

Preparación de modelos de membrana celular y su interacción con nanopartículas magnéticas

Laura Juliana Cortés Chacón y Paula Andrea Ojeda Giratá

Trabajo de Grado para Optar título de Ingeniero Químico

Directora

Luz Marina Ballesteros Rueda

Ingeniera Química, MSc, Ph.D

Codirectora

Pilar Cea Mingueza

Catedrática de Química Física, Doctora en Ciencias

Universidad de Zaragoza

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2020

*A Dios, por la vida, los dones, las gracias y bendiciones recibidas.*

*A mi mamá Olivia por y para quién soy, por su apoyo incondicional en mis decisiones, especialmente en el transcurso de mi carrera universitaria. A ella infinitas gracias por su labor como madre evidenciada en su entrega y sacrificio.*

*A mis abuelos Rosendo y María Oliva, los tesoros y amores de mi vida, mis alcahuetes, quiénes están dispuestos a dejarse robar sonrisas por esta, su nieta testaruda e hicieron posible mi viaje de pasantía de investigación.*

*A mi tía Fabiola por brindarme el amor más puro, bonito y desinteresado del mundo.*

*A mi tía Esperanza por inculcar en mi niñez el amor a la ciencia y a mi tía Edith por su acompañamiento, ánimo y cariño a lo largo de estos años.*

*A mi prima-hermana Natalie Giselle por creer y confiar en mis aptitudes y en lo alto que puedo escalar.*

*A mis primas Valeria y Zoé Samara por ser motivación.*

*A la familia León Ardila por ofrecerme un hogar y acogerme en su casa durante mi carrera universitaria.*

*A Paula Andrea, mi cómplice, confidente, mejor amiga, hermana, compañera de tesis, de viaje y ahora de vida, gracias por tanto.*

*Laura Juliana C. Chacón*

*A Dios y a la Virgen por concederme la sabiduría, fuerza y salud para el desarrollo de este proyecto.*

*A mi padre Jose Daniel por generar en mí la voluntad y fuerza para salir adelante.*

*A mi madre Aura Alicia por los grandes sacrificios, por soñar conmigo, por estar siempre segura de mis habilidades y verme siempre triunfante.*

*A mis hermanas Jhayne Esperanza y Aura María por su amor, ánimo y apoyo en cada uno de mis pasos.*

*A mi hermano Daniel Ricardo por ser mi inspiración y ejemplo a seguir, por ser mi guía en mi carrera profesional y siempre confiar en mis capacidades.*

*A mis sobrinitas Sofia y Sara por ser fuente de motivación y alegría en mi vida.*

*A mi compañera de tesis y mi mejor amiga Laura Juliana por su paciencia y que gracias a esta aventura que emprendimos juntas hicimos un lazo de hermandad. Fuimos compañía y apoyo en días difíciles y alegría en los días más geniales.*

*Paula Andrea Ojeda Giratá*

### Agradecimientos

A nuestra alma mater la UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER, a la ESCUELA DE INGENIERÍA QUÍMICA, a todos los profesores y administrativos que intervinieron en nuestro proceso educativo por aportar a nuestra formación personal y profesional.

A la UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA por el convenio celebrado, el cual permitió la investigación en la cual se enmarca este proyecto.

A los profesores LUZ MARINA BALLESTEROS y HERNANDO GUERRERO, por confiar en nuestro trabajo, gestionar y hacernos partícipes del convenio realizado entre la UIS y la UNIZAR.

A la profesora PILAR CEA MINGUEZA, gracias infinitas por aceptarnos en su grupo de investigación, compartir sus conocimientos e incentivar en nosotras el espíritu investigativo.

Al INSTITUTO DE NANOCIENCIA DE ARAGÓN y su personal de trabajo, por acogernos durante nuestra estancia en Zaragoza.

A nuestra tutora SILVIA RUIZ, nuestro *sol*, por estar dispuesta a ayudar y enseñar. Gracias por dedicarnos su tiempo, compartir su lugar de trabajo, corregir este documento, ser nuestra guía en Zaragoza, y brindarnos su amistad.

A nuestro tutor STEFANO CHIODINI por su apoyo y enseñanzas en la caracterización con AFM. Gracias por alegrar nuestras mañanas a la hora del café, por incentivarlos a hablar italiano e inglés, por las largas y extenuantes jornadas de trabajo y ofrecernos su amistad.

A los integrantes del GRUPO DE INVESTIGACIÓN PLATÓN, quienes estuvieron atentos a colaborarnos y responder nuestras dudas.

A INES TEJEDOR por ayudarnos a resolver inconvenientes presentados en el transcurso de la investigación, por su energía, alegría y disposición.

A ALONDRA BRAVO, nuestra *parcera*, amiga mexicana que conocimos en este proceso y con quién compartimos muchas alegrías, algunas tristezas y varios “montaditos”, gracias por su carisma, cariño, hermandad y amistad.

**Tabla de Contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	13
1. Objetivos .....	21
1.1. Objetivo General .....	21
1.2. Objetivos Específicos .....	21
2. Metodología .....	22
2.1. Elaboración de monocapas de Langmuir.....	22
2.2. Fabricación de películas Langmuir Blodgett .....	24
2.3. Deposición nanopartículas magnéticas MNPs .....	25
2.4. Aplicación hipertermia magnética .....	26
3. Análisis de Resultados .....	26
4. Conclusiones .....	44
Referencias Bibliográficas .....	45
Apéndices .....	52

**Lista de Tablas**

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Cambios de altura de MNPs sobre película de GSL4-COL-DPPC, con exposición de 15 minutos continuos de AMF.....	74
Tabla 2. Cambios de altura de MNPs sobre película de GSL4-COL-DPPC, con exposición de 30 minutos continuos de AMF.....	77
Tabla 3. Rangos de longitud de onda de grupos funcionales Alquino.....	83
Tabla 4. Rangos de longitud de onda de grupos funcionales Hidroxilos.....	84
Tabla 5. Rangos de longitud de onda de grupos funcionales Azida.....	85

### Lista de Figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Fases de formación monocapa interfaz aire-agua.....	16
Figura 2. Diagrama de flujo del proyecto de investigación .....	22
Figura 3. Imágenes de BAM .....	27
Figura 4. Isotermas presión superficial ( $\pi$ ) en función del área molecular (A) .....	28
Figura 5. Isotermas presión superficial ( $\pi$ ) en función del área molecular (A) para mezclas binarias .....	29
Figura 6. Exceso de área versus fracción molar para monocapas mixtas .....	30
Figura 7. Energía de mezcla Gibbs versus fracción molar para monocapas mixtas .....	31
Figura 8. Energía de Helmholtz versus fracción molar para monocapas mixtas .....	33
Figura 9. Imágenes AFM. Mezclas binarias de GSL2-DPPC transferidas .....	34
Figura 10. Imágenes AFM. Mezclas binarias de GSL2-COL transferidas .....	34
Figura 11. Imágenes AFM Mezclas binarias de GSL4-DPPC transferidas .....	35
Figura 12. Imágenes AFM Mezclas binarias de GSL4-COL transferidas .....	35
Figura 13. Imágenes AFM GSL2 transferido a diferentes presiones .....	36
Figura 14. Imágenes AFM GSL4 transferido a diferentes presiones .....	36
Figura 15. Imágenes AFM GSL2-DPPC-COL transferido .....	37
Figura 16. Imágenes AFM GSL4-DPPC-COL transferido .....	37
Figura 17. Comparación de película de GSL4-DPPC-COL proceso incubación MNPs y AMF...39	

Figura 18. Espectro ATR de GSL2 y GSL2-DPPC.COL con MNPs grupo alquino.....	40
Figura 19. Espectro ATR de GSL4 y GSL4-DPPC.COL con MNPs grupo alquino.....	41
Figura 20. Comparación de pruebas ATR y transmitancia del GSL4 con MNPs grupo alquino ..	42
Figura 21. Espectro de ATR de GSL4 y GSL4-DPPC-COL con MNPs con grupo alquino, incubación 24 horas.....	43
Figura 22. Partes del AFM .....	55
Figura 23. Estructura química de los compuestos químicos usados .....	57
Figura 24. Cuba KSV NIMA con BAM incorporado .....	58
Figura 25. Cuba KSV NIMA modelo 2003 .....	60
Figura 26. Detalles cuba KSV NIMA 2003 .....	61
Figura 27. Software KSV NIMA LB .....	62
Figura 28. Esquema de micas marcadas por PVD .....	66
Figura 29. Imágenes AFM mica marcada .....	67
Figura 30. Isotherma glicoesfingolípido 2 con imágenes de BAM.....	70
Figura 31. Isotherma glicoesfingolípido 4 con imágenes de BAM.....	71
Figura 32. Isotherma DPPC con imágenes de BAM.....	72
Figura 33. Isotherma COL con imágenes de BAM.....	73
Figura 34. Comparación de película de GSL4-DPPC-COL transferida a $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ .....	80
Figura 35. Comparación de película de GSL2-DPPC-COL transferida a $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ .....	81
Figura 36. Comparación de película de GSL2-DPPC-COL transferida a $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ .....	82

**Lista de Apéndices**

	<b>Pág.</b>
Apéndice A. Langmuir y Langmuir Blodgett .....	52
Apéndice B. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) .....	54
Apéndice C. Estructuras Químicas de los Compuestos .....	57
Apéndice D. Microscopio de Ángulo Brewster (BAM) .....	58
Apéndice E. Cuba KSV NIMA .....	60
Apéndice F. Limpieza de la Cuba KSV NIMA .....	64
Apéndice G. Marcas sobre la mica.....	66
Apéndice H. Reflectancia Total Atenuada (ATR) .....	68
Apéndice I. Hipertermia .....	69
Apéndice J. Isotermas de las soluciones según BAM.....	70
Apéndice K. Cambios en las alturas de MNPs sobre membrana fabricada .....	74
Apéndice L. Imágenes de AFM de mezclas ternarias con MNPs .....	80
Apéndice M. Tablas de Rangos de longitud de onda de grupos funcionales .....	83

**Adenda del Plan de Trabajo de Grado**

---

	<b>Planeado</b>	<b>Conseguido</b>	<b>Observaciones</b>
<b>Objetivo Específico</b>	Establecer las condiciones idóneas para la fabricación de capas y bicapas de fosfolípidos, colesterol y glicosfingolípidos usando Langmuir-Blodgett (LB) y Langmuir-Schaefer (LS).	Establecer las condiciones idóneas para la fabricación de capas y bicapas de fosfolípidos, colesterol y glicosfingolípidos usando Langmuir-Blodgett (LB).	El trabajo de investigación tenía como fecha de culminación la tercera semana de marzo, sin embargo, la situación de la pandemia COVID-19 obligó a los laboratorios en Zaragoza, España a cerrar la primera semana de dicho mes. La técnica Langmuir-Schaefer era adicional y de comparación, por tal razón se decidió omitir para evitar retrasos en la presentación del proyecto.

---

## Resumen

**Título:** Preparación de modelos de membrana celular y su interacción con nanopartículas magnéticas \*

**Autores:** Laura Juliana Cortés Chacón, Paula Andrea Ojeda Giratá \*\*

**Palabras Claves:** Membrana Celular, Nanopartículas Magnéticas, Langmuir-Blodgett, Microscopía de Fuerza Atómica, Hipertermia Magnética, Campo Magnético Alterno

### Descripción:

En la actualidad los procedimientos convencionales de tratamientos de cáncer generan efectos colaterales que repercuten de manera negativa en la vida del paciente. La terapia génica es una alternativa atractiva para evitar tratamientos invasivos; sin embargo, el sistema de entrega no viral presenta inconvenientes como la baja eficiencia de transfección, todas las aplicaciones de terapia génica dependen del hecho de que el material genético debe suministrarse a través de la membrana celular siendo el objetivo del proyecto MagicCellGene inducir poros de tamaño adecuado en la membrana celular para el mejoramiento de la transfección no viral mediante hipertermia magnética. Por lo tanto, es necesaria la fabricación de membranas celulares miméticas que permitan un estudio y control de los componentes. En este trabajo se fabrican películas de Langmuir-Blodgett simulando membranas biológicas a partir de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC), colesterol (COL), glicoesfingolípido 2 (GSL2) y glicoesfingolípido 4 (GSL4)  $10^{-4}$ M para depositar nanopartículas magnéticas (MNPs) mediante autoensamblaje, que junto a un campo magnético alterno (AMF) tienen la propiedad de liberar energía en forma de calor induciendo poros sobre la membrana. La caracterización de los procesos de fabricación de películas de Langmuir, deposición de MNPs y aplicación de hipertemia se realiza usando microscopía de fuerza atómica (AFM), de esta manera se garantizan condiciones óptimas de proceso y se evidencian los cambios en las membranas sintetizadas.

---

\* Trabajo de grado

\*\* Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Directora: Ingeniera Química, MSc, Ph.D. Luz Marina Ballesteros Rueda Codirectora: Doctora en Ciencias Pilar Cea Mingueza

### Abstract

**Title:** Preparation of cell membrane models and their interaction with magnetic nanoparticles \*

**Authors:** Laura Juliana Cortés Chacón, Paula Andrea Ojeda Giratá \*\*

**Key Words:** Cell Membrane, Magnetic Nanoparticles, Langmuir-Blodgett, Atomic Force Microscopy, Magnetic Hyperthermia, Alternating Magnetic Field

#### Description:

Currently conventional cancer treatment procedures generate side effects that have a negative impact on the patient's life. Gene therapy is an attractive alternative to avoid invasive treatments; however, the non-viral delivery system has drawbacks such as low transfection efficiency, all gene therapy applications depend on the fact that the genetic material must be injected through the cell membrane. Being the main purpose of the MagicCellGene project, to induce pores of adequate size in the cell membrane for the improvement of non-viral transfection by magnetic hyperthermia. Therefore, it is necessary simulate mimetic cell membranes to facilitate the understanding and control of the components. In this work, Langmuir-Blodgett films are made in order to behave as biological cell membranes obtained from 1,2-dipalmitoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (DPPC), cholesterol (COL), glycosphingolipid 2 (GSL2) and glycosphingolipid 4 (GSL4)  $10^{-4}M$  to deposit Magnetic Nanoparticles (MNPs) by self-assembly, subjected to an Alternating Magnetic Field (AMF) to get the property of releasing energy in form of heat, inducing pores in the membrane in this way. Characterization of Langmuir-Blodgett films making processes, deposition of MNPs and application of hyperthermia is carried out by using Atomic Force Microscopy (AFM), ensuring optimal process conditions to observe the changes in synthesized membranes.

---

\* Degree work

\*\* Faculty of Physicochemical Engineering. School of Chemical Engineering. Director: Chemical Engineer, MSc, Ph.D. Luz Marina Ballesteros Rueda Co-director: Doctor of Science Pilar Cea Minguenza

## Introducción

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, esta enfermedad consiste en un crecimiento desordenado de células viejas o dañadas que sobreviven cuando deberían morir. Los procedimientos para su tratamiento incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. La quimioterapia se refiere al uso de fármacos administrados de forma oral e intravenosa (*Tratamientos Para El Cáncer: MedlinePlus Enciclopedia Médica*, n.d.), este método genera efectos colaterales no deseados por la inadecuada distribución del medicamento en el cuerpo por la falta de distinción entre células sanas y cancerígenas (Grande, 2007). La terapia génica consiste en transferencia de material genético (Austin-ward & Villaseca G, 1098) y ofrece posibilidades de tratamiento para muchas enfermedades adquiridas y hereditarias donde los procedimientos clínicos convencionales son menos efectivos, estas enfermedades incluyen trastornos como la fibrosis quística, enfermedades cardiovasculares, del sistema nervioso, autoinmunes y cáncer (Gardlík et al., 2005). La transfección se refiere a la introducción de ADN al interior de células eucariotas (Armenta Ruiz et al., 2006), y puede realizarse en sistemas virales y no virales suministrando los fármacos de forma controlada y localizada. Las actuales metodologías de transfección no viral no alcanzan tasas de eficiencia de transfección adecuadas, lo que limita aplicaciones terapéuticas. Una forma de aumentar la transfección es la de mejorar las condiciones de los poros de las membranas celulares por donde se transfiere el material genético.

Esta pasantía de investigación se enmarca dentro del proyecto europeo MagicCellGene que tiene como propósito la eliminación terapéutica de oncogenes que conducen al cáncer mediante un método de transfección que usa hipertermia magnética. Durante la estancia en el Grupo de Investigación consolidado Platón de la Universidad de Zaragoza se desarrollaron simulaciones de

membranas celulares donde se utilizó la hipertermia magnética (Garaio et al., 2014), en la cual el aumento de la temperatura se realiza usando nanopartículas magnéticas (MNPs) bajo un campo magnético alterno (AMF) para la formación de poros que garanticen una adecuada transfección. ¿Será entonces posible inducir poros de tamaño adecuado en membranas miméticas para el mejoramiento de la transfección no viral mediante hipertermia magnética?

El estudio de la membrana celular es una compleja y atractiva investigación en ramas como la química, medicina y biotecnología, dado que en la actualidad lo que esté enmarcado en avances novedosos y tecnológicos de la salud es motivo de revolución. Las membranas celulares tienen aplicaciones, como el transporte de sustancias entre células y el medio ambiente, la energía, conversión y transducción de señales (Shan & Wang, 2015). La perspectiva vigente de la estructura y dinámica de las membranas celulares se enmarca en el "modelo mosaico fluido" de Singer y Nicolson de 1972, donde se expone que las membranas celulares son estructuras dinámicas que poseen fluidez, están constituidas de proteínas que emergen aleatoriamente en una bicapa de lípidos (con cabeza hidrófila y cola hidrófoba) y tienen dominios intra y extracelulares (Singer & Nicolson, 1972). Los lípidos presentes en la membrana son principalmente fosfoglicéridos, esfingolípidos y lípidos de esteroides, las proteínas se clasifican como transportadoras, receptoras, enzimas y anclaje, además se encuentran carbohidratos como la manosa, galactosa, glucosa, fucosa y ácido siálico (Shan & Wang, 2015). En una célula, el 25–40% corresponde a las proteínas que están asociadas con las membranas, los lípidos y sacáridos ocupan aproximadamente el 50-40% y 2–10%, respectivamente, a la masa de las membranas celulares (Arrazola, 1994). Para la elaboración de modelos de membranas celulares existen varios métodos experimentales, unos a partir de células vivas, como el método de cizallamiento de glóbulos rojos abiertos, el método hipotónico de lisis-centrifugación y la preparación de membrana plasmática de ovocitos. Existen también métodos de

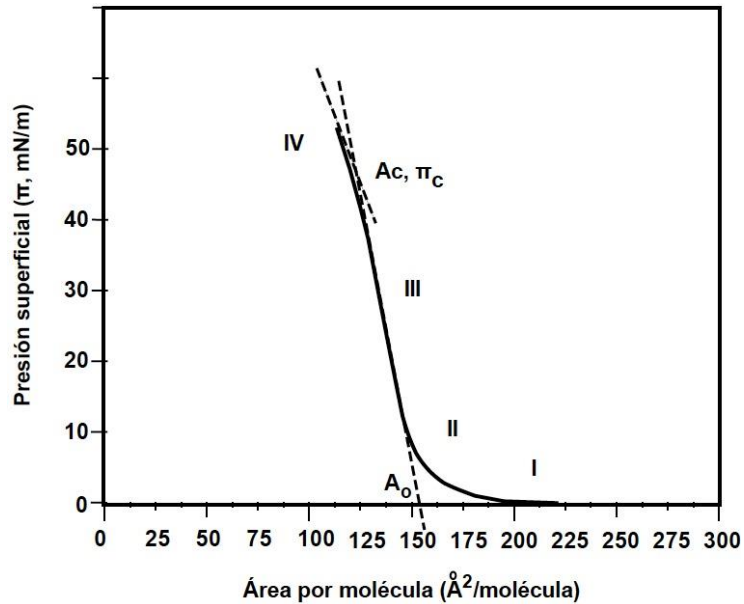
elaboración de membranas celulares desarrollando bicapas de lípidos artificiales como los fosfolípidos y el colesterol, por medio de la técnica de Langmuir-Blodgett (LB) que consiste en la transferencia de monocapas organizadas de moléculas anfifílicas (moléculas que constan de una parte hidrófila e hidrófoba) desde la interfase aire-agua a un sustrato sólido (Zasadzinski et al., 1994) (ver Apéndice A).

La técnica más usada para la caracterización de la monocapa de Langmuir es la isoterma de presión superficial versus área por molécula, la cual consiste en un gráfico que permite observar el cambio de la presión como medida de la tensión superficial, es decir, un estudio de la presión como función del área disponible para cada molécula en la superficie de la subfase acuosa. La medición de esta isoterma se realiza bajo una condición de pseudoequilibrio, comprimiendo de manera lenta y continua la monocapa mientras se controla la presión de la superficie. Proporciona información sobre las fases de la monocapa, comportamiento de colapso, interacción molecular de las especies en la subfase con la monocapa, estabilidad de la monocapa, comportamiento dinámico de la monocapa en la interfaz aire-agua, entre otras (Dyнарowicz-Łątka et al., 2001).

A medida que se comprime la monocapa se presentan fases, estas representan la condición de la sustancia en la formación de la monocapa de la interfaz aire-agua, las cuales son: gas(I), líquido expandido (II), líquido condensado (III) y especie de plegamiento (IV) como se muestra en la figura 1.

**Figura 1**

*Fases de formación monocapa interfaz aire-agua*



*Nota:* Gráfico de presión superficial versus área por molécula. Adaptado de Efecto de la adición de moléculas anfífilas sobre las propiedades de la película de asfaltenos en la interfase aire-agua, por Delgado et al. 2012. Revista Ingeniería UC, 19(2), 16-24.

La presión de colapso es característica de cada material. Si los compuestos son inmiscibles se espera un colapso intermedio en relación con los componentes puros; al contrario, si son miscibles se mostrará solo un colapso, probablemente a una presión diferente de cualquiera de las presiones de colapso de las monocapas de componentes puros (Zhao et al., 2004).

Defay y Crisp (1958) aplicaron la regla de las fases al colapso de la monocapa y ésta puede emplearse como un criterio adicional para establecer la miscibilidad en una película formada por varios multicomponentes (Defay et al., 1996; Gershfeld & Pagano, 1972; Zhao et al., 2004).

La naturaleza de las interacciones moleculares y la miscibilidad de los dos componentes pueden examinarse mediante análisis cuantitativo del área en exceso ( $A^E$ ) de la monocapa mixta en la interfaz aire-agua (Villares et al., 2008). El área en exceso puede obtenerse comparando el área promedio por molécula ( $A_{12}$ ) de una monocapa mixta que consta de los componentes 1 y 2 con la de una monocapa mixta ideal ( $A^{ideal}$ ) (Villares et al., 2008):

$$A^{ideal} = x_1A_1 + x_2A_2 \quad (\text{Ec. 1})$$

$$A^E = A_{12} - (x_1A_1 + x_2A_2) \quad (\text{Ec. 2})$$

Si se forma una monocapa mixta ideal y los componentes son completamente inmiscibles, el área en exceso será cero. Cualquier desviación de la línea recta indica miscibilidad, no idealidad (Gong et al., 2002), interacciones repulsivas, débiles, rotas o una atracción de los componentes según sea el caso (Fernández-Botello et al., 2008). Las desviaciones involucran generación de energía asociada al proceso de mezcla de los componentes puros en la fase bidimensional conocida como energía libre de exceso,  $\Delta G_m^E$  (Villares et al., 2008; Zhao et al., 2004). Para una monocapa mixta compuesta de dos componentes a cualquier temperatura dada  $T$ , se tiene que

$$\Delta G_m^E = \int_0^\pi (A_{12} - X_1A_1 - X_2A_2) d\pi \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\Delta G_m^{ideal} = RT(X_1 \ln(X_1) + X_2 \ln(X_2)) \quad (\text{Ec. 4})$$

$$\Delta G_m = \Delta G_m^E + \Delta G_m^{ideal} \quad (\text{Ec. 5})$$

Los valores negativos de la energía libre de Gibbs indican la presencia de interacciones intermoleculares atractivas. La existencia de un mínimo indicará una composición de mezcla de la mayor estabilidad termodinámica en comparación con las monocapas de componentes puros (Gong et al., 2002).

Sin embargo, la energía libre de Gibbs no es conveniente cuando las isothermas son más sensibles a la presión superficial que al área molecular, en tal caso se requiere hacer el análisis de cambio de energía mediante la evaluación de la energía de Helmholtz de exceso (Zhao et al., 2004) que resulta más preciso y brinda información de las interacciones y la estabilidad de las películas (Fernández-Botello et al., 2008).

La energía de mezcla de Helmholtz,  $\Delta A_m$ , es la suma del exceso de energía  $\Delta A_m^E$  y la energía libre ideal de mezcla,  $\Delta A_m^{ideal}$  y se calcula de la siguiente manera (Fernández-Botello et al., 2008):

$$\Delta A_m^E = \int_A^{A_0} \pi_{12} dA - X_1 \int_A^{A_0} \pi_1 dA - X_2 \int_A^{A_0} \pi_2 dA \quad (\text{Ec. 6})$$

$$\Delta A_m^{ideal} = RT(X_1 \ln X_1 + X_2 \ln X_2) \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\Delta A_m = \Delta A_m^E + \Delta A_m^{ideal} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde  $A_0$  es el área donde la presión superficial empieza a incrementar y  $A$  es el área molecular en la que se calculará la energía de Helmholtz.

La ventaja de usar la técnica LB es la posibilidad de controlar los parámetros adecuados para reproducir las condiciones biológicas necesarias (Zasadzinski et al., 1991). La naturaleza anfifílica de los compuestos usados en la síntesis de la membrana permiten la organización y unión de los fosfolípidos con el colesterol. Los estudios de monocapas mixtas formadas por la mezcla fosfolípidos/colesterol en la interfaz aire-agua indican que el colesterol tiene un pronunciado efecto de condensación (Kim et al., 2001; Shan & Wang, 2015), reduce el número de defectos, aumenta la densidad de empaquetamiento de la monocapa y modula la fluidez de la membrana celular y aumenta el orden estructural de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos (Kim et al., 2001).

Las membranas celulares artificiales tienen la ventaja de permitir un estudio detallado, dado que existe control de componentes, se puede garantizar la homogeneidad y es posible su inmovilización sobre soportes sólidos uniformes y poco rugosos como la mica en el proceso de caracterización. Para la caracterización de la monocapa formada se hace uso de la microscopia de fuerza atómica (AFM) (ver Apéndice B) que proporciona imágenes de alta resolución de superficies indicando en este caso las nanoestructuras de las monocapas formadas y propiedades mecánicas de la membrana celular artificial, así como las interacciones entre la membrana y las nanopartículas (Shan & Wang, 2015).

En el área de la biomedicina, las nanopartículas magnéticas (MNPs) son nanomateriales interesantes desde el punto de vista de sus características físicas biodegradabilidad, baja toxicidad y capacidad de ser manipuladas e inmovilizadas sobre membranas celulares simuladas mediante reacción química “*click*” biortogonal sin perturbar el sistema. La reacción biortogonal se centra específicamente en atacar covalentemente secuencias de aminoácidos con sondas de moléculas pequeñas, estas sondas biortogonales deben ser estables en ambientes acuosos, pero fácilmente reactivas entre sí y el término *click* hace referencia a la descripción una reacción química confiable que genera sustancias de forma rápida y uniendo pequeñas moléculas entre sí (Patterson et al., 2014). La reacción química “*click*” biortogonal se presenta cuando las nanopartículas magnéticas cumplen con las características apropiadas y se produce una unión covalente entre los grupos funcionales, tal que se anclen a la membrana celular ya simulada, para posterior aplicación de un campo magnético externo como la hipertermia. Además, las reacciones biortogonales se caracterizan por tener lugar en medio acuoso sin necesitar de reactivos de naturaleza orgánica que pudieran tener toxicidad en potenciales aplicaciones prácticas.

La hipertermia en términos médicos consiste en un incremento de la temperatura hasta los 40-45 °C en los tejidos corporales, de manera global o local, conduciendo así a la muerte de las células tumorales dado que son más sensibles al calor que las células sanas (Luk et al., 1980). La hipertermia magnética usa la capacidad de las nanopartículas magnéticas (MNPs) de generar calor cuando están expuestas a campos magnéticos externos, estas MNPs diseñadas y funcionalizadas para dirigirse a las zonas afectadas por el tumor evitando el calentamiento en el tejido sano y aumentando la eficacia en el procedimiento médico. Los campos magnéticos empleados para inducir la hipertermia no deben ser nocivos para el tejido sano, solo afectar zonas donde se redirigen las nanopartículas, que en caso de tratamientos pueden ser portadoras de fármacos que se liberarán de manera controlada (Chatterjee et al., 2011).

## **1. Objetivos**

### **1.1. Objetivo General**

El objetivo último del proyecto MagicCellGene es el objetivo general del presente trabajo que es inducir poros de tamaño adecuado para el mejoramiento de la transfección no viral mediante hipertermia magnética (MH).

### **1.2. Objetivos Específicos**

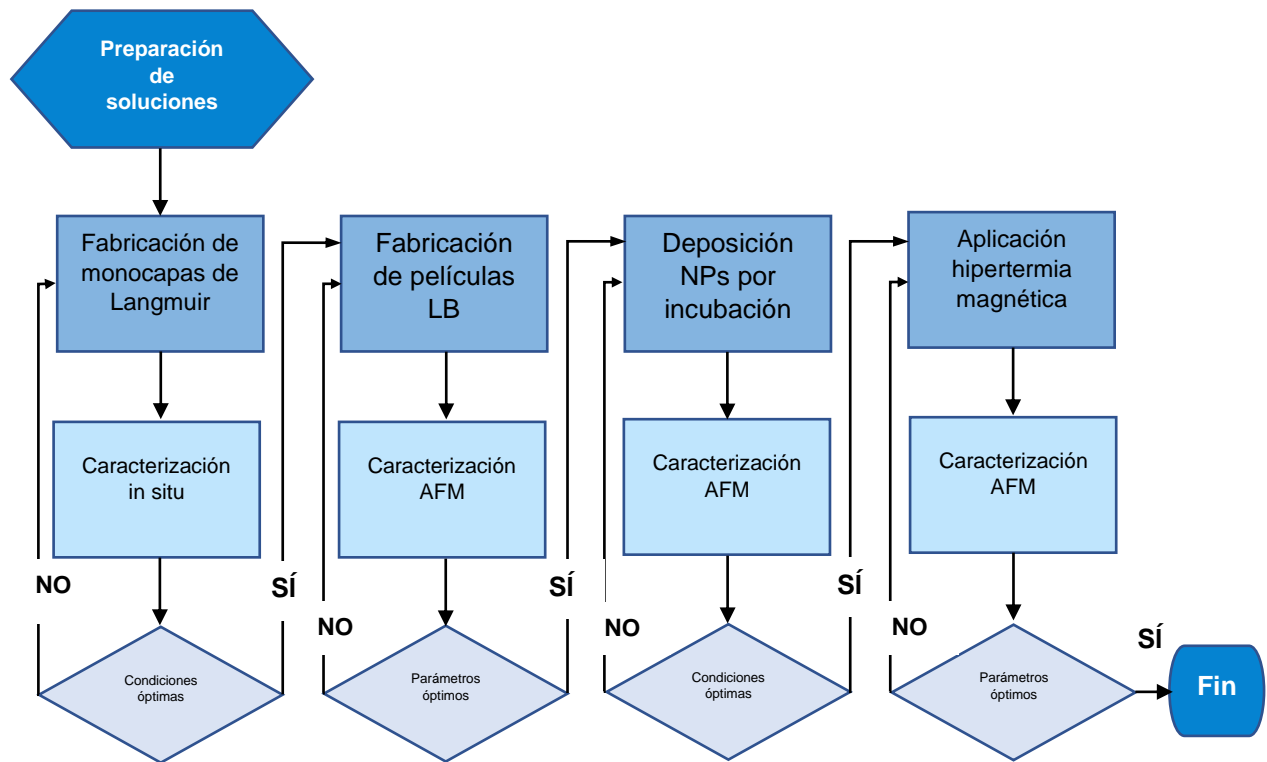
Los objetivos de este trabajo, en el marco del objetivo más amplio y ambicioso del conjunto del proyecto son:

- Establecer las condiciones idóneas para la fabricación de capas y bicapas de fosfolípidos, colesterol y glicoesfingolípidos usando Langmuir-Blodgett (LB).
- Analizar el efecto del método utilizado para la inmovilización de nanopartículas magnéticas a los modelos de membrana celular sobre la distribución homogénea en estas.
- Estudiar la influencia de los parámetros de hipertermia magnética como son tiempo de exposición, intensidad de AMF y frecuencia en la formación de poros para permitir la transfección celular.

## 2. Metodología

**Figura 2**

*Diagrama de flujo del proyecto de investigación*



### 2.1. Elaboración de monocapas de Langmuir

En el presente trabajo se han utilizado soluciones DPPC, COL, GSL2 y GSL4 (ver estructuras químicas en el Apéndice C) para la fabricación de los modelos de membranas celulares. Se estableció  $10^{-4}M$  como concentración de las soluciones tomando como referencia estudios previos hechos por el grupo de investigación Platón (Ruiz Rincón et al., 2017).

Los compuestos inicialmente se encuentran en estado sólido y se mantienen refrigerados, por ende, es necesario atemperarlos antes de preparar la solución para evitar que la temperatura

infera en un cambio de concentración. Se pesa en una balanza la cantidad de compuesto requerida para obtener soluciones de 25 mL con concentración  $10^{-4}M$ . Como solvente de las soluciones se emplea cloroformo, un solvente orgánico que no se mezcla con el agua y que al ser volátil permite que se evapore rápidamente de la superficie sobre la que se trabaja.

Las soluciones se caracterizan en el microscopio de ángulo Brewster (BAM) (ver Apéndice D) para estudiar la interfaz aire-agua y su homogeneidad y se almacenan en matraces aforados cubiertos de con parafilm para minimizar la evaporación del disolvente y se mantienen refrigerados hasta posterior uso. Las isothermas de presión superficial-área molecular ( $\pi - A$ ) y las transferencias Langmuir Blodgett se realizaron con una cuba de la marca KSV controlada por computadora (KSV Instruments Ltd., Finlandia) (ver Apéndice E), siendo indispensable previa limpieza (ver Apéndice F).

Las soluciones se dispersan sobre la subfase de agua con una micro jeringa de Hamilton presionando suavemente para evitar que el material caiga de manera brusca y se pierda la muestra en la subfase. Se debe tener la precaución de que la presión superficial no suba de un valor aproximado a  $1 mN \cdot m^{-1}$  ya que puede afectar la estructura y formación de las moléculas al disipar el solvente. Para la medición de la presión superficial se hace uso del método de Wilhelmy el cual consiste en sumergir parcialmente en la subfase, en este caso un papel de filtro, que mide las fuerzas que actúan sobre él (fuerzas descendentes como la gravedad y la tensión superficial y las fuerzas ascendentes como la flotabilidad debido al desplazamiento del agua) con una electro balanza sensible (electro balanza de Wilhelmy) (Dyнарowicz-Łątka et al., 2001). Después de la dispersión, se recomienda esperar 10-15 minutos para que el solvente se evapore (Biolin Scientific, 2004) y así poner en marcha la prueba. Subsecuente comienza el proceso de compresión con ayuda de dos barreras que se desplazan a una velocidad de  $6mm \cdot min^{-1}$ .

Inicialmente se registran isotermas de los compuestos puros para identificar las presiones de colapso del material, además se hacen mezclas binarias de los glicosfingolípidos con DPPC y COL en diferentes proporciones para examinar las interacciones de cada mezcla. También para estudiar la miscibilidad de los componentes usando la regla de Crips y se establece mediante propiedades como el área de exceso, la energía libre de Gibbs y la energía de Helmholtz.

## 2.2. Fabricación de películas Langmuir Blodgett

Las mezclas binarias se transfirieren a una presión determinada sobre placas de mica hidrófilas recién cortadas de  $10\text{ mm} \times 10\text{ mm} \times 1\text{ mm}$  y exfoliadas con celo (Jurak, 2013) para formar así las películas de Langmuir-Blodgett. La deposición de monocapas se efectúa elevando verticalmente la placa de mica de la subfase de la cuba de Langmuir una vez se haya alcanzado la presión deseada. La transferencia se realiza a una velocidad constante de  $1\text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$ , a  $20 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  y una humedad de  $50 \pm 10\%$ . Las muestras obtenidas se secan durante 24 horas y posteriormente se guardan en viales hasta su caracterización con microscopia de fuerza atómica.

Posterior se realizan transferencias de los glicosfingolípidos y de las mezclas ternarias en proporción 1:1:1 a diferentes presiones y se caracterizan mediante microscopia de fuerza atómica (AFM). El proceso se repite a varias presiones de transferencia para encontrar la presión de transferencia en la que exista poca segregación de fases, aglomeración de compuestos y generación de vesículas. De este modo se consiguen películas homogéneas apropiadas para la incubación de las nanopartículas magnéticas.

Establecidos los parámetros de presión se transfieren los glicosfingolípidos puros y las mezclas ternarias sobre sustratos de mica previamente marcadas, la marca consiste en cuatro cuadrados externos de  $30\text{ }\mu\text{m}$  de lado, distanciados por  $100\text{ }\mu\text{m}$  y cuatro cuadrados internos de  $3\text{ }\mu\text{m}$  de lado, distanciados por  $30\text{ }\mu\text{m}$ , las marcas tienen  $55\text{ nm}$  de altura de los cuales  $5\text{ nm}$  son

de cromo Cr y 50 *nm* son de cobre, Cu. Estas marcas en la mica se realizan mediante técnicas físicas de deposición de vapor del metal en cuestión. Las marcas actúan como guía en el proceso de caracterización (ver Apéndice G).

### 2.3. Deposición nanopartículas magnéticas MNPs

Sobre las películas LB se busca una deposición específica de nanopartículas magnéticas (MNPs) formadas por magnetita [Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>] y maghemita [Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>] con diámetro de 12 *nm* cada una, características hidrofílicas, diseñadas y funcionalizadas con grupo alquino y sin alquino con el propósito de que se produzca una reacción química “click” biortogonal entre las azidas y alquinos presentes en la membrana celular simulada demostrando así su especificidad.

En la literatura, un recubrimiento de las NPs utilizado con frecuencia es la sílice que debido a su carga negativa y a que es un material que forma una cubierta de diferentes grosores alrededor del núcleo magnético de las NPs, hace que éstas sean dispersables y muy estables en soluciones acuosas (Lacava & Morais, 2012). En este caso se hace uso de un recubrimiento de polietilenglicol (PEG) utilizado para mejorar la eficiencia del suministro de fármacos y genes a las células (Suk et al., 2016) y el recubrimiento con ciclooctino para disminuir la carga negativa y así conseguir la disminución de los grupos carboxilos [-COOH] libres en la superficie de la NPs (García Marquina, 2015).

La deposición de las nanopartículas magnéticas (MNPs) en la monocapa formada se lleva a cabo por el procedimiento de autoensamblaje. La incubación de las MNPs se realiza en un vial al que se le ha hecho una limpieza previa con etanol, agua Milli-Q y secado con nitrógeno. Se ubica la mica en el vial de modo que la parte expuesta sea la que está marcada. Las MNPs se dejan atemperar antes de colocarlas sobre la mica, se sitúan de manera que la superficie quede bien cubierta, es necesario sellar el recipiente con papel aluminio para evitar la evaporación de la

solución depositada, luego se deja incubar el tiempo designado, para el caso en cuestión será de 1 hora y 24 horas. Después del periodo de incubación, se retira el material en exceso haciendo 10 lavados con agua Milli-Q y se deja secar.

El estudio se centrará en señalar que las MNPs funcionalizadas con alquino presentan un anclaje a la membrana formada con el glicosfingolípidos GSL4 mientras que las MNPs funcionalizadas sin alquino no presentan ningún anclaje en las membranas formadas con los glicosfingolípidos estudiados (GSL2 y GSL4). Para verificar el anclaje se usará la espectroscopía de infrarrojo mediante la técnica ATR (ver Apéndice H).

#### **2.4. Aplicación hipertermia magnética**

Por último, se aplicará un campo magnético alterno (AMF) a las membranas miméticas con MNPs depositadas con el equipo de hipertermia (ver Apéndice I) a una frecuencia máxima de 829 Hz y un campo de 252 Gauss, se realiza la exposición de manera continua con tiempos de 15 y 30 minutos para diferentes muestras y luego para cada muestra exposición en forma de pulsos de 5 minutos con intervalos de 1 minuto entre ellos. Se calcula el tamaño del poro inducido mediante caracterización del AFM utilizando el software Gwyddion.

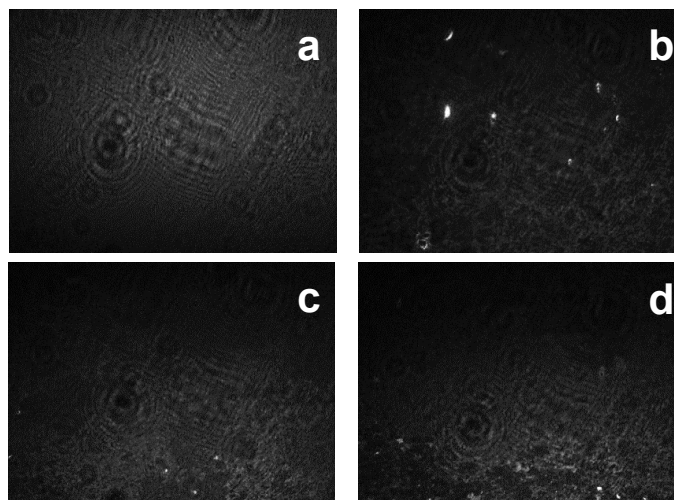
### **3. Análisis de Resultados**

Las soluciones de DPPC, COL, GSL2 y GSL4 se caracterizaron en el microscopio de ángulo Brewster (BAM), para la interfaz aire-agua la relación tangencial entre el sustrato y el aire toma el valor de  $53^\circ$  en ausencia de material y se torna completamente oscura, al formarse la película sobre el agua, la relación deja de cumplirse y se empiezan a detectar reflexiones que dan

lugar a imágenes más claras y compactas a medida que la estructura de la película se comprime (Torrent Burgués, 2012). Se percibieron sitios de zonas brillantes que no hacen alusión a agregados sino a partículas de polvo dado que la prueba no se realiza herméticamente, en la figura 3 se ilustran imágenes de los compuestos a una presión determinada. No hay evidencias de colapsos o formación de vesículas. En el Apéndice J se muestra las isotermas de las soluciones indicando las imágenes de presiones específicas.

### Figura 3

*Imágenes de BAM a  $20 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$*



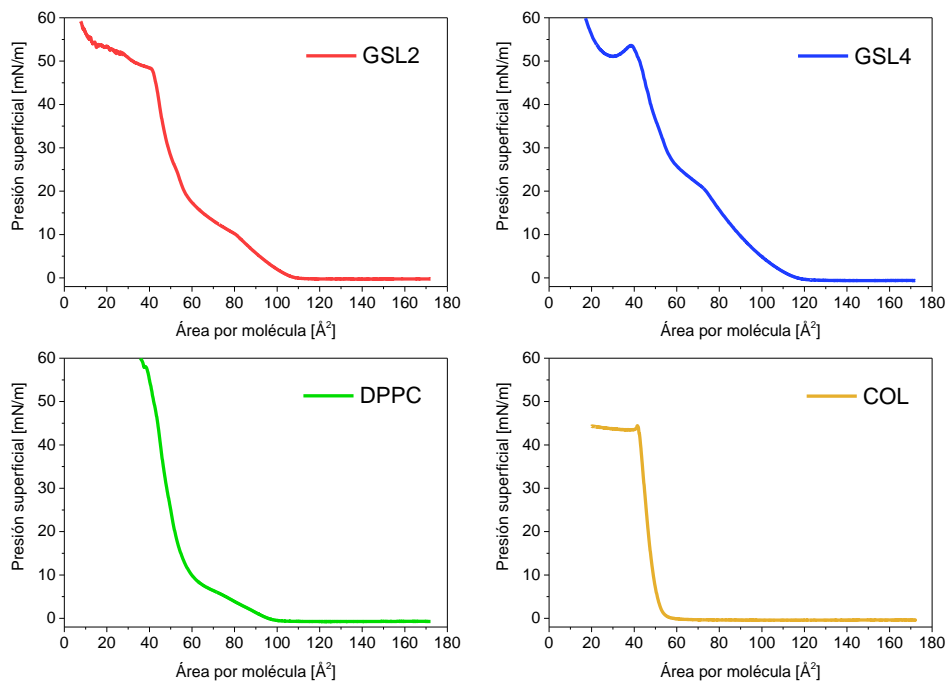
*Nota:* Imágenes de BAM a  $20 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  de (a) agua limpia; (b) DPPC; (c) GSL2; (d) GSL4

En la figura 4 se presentan las isotermas de los componentes puros que involucran la variación de la presión superficial ( $\pi$ ) en función del área molecular ( $A$ ). Se evidencia reducción del área molecular a medida que aumenta la presión, hasta un comportamiento de colapso para el GSL2, GSL4 y COL. Por encima de esta presión las soluciones formarán multicapas y por debajo de esta estará la presión óptima de trabajo que se determina de una manera experimental que se expondrá adelante. Se realizaron tres isotermas por compuesto y se concluyó que eran

reproducibles, además las isothermas  $\pi - A$  de las monocapas de DPPC y COL son conocidas y las presentadas están de acuerdo con las reportadas.

#### Figura 4

*Isotermas presión superficial ( $\pi$ ) en función del área molecular ( $A$ )*

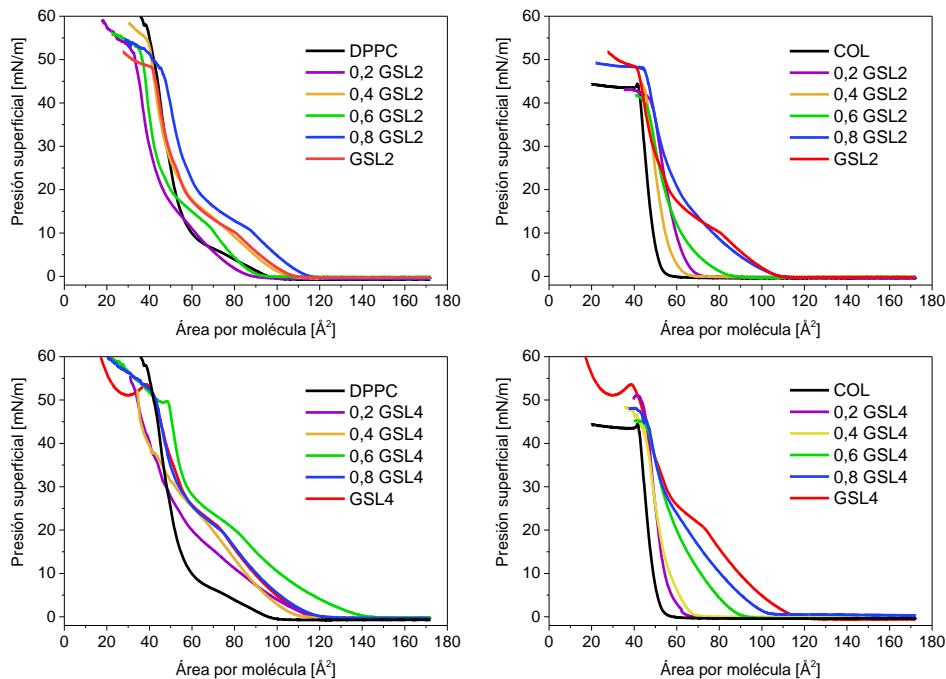


*Nota:* Isotermas área de presión superficial por molécula ( $\pi$ - $A$ ) de GSL2; GSL4; DPPC; COL

Para predecir el comportamiento de las mezclas ternarias es necesario conocer el de los compuestos de manera binaria. La regla de Crisp indica qué tan miscibles pueden ser las mezclas. En este trabajo se analizó la miscibilidad de las mezclas binarias GSL4-DPPC, GSL4-COL, GSL2-DPPC y GSL2-COL. El estudio de la interacción de la mezcla binaria DPPC-COL ha sido de estudio dentro del grupo Platón por ende se omitió. Las isotermas de compresión representativas de las mezclas en varias relaciones molares se ilustran en la figura 5. Se concluye que son parcialmente miscibles entre ellas y que existe formación de nuevas fases.

**Figura 5**

*Isotermas presión superficial ( $\pi$ ) en función del área molecular ( $A$ ) para mezclas binarias*



*Nota:* Isotermas área de presión superficial por molécula ( $\pi$ - $A$ ) para mezclas binarias de GSL2-DPPC; GSL2-COL; GSL4-DPPC; GSL4-COL

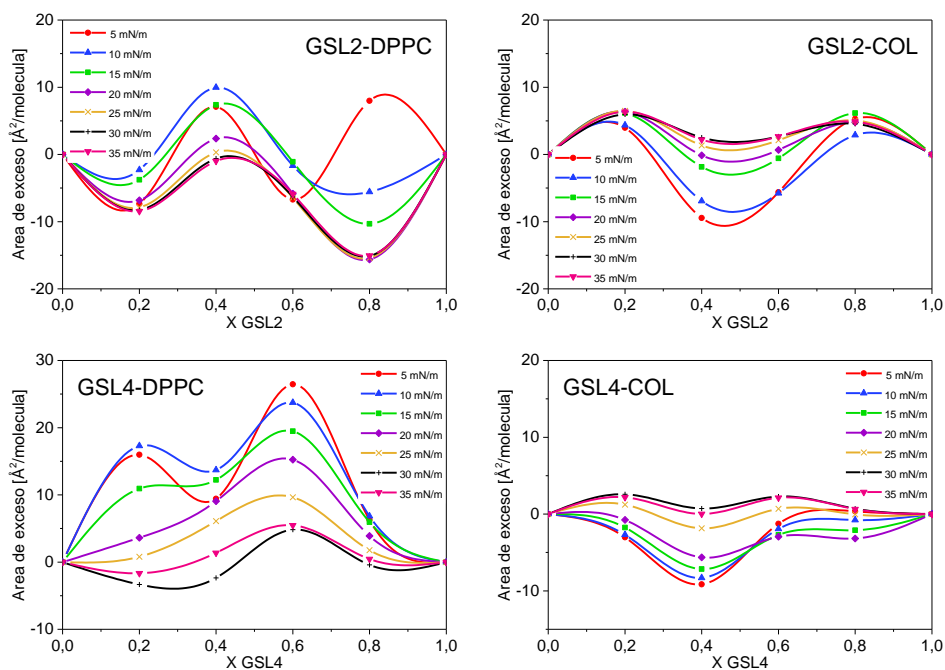
La figura 6 muestra los valores experimentales del área de exceso en función de la fracción molar a diferentes presiones superficiales. Para monocapas mixtas totalmente inmiscibles o ideales, el área en exceso es cero, mientras que las desviaciones positivas implican algún tipo de interacción repulsiva e interacciones rotas y débiles entre los compuestos 1-2 y las desviaciones negativas sugieren una interacción de atracción de los componentes que a su vez conduce a una disminución del área molecular media en las películas mixtas en comparación con las películas de los componentes puros (Villares et al., 2008).

Se evidencia que la gráfica del GSL2-DPPC las áreas de exceso aumentan con la presión, a presiones bajas las áreas de exceso son negativas, sin embargo, estas presiones no son adecuadas para una posible transferencia. En las monocapas de GSL2-COL las áreas de exceso disminuyen

al aumentar la presión, las curvas de las presiones de  $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  y  $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  difieren poco y el exceso a estas presiones en cualquier fracción molar es negativo. Para las mezclas GSL4-DPPC se tienen a presiones menores, mayor exceso, comportamiento similar al de la interacción del DPPC con el GSL2, el exceso que presenta es el más alto de las combinaciones binarias estudiadas. El GSL4-COL tiene interacciones más fuertes que el GSL2-COL. Las mezclas con COL tienen mayor atracción a medida que la presión disminuye, al contrario, las monocapas con DPPC tienen mayor atracción cuando la presión aumenta.

### Figura 6

*Exceso de área versus fracción molar para monocapas mixtas*



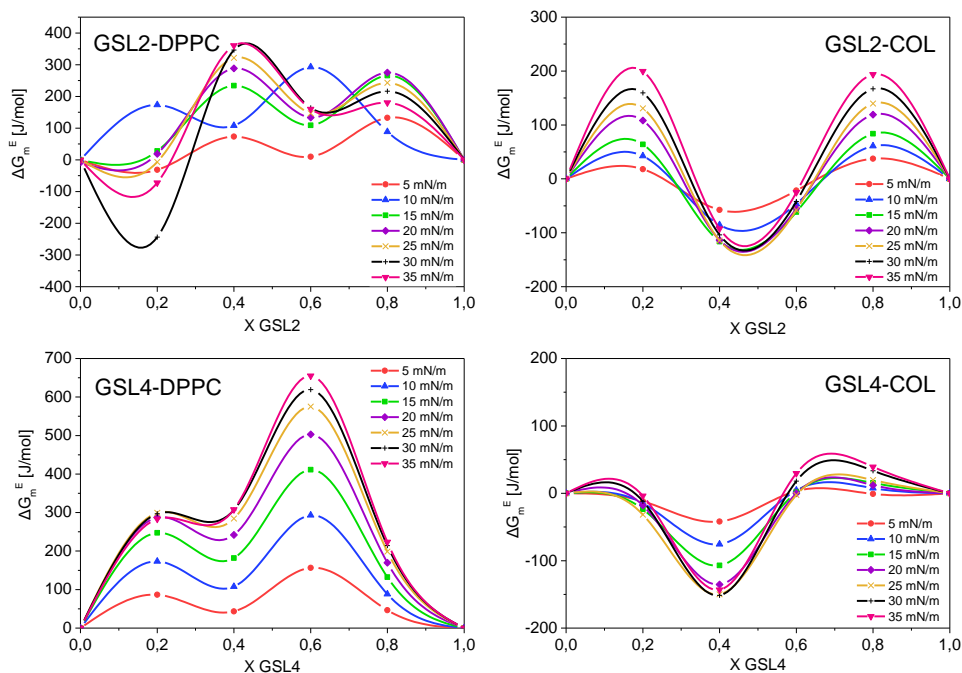
*Nota:* Exceso de área versus fracción molar para monocapas mixtas de GSL2-DPPC; GSL2-COL; GSL4-DPPC; GSL4-COL

Para cuantificar las desviaciones del comportamiento ideal, se calculó el exceso de energía de mezcla de Gibbs ( $\Delta G_m^E$ ). Los valores de  $\Delta G_m^E$  permiten la evaluación cuantitativa de la magnitud de las interacciones entre los glicosfingolípidos y el COL y los glicosfingolípidos y el DPPC y

la evaluación termodinámica de la estabilidad de las monocapas binarias formadas. Se presenta el comportamiento del exceso de energía de mezcla de Gibbs de los sistemas binarios en estudio a diferentes presiones de superficie y fracciones molares en la siguiente figura.

**Figura 7**

*Energía de mezcla Gibbs versus fracción molar para monocapas mixtas*



*Nota:* Energía de mezcla Gibbs versus fracción molar para monocapas mixtas de GSL2-DPPC; GSL2-COL; GSL4-DPPC; GSL4-COL

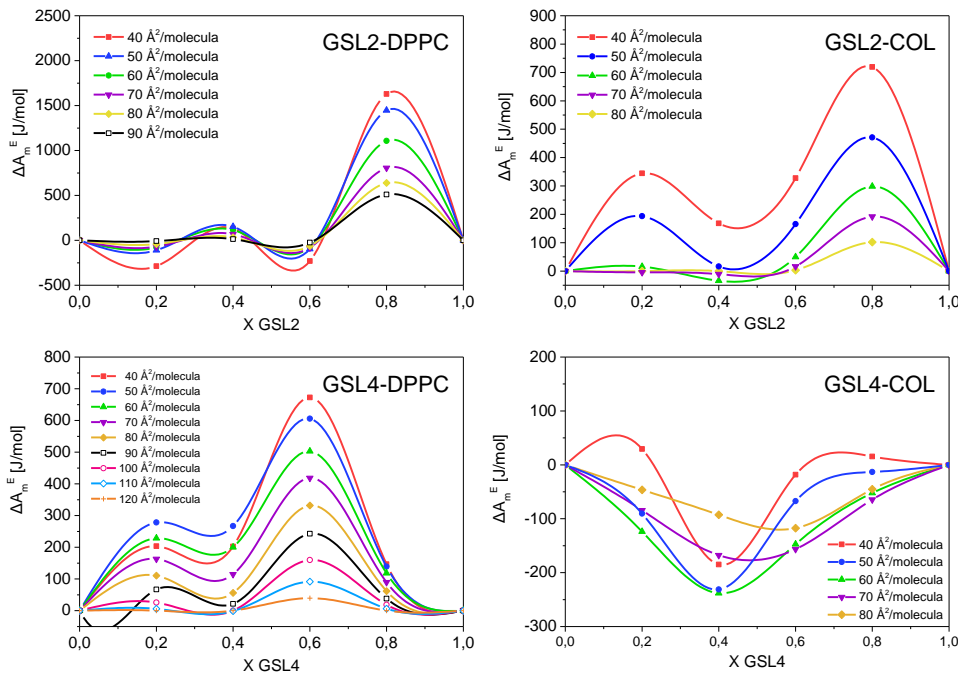
El valor  $\Delta G_m^E$  más negativo se obtuvo para el sistema GSL2-DPPC a  $X_{GSL2} = 0,2$  y presión de  $30 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , siendo esta la interacción atractiva más fuerte. En general para el sistema mencionado los valores de  $\Delta G_m^E$  más bajos se dan en esa fracción molar. Para la mezcla de GSL2-COL los puntos de valores más negativos se dan en cercanías a  $X_{GSL2} = 0,45$  y tiende a ser más positivos cuando se aumenta la presión. Los valores de  $\Delta G_m^E$  de las mezclas binarias de GSL4-DPPC son positivos para todas las fracciones molares y presiones lo que indica formación de

películas inestables y disposición poco favorable. Para las monocapas de GSL4-COL se tienen valores negativos a  $X_{GSL4} = 0,4$  para todas las presiones, evidenciando más estabilidad en toda su composición respecto a las monocapas GSL2-COL. Por otra parte, se concluye que las interacciones atractivas de los glicosfingolípidos con el DPPC son más débiles que las de los glicosfingolípidos con el colesterol.

La energía de Helmholtz resulta más precisa y brinda información de las interacciones y la estabilidad de las películas (Zhao et al., 2004). En la figura 8 se ilustra la variación de  $\Delta A_m^E$  con fracción molar de los sistemas en estudio en varias áreas representativas por molécula. Estas gráficas indican para las monocapas GSL2-DPPC valores negativos para  $X_{GSL2} = 0,2$  y  $X_{GSL2} = 0,6$ , en general los valores se vuelven más negativos con áreas moleculares más pequeñas lo que sugiere que la estabilidad de las monocapas mixtas aumenta a medida que las monocapas se condensan más. Para la mezcla de GSL2-COL solo se presentan valores negativos para fracciones cercanas a  $X_{GSL2} = 0,4$  y  $60 \text{ \AA/molécula}$  y la mezcla de GSL4-DPPC para fracciones menores a  $X_{GSL4} = 0,1$  y  $90 \text{ \AA/molécula}$ . Finalmente, los valores negativos de la monocapa de GSL4-COL se evidencian para áreas moleculares mayores a  $50 \text{ \AA/molécula}$  en toda su composición.

**Figura 8**

*Energía de Helmholtz versus fracción molar para monocapas mixtas*



*Nota:* Energía de Helmholtz versus fracción molar para monocapas mixtas de GSL2-DPPC; GSL2-COL; GSL4-DPPC; GSL4-COL

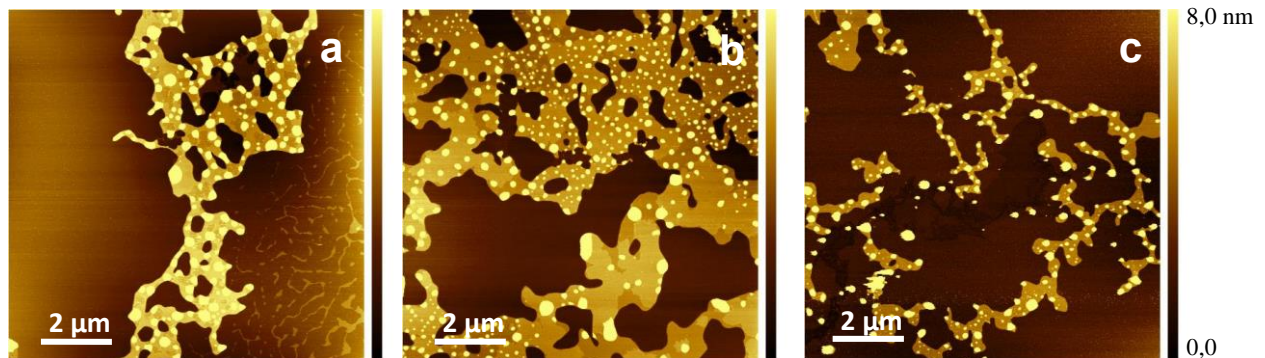
Las propiedades anteriores se han calculado a partir de los puntos de datos  $\pi - A$  y, por lo tanto, se necesitan otros métodos independientes para proporcionar información adicional del comportamiento de fase en las películas mixtas. Se realiza transferencia de monocapas binarias con diferentes fracciones molares a una presión determinada cerca de los puntos de inflexión que indican formación de nuevas fases para estudio con AFM.

En la figura 9 se evidencian regiones alargadas y agregados en las concentraciones estudiadas de GSL2-DPPC. Para la mezcla de GSL2-COL (figura 10), se percibe mayor densidad a medida que aumenta la concentración de colesterol, observándose una formación homogénea, no se crean parches ni agregados.

En general el GSL2 es más miscible con el colesterol que con el DPPC lo que concuerda con el área de exceso que, aunque tiene parte positiva y predice poca interacción, tiene valores menos excesivos que los de GSL2-DPPC.

### Figura 9

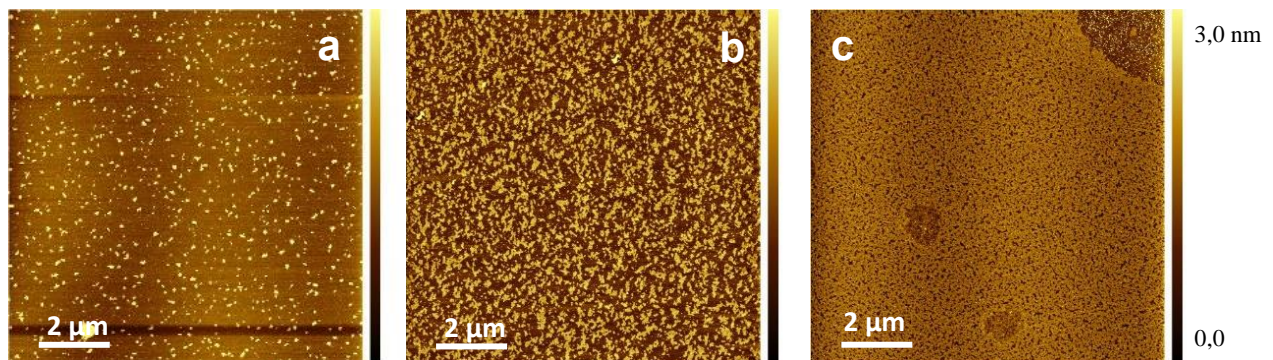
*Mezclas binarias de GSL2-DPPC transferidas a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$*



*Nota:* Mezclas binarias de GSL2-DPPC transferidas a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  con fracciones molares de (a)  $X_{\text{GSL2}} = 0,2$  (b)  $X_{\text{GSL2}} = 0,45$  ; (c)  $X_{\text{GSL2}} = 0,8$

### Figura 10

*Mezclas binarias de GSL2-COL transferidas a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$*

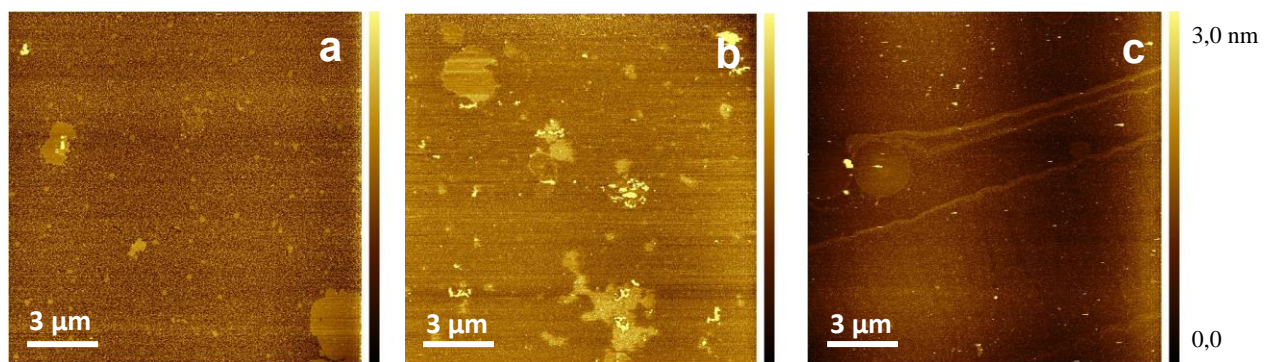


*Nota:* Mezclas binarias de GSL2-COL transferidas a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  con fracciones molares de (a)  $X_{\text{GSL2}} = 0,2$  (b)  $X_{\text{GSL2}} = 0,45$  ; (c)  $X_{\text{GSL2}} = 0,8$

Las imágenes del GSL4-DPPC presentan material a lo largo de la muestra e islas de este con pequeños puntos de agregados que aumentan de altura al aumentar la concentración del DPPC. El comportamiento del GSL4-COL concuerda con las propiedades termodinámicas calculadas, siendo la fracción molar de GSL2 de 0,4 la de mayor miscibilidad (ver figuras 11 y 12).

### Figura 11

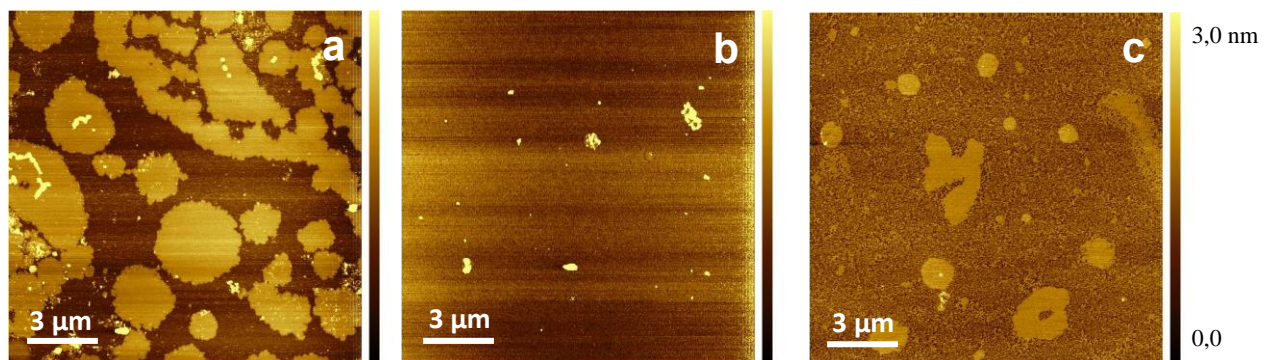
*Mezclas binarias de GSL4-DPPC transferidas a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$*



*Nota:* Mezclas binarias de GSL4-DPPC transferidas a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  con fracciones molares de (a)  $X_{\text{GSL4}} = 0,2$  (b)  $X_{\text{GSL4}} = 0,4$  ; (c)  $X_{\text{GSL4}} = 0,6$

### Figura 12

*Mezclas binarias de GSL4-COL transferidas a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$*

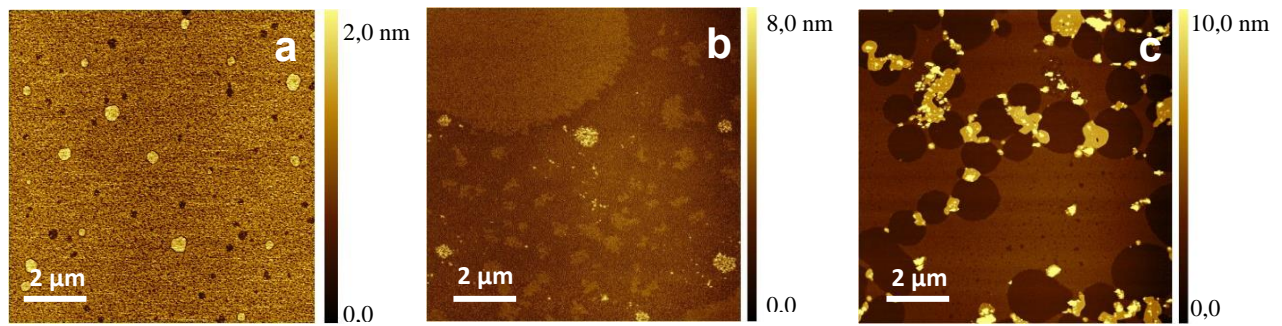


*Nota:* Mezclas binarias de GSL4-COL transferidas a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  con fracciones molares de (a)  $X_{\text{GSL4}} = 0,2$  (b)  $X_{\text{GSL4}} = 0,4$  ; (c)  $X_{\text{GSL4}} = 0,7$

Los glicosfingolípidos al ser transferidos presentan de por sí, parches y agregados sin interactuar con otro compuesto, esto se expone en las figuras 13 y 14, donde se muestra las imágenes de GSL2 y GSL4 transferidos a presiones de  $8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ,  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , y  $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ . Se identificó que a presión de  $8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ , no se formaban parches ni agregados, pero al ser una presión baja se transfiere poco material al sustrato y no es adecuada para el proceso.

### Figura 13

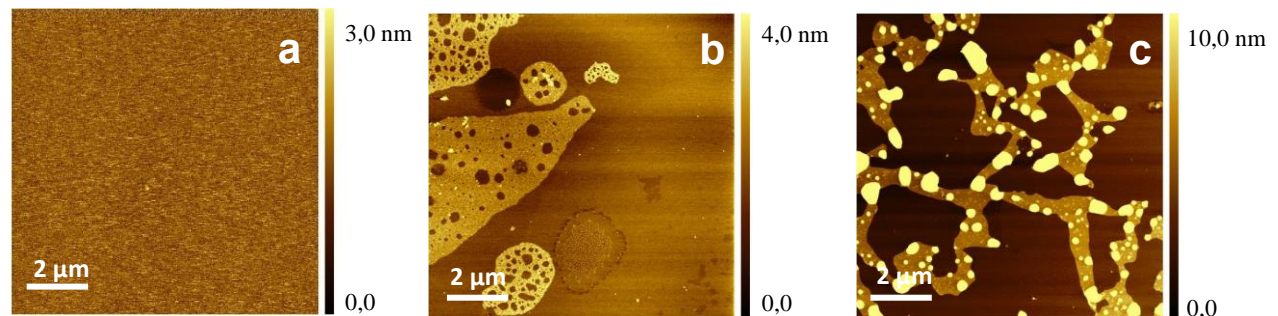
*Película de GSL2 transferido a diferentes presiones*



*Nota:* Película de GSL2 transferido a presiones de (a)  $8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ; (b)  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ; (c)  $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$

### Figura 14

*Película de GSL4 transferido a diferentes presiones*



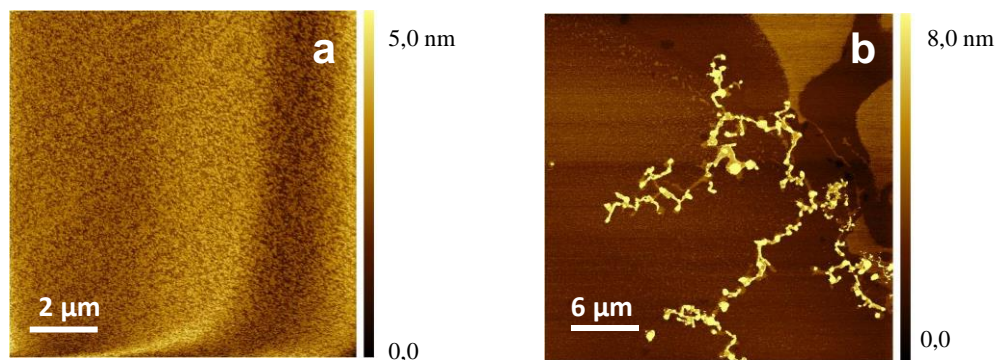
*Nota:* Película de GSL4 transferido a presiones de (a)  $8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ; (b)  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ; (c)  $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$

Para la transferencia de las mezclas ternarias se evaluaron presiones de  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  y  $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  (figura 15 y 16), usando una proporción de 1:1:1, que, aunque dista de la

composición real de la membrana celular ha sido usada por el grupo de investigación Platón para estudios previos de otros glicosfingolípidos facilitando su análisis e investigación.

### Figura 15

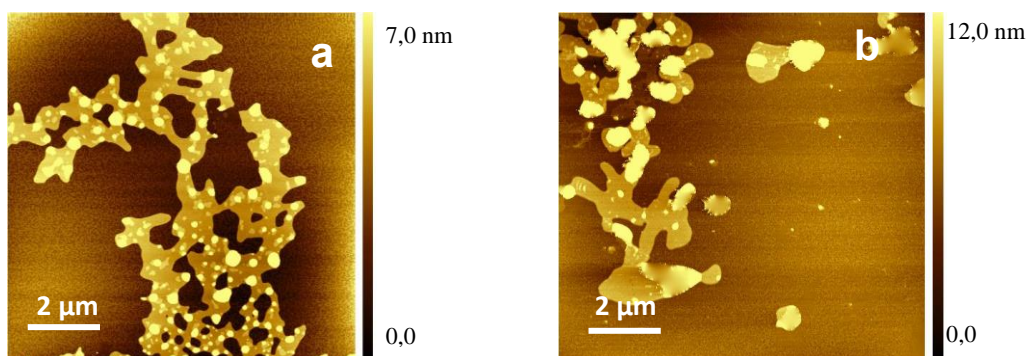
*Película de GSL2-DPPC-COL transferida a diferentes presiones*



*Nota:* Película de GSL2-DPPC-COL transferida a presiones de (a)  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ; (b)  $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$

### Figura 16

*Película de GSL4-DPPC-COL transferida a diferentes presiones*



*Nota:* Película de GSL4-DPPC-COL transferida a presiones de (a)  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ ; (b)  $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$

La presión de transferencia en la que existe menor segregación de fases, aglomeración de compuestos y generación de vesículas es  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$ . Por lo tanto, se descarta presión de  $35 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  en la investigación que, aunque imite la presión lateral en las membranas biológicas

(Jurak, 2013), genera menos homogeneidad en la película, lo que impide la incorporación adecuada de las nanopartículas magnéticas.

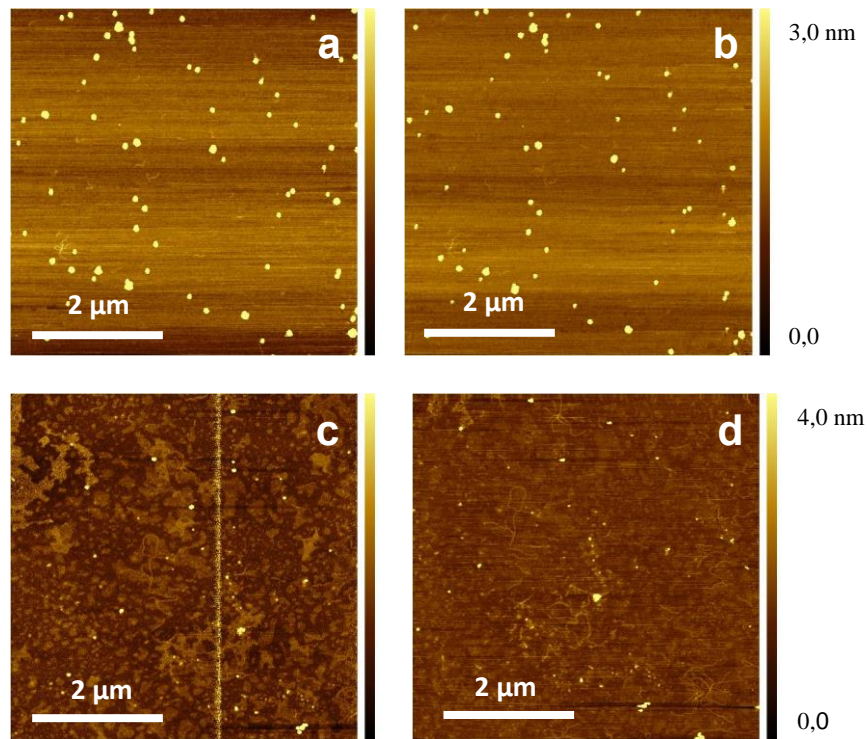
La figura 17 muestra las mismas zonas para dos películas de mezcla ternaria de GSL4, es decir, GSL4-DPP-COL después de la incubación de MNPs funcionalizadas con alquino durante 1 hora y de la exposición a la hipertermia magnética continua de 15 y 30 minutos respectivamente.

Se evidencia la deposición MNPs funcionalizadas con alquino en las dos muestras, se contabilizaron para la muestra expuesta 15 minutos continuos un total de 35 nanopartículas y 22 agregados en la imagen de  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  considerando como agregados de nanopartículas lo que excediera una altura de 15 nm, se identificaron cambios de alturas en promedio de 1,01 nm después de la aplicación de AMF. Para la muestra expuesta 30 minutos continuos se contabilizaron un total de 39 nanopartículas y 18 agregados y cambios de alturas en promedio de 1,06 nm (ver Apéndice K). Las nanopartículas funcionalizadas sin alquino no se depositaron sobre la película de GSL4-DPPC-COL. De igual manera no se evidencio deposición de MNPs sobre las películas de GSL2-DPPC-COL.

La comparación de las imágenes de la película de GSL4-DPPC-COL después de incubar nanopartículas funcionalizadas sin alquino y de las películas de GSL2-DPPC-COL después de incubar las nanopartículas funcionalizadas con y sin alquino se muestran en el Apéndice L.

**Figura 17**

*Comparación de película de GSL4-DPPC-COL proceso incubación MNPs y AMF*



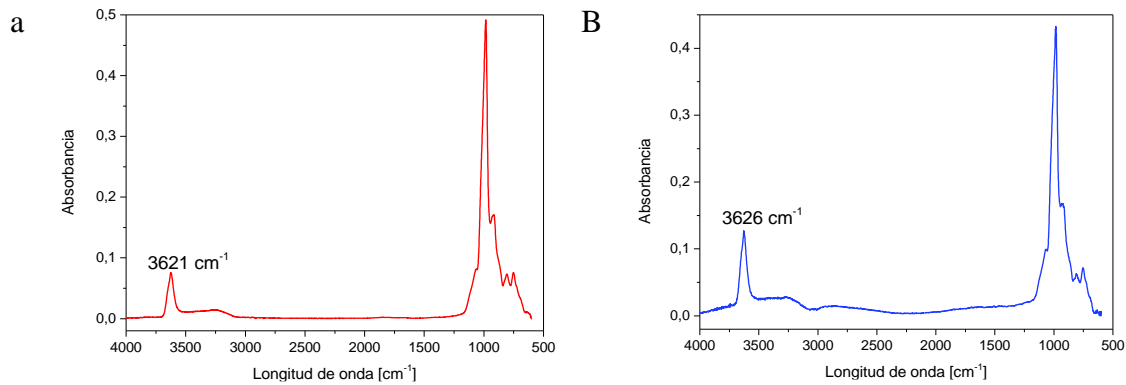
*Nota:* Comparación de película de GSL4-DPPC-COL, presión transferida a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  (a y c) después de incubar nanopartículas funcionalizadas con alquino; (b) luego de aplicar AMF durante 15 minutos continuos; (d) luego de aplicar AMF durante 30 minutos continuos

Para verificar una posible unión covalente entre las MNPs y las películas se realizaron pruebas de espectroscopia de infrarrojo en modo ATR. En la figura 18 se muestran los espectros de las películas de GSL2 y GSL2-DPPC-COL con MNPs funcionalizadas con alquino. Según la literatura los grupos funcionales como el  $-\text{OH}$  se presentan en longitudes de onda de  $3670$  a  $3580 \text{ cm}^{-1}$  y el alquino en longitudes de onda de  $2140$  a  $2100 \text{ cm}^{-1}$  (Socrates, 2001). En el espectro del GSL2 se evidencia con poca claridad la banda del grupo funcional  $-\text{OH}$  en una longitud de onda de  $3621 \text{ cm}^{-1}$ , de igual manera se percibe en la película de GSL2-DPPC-COL el grupo funcional –

OH en  $3626\text{ cm}^{-1}$ . Según los rangos donde la literatura expresa la ubicación de una señal de alquino no se denota ningún cambio para los espectros en cuestión.

### Figura 18

*Espectro de ATR de GSL2 y GSL2-DPPC-COL con MNPs grupo alquino*

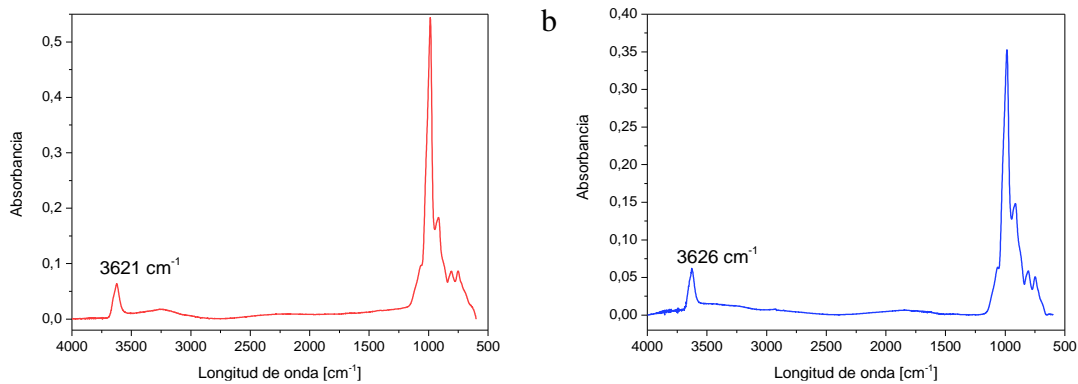


*Nota:* Espectro de ATR de (a) GSL2 con MNPs funcionalizadas con grupo alquino; (b) GSL2-DPPC-COL con MNPs funcionalizadas con grupo alquino

En el caso de las muestras con GSL4 y GSL4-DPPC-COL con MNPs funcionalizadas con grupo alquino (figura 19) se observa un comportamiento del espectro similar al del GSL2, notándose que el grupo funcional  $\text{-OH}$  tiene la misma longitud de onda,  $3621\text{ cm}^{-1}$ , para GSL4 y  $3626\text{ cm}^{-1}$  para GSL4-DPPC-COL. Las longitudes de onda cumplen con el rango de banda según la literatura para una señal de  $\text{-OH}$  y no se presentan cambios en la longitud de onda dada por la literatura donde debería mostrar una señal del grupo alquino, así como tampoco permite observar la azida que contiene este glicoesfingolípido.

**Figura 19**

*Espectro de ATR de GSL4 y GSL4-DPPC-COL con MNPs grupo alquino*

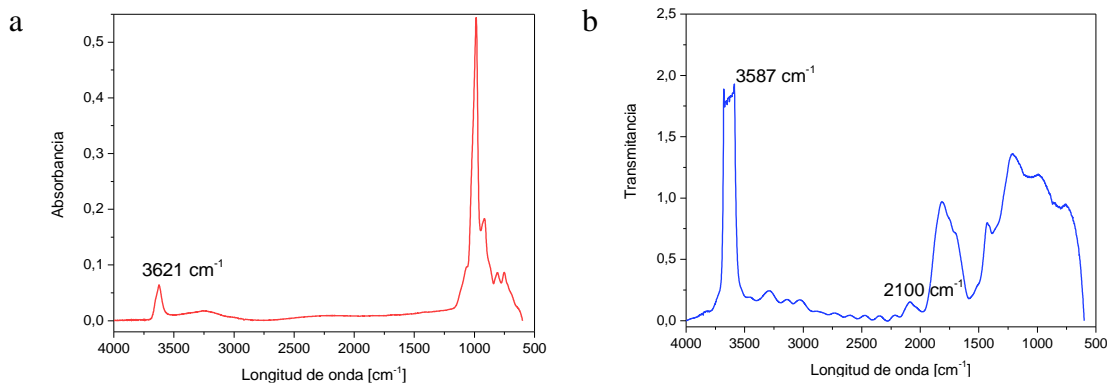


*Nota:* Espectro de ATR de (a) GSL4 con MNPs funcionalizadas con grupo alquino; (b) GSL4-DPPC-COL con MNPs funcionalizadas con grupo alquino.

En las pruebas de absorbancia no fue fehaciente la presencia de los grupos funcionales, sólo se observaron los hidroxilos(-OH) pero no las uniones de carbono (C-C). En la figura 20 (b) se enseña el espectro de una prueba alternativa para la muestra GSL4-DPPC-COL con MNPs funcionalizadas con un grupo alquino, donde se observa cambio en el rango que la literatura expone para la banda del grupo funcional alquino, con longitud de onda de  $2100\text{ cm}^{-1}$ . Cabe indicar que la banda de señal de los grupos azida presentes en el material se presenta en rangos de  $2170\text{-}2080\text{ cm}^{-1}$  de longitud de onda, por lo que se asume la probabilidad de una reacción química entre el azida del GSL4 y el grupo alquino de las MNPs. Al comparar el espectro de absorbancia con el de transmitancia se reconoce que este último da una mejor perspectiva de los grupos funcionales y se puede afirmar que se registró un cambio en la banda de señal del alquino presente en la muestra GSL4-DPPC-COL con MNPs funcionalizadas con un grupo alquino.

**Figura 20**

*Comparación de pruebas ATR y transmitancia del GSL4 con MNPs grupo alquino*

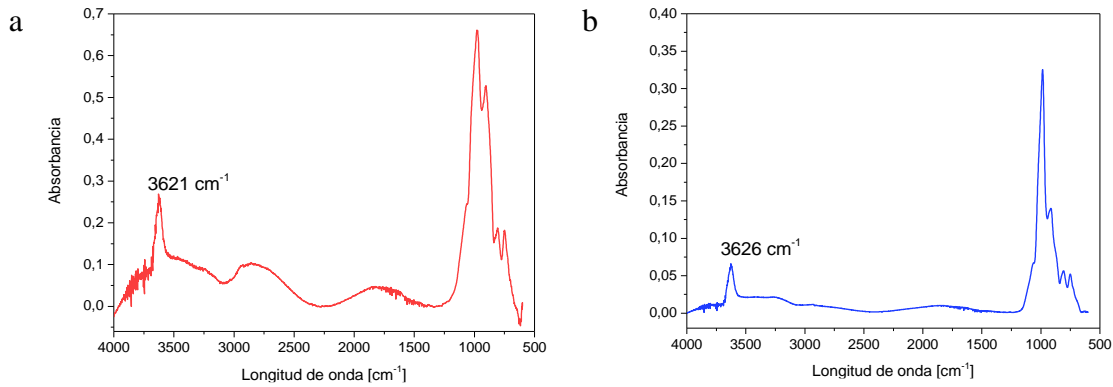


*Nota:* Comparación de pruebas de espectro para el GSL4 con MNPs funcionalizadas con grupo alquino (a) ATR (b) Transmitancia

En la figura 21 se presentan dos espectros de ATR con GSL4 y GSL4-DPPC-COL cada muestra con MNPs funcionalizadas con grupo alquino y un tiempo de incubación de 24 horas. Se ve un cambio en el espectro de la muestra con GSL4 en relación con el espectro de este con incubación de MNPs durante 1 hora, sin embargo, para la película ternaria se forma un espectro similar. Los rangos de longitud de onda de los grupos en cuestión se observan en el Apéndice M.

**Figura 21**

*Espectro de ATR de GSL4 y GSL4-DPPC-COL con MNPs con grupo alquino, incubación 24 horas*



*Nota:* Espectro de ATR de películas con MNPs funcionalizadas con grupo alquino con incubación de 24 horas de (a) GSL4; (b) GSL4-DPPC-COL

#### 4. Conclusiones

Se estableció como presión de transferencia  $25mN \cdot m^{-1}$  que, aunque es menor a la presión lateral en las membranas biológicas, evita la formación de agregados, también se optó por una composición equimolar de la membrana, dada la baja miscibilidad de los glicosfingolípidos con el DPPC y el COL y teniendo como referencia la buena miscibilidad que generan el DPPC y el COL en iguales proporciones.

El método de inmovilización usado, el autoensamblaje, tiene como principio la química *click* y genera una organización poco homogénea de las MNPs en comparación al método Langmuir-Schaefer (LS) indicado en trabajos anteriores del grupo de investigación Platón. Cabe indicar que la reacción que se produce entre las MNPs y el glicosfingolípido de la membrana es independiente del tiempo de incubación.

Se indujeron poros sobre las películas ternarias del glicosfingolípido 4, sin embargo, no se consideran adecuados dado que en trabajos reportados anteriormente con otro glicosfingolípido se obtuvo mayor penetración de las MNPs sobre la membrana fabricada.

Se identificó que el tamaño de los poros es independiente del tiempo de exposición al campo magnético, dado que no se evidenciaron cambios significativos en las alturas de las MNPs depositadas después de la aplicación de AMF.

En los análisis de ATR no se demostró con claridad la reacción química que ocurre en el momento de incubar por auto ensamblaje las MNPs funcionalizadas con grupo alquino. La prueba de espectroscopia no resultó óptima debido a que solo se pudo observar los grupos funcionales – OH presentes en la muestra y no su composición total. Por tal motivo se realizó una última prueba

cambiando la condición de absorbancia por transmitancia. Se interpreta que hubo un anclaje de las MNPs funcionalizadas de forma correcta.

Teniendo en cuenta que el estudio de espectroscopia de infrarrojo ejecutado en modo ATR no fue el deseado debido a la ausencia de datos que confirmaran la composición de grupos funcionales presentes en la película de Langmuir se sugiere repetir los análisis cambiando el modo de absorbancia a transmitancia, además se proponen pruebas de espectroscopia de fotoelectrones de rayos X (XPS).

### Referencias Bibliográficas

- Armenta Ruiz, E., Varela Echavarría, A., Martínez De La Escalera, G., & Loske Mehling, A. M. (2006). Transfección de células por medio de ondas de choque. *Revista Mexicana de Física*, 52(4), 352–358.
- Arrazola, A. (1994). Biología De La Membrana Celular. *Nefrología*, 14(4), 418–426.
- Austin-ward, E. D., & Villaseca G, C. (1098). La terapia génica y sus aplicaciones. *Revista Médica de Chile*, 126(7), 838–845. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98871998000700013>
- Ballesteros Rueda, L. M. (2012). *Ensamblaje de moléculas orgánicas altamente conjugadas con potenciales aplicaciones en electrónica molecular (Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza)*.
- Binnig, G., Quate, C. F., & Gerber, C. (1986). Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters*, 56(9), 930. <https://doi.org/10.1201/9781420075250>
- Biolin Scientific. (2004). Langmuir and Langmuir-Blodgett devices - KSV Nima Software Manual 6th Edition. In *KSV NIMA / Biolin Scientific Oy Tietäjántie*. [https://www.ccmr.cornell.edu/wp-content/uploads/sites/2/2015/11/KSV-NIMA-LB-Software-Manual\\_v1.4.pdf](https://www.ccmr.cornell.edu/wp-content/uploads/sites/2/2015/11/KSV-NIMA-LB-Software-Manual_v1.4.pdf)
- Biolin Scientific. (2010). Imaging the Structure of Thin Films: Brewster Angle Microscopy. *Journal of American Chemical Society*, 132, 1–4. <http://www.ksvnima.com/file/application-notes-2/ksvnimaan9.pdf>

Blodgett, K. B. (1935). Films Built by Depositing Successive Monomolecular Layers on a Solid Surface. *Journal of the American Chemical Society*, 57(6), 1007–1022.

<https://doi.org/10.1021/ja01309a011>

Černiukė, I., Tamulevičius, S., Prosyčėvas, I., Puišo, J., Guobienė, A., & Andrulevičius, M. (2006). Formation of metalloorganic multilayer structures by langmuir-blodgett technique. *Mater. Sci.*, 12(4), 292–296.

Chatterjee, D. kumar, Diagaradjane, P., & Krishnan, S. (2011). Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy. *Therapeutic Delivery*, 2(8), 1001–1014.

Crisp, D. J. (1958). Surface films of polymers. *Surface Phenomena in Chemistry and Biology*, 23, 49–70.

Defay, R., Bellemans, A., & Prigogine, I. (1996). *SURFACE TENSION AND ADSORPTION*.

*Descripción general de MultiMode 8*. (n.d.). Retrieved May 5, 2020, from

<https://www.bruker.com/es/products/surface-and-dimensional-analysis/atomic-force-microscopes/multimode-8-hr/overview.html>.

Diaz, C. (2011). *Adherencia y Colonización de Pseudomonas Fluorescens sobre Sustratos Sólidos: Influencia de la Topografía y Composición Química de la Superficie*.

Dynarowicz-Łątka, P., Dhanabalan, A., & Oliveira, O. N. (2001). Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. *Advances in Colloid and Interface Science*, 91(2), 221–293. [https://doi.org/10.1016/S0001-8686\(99\)00034-2](https://doi.org/10.1016/S0001-8686(99)00034-2)

Fernández-Botello, A., Comelles, F., Asunción Alsina, M., Cea, P., & Reig, F. (2008). A

- monolayer study on interactions of docetaxel with model lipid membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(44), 13834–13841. <https://doi.org/10.1021/jp806423k>
- Garaio, E., Collantes, J. M., Plazaola, F., Garcia, J. A., & Castellanos-Rubio, I. (2014). A multifrequency electromagnetic applicator with an integrated AC magnetometer for magnetic hyperthermia experiments. *Measurement Science and Technology*, 25(11). <https://doi.org/10.1088/0957-0233/25/11/115702>
- García Marquina, G. (2015). *Trabajo Fin de Grado Nanopartículas magnéticas inmovilizadas en la*.
- Gardlík, R., Pálffy, R., Hodosy, J., Lukács, J., Turňa, J., & Celec, P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Medical Science Monitor*, 11(4), 110–121.
- Gershfeld, N. L., & Pagano, R. E. (1972). Physical Chemistry of Lipids Films at the Air-Water interface. II. Binary Lipid Mixtures. The Principles Governing Miscibility of Lipids in Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry*, 76(9), 1238–1243.
- Gong, K., Feng, S. S., Go, M. L., & Soew, P. H. (2002). Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air-water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 207(1–3), 113–125. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(02\)00043-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(02)00043-2)
- González Rodríguez, M. P. (2020). *Influencia de las técnicas espectroscópicas y el método de análisis en la estimación del grado de conversión de diferentes composites Bulk-Fill*.
- González Fernández, A., Peleteiro Olmedo, M., Lozano Fernández, T., Simón Vázquez, R., & Díaz Freitas, B. (2012). Nanotecnología y sistema inmunitario. *Nuevas Perspectivas En*

*Inmunoterapia*, 25, 21–33.

Grande, A. H. (2007). Nanotecnología y nanopartículas magnéticas: la física actual en la lucha contra la enfermedad. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.*, 101(2), 321–327.

<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.14508/sdp.2014.6.12.129-140>

Jurak, M. (2013). Thermodynamic aspects of cholesterol effect on properties of phospholipid monolayers: Langmuir and langmuir-blodgett monolayer study. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(13), 3496–3502. <https://doi.org/10.1021/jp401182c>

Kim, K., Kim, C., & Byun, Y. (2001). Preparation of a dipalmitoylphosphatidylcholine/cholesterol Langmuir-Blodgett monolayer that suppresses protein adsorption. *Langmuir*, 17(16), 5066–5070. <https://doi.org/10.1021/la0102096>

Lacava, Z. G. M., & Morais, P. C. (2012). Aplicações biomédicas de nanopartículas magnéticas. *Parcerias Estratégicas*, 9(18), 73–86.

Luk, K. H., Hulse, R. M., & Phillips, T. L. (1980). Hyperthermia in cancer therapy. *Western Journal of Medicine*, 132(3), 170–185. <https://doi.org/10.1007/BF00442463>

Marrese, M., Guarino, V., & Ambrosio, L. (2017). Atomic Force Microscopy: A Powerful Tool to Address Scaffold Design in Tissue Engineering. *Journal of Functional Biomaterials*, 8(1), 7. <https://doi.org/10.3390/jfb8010007>

Patterson, D. M., Nazarova, L. A., & Prescher, J. A. (2014). Finding the Right ( Bioorthogonal ) Chemistry. *ACS Chemical Biology*, 9(3), 592–605. <https://doi.org/dx.doi.org/10.1021/cb400828a>

Pérez Mayen, L. (2010). *Preparación de sustratos con nanopartículas de plata mediante la técnica Langmuir-Blodgett (LB) para SERS.*

Ruiz Rincón, S., González Orive, A., De La Fuente, J. M., & Cea, P. (2017). Reversible Monolayer-Bilayer Transition in Supported Phospholipid LB Films under the Presence of Water: Morphological and Nanomechanical Behavior. *Langmuir*, *33*(30), 7538–7547.  
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01268>

*Serie DM 100 | nB biomagnetismo nanoescala.* (n.d.). Retrieved July 6, 2020, from  
<https://www.nbnanoscale.com/dm-100-series-2/>

Shan, Y., & Wang, H. (2015). The structure and function of cell membranes examined by atomic force microscopy and single-molecule force spectroscopy. *Chemical Society Reviews*, *44*(11), 3617–3638. <https://doi.org/10.1039/c4cs00508b>

Singer, S. J., & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of membrane structure. *Science*, *175*(4023), 443–461.

Socrates, G. (2001). Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts. In *JOHN WILEY & SONS, LTD.* <https://doi.org/10.1002/jrs.1238>

Suk, J. S., Xu, Q., Kim, N., Hanes, J., & Ensign, L. M. (2016). PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *99*, 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>

Torrent Burgués, J. (2012). *Detección de películas nanométricas por microscopia de ángulo de Brewster.*

*Tratamientos para el cáncer: MedlinePlus enciclopedia médica.* (n.d.). Retrieved May 25, 2019, from <https://medlineplus.gov/spanish/ency/patientinstructions/000901.htm>

Villares, A., Martín, S., Giner, I., Díaz, J., Lydon, D. P., Low, P. J., & Cea, P. (2008). The use of scanning polarization force microscopy to study the miscibility of a molecular wire candidate and an insulating fatty acid in mixed LB films. *Soft Matter*, *4*(7), 1508–1514. <https://doi.org/10.1039/b716798a>

Zasadzinski, J. A., Helm, C. A., Longo, M. L., Weisenhorn, A. L., Gould, S. A., & Hansma, P. K. (1991). Atomic force microscopy of hydrated phosphatidylethanolamine bilayers. *Biophysical Journal*, *59*(3), 755–760. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(91\)82288-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(91)82288-3)

Zasadzinski, J. A., Viswanathan, R., Madsen, L., Garnaes, J., & Schwartz, D. K. (1994). Langmuir-Blodgett Films. *Science*, *263*(5154), 1726–1733.

Zhao, L., Feng, S. S., & Go, M. L. (2004). Investigation of Molecular Interactions between Paclitaxel and DPPC by Langmuir Film Balance and Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *93*(1), 86–98. <https://doi.org/10.1002/jps.10523>

## Apéndices

### Apéndice A. Langmuir y Langmuir Blodgett

El término película de Langmuir se reserva normalmente para una monocapa flotante y Langmuir-Blodgett a la transferencia de las monocapas sobre soportes sólidos. El primero en realizar estudios sistemáticos sobre monocapas flotantes en el agua fue Irving Langmuir (1881-1957) quien ratificó que las capas de moléculas anfifílicas dispersas sobre superficies acuosas tienen el espesor de una capa molecular simple. Bajo la orientación de Langmuir, Katherine Blodgett (1898-1979) aportó la descripción detallada de la transferencia de monocapas de ácidos grasos desde la superficie acuosa sobre soportes sólidos (Blodgett, 1935). La técnica Langmuir Blodgett (LB) consiste en el esparcimiento de una solución en una cuba hecha de un material hidrofóbico (generalmente teflón) que contiene una subfase que generalmente es agua Milli-Q, donde las moléculas son ordenadas mediante una compresión en la superficie de este creando así una monocapa de moléculas para transferir luego a un sustrato sólido (Pérez Mayen, 2010). Esta técnica se fundamenta en que las moléculas anfifílicas poseen una parte hidrófila y una hidrófoba, lo que les permite permanecer ancladas en la interfaz aire-agua del teflón por la parte hidrófila y estabilizadas gracias a las interacciones de van der Waals establecidas entre moléculas vecinas por la parte hidrófoba (Černiukè et al., 2006). Las moléculas deben ser disueltas en un solvente volátil e inmiscible en agua para favorecer la máxima dispersión de estas, permitiendo así que al ser compactadas por una barrera se logre una monocapa uniforme sobre la interfaz en la que se sumerge un sustrato sólido a una velocidad determinada dando lugar a la ejecución de la transferencia pretendida. Esta técnica tiene un gran potencial ya que permite el control preciso del espesor de monocapa, una deposición homogénea de la monocapa sobre grandes áreas, capacidad de recubrir

superficies sin dañar la superficie y la posibilidad de hacer estructuras multicapa con composición de capa variable (Pérez Mayen, 2010). Una ventaja adicional de la técnica Langmuir Blodgett es que las monocapas se pueden depositar en casi cualquier tipo de sustrato sólido (Biolin Scientific, 2004).

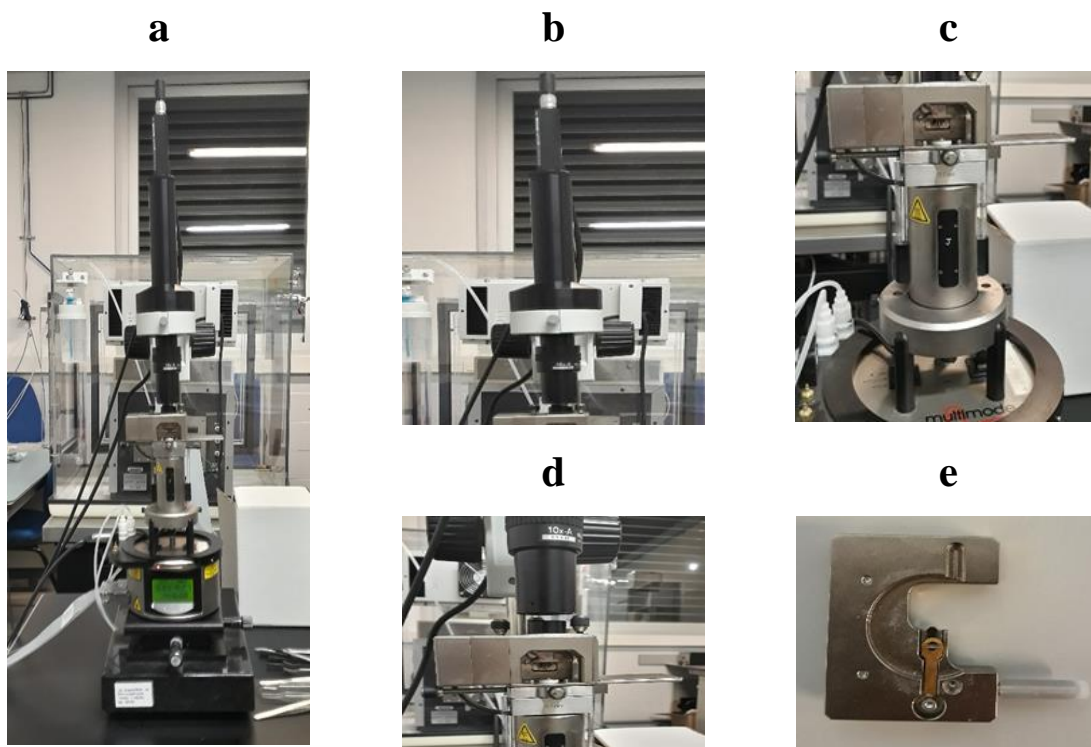
## Apéndice B. Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

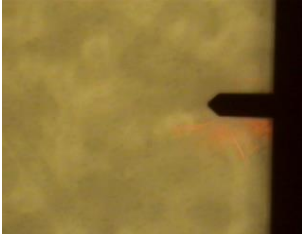
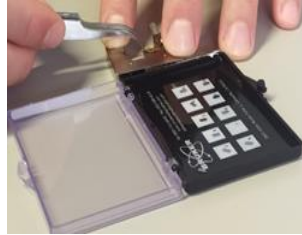
Para la caracterización de las muestras se hace uso de la técnica microscopía de fuerza atómica (AFM), técnica de análisis propuesta en el año 1986 por G. Binnig y C.F. Quate (Binnig et al., 1986). El principio de funcionamiento de AFM es el mapeo de la superficie de la muestra usando una punta muy fina (idealmente acabada en un átomo) que funciona como sonda de escaneo. Un láser se dispone sobre la punta; esta luz es reflejada sobre un fotodetector sensible a la posición que proporciona señal de retroalimentación a los escáneres piezoeléctricos que mantienen la punta a una altura o fuerza constante. En consecuencia, se obtiene información sobre la rugosidad de la superficie o la fuerza de interacción entre la muestra y la punta. Por lo tanto, incluso un ligero movimiento de la punta cambia la posición del haz en el fotodetector. El desplazamiento de la punta es función de las fuerzas de interacción entre la punta y la muestra (Marrese et al., 2017). La medición de AFM se puede llevar en tres modos dependiendo del tipo de interacción de la punta con la superficie: (i) contacto (en presencia de fuerzas constantemente repulsivas); sin contacto (en presencia de fuerzas atractivas sobre la punta) y (iii) modo *tapping*, en presencia de fuerzas atractivas y repulsivas (Diaz, 2011). Esta técnica se usa para analizar sistemáticamente la distribución de los componentes de la membrana *in situ* mediante imágenes de alta resolución que permiten proveer información nanoestructurada tridimensional y cuantitativa sobre la morfología de la estructura de la monocapa formada y propiedades mecánicas de la membrana artificial constituida y visualizar las interacciones entre ésta y las nanopartículas depositadas sobre ella (Shan & Wang, 2015). La técnica permite analizar la topografía de una muestra, no es destructiva y se puede utilizar para obtener imágenes a nano escala de alta resolución y estudiar sitios locales en entornos de aire o líquido (Diaz, 2011).

El Instituto de Nanociencia de Aragón cuenta con un cabezal AFM/STM multipropósito instalado sobre una mesa amortiguadora anti-vibraciones. El Multimode 8 de Bruker (Veeco-Bruker) es un microscopio SPM equipado con KPM (Microscopia Kelvin Probe), c-AFM (AFM-conductivo), celdas para medidas en aire, líquido y celdas electroquímicas, módulo PicoForce para espectroscopia de fuerzas, controlador Peltier de temperatura variable ( $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), medidas de Torsion-mode y QNM (Quantitative Nanomechanical Property Mapping), opción Peak Force y rango de escáner de  $200\text{ }\mu\text{m} \times 200\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$  y  $12\text{ }\mu\text{m} \times 12\text{ }\mu\text{m} \times 3\text{ }\mu\text{m}$  (*Descripción General de MultiMode 8*, n.d.) y como puntas de cantiléver las *Scanasyst-air* (Bruker), con una constante elástica de  $0,4\text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$  y una frecuencia nominal de 130 kHz.

### Figura 22

*Partes del AFM.*



**f****g****h**

*Nota:* Microscopio de fuerza atómica (a) Equipo AFM; (b) Microscopio atómico; (c) Cabezal AFM/STM; (d) Escáner microscópico; (e) Piezo eléctrico donde se ubica el cantiléver; (f) Detalle del cantiléver en la pantalla del ordenados desde la vista del microscopio atómico; (g) Ubicación del cantiléver en el piezo eléctrico; (h) Detalle del tipo de cantiléver a usar.

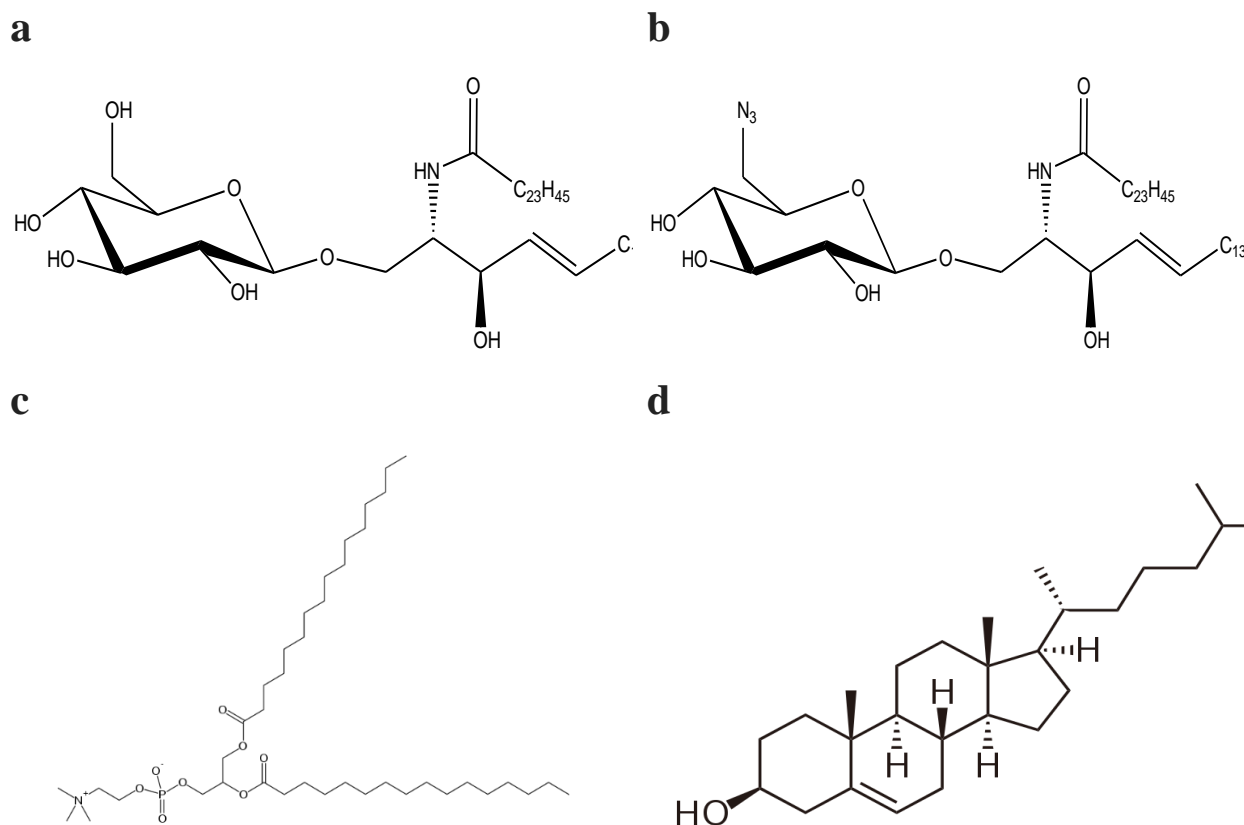
**Apéndice C. Estructuras Químicas de los Compuestos**

A continuación, se presentan las estructuras químicas de los compuestos utilizados en este trabajo de investigación

- Glicosfingolípido 2 (GSL2)
- Glicosfingolípido 4 (GSL4)
- D-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC)
- Colesterol (COL)

**Figura 23**

*Estructura química de compuestos químicos usados*



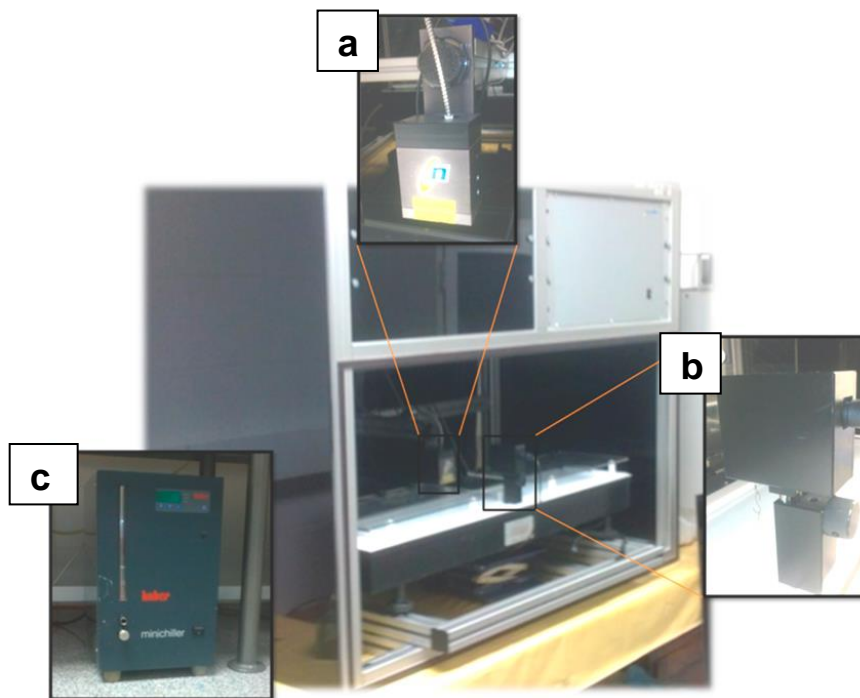
*Nota:* Estructura química de (a)GSL2 ;(b) GSL4; (c)DPPC; (d)COL

### Apéndice D. Microscopio de Ángulo Brewster (BAM)

Para el estudio de la morfología de la monocapa, el laboratorio del grupo de investigación Platón de la Universidad de Zaragoza cuenta con una KSV NIMA a la que se puede incorporar un microscopio de Ángulo Brewster (BAM) para poder visualizar la morfología de la monocapa. El equipo se compone de un láser rojo con una potencia de 50 mW y una longitud de onda de 659 nm. Cuenta con una cámara CCD controlada por un ordenador con una resolución de 640 x 480 píxeles. Este dispositivo cuenta con un ajuste vertical motorizado de alta precisión y una resolución lateral del sistema óptico en el plano de la superficie acuosa de 12  $\mu\text{m}$  (Ballesteros Rueda, 2012).

#### Figura 24

*Cuba KSV NIMA con BAM incorporado*



*Nota:* Cuba KSV NIMA con BAM incorporado (a) Sensor del espectrómetro de reflexión UV—Vis; (b) *Detalle* de la balanza de Wilhelmy; (c) Baño termostático. Cuba KSV NIMA BAM (a) Sensor del espectrómetro de reflexión UV—vis; (b) *Detalle* de la balanza de Wilhelmy; (c) Baño termostático. Adaptado de Ensamblaje de moléculas orgánicas altamente conjugadas con potenciales aplicaciones en electrónica molecular, por L. Ballesteros, 2012. Doctoral dissertation, Universidad de Zaragoza.

La cuba KSV NIMA con BAM incorporado (figura 24) posee un recipiente de teflón de dimensiones  $100 \times 720 \text{ mm}^2$ , dos barreras de compresión y no posee brazo para transferencias. En esta cuba además de obtener la isothermas de compresión se pueden determinar isothermas de potencial superficial y obtener espectros de reflexión UV-Vis de la monocapa durante el proceso de compresión. La medida de la presión superficial se realiza también con el método de la balanza de Wilhelmy, utilizando un papel de filtro de dimensiones  $10 \times 25 \text{ mm}^2$ . La balanza de Wilhelmy se encuentra situada en el centro de la cuba. Siendo la misma zona donde se registran los espectros de reflexión UV-vis. El software del equipo ha sido proporcionado por la casa comercial KSV NIMA Biolin Scientific y permite registrar simultáneamente isothermas y un software adicional, que contiene un programa escrito por miembros del grupo Platón en el que se registra los resultados procedentes de la reflexión UV-vis de forma automatizada (Biolin Scientific, 2010).

### Apéndice E. Cuba KSV NIMA

Para el proceso de experimentación de este trabajo de grado, el laboratorio del grupo de investigación Platón de la Universidad de Zaragoza cuenta con la cuba de tipo comercial KSV NIMA modelo 2003 controlada por computadora (KSV Instruments Ltd., Finlandia) equipada con dos barreras simétricas y una electro balanza con placa Wilhelmy.

En la figura 25 se muestra la fotografía del equipo KSV NIMA. La cuba contiene un recipiente de teflón de dimensiones de 580 x 145 mm<sup>2</sup> con profundidad de 4 mm, excepto la zona del pozo de transferencia que tiene una mayor profundidad y está situada en la parte céntrica del recipiente de teflón, además posee dos barreras de compresión de teflón y un brazo de transferencia.

Este tipo de cuba se encuentra dentro de una cabina especialmente diseñada para evitar la contaminación por partículas de polvo en el ambiente y está apoyada sobre una mesa que amortigua las vibraciones.

### Figura 25

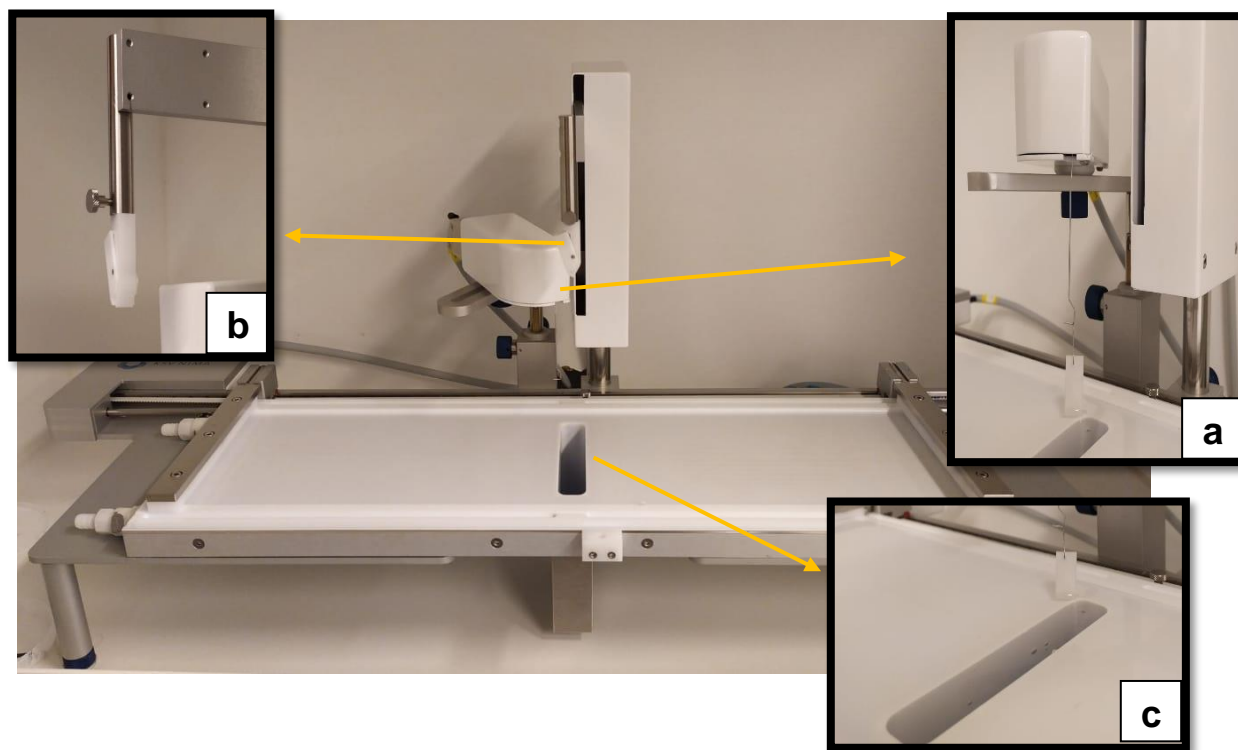
*Cuba KSV NIMA modelo 2003*



En esta cuba es posible la realización y registro de las isotermas de presión superficial-área molecular ( $\pi - A$ ) y la transferencia de las películas de Langmuir a sustratos sólidos. Para la determinación de la presión superficial se hace uso del método de la placa de Wilhelmy, el sensor en este caso es un papel de filtro con dimensiones  $10 \times 23 \text{ mm}^2$  sumergido parcialmente en la fase acuosa. La placa está conectada a un sensor magnético (figura 26.a), que es previamente calibrado, para que cuando se haya hecho la dispersión del surfactante con una micro jeringa de Hamilton no se altere la medición de la presión superficial. En la realización de las transferencias a sustratos sólidos el sistema presenta un brazo de transferencia donde en la parte inferior tiene una pinza la cual funciona como soporte para el sustrato sólido (figura 26.b).

### Figura 26

*Detalles Cuba KSV NIMA 2003*



*Nota:* (a) Balanza de Wilhelmy para la medida de la presión superficial en la interfase aire-agua. (b) Brazo de transferencia que contiene una pinza que sujeta el sustrato sólido. (c) Pozo de transferencia.

De manera similar las barreras de compresión de teflón y el brazo de transferencia constan de un motor encargado de accionar el desplazamiento vertical del brazo de transferencia y horizontal de las barreras de compresión. La velocidad de transferencia y el número de transferencias son programados y controlados por un software instalado en el ordenador. El software (figura 27) permite la acción de la cuba desde la activación de las barreras de compresión hasta el brazo de transferencia, este es proporcionado por la casa comercial KSV NIMA LB Software de Biolin Scientific que permite llevar un registro de las isotermas ( $\pi - A$ ). Este software permite la recolección de datos experimentales para los análisis respectivos y la visualización en tiempo real conforme se vayan comprimiendo las barreras y formando la monocapa.

Para mayor información sobre los detalles de instalación y configuración del software, en la referencia (Biolin Scientific, 2004) se encuentra el manual de instalación en el cual se explica con más profundidad el funcionamiento y activación del mismo. *NIMA Technology, Langmuir Blodgett troughs, operating manual 6th Edition, 2004.*

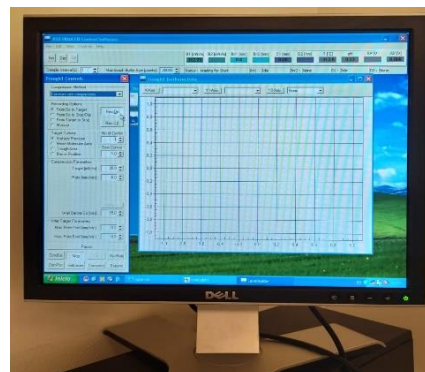
### Figura 27

Software KSV NIMA LB

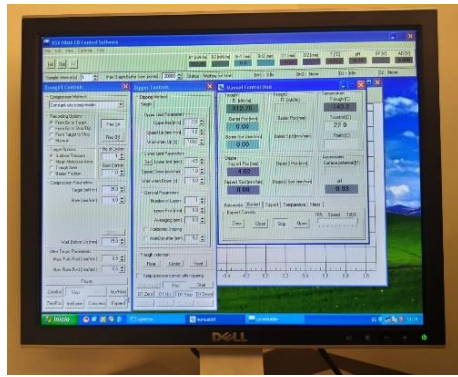
a



b



c



d



*Nota:* Software KSV NIMA LB (a) The Device Server, menú principal de la KSV NIMA LB software; (b) Opción para isotermas de Langmuir; (c) Opción para transferencias; (d) Unidad de interfase (LayerBuilder)

**Apéndice F. Limpieza de la Cuba KSV NIMA**

Para la elaboración de monocapas de Langmuir y películas Langmuir Blodgett es indispensable previa limpieza de la cuba, se requiere el uso de guantes de látex para minimizar la contaminación debida a la grasa de la piel del investigador que podría contaminar el equipo. La limpieza se debe efectuar sobre todo el área del teflón y las barreras contenedoras que regulan la tensión superficial del agua (Patterson et al., 2014), se desarrolla empleando papel óptico impregnado de acetona y cloroformo para remover residuos y muestras de contaminación (Pérez Mayen, 2010). El primer proceso de limpieza es con acetona ya que esta tiene la capacidad de retirar pequeñas cantidades de agua que hayan quedado en el teflón, además de que es menos volátil que el cloroformo permite la adhesión de polvo y pequeñas partículas sólidas existentes en el teflón (Pérez Mayen, 2010), se deja reposar 15 minutos para que se evapore la acetona completamente. Posteriormente se limpia con papel óptico impregnado con cloroformo (Pérez Mayen, 2010), este al ser miscible con la acetona permite retirar los restos de esta y al ser un solvente orgánico apolar proporciona un carácter más hidrófobo al teflón. Se deja evaporar durante 15 minutos. A continuación, se realizan tres lavados con agua ultra pura, filtrada y purificada (agua Milli-Q), llenando la cuba hasta la altura de los bordes y succionando la superficie del agua con una trompa de vacío para eliminar los contaminantes (Biolin Scientific, 2004), terminados los lavados se llena nuevamente la cuba y se verifica el nivel del agua, el objetivo es que esté al mismo nivel que los bordes del canal, ya que si el nivel es demasiado bajo, el surfactante podría deslizarse debajo de la barrera y si el nivel es demasiado alto, el surfactante podría derramarse. Para corroborar que la limpieza se haya hecho de manera correcta se registra una curva de presión superficial versus área para el agua (sin dispersar ningún surfactante), si al comprimir las barreras la presión superficial se mantiene por debajo de  $0,3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  indica que la cuba está limpia (Biolin Scientific, 2004),

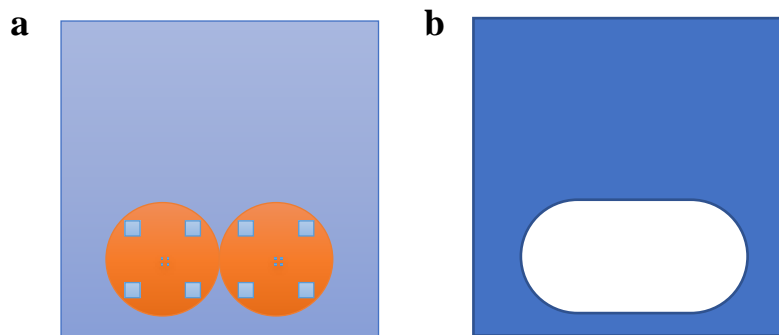
un cambio mayor muestra la presencia de tensioactivos, ya que en el caso del agua Milli Q, la presión superficial no cambia cuando se comprimen las barreras. La presión superficial es medida mediante una balanza de Wilhelmy; en nuestro caso la placa Wilhelmy fue papel de filtro comercial y ya cortado de 10,3 *mm* de ancho.

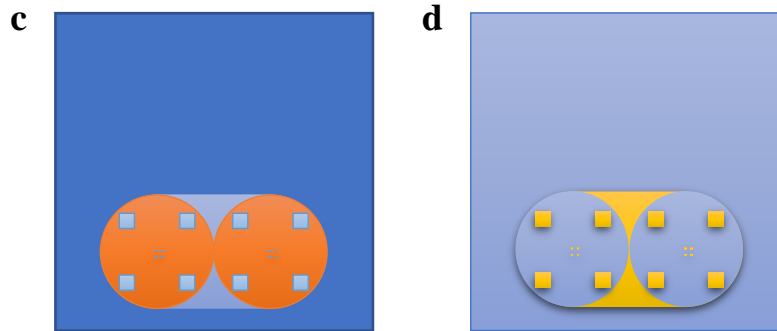
### Apéndice G. Marcas sobre la mica

Las marcas sobre las micas se realizan mediante deposición física de vapor (PVD). La resistencia de tungsteno del Electron Beam Power Supply se calienta cerca a los 1000°C lo que genera extracción y aceleración de electrones del material que se desea depositar. El haz de electrones se redirige por la acción de un campo magnético generado por un par de imanes hacia la caverna donde la mica está sujeta a la parte superior con cinta kapton que a su vez mantiene inmobilizadas un par de membranas de  $Si_3N_4$  y  $Si$  que previamente han sido perforadas mediante Focused Ion Beam (FIB) con el propósito de crear una plantilla con el tamaño de las marcas deseadas. Las marcas se realizan con cromo y cobre, se depositan inicialmente 5 nm de cromo, dada su buena adherencia a la mica este actuará como pegamento del cobre, del cual se depositarán 50 nm de material.

### Figura 28

*Esquema de micas marcadas por PVD*

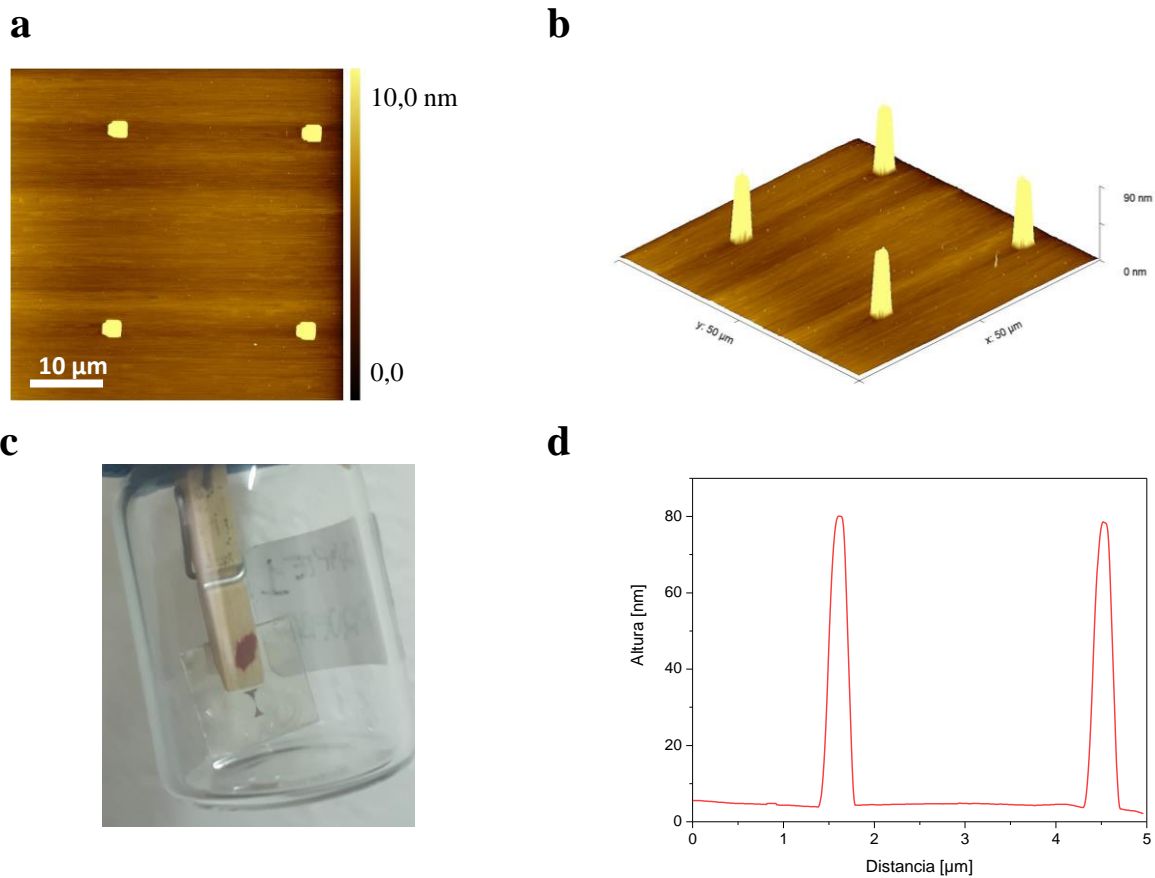




Nota: (a) membranas ubicadas sobre la mica; (b) plástico de protección de la mica; (c) mica preparada para PVD; (d) mica con las marcas hechas

**Figura 29**

*Mica marcada*



Nota: (a) Imagen AFM lado derecho de la mica marcada; (b) Imagen AFM lado derecho de la mica marcada en tres dimensiones; (c) Mica marcada; (d) Sección transversal correspondiente al lado derecha de la mica marcada

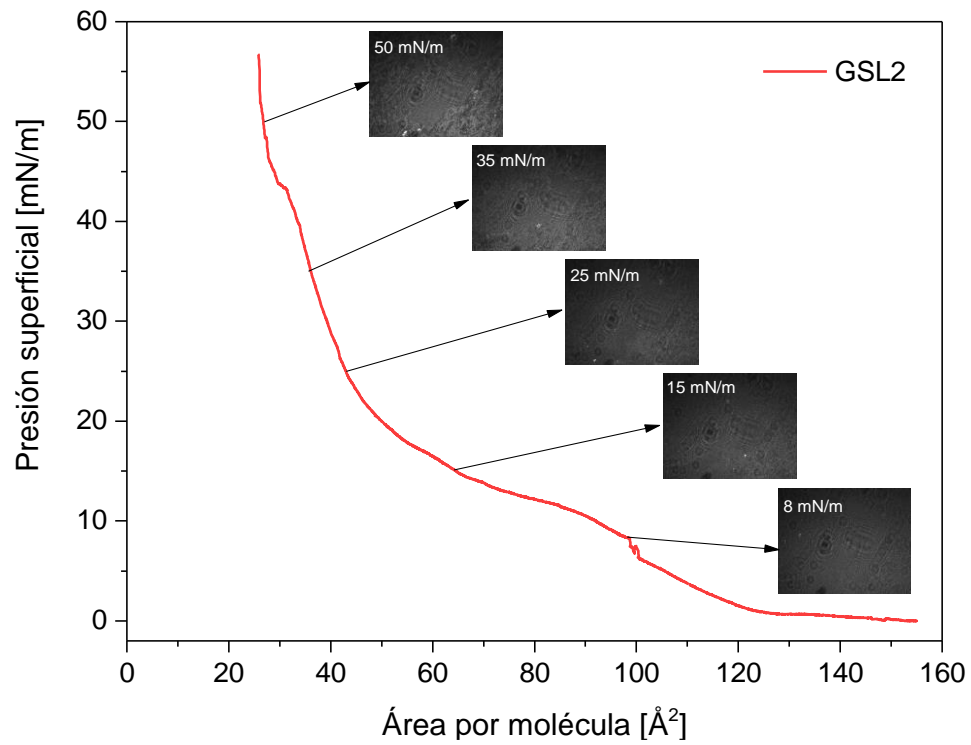
### **Apéndice H. Reflectancia Total Atenuada (ATR)**

La espectroscopia de infrarrojo es una técnica química analítica que permite obtención de un espectro infrarrojo de absorción o emisión que proporciona un espectro de reflexión, por el cual es posible realizar una identificación del tipo de enlaces y grupos funcionales de los materiales presentes en la muestra. Para la obtención de estos espectros se tienen tres técnicas de medida las cuales son: Transmisión, Reflexión y modo ATR (Attenuated Total Reflection), donde este último es un modo de muestreo en que un haz IR se proyecta en un cristal ATR transmisor, ópticamente denso y con un alto índice de refracción en cierto ángulo, haciendo que el haz se refleje internamente formando una onda evanescente sobre la superficie del mismo y de esta forma penetrar en la muestra. La energía de la onda evanescente es absorbida y la radiación reflejada (con la información química de la muestra) es conducida al detector. Esta onda se extiende a la muestra que se mantiene en contacto íntimo con el cristal, registrándose así el espectro de infrarrojo (González Rodríguez, 2020).

Para los experimentos de espectroscopia de infrarrojo el Instituto de Nanociencia de Aragón cuenta con un Espectrómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier modelo Tensor 27, Bruker, con una fuente MIR y con el accesorio de ATR modelo Platinum ATR, Bruker con cristal de diamante. Con el cual se puede obtener espectros en la región del infrarrojo entre  $4000\text{ cm}^{-1}$  y  $400\text{ cm}^{-1}$ .

## **Apéndice I. Hipertermia**

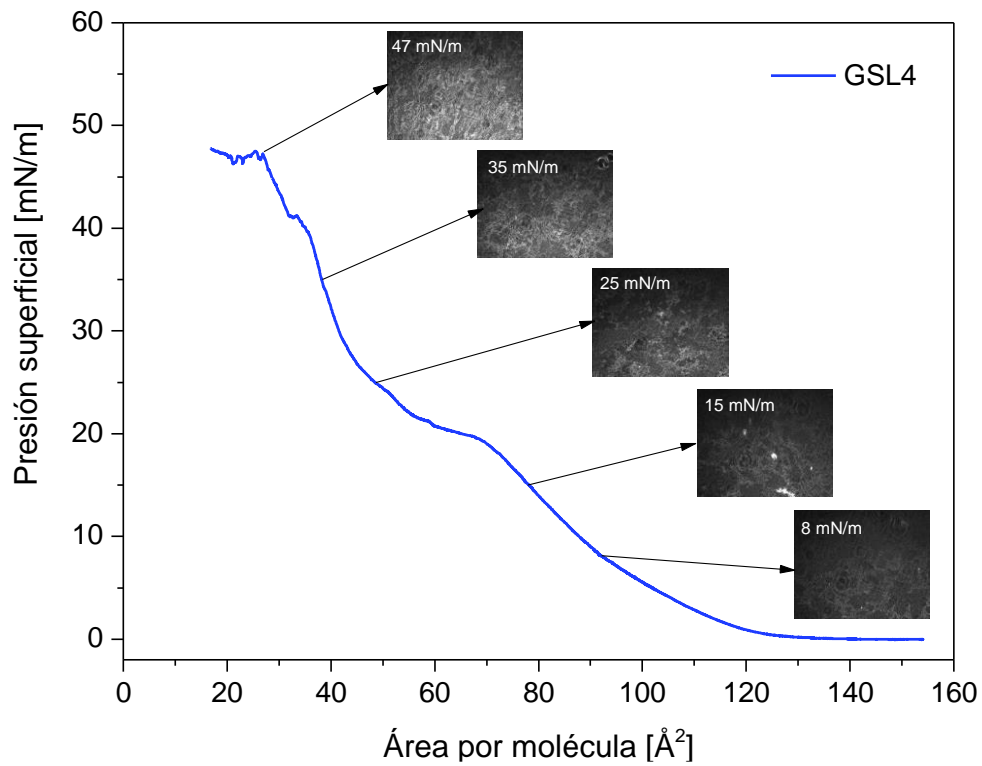
Los experimentos de hipertermia han sido realizados con un equipo DM100 series Applicator for calorimetry (DM1) de nB nanoScale Biomagnetics Company, conjunto con el software integrado de nB, MANIAC v1.0, que se encuentra en el Instituto de Nanociencia de Aragón que permite al usuario ejecutar y programar pruebas de calentamiento por inducción, así como monitorear y analizar los resultados de dichas pruebas. Este equipo cuenta con una capacidad máxima de frecuencia de 850 KHz y una intensidad de campo magnético máxima de 350 Gauss, y en rango de temperatura cuenta con funcionamiento normal de 5-40 °C, potencia máxima de 5-30 °C y almacenamiento de -20 - 70°C, maneja una humedad de 20-80% y sus dimensiones 415 x 712 x 285 mm<sup>3</sup> (*Serie DM 100 / NB Biomagnetismo Nanoescala, n.d.*).

**Apéndice J. Isotermas de las soluciones según BAM****Figura 30***Isoterma glicosfingolípido 2 con imágenes de BAM*

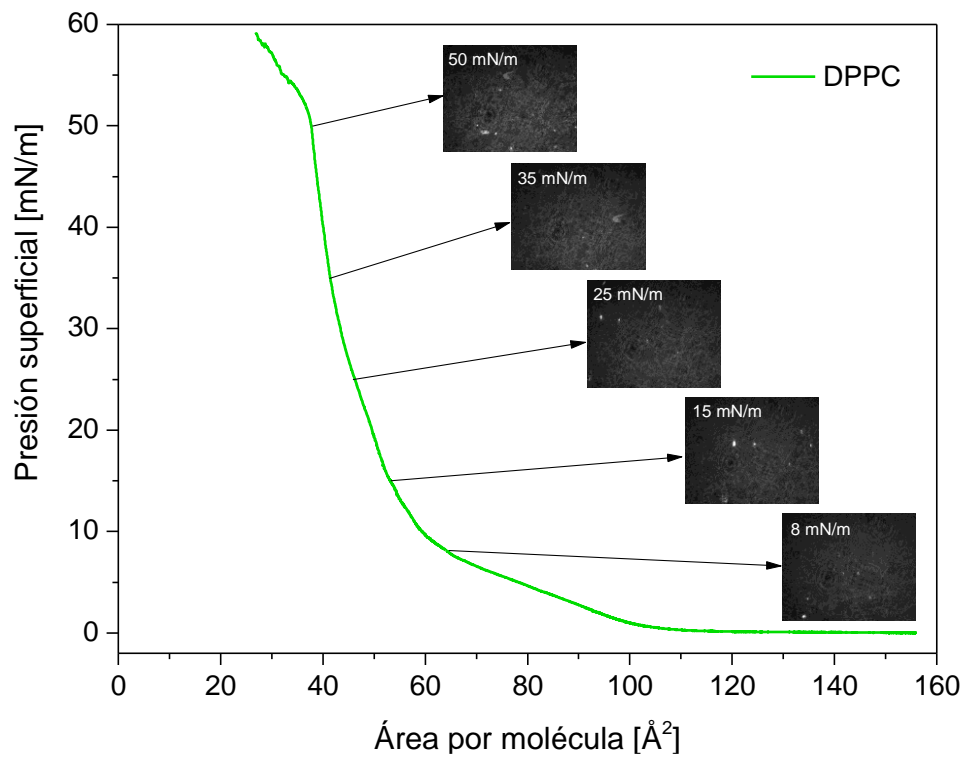
*Nota:* Isoterma de presión versus área por molécula del glicosfingolípido 2 (GSL2) con sus respectivas imágenes de BAM a diferentes presiones.

**Figura 31**

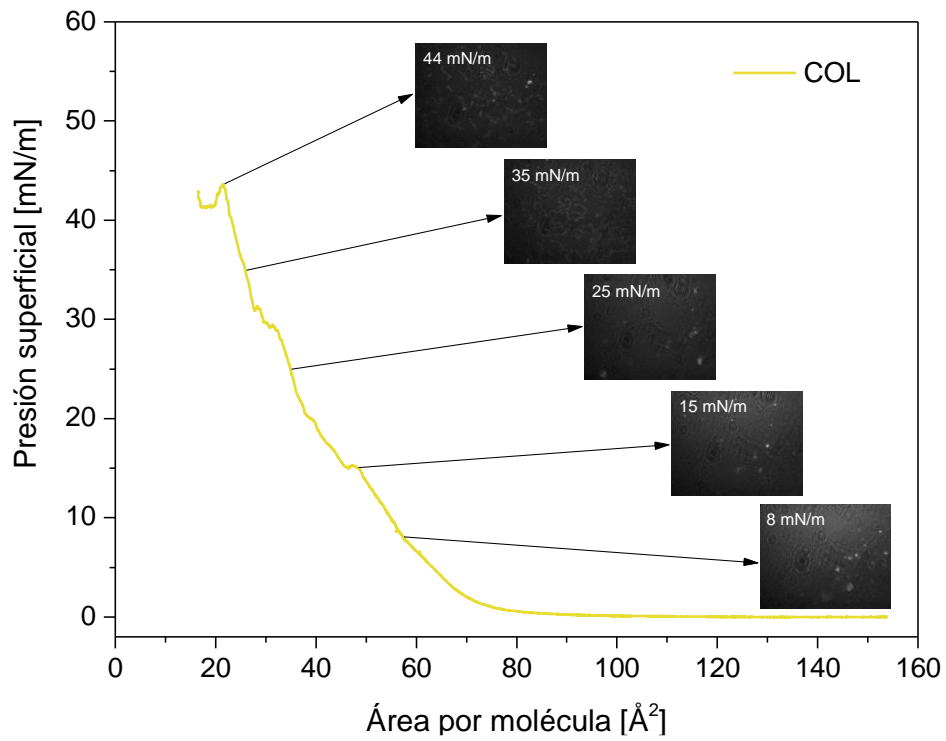
*Isoterma glicosfingolípido 4 con imágenes de BAM*



*Nota:* Isoterma de presión versus área por molécula del glicosfingolípido 4 (GSL4) con sus respectivas imágenes de BAM a diferentes presiones.

**Figura 32***Isoterma DPPC con imágenes de BAM*

*Nota:* Isoterma de presión versus área por molécula de D-1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) con sus respectivas imágenes de BAM a diferentes presiones.

**Figura 33***Isoterma COL con imágenes de BAM*

*Nota:* Isoterma de presión versus área por molécula de colesterol (COL) con sus respectivas imágenes de BAM a diferentes presiones.

**Apéndice K. Cambios en las alturas de MNPs sobre membrana fabricada****Tabla 1***Cambios de altura de MNPs sobre película de GSL4-COL-DPPC, con exposición de 15 minutos continuos de AMF*

N° NPs	SIN HIPERTERMIA			CON HIPERTERMIA			Diferencia alturas (nm)	NPs / Agregado		Antes	Después	Diferencia alturas
	Altura máxima (nm)	Altura superficie (nm)	Altura NPs (nm)	Altura máxima (nm)	Altura superficie (nm)	Altura NPs (nm)						
1	16,00	2,078	13,922	15,03	2,029	13,001	0,921	NPs	1	13,922	13,001	0,921
2	16,79	2,036	14,754	15,16	2,029	13,131	1,623	NPs	1	14,754	13,131	1,623
3	16,23	2,046	14,184	15,96	2,029	13,931	0,253	NPs	1	14,184	13,931	0,253
4	14,52	2,003	12,517	14,6	2,029	12,571	-0,054	NPs	0	0,000	0	0,000
5	18,62	2,053	16,567	18,03	2,029	16,001	0,566	Agregado	0	0,000	0	0,000
8	16,69	2,068	14,622	16,2	2,029	14,171	0,451	NPs	1	14,622	14,171	0,451
9	33,31	2,034	31,276	21,88	2,029	19,851	11,425	Agregado	0	0,000	0	0,000
10	18,38	2,047	16,333	18,79	2,029	16,761	-0,428	Agregado	0	0,000	0	0,000
11	13,74	2,033	11,707	12,6	2,029	10,571	1,136	NPs	1	11,707	10,571	1,136
12	17,05	2,065	14,985	16,28	2,029	14,251	0,734	NPs	1	14,985	14,251	0,734
13	16,91	2,071	14,839	16,47	2,029	14,441	0,398	NPs	1	14,839	14,441	0,398
14	13,41	2,090	11,320	13,88	2,029	11,851	-0,531	NPs	0	0,000	0	0,000
15	15,41	2,090	13,320	14,9	2,029	12,871	0,449	NPs	1	13,320	12,871	0,449

16	15,88	2,098	13,782	15,24	2,029	13,211	0,571	NPs	1	13,782	13,211	0,571
17	15,90	2,071	13,829	15,9	2,029	13,871	-0,042	NPs	0	0,000	0	0,000
19	12,74	2,114	10,626	12,63	2,029	10,601	0,025	NPs	1	10,626	10,601	0,025
20	14,42	2,098	12,322	12,92	2,029	10,891	1,431	NPs	1	12,322	10,891	1,431
21	13,82	2,052	11,768	13,97	2,029	11,941	-0,173	NPs	0	0,000	0	0,000
22	29,40	2,052	27,348	18,55	2,029	16,521	10,827	Agregado	0	0,000	0	0,000
23	15,47	2,113	13,357	15,21	2,029	13,181	0,176	NPs	1	13,357	13,181	0,176
24	16,45	2,125	14,326	12,96	2,029	10,931	3,395	NPs	1	14,326	10,931	3,395
25	14,42	2,098	12,322	13,76	2,029	11,731	0,591	NPs	1	12,322	11,731	0,591
26	15,23	2,098	13,132	13,32	2,029	11,291	1,841	NPs	1	13,132	11,291	1,841
27	13,58	2,098	11,482	11,89	2,029	9,861	1,621	NPs	1	11,482	9,861	1,621
28	14,42	2,052	12,368	12,47	2,029	10,441	1,927	NPs	1	12,368	10,441	1,927
29	46,24	1,943	44,297	22,51	2,029	20,481	23,816	Agregado	0	0,000	0	0,000
30	16,86	1,943	14,917	16,06	2,029	14,031	0,886	NPs	1	14,917	14,031	0,886
31	17,97	1,868	16,102	17,6	2,029	15,571	0,531	Agregado	0	0,000	0	0,000
32	17,13	2,011	15,119	17,02	2,029	14,991	0,128	Agregado	0	0,000	0	0,000
33	14,01	1,868	12,142	12,15	2,029	10,121	2,021	NPs	1	12,142	10,121	2,021
34	14,29	1,838	12,452	12,58	2,029	10,551	1,901	NPs	1	12,452	10,551	1,901
35	14,51	2,216	12,294	13,73	2,029	11,701	0,593	NPs	1	12,294	11,701	0,593
36	17,78	2,101	15,679	16,83	2,029	14,801	0,878	Agregado	0	0,000	0	0,000
37	16,90	2,101	14,799	16,51	2,029	14,481	0,318	NPs	1	14,799	14,481	0,318
38	12,84	1,937	10,903	11,99	2,029	9,961	0,942	NPs	1	10,903	9,961	0,942
39	17,02	1,892	15,129	15,8	2,029	13,771	1,358	Agregado	0	0,000	0	0,000
40	15,99	1,892	14,099	14,86	2,029	12,831	1,268	NPs	1	14,099	12,831	1,268
41	13,81	1,937	11,873	12,44	2,029	10,411	1,462	NPs	1	11,873	10,411	1,462
42	27,31	1,937	25,373	25,47	2,029	23,441	1,932	Agregado	0	0,000	0	0,000

43	14,37	1,892	12,479	14,15	2,029	12,121	0,357	NPs	1	12,479	12,121	0,357	
44	16,90	2,101	14,799	15,78	2,029	13,751	1,048	NPs	1	14,799	13,751	1,048	
45	13,43	2,216	11,214	12,88	2,029	10,851	0,363	NPs	1	11,214	10,851	0,363	
46	17,41	2,216	15,194	16,62	2,029	14,591	0,603	Agregado	0	0,000	0	0,000	
47	20,02	2,216	17,804	18,1	2,029	16,071	1,733	Agregado	0	0,000	0	0,000	
48	27,22	2,194	25,026	24,75	2,029	22,721	2,305	Agregado	0	0,000	0	0,000	
49	14,11	2,194	11,916	13,18	2,029	11,151	0,765	NPs	1	11,916	11,151	0,765	
50	15,81	2,101	13,709	15,43	2,029	13,401	0,308	NPs	1	13,709	13,401	0,308	
51	15,33	2,194	13,136	15,14	2,029	13,111	0,025	NPs	1	13,136	13,111	0,025	
52	15,60	2,247	13,353	15,06	2,029	13,031	0,322	NPs	1	13,353	13,031	0,322	
53	17,25	2,168	15,082	15,79	2,029	13,761	1,321	Agregado	0	0,000	0	0,000	
54	13,85	2,054	11,796	11,73	2,029	9,701	2,095	NPs	1	11,796	9,701	2,095	
55	15,44	2,153	13,287	13,91	2,029	11,881	1,406	NPs	1	13,287	11,881	1,406	
56	17,52	1,881	15,639	16,52	2,029	14,491	1,148	Agregado	0	0,000	0	0,000	
57	46,73	2,153	44,577	17,79	2,029	15,761	28,816	Agregado	0	0,000	0	0,000	
58	17,79	1,997	15,793	17,18	2,029	15,151	0,642	Agregado	0	0,000	0	0,000	
59	13,33	2,083	11,247	11,52	2,029	9,491	1,756	NPs	1	11,247	9,491	1,756	
61	34,53	1,997	32,533	17,13	2,029	15,101	17,432	Agregado	0	0,000	0	0,000	
<b>Total de NPs</b>										<b>35</b>	13,042	12,031	1,011
											0,216	0,261	0,126

Nota:

- Se consideran como agregados las MNPs que tengan altura mayor de 15nm.
- No se tienen en cuenta los cambios de altura negativos, estos valores se atribuyen a errores de la toma de la imagen mediante el AFM.
- (0) indica un agregado o cambios de altura negativos, (1) indica nanopartícula

**Tabla 2***Cambios de altura de MNPs sobre película de GSL4-COL-DPPC, con exposición de 30 minutos continuos de AMF*

N° NPs	SIN HIPERTERMIA			CON HIPERTERMIA			Diferencia alturas	NPs / Agregado	Antes	Después	Diferencia alturas	
	Altura máxima	Altura superficie	Altura NPs	Altura máxima	Altura superficie	Altura NPs						
11	16,39	2,0909	14,299	16,050	1,255	14,795	-0,496	Agregado	0	0	0	0
13	5,17	1,7517	3,415	4,718	1,3034	3,415	0,001	NPs	1	3,4153	3,4146	0,0007
14	7,04	1,5189	5,516	6,469	1,2776	5,191	0,325	NPs	1	5,5161	5,1914	0,3247
15	14,71	1,4063	13,304	14,410	1,1726	13,237	0,066	NPs	1	13,3037	13,2374	0,0663
16	3,99	1,4498	2,536	3,969	1,2291	2,740	-0,204	-	0	0	0	0
17	4,85	1,9163	2,936	4,303	1,4706	2,832	0,103	NPs	1	2,9357	2,8324	0,1033
18	4,10	1,7723	2,325	3,482	1,2830	2,199	0,126	NPs	1	2,3247	2,199	0,1257
19	14,80	1,9364	12,864	14,290	1,4495	12,841	0,023	NPs	1	12,8636	12,8405	0,0231
20	7,35	2,0700	5,284	7,013	1,5973	5,416	-0,132	-	0	0	0	0
21	4,86	1,7696	3,086	1,958	1,1834	0,775	2,312	NPs	1	3,0864	0,7746	2,3118
22	4,62	1,8786	2,740	2,111	1,2940	0,817	1,923	NPs	1	2,7404	0,817	1,9234
24	5,34	1,8455	3,495	4,545	1,2135	3,332	0,163	NPs	1	3,4945	3,3315	0,163
25	4,72	2,2697	2,454	3,749	1,4584	2,291	0,164	NPs	1	2,4543	2,2906	0,1637
26	4,86	2,0196	2,839	4,237	1,3215	2,916	-0,076	-	0	0	0	0
27	3,67	2,1245	1,550	2,974	1,3000	1,674	-0,125	-	0	0	0	0
28	5,41	1,9742	3,439	4,391	1,5825	2,809	0,630	NPs	1	3,4388	2,8085	0,6303
29	4,50	1,8101	2,687	3,287	1,2256	2,061	0,626	NPs	1	2,6869	2,0614	0,6255
30	3,70	1,8921	1,808	2,901	1,2868	1,614	0,194	NPs	1	1,8079	1,6142	0,1937

31	3,97	1,9565	2,017	2,763	1,2095	1,554	0,463	NPs	1	2,0165	1,5535	0,463
32	4,69	2,0421	2,648	3,528	1,2487	2,279	0,369	NPs	1	2,6479	2,2793	0,3686
33	5,50	2,1245	3,374	5,147	1,2853	3,862	-0,488	-	0	0	0	0
34	4,09	2,4265	1,659	3,385	1,6811	1,704	-0,045	-	0	0	0	0
35	4,90	1,9791	2,920	6,062	1,1519	4,910	-1,990	-	0	0	0	0
36	3,86	1,7846	2,074	3,276	1,7235	1,553	0,522	NPs	1	2,0744	1,5525	0,5219
37	3,48	1,8153	1,660	2,515	1,1726	1,342	0,317	NPs	1	1,6597	1,3424	0,3173
38	3,84	1,8153	2,029	2,867	1,1661	1,701	0,328	NPs	1	2,0287	1,700862	0,327838
39	8,38	1,7176	6,659	8,483	1,2194	7,264	-0,604	-	0	0	0	0
40	4,20	2,2672	1,929	3,112	1,1826	1,929	-0,001	-	0	0	0	0
41	4,64	2,2190	2,419	3,860	1,3027	2,557	-0,138	-	0	0	0	0
42	3,75	1,8333	1,913	2,938	1,1800	1,758	0,155	NPs	1	1,9127	1,758	0,1547
43	4,90	1,8333	3,066	4,052	1,1800	2,872	0,194	NPs	1	3,0657	2,872	0,1937
44	3,78	2,0640	1,719	3,016	1,2475	1,769	-0,050	-	0	0	0	0
45	3,53	1,8153	1,711	3,096	1,3645	1,732	-0,021	-	0	0	0	0
47	5,28	1,9885	3,287	5,234	1,2272	4,007	-0,720	-	0	0	0	0
48	4,37	1,9450	2,424	2,972	1,2177	1,754	0,670	NPs	1	2,424	1,7543	0,6697
49	4,37	2,1814	2,189	2,616	1,3507	1,265	0,923	NPs	1	2,1886	1,2653	0,9233
50	3,82	2,0310	1,790	2,922	1,2258	1,696	0,094	NPs	1	1,79	1,6962	0,0938
51	6,78	2,0126	4,767	5,712	1,1835	4,529	0,239	NPs	1	4,7674	4,5285	0,2389
54	3,86	2,3707	1,490	3,095	1,2725	1,823	-0,332	-	0	0	0	0
55	4,50	2,1331	2,363	3,094	1,2243	1,870	0,493	NPs	1	2,3629	1,8697	0,4932
56	3,55	1,9105	1,636	2,742	1,2336	1,508	0,127	NPs	1	1,6355	1,5084	0,1271
57	4,56	2,1387	2,423	3,332	1,3045	2,028	0,396	NPs	1	2,4233	2,0275	0,3958
58	6,40	2,0486	4,351	2,286	1,2661	1,020	3,332	NPs	1	4,3514	1,0199	3,3315
59	3,87	2,1450	1,724	2,766	1,2963	1,470	0,254	NPs	1	1,724	1,4697	0,2543

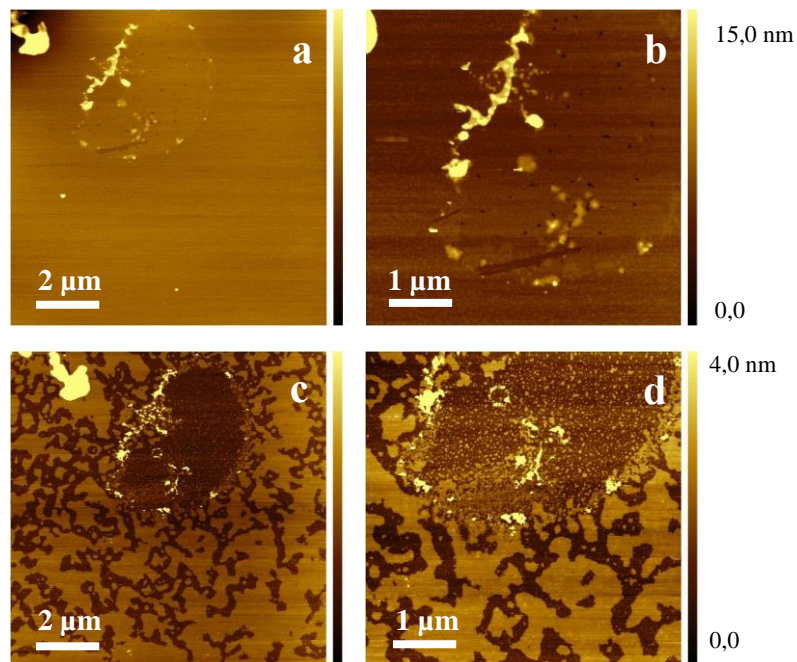
60	4,56	2,1204	2,439	3,785	1,2501	2,535	-0,096	-	0	0	0	0	
61	4,28	1,9722	2,303	3,499	1,2913	2,208	0,095	NPs	1	2,3028	2,2077	0,0951	
62	3,44	1,8534	1,586	2,978	1,3125	1,666	-0,080	-	0	0	0	0	
63	4,73	1,9722	2,762	3,946	1,2963	2,650	0,112	NPs	1	2,7618	2,6497	0,1121	
64	4,36	1,9722	2,383	3,094	1,2963	1,798	0,585	NPs	1	2,3828	1,7977	0,5851	
65	6,73	2,3859	4,348	5,677	1,2838	4,393	-0,045	-	0	0	0	0	
66	5,75	2,0690	3,676	4,577	1,2332	3,344	0,332	NPs	1	3,676	3,3438	0,3322	
67	4,10	1,9722	2,130	3,377	1,2963	2,081	0,049	NPs	1	2,1298	2,0807	0,0491	
68	3,76	1,9722	1,785	3,081	1,2963	1,785	0,000	NPs	1	1,7848	1,7847	0,0001	
69	4,36	1,9722	2,383	2,805	1,2963	1,509	0,874	NPs	1	2,3828	1,5087	0,8741	
70	4,58	1,9722	2,607	3,705	1,2963	2,409	0,198	NPs	1	2,6068	2,4087	0,1981	
71	15,28	2,036	13,244	2,73	1,525	1,205	12,039	NPs	1	13,2443	1,205	12,0393	
72	15,82	2,036	13,784	3,627	1,525	2,102	11,682	NPs	1	13,7843	2,102	11,6823	
<b>Total de NPs</b>										39	3,7486	2,6846	1,0640
											0,5340	0,4117	0,4025

*Nota:*

- Se consideran como agregados las MNPs que tengan altura mayor de 15nm.
- No se tienen en cuenta los cambios de altura negativos, estos valores se atribuyen a errores de la toma de la imagen mediante el AFM.
- (0) indica un agregado o cambios de altura negativos, (1) indica nanopartícula

**Apéndice L. Imágenes de AFM de mezclas ternarias con MNPs****Figura 34**

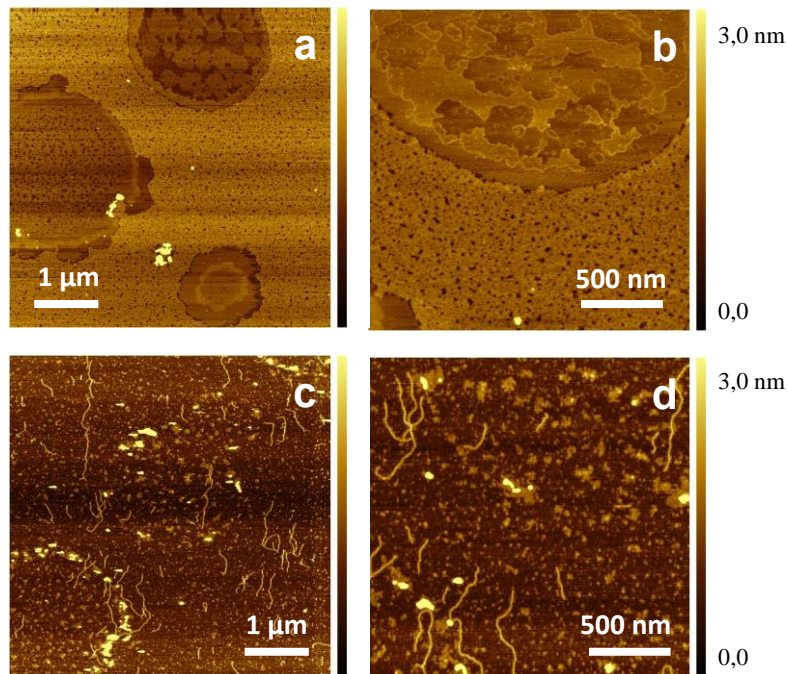
*Comparación de película de GSL4-DPPC-COL transferida a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$*



*Nota:* Comparación de película de GSL4-DPPC-COL antes y después de incubar MNPs sin alquino (a y b) sin tratamiento alguno; (c y d) después de incubar nanopartículas funcionalizadas sin alquino.

**Figura 35**

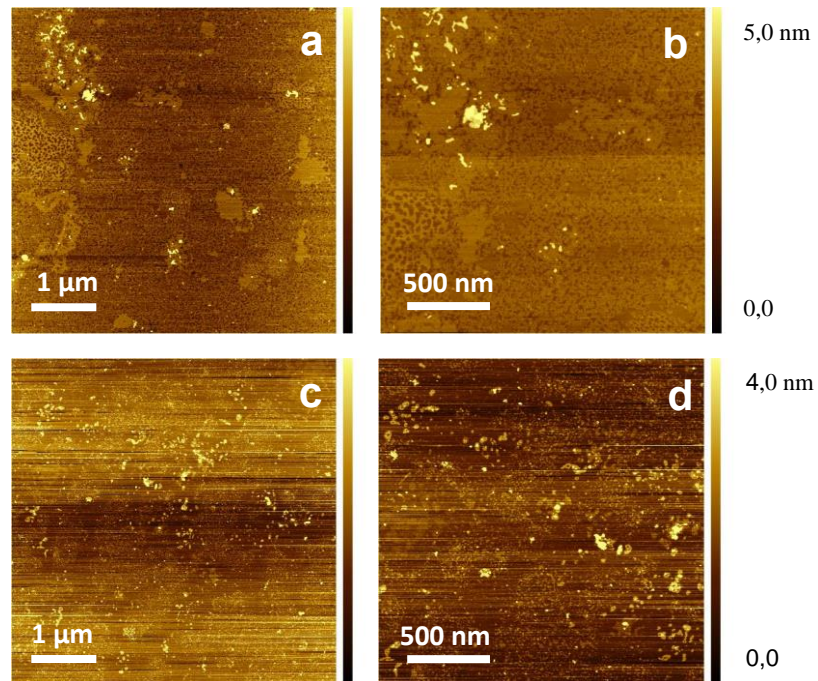
*Comparación de película de GSL2-DPPC-COL transferida a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$*



*Nota:* Comparación de película de GSL2-DPPC-COL antes y después de incubar MNPs con alquino (a y b) sin tratamiento alguno; (c y d) después de incubar nanopartículas funcionalizadas con alquino

**Figura 36**

*Comparación de película de GSL2-DPPC-COL transferida a  $25 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$*



*Nota:* Comparación de película de GSL2-DPPC-COL antes y después de incubar MNPs sin alquino (a y b) sin tratamiento alguno; (c y d) después de incubar nanopartículas funcionalizadas sin alquino

## Apéndice M. Tablas de Rangos de longitud de onda de grupos funcionales

### Tabla 3

Rangos de longitud de onda de grupos funcionales Alquino

Table 4.1 Alkyne C≡C stretching vibrations

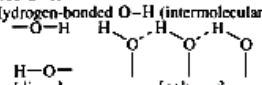
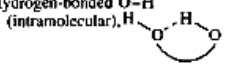



Functional Groups	Region		Intensity		Comments
	cm <sup>-1</sup>	μm	IR	Raman	
Monosubstituted alkynes, -C≡CH	2150–2100	4.65–4.76	w–m	s, p	See ref. 2. Vapour phase higher: 2165–2135 cm <sup>-1</sup>
Disubstituted alkynes	2260–2190	4.43–4.57	v	s, p	Intensity decreases as symmetry of molecule increases.
R-C≡CR'	2240–2190	4.46–4.57	m–w	s	Also medium intensity band at 2325–2285 cm <sup>-1</sup>
Conjugated alkynes (see comments)	2270–2200	4.41–4.55	m	s, p	Conjugated with C=C, C≡C
	2125–2035	4.71–4.91	w	s	
Conjugated alkynes (see comments)	~2250	~4.43	s	s	Conjugated with COOH or COOR
CH <sub>2</sub> X-C≡CH, X = halogen	2135–2125	4.68–4.71	m	s	
-C≡C-Cl	2270–2190	4.41–4.56	m	s, p	Strong band due to C-Cl str 760–430 cm <sup>-1</sup>
-C≡C-Br	2250–2150	4.44–4.65	m	s, p	Strong band due to C-Br str 690–350 cm <sup>-1</sup>
-C≡C-I	2220–2120	4.50–4.72	m	s, p	C-I str 660–310 cm <sup>-1</sup>
M-C≡C-H, M=P, As, Sb, Ge, Sn, SiH <sub>3</sub>	2055–2015	4.87–4.96	w–m	s, p	
M-C≡C-CH <sub>3</sub> , (M as above)	2200–2170	4.55–4.61	s	s, p	

Nota: Tabla 4.1 Rangos de longitud de onda de grupos funcionales Alquinos. Adaptado de Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts (p.84), por G. Socrates, 2001. In JOHN WILEY & SONS, LTD.

Tabla 4

## Rangos de longitud de onda de grupos funcionales Hidroxilos

Table 6.1 Hydroxyl group O-H stretching vibrations

Functional Groups	Region		Intensity		Comments
	cm <sup>-1</sup>	μm	IR	Raman	
Free O-H	3670–3580	2.73–2.80	v	w	sh, OH str
Hydrogen-bonded O-H (intermolecular), 	3550–3230	2.82–3.10	m-s	w	Usually broad but may be sharp, frequency is concentration-dependent
Hydrogen-bonded O-H (intramolecular), 	3590–3400	2.79–2.94	v	w	Usually sharp, frequency is concentration-independent
Chelated O-H, 	3200–2500	3.13–4.00	v	w	Usually broad, frequency concentration-independent
-OD	2780–2400	3.60–4.17	v	w	O-D str
OH of enol form of β-diketones	2700–2500	3.71–4.00	v	w	br, chelated OH
Intramolecular-bonded ortho-phenols	3200–2500	3.13–4.00	m	w	Free phenols ~3610 cm <sup>-1</sup>
Carboxylic acids, -COOH	3300–2500	3.03–4.00	w-m	w	br, O-H str, hydrogen-bonded, sometimes number of weak bands in region 2700–2500 cm <sup>-1</sup> . Band is concentration-dependent
OH of water of crystallization	3600–3100	2.78–3.23	w	w	In solid-state spectra
OH of water in dilute solution	1630–1600	6.13–6.25	m	w	def
Free oximes, 	~3760	~2.66	w-m	w	In non-polar solvents
Oximes, hydrogen-bonded	3600–3570	2.78–2.79	w-m	w	sh
Free hydroperoxides, -O-O-H	3300–3150	3.03–3.17	m	w	br
Peracids, -CO-O-OH	3560–3530	2.82–2.83	m	w	
Tropolones	~3280	~3.05	m	w	
Phosphorus acids, 	~3100	~3.23	w-m	w	
	2700–2560	3.70–3.91	m	w	br

Nota: Tabla 6.1 Rangos de longitud de onda de grupos funcionales Hidroxilos. Adaptado de Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts (p.95), por G. Socrates, 2001. In JOHN WILEY & SONS, LTD.

Tabla 5

Rangos de longitud de onda de grupos funcionales Azida

Table 5.2 (continued)

Functional Groups	Region		Intensity		Comments
	cm <sup>-1</sup>	μm	IR	Raman	
Alkyl selenocyanates, -SeCN	~2150	~4.65	s	s, p	Se-CN str
	545-520	18.35-19.23	m-s	s	
	420-400	23.81-25.00	w		
Aromatic selenocyanates, -SeCN	365-360	27.39-27.78	w		sh
	~2160	~4.63	s	s, p	
	420-400	23.81-25.00	w		
Alkyl isoselenocyanates	~350	~28.57	w		SeCN bending vib
	2185-2100	4.58-4.76	s	s	
Aromatic isoselenocyanates	560-500	17.86-20.00	m-s	s	
Azides -N=N=N	2200-2000	4.55-5.00	s	s	br, doublet
Azides -N=N=N	2170-2080	4.61-4.81	vs-s	m-s, p	asym str (sometimes a doublet)(-CO-N <sub>3</sub> ·, ~2150 cm <sup>-1</sup> )
	1345-1175	7.43-8.51	m-w	s, p	sym str
Metal azides and azide ion	680-410	14.71-24.39	w		N=N=N bending vib
Acid azides and nitro-aromatic azides	2240-2170	4.46-4.61	s	m-s	asym N=N=N str
	2155-2140	4.64-4.67	s	s	asym N=N=N str
	1710-1690	5.85-5.92	s	w-m	C=O str for acid azides
	1260-1235	7.94-8.10	m	s	sym N=N=N str
Diazo compounds $\text{>C=N=N-}$	2050-2000	4.88-5.00	vs	v	br, asym str CNN
	1390-1330	7.19-7.52	s	m-s	sym str CNN
Diazo ketones and diazoesters, -CO-C=N <sup>+</sup> =N <sup>-</sup>	2075-2050	4.82-4.88	s	m-s	(Ketones: C=O str, 1650-1600 cm <sup>-1</sup> and strong band, 1390-1330 cm <sup>-1</sup> - may be doublet; alkylketones: C=O str, ~1645 cm <sup>-1</sup> )
	2300-2230	4.35-4.69	m-s	m-s	N=N str, see refs: 31 and 32
Diazonium salt, Ar-N≡N <sup>+</sup> X <sup>-</sup>	2200-2080	4.45-4.81	m-s	v	often found near 2150 cm <sup>-1</sup>
	~1130	~8.85	v	m-s, p	sym C=C=O str. Range 1420-1120 cm <sup>-1</sup> usually s-m (Aromatics: IR intensity w, Raman s, p).
R <sub>3</sub> SiCH=C=O	2115-2085	4.73-4.80	s	w	asym C=C=O str
	1295-1265	7.72-7.90	w	s	sym C=C=O str
Ketenes, $\text{>C=C=N-}$	2170-2000	4.61-5.00	s	v	asym C=C=N str
	~1235	~8.10	m	s	sym C=C=N str
Aliphatic Carbodi-imines R-N=C=N-R	1190-1080	8.40-9.26	s		COCN str
	2155-2130	4.64-4.70	vs	w	asym N=C=N str, see ref. 33
Aryl carbodi-imines Ar-N=C=N-Ar	~1460	~6.85	w	s, p	sym N=C=N str
	2145-2135	4.66-4.68	vs	m-s, p	C=N str doublet due to Fermi resonance band at ~2110 cm <sup>-1</sup> usually being the stronger
Thionylamines -N=S=O	2115-2105	4.73-4.75	vs	m-s, p	
	1300-1230	7.69-8.13	v	s, p	NSO asym str
	1180-1100	8.48-9.09	v	s	NSO sym str

Nota: Tabla 5.2 Rangos de longitud de onda de grupos funcionales Azida. Adaptado de Infrared and Raman characteristic group frequencies. Tables and charts (p.92), por G. Socrates, 2001. In JOHN WILEY & SONS, LTD.