



Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional

Unidad Monterrey

*Análisis Termo-microreológico de DPPC y su interacción con
Propofol*

Tesis que presenta:

Francisco Javier Guevara Pantoja

para obtener el grado de Maestro en Ciencias en:

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de tesis:

Dr. J. Carlos Ruiz Suárez

Apodaca, Nuevo León

Agosto, 2013

Índice general

Índice de Figuras	4
Índice de Tablas	7
1. Agradecimientos	8
2. Resumen	9
3. Abstract	10
4. Introducción	1
4.1. Reología	2
4.2. Micro-reología	4
4.3. Biomembranas y propagación del impulso nervioso	7
4.4. Transición de fase	10
4.5. Medios líquidos	12

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	3
5. Objetivos	16
5.1. Objetivos particulares	16
6. Materiales y Métodos	17
6.1. Montaje experimental	17
6.2. Materiales	22
6.3. Metodología	22
6.3.1. Agua	22
6.3.2. Glicerina	23
6.3.3. PNIPAm	23
6.3.4. DPPC	24
6.4. Metodología	25
6.4.1. Agua	26
6.4.2. Glicerina	26
6.4.3. PNIPAm	26
6.4.4. DPPC	27
7. Resultados	29
7.1. Agua	29
7.2. Glicerol	31

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	4
7.3. PNIPAm	32
7.4. DPPC	38
7.5. DPPC y propofol	40
8. Discusión	46
9. Conclusión	48

Índice de figuras

4.1. Modelo mecánico de un líquido	2
4.2. Modelo mecánico de un sólido	3
4.3. Ejemplificación de módulo de pérdida y almacenamiento	3
4.4. Trayectoria de multiples partículas en agua	5
4.5. Ejemplo de Desplazamiento cuadrático medio	6
4.6. Modelo tridimensional de membrana celular propuesto por Singer y Nicholson	8
4.7. Tipos de Transporte	9
4.8. Esquema de las fases de DPPC	11
4.9. Molécula del agua	12
4.10. Molécula Glicerol	13
4.11. Viscosidades Glicerol	13
4.12. Monómero PNIPAm	14

<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	6
4.13. Transición de fase	14
4.14. Molécula DPPC	15
6.1. Portamuestra	18
6.2. Peltier	19
6.3. Diagrama del dispositivo	19
6.4. Diagrama de conexión	20
6.5. Control PID	21
6.6. Procesamiento de imagen	25
6.7. Procesamiento de imagen	28
7.1. Viscosidad reportada del agua a temperatura constante	30
7.2. Agua a Temperatura constante	30
7.3. Agua con una tasa de calentamiento	31
7.4. Reología de agua	32
7.5. Desplazamiento cuadrático medio Glicerol	33
7.6. Desplazamiento cuadrático medio para glicerol con gradiente de temperatura	34
7.7. Desplazamiento cuadrático medio PNIPAm	35
7.8. Módulos PNIPAm	36

<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	7
7.9. Conglomeración PNIPAm	36
7.10. Barrido PNIPAm	37
7.11. Calorimetría PNIPAm	37
7.12. Calentamiento lento y viscosidad de PNIPAm	38
7.13. Desplazamiento cuadrático medio DPPC	39
7.14. Reología de DPPC	39
7.15. Desplazamiento cuadrático medio de DPPC con un gradiente de temperatura	40
7.16. Calorimetría de DPPC	41
7.17. Desplazamiento cuadrático medio de DPPC y propofol	42
7.18. Reología de DPPC y propofol	42
7.19. Desplazamiento cuadrático medio de DPPC y propofol con un gradiente de temperatura	43
7.20. Reología de DPPC y DPPC con Propofol	43
7.21. Reología de Templado	44
7.22. Reología de Propofol Templado	45

1

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas, que fueron un apoyo, estando a mi lado para darme consejos.

A mi familia por su fe en mi.

Al Dr. Carlos Ruíz por su asesoría.

Al Cinvestav-Monterrey por ser un espacio libre para hacer investigación y brindar la infraestructura necesaria.

Al Conacyt por su apoyo financiero.

2

Resumen

La meta de este trabajo fue el diseño de un montaje experimental, para realizar mediciones micro-reológicas en fluidos complejos en diferentes condiciones de temperatura. Las temperaturas a las que se realizaron las mediciones fueron con tasas de calentamiento y temperaturas fijas. Dos fluidos fueron estudiados: Poli N-isopropilacrilamida (PNIPAm) y una suspensión de liposomas hechos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Los datos obtenidos nos dan el comportamiento termo-físico de las muestras, específicamente el cambio de la viscosidad durante las transiciones de fase. Además nuestro montaje nos da a conocer información relativa a la microestructura del fluido en estudio, donde, por ejemplo en el caso de PNIPAm, observamos una conglomeración entrópica de las partículas traza.

3

Abstract

The goal of this work was to design an experimental setup to perform micro-rheology measurements on complex fluids at fixed and variable temperature conditions. Two fluids were studied: Poly N-isopropylacrylamide (PNIPAm) and a suspension of liposomes made of Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). The obtained data give us the thermo-physic behavior of the samples, specifically the change of viscosity during phase transitions. Furthermore, our setup provides information relative to the microstructure of fluid in study, where, for example in the PNIPAm case, we observe an entropic clustering of the tracing particles, around.

4

Introducción

En el presente trabajo de investigación reportamos el estudio del comportamiento visco-elástico de una suspensión de liposomas elaborados con DPPC, al aplicarle diferentes temperaturas y un anestésico (propofol). La caracterización del comportamiento se realizó mediante la técnica micro-reológica. La solución esta validada como modelo de membrana celular. El propofol es un anestésico hidrofobico y es usado para inducir anestesia general. La caracterización de los efectos de este anestésico en la reología de la solución nos proporcionarán información de los cambios que provoca en la célula.

Para analizar la solución fue necesario la elaboración de un dispositivo en el cual se pudiera regular la temperatura y medir la dinámica de partículas dentro del sistema. La calibración del equipo se realizó mediante fluidos que poseen características reportadas. Los fluidos fueron agua, glicerina y PNIPAm.

La técnica, conceptos y las herramientas utilizadas se detallan en el primer capitulo de este trabajo. En el capitulo dos se dan a conocer el objetivo general y especifico de la investigación. Los materiales y métodos son descritos en el capitulo tres y los datos obtenidos de los experimentos están en el capitulo de resultados, por ultimo se discute la información obtenida en el capitulo cuatro y se concluye con el capitulo cinco.

4.1. Reología

La reología estudia las propiedades visco-elásticas de los fluidos simples y complejos [?].

Los líquidos presentan un comportamiento de disipación de energía, es decir, cuando a un líquido se le aplica un esfuerzo, la deformación del líquido es permanente [?]. Un ejemplo de que la materia se encuentra en estado líquido es, que la materia toma la forma del contenedor sin requerir esfuerzo alguno.

La forma de analizar mecánicamente el comportamiento a un esfuerzo de un líquido es como un amortiguador. En la Figura 4.1 se observa un modelo en el cual una fuerza se opone al movimiento y es representada por una constante llamada viscosidad, módulo viscoso o de pérdida. Los fluidos que se pueden con esta constante son conocidos como fluidos Newtonianos. Sin embargo existen líquidos más complejos que tienen características viscosas y elásticas. Los sólidos se caracterizan por mostrar un

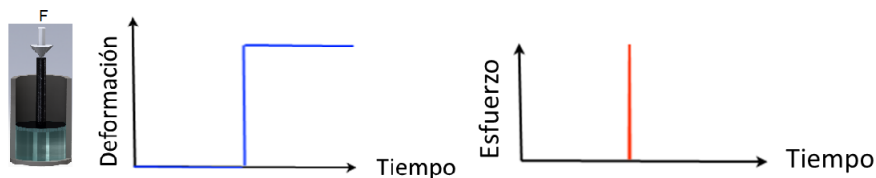


Figura 4.1: **Modelo mecánico de un líquido.**

comportamiento elástico, esto es: la deformación del material es proporcional al esfuerzo aplicado [?]. Un ejemplo sencillo de esto es el de un resorte, el cual, al dejarle de aplicar una fuerza regresa a su forma original, siempre y cuando no se sobrepase un umbral máximo. Al sobrepasar el umbral el resorte comienza a sufrir una deformación permanente de su forma original.

Para analizar mecánicamente los materiales sólidos se realiza un diagrama esfuerzo-deformación. En la Figura 4.2 se muestra la respuesta a la deformación del modelo mecánico para un resorte, en el cual para mantener la deformación es necesario mantener el esfuerzo. La relación entre el esfuerzo aplicado y la deformación medida se le conoce como módulo de Young, módulo elástico o de almacenamiento.

Para ambos casos los materiales son caracterizados mediante el comportamiento que

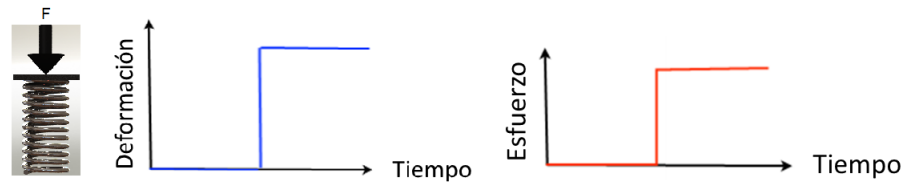


Figura 4.2: **Modelo mecánico de materia sólida.**

presentan cuando a éstos se les aplica una fuerza. La fuerza puede ser aplicada paralela a la superficie, ésta es llamada tensión, o perpendicular a la superficie, denominada esfuerzo.

Para simplificar la caracterización del fluido se realiza la aplicación de un esfuerzo sinusoidal, donde el desfase entre la respuesta del fluido ante la tensión y el esfuerzo aplicado nos proporciona el comportamiento de la muestra, y con esta relación se puede obtener la viscosidad (módulo de pérdida) y la elasticidad (módulo de almacenamiento). Cuando el desfase entre el esfuerzo y la tensión sea cero el líquido será completamente elástico.

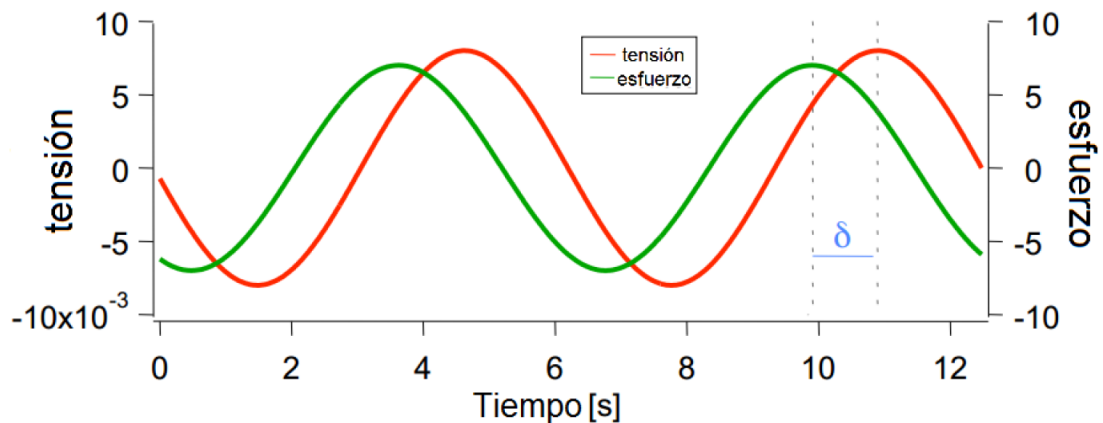


Figura 4.3: Se muestra el ejemplo del comportamiento de un líquido viscoelástico, al cual se le aplica un esfuerzo y una tensión.

$$G' = G * \text{Sen}(\omega). \quad (4.1)$$

$$G'' = G * \text{Cos}(\omega). \quad (4.2)$$

Donde: G : modulo complejo del fluido

G' : modulo elástico o almacenamiento

G'' : modulo Viscoso o de pérdida

ω : la frecuencia

4.2. Micro-reología

En el año de 1827 Robert Brown analizaba por primera vez el movimiento de pequeñas partículas de polen, el cual es muy parecido al mostrado en la Figura 4.4. Las partículas parecían moverse cómo si estuvieran vivas porque tenían un movimiento estocástico. Robert Brown no conocería la razón de este movimiento.

En el siglo XIX la idea de átomos comenzaba a debatirse, sería hasta 1905 cuando Einstein utilizaría el trabajo de Brown como base para tener una demostración más de la existencia de los átomos [?], y con ésto daría las bases para la técnica micro-reologica. Mientras tanto en el año de 1908 Langevin terminaría de resolver una ecuación fenomenológica para este movimiento [?]. La ecuación relaciona el movimiento de una partícula con una fuerza estocástica y otra fuerza que se opone a este movimiento debido a la viscosidad del fluido donde se encuentran inmersas las partículas. La ecuación es:

$$m \frac{dv}{dt} = -\eta v + F^s. \quad (4.3)$$

Donde:

m : masa de la partícula

$\frac{dv}{dt}$: aceleración

η : viscosidad del fluido

v : velocidad del fluido

F : fuerza estocástica debido a la temperatura

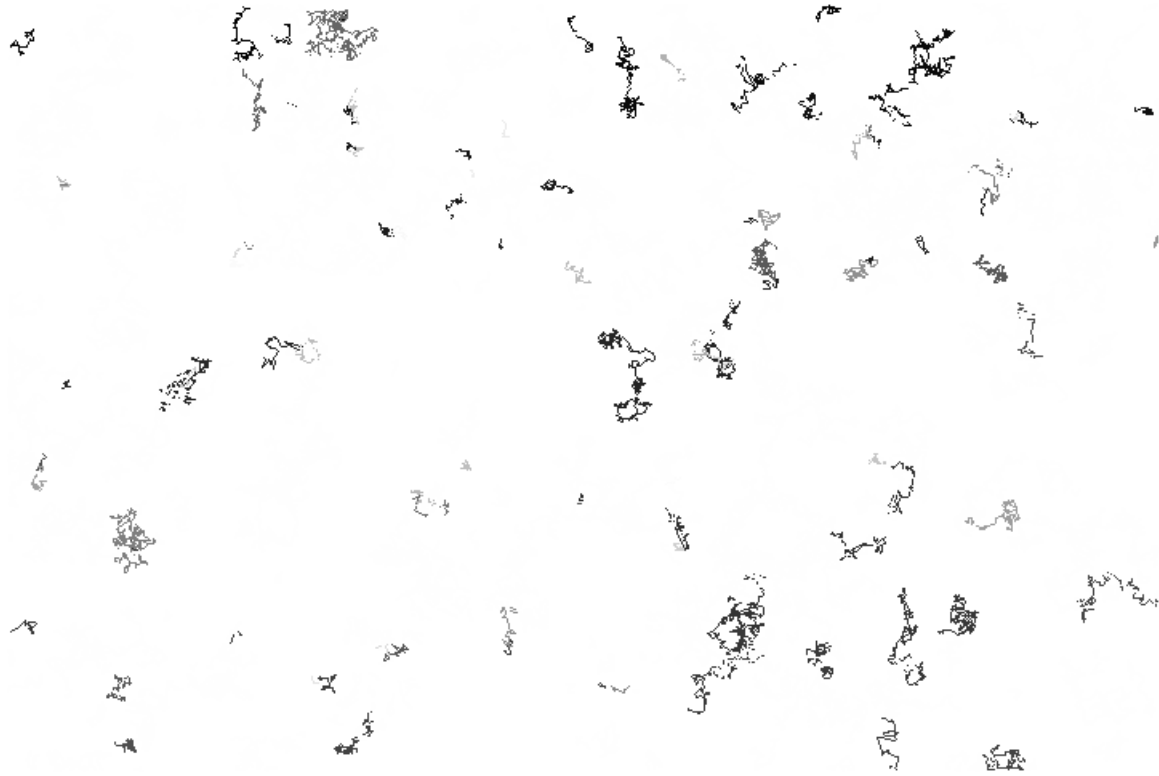


Figura 4.4: En la imagen se observa las trayectorias que realizaron varias partículas traza de 993 nm. en un minuto, éstas se encuentran dispersas en agua a 25°C.

La ecuación relaciona el movimiento de partículas microscópicas debido a las fluctuaciones térmicas del fluido, todos los átomos están ejerciendo alrededor de la partícula una fuerza fluctuante, cuando estas fuerzas salen del equilibrio provocan un movimiento en la partícula. Con la ecuación anterior se puede obtener la viscosidad del fluido conociendo el desplazamiento de las partículas embebidas, la temperatura y las características físicas de las partículas como son la forma y la densidad. Dando la primer contribución para la micro-reología.

Para lograr la caracterización del movimiento de la partícula Einstein propuso una forma de medición, en la cual se siguiera la sucesión de desplazamientos cuadráticos de una experiencia muy grande y promediada, llamado desplazamiento cuadrático medio. Él predijo que estos datos del desplazamiento cuadrático medio deberían de crecer de manera lineal con el tiempo, como se muestra en la Figura 4.5. La pendiente de la

gráfica depende de unas pocas variables como lo son: la temperatura del fluido, la viscosidad, el tamaño de la partícula y el número de Avogadro.

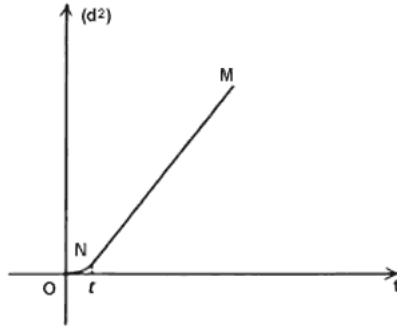


Figura 4.5: **El desplazamiento cuadrático medio de la partícula browniana de agua a 25°C predicho por Einstein.**

La ecuación que relaciona la viscosidad con este movimiento se resuelve haciendo las suposiciones siguientes:

Las partículas coloidales son mucho más grandes que el solvente.

La solución está en equilibrio térmico, excepto cuando lo altera una fuerza externa. En este caso la fuerza es provocada por la energía térmica.

El flujo es laminar, es decir la fuerza es proporcional a la velocidad en el fluido ($Fx = Vx$).

Los desplazamientos ocurren entre estados de equilibrio (desplazamientos virtuales).

Es un sistema cerrado, en equilibrio y sin expansión (el cambio en la entalpía es igual al movimiento en las partículas).

Las paredes están muy retiradas de la muestra.

Tomando que la ecuación de difusión está dada por:

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta a}. \quad (4.4)$$

Donde:

D : constante de difusión.

k_b : constante de Boltzmann.

T : temperatura absoluta.

η : viscosidad.

a : radio de la partícula coloidal.

Y conociendo que el desplazamiento cuadrático medio está relacionado con la difusión cómo:

$$\langle \Delta r(\tau) \rangle = \sqrt{2\eta D\tau}. \quad (4.5)$$

Sustituimos las ecuaciones y obtenemos:

$$\eta = \frac{k_b T}{3a\pi(\langle \Delta r^2(\tau) \rangle)}. \quad (4.6)$$

La viscosidad obtenida aquí puede ser sustituida por el modulo complejo viscoso, realizando un procedimiento en el espacio de Fourier y obteniendo la respuesta en frecuencia como se hizo en [?]. La cual quedaría:

$$|G^*(\omega)| = \frac{k_b T}{\pi a(\langle \Delta r^2(\frac{1}{\omega}) \rangle)\Gamma[1 + \alpha(\omega)]}. \quad (4.7)$$

Donde la función $\alpha(\omega)$ está dada por:

$$\alpha(\omega) \equiv \frac{d \ln(\langle \Delta r^2(t) \rangle)}{d \ln t} \Big|_{t=\frac{1}{\omega}}. \quad (4.8)$$

4.3. Biomembranas y propagación del impulso nervioso

La membrana plasmática celular es un organelo que separa el medio extracelular del intracelular, la conforma una mezcla de 50 % lípidos y 50 % proteínas en razón molar, funciona como barrera selectiva y es donde se realizan el intercambio de iones del el potencial de acción.

El potencial de acción es parte de la transmisión del impulso nervioso. Si el impulso nervioso es transferido por la membrana entonces gran parte de la contribución es dada por la bicapa lipídica. Aunado a la transmisión del impulso nervioso también existe una unión extracelular entre las células del sistema nervioso, esta conexión es llamada sinapsis, la cual es realizada entre dos células mediante el intercambio de neurotransmisores. La información anterior nos dice que las propiedades físicas de la bicapa lipídica son de

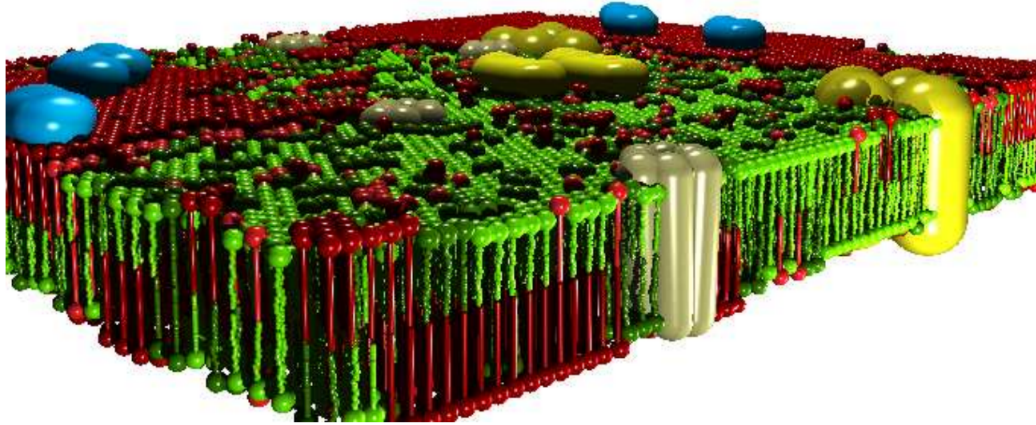


Figura 4.6: **Modelo tridimensional de membrana celular propuesto por Singer y Nicholson** [?].

gran importancia para las funciones celulares.

Los lípidos conocidos que conforman principalmente a esta bicapa son: dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), fosfatidiletanolamina(DPPE), fosfatidilserina(DPPS), fosfatidilinositol(DPPI), esfingomielina(SM), colesterol(Col) y glicolípidos. Todo éste sistema se ha modelado de muchas formas, el actual modelo mas aceptado es el de Singer y Nicholson, Figura 4.6, en el cual los lípidos se encuentran en un estado fluido y las proteínas difunden en ésta. Existen 4 formas en que una célula intercambia sustancias entre el exterior y el interior de la célula a través de la membrana plasmática, estas formas son: Difusión simple, transporte pasivo, difusión facilitada y transporte activo [?].

Se le llama difusión simple a el intercambio de elementos con el exterior de elementos muy pequeños, los cuales atraviesan sin problema debido a que la bicapa lipídica que los separa tiene pequeñas separaciones, por donde éstos difunden sin problema. Un ejemplo de la difusión simple es el caso de algunos elementos químicos como el hidrógeno, Figura 4.7.a.

Es llamado transporte pasivo si los elementos no son lo suficiente pequeños como para atravesar sin problema la bicapa lipídica, el intercambio de elementos por lo general son iones y moléculas muy pequeñas, Figura 4.7.b. Este tipo de transporte no consume energía de la célula y se da debido a los gradientes de concentración o gradiente de carga eléctrica.

la difusión facilitada es un intercambio de moléculas que no pueden atravesar la membrana plasmática debido a su tamaño, la cual se da mediante canales formados por proteínas transmembranales. Un ejemplo de éste es la difusión de la glucosa que se aprecia en la Figura 4.7.c), este tipo de transporte tampoco utiliza energía y también es generado por un gradiente de concentración de la sustancia, sin embargo depende de la cantidad de proteínas que generan los poros para éste transporte.

El transporte activo es usado en las sustancias para ser transportadas en contra de un gradiente ya sea de concentración o electro-químico. Una proteína realiza un trabajo para mover y hacer pasar a través de la membrana a la sustancia, ésto conlleva a un gasto de energía para la célula, esta energía es obtenida de una molécula que la libera al romper enlaces químicos entre fosfatos. La molécula que proporciona la energía es adenosil tri-fosfato (ATP), Figura 4.7.d).

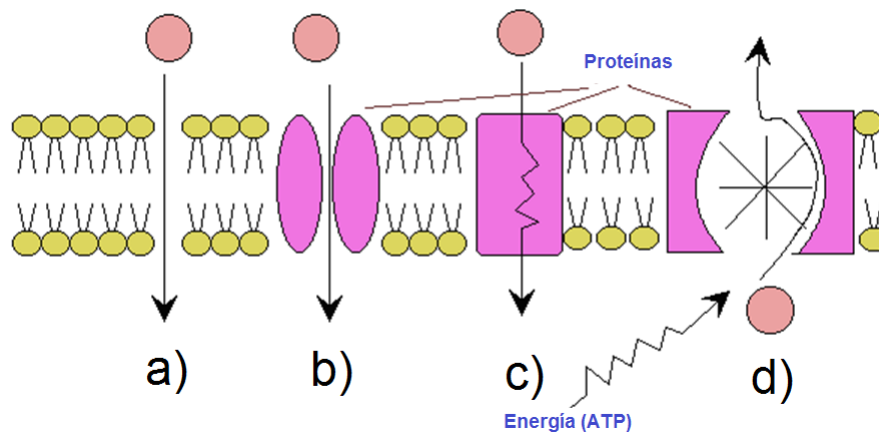


Figura 4.7: **Diagrama de los tipos de transporte celular.** a) **Difusión simple** b) **transporte pasivo**, c) **difusión facilitada** y d) **transporte activo**.

La propagación de impulsos se describe generalmente con un modelo eléctrico [?]. En el modelo las corrientes generadas en el modelo son debido a el intercambio de iones y solo analiza la parte eléctrica, no contiene información de las demás variables físicas como lo son la temperatura, área o rigidez.

Tasaki y colaboradores encontraron que un nervio cambia su espesor durante la propagación del potencial de acción, lo cual conlleva a un cambio directo en las propiedades

mecánicas de éste [?]. Además se reporto otro trabajo donde se realizó la medición de la motilidad de espermatozoides de ratón. Los espermatozoides fueron colocados en una solución que contenía sustancias anestésicas o excitatorias [?]. El estudio mostró que un espermatozoide, que no cumple con las características biológicas reportadas para ser afectada por estas drogas (cafeína, propofol, tetracaína,etc), fue afectado por las drogas tanto excitatorias como anestésicas. Con lo anterior se formulo la hipótesis de: "pueden ser las características físicas de los compuestos celulares lo que realmente afecta a las funciones celulares".

4.4. Transición de fase

Una transición de fase ocurre en un sistema termodinámico cuando: pasa de un estado de agregación de la materia o estado estable a otro estado estable o de agregación. Se describe como un cambio drástico de las propiedades físicas que describen al sistema. Por ejemplo en el agua, cuando cambia de estado líquido a estado sólido, la transición de fase se observa en la densidad del fluido.

En bicapas lipídicas se ha observado la existencia de tres fases dependientes de la temperatura: la fase gel, la fase ondeante y la fase fluida [?]. Definiendo la fase gel de la membrana como un estado estable en donde se encuentra la conformación de lípidos más rígida. La fase ondeante es otro estado estable de la bicapa lipídica que tiene moléculas ordenadas y desordenadas de fosfolípidos. La fase fluida es el estado en el que la bicapa bicapa lipídica es más fluida [?][?]. En el esquema de la Figura 4.8 se pueden observar las diferencias entre las fases. Para conocer la temperatura a la cual ocurre un cambio de fase se utiliza generalmente la microcalorimetría. También se han estudiado los cambios de fase en polímeros mediante el desplazamiento cuadrático medio[?], mediante la observación de la pendiente de éste. El experimento consiste en el cambio de fase de un polímero sensible al sodio.

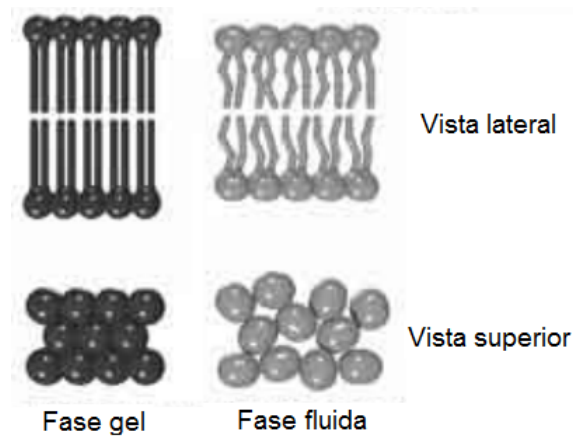


Figura 4.8: **Esquema de las fases de DPPC, a) Fase gel, b) Fase fluida** [?].

La microcalorimetría es una técnica en la cual se mide la cantidad de calor requerido para aumentar la temperatura de dos muestras, una muestra de referencia, cuya capacidad calorífica sea conocida (agua), y otra muestra a estudiar. Los resultados de esta técnica muestran un pico de potencia cuando ocurre una transición de fase.

Actualmente ya se han comenzado a realizar estudios de calorimetría de la membrana celular con anestésicos [?]. En el estudio se estudiaron liposomas y su interacción con cafeína y tetracaína. Los resultados mostraban un cambio de la temperatura a la que ocurre la transición de una fase gel a una fase fluida. El cambio de la temperatura de transición se relaciona con la fluidez de la membrana, volviendo más rígida la bicapa de lípidos si la temperatura de la transición de fase aumenta. La rigidez llevaría a una transmisión rápida del impulso y por consiguiente un efecto excitatorio, también es importante la estructura de la bicapa de lípidos, debido a que ésta es la que proporciona la base para las proteínas. Una estructura más rígida o fluida podría alterar el funcionamiento y propiedades de las funciones celulares.

4.5. Medios líquidos

El agua es un líquido esencial para la vida, debido a esto se ha estudiado con gran detenimiento. La molécula del agua esta formada por 2 átomos de hidrógeno y uno de oxígeno, como se muestra en la Figura 4.9. Actualmente se conocen las propiedades reológicas del agua y la forma en que cambian con la temperatura. Es por eso que se seleccionó como un líquido para la calibración del montaje experimental.

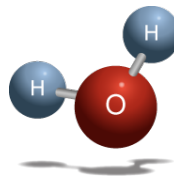


Figura 4.9: Modelo 3D de una molécula de agua.

El glicerol (Figura 4.10) o también conocido como glicerina es un líquido newtoniano que posee una alta viscosidad y es higroscópico, además de ser incoloro e inodoro. Posee un coeficiente de viscosidad alto, además se encuentran reportadas las variaciones de la viscosidad con respecto a la temperatura (Figura 4.11). Tener esta información lo hace un excelente líquido para la calibración del montaje experimental.

PNIPAm

El PNIPAm es un polímero sensible a la temperatura, el cual tiene una temperatura de transición de fase alrededor de los 34°C, esta temperatura es cercana a la del cuerpo humano. Ésta propiedad lo hace importante para aplicaciones medicas, debido a que puede ser utilizado como un acarreador de drogas. El monómero se observa en la Figura 4.12.

La configuración del polímero en una solución acuosa es lineal a temperaturas menores de su transición, al aumentar la temperatura por arriba de su transición cambia a una estructura mas compacta y libera moléculas de agua en sus vecindades, creando pequeñas

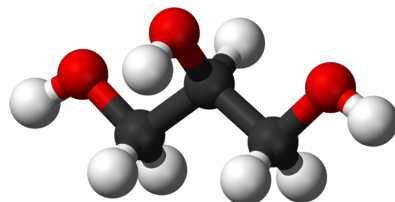


Figura 4.10: Modelo 3D de la molécula de glicerol. Los átomos de oxígeno están representados en color rojo, los átomos de carbono en gris y los átomos de hidrógeno en blanco.

Glycerine percent weight	Temperature (°C)										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0 ⁽¹⁾	1.792	1.308	1.005	0.8007	0.6560	0.5494	0.4688	0.4061	0.3565	0.3165	0.2838
10	2.44	1.74	1.31	1.03	0.826	0.680	0.575	0.500	-	-	-
20	3.44	2.41	1.76	1.35	1.07	0.879	0.731	0.635	-	-	-
30	5.14	3.49	2.50	1.87	1.46	1.16	0.956	0.816	0.690	-	-
40	8.25	5.37	3.72	2.72	2.07	1.62	1.30	1.09	0.918	0.763	0.668
50	14.6	9.01	6.00	4.21	3.10	2.37	1.86	1.53	1.25	1.05	0.910
60	29.9	17.4	10.8	7.19	5.08	3.76	2.85	2.29	1.84	1.52	1.28
65	45.7	25.3	15.2	9.85	6.80	4.89	3.66	2.91	2.28	1.86	1.55
67	55.5	29.9	17.7	11.3	7.73	5.50	4.09	3.23	2.50	2.03	1.68
70	76	38.8	22.5	14.1	9.40	6.61	4.86	3.78	2.90	2.34	1.93
75	132	65.2	35.5	21.2	13.6	9.25	6.61	5.01	3.80	3.00	2.43
80	255	116	60.1	33.9	20.8	13.6	9.42	6.94	5.13	4.03	3.18
85	540	223	109	58	33.5	21.2	14.2	10.0	7.28	5.52	4.24
90	1310	498	219	109	60.0	35.5	22.5	15.5	11.0	7.93	6.00
91	1590	592	259	127	68.1	39.8	25.1	17.1	11.9	8.62	6.40
92	1950	729	310	147	78.3	44.8	28.0	19.0	13.1	9.46	6.82
93	2400	860	367	172	89	51.5	31.6	21.2	14.4	10.3	7.54
94	2930	1040	437	202	105	58.4	35.4	23.6	15.8	11.2	8.19
95	3690	1270	523	237	121	67.0	39.9	26.4	17.5	12.4	9.08
96	4600	1580	624	281	142	77.8	45.4	29.7	19.6	13.6	10.1
97	5770	1950	765	340	166	88.9	51.9	33.6	21.9	15.1	10.9
98	7370	2460	939	409	196	104	59.8	38.5	24.8	17.0	12.2
99	9420	3090	1150	500	235	122	69.1	43.6	27.8	19.0	13.3
100	12070	3900	1410	612	284	142	81.3	50.6	31.9	21.3	14.8

Figura 4.11: Viscosidades ($mPa \cdot s$) reportadas para varias mezclas de glicerol-agua a varias temperaturas. Tomadas de [?].

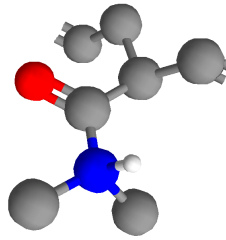


Figura 4.12: monómero del polímero PNIPAm. Las esferas de color gris representan los átomos de carbono, en color azul el átomo de nitrógeno y en rojo el átomo de oxígeno.

partículas de PNIPAm [?]. En la Figura 4.13 se muestra el cambio del diámetro con respecto a la temperatura.

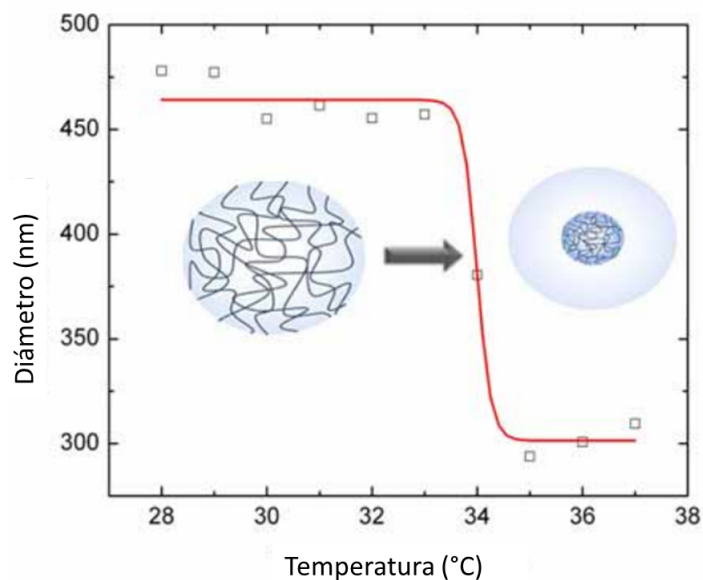


Figura 4.13: En la figura se gráfica el cambio en el diámetro del polímero PNIPAm en función de la temperatura. A 34°C hay un cambio abrupto en éste, también se observa el antes y el después la estructura del polímero.

DPPE

Dipalmitoilfosfatidilcolina o DPPE es un fosfolípido abundante en la membrana celular. Actualmente es de los fosfolípidos más utilizados como modelo de membrana celular biológica, pudiendo formar con éste bicapas y liposomas. Anteriormente se ha estudi-

ado la reología de bicapas de varios fosfolípidos[?], pero hemos decidido estudiar un modelo mas biológico elaborando liposomas. En la Figura 4.14, se detallan las partes de la molécula de DPPC.

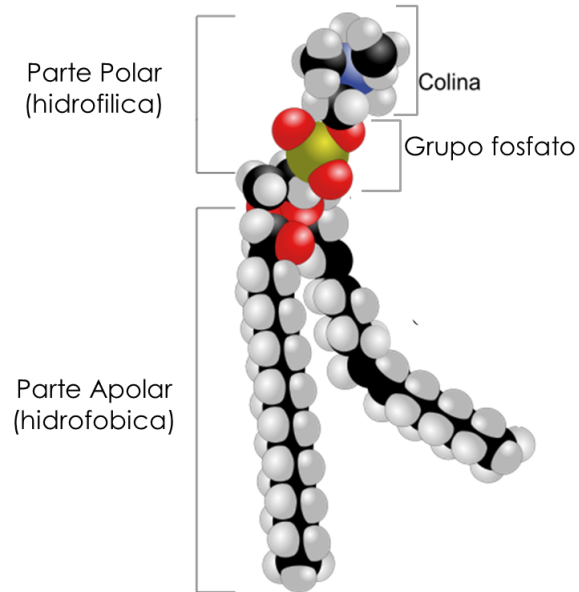


Figura 4.14: En la figura se observan las partes de una molécula de DPPC.

5

Objetivos

Estudiar las propiedades termo-mecánicas de una suspensión con liposomas de DPPC, en presencia de una sustancia no polar (hidrofóbica), utilizando micro-reología.

5.1. Objetivos particulares

- Montaje de un sistema para implementar la técnica micro-reológica.
- Estudio en fluidos newtonianos (agua y glicerina) con la técnica micro-reológica para la calibración del equipo.
- Estudiar un fluido complejo (PNIPAm) para obtener transiciones de fase basado en micro-reología.

6

Materiales y Métodos

En este capítulo se describirá la forma de elaborar las soluciones, las características y funcionamiento del montaje experimental además de los protocolos que se siguieron para obtener la información de la suspensión.

6.1. Montaje experimental

El dispositivo para realizar la medición fue diseñado para tener una detección de la temperatura fidedigna, necesitar poco volumen de la solución a estudio y poca reactividad del dispositivo con la muestra. Con estas características en mente se diseñó y fabricó una pequeña placa de cobre. El material se seleccionó debido a su alta conductividad térmica, su bajo precio relativo al oro y el grado de reactividad menor con respecto al aluminio. Las dimensiones del dispositivo fueron elegidas para proporcionar la mejor transferencia entre la placa de calentamiento, el sensor y la muestra. Las dimensiones son mostradas en la Figura 6.1

Para controlar la temperatura se requiere un transductor que convierta la energía eléctrica en energía térmica, el dispositivo que se seleccionó es un módulo peltier de 60 watts

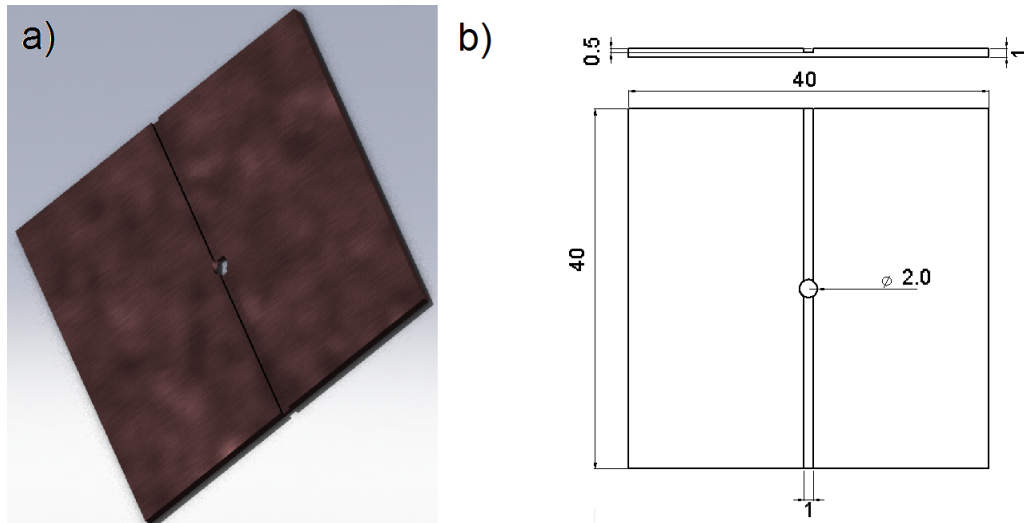


Figura 6.1: a) Vista tridimensional del portamuestra, b) Vista frontal, las cotas estan en milímetros.

de potencia. Al módulo peltier se le realizó una perforación en el centro, para permitir el paso de la luz del microscopio hacia la muestra y la cámara de vídeo. El dispositivo cuenta con 64 módulos de semiconductores distribuidos homogéneamente en todo el dispositivo peltier. En la Figura 6.2 se muestra un diagrama con las especificaciones del módulo peltier.

Se utilizó una pasta de silicon entre el modulo peltier y la placa porta-muestra, para mejorar la transferencia de calor entre ambas partes. El sellado del dispositivo se hizo con óxido de silicio, éste es hidrofóbico y tiene la elasticidad necesaria para cerrarse con un tapón en las entradas del porta muestra. Una placa de acero inoxidable se montó en la parte inferior de todo el dispositivo para proveer de una base que se ajustara al microscopio. en la Figura 6.3 se detalla el ensamblaje del dispositivo completo.

Para la realización de los vídeos se utilizó una cámara CCD marca Leica, modelo ICC50, graba vídeo a 30 cuadros por segundo y tiene una resolución de 720x480 pixeles. La cámara se coloca en el microscopio de la misma marca y tiene un objetivo de 100X de sumersión en aceite. El microscopio se coloca sobre una esponja para evitar que el movimiento de la mesa o vibraciones afecten los vídeos.

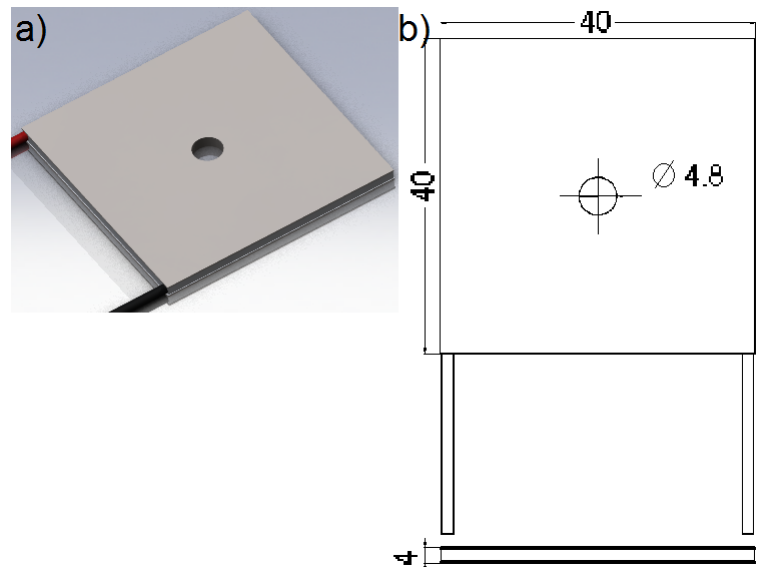


Figura 6.2: a) Vista tridimensional del módulo peltier, b) Diagrama con vista frontal y lateral, las cotas están dadas en milímetros.

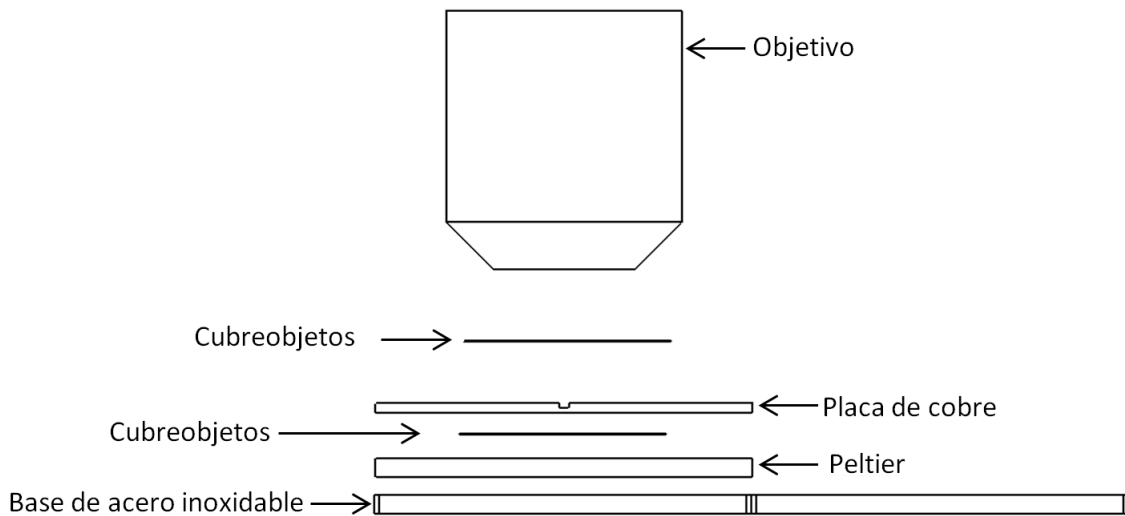


Figura 6.3: Diagrama del dispositivo para controlar la temperatura de la muestra. La base de acero inoxidable también cuenta con una perforación para dejar atravesar a la luz.

El control de temperatura se realizó con un algoritmo programado en LabView. Un transductor bimetálico mide la temperatura y después es conectado a un computador mediante una interfase USB de National Instruments TC-01. Para generar una retroalimentación de temperatura se utiliza una fuente de poder marca Hewlett Packard, mod-

elo E3633A, y es conectada al computador mediante un convertor de GPIB a USB de National Instruments. En la Figura 6.4 se muestra el diagrama de conexión del equipo.

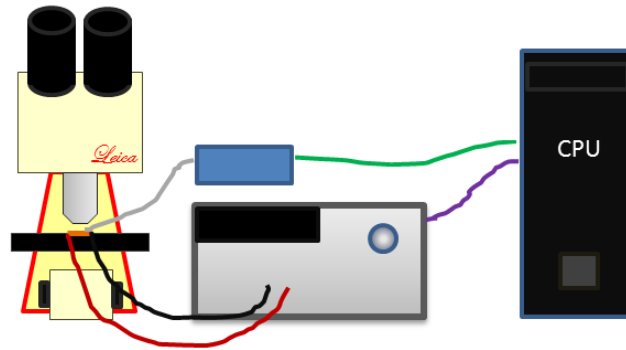


Figura 6.4: Diagrama de conexión para el montaje experimental, de izquierda a derecha, microscopio, fuente de poder(abajo) y transductor de temperatura (arriba), computador para el control.

El algoritmo de control de temperatura fue diseñado para obtener una buena velocidad de respuesta (menos de un minuto para estabilización) y una mínima variación de la temperatura ($\pm 0.05^{\circ}\text{C}$). Se utilizó un control proporcional integral derivativo (PID) doble. El PID doble funciona de la siguiente forma: para una diferencia grande, entre la temperatura deseada y la temperatura de la muestra, es usado un conjunto de parámetros; una vez alcanzada una diferencia de temperatura menor el programa comienza a utilizar otro conjunto de parámetros más precisos, lo que provoca una variación menor de la temperatura. Para la obtención de los parámetros del PID del sistema conformado por el módulo peltier, el sensor y el porta muestra, se realizó mediante un análisis del comportamiento del sistema [?]. El análisis consiste en registrar la respuesta del sistema ante el efecto de un escalón de voltaje constante proporcionado por la fuente. En la Figura 6.5 se muestra el diagrama de LabView.

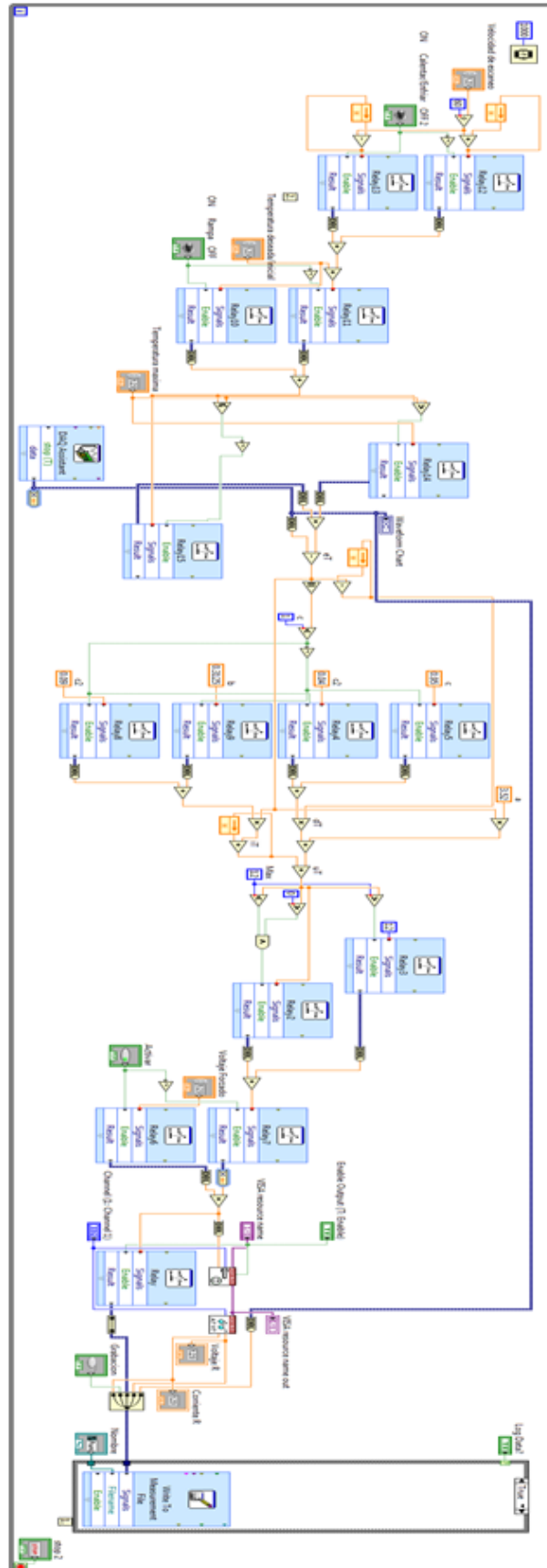


Figura 6.5: Diagrama de control PID doble en LabView.

6.2. Materiales

Para la realización del experimento reológico se utilizaron partículas de poliestireno de $993 \text{ nm} \pm 21 \text{ nm}$. de la marca Duke Scientific Corp. en solución acuosa. Se utilizó agua ultra pura obtenida de un filtro milipore marca milli-Q a $18.2 \text{ M}\Omega$. Se usó DPPC (1,2 dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfolina) sintetizado por Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL) en consistencia polvo. El propofol fue suministrado por Sigma Aldrich. La elaboración del polímero PNIPAm fue realizada con Nipam de Aldrich Chemical y Alfa Aesar.

6.3. Metodología

En esta sección se abarcará el procedimiento de elaboración para las suspensiones y el protocolo para realizar las mediciones reológicas.

Primero se realizó una calibración preliminar de líquidos con propiedades reológicas conocidas. Los líquidos fueron agua, una mezcla de agua con glicerina (70:30 v/v) y una solución termo-sensible elaborada con PNIPAm. Las pruebas se realizaron manteniendo temperaturas constantes y tazas de calentamiento.

6.3.1. Agua

Para la preparación de la suspensión con agua se utilizó una concentración del 20 % v/v de partículas traza, la concentración se selecciono para que al menos 70 partículas se observaran dentro de el campo de grabación.

Para mejorar la homogeneidad de la suspensión se pasaba por un mezclador vortex por al menos 30 segundos. Antes de la colocación de la muestra en el porta muestra se

corroboró que la temperatura se mantuviera estable.

Una vez colocada la muestra se cierra el porta muestra, después se procede a enfocar el microscopio en un plano retirado de las paredes. Una vez realizado lo anterior se procede a grabar 5 minutos de vídeo, los cuales son almacenados en la memoria del microscopio para después ser procesados en la computadora.

Para el caso del agua se realizaron 3 mediciones a temperaturas constantes, 25, 35 y 45°C, además se realizaron mediciones con una tasa de calentamiento de 1°C/min. De estas temperaturas se realizaron 2 repeticiones.

6.3.2. Glicerina

La calibración con glicerina se realizó con una mezcla de 30 % glicerina, y 70 % agua en relación volumen/volumen. Una vez elaborada la solución se procede a agregar las partículas traza, igualmente 20 % v/v, de la muestra se realizaron 3 mediciones a temperaturas constantes y una con una con tasa de calentamiento de 1°C/min.

6.3.3. PNIPAm

La concentración de la solución con PNIPAm es del 1 % (w/w). La muestra fue agitada durante 24 horas para cerciorarse que el gel se encontraba completamente hidratado y homogéneo, después se agregaron partículas traza en un 20 % (v/v). De la suspensión se realizaron 6 mediciones a temperaturas constantes, 25, 27, 29, 31, 33 y 35°C, adicionalmente se efectuaron otros análisis con tasas de calentamiento de 2°C/min y 0.15°C/min.

6.3.4. DPPC

La concentración utilizada para la preparación de liposomas fue de 38 mmol y el procedimiento para elaborarlos fue el siguiente [?]:

1. Mezclar los lípidos en agua durante 20 minutos en una temperatura superior a la de transición del lípido, la temperatura fue 60°C.
2. A continuación se prosiguió a sonicar la muestra en una sonicadora AS2060B (Ultrasonic cleaner) Autoscience (Dallas, TX EUA), a una frecuencia de 40KHz durante 25 minutos y una temperatura de 70°C.
3. Después se colocaba la muestra a una temperatura de 4°C durante 10 minutos. Éstos 2 pasos anteriores se repetían 5 veces. Con este procedimiento nos cercioramos de obtener una muestra con liposomas con un radio aproximado de 100 nm. El tiempo que la suspensión se mantiene estable es el suficiente para la realización del experimento.
4. Se realizan mediciones a 28, 30, 35 y 45°C y con un gradiente de temperatura de 1°C desde 35°C hasta 43°C .
5. Una vez realizados los pasos anteriores a una de las muestras se le añade propofol a una concentración de 14 mmol e inmediatamente se realiza la medición a 22, 25 y 28°C y con una tasa de calentamiento de 1°C desde 22°C hasta 25°C .

Al terminar de realizar el vídeo se procede a limpiar el porta-muestra con al menos 10 ml. de alcohol etílico al 96 % y se deja 20 minutos de tiempo de secado.

Para la obtención del desplazamiento cuadrático medio primero se procesa el vídeo obtenido. El vídeo es fragmentado en imágenes y posteriormente un algoritmo elaborado en IDL filtra y obtiene los centros de masa de las partículas. La Figura 6.7 muestra un ejemplo de una imagen antes y después de ser procesada.

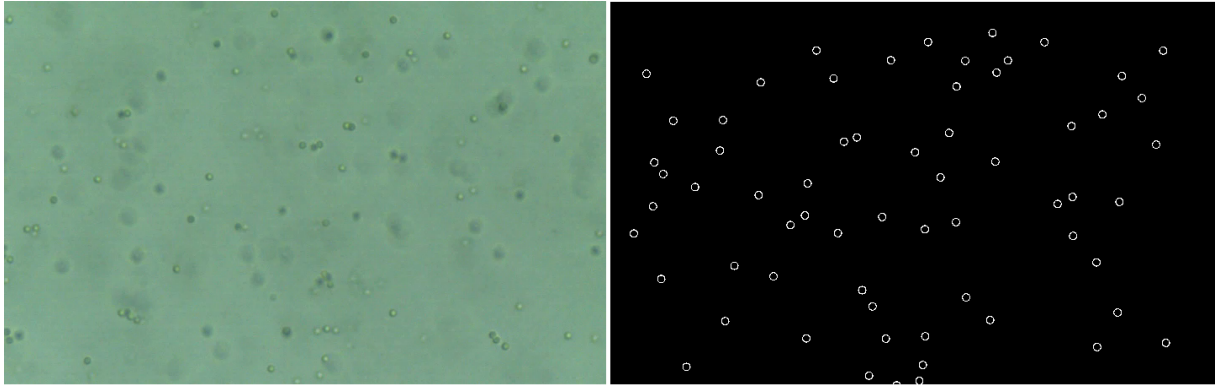


Figura 6.6: **En la izquierda se observa la imagen obtenida del vídeo, a la derecha la imagen después de ser procesada por el algoritmo.**

Una vez obtenidos las posiciones de las partículas, se procede a calcular el desplazamiento cuadrático medio. El desplazamiento cuadrático medio puede ser obtenido de dos formas, dependiendo de la información a obtener de él. La primera es tomando las trayectorias de cada partícula traza y después promediar su desplazamiento cuadrático medio, con este método obtenemos información para obtener los módulos de pérdida y almacenamiento de la muestra. También se puede promediar paso a paso el desplazamiento cuadrático medio y obtener la viscosidad de la solución. Las dos formas de calculo tienen su base en la teoría ergódica, y quedo aclarada que es valida para el desplazamiento cuadrático medio en [?].

6.4. Metodología

En esta sección se abarcará el procedimiento de elaboración para las suspensiones y el protocolo para realizar las mediciones reológicas.

Primero se realizó una calibración preliminar de líquidos con propiedades reológicas conocidas. Los líquidos fueron agua, una mezcla de agua con glicerina (70:30 v/v) y una solución termo-sensible elaborada con PNIPAm. Las pruebas se realizaron manteniendo temperaturas constantes y tazas de calentamiento.

6.4.1. Agua

Para la preparación de la suspensión con agua se utilizó una concentración del 20 % v/v de partículas traza, la concentración se seleccionó para que al menos 70 partículas se observaran dentro de el campo de grabación.

Para mejorar la homogeneidad de la suspensión se pasaba por un mezclador vortex por al menos 30 segundos. Antes de la colocación de la muestra en el porta muestra se corroboró que la temperatura se mantuviera estable.

Una vez colocada la muestra se cierra el porta muestra, después se procede a enfocar el microscopio en un plano retirado de las paredes. Una vez realizado lo anterior se procede a grabar 5 minutos de vídeo, los cuales son almacenados en la memoria del microscopio para después ser procesados en la computadora.

Para el caso del agua se realizaron 3 mediciones a temperaturas constantes, 25, 35 y 45°C, además se realizaron mediciones con una tasa de calentamiento de 1°C/min. De estas temperaturas se realizaron 2 repeticiones.

6.4.2. Glicerina

La calibración con glicerina se realizó con una mezcla de 30 % glicerina, y 70 % agua en relación volumen/volumen. Una vez elaborada la solución se procede a agregar las partículas traza, igualmente 20 % v/v, de la muestra se realizaron 3 mediciones a temperaturas constantes y una con una con tasa de calentamiento de 1°C/min.

6.4.3. PNIPAm

La concentración de la solución con PNIPAm es del 1 % (w/w). La muestra fue agitada durante 24 horas para cerciorarse que el gel se encontraba completamente hidratado y homogéneo, después se agregaron partículas traza en un 20 % (v/v). De la suspen-

sión se realizaron 6 mediciones a temperaturas constantes, 25, 27, 29, 31, 33 y 35°C, adicionalmente se efectuaron otros análisis con tasas de calentamiento de 2°C/min y 0.15°C/min.

6.4.4. DPPC

La concentración utilizada para la preparación de liposomas fue de 38 mmol y el procedimiento para elaborarlos fue el siguiente [?]:

1. Mezclar los lípidos en agua durante 20 minutos en una temperatura superior a la de transición del lípido, la temperatura fue 60°C.
2. A continuación se prosiguió a sonicar la muestra en una sonicadora AS2060B (Ultrasonic cleaner) Autoscience (Dallas, TX EUA), a una frecuencia de 40KHz durante 25 minutos y una temperatura de 70°C.
3. Después se colocaba la muestra a una temperatura de 4°C durante 10 minutos. Éstos 2 pasos anteriores se repetían 5 veces. Con este procedimiento nos cercioramos de obtener una muestra con liposomas con un radio aproximado de 100 nm. El tiempo que la suspensión se mantiene estable es el suficiente para la realización del experimento.
4. Se realizan mediciones a 28, 30, 35 y 45°C y con un gradiente de temperatura de 1°C desde 35°C hasta 43°C .
5. Una vez realizados los pasos anteriores a una de las muestras se le añade propofol a una concentración de 14 mmol e inmediatamente se realiza la medición a 22, 25 y 28°C y con una tasa de calentamiento de 1°C desde 22°C hasta 25°C .

Al terminar de realizar el vídeo se procede a limpiar el porta-muestra con al menos 10 ml. de alcohol etílico al 96 % y se deja 20 minutos de tiempo de secado.

Para la obtención del desplazamiento cuadrático medio primero se procesa el vídeo obtenido. El vídeo es fragmentado en imágenes y posteriormente un algoritmo elaborado en IDL filtra y obtiene los centros de masa de las partículas. La Figura 6.7 muestra un ejemplo de una imagen antes y después de ser procesada.

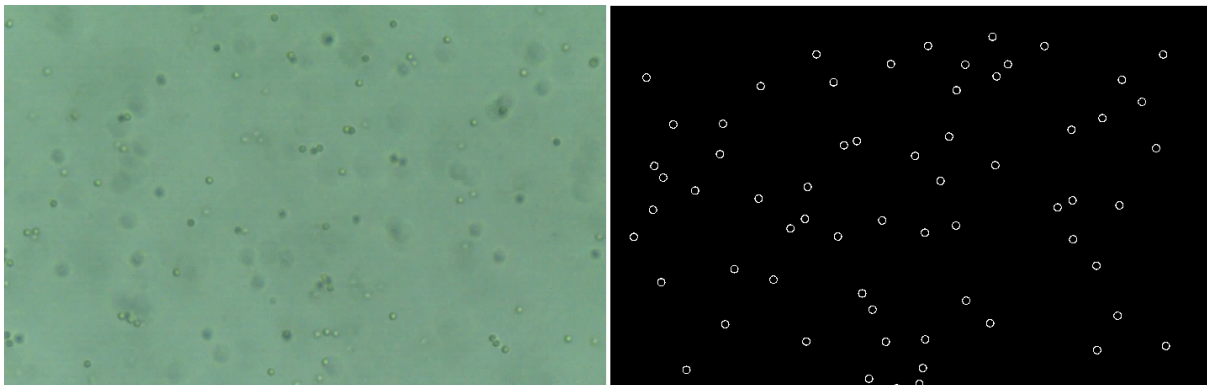


Figura 6.7: En la izquierda se observa la imagen obtenida del vídeo, a la derecha la imagen después de ser procesada por el algoritmo.

Una vez obtenidos las posiciones de las partículas, se procede a calcular el desplazamiento cuadrático medio. El desplazamiento cuadrático medio puede ser obtenido de dos formas, dependiendo de la información a obtener de él. La primera es tomando las trayectorias de cada partícula traza y después promediar su desplazamiento cuadrático medio, con este método obtenemos información para obtener los módulos de pérdida y almacenamiento de la muestra. También se puede promediar paso a paso el desplazamiento cuadrático medio y obtener la viscosidad de la solución. Las dos formas de cálculo tienen su base en la teoría ergódica, y quedo aclarada que es valida para el desplazamiento cuadrático medio en [?].

7

Resultados

En este capítulo se mostrará la información micro-relógica obtenida de los líquidos de calibración, los resultados del polímero PNIPAm, el fosfolípido DPPC y un estudio de calorimetría para la comprobación de la temperatura de transición.

7.1. Agua

Los datos reportados para el cambio de la viscosidad del agua con respecto a la temperatura [?] están detallados en la Figura 7.1. La calibración comenzó realizando mediciones del agua a temperaturas constantes, las temperaturas fueron 25, 35 y 45°C. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 7.2.

A los datos obtenidos se les realizó el ajuste a una recta para poder obtener la viscosidad del agua. La precisión de los ajustes para estas mediciones fueron de más del 99%. Para el caso del agua a 25°C la viscosidad calculada fue de $0.92 \text{ mPa} \cdot \text{s}$. Una vez aumentada la temperatura y llegando a 35°C se realizó el cálculo de la viscosidad, la cual fue de $0.69 \text{ mPa} \cdot \text{s}$. Por último se realiza el experimento a 45°C, la viscosidad obtenida para esta temperatura fue de $0.51 \text{ mPa} \cdot \text{s}$.

Temp. °C	Viscosity μ , $\mu\text{Pa s}$
10	1307
15	1138
20	1002
25	889
30	796
35	718
40	652
45	595
50	547
55	504
60	467
65	434
70	405

Figura 7.1: Viscosidades del agua a temperaturas constantes.

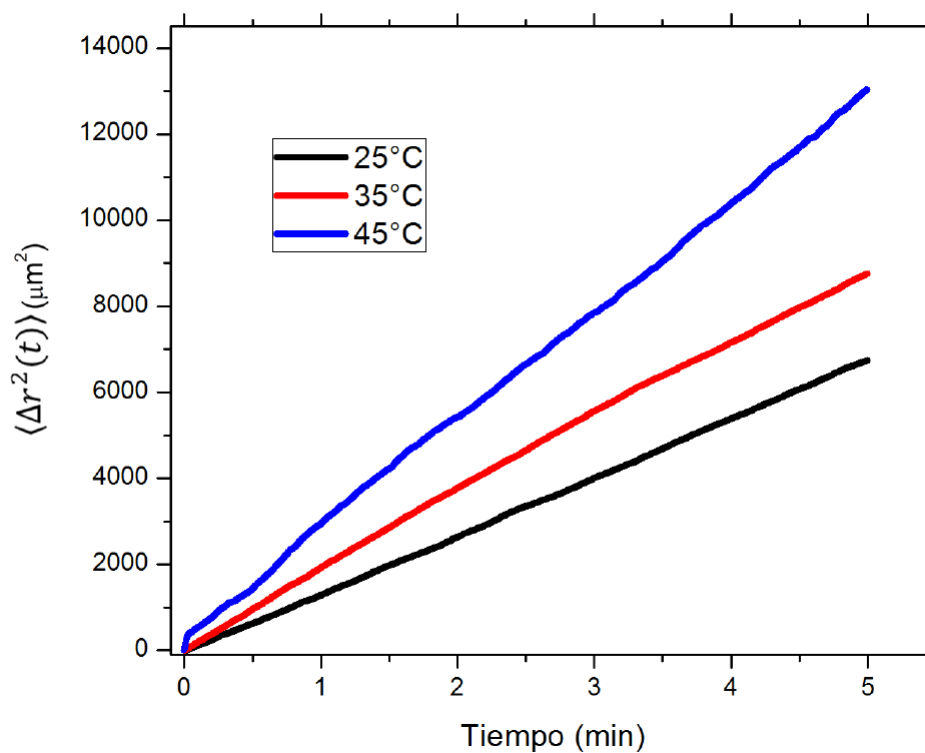


Figura 7.2: Desplazamiento cuadrático medio del Agua a 25, 35, y 45°C. Las líneas punteadas muestran los datos experimentales y las líneas continuas son el ajuste a una recta

Anteriormente no se había reportado el comportamiento del desplazamiento cuadrático medio al variar la temperatura en agua, es por esa razón que se realizó el siguiente experimento, fue realizado con una tasa de calentamiento de 1°C/min. Los datos obtenidos

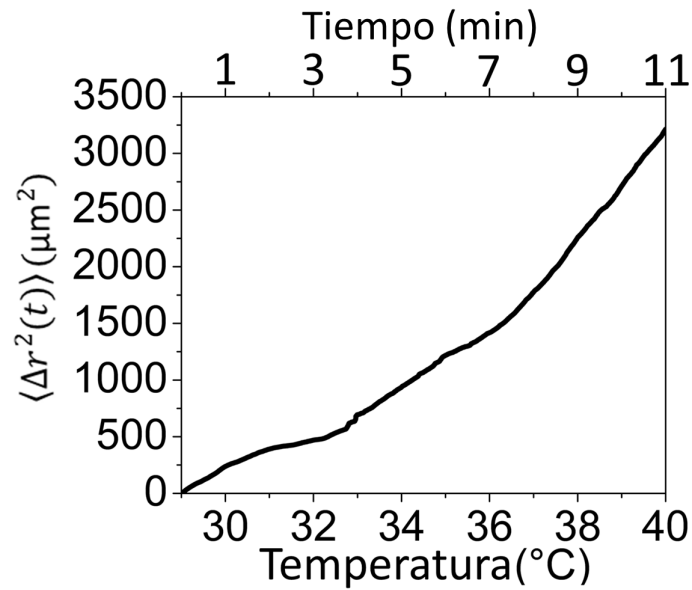


Figura 7.3: Desplazamiento cuadrático medio del Agua desde 29°C hasta 40°C

se muestran en la Figura 7.3. En la Figura 7.4 se muestra el desplazamiento cuadrático medio y la reología de una muestra de agua a 25°C , nótese que no tiene módulo de almacenamiento, ésto debido a que el agua es un líquido completamente newtoniano, la viscosidad calculada es de 1.05 centipoise.

7.2. Glicerol

El calculo de la viscosidad fue realizado a 2 temperaturas constantes, 30 y 50°C . En la Figura 7.5 se muestra el desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo para el glicerol. De los datos se calculó la viscosidad, a 30°C el cálculo mostró como resultado $1.49 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ y $1.12 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ a 50°C .

En la Figura 7.6 se muestran los datos obtenidos para la glicerina, en una medición con un gradiente de temperatura de $0.7^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Los líquidos anteriormente estudiados en este trabajo son fluidos newtonianos, los

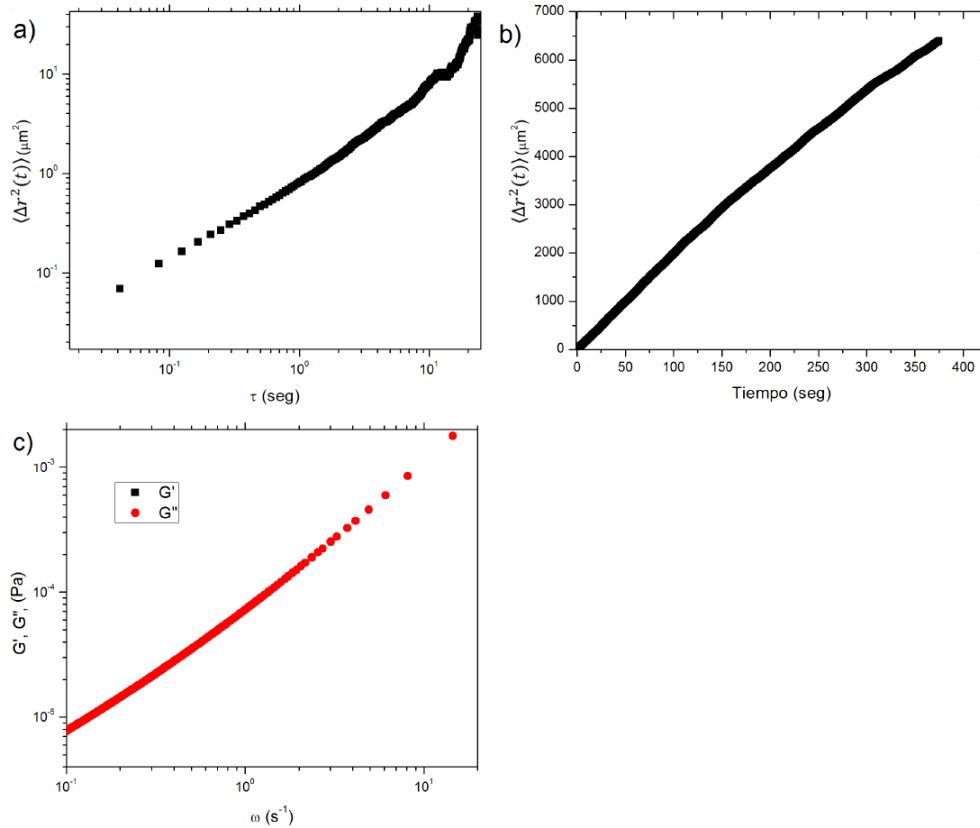


Figura 7.4: En las gráficas se muestra la información obtenida. a) desplazamiento cuadrático medio, b) desplazamiento cuadrático medio acumulado, c) Módulo de almacenamiento (G') y de pérdida (G'').

cuales al calcularse sus propiedades visco-elásticas sólo tienen una componente viscosa. A continuación se realiza la calibración con una suspensión visco-elástica y termo-sensible, con esta suspensión se terminará de comprobar que el sistema se encuentra en óptimas condiciones para las mediciones.

7.3. PNIPAm

Para la solución de PNIPAm se realizaron 6 mediciones a temperaturas constantes reguladas y una con un gradiente de temperatura. De las 6 temperaturas se obtuvo el

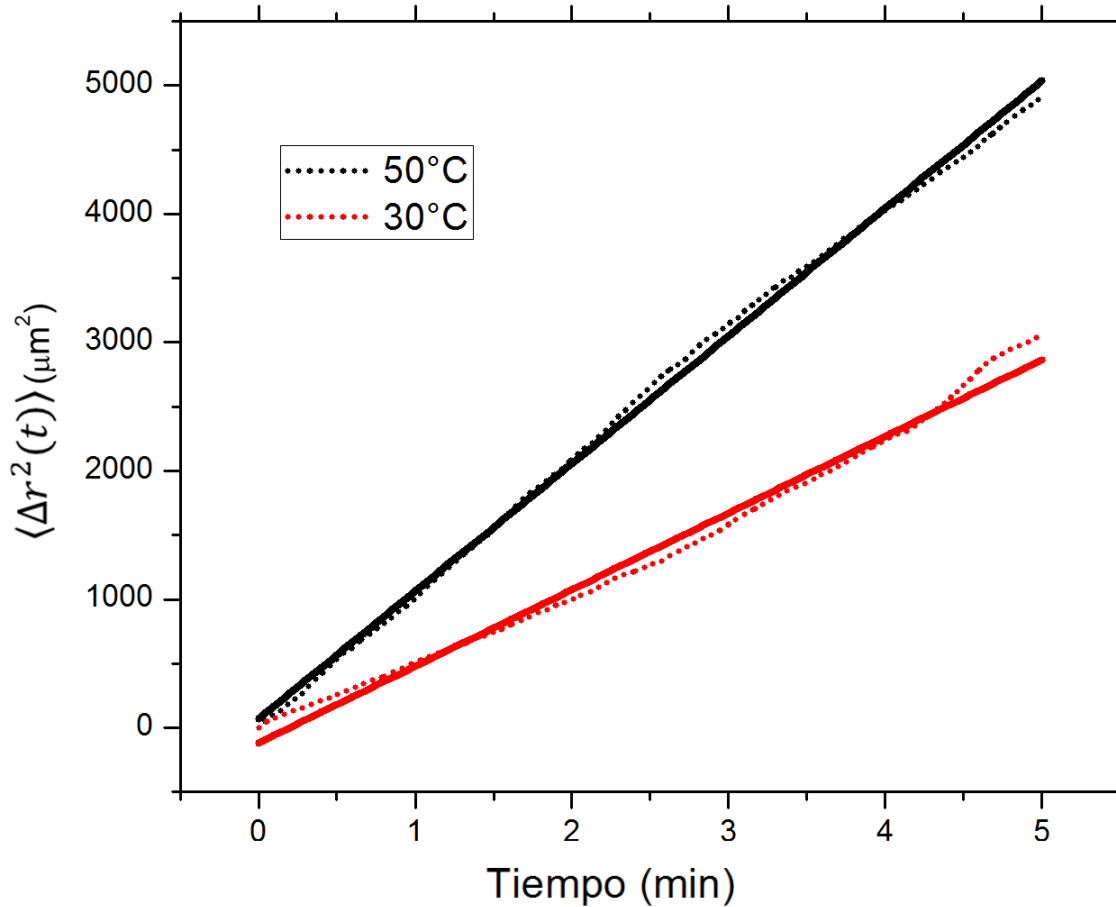


Figura 7.5: Desplazamiento cuadrático medio del glicerol a 30 y 50°C, la línea punteada representa los datos experimentales y la línea continua el ajuste a una recta

desplazamiento cuadrático medio, en el cual la pendiente nos indica la viscosidad del medio. Con la información obtenida también se calcula los módulos de almacenamiento y pérdida del fluido.

En la Figura 7.7 se muestran los datos del experimento con PNIPAm a temperaturas fijas. Se puede observar cómo el desplazamiento se va reduciendo, indicando que la muestra se vuelve más viscosa conforme aumenta la temperatura, este comportamiento ya se había reportado en [?].

La suspensión de PNIPAm muestra un comportamiento reológico muy parecido a temperaturas menores a las de su temperatura de transición, las cuales son coincidentes con

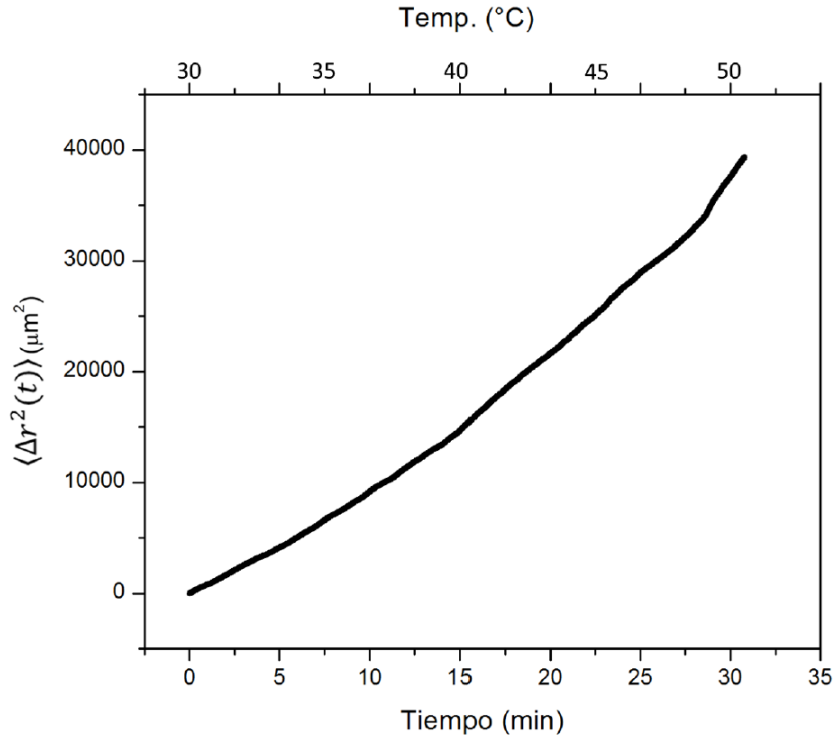


Figura 7.6: **Desplazamiento cuadrático medio de las partículas en glicerol sometido a un gradiente de temperatura, el calentamiento se realizó desde 30°C hasta 50°C en 30 minutos**

[?]. El PNIPAm cambia dramáticamente sus propiedades después de su temperatura de transición, pasa de tener un comportamiento mayormente viscoso a bajas frecuencias a tener uno mayormente elástico a bajas frecuencias (Figura 7.8). El comportamiento reológico después de la temperatura de transición no se había reportado anteriormente. Sin embargo se observó otro efecto en las partículas traza, un efecto entrópico que provocó una aglomeración de éstas. El efecto es apreciado en la Figura 7.9.

Otro análisis realizado fue el de someter a la solución de PNIPAm a un gradiente de temperatura. Los datos de este análisis son mostrados en la Figura 7.10, en ésta se puede observar el cambio en la pendiente del desplazamiento cuadrático medio. El

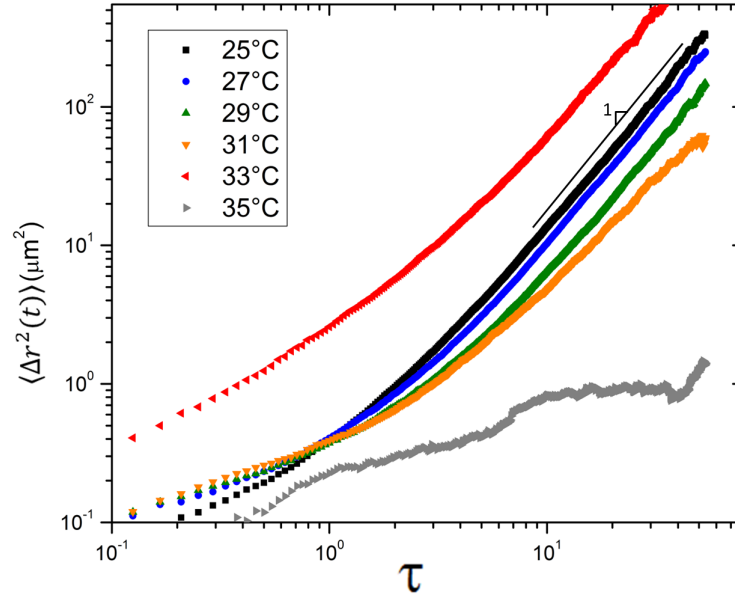


Figura 7.7: Desplazamiento cuadrático medio de PNIPAm sometido a diferentes temperaturas, desde 25°C hasta 35°C en intervalos de 2°C

cambio de la pendiente se debe a la transición de fase de la solución. El cambio en la viscosidad para el PNIPAm se había reportado anteriormente en [?] y es coherente el cambio en el desplazamiento cuadrático medio.

Para corroborar la temperatura de transición de la solución de PNIPAm se realizó un estudio de microcalorimetría diferencial de barrido. En la Figura 7.11 se muestran los datos de microcalorimetría para la solución con PNIPAm, el máximo del pico se encuentra a 34.6°C.

Como un estudio adicional se realizó otro experimento con una tasa de calentamiento de 0.15°C/min, los datos de este estudio se muestran en el inciso a) de la Figura 7.12 la tasa de calentamiento es más lenta en comparación con la anterior, ésta se tomó con el objetivo de tener la estadística suficiente para calcular una viscosidad relativa con una precisión superior al 99%. Los resultados de este estudio se muestran en el inciso b) de la Figura 7.12. Los resultados dan a conocer un aumento de la viscosidad conforme se incrementa la temperatura, además de mostrar a la temperatura de transición un salto

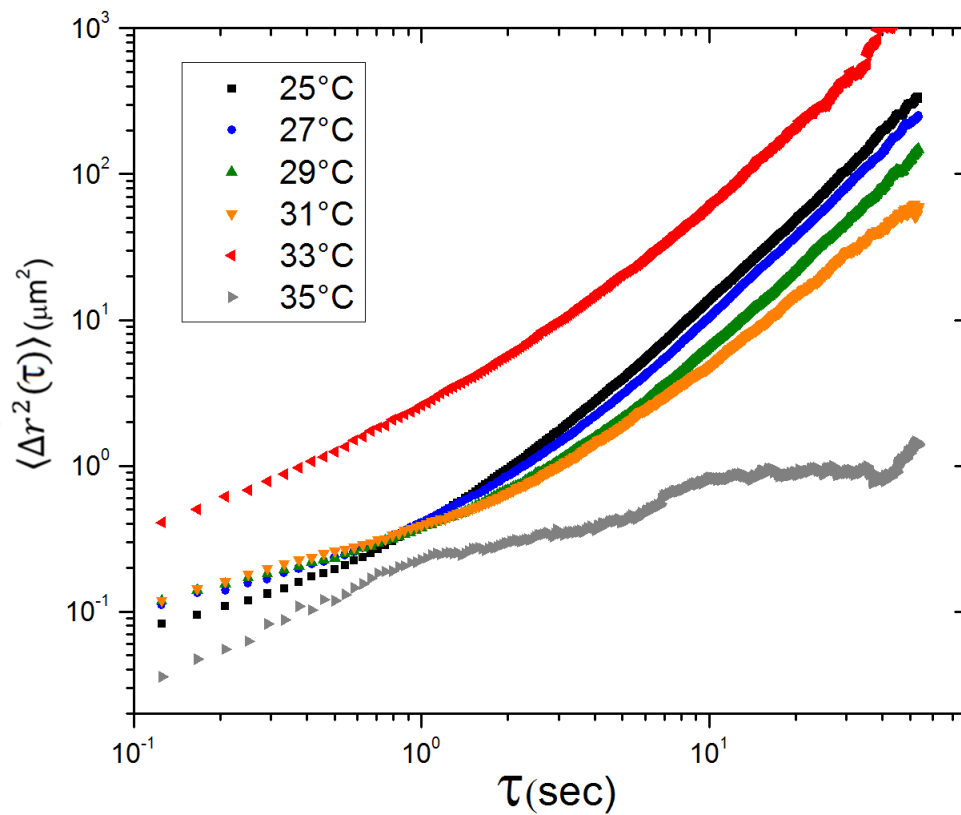


Figura 7.8: Módulos de almacenamiento y de pérdida para PNIPAM sometido a diferentes temperaturas, desde 25°C hasta 35°C en intervalos de 2°C

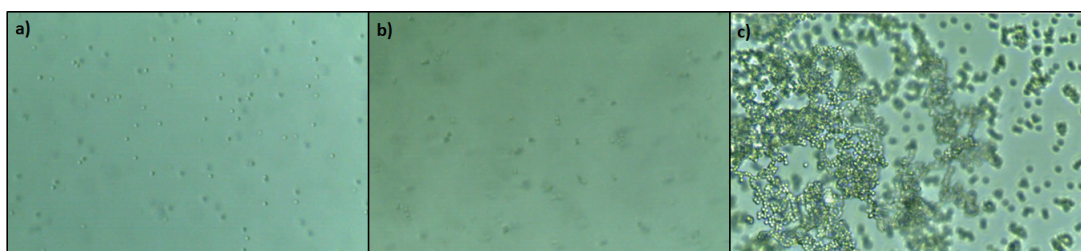


Figura 7.9: Imágenes de PNIPAM en: a) 27°C, b) 30°C y c) 35°C.

en la viscosidad.

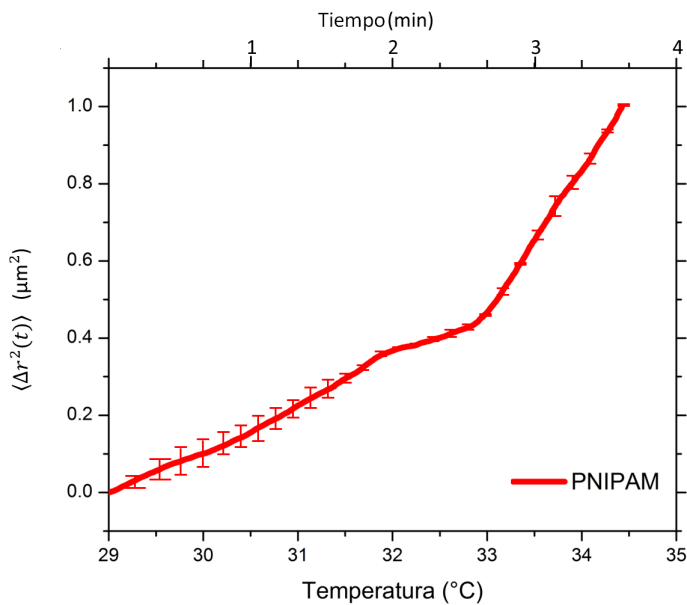


Figura 7.10: En la gráfica se muestra la evolución del desplazamiento cuadrático medio conforme avanza el tiempo y aumenta la temperatura desde 29 $^{\circ}\text{C}$ hasta 35 $^{\circ}\text{C}$ con una tasa de calentamiento de 1.5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

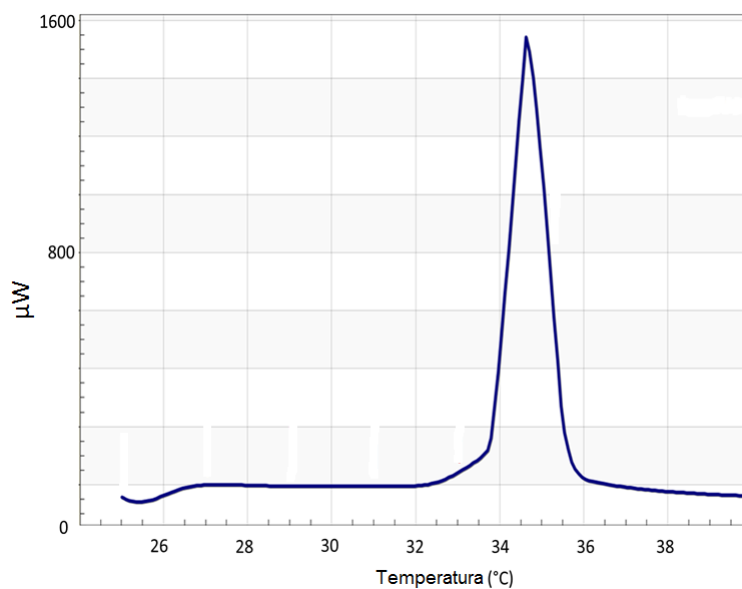


Figura 7.11: Termograma para la solución de PNIPAm, desde 25 $^{\circ}\text{C}$ hasta 40 $^{\circ}\text{C}$ con una tasa de calentamiento de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$

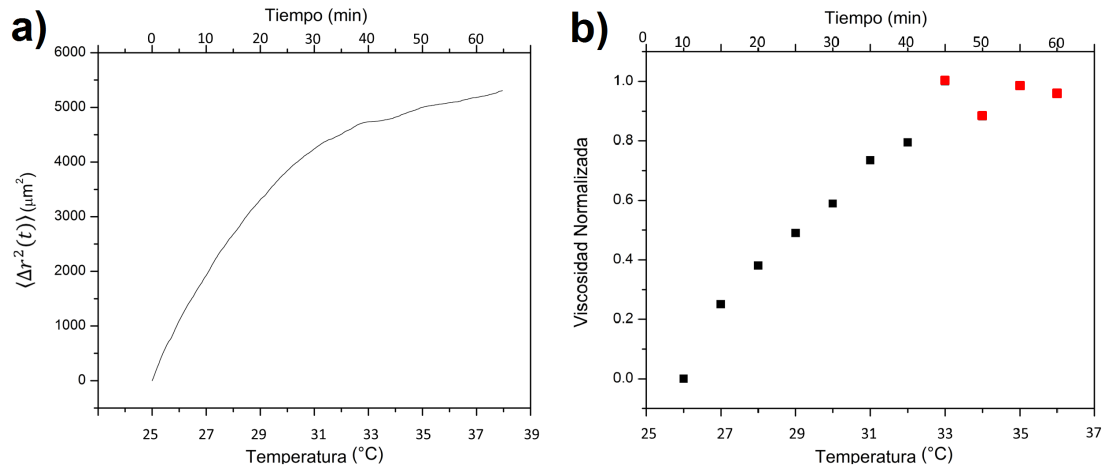


Figura 7.12: a) Desplazamiento cuadrático medio de una solución de PNIPAm con una tasa de calentamiento de $0.15^{\circ}\text{C}/\text{min}$. b) Resultados del cálculo de la viscosidad relativa para la tasa de calentamiento lenta.

7.4. DPPC

Las solución utilizada para la obtención de los módulos de almacenamiento y el módulo de pérdida es analizada con 3 temperaturas: 30°C , la temperatura corresponde a la fase gel de los liposomas; 35°C donde prevalece la fase ondeante y por ultimo a 45°C , temperatura correspondiente a la fase fluida. La Figura ?? muestra el desplazamiento cuadrático medio para estas 3 temperaturas, se observa que a temperaturas mayores el desplazamiento es menor, lo que indica un aumento en la viscosidad de la muestra.

La información del desplazamiento cuadrático medio fue utilizada para obtener los módulos de perdida y de almacenamiento a cada temperatura. En la Figura 7.14 se puede observar como conforme la temperatura va aumentando el módulo de almacenamiento también empieza a crecer y el módulo de pérdida comienza a disminuir.

Otro experimento se realizó para observar el comportamiento de la muestra, el cual fue elaborado aplicando una tasa de calentamiento de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. En la Figura 7.15 se observa el desplazamiento cuadrático medio en función del tiempo y la temperatura. En la figura se puede observar una curva, la cual es provocada por la transición de fase

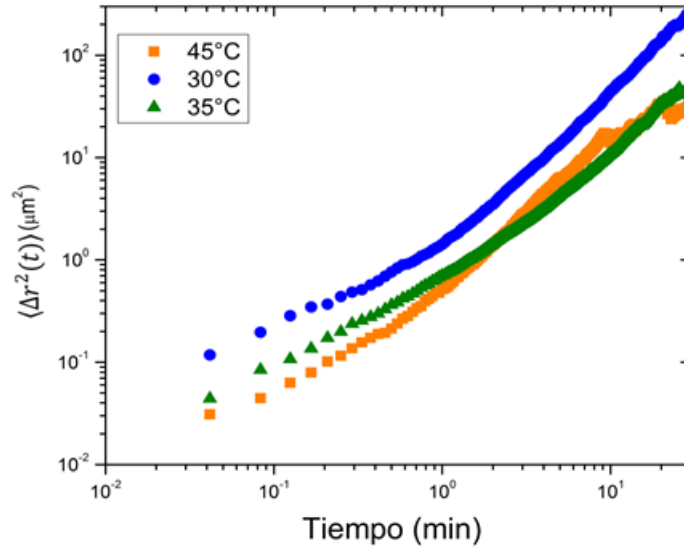


Figura 7.13: Desplazamiento cuadrático medio para 3 temperaturas de una solución de DPPC

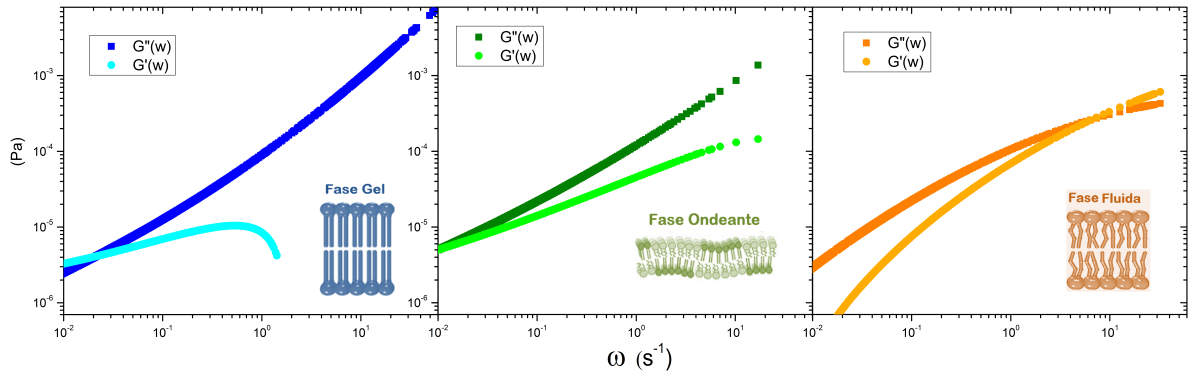


Figura 7.14: Módulo de pérdida (G'') y almacenamiento (G') para 3 temperaturas de una solución de DPPC. De izquierda a derecha, 30°C, 35°C y 45°C. Los dibujos dentro de los recuadros representan la fase en la que se encuentra la solución.

del DPPC de un estado ondeante a un estado fluido.

Adicionalmente se realizó un estudio de calorimetría diferencial de barrido. El termograma para esta solución de DPPC se muestra en la Figura 7.16. Los datos de la termografía nos muestra que la temperatura de transición de un estado ondeante a un estado fluido se encuentra a 42°C.

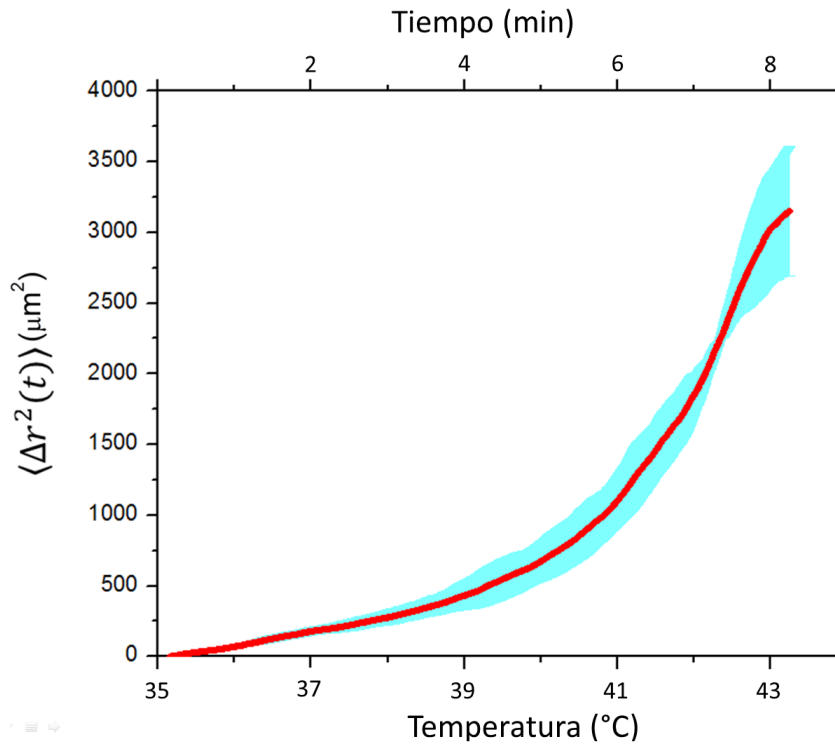


Figura 7.15: Desplazamiento cuadrático medio para una solución de DPPC aplicando un gradiente de temperatura, desde 35°C hasta 43°C , en un lapso de 8 minutos. La línea roja representa el promedio de 3 experimentos, la banda azul es la barra de error.

7.5. DPPC y propofol

En el estudio del efecto de la anestesia en liposomas se utilizó el propofol (diestiroil). Su uso fue seleccionado debido a que es un agente anestésico altamente lipófilo y su vida media es del orden de minutos a horas [?].

Los experimentos se realizaron a 2 temperaturas, 22°C y 28°C . La Figura ?? muestra el desplazamiento cuadrático medio obtenido de estos dos experimentos. Posteriormente se calculó los módulos de almacenamiento y pérdida, así como también la viscosidad que fue de $1.74 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ a 22°C y $1.62 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ para 28°C , los resultados de este cálculo son mostrados en la Figura 7.18. Cabe destacar que las propiedades reológicas de la suspensión con liposomas y propofol a 22°C es parecida a la solución con solo liposomas, mientras que estando ambas a 28°C tienen un comportamiento muy diferente.

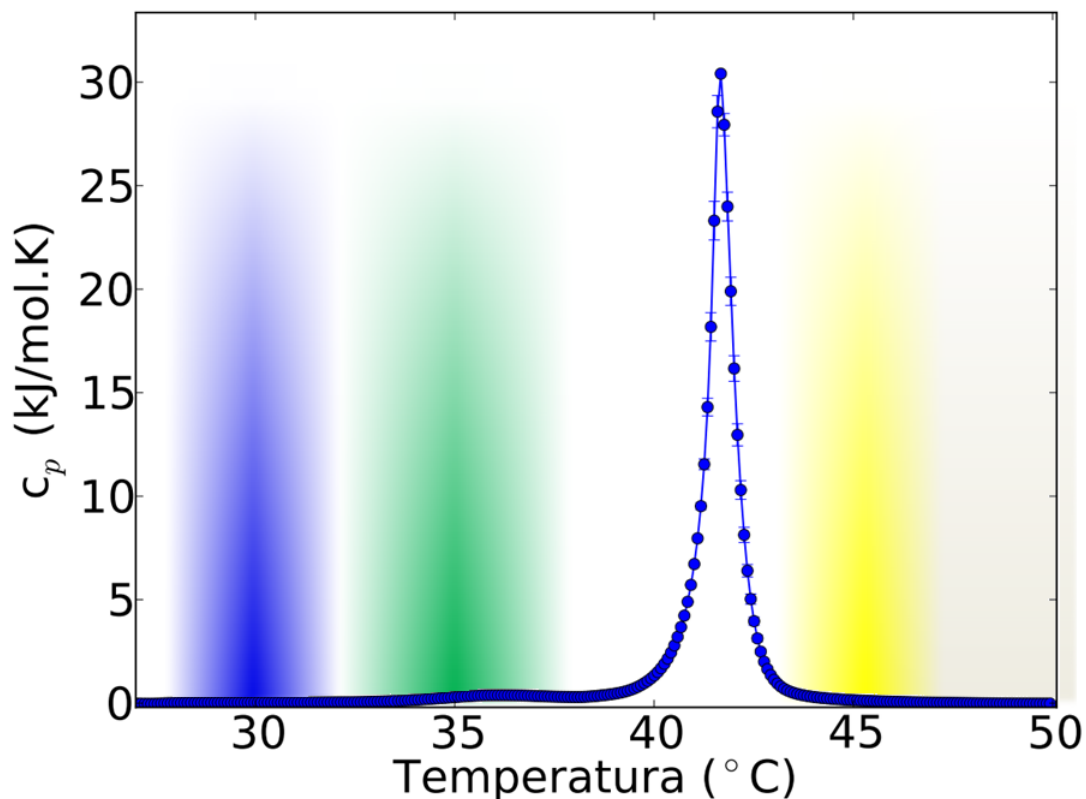


Figura 7.16: Termograma para la solución con liposomas de DPPC, las barras de color resaltan las temperaturas a las cuales se obtubieron los módulos reológicos (30, 35y45°C).

Para continuar con el estudio de la solución de liposomas con propofol, se realizó un experimento en el cual se aplica un gradiente de temperatura a la muestra. La Figura 7.19 muestra la evolución del desplazamiento cuadrático medio, en la cual se puede observar un cambio en la pendiente de la gráfica, este cambio de pendiente es debido al cambio de fase de la muestra.

La Figura 7.20 muestra como a la misma temperatura los liposomas que fueron expuestos a el propofol cambiaron las propiedades reológicas de la muestra.

El cambio en las propiedades reológicas podría ser consecuencia de la fusión de liposomas. Se hizo una comprobación la cual consto de dos ciclos de calentamiento-enfriamiento (templado). La Figura 7.22 muestra que para la temperatura de 30°C,

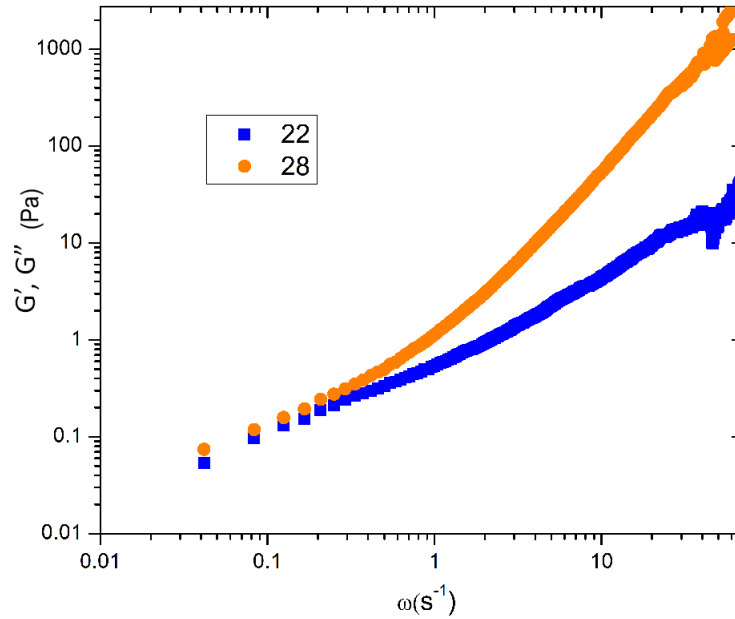


Figura 7.17: Desplazamiento cuadrático medio para una solución con propofol, los experimentos fueron realizados a 2 temperaturas.

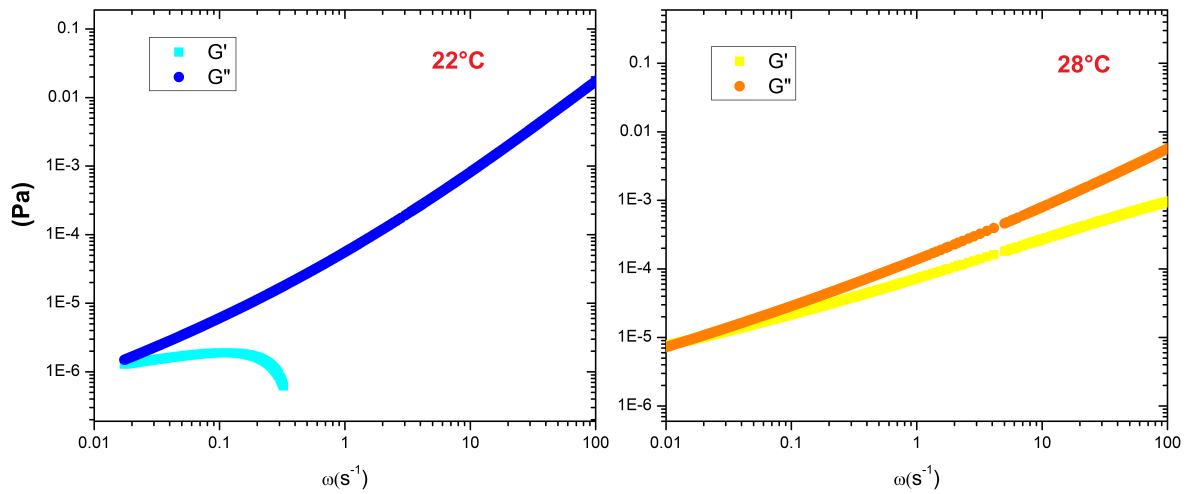


Figura 7.18: Módulos de pérdida (G'') y almacenamiento (G') para DPPC y propofol a 2 temperaturas.

después de dos templados, el comportamiento reológico es muy parecido al inicial. También indica que las mediciones reológicas no dependen del tiempo de envejecimiento de la muestra.

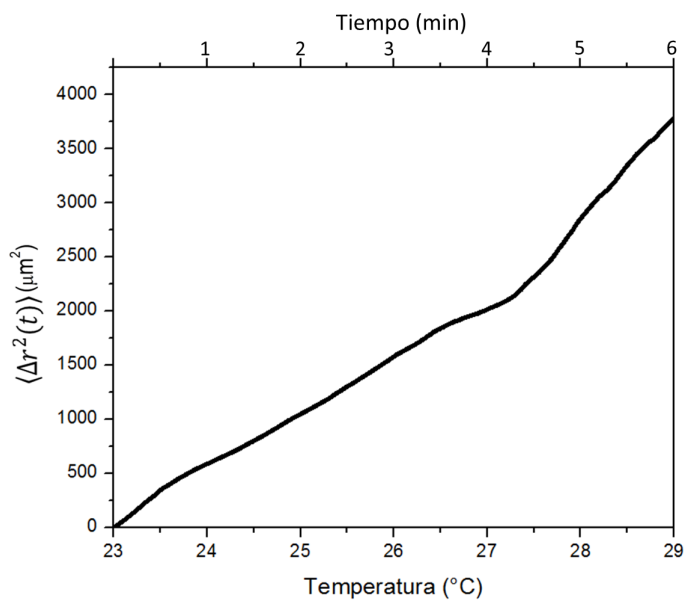


Figura 7.19: Desplazamiento cuadrático medio de una solución de DPPC y propofol, sometida a una tasa de calentamiento de $1^\circ\text{C}/\text{min}$

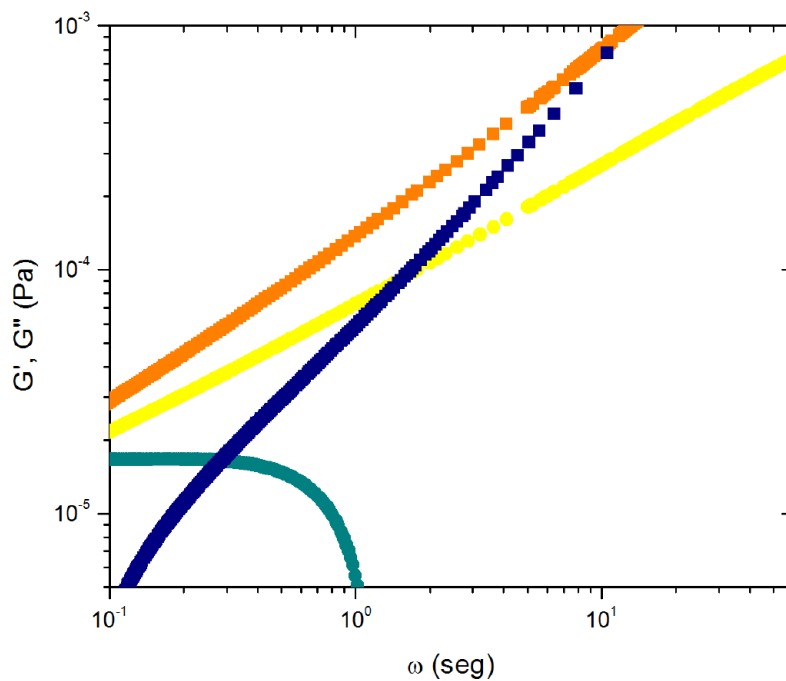


Figura 7.20: Módulos de pérdida (G'') en cuadros y almacenamiento (G') en círculos para DPPC (azules) y DPPC con propofol (amarillos), la medición fue realizada a 28°C .

El propofol mostró un cambio radical en las propiedades de la suspensión. Después

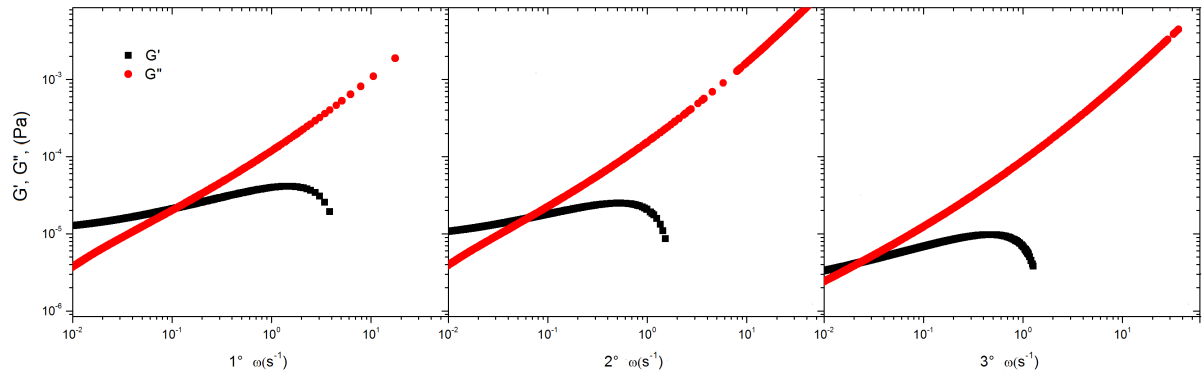


Figura 7.21: Módulos de pérdida (G'') y almacenamiento (G') para DPPC, los módulos son de la muestra a la misma temperatura, la primera corresponde a la medición de la muestra antes de el primer ciclo de templado, la segunda corresponde a la reología después del primer ciclo, la tercera a las propiedades después del segundo ciclo. El tiempo entre cada medición fue de 30 minutos.

de un recalentado la suspensión se volvió una solución sin liposomas, ésto se puede apreciar en la Figura ??, donde la suspensión muestra un comportamiento de viscosidad exponencial, además el desplazamiento cuadrático medio muestra poco desplazamiento. El calculo de la viscosidad dio como resultado $3.3 \text{ mPa} \cdot \text{s}$.

La interacción del propofol con los liposomas muestra que el propofol los desestabiliza, lo suficiente para que a temperatura ambiente los liposomas se fusionen rápidamente, volviendo dependiente del tiempo de elaboración la reología de la muestra.

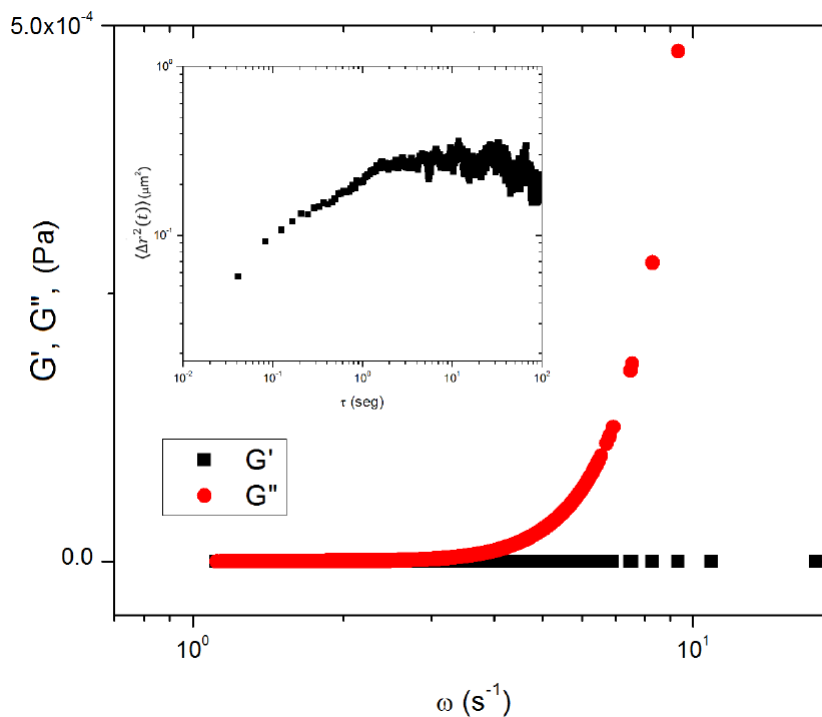


Figura 7.22: Módulos de pérdida (G'') y almacenamiento (G') para DPPC y propofol, los módulos son de la muestra a 23°C, La gráfica corresponde a las propiedades reológicas después de un ciclo de templado. En el recuadro se muestra el desplazamiento cuadrático medio de la muestra.

8

Discusión

Con el método reportado en la tesis hemos logrado desarrollar una técnica experimental, que puede regular con gran precisión la temperatura de una solución. La técnica nos permite obtener información termo-microreología, con la cual se pueden describir fluidos complejos a diferentes temperaturas. Los módulos de pérdida, almacenamiento y viscosidad de la muestra son algunas cantidades físicas que podemos medir. A pesar de la complejidad para la elaboración de liposomas, la fusión de ellos y los flujos, el análisis del sistema perturbado por una rampa de -calentamiento-, muestra que se puede distinguir la transición de fase midiendo el desplazamiento cuadrático medio.

La hipótesis del trabajo estuvo basada en un amplio conocimiento de los liposomas, aún así no se esperaba un cambio tan drástico en las propiedades de la suspensión. Los cambios reológicos en la suspensión de DPPC fueron muy parecidos a los que sufre un polímero, sin embargo en la suspensión no existe una malla generada por un polímero, lo que llevo a la idea de un enrejado virtual generado por liposomas en fase fluida.

La membrana celular se encuentra en estado fluido. Nuestra muestra contiene una suspensión de un modelo biológico de membrana celular y la información puede ser extrapolada. Se puede plantear por ejemplo: si la membrana celular de los linfocitos se encuentra en estado gel sería más difícil ensamblarse en otra membrana celular y evitaría que ellos efectuaran su función; la unión sináptica entre neuronas sería transmitida y

disipada de forma diferente dependiendo del estado en el que se encuentre la membrana; el surfactante pulmonar, que es en mayor parte el fosfolípido utilizado en este estudio, tiene propiedades visco-elásticas que ayudan a la respiración; por último la acción del propofol en las membranas celulares y su efecto anestésico podría deberse a un estado de desintegración parcial de la membrana celular.

9

Conclusión

En esta tesis hemos logrado por primera vez obtener la transición de fase, las propiedades reológicas de una suspensión de liposomas y los cambios que sufre con propofol utilizando de base el movimiento browniano.

Esta tesis ofrece suficiente información para generar dos artículos de primer nivel. Quedará en mi capacidad de redactarlos la posibilidad de su materialización.