseen una función estructural ya que son un componente principal de todas las membranas celulares debido a su capacidad de formar bicapas lipídicas [7]. En este trabajo se utilizó un fosfolípido particular llamado fosfatidilcolina de soja (SPC) adquirido de la empresa "Lipoid" con el nombre comercial "PHOSPHOLIPON 90 G" y cuya especie predominante es en un 94 %  $C_{42}H_{80}NO_8P$  con cadenas doblemente insaturadas y, en un 4 %, Lisofosfatidilcolina ( $C_{25}H_{50}NO_7P$ ). En la figura 1 se esquematiza la estructura de la especie predominante:

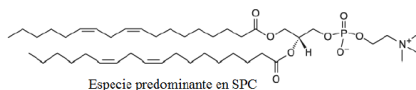


Figura 1: Estructura molecular de la fosfatidilcolina de soja (SPC). En el extremo derecho se observan los grupos polares, y en el extremo izquierdo se muestran las cadenas apolares.

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

Para determinadas concentraciones en un medio acuoso, los fosfolípidos forman bicapas que se curvan y se cierran espontáneamente en estructuras cuasi-esféricas llamadas liposomas, los cuales encierran en su interior parte del solvente que los rodea. Tales sistemas no están en equilibrio termodinámico pero pueden ser estables durante varios días. El tamaño de un liposoma puede ir desde unos 20nm hasta varios micrómetros de radio, y puede estar compuesto de una (unilamelar) o varias membranas concéntricas (multilamelar), cada una de las cuales tiene aproximadamente 6nm de espesor. En la figura 2 se esquematiza un liposoma.

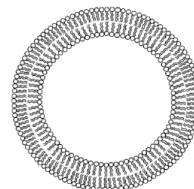


Figura 2: Representación esquemática de un liposoma. Los círculos representan los grupos polares mientras que las líneas onduladas hacen referencia a las cadenas hidrocarbonadas.

## 3. Experimental

### I. Preparación de la muestra

Se prepararon liposomas de SPC (Fosfatidilcolina de Soja) suspendidos en agua deuterada ( $D_2O$ ). Se procuró que el diámetro de los mismos no supere los 100nm por la aplicabilidad deseada.

Las suspensiones de liposomas fueron preparadas en el Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), de la facultad de ciencias químicas, UNC, en la ciudad de Córdoba.

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

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

#### Pasos de la preparación

##### 1. PESAJE

Se utilizó una balanza digital “HR-120” (A&D Weighing) con una apreciación de 0,0001g. El pesaje se realizó colocando el material dentro de un tubo cónico de vidrio de peso conocido. La masa total que se utilizó en todos los experimentos fue:  
 $M_{lip} = (61,19 \pm 0,05)mg$

##### 2. DISOLUCIÓN

Los lípidos se disolvieron en 2ml de cloroformo aproximadamente.

##### 3. FORMACIÓN DEL “FILM”

Se secó el solvente con una corriente de nitrógeno gaseoso, mientras se maniobraba el recipiente de tal forma de facilitar la adhesión de los lípidos a las paredes del mismo durante el secado del solvente, formandose un film.

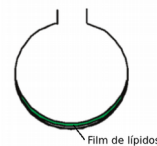


Figura 3: Representación esquemática de la formación del film dentro del recipiente.

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

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

#### 4. HIDRATACIÓN

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



Figura 4: Representación esquemática del proceso de hidratación.

#### 5. TRATAMIENTO TÉRMICO

Una vez realizada la hidratación se pasó la muestra a un “ependorf” y se

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

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

## 6. EXTRUSIÓN

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

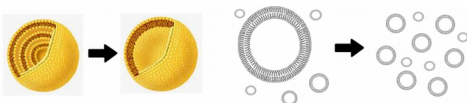


Figura 5: Representación esquemática del proceso de extrusión.

## II. Determinación del tamaño de los liposomas

Para determinar los tamaños promedios de las vesículas que se formaron una vez terminada la preparación, se utilizó un equipo de dispersión dinámica de luz láser (Zetasizer Nano-Zs, Malvern Instruments, UK), utilizando un

ángulo de detección de 173° y provisto de un láser de He-Ne operando a una longitud de onda de 633 nm.

## III. Medición de un perfil de dispersión

Se define “tiempo de relajación espín-red” ó  $T_1$  al tiempo característico asociado con la recuperación hacia la condición de equilibrio de la componente longitudinal (dirección paralela al eje de cuantización impuesto por el campo externo  $B_0$ ) de la magnetización y está determinado por los mecanismos que involucran una transferencia energética desde el sistema de espines a la red.

La relaxometría con ciclado rápido de campo ó FFC NMR (por sus siglas en inglés) es una técnica de Resonancia Magnética Nuclear que permite obtener tiempos de relajación de un sistema de núcleos en función del campo magnético externo aplicado [6]. Debido a que la frecuencia de Larmor  $\omega_0$  es proporcional a la magnitud del campo magnético aplicado como se indica en la siguiente ecuación 1:

$$\omega_0 = \gamma B_0, \quad (1)$$

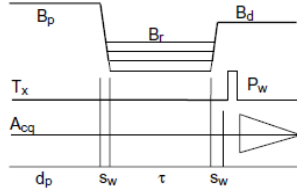
donde  $\gamma$  es la constante giromagnética de cada elemento, suele expresarse el campo magnético externo ( $B_0$ ) en función de la frecuencia de Larmor (de núcleos de Hidrógeno en este caso)  $\omega_0$ .

Si se mide la dependencia de  $T_1$  con el valor de campo, se obtiene la denominada “curva de dispersión de la tasa de relajación espín-red”, la cual consiste en expresar la tasa de relajación  $R_1 = T_1^{-1}$  en función de la frecuencia de Larmor.

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

## Secuencia PP

Esta secuencia se utiliza para medir  $T_1$  a campos muy bajos (en general menores a 10MHz). En la figura 6 se muestra un esquema de la misma.



**Figura 6:** Esquema de la secuencia pre-polarizada. Se muestra gráfica y cualitativamente los distintos valores que toma el campo  $B_0$ . Se puede ver que el campo  $B_r$  se esquematiza con más de una "línea" debido a que su valor varía durante el experimento. El pulso de radiofrecuencia se denota con las letras  $P_w$ ,  $\tau$  es el período temporal en que la magnetización se encuentra bajo la acción del campo  $B_r$ , y el lapso de tiempo en que el campo  $B_0$  cambia de un valor a otro se denota con las letras  $sw$  [8].

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

$$M_z(\tau) = M_0(B_r) + [M_0(B_p) - M_0(B_r)]e^{-\tau/T_1} \quad (2)$$

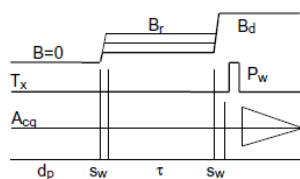
La señal remanente después de este intervalo de relajación es detectada en un campo  $B_d$ , de nuevo, tan alto como sea posible. Para la detección de la señal remanente, se aplica en este caso un pulso de  $\pi/2$  de duración de  $6,5\mu s$  (también se pueden utilizar ecos de espín) para observar la señal nuclear (señal de inducción libre o FID por sus siglas en inglés). Se adquirió la integral bajo un sector muy pequeño de la FID cercano al punto máximo de la misma, de modo de aprovechar el mayor valor de señal y, al mismo tiempo, no lidiar con posibles imperfecciones de los primeros puntos de la misma. Finalmente toma lugar el proceso de repolarización de la muestra, antes de que comience el ciclo nuevamente.

## Secuencia NP

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

Por lo tanto esta secuencia se utiliza para medir  $T_1$  a valores de campo próximos al valor de polarización, en este caso la magnetización crece desde un valor inicial próximo a cero. La misma se esquematiza en la figura 7.





**Figura 7:** Esquema de la secuencia no-polarizada. Se muestra gráfica y cualitativamente los distintos valores que toma el campo  $B_0$ . Se puede ver que el campo  $B_r$  se esquematiza con más de una "línea" debido a que su valor varía durante el experimento. El pulso de radiofrecuencia se denota con las letras  $P_w$ ,  $\tau$  es el período temporal en que la magnetización se encuentra bajo la acción del campo  $B_r$ , y el lapso de tiempo en que el campo  $B_0$  cambia de un valor a otro se denota con las letras  $sw$ .

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

$$M_z(\tau) = M_0(B_r)(1 - e^{-\tau/T_1}) \quad (3)$$

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

#### Descripción general y parámetros utilizados

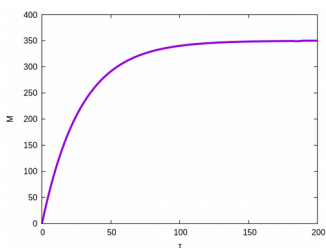
Los perfiles de dispersión de la tasa de relajación espín-red, fueron medidos usando la técnica de relaxometría con ciclado rápido de campo, con un relaxómetro "Spinmaster FC2000/C/D" (Stelar; Mede, Italia) y usando un volumen de muestra de 1ml. En todos los casos se utilizó un campo magnético de polarización de 15MHz, y un campo de adquisición de 14,19MHz (expresados en frecuencia de Larmor para núcleos de hidrógeno). Los perfiles se midieron dentro del rango de frecuencias de 30KHz a 15MHz (valores del campo de relajación), rango en el cual se puede asegurar

que las mediciones no están afectadas por la presencia de campos locales [1]. La cantidad de puntos que componen el perfil se fijó en 30 y, la medición del mismo demoró entre 2hs y 5hs según la temperatura de la medición. Una vez preparadas la suspensión de liposomas, el período de tiempo en el que se la sometió a todas las mediciones no fue nunca mayor a 10 días. Luego de este lapso no se puede garantizar el estado de estabilidad de la muestra. La temperatura de la muestra fue controlada con una variación de 1K aproximadamente, usando el control de temperatura del relaxómetro.

#### Medición genérica de un punto del perfil

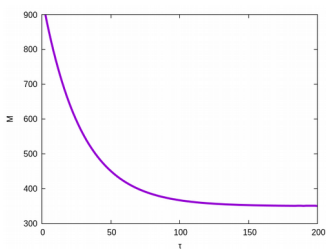
Como ya se mencionó, un perfil de dispersión de la tasa de relajación es justamente un gráfico del valor de  $R_1$  en función del campo magnético  $B_r$  en el cual tiene lugar la relajación. Por lo tanto, para la medición de un punto de esta curva lo que se hace es fijar un valor de campo  $B_r$ ,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

**Secuencia NP:** Esta secuencia se utilizó para la medición de los valores de  $R_1$  correspondientes a campos magnéticos  $B_r$  entre 10MHz y 15MHz. En este caso mientras mayor sea el tiempo  $\tau$  que la muestra se encuentra sometida al campo de relajación, mayor será la magnetización adquirida y más parecida al valor de saturación correspondiente a este valor de campo  $B_r$ . Por lo tanto se obtiene una curva de "recuperación de la magnetización". Típicamente luce como en la figura 8.



**Figura 8:** Esquema cualitativo de la forma funcional de la magnetización en función del tiempo de residencia al valor de campo  $B_r$  utilizando una secuencia NP.

**Secuencia PP:** Esta secuencia se utilizó para la medición de los valores de  $R_1$  correspondientes a campos magnéticos entre 30KHz y 10MHz. A diferencia de la secuencia NP, mientras más larga sea la permanencia del sistema en el campo de relajación, más va a decrecer la magnetización respecto a su valor alcanzado en el campo de polarización, pareciéndose al valor en equilibrio con el campo  $B_r$ . En este caso se obtienen gráficos como el de la figura 9, que ilustran la pérdida de magnetización.



**Figura 9:** Esquema cualitativo de la forma funcional de la magnetización en función del tiempo de residencia al valor de campo  $B_r$  utilizando una secuencia PP.

El valor de cada  $T_1$  se obtuvo ajustando por cuadrados mínimos cada curva de crecimiento/disminución de la magnetización según sea el caso. Los procesos de relajación resultaron ser todos monoexponenciales y, las funciones de ajustes utilizadas según la secuencia aplicada, fueron las dadas por las ecuaciones 2 y 3 en el marco teórico.

#### 4. Resultados y análisis de datos

Se realizó este estudio para verificar si cada instancia de la preparación de la muestra de

liposomas tenía el efecto deseado y si la técnica utilizada podía detectarlo a través de mostrar cambios en la dispersión de  $R_1$ .

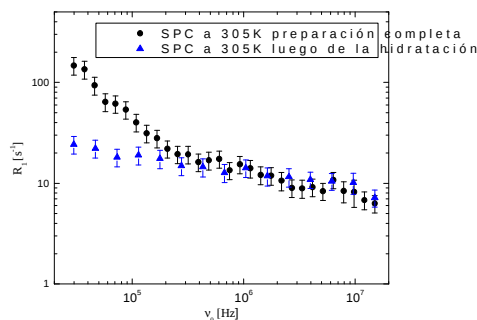
En términos generales, lo que se midió fue un perfil de dispersión de la tasa de relajación espín-red luego de cada proceso relevante en la preparación de liposomas, específicamente luego de la hidratación, luego de los ciclos térmicos, y por último, una vez terminada la extrusión (muestra final).

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

#### Post-Hidratación

Una vez formado el film, se procedió a la hidratación de la muestra, siguiendo el protocolo descrito en la sección I.1. Luego, se separó una pequeña parte de la muestra para realizar un experimento de DLS y, lo restante se utilizó para la medición del perfil de dispersión.

El perfil de dispersión obtenido, se ilustra en la figura 10.



**Figura 10:** Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC (\*) y para una suspensión de SPC luego de la hidratación (N).



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

### Post-Ciclos térmicos

Una vez terminada la medición anterior se procedió a realizarle a la muestra el tratamiento térmico. El perfil de dispersión obtenido luego de este proceso, se ilustra en la figura 11.

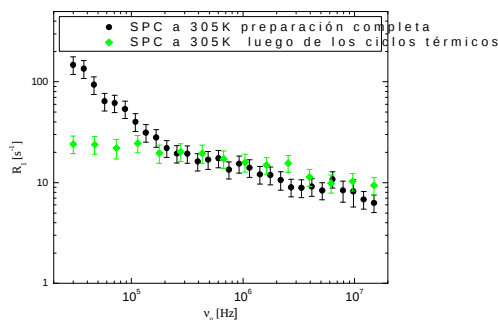


Figura 11: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC (•) y para una suspensión de SPC luego de el tratamiento térmico (◊).

Si se comparan las figuras 10 y 11 se puede observar que el perfil no cambió considerablemente respecto al paso de preparación anterior, es decir, presenta características mucho menos dispersivas que el correspondiente perfil de la muestra con preparación completa.

### Post-Extrusión

Por último, luego de los ciclos térmicos se sometió la muestra al proceso de extrusión.

Este paso se realizó para verificar si se podía reproducir un perfil típico de liposomas de SPC (muestra con preparación completa). Ambos perfiles (suspensión de SPC luego de la extrusión y liposomas de SPC) se ilustran en la figura 12.

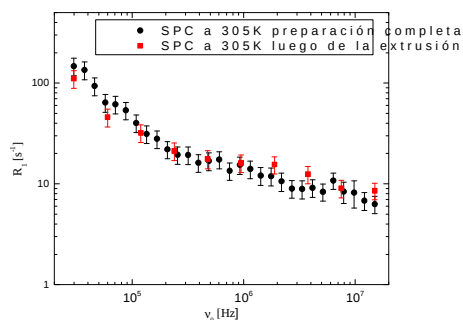


Figura 12: Dispersión experimental de la tasa de relajación espín-red para una suspensión de liposomas de SPC (•) y para una suspensión de SPC luego de la extrusión (◻).

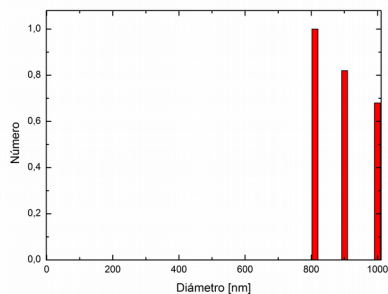
Las curvas no son 100 % indistinguibles, pero como lo que se desea observar son las propiedades dispersivas de la misma, se podría decir que ambas curvas poseen las mismas características a tal fin. La discrepancia observada se puede deber tal vez a diferencias en la temperatura del experimento no reportadas.

La medición de este último perfil demuestra la importancia de realizar todos y cada uno de los pasos de preparación descritos en la sección I.1 en orden de obtener un perfil con las características del graficado en la figura 12 y similares a las obtenidas para liposomas en trabajos previos [1] [2].

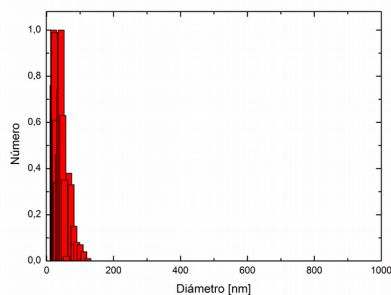
### DLS

Para completar este análisis de la preparación, se sometió a las muestras correspondientes a las instancias previa y posterior a la extrusión, a un estudio de dispersión dinámica de luz para observar la influencia que posee este proceso en la distribución de tamaños de las vesículas. Los resultados se muestran en las figuras 13 y 14 donde se pueden observar las distribuciones de diámetros de las vesículas

según la cantidad (“número”) que poseen un determinado diámetro, correspondientes a antes y después de la extrusión, respectivamente.



**Figura 13:** Distribución de diámetros de las vesículas según la cantidad que posee un determinado diámetro, antes de la extrusión



**Figura 14:** Distribución de diámetros de las vesículas según la cantidad que posee un determinado diámetro, luego de la extrusión, usando una membrana de tamaño de poro de 100nm de diámetro.

En la figura 13 se puede observar que antes de realizar la extrusión se tienen vesículas de tamaños de 800nm, 900nm y 1000nm aproximadamente, mientras que una vez realizado este proceso (diámetro de poro del filtro = 100nm), lo que se obtiene son vesículas de diámetros mucho más pequeños (~ 30 – 40nm y ~ 80 – 90nm).

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

## 5. Conclusiones

En cuanto a las propiedades intrínsecas de la muestra, se logró caracterizar cada instancia de la preparación de liposomas. Esta caracterización será de gran utilidad para futuros experimentos que se realicen con este tipo de sistemas utilizando la técnica de relaxometría con ciclado rápido de campo magnético. Se verificó que cada instancia de la preparación de liposomas tiene el efecto deseado y que la técnica utilizada puede detectar tales efectos a través de mostrar cambios en la dispersión de  $R_1$ .

Las diferencias observadas a bajas frecuencias en el perfil de dispersión de la instancia final de la muestra (post-extrusión) respecto a los perfiles de dispersión de los pasos previos, se deben a que en este rango de frecuencias los procesos dinámicos que contribuyen mayoritariamente a la relajación espín-red en membranas de liposomas (fluctuaciones de orden y la difusión translacional de los lípidos [1] [2]) no son eficientes para el caso de vesículas gigantes multilamelares. La baja dispersividad en los perfiles previos a la extrusión podría explicarse con el hecho de que los procesos que intervienen en la relajación de este tipo de sistemas (vesículas gigantes multilamelares) son demasiado rápidos como para poder ser observados dentro del rango de frecuencias estudiado.

## Referencias

- [1] Meledandri CJ, Perlo J, Farrher E, Brougham DF, Anordo E. Interpretation of Molecular Dynamics on Different Time Scales in Unilamellar Vesicles Using Field-Cycling NMR Relaxometry. *J Phys Chem B*. 2009;113:15532–40.
- [2] Perlo J, Meledandri CJ, Anordo E, Brougham DF. Temperature and Size-Dependence of Membrane Molecular Dynamics in Unilamellar Vesicles by Fast Field-Cycling NMR Relaxometry. *J Phys Chem B*. 2011;115:3444–51.

- [3] Fraenza CC, Meledandri CJ, Anoardo E, Brougham DF. The Effect of Cholesterol on Membrane Dynamics on Different Timescales in Lipid Bilayers from Fast FieldCycling NMR Relaxometry Studies of Unilamellar Vesicles. *ChemPhysChem*. 2014;15:425–35.
- [4] Domingez GA, Perlo J, Fraenza CC, Anoardo E. Measurement of the bending elastic modulus in unilamellar vesicles membranes by fast field cycling NMR relaxometry. *Chem Phys Lipids*. 2016;201:21-27.
- [5] Fraenza CC, Anoardo E. Dynamical regimes of lipids in additivated liposomes with enhanced elasticity: A field-cycling NMR relaxometry approach. *Biophys. Chem*. 2017; 228:38–46
- [6] Kimmich R, Anoardo E. Field-cycling NMR relaxometry. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*. 2004;44:257–320.
- [7] Gennis RB. *Biomembranes: molecular structure and function*. Springer Science and Business Media; 2013.
- [8] Anoardo E, Galli G, Ferrante G. Fast-Field-Cycling NMR: Applications and Instrumentations. *Appl Magn Reson*. 2001; 20:365-404.