



Construcción y validación de un sistema para formar Membranas de Bicapa Lipídica (BLM) e implementar protocolos de medición de corrientes *in vitro*

Lina Isabel Londoño Jiménez

Trabajo de grado presentado para optar al título de Bioingeniera

Asesores

Fabian Andrés Castaño Úsuga, Doctor (PhD) en Ing. Electrónica y ciencias de la computación

Marco Antonio Giraldo Cadavid, Doctor (PhD) en Física

Universidad de Antioquia

Facultad de Ingeniería

Bioingeniería

Medellín, Antioquia, Colombia

2024

Cita	Lina Isabel Londoño Jiménez [1]
Referencia	[1] L. I. Londoño Jiménez, “Construcción y Validación de un Sistema para formar Membranas de Bicapa Lipídica (BLM) e implementar protocolos de medición de corrientes <i>in vitro</i> ”, Trabajo de grado profesional, Bioingeniería, Universidad de Antioquia, Medellín, Antioquia, Colombia, 2024.
Estilo IEEE (2020)	



Grupo de Investigación Biofísica.

Centro de Investigación en Ciencias Exactas y Naturales (CIEN).



Biblioteca Carlos Gaviria Díaz

Repositorio Institucional: <http://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Universidad de Antioquia - www.udea.edu.co

Rector: John Jairo Arboleda Céspedes

Decano/Director: Julio Cesar Saldarriaga

Jefe departamento: John Fredy Ochoa Gómez

El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Antioquia ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por los derechos de autor y conexos.

Dedicatoria

A mis abuelos.

Agradecimientos

Agradezco a todos los que han hecho parte de mi proceso de formación académica y personal. A mis abuelos, Sergio por creer en mí desde pequeña e impulsarme con su apoyo, Carmen desde algún lugar por enseñarme lo fuertes y persistentes que podemos llegar a ser y Lucia por confiar en mis capacidades y motivarme a seguir adelante. A mi madre Carmen por su apoyo en todo momento y a mi padre Diego por estar ahí para escucharme. A mis hermanos Daniel y Diego por fortalecer mis aprendizajes personales, enseñándome que no es más valioso el que no se equivoca, sino el que sabe levantarse y aprender de sus errores. A mis tíos Sofia, Oscar y Juan por tratarme como una hermana adoptiva. Y a Juan Pablo por siempre estar ahí para ayudarme.

A mis amigos que han sido mi segundo hogar.

A mis profesores y compañeros por permitirme aprender no solo a nivel académico sino también personal.

A mis asesores, en especial a Fabian Castaño por su paciencia y dedicación no solo en este proyecto si no también en mi formación como profesional. Por brindarme una mano amiga.

TABLE OF CONTENTS

RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
III. JUSTIFICACIÓN.....	14
IV. OBJETIVOS	15
V. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	16
VI. MARCO TEÓRICO.....	17
VII. METODOLOGÍA.....	22
7.1. Perforación de Láminas de Teflón	22
7.2 Fabricación de la recámara.....	24
7.3 Formación de las membranas	24
7.4 Corroborar la formación de la membrana	25
VIII RESULTADOS	27
X. CONCLUSIONES.....	39
XI. RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS	41
ANEXOS.....	43
Anexo A. Código en ARDUINO para la selección de pulsos y frecuencias de conmuta.....	43
Anexo B. Planos de la recámara de BLM	48
Anexo C. Diseño PCB.....	49

LISTA DE TABLAS

TABLA I. RESULTADOS DE LAS PERFORACIONES	28
TABLA II. RESULTADOS DE LA VISUALIZACIÓN DE FORMACIÓN DE LA BLM	35

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura y bicapa de fosfolípidos. Una molécula de fosfolípido consta de una “cabeza” de fosfato polar, que es hidrófila, y una “cola” de lípidos no polar, que es hidrófoba. Los ácidos grasos insaturados provocan torceduras en las colas hidrofóbicas (tomada de [10]).	17
Fig. 2 Membrana celular de bicapa lipídica. La membrana celular es una bicapa de fosfolípidos que contiene muchos componentes moleculares diferentes, incluidos proteínas y colesterol, algunos con grupos de carbohidratos unidos [10].	18
Fig. 3 Una ilustración esquemática de un BLM en un chip a base de teflón con electrodos de Ti integrados [12].	19
Fig. 4. Microtomo LEICA, utilizado para cortar teflón blanco con espesor de 50 μ m.	22
Fig. 5. Diagrama de un circuito para perforación, controlado por pulsos conmutados.	23
Fig. 6. Esquemático recámara de BLM.	24
Fig. 7. Diagrama de flujo para hacer las soluciones de lípidos.	25
Fig. 8. Montaje para visualizar de forma óptica la formación de la membrana.	26
Fig. 9. Esquemático ideal de montaje de BLM [7]	26
Fig. 10. Láminas de teflón transparente y blanco.	27
Fig. 11. Sistema de perforación de láminas de teflón.	28
Fig. 12. Cortes no deseados en perforaciones de láminas de teflón transparente con medio metal-liquido.	30
Fig. 13. Tamaño de las perforaciones dependiendo de la frecuencia y con la cantidad de pulsos de 1000.	30
Fig. 14. Distribución normal de las perforaciones en las lamina de teflón transparente	31
Fig. 15. Recamaras impresas en 3D para dos materiales A. PLA y B. Resina.	31
Fig. 16. Graficas corrientes óhmicas y capacitivas en el montaje de BLM con láminas de teflón blanco y transparente perforado y sin perforar.	32
Fig. 17. Esquema explicativo de conducción capacitiva y óhmica.	33
Fig. 18. Montaje del sistema BLM.	34
Fig. 19. Señal medida en la formación de la BLM	35
Fig. 20. Resultados esperados de la formación de la BLM, de forma óptica [7].	37
Fig. 21. Curvas esperadas de formación de BLM [7].	38

SIGLAS, ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

BLM Membrana de Bicapa lipídica

RESUMEN

El conocimiento de la interacción de ciertas moléculas medicinales con la membrana celular es de especial interés en la biofísica contemporánea. Fenómenos como la aparición de bacterias multirresistentes o los cambios a nivel sistémico del cuerpo humano, pueden ser mejor comprendidos a partir de la elaboración de membranas sintéticas. La técnica de bicapa lipídica (BLM) permite analizar la actividad eléctrica que se da a partir del transporte iónico entre dos compartimientos que simulan el interior y exterior celular. En este trabajo se implementó la técnica de BLM construyendo un sistema que permitió la realización de esta, desde la elaboración de perforaciones en láminas de teflón que cumplieran con bordes finos, uniformes y de tamaños aproximados de 100 μ m, hasta el diseño de una recámara en resina donde se formaron membranas artificiales las cuales posteriormente al utilizar los dispositivos disponibles en el laboratorio se logró medir corrientes capacitivas en la membrana. La relevancia de este proyecto radica en su contribución al entendimiento de los procesos eléctricos celulares en áreas de investigación como la biofísica, la electrofisiología y la farmacología. Además, se propuso el desarrollo de un sistema más accesible y económico para la formación de membranas y su estudio, lo que facilitará la investigación en la Universidad de Antioquia.

***Palabras clave* — BLM, transporte de iones, corrientes, biofísica, electrofisiología, farmacología.**

ABSTRACT

The knowledge of the interaction between certain medicinal molecules and the cell membrane is of particular interest in contemporary biophysics. Phenomena such as the emergence of multi-resistant bacteria or systemic changes in the human body can be better understood through the development of synthetic membranes. The lipid bilayer membrane (BLM) technique allows for the analysis of electrical activity resulting from ion transport between two compartments that simulate the interior and exterior of a cell. In this study, the BLM technique was implemented by constructing a system that enabled its execution, from creating perforations in Teflon sheets with thin, uniform edges approximately 100 μ m in size, to designing a resin chamber where artificial membranes were formed. Subsequently, capacitive currents in the membrane were measured using the available laboratory devices. The significance of this project lies in its contribution to the understanding of cellular electrical processes in research areas such as biophysics, electrophysiology, and pharmacology. Additionally, the development of a more accessible and cost-effective system for membrane formation and study was proposed, facilitating research at the University of Antioquia.

Keywords — **BLM, ion transport, current, biophysics, electrophysiology, pharmacology.**

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades neurológicas, infecciosas y oncológicas son ampliamente estudiadas actualmente. Una forma de conocer cómo actúan a nivel sistémico es entender cómo lo hacen a nivel celular. En particular, la estructura celular que permite entender la influencia de factores oncológicos como el cambio en la morfología de la célula, o factores neurológicos e infecciosos que están relacionados con el intercambio iónico o la reacción a estímulos, es la membrana [1], [2], [3]. Esta estructura está formada por la unión de una doble capa de lípidos, proteínas y otros compuestos como el colesterol, los cuales brindan información que puede ser útil en el diagnóstico o tratamiento de diferentes patologías.

A partir de la creación de la primera membrana de bicapa lipídica (BLM) in vitro formada por Mueller, Rudin, Tien y Wescott en 1962, se dio paso a nuevos estudios y a la formación de bicapas tanto a partir de lípidos sintéticos como extraídos de tejidos biológicos. Posteriormente, en 1970 Neher y Sakman desarrollaron la técnica de patch-clamp que se centra en la medición de corrientes iónicas a través de canales en membranas celulares intactas, aislando un pequeño trozo de membrana celular utilizando un microelectrodo de vidrio [4]. Más adelante se fueron aplicando otras técnicas para formar BLM como la de fusión de vesículas y la técnica de Langmuir Blodgett; sin embargo, estas técnicas no permiten hacer un estudio de un canal iónico en un entorno controlado y definido. Por esta razón existe la técnica de BLM plana que consiste en depositar lípidos sobre una perforación en una lámina de teflón, la cual separa dos compartimientos que simulan el espacio intra y extracelular. En cada compartimiento se ubica un electrodo, lo cual permite el estímulo eléctrico del sistema y la medición de la respuesta a partir de la corriente medida. Esta técnica se usa para medir la función de canales iónicos y otras proteínas de membrana en una bicapa lipídica artificial [5].

Actualmente en la Universidad de Antioquia se han realizado estudios por medio de la técnica de Langmuir Blodgett para medir corrientes iónicas en células intactas; sin embargo, no es posible aún hacerlo a nivel de único canal y en una membrana artificial controlada, es decir asegurando una doble capa de lípidos y sin presencia de otras estructuras de soporte como sucede con Langmuir Blodgett. Los altos costos de los dispositivos que permiten desarrollar esta técnica

(i.e., la serie ORBIT de la empresa Nanion) hacen que sea aún más difícil su implementación. En este trabajo se implementó un sistema para usar la técnica de BLM en el laboratorio de Biofísica, a partir de membranas artificiales, elaboradas con lípidos de origen natural (i.e., fosfietilcolina – etanolamina) o sintético (DphPC o DphPE) que simulan un ambiente cercano al biológico. Se probaron parámetros en la perforación de la lámina de teflón sobre la que se depositan los lípidos, se realizó un protocolo de agregación de los lípidos que forman la bicapa y el acondicionamiento de un sistema de transimpedancia que permitió la adquisición de las señales provenientes de la corriente generada por la presencia de la membrana. Todo lo anterior con el fin de crear un espacio para futuros experimentos que permitan el estudio de canal iónico único y, por lo tanto, el avance científico en las diferentes áreas de interés que hay en la Universidad y en la región.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La formación de membranas bicapa lipídica (BLM) estables y reproducibles representan un gran desafío. La técnica BLM consiste en un sistema que permite formar membranas artificiales de un tamaño microscópico por medio de autoensamblaje de lípidos, en la cual se puede introducir un canal iónico, dando paso al estudio de propiedades eléctricas y dinámica de los canales. Existen dispositivos comerciales como el ORBIT de la empresa NANION que facilitan la formación de BLM y medir corrientes iónicas, sin embargo, su costo de aproximadamente \$68.000 hace que sea inasequible para algunos laboratorios en Colombia.

Por otro lado, existen otras técnicas que permiten realizar membranas artificiales como lo son, la técnica de Langmuir Blodgett, la cual consiste en la agregación de varias monocapas sobre un sustrato solido dando paso a una doble capa de lípidos, debido a esto puede presentar limitaciones ya que el sustrato puede influir en su comportamiento, esta técnica es usada para estudios de superficie y propiedades físicas. Otra técnica es la de vesículas, la cual genera estructuras esféricas formadas por una o más bicapas concéntricas, pero en estas no se tiene un control preciso sobre el entorno, además de que la complejidad de la estructura puede no representar de forma correcta una bicapa. Estas últimas son comúnmente usadas en estudios de encapsulación de fármacos, transporte evaluando la permeabilidad de la membrana y también usadas en interacciones de membrana con proteínas y péptidos. Por lo tanto, se requiere de otra técnica para formar membranas y que sea usada para estudios eléctricos.

A. Antecedentes

Existen métodos clásicos para formar bicapas lipídicas, utilizados para estudiar las propiedades de las membranas y la actividad de los canales iónicos como lo son las técnicas de Montal-Mueller (MM) y Mueller-Rudin (MR). En la década de 1960 se desarrolló la técnica de Paul Mueller y Donald Rudin esta consiste en que sobre una delgada lamina de teflón con una pequeña abertura que separa dos compartimientos con soluciones acuosas, se aplican lípidos alrededor de la apertura. Estos lípidos se disuelven en solventes orgánicos, los lípidos disueltos se desplazan hacia la apertura y el solvente se evapora formando una bicapa auto ensamblada. Esta

técnica presenta limitaciones ya que el uso de solventes orgánicos puede afectar la estructura de la bicapa, también la estabilidad y el tiempo de vida.

Con el fin de mejorar la mencionada técnica, Marcos Montal y Pierre Mueller en la época de 1970 hicieron cambios a esta, donde modificaron el solvente usado para disolver los lípidos por solventes volátiles. Estos lípidos se adicionan en una superficie de agua añadida en ambos compartimientos separados por una lámina de teflón con una pequeña apertura. En cada lado de los compartimientos se forma una monocapa lipídica en la interfaz aire-agua, las cuales por aproximación forman una bicapa autoensamblada. Este método permite una mayor precisión en el control del grosor y la composición de la bicapa. Esta técnica es descrita por Alexandr Chanturiya en su libro “QUICK START ON BLM TECHNIQUE” [6].

La técnica BLM ha sido implementada por distintos autores como lo hizo J.A Álvarez en su tesis doctoral en la cual evaluó la permeabilización potencial-dependiente de membranas lipídicas artificiales con péptidos policatiónicos. Desarrollo un método de perforación eléctrica de láminas de teflón, en el cual se tuviesen perforaciones con bordes finos, regulares y sin quemaduras, permitiendo la formación de membranas en dichas aberturas. Posteriormente implemento el montaje de BLM y midió corrientes iónicas para corroborar la formación de las membranas [7].

Otros artículos recientes permiten evidenciar el uso de BLMs para evaluar la permeabilidad en modelos neuronales con el fin de mostrar el efecto protector de la melatonina contra el daño inducido por los canales iónicos del péptido β -amiloide [8]. Por otro lado, existen estudios donde se han implementado las BLMs para comprender como las partículas en suspensión afectan las propiedades eléctricas de las membranas [9]. Hay muchos estudios recientes que implementan la técnica y permiten avances científicos significativos.

III. JUSTIFICACIÓN

La formación de membranas bicapa lipídica (BLM) se ha convertido en una importante herramienta en el campo de la investigación, especialmente en estudios relacionados con la biofísica, electrofisiología o farmacología. Estas membranas artificiales están diseñadas para simular membranas celulares naturales, permitiendo un entorno controlado en el cual se puede analizar la función y dinámicas de ciertos canales iónicos o proteicos. Diseñar y construir un sistema que permita la formación de BLM y la medición de corrientes iónicas es significativo en las áreas de investigación anteriormente mencionadas.

El desarrollo de este sistema es debido a la necesidad de tener un modelo experimental que permita estudiar la actividad iónica de un solo canal en específico, las técnicas de vesículas o membranas soportadas (Langmuir Blodget) no facilitan este proceso. Las BLMs son capaces de proporcionar información detallada sobre la conductancia y la selectividad de los canales iónicos, aspectos que son significativos en el desarrollo de nuevos fármacos los cuales pueden regular la actividad celular. Además, la medición de corrientes iónicas es esencial para entender el funcionamiento de distintos tipos de células del cuerpo humano como las neuronas y otros tipos de células excitables. Incluso en enfermedades como el Alzheimer, se han realizado estudios utilizando esta técnica con el fin de analizar cómo actúa una proteína específica de esta enfermedad y cuales podrían ser futuros tratamientos basándose en la selectividad de esta proteína. Así mismo en la biofísica, la formación de membranas puede proporcionar un modelo experimental para estudiar las propiedades físicas y químicas de las membranas celulares y sus componentes. Un ejemplo de esto es el estudio de la morfología de células cancerígenas basado en el ordenamiento y composición de los lípidos que conforman la membrana celular.

En conclusión, la técnica de BLM puede brindar avances significativos en el diagnóstico y tratamiento de distintas patologías. Además de contribuir en el estudio de diversas disciplinas científicas, por lo tanto, ya que actualmente en la Universidad de Antioquia no se cuenta con un sistema para implementar la técnica BLM, en este trabajo de grado se reproduce esta técnica con el fin de corroborar una formación adecuada de la membrana y medir corrientes iónicas, dando paso a que futuros investigadores puedan aplicarla.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Construir, caracterizar y validar un prototipo de sistema para el estudio de membrana bicapa lipídica (BLM) en un ambiente *in vitro*.

B. Objetivos específicos

1. Desarrollar un sistema para la perforación en láminas de teflón con el fin de depositar lípidos y formar una membrana bicapa lipídica (BLM).
2. Implementar la técnica de BLM sobre láminas de teflón caracterizando parámetros importantes para la formación de la membrana.
3. Instrumentar y caracterizar el sistema BLM poniendo a punto los equipos disponibles en el laboratorio de la tecnología biomédica.
4. Validar la funcionalidad del montaje mediante la utilización de combinaciones de lípidos, que permitan el modelamiento de cardiomiocitos o bacterias.

V. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La formación de bicapas lipídicas (BLM) artificiales ha demostrado ser una técnica esencial en el estudio de las propiedades biofísicas de las membranas celulares, permitiendo la medición de corrientes iónicas y el análisis de la interacción de diversos compuestos con la membrana. Sin embargo, uno de los principales desafíos en la implementación de esta técnica es el elevado costo de los equipos comerciales disponibles, lo cual limita su accesibilidad y aplicabilidad en muchas instituciones académicas, incluida nuestra universidad. Hasta la fecha, no se ha intentado la formación de BLM en nuestros laboratorios, lo que plantea una oportunidad para explorar la viabilidad de desarrollar un sistema y protocolos específicos que permitan la replicación y reproducción de estas membranas artificiales. Este proyecto busca responder a la pregunta: ¿es posible construir un sistema para la formación de BLM y la medición de corrientes iónicas utilizando recursos disponibles en nuestros laboratorios? La investigación se centrará en la adaptación y optimización de métodos descritos en la literatura para crear un sistema, evaluando su eficacia. Además, se desarrollarán protocolos que permitan la replicabilidad y reproducibilidad de los experimentos, proporcionando una base para futuros estudios y aplicaciones en nuestra institución. Este planteamiento podría abrir nuevas vías para la formación de estudiantes y la realización de investigaciones avanzadas en un entorno universitario con recursos limitados.

VI. MARCO TEÓRICO

La membrana celular es una estructura encargada de separar el contenido interno de la célula del exterior, la cual tiene como funciones proteger la célula y regular el paso de sustancias a través de ella. La membrana es una bicapa, constituida principalmente por fosfolípidos, los cuales constan de dos partes: la parte hidrófila que es un grupo fosfato conocido como “cabeza” y la parte hidrófoba que son ácidos grasos insaturados conocidos como “cola” [10]. El término bicapa hace referencia a una capa de fosfolípidos la cual se une a otra por medio de su parte hidrófoba, es decir, las colas. La parte hidrófila (cabeza) queda expuesta al exterior e interior de la célula (Fig. 1).

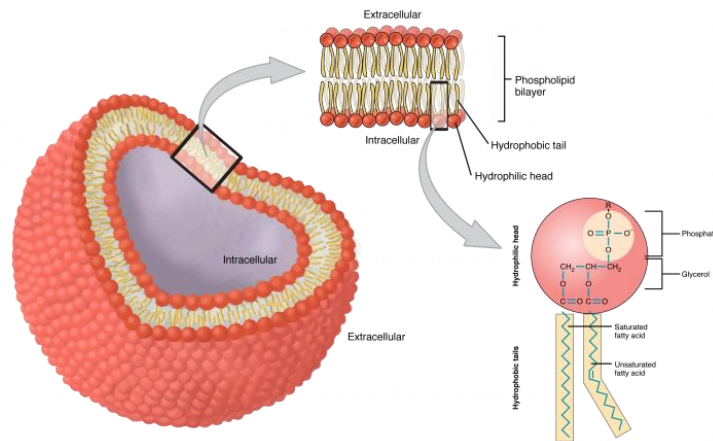


Fig. 1. Estructura y bicapa de fosfolípidos. Una molécula de fosfolípido consta de una “cabeza” de fosfato polar, que es hidrófila, y una “cola” de lípidos no polar, que es hidrófoba. Los ácidos grasos insaturados provocan torceduras en las colas hidrofóbicas (tomada de [10]).

La membrana celular no solo está constituida por fosfolípidos, sino también por colesterol y proteínas (Fig. 2), entre las que se encuentran proteínas integrativas y proteínas periféricas. Dentro de las proteínas integrativas se encuentran las de canal en donde se da el flujo de sustancias, como: iones Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} y Cl^{-} , mientras que las proteínas periféricas permiten la adhesión de sustancias como las hormonas.

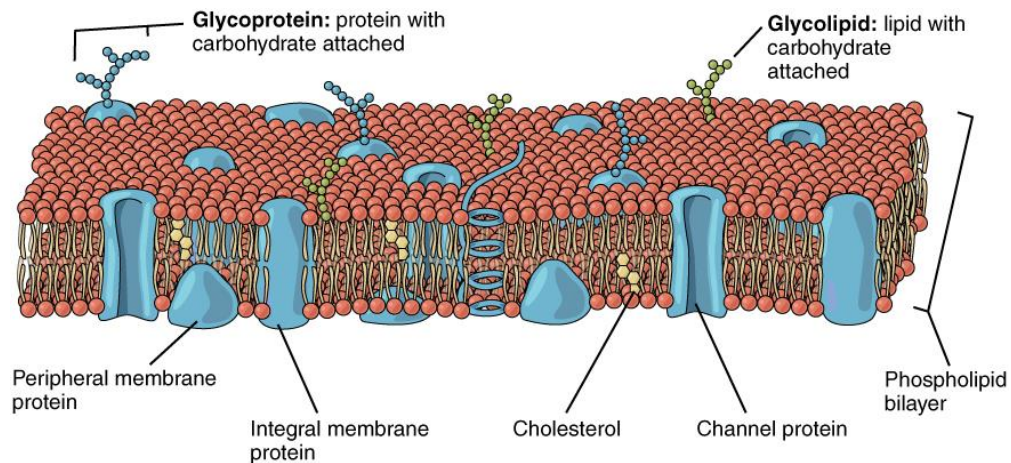


Fig. 2 Membrana celular de bicapa lipídica. La membrana celular es una bicapa de fosfolípidos que contiene muchos componentes moleculares diferentes, incluidos proteínas y colesterol, algunos con grupos de carbohidratos unidos [10].

La unión de lípidos y proteínas son lo que determina propiedades físicas de la bicapa como la fluidez, permeabilidad y presión lateral. Además, la presencia de colesterol afecta la microfluidez. Entonces se hace evidente que es importante conocer las clases de lípidos que forman las membranas. Estos pueden variar según la longitud y grado de saturación de su parte hidrofóbica o según sus grupos R en su parte hidrofílica (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol). Todos estos compuestos pueden hacer aún más complejas las membranas celulares [5].

Técnicas de formación de BLM

Las membranas de bicapa lipídica (BLM) se pueden formar artificialmente a partir de una solución de fosfolípidos mediante varios procedimientos, entre los que está el método de pintura o también llamado membrana lipídica plana (BLP). Este generalmente se realiza en una cámara con dos compartimientos separados por una delgada lámina de teflón o algún material similar que contengan una perforación en el centro. En un compartimiento de la cámara se coloca una solución de lípidos en un disolvente, mientras que en el otro compartimiento se coloca una solución tampón acuosa. A medida que se agregan los lípidos en el disolvente, las moléculas de los lípidos se organizan espontáneamente. Las partes hidrofóbicas de los lípidos se unen en la abertura, mientras que la parte hidrofílica queda expuesta al medio, lo que da lugar a la formación de la bicapa (Fig. 3). Este proceso resulta en la formación de una delgada bicapa lipídica autoensamblada que separa

dos compartimentos (cis/trans) con soluciones distintas, creando así una estructura similar a una membrana celular [9], [11].

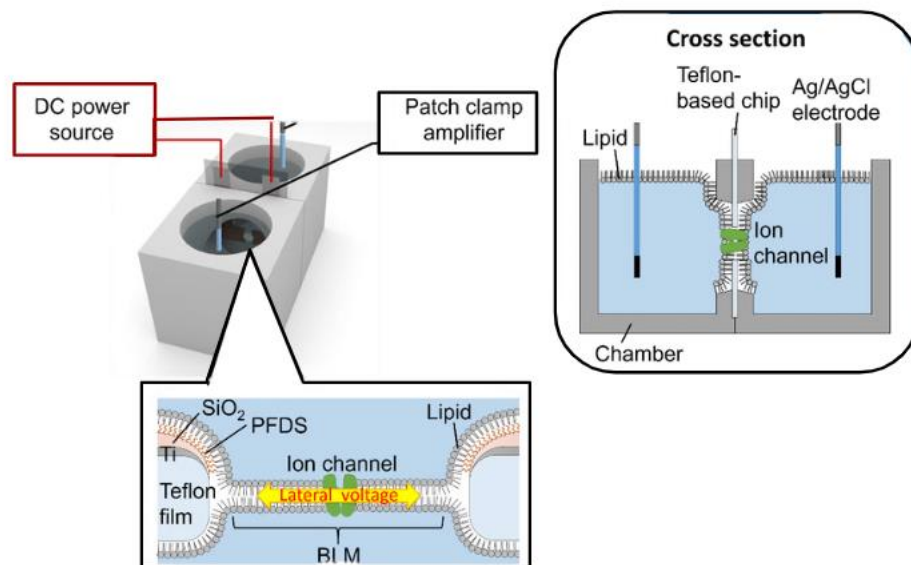


Fig. 3 Una ilustración esquemática de un BLM en un chip a base de teflón con electrodos de Ti integrados [12].

Además de estos métodos, es importante destacar que la formación de membranas de bicapa lipídica también puede lograrse mediante otras técnicas como la técnica del Langmuir-Blodgett y la técnica de transferencia de vesículas. En la técnica del Langmuir-Blodgett, los lípidos se extienden en la interfaz aire-agua de una cubeta de Langmuir y luego se transfieren a un sustrato sólido para formar una bicapa lipídica ordenada y uniforme, aunque no en solución acuosa. Esto constituye una de las principales limitantes de la técnica, además de que por medio de esta al estar irse agregando sobre un sustrato puede no tenerse control de la cantidad de monocapas que pueden ser no deseadas. Por otro lado, la técnica de transferencia de vesículas implica la deposición de vesículas lipídicas sobre un sustrato sólido, seguida de la ruptura controlada de las vesículas para formar una bicapa lipídica plana. Esta variante de la formación de bicapas lipídicas ofrece flexibilidad en términos de controlar la estructura y las propiedades de la bicapa [13].

Estudio de transporte iónico

Para el estudio de transporte iónico o la permeabilización de la membrana, el método de BLM por pintura ha demostrado presentar ventajas, tales como ser la forma más cercana para

simular un ambiente vivo debido a que las dos caras de la membrana están expuestas a soluciones acuosas. Esto permite el movimiento iónico controlado, dando paso a estudios de transporte o actividad sobre canales, porinas y otros complejos que formen poro [7]. Además, por su tamaño nanométrico las propiedades resistivas de la bicapa son altas ($100 \text{ M}\Omega/\text{cm}^2$) [11], [14]. Sin embargo, una de sus desventajas es la inestabilidad ante perturbaciones eléctricas y mecánicas, debido a que son estructuras delgadas y frágiles. Para mejorar la longevidad de la membrana se han desarrollado arquitecturas distintas de BLM como atar la membrana a una superficie sólida o proteínas; sin embargo, estos métodos pueden empeorar las propiedades resistivas de la membrana [15], [16].

Una forma de estudiar el movimiento iónico ya sea por difusión o por medio de canales, es gracias al potencial de membrana (V_m), el cual hace referencia a la diferencia de potencial eléctrico que se presenta entre el exterior e interior de la membrana celular. El V_m generalmente es negativo en el interior con respecto al exterior, atrayendo moléculas con carga positiva hacia la bicapa [17]. La membrana celular se puede modelar como un circuito RC (resistencia, capacitor) donde la bicapa lipídica cumple la función de capacitancia mientras que la resistencia hace referencia a los canales o poros que se oponen o permiten el flujo de iones [6]. Por esta razón para estudios experimentales se necesita producir el potencial transmembranal utilizando un electrodo en cada lado de la bicapa lipídica, sumergidos en soluciones salinas y conectados a una fuente de voltaje que permite un ajuste en la intensidad del potencial eléctrico y la polaridad. Posteriormente se registra la corriente eléctrica que pasa a través de la membrana con uno de los electrodos conectado a un circuito de transimpedancia [6], [7].

La doble capa de lípidos se puede modelar como un capacitor de capas paralelas, es decir que la distancia entre ellas es inversamente proporcional a la capacitancia de la membrana (Ecuación 1), por lo tanto, la corriente en la membrana aumenta a medida que su capacitancia aumenta (Ecuación 2). La capacitancia va aumentando cuando la membrana se está formando debido a que cada capa de lípidos se va uniendo por lo tanto disminuye la distancia entre ellos, del mismo modo la corriente aumenta, lo que permite visualizar en las curvas de corriente que cuando esta llega a su punto más alto, se ha formado la membrana [6].

Ecuación de capacitancia de membrana:

$$C_m = \varepsilon_m \frac{A}{d} \quad (1)$$

A: Área de la membrana

D: Distancia entre las monocapas

ε_m : Permitividad dieléctrica de la membrana

Ecuación de corriente en la membrana:

$$i_m = C_m \frac{dV}{dt} \quad (2)$$

Aplicaciones de BLM

La técnica BLM ha sido aplicada en diferentes áreas de investigación, como la biofísica, la electrofisiología y el descubrimiento de fármacos [9]. Los estudios más recientes se han hecho tanto en actividad antimicrobiana o anticancerígena de algunos péptidos [7], [18], [19] como en el análisis de enfermedades de Alzheimer o Huntington [1], [3]. En el Alzheimer se ha reportado el uso de la técnica para evaluar como una proteína específica de esta enfermedad puede alterarse en presencia de la melatonina [8], lo que puede permitir un avance significativo en el diagnóstico y tratamiento de esta. Del mismo modo, la técnica se utiliza para la evaluación de diferentes péptidos y conocer su influencia en la actividad celular, lo que puede dar paso a la generación de nuevos medicamentos para combatir las infecciones u otras patologías.

VII. METODOLOGÍA

La técnica BLM consiste en depositar lípidos sobre una lámina de teflón con una micro perforación, la cual separa dos compartimientos. Por lo que para poder realizar esta técnica lo primero que se hizo fue el diseño de un sistema para perforar láminas de teflón. Lo segundo fue realizar una recámara en dos tipos de material donde se colocó la lámina de teflón previamente perforada, soluciones acuosas y lípidos. Por último, se colocaron dos electrodos, haciendo uso de un osciloscopio y generador de los laboratorios de la tecnología biomédica, se visualizó la corriente para verificar la formación de la membrana bicapa.

Las láminas de teflón usadas eran de dos materiales distintos, teflón blanco y teflón transparente. El teflón transparente se compró con un espesor de $50\mu\text{m}$ mientras que el teflón blanco se compró en bloque y se cortó con un microtomo. El microtomo *Leica RM2125 RTS* (Fig. 4) permite hacer cortes entre los $0,5$ a $60\mu\text{m}$, estos cortes se hacen de forma horizontal de 25mm y verticales de 59mm . Se coloca una pieza de teflón blanco y por el movimiento vertical de la pieza sobre una cuchilla, se cortan láminas de teflón de $50\mu\text{m}$.



Fig. 4. Microtomo LEICA, utilizado para cortar teflón blanco con espesor de $50\mu\text{m}$.

7.1. Perforación de Láminas de Teflón

Para obtener láminas de teflón con perforaciones de aproximadamente $100\mu\text{m}$ de diámetro, se diseñó un sistema de conmutación con pulsos eléctricos, como se muestra en la Fig. 5. Este sistema consta de tres etapas principales:

1. Etapa de Conmutación: Se generan pulsos cuadrados programados en un ARDUINO UNO. Estos pulsos cuadrados tienen un voltaje pico de aproximadamente 5V, una frecuencia y duración programable por el usuario, por lo que se realizó una interfaz del sistema que permite al usuario seleccionar entre tres frecuencias diferentes (100, 50, 20 Hz) y ajustar la cantidad de pulsos (10, 1000, 2000). El código se encuentra en el anexo A (ANEXOS).
2. Etapa de Elevación de Voltaje: Los pulsos generados por el Arduino se conectaron a un optoacoplador PC817 con el fin de convertir los pulsos cuadrados provenientes del microcontrolador a pulsos eléctricos aislados, la salida de este se conectó a un MOSFET IRF840 el cual funcionó como un interruptor y al conectarse con una bobina de encendido CELRMIC10009, alimentada a 12V se generó a la salida de la bobina un voltaje aproximado de 45 kV, este voltaje permitió perforar láminas de teflón de 50 μm de espesor. También se agregó un diodo de protección para evitar autoinductancia proveniente de la bobina. Como fuente de alimentación se usó una fuente comercial disponible en el laboratorio.
3. Sistema de Perforación: Mediante impresión 3D, se diseñó y fabricó un soporte para sujetar un electrodo inferior (lámina de aluminio) y un electrodo superior (mina de grafito de 2 mm de espesor). La lamina de aluminio se conectó a la terminal negativa de la bobina, mientras que la mina de grafito se conectó a la salida de la bobina.

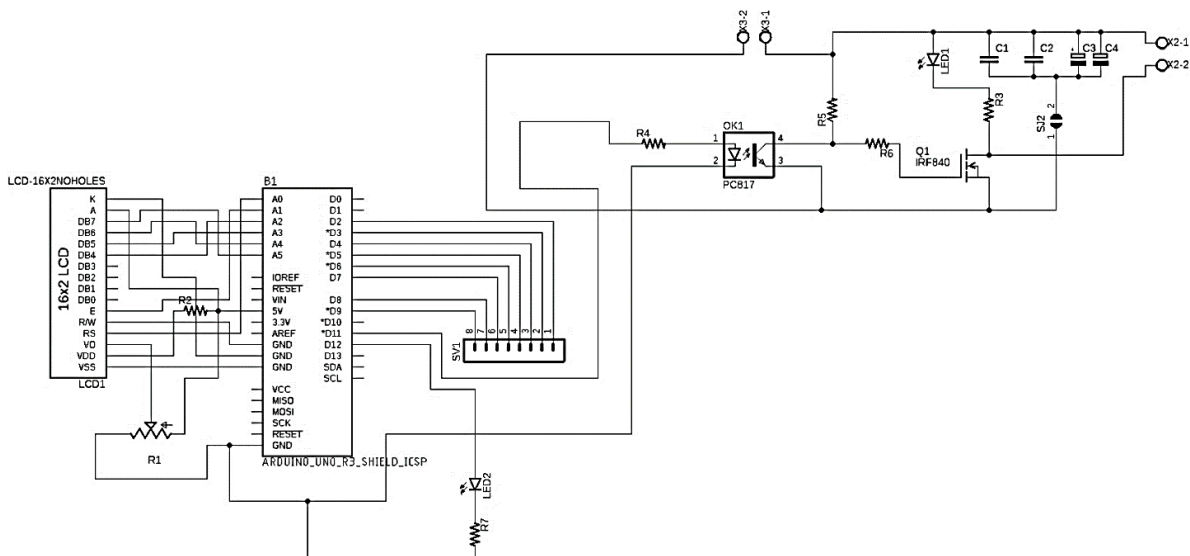


Fig. 5. Diagrama de un circuito para perforación, controlado por pulsos conmutados.

7.2 Fabricación de la recamara

Por medio del software AUTODESK INVENTOR, se diseñó una recamara para la agregación de los lípidos y soluciones. Se hizo con cuatro compartimentos, con el fin de realizar dos experimentos en simultaneo, como se muestra en la Fig. 6. Cada compartimiento tiene un agujero pasante cónico de diámetro mayor de 8mm y diámetro menor de 4 mm, también cuenta con cavidades donde se ubicaron miniagitadores magnéticos para evitar la aglomeración de los lípidos. Además, un agujero pasante a 45° de la parte superior el cual finaliza dentro de las recamaras, estos agujeros permitían agregar por medio de perfusión soluciones de lípidos o soluciones acuosas, según el método de agregación deseado para formar la membrana. La impresión de esta recamara se hizo en dos materiales distintos por medio de una impresora ANYCUBIC photon mono 2 con resina estándar blanca y con una impresora de hilo con PLA. En las caras laterales, con el fin de sostener el medio líquido, se usaron cubreobjetos de 20x20mm adheridos con silicona.

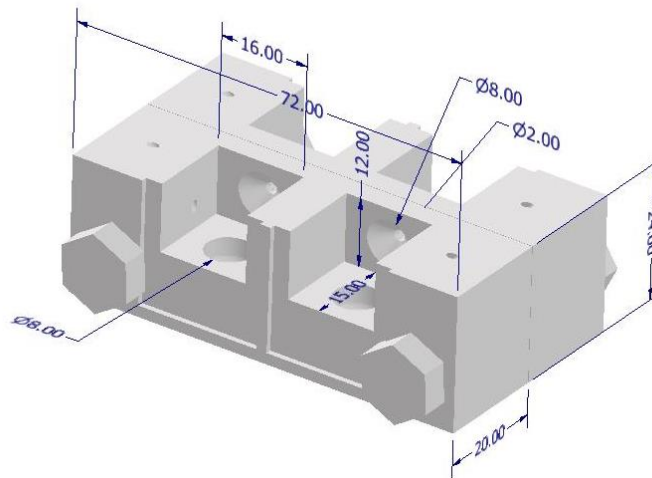


Fig. 6. Esquemático recamara de BLM.

7.3 Formación de las membranas

La lámina de teflón previamente perforada se ubicó entre dos compartimentos de la recamara, con un poco de vaselina con el fin de mejorar su adhesión. Para el método de agregación por cepillado, se realizó la preparación de las soluciones de lípidos como se muestra en la Fig. 7. Primero se disolvieron los lípidos DOPE (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) de

Avanti en cloroformo:metanol, se agregaron en dos viales en relación de 1 a 4 partes de solución, se secaron en presencia de gas nitrógeno hasta evaporar el cloroformo, después de esto, en el vial A (el de menor concentración) se agregó 1mL de Hexano (*PanReac*) y en el vial B (mayor concentración) se agregó 1mL de Dodecano (*Sigma-Aldrich*). La solución A, se usó para mejorar la hidrofobicidad del agujero en la lámina de teflón por lo tanto se pre-cubrió el agujero con esta, posteriormente se hizo el llenado con medio salino (cloruro de sodio al 0.9%) a cada lado de los compartimientos, finalmente se agregó un poco de la solución B, sobre el agujero.

Para el método de perfusión, era necesario un sistema que permitiera el llenado a cada lado de los compartimientos de manera simultánea, con el fin de que se formara una interfaz aire-líquido donde los lípidos ordenados sobre la superficie, al ir subiendo el nivel de medio salino llegaran a un punto de encuentro en la perforación dando paso a la formación la bicapa. La preparación de las soluciones de lípidos se hacía de igual forma que para el método de cepillado.

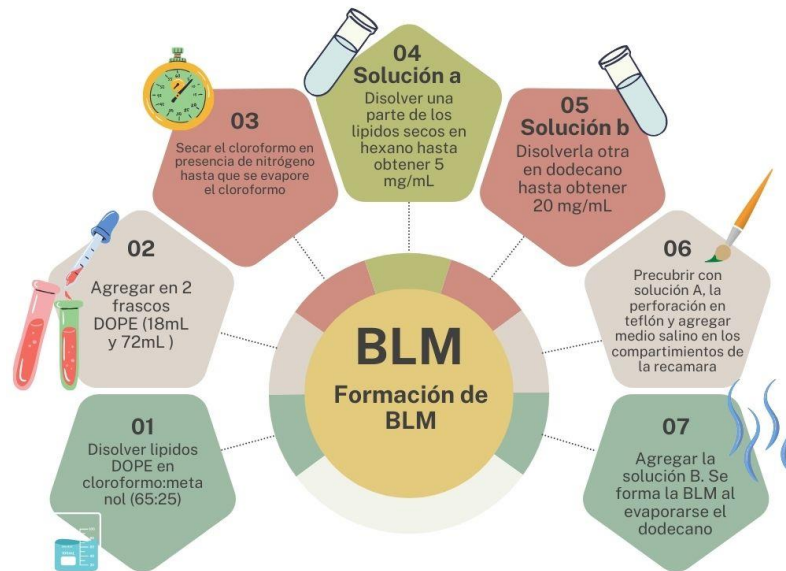


Fig. 7. Diagrama de flujo para hacer las soluciones de lípidos.

7.4 Corroborar la formación de la membrana

Es posible corroborar la formación de la membrana de manera óptica o realizando la medición de las corrientes. Para la forma óptica se usó un estereoscopio el cual permitió ver el agujero en la lámina de teflón ya puesta en la recámara, el montaje se muestra en la Fig. 8.

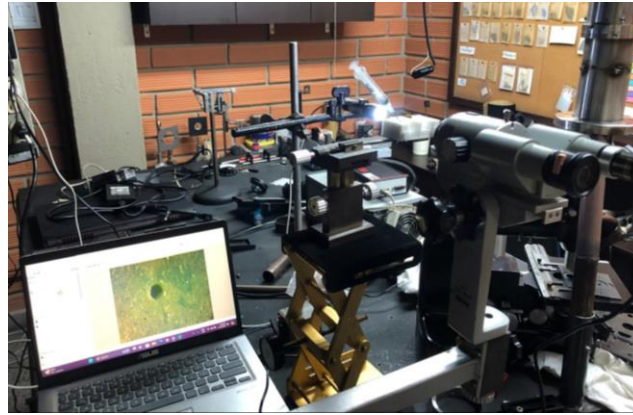


Fig. 8. Montaje para visualizar de forma óptica la formación de la membrana.

La otra forma para corroborar la formación de la membrana es por medio de la medición de corriente. Antes de que se formará la membrana se caracterizaron las curvas de corriente capacitivas y óhmicas en la recámara, con las láminas de teflón blanco o transparente perforadas y sin perforar, esto con ayuda de un generador de señales y un osciloscopio, disponibles en el laboratorio de la tecnología biomédica. Al tener la membrana ya formada se colocaron electrodos en ambos compartimientos de la recámara con las soluciones y lípidos previamente agregados. Un esquemático del montaje de BLM se muestra en la Fig. 9, donde se coloca en la mitad de la recámara, la lámina de teflón con la micro perforación de tamaño aproximado de $100\mu\text{m}$ y bordes uniformes, sin quemaduras. En cada lado de los compartimientos se agrega medio salino y se colocan dos electrodos, en el lado CIS se envía la señal y en el lado TRANS se lee, lo obtenido. La señal enviada es una señal cuadrada de $\pm 25\text{mV}$ con una frecuencia de 1Hz y hasta 100Hz .

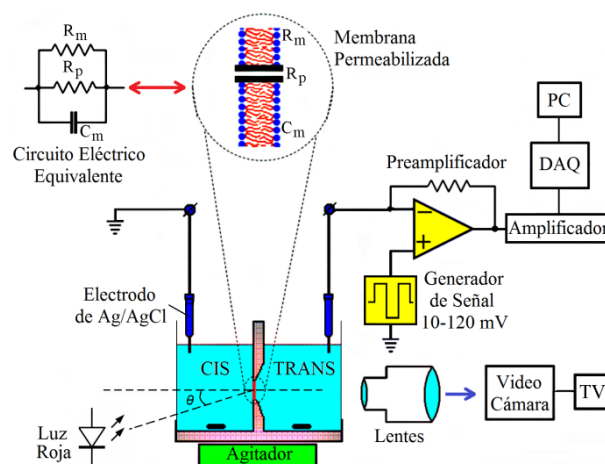


Fig. 9. Esquemático ideal de montaje de BLM [7]

VIII RESULTADOS

Las láminas de teflón cortadas por el micrótopo y puestas en un microscopio se muestran en la Fig. 10. El teflón blanco muestra cambios de coloración lo que puede deberse a imperfectos del material que al ser cortado puede tener partes irregulares, las láminas de teflón transparentes son uniformes en coloración.

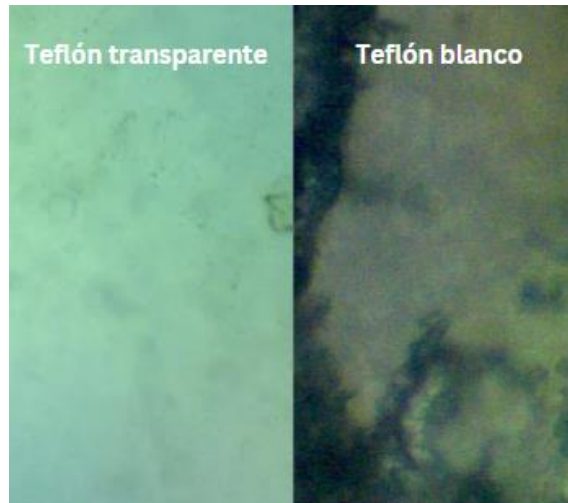


Fig. 10. Láminas de teflón transparente y blanco.

El sistema de perforación para láminas de teflón se muestra en la Fig. 11, donde se pueden observar las tres etapas de conmutación (A), elevación (B) y por ultima la parte de generación de la chispa (C), dónde se muestra también el soporte en su parte fija elaborado en acero inoxidable y las demás partes impresas en PLA una para sostener la lámina de aluminio y la otra sostiene un tornillo pasante con dos tuercas que sujetan la mina de grafito. Se caracterizó la máxima distancia a la cual se seguía produciendo chispa con el fin de conocer el voltaje que entrega la bobina de encendido, teniendo como resultado una distancia de aproximadamente 7mm, en vista de que la chispa se genera con un estimado de 3kV/mm, se puede decir que la bobina entrega aproximadamente 21kV. A partir de esto se estimó que la mejor distancia para hacer las perforaciones fue de 3 mm entre la punta de la mina de grafito y la lámina de aluminio.

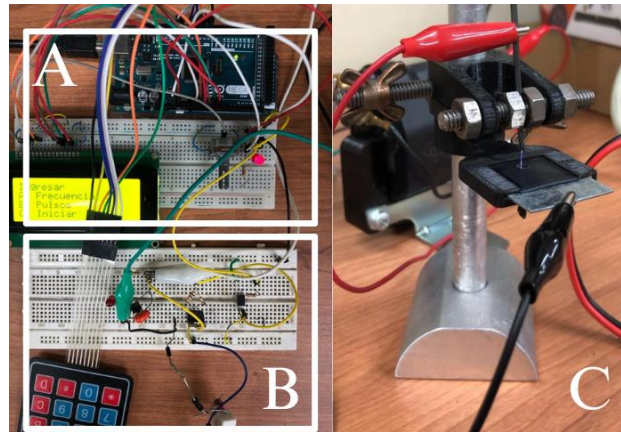
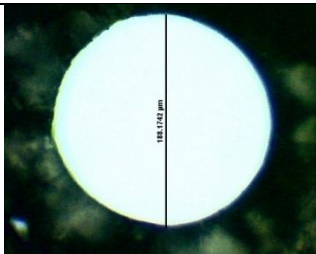
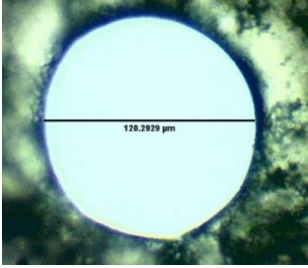
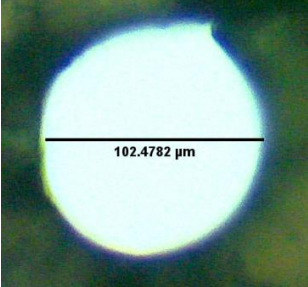
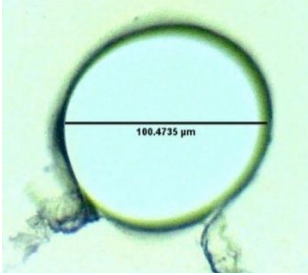
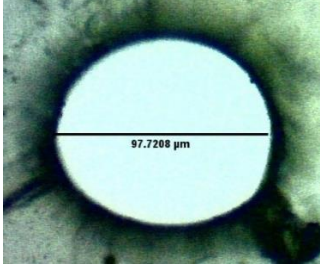
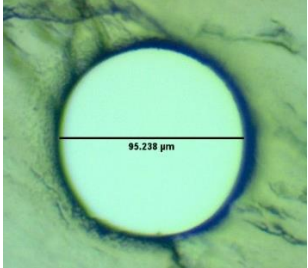


Fig. 11. Sistema de perforación de láminas de teflón.

Las perforaciones sobre las láminas de teflón transparente y blanco de 50 μm de espesor se muestran en la TABLA I. La perforación en teflón blanco que más se aproxima a las condiciones deseadas de tamaño de 100 μm y bordes uniformes, es la perforación de 50 Hz a 1000 pulsos, sin embargo, cabe resaltar que en el teflón blanco se obtuvieron algunos resultados no deseados como micro perforaciones alrededor de la perforación principal. Por otro lado, las perforaciones en teflón transparente se obtuvieron con bordes uniformes y tamaño deseado, sin micro perforaciones, a los 20 Hz a 1000 pulsos. Este último presenta más resistencia eléctrica, por lo que el proceso de perforación fue más demandante. La cantidad de pulsos se definió en 1000 debido a que, para pulsos de 2000, las láminas de teflón se recogían y no se obtenían perforaciones uniformes. En 10 pulsos las perforaciones que se hacían eran muy pequeñas o incluso no se lograban perforar.

TABLA I
RESULTADOS DE LAS PERFORACIONES

Material	Pulsos	Frecuencia	Metal- aire
Teflón blanco	1000	100 Hz	

	1000	50 Hz	
	1000	20 Hz	
Teflón transparente	1000	100 Hz	
	1000	50 Hz	
	1000	20 Hz	

Nota: Tipos de perforaciones en teflón blanco y transparente, variando la frecuencia entre 20, 50, 100 Hz y a 1000 pulsos. Todas las perforaciones se realizaron en medio seco (metal-aire).

Las perforaciones se realizaron en medio metal-aire y líquido, sin embargo, en medio metal-líquido no se obtuvieron buenos resultados ya que el electrolito (0.1M de NaCl) generaba

quemaduras en los bordes, para las perforaciones en láminas de teflón blanco y en las láminas de teflón transparente producía cortes longitudinales, como se muestra en la Fig. 12.

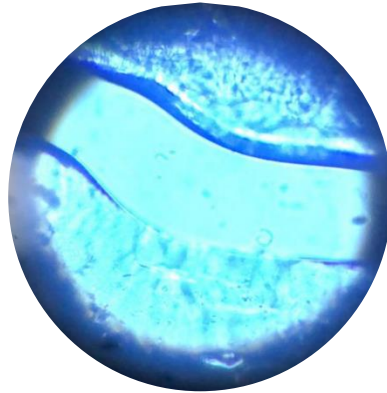


Fig. 12. Cortes no deseados en perforaciones de láminas de teflón transparente con medio metal-liquido.

Se hicieron 27 perforaciones en cada lamina de teflón blanco y transparente para las cuales, según la frecuencia aplicada, el tamaño fue cambiando como se muestra en la Fig. 13. A medida que se aumentaba la frecuencia el diámetro de la perforación fue mayor. Las láminas de teflón blanco tenían menor resistencia eléctrica por lo que con las diferentes frecuencias y la misma cantidad de pulsos, los diámetros de las perforaciones eran mayores en comparación con las perforaciones en las láminas de teflón transparente.

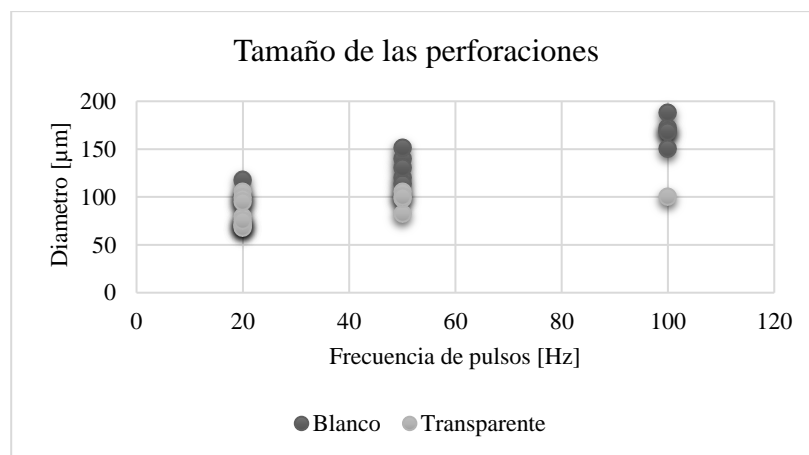


Fig. 13. Tamaño de las perforaciones dependiendo de la frecuencia y con la cantidad de pulsos de 1000.

Las perforaciones en la lámina de teflón transparente a 20Hz, siguen una distribución normal como se muestra en la Fig. 14. El valor promedio del tamaño de las perforaciones es aproximadamente de 85µm con una desviación estándar de 15 µm, lo que se encuentra dentro del diámetro adecuado

para que se formen las BLM. De igual forma existen datos atípicos como perforaciones de tamaños entre los $60\mu\text{m}$ lo que puede deberse a fallas en el proceso de perforado.

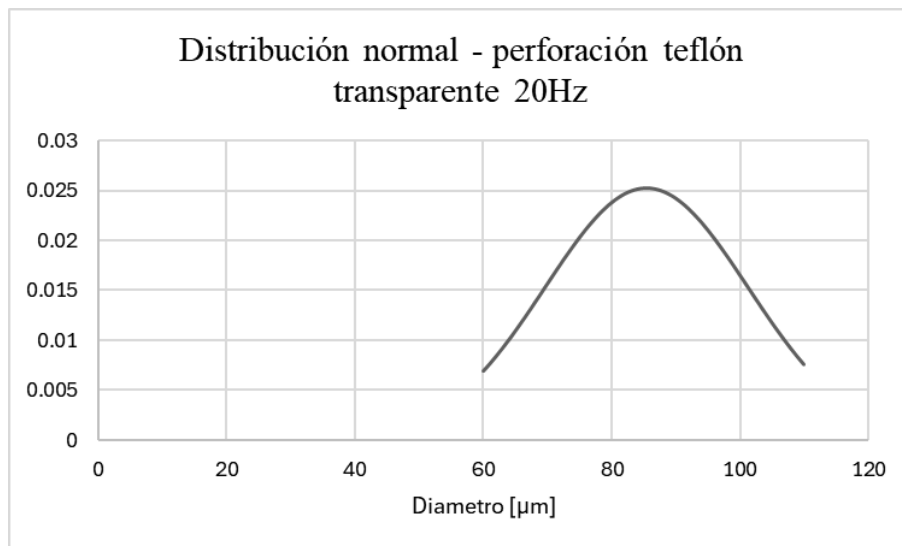


Fig. 14. Distribución normal de las perforaciones en las lamina de teflón transparente

La recamara, donde se colocaron las láminas de teflón perforadas se imprimió en dos materiales diferentes, el primero fue PLA como se muestra en la Fig. 15 donde por la resolución de la impresora, se obtuvo una pieza con rugosidades debido a las capas generadas al imprimirse. El segundo material usado fue la resina, con la cual se obtuvo una pieza con mejores acabados, una superficie lisa que facilita la limpieza. Cabe resaltar que la selección de estos materiales se hizo considerando que fuesen hidrofóbicos.

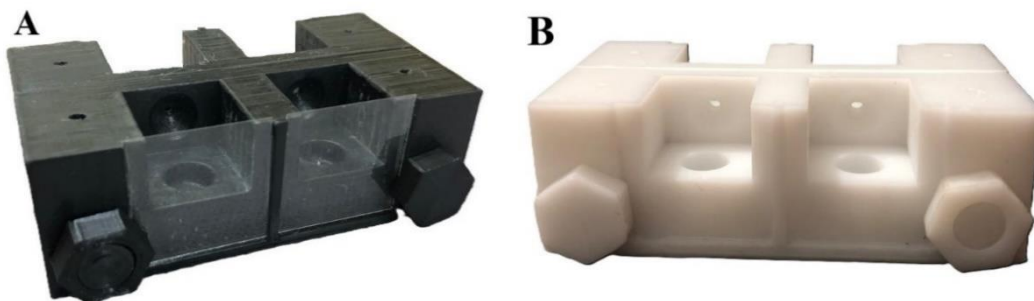


Fig. 15. Recamaras impresas en 3D para dos materiales A. PLA y B. Resina.

En las perforaciones de la TABLA I, se observó que existen coloraciones alrededor de los agujeros de las diferentes láminas de teflón. Por esta razón se hizo un análisis de las curvas de corrientes

óhmicas y capacitivas para verificar que no existan perforaciones no deseadas debido a los imperfectos del material. Esto, además permitió caracterizar las curvas de corriente antes de la formación de la membrana. En la Fig. 16, se observan cuatro gráficas, en azul se evidencia una entrada de pulsos cuadrados de $\pm 100\text{mV}$ con una frecuencia de 100Hz , la gráfica de teflón blanco sin perforar muestra una curva de corriente con picos capacitivos, mientras que en la gráfica de teflón blanco con perforación se observa una curva de corriente con picos capacitivos y óhmicos. De igual manera en las gráficas de teflón transparente se observan los mismos picos para la lámina de teflón transparente sin perforar, mientras que, en la gráfica de teflón transparente con una perforación, las amplitudes de las curvas de corrientes óhmicas son mayores que en el teflón blanco, además, las curvas de corrientes capacitivas son más pequeñas.

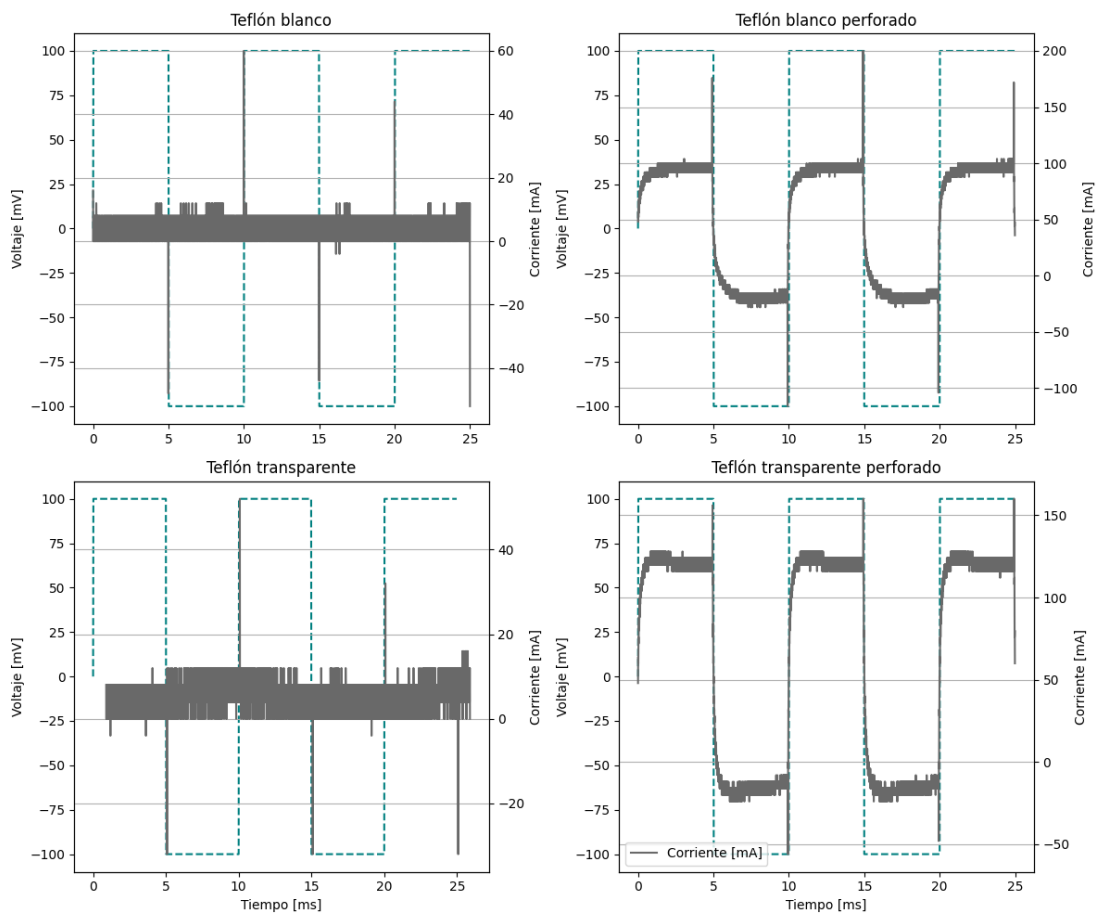


Fig. 16. Graficas corrientes óhmicas y capacitivas en el montaje de BLM con láminas de teflón blanco y transparente perforado y sin perforar.

En la Fig. 17 se muestra un diagrama explicativo sobre las curvas de corriente de conducción óhmica y capacitiva. Al adicionar a la recámara un medio salino con cargas positivas y negativas al cual se le aplica una señal de pulsos, el medio se comporta como un resistor, este produce una señal de salida similar a la de entrada con un voltaje menor. Cuando en la recámara se coloca una lámina de teflón sin perforar, esta funciona como un capacitor en la cual se acumulan cargas a cada lado de ella, produciendo una señal con picos capacitivos positivos o negativos dependiendo de la señal de entrada. Si se coloca una lámina de teflón con una micro perforación, se obtienen picos capacitivos y óhmicos debido a que hay un flujo de cargas a través de la perforación, sin embargo, también existe una acumulación de cargas sobre la lámina, obteniendo una curva de conducción con picos capacitivos y corriente óhmica.

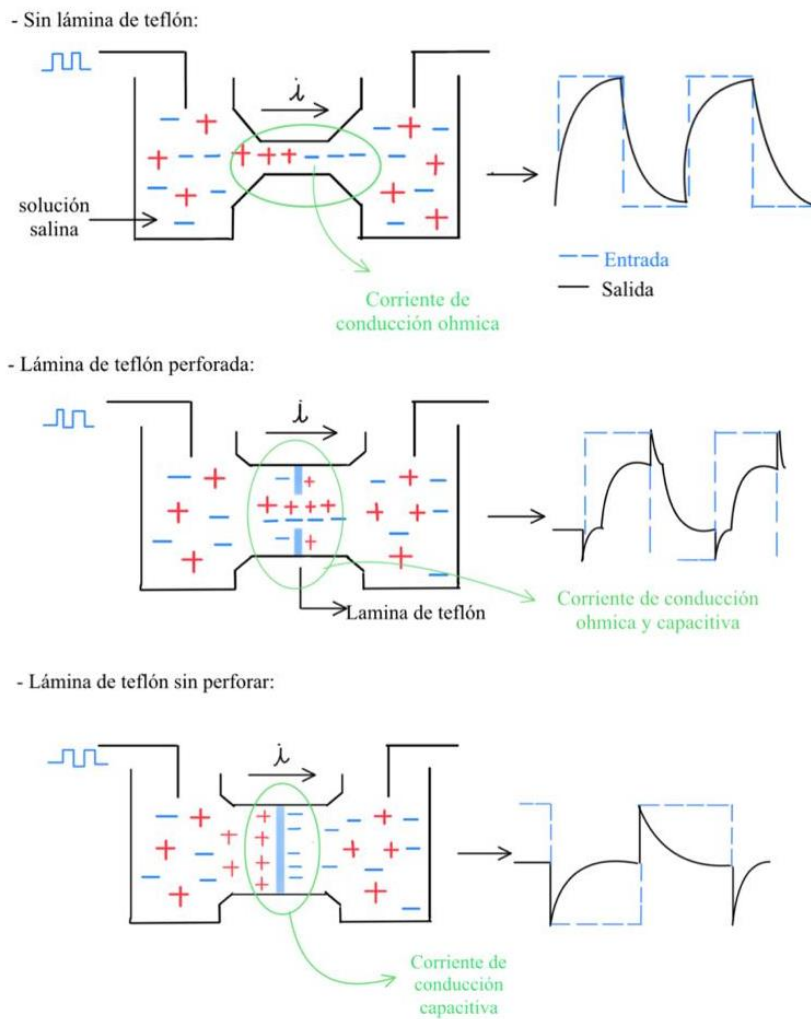


Fig. 17. Esquema explicativo de conducción capacitiva y óhmica.

La validación de la formación de la membrana se realizó con los lípidos DOPE disueltos en cloroformo y metanol, los cuales se secaron con nitrógeno gaseoso para evitar oxidación de los lípidos, posteriormente se les agregó el hexano y el dodecano y por último se adicionaron en la recámara donde estaba ubicada la lámina de teflón transparente con una microperforación de $95.238\mu\text{m}$. Este montaje experimental se realizó en los laboratorios de la tecnología biomédica de la universidad de Antioquia como se muestra en la Fig. 18. El secado de los lípidos corresponde al montaje A en la figura, mientras que en la figura B, se encuentra el montaje realizado para agregar los lípidos a la recámara, visualizarla y medir las corrientes.

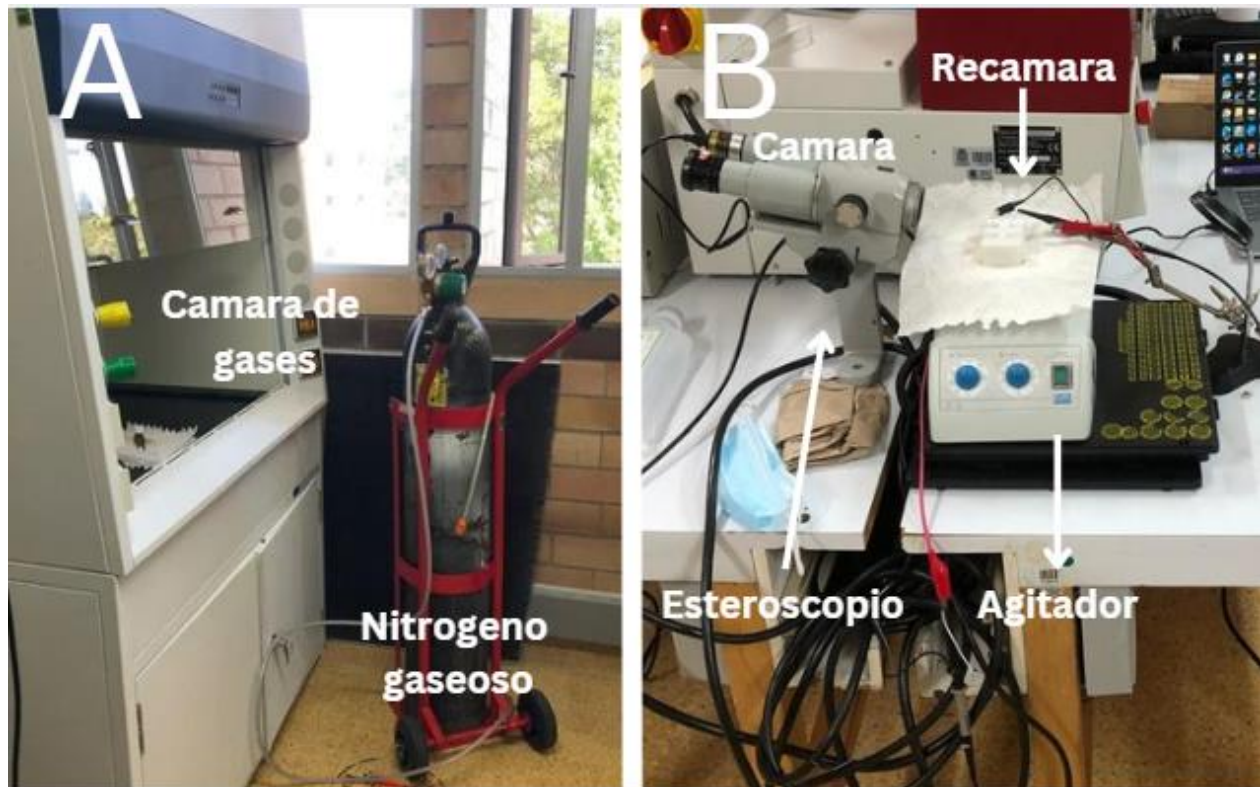


Fig. 18. Montaje del sistema BLM

A un lado de los compartimientos, por medio del generador de señales se envió un pulso cuadrado con $\pm 25\text{mV}$ y una frecuencia de 1Hz , la señal obtenida en el otro compartimiento, se muestra en la Fig. 19 donde se puede observar que existe un aumento en la amplitud de señal de voltaje obtenida a medida que pasa el tiempo, es decir a medida que el Dodecano se evapora y quedan los lípidos unidos a el teflón.

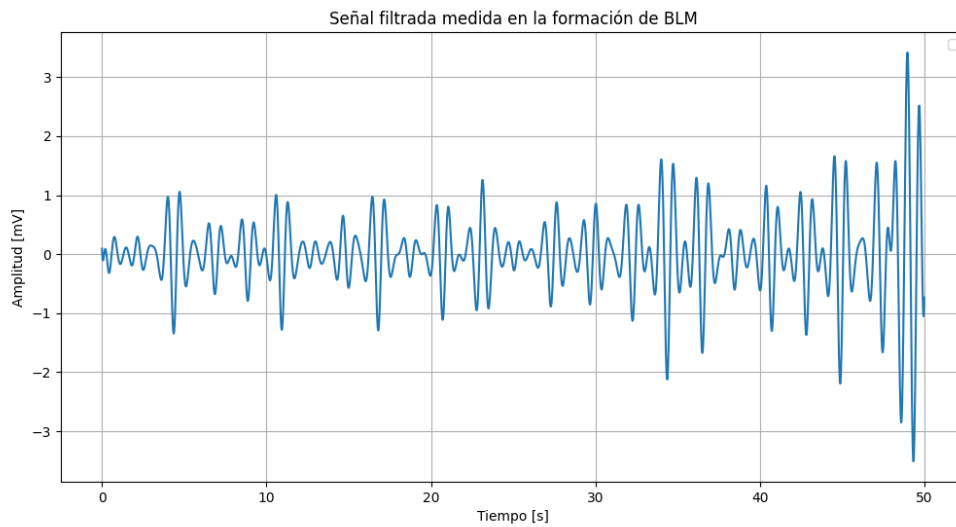
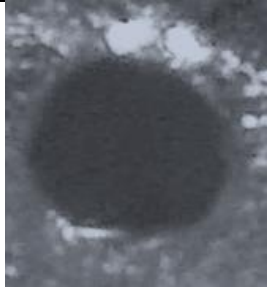


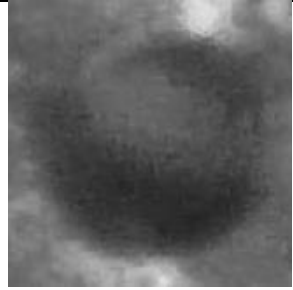


Fig. 19. Señal medida en la formación de la BLM

Se intentó corroborar de forma óptica la formación de la membrana sin embargo debido a la resolución de la cámara y el estereoscopio no se logró observar con claridad la presencia de un anillo de luz.

TABLA II.

RESULTADOS DE LA VISUALIZACIÓN DE FORMACIÓN DE LA BLM

			
Perforación inicial	Recubierta con solución de hexano (5mg lípido/ml hexano)	Se agrega Dodecano (20 mg de lípido/ml de dodecano)	Se empieza a evaporar el Dodecano

IX. DISCUSIÓN

Para realizar BLM, los bordes uniformes y sin quemaduras son características cruciales en las micro perforaciones de las láminas de teflón, ya que de esta manera la adhesión de los lípidos se hace fácilmente. Por lo tanto, la caracterización de la chispa que permite perforar las láminas es importante, la chispa se produce debido a que entre ambos electrodos provenientes de la salida y

la terminal negativa de la bobina se genera una diferencia de potencial muy alta creando un fuerte campo eléctrico. Este campo eléctrico es capaz de ionizar el aire en el espacio entre las terminales, convirtiéndolo en un conductor que genera un flujo de corriente entre un electrodo y el otro [20], la rigidez del aire para una temperatura aproximada de 24°C y una presión atmosférica de 1 atm es de 3kV/mm, por lo que se necesita como mínimo tener este voltaje de salida de la bobina para generar la chispa. Por otro lado, la rigidez del teflón esta entre 40kV/mm a 60kV/mm, por lo que para perforar una lámina de teflón con un espesor de 50µm a una distancia de 3mm entre cada electrodo se necesita que la bobina entregue un valor mínimo de 12kV. Esta corriente se visualiza como una chispa visible, que es una pequeña descarga eléctrica la cual equilibra temporalmente la diferencia de potencial y perfora la lámina de teflón.

La cantidad de descargas en un determinado tiempo influye en el tamaño de la perforación para las frecuencias de 20, 50 y 100 Hz con una cantidad de pulsos establecida en 1000. Se obtuvo que a medida que se aumentaba la frecuencia el tamaño de la perforación aumentaba hasta aproximadamente los 200µm. Se encontró una diferencia entre las perforaciones de las lamina de teflón blanco y transparente, al tener mayor resistencia eléctrica el teflón transparente, el tamaño de la perforación fue más pequeña en comparación con las del teflón blanco. Esto puede deberse a que el teflón transparente tiene otros componentes además del PTFE, lo que le da mayor resistencia eléctrica. Para el teflón blanco la mejor perforación se obtuvo a 50 Hz con 1000 pulsos, ya que los bordes no presentaban quemaduras muy grandes y eran uniformes, por otro lado, en teflón transparente la mejor perforación se obtuvo a 20 Hz con 1000 pulsos. La selección entre un teflón o el otro se hizo debido a que en el teflón blanco se presentaban en algunos casos micro perforaciones alrededor del agujero lo que podría afectar los resultados del montaje de BLM. Así mismo el tamaño del agujero se estableció en 100µm, ya que al tener un menor tamaño de la micro perforación la membrana formada es más estable y por lo tanto con mayor vida útil aproximadamente de 2 horas.

La importancia de la técnica BLM es que los lípidos formen una doble capa, por esta razón para su formación la recámara donde se realice el montaje debe ser de un material hidrofóbico como lo es el PLA y la resina, donde la parte hidrófoba de los lípidos se una a las paredes de la recámara y a su vez a la lámina de teflón soportada en ella. Cabe resaltar que la recámara es

comúnmente elaborada en teflón, sin embargo, debido a la dificultad de maquinado y al alto costo de este, hacerlo en resina facilitó la adquisición de una recámara sin imperfecciones, con facilidad de limpieza y de adhesión de los lípidos.

La validación de la formación de la membrana se hizo con lípidos DOPE, estos tienen una estructura retorcida debido a sus cadenas insaturadas que le ayudan a mantener la fluidez y flexibilidad de la bicapa, los ácidos grasos (“la cola”) de los fosfolípidos son de 16, 18 y 20 carbonos es decir colas largas [21], lo que facilita su autoensamblaje en el agujero de la lámina de teflón. Para corroborar la formación de la bicapa, se hizo la medición de la corriente y también la observación con el estereoscopio, sin embargo, para la forma óptica se esperaba visualizar un anillo de luz como se muestra en la Fig. 20, las bicapas lipídicas planas no reflejan luz y se visualizan negras después de su formación, es decir que se esperaba observar entre la lámina de teflón y la luz un anillo oscuro con pequeño espesor. No obstante, no se logró observar este fenómeno debido a la resolución de la cámara de microscopio y el estereoscopio.

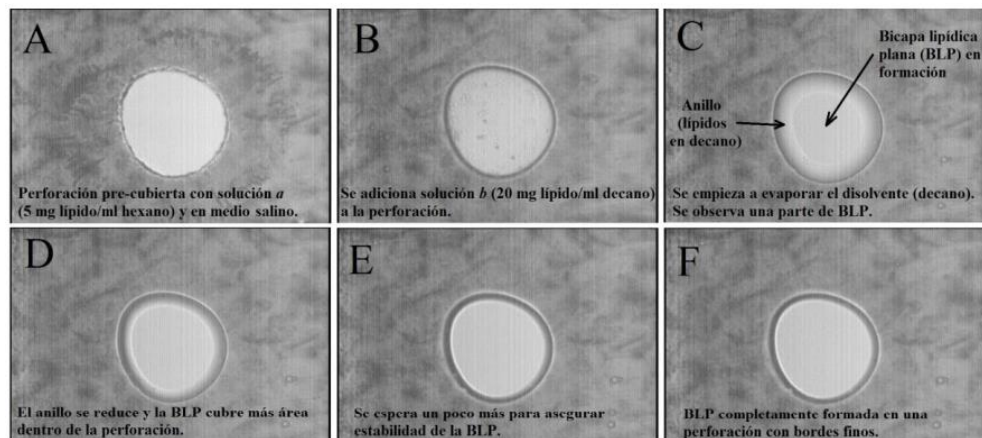


Fig. 20. Resultados esperados de la formación de la BLM, de forma óptica [7].

La otra alternativa para verificar la unión de los lípidos es calcular la capacitancia, midiendo corrientes capacitivas, cuando la película de lípidos se adelgaza, es decir que se unen entre sí y por lo tanto disminuye la distancia entre ellos, la capacitancia aumenta. Esto se debe a que al ser modelada la membrana celular como un capacitor de placas paralelas cuando la distancia entre ambas monocapa disminuye, la corriente aumenta y por ende la capacitancia, esta última es directamente proporcional al área de la superficie de la membrana y la constante dieléctrica de los lípidos, e inversamente proporcional a la distancia entre ellos [6]. La capacitancia de la membrana

puede alcanzar de 100 a 200pF según el tamaño de la perforación utilizada [22], las curvas reportadas en literatura Fig. 21, muestran picos capacitivos que aumentan a medida que el solvente se evapora y los lípidos se unen. En la Fig. 19, debido a la adquisición de los datos y el montaje realizado, no se observan picos claros de capacitancia, pero si un aumento en la amplitud de la señal a medida que incrementa el tiempo. Esto podría indicar que tal vez no se presenta una formación adecuada de la bicapa debido a factores como los dispositivos utilizados para el montaje o movimientos mecánicos que pueden afectar la formación y estabilidad de la membrana. Pero, si se mejora el protocolo de formación se podría obtener la membrana deseada.

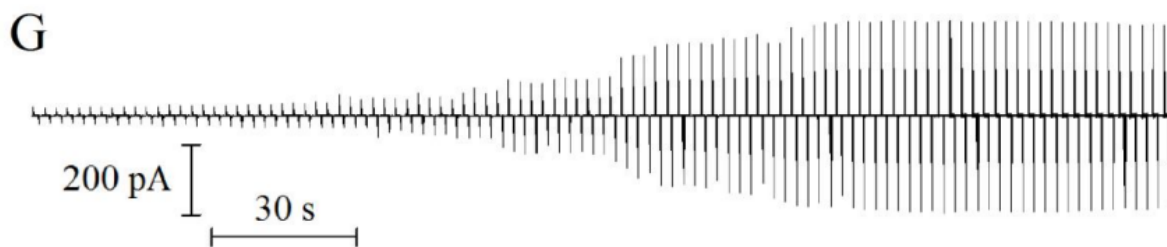


Fig. 21. Curvas esperadas de formación de BLM [7].

X. CONCLUSIONES

1. Las perforaciones destinadas a la formación de la membrana deben tener bordes uniformes y no quemados, con un tamaño entre 50 y 250 μm . Esta característica se puede controlar ajustando la cantidad de pulsos y la frecuencia de la chispa. La perforación óptima se obtuvo con 1000 pulsos a una frecuencia de 20 Hz, utilizando una lámina de teflón transparente de 50 μm de espesor en un medio metal-aire.
2. Una alternativa viable para el material hidrofóbico en la construcción de una cámara de BLM es la resina. Su impresión en 3D ofrece la ventaja de proporcionar acabados superiores, con capas lisas que facilitan la limpieza. Además, la precisión y personalización que permite la impresión en 3D aseguran una fabricación más controlada y reproducible de la cámara, optimizando así el rendimiento y la consistencia de las membranas formadas.
3. Aunque no se puede concluir con certeza la correcta formación de la membrana, el aumento observado en la corriente sugiere resultados prometedores. Con la mejora del protocolo y los dispositivos, es posible lograr la obtención de una membrana reproducible, elaborada con lípidos DOPE.

XI. RECOMENDACIONES

Continuar afinando el protocolo de formación de la membrana, enfocándose en los parámetros que afectan directamente la calidad y reproducibilidad de la membrana. Experimentar con diferentes combinaciones de lípidos, e implementar antioxidantes como la vitamina E para ayudar en la preservación de la calidad de los lípidos y ajustar las condiciones experimentales para obtener resultados consistentes.

Mejorar los dispositivos utilizados o usar dispositivos con filtros de ruido que permitan una mejor adquisición de las señales, además de usar elementos anti vibratorios para que no se afecte la estabilidad de la membrana.

REFERENCIAS

- [1] N. Mei *et al.*, “Protective effect of melatonin against amyloid-beta-induced damage in model lipid membranes,” *Biophys. J.*, vol. 123, no. 3, p. 156a, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.bpj.2023.11.1059.
- [2] W. Szlasa, I. Zendran, A. Zalesińska, M. Tarek, and J. Kulbacka, “Lipid composition of the cancer cell membrane,” *J. Bioenerg. Biomembr.*, vol. 52, no. 5, pp. 321–342, 2020, doi: 10.1007/s10863-020-09846-4.
- [3] N. Nanajkar, A. Sahoo, and S. Matysiak, “Effects of lipid composition on the curvature sensing of Huntingtin’s N17 domain,” *Biophys. J.*, vol. 123, no. 3, p. 156a, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.bpj.2023.11.1060.
- [4] C. Ramírez-martín and O. Duran Avendaño, “Technical measure for capacitance and resistance of a lipid bilayer membrane,” vol. 2, no. 1, *Revista I3+*, Tunja, pp. 46–65, 2014. [Online]. Available: <https://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/reiv3/article/view/73/74>
- [5] O. Zabala-Ferrera, P. Liu, and P. J. Beltramo, “Determining the Bending Rigidity of Free-Standing Planar Phospholipid Bilayers,” *Membranes (Basel)*, vol. 13, no. 2, Feb. 2023, doi: 10.3390/membranes13020129.
- [6] A. Chanturiya, *QUICK START ON BLM TECHNIQUE. | Request PDF*, Eastern Sc. Amazon, 2013. Accessed: Jun. 13, 2024. [Online]. Available: https://www.amazon.com/-/es/Alexandr-Chanturiya-ebook/dp/B00AVQKIOG/ref=monarch_sidesheet#detailBullets_feature_div
- [7] J. A. Alvarez, “PERMEABILIZACIÓN POTENCIAL-DEPENDIENTE DE MEMBRANAS LIPÍDICAS ARTIFICIALES CON PÉPTIDOS POLICATIÓNICOS,” Universidad Nacional de Colombia, 2017.
- [8] C. T. Filice, J. Lumini, B. Y. Lee, and Z. Leonenko, “Melatonin Changes Domain Structure and Protects Model Neuronal Membranes Against Damage Caused by Amyloid-Beta,” *Biophys. J.*, vol. 118, no. 3, p. 232a, 2020, doi: 10.1016/j.bpj.2019.11.1373.
- [9] J. Hoser, A. Dabrowska, M. Zajac, and P. Bednarczyk, “Changes in Ion Transport across Biological Membranes Exposed to Particulate Matter,” *Membranes (Basel)*, vol. 13, no. 9, Sep. 2023, doi: 10.3390/membranes13090763.

-
- [10] J. Young *et al.*, “Anatomy & Physiology,” in *Anatomy & Physiology*, Houston: OpenStax College, 2013. doi: 10.5399/osu/1116.
- [11] M. Montal and P. MUELLER, “Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 69, no. 12, USA, pp. 3561–3566, Sep. 1972. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.69.12.3561>.
- [12] M. Komiya *et al.*, “A Teflon-based system for applying multidirectional voltages to lipid bilayers as a novel platform for membrane proteins,” *arXiv*, no. July, 2019, [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/334457565_A_Teflon-based_system_for_applying_multidirectional_voltages_to_lipid_bilayers_as_a_novel_platform_for_membrane_proteins
- [13] L. Bar, M. E. Villanueva, S. Neupane, G. Cordoyiannis, and P. Losada-Pérez, “QCM-D Study of the Formation of Solid-Supported Artificial Lipid Membranes: State-of-the-Art, Recent Advances, and Perspectives,” *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.*, vol. 220, no. 22, 2023, doi: 10.1002/pssa.202200625.
- [14] J. Andersson, I. Köper, and W. Knoll, “Tethered membrane architectures—design and applications,” *Front. Mater.*, vol. 5, no. September, pp. 1–11, 2018, doi: 10.3389/fmats.2018.00055.
- [15] I. Hashimoto *et al.*, “Reproducible reformation of a bilayer lipid membrane using microair bubbles,” *Droplet*, vol. 2, no. 3, pp. 1–9, 2023, doi: 10.1002/dro2.73.
- [16] T. Phung, Y. Zhang, J. Dunlop, and J. Dalziel, “Bilayer lipid membranes supported on Teflon filters: A functional environment for ion channels,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 7, pp. 3127–3135, Mar. 2011, doi: 10.1016/J.BIOS.2010.12.013.
- [17] V. Milesi and M. Moncada, “Potencial de membrana celular,” in *Fisiología celular: Señales y respuestas*, E. de la U. de La Plata, Ed., Universidad Nacional de La Plata, 2019, pp. 1–42. Accessed: Mar. 05, 2024. [Online]. Available: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/149566>
- [18] O. V. Batishchev *et al.*, “Antimicrobial activity of photosensitizers: arrangement in bacterial membrane matters,” *Front. Mol. Biosci.*, vol. 10, no. May, pp. 1–14, 2023, doi: 10.3389/fmolb.2023.1192794.
- [19] D. Kozon-Markiewicz, R. J. Kopiasz, M. Głusiec, A. Łukasiak, P. Bednarczyk, and D.

- Jańczewski, “Membrane lytic activity of antibacterial ionenes, critical role of phosphatidylcholine (PC) and cardiolipin (CL),” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 229, no. May, 2023, doi: 10.1016/j.colsurfb.2023.113480.
- [20] K. Naoki, M. Ryota, and O. Kohei, “Derivation of Arc Length Calculation for DC High Voltage Arc Interruption in Closed Space,” *OMRON Tech.*, vol. 53, no. 1, pp. 1–7, 2021, [Online]. Available: https://www.omron.com/global/en/assets/file/technology/omrontechnics/vol53/OMT_Vol53_014EN.pdf
- [21] J. Parchekani, A. Allahverdi, M. Taghdir, and H. Naderi-Manesh, “Design and simulation of the liposomal model by using a coarse-grained molecular dynamics approach towards drug delivery goals,” *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–15, 2022, doi: 10.1038/s41598-022-06380-8.
- [22] E. Zakharian, “Recording of ion channel activity in planar lipid bilayer experiments,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 998, pp. 109–118, 2013, doi: 10.1007/978-1-62703-351-0_8.

ANEXOS

Anexo A. Código en ARDUINO para la selección de pulsos y frecuencias de conmutación.

```
#include <LiquidCrystal.h>
LiquidCrystal lcd(A0, A1, A2, A3, A4, A5); //Pines donde va conectada la
pantalla (RS, E, D4, D5, D6, D7)

#include <Keypad.h>

const byte filas = 4; //Numero de filas del teclado
const byte columnas = 4; //Numero de columnas del teclado

//Defino una matriz 4x4 con la posicion de las filas y columnas
char matriz[filas][columnas] = {

  { '1', '2', '3', 'A' },
  { '4', '5', '6', 'B' },
  { '7', '8', '9', 'C' },
  { '*', '0', '#', 'D' },

};
```

```
byte pinesFilas[filas] = { 9, 8, 7, 6 };           //Pines donde van conectadas las
filas del teclado
byte pinesColumnas[columnas] = { 5, 4, 3, 2 }; //Pines donde van conectadas las
columnas del teclado

//Inicializo el teclado con el numero de filas, columnas, los pines del Arduino
utilizados y la matriz
Keypad teclado = Keypad(makeKeymap(matriz), pinesFilas, pinesColumnas, filas,
columnas);

char pulsacion;
char frecuencia;
char pulso;
char salir;
char fr;
char pul;
int fre = 20;
int puls = 1000;

void setup() {
  lcd.begin(20, 4); // Inicializa la pantalla LCD: 16 columnas y 2 filas
  pinMode(11, OUTPUT);
  digitalWrite(11, HIGH);
  intro_0();
  Serial.begin(115200);
}

void loop() {

  pulsacion = teclado.getKey();
  Serial.println(pulsacion);

  if (pulsacion == 'A') {
    menuA();
  }
  if (pulsacion == 'B') {
    menuB();
  }
  if (pulsacion == 'C') {
    menuC();
  }
}

//INTRO 0//
```

```
void intro_0() {
    lcd.clear();          // Limpia la pantalla LCD
    lcd.setCursor(0, 0); // Establece la posición del cursor en la fila 1, columna
1
    lcd.print("Ingresar");
    lcd.setCursor(0, 1);
    lcd.print("A. Frecuencia");
    lcd.setCursor(0, 2);
    lcd.print("B. Pulsos");
    lcd.setCursor(0, 3);
    lcd.print("C. Iniciar");
    pulsacion = teclado.getKey();
}

//MENU//
void menuA() {
    lcd.clear();
    lcd.print("Frecuencia Hz");
    lcd.setCursor(0, 1);
    lcd.print("1. 100 Hz");
    lcd.setCursor(0, 2);
    lcd.print("2. 50 Hz");
    lcd.setCursor(0, 3);
    lcd.print("3. 20 Hz");

    while (pulsacion != 0) {

        fr = teclado.getKey();

        if (fr == '1') {
            fre = 100;
            lcd.clear();
            lcd.setCursor(2, 1);
            lcd.print("Selecciono ");
            lcd.print(fre);
            lcd.print(" Hz");
            delay(1000);
            intro_0();
        }
        if (fr == '2') {
            fre = 50;
            lcd.clear();
            lcd.setCursor(2, 1);
            lcd.print("Selecciono ");
            lcd.print(fre);
        }
    }
}
```

```
        lcd.print(" Hz");
        delay(1000);
        intro_0();
    }
    if (fr == '3') {
        fre = 20;
        lcd.clear();
        lcd.setCursor(2, 1);
        lcd.print("Selecciono ");
        lcd.print(fre);
        lcd.print(" Hz");
        delay(1000);
        intro_0();
    }
    if (fr == '*') {
        lcd.clear();
        lcd.setCursor(2, 1);
        lcd.print("Selecciono ");
        lcd.print("*");
        pulsacion = teclado.getKey();
        intro_0();
    }
}
}

void menuB() {
    lcd.clear();
    lcd.print("Pulsos: ");
    lcd.setCursor(0, 1);
    lcd.print("1. 10");
    lcd.setCursor(0, 2);
    lcd.print("2. 1000");
    lcd.setCursor(0, 3);
    lcd.print("3. 2000");

    while (pulsacion != 0) {

        pul = teclado.getKey();

        if (pul == '1') {
            puls = 10;
            lcd.clear();
            lcd.setCursor(1, 1);
            lcd.print("Selecciono ");
            lcd.print(puls);
```

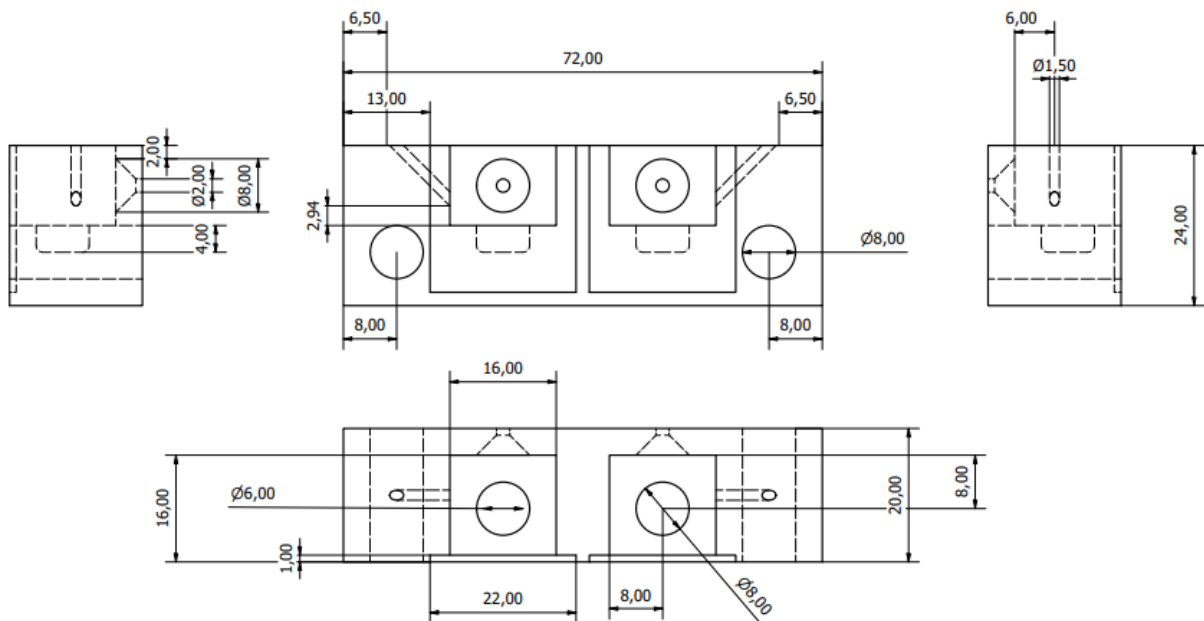
```
    lcd.print(" Pul");
    delay(800);
    intro_0();
}
if (pul == '2') {
    puls = 1000;
    lcd.clear();
    lcd.setCursor(1, 1);
    lcd.print("Selecciono ");
    lcd.print(puls);
    lcd.print(" Pul");
    delay(1000);
    intro_0();
}
if (pul == '3') {
    puls = 2000;
    lcd.clear();
    lcd.setCursor(1, 1);
    lcd.print("Selecciono ");
    lcd.print(puls);
    lcd.print(" Pul");
    delay(1000);
    intro_0();
}
if (pul == '*') {
    lcd.clear();
    lcd.setCursor(3, 1);
    lcd.print("Selecciono ");
    lcd.print("*");
    pulsacion = teclado.getKey();
    intro_0();
}
}
}
```

```
void menuC() {

    lcd.clear();
    lcd.setCursor(5, 0);
    lcd.print("Perforando");
    lcd.setCursor(8, 1);
    lcd.print("...");
    lcd.setCursor(1, 2);
    lcd.print("Frecuencia: ");
    lcd.print(fre);
```

```
lcd.setCursor(1, 3);  
lcd.print("Pulsos: ");  
lcd.print(puls);  
  
double delay_time = 1000.0 * 0.25 / (fre);  
for (int i = 0; i < puls; i++) {  
    digitalWrite(11, HIGH);  
    delay(delay_time);  
    digitalWrite(11, LOW);  
    delay(delay_time);  
    digitalWrite(11, HIGH);  
    if (i == (puls - 1)) {  
        delay(500);  
        intro_0();  
    }  
}  
}  
}
```

Anexo B. Planos de la recámara de BLM



Anexo C. Diseño PCB