

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional
Unidad Monterrey**

**Estudio de la interacción de nanoemulsiones y
nanoespumas con membranas lipídicas**

Tesis que presenta

Ángela María Jaramillo Granada

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

En Ingeniería y Física Biomédicas

Director de Tesis:

Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez

Apodaca, Nuevo León.

Diciembre 2022.

Este trabajo es dedicado exclusivamente a mi papá, quien fue mi mayor motivación para culminar mis estudios de doctorado. Para él que con su sencillez y maneras de afrontar las adversidades me dio nuevas y valiosas lecciones de vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi asesor de tesis por permitirme trabajar bajo su tutoría, por su orientación y apoyo incondicional.

A mis sinodales los Doctores Gabriel Caballero, Mauricio Carrillo y Rafael Guzmán porque con las discusiones generadas en los avances y en otros espacios nos permitieron considerar problemáticas desde otras perspectivas.

A mi sinodal externo, el Dr. Juan Manuel Solano quien amablemente aceptó ser parte de mi comité tutorial en mi defensa de tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio con quienes pase momentos agradables, especialmente a mi compañera Alejandra Lara Valdez con quién realicé conjuntamente algunos de los resultados mostrados.

A la Dra. Hilda y a su laboratorio porque además de permitirme usar sus equipos, también pudimos realizar colaboraciones.

A Ángel Reyes por su amistad y orientación en los experimentos con las simulaciones de dinámica molecular.

A mi familia por el apoyo incondicional que siempre me han brindado.

Al CINVESTAV Monterrey y al CONACYT porque gracias a sus recursos pude realizar este trabajo.

Índice

Índice de figuras	7
Índice de tablas	10
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Membranas lipídicas	13
1.1.1. Hidrofobicidad	14
1.1.2. Modelos de membranas	15
1.1.3. Propiedades termodinámicas de las membranas	16
1.2. Nanoemulsiones y nanoespumas	17
1.2.1. Presión de Laplace	18
1.2.2. Procesos de desestabilización de las nanoemulsiones y nanoespumas	20
1.2.3. Ley de Stokes	23

2. ANTECEDENTES	28
3. HIPÓTESIS	34
4. OBJETIVOS	35
4.1. Objetivo General	35
4.2. Objetivos Específicos	35
5. METODOLOGÍA	36
5.1. Técnicas	37
5.1.1. Mediciones de tamaño	37
5.1.2. Mediciones de potencial Z	37
5.1.3. Mediciones de Calorimetría	38
5.2. Materiales y métodos	40
5.2.1. Reactivos	40
5.2.2. Preparación de las nanoemulsiones	40
5.2.3. Preparación de las nanoespumas	41
5.2.4. Preparación de liposomas	44
6. RESULTADOS	47
6.1. Caracterización de las nanoemulsiones	47

6.2. Caracterización de las nanoespumas	50
6.3. Efectos termodinámicos de las suspensiones coloidales en las membranas lipídicas	65
6.3.1. Efectos de las nanoemulsiones en los liposomas	66
6.3.2. Efectos de las suspensiones coloidales de Kr y Xe en los liposomas	73
7. DISCUSIÓN	76
8. CONCLUSIONES	79
9. PERSPECTIVAS	80
10. APÉNDICE	81

Índice de figuras

1.1. Esquema de una suspensión coloidal.	18
1.2. Diagrama de cuerpo libre de una gota/burbuja.	19
1.3. Procesos de desestabilización de las nanoemulsiones y nanoespumas.	21
1.4. Diagrama de cuerpo libre para una partícula en equilibrio sumergida en un fluido.	24
2.1. Nanoburbujas reportadas.	30
2.2. Interacción entre nanoburbujas de Xe y un modelo de balsa lipídica.	32
5.1. Hidrofobicidad y estructura del Kr, Xe, propofol y CBD.	36
5.2. Correlogramas característicos de partículas.	38
5.3. Perfil calorimétrico característico de los liposomas.	39
5.4. Parámetros de diseño del generador de nanoburbujas.	43
5.5. Diseño del generador de nanoburbujas.	44
5.6. Combinaciones de las muestras de liposomas con nanoemulsiones para el estudio de calorimetría.	45
5.7. Combinaciones de las muestras de liposomas con nanoespumas para el estudio de calorimetría.	46
6.1. Caracterización de las nanoemulsiones.	48

6.2. Estabilidad de las nanoemulsiones.	49
6.3. Curvas de presión-volumen experimental y de gases ideales.	51
6.4. Caracterización de los viales usados en el DLS.	52
6.5. Caracterización de nanodominios de Kr y Xe	53
6.6. Mediciones de DLS de nanoburbujas de Kr y Xe antes y después de centrifugación.	55
6.7. Contracción de burbujas debido a la centrifugación.	57
6.8. Tiempos de residencia de los nanodominios bajo un campo gravi- tacional de 4 200 G	59
6.9. Fracciones volumétricas de Kr y Xe en los nanodominios encon- trados.	61
6.10. Características principales de los clatratos.	62
6.11. Estructuras de hielos de Xe observados después de la despresuri- zación.	63
6.12. Correlogramas del agua y muestras con diferentes gases.	65
6.13. Estructura molecular de los componentes lipídicos de las membra- nas de DPPC-SM-CHOL.	67
6.14. Perfiles calorimétricos de liposomas con las emulsiones.	68
6.15. Cambios de entalpía en membranas lipídicas producidos por las nanoemulsiones	70

6.16. Curva de calibración del CBD.	71
6.17. Perfiles calorimétricos de liposomas con Kr y Xe.	74
10.1. Esquema de la presión ejercida sobre una semiesfera.	82

Índice de tablas

1.1. Velocidades de subida de gotas de propofol y burbujas de xenón para diferentes radios.	26
6.1. Radio promedio de las nanoemulsiones.	49
6.2. Tiempos de residencia de burbujas de Kr y Xe bajo condiciones de centrifugación	58

RESUMEN

En este proyecto, se crearon diferentes tipos de suspensiones coloidales con moléculas de relevancia biológica y se evaluaron las propiedades tanto de las suspensiones *per se*, como la interacción de éstas con membranas lipídicas mediante calorimetría. Nanoemulsiones de propofol y CBD presentaron una buena estabilidad cinética, los tamaños se conservaron por al menos 4 meses. Las suspensiones fueron probadas en liposomas y examinadas a través de calorimetría, con el objetivo de conocer si la afinidad por la membrana es proporcional al efecto generado. Se determinó que tanto la hidrofobicidad como la estructura de las moléculas influyen en el grado de interacción con la membrana. En cuanto a las nanoespumas de Kr y Xe, si bien se encontraron resultados de partículas con características similares a las de nanoburbujas de bulto reportadas, se concluyó que carecían de un núcleo gaseoso. También se encontró evidencia de que tales entes pudieran ser precursores de hidratos clatratos del Kr y Xe, lo cual estaría en concordancia con la teoría desarrollada sobre burbujas. Por último, la importancia del colesterol en las membranas se evaluó por medio de un modelo de liposoma con y sin colesterol. Se estudiaron los cambios termodinámicos producidos por dos moléculas con diferentes propiedades. Los resultados mostraron que las membranas con colesterol tuvieron mayores cambios con menor soluto, lo cual fue interpretado como un aumento en la sensibilidad de la membrana que incluso fue independiente de la estructura de molécula añadida.

ABSTRACT

In this project, colloidal suspensions were prepared with biologically-relevant molecules, then the properties of the nanoemulsions and their interactions with lipid membranes were evaluated. Propofol and CBD nanoemulsions exhibited good kinetic stability. The size was maintained for at least four months. These suspensions were tested on liposomes and their affinity to lipid membranes was studied by means of calorimetry. It was determined that hydrophobicity and structure of the molecules influence the level of interaction with a lipid membrane. Regarding Kr and Xe nanofoams, the results show that nanoentities are formed whose characteristics are similar to those of bulk nanobubbles; however, it was experimentally determined that such entities lack a gaseous nucleus. In addition, evince was found that these entities could be precursors of Kr and Xe hydrate clathrates. This would be in concordance with current (available) theory of bubble formation. Finally, the importance of cholesterol in the membranes was estimated through a liposome model with and without cholesterol. We studied the thermodynamic changes generated by molecules with different properties. The results showed membranes with cholesterol had major changes with less solute. This was interpreted as an increase in the membrane sensitivity which, in addition, was independent of the molecule structure added.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Membranas lipídicas

Las membranas lipídicas son estructuras moleculares que separan dos medios acuosos. La propiedad que permite el ensamblaje espontáneo de lípidos en formas de bicapas es el carácter anfipático de estas moléculas, donde los grupos polares interactúan con el agua mientras que las cadenas hidrocarbonadas se asocian entre ellas evitando el medio acuoso.

La membrana lipídica más importante y conocida es la membrana celular, la cual está formada por glúcidos, lípidos y proteínas, estos últimos en proporciones similares en masa [1, 2].

La membrana celular o membrana plasmática, además de delimitar la célula, está encargada de regular procesos que van desde el transporte celular, hasta la transducción de señales complejas [2].

Una de las funciones más importantes es mantener las concentraciones intracelulares adecuadas de iones como Ca, K, Na y Cl involucrados en la transducción de señales electroquímicas [2]. Se sabe que las proteínas integrales son las responsables de tal tarea, mediante la formación de canales que pueden ser activados de forma eléctrica (voltaje), química (ligandos) o mecánica.

Actualmente, se cree que en la membrana celular se generan dominios formados por lípidos que tienen una fluidez menor a su entorno, llamados balsas lipídicas. Se piensa que a estos dominios se ensamblan proteínas encargadas de procesos

de señalización. Se ha reportado que estas regiones son dinámicas y ricas en colesterol, esfingolípidos y proteínas. Además, presentan tamaños nanométricos [3, 4].

Gracias a modelos de balsas lipídicas se ha logrado establecer que el colesterol es indispensable en su creación [4]. Se han formado modelos principalmente de fosfolípidos insaturados, saturados y colesterol; el fosfolípido insaturado tiene una temperatura de transición mucho menor que los demás lípidos de la balsa, por lo que se encuentra en fase fluida (líquido desordenado) mientras que los demás se agrupan formando una nueva fase llamada líquido ordenado.

Como consecuencia, se cree que modificaciones en las balsas lipídicas puede desencadenar en alteraciones de las funciones realizadas por las proteínas ancladas a éstas [5]. Debido a que el núcleo de las membranas es hidrófobo, solo puede ser alterado por moléculas afines a éste. Las modificaciones en las balsas lipídicas y las membranas en general, pueden ser causadas por moléculas exógenas cuya afinidad por los lípidos causa que las propiedades de la membrana cambien.

1.1.1. Hidrofobicidad

La hidrofobicidad es la incapacidad de ciertas moléculas apolares a no formar puentes de hidrógeno, lo cual lleva eventualmente a aislarlas y adoptar una forma tal que minimice la energía libre [6].

Una manera de medir la hidrofobicidad de una molécula es mediante el coeficiente de partición, $LogP$, que mide la preferencia de una molécula por una fase acuosa y una fase orgánica. Dos fases muy usadas son agua-Octanol.

$$\text{Log } P_{\text{octanol-agua}} = \text{Log} \left(\frac{[\text{soluto}]_{\text{octanol}}}{[\text{soluto}]_{\text{agua}}} \right). \quad (1.1)$$

La lectura del coeficiente de partición puede entenderse mejor si tomamos como ejemplo una molécula cuyo $\text{Log}P$ es 3, lo que significa que 10^3 moléculas prefieren disolverse (particionarse) en octanol por una en el agua. El signo positivo de este indicador hidrófobo indica su preferencia por el octanol, mientras que valores negativos por el agua. Así, si una molécula tiene un $\text{Log}P$ de -4, 10^4 moléculas se encuentran en agua y una en octanol.

El coeficiente de partición es un indicativo de la tendencia de una molécula o átomo a interactuar con el agua y grupos polares de los lípidos o proteínas; o sitios hidrofóbos como las cadenas hidrocarbonadas.

1.1.2. Modelos de membranas

Por otra parte, una herramienta muy útil en la comprensión del funcionamiento de las membrana celular son los modelos de membranas, los cuales son aproximaciones que permiten evidenciar el efecto sobre componentes específicos de un sistema de estudio.

Los liposomas son un tipo de modelo que forma, de manera espontánea, vesículas de bicapas lipídicas. Éstos han sido usados en sistemas con moléculas de interés como iones y fármacos para evaluar el posible rol que desempeñan los lípidos en procesos que involucran la membrana plasmática.

1.1.3. Propiedades termodinámicas de las membranas

Los liposomas y en general, las membranas lipídicas, presentan cambios de fases ante variaciones en la temperatura. Esta propiedad se ha usado para estudiar sus comportamientos mediante técnicas analíticas como la calorimetría, con la que es posible obtener la caracterización de sus estados de equilibrio mediante parámetros termodinámicos como la capacidad calorífica, el cambio en la entalpía y entropía de las transiciones de fase.

La capacidad calorífica (C_p), se define como el calor (Q) necesario para incrementar la temperatura (T) de los liposomas en una unidad a presión constante. Esta variable puede ser medida directamente mediante calorimetría diferencial de barrido (descrita en la sección 5.1.3).

$$C_p = \left(\frac{dQ}{dT} \right)_p. \quad (1.2)$$

Así mismo, es posible estimar a partir de la ecuación 1.2 el cambio en la entalpía (ΔH), la cual está definida como la cantidad de energía que los liposomas pueden intercambiar con el medio en el que están suspendidos $dH = dQ + V dp$, a presión constante $dH = dQ$, por lo que en términos de la capacidad calorífica:

$$\Delta H = \int_{T_0}^{T_1} C_p dT. \quad (1.3)$$

Como ya se dijo, también es posible conocer el valor del cambio en la entropía (ΔS), conociendo de antemano la capacidad calorífica, de la segunda ley de la termodinámica:

$$dS = \frac{dQ}{T}, \quad (1.4)$$

o lo que es lo mismo:

$$\frac{dQ}{dT} = T \frac{dS}{dT}. \quad (1.5)$$

Finalmente, combinando la ecuación 1.2 y 1.5

$$\Delta S = \int_{T_0}^{T_1} \frac{C_p}{T} dT. \quad (1.6)$$

1.2. Nanoemulsiones y nanoespumas

Las nanoemulsiones y nanoespumas son dispersiones coloidales nanométricas compuestas por dos fases inmiscibles, una fase dispersa embebida en una fase continua (ver figura 1.1).

Debido a sus pequeños tamaños, estos sistemas tienen una mayor cantidad de moléculas por área superficial comparada con coloides de tamaños más grandes, lo que les permite una mejor absorción en una superficie y una mayor estabilidad cinética (a menor tamaño menor bouyancia y más movimiento browniano). Estas propiedades son las razones por las cuales se han propuesto para resolver o mejorar problemáticas en diferentes áreas de investigación.

Las nanoemulsiones y nanoespumas son sistemas termodinámicamente inestables debido a las interacciones moleculares desfavorables que ocurren en la inter-

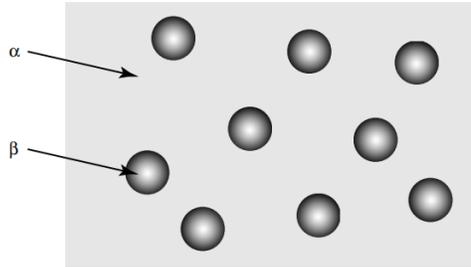


Figura 1.1: Esquema general de las fases que componen una suspensión coloidal. α es la fase continua y β la fase dispersa. Esta última puede estar en estado líquido y formar emulsiones o en estado gaseoso y generar espumas. Ambos son casos particulares de suspensiones coloidales [7].

fase a causa del efecto hidrofóbico, el cual busca reducir el área de contacto entre las fases inmiscibles adoptando formas esféricas (en ausencia de fuerzas externas), ya que es la geometría con menor relación superficie-volumen.

1.2.1. Presión de Laplace

La geometría esférica que adopta la fase dispersa genera un efecto de curvatura conocido como presión de Laplace (ΔP), que es resultado del balance de fuerzas de compresión y expansión que actúan en la gota/burbuja bajo condiciones de equilibrio. La presión externa y la tensión superficial constituyen las fuerzas de compresión, mientras que la fuerza de expansión se debe a la presión interna. La fuerza debido a la tensión superficial actúa sobre la superficie, y es quién compensa la fuerza ejercida por el interior de la gota/burbuja. Matemáticamente:

$$P_{in}A = P_{out}A + \gamma L, \quad (1.7)$$

A , L , γ , P_{in} y P_{out} son el área, el perímetro, la tensión superficial, la presión interna y externa de la gota/burbuja representada en la figura 1.2. Reorganizando términos y reemplazando los valores de área y longitud se tiene lo siguiente:

$$\Delta P = P_{in} - P_{out} = \frac{2\gamma}{r}. \quad (1.8)$$

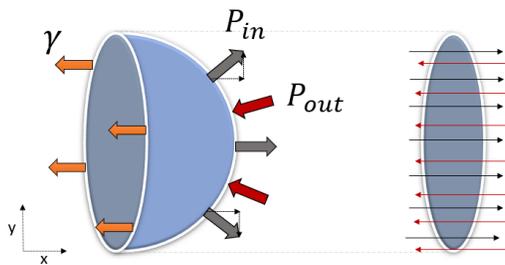


Figura 1.2: Diagrama de cuerpo libre de una gota/burbuja. Para visualizar las fuerzas que actúan en el objeto en equilibrio se divide en dos partes. La fuerza que ejerce el lado izquierdo sobre el derecho es representado por las flechas amarillas y se debe a la tensión superficial. Las flechas grises representan la presión interna, que es ejercida de manera perpendicular a la superficie de la semiesfera. Por simetría, se cancelan las contribuciones de P_{in} en el eje Y, quedando las contribuciones en el eje X que actúan sobre el área transversal de la semiesfera. Realización propia.

La expresión anterior se conoce como la ecuación de Young-Laplace para una interfase esférica. Como $\gamma > 0$ y $r > 0$, la presión interna de la gota/burbuja

siempre será mayor que la presión externa y aumentará con la disminución de su tamaño. Así, una gota de 100 nm tendrá una diferencia de presión 10 veces mayor que una de $1\ \mu\text{m}$.

Dada la escala de tamaño de las gotas/burbujas, éstas experimentan movimientos aleatorios debido al movimiento Browniano. Por ello, si dos o más de ellas chocan, dependiendo de la fuerza y de las interacciones que se generen entre ambas, podrían desestabilizarse. De ahí la importancia de conocer las maneras de desestabilización de las nanoemulsiones/espumas y cómo prevenirlas.

1.2.2. Procesos de desestabilización de las nanoemulsiones y nanoespumas

El esquema de la figura 1.3 muestra los procesos de desestabilización de las nanoemulsiones y nanoespumas; tanto la coalescencia como la maduración de Ostwald son procesos irreversibles que llevan, eventualmente, a una separación de fase; mientras que la separación gravitacional y la floculación son estados en los cuales las gotas/burbujas pueden persistir en sus formas agregadas o coalescer.

Si bien la coalescencia y la maduración de Ostwald llevan a la fusión del contenido del coloide, los procesos mediante los cuales esto sucede son diferentes.

En la coalescencia, un número de ellos chocan y se fusionan formando dominios más grandes, que son más estables por tener una presión de Laplace menor. Sin embargo, para evitarlo, se suelen emplear estabilizadores como lípidos cargados, proteínas o polímeros que generen repulsiones electrostáticas o estéricas.

En el caso de la maduración de Ostwald, las moléculas o átomos se difunden en el medio acuoso debido al aumento de su solubilidad provocado por la presión



Figura 1.3: Procesos de desestabilización de las nanoemulsiones y nanoespumas. La fase dispersa de una nanoemulsión/espuma puede sufrir diferentes eventos que conllevan a su desestabilización, como la formación de agregados o flóculos que podrían incluso coalescer y en cualquiera de los casos, aumentar la velocidad de separación gravitacional, llevando eventualmente a una separación de fases [8].

interna. Esto hace que las gotas/burbujas pequeñas se encojan, generando una migración de átomos o moléculas en la fase continua que eventualmente llegan a los dominios de las fases dispersas, incrementando el tamaño de estos últimos.

Para las gotas la relación entre presión y solubilidad está dada por la ley de Kelvin

$$S = S_0 e^{\frac{\Delta P V_m}{RT}}, \quad (1.9)$$

siendo S_0 , V_m , R y T la solubilidad inicial, el volumen molar, la constante de los gases y la temperatura, respectivamente. Puede notarse que entre mayor es la

presión de Laplace mayor será la solubilidad de las moléculas que componen la fase dispersa.

En el caso de las burbujas es la **ley de Henry** quien describe una relación lineal entre la presión del gas (P) y su concentración (C) en la fase acuosa. Cabe anotar que H es la constante de proporcionalidad, conocida como constante de Henry que es específica para cada gas y depende tanto del disolvente como de la temperatura.

$$C = HP. \quad (1.10)$$

De la ecuación anterior se infiere que entre más pequeña sea la constante de Henry, mayor presión será necesaria para solubilizar el gas. Cabe resaltar que la ley de Henry no solo es aplicable a burbujas, sino que se usa de manera general para conocer la cantidad de un gas solubilizado independiente de la geometría del compartimento del gas.

Es posible minimizar la maduración de Ostwald escogiendo el material de las gotas/burbujas con menor solubilidad o cambiándola mediante la adición de moléculas hidrófobas a la fase dispersa, haciendo que la penalización energética de solvatar moléculas migrando de gotas pequeñas a más grandes, sea mayor que la de las moléculas de agua al cubrir el tamaño de la gota original.

La floculación, otra forma de desestabilización, es la aglomeración de gotas/burbujas sin que esto involucre fusión entre ellas. Se genera por fuerzas de atracción (Van der Waals) que son superiores a las fuerzas de repulsión (estéricas o electrostáticas). Aunque la floculación puede no necesariamente desencadenar en la coalescencia, la formación de un clúster aumenta la velocidad de buoyancia.

Por último, la separación gravitacional se da por la densidad mayor o menor de la fase dispersa con respecto a la fase continua, haciendo que las gotas/burbujas se dirijan hacia la superficie (efecto de crema) o hacia el fondo (sedimentación).

Para controlar la separación gravitacional se escogen materiales para la fase continua y dispersa tal que se minimice la diferencia de densidades, se reduzca el tamaño de las gotas y burbujas, se aumente la viscosidad de la fase continua y/o se evite la floculación. Para que las emulsiones sean estables por más tiempo se suelen emplear moléculas adicionales que les brindan las propiedades adecuadas a las nanogotas o nanoburbujas para evitar la desestabilización.

Nos permitimos ampliar a continuación la ecuación que gobierna la separación gravitacional dada la importancia de ésta dentro del presente trabajo.

1.2.3. Ley de Stokes

Una aproximación de la velocidad de buoyancia o sedimentación puede estimarse mediante la ley de Stokes [9]. Para ello se considera una gota/burbuja en un medio, sin ninguna fuerza actuando sobre ella. En la figura 1.4 se muestra un diagrama de cuerpo libre en que se observan tres fuerzas: la fuerza de empuje (F_E) que se opone a que la partícula (gota/burbuja) esté completamente sumergida, la fricción o rozamiento (F_r) que se opone a su movimiento, y el peso [9, 10].

La suma de fuerzas quedaría como sigue:

$$F_E + F_r - mg = m \frac{dv}{dt}. \quad (1.11)$$

La fuerza de empuje es igual al peso del volumen de la fase dispersa que des-



Figura 1.4: Diagrama de cuerpo libre para una partícula sedimentándose en un medio. Sobre ella se ejercen tres tipos de fuerzas. La fuerza de empuje (F_E) y la fuerza de fricción (F_r) que se oponen a la fuerza ejercida por la gravedad. Realización propia.

plaza la partícula (principio de Arquímedes), por lo tanto, el volumen desplazado es el mismo de la partícula. La fuerza de fricción o resistencia para una partícula actúa en dirección opuesta al peso y es proporcional a la velocidad de movimiento.

Una vez que se llega a la velocidad terminal (velocidad constante), el término de la derecha se hace cero y la ecuación quedaría de la siguiente forma:

$$\rho_c g V + 6\pi\mu v r - mg = 0, \quad (1.12)$$

donde ρ_c , μ , g , V , v , r son la densidad y viscosidad del fluido de la fase continua, la gravedad, el volumen, la velocidad y el radio de la partícula, respectivamente.

Cabe anotar que el término $6\pi\mu v r$ aplica para una partícula esférica, sin rugosidades y moviéndose en un fluido laminar con un número de Reynolds menor a uno.

Despejando la velocidad de la ecuación 1.12 y expresando la masa del coloide en términos del volumen se tiene que:

$$v = \frac{\rho_d g V - \rho_c g V}{6\pi\mu r} = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3 g(\rho_d - \rho_c)}{6\pi\mu r}, \quad (1.13)$$

con ρ_d la densidad de la fase dispersa.

La ecuación 1.13 representa la tasa a la cual se mueve una gota de determinado tamaño respecto a su medio bajo la influencia de la gravedad, que puede simplificarse a:

$$v = \frac{2gr^2\Delta\rho}{9\mu}, \quad (1.14)$$

$\Delta\rho$ representa la diferencia de densidades entre la fase dispersa y la fase continua.

Es importante resaltar el marco de referencia usado, donde una velocidad negativa es generada cuando la densidad de la gota/burbuja es menor a la densidad de la fase continua. Por lo tanto, su movimiento será hacia la superficie y las gotas/burbujas tenderán a formar crema. Cabe señalar, que una burbuja por estar en fase gaseosa tiene una densidad mucho más baja que la de una sustancia líquida, por lo tanto, la sedimentación no se da.

Para tener una estimación del movimiento de los coloides, se presenta en la tabla 1.1 la velocidad de buoyancia de una gota de propofol y una burbuja de xenón en un rango de 10 nm a 1000 nm de radio, inmersas en agua desionizada, donde $g = 9.8 m/s^2$, $\mu = 0.000891 kg/ms$, $\rho_c = 998.29 kgm^3$ y las densidades del propofol y xenón de $955 kg/m^3$ y $5.4 kg/m^3$.

$r[nm]$	$v[\frac{nm}{s}]$	
	burbuja	gota
10	0.24	0.01
100	24.27	1.06
1000	2426.82	105.81

Tabla 1.1: Velocidades de subida de gotas de propofol y burbujas de xenón para diferentes radios.

Se puede observar que a medida que el radio crece, el ascenso tanto de la gota como de la burbuja aumenta hasta en dos órdenes de magnitud. Por ende, una burbuja de 100 nm recorre en 9.5 días la misma distancia que una de 1 μm en 2.3 horas.

No obstante, la ecuación 1.14 tiene en cuenta algunas consideraciones que difieren un poco de la realidad. La emulsión o espuma tiene una población polidisper-

sa y ubicada a diferentes profundidades de la solución, por lo que cada una tendrá diferentes velocidades de buoyancia, siendo más rápidas las de mayor tamaño. Sin embargo, puede calcularse la velocidad promedio de ascenso con el promedio de la distribución de tamaños.

También la aglomeración de varias gotas o flóculos pueden aumentar el radio efectivo de la gota o burbuja aumentando la velocidad de ascensión [10].

2. ANTECEDENTES

Si bien las burbujas que componen las espumas han sido ampliamente estudiadas y usadas en diferentes aplicaciones, las nanoburbujas son menos conocidas y su existencia materia de debate entre la comunidad científica [11, 12, 13, 14, 15]. Esto se debe a que las nanoburbujas en una solución podrían experimentar dos situaciones por causa de la presión de Laplace que, en cualquier caso, no favorecería su existencia. 1) Elevadas presiones de Laplace generan un aumento de la solubilidad del gas en el medio (Ley de Henry), lo que a su vez causa una disminución en el tamaño de las nanoburbujas; tamaños más pequeños generan presiones mayores y nuevamente se repite el ciclo hasta terminar con la disolución de la nanoburbuja. 2) Las altas presiones de Laplace a las que están sometidas las burbujas, promueven el crecimiento de nanoburbujas a partir del gas disuelto en el medio o la coalescencia entre ellas, por lo que entre mayor tamaño alcancen, menor presión interna tendrán. Lo anterior es conocido como catástrofe de Laplace [16].

Aunado a esto, el costo energético de incrementar la tensión superficial está asociado a la energía libre (ΔG) mediante la ecuación $\Delta G = \gamma \Delta A$, con ΔA el cambio en el área superficial. Así, dos gotas tienen una mayor área superficial y por tanto una energía desfavorable mayor que si coalescieran [16].

En 1950 Epstein y Plesset desarrollaron una teoría de disolución de burbujas (Teoría EP) que tiene en cuenta la presión de Laplace y la solubilidad predicha por la ley de Henry [17]. Específicamente, el tiempo de disolución t_d de una burbuja en un medio saturado de gas es [18]:

$$t_d = \frac{r^2}{3DH} \left(\frac{r\rho}{2M_w\gamma} + \frac{1}{RT} \right), \quad (2.1)$$

con r, D, H, M_w, ρ, R y T el radio de la burbuja, el coeficiente de difusión y la solubilidad del gas en el medio, el peso molecular y la densidad del gas, la constante de los gases ideales y la temperatura, respectivamente. Por lo tanto, se ha estimado que burbujas menores a una micra deberían disolverse en menos de 0.02 s [17, 19].

Se ha encontrado que esta teoría predice bien los resultados experimentales de los tiempos de disolución de burbujas con tamaños mayores a $1\mu m$ [18]. Sin embargo, está en desacuerdo con las observaciones de burbujas menores que, en contraste, presentaron en algunos casos tiempos de residencia hasta de meses, por lo que se ha llegado a pensar que no funciona para escala nanométricas.

Hoy son abundantes los artículos de nanoburbujas como el presentado por Ushikubo et al., quienes reportaron la existencia de nanoburbujas de oxígeno y aire en agua mediante su distribución de tamaño y potencial Z, tal como se muestra en la figura 2.1 [20]. Estas características, en términos generales son similares a lo encontrado en los demás manuscritos. Por tal motivo, cierta parte de la comunidad científica trata de buscar factores que pudieran explicar la duración de estas entidades.

Es así como se han propuesto desde teorías que apuntan a una reducción de la tensión superficial a causa de una capa de contaminantes intrínseca a los experimentos [21], hasta términos que no fueron tomados en cuenta en la ecuación de Young-Laplace y que disminuirían su magnitud, como el debido a la presión generada por la carga superficial de la burbuja [22]. Recientemente, se ha propuesto

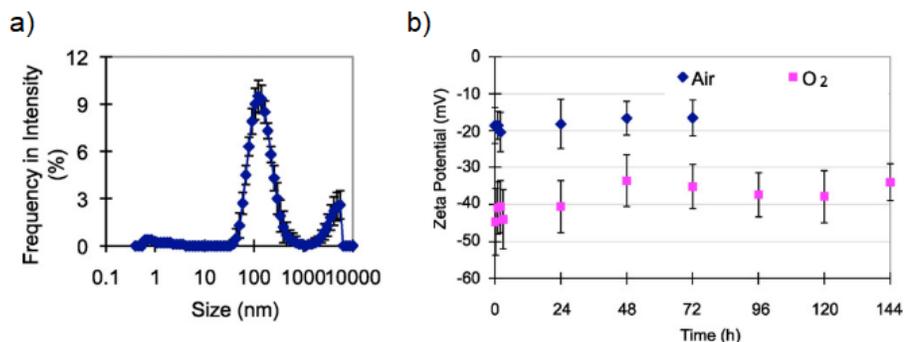


Figura 2.1: a) Distribución de tamaño de nanoburbujas de O_2 y b) Potencial Z de nanoburbujas de O_2 y aire reportadas por F.Y. Ushikubo et al. [20]

que la tensión superficial es un término dependiente de la curvatura [23]. En contraste con lo publicado por Matsumoto et al., quienes verificaron la validez de la relación de Young-Laplace en una cavidad de hasta 2 nm, al igual que mediciones constantes en la tensión superficial correspondientes a las medidas en interfaces planas [24]. Sin embargo, ninguna de las correcciones mencionadas logra justificar completamente los tiempos de duración observados en los resultados experimentales.

Pese a que aún no hay concordancia entre la teoría y los resultados experimentales, se ha estudiado el uso de nanoburbujas en diferentes aplicaciones. En ese sentido, se ha encontrado evidencia que sugiere que el uso de nanoburbujas de oxígeno actúa como un potenciador del crecimiento de plantas y animales (pescados y ratones) [25], así como mejoras en la tasa de crecimiento de semillas de hortalizas y cultivos hidropónicos [26, 27]. Por lo tanto, las nanoburbujas podrían convertirse en una potencial herramienta en el área de la agricultura y zootecnia.

Es preciso anotar que, si bien hay un debate sobre la existencia de las nanoespumas, esto no ocurre con las nanoemulsiones, siendo las investigaciones sobre sus aplicaciones un tema en crecimiento, como es el caso de su uso como agentes antimicrobiales.

Recientemente se ha estudiado el efecto de nanoemulsiones de aceites esenciales sobre bacterias E.Coli y se ha encontrado efectos antibacteriales en algunos de ellos [28, 29, 30]. Donsi et al. propusieron diferentes mecanismos de acción que en su mayoría apuntan a interacciones con la membrana, estos métodos son: el paso de nanogotas a través de porinas; la solubilización del contenido de las nanogotas en la fase acuosa que migra hacia las membranas; y, finalmente, repulsiones electrostáticas que, debido a la carga superficial de las nanogotas, podrían promover o no su interacción con las membranas [31].

Ante la evidencia de que probablemente las nanogotas actúan sobre la membrana debido a su naturaleza hidrofóbica, una característica que comparten con las nanoburbujas, podría esperarse que las nanoburbujas también tengan efectos sobre las membranas.

Reyes et al. estudiaron, mediante simulaciones de dinámica molecular, la interacción entre el Xe, el cual es un reconocido anestésico, y un modelo de balsa lipídica compuesta por DPPC, DLPC y colesterol. Después de agregar átomos de Xe sobre la fase acuosa, observaron la formación de clústeres de Xe e internalización de éstos en la parte central de la membrana, cambiando sus propiedades cohesivas [32]. Al cuantificar la distribución de las moléculas de colesterol mediante funciones de distribución radial, como se observa en la figura 2.2, se encontró que el colesterol estaba siendo secuestrado por los átomos de Xe.

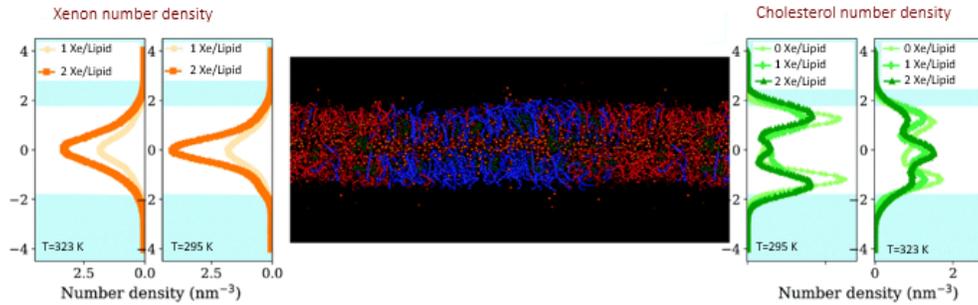


Figura 2.2: Interacción entre nanoburbujas de Xe y un modelo de balsa lipídica. Con el Xe, DPPC, DLPC y colesterol representados en amarillo, azul, rojo y verde respectivamente. Las gráficas de distribución radial cuantifican los cambios observados en la simulación mostrada en la figura central. La gráfica izquierda muestra la ubicación preferente de los átomos de Xe en centro de la membrana invariable ante dos concentraciones de Xe (1 y 2 Xe/lípido). Al lado derecho la redistribución de las moléculas de colesterol en la región interna de la bicapa, siendo más notable a 323K [32].

Así mismo, descubrieron que al aumentar la concentración a 3 Xe/lípido, se observaba mayor presencia de los átomos de Xe en los dominios de la membrana ricos en colesterol.

Además, se ha demostrado que los cambios estructurales en estos dominios generan de manera indirecta la apertura de canales de potasio, causando una hiperpolarización en la célula e impidiendo la propagación del impulso nervioso [33]. Adicionalmente, se encontró que tanto los anestésicos generales como el secuestro de colesterol causan la translocación de una enzima cuyo producto activa

los canales.

Por consiguiente, con lo anteriormente mencionado se pueden inferir que:

Ya que los átomos de Xe prefieren las regiones de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, entonces las interacciones lípido-lípido deberían verse afectadas, y por ende las propiedades de la membrana que dependan de estas interacciones, como las propiedades termodinámicas.

Además, dado que los átomos de Xe preferían las regiones con mayor densidad de colesterol, y teniendo en cuenta su alta hidrofobicidad (Log P de 9.85), cambios en la membrana (como variaciones en el grosor de la membrana, redistribución lipídica o modificaciones en las propiedades termodinámicas) podrían ser dependientes tanto de la hidrofobicidad de las dispersiones coloidales como de la presencia de colesterol.

3. HIPÓTESIS

Las nanoemulsiones y nanoespumas inducen cambios en las interacciones lipídicas afectando las propiedades termodinámicas de las membranas, y estos cambios pueden ser potenciados por el colesterol.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Estudiar los cambios en las propiedades termodinámicas producidos por nanoemulsiones y nanoespumas en membranas lipídicas de diferente composición.

4.2. Objetivos Específicos

1. Generar y caracterizar nanoemulsiones (con diferentes hidrofobicidades).
2. Diseñar y construir un generador de burbujas.
3. Generar y caracterizar nanoespumas (con diferentes hidrofobicidades).
4. Medir mediante calorimetría las propiedades de las membranas lipídicas variando la concentración de colesterol en presencia de nanoemulsiones y nanoespumas.

5. METODOLOGÍA

Para estudiar el efecto de las nanoemulsiones y nanoespumas en las membranas lipídicas, se usaron moléculas y átomos que tuvieran diferentes hidrofobicidades con: similar y diferente estructura. En la figura 5.1, se muestran 4 elementos con las características ya mencionadas. Además de ello, son biológicamente relevantes, tanto el Xe como el propofol son anestésicos [34, 35, 36, 37], mientras que el CBD es usado en tratamientos de epilepsia y esquizofrenia [38, 39]. En contraste, el Kr no es usado en la medicina, pero sus efectos también están asociados a la actividad neuronal [40]. Es importante mencionar que en todos los casos, el mecanismo de acción involucrado en los efectos de cada una de las moléculas y átomos sigue siendo un misterio.

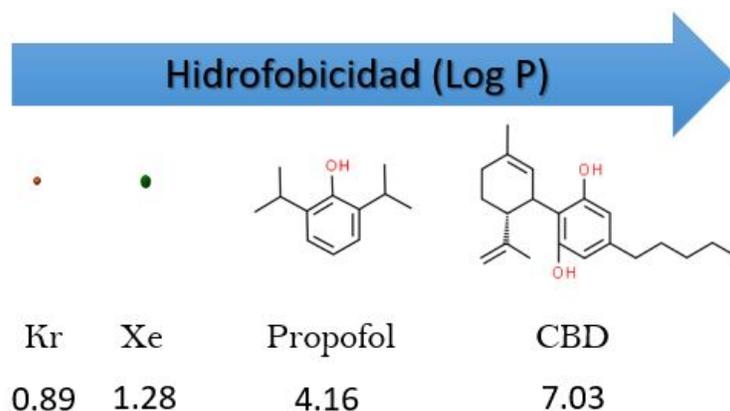


Figura 5.1: Hidrofobicidad y estructura de los elementos usados para la generación de nanoemulsiones y nanoespumas. Realización propia.

5.1. Técnicas

5.1.1. Mediciones de tamaño

Las mediciones de tamaño se realizaron mediante esparcimiento dinámico de luz (DLS), en un Zsizer nano ZSP (Malvern Instrument). En esta técnica se hace incidir un haz de 633 nm de longitud de onda sobre una muestra con partículas, que dependiendo de su tamaño se ven más o menos influenciadas por el movimiento browniano, esto genera fluctuaciones de intensidad en el haz de luz esparcido y posteriormente detectado por medio de un sensor. El análisis temporal de estas fluctuaciones produce un correlograma, cuyo decaimiento da información del tamaño de las partículas; el correlograma que genera las partículas más pequeñas decae más rápido que el de las más grandes (ver figura 5.2). Del análisis de los correlogramas se puede estimar el coeficiente de difusión y así, el tamaño hidrodinámico de la partícula mediante la ecuación de Stokes-Einstein $R = K_B T / 6\pi\eta D$, con R , K_B , T , η y D , el radio hidrodinámico, la constante de Boltzmann, la temperatura, la viscosidad dinámica y el coeficiente de difusión, respectivamente. Las mediciones fueron hechas a una temperatura de 25°C y cada medición fue repetida al menos 3 veces.

5.1.2. Mediciones de potencial Z

Las mediciones de potencial Z (ζ) fueron realizadas en el mismo equipo que las mediciones de tamaño y fueron calculadas a partir de la movilidad electroforética mediante la ecuación de Smoluchowski $\mu = \epsilon\zeta/\eta$, donde ϵ es la constante

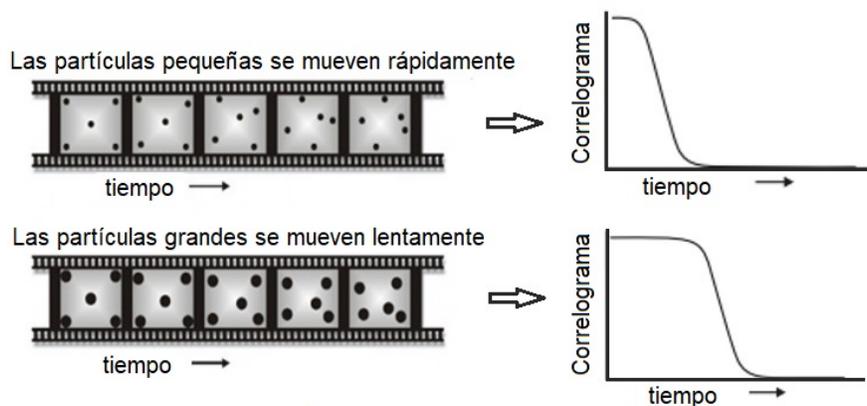


Figura 5.2: Correlogramas característicos de partículas. Las partículas más grandes decaen más lento que las de tamaños menores. Modificado de [41].

dieléctrica y η la viscosidad del medio. Las mediciones fueron hechas a una temperatura de 25°C y cada medición fue repetida al menos 3 veces.

5.1.3. Mediciones de Calorimetría

La calorimetría es una técnica empleada para medir las propiedades termodinámicas de las membranas. Particularmente la calorimetría diferencial de barrido estima el calor adicional que es absorbido o liberado de una celda que contiene la muestra respecto a otra celda referencia, la cual contiene el medio en el que está suspendida la muestra. El sistema está aislado térmicamente y se encuentra a presión constante. El equipo controla el flujo de calor ($\Delta Q/t$) a una misma tasa de temperatura ($\Delta T/t$). Por lo tanto, de la relación entre estas dos cantidades es posible conocer la capacidad calorífica del sistema de estudio:

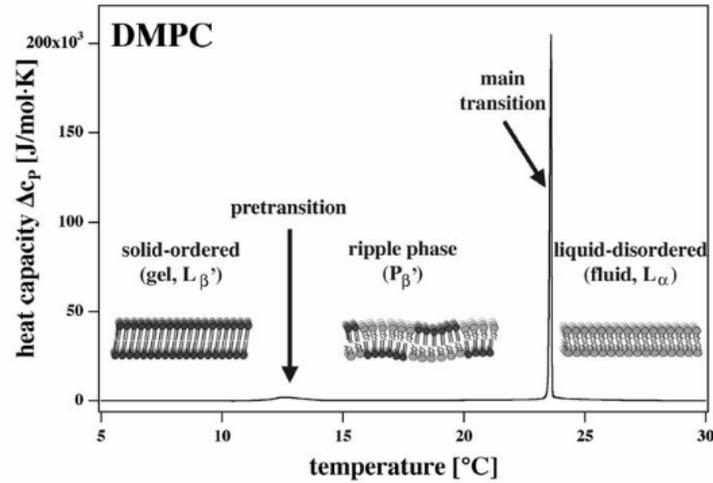


Figura 5.3: Perfil calorimétrico representativo de una modelo de membrana compuesto por DMPC. Tomado de [42].

$$\frac{\text{Flujo de calor}}{\text{Tasa de calentamiento}} = \frac{\Delta Q}{\Delta T} = C_p, \quad (5.1)$$

En la figura 5.3, se observa un perfil calorimétrico típico de liposomas. Un primer pico es conocido como pre-transición y es exclusivo de determinado tipo de fosfolípidos. A temperaturas por debajo de la pre-transición, los fosfolípidos se encuentran en una fase conocida como sólido-ordenado. A temperaturas mayores a la pre-transición, algunos fosfolípidos pasan a la transición de líquido desordenado mientras que otros permanecen en estado sólido ordenado, formando una nueva fase llamada fase ondulada (no todos los fosfolípidos tiene esta fase). Finalmente, después de la temperatura de transición principal, todos los lípidos pasan a líquido desordenado.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Reactivos

2,6-Diisopropilfenol (Propofol, PFL) >97 %, Aceite de oliva grado analítico, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina (DPPC) \geq 99 %, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich México. Esfingomielina (SM) >99 % y Colesterol (CHOL) >98 % de Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA). Cannabidiol (CBD) >98 % fue suministrado por CrescentCanna (New Orleans, USA). Finalmente, xenón (Xe) >99.99 %, criptón (Kr) >99 % y helio (He) >99 % fueron comprados a GrupoInfra México.

Se usó agua desionizada en todas las preparaciones, obtenida de un sistema Milli-Q IQ 7000, con una resistividad de 18.6 M Ω .

5.2.2. Preparación de las nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, lo que significa que no son procesos producidos espontáneamente. En el proceso de formación de emulsiones generalmente se parte de una pre-emulsión formada por gotas gruesas. Para disminuir su tamaño, es necesario aplicar una energía suficiente para romper la interface. Estas energías deben ser proporcionadas por fuerzas de corte mayores a la presión de Laplace. Por lo tanto, gotas más pequeñas necesitarán mayor energía. Un dispositivo muy usado para este propósito es el microfluidizador (MP-110 Microfluidics), el cual, eleva la presión del líquido a través de una bomba mecánica, posteriormente entra a una cámara de interacción tipo “Y” donde pasa por un canal de 75 μ m, aumentando la velocidad de la emulsión y dirigiendo el flui-

do hacia un área de impacto que genera fuerzas de corte, cavitación y turbulencia [43, 44].

Para la preparación de las emulsiones se hicieron stocks de CBD y propofol (PFL) en aceite de oliva (AO): 380 mg por cada mL de AO. Se prepararon tres emulsiones en agua purificada: AO y CBD-AO al 3 % v/v y PFL-AO al 1 % v/v. La emulsión de AO se usó para experimentos control. Antes de pasarlas por el microfluidizador, se agitó manualmente durante algunos minutos para generar la pre-emulsión. Posteriormente, se hizo pasar el fluido 3 veces por la cámara de interacción a 100MPa y 150 MPa. La temperatura fue controlada mediante la adición de hielo en el intercambiador de temperatura del equipo. A partir de las emulsiones preparadas se hizo una dilución adicional al 1 % v/v para el AO y CBD-AO. Finalmente se almacenaron a 4°C.

5.2.3. Preparación de las nanoespumas

Basado en la ley de Henry, se diseñó y construyó un equipo que sobresaturara una solución acuosa mediante presión.

Diseño

Para los parámetros de diseño se partió de la formación de clústeres de Xe a una relación de 40 moléculas de agua por cada Xe, observados en [32]. Ya que en 1 ml de agua hay 0.0555 mol, se necesitaría solubilizar 1.387 mmol de Xe, equivalente a 1.387 M. Dada la baja solubilidad del Xe en agua, se hizo uso de la ley de Henry $X = H * P$, donde se establece que la solubilidad de un gas X , en un fluido a

temperatura constante es proporcional a la presión P , siendo H la constante de Henry específica para cada gas. Teniendo en cuenta que $H = 0.0043M/atm$ para el Xe a 25°C, entonces la presión adecuada para solubilizar el Xe es 323atm.

Se consideró una presión inicial P_i de 15 atm en un tubo que a través de un sistema émbolo-pistón aumentaba la presión. Como la densidad del Xe a 15 atm es 0.0805 g/ml, entonces 1.387 M también puede ser expresado como 2.3 ml de Xe por cada ml de agua, esto permitió estimar la altura mínima que debía tener el tubo. Así, para 14 ml de agua, se necesitarían 32 ml de Xe. Asumiendo un diámetro del tubo de 1.27 cm, la altura de la columna de gas sería de 25 cm y la del agua 11 cm. Por lo tanto, la altura total del tubo debe ser mayor o igual a 36 cm, como se esquematiza en la figura 5.4.

Construcción

Una vez establecidas las dimensiones mínimas que debe tener el tubo se procedió a la construcción del equipo, que consistió en una estructura metálica, con un gato hidráulico acondicionado para soportar una plataforma que sostenía un tubo de acero inoxidable con un diámetro externo e interno de 1 y 1/2 pulgada respectivamente, ver figura 5.5. En la parte inferior del tubo se fijaron un manómetro (Primium flicerina instrutek 1000 bar) y una válvula de aguja (ALCO UN2NS). Un émbolo del mismo material del tubo fue fijado a la estructura metálica. Para evitar el escape del gas, se acondicionaron dos tapones de caucho de jeringas de plástico desechables de 10 ml BD Plastipak y un tapón cilíndrico de teflón de altura y diámetro 1.5 y 1.27 cm. Una lámina metálica de 40X25X0.5 cm se adicionó sobre la parte delantera de la estructura para brindar mayor protección.

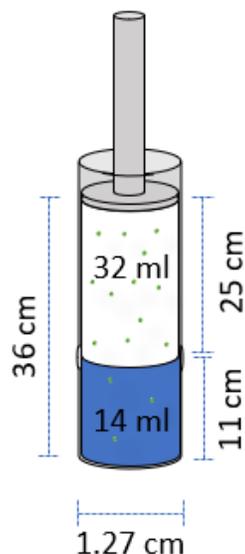


Figura 5.4: Parámetros de diseño tomados en cuenta para la construcción del generador de nanoburbujas. Realización propia.

Para la formación de nanoburbujas, un vial de vidrio lleno con 2.3 ml de agua desionizada es puesto al interior del tubo de acero inoxidable. Se añadieron 9 ml de agua desionizada para generar una columna de agua de 5 cm aproximadamente y una columna de gas de 28.8 cm. Se colocaron los tapones de caucho y teflón para generar el sello. A través de la válvula de aguja se adicionó el gas Kr o Xe a una presión inicial de 20 bar. Mediante el gato hidráulico se levantó la plataforma que sostenía el tubo, reduciendo el volumen del gas. Los cambios de presión fueron monitoreados mediante el manómetro. Luego de 60 minutos de equilibrio a la presión final (620 bar para el Kr y 360 bar para el Xe), se realizó la despresurización en un tiempo de alrededor de 45 minutos. La temperatura de formación se mantuvo entre 23°C y 25°C.

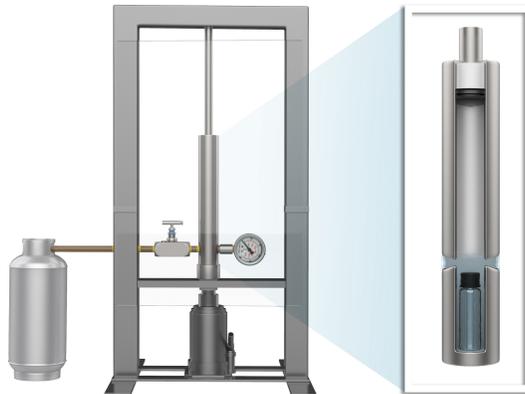


Figura 5.5: Diseño del generador de nanoburbujas. Realización propia.

5.2.4. Preparación de liposomas

Para evaluar el efecto de las nanoemulsiones en membranas se emplearon dos tipos de liposomas, DPPC-SM (90:10 mol %) y DPPC-SM-CHOL (80:10:10 mol %). Para medir el efecto de las nanoespumas se usaron liposomas de DPPC y DPPC-CHOL (85:15) mol %.

Para la preparación de los liposomas se pesó cada lípido en su proporción adecuada, se disolvió en cloroformo y se evaporó el solvente con una corriente de nitrógeno por 30 min a 55°C con agitación magnética a 130rpm. La película de lípidos resultante fue resuspendida en agua desionizada, el tiempo de hidratación fue de 1.5 horas. Posteriormente se extruyeron los lípidos con un poro de membrana de 100nm, se termalizó la suspensión a 25°C por 15 min y se degasificó 25 minutos.

Finalmente, a las suspensiones de DPPC-SM y DPPC-SM-CHOL se les adicionaron las emulsiones de AO, CBD-AO y PFL-AO (o agua desionizada en el caso control) a una relación 50 %v/v. Las concentraciones finales de las emulsiones de CBD-AO y PFL-AO al 1 % fueron de 1.9mg/ml y CBD-AO al 3 % 5.7mg/ml, tal como se indica en la figura 5.6. La concentración de lípidos totales fue de 5mM.

Los liposomas formados con DPPC y DPPC-CHOL tuvieron una concentración final de 1.5M. Las muestras analizadas son mostradas en la figura 5.7.

Liposomas con nanoemulsiones

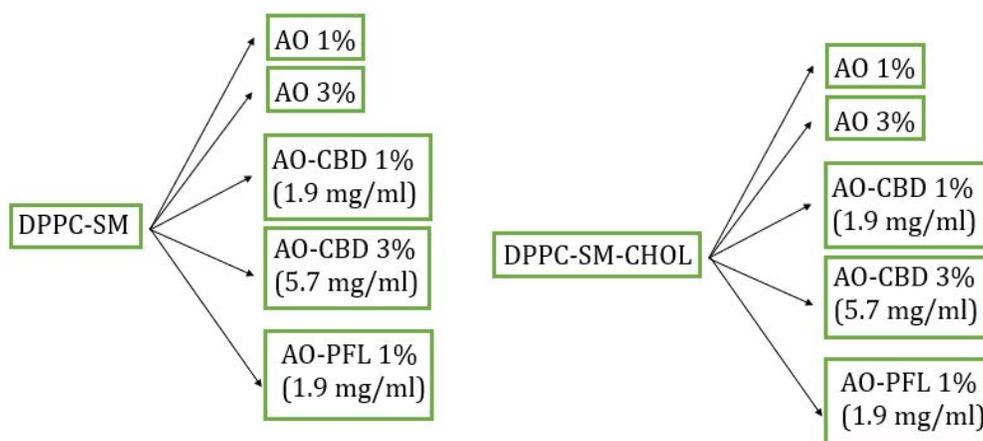


Figura 5.6: Combinaciones de las muestras de liposomas con nanoemulsiones. Entre paréntesis se indica la concentración final de propofol y CBD en cada muestra. La presencia y ausencia de colesterol en composición de las membranas permiten evaluar el efecto del colesterol en la interacción con las nanoemulsiones.

Liposomas con nanoespumas

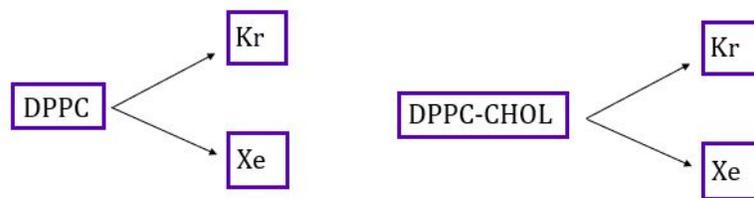


Figura 5.7: Combinaciones de las muestras de liposomas con nanoespumas. Con el objetivo de estudiar el efecto del colesterol en la interacción con las nanoespumas, se usaron liposomas con y sin mencionado lípido.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización de las nanoemulsiones

Las nanoemulsiones de CBD-AO y PFL-AO fueron realizadas mediante un microfluidizador, aplicando el procedimiento descrito en la sección 5.2.1. Posteriormente, fueron caracterizadas mediante DLS.

En el panel a) de la figura 6.1, se muestran las distribuciones de tamaños para AO y CBD-AO al 1 y 3 % en agua, y PFL-AO al 1 % en agua. Los radios de los picos máximos son mostrados en la tabla 6.1. La similaridad entre las distribuciones de tamaño del AO y CBD-AO al 1 y 3 % era un resultado esperado ya que son diluciones. Sin embargo, que se parezcan las emulsiones de AO, CBD-AO y PFL-AO es gracias al protocolo de generación aplicado y al mismo tiempo la presencia de aceite de oliva, compuesto que es común en todas las emulsiones y que, debido a su contenido de ácidos grasos, permite reducir la tensión interfacial del CBD y propofol haciendo más reproducibles las distribuciones de tamaño.

Adicionalmente, se midió el potencial Z (ζ) y los resultados son mostrados en el panel b). En todos los casos, las suspensiones presentaron potenciales Z negativos < -25 mV, por lo que estarían en el límite de una suspensión estable, lo cual impediría la coalescencia de las gotas por repulsiones electrostáticas cuando éstas se acercan [45, 46, 47].

Como se dijo con anterioridad, la fase dispersa de todas las nanoemulsiones contenía aceite de oliva, compuesto principalmente de ácidos grasos como oleico,

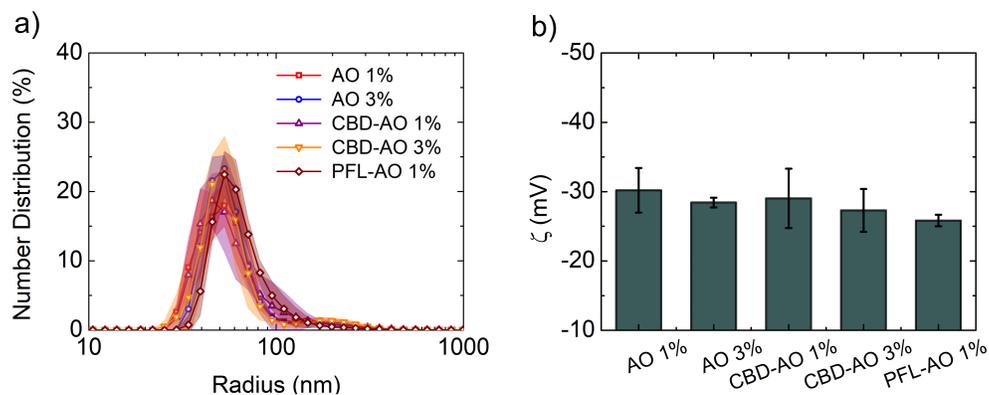


Figura 6.1: Caracterización de las nanoemulsiones mediante a) distribuciones de tamaño y b) potencial Z. Bajo el protocolo descrito, las nanoemulsiones presentan distribuciones de tamaño similares independientemente del tipo de emulsión siendo las poblaciones con radios predominantes de alrededor de 50 nm. Las barras de error o región sombreada representan la desviación estándar de 3 muestras.

palmítico, linoleico, linolénico y estérico. Estos a su vez, tienen en su estructura grupos carboxilos que tienen un pKa de alrededor 3.5, lo que significa que a un pH de aproximadamente 6 (pH del agua desionizada) se encuentren en su forma desprotonada (-), siendo probablemente los responsables de los potenciales Z negativos [48].

Para completar la etapa de caracterización, se midieron durante varios días las distribuciones de tamaño de las emulsiones tal como se observa en la figura 6.2, se pudo notar que no presentaron cambios relevantes al cabo de 4 meses de preparados pues los radios predominantes siguen estando alrededor de 50 nm. El aumento en la desviación estándar se debe al efecto de maduración de Ostwald, donde las gotas más pequeñas tienen una mayor presión de Laplace y, por ende,

Nanoemulsión	$r[nm]$	$\pm SD$
AO 1 %	48	7.9
AO 3 %	51	4.2
CBD-AO 1 %	48	4.2
CBD-AO 3 %	51	4.2
PFL-AO 1 %	53	0

Tabla 6.1: Radio promedio y desviación estándar de los picos de las distribuciones de tamaño de las nanoemulsiones mostradas en la figura 6.1 a). (n=3)

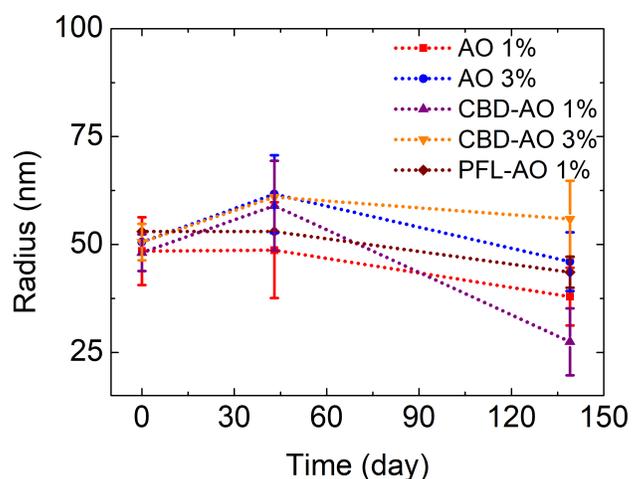


Figura 6.2: Estabilidad de las nanoemulsiones mediante el monitoreo del tamaño durante diferentes días. Puede notarse que de manera general su radio permanece alrededor de los 50nm hasta cuatro meses después de hechas las emulsiones. Las barras de error son la desviación estándar de 3 muestras.

una mayor solubilidad de los componentes de la gota (ver ecuación 1.9). Esto hace que las gotas grandes crezcan a expensas de las pequeñas; como los tamaños de

las partículas más grandes tiene una mayor velocidad de buoyancia ascenderán a la superficie y, en consecuencia, quedarán en la fase continua las gotas de tamaños menores.

En resumen, en la etapa de caracterización de las nanoemulsiones de AO (control), CBD-AO y PFL-AO se puede concluir que presentan una buena estabilidad y que es viable el uso de estas suspensiones en membranas lipídicas y en general, cualquier sistema de estudio que pretenda evaluar las propiedades de estos compuestos, ahora solubilizados en agua en forma de dispersiones coloidales.

6.2. Caracterización de las nanoespumas

Como se indicó en la sección de la metodología, para la formación de nano espumas se diseñó y construyó un equipo que mediante presión saturara de un gas un medio líquido. El comportamiento del dispositivo se observa en la figura 6.3. En primer lugar se pueden descartar fugas, pues si éste fuese el caso, a volúmenes cada vez menores no se apreciarían incrementos de presión.

Si bien no son iguales, la curva correspondiente a la ecuación de los gases ideales presenta una tendencia hiperbólica similar a la curva experimental. Las diferencias se deben a que esta última es de una columna con agua, por lo que el gas se solubiliza, aumenta ligeramente el volumen de ésta y la presión sobre el sensor aumenta.

Una vez construido el equipo se prepararon muestras con diferentes gases y se caracterizaron las suspensiones obtenidas a través de DLS, para las cuales fueron indispensables el uso de viales redondos que inicialmente estaban llenos de agua

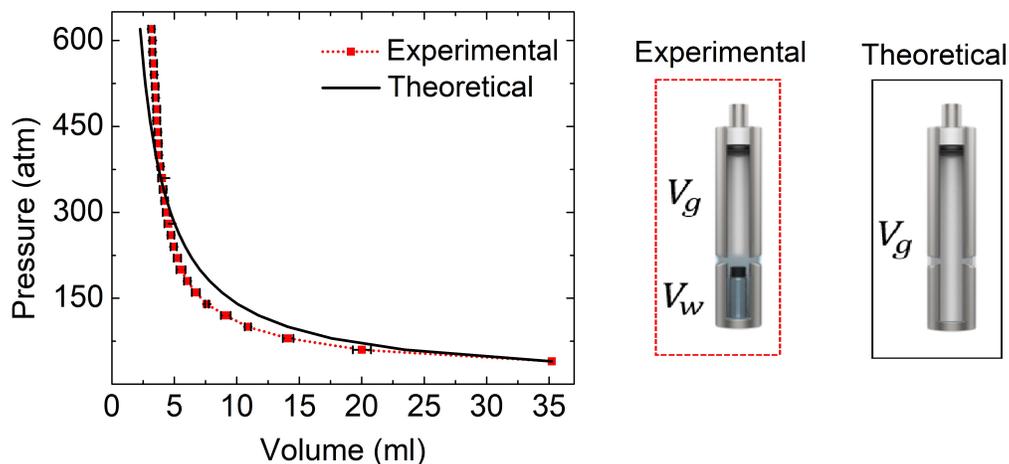


Figura 6.3: Curvas de presión-volumen experimental (en líneas rojas discontinuas) comparado con los gases ideales (línea negra sólida). En los esquemas se muestran las condiciones correspondientes a cada curva; la experimental tiene un volumen total compuesto por una columna de agua y gas, mientras que en el teórico sólo hay gas. Las barras de error representan el error estándar, con $n=3$.

y gas disuelto después de la presurización. Dado que las celdas del equipo son por defecto cuadradas, se corroboró que las mediciones no son afectadas por el cambio de geometría de los contenedores. En la figura 6.4 se observan las mediciones de partículas estándar de SiO_2 , puede notarse que aunque hay una ligera diferencia entre los correlogramas obtenidos en el vial redondo y cuadrado, esto no incidió en sus distribuciones de tamaño de intensidad y numérica, por lo tanto, es factible el uso de viales redondos que además tienen la ventaja de aislar la muestra de posibles contaminantes durante el experimento.

Después de esto, se hicieron tres muestras independientes de Kr y Xe, se midió

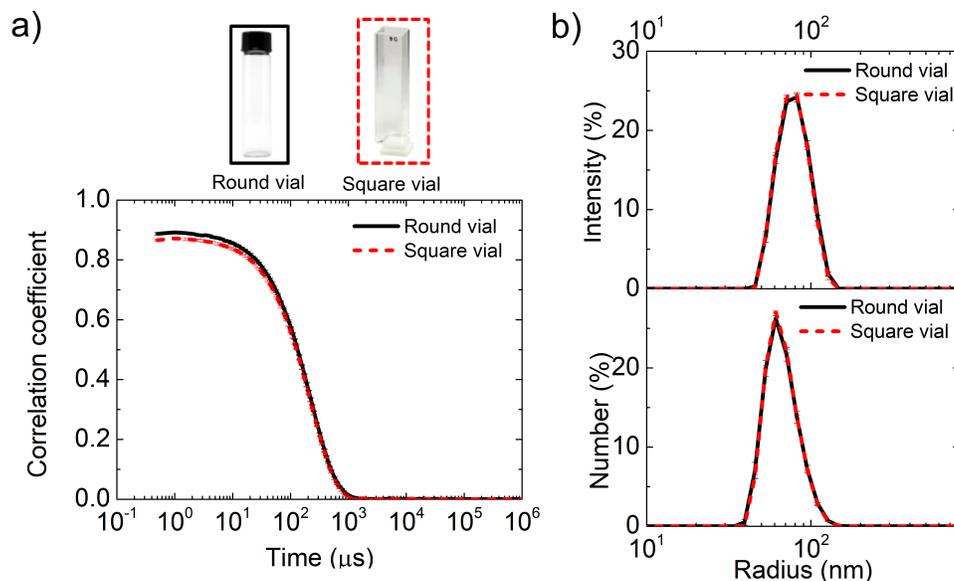


Figura 6.4: Mediciones de a) correlogramas de partículas estándar (SiO_2) y b) distribuciones de tamaño de celdas cuadradas y redondas. Note que las distribuciones de tamaño son las mismas independientemente de la geometría del vial usado. Las barras de error representan el error estándar, con $n=3$.

su potencial Z y se monitorearon las distribuciones de tamaño durante varios días, tal como se muestra en la figura 6.5 a). Puede notarse que el tamaño de ambas muestras permanecieron constantes por al menos uno y dos meses, probablemente debido al hecho de que las burbujas presentaron potenciales Z negativos $< -25\text{mV}$ (inset de la figura), por lo tanto, a distancias muy cercanas tenderían a repelerse. Esto coincide con varios reportes de nanoburbujas, tanto en estabilidad como en potencial Z . Para explicar esta carga negativa se han considerado dos posibles razones, 1) la preferencia de iones hidrógeno presentes en el agua, los cuales tienen una energía de hidratación menor a los iones hidroxilos; o 2) una orientación de-

finida de los dipolos del agua con los hidrógenos apuntando, en su mayor parte, al bulto [49, 50, 51, 52].

Los tamaños de las nanourbujas de Kr y Xe concuerdan con varios reportes de burbujas con dimensiones que rondan los 100 nm [53, 54], incluso con reportes recientes que muestran que además son termorresistentes [55], ver figura 6.5 b), lo cual sorprende debido a que la solubilidad de un gas disminuye con la temperatura.

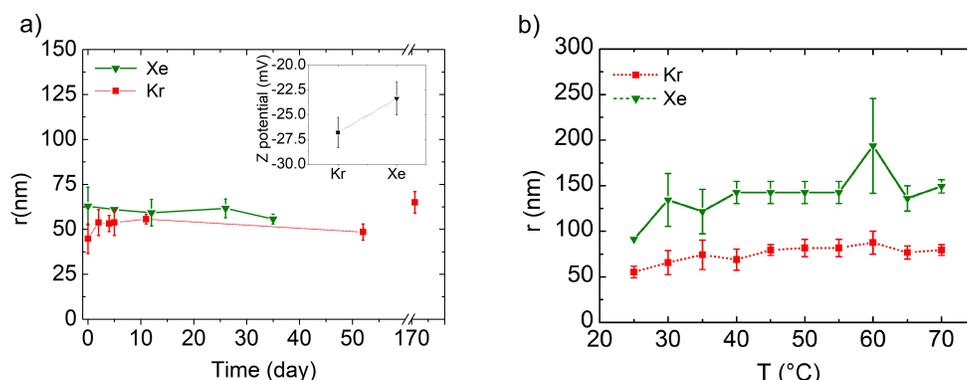


Figura 6.5: a) Tamaños de nanodominios de Kr y Xe durante varios días. En el inset se observa el potencial Z. b) Tamaño como función de la temperatura. Las barras de error representan el error estándar, con $n=3$.

Antes de estudiar la interacción de las burbujas en las membranas lipídicas, se quiso estimar la concentración de gas disuelto mediante la diferencia de masa de las muestras con y sin burbujas. Para retirarlas se usó una centrífuga (eppendorf 5804R) a 4 200 G por 2 horas, tiempo suficiente para que salieran del vial (ver 6.2).

A continuación, se muestran en la figura 6.6 las mediciones de DLS antes y después de centrifugar. En el panel a) se observan los correlogramas para las muestras

con Kr y Xe, puede notarse que la cantidad de burbujas disminuyó, tal como lo indica la reducción de los valores máximos de las curvas. Cabe resaltar que la ausencia de burbujas hubiese estado corroborada si la señal de correlación hubiera caído a cero. En el panel b) se muestran las distribuciones de tamaño correspondientes a cada correlograma, donde se ven ligeros corrimientos hacia valores menores, lo cual es un resultado consistente dado que las poblaciones de mayor tamaño son más susceptibles a la centrifugación.

Sin embargo, debido a que la centrifugación aumenta la presión hidrostática, es decir, la presión que siente una burbuja sumergida en una columna de agua, las burbujas pudieran contraerse y así escapar a los efectos de centrifugación, es por esto que se calculó la nueva presión interna y el nuevo tamaño de la burbuja contraída. Para ello se partió de la ecuación de Laplace (ecuación 1.8) redefiniendo el término $P_{out} = P_0 + \rho Ngh$, siendo P_0 la presión atmosférica y N el número de gravedades. Cabe aclarar que la altura de la columna de agua en los viales usados es de 3.4 cm, por lo que la expresión ρNgh es despreciable y sólo cobra sentido cuando N aumenta.

Durante la centrifugación una burbuja podría contraerse Δr y la presión interna podría ser definida como:

$$P_{int}^c = P_0 + \rho Ngh + \frac{2\gamma}{r - \Delta r}, \quad (6.1)$$

Por otro lado, usando la ley de Boyle que establece que $P_f V_f = P_i V_i$ (a temperatura constante y sin pérdidas de masa), siendo V el volumen y los subíndices refiriéndose a la condición inicial y final, que en el caso de las burbujas sería antes

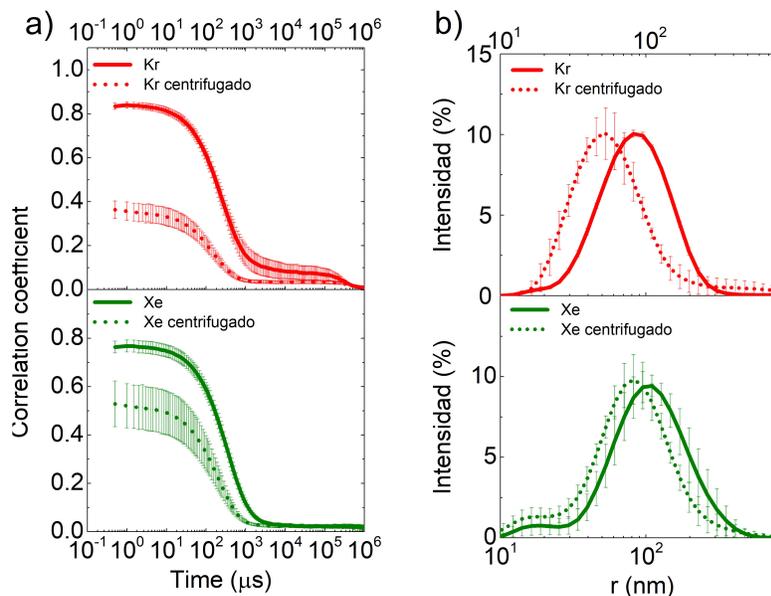


Figura 6.6: a) Correlogramas de nanoburbujas antes y después de centrifugados a 4 200 G por 2 horas. b) Distribuciones de tamaño correspondientes a cada correlograma. Las disminuciones en las curvas de correlación indican que hubo una reducción en la concentración de burbujas, mientras que los corrimientos en las distribuciones de tamaño hacia la izquierda confirman que la población de burbujas está constituida por entidades de menor tamaño en promedio. Nota: la distribución de intensidad registra las distribuciones de tamaño en función de la cantidad de luz dispersada por cada partícula, siendo proporcional a r^6 por lo que en este caso es más adecuada que la distribución numérica donde cada partícula tiene el mismo peso independiente de su tamaño. Las barras de error representan el error estándar, con $n=3$.

y durante la centrifugación, se tendría lo siguiente:

$$P_{int}r^3 = P_{int}^c(r - \Delta r)^3. \quad (6.2)$$

Sustituyendo la ecuación 6.1 en 6.2 y reorganizando los términos tendríamos una ecuación de la forma

$$\frac{a}{(r-x)^3} - \frac{c}{r-x} = b, \quad (6.3)$$

o lo que es lo mismo:

$$x^3 - \frac{3rb+c}{b}x^2 + \frac{3r^2b+2rc}{b}x + \frac{a-r^3b-r^2c}{b} = 0, \quad (6.4)$$

siendo $a = (P_0 + 2\gamma/r)r^3$, $b = P_0 + \rho Ngh$, $c = 2\gamma$ y $x = \Delta r$. Dada las condiciones del experimento $P_0 = 0.1 \text{ MPa}$, $h = 0.034 \text{ m}$, $\rho = 998 \text{ kg/m}^3$, $\gamma = 72 \times 10^{-3} \text{ N/m}$, $g = 9.8 \text{ m/s}^2$ y $N = 4200$. Se encontraron las raíces del polinomio de la ecuación 6.4 con solo una solución real (las otras dos eran imaginarias). Posteriormente, se graficaron las soluciones para diferentes tamaños de burbujas, los cuales son mostrados en la figura 6.7. En el eje vertical izquierdo se muestran distintos radios y en el eje horizontal su respectiva compresión cuando es centrifugada, así como su correspondiente presión interna en el eje vertical derecho. Es claro que, bajo las mismas condiciones las burbujas más pequeñas se comprimen menos que las de tamaños mayores, debido al hecho de que su presión interna aumenta dramáticamente. Así, una burbuja de 100 nm y 50 nm se comprimen de tal modo que alcanzan un tamaño de aproximadamente 80 nm y 40 nm, correspondientemente, mientras que la presión interna aumenta de 1.5 MPa y 3

MPa a 4 MPa y 5 MPa, respectivamente.

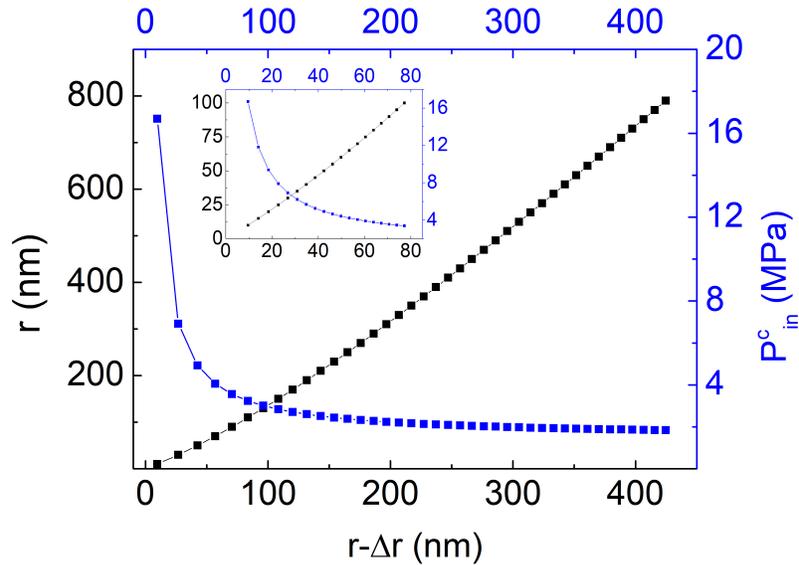


Figura 6.7: Contracción de las burbujas bajo un campo gravitacional de 4200 G. El radio de las burbujas r (eje vertical izquierdo), se contrae durante la centrifugación hasta un nuevo tamaño $r - \Delta r$ (eje horizontal), esta disminución genera un aumento de la presión interna P_{in}^c (eje vertical derecho). En el inset se observa un zoom con los radios de las burbujas entre 0-100nm.

Considerando que la compresión causada por la centrifugación eleva la densidad del gas, entonces pueden calcularse las nuevas densidades a través de la relación $P_i/\rho_i = P_f/\rho_f$, las cuales son mostradas en la tabla 6.2, junto con el tiempo que les tomaría ascender la altura del vial (3.4 cm).

Puede notarse que en todos los casos el tiempo de centrifugación de dos horas es más que suficiente para garantizar que las burbujas salieran del vial. Como esto no sucedió, entonces probablemente las nanoentidades medidas a través de

Gas	$r[nm]$	$\rho_r[\frac{kg}{m^3}]$	$r - \Delta r[nm]$	$\rho_{r-\Delta r}[\frac{kg}{m^3}]$	$t_{r-\Delta r}[min]$
<i>Kr</i>	100	57	80	148	10
	50	111	40	185	42
<i>Xe</i>	100	84	80	216	11
	50	162	40	270	47

Tabla 6.2: Tiempos de ascensión de burbujas de Kr y Xe teniendo en cuenta que la densidad del gas aumenta debido a la presión interna.

DLS no tenían la densidad de un gas y por lo tanto sería inconveniente llamarlas nanoburbujas.

Por otro lado, una estimación de las densidades de los especímenes encontrados puede ser calculada asumiendo que la densidad de una partícula está entre la del Kr o Xe en estado gaseoso y líquido. Nuevamente recurriendo a la ecuación de Stokes se cuantificó el tiempo de centrifugación en función de la diferencia de densidades entre la partícula y agua ($\Delta\rho = \rho_p - \rho_w$). Matemáticamente:

$$t = \frac{9h\mu}{2gr^2\Delta\rho}, \quad (6.5)$$

con $h = 0.034 \text{ m}$, $\mu = 0.000891 \text{ kg/m s}$, $g = 41160 \text{ m/s}^2$. Los radios fueron 82 nm y 110 nm para el Kr y Xe, respectivamente, ya que fueron los tamaños de las poblaciones que se movieron debido a la centrifugación (ver figura 6.6 b).

Las curvas hiperbólicas obtenidas de la ecuación 6.5 son mostradas en la figura 6.8. Puesto que con las mediciones de DLS no fue posible establecer si las nano-entidades ascendían o descendían en el vial, $\Delta\rho$ puede ser positivo o negativo. La discontinuidad en cero indica que la densidad de la partícula es igual a la del agua.

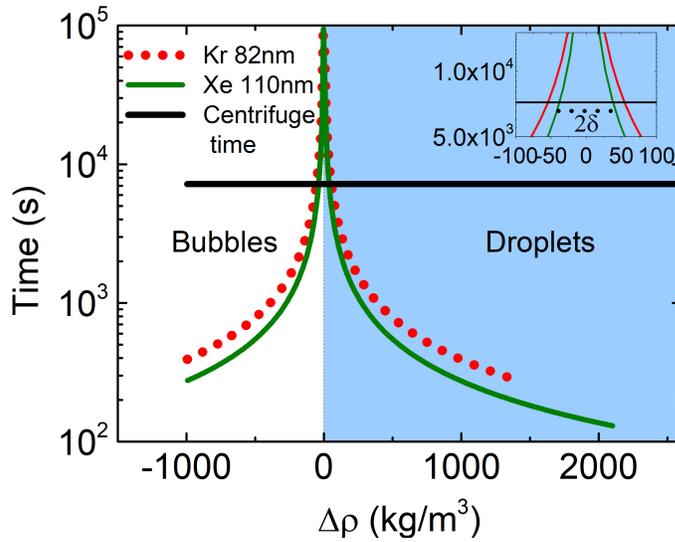


Figura 6.8: Tiempos de residencia de las nanoentidades sometidas a un campo gravitacional de 4 200 G. La región blanca representa las densidades de las partículas menores a las del agua, mientras que lo opuesto es representado en la región azul. El tiempo de centrifugación de 2 horas está representado en línea negra sólida. La intersección del tiempo de centrifugación con los tiempos de residencia de las partículas definen el intervalo de densidades que tuvieron las entidades para permanecer en el vial después de 2 horas de centrifugación (ver inset).

Las intersecciones de las curvas con el tiempo de centrifugación a 7200 s definen el intervalo $\delta\rho$ alrededor de ρ_w de los nanodominios observados mejor en el inset, expresado como $\rho_{eff} = \rho_w \pm \delta\rho$, con $\rho_w = 998 \text{ Kg/m}^3$ y $\delta\rho = 54.3 \text{ kg/m}^3$ para el Kr y 38 kg/m^3 para el Xe, por consiguiente las entidades encontradas son cuasi-isodensas.

Puesto que ya se descartó que los nanodominios pudieran ser gas condensado

tal que su densidad coincidiera con la del agua, queda explorar si se trata de entidades formadas por una combinación de moléculas de agua y átomos del gas. Por ende, con las estimaciones anteriores de las densidades efectivas se calcularon las fracciones volumétricas (ϕ) de cada gas en las partículas medidas a partir de la ecuación de medios efectivos [56]:

$$\rho_{eff} = (1 - \phi)\rho_w + \phi\rho_p, \quad (6.6)$$

o lo que es lo mismo:

$$\rho_{eff} = (\rho_p - \rho_w)\phi + \rho_w. \quad (6.7)$$

La gráfica de la ecuación 6.7 es mostrada en la figura 6.9 a). Las líneas horizontales corresponden a las densidades efectivas encontradas anteriormente para cada gas. Las intersecciones de las rectas definen el intervalo de las posibles fracciones volumétricas de las nanoentidades, las cuales fueron menores a 0.05 para el Kr y 0.04 para el Xe. Por consiguiente, la proporción de Kr y Xe es alrededor de 1 átomo por cada 20 y 25 moléculas de agua. Por tanto, cada dominio puede imaginarse como un aglomerado de átomos de gas noble con moléculas de agua que juntos se logran diferenciar del bulto (ver esquema de la figura 6.9 b)).

Si bien genera escepticismo pensar en entidades nanométricas compuestas de moléculas de un gas hidrófobo enlazados a moléculas de agua (medio en el que están inmersas), es posible encontrar en la naturaleza sistemas con características semejantes. Tal es el caso de los hidratos clatratos de gases hidrófobos.

Los clatratos hidratos son estructuras que forman algunos gases hidrófobos o

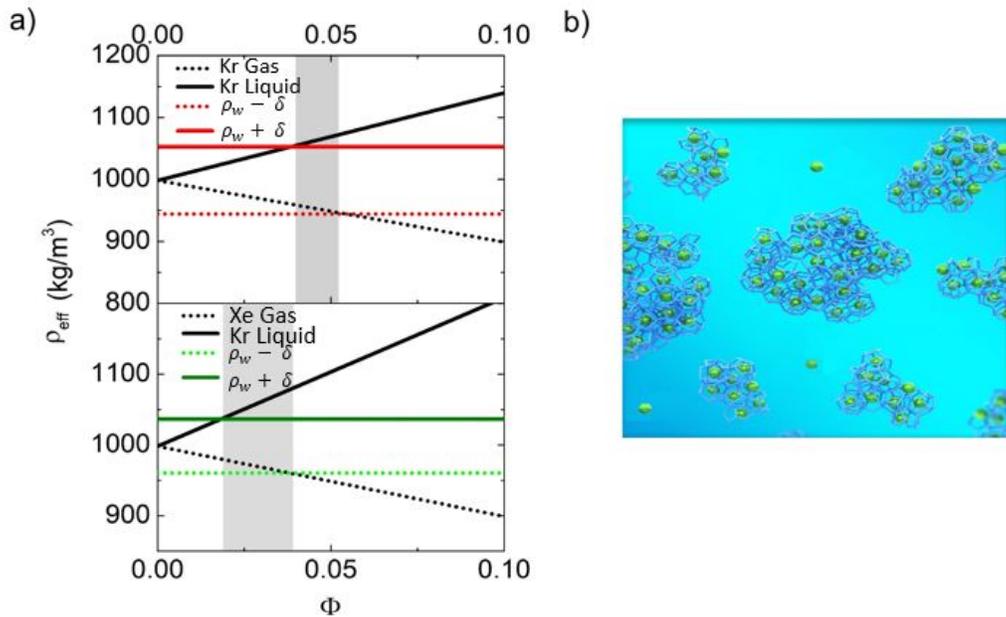


Figura 6.9: a) Densidades efectivas de nanodominios en función de las fracciones volumétricas de Kr y Xe. Las intersecciones con las líneas horizontales son las estimaciones de las fracciones volumétricas entre las que se encuentran los nanodominios esquematizados en b). Realización propia.

poco polares con las moléculas de agua. Esto se debe que el gas, carente de un dipolo permanente, entra al agua y los dipolos de estas últimas prefieren formar puentes de hidrógeno entre ellas mismas que con el huésped, formando cavidades en las cuales, de manera general, puede habitar todo átomo o molécula con el tamaño apropiado. Cabe anotar que las moléculas de agua interactúan con el huésped en menor medida generando dipolos inducidos sobre éstos, lo que repercute en la estabilidad de la estructura formada.

Existen tres tipos de estructuras (SI, SII y SH) que forman combinaciones de

cajas poliédricas en cuyas aristas se ubican las moléculas de agua. El Xe y Kr forman la estructura SI y SII. La figura 6.10 o tabla resume sus características principales [57, 58].

Tipos de estructuras:

SI 2 (5¹²) • 6 (5¹²6²)

SII 16 (5¹²) • 8 (5¹²6⁴)



5¹²

Xe : 20 H₂O

D_{host} ≤ 5.1 Å



5¹²6²

Xe : 24 H₂O

D_{host} ≤ 5.8 Å



5¹²6⁴

Xe : 28 H₂O

D_{host} ≤ 6.7 Å

Figura 6.10: Características principales de los hidratos de clatratos SI y SII. Realización propia.

Los hielos hidratos de clatratos se forman mayormente a bajas temperaturas y altas presiones. Su mecanismo de formación se ha estudiado a través de simulaciones de dinámica molecular. Jacobson et al. reportaron una secuencia de etapas que podrían dar lugar a la formación del cristal de clatrato; en resumen, el proceso inicia con la disolución del gas en el agua y la posterior formación de aglomeraciones dinámicas de gas-agua, entre mayor tamaño más estables. Estos agregados son los precursores de cristales inicialmente amorfos que, posteriormente, se convierten

en estructuras conocidas de cristales de clatrato [59].

En la cavidad mínima regular que forman los hidratos de clatrato el huésped está rodeado de 20 moléculas de agua, una relación similar a la proporción encontrada de los cálculos de las fracciones volumétricas mostradas en la figura 6.9, por lo tanto, no es descabellado pensar en dominios de gas y agua con mayor proporción de estos últimos.

Adicionalmente, durante la realización de los experimentos, en específico después de despresurizar algunas muestras de Xe, se encontraron hielos sobre el fondo del vial que al agitarlos se sedimentaban rápidamente (ver figura 6.11). Posteriormente, desde allí se nucleaban burbujas que crecían hasta alcanzar determinado tamaño y por buoyancia ascendían a la superficie, lo cual fue registrado en la figura 6.11.

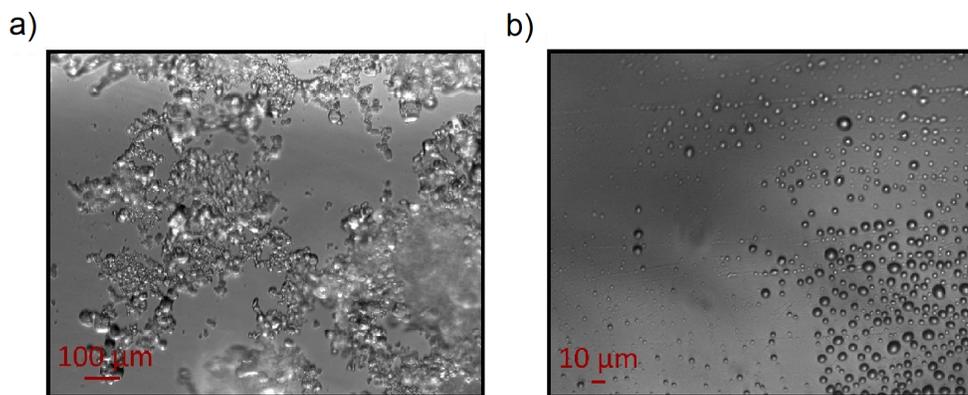


Figura 6.11: a) Hielos de Xe observados después de despresurizar en un microscopio invertido (Axio Observer.Z1, Zeiss), b) después de unos minutos los hielos se empiezan a derretir, nucleando burbujas en el fondo del vial.

Indagando en la naturaleza de lo encontrado, se descartó que se tratara de hielo denso (1300 kg/m^3), pues éste se forma a presiones por encima de 2000 atm a 25°C [60]. En cambio, se confirmó que se trataban de hielos de clatratos de Xe, cuya densidad puede variar según la ocupación de las cajas. Se ha reportado que la estructura vacía tiene una densidad de 825 kg/cm^3 , mientras que con una ocupación del 87 % de las cavidades dodecaédricas (5^{12}) es de 1837 kg/cm^3 [61].

Finalmente, para asegurar que los nanodominios encontrados no fueran contaminantes, se realizaron controles tanto de agua como de He, este último sometido a una presión de 620 atm, y se compararon los correlogramas del Kr y Xe mostrados en la figura 6.12. Se puede observar que el He presentó el mismo correlograma del agua, lo que indica que el experimento es lo suficientemente limpio para descartar que lo visto sean contaminantes. Además, el He es conocido en la literatura por no formar hidratos de clatratos [62], lo que aúna a la idea que los entes observados con el Kr y Xe podrían ser blobs.

Teniendo en cuenta que el Xe y el Kr forman hidratos de clatratos, en este trabajo se propone que los nanodominios que inicialmente se creía eran nanoburbujas, no son tal cosa sino blobs, agregados amorfos que no cumplen con las condiciones necesarias para formar cristales y en cambio, permanecen estables por una sinergia con huéspedes atrapados entre moléculas de agua estabilizadas por ellos. Estos resultados fueron publicados recientemente en la revista *Physical Review Letters* [63].

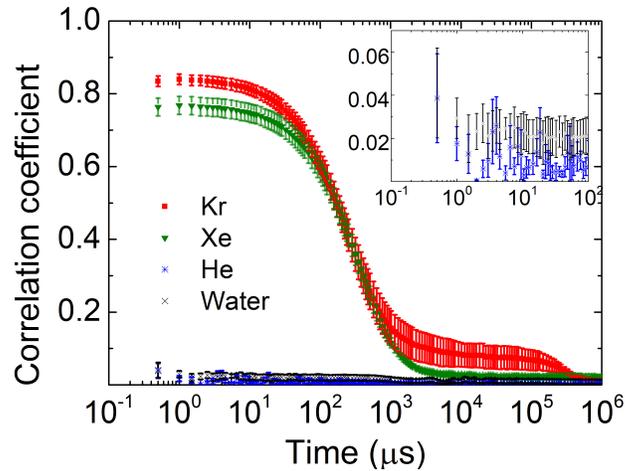


Figura 6.12: Correlogramas de agua y muestras con Kr, Xe y He. Los correlogramas del agua y He son mostrados en el inset, no se aprecia ninguna diferencia entre ambos. Las barras de error representan el error estándar, con $n=3$.

6.3. Efectos termodinámicos de las suspensiones coloidales en las membranas lipídicas

Luego de generar y caracterizar las suspensiones coloidales, se estudió el efecto de cada una sobre diferentes modelos de membranas.

Es importante aclarar que ya que no fue posible conocer las concentraciones del gas disuelto en las suspensiones formadas por el Kr y Xe, los resultados de su efecto en membranas no son comparables y por tanto son tratados de manera separada, por esta misma razón era indistinto el modelo de membrana usado.

6.3.1. Efectos de las nanoemulsiones en los liposomas

Como se mencionó anteriormente, los liposomas son modelos que nos ayudan a comprender las interacciones entre componentes específicos gracias a la reducción de variables de un sistema que posee una mayor complejidad, como lo es la membrana plasmática.

Actualmente se ha asociado la presencia de proteínas involucradas en procesos de señalización a los dominios formados en la membrana celular conocidos como balsas lipídicas, y se cree que cambios en sus propiedades pueden modificar la actividad de las proteínas presentes en ellas. Partiendo de este hecho se consideró un modelo de membrana compuesto por DPPC-SM-CHOL (ver figura 6.13), ya que éstos en presencia de lípidos insaturados pueden formar también dominios semejantes a las balsas lipídicas; es decir, que el modelo usado sería análogo a estudiar los componentes del modelo de balsa completo. Además, se evaluó el papel del colesterol en la interacción con moléculas externas como las usadas en las suspensiones coloidales.

Inicialmente se estudió la interacción entre las nanoemulsiones y los liposomas compuestos por DPPC-SM. El efecto generado fue registrado mediante los perfiles calorimétricos mostrados en el panel superior de la figura 6.14. Se puede observar que la temperatura de transición principal (T_m) de la mezcla fue de 40.4°C , lo cual fue previamente reportado en [65]. Este resultado era de esperarse dado que la membrana está compuesta en su mayoría por DPPC cuya T_m es 41°C y apenas un 10 mol % de SM con una T_m de 37.5°C [66].

Los termogramas de los liposomas con las nanoemulsiones de AO al 1 y 3 %

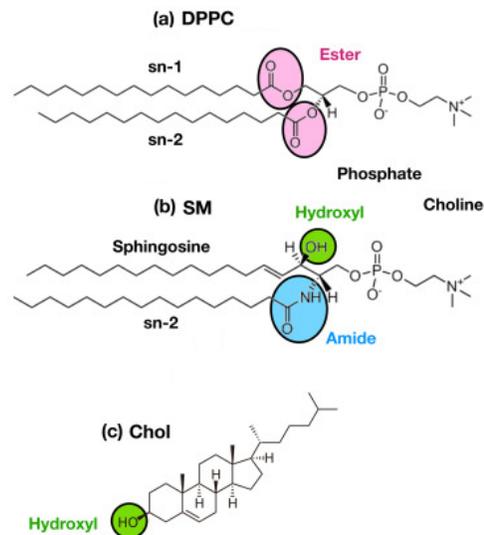


Figura 6.13: Estructura molecular de los lípidos que componen el modelo de membrana usados. Los grupos funcionales resaltados son importantes en las interacciones con las moléculas hidrófobas. Tomado de [64].

no modificaron la temperatura de transición principal, aunque sí disminuyeron levemente la capacidad calorífica máxima, por lo tanto, es adecuado como un acareador de las moléculas de CDB y propofol.

Entre tanto, el CBD-AO al 1 % afectó seriamente el comportamiento termotrópico de los liposomas: ensanchando el pico, disminuyendo la cooperatividad de los lípidos (bajando la capacidad calorífica) y decreciendo la temperatura de transición. Este efecto es aún más grande a concentraciones mayores de CBD-AO, incluso puede evidenciarse mejor un hombro en el pico principal que puede interpretarse como una separación de fase. Esto además coincide con observaciones antes

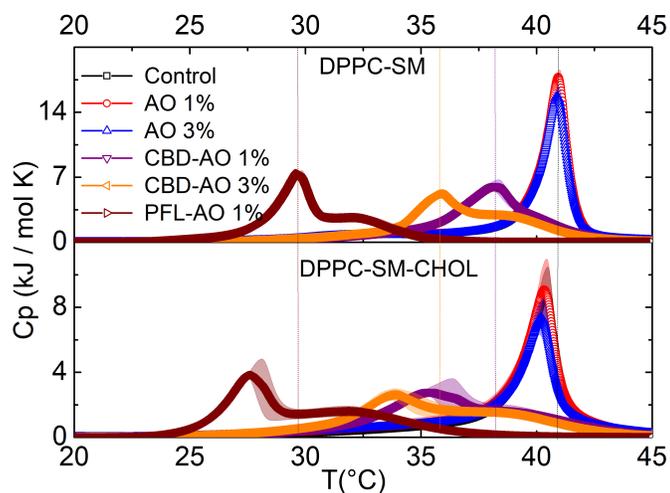


Figura 6.14: Perfiles calorimétricos del efecto de las emulsiones en liposomas con (panel superior) y sin (panel inferior) colesterol. Las regiones sombreadas representan la desviación estándar, con $n=3$.

hechas en membranas de DPPC [67].

Sorprendentemente, el PFL-AO incluso a una concentración menor que el CBD-AO (3%), corre aún más la T_m a valores menores, causando también una separación de fase que de forma general pudieron ser provocados por inhomogeneidades en las bicapas lipídicas, es decir, regiones con mayor o menor concentración de CBD-AO o PFL-AO [68].

Con lo anteriormente mencionado, podría pensarse que la hidrofobicidad no es el único factor determinante de una molécula para afectar la membrana, sino que entran en juego otros factores como la estructura del huésped.

Dada la importancia del colesterol en las membranas, y teniendo en cuenta que

esta molécula tiene una alta hidrofobicidad (Log P 9.85), se midieron las respuestas calorimétricas de los liposomas de DPPC-SM-CHOL, para determinar si hay diferencias con las mediciones previamente realizadas. Los resultados son mostrados en el panel inferior de la figura 6.14. La primera discrepancia que se puede notar es un ligero corrimiento en la T_m del control, así como un ensanchamiento y disminución del pico principal asociado a una pérdida de cooperatividad de los lípidos, lo que resulta en un cambio en la entalpía menor que en las membranas de DPPC-SM (calculada a partir de la integración de los perfiles calorimétricos), ver figura 6.15. Esto sugiere que las interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals que existen entre los lípidos se vieron disminuidas por la inclusión de colesterol, un efecto que ha sido ampliamente discutido [69, 70, 71, 72].

Además se evidenció que las emulsiones tuvieron un efecto aún mayor cuando los liposomas contenían colesterol. Por lo tanto, se podría pensar en el colesterol como en un atractor de moléculas hidrófobas.

La figura 6.15 muestra el cambio en la entalpía de los liposomas con y sin colesterol para cada nanoemulsión. Puede notarse la tendencia que tienen las emulsiones a decrecer ΔH en los liposomas de DPPC-SM. Esto significa que las moléculas hidrófobas reducen la cohesión de las colas lipídicas y como consecuencia la bicapa lipídica se desordenan. También, las membranas con colesterol presentarán menores ΔH . Sin embargo, la adición de este lípido parece haberle dado la propiedad de amortiguar los cambios que se habían visto generaban las emulsiones, ya que se mantuvo casi constante la energía de cohesión de los liposomas con colesterol.

Para finalizar, se quiso cuantificar la cantidad de CBD captado por la mem-

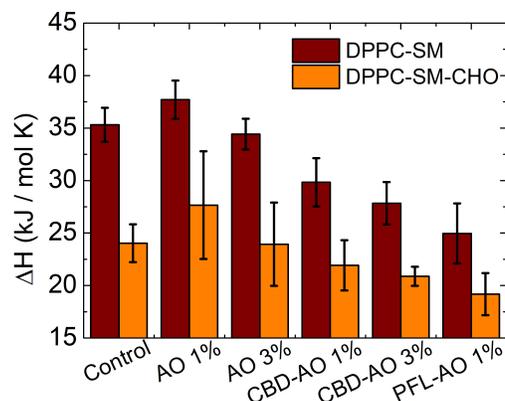


Figura 6.15: cambios la entalpía de liposomas con (barras naranjas) y sin (barras rojas) colesterol producidos por las nanoemulsiones. Las líneas verticales permiten evidenciar mejor el desplazamiento de los termogramas para cada nanoemulsión. Puede notarse que el cambio en la entalpía se mantuvo casi constante en los liposomas con colesterol a diferencia de los que carecían de éste. Las barras de error son el error estándar, con $n=3$.

brana mediante una curva de calibración de la temperatura de transición principal en función de la concentración de CBD. A diferencia de las nanoemulsiones que llegan a la bicapa por difusión, el CBD fue añadido antes de formar la película de lípidos, posteriormente se hidrató con agua desionizada y se continuó con el protocolo mencionado en la metodología. Los resultados son mostrados en la figura 6.16.

Luego de ajustar los datos a una línea recta se pudo calcular la concentración aproximada de moléculas de CBD que interactuaron con la membrana de DPPC-SM en forma de emulsiones, la cual fue de 0.11 y 0.2 mg/ml para 1 y 3 % respec-

tivamente, y para DPPC-SM-CHO fue de 0.09 y 0.11 mg/ml. Interesantemente, las membranas con colesterol recibieron menos moléculas de CBD que las que carecían de éste, aun cuando eran quienes mayores desplazamientos presentaban en los termogramas. Por lo tanto, creemos que ocurre una sinergia entre el colesterol y el CBD.

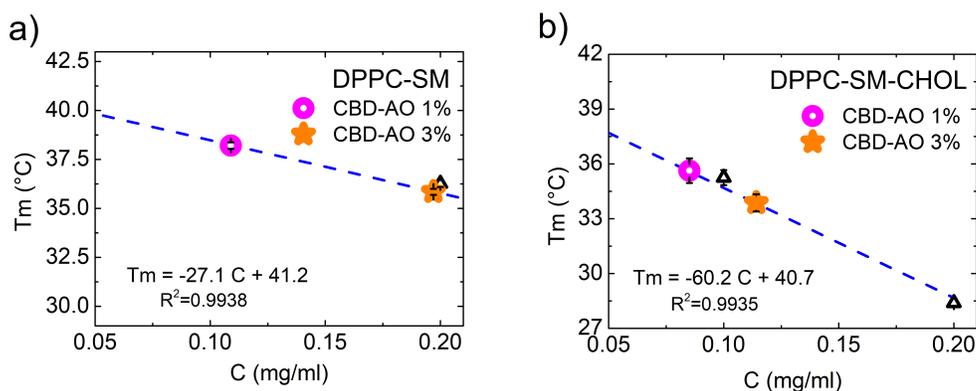


Figura 6.16: Curva de calibración de la T_m en función de la concentración de CBD. Las barras de error representan el error estándar, con n=3.

También puede razonarse que la membrana de colesterol con menor cantidad de moléculas pareciera saturarse más rápido, pues un aumento del triple en la concentración de CBD en emulsiones apenas genera un incremento de moléculas en la membrana del 22 %, mientras que para el DPPC-SM la presencia de CBD aumentó el 82 %.

Cabría preguntarse si el hecho de que las emulsiones empleadas están siendo comparadas en términos de mg/ml, es la razón por la cual el propofol teniendo una concentración tres veces menor, tiene más efecto que el CBD, pues este último al tener un peso molecular mayor, tendría una menor cantidad de moléculas que en el

caso del propofol. Sin embargo, las equivalencias de las emulsiones de CBD-AO al 1 y 3 % en la suspensión de liposomas son 6 y 18 mM, mientras que PFL-AO al 1 % es 10 mM, en consecuencia, lo anteriormente discutido sigue siendo válido.

Cabe mencionar que al igual que con el CBD, también se hicieron experimentos para conocer la cantidad de propofol en la membrana por medio de las emulsiones. Sin embargo, como la concentración probada fue cercana a la T_m de las emulsiones, se decidió tomar esta medición como un valor aproximado. La emulsión al 1 % tuvo una T_m de 29.7 ± 0.11 °C para liposomas de DPPC-SM. Una concentración de 1 mg/ml, añadido a los lípidos antes de la hidratación, obtuvo una T_m de 31.4 ± 0.6 °C.

En membranas de DPPC-SM-CHOL la T_m fue de 27.7 ± 0.4 °C cuando el propofol en emulsión era adicionado; y 1 mg/ml aplicado directamente a los lípidos produjo una T_m de 25.7 ± 2.5 °C. El incremento en la desviación estándar de los liposomas con colesterol dificultó el cálculo de la concentración de propofol en la bicapa. No obstante, con y sin colesterol es un orden de magnitud mayor que el encontrado para el CBD.

Por lo tanto, se puede concluir que la razón por la cual la emulsión de PFL-AO obtuvo una menor T_m comparado con el CBD-AO al 1 y 3 %, fue porque tenía una mayor cantidad de moléculas en la membrana. Ahora bien, como el CBD es 741 veces más hidrófobo que el propofol ($10^{7.03}/10^{4.16}$), se hubiese esperado el resultado contrario. Sin embargo, una manera en que el propofol y CBD pueden llegar a la membrana es mediante la solubilización de los componentes de la gota en el agua y su posterior migración a la bicapa (efecto conocido como maduración de Ostwald); y dado que el CBD es menos soluble que el propofol es de esperarse

que hayan más moléculas de este último disueltas en el medio acuoso.

Cabe aclarar que los tamaños nanométricos de las gotas también aumentan la solubilidad *per se* de las moléculas contenidas en ellas un factor de $e^{\frac{\Delta P}{RT}}$ donde ΔP , R y T son la presión de Laplace, la constante de los gases ideales y la temperatura, pero como las emulsiones tiene casi las mismas distribuciones de tamaño, el factor en que aumentan es el mismo.

6.3.2. Efectos de las suspensiones coloidales de Kr y Xe en los liposomas

Ya que no fue posible estimar experimentalmente la concentración de gas disuelto en el agua de las muestras de Kr y Xe (las estimaciones de fracciones volumétricas de cada gas calculadas en la sección 6.2 corresponden a las partículas medidas, pero se desconoce el número de partículas en las muestras), se decidió evaluar el papel de los gases hidrófobos en las membranas lipídicas, así como el rol que desempeña el colesterol en las mismas bajo condiciones de presión.

Para ello se usaron liposomas de DPPC a una concentración de 1.5 mM, suficiente para ser detectada por el calorímetro y al mismo tiempo conveniente, ya que el volumen de cada muestra empleado era de alrededor de 3ml. Cada experimento se repitió al menos 3 veces.

Cada muestra permaneció bajo presión 60 minutos a 360 y 600 atm para el Xe y Kr respectivamente. Las presiones se calcularon a partir de la ley de Henry para una concentración de gas disuelto en agua de 1.5 mol/L.

Los perfiles calorimétricos son mostrados en la figura 6.17. Aquí puede destacarse la correlación evidente entre el corrimiento en la temperatura de transición

principal y la hidrofobicidad del gas que es 1.4 veces mayor para el Xe que para el Kr, lo cual concuerda con reportes previos [73]. También se observa que los termogramas conservaron su forma inicial, lo que indica una distribución uniforme de los átomos del gas sobre las bicapas.

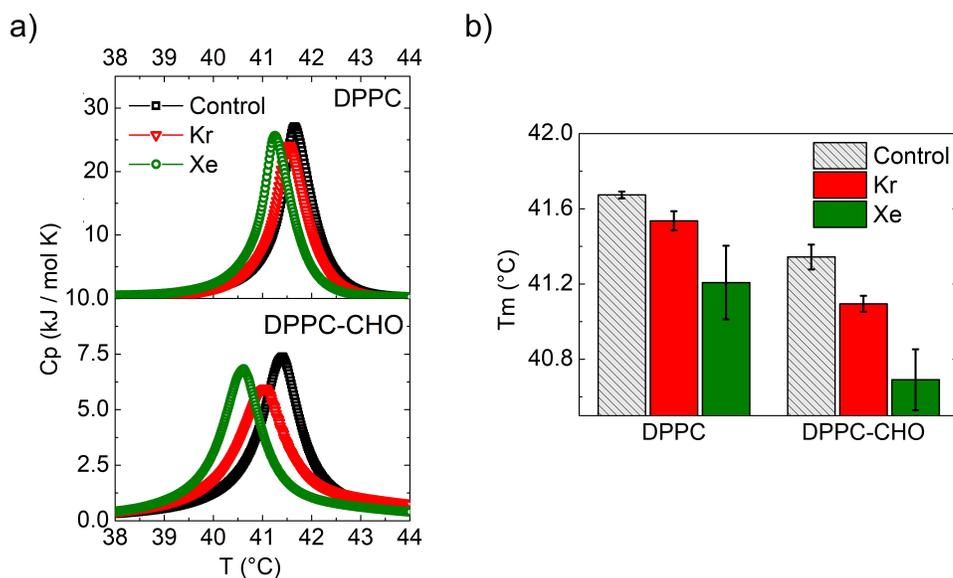


Figura 6.17: a) Perfiles calorimétricos del efecto del Kr y Xe en liposomas con (panel inferior) y sin (panel superior) colesterol. b) Corrimientos en la temperatura de transición. $n=3$ y las barras de error representan la desviación estándar.

En la figura 6.17 b) puede apreciarse cuantitativamente las diferencias en la T_m cuando los liposomas contienen colesterol comparado con la ausencia de éste. Los resultados muestran una tendencia semejante al estudio con nanoemulsiones en cuanto a un mayor efecto cuando hay colesterol.

Finalmente, ya que tanto el Kr como el Xe son átomos con hidrofobicidades

diferentes pero solubilizados a la misma concentración, es posible relacionar la hidrofobicidad con el efecto causado en la membrana, en consecuencia, a mayor hidrofobicidad mayor efecto.

7. DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos pueden destacarse dos puntos en los que además de lo antedicho, es preciso profundizar: 1) la naturaleza de las entidades encontradas en las suspensiones con Kr y Xe y 2) el efecto de las nanoemulsiones en los modelos de membrana.

Uno de los resultados más relevantes de este proyecto fue la determinación de los nanodominios cuasi-isodensos de las muestras que contenían Xe y Kr. Aquí es importante mencionar que esto coincide con otros reportes, aunque con técnicas y gases diferentes a los usados en el presente trabajo. En ellos se concluye que las partículas medidas son ligeramente menos densas que el agua, y dado que la densidad era similar a la de componentes orgánicos concluyeron que eran contaminantes del método de fabricación empleado, los cuales variaban entre sonicación, mezcla de etanol-agua y saturación del gas en el medio usando un dispositivo mecánico [11, 74, 75, 14]. Sin embargo, nosotros pudimos verificar que el método de generación utilizado aquí no producía contaminantes, pues el control hecho con He registró la misma señal del agua.

Es importante mencionar que la observación de los hielos en las muestras de Xe, fue determinante para la asociación de los especímenes encontrados con las estructuras amorfas o *blobs* que preceden la formación de cristales de clatratos. Lo cual es consistente con la ausencia de nanodominios en los experimentos del He, teniendo en cuenta que éstos no forman hidratos de clatrato, entre otras cosas porque su tamaño, y por ende su polarizabilidad, es demasiado pequeña para estabilizar las estructuras del agua [58].

No solo el Kr y Xe pueden formar hidratos clatrato, también lo pueden hacer el aire, CO₂, N₂, O₂, CH₄ y en general, todo átomo o molécula con un diámetro apropiado para que quepa en las cavidades que forman los puentes de agua [58]. Curiosamente los reportes de nanoburbujas revisados hasta el momento son de estos elementos, así que podría ser probable que la discusión del presente trabajo también aplicara a otro tipo de burbujas.

Por otro lado, dado que estos clústeres amorfos son estructuras compuestas en su mayoría de agua, y el medio en el que se encuentran inmersas también es agua, no se producirían entre ellos desbalances de las interacciones intermoleculares que generaran el efecto de tensión interfacial, por consiguiente, no habría presión de Laplace ni violación a la ley de Henry.

En cuanto a los estudios de calorimetría con nanoemulsiones, es importante precisar que existen ya reportes del efecto de cada uno de estos solutos en diferentes tipos de membranas, tal es el caso del propofol, de cuya capacidad para alterar la membrana y fluidizarla ya se conocía [76]. Estudios de dinámica molecular revelaron que la orientación preferente del propofol es sobre el inicio de las cadenas hidrocarbonadas. Allí, el grupo hidroxilo puede interactuar con el oxígeno del grupo éster de los fosfolípidos (ver figura 6.13), y generar perturbaciones de tal manera que causan que con menor energía los lípidos cambien de fase sólido-ordenado a líquido-desordenado [77]. Esto mismo sucede con el CBD [68], quien posee dos grupos hidroxilos que al igual que con el propofol, podrían interactuar con el oxígeno del grupo éster y el resto de la molécula orientarse hacia las colas hidrofóbicas. Debido a que el CBD es más grande que el propofol, es de esperarse que interactúe en mayor medida con la región hidrofóbica. Sin embargo, no fue

suficiente para que generara corrimientos mayores al propofol, aunque eso pudo deberse a que la membrana tenía más contenido de propofol que de CBD.

Al evaluar el rol del colesterol en las membranas, inicialmente se pensó que actuaba como un “atractor de moléculas hidrofóbicas”, sin embargo, estudios posteriores demostraron que concentraciones de soluto menores producían mayores cambios en las membranas que contenían colesterol. Por tanto, sobre su papel, podría decirse que es potenciar el efecto de los solutos afines a la membrana, independiente de la forma que éstas tengan (es decir, las estructuras de las moléculas).

Además, se sabe que los lípidos en fase líquido-desordenado tienen una mayor área y un menor espesor de la bicapa [78]. En consecuencia, si una molécula tiene la capacidad de generar un cambio de fase en los lípidos, podría también afectar de manera indirecta a las proteínas a través del emparejamiento hidrofóbico, conocido también como mismatch, y causar un cambio conformacional en ellas afectando las posibles funciones que estas desempeñen [79, 80]. Ahora bien, como las balsas lipídicas son dominios ricos en colesterol, podrían ser más susceptibles a cambios externos al cambiar el espesor de la bicapa y por ende, la función de las proteínas ancladas a ellas. Sin embargo, esta afirmación es solo una posible implicación de los resultados encontrados en este trabajo, para su verificación estudios adicionales deben ser realizados.

8. CONCLUSIONES

Luego de sobresaturar un medio acuoso con Kr y Xe, se encontraron nanodominios con características similares a las reportadas en los artículos sobre nanoburbujas. Sin embargo, después de someterlos a centrifugación, resultaron ser cuasi-isodensos y por lo tanto carentes de núcleo gaseoso. En cambio, se observó una probable conexión entre los especímenes encontrados y lo que serían los posibles precursores de los hidratos de clatratos, “blobs”, que no violarían ninguna de las teorías que se han establecido. Además, estos resultados podrían ser extrapolables a otros tipos de nanoburbujas.

Al estudiar el efecto que generan nanoemulsiones de CBD y propofol, en un modelo de membrana, se pudo establecer que la hidrofobicidad no es el principal parámetro que determina el grado de interacción con la membrana, sino que también debe ser tomada en cuenta la estructura de las moléculas hospederas.

La función del colesterol en las membranas fue evaluada mediante dos tipos de modelos de cuya composición lipídica se cree están formadas las balsas lipídicas. Se estudiaron los cambios termodinámicos producidos por dos moléculas con propiedades diferentes (hidrofobicidad y estructura). Los resultados mostraron que las membranas con colesterol tuvieron cambios mayores en los perfiles calorimétricos con menor soluto, lo cual fue interpretado como un aumento en la sensibilidad de la membrana, que incluso fue independiente de la estructura de la molécula añadida. Lo anterior podría aplicarse a balsas lipídicas en cuyos dominios se cree habitan proteínas involucradas en respuestas celulares.

9. PERSPECTIVAS

En la evaluación de las propiedades termodinámicas de las membranas con y sin colesterol con nanoemulsiones de CBD y propofol, se pudo identificar la posible función del colesterol actuando como un amplificador de señales produciendo un aumento de la sensibilidad de las membranas que lo contienen. Sin embargo, cabría preguntarse si la sensibilidad crece con el aumento del contenido de colesterol.

Además de ello realizar estudios adicionales para determinar si moléculas polares o iones que pudieran afectar las regiones polares de las membranas también son potenciadas por el colesterol.

También es importante verificar que, en efecto, un modelo de balsa lipídica completo presente el mismo comportamiento predicho en este estudio.

10. APÉNDICE

“La fuerza debido a una presión en una semiesfera es igual a la presión por el área de la semiesfera proyectada”

Una de las asunciones que se hicieron en la figura 1.2 fue que la fuerza debido a la presión actuaba sobre el área transversal proyectada de la semiesfera. Sin embargo, la demostración de ello se hará a continuación:

Partimos del esquema representado en la figura 10.1 ampliado a coordenadas esféricas, donde se puede observar que la fuerza interna de la burbuja tiene una dirección radial que actúa desde el centro hacia el exterior de la burbuja. Por lo tanto, la fuerza en z es igual a:

$$F_{P_{in}} = P_{in} dA \cos\theta. \quad (10.1)$$

El elemento diferencial de área está definido como $dm * dn$, siendo cada uno de ellos un segmento de arco, el cuál es igual al ángulo por el radio. Así:

$$dA = r^2 d\theta \operatorname{sen}\theta d\varphi. \quad (10.2)$$

Al reemplazar la ecuación 10.2 en 10.1 se tiene lo siguiente:

$$F_{P_{in}} = P_{in} r^2 \int_0^{\pi/2} \int_0^{2\pi} \operatorname{sen}\theta \cos\theta d\varphi d\theta. \quad (10.3)$$

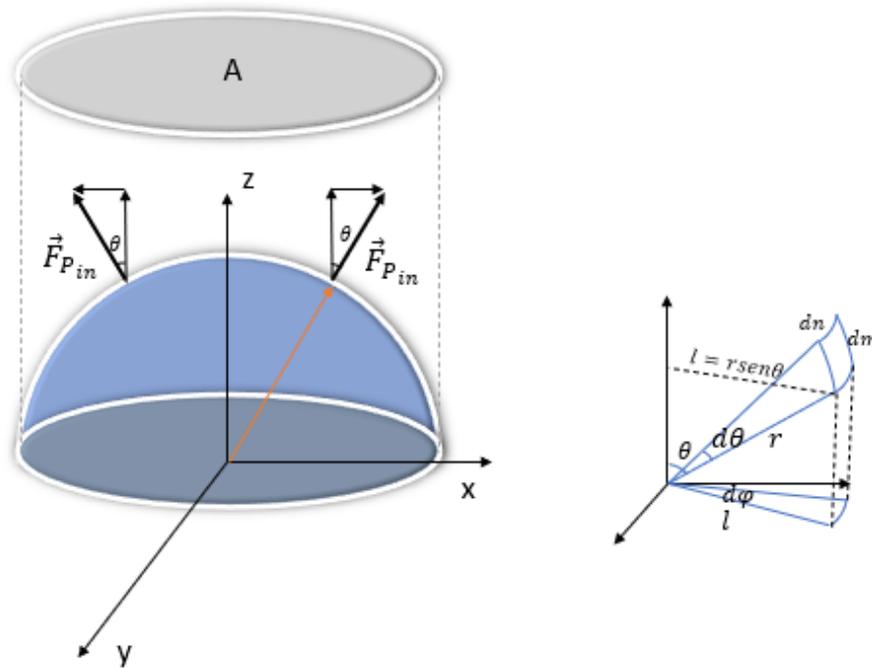


Figura 10.1: Esquema de la fuerza debido a la presión sobre una semiesfera. Al descomponer la fuerza debido a la presión interna, se anulan las componentes en el eje x que por simetría tienen direcciones opuestas y sobreviven las de eje z. La imagen de la izquierda es la descripción geométrica de un elemento dA de la superficie de la semiesfera. Realización propia.

Lo anterior puede ser expresado como

$$F_{P_{in}} = 2\pi r^2 P_{in} C, \quad (10.4)$$

con

$$C = \int_0^{\pi/2} \text{sen}\theta \cos\theta d\theta. \quad (10.5)$$

La integral C puede ser resuelta aplicando el método de integración por partes donde $u = \text{sen}\theta$ y $dv = \cos\theta d\theta$, por lo tanto, escribiendo la integral en la forma $uv - \int vdu$, se tiene que:

$$C = \text{sen}^2\theta - \int_0^{\pi/2} \text{sen}\theta \cos\theta d\theta. \quad (10.6)$$

Como la integral que aparece fue la misma que definimos como C, entonces:

$$C = \frac{\text{sen}^2\theta}{2} \Big|_0^{\pi/2} = \frac{1}{2}. \quad (10.7)$$

Para terminar, reemplazando en la ecuación 10.8 obtenemos la expresión que demuestra que la fuerza debido a la presión interna que es ejercida de manera perpendicular sobre la superficie de una semiesfera es igual al área transversal de ésta por la presión interna.

$$F_{P_{in}} = \pi r^2 P_{in} = A P_{in}. \quad (10.8)$$

Finalmente, un tratamiento similar debe hacerse con la fuerza debido a la presión externa, donde la única diferencia es el signo de la presión externa que es contrario al de la presión interna.

Referencias

- [1] Bruce Alberts. *Molecular biology of the cell*. WW Norton & Company, 2017.
- [2] Geoffrey M Cooper, Robert E Hausman, and Robert E Hausman. *The cell: a molecular approach*, volume 4. ASM press Washington, DC, 2007.
- [3] Kai Simons and Derek Toomre. Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(1):31–39, 2000.
- [4] Kai Simons, Robert Ehehalt, et al. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *The Journal of clinical investigation*, 110(5):597–603, 2002.
- [5] Michael Weinrich and David L Worcester. Xenon and other volatile anesthetics change domain structure in model lipid raft membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(50):16141–16147, 2013.
- [6] David Chandler. Hydrophobicity: Two faces of water. *Nature*, 417(6888):491–491, 2002.
- [7] Terence Cosgrove. *Colloid science: principles, methods and applications*. John Wiley & Sons, 2010.
- [8] Zipei Zhang and David J McClements. Overview of nanoemulsion properties: Stability, rheology, and appearance. In *Nanoemulsions*, pages 21–49. Elsevier, 2018.
- [9] David Julian McClements and Seid Mahdi Jafari. *General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation*. Elsevier Inc., 2018.

- [10] David Julian McClements. *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press, 2004.
- [11] Muidh Alheshibri and Vincent SJ Craig. Differentiating between nanoparticles and nanobubbles by evaluation of the compressibility and density of nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 122(38):21998–22007, 2018.
- [12] Ananda J Jadhav and Mostafa Barigou. Bulk nanobubbles or not nanobubbles: That is the question. *Langmuir*, 36(7):1699–1708, 2020.
- [13] Dmytro Rak and Marián Sedlák. Comment on “bulk nanobubbles or not nanobubbles: that is the question”. *Langmuir*, 36(51):15618–15621, 2020.
- [14] Marian Sedlák and Dmytro Rak. Large-scale inhomogeneities in solutions of low molar mass compounds and mixtures of liquids: supramolecular structures or nanobubbles? *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(8):2495–2504, 2013.
- [15] Limin Zhou, Shuo Wang, Lijuan Zhang, and Jun Hu. Generation and stability of bulk nanobubbles: A review and perspective. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 53:101439, 2021.
- [16] Muidh Alheshibri, Jing Qian, Marie Jehannin, and Vincent SJ Craig. A history of nanobubbles. *Langmuir*, 32(43):11086–11100, 2016.
- [17] Paul S Epstein and Milton S Plesset. On the stability of gas bubbles in liquid-gas solutions. *The Journal of Chemical Physics*, 18(11):1505–1509, 1950.

- [18] P Brent Duncan and David Needham. Test of the epstein- plesset model for gas microparticle dissolution in aqueous media: effect of surface tension and gas undersaturation in solution. *Langmuir*, 20(7):2567–2578, 2004.
- [19] Stig Ljunggren and Jan Christer Eriksson. The lifetime of a colloid-sized gas bubble in water and the cause of the hydrophobic attraction. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 129:151–155, 1997.
- [20] Fernanda Yumi Ushikubo, Takuro Furukawa, Ryou Nakagawa, Masatoshi Enari, Yoshio Makino, Yoshinori Kawagoe, Takeo Shiina, and Seiichi Oshita. Evidence of the existence and the stability of nano-bubbles in water. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 361(1-3):31–37, 2010.
- [21] Haichang Yang, Yaowen Xing, Fanfan Zhang, Xiahui Gui, and Yijun Cao. Contact angle and stability of interfacial nanobubble supported by gas monolayer. *Fundamental Research*, 2022.
- [22] Nikolai F Bunkin, Alexey V Shkirin, Nikolay V Suyazov, Vladimir A Babenko, Andrey A Sychev, Nikita V Penkov, Konstantin N Belosludtsev, and Sergey V Gudkov. Formation and dynamics of ion-stabilized gas nanobubble phase in the bulk of aqueous nacl solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(7):1291–1303, 2016.
- [23] Yongcai Pan, Bing He, and Binghai Wen. Effects of surface tension on the stability of surface nanobubbles. *Frontiers in Physics*, page 494, 2021.

- [24] Mitsuhiro Matsumoto and Kotaro Tanaka. Nano bubble—size dependence of surface tension and inside pressure. *Fluid dynamics research*, 40(7-8):546, 2008.
- [25] Kosuke Ebina, Kenrin Shi, Makoto Hirao, Jun Hashimoto, Yoshitaka Kawato, Shoichi Kaneshiro, Tokimitsu Morimoto, Kota Koizumi, and Hideki Yoshikawa. Oxygen and air nanobubble water solution promote the growth of plants, fishes, and mice. *PLoS One*, 8(6):e65339, 2013.
- [26] Shu Liu, Seiichi Oshita, Saneyuki Kawabata, Yoshio Makino, and Takahiko Yoshimoto. Identification of ros produced by nanobubbles and their positive and negative effects on vegetable seed germination. *Langmuir*, 32(43):11295–11302, 2016.
- [27] Jong-Seok Park and Kenji Kurata. Application of microbubbles to hydroponics solution promotes lettuce growth. *HortTechnology*, 19(1):212–215, 2009.
- [28] Roya Moghimi, Lida Ghaderi, Hasan Rafati, Atousa Aliahmadi, and David Julian McClements. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of thymus daenensis essential oil against e. coli. *Food chemistry*, 194:410–415, 2016.
- [29] Francesco Donsì, Marianna Annunziata, Mariarosaria Vincenzi, and Giovanna Ferrari. Design of nanoemulsion-based delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. *Journal of biotechnology*, 159(4):342–350, 2012.

- [30] Nino Terjung, Myriam Löffler, Monika Gibis, Jörg Hinrichs, and Jochen Weiss. Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. *Food & function*, 3(3):290–301, 2012.
- [31] Francesco Donsì and Giovanna Ferrari. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of biotechnology*, 233:106–120, 2016.
- [32] AD Reyes-Figueroa, Mikko Karttunen, and JC Ruiz-Suárez. Cholesterol sequestration by xenon nano bubbles leads to lipid raft destabilization. *Soft Matter*, 16(42):9655–9661, 2020.
- [33] Mahmud Arif Pavel, E Nicholas Petersen, Hao Wang, Richard A Lerner, and Scott B Hansen. Studies on the mechanism of general anesthesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(24):13757–13766, 2020.
- [34] Joseph A Joyce. Xenon: anesthesia for the 21st century. *AANA J*, 68(3):259–264, 2000.
- [35] Hironori Tsuchiya. Structure-specific membrane-fluidizing effect of propofol. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 28(4):292–299, 2001.
- [36] GM Trapani, Cosimo Altomare, Enrico Sanna, Giovanni Biggio, and Gaetano Liso. Propofol in anesthesia. mechanism of action, structure-activity relationships, and drug delivery. *Current medicinal chemistry*, 7(2):249–271, 2000.
- [37] M Coburn, O Kunitz, J-H Baumert, K Hecker, S Haaf, A Zühlsdorff, T Becker, and R Rossaint. Randomized controlled trial of the haemodynamic

- and recovery effects of xenon or propofol anaesthesia. *British journal of anaesthesia*, 94(2):198–202, 2005.
- [38] Orrin Devinsky, J Helen Cross, Linda Laux, Eric Marsh, Ian Miller, Rima Nababout, Ingrid E Scheffer, Elizabeth A Thiele, and Stephen Wright. Trial of cannabidiol for drug-resistant seizures in the dravet syndrome. *New England Journal of Medicine*, 376(21):2011–2020, 2017.
- [39] Philip McGuire, Philip Robson, Wieslaw Jerzy Cubala, Daniel Vasile, Paul Dugald Morrison, Rachel Barron, Adam Taylor, and Stephen Wright. Cannabidiol (cbd) as an adjunctive therapy in schizophrenia: a multicenter randomized controlled trial. *American Journal of Psychiatry*, 175(3):225–231, 2018.
- [40] Stuart C Cullen and Erwin G Gross. The anesthetic properties of xenon in animals and human beings, with additional observations on krypton. *Science*, 113(2942):580–582, 1951.
- [41] Malvern Panalytical. Zetasizer aps user manual. manual on <https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/user-manuals/man0425en>, 2017.
- [42] Thomas Heimburg. *Thermal biophysics of membranes*. John Wiley & Sons, 2008.
- [43] Saeed Sadeghpour Galooyak and Bahram Dabir. Three-factor response surface optimization of nano-emulsion formation using a microfluidizer. *Journal of food science and technology*, 52(5):2558–2571, 2015.

- [44] Long Bai and David Julian McClements. Development of microfluidization methods for efficient production of concentrated nanoemulsions: Comparison of single- and dual-channel microfluidizers. *Journal of Colloid and Interface Science*, 466:206–212, 2016.
- [45] Gregory V Lowry, Reghan J Hill, Stacey Harper, Alan F Rawle, Christine Ogilvie Hendren, Fred Klaessig, Ulf Nobbmann, Philip Sayre, and John Rumble. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoemulsions. *Environmental Science: Nano*, 3(5):953–965, 2016.
- [46] Kim E Sapsford, Katherine M Tyner, Benita J Dair, Jeffrey R Deschamps, and Igor L Medintz. Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical chemistry*, 83(12):4453–4488, 2011.
- [47] Rakesh Kumar Tekade. *Biomaterials and Bionanotechnology*. Academic Press, 2019.
- [48] Ying Yang, Martin E Leser, Alexander A Sher, and David Julian McClements. Formation and stability of emulsions using a natural small molecule surfactant: Quillaja saponin (q-naturale®). *Food Hydrocolloids*, 30(2):589–596, 2013.
- [49] James K Beattie, Alex M Djerdjev, and Gregory G Warr. The surface of neat water is basic. *Faraday discussions*, 141:31–39, 2009.
- [50] Masayoshi Takahashi. ζ potential of microbubbles in aqueous solutions: electrical properties of the gas-water interface. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(46):21858–21864, 2005.

- [51] M Chaplin. Theory versus experiment. what is the charge at the surface of water. *Multidisciplinary Research Journal*, 2:1–28, 2009.
- [52] Neelkanth Nirmalkar, AW Pacek, and Mostafa Barigou. On the existence and stability of bulk nanobubbles. *Langmuir*, 34(37):10964–10973, 2018.
- [53] Qiaozhi Wang, Hui Zhao, Na Qi, Yan Qin, Xuejie Zhang, and Ying Li. Generation and stability of size-adjustable bulk nanobubbles based on periodic pressure change. *Scientific reports*, 9(1):1–9, 2019.
- [54] Gianluca Ferraro, Ananda J Jadhav, and Mostafa Barigou. A henry’s law method for generating bulk nanobubbles. *Nanoscale*, 12(29):15869–15879, 2020.
- [55] Mingbo Li, Xiaotong Ma, Julian Eisener, Patricia Pfeiffer, Claus-Dieter Ohl, and Chao Sun. How bulk nanobubbles are stable over a wide range of temperatures. *Journal of Colloid and Interface Science*, 596:184–198, 2021.
- [56] LG Gibilaro, K Gallucci, R Di Felice, and P Pagliai. On the apparent viscosity of a fluidized bed. *Chemical engineering science*, 62(1-2):294–300, 2007.
- [57] Maninder Khurana, Zhenyuan Yin, and Praveen Linga. A review of clathrate hydrate nucleation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 5(12):11176–11203, 2017.
- [58] Stanley L Miller. A theory of gaseous anesthetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47(9):1515, 1961.

- [59] Liam C Jacobson, Waldemar Hujo, and Valeria Molinero. Amorphous precursors in the nucleation of clathrate hydrates. *Journal of the American Chemical Society*, 132(33):11806–11811, 2010.
- [60] Barclay Kamb. Structure of ice vi. *Science*, 150(3693):205–209, 1965.
- [61] Satoshi Takeya and Akihiro Hachikubo. Structure and density comparison of noble gas hydrates encapsulating xenon, krypton and argon. *ChemPhys-Chem*, 20(19):2518–2524, 2019.
- [62] Raquel Yanes-Rodríguez, Adriana Cabrera-Ramírez, and Rita Prosimiti. Delving into guest-free and he-filled si and sii clathrate hydrates: a first-principles computational study. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, pages–, 2022.
- [63] Angela M Jaramillo-Granada, AD Reyes-Figueroa, and JC Ruiz-Suárez. Xenon and krypton dissolved in water form nanoblobs: No evidence for nanobubbles. *Physical Review Letters*, 129(9):094501, 2022.
- [64] Paulo Siani, Edoardo Donadoni, Lorenzo Ferraro, Francesca Re, and Cristiana Di Valentin. Molecular dynamics simulations of doxorubicin in sphingomyelin-based lipid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1864(1):183763, 2022.
- [65] R Pérez-Isidoro and M Costas. The effect of neuroleptic drugs on dppc/sphingomyelin/cholesterol membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 229:104913, 2020.
- [66] Derek Marsh. *Handbook of lipid bilayers*. CRC press, 2013.

- [67] D Bach, A Raz, and Rachel Goldman. The effect of hashish compounds on phospholipid phase transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 436(4):889–894, 1976.
- [68] Escarlin Perez, Jasmin Ceja-Vega, Michael Krmic, Alondra Gamez Hernandez, Jamie Gudyka, Riley Porteus, and Sunghee Lee. Differential interaction of cannabidiol with biomembranes dependent on cholesterol concentration. *ACS Chemical Neuroscience*, 2022.
- [69] Todd PW McMullen and Ronald N McElhaney. Physical studies of cholesterol-phospholipid interactions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 1(1):83–90, 1996.
- [70] Todd PW McMullen, Ruthven NAH Lewis, and Ronald N McElhaney. Differential scanning calorimetric study of the effect of cholesterol on the thermotropic phase behavior of a homologous series of linear saturated phosphatidylcholines. *Biochemistry*, 32(2):516–522, 1993.
- [71] Pooria Nakhaei, Ria Margiana, Dmitry O Bokov, Walid Kamal Abdelbasset, Mohammad Amin Jadidi Kouhbanani, Rajender S Varma, Farooq Marofi, Mostafa Jarahian, and Nasrin Beheshtkhoo. Liposomes: Structure, biomedical applications, and stability parameters with emphasis on cholesterol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 2021.
- [72] Maria Ricci, Rosario Oliva, Pompea Del Vecchio, Marco Paolantoni, Assunta Morresi, and Paola Sassi. DmsO-induced perturbation of thermotropic properties of cholesterol-containing dppc liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1858(12):3024–3031, 2016.

- [73] FJ Sierra-Valdez and JC Ruiz-Suárez. Noble gases in pure lipid membranes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(11):3167–3172, 2013.
- [74] Muidh Alheshibri and Vincent SJ Craig. Generation of nanoparticles upon mixing ethanol and water; nanobubbles or not? *Journal of colloid and interface science*, 542:136–143, 2019.
- [75] Dmytro Rak, Michaela Ovadová, and Marián Sedlák. (non) existence of bulk nanobubbles: the role of ultrasonic cavitation and organic solutes in water. *The journal of physical chemistry letters*, 10(15):4215–4221, 2019.
- [76] Rosendo Pérez-Isidoro, FJ Sierra-Valdez, and JC Ruiz-Suárez. Anesthetic diffusion through lipid membranes depends on the protonation rate. *Scientific reports*, 4(1):1–9, 2014.
- [77] Anders Højgaard Hansen, Kristian Tølbøl Sørensen, Richard Mathieu, Alois Serer, Lars Duelund, Himanshu Khandelia, Per Lyngs Hansen, and Adam Cohen Simonsen. Propofol modulates the lipid phase transition and localizes near the headgroup of membranes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 175-176:84–91, 2013.
- [78] RE Pagano, RJ Cherry, and D Chapman. Phase transitions and heterogeneity in lipid bilayers. *Science*, 181(4099):557–559, 1973.
- [79] J Antoinette Killian. Hydrophobic mismatch between proteins and lipids in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1376(3):401–416, 1998.

- [80] Anthony G Lee. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1666(1-2):62–87, 2004.