



**FACULTADE DE FÍSICA
DEPARTAMENTO DE FÍSICA APLICADA
GRUPO DE BIOFÍSICA E INTERFASES**

**ESTABILIDAD COLOIDAL DE
NANOESTRUCTURAS LIPOSÓMICAS**

**TESIS DOCTORAL
Juan D. Sabín Fernández
Enero 2007**



DEPARTAMENTO DE FÍSICA APLICADA
FACULTADE DE FÍSICA
GRUPO DE BIOFÍSICA E INTERFASES
Campus universitario sur,
15782 Santiago de Compostela.
Tel. +34 981563100
Fax: +34 981520676

Félix Miguel Sarmiento Escalona, Catedrático de Física Aplicada y **Gerardo Prieto Estévez**, Profesor Titular de Física Aplicada, adscritos al Departamento de igual denominación de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN,

Que el trabajo titulado *Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas*, ha sido realizado por **D. Juan Daniel Sabín Fernández** bajo nuestra dirección en los siguientes laboratorios: Grupo de Biofísica e Interfases del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Santiago, Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides del Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Granada, Unidad de Fisicoquímica de la Universidad de Barcelona, Departamento de Física de la "Università La Sapienza" de Roma y Departamento de Físico-Química de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, constituyendo la memoria que presenta para optar al grado de Doctor en Física.

Santiago de Compostela, a 23 de enero de 2007

Fdo. Félix M. Sarmiento Escalona

Fdo. Gerardo Prieto Estévez

Índice General

Prólogo	3
Capítulo 1: Liposomas	5
1.1. Componentes y Estructura de los Liposomas	10
1.2. Propiedades de los Liposomas	14
1.3. Clasificación de los Sistemas Liposómicos	22
1.4. Preparación de Liposomas	25
1.5. Bibliografía	35
Capítulo 2: Técnicas Experimentales	37
2.1. Difusión de Luz	40
2.2. Movilidades Electroforéticas: Potencial Zeta (ζ)	55
2.3. Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)	67
2.4. Espectrofotometría de Fluorescencia	72
2.5. Calorimetría Diferencial de Barrido	75
2.6. Bibliografía	81
Capítulo 3: Estabilidad Coloidal de los Liposomas	83
3.1. Teoría Clásica DLVO	87
3.2. Agregación	94
3.3. Fusión	97
3.4. Regla de Schulze-Hardy	100
3.5. Teoría dlvo Ampliada	101
3.6. Resultados y Discusión	114
3.7. Conclusiones	149
3.8. Bibliografía	151
Capítulo 4: Inestabilidad Coloidal de los Liposomas	157
4.1. Geometría Fractal	160
4.2. Geometría Fractal en Coloides	166
4.3. Cálculo de la Dimensión Fractal en Liposomas	171
4.4. Resultados y discusión	178
4.5. Conclusiones	209
4.6. Bibliografía	211
Capítulo 5: Liposomas Fluorados	215
5.1. El Flúor	219
5.2. Estructuras Coloidales Fluoradas	222
5.3. Liposomas Fluorados	224
5.4. Los Dibloques Semifluorados FnHm	225
5.5. Resultados y Discusión	227
5.6. Conclusiones	259
5.7. Bibliografía	260
Capítulo 6: Conclusiones	263

Prólogo

El trabajo de investigación presentado en esta tesis para optar al grado de Doctor en Física ha sido realizado en el *Grupo Biofísica e Interfases (GBI)* del Departamento de Física Aplicada de la *Facultade de Física da Universidade de Santiago de Compostela*, bajo la dirección de los Doctores Félix Miguel Sarmiento Escalona y Gerardo Prieto Estévez. La investigación realizada está enmarcada dentro de los proyectos “*Materiales altamente fluorados como sistemas coloidales y sus aplicaciones biotecnológicas*” (MAT2002-00608) y “*Sistemas nanoheterogéneos con componentes fluorados. Preparación, caracterización, estabilidad coloidal e interacciones con proteínas*” (MAT2005-02421) financiados por el *Ministerio de Ciencia y Tecnología, Ministerio de Educación y Ciencia* y la

Dirección Xeral de Investigación e Desenvolvemento da Consellería de Innovación, Industria e Comercio da Xunta de Galicia.

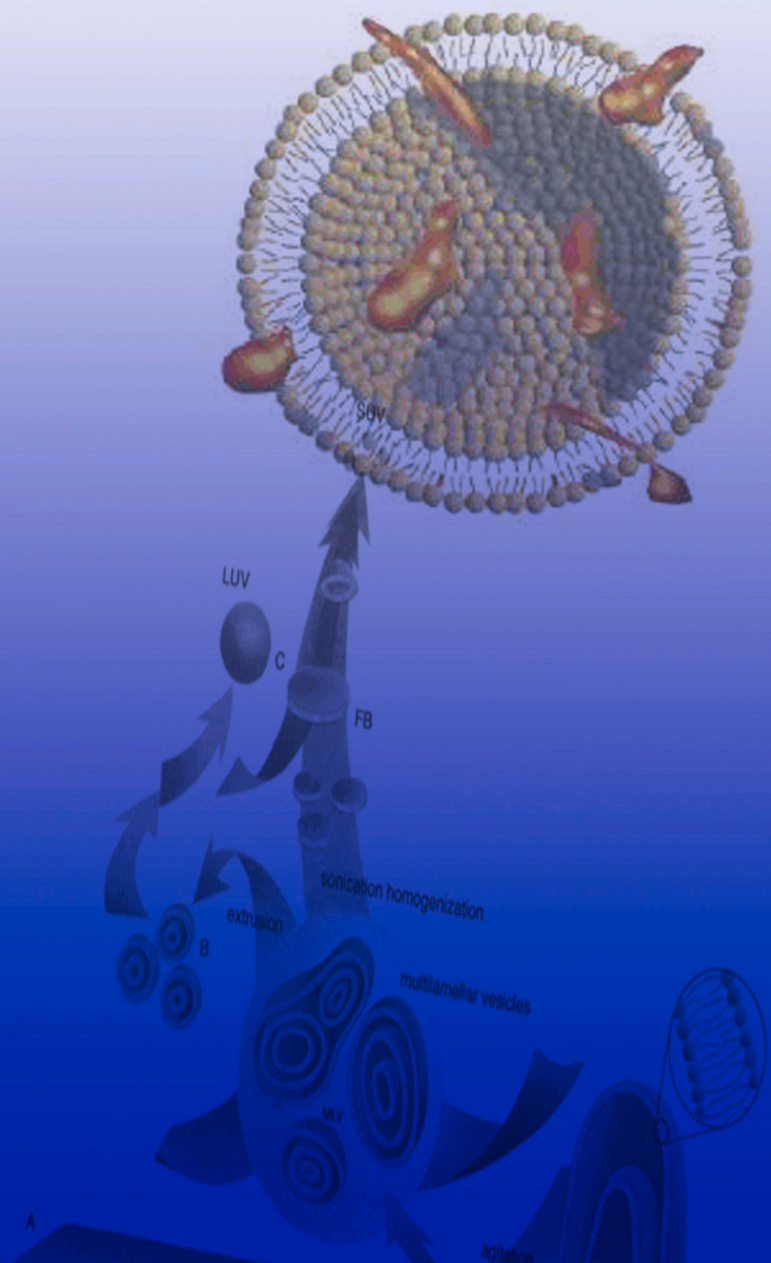
Parte del trabajo experimental se ha realizado en colaboración con los siguientes grupos de investigación: *Grupo de Física de Flúidos y Biocoloides de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, Unitat de Fisicoquímica de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona, Dipartimento di Física de la Università di Roma “La Sapienza” y Departamento de Físico-Química de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.*

La tesis que se presenta a continuación muestra el estudio y las conclusiones de la investigación en la estabilidad de liposomas convencionales y de liposomas fluorados en presencia de distintos iones mono, di y trivalentes. En el *capítulo 1 y 2* se hace una introducción al campo de los liposomas y a las técnicas experimentales empleadas. El *capítulo 3* está referido a las fuerzas que intervienen en la estabilidad coloidal de los liposomas. En él se muestran resultados de la aplicabilidad de la teoría DLVO para predecir la estabilidad de los distintos sistemas y se estudia la importancia de las fuerzas osmóticas y de las fuerzas de hidratación en el comportamiento de los liposomas. En el *capítulo 4* se estudia la inestabilidad de los liposomas y los mecanismos de agregación a través del cálculo de la dimensión fractal de los agregados. En el *capítulo 5* se hace una caracterización de liposomas obtenidos al introducir dibloques semifluorados en la membrana lipídica de los liposomas. Por último, el *capítulo 6* muestra las conclusiones generales de toda la tesis a modo de resumen.

Se ha decidido mostrar parte de los datos experimentales a través de los artículos publicados en revistas de la especialidad para presentar cada estudio de forma más clara y compacta, y para que puedan ser leídos de forma independiente del resto del texto.

Capítulo 1

Liposomas



Capítulo 1

Liposomas

Los liposomas son vesículas submicroscópicas con una cavidad central acuosa envuelta por una o más bicapas lipídicas separadas las unas de las otras por espacios acuosos. La cavidad puede variar entre 20 nm y decenas de μm , mientras que el espesor de la membrana es de alrededor de 4 nm [Lasic (1993)]. Tienen una estructura de membrana similar a las biológicas y por eso se utilizan ampliamente en Biofísica como modelos de membranas [New (1990)].

El estudio de los liposomas se remonta a mucho tiempo antes de descubrirse sus propiedades únicas y antes de atisbar sus múltiples aplicaciones

En 1850, el científico francés Maurice Goble descubrió la estructura de las lecitinas; un tipo de fosfolípidos, principales componentes de los liposomas. Les denominó “lekithos”; término griego para denominar la procedencia de la yema de huevo. A principio de siglo, Lehmann obtuvo las primeras micrografías de lo que hoy se conoce como *liposomas multilamelares grandes* y dio lugar al estudio de las estructuras que forman las lecitinas en agua.

Estas investigaciones tomaron mayor relevancia cuando en 1925, los investigadores Gorter y Grendel [Gorter y Grendel (1925)], propusieron con un sencillo experimento, que las membranas biológicas de las células estaban formadas por una doble capa de lecitinas. El experimento consistía en aislar una cantidad conocida de glóbulos rojos (eritrocitos) que colocaron sobre la superficie del agua, de manera que formaran una capa de una sola molécula de grosor y midieron el área. Teniendo en cuenta la forma y las dimensiones de los glóbulos rojos, calcularon el área, encontrando que era la mitad del área de las lecitinas dispersas. De esta sencilla forma Gorter y Grendel propusieron que las lecitinas deberían estar formando una doble capa en la membrana con las zonas apolares opuestas y alejadas del agua.

En 1965, Bangham creó, sin proponérselo, los primeros liposomas en un laboratorio mientras valoraba el efecto de los fosfolípidos en la coagulación sanguínea. Cuando Bangham añadió agua a un matraz que contenía una fina película lipídica, el agua forzó a las moléculas de grasa a disponerse

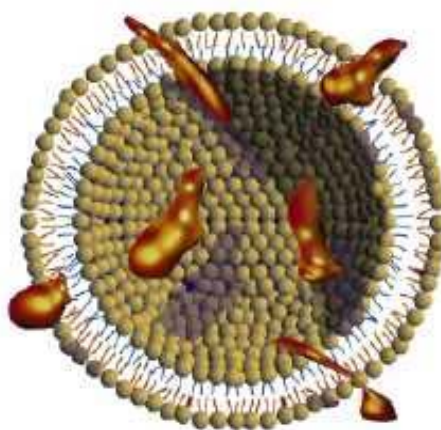


Figura 1.1. Sección transversal de un liposoma encapsulando otras moléculas

en lo que más tarde descubrió que eran vesículas microscópicas cerradas que constaban de una membrana fosfolipídica en forma de bicapa que atrapaba agua del medio [Bangham *et al.* (1965)] [Bangham y Horn. (1964)].

Desde entonces, múltiples laboratorios de todo el mundo centran sus investigaciones en el estudio de las propiedades de los liposomas, gracias a lo cual se conocen cada vez más sus aplicaciones en diversos campos de la ciencia y la tecnología:

- Como modelo experimental de membranas y células en el campo de la Biofísica [Singer y Nicolson (1972)].
- Como sistemas de transporte para la liberación controlada de medicamentos [Poznansky y Juliano (1984)].
- En la industria alimenticia y cosmética [Cevc y Blume (1992)].
- En la administración de genes terapéuticos y en terapias contra el cáncer [Mastrobattista *et al.* (1999)].

En resumen, podemos decir que se han abierto interesantes perspectivas futuras para los sistemas liposómicos ya que a su funcionalidad y versatilidad de empleo se añade el hecho de que sus componentes poseen baja toxicidad, no son irritantes, son biodegradables y pueden incorporar una gran variedad de fármacos tanto de naturaleza hidrófila (dentro de su interior acuoso) como de naturaleza hidrófoba (en medio de la membrana) [Jones y Chapman (1995)].

1.1. COMPONENTES Y ESTRUCTURA DE LOS LIPOSOMAS

1.1.1. MOLÉCULAS ANFIFÍLICAS

Debido a la polaridad de la molécula de agua, la solubilidad de otras moléculas en medios acuosos está definida por su polaridad. La mayoría de las sustancias apolares son prácticamente insolubles en ella ya que la atracción entre los “*polos*” de agua no permite que entren otras moléculas apolares.

Sin embargo, las moléculas con cierta polaridad pueden intercalarse con más facilidad entre las moléculas de agua orientando sus *polos* positivos hacia los *polos* negativos del agua y viceversa, para evitar las repulsiones.

Pero existen en la naturaleza moléculas que no se pueden clasificar estrictamente en moléculas polares o apolares, ya que poseen ambas cualidades a la vez. Son las llamadas moléculas anfifílicas o anfipáticas (del griego; *anfi*:ambos) que están constituidas de dos partes:

- **Parte liófila**, que está formada por una cabeza polar y presenta una gran atracción por el disolvente.
- **Parte liófoba**, que suele estar constituida por una, dos o tres cadenas hidrocarbonadas y presenta poca atracción por el disolvente.

Cuando el disolvente es el agua ambas partes se conocen respectivamente como *parte hidrófila* y *parte hidrófoba*.

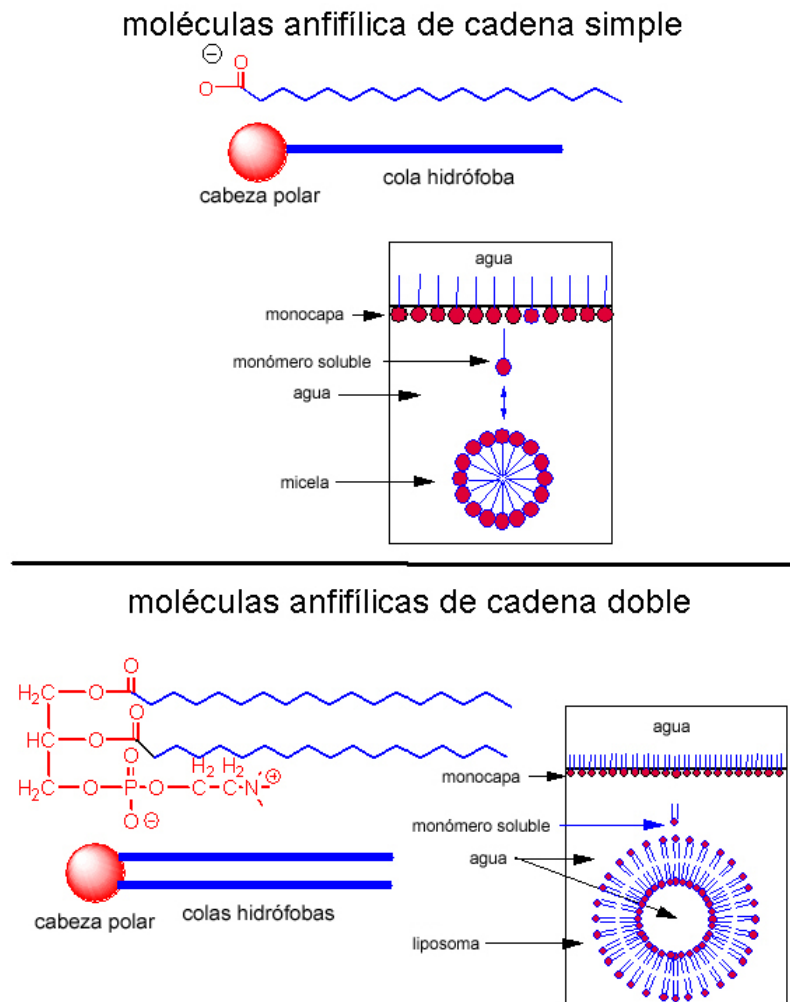


Figura 1.2. Esquema de moléculas anfifílicas de cadena simple y doble.

En disolución acuosa estas moléculas se autoensamblan con el fin de minimizar las repulsiones de las partes hidrófobas con el agua, creando diferentes estructuras que pueden ir desde micelas hasta microtubos.

1.1.2. LOS FOSFOLÍPIDOS

Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas cuya parte hidrófoba está constituida por dos o más colas hidrocarbonadas. Son miembros de una gran familia de ácidos grasos. Su principal característica es que juegan un papel estructural y metabólico muy importante en las células de los seres vivos. Normalmente están compuestos por un grupo fosfato, dos alcoholes y dos o más ácidos grasos. En un extremo de la molécula se encuentra el grupo fosfato y un alcohol. Esta zona es la cabeza polar, es decir, tiene carga eléctrica y es atraída por el agua (parte hidrófila). El otro extremo está formado por los ácidos grasos, es neutro, hidrófobo e insoluble en agua, pero soluble en grasas.

En general la estructura de los fosfolípidos puede ser representada como muestra la figura 1.3., siendo R_3 la cabeza polar que confiere la carga a los fosfolípidos. En la tabla 1.1 se muestran las moléculas más frecuentes de las cabezas polares. R_1 y R_2 representan las dos colas hidrofóbicas que normalmente tienen entre 12 y 18 carbonos y que pueden ser hidrocarburos saturados o insaturados.

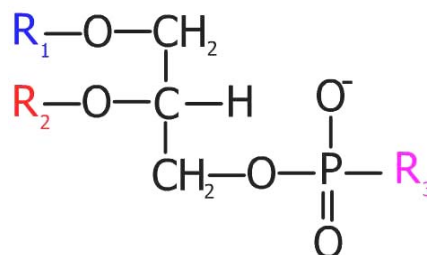


Figura 1.3. Molécula de fosfolípido

La naturaleza anfifílica convierte a los fosfolípidos en constituyentes fundamentales de las membranas; formando una estructura de doble capa llamada bicapa lipídica, gracias a su propia autoasociación, con la cabeza polar hacia el exterior de la superficie e interaccionando con el agua y sus colas neutras dirigidas hacia el interior y juntándose unas con otras. Las bicapas lipídicas son entonces estructuras cooperativas que se mantienen juntas mediante muchas interacciones no

covalentes que las refuerzan y por tanto estas estructuras tenderán a cerrarse en sí mismas, de tal manera que no existan extremos con cadenas hidrocarbonadas expuestas.

Los fosfolípidos, al igual que todas las moléculas de carácter anfifílico, pueden clasificarse según la carga de la cabeza polar [Rosen (1978)] como aniónicos (cabeza polar cargada negativamente), catiónicos (cabeza polar cargada positivamente), zwitteriónicos (la cabeza polar puede tener tanto carga negativa como positiva dependiendo del medio) y no iónicos (la cabeza polar no tiene carga). La elección de los fosfolípidos a la hora de la preparación de liposomas debe de estar de acuerdo con el objetivo que se persigue, que, en último término, es hacer viable una aplicación particular. Así, la inclusión de fosfolípidos cargados dota de su carga respectiva a la superficie de los liposomas.

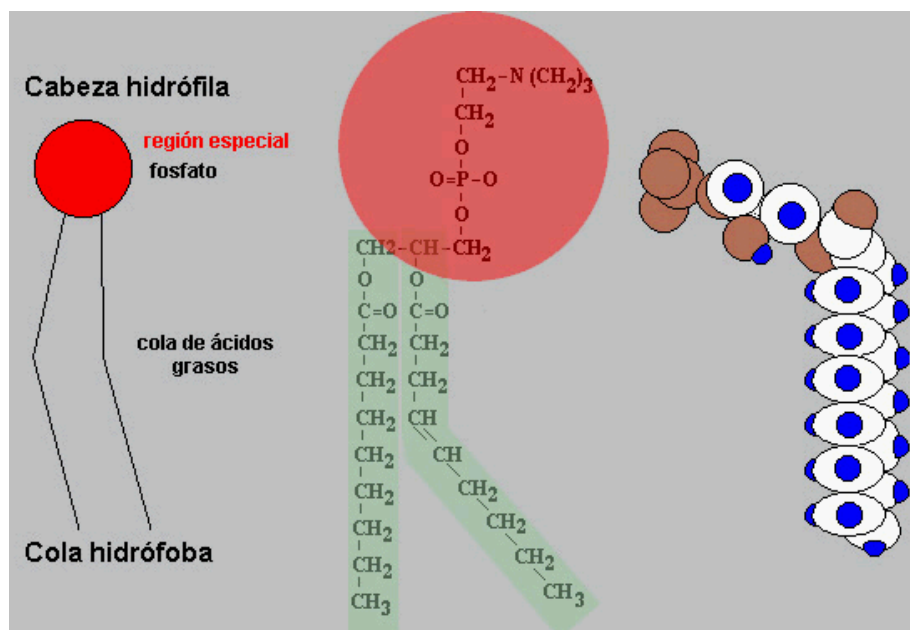


Figura 1.4. Estructura típica de la fosfatidilcolina

El comportamiento de los liposomas no sólo varía dependiendo de la composición química, sino que también influyen propiedades como: número de láminas, tamaño y volumen interno. Adquiere entonces gran importancia usar métodos de preparación que produzcan liposomas bien definidos con respecto a todos estos parámetros [Woodle y Papahadjopoulos (1989)]. Lo más interesante de los liposomas es que su interior suele ser acuoso y eso hace posible preparar vesículas con distintas sustancias atrapadas en su interior.

En realidad, tanto el entorno externo como el interno puede ser manipulado, lo que permite llevar a cabo estudios sobre una serie de propiedades, entre ellas: su capacidad para excluir moléculas, su interacción con diversas sustancias y su estabilidad en diferentes condiciones.

1.2. PROPIEDADES DE LOS LIPOSOMAS

Permeabilidad: Las membranas lipídicas de los liposomas son semi-permeables. Ya en los años 50 Collander [Collander (1954)] haciendo investigaciones sobre el alga *Nitella*, encontró que las sustancias que pueden pasar a través de la membrana están en muy estrecha relación con su solubilidad en las grasas. En el mismo experimento de Collander también se mostraba que el agua difiere del comportamiento general de otras sustancias. Siendo poco soluble en grasas, entra con gran facilidad en las membranas de los liposomas. Este comportamiento no tiene una explicación clara hasta ahora aunque las últimas investigaciones apuntan a la existencia de poros en la membrana provocados por imperfecciones en la doble capa de lípidos [Paula *et al.* (1996); Jansen y Blume (1995)].

El grado de difusión a través de las membranas lipídicas puede variar mucho de unas moléculas a otras. Por ejemplo, las moléculas que tengan una alta solubilidad tanto en agua como en grasas pueden atravesar las paredes de los liposomas de forma eficaz, mientras que solutos como la glucosa o componentes de alta masa molecular se difunden a través de la bicapa muy lentamente. Moléculas pequeñas y neutras puede atravesar la membrana de forma rápida, mientras que los iones se comportan de diferente manera dependiendo de su tamaño y de la afinidad con las cabezas polares de los fosfolípidos que forman la membrana.

A pesar de que hemos hablado de los fosfolípidos como componentes básicos de las membranas, lo cierto es que en las membranas biológicas (células) ciertas proteínas tienen un papel importantísimo en la estructura y funcionalidad de la bicapa. Muchos grupos proteicos incrustados en el seno de la bicapa lipídica funcionan como reguladoras del *tráfico* de sustancias a través de la membrana (figura 1.5).

Estas proteínas pueden tener una gran especificidad y funcionar como barreras selectivas dependiendo del tipo de ión, tamaño, concentración del interior y exterior de la célula, funcionalidad, etc... [Peña (1986)]

El estudio de la permeabilidad de las membranas a distintas sustancias de interés terapéutico es de relevancia para la aplicación de estos sistemas como transportadores de fármacos y para su liberación controlada.

En el capítulo 3 de esta tesis, se estudian las fuerzas osmóticas como consecuencia de la impermeabilidad de la membrana a ciertos iones, y los cambios estructurales y de tamaño que estas fuerzas pueden provocar en los liposomas.

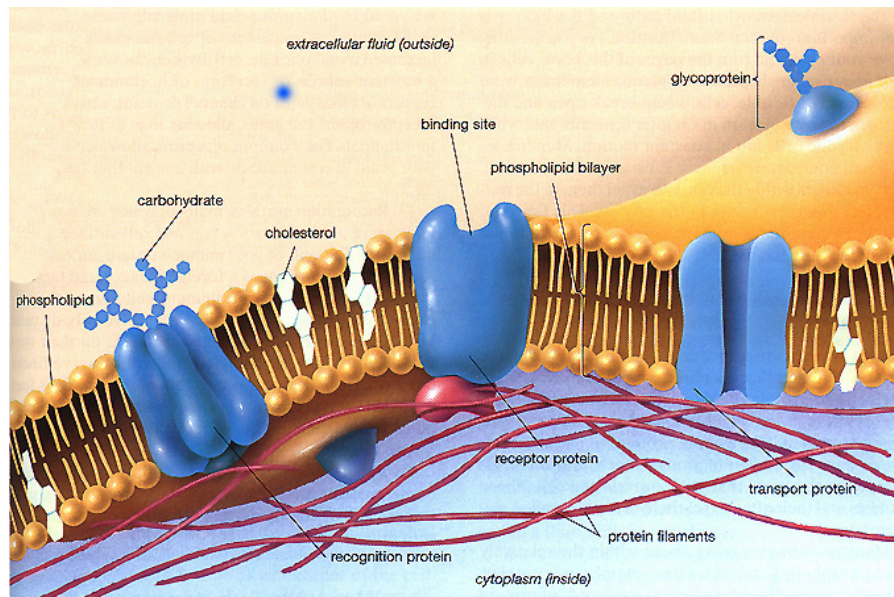


Figura 1.5. Las membranas celulares tienen proteínas intercaladas entre los fosfolípidos

Carga superficial: La carga superficial de los liposomas crea un campo eléctrico que afecta a la estructura de la bicapa, a su fluidez y al transporte de moléculas a través de la membrana [Cevc y Marsh 1984]. Además la carga superficial juega un papel trascendental en la estabilidad coloidal de los liposomas. Los procesos de agregación y fusión de liposomas están controlados, en gran parte, por la repulsión o atracción de sus superficies lipídicas.

La carga superficial de los liposomas depende de la composición fosfolipídica de la bicapa. En la tabla 1.1 aparece la fórmula y estructura genérica de algunos fosfolípidos de membrana con la correspondiente carga de la cabeza polar.

Región polar	Nombre	Abrev.	Carga
-OH	ácido fosfatídico	PA	Negativa
-CH ₂ CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃	Fosfatidilcolina	PC	Zwiteriónico
-CH ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	Fosfatidiletanolamina	PE	Zwiteriónico
-CH ₂ CHNH ₃ ⁺ COO ⁻	Fosfatidilserina	PS	Negativa
-CH ₂ CHOHCH ₂ OH	Fosfatidilglicerol	PG	Negativa
-HC ₆ H ₅ (OH) ₅	Fosfatidilinositol	PI	Negativa

Tabla 1.1. Nombres y estructuras de algunas cabezas polares típicas.

La agregación de liposomas neutros es producida por las interacciones de Van der Waals y tiende a ser más pronunciada en vesículas largas, donde el incremento en la planaridad de las membranas permite áreas más grandes en contacto unas con otras. Se trata de un fenómeno natural e inevitable para membranas sin carga, y el camino para vencerla es la introducción de carga en la mezcla de lípidos [New (1990)]. La repulsión electrostática es suficiente para estabilizar liposomas in vitro. Los fosfolípidos cargados negativamente se añaden en muchas preparaciones en forma de fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI). Este tipo de fosfolípidos decrece la tendencia de los liposomas de fosfatidilcolina a agregarse y puede incrementar la eficiencia de encapsulación de ciertos medicamentos gracias a la mejora del volumen interno y a las interacciones entre cargas [Woodle y Papahadjopoulos, 1989].

En el capítulo 3 de esta tesis se hace un estudio de la estabilidad coloidal de los liposomas bajo la teoría de estabilidad coloidal DLVO [Deryagin y Landau (1941)][Verwey y Overbeek (1948)], teniendo en cuenta la carga superficial a distintas concentraciones de electrolito.

Transiciones de fase de la bicapa lipídica: Una de las características más importantes de los liposomas es la fluidez o movilidad de la bicapa lipídica, la cual depende de la temperatura. Existen transiciones de fase en la movilidad de las cabezas y de las colas de los fosfolípidos que son especialmente útiles para la caracterización de los liposomas.

A bajas temperaturas los lípidos se encuentran en un estado gel cristalino, estructura más bien rígida, donde su movilidad está restringida (figura 1.6). Al aumentar la temperatura se produce una pretransición de fase que tiene que ver con el aumento en la movilidad rotacional de las cabezas lipídicas y la aparición de ondulaciones en la superficie de los liposomas. A mayores temperaturas tiene lugar una transición en la movilidad de las colas de los fosfolípidos. Es una transición termotrópica en la estructura laminar de la bicapa, hacia un estado líquido cristalino, en el que la fluidez es mayor: se produce un incremento en la libertad rotacional y en el área por lípido de las cadenas de ácidos grasos de la bicapa. La temperatura de la transición de fase en la cual las cadenas de ácidos grasos se funden se denota por T_c . La formación de liposomas se produce a una temperatura superior a la T_c de los lípidos que los constituyen y de ahí la importancia de conocer esta temperatura. Esta temperatura es función de las propiedades físico-químicas de la bicapa y de la naturaleza del medio. Así, por ejemplo, la T_c para la fosfatidilcolina se desplaza a temperaturas mayores al incrementar la longitud de las cadenas de ácidos grasos [New (1990)] y, a su vez, también puede aumentar con la adición de sales al medio [Garidel y Blume (1999)]. En los liposomas preparados a partir de un único tipo de fosfolípido, la temperatura de cambio de fase T_c es bastante precisa, siendo la temperatura crítica más alta para lípidos saturados que para lípidos insaturados. Por el contrario, en los liposomas constituidos por una mezcla de lípidos la temperatura de transición de fase no es precisa dada la composición química heterogénea [Ostro (1983)].

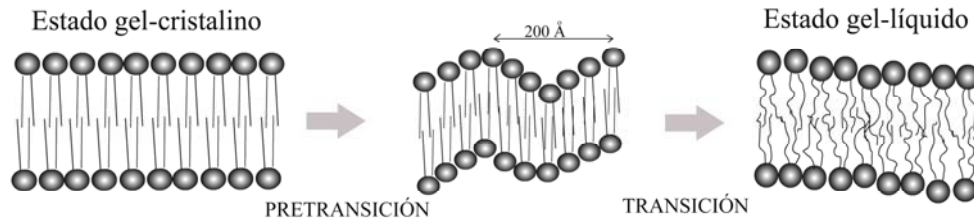


Figura 1.6. Representación de la transición de la fase gel-cristalina a la fase líquido-cristalina donde aumenta la fluidez de la membrana

Empaquetamiento: Geométricamente, los fosfolípidos se diferencian de otras moléculas anfifílicas (tensoactivo, lysolecitasas,..) en la estructura tubular que le confiere la existencia de dos cadenas de ácidos grasos. Esta estructura tubular en disolución acuosa tiende a asociarse para minimizar las repulsiones hidrofóbicas de las colas en forma de lamelas, a diferencia de los tensoactivos con una única cola hidrofóbica, que poseen una estructura cónica y *prefieren* agregarse en forma de micela [Israelachvili (1985)].

A la hora de modelar el tipo de agregación y el empaquetamiento de las moléculas anfifílicas se suele definir el parámetro de empaquetamiento crítico P_c como [Israelachvili (1992)]:

$$P_c = v/a_c l_c \quad [1.1]$$

siendo v el volumen de la molécula anfifílica, a_c el área crítica de la cabeza polar y l_c la longitud crítica de las cadenas hidrocarbonadas. Para lípidos de una sola cola hidrofóbica, la cabeza polar es relativamente grande comparada con la cola ($v < a_c l_c$) y se agregan en forma de micelas esféricas si $P_c < 1/3$ o micelas de *rodlike* (rodillo) si $1/3 < P_c < 1/2$. Los lípidos de doble cadena, al tener una estructura geométrica similar a un tubo cilíndrico, cumple la relación $v \sim a l$, es decir, $1/2 < P_c < 1$ y se autoagregan en forma de lamelas, micelas de disco o liposomas. Existen algunos lípidos de doble cadena que debido a su estructura tienen un área

de la cabeza polar pequeña comparado con la sección de la colas y cumplen que $v > a_c l_c$ y $P_c > 1$. Estos lípidos suelen formar estructuras de micelas inversas. La tabla 1.2 resume las distintas estructuras que pueden formar las moléculas anfifílicas dependiendo de su parámetro de empaquetamiento [Cevc y Marsh (1984)].

Del empaquetamiento de los fosfolípidos en la membrana de los liposomas depende en gran parte la fluidez y la permeabilidad de los liposomas. El empaquetamiento de una membrana compuesta de mezcla de fosfolípidos también puede facilitar la existencia de poros o canales de agua a través de la membrana.

Cierta configuración de fosfolípidos o de mezclas de lípidos pueden obligar a los liposomas a formarse de forma espontánea en determinados tamaños para provocar que el empaquetamiento en la membrana sea el que minimice las fuerzas hidrofóbicas de las colas de los fosfolípidos.

A su vez el empaquetamiento de los fosfolípidos depende fuertemente de la temperatura y de las transiciones de fase de la membrana de los liposomas. En la fase rígida (gel-cristalina) la membrana es mas compacta y el área por lípido es mucho mas pequeña que en la fase fluido (gel-líquida) donde desaparecen muchas de las interacciones entre las colas de los fosfolípidos, el área por lípido aumenta y la membrana tiene mayor fluidez.

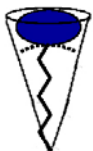
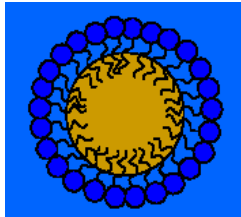
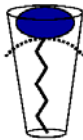
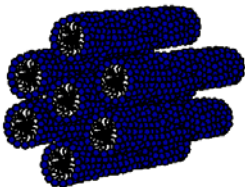
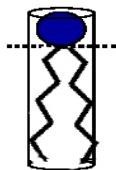
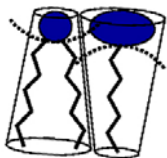
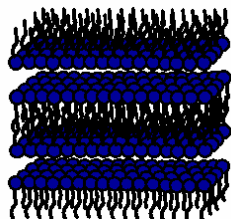
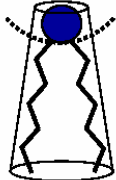
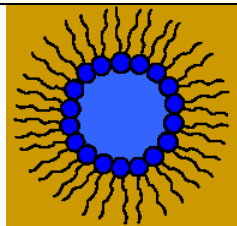
LÍPIDOS	FORMA	P_c	ORGANIZACIÓN	FASE
Jabones Detergentes Lysofosfolípidos		$P_c < 1/3$		Micelas esféricas
Mezcla de surfactantes		$1/3 < P_c < 1/2$		Micelas cilíndricas
Fosfolípidos		$1/2 < P_c < 1$		Bicapas
Mezcla de fosfolípidos		$P_c \sim 1$		Bicapas
Fosfatidil- etanoaminas Acidos fosfatídicos Colesterol Cardiolipin		$P_c > 1$		Micelas inversas

Tabla 1.2. Esquema de las diferentes estructuras de autoorganización dependiendo del parámetro de empaquetamiento de la molécula anfifílica

1.3. CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS LIPOSÓMICOS

Los liposomas pueden ser caracterizados por su forma y tamaño. El diámetro de los liposomas puede variar desde 25 nm hasta 10000 nm. En este caso, los liposomas son visibles a través de un microscopio y equivale aproximadamente al diámetro de las células vivas. En cuanto a su forma, pueden estar constituidos por una simple bicapa o por múltiples bicapas concéntricas. Podemos definir las siguientes categorías:

1. ***Liposomas multilamelares grandes (LMG)***: Los tamaños de estos liposomas suelen ser mayores a 3000 nm. Cada liposoma consiste en cinco o más láminas concéntricas de fosfolípidos en las que el compartimiento acuoso está muy reducido. Fueron los primeros liposomas preparados por Bangham [Bangham *et al.* (1965)] formados simplemente por la dispersión de los fosfolípidos en un medio acuoso.
2. ***Liposomas unilamelares pequeños (LUP)***: Estos liposomas tienen diámetros del orden de 25-50 nm. Estos límites varían ligeramente según la fuerza iónica del medio y la composición de lípidos de la membrana [Jones y Chapman, (1995); New (1990)]. Contienen una simple bicapa y normalmente se obtienen sometiendo las vesículas multilaminares a sonicación.
3. ***Liposomas unilamelares grandes (LUG)***: Surgieron debido a las limitaciones que presentaban tanto las LMG como las LUP para modelos de ciertos sistemas. Son vesículas con una simple bicapa y de diámetros entre 50-1000 nm [New (1990)].

Una forma de producir vesículas unilamelares grandes del orden de 100 nm de diámetro es por extrusión de vesículas multilamelares, preparadas por simple rehidratación de una película de lípido en un medio tamponado acuoso, a través de filtros de tamaño de poro controlado usando alta presión (800 psi). Esta técnica fue desarrollada por Hope y colaboradores en 1983 [Hope *et al.* (1983)], quienes definieron tales vesículas como LTE (liposomas por la técnica de extrusión). Otros términos usados en la bibliografía son LEI (liposomas por evaporación de la fase inversa) y LMV (liposomas multivesiculares) [Jones y Chapman, (1995); New (1990)], pero en esta tesis solo nos referimos a los LUG y LMG.

Los sistemas liposómicos también se caracterizan por el volumen interno y la lamellaridad. El volumen interno, definido como el volumen encerrado por una cantidad dada de lípido, oscila entre 0.2-1.5 litros por mol de lípido para las vesículas unilamelares pequeñas a 1-4 litros por mol de lípido para los liposomas multilamelares, aunque depende también del tamaño y del número de lamelas por vesícula [Jones y Chapman, (1995), Lasic (1993)]. La gran ventaja de las vesículas unilamelares grandes es que el volumen capturado es mayor que en el caso de otros liposomas, de ahí su gran importancia en la encapsulación de fármacos.

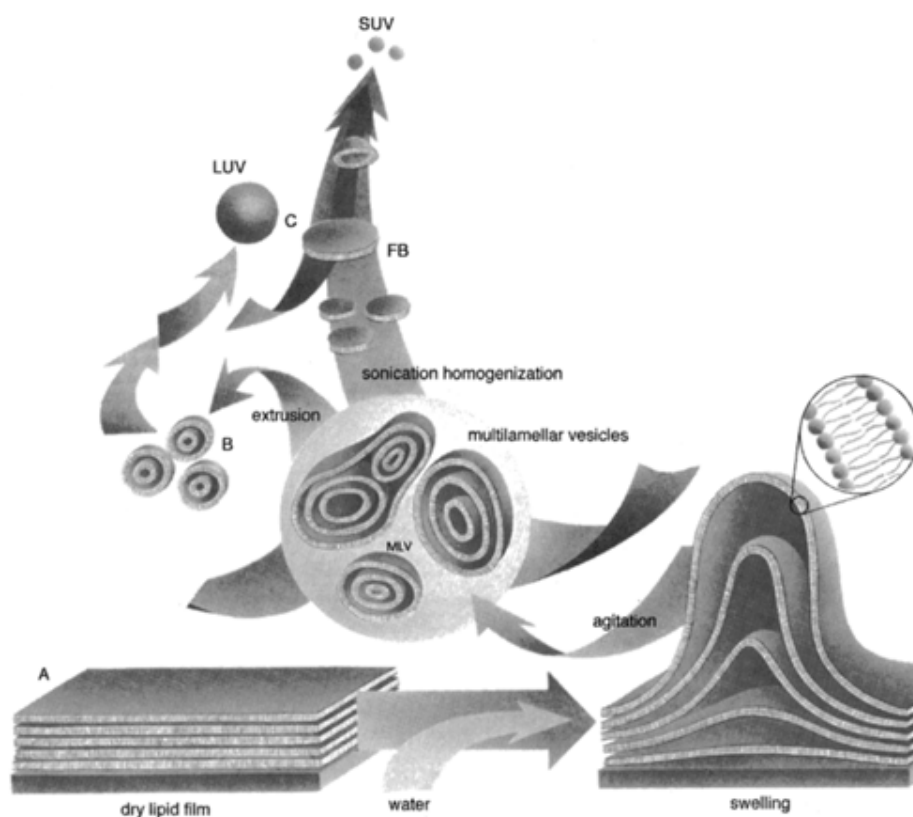


Figura 1.7. Proceso de preparación de vesículas multilamelares y unilamelares

La lamellaridad es un parámetro que proporciona información del tipo de suspensiones liposómicas obtenidas, es decir, vesículas unilamelares o multilamelares. Consideramos liposomas unilamelares todos aquellos en que el número de lamelas sea inferior a tres, mientras que los liposomas multilamelares pueden tener hasta diez láminas. Así, las vesículas oligolamelares [Woodle y Papahadjopoulos (1989)] que se caracterizan por su gran volumen interno pero con varias bicapas muy separadas, son a menudo descritas como unilamelares debido a la dificultad de distinguir entre las dos.

1.4. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS

Desde las primeras preparaciones de liposomas por Bangham y Horne [Bangham y Horne (1964)] en los años 60 han surgido una gran variedad de aplicaciones de dichas vesículas fosfolipídicas. El entusiasmo inicial en cuanto a las posibilidades de estas vesículas produjo gran cantidad de trabajos dispersos que hacían uso de las clásicas vesículas multilamelares o incluso de las unilamelares con un gran desconocimiento del sistema y, en consecuencia, con poco aprovechamiento de los resultados. Desde hace unos años, se han desarrollado métodos de preparación más rápidos y fiables que proporcionan estructuras más homogéneas. En la actualidad, con la información existente y las nuevas técnicas, estamos en condiciones de abordar el diseño de buenos sistemas liposómicos.

La estabilidad de las estructuras liposómicas es un factor a tener en cuenta debido a que con el tiempo sufren fenómenos de agregación y/o fusión que provocan la pérdida de su tamaño original siendo la composición lipídica fundamental para lograr estructuras más estables [Carrión *et al.* (1994)]. En muchas investigaciones se suele incluir una proporción de colesterol que aumenta sensiblemente su estabilidad y decrece la permeabilidad de los liposomas en medios tamponados, pequeñas moléculas polares y proteínas plasmáticas.

El tamaño de las vesículas también influye en la estabilidad de los sistemas. Se considera que a mayor tamaño los liposomas son más estables. Este fenómeno se atribuye a un decrecimiento del radio de curvatura y a un estiramiento de la bicapa de tal forma que se expone menos superficie a la acción de componentes externos.

Otro factor importante es el estado físico de la bicapa ya sea rígida (gel-cristalino) o fluida (líquido-cristalino) (figura 1.6). Las bicapas rígidas al encontrarse en un empaquetamiento más compacto incorporan menos moléculas de agua asociadas. La fluidez de las bicapas de liposomas se puede controlar por la composición de los lípidos en términos de número de dobles enlaces y la longitud de las cadenas hidrocarbonadas. Los métodos de preparación de liposomas exigen que se lleven a cabo siempre a temperaturas superiores a su temperatura de transición de los lípidos para que se encuentren en estado líquido-cristalino.

Los liposomas se pueden preparar por diversos métodos: dispersión simple, inversión de fase, deshidratación-hidratación y congelación-descongelación pero en todos ellos los pasos que hay que seguir son básicamente los siguientes:

1. Eliminación del disolvente orgánico en el que se hallan disueltos los lípidos con la consiguiente formación de la película lipídica.
2. Dispersión e hidratación de los lípidos en medio acuoso.
3. Purificación de los liposomas resultantes.
4. Análisis del producto final.

El disolvente orgánico escogido, ya sea éter, cloroformo o metanol debe ser tal que los lípidos utilizados en la preparación sean solubles a la concentración deseada que normalmente suele ser sobre 10-20 mg lípido/ml de disolvente orgánico. Para pequeños volúmenes de disolvente orgánico (< 1 ml), éste puede ser evaporado usando nitrógeno seco y si su volumen es mayor que 1 ml se elimina mediante evaporación rotatoria [www.avantilipids.com]. Teniendo en cuenta que los restos de disolvente orgánico pueden aumentar el proceso de desestabilización de los liposomas se hace necesaria una completa eliminación del disolvente para lo cual siempre es recomendable usar un flujo de nitrógeno seco tras el uso del rotavapor.

La fuerza iónica [Carrión *et al.* (1994)] y el pH [Grohmann *et al.* (1998)] son propiedades fundamentales de la fase acuosa cuando preparamos liposomas. El pH puede alterar la ionización de los lípidos desestabilizando la estructura de la bicapa. Por otra parte algunos iones introducidos en la fase acuosa pueden interactuar con las cabezas polares de los lípidos cargados negativamente dando lugar a la agregación, fusión o afectando a la interacción entre liposomas y otras superficies como células.

En este trabajo se crearon vesículas multilamelares por la técnica de dispersión simple usando un rotavapor, y después se obtuvieron vesículas unilamelares pequeñas por filtración usando la técnica de extrusión.

1.4.1. DISPERSIÓN SIMPLE

Este procedimiento de dispersión simple es descrito por primera vez por Bangham [Bangham (1965)]. Fue el primer método que caracterizó los liposomas como vesículas cerradas compuestas de múltiples capas de lípidos concéntricas. La técnica de preparación es una de las más sencillas. En una primera etapa los fosfolípidos, disueltos en una disolución orgánica que puede ser cloroformo, metanol o etanol son depositados, en forma de capa fina en la pared de un recipiente por evaporación del disolvente al vacío. La película así formada se redispersa con el volumen conveniente de agua. La suspensión se somete a agitación mecánica para asegurarse el desprendimiento completo del fosfolípido de las paredes del matraz dando lugar a la formación de LMG [Yang *et al.* (2000)]. La suspensión debe mantenerse en todo momento a temperatura superior a la temperatura de transición (T_c) específica de cada lípido.

Cuando en la formación se incluyen fosfolípidos con cierta cargas (incluidos los zwiterionicos) estas estructuras se forman espontáneamente al equilibrarse las fuerzas de Van der Waals, las de repulsión electrostáticas y las fuerzas de hidratación.

Las vesículas multilamelares obtenidas por este método tienen un tamaño que oscila entre 400 y 5000 nm, y cada vesícula consiste en varias lamelas concéntricas de fosfolípidos. El tamaño de estas estructuras depende de la energía suministrada por agitación mecánica, la fuerza iónica del medio externo, la concentración y la pureza de los fosfolípidos.

Las vesículas multilamelares formadas únicamente de lípidos neutros son muy inestables: tienden a tener las bicapas contiguas unidas unas sobre otras con muy poco espacio acuoso entre ellas. Las bicapas se encierran en vesículas antes de la total hidratación de las cabezas polares de los lípidos. Los fosfolípidos cargados negativamente en la membrana tienden a empujar las bicapas separando unas de otras incrementando de manera significativa el volumen capturado y consiguiendo además una mayor estabilidad del sistema.

1.4.2. EQUIPO EMPLEADO

1.4.2.1. ROTAVAPOR

Básicamente consiste en un motor eléctrico que produce la rotación de un tubo con un ajuste esmerilado al que se acopla un matraz de fondo redondo que contiene la disolución orgánica de fosfolípido. Dicho matraz se sumerge parcialmente en un baño de agua a una temperatura constante mayor a la T_c , manteniendo la velocidad de rotación.

Acoplado al sistema, se encuentra un sistema refrigerador por el que circula un líquido refrigerante, por lo general agua, que produce la condensación del disolvente que se recoge en un colector. El conjunto constituye un sistema cerrado conectado a una bomba de vacío que hace más eficaz la evaporación de la fase orgánica.

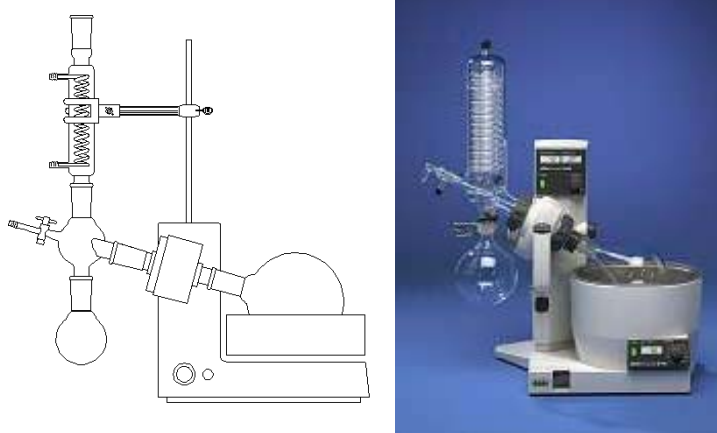


Figura 1.8. Esquema y fotografía del rotavapor empleado

En este trabajo se ha usado un rotavapor modelo LABO-ROTA C311 de la casa Resona Technics para la preparación de vesículas multilamelares grandes por dispersión simple.

1.4.2.2. EXTRUDER

La extrusión de liposomas es el proceso por el cual las liposomas multilamelares pierden su estructura para dar lugar a liposomas unilamelares grandes (LUG). En este proceso las vesículas multilamelares son físicamente

estrujadas bajo presión de nitrógeno a través de membranas de policarbonato con poros de un tamaño determinado. La dispersión lipídica resultante es una disolución homogénea de LUG donde el diámetro medio de las vesículas es similar al del poro utilizado.

El extruder consiste en una cavidad cerrada donde se somete a las muestras a altas presiones de nitrógeno. En la parte superior hay una válvula que regula la presión y en la parte inferior se sitúan las membranas que filtran las muestras. Esta técnica es aplicable a un rango amplio de concentraciones de lípido (0-400 mg/ml) y prácticamente todos los lípidos y mezcla de lípidos, ya que la temperatura



Figura 1.9. Extruder

del filtrado se puede controlar con un baño para que sea siempre mayor que la T_c del lípido. Para obtener una alta homogeneidad de los LUGs es conveniente filtrar las muestras sucesivamente por encima de su T_c y emplear filtros con poros de distintos tamaños, empezando filtrando por los más grandes hasta acabar con filtros cuyo poro sea el diámetro deseado de los LUG.

En este trabajo se ha usado un extruder modelo LIPEX™ EXTRUDER de 10 ml de capacidad de la casa Northern Lipids Inc. Los filtros usados son de la marca MILIPORE con poros de 800, 400 y 200 nm de diámetro [Casals *et al.* (2003)].



Figura 1.10. Piezas del extruder desmontadas

1.4.3. MATERIALES EMPLEADOS

Se han trabajado con distintos tipos de fosfolípidos, pero siempre del grupo de los fosfatidilcolinas, es decir, manteniendo la misma cabeza polar ($-CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$).

Los distintos tipos de colas hidrofóbicas fueron escogidas en función de la propiedad física bajo estudio. Por ejemplo, en el uso del calorímetro diferencial de barrido (DSC) donde buscábamos la mayor precisión en la caracterización de la transición de fase de gel-cristalina a líquido-cristalina, usamos fosfolípidos de DPPC y DMPC porque sus T_c se encuentran a temperaturas más asequibles (42 y 23 °C respectivamente) que en el caso de colinas naturales (-7 °C). En otros casos nos interesaba comparar la absorción de iones de liposomas con distintas cargas superficiales.

DPPC : “1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glicero-3-Phosphocholine”

Fosfatidilcolina sintética de doble cola hidrofóbica con 16 carbonos saturados cada una. Su cabeza polar es zwitteriónica, ligeramente positiva a pH neutro. Suministrada por Sigma (No P0763) con pureza del 99%.

DMPC : “1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine”

Fosfatidilcolina sintética de doble cola hidrofóbica con 14 carbonos saturados cada una. Su cabeza polar es zwitteriónica, negativa a pH neutro. Suministrada por Sigma (No P2663) con pureza del 99%.

EYPC: “Egg Yolk L- α phosphatidilcholine”

Fosfatidilcolina natural derivada de la yema de huevo. Es una mezcla de fosfolípidos saturados e insaturados de distintas longitudes. Suministrada por Sigma Chemical Co., producto numero P-3556 con una pureza de aproximadamente el 99%.

La proporción de fosfolípidos que contiene el EYPC es la mostrada en la figura 1.11:

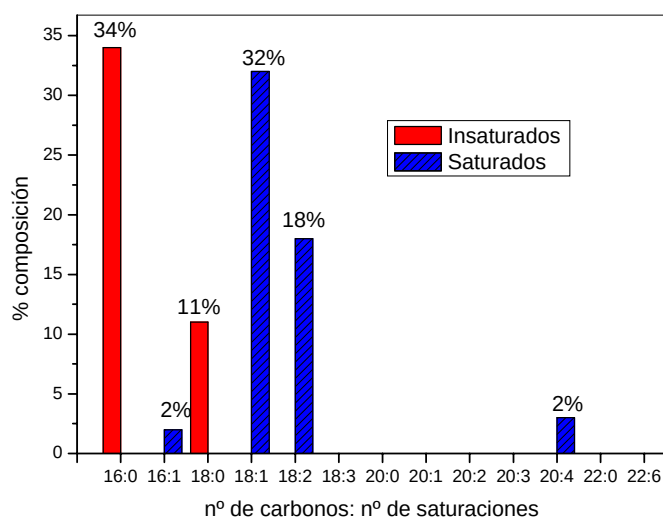


Figura 1.11. Distribución en % de composición de los ácidos grasos que contiene la L- α fosfatidilcolina (EYPC) [www.avantilipids.com].

	Fórmula molecular	Nº de carbonos en las colas	Peso molecular (g/mol)	Tª de transición (T_c) °C
DPPC	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈ P	16	734.05	41.3
DMPC	C ₃₆ H ₇₂ NO ₈ P	14	677.94	23.5
EYPC	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	16, 18 y 20	760.09	-17 < T _c < -5 °C

***Tabla 1.3.** Principales características de las fosfatidilcolinas empleadas en este estudio.*

1.4.4. OBTENCIÓN DE LOS LIPOSOMAS UNILAMELALES GRANDES (LUG)

Para conseguir poner a punto nuestra técnica de preparación de liposomas se han llevado a cabo varias experiencias variando distintos parámetros (velocidad de rotación del rotavapor, tamaño del poro, presión de extrusión, número de filtraciones...) con el fin de obtener estructuras liposómicas lo mas homogéneas y estables posible.

Partimos de una disolución de un determinado fosfolípido a una concentración de 10-5 mM en una mezcla 4:1 de cloroformo: metanol. 5 ml de esta disolución orgánica de fosfolípido se introducen en el rotavapor a una temperatura por encima de su T_c. El disolvente orgánico se evapora lentamente, dejando en las paredes del matraz una película fina de fosfolípidos.

Los restos del disolvente orgánico son eliminados con nitrógeno durante unos 10 minutos [Armentol y Estelrich (1995)]. La película formada se redispersa en agua y se agita mecánicamente durante varias horas para asegurar el total desprendimiento del fosfolípido de las paredes del matraz durante varias horas. De esta forma, las

bicapas lineales de fosfolípidos que forman la película se pliegan sobre sí mismas para formar vesículas multilamelares grandes.

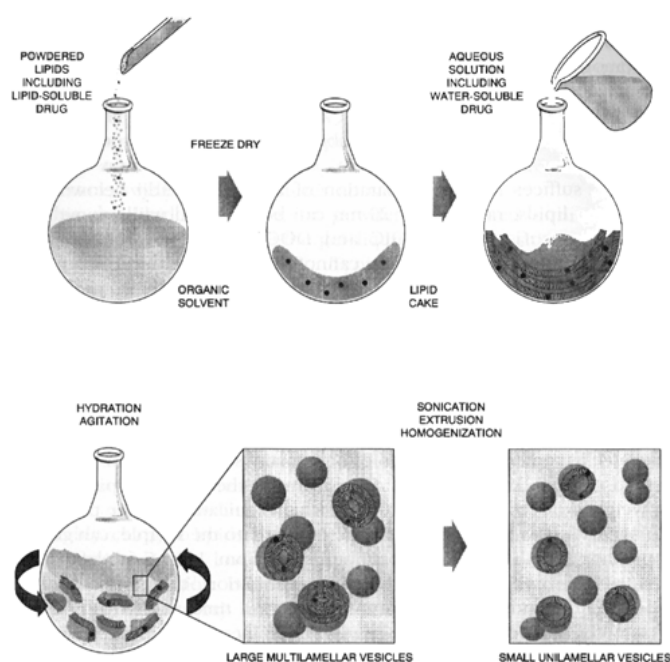


Figura 1.12. Esquema del proceso de preparación de LUG por dispersión simple.

Las dos técnicas más usadas para la obtención de vesículas unilamelares pequeñas a partir de multilamelares son la sonicación y la extrusión. La sonicación consiste en aplicar una energía mecánica a los liposomas a través de pulsos de vibraciones producidos por una sonda o por un baño. Esta energía rompe las membranas de menor curvatura, quedando únicamente los liposomas con una única membrana y un determinado diámetro que depende de la frecuencia y la potencia de las vibraciones. La técnica de extrusión ya fue explicada en el apartado anterior y ha sido la más usada en los trabajos que se presentan en esta memoria.

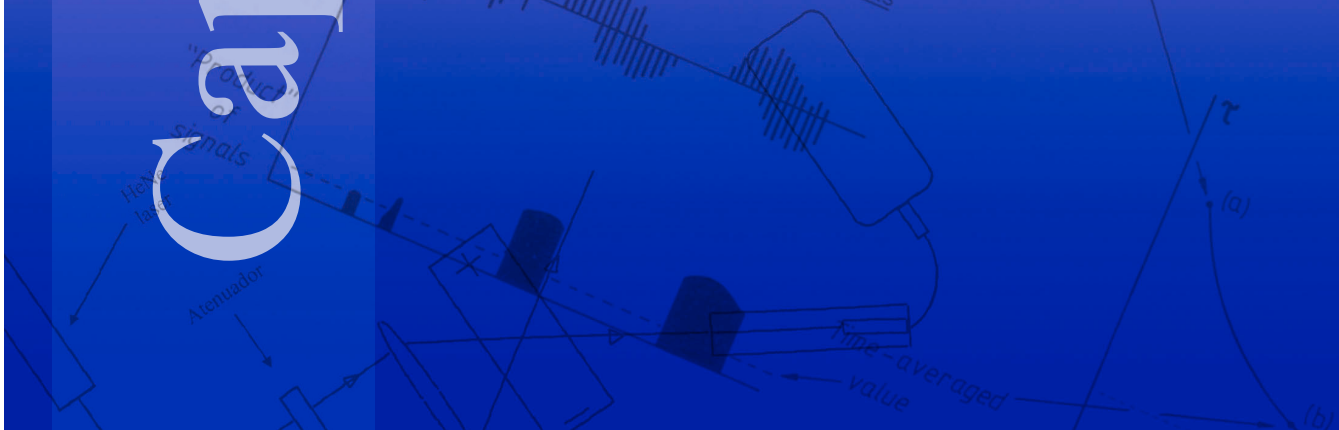
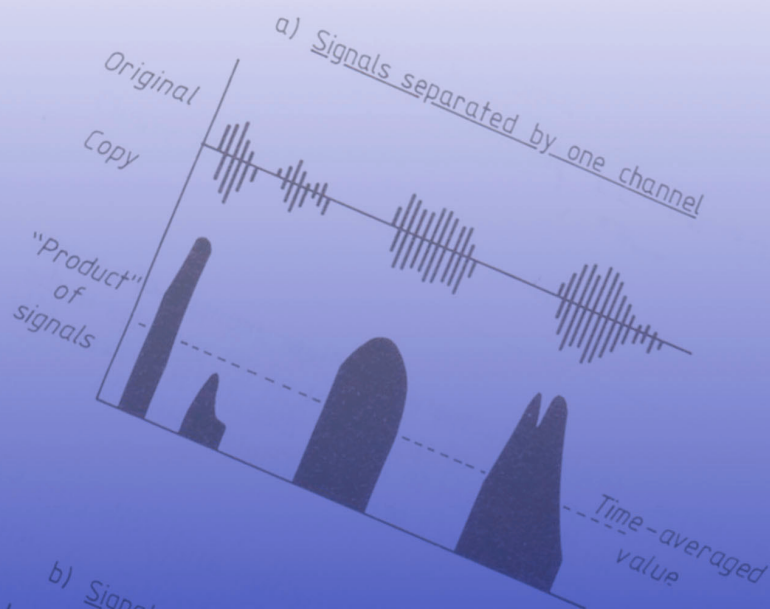
1.5. BIBLIOGRAFÍA

- Armengol X. and Estelrich J.** (1995) J. Microencap. 2: 525-535. "*Physical stability of different liposome composition obtained by extrusion method*"
- Bangham A.D., Standish M.M. and Watkins J.C.** (1965) J. Mol. Biol. 13: 238-252 "*Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids*"
- Bangham A.D. and Horn R.W.** (1964) J. Mol. Biol. 8: 660-668. "*Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-active Agents as Observed in the Electron Microscope*"
- Carrión F. J., De La Maza, A. and Parra, J. L.** (1994): J. Colloid Interface Sci. 164: 78-87. "*The Influence of Ionic Strength and Lipid Bilayer Charge on the Stability of Liposomes*"
- Casals E., Galán A., Escolar G., Gallardo H and Estelrich J.** (2003) Chem. Phys. Lip. 125: 139-146. "*Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity*"
- Cevc G. and Blume G.** (1992) Biochim. Biophys. Acta 1104: 226-232. "*Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force*".
- Cevc G. and Marsh D.** (1984) "*Phospholipids Bilayers*" Wiley-Interscience Publications, New York.
- Collander R.** (1954) Physiol. Plant. 7: 420-425. "*The permeability of Nitella cells to non electrolytes*".
- Deryagin B. and Landau L.** (1941) Acta Physicochim. 14: 633-662. "*Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes*"
- Garidel P. and Blume A.** (1999) Langmuir 15: 5526-5534. "*Interaction of Alkaline Herat Cations with the Negative Charged Phospholipids 1,2-Dimyristiol-sn-glycero-3-phosphoglycerol: A Differential Scanning and Isothermal Titration Calorimetric Study*"
- Gorter E. and Grendel J.** (1925). J. Exp. Med. 41: 439-443. "*On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of blood*"
- Grohmann F. L., Csempeš F. and Szógyi M.** (1998), Coll. Polym. Sci. 276: 66-71 "*Stabilization of Small Unilamellar DMPC-Liposomes by Uncharged Polymers*"
- Hope M.J., Bally M.B., Webb G. and Cullis P.R.** (1985) Biochim. Biophys. Acta. 36: 2860-2866. "*Production of large unilamellar vesicles by rapide extrusion procedure*"

- Israelachvili J.** (1985) *Intermolecular & Surface Forces*. 2nd Edition. Academic Press. Harcourt Brace & Company. London
- Israelachvili J.** (1992) *Intermolecular and Surfaces Forces*. 2th Edition. Academic Press. London
- Jansen M and Blume A.** (1995). *Biophys. J.* 68: 997-1008. "A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayer composed of phospholipids with different head groups and fatty acyl chain"
- Jones M. N. and Chapman D.** (1995): *Micelles, Monolayers and Biomembranes*. John Wiley & Sons, New York
- Lasic D. D.** (1993): *Liposomes: from Physics to applications*. Elsevier, Amsterdam
- Mastrobattista E., Koning G.A. and Store G.** (1999) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 40: 103–127. "Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs"
- New R.R.C.** (1990): *Liposomes: A Practical Approach*. IRL Press, New York
- Ostro M. J.** (1983): *Liposomes*. Marcel Dekker, New York
- Paula S., Volkov A.G., Van Hock A.N. Haines T.H. and Deamer D.W.** (1996). *Biophys. J.* 70: 339-348 "Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipids bilayers as a function of membrana thickness"
- Peña A.** (1986) *Las membranas celulares*. Ciencia para todos México
- Poznansky M. and Juliano R.L.** (1984). *Pharm. Rev.* 36: 277-336. "Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs: A Critical Review"
- Rosen, M. J.** (1978): *Surfactants and Interfacial Phenomena*. John Wiley, New York
- Singer S.I. and Nicolson G.L.** (1972). *Science* 175: 720-731. "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes"
- Verwey E.J.W. and Overbeek J.** (1948) "Theory of Stability of Lyophobic Colloids". Elsevier. Amsterdam
- Woodle M.C. and Papahadjopoulos D.** (1989) *Methods Enzymol.* 171: 193-217. "Liposome preparation and size Characterization"
- www.avantilipids.com**
- Yang B., Matsumura H., Kise H. and Furusawa K.** (2000) *Langmuir* 16: 3160-3164. "Aggregation behaviour of hexadecane emulsion induced by Egg Yolk PC vesicles"

Técnicas Experimentales

Capítulo 2



Capítulo 2

Técnicas experimentales

En este capítulo se presentan las técnicas experimentales empleadas para la caracterización físico-química de las membranas lipídicas y de la estabilidad coloidal de los sistemas liposómicos. Se han incluido los fundamentos teóricos de cada técnica así como las características de los equipos empleados y su aplicación concreta dentro de este estudio. Las principales técnicas usadas fueron: dispersión de luz estática y dinámica, electroforesis, microscopía de transmisión electrónica, calorimetría diferencial de barrido y espectrofotometría de fluorescencia.

2.1. DIFUSIÓN DE LUZ

Los fenómenos de difusión de luz se basan en considerar que la intensidad de luz dispersada a un ángulo determinado por una población de partículas depende de la longitud de onda del haz de luz incidente, el tamaño y la forma de las partículas dispersoras y sus propiedades ópticas.

La difusión de luz se clasifica en estática o dinámica dependiendo de la forma en que se mida la intensidad. En los experimentos de difusión estática se mide la intensidad promedio temporal de la luz difundida en función del ángulo de dispersión. La masa y la dimensión lineal de las partículas, así como su estructura interna y su forma son propiedades que pueden ser determinadas para algunos sistemas por medio de la difusión estática de luz. En la difusión dinámica de luz, técnica también conocida como espectroscopía de correlación fotónica (*PCS*; *Photon Correlation Spectroscopy*), se mide la variación temporal de la intensidad. De estas medidas se pueden obtener tamaños, coeficientes de difusión y distribución de tamaños de las partículas objeto de estudio.

2.1.1. DISPERSIÓN ESTÁTICA DE LUZ

La teoría de la difusión de luz por un medio fue desarrollada por Lord Rayleigh a finales del siglo XVIII [Rayleigh (1873)] durante sus estudios de las propiedades de los gases. En esta teoría, las dimensiones de las partículas deben de ser mucho más pequeñas que la longitud de onda, λ , de la luz incidente monocromática y polarizada.

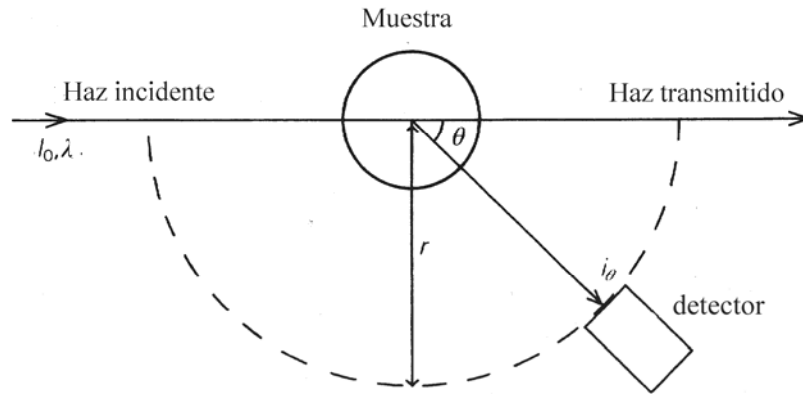


Figura 2.1. Esquema del experimento de Rayleigh.

La ecuación de Rayleigh que relaciona la intensidad de luz incidente, I_0 , con la intensidad de luz difundida a un ángulo θ respecto a la dirección del haz incidente, I_θ , viene dada por la ecuación:

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{16\pi^4 \alpha (1 + \cos^2 \theta)}{\lambda^4 r^2} \quad [2.1]$$

donde α es la polarizabilidad de la partícula, es decir, una magnitud de proporcionalidad entre la magnitud del dipolo inducido en la partícula y la magnitud del campo eléctrico de la luz incidente. Siendo, además, r la distancia entre el punto de difusión y el de la medida del haz difundido, tal y como se ve en la figura 2.1.

Si se considera un volumen V de gas diluido en el cual hay N moléculas de gas, y asumiendo que la intensidad total, I_θ , de la radiación difundida por la unidad de volumen de gas diluido, es la suma de las intensidades de cada una de las moléculas del gas presente, entonces [Degiorgio y Corti (1985)]:

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{N}{V} \frac{16\pi^4 \alpha^2 (1 + \cos^2 \theta)}{\lambda^4 r^2} \quad [2.2]$$

El parámetro α no se determina fácilmente, para su cálculo se utiliza la ecuación de Clausius-Mossotti, que denota su relación con el índice de refracción, n :

$$4\pi \frac{N}{V} \alpha = n^2 - 1 \quad [2.3]$$

siendo 1 el índice de refracción en el vacío.

Para un gas diluido el índice de refracción varía con la concentración por $n=1+(dn/dc)c$ donde c es la masa por unidad de volumen. Si c es pequeña, entonces $n^2 \approx 1+2(dn/dc)c$ que al sustituirla en la ecuación 2.3 se obtiene: $\alpha = (V/2\pi N)(dn/dc)c$. Sustituyendo el resultado anterior en la ecuación 2.2:

$$\frac{I_\theta}{I_0} = \frac{4\pi^2}{N} \frac{V \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 c^2 (1 + \cos^2 \theta)}{\lambda^4 r^2} \quad [2.4]$$

También podemos utilizar la relación $N/V=cL/M$ (donde M es la masa molar y L es el número de Avogadro) en la ecuación 2.4 para obtener la ecuación de Rayleigh para la difusión ideal de luz polarizada:

$$\frac{I_{\theta}}{I_0} = \frac{4\pi^2 \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 Mc(1 + \cos^2 \theta)}{\lambda^4 r^2 L} \quad [2.5]$$

Es conveniente utilizar la relación de Rayleigh, R :

$$R = \frac{I_{\theta} r^2}{I_0 (1 + \cos^2 \theta)} \quad [2.6]$$

ya que de esta forma obtenemos una expresión que es independiente de r y θ , en base a la ecuación de Rayleigh. Hay autores que prefieren escribirla en función de θ de tal forma que la definen como $R=I_{\theta}r^2/I_0$, aunque aquí utilizaremos la expresión 2.6. Utilizando entonces la relación de Rayleigh en la ecuación del mismo nombre se obtiene:

$$R = \frac{4\pi^2 Mc \left(\frac{dn}{dc}\right)^2}{\lambda^4 L} \quad [2.7]$$

En el caso de líquidos y disoluciones de partículas pequeñas, la concentración de moléculas por unidad de volumen es mucho mayor que en un gas ideal. Cabría esperar que ello hiciera aumentar de forma proporcional la difusión producida por las moléculas, sin embargo no es así, ya que las moléculas de un

líquido tienen cierto orden. Este orden crea una interferencia destructiva parcial de la luz difundida, ya que la luz difundida lo es en cada molécula e interfiere con la de sus vecinos produciendo una interferencia parcialmente destructiva.

Si se considera que el líquido se encuentra formando una perfecta red de elementos de volumen los cuales contienen moléculas (de dimensiones mucho más pequeñas que λ para que produzcan la difusión), la difusión producida, daría lugar a una interferencia destructiva completa, excepto para $\theta = 0$. Claramente este no es el caso, la difusión de luz por líquidos proviene de las fluctuaciones locales de densidad dentro del líquido.

En disoluciones diluidas, hay una contribución adicional proveniente de las fluctuaciones locales de la concentración de soluto. Para eliminar la difusión debido a las fluctuaciones locales del disolvente se utiliza la diferencia ΔR , entre las relaciones de Rayleigh de la disolución y el disolvente puro.

$$\Delta R = R_{\text{disolucion}} - R_{\text{disolvente}} \quad [2.8]$$

ΔR es conocido por la relación Rayleigh de exceso y en la difusión de luz estática depende de la media temporal de $(\Delta\alpha)^2$. Se hace necesario introducir la media temporal porque se mide la intensidad en un tiempo superior al tiempo característico de las fluctuaciones. Se considerará que hay N elementos de volumen, cada uno de los cuales ocupa un volumen δV , es decir:

$$\frac{N}{V} = \frac{N}{N\delta V} = \frac{1}{\delta V} \quad [2.9]$$

Sustituyendo la ecuación 2.9 en la 2.2 y aplicando la relación de Rayleigh:

$$\Delta R = \frac{1}{\delta V} \frac{16\pi^4 (\Delta\alpha)^2}{\lambda^4} \quad [2.10]$$

la ecuación 2.10 promediada temporalmente, queda:

$$\Delta R = \frac{1}{\delta V} \frac{16\pi^4 \langle (\Delta\alpha)^2 \rangle}{\lambda^4} \quad [2.11]$$

media temporal que solo afecta a $(\Delta\alpha)^2$, ya que el resto son constantes.

Teniendo en cuenta de nuevo 2.3 y una serie de aproximaciones sobre el índice de refracción se puede llegar a:

$$\Delta R = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 \delta V \langle (\delta c)^2 \rangle}{\lambda^4} \quad [2.12]$$

Para calcular la dependencia de $\langle (\delta c)^2 \rangle$ con respecto a c , es necesario recurrir a la teoría de fluctuaciones de Einstein y Smoluchowski [Smoluchowski (1906), Einstein (1905)] y a una expresión de la variación de la presión osmótica, π , con respecto a la concentración, dada por la teoría de Flory-Huggins [Huggins (1941); Flory (1941)] para disoluciones diluidas y monodispersas. Finalmente se obtiene:

$$\Delta R = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 c}{L\lambda^4 \left[\frac{1}{M} + A_2 c + A_3 c^2 + \dots \right]} \quad [2.13]$$

En el desarrollo de la serie se desprecian los términos de orden dos de la concentración, con lo que la ecuación anterior quedaría como sigue:

$$\frac{kc}{\Delta R} = \frac{1}{M} + A_2 c \quad [2.14]$$

con

$$k = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right)^2}{\lambda^4 L} \quad [2.15]$$

finalmente es interesante indicar que R está relacionada con la turbidez, τ , a través de la expresión:

$$\tau = \frac{16\pi}{3} R \quad [2.16]$$

2.1.2. DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ: Espectroscopia de Correlación Fotónica

La espectroscopia de correlación fotónica analiza la dependencia con el tiempo de las fluctuaciones de la intensidad de luz dispersada por las partículas en disolución bajo movimiento browniano.

Como muestra la figura 2.2 las partículas más grandes son más lentas y su intensidad dispersada fluctúa más pero con menos frecuencia que las partículas más pequeñas. A partir del análisis de estas fluctuaciones se puede calcular: el coeficiente de difusión, D ; usando la relación de Stokes- Einstein, el valor promedio de los radios hidrodinámicos, R_h ; la polidispersidad, $Poly$, de las partículas en dispersión.

La determinación del diámetro y polidispersidad de las partículas por dispersión dinámica de luz tiene tres procesos: procesado, autocorrelación y análisis.

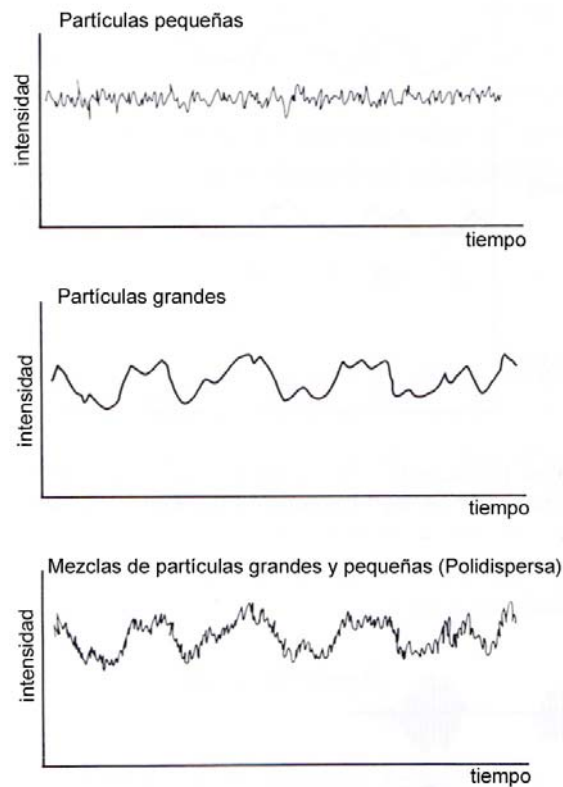


Figura 2.2. Fluctuaciones de la intensidad dispersada por partículas pequeñas (arriba), partículas grandes (en medio) y por una mezcla polidispersa de partículas grandes y pequeñas (abajo).

Procesado: La señal de intensidad dispersada por las partículas en disolución en un determinado periodo de tiempo es recogida por un fotomultiplicador situado a un ángulo determinado respecto al haz incidente del

láser. Esta señal con sus fluctuaciones es recortada y digitalizada para que pueda ser almacenada y manipulada de forma rápida.

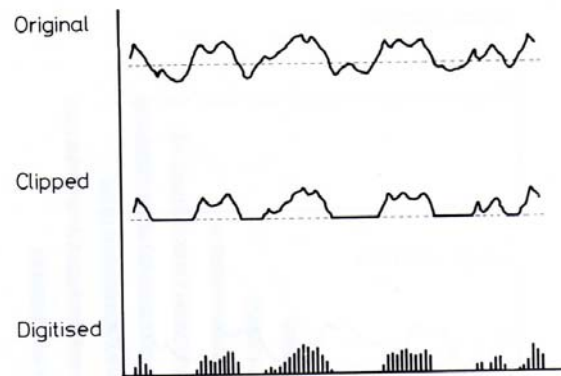


Figura 2.3. Recorte y digitalización de la señal recogida por el multiplicador.

Autocorrelación: Para parametrizar las fluctuaciones en la intensidad se lleva a cabo un proceso matemático denominado “correlación”, que consiste en comparar la señal digitalizada original con una copia de sí misma pero retardada distintas cantidades de tiempo (Δt). La función de correlación se construye representando el área acumulada bajo de curva obtenido de la multiplicación de la señal original y la inversa de la señal retrasada para distintos tiempos de retraso.

El resultado es una curva que decae exponencialmente hacia una constante. El valor de esa constante depende de la intensidad de las fluctuaciones en la intensidad y la velocidad de decaimiento de la frecuencia de las fluctuaciones, es decir, del coeficiente de difusión y por tanto del radio hidrodinámico [Berne y Peroca (1976)].

Para Δt pequeños, el cambio en los niveles de intensidad dispersada es muy pequeño ya que a las partículas no les ha dado mucho tiempo a moverse. En

términos estadísticos puede decirse que la posición de las partículas para tiempos pequeños está altamente correlacionada. Sin embargo, para Δt altos la posición de las partículas no está correlacionada ya que tras Δt las partículas pueden estar en cualquiera posición respecto a la inicial. El sentido físico de la función de correlación es la medida de lo rápido que la señal está totalmente fuera de fase consigo misma.

Matemáticamente esta función se puede expresar como [Holmberg (2002), Young y Lovell (1991)]:

$$g^{(1)}(t) = \exp^{(-\Gamma t)} \quad [2.17]$$

Donde Γ es la velocidad característica de decaimiento, relacionada con el coeficiente de difusión D de las partículas bajo estudio por la expresión:

$$\Gamma = q^2 D \quad [2.18]$$

Siendo q el vector de dispersión:

$$q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda} \right) \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad [2.19]$$

y n el índice de refracción, λ la longitud de onda del haz y θ el ángulo de dispersión.

El valor del radio hidrodinámico promedio (R_h) de las partículas bajo estudio se puede calcular a partir de su coeficiente de difusión usando la relación de Stokes- Einstein:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad [2.20]$$

donde k_B es la constante de Boltzman, T la temperatura absoluta, η la viscosidad del solvente.

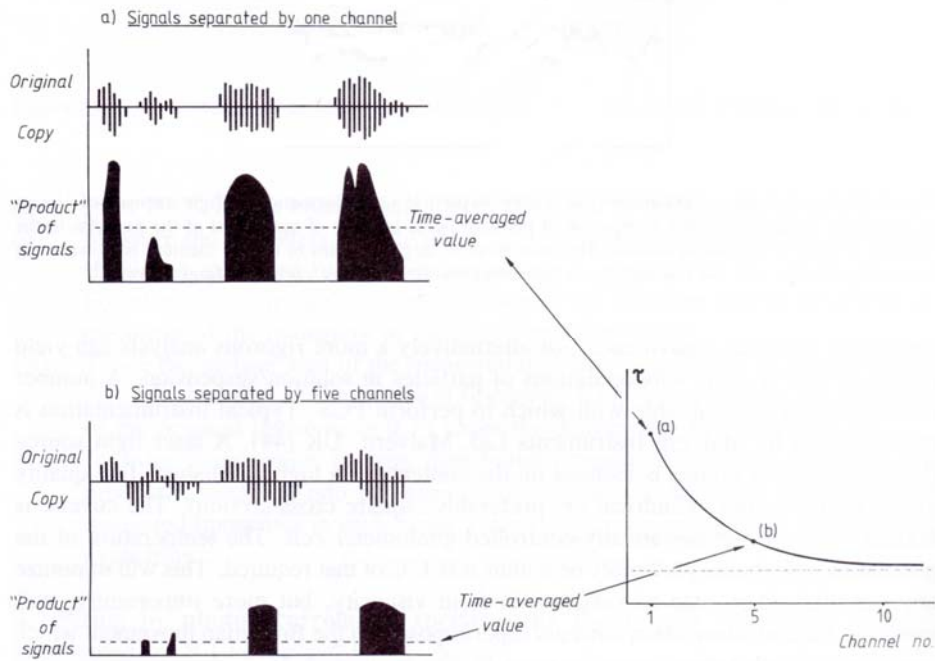


Figura 2.4. Esquema de la construcción de la función de correlación.

La expresión 2.17 puede generalizarse para disoluciones polidispersas como:

$$g^{(1)}(t) = \sum_i c_i \exp(-\Gamma_i t) \quad [2.21]$$

donde c_i y Γ_i son factores de ponderación fraccional y la razón de decaimiento característica de cada especie en la disolución respectivamente.

Análisis: El análisis de datos en la dispersión dinámica de luz implica ajustar la función de correlación a una ecuación del tipo 2.21 que nos permita obtener los coeficientes de difusión y el radio hidrodinámico.

Existen distintos algoritmos de ajuste dependiendo de las características de la muestra bajo estudio. El algoritmo *Monomodal* o *Cumulantes* ajusta el logaritmo de la función de correlación a un polinomio, cuyos coeficientes nos dan información de los tamaños y polidispersidades. Este algoritmo puede ser útil cuando no se necesitan muchos detalles de la distribución de tamaños o si las muestras no son polidispersas.

El algoritmo *Multimodal* ofrece un análisis de alta resolución de las distribuciones representando la intensidad relativa dispersada por 24 diferentes *clases* de tamaños. Si se conocen los índices de refracción de las muestras el algoritmo *Multimodal* puede representar la distribución de tamaños en función del número de partículas con dicho tamaño. Representar las distribuciones de tamaños en función del número puede dar mayor información al usuario que la representación en intensidad relativa ya que muchas partículas pequeñas pueden dispersar muy poca intensidad comparada con una población escasa de partículas muy grandes. Ambas representaciones pueden complementarse para tener un estudio en detalle de muestras polidispersas.

Pero, desde que en 1979 Provencher [Provencher (1979)] propusiera el algoritmo *CONTIN* para el análisis de la función de correlación, este se ha convertido en el algoritmo más usado, especialmente en los casos donde es necesario un análisis detallado de las distribuciones de tamaños en muestras polidispersas. El algoritmo *CONTIN* obtiene el ajuste óptimo de minimizar la suma VAR+REG, donde VAR es la varianza por mínimos cuadrados:

$$VAR = \sum_{k=1}^S [g^{(1)}(t)_{\text{exp}} - g^{(1)}(t)_{\text{calc}}]^2 \quad [2.22]$$

y el sumatorio se realiza sobre los S tiempos de retardo (Δt), para cada uno de los cuales g_{exp} es el valor medido y g_{calc} es el valor calculado de la función de correlación.

REG se conoce con el nombre de función de regulación y se define como:

$$REG = \alpha^2 \sum_{j=1}^J \left[\left(\frac{d^2 I}{d\Gamma^2} \right)_j \right]^2 \quad [2.23]$$

donde α es un parámetro de regulación.

El algoritmo debe determinar las intensidades $I_1 \dots I_j$ relacionadas con las razones de decaimiento $\Gamma_1 \dots \Gamma_j$. El procedimiento consiste en encontrar los valores de las intensidades que nos dan los S valores de g_{calc} que minimizan la suma $VAR+REG$. Para ello, se procede primero a calcular el ajuste por mínimos cuadrados de $VAR+REG$ con $\alpha=0$ (disolución de referencia), y luego se minimiza esta suma para valores de α distintos de cero. El algoritmo calcula 18 posibles soluciones, cada una de ellas con una posibilidad llamada $prob(\alpha)$. Estas soluciones se denominan soluciones preliminares. Las desviaciones de los S valores medidos de g_{exp} de los valores de g_{calc} predichos por las soluciones preliminares se usan como un conjunto de pesos estadísticos, de tal manera que se repite de nuevo el proceso para obtener las 18 soluciones finales, cada una de ellas con su valor $prob(\alpha)$. La salida del algoritmo contiene los dos tipos de soluciones, esto es, S valores de g_{calc} frente a τ y J valores de $I(\Gamma)$ frente a Γ . La solución final es la que tenga la probabilidad $prob(\alpha)$ más cercana a 0.5.

Las soluciones de CONTIN están sujetas a dos condiciones. Por un lado se rechazan las soluciones no razonables. Y por otro lado están sujetas al *principio de parsimonia*, es decir, todas las soluciones que permanecen después de la aplicación de la primera condición se tienen en cuenta, pero la elegida será la más simple.

2.1.3. EQUIPO EMPLEADO

Las medidas de dispersión dinámica y estática de luz se realizaron en un equipo PCS 4700 de Malvern equipado con un láser de argón que genera una fuente de luz verticalmente polarizada de longitud de onda de 488 nm. Un diagrama del equipo se muestra en la figura 2.5.

El haz láser era dirigido a una célula muestra de 3 a 4 ml de volumen, sumergida en una baño de agua a una temperatura controlada de 25 ± 0.1 °C. El baño de agua era pasado continuamente a través de una bomba filtradora (Millipore 0.45 μm) para asegurarnos la perfecta eliminación de partículas de polvo. Además la célula se dejaba al menos diez minutos en el baño para asegurarse que alcanzara el equilibrio térmico.

La radiación difundida era detectada por un tubo fotomultiplicador Malvern, que asocia los fotones detectados con salidas electrónicas para su procesamiento en el autocorrelador digital. Dicho fotomultiplicador está montado sobre un goniómetro acoplado a un motor controlado por ordenador, véase figura 2.5. Esta técnica es muy sensible a la contaminación de la disolución (polvo), por lo que es necesario tener un cuidado extremo en la limpieza de todo el material utilizado en la experiencia.

En concreto es preciso ser muy meticuloso en la limpieza de las células donde se introduce la muestra para proceder a la medición. Una vez que el recipiente estaba perfectamente limpio se procedía a preparar la disolución. Como en este proceso siempre se introducían partículas de polvo se hacía necesario filtrar la muestra. Para ello se pasaba la muestra por un filtro Millipore con el fin de que estuviera lo más limpia posible.

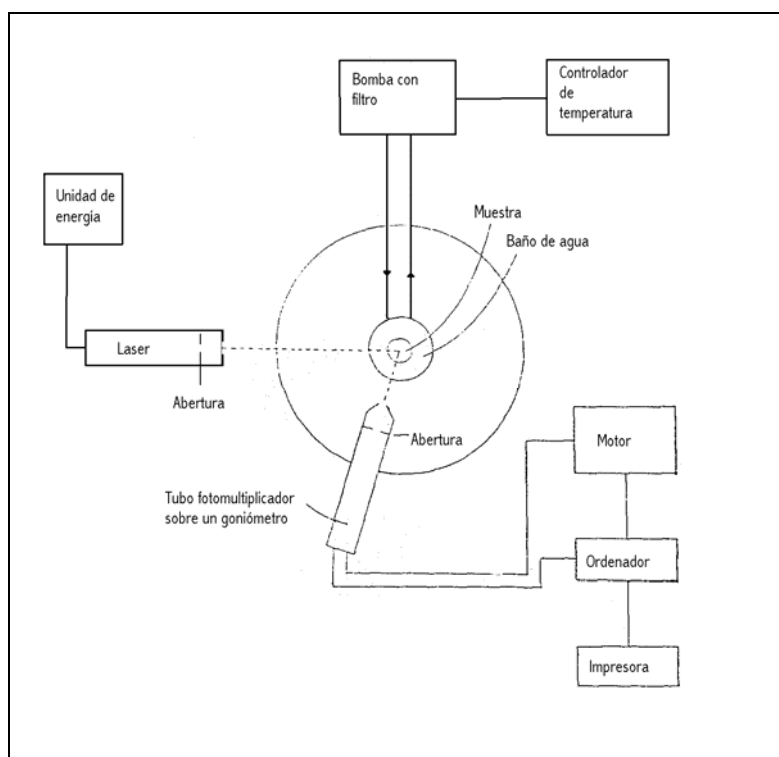


Figura 2.5. Diagrama esquemático del equipo usado para la difusión dinámica de luz.

También se ha usado la técnica de nefelometría para medir la dispersión estática de luz a bajo ángulos (4.5, 10 y 20 °C) durante los 120 segundos después de realizar la mezcla, por inyección automática de 1 ml de liposomas y 1 ml de cierto electrolito. La agregación de los liposomas incrementa la intensidad

dispersada linealmente, con una pendiente que depende de la probabilidad de “colisión eficiente” entre liposomas.

En este trabajo se ha usado el equipo PCS 4700 de Malvern con dispersión dinámica para medir los diámetros y polidispersidades de los liposomas. También se ha empleado para detectar procesos de agregación y fusión monitorizando el aumento del tamaño de los agregados con el tiempo.

La dispersión estática de luz se ha usado para determinar la dispersión de luz de los agregados en función del ángulo para poder obtener la dimensión fractal de los cluster.

A partir de las medidas de nefelometría se han calculado las constantes de estabilidad (w) para distintas concentraciones iónicas, a partir de las cuales se han determinado las concentraciones de agregación crítica (c.a.c.)

2.2. MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA: POTENCIAL ZETA (ζ)

La electroforesis consiste en la medida del movimiento de partículas coloidales bajo un campo eléctrico. Esta medida puede ser usada para determinar el signo de la carga de las partículas o su movilidad electroforética, que está relacionada con la carga superficial y el potencial ζ .

2.2.1. PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO

La técnica para medir la movilidad de las partículas está basada en la detección de las variaciones del patrón de interferencia generado por un láser Doppler inducidas por partículas moviéndose bajo un campo eléctrico.

Un doble haz de luz se hace pasar por una lente convergente para cruzarse en un pequeño volumen donde se producen patrones de interferencia que son detectados por un fotomultiplicador. La zona en la que los dos haces se cruzan está inmersa en el capilar donde la muestra coloidal está moviéndose bajo un campo eléctrico inducido por un potencial en los extremos del capilar. Las partículas coloidales interactúan con estos patrones de interferencia produciendo luz dispersada que oscila en el tiempo de forma dependiente con la velocidad de las partículas [Holmberg (2002)].

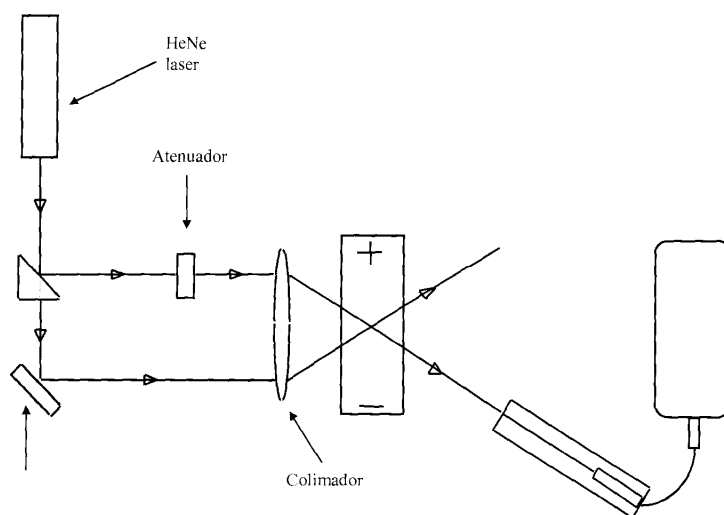


Figura 2.6. Diagrama esquemático del dispositivo óptico de electroforómetro.

Esta técnica también permite realizar medidas sobre partículas sin carga, mediante un espejo móvil, sincronizado con el voltaje aplicado a la celda, que provoca una variación en la frecuencia de uno de los rayos. De este modo el patrón de interferencias se desplazará en una dirección con una velocidad determinada y al atravesar la partícula se producirá una variación en la frecuencia.

2.2.2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Una partícula aislada (entiéndase partícula coloidal), inmersa en un líquido, estará rodeada por una doble capa eléctrica. La primera capa corresponde a la carga en la superficie de la partícula. Vamos a suponer un reparto uniforme de dicha carga, lo cual no es del todo correcto debido a la existencia de huecos, lugares preferentes de ocupación, existencia de dipolos, etc. En general, sólo estamos interesados en lo que ocurre a grandes distancias de la partícula, por lo que la anterior aproximación no se considera muy restrictiva [Hunter (1981)].

La segunda capa es la formada por el exceso de iones de igual signo y signo contrario (iones comunes y contraiones respectivamente) en la solución. El espesor de esta capa puede ser del orden del tamaño de las partículas coloidales, dependiendo de la cantidad de concentración de electrolito (figura 2.8).

En los tratamientos teóricos vamos a asumir que el sólido tiene forma de esfera, cilindro o plano infinito. El líquido se supone newtoniano y se mueve con una velocidad lo suficientemente lenta para que las turbulencias y otros fenómenos no lineales pueden ser despreciados. Vamos a introducir una superficie imaginaria que envuelva la superficie del sólido y el fluido estacionario que lo rodea. En nuestro caso esta superficie envuelve a la partícula. Toda la sustancia dentro de la superficie forma una unidad cinética, de forma que la partícula se mueve con una cierta cantidad de líquido y su carga correspondiente. Esta superficie se denomina *superficie de deslizamiento*. A través de la movilidad electroforética (velocidad por unidad de campo eléctrico) obtenemos la carga neta sobre la partícula.

El análisis de las fuerzas también puede llevarse a cabo en términos de carga o potencial electrostático. En este último caso, se calcula el potencial en la superficie de deslizamiento. Es el llamado potencial electrocinético o potencial zeta (se representa mediante la letra griega zeta “ ζ ”).

La teoría clásica fue formulada en su forma actual por von Smoluchowski [Smoluchowski, (1921)], quien consideró el movimiento de un líquido con respecto a una superficie plana (con carga superficial), bajo la influencia de un campo eléctrico paralelo a dicha superficie. Si la superficie está negativamente cargada habrá un exceso de iones positivos en la interfase, los cuales se moverán bajo la influencia del campo aplicado, arrastrando líquido con ellos. La superficie de deslizamiento, en este caso, se puede considerar como un plano paralelo a la superficie, situado a una distancia Δ de ella.

La velocidad del líquido en la dirección paralela a la pared, v_z , varía desde un valor cero en el plano de deslizamiento a otro máximo v_{eo} a una cierta distancia de la pared, a partir de la cual permanece constante (v_{eo} se denomina velocidad electroosmótica del líquido).

Las fuerzas que actúan sobre un elemento de volumen de líquido con carga se muestran en la figura 2.7., así [Heimenz y Rajagopalan (1997)]:

$$E_z dQ = E_z \rho A dx = \eta A \left(\frac{dv_z}{dx} \right)_x - \eta A \left(\frac{dv_z}{dx} \right)_{x+dx} \quad [2.24]$$

donde E_z es el campo aplicado y η la viscosidad.

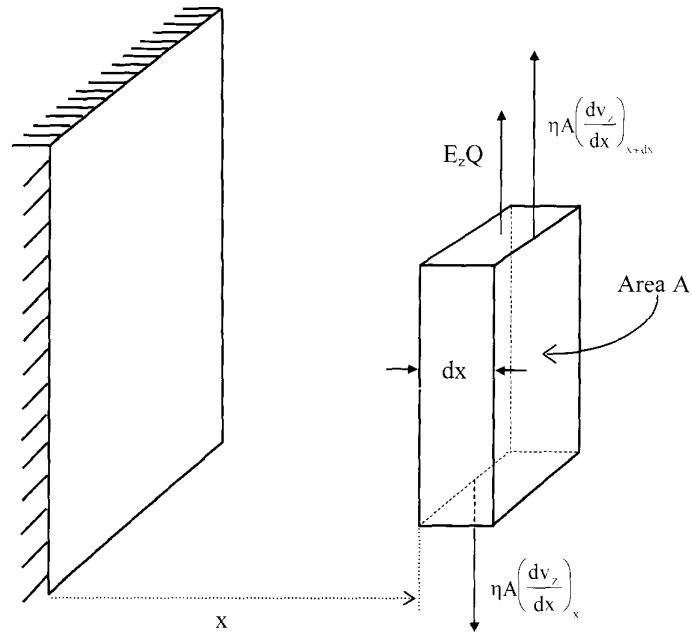


Figura 2.7. Fuerzas sobre un elemento de volumen del líquido de área A y carga Q .

Si sustituimos p usando la ecuación de Poisson, obtendremos:

$$E_z (4\pi\epsilon_0) \frac{D}{4\pi} \frac{d^2\psi}{dx^2} dx = \eta \left(\frac{d^2v_z}{dx^2} \right) dx \quad [2.25]$$

siendo $D = \epsilon / \epsilon_0$.

Integrando esta última ecuación, desde un punto muy alejado de la superficie de la partícula donde $\psi = 0$ y $v_z = v_{eo}$, hasta el plano de deslizamiento donde $\psi = \zeta$ y $v_z = 0$, teniendo en cuenta que para la primera integración se

cumple que $\frac{d\psi}{dx} = \frac{dv_z}{dx} = 0$ en puntos muy alejados de la superficie, se obtiene el resultado:

$$\frac{v_{eo}}{E_z} = u_E = 4\pi\epsilon_0 \frac{D\zeta}{4\pi\eta} = \frac{\epsilon\zeta}{\eta} \quad [2.26]$$

donde se ha considerado que η y D permanecen constantes en la doble capa e iguales a sus valores en el seno de la disolución. u_E es la movilidad de la partícula. Esta ecuación se denomina de Smoluchowski para la movilidad electroforética.

Poco después de la publicación de la teoría para electrolitos fuertes por Debye y Hückel, este último examinó el problema de la electroforesis y obtuvo un resultado diferente para la movilidad de las partículas:

$$u_E = 4\pi\epsilon_0 \frac{D\xi}{6\pi\eta} = \frac{2\epsilon\xi}{3\eta} \quad [2.27]$$

Una ecuación similar a ésta se puede obtener igualando la fuerza eléctrica ejercida sobre la partícula ($f_e = QE_z$) y la fuerza de Stokes debida al rozamiento ($f_r = 6\pi\eta a v_E$):

$$u_E = \frac{v_e}{E_z} = \frac{Q}{6\pi a \eta} \quad [2.28]$$

donde a es el radio de la partícula. Sustituyendo Q por su valor en función del potencial electrocinético, obtenemos:

$$u_E = 4\pi\epsilon_0 \frac{D\xi}{6\pi\eta} (1 + ka) \quad [2.29]$$

donde k se conoce como el *parámetro de Debye-Hückel*. Su inverso, k^{-1} , tiene dimensiones de longitud y nos dará la distancia a la cual el potencial cae una fracción $1/e$, recibiendo el nombre de espesor de la doble capa eléctrica. Depende fuertemente de la concentración de electrolito, n_i^0 .

Se puede observar que la ecuación 2.29 coincide con la obtenida por Hückel, en el límite de valores muy pequeños de ka (partículas pequeñas con una doble capa estrecha). El efecto que ejerce el campo eléctrico sobre los iones de la doble capa, obligándolos a moverse en dirección contraria a la de la partícula y arrastrando con ellos al líquido, es conocido como retardación electroforética, debido a la reducción de velocidad que causa en la partícula. Smoluchowski asume que está en la fuerza dominante y que el movimiento de la partícula es igual y de sentido contrario al del líquido. Por su parte Hückel, presenta una hipótesis diferente con respecto a la retardación, obteniendo una ecuación válida sólo para ka pequeños, es decir, cuando la retardación es prácticamente insignificante, siendo la fuerza principal la de fricción con el medio. Un análisis más detallado de esta situación fue dado por Durkin y Deryaguin [Durkin y Derjaguin (1974)], quienes mostraron que la relación entre la fuerza de retardación y la fuerza viscosa del medio es del orden de ka . En experimentos de electroforesis consideramos la partícula como un ente aislado en un medio infinito. En el caso de partículas grandes con una doble capa muy delgada toda la retardación electroforética se va a comunicar directamente a la partícula.

Según Henry la discrepancia entre estos modelos esta determinada por la forma de asumir el campo eléctrico alrededor de la partícula. Hückel no tiene en cuenta la deformación de este campo debido a la presencia de la partícula y

Smoluchowski lo considera uniforme y paralelo a la superficie de la partícula. Estas consideraciones se verifican para situaciones extremas, o sea, para $ka \ll 1$ y $ka \gg 1$ respectivamente.

Cuando al potencial de una partícula se le superpone un campo externo, la movilidad viene determinada por la ecuación de Henry:

$$u_E = (4\pi\epsilon_0) \frac{D\xi}{6\pi\eta} f_1(ka) = \frac{2\epsilon\xi}{3\eta} f_1(ka) \quad [2.30]$$

Donde la función $f_1(ka)$, conocida por la función de Henry, depende de la forma de la partícula y, para una esfera, está dada:

Para $ka < 1$

$$f_1(ka) = 1 + \frac{(ka)^2}{16} - \frac{5(ka)^3}{48} - \frac{(ka)^4}{96} + \frac{(ka)^5}{96} - \left[\frac{(ka)^4}{8} - \frac{(ka)^6}{96} \right] e^{ka} \int_{\infty}^{ka} \frac{e^{-t}}{t} dt \quad [2.31]$$

Y para $ka > 1$

$$f_1(ka) = \frac{3}{2} - \frac{9}{2ka} + \frac{75}{2k^2a^2} - \frac{330}{k^3a^3} \quad [2.32]$$

2.2.3. PLANO DE DESLIZAMIENTO

La primera discusión teórica para analizar el sentido físico del potencial ζ es determinar donde está situada la superficie de deslizamiento respecto a la superficie de las partículas coloidales.

Diversos estudios apuestan a que el potencial ζ en la superficie de desplazamiento coincide con el potencial (ψ_d) en el denominado plano exterior de Helmholtz (OHP). Esto es de gran utilidad ya que el potencial ψ_d está implicado en la determinación del potencial electrostático DLVO.

Helmholtz fue el primero en proponer un modelo de estructura de doble capa eléctrica que consistía en un exceso de iones o electrones absorbidos en la superficie del coloide, y la misma cantidad de iones de signo opuesto situados a una distancia δ_r , que depende del radio iónico. Este modelo es semejante a un condensador plano cuya separación entre placas es δ_r .

Gouy y Chapman, independientemente, supusieron una doble capa difusa, debido a que la agitación térmica destruiría la colocación ordenada y rígida de los iones en la interfase y calcularon la distribución del potencial suponiendo ψ lo suficientemente pequeño para que $z_i e \psi \ll k_B T$, cuya solución es:

$$\psi(x) = \psi_0 e^{-kx} \quad [2.33]$$

donde ψ_0 es el potencial en la superficie coloidal y k es el parámetro de Debye-Hückel.

Gouy y Chapman en su teoría no tuvieron en consideración ni la adsorción ni el tamaño de los iones. En disoluciones diluidas, su modelo es aceptable pero a concentraciones más elevadas se llega a resultados no satisfactorios.

Stern desarrolla un modelo teniendo en cuenta estos efectos, para ello divide la doble capa eléctrica en dos zonas:

1. Una zona compacta o interna, formada por una capa de iones adsorbidos sobre la pared. Se representa en teoría por una carga superficial concentrada en un plano a una distancia Δ de la superficie (Capa de Stern).
2. Una zona difusa que se extiende desde $x = \Delta$ hasta el infinito. Está formada por la carga difusa en el medio y el potencial se representa bien por la ecuación de Poisson-Boltzmann.

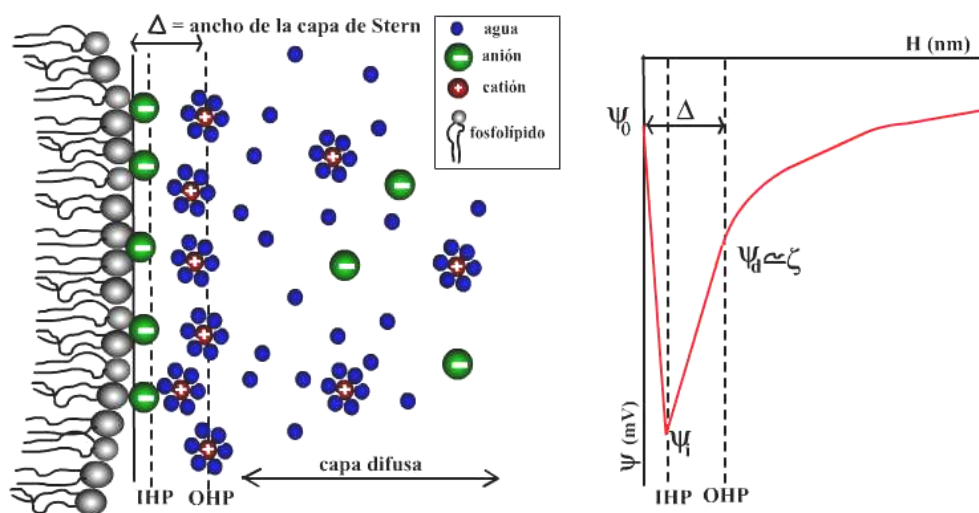


Figura 2.8. Esquema de la doble capa difusa del modelo de Stern.

A su vez la capa de Stern está subdividida en dos planos: el primer plano, denominado plano interior de Helmholtz (IHP) es el de los centros de los iones adsorbidos. Estos iones no están hidratados, e interaccionan con la superficie

mediante enlaces covalentes o por puentes de hidrógeno. Las distribuciones de carga y potencial están determinadas básicamente por los tamaños de iones y por las interacciones de corto alcance entre iones y dipolos con la pared. El potencial disminuye linealmente, como en el dieléctrico de un condensador plano. Se denomina plano exterior de Helmholtz (OHP) al plano de los centros de los cationes hidratados en contacto con la superficie.

Las primeras estimaciones sobre la situación de la superficie de desplazamiento, se basaron en el modelo de la doble capa de Gouy-Chapman. Así Haydon en 1960 va a encontrar que a valores pequeños de carga superficial, los dos potenciales ζ (potencial en la superficie de desplazamiento) y ψ_d (potencial en el plano OHP) son prácticamente iguales.

En 1977 Lyklema [Lyklema (1977)] resolvió lo que él llamó el “problema ψ_d - ζ ” estudiando la coagulación de sales de iodato de plata, obteniendo que la identificación $\psi_d=\zeta$ está dentro del error experimental de cada una de las medidas.

2.2.4. EQUIPO EMPLEADO

Las medidas de potencial ζ fueron realizadas mediante un equipo Zetamaster modelo 5002 (Malvern Instruments). El sistema lleva incorporada una célula de medida rectangular (capilar) de cuarzo, de dimensiones 5 mm x 2 mm. Dos electrodos de platino situados en los extremos de la célula suministran el voltaje necesario para el experimento.

La resistencia eléctrica de la célula varía directamente con la longitud e inversamente con la sección. Para obtener una buena precisión en las medidas se necesitan voltajes elevados, pero ello conlleva un calentamiento de la muestra por efecto Joule. Para evitar esto, el equipo está preparado para permitir al voltaje desconectarse durante un tiempo determinado (ciclo libre), durante el cual, la transmisión de los datos permanece interrumpida.

La unidad óptica del sistema consta de un láser de helio-neón de 2 mW de potencia. El haz de la luz inicial se divide mediante un prisma en dos rayos, los cuales se orientan de forma que se crucen en la célula (Fig. 2.6.). Los dos rayos forman unas franjas de interferencia.



Figura 2.9. Equipo ZetaMaster empleado.

La geometría del sistema está bien definida y el ángulo que forman los dos rayos es bien conocido, determinándose el espacio entre franjas a partir de dicho ángulo. La luz difundida se recoge mediante un fotomultiplicador con un tiempo de respuesta mínimo de 50 nanosegundos. Esta luz difundida por la muestra se detecta como fotones individuales, cuya distribución en el tiempo reflejará la estadística del proceso de difusión.

El calibrado del equipo se realizó con un patrón suministrado por el fabricante. Es poliestireno de látex carboxi-modificado, donde su carga superficial ha sido modificada mediante un polímero soluble cargado. El resultado es una

superficie hidrófoba, la cual nos evita los problemas de contaminación que suelen ocurrir con las superficies de látex hidrófobas comunes.

En este trabajo se han usado las medidas de potencial ζ realizadas con el equipo ZetaMaster de Malvern para caracterizar la absorción de distintos iones a la superficie de los liposomas.

Además esta técnica ha sido utilizada para medir el potencial ψ_d , y así poder calcular el potencial electrostático y hacer un estudio de la estabilidad coloidal de los liposomas usando la teoría DLVO.

2.3. MICROSCOPIA DE TRANSMISIÓN ELECTRÓNICA (TEM).

La microscopía de transmisión electrónica se basa en un haz de electrones que manejado a través de lentes electromagnéticas se proyecta sobre una muestra muy delgada situada en una columna de alto vacío. Debido a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas.

El primer microscopio electrónico de transmisión fue desarrollado entre 1931 y 1933 por Ruska y sus colaboradores. La óptica básica de ese primer microscopio electrónico se mantiene hasta nuestros días; los cambios en los microscopios modernos consisten en adicionar más lentes para incrementar el ámbito de aumentos y darle mayor versatilidad. El primer microscopio electrónico de transmisión comercial lo construyó Siemens en 1939.

Las partes principales de un microscopio electrónico son:

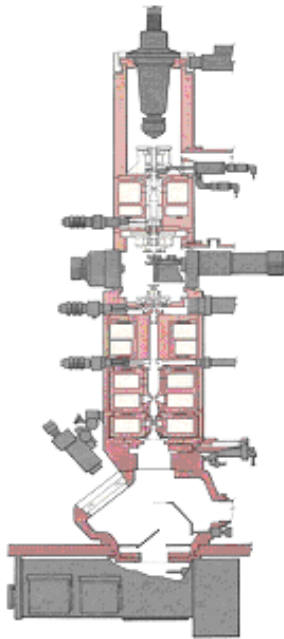


Figura 2.10. Esquema del equipo TEM.

- **Cañón de electrones**, que emite los electrones que chocan contra la muestra, creando una imagen aumentada.
- **Lentes magnéticas** para crear campos que dirigen y enfocan el haz de electrones.
- **Sistema de vacío**, que es una parte muy importante del microscopio electrónico. Debido a que los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, se debe hacer un vacío casi total en el interior de un microscopio de estas características.
- **Placa fotográfica o pantalla fluorescente** que se coloca detrás del objeto a visualizar para registrar la imagen aumentada.
- **Sistema de registro** que muestra la imagen que producen los electrones y que suele ser una computadora.

2.3.1. PRINCIPIOS DE FUNCIONAMIENTO

El Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM) utiliza como fuente de iluminación un haz electrónico que es dirigido y focalizado mediante lentes electromagnéticas. Este proceso se realiza en el interior de una columna en condiciones de alto vacío, de forma que los electrones acelerados siguen trayectorias rectas salvo que interaccionen con los átomos presentes en la muestra. El choque de los electrones con los átomos de la muestra provoca que estos pierdan

velocidad y varíen su trayectoria. Los electrones que no chocan con la muestra se proyectan sobre una pantalla fluorescente, placa fotográfica o CCD de una cámara formando imágenes reales. Al formarse la imagen, las zonas que más desvían los electrones aparecerán más oscuras que las que desvían menos. La magnitud de cambio de la trayectoria y pérdida de energía aumenta con el número atómico por lo que en las muestras biológicas compuestas por C, H, O, N, S esas diferencias son escasamente apreciables. Por este motivo es necesario usar tintes que introducen átomos pesados (Os, U, Pb, etc.) selectivamente en determinadas partes de la muestra.

El tipo de muestras que se pueden visualizar en el TEM es muy variado incluyendo suspensiones celulares, virus, nanopartículas, secciones de tejidos, polímeros laminares, etc. Las secciones ultrafinas de tejidos o muestras en suspensión se colocan sobre rejillas portaobjetos metálicos de 3 mm. Para la visualización de muestras particulares es imprescindible aplicar previamente sobre la rejilla una membrana de soporte de Formvar o carbono.

Generalmente las muestras orgánicas carecen de contraste suficiente para poder ser visualizadas, y son atravesadas por los electrones con facilidad. Por este motivo es necesario realizar una serie de tinciones con soluciones de metales pesados. Las muestras en suspensión (micropartículas, nanopartículas, virus, etc.) pueden estudiarse fácilmente aumentando el contraste mediante tinción negativa. Mediante esta tinción se tiñe el entorno de la muestra donde se impide el paso de los electrones. Como resultado se obtiene imágenes con un fondo oscuro adecuado sobre el que queda contrastada la estructura. Las soluciones de contraste más utilizadas son acetato de uranilo (1%) o ácido fosfotúngstico al 1-2% [New (1990)].



Figura 2.11. Representación de la preparación de liposomas negativamente teñidos para medidas de TEM.

2.3.2. EQUIPO EMPLEADO

El Microscopio de Transmisión Electrónica empleado en este trabajo es un PHILIPS CM-12 perteneciente a la “Rede de Infraestructuras de Apoio á Investigación e ó Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Santiago de Compostela”.

Este microscopio tiene acoplado a una cámara MEGA VIEW-II DOCU que obtiene imágenes digitales de 31x hasta 730.000x que son analizadas con el software SIS NT DOCU con capacidad de resolución de 0.2 nm, entre líneas, y 0.3 nm entre puntos.



Figura 2.12. Fotografía del equipo TEM empleado.

Puede trabajar a distintas aceleraciones de los electrones usando distintos voltajes (20, 40, 60, 80, 100 y 120 kV) y tiene las opciones de observación en campo oscuro, campo claro y difracción de electrones.

Para aumentar el contraste de las imágenes se tiñeron las muestras con ácido fosfotúngstico siguiendo el siguiente protocolo:

1. Aplicar una gota de la muestra sobre una rejilla recubierta con una película de Formvar.
2. Secar suavemente por absorción tocando el borde de la gota con papel de filtro teniendo cuidado de no arrastrar el papel sobre la rendija.
3. Depositar una gota de ácido fosfotúngstico al 2 % y eliminarla transcurrido un minuto por el mismo procedimiento que en el anterior paso.
4. Depositar una gota de agua bidestilada y tras esperar otro minuto eliminarla absorbiéndola con papel de filtro.

En este trabajo se ha empleado el Microscopio de Transmisión Electrónica para la comprobación de la formación de liposomas monodispersos. Además se ha utilizado para observar las estructuras de los agregados de liposomas en presencia de iones.

Sin embargo, a pesar de que existe abundante bibliografía sobre la utilización de esta técnica con liposomas, se ha evitado hacer un análisis a partir de las fotos TEM ya que la preparación de las muestras implica el secado de las mismas y esto puede modificar la estructura de los liposomas.

2.4. ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA

La polarización por fluorescencia permite analizar perturbaciones en la orientación y movilidad de ciertas moléculas fluorescentes, denominadas *sondas*, que se encuentran ligadas a otras moléculas a estudiar. Esta técnica está siendo empleada en el estudio de muchos sistemas en el campo de la biofísica: estructuras proteicas, ADN, ARN... Está resultando especialmente útil en el estudio de la fluidez de membranas artificiales y células vivas [Lakowicz (1983)]. El 30% de las publicaciones recientes donde se usa esta técnica está relacionado con el estudio de membranas

2.4.1. PRINCIPIOS DE FUNCIONAMIENTO

El fenómeno básico en el que se basa la polarización por fluorescencia fue descrito por Einstein en 1906 mediante la ecuación que gobierna el movimiento browniano de una partícula en un disolvente [Einstein (1906)]:

$$K = \frac{RT}{6\eta V} \quad [2.34]$$

donde K es el coeficiente de difusión rotacional de la partícula, R la constante de los gases, T la temperatura absoluta, V el volumen molar y η la viscosidad del medio.

Para entender los principios básicos de la polarización fluorescente se debe tener en cuenta que [Kevin *et al.* (1985)]:

- La luz es preferentemente absorbida por las sondas cuando el vector del campo eléctrico de la luz de excitación es paralelo al momento de transición de la sonda. La emisión fluorescente funciona de forma análoga,

el vector del campo eléctrico de la luz emitida será paralelo al momento de transición de la molécula excitada.

- Existe un intervalo de tiempo entre la absorción de la luz y la emisión fluorescente denominado tiempo de vida de fluorescencia (τ) de la sonda, que suele ser del orden de nanosegundos.

Ahora bien, cuando una molécula es excitada con luz polarizada, el vector del campo eléctrico de la luz emitida será paralelo al vector del campo eléctrico de la luz de excitación si la sonda permanece estacionaria durante el tiempo de vida del estado excitado (τ), es decir, rotaciones de la sonda durante su excitación producirán una despolarización de la luz emitida respecto a la luz de excitación [Rosoff (1996)]. Esto es fundamental para la determinación de la movilidad de la sonda en una bicapa lipídica (o rigidez de la membrana) ya que si la sonda tiene su orientación restringida debido a la rigidez de la membrana en la que se localiza, provocará que la luz emitida sea siempre paralela a la luz de excitación [Kasprzak y Weber (1982)] [Einstein (1916)].

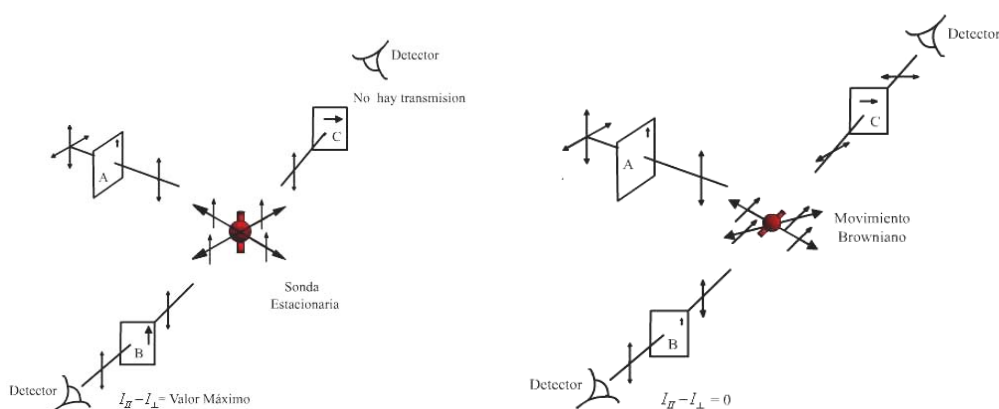


Figura 2.13. Esquema de los principios básicos de la polarización por fluorescencia. Si la sonda tiene su orientación restringida debido a rigidez de la membrana en la que se localiza, provocará que la luz emitida sea siempre paralela a la luz de excitación.

El parámetro que se mide en la espectroscopia por fluorescencia es la *anisotropía* (r) expresada como:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad [2.35]$$

donde $I_{\parallel}$ es la intensidad de luz cuando los polarizadores de emisión y recepción están orientados paralelamente, e $I_{\perp}$ es la intensidad de luz cuando los polarizadores de excitación y recepción están orientados perpendicularmente [Lakowicz y Maliwal (1983)] [Weber (1953)]. El término $I_{\parallel} - I_{\perp}$ de la ecuación 2.35 se aproximará a cero cuando la molécula está totalmente libre y tomará un valor máximo cuando la sonda esté en estado estacionario. De tal forma que la anisotropía refleja el grado de restricción en la movilidad de las sondas que han sido sensibles a la excitación durante su estado excitado.

El valor máximo teórico que puede alcanzar la anisotropía es $r = 0.4$, que sería medido en el supuesto de una sonda “congelada”, completamente estática con momentos de transición de emisión y excitación paralelos (condición que se suele dar cuando una sonda es excitada con una longitud de onda, λ , próxima a la de emisión). Por otro lado, el solapamiento de los espectros de emisión y excitación de la sonda produce una disminución de la anisotropía debido a la reabsorción de la luz emitida. Por esta razón el valor máximo teórico no se puede alcanzar [Kevin et al. (1985)].

2.4.2. EQUIPO Y MATERIAL EMPLEADO

El espectrofluorímetro empleado es el modelo SL_900CD en formato de la casa *Edinburgh Instruments* al que se le adaptó una lámpara Xenon de estado

estacionario. Este espectrofluorímetro pertenece al *Grupo de Fotoquímica de la Facultade de Química de la Universidade de Santiago de Compostela*.

Las tres sonda empleadas en el estudio de su movilidad en el interior de las membranas lipídicas de los liposomas fueron “1,6-difenyl-1,3,5-hexatriene” (DPH), “1-[4-(trimethylammonium) phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene” (TMA-DPH) suministradas por *Molecules Probes* y “N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) dioleoylphosphatidylethanolamine” (NBD-PE) suministrada por *Avanti Polar Lipids*.

En este trabajo se ha medido por espectroscopia de fluorescencia la diferencia en la movilidad de estas tres sondas en los liposomas, con y sin moléculas fluoradas y para estudiar la influencia que tienen las moléculas fluoradas en la viscosidad y rigidez al incorporarse a las bicapas.

2.5. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO

La Calorimetría Diferencial de Barrido, comúnmente conocida como DSC, acrónimo del nombre inglés “Differential Scanning Calorimetry”, es la técnica experimental más directa y precisa para caracterizar sistemas moleculares bien definidos, cuyas estructuras están estabilizadas por numerosas fuerzas débiles y, por consiguiente, susceptibles de experimentar transiciones conformacionales y/o cambios de fase al modificar la temperatura [Brown (1998)].

Es, consecuentemente, la técnica más adecuada para caracterizar termodinámicamente sistemas macromoleculares como proteínas [Privalov y

Khechinashvili (1974); Privalov y Potekhin (1986)], ácidos nucleicos [Privalov y Filimonov (1978)] y biomembranas [Mabrey y Sturtevant (1978); Bach y Chapman (1980)].

El uso de la calorimetría diferencial de barrido nos permite medir la capacidad calorífica aparente de una disolución macromolecular como una función continua de la temperatura, obteniéndose así lo que comúnmente se denomina *termograma*. A partir de esta función es posible, si el sistema macromolecular está bien definido, determinar los parámetros termodinámicos asociados a la transición inducida por la temperatura: cambios de entalpía (ΔH), de entropía (ΔS), de energía de Gibbs (ΔG) y de la capacidad calorífica (ΔC_p) [McNaughton y Mortimer (1975)].

2.5.1. PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO

En general, un microcalorímetro DSC consiste básicamente en dos células gemelas, una actúa de referencia (que se llena únicamente del disolvente de la muestra a estudiar), y la otra contiene la muestra en disolución, ambas situadas simétricamente dentro de un caparazón metálico diseñado para crear un entorno casi adiabático. La temperatura de este caparazón se controla a través de termosensores y efectores apropiados para que esté en todo momento muy próxima a la temperatura de las células.

El principio de funcionamiento de un calorímetro adiabático diferencial de barrido, midiendo por compensación, puede resumirse en los siguientes puntos [Sadqi M. (2000)] [Sorai (2004)]:

1. Al comenzar un barrido se suministra a las resistencias eléctricas, en íntimo contacto térmico con la superficie de cada célula, R_m y R_r en la

figura 2.14., la misma intensidad de corriente cuyo valor está fijado por la velocidad de barrido de temperatura seleccionada.

2. La adiabaticidad del sistema se consigue recubriendo ambas células con dos corazas concéntricas, coraza interna CI y externa CE, que las separan del medio exterior y cuyas temperaturas, siempre muy próximas a las de las células, están controladas por sendos sistemas de retroalimentación. Estos sistemas de control utilizan como sensores de temperatura termopilas de uniones bimetal, SE y SI, y como efectores resistencias eléctricas laminares, RCE y RCI (figura 2.14). En el caso ideal de una simetría perfecta de ambas células y ausencia de cualquier efecto térmicamente inducido, la temperatura de ambas células evoluciona con el mismo valor.
3. La aparición de un efecto térmicamente inducido durante el calentamiento en la célula de muestra retarda la temperatura de esta célula respecto a la célula de referencia. La diferencia de temperatura momentánea es detectada por el sensor de temperatura SC (figura 2.14), una termopila cuya señal eléctrica comanda un sistema de compensación que suministra un exceso de potencia eléctrica a la célula de menor temperatura para restablecer rápidamente la igualdad de temperaturas de las dos células.
4. La señal que se registra es proporcional a esta potencia de exceso o compensación y ésta, a velocidad de barrido constante, es directamente proporcional a la diferencia de capacidad calorífica entre ambas células.

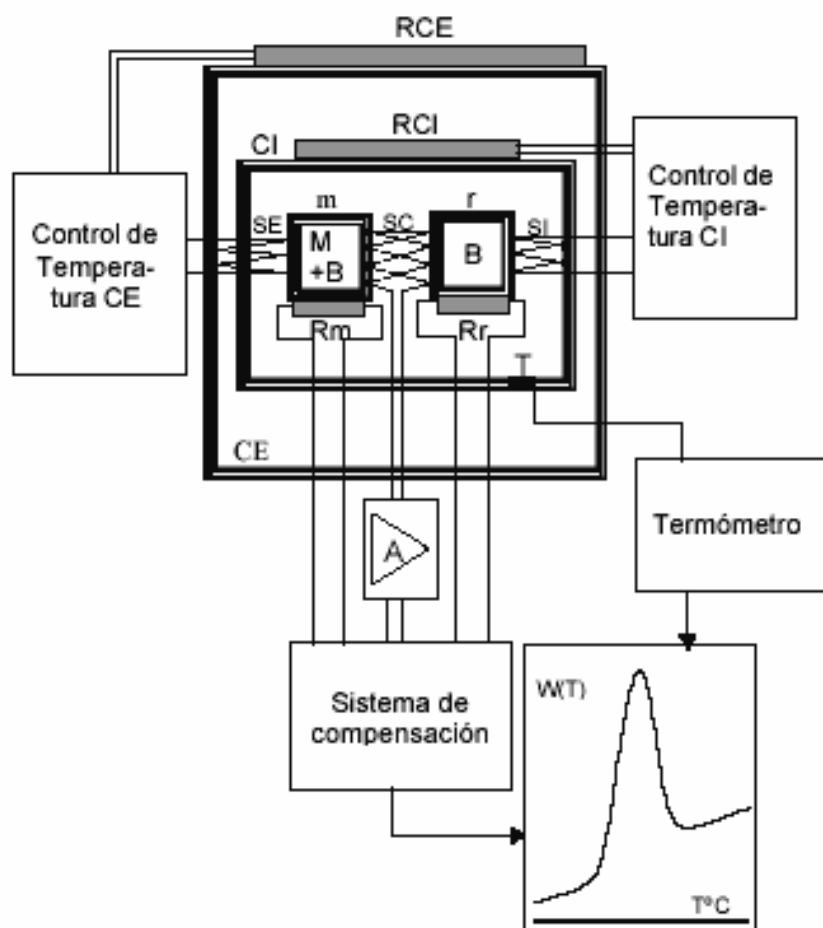


Figura 2.14. Esquema de los elementos que constituyen un calorímetro diferencial de barrido tipo DASM, Biopribor, Scal o VP-DSC. Célula de muestra, *m*; célula de referencia, *r*; muestra, *M*; tampón, *B*; sensor de temperatura de las células, *SC*; resistencia de la célula de muestra, *R_m*; resistencia de la célula de referencia, *R_r*; coraza interna, *CI*; coraza externa, *CE*; sensor de temperatura de la *CI*, *SI*; sensor de temperatura de la *CE*, *SE*; resistencia de la coraza externa, *RCE*; resistencia de la coraza interna, *RCI*; amplificador (*A*).

2.5.2. EQUIPO EMPLEADO

En este trabajo se han empleado dos equipos distintos de DSC consecuencia de la colaboración con distintos grupo de investigación:

Perkin-Elmer: Los primeros estudios termodinámicos de las transiciones de fase de los liposomas se realizaron con el calorímetro diferencial de barrido (modelo de diamante) de la marca Perkin Elmer del *Dipartimento di Fisica de la Università di Roma “La Sapienza”* con el software Pyris para el análisis termodinámico. Este calorímetro usa células de 50 μl que deben de ser selladas herméticamente con una prensa mecánica.

MicroCal VP-DSC: También se ha usado un VP-DSC (*Valery Plotnikov Differential Scanning Calorimetric*) de la casa Microcal en el *Departamento de Físico-Química de la Facultad de Química de la Diversidad Nacional Autónoma de México (México)*.

Este calorímetro presenta una serie de ventajas que lo hacen idóneo para la determinación de las transiciones de fase de las membranas de los liposomas. A diferencia del Perkin-Elmer el bloque calorimétrico es fijo (células no desmontables), lo que permite una mayor reproducibilidad. Estas células consisten en tubos cilíndricos de 1.5 mm de diámetro y con un volumen efectivo de 0.523 ml, fabricados con una aleación de tántalo, cuyas propiedades químicas se asemejan a las del cristal, siendo inerte a gran cantidad de sustancias, en especial a casi todos los ácidos.



Figura 2.15. Fotografía del VP-DSC empleado.

El intervalo de temperatura en el que puede trabajar va desde $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta $130\text{ }^{\circ}\text{C}$, la velocidad de barrido puede variar desde 0 a $2^{\circ}\text{ grad/min}$. Utiliza un mecanismo interno basado en el efecto Peltier, de manera que no requiere dispositivos externos de calentamiento o enfriamiento. Para trabajar a temperatura igual o superior a la de ebullición el VP-DSC ha sido diseñado con un sistema de presurización que permite el uso de presiones que oscilan desde 0 a 35 psi, evitando la ebullición de la muestra.

Las principales ventajas de este calorímetro se basan en el gran avance en sensibilidad, reproducibilidad, estabilidad y mejora de la adiabaticidad (asegurada por medio de dos corazas, interna y externa de geometría cilíndrica).

En este trabajo se ha empleado el DSC Perkin- Elmer para el estudio del cambio en las transiciones de fase de las membranas de los liposomas con iones y se hicieron los primeros estudios sobre la incorporación de moléculas fluoradas a la bicapa lipídica de los liposomas.

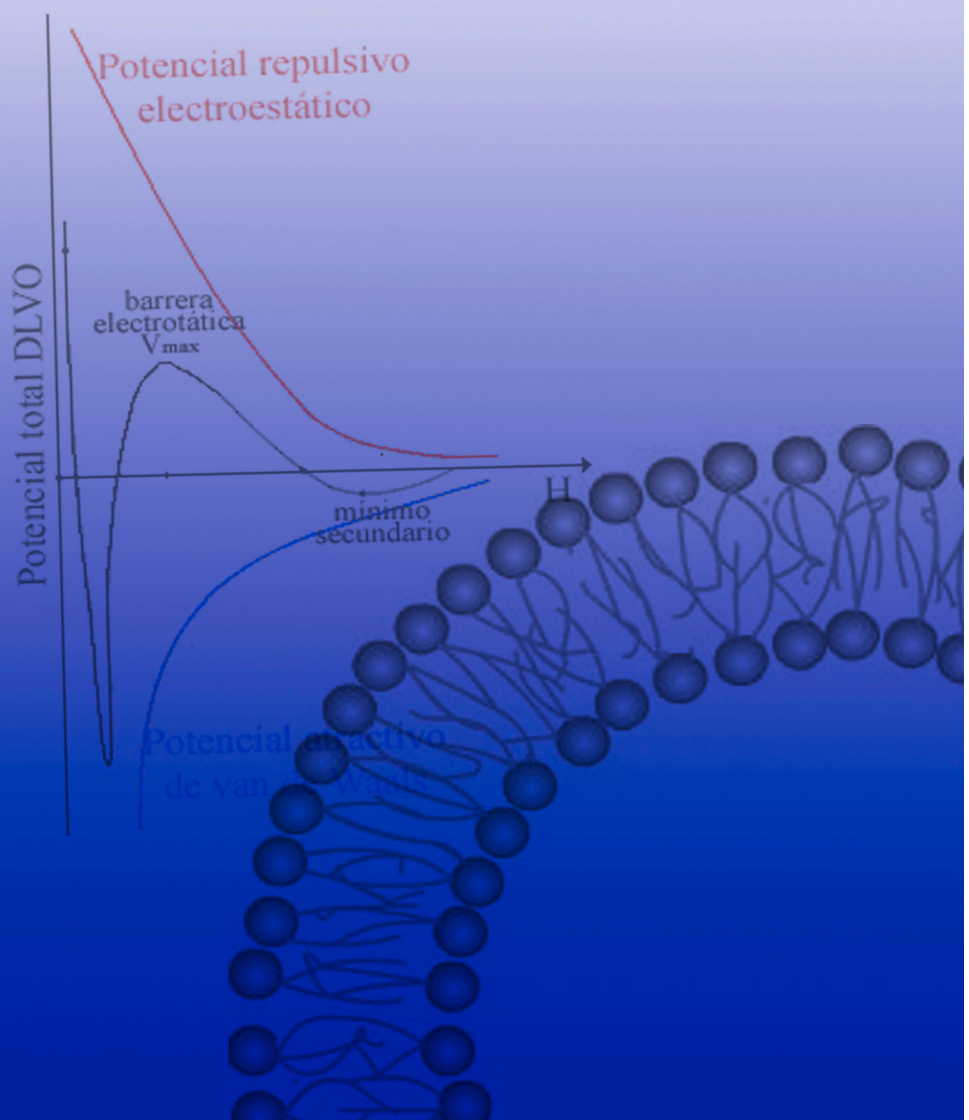
Debido a su mayor precisión para muestras líquidas, se ha utilizado el VP-DSC de Microcal para profundizar en la caracterización de la incorporación de distintos componentes fluorados a dos tipos de membranas lipídicas.

2.6. BIBLIOGRAFÍA

- Bach D. and Chapman D.** (1980) *Biological Microcalorimetry* Beeper, A.E. Ed. pag 265, Academic Press, London.
- Brown M.E.** (1998) *“Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry”* Elsevier. Amsterdam
- Sadqi M.** (2000) *“Estudio Termodinámico de los Estados Parcialmente Plegados del Dominio SH3 de α -Espectrina”* Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Degioro V. and Corti M.** (1985) *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsion*. Italian Physical Society. NHPC, Noth Holland.
- Berne B.J. and Pecora R.** (1976) *Dynamic Light Scattering: With Application to Chemistry, Biophysics and Physics* John Wiley and Sons Inc., New York.
- Durkin S.S. and Derjaguin B. V.** (1974): *Surface and Colloid Science*. Ed. E. Matijevic, vol 7, New York.
- Einstein A.** (1905), Ann. Physik. 17: 549. *“Investigations on the Theory of Brownian Movement”*.
- Einstein A.** (1916) Verh. Deutsch. Phys. Ges. 18: 318. *“Emission and absorption of radiation according to the quantum theory.”*
- Einstein A.** (1906). Ann. Phys. 19: 371-381. *“Zur theorie der brownischen bewegung”*.
- Flory P.J.** (1941) J. Chem. Phys. 9: 660. *“Thermodynamics of High Polymer Solutions”*.
- Heimenz P.C. and Rajagopalan R.** (1997) *“Principles of Colloid Surface Chemistry”* 3th Edition Marcel Dekker, New York.
- Holmberg K.** (2002) *“Applied Surface and Colloid Chemistry”*. Wiley Ltd. West Sussex, England.
- Huggins M.L.** (1941) J. Chem. Phys. 9: 440 *“Solutions of Long Chain Compounds”*.
- Hunter R. J.** (1981) *“Zeta Potential in Colloid Science”*. Ottewill, R. H. and Rowel R. L. (eds.), New York.
- Kasprzak A. and Weber G.** (1982) Biochem J. 191: 395-400. *“Flourescence Polarization studies on binding of 4-methylumbeliferyl beta-D-galactopyranoside to Ricinus Communis agglutinin”*.
- Kevin L. B., Thompson L., Klebe R. and Horowitz P.** (1985). Biotechn. 3: 356-366. *“Flourescence Polarization : A General Method for Measuring Ligand Binding and Membrane Microviscosity”*.
- Lakowicz J.R.** (1983) *Principles of fluorescence spectroscopy*. Plenum Press

- Lakowicz J.R. and Maliwal B.P.** (1983). J. Biol. Chem. 258: 4794-4801. "*Oxygen quenching and fluorescence depolarization of tyrosine residues in proteins*".
- Lyklema J.** (1977). J. Colloid Interface Sci. 53: 242-250. "*Water at Interfaces: A Colloid-Chemical Approach*".
- Mabrey S. and Sturtevant J.M.** (1978) Methods Membr. Biol. 9: 237. "*High-sensitivity differential scanning calorimetry in the study of biomembranes and related model systems.*"
- McNaughton J.L. and Mortimer C.T.** (1975) "*Calorimetría Diferencial de Barrido*". Perkin Elmer Corporation.
- New R.R.C.** (1990): *Liposome: A Practical Approach*. IRL Press, New York
- Privalov P.L. and Filimonov V.V.** (1978) J. Mol. Biol. 122: 447. "*Thermodynamic analysis of transfer RNA unfolding*".
- Privalov P.L. and Khechinashvili N.N.** (1974) J. Mol. Biol. 86: 665-684. "*A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study*".
- Privalov P.L. and Potekhin S.A.** (1986) Methods Enzymol. 131: 4-51. "*Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins*".
- Provencher S.W.** (1979) Macromol. Chem. 180: 210. "*Inverse problems in polymer characterization; direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy*".
- Rayleigh, Lord**, (1873) Proceedings of the London Mathematical Society, 4: 357-368. (Republished in Scientific Papers, by John William Strutt, Vol. 1, Cambridge University Press, 1899, pp. 170-181.) "*Some general theorems relating to vibrations*".
- Rosoff M.** (1996) "*Vesicles*". Marcel Dekker. New York
- Smoluchowski M.** (1921) "*Hansbulch der Electrilität und des Magnetismus (Graetz)*" vol.II, Barth, Leipzig .
- Smoluchowski M.** (1906), Ann. Physik 21: 756. "*Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen*".
- Sorai M.** (2004) "*Calorimetry & Thermal Analysis*". Wiley Ltd., England.
- Weber G.** (1953) Adv. Prot. Chem. 8: 145-167. "*Rotacional brownian motion and polaritation of the flourescence of solutions*".
- Young R.J. and Lovell P.A.** (1991) "*Introduction to Polymers*" 2th Edition. Chapman & Hall. London.

Estabilidad coloidal de los liposomas



Capítulo 3

Estabilidad Coloidal de los Liposomas

Las dispersiones de liposomas tienen una elevada energía superficial asociada a la enorme superficie que presentan. Desde el punto de vista termodinámico son inestables y tienden de forma natural a agregarse o fusionarse, para así disminuir su energía libre superficial y su área. Si la fase dispersa permanece estable en un medio líquido es como consecuencia de la existencia de un mecanismo estabilizador (repulsión electrostática, impedimentos estéricos, fuerzas de hidratación...). El estudio de la estabilidad coloidal de los liposomas es

de importancia fundamental para sus aplicaciones como transportadores de medicamentos, encapsulación de vacunas o en la liberación controlada de fármacos. En algunas ocasiones interesa mantener estable el sistema, pero en otras lo que conviene es controlar la velocidad y las condiciones de agregación, fusión y ruptura de los liposomas.

A partir del estudio de las fuerzas de interacción entre liposomas, el campo de la físico-química se presenta clave para la comprensión de los factores de su estabilización. En la mayoría de los sistemas coloidales estas fuerzas de interacción son modelizadas a partir de la teoría DLVO. Desde principios de siglo se conocía la capacidad que tienen los electrolitos de provocar la agregación de numerosos coloides [Schulze (1882), Arai y Norde (1990), Freundlich (1926)] y las expresiones para la velocidad de formación de dobletes en un proceso de agregación debido al movimiento Browniano [Hunter (1981)]. Sin embargo, hasta que no se desarrollaron las expresiones de los potenciales de interacción entre dos partículas no se pudo obtener una teoría que explicase los hechos experimentales. La teoría DLVO fue desarrollada en los años 40 por Derjaguin y Landau, Verwey y Overbeek [Derjaguin y Landau (1941), Verwey y Overbeek (1948)] y supone que el potencial total de interacción entre dos partículas es la suma del potencial repulsivo electrostático y el potencial atractivo de London van der Waals.

La validez de la teoría DLVO para explicar la estabilidad coloidal fue tema de estudio para muchos científicos en el periodo de los años 40 a los 80. Derjaguin y Titievskaya [Derjaguin y Titievskaya (1957)] estudiaron la estabilidad de coloides hidrófobos, encontrando explicación al espesor de películas de jabón en la teoría DLVO. Lyklema [Lyklema (1967)] amplió este trabajo estudiando el efecto de la concentración de sales en el espesor de la lámina en equilibrio.

Norris y Rausell-Colom [Norris y Rausell-Colom, (1963)] obtuvieron resultados experimentales de acuerdo con las predicciones de la teoría DLVO a la hora de estudiar el comportamiento de arcillas en presencia de distintos cationes.

A partir de los años 70 se desarrollan nuevas y potentes técnicas para medir la fuerzas de interacción a corto alcance (*Microscopios de Fuerza Atómica AFM*) entre superficies de moléculas en soluciones electrolíticas. La consecuencia fue una ampliación del campo de estudio de la teoría DLVO. Así, Israelachvili y Adams [Israelachvili y Adams (1978)] estudiaron la atracción entre superficies de mica en presencia de distintas sales, confirmando los valores teóricos.

Hoy en día no existe una teoría más general que ésta para la estabilidad coloidal. Es verdad que ha sufrido múltiples modificaciones en las décadas posteriores, pero no se trata de cambios de carácter fundamental, sino más bien aportaciones relacionadas con términos energéticos asociados a parámetros que no habían sido tenidos en cuenta por la teoría primitiva [Molina (1999)].

3.1. TEORÍA CLÁSICA DLVO

3.1.1. FUERZAS DE VAN DER WAALS

Las fuerzas de van der Waals, o de dispersión, tienen su origen físico en la interacción entre los dipolos de una molécula y los dipolos inducidos en una molécula vecina [Cevc y Marsh (1984)]. Las fuerzas de van der Waals son de carácter atractivo y están presentes en todos los coloides. Son responsables de que los sistemas coloidales sean inestables en ausencia de cualquier otro potencial repulsivo electrostático, estérico, de hidratación...).

En los primeros años 30, Kallmann y Willstätter [Kallmann y Willstätter (1932)] ya sugerían que la fuerzas atractivas que provocaban la agregación de coloides debían ser del tipo van der Waals, similares a las fuerzas atractivas entre átomos y moléculas o semejante a la fuerza responsable de la condensación de gases en líquidos.

Teniendo en cuenta que en el caso de coloides las fuerzas de van der Waals entre átomos de dos coloides próximos pueden tomarse como aditivas y si calculamos las fuerzas resultantes como la superposición de todos los átomos, obtenemos una fuerza atractiva que decrece con el cuadrado de la distancia entre los coloides y su alcance llega hasta unos diez nanómetros, lo cual es comparable con el alcance de la fuerza repulsiva electrostática.

Hamaker [Hamaker (1936), (1937)] profundizó en el estudio realizado por London [Hunter (2001)] sobre las fuerzas de dispersión y obtuvo la expresión de la energía de atracción entre dos partículas mediante la integración de la energía interatómica en los volúmenes de las dos partículas que interaccionan:

$$V_A = - \int_{v_1} \int_{v_2} \frac{q^2 \beta}{H^6} dv_1 dv_2 \quad [3.1]$$

donde v_1 y v_2 son los volúmenes de las partículas, H la distancia entre dos partículas, q es el número de átomos y β es la constante de London.

La integración de la ecuación 3.1 para dos esferas huecas de igual radio (a) e igual espesor (d) resulta [Tadmor (2001)]:

$$V_A(H) = \frac{-Aa}{12} \left[\frac{1}{d+2H} - \frac{2}{d+H} - \frac{1}{d} - 2A \ln \left(\frac{d(2H+d)}{(d+H)^2} \right) \right] \quad [3.2]$$

donde A es la constante de Hamaker y H es la distancia de separación entre la superficie de dos partículas.

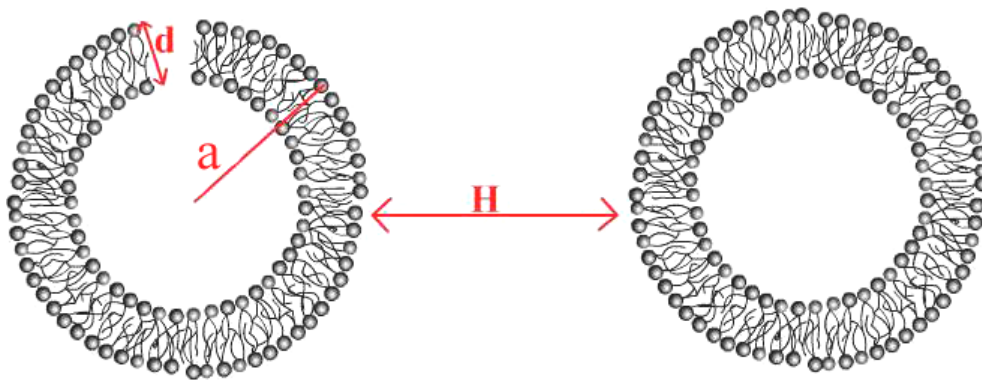


Figura 3.1. Parámetros de la ecuación de van der Waals para el caso de dos liposomas de radio a y espesor de la bicapa d , separados una distancia H .

Para el cálculo del potencial atractivo de van der Waals se han tenido en cuenta las siguientes restricciones:

- Asumir la aditividad de las atracciones interatómicas de los coloides
- Despreciar el retardo electromagnético basado en la velocidad finita de la propagación de las ondas electromagnéticas

La teoría propuesta por Lifshitz [Lifshitz (1956)] para el cálculo del potencial incluye estos dos factores, pero la complejidad en los cálculos la hace poco práctica

en su aplicación a coloides. De hecho, muchos autores [Lasic (1993), Garcia-Manyes *et al.* (2005)] simplifican la ecuación 3.2 para el caso de esferas sólidas cuyo tamaño es mucho mayor que la distancia entre coloides ($H \ll a$), quedando la expresión simplemente como:

$$V_A(H) = \frac{-Aa}{6H} \quad [3.3]$$

3.1.2. FUERZAS ELECTROSTÁTICAS

La interacción repulsiva se debe a la carga eléctrica de los coloides y depende de la composición lipídica y del tamaño de los liposomas, así como de la fuerza iónica, del pH y de las propiedades dieléctricas del medio.

Cuando dos partículas coloidales se aproximan, las dobles capas eléctricas que las rodean empiezan a interactuar conduciendo a un término repulsivo de tipo eléctrico en el balance energético total. Si esta repulsión es mayor a la atracción de van der Waals se dice que el coloide está estabilizado electrostáticamente y el sistema se mantiene estable. Un aumento de la concentración iónica o una disminución del potencial difuso conducen a la disminución de la estabilidad del coloide, que en consecuencia puede agregarse o fusionarse hasta llegar a precipitar.

Según el modelo de Stern la capa de iones que rodea a la esfera se encuentra subdividida en dos capas, una más interna y más delgada bajo el plano interno de Helmholtz (IHP), y otra externa y difusa bajo el plano externo de Helmholtz (OHP), en donde los iones se encuentran distribuidos según la ecuación

de Poisson-Boltzmann (figura 2.8.). En este caso la repulsión de largo alcance está determinada por el potencial de la capa externa de Helmholtz ψ_d . Como no existe una solución analítica exacta para la ecuación de Poisson-Boltzmann, las soluciones se calculan asumiendo que $ze\psi_d \ll k_B T$, donde z es la valencia del ión y e la carga eléctrica. Basándose en estas consideraciones, la ecuación de Poisson-Boltzmann se reduce a la expresión:

$$\nabla^2 \psi = k^2 \psi \quad [3.4]$$

donde k es el parámetro de Debye, un parámetro que se calcula a partir de la relación

$$k^2 = \frac{8\pi c_s e^2 z^2}{\epsilon k_B T} \quad [3.5]$$

donde ϵ es la constante dieléctrica del medio y c_s la concentración iónica de la misma especie en $\text{iones} \cdot \text{cm}^{-3}$.

A partir de la ecuación 3.4 Derjaguin [Derjaguin (1934)] calculó las expresiones aproximadas para el potencial de interacción repulsivo (V_R) en el caso de distancias relativamente grandes (kH grandes) y valores ka elevados ($ka > 10$):

$$V_R = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r \left(\frac{4\kappa_B T}{ze} \gamma \right)^2 \ln[1 + \exp(-kH)] \quad [3.6]$$

donde

$$\gamma = \tanh \frac{ze\psi_d}{4\kappa_B T} \quad [3.7]$$

Cuando la doble capa que rodea los coloides está extendida, es decir, para valores pequeños de ka la aproximación de Derjaguin empieza a fallar. Verwey y Overbeek [Verwey y Overbeek (1948)] elaboraron un procedimiento alternativo para el caso de potenciales bajos y obtuvieron la siguiente expresión del potencial electrostático:

$$V_R = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r a \left(\frac{4k_B T}{ze} \gamma \right)^2 \exp(-kH) \quad [3.8]$$

que es una aproximación válida para valores de $\psi_d < 50$ mV y para $kH > 1$.

Pero para ser coherentes con el modelo de la doble capa difusa, tenemos que tener en cuenta que los coloides están rodeados de una capa fina de iones del ancho de la capa de Stern (Δ). Tal como ya se comentó en la sección 2.2.3., el potencial (ψ_d) en el plano OHP de la capa de Stern se puede identificar con la superficie de desplazamiento donde se mide el potencial ζ . De esta forma podremos obtener directamente el valor de ψ_d a través de medidas de electroforesis. Teniendo en cuenta estas consideraciones podemos escribir la ecuación 3.8 como:

$$V_R = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r (a + \Delta) \left(\frac{4\kappa_B T}{ze} \tanh\left(\frac{ze\zeta}{4k_B T}\right) \right)^2 \exp(-k(H - 2\Delta)) \quad [3.9]$$

3.1.3. TEORÍA CLÁSICA DLVO

Esta teoría se basa principalmente en el hecho de que la estabilidad coloidal está dominada esencialmente por la suma del potencial atractivo de van der Waals y el potencial repulsivo electrostático. La combinación de ambos

potenciales origina un potencial total de interacción en función de la distancia entre dos partículas que se aproximan:

$$V_{DLVO} = V_R + V_A \quad [3.10]$$

donde V_R es el potencial repulsivo electroestático y V_A es el potencial atractivo de van der Waals.

En el caso de liposomas de fosfatilcolina, los cuales poseen baja carga superficial, el potencial DLVO toma la forma:

$$V_{DLVO} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r(a + \Delta)\left(\frac{4\kappa_B T}{ze}\gamma\right)^2 \exp(-k(H - 2\Delta)) \\ + \frac{-Aa}{12} \left[\frac{1}{d + 2H} - \frac{2}{d + H} - \frac{1}{d} - 2A \ln\left(\frac{d(2H + d)}{(d + H)^2}\right) \right] \quad [3.11]$$

La figura 3.2. muestra la típica curva de potencial de interacción obtenida por combinación de las ecuaciones 3.2 y 3.9.

El potencial de van der Waals domina a distancias grandes y pequeñas. A distancias pequeñas V_R tiene un valor finito, mientras que V_A aumenta rápidamente tendiendo a infinito. A distancias intermedias aparece una barrera de potencial cuya altura es $V_{\max}$.

La altura de esta barrera determina la estabilidad del coloide, y dependerá del potencial eléctrico difuso de las dobles capas, de la constante de Hamaker, de la valencia del contraión, del ancho de la capa de Stern, del tamaño de la partícula y de la concentración de electrolito.

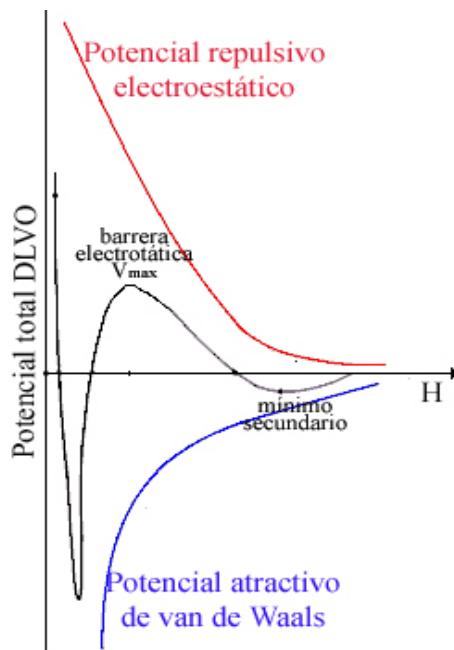


Figura 3.2. Curva típica del potencial DLVO: suma de un potencial atractivo de van der Waals y un potencial repulsivo electrostático.

La teoría DLVO es una teoría general que se aplica a gran cantidad de sistemas coloidales y en muchos casos puede sufrir modificaciones para tener en cuenta las características específicas de los sistemas. Una de las mayores limitaciones de las predicciones de la teoría DLVO clásica viene dada porque la teoría interpreta el disolvente como un continuo y no tiene en cuenta la estructura y el tamaño de las moléculas del agua.

3.2. AGREGACIÓN

Cuando entre los liposomas no existe ninguna fuerza repulsiva que estabilice el sistema (electrostática, estérica, hidratación...), estos se empiezan a adherir unos a otro. En esta adhesión se crean grandes clusters que pueden tener tamaños de micras y con el tiempo pueden precipitar. Por eso se dice que el sistema se vuelve inestable.

En general, puede decirse que existen tres situaciones distintas dependiendo de los valores de los potenciales repulsivo y atractivo [Oliveira (1997)]:

La figura 3.3.(a) representa un potencial DLVO que muestra una barrera de potencial ($V_{\max}$). Esta barrera de potencial repulsiva domina sobre las fuerzas atractivas de van der Waals y se evita la agregación. Normalmente se considera que los sistemas coloidales permanecen largo tiempo estables si la barrera de potencial $V_{\max} > 10 k_B T$.

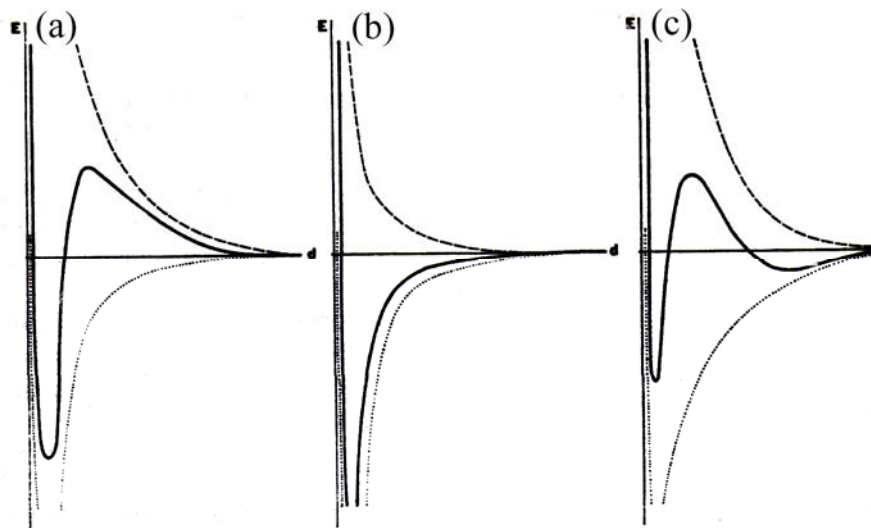


Figura. 3.3. Tres posibles situaciones del potencial DLVO: (a) Aparición de una barrera de potencial repulsiva de altura $V_{\max}$. (b) Las fuerzas atractivas de van der Waals dominan y la barrera de potencial desaparece. (c) Aparición de una barrera de potencial junto a un mínimo secundario.

Un aumento de la concentración de iones provoca un apantallamiento de la carga del coloide (figura 3.4.), lo que se traduce en una disminución de ψ_d y por tanto de V_R , y con ello una disminución de la barrera del potencial. La concentración a la cual la barrera electrostática desaparece se suele denominar *concentración de agregación crítica (c.a.c.)*. Para concentraciones mayores el sistema es inestable y comienza el proceso de agregación. De hecho se consideran inestables los sistemas que tengan una barrera de potencial de $V_{\max} < k_B T$. Esta situación está representada en la figura 3.3.(b), donde la barrera de potencial ha desaparecido y los coloides caen en el mínimo primario situado muy próximo a la

superficie del coloide. Por tanto, las superficies de los coloides agregados están en contacto. La profundidad de este mínimo primario implica que la agregación es irreversible y una vez agregados no se pueden volver a redispersar.

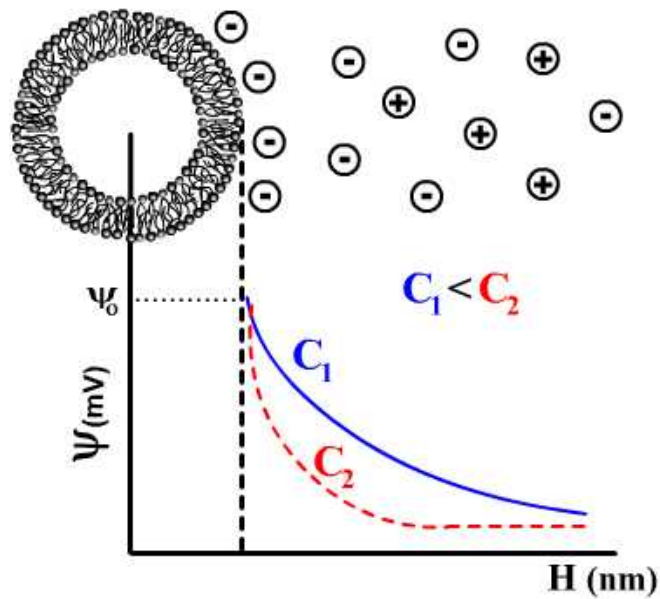


Figura 3.4. Apantallamiento del potencial repulsivo al aumentar la concentración de electrolito en el medio.

Existe otra posible situación, representada en la figura 3.3.(c) donde el potencial total DLVO muestra un mínimo secundario a cierta distancia de la superficie de la partícula. Esta situación se traduce en una agregación débil que puede ser reversible si la profundidad del mínimo secundario no es muy grande y que mantiene a los coloides agregados pero sin que sus superficies lleguen a estar en contacto (figura 4.21.).

3.3. FUSIÓN

La fusión de liposomas es un posible paso tras la agregación, en la que las dos membranas en contacto se mezclan para formar un liposoma mayor. Es un proceso irreversible que sólo se da en coloides con una cavidad acuosa en el interior, como es el caso de los liposomas.

El estudio de la fusión de liposomas es de gran relevancia como modelización de la fusión de células en los procesos biológicos. Existen en la naturaleza muchos procesos celulares que implican la fusión de membranas como la propagación de virus, la reproducción o los procesos de endo- y exo-citosis por los cuales las células se comunican con su entorno. El estudio de la fusión de liposomas como modelo celular puede dar luz a nuestra comprensión de la división celular, un proceso inverso a la fusión.

Existe, sin embargo, una diferencia con respecto a la agregación: los liposomas que se fusionan han de sufrir cambios topológicos en sus membranas [Ceve y Marsh (1984)]. Para que la fusión se lleve a cabo, es necesario que tras la agregación, las superficies de los liposomas se deshidraten para que sus membranas estén en contacto directo unas con otras. Una vez en contacto directo, es necesario que se creen perturbaciones en las zonas de contacto de las dos membranas y se formen estructuras intermedias como micelas inversas entre las dos membranas (figura 3.5.).

Debido a la repulsión de las fuerzas de hidratación, las perturbaciones de las membranas de dos liposomas agregados solo se pueden dar si las superficies están parcialmente libres de moléculas de agua. Por eso existen ciertas partículas – ciertas proteínas, enzimas, gliceroles, iones divalentes (Ca^{2+}) – que pueden

favorecer esta deshidratación de las membranas. Imperfecciones, ondulaciones o defectos en las membranas facilitan igualmente la fusión de los liposomas.

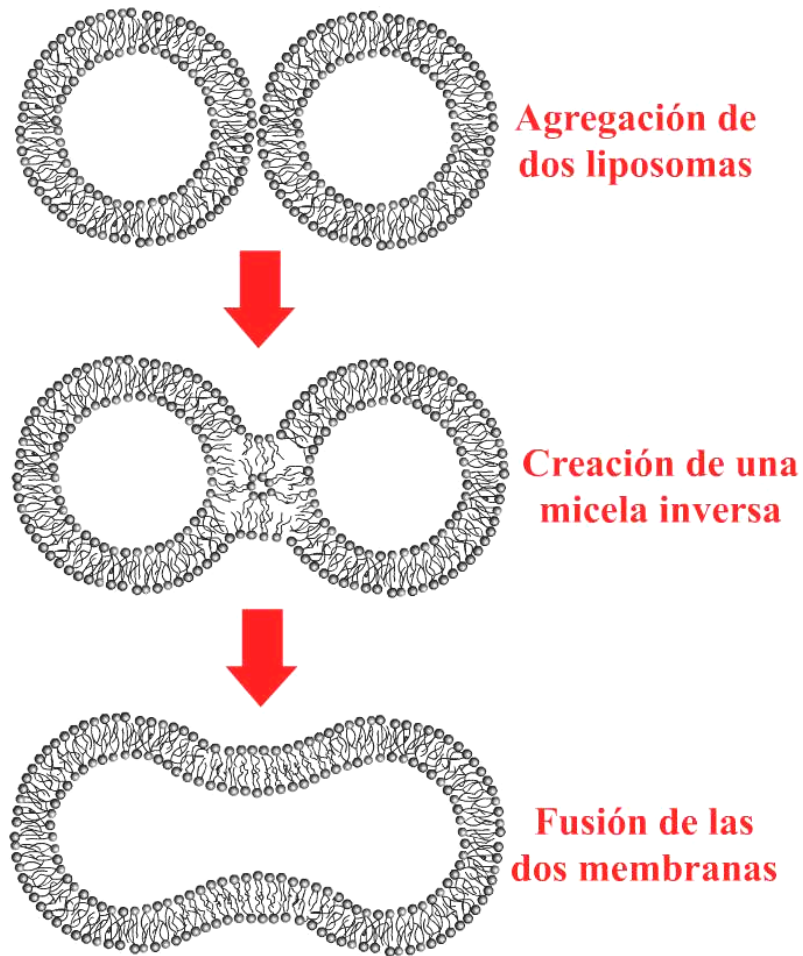
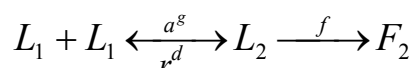


Figura 3.5. Proceso de fusión de liposomas: agregación, creación de micela inversa y fusión de las membranas.

La simple agregación de membranas es un proceso de primer orden de un único paso. Sin embargo, la fusión de liposomas es un proceso que requiere dos pasos; la agregación y la fusión propiamente dicha:



La fusión es un proceso irreversible que puede tener una constante de equilibrio (f) distinta a la de la agregación (a^g), ya que no todos los liposomas que se agregan se acaban fusionando. La agregación es un proceso que puede ser reversible, por tanto puede existir una constante de equilibrio de redispersión de los agregados (r^d). A bajas concentraciones de liposomas, la agregación es tan lenta, que es la que controla todo el proceso de fusión pero a mayores concentraciones de liposoma el proceso total de fusión está controlado por la constante de agregación (a^g) [Cevc y Marsh (1984)].

Los mecanismos de fusión y las condiciones que los provocan todavía no son del todo entendidos por los investigadores y existen ciertas peculiaridades de la fusión que ponen de manifiesto la necesidad de un estudio físico-químico para comprender a fondo el proceso. Por ejemplo, la secuencia de la capacidad que tienen los iones alcalinos de provocar la fusión es distinta que para provocar la agregación. En el caso de la agregación la secuencia es $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+}$, mientras que para la fusión es $\text{Ca}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$. Existe cierta especificidad de los iones que provocan la fusión.

3.4. REGLA DE SCHULZE-HARDY

Con anterioridad se ha definido la *c.a.c.* como la concentración a la cual la barrera electrostática se hace menor a $k_B T$ y a partir de la cual se produce la agregación de los liposomas. La regla de Schulze-Hardy relaciona la *c.a.c.* con la valencia del electrolito en disolución y puede ayudar a predecir a qué concentraciones los liposomas serán inestables para distintos iones.

Teniendo en cuenta ciertas aproximaciones y la relación del parámetro de Debye con la concentración de electrolito (ecuación 3.5), podemos escribir el potencial total DLVO como [Hunter (2001)]:

$$V_{DLVO} = \frac{64\pi\kappa_B T a c_s \gamma^2}{k^2} \exp(-kH) - \frac{Aa}{6H} \quad [3.12]$$

Cuando la concentración de electrolito sea la *c.a.c.*, la barrera de potencial desaparece, es decir, $V_{DLVO}=0$ y $dV_{DLVO}/dH = 0$. La primera condición nos lleva a que:

$$\frac{k^2}{c_s} = \frac{384\pi\kappa_B T \gamma^2 \exp(-kH)}{A} \quad [3.13]$$

mientras que la segunda condición nos lleva a $kH=1$, que implica que el máximo de potencial ocurre a una distancia de la superficie del liposoma de $H=k^{-1}$ (la distancia de Debye). Teniendo en cuenta esto en la ecuación anterior, tenemos que:

$$\frac{k^3}{c_s} = \frac{768\pi\kappa_B T \gamma^2 \exp(-1)}{A} ; \text{ es decir } \frac{k^6}{c_s^2} \propto \left(\frac{T \gamma^2}{A} \right) \quad [3.14]$$

Se supone que los valores del potencial serán bajos (próximos a cero) cuando la concentración de electrolito sea la *c.a.c.*; así que podemos asumir que γ será proporcional a $z\psi_d / T$. Si además tenemos en cuenta que k^2 es proporcional a $c_s z^2 / \epsilon T$ podemos expresar la regla de Schulze-Hardy para potenciales bajos como:

$$z^2 c_s \propto \frac{\epsilon^2 T \gamma_d^4}{A^2} \quad [3.15]$$

donde la parte izquierda es una constante si ψ_d es una constante. Como los valores del potencial en la *c.a.c.* no suelen ser muy distintos de cero, podemos escribir que:

$$c.a.c. \propto \frac{1}{z^2} \quad [3.16]$$

la *c.a.c.* es inversamente proporcional al cuadrado de la valencia del electrolito. Por tanto si la agregación ocurre a 1M con un electrolito 1:1, entonces el mismo sistema se agregará a una concentración de 0.25 M con un electrolito 2:2.

3.5. TEORÍA DLVO AMPLIADA

3.5.1. FUERZAS DE HIDRATACIÓN

Existen múltiples sistemas hidrófobos o hidrófilos donde la estabilidad coloidal no puede ser explicada satisfactoriamente por la teoría DLVO [Lawrence y Matijevi (1969), LeNeveu *et al.* (1976), Broide *et al.* (1995)]. El origen de esta discrepancia entre las predicciones de dicha teoría y los datos experimentales se debe a que la teoría clásica DLVO considera el medio de dispersión (normalmente agua) como un continuo. Esta aproximación es válida cuando los coloides se encuentran muy

separados (H grandes), pero deja de serlo cuando los coloides se aproximan y las capas de estructuras de agua que rodean los coloides entran en contacto.

En estos casos aparece una fuerza de corto alcance, no contemplada por la teoría DLVO denominada fuerza de hidratación, que es repulsiva si los coloides son hidrófilos y atractiva si son hidrófobos. En el caso particular de los liposomas, las fuerzas de hidratación son repulsivas ya que el agua rodea las cabezas polares hidrófilas de la superficie de los liposomas. Dicha fuerza esta asociada a la energía necesaria para deshidratar las superficies de los liposomas permitiendo que entren en contacto.

La existencia de fuerzas repulsivas originadas por la estructuración del agua en torno a coloides hidrófilos ya era supuesta desde hace tiempo, pero es a partir del desarrollo de microscopios de fuerza atómicas (AFM) cuando se empezaron a medir directamente [Horn *et al.* (1989), Israelachvili y Adams (1978)].

3.5.1.1. MODELOS TEÓRICOS

Pashley [Pashley (1981a, 1981b, 1982), Pashley y Israelachvili (1984)] midió por primera vez las fuerzas de hidratación entre dos superficies de mica en disoluciones acuosas con distintas concentraciones de KNO_3 . Observó que para bajas concentraciones de iones la teoría DLVO predecía los valores experimentales de la fuerza repulsiva medidas por AFM. Pero para concentraciones elevadas ($[\text{KNO}_3] > 0.1\text{M}$) aparece una fuerza repulsiva de corto alcance que aumenta con la concentración de electrolito. Pashley atribuyó esta fuerza repulsiva a las fuerzas de hidratación entre las placas de mica (ver figura 3.6.).

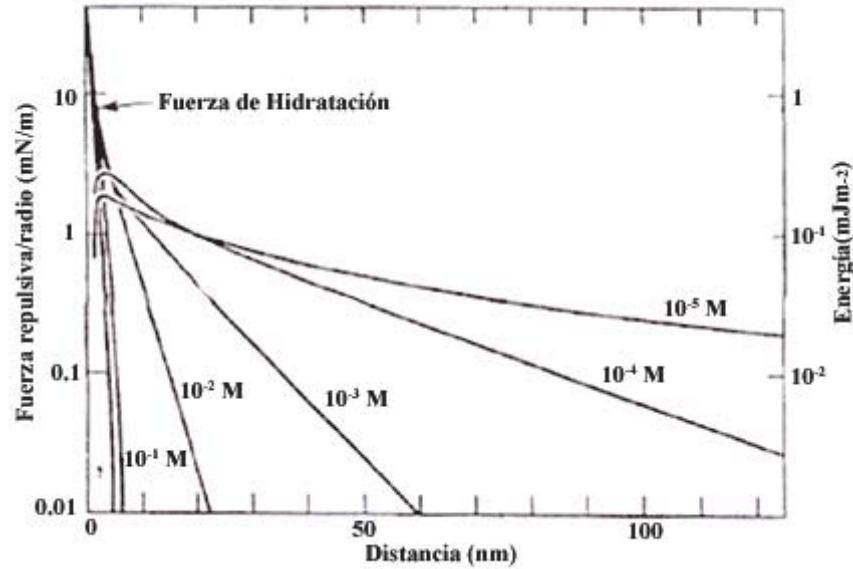


Figura 3.6. Fuerzas de hidratación medidas entre las superficies de mica en presencia de varias concentraciones de KNO_3 [Pashley (1981a)].

A partir de los estudios de Pashley fueron apareciendo muchos trabajos centrados en estudiar estas fuerzas de hidratación. Casi todos los datos experimentales publicados presentan una dependencia exponencial con la distancia entre coloides (H) [Delgado *et al.* (2005)]:

$$V_{hidra}(H) = P_0 \exp(-H / \omega) \quad [3.17]$$

donde ω es la longitud de decaimiento que depende de la hidratación del catión y que oscila entre 0.2 nm y 1.1 nm [van Oss (1993)] y P_0 es una constante dependiente de la hidratación de la superficie del coloide, que es positiva en el caso de coloides hidrófilos, y negativa en el caso de que sean hidrófobos.

En los últimos 30 años muchos investigadores se han esforzado en encontrar un modelo teórico capaz de predecir la existencia de las fuerzas de

hidratación. Los distintos modelos se basan en distintas hipótesis sobre el origen de la estructuración de agua: formación de puentes de H; polarización de las moléculas de H_2O , etc... Algunos de estos modelos son muy diferentes entre si, y ninguno puede explicar de forma general la existencia de las fuerzas de hidratación en todos los casos, llegando a veces a resultados contradictorios [Delgado (2004)]. Pero merece la pena exponer los distintos modelos y ver su aplicabilidad en los distintos sistemas coloidales.

Marcelja y Radic [Marcelja y Radic (1976)] fueron los primeros en presentar un modelo fenomenológico para explicar las repulsiones de corto alcance medidas experimentalmente entre membranas de fosfolípidos. Para ello, supusieron que la energía libre de las moléculas de agua en torno a las superficies de los fosfolípidos es menor que en el seno de la disolución y obtuvieron una fuerza de hidratación que seguía una ley de caída exponencial, pero cuyos parámetros no tenían ninguna interpretación física.

En 1983 Jönsson y Wennerström [Jönsson y Wennerström (1983) (2001)] propusieron un modelo para explicar las mismas fuerzas de hidratación entre membranas de fosfolípidos basado en la inducción de dipolos en las moléculas de la membrana inducidos por los dipolos de otra membrana próxima. El problema matemático que se presenta es el mismo si se sustituyen esas cargas de polarización por “cargas imágenes” localizadas en el interior de la membrana lipídica como indica la figura 3.7.

Ocho años después, Attard y Patey [Attard y Patey (1991)] generalizaron este modelo de “cargas imágenes” analizando la interacción electrostática entre dos redes o capas de dipolos. A cortas distancias, la interacción depende de la correlación de dichas redes: si se aproximan de tal modo que una de las capas de dipolos es imagen especular de la otra, la interacción resultante será repulsiva; si se

aproximan con un cierto desplazamiento relativo de tal forma que las capas de dipolos se acomodan en la posición de mínima energía, la interacción resultante será atractiva.

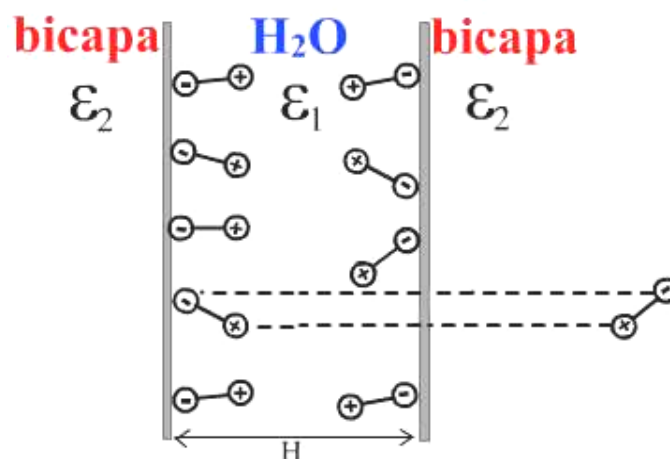


Figura 3.7. Representación del modelo de carga imagen para explicar el origen de las fuerzas de hidratación.

Recientemente Ruckenstein y Maciu [Maciu y Ruckenstein (2001a), (2001b), (2002), Huang *et al.* (2003)] han propuesto un modelo para el origen de las fuerzas de hidratación basado en la polarización de las moléculas de agua por los dipolos formados en la superficie de la membrana. La polarización que inducen estos dipolos sobre las moléculas de agua vecinas se propaga a sucesivas capas de agua, apareciendo una región en torno a la membrana en la que las moléculas de agua tienen una orientación determinada. El solapamiento de estas capas de agua de dos membranas da lugar a un aumento de la energía libre del sistema, lo cual provoca la aparición de una interacción repulsiva entre ellas.

En 2001 Paunov y colaboradores [Paunov *et al.* (2001)] estudiaron la aparición de las fuerzas de hidratación en suspensiones de proteínas globulares. Sugieren que

las fuerzas de hidratación son debidas al solapamiento de capas de contraiones hidratados absorbidos sobre las superficies de la partícula coloidal. Estos cationes hidratados son absorbidos en el plano de Stern de cada una de las superficies de las partículas coloidales. Cuando las capas de Stern se empiezan a solapar, surge la fuerza repulsiva de hidratación. El ancho de esta capa dependerá del radio hidratado de cada contraión y por tanto de su carga, tamaño y electronegatividad. La figura 3.8 muestra el mecanismo por el que se produce esta repulsión.

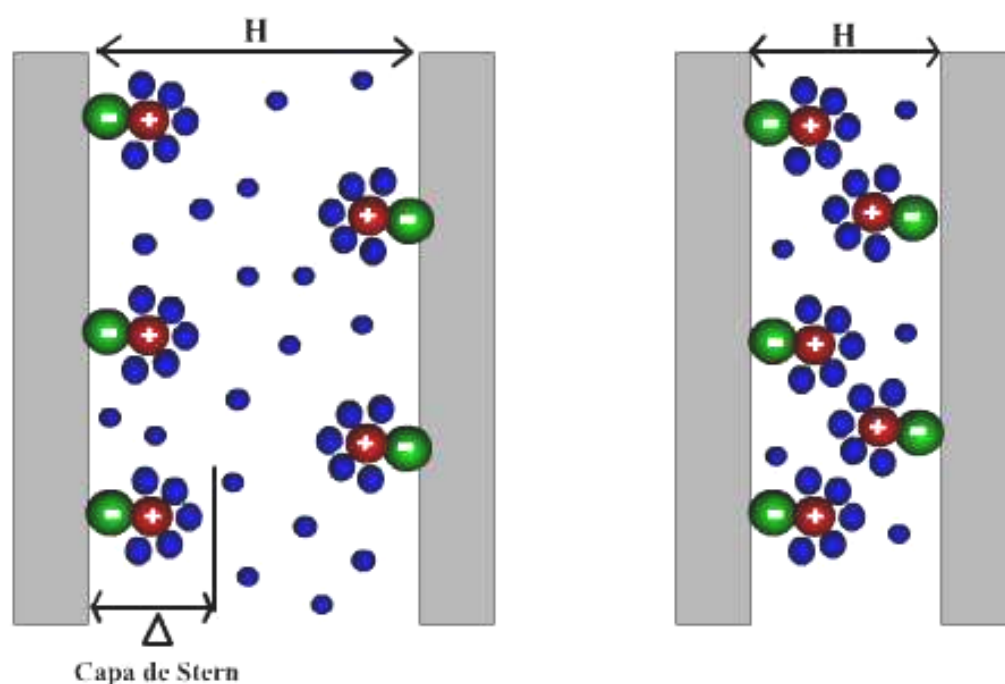


Figura 3.8. Representación del modelo del solapamiento de las capas de Stern para la explicación de las fuerzas de hidratación.

En la práctica, hemos usado este modelo para estudiar la estabilidad coloidal de los liposomas, tomando el ancho de la capa de Stern (Δ) de la fórmula 3.9 como el diámetro de los iones hidratados.

3.5.1.2. IONES HIDRATADOS

Debido a la fuerte dependencia de la interacción dipolo-ión con su orientación, los iones pequeños o multivalentes en solventes polares, tienden a orientar las moléculas de agua que tienen a su alrededor. Estos iones son llamados *iones hidratados o solvatados* y al número de moléculas de agua orientadas que tienen pegadas se le denomina *número de hidratación*. La interacción dipolo-ión que mantiene a estas moléculas de agua unidas al ión no las mantiene totalmente inmovilizadas, e incluso pueden intercambiarse con la disolución. Así que el número de hidratación es un indicativo cualitativo del grado de hidratación del ión, más que un valor exacto.

Se denomina *radio hidratado* de los iones al radio del ión teniendo en cuenta las capas de moléculas de agua que se mantienen pegadas a él. Estos radios son, obviamente, siempre mayores que el radio del ión cristalizado. Los radios hidratados de los iones más pequeños suelen ser mayores a los de aquellos iones de mayor tamaño, pues pueden tener más de una capa de hidratación.

Otro concepto que se suele asociar a los iones hidratados es el tiempo medio que las moléculas de agua se mantienen pegadas al ión. El tiempo de *reorientación* de una molécula de agua sin presencia alguna de iones es de unos 10^{-11} s. Es sabido que las moléculas que se mantienen directamente pegadas a los iones en la primera capa de hidratación puede aumentar su tiempo de reorientación hasta horas.

Por lo general, los cationes están más hidratados que los aniones con la misma valencia, porque suelen ser más pequeños. Las moléculas de agua tienen un tiempo de permanencia en las primeras capas de hidratación de cationes K^+ , Na^+ o Li^+ de 10^{-9} s. Los cationes divalentes están siempre más hidratados que los

monovalentes por su mayor carga, el Ca^{2+} y Mg^{2+} tienen tiempos de unión con el agua de 10^{-8} y 10^{-6} s respectivamente. Para cationes trivalentes (Al^{3+} , La^{3+}) o cationes divalentes muy pequeños (Be^{2+}) los tiempos de unión con las moléculas de agua puede aumentar hasta segundos o incluso horas [Israelachvili (1985)].

Los radios y el número de hidratación se pueden obtener a través de medidas de viscosidad, conductividad y compresibilidad. Y los tiempos de unión se pueden obtener por medidas de NMR. La tabla 3.1 muestra los parámetros de hidratación de algunos cationes y aniones:

Ión	Radio cristalográfico (nm)	Radio hidratado (nm)	número de hidratación (± 1)	Tiempo medio de unión (s)
Li^+	0.068	0.38	5-6	10^{-9} - 10^{-8}
Na^+	0.095	0.36	4-5	10^{-9}
K^+	0.133	0.33	1-2	10^{-9}
Be^{2+}	0.031	0.46	4	10^{-3} - 10^{-2}
Mg^{2+}	0.065	0.43	6	10^{-6} - 10^{-5}
Ca^{2+}	0.099	0.41	6	10^{-8}
Al^{3+}	0.050	0.48	6	10^{-1} -1
La^{3+}	0.115	0.49	7	-
Gd^{3+}	0.102	0.497	-	-
OH^-	0.176	0.30	3	-
F^-	0.136	0.35	2	-
Cl^-	0.181	0.33	1	-

Tabla 3.1. Datos para distintos cationes y aniones de los radios cristalográfico e hidratado, número de moléculas de agua en la primera capa de hidratación y su tiempo medio de unión. Datos obtenidos de [Israelachvili (1985), Näslund et al. (1999) Bouanz y Gharbi (1994), Vinogradov et al. (2003), Volkov et al. (1997)].

3.5.2. FUERZAS OSMÓTICAS

Teniendo en cuenta que los liposomas son complejos coloidales con la peculiaridad de encerrar una fase acuosa en su interior y la semi-permeabilidad de la membrana lipídica que encierra dicha fase acuosa, es de esperar que, en presencia de un gradiente de concentración de soluto entre el interior y el exterior del liposoma, se genere una presión osmótica sobre la membrana. Esta presión osmótica dependerá de la permeabilidad de la membrana al soluto y al agua, de las concentraciones interior y exterior del soluto y de la fluidez y elasticidad de la membrana.

Las fuerzas osmóticas regulan generalmente el transporte pasivo de sustancias a través de la membrana. Por eso es importante su estudio para las aplicaciones de los liposomas como liberadores de fármacos en el torrente sanguíneo y como modelo para entender el funcionamiento de las células biológicas.

3.5.2.1. FLUJO DE ELECTROLITOS A TRAVÉS DE LA MEMBRANA LIPÍDICA

El estudio de las fuerzas osmóticas se puede resumir en el estudio del flujo de electrolito a través de membranas y de los coeficientes de permeabilidad de los distintos solutos.

Según la ley de Fick, el flujo, es decir, el número de moles de electrolito que atraviesan una unidad de área en la unidad de tiempo es proporcional a la constante de difusión (D) y al gradiente de concentración (ΔC) a través de la membrana de espesor d :

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial X} = -D \frac{\Delta C}{d} \quad [3.18]$$

En el caso del sistema agua-membrana se define el coeficiente de permeabilidad como:

[3.19]

que suele tener unidades de cm/s y que, en esencia, es un coeficiente de difusión a través de una membrana de espesor d corregida por el coeficiente de partición K_d . Este coeficiente K_d es una medida de la solubilidad del soluto en los lípidos.



Figura 3.9. Figura de un poro provocado por impurezas de esterol en una membrana de fosfatidilcolina.

Por lo general, todavía no se entienden los mecanismos de difusión de moléculas a través de las membranas lipídicas. Se sabe que en el caso de partículas sin carga, la permeabilidad es proporcional a la solubilidad en grasas. Pero las moléculas cargadas o polares se cree que aprovechan los poros e imperfecciones de la membrana para crear canales por los cuales la atraviesan

Así que la permeabilidad también depende del orden de los lípidos en la membrana. Esto explicaría por qué los coeficientes de permeabilidad son mayores para membranas en estado gel-líquido que para membranas en estado gel-cristalino. Los coeficientes de permeabilidad del agua en membranas de DMPC pasan de $2 \cdot 10^{-5}$ cm/s en estado gel-líquido, a $6 \cdot 10^{-4}$ cm/s en estado gel-cristalino. En el caso del DPPC aumenta de $4.7 \cdot 10^{-6}$ a $6.3 \cdot 10^{-4}$ cm/s .

Otro hecho que parece señalar a los poros como los mecanismos de difusión de moléculas cargadas es que las membranas tienen un máximo en la permeabilidad exactamente igual a la temperatura (T_c) de transición de estado rígido a fluido. El número de imperfecciones en las que se puede crear un poro aumentan en la T_c , donde coexisten los dos estados a la vez. Pequeñas contaminaciones en la membrana con moléculas anfífilas o hidrófobas también aumentan la permeabilidad en dos órdenes de magnitud, debido a que aumenta el desorden de la membrana favoreciendo la creación de poros.

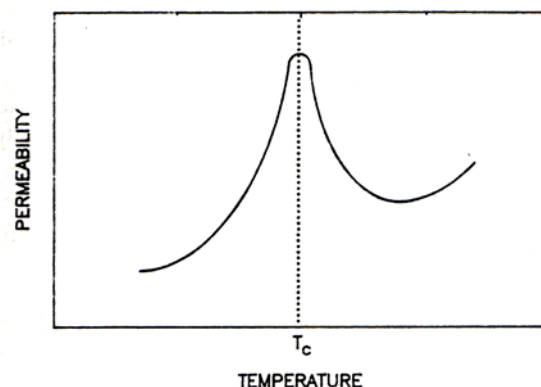


Figura 3.10. Representación del aumento de la permeabilidad de soluto por una membrana de fosfatidilcolina en la temperatura de transición.

3.5.2.2. COEFICIENTES DE PERMEABILIDAD

Por lo general, los iones tienen coeficientes de permeabilidad menores a las moléculas neutras debido a su menor solubilidad en la fase no polar de la bicapa. Los aniones ($P \sim 10^{-11}$ - 10^{-12} cm/s) suelen ser más permeables que los cationes ($P \sim 10^{-12}$ - 10^{-14} cm/s), ya que pueden crear más fácilmente complejos de corta vida que

ayudan a traspasar la membrana. Las moléculas de agua atraviesan extraordinariamente bien las membranas lipídicas, sus coeficientes de permeabilidad en la lecitina están en torno a 10^{-3} - 10^{-4} cm/s. En la práctica, esto significa que unas 4000 moléculas de agua atraviesan la membrana por segundo y por cabeza polar ($70 \text{ \AA}^2$), mientras que un átomo de sodio necesita 70 horas para atravesar la membrana.

La tabla 3.2. muestra los valores de los coeficientes de permeabilidad para algunas moléculas en membranas de lecitina. Algunos valores varían mucho ya que las medidas de los coeficientes de permeabilidad pueden diferir según el método de medida empleado.

	P (cm/s)
H₂O	2×10^{-4}
Etanol	10^{-6}
Glucosa	10^{-8}
Na⁺	1.2×10^{-14}
K⁺	1.7×10^{-12}
Cl⁻	5.5×10^{-11}
Proteínas	10^{-9} - 10^{-14}
NH₃	0.1
Glycerol	5.7×10^{-6}

Tabla 3.2. *Coefficientes de permeabilidad de distintos solutos a través de membranas de lecitina.*[Lasic (1993), Carruthers y Melchior (1983,) Hauser et al. (1973) y Paula et al. (1996)].

3.5.2.3. FUERZAS OSMÓTICAS EN LIPOSOMAS

La impermeabilidad de las membranas lipídicas de los liposomas a macromoléculas o a iones implica que si se genera una gradiente de concentraciones de estas partículas entre el interior y exterior del liposoma, se generará una fuerza osmótica sobre las paredes de la membrana dirigida hacia la zona de menor concentración.

Estas fuerzas osmóticas afectan a la curvatura de la membrana, su elasticidad, empaquetamiento, etc... y tienen consecuencia directa en la estabilidad de los liposomas, llegando incluso a provocar la ruptura (lysis) de la membrana.

El estudio de la influencia de estas fuerzas osmóticas es de gran importancia para la utilización de liposomas como transportadores de fármacos, ya que, una vez inyectados en el torrente sanguíneo, se encontrarán con un entorno exterior muy diferente al de su interior, pudiendo modificarse sus propiedades.

Las fuerzas osmóticas también juegan un papel muy importante en la comunicación y transporte a través de las células biológicas de la naturaleza. De hecho, los primeros estudios sobre estas fuerzas fueron realizados por Milner y su equipo [Milner *et al.* (1988)], investigando el transportador *ProP* de la bacteria *Escherichia coli*. Observaron que dicho transportador sólo se activaba en presencia de solutos a los que la membrana era impermeable (0.44 M de sacarosa o 0.3 M de NaCl), pero permanecía inactivo en presencia de 0.3 M de glicerol. Posteriormente Csonka y Hanson (1991) [Csonka y Hanson (1991)] observaron que las variaciones en las fuerzas osmóticas producían la activación de la mayoría de los transportadores de las membranas biológicas.

Como se observa en la tabla 3.2., las membranas lipídicas son muy permeables a las moléculas de agua, así que es de esperar que los liposomas reaccionen ante la fuerza osmótica, expulsando agua de su interior para tratar de compensar el gradiente de concentración de algún soluto que no puede traspasar la membrana (figura 3.17).

Este desalojo de agua del interior del liposomas afecta a la hidratación de las cabezas polares y, obviamente, a su volumen interno, comprimiendo la membrana lipídica y disminuyendo el tamaño del liposoma [White *et al.* (1996)][Sabin *et al.* (2006c)].

3.6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo presentamos los estudios realizados sobre la estabilidad coloidal de los liposomas en presencia de distintos medios iónicos. Hemos usado como marco general del estudio la teoría clásica DLVO. El objetivo es presentar un esquema global de todas las fuerzas que intervienen en la estabilización de los sistemas liposómicos para poder interpretar y predecir el comportamiento de los liposomas en función del medio iónico en el que se encuentren.

Previamente ha sido necesario poner a punto las técnicas de obtención de liposomas unilamelares pequeños y una precisa caracterización de estos sistemas para tener unas condiciones iniciales de estudio lo más homogéneas y conocidas posibles. Existen tres aspectos críticos en la caracterización de los sistemas iniciales en ausencia de iones. (i) La homogeneización de la dispersión liposómica (polidispersidad), (ii) la reproducibilidad del sistema y (iii) el tiempo que los liposomas se mantienen sin agregarse si no se perturba el medio en el que se encuentran.

Para mejorar la homogeneización y la monodispersidad de las disoluciones se han variado diferentes parámetros en el método de obtención de liposomas multilamelares (velocidad de giro del rotavapor, tiempo de evaporación, tiempo de hidratación, mezcla orgánica, etc...) pero los parámetros más críticos son los que controlan el proceso de extrusión. Por ello, se ha hecho un estudio del número de filtraciones y de la presión necesaria para obtener una disolución homogénea de liposomas monodispersos.

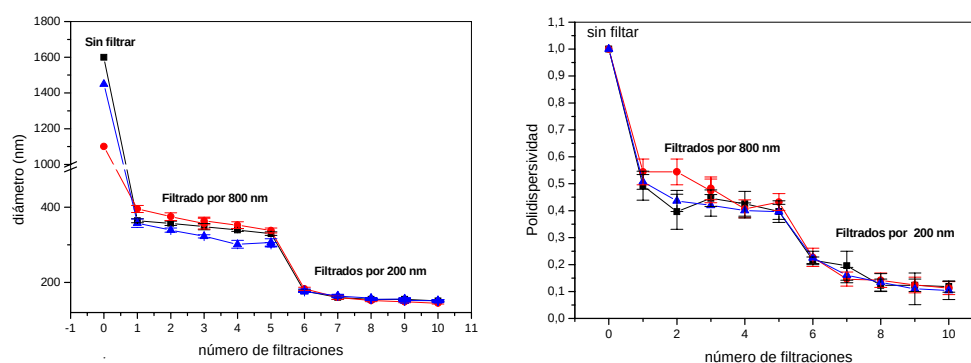


Figura 3.11. Variación del diámetro y polidispersidad de liposomas de EYPC en función del número de filtraciones para distintas presiones de extrusión: (●) 5.5 psi, (■) 7 psi y (▲) 8 psi. Las cinco primeras filtraciones se hicieron por poros de 800 nm y las cinco siguientes por poros de 200 nm.

La figura 3.11. muestra el tamaño y la polidispersidad de los liposomas en función del número de filtraciones para distintas presiones de nitrógeno en el interior del extruder. Tras el proceso de rotaevaporación, los liposomas sin filtrar son muy polidispersos y tienen un tamaño mayor a una micra. Después de 5 filtraciones por poros de 800 nm y otras 5 por poros de 200 nm los liposomas obtenidos tienen un tamaño en torno a 110-160 nm con polidispersidades muy bajas, menores a 0.1. La presión de nitrógeno no parece influir en el resultado final

tras pasar por los poros de 200 nm, pero si en el paso intermedio de filtraje por 800 nm.

Las figuras 3.12. (a) y (b) muestran imágenes TEM de una disolución de liposomas después de ser filtrada 5 veces por poros de 200 nm. En ellas se puede comprobar la monodispersividad y homogeneidad de la disolución, así como una estimación del tamaño.

Se estudió también el efecto de la concentración de lípido en el resultado final de la disolución liposómica. La figura 3.13. muestra los tamaños medios de los liposomas en función del número de filtraciones por poros de 200 nm para distintas concentraciones de lípido. Las polidispersidades en todos los casos eran menores a 0.15 con pocas variaciones en función de la concentración. Sin embargo, cuanto menor es la concentración de lípido, los liposomas filtrados son de menor diámetro.

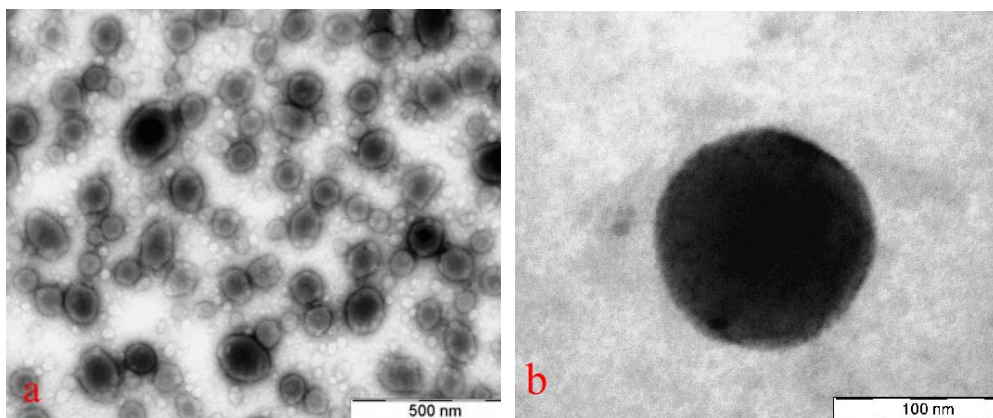


Figura 3.12. Fotografías TEM de liposomas filtrados por extrusión por poros de 200 nm.

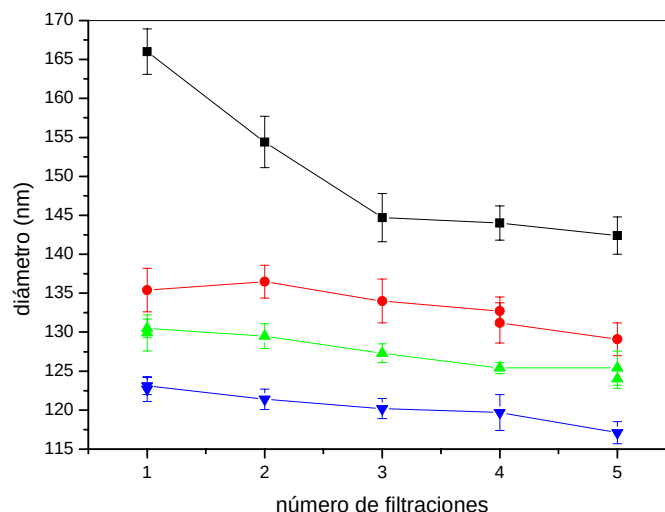


Figura 3.13. Variación del diámetro de liposomas en función del número de filtraciones para distintas concentraciones de lípido: (▼) 1 mM, (▲) 2 mM, (●) 3 mM, (■) 5 mM..

Pequeñas variaciones en el diámetro final de los liposomas no tienen mucha relevancia ya que al estudiar su estabilidad coloidal se determinan las variaciones en el tamaño. Lo importante es que en todos los casos se consiguieron polidispersidades menores a 0.15.

Otra cuestión a tener en cuenta es la posible pérdida de lípido en los filtros del extruder. Esta pérdida puede llegar hasta el 10% de la concentración inicial y para evitarla es conveniente hacer varios prefiltrados con poros 800 y 400 nm. Sin embargo, para el estudio de la estabilidad de los liposomas en presencia de distintos iones, una cierta incertidumbre en la concentración de liposomas no es crucial ya que la carga de los liposomas depende de la fuerza iónica del medio donde se encuentren y no de la ratio [lípido]/[ión] [Sabin et al. (2006b)]. Para otro tipo de estudios, como la interacción entre liposomas y proteínas, donde el número de

proteínas absorbidas en la superficie del liposoma es lo que determina su estabilidad, existe métodos para la determinación de la concentración de lípido tras la extrusión como el método de Stewart [Stewart (1959)] o Barlett [Barlett (1959), New (1990)],

Para conocer cuánto tiempo permanecen estables en agua se midieron los tamaños de los mismos liposomas a lo largo de días para determinar cuándo empiezan a agregarse y cuándo empiezan a precipitar. La figura 3.14. muestra que los liposomas de EYPC permanecen estables, al menos, dos días y al cuarto ya precipitan. Los liposomas de DPPC se mantienen estables más de cinco días. Por último los liposomas de DMPC son los más estables, debido a que tienen más carga superficial, y se mantienen sin agregar casi dos semanas. El estudio de la estabilidad coloidal en presencia de distintos iones debe hacerse en el tiempo en que los liposomas se mantienen estables por sí mismos.

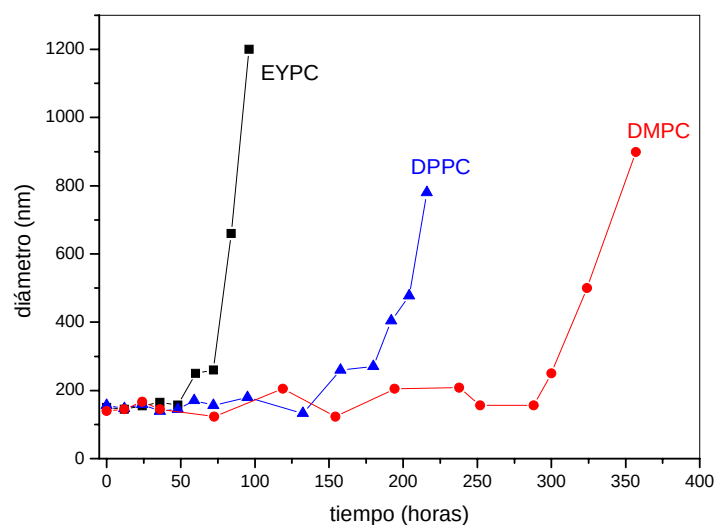


Figura 3.14. Diámetro de los liposomas de EYPC (■), DPPC (▲) y DMPC (●) en agua a lo largo del tiempo. El incremento del tamaño indica el inicio de la agregación.

Los diámetros mostrados en las figuras 3.11., 3.13. y 3.14. son diámetros promedios de una distribución de tamaños medida por dispersión dinámica de luz. La figura 3.15(a) muestra la distribución de tamaños de una disolución monodispersa de liposomas cuya tamaño promedio es 100 nm y su polidispersidad 0.08. Por el contrario, la figura 3.15(b) muestra la distribución de tamaños de una disolución polidispersa con un tamaño promedio de 700 nm y polidispersidad 0.8 que podría corresponder con una muestra no filtrada de liposomas multilamelares grandes o con una muestra de liposomas unilamelares pequeños que se han ido agregando y creando clusters de diversos tamaños y formas.

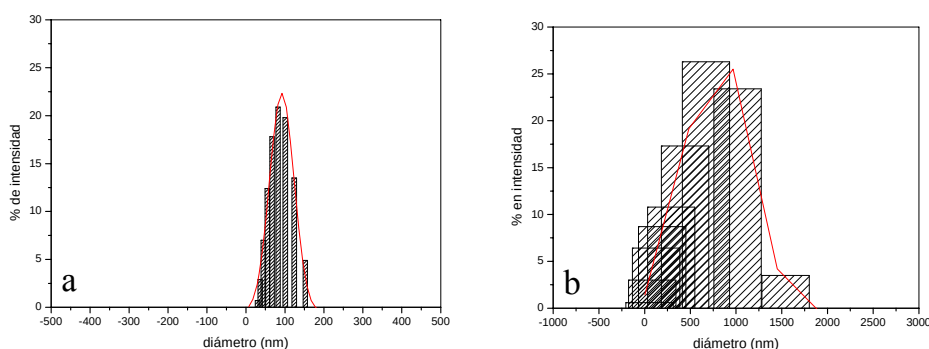


Figura 3.15. Distribución de tamaños medidos por dispersión dinámica de luz de: (a) una muestra de liposomas monodispersos y (b) una muestra de liposomas polidispersos.

Una vez puesta a punto la técnica de obtención de disoluciones monodispersas de liposomas unilamelares pequeños y de su caracterización en ausencia de iones, podemos empezar a estudiar la estabilidad coloidal en distintos medios iónicos.

El primer estudio se centra en la estabilidad de liposomas de EYPC en presencia de Ca^{2+} y La^{3+} . Los resultados se muestran en el trabajo “***On the Effect of Ca^{2+} and La^{3+} on the Colloidal Stability of Liposomes***” [Sabín *et al.* (2005)], donde se hace una comparativa de los datos experimentales y las predicciones de la teoría DLVO.

Los potenciales DLVO pueden representarse en función de la distancia entre liposomas a partir de los valores experimentales de potencial ζ , tamaño inicial de los liposomas y las características del medio, usando la ecuación 3.11. A partir de las curvas del potencial DLVO para cada concentración iónica puede deducirse la concentración de agregación crítica (*c.a.c.*) para compararla con las observadas experimentalmente.

Las concentraciones de agregación crítica (*c.a.c.*) experimentales fueron obtenidas por dispersión dinámica de luz y por nefelometría. Las coincidencias entre los valores teóricos y experimentales son prácticamente exactas para el caso de La^{3+} . Para el caso del Ca^{2+} las coincidencias siguen siendo aceptables aunque no tan precisas. La ley de Schulze-Hardy también fue confirmada como comprobación paralela de la teoría DLVO.

Además, en este trabajo se ha hecho un estudio de la absorción de los iones Ca^{2+} y La^{3+} sobre monocapas de fosfolípidos a través de medidas de tensión superficial con un tensiómetro de gota pendiente. Los resultados obtenidos apuntan a que para altas concentraciones de Ca^{2+} aumenta el área por molécula de las cabezas polares, en mayor medida que la presencia de La^{3+} . Esto puede ser una explicación de cómo el Ca^{2+} induce la fusión de las membranas en liposomas agregados, como indica una amplia bibliografía [Wilschut y Hoekstra (1986), Ohki (1982), Papahadjopoulos *et al.* (1990)].

Como ampliación del estudio anterior, se ha caracterizado la estabilidad coloidal de liposomas de DPPC en presencia de distintas concentraciones de Gd^{3+} , ya que este sistema tiene un gran interés por su aplicación en imágenes de resonancia magnética (MRI). Los complejos basados en Gadolinio actúan con agentes de contraste resaltando las diferencias entre tejido sano y tejido enfermo en las imágenes MRI [Botta (2000)]. Sus siete electrones

desapareados y la alta simetría de su estado S favorece que el tiempo de relajación del momento magnético de las moléculas de agua vecinas aumente [Caravan et al. (1999)], mejorando las imágenes MRI. Los resultados de este segundo estudio se presentan en el trabajo *“Effect of Gd^{3+} on the colloidal stability of liposomes”* [Sabín et al. (2006b)] mostrando, de nuevo, la validez de la teoría DLVO en presencia de iones trivalentes. Los valores teóricos de la *c.a.c.* predichos por la teoría coinciden en gran medida con los observados experimentalmente por difusión dinámica de luz.

Se ha estudiado especialmente la adsorción de iones Gd^{3+} a la doble capa eléctrica de los liposomas y su efecto sobre el potencial ζ , aplicando la ecuación de Ottewill y Watanabe [Ottewill y Watanabe (1960), Tatulian (1994)]. Este modelo ya fue utilizado en el estudio de la adsorción de tensioactivos fluorados e hidrogenados sobre diferentes proteínas [Prieto et al (2004)] [Sabín et al. (2006a)]. Utiliza la concentración de electrolito y la pendiente del potencial ζ en el punto de carga nula

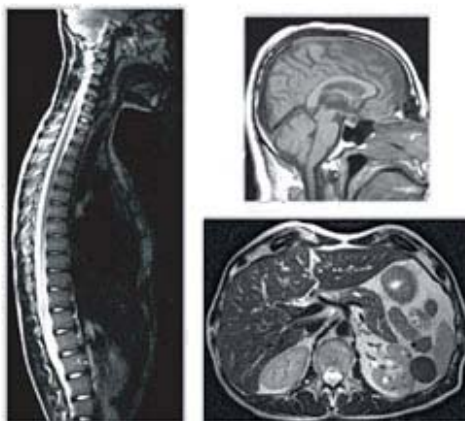


Figura 3.16. Ejemplos de imagen obtenidas por Resonancia Magnética.

(p.z.r.) para calcular el número de puntos de absorción (N_I) de los iones Gd^{3+} sobre la superficie de los liposomas a través de la ecuación [Hunter (1981)]:

$$\left(\frac{d\zeta}{d \log c} \right)_{\zeta=0} = 2.303 \zeta^o \left[\frac{\varepsilon(1+ka)\zeta^o}{a z e N_I} - 1 \right] \quad [3.20]$$

donde z es la carga iónica, c_o es la concentración de ión, ζ^o es el potencial ζ en ausencia de iones, a es el radio del liposoma y ε la constante dieléctrica del medio.

Para la aplicación biomédica de estos liposomas marcados con Gd^{3+} , que algunos autores llaman liposomas *paramagnéticos* [Il'yasov et al. (2001)], es importante conocer cómo afecta la adsorción de iones Gd^{3+} a la temperatura de transición de gel-cristalino a gel-líquido. Para ello se han hecho experimentos con un calorímetro diferencial de barrido Perkin-Elmer. Como se explicará en capítulos posteriores, este calorímetro no es el más indicado para la detección de cambio de fases en muestras líquidas, pero su precisión fue suficiente para detectar un desplazamiento de la T_c hacia temperaturas mayores de hasta $\Delta T_c = 6^\circ C$.

Hasta ahora las predicciones de la teoría DLVO nos dan una estimación (en el caso de iones trivalentes, muy precisa) de la estabilidad coloidal de los liposomas. Sin embargo, encontramos dos comportamientos anómalos en la estabilidad de los liposomas que eran difícilmente explicables con la teoría DLVO:

- (i) En presencia de iones monovalentes no agregan a pesar de tener su carga totalmente apantallada. Según la teoría clásica DLVO, en ausencia de potencial repulsivo electrostático, la fuerzas atractivas de van der Waals serían las únicas que actuarían y por tanto los liposomas deberían tender a agregarse.

- (ii) A concentraciones 10^{-3} y $2 \cdot 10^{-1}$ M su diámetro disminuye ($\Delta d \sim 20$ nm). Este comportamiento se observa en los anteriores trabajos tanto con iones divalentes como trivalentes, pero el efecto es más notable y más fácil de analizar con iones monovalentes porque nunca se produce la agregación, como se explicó en (i).

En el trabajo ***“Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces”*** [Sabin *et al.* (2006c)] se estudia la importancia de las fuerzas de hidratación y las fuerzas osmóticas en la estabilización de liposomas en presencia de iones monovalentes. Se incorpora un término a la teoría clásica DLVO que tiene en cuenta las fuerzas de hidratación surgidas de la estructuración del agua en torno a la superficie de los liposomas. Estas fuerzas de hidratación son repulsivas y de corto alcance y explica que los liposomas se mantengan estables a pesar de no existir repulsión electrostática.

Los datos experimentales mostrados descartan la posibilidad de que la disminución del diámetro de los liposomas al aumentar la concentración de iones en el medio sea debido a la variación de la carga superficial que obligase a cambiar la curvatura de las membranas, y se sugiere que son las fuerzas osmóticas las que comprimen la membrana. Estas fuerzas osmóticas surgen por la impermeabilidad de la membrana a los iones y la creación de un gradiente de concentraciones entre el exterior y el interior del liposoma que obliga a los liposomas a expulsar agua de su interior como muestra la figura 3.17.

La máxima compresión de la bicapa, es decir, el diámetro mínimo de los liposomas, se consigue a menores concentraciones cuanto mayor sea la carga del catión. Pero si tenemos en cuenta la concentración total de iones deducimos que el máximo de compresión se consigue siempre a la misma concentración.

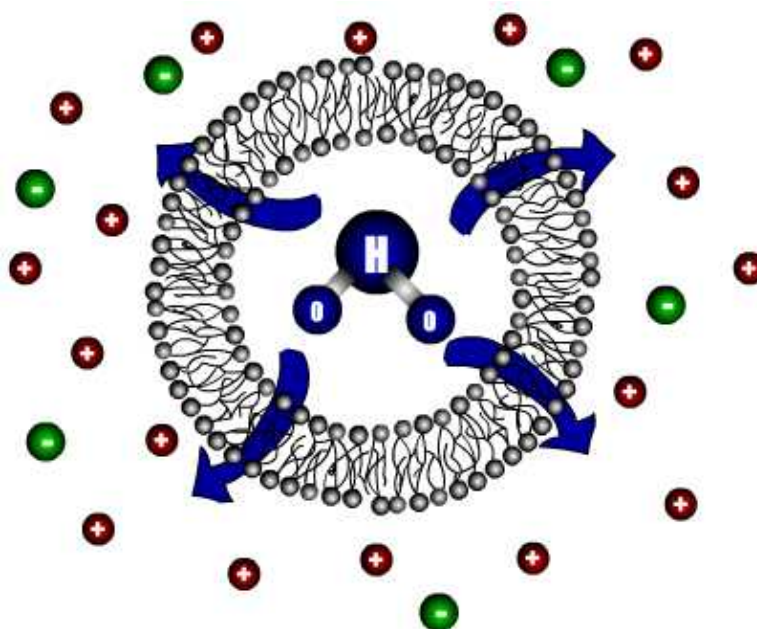


Figura 3.17. Esquema del efecto de las fuerzas osmóticas sobre la membrana de los liposomas.

Los liposomas en presencia de NaCl y KCl alcanzan el diámetro mínimo a 0.2 M de sal, lo que equivale a 0.4 M de iones totales. En presencia de CaCl₂ el mínimo se alcanza a 0.15 M de sal, lo que equivale aproximadamente a 0.4 M de iones totales. El mínimo en el caso de AlCl₃ o LaCl₃ se obtiene a menor concentración, 0.1 M, que en concentración total de iones equivale, de nuevo, a 0.4 M. Esto refuerza la idea de que es el gradiente de iones entre el interior y el exterior del liposoma que provoca su disminución de tamaño. Podemos, entonces, estimar la presión osmótica, suponiendo comportamiento ideal, como:

$$\Pi = cRT = 0.4 \text{ mol dm}^{-3} \times 82.06 \times 10^{-3} \text{ dm}^3 \text{ atm K}^{-1} \text{ mol}^{-1} \times 298.15 \text{ K} = 9.8 \text{ atm}$$

que es igual a la resistencia a la compresión de la bicapa cuando se llega a tamaño mínimo del liposoma.

On the Effect of Ca^{2+} and La^{3+} on the Colloidal Stability of Liposomes

Juan Sabín,[†] Gerardo Prieto,* Paula V. Messina,[§] Juan M. Ruso,[†]
Roque Hidalgo-Alvarez,[‡] and Félix Sarmiento[†]

Grupo de Biofísica e Interfases, Departamento de Física Aplicada, Facultad de Física, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain, and Grupo de Física de Fluidos y Biocoloides, Departamento de Física Aplicada, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071, Spain

Received May 27, 2005. In Final Form: September 6, 2005

This work deals with the effect of Ca^{2+} and La^{3+} on the colloidal stability of phosphatidylcholine (PC) liposomes in aqueous media. As physical techniques, nephelometry, photon correlation spectroscopy, electrophoretic mobility, and surface tension were used. The theoretical predictions of the colloidal stability of liposomes were followed using the Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek theory. Changes in the size of liposomes and high polydispersity values were observed as La^{3+} concentration increases, suggesting that this cation induces the aggregation of liposomes. However, changes in polydispersity were not observed with Ca^{2+} , suggesting a coalescence mechanism or fusion of liposomes. The stability factor (W), calculated from the nephelometry measurements indicated that aggregation/fusion occurs at a critical concentration (c.c.) of 0.3 and 0.7 M for La^{3+} and Ca^{2+} , respectively. To gain a better insight into the interaction mechanism between the liposomes and the studied ions, the interaction between PC monolayers and Ca^{2+} and La^{3+} was studied. Changes in the surface area per lipid molecule (A_0) in the monolayer at the c.c. values were found for both ions, with a more pronounced effect in the case of Ca^{2+} . This corresponds with a larger reduction of the steric repulsive interaction between the headgroups at the phospholipid membrane (π_{head}). The experimental result validates the hypothesis made on the liposome fusion in the presence of Ca^{2+} and liposome aggregation in the presence of La^{3+} . These aggregation mechanisms have also been confirmed by transmission electron microscopy.

Introduction

Liposomes are spherical, self-closed structures consisting of one or more concentric lipid bilayers encapsulating aqueous volume, their size ranging from 20 nm to several micrometers, whereas the thickness of the membranes is around 4 nm.¹ The high biocompatibility of liposomes makes it possible to use them as models for the study of biological membranes, but in the past decades, liposomes are finding a lot of different biotechnology applications as drug delivery systems.^{2–4} The properties of the liposomes depend on the composition and concentration of constituents of phospholipids and the ionic strength of aqueous medium, as well as the method of preparation.⁵

The L- α -phosphatidylcholines (PC) are the most common phospholipid components of biological membranes. They are amphipathic molecules in which a glycerol bridge links a pair of hydrophobic acyl hydrocarbon chains with a zwitterionic hydrophilic headgroup. Their low cost, neutral charge, and chemical inertness make them ideal for the “in vitro” preparation of liposomes as biomembranes models.⁶ Biological membranes are surrounded by an

aqueous buffer containing Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , or Cl^- ions with different concentrations inside and outside of the cells. Electrostatic interactions between these ionic buffers and the lipid molecules are crucial for membrane fusion, phase transitions, or transport across the membrane. Divalent cations interact very strongly with charged lipids, but also moderately with zwitterionic lipids.⁷ Lanthanum (La^{3+}) plays an important role in the structure and function of biomembranes or phospholipid membranes. La^{3+} can modulate the gating properties of a voltage-gated sodium channel. Also, the lanthanides exert a marked effect on the structure and stability of phospholipid membranes. The interaction of calcium and lanthanum with neutral zwitterionic membranes is the subject of this study.

In general, conventional PC liposomes exhibit moderate colloidal stability due to the aggregation/fusion processes that can prevent drug-loaded liposomes from reaching a targeted site in biomedical applications.⁸ It has also been reported⁹ that large phospholipid structures (such as liposome aggregates) are cleaned from the bloodstream more rapidly than small structures. Therefore, the studies of the aggregation and fusion processes of the PC liposomes are necessary if efficient liposomes as drug delivery system are to be designed. This tendency of aggregation is attributable to attractive van der Waals forces. The existence of other interactions between particles determines the stability, rheology, and many other properties

* To whom correspondence should be addressed.. Tel: +34 981 563 100. Fax: +34 981 520 676. E-mail: faxera@usc.es.

[†] Universidade de Santiago de Compostela.

[‡] Universidad de Granada.

[§] Permanent address: Grupo de Ciencia de Superficies y Coloides, Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

(1) Lasic, D. D. *Liposomes. From Physics to Applications*; Elsevier: Amsterdam, 1993.

(2) Cevc, G.; Gebauer, D. *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1010.

(3) Forssen, E.; Willis, M. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16*, 267.

(4) Kullberg, E. B.; Carlsson, J.; Edwards, K.; Capala, J.; Sjöberg, S.; Gedda, L. *Int. J. Oncol.* **2003**, *23*, 461.

(5) Armengol, X.; Estelrich, J. J. *Microencapsulation* **1995**, *12*, 525.

(6) New, R. R. C. *Liposomes: A Practical Approach*; IRL Press: Oxford, 1990.

(7) Tatulian, S. A. Ionization and ion binding. In *Phospholipids Handbook*; Cevc, G., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1993; pp 511–552.

(8) Gamon, B. L.; Virden, J. W.; Berg, J. C. *J. Colloid Interface Sci.* **1989**, *132*, 122.

(9) Juliano, R. L.; Stamp, D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *63*, 651.

of these colloidal dispersions. The colloidal stability warrants detailed attention since the development of these liposomes to biophysics, pharmacy, agriculture, and medicine are dependent on a large extent on a better understanding of the colloidal interactions.

Liposomes can be characterized as a type of association colloid governed by interparticle forces. Such forces have usually been described by the Derjaguin–Landau–Verwey–Overbeek (DLVO) theory, which, in the past 50 years has been a standard model for describing interparticle forces.^{10,11} This theory assumes that two types of forces control colloidal interactions: electrostatic forces, which are typically repulsive for like-charged particles, and van der Waals forces, which are typically attractive.

The DLVO theory can be a very powerful assay in the prediction of the colloidal stability of liposomes at different ion concentrations, temperatures, etc. The aim of this work is to test the validity of the DLVO theory in the case of dynamic processes such as aggregation or fusion. We have experimentally estimated the stability of the liposomes at different concentrations of $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ using two different optical techniques, nephelometry and photon correlation spectroscopy (PCS), and compared the results with the stability predicted by the DLVO theory. In addition, the ion adsorption onto liposome surfaces using measurements of electrophoretic mobilities has been characterized. To consider the mechanism/explanation of the fusion/aggregation of PC liposomes induced by Ca^{2+} and La^{3+} , the effect of Ca^{2+} and La^{3+} on the PC monolayers was investigated. We have analyzed the dynamic surface tension of PC by adding Ca^{2+} and La^{3+} . The active research of Langmuir–Blodgett monolayers and multilayers of fatty acids and phospholipids^{12,13} suggested significant influence of divalent cations on the packing order and structure of the films.

Experimental Section

Materials. PC from egg yolk (No. P 3556) was from Sigma and used as received. Organic solvents methanol and chloroform were from Aldrich and Merck, respectively. All used salts ($\text{La}(\text{NO}_3)_3$ and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) were of analytical grade with purity higher than 99%. Polycarbonate membrane filters were purchased from Millipore.

Vesicle Preparation. Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by the thin-film hydration method.¹ A solution of PC in chloroform/methanol (4:1) was evaporated in a rotary evaporator to dryness under a stream of nitrogen, and the resultant lipid film hydrated with double distilled, degassed, and deionized water. This mixture was extruded five times through polycarbonate filters of 800 nm pore size and five times through polycarbonate filters of 200 nm to form LUVs.^{14–16} The extrusion through pores larger than 100 nm generally yielded liposomes smaller than the pore size.¹⁷ In our case, liposomes with a (140 ± 2) nm diameter were obtained.

Transmission Electron Microscopy. The morphological examination of the liposomes was performed by transmission electron microscopy (TEM) (CM-12 Philips). The samples were stained with 2% (w/v) phosphotungstic acid¹⁸ and placed on copper grids with Formvar films for viewing by TEM.

(10) Verwey, E. J. W.; Overbeek, J. Th. G. *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*; Elsevier: Amsterdam, 1948.

(11) Israelachvili, J. N. *Intermolecular & Surface Forces*, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, CA, 1995.

(12) Schwartz, D. K.; Viswanathan, R.; Garnas, J.; Zasadzinski, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 7374.

(13) Peng, J. B.; Barnes, G. T.; Gentle, I. R. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2001**, *91*, 163.

(14) Foradada, M.; Pujol, M. D.; Bermúdez, J.; Estelrich, J. *Chem. Phys. Lipids* **2000**, *104*, 133.

(15) Casals, E.; Galán, A. M.; Escolar, G.; Gallardo, M.; Estelrich, J. *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *125*, 139.

(16) Patty, P. J.; Frisken, B. J. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 996.

(17) Hunter, D. G.; Frisken, B. J. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2996.

(18) Ran, Y.; Yalkowsky, S. H. *AAPS PharmSciTech* **2003**, *4*, 1.

Electrophoretic Mobility. Electrophoretic mobility of the PC liposome particles was measured using a Malvern Instruments Zetamaster 5002 by taking the average of five measurements at stationary level. The cell used was a 5 mm $\times$ 2 mm rectangular quartz capillary. The temperature of the experiments was 25 °C, controlled by a Haake temperature controller. The zeta potential was calculated from the electrophoretic mobilities, μ_E , by means of the Henry correction of Smoluchowski's equation¹⁹

$$\zeta = \frac{3\mu_E\eta}{2\epsilon_0\epsilon_r} \frac{1}{f(\kappa a)} \quad (1)$$

where ϵ_0 is the permittivity of the vacuum, ϵ_r is the relative permittivity dielectric constant, a is the particle radius, κ is the Debye length, and η is the viscosity of water. The function $f(\kappa a)$ depends on the particle shape and, for our system, was determined by

$$f(\kappa a) = \frac{3}{2} - \frac{9}{2\kappa a} + \frac{75}{2\kappa^2 a^2} \quad (2)$$

which is valid for $\kappa a > 1$.

Photon Correlation Spectroscopy (PCS). Measurements of the size and polydispersities of the liposome systems were performed by PCS using a Spectrometer Autosizer 4800 from Malvern Instruments equipped with a Uniphase 75 mW Ar laser operating at 488 nm with vertically polarized light at a scattering angle of 90° at 298.15 ± 0.01 K. Time correlation was analyzed by a digital autocorrelator PCS7132 from Malvern Instruments and using the CONTIN algorithm.

Nephelometry. The aggregation/fusion rates of the liposomes were measured by nephelometry measuring at a low angle to the static light scattering. Scattered light intensity (Malvern 4700 System, U.K.) was followed at 10° during 120 s in a rectangular flow cell with 2 mm path length. The cell was thoroughly cleaned with chromic acid and rinsed with distilled water. Equals volumes (1 mL) of salt and liposome solutions were mixed and introduced into the cell by an automatic mixing device. The dead time was quite short.²⁰

The scattered light intensity at low angles increases linearly with time, and then an absolute aggregation/fusion rate (k) can be obtained from the slope of intensity versus time. When the repulsive potential between liposomes disappears, all the collisions are efficient and cause the aggregation or fusion of the liposomes. This is, usually, denominated as the *rapid regime*.²¹

The stability ratio (W) is a criterion of stability of the colloidal system:

$$W = \frac{k_r}{k_s} \quad (3)$$

in which k_r describes the rate constant in the *rapid regime* and k_s is the rate constant for the *slow regime*. Thus, the inverse of the stability ratio provides a measure of the effectiveness of collisions leading to aggregation or fusion.

Surface Tension. The experiments were performed with a constant surface pressure penetration Langmuir balance based on axisymmetric drop shape analysis (ADSA) which is described in detail in refs 22 and 23. The whole setup (image capturing, microinjector, ADSA algorithm, and the fuzzy pressure control) is managed by a Windows-integrated program (DINATEN).

A solution droplet is formed at the tip of the coaxial double capillary connected to a double microinjector. The program fits experimental drop profiles, extracted from digital drop micrographs, to the Young–Laplace equation of capillarity by using

(19) Hunter, J. R. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Application*; Academic Press: London, 1981.

(20) Molina-Bolívar, J. A.; Galisteo-González, F.; Hidalgo-Alvarez, R. *Polym. Int.* **1999**, *48*, 685.

(21) Molina-Bolívar, J. A.; Galisteo-González, F.; Hidalgo-Alvarez, R. *Colloids Surf., B* **1999**, *14*, 3.

(22) Cabrerizo-Vilchez, M. A.; Wege, H. A.; Holgado-Terriza, J. A.; Neumann, A. W. *Rev. Sci. Instrum.* **1999**, *70*, 2438.

(23) Wege, H. A.; Holgado-Terriza, J. A.; Cabrerizo-Vilchez, M. A. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *249*, 263.

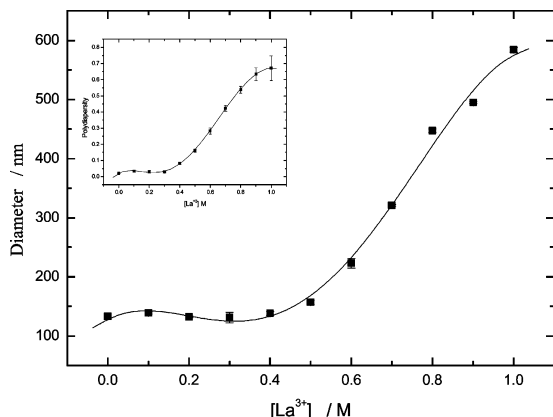


Figure 1. Values of diameter and polydispersity index of the PC liposomes for different La^{3+} concentrations measured by PCS.

ADSA, and provides as outputs the drop volume, V , the interfacial tension, γ , and the surface area, A . Pressure and area control use a modulated fuzzy logic PID algorithm (proportional, integral, and derivative control). Changing the drop volume in a controlled manner and simultaneously measuring surface tension and surface area generate the isotherms.

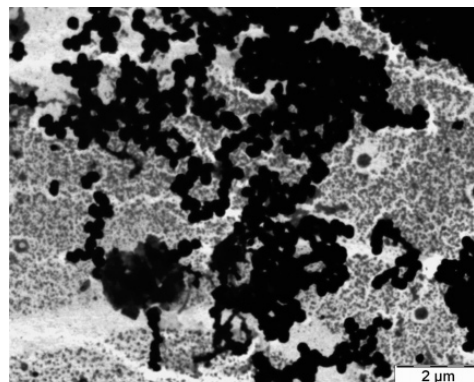
The surface pressure values are obtained from the relationship $\pi = \gamma_0 - \gamma$, where π is the surface pressure, γ_0 is the surface tension of pure liquid, and γ is the surface tension of the liquid covered by the monolayer.

Phospholipid Monolayers. PC was dissolved in a methanol/chloroform mixture (1:4) to obtain solutions of (7×10^{-5} to 4×10^{-5}) M concentration range. Then, an aliquot of $1 \mu\text{L}$ was spread on the subphase using a microsyringe. Four minutes were allowed for solvent evaporation before starting the expansion until a volume of $25 \mu\text{L}$ was reached at a rate of $0.2 \mu\text{L/s}$. When expansion was finished, the program maintains the drop area constant for 118 s to reach the monolayer equilibrium and then the compression started at the same rate of expansion.

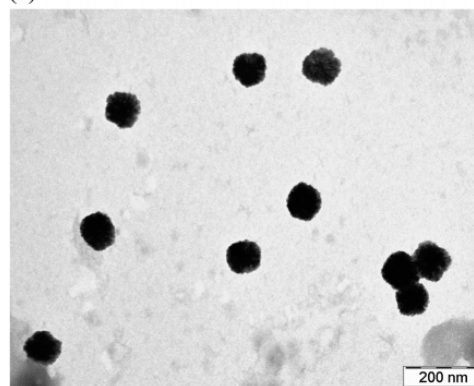
The cation concentrations in the subphase were 0.2, 0.4, 0.6, 0.7, 0.8, and 1 M for Ca^{2+} and 0.1, 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, and 0.5 M for La^{3+} .

Results and Discussion

Experimental and Predicted DLVO Stability of the Liposomes in $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ Solution. To compare with the DLVO theory predictions, measurements of stability of the liposomes at different concentrations of La^{3+} were made by two different methods. First, the size and polydispersity of the liposomes in La^{3+} solutions using PCS were measured. Figure 1 shows an initial liposome size of 140 nm and a small polydispersity of 0.025. However, there is a sharp increase of the size and polydispersity starting at a La^{3+} concentration of 0.3 M. At higher concentration, the system is unstable and large aggregates (>500 nm) of different sizes are originated. There is an extensive bibliography reporting that the aggregation of liposomes in the presence of La^{3+} predominates more than in the fusion process.^{24,25} The micrographs obtained by TEM (Figure 2a) confirm that the aggregation processes are causing the increase in size and polydispersity of the system when the La^{3+} concentration is increasing. The particle concentration used in the TEM micrograph was 1.2×10^{19} liposome/ m^3 .



(a)



(b)

Figure 2. Transmission electron micrograph of spontaneous PC liposomes in the presence of (a) 0.7 M Ca^{2+} and (b) 0.3 M La^{3+} .

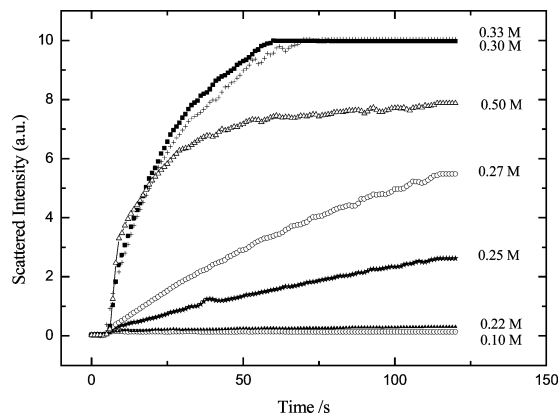


Figure 3. Scattered light intensity (arbitrary unit) vs time for a typical nephelometry experience with PC liposomes at different concentrations of La^{3+} .

To get a more complete characterization of the stability of the liposomes in La^{3+} solution, the stability constant (W) at different La^{3+} concentrations was measured using the nephelometry technique. From the slopes of the intensity versus time of Figure 3, W was calculated using eq 3. The results are shown in Figure 4. Usually the critical concentration (c.c.) is defined as the intersection of the linear fit in the slow regime and the linear fit in the rapid

(24) Zschörnig, O.; Richter, W.; Paasche, G.; Arnold, K. *Colloid Polym. Sci.* **2000**, *278*, 637.

(25) Jones, M. N.; Hammond, K.; Reboiras, M. D.; Acerete, C.; Jackson, S. M.; Nogueira, M.; Nicholas, A. R. *Colloids Surf.* **1986**, *18*, 75.

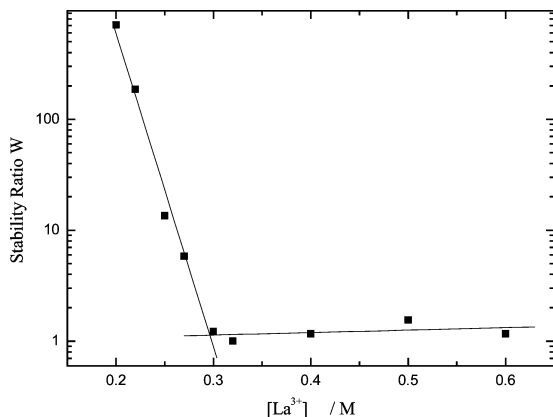


Figure 4. Variation of stability ratio (W) with La^{3+} concentration measured by nephelometry.

regime. In that case, the c.c. is 0.3 M, which agrees with the result obtained by PCS.

Now, the interest is to compare the experimental results of stability with the DLVO theory predictions. The DLVO theory considers the interaction potential between liposomes such as the sum of an attractive London–van der Waals interaction $V_A(x)$ and a repulsive interaction $V_R(x)$ due to the electric charge on the particles:

$$V_T(x) = V_A(x) + V_R(x) \quad (4)$$

$V_A(x)$ for the case of two spherical shells of equal radius, a , and thickness, d , derived by Hamaker,^{10,26} is given by²⁷

$$V_A(x) = -\frac{Aa}{12} \left[\frac{1}{x+2d} - \frac{2}{x+d} + \frac{1}{d} \right] - \frac{A}{6} \ln \frac{x(x+2d)}{(x+d)^2} \quad (5)$$

where A is the attractive Hamaker constant, a the initial radius of the liposomes, and x the distance between the two spherical shells.

The Hamaker constant, A , was calculated using an algorithm based on a SIMPLEX method, which minimizes the error fit of the nephelometry data to the function:

$$W = \frac{\int_0^\infty \frac{\beta(u)}{(u+2a)^2} \exp \frac{V_T}{k_B T} du}{\int_0^\infty \frac{\beta(u)}{(u+2a)^2} \exp \frac{V_A}{k_B T} du} \quad (6)$$

where $\beta(u)$ is the hydrodynamic correlation factor, related to retardation on the particles diffusion due to the friction with the medium:

$$\beta(u) = \frac{6u^2 + 13u + 2a^2}{6u^2 + 4ua} \quad (7)$$

where $u = (x - 2a)/a$. The Hamaker constants were in the range of $(0.1 \times 10^{-20}$ to 7×10^{-20}) J with no changes in the DLVO potentials in that range of values.

The expression for the repulsive potential, $V_R(x)$, by area unit has the form^{28–30}

$$V_R(x) = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r(a + \Delta)\psi_0^2 \exp[-\kappa(x - 2\Delta)] \quad (8)$$

where k_B is the Boltzmann constant, T is the absolute

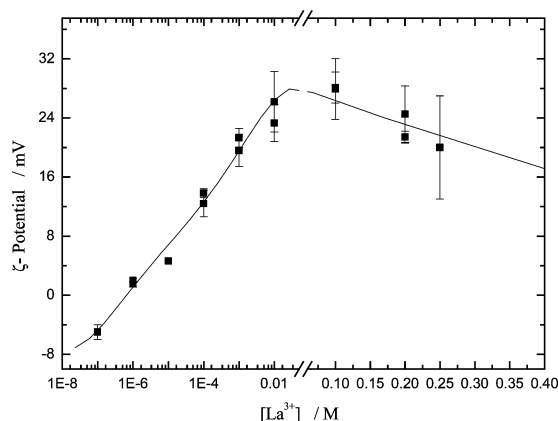


Figure 5. Zeta potential of PC liposomes as a function of La^{3+} concentrations.

temperature, ψ_0 is the surface potential which coincides with ζ for high values,³¹ and κ is the reciprocal Debye length:

$$\kappa^2 = \frac{(z_1^2 z_2 + z_2^2 z_1) c_s N_A e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T} \quad (9)$$

where c_s is the concentration, e the elementary charge, z_i the valence of the ions, and N_A Avogadro's number. Finally, Δ is the thickness of the Stern layer, and it was taken as the hydrated radius of the adsorbed lanthanum ion, 0.49 nm.^{32,33}

To know $V_T(x)$, we need to measure the zeta potential ($\zeta \approx \psi_0$) of the liposomes for each La^{3+} concentration. The results are shown in Figure 5, where a change in the sign and a fast increase of the zeta potential until +25 mV due to the adsorption of La^{3+} onto the liposome surface can be seen. For higher concentrations than 0.05 M, there is a small decrease of the ζ -potential due to the adsorption of NO_3^- . Using the values of ζ , we can represent the DLVO potential for each La^{3+} concentration, as is shown in Figure 6. The aggregation of the liposomes will occur when the repulsive barrier is lower than $k_B T$ at the contact surface (hydration surface $\Delta = 0.49$ nm). As can be seen in Figure 6, the repulsive barrier is below $k_B T$ for La^{3+} concentrations larger than 0.27 M. This agrees with the experimental data obtained by nephelometry and PCS, proving the good accuracy of the DLVO theory to describe the stability of liposomes in the presence of La^{3+} .

Experimental and Predicted DLVO Stability of the Liposomes in a $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ Solutions. Similar experiments to the above-mentioned one have been performed with liposomes in $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ solutions. Figure 7 shows the sizes and polydispersities of the liposomes at different concentrations of Ca^{2+} . It can be observed an

(26) Derjaguin, B. V.; Landau, L. D. *Acta Physicochim. U.R.S.S.* **1941**, *14*, 633.

(27) Tadmor, R. J. *Phys.: Condens. Matter* **2001**, *13*, L195.

(28) Hamaker, H. C. *Rec. Trav. Chim.* **1936**, *55*, 1015. Hamaker, H. C. *Rec. Trav. Chim.* **1937**, *56*, 3.

(29) Matijevic, E.; Mathai, K. G.; Ottewill, R. H.; Kerker, M. *J. Phys. Chem.* **1961**, *65*, 826.

(30) Vincent, B.; Bijsterbosch, H.; Lyklema, J. *J. Colloid Interface Sci.* **1970**, *37*, 171. Bastos, D.; de las Nieves, F. J. *Colloid Polym. Sci.* **1994**, *272*, 592.

(31) Lyklema, J. *J. Colloid Interface Sci.* **1977**, *58*, 242.

(32) Vinogradov, E. V.; Smirnov, P. R.; Tostón, V. N. *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* **2003**, *52*, 1253.

(33) Näslund, J.; Lindqvist-Reis, P.; Persson, I.; Sandström, M. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 4006.

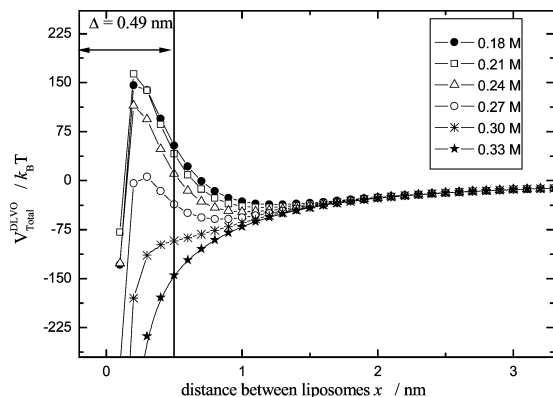


Figure 6. DLVO potentials of PC liposomes as a function of the distance between two liposomes for different La^{3+} concentrations. (●) 0.18, (□) 0.21, (△) 0.24, (○) 0.27, (*) 0.30, and (★) 0.33 M.

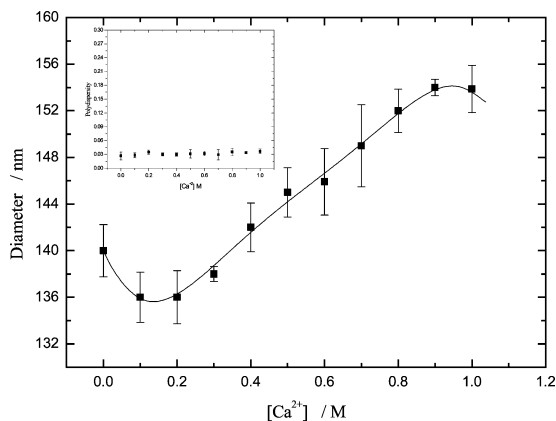


Figure 7. Values of diameters and polydispersity index of the PC liposomes for different Ca^{2+} concentrations measured by PCS.

initial decrease of their size at low Ca^{2+} concentrations due to the osmotic pressure^{34–36} and a slow increase of the size until a maximum of 155 nm in the range of 0.3–0.9 M. The TEM micrographs of Figure 2b and the unchanged polydispersity (Figure 7) reflect that no aggregation process occurs. This means that the increase of the size of the liposomes in the presence of Ca^{2+} are, essentially, due to a fusion process between the liposomes particles, as other authors have reported.^{37–39}

Due to the fusion being a slow process, it is not possible to define the critical concentration by PCS; therefore, the nephelometry technique was used to calculate it. The results are plotted in Figure 8, showing the c.c. at 0.7 M.

To calculate the DLVO potentials, we have estimated the ζ -potential for different Ca^{2+} concentrations. The results are plotted in Figure 9. The initial negative value drastically decreases with increasing ion concentration,

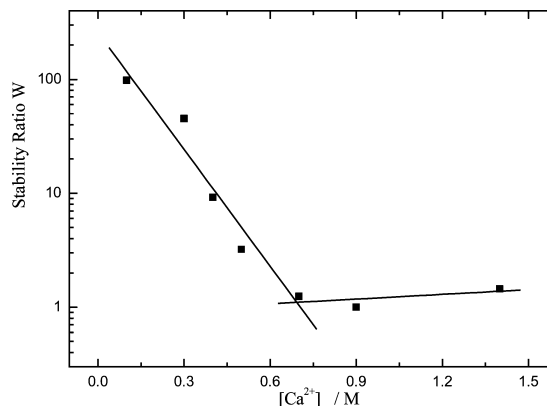


Figure 8. Variation of $\log W$ with Ca^{2+} concentration measured by nephelometry.

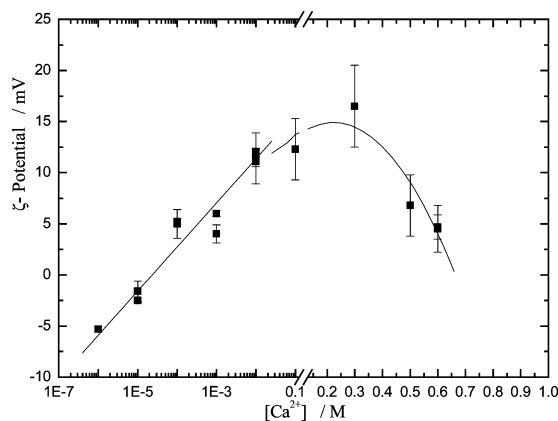


Figure 9. Zeta potential of PC liposomes as a function of Ca^{2+} concentrations.

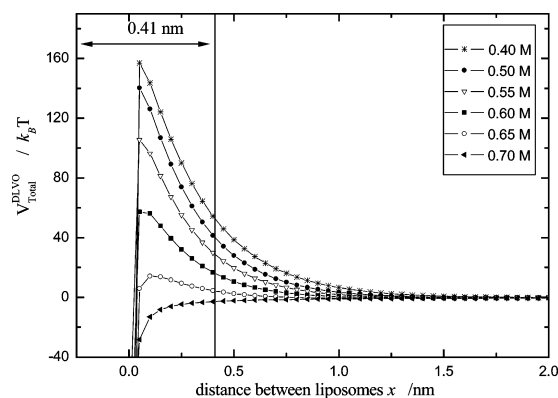


Figure 10. DLVO potentials of PC liposomes as a function of the distance between two liposomes for different Ca^{2+} concentrations. (*) 0.4, (●) 0.5, (▽) 0.55, (■) 0.6, (○) 0.65, and (▲) 0.7 M.

suggesting the binding of cations to the liposome surface until a maximum, after which a slight decrease with ion concentration is observed. Figure 10 shows DLVO potential curves calculated through the eqs 4, 5, and 7. As can be seen in Figure 10, the repulsive potential barrier at the hydrated surface ($\Delta = 0.41$ nm)¹¹ disappears for larger Ca^{2+} concentrations than 0.65 M. The theoretical

(34) White, G.; Pencer, J.; Nickel, B. G.; Wood, J. M.; Hallett, F. R. *Biophys. J.* **1996**, 71, 2701.

(35) Bordi, F.; Cametti, C.; Naglieri, A. *Biophys. J.* **1998**, 74, 1358.

(36) Soveral, G.; Macey, R. I.; Moura, T. F. *J. Membrane Biol.* **1997**, 158, 209.

(37) Ohki, S. *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 689, 1.

(38) Papahadjopoulos, D.; Vail, W. J.; Pangborn, W. A.; Poste, G. *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 448, 265.

(39) Wilschut, J.; Hoekstra, D. *Chem. Phys. Lipids* **1986**, 40, 145.

Table 1. Zeta Potential Reversal (pzc), $(d\zeta/d \log c)_{\zeta=0}$, Number of Adsorption, N_1 , Adsorption Constant, k_2 , and Free Energy of Adsorption, ΔG_{ads} of Ca^{2+} and La^{3+} to PC Liposomes

	$(d\zeta/d \log c)_{\zeta=0}$ (mV)	N_1 (m^{-2})	k_2 (m^3/mol)	ΔG_{ads} (kJ)
La^{3+}	6.05	5.12×10^{14}	6.1×10^6	-48.7
Ca^{2+}	4.1	1.41×10^{15}	1.81×10^6	-40.0

data are in reasonable agreement with the experimental data obtained by nephelometry.

Schulze–Hardy Rule. Following the Schulze–Hardy rule, the c.c. has to change with the inverse quadratic power of the valence, z , of the electrolyte counterions; i.e., $\text{c.c.} \propto 1/z^2$; if the ζ -potential is less than 100 mV.¹¹

In our case, the Schulze–Hardy rule implies that $\text{c.c.}_{\text{Ca}}/\text{c.c.}_{\text{La}} = z_{\text{La}}^2/z_{\text{Ca}}^2 = 2.25$. Using the experimental measurements of the c.c. from nephelometry, we observe that $\text{c.c.}_{\text{Ca}}/\text{c.c.}_{\text{La}} = 2.3$. Since the Schulze–Hardy rule is derived directly from DLVO theory, the good agreement between the experimental data and the Schulze–Hardy rule is another proof of the suitability of DLVO theory to predict the colloidal stability of liposomes.

Characterization of the Ion Adsorption onto Liposome Surface. In an attempt to analyze the colloidal stability of liposomes, the ion adsorption has been studied. Figures 5 and 9 show ζ -potential values of liposomes as a function of La^{3+} and Ca^{2+} concentrations.

Considering the slope of ζ -potential versus $\log c$ at the ζ -potential reversal (pzc), the number of adsorption sites per unit area (N_1), can be calculated using the equation:¹⁹

$$\left(\frac{d\zeta}{d \log c} \right)_{\zeta=0} = 2.303 \zeta^0 \left[\frac{\epsilon \zeta^0 (1 + \kappa a)}{a z e N_1} - 1 \right] \quad (10)$$

where ζ^0 is the ζ -potential in the absence of salt and the other symbols have their usual meaning.

The adsorption constant, k_2 , can be calculated from the equation

$$\frac{1}{c_0} = k_2 \left\{ \frac{a z e N_1}{\epsilon \zeta^0 (1 + \kappa a)} - 1 \right\} \quad (11)$$

where c_0 is the concentration at the pzc.

The standard free energy of adsorption, ΔG_{ads}^0 can be obtained from the equation

$$k_2 = \exp \left(- \frac{\Delta G_{\text{ads}}^0}{k_B T} \right) \quad (12)$$

Table 1 shows the number of adsorption sites, the adsorption constant, and the Gibbs free energy of the adsorption of La^{3+} and Ca^{2+} onto the PC liposome surfaces.

Although the adsorption constant k_2 is larger for La^{3+} than for Ca^{2+} , the number of adsorption sites, N_1 , is smaller for La^{3+} than for Ca^{2+} . It is due to the electrostatic forces between La^{3+} ions onto the liposome surface do not allowing them to be close to each other. The larger number of calcium ions binding onto the liposome surface can be an indication of the increment of distance between the lipid molecules in the external surface of liposomes. This fact suggests that our liposome surface with Ca^{2+} is more favorable to fusion due to the decrease of the possible steric effects, which are opposite to fusion. Also, we can assume that the repulsion between lanthanum ions is more important, giving place to an aggregation process. To test this hypothesis, an experimental study on the effect of ion concentration on the interfacial behavior of PC molecules at the air–water interface was performed.

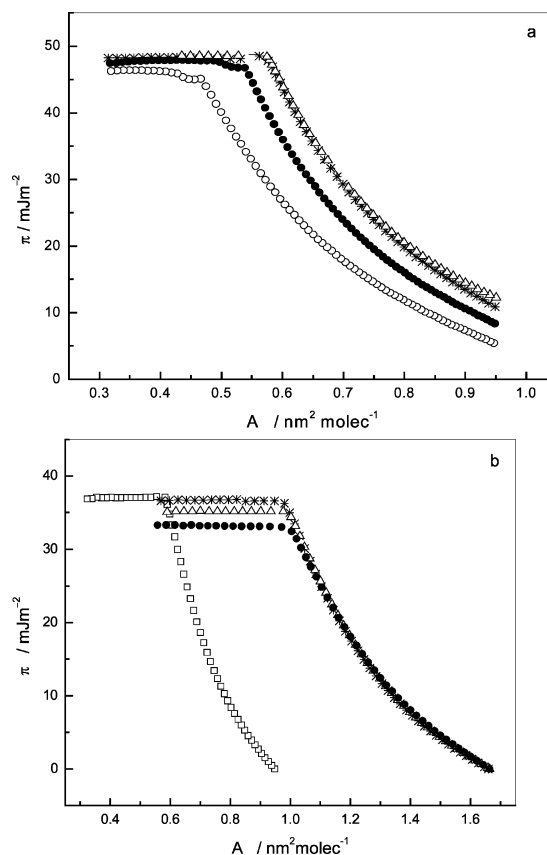


Figure 11. (a) Effect of La^{3+} on the PC monolayer. (○) 0.1, (●) 0.15, (*) 0.20, and (▲) 0.3 M La^{3+} . (b) Effect of Ca^{2+} on the PC monolayer. (□) 0.4, (*) 0.7, (Δ) 0.8, and (●) 1 M Ca^{2+} .

Phospholipid Monolayers. To confirm the effect of the Ca^{2+} and La^{3+} ions on the bilayer of liposomes, the behavior of PC monolayers at the air–water interface at different ionic strength values of the aqueous subphase has been studied. The interaction of La^{3+} and Ca^{2+} with PC molecules was analyzed using Langmuir monolayers. Cations were introduced into the subphase of the phospholipid monolayers, and their effects were characterized with surface pressure measurements. Figure 11a and b shows surface pressure/molecular area (π/A) isotherms for PC monolayers in the presence of different La^{3+} and Ca^{2+} concentration, respectively. Similar curves were obtained for all cation concentration values. The PC monolayer is characterized by a sharp transition between the liquid expanded (LE) and liquid condensed (LC) phases, which occurs at 25 °C. The extrapolated area, A_0 , in the LC phase and the surface pressure (π) are shown in Figures 12 and 13. Figure 12 displays the variation of A_0 with the cation concentration. The form of curves suggests a pronounced effect of divalent and trivalent cations on the packing order and structure of the PC film. The surface area per lipid molecule increases significantly with the increase of cation concentration. This is due to the adsorption of hydrated cations onto the charged points of the lipid molecules. It is generally accepted that the cations are adsorbed specifically onto lipid bilayers.⁴⁰ This

(40) Sundler, R. In *Membrane Fluidity, Biomembranes*; Kates, M., Manson, L. A., Eds.; Plenum: New York, 1984; Vol. 12.

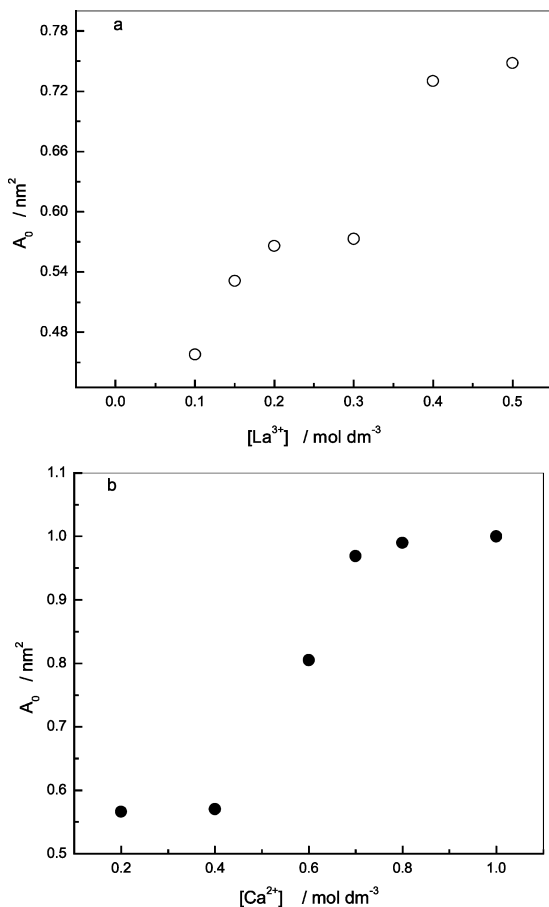


Figure 12. Variation of A_0 versus ion concentration. (a) La^{3+} and (b) Ca^{2+} .

specific adsorption causes an inevitable change of the form and effective size of hydrated headgroups. A_0 increases simultaneously with cation concentration, but there is a concentration at which the increment in the A_0 value is greater. This concentration is the c.c. determined by nephelometry techniques. Figure 13 shows variation of π with cation concentration. The form of the curves exhibits a decrease of π from a certain salt concentration. This concentration corresponds with c.c. In equilibrium, three kinds of lateral pressures in the monolayer have to be balanced, i.e., $\pi_{\text{head}} + \pi_{\text{chain}} = \pi$, where π_{head} is the steric repulsive interaction between the headgroups in the phospholipid membrane, π_{chain} is the repulsive chain pressure, and π is the attractive interfacial pressure due to the hydrophobic interaction between the alkyl chains and water at the membrane interface.

Recent studies on the structure of phospholipid membranes clearly show that their membrane interfaces have a dynamic structure and are made of a complex and thermally disordered mixture of hydrophilic segments of headgroups, hydrophobic segments of alkyl chains, and water molecules.^{11,41} The binding or interaction of substances with the membrane interface largely changes its structure, its surface area, and also intermolecular

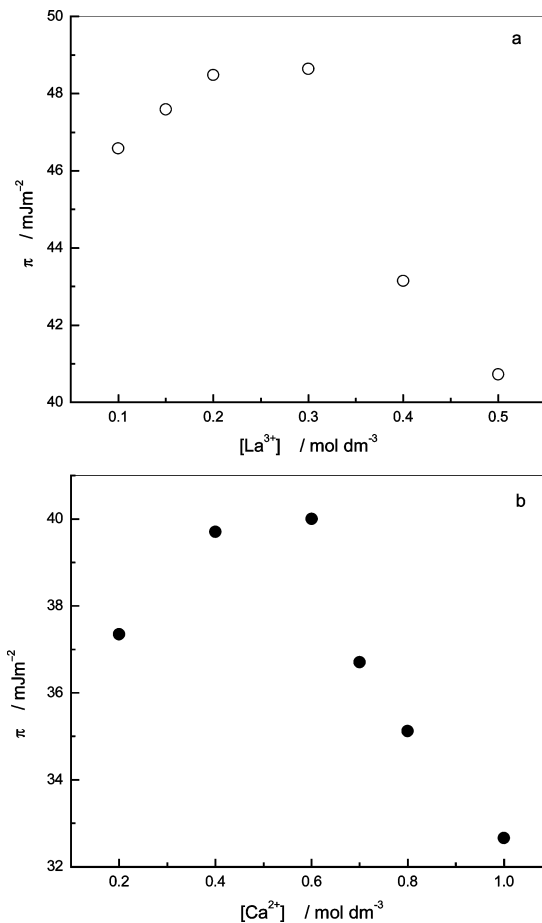


Figure 13. Variation of π versus ion concentration. (a) La^{3+} and (b) Ca^{2+} .

interactions such as π_{head} in the membrane interface.^{42–43} Hence, in the case of the membrane interface of a phospholipid monolayer, the change in the surface free energy is not determined by the adsorption (i.e., surface excess) of substrates on the membrane according to Gibbs surface tension equation. Therefore, we have to consider the effect of the substances with the membrane interface on its structure and physical properties.

Cations can specifically adsorb onto headgroups of an electrically neutral PC membrane and induce orientation changes of the headgroup moving the N end of the P $\rightarrow$ N vector (see Figure 14) perpendicular to the water phase. In water (in absence of these ions), the headgroup orients itself almost parallel to the membrane surface. La^{3+} and Ca^{2+} may bind with the headgroup of the PC membrane near the phosphate group, which induces an electrostatic attraction between the negative charges of the phosphate groups (O^-) of neighboring phospholipids. This conformational change decreases π_{head} . The increase in the lateral compression pressure of the membrane can reasonably explain the disappearance of the undulation motion of the bilayer in the presence of cations and the fact that the transition $\text{LE} \rightarrow \text{LC}$ moves to a high A_0 value.

(42) Kinoshita, K.; Li, S. J.; Yamazaki, M. *Eur. Biophys. J.* **2001**, *30*, 207.

(43) Furuike, S.; Levadny, V. G.; Li, S. J.; Yamazaki, M. *Biophys. J.* **1999**, *77*, 2015.

(41) Kinoshita, K.; Furuike, S.; Yamazaki, M. *Biophys. Chem.* **1998**, *74*, 237.

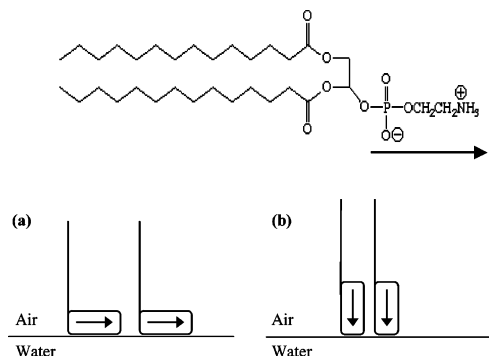


Figure 14. Phosphatidylcholine molecule (arrows indicate orientation of P → N vector in the headgroup). (a) In water; (b) in water + Ca²⁺

If we translate these results to liposomes, a reduction of π_{head} at the liposome surface due to the presence of divalent and trivalent cations should increase electrostatic attraction between lipid molecules and favor their aggregation or fusion.

As can be seen in Figure 12, the Ca²⁺ increases the value of A_0 much more than does La³⁺, which corresponds with a larger reduction of π_{head} . This result confirms our interpretation of liposome fusion in the presence of Ca²⁺ detected by TEM, while in the presence of La³⁺, we can only observe liposome aggregation. In the presence of La³⁺, the fusion among liposome particles is never observed. On the other hand, a smaller La³⁺ concentration is needed to commence the reduction of the π_{head} ; this fact is related to the greater charge that the lanthanum ion possesses. Therefore, a smaller concentration of this ion is needed to generate the liposome aggregation.

Conclusions

Interactions between cations (La³⁺, Ca²⁺) and phospholipid liposomes have been studied by different techniques: PCS, electrophoretic mobility, and nephelometry. To corroborate the experimental results, we have used the DLVO theory to describe the colloidal stability of liposomes. Also, we have studied the effect of the two cations mentioned on the phospholipid monolayers. Light scattering shows an increase of size and polydispersity of the liposomes in the presence of lanthanum at concentration up to 0.3 M. This result can indicate an aggregation process of the liposomes. This is confirmed by micrographs obtained by TEM. The c.c. determined by nephelometry, using the stability constant (W), confirms that the aggregation processes start at a concentration of 0.3 M of La³⁺. The liposome, upon addition of calcium, shows a different pathway in its behavior. The PCS measurements

show a decrease in the size of the liposome until its concentration reaches 0.2 M, probably due the osmotic pressure. At larger concentration, the size and the polydispersity index increase, suggesting that the fusion process is progressing. In the PCS measurements, we cannot ensure when the process begins. However, by nephelometry measurements, we can determine the c.c. so the fusion process commences at a concentration of 0.7 M for Ca²⁺. Also, the micrographs obtained by TEM confirm this fusion process. The DLVO theory, in the case of two spherical shells and the hydrated ions, illustrates that this theory is applicable to study the stability of this system. In both cases, the DLVO theory and experimental data agree. To confirm the consistency of DLVO, we applied the Schulze–Hardy rule and the results were reasonable. By means of electrophoretic measurements, we have characterized the adsorption of ions onto the liposome surface. The larger number of molecules of calcium suggests that the distance between lipid molecules in the external surface is larger than that in the lanthanum adsorption. To study the ion effect on the bilayer of liposome, we have analyzed the behavior of these ions on the phospholipid monolayer. The results indicate the specific adsorption of hydrated cations on the charged groups of the lipid molecules. The extrapolated area (A_0) increases simultaneously with cation concentration; however, there is a concentration at which the increment in the A_0 value is greater. This concentration corresponds with the c.c. determined by nephelometry. Ca²⁺ increases the value of A_0 much more than does La³⁺, which corresponds with a higher reduction of π_{head} . This fact validates the phenomenon of liposome fusion in the presence of Ca²⁺ detected by TEM, while in the presence of La³⁺, we can observe the liposome aggregation. In presence of La³⁺, fusion is not reached. Also, the electrophoretic measurements predict a larger Ca²⁺ adsorption onto the liposome surface, which implies that the area, A_0 , is bigger than that in the case of La³⁺.

On the other hand, a smaller La³⁺ concentration is needed to commence the reduction of the π_{head} ; this is related to the greater charge that the lanthanum ion possesses. Therefore, a smaller concentration of this ion is needed to generate the liposome aggregation

Acknowledgment. This research was funded by the Spanish Ministry of Science and Technology (Project No. MAT2002-00608) by the European Regional Development Fund (ERDF) and by Xunta de Galicia (Project No. PGIDIT03PXI20615PN). P.V.M. thanks Fundación Antorchas, Argentine (14308/110) and Banco Rio, Argentine for financial support. R.H.-A. acknowledges the financial support from the project MAT2003-08356-C04-01 and by the European Regional Development Fund (ERDF).

LA051397T

Effect of Gd^{3+} on the colloidal stability of liposomesJuan Sabín,¹ Gerardo Prieto,^{1,*} Simona Sennato,² Juan M. Ruso,¹ Roberta Angelini,² Federico Bordini,² and Félix Sarmiento¹¹*Grupo de Biofísica e Interfases, Departamento de Física Aplicada, Facultad de Física, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain*²*Dipartimento di Fisica, Università di Roma "La Sapienza," Piazzale Aldo Moro 2, I-00185 Roma, Italy and INFN CRS-SOFT, Unità di Roma1, Rome, Italy*

(Received 27 February 2006; revised manuscript received 24 July 2006; published 25 September 2006)

Lanthanide ions such as La^{3+} and Gd^{3+} are well known to have large effects on the structure of phospholipid membranes. Unilamellar vesicles of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) were prepared by sonication method and confirmed by transmission electron microscopy. The effects of concentration of gadolinium ions Gd^{3+} on DPPC unilamellar vesicles in aqueous media were studied by different techniques. As physical techniques, photon correlation spectroscopy, electrophoretic mobility, and differential scanning calorimetry were used. The theoretical predictions of the colloidal stability of liposomes were followed using the Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek theory. Changes in the size of liposomes and high polydispersities values were observed as Gd^{3+} concentration increases, suggesting that this cation induces the aggregation of vesicles. Electrophoretic mobility measurements on unilamellar vesicles as a function of Gd^{3+} ion concentration show that the vesicles adsorb Gd^{3+} ions. Above Gd^{3+} concentrations of 0.1 mol dm^{-3} , the ζ potential and light scattering measurements indicate the beginning of aggregation process. For comparison with similar phospholipids, the zeta potential of phosphatidylcholine interacting with Gd^{3+} was measured, showing an analogous behavior. Differential scanning calorimetry has been used to determine the effect of Gd^{3+} on the transition temperature (T_c) and on the enthalpy (ΔH_c) associated with the process.

DOI: [10.1103/PhysRevE.74.031913](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.74.031913)

PACS number(s): 87.68.+z, 47.63.mh, 87.90.+y, 87.83.+a

INTRODUCTION

Magnetic resonance imaging (MRI) has evolved into one of the most powerful techniques in diagnostic clinical medicine and biomedical research by enabling the acquisition of high-resolution three-dimensional images of the distribution of water in vivo [1]. The strong expansion of medical MRI has prompted the development of a new class of pharmacological products, called contrast agents [2]. These agents catalytically shorten the relaxation time of nearby water molecules, thereby enhancing the contrast with background tissues. In 1999, approximately 30% of all MRI scans used a contrast agent, most of which were based on gadolinium complexes [1]. In an effort to improve the design and interpretation of the protocols to use for these agents, there is a need to understand how they interact with biological molecules and assemblies. Gd^{3+} is known to induce conformational changes in some proteins [3], but the physiological effects of lanthanides are usually expected to result mainly from alterations in the structure of the membrane bilayer.

It is this expectation that has prompted us to investigate further the effect of gadolinium on the structure and surface electrical properties of liposomes. Liposomes are vesicular structures formed by a closed lipid bilayer, encompassing an aqueous core [4]. In an appropriate environment, these structures self-assemble, due to the amphiphilic character of their component molecules. Amphiphilic molecules, being composed of a hydrophobic and a hydrophilic part, in aqueous solution give rise to a variety of morphologically different

structures. Among these, unilamellar or multilamellar vesicles (liposomes) are of peculiar interest as a simple model of biomembranes. Sharing with biomembranes the basic bilayer structure, they offer the unique advantage that their lipid composition can be varied in a well-defined and controlled way.

Composition, together with the characteristics of the aqueous phase, defines the physico-chemical properties of these structures, such as their stability, surface charge density, bilayer rigidity, etc., and their properties as colloidal particles, such as size, electrophoretic mobility, and interparticle interactions.

Although the self-assembling of amphiphilic lipids is mainly driven by the so-called "hydrophobic effect" [5], electrostatic interactions among the polar heads play a fundamental role in the aggregation process and in determining the properties of the bilayer. For this reason, the presence of multivalent ions in the solution can have a strong influence on the organization of the lipids within the bilayer and on structure and the dynamical properties of the liposome-water interface.

Because of their biocompatibility and of their structure, liposomes can be effectively used as drug delivery systems, since the lipid bilayer allows the entrapment of hydrophilic material within the aqueous core and hydrophobic material within the hydrocarbon chain phase [4,6].

The biological applications of Gd-labeled liposomes are focusing on the monitoring of the liposomal distribution within targeted regions, the temperature control, and the gradual administration of the gadolinium as catalytic agents to increase the contrast in the MRI [7–9].

The lanthanide ions (La^{3+} , Gd^{3+}) have effects on the structure and stability of phospholipids membranes. Several

*Corresponding author. FAX: +34 981 520 676. Electronic address: faxera@usc.es

authors have studied the interactions of La^{3+} with the surface of negatively charged lipid layers made up of phosphatidylserine (PS) and dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (DPPC)-phosphatidyl-inisitol (PI), with apparently contradictory results. In its interaction with PS membranes, La^{3+} induces membrane fusion of the vesicles [10–12]. On the contrary, La^{3+} does not induce fusion of DPPC-PI vesicles [13]. Averbahk and co-workers [14,15] observed that Gd^{3+} induces aggregation of di-myristoyl-phosphatidyl-serine liposomes. Studying the effects of La^{3+} and Gd^{3+} on membranes composed of phosphatidyl-choline (PC) and phosphatidyl-ethanolamine Tanaka *et al.* [16] found that chain-melting transition temperatures of PC and PE membranes increased with an increase in La^{3+} concentration indicating that the lateral compression pressure of the membrane increases with the concentration of the multivalent ions. More recently, Tanaka and Yamazaki [17] proposed a new model for the mechanism of La^{3+} -induced membrane fusion of giant unilamellar vesicles.

In the present paper, we have studied the effect of gadolinium on the stability of the liposomes and on different physical properties characterizing the bilayer. Moreover, the aggregation process of DPPC liposomes at different concentrations of Gd^{3+} have been studied by means of dynamic light scattering (DLS), and the results have been interpreted within the framework of the Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory. The adsorption of Gd^{3+} ions to the membrane has been quantified by electrophoretic measurements, and differential scanning calorimetry (DSC) has been employed to investigate the effect of the Gd^{3+} on the phase transition of the membrane.

MATERIAL AND METHODS

Materials

L- α -Phosphatidylcholine Dipalmitoyl (DPPC) (No. P 0763) and the L- α -Phosphatidylcholine from egg yolk (EYPC) (No. P 3556) were purchased from Sigma and used without further purification.

The GdCl_3 was from Sigma Chemical and had a purity of 99.9%. Organic solvents methanol and chloroform were from Aldrich and Merck, respectively. The water was doubly distilled.

Dynamic light scattering

Dynamics light scattering measurement were performed by a standard laboratory-built DLS spectrometer equipped with a BI-9000AT digital correlator (Brookhaven Instruments) and a He-Ne laser operating at 10 mW power and 632.8 nm wavelength. Data analysis was performed using a software based on the CONTIN method [18].

Electrophoretic mobility

Zeta potentials (ζ potential) of the liposome system were measured using a Malvern Instruments Zetamaster 5002 by taking the average of five measurements at stationary level. The cell used was a $5 \times 2 \text{ mm}^2$ rectangular quartz capillary. The temperature of the experiments was $25.0 \pm 0.1^\circ \text{C}$ and

was controlled by a Haake temperature controller. The zeta potential ζ was calculated from the electrophoretic mobility μ_E by means of the Henry correction to Smoluchowski's equation [19]:

$$\zeta = \frac{3\mu_E\eta}{2\epsilon_0\epsilon_r f(\kappa a)}, \quad (1)$$

where ϵ_0 is the vacuum permittivity, ϵ_r is the relative permittivity of the solvent, a is the particle radius, κ^{-1} is the Debye length, and η is the solvent viscosity (water, in our case).

Differential scanning calorimetry

A Perkin-Elmer differential scanning calorimeter (Model Diamond) was used for the DSC experiments. 50 μl sealed pans of aluminum have been used as cell and reference. The former has been filled with 0.5 mg of DPPC and 40 μl of GdCl_3 aqueous solutions, at the different concentrations of the electrolyte, the latter has been filled with the same amount of water. The thermograms have been obtained at a cooling and heating rate of $10^\circ \text{C}/\text{min}$. The temperature (T_c) and enthalpy (ΔH) of transition were determined using Pyris for Windows software (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT). All the thermograms were measured, at least, four times with a high reproducibility.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The morphological examination of the liposomes was performed by transmission electron microscopy (CM-12 Philips). The samples were stained with 2% (w/v) (per weight) phosphotungstic acid and placed on copper grids with Formvar films for viewing by TEM.

Preparation of the liposomes

An appropriate amount of DPPC (20 mg) was dissolved in 2 ml of a methanol-chloroform solution (1:1 v/v) (per volume), the solution was placed in a glass vessel and allowed to form a dry film after rotary evaporation of the solvent. The film was then hydrated with 2 ml pure water at the temperature of 43°C for 1 h. The resulting mixture was sonicated at a temperature of 43°C for 1 h, at continuous power mode using a probe sonicator model Vibra-Cell Sonics, until the solution appeared to be optically transparent in white light. Having in mind the area per molecule, the total liposome surface is several orders of magnitude greater than the surface of the container, so the amount of Gd^{3+} adsorbed at the glass surface is expected to be, for entropic reasons, completely negligible. A homogeneous liposomal suspension of unilamellar vesicles was obtained. Lipids were usually dried under vacuum overnight.

Figures 4 and 5 confirm the existence of unilamellar liposomes with low polydispersities in the absence of gadolinium.

RESULTS AND DISCUSSION

Adsorption of Gd^{3+} to liposomes

In order to analyze the colloidal stability of liposomes in the presence of Gd^{3+} ions, we have measured the ζ potential

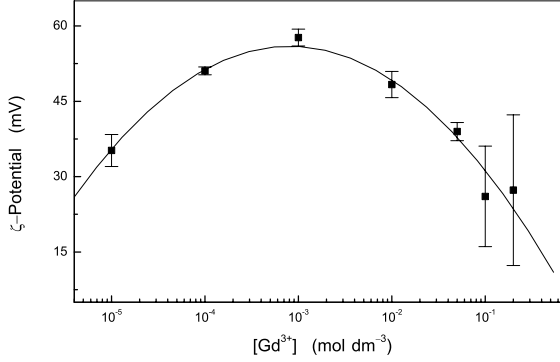


FIG. 1. ζ potential of DPPC liposomes as a function of the Gd^{3+} concentrations at 25 °C.

of DPPC liposomes as a function of concentration of Gd^{3+} . The results are shown in Fig. 1. DPPC molecules are zwitterionic, so that the liposomes bear a weak average charge, whose value depends on the pH of the medium.

As the Gd^{3+} ion concentration progressively increases, due to the adsorption of Gd^{3+} ions, the ζ potential increases from a value of +30 mV to a maximum of about +60 mV, which is reached at a concentration of 1 mol dm^{-3} . The subsequent decrease, observed at higher Gd^{3+} concentrations, can be justified by the increase of the ionic strength of the medium, which progressively reduces the surface charge of the liposomes. For concentrations higher than 0.1 mol dm^{-3} the uncertainties in the ζ potential values are larger, because the aggregation process begins to occur. This overall behavior was supported by other authors [20,21] who established that the dependence of the surface potential on ion concentration is governed by two different contributions: (a) screening of the surface charge by counterions, which always decreases the surface potential with increasing salt concentration, and (b) ion binding, which varies the surface potential.

In order to further study the adsorption of Gd^{3+} at the bilayer surface we have measured the ζ potential of liposomes build up with a natural zwitterionic phospholipid (EYPC), which differs from DPPC in its hydrophobic tail composition, for different gadolinium concentrations. In the absence of Gd^{3+} EYPC liposomes have a negative ζ potential of -15 mV [22,23]. Figure 2 shows the variations of the ζ potential of EYPC and DPPC liposomes depending of the Gd^{3+} concentration and different packing of the tails, having in mind that EYPC is above their phase transition temperature (-15 °C to -7 °C) and DPPC below (41 °C) [24].

In the case of the EYPC liposomes, where the ζ potential changes sign as the Gd^{3+} ion concentration is increased, we can evaluate the number of absorption sites N_1 per unit area. Plotting the ζ potential versus the logarithm of the electrolyte concentration c , and using the Ottewill and Watanabe equation [25], at the point of zero charge (pzc), we have

$$\left(\frac{d\zeta}{d \log c} \right)_{\zeta=0} = 2.303 \zeta^0 \left[\frac{\epsilon(1 + \kappa a) \zeta^0}{a z e N_1} - 1 \right], \quad (2)$$

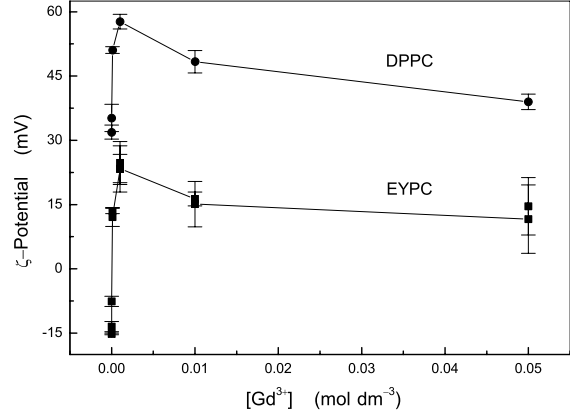


FIG. 2. ζ potential of DPPC (•) and EYPC (■) liposomes as a function of the Gd^{3+} concentrations at 25 °C.

$$\frac{1}{c_0} = k_2 \left[\frac{a z e N_1}{\epsilon \zeta^0 (1 + \kappa a)} - 1 \right], \quad (3)$$

where $z e$ is the ion charge, c_0 is the salt concentration at the pzc, ζ^0 is the ζ potential in the absence of salt, a is the liposome radius, and ϵ the dielectric constant of the medium. Equations (2) and (3) can be simultaneously solved using the experimental values of $(d\zeta/d \log c)_{\zeta=0}$ and c_0 to obtain values of N_1 and k_2 .

The standard free energy of adsorption, ΔG_{ads}^0 , can be obtained from the relationship

$$k_2 = \exp \left(- \frac{\Delta G_{ads}^0}{k_B T} \right). \quad (4)$$

The results obtained for the absorption of Gd^{3+} at the EYPC liposome surfaces are $N_1 = 5.1 \times 10^{14} \text{ m}^{-2}$, $k_2 = 8.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, $\Delta G = -49.6 \text{ kJ/g}$, respectively. These values are comparable with the ones obtained by other authors in the investigation of trivalent ion absorption to liposome surfaces [13,26].

Stability of Gd^{3+} -labeled liposomes

The stability of the liposomes at different concentrations of Gd^{3+} was investigated by means of photon correlation spectroscopy. Figure 3 shows the size of the DPPC liposomes at different concentrations of gadolinium. For concentrations of Gd^{3+} higher than 0.1 mol dm^{-3} , the diffusing objects start to increase in size due to the aggregation of liposomes. The formation of clusters of liposomes after this critical aggregation concentration (CAC) corresponds to the region where the ζ potential is decreasing, as shown in Figs. 1 and 2. TEM images shown in Fig. 4 confirm the existence of large clusters of aggregated liposomes, for concentration of Gd^{3+} higher than 0.1 mol dm^{-3} .

The stability of liposomes before the CAC is governed by electrostatic interactions and when the ionic strength is high enough to screen the charge of the liposomes, the aggregation process begins to occur. See Fig. 5.

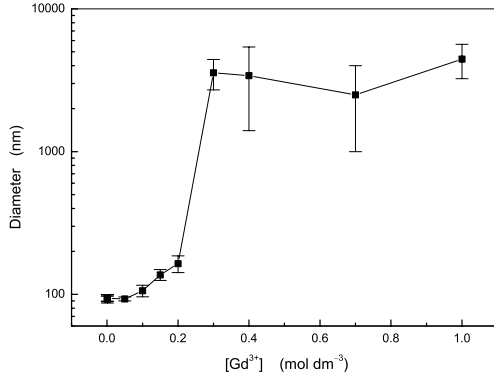


FIG. 3. Diameters of the DPPC liposomes for different Gd^{3+} concentrations measured by DLS at 25 °C.

In Fig. 6 the size of the DPPC liposomes as a function of the concentration of Gd^{3+} is reported in the range from 10^{-5} up to 0.2 mol dm^{-3} , where the aggregation begins. Data have been reported for two different lipid concentrations: $1.36 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ and $13.6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$. It was observed that the CAC does not vary independently of the ratio [liposomes]/[gadolinium], confirming that the aggregation process depends of the screening of the charge of the liposomes due to the increase of the ionic strength.

To correlate these observations with the forces between particles, the data were analyzed within the DLVO theory of colloidal stability [27]. The interaction potential between particles is written as the sum of an attractive London-van der Waals potential $V_A(x)$ and a repulsive interaction potential $V_R(x)$ due to the electric charge of the particles.

$$V_{DLVO} = V_A(x) + V_R(x). \quad (5)$$

The attraction potential $V_A(x)$ [28,29] in the case of two equal vesicles of radius a and thickness of the bilayer d is given by [30]

$$V_A(x) = -\frac{Aa}{12} \left[\frac{1}{(2d+x)} + \frac{2}{d+x} + \frac{1}{x} \right] - \frac{A}{6} \ln \left[\frac{x(x+2d)}{(x+d)^2} \right], \quad (6)$$

where A is the Hamaker constant and x is the distance between the two liposomes. The expression for $V_R(x)$ per unit area has the form [31,32]

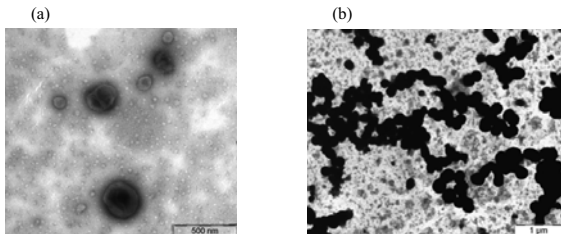


FIG. 4. Transmission electron micrograph of spontaneous DPPC liposomes at presence of (a) 0.05 mol dm^{-3} of Gd^{3+} and (b) 0.7 mol dm^{-3} Gd^{3+} , respectively.

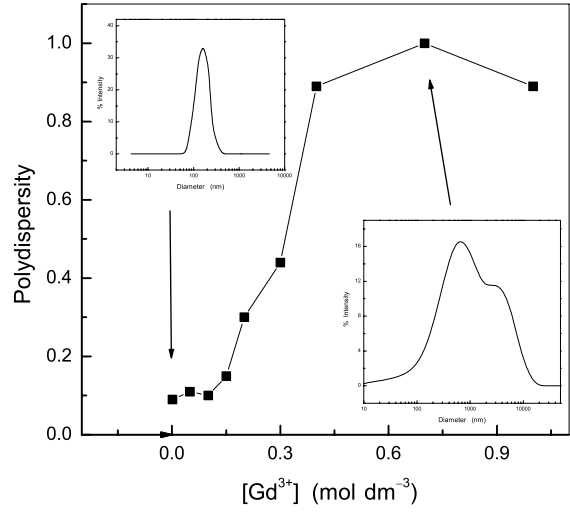


FIG. 5. Polydispersities of the DPPC liposomes for different Gd^{3+} concentrations measured by DLS at 25 °C. The inset represents the size distribution, calculated by CONTIN methods, in absence of Gd^{3+} and at 0.7 mol dm^{-3} of Gd^{3+} .

$$V_R(x) = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r(a+\Delta) \left(\frac{4k_B T}{ze} \gamma \right)^2 \exp[-\kappa(x-2\Delta)], \quad (7)$$

where $k_B T$ is the thermal energy and κ is the reciprocal Debye length:

$$\kappa^2 = \frac{(z_1^2 z_2 + z_2^2 z_1) c_s N_A e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}, \quad (8)$$

where c_s is the concentration. Finally, Δ is the thickness of the Stern layer and

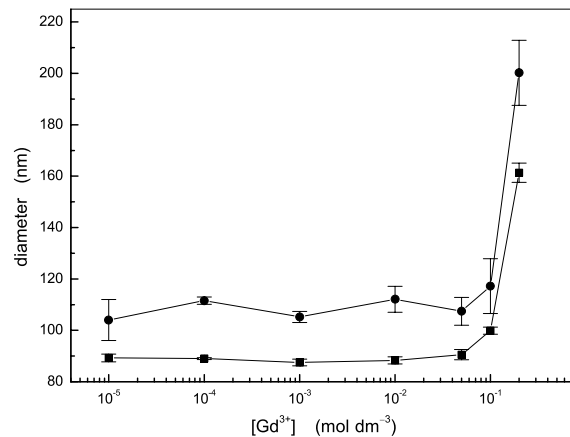


FIG. 6. Diameters of the DPPC liposomes for different phospholipid concentrations measured by DLS at 25 °C. (■) $1.36 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ and (●) $13.6 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.

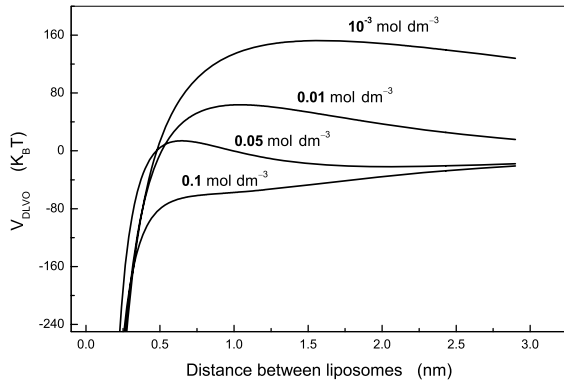


FIG. 7. DLVO potentials of EYPC liposomes as a function of the distance between two liposomes for different Gd^{3+} concentrations, 10^{-3} , 0.01, 0.05, and 0.10 mol dm^{-3} .

$$\gamma = \tan \frac{ze\psi_d}{4k_B T}, \quad (9)$$

where ψ_d is the surface potential that can be assumed as the ζ potential at low ionic strength [33].

Assuming that the aggregation process occurs when the electrostatic barrier disappear and $V_{DLVO} = k_B T$ [34,35], taking in account the value of the CAC = 0.1 mol dm^{-3} , the surface potential, $\psi_d \approx +26 \text{ mV}$, and the initial radius of the stable liposomes, $a = 70 \text{ nm}$, we can calculate the Hamaker constant using Eqs. (6) and (7). We obtained a value of the Hamaker constant of $A = 11.2 \times 10^{-20} \text{ J}$, in reasonably good agreement with the values reported by other authors [35–38].

Figure 7 shows the calculated DLVO potential curves as a function of the distance x for several concentrations of Gd^{3+} , using the calculated value of the Hamaker constant. An increased attraction between vesicles as the salt concentration is increased is observed. As a consequence, the electrostatic barrier decrease. These observations suggest a screening of the liposome charge, close to CAC, leading to a disappearance of the barrier. However, as it is well known, the DLVO theory is inaccurate in the case of multivalent ions. For example, multivalent ions can cause net attraction between similarly charged objects, in violation of the mean-field theory. Then, other effects (other forces) non-DLVO, must be present in the system. These forces are basically due to hydration and osmosis phenomena and have been considered in the thickness of Stern layer, Δ , which is determined by the hydrated radius of the adsorbed ion.

Thermal analysis of phase transition

To proceed further in the direction of a complete analysis of the effect of the Gd^{3+} onto DPPC liposomes, DSC has been employed.

On heating, phospholipids undergo a melting process, as shown by the endothermic peaks in Fig. 8(a). They pass, in fact, from a “gel state,” where the hydrocarbon chains are in the fully extended state and the polar head groups are relatively immobile, to a “liquid-crystalline state,” where the

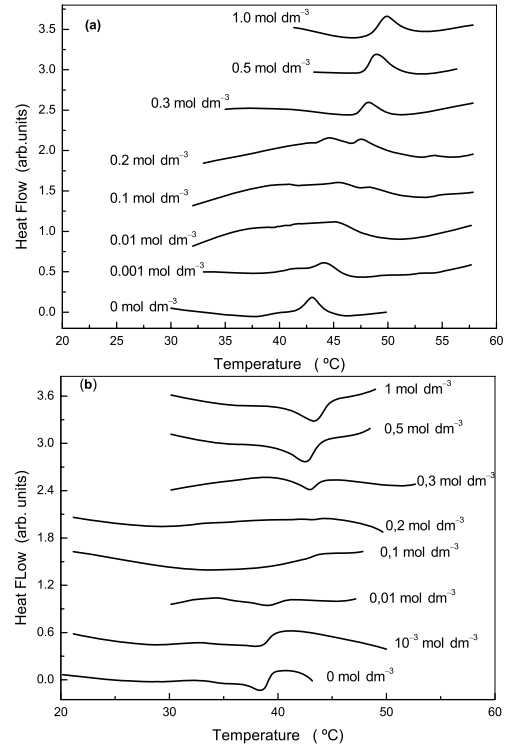


FIG. 8. The DSC endotherms of DPPC liposomes with varying amounts of Gadolinium: heating (a), cooling (b).

head groups have increased mobility and there is a disordering of the hydrophobic chains [38].

This “gel to liquid-crystalline” phase transition is easily detected by DSC, and characterized by a transition temperature (T_c), and an enthalpy (ΔH_c) associated to the process.

Although this phase transition is reversible, the values of T_c and ΔH_c obtained on heating the sample differ from those obtained on cooling it. This indicates that an equilibrium state is reached much faster on cooling than on heating. This effect is probably due to the fact that in the “gel phase” the phospholipids are more correlated with respect to the “liquid crystal phase,” characterized by a higher lateral mobility of the phospholipids. This leads to a shorter equilibration time when the bilayer cools down from the liquid crystal phase to the gel phase [39,40].

The measurements have been performed as a function of the concentration of Gd^{3+} in the range 10^{-5} – 1 mol dm^{-3} . The effect of the different concentrations of Gd^{3+} on the DPPC unilamellar liposomes is illustrated by the DSC curves in Fig. 8. In the absence of Gd^{3+} DPPC liposomes show a $T_c = 40.88 \pm 0.08^\circ \text{C}$ and a $\Delta H_c = 9.6 \pm 1.3 \text{ J/g}$, in reasonable agreement with literature data that, however, in the case of ΔH_c show slight discrepancies [37,39,41]. The addition of Gd^{3+} , in the range 0.4 – 1.0 mol dm^{-3} , to the liposomes solution results in a displacement of the transition temperature without broadening of the peak transition (ΔH_c) as shown in Fig. 9. At intermediate concentrations of Gd^{3+} ,

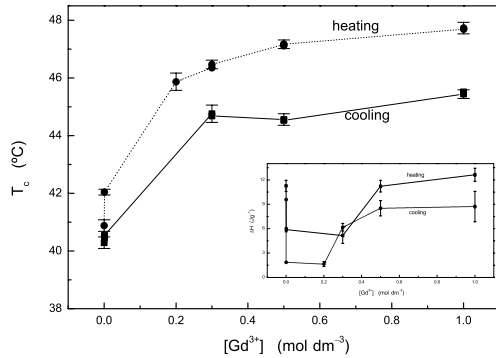


FIG. 9. Variation of the transition temperature (T_c) as a function of Gd^{3+} concentration, by heating and cooling. The inset shows the variation of the enthalpy for the gel to liquid crystalline transition (ΔH_c) of DPPC liposomes as a function of Gd^{3+} concentration, by heating and cooling.

0.1–0.3 mol dm^{-3} , the liposomes become unstable (Fig. 3) coexisting clusters of aggregated liposomes with simple liposomes. At those intermediate concentrations a displacement and broadening of the peak is present and a single transition peak is not observed anymore, as shown by the thermograms of Fig. 8.

In Fig. 9 the dependence of the transition temperature on the Gd^{3+} concentration is reported for both the heating and cooling processes. In the explored concentration range a displacement of T_c of around 6 °C is observed, in agreement with what is already found by other authors in multilamellar liposomes [16,38,42].

To explain this displacement we should remember that, at equilibrium, the attractive interfacial pressure π due to the hydrophobic interaction between the alkyl chains and water [16] balances the sum $\pi_{head} + \pi_{chain} = \pi$ of the interfacial pressure π_{head} , generated by the repulsive steric interaction between head groups, and of the chain pressure π_{chain} . Cations can specifically adsorb onto head groups of electrically neutral PC membranes and induce orientation changes of the head group, moving the N end of $P \rightarrow N$ vector perpendicular to the water phase [16,43–46]. In water (in the absence of these ions) the head group orients almost parallel to the membrane surface. Cations may bind to the phosphate of a PC head group, forming an electrostatic “salt bridge” among neighboring phospholipids. The conformational change and the formation of the salt bridge decrease π_{head} leading to a new balance of the interfacial pressure. The resulting increase in the lateral compression of the membrane, due to some rearrangement in the zwitterionic head group region in the presence of Gd^{3+} , can reasonably explain the changes on the packing of the lipid molecules in the bilayer.

As theoretical explanations for the increase in the melting temperature with ion concentration, the attraction between like-charge objects induced by correlations has been postulated. These interactions, based on mean-field theories, have been observed in a variety of systems [47]. However, no consensus exists for the precise mechanism, depending on the kind of system. A proposed mechanism [48] establishes that

multivalent counterions adsorbed onto a charged membrane dramatically enhance stability through two effects: (i) a significant reduction of surface charge density and (ii) an induction of attraction between charged head groups of the membrane and thus a barrier to pore growth induced upon adding a small content of multivalent anions, the adsorbed cations are released into solution, thus reversing the membrane stabilization. Adsorption and desorption of multivalent cations provide an effective way to regulate the membrane stability. A different mechanism [49], including cooperative effects between counterions on both sides of an impermeable membrane, states that (i) the vesicle composition could remain uniform, and thus be uniformly attractive to the approaching surfaces. In this case, the vesicle should end up completely covered by particles. (ii) Alternately, binding could cause total lateral demixing of the charged and neutral surfactant in the membrane, and lead to a charged-depleted zone with no attraction to negative objects. (iii) A coexistence between high charge density and low charge density zones. An interesting experimental work evidencing the mechanism for like-charge attraction in cytoskeletal F-actin for counterion correlations has been reported recently [50].

Probably in our system, with vesicle constant composition, the mechanism proposed by Aranda-Espinoza *et al.* [49] could be of value. However, the predicted effect is too small to explain our experimental results. In this way, future studies are going to analyze this last effect with other techniques.

CONCLUSIONS

Interactions of a trivalent cation (Gd^{3+}) with phospholipid liposomes (DPPC) have been studied by different techniques: photon correlation spectroscopy, electrophoretic mobility and differential scanning calorimetry. In order to corroborate the experimental results the interaction potential between particles in the framework of DLVO theory has been calculated and used to describe the colloidal stability of liposomes.

By means of electrophoretic measurements we have characterized the adsorption of Gd^{3+} onto DPPC and EYPC liposome surface. The ζ -potential reaches a maximum at a Gd^{3+} concentration of 1×10^{-3} mol dm^{-3} ; above this concentration, due to the increasing screening, the ζ potential decreases.

Dynamic light scattering measurements show a strong increase of size and polydispersity of the particles in the suspension when gadolinium ions are present at concentrations above 0.1 mol dm^{-3} . This increase is apparently due to an aggregation process of the liposomes as confirmed by the TEM images.

It was observed that the concentration of Gd^{3+} , where aggregation begins, is independent of the ratio [liposomes]/[gadolinium]. This finding suggests that the aggregation process only depends on the ionic strength which screens the electrostatic repulsion between liposomes.

Using the DLVO theory, the decrease of the electrostatic barrier with the gadolinium concentration due to the screening of the charge of the liposomes, can be calculated. The repulsive barrier disappears at concentration near the CAC.

Theoretical analysis seems to corroborate the overall picture deduced on the basis of the experimental findings.

A low Gd^{3+} concentrations is needed to commence the reduction of the steric repulsive interaction between the head groups in the phospholipid membrane. This is related to the greater charge that possesses the ion gadolinium. So that a smaller concentration of this ion is needed to induce the liposome aggregation.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial support from Spanish "Ministerio de Educación y Ciencia," Plan Nacional de Investigación (I+D+i), MAT 2005-02421 and by "European Regional Development Fund (ERDF)." J.S. thanks the Spanish "Ministerio de Ciencia y Tecnología" for his FPI grant.

-
- [1] K. N. Raymond and V. C. Pierre, *Bioconjugate Chem.* **16**, 3 (2005).
 - [2] V. Weissig, J. Babich, and V. Torchilin, *Colloids Surf., B* **18**, 293 (2000).
 - [3] C. Soto, P. H. Rodríguez, and O. Monasterio, *Biochemistry* **35**, 6337 (1996).
 - [4] D. D. Lasic, *Liposomes, From Physics to Applications* (Elsevier, Amsterdam, 1993).
 - [5] A. Finkelstein and O. B. Ptitsyn, *Protein Physics* (Academic, London, 2002), Chap. 5.
 - [6] R. Saito, J. R. Bringas, T. R. McKnight, M. F. Wendland, C. Mamot, D. C. Drummond, D. B. Kirpotin, J. W. Park, M. S. Berger, and K. S. Bankiewicz, *Cancer Res.* **64**, 2572 (2004).
 - [7] K. A. Il'yasov, A. Bjørnerud, A. Rogstad, U. N. Wiggen, I. Henriksen, B. Eissner, J. Hennig, and L. Fossheim, *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **9**, 324 (2001).
 - [8] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, and E. Dugué, *J. Mater. Chem.* **14**, 2161 (2004).
 - [9] C. Day, *Phys. Today* **56**(10), 26 (2003).
 - [10] M. M. Hammoudah, S. Nir, T. Isac, R. Kornhauser, T. P. Stewart, S. W. Hui, and W. L. C. Vaz, *Biochim. Biophys. Acta* **558**, 338 (1979).
 - [11] J. Bentz, D. Alford, J. Cohen, and N. Duzgunes, *Biophys. J.* **53**, 593 (1988).
 - [12] M. Petersheim and J. Sun, *Biophys. J.* **55**, 631 (1989).
 - [13] M. N. Jones, K. Hammond, M. D. Reboiras, C. Acerete, S. M. Jackson, M. Nogueira, and A. R. Nicholas, *Colloids Surf.* **18**, 75 (1986).
 - [14] A. Averbakh, D. Pavlov, and V. I. Lobyshev, *J. Therm. Anal. Calorim.* **62**, 101 (2000).
 - [15] A. Averbakh and V. I. Lobyshev, *J. Biochem. Biophys. Methods* **45**, 23 (2000).
 - [16] T. Tanaka, Y. Tamba, S. Md. Masum, Y. Yamashita, and M. Yamazaki, *Biochim. Biophys. Acta* **1564**, 173 (2002).
 - [17] T. Tanaka and M. Yamazaki, *Langmuir* **20**, 5160 (2004).
 - [18] S. Provencher, *Comput. Phys. Commun.* **27**, 213 (1982); **27**, 229 (1982).
 - [19] J. R. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Application* (Academic, London, 1981).
 - [20] S. A. Tatulian, *J. Phys. Chem.* **98**, 4963 (1994).
 - [21] Y. A. Ermakov, A. Z. Averbakh, A. I. Yusipovich, and S. Sukharev, *Biophys. J.* **80**, 1851 (2001).
 - [22] F. J. Carrion, A. de la Maza, and J. L. Parra, *J. Colloid Interface Sci.* **164**, 78 (1994).
 - [23] A. McLaughlin, W. K. Eng, G. Vaio, T. Wilson, and S. McLaughlin, *J. Membr. Biol.* **76**, 183 (1983).
 - [24] R. R. C. New, *Liposomes: A Practical Approach* (Oxford University Press, Oxford, 1990), p. 9.
 - [25] R. H. Ottewill and A. Watanabe, *Kolloid-Z.* **171**, 132 (1960).
 - [26] M. N. Jones and M. D. Reboiras, *Colloids Surf.* **15**, 239 (1985).
 - [27] E. J. B. Verwey and J. Th. G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids* (Elsevier, Amsterdam, 1948).
 - [28] H. C. Hamaker, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **55**, 1015 (1936).
 - [29] H. C. Hamaker, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **56**, 727 (1937).
 - [30] R. Tadmor, *J. Phys.: Condens. Matter* **13**, L195 (2001).
 - [31] M. S. Romero Cano, A. Martín Rodríguez, G. Chauveteau, and F. J. de las Nieves, *J. Colloid Interface Sci.* **198**, 273 (1988).
 - [32] J. M. Peula, R. Santos, J. Forcada, R. Hidalgo Álvarez, and F. J. de las Nieves, *Langmuir* **14**, 6377 (1998).
 - [33] J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.* **58**, 242 (1977).
 - [34] F. Bordini and C. Cametti, *Colloids Surf., B* **26**, 341 (2002).
 - [35] T. Inoue, H. Minami, R. Shimoza, and G. Sugihara, *J. Colloid Interface Sci.* **152**, 493 (1992).
 - [36] J. Sabín, G. Prieto, P. V. Messina, J. M. Ruso, R. Hidalgo Álvarez, and F. Sarmiento, *Langmuir* **21**, 10968 (2005).
 - [37] H. Ohshima, Y. Inoko, and T. Mitsui, *J. Colloid Interface Sci.* **86**, 57 (1982).
 - [38] K. M. G. Taylor and R. M. Morris, *Thermochim. Acta* **248**, 289 (1995).
 - [39] S. Bonora, G. Fini, and B. Piccirilli, *J. Therm. Anal. Calorim.* **61**, 731 (2000).
 - [40] D. J. Hirsh, N. Lazaro, L. R. Wright, J. M. Boggs, T. J. McIntosh, J. Schaefer, and J. Blazyk, *Biophys. J.* **75**, 1858 (1998).
 - [41] J. Repáková, J. M. Holopainen, M. R. Morrow, M. C. McDonald, P. Capková, and I. Vattulainen, *Biophys. J.* **88**, 3398 (2005).
 - [42] M. K. Jain and N. M. Wu, *J. Membr. Biol.* **34**, 157 (1977).
 - [43] J. N. Israelachvili, *Intermolecular & Surface Forces*, 2nd ed. (Academic, San Diego, CA, 1995).
 - [44] K. Makino, T. Yamada, M. Kimura, T. Oka, H. Ohshima, and T. Kondo, *Biophys. Chem.* **41**, 175 (1991).
 - [45] M. F. Brown and J. Seelig, *Nature (London)* **269**, 721 (1977).
 - [46] H. Akutsu and T. Nagamori, *Biochemistry* **30**, 4510 (1991).
 - [47] W. M. Gelbart, R. F. Bruinsma, P. A. Pincus, and V. A. Parsegian, *Phys. Today* **53**(9), 38 (2000).
 - [48] B.-Y. Ha, *Phys. Rev. E* **64**, 051902 (2001).
 - [49] H. Aranda-Espinoza, Y. Chen, N. Dan, T. C. Lubensky, P. Nelson, L. Ramos, and D. A. Weitz, *Science* **285**, 394 (1999).
 - [50] T. E. Angelini, H. Liang, W. Wriggers, and G. C. L. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 8634 (2003).

Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces

J. Sabín¹, G. Prieto¹, J.M. Ruso¹, R. Hidalgo-Álvarez², and F. Sarmiento^{1,a}

¹ Biophysics and Interfaces Group, Department of Applied Physics, University of Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain

² Biocolloid and Fluid Physics Group, Department of Applied Physics, Faculty of Sciences, University of Granada, E-18071 Granada, Spain

Received 19 April 2006 and Received in final form 20 July 2006 /

Published online: 7 September 2006 – © EDP Sciences / Società Italiana di Fisica / Springer-Verlag 2006

Abstract. Dynamic light scattering and electrophoretic mobility measurements have been used to characterize the size, size distribution and zeta potentials (ζ -potentials) of egg yolk phosphatidylcholine (EYPC) liposomes in the presence of monovalent ions (Na^+ and K^+). To study the stability of liposomes the Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory has been extended by introducing the hydrated radius of the adsorbed ions onto the liposome surfaces. The decrease of liposome size is explained on the basis of the membrane impermeability to some ions which generate osmotic forces, which leads to evacuate water from liposome inside.

PACS. 87.16.Dg Membranes, bilayers, and vesicles – 87.68.+z Biomaterials and biological interfaces – 89.75.-k Complex systems

1 Introduction

Liposomes can be characterized as associating colloids, built up of amphoteric lipid molecules that self-assemble in aqueous media into spherical, self-closed structures. They consist of one or several concentric membranes; their size ranges from 20 nm to several micrometers, whereas the thickness of the membranes is around 4 nm [1]. Liposomes play an important role in the colloidal science as model membranes and are important in biological, pharmaceutical and medical research because liposomes are the most effective carriers for introducing many different types of agents into cells, and the applications for liposome-based simples and products are extremely wide.

Liposome dispersions are not thermodynamically stable [2]. The total free energy of a dispersed system can always be lowered by reduction in the interfacial area. This tendency to aggregation is attributable to attractive van der Waals forces. The existence of other interactions between particles determines the stability. The applications of liposomes as nanoscale containers for drugs [3,4], vaccines [5], enzymes or genetic material [6] require control and prediction of the liposome dispersion stability.

Since the 1940s, when Derjaguin and Landau [7] and Verwey and Overbeek [8] developed independently the so-called DLVO theory for colloidal stability, it has become central in the theory to explain the stability of most of

the colloidal systems. According to this theory, the stability is predicated on the notion that two independent types of forces govern the interaction between similar colloidal particles immersed in polar (especially aqueous) solutions: attractive van der Waals forces and repulsive electrostatic forces. The DLVO theory has been extensively tested and reviewed and it stands today as the only quantitative theory of the colloidal and biocolloidal sciences. The DLVO theory has been applied to explain the stability of colloidal systems constituted by surfactants [9–11], drugs with amphiphilic structure [12,13], latex [14,15], protein complexes [16,17] and also liposomes [18–20]. Despite its time-honoured success, application of the classical DLVO theory has its inherent limitations in the explication of the stability of liposomes [21].

In the 1980s, the discovery of the atomic force microscope made possible the measurement of surface force interactions between two surfaces at very short separation [22]. These measurements pointed out the existence of a repulsive force due to the structure of the solvent between the surfaces. This force was called “hydration force”. Its origin and nature have long been controversial.

The first contribution on the importance of hydration force is due to Marcelja and Radic [23], who consider a force associated with the molecular nature of the solvent (water). The basic idea is that the bilayer surface orients the water molecules in direct contrast with the surface. This orientation is then propagated, in a damped way, out of the surface through successive layer interactions.

^a e-mail: fsarmi@usc.es

Jönsson and Wennerström [24], in a combined statistical-mechanical electrostatic formulation, develop the image-charge model of hydration forces for both the bilayer and the aqueous region. When a second bilayer approaches, surface charges are induced by the ionic groups and a repulsive force is generated. The repulsion between the polar lipid head groups and their own dielectric images is due to the surface polarization induced at the dielectric boundaries.

Closely related with the Jönsson and Wennerström model is the Attard and Patey development [25]. These authors suggest that the force between a polar lipid bilayer adsorbed to mica and a clean mica surface be measured, a similar experiment to those already performed for two opposing bilayers using a surface force apparatus. If the self-image repulsion picture is applicable, measurements will yield a hydration repulsion which is half the magnitude of the hydration force between two bilayers.

The model for hydration interactions of Paunov, Kaler, Sandler and Petsev [26] explains the effects of the solution ionic strength and pH on the interprotein interaction of the globular protein apoferritin. At low ionic strengths the behaviour agrees with DLVO predictions. However, non-DLVO hydration forces due to overlapping of the Stern layers of the protein molecules appear at higher ionic strengths. The non-DLVO effect arises from ionic exchange between hydrogen and sodium ions at the protein surface.

The role of the hydration forces in the stability of colloids has been widely studied by Ruckenstein and coworkers [27–30]. The first work [27] shows that the repulsion between colloidal particles depends both on the charge density and on the surface dipole density, the latter being a result of the presence of ion pairs on the surface. Then, the electrolyte concentration has an important influence. At relatively low salt concentrations, the repulsion due to the double layer is dominant and decreases as the electrolyte concentration increases. At relatively high electrolyte concentrations, the hydration force due to the ion pairs present on the surface becomes dominant. Consequently, as the salt concentration increases, the total repulsion decreases and passes through a minimum, after which it increases. The second work [28] studies the contribution of the polarization to hydration force. The predictions show a polarization that oscillates with the distance from the surface, obtaining a monotonically decaying average polarization when the polarizing surface is considered rough or fluctuating. In another work [29] a model that accounts in a unitary manner for both the double layer and hydration repulsions is presented. Finally [30], double-layer and hydration interactions are coupled into a single set of equations, taking into account the fact that both depend on the polarization of the water molecules.

Attard and Batchelor postulate a model to analyze the mechanism of hydrogen-bonding disruption [31]. Water is placed between two surfaces on a two-dimensional square lattice with each site occupied by a so-called vertex. A vertex represents a water molecule having one of the six orientations that are possible in the model. Each water molecule has two proton donors and two acceptors, at-

tributing a positive energy to a donor-donor or acceptor-acceptor contact. In this model no variation of density is allowed and hence the water-water coordination number is fixed at four.

A more elaborate model, in three-dimensional body-centered cubic lattice is that designed by Basseling [32]. According to the model for water, two types of ordering that can occur in hydration layers near surfaces are identified in molecular terms. One ordering mechanism is associated with a change in local density as compared to that of the bulk liquid. For water, the orientation distribution can also differ from that of the bulk liquid. In this case the formation of hydrogen bonds is frustrated because at any plane parallel to the surface the number of outward-directed proton donors and acceptors does not match that for inward-directed ones. With the latter type of ordering, a repulsive force between two such surfaces is associated.

The hydration forces have clarified the stability of systems where the DLVO theory fails, as deposition of polystyrene latex on glass surfaces, swelling of clays, silica at its isoelectric point or protein-coated particles [21]. These no-DLVO forces should be taken into account in the study of colloidal stability, especially with very hydrophilic system, as liposome surfaces are. On the other hand, the classical DLVO theory has been developed for rigid colloids. Liposomes are phospholipids shells whose membrane can be deformed due to the fluidity of the bilayer. This particularity of liposomes should have an important role in the calculation of the van der Waals potential as well as in the possible effect of osmotic forces through the membrane.

Previously we have studied the characterization of egg yolk phosphatidylcholine liposomes (EYPC) in which we had incorporated a semifluorinated alkane to the bilayer [33], and we have analysed the effect of divalent and trivalent ions on the colloidal stability of EYPC liposomes [20]. The reason to choose EYPC liposomes is that these phospholipids are the most common components of biological membranes. They are amphiphilic molecules in which a glycerol bridge links a pair of hydrophobic acyl hydrocarbon chains with a zwitterionic hydrophilic head-group. Their low cost, neutral charge and chemical inertness make them ideal for the *in vitro* preparation as biomembranes models [1]. Now, our interest focusses on the effect of the hydration and osmotic forces in the stability of liposomes in the presence of monovalent salts (KCl and NaCl), extending the DLVO theory by considering the hydrated radius of the adsorbed ions onto the liposome surfaces. Also, the decrease of liposome size is explained on the basis of the membrane impermeability to some ions, which generate osmotic forces which lead to evacuate water from liposome inside.

2 Materials

2.1 Lipids and salts

Phosphatidylcholine from egg yolk (EYPC), was purchased from Sigma Chemical Co. Ltd. and used without further purification. All the salts used were of analytical

grade quality from Sigma. Organic solvents methanol and chloroform were from Aldrich and Merck, respectively.

2.2 Vesicle preparation

Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by the thin-film hydration method [1]. A solution of EYPC in chloroform/methanol was evaporated in a rotary evaporator to dryness under nitrogen flux and the resulting lipid film was hydrated with double distilled, degassed and deionised water. This mixture was extruded 5 times through polycarbonate filters of 800 nm, 5 through filters of 400 nm and 5 through filters of 200 nm pore size to form LUVs. To change the pH inside liposomes the corresponding amount of HCl or NaOH was added. Although the solutions were filtered several times we check that this did not introduce any bias to the final size of the liposomes.

2.3 Electrophoretic mobilities

The electrophoretic mobility of the liposomes was measured using a Malvern Instruments Zetamaster 5002 by taking the average of ten measurements at stationary level. The cell was a 5 mm × 2 mm rectangular quartz capillary. The temperature was 298.15 ± 0.01 K, controlled by a Haake temperature controller. The ζ -potential was calculated from the electrophoretic mobility, μ_E , by using the Henry correction of Smoluchowski's equation [34]:

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

where ε_0 is the vacuum permittivity, ε_r is the relative permittivity, a is the particle radius, κ^{-1} is the Debye length and η is the viscosity of water. The function $f(\kappa a)$ depends on the particle shape and the ionic strength is computed by

$$f(\kappa a) = \frac{3}{2} - \frac{9}{2\kappa a} + \frac{75}{2\kappa^2 a^2} \quad (2)$$

which is valid for $\kappa a > 10$.

2.4 Light scattering

Dynamic light scattering measurements were made at 298.15 ± 0.01 K at scattering angles of 45° , 90° and 135° , using a Spectrometer Autosizer 4800 from Malvern Instruments equipped with a Uniphase 75 mW Ar laser operating at 488 nm with vertically polarized light. Results at the three angles were highly reproduced. Time correlation was analysed by a digital autocorrelator PCS7132 from Malvern Instruments.

3 Results and discussion

3.1 Hydration forces

The first results make reference to size measurements of liposomes in the presence of Na^+ and K^+ salts. Figures 1

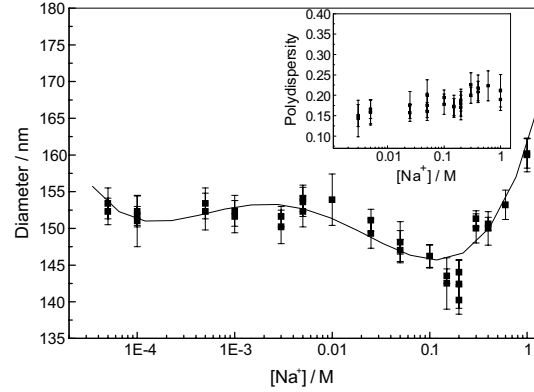


Fig. 1. Sizes and polydispersity of EYPC liposomes as a function of Na^+ concentration.

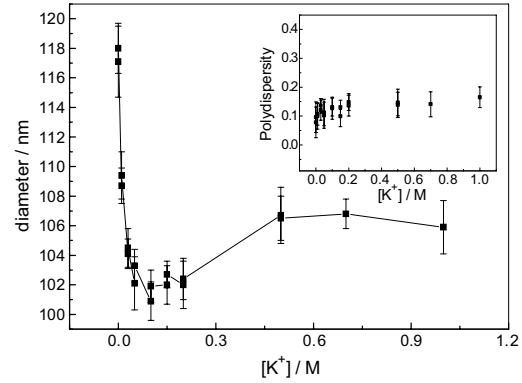


Fig. 2. Sizes and polydispersity of EYPC liposomes as a function of K^+ concentration.

and 2 show the variation of size and polydispersity of liposomes as a function of NaCl and KCl concentration, respectively. Here polydispersity indicates the distribution of individual molecular weights in a bath of particles. In our measurement system, the number of polydispersity represents the width of the distribution, measured as the ratio between the first and the second cumulants. The value near zero indicates that the sample is monodisperse. As seen in Figures 1 and 2, this number is, within the experimental error, practically constant. What we want to emphasize in these plots is that there is not a drastical increase of the size and polydispersity of liposomes, meaning that there is no aggregation. If aggregation occurs, the liposome clusters raise sizes around 5000 nm and the polydispersity near 1 [20]. Therefore, the liposomes keep stable in all ranges of concentrations with both salts. The small variation of the diameter of liposomes will be explained in next section.

To theoretically analyze the stability of the liposomes we have used an extension of the DLVO theory. In their classical DLVO formulation, the interaction potential between particles is described as the sum of an attractive

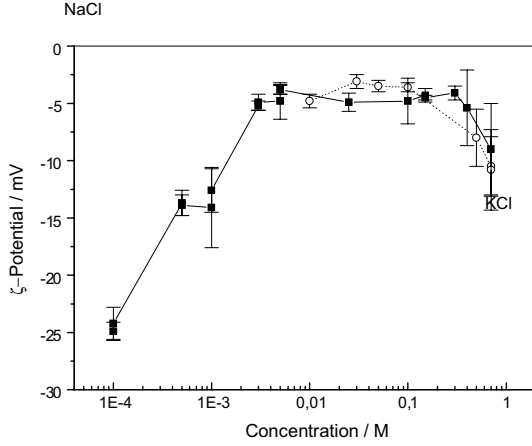


Fig. 3. ζ -potential of EYPC liposomes as a function of Na^+ (■) and K^+ (○).

London-van der Waals interaction $V_A(x)$ and a repulsive interaction $V_R(x)$ due to the electric charge of the particles,

$$V_T = V_A + V_R; \quad (3)$$

$V_A(x)$, derived by Hamaker [35], for the case of two shells of equal radius (a) and equal thickness (d) has the expression [36]

$$V_A(x) = -\frac{Aa}{12} \left[\frac{1}{2d+x} - \frac{2}{d+x} + \frac{1}{x} \right] - \frac{A}{6} \ln \left[1 - \left(\frac{d}{d+x} \right)^2 \right], \quad (4)$$

where A is the attractive Hamaker constant and x is the distance between the two spheres. The expression for $V_R(x)$ by area unit has the form [37–41]

$$V_R(x) = -2\pi a \varepsilon_0 \varepsilon_r \left(\frac{4k_B T}{ze} \gamma \right)^2 \exp[-\kappa(x)], \quad (5)$$

where k_B is the Boltzmann constant, and T is the absolute temperature, and

$$\kappa^2 = \frac{(z_1^2 z_2 + z_2^2 z_1) c_s N_A e^2}{\varepsilon_0 \varepsilon_r k_B T}, \quad (6)$$

where c_s is the ionic concentration, e the elementary charge, z_i the valence of the ions, N_A Avogadro's number and

$$\gamma \approx \tanh \frac{ze\zeta}{4k_B T}, \quad (7)$$

where ζ is the ζ -potential.

Figure 3 shows the ζ -potential of liposomes at different concentrations of KCl and NaCl. The ζ -potential is determined at the surface of shear, which is located at some small distance out of the actual bilayer surface. The magnitude of the potential may be reduced substantially at this small distance depending on the Debye length. The distance from the plane of shear to the charge plane, as

described with the Gouy-Chapman-Stern theory, strongly depends on ionic strength, decreasing with salt concentration increase [42,43]. In our working conditions, of very high molarities, we can assume without significant errors that: 1) the membrane potential is screened only by the monovalent ions and 2) the ζ -potential is equal to the membrane potential.

As can be seen, EYPC vesicles possess negative charge at very low K^+ and Na^+ concentrations. This finding is consistent with Carrion *et al.* [44], McLaughlin *et al.* [45] and Liu *et al.* [46]. A fast decrease of the negative ζ -potential can be noticed due to the absorption of K^+ and Na^+ ions to the surface of the liposomes. For concentrations higher than 0.1 M the ζ -potential is screened due to the high ionic strength of the medium. The rise of both ζ -potential and size seems to indicate that the ion adsorption mechanism is more influential than hydrodynamics friction. For that reason, the effective charge on liposome surface raises and therefore the ζ -potential increases.

We can use the experimental values of the ζ -potential and the radius of the liposomes in the absence of salt ($a = 72$ nm) in the calculation of the electrostatic and the van der Waals potentials. The value of the Hamaker constant has been taken as 7.6×10^{-20} J, as we have calculated experimentally by nephelometry in a previous work [20]. This value is comparable to those found for other similar systems by application of DLVO theory. Nir and Bentz [47] have studied the van der Waals interaction by a computational procedure based on an effective pair summation. The Hamaker constants are in the range 10^{-21} – 10^{-20} J. Ohshima *et al.* [48] in their study on the dipalmitoylphosphatidylcholine/water system obtain a value of $(3.6 \pm 0.8) \times 10^{-21}$ J. Evans and Metcalfe [49] present a work on the direct observation of van der Waals attraction between biomembranes capsules using measurements of the free-energy reduction per unit area of membrane-membrane contact formation. Using published values for equilibrium spacing between lipid bilayers in multilamellar lipid-water dispersions and a theoretical equation for the van der Waals attraction between continuous dielectric layers, they obtain for the Hamaker constant a value of 5.8×10^{-21} J. Ahmed and Jones [50] made an interesting study on the desorption of cationic liposomes (prepared from mixtures of dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol/dimethyloctadecylammonium bromide) from immobilized biofilms of *Staphylococcus aureus* with the aid of a flow cell assembly. The Hamaker constant varies in the range 3.75 – 5.48×10^{-20} J.

Using this value in equations (4) and (5) we can obtain the interaction potential, (Eq. (5)) and draw the classical DLVO curve for each concentration of salt as a function of the distance between two liposomes.

If the electrostatic repulsion between liposomes is too low and the maximum of the DLVO curve is less than $k_B T$ [18], the liposomes should undergo a very rapid aggregation. Figures 4 and 5 show the DLVO curves for each concentration of NaCl and KCl. No electrostatic barrier is observed and the maximum of the DLVO curves is lower than $k_B T$. Consequently, the liposomes should undergo

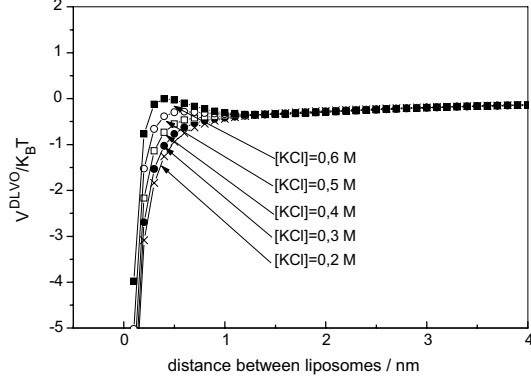


Fig. 4. Potential curves by classical DLVO theory for EYPC liposomes at different K^+ concentrations: (x) 0.2 M; (●) 0.3 M; (□) 0.4 M; (○) 0.5 M; (■) 0.6 M.

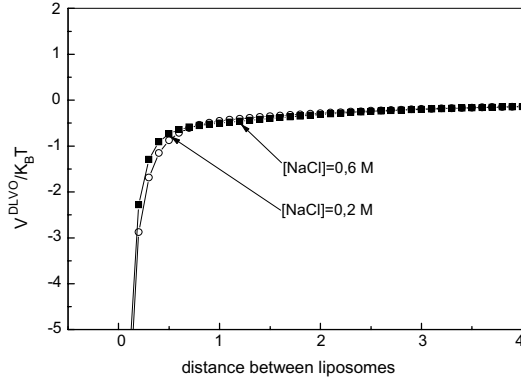


Fig. 5. Potential curves calculated by classical DLVO theory for EYPC liposomes at different Na^+ concentrations: (○) 0.2 M; (■) 0.6 M.

a rapid aggregation due to the attractive van der Waals forces, which is in contradiction with the experimental data of Figures 1 and 2. We can conclude that the classical DLVO theory does not predict the experimental data of colloidal stability of the liposomes. If the liposomes are stable, even without electrostatic repulsion, this means that another force should be responsible for keeping the liposomes far enough to avoid the van der Waals attraction. This force is probably the hydration force, which has been mentioned above.

We have made a simple correction to the classical DLVO theory in order to include the effect of the hydration force on the stability of the liposomes. We have considered that there is a water layer around the liposomes surfaces whose thickness is the hydrated radius of the adsorbed ion (see Fig. 6). The corrected electrostatic potential is given by the expression

$$V'_R(x) = 2\pi(a+\Delta)\varepsilon_0\varepsilon_r \left(\frac{4k_B T}{ze} \gamma \right)^2 \exp[-\kappa(x-2\Delta)], \quad (8)$$

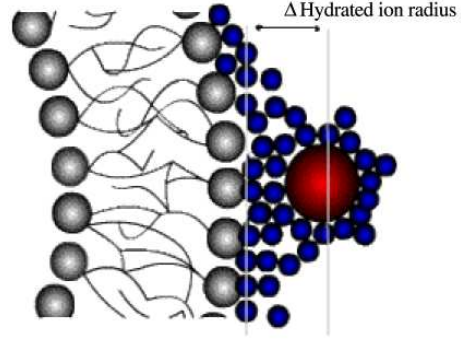


Fig. 6. A schematic representation of the hydration forces effect.

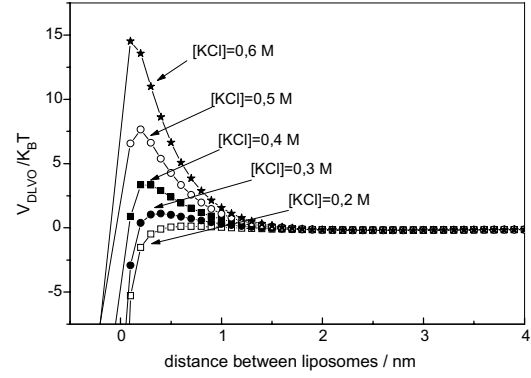


Fig. 7. Potential curves calculated by DLVO theory taking in account the hydration forces, for EYPC liposomes at different K^+ concentrations: (□) 0.2 M; (●) 0.3 M; (■) 0.4 M; (○) 0.5 M; (★) 0.6 M.

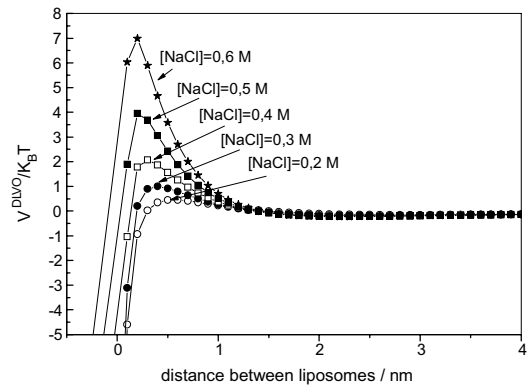


Fig. 8. Potential curves calculated by DLVO theory taking in account the hydration forces, for EYPC liposomes at different Na^+ concentrations: (○) 0.2 M; (●) 0.3 M; (□) 0.4 M; (■) 0.5 M; (★) 0.6 M.

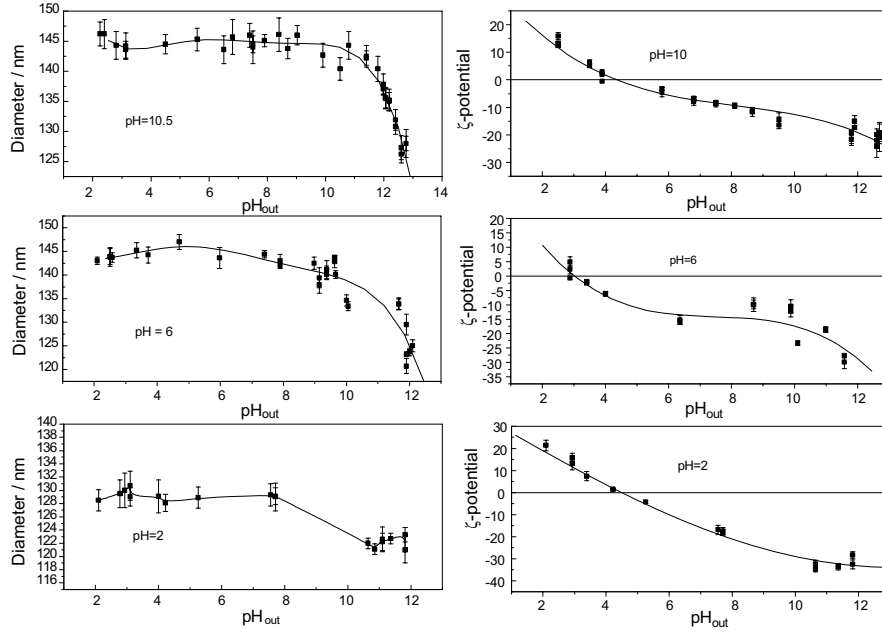


Fig. 9. Variation of sizes and ζ -potentials of PC liposomes, prepared at $pH_{in} = 2, 6$ and 10 , as a function of the pH of the medium (pH_{out}).

where Δ is the hydrated radius of the absorbed ion; 0.36 nm in the case of Na^+ , and 0.33 nm for K^+ [51]. This equation is justified in the sense that the majority of hydration theories include an exponential term.

Figures 7 and 8 show the V_T values as a function of the distance calculated using equation (8) instead of equation (7). When we take into account the hydration forces a repulsion barrier appears in the potential curves. This repulsion barrier dominates over the attractive van der Waals forces and it is responsible for the stability of liposomes.

3.2 Osmotic forces

In previous works we have observed a small decrease ($\Delta d \sim 20$ nm) in the diameter of liposomes in the presence of low concentrations of La^{3+} , Al^{3+} and Ca^{2+} ions [20]. Other authors have observed a similar phenomenon with other kinds of liposomes [52–55]. Figures 1 and 2 show that this effect is more pronounced with monovalent salts (K^+ and Na^+) due to the higher stability of the systems.

To explain this salt effect, two hypotheses were established: i) the ions adsorption to the bilayer originates a change in the head groups charge and, as consequence, the bilayer changes its curvature due to the electric interactions [56], changing their size. ii) The concentration gradient at both membrane sides generates an osmotic force. Due to the membrane impermeability to some ions, the liposomes react sending off water, decreasing their size. At

this point it is necessary to emphasize that with the experimental techniques used in this study only macroscopic effects can be observed. From these observations we must deduce the fundamental mechanisms.

In order to clarify whether the charge is the origin of this effect, we have prepared three classes of liposomes at different pH 's ($pH_{in} = 2, 6$ and 10.5). We measured the size and ζ -potential of liposomes varying the pH of the external medium (pH_{out}) by adding HCl or NaOH. Figure 9 displays the obtained results.

The decrease of the ζ -potential by increasing the pH is similar in the three cases, changing from positive values at low pH , to a negative ζ -potential at high pH . The isoelectric points calculated for liposomes prepared at $pH_{in} = 2$ and 10.5 are in good agreement with references [57,58] ($pH_{iso} = 4.3$). But in the case of $pH_{in} = 6$, the isoelectric point is slightly shifted to lower values.

The liposomes are stable even at the isoelectric point due to the hydration forces as we explained in the previous section. The sizes of the liposomes in the range $2 < pH_{out} < 11$ keep constant in all the cases, independently of the variation of the ζ -potential. This independence of the sizes from the charge of the liposomes discards our first hypothesis i).

Nevertheless, there is a decrease of the size of liposomes of 20 nm at pH higher than $pH = 11$. But this is not due to variation of the charge; it is due to the excess of concentration of Na^+ added to increase the pH . Notice that the concentration of Na^+ where this effect starts is the same as shown in Figure 1.

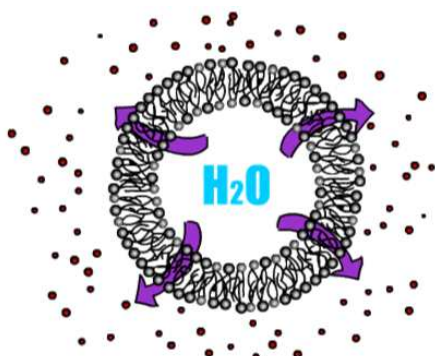


Fig. 10. Sketch of the effect of osmotic forces.

When the gradient of concentration of Na^+ through the bilayer is too high an osmotic force is generated and the liposomes react evacuating water from inside to compensate the excess of cations outside the liposome (see Fig. 10). This effect causes a decrease of the diameter until the maximum compaction of the bilayer.

This osmotic force should be visible also when HCl is added to the medium to reduce the pH (Fig. 9), but the phospholipid bilayer has not the same permeability for all the ions. Anions are generally more permeable than cations [2]. This is not necessarily due to their larger size and lower affinity to polar head but to the formation of short-lived complexes, which can help to shuttle them across the bilayer. The water permeability coefficient (P) through lecithin membranes is of the order of 10^{-3} – 10^{-4} cm/s, anions have $P \approx 10^{-11}$ – 10^{-12} and cations are usually 50–200 times less permeable than anions, $P \approx 10^{-12}$ – 10^{-14} . This explains why the pH and Cl^- gradients through the membrane of the liposomes are easily balanced out; however, if there is an excess of Na^+ ions, the osmotic force should start decreasing the size of the liposomes.

4 Concluding remarks

This work permits to obtain the following conclusions: i) EYPC liposomes in the presence of monovalent ions Na^+ and K^+ keep stable in a wide range of ion concentrations. ii) The application of the DLVO theory in their classical formulation does not predict the observed colloidal stability. iii) The extension of the DLVO theory, including the effect of the hydration force, satisfactorily explains the experimental observations, with the appearance in the potential curves of a repulsion barrier responsible for the liposomes stability. iv) At low concentrations of Na^+ and K^+ a decrease in the liposome diameters is observed. v) The fact iv) can be explained because the concentration gradient at both membrane sides generates an osmotic force, and vi) due to the membrane impermeability to some ions, the liposomes react sending off water, decreasing their size.

The authors acknowledge the financial support from the Spanish “Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional de Investigación Científica e Innovación Tecnológica” (I+D+i), Project No. MAT2005-02421 and from the “European Regional Development Fund” (ERDF). Financial support received by R.H.-A. from the “Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional de Investigación Científica e Innovación Tecnológica” (I+D+i), Project No. MAT2006-12918-C05, from the “European Regional Development Fund” (ERDF), and from the project FQM392 from “Junta de Andalucía” is gratefully acknowledged.

References

1. R.R.C. New, *Liposomes: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1990).
2. D.D. Lasic, *Liposomes. From Physics to Applications* (Elsevier, Amsterdam, 1993).
3. G. Gregoriadis, *Liposomes as Drug Carriers* (Wiley, New York, 1987).
4. J.P. Devissaguet, F. Puisieux, *Les Liposomes: Aspects Technologiques, Biologiques et Pharmacologiques* (Les Editions Inserm, Paris, 1993).
5. C. Alving, R. Richards, *Liposomes*, edited by M. Ostro (Marcel Dekker, New York, 1983).
6. C. Nicolau, *Les Liposomes: Applications Thérapeutiques*, edited by F. Puisieux, J. Delattre (Tec and Doc Lavoisier, Paris, 1985).
7. B.V. Derjaguin, L.D. Landau, *Acta Physicochim. URSS* **14**, 633 (1941).
8. E.J.B. Verwey, J.Th.G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids* (Elsevier, Amsterdam, 1948).
9. R. Dorshow, J. Briggs, C.A. Bunton, D.F. Nicolit, *J. Phys. Chem.* **86**, 2388 (1982).
10. J.M. Ruso, D. Attwood, C. Rey, P. Taboada, V. Mosquera, F. Sarmiento, *J. Phys. Chem. B* **103**, 7092 (1999).
11. J.M. Ruso, D. Attwood, P. Taboada, V. Mosquera, F. Sarmiento, *Langmuir* **16**, 1620 (2000).
12. P. Taboada, D. Attwood, J.M. Ruso, M. García, F. Sarmiento, V. Mosquera, *Langmuir* **16**, 3175 (2000).
13. J.M. Ruso, J.L. López-Fontán, G. Prieto, F. Sarmiento, *J. Chem. Phys.* **118**, 5964 (2003).
14. S. Croll, *Prog. Org. Coat.* **44**, 131 (2002).
15. S.H. Behrens, M. Borkovec, P. Schurtenberger, *Langmuir* **14**, 1951 (1998).
16. H. Huang, M. Manciu, E. Ruckenstein, *Langmuir* **21**, 94 (2005).
17. G. Pollicanel, D. Costa, C. Caccamo, *J. Phys.: Condens. Matter* **15**, 375 (2003).
18. F. Bardi, C. Cametti, *Colloids Surf. B* **26**, 341 (2002).
19. K. Nakamori, T. Nakajima, M. Odawara, I. Koyama, M. Nemoto, T. Yoshida, H. Ohshima, K. Inoue, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **41**, 1279 (1993).
20. J. Sabín, G. Prieto, P.V. Messina, J.M. Ruso, R. Hidalgo-Álvarez, F. Sarmiento, *Langmuir* **21**, 10968 (2005).
21. J.A. Molina-Bolívar, F. Galisteo-González, R. Hidalgo-Álvarez, *Colloids Surf. B* **14**, 3 (1999).
22. J.N. Israelachvili, R.M. Pashley, *J. Colloid Interface Sci.* **98**, 500 (1984).
23. S. Marcelja, N. Radic, *Chem. Phys. Lett.* **42**, 129 (1976).
24. B. Jönsson, H. Wennerström, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **79**, 19 (1983).

25. P. Attard, G.N. Patey, Phys. Rev. A **43**, 2953 (1991).
26. V.N. Paunov, E.W. Kaler, S.I. Sandler, D.N. Petsev, J. Colloid Interface Sci. **240**, 640 (2001).
27. M. Manciu, E. Ruckenstein, Langmuir **17**, 7061 (2001).
28. M. Manciu, E. Ruckenstein, Langmuir **17**, 7582 (2001).
29. E. Ruckenstein, M. Manciu, Langmuir **18**, 7584 (2002).
30. H. Huang, M. Manciu, E. Ruckenstein, J. Colloid Interface Sci. **263**, 156 (2003).
31. P. Attard, M.T. Batchelor, Chem. Phys. Lett. **149**, 206 (1988).
32. N.A.M. Basseling, Langmuir **13**, 2113 (1997).
33. J. Sabin, J.M. Ruso, A. González-Pérez, G. Prieto, F. Sarmiento, Colloids Surf. A **47**, 64 (2006).
34. J.R. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science* (Academic Press, London, 1981).
35. H.C. Hamaker, Recl. Trav. Chim. **56**, 727 (1937).
36. R. Tadmor, J. Phys. Matter **13**, 195 (2001).
37. H.C. Hamaker, Recl. Trav. Chim. **55**, 1015 (1936).
38. H.C. Hamaker, Recl. Trav. Chim. **56**, 3 (1937).
39. E. Matijevic, K.G. Mathai, R.H. Ottewil, M. Kerker, J. Phys. Chem. **65**, 826 (1961).
40. B. Vincent, H. Bijsterbosch, J. Lyklema, J. Colloid Interface Sci. **37**, 171 (1970).
41. D. Bastos, F.J. de las Nieves, Colloid Polym. Sci. **272**, 592 (1994).
42. S. McLaughlin, Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. **18**, 113 (1989).
43. D. Murray, A. Arbuzova, G. Hangyás-Mihályiné, A. Gambhir, N. Ben-Tal, B. Honig, S. McLaughlin, Biophys. Chem. **77**, 3176 (1999).
44. F.J. Carrion, A.D. Maza, J.L. Parra, J. Colloid Interface Sci. **164**, 78 (1994).
45. A. McLaughlin, W.K. Eng, G. Vaio, T. Wilson, S. McLaughlin, J. Membr. Biol. **76**, 183 (1983).
46. D-Z. Liu, W-Y. Chen, L-M. Tasi, S-P. Yang, Colloids Surf. A **172**, 57 (2000).
47. S. Nir, J. Bentz, J. Colloid Interface Sci. **65**, 399 (1978).
48. H. Ohshima, Y. Inoko, T. Mitsu, J. Colloid Interface Sci. **86**, 57 (1982).
49. E. Evans, M. Metcalfe, Biophys. J. **46**, 423 (1984).
50. K. Ahmed, M.N. Jones, J. Lipid Res. **13**, 187 (2003).
51. J.N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces* (Academic Press, New York, 1991).
52. F. Bordini, C. Cametti, M. Diociaiuti, D. Gaudino, S. Senato, Langmuir **20**, 5214 (2004).
53. M.M.A.E. Claessens, B.F. van Oort, F.A.M. Leermakers, F.A. Hoekstra, M.A. Cohen Stuart, Biophys. J. **87**, 3882 (2004).
54. J. Pencer, G. White, F.R. Hallet, Biophys. J. **81**, 2716 (2001).
55. G. White, J. Pencer, B.G. Nickel, J.M. Wood, R.F. Hallet, Biophys. J. **71**, 2701 (1996).
56. G. Cevc, Biochim. Biophys. Acta **1031**, 311 (1990).
57. A.D. Petelska, Z.A. Figaszewski, Biophys. J. **78**, 812 (2000).
58. A.D. Petelska, M. Naumowicz, Z.A. Figaszewski, Cell. Mol. Biol. Lett. Suppl. **7**, 212 (2002).

3.7. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha presentado el estudio experimental de la estabilidad coloidal de liposomas unilamelares de lecitinas (EYPC y DPPC) en función de la concentración de distintos iones (La^{3+} , Gd^{3+} , Ca^{2+} , Na^+ y K^+), usando medidas experimentales de dispersión de luz, potencial ζ , nefelometría y microscopía de transmisión electrónica.

Para explicar los resultados experimentales obtenidos, se aplicó la teoría clásica DLVO usando un potencial repulsivo electrostático y un potencial atractivo de van der Waals. El grado de coincidencia de las predicciones teóricas de la teoría DLVO con los datos experimentales depende de los iones empleados:

- Con **iones trivalentes**, donde se produce una rápida y pronunciada agregación, las concentraciones de agregación críticas predichas por la teoría coinciden perfectamente con las medidas experimentales. La barrera de potencial repulsiva de las curvas teóricas del potencial DLVO desaparece a las mismas concentraciones de La^{3+} y Gd^{3+} a las que se detecta la agregación a través de las técnicas experimentales.
- Con **iones divalentes**, donde la agregación es lenta y los cluster producidos no son muy grandes comparados con los iones trivalentes, la teoría DLVO no predice con exactitud las concentraciones de agregación críticas. En los trabajos presentados en este capítulo se sugiere que el Ca^{2+} produce la desestabilización de las membranas de liposomas agregados provocando la fusión de las dos membranas. La fusión de liposomas, provocada por el Ca^{2+} está ampliamente referenciada en la literatura y explicaría las diferencias entre las predicciones de la teoría DLVO y los datos experimentales. Sin embargo, en el siguiente capítulo se profundizará

sobre los procesos de agregación en liposomas de EYPC, obteniéndose que, en realidad, estas discrepancias entre las medidas experimentales y el modelo teórico no se debe a la fusión de los liposomas, sino a que la agregación se produce en un mínimo secundario del potencial de interacción, y que la aparición de este mínimo está directamente relacionada con las fuerzas de hidratación.

- Con **iones monovalentes** los liposomas se mantienen estables a cualquier concentración estudiada de Na^+ o K^+ , en contradicción con los resultados mostrados por la teoría clásica DLVO que predicen la agregación de los liposomas. Sin embargo, introduciendo en la teoría DLVO un término que tenga en cuenta el aumento de la capa de Stern debido a las fuerzas de hidratación, se puede predecir la estabilidad de liposomas en presencia de iones monovalentes.

Para estudiar el comportamiento de los liposomas en presencia de iones monovalentes, además de las fuerzas de hidratación, también es necesario tener en cuenta las fuerzas osmóticas. Si se introduce sales en una disolución de liposomas ya formados, se crea un gradiente de concentración iónica entre el interior y el exterior de los mismos debido a que las membranas lipídicas de los liposomas no son permeables a los iones. Para compensar este gradiente de concentraciones, se produce un flujo de moléculas de agua desde el interior y consecuentemente, los liposomas se *achican* y disminuyen su tamaño. Este efecto, en realidad, se produce también con iones divalentes y trivalentes, pero se hace más notorio en el caso de monovalentes por que con ellos no se produce agregación y se puede apreciar más claramente la disminución en los diámetros de los liposomas.

En este capítulo también se presenta un trabajo de caracterización de liposomas marcados con Gd^{3+} cuyo interés radica en su aplicación como agentes de contraste en técnicas de Imagen por Resonancia Magnética (MRI). Además de estudiar su estabilidad coloidal, se ha detectado un desplazamiento de hasta 6 °C en la temperatura de transición (T_c) al aumentar la cantidad de iones Gd^{3+} absorbidos en la superficie de los liposomas.

3.8. BIBLIOGRAFÍA

- Arai T. and Norde W.** (1990) Coll. Surf. 51:186-216 "*The behaviour of some model proteins at solid-liquid interfaces 2, Sequential and competitive adsorption*"
- Attard P. and Patey G.N.** (1991) Phys. Rev. A, 43: 2953. "*Continuum electrostatic interactions between planar lattices of dipoles and the possible relevance to the hydration force*"
- Bartlett G.R.** (1959) J. Biol. Chem. 234: 466 "*Phosphorus Assay in Column Chromatography*"
- Botta M.** (2000) Eur. J. Inorg. 399-407 "*Second Coordination Sphere Water Molecules and Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Implications for MRI Contrast Agents*"
- Bouanz M. and Gharbi A.** (1994) J. Phys.: Condens. Matter. 6: 4429-4435. "*Ionic structure in a binary fluid*"
- Broide M.L., Tominc T.M. and Saxowsky M.D.** (1995) Phys. Rev. E. 53: 6325-6335. "*Using phase transitions to investigate the effect of salts on protein interactions*"
- Caravan P., Ellison J.E., McMurry T.J. and Lauffer R.B.** (1999) Chem. Rev. 99: 2293-2352 "*Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and Applications*"
- Carruthers A. and Melchior D.L.** (1983) Biochemistry 22: 5797-5807. "*Study of the relationship between bilayer water permeability and bilayer physical state*"
- Cevc G. and Marsh D.** (1984) "*Phospholipids Bilayers*" Wiley-Interscience Publications. New York.

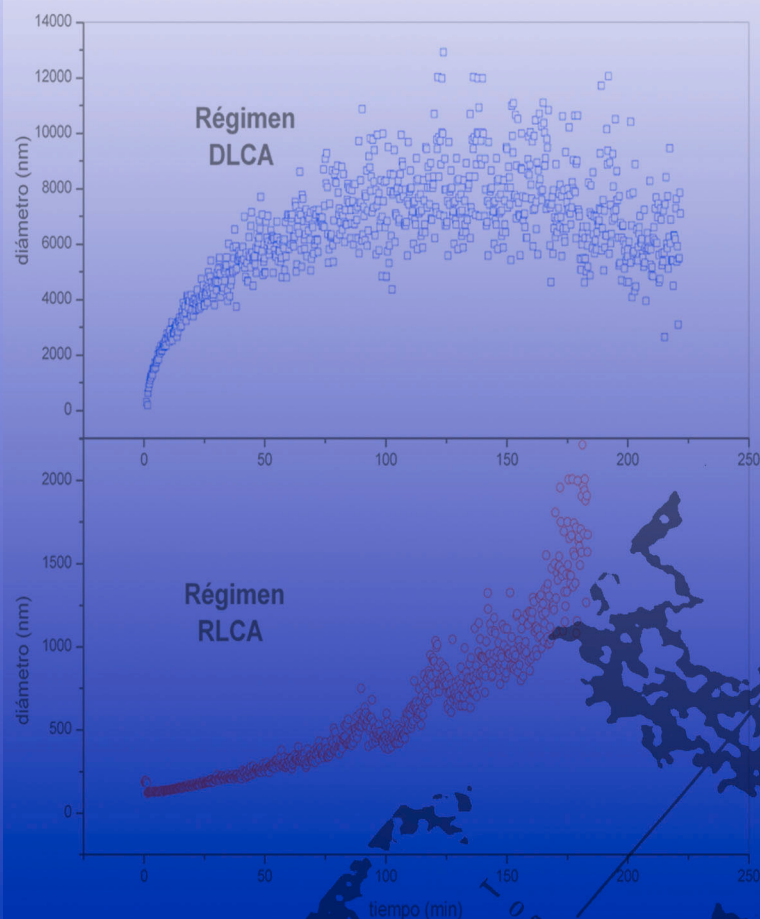
- Csonka L.N. and Hanson A.D.** (1991). *Ann. Rev. Microbiol.* 45: 569-606.
"Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology"
- Delgado J.V.** (2004) Tesis Doctoral: "Fuerzas estructurales en sistemas hidrófilos". Universidad de Granada.
- Delgado J.V., Molina-Bolívar J.A., Galisteo González F., Gálvez Ruiz M.J., Freiler A. and Rutilan M.W.** (2005) *J. Chem. Phys.* 123 : 034709.
"Hydration forces between silica surfaces: Experimental data and predictions from different theories"
- Derjaguin B.V.** (1934) *Kolloid-Z* 69: 155. "Untersuchungen über die Reibung und Adhäsion"
- Derjaguin B.V. and Titievskaya A.S.** (1957) "Proceeding of the Internacional Congress on Surface Activity" Vol 1, p 211. Butterworth, London
- Deryagin B. and Landau L.** (1941) *Acta Physicochim.* 14: 633-662. "Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes"
- Freundlich H.** (1926) "Colloid and Capillary Chemistry". Mathuen, London.
- Garcia-Manyes S., Oncins G. and Sanz F.** (2005) *Biophys. J.* 89: 1812-1826.
"Effect of Ion-Binding and Chemical Phospholipid Structure on the Nanomechanics of Lipid Bilayers Studied by Force Spectroscopy"
- Hamaker H.C.** (1936) *Rec. Trav. Chim.* 55: 1015. "A general theory of lyophobic colloids. I"
- Hamaker H.C.** (1937) *Rec. Trav. Chim.* 56: 727. "A system of colloid phenomena"
- Hauser H., Oldani D. and Philips M.C.** (1973). *Biochemistry* 12: 4507-4517.
"Mechanism of Ion Escape from Phosphatidylcholine and Phosphatidylserine Single Bilayer Vesicles"
- Horn R.G., Smith D.T. and Haller W.** (1989) *Chem. Phys. Lett.* 162: 404-408
"Surface forces and viscosity of water measured between silica sheets"
- Huang H., Manciu M. and Ruckenstein E.** (2003) *J. Coll. Interfase Sci.* 263: 156-161. "The effect of surface dipoles and of the field generated by a polarization gradient on the repulsive force"
- Hunter R.J.** (1981) "Zeta Potential in Colloid Science". Academic Press, London
- Hunter R.J.** (2001) "Foundations of the Colloid Science". Cap. 12, p. 603 Oxford University Press Inc, New York
- Il'yasov K. A., Bjørnerud A., Rogstad A., Wiggen U.N., Henriksen I., Eissner B., Hennig J. and Fossheim S.L.** (2001) *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med* 9: 324.
"Paramagnetic Liposomes as Thermosensitive Probes for MRI-Guided Thermal Ablation: Feasibility Study on the Perfused Porcine Kidney"

- Israelachvili J.** (1985) *"Intermolecular & Surface Forces"*. 2nd Edition. Academic Press. Harcourt Brace, London
- Israelachvili J.N. and Adams G.E.** (1978) J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1, 74: 975. *"Measurement of forces between two mica surfaces in aqueous electrolyte solutions in the range of 0–100 nm"*.
- Jönsson B. and Wennerström H.** (1983) J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 79: 19
- Jönsson B. and Wennerström H.** (2001) *"In Electrostatic Effects in Soft Matter and Biophysics"*, C. Holm (Ed.), Kluwer Academic Press, Amsterdam.
- Kallmann H. and Willstätter M.** (1932) Naturwissenschaften 20: 952. *"The theory of the structure of colloidal systems"*
- Lasic D.D.** (1993) *"Liposomes: From Physics to Applications"*. Elsevier, Amsterdam
- Lawrence H. A. and Matijevic E.** (1969) J. Colloid Interface Sci. 31: 287-296 *"Stability of colloidal silica : I. Effect of simple electrolytes"*
- LeNeveu D.M., Rand R.P. and Parsegian V.A.** (1976) Nature 256: 601-603. *"Measurement of forces between lecithin bilayers"*
- Lifshitz E.M.** (1956) Sov. Phys. JETP 2: 73. *"The theory of molecular attraction forces between solid bodies"*
- Lyklema J.** (1967) *"Molecular Forces"*, edited by B. Chu, Pontif. Acad. Sci. Scripta Varia, Vol. 31 (North-Holland, Amsterdam, 1967), pp. 181, 221
- Manciu M. and Ruckenstein E.** (2001a) Langmuir 17: 7061-7070. *"Role of the Hydration Force in the Stability of Colloids at High Ionic Strengths"*
- Manciu M. and Ruckenstein E.** (2001b) Langmuir 17: 7582-7592. *"Oscillatory and Monotonic Polarization. The Polarization Contribution to the Hydration Force"*
- Marcelja S. and Radic N.** (1976) Chem. Phys. Lett. 42: 129. *"Repulsion of interfaces due to boundary water"*
- Milner J.L., Grothe S. and Wood J.M.** (1988) J. Biol. Chem. 263: 14900-14905. *"Proline Porter II is activated by hyperosmotic shift in both whole cells and membrane vesicles of Escherichia coli K12."*
- Molina Bolívar J.A.** (1999) *"Mecanismos de Estabilidad Coloidal"*. Tesis Doctoral. Universidad de Granada
- Näslund J, Lindqvist P., Persson I. and Sandström M.** (1999) Inorg. Chem. 39: 4006-4011. *"Steric Effects Control the Structure of the Solvated Lanthanum(III) Ion in Aqueous, Dimethyl Sulfoxide, and N,N'-Dimethylpropyleneurea Solution. An EXAFS and Large-Angle X-ray Scattering Study"*
- New R.R.C.** (1990): *Liposomes: A Practical Approach*. IRL Press, New York

- Norris K. and Rausell-Colom J.A.** (1963) *Clays Clay Minerals* 10: 123. "Low-angle x-ray diffraction studies of the swelling of montmorillonite and vermiculite"
- Ohki S.** (1982) *Biochim. Biophys. Acta.* 689 : 1-11. "A Mechanics of Divalent Ion-induced Phosphatidylserine Membrane Fusion"
- Oliveira R.** (1997) *Experim. Therm. Fluid Sci.* 14: 316-322. "Understanding Adhesion: A Means for preventing Fouling"
- Ottewill and Watanabe** (1960) *Kolloid-Z.* 191: 132 "The mechanism of coagulation. II. The electrophoretic behavior of positive silver iodide sols in the presence of anionic surface-active agents."
- Papahadjopoulos D., Nir S. and Düzgünes N.** (1990) *J. Bioenerg. Biomembr.* 22 : 157. "Molecular Mechanics of Calcium-Induced Membrane Fusion"
- Pashley R. M.** (1981a.) *J. Colloid Interface Sci.* 83: 531-546. "DLVO and hydration forces between mica surfaces in Li^+ , Na^+ , K^+ and Cs^+ electrolyte solutions: a correlation of double-layer and hydration forces with surface cation exchange properties."
- Pashley R. M.** (1981b). *J. Colloid Interface Sci.* 80: 153-162. "Hydration forces between mica surfaces in aqueous electrolyte solutions"
- Pashley R. M.** (1982). *Adv. Colloid Interface Sci.* 16: 57-62. "Hydration forces between mica surfaces in aqueous electrolyte solutions"
- Pashley R. M., and Israelachvili, J. N.** (1984). *J. Colloid Interface Sci.* 97: 446-455. "DLVO and hydration forces between mica surfaces in Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} chloride solutions"
- Paula S., Volkov A.G., Van Hock A.N., Haines T.H. and Deamer D.W.** (1996). *Biophys. J.* 70: 339-348. "Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipids bilayers as a function of membrane thickness"
- Paunov V.N., Kaler E.W., Sandler S.I. and Petsev D.N.** (2001) *J. Colloid Interface Sci.*, 240: 640-643. "A Model for Hydration Interactions between Apoferritin Molecules in Solution "
- Prieto G., Sabín J., Ruso J.M., González-Pérez A. and Sarmiento F.** (2004) *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 249: 51-55 "A study of the interaction between proteins and fully-fluorinated and fully-hydrogenated surfactants by ζ -potential measurements."
- Ruckenstein E. and Manciu M** (2002) *Langmuir* 18 : 7584-7593. "The Coupling between the Hydration and Double Layer Interactions"
- Sabín J., Prieto G, Ruso J.M., González-Pérez A. and Sarmiento F.** (2006a) *Biomacromolecules* 7 : 176-182 "Effects of Fluorinated and Hydrogenated Surfactants on Human Serum Albumin at Different pHs"

- Sabín J., Prieto G., Messina P.V., Ruso J.M., Hidalgo-Álvarez R. and Sarmiento F.** (2005) *Langmuir* 21: 10968 “On the Effect of Ca^{2+} and La^{3+} on the Colloidal Stability of Liposomes”
- Sabín J., Prieto G., Ruso J.M., Hidalgo-Álvarez R. and Sarmiento F.** (2006c) *Eur. Phys. J. E* 20: 401-408 “Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces”
- Sabín J., Prieto G., Sennato S., Ruso J.M., Angelini R., Bordi F. and Sarmiento F.** (2006b) *Phys. Rev. E* 74: 031913 “Effect of Gd^{3+} on the colloidal stability of liposomes”
- Schulze H.** (1882) *J. Prakt. Chem.* 25: 431 “Schwefelarsen in wässriger Lösung”
- Stewart J.C.M.** (1959) *Anal. Biochem.* 104: 10 “Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate ”
- Tadmor R.** (2001) *J. Phys.: Cond. Matt.* 13: L195–L202 “The London-van der Waals interaction energy between objects of various geometries”
- Tatulian S.A.** (1994) *J. Phys. Chem.* 98: 4963 “Evaluation of Ion Binding of Zwitterionic Membranes Based on Extended Gouy-Chapman-Stern Theory”
- van Oss C.J.** (1993) *Coll. Surf. A* 78: 1-49. “Acid-base interfacial interactions in aqueous media”
- Verwey E.J.W. and Overbeek J.** (1948) “Theory of Stability of Lyophobic Colloids”. Elsevier, Amsterdam
- Vinogradov E.V, Smirnov P.R. and Trostin V.N.** (2003) *Rus. Chem. Bol. International Edition*, 53: 1253-1271. “Structure of hydrated complexes formed by metal ions of Groups I—III of the Periodic Table in aqueous electrolyte solutions under ambient conditions”
- Volkov A.G., Paula S. and Deamer D.W.** (1997) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 42: 153-160. “Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers”
- White G., Pencer J., Nickel B.G., Word J.M. and Hallet F.R.** (1996) *Biophys. J.* 71: 2701-2715. “Optical Changes in Unilamellar Vesicles Experiencing Osmotic Stress. Biophysical”
- Wilschut J. and Hoekstra D.** (1986) *Chem. Phys. Lip.* 40: 145-166 “Membrane Fusion: Lipid Vesicles as Model System”

Inestabilidad coloidal de los liposomas



Capítulo 4

Inestabilidad coloidal de los liposomas

Después de estudiar la estabilidad de los liposomas y de establecer los factores que favorecen que estos no se agreguen, nos hemos propuesto como objetivo dar un paso más, investigando los procesos de inestabilidad coloidal. Para ello hemos caracterizado la velocidad de agregación, la ramificación o compactación de los agregados formados, su dimensión fractal, tamaño máximo, la irreversibilidad del proceso, etc...

Los conocimientos obtenidos en los estudios presentados en el capítulo 3 nos han sido de gran utilidad para conocer las c.a.c. de los sistemas, la adsorción de iones o la variación de la carga superficial y así poder provocar la agregación de los liposomas de forma controlada. Las técnicas de dispersión de luz y la microscopía de transmisión electrónica presentadas en el capítulo 2 nos han permitido caracterizar estos procesos de agregación y la morfología de los clusters formados.

El estudio de los procesos de agregación es de gran interés general en todo el campo de los coloides. La universalidad de los procesos, que los hacen independientes de la naturaleza del coloide, ha hecho que la mayoría de los estudios de agregación se realicen con partículas de oro [Liu *et al.* (1990)], látex [Majolino *et al.* (1989)] o sílice [Aubert y Cannell (1986)]. Sin embargo, Lasic en su libro “*Liposomes: from Physics to Application*” [Lasic (1993)] se sorprendía del poco trabajo hecho en el estudio fractal de la agregación de liposomas.

Los liposomas son los sistemas con mayores aplicaciones en biotecnología, y sin duda su uso como transportadores de fármacos hace necesario un certero conocimiento de los procesos de agregación. A este fin quiere contribuir el presente capítulo de la tesis.

4.1. GEOMETRÍA FRACTAL

Un fractal es un objeto geométrico cuya estructura básica se repite en diferentes escalas. En muchos casos los fractales pueden ser generados por un proceso recursivo o iterativo capaz de producir estructuras autosimilares independientemente de la escala específica. Son estructuras geométricas que combinan irregularidad y estructura.

La geometría clásica propuesta por Euclídeo de Alejandría (300 a.C.) se basaba en formas uniformes compuestas por líneas rectas y curvas, y satisfizo las inquietudes científicas durante mas de 20 siglos. Platón trató de explicar la naturaleza basándose en figuras sólidas regulares euclídeas. Los estudios de Newton y Kepler, también basados en la geometría euclídea, explicaron toda la mecánica clásica de la teoría gravitacional [Lesmoir *et al.* (2000)].

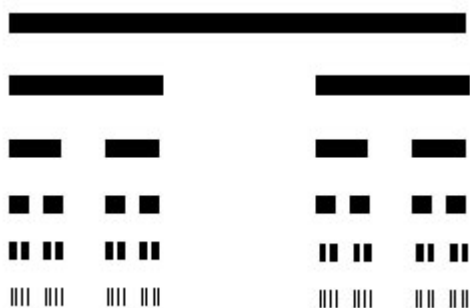


Figura 4.1. Polvo de Cantor.

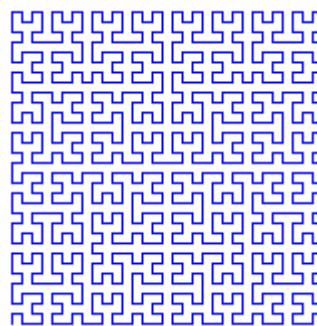


Figura 4.2. Curva de Peano.

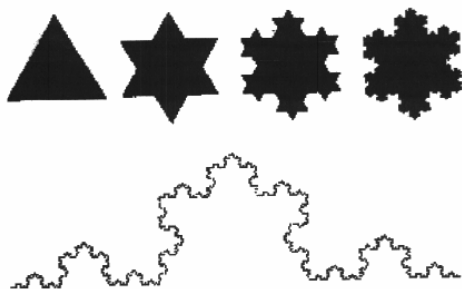


Figura 4.3. Copo de nieve de Koch.

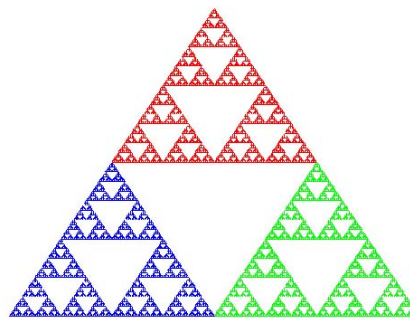


Figura 4.4. Triángulos de Sierpinski.

Pero a partir de finales de siglo XIX algunos matemáticos empezaron a diseñar sistemas cuyas dimensiones eran no enteras y no podían ser definidos en la geometría euclídea. Philipp Cantor desarrolló lo que se puede llamar el primer

fractal, una sucesión de segmentos conocida como "*polvo de Cantor*" (figura 4.1). Años más tarde, en 1890, Guiseppe Peano encontró una curva que podía rellenar toda la superficie de un plano, lo cual hacía posible definir cualquier punto de un área con una sola coordenada. Esta curva fue denominada como la "*curva de Peano*" (figura 4.2) y empezó a cuestionar la necesidad de definir dimensiones no enteras para ciertos sistemas. El sueco Helge von Koch diseñó en 1904 lo que hoy, quizás, sea el fractal más famoso: el copo de nieve de Koch (figura 4.3). Otro fractal muy popular lo introdujo Waclaw Sierpinski basándose en la repetición de figuras triangulares (figura 4.4).

Sin embargo todas estas aportaciones desde el campo de las matemáticas todavía no habían dado lugar a una aplicación práctica en el campo de las ciencias. Fue Benoît Mandelbrot el gran impulsor de la geometría fractal y el primero en usar el término *fractal* en 1975. Según Mandelbrot en la naturaleza no existen objetos uniformemente rectangulares o esferas perfectas como describe la geometría euclídea. Para él la verdadera geometría del mundo animal, vegetal y mineral, es la geometría fractal [Mandelbrot (1983)].

Hoy día la geometría fractal se aplica en campos tan diversos como la economía (*flustraciones de la bolsa*), biología (*estudio de las poblaciones de especies, ramificaciones de vegetales*), arquitectura (*figura 4.5*), cartografía (*análisis de las costas, ríos...*), cosmología (*distribución de cráteres y asteroides*), física (*teoría del caos, turbulencias*) o biomedicina (*estructura de los vasos sanguíneos, del cerebro etc...*) [Takayasu (1989)].



Figura 4.5. Ejemplos de geometría fractal: base del Castel de Monte de Abulia (Italia), caparazón de molusco, las ramificaciones del brócoli, las fluctuaciones de la bolsa de valores.

4.1.1. LA DIMENSIÓN FRACTAL

Para el estudio de estos sistemas que presentan la característica de autosemejanza fue necesario definir una dimensión fractal (d_f) que indicase una medida del grado de complejidad y estructuración al llenar el espacio. Entonces surge una interesante paradoja: su tamaño siempre depende de la escala con la que se está midiendo. Se suele definir la dimensión fractal como el cociente entre el logaritmo de la medida del tamaño (X) y el logaritmo de la escala (S).

$$d_f = \frac{\log X}{\log S} \quad [4.1]$$

Los siguientes ejemplos pueden ayudar a aclarar este concepto de dimensión fractal:

Ejemplo 1: Fractal matemático de la repetición de cuadrados

La figura 4.6 muestra un fractal construido con la repetición de cuadrados. Como se observa, el sistema es invariante al cambiar la escala, ya que si que toma

una parte del tercer sistema se obtiene la figura del segundo sistema y así sucesivamente. Por tanto se cumple la propiedad de autosemejanza.

La circunferencia que rodea la primera imagen tiene un diámetro de 3 en unidades de cuadrado, y el número de cuadrados que contiene dentro es 5. El diámetro de la segunda figura tiene 9 unidades y contiene 25 cuadrados en su interior. En la última figura la circunferencia tiene 27 unidades de cuadrado y contiene 125.

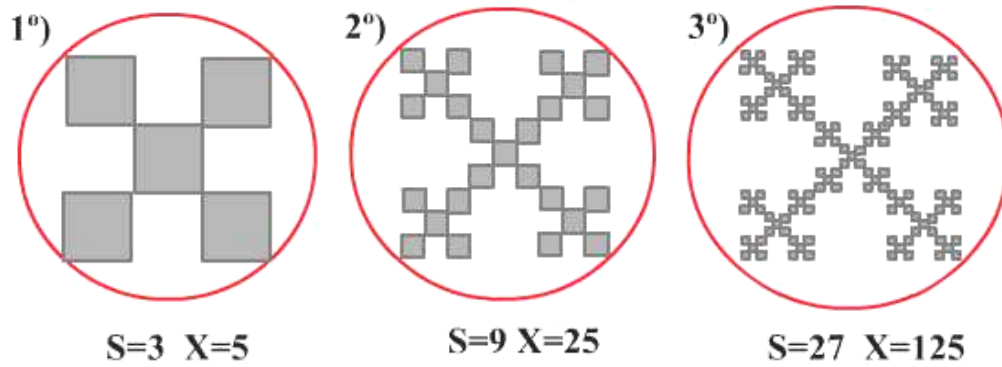


Figura 4.6. Ejemplo de fractal construido con la repetición de cuadrados.

La relación entre el número de cuadrados inscritos en la circunferencia y el diámetro de la misma es una constante intrínseca del sistema, siendo precisamente, su dimensión fractal.

$$\frac{\log X}{\log S} = \frac{\log 5}{\log 3} = \frac{\log 25}{\log 9} = \frac{\log 125}{\log 27} = 1.46 = d_f \quad [4.2]$$

Expresado de otra manera, el número (N) de cuadrados de tamaño a inscritos en una circunferencia de radio R se puede expresar en función de la dimensión fractal como:

$$N = \left(\frac{R}{a} \right)^{d_f} \quad [4.3]$$

Ejemplo 2: La costa de Inglaterra.

Nos resultaría imposible determinar con total certeza la longitud de la costa de Inglaterra (figura 4.7), ya que ésta dependerá siempre de la escala con la que se mida. Siempre existirán detalles de calas, cabos o pequeños entrantes del mar en la costa que ciertos tamaños de escalas no tendrían en cuenta y otros si.

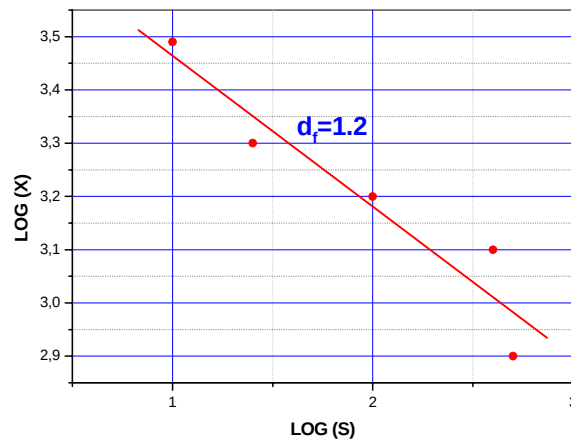


Figura 4.7. Estudio fractal de la costa de Inglaterra.

La pendiente de la recta que ajusta la representación del logaritmo de la longitud medida frente al logaritmo de la escala usada, es la dimensión fractal de la costa inglesa que a su vez nos proporciona una medida de su grado de complejidad.

4.2. GEOMETRÍA FRACTAL EN COLOIDES

El análisis de los procesos de agregación coloidal puede hacerse mediante la geometría fractal. Las estructuras creadas tras la agregación (*clusters*) son invariantes al cambio de escala y pueden ser tratados como fractales.

Cuando las partículas coloidales se agregan, se forman clusters que pueden adoptar infinidad de formas. En el caso más simple de dos partículas iguales que colisionan no existe duda acerca de la estructura del dímero formado. Sin embargo, una tercera partícula se podría unir al dímero en diferentes direcciones, complicándose considerablemente las estructuras posibles al ir aumentando el tamaño del cluster. En un caso real de agregación, un cluster puede contener cientos, incluso miles de partículas primarias siendo imposible predecir su estructura. No obstante, gracias a la introducción del concepto matemático de la dimensión fractal se ha podido obtener información sobre los clusters, considerados durante años como formas excesivamente complicadas [Molina (1999)].

La dimensión fractal de un cluster de coloides puede darnos mucha información sobre la morfología del agregado, la velocidad de agregación o la probabilidad de colisión de las partículas coloidales. Forrest y Witten [Forrest y Witten (1979)] hicieron las primeras medidas de dimensión fractal de los agregados de partículas de humo ultrafino a partir de micrografías de transmisión electrónica. (figura 4.8).

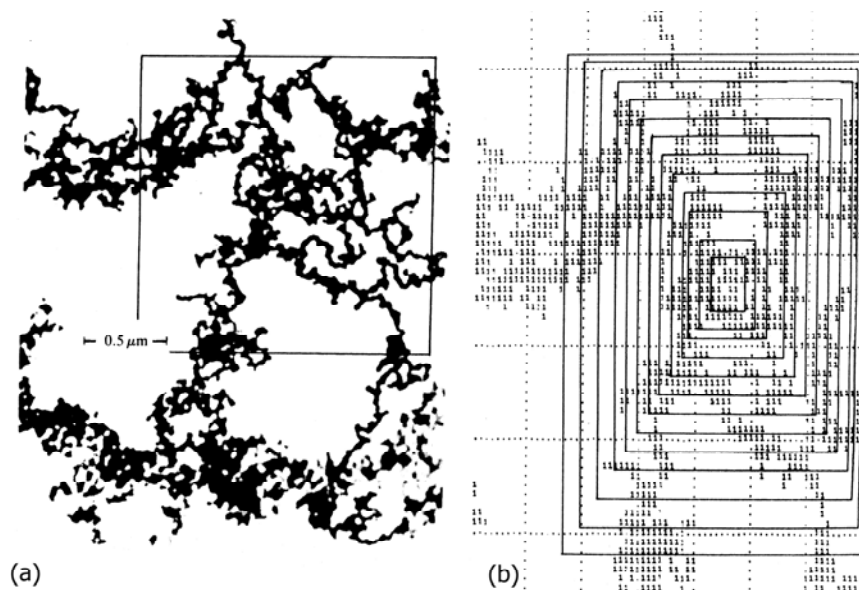


Figura 4.8. (a) Micrografías TEM de las partículas ultrafinas de humo realizadas por Forrest y Witten (b) y su digitalización.

El desarrollo en la década de los 80 de simulaciones computacionales [Meakin (1983a)][Meakin (1983b)] [Kolb *et al.* (1983)] y de nuevas técnicas de medición indirecta de la dimensión fractal (dispersión de luz, dispersión de rayos X a bajo ángulo) ha impulsado el estudio fractal de los procesos de agregación de diversos coloides (partícula de látex, sílice o oro, aerosoles, polímeros, proteínas...)

Estas investigaciones han puesto de manifiesto que existen dos tipos de regímenes de agregación de coloides. Uno de ellos está dominado por la simple difusión de las partículas bajo movimiento browniano, y recibe el nombre de *Agregación de Clusters Limitada por Difusión*, **DLCA** (de sus siglas en inglés). En el otro, la agregación esta gobernada por la reacción (generalmente electrostática) denominada *Agregación de Clusters Limitada por Reacción*, **RLCA** (de sus siglas en inglés). Estos dos regímenes de agregación dan lugar a dos tipos de agregados distintos que se pueden distinguir por su dimensión fractal tal y como describimos a continuación.

4.2.1. REGÍMENES DE AGREGACIÓN COLOIDAL

4.2.1.1. AGREGACIÓN DE CLUSTERS LIMITADA POR DIFUSIÓN: *DLCA*

En el régimen DLCA los coloides se mueven en la disolución libremente bajo movimiento browniano. No existe ningún tipo de interacción repulsiva entre ellos, de tal modo que siempre que dos coloides se aproximen lo suficiente quedarán necesariamente agregados. En otras palabras, la probabilidad de que dos coloides que “chocan” se queden “pegados” uno al otro, es 1 ($P_{c \rightarrow a} = 1$). Este tipo de agregación suele darse en coloides no iónicos y coloides cargados cuya carga ha sido apantallada con adicción de iones.

Los agregados formados bajo el régimen DLCA son ramificados y poco compactos, ya que es prácticamente imposible que una partícula coloidal moviéndose bajo movimiento browniano llegue a las zonas más internas del cluster sin colisionar con ninguna otra partícula. Normalmente son la “ramas” externas del cluster las que captan nuevas partículas primarias.

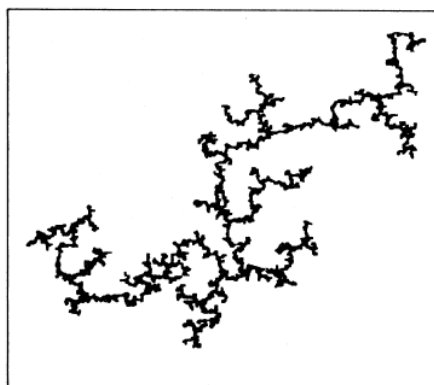


Figura 4.9. Ejemplo de un cluster ramificado bajo régimen DLCA obtenido por simulación computacional.

Las simulaciones computacionales [Meakin y Wasserman (1984)] sobre la agregación de coloides limitada por difusión rebelan que esta agregación se produce de forma rápida siguiendo la siguiente regla:

$$R_g \propto t^{1/d_f} \quad [4.4]$$

siendo R_g el tamaño del cluster, y t el tiempo de agregación. Además los agregados formados en el régimen DLCA tienen una dimensión fractal en torno a $d_f = 1.8$. Estos datos teóricos procedentes de simulaciones han sido verificados en múltiples trabajos experimentales con diferentes partículas coloidales [Burn *et al.* (1997)] [Carpinetti *et al.* (1990)] [Liu *et al.* (1990)].

4.2.1.2. AGREGACIÓN DE CLUSTERS LIMITADA POR REACCIÓN: RLCA

En el régimen RLCA la agregación ocurre de modo bien diferente. Cuando una partícula colisiona con otra, la probabilidad de que quede pegada a ella es distinta de uno ($P_{c \rightarrow a} < 1$). Una partícula coloidal tiene que chocar varias veces con el cluster antes de agregarse a él, aumentando así las posibilidades de introducirse en las zonas internas del cluster y no quedarse en las *ramas* del agregado (figura 4.10). Este tipo de proceso da lugar a agregados compactos y muy densos como se observa en la figura 4.11.

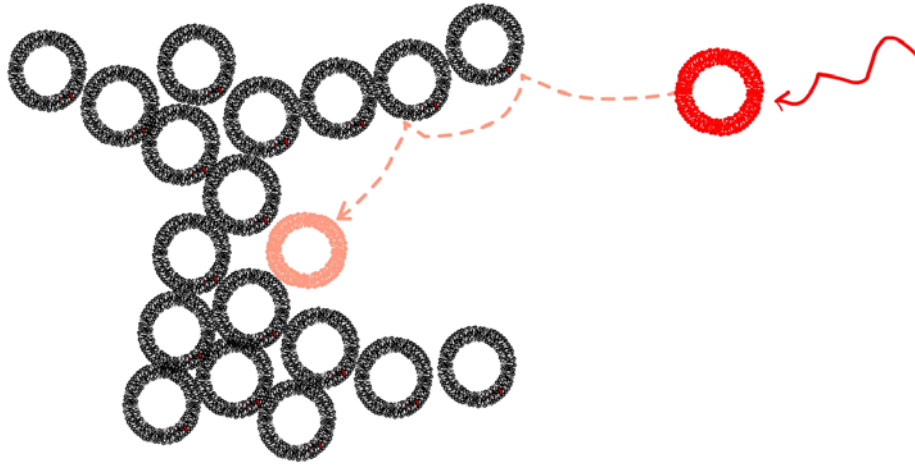


Figura 4.10. Esquema de la agregación limitada por reacción (RLCA) donde la probabilidad de agregación de dos partículas que interactúa es menor 1.

Este tipo de agregación se asocia con coloides ligeramente cargados, que todavía mantienen cierta repulsión electrostática, aunque no suficiente como para mantener la estabilidad, sí para que la probabilidad de agregación sea menor que 1.



Figura 4.11. Ejemplo de un cluster compacto bajo régimen RLCA obtenido por simulación computacional

Los estudios de simulación muestran que los agregados formados tiene una dimensión fractal entorno a $d_f = 2.1$, y que el crecimiento de los cluster es más lento que por régimen DLCA, siguiendo una ley exponencial [Lynch *et al.* (1996)]:

$$R_g \propto e^{\alpha t} \quad [4.5]$$

donde α es una constante que depende del valor de $P_{c \rightarrow a}$.

4.3. CÁLCULO DE LA DIMENSIÓN FRACTAL EN LIPOSOMAS

Existen distintas técnicas para el cálculo de la dimensión fractal de los agregados de liposomas. La más directa, y la primera que se utilizó [Forrest y Witten (1979)], fue el análisis de micrografías TEM. Con esta técnica se pueden obtener valores fiables de la dimensión fractal si se analizan un gran número de cluster y se obtiene una alta estadística, pero presenta un inconveniente, ya que exige el secado de las muestras antes de analizarlas.

En el caso de los liposomas, dado que encierran agua en su interior, secarlos puede significar modificar su morfología y la de sus agregados. Existen muchos trabajos de investigación que utilizan micrografías TEM con liposomas [New (1990)], sin embargo se ha preferido prescindir de esta técnica para el análisis de la dimensión fractal, aunque sí se utilizó para confirmar resultados o para visualizar algunos ejemplos.

Para la caracterización de la dimensión fractal de los agregados de liposomas hemos usado la técnica de dispersión de luz con dos métodos distintos.

A partir de medidas de dispersión dinámica de luz hemos monitorizado la evolución temporal del tamaño de los agregados y a partir de ahí hemos calculado la dimensión fractal en los casos de agregación en régimen DLCA. Una vez *estabilizados* los clusters usamos medidas de dispersión estática de luz; el objetivo era determinar la dispersión angular de los datos a partir de la cual podemos calcular la dimensión fractal, tal y como se muestra a continuación.

4.3.1. CÁLCULO DE LA DIMENSIÓN FRACTAL A PARTIR DE LA DISPERSIÓN ANGULAR DE LOS AGREGADOS

Los estudios realizados por Forrest y Witten sobre la agregación de coloides muestran que la función de correlación de la densidad varía con la distancia (r) al centro del agregado con una ley de potencias:

$$g(r) \propto r^{d_f - D} \quad [4.6]$$

siendo D la dimensión euclídea. Conceptualmente, la técnica empleada por Forrest y Witten es similar a la mostrada en el ejemplo de la figura 4.8. pero realizada sobre sus fotos TEM de partículas ultrafinas de humo.

A partir de la función de correlación de la densidad se puede deducir que la masa del agregado de radio R_g en una dimensión euclídea D puede expresarse como:

$$M(R_g) \propto \int_0^\infty g(r) r^{D-1} \propto R_g^{d_f} \quad [4.7]$$

Así, por ejemplo, el número de partículas (n) comprendidas en una esfera de radio r centrada en el agregado, dependerá del radio de las partículas primarias (R_o) y de la dimensión fractal del cluster (d_f). Tomando r como el radio de giro del agregado R_g , el valor n se puede obtener como sigue [Carpinetti *et al.* (1990)] [Schaefer y Martin (1984)]:

$$n = \left(\frac{R_g}{R_o} \right)^{d_f} \quad [4.8]$$

cuanto más compacto sea el agregado mayor será su dimensión fractal.

Si denominamos $I_M(q)$ la intensidad de luz dispersada por un cluster de masa M , la intensidad de luz total dispersada por una distribución de $N(M)$ agregados será:

$$I(q) = \sum_M N(M) I_M(q) \quad [4.9]$$

siendo q el vector de onda definido en la ecuación 2.19 ($q=4\pi n \sin(\theta/2)/\lambda$).

El valor de $I_M(q)$ dependerá del producto entre el vector de onda q y el radio de giro del agregado R_g a través del conocido factor de estructura entre partículas $S(qR_g)$. Así la ecuación 4.9 queda [Lin *et al.* (1990)]:

$$I(q) = \sum_M N(M) M^2 S(qR_g) \quad [4.10]$$

donde $S(qR_g)$ se define como la transformada de Fourier de la función de correlación de la densidad $g(r)$.

En un experimento de dispersión de luz en función del ángulo de una disolución de agregados fractales podremos distinguir tres zonas distintas [Tang (1999)] [Martin y Ackerson (1985)]:

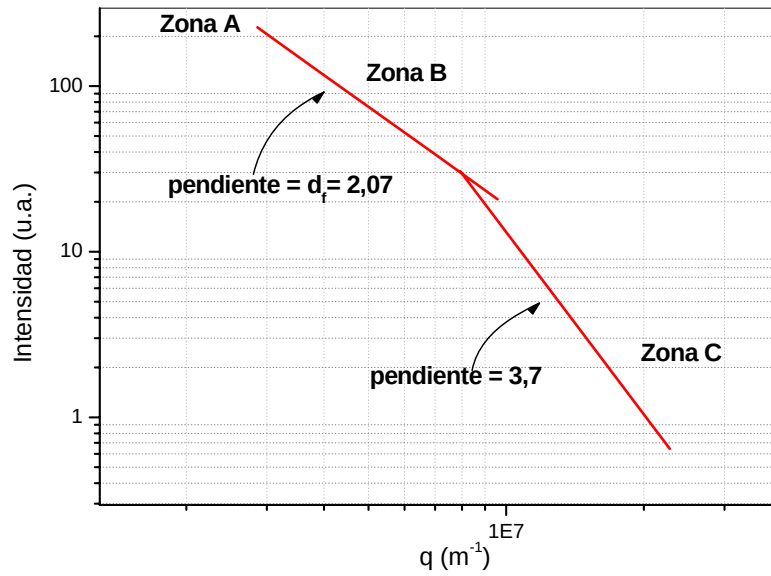


Figura 4.12. Intensidad dispersada por clusters de liposomas de DPPC en presencia de La^{3+} a 0.5 M donde se muestran las tres zonas de análisis.

Zona A: $qR_o \gg 1$. Siendo R_o el radio de giro de la partícula coloidal primaria. En esta región se cumple la ley de Porod $I(q) \sim q^{-4}$ [Wong y Bray (1988)].

Zona B: $qR_g \gg 1 \gg qR_o$. Donde se cumple que $S(qR_g) = (qR_g)^{-d_f}$. Con lo cual la ecuación 4.10 queda como: [Onuma *et al.* (2000)]

$$I(q) \propto S(q) \propto q^{-d_f} \quad [4.11]$$

Zona C: $l > qR_g$ Se cumple la ley de Guinier donde el agregado se comporta como una partícula simple cuando se ve desde un ángulo de dispersión pequeño.

Para nosotros es la zona B la que tiene interés práctico para el cálculo de la dimensión fractal del agregado.

4.3.2. CÁLCULO DE LA DIMENSIÓN FRACTAL A PARTIR DE LA EVOLUCIÓN TEMPORAL DEL TAMAÑO DE LOS AGREGADOS

El cálculo de la dimensión fractal a partir de la evolución temporal del tamaño de los clusters se basa, principalmente, en la información adquirida de las simulaciones computacionales de modelos de crecimiento realizadas en los años 80.

Witten y Sander [Witten y Sander (1981)] simularon un modelo simple que describía procesos aleatorios irreversibles para generar fractales. Para ello, simularon partículas que se movían aleatoriamente hasta encontrarse con otra a la cual se adherían de forma irreversible. Repitiendo este proceso con cientos de partículas conseguían explicar ciertos procesos como la electrodeposición o la ruptura eléctrica pero no conseguían describir correctamente la agregación de coloides. Sus valores de la dimensión fractal siempre eran mayores al experimental. Este primer modelo de agregación limitada por difusión se conoce como régimen **DLA** y la causa de la sobreestimación de la dimensión fractal era que este modelo no tenía en cuenta la agregación entre clusters.

En 1983, Kolb y colaboradores [Kolb (1983)] [Sander *et al.* (1983)] [Meakin (1984a)(1984b)] corrigieron esta limitación permitiendo la agregación de varios

clusters. La simulación se iniciaba con un conjunto de partículas bajo movimiento browniano, que se agregaban siempre que entraban en contacto para formar clusters de mayor tamaño ($P_{c \rightarrow a} = 1$). Estos nuevos clusters de partículas pasaban a considerarse como partículas iniciales de mayor tamaño que así mismo presentaban un movimiento browniano y podían agregarse a otro cluster o a otras partículas. Los clusters eran considerados como un todo, sin tener en cuenta las interacciones entre las partes del agregado y asumiendo las mismas propiedades que las partículas primarias excepto el tamaño. Este modelo es conocido como régimen **DLCA**.

Para simular el régimen **RLCA** basta con introducir una probabilidad ($P_{c \rightarrow a} < 1$) de agregación por cada colisión entre partículas que dependa del potencial repulsivo electrostático.

De estos estudios de simulación y del análisis de los agregados formados se sabe que en el régimen RLCA los agregados son compactos y densos, como ya fue explicado en la sección 4.2.1., y que tienen una dimensión fractal en torno a $d_f \sim 2.1$. Además el crecimiento del tamaño de los agregados es exponencial con el tiempo.

$$R_g \propto e^{\alpha t}$$

siendo α una constante que depende de la probabilidad de agregación y por tanto del potencial electrostático.

En el régimen DLCA los agregados formados son ramificados y abiertos con una dimensión fractal en torno a $d_f \sim 1.8$ [Asnaghi *et al.* (1992)]. Debido a que todas sus colisiones son efectivas, agregan más rápidamente que en el régimen

RLCA. El tamaño de los agregados sigue una ley de potencias que depende de la dimensión fractal del agregado:

$$R_g \propto t^{1/d_f}$$

Monitorizando por dispersión dinámica de luz el tamaño de los agregados a lo largo del tiempo y representando en escala *log-log* el radio de los agregados frente al tiempo, podemos obtener la dimensión fractal del inverso de la pendiente (figura 4.13).

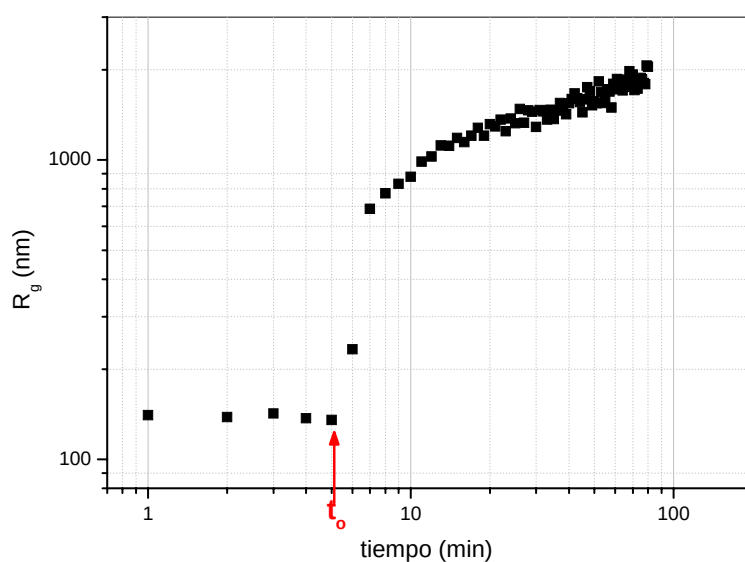


Figura 4.13. Evolución temporal del radio de los clusters de liposomas de DPPC. El tiempo t_0 indica la adición de 0,7 M de La^{3+} que provoca el inicio de la agregación.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se ha estudiado la agregación de liposomas de distinta composición (DPPC, DMPC y EYPC) en presencia de diferentes iones (K^+ , Ca^{2+} , La^{3+}).

La elección de estos lípidos tenía como objeto mantener la misma cabeza polar en todos los liposomas, cambiando únicamente la longitud de las colas. El DPPC tiene una doble cadena hidrocarbonada de longitud de 16 carbonos, mientras que el DMPC tiene 14 carbonos en sus cadenas. El EYPC es una mezcla heterogénea de lípidos saturados e insaturados con distinto número de carbonos, pero con predominio de los de 16 y 18 carbonos como muestra la figura 1.11. En la práctica, la longitud de la cadena hidrofóbica sólo afecta a la orientación del dipolo hidrofílico, lo cual modifica la carga superficial del liposoma.

Hemos usado el estudio de estabilidad de los liposomas y de las *c.a.c.* reflejado en el capítulo 3 para provocar la inestabilidad del sistema controlando la concentración iónica del medio. Los datos obtenidos de la teoría DLVO teniendo en cuenta las fuerzas de hidratación nos han servido para deducir las concentraciones iónicas necesarias para observar los regímenes de agregación RLCA y DLCA.

Con el objetivo de estudiar los procesos de agregación se han calculado las dimensiones fractales para cada tipo de lípido y para cada concentración iónica por dos métodos diferentes. Para determinar la evolución temporal de los agregados se ha monitorizado el tamaño de los clusters por dispersión dinámica de luz midiendo el diámetro cada 15 segundos. El inicio de la agregación se producía inyectando el ión a una cierta concentración. Una vez que estos clusters llegaban a un tamaño máximo, y antes de que precipitasen, medíamos la dispersión angular. El cálculo de

las dimensiones fractales por ambos métodos se ha hecho siempre con la misma muestra.

Antes de realizar estos experimentos se implementaron una serie de pruebas que nos permitieron determinar las condiciones adecuadas para llevar a cabo las medidas. La figura 4.14 muestra la dispersión angular de liposomas estables a distintas concentraciones de lípido. La curva obtenida con 1 mM de lípido se consideró adecuada, pues permitía distinguir la Zona B de la Zona A en la dispersión angular de intensidad (figura 4.12).

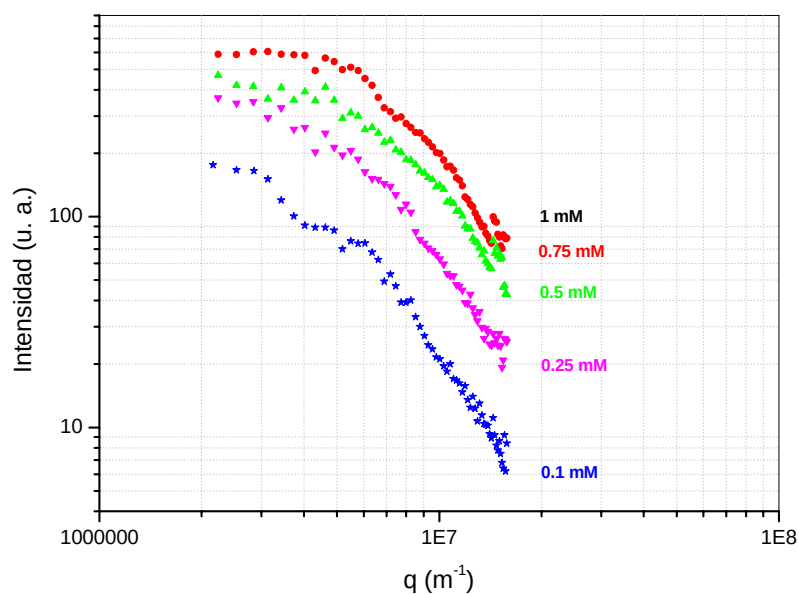


Figura 4.14. Dispersión angular de liposomas de DPPC a distintas concentraciones de lípido: (*) 0.1 mM, (▼) 0.25 mM, (▲) 0.5 mM, (●) 0.75 mM y (■) 1 mM.

Si la agregación se produce en el mínimo primario del potencial DLVO (figura 3.3) el proceso es irreversible y continuo. Transcurrido un tiempo suficiente los agregados adquieren un tamaño tal que empiezan a precipitar. Conocer cuánto tiempo es necesario para que esto ocurra es importante, pues nos permite garantizar que cuando se mida la dispersión angular de los clusters, todavía no habrá empezado la sedimentación.

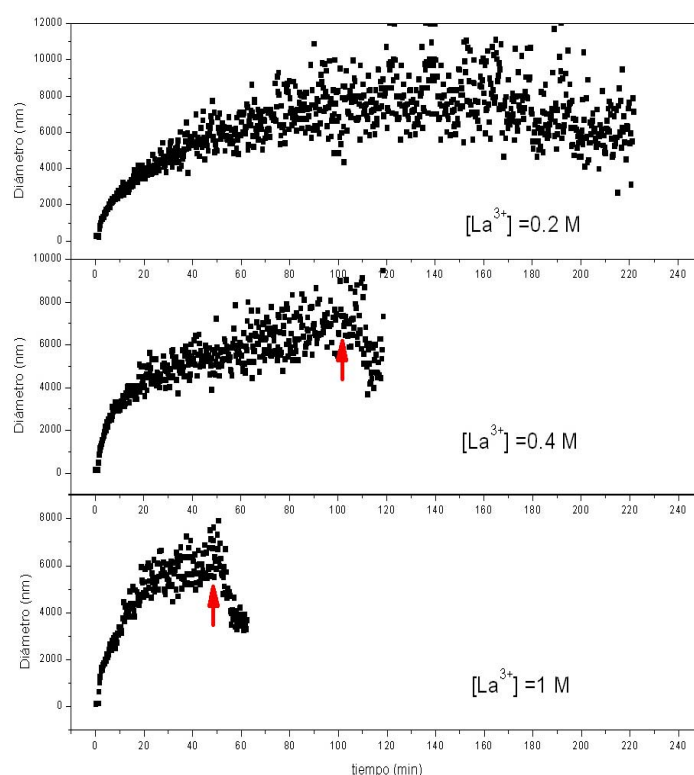


Figura 4.15. Incremento del tamaño de los clusters de liposomas de DPPC a distintas concentraciones de La^{3+} . Las flechas indican el inicio de la sedimentación.

La figura 4.15 muestra el incremento de tamaños de liposomas de DPPC a distintas concentraciones de La^{3+} . Se ha permitido a los agregados crecer durante horas para observar la sedimentación.

La disminución de tamaño que se observa más claramente para $[La^{3+}] = 0.4$ y 1 M, en realidad, no significa que los agregados se hagan más pequeños, si no que los agregados más grandes han precipitado y el fotomultiplicador solo recibe la señal producida por la dispersión de los agregados menores. De lo mostrado en la figura 4.15 se puede deducir que los agregados precipitan más precozmente cuanto mayor sea la concentración iónica, siendo 50 minutos el tiempo mínimo para el caso de $[La^{3+}] = 1$ M. Por tanto, las medidas de dispersión angular de los agregados deben de ser hechas antes de haber transcurrido 50 minutos tras el inicio de la agregación.

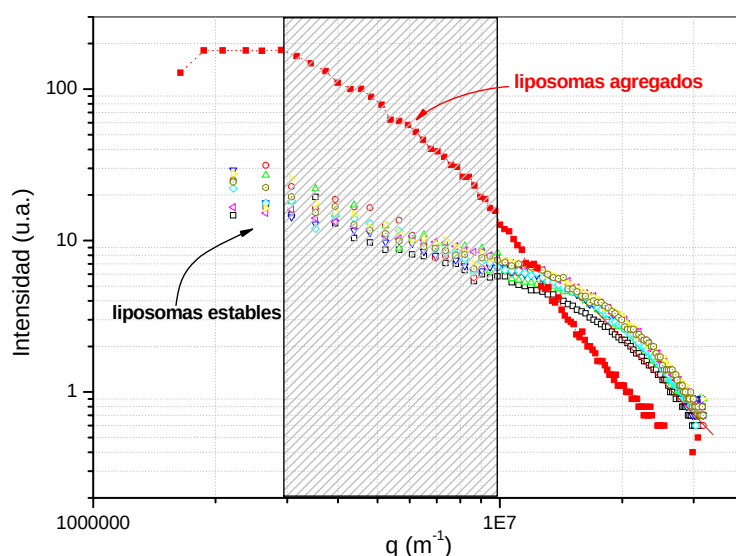


Figura 4.16. Dispersión angular de liposomas estables de EYPC en presencia de distintas concentraciones de K^+ : 1M, 0.7M, 0.5 M, 0.3M, 0.2M, 0.1M, 0.05 M, 0 M en comparación con la intensidad dispersada por un cluster de liposomas en presencia de 0.7 M La^{3+} . La zona rayada muestra la zona B del cálculo de la dimensión fractal.

Anteriormente comentamos la intención de estudiar los procesos de agregación de los liposomas en presencia de iones K^+ . Sin embargo, como reflejamos en el capítulo anterior, los liposomas son estables para cualquier concentración de iones monovalentes. A pesar de ello, no se desechó el estudio fractal de este sistema a modo de comprobación de la aplicabilidad de estos métodos.

La figura 4.16 muestra la dispersión angular de intensidad de los liposomas de EYPC en presencia de distintas concentraciones de K^+ , comparado con los datos obtenidos para clusters de EYPC en presencia de La^{3+} . Debido a que, en presencia de K^+ , nunca se produce agregación, no podemos definir la zona B donde calcular la dimensión fractal. Pero, si se toma el mismo rango de valores de q que para el caso de los agregados con La^{3+} obtenemos dimensiones

fractales en torno a 1 como era de esperar ya que los liposomas se mantienen independientes como unidades puntuales en el espacio.

La evolución temporal del tamaño de los liposomas al añadir iones K^+ no tiene más interés que el verificar la disminución de tamaño de los liposomas debido a las fuerzas osmóticas, tal y como se ha explicado en detalle en el capítulo 3 (figura 3.17). Desde el punto de vista fractal no hay ningún análisis posible ya que no se crean agregados.

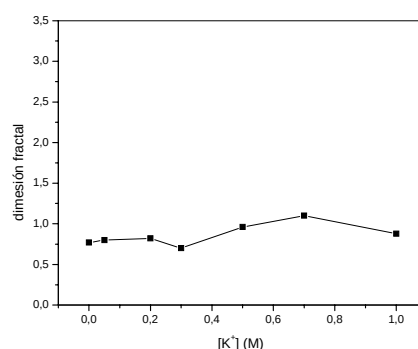


Figura 4.17. Dimensión fractal de liposomas estables a distintas concentraciones de K^+ .

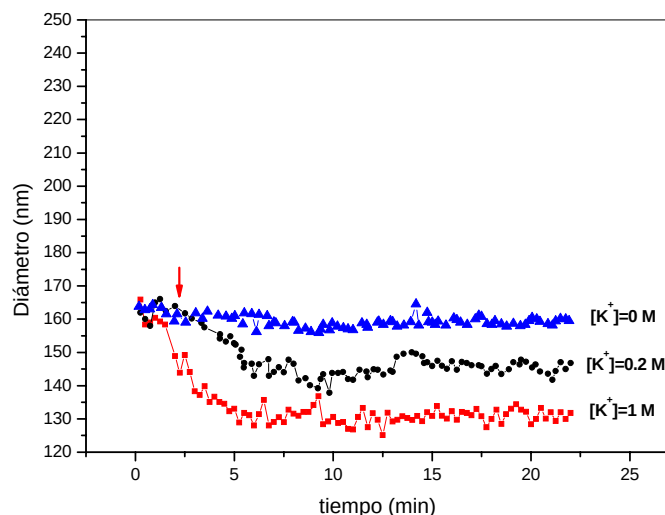


Figura 4.18. Evolución temporal de los liposomas de EYPC al añadir distintas concentración de iones K^+ : (■) 1M, (●) 0.2 M y (▲) 0M. No se observa agregación de los liposomas pero sí su disminución de tamaño debido a las fuerzas osmóticas. La flecha indica el momento de añadir los iones K^+ .

Los resultados del estudio fractal de la agregación de liposomas de EYPC, DPPC y DMPC en presencia de distintas concentraciones de La^{3+} se muestran en el artículo “*A study of the fractal dimension of the aggregates of liposomes in the presence of La^{3+}* ” [Sabin *et al.* (2007a)].

En este estudio se han provocado la agregación de los liposomas de DPPC, DMPC y EYPC por la adsorción de distintas concentraciones de La^{3+} , determinando la c.a.c. para cada tipo de liposomas. Los valores experimentales de las c.a.c. están dentro de lo esperado teniendo en cuenta la teoría DLVO y la variación del potencial zeta con la concentración de La^{3+} .

	$[\text{La}^{3+}] = \text{c.a.c.}$
DPPC	0.1 M
DMPC	0.4 μM
EYPC	0.2 M

Tabla 4.1. Concentraciones de agregación crítica de La^{3+} para liposomas unilamelares de DPPC, DMPC y EYPC.

Monitorizando el tamaño de los clusters con el tiempo se han observado los dos tipos de comportamientos en su crecimiento dependiendo de las concentraciones de iones en el medio. Se comprueba un crecimiento exponencial típico del régimen RLCA y otro siguiendo la ley de potencias característica del régimen DLCA de agregación. La figura 4.19 muestra un ejemplo de cada uno de ellos.

El cálculo de las dimensiones fractales para concentraciones mayores a la c.a.c. se realizó por los dos métodos descritos con anterioridad, obteniendo resultados dentro de los esperados por las simulaciones. En prácticamente todos los casos puede observarse una disminución de la dimensión fractal al ir apantallándose la carga de los liposomas. Es decir, los clusters se hacen más ramificados al pasar de agregar en el régimen RLCA donde aún existe cierta repulsión electrostática y $P_{c \rightarrow a} < 1$, a un régimen DLCA donde todas las colisiones son efectivas. La morfología de los clusters en cada régimen se ha verificado por micrografías de transmisión electrónica (figura 4.20.)

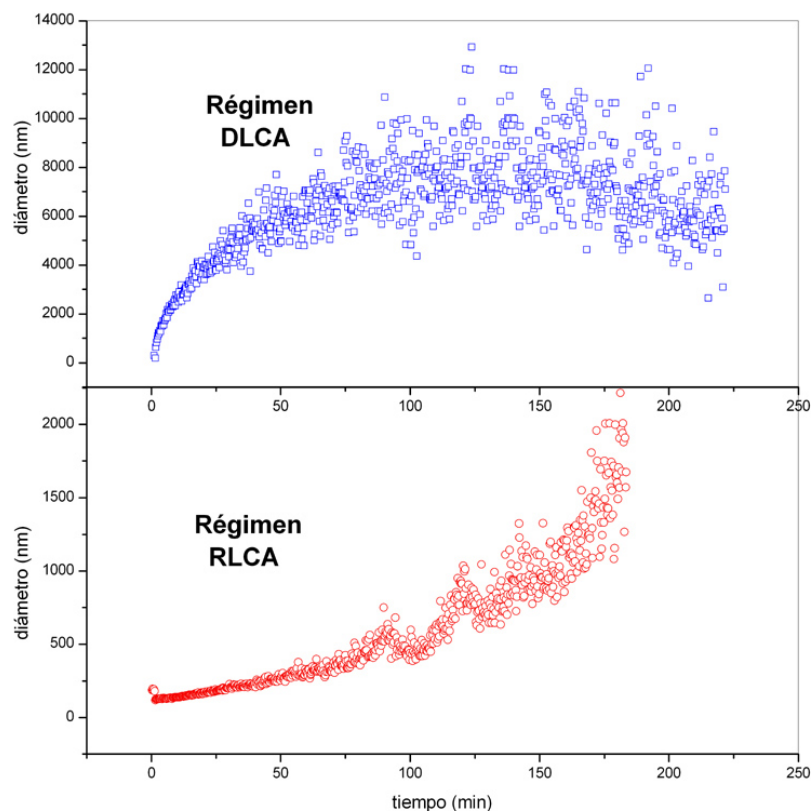


Figura 4.19. Ejemplo de la evolución temporal de los agregados de DPPC en régimen DLCA ($\square$) con 0.2M de La^{3+} y en régimen RLCA ($\circ$) con 0.1 M de La^{3+} .

En este estudio se observó que los liposomas de EYPC no agregaban de forma continua hasta precipitar como en el caso de DPPC, DMPC y el de la mayoría de sistemas coloidales. Por el contrario los agregados, al llegar a un determinado tamaño, se estabilizan y dejan de “captar” nuevos liposomas. Además, el tamaño final de los clusters en el que se estabilizan, depende de la concentración de La^{3+} que provoca la inestabilidad.

También se comprobó experimentalmente la reversibilidad de la agregación de liposomas de EYPC, lo que indica que la agregación se produce en

un mínimo secundario y no el mínimo primario en el que agregan, de forma irreversible, los liposomas de DPPC y DMPC [Nir *et al.* (1981)].

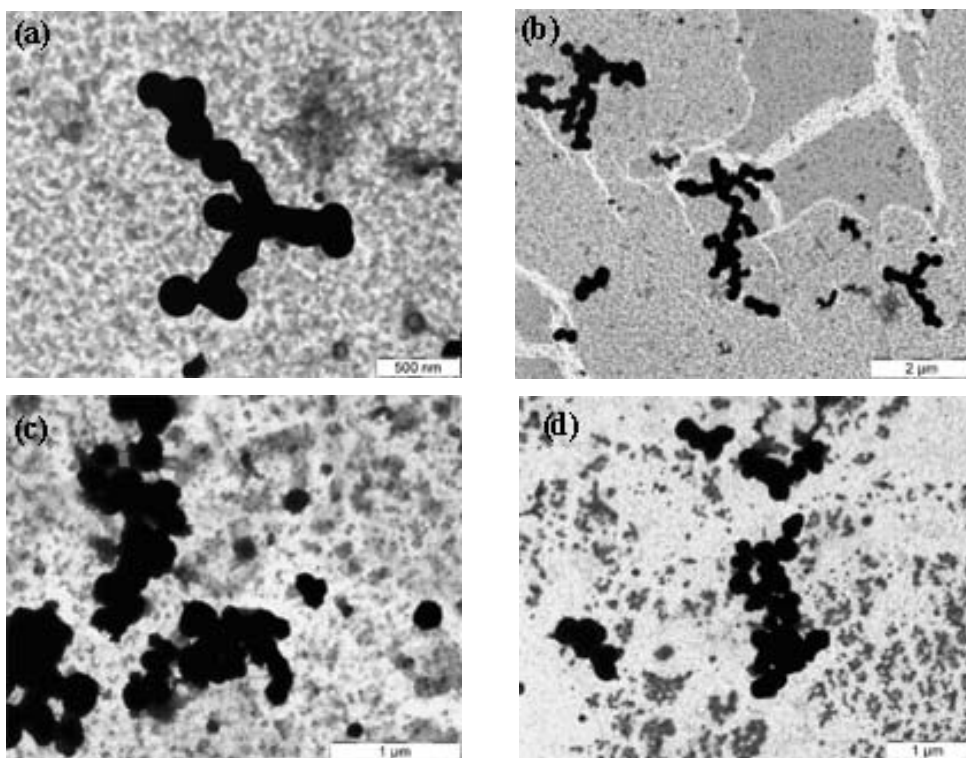


Figura 4.20. Fotografías TEM de agregados de liposomas de DPPC: (a) y (b) cluster ramificados típicos del régimen de agregación DLCA obtenidos con 0.7 M de La^{3+} . (c) y (d) muestran clusters compactos típicos del régimen RLCA obtenidos con 0.2M de La^{3+} .

Como ya se ha indicado, los liposomas de EYPC, están formados por una mezcla heterogénea de distintos fosfolípidos. Esto provoca que la bicapa de fosfolípidos sea mucho más irregular y tenga más imperfecciones, poros o canales donde se puede situar el agua [Matsumura *et al.* (1995)]. La estructura de este agua provoca que las fuerzas repulsivas de hidratación sean mayores que en el caso de DPPC y DMPC. Esto explicaría la agregación reversible de los liposomas de EYPC, ya que es sabido que las fuerzas de hidratación pueden provocar la aparición de mínimos secundarios en el potencial DLVO [Inoue *et al.* (1992)].

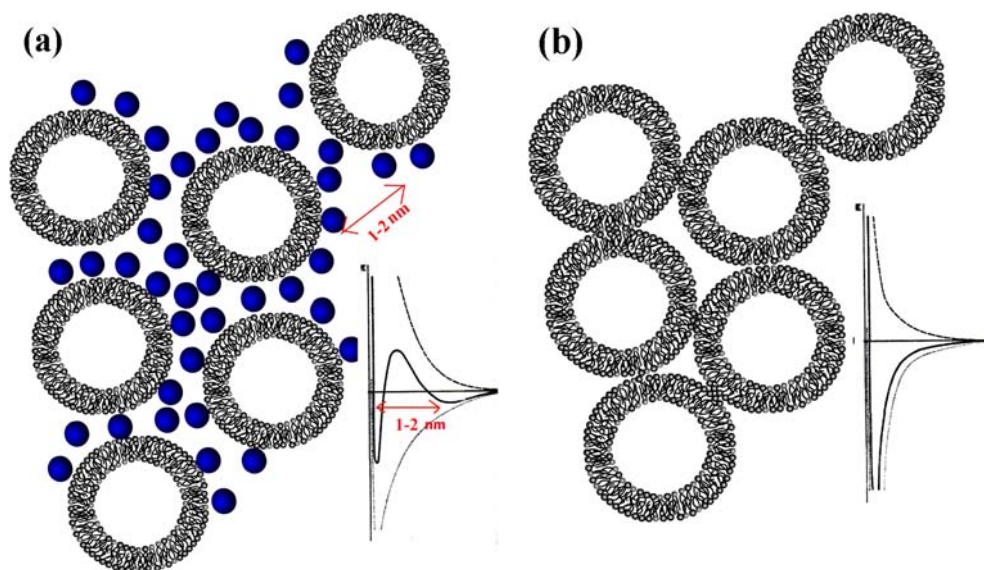


Figura 4.21. (a) Representación esquemática de liposomas agregados en un mínimo secundario situado entre 1 y 2 nm de la superficie de los liposomas. Los liposomas se agregan sin estar directamente en contacto y existen capas de agua entre ellos. (b) Si la agregación se produce en el mínimo primario, los liposomas agregados están en contacto y no hay moléculas de agua entre ellos.

El poder controlar el tamaño de los agregados de liposomas es de gran interés práctico en las aplicaciones biomédicas de los mismos, ya que permitiría diseñar clusters al tamaño deseado en función de la concentración iónica del medio. Además, la reversibilidad de la agregación puede ser útil en el almacenamiento y conservación de los liposomas, ya que estos se mantienen sin precipitar y, por simple dilución, pueden recuperarse aislados y estables.

Un segundo estudio de los modos de agregación de estos tres tipos de liposomas en presencia de distintas concentraciones de Ca^{2+} se presenta en el trabajo *“Fractal aggregation induced by liposome-liposome interaction in the presence of Ca^{2+} ”* [Sabin *et al.* (2007b)]. El comportamiento de la agregación de los liposomas de DMPC en presencia de Ca^{2+} no difiere mucho de aquella que se da en presencia de La^{3+} . Debido a la menor carga de los iones de calcio, hace falta más

concentración de iones Ca^{2+} para apantallar la carga inicial de los liposomas de DMPC. Consecuentemente, la concentración de agregación crítica de Ca^{2+} es mayor (10^{-3} M) que la del La^{3+} , en coherencia con la regla de Schulze-Hardy. En este caso también se pudieron observar regímenes de agregación RLCA y DLCA dependiendo de la concentración de Ca^{2+} . Los clusters creados eran irreversibles por dilución, lo que indica que la agregación se produce en un mínimo primario del potencial DLVO, tal como sucedía en el caso de La^{3+} .

Sin embargo, existen diferencias claras entre el comportamiento de la agregación de liposomas de DPPC en presencia de Ca^{2+} y en presencia de La^{3+} . La reversibilidad de los clusters en presencia de Ca^{2+} y la formación de agregados “estables” al llegar a un determinado tamaño reflejan que la agregación se produce en un mínimo secundario del potencial DLVO. Los liposomas de EYPC agregan en un mínimo secundario tanto con Ca^{2+} como con La^{3+} . Lo único que cambia es el valor de la concentración de agregación crítica.

De nuevo, sugerimos que las fuerzas de hidratación son las responsables de provocar la existencia de un mínimo secundario en el potencial de interacción entre dos liposomas, pero en este artículo hemos profundizado en la modelización de estas fuerzas de hidratación, añadiendo a los potenciales de la teoría clásica DLVO un potencial repulsivo debido específicamente a dicha hidratación.

La suma de este potencial de hidratación al potencial de interacción total entre dos liposomas predice la existencia de los mínimos secundarios que a su vez provocan la reversibilidad de los liposomas de EYPC. Además, el potencial usado depende linealmente del tamaño de las partículas y por tanto podría justificar el hecho de que los agregados, al llegar a un determinado tamaño, se vuelvan estables por la desaparición del mínimo secundario.

A study of the fractal dimension of the aggregation of liposomes in the presence of La^{3+}

J. Sabín, J.M. Ruso, G. Prieto, P. Messina and F. Sarmiento*

Biophysics and Interfaces Group, Department of Applied Physics, Faculty of Physics, University of Santiago de Compostela, E-15782 Santiago de Compostela, Spain.

A study of the fractal dimension of the aggregation of three different types of large unilamellar vesicles (LUVs), formed by egg yolk phosphatidylcholine (EYPC), dimyristoyl-phosphocholine (DMPC) and dipalmitoyl-phosphocholine (DPPC), in the presence of La^{3+} , is presented. Aggregate liposome fractal dimensions were calculated by two methods, aggregation kinetics, using the approaches Diffusion-Limited Cluster Aggregation (DLCA) and Reaction-Limited Cluster Aggregation (RLCA) and angle-scattering light dispersion. Electrophoretic measurements show a similar variation of the zeta potential (ζ -potential) for EYPC and DPPC, with a small increase of initial positive values. However, the ζ -potential of DMPC changes from a initial negative value to near zero with increasing La^{3+} concentration. The evolution of the aggregate sizes was followed by light scattering. DPPC and DMPC show a RLCA regimen growth at low La^{3+} concentrations and a DLCA regimen at higher concentrations. In the case of EYPC, the final size of aggregation strongly depends on La^{3+} concentration. The calculated fractal dimension fluctuate in the range 1.8 to 2.1.

An aggregate liposome fractal dimension has been determined using the approaches Diffusion-Limited Cluster Aggregation (DLCA) and Reaction-Limited Cluster Aggregation (RLCA). Obtained values fluctuate in the range 1.8 to 2.1. The evolution of aggregate sizes, followed by light scattering, show RLCA regimen growth at low La^{3+} concentrations and DLCA regimen growth at higher concentrations.

I. INTRODUCTION

Liposomes are spherical, self-closed structures composed of curved lipid bilayers which entrap part of the solvent into their interior.¹ They may consist of one or several concentric bilayers and their size ranges from 20 nm to several micrometers.² They have been the subject of extensive experimental study due to their importance as a drug delivery system and to their value as a model system for more complex biological membranes.³ An important phenomenon, from both a theoretical and applied perspective, is the

membrane-membrane interaction between bilayer membranes. The large structures that liposomes form when they aggregate produce good models for further analysis. These structures are of disorderly nature but can be quite well described in terms of fractal geometry.⁴ The fractal geometry of colloidal particle aggregates plays an important role in their physical behaviour.

Mandelbrot, in 1975, was the first to recognize that many common structures in nature possess their particular complexity. He used the term *fractal* to express the measurement of disorder, corresponding to the degree of irregularity and complexity of the space-filling capacity of the fractal object.^{5,6} For aggregates, the fractal dimension characterizes how the monomers occupy space in the aggregates.⁷ The first experiments that explicitly investigated the fractal nature of aggregates were reported in 1979 by Forrest and Witten. In these experiments, metallic oxide smoke particles were deposited onto transmission electron microscopy (TEM) substrates and their fractal dimensions determined using image analysis techniques.⁸ Nowadays, there are numerous fractal studies characterizing the aggregation of silica,^{9,10} proteins,¹¹⁻¹³ gold,¹⁴ or polystyrene latex.^{7,15,16}

From a theoretical point of view, the introduction of the diffusion-limited aggregation model (DLA) by Witten and Sander¹⁷ in 1981 has improved studies of fractal geometry in colloidal aggregation. In this model, particles are added one at time to a growing cluster or aggregate of particles via random walk trajectories starting from outside of the region occupied by the cluster. The structures generated in this way are random ramified clusters with a determined fractal dimension.¹⁸ An extension of this model, the diffusion-limited cluster aggregation (DLCA),¹⁹⁻²¹ considers that the clusters can interact with each other to form clusters of greater size. In this model the sticking probability is equal to one and all the collisions between particles are effective.

Another model is the reaction-limited cluster aggregation (RLCA)²² for which a large number of collisions are needed before the particles bind. Obviously, in this case the sticking probability is smaller than one. Studies of the aggregates by application of these models have been made in some detail using by simulations and experiments on small-angle neutron scattering²⁴ or by Monte Carlo simulations.^{25,26}

The results have shown that DLCA clusters have a fractal dimension of $df \approx 2.1$ and the kinetics of aggregation is characterized by a power-law growth for the average radius of gyration:

$$R_g \propto t^{1/df} \quad (1)$$

while RLCA clusters have a fractal dimension of $df \approx 1.8$ and the growth is exponential:

$$R_g \propto e^{at} \quad (2)$$

Light scattering has been extensively used in the study of the fractal dimension aggregation. In static light scattering, a beam of light is directed onto a sample and the scattered intensity is measured as a function of the magnitude of the scattering vector, q , with:

$$q = \frac{4\pi n_0 \sin(\theta/2)}{\lambda_0} \quad (3)$$

where n_0 is the refractive index of the dispersion medium, θ is the scattering angle, and λ_0 is the wavelength of the incident light. If the individual particles in a fractal aggregate are monodisperse, the scattered intensity $I(Q)$ by an aggregate can be written as:

$$I(q) \propto P(q)S(q) \quad (4)$$

In the above expression, $P(q)$ is related to the shape of the single particle and $S(q)$ is the inter-particle structure factor, which represents the correlations between different primary particles within an aggregate, assuming there are no correlations between the aggregates themselves. Thus, it describes the spatial arrangement of the particles in an aggregate.⁴ At large values of q , $S(q)$ is approximately equal to 1. The scattered intensity is then dominated by the single particle form factor and only the scattering due to individual particles is seen. At small q values compared to $1/r_0$, but large compared to $1/R_G$, being r_0 the radius of the monomer and R_G the radius of the aggregate (i.e., $1/R_G \ll q \ll 1/r_0$), $P(Q) \approx 1$ and $S(Q)$ reduces to²⁷

$$S(q) \propto q^{-df} \quad (5)$$

Hence, provided that R_G is much larger than r_0 , (4) takes the form of the well-known power-law scattering power-law, i.e.:

$$I(q) \propto S(q) \propto q^{-df} \quad (6)$$

In accordance the previous information, we can calculate the fractal dimension of the aggregates of liposomes by two method using the light scattering.

In previous works we studied the colloidal stability of the liposomes in the presence of different ions under the Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory^{28,29} focusing on the range of concentrations of ions in which the liposomes are stable.^{30,31} We found that liposomes are unstable at trivalent ion concentrations above 0.1-0.2 M due to aggregation processes.^{30,32} The goal of this work is to characterize the aggregation of liposomes composed of different cholines (EYPC, DPPC and DMPC) and to determine their fractal dimension. The aggregation of the liposomes has been induced by the addition of La^{3+} at different concentrations. The fractal dimension was calculated by two methods: following the evolution of the size of the aggregates during the process and measuring the scattering light dispersion of the final aggregates.

II. EXPERIMENTAL METHOD

Materials. L- α -phosphatidylcholine from egg yolk (EYPC) (No. P 3556), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) (No. P 2663), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

(DPPC) (No. P 0763) with 99% purity were purchased from Sigma and used as received. Lanthanum nitrate hexahydrate with a purity of 99.999% was purchased from Aldrich (No. 203548). Organic solvents, methanol and chloroform, were supplied by Aldrich and Merck, respectively. Polycarbonate membranes were purchased from Millipore.

Vesicle preparation. Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by the thin-film hydration method.¹⁵ A solution of phospholipid in chloroform/methanol was dried in a rotary evaporator under a stream of nitrogen. The resultant lipid film was hydrated with double distilled, degassed and deionised water. This mixture was extruded 5 times through polycarbonate filters of 800 nm pore size and 5 times through polycarbonate filters of 200 nm to form LUVs.

Transmission electron microscopy. The morphological examination of the liposomes was performed by transmission electron microscopy (TEM) (CM-12 Philips). The samples were stained with 2% (w/v) phosphotungstic acid and placed on copper grids with Formvar films for viewing by TEM.

Electrophoretic measurements. Electrophoretic measurements of the liposome systems were measured using a Malvern Instruments Zetamaster 5002 by taking the average of five measurements. The cell used was a 5 mm × 2 mm rectangular quartz capillary. The temperature of the experiments was 298.15 ± 0.01 K and was controlled by a Haake temperature controller. The zeta potentials (ζ -potentials) were calculated from the electrophoretic motilities, μ_E , by means of the Henry correction of the Smoluchowski equation:³³

$$\zeta = \frac{3\mu_E\eta}{2\varepsilon_0\varepsilon_r} \frac{1}{f(\kappa a)} \quad (7)$$

where ε_0 is the permittivity of the vacuum, ε_r is the relative permittivity, a is the particle radius, κ is the Debye length and η is the viscosity of water. The function $f(\kappa a)$ depends on the particle shape and for our system was determined by

$$f(\kappa a) = \frac{3}{2} - \frac{9}{2\kappa a} + \frac{75}{2\kappa^2 a^2} \quad (8)$$

which is valid for $\kappa a > 1$.

Light scattering. Static and dynamic light scattering measurements were made at 298.15 ± 0.01 K and an angle of 90° using a Spectrometer Autosizer 4800 from Malvern Instruments equipped with a Uniphase 75 mW Ar laser operating at 488 nm with vertically polarized light. Time correlation was analyzed by a digital autocorrelator PCS7132 from Malvern Instruments and the correlation function obtained was analysed by the CONTIN method. The evolution of the aggregations was followed by measuring the radius of a cluster every 15 seconds. Scattering light measurements were made after the aggregates reached a stationary condition. The range of scattering angle was $10^\circ < \theta < 135^\circ$ and the wave vector was $3 \times 10^{-6} < q < 3.2 \times 10^{-7} \text{ m}^{-1}$.

III. RESULTS AND DISCUSSION

In this study, three different PC cholines were chosen, which have the same zwitterionic headgroup, but different tails. DMPC and DPPC are synthetic lipids with saturated double tails of 14 and 16 carbons, respectively. The EYPC cholines are natural lipids. They are mixtures of saturated and unsaturated lipids of different lengths.² Figure 1 shows the ζ -potential for DPPC, DMPC and EYPC liposomes at different concentrations of La^{3+} . DPPC and EYPC liposomes behave in similar ways. At low salt concentrations, they have a low positive ζ -potential value which increases due to the absorption of La^{3+} ions until a maximum is reached at around 0.1-0.2 M La^{3+} . For higher concentrations, the charge is screened due to the increase in the ionic strength of the medium and the ζ -potential values decrease for both types of liposomes. The DMPC liposomes have an initial negative ζ -potential value which decreases (in absolute value) due to the strong absorption of the positive La^{3+} ions to the negative surface of the DMPC liposomes. For concentrations above 10^{-4} M of La^{3+} , DMPC liposomes have a ζ -potential value near zero.

The ζ -potential values play an important role in the colloidal stability of liposomes. According to the classical DLVO theory, the stability of the particles in solution is predicated on the notion that two independent types of forces govern the interaction between similar colloidal particles immersed in polar solutions: attractive van der Waals forces and repulsive electrostatic forces.

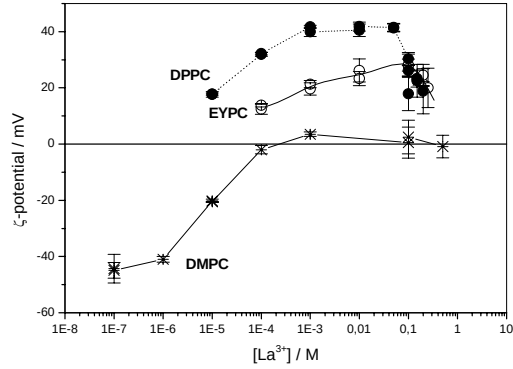


FIG.1. Variation of ζ -potential with the La^{3+} concentration for EYPC (○), DPPC (●) and DMPC (*) liposomes.

In liposomes with ζ -potential near zero, the repulsive electrostatic barrier disappears and the interaction between liposomes is governed only by the attractive van der Waals forces, as observed in a RLCA or DLCA aggregation regimen.

Figure 2 shows the cluster sizes at different La^{3+} concentrations for each type of liposome measured when the stationary conditions have been reached. A drastic increase in the size of the liposomes indicates the threshold of the aggregation. Consistent with the classical DLVO theory, aggregation initiates when the ζ -potential approaches zero as Figures 1 and 2 show.

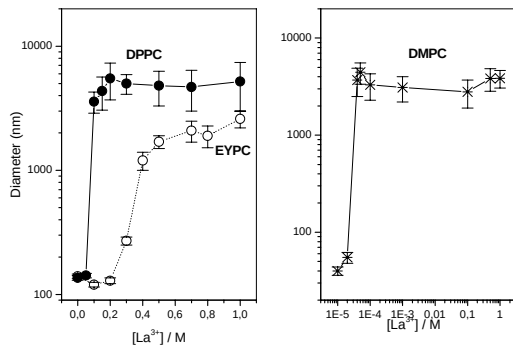


FIG. 2. Variation of the diameter of the aggregates with the La^{3+} concentration for EYPC (○), DPPC (●) and DMPC (*) liposomes.

The evolution of the size of the aggregates was followed by light scattering at different La^{3+} concentrations for three types of liposomes. The salt solutions were added 90 seconds after measuring was started. Figure 3 shows these results. DPPC liposomes exhibit the two typical types of aggregation behavior. For 0.1 and 0.12 M of La^{3+} , the growth in size follows the exponential (2), typical of the RLCA regimen. At higher concentrations, the DLCA regimen occurs and growth follows the power-law of (1). Similar results were observed for DMPC liposomes although no RLCA regimen was observed. The EYPC results are of special interest because these liposomes behaved in unexpected ways: the final sizes of these aggregations seemed to depend on the concentration of La^{3+} . This unusual behavior is of great relevance because it allows the size of *stable aggregates* of EYPC liposomes to be controlled.

Once the liposomes were aggregated, the angular scattering light dispersed by the clusters was measured. Figure 4 shows the scattering intensity as a function of vector q for liposomes of EYPC in the presence of different La^{3+} concentrations. These measurements were also taken for DPPC and DMPC (data not shown). Following (1) and (6), the fractal dimension of the aggregates can be calculated from Figures 3 and 4 by two different methods.

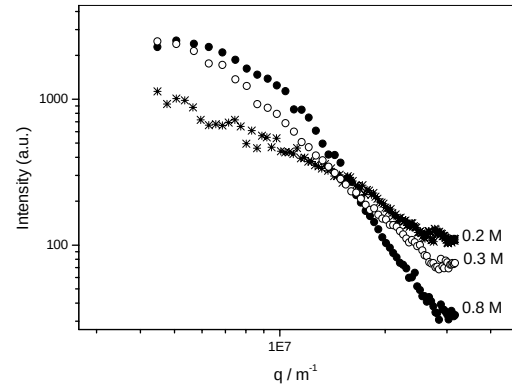


FIG. 4. Scattering intensity of EYPC liposomes in presence of 0.2 M (*), 0.3 M (○) and 0.8 M (●) of La^{3+} .

Figures 5, 6 and 7 show the fractal dimensions for DPPC, DMPC and EYPC liposomes depending on the concentration of La^{3+} .

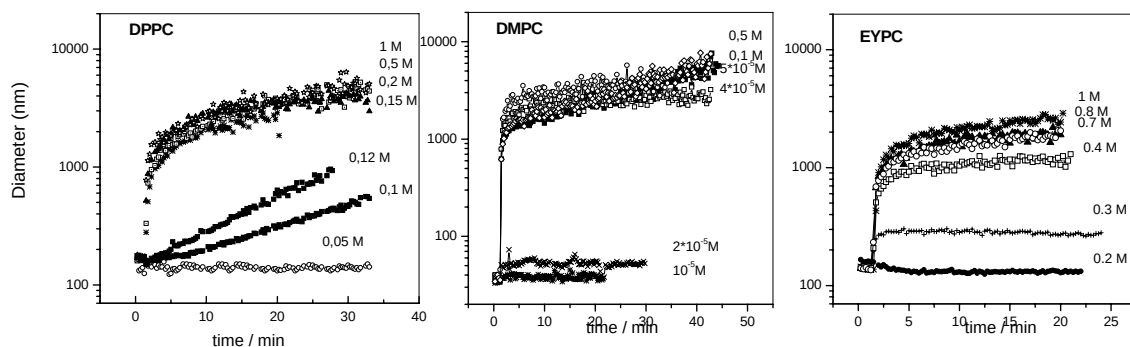


FIG. 3. Time evolution of the diameter of the aggregates for DPPC, DMPC and EYPC liposomes

The values of the fractal dimensions fluctuate within the range predicted by computer simulations. Some variations from the computed simulated values were expected. The universal DLCA and RLCA regimens were studied under ideal conditions and the iterations between clusters or between parts of clusters were not taken into account. However, there is a tendency to decrease from values near 2.1 (RLCA) to lower values near 1.8 (DLCA) as the La^{3+} concentration increases.

When the charge of the liposome is totally screened and the liposomes move like Brownian particles, there is a high probability that, as the particle moves from an exterior point to an interior point of a cluster, it will intercept an arm of the cluster. Therefore, the growing arms will screen the interior of the cluster from incoming particles, resulting in an open structure with a low fractal dimension around 1.8.^{34,35}

If the charge of the liposome is not totally screened and there is some electrostatic repulsion between liposomes, the sticking probability is less than 1 and the clusters will have to collide many times before they stick to each other.³⁶ This situation increases the possibility that the liposomes will reach interior point of the clusters, resulting in compact and spherical structures with a high fractal dimension around 2.1. Figures 8 and 9 are TEM micrographs of EYPC liposomes that illustrate two different regimes of aggregation. Other authors have found similar values by other techniques (Optical Microscopy³⁷ or AFM³⁸).

We have focused on the characterization of the clusters of EYPC liposomes due to their unusual behavior in the aggregation process. It was confirmed that the aggregates are reversible by adding water to the solution. Figure 10 shows that clusters return to their initial size when water is added if the final concentration of La^{3+} does not completely screen the charge of the liposomes. This effect only occurs with EYPC liposomes but not with DPPC or DMPC (inset Figure 10). These results suggest that EYPC liposome aggregation occurs at a secondary minimum of the DLVO potential.³⁹

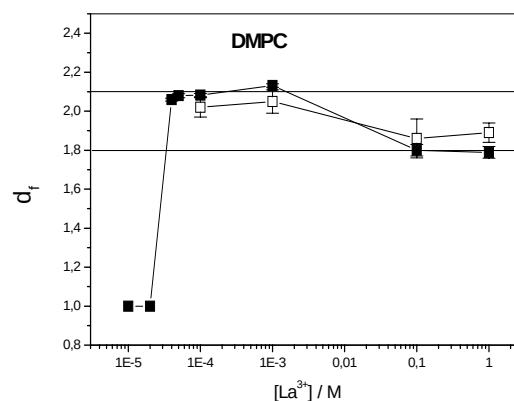


FIG. 5. Fractal dimension of the aggregates of DMPC liposomes at different concentrations of La^{3+} calculated by scattering intensity measurements (■) and by time evolution of the diameters (□) of the clusters.

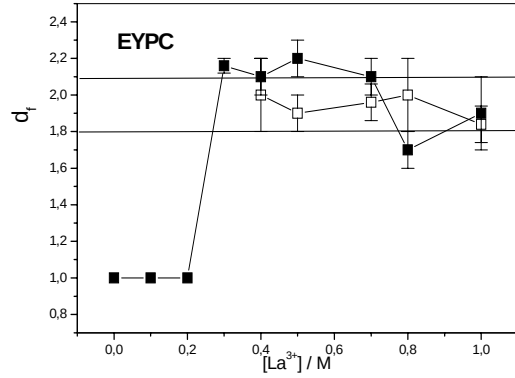


FIG. 6. Fractal dimension of the aggregates of EYPC liposomes at different concentration of La^{3+} calculated by scattering intensity measurements (■) and by time evolution of the diameters (□) of the clusters.

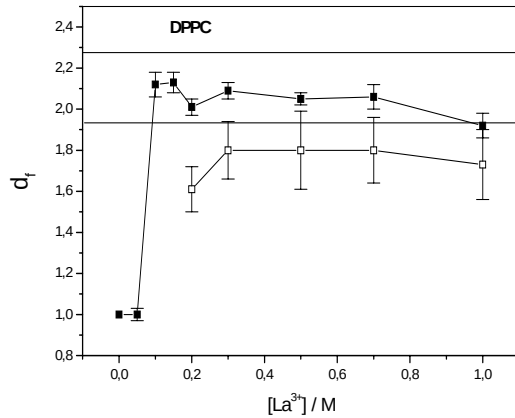


FIG. 7. Fractal dimension of the aggregates of DPPC liposomes at different concentration of La^{3+} calculated by scattering intensity measurements (■) and by time evolution of the diameters (□) of the clusters.

In a previous work³⁰ we found that when the electrostatic forces are totally screened, the total interaction potential between two liposomes consists of the sum of the van der Waals potential and the hydration potential. In this case the hydration force is short-range, unlike the electrostatic force, so the total potential can display one secondary potential minimum.⁴⁰ The hydration force on EYPC is high enough to display a secondary minimum due to the

heterogeneous composition of saturated and unsaturated lipids which develop the existence of long-wavelength undulations of bilayers, local fluctuations in the bilayer thickness, and an increase in the motion of the hydrated head group.^{40,41} Theoretical calculations^{41,42} have shown that the secondary minimum is located around 1-2 nm away from the liposomes surface. Ions located between two liposomes are rather easily removed by dilution with water. On the other hand, DPPC or DMPC liposomes aggregate at the primary potential minimum on the liposome's surface; hence, dilution with water has no effect on the dissociation of the aggregates.

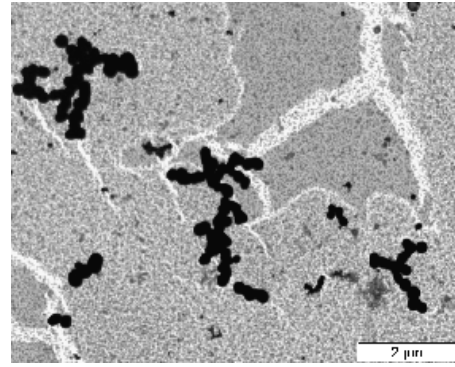


FIG. 8. TEM photo of DPPC liposomes in the presence of 0.7 M of La^{3+} . DLCA clusters with open structures

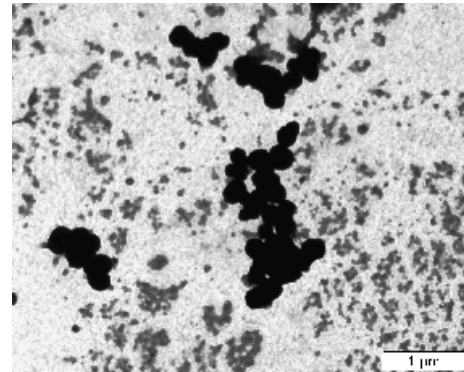


FIG. 9. TEM photo of DPPC liposomes in the presence of 0.2 M of La^{3+} . RCLA clusters with closed and compact structures.

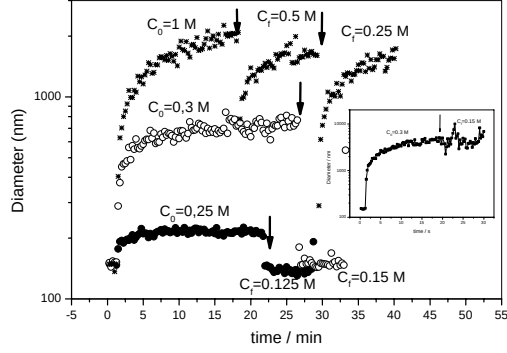


FIG. 10. Time evolution of the aggregates of EYPC liposomes at 0.25 M (●), 0.3 M (○) and 1 M (✱) of La^{3+} . The arrows indicate the time when water was added to dissociate the aggregates.

As seen in Figures 3 and 11, there is another unusual behaviour in the aggregation process of the EYPC liposomes. Usually, unstable liposomes aggregate in an infinite cluster in finite time (Figure 3). However, in the lanthanum concentration range, 0.3 M – 0.7 M, the creation of “stationary” clusters of well-defined sizes that remain stable over time were observed.

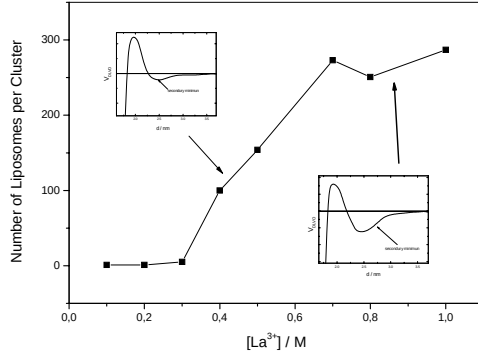


FIG. 11. Variation of the number of liposomes aggregated with the concentration of La^{3+} ions. The insets represent the secondary minimum of the DLVO potential at high and intermediate concentrations.

The number of liposomes aggregated in the clusters can be calculated for each La^{3+} concentration using the equation²³

$$n = \left(\frac{R_G}{r_o} \right)^{d_f}$$

Results are plotted in the Figure 11.

According to the DLVO theory, the depth of the secondary minimum of the potential increases at higher salt concentrations. At intermediate concentrations (0.3 M–0.6 M) the depth of the minimum is small enough to disappear when the cluster reaches a critical number of liposomes. Figure 12 also shows that the depth of the secondary minimum does not decrease with the diameter of the cluster, so, we conclude that some additional factor, such as fluctuation of surface geometry or steric forces, which are not considered in the DLVO theory, should be taken into account to describe the existence of “stationary” clusters of EYPC liposomes.^{43,44}

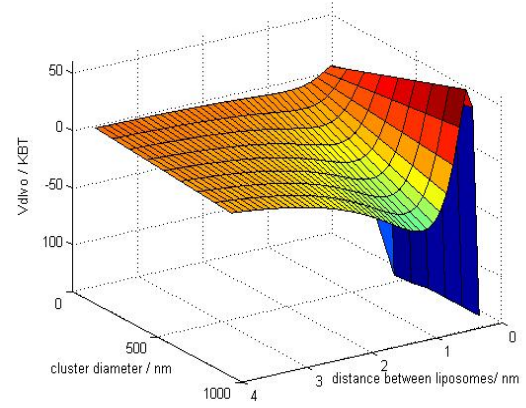


FIG. 12. DLVO potential simulation as a function of the distant between liposomes and the cluster diameter.

IV. CONCLUSIONS

In this research, the fractal dimension of the liposome aggregations of three different types of systems, EYPC, DPPC and DMPC in the presence of La^{3+} have been determined. For this determination, two methods have been used, aggregation kinetics and the light scattering. Variations of ζ -potential associated with La^{3+} concentration were similar for EYPC and DPPC, with a positive value which increases until 20-40 mV. However, DMPC has an initial negative value which decreases (in absolute value) to reach zero. In this case, the interaction between liposomes is governed only by the attractive

van der Waals forces. Evolution of the aggregate sizes, followed by light scattering, shows typical behavior for DPPC and DMPC. In the case of EYPC, the final sizes of the aggregates seem to depend on the La^{3+} concentration, which permits the control of the size of stable aggregates of EYPC liposomes. The obtained fractal dimensions of the aggregates fluctuates within the range of 1.8 to 2.1.

EYPC liposomes demonstrate unusual behavior in the aggregation process; One, the clusters return to initial size when water is added, if the final concentration of La^{3+} does not completely screen the liposome charges. Two, the hydration force on EYPC is enough to display a secondary potential minimum. Three, the EYPC clusters are stables with the time.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the financial support from Spanish “Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional de Investigación (I+D+i), MAT2005-02421” and from “European Regional Development Fund, (ERDF)”. P.M. is an assistant researcher of the “Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET)”. P. M. thanks “Fundación Antorchas, Argentina (project 4308-110)”, for her grant.

REFERENCES

- ¹M. T. Roy, M. Gallardo, and J. Estelrich, J. Colloid Interface Sci. **206**, 512 (1998).
- ²D. D. Lasic, *Liposomes. From Physics to Applications* (Elsevier, Amsterdam, 1993).
- ³J. Pencer, G. F. White, and F. R. Hallet, Biophys. J. **81**, 2716 (2001).
- ⁴J. L. Burns, Y. Yan, G. J. Jameson, and S. Biggs, Langmuir **13**, 6413, (1997).
- ⁵B. Mandelbrot, *The Fractal Geometry of Nature* (Freeman, San Francisco, CA, 1982).
- ⁶N. Lesmoir-Gordon, W. Rood, and R. Edney, *Introducing Fractal Geometry* (Cambridge, England, 2000).
- ⁷S. Tang, Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects **157**, 185, (1999).
- ⁸S. R. Forrest, and T. A. Witten Jr, J. Phys. A: Math. Gen. **12**, L109 (1979).
- ⁹D. W. Schaefer, J. E. Martin, P. Wiltzius, and D. S. Cannell, Phys. Rev. Lett. **52**, 2371 (1984).
- ¹⁰T. Sintes, R. Toral, and A. Chakrabarti, J. Phys. A: Math. Gen. **29**, 533 (1966).
- ¹¹K. Onuma, N. Kanzaki, and T. Kubota, J. Phys. Chem. B **107**, 11224 (2003).
- ¹²J. Schüler, J. Frank, W. Saenger, and Y. Georgalis, Biophys. J. **77**, 1117 (1999).
- ¹³M. Panouillé, D. Durand, T. Nicolai, E. Larquet, and N. Boisset, J. Colloid Interface Sci. **287**, 85 (2005).
- ¹⁴J. Liu, W. Y. Shih, M. Sarikaya, and I. A. Aksay, Phys. Rev. A **41**, 3206 (1990).
- ¹⁵I. Katsuhiko, and I. Toshiaki, J. Opt. A: Pure Appl. Opt. **2**, 505 (2000).
- ¹⁶D. Majolino, F. Mallamace, P. Migliardo, N. Micali, and C. Vasi, Phys. Rev. A **40**, 4665 (1989).
- ¹⁷T. A. Witten and L. M. Sander, Phys. Rev. Lett. **47**, 1400 (1981).
- ¹⁸P. Meakin, Phys. Scr. **46**, 295 (1992).
- ¹⁹M. Kolb, R. Botet, and R. Julien, Phys. Rev. Lett. **51**, 1123 (1983).
- ²⁰L. M. Sander, Z. M. Cheng, and R. Richter, Phys. Rev. B **28**-11, 6394 (1983).
- ²¹P. Meakin, Phys. Rev. Lett. **51**, 1119 (1983).
- ²²P. Meakin, Phys. Rev. A **27**, 1495 (1983).
- ²³M. Carpineti, F. Ferri, M. Giglio, E. Paganini, and U. Perini, Phys. Rev. A **42**, 7347 (1990).
- ²⁴A. Hasmy, M. Foret, J. Pelous and R. Jullien, Phys. Rev. B **48**, 9345 (1993).
- ²⁵M. Rotureau, J. C. Gimel, T. Nicolai, and D. Durand, Eur. Phys. J. E **15**, 133 (2004).
- ²⁶M. Rotureau, J. C. Gimel, T. Nicolai, and D. Durand, Eur. Phys. J. E **15**, 141 (2004).
- ²⁷J. Teixeira, J. Appl. Crystallogr. **21**, 781 (1988).
- ²⁸B. Derjaguin, and L. D. Landau, Acta Physicochim. URSS **14**, 633 (1941).
- ²⁹E. J. B. Verwey, and J. Th. G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids* (Elsevier, Amsterdam, 1948).
- ³⁰J. Sabín, G. Prieto, P. Messina, J. M. Ruso, R. Hidalgo-Alvarez, and F. Sarmiento, Langmuir **21**, 10968 (2005).
- ³¹J. Sabín, J. M. Ruso, A. González-Pérez, G. Prieto, and F. Sarmiento, Colloids Surf. B: Biointerfaces **47**, 64 (2006).

- ³²J. Sabín, G. Prieto, S. Sennato, J. M. Ruso, R. Angelini, F. Bordini, and F. Sarmiento, *Phys. Rev. E* **74**, 031913-1 (2006).
- ³³J. R. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science* (Academic Press, London, 1981).
- ³⁴P. Meakin, *Phys. Rev. A* **29**, 997 (1984).
- ³⁵P. Meakin *Phys. Rev. B* **29**, 3722 (1984).
- ³⁶N. J. Lynch, P. K. Kilpatrick, and G. R. Carbonell, *Biotech. Bioeng.* **50**, 151 (1996).
- ³⁷B. Yang, K. Furusawa, and H. Matsumura, *Langmuir* **19**, 9023 (2003).
- ³⁸A. S. Muresan, H. Diamant, and K. Y. C. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 6951 (2001).
- ³⁹S. Nir, J. Bentz, and N. Düzgünes, *J. Colloid Interface Sci.* **84**, 266 (1981).
- ⁴⁰J. Marra, and J. Israelachvili, *Biochemistry* **24**, 4608 (1985).
- ⁴¹T. Inoue, H. Minami, and R. Shimozaawa, *J. Colloid Interface Sci.* **152**, 493 (1992).
- ⁴²H. Matsumura, K. Watanabe, and K. Furusawa, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **98**, 175 (1995).
- ⁴³F. Bordini, and C. Cametti, *Colloid Surf. B: Biointerfaces* **26**, 341 (2002).
- ⁴⁴L. Stamatatos, R. Leventis, M. J. Zuckermann, and J. R. Silvius, *Biochemistry* **27**, 3917 (1988).

Fractal aggregates induced by liposome-liposome interaction in the presence of Ca^{2+}

Juan Sabín, Gerardo Prieto, Juan M. Ruso and Félix Sarmiento

Biophysics and Interfaces Group, Department of Applied Physics, Faculty of Physics, University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Abstract. We present a study of the fractal dimension of clusters of large unilamellar vesicles (LUVs) formed by egg yolk phosphatidylcholine (EYPC), dimyristoylphosphocholine (DMPC) and dipalmitoylphosphocholine (DPPC), induced by Ca^{2+} . Fractal dimensions were calculated by application of two methods, measuring the angular dependency of the scattered light by the clusters and following the cluster sizes evolution. In all cases the fractal dimensions fell in the range of 2.1 to 1.8, corresponding to two regimes, Diffusion-Limited Cluster Aggregation (DLCA) and Reaction-Limited Cluster Aggregation (RLCA). Whereas DMPC clusters showed a typical transition from RLCA to DLCA aggregation, EYPC exhibited an unusual behaviour, since the aggregation was limited for higher concentration than critical aggregation concentration. The behaviour of DPPC was intermediate, with a transition from RLCA to DLCA with cluster sizes depending on Ca^{2+} concentration. Studies on the reversibility of the aggregates show that EYPC and DPPC clusters can be re-dispersed by dilution with water. DMPC do not presented reversibility. The reversibility is an evidence of the existence of secondary minima in the DLVO potential between two liposomes. To predict these secondary minima a correction of DLVO model was necessary, taking into account a repulsive force of hydration.

1 Introduction

Small particles can aggregate forming clusters. The mechanism of cluster formation is of interest from both theoretical and applied point of view. Processes as dendritic growth in physics [1], flocculation of colloids and formation of gels in chemistry [2,3], kinetics of polymerisation in polymer science [4], growth of tumors in medicine [5] and cloud formation and coagulation of smoke particles in meteorology and ecology [6,7,8] can be easily understood by the characterization of these clusters.

The structure of the clusters is flimsy but has been well characterized by simulations and the results permit to describe them as fractals [9].

Witten and Sanders [8,10] associate the complicated shapes of the clusters with the proliferation of instabilities induced by a diffusion-limited process. They postulate a model, the diffusion-limited aggregation model (DLA), which simulates such diffusion. Those simulations consist on an initial state with a seed particle at the origin of a lattice and a second particle at some random site at large distance from the origin. This particle walks randomly until it visits a site adjacent to the seed. Then the walking particle becomes part of the cluster. Another particle is now introduced at a random distant point, and it walks

randomly until it joints the cluster, and so forth. If a particle touches the boundaries of the lattice in its random walk it is removed and another introduced. The result is scale-invariant objects with fractal dimension in the range 1.66 to 1.89.

Meakin improved that model allowing the cluster-cluster aggregation [11]. In his model, the diffusion-limited cluster aggregation (DLCA) model, the clusters growth is controlled by diffusion and every collision between particles result in the formation of a permanent contact. The fractal dimensionality is insensitive to the sticking probability. Computer simulations of this model yield to a fractal dimension of 1.8 in three dimensions.

A simple model for the growth of the clusters is the Eden model (RLCA) [12]. It is a lattice model in which particles are added one at a time at random to sites adjacent to occupied sites. This process produces a relatively compact cluster whose density correlations are independent of distance in the limit of large size. The growth is limited by the reaction kinetics at the interface of the growing clusters and only a small fraction of particle collisions leads to permanent contact. In this case the computer simulations give a fractal dimension of 2.1 in three dimensions.

To study the complete evolution of the aggregating particles, from initial flocculation through the gel transition to the fully aggregates gels, lattice simulations of both DLCA and RLCA models have been reported by Rottureau et al. [13,14]. As main conclusion these

researchers find that the growth rate of large clusters is a universal function of time reduced by the gel time.

The two models of aggregation lead to two different kinds of clusters. Clusters obtained in the DLCA regime are very open structures because the particles stick where the collisions occurs and the probability to collide branches is higher than to penetrate to the centre of the cluster. On the contrary, in the RLCA regime, the particles have to collide with the cluster several times before stick increasing the possibility of the particle to get the centre of the cluster. The resulting structure is a compact and dense cluster.

Computer simulation also reveals that the cluster size grow differently in DLCA and RLCA regimes. DLCA clusters grow faster since all collisions are effective, following a power law for the average radius of gyration, R_g [7]:

$$R_g \propto t^{1/d_f} \quad (1)$$

where t is the time and d_f the fractal dimension.

The growth of the RLCA clusters follows an exponential law [15]:

$$R_g \propto e^{\alpha t} \quad (2)$$

where α is a constant which depends on the sticking probability (P).

An interesting aggregation is that occurs between liposomes. Liposomes are spherical, self-closed structures composed by curved lipid bilayers which entrap part of the solvent into their interior [17]. Their sizes are in the range of 20 nm to several micrometers [17]. The way the structure of liposomes mimics that of cell membranes enables to serve a model for physical and biochemical studies [18-21]. Then the characterization of the aggregation process of liposomes is of paramount importance for their applications in bioscience.

Calcium is known to be an essential requirement in many biological membrane fusion and a wide bibliography exists about the mechanism of its action [22]. Most these studies concern with negatively charged liposomes [23-25], made with phospholipids with charge or by introduction of different charged components into the bilayer. However, information on the effect of Ca^{2+} in the aggregation of zwitterionic liposomes is scarce. This paper investigates the mechanism of aggregation of three types of these liposomes, egg yolk phosphatidylcholine (EYPC), dimyristoylphosphocholine (DMPC) and dipalmitoylphosphocholine (DPPC) in the presence of Ca^{2+} . The three have the same zwitterionic head but different tails. DMPC and DPPC have 14 and 16 carbon atoms respectively and EYPC is a mixture of cholines.

The aim of this study is to characterize the dimension fractal of the liposome aggregation and to relate it with the predictions that the DLVO theory [26,27] of colloidal stability made.

2. Experimental

2.1 Materials

1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3- Phosphocholine (DMPC) (No. P 2663), 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-Phosphocholine (DPPC) (No. P 0763) and L- α -Phosphatidylcholine from egg yolk (EYPC) (No. P 3556), were purchased from Sigma with a purity of 99 % and used as received. Calcium nitrate hexahydrate was purchased by Aldrich (No. 203548) with a purity of 99.999%. Organic solvents methanol and chloroform were from Aldrich and Merck respectively. Polycarbonate membranes were purchased from Millipore.

2.2 Liposomes preparation

Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by the thin-film hydration method. A solution of phospholipid in chloroform/methanol was evaporated in a rotary evaporator to dryness under a stream of nitrogen and the resultant lipid film was hydrated with double distilled, degassed and deionised water. This mixture was extruded 5 times through polycarbonate filters of 800 nm pore size and 5 times through polycarbonate filters of 200 nm to form LUVs. The final result is a solution of liposomes of approximately 150 nm diameter and polydispersity below 0.15.

2.3. Electrophoretic mobilities

Zeta potential (ζ -potential) of the liposomes was measured using a Malvern Instruments Zetamaster 5002 by taking the average of five measurements at stationary level. The cell was a 5 mm $\times$ 2 mm rectangular quartz capillary. The temperature of the experiments was 298.15 ± 0.01 K, controlled by a Haake temperature controller.

2.4 Transmission electron microscopy

The morphological examination of the liposomes was performed by transmission electron microscopy (TEM) (CM-12 Philips). The samples were stained with 2% (w/v) phosphotungstic acid and placed on copper grids with Formvar films for viewing by TEM.

2.5 Light scattering

Static light scattering have been extensively used in experimental studies of aggregation to obtain was performed to obtain the fractal dimension of the clusters. In static light scattering, a beam of light is directed onto a sample and the scattered intensity is measured as a function of the magnitude of the scattering vector, q :

$$q = \frac{4\pi n_0 \sin(\theta/2)}{\lambda_0} \quad (3)$$

where n_0 is the refractive index of the dispersion medium, θ is the scattering angle, and λ_0 is the wavelength of the incident light.

If the individual particles in a fractal aggregate are monodisperse, the scattered intensity $I(q)$ produced by an aggregate can be written as [28,29]

$$I(q) \propto P(q)S(q) \quad (4)$$

where $P(q)$ is related to the shape of the single particle and $S(q)$ is the interparticle structure factor which represents the correlations between different primary particles within an aggregate, assuming there are no correlations between the aggregates themselves. Thus, it describes the spatial arrangement of the particles in an aggregate.

At large values of q , $S(q)$ is approximately equal to 1. The scattered intensity is then dominated by the single particle form factor and only the scattering due to individual particles is seen. At q values small compared to $1/r_0$, but large compared to $1/R_g$, being r_0 the radius of the monomer and R_g the radius of the aggregate (i.e., $1/R_g \ll q \ll 1/r_0$) [30,31], $P(q) \approx 1$ and $S(q)$ reduces to [32]:

$$S(q) \propto q^{-d_f} \quad (5)$$

Hence, provided that R_g is much larger than r_0 , equation 4 becomes the well-known power-law scattering equation:

$$I(q) \propto S(q) \propto q^{-d_f} \quad (6)$$

Accordingly, the fractal dimension of the aggregates of liposomes can be computed by two different methods. Dynamic light scattering can be used to monitor the growing of the cluster along time and to calculate the fractal dimension of the DLCA cluster using Equation (1). Static light scattering to measure the angular dispersion of the clusters and to calculate the fractal dimension by using Equation (6). Of course, it

would be desirable to obtain information of the fractal dimension by both methods with the same sample.

Light scattering measurements were made at 298.15 ± 0.01 K using a Spectrometer Autosizer 4800 from Malvern Instruments equipped with a Uniphase 75 mW Ar laser operating at 488 nm with vertically polarized light. Time correlation was analysed by a digital autocorrelator PCS7132 from Malvern Instruments. The kinetics of the aggregation was followed by measuring the radius of the clusters every 15 seconds by dynamic light scattering (DLS). The static light scattering (SLS) measurements were made after the aggregates reached a stationary condition. The range of scattering angles was $10^\circ \langle \theta \rangle 135^\circ$ and the wave vector range used to calculate the fractal dimension was $3 \times 10^{-6} \langle q \rangle 10^{-7} \text{ m}^{-1}$.

3 Results and Discussion

In order to study the aggregation of the liposomes composed of DMPC, DPPC and EYPC, the critical aggregation concentration (c.a.c.) of each system in the presence of Ca^{2+} should be known. Under the classical DLVO theory [26,27], liposome suspension becomes unstable when no electrostatic repulsion exists. The van der Waals attractive forces are responsible for the aggregation when two or more liposomes are near enough. The variation of the ζ -potential measurement gives an estimation of the screening of the electrostatic repulsion. Figure 1 shows the variation of the zeta potential with the Ca^{2+} concentration for the liposomes composed by different phospholipids. DPPC and EYPC liposomes in absence of salt have an initial negative zeta potential around -15 mV, the adsorption of small concentrations of Ca^{2+} produces an immediate inversion in the sign of the ζ -potential to positive potential. For higher concentrations the change are screened due to the high ionic strength of the medium and the zeta potential approximates to zero. DMPC has an initial negative ζ -potential around -40 mV and no change of sign of the ζ -potential occurs in that range of concentrations but the adsorption of Ca^{2+} reduces the absolute value of the ζ -potential of the liposomes by increasing the concentration.

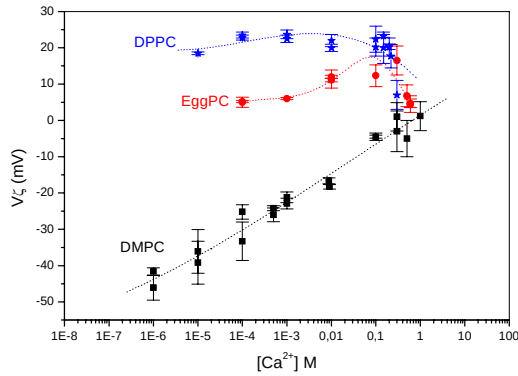


Fig. 1. ζ -potential of DMPC (■), DPPC (*) and EYPC (●) liposomes in the presence of different Ca^{2+} concentrations

Figure 2 shows the diameter of clusters of liposomes at different concentrations of Ca^{2+} for DMPC, DPPC and EYPC. The high electrostatic barrier (ζ -potential) of the liposomes at low concentrations of Ca^{2+} avoids aggregation (see figure 1) and maintains their sizes around 150 nm. The drastic increase in the diameter determines the c.a.c. for each kind of liposomes: 3×10^{-3} M for DMPC, 0.17 M for DPPC and 0.2 M for EYPC.

The c.a.c. values coincide with the reduction of the ζ -potential shown in figure 1 as well as the prediction of the Schulze-Hardy rule [33] using the c.a.c. when La^{3+} is added instead of Ca^{2+} [34].

In order to perform a fractal study of the aggregation of DMPC, DPPC and EYPC liposomes, the evolution of the size of the clusters along time and the light scattering were measured by DLS and SLS respectively.

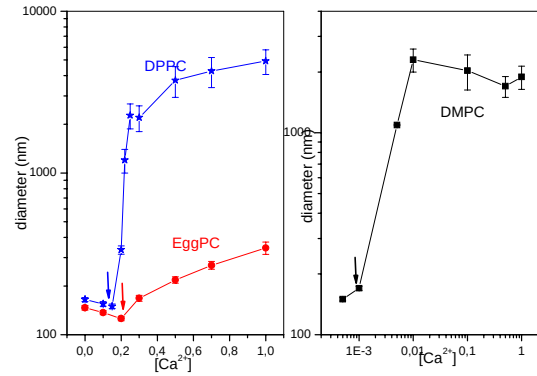


Fig. 2. Diameters of the clusters of DMPC (■), DPPC (*) and EYPC (●) liposomes at different Ca^{2+} concentrations. The arrows indicate the c.a.c.: $1 \cdot 10^{-3}$ M for DMPC; 0.17 M for DPPC and 0.2 M for EYPC.

DMPC shows the typical transition from the RLCA to the DLCA aggregation. For concentrations below 0.5×10^{-3} M, the liposomes remain stable with no changes in the size. At concentrations between 0.5×10^{-3} and 10^{-2} M, where the ζ -potential is still around 15 mV, the growing of clusters is slow and exponential, as a typical RLCA aggregation (Equation (2)). For higher concentrations, the increase follows equation 1 and no differences between Ca^{2+} concentrations can be noticed.

EYPC liposomes have an unusual behavior since the aggregation is limited for higher concentrations than c.a.c. The clusters reach a maximum size which depends on the Ca^{2+} concentrations and, after this size, the cluster becomes stable and no other liposomes aggregate to the clusters. DPPC liposomes show an intermediate behavior. There is a transition from RLCA to DLCA aggregation but the size reached by the clusters depends on the Ca^{2+} concentration.

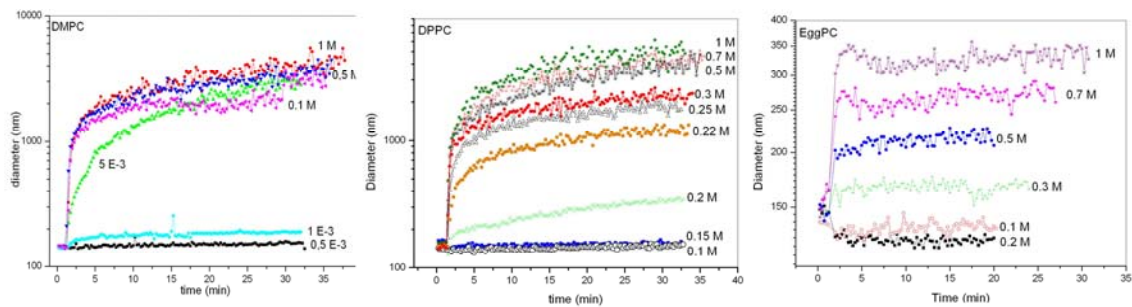


Fig. 3. Evolution of the size of the cluster of DMPC, DPPC and EYPC liposomes along time. The aggregation was induced by the addition of different concentrations of Ca^{2+} 90 seconds after starting the measurements.

For concentrations lower than 0.15 M, DPPC liposomes are stable but a slight decrease in size can be observed due to osmotic forces. At 0.2 M the liposomes have a ζ -potencial low enough to allow aggregation ($\zeta \sim 15\text{mV}$) but P is below 1 and the liposomes aggregate under the RLCA regime. For higher concentrations DPPC liposomes aggregate under the DLCA regime but the final clusters are bigger as the concentration of Ca^{2+} increases. The fractal dimensions of the DLCA clusters, calculated from the evolution of size along time with equation 1, are shown in Tables 1, 2 and 3.

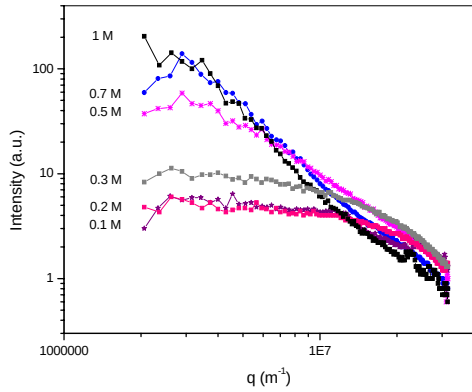


Fig. 4. Light scattering intensity as a function of the vector q for DPPC liposomes at different concentrations of Ca^{2+} .

Once the clusters reach a maximum size and assuring that no sedimentation occurs, we have measured the light scattering in order to determine the fractal dimension using Equation (6). Figure 4 plots, as an example, the light scattering intensity as a function of the vector q for DPPC liposomes in presence of different concentrations of Ca^{2+} . By this method we can calculate the fractal dimension in both the RLCA and DLCA regimes. Results are shown in Tables 1, 2 and 3.

$[\text{Ca}^{2+}] \text{ M}$	Regimen	d_f^t	d_f^0
0	Stable	1 ± 0.05	1 ± 0.05
$1 \cdot 10^{-3}$	Stable	2.12 ± 0.10	1.99 ± 0.2
$5 \cdot 10^{-3}$	RLCA	2.02 ± 0.13	1.98 ± 0.2
0.01	RLCA	1.89 ± 0.22	1.75 ± 0.16
0.5	DLCA	1.91 ± 0.14	2.00 ± 0.14
0.7	DLCA	1.8 ± 0.12	1.95 ± 0.12
1	DLCA	1.85 ± 0.20	1.89 ± 0.21

Table 1. Fractal dimension of DMPC liposomes for different Ca^{2+} concentrations. d_f^t are the values calculated by evolution of the size of clusters with tiem and d_f^0 the values calculated by the angle-scattering measurements.

Roughly, we can affirm that the fractal dimension maintains the expected values from the simulations. In some cases a clear decrease of the fractal dimension from 2.1 to 1.8 can be observed, when Ca^{2+} concentration increases. This suggests that the clusters are more compact and dense if the charge of the liposomes is not completely screened and $P < 1$.

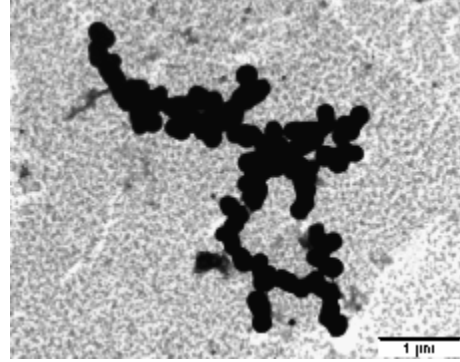


Fig. 5. TEM micrographs of a cluster of DDPC liposomes in the presence of 0.2 M of Ca^{2+} : A branched and open aggregate typical of DLCA aggregation regime.

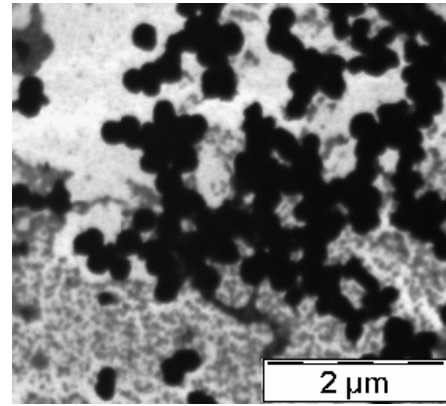


Fig.6. TEM micrographs of a cluster of DDPC liposomes in the presence of 0.7 M of Ca^{2+} : A compact and dense aggregate typical of RLCA aggregation regime.

Those are the typical clusters of the RLCA regime. By increasing the Ca^{2+} concentration, the electrostatic repulsion disappears and all collisions are completely effective ($P=1$). In this case, we obtain branched clusters which are typical of the DLCA regime. Figures 5 and 6 show two TEM micrographs which illustrate those two kinds of clusters.

In a previous work we have studied the aggregation of this kind of liposomes induced by the addition of

La^{3+} and we found similar anomalous behaviour in the aggregation of EYPC liposomes [35].

$[\text{Ca}^{2+}]$ M	Regime	d_f^t	d_f^0
0	Stable	-	-
0.1	Stable	-	0.98 ± 0.02
0.15	Stable	-	-
0.2	RLCA	2.18 ± 0.07	2.14 ± 0.02
0.22	DLCA	2.15 ± 0.06	2.07 ± 0.02
0.25	DLCA	1.9 ± 0.10	1.98 ± 0.02
0.3	DLCA	2.1 ± 0.21	2.1 ± 0.03
0.5	DLCA	1.98 ± 0.14	1.97 ± 0.03
0.7	DLCA	1.84 ± 0.15	2.04 ± 0.03
1	DLCA	1.77 ± 0.16	2.00 ± 0.03

Table 2. Fractal dimension of the DPPC liposomes for different Ca^{2+} concentrations calculated by time evolution of the size of clusters (d_f^t) and measuring the angle-scattering (d_f^0).

$[\text{Ca}^{2+}]$ M	Regime	d_f^t	d_f^0
0	Stable	-	-
0.1	Stable	-	-
0.2	Stable	-	-
0.3	?	-	1.643 ± 0.2
0.5	?	-	2.10 ± 0.15
0.7	?	-	1.99 ± 0.09
1	?	-	2.06 ± 0.08

Table 3. Fractal dimension of the cluster of EYPC liposomes for different Ca^{2+} concentrations. It was not possible to evaluate the d_f^t values due to small cluster sizes in figure 3. Due to the same reason, d_f^0 values were calculated in the same q range than cluster of DMPC liposomes.

Also, we have found that the aggregation occurs in a secondary minimum of the DLVO potential and we have pointed to the hydration forces as probably responsible of favouring the existence of secondary minima [36,37]. The hydration forces are more pronounced in EYPC liposomes because the EYPC cholines are a mixture of lipids of different length [38]. Therefore, the liposomes surfaces have more irregularities where water molecules can penetrate.

The reversibility of the aggregations of the liposomes has been investigated by diluting the cluster adding water. When water was added to the system having EYPC clusters, they were destroyed indicating that the aggregation was reversible (Figure 7). Therefore, the aggregation of EYPC liposomes must occur in a secondary minimum. Thus, the dilution of

Ca^{2+} reduces the charge screening increasing the inter-liposome repulsion. The results are similar than in Figure 3. The arrows indicate the moment at which the solution was diluted by adding the same amount of water than solution. The final Ca^{2+} concentrations were 0.3 M and 0.4 M. At those concentrations the EYPC liposomes are stable and the clusters are re-dispersed, coming back to the initial size of the single liposomes.

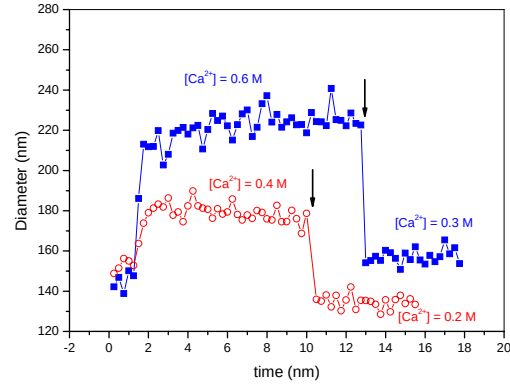


Fig. 7. Diameter of clusters of EYPC liposomes in the presence of (■) 0.7 M and (○) 0.5 M of Ca^{2+} . The salt was added 90 seconds after starting measurements and the arrows indicate the time when water was added to dilute the Ca^{2+} concentration. The final concentrations were 0.3 and 0.2 M

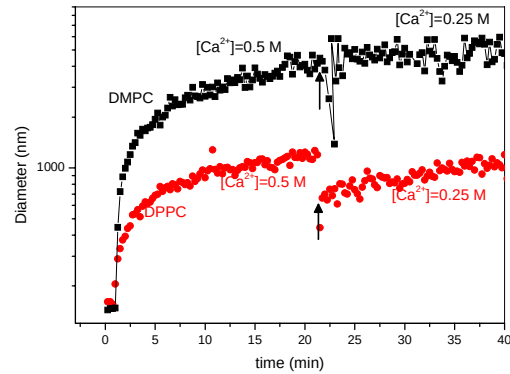


Fig. 8. Diameter of clusters of DMPC(■) and DPPC(●) liposomes in presence of 0.5 M of Ca^{2+} . The salt was added 90 seconds after starting measurements and the arrows indicate the time when water was added to dilute the Ca^{2+} concentration. The final concentration of Ca^{2+} was 0.25 M

The same experiment with similar results was done with DPPC liposomes. The aggregation of the DPPC liposomes also is reversible since Figure 8 shows how the clusters are re-dispersed when water is added. But the final concentrations of Ca^{2+} after diluting (0.25 M)

make the liposomes still unstable and the aggregation starts again. The reversibility of the aggregation of EYPC and DPPC is a evidence of the existence of secondary minima in the potential between two liposomes [33]. On the other hand DMPC does not present reversibility in the aggregation after diluting with water, indicating that the aggregation occurs in a primary minimum of the DLVO potential.

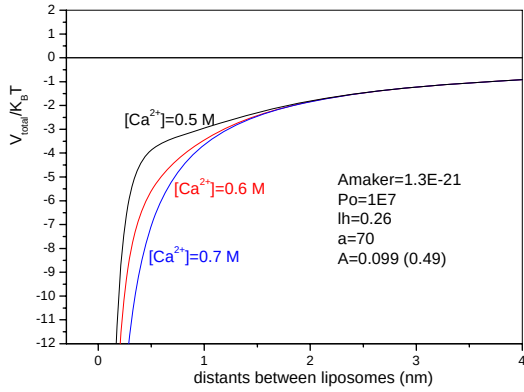


Fig. 9. Interaction potential between two liposomes in presence of 0.5 M, 0.6 M and 0.7 M of Ca^{2+} . The potential has been calculated as the sum of electrostatic and van der Waals potentials, taking the Stern layer thickness (Δ) as the hydrated radius of Ca^{2+} ion.

In order to predict the secondary minimum in the DLVO potential, we compared two different models for the hydration forces. The DLVO theory considers the interaction potential between liposomes as the sum of an attractive London-van der Waals interaction (V_{Waals}) and a repulsive interaction (V_{elec}) due to the electric charge on the particles:

$$V_T(x) = V_{\text{Waals}}(x) + V_{\text{elec}}(x) \quad (7)$$

in which x is the distance between the surfaces of two liposomes.

For the case of two spherical shells of equal radius, a , and thickness, d , the expression of V_{Waals} , derived by Hamaker [26,27] is given by [39]:

$$V_{\text{Waals}}(x) = -\frac{Aa}{12} \left[\frac{1}{x+2d} - \frac{2}{x+d} + \frac{1}{d} \right] - \frac{A}{6} \ln \frac{x(x+2d)}{(x+d)^2} \quad (8)$$

where A is the attractive Hamaker constant.

The expression for the repulsive potential V_{elec} has the form [40-44]

$$V_{\text{elec}}(x) = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r(a+\Delta)\psi_d^2 \exp[-\kappa(x-2\Delta)] \quad (9)$$

where κ is the reciprocal Debye length, Δ is the thickness of the Stern layer and ψ_d is the surface potential in the outer Helmholtz plane which can be considered equal to the ζ -potential for low values [45].

We have taken into account the repulsive hydration force by considering the Stern layer thickness equal to the hydration radius of the adsorbed ion. But no secondary minimum are predicted by this model as Figure 9 shows. We have used this correction to the DLVO theory in previous works obtaining similar results.

We tried to reproduce the secondary minimum by using a specific hydration potential proposed by Lis et. al. [46]:

$$V_{\text{hydra}}(x) = \pi\lambda^2 H_0 \exp[-x/\lambda] \quad (10)$$

where H_0 is the constant of hydration and λ a decay constant.

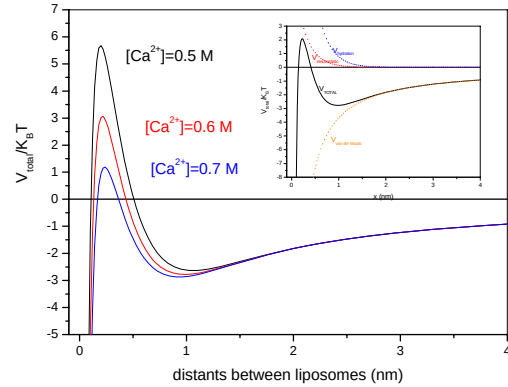


Fig. 10. Interaction potential between two liposomes in presence of 0.5 M, 0.6 M and 0.7 M of Ca^{2+} . The potential has been calculated as the sum of the electrostatic van der Waal and a specific hydration potential.

Figure 10 displays the total potential as the sum of $V_{\text{Waals}} + V_{\text{elec}} + V_{\text{hydra}}$ for 0.7, 0.6 and 0.5 M of Ca^{2+} using $A_{\text{hydra}} = 1.3 \times 10^{-21}$, $H_0 = 10^7$ N/m² and $\lambda = 0.26$ nm [17,36], values according with literature. Adding the hydration potential to the total DLVO potential, a secondary minimum at a distance of 1 nm from the liposomes surface is predicted.

4 Concluding remarks

The variation of ζ -potential with Ca^{2+} concentration has been measured and the c.a.c. of liposomes composed by DMPC, DPPC and EYPC, determined. These measurements have given information to control the aggregation in order to observe the transition from RLCA to DLCA regimen of aggregation.

A fractal study has been done, by two different methods, for the aggregation of each kind of liposomes in presence of Ca^{2+} . In all cases the fractal dimensions fell in the expected values predicted by simulation $(2.1 > d_f > 1.8)$. Generally, a decrease of fractal dimension from $d_f \sim 2.1$ (RLCA) to $d_f \sim 1.8$ (DLCA) could be observed as the ionic strength increased and the charge of the liposomes was screened. The clusters formed when the charge of the liposomes is not completely screened ($\zeta \approx 15$ mV and $P(1)$) were more compact and dense than the clusters formed when no electrostatic repulsion exist ($\zeta \approx 0$ mV and $P=1$).

Focusing in the evolution of the size of the clusters, DMPC liposomes have shown a clear transition from RLCA to DLCA regime depending of the Ca^{2+} concentration. On contrary, EYPC liposomes had an unexpected behaviour since the aggregation is limited and the final size of the cluster depended of the Ca^{2+} concentration. DPPC seemed to have a similar, but less pronounced, behaviour.

The aggregation of EYPC liposomes was reversible by diluting the Ca^{2+} solution, suggesting that aggregation occurs in a secondary minimum of the interaction potential between two liposomes. This effect can be useful to store the liposomes since the aggregates keep "stable" without precipitate in short time and the re-dispersion to isolate liposomes can easily be done by dilution with water. Another advantage of the aggregation on the secondary minimum of EYPC is the possibility to regulate the size of the final clusters by controlling the Ca^{2+} concentration in the medium. This can boost the use of liposomes like biological models.

We have used a specific hydration potential to predict the existence of a secondary minimum under the DLVO theory. Since the minimum is placed at 1 nm from the liposome surface, the aggregated liposomes are not directly in contact, there is a water layer of 1 nm of thickness. This concurs with the idea that hydration forces are the responsible of the existence of the secondary minima in the interaction potential (see Figure 11) [37,47].

In literature is usually claimed in that Ca^{2+} induces the fusion of the liposomes once they aggregated [48-50]. However, if the liposomes aggregate in a secondary

minimum, as the case of EYPC, fusion is impossible since the liposome membranes are not in contact and they keep at a distance of 1 nm with water molecules in between as it is shown in Figure 11.

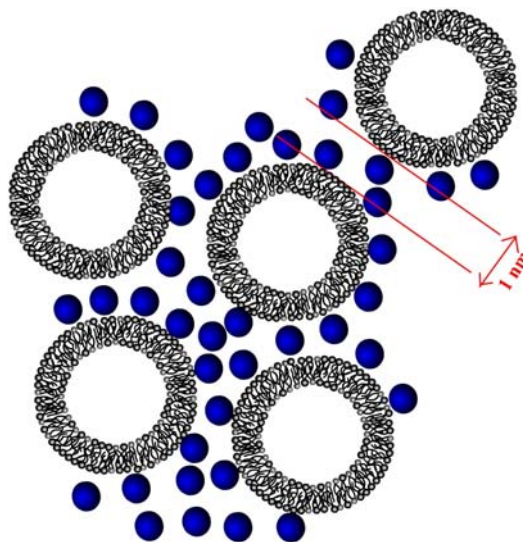


Figure 11. Schematic representation of the aggregation of EYPC liposomes in a secondary minimum of the interaction potential. Hydration forces keep the liposomes at a distance of 1 nm.

Acknowledgement

The authors acknowledge the financial support from Spanish "Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional de Investigación (I+D+i), MAT2005-02421" and from "European Regional Development Fund, (ERDF)".

References

1. J.S. Langer, H. Mueller-Krumbhaar, *Acta Metall.* **26**, 1681 (1978).
2. D.N. Sutherland, *J. Colloid Interface Sci.* **25**, 373 (1967).
3. P. Manneville, L. de Seze, in *Numerical methods in the study of critical phenomena*. I. della Dora, J. Demangeot, B. Lacolle, Eds. (Springer-Verlag, Berlin, 1983).
4. P.J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry* (Cornell Univ. Press, Ithaca, 1983).
5. T. Williams, R. Bjerknes, *Nature* **236**, 19 (1972).
6. S.K. Friedlander, *Smoke, dust and haze: Fundamentals of aerosol behaviour* (Wiley, New York, 1977).

7. S.R. Forrest, T.A. Witten, J. Phys. A Math. Gen. **12**, L109 (1979).
8. T.A. Witten, L.M. Sander (1981) Diffusion-limited aggregation, a kinetic critical phenomenon. Phys. Rev. Lett. **47**, 1400 (1981).
9. B.B. Mandelbrot, *The fractal geometry of nature*. (Freeman, San Francisco, CA, 1982).
10. T.A. Witten, L.M. Sander, Phys. Rev. B **27**, 5686 (1983).
11. P. Meakin, Phys. Rev. Lett. **51**, 1119 (1983).
12. M. Eden, *Proceedings of the Fourth Berkeley Symposium on Mathematics, Statistics and Probability*. F. Neyman, Ed (University of California Press, Berkeley, 1961, p 223).
13. M. Rotterreau, J.C. Gimel, T. Nicolai, D. Durand, Eur. Phys. J. E **15**, 133 (2004).
14. M. Rotterreau, J.C. Gimel, T. Nicolai, D. Durand, Eur. Phys. J. E **15**, 141 (2004).
15. N. Lynch, P. Kilpatrick, G. Carbonell, Biotechnol. Bioeng. **50**, 151 (1996).
16. M.T. Roy, M. Gallardo, J. Estelrich, J. Colloid Interface Sci. **206**, 512 (1998).
17. D.D. Lasic, *Liposomes. From Physics to Applications* (Elsevier, Amsterdam, 1993).
18. R.M. Fielding, Clin. Pharmacokinet **21**, 155 (1991).
19. M. Costuleanu, E. Brailoiu, C.M. Filipeanu, O. Baltatu, S. Slatineanu, L. Saila, L.M. Nechifor, D.D. Branisteanu, Eur. J. Pharmacol. **281**, 89 (1995).
20. C. Karau, M. Petszulat, P.C. Schmit, Int. J. Pharm. **128**, 89 (1996).
21. D.D. Lasic, H. Strey, M.C. Stuart, R. Podgornic, P.M. Frederic, J. Am. Chem. Soc. **119**, 832 (1997).
22. D. Papahadjopoulos, G. Poste, B.E. Schaeffer, W.J. Vail, Biochim. Biophys. Acta **352**, 10 (1974).
23. K. Ohki, K. Takahashi, S. Kato, A. Maesono, Chem. Phys. Lip. **50**, 109 (1989).
24. M.R. Mozafari, M.H. Zareie, E. Piskin, V. Erhan, Drug Deliv. **5**, 135 (1998).
25. D.K. Hinch, Biochim. Biophys. Acta, **1611**, 180 (2003).
26. B.V. Derjaguin, L.D. Landau, Acta Physicochim. URSS **14**, 633 (1941).
27. E.J.B. Verwey, J.Th.G. Overbeck, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids* (Elsevier, Amsterdam, 1948).
28. M.Y. Lin, H.M. Lindsay, D.A. Weitz, R.C. Ball, R. Klein, P. Meakin, Phys. Rev. A **41**, 2005 (1990).
29. J.L. Burn, Y. Yan, G.J. Jamenson, S. Biggs, Langmuir **13**, 6413 (1997).
30. J. Martin, B. Ackerson, Phys. Rev. A **31**, 1180 (1985).
31. S. Tang, Coll. Surf. A. Physicochem. Eng. Aspects **157**, 185 (1999).
32. K. Onuma, A. Oyane, K. Tsutsui, K. Tanaka, G. Treboux, N. Kanzaki, A. Ito, J Phys. Chem. B **104**, 10563 (2000).
33. R.J Hunter, *Foundations of the Colloid Science*. Chap. 12, p. 603. (Oxford University Press, New York).
34. J. Sabín, G. Prieto, P.V. Messina, J.M. Ruso, R. Hidalgo-Álvarez, F. Sarmiento, Langmuir **21**, 10968 (2005).
35. J. Sabín, J.M. Ruso, G. Prieto, P. Messina, F. Sarmiento, Chaos (in press).
36. T. Inoue, H. Minami, R. Shimozawa, G. Sugihara, J. Colloid Interface Sci. **152**, 493 (1992).
37. H. Matsumura, K. Watanabe, K. Furusawa, Coll. Surf. A. Physicochem. Eng. Asp. **98**, 175 (1995).
38. R.R.C. New, *Liposomes: A Practical Approach*. (Oxford University Press, New York).
39. R. Tadmor, J. Phys. Condens. Matt. **13**, L195 (2001).
40. H.C. Hamaker, Rec. Trav. Chim. **55**, 1015 (1936).
41. H.C. Hamaker, Rec. Trav. Chim. **56**, 3 (1937).
42. E. Matijevic, K.G. Mathai, R.H. Ottewill, M. Kerker, J. Phys. Chem. **65**, 826 (1961).
43. B. Vincent, H. Bijsterbosch, J. Lyklema, J. Colloid Interface Sci. **37**, 171 (1970).
44. D. Bastos, F.J. de las Nieves, J. Colloid Interface Sci. **272**, 592 (1994).
45. J. Lyklema, J. Colloid Interface Sci. **53**, 242 (1977).
46. L.J. Lis, M. McAlister, N. Fuller, R.P. Rand, Biophys. J. **37**, 657 (1982).
47. J. Wilzschut, D. Hoekstra, Chem. Phys. Lip. **40**, 156 (1986).
48. D. Papahadjopoulos, W.J. Vail, C. Newton, S. Nir, K. Jacobson, G. Poste, R. Lazo, Biochim. Biophys. Acta **465**, 579 (1977).
49. S. Ohki, Biochim. Biophys. Acta **689**, 1(1982).
50. D. Papahadjopoulos, S. Nir, N. Düzgünes, J. Bioenerg. Biomemb. **22**, 157 (1989).

4.5. CONCLUSIONES

Se ha realizado un estudio fractal de la agregación de liposomas compuestos de DMPC, DPPC o EYPC en presencia de La^{3+} y Ca^{2+} por dos métodos distintos: monitorizando el crecimiento del tamaño de los agregados con el tiempo y midiendo la dispersión angular de luz una vez formados los agregados.

Las dimensiones fractales (d_f) de cada tipo de liposomas para distintas concentraciones de Ca^{2+} y La^{3+} se mantienen en los valores predichos por las simulaciones computacionales. Para valores de concentración bajos, donde la carga de los liposomas no se apantalla completamente, la agregación se produce bajo régimen RLCA (*Agregación de Clusters Limitada por Reacción*) y los agregados resultantes son densos y compactos con una $d_f \sim 2.1$. Para concentraciones superiores, que apantallen completamente la carga de los liposomas, la agregación se produce en régimen DLCA (*Agregación de Clusters Limitada por Difusión*), y los agregados son ramificados con una $d_f \sim 1.8$.

La distinta morfología de los agregados es debida a que cuando la carga no está totalmente apantallada, la probabilidad de que dos liposomas agreguen cada vez que *chocan* es menor a 1. Esto aumenta las posibilidades de que un liposoma alcance el centro de un agregado, creando un cluster compacto típico del régimen RLCA. Por el contrario, si la carga esta apantallada, los liposomas se quedarán *pegados* cada vez que colisionen, lo que facilita que sean las *ramas externas* de los agregados las que crezcan dando lugar a estructuras abiertas y ramificadas típicas de la agregación en régimen DLCA.

Los liposomas compuestos de DMPC agregan en un mínimo primario del potencial de interacción entre liposomas, independientemente de que los iones que apantalla su carga sean Ca^{2+} o La^{3+} . Sin embargo, los liposomas de DPPC agregan

en un mínimo primario en presencia de La^{3+} , pero en presencia de Ca^{2+} lo hacen en un mínimo secundario del potencial. Los liposomas de EYPC agregan en el mínimo secundario tanto con Ca^{2+} como con La^{3+} .

La agregación en un mínimo secundario del potencial de interacción implica que tal agregación es reversible y que los liposomas pueden re-dispersarse por simple dilución. Además, la agregación se produce de forma limitada, los clusters al alcanzar un cierto tamaño, dependiente de la concentración iónica, dejan de crecer y se crean *agregados estables*. El estudio de este tipo de agregación reversible puede tener gran relevancia en el almacenamiento de liposomas y en su aplicación como modelos coloidales ya que se puede controlar el tamaño de los *agregados estables* controlando la concentración iónica.

La aparición de mínimos secundarios en el potencial de interacción entre dos liposomas está favorecida por la existencia de fuerzas repulsivas de hidratación originadas por la estructuración de las moléculas de agua en la superficie de los liposomas. Empleando el potencial propuesto por Lis y colaboradores [Lis *et al.* (1982)] para las fuerzas de hidratación:

$$V_{\text{hidra}}(x) = \pi a \lambda^2 H_0 \exp[-x / \lambda]$$

junto al potencial usado en la teoría DLVO (electrostático y de van de Waals) puede explicarse la reversibilidad de la agregación de liposomas de EYPC y la formación de *agregados estables*.

4.6. BIBLIOGRAFÍA

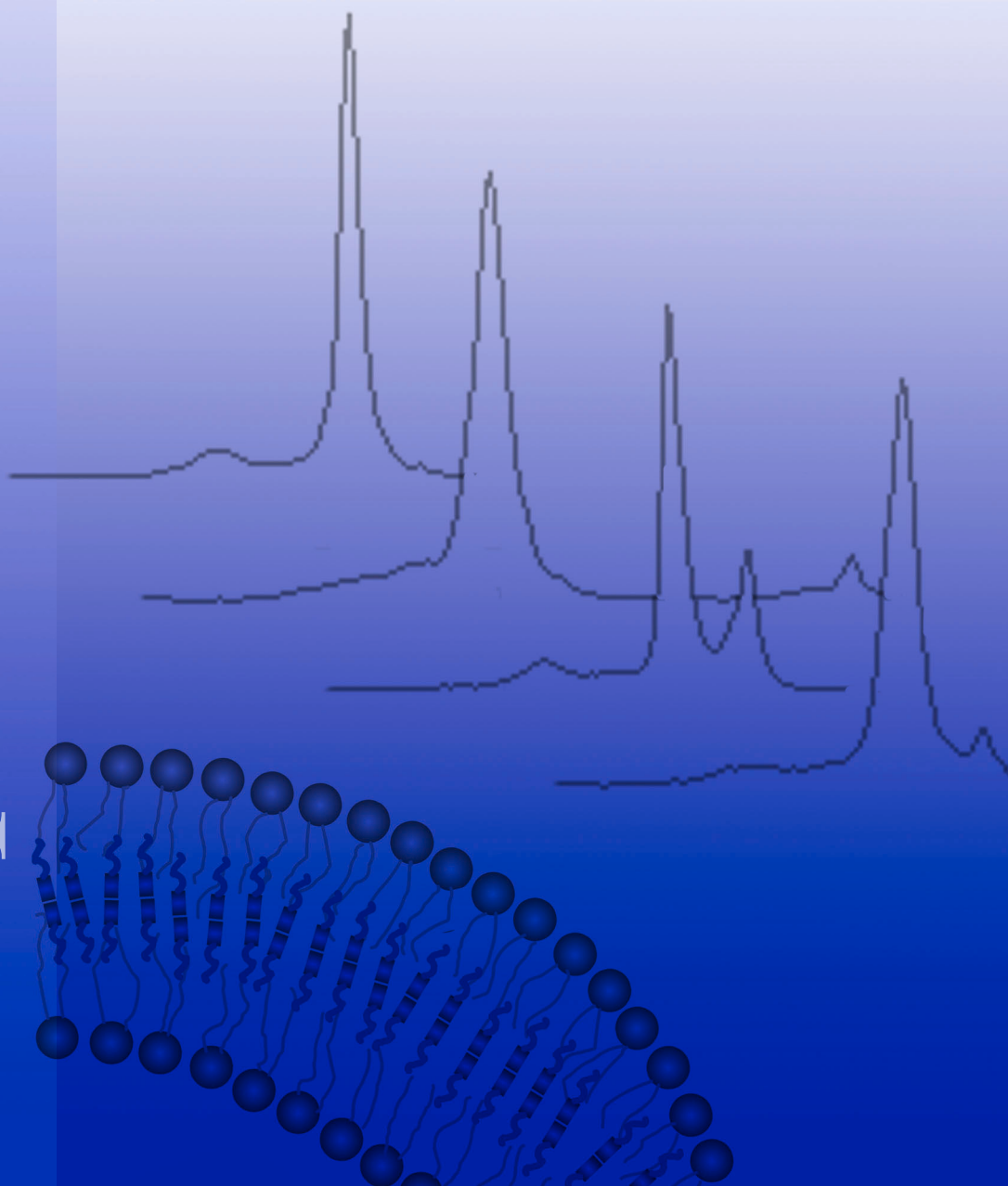
- Asnaghi D., Carpineti M. Giglio M. and Sois M.** (1992) Phys. Rev. A 45: 1018-1022. "Coagulation kinetics and aggregate morphology in the intermediate regimes between diffusion-limited and reaction-limited cluster aggregation"
- Aubert C. and Cannell D.S.** (1986) Phys. Rev. Lett. 56: 738-741. "Restructuring of colloidal silica aggregates"
- Burn J.L., Yan Y., Jamenson G.J. and Biggs S.** (1997) Langmuir. 13: 6413-6420. "A Light Scattering Study of the Fractal Aggregation Behavior of a Model Colloidal"
- Carpinetti M., Ferri F. and Giglio M.** (1990) Phys. Rev. A 42: 7347-7354 "Salt-induced fast aggregation of polystyrene latex"
- Forrest S.R. and Witten Jr T.A.** (1979) J. Phys. A: Math. Gen. 12: L109-L117. "Long-range correlations in smoke-particle aggregates"
- Inoue T., Minami H., Shimozawa R. and Sugihara G.** (1992) J. Colloid Interface Sci. 152: 493-506. "Stability of DLPA/DLPC mixed vesicles against divalent cation-induced aggregation : importance of the hydration force"
- Kolb M., Botet R. and Jullien R.** (1983) Phys. Rev. Lett., 51: 1123-1126. "Scaling of Kinetically Growing Clusters"
- Lasic D. D.** (1993): *Liposomes: From Physics to Applications*. Elsevier, Amsterdam p. 204
- Lesmoir N., Rood W. and Edney R.** (2000) *Introducing Fractal Geometry*. Icon Books, Canada.
- Lin M.Y., Lindsay H.M., Weitz D.A., Ball R.C., Klein R. and Meakin P.** (1990) Phys. Rev. A, 41: 2005-2020. "Universal reaction-limited colloid aggregation"
- Lis L.J., McAlister M., Fuller N. and Rand R.P.** (1982) Biophys. J. 37: 657. "Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes"
- Liu J., Shih W.Y., Sarikaya M and Aksay I.** (1990) Phys. Rev. A 41: 3206-3212. "Fractal colloidal aggregates with finite interparticle interactions: Energy dependence of the fractal dimension"
- Lynch N., Kilpatrick P. and Carbonell G.** (1996) Biotech. Bioeng. 50: 151-168. "Aggregation of ligand-modified liposomes by specific interactions with proteins. I: Biotinylated liposomes and avidin"
- Majolino D., Mallamace F. and Migliardo P.** (1989) Phys. Rev. A, 40: 4665-4674. "Elastic and quasielastic light-scattering studies of the aggregation phenomena in water solutions of polystyrene particles"
- Mandelbrot B.** (1983) *Geometría Fractal de la Naturaleza*. Tusquest Ediciones, Barcelona.

- Martin J. and Ackerson B.** (1985) Phys. Rev. A. 31: 1180-1183. “*Static and dynamic scattering from fractals*”
- Matsumura H., Watanabe K. and Furusawa K.** (1995) Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. 98: 175-184. “*Flocculation behavior of egg phosphatidylcholine liposomes caused by Ca^{2+} ions*”
- Meakin P.** (1984a) Phys. Rev. A. 29: 997-999. “*Effects of cluster trajectories on cluster-cluster aggregation: A comparison of linear and Brownian trajectories in two- and three-dimensional simulations*”
- Meakin P.** (1984b) Phys. Rev. B. 29: 3722-3725. “*Cluster-particle aggregation with fractal (Levy flight) particle trajectories*”
- Meakin P. and Wasserman Z.R.** (1984) Phys. Lett. A, 103A: 337-341. “*Some universality properties associated with the cluster-cluster aggregation model*”
- Meakin P.** (1983a) Phys. Rev. Lett. 51: 1119. “*Formation of Fractal Clusters and Networks by Irreversible Diffusion-Limited Aggregation*”
- Meakin P.** (1983b) Phys. Rev. A, 27: 1495. “*Diffusion-controlled cluster formation in 2—6-dimensional space*”
- Molina J.A.** (1999) “*Mecanismos de Estabilidad Coloidal*”. Tesis Doctoral por la Universidad de Granada.
- New R.R.C.** (1990): *Liposomes: A Practical Approach*, R R.C. New, Ed., IRL Press, Oxford University Press, New York. p. 140
- Nir S., Bentz J. and Düzgünes N.** (1981) J. Colloid Interfaces Sci. 84: 266-269. “*Two Modes of Vesicle Aggregation: Particle Size and the DLVO theory*”
- Onuma K., Oyane A., Tsutsui K., Tanaka K., Treboux G., Kanzaki and Ito A.** (2000) J. Phys. Chem. B 104: 10563-10568. “*Precipitation Kinetics of Hydroxyapatite Revealed by the Continuous-Angle Laser Light-Scattering Technique*”
- Sabín J., Ruso J.M., Prieto G., Sarmiento F. and Messina P. (2007a)** Chaos “*A study of the fractal dimension of the aggregation of liposomas in the presence of La^{3+}* ” (ENVIADO)
- Sabín J., Ruso J.M., Prieto G. and Sarmiento F. and (2007b)** Eur. Phys. J. E “*Fractal aggregation induced by liposome-liposome interaction in the presence of Ca^{2+}* ” (ENVIADO)
- Sander L.M., Cheng Z.M. and Richter R.** (1983) Phys. Rev. B, 28: 6394-6396. “*Diffusion-limited aggregation in three dimensions*”
- Schaefer D. and Martin J.** (1984) Phys. Rev. Lett. 52: 2371-2374. “*Diffusion-Limited Aggregation, a Kinetic Critical Phenomenon*”
- Takayasu H.** (1989) *Fractals in the Physical Science*. Manchester University Press, Manchester.

- Tang S.** (1999) Coll. Surf. A. Physicochem. Eng Aspects. 157: 185-192. *"Prediction of fractal properties of polystyrene aggregates"*
- Witten T.A. and Sander L.M.** (1981) Phys. Rev. Lett. 47: 1400-1403. *"Diffusion-Limited Aggregation, a Kinetic Critical Phenomenon"*
- Wong P. and Bray A.** (1988) Phys. Rev. Lett. 60: 1344. *"Porod scattering from fractal surfaces"*

Capítulo 5

Liposomas Fluorados



Capítulo 5

Liposomas Fluorados

Las extraordinarias precualidades de la incorporación de átomos de flúor a cadenas carbonas ha abierto una nueva vía para la obtención de sistemas coloidales más estables y eficientes. La fuerte unión C-F y la mayor hidrofobicidad del flúor provocan que las cadenas de perfluoroalcanos sean más estables que sus análogas hidrogenadas y que puedan ser utilizadas en condiciones extremas de acidez, oxidación o a altas temperaturas, donde las cadenas hidrogenas convencionales pierden su funcionalidad.

Pare ello se han desarrollado nuevas moléculas fluoradas que puedan usarse como monómeros y generar estructuras coloidales complejas por si solas o en combinación con las convencionales hidrogenadas. Sustituyendo los átomos de H por F en las cadenas carbonadas se han obtenido surfactantes fluorados, lípidos fluorados de uno, dos o tres cadenas, perfluoroalcanos o dibloques en donde una parte de la cadena carbonada es hidrogenada y la otra parte es fluorada.

El objetivo es obtener estructuras más estables que puedan tener aplicaciones biológicas como encapsuladores de fármacos, transportadores genéticos, estabilizadores de emulsiones, modelos celulares...

Pero además de aumentar la estabilidad coloidal de las estructuras formadas, la incorporación de flúor a las cadenas carbonadas de los monómeros han abierto nuevas y prometedoras expectativas en las aplicaciones de estos sistemas. La buena afinidad del flúor con el oxígeno, hacen de estas moléculas fluoradas firmes candidatos a ser la base de estructuras coloidales o emulsiones que sirvan como sustitutivos artificiales de la sangre. Muchas de las investigaciones con moléculas fluoradas van dirigidas hacia este objetivo.

En el caso de liposomas fluorados, se usan distintas estrategias a la hora de incorporar cadenas de perfluoroalcanos a la estructura de la bicapa de los liposomas. Su estudio se ha basado en la caracterización de la estabilidad, de la permeabilidad a diferentes solutos, de las transiciones de fase y de la estructura interna de la bicapa. Todos los estudios parecen indicar una mayor estabilidad de los liposomas fluorados en comparación de sus análogos hidrogenados, debido a que la mayor hidrofobicidad de las cadenas fluoradas aumenta el empaquetamiento de la bicapa, lo cual también provoca una mayor impermeabilidad del liposoma.

Este trabajo pretende avanzar en el estudio de liposomas formados por la combinación de fosfatidilcolinas convencionales y dibloques semifluorados, caracterizando su estabilidad coloidal bajo la teoría DLVO en presencia de distintos iones y profundizando en la influencia de la incorporación de los dibloques a las propiedades fisico-químicas de la membrana de los liposomas.

5.1. EL FLÚOR

Los perfluoroalcanos son mucho más estables química y térmicamente que sus análogos hidrogenados. La fuerte unión del enlace C-F los hacen aplicables en condiciones extremas de oxidación o reducción, incluso, a temperaturas muy elevadas [Kissa (2001)].

El origen de la alta estabilidad de los perfluoroalcanos radica en las peculiares características del átomo de Flúor [Sheppard y Shorts (1969)] en comparación con otros átomos (tablas 5.1 a 5.3):

Reacción en el electrodo	Potencial de oxidación (V)
$\text{Li}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Li}$	-3.024
$\text{Na}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{Na}$	-2.714
$2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$	0.000
$\text{I}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{I}^-$	0.536
$\text{Br}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{Br}^-$	1.065
$\text{Cl}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{Cl}^-$	1.358
$\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$	2.07
$\text{F}_2 + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{F}^-$	2.65

Tabla 5.1. Potencial de oxidación para distintas reacciones en el electrodo [Arrington y Patterson (1953)].

- *Alto potencial de oxidación*, potencial eléctrico requerido para transferir electrones desde un oxidante a un reductor ($F_2 + 2e^- \rightarrow 2F^-$) (tabla 5.1)
- *Alta energía de ionización*, que es la energía necesaria para arrancarle al flúor el electrón más débil de su orbital externo ($F \rightarrow F^+ + e^-$) (tabla 5.2)
- *Alta afinidad eléctrica*, es la cantidad de energía absorbida por un átomo aislado en fase gaseosa para formar un ión con una carga eléctrica de “-1” (tabla 5.2).
- *Alta electronegatividad*, que es una medida de la fuerza de atracción que ejerce un átomo sobre los electrones de otro en un enlace covalente (tabla 5.2).

Elemento	Energía de ionización (kcal/mol)	Afinidad electrónica (kcal)	Electronegatividad (escala Pauling)
F	401.5	83.5	4.0
Cl	300	87.3	3.0
Br	272.9	82.0	2.8
I	242.2	75.7	2.5
O	313.8	-	3.5
H	315.0	0	2.1
Li	125.8	0	1

Tabla 5.2. *Energía de ionización, electroafinidad y electronegatividad del Flúor comparados con otros elementos químicos [Pauling (1960)].*

- *Baja energía de disociación*; energía necesaria para romper el enlace ($F_2 \rightarrow 2F$). Esto puede ser la razón de la alta reactividad del flúor y a su facilidad para disociarse proporcionando un alto número de átomos (tabla 5.3).

Elemento	Energía de disociación (kcal)
F₂	37
Cl₂	58
Br₂	46
N₂	225
O₂	118

Tabla 5.3. Energía de disociación para distintos elementos químicos.

- *Baja facilidad para polarizarse.*

Las peculiares características que hace ventajoso el uso de átomos de flúor en los componentes orgánicos, derivan especialmente de su alta electronegatividad y del buen acoplamiento de sus orbitales 2s y 2p con los orbitales de otros elementos del segundo periodo de la tabla periódica (O, N, C...).

De esta forma el flúor crea enlaces muy fuertes con el carbono. De hecho, la unión C-F es el enlace covalente mas fuerte conocido. Además la fuerza de este enlace aumenta al incrementar el número de átomos de F unidos al carbono (tabla 5.4).

	Energía de formación de enlace (kJ/mol)
CH₃F	448
CH₂F₂	459
CHF₃	480
CF₄	486

Tabla 5.4. Energía de formación de enlace C-F.

Pero la alta estabilidad de los perfluoroalcanos no radica sólo en el fuerte enlace C-F. La alta electronegatividad del flúor disminuye el radio atómico del enlace covalente C-F, hasta 0.72 Å. Esto permite que los átomos de flúor se acoplen mejor en la cadena carbonada y protejan a los átomos de carbono con poco stress estérico [Klein *et al.* (1975)].

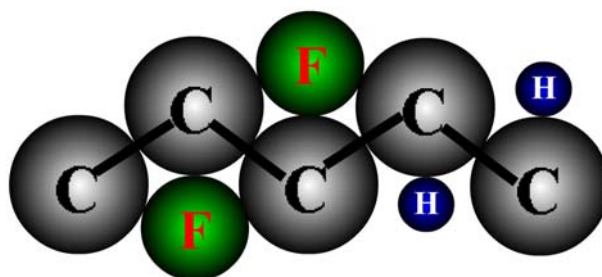


Figura 5.1. Efectos estéricos de los perfluoroalcanos.

Debido a la alta estabilidad del enlace C-F que acabamos de explicar, los grupos perfluorometilos (CF_3) forman compuestos con una fuerza intermolecular muy débil haciendo muy insolubles los perfluoroalcanos en solventes orgánicos comunes. Los perfluoroalcanos son más hidrófobos que sus análogos hidrogenados. CF_4 es siete veces menos soluble en agua que CH_4 [Hildebrand *et al.* (1970)].

5.2. ESTRUCTURAS COLOIDALES FLUORADAS

Recientemente se están usando las ventajosas características de las moléculas fluoradas en la investigación de nuevas estructuras coloidales que mejoren la estabilidad de las clásicas estructuras coloidales basadas en el hidrógeno.

Existen ya diversos campos de la tecnología donde se usan surfactantes fluorados con aplicaciones industriales. Por ejemplo, se usan surfactantes fluorados en los adhesivos, en lubricantes, en líquidos antihumedad, en aditivos del cemento que aumentan su resistencia, en productos de limpieza, en cosmética, en insecticidas y un largo etc [Kissa (2001)].

Debido al alto carácter dual, hidro- y lipo-fóbico de los componentes fluorados, estos se presentan como una herramienta útil para construir nanoestructuras encapsuladoras de moléculas (fármacos, proteínas, oxígeno, ADN,...) de forma controlada, específica y estable.

En el campo biomédico, se han desarrollado microburbujas estabilizadas por moléculas perfluorocarbonadas para la mejora de los diagnósticos de imágenes por ultrasonidos [Riess (2003)]. Las investigaciones actuales de emulsiones y microemulsiones de surfactantes fluorados van encaminadas hacia su aplicación como transportadores de fármacos, genes e incluso oxígeno.

Las dificultades que conlleva las transfusiones sanguíneas debido a su conservación, almacenamiento, compatibilidad, infecciones, o rechazo del paciente de sangre ajena por motivos religiosos, ha llegado a los investigadores a pensar en sustitutivos artificiales de la sangre [Lee y Downey (2002)][Lowe *et al.* (2001)]. Debido a la alta afinidad del flúor con las moléculas de oxígeno, las emulsiones de surfactantes fluorados son la principal estrategia, junto con las disoluciones de hemoglobina [Holding-Smee y Wilson (1988)] [Riess y Krafft (1998)], para obtener un sustitutivo de la sangre que pueda transportar oxígeno en el caso de operaciones cerebrales o de corazón, así como para conservar órganos donados [Jouan *et al.* (2002)].

En un marco general podría decirse que las recientes investigaciones en este campo tratan de definir una arquitectura coloidal para moléculas fluoradas aprovechando la mayor estabilidad, mayor hidrofobicidad y mayor afinidad a ciertas moléculas como el oxígeno, en comparación con las estructuras ampliamente estudiadas basadas en hidrógeno.

5.3. LIPOSOMAS FLUORADOS

Existe ya un amplio trabajo en nuestro grupo en la caracterización de la micelización de moléculas fluoradas en comparación con sus análogas hidrogenadas, basado en la determinación de concentraciones micelares críticas, número de agregación, punto de Krafft, interacción con proteínas, etc...[Blanco et al. (2005), González-Pérez *et al.* (2005)] En este trabajo pretendemos dar un paso más en el estudio del comportamiento de estructuras coloidales basadas en el flúor, determinando las propiedades de *liposomas con componentes fluorados*.

Pueden crearse liposomas fluorados usando diferentes estrategias a la hora de elegir los componentes fluorados que componen la bicapa. Riess estudió liposomas formados por moléculas anfifílicas perfluoradas, que son moléculas que tienen una terminación fluorada en su cadena hidrofóbica. Estas moléculas tienen una fuerte tendencia a crear estructuras muy estables como muestra el hecho de que crean complejas estructuras de bicapas como liposomas o microtubos a concentraciones donde sus análogos hidrogenados solo crean micelas. [Riess (1994)][Krafft y Riess (1998)].

Santaella [Santaella et al. (1993)] [Frézard *et al.* (1994)] y sus colaboradores estudiaron liposomas fluorados a partir de fosfatidilcolinas perfluoradas, observando que estos liposomas son menos permeables a moléculas hidro y lipofóbicas encapsuladas en su interior.

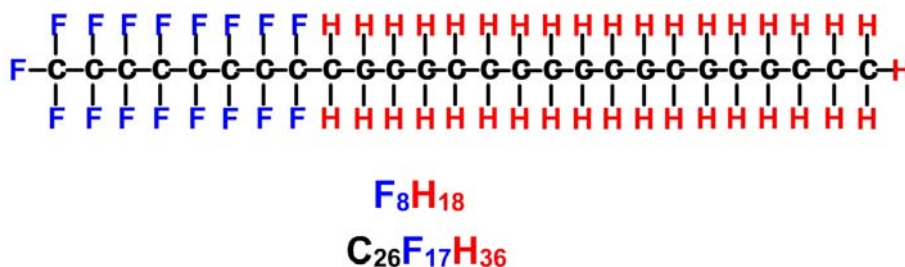
Por último, Krafft ha estudiado liposomas fluorados combinando fosfolípidos hidrocarbonados comunes y alcanos semifluorados. Estos alcanos semifluorados consisten en dibloques unidos por un enlace covalente donde una parte de la cadena tiene todos sus carbonos hidrogenados (HC) y la otra parte tiene los carbonos fluorados (FC). La incorporación de estos dibloques parece aumentar la estabilidad y la impermeabilidad de los liposomas, así como inhibe la fusión de liposomas [Ferro y Krafft (2002)] [Krafft (2001)].

5.4. LOS DIBLOQUES SEMIFLUORADOS F_nH_m

En este trabajo hemos caracterizado las propiedades de las membranas y la estabilidad coloidal de liposomas formados por fosfatidilcolina en combinación con dibloques semifluorados siguiendo trabajos previos de Krafft y sus colaboradores.

Para ello hemos usado distintos tipos de dibloques variando el número total de carbonos y las proporciones de carbonos fluorados respecto a los carbonos hidrogenados de una misma molécula.

Es comúnmente aceptada la nomenclatura F_nH_m ó $C_nF_{2n+1}C_mH_{2m+1}$; que indica que la molécula contiene n carbonos continuos unidos al flúor (FC) y a continuación m carbonos unidos al hidrógeno (HC).



F_nH_m	$\text{C}_n\text{F}_{2n+1}\text{C}_m\text{H}_{2m+1}$	$\text{F}_3\text{C}-(\text{CF}_2)_{n-1}-(\text{CH}_2)_{m-1}-\text{CH}_3$
F_6H_2	$\text{C}_8\text{F}_{13}\text{H}_5$	$\text{F}_3\text{C}-(\text{CF}_2)_5-\text{CH}_2-\text{CH}_3$
F_6H_{10}	$\text{C}_{16}\text{F}_{13}\text{H}_{21}$	$\text{F}_3\text{C}-(\text{CF}_2)_5-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$
F_8H_{14}	$\text{C}_{22}\text{F}_{17}\text{H}_{29}$	$\text{F}_3\text{C}-(\text{CF}_2)_7-(\text{CH}_2)_{13}-\text{CH}_3$
F_8H_{16}	$\text{C}_{24}\text{F}_{17}\text{H}_{33}$	$\text{F}_3\text{C}-(\text{CF}_2)_7-(\text{CH}_2)_{15}-\text{CH}_3$
F_8H_{18}	$\text{C}_{26}\text{F}_{17}\text{H}_{37}$	$\text{F}_3\text{C}-(\text{CF}_2)_7-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$
F_8H_{20}	$\text{C}_{28}\text{F}_{17}\text{H}_{41}$	$\text{F}_3\text{C}-(\text{CF}_2)_7-(\text{CH}_2)_{19}-\text{CH}_3$

Tabla 5.5. Nomenclatura y esquema de los dibloques empleados.

Estos dibloques fluorados presentan baja tensión superficial, baja constante dieléctrica e índice de refracción, alta presión de vapor y alta compresibilidad. [Johns y Otead (2000)][Pádua (2002)]. Además son totalmente insolubles en agua debido a su alta hidrofobicidad.

Pero además de su hidrofobicidad, los dibloques F_nH_m presentan un pronunciado efecto lipofóbico cuya fuerza está estimada en un tercio de la hidrófoba. Esta incompatibilidad recíproca entre las cadenas hidrogenadas y las fluoradas de la misma cadena da lugar a nuevas estructuras e interacciones específicas.

F_nH_m no son surfactantes propiamente dichos ya que carecen de un cabeza polar pero pueden funcionar como agentes de superficie activos en ciertos solventes. En estos casos en el sistema sólo hay que tener en cuenta tres tipos de interacciones (HC-HC, FC-FC y FC-HC) al contrario de los sistemas acuosos donde seis tipos de interaccionan entran en juego (agua-agua, agua-HC, agua-FC, HC-HC, FC-FC y HC-FC) [Pierandrea (2003)]. Por este motivo Turberg y Brady en 1988 ya denominada a estos dibloques “*surfactantes primitivos*” [Turberg y Brady (1988)]

Existen múltiples trabajos en el estudio de monocapas formadas por dibloques F_nH_m o de mezcla de dibloques con surfactantes convencionales que parecen indicar que el bloque fluorado (FC) se orienta hacia el aire alejado de la fase acuosa y también de la fase hidrocarbonada de los surfactantes convencionales [Krafft y Goldmann (2003)].

Los dibloques F_nH_m son unos de los mejores candidatos para la estabilización de emulsiones que disuelvan, transporten y liberen oxígeno como sustitutivos sanguíneos debido al pequeño tamaño de sus emulsiones y a su alta estabilidad [Krafft et al. (2003)]. Además los dibloques F_nH_m son fáciles de sintetizar, no son tóxicos, son biológicamente tolerables y tienen grados de excreción aceptables [Krafft (2001)].

5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo hemos estudiado la estabilidad coloidal de los liposomas fluorados formados por la mezcla de fosfolípidos convencionales y dibloques F_nH_m . Para ello hemos caracterizado los liposomas fluorados en presencia de distintos iones, variando diferentes parámetros en el diseño de los experimentos en busca de los mayores contrastes entre el comportamiento de los liposomas fluorados y los

convencionales. Para ello, se han usado los lípidos DPPC, DMPC y EYPC, los dibloques semifluorados F_6H_2 , F_6H_{10} , F_8H_{14} , F_8H_{16} , F_8H_{18} y F_8H_{20} y los iones K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Gd^{3+} .

Los dibloques semifluorados fueron sintetizados por el grupo “*Chimie des Systemes Associatifs*” del *Institut Charles Sadron* de Strasburgo (Francia). Su pureza fue determinada por TLC y NMR, obteniéndose valores superiores a 99 %.

Pero antes de realizar este estudio ha sido necesario poner a punto la preparación de liposomas fluorados y, sobre todo, hacer un estudio que asegure la incorporación de los dibloques a la bicapa lipídica. La alta insolubilidad de los dibloques semifluorados debido a su hidrofobicidad y lipofobicidad, hace cuestionable que los dibloques formen membranas junto a los lípidos convencionales. Nos hemos ayudado de técnicas de fluorescencia y calorimetría para estudiar dónde se sitúan los dibloques en la bicapa y como afectan a la estructura y características fisicoquímicas de la membrana.

5.5.1. PREPARACION DE LIPOSOMAS FLUORADOS

La preparación de los liposomas fluorados ha seguido pautas muy similares a las ya descritas en el apartado 1.4.:

- Se disolvieron las proporciones adecuadas en fracción molar de lípido y F_nH_m en disolvente orgánico de cloroformo y metanol (4:1).
- Se dejó evaporar el disolvente lentamente en el rotavapor bajo atmósfera de vacío.
- Se hidrató con agua la película de lípido y F_nH_m depositada en las paredes del recipiente.

Debido a que, en este caso, no sólo se iba a estudiar la estabilidad coloidal, sino que también las propiedades fisico-químicas de la membrana; se prestó especial atención en utilizar largos tiempos de evaporación de solvente para que no quedasen trazas de cloroformo o metanol en medio de las membranas que pudiesen afectar a las medidas. También se emplearon largos tiempos de hidratación para garantizar que la máxima cantidad posible de F_nH_m se disolviese formando liposomas.

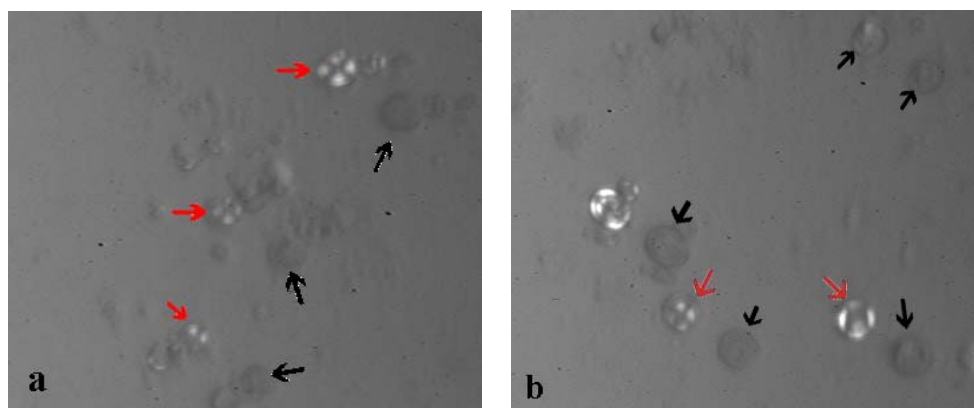


Figura 5.2. Fotografía con luz polarizada de (a) liposomas multilamelares de DMPC (b) liposomas multilamelares de DMPC- F_8H_{14} a 50 % de fracción molar. Flechas negras indican LMG y flechas rojas indican “esferulitas”.

La figura 5.2.(b) muestra la fotografía bajo luz polarizada de liposomas fluorados de DMPC y F_8H_{14} al 50% en fracción molar. En ella pueden verse directamente liposomas multilamelares e incluso se pueden observar *esferulitas* típicas de las estructuras lamelares en estado gel-líquido. Esto confirma la existencia de liposomas multilamelares con la mezcla lípido-fluorado, pero no nos da información de si los dibloques se introducen en las membranas de los liposomas.

Para obtener liposomas unilamelares se han probado dos métodos distintos: filtración por extruder como se explica en el apartado 1.4.2.2. (donde hemos usado

filtros con poros de 800, 400 y 200 nm) y sonicación donde hemos usado una sonda Vibra-Cell durante una hora a una temperatura mayor a la de transición de los lípidos. Los resultados obtenidos por ambos métodos han sido muy similares tanto en la incorporación de los dibloques a la bicapa como en el posterior estudio coloidal de los liposomas fluorados.

5.5.2. INCORPORACIÓN DE LOS DIBLOQUES F_nH_m A LA BICAPA LIPÍDICA DE LOS LIPOSOMAS

En un simple estudio preliminar podría deducirse que los dibloques se incorporan a la bicapa siempre que se disuelvan al hidratar con agua la película depositada en el frasco del rotavapor, ya que, debido a su hidrofóicidad, tenderían a tener el menor contacto posible con las moléculas de agua. Como, por sí solas, no forman estructuras micelares o vesiculares, el interior de la bicapa parece ser el único sitio donde los dibloques se mantendrían “cómodos” en disolución acuosa.

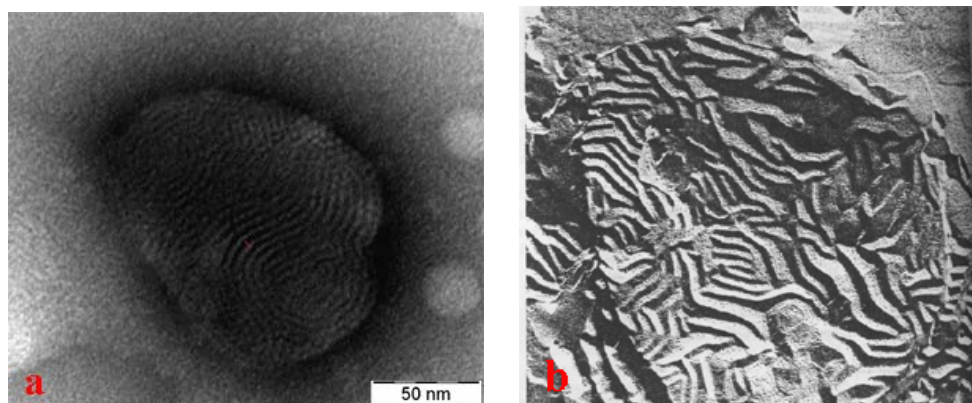


Figura 5.3. Rugosidades superficiales de los liposomas de EYPC observadas (a) por fotografías TEM en comparación con las observadas por (b) Papahadjopoulos [Lasic (1993)] con la técnica de Cryo-TEM.

La técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) explicada en el apartado 2.5. nos da información directa de la transición de fase de gel-cristalina a gel-líquido de las colas hidrófobas que forman la membrana y también de la transición de fase (o pretransición) de las cabezas polares hacia una configuración más flexible donde puedan aparecer rugosidades en la superficie del liposoma. Estas rugosidades de la superficie de los liposomas tras la pretransición pueden observarse directamente por fotografías TEM. La figura 5.3.(a) muestra una fotografía TEM obtenida a temperatura ambiente de un liposoma unilamelar de EYPC (cuya transición y pretransición están a $T_c < -10^\circ\text{C}$). La fotografía se muestra en comparación con la obtenida por Papahadjopoulos [Lasic (1993)] por cryo-TEM (figura 5.3.(b)).

Las temperaturas (T_c) y variaciones de entalpía (ΔH) de las transiciones de fase de liposomas de componentes puros de fosfolípidos están ya perfectamente determinadas y tabuladas [Cevc y Marsh (1984)] [Lasic (1993)], y tienen una variación lineal con el número de carbonos de la cadena hidrocarbonada hidrofóbica (figura 5.4.). En líneas generales podría decirse que la temperatura de transición aumenta 10°C por cada carbono de la cadena hidrófoba.

Cualquier cambio en la T_c o en ΔH de las transiciones de fase implica un cambio en la estructura, empaquetamiento o composición de la membrana que forma el liposoma. Por este motivo, la incorporación de los dibloques semifluorados a la bicapa puede detectarse observando las variaciones de los termogramas de DSC con y sin molécula fluorada.

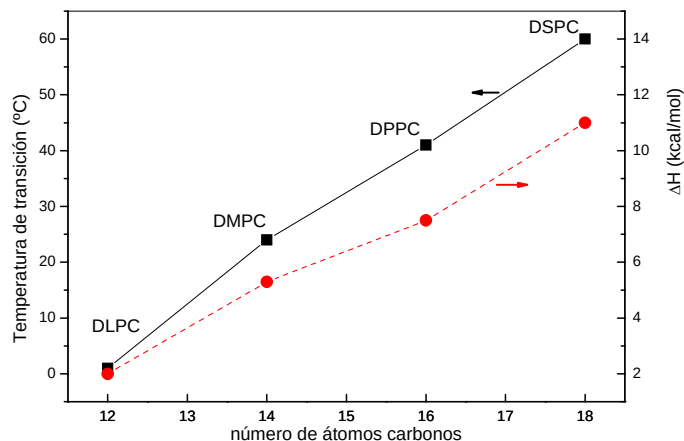


Figura 5.4. Variación de la temperatura y entalpía de transición en función del número de carbonos de la cola hidrofóbica de los fosfolípidos.

La figura 5.5. muestra los termogramas de liposomas multilamelares fluorados con distintos dibloques F_nH_m en comparación con el termograma de liposomas multilamelares de DMPC puro. La concentración de lípido usada fue 0.74 mM (0.5 mg/ml), exactamente igual a la de los distintos F_nH_m (50 % en fracción molar). La velocidad de calentamiento fue 1 °C/min. Todas las experiencias se realizaron por duplicado y cada barrido en temperaturas del DSC se repitió, al menos, tres veces obteniéndose una gran reproducibilidad en todos los casos.

El primero de los termogramas de la figura 5.5., muestra las transiciones de fase de liposomas formados por DMPC. Puede observarse una pretransición a 14.3 °C ($\Delta H=0.473$ kcal/mol °C) debido al aumento de la movilidad de las cabezas polares y una transición mayor a 24.2 °C con $\Delta H=4.98$ kcal/mol°C debido al cambio de fase de las cadenas hidrófobas. Todos los valores concuerdan bien con

los presentados en la bibliografía [Heerklotz y Seeling (2002), Redfern and Gericke (2004), New (1990)]. Las posibles discrepancias son debidas más a las dificultades de un buen ajuste gaussiano de los picos que a verdaderas diferencias en la transición del liposoma.

El resto de los termogramas muestran las transiciones de fase sufridas por liposomas formados de DMPC con F_8H_{14} , F_8H_{16} , F_8H_{18} , F_8H_{20} y F_6H_{10} a 50% en fracción molar. En todos los termogramas puede observarse, en mayor o menor medida, cambios en el termograma que evidencian la influencia de los dibloques semifluorados incorporados a la bicapa.

La serie F_8H_{14} , F_8H_{16} y F_8H_{18} parece influir de forma similar, aunque en distinta intensidad, en los termogramas de DMPC. En todos los casos, tanto la transición como la pretransición se trasladan casi un grado, sin variar prácticamente sus ΔH . Pero lo más significativo es la aparición de un tercer pico en torno a 46 °C que es especialmente intenso en el caso de F_8H_{14} .

La disminución del tamaño del pico al aumentar el número de carbonos hidrogenados del dibloque no es debido a un menor efecto del dibloque sino a la menor cantidad de ellos presentes en la bicapa ya que al aumentar la cadena hidrogenada, el dibloque se hace más insoluble. Esto se manifestó en la imposibilidad de hidratar toda la película depositada en el matraz del rotavapor. Una vez acabado el proceso de hidratación, podían observarse en el matraz restos de F_8H_{16} y F_8H_{18} . Situación que no sucedió cuando se incluía F_8H_{14} a la disolución de DMPC.

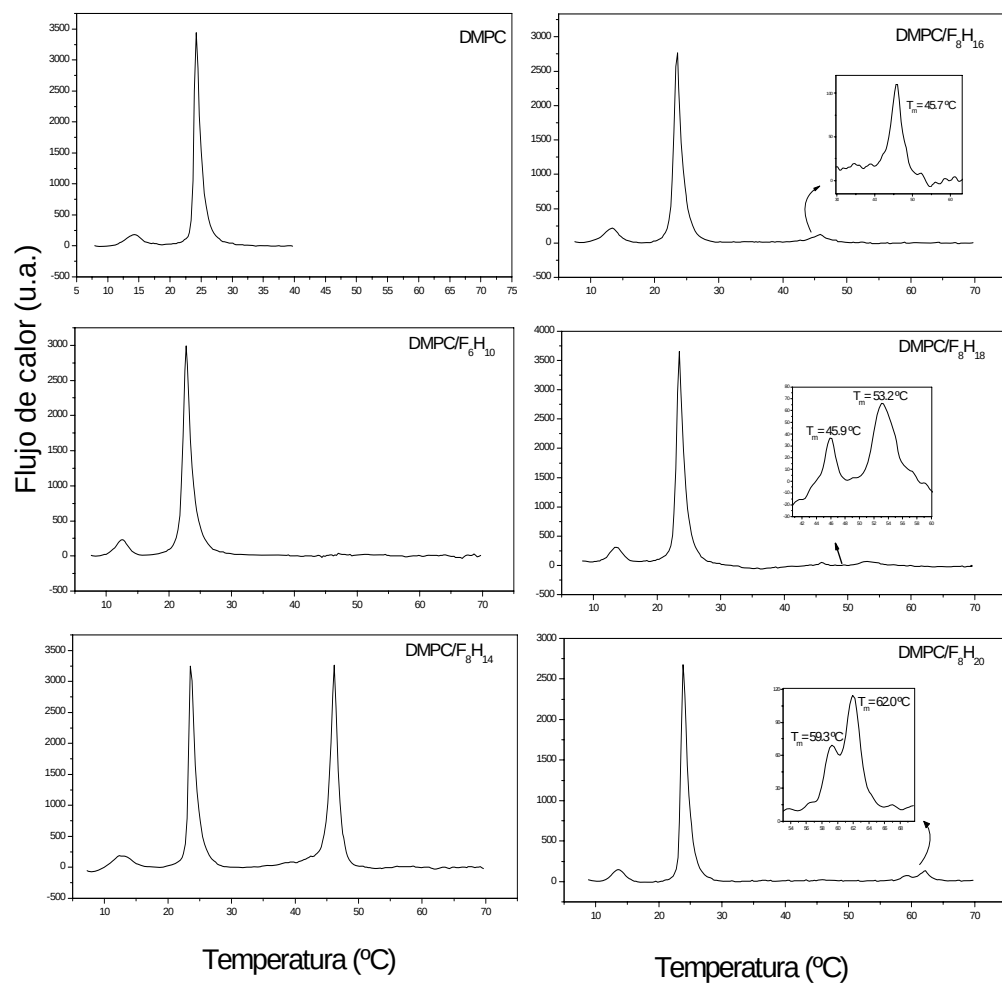


Figura 5.5. Termogramas de DSC para liposomas multilamelares de DMPC puro, y de liposomas multilamelares de DMPC con distintos dibloques (F_8H_{14} , F_8H_{16} , F_8H_{18} , F_8H_{20} , F_6H_{10}) semifluorados al 50% de fracción molar.

Para confirmar este hecho se estudió el tamaño del tercer pico a 46 °C para distintas concentraciones de F_8H_{14} y se observó una disminución similar del pico al disminuir la cantidad de moléculas fluoradas en la bicapa. La figura 5.6 muestra este efecto, y a su vez, muestra que la variación de la concentración de fluorado no afecta a la transición principal de las colas del DMPC, pero si a la pretransición relacionada con sus cabezas polares.

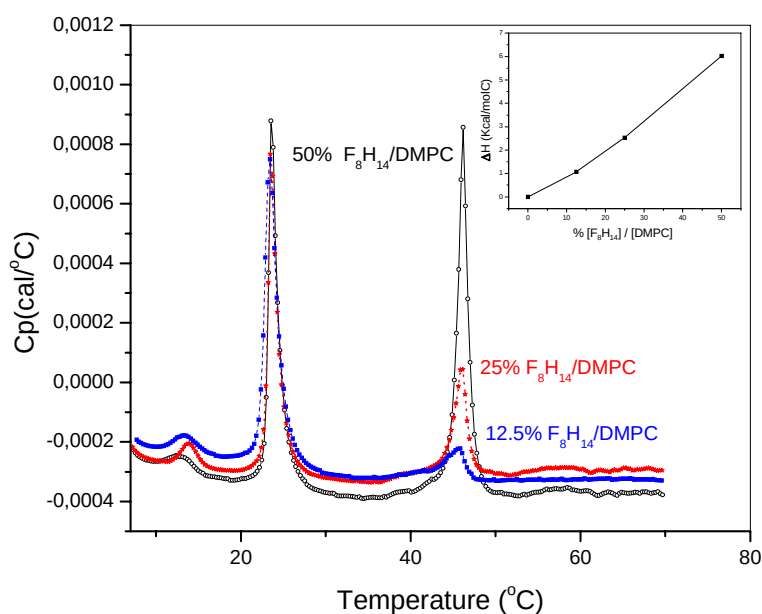


Figura 5.6. Variación del termograma de liposomas fluorados en función de la fracción molar de F_8H_{14} . El gráfico insertado muestra el aumento de la variación de la entalpía de transición.

También se realizó el termograma de la disolución resultante tras el proceso de rotaevaporación introduciendo únicamente F_8H_{14} en disolvente orgánico, sin ningún lípido. Tras la hidratación con agua, las moléculas fluorada no

se disolvieron y permanecieron pegadas al frasco del rotavapor. El termograma no mostraba ningún pico, igual que con agua pura (gráfica no mostrada). Esto demuestra que los dibloques no forman estructuras por si mismas, si no es en combinación con lípidos.

El hecho de que aparezca un pico adicional a 46 °C cuando se incorporan los dibloques semifluorados sin afectar la ΔH de la transición principal de los lípidos de DMPC indica que los dibloques no se entremezclan con los lípidos interactuando con ellos. La transición adicional aparecida parece ser exclusivamente debida a la transición sufrida por los dibloques, por tanto deben situarse juntos e interactuando entre sí en algún lugar de la membrana del liposoma.

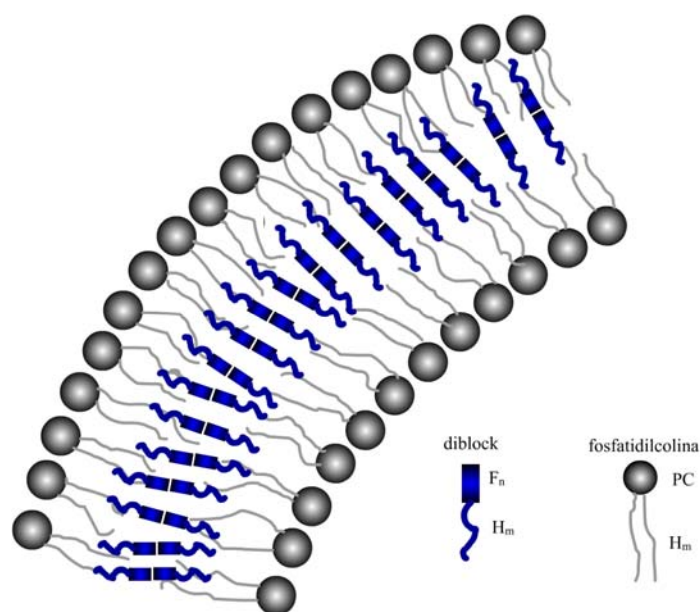


Figura 5.7. Esquema de modelo de la cuadricapa formada por los fosfolípidos y los dibloques semifluorados.

Esta hipótesis concuerda perfectamente con el modelo propuesto por otros investigadores [Riess (1994)] [Schmutz *et al.* (2003)] donde sugiere que los dibloques se sitúan en medio de la membrana, formando una segunda bicapa con las cadenas hidrogenadas orientadas hacia las cadenas hidrogenadas de los lípidos y las partes fluoradas orientadas hacia el interior (figura 5.7). Este modelo de cuatricapa ha sido propuesto tras realizar estudios de tensión superficial con monocapas de mezclas lípido-dibloque y por fotografías de Cryo-TEM.

Volviendo a la figura 5.5., la incorporación del dibloque F_8H_{20} también presenta una nueva transición en $\sim 62\text{ }^\circ\text{C}$ y un ligero desplazamiento ($\sim 1\text{ }^\circ\text{C}$) de la transición y pretransición de los liposomas de DMPC. En este caso el dibloque semifluorado tampoco se pudo disolver completamente en la bicapa lipídica y parte se quedó en las paredes del frasco del rotavapor. Al contrario de cómo sucedía con la transición de los lípidos convencionales (figura 5.4), la posición del pico provocado por la transición sufrida por los dibloques no parece que tenga una dependencia claramente lineal ni con el número de carbonos hidrogenados, ni con el número de carbonos fluorados ni con el número de carbonos totales. Santaella y sus colaboradores [Santaella (1994)] obtuvieron una conclusión similar cuando estudiaron las transiciones de fase de liposomas formados por colinas con dos colas hidrófobas semifluoradas (F_nH_mPC). Las transiciones de fase de las cadenas semifluoradas no parecen seguir las mismas pautas de sus análogas hidrogenadas.

Mención aparte merece el termograma producido al introducir el dibloque mas corto, F_6H_{10} , en la bicapa de DMPC. A pesar de que todo el fluorado se disolvía en la disolución de liposomas no se producía ningún pico adicional de los típicos del DMPC pero producía un mayor desplazamiento de la transición y la pretransición del lípido. El F_6H_{10} es el dibloque más parecido en número de carbonos al DMPC, que tiene 14 carbonos en sus colas hidrófobas. Esto puede producir un mejor acoplo entre los lípidos y los dibloques y derivar en una única

transición de fase a 22.8 °C. En el estudio ya mencionado de Santealla y colaboradores [Santealla (1994)] la transición de fase de liposomas formados por colinas fluoradas $F_6H_{10}PC$ está situada a 18.6 °C y tiene una ΔH baja de 1.8 kcal/mol°C; lo que hace posible la anterior hipótesis.

El mismo estudio se ha realizado con liposomas de DPPC introduciendo los distintos dibloques semifluorados F_8H_{14} , F_8H_{16} , F_8H_{18} , F_8H_{20} y F_6H_{10} a 50% en fracción molar (figura 5.8.). El comportamiento de las transiciones de fase de los dibloques es exactamente igual a cuando se situaban en la bicapa de DMPC. El hecho de que los picos del termograma de DSC sean iguales independientemente del lípido que forma el liposoma es coherente con la hipótesis de que los dibloques semifluorados se sitúan juntos formando otra bicapa en el centro de la membrana como muestra la figura 5.7., y su transición no se ve afectada por la interacción con los lípidos.

Para confirmar la hipótesis de la cuatricapa de lípidos y dibloques, se ha medido la movilidad de distintas sondas por espectroscopia de fluorescencia (apartado 2.4.). Al igual que la técnica de DSC, cualquier cambio en la movilidad de la sonda implica cambios en la viscosidad, empaquetamiento o composición de la membrana del liposoma. Esta técnica presenta la ventaja de que las sondas fluorescentes están perfectamente localizadas en la membrana y nos pueden dar información directa de dónde se sitúan las moléculas incorporadas a la membrana.

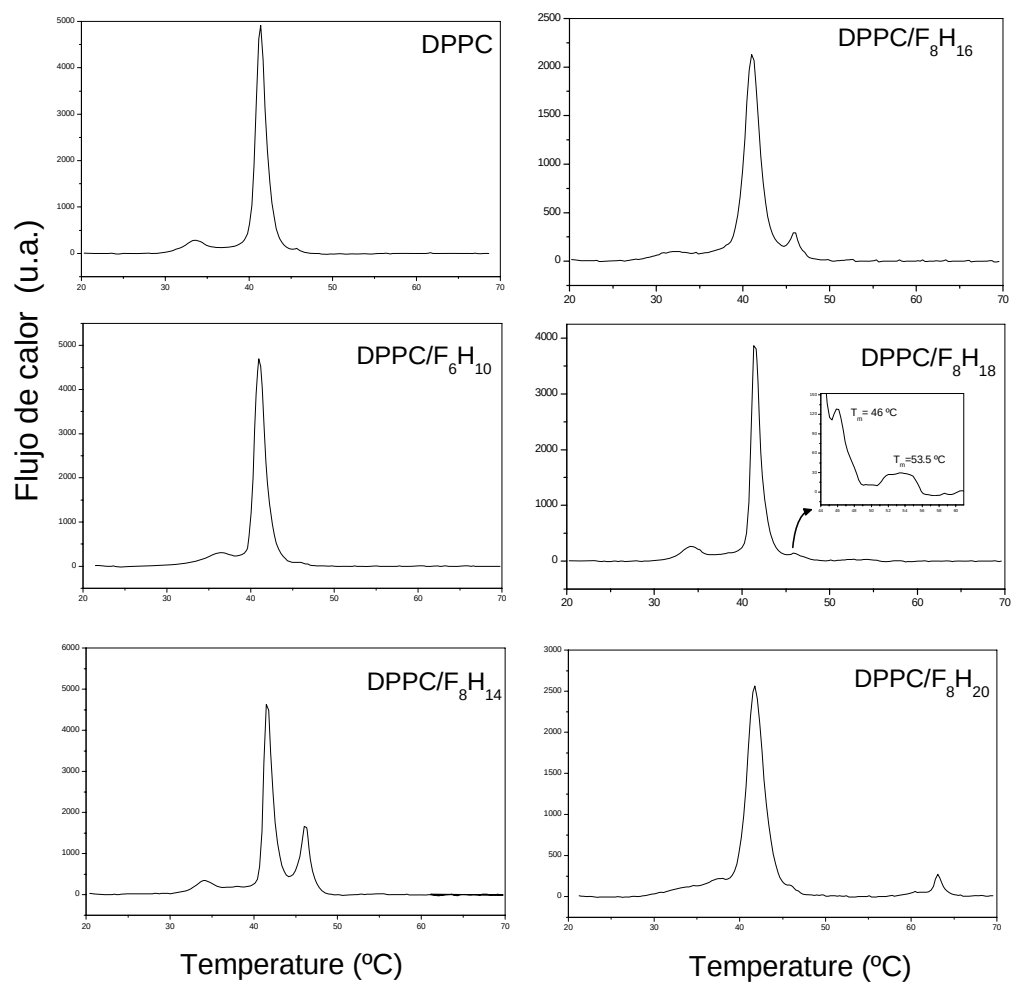


Figura 5.8. Termogramas de DSC para liposomas multilamelares de DPPC puro, y de liposomas multilamelares de DPPC con distintos dibloques F_8H_{14} , F_8H_{16} , F_8H_{18} , F_8H_{20} , F_6H_{10} semifluorados a 50% de fracción molar.

Se han usado tres tipos de sondas fluorescentes que se sitúan en tres zonas distintas de la membrana del liposoma como indica la figura 5.9.:

- **1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH).** El DPH es una molécula hidrófoba que emite fluorescencia cuando se ha incorporado al liposoma y tiene una fluorescencia nula cuando está disuelta en agua. Dentro de la bicapa del liposoma el DPH se sitúa en la zona de las colas hidrófobas a unos 13 Å del centro de la bicapa en liposomas de PC [Kaiser y London (1998)]. Del estudio de la despolarización por fluorescencia de liposomas con DPH se saca información de la viscosidad y el empaquetamiento de las colas hidrófobas en la parte más interna de la bicapa. Su longitud de onda de máxima absorción es 365 nm, y la de máxima emisión 425 nm.

- **Trimetilamonio DPH (TMA-DPH)** es una modificación del DPH que consiste en la adición de un grupo cargado de nitrógeno y provoca que, en vez de situarse en la zona interna, lo haga en una zona más próxima a la interfase agua-lípido del liposoma [Engel y Prendergast (1981)]. Las longitudes de onda máximas de emisión y absorción son las mismas que para el DPH.

- **N-(7-nitro-2-1-3-benzoxadiazol-4-yl) dioleoilfosfatidiletanolamina (NBD-PE)** es una sonda fosfolipídica fluorescente que se sitúa en la región de las cabezas hidrófilas del liposoma. (figura 5.9) [Lentz *et al.* (1996)]. Su longitud de onda de máxima absorción es 460 nm, y la de máxima emisión 534 nm.

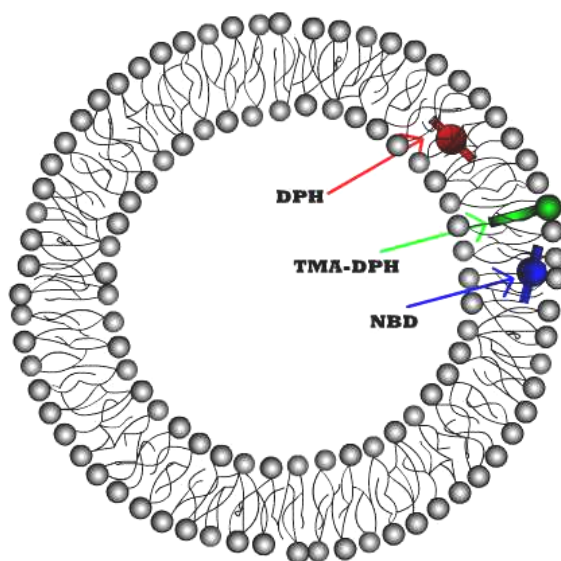


Figura 5.9. Esquema de la posición de las sondas fluorescentes en el seno de la membrana lipídica.

Las tres sondas presentan fluorescencia cuando se sitúan en un medio lipídico y se inactivan en medio acuoso. Por tanto, el simple hecho de detectar una cierta señal fluorescente, garantiza que las sondas fueron incorporadas correctamente a la membrana de los liposomas [Kevin *et al.* (1985)].

Se determinó la anisotropía de las sondas usando los espectros de emisión para distintas configuraciones de los polarizadores de emisión y detección ($I_{||}$ y $I_{\perp}$), usando la ecuación 2.35. Las figuras 5.10. y 5.11. muestran un ejemplo de los espectros de emisión del DPH en liposomas de EYPC y de su anisotropía.

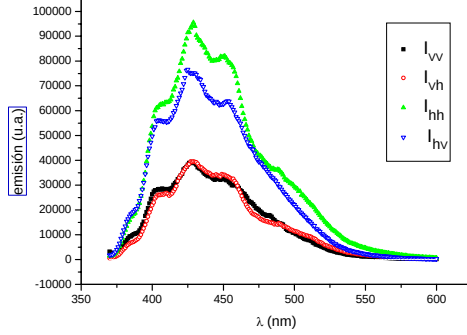


Figura 5.10. Espectros de emisión del DPH en liposomas de EYPC con distintas configuraciones de los polarizadores (I_{vv} , I_{hh} , I_{vh} , I_{hv}).

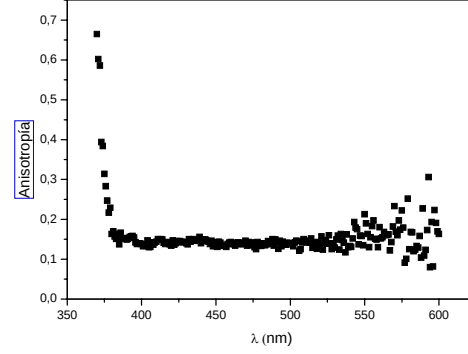


Figura 5.11. Valores calculados de la anisotropía del DPH en liposomas de EYPC.

Se compararon las medidas de anisotropía, a temperatura ambiente, de las tres sondas en liposomas de EYPC (r_{PC}) con la anisotropía de las mismas sondas en liposomas de EYPC con dibloques de F₆H₂ (r_{F-PC}):

$$\Delta r_{NBD} = r_{PC_{NBD}} - r_{F-PC_{NBD}} = 0$$

$$\Delta r_{TMA} = r_{PC_{TMA}} - r_{F-PC_{TMA}} = 0.02$$

$$\Delta r_{DPH} = r_{PC_{DPH}} - r_{F-PC_{DPH}} = 0.15$$

La anisotropía (movilidad) de las sondas que se sitúan más hacia el exterior de la membrana, NBD y TMA, no se ven afectadas por la incorporación del dibloque. Sin embargo, la incorporación del dibloque sí que afecta al entorno de la sonda DPH y varía su anisotropía.

La figura 5.12. muestra en detalle la variación de la anisotropía del DPH al incorporar el dibloque para distintas temperaturas. Teniendo en cuenta que el valor máximo de la anisotropía es 0.4, puede deducirse que los dibloques F_6H_2 se incorporan a la membrana en su zona central afectando a la movilidad de la sonda de DPH:

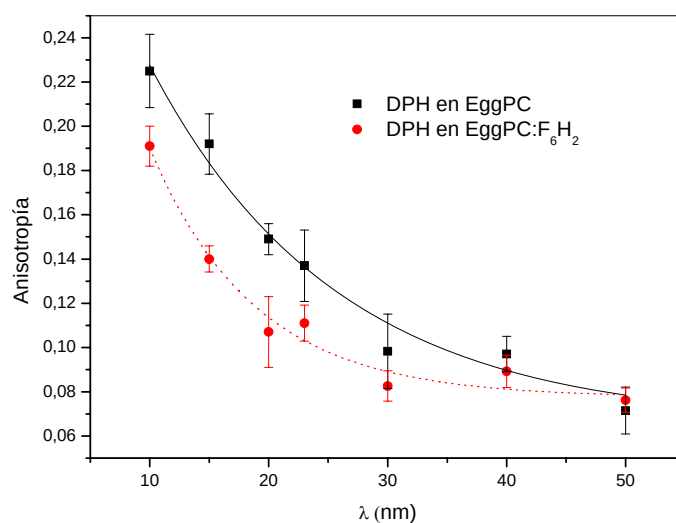


Figura 5.12. Variación de la anisotropía en función de la temperatura para la sonda DPH en liposomas de EYPC (■) y en liposomas de EYPC- F_6H_2 (●).

La incorporación de los dibloques fluorados al liposoma sólo afecta a la movilidad de la sonda DPH, lo que indica que los dibloques se sitúan en la zona central de la membrana, en coherencia con la hipótesis de formación de una cuatricapa, con los dibloques en la parte central de la membrana (figura 5.7).

5.5.3. ESTABILIDAD COLOIDAL DE LOS LIPOSOMAS FLUORADOS

Una vez que ya tenemos evidencias de que los dibloques semifluorados F_nH_m se incorporan a la bicapa de los liposomas, podemos estudiar la estabilidad

coloidal de estos liposomas fluorados de forma similar a como se mostró en el capítulo 3 de esta tesis. Se han realizado dos estudios en esta línea variando la composición de los liposomas y el medio iónico externo.

El primero de ellos, el más general, estudia la estabilidad coloidal de liposomas de DPPC con distintas fracciones molares del dibloque F_6H_{10} (10, 20, 40, 60 y 70 %) y en presencia de distintos iones mono-, di- y tri-valentes (Na^+ , Ca^{2+} y Gd^{3+}). Los resultados se muestran en el artículo ***“Examination of the Influence of F6H10 Fluorinated Diblocks on DPPC Liposomes.”*** [Sabin et al. (2007)]

Con las técnicas experimentales empleadas (potencial ζ , dispersión de luz) es conveniente trabajar con disoluciones unilamelares y monodispersas de liposomas. Por ello, los liposomas fueron sonicados hasta conseguir una disolución transparente de liposomas unilamelares y monodispersos.

Se usaron técnicas calorimétricas para determinar la incorporación del dibloque a la membrana de los liposomas. Sin embargo, el calorímetro usado (*Perkin-Elmer*) no estaba diseñado específicamente para muestras líquidas. La precisión en la detección de los cambios de fase fue suficiente para comprobar el efecto del dibloque en la bicapa, pero no para distinguir las transiciones de fase del lípido y la del dibloque como muestra la figura 5.8. de este capítulo. Sin embargo, sí se puede intuir que el ensanchamiento de los picos de la transición mostrado en este artículo es debida, en realidad, a la aparición de un segundo pico entorno a $\sim 46^\circ C$. La falta de precisión de estas medidas fue lo que nos motivó a repetirlas con otro calorímetro diseñado específicamente para líquidos (MicroCal VP-DSC). Los resultados son los ya mostrados en el apartado 5.5.2. de este capítulo.

Se determinó la *c.a.c.* para liposomas de DPPC con distintas fracciones molares de F_6H_{10} en presencia de distintos iones (Gd^{3+} , Ca^{2+} , Na^+) y se interpretó

su estabilidad bajo el potencial de interacción DLVO, obteniéndose resultados muy similares, independientemente de las fracciones molares de F_6H_{10} . La incorporación del dibloque F_6H_{10} a la bicapa de DPPC no afecta a la estabilidad coloidal en presencia de iones mono, di o trivalentes.

Se ha realizado un segundo estudio caracterizando la estabilidad de liposomas de EYPC con un dibloque mucho mas corto que el anterior, F_6H_2 , a fracción molar de 50 % en presencia de distintas concentraciones de K^+ . Los resultados se muestran en el trabajo ***“Characterization of phospholipid + semifluorinated alkane vesicle system”*** [Sabin et al. (2006)].

En esta ocasión la obtención de liposomas unilamelares y monodispersos se realizó por extrusión usando filtros de 200 nm, obteniendo una disolución de liposomas fluorados cuyo diámetro, medido por dispersión de luz, variaba entre 100-120 nm y su polidispersidades menores a 0.07. Las fotografías TEM de la figura 5.13. confirman el tamaño y la homogeneidad de las disolución después de la extrusión.

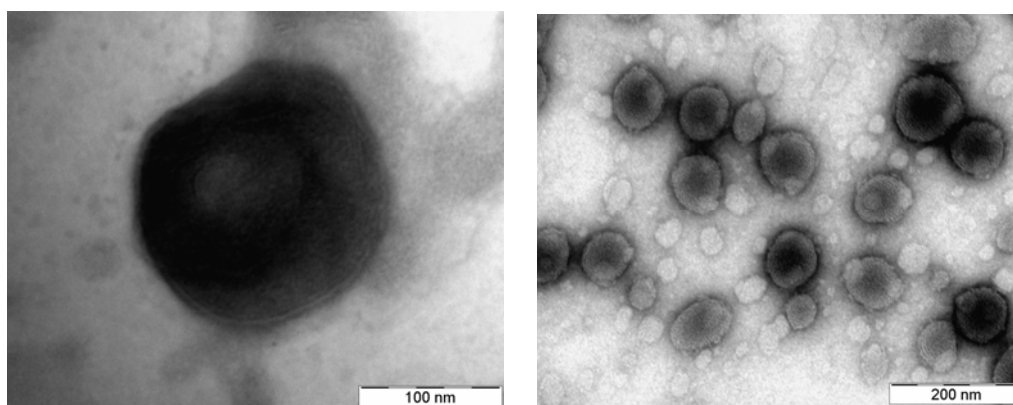


Figura 5.13. Fotografías TEM de liposomas compuestos de EYPC y F_6H_2 .

La comprobación de la incorporación de los dibloques de F_6H_2 al centro de la bicapa del liposomas se realizó por espectroscopía de fluorescencia como ya se indicó en el apartado 5.5.2. de este capítulo. La variación de la anisotropía de la sonda DPH confirma localización de los dibloques en el centro de la membrana lipídica.

El estudio de la estabilidad coloidal de los liposomas fluorados se realizó midiendo el tamaño del sistema para distintas concentraciones de iones K^+ . Las medidas de potencial ζ se emplearon para determinar las curvas de potencial entre liposomas de la teoría DLVO.

La incorporación del dibloque F_6H_2 a liposomas de EYPC no afecta a su estabilidad a cualquier concentración de K^+ , ni tampoco evita la disminución de tamaño de los liposomas debido a las fuerzas osmóticas.

EXAMINATION OF THE INFLUENCE OF F6H10 FLUORINATED DIBLOCKS ON DPPC LIPOSOMES

J. Sabin¹, G. Prieto^{1*}, Simona Sennato², Elena Blanco¹, Paula V. Messina¹, J. M. Ruso¹, Roberta Angelini², F. Bordini² and F. Sarmiento¹

¹Grupo de Biofísica e Interfaces, Departamento de Física Aplicada, Faculdade de Física, Universidade de Santiago de Compostela 15782 Santiago de Compostela, Spain

²Dipartimento di Fisica, Università di Roma 'La Sapienza', Piazzale A. Moro 2, 00185 Roma, Italy and INFM CRS-SOFT Unità di Roma 1, Italy

The interactions of unilamellar vesicles obtained by the incorporation of (1,2,3,4,5,6)-tridecafluoro-hexadecane (F6H10 diblock) to dipalmitophosphatidyl-choline (DPPC), with Gd^{3+} , Ca^{2+} , Na^{+} ions were studied by electrophoretic measurements, dynamic light scattering and differential scanning calorimetry (DSC). Electrophoretic mobility measurements on unilamellar vesicles as a function of ion concentrations show that the vesicles adsorb the different ions employed. DSC has been used to determine the effect of diblock on the transition temperature (T_c) and on the change of enthalpy (ΔH_c) associated with the process.

Keywords: DSC, fluorinated diblocks, vesicle-ion interactions

Introduction

Liposomes are artificial systems that are formed by the self-assembly of lipids into spherical or quasi-spherical structures. Their size is in the range from nanometers to micrometers and can be formed of a single bilayer shell, unilamellar, or multiple concentric bilayer shells, containing an aqueous central cavity. Liposomes have important applications in research and industry. Liposomes have been used as model systems in the study of membrane-bound proteins, ion transport, energy transduction, cellular functions, etc. Their ability to act as versatile containers has been used for drug delivery and targeting, for the transfer of genetic materials to cells, and for use as food and cosmetic ingredients [1–5].

To improve the stability of liposomes several strategies have been performed. A useful method has been the introduction of fluorinated or semi-fluorinated chains. These systems impart a combination of thermal, chemical and biological inertness, high gas-dissolving capacities, low surface tension, high fluidity, excellent spreading characteristic and low solubility in water to various colloidal systems of biological interest such as liposomes fluorocarbon-in-water emulsions and hydrogen-in-fluorocarbon emulsions [6].

In this work we study the behaviour of DPPC liposomes whose bilayer has been modified by the introduction of a semifluorinated chain of sixteen carbon atoms, six of which are fluorinated and ten hydrogenated

(F6H10 diblock). The effects of the interaction of Gd^{3+} , Ca^{2+} and Na^{+} in these liposomes were observed through their electrokinetic behaviour, size variation and thermal response to heating and to cooling.

Experimental

Materials

1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) (No. P 0763) was obtained from Sigma, of analytical grade (99%) and used without further purification. Organic solvents, methanol and chloroform, were from Aldrich and Merck respectively. All used salts [$La(NO_3)_3$, $GdCl_3$, $Ca(NO_3)_2$, $NaCl$] were of analytical grade with purity higher than 99%. Polycarbonate membrane filters were purchased from Millipore. F6H10 was synthesized according to reference [7] in the Institut Charles Sadron, 'Chimie des Systèmes Associatifs' group, Strasbourg, France. Their purity (>99%) was determined by TLC, NMR and elemental analysis.

Vesicle preparation

An appropriate amount of DPPC with different amounts of F6H10 was dissolved in 2 mL of a methanol-chloroform solution (1:1 v/v). The solution was placed in a glass vessel and allowed to form a dry film after rotary evaporation of the solvent. The film was then hydrated with 2 mL pure water at the temperature

* Author for correspondence: faxera@usc.es

of 43°C for 1 h. The resulting mixture was sonicated at a temperature up to 43°C for 1 h at continuous power mode, using a probe sonicator model Vibra-Cell Sonics, until the solution appeared to be optically transparent in white light. A homogeneous liposomal suspension of unilamellar vesicles was obtained.

Methods

Electrophoretic mobility

Electrophoretic mobility of the PC liposome particles was measured using a Malvern Instruments Zeta-master 5002 by taking the average of five measurements at stationary level. The cell used was a 5×2 mm rectangular quartz capillary. The temperature of the experiments was 25°C, controlled by a Haake temperature controller. The zeta potential (ζ -potential) was calculated from the electrophoretic mobilities as previously reported [8].

Photon correlation spectroscopy (PCS)

Measurements of the size and polydispersities of the liposome systems were performed by PCS using a Spectrometer Autosizer 4800 from Malvern Instruments equipped with a Uniphase 75 mW Ar laser, operating at 488 nm with vertically polarized light at a scattering angle of 90° at 298.15±0.01 K. Time correlation was analysed by a digital autocorrelator PCS7132 from Malvern Instruments and using the CONTIN algorithm. The lipid concentration used was 1 mg mL⁻¹ of DPPC (1.36 mM).

Differential scanning calorimetry (DSC)

A Perkin-Elmer differential scanning calorimeter (Model DSC-7) was used for the DSC experiments. Fifty μ L sealed pans of aluminum have been used as cell and reference. DPPC concentrations used were 10 mg mL⁻¹ (13.6 mM) and different amounts in molar fraction (10, 20, 40, 50%) of diblock were added. The curves were obtained at a cooling and heating rate of 10°C min⁻¹. The temperature (T_c) and enthalpy (ΔH) of transition were determined using Pyris for Windows software (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT). All the curves were measured, at least, four times with high reproducibility.

Results and discussion

To investigate the stability of DPPC-F6H10 vesicle the adsorption of polyvalent metal ions Gd³⁺, Ca²⁺, Na⁺ has been studied. We are interested in these ions to obtain a complete characterization of their interactions with liposomes, continuing our more recent works

[8–10]. For this purpose, measurements of the ζ -potential of DPPC-F6H10 vesicles as a function of concentration of ions have been made. DPPC molecules are zwitterionic, so that the liposomes bear a weak average charge, whose value depends on the pH of the medium. The ion concentration ranges include in all cases the critical aggregation concentration (*cac*). Figure 1 shows ζ -potential of DPPC-F6H10 liposomes as a function of Gd³⁺. As it can be seen, the potential increase from an initial value of +30 mV to reach a maximum, which can be identified as the point of saturation of the liposome surface with Gd³⁺ ions. After this point, a slow decrease is observed (see onset plot) that could be due to ionic strength of the medium, which progressively screens the surface charge of the liposomes [11, 12]. Figure 2 shows ζ -potential of DPPC-F6H10 liposomes as a function of Ca²⁺ and Na⁺ concentrations. In this case the potential always decreases with an increment of ion concentrations, which suggests that the screening of the surface by counterions and the consequent ζ -potential decrease is predominant vs. cation bindings.

To obtain deeper information regarding vesicle stabilization, photon correlation spectroscopy (PCS)

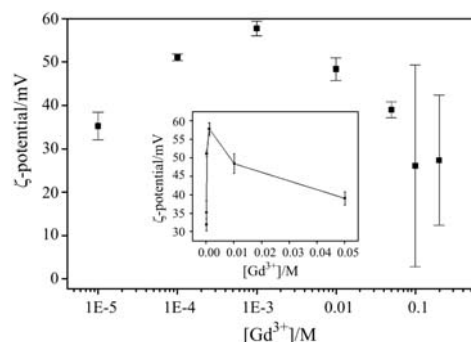


Fig. 1 ζ -Potential of DPPC-F6H10 as a function of Gd³⁺ molar concentration at 25°C

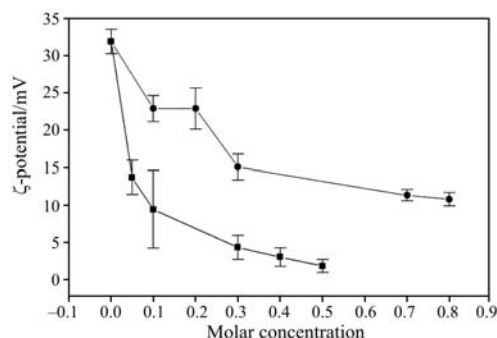


Fig. 2 ζ -Potential of: ● – DPPC-F6H10 and ■ – DPPC-F6H10 as a function of Ca²⁺ and Na⁺ molar concentration, respectively, at 25°C

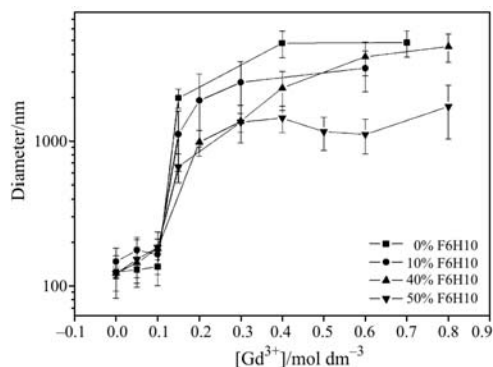


Fig. 3 Diameters of DPPC liposomes with different molar fractions of F6H10 as a function of Gd^{3+} concentration

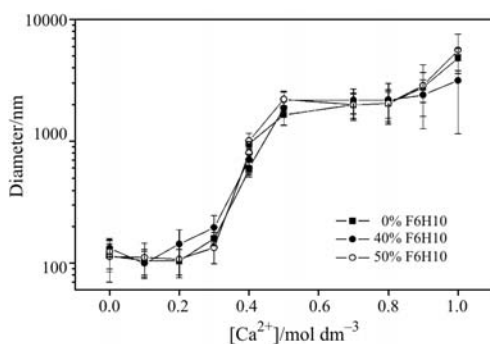


Fig. 4 Diameters of DPPC liposomes with different molar fractions of F6H10 as a function of Ca^{2+} concentration

was used. Figures 3 and 4 show size variation of DPPC-F6H10 liposomes as a function of Gd^{3+} and Ca^{2+} concentrations respectively. Liposomes in the presence of Gd^{3+} and Ca^{2+} show similarities. For concentrations >0.1 and >0.3 mol dm^{-3} respectively, the diffusing objects start to increase in size, probably due to an aggregation of liposomes. However the plot of Na^{+} (Fig. 5) offers a distinct feature. The size of liposomes does not increase with ion concentration, which suggests that the liposomes maintain stability. In all the cases, the incorporation of F6H10 to the bilayer does not affect the stability of the liposome.

The 'gel to liquid-crystalline' phase transition is easily detected by DSC, and characterized by a transition temperature (T_c), and an enthalpy change (ΔH_c), associated with the process. To proceed further in the direction of a complete analysis of the effect of the incorporation of diblock fluorinated in the membrane, DSC has been employed.

Figures 6 and 7 show cooling and heating curves, respectively, of DPPC-F6H10 liposomes. In the absence of diblock, DPPC liposomes had a gel to liquid transition temperature of $T_c \approx 42^\circ C$ and a change of enthalpy of $\Delta H \approx 9.6$ J g^{-1} . These specific results

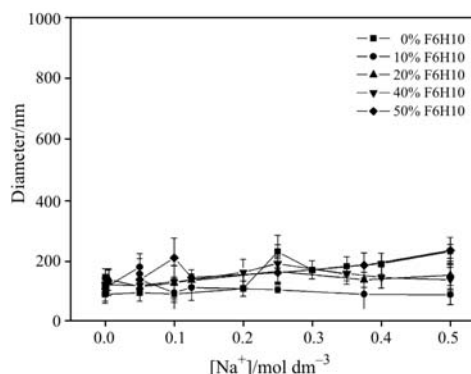


Fig. 5 Diameters of DPPC liposomes with different molar fractions of F6H10 as a function of Na^{+} concentration

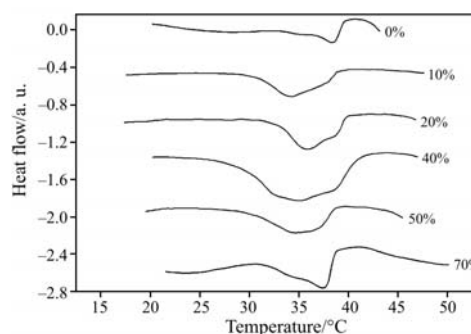


Fig. 6 Cooling curves of DPPC liposomes with different amounts of F6H10

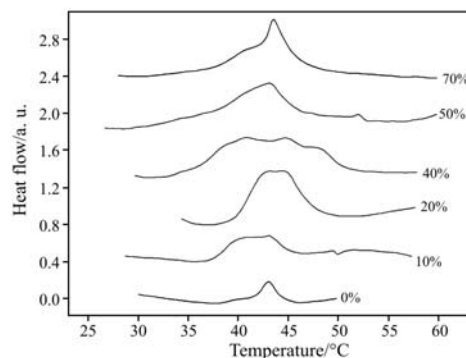


Fig. 7 Heating curves of DPPC liposomes with different amounts of F6H10

reasonable with bibliography citation [13, 14]. The addition of F6H10 to liposomes, in the range 0–15% molar fraction, results in a displacement of T_c , with broadening of the peak transition. Figure 8 shows the dependence of the transition enthalpy on diblock concentration. At intermediate concentrations of 15–50%

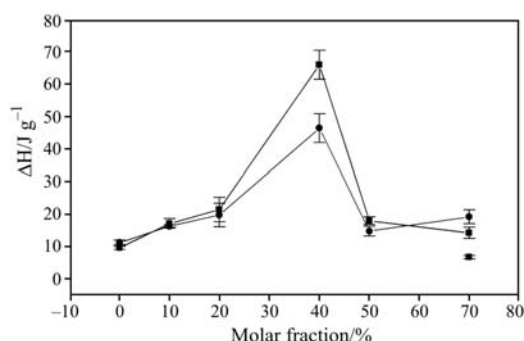


Fig. 8 Variation of enthalpy from gel to liquid crystalline transition of DPPC as a function of molar fraction of F6H10: ■ – heating, ● – cooling

molar fractions, the enthalpy change sharply increases. Beyond 50%, ΔH practically keeps constant.

The high hydrophobicity of diblock molecule suggests that the incorporation of the diblock into the bilayer is close to the hydrophobic tails of the lipid molecule. In previous work, anisotropic measurements show that the diblock (F6H2) is incorporated into the PC bilayer and the location of the diblock is in the middle of the bilayer [9].

Conclusions

Liposomes formed by DPPC with the semifluorinated diblock F6H10, in the presence of Gd^{3+} , Ca^{2+} , Na^{+} undergo changes in size, ζ -potential and 'gel to liquid' phase transition. The size change is enhanced more intensely in the presence of Gd^{3+} . The curves are affected by the incorporation of the fluorinated diblock. The changes in thermodynamic parameters of the phase transition are more important when the diblock concentration is around 20%.

By means of electrophoretic measurements, the adsorption of Gd^{3+} , Ca^{2+} , Na^{+} onto F6H10-DPPC liposome surface has been detected. ζ -Potential reaches a maximum, for Gd^{3+} ions, at very low salt concentrations ($\approx 10^{-3}$ M). Above this initial maximum, due to the increasing screening, ζ -potential decreases towards a constant value at higher ion concentrations.

The incorporation of the semifluorinated diblock into vesicles affects the physical properties of the bilayer. From the present study we cannot assume changes in their stability.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from Spanish 'Ministerio de Educación y Ciencia, Plan Nacional de Investigación (I+D+i), MAT2005-02421' and by the 'European Regional Development Fund (ERDF)'. PVM is an assistant researcher of the Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET).

References

- 1 K. Yagi, *Medical Applications of Liposomes*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo 1986.
- 2 D. D. Lasic, *Liposomes, From Physics to Applications*, Elsevier, Amsterdam 1993.
- 3 B. Ceh and D. D. Lasic, *Langmuir*, 11 (1995) 3356.
- 4 B. Ceh and D. D. Lasic, *J. Colloid Interface Sci.*, 185 (1997) 9.
- 5 M. D. Pysher and M. A. Hayes, *Langmuir*, 20 (2004) 4369.
- 6 G. Zhang, M. Maalum, P. Muller, N. Benoit and M. P. Krafft, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 6 (2004) 1566 and references therein.
- 7 N. O. Brace, *J. Org. Chem.*, 38 (1973) 3167.
- 8 J. Sabín, G. Prieto, P. V. Messina, J. M. Ruso, R. Hidalgo-Álvarez and F. Sarmiento, *Langmuir*, 21 (2005) 10968.
- 9 J. Sabín, J. M. Ruso, A. González-Pérez, G. Prieto and F. Sarmiento, *Colloids Surf. B*, 47 (2006) 64.
- 10 J. Sabín, G. Prieto, J. M. Ruso, R. Hidalgo-Álvarez and F. Sarmiento, *Eur. Phys. J. E*, 20 (2006) 401.
- 11 S. A. Tatulian, *J. Phys. Chem.*, 98 (1994) 4963.
- 12 Y. A. Ermakov, A. Z. Averbakh, A. I. Yusipovich and S. Sukharev, *Biophys. J.*, 80 (2001) 1851.
- 13 H. Ohsima, Y. Inoko and T. Mitsui, *J. Colloid Interface Sci.*, 86 (1982) 57.
- 14 S. Bonora, G. Fini and B. Piccirilli, *J. Therm. Anal. Cal.*, 61 (2000) 731.

DOI: 10.1007/s10973-006-7846-1

ERRATUM

Dynamic light scattering

Dynamic light scattering (DLS) measurement were performed by a standard laboratory-built DLS spectrometer equipped with a BI-9000AT digital correlator (Brookhaven Instruments) and a He-Ne laser operation at 10 mW power and 632.8 nm wavelength. Data analysis was performed using a software based on the CONTIN method.



Characterization of phospholipid + semifluorinated alkane vesicle system

Juan Sabín, Juan M. Ruso, Alfredo González-Pérez, Gerardo Prieto, Félix Sarmiento*

*Biophysics and Interfaces Group, Department of Applied Physics, Faculty of Physics, University of Santiago de Compostela,
E-15782 Santiago de Compostela, Spain*

Received 11 March 2005; received in revised form 21 November 2005; accepted 28 November 2005

Available online 6 January 2006

Abstract

The aim of this study is to characterize vesicles obtained by the incorporation of the semifluorinated alkane, (perfluoro-*n*-hexyl)ethane (diblock F_6H_2) to a standard lipid, egg yolk phosphatidylcholine (PC). Large unilamellar vesicles (LUVs), prepared by extrusion, were characterized by fluorescence spectroscopy, zeta potential (ζ -potential) and light scattering. By using the fluorescence spectroscopy technique, the anisotropy of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) probe at different temperatures was determined. It was demonstrated that F_6H_2 is placed inside of the lipid bilayer and that the hydrocarbon acyl chain in the bilayers has higher viscosity in the presence of fluoroalkane. The ζ -potential of the PC- F_6H_2 system is negative and increases (in absolute value) from -10 to -19 mV when the temperature rises from 10 to 25 °C, this last value keeping practically constant with a further increase of temperature. The adsorption of K^+ ions on the liposome surface was measured by ζ -potential. This adsorption originates a sudden increase of the initial ζ -potential followed by a slight decrease with K^+ concentration. The application of the DLVO theory of colloidal stability showed a growing dependence of the DLVO potential with K^+ concentration and consequently a increasing stability. © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Liposomes; Semifluorinated; Zeta potential; Anisotropy; Light scattering; DLVO theory

1. Introduction

Liposomes can be characterised as associated colloids, built up of double-chained amphiphilic molecules that self-assemble in aqueous media into spherical, self-closed structures. Liposomes can be composed of either extracted and purified, naturally occurring lipids or many synthetic products. In this last case, the artificial liposomes are named vesicles. They can consist of one or several concentric membranes; their size ranges from 20 nm to several micrometers, whereas the thickness of the membranes is around 3.5 nm [1]. They can be prepared in the laboratory by various methods including reverse phase evaporation, detergent dialysis, and extrusion [2]. Liposomes have applications in research laboratory as model membranes and in the pharmaceutical industry as nanoscale containers for drugs [3,4], vaccines [5], enzymes or genetic material [6]. In general, conventional liposomes exhibit poor stability during storage, use and transit if used in medical field. To improve the stability of liposomes several strategies have been performed. An interest-

ing method has been the use of fluorocarbon surfactants due to their extraordinary features.

Fluorinated chains display a combination of thermal, chemical and biological inertness, high gas-dissolving capacities, low surface tension, high fluidity, excellent spreading characteristics and low solubility in water [7–10]. The hydrophobic region of perfluorinated surfactants is much stiffer than the hydrophobic backbone of hydrocarbon surfactants. Therefore, model membranes made up of surfactants with perfluoroalkyl chains should show an enhanced stability compared to vesicles, which are derived from hydrocarbon detergents [11]. However, these vesicles are less permeant with respect to the release of both hydrophilic and lipophilic encapsulated species [12] and display increased persistence in vivo persistence [13]. For these reasons, vesicles formed from standard hydrocarbon lipids and semi or perfluorinated alkanes have raised interest because of new properties, different from those of conventional vesicles made from hydrocarbon lipids, and because of their potential as drug delivery systems [14–17].

The formation of vesicles has been observed in the case of single- and double-chain perfluoroalkyl surfactants [18] as well as with “hybrid” surfactants consisting of a hydrocarbon and a perfluoroalkyl chain [19], respectively. Ion pairs of

* Corresponding author. Tel.: +34 981 563 100; fax: +34 981 520 676.
E-mail address: fsarmi@usc.es (F. Sarmiento).

fluorocarbon amphiphiles have been shown to form vesicles [20,21]. Surfactants derived from $R_F C_2 H_4 OH$, $R_F CH_2 CO_2 H$, or $R_F C_2 H_4 CO_2 H$ tend to aggregate to vesicles [11]. Vesicles were observed in a zwitterionic fluorocarbon system derived from $C_8 F_{17} C_2 H_4 OP(O)_2^- C_2 H_4 N(CH_3)_3^+$ [22] and in non-ionic systems derived from $R_F C_2 H_4 OH$ [23]. Previous physico-chemical studies have shown an increase on stability of perfluoroalkylated liposomes with regard to hydrogenated analogous. Cornelius et al. [24] and Krafft et al. [25] report $F_n H_m$ diblocks as efficient stabilizers of phospholipid-based fluorocarbon emulsions and allowed precise particle size control. Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)/ $C_n F_{2n+1} CH=CH C_m H_{2m-1}$ vesicles are considerably more stable and less permeant to 5,6-carboxyfluorescein release than vesicles made from DPPC alone [26].

The purpose of this work is to investigate alternative vesicles made by the incorporation of a semifluorinated alkane, (perfluoro-*n*-hexyl) ethane (diblock $F_6 H_2$), to a standard lipid, egg yolk phosphatidylcholine (PC), using anisotropy, zeta potential (ζ -potential) and light scattering measurements. The aim is to study the improvement of vesicle properties in reference to PC without fluorinated alkane and this work is the first of a series of studies on these kind of systems with different lipids and F-alkanes.

2. Experimental

2.1. Materials

L- α -Phosphatidylcholine from egg yolk (No. P 3556) was from Sigma and used as received. (Perfluoro-*n*-hexyl)ethane (No. 7063) was from Fluorochem. The probes 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (No. D202) and 1-[4-(trimethylammonium) phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene were from Molecular Probes. The probe *N*-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) dioleoylphosphatidylethanolamine was from Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL). Organic solvents methanol and chloroform were from Aldrich and Merck, respectively. Polycarbonate membranes were purchased from Millipore.

2.2. Vesicle preparation

Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared by the thin-film hydration method [1]. A solution of lipid PC with and without $F_6 H_2$ in chloroform/methanol (4:1) was evaporated in a rotary evaporator to dryness under nitrogen flux and the resulting lipid film was hydrated with double distilled, degassed and deionised water. This mixture was extruded 5 times through polycarbonate filters of 800 nm, 5 through of 400 nm and 5 through of 200 nm pore size to form LUVs.

2.3. Fluorescence anisotropy

Steady state fluorescence measurements of labelled liposomes were accomplished in a SL 900CD spectrofluorometer (Edinburgh Instruments) using L-format fluorescence polarizers. The sequence of probes fluorescence spectra was measured 24 h after the vesicle labelling to follow the course of staining.

The excitation and emission wavelengths were 365/425 nm (slit-widths: 4 nm) for 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) and 1-[4-(trimethylammonium) phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene (TMA-DPH) and 460/534 nm for JV-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) dioleoylphosphatidylethanolamine (NBD-PE) (slit-widths: 4 nm). Each wavelength was accumulated for 1 s, the time interval between the spectra was 5 min. The fluorescence polarization values were measured by: (a) exciting a molecule with polarized light and (b) observing the intensity of emitted light passing through a polarizer held parallel ($\parallel$) or perpendicular ($\perp$) to the direction of the electric vector to the polarized excitation. Polarization values (P) are computed as indicated in the equation:

$$P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}} \quad (1)$$

where $I_{\parallel}$ is the intensity of light when polarizers are in a parallel orientation, and $I_{\perp}$ is the intensity when polarizers are in a perpendicular orientation [27,28]. The term " $I_{\parallel} - I_{\perp}$ " will approach zero if molecular motion occurs. Hence, polarization values (P) reflect the degree to which the photoselected population of excited molecules becomes randomised during the excited state to the direction of the electric vector to the polarized excitation. In practice, polarization measurements are made by taking fluorescence intensity readings with the excitation and emission polarizers in combinations of vertical (v) and horizontal (h) positions. These combinations are vv , vh , hh , and hv , where the order of the letters represents the positions of the excitation and emission polarizers, respectively. In equation (1), $I_{\parallel}$ and $I_{\perp}$ correspond to intensity readings taken in the vv and vh laboratory settings, respectively. The hh and hv readings are used to correct for optical artefacts introduced by the instrument. Thus, in actual practice, polarization values are calculated for each wavelength from:

$$p = \frac{I_{vv} - G I_{vh}}{I_{vv} + G I_{vh}} \quad (2)$$

where $G = I_{vh}/I_{hh}$. Anisotropy (r) was computed by the equation

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (3)$$

2.4. Transmission electron microscopy

The morphological examination of liposomes was performed by transmission electron microscopy (TEM) (CM-12 Philips). The samples were stained with 2% (w/v) phosphotungstic acid and placed on copper grids with Formvar films for viewing by TEM.

2.5. ζ -potential

ζ -Potential of the PC- $F_6 H_2$ system were measured using a Malvern Instruments Zetamaster 5002 by taking the average of ten measurements at stationary level. The cell was a 5 mm $\times$ 2 mm rectangular quartz capillary. The temperature was

controlled by a Haake temperature controller. The ζ -potential was calculated from the electrophoretic mobility, μ_E , by using the Henry correction of Smoluchowski's equation [29]:

$$\zeta = \frac{3\mu_E\eta}{2\varepsilon_0\varepsilon_r} \frac{1}{f(\kappa a)} \quad (4)$$

where ε_0 is the vacuum permittivity, ε_r is the relative permittivity, a is the particle radius, κ^{-1} is the Debye length and η is the viscosity of water. The function $f(\kappa a)$ depends on the particle size and the ionic strength being computed by:

$$f(\kappa a) = \frac{3}{2} - \frac{9}{2\kappa a} + \frac{75}{2\kappa^2 a^2} \quad (5)$$

which is valid for $\kappa a > 10$

2.6. Light scattering

Dynamic light scattering measurements were made at different temperatures at a scattering angle of 90° using a Spectrometer Autosizer 4800 from Malvern Instruments equipped with a Uniphase 75 mW Ar laser operating at 488 nm with vertically polarized light. Time correlation was analysed by a digital autocorrelator PCS7132 from Malvern Instruments.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the vesicles

The morphology of PC- F_6H_2 vesicles was observed by TEM. The micrographs (Fig. 1) show high homogeneity with a bilayer thickness of 3.5 nm in concordance with literature [1]. In order to clarify the fluoroalkane position in the bilayer, three different probes were separately incorporated in the membrane of the vesicles. DPH, a hydrophobic molecule that is oriented predominantly parallel to the fatty acid chains, the distance of the shallow end of the group to the bilayer center in PC vesicles being about 13 Å [30]. It reports about the order of the lipid fatty acyl chains in the bilayer core region. TMA-DPH is anchored at the water/lipid interface, because of its additional charged trimethylammonium group, and the distance of the shallow end of the TMA-DPH group to the center of PC bilayers is 16.5 Å

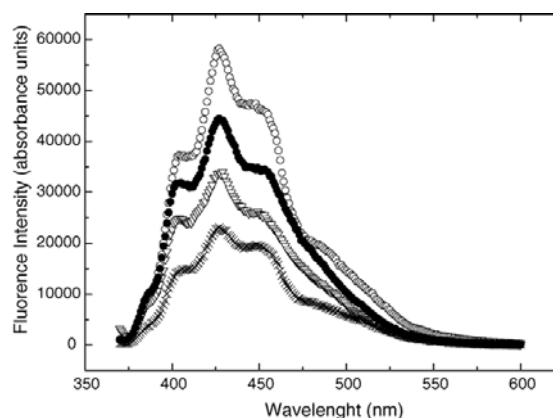


Fig. 2. Fluorescence spectra of DPH on PC at room temperature: (∇) vv; ($\times$) vh; ($\circ$) hh; and ($\bullet$) hv.

[31]. Finally, NBD-PE that is an indicator of the mobility of the lipid headgroup region of the membranes [32]. Variation of anisotropy measurements at higher emission wavelength for vesicles with and without fluoroalkane were:

$$\begin{aligned} \Delta r_{\text{NBD-PE}} &= r_{\text{EYCP}} - r_{\text{EYCP-PHFE}} \approx 0 \\ \Delta r_{\text{TMA-DPH}} &= r_{\text{EYCP}} - r_{\text{EYCP-PHFE}} = 0.02 \\ \Delta r_{\text{DPH}} &= r_{\text{EYCP}} - r_{\text{EYCP-PHFE}} = 0.15 \end{aligned} \quad (6)$$

then DPH probe was used to characterize the incorporation of fluoroalkane to the liposome structure. Since fluorescence anisotropy is highly dependent upon the viscosity of the solution in which the fluorophore is dissolved, it can be used to obtain information on the microviscosity of lipid membranes. As an example Fig. 2 shows the fluorescence intensity results with the excitation and emission polarizers in combinations of vertical and horizontal positions. Fig. 3 depicts the temperature dependence of DPH fluorescence anisotropy, r , in bilayers prepared with PC and PC- F_6H_2 . The results obtained for PC agrees with those obtained by Besanger et al. [33] The profiles are similar with larger r for PC. Thus, the introduction of the fluoroalkane in the bilayer decreases the viscosity and consequently the acyl chain has larger degree of motion, giving rise to a more flexible

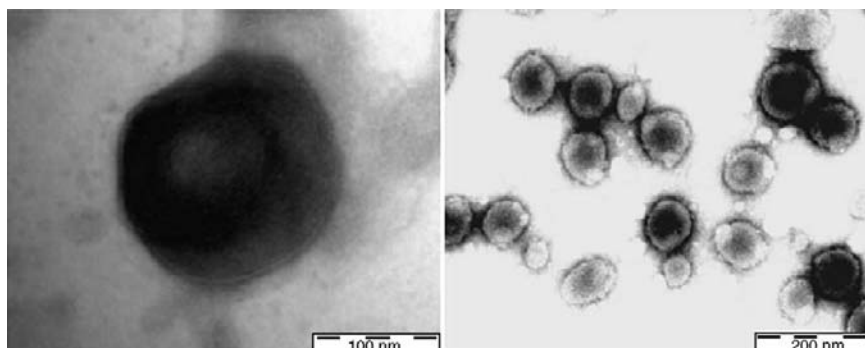


Fig. 1. Transmission electron micrograph of spontaneous PC + F_6H_2 .

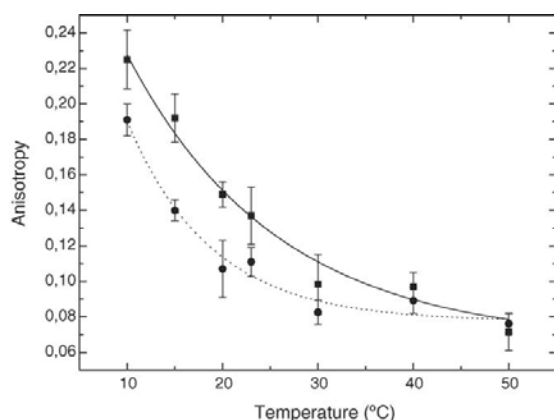


Fig. 3. Temperature dependence of the fluorescence anisotropy of DPH on liposomes: (■) PC and (●) PC + F₆H₂.

vesicle. Egg phosphatidylcholine is composed by a mixture of phospholipids whose gel phase transition is below 0 °C [34]. For this reason PC vesicles are expected to show no phase transitions along the temperature range studied in this work, as observed. The different curves for the two type of liposomes probe that fluorinated compound is located in the bilayer. Since the maximum value of anisotropy is 0.4, there is evidence that perfluoroalkane is placed in the middle of the bilayer. A scheme is shown in Fig. 4.

Fig. 5 shows the temperature dependence of the ζ -potential of fluorinated liposomes. Experimental results indicate that the PC–F₆H₂ system possess negative charge in the experimental conditions, indicating a weak electrostatic repulsive force between vesicles. Since similar values have been reported by Carrion et al. [35] and McLaughlin et al. [36] for PC liposomes at pH 7.4, it may be concluded that the addition of F₆H₂ to PC liposomes does not change the sign of the surface charge. The value of the liposome ζ -potential varies from approximately –10 to approximately –19 mV as the temperature raises from 10 to 25 °C. The increase could be caused by the increase of the thermal energy and motion of particles at higher temperature. This behaviour was also found by Cocera et al. [37] for the solubilization of PC liposomes with sodium decylsulfate, dodecylsulfate and tetradecylsulfate. From 25 °C the ζ -potential raises at a constant value. However, the size of liposomes (obtained by light scattering measurements) increases with rising temperature, as it can be observed in Fig. 6. These results could be explained in

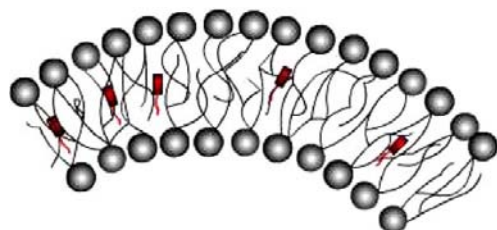


Fig. 4. Scheme of a PC bilayer showing a location of F₆H₂ in the bilayer core region.

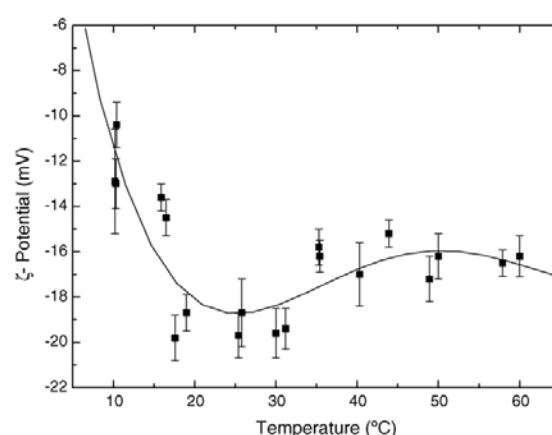


Fig. 5. Temperature dependence of the ζ -potential of PC + F₆H₂ liposomes.

two ways. Firstly, by changes in the direction of the lipid dipole moments with respect to the monolayer surface, induced by temperature. Several studies have been made on this dependence [38–41]. Makino et al. [42] have proposed an elegant model to describe the size variation with the temperature. In agreement with this model, the variation of the liposome size is due to an alteration of angles between the head groups of lipids and the membrane surface. The head groups can change from perpendicular to parallel to the surface. Secondly, the movement of the lipid molecules acyl chain must increase with the temperature, contributing to an expansion of the liposome size.

3.2. Adsorption of K⁺ to PC–F₆H₂ liposomes

In order to analyze the colloidal stability of fluorinated liposomes the adsorption of K⁺ ions has been studied. Fig. 7 shows the ζ -potential of PC–F₆H₂ liposomes as a function of K⁺ concentration. In absence of added salt, the potential value is negative, due to zwitterionic character of hydrophilic head of phospholipids. In concordance with other authors [43], confirm-

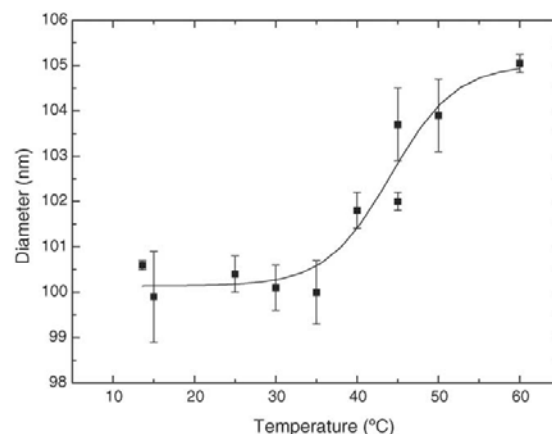


Fig. 6. Temperature dependence of size of PC + F₆H₂ liposomes.

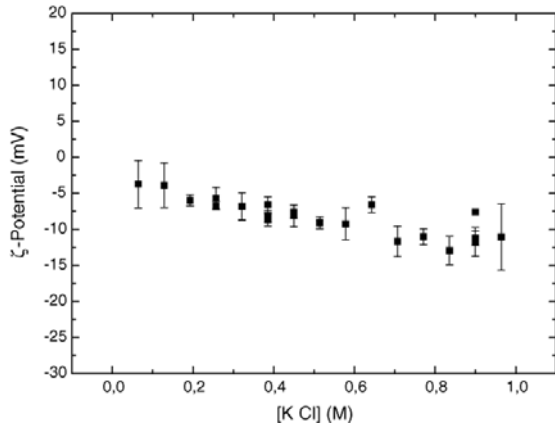


Fig. 7. ζ -Potential of PC + F₆H₂ liposomes as a function of the K⁺ concentration.

ing that the incorporation of fluoroalkane does not affect the surface charge of liposomes. This initial negative value drastically increases with increase in ion concentration. The ion K⁺ is adsorbed by electrostatic and van der Waals interactions, which produces an increase in the ζ -potential until the effect is counteracted by the thermal waving, at $\zeta \approx -3$ mV. In this point, starts the Cl⁻ adsorption by van der Waals forces and a slow decrease of ζ -potential is appreciated.

To explain the decrease in the ζ -potential by increasing K⁺, dynamic light scattering measurements were carried out to determine the size distribution and polydispersity of vesicles. Fig. 8 shows size distribution. In absence of salt, liposomes had a diameter of 117 nm and were stables in a period of several days. When salt concentration increases, the size exponentially decreases reaching a constant value of 100 nm at a concentration of 0.3 M. Polydispersities (Fig. 9) are low and practically constants in all range of concentrations, indicating that vesicles keep their spherical shape. A possible explanation of the consideration of

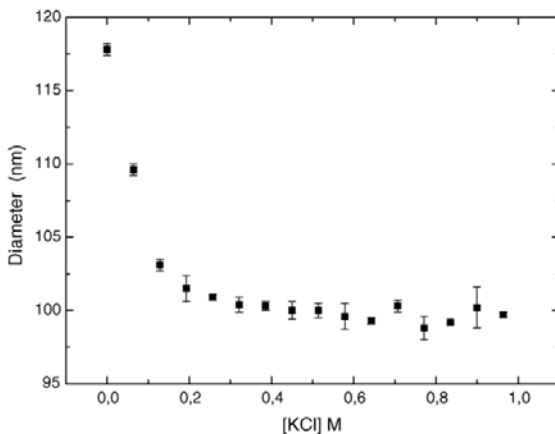


Fig. 8. Size distribution of PC + F₆H₂ liposomes as a function of the K⁺ concentration.

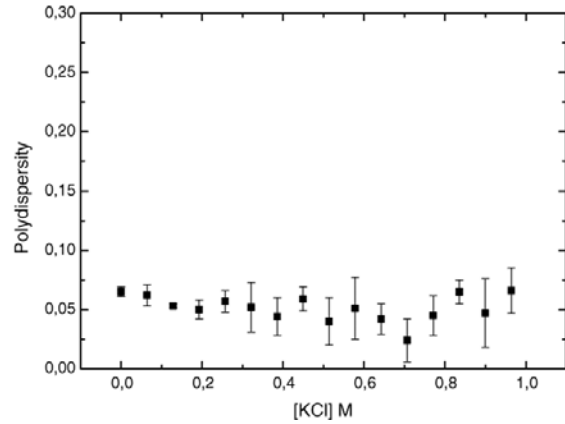


Fig. 9. Polydispersities of PC + F₆H₂ liposomes as a function of the K⁺ concentration.

the liposome as a soft and fluid colloidal system with capacity to vary their size by the flexibility of the membrane. The osmotic pressure difference reduces the water amount inside vesicles, while the counterions adsorption reduces the repulsion between polar groups. As consequence, the bilayer, which has a structure of liquid monolayer (double) in the inferior limit of cohesion, starts to contract increasing their compactness as far as it can not more. This is thereby because the bilayer has the compactness of a liquid monolayer (double) and the only manner to reduce the area is by breakdown, i.e. by monolayer fold. At this moment, the bilayer resistance to contract more produces the equilibrium with the osmotic pressure and the vesicle reach a stable size, which is independent of electrolyte added concentration. The constant polydispersity confirms that all vesicles are approximately equivalents, which happens because a thermodynamic equilibrium has been reached.

To correlate these observations with interactive forces between particles the data were analysed by application of the DLVO theory of colloidal stability [44,45]. The interaction potential between particles is written as the sum of an attractive London–van der Waals interaction $V_A(x)$ and a repulsive interaction $V_R(x)$ due to the electric charge of the particles. $V_A(x)$ was derived by Hamaker [46,47] for the case of two spheres of equal radius, a :

$$V_A(x) = -\frac{A}{6} \left[\frac{2a^2}{x(4a+x)} + \frac{2a^2}{(2a+x)^2} + \ln \frac{x(4a+x)}{2a+x} \right] \quad (7)$$

where A is the attractive Hamaker constant and x is the distance between the two spheres. The expression for $V_R(x)$ by area unit has the form [48,49]

$$V_R(x) = 2\pi\epsilon_0\epsilon_r(a+\Delta) \left(\frac{4k_B T}{ze} \gamma \right)^2 \exp[-\kappa(x-2\Delta)] \quad (8)$$

where ϵ_0 is the electric permittivity of vacuum, ϵ_r is the relative electric permittivity of medium, k_B is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, κ is the reciprocal of the Debye

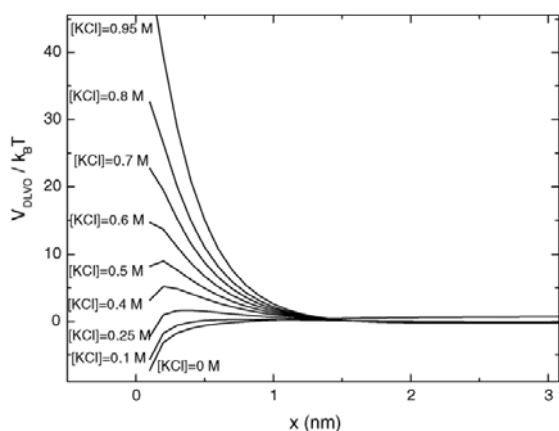


Fig. 10. DLVO potentials of PC + F₆H₂ liposomes for different K⁺ concentrations.

length:

$$\kappa^2 = \frac{(z_1^2 z_2 + z_2^2 z_1) c_s N_A e^2}{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T} \quad (9)$$

where c_s is the concentration, e the elementary charge, z_i the charge of the ions, N_A the Avogadro's number. Finally, Δ is the thickness of the Stern layer, i.e. taking in account of hydrated radius ion and

$$\gamma = \tan \frac{ze\Psi_d}{4k_B T} \quad (10)$$

where Ψ_d is the surface potential.

Fig. 10 shows the results obtained as a function of x and the K⁺ concentration. The Hamaker constant was 0.07×10^{-20} J [50] and $\Delta = 0.33$ nm [51,52]. The curves increase their repulsive barrier with concentration increase in agreement with the increase, in absolute value, of zeta potential. At low concentrations, where ζ -potential is near zero, the electrostatic potential is insignificant and DLVO potential is principally due to van

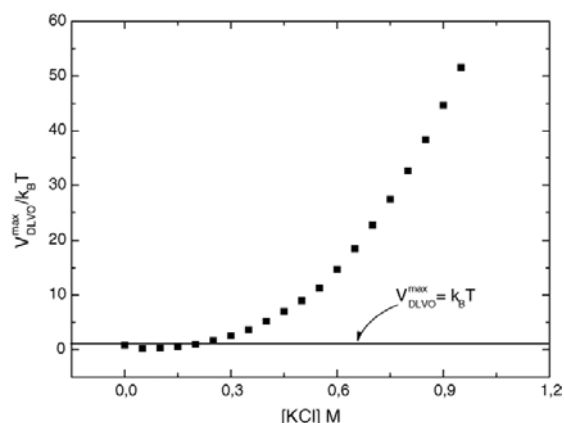


Fig. 11. DLVO potential maximum of PC + F₆H₂ liposomes for each K⁺ concentration.

der Waals forces. Fig. 11 shows the maximum of DLVO potential curves for each salt concentration. A growing dependence of potential with concentration is observed and consequently an increased stability. With the criterion that a system is stable when the repulsive potential is larger than $k_B T$, our system is unstable approximately below 0.3 M, which disagrees with experimental results. Instabilities should lead to aggregation or fusion of liposomes and, consequently, to a size growing.

Acknowledgments

The authors are indebted to the Photochemistry Group (Physical Chemistry Department at University of Santiago de Compostela) for kind access to the spectrofluorometer. This research was funded by the Spanish Ministry of Science and Technology (Project MAT2002-00608, European FEDER support included) and by Xunta de Galicia (Project PGIDIT03PXIC20615PN). Juan Sabin thanks to the Spanish Ministry of Science and Technology for his FPI grant.

References

- [1] D.D. Lasic, *Liposomes. From Physics to Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1993.
- [2] R.R. New, *Liposomes: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, 1990.
- [3] G. Gregoriadis, *Liposomes as Drug Carriers*, Wiley, New York, 1987.
- [4] J.P. Devissaguet, F. Puisieux, *Les Liposomes: Aspects Technologiques*, in: *Biologiques et Pharmacologiques*, Les Editions Inserm, Paris, 1993, p. 209.
- [5] C. Alving, R. Richards, in: M. Ostro (Ed.), *Liposomes*, Marcel Dekker, New York, 1983, p. 209.
- [6] C. Nicolau, in: F. Puisieux, J. Delattre (Eds.), *Les Liposomes: Applications Thérapeutiques*, Tec and Doc Lavoisier, Paris, 1985, p. 277.
- [7] J.R. Riess, *Chem. Rev.* 101 (2001) 2797.
- [8] J.R. Riess, *Tetrahedron* 58 (2002) 4113.
- [9] M.P. Krafft, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 209.
- [10] M.P. Krafft, J.G. Riess, *Biochimie* 80 (1998) 489.
- [11] S. Szönyi, H.J. Watzke, A. Cambon, *Prog. Colloid Polym. Sci.* 89 (1992) 149.
- [12] F. Frézard, C. Santaella, P. Vierling, J.G. Riess, *Biochim. Biophys. Acta* 1192 (1994) 61.
- [13] C. Santaella, F. Frézard, P. Vierling, J.G. Riess, *FEBS Lett.* 336 (1993) 481.
- [14] J.G. Riess, *J. Drug. Target.* 2 (1994) 455.
- [15] J.G. Riess, *J. Liposome Res.* 5 (1995) 413.
- [16] L. Trevino, F. Frézard, M. Postel, J.G. Riess, *J. Liposome Res.* 4 (1994) 1017.
- [17] M. Schmutz, B. Michels, P. Marie, M.P. Krafft, *Langmuir* 19 (2003) 4889.
- [18] T. Kunitake, Y. Okahata, S. Yasunami, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 5547.
- [19] T. Kunitake, N. Higashi, *Makromol. Chem. Suppl.* 14 (1985) 81.
- [20] E. Kaler, A.K. Murthy, B.E. Rodriguez, J.A.N. Zasadzinski, *Science* 245 (1989) 1371.
- [21] S. Szönyi, H. Watzke, *Springer Proc. Phys.* 66 (1992) 198.
- [22] M.P. Krafft, F. Giulieri, J.G. Riess, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 105 (1993) 783.
- [23] J. Würtz, H. Hoffmann, *J. Colloid Interface Sci.* 175 (1995) 304.
- [24] C. Cornélus, M.P. Krafft, J.G. Riess, *Artif. Cells, Blood Subst. Immob. Biotech.* 22 (1994) 1183.
- [25] M.P. Krafft, J.G. Riess, J.G. Weers, in: S. Benita (Ed.), *Submicronic Emulsions in Drug Targeting and Delivery*, Harwood Academic, Amsterdam, 1998, p. 235.

- [26] L. Trevino, F. Frézard, J.P. Rolland, M. Postel, J.G. Riess, *Colloids Surf.* 88 (1994) 223.
- [27] L.A. Kashparov, G.V. Semisotnov, Y.B. Alakhov, *Eur. J. Biochem.* 21 (1982) 5924.
- [28] G. Weber, *Adv. Protein Chem.* 8 (1953) 415.
- [29] J.R. Hunter, *Zeta Potential in Colloid Science*, Academic Press, London, 1981.
- [30] R.D. Kaiser, E. London, *Biochemistry* 37 (1998) 8180.
- [31] L.W. Engel, F.G. Prendergast, *Biochemistry* 20 (1981) 7338.
- [32] B.R. Lentz, J.R. Wu, L. Zheng, J. Prevatil, *Biophys. J.* 71 (1996) 3302.
- [33] T. Besanger, Y. Zhang, J.D. Brennan, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 10535.
- [34] D. Marsh, *CRC Handbook of Lipid Bilayers*, Chemical Rubber Company Press, Boca Raton, FL, 1990.
- [35] F.J. Carrion, A.D. Maza, J. Parra, *J. Colloid Interface Sci.* 164 (1994) 78.
- [36] A. McLaughlin, W.K. Eng, G. Vaio, T. Wilson, S. McLaughlin, *J. Membrane Biol.* 76 (1983) 183.
- [37] M. Cocera, O. López, A. de la Maza, J.L. Parra, J. Estelrich, *Langmuir* 15 (1999) 2230.
- [38] K.C. Sehgal, W.F. Pickard, C.M. Jackson, *Biochim. Biophys. Acta* 552 (1979) 11.
- [39] V. Vogel, D. Möbius, *J. Colloid Interface Sci.* 126 (1988) 408.
- [40] V. Vogel, D. Möbius, *Thin Solid Films* 159 (1988) 73.
- [41] C.M. Roland, M.J. Zuckermann, A. Geogallas, *J. Chem. Phys.* 86 (1987) 5852.
- [42] K. Makino, T. Yamada, M. Kimura, T. Oka, H. Ohshima, T. Kondo, *Biophys. Chem.* 41 (1991) 175.
- [43] M. Silvander, P. Hanson, K. Edwards, *Langmuir* 16 (2000) 3696.
- [44] B.V. Derjaguin, L.D. Landau, *Acta Physicochim. URSS* 14 (1941) 633.
- [45] E.J.B. Verwey, J.Th.G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier, Amsterdam, 1948.
- [46] H.C. Hamaker, *Rec. Trav. Chim.* 55 (1936) 1015.
- [47] H.C. Hamaker, *Rec. Trav. Chim.* 56 (1937) 727.
- [48] E. Matijevic, K.J. Mathai, R.H. Ottewill, M. Kerker, *J. Phys. Chem.* 65 (1961) 826.
- [49] B. Vincent, H. Bijsterbosch, J. Lyklema, *J. Colloid Interface Sci.* 37 (1970) 171.
- [50] D. Bastos, F.J. de las Nieves, *Colloid Polym. Sci.* 272 (1994) 592.
- [51] M.S. Romero Cano, A. Martín Rodríguez, F.J. de las Nieves, *J. Colloid Interface Sci.* 198 (1988) 273.
- [52] J.N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Academic Press, London, 1995.

5.6. CONCLUSIONES

Se han preparado liposomas fluorados por combinación de fosfolípidos (DMPC, DPPC y EYPC) con dibloques semifluorados (F_6H_2 , F_6H_{10} , F_8H_{14} , F_8H_{16} , F_8H_{18} , F_8H_{20}) por la técnica de dispersión simple.

Para comprobar la incorporación de los dibloques a la bicapa lipídica se han empleado técnicas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y de espectrofotometría de fluorescencia. Los datos obtenidos por ambas técnicas muestran un esquema coherente con los modelos propuestos por otros investigadores, en los cuales los dibloques no se entremezclan con los lípidos, si no que forman una bicapa propia en medio de la membrana lipídica constituyendo así una cuatricapa de lípidos y dibloques semifluorados (figura 5.7).

Se ha estudiado cómo afectan los dibloques a la estabilidad coloidal de los liposomas. La incorporación de un dibloque con 16 carbonos, F_6H_{10} , a liposomas de DPPC a fracciones molares de 10, 20, 40, 50 y 70 % no parece influir en la estabilidad para distintas concentraciones de Gd^{3+} , Ca^{2+} y Na^+ . Tampoco la incorporación de un dibloque con la mitad de átomos de carbono, F_6H_2 , varía la estabilidad de liposomas de EYPC en presencia de distintas concentraciones de K^+ .

5.7. BIBLIOGRAFÍA

- Arrington C.H. and Patterson G.D.** (1953) J. Phys. Chem. 57: 247. "*Colloidal Properties of Highly Fluorinated Alkanoic Acids*"
- Cevc G. and Marsh D.** (1984) "*Phospholipids Bilayers*" Wiley-Interscience Publications. New York.
- Blanco E., González-Pérez A., Ruso J.M., Pedrido R., Prieto G. and Sarmiento F.** (2005) J. Colloid Interface Sci. 288: 247-260. "*A comparative study of the physicochemical properties of perfluorinated and hydrogenated amphiphiles*"
- Engel L.W. and Prendergast F.G.** (1981) Biochemistry 20: 7338. "*Values for and significance of order parameters and "cone angles" of fluorophore rotation in lipid bilayers*"
- Ferro Y. and Krafft M.P.** (2002) Biochim. Biophys. Acta 1581: 11-20. "*Incorporation of semi-fluorinated alkanes in the bilayer of small unilamellar vesicles of phosphatidylserine: impact on fusion kinetics*"
- Frézar, F., Santaella C., Mostisci M.J., Vierling P. and Riess J.G.** (1994) Biochim Biophys. Acta 1194: 61-68. "*Fluorinated phosphatidylcholine-based liposomes: H⁺/Na⁺ permeability, active doxorubicin encapsulation and stability, in human serum.*"
- González-Pérez A., Ruso J.M., Romero M.J., Blanco E., Prieto G. and Sarmiento F.** (2005) Chem. Phys. 313: 245-259. "*Application of thermodynamic models to study micellar properties of sodium perfluoroalkyl carboxylates in aqueous solutions*"
- Heerklotz H. and Seeling J.** (2002) Biophys. J. 82: 1445-1452. "*Application of Pressure Perturbation Calorimetry to Lipid Bilayers*"
- Hildebrand J.H., Prausnitz J.M. and Scott R.L.** (1970) "*Regular and related Solutions*" Van Nostrand Reinhold, New York
- Holding- Smee G.W. and Wilson B.G.** (1988) "*Blood Substitutes*" K.C. Lowe Editions, Cambridge
- Johns, K. and Stead, G.** (2000), J. Fluor. Chem. 104: 5-18. "*Fluoroproducts - the extremophiles*"
- Jouan V., Audonnet S., Krafft M.P. and Menu P.** (2002) 4th International Symposium on Current Issues of Blood Substitute Research; p.59
- Kaiser R.D. and London E.** (1998). Biochemistry 37: 8180. "*Location of Diphenylhexatriene (DPH) and Its Derivatives within Membranes: Comparison of Different Fluorescence Quenching Analyses of Membrane Depth*"

- Kevin L.B., Thompson L.K., Klebe R.J. and Horowitz P.** (1985) *BioTech.* 3: 356-366. "Flourescence Polarization: A General Method for Measuring Ligand Binding and Membrane Microviscosity."
- Kissa E.** (2001) "Fluorinated Surfactants and Repellents" Marcel Dekker Inc. New York
- Klein H. G., Meussdoerffer J. N. and Niederpruem H.** (1975) *Metalloberflaeche* 29: 559-567. "Fluorine-containing surfactants based on electrochemical fluoridation and possibilities for introducing them in surface treatment techniques"
- Krafft M.P.** (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47: 209. "Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research "
- Krafft M.P. and Goldmann M.** (2003) *Curr. Op. Coll. Interf. Sci.* 8: 243-250. "Monolayers made from fluorinated amphiphiles"
- Krafft M.P. and Riess J.G.** (1998) *Biochimie.* 80: 489-514. "Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and their applications in the biomedical field. A contribution "
- Krafft M.P., Chittofrati A. and Riess J.G.** (2003) *Curr. Op. Interf. Coll. Sci.* 8: 251-258. "Emulsions and microemulsions with a fluorocarbon phase "
- Lasic D.D.** (1993) "Liposomes: from Physics to Applications". Elsevier, Amsterdam. p.276
- Lee W.L. and Downey G.P.** (2002) *Crit. Care* 6: 291. "ICU Cornerstone: Changing our view of blood transfusions"
- Lentz B.R., Wu J.R., Zheng L. and Prevatil J.** (1996) *Biophys. J.* 71: 3302. "The interfacial region of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers is perturbed by fusogenic amphipaths."
- Lowe K.C., Farrell K., Ferguson E and James V.** (2001) *Artif. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech.* 29: 179. "Current perceived risks of transfusion in the uk and relevance to the future acceptance of blood substitutes"
- New R.R.C.** (1990) "Liposomes; A Practical Approach" Oxford University Press, Oxford. p.8
- Pádua A.** (2002) *J. Phys. Chem. A* 116: 106-110. "Force fields and torsion potentials for the simulation of hydrocarbon-fluorocarbon diblocks and perfluoroalkylbromides"
- Pauling L.** (1960) "The nature of the Chemical Bond" Cornell University Press, New York
- Pierandrea L.N.** (2003) *Curr. Op. Coll. Interf. Sci.* 8: 223-226. "Aggregates from semifluorinated n-alkanes: how incompatibility determines self-assembly "

- Redfern D. and Gericke A.** (2004) *Biophys. J.* 86: 2980-2992. “*Domain Formation in Phosphatidylinositol Monophosphate/Phosphatidylcholine Mixed Vesicles*”
- Riess J.G.** (1994) *J. Drug Targ.* 2: 455-468. “*Fluorinated vesicles*”
- Riess J.G.** (1995) *J. Lip. Res.* 5: 413-430. “*Introducing a new element fluorine-into the liposomal membrane*”
- Riess J.G.** (2003) *Curr. Op. Coll. Interf. Sci.* 8: 259-266. “*Fluorocarbon-based injectable gaseous microbubbles for diagnosis and therapy*”
- Riess J.G. and Krafft M.P.** (1998) *Biomaterials* 19: 1529-1539. “*Fluorinated materials for in vivo oxygen transport (blood substitutes), diagnosis and drug delivery*”
- Sabín J., Ruso J.M., González-Pérez A., Prieto G. and Sarmiento F.** (2006) *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 47: 64-70. “*Characterization of phospholipid + semifluorinated alkane vesicle system*”
- Sabín J., Prieto G., Sennato S., Blanco E., Messina P., Ruso J.M., Angelini R., Bordi F. and Sarmiento F.** (2007) *J. Therm. Anal. Calor.* 87: 301-304. “*Examination of the Influence of F6H10 Fluorinated Diblocks on DPPC Liposomes*”
- Santaella C., Vierling P., Riess J., Gulik-Krzywicki T., Gulik A. and Monasse B.** (1994) *Biochim. Biophys. Acta.* 1190: 25-39. “*Polymorphic phase behavior of perfluoroalkylated phosphatidylcholines*”
- Santaella C. Frézard, F., Vierling P. and Riess J.G.** (1993) *FEBS Lett.* 336: 481-484. “*Extended in vivo blood circulation time of fluorinated liposomes*”
- Schmutz M, Michels B. and Krafft M.P.** (2003) *Langmuir.* 19: 4889-4894. “*Fluorinated Vesicles Made from Combinations of Phospholipids and Semifluorinated Alkanes. Direct Experimental Evidence of the Location of the Semifluorinated Alkane within the Bilayer*”
- Sheppard W.A. and Shorts C.M.** (1969) “*Organic Fluorine Chemistry*” W.A. Benjamín, New York
- Turberg M.P. and Brady J.E.** (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110: 7797. “*Semifluorinated hydrocarbons: primitive surfactant molecules*”

Conclusiones

Capítulo 6

3. La agregación que provocada por el La^{3+} en liposomas de EggPC tiene

estas se producen en un mínimo secundario

previa que la agregación sea reversible y que

dilución. Además,

Capítulo 6

Conclusiones

1. En el trabajo realizado para esta tesis doctoral se han puesto a punto las técnicas para la obtención de liposomas unilamelares con distintos tipos de fosfolípidos (DPPC, DMPC, EYPC). Se ha empleado la técnica de rotaevaporación para la obtención de liposomas multilamelares que se han filtrado por extrusión por poros de 800, 400 y 200 nm. El resultado ha sido la obtención de una disolución de liposomas unilamelares de diámetro entre 110 y 180 nm y polidispersidad menor a 0.15.

La caracterización de estos sistemas liposómicos se realizó por dispersión dinámica de luz, movilidad electroforética (potencial ζ), microcalorimetría, espectrofotometría de fluorescencia, tensiometría de gota, nefelometría, microscopía de transmisión electrónica y microscopía de luz polarizada.

2. Se ha estudiado la estabilidad coloidal de liposomas unilamelares en presencia de distintas concentraciones de iones mono, di y trivalentes a través de la teoría clásica DLVO. Esta teoría predice la estabilidad o la agregación coloidal en función de un potencial de interacción entre dos liposomas que tiene en cuenta las fuerzas repulsivas electrostáticas y las fuerzas atractivas de van der Waals.

Sin embargo, esta teoría es insuficiente para explicar el comportamiento estable de liposomas en presencia de iones monovalentes (Na^+ , K^+). A pesar del apantallamiento de la carga de los liposomas y la desaparición de las fuerzas repulsivas electrostáticas al aumentar la concentración iónica, los liposomas no se agregan, manteniéndose estables incluso a 1M. Existe una fuerza repulsiva, no tenida en cuenta en la teoría clásica DLVO, provocada por la estructuración de las moléculas de agua en las cercanías de los liposomas, que mantienen a los liposomas lo suficientemente lejos del alcance de las fuerzas de van der Waals. Por tanto, estas fuerzas de hidratación son las responsables de la estabilidad de los liposomas en presencia de iones monovalentes, incluso cuando carecen de repulsión electrostática.

Además, cuando se añaden iones a una disolución de liposomas unilamelares ya formados, han de tenerse en cuenta las fuerzas osmóticas generadas por el gradiente de concentración iónica dentro y fuera del liposoma. Debido a que las membranas lipídicas son más permeables a las moléculas de agua que a los iones, el sistema reacciona ante el gradiente de concentración, expulsando moléculas de agua desde el interior de los liposomas, lo que conlleva que

disminuyan su tamaño. Se ha estimado la presión osmótica que sufren los liposomas en 9.8 atm y producen una reducción máxima en el diámetro de unos ~ 20 nm. Este efecto se produce a las mismas concentraciones de iones independientemente de si los iones son mono-, di- o tri-valentes, pero es más evidente con iones monovalentes porque con ellos no se produce agregación.

La teoría DLVO se muestra una herramienta muy efectiva para predecir la estabilidad y las *concentraciones de agregación críticas* (c.a.c.) en presencia de iones trivalentes, incluso si no se tiene en cuenta las fuerzas de hidratación. Se han determinado las *concentraciones de agregación críticas* (c.a.c.) de La^{3+} con liposomas de DMPC y DPPC de forma experimental por diversas técnicas concordando con las predichas por la teoría DLVO. También se ha estudiado la estabilidad de liposomas de DPPC en presencia de Gd^{3+} por su interés en el campo de la biomedicina como agentes de contraste en Imágenes de Resonancia Magnética.

3. La agregación provocada por el Ca^{2+} en liposomas de DPPC y EYPC, y la provocada por La^{3+} en liposomas de EYPC tiene un origen distinto a las mencionadas anteriormente ya que éstas se producen en un mínimo secundario del potencial de interacción entre los liposomas. Esto provoca que la agregación sea reversible y que los liposomas puedan re-dispersarse por simple dilución. Además la agregación se produce de forma limitada. Los clusters alcanzan un cierto tamaño, que depende de la concentración iónica, y luego dejan de crecer creandose *agregados estables*. La aparición o no de mínimos secundarios en el potencial de interacción entre liposomas está directamente relacionado, con las fuerzas de hidratación y puede ser predicha añadiendo un potencial de hidratación a la teoría DLVO. El estudio de este tipo de agregación reversible puede tener gran relevancia en el almacenamiento de liposomas y su aplicación como modelos coloidales, ya

que se puede controlar el tamaño de estos *agregados estables* controlando la concentración iónica.

4. Una vez conocidos en detalle los mecanismos de estabilidad y las c.a.c. de los sistemas se ha estudiado los diferentes regímenes de agregación y determinado las dimensiones fractales de los clusters de liposomas. Para liposomas de DMPC y DPPC en concentraciones ligeramente superiores a la c.a.c. se ha observado regímenes de agregación limitados por reacción (*RLCA*) cuyos agregados finales eran compactos con dimensiones fractales más próximas a ~ 1.8 . Para concentraciones mayores, la agregación estaba limitada por difusión (*DLCA*) y los agregados eran ramificados con dimensiones fractales entorno a ~ 2.1 .

Las dimensiones fractales fueron calculadas por dos métodos distintos: midiendo la velocidad de crecimiento de los agregados y determinando la dispersión angular de luz de los agregados. Los valores se mantuvieron dentro de lo esperado por las simulaciones computacionales.

5. Se han usado distintos dibloques perfluoroalcanos F_nH_m junto a fosfolípidos convencionales para formar liposomas fluorados y estudiar su estabilidad coloidal en presencia de distintos iones. Previamente se ha comprobado por técnicas calorimétricas y de fluorescencia la incorporación de los dibloques F_2H_{10} , F_6H_{10} , F_8H_{14} , F_8H_{16} , F_8H_{18} , F_8H_{20} a la membrana del liposoma. Los datos experimentales obtenidos confirman las hipótesis de otros investigadores que afirman que los dibloques se sitúan en el centro de la membrana del liposoma formando una cuatricapa, con sus partes fluoradas orientadas hacia el centro y sus partes hidrogenadas orientadas hacia las colas hidrófobas de los lípidos.

La estabilidad de los liposomas fluorados en presencia de iones mono, di y trivalentes no parece verse afectada por la incorporación de los dibloques semifluorados a la membrana de los liposomas. Se ha hecho un estudio con liposomas de DPPC con un dibloque de 16 carbonos, F_6H_{10} , a distintas fracciones molares y otro con liposomas de EYPC y un dibloque de 8 carbonos, F_2H_6 , a 50% de fracción molar. En ambos estudios la *c.a.c.* para iones Gd^{3+} , Ca^{2+} , K^+ , y Na^+ no se ve influida por la incorporación de los dibloques semifluorados. También los efectos osmóticos debido a la adicción de iones al medio se ven afectados.

Índice de figuras

Figura 1.1.	<i>Sección transversal de un liposoma</i>	8
Figura 1.2.	<i>Esquema de moléculas anfifílicas</i>	11
Figura 1.3.	<i>Molécula de fosfolípido</i>	12
Figura 1.4.	<i>Estructura típica de la fosfatidilcolina</i>	13
Figura 1.5.	<i>Membranas celulares</i>	16
Figura 1.6.	<i>Transiciones de fase de la membrana</i>	19
Figura 1.7.	<i>Proceso de preparación de LMG y LUG</i>	24
Figura 1.8.	<i>Rotavapor</i>	29
Figura 1.9.	<i>Extruder</i>	30
Figura 1.10.	<i>Piezas del extruder</i>	31
Figura 1.11.	<i>Composición de la EYPC</i>	32
Figura 1.12.	<i>Proceso de dispersión simple</i>	34
Figura 2.1.	<i>Experimento de Rayleigh</i>	41
Figura 2.2.	<i>Fluctuaciones de la intensidad</i>	47
Figura 2.3.	<i>Recorte y digitalización de la señal</i>	48
Figura 2.4.	<i>Función de correlación</i>	50
Figura 2.5.	<i>Diagrama del equipo de difusión dinámica de luz</i>	54
Figura 2.6.	<i>Diagrama del electroforómetro</i>	56
Figura 2.7.	<i>Fuerzas sobre un elemento de volumen (electroforesis)</i>	59
Figura 2.8.	<i>Esquema de la doble capa difusa del modelo de Stern</i>	64
Figura 2.9.	<i>Equipo ZetaMaster</i>	66
Figura 2.10.	<i>Equipo TEM</i>	68
Figura 2.11.	<i>Esquema de preparación de liposomas para TEM</i>	70
Figura 2.12.	<i>Fotografía del equipo TEM</i>	70

Figura 2.13. Esquema del equipo de espectroscopía por fluorescencia	73
Figura 2.14. Esquema del VP-DSC.....	78
Figura 2.15. Fotografía del VP-DSC	80
Figura 3.1. Parámetros de la ecuación de van der Waals	89
Figura 3.2. Curva típica del potencial DLVO.....	94
Figura. 3.3. Tres posibles situaciones del potencial DLVO.....	95
Figura 3.4. Apantallamiento del potencial repulsivo	96
Figura 3.5. Proceso de fusión de dos liposomas	98
Figura 3.6. Fuerzas de hidratación.....	103
Figura 3.7. Modelo de carga imagen	105
Figura 3.8. Modelo del solapamiento de las capas de Stern.....	106
Figura 3.9. Poro en una membrana	110
Figura 3.10. Permeabilidad frente a temperatura	111
Figura 3.11. Diámetro y polidispersidad de liposomas	115
Figura 3.12. Fotografías TEM de liposomas filtrados.....	116
Figura 3.13. Diámetro de liposomas frente a la presión de extrusión.....	117
Figura 3.14. Diámetro de los liposomas frente al tiempo	118
Figura 3.15. Distribución de tamaños.....	119
Figura 3.16. Imagen obtenidas por Resonancia Magnética	121
Figura 3.17. Esquema del efecto de las fuerzas osmóticas	124
Figura 4.1. Polvo de Cantor.....	161
Figura 4.2. Curva de Peano	161
Figura 4.3. Copo de nieve de Koch	161
Figura 4.4. Triángulos de Sierpinski.....	161
Figura 4.5. Ejemplos de geometría fractal.....	163
Figura 4.6. Ejemplo 1 de geometría fractal	164
Figura 4.7. Ejemplo 2 de la geometría fractal	165
Figura 4.8. Dimensión fractal por micrografías TEM	167
Figura 4.9. Ejemplo de un cluster DLCA	168
Figura 4.10. Esquema de la agregación en régimen RLCA	170
Figura 4.11. Ejemplo de un cluster RLCA	170
Figura 4.12. Intensidad dispersada por clusters de DPPC.....	174
Figura 4.13. Evolución temporal del radio de los clusters de DPPC.....	177
Figura 4.14. Dispersión angular de liposomas de DPPC	179
Figura 4.15. Precipitación de clusters de DPPC	180
Figura 4.16. Dispersión angular de liposomas en presencia de K^+	181
Figura 4.17. Dimensión fractal de liposomas estables	182
Figura 4.18. Evolución temporal de los liposomas estables de EYPC.....	183
Figura 4.19. Ejemplo de agregación en régimen DLCA y RLCA	185
Figura 4.20. Fotografías TEM de agregados DLCA y RLCA	186
Figura 4.21. Agregación en un mínimo primario y secundario	187
Figura 5.1. Perfluoroalcanos	222
Figura 5.2. Fotografía con luz polarizada de LMG.....	229
Figura 5.3. Fotograías TEM de la pretransición	230

Figura 5.4.	<i>Temperatura y entalpía de transición de los lípidos</i>	232
Figura 5.5.	<i>DSC de liposomas de DMPC con distintos dibloques</i>	234
Figura 5.6.	<i>ΔH de liposomas fluorados en función de $[F_6H_{10}]$</i>	235
Figura 5.7.	<i>Esquema de modelo de la cuatricapa</i>	236
Figura 5.8.	<i>DSC de liposomas de DPPC con distintos dibloques</i>	239
Figura 5.9.	<i>Esquema de la posición de las sondas fluorescentes</i>	241
Figura 5.10.	<i>Espectros de emisión del DPH</i>	242
Figura 5.11.	<i>Anisotropía del DPH en liposomas de EYPC</i>	242
Figura 5.12.	<i>Variación de la anisotropía en función de la temperatura</i>	243
Figura 5.13.	<i>Fotografías TEM de liposomas fluorados</i>	245

Índice de tablas

Tabla 1.1.	<i>Nombres y estructuras de algunas cabezas polares típicas.</i>	17
Tabla 1.2.	<i>Autoorganización dependiendo del parámetro de empaquetamiento</i>	21
Tabla 1.3.	<i>Características de las fosfatidilcolina</i>	33
Tabla 3.1.	<i>Parámetros de hidratación de distintos iones</i>	108
Tabla 3.2.	<i>Coefficientes de permeabilidad</i>	112
Tabla 4.1.	<i>Concentraciones de agregación crítica</i>	184
Tabla 5.1.	<i>Potenciales de oxidación</i>	219
Tabla 5.2.	<i>Energías de ionización</i>	220
Tabla 5.3.	<i>Energías de disociación</i>	221
Tabla 5.4.	<i>Energías de formación</i>	221
Tabla 5.5.	<i>Nomenclatura y esquema de los dibloques</i>	226

Índice temático

<i>AFM</i>	87, 102
<i>Agregación</i>	4, 16-19, 25-27, 55, 86-88, 95-101, 118-123, 149, 159, 166-172, 175-188, 209, 224, 266-268
<i>Agregados estables</i>	210, 267
<i>Anisotropía</i>	74, 241-243
<i>Aplicaciones</i>	7, 25, 86, 109, 187, 218, 223
<i>Autosemejanza</i>	163
<i>c.a.c.</i>	95, 100, 160, 178, 183, 244, 267
<i>Cañón de electrones</i>	68
<i>Capa de Stern</i>	64
<i>Cargas imágenes</i>	104
<i>Coficiente de partición</i>	110
<i>CONTIN</i>	51, 53
<i>Copo de nieve de Koch</i>	161
<i>Correlación fotónica</i>	46
<i>Cryo-TEM</i>	231
<i>Cuadrícapa</i>	236, 238, 243, 268
<i>Curva de Peano</i>	161, 162
<i>Debye</i>	60- 63, 91, 100
<i>Dibloque</i>	218, 225-246, 268
<i>Dispersión de luz</i>	55, 149, 160, 167, 171, 174
<i>DLA</i>	175
<i>DLCA</i> ..	167-171, 176, 184-188, 209, 268
<i>DLVO</i> .	4, 17, 63, 67, 86, 92-96, 100-102, 114, 120-123, 149, 154, 178-188, 210, 219, 245, 266, 290
<i>DPH</i>	75, 240-243, 260, 287
<i>DSC</i>	31, 75-80, 231-234, 238, 244
<i>Ecuación de Henry</i>	62
<i>Electroforesis</i>	55, 60, 92
<i>Electronegatividad</i>	106, 220- 222
<i>Empaquetamiento</i> ..	19-21, 26, 113, 218, 231, 238, 240
<i>Encapsulación</i>	17, 23, 86
<i>Esferulitas</i>	229
<i>Estabilidad coloidal</i>	4, 16, 67, 86, 92, 101, 106, 114, 117-122, 149, 218, 225-229, 244, 266, 268
<i>Extruder</i> ..	23, 27-34, 115-118, 229, 245, 265

<i>Fluorescencia</i>	72-75, 228, 238, 240, 246, 268
<i>Fosfolípidos</i> ...	8, 12-22, 27-34, 104, 120, 186, 225, 227, 231, 236, 265, 268
<i>Fosfotúngstico</i>	69, 71
<i>Fractal</i>	4, 55, 159-184, 209-213, 268, 289, 290, 293
<i>Fuerzas de hidratación</i>	4, 28, 85, 97, 102-106, 123, 150, 178, 186, 188, 266, 267
<i>Fuerzas estéricas</i>	87, 94, 222
<i>Fusión</i>	16, 25, 55, 86, 97-99, 120, 149, 225
<i>Hamaker</i>	88, 93, 152, 286
<i>Lentes magnéticas</i>	68
<i>Ley de Fick</i>	109
<i>Ley de Guinier</i>	175
<i>Ley de Porod</i>	174
<i>Liposomas fluorados</i>	4, 218, 224-230, 235, 244, 268, 269
<i>Liposomas paramagnéticos</i>	122
<i>LMG</i>	22, 27
<i>LUG</i>	23, 29, 33, 34
<i>LUP</i>	22
<i>Luz polarizada</i>	43, 73, 229, 266
<i>Mínimo secundario</i>	95, 150, 186-188, 210, 267
<i>Neferometría</i>	120, 149, 266
<i>Osmóticas</i>	4, 15, 109, 113, 123, 150, 182, 246, 266
<i>p.z.r.</i>	122
<i>Película de Formvar</i>	71
<i>Perfluoroalcano</i>	217- 222, 268
<i>Permeabilidad</i> ..	14, 20, 25, 109-112, 218
<i>Plano de deslizamiento</i>	58
<i>Planos de Helmholtz</i>	63-65, 90-92
<i>Poisson-Boltzmann</i>	64, 91
<i>Polvo de Cantor</i>	161
<i>Pretransición</i>	18, 231-235, 237
<i>Proteínas</i> ..	15, 25, 75, 97, 105, 117, 121, 167, 223, 224
<i>Radio hidratado</i>	106
<i>Radio hidrodinámico</i>	48-51
<i>Radios hidratados</i>	107
<i>Rayleigh</i>	40-44, 82, 291
<i>Resonancia Magnética</i>	121, 151
<i>RLCA</i>	167-178, 184-188, 209, 268
<i>Rotavapor</i> ..	26-29, 33, 115, 228, 230, 233, 236
<i>Sangre artificial</i>	218, 223, 227
<i>Schultz-Hardy</i>	100, 120, 188
<i>Sondas</i>	34, 72-75, 230, 238, 240-243
<i>Surfactantes primitivos</i>	227
<i>TEM</i>	67-71, 116, 149, 167, 171, 230, 237
<i>Tensión superficial</i>	120, 226
<i>Transición de fase</i>	18, 31, 231, 238
<i>Triángulos de Sierpinski</i>	161
<i>Vector de onda</i>	49, 88, 173, 182
<i>Viscosidad</i>	50, 58, 72, 108, 238, 240

Índice de símbolos y abreviaturas

a	<i>Radio de los liposomas</i>
A	<i>Constante de Hamaker</i>
a_c	<i>Área crítica de la cabeza polar</i>
AFM	<i>Microscopía de Fuerza Atómica</i>
a^g	<i>Constante de equilibrio de agregación</i>
<i>c.a.c.</i>	<i>Concentración de agregación crítica</i>
D	<i>Coeficiente de difusión</i>
d	<i>Espesor de la bicapa lipídica</i>
d_f	<i>Dimensión fractal</i>
DLCA	<i>Régimen de agregación limitada por difusión</i>
DMPC	<i>1,2-Dimyristoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine</i>
DPH	<i>1,6-difenyl-1,3,5-hexatrieno</i>
DPPC	<i>1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine</i>
DSC	<i>Calorimetría diferencial de barrido</i>
EYPC	<i>Egg Yolk L-α phosphatidilcholine</i>
E_z	<i>Campo aplicado en electroforesis</i>
f	<i>Constante de equilibrio de fusión</i>
$f_1(ka)$	<i>Función de Henry</i>
H	<i>Distancia entre liposomas</i>
IHP	<i>Plano interior de Helmholtz</i>
k	<i>Parámetro de Debye-Hückel</i>
k_B	<i>Constante de Boltzman</i>
k_d	<i>Coeficiente de solubilidad</i>

l_c	<i>Longitud crítica de las colas hidrofóbica</i>
LMG	<i>Liposomas Multilamelares Grandes</i>
LUG	<i>Liposomas Unilamelas Grandes</i>
LUP	<i>Liposomas Unilamelares Pequeños</i>
MRI	<i>Imágenes de Resonancia Magnética</i>
N_1	<i>Número de puntos de adsorción</i>
NBD	<i>N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) dioleoylphosphatidylethanolamine</i>
NMR	<i>Resonancia Magnética Nuclear</i>
OHP	<i>Plano exterior de Helmholtz</i>
P	<i>Coefficiente de permeabilidad</i>
P(H)	<i>Potencial de hidratación</i>
<i>p.z.r.</i>	<i>Punto de carga nula</i>
P_c	<i>Parámetro de empaquetamiento crítico</i>
$P_{c \rightarrow a}$	<i>Probabilidad de adhesión por cada colisión de liposomas</i>
PCS	<i>Espectroscopia de correlación fotónica</i>
P_o	<i>Constante de hidratación</i>
Poly	<i>Polidispersidad</i>
q	<i>Vector de onda</i>
R	<i>Parámetro de Rayleigh</i>
r	<i>Anisotropía</i>
r_0	<i>Radio del monómero en un cluster</i>
r^d	<i>Constante de equilibrio de redispersión</i>
REG	<i>Función de Regulación del método CONTIN</i>
R_g	<i>Radio del cluster</i>
R_h	<i>Radio hidrodinámico</i>
RLCA	<i>Régimen de agregación limitada por reacción</i>
T	<i>Temperatura</i>
t	<i>Tiempo</i>
T_c	<i>Temperatura de transición crítica de los fosfolípidos</i>
TEM	<i>Microscopía de Transmisión Electrónica</i>
TMA-DPH	<i>1-[4-(trimethylammonium) phenyl]-6-phenyl-1,3,5-hexatriene</i>
$V_A(H)$	<i>Potencial atractivo de van der Waals</i>
VAR	<i>Función de Varianza del método CONTIN</i>
V_{DLVO}	<i>Potencial total de la teoría DLVO</i>
V_{hidra}	<i>Potencial de hidratación</i>
V_{max}	<i>Altura de la barrera del potencial DLVO</i>
$V_R(H)$	<i>Potencial repulsivo electrostático</i>
Δ	<i>Ancho de la capa de Stern</i>
ΔC_p	<i>Variación de capacidad calorífica</i>
ΔH	<i>Variación de entalpía</i>
ΔS	<i>Variación de entropía</i>
w	<i>Longitud de decaimiento del potencial de hidratación</i>
z	<i>Carga iónica</i>
α	<i>Polarizabilidad de una partícula</i>
Γ	<i>Constante de decaimiento de la función de correlación</i>
ε	<i>Constante dieléctrica</i>
ζ	<i>Potencial Zeta</i>
η	<i>Viscosidad</i>

λ	<i>Longitud de onda</i>
v_{eo}	<i>Velocidad electrosmótica</i>
Π	<i>Presión osmótica</i>
τ	<i>Turbidez</i>
ψ_0	<i>Potencial superficial</i>
ψ_d	<i>Potencial en OHP</i>

Bibliografía General

1. **Arai T. and Norde W.** (1990) Coll. Surf. 51:186-216 *"The behaviour of some model proteins at solid-liquid interfaces 2, Sequential and competitive adsorption"*
2. **Armengol X. and Estelrich J.** (1995) J. Microencap. 2: 525-535. *"Physical stability of different liposome composition obtained by extrusion method"*
3. **Arrington C.H. and Patterson G.D.** (1953) J. Phys. Chem. 57: 247. *"Colloidal Properties of Highly Fluorinated Alkanoic Acids"*
4. **Asnaghi D., Carpineti M. Giglio M. and Sois M.** (1992) Phys. Rev. A 45: 1018-1022. *"Coagulation kinetics and aggregate morphology in the intermediate regimes between diffusion-limited and reaction-limited cluster aggregation"*
5. **Attard P. and Patey G.N.** (1991) Phys. Rev. A, 43: 2953. *"Continuum electrostatic interactions between planar lattices of dipoles and the possible relevance to the hydration force"*
6. **Aubert C. and Cannell D.S.** (1986) Phys. Rev. Lett. 56: 738-741. *"Restructuring of colloidal silica aggregates"*
7. **Bach D. and Chapman D.** (1980) *Biological Microcalorimetry* Beeper, A.E. Ed. pag 265, Academic Press, London.
8. **Bangham A.D. and Horn R.W.** (1964) J. Mol. Biol. 8: 660-668. *"Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-active Agents as Observed in the Electron Microscope"*

9. **Bangham A.D., Standish M.M. and Watkins J.C.** (1965) *J. Mol. Biol.* 13: 238-252
“*Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids*”
10. **Bartlett G.R.** (1959) *J. Biol. Chem.* 234: 466 “*Phosphorus Assay in Column Chromatography*”
11. **Berne B.J. and Pecora R.** (1976) *Dynamic Light Scattering: With Application to Chemistry, Biophysics and Physics* John Wiley and Sons Inc., New York.
12. **Blanco E., González-Pérez A., Ruso J.M., Pedrido R., Prieto G. and Sarmiento F.** (2005) *J. Colloid Interface Sci.* 288: 247-260.” *A comparative study of the physicochemical properties of perfluorinated and hydrogenated amphiphiles*”
13. **Botta M.** (2000) *Eur. J. Inorg.* 399-407 “*Second Coordination Sphere Water Molecules and Relaxivity of Gadolinium(III) Complexes: Implications for MRI Contrast Agents*”
14. **Bouanz M. and Gharbi A.** (1994) *J. Phys.: Condens. Matter.* 6: 4429-4435. “*Ionic structure in a binary fluid*”
15. **Broide M.L., Tominc T.M. and Saxowsky M.D.** (1995) *Phys. Rev. E.* 53: 6325-6335. “*Using phase transitions to investigate the effect of salts on protein interactions*”
16. **Brown M.E.** (1998) “*Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*” Elsevier. Amsterdam
17. **Burn J.L., Yan Y., Jamenson G.J. and Biggs S.** (1997) *Langmuir.* 13: 6413-6420. “*A Light Scattering Study of the Fractal Aggregation Behavior of a Model Colloidal*”
18. **Caravan P., Ellison J.E., McMurry T.J. and Lauffer R.B.** (1999) *Chem. Rev.* 99: 2293-2352 “*Gadolinium(III) Chelates as MRI Contrast Agents: Structure, Dynamics, and*
19. **Carpinetti M., Ferri F. and Giglio M.** (1990) *Phys. Rev. A* 42: 7347-7354 “*Salt-induced fast aggregation of polystyrene latex*”
20. **Carrión F. J., De La Maza, A. and Parra, J. L.** (1994); *J. Colloid Interface Sci.* 164: 78-87. “*The Influence of Ionic Strength and Lipid Bilayer Charge on the Stability of Liposomes*”
21. **Carruthers A. and Melchior D.L.** (1983) *Biochemistry* 22: 5797-5807. “*Study of the relationship between bilayer water permeability and bilayer physical state*”
22. **Casals E., Galán A., Escolar G., Gallardo H and Estelrich J.** (2003) *Chem. Phys. Lip.* 125: 139-146. “*Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity*”
23. **Cevc G. and Blume G.** (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1104: 226-232. “*Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force*”.
24. **Cevc G. and Marsh D.** (1984) “*Phospholipids Bilayers*” Wiley-Interscience Publications, New York.
25. **Collander R.** (1954) *Physiol. Plant.* 7: 420-425. “*The permeability of Nitella cells to non electrolytes*”.

26. **Csonka L.N. and Hanson A.D.** (1991). *Ann. Rev. Microbiol.* 45: 569-606. "*Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology*"
27. **Degiorgo V. and Corti M.** (1985) *Physics of Amphiphiles: Micelles, Vesicles and Microemulsion*". Italian Physical Society. NHPC, Noth Holland.
28. **Delgado J.V.** (2004) Tesis Doctoral: "*Fuerzas estructurales en sistemas hidrófilos*". Universidad de Granada.
29. **Delgado J.V., Molina-Bolívar J.A., Galisteo González F., Gálvez Ruiz M.J., Freiler A. and Rutilan M.W.** (2005) *J. Chem. Phys.* 123 : 034709. "*Hydration forces between silica surfaces: Experimental data and predictions from different theories*"
30. **Derjaguin B.V.** (1934) *Kolloid-Z* 69: 155. "*Untersuchungen über die Reibung und Adhäsion*"
31. **Derjaguin B.V. and Titievskaya A.S.** (1957) "*Proceeding of the Internacional Congress on Surface Activity*" Vol 1, p 211. Butterworth, London
32. **Deryagin B. and Landau L.**(1941) *Acta Physicochim.* 14: 633-662. "*Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes*"
33. **Durkin S.S. and Derjaguin B. V.** (1974): *Surface and Colloid Science*. Ed. E. Matijevic, vol 7, New York.
34. **Einstein A.** (1905), *Ann. Physik.* 17: 549. "*Investigations on the Theory of Brownian Movement*".
35. **Einstein A.** (1906). *Ann. Phys.* 19: 371-381. "*Zur theorie der brownschen bewegung*".
36. **Einstein A.** (1916) *Verh. Deutsch. Phys. Ges.* 18: 318. "*Emission and absorption of radiation according to the quantum theory.*"
37. **Engel L.W. and Prendergast F.G.**(1981) *Biochemistry* 20: 7338. "*Values for and significance of order parameters and "cone angles" of fluorophore rotation in lipid bilayers*"
38. **Ferro Y. and Krafft M.P.** (2002) *Biochim. Biophys. Acta* 1581: 11-20. "*Incorporation of semi-fluorinated alkanes in the bilayer of small unilamellar vesicles of phosphatidylserine: impact on fusion kinetics*"
39. **Flory P.J.** (1941) *J. Chem. Phys.* 9: 660. "*Thermodynamics of High Polymer Solutions*".
40. **Forrest S.R. and Witten Jr T.A.** (1979) *J. Phys. A: Math. Gen.* 12: L109-L117. "*Long-range correlations in smoke-particle aggregates*"
41. **Freundlich H.** (1926) "*Colloid and Capillary Chemistry*". Mathuen, London.
42. **Frézard, F, Santaella C, Mostisci M.J., Vierling P. and Riess J.G.** (1994) *Biochim Biophys. Acta* 1194: 61-68. "*Fluorinated phosphatidylcholine-based liposomes: H⁺/Na⁺ permeability, active doxorubicin encapsulation and stability, in human serum.*"

43. **Garcia-Manyes S., Oncins G. and Sanz F.** (2005) *Biophys. J.* 89: 1812–1826. “*Effect of Ion-Binding and Chemical Phospholipid Structure on the Nanomechanics of Lipid Bilayers Studied by Force Spectroscopy*”
44. **Garidel P. and Blume A.** (1999) *Langmuir* 15: 5526-5534. “*Interaction of Alkaline Herat Cations with the Negative Charged Phospholipids 1,2-Dimysterial-sn-glycero-3-phosphoglycerol: A Differential Scanning and Isothermal Titration Calorimetric Study*”
45. **González-Pérez A., Ruso J.M., Romero M.J., Blanco E., Prieto G. and Sarmiento F.** (2005) *Chem. Phys.* 313: 245-259. “*Application of thermodynamic models to study micellar properties of sodium perfluoroalkyl carboxylates in aqueous solutions*”
46. **Gorter E. and Grendel J.** (1925). *J. Exp. Med.* 41: 439–443. “*On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of blood*”
47. **Grohmann F. L., Csemesz F. and Szógyi M.** (1998), *Coll. Polym. Sci.* 276: 66-71 “*Stabilization of Small Unilamellar DMPC-Liposomes by Uncharged Polymers*”
48. **Hamaker H.C.** (1936) *Rec. Trav. Chim.* 55: 1015. “*A general theory of lyophobic colloids. I*”
49. **Hamaker H.C.** (1937) *Rec. Trav. Chim.* 56: 727. “*A system of colloid phenomena*”
50. **Hauser H., Oldani D. and Philips M.C.** (1973). *Biochemistry* 12: 4507-4517. “*Mechanism of Ion Escape from Phosphatidylcholine and Phosphatidylserine Single Bilayer Vesicles*”
51. **Heerklotz H. and Seeling J.** (2002) *Biophys. J.* 82: 1445-1452.” *Application of Pressure Perturbation Calorimetry to Lipid Bilayers*”
52. **Heimenz P.C. and Rajagopalan R.** (1997) “*Principles of Colloid Surface Chemistry*” 3th Edition Marcel Dekker, New York.
53. **Hildebrand J.H., Prausnitz J.M. and Scout R.L.** (1970) “*Regular and related Solutions*” Van Nostrand Reinhold, New York
54. **Holding- Smee G.W. and Wilson B.G.** (1988) “*Blood Substitutes*” K.C. Lowe Editions, Cambridge
55. **Holmberg K.** (2002) “*Applied Surface and Colloid Chemistry*”. Wiley Ltd. West Sussex, England.
56. **Hope M.J., Bally M.B., Webb G. and Cullis P.R.** (1985) *Biochim. Biophys. Acta.* 36: 2860-2866. “*Production of large unilamellar vesicles by rapide extrusion procedure*”
57. **Horn R.G., Smith D.T. and Haller W.** (1989) *Chem. Phys. Lett.* 162: 404-408 “*Surface forces and viscosity of water measured between silica sheets*”
58. **Huang H., Manciu M. and Ruckenstein E.** (2003) *J. Coll. Interfase Sci.* 263: 156-161. “*The effect of surface dipoles and of the field generated by a polarization gradient on the repulsive force*”
59. **Huggins M.L.** (1941) *J. Chem. Phys.* 9: 440 “*Solutions of Long Chain Compounds*”.
60. **Hunter R.J.** (1981) “*Zeta Potential in Colloid Science*”. Academics Press, London

61. **Hunter R.J.** (2001) "*Foundations of the Colloid Science*". Cap. 12, p. 603 Oxford University Press Inc, New York
62. **Il'yasov K. A., Bjørnerud A., Rogstad A., Wiggen U.N., Henriksen I., Eissner B.,**
63. **Hennig J. and Fossheim S.L.** (2001) Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med 9: 324. "*Paramagnetic Liposomes as Thermosensitive Probes for MRI-Guided Thermal Ablation: Feasibility Study on the Perfused Porcine Kidney*"
64. **Inoue T., Minami H., Shimozawa R. and Sugihara G.** (1992) J. Colloid Interface Sci. 152: 493-506. "*Stability of DLPA/DLPC mixed vesicles against divalent cation-induced aggregation : importance of the hydration force*"
65. **Israelachvili J.** (1985) "*Intermolecular & Surface Forces*". 2nd Edition. Academic Press. Harcourt Brace, London
66. **Israelachvili J.** (1992) *Intermolecular and Surfaces Forces*. 2th Edition. Academic Press. London
67. **Israelachvili J.N. and Adams G.E.** (1978) J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1, 74: 975. "*Measurement of forces between two mica surfaces in aqueous electrolyte solutions in the range of 0–100 nm*".
68. **Jansen M and Blume A.** (1995). Biophys. J. 68: 997-1008. "*A comparative study of diffusive and osmotic water permeation across bilayer composed of phospholipids with different head groups and fatty acyl chain*"
69. **Johns, K. and Stead, G.** (2000), J. Fluor. Chem. 104: 5-18. "*Fluoroproducts - the extremophiles*"
70. **Jones M. N. and Chapman D.** (1995): *Micelles, Monolayers and Biomembranes*. John Wiley & Sons, New York
71. **Jönsson B. and Wennerström H.** (1983) J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 79: 19
72. **Jönsson B. and Wennerström H.** (2001) "*In Electrostatic Effects in Soft Matter and Biophysics*", C. Holm (Ed.), Kluwer Academic Press, Amsterdam.
73. **Jouan V., Audonnet S., Krafft M.P. and Menu P.** (2002) 4th International Symposium on Current Issues of Blood Substitute Research; p.59
74. **Kaiser R.D. and London E.**(1998). Biochemistry 37: 8180. "*Location of Diphenylhexatriene (DPH) and Its Derivatives within Membranes: Comparison of Different Fluorescence Quenching Analyses of Membrane Depth*"
75. **Kallmann H. and Willstätter M.** (1932) Naturwissenschaften 20: 952. "*The theory of the structure of colloidal systems*"
76. **Kasprzak A. and Weber G.** (1982) Biochem J. 191: 395-400. "*Flourescence Polarization studies on binding of 4-methylumbeliferyl beta-D-galactopyranoside to Ricinus Communis agglutinin*".
77. **Kevin L. B., Thompson L., Klebe R. and Horowitz P.** (1985). Biotechn. 3: 356-366. "*Flourescence Polarization : A General Method for Measuring Ligand Binding and Membrane Microviscosity*".

78. **Kissa E.** (2001) *"Fluorinated Surfactants and Repellents"* Marcel Dekker Inc. New York
79. **Klein H. G., Meussdoerffer J. N. and Niederpruem H.** (1975) *Metalloberflaeche* 29: 559-567. *"Fluorine-containing surfactants based on electrochemical fluoridation and possibilities for introducing them in surface treatment techniques"*
80. **Kolb M, Botet R. and Jullien R.** (1983) *Phys. Rev. Lett.*, 51: 1123-1126. *"Scaling of Kinetically Growing Clusters"*
81. **Krafft M.P.** (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47: 209. *"Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research"*
82. **Krafft M.P. and Goldmann M.** (2003) *Curr. Op. Coll. Interf. Sci.* 8: 243-250. *"Monolayers made from fluorinated amphiphiles"*
83. **Krafft M.P. and Riess J.G.** (1998) *Biochimie.* 80: 489-514. *"Highly fluorinated amphiphiles and colloidal systems, and their applications in the biomedical field. A contribution"*
84. **Krafft M.P., Chittofrati A. and Riess J.G.** (2003) *Curr. Op. Interf. Coll. Sci.* 8: 251-258. *"Emulsions and microemulsions with a fluorocarbon phase"*
85. **Lakowicz J.R.** (1983) *Principles of fluorescence spectroscopy.* Plenum Press
86. **Lakowicz J.R. and Maliwal B.P.** (1983). *J. Biol. Chem.* 258: 4794-4801. *"Oxygen quenching and fluorescence depolarization of tyrosine residues in proteins"*.
87. **Lasic D. D.** (1993): *Liposomes: from Physics to applications.* Elsevier, Amsterdam
88. **Lawrence H. A. and Matijevi E.** (1969) *J. Colloid Interface Sci.* 31: 287-296 *"Stability of colloidal silica : I. Effect of simple electrolytes"*
89. **Lee W.L. and Downey G.P.** (2002) *Crit. Care* 6: 291. *"ICU Cornerstone: Changing our view of blood transfusions"*
90. **LeNeveu D.M., Rand R.P. and Parsegian V.A.** (1976) *Nature* 256: 601-603. *"Measurement of forces between lecithin bilayers"*
91. **Lentz B.R., Wu J.R., Zheng L. and Prevattil J.** (1996) *Biophys. J.* 71: 3302. *"The interfacial region of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers is perturbed by fusogenic amphipaths."*
92. **Lesmoir N., Rood W. and Edney R.** (2000) *Introducing Fractal Geometry.* Icon Books, Canada.
93. **Lifshitz E.M.** (1956) *Sov. Phys. JETP* 2: 73. *"The theory of molecular attraction forces between solid bodies"*
94. **Lin M.Y., Lindsay H.M., Weitz D.A., Ball R.C., Klein R. and Meakin P.** (1990) *Phys. Rev. A*, 41: 2005-2020. *"Universal reaction-limited colloid aggregation"*
95. **Lis L.J., McAlister M., Fuller N. and Rand R.P.** (1982) *Biophys. J.* 37: 657. *"Interactions between neutral phospholipid bilayer membranes"*

96. **Liu J., Shih W.Y., Sarikaya M and Aksay I.** (1990) Phys. Rev. A 41: 3206-3212. *"Fractal colloidal aggregates with finite interparticle interactions: Energy dependence of the fractal dimension"*
97. **Lowe K.C., Farrell K., Ferguson E and James V.** (2001) Artif. Cells, Blood Subst., Immob. Biotech. 29: 179. *"Current perceived risks of transfusion in the uk and relevance to the future acceptance of blood substitutes"*
98. **Lyklema J.** (1967) "Molecular Forces", edited by B. Chu, Pontif. Acad. Sci. Scripta Varia, Vol. 31 (North-Holland, Amsterdam, 1967), pp. 181, 221
99. **Lyklema J.** (1977). J. Colloid Interface Sci. 53: 242-250. *"Water at Interfaces: A Colloid-Chemical Approach"*.
100. **Lynch N., Kilpatrick P. and Carbonell G.** (1996) Biotech. Bioeng. 50: 151-168. *"Aggregation of ligand-modified liposomes by specific interactions with proteins. I: Biotinylated liposomes and avidin"*
101. **Mabrey S. and Sturtevant J.M.** (1978) Methods Membr. Biol. 9: 237. *"High-sensitivity differential scanning calorimetry in the study of biomembranes and related model systems."*
102. **Majolino D., Mallamace F. and Migliardo P.** (1989) Phys. Rev. A, 40: 4665-4674. *"Elastic and quasielastic light-scattering studies of the aggregation phenomena in water solutions of polystyrene particles"*
103. **Manciu M. and Ruckenstein E.** (2001a) Langmuir 17: 7061-7070. *"Role of the Hydration Force in the Stability of Colloids at High Ionic Strengths"*
104. **Manciu M. and Ruckenstein E.** (2001b) Langmuir 17: 7582-7592. *"Oscillatory and Monotonic Polarization. The Polarization Contribution to the Hydration Force"*
105. **Mandelbrot B.** (1983) *Geometría Fractal de la Naturaleza*. Tusquest Ediciones, Barcelona.
106. **Marcelja S. and Radic N.** (1976) Chem. Phys. Lett. 42: 129. *"Repulsion of interfaces due to boundary water"*
107. **Martin J. and Ackerson B.** (1985) Phys. Rev. A. 31: 1180-1183. *"Static and dynamic scattering from fractals"*
108. **Mastrobattista E., Koning G.A. and Store G.** (1999) Adv. Drug Deliv. Rev. 40: 103-127. *"Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs"*
109. **Matsumura H., Watanabe K. and Furusawa K.** (1995) Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects. 98: 175-184. *"Flocculation behavior of egg phosphatidylcholine liposomes caused by Ca²⁺ ions"*
110. **McNaughton J.L. and Mortimer C.T.** (1975) *"Calorimetría Diferencial de Barrido"*. Perkin Elmer Corporation.
111. **Meakin P.** (1983a) Phys. Rev. Lett. 51: 1119. *"Formation of Fractal Clusters and Networks by Irreversible Diffusion-Limited Aggregation"*
112. **Meakin P.** (1983b) Phys. Rev. A, 27: 1495. *"Diffusion-controlled cluster formation in 2-6-dimensional space"*

113. **Meakin P.** (1984a) *Phys. Rev. A*. 29: 997-999. "Effects of cluster trajectories on cluster-cluster aggregation: A comparison of linear and Brownian trajectories in two- and three-dimensional simulations"
114. **Meakin P.** (1984b) *Phys. Rev. B*. 29: 3722-3725. "Cluster-particle aggregation with fractal (Levy flight) particle trajectories"
115. **Meakin P. and Wasserman Z.R.** (1984) *Phys. Lett. A*, 103A: 337-341. "Some universality properties associated with the cluster-cluster aggregation model"
116. **Milner J.L., Grothe S. and Wood J.M.** (1988) *J. Biol. Chem.* 263: 14900-14905. "Proline Porter II is activated by hyperosmotic shift in both whole cells and membrane vesicles of *Escherichia coli* K12."
117. **Molina Bolívar J.A.** (1999) "Mecanismos de Estabilidad Coloidal". Tesis Doctoral. Universidad de Granada
118. **Näslund J., Lindqvist P., Persson I. and Sandström M.** (1999) *Inorg. Chem.* 39: 4006-4011. "Steric Effects Control the Structure of the Solvated Lanthanum(III) Ion in Aqueous, Dimethyl Sulfoxide, and *N,N'*-Dimethylpropyleneurea Solution. An EXAFS and Large-Angle X-ray Scattering Study"
119. **New R.R.C.** (1990): *Liposome: A Practical Approach*. IRL Press, New York
120. **Nir S., Bentz J. and Düzgünes N.** (1981) *J. Colloid Interfaces Sci.* 84: 266-269. "Two Modes of Vesicle Aggregation: Particle Size and the DLVO theory"
121. **Norris K. and Rausell-Colom J.A.** (1963) *Clays Clay Minerals* 10: 123. "Low-angle x-ray diffraction studies of the swelling of montmorillonite and vermiculite"
122. **Ohki S.** (1982) *Biochim. Biophys. Acta.* 689 : 1-11. "A Mechanism of Divalent Ion-induced Phosphatidylserine Membrane Fusion"
123. **Oliveira R.** (1997) *Experim. Therm. Fluid Sci.* 14: 316-322. "Understanding Adhesion: A Means for preventing Fouling"
124. **Onuma K., Oyane A., Tsutsui K., Tanaka K, Treboux G., Kanzaki and Ito A.** (2000) *J. Phys. Chem. B* 104: 10563-10568. "Precipitation Kinetics of Hydroxyapatite Revealed by the Continuous-Angle Laser Light-Scattering Technique"
125. **Ostro M. J.** (1983): *Liposomes*. Marcel Dekker, New York
126. **Ottewill and Watanabe** (1960) *Kolloid-Z.* 191: 132 "The mechanism of coagulation. II. The electrophoretic behavior of positive silver iodide sols in the presence of anionic surface-active agents."
127. **Pádua A.** (2002) *J. Phys. Chem. A* 116: 106-110. "Force fields and torsion potentials for the simulation of hydrocarbon-fluorocarbon diblocks and perfluoroalkylbromides"
128. **Papahadjopoulos D., Nir S. and Düzgünes N.** (1990) *J. Bioenerg. Biomembr.* 22 : 157. "Molecular Mechanics of Calcium-Induced Membrane Fusion"
129. **Pashley R. M.** (1981a.) *J. Colloid Interface Sci.* 83: 531-546. "DLVO and hydration forces between mica surfaces in Li^+ , Na^+ , K^+ and Cs^+ electrolyte solutions: a correlation of double-layer and hydration forces with surface cation exchange properties."

130. **Pashley R. M.** (1981b). J. Colloid Interface Sci. 80: 153-162. "*Hydration forces between mica surfaces in aqueous electrolyte solutions*"
131. **Pashley R. M.** (1982). Adv. Colloid Interface Sci. 16: 57-62. "*Hydration forces between mica surfaces in aqueous electrolyte solutions*"
132. **Pashley R. M., and Israelachvili, J. N.** (1984). J. Colloid Interface Sci. 97: 446-455. "*DLVO and hydration forces between mica surfaces in Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} and Ba^{2+} chloride solutions*"
133. **Paula S., Volkov A.G., Van Hock A.N., Haines T.H. and Deamer D.W.** (1996). Biophys. J. 70: 339-348. "*Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipids bilayers as a function of membrana thickness*"
134. **Pauling L.** (1960) "*The nature of the Chemical Bond*" Cornell University Press, New York
135. **Paunov V.N., Kaler E.W., Sandler S.I. and Petsev D.N.** (2001) J. Colloid Interface Sci., 240: 640-643. "*A Model for Hydration Interactions between Apoferritin Molecules in Solution*"
136. **Peña A.** (1986) *Las membranas celulares*. Ciencia para todos México
137. **Pierandrea L.N.** (2003) Curr. Op. Coll. Interf. Sci. 8: 223-226. "*Aggregates from semifluorinated n-alkanes: how incompatibility determines self-assembly*"
138. **Poznansky M. and Juliano R.L.** (1984). Pharm. Rev. 36: 277-336. "*Biological Approaches to the Controlled Delivery of Drugs: A Critical Review*"
139. **Prieto G., Sabín J., Ruso J.M., González-Pérez A. and Sarmiento F.** (2004) Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects 249: 51-55 "*A study of the interaction between proteins and fully-fluorinated and fully-hydrogenated surfactants by ζ -potential measurements.*"
140. **Privalov P.L. and Filimonov V.V.** (1978) J. Mol. Biol. 122: 447. "*Thermodynamic analysis of transfer RNA unfolding*".
141. **Privalov P.L. and Khechinashvili N.N.** (1974) J. Mol. Biol. 86: 665-684. "*A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study*".
142. **Privalov P.L. and Potekhin S.A.** (1986) Methods Enzymol. 131: 4-51. "*Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins*".
143. **Provencher S.W.** (1979) Macromol. Chem. 180: 210. "*Inverse problems in polymer characterization; direct analysis of polydispersity with photon correlation spectroscopy*".
144. **Rayleigh, Lord,** (1873) Proceedings of the London Mathematical Society, 4: 357-368. (Republished in Scientific Papers, by John William Strutt, Vol. 1, Cambridge University Press, 1899, pp. 170-181.) "*Some general theorems relating to vibrations*".
145. **Redfern D. and Gericke A.** (2004) Biophys. J. 86: 2980-2992. "*Domain Formation in Phosphatidylinositol Monophosphate/Phosphatidylcholine Mixed Vesicles*"
146. **Riess J.G.** (1994) J. Drug Targ. 2: 455-468. "*Fluorinated vesicles*"

147. **Riess J.G.** (1995) *J. Lip. Res.* 5: 413-430. "Introducing a new element fluorine-into the liposomal membrane"
148. **Riess J.G.** (2003) *Curr. Op. Coll. Interf. Sci.* 8: 259-266. "Fluorocarbon-based injectable gaseous microbubbles for diagnosis and therapy "
149. **Riess J.G. and Krafft M.P.** (1998) *Biomaterials* 19: 1529-1539. "Fluorinated materials for in vivo oxygen transport (blood substitutes), diagnosis and drug delivery "
150. **Rosen, M. J.** (1978): *Surfactants and Interfacial Phenomena*. John Wiley, New York
151. **Rosoff M.** (1996) "Vesicles" Marcel Dekker. New York
152. **Ruckenstein E. and Manciu M** (2002) *Langmuir* 18 : 7584-7593. "The Coupling between the Hydration and Double Layer Interactions"
153. **Sabín J., Prieto G, Ruso J.M., González-Pérez A. and Sarmiento F.** (2006a) *Biomacromolecules* 7 : 176-182 "Effects of Fluorinated and Hydrogenated Surfactants on Human Serum Albumin at Different pHs"
154. **Sabín J., Prieto G., Messina P.V., Ruso J.M., Hidalgo-Álvarez R. and Sarmiento F.** (2005) *Langmuir* 21: 10968 "On the Effect of Ca^{2+} and La^{3+} on the Colloidal Stability of Liposomes"
155. **Sabín J., Prieto G., Ruso J.M., Hidalgo-Álvarez R. and Sarmiento F.** (2006c) *Eur. Phys. J. E* 20: 401-408 "Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces"
156. **Sabín J., Prieto G., Sennato S., Blanco E., Messina P., Ruso J.M., Angelini R., Bordi F. and Sarmiento F.** (2007) *J. Therm. Anal. Calor.* 87: 301-304. "Examination of the Influence of F6H10 Fluorinated Diblocks on DPPC Liposomes"
157. **Sabín J., Prieto G., Sennato S., Ruso J.M., Angelini R., Bordi F. and Sarmiento F.** (2006b) *Phys. Rev. E.* 74: 031913 "Effect of Gd^{3+} on the colloidal stability of liposomes"
158. **Sabín J., Ruso J.M., González-Pérez A., Prieto G. and Sarmiento F.** (2006) *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 47: 64-70. "Characterization of phospholipid + semifluorinated alkane vesicle system"
159. **Sabín J., Ruso J.M., Prieto G. and Sarmiento F. and** (2007b) *Eur. Phys. J. E* "Fractal aggregation induced by liposome-liposome interaction in the presence of Ca^{2+} " (ENVIADO)
160. **Sabín J., Ruso J.M., Prieto G., Sarmiento F. and Messina P.** (2007a) *Chaos* "A study of the fractal dimension of the aggregation of liposomes in the presence of La^{3+} " (ENVIADO)
161. **Sadqi M.** (2000) "Estudio Termodinámico de los Estados Parcialmente Plegados del Dominio SH3 de α -Espectrina" Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
162. **Sander L.M., Cheng Z.M. and Richter R.** (1983) *Phys. Rev. B*, 28: 6394-6396. "Diffusion-limited aggregation in three dimensions"

163. **Santaella C. Frézard, F., Vierling P. and Riess J.G.** (1993) FEBS Lett. 336: 481-484. *"Extended in vivo blood circulation time of fluorinated liposomes"*
164. **Santaella C., Vierling P., Riess J., Gulik-Krzywicki T., Gulik A. and Monasse B.** (1994) Biochim. Biophys. Acta. 1190: 25-39. *"Polymorphic phase behavior of perfluoroalkylated phosphatidylcholines"*
165. **Schaefer D. and Martin J.** (1984) Phys. Rev. Lett. 52: 2371-2374. *"Diffusion-Limited Aggregation, a Kinetic Critical Phenomenon"*
166. **Schmutz M, Michels B. and Krafft M.P.** (2003) Langmuir. 19: 4889-4894. *"Fluorinated Vesicles Made from Combinations of Phospholipids and Semifluorinated Alkanes. Direct Experimental Evidence of the Location of the Semifluorinated Alkane within the Bilayer"*
167. **Schulze H.** (1882) J. Prakt. Chem. 25: 431 *"Schwefelarsen in wässriger Lösung"*
168. **Sheppard W.A. and Shorts C.M.** (1969) *"Organic Fluorine Chemistry"* W.A. Benjamin, New York
169. **Singer S.I. and Nicolson G.L.** (1972). Science 175: 720-731. *"The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes"*
170. **Smoluchowski M.** (1906), Ann. Physik 21: 756. *"Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen"*.
171. **Smoluchowski M.** (1921) *"Hansbulch der Electrizität und des Magnetismus (Graetz)"* vol.II, Barth, Leipzig .
172. **Sorai M.** (2004) *"Calorimetry & Thermal Analysis"*. Wiley Ltd., England.
173. **Stewart J.C.M.** (1959) Anal. Biochem. 104: 10 *"Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate"*
174. **Tadmor R.** (2001) J. Phys.: Cond. Matt. 13: L195–L202 *"The London-van der Waals interaction energy between objects of various geometries"*
175. **Takayasu H.** (1989) *Fractals in the Physical Science*. Manchester University Press, Manchester.
176. **Tang S.** (1999) Coll. Surf. A. Physicochem. Eng Aspects. 157: 185-192. *"Prediction of fractal properties of polystyrene aggregates"*
177. **Tatulian S.A.** (1994) J. Phys. Chem. 98: 4963 *"Evaluation of Ion Binding of Zwitterionic Membranes Based on Extended Gouy-Chapman-Stern Theory"*
178. **Turberg M.P. and Brady J.E.** (1988) J. Am. Chem. Soc. 110: 7797. *"Semifluorinated hydrocarbons: primitive surfactant molecules"*
179. **van Oss C.J.** (1993) Coll. Surf. A. 78: 1-49. *"Acid-base interfacial interactions in aqueous media"*
180. **Verwey E.J.W. and Overbeek J.** (1948) *"Theory of Stability of Lyophobic Colloids"*. Elsevier. Amsterdam
181. **Vinogradov E.V, Smirnov P.R. and Trostin V.N.** (2003) Rus. Chem. Bol. International Edition, 53: 1253-1271. *"Structure of hydrated complexes formed by"*

metal ions of Groups I—III of the Periodic Table in aqueous electrolyte solutions under ambient conditions”

182. **Volkov A.G., Paula S. and Deamer D.W.** (1997) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 42: 153-160. “Two mechanisms of permeation of small neutral molecules and hydrated ions across phospholipid bilayers”
183. **Weber G.** (1953) *Adv. Prot. Chem.* 8: 145-167. “Rotacional brownian motion and polaritation of the flourescence of solutions”.
184. **White G., Pencer J., Nickel B.G., Word J.M. and Hallet F.R.** (1996) *Biophys. J.* 71: 2701-2715. “Optical Changes in Unilamellar Vesicles Experiencing Osmotic Stress. Biophysical”
185. **Wilschut J. and Hoekstra D.**(1986) *Chem. Phys. Lip.* 40: 145-166 “Membrane Fusion: Lipid Vesicles as Model System”
186. **Witten T.A. and Sander L.M.** (1981) *Phys. Rev. Lett.* 47: 1400-1403. “Diffusion-Limited Aggregation, a Kinetic Critical Phenomenon”
187. **Wong P. and Bray A.** (1988) *Phys. Rev. Lett.* 60: 1344. “Porod scattering from fractal surfaces”
188. **Woodle M.C. and Papahadjopoulos D.** (1989) *Methods Enzymol.* 171: 193-217. “Liposome preparation ans size Characterization”
189. **www.avantilipids.com**
190. **Yang B., Matsumura H., Kise H. and Furusawa K.** (2000) *Langmuir* 16: 3160-3164. “Aggregation behaviour of hexadecane emulsion induced by Egg Yolk PC vesicles”
191. **Young R.J. and Lovell P.A.** (1991) “Introduction to Polymers” 2th Edition. Chapman & Hall. London.

Agradecimientos

A la hora de escribir esta tesis y recopilar el trabajo de estos últimos cuatro años de doctorado, uno se siente satisfecho al tener la sensación de que se está cerrando una etapa que ha resultado muy placentera y decisiva en mi formación científica y personal.

No querría cerrar esta etapa sin mostrar mis más sinceros agradecimientos a todas las personas que han sido fundamentales para hacer esta tesis:

Principalmente a mis directores de tesis, Félix Sarmiento y Gerardo Prieto, por confiar en mí y guiarme con su experiencia, pero sobre todo, por el trato de amistad que siempre tuvieron conmigo.

A los doctores Juan Manuel Ruso y Pablo Schulz por sus buenos consejos y su disponibilidad para ayudarme a salir de los *atascos* de esta tesis.

También quiero agradecer al resto de miembros del *Grupo de Biofísica e Interfases*, Paula Messina, las nuevas incorporaciones y especialmente, a Elena Blanco sin la cual nuestro despacho sería bastante menos divertido.

FE DE ERRATAS

Página 18 línea 6 desde abajo: **adición**, no **adicción**.

Página 19 línea 2 desde arriba: tensioactivos.

Página 25, segundo párrafo: la frase “...y decrece la permeabilidad de los liposomas en medios tamponados, ~~pequeñas moléculas polares y proteínas plasmáticas~~”

Página 33, línea 8 desde abajo: 10^{-5} , no **10-5**. Líneas 1 y 2 desde abajo: “**durante varias horas**” está repetido.

Página 45, línea 2 desde abajo: “**los términos de orden dos**” sustituir por “**términos superiores a la unidad**”

Página 54, línea 3 desde abajo: (4.5, 10 y 20 **°C**) Son grados sexagesimales, no centígrados

Página 102, línea 11 desde abajo: **microscopios**, no **microspocios**.

Página 110, la ecuación [3.19.] es
$$P = \frac{K_d D}{d} = \frac{J}{\Delta C}$$

Página 117, línea 2 desde abajo: **ratio**, debe reemplazarse por **razón o cociente**.

Página 160, línea 10 desde abajo: **aplicaciones**.

Página 162, línea 5 desde abajo: **fluctuaciones**, no **flustraciones**.

Página 168, final del primer párrafo: **adición**, no **adicción de iones**. No hay coloides ionadictos...

Página 169, línea 2 desde arriba: **revelan**, no **rebelan**. No hay sistemas químicos subversivos...

Página 217, línea 2 desde abajo: cadenas **hidrogenadas**, no **hidrogenas**.

A lo largo de las estancias en otras universidades he podido conocer a gente que siempre me ha recibido con los brazos abiertos y me ha ayudado a sentirme “como en casa”. Quisiera dar las gracias:

Al Dr. Joan Estelrich y a su grupo, por ayudarme a salir de los primeros tropiezos en la preparación de los liposomas.

Al Dr. Roque Hidalgo y a todo el *Grupo de Física de Flúidos y Biocoloides*, por acogerme en su laboratorio de investigación y por todos sus consejos.

A los doctores F. Bordi y C. Cametti y su grupo de la “*La Sapienza*” por su disponibilidad a la hora de usar sus equipos, que tan útiles me han sido para esta tesis y por su paciencia con *mi italiano*.

Al Dr. Miguel Costas de la *U.N.A.M.* por transmitirme su pasión por la investigación y al departamento de fisico-química (Norma, Aidee, Lalo, Jorge, Ángel, Xelhua, Isaac...) por su cálida acogida y amistad.

Por último, agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico mediante beca FPI.

También tengo mucho que agradecer a gente que no tienen tanto que ver con el mundo de los liposomas:

A María, por compartir conmigo los éxitos y también los fracasos y por su apoyo incondicional.

A mis padres, que con su trabajo me han dado la oportunidad de poder estudiar esta profesión que cada día me gusta más.

A Pili, que con cariño y paciencia, me ha ayudado a corregir todos los *errores* de esta tesis.

Y todos los amigos, que de alguna u otra manera me han apoyado en estos años.