



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD MONTERREY

**Modificación de las propiedades termotrópicas de liposomas mediante  
NaCl**

Tesis que presenta

**Ángela María Jaramillo Granada**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias**

Con especialidad en

**Ingeniería Y Física Biomédicas**

Director de la tesis

**Dr. Jesús Carlos Ruiz Suarez**

Monterrey, Nuevo León

Agosto, 2018



## Agradecimientos

Al Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para que pudiera desarrollar el proyecto.

Al Cinvestav unidad Monterrey por brindarme la oportunidad de escalar un grado más en mi preparación académica.

Al Dr. Carlos Ruiz Suarez por la confianza que depositó en mí al aceptarme como una de sus estudiantes y creer en mis capacidades para el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, especialmente a Eric Oropeza quien con su conocimiento y discusiones permitió que mi trabajo fuera más direccionado y enriquecedor.

A mis compañeros de maestría, principalmente Alberto Ramírez por apoyarme no solo académicamente sino también en los momentos de dificultades, a él mil gracias.

A mi familia porque fueron parte esencial para que yo finalmente continuara con mis estudios.



# Índice

Índice de figuras .....	7
Índice de tablas .....	9
Abreviaturas .....	10
Resumen.....	11
Abstract .....	12
1 Introducción.....	13
1.1 Membrana plasmática .....	13
1.2 Modelos de membrana.....	14
1.3 Conductimetría .....	15
1.4 Calorimetría .....	16
1.5 Interacciones entre los liposomas y iones .....	17
1.6 Fuerza de hidratación .....	19
1.7 Antecedentes .....	20
2 Hipótesis.....	24
3 Objetivos .....	25
3.1 Objetivo general.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4 Metodología.....	26
4.1 Reactivos .....	26
4.2 Preparación de los liposomas .....	26
4.3 Mediciones.....	28
4.4 Mediciones de calorimetría .....	29
4.5 Mediciones de conductividad .....	29
4.6 Análisis estadístico .....	29
5 Resultados.....	30
5.1 Calorimetría .....	30
5.2 Conductimetría .....	38

6	Discusión .....	42
7	Conclusiones .....	46
8	Perspectivas .....	47
9	Bibliografía .....	48
10	Anexo .....	51

# Índice de figuras

Figura 1. Composición de la membrana plasmática de un eritrocito SM: esfingomielina, PC: fosfatidilcolina: PE: fosfatidiletanolamina, PS: fosfatidilserina. Esta figura fue tomada de [1].	14
Figura 2. Esquema de un perfil calorimétrico. ....	17
Figura 3. Modelo de la doble capa eléctrica. Esta figura fue modificado de [5].....	18
Figura 4. Perfil calorimétrico de MLVs POPC. a. Diferentes concentraciones de NaCl. b. Molécula de DOPC. Esta figura fue modificada de [13].....	21
Figura 5. a. DPPC y b. DMPC ambas moléculas se diferencian por el número de carbonos en su región hidrofóbica, la molécula de DPPC tiene dos carbonos más que el DMPC. Tomado de Avanti Polar Lipids, Inc. ....	26
Figura 6. Esquema de la preparación de los liposomas. ....	28
Figura 7. Esquema de perfiles calorimétricos de un experimento de LUVs de 200 nm de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl.....	31
Figura 8. Capacidad calorífica máxima de LUVs de 200 nm de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl. ....	32
Figura 9. Entalpía de LUVs de 200 nm de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl.32	
Figura 10. Temperatura de transición principal para LUVs de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl. ....	33
Figura 11. Capacidad calorífica máxima de LUVs de 200 nm de DMPC a diferentes concentraciones de NaCl. ....	34
Figura 12. Entalpía de LUVs de 200 nm de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl.	35
Figura 13. Temperatura de transición principal para LUVs de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl. ....	35
Figura 14. Perfil calorimétrico de DPPC suspendidos en agua des-ionizada (sin NaCl). 36	

Figura 15. Perfiles calorimétricos de DPPC a 14 mM de NaCl.....	37
Figura 16. Conductividad eléctrica del medio en el que están suspendidos los liposomas de DPPC y DMPC. ....	39
Figura 17. Conductividad eléctrica de soluciones de NaCl con y sin evaporación (sin liposomas).....	40
Figura 18. Curva de calibración de NaCl para diferentes valores de conductividad. ....	40
Figura 19. Concentración de NaCl correspondiente a los valores de conductividad para DMPC y DPPC. ....	41

# Índice de tablas

Tabla 1. Datos termodinámicos de un perfil calorimétrico de DPPC a las concentraciones de NaCl especificadas. Modificado de [17]..... 22

Tabla 2. Promedio de 5 repeticiones de los datos absolutos de capacidad calorífica máxima, entalpía y temperatura de transición principal del control y la muestra a diferentes concentraciones de NaCl para liposomas de DPPC a una concentración de 5 mM. La capacidad calorífica está en kJ/mol\*K, la entalpía en kJ/mol, la temperatura de transición principal en °C y la concentración de NaCl en mM, SD es la desviación estándar..... 51

Tabla 3. Promedio de 5 repeticiones de los datos absolutos de capacidad calorífica máxima, entalpía y temperatura de transición principal del control y la muestra a diferentes concentraciones de NaCl para liposomas de DMPC a una concentración de 5 mM. La capacidad calorífica está en kJ/mol\*K, la entalpía en kJ/mol, la temperatura de transición principal en °C y la concentración de NaCl en mM, SD es la desviación estándar. .... 52

Tabla 4. Conductividad de liposomas de DPPC y DMPC a 5 mM, suspendidos en una solución electrolítica de 14 mM de NaCl, los valores de conductividad eléctrica son el promedio de 5 repeticiones para cada lípido, la conductividad está dada en mS/cm, SD es la desviación estándar. .... 52

# Abreviaturas

DPPC: 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina.

DMPC: 1,2-dimiristoil-sn-3-fosfatidilcolina.

POPC: 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3- fosfatidilcolina.

DSC: Calorimetría diferencial de barrido.

MD: Dinámica molecular.

EDL: Doble capa eléctrica.

IHP: Plano interno de Helmholtz.

OHP: Plano externo de Helmholtz.

NaCl: Cloruro de sodio.

LiCl: Cloruro de litio.

CsCl: Cloruro de cesio.

KCl: Cloruro de potasio.

Na<sup>+</sup>: Ion de sodio.

Cl<sup>-</sup>: Ion de cloro.

NMR: Resonancia magnética nuclear.

SD: Desviación estándar.

# Resumen

Los liposomas son modelos de membrana ampliamente estudiados que permiten conocer interacciones básicas entre fosfolípidos y diferentes componentes biológicos, entre los que se encuentran proteínas, colesterol, iones, entre otros.

En el presente trabajo se estudian las interacciones entre liposomas de lípidos zwitteriónicos con iones monovalentes, para analizar las propiedades termotrópicas de vesículas unilaminares en medios electrolíticos y conocer si estas son alteradas por la deshidratación del medio.

Se sabe que los iones y liposomas en un medio acuoso son rodeados por moléculas de agua que pueden alterar su interacción, por lo que se cree que, al disminuir el número de estas moléculas, los fosfolípidos son capaces de generar uniones estables con los iones, de modo que una rehidratación del medio sea incapaz de debilitar estas interacciones y por lo tanto se generen cambios en las respuestas termotrópicas de los liposomas.

Mediante técnicas de calorimetría y conductimetría se demostró que la deshidratación del medio es capaz de favorecer la adsorción de iones a la superficie del liposoma y cambiar las características termotrópicas de dispersiones de DPPC y DMPC en medios electrolíticos.

# Abstract

Liposomes are well studied membrane models that allow knowing basic interactions between phospholipids and different biological components like proteins, cholesterol, ions, among others.

In the present work, the interactions between zwitterionic lipid liposomes with monovalent ions are studied, to analyze the thermotropic properties of unilamellar vesicles in electrolytic media and to know if these are altered by the dehydration of the medium.

It is known that liposomes and ions in an aqueous medium are surrounded by water molecules that can affect their interaction, which may be able to generate stable molecules with ions so that a rehydration of the environment cannot weaken these interactions and therefore generate changes in the thermotropic responses of the liposomes.

By means of calorimetry and conductimetry techniques, it is demonstrated that the dehydration of the medium is able to favor the adsorption of ions to the liposome surface and change the thermotropic characteristics of the dispersions of DPPC and DMPC in electrolytic media.

# 1 Introducción

## 1.1 Membrana plasmática

La célula es la unidad básica de la vida y está compuesta por una barrera semipermeable llamada membrana plasmática. Ésta permite separar el medio extracelular del medio intracelular; se constituye principalmente por glúcidos y proteínas embebidas en una red de lípidos que permiten controlar el movimiento de sustancias dentro y fuera de la célula. El contenido de proteínas en la membrana plasmática hace que sea selectivamente permeable a iones, entre los principales se encuentran el cloro, calcio, sodio y potasio cuyas concentraciones más altas están en el rango de 100 a 200 mM.

La membrana plasmática forma una estructura en forma de bicapa en la cual se encuentran diferentes tipos de fosfolípidos distribuidos asimétricamente sobre ambos lados de la bicapa, la composición de fosfolípidos en el interior y exterior de la bicapa varía con el tipo de célula; para eritrocitos se ha encontrado que las proporciones entre las capas de la membrana plasmática se forman en su mayoría por esfingomiélin y fosfatidilcolina, mientras que en el interior de la membrana dominan los fosfolípidos de fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, tal como se indica en la figura 1 [1].

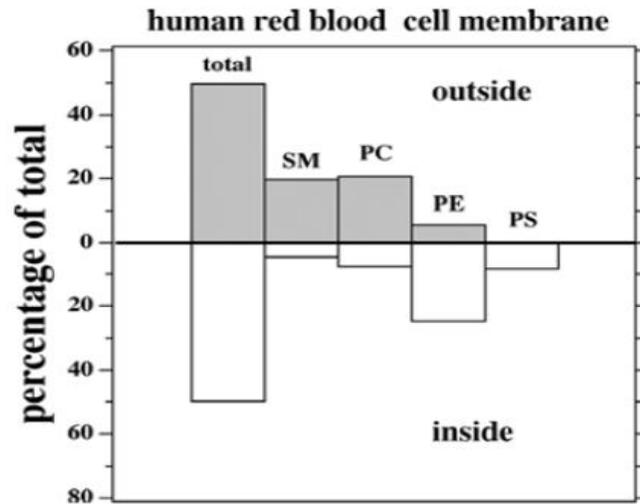


Figura 1. Composición de la membrana plasmática de un eritrocito SM: esfingomielina, PC: fosfatidilcolina: PE: fosfatidiletanolamina, PS: fosfatidilserina. Esta figura fue tomada de [1].

## 1.2 Modelos de membrana

Debido a la complejidad de la membrana plasmática y la heterogeneidad en su composición, se ha optado por el estudio en modelos más sencillos llamados liposomas que permitan ayudar a entender las interacciones que se dan entre componentes de la célula, con el fin de entender las interacciones entre: las membranas y las proteínas, las diferentes especies de lípidos y las interacciones con iones [2], [3].

Los liposomas son pequeñas vesículas de fosfolípidos que se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se exponen en una disolución, formando un núcleo acuoso separado del medio exterior.

La formación de la vesícula se produce por las características de los fosfolípidos, al estar compuestos de un grupo de cabeza polar o hidrofílica y una región de cadena apolar o hidrofóbica, al contacto con el agua, las colas

hidrocarbonadas se reorganizan con otros fosfolípidos para alejarse de la región hidrofóbica y exponen sus cabezas polares [1].

Para entender cómo se organizan las estructuras formadas por los fosfolípidos en medios acuosos se han medido sus propiedades mediante diversas técnicas como calorimetría, espectroscopia de fluorescencia, potenciometría, conductimetría, dispersión dinámica de luz, espectroscopia de fuerza atómica, difracción de rayos x, entre otras.

### 1.3 Conductimetría

La conductimetría es una técnica que mide la conductividad eléctrica de una solución electrolítica, una de sus aplicaciones es la titulación de concentraciones iónicas o salinas en una disolución, sin embargo, se puede aplicar a cualquier estudio que busque conocer la capacidad de una solución para conducir la electricidad.

El valor de conductividad de una solución puede conocerse a través de la ley de Ohm, la cual que establece que el voltaje ( $V$ ) es el producto de la resistencia ( $R$ ) por la corriente ( $I$ ).

$$V = I * R \quad (1)$$

Haciendo uso de la relación que existe entre la conductividad ( $\sigma$ ) y la resistencia

$$R = \frac{l}{A \sigma} \quad (2)$$

Siendo  $l$  la distancia de separación entre los electrodos y  $A$  el área de los mismos. Por lo tanto, reemplazando (2) en (1) y despejando  $\sigma$  se tiene la expresión matemática que permite calcular la conductividad de una solución.

$$\sigma = \frac{l I}{A V} \quad (3)$$

Las unidades de la conductividad son S/cm (siemens por centímetro).

## 1.4 Calorimetría

Una de las herramientas para el análisis de las interacciones entre los iones y los liposomas es la calorimetría, esta técnica se fundamenta en las propiedades termotrópicas que exponen los liposomas ante cambios en la temperatura, como todo sistema termodinámico, el cambio en la energía interna de los liposomas ( $dU$ ) es el resultado del cambio de calor del sistema ( $dQ$ ) y el cambio de trabajo realizado ( $dW$ ).

$$dU = dQ + dW \quad (4)$$

El trabajo realizado puede deberse a cambios en el volumen, cambios en el área, entre otros.

Mediante la calorimetría se puede conocer de manera indirecta la capacidad calorífica de los liposomas en función de la temperatura, la cual está definida como el calor necesario para incrementar la temperatura una unidad.

$$c_p = \left( \frac{dQ}{dT} \right)_p \quad (5)$$

Del diferencial de la función de estado de entalpía se tiene:

$$dH = dQ + Vdp \quad (6)$$

A presión constante la ecuación (2) queda de la forma:

$$c_p = \left( \frac{dH}{dT} \right)_p \quad (7)$$

Despejando la entalpía e integrando sobre un rango de temperatura se tiene:

[1]

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} c_p dT \quad (8)$$

En los perfiles calorimétricos de los liposomas se pueden ver principalmente dos picos, un pequeño pico es llamado pre-transición e indica un cambio de los

liposomas de fase gel a fase ondulada y se debe a que a cierta temperatura algunos fosfolípidos pasan a fase fluida. Más adelante a una temperatura superior, se observa un pico de mayor amplitud conocido como transición principal. Por convención se suele llamar la temperatura de amplitud máxima como temperatura de transición principal, luego de la transición principal todos los lípidos están en fase fluida, la entalpia de cada fase representa el área bajo la curva de cada pico (ecuación 8).

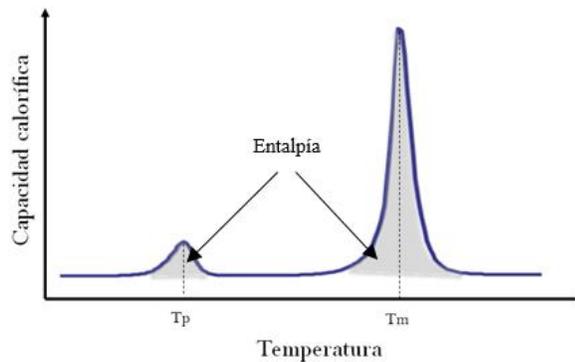


Figura 2. Esquema de un perfil calorimétrico.

De tal modo, se ha observado que los iones pueden desplazar la temperatura a la cual suceden los cambios de fase hacia temperaturas más altas, incluso su efecto está relacionado con su concentración en la solución [4].

## 1.5 Interacciones entre los liposomas y iones

Se cree que los iones se organizan alrededor de los liposomas siguiendo una distribución específica conocida como modelo de la doble capa eléctrica (EDL, por sus siglas en inglés) tal como se indica en la figura 3 [5].

La primera capa de esta distribución se conoce como capa Stern, en la cual se distinguen a su vez dos planos. El primer plano es conocido como plano interno de Helmholtz (IHP, por sus siglas en inglés), que aloja los iones específicamente adsorbidos a la superficie del liposoma; en el caso del segundo plano o plano externo

de Helmholtz (OHP), se localizan contra-iones que son atraídos por interacciones Coulombicas.

La segunda capa de la distribución es conocida como capa difusa y contiene un arreglo de co-iones y contra-iones que eventualmente coincide con la distribución electrolítica del bulto

En presencia de un campo eléctrico, o una fuerza mecánica, se genera una delgada capa de fluido adherido a la superficie la cual es llamada capa hidrodinámicamente estancada, que va desde la superficie hasta cierta distancia donde se ubica un plano deslizando.

El potencial medido desde el plano deslizando con respecto al bulto es llamado potencial  $z$  y es una medida relacionada con la carga superficial de la membrana.

El espacio de carga en la capa estancada es hidrodinámicamente inmóvil, por lo que, en conjunto, el liposoma y la capa estancada se comportan como si fueran una sola partícula.

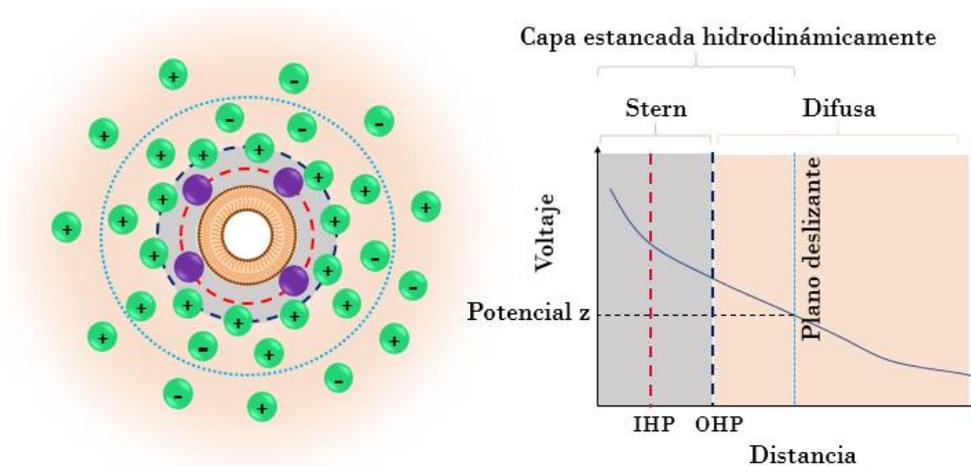


Figura 3. Modelo de la doble capa eléctrica. Esta figura fue modificado de [5].

## 1.6 Fuerza de hidratación

Gracias a estudios experimentales se sabe, que existe una fuerza de interacción que afecta a las superficies de modelos de membrana de DPPC inmersos en agua, donde se logró determinar a través de técnicas como estrés osmótico que tal interacción es repulsiva y que obedece a un decaimiento exponencial; dado que la constante de decaimiento de la función exponencial era cercana al tamaño de las moléculas de agua, se le llamó fuerza de hidratación [6].

Para conocer la naturaleza de la fuerza de hidratación McIntosh y Simon realizaron un estudio donde propusieron, luego de realizar experimentos de difracción de rayos X y estrés osmótico entre bicapas de fosfolípidos separados cierta distancia  $d$ , que la fuerza de hidratación tiene tres regímenes.

El primer régimen es a grandes distancias ( $d > 0.8$  nm), donde la fuerza de hidratación es dependiente de la fase del lípido y principalmente debido a interacciones entre las superficies de las bicapas, dado que se generan ondulaciones térmicas, cuyas amplitudes incrementan con el aumento de la temperatura y que resultan en repulsiones entre las bicapas opuestas[6].

El segundo régimen comprende una distancia  $d$  entre 0.4 nm y 0.8 nm, cuya fuerza es debido a la presencia de moléculas de agua, siendo aproximadamente tres capas las que separan las superficies de las bicapas lipídicas.

El tercer régimen es cuando la distancia  $d$  que separa las bicapas está por debajo de 0.4 nm, allí actúan las interacciones estéricas, las cuales hacen referencia a las interacciones producidas por el contacto físico entre moléculas de lípidos adyacentes de la bicapa.

Por otra parte, Aman et al, realizaron experimentos de NMR (resonancia magnética nuclear) para conocer el número de moléculas de agua que hacían parte de la capa de hidratación, encontrando que en la interface aproximadamente 17

moléculas de agua por lípido son perturbadas por los grupos funcionales de las cabezas de DPPC [7].

En general, cualquier soluto que es sumergido en una solución acuosa experimenta una atracción de moléculas del solvente que se forman estructuralmente entorno él, formando capas de hidratación. Cuando el soluto es formado por iones, el número de moléculas del solvente que hacen parte de las capas de hidratación dependen del tipo de ion, tal como su carga y tamaño, se ha determinado que el  $\text{Na}^+$  tiene en su primera y segunda capa de hidratación 5 y 16 moléculas de agua respectivamente [8], [9]. Mientras que para el  $\text{Cl}^-$  se han reportado 7 moléculas de agua en la primera capa de hidratación [9]. Por lo tanto, la fuerza de hidratación hace que deba haber una fuerza de atracción mayor que le gane a las fuerzas de repulsión determinadas en la hidratación, para que se produzca una interacción directa entre los liposomas y los iones en una solución acuosa.

Por último, cuando los liposomas son hidratados en agua se generan interacciones fosfolípido-fosfolípido, fosfolípido-agua y agua-agua [10], sin embargo, cuando la dispersión de liposomas contiene iones aparecen además de las ya mencionadas, interacciones fosfolípido-ion, agua-ion [11].

## 1.7 Antecedentes

Diferentes grupos de investigación han caracterizado el efecto de la interacción de membranas con iones evaluando sus parámetros termotrópicos, observando cambios en la temperatura de transición, cambios en las funciones de estado y el ancho del pico de la transición principal [12], [13].

También se han clasificado los efectos termotrópicos respecto a la magnitud de la respuesta de los iones para desplazar la temperatura de fusión hacia temperaturas más altas debido al tipo de catión, tanto en fase de pre-transición como transición principal [13]. Los iones monovalentes y en especial el sodio han sido ampliamente estudiados, siendo cuestionada su capacidad para generar una carga superficial sobre

la membrana de acuerdo a estudios de difracción de rayos X, calorimetría y simulaciones de dinámica molecular [4], [13], [14].

Según estudios realizados por Bockmann et al. encontraron que los perfiles calorimétricos de vesículas multilaminares (MLVs) formadas a partir de fosfolípidos de 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3- fosfatidilcolina (POPC) cambian cuando se aumenta la concentración de NaCl (figura 4), específicamente disminuyendo la capacidad calorífica máxima de los liposomas, mientras que la entalpía permaneció constante; este comportamiento se complementó con simulaciones de dinámica molecular llegando a la conclusión de la formación de complejos entre fosfolípidos y iones que generan una disminución en el coeficiente de difusión lateral de los liposomas cuando incrementa la concentración de NaCl. Así mismo, simulaciones MD les permitieron observar disminuciones en el área por lípido con incrementos de NaCl, determinando complejos de un ion de sodio coordinado por el oxígeno del grupo carbonil de tres fosfolípidos [15].

Pabst et al. observó que además de lo anterior, la temperatura de transición principal de los liposomas de POPC se desplazaba hacia temperaturas más altas cuando la concentración de NaCl varió entre 1-5 M, favoreciendo la fase gel. Sin embargo, y a diferencia de lo encontrado por Bockman, la entalpía de transición principal disminuía cuando aumentaba la concentración de sales [16].

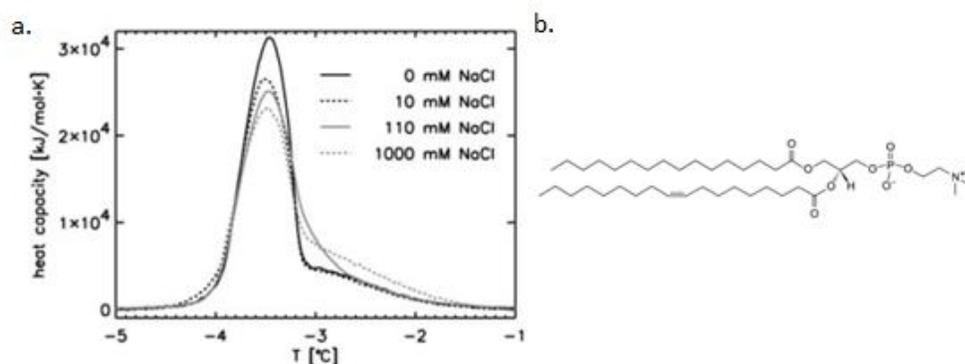


Figura 4. Perfil calorimétrico de MLVs POPC. a. Diferentes concentraciones de NaCl. b. Molécula de POPC. Esta figura fue modificada de [15].

En la tabla 1, Se observa un comportamiento similar que el del POPC, un desplazamiento hacia temperaturas más altas de aproximadamente tres grados y una entalpía que sólo cambió en 0.1 kcal/mol para un barrido de 0 a 3 M de NaCl para liposomas compuestos por DPPC [17].

Tabla 1. Datos termodinámicos de un perfil calorimétrico de DPPC a las concentraciones de NaCl especificadas. Modificado de [17].

[NaCl] mol	DSC		
	$T_p$ (°C)	$T_m$ (°C)	$\Delta H_m$ (kcal/mol)
0	33.6	41.4	7.8
1	38.0	43.0	7.8
2	40.5	43.8	7.9
3	41.4	44.5	7.9

Así mismo, en un estudio realizado por Rosendo Pérez et al, se analizó la formación de cristales generados por la evaporación en un sustrato de gotas que contenían soluciones con liposomas de DMPC y diferentes tipos de sales (LiCl, NaCl, KCl y CsCl), para así ver los cambios estructurales en los liposomas debido a la presencia de electrolitos [18]. Se encontró al analizar los patrones de gotas disecadas que el tamaño del catión es determinante en los patrones de gotas disecadas, mientras más pequeño, tiene la facilidad de adentrarse e interactuar en la región de las cabezas polares, generando un mayor empaquetado de los fosfolípidos y desplazando hacia temperaturas mayores la temperatura de transición [18].

Sin embargo, en tal estudio no se analizaron qué propiedades termodinámicas se ven alteradas luego de un proceso de evaporación y posterior rehidratación de las gotas de mezclas de liposomas con cloruros alcalinos.

Debido a lo anterior, es de nuestro interés ahondar en el estudio de las interacciones de lípidos zwitteriónicos con iones monovalentes y determinar si la evaporación genera un cambio en tales interacciones; para ello se pretende comparar la capacidad del ion para interactuar con las cabezas polares tanto hidratado como luego de un proceso de evaporación y posterior rehidratación, ya que una de las fuerzas que se oponen a la interacción entre las cabezas polares y los iones es la hidratación.

## 2 Hipótesis

Las propiedades termotrópicas de liposomas de fosfolípidos zwitteriónicos suspendidos en un medio salino con NaCl, son afectadas por la evaporación del medio.

# 3 Objetivos

## 3.1 Objetivo general

Determinar si la evaporación modifica las propiedades **termotrópicas** de liposomas zwitteriónicos en presencia de NaCl (temperatura de transición, entalpía y capacidad calorífica máxima).

## 3.2 Objetivos específicos

- Analizar el efecto de la evaporación con diferentes tipos de fosfolípidos.
- Complementar el análisis de parámetros termotrópicos con mediciones de conductividad.

# 4 Metodología

## 4.1 Reactivos

Para la realización del presente trabajo se usaron dos tipos de fosfolípidos zwitteriónicos, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DPPC) y 1,2-dimiristoil-sn-3-fosfatidilcolina (DMPC), cuyas moléculas se muestran en la figura 5. Ambos lípidos fueron comprados en Avanti Polar Lipids y Sigma-Aldrich y Cloruro de Sodio (NaCl) con una pureza mayor o igual al 99.5% fue adquirido en Sigma-Aldrich, todos los reactivos sin purificación adicional.

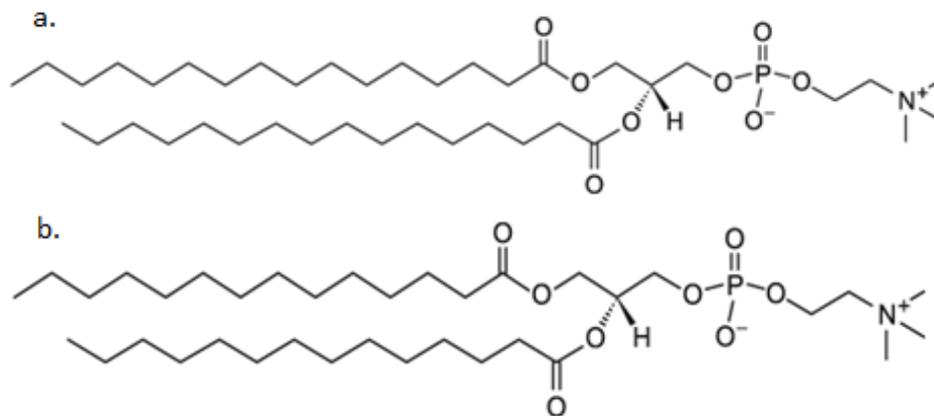


Figura 5. a. DPPC y b. DMPC ambas moléculas se diferencian por el número de carbonos en su región hidrofóbica, la molécula de DPPC tiene dos carbonos más que el DMPC. Tomado de Avanti Polar Lipids, Inc.

## 4.2 Preparación de los liposomas

Para la preparación de los liposomas se empleó un protocolo que consistió como primera medida en calentar por 15 minutos el lípido en polvo a una temperatura de 60°C para ambos lípidos, posteriormente se hidrató con 1.1 mL de

una disolución previamente calentada a la misma temperatura de NaCl con agua desionizada Milli-Q, luego de una vigorosa agitación se dejó reposar por 15 minutos.

Una vez obtenidas las MLVs del lípido deseado, se extruyeron con la ayuda de un mini-extruder Avanti Polar Lipids Inc. La suspensión de liposomas se hizo pasar 15 veces por un poro de membrana de policarbonato de 200 nm (Nucleopore Track-Etched Membranes, Whatman) todo ello a una temperatura de 60°C.

Una vez extruidas se pusieron a reposar en un horno a la misma temperatura por 15 minutos, para posteriormente ser divididas de allí tanto la muestra como el control, los cuales conservan las mismas concentraciones tanto de lípido como de NaCl, así como el mismo volumen, para esto en dos viales de vidrio se adiciona 950 µL de la dispersión de liposomas y 950 µL del disolvente (disolución de NaCl) a cada vial.

Si el equipo de medición requiere de la referencia, 950 µL de disolución de NaCl se adicionan a un vial eppendorf y se dejan reposando 15 minutos en el horno junto al control y la muestra.

El control se termaliza a 15 minutos a 25°C y posteriormente se desgasifica 16 minutos en un equipo de Degassing Station Model Number 6326 TA instrument, para finalmente ser medido.

Al vial que contiene la muestra se le pone en la tapa una punta de aguja y se pone en una cámara de vacío 40 min a desgasificar a una presión de 23 inHg, esto es para evitar que la solución salpique las paredes del vial y finalmente se deja evaporando 60 minutos a 28 inHg.

Una vez evaporada la muestra, la película de lípidos formada en el asiento del vial es re-hidratada con 950 µL de agua desionizada Milli-Q previamente desgasificada y calentada a una temperatura de 60°C, para no alterar la concentración iónica inicial, y se deja en reposo 15 minutos.

Nuevamente se realiza el proceso de extrusión con las mismas condiciones anteriormente mencionadas y la solución obtenida es puesta en el horno por 15

minutos, al igual que la referencia en caso de ser necesario para la medición, finalmente se **termaliza a 15 minutos a 25°C y desgasifica 16 minutos** antes de ser medida.

La concentración de fosfolípidos al final de la medición es de 5 mM en todos los casos, mientras que la concentración de NaCl varió entre 14, 140 y 1400 mM. El protocolo es esquematizado en la figura 6.

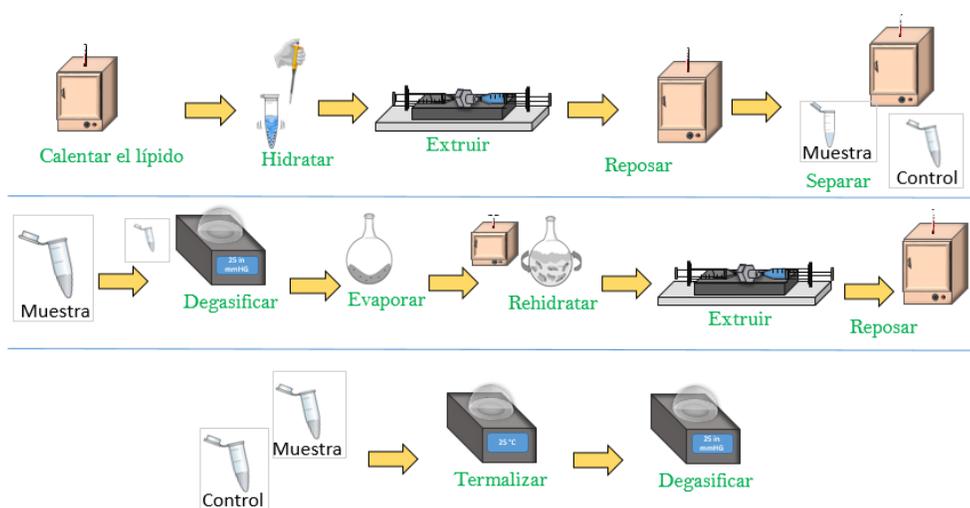


Figura 6. Esquema de la preparación de los liposomas.

### 4.3 Mediciones

Con el objetivo de estudiar las interacciones entre los iones y los fosfolípidos zwitteriónicos, se hicieron mediciones de calorimetría con DPPC o DMPC y diferentes concentraciones de NaCl de 14, 140 y 1400 mM, y se estudiaron los efectos termotrópicos de los liposomas para todas las combinaciones posibles entre fosfolípidos y NaCl, manteniendo constante la concentración de lípidos.

Una vez obtenidos los perfiles calorimétricos **para 5 repeticiones**, se analizaron las respuestas para cada concentración, y se determinó la concentración en la cual se obtiene una señal adecuada donde los efectos que se puedan apreciar en

conductimetría sean únicamente debido a la interacción iónica y no a la formación de otro tipo de vesículas (ver la sección de resultados).

Por lo anterior las mediciones de conductividad se hicieron a 14 mM de NaCl para cada tipo de fosfolípido.

#### 4.4 Mediciones de calorimetría

Las mediciones de calorimetría se hicieron en un microcalorímetro NanoDSC (TA instrument) a una tasa de escaneo de 1°C/min y a una presión constante de 3 atm para prevenir la formación de burbujas y ebullición de la solución acuosa.

Dado que la temperatura de transición principal y pre-transición para el DPPC está alrededor de los 41°C y 34°C respectivamente, se hizo un barrido en temperatura desde 15°C hasta 50°C, de tal manera que la señal del calorímetro se estabilice antes de llegar a las temperaturas donde ocurren los cambios de fase. Así mismo para el caso DMPC, cuyas temperaturas de transición y pre-transición están en aproximadamente 12°C y 21°C, el barrido se hizo desde -5°C hasta 35°C.

#### 4.5 Mediciones de conductividad

En las mediciones de conductividad se usó un Zetasizer Nano ZSP, a una temperatura de 25°C, con un tiempo de equilibrio de 10 minutos, en una celda DTS1070.

#### 4.6 Análisis estadístico

Para saber si las diferencias encontradas eran significativas se hizo una prueba estadística pareada para experimentos independientes, realizando dos pruebas estadísticas, la primera, una prueba de Shapiro-Wilk para determinar si los datos siguen una distribución normal y la segunda una prueba t para conocer si las diferencias entre los controles y las muestras eran estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

# 5 Resultados

Los resultados obtenidos aplicando la metodología anteriormente mencionada se dividirán en dos etapas. La primera etapa consiste en los resultados de calorimetría que nos permiten conocer si la deshidratación del medio tiene algún efecto en los parámetros termotrópicos de liposomas compuestos de fosfolípidos y la segunda etapa contiene los resultados de las pruebas de conductimetría, como una manera de explicar los posibles efectos de la primera etapa.

## 5.1 Calorimetría

Para ver el efecto que generan las sales en liposomas de DPPC se muestran en la figura 7 los trazos representativos de las suspensiones de liposomas a diferentes concentraciones de NaCl, donde se pueden observar los cambios en las respuestas termotrópicas de liposomas ante incrementos en la concentración de NaCl.

Destaca la formación de un hombro a 140 mM de NaCl. En la literatura, este comportamiento se relacionó con la presencia de poblaciones de vesículas oligolaminares generadas por el tamaño de extrusión [19], en este caso de 200 nm para vesículas de DPPC específicamente; esto se determinó con imágenes de CriotEM. Así mismo, se cree que el incremento de sales favorece el aumento de esta población y por ello la aparición del pico a 1400 mM de NaCl.

Para analizar el efecto que la deshidratación del medio genera en liposomas de DPPC en presencia de medios salinos, se analizaron los datos de los parámetros que componen los termogramas, tales como, capacidad calorífica máxima, entalpía y temperatura de transición principal, y se compararon las muestras con su respectivo control. Este procedimiento se hizo para un total de 5 experimentos independientes.

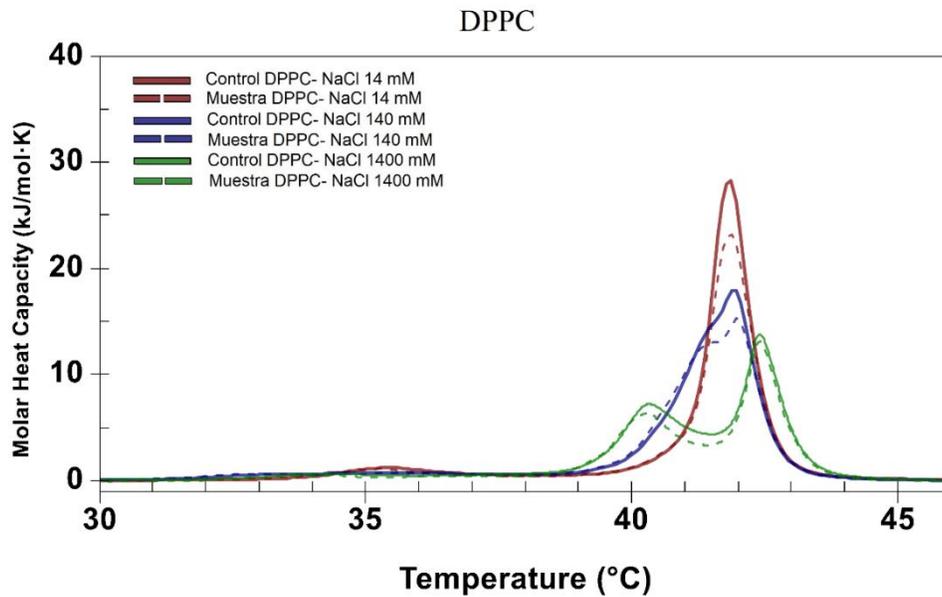


Figura 7. Esquema de perfiles calorimétricos de un experimento de LUVs de 200 nm de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl.

En la figura 8 se observan las diferencias en la capacidad calorífica máxima entre control y muestra, en todos los casos se puede apreciar una disminución en la capacidad calorífica máxima de la muestra respecto al control, siendo las barras la desviación estándar. Se nota que las concentraciones de NaCl que más diferencias tuvieron con respecto al control fueron a 14 mM y 140 mM.

La evaporación del medio salino de los liposomas también reduce la entalpía de la transición (pre-transición y transición principal) para las tres concentraciones de NaCl tal como se evidencia en la figura 9. Las concentraciones de NaCl que mayores cambios tuvieron fueron a 14 mM y 140 mM, sin embargo, también presentaron mayores dispersiones respecto a la concentración de 1400 mM.

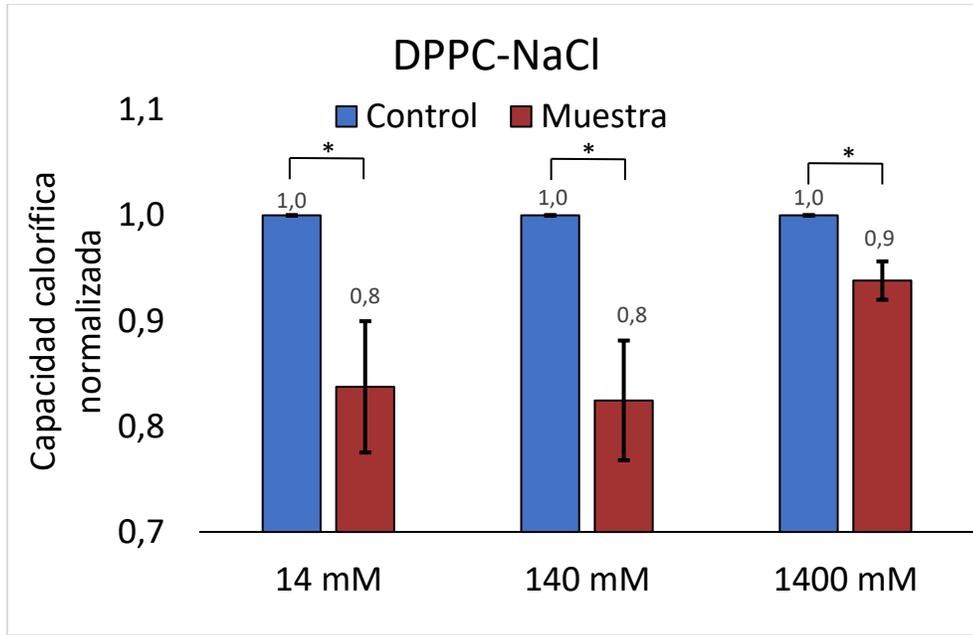


Figura 8. Capacidad calorífica máxima de LUVs de 200 nm de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl. \*:  $p < 0,05$

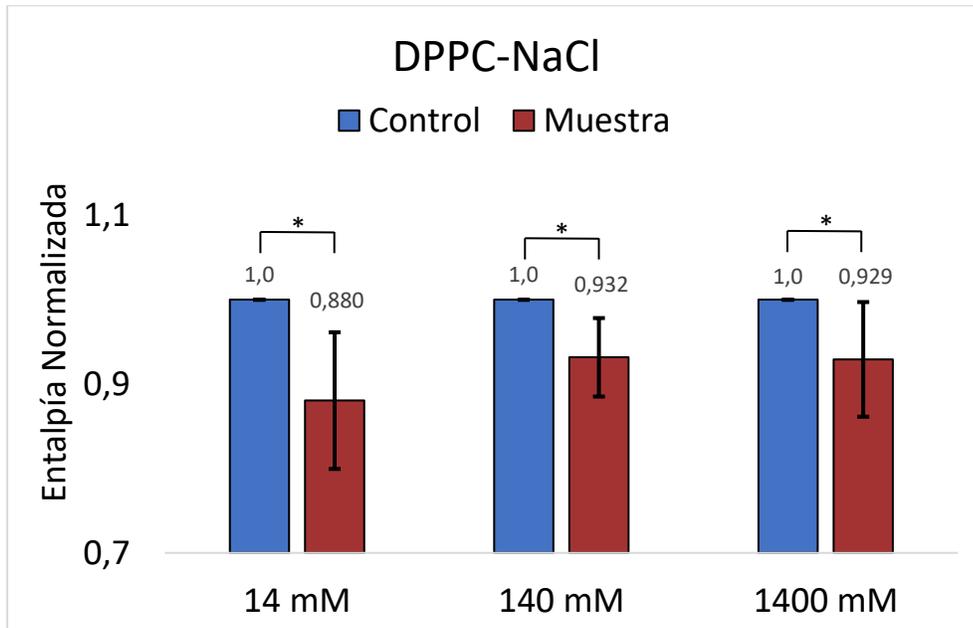


Figura 9. Entalpía de LUVs de 200 nm de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl. \*:  $p < 0,05$

A diferencia de los demás parámetros, la temperatura de transición principal, es decir, la temperatura a la cual se da la capacidad calorífica máxima, no presentó diferencias entre control y muestra, excepto para 1400 mM de NaCl, ver figura 10. En esta última concentración, la muestra tuvo un corrimiento en la temperatura de transición principal de 0,1%, que corresponde a 0,04°C aproximadamente, representando un cambio apreciable teniendo en cuenta que el cambio en la temperatura de transición principal de los liposomas de DPPC es de aproximadamente 1°C para 1400mM de NaCl respecto a liposomas dispersos en agua.

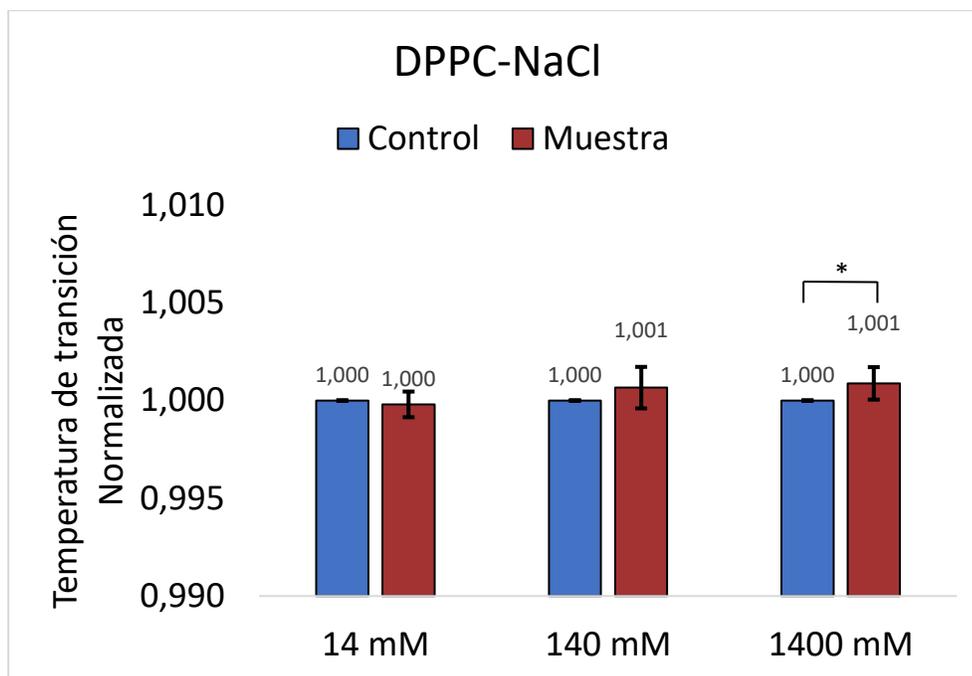


Figura 10. Temperatura de transición principal para LUVs de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl. \*:  $p < 0,05$

Según los resultados obtenidos para DPPC, se pudo apreciar que éste presentó diferencias tanto en capacidad calorífica máxima como en la entalpía de la transición y únicamente se vieron diferencias en la temperatura de transición principal a 1400 mM de NaCl. Con el objetivo de ver si el efecto de la evaporación también afecta las

propiedades de liposomas compuestos de otro fosfolípido se repitió el análisis anterior para dispersiones de DMPC.

Los resultados muestran que el tratamiento al que fue sometida la muestra redujo su capacidad calorífica en todas las concentraciones de NaCl tal como se observa en la figura 11.

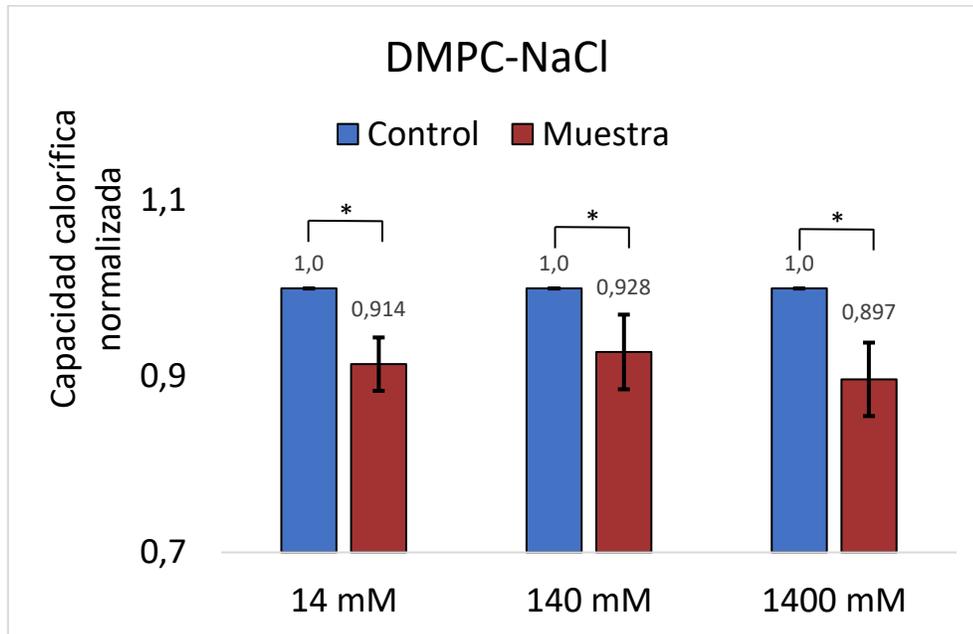


Figura 11. Capacidad calorífica máxima de LUVs de 200 nm de DMPC a diferentes concentraciones de NaCl. \*:  $p < 0,05$

La entalpía de transición para liposomas de DMPC, al igual que las vesículas de DPPC, también presentan diferencias cuando es aplicado el tratamiento de evaporación, para todas las concentraciones de NaCl (figura 12).

Finalmente, en la temperatura de transición principal no se observaron diferencias entre control y muestra tal como lo evidencia la figura 13.

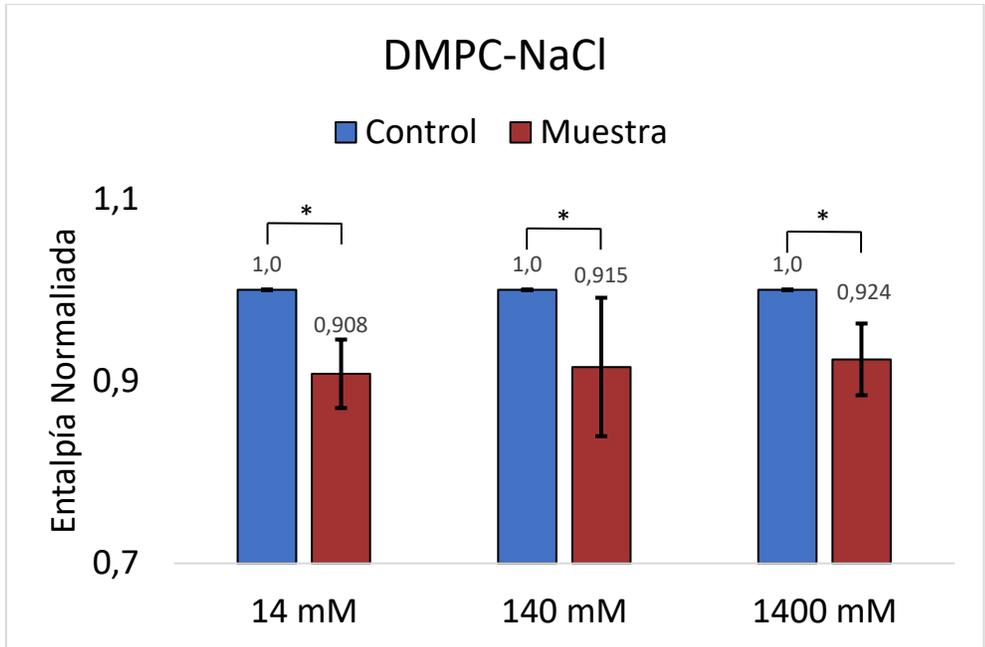


Figura 12. Entalpía de LUVs de 200 nm de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl. \*:  $p < 0,05$

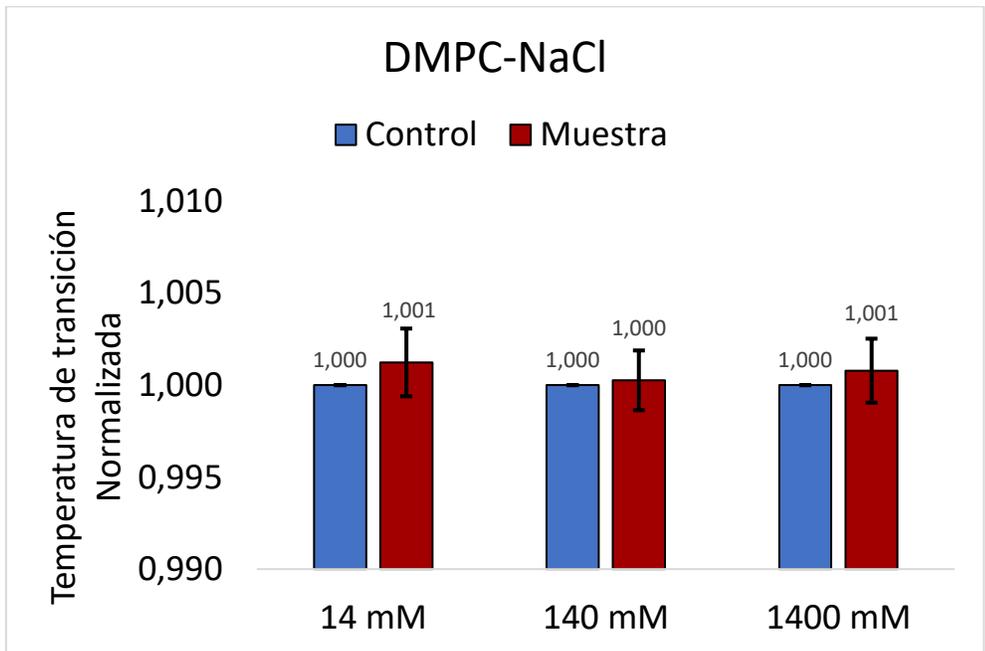


Figura 13. Temperatura de transición principal para LUVs de DPPC a diferentes concentraciones de NaCl.

Hasta aquí, se encontraron diferencias principalmente en la capacidad calorífica máxima y en la entalpía de transición principal, tanto para DPPC como para DMPC. Sin embargo, para descartar que las diferencias obtenidas sean debido a la evaporación en sí, independientemente del medio electrolítico, se hizo una prueba sin sales, es decir, liposomas de DPPC dispersos en agua des-ionizada, el trazo morado en línea continua representa los liposomas que no fueron deshidratados, mientras que las líneas interrumpidas corresponden a los liposomas evaporados (figura 14). En ambos perfiles calorimétricos no se notan diferencias entre control y muestra, por lo tanto, la evaporación en sí no es responsable de los cambios en los parámetros termotrópicos antes mencionados.

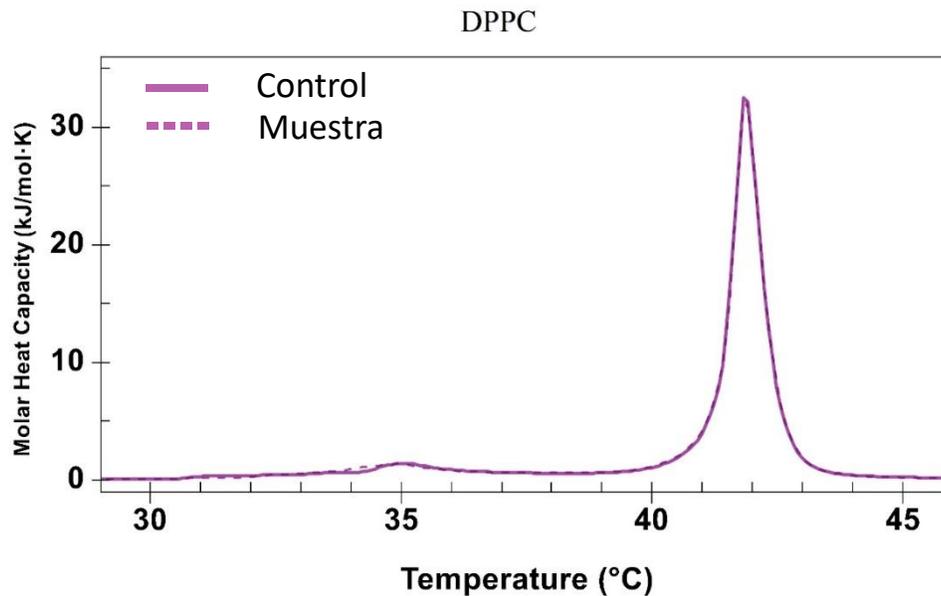


Figura 14. Perfil calorimétrico de DPPC suspendidos en agua des-ionizada (sin NaCl).

En la figura 15 se observan los perfiles calorimétricos de liposomas de DPPC a 14 mM de NaCl, el trazo rojo en línea sólida representa el control, y el trazo azul en línea sólida representa a la muestra.

Si la muestra se enfría lentamente y se vuelve a medir, se aprecia el comportamiento de la línea azul punteada, donde se nota un incremento en la capacidad calorífica máxima de modo que alcanza el termograma del control, por lo tanto, el efecto que genera la evaporación del medio salino en los liposomas puede desaparecer mediante un tratamiento térmico.

Un efecto similar ocurre en el recocido de materiales, donde el calor aumenta la velocidad de difusión de los átomos en el medio, proporcionando la energía necesaria para romper enlaces y eliminando los defectos en el material.

Es por esto que se piensa que los iones son adsorbidos por la membrana cambiando algunos de los parámetros termotrópicos de los liposomas, sin embargo, esta unión es debilitada por un tratamiento térmico, en tal caso los iones que son adsorbidos dejarían de estar libres en el bulto.

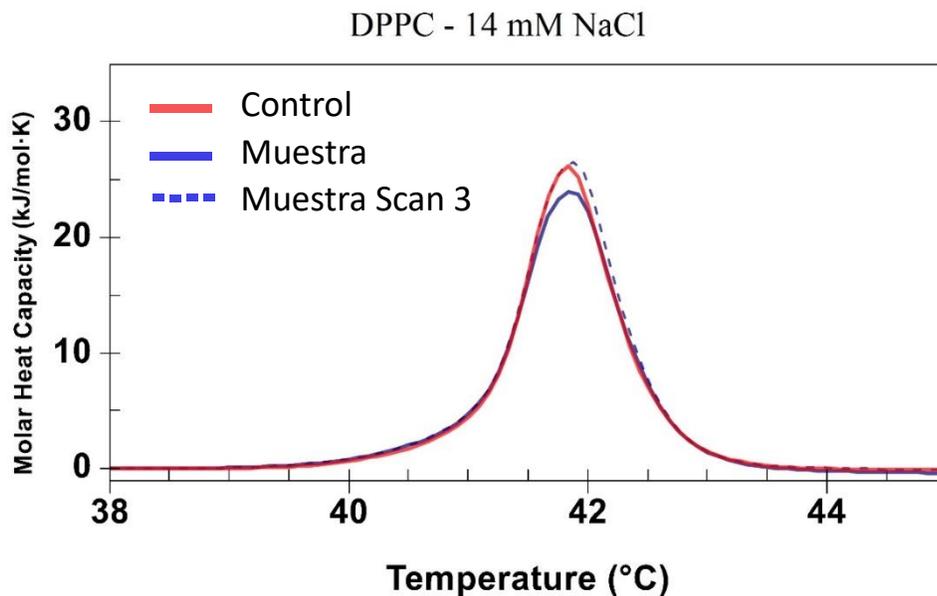


Figura 15. Perfiles calorimétricos de DPPC a 14 mM de NaCl.

Finalmente, si bien la técnica de la calorimetría revela el efecto de las sales sobre los modelos de membranas, con ésta no es posible conocer molecularmente las interacciones producidas por los iones, por lo tanto, la cuantificación del sodio libre

presente en el sistema iones-liposomas es una manera de comprobar si las respuestas calorimétricas son debido a la adsorción de iones de sodio.

## 5.2 Conductimetría

Para tratar de comprender si los cambios en los parámetros termotrópicos son debido a una mayor interacción entre los iones y las cabezas polares, es decir, un aumento de la cantidad de iones adsorbidos por la membrana, se hicieron pruebas de conductividad y de esta manera comparar la conductividad de las suspensiones de liposomas antes y después de la evaporación.

La concentración de NaCl del medio salino seleccionada fue 14 mM dado que a esta concentración se obtuvo una curva calorimétrica sin hombros, ni segundos picos que pudieran generar confusiones en el resultado de conductimetría por la posible presencia de vesículas oligolaminares y así una interacción diferente con las sales (figura 7).

En la figura 16, se muestran los resultados de conductividad eléctrica obtenidos para suspensiones con liposomas de DPPC y DMPC a 14 mM de NaCl, en ella se observan que la conductividad de los liposomas que fueron evaporados y rehidratados disminuyó con respecto a las que no tuvieron este tratamiento.

Para descartar que esta diferencia se deba a la pérdida de iones por el procedimiento adicional que sufre la muestra, se hicieron medidas de conductividad a 14 mM de NaCl sin liposomas, y se compararon antes y después de la evaporación, (figura 17); los resultados muestran que el procedimiento no es el responsable del cambio iónico en la solución salina de la figura 16.

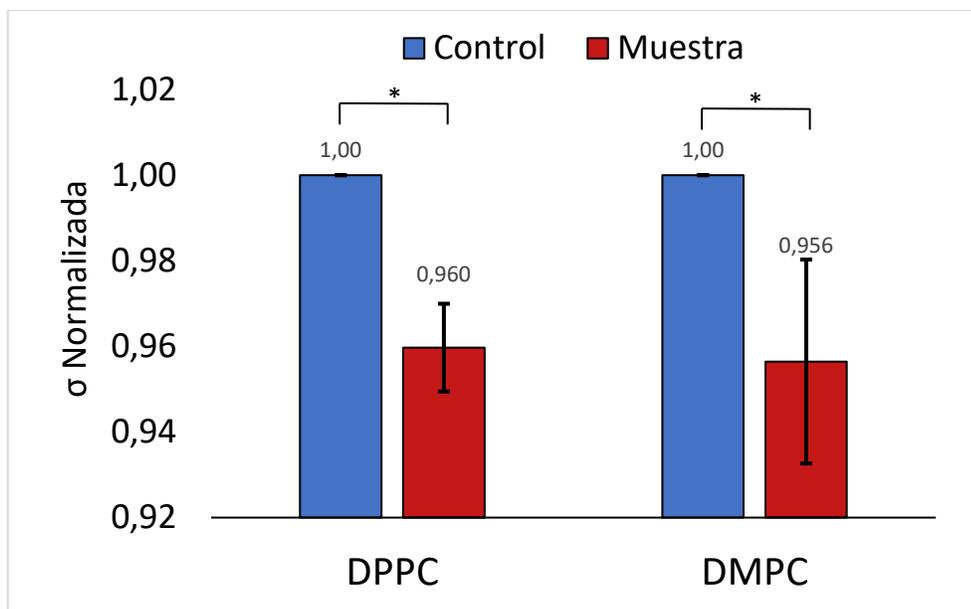


Figura 16. Conductividad eléctrica del medio en el que están suspendidos los liposomas de DPPC y DMPC. \*:  $p < 0,05$

Para conocer las concentraciones de NaCl a las que corresponden las mediciones de conductividad para las dispersiones de liposomas, se hizo una curva de calibración a partir de disoluciones de NaCl a diferentes concentraciones, en la figura 18 se puede apreciar una tendencia lineal entre los valores de conductividad en una región entre 13 mM y 14 mM de NaCl.

Mediante una regresión lineal se muestra en la figura 19, la concentración de NaCl que corresponde a los valores de conductividad para los controles y muestras de DPPC y DMPC, se pudo estimar que la diferencia de conductividad entre control y muestra corresponde a una diferencia de concentración de 500  $\mu\text{M}$  de NaCl.

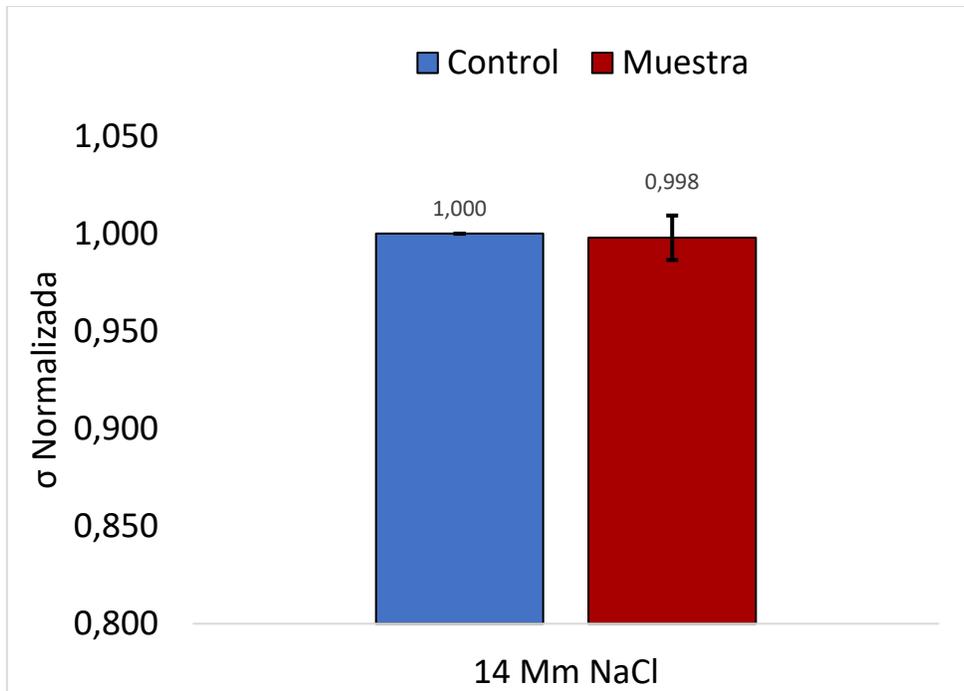


Figura 17. Conductividad eléctrica de soluciones de NaCl (sin liposomas) con evaporación (control) y sin evaporación (muestra).

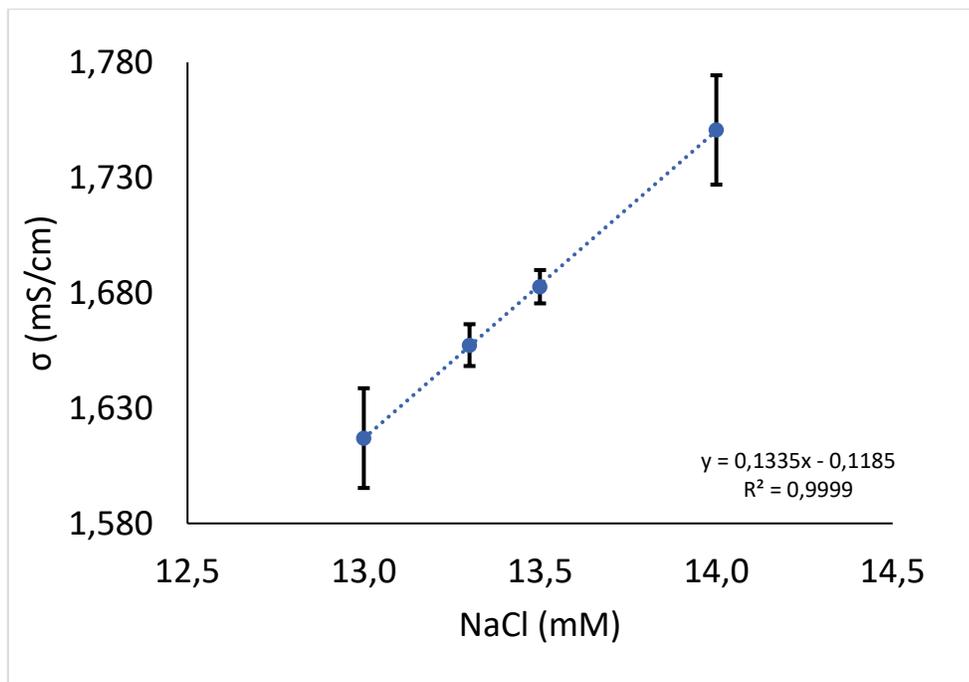


Figura 18. Curva de calibración de NaCl para diferentes valores de conductividad.

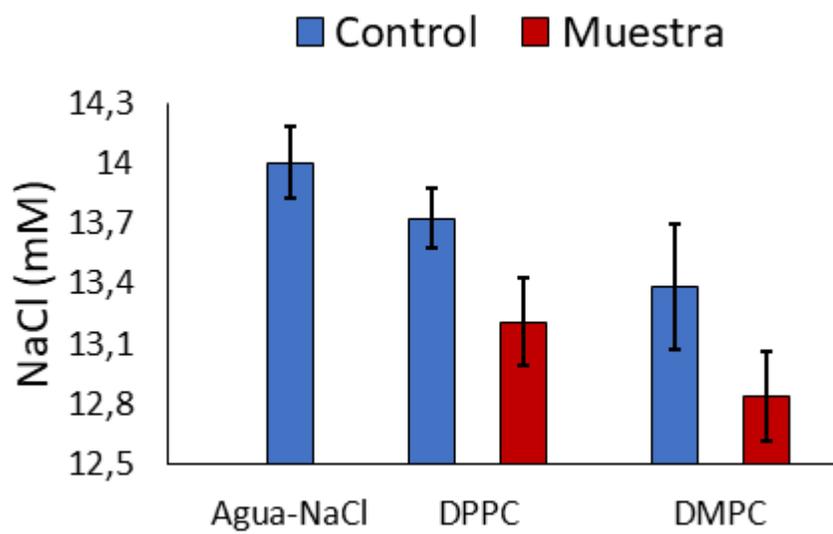


Figura 19. Concentración de NaCl correspondiente a los valores de conductividad para DMPC y DPPC.

## 6 Discusión

La membrana plasmática es una estructura que permite en gran medida el buen funcionamiento de la célula, siendo fundamental para la comunicación de ésta con el exterior. Así mismo, la complejidad de la membrana plasmática hace que el estudio de sus propiedades e incluso sus componentes sea tan diverso, que se vuelve de gran interés para la comunidad científica el planteamiento de modelos más reducidos que permitan dar conclusiones puntuales acerca del comportamiento de moléculas específicas (por ejemplo, la interacción entre diferentes fosfolípidos y iones). Es aquí donde diversos grupos de investigación han estudiado los liposomas de fosfolípidos como un modelo simple de membrana, que responde preguntas específicas del comportamiento de sus componentes.

Es importante, además de saber las funciones biológicas que desempeñan estas estructuras, conocer las propiedades físicas de estos sistemas; por tal motivo, el objetivo de este tipo de investigaciones es ahondar en el conocimiento básico de las propiedades que exhiben los diferentes componentes biológicos de una membrana plasmática y poco a poco agregarle complejidad. Con la información recogida se podría entender en su totalidad qué papel desempeñan cada una de las moléculas que componen las membranas celulares. El estudio realizado en este trabajo es un aporte que permite tratar de comprender cómo son las interacciones entre los fosfolípidos y los iones, específicamente cloro y sodio, y cómo éstos pueden alterar las propiedades de las membranas cuando el medio cambia, en particular la hidratación.

Puntualmente, el propósito de este trabajo era ver si la evaporación de medios electrolíticos con liposomas era capaz de cambiar los parámetros termotrópicos de estos últimos. Los resultados mostraron que, efectivamente las respuestas calorimétricas antes y después de la evaporación cambiaban principalmente la entropía y la capacidad calorífica máxima.

Además, cambios similares también se presentaron con otro tipo de fosfolípido, esta vez, con dos carbonos menos en la cadena hidrocarbonada del lípido, por lo tanto, esto sugiere que las modificaciones en los parámetros termotrópicos son independientes del número de carbonos para fosfolípidos saturados.

Los resultados encontrados, mostraron que la entalpía de transición, que es el calor absorbido por los liposomas en el cambio de fase gel a fluida, fue menor cuando el medio en el que los liposomas están suspendidos fue evaporado. Por lo tanto, se cree que en este proceso, los fosfolípidos quedan más restringidos por la adsorción de los iones, reduciendo el grado de libertad de las cabezas lipídicas. De esta manera, la absorción de energía sería más eficiente, siendo menor el calor suministrado necesario para llevar a los liposomas de la fase gel a la fase fluida.

Así mismo, se pudo reproducir el efecto que genera el NaCl en las respuestas calorimétricas de los liposomas, donde a medida que aumenta la concentración de sal disminuye la capacidad calorífica máxima; también se observaron corrimientos en la temperatura de transición principal hacia temperaturas más altas (temperaturas de transición principal de controles para un mismo fosfolípido) [15]–[17].

Al comparar los perfiles calorimétricos de los liposomas evaporados (muestra), con el control para una misma concentración de NaCl y un mismo fosfolípido, la muestra presentó en todos los casos una reducción en la capacidad calorífica máxima de la misma forma que cuando se aumenta la concentración de NaCl, por lo tanto, el efecto generado por la evaporación es análogo a aumentar la cantidad de sal en el medio electrolítico de los liposomas.

Debido a que los perfiles calorimétricos de dispersiones de liposomas en ausencia de sales no presentan discrepancias entre control y muestra a diferencia de liposomas en medios salinos, se cree que los cambios se deben a la presencia de iones que modifican las interacciones ion-lípido de modo que algunos parámetros termotrópicos cambian mediante la deshidratación del medio.

Los resultados expuestos para liposomas de DPPC a 14 mM de NaCl mostraron que después de varios escaneos, el perfil calorimétrico de la muestra iguala al control, por lo tanto, el efecto producido en el proceso de evaporación- rehidratación de los liposomas es reversible, pues un tratamiento térmico fue capaz de regresarlo al estado inicial. Como ya se mencionó, un efecto similar ocurre en el área de los materiales, donde los tratamientos térmicos son utilizados para mejorar algunas de las propiedades físicas, de modo que los defectos o dislocaciones son removidos cuando los átomos dentro de la red cristalina adquieren la energía suficiente para romper enlaces.

Por otro lado, los resultados de conductimetría permitieron saber que en el medio en el que están suspendidos los liposomas hay una disminución de iones libres de aproximadamente 500  $\mu\text{M}$  de NaCl para DPPC y DMPC cuando se hace el tratamiento de evaporación, que según lo presentado en la introducción, son los iones que hacen parte de la capa estancada hidrodinámicamente, es decir, tanto iones adsorbidos a la membrana como atraídos por interacciones Coulombicas que se mueven junto con el liposoma, los cuales, según los resultados obtenidos tiene una energía de enlace con los fosfolípidos que les impide estar disponibles para conducir la electricidad.

Con lo expuesto en este trabajo se puede afirmar que las modificaciones en los parámetros termotrópicos luego de aplicado el tratamiento de evaporación son a causa de los iones presentes en el medio, sin embargo, no es posible diferenciar que ion es el responsable de este fenómeno, pues los fosfolípidos en su cabeza polar contienen una carga positiva y otra negativa, por lo tanto, tanto el ion de  $\text{Na}^+$  como el de  $\text{Cl}^-$  se ve atraídos por ambas cargas. No obstante, algunos estudios de simulación MD revelan que los iones de sodio son adsorbidos por los liposomas generando cambios en las propiedades físicas de las membranas tales como ordenamiento de las cadenas hidrocarbonadas, grosor de la bicapa y cambios en el potencial de membrana [15], [20]–[24]; Asimismo, dos trabajos diferentes han logrado determinar diferentes relaciones sodio:fosfolípido, donde Pandit et al. encontró la relación 1:2 [22],

mientras que Bockmann et al. encontró la relación 1:3 [15]; ambos trabajos ubican los iones de sodio en la región de las cabezas polares, interactuando con ellas, mientras que el ion de cloro se encuentra en la interface.

Para finalizar, el hecho de que la muestra presente diferencias respecto al control debido a una mayor interacción iónica tal como se demostró con los resultados de conductimetría, indica que fue mayor la fuerza de atracción entre los iones y los fosfolípidos que la capacidad de las moléculas de agua para solvatar los iones presentes en la disolución.

# 7 Conclusiones

La reducción de la cantidad de moléculas de agua mediante la evaporación de liposomas en medios salinos, produce una mayor interacción entre los fosfolípidos y los iones presentes en la disolución y genera un **aumento** de la adsorción de iones sobre la membrana del liposoma.

Cuando se favorecen las condiciones para que fosfolípidos y iones interactúen, la fuerza que se genera entre ellos supera las fuerzas de solvatación producidas al añadir agua.

## 8 Perspectivas

Este estudio se centró en los efectos que genera la deshidratación del medio salino que contiene vesículas de fosfolípidos en sus parámetros termotrópicos, usando NaCl que se descompone en dos iones presentes en el medio celular; además se logró asociar como resultado de los cambios termotrópicos un aumento en las interacciones iónicas con los fosfolípidos, sin embargo, sería interesante estudiar si estos cambios en los parámetros termotrópicos son observables en otro tipo de iones de relevancia biológica.

Así mismo, sería importante también tratar de agregarle complejidad al modelo de membrana de modo que se acerque más a la realidad biológica con modelos de membrana compuestos por mezclas de fosfolípidos y ver si así se mantienen los resultados obtenidos para liposomas de un solo fosfolípido.

## 9 Bibliografía

- [1] T. Heimburg, *Thermal Biophysics of Membranes*. John Wiley & Sons, 2008.
- [2] A. P. Serro *et al.*, “Effect of tetracaine on DMPC and DMPC+cholesterol biomembrane models: liposomes and monolayers,” *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 116, pp. 63–71, Apr. 2014.
- [3] M. Eisenberg, T. Gresalfi, T. Riccio, and S. McLaughlin, “Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids,” *Biochemistry*, vol. 18, no. 23, pp. 5213–5223, 1979.
- [4] C. C. Valley, J. D. Perlmutter, A. R. Braun, and J. N. Sachs, “NaCl interactions with phosphatidylcholine bilayers do not alter membrane structure but induce long-range ordering of ions and water,” *J. Membr. Biol.*, vol. 244, no. 1, pp. 35–42, 2011.
- [5] A. V. Delgado, F. González-Caballero, R. J. Hunter, L. K. Koopal, and J. Lyklema, “Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena (IUPAC Technical Report),” *Pure Appl. Chem.*, vol. 77, no. 10, pp. 1753–1805, 2005.
- [6] M. L. Berkowitz, D. L. Bostick, and S. Pandit, “Aqueous solutions next to phospholipid membrane surfaces: Insights from simulations,” *Chem. Rev.*, vol. 106, no. 4, pp. 1527–1539, 2006.
- [7] K. Åman, E. Lindahl, O. Edholm, P. Håkansson, and P.-O. Westlund, “Structure and Dynamics of Interfacial Water in an  $\alpha$  Phase Lipid Bilayer from Molecular Dynamics Simulations,” *Biophys. J.*, vol. 84, no. 1, pp. 102–115, 2003.
- [8] M. Carrillo-Tripp, H. Saint-Martin, and I. Ortega-Blake, “A comparative study of the hydration of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> with refined polarizable model potentials,” *J. Chem. Phys.*, vol. 118, no. 15, pp. 7062–7073, Apr. 2003.
- [9] H. Chen and E. Ruckenstein, “Hydrated Ions: From Individual Ions to Ion Pairs

- to Ion Clusters.," *J. Phys. Chem. B*, vol. 119, no. 39, pp. 12671–6, Oct. 2015.
- [10] T. J. McIntosh and S. A. Simon, "Hydration and steric pressures between phospholipid bilayers," *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 23, pp. 27–51, 1994.
- [11] E. Leontidis, "Investigations of the Hofmeister series and other specific ion effects using lipid model systems," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 243, no. April, pp. 8–22, 2017.
- [12] D. Chapman, W. E. Peel, B. Kingston, and T. H. Lilley, "Lipid phase transitions in model biomembranes. The effect of ions on phosphatidylcholine bilayers," *BBA - Biomembr.*, vol. 464, no. 2, pp. 260–275, 1977.
- [13] B. A. Cunningham *et al.*, "The Influence of Ion Species on Phosphatidylcholine Bilayer Structure and Packing," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 39, no. 1–2, pp. 135–143, 1986.
- [14] O. Szekely *et al.*, "The structure of ions and zwitterionic lipids regulates the charge of dipolar membranes," *Langmuir*, vol. 27, no. 12, pp. 7419–7438, 2011.
- [15] R. A. Böckmann, A. Hac, T. Heimburg, and H. Grubmüller, "Effect of Sodium Chloride on a Lipid Bilayer," *Biophys. J.*, vol. 85, no. 3, pp. 1647–1655, Sep. 2003.
- [16] G. Pabst *et al.*, "Rigidification of Neutral Lipid Bilayers in the Presence of Salts," *Biophys. J.*, vol. 93, no. 8, pp. 2688–2696, 2007.
- [17] P. Sapia and L. Sportelli, "Effect of high electrolyte of DPPC cooperativity of the main phase-transition of DPPC," *J. Phys. II Fr.*, vol. 4, pp. 1107–1116, 1994.
- [18] R. Pérez-Isidoro, A. D. Reyes-Figueroa, and J. C. Ruiz-Suárez, "Ionic interactions determine the morphology of dried alkali/liposome suspension droplets," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, 2017.
- [19] J. Drazenovic *et al.*, "Effect of lamellarity and size on calorimetric phase

transitions in single component phosphatidylcholine vesicles," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1848, no. 2, pp. 532–543, 2015.

- [20] B. Klasczyk, V. Knecht, R. Lipowsky, and R. Dimova, "Interactions of alkali metal chlorides with phosphatidylcholine vesicles," *Langmuir*, vol. 26, no. 24, pp. 18951–18958, 2010.
- [21] S.-J. Lee, Y. Song, and N. a Baker, "Molecular Dynamics Simulations of Asymmetric NaCl and KCl Solutions Separated by Phosphatidylcholine Bilayers: Potential Drops and Structural Changes Induced by Strong Na<sup>+</sup>-Lipid Interactions and Finite Size Effects," *Biophys. J.*, vol. 94, no. 9, pp. 3565–3576, May 2008.
- [22] S. A. Pandit, D. Bostick, and M. L. Berkowitz, "Molecular dynamics simulation of a dipalmitoylphosphatidylcholine bilayer with NaCl.," *Biophys. J.*, vol. 84, no. 6, pp. 3743–50, 2003.
- [23] I. V. Khavrutskii, A. A. Gorfe, B. Lu, and J. A. McCammon, "Free energy for the permeation of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions and their ion-pair through a zwitterionic dimyristoyl phosphatidylcholine lipid bilayer by umbrella integration with harmonic fourier beads," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 5, pp. 1706–1716, 2009.
- [24] J. Kotyska, I. Dobrzyska, and Z. A. Figaszewski, "Association of alkali metal cations with phosphatidylcholine liposomal membrane surface," *Eur. Biophys. J.*, vol. 46, no. 2, pp. 149–155, 2017.

# 10 Anexo

Tabla 2. Promedio de 5 repeticiones de los datos absolutos de capacidad calorífica máxima, entalpía y temperatura de transición principal del control y la muestra a diferentes concentraciones de NaCl para liposomas de DPPC a una concentración de 5 mM. La capacidad calorífica está en kJ/mol\*K, la entalpía en kJ/mol, la temperatura de transición principal en °C y la concentración de NaCl en mM, SD es la desviación estándar.

## DPPC

NaCl	Capacidad calorífica máxima			
	Control	Muestra	SD Control	SD Muestra
14	27,4372	22,9464	0,8091	1,2290
140	18,2168	15,0139	0,2705	0,8866
1400	15,3166	14,3641	0,9955	0,8641

NaCl	Entalpía de transición			
	Control	Muestra	SD Control	SD Muestra
14	35,5835	31,2834	1,0022	2,3148
140	35,1207	32,7453	0,9168	2,3031
1400	30,8390	28,6072	1,5095	1,5837

NaCl	Temperatura de transición principal			
	Control	Muestra	SD Control	SD Muestra
14	41,8546	41,8463	0,0151	0,0376
140	41,9390	41,9666	0,0139	0,0352
1400	42,3904	42,4276	0,0400	0,0240

Tabla 3. Promedio de 5 repeticiones de los datos absolutos de capacidad calorífica máxima, entalpía y temperatura de transición principal del control y la muestra a diferentes concentraciones de NaCl para liposomas de DMPC a una concentración de 5 mM. La capacidad calorífica está en kJ/mol\*K, la entalpía en kJ/mol, la temperatura de transición principal en °C y la concentración de NaCl en mM, SD es la desviación estándar.

### DMPC

NaCl	Capacidad calorífica máxima			
	Control	Muestra	SD Control	SD Muestra
14	14,4665	13,2139	0,3779	0,2468
140	14,2127	13,1866	0,1146	0,6099
1400	14,4084	12,9048	0,9039	0,7473

NaCl	Entalpía de transición			
	Control	Muestra	SD Control	SD Muestra
14	23,7812	21,5758	0,7302	0,5843
140	23,8820	21,8795	0,5188	2,0916
1400	21,7550	20,0645	1,2184	0,6381

NaCl	Temperatura de transición principal			
	Control	Muestra	SD Control	SD Muestra
14	24,3488	24,3788	0,0337	0,0457
140	24,3643	24,3706	0,0229	0,0390
1400	24,6465	24,6658	0,0381	0,0191

Tabla 4. Conductividad de liposomas de DPPC y DMPC a 5 mM, suspendidos en una solución electrolítica de 14 mM de NaCl, los valores de conductividad eléctrica son el promedio de 5 repeticiones para cada lípido, la conductividad está dada en mS/cm, SD es la desviación estándar.

Fosfolípido	Control	Muestra	SD Control	SD muestra
DPPC	1,7138	1,6448	0,0198	0,0291
DMPC	1,6682	1,5950	0,0412	0,0299