



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

POSGRADO EN CIENCIAS FÍSICAS  
INSTITUTO DE FÍSICA

ESTUDIO DE MONOCAPAS DE LANGMUIR DE  
SURFACTANTES PULMONARES UTILIZADOS EN  
EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME DE  
DEFICIENCIA RESPIRATORIA NEONATAL

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS (FÍSICA MÉDICA)**

PRESENTA:

**MARCELINO ARCINIEGA CASTRO**

DIRECTORES DE TESIS: DRA. ALICIA ORTEGA AGUILAR  
DR. ROLANDO C. CASTILLO CABALLERO

COMITÉ TUTORAL: DR. FIDEL RAMÓN ROMERO



posgrado en ciencias físicas  
u n a m

MÉXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Dedicatorias

*A mis padres. Por ser ejemplo de trabajo y superación. Por enseñarme, que el ser humano se valora por sus actos y pensamientos, no por sus posesiones.  
Los amo.*

*A mis hermanos Edson y Pavel. Por formar parte esencial de mi vida. Los quiero.*

*A Fernanda, por mostrarme su apoyo en todo momento y compartir estos maravillosos 2 años a mi lado. Te adoro.*

*A los ingenuos que piensan que el honor,  
la sabiduría y el respeto, se obtienen con títulos.*

# **Agradecimientos Institucionales**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindar una educación pública, gratuita y de alta calidad.

Al Instituto de Física, a la Facultad de Medicina y al Instituto Nacional de Perinatología, les agradezco el haberme permitido hacer uso de sus instalaciones y equipos para la realización de este proyecto. En especial a los departamentos de Física Química, Bioquímica y (nuevamente) Bioquímica, respectivamente.

A el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, institución que por medio de Becas Nacionales y de Proyecto (CONACYT-50347), me respaldó económicamente durante los dos años que cursé la Maestría.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP), por el soporte financiero brindado para la adquisición de materiales y la asistencia a congresos.

A la Coordinación de Estudios de Posgrado (CEP) por el apoyo económico ofrecido para la realización de esta tesis mediante las becas de apoyo a la titulación.



## **Agradecimientos**

Agradezco el apoyo, orientación, confianza, paciencia y consejos que recibí de mis tutores, Dra. Alicia Ortega Aguilar y Dr. Rolando Castillo Caballero. Desde el fondo de mi corazón, gracias a ambos.

Al Dr. Fidel Ramón Romero por que al ser parte de mi comité tutorial, aportó su valiosa experiencia científica. Gracias por su amabilidad y su gentileza.

A los miembros del jurado de titulación: Dra. Alicia Ortega Aguilar, Dr. Rolando Castillo Caballero, Dr. Jaime Mas Oliva, Dr. Luis Alberto Medina Velazquez y M. en C. Joel Arias Martínez.

Al M. en C. Salvador Ramos Solorzano. Gracias por el tiempo, soporte científico y técnico aportado a este trabajo de tesis. Mas importante aún, gracias por brindarme tu amistad.

Al laboratorista Erick Guzmán Gómez, gracias por ser tan atento en lo laboral, y tan sincero en lo personal. Gracias por tu amistad.

A la Q.F.B. María del Rocío Alvarez Medina por las atenciones, tanto académicas como personales, que en todo momento tuvo conmigo.

A Yanalté Herrero Quezadas y a Rosa Isela Gallegos Bárcenas, por hacer que el posgrado en ciencias físicas funcione.

Al Dr. José Campos Terán y al Dr. Jaime Mas Oliva, por brindarme valiosos consejos en tiempos de poca confianza.

Agradezco enormemente a todos mis profesores del posgrado, por compartir sus conocimientos y gran profesionalismo. En especial al Ing. Fernando Iturbe Hermann y a la Dra. María Ester Brandan Siqués, quienes influyeron fuertemente en mi desarrollo profesional.

A TODA MI FAMILIA, por enseñarme a reír en la vida.

A TODOS MIS AMIGOS. Los que acompañaron mi infancia y adolescencia en Tepic, los que estuvieron a mi lado durante mi paso por Guadalajara y los

que ha hecho de esta ciudad un lugar maravilloso. A todos y cada uno de ustedes, mil gracias.

## Resumen

El surfactante pulmonar (SP) es una mezcla de lípidos y proteínas, el cual es excretado dentro de la cavidad alveolar. Es ampliamente aceptado que el SP, es responsable de la reducción de tensión superficial de la interfase aire-agua en la pared alveolar dentro del pulmón, mediante la formación de una monocapa (película de una sola molécula de espesor). La ausencia de SP, frecuentemente observada neonatos prematuros, trae consigo el padecimiento del Síndrome de Deficiencia Respiratoria Neonatal (SDRN), el cual es un cuadro clínico de dificultad respiratoria. La formulación de SP sustitutos con fines terapéuticos, exige un mejor entendimiento de los mecanismos de acción del SP natural. En este trabajo se evalúan, bajo diferentes condiciones, varios tipos de SP con el fin de identificar las características y posiblemente los componentes, que tienen mayor influencia en el comportamiento superficial de SP. El estudio consistió en realizar, en una palangana de Langmuir, compresiones isotérmicas de monocapas hechas de SP, complementando la información con imágenes de microscopia de ángulo de Brewster. Los resultados mostraron las dependencias de la temperatura y velocidad de compresión. Las conclusiones más importantes obtenidas de este estudio son, el impacto negativo que brinda la presencia de colesterol en la mezclas tensoactivas, y la necesidad replantear los métodos de estudio de este problema.

# Índice

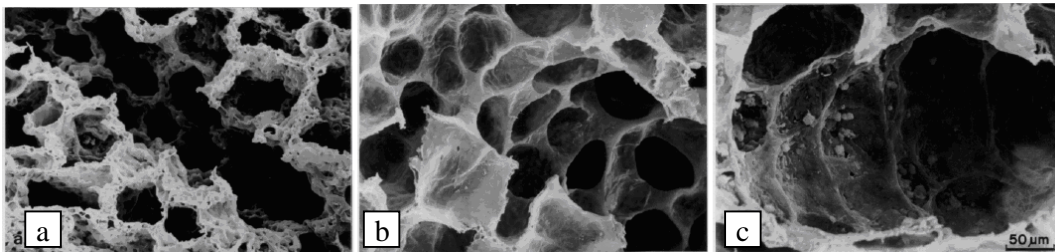
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1.1</b> Mecánica respiratoria	3
<b>1.2</b> Estructura alveolar	6
<b>1.3</b> Surfactante pulmonar	8
<b>1.4</b> Modelo clásico de la función del surfactante pulmonar	9
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	12
<b>HIPÓTESIS</b>	13
<b>OBJETIVO</b>	13
<b>CAPÍTULO 2: SECCIÓN EXPERIMENTAL</b>	14
<b>2.1</b> Monocapas de Langmuir	14
<b>i.</b> Presión superficial	15
<b>ii.</b> Isotermas	16
<b>iii.</b> Diagramas de fase	18
<b>2.2</b> Palangana de Langmuir	21
<b>2.3</b> Placa de Wilhelmy	22
<b>2.4</b> Microscopia de Ángulo de Brewster	24
<b>2.5</b> Procedimiento de limpieza y depósito	26
<b>2.6</b> Muestras y mezclas evaluadas	27
<b>2.7</b> Desarrollo del experimento	31
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	32
<b>3.1</b> Mezclas sintéticas	33
<b>i.</b> Mezcla 1	33
<b>ii.</b> Mezcla 2	39
<b>iii.</b> Mezcla 3	43
<b>3.2</b> Discusión mezclas sintéticas	47
<b>3.3</b> Surfactantes terapéuticos naturales	48
<b>i.</b> Survanta	48
<b>ii.</b> Survanta sin proteínas	52
<b>iii.</b> Curosurf	56
<b>iv.</b> Curosurf sin proteínas	60

<b>3.4</b>	Discusión surfactantes terapéuticos naturales	64
<b>3.5</b>	Surfactantes pulmonares naturales	65
<b>i.</b>	Surfactante pulmonar humano	65
<b>ii.</b>	Surfactante pulmonar humano sin proteína	68
<b>iii.</b>	Surfactante pulmonar de conejo	71
<b>iv.</b>	Surfactante pulmonar de conejo sin proteína	74
<b>3.6</b>	Discusión surfactantes pulmonares naturales	77
<b>3.7</b>	Comparación entre mezclas	78
<b>3.8</b>	Discusión general	80
<b>CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES</b>		83
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>		85
<b>REFERENCIAS</b>		87

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

Von Neergaard (1929) fue el primero en establecer que en un pulmón aislado, la presión requerida para mantenerlo inflado con aire es mayor a la que se requiere si se llena con solución isotónica. Von Neergaard concluyó que la diferencia de presiones era causada por la diferencia de tensión superficial ( $\gamma$ ) existente en cada uno de los casos y que los extractos de lavados pulmonares contenían sustancias tensoactivas [1]. Pattle (1955), Clements (1957) y Arvery (1959) reportaron la existencia en los lavados pulmonares, de un material prácticamente insoluble en agua que reduce la tensión superficial a valores muy bajos. En la figura 1 se muestran los cambios que sufren las estructuras pulmonares ante diferentes tensiones superficiales.

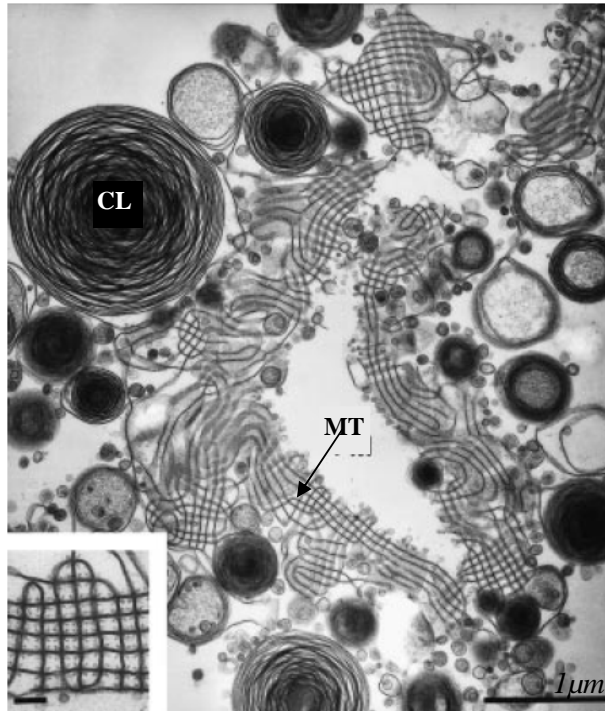


**Figura 1.** Micrografías electrónicas de conductos alveolares llenados con a) solución salina (tensión superficial ( $\gamma$ ) superior a la normal), b) aire ( $\gamma$  normal) y c) detergente ( $\gamma$  inferior a la normal). Por normal se entiende a la  $\gamma$  que existe cuando el pulmón se insufla con aire, caso b) [2].

El surfactante pulmonar es una mezcla de lípidos y proteínas que se adsorbe a la interfase aire/agua que recubre la pared alveolar, logrando disminuir la tensión superficial y con ello facilitando la expansión de la cavidad alveolar para un mejor intercambio gaseoso [2]. Esta mezcla se sintetiza y organiza en los neumocitos tipo II [3]. Cuando el surfactante pulmonar es excretado al espacio alveolar pasa de una organización multilamelar enrollada conocida como cuerpo lamelar (CL), a otra organización menos densa llamada mielina tubular (MT), que es un arreglo ordenado de túbulos con sección transversal aproximadamente rectangular, organizados en forma de red (figura 2) [3].

Se ha propuesto que la dinámica del surfactante fuera de la célula, puede describirse en 3 pasos, que en resumen es un proceso de transporte, anclaje y transferencia [4]

1. El movimiento de los agregados del surfactante a través de la subfase con fines de llegar a regiones cercanas a la interfase aire/agua.
2. Las bicapas del surfactante pulmonar, en forma de MT se asocian a la interfase o a la preexistente monocapa.
3. La estructura de bicapas es perturbada y abierta para permitir la transferencia de moléculas a la interfase aire/agua o a la monocapa ya existente.



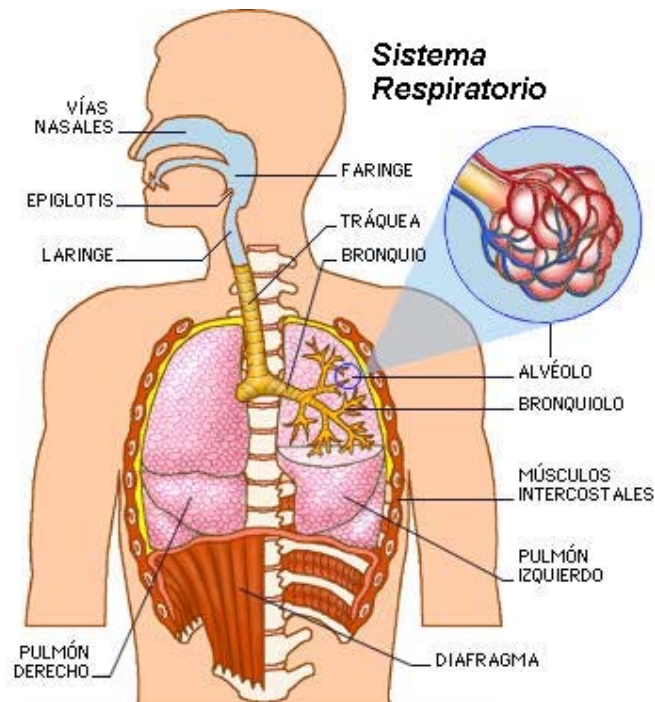
**Figura 2.** Micrografía electrónica de una sección de pulmón de rata. A partir de los cuerpos lamerales (CL) se forma la mielina tubular (MT). En la esquina inferior izquierda se observa una ampliación de mielina tubular [3].

La naturaleza antipática del surfactante pulmonar, y la evidencia de su efecto en la tensión superficial en la cavidad alveolar, ha llevado a proponer y mostrar evidencias de la formación de monocapas en la interfase aire/agua como el mecanismo funcional mediante el cual actúa el surfactante. Sin embargo, después de 50 años de investigación tales evidencias no son lo suficientemente convincentes, manteniendo el mecanismo de acción del surfactante pulmonar como tema de investigación vigente dadas las implicaciones que tiene en la vida de los mamíferos pulmonados, incluyendo al ser humano [5].

La hipótesis de que el surfactante pulmonar forma una monocapa en la interfase aire/agua de la pared alveolar, parece ajustarse a la evidencia experimental, por lo que gran cantidad de investigación se ha realizado con base en ello. Aunque el objetivo del trabajo no es proponer un nuevo modelo de función del surfactante, es necesario decir que existen otras posibles estructuras; como fase bicontinua o monocapas de Gibbs, que no han sido suficientemente analizadas y que también podrían ajustarse a la evidencia experimental.

## 1.1 Mecánica respiratoria

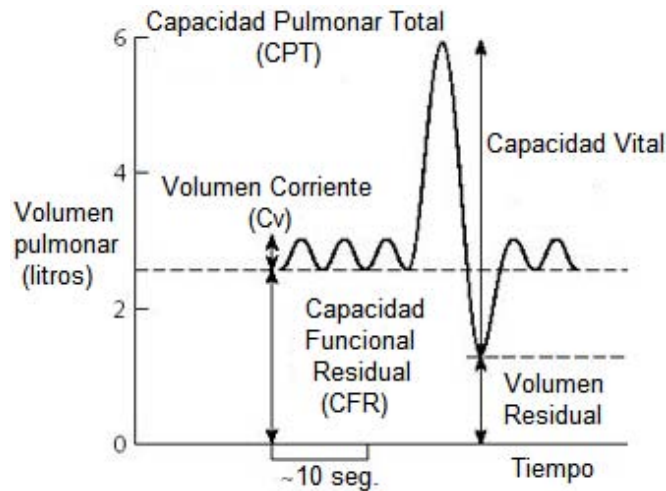
La respiración (utilizada como sinónimo de ventilación pulmonar) se asocia con cambios en el volumen del tórax. La expansión de los pulmones se consigue por la acción de los músculos respiratorios, principalmente el diafragma y los músculos intercostales internos y externos (figura 3). La pared torácica está recubierta por una membrana denominada pleura parietal, que está separada de la pleura visceral; que recubre los pulmones, por una fina capa de líquido que lubrica las superficies de las membranas pleurales cuando se mueven durante la respiración. Las propias membranas pleurales están formadas por capas de tejido conjuntivo colágeno y elástico que se unen a las raíces de los pulmones. Por debajo de la pleura visceral se sitúa la membrana limitante del propio pulmón que, junto con la pleura visceral, limita la expansión de los pulmones [6].



**Figura 3.** Ilustración del sistema respiratorio [44].

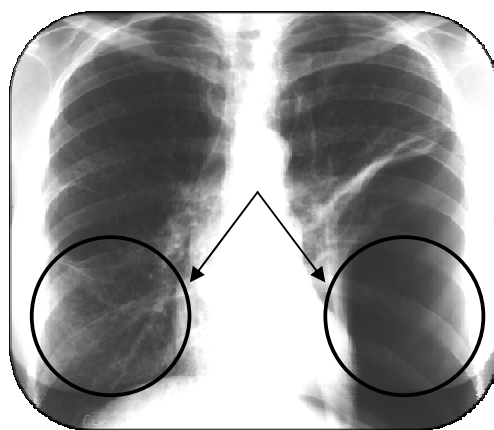
En la figura 4, se presenta un esquema con los diferentes volúmenes que han sido definidos para estudios pulmonares. La capacidad pulmonar total (CPT), es el volumen de aire que pueden almacenar los pulmones después de una inhalación máxima. Si por el contrario se realiza una exhalación máxima, en los pulmones aún quedará un volumen de aire que no puede ser expulsado, el llamado volumen residual (VR). Debido a que estos dos parámetros son las cotas superior e inferior de los volúmenes de aire que son fisiológicamente accesibles, a la diferencia entre CPT y VR recibe el nombre de capacidad vital (CV). La cantidad de aire inhalado y exhalado en cada ciclo respiratorio recibe el nombre de volumen corriente (VC). En una situación de reposo, cuando la espiración es tranquila y normal, el VC es aprox. 0.5 l. La capacidad residual funcional (CRF) es el volumen de aire que queda en el interior de los pulmones al final de una espiración normal, con valores ligeramente superiores a los 2 l.





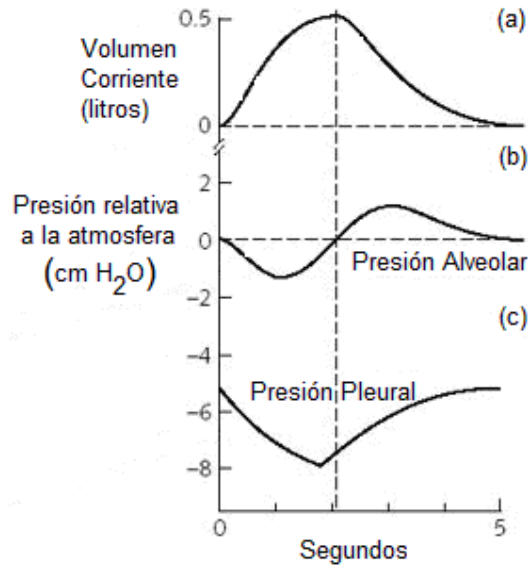
**Figura 4.** Esquema que muestra los diferentes volúmenes pulmonares de respiración con respecto al tiempo. El volumen corriente de una respiración tranquila entra y sale de los pulmones en aproximadamente 5 seg. [45].

Desde un punto de vista físico; los pulmones son expandidos y contraídos por movimientos descendentes y ascendentes del diafragma para aumentar o disminuir el tamaño de la cavidad torácica. Durante la inhalación, la contracción del diafragma produce un movimiento descendente de superficie inferior del pulmón. Mientras que durante la exhalación, la relajación del diafragma provoca un movimiento ascendente que junto con el repliegue elástico del parénquima pulmonar, comprimen nuevamente los pulmones, disminuyendo con ello el volumen de la cavidad torácica [7]. Para que el aire entre en los pulmones, la presión intrapulmonar o alveolar debe ser inferior a la atmosférica durante la inhalación. Por el contrario, en la exhalación la presión alveolar debe superar a la presión atmosférica para expulsar el aire. En el caso del espacio comprendido entre las pleuras parietal y visceral, la presión es inferior a la presión del aire contenido en los alvéolos. Esta presión se conoce como presión pleural. Una prueba directa de que la presión pleural es menor a la atmosférica es el hecho de que si se punciona la pared torácica con una aguja de modo que su punta quede situada en el espacio interpleural, la entrada de aire de la atmósfera a este espacio hará que se igualen las presiones, produciendo que pulmón colapse (figura 5) [6].



**Figura 5.** Radiografía de tórax. Colapso del pulmón izquierdo debido a la entrada de aire al espacio intrapleural. Las flechas señalan el espacio que dejó libre el pulmón colapsado [46].

El volumen corriente de una respiración en reposo, es aproximadamente 0.5l para un adulto normal con un tiempo de inhalación de aproximadamente 2 segundos. Una respiración con estas características es llamada respiración pasiva. Durante la exhalación pasiva, la presión en el espacio alveolar logra adquirir valores que superan por 0.1kPa los valores de la presión atmosférica ( $1\text{cm H}_2\text{O} \approx 0.1\text{kPa}$ ), lo cual hace que los 0.5l de aire inhalado salgan de los pulmones en 2-3 segundos. Al final de la exhalación la presión alveolar se iguala con la presión atmosférica, en ese mismo instante la presión pleural es inferior a la presión atmosférica en aproximadamente 0.5kPa. Al final de una inhalación pasiva la presión pleural es inferior en aproximadamente 0.8 kPa a la presión atmosférica (figura 6) [7].

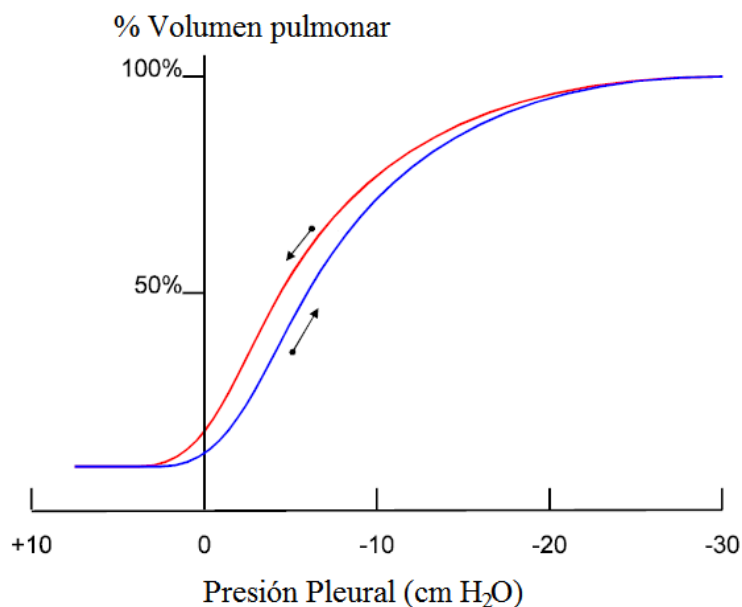


**Figura 6.** Cambios en el volumen pulmonar y en las presiones alveolar y pleural durante la respiración [45].

El cambio en el volumen pulmonar, provocado por la variación de la presión pulmonar, se denomina complianza. La complianza es una medida de la facilidad con la que se puede modificar el volumen torácico y se determina de manera estática. En un adulto normal, la complianza presenta valores alrededor de 2 l/kPa (figura 7) [6].

Durante la respiración, es necesario un cambio importante de la presión para desplazar un volumen dado de aire, en comparación con lo esperado según la complianza estática. Este efecto se debe a que es necesario vencer resistencias no elásticas adicionales:

1. Resistencia de las vías aéreas al movimiento del aire
2. Fricción de la pared torácica con los pulmones
3. Inercia del aire y los pulmones



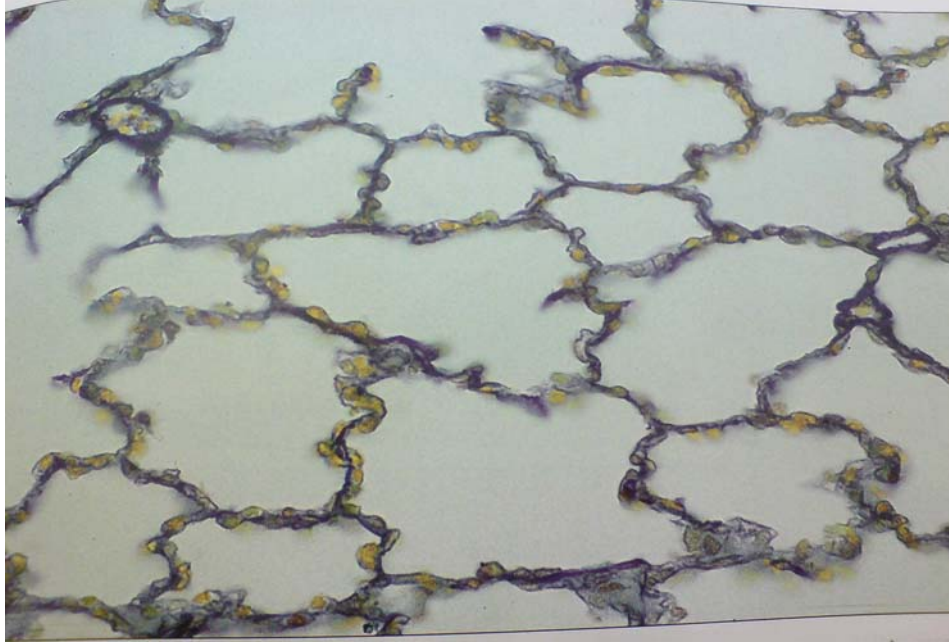
**Figura 7.** Complianza. A la pendiente de la curva presión transpulmonar-volumen pulmonar, se le denomina complianza. Es un parámetro clínico que determina la facilidad con la que se expande el pulmón. En la zona media de la curva, la complianza es de aproximadamente 2l/kPa en un adulto normal. Valores menores indican mayor rigidez, como en la fibrosis pulmonar o SDRN. Valores superiores son relacionados con casos de enfisema [6].

La complianza está determinada por la elasticidad de la pared torácica y la de los pulmones. La última proviene de las fibras elásticas existentes en el parénquima pulmonar y la tensión superficial inducida por la capa de agua que reviste los alvéolos. Cuando a un pulmón se le expanden mediante la inyección de solución salina, la única fuerza que se opone a dicha expansión es la tensión de los elementos elásticos del parénquima. En cambio, cuando los pulmones se expanden con aire, la tensión superficial de la interfase aire-agua existente en los alvéolos también se opone a la expansión. En consecuencia el surfactante pulmonar disminuye la tensión superficial del líquido que reviste los espacios respiratorios pulmonares disminuyendo de manera importante las presiones necesarias para mantener abiertos los alvéolos [6].

## 1.2 Estructura alveolar

El intercambio de gases entre la atmósfera y la sangre del individuo para obtener oxígeno y desechar dióxido de carbono se lleva a cabo en la unidad respiratoria, que está constituida principalmente por la pared alveolar que es extremadamente delgada. En detrás de la pared alveolar, existe una red casi sólida de capilares interconectados que también están constituidos por una capa de células endoteliales. Las paredes alveolares están formados por una sola capa de células epiteliales que presenta 2 tipos de células, denominadas neumocitos tipo I y tipo II [6]. Su contraparte en el intercambio gaseoso es el endotelio capilar, que también está compuesto por una sola capa de células. El espesor que tienen que atravesar los gases es de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$ ; esto debido a que la membrana del glóbulo rojo se pone en contacto con la membrana de la pared capilar, lo que reduce la distancia de deben recorrer los gases y reduce su difusión en plasma sanguíneo. Existen aproximadamente 300 millones de alvéolos en el pulmón de un adulto, cada uno de ellos se encuentra prácticamente envuelto por los

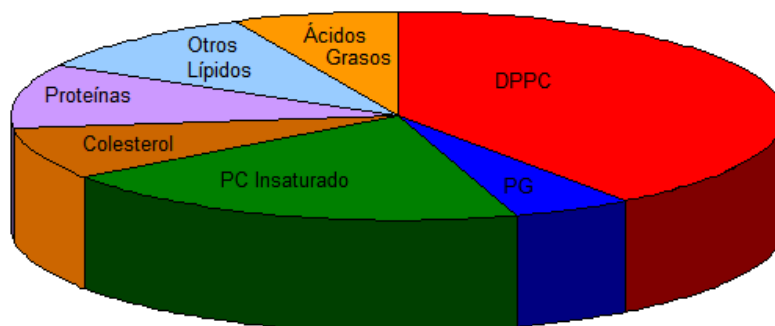
capilares pulmonares. Se estima que hay cerca 1000 capilares por alvéolo (figura 8). Entre los capilares en las paredes de los alvéolos se encuentran las fibras elásticas y de colágeno que forman el tejido conjuntivo del pulmón. Éste une los alvéolos para formar el parénquima pulmonar, que tiene apariencia esponjosa. Los alvéolos vecinos se interconectan por pequeños conductos aéreos llamados poros de Kohn [6].



**Figura 8.** Estructura alveolar. La figura muestra a los espacios alveolares definidos por los contornos sinuosos que forma el tejido conjuntivo (color morado) y los capilares sanguíneos (color amarillo). Nótese que un mismo capilar puede estar en contacto con dos espacios alveolares contiguos, por lo que la difusión de gases puede proceder de dos espacios alveolares a un mismo capilar [47].

### 1.3 Surfactante Pulmonar

El surfactante pulmonar (SP) es una mezcla compleja compuesta prácticamente por un 90% de lípidos y 10% de proteínas que se encuentran suspendidos en solución acuosa. El mayor componente de la fracción lipídica es la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) que representa entre un 40 y 80%, dependiendo de la especie animal. Además de DPPC, el surfactante pulmonar también está constituido por otras especies de fosfolípidos como el dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG) y lípidos simples, como colesterol y ácido palmítico que complementan la fracción lipídica (figura 9). Cuatro proteínas surfactantes han sido identificadas, SP-A, SP-B, SP-C y SP-D, de las cuales solo SP-B y SP-C tienen carácter hidrofóbico [5].



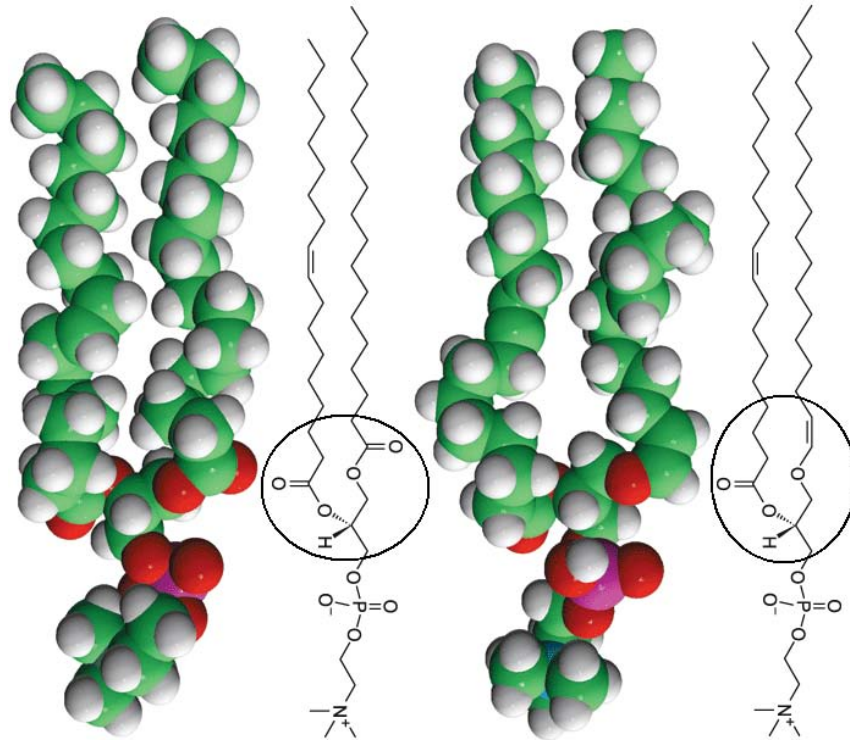
**Figura 9.** Distribución esquemática de la composición de surfactante pulmonar. La figura muestra una representación lo más general posible de la composición del surfactante debido a que ésta presenta variaciones de especie en especie.

Aunque la composición del SP presenta variaciones de especie en especie; la presencia predominante de DPPC es una característica general de mamíferos, al igual como ocurre en todas las membranas biológicas [8,9].

En el surfactante pulmonar existen otros fosfolípidos llamados plasmalógenos, los cuales se diferencian por tener un enlace tipo éter en la posición sn-1 del glicerol. Los fosfolípidos nombrados con el término fosfatidil corresponden a que los enlaces de los ácidos grasos con el glicerol son tipo éster, esto es 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfolcolina. Mientras que los llamados plasmalógenos corresponden a que existen un enlace tipo éter y un tipo éster entre los 2 ácidos grasos con el glicerol, además de que el ácido graso con enlace tipo éter tiene un doble enlace entre su primer y segundo carbono, 1-alkil-1P-enil-2-acil-sn-glicero-3-fosfolcolina. La diferencia entre las moléculas puede apreciarse mejor en la figura 10.

La función biológica de los plasmalógenos en el surfactante pulmonar es desconocida, existiendo incluso controversias respecto a su biosíntesis [10,11].

La importancia de las proteínas surfactantes queda demostrada partiendo de que la eficacia de las preparaciones surfactantes dependen de la relativa proporción de las proteínas hidrofóbicas (SP-B y SP-C) que contienen [12]. En particular, la deficiencia de la proteína surfactante SP-B debida a mutaciones en el gen que la expresa puede producir deficiencias respiratorias fatales en ratones neonatos [13].



**Figura 10.** Molécula izquierda: 1-Esteroil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina (SOPC) Molécula Derecha: 1-O-1'-(Z)-Octadecenil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina (plasmalogeno de SOPC). La diferencia entre las moléculas esta señalada por los círculos [48].

#### 1.4 Modelo clásico de la función del surfactante

La función más aceptada del surfactante pulmonar en el proceso respiratorio consiste en la adsorción de éste a la interfase aire/agua existente en la pared alveolar, reduciendo la tensión superficial de la interfase. De manera más específica, durante la inhalación el SP minimiza el trabajo de expansión alveolar, lo que a su vez se traduce en una mayor área de intercambio gaseoso. Por otro lado, durante el proceso de exhalación, el SP estabiliza los alvéolos impidiendo que las paredes alveolares entren en contacto y compliquen la reexpansión del alveolo. El proceso en el cual las paredes alveolares entran en contacto se le conoce como colapso alveolar (clínicamente micro-actelactasis). Tal comportamiento fisiológico, así como la importancia que tiene el SP especialmente al inicio de la vida extrauterina, está ampliamente aceptado [5]. De ahí la importancia del estudio del SP tanto *in situ* como *in vitro*.

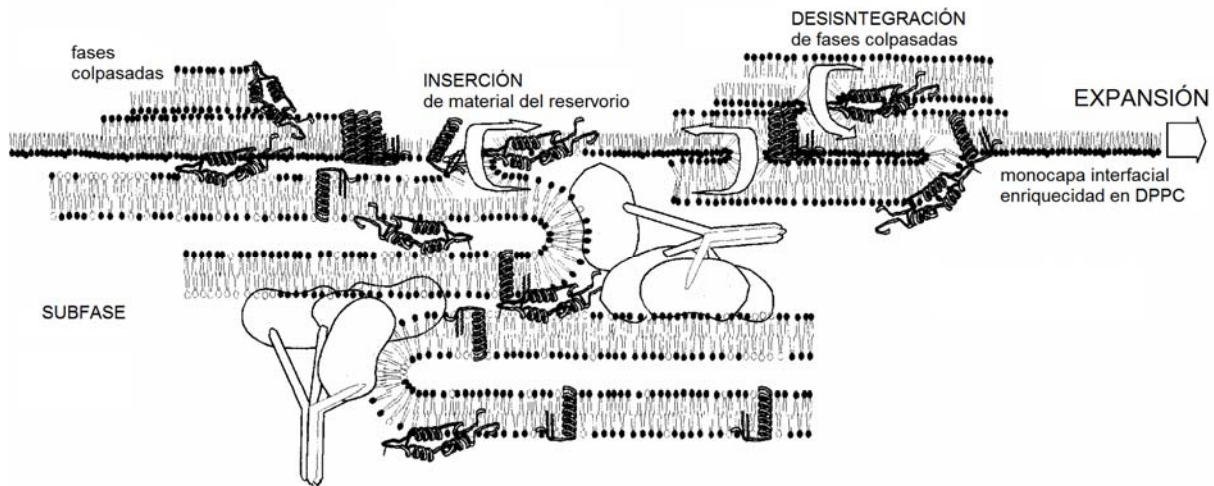
La primera determinación de la tensión superficial *in situ* fue realizada por Schürch en 1976 [14], quien registró que la tensión superficial disminuía a valores de 1mN/m durante una deflación a un 40% de la capacidad pulmonar total de un pulmón aislado, sin que existiera una gran diferencia en el área alveolar con el cambio en tensión superficial. En la capacidad pulmonar total, Schürch logró registrar valores de tensión superficial de ( $\gamma$ ) de aproximadamente 30mN/m. Esta tensión superficial concuerda con la tensión superficial de equilibrio alcanzada por saturación *in vitro*; la cual corresponde a la tensión superficial más baja que puede ser alcanzada de manera espontánea, debida únicamente a la adsorción de material surfactante. Por tales motivos, para estudiar el SP



bajo condiciones de relevancia fisiológica es necesario estudiar el intervalo de tensión superficial comprendido entre 1 y 30mN/m [1].

Se han obtenido evidencias [1,4] que sugieren que, las proteínas del surfactante pulmonar (SP-B y SP-C) facilitan la formación de lo que se ha llamado reservorio superficial al conglomerarse en los bordes de los dominios de fases condensadas. El reservorio superficial se forma por componentes distintos a la DPPC, que son expulsados de la monocapa interfacial (una expulsión selectiva ó squeeze-out), al no poder formar las fases condensadas que permiten reducir considerablemente la tensión superficial. De esta manera, el reservorio molecular esta compuesto por varias membranas empaquetadas que están asociadas a la monocapa interfacial. El modelo sugerido de la organización del SP, propone una superficie continua y dinámica con flujos de especies lipídicas entre la monocapa y bicapas asociadas a ella. Las proteínas son las encargadas de modular y optimizar las estructuras producidas por la compresión de la película, manteniéndolas asociadas a la monocapa de la interfase (fig. 11) [4].

La hipótesis de la expulsión selectiva de componentes del SP, se debe a que la DPPC es la única de los componentes del SP, capaz de formar películas que logren reducir la tensión superficial a los valores requeridos en la temperatura que marca la condición fisiológica [1].



**Figura 11.** Esquema del modelo clásico de squeeze-out propuesto para la organización del surfactante durante el proceso de expansión. Durante la compresión la monocapa queda compuesta principalmente por moléculas de DPPC (moléculas con cabeza negra). Bicapas de moleculares compuestas por los elementos expulsados como POPG (moléculas con cabeza clara) y POPC (moléculas con cabeza negra, nótese que la cabeza polar es la misma que la de la molécula de DPPC, de ahí que también sea color negro) se encuentran asociadas a la internase por medio de la proteínas, formando un reservorio molecular. Las proteínas surfactantes ayudan a la reinserción de los fosfolípidos que fueron expulsados de la monocapa durante la compresión, incluyendo los que fueron expulsados para formar fases colapsadas [4].

En resumen, el modelo clásico de la función del surfactante natural considera que la película funcional en el pulmón a altas presiones superficiales (expiración profunda) consiste de una fase líquido condensado altamente rica en DPPC. En el caso de la

expansión (inhalación) la monocapa interfacial debe ser reestablecida lo más rápido posible para volver a cubrir por completo la pared alveolar, aunque esto podría ser un proceso relativamente lento.



# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Síndrome de Deficiencia Respiratoria Neonatal (SDRN) se presenta en neonatos prematuros, especialmente en aquellos que nacen antes de las 32 semanas de gestación y que pesan menos de 1.5kg. Tales características de nacimiento llevan consigo generalmente la inmadurez de las células alveolares tipo 2 (neumocitos tipo II), quienes son las encargadas de la síntesis del SP. Alrededor de 23.000 bebés en Estados Unidos de America desarrollan SDRN cada año [15]. Estadísticas similares referentes a la población mexicana no han sido publicadas, pero se espera que el problema sea más grave. El principal síntoma del SDRN se manifiesta una reducción de la complianza pulmonar e intercambio gaseoso. Para reducir la mortalidad por SDRN, los neonatos prematuros son tratados con surfactantes terapéuticos sustitutos. A la fecha, los sustitutos de surfactante pulmonar utilizados en el tratamiento de SDRN han sido clasificados según su fabricación en:

1. **Surfactantes Pulmonares Terapéuticos Sintéticos:** Estos se fabrican a partir de reproducir la composición lipídica de surfactante natural, utilizando lípidos sintéticos, buscando inducir las bajas tensiones superficiales alcanzadas por el complejo nativo.
2. **Surfactantes Pulmonares Terapéuticos Naturales:** Tienen como base lavados bronqueoalveolares realizados a otros mamíferos (bovino y porcino, principalmente) para de ellos obtener el surfactante mediante métodos biológicos y químicos de aislamiento.

El tratamiento con surfactante ha permitido reducir considerablemente el número de bebés que muere por SDRN. Sin embargo en Estados Unidos, todavía mueren aproximadamente 880 bebés por año en su período neonatal a causa de esta enfermedad [16]. Los resultados de estudios clínicos realizados en la población neonatal con SDRN, han demostrado que los surfactantes pulmonares terapéuticos naturales son más eficientes en alcanzar su objetivo [17].

Sin embargo, se tiene el problema de que los surfactantes pulmonares terapéuticos naturales presentan riesgos de transmisión de agentes infecciosos, inmunogenicidad e inconsistencias en la manufactura de los lotes (debido a variaciones biológicas de un espécimen a otro); sin mencionar lo complicado del proceso de extracción. Ante tales situaciones, la formulación de surfactantes pulmonar sintéticos es un área de investigación en constante crecimiento [18, 19, 20, 21].

# HIPÓTESIS

Con el estudio comparativo de diferentes de surfactantes pulmonares, podremos identificar factores favorables para el funcionamiento *in vivo* del surfactante pulmonar.

## OBJETIVO

### General

Definir las características termodinámicas de monocapas moleculares de diferentes tipos surfactantes pulmonares. La información permitirá un mejor entendimiento de la función del surfactante pulmonar, con implicación directa en la formulación de nuevos surfactantes terapéuticos para casos de NRDS.

### Específicos

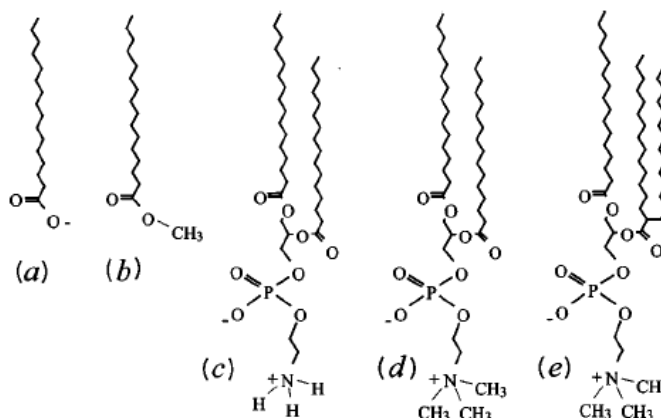
Se estudian 3 mezclas sintéticas, 2 surfactantes pulmonares terapéuticos naturales, ampliamente utilizados en la clínica (Survanta y Curosurf), y 2 surfactantes naturales (humano neonato y conejo). El estudio consiste en realizar compresiones isotérmicas de monocapas de moleculares formadas por las diferentes muestras y la observación del sistema con Microscopia de Ángulo de Brewster (BAM).

## Capítulo 2

# SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 2.1 Monocapas de Langmuir

Las películas mono-moleculares insolubles sobre la superficie de un líquido (generalmente agua) son llamadas monocapas de Langmuir, en honor a Irving Langmuir quien realizó grandes avances en el estudio de estos sistemas en las primeras décadas del siglo pasado. Tales moléculas son llamadas anfifílicas (fig. 12) y están compuestas por dos partes, una cabeza polar y una cola no polar. Cuando existe el balance correcto entre la solubilidad de la cabeza polar y la naturaleza hidrofóbica de su cola es posible formar monocapas de Langmuir. Como ejemplo de ese balance se tiene que el ácido hexadecanóico ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-CO}_2\text{H}$ ) forma monocapa, mientras que el cloruro de hexadeciltrimetilamonio ( $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-N(CH}_3\text{)}^+\text{CL}^-$ ) no lo logra. En ácidos grasos este balance se encuentra en cadenas de entre 12 y 30 carbonos. Las moléculas anfifílicas más frecuentemente encontradas en la naturaleza son los fosfolípidos, éstos consisten esencialmente en una molécula de glicerol al que se le han unido 2 ácidos grasos, un grupo fosfato y un alcohol aminado (fig. 12).



**Figura 12.** Algunas de las moléculas comunes que forman monocapas de langmuir. (a) ácido graso, (b) éster de ácido graso, (c)-(e) fosfolípidos: (c) diacilfosfatidiletanolamina, (d) diacilfosfatidilcolina, (e) diacilfosfatidilcolina con una rama hidrofóbica.[22]

Experimentalmente una monocapa de Langmuir se puede preparar depositando sobre una superficie de agua una pequeña cantidad del anfifilo en solución con un disolvente volátil. La monocapa se forma conforme el disolvente se dispersa y evapora sobre la superficie de agua. Una vez constituida, se tiene un sistema de aproximadamente  $10^{16}$  moléculas, las cuales están confinadas en la interfase aire/agua.

Ante estas circunstancias experimentales descritas, la representación energética conveniente para el estudio termodinámico del sistema es la energía libre de Helmholtz  $F(T,V,N)$ ; sin embargo, en nuestro sistema las moléculas se encuentran sobre la superficie (2-dim), por lo que el volumen es sustituido por el área,  $F(T,A,N)$ .

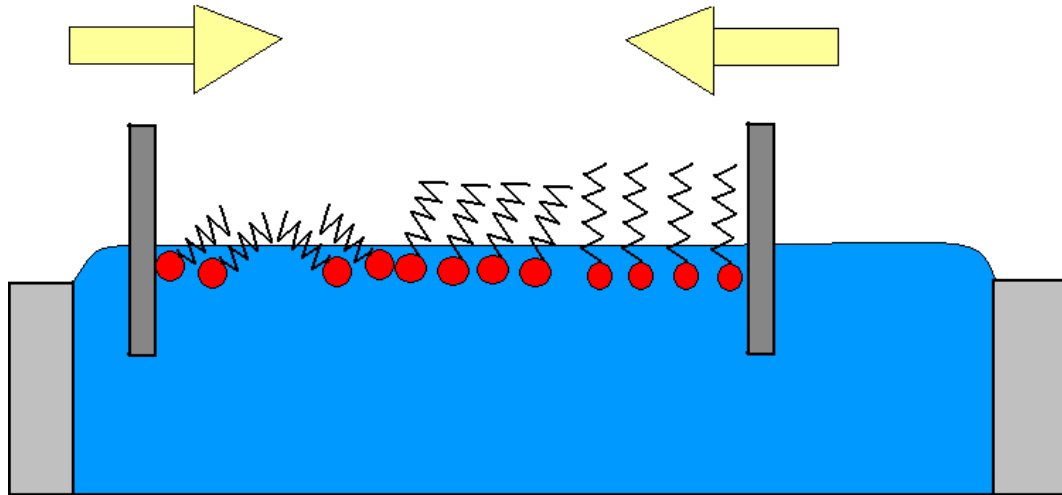
Si  $N$  y  $T$  se mantienen constantes, entonces los cambios en la energía libre del sistema serán proporcionales a cambios en el área en la cual se encuentran las moléculas (cambios en la densidad de moléculas).

$$dF = (\partial F / \partial A) dA \quad (1)$$

El coeficiente de proporcionalidad  $(\partial F / \partial A)$  es llamado tensión superficial  $\gamma$  [ $\text{J}/\text{m}^2$ ]. Midiendo la tensión superficial de la monocapa mientras se realizan cambios en el área que ocupa el sistema (con  $N$  y  $T$  constantes), es posible registrar cambios en la energía libre del sistema, que a su vez son manifestaciones de la interacción molecular.

### i. Presión superficial

La medición de la tensión superficial durante la compresión isotérmica de una monocapa, es uno de los principales métodos de estudio de estos sistemas. La palangana de Langmuir es un dispositivo experimental que sirve como contenedor del agua (sobre el cual se forma la monocapa) dejando gran cantidad de superficie del agua expuesta a la atmósfera. Tiene barreras móviles que se deslizan sobre la superficie del agua, modificando el área que ocupa de la monocapa sin que en algún momento se interfiera con la continuidad de la subfase, la cual se define como el volumen del líquido que no está en contacto con la atmósfera. La figura 13 muestra una representación esquemática de la función que realiza la palangana de Langmuir (Ver sección Palangana de Langmuir para mayor detalle).



**Figura 13.** Esquema representativo de la compresión de la monocapa. Las flechas indican la dirección del movimiento de las barreras. Mediante este sistema se reduce el área por molécula, confinando a las moléculas en el espacio entre las barreras.

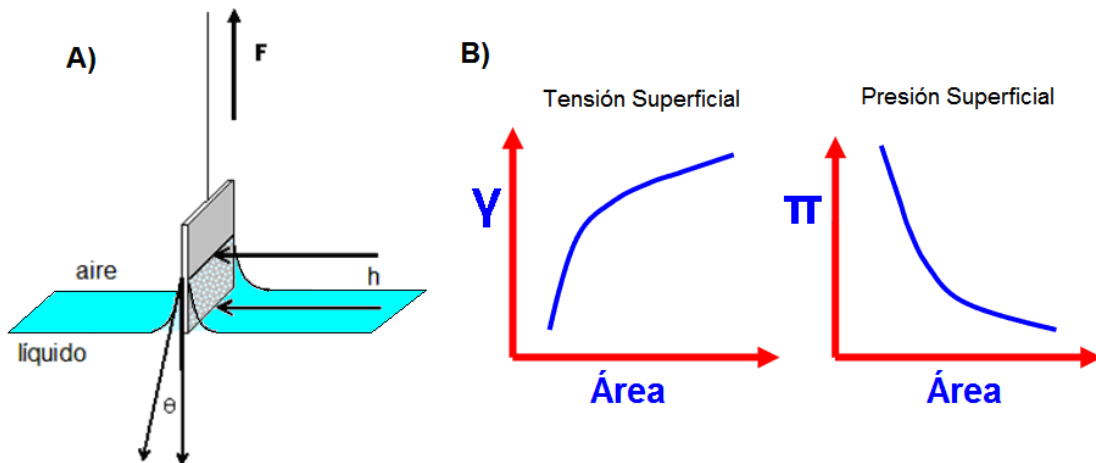
La medida de la tensión superficial [ $\text{N}/\text{m}$ ]\* en una palangana de Langmuir se realiza con una placa de Wilhelmy, que consiste de una lámina delgada de papel poroso de unos cuantos centímetros cuadrados, que es suspendida en la interfase aire-agua. Es interesante observar que desde el punto de vista conceptual, la tensión superficial representa una presión 2-dim, y la compresión de la monocapa representa una analogía a

\* La tensión superficial también puede ser vista como fuerza por unidad de línea [ $\text{N}/\text{m}$ ]. En la sección placa de Wilhelmy se presenta la deducción de esta otra definición de  $\gamma$ .

la compresión de un gas contenido en un pistón. Sin embargo, existe una importante diferencia entre las dos situaciones; al retirar la fuerza restrictiva sobre el volumen de un sistema 3-dim, el sistema se expande, mientras que el retirar la fuerza restrictiva sobre el área del sistema 2-dim, el sistema se contrae. Debido a que esta diferencia puede ser causa de confusiones, se utiliza el concepto de presión superficial para trabajar con compresiones isotérmicas de monocapas en lugar de la tensión superficial  $\gamma$  (Figura 14). La presión superficial es entonces una ecuación de estado del sistema, y es definida como la diferencia entre la tensión superficial del agua pura y la tensión superficial de la monocapa que cubre el agua.

$$\Pi = \Pi(T, A, N) = \Pi(T, a) = \gamma_o - \gamma \quad (2)$$

donde  $a$  es área por molécula y  $T$  la temperatura de la subfase.

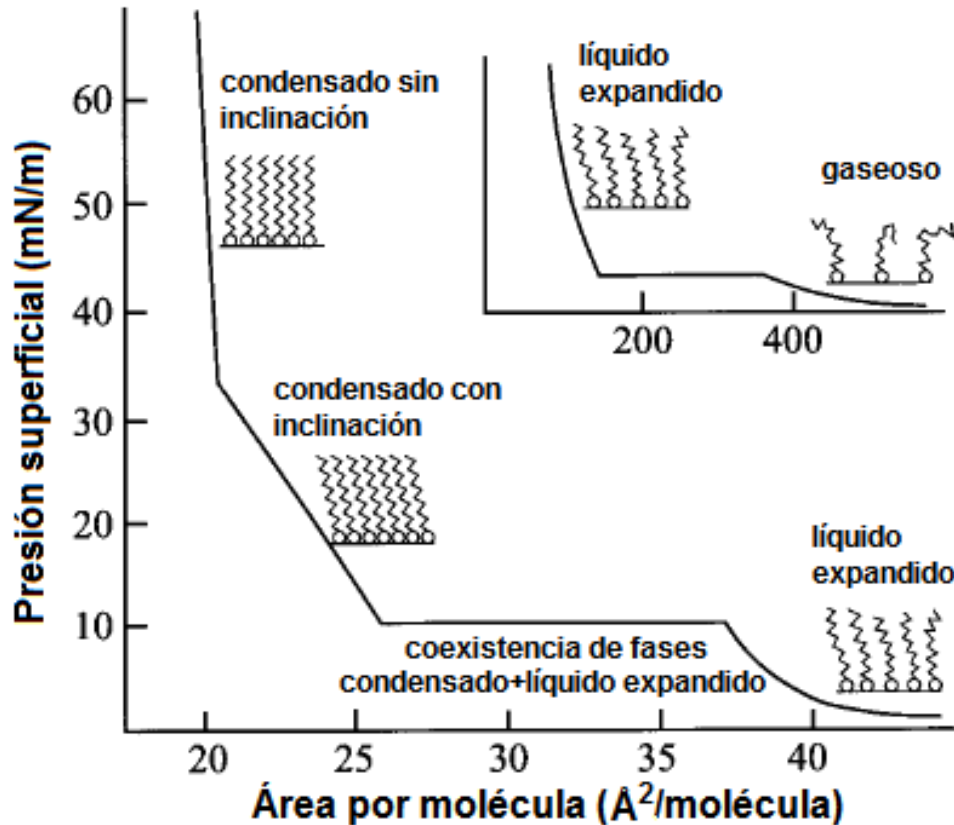


**Figura 14.** Placa de Wilhelmy y presión superficial. A) Esquema de la placa de Wilhelmy. De medir la fuerza que necesita ser aplicada para mantener la lámina en una posición sumergida fija respecto a la interfase, es posible obtener la tensión superficial. B) Para lograr una mejor analogía entre el concepto de tensión superficial y la presión 3-dim, se utiliza el concepto de presión superficial.

## ii. Isotermas

La figura 15 muestra un diagrama de la organización a lo largo de una isoterma de un monocapa de un ácido graso, que son los materiales que forman monocapa más estudiados. Cuando la monocapa está muy diluida, es decir, cuando el área por molécula está en el intervalo de cientos de angstroms cuadrados ( $\text{\AA}^2$ ), está se describe suficientemente bien como un gas 2-dim. En esta fase (fase gaseosa G) dos moléculas cualesquiera están lejanas una de otra, y la interacción entre ellas es despreciable. Con la disminución del área por molécula (incrementando la presión superficial), la monocapa tiene una transición de primer orden presentando coexistencia entre la fase gaseosa y la fase llamada líquido expandido (abreviada como LE o  $L_1$ ). Esta transición se expresa en la isoterma como una región horizontal (meseta). En fase LE, como en la fase gaseosa, presumiblemente las cabezas de las moléculas están desordenadas, así como también sus colas (esto se infiere a partir de que no existe señal detectable al utilizar técnicas de difracción de rayos x). Comprimiendo aún más, en la monocapa

tiene lugar una segunda transición de primer orden, entre la fase LE y una fase líquido condensado (LC). La monocapa es menos compresible en el estado condensado que en el estado líquido expandido. Continuando con la compresión, usualmente se observa un ligero cambio de pendiente en la isoterma, con la compresibilidad disminuyendo después de tal cambio. Estas dos regiones de la isoterma que poseen diferentes compresibilidades son frecuentemente llamadas estados “líquido condensado” y “sólido”. La monocapa tiene el mismo grado de orden translacional en ambas regiones de la isoterma.



**Figura 15.** Diagrama que esquematiza una monocapa de Langmuir de manera general. Secciones horizontales de la isoterma son regiones de coexistencia de fases en transiciones de primer orden. La gráfica anidada en la esquina superior derecha, corresponde a la región de de bajas presiones superficiales y grandes áreas por molécula [22].

De estudios de difracción de rayos x, se sabe que en ambas regiones (líquido condensado y sólido) de la isoterma, las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas están alineadas paralelas unas con otras; la diferencia es la orientación de las cadenas. Las cuales están inclinadas con respecto a la superficie del agua o perpendicular a está [22].

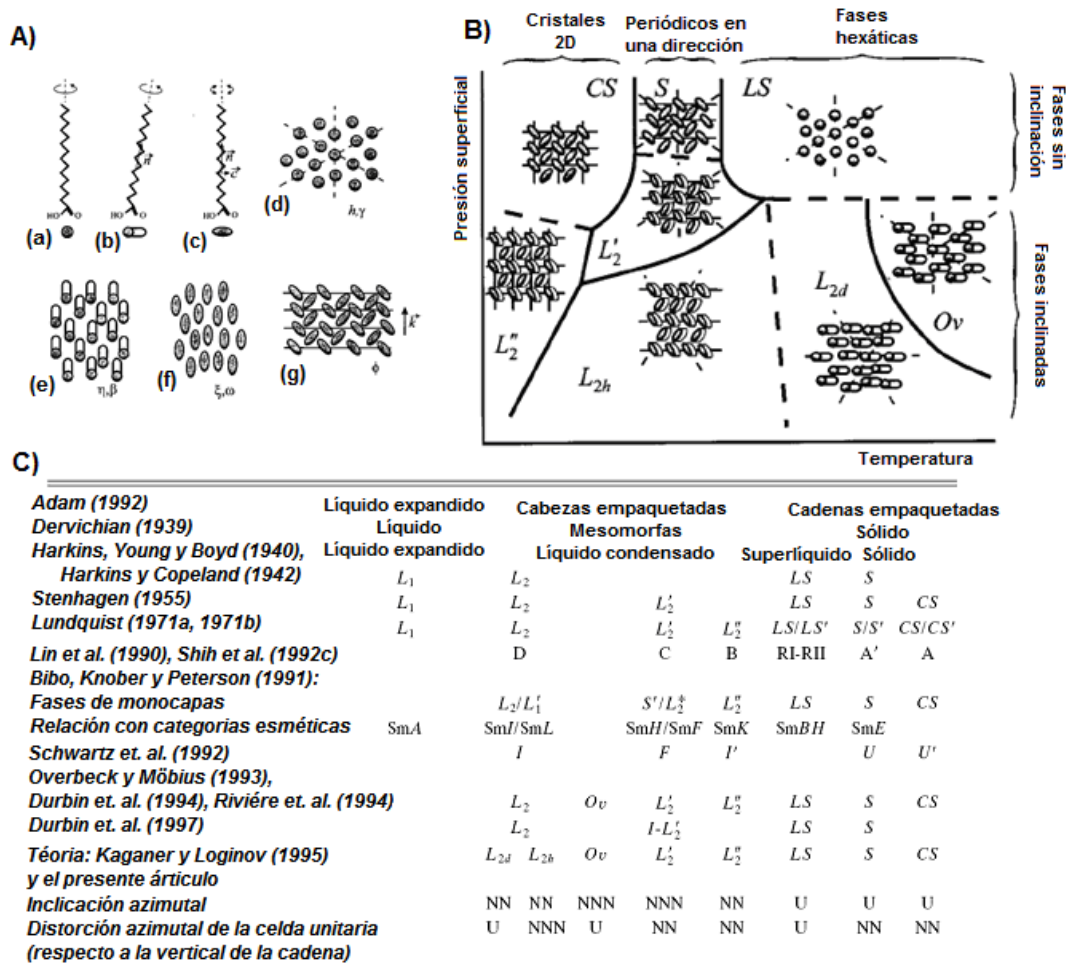
El intervalo de presiones superficiales experimentalmente accesibles esta restringido por el colapso de la monocapa. La compresión termina con una la fractura abrupta de la monocapa y la aparición de estructuras tridimensionales. Las presiones de fractura son altamente dependientes de la velocidad de compresión y comúnmente no son reproducibles [22].

### iii. Diagramas de Fase

Experimentos de difracción de rayos x de sincrotrón permiten identificar la estructura intermolecular de la monocapa. A su vez, la invención de técnicas microscópicas tales como microscopia de fluorescencia y microscopia de ángulo de Brewster permitió la visualización de estructuras mesoscópicas en las monocapas. Estas técnicas en muchas ocasiones son más sensibles a las transiciones de fase en las monocapas que las clásicas mediciones isotérmicas [22].

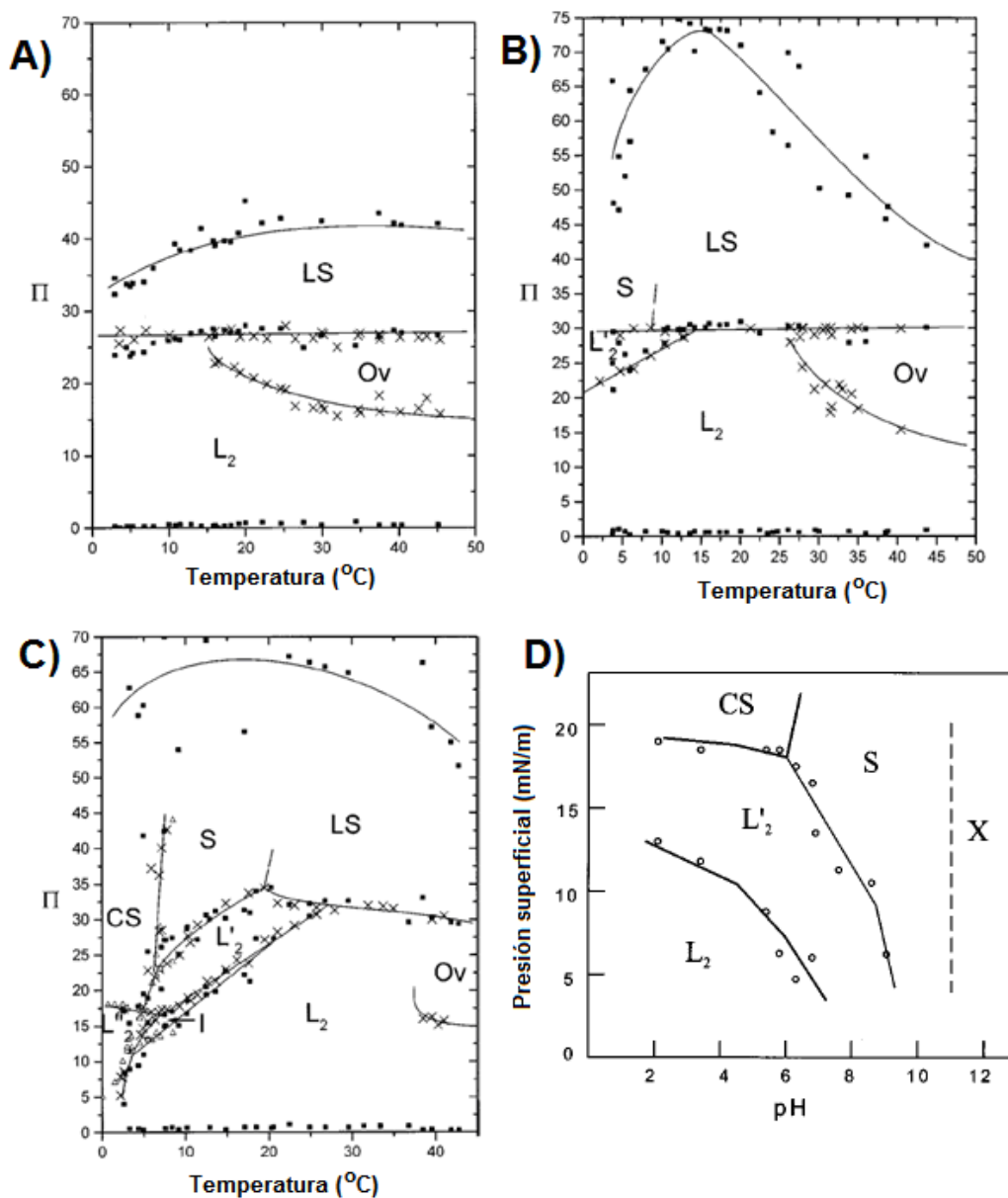
Para caracterizar cada una de las fases se han utilizado los parámetros de orden, como se muestra en la Figura 16. La Figura 16A esquematiza el Orden posicional (PO); Orden de inclinación colectivo (TO); Orden de orientación en red o en enlace (BO) y Orden Herringbone (HO), que se refiere al orden de los planos de todas las cadenas hidrocarbonadas en conformación *trans*, en todos los casos las abreviaturas corresponden al idioma inglés. En la figura 16B se muestra un diagrama de fase generalizado en el cual se esquematizan los ordenamientos moleculares que definen cada una de las fases. La tabla mostrada en la figura 16C enlista a las fases observadas en diferentes estudios realizados sobre ácido behénico; ácido graso saturado de 22 carbonos (C<sub>22</sub>), hasta el año 1997, con las diferentes nomenclaturas usadas por los diferentes autores. Es importante notar que no todos los autores registran el mismo número de fases, lo cual refleja las complicaciones existentes para concretar un acuerdo respecto a la existencia de las fases.

Sin embargo, como es de esperarse las interacciones que producen los diferentes ordenamientos (fases), no solo están restringidas a interacciones intermoleculares, sino que también incluyen interacciones con la subfase e incluso con la atmósfera. Debido a esto, las interacciones (y con ello los ordenamientos) pueden ser ampliamente variadas cambiando el componente polar (la cabeza) o la región no polar (la cola) de las moléculas, modificando el pH y/o la cantidad de iones en la subfase [22]. La figura 17.A-C muestra la modificación del diagrama de fase debida a diferentes longitudes de cadena hidrocarbonada de ácidos grasos.



**Figura 16.** A) (a-c) grados de libertad de la molécula. (a-g) parámetros de orden PO, TO, BO y HO, respectivamente. B) Representación esquemática de ordenamiento molecular en un diagrama de fase. C) Fases observadas en monocapas de Langmuir en diferentes estudios. La tabla organiza los estudios en orden cronológico. Se aprecia que en los primeros estudios solo se lograban identificar 3 fases, líquido, líquido condensado y sólido. En la actualidad se sabe de la existencia de un gran número de fases condensadas, las cuales se caracterizan según los parámetros de orden anteriormente descritos. NN= inclinación a la molécula vecina más cercana, NNN= al siguiente vecino más cercano, U= sin inclinación [22].





**Figura 17.** (a-c) Diagrama de fase ( $\Pi$ , T) para monocapas de ácido graso  $C_{17}$ ,  $C_{19}$  y  $C_{21}$ , respectivamente. Observación de isoterma  $\Pi$ -a (■) y observación BAM (×). En esta secuencia de diagramas de fase se puede observar el desplazamiento de las fronteras entre fases hacia la derecha (temperaturas mayores) debido a la adición de un grupo  $CH_2$  a la cola de un ácido graso. De manera general se considera que la adición del grupo metilo desplaza las fronteras en 8-10°C [23]. d) Modificación de transiciones en ácido graso  $C_{21}$  debida al pH de la subfase. A medida que el pH se incrementa, las fronteras entre las fases se desplazan hacia presiones superficiales menores hasta llegar a un punto en el cual las fases características de altas presiones se encuentran presentes en todas las presiones [22].

## 2.2 Palangana de Langmuir

La palangana de Langmuir es un dispositivo experimental que sirve como contenedor del agua (sobre el cual se forma la monocapa) dejando gran cantidad de superficie del agua expuesta a la atmósfera. Tiene barreras móviles que se deslizan sobre la superficie del agua, modificando el área de la monocapa sin que en momento alguno se interfiera con la continuidad de la subfase, la cual se define como el volumen del líquido que no está en contacto con la atmósfera. La palangana utilizada (figura 18) en este trabajo tiene un área de  $497\text{cm}^2$ , de forma rectangular (modelo TBK 2410<sup>a</sup>, Nima Techology Ltd; Inglaterra). El material del que está hecha es Teflón (Politetrafluoroetileno, PTFE), el polímero más hidrofóbico conocido (formando un ángulo de contacto con el agua de casi  $90^\circ$ ); además de ser un material que no contamina la subfase y que puede ser sometido a procesos de limpieza bastante rigurosos. La palangana esta montada sobre un sistema dinámico aislador de vibraciones (modelo 2S, Halcyonics GMBH; Alemania), con el objetivo de evitar la influencia de perturbaciones mecánicas en las mediciones.



*Figura 18.* Palangana de Langmuir utilizada en este trabajo, modelo TBK 2410<sup>a</sup>, (Nima Techology Ltd; Inglaterra) [24].

Otra variable termodinámica que debe controlarse es la temperatura de la subfase, para lograrlo se utiliza un recirculador (Cole-Palmer 1268-24; E.U.A), que cuenta con una precisión de  $0.1^\circ\text{C}$ .

## 2.3 Placa de Wilhelmy

La placa de Wilhelmy consiste de una tira delgada; en nuestro caso un área de  $2.3\text{cm}^2$  y un grosor de  $1\text{mm}$ , hecha de papel cromatográfico, que es suspendida en forma perpendicular en la interfase aire/agua.

Las fuerzas que actúan sobre la placa (figura 19) para llevarla a la subfase son la gravedad y la tensión superficial; mientras que la fuerza boyante actúa en dirección opuesta. Si la placa tiene las dimensiones  $l * w * t$  (largo, ancho, grosor) y una densidad  $\rho$ , y esta inmersa una distancia  $h$  en el agua; entonces la fuerza neta que debe ser aplicada para que la placa mantenga su posición es  $F$ , la cual está descrita por la ecuación

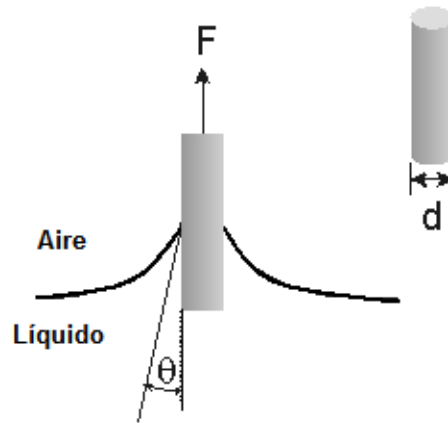


Figura 19. Placa de Wilhelmy.

$$F = (\rho_p l w t) \cdot g - (\rho_l h w t) \cdot g + 2 \cdot (w + t) \cdot (\gamma) \cdot \cos \theta \quad (3)$$

Donde  $\rho_p$  es la densidad de la lámina, y  $\rho_l$  es la densidad del líquido; mientras que  $\gamma$  es la tensión superficial del líquido, y  $\theta$  es el ángulo de contacto entre el líquido y la lámina. Finalmente  $g$  es la aceleración debida a la gravedad.

Antes de realizar cualquier medición, la lectura de la fuerza se lleva a cero, con ello se elimina el término del peso en la ecuación 3, obteniendo:

$$F = -(\rho_l h w t) \cdot g + 2 \cdot (w + t) \cdot (\gamma) \cdot \cos \theta \quad (4)$$

El término de la fuerza boyante es eliminado de la ecuación 4, debido a que la placa siempre se mantiene a nivel constante respecto a la superficie después de haber llevado la lectura a cero:

$$F = 2 \cdot (w + t) \cdot (\gamma) \cdot \cos \theta \quad (5)$$

Finalmente si asegura que el ángulo de contacto entre la placa y el líquido sea  $0^\circ$  la expresión anterior se reduce a:

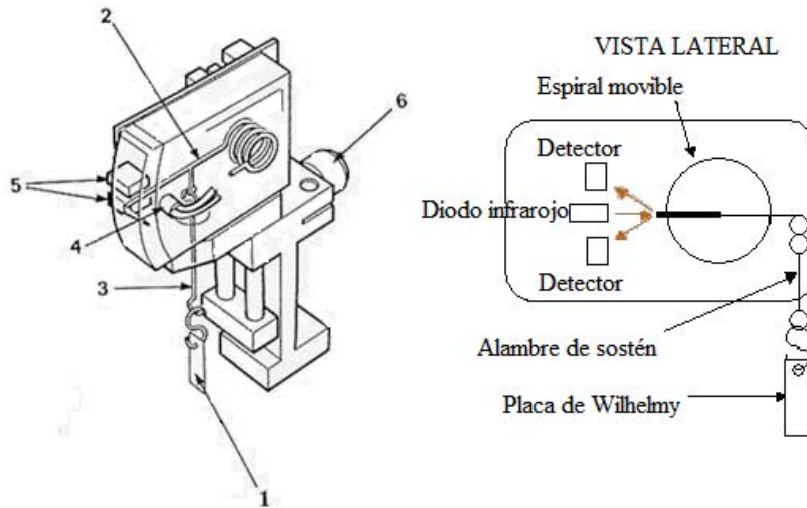
$$F = 2 \cdot (w + t) \cdot (\gamma) \quad (6)$$

De esta manera es posible encontrar la tensión superficial del líquido bajo estudio con una balanza de Wilhelmy:

$$\gamma = F/2(w+t) \quad (7)$$

donde la tensión superficial esta dada en mN/m, la fuerza en mN y el perímetro en m.

La placa se coloca al final del brazo de un galvanómetro, la posición del brazo se ajusta mediante retroalimentación óptica. La fuerza que actúa sobre la placa se obtiene midiendo la cantidad de corriente eléctrica requerida para mantener el brazo en la misma posición (figura 20). De esta forma la balanza de Wilhelmy mide la fuerza total sobre la monocapa, y a partir de ahí se conocen los valores de la presión lateral, la cual como ya se vio, es una variable termodinámica necesaria para la construcción de las isothermas. La resolución del instrumento es de 0.1 mN/m.



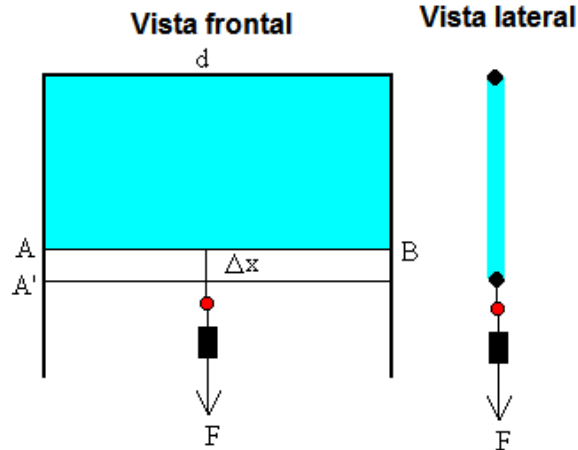
**Figura 20.** Diagrama del sensor de presión superficial. 1) Papel filtro, 2) Brazo, 3) Suspensión, 4) Cables, 5) Placas del galvanómetro, 6) Perilla para ajustar del nivel de la placa. Un diodo ilumina la espiral movible (a la cual la placa está conectada). La reflexión del borde de la espiral llega a los 2 detectores, y el control electrónico sostiene el brazo de tal manera que la iluminación que llega a cada uno de los detectores siempre sea la misma. Con ello el brazo se mantiene a posición constante bajo diferentes cargas [49, 50].

En la sección de monocapas de Langmuir se explicó que la tensión superficial es un parámetro referido a la energía que debe de ser empleada para aumentar el área de contacto entre dos fases (usualmente líquida y gaseosa). A continuación mostraremos que la tensión superficial también puede ser vista como la fuerza por unidad de línea que necesita ser empleada para modificar la superficie de un sistema.

La figura 21 muestra un esquema de una lámina de jabón la cual queda adherida a un alambre doblado en doble ángulo recto y a un alambre deslizante, este último representado por el segmento AB. Si el alambre deslizante se le aplica una fuerza que produzca un desplazamiento  $\Delta x$ , tal como se esquematiza en la imagen, esta fuerza exterior realizará un trabajo  $F\Delta x$  para modificar el área de la lámina jabón. Este cambio es  $\Delta(\text{área}) = 2\Delta x d$ , el factor 2 se debe a que la lámina tiene 2 caras (vista lateral en Figura 20). En este suceso parte de las moléculas que se encontraban en el interior del líquido se han trasladado a la superficie recién creada, lo cual trae consigo un cambio en

la energía. Como ya habíamos visto ese cambio de energía relacionado con el cambio de área es la tensión superficial. Entonces finalmente es posible establecer la tensión superficial en términos de [N/m]:

$$\gamma = F\Delta x / 2\Delta x d = F/2d \quad (8)$$



**Figura 21.** Concepto de tensión superficial como fuerza por unidad de línea requerida para modificar la superficie del sistema.

## 2.4 Microscopia de Ángulo de Brewster

La microscopia de ángulo de Brewster (BAM) es una técnica que permite la observación directa de películas en la interfase aire/agua. Esta técnica es sensible a la densidad superficial y a la anisotropía de las fases en monocapas, donde la reflectividad de la interfase plana entre dos medios depende de la polarización de la luz incidente y del ángulo de incidencia. Para una interfase de Fresnel (una interfase donde el índice de refracción cambia bruscamente) y un haz polarizado con el campo eléctrico en el plano de incidencia, la reflectividad es nula en el ángulo de Brewster. La reflectividad es una magnitud que relaciona la intensidad de la luz reflejada y la de la luz incidente. Para un haz en el plano de incidencia, la reflectividad es

$$R_p = [\tan(\theta_i - \theta_r) / \tan(\theta_i + \theta_r)]^2 \quad (9)$$

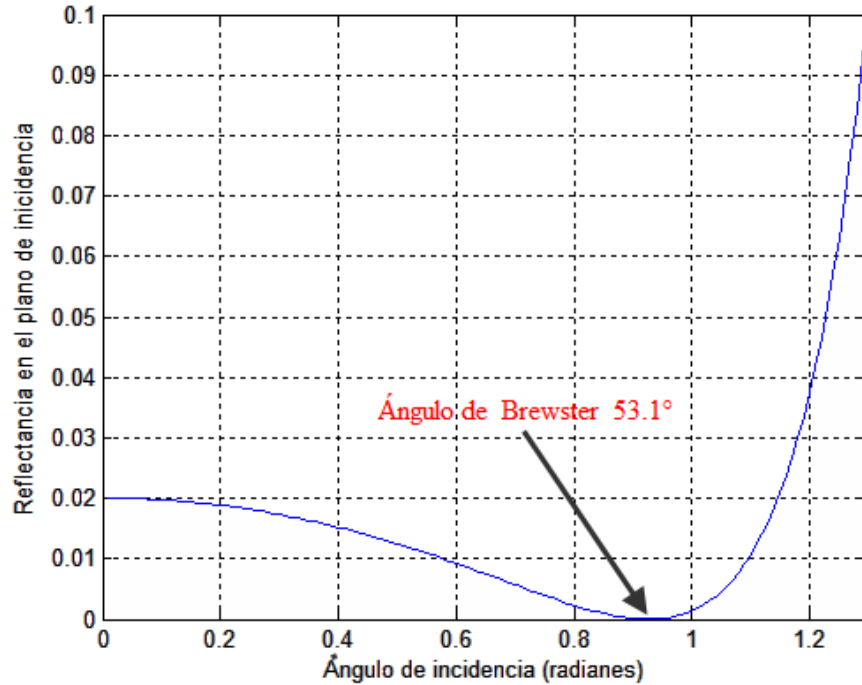
En donde  $\theta_i$  es el ángulo de incidencia,  $\theta_r$  es el ángulo de refracción [43]. La expresión que relaciona  $\theta_r$  con las propiedades ópticas de los medios que forman la interfase es

$$n_1 \sin \theta_i = n_2 \sin \theta_r \quad (10)$$

La figura 22 muestra la reflectividad  $R_p$  en función del ángulo de incidencia para  $n_1 = 1$  (aire) y  $n_2 = 1.33$  (agua). El ángulo de incidencia para el cual  $R_p = 0$  recibe el nombre de ángulo de Brewster. La ecuación 9 muestra que esto sucede cuando la expresión  $\tan(\theta_i + \theta_r)$  es infinito, es decir, cuando  $\theta_i + \theta_r = \pi/2$ , lo que significa que los rayos reflejado y refractado son perpendiculares entre sí. Lo anterior nos lleva

$$n_2/n_1 = \sin \theta_i / \sin \theta_r = \sin \theta_i / \sin (\theta_i - \pi/2) = \sin \theta_i / \cos \theta_i = \tan \theta_{\text{Brewster}} \quad (11)$$

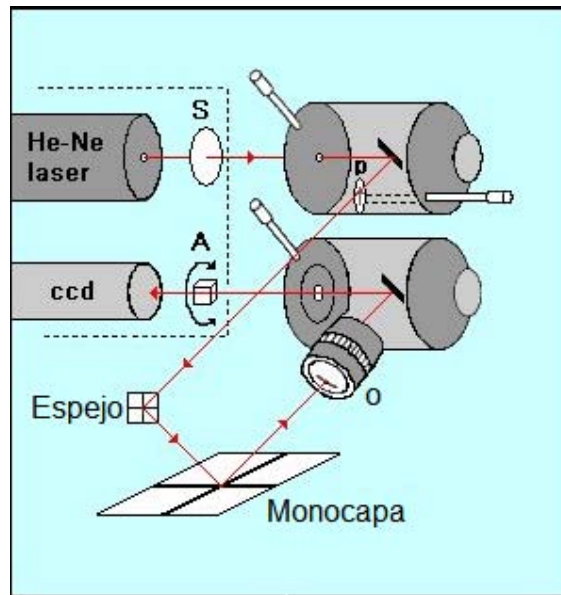
de acuerdo con esto, si la luz incidente es p-polarizada, no existe luz reflejada cuando el ángulo de incidencia coincide con el de Brewster, el cual, en el caso del agua es aproximadamente de  $53^\circ$ .



**Figura 22.** Dependencia del ángulo de incidencia del coeficiente de reflectividad en el plano de incidencia  $R_p$ , para  $n_1=1$  (aire) y  $n_2=1.33$  (agua).

Para una interfase real, la intensidad de la luz reflejada presenta un mínimo en el ángulo de Brewster, pero no es nula. Sin embargo, la intensidad reflejada en el ángulo de Brewster tiene una fuerte dependencia sobre las propiedades de la interfase y es particularmente sensible a monocapas en la interfase. La reflectividad de una interfase real en el ángulo de Brewster para la mencionada polarización tiene tres orígenes: (a) el grosor de la interfase, (b) la rugosidad de la interfase real, y (c) la anisotropía de las monocapas [24].

En este trabajo se utilizó un microscopio de ángulo de Brewster BAM1 (Nanofilm Technologie GmbH; Alemania) (figura 23), con una resolución espacial de  $4\mu\text{m}$  y un elipsómetro en modo BAM (Elli2000, Nanofilm Technologie GmbH; Alemania), la resolución espacial de este microscopio es de  $1\mu\text{m}$ .



**Figura 23.** Esquema del BAM utilizado en este trabajo. La interfase es iluminada con incidencia en el ángulo de Brewster ( $\sim 53^\circ$ ) con un haz polarizado de un laser de He-Ne. El haz reflejado es recibido por un microscopio. El haz es analizado por un analizador de polarización y recibido por una videocámara de CCD para desarrollar la imagen de la monocapa [24].

## 2.5 Procedimiento de limpieza y depósito de tensoactivos

Cuando se trabaja con monocapas las cuales contienen unos cuantos miligramos de un material, incluso pequeñas cantidades de contaminante pueden causar serios errores. Por consiguiente la palangana, substratos, aparatos e instrumentos que se utilizan para la realización del estudio experimental se deben mantener lo más limpios posible. Las principales indicaciones de protección contra contaminación que marca el protocolo de experimentación de monocapas son enumeradas a continuación.

- Pinzas metálicas limpias para manejar substratos.
- Microjeringas de vidrio con embolo metálico para el deposito del anfífilo en solución. Estas se limpian entre usos y son enjuagadas por lo menos una vez en la solución que será depositada.
- Bata de laboratorio, gorra para el cabello y cubrebocas, usados no solo por protección sino también para prevenir el depósito de fibras de la ropa, cabello o saliva en la subfase.
- Guantes desechables de polietileno libres de polvo son utilizados para realizar todas las operaciones en las que exista contacto con los componentes del dispositivo experimental (desde las barreras de compresión y la palangana misma, hasta los sensores de temperatura y presión).

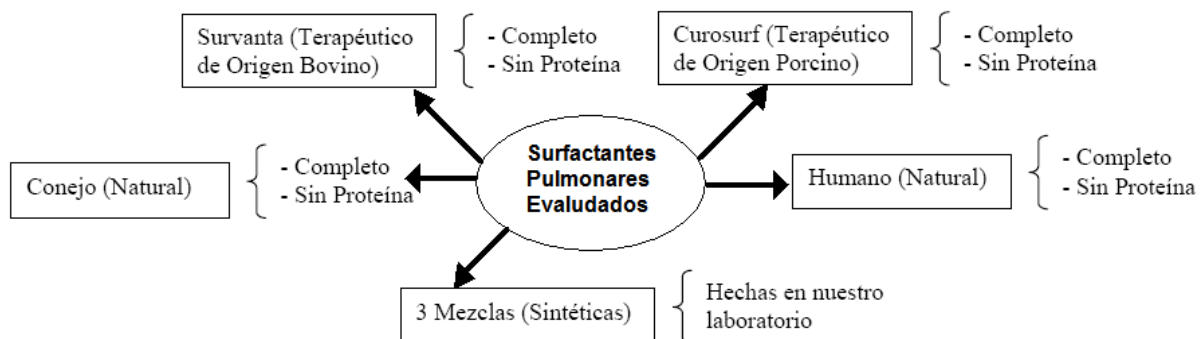
- Los sustratos con los que se forma la monocapa y los químicos utilizados para la limpieza de la palangana son tan puros como sea posible encontrarlos en el mercado.
- El lavado de la palangana se realiza todo día que se labore con ella. El lavado consiste en llenar la palangana con disolvente orgánico (Cloroformo HPLC con pureza 99.9%, Iso-propanol) y frotar con toallitas que no dejen fibras que contaminen la monocapa (Kimwipes).
- Los sustratos son pesados en balanza de alta precisión (Perkin-Elmer, AD2-Z; E.U.A) cuya mínima escala es 1 µg.
- La solución para dispersar los tensoactivos se prepara en un envase de vidrio que ha sido limpiado previamente. Las soluciones son cuidadosamente guardadas y manejadas a bajas temperaturas para prevenir la evaporación del disolvente, además de hidrólisis, oxidación o contaminación.

Todos los cuidados anteriores son inútiles si no se cuenta con una subfase limpia. Debido a ello, se utiliza un sistema de filtrado (Nanopure-UV; E.U.A) que hace que el agua utilizada sea ultra pura, desionizada y libre de compuestos orgánicos; con una resistencia superior a los 18MΩ.

## 2.6 Muestras y mezclas evaluadas

En este trabajo se evaluaron por las técnicas que ya han sido descritas 11 surfactantes pulmonares de diversos orígenes y presentaciones. El siguiente esquema muestra la lista de los surfactantes evaluados.

Survanta (Beractant, Abbott Ltd, Ross Laboratorios, Columbus, OH), es un surfactante natural modificado con fines terapéuticos. Su composición base es surfactante pulmonar de bovino, al cual se le añade DPPC, ácido palmítico y tripalmitato en cantidades específicas [25].



Curosurf (Poractant, Chiesi Farmaceutici, Parma, Italy) es un surfactante natural modificado con fines terapéuticos. Se prepara a partir de extracto pulmonar porcino, del cual se obtiene el surfactante por centrifugación, extracciones 2:1 de cloroformo:metanol y cromatografía líquido-gel. Curosurf ha sido aprobado por la FDA



(Food and Drug Administration, organismo evaluador de alimentos y medicamentos de uso permisible en los E.U.A.) en Noviembre de 1999 (figura 24) [25].



**Figura 24.** Surfactantes terapéuticos naturales utilizados en este trabajo. Curosurf (izquierda) y Survanta (derecha) [51] [52].

Las muestras de surfactante pulmonar de conejo, humano, Survanta y Curosurf (con y sin proteínas) fueron procesadas en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) y la Facultad de Medicina.

El método de aislamiento de lípidos consiste en homogenizar la muestra con una mezcla de cloroformo/metanol. Primero las muestras (aproximadamente 1 gr), se diluyen en 4 ml de agua desionizada. A esta suspensión se le agregan 20 ml de la mezcla  $\text{CHCl}_3/\text{Metanol}$  3:1, para proseguir con agitar el sistema. Después de haber realizado el paso anterior tres veces se obtiene una mezcla separada en dos fases. La fase inferior se evapora con Nitrógeno hasta una tercera parte de su volumen, en esta fase se encuentra el extracto de los lípidos puros. A la mezcla resultante se le agregan 10 ml de agua desionizada y se agita vigorosamente. El procedimiento de lavado remueve básicamente todos los contaminantes no lipídicos. Sin embargo, pequeñas cantidades de material soluble en la fase lipídica se eliminan con  $\text{NaSO}_4$  granular y centrifugación a 5000 rpm durante 5 min. La eficiencia del procedimiento de lavado depende de la presencia de sales minerales en el extracto crudo. La presencia de estas sales altera la distribución de lípidos y prácticamente los eliminan de la fase acuosa. En la ausencia de sales, una buena cantidad de lípidos ácidos están presentes en la fase acuosa y puede que se pierdan durante el lavado [26].

Para la elección de la composición de las mezclas hechas en el Instituto de Física se realizó una búsqueda bibliográfica de las composiciones lipídicas de diferentes surfactantes pulmonares, tanto terapéuticos como naturales. De los datos reportados se seleccionaron los componentes más relevantes respecto a su porcentaje de presencia en cada sistema surfactante. En la tabla de la figura 25, se muestra la composición de diferentes surfactantes, terapéuticos, naturales y mezclas propuestas. Los valores han sido renormalizados para ajustar la información reportada en la bibliografía al número y tipo de componentes con los cuales se disponía para realizar el trabajo.

La elección de la composición de las mezclas se realizó buscando un equilibrio entre las fracciones de fosfolípidos y lípidos neutros reportados por Survanta y Curosurf que son los que reportan de manera más completa la relación entre estas dos fracciones. Sin embargo, para la asignación de los valores de composición de los componentes más

importantes de las mezclas, sí se consideraron los valores reportados para los surfactantes naturales.

Con las tres diferentes mezclas se busca observar diferencias causadas por la presencia de plasmalógeno, triglicérido y colesterol. Esto debido a que se reporta poco conocimiento del efecto de los plasmalógenos [10, 11]; La cantidad de ácido palmítico reportada para el caso de Survanta es bastante importante respecto al resto de la mezcla [27]. No se reporta presencia importante de colesterol en ninguno de los 2 surfactantes de uso terapéutico, pero sí en los naturales.

Los lípidos utilizados para la formación de las mezclas fueron adquiridos de *Avanti Polar Lipids (USA)*:

- 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina (DPPC)
- 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3- Fosfocolina (POPC)
- 1,2-Dipalmitoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] (Sal de Sodio) (DPPG)
- 1-Palmitoil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-[Fosfo-rac-(1-glicerol)] (Sal de Sodio) (POPG)
- 1-O-1'-(Z)-Octadecenil-2-Oleoil-sn-Glicero-3-Fosfocolina (SOPC - *plasmalogeno*)

Y de SigmaUltra (USA):

- Ácido Palmítico
- Colesterol (Lana Ovina)
- Triplamitin (Gliceril tripalmitato)

Todos con purezas superiores al 99% (excepto colesterol 98%).

	Survanta (%mol)	Bovino (%mol)	Curosurf (%mol)	Porcino (%mol)	Conejo (%mol)	Humano (%mol)	Mezcla 1 (%mol)	Mezcla 2 (%mol)	Mezcla 3 (%mol)
DPPC	32	51	21	50	52	61	48	48	49
POPC	12	25	5	25	28	14	18	18	18
POPG	4	8	30	7	5	7	3.5	3.5	3.5
DPPG	4	4	8	5	3	2	1.5	1.5	1.5
SOPC (Plasmalogeno)	1	-	1	-	-	-	1	1	-
Otros	3	9	23	13	12	9	-	-	-
<b>FFL</b>	<b>56</b>	<b>97</b>	<b>88</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>93</b>	<b>72</b>	<b>72</b>	<b>72</b>
Triglicérido	7	-	1	-	-	-	8	-	8
Colesterol	-	3	-	-	-	7	-	8	-
Ácido Palmítico	35	-	6	-	-	-	20	20	20
Otros	2	-	5	-	-	-	-	-	-
<b>FLN</b>	<b>44</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>7</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>28</b>
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Figura 25.** FFL: Fracción de Fosfolípidos; FLN: Fracción de Lípidos Neutros. \*Los valores de Survanta y Curosurf fueron inferidos a partir de datos reportados por Rüdiger[27]. La composición de Porcino se obtuvo de [8] y [28]. La composición de Bovino se infirió de [9] y [29]. La composición de Conejo y Humano se infirió de [8] y [9].

## 2.7 Desarrollo del experimento

Los 11 surfactantes pulmonares fueron evaluados a diferentes temperaturas, en el intervalo de 22°C a 37°C en compresión cuasi-estática ( $10\text{cm}^2/\text{min}$ ). Lo anterior con la intención de evaluar el efecto de la temperatura en el comportamiento termodinámico de los surfactantes pulmonares. Para observar la respuesta superficial a 37°C de la monocapa ante deformaciones rápidas y la reproducibilidad de la misma, se realizaron compresiones rápidas a  $90\text{cm}^2/\text{min}$  (En algunos casos también a  $45\text{cm}^2/\text{min}$ ) y ciclos de compresión-expansión a 20 y 30  $\text{cm}^2/\text{min}$ , con tiempos de espera de 5 a 10 minutos entre ciclo y ciclo. La subfase en la que se realizaron todas las monocapas fue buffer de fosfatos con  $\text{pH}=7.4$ . Los surfactantes pulmonares contenientes de proteína fueron puestos en disolución con el buffer de la subfase para prevenir su desnaturalización. Los surfactantes pulmonares sin proteína fueron puestos en disolución con cloroformo.

Debido a que las muestras evaluadas son multicomponentes, se utilizó un peso molecular equivalente para realizar los cálculos del área por molécula. Se supuso a una monocapa formada por un solo tipo de molécula, siendo el peso molecular de tal “molécula equivalente”, un promedio de los pesos moleculares de los componentes de la mezcla, ponderados por su correspondiente fracción molar. Este procedimiento se realizó para las mezclas sintéticas elaboradas en nuestro laboratorio. Para los surfactantes pulmonares naturales y los surfactantes pulmonares terapéuticos, no fue posible determinar un peso molecular equivalente, debido a que se desconocía las concentraciones de fosfolípidos en disolución. En estos casos se utilizó como aproximación el peso molecular calculado para la mezcla 1. Por estas razones el área por molécula de las isothermas, solo tiene relevancia en casos de los surfactantes pulmonares sintéticos preparados en el laboratorio; para los demás casos, el área por molécula es una escala relativa a las características presentadas por cada muestra en particular.

Paralelo al proceso de compresión, se realizó la observación de la monocapa con el Microscopio de Ángulo de Brewster (BAM). La imagen es desplegada en escala de grises en un monitor, del cual es posible videogravar todo el proceso de compresión, lo que brinda una importante posibilidad de análisis.

## Capítulo 3

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados están organizados en tres diferentes categorías; 1) mezclas sintéticas, 2) surfactantes terapéuticos naturales y 3) surfactantes pulmonares naturales. Los resultados correspondientes a las mezclas sintéticas consisten en isothermas de compresión cuasi-estática en el intervalo de 22°C a 37°C, isothermas de compresiones fuera de equilibrio (compresiones rápidas) y ciclos de compresión-expansión isotérmica, ambos a 37°C. También se presenta un resumen de imágenes de BAM de la monocapa a diferentes presiones superficiales y temperaturas. En el mismo formato se presentan los resultados de los surfactantes terapéuticos naturales y de los surfactantes naturales, salvo pequeñas diferencias. Las temperaturas evaluadas son únicamente: 25°C, 33°C y 37°C. No se realizaron ciclos de compresión-expansión para los surfactantes naturales.

### 3.1 Resultados de mezclas sintéticas

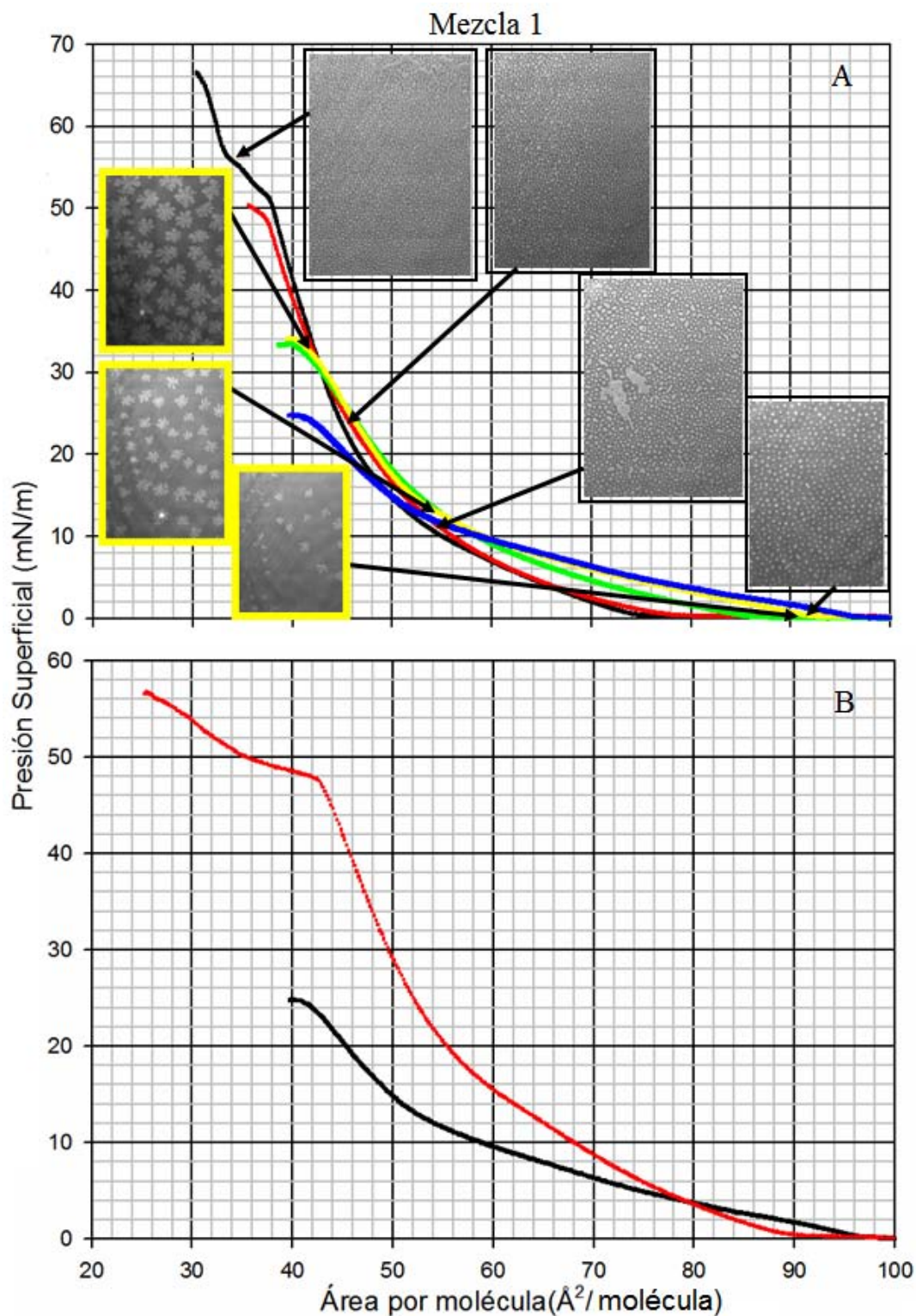
#### i. Mezcla 1

La figura 26A, muestra la dependencia de la presión superficial en función del área por molécula de la monocapa a diferentes temperaturas, con una velocidad de compresión de  $10 \text{ cm}^2/\text{min}$ . La presión de colapso cambia de  $52 \text{ mN/m}$  a  $25 \text{ mN/m}$ , en el intervalo  $21^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$ . En este mismo intervalo de temperaturas, se observa un desplazamiento a áreas mayores del punto en el cual comienza a aumentar la presión superficial respecto a  $0 \text{ mN/m}$ . Este aumento en el área por molécula es de un 26% al pasar de  $21^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$ . El área por molécula en la que ocurre el colapso es aproximadamente  $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  para todos los casos.

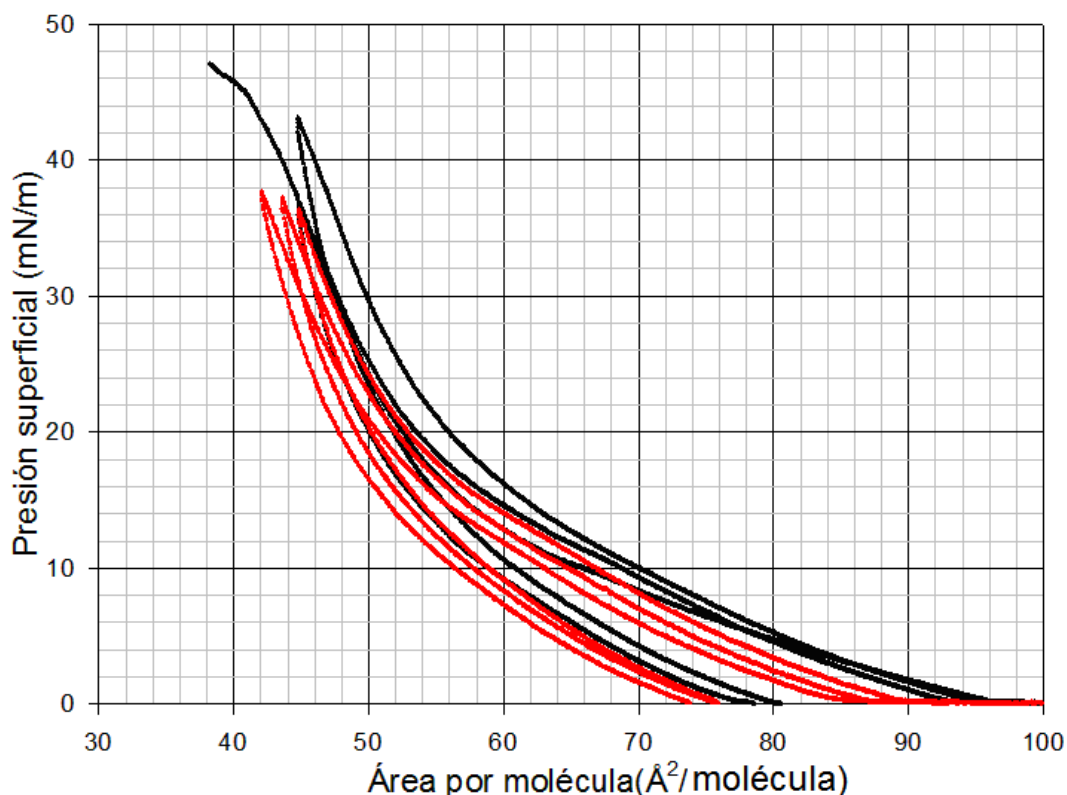
A bajas temperaturas ( $21^\circ\text{C}$  y  $27^\circ\text{C}$ ) cuando el área por molécula se acerca a los  $37 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , la compresibilidad disminuye considerablemente (compresibilidad 2-dim  $\kappa = -a^{-1}(\partial a / \partial \Pi |_p)$ ), es decir hay un aumento en la pendiente de la isoterma. Este cambio abrupto en la compresibilidad corresponde a valores de presión superficial de  $\Pi \approx 50 \text{ mN/m}$  (a este punto previamente lo hemos señalado como el colapso). La compresión más allá del colapso alcanza valores cercanos a los  $70 \text{ mN/m}$  en presión superficial, es decir, muy bajas tensiones superficiales. A altas temperaturas (mayores de  $30^\circ\text{C}$ ) cuando el área por molécula se acerca a los  $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , la compresibilidad cambia en mucho menor medida en comparación con lo observado a bajas temperaturas. A altas temperaturas el colapso se hace evidente debido a que la compresión de la monocapa más allá de los  $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  produce un descenso en la presión superficial.

La observación directa de la monocapa con la microscopia de ángulo de Brewster nos permitió observar la presencia de una coexistencia de las fases, líquido expandido y líquido condensado (recordando que la fase condensada es la más brillante, debido a que la intensidad de la imagen depende de la densidad de moléculas, su altura y la orientación de sus colas hidrofóbicas relativa a la onda de luz incidente). En la figura 25A se observa que a bajas temperaturas los dominios son más pequeños y más numerosos que los que se presentan a altas temperaturas.

La figura 26B muestra el efecto de la velocidad de compresión sobre monocapas de la mezcla 1 a  $37^\circ\text{C}$ . La compresión fuera de equilibrio ( $90 \text{ cm}^2/\text{min}$ ) no presentó quiebres en la isoterma sino hasta alcanzar los  $48 \text{ mN/m}$  en  $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Esta discontinuidad en el cambio de pendiente, coincide con el área por molécula de colapso encontrada para los casos de compresión en equilibrio ( $10 \text{ cm}^2/\text{min}$ ). Comprimiendo a áreas menores a  $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , la isoterma mostró una alta compresibilidad que culminó en  $\Pi \approx 58 \text{ mN/m}$ . Para isotermas donde la velocidad de compresión es de  $90 \text{ cm}^2/\text{min}$  no fue posible obtener imágenes, sin embargo los videos muestran la coexistencia de fase que mostraron las isotermas en equilibrio.



**Figura 26.** Isothermas de monocapas de Langmuir de la mezcla 1. A) Realizadas con una rapidez de compresión de 10cm<sup>2</sup>/min., a diferentes temperaturas; (●) 21°C, (●) 27°C, (▲) 30°C, (▲) 34°C y (■) 37°C. Imágenes con marco negro corresponden a la isoterma a 21°C. Imágenes con marco amarillo corresponden a la isoterma a 32°C. B) Realizadas a 37°C a diferentes velocidades de compresión; (●) 10cm<sup>2</sup>/min. y (●) 90cm<sup>2</sup>/min.



**Figura 27.** Ciclos de compresión isotérmica de la mezcla 1 realizados a 37°C y diferentes velocidades de compresión; (●) 20cm<sup>2</sup>/min. y (●) 30cm<sup>2</sup>/min.

Se exploró la reversibilidad de la monocapa para desarrollar isothermas, haciendo ciclos de compresión-expansión a diferentes velocidades.

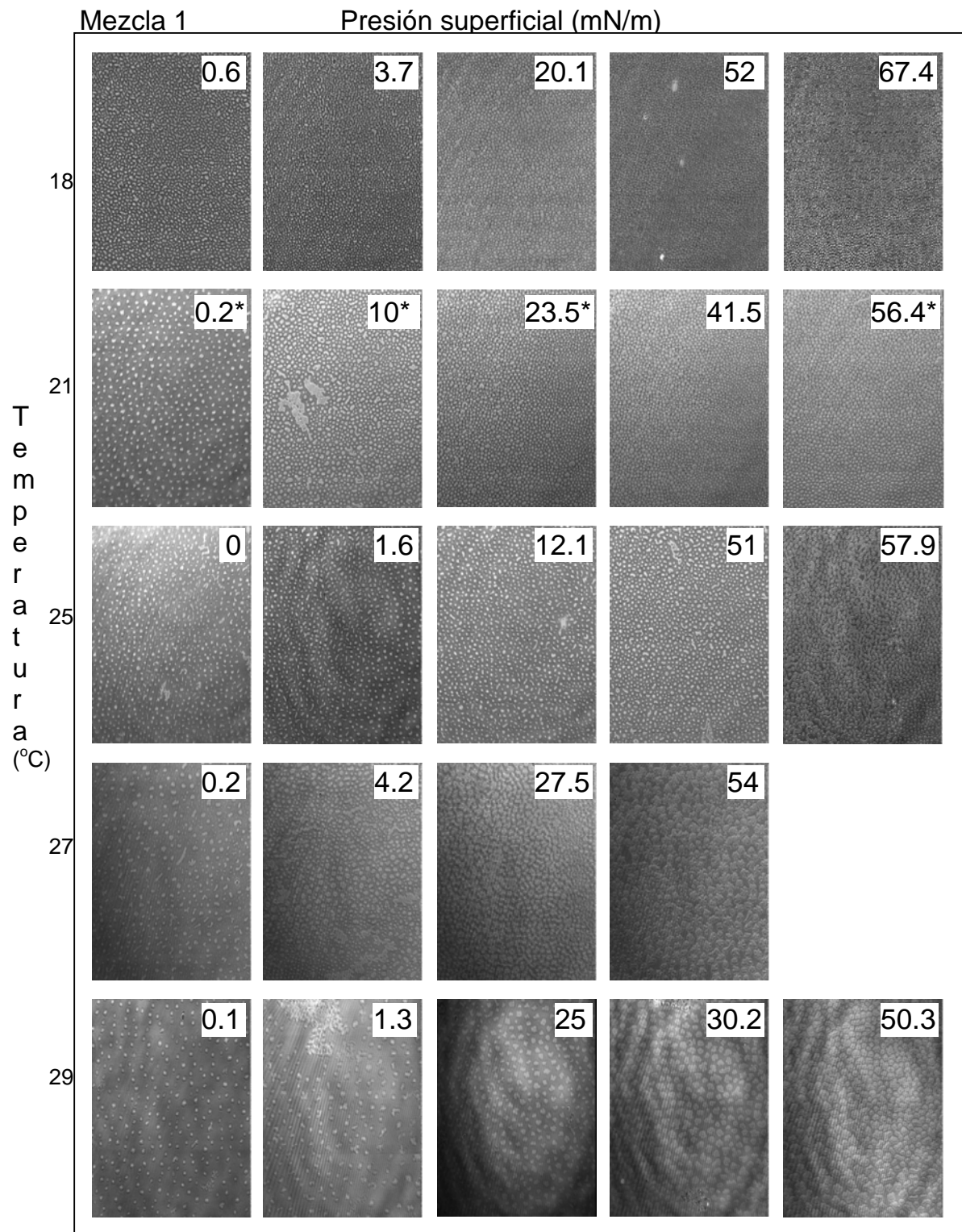
La figura 27 muestra tres ciclos de compresión de la mezcla 1 a dos velocidades de compresión, 20 y 30 cm<sup>2</sup>/min a 37°C. Como se observa, tanto a 20 como a 30 cm<sup>2</sup>/min las curvas isotérmicas muestran poca histéresis, lo cual podría indicar que no existieron cambios importantes en el sistema (como el colapso de la monocapa), y que esa pequeña desviación de la curva de expansión respecto de la curva de compresión, pudiera ser el resultado del tiempo que le toma a los dominios de la fase condensada o a pequeños dominios de colapso desintegrarse. Este tiempo siendo (presumiblemente) mayor que el tiempo con el cual se expande la monocapa. Es necesario mencionar que en estas isothermas se aprecia nuevamente el efecto de realizar una compresión rápida, pues los valores de presión superficial ( $\Pi$ ) a áreas superiores al área de colapso (40 Å<sup>2</sup>/molécula), son superiores a los alcanzados en el caso de equilibrio. Las imágenes observadas en los videos de estas isothermas no mostraron diferencias substanciales en comparación con las compresiones en equilibrio.

La figura 28 muestra las imágenes de las monocapas bajo compresiones de equilibrio termodinámico. Las imágenes a una misma temperatura fueron obtenidas de la misma isoterma. La temperatura de la isoterma a la cual pertenecen las imágenes está indicada en el margen izquierdo de la página, mientras que en la esquina superior derecho de cada imagen se indica la presión correspondiente. Las sombras negras que aparecen en algunas imágenes a temperaturas superiores a los 25°C, son debidas a la condensación de vapor de agua sobre el lente del microscopio. A temperaturas menores a 27°C existen

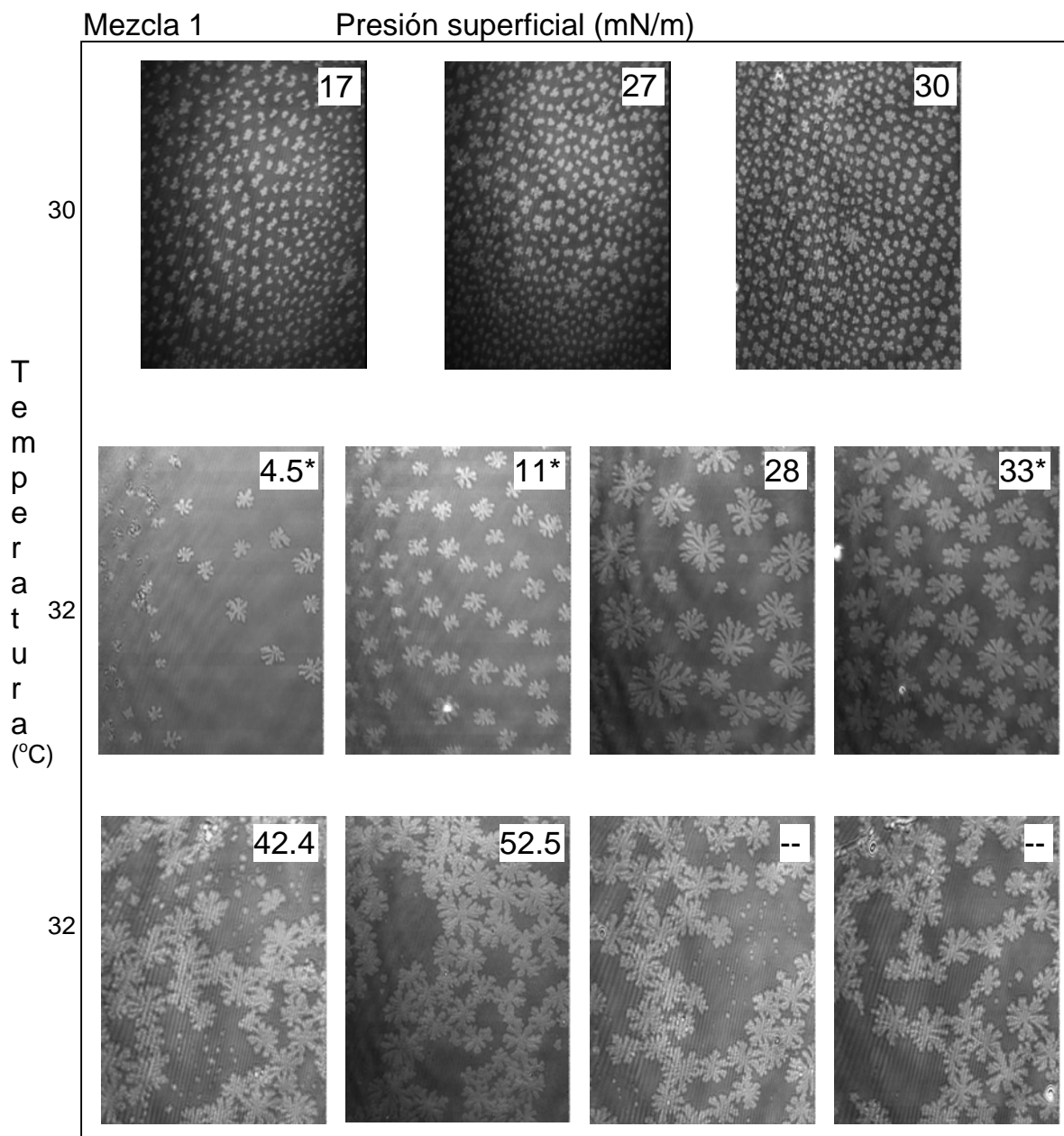


pequeños dominios de fase condensada desde el inicio. El brillo de los dominios y su densidad en la imagen aumenta conforme se comprime. A 32°C la monocapa tiene una apariencia lisa. Dominios de fase condensada surgen aproximadamente a 4.5mN/m. Éstos crecen con formas de algas, y aumentan su intensidad conforme se realiza la compresión. La última serie de imágenes de la figura 28, muestra el aspecto de la monocapa colapsada a 32°C. La imagen presenta la unión de dominios de fase condensada, sin embargo, este aspecto lo adquiere mucho después del colapso.

El crecimiento de los dominios en forma de algas evidencia que el proceso de crecimiento se encuentra ligeramente fuera de equilibrio. La compresión tendría que ser infinitamente lenta para que el crecimiento de estos fuera isotrópico. Esta situación de no equilibrio está reflejada únicamente en el patrón de crecimiento de los dominios sin afectar de manera considerable el diagrama (II,T).



**Figura 28.** Imágenes de BAM de monocapas de la mezcla 1. Los números dentro de las imágenes indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma.



**Figura 28.** (Continuación) Imágenes de BAM de monocapas de la mezcla 1. Los números dentro de las imágenes indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma.

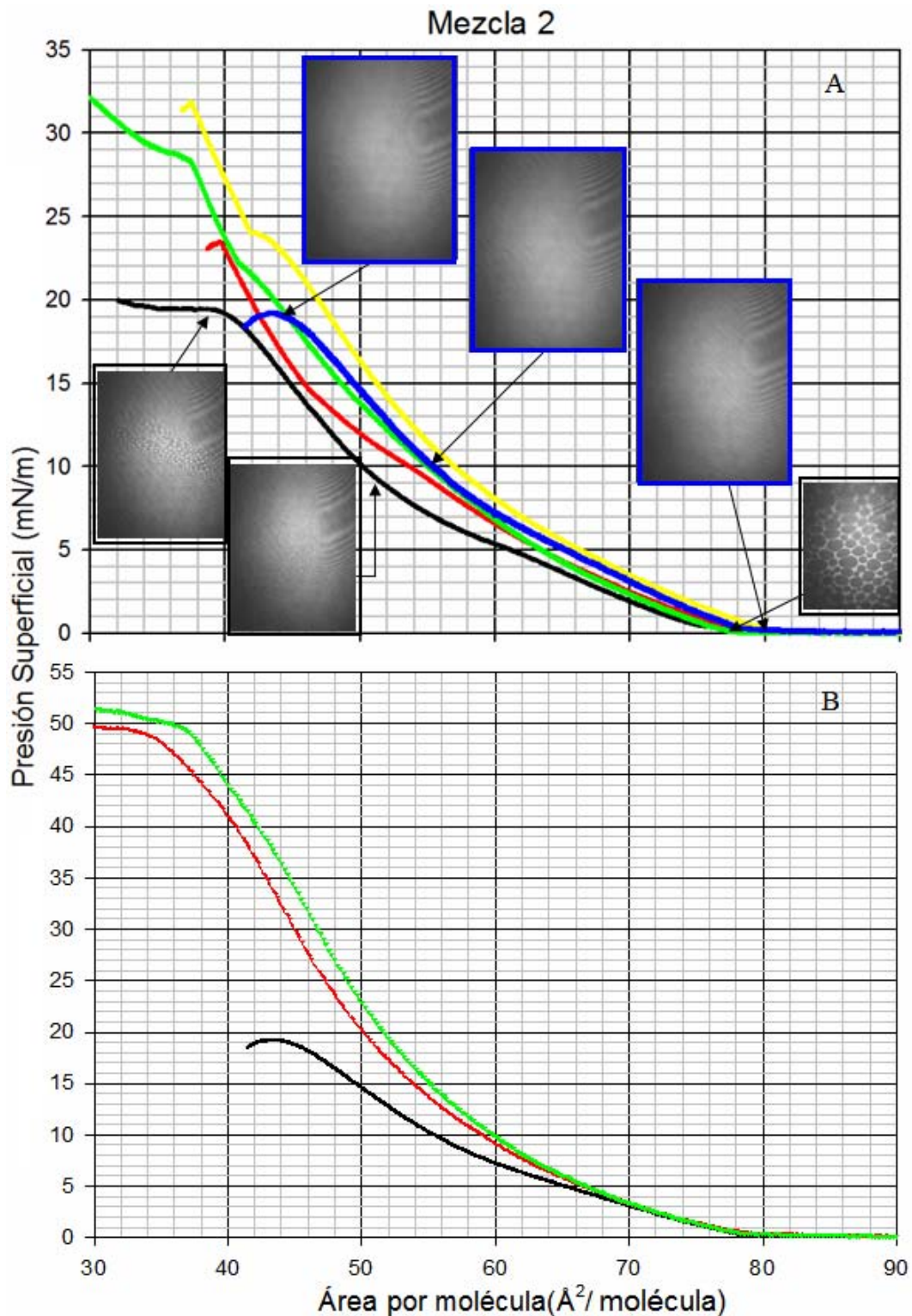
## ii. Mezcla 2

La figura 29A muestra las isothermas de la monocapa de Langmuir de la mezcla 2 realizadas en compresión de equilibrio termodinámico. Es necesario recordar que en esta mezcla el triglicérido (Tripalmitato) de la mezcla 1 fue substituido por colesterol en igual porcentaje molar (8%). La mezcla 2 muestra pocos cambios en las curvas isotérmicas con respecto a las diferentes temperaturas evaluadas, colapsando a valores de presión superficial alrededor de 22mN/m. Existe un ligero incremento en la compresibilidad de las isothermas conforme la temperatura aumenta de 22°C a 34°C, sin embargo, esta tendencia se rompe para el caso de 37°C. En esta mezcla el desplazamiento del punto en el cual comienza a aumentar la presión superficial a áreas por molécula mayores es prácticamente inexistente. El área por molécula a la cual colapsan las isothermas se encuentra alrededor de 40 Å<sup>2</sup>/molécula para todos los casos. Las imágenes de BAM muestran dominios moleculares en diferentes regiones de las isothermas a diferentes temperaturas excepto a 37°C. Estos dominios son de mucho menor tamaño que los que se observaron en la mezcla 1.

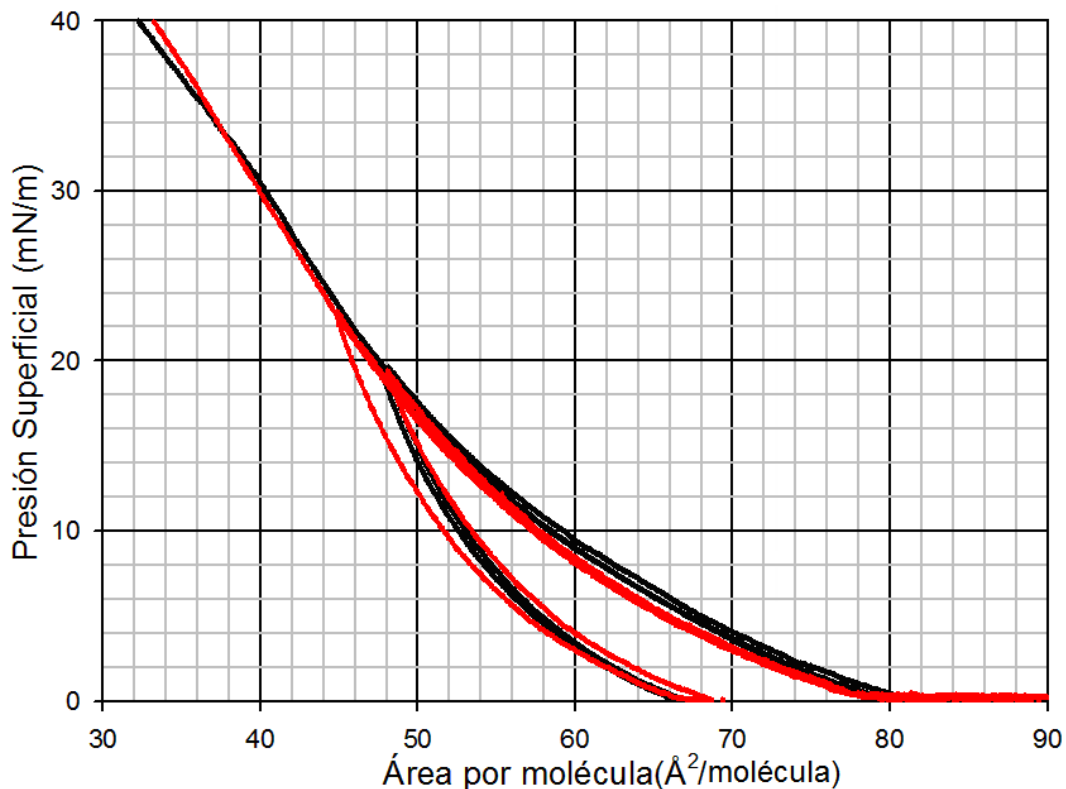
Debido a que las isothermas son curvas suaves hasta llegar al colapso, es difícil deducir la existencia de transiciones de fase. Sin embargo, la observación directa de la monocapa con la microscopía de ángulo de Brewster nos permitió observar con claridad la presencia de transiciones de líquido expandido a líquido condensado. En la figura 28A se observa que a bajas temperaturas existen pequeños dominios los cuales dejan de ser evidentes a altas temperaturas.

La figura 29B muestra el efecto de la velocidad de compresión en monocapas de la mezcla 2 a 37°C. La compresión fuera de equilibrio (90 cm<sup>2</sup>/min), no presentó cambios abruptos de pendiente de la isoterma, alcanzando presiones superficiales de 49mN/m en áreas apenas menores a 40 Å<sup>2</sup>/molécula. En este punto se presentaron mesetas que continuaron hasta llegar a los 30 Å<sup>2</sup>/molécula, donde por limitación técnica terminó la compresión. A una velocidad de compresión de 45 cm<sup>2</sup>/min los resultados fueron prácticamente los mismos que se observaron en la compresión de 90 cm<sup>2</sup>/min. El colapso en la compresión de equilibrio (10 cm<sup>2</sup>/min) aparece a presiones superficiales menores a 20 mN/m en un área por molécula superior a 40 Å<sup>2</sup>/molécula.

La figura 30 muestra los ciclos de compresión-expansión de la mezcla 2 a 37°C, a dos velocidades de compresión (20 y 30 cm<sup>2</sup>/min). Como se puede apreciar, las histéresis presentadas son pequeñas (diferencia de 5 mN/m entre la curva de compresión y de expansión). Las isothermas se superponen para ambas velocidades y en cada ciclo de compresión. Las imágenes observadas en los videos de estas isothermas no mostraron diferencias substanciales en comparación con las compresiones en equilibrio (10 cm<sup>2</sup>/min.).

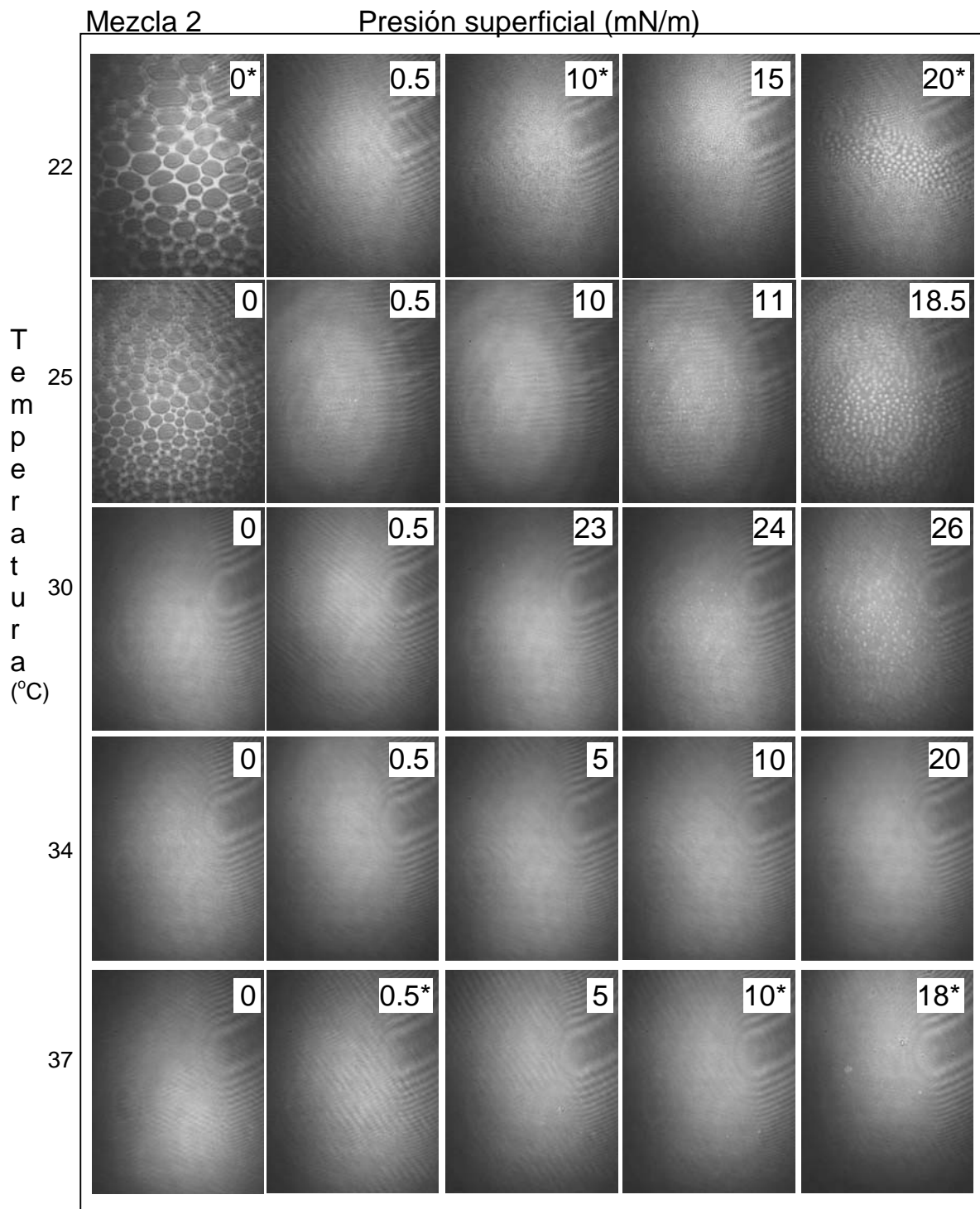


**Figura 29.** Isothermas de monocapas de Langmuir de la mezcla 2. A) Realizadas con una rapidez de compresión de 10cm<sup>2</sup>/min., a diferentes temperaturas; (●) 22°C, (●) 25°C, (▲) 30°C, (▲) 34°C y (■) 37°C. Imágenes con marco negro corresponden a la isoterma a 22°C. Imágenes con marco azul corresponden a la isoterma a 37°C. B) Realizadas a 37°C a diferentes velocidades de compresión; (●) 10cm<sup>2</sup>/min., (●) 45cm<sup>2</sup>/min. y (▲) 90cm<sup>2</sup>/min. (Las rayas curvas en la imágenes son artefactos debido a la óptica).



**Figura 30.** Ciclos de compresión isotérmica la mezcla 2 realizados a 37°C y diferentes velocidades de compresión; (●) 20cm<sup>2</sup>/min. y (●) 30cm<sup>2</sup>/min.

La figura 31 presenta las imágenes de las monocapas bajo compresiones de equilibrio termodinámico (10 cm<sup>2</sup>/min). Las imágenes a una misma temperatura fueron obtenidas de una misma isoterma. La temperatura de la isoterma a la cual pertenecen las imágenes está indicada en el margen izquierdo de la figura, mientras que en la esquina superior derecha de cada imagen se indica la presión superficial correspondiente. Las sombras negras que aparecen en el costado derecho de las imágenes son patrones de difracción debido a la presencia de una partícula de polvo en uno de los espejos del microscopio. A 25°C, en áreas por molécula muy grandes, existe espuma (coexistencia de fases líquida y gaseosa) en la monocapa. A medida que se reduce el área por molécula, la espuma desaparece y la presión incrementa. La monocapa muestra una imagen rugosa debido a la gran cantidad de pequeños dominios, remanentes de la desaparición de la fase espuma. Con el aumento en la presión desaparece la rugosidad, volviendo a aparecer dominios a una presión de 11mN/m. No existe un claro crecimiento de los dominios conforme aumenta la presión superficial, pero sí un aumento de su densidad en la imagen (definiendo densidad en la imagen como número de dominios en la imagen). A 34°C la monocapa presenta una imagen lisa al inicio, tornándose rugosa en algún momento de la compresión que es difícil de precisar. La intensidad de la rugosidad no aumenta con la compresión. A los 34 y 37°C las imágenes correspondientes son similares. La última imagen a 37°C correspondiente al colapso de la monocapa, no muestra una diferencia significativa con la monocapa antes de colapsar.



**Figura 31.** Imágenes de BAM de monocapas de la mezcla 2. Los números dentro de las imágenes indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma.



### iii. Mezcla 3

Recordemos que la mezcla 3 no contiene plasmalógeno ni colesterol (Figura 25) y que la proporción molar correspondiente al plasmalógeno (1%) fue substituida por DPPC.

La figura 32A muestra la dependencia de la presión superficial de la mezcla 3, en función del área por molécula de la monocapa a diferentes temperaturas y a una velocidad de compresión de  $10 \text{ cm}^2/\text{min}$ . La presión de colapso cambia de  $58 \text{ mN/m}$  a  $28 \text{ mN/m}$  entre los  $22^\circ\text{C}$  y  $37^\circ\text{C}$ . Se observa un desplazamiento a áreas por molécula mayores del punto en el cual comienza a aumentar la presión superficial. Este aumento en el área por molécula es de un 20% al pasar de  $22^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$ . El área por molécula de colapso es bastante similar en todas las temperaturas, presentándose alrededor de los  $38 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ .

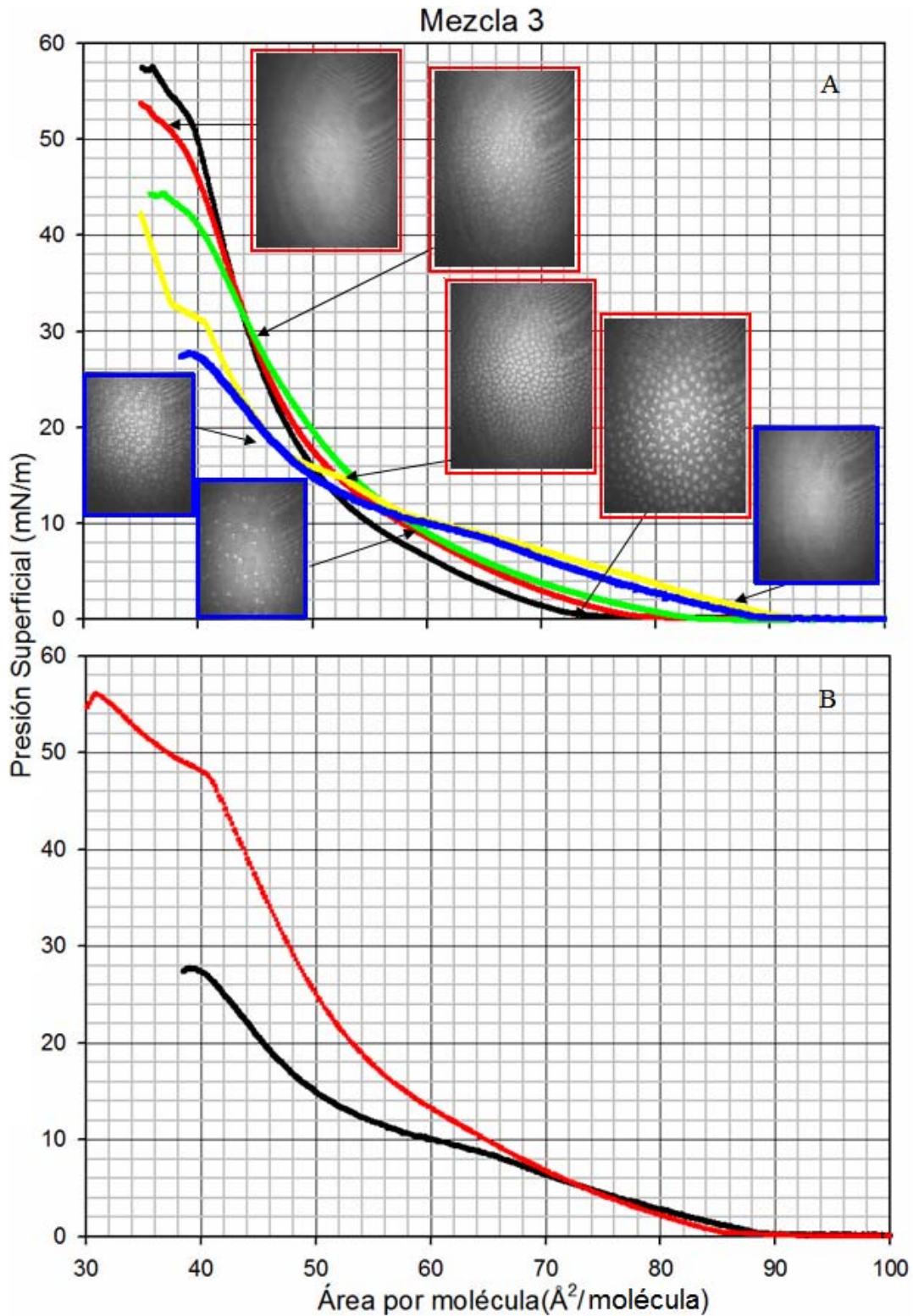
A bajas temperaturas ( $22^\circ\text{C}$  y  $25^\circ\text{C}$ ) cuando el área por molécula se acerca a los  $38 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , la compresibilidad disminuye considerablemente. Cuando la compresión de la monocapa va más allá de los  $38 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , ocurre el colapso de la monocapa, correspondiendo a valores de presión superficial de  $\Pi \approx 55 \text{ mN/m}$ . A altas temperaturas (superiores a  $30^\circ\text{C}$ ) cuando el área por molécula se acerca a los  $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ , la compresibilidad también disminuye, pero en mucho menor medida en comparación con lo observado a bajas temperaturas. A altas temperaturas el colapso se hace evidente debido a que la compresión de la monocapa más allá de los  $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  produce un descenso en la presión superficial.

La observación directa de la monocapa con microscopia de ángulo de Brewster nos permitió observar con claridad la presencia de al menos una transición de fase de líquido expandido y líquido condensado. Tales transiciones se dieron en  $5 \text{ mN/m}$  y  $10 \text{ mN/m}$ , a  $34^\circ\text{C}$  y  $37^\circ\text{C}$  respectivamente (ver figura 34). En la figura 32A se observa que a bajas temperaturas los dominios de fase condensada son más pequeños y más numerosos que los que se presentan a altas temperaturas.

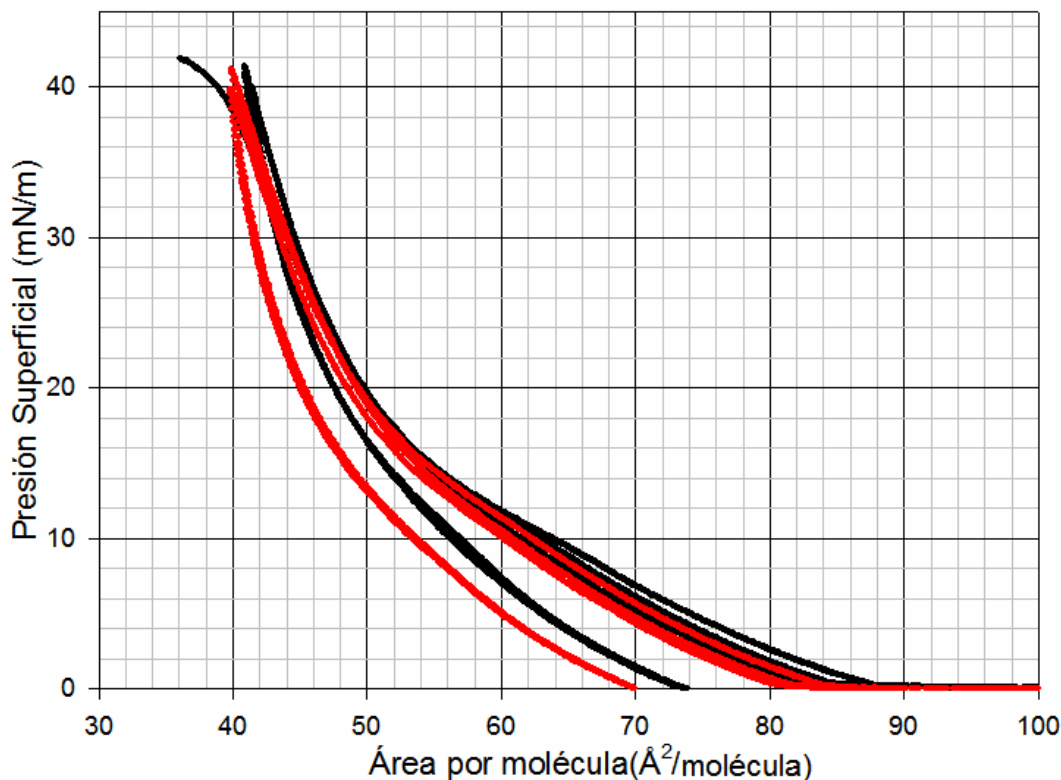
La figura 32B muestra el efecto de la compresión rápida ( $90 \text{ cm}^2/\text{min}$ ) de monocapas de la mezcla 3 a  $37^\circ\text{C}$ . La compresión fuera de equilibrio no presentó cambios abruptos en la pendiente de la isoterma sino hasta alcanzar una presión superficial de  $48 \text{ mN/m}$  en áreas cercanas a  $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ . Esta discontinuidad en el cambio de pendiente la relacionamos con el colapso de la monocapa debido a que el área por molécula a la cual se presenta, corresponde con el área por molécula de colapso encontrada para los casos de compresión en equilibrio ( $10 \text{ cm}^2/\text{min}$ ). Comprimiendo a áreas menores, la isoterma mostró una alta compresibilidad que culminó en  $\Pi \approx 56 \text{ mN/m}$ . Para isotermas donde la compresión es muy rápida no fue posible obtener imágenes, sin embargo los videos mostraron una coexistencia de fases similar a la que se observó en las isotermas de en equilibrio.

La figura 33 muestra los ciclos de compresión-expansión de la mezcla 3 a  $37^\circ\text{C}$ , a dos velocidades de compresión ( $20$  y  $30 \text{ cm}^2/\text{min}$ ). Las histéresis son pequeñas, lo que podría indicar que no existieron cambios importantes en el sistema. Es necesario mencionar que en estas isotermas se aprecia nuevamente el efecto de realizar una compresión rápida, pues los valores de  $\Pi$  correspondientes a áreas superiores al área de colapso ( $38 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ ) son mayores a los alcanzados en el caso de equilibrio.



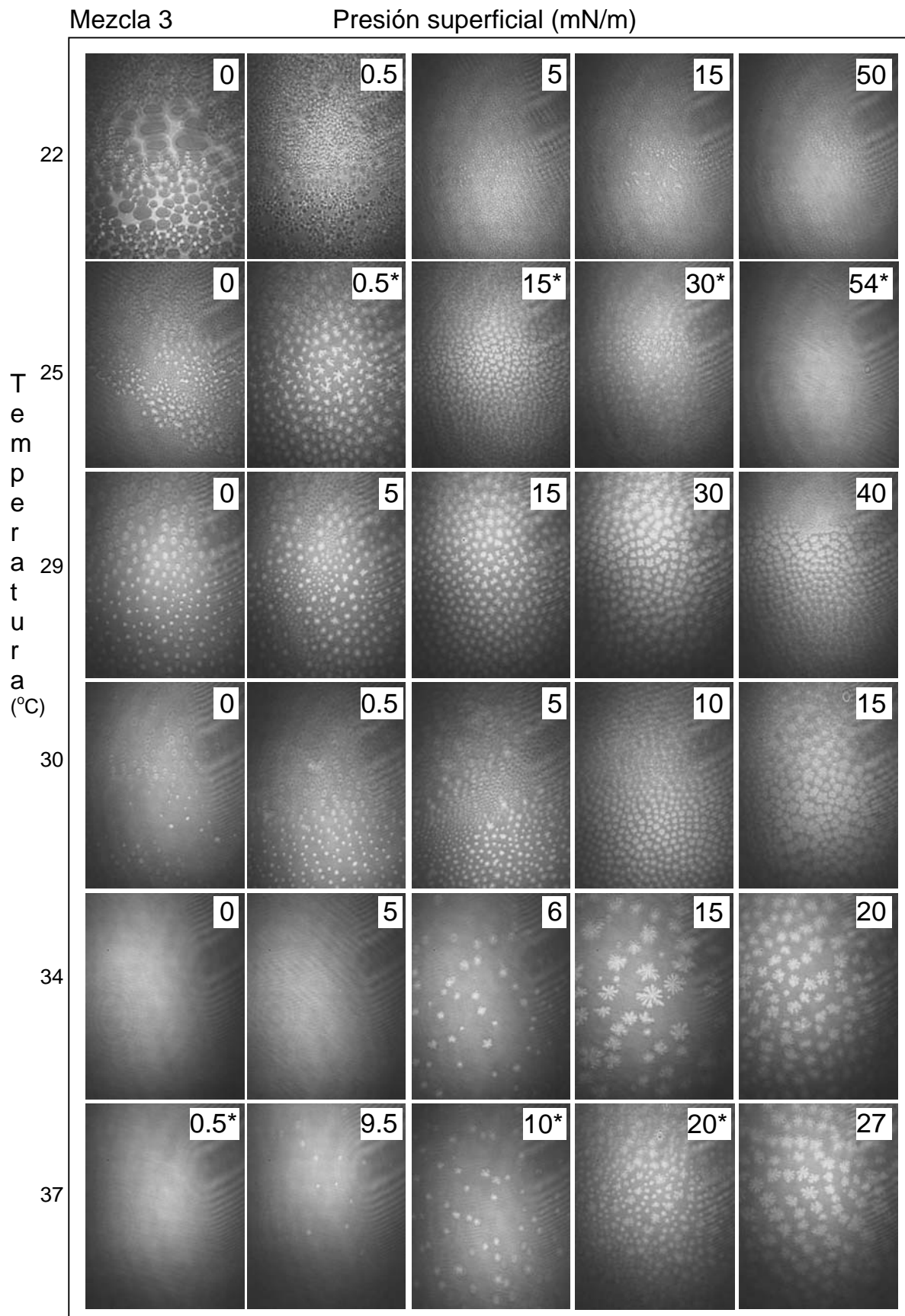


**Figura 32.** Isothermas de monocapas de Langmuir de la mezcla 3. A) Realizadas con una rapidez de compresión de  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , a diferentes temperaturas; (●)  $22^\circ\text{C}$ , (●)  $25^\circ\text{C}$ , (▲)  $30^\circ\text{C}$ , (▲)  $34^\circ\text{C}$  y (■)  $37^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco rojo corresponden a la isoterma a  $25^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco azul corresponden a la isoterma a  $37^\circ\text{C}$ . B) Realizadas a  $37^\circ\text{C}$  a diferentes velocidades de compresión; (●)  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , (●)  $90\text{cm}^2/\text{min.}$  (Las rayas curvas en las imágenes son artefactos debido a la óptica).



**Figura 33.** Ciclos de compresión isotérmica la mezcla 3 realizados a 37°C y diferentes velocidades de compresión; (●) 20cm<sup>2</sup>/min. y (●) 30cm<sup>2</sup>/min.

La figura 34 muestra las imágenes de las monocapas bajo compresiones de equilibrio termodinámico. Las imágenes a una misma temperatura fueron obtenidas de una misma isoterma. La temperatura de la isoterma a la cual pertenecen las imágenes está indicada en el margen izquierdo de la página, mientras que en la esquina superior derecho de cada imagen se indica la presión correspondiente. Las sombras negras que aparecen en el costado derecho de las imágenes son patrones de difracción debido a la presencia de una partícula de polvo en uno de los espejos del microscopio. A 25°C en áreas por moléculas muy grandes, se observa una imagen con tres diferentes contrastes, que indica coexistencia de líquido, gas y probablemente una fase condensada. Al continuar reduciendo el área por molécula la fase gaseosa desaparece y la presión superficial comienza a aumentar, dando paso a una monocapa mayoritaria en fase líquido expandido con algunos dominios en fase líquido condensado, cuya morfología es difícil de clasificar como tipo dendrítico o tipo alga. Los dominios aumentan en intensidad y número conforme se realiza la compresión. A 29°C la monocapa muestra pequeños dominios, que desde el inicio de la compresión incrementan su tamaño. A 37°C la monocapa muestra una imagen lisa, libre de dominios o espuma. Los dominios de fase condensada aparecen alrededor de los 10mN/m, presentando forma de alga. Los dominios aumentan su tamaño e intensidad conforme se realiza la compresión. Las imágenes de la monocapa colapsada no mostraron diferencias con las imágenes antes del colapso.



**Figura 34.** Imágenes de BAM de monocapas de la mezcla 3. El número dentro de las imagen indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma.

### 3. 2 Discusión de mezclas sintéticas

Es notable la similitud de comportamiento de las mezclas 1 y 3, que muy probablemente sea consecuencia de que solo existe 1% de diferencia en la composición de lípidos entre ellas (la presencia de plasmalógeno en la primera y la ausencia de éste en la mezcla 3). Quizá el punto de comparación más interesante entre estas dos mezclas surja de buscar una relación entre tres factores: 1) el cambio dependiente de la temperatura, 2) el cambio en la compresibilidad y 3) la fracción de monocapa en fase condensada. También resulta interesante observar el desplazamiento a áreas por molécula mayores del punto donde comienza a subir la presión superficial con respecto al aumento en temperatura. Este desplazamiento puede ser resultado del aumento en la energía cinética de las colas hidrofóbicas (vía el aumento en temperatura), lo que produce un área de interacción mayor. Las imágenes obtenidas por el BAM corroboran la similitud mostrada en las isotermas de las mezcla 1 y 3. Por ejemplo, en ambas aparecen dominios a presiones superficiales muy similares.

La mezcla 2 presentó una caída considerable en la presión de colapso debido a la presencia de colesterol. Es posible que el colesterol también sea responsable del pequeño tamaño de los dominios en fase condensada. Estos efectos están relacionados con la presencia de colesterol y no a la ausencia de triglicérido, debido a que algunos autores reportan efectos similares en mezclas de fosfolípidos mucho más sencillas a las nuestras [30,31]. Finalmente, es necesario mencionar que los valores de área por molécula en los que se observan los colapsos para cada una de las mezclas, corresponden bastante bien con los valores encontrados para la DPPC, todos cercanos a los  $40 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$  [30, 32, 33]. Lo anterior tiene sentido por dos razones; la primera se debe a que el DPPC es el mayor componente de nuestras mezclas, y el peso molecular equivalente fue un promedio ponderado por la fracción molar; y segundo, debido a que salvo por el triglicérido, el colesterol y el ácido palmítico, los pesos moleculares del resto de los componentes son muy parecidos al valor del peso molecular del DPPC.

Todas las mezclas a  $37^\circ\text{C}$  en compresión rápida alcanzaron valores de presión superficial bastante cercanos a lo esperado según los requerimientos fisiológicos (valores cercanos a los  $72\text{mN/m}$ ). Estas isotermas “rápidas” presentan cierta similitud con las isotermas a  $25^\circ\text{C}$  en condiciones de equilibrio.

En conclusión:

1. El colesterol afecta considerablemente el comportamiento superficial de la mezcla. Probablemente, por medio de impedir la formación de dominios de fase condensada.
2. Las monocapas mostraron dependencia del aumento en temperatura. A  $37^\circ\text{C}$  las monocapas en compresión en equilibrio alcanzaron valores de presión superficial muy por debajo de los  $72\text{mN/m}$ , que es el valor esperado en términos fisiológicos.
3. El comportamiento superficial de las mezclas mostró dependencia de la velocidad de deformación de la monocapa.

### 3.3 Resultados de los surfactantes terapéuticos naturales

Es importante recordar que estas mezclas comerciales contienen las proteínas hidrofóbicas SP-B y SP-C, que forman parte fundamental de los surfactantes pulmonares en todas las especies [8, 9]. En esta sección el área por molécula es una aproximación, ya que no se conoce la composición molecular exacta de éstas mezclas.

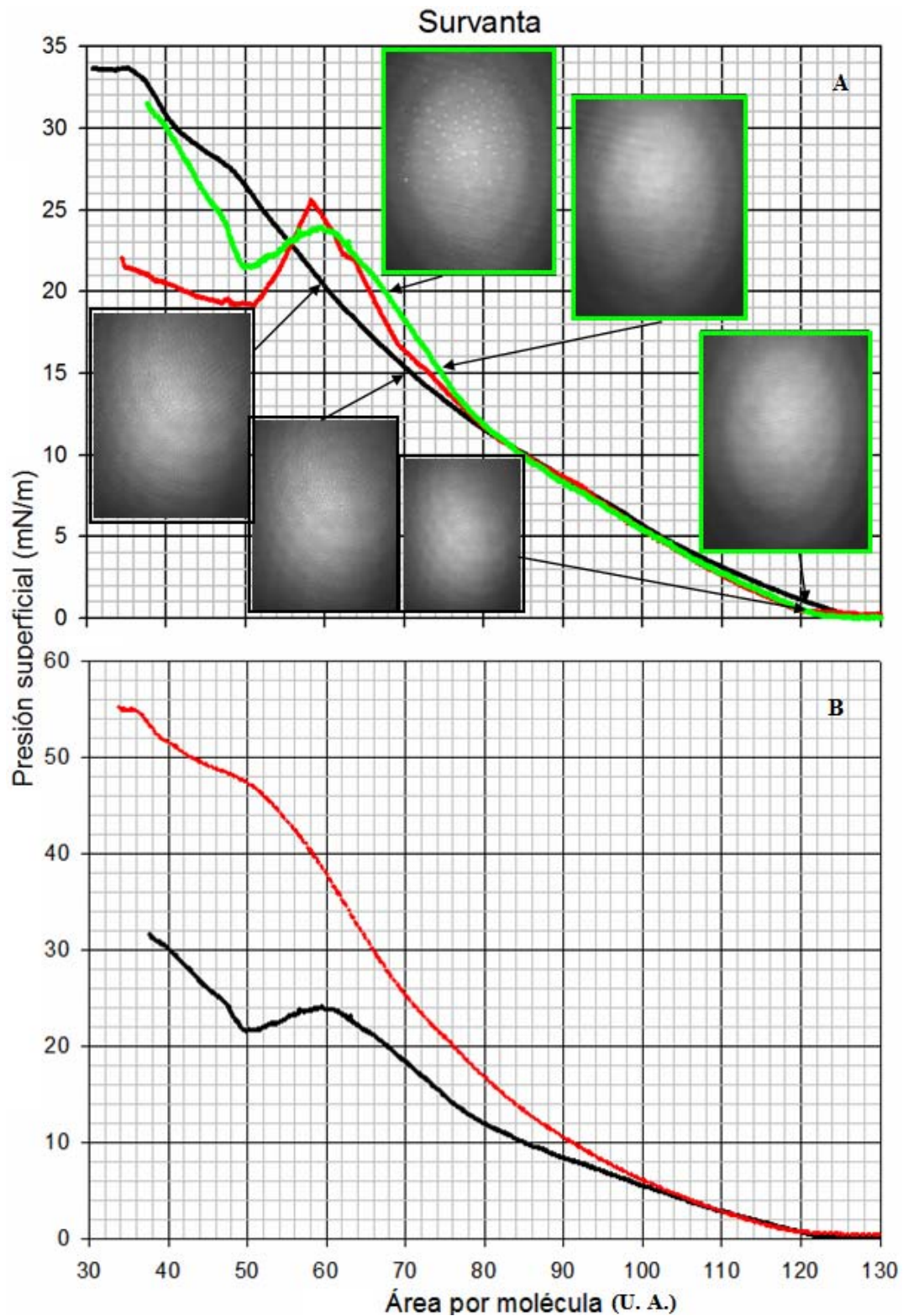
#### i. Survanta con proteínas (origen bovino).

Survanta es un surfactante pulmonar terapéutico natural de origen bovino, al cual se le adiciona DPPC y triglicérido. En la figura 35A muestra que a temperaturas de poca relevancia fisiológica ( $25^{\circ}\text{C}$ ), la monocapa colapsa a presiones superficiales alrededor  $\Pi \approx 28\text{mN/m}$ , mientras que a temperaturas superiores ( $33^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$ ) desciende ligeramente a valores de  $\Pi \approx 25\text{mN/m}$ . Si la compresión de la monocapa continua después del colapso, la presión superficial se incrementa nuevamente, llegando incluso a sobrepasar la presión de colapso. Claro ejemplo de ello se observa en la isoterma correspondiente a los  $37^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado, las imágenes de BAM muestran que a  $25^{\circ}\text{C}$  existen pequeños dominios prácticamente desde el inicio de la compresión, mientras que a  $37^{\circ}\text{C}$  los dominios de fases condensadas hacen su aparición a partir de un  $18\text{mN/m}$ .

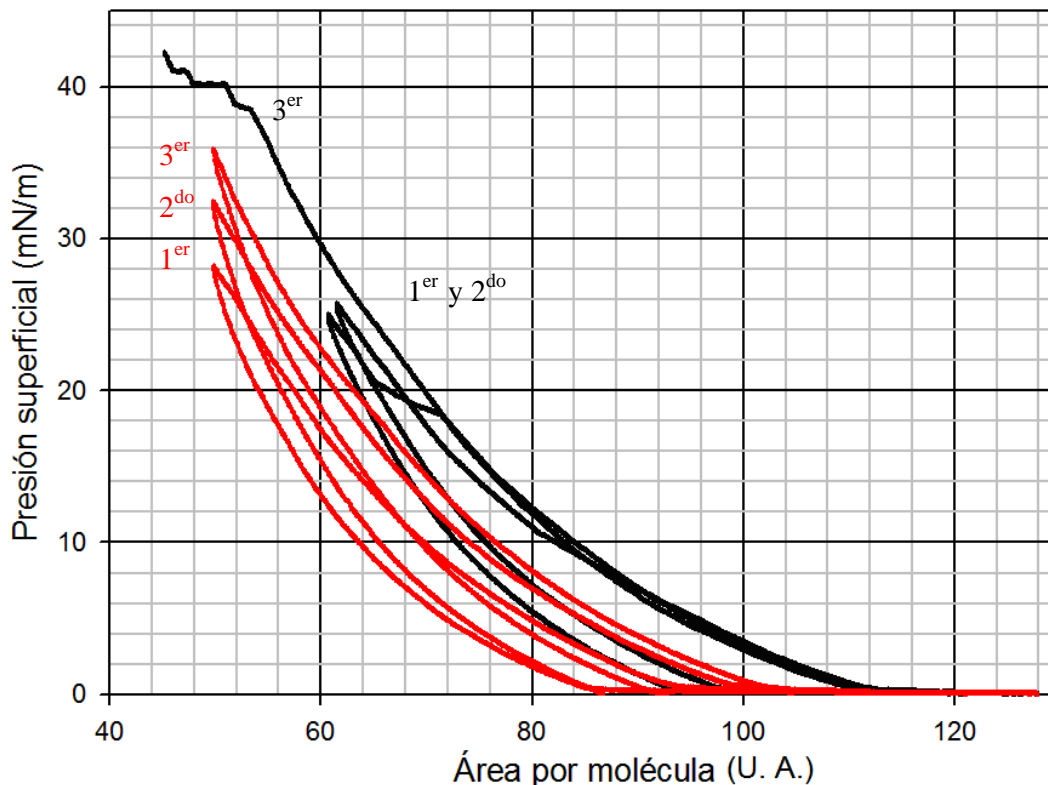
La figura 35B muestra el efecto de la velocidad de compresión sobre la monocapa de Survanta a  $37^{\circ}\text{C}$ . La compresión fuera de equilibrio ( $90\text{ cm}^2/\text{min}$ ) presentó una curva isotérmica suave con una pendiente más pronunciada que la isoterma en equilibrio. En áreas muy similares, la compresión rápida alcanzó los  $\Pi \approx 48\text{mN/m}$ , mientras que la compresión en equilibrio colapsó a los  $\Pi \approx 24\text{mN/m}$ . La isoterma fuera de equilibrio tuvo una alta compresibilidad que después de los  $\Pi \approx 48\text{mN/m}$ , que continuó hasta llegar a los  $55\text{mN/m}$ , donde por limitación técnica terminó la compresión.

Al final de cada una de las compresiones de las monocapas de Survanta, se logró observar material tensoactivo del otro lado de las barreras de compresión. Una posible explicación es que, al ir reduciendo el área en el cual yacen las moléculas (área entre las barreras de compresión), las moléculas son expulsadas de la monocapa, disolviéndose en el agua para después emerger del otro lado de la barrera. Este comportamiento es característico de las monocapas de Gibbs. Una monocapas de Gibbs es estructuralmente idéntica a una monocapas de Langmuir, diferenciándose únicamente por la solubilidad del anfífilo. Las sustancias que forman monocapas de Langmuir son esencialmente insolubles, por lo que las moléculas están confinadas en la interfase aire-agua. En una monocapa de Gibbs, las moléculas pueden salir de la interfase e ir a la subfase y viceversa. En nuestro caso la monocapa de Survanta es de Gibbs.





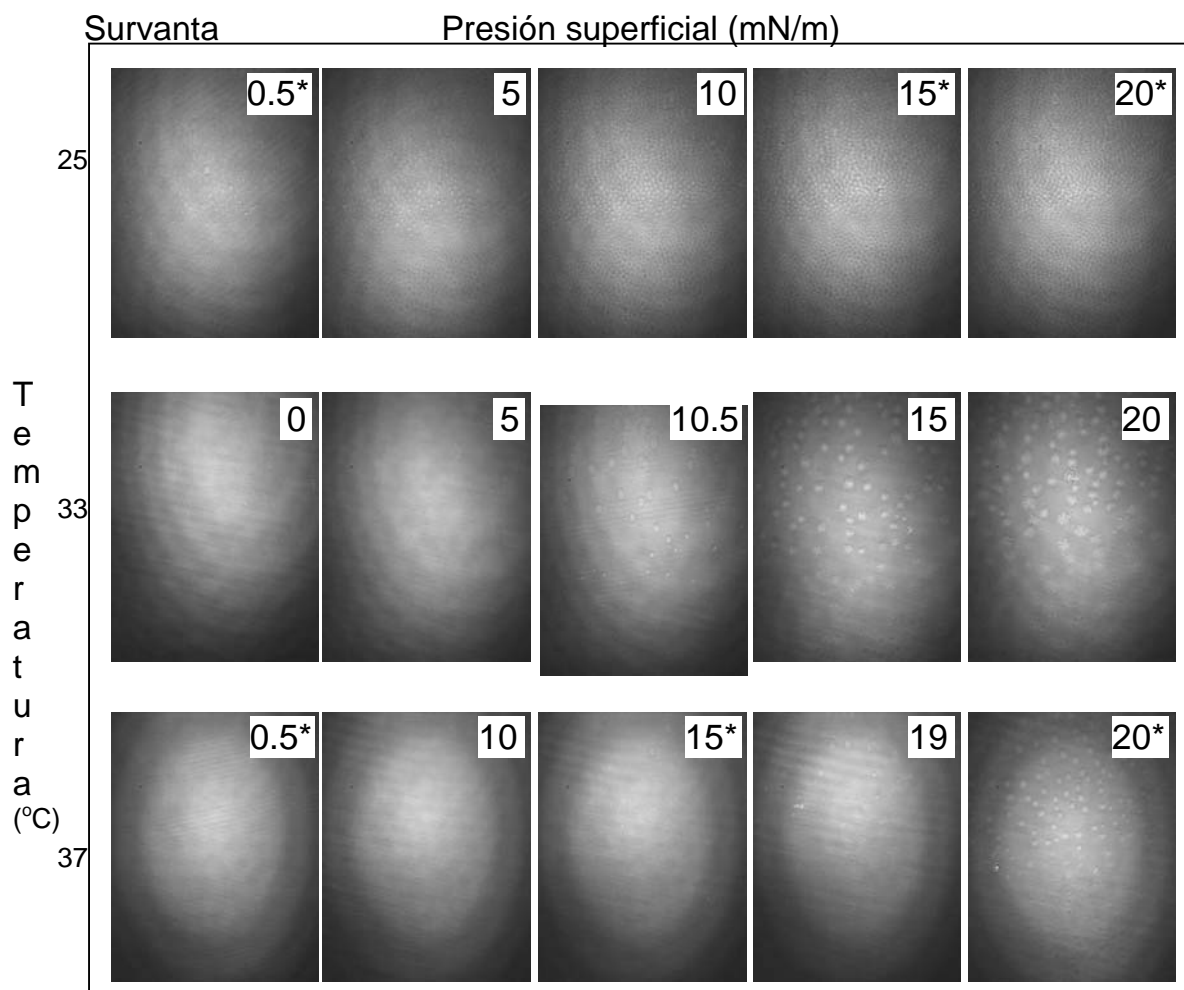
**Figura 35.** Isothermas de monocapas de Langmuir de Survanta. A) Realizadas con una rapidez de compresión de  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , a diferentes temperaturas; ( $\bullet$ )  $25^\circ\text{C}$ , ( $\color{red}\bullet$ )  $33^\circ\text{C}$  y ( $\color{green}\blacktriangle$ )  $37^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco negro corresponden a la isoterma a  $25^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco verde corresponden a la isoterma a  $37^\circ\text{C}$ . B) Realizadas a  $37^\circ\text{C}$  a diferentes velocidades de compresión; ( $\bullet$ )  $10\text{cm}^2/\text{min.}$  y ( $\color{red}\bullet$ )  $90\text{cm}^2/\text{min.}$



**Figura 36.** Ciclos de compresión isotérmica de Survanta realizados a 37°C y diferentes velocidades de compresión; (●) 20cm<sup>2</sup>/min. y (●) 30cm<sup>2</sup>/min. Los señalamientos 1<sup>er</sup>, 2<sup>do</sup> y 3<sup>er</sup> indican en cada caso el orden de aparición de cada uno de los ciclos de compresión.

La figura 36 muestra ciclos de compresión-expansión de la mezcla Survanta a dos velocidades de compresión, 20 y 30 cm<sup>2</sup>/min a 37°C. Como se puede observar, la histéresis no es muy pronunciada (la compresión y la expansión difieren en apenas 2mN/m). Sin embargo con cada ciclo se presenta un desplazamiento de la curva hacia áreas por molécula mayores para ambas velocidades de compresión. En la figura se indican el orden de aparición de las curvas. Las imágenes observadas en los videos de estas isoterma no muestran diferencias substanciales en comparación con las compresiones en equilibrio.

La figura 37 muestra imágenes de las monocapas de Survanta bajo compresiones en equilibrio termodinámico. A 25°C la imagen es rugosa (dominios pequeños poco contrastados). A 2mN/m mejora el contraste de los dominios de fase condensada. Al final de la compresión la densidad de dominios es tal que prácticamente ocupan toda la imagen. A 33°C la monocapa presenta una imagen lisa al inicio. La aparición de dominios ocurre en aproximadamente 11 mN/m, estos tienen forma de alga y crecen conforme se realiza la compresión. A 37°C la imagen presentada por la monocapas es bastante similar a la presentada a 33°C excepto que la aparición de los dominios ocurre alrededor de los 20mN/m, muy cercano al punto de colapso. A partir de las imágenes no es posible identificar el colapso de la monocapa, debido en ellas no existe la diferencia que marca la isoterma.



**Figura 37.** Imágenes de BAM de monocapas de Survanta. Los números dentro de las imágenes indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma.



## ii. Survanta sin proteínas (origen bovino).

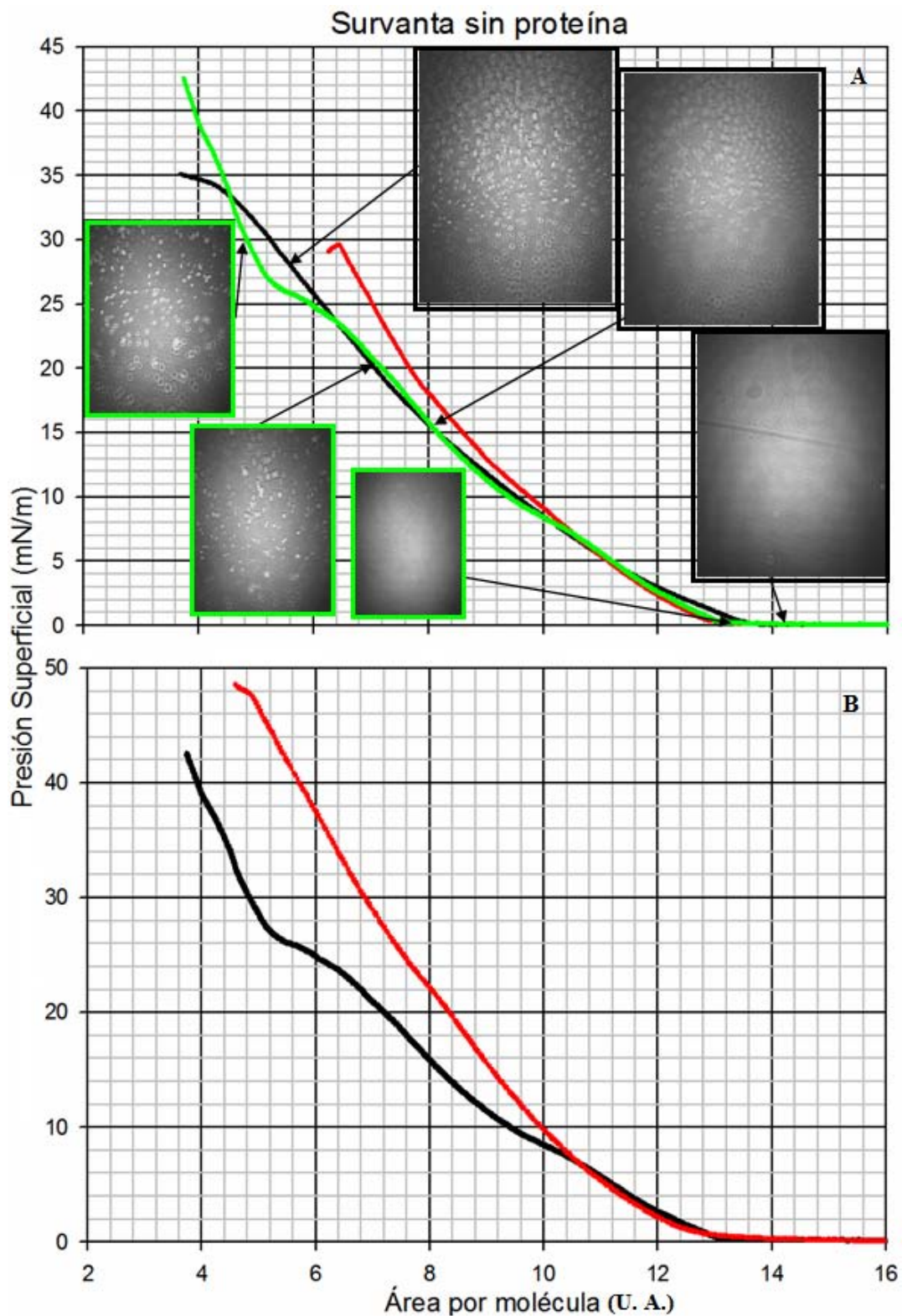
La figura 38A muestra el efecto de la temperatura sobre las isotermas de la mezcla Survanta sin proteínas a una velocidad de compresión de 10 cm<sup>2</sup>/min. Se observan pocos cambios con la temperatura. Las monocapas colapsan a presiones superficiales entre 25mN/m y 35mN/m. Sin embargo, si la compresión de la monocapa se extiende después del colapso, la presión superficial continúa incrementando su valor. Las imágenes de BAM exhiben que a bajas temperaturas (25°C) no existen dominios al inicio de la compresión, éstos aparecen y aumentan su intensidad a medida se reduce el área por molécula. A 37°C los dominios de fases condensadas existen en la monocapa desde el inicio de la compresión, aumentado su intensidad durante el transcurso de la misma. Llama la atención la gran intensidad luminosa de los dominios.

La figura 38B muestra el efecto de la velocidad de compresión sobre la mezcla de Survanta sin proteína a 37°C. La compresión fuera de equilibrio (90 cm<sup>2</sup>/min) presentó una menor compresibilidad, alcanzando una presión superficial de 48mN/m en áreas apenas menores a las que se presentó el colapso en el caso de equilibrio.

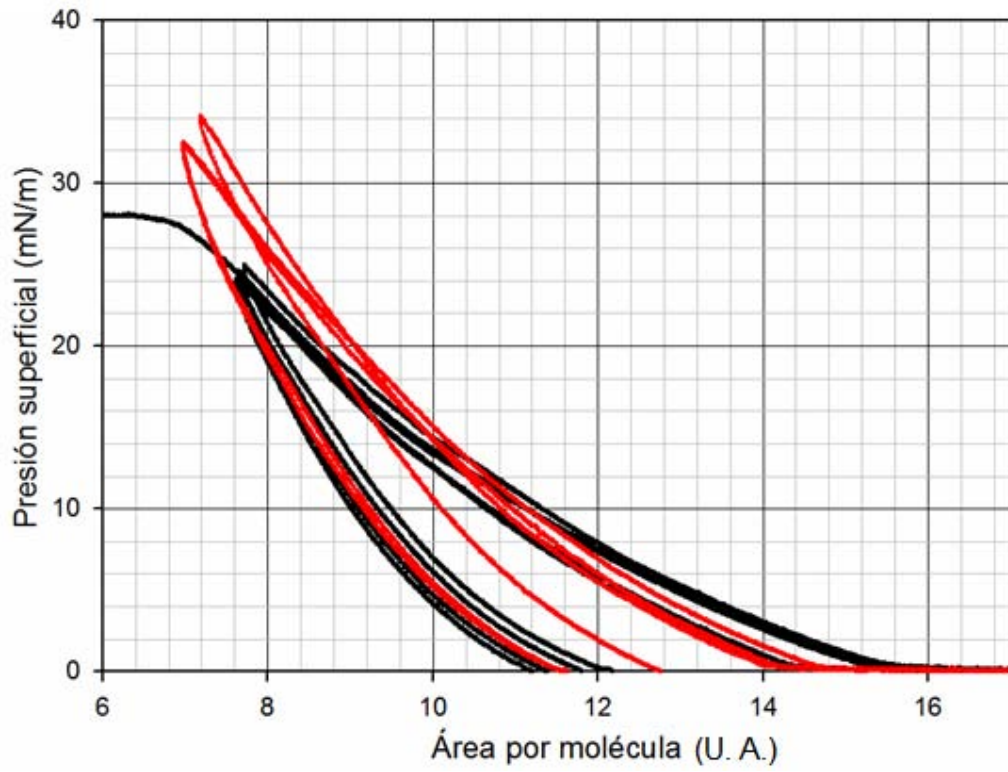
La figura 39 muestra los ciclos de compresión-expansión realizados sobre una monocapa de Survanta sin proteínas a dos velocidades de compresión, 20 y 30 cm<sup>2</sup>/min a 37°C. Como se puede apreciar, las histéresis son mayores comparadas con el caso de Survanta con proteína, en este caso la diferencia llega a ser de 10 mN/m entre la curva de compresión y la expansión. Este aumento en la histéresis pudiera deberse a la ausencia de proteínas. Por otro lado, los diferentes ciclos de compresión se superponen bastante bien, es decir, no existe el desplazamiento de las curvas hacia áreas mayores observado en el caso de Survanta con proteína. Las imágenes observadas en los videos de estas isotermas no mostraron diferencias substanciales en comparación con las compresiones en equilibrio.

Es necesario mencionar, la presencia de material parcialmente soluble en la muestra de Survanta sin proteínas, debido a que al final de cada una de las compresiones de las monocapas, se logró observar material surfactante del otro lado de las barreras de compresión. Este comportamiento corresponde al presentado por monocapas de Gibbs.

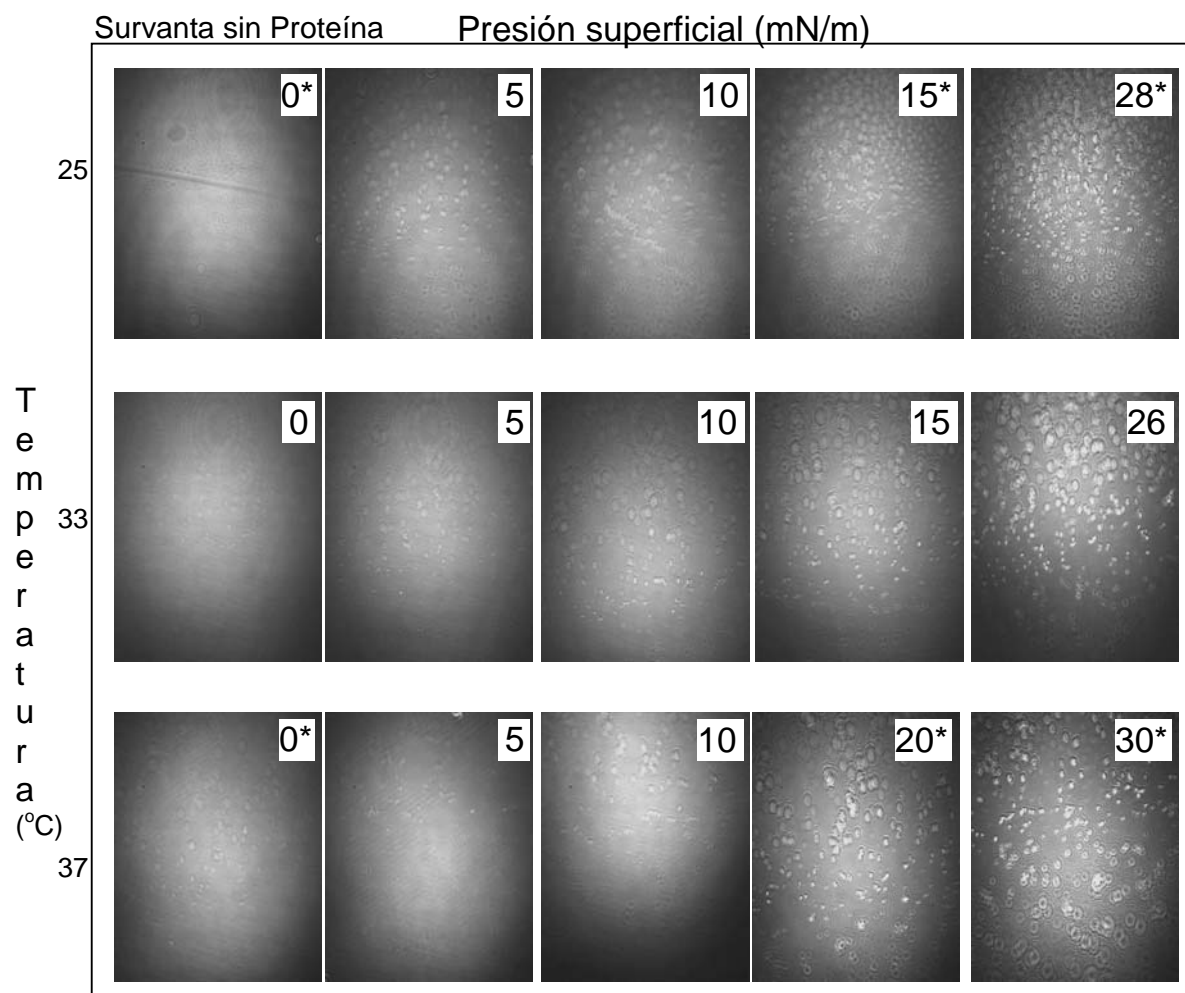
La figura 40 muestra imágenes de las monocapas de Survanta sin proteínas bajo compresiones de equilibrio termodinámico. A 25°C en el inicio de la compresión, se observa zonas de coexistencia líquido expandido y gas. La fase gaseosa desaparece en 1mN/m, dando lugar al surgimiento de dominios de fase condensada, que aumentan en número a medida que aumenta la presión superficial. Al final de la compresión la densidad de dominios es tal que prácticamente ocupan toda la imagen. A 33°C la monocapa presenta una imagen con pequeños dominios que durante el transcurso de la compresión aumentan en número e intensidad pero no en tamaño. A 37°C el comportamiento es bastante parecido al observado a 33°C. A partir de las imágenes no es posible identificar el colapso de la monocapa, debido en ellas no existe la diferencia que marca la isoterma.



**Figura 38.** Isothermas de monocapas de Langmuir de Survanta sin proteína. A) Realizadas con una rapidez de compresión de  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , a diferentes temperaturas; (●)  $25^\circ\text{C}$ , (●)  $33^\circ\text{C}$  y (▲)  $37^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco negro corresponden a la isoterma a  $25^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco verde corresponden a la isoterma a  $37^\circ\text{C}$ . B) Realizadas a  $37^\circ\text{C}$  a diferentes velocidades de compresión; (●)  $10\text{cm}^2/\text{min.}$  y (●)  $90\text{cm}^2/\text{min.}$



**Figura 39.** Ciclos de compresión isotérmica de Survanta sin proteína realizados a 37°C y diferentes velocidades de compresión; (●) 20cm<sup>2</sup>/min. y (●) 30cm<sup>2</sup>/min.



**Figura 40.** Imágenes de BAM de monocapas de Survanta sin proteínas. Los números dentro de las imágenes indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma.

### iii. Curosurf con proteínas (origen porcino).

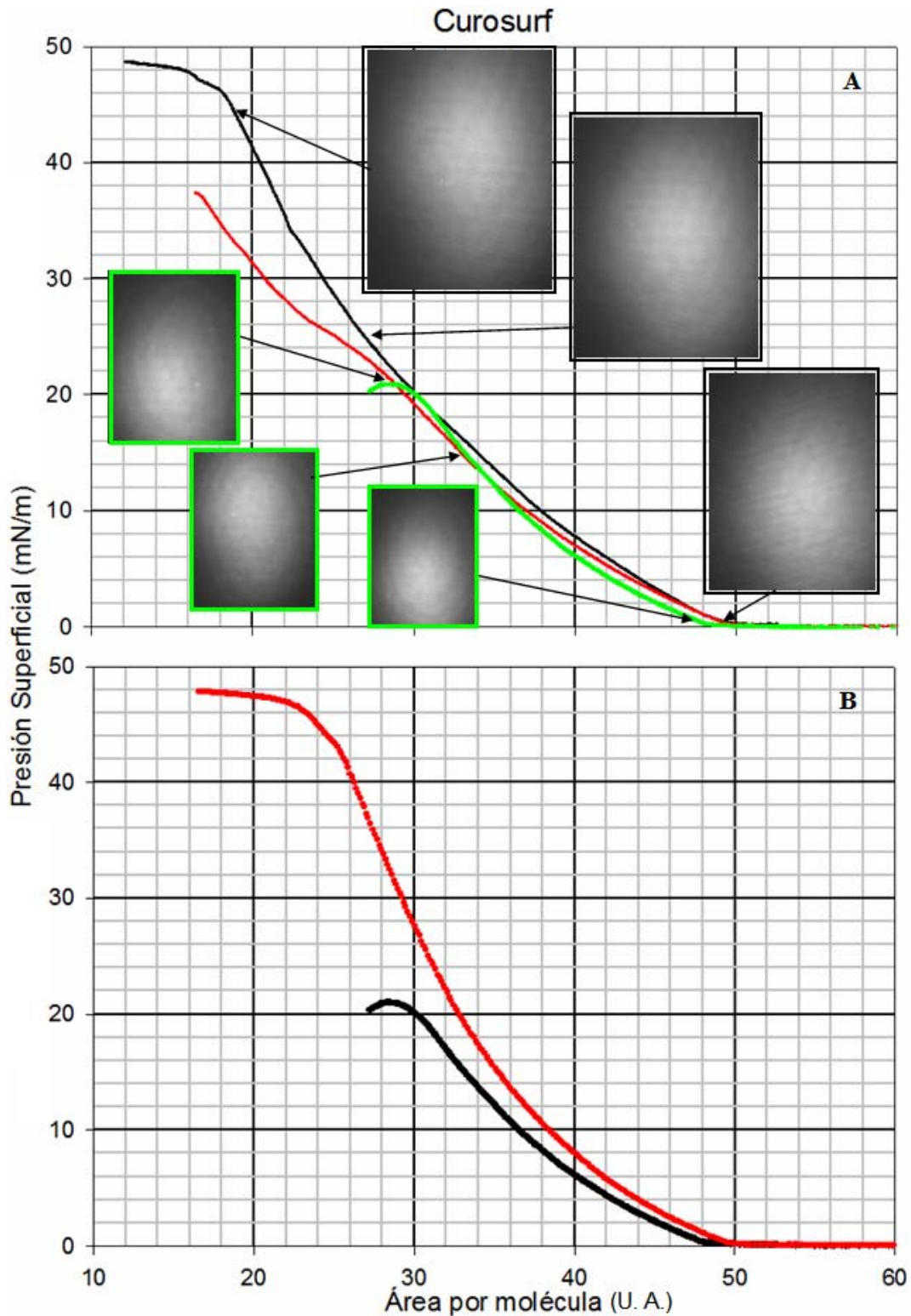
La figura 41A muestra el efecto de la temperatura sobre las monocapas de Curosurf. A 25°C las monocapas colapsan a presiones superficiales de  $\Pi \approx 46 \text{ mN/m}$ , lo cual es mucho mayor de lo que se observó para Survanta (ver figura 34A). Sin embargo a 33°C y particularmente a 37°C, la presión de colapso desciende considerablemente, haciendo evidente el efecto de la temperatura en esta muestra. El efecto de la temperatura no se ve expresado en las imágenes de BAM, la cuales son igual de llanas en todas la temperaturas y presiones superficiales evaluadas, inclusive cuando la isoterma indica que la monocapa ha colapsado. Resulta interesante el desplazamiento del colapso en el área por molécula, que pasa de 20 Å/molécula en 25°C a 30 Å/molécula en 37°C.

La figura 41B muestra el efecto de la velocidad de compresión sobre las monocapas de Curosurf a 37°C. La compresión fuera de equilibrio (90 cm<sup>2</sup>/min) presentó una pendiente superior a la mostrada por la isoterma de equilibrio, alcanzando presiones superficiales de 48mN/m en áreas similares en las que ocurrió el colapso en la monocapa en equilibrio. En 48mN/m la isoterma de 90 cm<sup>2</sup>/min presentó una meseta que continuó hasta finalizada la compresión.

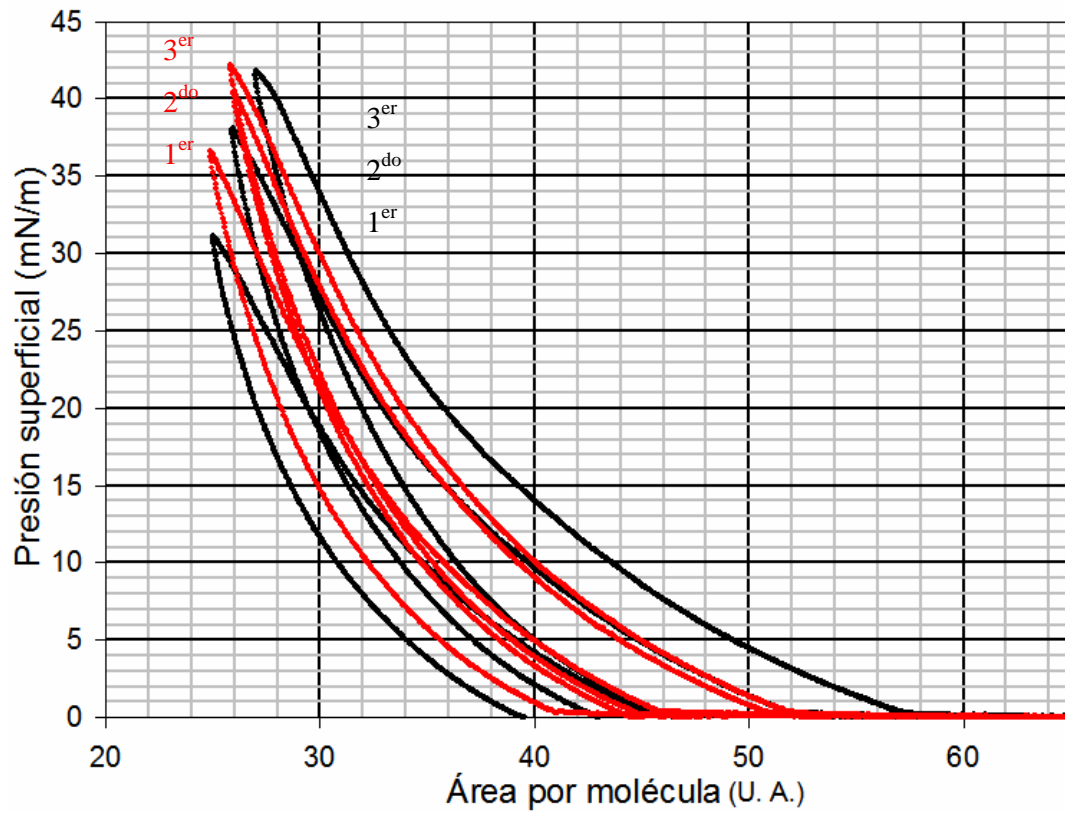
La figura 42 muestra los ciclos de compresión-expansión de las monocapas de Curosurf a dos velocidades de compresión, 20 y 30 cm<sup>2</sup>/min a 37°C. Como se puede observar la histéresis es pequeña (6mN/m de diferencia entre la curva compresión y la de expansión). Sin embargo, con cada ciclo se presenta un desplazamiento de la curva hacia áreas por molécula mayores para ambas velocidades de compresión. En la figura se indican el orden de aparición de las curvas. Las imágenes observadas en los videos de estas isotermas no mostraron diferencias substanciales en comparación con las compresiones en equilibrio.

Fue detectada la presencia de material parcialmente soluble en la composición de Curosurf, debido a que al final de cada una de las compresiones de las monocapas se observó material surfactante del otro lado de las barreras de compresión. Este comportamiento corresponde al presentado por monocapas de Gibbs.

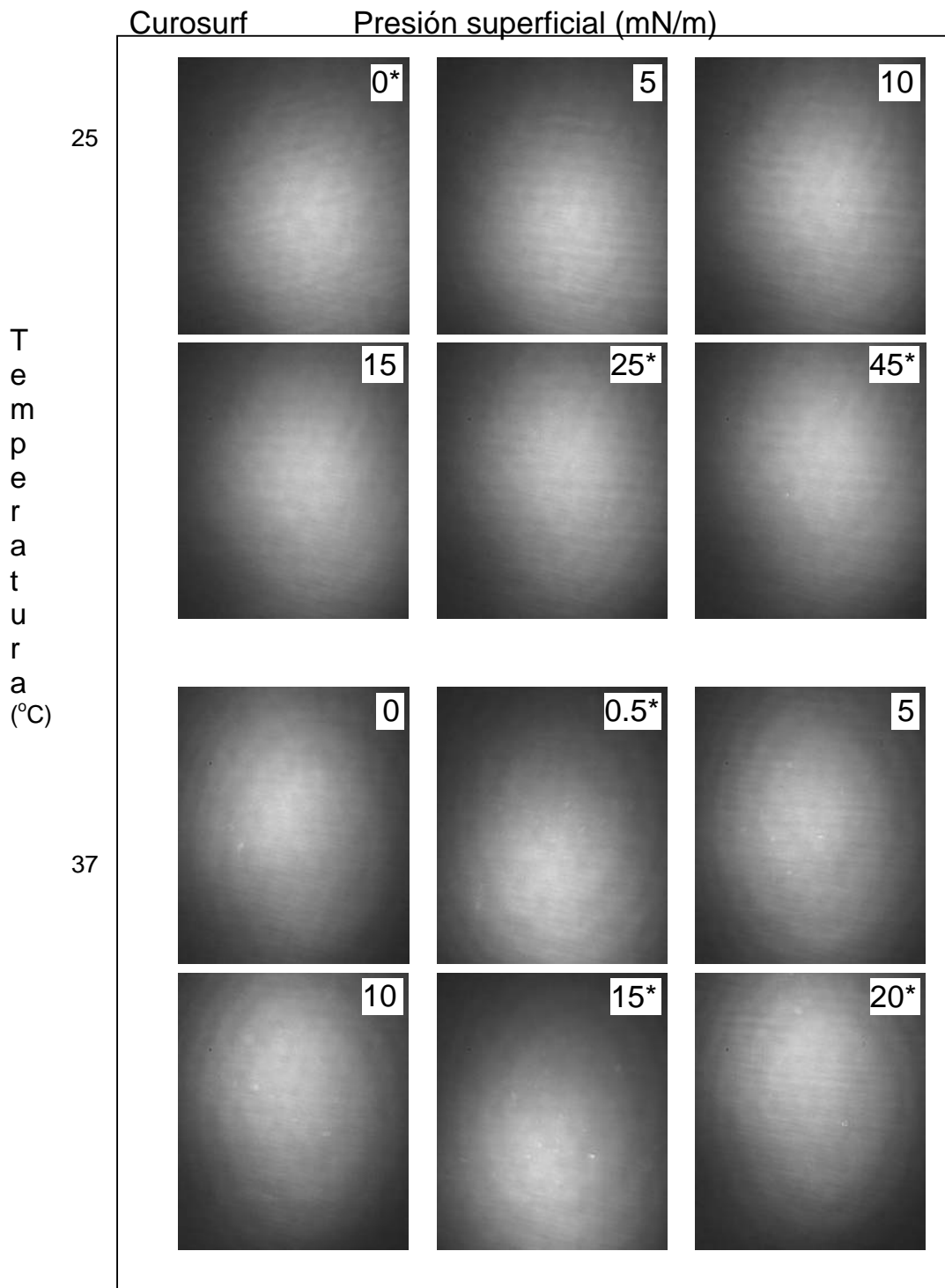
Finalmente, la figura 43 muestra las imágenes de las monocapas de Curosurf bajo compresiones de equilibrio termodinámico. Tanto en 25°C como en 37°C las imágenes de BAM son poco contrastadas, debido a la ausencia de dominios en todas presiones superficiales, a diferentes temperaturas y diferentes velocidades de compresión. A partir de las imágenes no es posible identificar el colapso de la monocapa, debido en ellas no existe la diferencia que marca la isoterma.



**Figura 41.** Isothermas de monocapas de Langmuir de Curosurf. A) Realizadas con una rapidez de compresión de  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , a diferentes temperaturas; ( $\bullet$ )  $25^\circ\text{C}$ , ( $\bullet$ )  $33^\circ\text{C}$  y ( $\blacktriangle$ )  $37^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco negro corresponden a la isoterma a  $25^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco verde corresponden a la isoterma a  $37^\circ\text{C}$ . B) Realizadas a  $37^\circ\text{C}$  a diferentes velocidades de compresión; ( $\bullet$ )  $10\text{cm}^2/\text{min.}$  y ( $\bullet$ )  $90\text{cm}^2/\text{min.}$



**Figura 42.** Ciclos de compresión isotérmica de Curosurf realizados a 37°C y diferentes velocidades de compresión; (●) 20cm<sup>2</sup>/min. y (●) 30cm<sup>2</sup>/min. Los señalamientos 1<sup>er</sup>, 2<sup>do</sup> y 3<sup>er</sup> indican en cada caso el orden de aparición de cada uno de los ciclos de compresión.



**Figura 43.** Imágenes de BAM de monocapas de Curosurf. Los números dentro de las imágenes indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma.



#### **iv. Curosurf sin proteínas (origen porcino)**

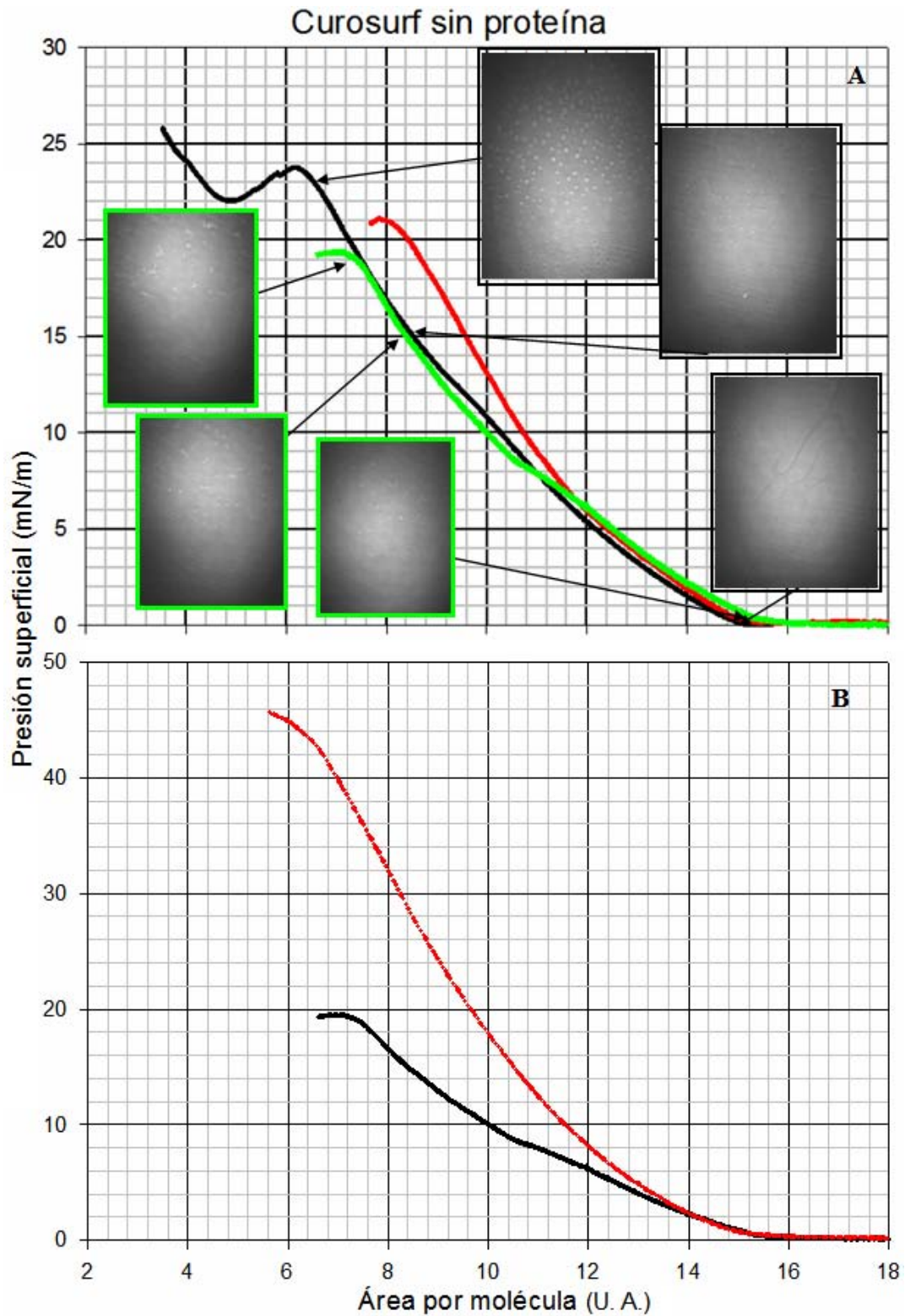
La figura 44A muestra el efecto de la temperatura sobre las monocapas de Curosurf sin proteínas en compresión en equilibrio ( $10\text{cm}^2/\text{min}$ ). Curosurf sin proteínas colapsó a presiones superficiales alrededor  $22\text{mN/m}$  para todos los casos. Las imágenes de BAM muestran la aparición de dominios muy brillantes. La aparición de éstos es difícil de precisar en algún punto de la isoterma. Se observa que a bajas temperaturas no existen dominios al inicio de la compresión, pues éstos aparecen y aumentan su intensidad conforme se realiza la misma. A temperatura de relevancia fisiológica, los dominios de fase condensada existen en la monocapa desde el inicio de la compresión, aumentando su intensidad durante el transcurso del experimento.

La figura 44B muestra el efecto de la velocidad de compresión sobre una monocapa de Curosurf sin proteína a  $37^\circ\text{C}$ . La compresión fuera de equilibrio ( $90\text{cm}^2/\text{min}$ ) presentó una menor compresibilidad, alcanzando una presión superficial de  $44\text{mN/m}$  en áreas apenas menores en las que se presentó el colapso en el caso de equilibrio.

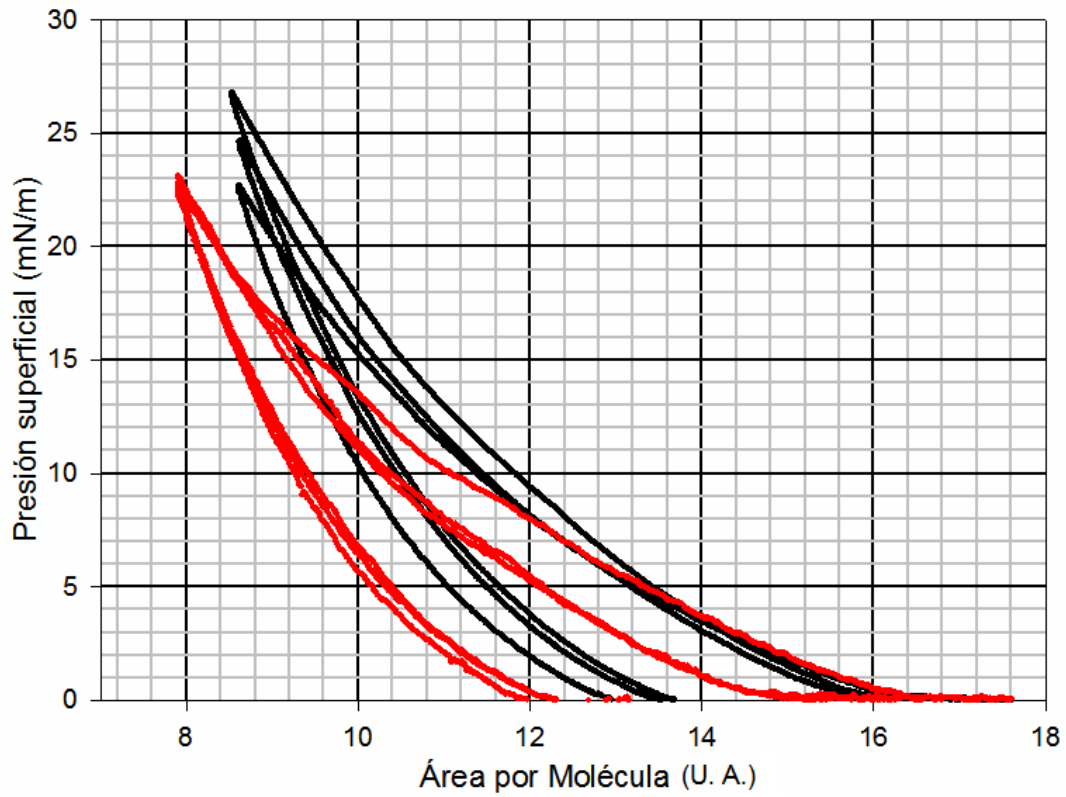
La figura 45 muestra los ciclos de compresión de monocapas de Curosurf sin proteínas a dos velocidades de compresión,  $20$  y  $30\text{cm}^2/\text{min}$  a  $37^\circ\text{C}$ . Como se puede observar, las histéresis no son mucho mayores a las encontradas en el caso de Curosurf con proteína. Las imágenes observadas en los videos de estas isotermas no mostraron diferencias substanciales en comparación con las compresiones en equilibrio.

Se observó la presencia de material parcialmente soluble en la composición de Curosurf sin proteínas debido a que al final de cada una de las compresiones de las monocapas se logró observar material surfactante del otro lado de las barreras de compresión. Este comportamiento corresponde al presentado por monocapas de Gibbs.

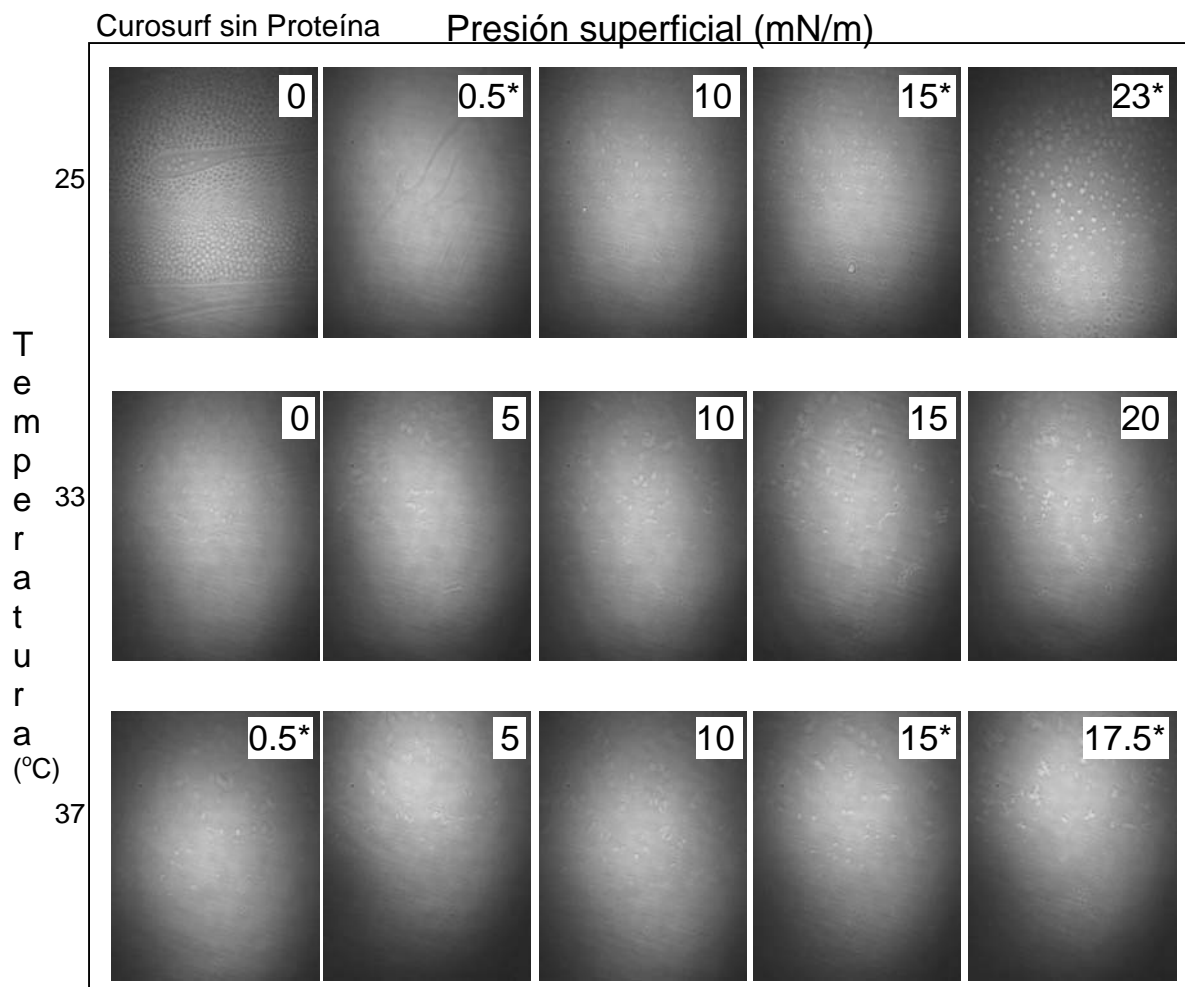
La figura 46 muestra las imágenes de las monocapas de Curosurf sin proteínas bajo compresiones de equilibrio termodinámico ( $10\text{cm}^2/\text{min}$ ). A  $25^\circ\text{C}$ , en el inicio de la compresión, se observa zonas de coexistencia líquido expandido y gas. Cuando la fase gaseosa ha desaparecido, en aproximadamente  $1\text{mN/m}$ , aparecen dominios de fase condensada que crecen en número a medida que aumenta la presión superficial. A  $33^\circ\text{C}$  y  $37^\circ\text{C}$  el comportamiento es similar; la monocapa presenta desde el inicio pequeños dominios, que durante el transcurso de la compresión aumentan en número e intensidad, pero no en tamaño. Al final de compresión la imagen no es densamente poblada por dominios, como ocurre a  $25^\circ\text{C}$ . Además, los dominios son amorfos en las temperaturas de  $33^\circ\text{C}$  y  $37^\circ\text{C}$ . A partir de las imágenes no es posible identificar el colapso de la monocapa, debido en ellas no existe la diferencia que marca la isoterma.



**Figura 44.** Isothermas de monocapas de Langmuir de Curosurf sin proteína. A) Realizadas con una rapidez de compresión de  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , a diferentes temperaturas; (●)  $25^\circ\text{C}$ , (●)  $33^\circ\text{C}$  y (▲)  $37^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco negro corresponden a la isoterma a  $25^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco verde corresponden a la isoterma a  $37^\circ\text{C}$ . B) Realizadas a  $37^\circ\text{C}$  a diferentes velocidades de compresión; (●)  $10\text{cm}^2/\text{min.}$  y (●)  $90\text{cm}^2/\text{min.}$



**Figura 45.** Ciclos de compresión isotérmica de Curosurf sin proteína realizados a 37°C y diferentes velocidades de compresión; (●) 20cm<sup>2</sup>/min. y (●) 30cm<sup>2</sup>/min.



**Figura 46.** Imágenes de BAM de monocapas de Curosurf sin proteína. Los números dentro de las imágenes indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma.

### 3.4 Discusión surfactantes terapéuticos naturales

Curosurf es considerado en la literatura el surfactante pulmonar terapéutico de mayor eficiencia en comparación con Survanta [17, 33, 34, 35, 36]. Nuestros resultados muestran un par diferencias substanciales entre los dos surfactantes comerciales. La primera consiste en que Curosurf a 25°C en compresión cuasi-estática, alcanzó valores de presión superficial de 48mN/m, mientras Survanta en las mismas condiciones alcanzó valores alrededor de los 28mN/m. La segunda diferencia consiste en Curosurf no presentó dominios de fase condensada ante ninguna de las circunstancias evaluadas, mientras que Survanta si los mostró. En consecuencia, quizá las fases condensadas no son de vital importancia en la función del surfactante pulmonar.

Por otro lado, Curosurf y Survanta a 37°C en compresiones rápidas ( $90 \text{ \AA}^2/\text{molécula}$ ) alcanzaron la misma presión superficial, además de mostrar mesetas en valores de presión superficial similares a los reportados por otros grupos [19, 34, 35]. Tal presión superficial es considerada como límite mínimo de presión superficial que se alcanza en los alvéolos [4].

La única diferencia existente entre las muestras sin proteínas de Survanta y Curosurf es la intensidad de los dominios brillantes, siendo más intensos los dominios de Survanta. Considerando que la intensidad de los dominios depende, entre otras cosas, de su espesor, esto sugiere que tales dominios brillantes representen la formación de dominios de fosfolípidos con colas dispuestas verticalmente.

La diferencia fundamental entre los surfactantes con proteína y sin proteína, es la formación de los dominios de gran intensidad formados en las muestras sin proteína. Quizá, la función de las proteínas sea impedir la formación de dominios. Sin embargo, la respuesta superficial de la monocapa en compresión rápida ( $90 \text{ \AA}^2/\text{mole}$ ) no se vio afectada por la ausencia de proteínas. Todas las muestras alcanzaron valores superiores a los 45mN/m.

Otra diferencia entre los surfactantes con proteína y sin proteína, es que en los primeros, se observó un desplazamiento de la isoterma hacia áreas por molécula mayores con cada ciclo de expansión-compresión. Una explicación resulta de pensar en la continua adsorción a la interfase de moléculas disueltas en la subfase, durante la realización de los ciclos de expansión-compresión. Lo anterior, tiene sustento en que nuestras observaciones evidenciaron la existencia de sustancias solubles en Survanta y Curosurf, esta observación ha sido previamente reportada [36]. Sin embargo, esta posibilidad es limitada si se considera que, los experimentos comenzaban hasta que se tenía certeza de que la presión superficial no modificaba su valor en tiempos considerablemente grandes (20 minutos después de realizado el depósito de la muestra). Por otro lado, han sido reportado que la respuesta superficial de los surfactantes terapéuticos naturales depende de la concentración [25], lo cual refuerza la posible presencia de una monocapa de Gibbs.

En conclusión:

1. Las monocapas mostraron dependencia del aumento en temperatura. A 37°C las monocapas en compresión de equilibrio alcanzaron valores de presión

superficial muy por debajo de los 72mN/m, que es el valor esperado en términos fisiológicos.

2. El comportamiento superficial de las muestras mostró dependencia de la velocidad de deformación de la monocapa. En compresión fuera de equilibrio todas las muestras lograron reducir considerablemente la presión superficial.
3. La formación de dominios moleculares de alta intensidad podría estar relacionada con la ausencia de proteínas.

### **3.5 Resultados de surfactantes naturales**

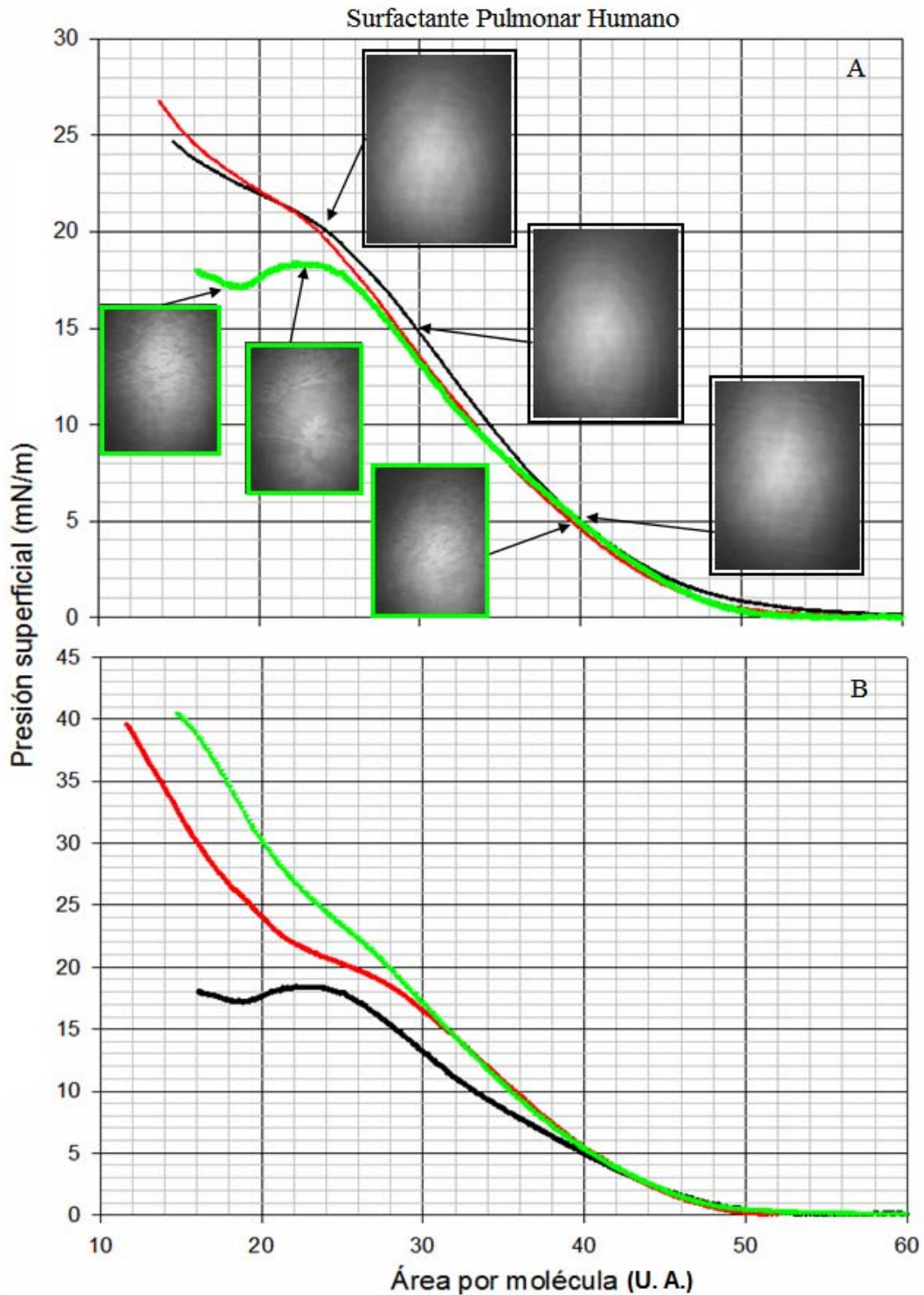
#### **i. Surfactante pulmonar humano**

En la figura 47A se presentan las isoterma de surfactante pulmonar de humano realizadas a diferentes temperaturas en condiciones de compresión cuasi-estática (10cm<sup>2</sup>/min.). En la figura es posible observar que el comportamiento cambia muy poco con la temperatura, presentándose el colapso de la monocapa alrededor de 19mN/m. Las imágenes de la monocapa a 37°C muestran al inicio de la compresión, una coexistencia de 2 fases (diferentes tonos de gris en la imagen) que aumentan su contraste conforme se reduce el área por molécula. Con el análisis del video de la compresión se identificó una gran fluidez en la fase líquido expandido. Las imágenes de la monocapa a temperaturas menores son completamente lisas, lo cual resalta la posible importancia de la temperatura en el surfactante pulmonar humano por lo menos desde el punto de vista morfológico. El comportamiento de los dominios puede apreciarse mejor en la figura 48.

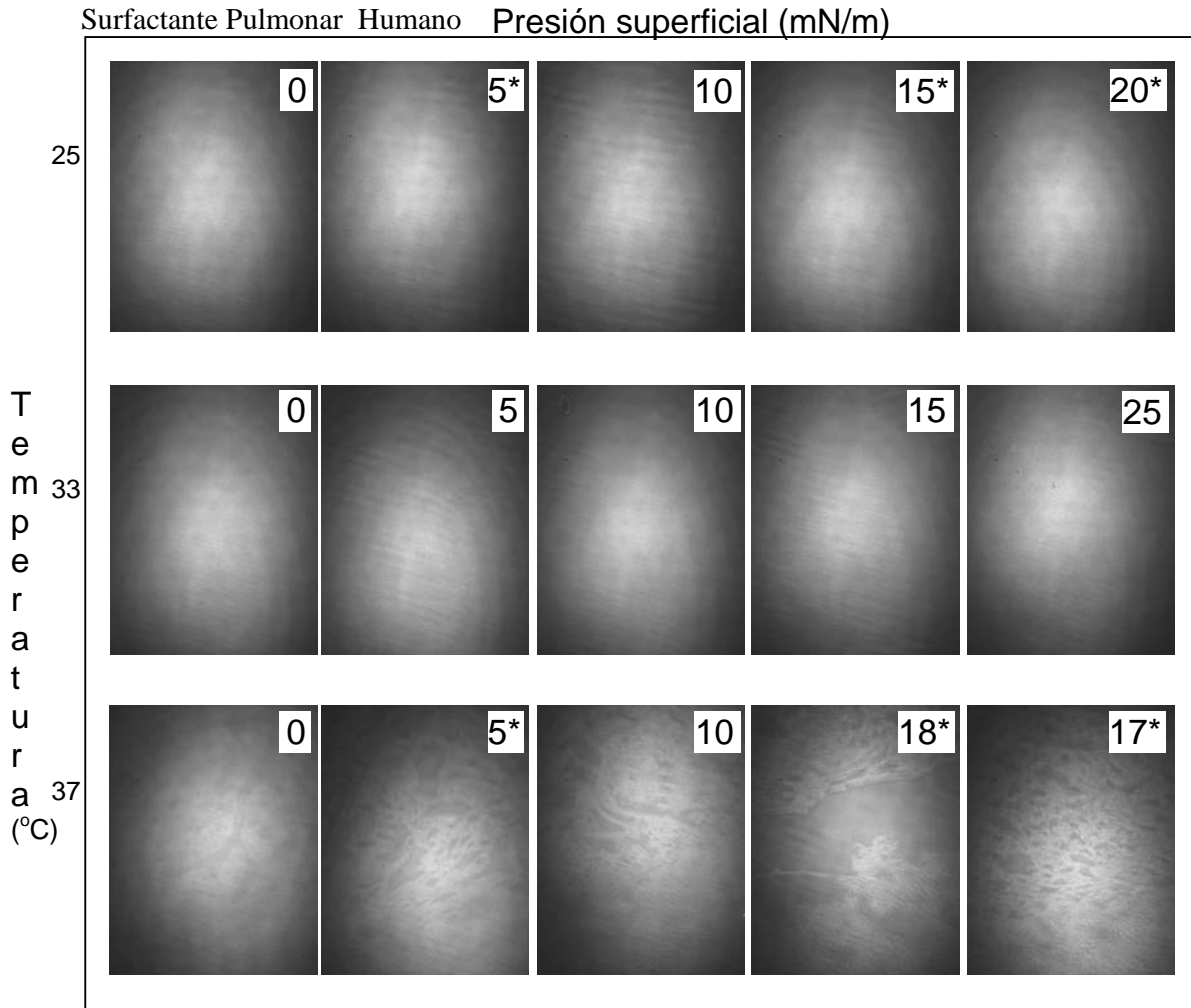
La figura 47B se muestra el efecto de comprimir de manera rápida una monocapa de surfactante pulmonar humano a 37°C. Las compresiones fuera de equilibrio (90cm<sup>2</sup>/min.) presentaron una menor compresibilidad, alcanzando presiones superficiales cercanas a los 40mN/m, en áreas apenas menores a las que se presentó el colapso en el caso de equilibrio.

Se observó la presencia de material parcialmente soluble muestra de surfactante pulmonar humano, debido a que al final de cada una de las compresiones de las monocapas se logró observar material tensoactivo al otro lado de las barreras de compresión. Este comportamiento corresponde al presentado por monocapas de Gibbs.

La figura 48 muestra imágenes de las monocapas surfactante pulmonar humano bajo compresiones en equilibrio termodinámico. A 25°C y 33°C las imágenes de la monocapa son poco contrastadas, esto debido a la ausencia de dominios en todas presiones superficiales evaluadas. Sin embargo, a 37°C las imágenes de BAM de la monocapa muestran, desde el inicio de la compresión, una coexistencia de 2 fases (diferentes tonos de gris en la imagen) que aumenta contraste conforme se reduce el área por molécula. A partir de las imágenes no es posible identificar el colapso de la monocapa, debido en ellas no existe la diferencia que marca la isoterma. Ejemplo de ello se puede observar en la serie de imágenes a 37°C. La imagen de la imagen colapsada a 17mN/m es bastante parecida a la imagen a 5mN/m.



**Figura 47.** Isotermas de monocapas de Langmuir de SP Humano. A) Realizadas con una rapidez de compresión de 10cm<sup>2</sup>/min., a diferentes temperaturas; (●) 25°C, (●) 33°C y (▲) 37°C. Imágenes con marco negro corresponden a la isoterma a 25°C. Imágenes con marco verde corresponden a la isoterma a 37°C. B) Realizadas a 37°C a diferentes velocidades de compresión; (●) 10cm<sup>2</sup>/min., (●) 45cm<sup>2</sup>/min. y (▲) 90cm<sup>2</sup>/min.



**Figura 48.** Imágenes de BAM de monocapas de SP humano. Los números dentro de las imágenes indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma.



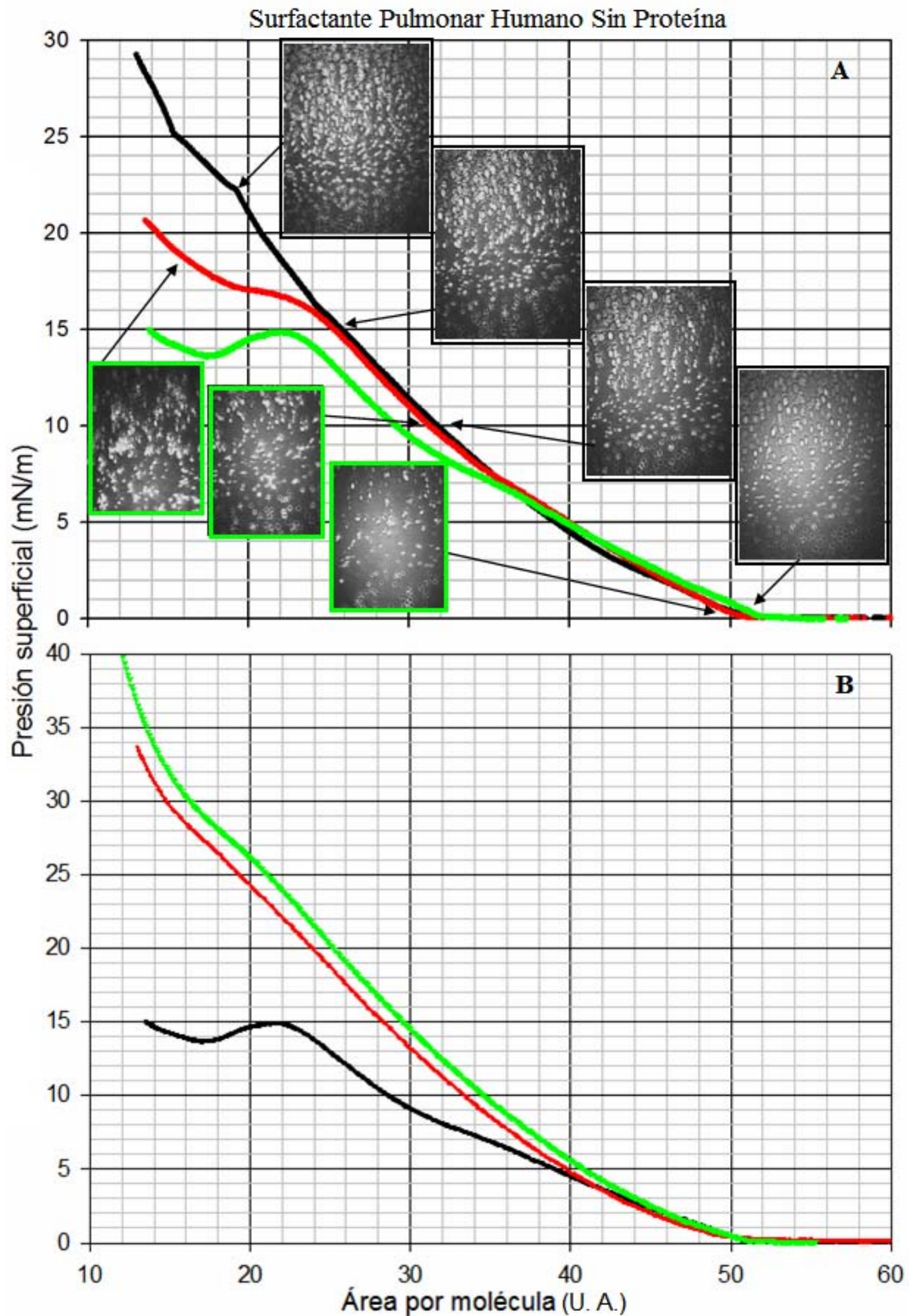
## ii. Surfactante pulmonar humano sin proteínas

El surfactante pulmonar de humano al cual se le retiraron las proteínas surfactantes, mostró ligeras modificaciones en las isotermas respecto a los cambios en la temperatura (figura 49A). En las tres isotermas mostradas se observa que existen cambios de pendiente en un área por molécula de  $20\text{\AA}^2/\text{molécula}$  (recordando que esta área por molécula es arbitraria). Este cambio de pendiente, apenas perceptible en la isoterma a  $25^\circ\text{C}$ , es bastante obvio en la isoterma a  $37^\circ\text{C}$ , en esta última indica el colapso de la monocapa. Importarte hacer notar que si se continua la compresión más allá del colapso, es posible incrementar aún más la presión superficial. Las imágenes obtenidas de las muestran la existencia de dominios en fase condensada muy brillantes, que aumentan su intensidad y densidad en la imagen a medida que aumenta la presión. El comportamiento de los dominios puede apreciarse mejor en la figura 50.

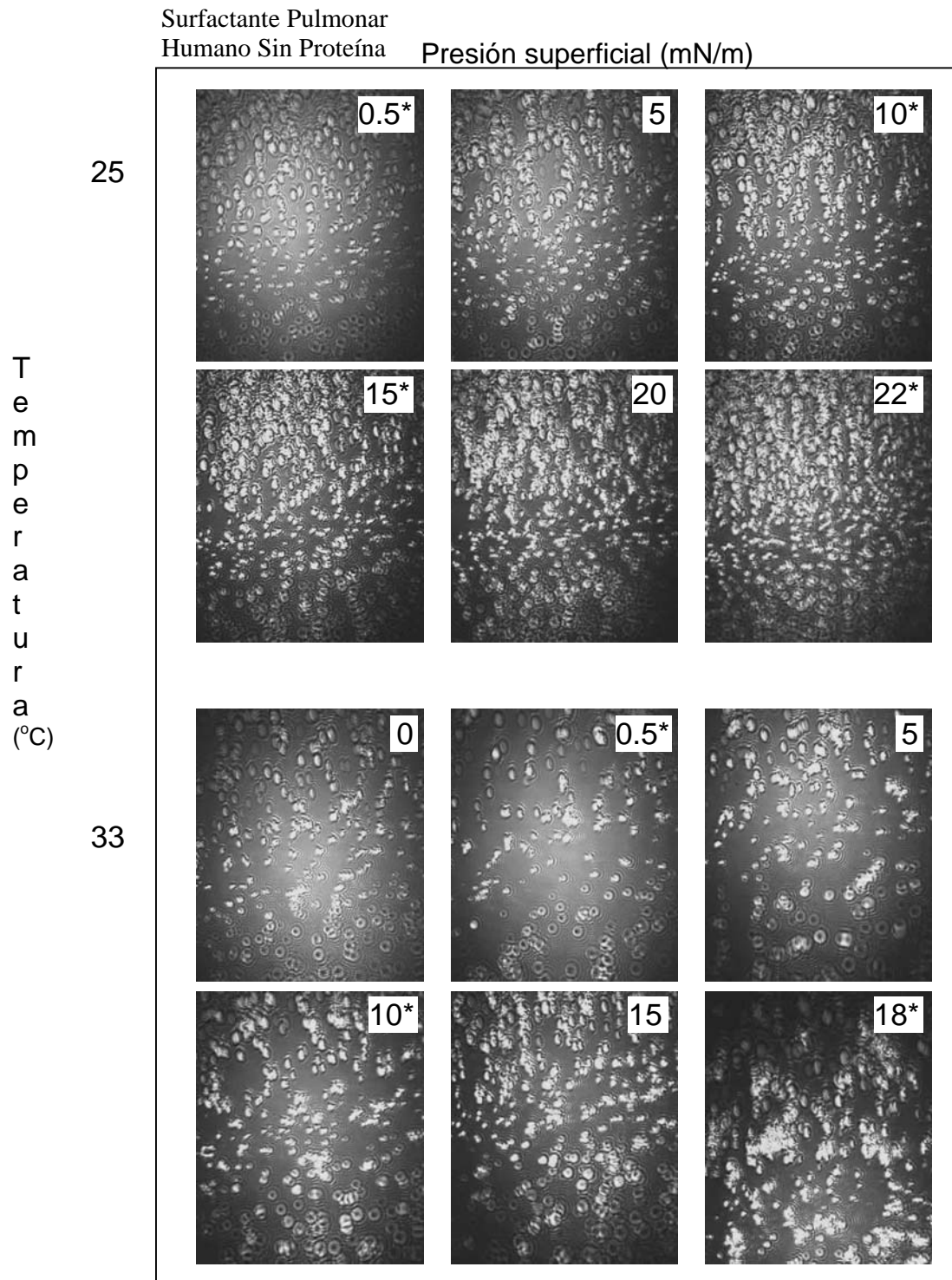
La figura 49B muestra el efecto de comprimir en condiciones fuera de equilibrio ( $90\text{cm}^2/\text{min}$ ) una monocapa de surfactante pulmonar humano a  $37^\circ\text{C}$ . Las compresiones fuera de equilibrio presentaron una menor compresibilidad, alcanzando presiones superficiales alrededor de los  $35\text{mN/m}$ , en áreas apenas menores en las que se presentó el colapso de la monocapa en equilibrio. Existen ligeros cambios de pendiente en las isotermas de compresión rápida, que corresponden con el área de colapso de la isoterma de compresión cuasi-estática.

La figura 50 presenta imágenes de las monocapas de surfactante pulmonar humano sin proteínas bajo compresiones de equilibrio termodinámico. A  $25^\circ\text{C}$  y  $33^\circ\text{C}$ , las imágenes presentan dominios en extremo brillantes, los cuales aumentan en número e intensidad conforme aumenta la tensión superficial. A partir de las imágenes no es posible identificar el colapso de la monocapa, debido en ellas no existe la diferencia que marca la isoterma.

Se observó la presencia de material parcialmente soluble en la composición de muestra de humano sin proteína, debido a que al final de cada una de las compresiones, se identificó material surfactante del otro lado de las barreras de compresión. Este comportamiento corresponde al presentado por monocapas de Gibbs.



**Figura 49.** Isothermas de monocapas de Langmuir de SP Humano sin proteína. A) Realizadas con una rapidez de compresión de  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , a diferentes temperaturas; (●)  $25^\circ\text{C}$ , (●)  $33^\circ\text{C}$  y (▲)  $37^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco negro corresponden a la isoterma a  $25^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco verde corresponden a la isoterma a  $33^\circ\text{C}$ . B) Realizadas a  $37^\circ\text{C}$  a diferentes velocidades de compresión; (●)  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , (●)  $45\text{cm}^2/\text{min.}$  y (▲)  $90\text{cm}^2/\text{min.}$



**Figura 50.** Imágenes de BAM de monocapas de SP humano sin proteína. Los números dentro de las imágenes indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma.

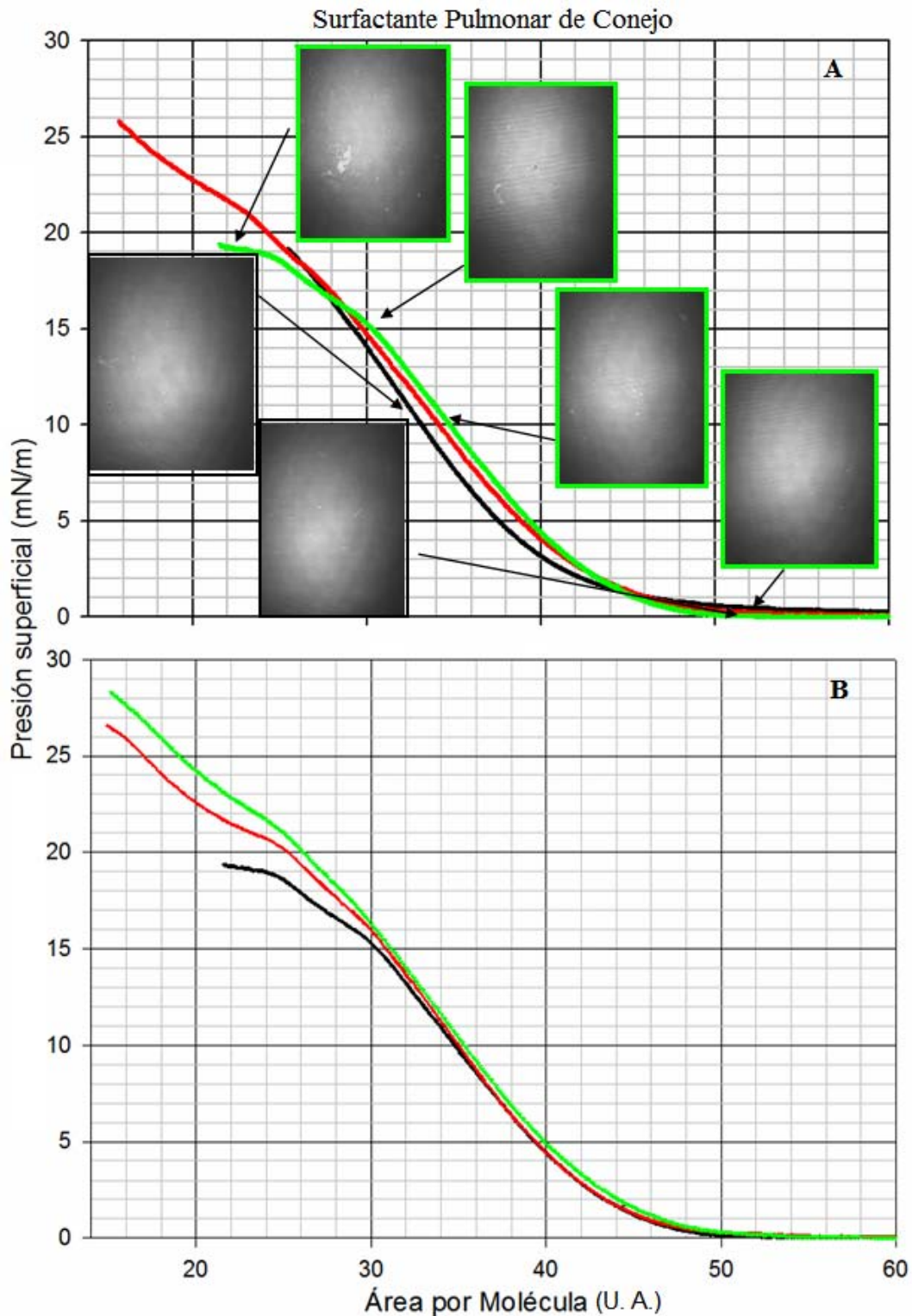
### **iii. Surfactante pulmonar de conejo**

La figura 51A muestra isotermas de surfactante pulmonar de conejo realizadas a diferentes temperaturas en condiciones de compresión cuasi-estática. Se observan ligeros cambios con la temperatura. Existen pequeñas modificaciones en pendiente en aproximadamente 20mN/m para todas las temperaturas. Debido a que las imágenes de BAM de la monocapa a cualquier temperatura y a cualquier presión muestran imágenes completamente lisas, no fue posible determinar si estos ligeros cambios de pendiente están relacionados con el colapso de la monocapa.

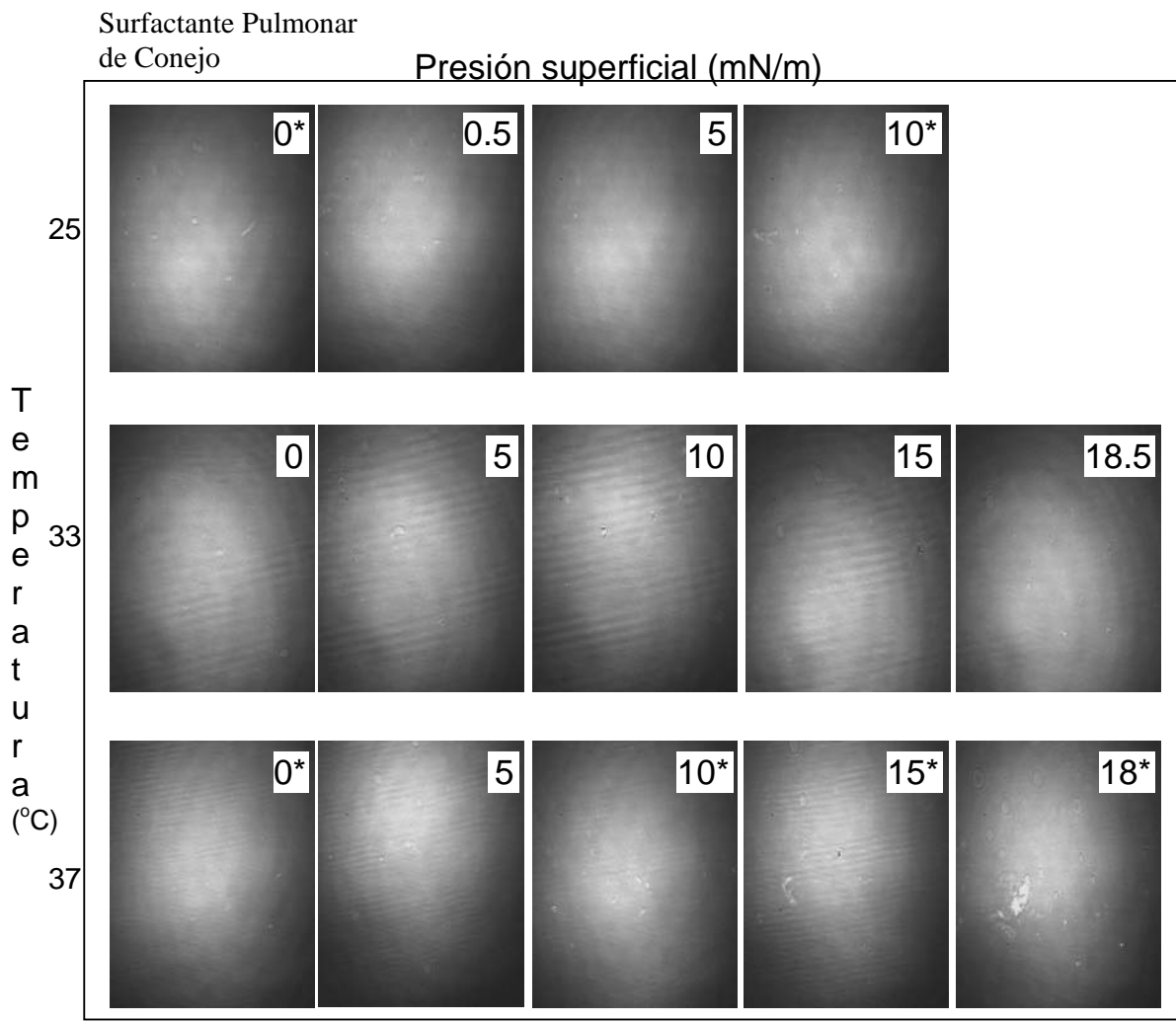
La figura 51B muestra el efecto de comprimir de manera rápida una monocapa de surfactante pulmonar de conejo a 37°C. Las compresiones fuera de equilibrio resultaron bastante parecidas a las compresiones de equilibrio. Las isotermas de compresión rápida reproducen de manera bastante fiel los cambios de pendiente propios de la isoterma en equilibrio.

Se observó la presencia de material parcialmente soluble en la composición de muestra de conejo, debido a que al final de cada una de las compresiones se logró identificar, material surfactante del otro lado de las barreras de compresión. Este comportamiento corresponde al presentado por monocapas de Gibbs.

La figura 52 muestra imágenes obtenidas de las monocapas hechas de surfactante pulmonar de conejo bajo compresiones de equilibrio termodinámico. Las imágenes de BAM son poco contrastadas, debido a la ausencia de dominios en todas las presiones y temperaturas evaluadas.



**Figura 51.** Isothermas de monocapas de Langmuir de SP de conejo. A) Realizadas con una rapidez de compresión de  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , a diferentes temperaturas; (●)  $25^\circ\text{C}$ , (●)  $33^\circ\text{C}$  y (▲)  $37^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco negro corresponden a la isoterma a  $25^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco verde corresponden a la isoterma a  $37^\circ\text{C}$ . B) Realizadas a  $37^\circ\text{C}$  a diferentes velocidades de compresión; (●)  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , (●)  $45\text{cm}^2/\text{min.}$  y (▲)  $90\text{cm}^2/\text{min.}$



**Figura 52.** Imágenes de BAM de monocapas de SP de conejo. Los números dentro de las imágenes indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma.

#### **iv. Surfactante pulmonar de conejo sin proteínas**

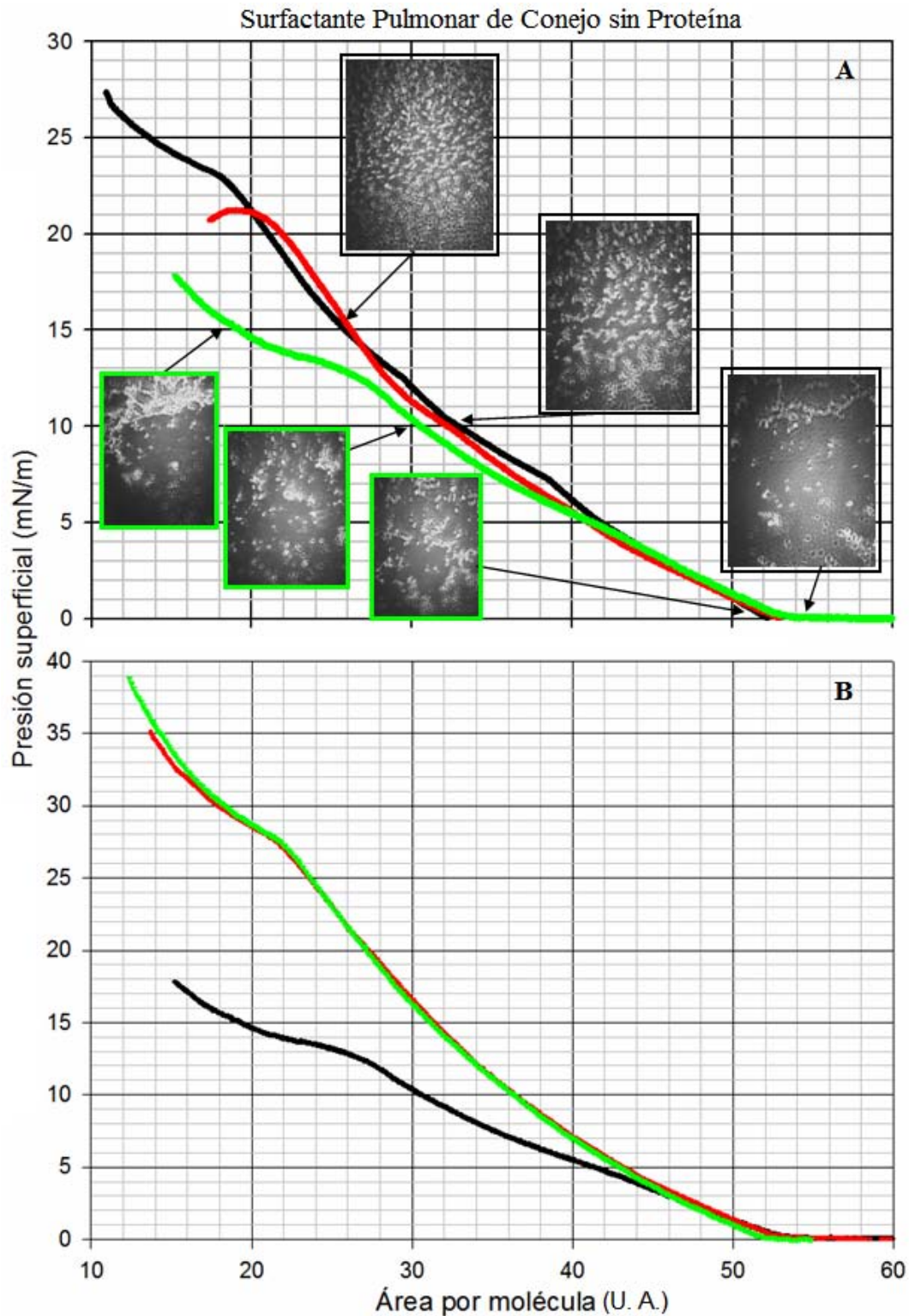
La figura 53A presenta isotermas de surfactante pulmonar de conejo sin proteínas realizadas a diferentes temperaturas en condiciones de compresión cuasi-estática. Se observan ligeros cambios con la temperatura. La isoterma a 33°C colapsa a en  $20\text{\AA}^2/\text{molécula}$ . La isoterma a 37°C presenta el cambio de pendiente en un área por molécula muy parecida al área de colapso a 33°C. Por su parte, la isoterma a 25°C no muestra ningún indicio de colapso. Las imágenes de BAM obtenidas de las monocapas de este surfactante muestra la existencia de dominios en fase condensada, muy brillantes que aumentan su intensidad y densidad en la imagen, a medida que aumenta la presión superficial.

La figura 53B muestra el efecto de comprimir de manera rápida una monocapa de surfactante pulmonar humano a 37°C. Las compresiones fuera de equilibrio presentaron una menor compresibilidad, alcanzando presiones superficiales considerablemente superiores a la alcanzada en por la isoterma en equilibrio. Resulta interesante que el cambio de pendiente en las isotermas fuera de equilibrio a 37°C, corresponda en área con el colapso de las isotermas en equilibrio a 25°C y 35°C.

La figura 54 es el resumen de las imágenes obtenidas de las monocapas de surfactante pulmonar de conejo sin proteínas bajo compresiones de equilibrio termodinámico. En todas temperaturas evaluadas las imágenes de BAM, presentan dominios muy brillantes, los cuales aumentan en número e intensidad conforme aumenta la presión superficial. Estos dominios parecen organizarse en cúmulos más grandes conforme se realiza la compresión. A partir de las imágenes no es posible identificar el colapso de la monocapa, debido en ellas no existe la diferencia que marca la isoterma.

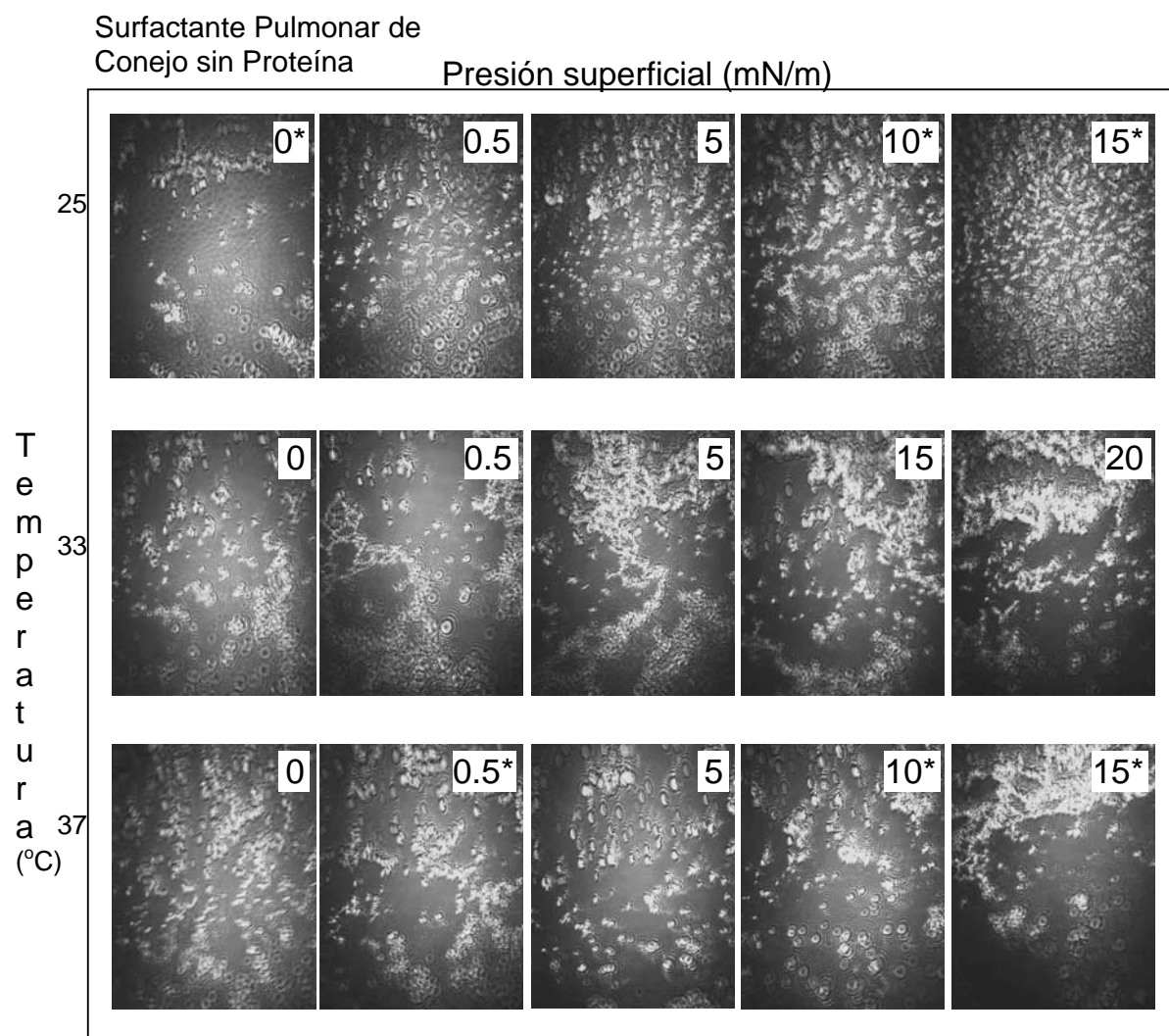
Se observó la presencia de material parcialmente soluble en la composición del surfactante pulmonar humano sin proteínas debido a que al final de cada una de las compresiones de las monocapas se logró identificar material surfactante del otro lado de las barreras de compresión. Este comportamiento corresponde al presentado por monocapas de Gibbs.





**Figura 53.** Isothermas de monocapas de Langmuir de SP de conejo sin proteína. A) Realizadas con una rapidez de compresión de  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , a diferentes temperaturas; (●)  $25^\circ\text{C}$ , (●)  $33^\circ\text{C}$  y (▲)  $37^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco negro corresponden a la isoterma a  $25^\circ\text{C}$ . Imágenes con marco verde corresponden a la isoterma a  $37^\circ\text{C}$ . B) Realizadas a  $37^\circ\text{C}$  a diferentes velocidades de compresión; (●)  $10\text{cm}^2/\text{min.}$ , (●)  $45\text{cm}^2/\text{min.}$  y (▲)  $90\text{cm}^2/\text{min.}$





**Figura 54.** Imágenes de BAM de monocapas de SP de conejo sin proteína. Los números dentro de las imágenes indican la presión superficial en mN/m a la cual se tomó la imagen. (\*)imagen utilizada en ilustración de isoterma

### 3.6 Discusión surfactantes pulmonares naturales

Las imágenes muestran la presencia de dominios extremadamente brillantes en los surfactantes pulmonares a los cuales les fue retirada la proteína. Estos dominios brillantes tienden, en ambos casos, a formar conglomerados con el aumento en la temperatura. Posiblemente, la presencia de las proteínas en la mezcla tensoactiva, inhibe la formación de tales dominios. Sin embargo, la presencia de estos dominios, debe involucrar a una o varias moléculas diferentes a las consideradas para la composición de nuestras mezclas sintéticas, que se evaluaron en este trabajo. Lo anterior, debido a que en nuestras mezclas, la ausencia de proteínas no produjo la formación de tales dominios brillantes.

Los surfactantes naturales con proteína y sin proteína modifican su comportamiento ante las compresiones fuera de equilibrio ( $90\text{cm}^2/\text{min}$ ), aunque esta modificación no es tan importante, como las observadas en las demás mezclas evaluadas en este trabajo.

El cambio en la temperatura afecta muy poco a las monocapas de surfactantes naturales, excepto para el caso a  $37^\circ\text{C}$  del surfactante pulmonar de humano, que mostró dominios inusuales a los observados a lo largo de todo este trabajo. Sin embargo, ante ninguna de las circunstancias lograron alcanzar valores de presión superficial cercanos a los  $72\text{mN/m}$ .

Estos resultados no coinciden con los resultados de reportados para surfactante pulmonar de humano adulto (recordando que este trabajo se utiliza surfactante pulmonar de humano neonato) [37]. No existen estudios de monocapas de Langmuir de surfactante pulmonar conejo pero si cabra [32], aunque de igual manera los resultados no corresponden. En la literatura se reporta la existencia de una meseta cercana a los  $50\text{mN/m}$ . Una hipótesis que pudiera explicar la falta de relación con la literatura es que, nuestras muestras eran poco concentradas, y que se debió de haber comprimido mucho más la monocapa para observar dicha meseta.

En conclusión:

1. Las muestras de surfactantes pulmonares naturales mostraron evidencias de contener material soluble en la subfase. Lo cual hace posible la formación de monocapas de Gibbs.
2. La ausencia de proteínas esta relacionada con la presencia de dominios en las monocapas de los surfactantes pulmonares naturales.
3. El comportamiento superficial de las muestras mostró poca dependencia de la velocidad de deformación de la monocapa (en comparación con lo observado en las otras muestras del estudio).

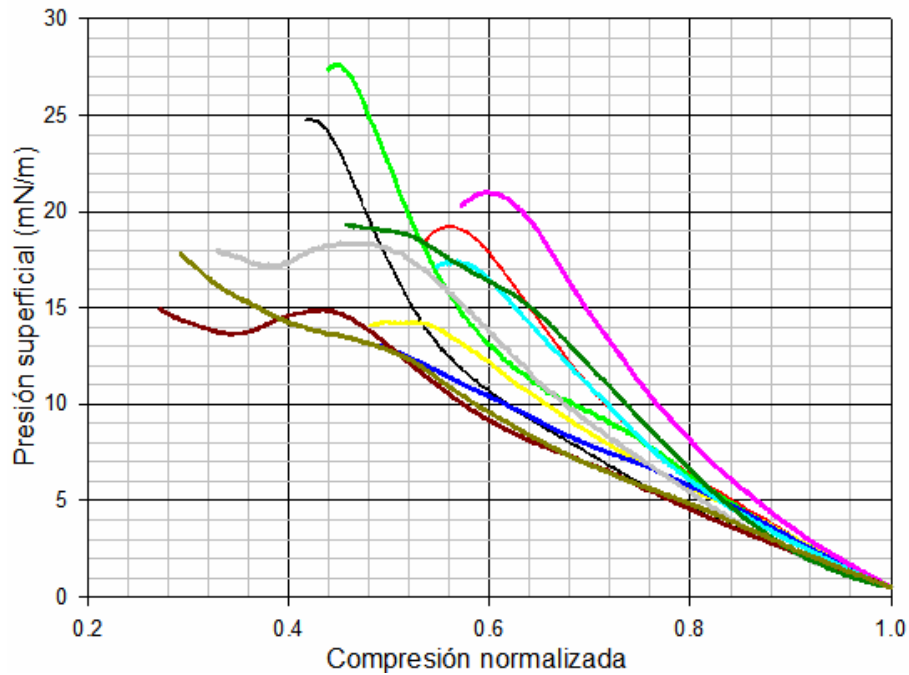
### 3.7 Comparación entre muestras

En la figura 55 se muestran curvas isotérmicas de las 11 muestras evaluadas en este estudio a 37°C en compresión cuasi-estática. Para lograr realizar la comparación entre las 11 muestras, se normalizó la compresión de las monocapas. El valor de área utilizado para la normalización, fue el área por molécula en la cual cada una de las isotermas presentaba una presión superficial de 0.5mN/m. De esta manera el eje de las abscisas se interpreta como un porcentaje de la reducción del área por molécula.

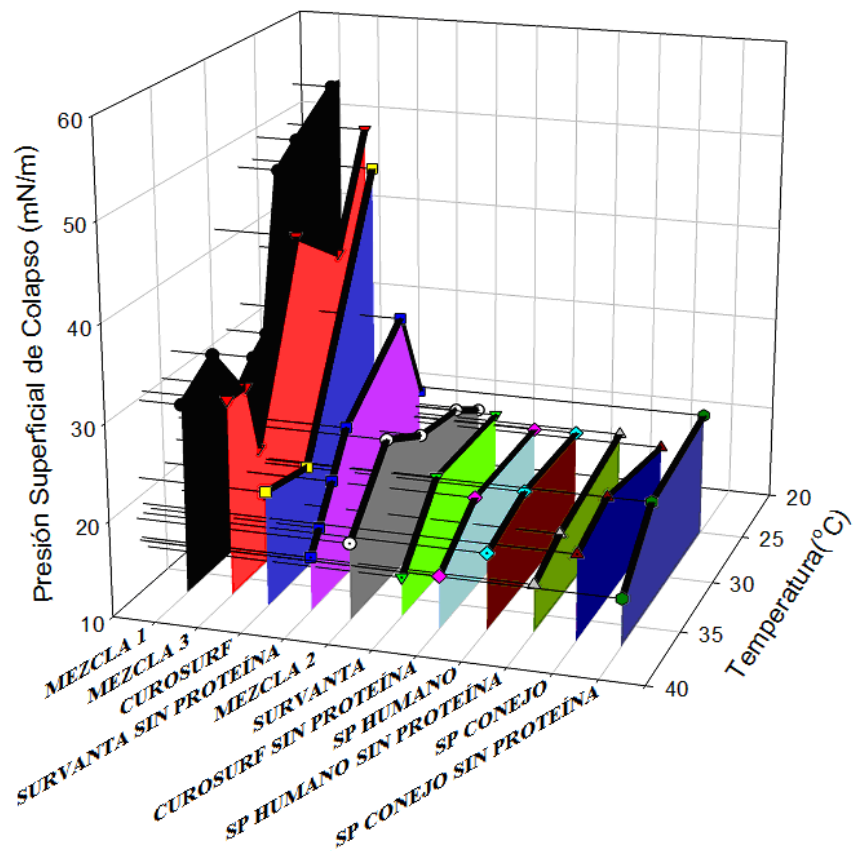
Todos los colapsos ocurren entre el 45 y 60% de la compresión. La cota inferior correspondiente a los colapsos de los SP naturales sin proteína, mientras que la cota superior corresponde a Curosurf. Por otro lado, las presiones superficiales de colapso  $\Pi_c$ , se encuentran entre 15 y 28mN/m. Desde esta perspectiva, Curosurf muestra un buen comportamiento, debido a que la presión superficial incrementa más rápido su valor ante la reducción del área. Bajo este mismo criterio, el SP humano sin proteína y el SP de conejo sin proteína son los peores. Resulta preocupante el pensar que en estos intervalos (13mN/m en presión superficial y 15% de compresión), debe de existir diferencias de carácter vital.

En la figura 56 se muestran una grafica de la presiones de colapso de las 11 muestras con respecto de la temperatura. Los resultados muestran que, aunque a bajas temperaturas algunas muestras logran alcanzar altos valores de presión superficial, a temperaturas de relevancia fisiológica todos son bastante similares al colapsar a bajas presiones superficiales. Resulta interesante que Survanta es más afectado por la temperatura cuando las proteínas están ausentes. Se observa que en la mezcla 2, la presencia de colesterol, afecta considerablemente la habilidad de la mezcla de lípidos para alcanzar altas tensiones superficiales durante la compresión.

La figura 57 muestra una tabla donde se comparan los valores la presión superficial de colapso de las diferentes monocapas, en condiciones de compresión cuasi-estática y no cuasi-estática. A 37°C en condiciones de equilibrio, no existe gran diferencia en las presiones superficiales de colapso ( $\Pi_c$ ) entre los diferentes surfactantes, teniendo además valores muy por debajo de lo esperado (según el requerimiento fisiológico de alcanzara valores de 72mN/m). Cuando la compresión se realiza a 90cm<sup>2</sup>/min, la  $\Pi_c$  en algunos casos incrementan su valor considerablemente. Se debe hacer hincapié en que exceptuando los SP naturales (humano neonato y conejo) el valor de  $\Pi_c$  esta alrededor de los 48mN/m, presentando una meseta en ciertos casos. Los SP naturales con proteína son los que presentan menores respuestas a la compresión rápida.



**Figura 55.** Grafica comparativa. Isotermas de las 11 muestras realizadas en condiciones de equilibrio a 37°C. (●) Mezcla 1, (●) Mezcla 2, (▲) Mezcla 3, (▼) Survanta, (■) Survanta sin proteína, (■) Curosurf, (◆) Curosurf sin proteína, (◆) Humano, (▲) Humano sin proteína, (▼) Conejo y (●) conejo sin proteína.



**Figura 56.** Presión superficial de colapso en condiciones de equilibrio (10cm<sup>2</sup>/min). Aunque a 25°C algunos de las muestras evaluadas alcanzan altas presiones de colapso, a 37°C ninguna de las monocapas logra reducir la tensión superficial a valores cercanos a los 72mN/m.

	HN	HN (sin)	C	C (sin)	S	S (sin)	Cu	Cu (sin)	M1	M2	M3
$\Pi_C$ (mN/m) A 10cm <sup>2</sup> /min	18	15	19	13	14	16	22	16	25	19	30
$\Pi_C$ (mN/m) A 90cm <sup>2</sup> /min	24	26	21	28	47	48	44	44	48	50	48
Incremento (%)	33	73	11	115	235	200	100	175	92	163	60

**Figura 57.** La tabla muestra las presiones superficiales promedio de colapso alcanzado por las diferentes muestras en condiciones de equilibrio 10 cm<sup>2</sup>/min. y en condiciones fuera de equilibrio 90 cm<sup>2</sup>/min. a 37°C de temperatura. También se muestra el incremento porcentual de los valores de colapso debido al aumento de la rapidez de compresión. Notación:  $\Pi_C$ =presión superficial de colapso, (sin)=sin proteína, HN=Humano Neonato, C=Conejo, S=Survanta, Cu=Curosurf, M1=Mezcla 1, M2=Mezcla 2 y M3=Mezcla 3.

### 3.8 Discusión General

El modelo clásico del mecanismo de acción del surfactante pulmonar, dicta que éste después de ser excretado por los neumocitos tipo II, se adsorbe a la interfase aire/agua para reducir la tensión superficial, de 72mN/m a 30mN/m. Cuando el alvéolo reduce su área durante la exhalación, la monocapa de surfactante se comprime, reduciendo la tensión superficial hasta llegar a valores cercanos a 0mN/m [14]. El modelo supone que en esta compresión ocurre un proceso de expulsión selectiva (squeeze-out) de los componentes del surfactante distintos al DPPC. La aparición de estructuras 3-dim (vesículas asociadas con la interfase, o pliegues de la monocapa coexistiendo con capas planas) durante la compresión, ha sido interpretado como el surgimiento de depósitos moleculares, en donde las proteínas surfactantes tiene un papel principal, al servir como enlace entre éstas estructuras y la monocapa de la interfase [1, 3, 19].

Los 30mN/m en tensión superficial (que indica el modelo clásico) corresponden a valores alrededor de  $\Pi=45$ mN/m en presión superficial. Este valor es encontrado en este estudio cuando la compresión se realiza a altas velocidades (Figura 55), además de encontrarse frecuentemente en la literatura [1, 2, 3, 4, 19, 32, 33, 35, 36, 37, 38]. En nuestro caso la presión superficial de  $\Pi=45$ mN/m se alcanza cuando la monocapa ya ha colapsado. El colapso de la monocapa impone una complicación, debido a que las estructuras colapsadas son usualmente mecánicamente inestables, y en consecuencia no pueden resistir un posterior incremento en la presión [4]. Sin embargo, algunos de nuestros resultados muestran que es posible que la presión lateral aumente si la compresión continúa después de que el colapso ha sido alcanzado. Ejemplo de ello se observa en la figura 47, correspondiente a isotermas de SP de humano. Ésta peculiaridad también se cumple para muestras sin proteínas (ver figura 49 correspondiente a isotermas de SP de humano sin proteína). Por lo tanto, no es posible señalar a las proteínas como responsables de la estabilidad de la monocapa colapsada. Según lo observado en este trabajo, las proteínas son responsables de evitar la formación de dominios de fase condensada, excepto para monocapas de surfactante pulmonar humano a 37°C. Esta propuesta de la función de las proteínas no ha sido reportada.

El modelo clásico indica que la meseta en  $\Pi \approx 45 \text{ mN/m}$  es el lugar donde ocurre exclusión selectiva de los componentes que no logran formar fases condensadas. En nuestras mezclas 1 y 3, en el SP humano y en Survanta a  $37^\circ\text{C}$ , las imágenes de BAM muestran una monocapa con un gran porcentaje de fase condensada, al momento del colapso. Esta observación también es hecha por Alonso [19], en monocapas de Survanta a  $25^\circ\text{C}$  en compresión fuera de equilibrio. Sin embargo, Curosurf en ningún momento presentó dominios de fase condensada. Por tanto, no es posible afirmar que las fases condensadas, que justifican el modelo del squeeze-out, tengan primordial importancia en el mecanismo fisiológico del SP. Además, la exclusión selectiva (ó colapso selectivo) de los componentes de la mezcla surfactante a presiones laterales superiores a  $\Pi \approx 45 \text{ mN/m}$  es poco probable, debido a que se han reportado evidencias de que las fases condensadas no están compuestas únicamente por DPPC [4, 19, 31, 33].

En las figuras 26A, 29A, 32A, 35A, 41A, 47A y 49A, se observan los casos evidentes del efecto de la temperatura sobre el comportamiento superficial de la monocapa. De manera general, el aumento de la temperatura produce un descenso presión de colapso y un aumento en la compresibilidad. Alonso [19] reporta que no hay diferencias substanciales en monocapas de Survanta en el intervalo de  $25^\circ\text{C}$  a  $37^\circ\text{C}$ , en compresiones fuera de equilibrio. Lo observado en este trabajo indica que en algunos casos, la respuesta superficial de la monocapa a  $25^\circ\text{C}$  en compresión cuasi-estática es similar a la respuesta de la compresión fuera de equilibrio a  $37^\circ\text{C}$ . Lo anterior pudiera explicar por que Alonso [19] no reporta dependencia de la temperatura, dado que ese trabajo las compresiones son fuera de equilibrio.

Dadas las características de una respiración pasiva, los cambios en el área alveolar son de aproximadamente un 6% [7, 39, 40]. De acuerdo a esto, el modelo clásico del surfactante pulmonar indicaría que la presión lateral, debe pasar de  $\Pi \approx 45 \text{ mN/m}$  a  $\Pi \approx 65 \text{ mN/m}$  al reducir el área por molécula en tan solo un 6%. Lo anterior implica una compresibilidad de  $\kappa \approx 2.4 \times 10^{-3} \text{ m/mN}$ . Si consideramos que las compresibilidades más bajas observadas en este estudio fueron de  $\kappa \approx 6 \times 10^{-3} \text{ m/mN}$  (correspondientes a las mezclas sintéticas 1 y 3, bajo condiciones de compresión en equilibrio ( $10 \text{ cm}^2/\text{min}$ ) a  $25^\circ\text{C}$  y compresión fuera de equilibrio ( $90 \text{ cm}^2/\text{min}$ )), podemos decir que la condición impuesta por la reducción de la superficie alveolar en una respiración pasiva, es difícil de lograr. Aunque las compresibilidades antes mencionadas son del mismo orden de magnitud, entre éstas aun existe un factor de 2 de diferencia. Para todos los demás casos las compresibilidades fueron por lo menos un orden de magnitud más grande.

La presencia de colesterol afectó considerablemente el comportamiento superficial de la mezcla sintética número 2. En consecuencia, el colesterol podría ser un componente no deseado en la formulación de surfactantes pulmonares con fines terapéuticos. Lo anterior pudiera explicar las pequeñas cantidades de colesterol que son reportadas en las composiciones de Survanta y Curosurf,  $15 \times 10^{-3}$  y  $0.8 \times 10^{-3}$  de porcentaje molar, respectivamente [27]. Por otro lado, la presencia de plasmalógeno en tan pequeñas cantidades no pareció afectar considerablemente la respuesta superficial de la mezcla. La presencia de plasmalógeno en el surfactante pulmonar es frecuentemente reportada como despreciable [3, 8, 9].

La ausencia de proteínas produjo la formación de dominios extremadamente brillantes en las monocapas de Survanta, Curosurf y de las muestras de surfactante pulmonar natural, pero estos dominios brillantes no aparecieron en monocapas de nuestras

mezclas sintéticas, donde tampoco había proteína. Podría ser que la composición de los surfactantes pulmonares terapéuticos y naturales, es demasiado compleja en relación a nuestra mezclas modelos (lo cual es muy probable), por que éstas no pueden reproducir el efecto causado por la ausencia de proteína. Sin embargo, estos dominios de gran intensidad luminosa no han sido reportados anteriormente.

Los surfactantes terapéuticos naturales y surfactantes naturales mostraron evidencias de contener componentes solubles, lo que implica que las monocapas de estos surfactantes pulmonares corresponden a monocapas de Gibbs. Es necesario mencionar que en una monocapa de Gibbs, la compresión isotérmica de la monocapa con el objetivo de determinar la tensión superficial carece de sentido; pues recordemos que para que la ecuación 1 sea válida es necesario que el número de moléculas en la interfase se mantenga constante. Una manera de estudiar las monocapas de Gibbs de un tensoactivo no iónico considerándolo en disolución ideal es utilizar la relación

$$\Gamma = - (\partial\gamma/\partial\mu)_{P,T} = - (\partial\gamma/\partial\ln C)_{P,T} (RT)^{-1} \quad (13)$$

Donde  $\mu$  es el potencial químico;  $\gamma$  es la tensión superficial; R es la constante de los gases; T es la temperatura absoluta; C es la concentración del tensoactivo en disolución y  $\Gamma$  es la concentración superficial de exceso, que es el inverso del área por molécula. La ecuación 13 se conoce como relación Gibbs [41], e indica que la disminución en la tensión superficial esta relacionada con la adsorción de moléculas a la interfase  $\Gamma$ , tal proceso de adsorción es gobernado por el potencial químico. La intención de dar esta breve descripción de las monocapas de Gibbs es la hacer notar de estas no pueden ser estudiadas por los mismos métodos que las monocapas de Langmuir.

En algunas monocapas la presión superficial de colapso mostró dependencia con la velocidad de compresión (ver figura 57). Este comportamiento es característico de un material viscoelástico. Si se realiza una deformación (cambio de área de la monocapa) senoidal con frecuencia  $\omega$  sobre una monocapa de Langmuir, el cambio relativo del área de la monocapa producirá un cambio en la presión superficial también oscilatorio con la misma frecuencia pero con diferente fase, respecto a la deformación. Tal fenómeno está relacionado con el modulo de elasticidad complejo por

$$\bar{E}(\omega) = A(d\Pi/dA) \quad (15)$$

$$\bar{E}(\omega) = E'(\omega) + i E''(\omega) \quad (16)$$

donde  $E'(\omega)$  es el modulo elástico, que representa la energía almacenada y restaurada en cada ciclo de deformación.  $E''(\omega)$  es el modulo viscoso, o modulo de perdida, representando la energía perdida por fricción viscosa en cada ciclo[42]. En nuestro caso, la deformación de la monocapa a diferentes velocidades de compresión puede compararse, por medio de descomposición en series Fourier, a las deformaciones senoidales antes mencionadas. Los incrementos de presión lateral observados con el incremento en la velocidad de compresión, inducen a pensar que los surfactantes pulmonares tienen un comportamiento viscoelástico.

## Capítulo 4

# CONCLUSIONES

La realización este trabajo nos ha permitido comprender mejor la magnitud del problema que representa la explicación del mecanismo de funcionamiento del surfactante pulmonar. Sin duda, después de 50 años de estudio y sin tener certeza de control del Síndrome de Deficiencia Respiratoria Neonatal (SDRN), la investigación del mecanismo de acción del surfactante pulmonar sigue vigente.

En el presenta trabajo, a pesar de vernos superados por la magnitud del problema, podemos enunciar las siguientes conclusiones, que ayudarán a definir el camino de futuras investigaciones:

- La influencia de temperatura sobre el comportamiento de la monocapa fue evidente, contrario a lo establecido por algunos autores, quienes mencionan tal dependencia como despreciable.
- Se logró establecer que el colesterol afecta la respuesta superficial del surfactante pulmonar, por lo que quizá este no debería de ser considerado en la formulación de surfactantes pulmonares terapéuticos.
- La presencia de plasmalógeno en las mezclas tensoactivas, no modificó considerablemente el comportamiento general presentado por éstas. Probablemente debido a que su porcentaje molar en la composición es muy bajo.
- La ausencia de proteínas mostró su efecto en la formación de dominios, de fase condensada, extremadamente brillantes, pero sin mostrar diferencias sustanciales en la reducción de la tensión superficial, con respecto de los casos donde las proteínas estaban presentes.
- Se logró observar un comportamiento viscoelástico, el cual pudiera tener implicaciones muy grandes en el funcionamiento del surfactante pulmonar *in vivo*. Sin embargo, en los surfactantes pulmonares naturales el efecto viscoelástico fue de mucha menor magnitud.
- Los posibles cambios estructurales de la monocapa durante los ciclos de compresión expansión no fueron particularmente importantes (las histéresis no fueron muy pronunciadas). Esta situación podría cambiar considerablemente debido al efecto viscoelástico, es decir aumentando la rapidez con la que se realizan los ciclos.
- La presencia de materiales solubles en las muestras de Survanta, Curosurf y las muestras de surfactante pulmonar natural, tuvo como consecuencia que las monocapas fueran de Gibbs y no de Langmuir. Esto impone la necesidad de buscar nuevas maneras de estudiar los surfactanes pulmonares.



Estas conclusiones nos conducen a nuevas preguntas, las cuales es necesario responder con fines de continuar la investigación de este tema.

- ¿La formación de dominios brillantes es consecuencia directa de la ausencia de proteína?, ¿Por qué nadie ha reportado este comportamiento tan peculiar?
- ¿Qué tan rápido se comprime una monocapa en la pared alveolar *in-vivo*?, ¿Qué tan importante puede resultar el comportamiento viscoelástico observado, cuando los cambios en el de área alveolar para una respiración tranquila son aproximadamente de  $7.2 \times 10^{-5} \text{mm}^2$ ?, ¿Es continua la monocapa dentro del pulmón?
- Debido a las evidencias de la formación de monocapas de Gibbs, ¿Cuál es la concentración del surfactante que forma la monocapa en el pulmón?
- ¿Por qué las imágenes de BAM no mostraron evidencia de colapso en la monocapa?

# Índice de figuras

Número de figura	Página
1. Efecto de la tensión superficial sobre la estructura de los conductos alveolares	1
2. Cuerpo lamelar y mielina tubular	2
3. Sistema respiratorio	3
4. Volúmenes pulmonares	4
5. Radiografía de pulmón colapsado	4
6. Cambios en el volumen pulmonar y en las presiones alveolar y pleural durante la respiración	5
7. Complianza pulmonar	6
8. Estructura alveolar	7
9. Composición del surfactante pulmonar	8
10. Fosfolípidos (plasmalogenos)	9
11. Esquema del modelo clásico del mecanismo del surfactante pulmonar	10
12. Moléculas anfifílicas	14
13. Esquema representativo de la compresión de la monocapa	15
14. Placa de Wilhelmy y presión superficial	16
15. Esquema de isoterma para ácidos grasos simples	17
16. Ordenamientos moleculares	19
17. Ejemplos de Diagramas de fase	20
18. Palangana de Langmuir	21
19. Balanza de Wilhelmy	22
20. Sensor de presión superficial	23
21. Tensión superficial	24
22. Dependencia del ángulo de incidencia del coeficiente de reflectividad en el plano de incidencia	25
23. Esquema del BAM utilizado en este trabajo	26
24. Curosurf y Survanta	28
25. Tabla de composición de mezclas	30
26. Isotermas de monocapas de Langmuir de la mezcla 1	34
27. Ciclos de compresión isotérmica la mezcla 1	35
28. Imágenes de BAM de monocapas de la mezcla 1	37
29. Isotermas de monocapas de Langmuir de la mezcla 2	40
30. Ciclos de compresión isotérmica la mezcla 2	41
31. Imágenes de BAM de monocapas de la mezcla 2	42
32. Isotermas de monocapas de Langmuir de la mezcla 3	44

33. Ciclos de compresión isotérmica la mezcla 3	45
34. Imágenes de BAM de monocapas de la mezcla 3	46
35. Isotermas de monocapas de Langmuir de Survanta	49
36. Ciclos de compresión isotérmica de Survanta	50
37. Imágenes de BAM de monocapas de Survanta	51
38. Isotermas de monocapas de Langmuir de Survanta sin proteína	53
39. Ciclos de compresión isotérmica de Survanta sin proteína	54
40. Imágenes de BAM de monocapas de Survanta sin proteína	55
41. Isotermas de monocapas de Langmuir de Curosurf	57
42. Ciclos de compresión isotérmica de Curosurf	58
43. Imágenes de BAM de monocapas de Curosurf	59
44. Isotermas de monocapas de Langmuir de Curosurf sin proteína	61
45. Ciclos de compresión isotérmica de Curosurf sin proteína	62
46. Imágenes de BAM de monocapas de Curosurf sin proteína	63
47. Isotermas de monocapas de Langmuir de SP de Humano	66
48. Imágenes de BAM de monocapas de SP humano	67
49. Isotermas de monocapas de Langmuir de SP de Humano sin proteína	69
50. Imágenes de BAM de monocapas de SP humano sin proteína	70
51. Isotermas de monocapas de Langmuir de SP de conejo	72
52. Imágenes de BAM de monocapas de SP de conejo	73
53. Isotermas de monocapas de Langmuir de SP de conejo sin proteína	75
54. Imágenes de BAM de monocapas de SP de conejo sin proteína	76
55. Grafica comparativa	79
56. Dependencia de temperatura	79
57. Tabla de presiones superficiales de colapso	80

# Referencias

1. (Review) R. Wüstneck et al. *Advances in Colloid and Interface Science* 117 (2005) 33–58
2. (Review) H. Bachofen y S. Schürch. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 129 (2001) 183-193.
3. (Review) J. Goerke. *Biochimica et Biophysica Acta* 1408 (1998) 79-89.
4. (Review) J. Pérez-Gil y K. M. W. Keough. *Biochimica et Biophysica Acta* 1408 (1998) 203-217.
5. (Review) S. Engelskirchen. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 12 (2007) 68–74.
6. *Fisiología humana base de la medicina*. Pocock, Richards. 2<sup>da</sup> edición. Editorial Masson. 2005 Barcelona, España.
7. V. J. Menom y D. C. Agrawal. *Am. J. Phys.* 71 (5), May 2003.
8. A. D. Postle et al. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 129 (2001) 65-73.
9. R. Veldhuizen et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1408 (1998) 90-108.
10. B. Rustow; I. Kolleck; F. Guthmann; R. Haupt; D. Kunze y P. Stevens. *Biochemical Journal*. 302 (1994) 665-668.
11. T. Lee. *Biochimica et Biophysica Acta* 1394 (1998) 129-145.
12. L. M. Noguee; G. Garnier; H. C. Dietz; L. Singer; A. M. Murphy; D. E. deMello y H. R. Colten. 1994. *J. Clin. Invest.* 93:1860–1863.
13. S. B. Hall; A. R. Venkitaraman; J. A. Whitsett; B. A. Holm y R. H. Notter. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145:24–30 (1992).
14. S. Schürch; J. Georke y J. Clements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 73, no. 12, pag. 4698-4702. December 1976.
15. J.A. Martin, et al. *Births: Final Data for 2003*. National Vital Statistics Reports, volumen 54, número 2, 8 de septiembre de 2005.
16. National Center for Health Statistics. 2002 Period Linked Birth/Infant Death Data.
17. R. Ramanathan. *Journal of Perinatology* (2006) 26, S51-S56.

18. L.M.Y. Yu; J.J. Lu; I.W.Y. Chiu; K.S. Leung; Y.W.W. Chan; L. Zhang et al . *Colloids Surf B Biointerfaces* 2004; 36:167–76.
19. C. Alonso; F. Bringezu; G. Brezesinski; A.J. Waring y J.A. Zasadzinski. *Langmuir* 2005; 21: 1028–35.
20. K.W. Lu; J. Goerke y J.A. Clements, H.W. Taeusch. *Pediatr. Res.* 2005; 57 : 237–41.
21. H. Nakahara; S. Lee; G. Sugihara; C. Chang y O. Shibata. *Langmuir* 2008, 24 (7): 3370 -3379.
22. (Review) V. M. Kaganer; H. Möhwald y P. Dutta. *Reviews of Modern Physics*, Vol. 71, No. 3, pag:779-819, April 1999.
23. S. Ramos y R. Castillo. *J. Chem. Phys.*, Vol. 110, No. 14, 8 April 1999.
24. [www.fisica.unam.mx/liquids](http://www.fisica.unam.mx/liquids)
25. H. W. Taeush; K. Lu y D. Ramírez-Schrempp. *Acta Pharmacol Sin* supplement: 11-15, Oct 2002.
26. J. Folch; M. Lees y G.H. Stanley. *Journal of Biological Chemistry* 1957, 226, 497-509.
27. M. Rüdiger; A. Tölle; W. Meier y B. Rüstow. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:379-383, 2005.
28. E.J.A. Veldhuizen y H.P. Haagsman. *Biochimica et Biophysica Acta* 1467 (2000) 255-270.
29. W. Bernhard; J. Mottaghian; A. Gebert et al. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Vol. 162, 1524-1533, 2000.
30. C. Yuan y L. J. Johnston. *Journal of Microscopy*, Vol. 205, Pt 2 February 2002, pp. 136–146.
31. V. Vogel et al. *Biophysical Journal* Volume 84 June 2003 3792–3806.
32. J. M. Crane; S. B. Hall. *Biophysical Journal* Volume 80 April 2001 1863–1872.
33. B. Piknova; W. R. Schief; V. Vogel; B. M. Discher y S. B. Hall. *Biophysical Journal* Volume 81 October 2001 2172–2180.
34. T. Ivanova; I. Minkov; I. Panaiotov; P. Saulnier y J. E. Proust. *Colloid Polym Sci* (2004) 282: 1258–1267.
35. S. Schürch et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 1720 (2005) 59 – 72.

36. Z. Lalchev et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 33 (2004) 227–234.
37. F. Gerber et al. Biophysical Journal Volume 90 May 2006 3184–3192.
38. K. Winsel; D. Hönig; K. Lunkenheimer; K Geggel y C. Witt. European Biophysical Journal (2003) 32: 544–552
39. Tratado de histología. Bloom, Fawcett. 12<sup>a</sup> edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 1995 Madrid, España.
40. J. E. Hansen y E. P. Ampaya. Journal of Applied Physiology Vol. 38, No. 6, June 1975.
41. A. W. Adamson; A. P. Gast. Physical Chemistry of Surfaces, 6<sup>th</sup> ed., Edt John Wiley and Sons, Inc., New York, 1997.
42. P. Saulnier; F. Boury; A. Malzert; B. Heurtault; Tz. Ivanova; A. Cagna; I. Panaiotov; y J. E. Proust. Langmuir 2001, 17, 8104-8111.
43. Optics. E. Hecht, con contribuciones de A. Zajac. Editorial Addison-Wesley. Massachusetts, 1987.
44. (Imagen) [http:// photobucket.com/albums](http://photobucket.com/albums).
45. (Imagen) [www.answers.com/topic/breathing](http://www.answers.com/topic/breathing).
46. (Imagen) <http://e2salud.juntaextremadura.net/bibliotecas/imagenes>.
47. (Imagen) Atlas de histología y organografía microscópica. Boya Venge. 2<sup>da</sup> edición. Editorial Medicina Panamericana. 2004 Madrid, España.
48. (Imagen) [www.avantilipids.com](http://www.avantilipids.com).
49. (Imagen) [www.nima.co.uk](http://www.nima.co.uk).
50. (Imagen) P. Martin, M. Szablewski, en Langmuir-Blodgett Troughs Operating Manual, editado por F. Grunfeld (Nima Technology Ltd) (2002) 18.
51. (Imagen) [www.novamedical.com](http://www.novamedical.com)
52. (Imagen) [www.jahanbehbood.com](http://www.jahanbehbood.com)