



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE CIENCIAS

AUTOORGANIZACIÓN EN SISTEMAS BIOMOLECULARES

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN IÓNICA EN LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE LIPOSOMAS DE DPPC

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PRESENTADO COMO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE FÍSICA

JOYCE LIZBETH BARROS MORENO

joyce.barros@epn.edu.ec

DIRECTOR: MARCO VINICIO BAYAS REA

marco.bayas@epn.edu.ec

DMQ, FEBRERO 2023

CERTIFICACIONES

Yo, JOYCE LIZBETH BARROS MORENO, declaro que el trabajo de integración curricular aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.



Joyce Lizbeth Barros Moreno

Certifico que el presente trabajo de integración curricular fue desarrollado por Joyce Lizbeth Barros Moreno, bajo mi supervisión.



Marco Vinicio Bayas Rea
DIRECTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

A través de la presente declaración, afirmamos que el trabajo de integración curricular aquí descrito, así como el(los) producto(s) resultante(s) del mismo, es(son) público(s) y estará(n) a disposición de la comunidad a través del repositorio institucional de la Escuela Politécnica Nacional; sin embargo, la titularidad de los derechos patrimoniales nos corresponde a los autores que hemos contribuido en el desarrollo del presente trabajo; observando para el efecto las disposiciones establecidas por el órgano competente en propiedad intelectual, la normativa interna y demás normas.

Joyce Lizbeth Barros Moreno

Marco Vinicio Bayas Rea

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la distribución de tamaños y de potencial ζ , de liposomas preparados con el lípido Dipalmitoilfosfatidicolina (DPPC) en soluciones con pH 7 y concentraciones salinas de $0mM - 200mM$ en pasos de $50mM$. Los liposomas fueron preparados por el método de hidratación y sonificación. Mientras que su caracterización fue realizada a partir del seguimiento de las trayectorias de las partículas. La concentración de liposomas fue determinada inicialmente con la absorbancia a $230nm$. Los valores medios de los diámetros de liposomas en soluciones con concentraciones salinas de $50mM - 200mM$ fueron comparables entre sí, con valores cercanos a $132nm$. No obstante, para los liposomas en PB se obtuvo un tamaño medio inferior. De manera que en dicha muestra en promedio las partículas tuvieron menor radio hidrodinámico. Los liposomas presentaron una carga superficial predominantemente positiva. Ya que, la distribución de movilidad electroforética y potencial en su mayoría presentaron valores en el rango negativo. Además, el promedio del potencial en las muestras de $0mM$ y $50mM$ no fueron estadísticamente iguales a los demás. Para $100mM - 200mM$, los potenciales medios se hallaron cercanos a $-45mV$.

Palabras clave: liposomas, *nanotracking*, potencial ζ , DPPC.

ABSTRACT

In this work we have studied the size distribution and potential ζ , of liposomes prepared with the lipid Dipalmitoylphosphatidicoline (DPPC) in solutions with salt concentrations of $0mM - 200mM$ in steps of $50mM$. Liposomes were prepared by hydration and sonification method. While their characterization was performed by tracking the particle trajectories. The concentration of liposomes was initially determined with absorbance at $230nm$. It was established that colloidal stability is maintained for liposomes in solutions with PBS concentrations of $50mM - 200mM$. Since the mean values of particle diameters in the samples were comparable to each other, with values close to $132nm$. However, for liposomes in PB a lower mean size was obtained. So in that sample on average the particles had smaller hydrodynamic radius. The liposomes presented a predominantly positive surface charge. Since, the electrophoretic mobility distribution and potential mostly presented values in the negative range. In addition, the average potential in the $0mM$ and $50mM$ samples were not statistically equal to the others. For $100mM - 200mM$, the average potentials were found to be close to $-45mV$.

Keywords: liposomes, nanotracking, ζ potential, DPPC.

Índice general

| | |
|--|-----------|
| 1. Descripción del componente desarrollado | 1 |
| 1.1. Objetivo general | 1 |
| 1.2. Objetivos específicos | 1 |
| 1.3. Alcance | 2 |
| 1.4. Marco teórico | 3 |
| 1.4.1. Formación de Liposomas | 3 |
| 1.4.2. Caracterización de Liposomas | 4 |
| 1.4.3. Teoría DLVO | 6 |
| 2. Metodología | 8 |
| 2.1. Preparación de liposomas | 8 |
| 2.1.1. Soluciones de Trabajo | 8 |
| 2.1.2. Método de hidratación y sonificación | 9 |
| 2.1.3. Calibración del equipo analizador de trayectorias | 9 |
| 2.2. Experimentos | 10 |
| 2.2.1. Espectros de Absorción | 10 |
| 2.2.2. Mediciones Sobre las Muestras | 10 |
| 2.3. Análisis de datos | 11 |
| 3. Resultados, Conclusiones y Recomendaciones | 13 |

| | |
|--|----|
| 3.1. Resultados | 13 |
| 3.1.1. Espectros de Absorción de las Soluciones de Liposomas | 13 |
| 3.1.2. Liposomas en PB | 14 |
| 3.1.3. Liposomas en PBS 50mM | 18 |
| 3.1.4. Liposomas en PBS 100mM | 20 |
| 3.1.5. Liposomas en PBS 150mM | 22 |
| 3.1.6. Liposomas en PBS 200mM | 24 |
| 3.2. Influencia de la concentración iónica en la formación de li- posomas | 27 |
| 3.3. Conclusiones y recomendaciones | 28 |

| | |
|---------------------|-----------|
| Bibliografía | 31 |
|---------------------|-----------|

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| 1.1. Esquema de liposomas. Las cabezas polares se encuentran en contacto con el medio acuoso (fase hidrofílica), y las colas en la fase hidrofóbica. Elaborado en canva [1]. | 4 |
| 1.2. Potencial eléctrico en función de la distancia respecto a la superficie de la partícula coloidal, a radio hidrodinámico. Región I: Hidrodinámicamente inmóvil. Región II: mayor movilidad de cargas. Elaborado en canva [1]. | 6 |
| 3.1. Espectros de absorción de muestras de liposomas en PB y PBS 50mM. | 13 |
| 3.2. Liposomas en PB, observados por la cámara del equipo <i>ZetaView Analyzer</i> | 14 |
| 3.3. Resultados obtenidos para el primer experimento de la muestra de liposomas en PB. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta. | 15 |
| 3.4. Resultados obtenidos para el segundo experimento de la muestra de liposomas en PB. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta. | 16 |

| | |
|---|----|
| 3.5. a) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños de liposomas en PB. b) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños acumulada de liposomas en PB. | 17 |
| 3.6. a) Distribución de potencial de superposición de experimentos $0mM$. b) Densidad de probabilidad de distribución de superposición de experimentos $0mM$ | 17 |
| 3.7. Resultados obtenidos para la muestra de liposomas en PBS $50mM$. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta. | 19 |
| 3.8. a) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños de liposomas en PBS $50mM$. b) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños acumulada de liposomas en PB. . . | 20 |
| 3.9. a) Distribución de potencial de superposición de experimentos $50mM$. b) Densidad de probabilidad de distribución de superposición de experimentos $50mM$ | 20 |
| 3.10 Resultados obtenidos para la muestra de liposomas en PBS $100mM$. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta. | 21 |
| 3.11 a) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños de liposomas en PBS $100mM$. b) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños acumulada de liposomas en PBS $100mM$ | 22 |
| 3.12 a) Distribución de potencial de superposición de experimentos $100mM$. b) Densidad de probabilidad de distribución de superposición de experimentos $100mM$ | 22 |
| 3.13 Resultados obtenidos para la muestra de liposomas en PBS $150mM$. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta. | 23 |

| | |
|--|----|
| 3.14a) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños de liposomas en PBS 150mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños acumulada de liposomas en PBS 150mM. | 24 |
| 3.15a) Distribución de potencial de superposición de experimentos 150mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de superposición de experimentos 150mM. | 24 |
| 3.16 Resultados obtenidos para la muestra de liposomas en PBS 200mM. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta. | 25 |
| 3.17a) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños de liposomas en PBS 200mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños acumulada de liposomas en PBS 200mM. | 26 |
| 3.18a) Distribución de potencial de superposición de experimentos 200mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de superposición de experimentos 200mM. | 26 |
| 3.19a) Valores medios de diámetro en función de la concentración salina. b) Valores medios de potencial ζ en función de la concentración salina. | 27 |

Capítulo 1

Descripción del componente desarrollado

El trabajo se centró en la preparación de liposomas con el lípido Dipalmitoilfosfatidicolina (DPPC) con pH 7, y su caracterización para concentraciones iónicas de NaCl de: 0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM. La distribución de tamaños se obtuvo por medio del seguimiento de las trayectorias de los liposomas mediante microscopía óptica con un equipo analizador de trayectorias. Éste permitió además obtener la distribución de potencial ζ de los liposomas.

1.1. Objetivo general

Estudiar la distribución de tamaños y potencial ζ de liposomas preparados con DPPC en soluciones con diferentes concentraciones iónicas.

1.2. Objetivos específicos

1. Determinar la distribución de tamaños de liposomas preparados con DPPC en soluciones buffer con concentraciones de NaCl de 0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM.
2. Determinar la carga superficial de los liposomas preparados con DPPC en soluciones buffer con concentraciones de NaCl de 0mM, 50mM, 100mM, 150mM y 200mM.

1.3. Alcance

En los últimos años ha surgido un gran interés en la caracterización de liposomas preparados *in vitro*. Pues, son partículas con un tamaño coloidal (entre $20nm$ y $10\mu m$), que poseen un centro acuoso delimitado por una bicapa lipídica, análogas a las que se encuentra en la naturaleza [2, 3]. El centro acuoso de los liposomas permite almacenar diferentes biomoléculas. En campos como el de farmacología, son utilizados para el transporte de fármacos, al ser almacenados en su núcleo y dirigirlos hacia el organismo [4]. En cosmetología, se utilizan para encapsular sustancias deseadas y deliberarlas en las distintas capas de la piel, según el tamaño nanométrico de las partículas [5]. Es por ello que, al ser los liposomas partículas versátiles, es de interés estudiar sus propiedades físicas.

Generalmente los lípidos utilizados para el ensamble de liposomas son los fosfolípidos. Estos se encuentran tanto en células vegetales como animales, cumplen roles importantes en las funciones de los organismos vivos y forman parte de los componentes principales de las membranas biológicas [2, 6]. La Dipalmitoilfosfatidicolina (DPPC) con nomenclatura $C_{40}H_{80}NO_8P$, está conformada por una cabeza hidrofílica de fosfatidilcolina (FC) y una cola hidrofóbica que a su vez se compone por dos cadenas de ácido palmítico (C_{16}) [7]. La fosfatidilcolina (FC) es uno de los fosfolípidos más comunes en la naturaleza. Pues, se la puede hallar incluso en los glóbulos rojos; ya que representa el $29,3 \pm 1,5\%$ de los fosfolípidos en la membrana de los eritrocitos [6, 8]. Se compone por una cabeza que consta de un grupo fosfato PO_4^{3-} más un grupo colina $C_5H_{14}NO^+$, y una doble cadena de carbono en su cola [9].

El proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Biofísica de la Escuela Politécnica Nacional en donde se prepararon liposomas con el lípido DPPC. Para esto se utilizó el método *Bangham*. Se realizaron soluciones base de liposomas en buffer con concentraciones de NaCl de: $0mM$, $50mM$, $100mM$, $150mM$ y $200mM$. Se determinó la concentración de las partículas apropiadas para los experimentos, mediante la medición de su absorbancia. Debido a que, el rango de concentraciones que admite el método utilizado es de $10^7 - 10^9$ partículas por cm^3 [10].

La distribución de tamaños se determinó con un equipo analizador de trayectorias, que realizó un análisis de seguimiento de nanopartículas o *nanotracking* (NTA). El NTA considera el sistema con movimiento browniano y determina la distribución de tamaños de las partículas de una muestra líquida por medio de las dispersiones de luz generadas al incidir un rayo láser. De manera similar, con el equipo analizador se determinó el potencial ζ de los liposomas por medio de las mediciones de movilidades electroforéticas [11, 12]. El potencial reflejará el comportamiento de las cargas superficiales de las partículas mediante dicha movilidad, ya que éste es proporcional a la carga superficial [12]. Finalmente, el análisis de datos respectivo se realizó considerando el régimen de la teoría de Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek (DLVO); teoría que ha sido implementada en el análisis de interacciones en sistemas coloidales [13].

1.4. Marco teórico

1.4.1. Formación de Liposomas

Los liposomas se forman gracias a las características físico-químicas de sus componentes, los lípidos. Éstos se conforman por dos regiones, una región hidrofílica y otra hidrofóbica. Se conocen varios grupos de cabezas hidrofílicas; uno de ellos son los zwitteriónicos, un ejemplo de éste es la fosfatidilcolina, que a PH 7 posee cargas positivas y negativas. Es así que, los fosfolípidos, al conformarse por largas cadenas de carbono son casi insolubles en agua. Los hidrocarburos al interactuar con un medio acuoso tienden a agregarse, lo que conlleva a una disminución en su energía libre [9]. A su vez, en los lípidos, debido a la tendencia a aislar a los hidrocarburos del agua (efecto hidrofóbico), cuando las moléculas interactúan con un medio acuoso. Éstas se asocian para auto-ensamblarse formando liposomas, ver fig. 1.1 [2, 14, 15]. Esto sucede al sobrepasar una determinada concentración, conocida como concentración micelar crítica (cmc): la cual varía según el lípido y depende en gran medida del número de carbonos correspondientes a las colas [14].

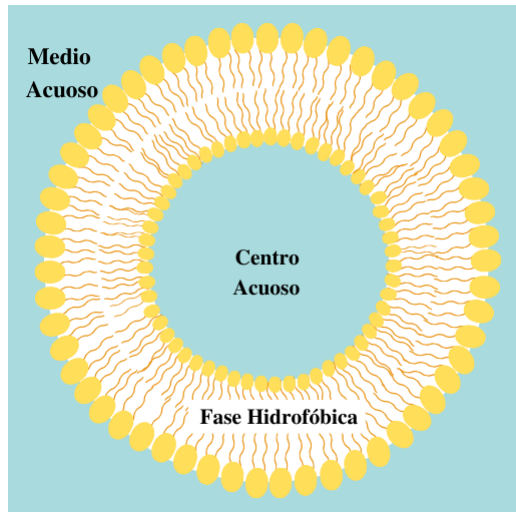


Figura 1.1: Esquema de liposomas. Las cabezas polares se encuentran en contacto con el medio acuoso (fase hidrofílica), y las colas en la fase hidrofóbica. Elaborado en canva [1].

1.4.2. Caracterización de Liposomas

La estabilidad de los liposomas es un aspecto crucial para su aplicación en la industria. Pues, éstos son partículas termodinámicamente inestables [2]. Es por ello que se han ideado varios métodos que permiten la caracterización tanto de distribución de tamaños, como su carga superficial (potencial ζ). Uno de ellos es el análisis de rastreo de partículas o más conocido como *nanotracking*. El nanotracking determina la distribución de tamaños de las partículas por medio del coeficiente de difusión D . Considera que las partículas que se hallan dentro de una solución acuosa se rigen bajo un movimiento browniano, y analiza la luz dispersada por las mismas. El coeficiente D y el desplazamiento cuadrático medio $\langle r^2 \rangle$ de las partículas están ligados por la expresión $\langle r^2 \rangle = 4D\Delta t$. Donde Δt es el intervalo de tiempo entre cada fotograma realizado por el dispositivo analizador de trayectorias. A su vez, el coeficiente de difusión viene dado por la ecuación de *Stokes-Einstein* [16]:

$$D = \frac{4k_B T}{3\pi\eta d}, \quad (1.1)$$

donde, k_B la constante de Boltzman, T la temperatura, η la viscosidad y d el diámetro hidrodinámico de la partícula analizada. Entonces:

$$d = \frac{k_B T \Delta t}{3\pi\eta\langle r^2 \rangle}. \quad (1.2)$$

Adicionalmente, un dispositivo analizador de trayectorias realiza el cálculo del potencial ζ , al aplicar un campo eléctrico en la solución muestra [16]. Cuando las partículas coloidales cargadas en una solución, se someten a un campo eléctrico externo, se produce un efecto de *electroforesis*. Éste hace referencia al movimiento de las partículas a una velocidad electroforética v_E debido a la interacción con el campo. Tal que, la razón entre la velocidad y el campo se denomina movilidad electroforética $\mu_E = vE^{-1}[m^2V^{-1}s^{-1}]$ [16, 17].

Las propiedades eléctricas de las partículas coloidales se determinan por medio de la distribución espacial de los iones que las recubren. Dicha distribución da lugar a lo que se conoce como doble capa eléctrica [17]. En los experimentos de electroforesis, la partícula coloidal conjuntamente con los iones en su vecindad, que se mantienen relativamente inmóviles, se desplazan como una unidad [18]. Este conjunto (partícula más iones) se comporta como una partícula con una cierta carga efectiva. El potencial asociado a ésta, es el potencial ζ , ver fig 1.2. Por lo tanto el potencial ζ es un parámetro que sigue una distribución de Boltzman, que está ligado a la movilidad electroforética. La descripción teórica viene dada por la ecuación de Helmholtz-Smoluchowski, ec.(1.3) [17, 18].

$$\zeta = \frac{3\mu_E\eta}{2\varepsilon_0\varepsilon_r} \frac{1}{f(\kappa a)}, \quad (1.3)$$

Donde $\varepsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12}[C^2(N \cdot m^2)^{-1}]$ la permitividad en el vacío, ε_r la permitividad relativa, a el radio hidrodinámico, κ^{-1} la longitud de Debye. La longitud de Debye corresponde al espesor de la doble capa eléctrica. Esta longitud es el inverso coeficiente de decaimiento del potencial ζ [19]. Para $\kappa a > 1$, la función $f(\kappa a)$, depende de los iones, su concentración y de la temperatura absoluta [17].

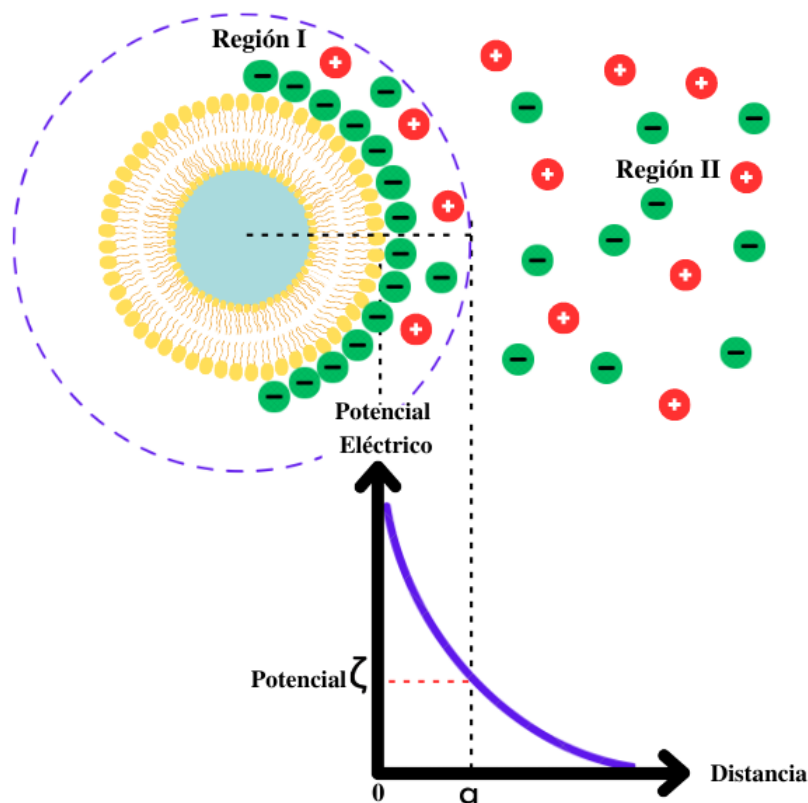


Figura 1.2: Potencial eléctrico en función de la distancia respecto a la superficie de la partícula coloidal, a radio hidrodinámico. Región I: Hidrodinámicamente inmóvil. Región II: mayor movilidad de cargas. Elaborado en canva [1].

1.4.3. Teoría DLVO

Una de las teorías que estudia la estabilidad de sistemas coloidales, como los de liposomas, es la formulada por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek (DLVO). Dicha teoría propone que las dos fuerzas de interacción que se rigen entre un medio acuoso y partículas coloidales son las fuerzas atractivas de Van der Waals y las fuerzas repulsivas electrostáticas [20,21]. Sin embargo, lo que habían enunciado Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek no fue totalmente acertado, ya que, posteriormente se descubrió que existe una fuerza superficial de interacción entre dos superficies separadas a una distancia pequeña. Dicha fuerza fue denominada “fuerza de hidratación” [22]. Es así, que utilizando como base de la teoría DLVO y considerando la fuerza de hidratación, es posible analizar un sistema de liposomas. Tal es el caso de [13], en el que sus resultados experimentales coinciden con la teoría mencionada para el caso de estu-

dio de un sistema de liposomas preparados por fosfatidilcolina de yema de huevo en presencia de iones monovalentes (Na^+ y K^+).

Capítulo 2

Metodología

2.1. Preparación de liposomas

2.1.1. Soluciones de Trabajo

La solución base de DPPC se preparó con $0,6\text{ml}$ de una solución de DPPC (*Avanti Polar Lipids*, EUA) con concentración $19\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, aforados a 5ml de cloroformo de grado analítico (*Fisher Scientific*, C298-4), obteniendo una concentración aproximada de $1\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Además, las soluciones buffer con distintas concentraciones salinas se prepararon a partir de una solución buffer-fosfato (PB) 50mM y una solución salina 1M . El PB 50mM de pH 7, se preparó a partir de la mezcla de fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 y fosfato de sodio dibásico Na_2HPO_4 . La solución salina se obtuvo al añadir $\approx 29,22\text{g}$ de NaCl diluidos hasta 1L de agua desionizada. Así, las soluciones PBS 50mM , 100mM , 150mM y 200mM fueron preparadas con 10ml , 20ml , 30ml y 40ml de solución NaCl 1M respectivamente, y aforadas hasta 200ml con buffer. Cabe mencionar que, la concentración de PBS 0mM corresponde a la solución PB 50mM .

2.1.2. Método de hidratación y sonificación

El método de preparación de liposomas utilizado se conoce como método Bangham. Este consiste en solubilizar el lípido en un disolvente orgánico, y dejarlo evaporar para generar una capa lipídica, que posteriormente debe ser hidratada [23].

En un matraz de fondo redondo de $2ml$ se añadió $0,6ml$ de la solución base de DPPC y cloroformo con $0,1ml$ de metanol (*Fisher Scientific, A452-4*), y se dejó evaporar aproximadamente $15h$. Una vez conformada la capa lipídica en la superficie interna del matraz, se añadieron $2ml$ de PBS con concentración de $0mM$, $50mM$, $100mM$, $150mM$ o $200mM$, dependiendo del experimento.

En la placa calentadora se preparó un baño María de laboratorio a una temperatura $\approx 50^{\circ}C$ para la película hidratada, y agitación de $\approx 685rpm$. Cada $30min$ se retiró la solución y se sometió a $2min$ en el vortex (*Boeco Germany, V-1plus*). Esto hasta haber alcanzado $1,5h$, posterior a ello se sometió la muestra a ultrasonido por $10min$ a $50^{\circ}C$ en el baño ultrasónico (*Fisher Scientific, FS20D*) durante $10min$. Al acabar este procedimiento se obtuvo como resultado la solución base de liposomas para el experimento.

2.1.3. Calibración del equipo analizador de trayectorias

El equipo analizador de trayectorias (*Zetaview, Particle Tracking Analyzer*) fue calibrado a partir de la inyección de $5ml$ de una dilución $1 : 25000$ de partículas de $102nm$ de poliestireno en agua desionizada. Luego, en el programa *ZetaView Analyzer* se realizaron las configuraciones, para medir los liposomas con un diámetro de hasta $600nm$. El equipo se consideró calibrado si el máximo de la distribución de tamaños coincidía dentro del margen de error con el tamaño nominal de las nanopartículas de poliestireno.

2.2. Experimentos

2.2.1. Espectros de Absorción

Con la finalidad de definir un valor de longitud de onda que permita la medida de la concentración de liposomas a través de la correspondiente absorbancia, se obtuvieron los espectros de absorción de las soluciones de liposomas en buffer y PBS $50mM$. Los espectros se obtuvieron para un rango de longitud de onda entre $[195nm - 600nm]$, en pasos de $0,1nm$, usando un espectrofotómetro UV-Vis (*Thermo Scientific, Evolution60s*). Para esto, se utilizaron disoluciones 1:3 de las soluciones de liposomas obtenidas después de la hidratación. A partir de estos espectros se identificó una longitud de onda de referencia λ_c para la cual se obtuvo la absorbancia en las muestras de liposomas antes de las mediciones de tamaño y potencial ζ .

2.2.2. Mediciones Sobre las Muestras

A partir de la absorbancia obtenida en la longitud de onda λ_c se prepararon $5ml$ de disoluciones de liposomas en PBS. Se procuró que las concentraciones de la solución de partículas se encuentren dentro del rango admitido por el equipo analizador de trayectorias (ver en Alcance). Cabe mencionar que a pesar de haber analizado la absorbancia de dos soluciones de liposomas en PBS $50mM$, únicamente se realizó el *nanotracking* para una, para la otra sólo se registró el espectro de absorbancia. Para todas las muestras preparadas, se obtuvo la curva de número de partículas en función de la sensibilidad del equipo, por la cual posteriormente se configuró la sensibilidad de medición en 75, en la posición de 0,5 de la cámara. A $25^\circ C$, se realizó un experimento de distribución de tamaños, seguido de dos de potencial ζ y otro de distribución de tamaños. No obstante, para la muestra de $200mM$ se realizaron tres experimentos consecutivos de potencial. Además, es importante mencionar que todas las muestras preparadas fueron filtradas con *Chromafil Xtra* de $0,45\mu m$.

2.3. Análisis de datos

El equipo analizador retornó dos tipos de archivos para cada medición, además de un vídeo del *nanotracking*. Para el caso de la distribución de tamaños se obtuvo un archivo con los datos del diámetro de liposomas, el número de partículas $\times 10^6$, la concentración y el volumen que ocupan los liposomas con un diámetro específico (x), considerando que éstos son completamente esféricos, ec.(2.1). Adicionalmente, se generó un reporte del análisis de datos. De manera similar, al medir el potencial ζ se obtuvo un archivo de valores de movilidad electroforética, potencial, frecuencia y el valor experimental correspondiente a el factor de Smoluchowski, considerando que la función $f(\kappa a) = 3/2$. Así como el reporte asociado a la medición.

$$V(x) = N(x) \frac{\pi x^3}{6}. \quad (2.1)$$

Los datos de los archivos generados por el equipo fueron separados mediante dos programas en lenguaje C++. El primer programa se encarga de reordenar los datos del diámetro en función del número de liposomas, pues cuenta el número de partículas n que poseen un diámetro específico m , se imprime en la primera columna n veces m , y en la segunda la unidad. Además, calcula e imprime la distribución de partículas acumulada en función del diámetro. Así como el volumen de liposomas en función del diámetro. Asimismo, el segundo archivo reordena los datos de movilidad electroforética y potencial zeta en función de la frecuencia. Considerando que los valores de frecuencia que retornó el equipo estaban divididos para el valor más alto de éste. Por lo cual, en el código se multiplicó la columna de frecuencias por dicho valor, el mismo que se determinó al observar el histograma del reporte correspondiente a la medición.

Ahora bien, los archivos resultantes fueron tratados con el programa GNUplot [24]. Se realizaron distribuciones para todas las magnitudes. Para las distribuciones de tamaños se utilizó un ancho de clase (Δx) dado por los datos de $30nm$, y 199 números de clase. Mientras que, para las propiedades electrocinéticas el ancho de clase se calculó a partir del criterio Herbert A. Sturges (ec.(2.2)) [25]. Donde R es el número total de

registros de datos dentro del rango, a el valor máximo de la magnitud y b el mínimo.

$$\Delta x = \frac{a - b}{1 + 3,322 \log R}. \quad (2.2)$$

El análisis estadístico de los datos se estableció con el comando *stats* de Gnuplot. Además, se obtuvo la densidad de probabilidad de distribución de tamaños de los liposomas considerando la ec.(2.3), y su densidad acumulada. Donde $N(x)$ es el número de partículas y $\Delta x = 30nm$. N_T se determina con el comando *STATS_sum* de la columna unidad de los archivos.

De igual forma se determinó la densidad de probabilidad para la superposición de experimentos asociados al potencial ζ (ec.(2.4)), con f la frecuencia y Δx_ζ el ancho de clase.

$$P_N = \frac{N(x)}{\Delta x N_T}, \quad (2.3)$$

$$P_\zeta = \frac{\zeta}{\sum_i f_i \Delta x_\zeta}. \quad (2.4)$$

Capítulo 3

Resultados, Conclusiones y Recomendaciones

3.1. Resultados

3.1.1. Espectros de Absorción de las Soluciones de Liposomas

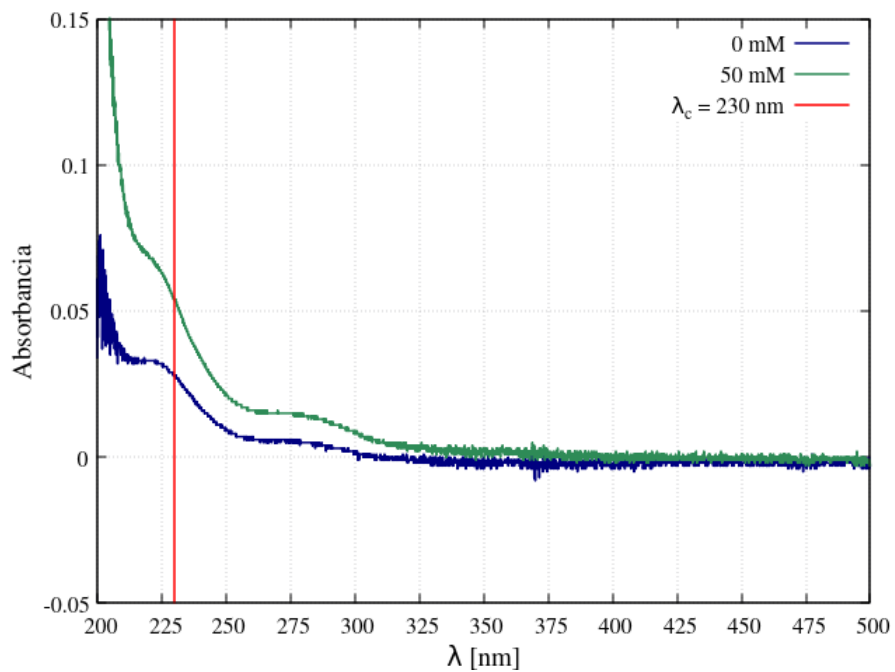


Figura 3.1: Espectros de absorción de muestras de liposomas en PB y PBS 50mM.

En la figura 3.1 se presentan los espectros de absorbancia de los liposomas en PBS $0mM$ y $50mM$ obtenidos con el protocolo descrito anteriormente. Se observa que, para longitudes de onda mayores de $325nm$, la absorbancia toma valores aproximados a cero. Lo cual implica que, no hay variaciones con respecto a la muestra blanco (PBS). Tal que, a menores longitudes de onda, se tiene el comportamiento de la absorbancia correspondiente a los liposomas. Además, es claro que las tendencias de las curvas son similares. Es por esto que, en los experimentos posteriores no se realizaron medidas de todo el espectro para el resto de las muestras, sino únicamente se tomó como referencia el valor correspondiente a una longitud de onda $\lambda_c = 230nm$.

3.1.2. Liposomas en PB

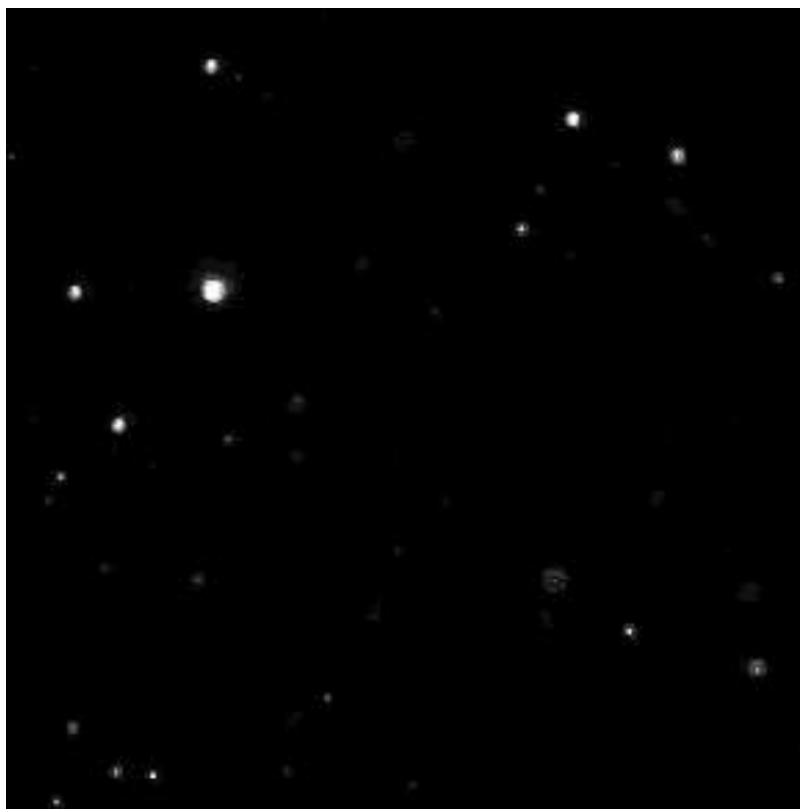


Figura 3.2: Liposomas en PB, observados por la cámara del equipo *ZetaView Analyzer*.

El valor de absorbancia en λ_c correspondiente a la solución base de liposomas en PB fue 0,028. Por ello en la formulación de la muestra se utilizó una dilución 1 : 63. Entonces, en el primer experimento se reportó

una concentración de partículas de 33×10^6 [partículas/ml], mientras que, en el segundo experimento, 34×10^6 [partículas/ml]. De tal manera que, se tuvo una concentración media de $33,5 \times 10^6$ [partículas/ml]. Adicionalmente, en la fig. 3.2 se muestra una fotografía tomada por el equipo analizador de trayectorias, al realizar el primer experimento de distribución de tamaños de la muestra de liposomas en PB.

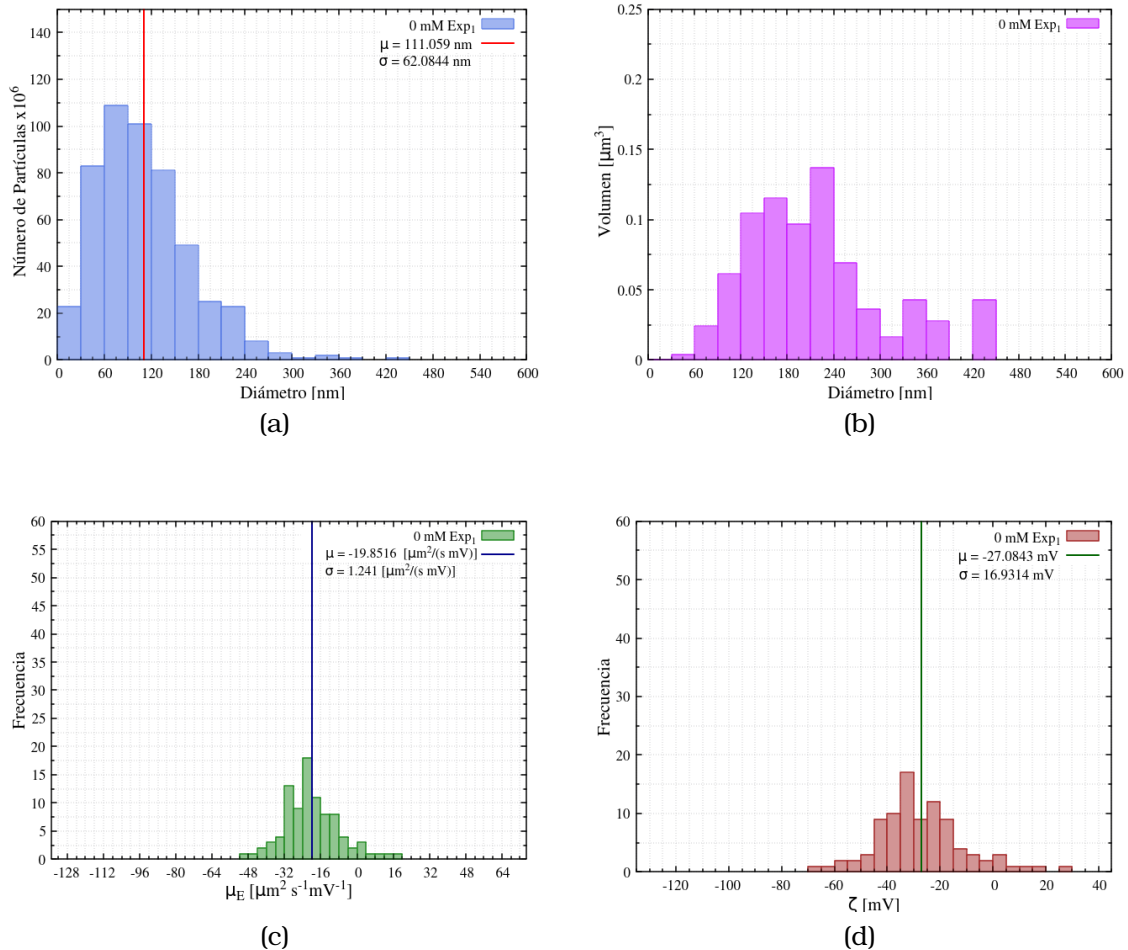


Figura 3.3: Resultados obtenidos para el primer experimento de la muestra de liposomas en PB. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta.

El análisis de datos correspondiente a la solución de liposomas en PB, se muestran en las fig. 3.3 - fig. 3.6. Por un lado, en la fig. 3.3, se presentan los resultados asociados al primer experimento. Se puede apreciar que, hubo mayor cantidad de liposomas con un diámetro entre $60\text{nm} - 90\text{nm}$. Se obtuvo un valor medio de $111,059\text{nm}$, con una desviación estándar de $62,0844\text{nm}$. Además, hubo mayor volumen ocupado por partí-

culas con un diámetro entre $210\text{nm} - 240\text{nm}$.

En cuanto, a la electrocinética, en la fig. 3.3c se muestra que se obtuvo más cantidad de partículas con movilidad electroforética entre -20 a -24 $\left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}\cdot\text{mV}}\right]$. Se obtuvo un valor medio de $-19,8516$ $\left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}\cdot\text{mV}}\right]$, con una desviación de $1,241$ $\left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}\cdot\text{mV}}\right]$. En la fig.3.3d se muestra un pico en el número de partículas entre -30mV a -35mV , además se obtuvo un promedio $-27,0843$ mV , con una desviación estándar de $16,9314$ mV . Es así que, tanto en la fig. 3.3d como en la fig. 3.3c se aprecia que, en su mayoría, las distribuciones de cargas adsorbidas ubicadas en la región hidrodinámica inmóvil fueron negativas.

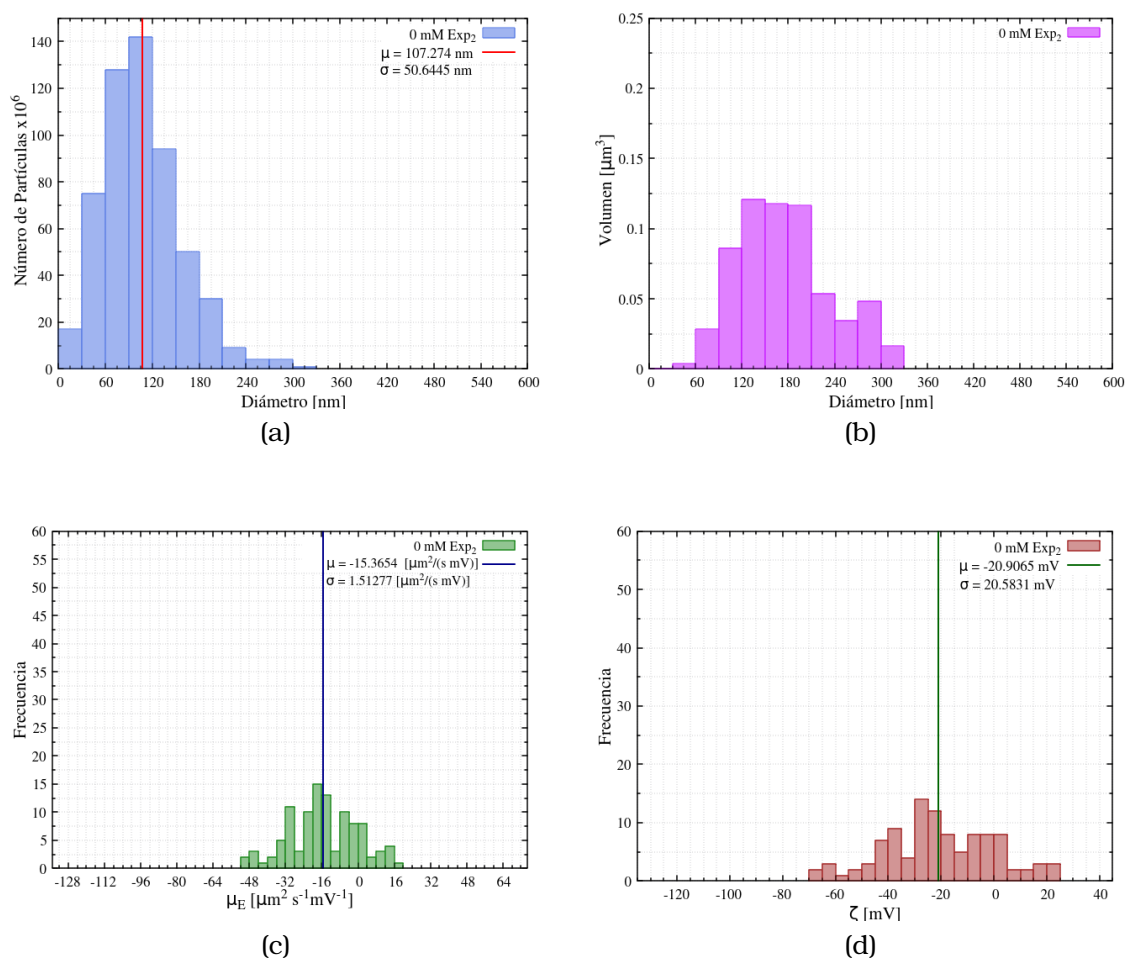


Figura 3.4: Resultados obtenidos para el segundo experimento de la muestra de liposomas en PB. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta.

Por otro lado, la fig. 3.4 muestra los resultados del segundo experi-

mento. Se presentaron más liposomas con un diámetro hidrodinámico entre $90\text{nm} - 120\text{nm}$. Se obtuvo un tamaño medio de $107,274\text{nm}$, con desviación de $50,6445\text{nm}$. Los liposomas que ocuparon mayor volumen fueron aquellos con tamaños entre $120\text{nm} - 150\text{nm}$. Además, al igual que en el primer experimento, las partículas en la solución en general tuvieron cargas efectivas negativas, ver fig 3.4c y 3.4d. Los valores medios asociados a la movilidad y al potencial fueron $-15,3654 \pm 1,51277 \left[\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}\cdot\text{mV}} \right]$ y $-20,9065 \pm 20,5831 \text{mV}$ respectivamente.

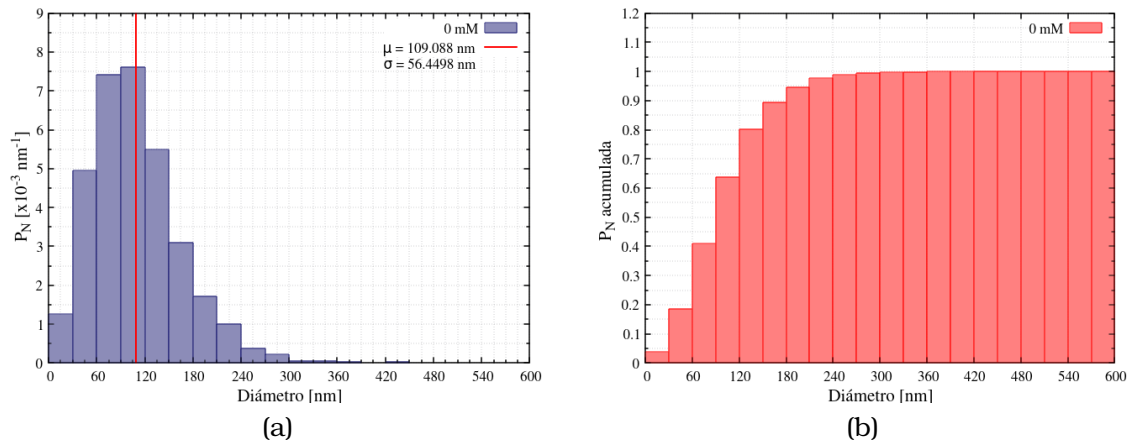


Figura 3.5: a) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños de liposomas en PB. b) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños acumulada de liposomas en PB.

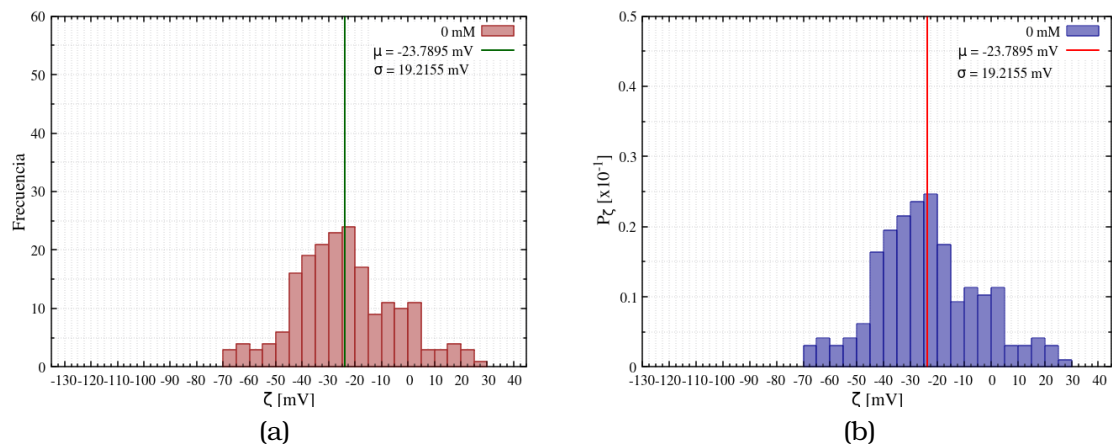


Figura 3.6: a) Distribución de potencial de superposición de experimentos 0mM . b) Densidad de probabilidad de distribución de superposición de experimentos 0mM .

Ahora, en contraste entre ambos experimentos, no se obtuvieron cambios drásticos en los resultados correspondientes a sus distribuciones

de tamaños. Sin embargo, en las distribuciones de potenciales se puede notar visualmente que hay variaciones entre sí. Por lo que, para un mejor análisis, al determinar las distribuciones de probabilidad tanto de tamaños como de potencial, se trabajó con el conjunto de datos de ambos experimentos. De tal forma que, en el grupo de la fig. 3.5 se muestra la densidad de probabilidad de la distribución de tamaños, así como la densidad acumulada de la superposición de datos. De las cuales se evidencia un pico de probabilidad de liposomas con un diámetro entre $90nm$ a $120nm$, a partir de dichos tamaños la probabilidad decae rápidamente. Las partículas con un tamaño hasta $120nm$, correspondieron a aproximadamente $0,65$ de la densidad acumulada; hasta los $200nm$ se tiene casi el total de ésta. Además, hubo una mayor probabilidad de partículas con un potencial entre $-25mV$ a $-20mV$. Y, en su mayoría los liposomas presentaron aglomeración de cargas efectivas negativas, ver fig. 3.6. Cabe recalcar que, a diferencia de la distribución de densidad de probabilidad de tamaños, la correspondiente al potencial no presenta un comportamiento suave.

3.1.3. Liposomas en PBS 50mM

A una longitud de onda λ_c , la solución de liposomas en PBS tuvo una absorbancia de $0,012$, por lo que la dilución utilizada fue de $1 : 14$. De ésta se obtuvo una concentración media de partículas en solución PBS $50mM$ de $37,7$ [partículas/ml]. En la fig. 3.7 se hallan los resultados de un experimento efectuado con la muestra de liposomas en solución PBS $50mM$ (primer experimento). De la fig.3.7a se puede decir que, se obtuvieron más liposomas con un tamaño entre $[120nm - 150nm]$. El promedio de tamaños de liposomas en la solución PBS $50mM$ fue de $136,671nm \pm 57,3425nm$. Los liposomas con un diámetro entre $[180nm - 210nm]$ correspondieron a un pico de volumen de $\approx 0,2\mu m^3$, ver fig. 3.7b. Adicionalmente, se obtuvo un promedio una movilidad electroforética de liposomas de $-34,3298 \pm 1,43887$ $\left[\frac{\mu m^2}{s \cdot mV} \right]$. Además de un valor medio de potencial de $-59,8015 mV$, con una desviación de $17,5024 mV$.

En las fig. 3.8a y fig. 3.8b se puede apreciar que, la densidad de probabilidad de distribución crece hasta aquellas partículas con tamaños entre

[90nm – 120nm], y luego disminuye. Tal y como en el caso de la solución en PB. Los liposomas con un tamaño hasta 120nm corresponden a alrededor del $\approx 0,45$ del total de la densidad de probabilidad acumulada. Mientras que, los que tienen un diámetro menor a 210nm representan $\approx 0,9$ de la densidad. Con respecto al potencial ζ , la densidad de probabilidad de la distribución indica un pico en el rango de $-66mV$ a $-60mV$. Consecuentemente, en las dobles capas de los liposomas hubo gran distribución de cargas negativas.

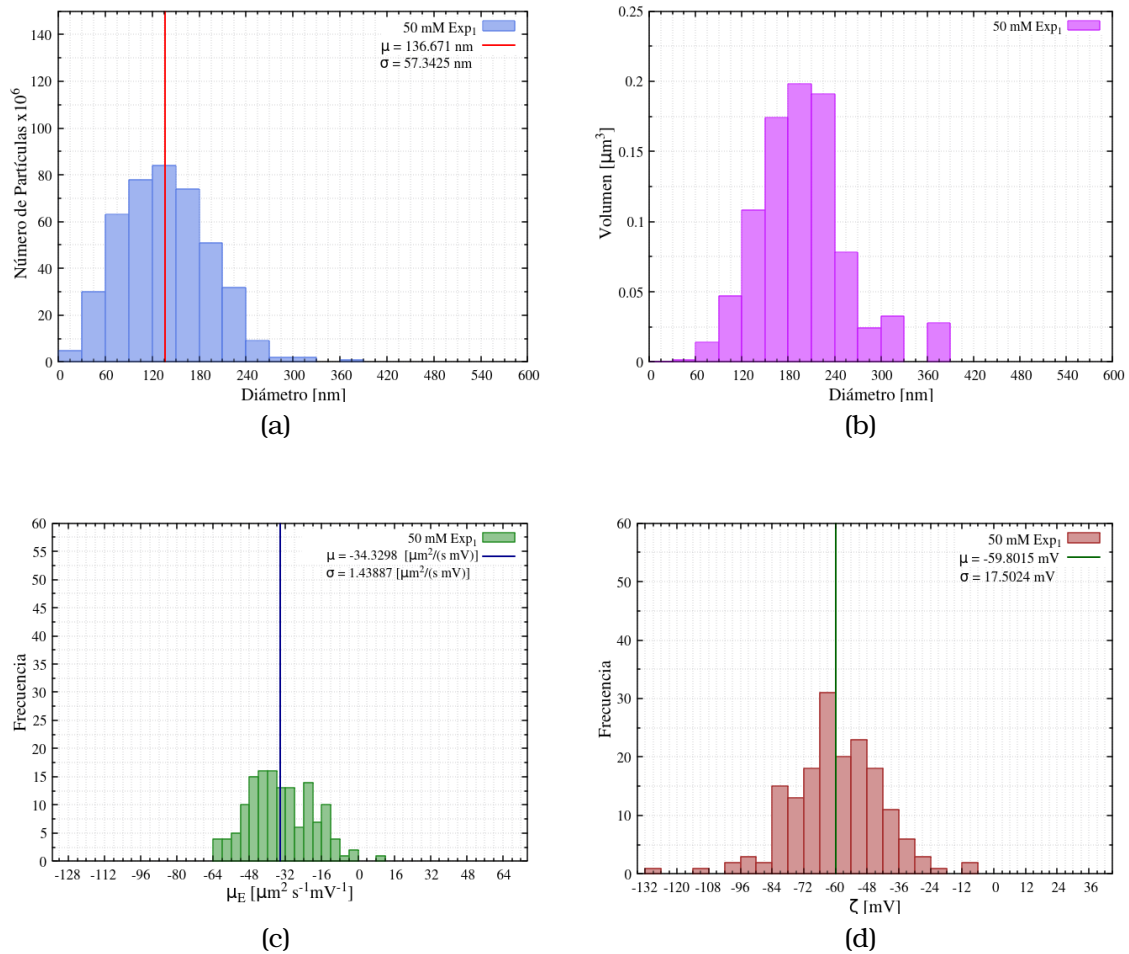


Figura 3.7: Resultados obtenidos para la muestra de liposomas en PBS 50mM. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta.

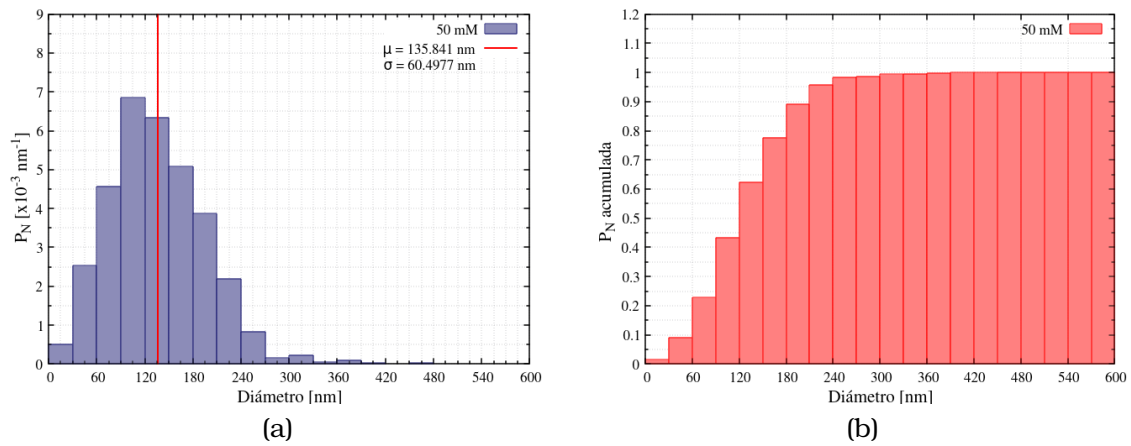


Figura 3.8: a) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños de liposomas en PBS 50mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños acumulada de liposomas en PB.

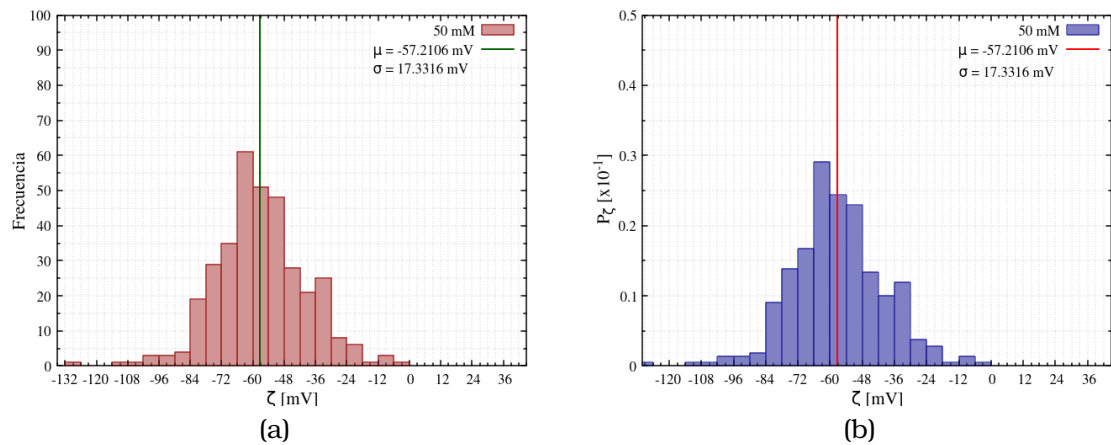


Figura 3.9: a) Distribución de potencial de superposición de experimentos 50mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de superposición de experimentos 50mM.

3.1.4. Liposomas en PBS 100mM

La absorbancia de la solución en λ_c fue 0,061, por lo que la dilución utilizada para los experimentos fue 1 : 63. Tal que la concentración media de las partículas en la solución fue 48,9 [partículas/ml]. El diámetro hidrodinámico medio del primer experimento de los liposomas en solución PBS 100mM fue de $131,136 \pm 57,5165$ nm. A su vez, los liposomas con tamaño en un rango de [150nm – 180nm] ocupan el mayor volumen, $\approx 0,225\mu m^3$, fig. 3.10b. Al igual que en los resultados previos, en el primer experimento se tiene mayor distribución de liposomas con un tamaño entre 90nm a 120nm

(fig. 3.10a), Asimismo, en la fig. 3.11 se muestra que se tuvo una mayor densidad de probabilidad de la distribución de liposomas en dicho rango. Además, nuevamente las partículas con un diámetro hasta $210nm$ representan el 0,9 de la densidad acumulada, y aquellas entre $120nm - 150nm$ el 0,65.

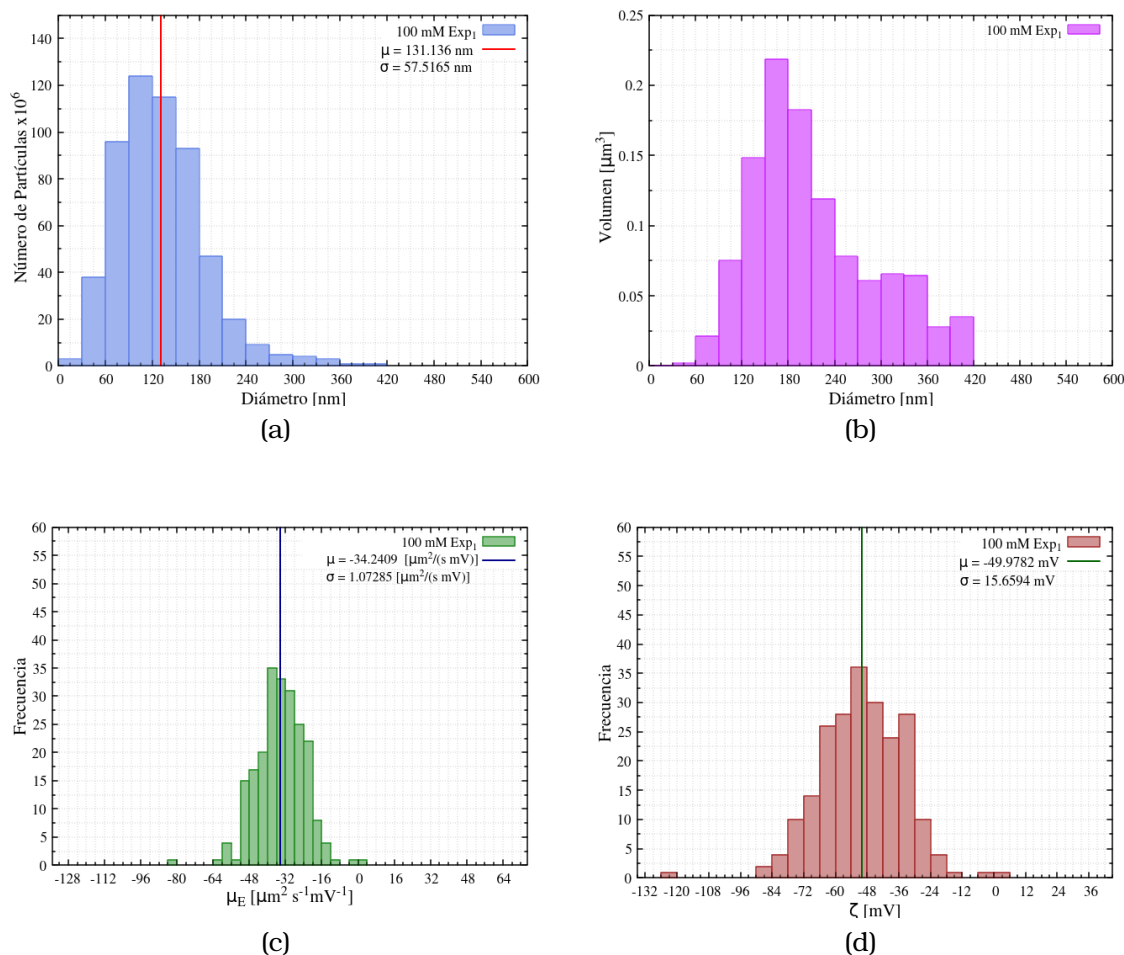


Figura 3.10: Resultados obtenidos para la muestra de liposomas en PBS $100mM$. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta.

Las fig. 3.10c y fig. 3.12 muestran que la carga efectiva de las partículas fue predominantemente negativas. El valor medio asociado a la movilidad fue de $-34,2409 \left[\frac{\mu m^2}{s \cdot mV} \right]$, con una desviación de $1,07285 \left[\frac{\mu m^2}{s \cdot mV} \right]$. Las distribuciones de potencial para el primer experimento y para la densidad de probabilidad tomaron valores medios de $-49,9782 \pm 15,6594$ y $-45,043 \pm 18,0213 mV$, respectivamente (fig. 3.10d y fig. 3.12a). En éstos se obtuvo un pico de frecuencia en el rango de $-54 mV$ a $-48mV$. Con-

secuente, en este rango se obtuvo mayor densidad de probabilidad de los liposomas en solución PBS 100mM.

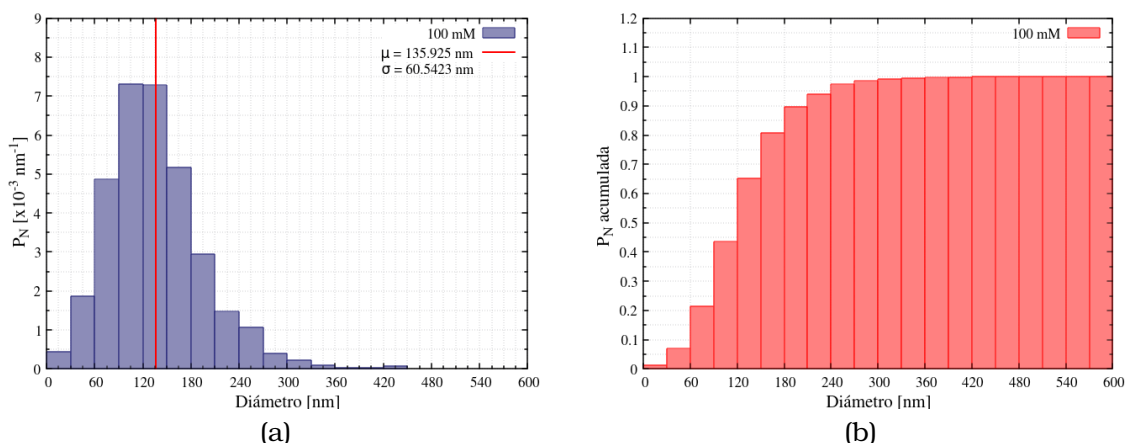


Figura 3.11: a) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños de liposomas en PBS 100mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños acumulada de liposomas en PBS 100mM.

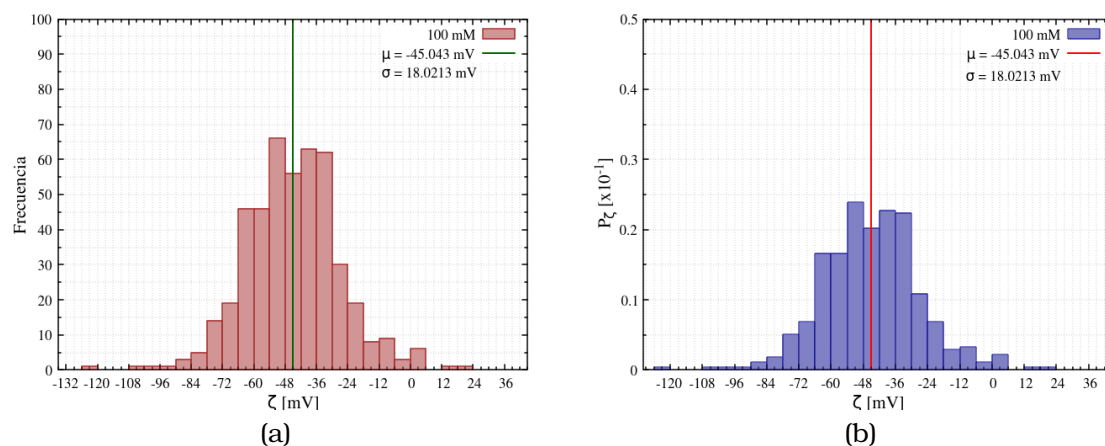


Figura 3.12: a) Distribución de potencial de superposición de experimentos 100mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de superposición de experimentos 100mM.

3.1.5. Liposomas en PBS 150mM

La absorbancia de la solución en λ_c fue 0,51, por lo que se utilizó una disolución 1 : 63 en la formulación de la muestra. La concentración promedio de la solución de liposomas fue 34 [partículas/ml]. La primera medición de la solución de liposomas en PBS 150mM tuvo un mayor número de partículas con un tamaño entre 120nm a 150nm. Aquellos que se encontraron en un rango de 180nm – 210nm ocuparon más volumen, $\approx 0,2\mu m^3$, ver

fig. 3.13b. En la fig. 3.13c se presenta la distribución de movilidad electroforética. En ésta se obtuvo un máximo de frecuencia entre $-40 \left[\frac{\mu m^2}{s \cdot mV} \right]$ y $-36 \left[\frac{\mu m^2}{s \cdot mV} \right]$. Con un valor medio de $-34,3298 \pm 1,43887 \left[\frac{\mu m^2}{s \cdot mV} \right]$. La distribución de potencial (fig. 3.15), tuvo un pico de frecuencia en un rango de $-66mV$ a $-60mV$, el valor medio fue de $-49,8377mV$, con una desviación estándar de $20,8886mV$.

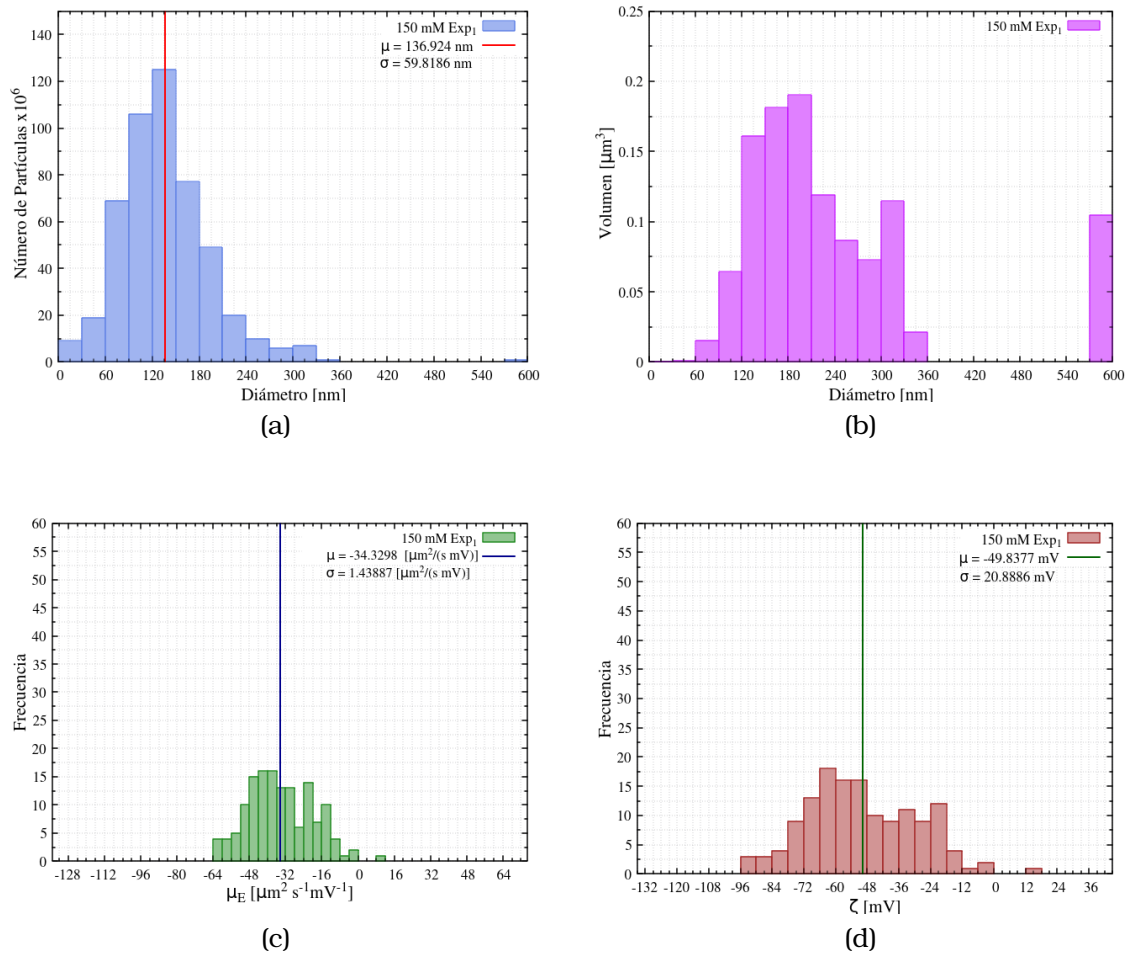


Figura 3.13: Resultados obtenidos para la muestra de liposomas en PBS 150mM. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta.

La densidad de probabilidad para el conjunto de datos de la distribución de tamaños presentó un pico en el rango $120nm$ a $150nm$. Los liposomas con un diámetro hasta ese rango corresponden a $\approx 0,65$ de la densidad acumulada, ver fig.3.14. Adicionalmente, en la fig. 3.13d se visualiza que, la distribución la potencial presentó varias fluctuaciones, es decir, no se tiene una distribución suave. Se obtuvo una media de

$-45,4823 \pm 19,7395 \text{ mV}$. Además, se determinó que los liposomas con un potencial ζ entre -42mV y -36mV fueron aquellos con mayor densidad de probabilidad. Así, los resultados obtenidos indican que los liposomas poseían una distribución de carga efectiva negativa.

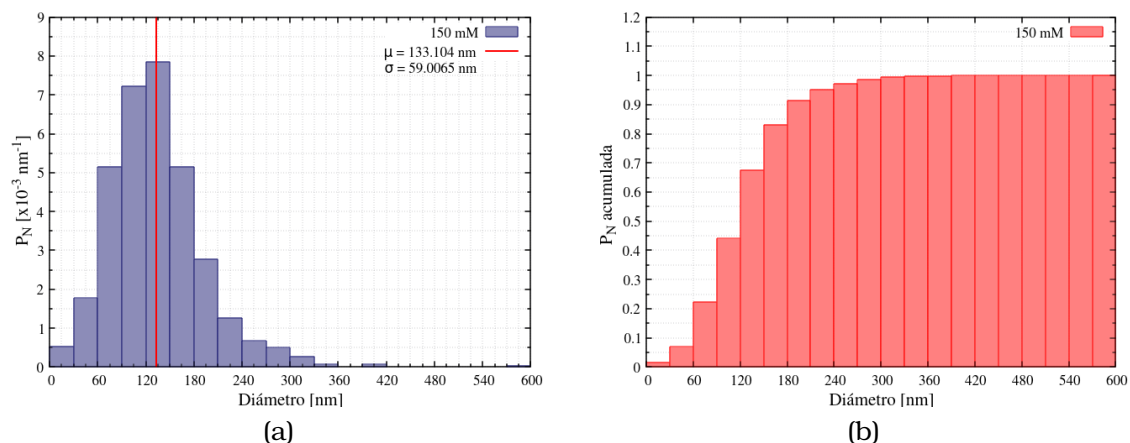


Figura 3.14: a) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños de liposomas en PBS 150mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños acumulada de liposomas en PBS 150mM.

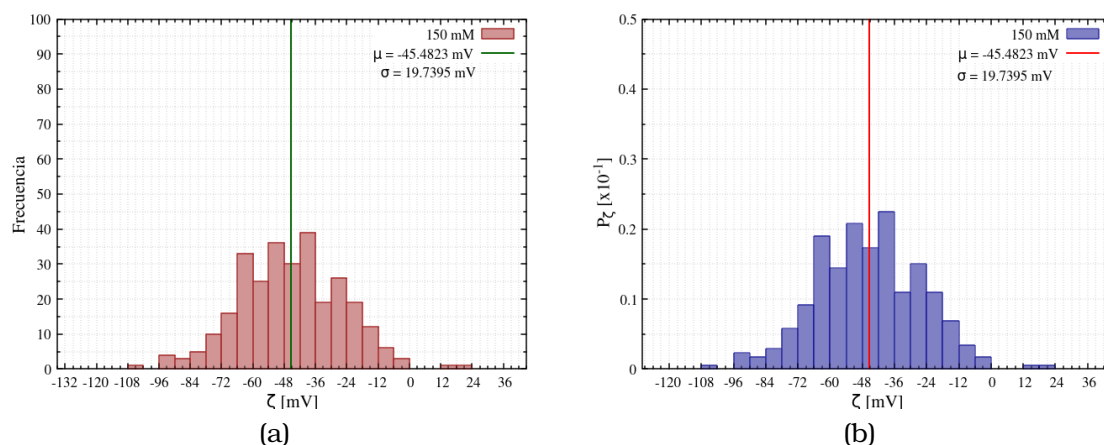


Figura 3.15: a) Distribución de potencial de superposición de experimentos 150mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de superposición de experimentos 150mM.

3.1.6. Liposomas en PBS 200mM

La dilución utilizada en la preparación de la muestra fue de 1 : 63, ya que la absorbancia en 230nm fue de 0,61 (al igual que en la muestra PBS 100mM). Además, la densidad de partículas analizadas en promedio fue $54,5 \times 10^6$ [partículas/ml]. En la fig.(3.16) se presentan los resultados

asociados al primer experimento de tamaños y el segundo de potencial. Puesto que, el primer experimento de potencial arrojó datos fuera del rango de medida del equipo. En la fig. 3.16a se puede visualizar que se obtuvo más cantidad de liposomas con un diámetro entre $90nm$ a $120nm$, el diámetro hidrodinámico medio fue $138,213 \pm 66,707nm$. Mientras que los que ocuparon mayor volumen ($\approx 0,375\mu m^3$) fueron los que tuvieron un tamaño entre $180nm$ y $210nm$. Además, aquellos cuyos tamaños fueron hasta $150nm$ representaron cerca del 0,7 de la densidad acumulada, fig. 3.17b.

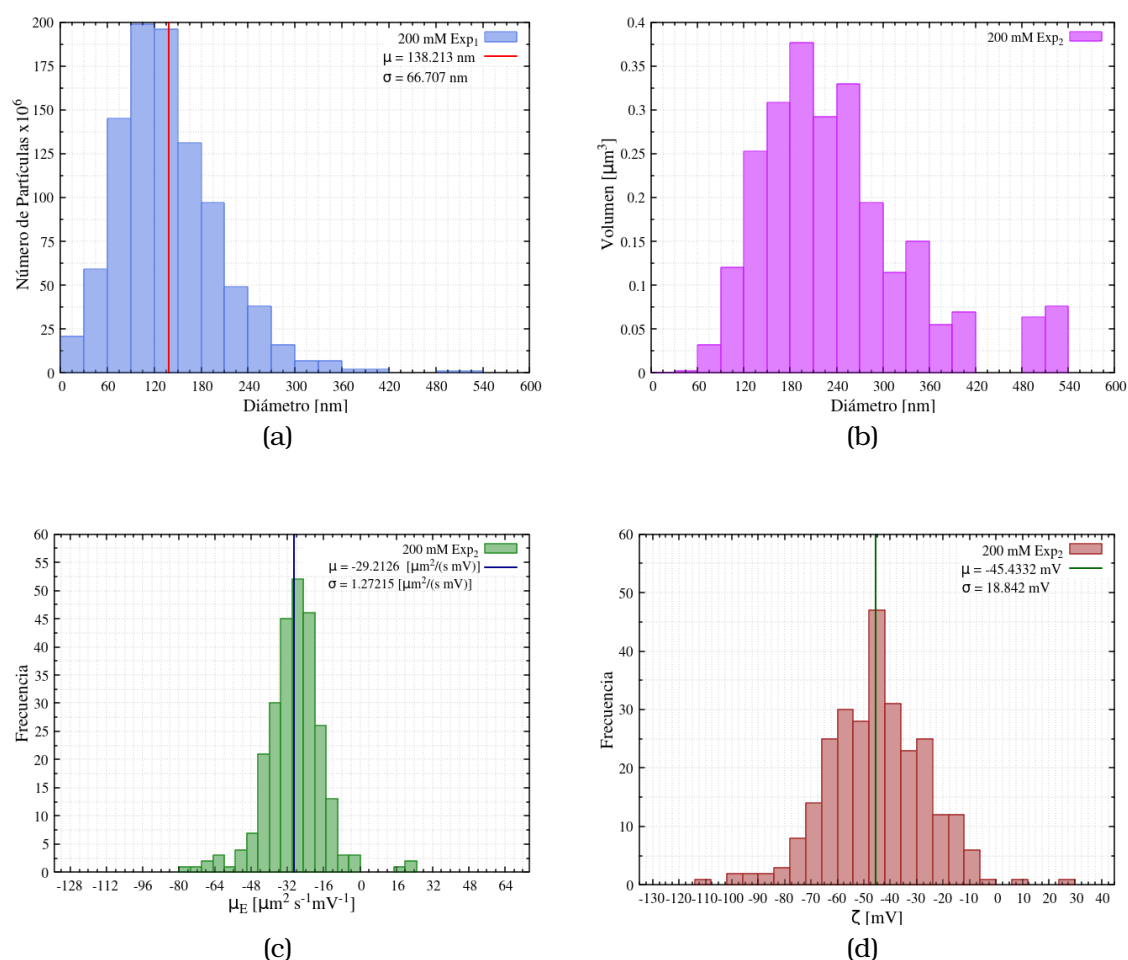


Figura 3.16: Resultados obtenidos para la muestra de liposomas en PBS 200mM. a) Distribución de tamaños. b) Volumen que ocupan los liposomas con un determinado diámetro. c) Distribución de movilidad electroforética. d) Distribución de potencial zeta.

Las partículas en el segundo experimento presentaron un promedio de movilidad electroforética de $-29,2126 \pm 1,27215 \left[\frac{\mu m^2}{s \cdot mV} \right]$, fig. 3.16c). El potencial promedio en el segundo experimento fue de $-45,4332 \pm 18,842mV$, fig.

3.16d. Además, la distribución de densidades de probabilidad se observa mucho más suave, en comparación del resto de resultados. Se obtuvo un incremento de probabilidad hasta alcanzar su máximo entre $-48mV$ y $-42mV$, luego de ello decae (con menor rapidez que en la distribución de tamaños), fig. 3.18b. En esta distribución el tamaño medio fue $-43,5994 \pm 18,602mV$, fig(3.18a).

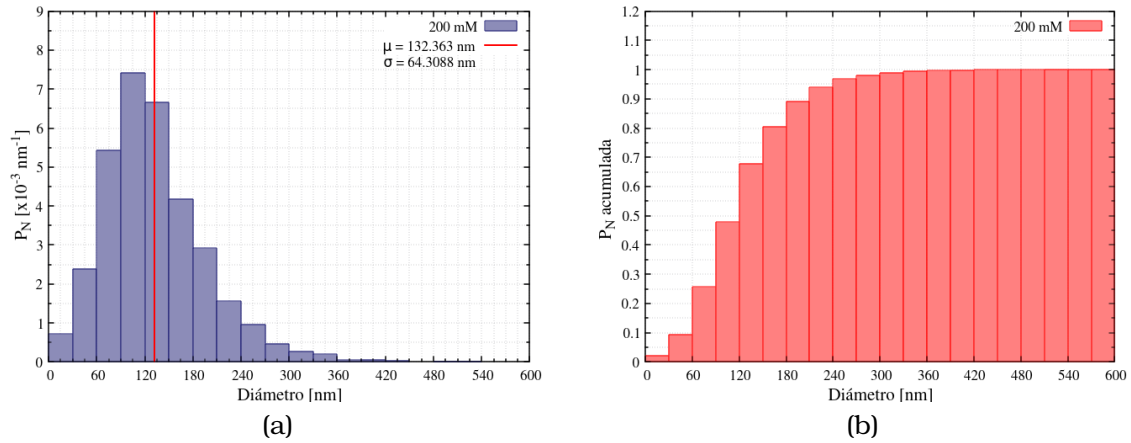


Figura 3.17: a) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños de liposomas en PBS 200mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de tamaños acumulada de liposomas en PBS 200mM.

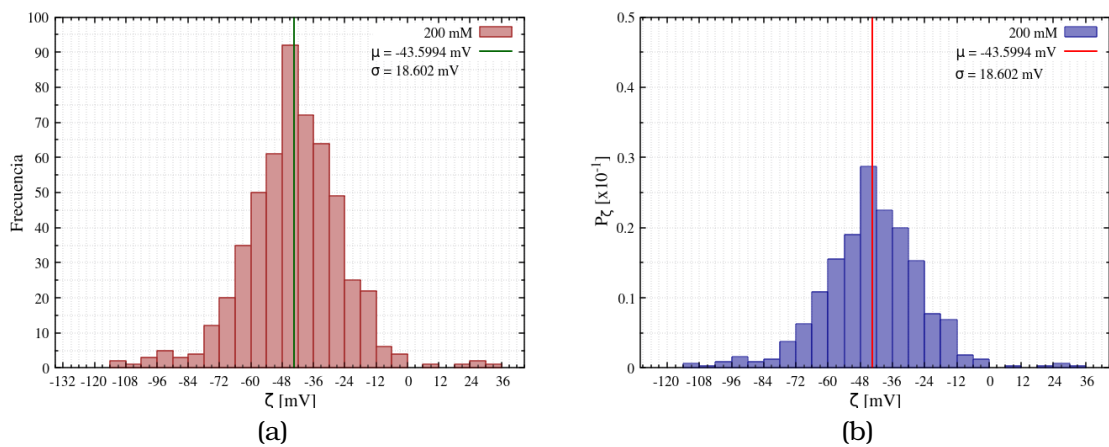


Figura 3.18: a) Distribución de potencial de superposición de experimentos 200mM. b) Densidad de probabilidad de distribución de superposición de experimentos 200mM.

3.2. Influencia de la concentración iónica en la formación de liposomas

En la fig.(3.19) se presentan gráficos correspondientes a los valores medios del diámetro y del potencial ζ de los liposomas. En éstos se observa que los valores correspondientes a la muestra de liposomas en PBS $0mM$ presentan variaciones con respecto a los demás. Es por ello que, se realizó una prueba de hipótesis suponiendo una distribución normal. Ésta determinó con una confiabilidad del 95%, que dicha media no es estadísticamente igual a las obtenidas en los otros experimentos, tanto para la distribución de tamaños como del potencial. Además, este potencial es el de menor magnitud en comparación a los otros resultados. De manera que, el radio hidrodinámico de los liposomas en PB es menor en comparación de aquellos en PBS. También, en la fig. 3.19b se visualiza que el valor asociado a la muestra de PBS $50mM$ difiere. Por ello, de igual manera se efectuó una prueba de hipótesis, que determinó con 95% de fiabilidad, que estadísticamente dicho promedio no es igual a los otros. A diferencia, de la comparación de medias de potencial para las soluciones de liposomas en buffer con concentraciones de NaCl de $100mM - 200mM$, en las que se acepta la hipótesis nula de que éstas son estadísticamente iguales.

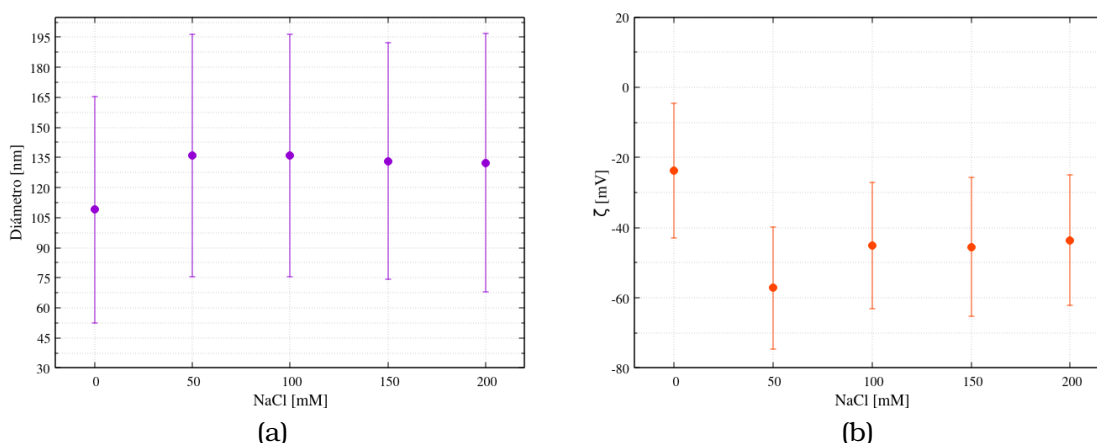


Figura 3.19: a) Valores medios de diámetro en función de la concentración salina. b) Valores medios de potencial ζ en función de la concentración salina.

3.3. Conclusiones y recomendaciones

Los resultados obtenidos indican que, el comportamiento de la distribución de tamaños y la densidad de probabilidad de liposomas preparados con DPPC en soluciones PBS con pH 7, por el método de hidratación y sonificación, es independiente de la concentración salina para concentraciones entre $0mM - 200mM$. Debido a que, los valores medios de los diámetros hidrodinámicos fueron comparables entre sí. Lo cual coincide con los resultados presentados por [13]. No obstante, los tamaños medios de la solución de liposomas en PB difieren de éstos. Tanto para la distribución de tamaños, como para el potencial ζ . Además, las medias correspondientes al potencial, sólo se mantuvieron comparables estadísticamente para las muestras en soluciones con concentraciones de $100mM - 200mM$.

En todas las mediciones de tamaños realizadas el orden de magnitud asociado a las concentraciones de partículas fue de 10^6 . Éstas se encontraron entre $33 - 57 [\times 10^6 \text{partículas/ml}]$. Además, dado que las absorbancias en las muestras $100mM$ y $200mM$ fueron las mismas, fue posible determina la desviación estándar del promedio de las concentraciones, $3,79 \times 10^6 [\text{partículas/ml}]$, con un factor de conversión entre absorbancia y concentración entre con un factor de corrección entre $55 \times 10^7 - 97 \times 10^7$. De esta forma se puede decir que, en base a la absorbancia de las soluciones es posible tener una estimación de la concentración de vesículas.

El rango de tamaños de los liposomas en solución buffer con las diferentes concentraciones salinas estudiadas, en el cual se encontró un mayor número y mayor densidad de probabilidad fue $90nm$ a $150nm$. Adicionalmente, el conjunto de liposomas que ocuparon mayor volumen fueron cuyos diámetros se encontraron entre $150nm$ a $210nm$. De tal manera que, a pesar de haberse obtenido mayor cantidad de partículas coloidales entre $90nm$ a $150nm$, esto no implica que éstos fueron los que ocuparon un mayor volumen. Además, aquellas cuyos tamaños se encontraron hasta $120nm$, correspondieron al menos al 0,5 de la densidad de probabilidad acumulada, y en general, los liposomas de hasta $210nm$ representaron aproximadamente el 0,9 de la densidad. Ahora bien, tal y como se apreció anteriormente, las distribuciones de tamaños y sus densidades de pro-

babilidad presentaron tendencias similares en todas las muestras, hubo un crecimiento hasta alcanzar el pico y luego un decaimiento rápido. Sin embargo, no se determinó una curva de ajuste para éstos. Por lo cual, se sugiere como proyecto futuro establecer dicho ajuste.

Los tamaños medios de la distribución de los experimentos con soluciones PBS se encontraron en un rango entre $132nm - 136nm$. De tal manera que, con una confiabilidad del 95% se puede decir que fueron comparables estadísticamente iguales. Análogamente, con el mismo porcentaje de confianza, se determinó que el diámetro hidrodinámico medio correspondiente a los experimentos en PB no es estadísticamente igual a aquellos de las soluciones PBS. De hecho, éste fue el tamaño promedio de menor magnitud. De lo cual se infiere que la región hidrodinámica inmóvil de los liposomas en PB es menor a aquellos en PBS.

Las propiedades electrocinéticas (movilidad electroforética y potencial ζ), en general presentaron distribuciones en el rango de los negativos. Por consiguiente, las distribuciones de carga en la región hidrodinámica inmóvil de los liposomas fueron predominantemente negativas. Consecuentemente, las cargas superficiales de éstos son positivas (por atracción de cargas). Las partículas en solución PB y PBS $50mM$, con una confianza del 95% no presentaron valores medios estadísticamente iguales en comparación de aquellos en las soluciones PBS $100mM - 200mM$, cuyos potenciales medios se hallaron entre $-43mV$ a $-45mV$. Además, la magnitud del potencial medio correspondiente a la muestra de PB fue la menor. De tal forma que, la adsorción de iones fue inferior. Lo cual es coherente con la idea de que al ser los fosfatos los únicos iones en el PB, al ser estos más grandes que los del cloro, se tiene una menor cantidad de iones adsorbidos. Lo mismo que, también pudo haber influido en el radio hidrodinámico de los liposomas. No obstante, esto no justifica el resultado anómalo obtenido en el promedio de potencial ζ de la muestra $50mM$ ($-57,211 \pm 17,332 nm$). Por este motivo, lo conveniente sería realizar experimentos que corroboren o descarten este valor.

Adicionalmente, de las distribuciones de potencial se obtuvo que los rangos en los que hubo picos de cantidad de liposomas fueron variados en cada experimento. Esto, debido a que las tendencias de éstas fueron muy diferentes entre sí, sólo se presentó un comportamiento suave en

los experimentos con solución PBS $200mM$, en la cual se establecieron tres mediciones consecutivas. Si bien el conjunto de datos de la primera medición no estaba en el rango permitido del equipo, al haber realizado más experimentos la muestra se estabilizó, por lo cual se obtuvo una mejor distribución del potencial. Por ello, lo más adecuado sería realizar los experimentos un tiempo apropiado para que las muestras se estabilicen previo a la toma de mediciones.

Referencias bibliográficas

- [1] Word Inc. Canva (versión 1.60.0). <https://www.canva.com>. Accedido en febrero de 2023.
- [2] D.D. Lasic. *Liposomes: From Physics to Applications*. Elsevier. Vol 1., 1993.
- [3] A.D Bangham and R.W. Negative staining of phospholipids and their structured modification by surface active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.*, 1964.
- [4] M. Riaz, X. Zhang, C. Lin, K. Wong, X. Chen, G. Zhang, A. Lu, and Z. Yang. Negative staining of phospholipids and their structured modification by surface active agents as observed in the electron microscope. *Int. J. Mol. Sci.* 1, 2018.
- [5] A. Singh, P. Vengurlekar, and S. Rathod. Design, development and characterization of liposomal neem gel. *Int. J.Pharm Sci. Res*, 2014.
- [6] G. Cecv. *Phospholipids Handbook*. Marcel Dekker. Inc, 1993.
- [7] R. Smith and C. Tanford. The critical micelle concentration of 1- α dipalmitoylphosphatidylcholine in water and water/methanol solutions. *J. Mol. Biol.*, 1971.
- [8] J.A. Virtanen, K. H. Cheng, and P Somerhaurju. Phospholipid composition of the mammalian red cell membrane can be rationalized by a superlattice model. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.*, 1998.

- [9] I. Tinoco, K. Sauer, J.C. Wang, J.D. Puglisi, G. Harbison, and D. Rovnyak. *Physical chemistry: Principles and applications in biological sciences*. Pearson, 2007.
- [10] V. Filipe, A. Hawe, and W. Jiskoot. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (nta) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res.*, 2010.
- [11] K. Ahram, B. Wei, W. Bernt, and C. Nam-Joon. Validation of size estimation of nanoparticle tracking analysis on polydisperse macromolecule assembly. *Scientific Reports*, 2019.
- [12] M. Kaszuba, J. Corbett, F.M. Watson, and A. Jones. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Phil. Trans. R. Soc*, 2010.
- [13] J. Sabín, G. Prieto, J.M. Ruso, R. Hidalgo-Alvarez, and F. Sarmiento. Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces. *Eur.Phys. J.*, 2006.
- [14] Ch. Conn and J. Seddon. *Liposomes, Lipid Bilayers and Model Membranes From Basic Research to Application*. Taylor Francis Group, 2014.
- [15] Hunter R.J. *Foundations of Colloid Science*. Oxford Univ Press, 1987.
- [16] A. Kim, W. Bernt, and N-J. Cho. Validation of size estimation of nanoparticle tracking analysis on polydisperse macromolecule assembly. *Sci Rep*, 2019.
- [17] R.J. Hunter. *Zeta Potential in Colloid Science*. Academic Press, 1981.
- [18] *Physical Chemistry of Macromolecules, Basic Principles and Issues*. JOHN WILEY & SONS INC., 2004.
- [19] *Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Unitsx, Appendix II: Definitions, Terminology and Symbols in Colloid and Surface Chemistry*. D.H. Everett, 1972.
- [20] B. Derjaguin and L.D. Landau. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochimica U.R.S.S.*, 1941.

- [21] J. Verwey, E. anf Overbeck. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*. Elseiver, 1948.
- [22] J.N. Israelachvili and R.M. Pashley. *Measurement of the hydrophobic interaction between two hydrophobic surfaces in aqueous ecoolectrolyte solutions*. Elseiver, 1984.
- [23] A.D. Bangham, M.M Standish, and J.C. Watkins. Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.*, 1965.
- [24] Thomas. Williams, Colin. Kelley, et al. Gnuplot (versión 5.4). <http://www.gnuplot.info/>. Accedido en febrero de 2023.
- [25] H.A. Sturges. The choice of a class interval. *Statistical Association*, 1926.